(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119032174 A
(43)申请公布日 2024.11.26

(21)申请号 202380033802.X
(22)申请日 2023.04.12
(30)优先权数据
22167926.9 2022.04.12 EP
22200272.7 2022.10.07 EP
23162681.3 2023.03.17 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/059507 2023.04.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/198745 EN 2023.10.19
(71)申请人 优尼科生物制药有限公司
地址 荷兰阿姆斯特丹
(72)发明人 L·M·亨切尔 A·祖科
Y·P·刘 安加库苏马
J·G·比利亚米尔
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 左路
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
C07K 14/775(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)

权利要求书3页 说明书87页
序列表（电子公布） 附图29页

(54)发明名称

ApoE的核酸调节

(57)摘要

本发明涉及包含两个RNA编码序列的核酸，其中每个RNA包含发夹和与APOE基因的一部分基本上互补的指导序列;以及相关的AAV、组合物、药物组合物及其在治疗中的用途。

CN 119032174 A

1.一种核酸,该核酸包含编码第一RNA的序列和编码第二RNA的序列,其中该第二RNA包含与ApoE基因的一部分基本上互补的至少19个核苷酸的指导序列,并且其中该第一RNA和该第二RNA各自包含发夹。

2.根据权利要求1所述的核酸,其中,在5'至3'方向上,编码该第一RNA的该序列之后是间隔子,该间隔子之后是编码该第二RNA的该序列,并且其中该间隔子是至少50个核苷酸。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的核酸,其中该第二RNA中的该发夹包含至少40个核苷酸。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的核酸,其中该第一RNA包含SEQ ID NO.235或其变体,并且该第二RNA包含SEQ ID NO.190或其变体。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的核酸,其中该指导序列是至少22个核苷酸。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的核酸,其中该指导序列对ApoE4基因的一部分具有特异性。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的核酸,其中该指导序列与选自SEQ ID NO.16、24、54的序列基本上互补。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的核酸,其中该第一RNA发生突变以减少该第一RNA的加工和/或表达。

9.一种表达盒,该表达盒包含根据权利要求1至8中任一项所述的核酸,其中该表达盒是DNA分子。

10.根据权利要求9所述的表达盒,该表达盒进一步包含编码APOE2和APOE3中的至少一种的第二核酸,其中该第一核酸和该第二核酸可操作地连接至启动子并且任选地连接至聚A信号,其中优选地,该第二核酸编码包含SEQ ID NO 249-254之一的蛋白质和/或该第二核酸包含SEQ ID NO.195-217之一。

11.根据权利要求10所述的表达盒,其中该第二核酸不包含与如权利要求1至7中任一项所定义的指导序列基本上互补的序列,其中优选地,该核苷酸序列经密码子优化以在人细胞中表达。

12.根据权利要求10或权利要求11所述的表达盒,其中该第二核酸包含选自SEQ ID NO.195-217的序列。

13.根据权利要求10至12中任一项所述的表达盒,其中编码该第一RNA的该序列和编码该第二RNA的该序列包含在内含子序列中。

14.根据权利要求13所述的表达盒,其中内含子序列存在于该启动子中,其中优选地该内含子序列包含SEQ ID NO.231。

15.根据权利要求9至14中任一项所述的表达盒,其中该启动子是能够驱动在脑细胞中转录的启动子,其中优选地,该启动子包含SEQ ID NO.191、192、193或232之一。

16.根据权利要求9至15中任一项所述的表达盒,其中该表达盒侧接反向末端重复(ITR)。

17.一种腺相关病毒(AAV)载体,该腺相关病毒载体包含根据权利要求16所述的表达盒。

18.根据权利要求17所述的AAV载体,该AAV载体包含AAV5或AAV9衣壳蛋白。

19.一种药物组合物,该药物组合物包含根据权利要求1至8中任一项所述的核酸、或根

据权利要求9至16所述的表达盒、或根据权利要求17或权利要求18所述的AAV载体以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

20.根据权利要求1至8中任一项所述的核酸、或根据权利要求9至16所述的表达盒、或根据权利要求17或权利要求18所述的AAV载体、或根据权利要求19所述的药物组合物,用于作为药剂使用。

21.根据权利要求1至8中任一项所述的核酸、或根据权利要求9至16所述的表达盒、或根据权利要求17或权利要求18所述的AAV载体、或根据权利要求19所述的药物组合物,用于在治疗和/或预防受试者的阿尔茨海默病中使用。

22.根据权利要求20所述的用于该用途的根据权利要求1至8中任一项所述的核酸、或根据权利要求9至16所述的表达盒、或根据权利要求17或权利要求18所述的AAV载体、或根据权利要求19所述的药物组合物,其中该受试者是ApoE4等位基因的携带者,其中优选地该受试者是ApoE4等位基因纯合的。

23.根据权利要求20或21所述的用于该用途的根据权利要求1至8中任一项所述的核酸、或根据权利要求9至16所述的表达盒、或根据权利要求17或权利要求18所述的AAV载体、或根据权利要求19所述的药物组合物,其中将该核酸、该表达盒、该AAV载体或该药物组合物优选地通过脑内注射、实质内注射、鞘内注射或其组合,更优选地通过对流增强递送施用至中枢神经系统。

24.一种试剂盒,该试剂盒包含根据权利要求1至8中任一项所述的核酸、或根据权利要求9至16所述的表达盒、或根据权利要求17或权利要求18所述的AAV载体、或根据权利要求19所述的药物组合物,其中该试剂盒进一步包含免疫抑制剂。

25.一种表达盒,该表达盒包含编码选自SEQ ID NO.249-254的一种或多种APOE2和APOE3蛋白的核酸,用于在基因疗法中使用。

26.根据权利要求25所述的表达盒,其中所述一种或多种蛋白质由包含至少部分野生型序列的核酸序列编码。

27.根据权利要求25所述的表达盒,其中所述一种或多种蛋白质由包含全长野生型编码序列的核酸序列编码。

28.根据权利要求25所述的用于该用途的表达盒,其中该表达盒包含选自SEQ ID NO.195-201的一个或多个核酸序列,该一个或多个核酸序列任选地可操作地连接至启动子和聚A信号。

29.根据权利要求25至28所述的表达盒,其中该表达盒侧接ITR。

30.一种腺相关病毒(AAV)载体,该腺相关病毒载体包含根据权利要求25至29中任一项所述的表达盒。

31.根据权利要求30所述的AAV载体,该AAV载体包含AAV5或AAV9衣壳蛋白。

32.一种药物组合物,该药物组合物包含根据权利要求30或权利要求31所述的AAV载体以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

33.根据权利要求25至29所述的表达盒、或根据权利要求30或权利要求31所述的AAV载体、或根据权利要求32所述的药物组合物,用于在治疗和/或预防受试者的阿尔茨海默病中使用。

34.根据权利要求33所述的用于该用途的根据权利要求25至29所述的表达盒、或根据

权利要求30或权利要求31所述的AAV载体、或根据权利要求32所述的药物组合物,其中该受试者是ApoE4等位基因的携带者,其中优选地该受试者是ApoE4等位基因纯合的。

35.根据权利要求33所述的用于该用途的根据权利要求25至29所述的表达盒、或根据权利要求30或权利要求31所述的AAV载体、或根据权利要求32所述的药物组合物,其中将该表达盒、该AAV载体或该药物组合物优选地通过脑内注射、实质内注射、鞘内注射或其组合,更优选地通过对流增强递送施用至中枢神经系统。

36.一种试剂盒,该试剂盒包含根据权利要求25至29所述的表达盒、或根据权利要求30或权利要求31所述的AAV载体、或根据权利要求3所述的药物组合物,其中该试剂盒进一步包含免疫抑制剂。

ApoE的核酸调节

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术、医学和基因疗法领域。本发明涉及包含两个或更多个RNA编码序列的核酸,其中一个RNA编码序列含有与APOE基因的一部分基本上互补的指导序列);相关的组合物、药物组合物及其在治疗中的用途。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病(AD)是一种进行性神经系统变性障碍,其被认为是成年人痴呆的主要原因(Van Cauwenberghe等人2016,Genet Med.[医学遗传学];18:421:30)。该疾病的特征在于细胞外淀粉样蛋白-β(Aβ)斑块和细胞内神经原纤维缠结的积累,其引起神经元细胞死亡和神经胶质细胞激活,最终导致脑功能降低。淀粉样蛋白斑块的形成是由于β-分泌酶和γ-分泌酶对淀粉样前体蛋白(APP)的切割。神经原纤维缠结的形成反而是由于τ蛋白的错误折叠(Pospich和Raunser 2017,Science[科学];358:45-46)。

[0003] 增加发生AD的风险的遗传因素之一与人载脂蛋白(APOE)基因有关。人APOE基因具有单核苷酸多态性(SNP),其产生以下三种主要等位基因变体:ε2、ε3和ε4(即,APOE亚型E2、E3和E4)(Belbin等人2007,Hum Mol Genet.[人类分子遗传学];16:2199-208)。ε4变体参与迟发性AD(LOAD),并且APOEε4的携带者以等位基因数量依赖性方式增加AD发作的风险,即一个APOEε4等位基因使发作年龄平均提前2-5岁,而两个APOEε4等位基因的存在使发作提前5-10年。重要的是,40%-65%的AD患者携带至少一个APOEε4等位基因。此外,还已经观察到APOE4与动脉粥样硬化、颅脑损伤(TBI)和其他疾病中的不利结果相关。相比之下,APOEε2和/或APOEε3等位基因对AD发生发挥保护性或中性作用(Yamazaki等人2016,CNSDrugs[CNS药物].;30:773-89)。

[0004] 由APOE基因编码的APOE蛋白是一种分泌型脂质转运蛋白,其发现于外周和中枢身体系统(如中枢神经系统(CNS))中。在外周中,APOE主要由肝细胞分泌,而在CNS中,星形胶质细胞是APOE的主要来源(Chernick等人2019,Neurosci Lett.[神经科学快报];708:134306)。

[0005] APOE基因中的SNP诱导位于位置130和176(当不包括蛋白质的信号肽时,也分别称为位置112和158)处的氨基酸残基处的差异(APOEε2,Cys112/Cys158;APOEε3,Cys112/Arg158;APOEε4,Arg112/Arg158)。这些单氨基酸多态性被认为严重影响APOE的结构和功能,从而影响Aβ代谢、聚集、沉积和τ蛋白磷酸化。(Liu等人2013,Nat Rev Neurol.[自然评论神经学];9:106-18)。

[0006] 考虑到AD的复杂病理生理学和相关的基因调节网络,目前没有用于治疗AD的有希望的疗法,因此迫切需要找到这样的疗法。

发明内容

[0007] 本发明通过应用核酸技术解决了该问题,其中所述核酸包含两个或更多个RNA编码序列,其中一个RNA编码序列含有与APOE基因的一部分基本上互补的指导序列,并且另一

个RNA编码序列可能通过簇形成支持第一RNA编码序列的表达。因此,增加APOE基因的沉默。

[0008] 在一方面,提供了一种表达盒,该表达盒包含根据本发明的核酸,其中该表达盒是DNA分子。

[0009] 在一方面,提供了一种腺相关病毒(AAV)载体,该腺相关病毒载体包含根据本发明的表达盒。

[0010] 在一方面,提供了一种药物组合物,该药物组合物包含根据本发明的核酸、根据本发明的表达盒、或根据本发明的AAV载体以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

[0011] 在一方面,提供了根据本发明的核酸、或根据本发明的表达盒、或根据本发明的AAV载体、或根据本发明的药物组合物,用于作为药剂使用。

[0012] 在一方面,提供了一种试剂盒,该试剂盒包含根据本发明的核酸、或根据本发明的表达盒、或根据本发明的AAV载体、或根据本发明的药物组合物,其中该试剂盒进一步包含免疫抑制剂。

[0013] 在一方面,提供了一种表达盒,该表达盒包含编码选自SEQ ID NO.249-254的一种或多种APOE2和APOE3蛋白的核酸,用于在基因疗法中使用。

具体实施方式

[0014] 定义

[0015] 除非另外定义,否则本文所用的技术和科学术语具有与本披露内容所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。本领域技术人员将认识到与本文所述的方法和材料相似或等同的许多方法和材料,它们可以用于本发明的实践。实际上,本发明决不限于该方法。

[0016] 在本文件及其权利要求中,动词"以包含(to comprise)"及其变位在其非限制性意义上用于意指包括单词后面的项目,但是不排除未具体提及的项目。此外,通过不定冠词"一个/一种(a)"或"一个/一种(an)"提及要素并不排除存在多于一个要素的可能性,除非上下文明确要求存在一个且仅存在一个要素。因此,不定冠词"一个/一种(a)"或"一个/一种(an)"通常意指"至少一个/至少一种"。

[0017] 出于本发明的目的,术语"获得"被认为是术语"可获得"的优选实施例。如果在下文中例如抗体被定义为可从特定来源获得,则这也应被理解为披露了从此来源获得的抗体。

[0018] 如本文所用,术语"和/或"指示所陈述情况中的一个或多个可以单独发生或与所陈述情况中的至少一个组合发生,直至与所有所陈述情况组合发生。

[0019] 如本文所用,"至少"特定值意指该特定值或更多。例如,"至少2"被理解为与"2或更多"(即,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15……等)一样。

[0020] 单词"约"或"大约"当与数值结合使用时(例如,约10)优选地意指值可以是给定值(10)加或减该值的0.1%。

[0021] 如本文所用,"有效量"意指相对于未治疗的患者改善疾病的症状所需的药剂的量。用于实践本发明而用以治疗性治疗例如癌症的一种或多种活性剂的有效量取决于施用方式,受试者的年龄、体重和一般健康状况而变化。最终,主治医师或兽医将决定适当的量和剂量方案。这样的量被称为"有效"量,其可以被确定为基因组拷贝/千克(GC/kg)。因此,

与药物的施用连用,该药物在本披露内容的上下文中对疾病或病症是“有效的”指示,以临床上适当的方式施用对至少统计学上显著的一部分患者产生有益的作用,如症状改善、治愈、至少一种疾病体征或症状减轻、寿命延长、生活质量改善或熟悉治疗特定类型的疾病或病症的医生普遍认为积极的其他作用。

[0022] 如本文件所述,物质作为药剂的用途也可以被解释为所述物质在药剂制造中的用途。类似地,无论何时物质用于治疗或用作药剂,它也都可以用于制造用以治疗的药剂。用于作为本文所述的药剂使用的产品可以用于治疗方法中,其中此类治疗方法包括施用产品以供使用。

[0023] 术语“同源性”、“序列同一性”等在本文中可互换地使用。序列同一性在本文中被定义为两个或更多个氨基酸(多肽或蛋白质)序列或两个或更多个核酸(多核苷酸)序列之间的关系,如通过比较序列所确定。在本领域中,“同一性”还意指氨基酸或核酸序列之间的序列相关性程度,视情况而定,如通过此类序列的串之间的匹配所确定。通过将一种多肽的氨基酸序列及其保守氨基酸取代物与第二多肽的序列进行比较来确定两个氨基酸序列之间的“相似性”。“同一性”和“相似性”可以通过已知的方法容易地计算。

[0024] “序列同一性”和“序列相似性”可以通过使用全局或局部比对算法对两个肽或两个核苷酸序列进行比对来确定,这取决于两个序列的长度。优选地使用全局比对算法(例如,尼德曼-翁施(Needleman Wunsch))比对长度相似的序列,这些全局比对算法在整个长度上最佳地比对序列;而优选地使用局部比对算法(例如,史密斯-沃特曼(Smith Waterman))比对长度大不相同的序列。当序列(当通过例如程序GAP或BESTFIT使用默认参数进行最佳比对时)具有至少某个最小百分比的序列同一性(如下文所定义)时,则它们可以被称为“基本上相同”或“大体上相似”。GAP使用尼德曼和翁施全局比对算法在其整个长度(全长)上比对两个序列,使匹配数量最大化并使空位数量最小化。当两个序列具有相似的长度时,全局比对适用于确定序列同一性。通常,使用GAP默认参数,其中空位产生罚分=50(核苷酸)/8(蛋白质),并且空位延伸罚分=3(核苷酸)/2(蛋白质)。对于核苷酸,所使用的默认评分矩阵是nwsgapdna,并且对于蛋白质,默认评分矩阵是Blosum62(Henikoff和Henikoff,1992,PNAS[美国国家科学院院刊]89,915-919)。序列比对和序列同一性百分比得分可以如下来确定:使用计算机程序,如可从美国加利福尼亚州92121-3752圣地亚哥斯克兰顿路(Scranton Road)9685号的Accelrys Inc.公司获得的GCG Wisconsin软件包10.3版;或使用开源软件,如EmbossWIN 2.10.0版中的程序“needle”(使用全局尼德曼-翁施算法)或“water”(使用局部史密斯-沃特曼算法),使用与上文GAP相同的参数,或使用默认设置(两者都对于“needle”和“water”,并且两者都对于蛋白和DNA比对,默认空位开放罚分是10.0,并且默认空位延伸罚分是0.5;对于蛋白质,默认评分矩阵是Blossum62;并且对于DNA,默认评分矩阵是DNAFull)。当序列具有大不相同的总长度时,优选的是局部比对,如使用史密斯-沃特曼算法的局部比对。

[0025] 可替代地,相似性或同一性百分比可以通过使用诸如FASTA、BLAST等的算法对公共数据库进行检索来确定。因此,本发明的核酸和蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行检索,例如以鉴定其他家族成员或相关序列。可以使用Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-10的BLASTn和BLASTx程序(2.0版)来进行此类检索。可以用NBLAST程序(得分=100,字长=12)进行BLAST核苷酸检索,以获得与本发

明的氧化还原酶核酸分子同源的核苷酸序列。可以用BLASTx程序(得分＝50,字长＝3)进行BLAST蛋白质检索,以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目标的有空位的比对,可以利用如在Altschul等人,(1997)Nucleic Acids Res.[核酸研究]25(17):3389-3402中所述的Gapped BLAST。当利用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用各自的程序(例如,BLASTx和BLASTn)的默认参数。参见美国国家生物技术信息中心的主页http://www.ncbi.nlm.nih.gov/。

[0026] 如本文所用,术语“选择性杂交(selectively hybridizing)”、“选择性杂交(hybridizes selectively)”和相似术语旨在描述这样的杂交和洗涤条件,在这些条件下,彼此至少66％、至少70％、至少75％、至少80％、更优选至少85％、甚至更优选至少90％、优选至少95％、更优选至少98％或更优选至少99％同源的核苷酸序列典型地彼此保持杂交。也就是说,此类杂交序列可以具有至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、更优选至少85％、甚至更优选至少90％、更优选至少95％、更优选至少98％或更优选至少99％序列同一性。

[0027] 此类杂交条件的优选的非限制性实例是在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中在约45℃下杂交,之后在1X SSC、0.1％ SDS中在约50℃下、优选在约55℃下、优选在约60℃下并且甚至更优选在约65℃下洗涤一次或多次。高度严格的条件包括例如在约68℃下在5x SSC/5x Denhardt溶液/1.0％ SDS中杂交,并且在室温下在0.2x SSC/0.1％ SDS中洗涤。可替代地,洗涤可以在42℃下进行。

[0028] 熟练技术人员将知道哪些条件适用于严格和高度严格的杂交条件。关于此类条件的另外的指导在本领域是可容易地获得的,例如可在以下文献中获得:Sambrook等人,1989,Molecular Cloning,ALaboratory Manual[分子克隆,实验室手册],Cold Spring Harbor Press[冷泉港出版社],纽约州;和Ausubel等人(编辑),Sambrook和Russell(2001)"Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册](第3版),Cold Spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室],Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],纽约1995,Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学实验指南],(John Wiley&Sons[约翰·威利父子公司],纽约州)。

[0029] 当然,仅与聚A序列(如mRNA的3'末端聚(A)束)或T(或U)残基的互补段杂交的多核苷酸将不包括在用于与本发明的核酸的一部分特异性杂交的本发明的多核苷酸中,因为这样的多核苷酸将与含有聚(A)段或其互补体的任何核酸分子(例如,实际上任何双链cDNA克隆)杂交。

[0030] “核酸构建体”或“核酸载体”在本文中应被理解为意指由使用重组DNA技术产生的人造核酸分子。因此,术语“核酸构建体”不包括天然存在的核酸分子,尽管核酸构建体可以包含天然存在的核酸分子(的一部分)。“载体”是用于将外源核酸序列(即,DNA或RNA)转移到宿主细胞中的核酸构建体(典型地是DNA或RNA)。载体优选地通过自主复制和整合到宿主细胞的基因组中的至少一种来维持在宿主中。术语“表达载体”或“表达构建体”是指能够影响基因在与此类序列相容的宿主细胞或宿主生物体中的表达的核苷酸序列。这些表达载体典型地包含至少一个“表达盒”,表达盒是能够影响编码待表达产物的序列的表达的功能单元,并且其中编码序列可操作地连接至适当的表达控制序列,其至少包含合适的转录调节序列以及任选地3'转录终止信号。还可以存在在实现表达中必要的或有帮助的另外的因

子,如表达增强子元件。表达载体将被引入合适的宿主细胞中,并且能够影响编码序列在宿主细胞的体外细胞培养物中的表达。优选的表达载体将适合于表达病毒蛋白和/或核酸,特别是重组AAV蛋白和/或核酸。

[0031] 如本文所用,术语“启动子”或“转录调节序列”是指这样的核酸片段,其起到控制一个或多个编码序列转录的作用,并且相对于编码序列的转录起始位点的转录方向位于上游,并且因存在DNA依赖性RNA聚合酶的结合位点、转录起始位点和任何其他DNA序列而被在结构上鉴定出,这些DNA序列包括但不限于转录因子结合位点、阻遏蛋白和激活蛋白结合位点以及本领域技术人员已知的直接或间接发挥作用以调节来自启动子的转录量的任何其他核苷酸序列。“组成型”启动子是在大多数生理和发育条件下在大多数组织中具有活性的启动子。“诱导型”启动子是受生理或发育调节(例如,通过应用化学诱导剂或生物实体)的启动子。

[0032] 术语“报告物”可以与标记物可互换地使用,尽管它主要用于指代可见标记物,如绿色荧光蛋白(GFP)或萤光素酶。

[0033] 术语“蛋白质”或“多肽”可互换地使用,并且是指由氨基酸链组成的分子,而不涉及特定的作用模式、大小、三维结构或来源。

[0034] 术语“基因”意指包含在细胞中被转录成RNA分子(例如,mRNA)的可操作地连接至合适的调节区(例如,启动子)的区域(转录的区域)的DNA片段。基因通常将包含几个可操作地连接的片段,如启动子、5’前导序列、编码区和含有多腺苷酸化位点的3’非翻译序列(3’端)。“基因的表达”是指这样的过程,其中可操作地连接至适当的调节区、特别是启动子的DNA区被转录成具有生物活性的RNA,即能够被翻译成具有生物活性的蛋白质或肽的RNA。

[0035] 术语“同源”当用于指示给定(重组)核酸或多肽分子与给定宿主生物体或宿主细胞之间的关系时应被理解为意指在自然界中,核酸或多肽分子由相同物种(优选相同品种或品系)的宿主细胞或生物体产生。如果与宿主细胞同源,则编

[0036] 码多肽的核酸序列将典型地(但不一定)可操作地连接至与其天然环境中不同的另一个(异源)启动子序列和(如果适用)另一个(异源)分泌信号序列和/或终止子序列。应理解,调节序列、信号序列、终止子序列等也可以与宿主细胞同源。在此上下文中,仅使用“同源”序列元件允许构建“自克隆”遗传修饰生物体(GMO)(自克隆在本文中如在欧洲指令98/81/EC附件II中所定义)。当用于指示两个核酸序列的相关性时,术语“同源”意指一个单链核酸序列可以与互补的单链核酸序列杂交。杂交程度可能取决于多种因素,包括序列之间的同一性量和杂交条件(如稍后讨论的温度和盐浓度)。

[0037] 术语“异源”和“外源”当关于核酸(DNA或RNA)或蛋白质使用时是指这样的核酸或蛋白质,其不是天然地作为存在它的生物体、细胞、基因组或DNA或RNA序列的一部分存在,或其发现于不同于在自然界中发现它的细胞中或基因组或DNA或RNA序列中的一个或多个位置中。异源和外源核酸或蛋白质对于引入它们的细胞不是内源的,但是已经从另一种细胞获得或合成或重组产生。通常,尽管不一定,此类核酸编码通常不是由转录或表达DNA的细胞产生的蛋白质,即外源蛋白质。类似地,外源RNA编码通常不在存在外源RNA的细胞中表达的蛋白质。异源/外源核酸和蛋白质也可以被称为外来核酸或蛋白质。本领域技术人员将认识到的对于表达它的细胞而言是外来的任何核酸或蛋白质在本文中都被术语异源或外源核酸或蛋白质涵盖。术语异源和外源也适用于核酸或氨基酸序列的非天然组合,即组合

序列中的至少两个相对于彼此是外来的组合。

[0038] 如本文所用,术语“非天然存在的”当用于提及生物体时意指生物体具有至少一种遗传改变,其通常在参考物种的天然存在的品系(包括参考物种的野生型品系)中未发现。遗传改变包括例如引入编码蛋白质或酶的可表达核酸的修饰、其他核酸添加、核酸缺失、核酸取代或生物体遗传物质的其他功能破坏。此类修饰包括例如参考物种的异源或同源多肽的编码区及其功能片段。另外的修饰包括例如非编码调节区,其中修饰改变基因或操纵子的表达。对编码酶的核酸分子或其功能片段的遗传修饰可以赋予非天然存在的生物体从其天然存在的状态改变的生物化学反应能力或代谢途径能力。

[0039] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指处于功能关系中的多核苷酸(或多肽)元件的连接。当核酸被放置成与另一个核酸序列具有功能关系时,它是“可操作地连接的”。例如,如果转录调节序列影响编码序列的转录,则它可操作地连接至编码序列。可操作地连接意指被连接的DNA序列典型地是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区的情况下,是连续的并且在阅读框中。

[0040] 当表达控制序列控制并调节核苷酸序列的转录和/或翻译时,表达控制序列“可操作地连接”至核苷酸序列。因此,表达控制序列可以包括启动子、增强子、内部核糖体进入位点(IRES)、转录终止子、蛋白质编码基因前面的起始密码子、内含子的剪接信号和终止密码子。

[0041] 术语“表达控制序列”旨在至少包括其存在被设计成影响表达的序列,并且还可以包括另外的有利组分。例如,前导序列和融合配偶体序列是表达控制序列。该术语还可以包括这样的核酸序列设计,使得从序列中去除框内和框外的不想要的潜在起始密码子。它还可以包括这样的核酸序列设计,使得去除不想要的潜在剪接位点。它包括指导添加聚A尾的序列或多腺苷酸化序列(pA),即在mRNA的3’端的腺嘌呤残基串,称为聚A序列的序列。它还可以被设计成增强mRNA稳定性。影响转录和翻译稳定性的表达控制序列(例如,启动子)以及影响翻译的序列(例如,科扎克序列)在昆虫细胞中是已知的。表达控制序列可以具有这样的性质,以便调节与其可操作地连接的核苷酸序列,使得实现较低的表达水平或较高的表达水平。

[0042] 如本文所用,术语“密码子优化”是指被设计成基于多种标准改进重组基因的密码子组成而不改变氨基酸序列的实验方法。这是可能的,因为大多数氨基酸由多于一种密码子编码。大多数密码子优化方法避免使用稀有密码子。然而,不同方法在所考虑的其他特征的程度上有所不同,这些特征包括可以抑制表达的mRNA元件、起始密码子的核苷酸背景、mRNA二级结构、序列重复、核苷酸组成、内部核糖体进入位点、启动子序列以及推定的剪接供体和受体位点。此外,一些程序考虑蛋白质结构信息、基因内聚(A)位点、可变阅读框中的终止密码子以及作为RNA酶切割、突变和甲基化依赖性基因沉默的靶标的二核苷酸。本领域技术人员理解设计这样的密码子优化的核酸所需的要求。

[0043] 发明详细描述

[0044] 诸位发明人已经着手开发包含RNA编码序列的核酸以改变细胞中的APOE表达。人APOE基因与发生AD的风险增加相关。特别地,ε4变体参与迟发性AD(LOAD),并且APOEε4的携带者以等位基因数量依赖性方式增加AD发作的风险,即一个APOEε4等位基因使发作年龄平均提前2-5岁,而两个APOEε4等位基因的存在使发作提前5-10年。重要的是,40%-65%的AD

患者携带至少一个APOEε4等位基因。相比之下,APOEε2和/或APOEε3等位基因对AD发生发挥保护性或中性作用。因此,降低RNA表达水平是为了减少至少与APOE4表达相关的神经病理。使用如本文概述的基因疗法方法通过逆转、预防神经病理、减缓神经病理的进展或使神经病理完全停止从而显著有益于受影响的人类患者。

[0045] 在本发明的第一方面,提供了核酸,该核酸包含编码第一RNA的序列和编码第二RNA的序列,其中第二RNA包含与APOE基因的一部分基本上互补的至少19个核苷酸的指导序列,并且其中第一RNA和第二RNA各自包含发夹。

[0046] RNA

[0047] 如本文所用的术语“核酸”具有其在本领域中的常规含义。因此,如本文所用的术语“RNA”或“RNA分子”或“核糖核酸分子”是指核糖核苷酸(例如,2、3、4、5、10、15、20、25、30个或更多个核糖核苷酸)的聚合物,并且如本文所用的术语“DNA”或“DNA分子”或“脱氧核糖核酸分子”是指脱氧核糖核苷酸的聚合物。DNA和RNA可以天然合成(例如,分别通过DNA复制或DNA转录合成)。RNA可以进行转录后修饰。DNA和RNA还可以化学合成。DNA和RNA可以是单链的(即,分别是ssRNA和ssDNA)或多链的(例如,双链的,即分别是dsRNA和dsDNA)。“mRNA”或“信使RNA”是指定一条或多条多肽链的氨基酸序列的单链RNA。当核糖体与mRNA结合时,在蛋白质合成期间翻译此信息。

[0048] 如本文所用,术语“小干扰RNA”(“siRNA”)(在本领域中也称为“短干扰RNA”)是指包含约10-50个之间的核苷酸(或核苷酸类似物)的能够指导或介导RNA干扰的RNA(或RNA类似物)。优选地,siRNA包含约15-30个之间的核苷酸或核苷酸类似物、更优选约16-25个之间的核苷酸(或核苷酸类似物)、甚至更优选约18-23个之间的核苷酸(或核苷酸类似物)并且甚至更优选约19-22个之间的核苷酸(或核苷酸类似物)(例如,19、20、21或22个核苷酸或核苷酸类似物)。术语“短”siRNA是指包含约21个核苷酸(或核苷酸类似物)(例如,19、20、21或22个核苷酸)的siRNA。术语“长”siRNA是指包含约24-25个核苷酸(例如,23、24、25或26个核苷酸)的siRNA。在一些情形下,短siRNA可以包含少于19个核苷酸(例如,16、17或18个核苷酸),条件是较短siRNA保留介导RNAi的能力。同样地,在一些情形下,长siRNA可以包含多于26个核苷酸,条件是较长siRNA保留在不存在进一步加工(例如,酶促加工)成短siRNA的情况下介导RNAi的能力。

[0049] 如本文所用,术语“RNA干扰”(“RNAi”)是指RNA的选择性细胞内降解。RNAi天然存在于细胞中以去除外来RNA(例如,病毒RNA)。天然RNAi经由从游离dsRNA切割的片段进行,这些片段将降解机制指导至其他相似的RNA序列。可替代地,可以诱导RNAi,例如以使靶基因的表达沉默。适合于诱导RNAi的双链RNA结构是本领域熟知的。例如,小干扰RNA(siRNA)可以诱导RNAi。siRNA包含两条分开的RNA链,一条链包含第一RNA序列,并且另一条链包含第二RNA序列,因此称为第一链和第二链。经常使用的siRNA设计涉及具有3’突出端的连续碱基对。第一链和/或第二链可以包含3’突出端。3’突出端优选地是siRNA的两条链上的二核苷酸突出端。这样的设计基于观察到的较大双链RNA的Dicer加工,其产生具有这些特征的siRNA。3’突出端可以包含在第一链中。3’突出端可以是第一链之外的。组成siRNA的两条链的长度可以是19、20、21、22、23、24、25、26或27个或更多个核苷酸。

[0050] siRNA还可以充当Dicer底物。例如,Dicer底物可以是由两条具有27个连续碱基对的RNA链组成的27聚体。第一链位于27聚体双链体的3’端。在3’端,与siRNA一样,每条链或

一条链可以包含两个核苷酸突出端。3'突出端可以包含在第一链中。3'突出端可以是第一链之外的。在第一链的5'端,可以包含与相邻的靶RNA序列互补或不互补的另外的序列。siRNA dicer底物的另一端是平端的。此dicer底物设计可能导致由Dicer加工的偏好,使得siRNA可以像如上文所述的siRNA设计那样形成,在两个3'端都具有19个连续碱基对和2个核苷酸突出端。在任何情况下,siRNA等都由两条分开的RNA链组成(Fire等人1998,Nature[自然].1998年2月19日;391(6669):806-11),每条RNA链包含根据本发明的第一RNA链和第二RNA链或由其组成。因此,可以说本发明的核酸衍生出第一RNA链和第二RNA链(其是第一RNA),以及第三RNA链和第四RNA链(其是第二RNA)。对于第一RNA链、第二RNA链、第三RNA链和第四RNA链各自的替代命名惯例在本发明的范围内,其可以彼此互补、基本上互补或独特,或处于如本文所讨论的任何其他所需排列。

[0051] 环序列还可以是茎-环序列,由此延伸shRNA的双链区。与如上文所述的siRNAdicer底物一样,shRNA可以由例如Dicer加工以提供具有如上文所述的siRNA设计的siRNA,在两个3'端都具有例如19个连续碱基对和2个核苷酸突出端。在shRNA待由Dicer加工的情况下,优选的是在shRNA的末端具有第一链和第二链,即使得siRNA的推定链经由茎环序列连接:5'-第一链-顶端环序列-第二链-任选的2nt突出端序列-3'。或者相反地,5'-第二链-顶端环序列-第一链-任选的2nt突出端序列-3'。另一种shRNA设计可以是由RNAi机器加工以提供不需要Dicer加工的激活的RISC复合物的shRNA结构(Liu等人,Nucleic Acids Res.[核酸研究]2013年4月1日;41(6):3723-33,通过援引并入本文),所谓的AgoshRNA或Ago2加工的shRNA,其基于与如下文所述的miR-451支架非常相似的结构。这样的shRNA结构在其环序列中包含第一RNA序列的一部分。这样的shRNA结构还可以由第一链、之后紧接着第二链组成。

[0052] 在一个实施例中,提供了核酸,其中编码第一RNA的序列之后是间隔子和编码第二RNA的序列,其中间隔子是至少50个核苷酸。因此,优选地,在5'至3'方向上,编码第一RNA的序列之后是包含至少50个核苷酸的第一间隔子,该间隔子之后是编码第二RNA的序列。应理解,在ds核酸的情况下,5'至3'方向是指编码链。偶然地鉴定出,使用如本文所述的间隔子使得能够对编码第一RNA和第二RNA的序列进行下游加工,允许实现其组合作用。如上所述,可以说所述核酸衍生出第一RNA链和第二RNA链(其是第一RNA),以及第三RNA链和第四RNA链(其是第二RNA),其中编码第一RNA链和第二RNA链的序列之后是间隔子以及编码第三RNA链和第四RNA链的序列,其中间隔子是至少50个核苷酸,如至少60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125或130个核苷酸。在一些实施例中,间隔子在60至130个核苷酸之间。在优选实施例中,间隔子在90与105个核苷酸之间。在更优选的实施例中,间隔子是92个核苷酸。在本发明的一些实施例中,间隔子包含SEQ ID NO.237。因此,当从物理上相邻的基因转录时,第一RNA和第二RNA也可以被称为RNA簇。在另外的实施例中,在一种或两种RNA是待由Dicer加工的shRNA的情况下,上文提及的相关shRNA结构也是适用的。在替代实施例中,在一种或两种RNA是AgoshRNA的情况下,上文提及的相关shRNA结构也是适用的。因此,一种或两种RNA可以由相同或不同的RNAi机器(如RNAi机器的Dicer和/或Ago2)加工。在优选实施例中,第一RNA由Dicer加工,因此,随后的siRNA的推定链经由茎环序列连接:5'-第一链-顶端环序列-第二链-任选的2nt突出端序列-3',或者相反地,5'-第二链-顶端环序列-第一链-任选的2nt突出端序列-3'。如实例中所示,本发明的第一链和第二链可以优选

地掺入衍生自前miRNA(pri-miRNA)或前体miRNA(pre-miRNA)支架(衍生自miR-144(SEQ ID NO.235))的前体miRNA或前miRNA支架中。在优选实施例中,将本发明的第三链和第四链掺入衍生自miR-451(SEQ ID NO.190)的前miRNA或前体miRNA支架中。因此,第一RNA和/或第二RNA可以被描述为与其自身基本上互补的发夹或双链RNA。在更优选的实施例中,第一RNA包含SEQ ID NO.235(miR-144)或其变体。

[0053] 在本发明的将第一RNA掺入衍生自miR-144的前体miRNA或前miRNA支架中的一些实施例中,第一RNA发生突变以减少第一RNA的加工和/或表达。在一些具体实施例中,SEQ ID NO.235或其变体发生突变以减少第一RNA的加工和/或表达。在一些实施例中,突变是单点突变。换言之,第一RNA包含单点突变以减少第一RNA的加工和/或表达。在一些优选实施例中,单点突变是A-T-位置19(SEQ ID NO.236)。技术人员可以通过使用标准测定和适当的对照(如在实例中所述的和本领域已知的)来容易地确定是否是这种情况。

[0054] 因此,在一些实施例中,第一RNA由Dicer加工,并且第二RNA由Ago2加工,如AgoshRNA或miR-451模拟RNA,并且可以说在其环序列中包含第二RNA序列的一部分。这样的shRNA结构还可以由本发明的第三链、之后紧接着第四链组成。

[0055] 根据本发明的双链RNA还可以掺入前体miRNA或前miRNA支架中。微RNA(即,miRNA)是源自双链RNA分子的指导链,这些双链RNA分子例如在哺乳动物细胞中内源表达。两种或更多种miRNA也可以包含在miRNA簇中,其中簇中的miRNA以相同的方向转录,并且不被转录单元或相反方向的miRNA分开。miRNA从前体miRNA前体分子加工,与如上文所述的由RNAi机器加工shRNA或延伸的siRNA相似,并且被掺入激活的RNA诱导的沉默复合物(RISC)中(Tijsterman M,Plasterk RH.Dicers at RISC[RISC处的Dicer];the mechanism of RNAi[RNAi的机制].Cell[细胞].2004年4月2日;1 17(1):1-3)。前体miRNA是发夹RNA分子,其可以是较大RNA分子(前miRNA)的一部分,例如包含在内含子中,该较大RNA分子首先由Drosha加工以形成前体miRNA发夹分子。在一个实施例中,第二RNA中的发夹包含至少40个核苷酸。前体miRNA分子是shRNA样分子,其随后可以由Dicer或Ago2加工以产生siRNA样双链RNA双链体(参见图2A和图2B)。

[0056] 作为双链RNA双链体的一部分的miRNA(即,指导链)随后被掺入RISC中。在一个实施例中,第二RNA包含与APOE基因的一部分基本上互补的至少19个核苷酸(如20、21、22、23、24、25或26个核苷酸)的指导序列。在另外的实施例中,第二RNA包含与APOE基因的一部分基本上互补的至少22个核苷酸的指导序列,优选地指导序列对APOE4基因的一部分具有特异性。偶然地鉴定出,所提供的如本文所述的指导序列的长度是对APOE4基因的一部分具有特异性以实现所需作用的最佳长度。较短序列可能导致脱靶效应。RNA分子(如在自然界中所存在,即前miRNA、前体miRNA或miRNA双链体)可以用作用于产生特异性靶向所选基因的人工miRNA的支架。基于如在自然界中存在的RNA分子的预测RNA结构,例如如使用例如m-fold软件使用标准设置所预测(Zuker.Nucleic Acids Res.[核酸研究]31(13),3406-3415,2003),存在于RNA结构中的天然miRNA序列(即,双链体、前体miRNA或前miRNA)和存在于结构中的与其基本上互补的序列被去除并用根据本发明的第一链和第二链(即,第一RNA的第一链和第二链或第二RNA的第一链和第二链(其也可以被称为第三链和第四链))替代。因此,使用第一链和第二链仅用于示例性目的,优选地这样选择第一链和第二链,使得形成的预测二级RNA结构(即,前体miRNA、前miRNA和/或miRNA双链体)类似于天然RNA序列的对应

预测原始二级结构。如在自然界中发现的前体miRNA、前miRNA和miRNA双链体(其由经由互补碱基配对杂交的两条分开的RNA链组成)通常不是完全碱基配对的,即不是与如上文所定义的第一链和第二链对应的所有核苷酸都是碱基配对的,并且第一链和第二链通常不具有相同的长度。如何使用miRNA前体分子作为任何选择的靶RNA序列和基本上互补的第一链的支架描述于例如Liu YP Nucleic Acids Res.[核酸研究]2008年5月;36(9):281 1-24中,将其通过援引并入本文。

[0057] 前miRNA可以由细胞的RNAi机器加工。前miRNA在前体miRNA发夹和/或shRNA样分子的5'端和3'端包含侧翼序列。这样的前miRNA发夹可以由Drosha加工以产生前体miRNA。侧翼序列的长度可以变化,但是长度可以为约80nt(Zeng和Cullen,J Biol Chem.[生物化学杂志]2005年7月29日;280(30):27595-603;Cullen,Mol Cell.[分子细胞]2004年12月22日;16(6):861-5)。单链侧翼的最小长度可以容易地确定,因为当它变得太短时,RNA分子可能失去其功能,因为例如Drosha加工不能导致序列特异性抑制减少或甚至不存在。在一个实施例中,携带根据本发明的第一链和第二链的前miRNA支架相对于预测前体miRNA结构具有至少5、至少10、至少15、至少20、至少30、至少40或至少50个核苷酸的5'序列侧翼和3'序列侧翼。优选地,包含在miRNA支架中的前miRNA衍生的侧翼序列(5'和3')衍生自相同的天然存在的前miRNA序列。优选地,包含在miRNA支架中的前体miRNA和/或前miRNA衍生的侧翼序列(5'和3')和/或环序列衍生自相同的天然存在的前miRNA序列。由于如包含在内源miRNA序列中的(推定的)指导链RNA可以被包含第一链(或由其组成)的序列替代,并且过客链序列可以被包含第二链(或由其组成)的序列替代,应理解,内源序列的前miRNA或前体miRNA序列的侧翼序列和/或环序列可以包含小序列修饰,使得支架miRNA序列的预测结构(例如,M-fold预测结构)与内源miRNA序列的预测结构相同。

[0058] 第一链和第二链以及第三链和第四链(如以形成两种双链RNA(即,本发明的第一RNA和第二RNA))由表达盒编码。应理解,当双链RNA是例如两种siRNA时,每种siRNA由两条链组成,可能需要两种或更多种表达盒。当每种双链RNA包含在单一RNA分子(例如,编码shRNA、前体miRNA或前miRNA)中时,每种RNA分子一种表达盒可能足够。pol II表达盒可以包含启动子序列(编码待表达的RNA的序列),之后是多腺苷酸化序列。在表达的双链RNA包含前miRNA支架的情况下,编码的RNA序列可以编码内含子序列和外显子序列以及3'UTR和5'UTR。pol III表达盒通常包含启动子序列,之后是编码RNA(例如,shRNA序列、前体miRNA或待包含在例如siRNA或5T延伸的siRNA中的双链RNA的链)的序列。pol I表达盒可以包含pol I启动子,之后是RNA编码序列和3'序列。双链RNA的表达盒是本领域熟知的,并且任何类型的表达盒都可以满足,例如可以使用pol III启动子、pol II启动子或pol I启动子(例如(i.a.),ter Brake等人,Mol Ther.[分子治疗]2008年3月;16(3):557-64;Maczuga等人,BMC Biotechnol.[BMC生物技术]2012年7月24日;12:42)。在一个实施例中,表达盒是DNA分子。此类DNA分子可用于另外的技术和应用的应用,为如本文所述的核酸提供载体。

[0059] 如从上文可清楚地看出,包含在双链RNA中的第一链和第二链(因此还有第三链和第四链)可以含有另外的核苷酸和/或核苷酸序列。双链RNA可以包含在单个RNA序列中或包含在两条分开的RNA链中。无论使用何种设计,它都被这样设计,使得从第一RNA序列和第二RNA序列,本发明的包含第一链(因此还有第三链)的反义RNA分子(全部或其大部分)可以由RNAi机器加工,使得它被掺入RISC复合物中以实现其作用,即以诱导针对包含在由APOE基

因编码的RNA中的RNA靶序列的RNAi。包含第一链(因此还有第三链)或由其组成的序列(全部或其大部分)能够序列特异性靶向由人APOE基因编码的RNA。因此,只要双链RNA能够诱导RNAi,本发明就考虑了这样的双链RNA。在一个实施例中,根据本发明的双链RNA包含在前体miRNA支架、前miRNA支架、shRNA或siRNA中。优选地,如由表达盒编码的第一链和第二链或第三链和第四链或所有四条链包含在单一转录物中。应理解,在随后的加工(即,切割)中表达的转录物导致单一转录物被加工成多种分开的RNA分子。

[0060] 术语互补在本文中被定义为可以通过氢键与另一个核酸序列结合的核酸序列的核苷酸,即能够碱基配对的核苷酸。核糖核苷酸(RNA的结构单元)由含有糖、磷酸和碱基的单体(核苷酸)组成,该碱基是嘌呤(鸟嘌呤、腺嘌呤)或嘧啶(尿嘧啶、胞嘧啶)。互补RNA链形成双链RNA。双链RNA可以由两条分开的互补RNA链形成,或者两条互补RNA链可以包含在一条RNA链中。在互补RNA链中,核苷酸胞嘧啶和鸟嘌呤(C和G)可以形成碱基对,鸟嘌呤和尿嘧啶(G和U)以及尿嘧啶和腺嘌呤(U和A)也可以形成碱基对。术语实质互补性意指不需要使第一RNA序列和第二RNA序列完全互补,或者不需要使第一RNA序列和靶RNA序列或由人APOE基因编码的RNA序列完全互补。

[0061] 靶序列

[0062] 待根据本发明表达的第二RNA(全部或其大部分)包含指导链,也称为反义链,因为它与有义靶RNA序列互补(“抗”),有义靶RNA序列包含在由人APOE基因编码的RNA中。因此,第二RNA还包含“有义链”,其可以与靶RNA序列具有实质序列同一性或与靶RNA序列相同。因此,第二RNA可以被描述为与其自身基本上互补的发夹或双链RNA。根据本发明的所述双链RNA诱导RNA干扰,从而减少APOE转录物的表达,这包括敲减APOE衍生的转录物。可以靶向的转录物可以包括剪接的(包括剪接变体)和未剪接的RNA转录物,如由SEQ ID NO.1所编码。因此,由人APOE基因编码的RNA被理解为包含未剪接的mRNA,这些未剪接的mRNA包含5’非翻译区(UTR)、内含子和外显子序列,之后是3’UTR和聚A尾;以及其剪接变体。根据本发明的所述双链RNA还可以诱导转录沉默。应理解,根据本发明,可以提供一起编码第二RNA的第三链和第四链,而不是提供表达盒。

[0063] 在一个实施例中,根据本发明的双链RNA包含第一RNA序列和第二RNA序列(即,第三RNA链和第四RNA链),其中第一RNA序列和第二RNA序列基本上互补,并且其中第一RNA序列具有至少19个核苷酸的序列长度并且与由人APOE基因编码的RNA的靶RNA序列基本上互补,该第一RNA序列能够诱导RNA干扰序列,特异性减少包含靶RNA序列的RNA转录物的表达。在另外的实施例中,RNA干扰的所述诱导以减少包含靶RNA序列的RNA转录物的表达意指它减少APOE基因表达。如先前所讨论,APOE基因包含单核苷酸多态性(SNP),其诱导APOE亚型中位于位置112和158处的氨基酸残基处的差异(APOEε2,Cys112/Cys158;APOEε3,Cys112/Arg158;APOEε4,Arg112/Arg158)。这些单氨基酸多态性被认为严重影响APOE的结构和功能,从而影响Aβ代谢、聚集、沉积和τ蛋白磷酸化。(Liu等人2013,Nat Rev Neurol.[自然评论神经学];9:106-18)。APOE亚型之间的小差异意指使用如本文所定义的RNA序列进行靶向可能导致所有APOE的表达减少,优选地使用如所定义的RNA序列进行靶向导致所有APOE的表达减少。然而,在替代实施例中,可以靶向单独亚型。单独RNA序列的设计在本领域技术人员的专业知识范围内。在一些实施例中,靶RNA序列靶向APOE基因的一部分,优选地靶RNA序列靶向APOE4基因的一部分。因此,本发明旨在减少参与迟发性AD(LOAD)的APOEε4变体,因

为APOEε4的携带者以等位基因数量依赖性方式具有增加的AD发作风险。此外,本发明旨在减少与APOEε4变体(APOE4)相关的与动脉粥样硬化相关的发展和颅脑损伤(TBI)的不利结果。APOE4的所述“减少”涉及使用如本文所述的靶向APOE4基因的一部分的靶RNA序列。诸位发明人已经鉴定出靶RNA序列的长度和靶位点具有改善与APOE4表达相关的疾病的所需结果,如上文所讨论和实例所示。

[0064] 因此,减少APOE转录物的表达在本文中优选地被理解为降低靶细胞中功能性APOE mRNA的稳态水平,使得在细胞中可获得的mRNA较少用于翻译成APOE蛋白,从而降低靶细胞中蛋白质的稳态水平。因此,减少APOE转录物的表达不一定涉及减少APOE基因的从头转录,而是增加APOE mRNA和/或其前体(例如,未剪接的RNA转录物)的降解。

[0065] 通过使用标准萤光素酶报告物测定和适当的对照,如在实例中所述的和本领域已知的(Zhuang等人2006Methods Mol Biol.[分子生物学方法]2006;342:181-7),可以容易地确定APOE基因表达的减少程度,对于单独同种型也是如此。例如,包含靶RNA序列的萤光素酶报告物可以用于显示根据本发明的双链RNA能够序列特异性敲减。此外,如例如实例部分中所示,APOE表达的水平可以通过检测APOE RNA(细胞核的和/或细胞质的)或APOE蛋白来确定。

[0066] 如本文所用,术语“RNA沉默”是指由RNA分子介导的一组序列特异性调节机制(例如,RNA干扰(RNAi)、转录基因沉默(TGS)、转录后基因沉默(PTGS)、压抑、共阻抑和翻译阻遏),其导致对应蛋白质编码基因的表达的抑制或“沉默”。已经在许多类型的生物体(包括植物、动物和真菌)中观察到RNA沉默。

[0067] 应理解,在此上下文中,“基本上互补”意指不需要使指导序列和靶序列的所有核苷酸都是碱基配对的(即,完全互补),或者不需要使指导序列和靶序列的所有核苷酸都是碱基配对的。只要第二RNA能够诱导RNA干扰从而序列特异性靶向包含靶RNA序列的序列,根据本发明就考虑了这样的实质互补性。

[0068] 与靶RNA序列互补的链(也称为APOE基因的一部分)之间的实质互补性优选地由至多两个错配核苷酸组成,更优选地具有一个错配核苷酸,最优选地没有错配。应理解,一个错配核苷酸意指当与靶RNA序列碱基配对时,在与靶RNA序列互补的链的整个长度上,一个核苷酸不与靶RNA序列碱基配对。没有错配意指与靶RNA互补的链的所有核苷酸都与靶RNA序列碱基配对,具有2个错配意指与靶RNA互补的链的两个核苷酸不与靶RNA序列碱基配对。与靶RNA互补的链还可以包含与靶RNA序列不具有互补性的另外的核苷酸,并且可以比例如21个核苷酸长,在这种情况下,在靶RNA序列的整个长度上确定实质互补性。这意指在此实施例中,当与和靶RNA互补的链碱基配对时,靶RNA序列在其整个长度上没有错配、具有一个错配或两个错配。

[0069] 如实例部分中所示,测试了包含与长度为22个核苷酸的靶RNA互补的链的双链RNA。与靶RNA互补的这些链没有错配,并且与靶RNA序列完全互补。然而,根据本发明,可以允许在与靶RNA互补的链与靶RNA序列之间具有一些错配,只要根据本发明的双链RNA能够减少包含靶RNA序列的转录物(如萤光素酶报告物或例如包含靶RNA序列的转录物)的表达。在此实施例中,与靶RNA互补的链与靶RNA序列之间的实质互补性由以下组成:在与靶RNA互补的链或由人APOE的RNA编码的靶RNA序列的整个长度上没有错配、具有一个错配或两个错配,以最短者为准。

[0070] 如所述,根据本发明的错配意指第一链或第三链的核苷酸不与由人APOE的RNA编码的靶RNA序列碱基配对。不碱基配对的核苷酸是A和A、G和G、C和C、U和U、A和C、C和U或A和G。错配也可能由核苷酸的缺失或核苷酸的插入引起。当错配是第一链序列或第三链序列中的缺失时,这意指当与第一链序列或第三链序列的整个长度相比时,靶RNA序列的核苷酸不与第一链序列或第三链序列碱基配对。可以碱基配对的核苷酸是A-U、G-C和G-U。G-U碱基对也被称为G-U摆动或摆动碱基对。在一个实施例中,第一链序列或第三链序列与靶RNA序列之间的G-U碱基对的数量是0、1或2。在一个实施例中,在第一链序列或第三链序列与靶RNA序列之间不存在错配,并且允许一个G-U碱基对或多个G-U对。优选地,在第一链序列或第三链序列与靶RNA序列之间可以不存在G-U碱基对,或者第一链序列或第三链序列与靶RNA序列仅具有作为A-U或G-C的碱基对。优选地,在第一链序列或第三链序列与靶RNA序列之间不存在G-U碱基对并且不存在错配。根据本发明的双链RNA的第一链序列或第三链序列优选地与靶RNA序列完全互补,所述互补性由G-U、G-C和A-U碱基对组成。根据本发明的双链RNA的第一链序列或第三链序列更优选地与靶RNA序列完全互补,所述互补性由G-C和A-U碱基对组成。更优选地,它是第三链,即本发明的第二RNA的第一链。

[0071] 因此,在一个实施例中,第二RNA的第一链和靶RNA序列具有碱基配对的至少15、16、17、18或19个核苷酸。优选地,第二RNA的第一链和靶RNA序列基本上互补,所述互补性包含至少19个碱基对。在另一个实施例中,第二RNA的第一链具有与靶RNA序列的连续核苷酸碱基配对的至少8、9、10、11、12、13或14个连续核苷酸。在另一个实施例中,第二RNA的第一链具有与靶RNA序列的连续核苷酸碱基配对的至少19个连续核苷酸。在另一个实施例中,第二RNA的第一链包含与靶RNA序列的19个连续核苷酸碱基配对的至少19个连续核苷酸。在仍另一个实施例中,第二RNA的第一链具有与靶RNA序列碱基配对的至少17个核苷酸,并且具有与靶RNA序列的连续核苷酸碱基配对的至少15个连续核苷酸。第一链的序列长度优选地为至多21、22、23、24、25、26或27个核苷酸。在另一个实施例中,第二RNA的第一链具有与靶RNA序列的20个连续核苷酸碱基配对的至少20个连续核苷酸。在另一个实施例中,第二RNA的第一链包含与靶RNA序列的21个连续核苷酸碱基配对的至少21个连续核苷酸。

[0072] 如所述,可能不需要在第二RNA的第一链与靶RNA序列之间具有完全互补性(即,完全碱基配对(无错配)并且没有G-U碱基对),因为第二RNA的这样的第一链仍然可以允许充分阻抑基因表达。此外,可以考虑不具有完全互补性,例如以避免或减少脱靶RNA序列特异性基因阻抑,同时维持对包含靶RNA序列的转录物的序列特异性抑制。然而,可能优选的是具有完全互补性,因为它可能导致更有效的抑制。不受理论束缚,第二RNA的第一链与靶RNA序列之间具有完全互补性可以允许包含第二RNA的所述第一链(或其大部分)的激活的RISC复合物切割其靶RNA序列,而具有错配可能阻碍切割并且可能导致主要允许抑制翻译,其中后者可能导致抑制效力减弱。

[0073] 关于第二RNA上的第二链,第二链与第一链基本上互补。与第一链组合的第二链形成双链RNA。如所述,这形成RNA干扰机器的合适底物,使得衍生自第一链的指导序列包含在RISC复合物中,以便序列特异性抑制其靶标(即,由人APOE基因编码的RNA)的表达。第二链的序列与靶RNA序列具有序列相似性。然而,第二链与第一链的实质互补性可以被选择为与第一链与靶RNA序列之间的实质互补性相比具有更少的实质互补性。因此,第二链可以包含0、1、2、3、4个或更多个错配,0、1、2、3个或更多个GU摆动碱基对,并且可以包含0、1、2、3、4个

核苷酸的插入和/或0、1、2、3、4个核苷酸的缺失。优选地,第一链和第二链基本上互补,所述互补性包含0、1、2或3个G U碱基对和/或其中所述互补性包含至少17个碱基对。这些错配、G-U摆动碱基对、插入和缺失是关于第一链(即,在第一链与第二链之间形成的双链区)的。只要第一链和第二链可以基本上碱基配对,并且能够诱导对由人APOE基因编码的RNA的序列特异性抑制,根据本发明就允许这样的实质互补性。还应理解,第一链与第二链之间的实质互补性可能取决于所选双链RNA设计。它可能取决于例如所选择的miRNA支架,在其中待掺入双链RNA。

[0074] 如从上文可清楚地看出,第二RNA的第一链与第二链之间的实质互补性可以包含相对于完全互补(即,完全碱基配对)的第一RNA序列和第二RNA序列的错配、缺失和/或插入。在一个实施例中,第二RNA的第一链和第二链具有至少11个连续碱基对。因此,第一链的至少11个连续核苷酸和第二链的至少11个连续核苷酸完全互补。在另一个实施例中,第二RNA的第一链和第二链具有碱基配对的至少15个核苷酸。第一链的至少15个核苷酸与第二链的至少15个核苷酸之间的所述碱基配对可以由G-U、G-C和A-U碱基对组成,或者可以由G-C和A-U碱基对组成。在另一个实施例中,第一RNA序列和第二RNA序列具有碱基配对的至少15个核苷酸,并且具有至少11个连续碱基对。在另一个实施例中,第一RNA序列和第二RNA序列基本上互补,其中所述互补性包含至少17个碱基对。所述17个碱基对可以优选地是17个连续碱基对,所述碱基配对由G-U、G-C和A-U碱基对组成,或者由G-C和A-U碱基对组成。

[0075] 如所述,本发明现在提供了编码第二RNA的第一链和第二链的表达盒,其中第一链和第二链基本上互补,其中第一链具有至少19个核苷酸的序列长度,并且与包含在由人APOE基因编码的RNA中的靶RNA序列基本上互补。如实例中所示,提供了根据本发明的合适靶RNA序列(参见例如表1)。因此,在一个实施例中,提供了编码第一链和第二链的表达盒,其中第一链和第二链基本上互补,其中第一链具有至少19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸或22个核苷酸的序列长度,并且与选自列在表1中的包含在由人APOE基因编码的RNA中的靶RNA序列基本上互补。

[0076] 表1:由人APOE基因编码的RNA靶序列。

[0077]

SEQ ID NO.	RNA 靶序列（5'-3'）
2	ACUGGCCAAUCACAGGCAGGAA
3	CUGGCCAAUCACAGGCAGGAAG
4	UGGCCAAUCACAGGCAGGAAGA
5	GGCCAAUCACAGGCAGGAAGAU
6	GCCAAUCACAGGCAGGAAGAUG
7	CCAAUCACAGGCAGGAAGAUGA
8	CAAUCACAGGCAGGAAGAUGAA
9	AAUCACAGGCAGGAAGAUGAAG
10	AUCACAGGCAGGAAGAUGAAGG
11	UCACAGGCAGGAAGAUGAAGGU
12	CACAGGCAGGAAGAUGAAGGUU
13	CAGGCAGGAAGAUGAAGGUUCU
14	AGGCAGGAAGAUGAAGGUUCUG

[0078]

15	GGCAGGAAGAUGAAGGUUCUGU
16	GCAGGAAGAUGAAGGUUCUGUG
17	CAGGAAGAUGAAGGUUCUGUGG
18	AGGAAGAUGAAGGUUCUGUGGG
19	GAAGAUGAAGGUUCUGUGGGCU
20	AAGAUGAAGGUUCUGUGGGCUG
21	AUGAAGGUUCUGUGGGCUGCGU
22	UGAAGGUUCUGUGGGCUGCGUU
23	UGGGCUGCGUUGCUGGUCACAU
24	GGGCUGCGUUGCUGGUCACAUU
25	CUGCGUUGCUGGUCACAUUCCU
26	GCGUUGCUGGUCACAUUCCUGG
27	UUGCUGGUCACAUUCCUGGCAG
28	CACAUUCCUGGCAGGAUGCCAG
29	UUUGGGAUUACCUGCGCUGGGU
30	GCUGGGUGCAGACACUGUCUGA
31	CUGGGUGCAGACACUGUCUGAG
32	GGUGCAGACACUGUCUGAGCAG
33	GUGCAGACACUGUCUGAGCAGG
34	UGCAGACACUGUCUGAGCAGGU
35	GCAGACACUGUCUGAGCAGGUG
36	AGACACUGUCUGAGCAGGUGCA
37	GACACUGUCUGAGCAGGUGCAG
38	ACACUGUCUGAGCAGGUGCAGG
39	GAGACCAUGAAGGAGUUGAAGG
40	ACCAUGAAGGAGUUGAAGGCCU
41	CCAUGAAGGAGUUGAAGGCCUA
42	AUGAAGGAGUUGAAGGCCUACA
43	UGAAGGAGUUGAAGGCCUACAA
44	GAAGGAGUUGAAGGCCUACAAA
45	AAGGAGUUGAAGGCCUACAAAU
46	AGGAGUUGAAGGCCUACAAAUC
47	GGAGUUGAAGGCCUACAAAUCG
48	GAGUUGAAGGCCUACAAAUCGG
49	AGUUGAAGGCCUACAAAUCGGA

[0079]

50	GUUGAAGGCCUACAAAUCGGAA
51	UGAAGGCCUACAAAUCGGAACU
52	GAAGGCCUACAAAUCGGAACUG
53	AAGGCCUACAAAUCGGAACUGG
54	AGGCCUACAAAUCGGAACUGGA
55	GGCCUACAAAUCGGAACUGGAG
56	GCCUACAAAUCGGAACUGGAGG
57	CCUACAAAUCGGAACUGGAGGA
58	CUACAAAUCGGAACUGGAGGAA
59	ACAAAUCGGAACUGGAGGAACA
60	CACGGCUGUCCAAGGAGCUGCA
61	ACGGCUGUCCAAGGAGCUGCAG
62	UCGCCUCCCACCUGCGCAAGCU
63	GAUGACCUGCAGAAGCGCCUGG
64	GACCUGCAGAAGCGCCUGGCAG
65	ACCUGCAGAAGCGCCUGGCAGU
66	CUGCAGAAGCGCCUGGCAGUGU
67	UGCAGAAGCGCCUGGCAGUGUA
68	ACCGCCUGGACGAGGUGAAGGA
69	CUGGACGAGGUGAAGGAGCAGG
70	GACGAGGUGAAGGAGCAGGUGG
71	CCCGCCUCAAGAGCUGGUUCGA
72	CCGCCUCAAGAGCUGGUUCGAG
73	GCUGGUGGAGAAGGUGCAGGCU
74	UGGAGAAGGUGCAGGCUGCCGU
75	CCUGUGCCCAGCGACAAUCACU
76	UGUGCCCAGCGACAAUCACUGA
77	GUGCCCAGCGACAAUCACUGAA
78	GCCCAGCGACAAUCACUGAACG
79	CAGCCUGCAGCGGGAGACCCUG
80	AGCCUGCAGCGGGAGACCCUGU
81	GGCGCGGACAUGGAGGACGUGC
82	GCGCGGACAUGGAGGACGUGCG
83	CGCGGACAUGGAGGACGUGCGC
84	GCGGACAUGGAGGACGUGCGCG

[0080]

85	CGGACAUGGAGGACGUGCGCGG
86	GGACAUGGAGGACGUGCGCGGC
87	GACAUGGAGGACGUGCGCGGCC
88	ACAUGGAGGACGUGCGCGGCCG
89	CAUGGAGGACGUGCGCGGCCGC
90	UGCGCGGCCGCCUGGUGCAGUA
91	GGGUGGACCCUAGUUUAAUAAA
92	GGUGGACCCUAGUUUAAUAAAG
93	GUGGACCCUAGUUUAAUAAAGA

[0081] 表1.SEQ ID NO.2-93与由人APOE基因编码的转录物的靶RNA序列对应。对于这些靶RNA序列,发现根据本发明可以制备第二RNA的出人意料地高度有利的合适的第三链和第四链,以提供编码所述第二RNA的表达盒,其中所述第三链和第四链基本上互补,其中第三链RNA序列具有至少19个核苷酸的序列长度并且与所述靶RNA序列之一基本上互补以高效地诱导RNAi以减少APOE基因表达。应理解,APOE基因表达的减少可以包括与τ蛋白病相关的转录物的减少。

[0082] 如实例中所示,本发明的第三链和第四链可以优选地掺入衍生自miR-101的前体miRNA或前miRNA支架或衍生自miR-451的前miRNA或前体miRNA支架中。在优选实施例中,将本发明的第三链和第四链掺入衍生自miR-451的前miRNA或前体miRNA支架中。发现这些支架特别有用,因为这些支架既可以诱导RNA干扰又可以组合在单一转录物中。这些支架还允许诱导RNA干扰,其可能主要导致指导链诱导的RNA干扰。前miR451支架不产生过客链,因为加工不同于典型miRNA加工途径(Cheloufi等人,2010年6月3日;465(7298):584-9和Yang等人,Proc Natl Acad Sci U S A.[美国国家科学院院刊]2010年8月24日;107(34):15163-8)。前miR-101支架是通过典型miRNA加工途径产生的,但是发现许多miR-101支架主要产生指导链(参见例如C2、C4、C32和C33)和非常少量的过客链。因此,这两种支架代表开发基因疗法产品的优异候选物,因为可以在很大程度上(如果不完全的话)避免过客链的不想要的潜在脱靶。由于过客链(对应于第二序列)可能导致靶向除APOE RNA之外的转录物,使用此类支架可以允许避免这样的不想要的靶向。因此,优选的是选择产生少于15%、少于10%、少于5%、少于4%或少于3%的过客链的支架。在一些实施例中,第二RNA衍生自选自由以下组成的组的前miRNA支架:前miR-21、前miR-22、前miR-26a、前miR-30a、前miR-33、前miR-122、前miR-375、前miR-199、前miR-99、前miR-194、前miR-155和前miR-451。在优选实施例中,第二RNA衍生自包含SEQ ID NO.190(miR-451)或其变体的支架。因此,在一个实施例中,第一RNA包含SEQ ID NO.235(miR-144)或其变体,并且第二RNA包含SEQ ID NO.190(miR-451)或其变体。本文随附的实验数据支持令人惊讶的发现,即当应用miRNA簇方法时,实现APOE的改善的沉默。在本发明的核酸内144/451支架的特定组合在基因疗法和RNA沉默的背景下是特别有用的。miR-144和miR-451是反式调节的成簇miRNA的实例,其中miR-144调节由Ago2对miR-451的加工。具体地,miR-144通过阻遏Dicer并且进而阻遏全局典型miRNA加工来反式增强miR-451生物发生(Kretov等人,2020,Molecular Cell[分子细胞]78,317-

328)。虽然已经证明miR451是红细胞中丰度最高的miRNA,并且与miR144成簇,其中此簇在红细胞生成期间起复杂的作用,但诸位发明人已经进一步开发了此簇并且现在首次显示这些miRNA也可以用作靶RNA的支架,其在以相似方式成簇时影响它们的表达。因此,在使用此支架组合的情况下,本发明的第一RNA在增强本发明的第二RNA的生物发生以及因此增强包含在所述第一RNA和第二RNA中的指导序列的递送中起关键作用。因此,在一个实施例中,当与单独表达第二RNA实现的APOE表达降低相比时,当第二RNA与第一RNA一起表达时,APOE表达的减少和/或沉默增加。

[0083] 如实例中所示,可以选择长度为22个核苷酸(例如,对于miR-451)的第二RNA的第一链或本发明的第三链,并且将其掺入miRNA支架中。这样的miRNA支架序列随后由如在细胞中存在的RNAi机器加工。当提及miRNA支架时,它应被理解为包含前miRNA结构或前体miRNA结构。如实例中所示,当在细胞中加工时,此类miRNA支架产生指导序列,这些指导序列包含第二RNA的第一链或其大部分,对于miR-451支架,在长度为21-30个核苷酸的范围内。此类指导链能够通过靶向所选择的靶序列来减少APOE转录物表达。如从上文可清楚地看出,并且如实例中所示,当第二RNA的第一链已经被细胞的RNAi机器加工时,在它由本发明的表达盒编码时,部分或全部包含在指导链中。因此,待从由表达盒编码的RNA产生的包含第二RNA的第一链和第二RNA的第二链的指导链包含第一RNA序列的至少18个核苷酸。优选地,这样的指导链包含至少19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸或22个核苷酸。指导链也可以整体包含第二RNA序列的第一链。在选择miRNA支架时,可以这样选择第二RNA序列的第一链,使得它替代原始指导链。如实例部分中所示,这不一定意指由这样的人工支架产生的指导链在长度上与所选择的第二RNA的第一链相同,也不意指第二RNA的第一链在所产生的指导链中以其整体被发现。如实例中所示,并且如图2a中所示,miR-451支架优选地从5’至3’包含首先是5’-CUUGGGAAUGGCAAGG-3’(SEQ ID NO.233);之后是22个核苷酸的序列,该序列包含第一RNA序列或由其组成;之后是17个核苷酸的序列,该序列可以被认为是第二RNA序列,其在其整个长度上与22个核苷酸的所述序列的核苷酸2-18互补;随后之后是序列5’-MWCUUGCUAUACCCAGA-3’(其中M是A或C并且W是A或U)(SEQ ID NO.234)。优选地,后一序列的第一个5’C核苷酸不与第二RNA的第一链的第一个核苷酸碱基配对。这样的支架可以包含另外的侧翼序列,如在原始前miR-451支架中所发现。可替代地,侧翼序列5’-CUUGGGAAUGGCAAGG’-3’和5’-MWCUUGCUAUACCCAGA-3’可以被其他前mRNA结构的侧翼序列替代。如从上文可清楚地看出,支架的序列可以不仅关于如在野生型支架(图2a)中存在的(推定的)指导链序列及其互补序列不同,而且还可以包含5’、环和3’序列中的另外的突变,因为可能需要另外的突变来提供预测模拟野生型支架的二级结构的RNA结构。这样的支架可以包含在较大的RNA转录物(例如,pol II表达的转录物)中,其包含例如5’UTR和3’UTR以及聚A。侧翼结构也可以不存在。因此,根据本发明的表达盒表达shRNA样结构,该shRNA样结构具有22个核苷酸的序列,该序列包含第二RNA的第一链或由其组成;之后是17个核苷酸的序列,该序列可以被认为是第二RNA的第二链,其在其整个长度上与22个核苷酸的所述序列的核苷酸2-18互补。衍生自miR-451支架的后一shRNA样结构可以被称为来自miR-451的前体miRNA支架。

[0084] 可替代地,侧翼序列可以被其他前体miRNA结构的侧翼序列替代。侧翼结构也可以不存在。因此,根据本发明的表达盒表达shRNA样结构(miR-101的前体miRNA结构)。这样的

shRNA样结构由以下组成:从5'端开始,长度为22个核苷酸的第二RNA序列;随后之后是环序列,其中环序列的最后3'两个核苷酸与第二RNA的第二链的最后3'核苷酸碱基配对;之后是长度为21个核苷酸的第二RNA的第一链,其中前20个连续核苷酸与第二RNA的第二链互补。第二RNA的第二链包含所述22个核苷酸的位置5处(从3'端开始计数)的凸起(非碱基配对核苷酸)。

[0085] 在一个实施例中,提供了根据本发明的表达盒,其中第二RNA的所述第一链与包含在由人APOE基因编码的反义RNA转录物中的靶RNA序列基本上互补。优选地,第二RNA的所述第一链与SEQ ID NO.4、16、24、41、44、46、54、59、93基本上互补。更优选地,第二RNA的所述第一链具有19、20、21或22个核苷酸的长度。更优选地,第二RNA的所述第一链在其整个长度上与所述靶序列完全互补。最优选地,第二RNA的所述第一链具有19、20、21或22个核苷酸的长度,其中第二RNA的所述第一链在其整个长度上与所述靶序列完全互补。第二RNA的所述第一链可以是SEQ ID NO.94-185,表2。

[0086] 表2:miAPOE指导链序列。

[0087]

SEQ ID NO.	ID	RNA 指导序列 (5'-3')
94	miAPOE_001	UUCCUGCCUGUGAUUGGCCAGU
95	miAPOE_002	CUUCCUGCCUGUGAUUGGCCAG
96	miAPOE_003	UCUUCCUGCCUGUGAUUGGCCA
97	miAPOE_004	AUCUUCCUGCCUGUGAUUGGCC
98	miAPOE_005	CAUCUUCCUGCCUGUGAUUGGC
99	miAPOE_006	UCAUCUUCCUGCCUGUGAUUGG
100	miAPOE_007	UUCAUCUUCCUGCCUGUGAUUG
101	miAPOE_008	CUUCAUCUUCCUGCCUGUGAUU
102	miAPOE_009	CCUUCAUCUUCCUGCCUGUGAU
103	miAPOE_010	ACCUUCAUCUUCCUGCCUGUGA
104	miAPOE_011	AACCUUCAUCUUCCUGCCUGUG
105	miAPOE_013	AGAACCUUCAUCUUCCUGCCUG
106	miAPOE_014	CAGAACCUUCAUCUUCCUGCCU

[0088]

107	miAPOE_015	ACAGAACCUUCAUCUUCCUGCC
108	miAPOE_016	CACAGAACCUUCAUCUUCCUGC
109	miAPOE_017	CCACAGAACCUUCAUCUUCCUG
110	miAPOE_018	CCCACAGAACCUUCAUCUUCCU
111	miAPOE_020	AGCCCACAGAACCUUCAUCUUC
112	miAPOE_021	CAGCCCACAGAACCUUCAUCUU
113	miAPOE_024	ACGCAGCCCACAGAACCUUCAU
114	miAPOE_025	AACGCAGCCCACAGAACCUUCA
115	miAPOE_036	AUGUGACCAGCAACGCAGCCCA
116	miAPOE_037	AAUGUGACCAGCAACGCAGCCC
117	miAPOE_040	AGGAAUGUGACCAGCAACGCAG
118	miAPOE_042	CCAGGAAUGUGACCAGCAACGC
119	miAPOE_045	CUGCCAGGAAUGUGACCAGCAA
120	miAPOE_053	CUGGCAUCCUGCCAGGAAUGUG
121	miAPOE_085	ACCCAGCGCAGGUAAUCCCAAA
122	miAPOE_100	UCAGACAGUGUCUGCACCCAGC
123	miAPOE_101	CUCAGACAGUGUCUGCACCCAG
124	miAPOE_104	CUGCUCAGACAGUGUCUGCACC
125	miAPOE_105	CCUGCUCAGACAGUGUCUGCAC
126	miAPOE_106	ACCUGCUCAGACAGUGUCUGCA
127	miAPOE_107	CACCUGCUCAGACAGUGUCUGC
128	miAPOE_109	UGCACCUGCUCAGACAGUGUCU
129	miAPOE_110	CUGCACCUGCUCAGACAGUGUC
130	miAPOE_111	CCUGCACCUGCUCAGACAGUGU
131	miAPOE_126	CCUUCAACUCCUUCAUGGUCUC
132	miAPOE_129	AGGCCUUCAACUCCUUCAUGGU
133	miAPOE_130	UAGGCCUUCAACUCCUUCAUGG
134	miAPOE_132	UGUAGGCCUUCAACUCCUUCAU
135	miAPOE_133	UUGUAGGCCUUCAACUCCUUCA
136	miAPOE_134	UUUGUAGGCCUUCAACUCCUUC
137	miAPOE_135	AUUUGUAGGCCUUCAACUCCUU
138	miAPOE_136	GAUUUGUAGGCCUUCAACUCCU
139	miAPOE_137	CGAUUUGUAGGCCUUCAACUCC
140	miAPOE_138	CCGAUUUGUAGGCCUUCAACUC
141	miAPOE_139	UCCGAUUUGUAGGCCUUCAACU

[0089]

142	miAPOE_140	UUCCGAUUUGUAGGCCUUCAAC
143	miAPOE_142	AGUUCCGAUUUGUAGGCCUUCA
144	miAPOE_143	CAGUUCCGAUUUGUAGGCCUUC
145	miAPOE_144	CCAGUUCCGAUUUGUAGGCCUU
146	miAPOE_145	UCCAGUUCCGAUUUGUAGGCCU
147	miAPOE_146	CUCCAGUUCCGAUUUGUAGGCC
148	miAPOE_147	CCUCCAGUUCCGAUUUGUAGGC
149	miAPOE_148	UCCUCCAGUUCCGAUUUGUAGG
150	miAPOE_149	UUCCUCCAGUUCCGAUUUGUAG
151	miAPOE_151	UGUUCCUCCAGUUCCGAUUUGU
152	miAPOE_175	UGCAGCUCCUUGGACAGCCGUG
153	miAPOE_176	CUGCAGCUCCUUGGACAGCCGU
154	miAPOE_202	AGCUUGCGCAGGUGGGAGGCGA
155	miAPOE_206	CCAGGCGCUUCUGCAGGUCAUC
156	miAPOE_209	CUGCCAGGCGCUUCUGCAGGUC
157	miAPOE_210	ACUGCCAGGCGCUUCUGCAGGU
158	miAPOE_212	ACACUGCCAGGCGCUUCUGCAG
159	miAPOE_213	UACACUGCCAGGCGCUUCUGCA
160	miAPOE_278	UCCUUCACCUCGUCCAGGCGGU
161	miAPOE_283	CCUGCUCCUUCACCUCGUCCAG
162	miAPOE_286	CCACCUGCUCCUUCACCUCGUC
163	miAPOE_336	UCGAACCAGCUCUUGAGGCGGG
164	miAPOE_337	CUCGAACCAGCUCUUGAGGCGG
165	miAPOE_345	AGCCUGCACCUUCUCCACCAGC
166	miAPOE_350	ACGGCAGCCUGCACCUUCUCCA
167	miAPOE_360	AGUGAUUGUCGCUGGGCACAGG
168	miAPOE_362	UCAGUGAUUGUCGCUGGGCACA
169	miAPOE_363	UUCAGUGAUUGUCGCUGGGCAC
170	miAPOE_365	CGUUCAGUGAUUGUCGCUGGGC
171	miAPOE_368	CAGGGUCUCCCGCUGCAGGCUG
172	miAPOE_369	ACAGGGUCUCCCGCUGCAGGCU
173	miAPOE_391	GGCGCGGACAUGGAGGACGUGC
174	miAPOE_392	GCGCGGACAUGGAGGACGUGCG
175	miAPOE_393	CGCGGACAUGGAGGACGUGCGC
176	miAPOE_394	GCGGACAUGGAGGACGUGCGCG

[0090]

177	miAPOE_395	CGGACAUGGAGGACGUGCGCGG
178	miAPOE_396	GGACAUGGAGGACGUGCGCGGC
179	miAPOE_397	GGCCGCGCACGUCCUCCAUGUC
180	miAPOE_398	CGGCCGCGCACGUCCUCCAUGU
181	miAPOE_399	GCGGCCGCGCACGUCCUCCAUG
182	miAPOE_410	UACUGCACCAGGCGGCCGCGCA
183	miAPOE_417	UUUAUUAAACUAGGGUCCACCC
184	miAPOE_418	CUUUAUUAAACUAGGGUCCACC
185	miAPOE_419	UCUUUAUUAAACUAGGGUCCAC

[0091] 如所述,第二RNA的这样的第一链与第二RNA的第二链组合,该第一链和第二链也可以被称为本发明的第三链和第四链。如本文所述,技术人员能够设计和选择第二RNA的合适第二链,以便提供当在细胞中表达时可以诱导RNA干扰的第二RNA的第一链和第二链。第二RNA的合适第二链在其整个长度上与长度为19、20、21或22个核苷酸的第二RNA的第一链的核苷酸2-15、2-16、2-17或2-18互补。

[0092] 第二RNA的所述第一链优选地包含在miRNA支架、更优选miR-451支架中,如实例中所示。包含根据本发明的第二RNA的第一链和第二链的合适支架可以是诸如SEQ ID NO.190的序列。

[0093] 如上文所述的第二RNA的这样的第一链可以包含在表达盒中。第二RNA的这样的第一链可以包含在由表达盒编码的RNA结构中。

[0094] 如上文所述的第二RNA序列的此类第一链和第二链可以包含在表达盒中。第二RNA的此类第一链和第二链可以包含在由表达盒编码的RNA结构中。因此,在一些实施例中,编码第一RNA的序列和编码第二RNA的序列包含在内含子序列中。通过掺入编码第一RNA序列和第二RNA序列的序列,诸位发明人鉴定出衍生用于表达本发明的RNA的较小构建体的有益作用,该构建体对于下游加工步骤(如在病毒载体技术的应用中)特别有用。在另外的实施例中,编码第一RNA的序列和编码第二RNA的序列存在于启动子中,其中优选地内含子序列具有SEQ ID NO.231。

[0095] 因此,发现利用第二RNA的此类第一链和第二链靶向这些靶RNA序列对于减少由人APOE基因编码的RNA转录物的表达特别有用。通过以这种方式靶向人APOE,诸位发明人能够高效地减少人APOE基因表达,因此可以减少淀粉样蛋白斑块的形成。最终,这可以逆转、预防神经病理(如神经变性和/或τ蛋白病)、减缓神经病理的进展或使神经病理完全停止。

[0096] APOE表达

[0097] 在另外的方面,提供了编码APOE2和APOE3中的至少一种的表达盒。APOEε2和/或APOEε3等位基因对AD发生发挥保护性或中性作用(Yamazaki等人2016,CNSDrugs[CNS药物].;30:773-89)。因此,在一些实施例中,表达盒包含编码具有选自SEQ ID NO.249-254的氨基酸序列的APOE2和APOE3中的至少一种的核酸。APOE2和APOE3中的至少一种的表达对τ蛋白病是神经保护性的。如本文所用的术语“τ蛋白病”描述了以异常τ蛋白在脑中的沉积为特征的神经系统变性障碍。在实施例中,编码APOE2和APOE3中的至少一种的表达盒进一步

包含启动子和聚A信号。在另外的实施例中,表达盒包含编码具有选自SEQ ID NO.249-254中的一个或多个的氨基酸序列或其变体的一种或多种APOE2和APOE3蛋白的核酸,用于在基因疗法中使用。

[0098] 在一些实施例中,表达盒包含一个或多个核酸序列,其包含至少部分野生型序列。至少部分野生型序列意指仅在特定区域具有密码子优化的序列,如可见于SEQ ID NO:212-217。在优选实施例中,表达盒包含一个或多个核酸序列,其包含全长野生型编码序列(例如,SEQ ID NO:195-201)。本申请的本发明已经出人意料地显示核酸序列的(至少部分)野生型形式在不同变体中显示出最高的蛋白质表达。在更优选的实施例中,表达盒包含选自SEQ ID NO.195、197、200之一的核酸。在仍更优选的实施例中,表达盒包含含有SEQ ID NO.197和200的核酸,因为所编码的蛋白质的已知有益特性。在替代实施例中,表达盒包含选自SEQ ID NO.197和200之一的核酸。诸位发明人已经出人意料地显示编码APOE2或APOE3蛋白的核酸序列的野生型形式是在不同变体中导致最高蛋白质表达和分泌的那些。核酸序列的全长的密码子优化导致APOE2或APOE3蛋白的表达水平降低。

[0099] 在另外的实施例中,编码APOE2和APOE3中的至少一种的表达盒包含选自SEQ ID NO 195-217中的一个或多个的一个或多个核酸序列或其变体。例如,在仍另外的实施例中,编码APOE2和APO3中的至少一种的表达盒包含选自SEQ ID NO.195-217中的一个或多个的2、或3、或4个或更多个核酸序列或其变体。在另外的方面,提供了如本文所披露的表达盒,该表达盒包含核酸,其包含编码如本文所披露的第一RNA的序列和编码第二RNA的序列,其中第二RNA包含与APOE基因的一部分基本上互补的至少19个核苷酸的指导序列,并且其中第一RNA和第二RNA各自包含发夹;该表达盒进一步包含编码APOE2和APOE3中的至少一种的第二核酸。在实施例中,第一核酸和第二核酸可操作地连接至启动子和聚A信号。在另外的实施例中,第二核酸编码包含SEQ ID NO 249-254之一的蛋白质和/或第二核酸包含SEQ ID NO.195-217之一。因此,在一些实施例中,第二核酸编码具有SEQ ID NO.249-254所示的氨基酸序列的蛋白质。在一些实施例中,第二核酸是由天然存在的基因的编码部分(例如,cDNA)编码的基因产物。在一些实施例中,基因产物是由APOE基因的APOE2和/或APOE3亚型编码的蛋白质或其片段。在另外的实施例中,第二核酸不包含与如本文所定义的指导序列基本上互补的序列。在另外的实施例中,第二核酸包含经密码子优化以在人细胞中表达的核苷酸序列。在另外的实施例中,第二核酸经密码子优化以与细胞中的内源APOE2和/或APOE3序列充分不同,使得它将不被靶向野生型APOE、APOE2和/或APOE3的shRNA识别。本领域技术人员理解设计这样的核酸所需的要求。在另外的实施例中,第二核酸包含选自表3(SEQ ID NO.195-217)的序列。

[0100] 表3.表达APOE2或APOE3的核酸。

[0101]

SEQ ID NO.	名称	DNA 序列
195	APOE2-WT	ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGA

		CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC CTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA
196	APOE3-WT	ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC CTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT

[0102]

[0103]

		GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA
197	APOE2 ch-WT（克赖斯特彻奇，R136S）	ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGAGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC CTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA
198	APOE3 ch-WT（克赖斯特彻奇，R136S）	ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGAGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC

[0104]

		CTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA
199	APOE3 ch-HA-WT（克赖斯特彻奇，R136S）	ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGtGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGC TCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGaGCCTCGCCTCCCA CCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACC TGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGG CGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCC CTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCC TGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCGA GCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGC GACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGC GCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCG AGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGT GGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCAC
200	APOE2b -APOE2-Jac -WT（杰克	ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG

[0105]

	逊维尔，V236E）	CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC CTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGAGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA
201	APOE3b - APOE3-Jac -WT（杰克逊维尔，V236E）	ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC CTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG

[0106]

		CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGAGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA
202	APOE2-V1	ATGAAGGTGCTGTGGGCCGCTCTGCTGGTCACATTTCTGGCCGG CTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGAGCCTGAG CCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAGAGAT GGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGTG CAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGC CAAGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGA AGGAACTGAAGGCCTACAAGAGCGAGCTGGAAGAACAGCTGA CCCCTGTGGCCGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGC TGCAGGCCGCTCAAGCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTG TGCGGCAGACTGGTGCAGTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGC TGGGCCAGTCTACCGAGGAACTGAGAGTGCGGCTGGCCTCTCA CCTGAGAAAGCTGAGGAAGAGACTGCTGAGGGACGCCGACGA CCTGCAGAAATGTCTGGCCGTGTATCAGGCAGGCGCCAGAGAA GGTGCAGAGAGAGGACTGTCTGCCATCAGAGAAAGACTGGGCC CTCTGGTCGAGCAGGGCAGAGTTAGAGCTGCCACAGTGGGAAG TCTGGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCACAGGCCTGGGGC GAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACC CGGGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTG CGCGCCAAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGG CTGAAGCCTTTCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCT GGTGGAAGATATGCAGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAG GTGCAGGCTGCCGTGGGAACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGA CAACCACTGA
203	APOE3-V1	ATGAAGGTGCTGTGGGCCGCTCTGCTGGTCACATTTCTGGCCGG CTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGAGCCTGAG CCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAGAGAT GGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGTG CAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGC CAAGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGA AGGAACTGAAGGCCTACAAGAGCGAGCTGGAAGAACAGCTGA CCCCTGTGGCCGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGC

[0107]

		TGCAGGCCGCTCAAGCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTG TGCGGCAGACTGGTGCAGTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGC TGGGCCAGTCTACCGAGGAACTGAGAGTGCGGCTGGCCTCTCA CCTGAGAAAGCTGAGGAAGAGACTGCTGAGGGACGCCGACGA CCTGCAGAAAAGACTGGCCGTGTATCAGGCAGGCGCCAGAGAA GGTGCAGAGAGAGGACTGTCTGCCATCAGAGAAAGGCTGGGCC CTCTGGTTGAGCAGGGCAGAGTTAGAGCTGCCACAGTGGGAAG TCTGGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCACAGGCCTGGGGC GAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACC CGGGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTG CGCGCCAAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGG CTGAAGCCTTTCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCT GGTGGAAGATATGCAGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAG GTGCAGGCTGCCGTGGGAACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGA CAACCACTGA
204	APOE2 ch-V1（克赖斯特彻奇，R136S）	ATGAAGGTGCTGTGGGCCGCTCTGCTGGTCACATTTCTGGCCGG CTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGAGCCTGAG CCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAGAGAT GGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGTG CAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGC CAAGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGA AGGAACTGAAGGCCTACAAGAGCGAGCTGGAAGAACAGCTGA CCCCTGTGGCCGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGC TGCAGGCCGCTCAAGCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTG TGCGGCAGACTGGTGCAGTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGC TGGGCCAGTCTACCGAGGAACTGAGAGTGTCTCTGGCCAGCCA CCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGCTGAGAGATGCCGACGAC CTGCAGAAATGCCTGGCCGTGTATCAGGCTGGCGCTAGAGAAG GCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAAGACTGGGCCC TCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTGGGATCT CTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGGCG AGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCA GAGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGC GCGCCAAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGC TGAAGCCTTTCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTG GTGGAAGATATGCAGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGG TGCAGGCTGCCGTGGGAACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGAC

[0108]

		AACCACTGA
205	APOE3 ch-V1（克赖斯特彻奇，R136S）	ATGAAGGTGCTGTGGGCCGCTCTGCTGGTCACATTTCTGGCCGG CTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGAGCCTGAG CCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAGAGAT GGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGTG CAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGC CAAGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGA AGGAACTGAAGGCCTACAAGAGCGAGCTGGAAGAACAGCTGA CCCCTGTGGCCGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGC TGCAGGCCGCTCAAGCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTG TGCGGCAGACTGGTGCAGTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGC TGGGCCAGTCTACCGAGGAACTGAGAGTGTCTCTGGCCAGCCA CCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGCTGAGAGATGCCGACGAC CTGCAGAAAAGACTGGCCGTGTATCAGGCAGGCGCCAGAGAAG GTGCAGAGAGAGGACTGTCTGCCATCAGAGAAAGGCTGGGCCC TCTGGTTGAGCAGGGCAGAGTTAGAGCTGCCACAGTGGGAAGT CTGGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCACAGGCCTGGGGCG AGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCC GGGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGC GCGCCAAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGC TGAAGCCTTTCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTG GTGGAAGATATGCAGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGG TGCAGGCTGCCGTGGGAACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGAC AACCACTGA
206	APOE2-V2	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCCGG CTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGAGCCTGAG CCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAGAGAT GGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGTG CAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGC CAAGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGA AAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGAC CCCTGTGGCCGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCT GCAGGCCGCTCAAGCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGT GCGGCAGACTGGTGCAGTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCT GGGCCAGTCTACCGAGGAACTGAGAGTGCGGCTGGCCAGCCAC CTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGCTGAGAGATGCCGACGACC TGCAGAAATGCCTGGCCGTGTATCAGGCTGGCGCTAGAGAAGG

[0109]

		CGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAAGACTGGGCCCT CTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTGGGATCTC TTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGGCGA GAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAG AGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCG CGCCAAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCT GAAGCCTTTCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGATATGCAGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGAACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACA ACCACTGA
207	APOE3-V2	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCCGG CTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGAGCCTGAG CCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAGAGAT GGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGTG CAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGC CAAGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGA AAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGAC CCCTGTGGCCGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCT GCAGGCCGCTCAAGCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGT GCGGCAGACTGGTGCAGTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCT GGGCCAGTCTACCGAGGAACTGAGAGTGCGGCTGGCCAGCCAC CTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGCTGAGAGATGCCGACGACC TGCAGAAACGCCTGGCCGTGTATCAGGCTGGCGCTAGAGAAGG CGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAAGACTGGGCCCT CTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTGGGATCTC TTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGGCGA GAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAG AGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCG CGCCAAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCT GAAGCCTTTCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGATATGCAGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGAACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACA ACCACTGA
208	APOE2 ch-V2（克赖斯特彻奇，R136S）	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCCGG CTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGAGCCTGAG CCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAGAGAT GGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGTG

[0110]

		CAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGC CAAGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGA AAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGAC CCCTGTGGCCGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCT GCAGGCCGCTCAAGCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGT GCGGCAGACTGGTGCAGTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCT GGGCCAGTCTACCGAGGAACTGAGAGTGTCTCTGGCCAGCCAC CTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGCTGAGAGATGCCGACGACC TGCAGAAATGCCTGGCCGTGTATCAGGCTGGCGCTAGAGAAGG CGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAAGACTGGGCCCT CTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTGGGATCTC TTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGGCGA GAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAG AGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCG CGCCAAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCT GAAGCCTTTCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGATATGCAGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGAACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACA ACCACTGA
209	APOE3 ch-V2（克赖斯特彻奇，R136S）	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCCGG CTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGAGCCTGAG CCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAGAGAT GGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGTG CAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGC CAAGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGA AAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGAC CCCTGTGGCCGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCT GCAGGCCGCTCAAGCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGT GCGGCAGACTGGTGCAGTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCT GGGCCAGTCTACCGAGGAACTGAGAGTGTCTCTGGCCAGCCAC CTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGCTGAGAGATGCCGACGACC TGCAGAAACGCCTGGCCGTGTATCAGGCTGGCGCTAGAGAAGG CGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAAGACTGGGCCCT CTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTGGGATCTC TTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGGCGA GAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAG AGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCG

[0111]

		CGCCAAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCT GAAGCCTTTCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGATATGCAGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGAACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACA ACCACTGA
210	APOE2b - APOE2-Jac -V2（杰克逊维尔，V236E）	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCCGG CTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGAGCCTGAG CCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAGAGAT GGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGTG CAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGC CAAGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGA AAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGAC CCCTGTGGCCGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCT GCAGGCCGCTCAAGCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGT GCGGCAGACTGGTGCAGTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCT GGGCCAGTCTACCGAGGAACTGAGAGTGCGGCTGGCCAGCCAC CTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGCTGAGAGATGCCGACGACC TGCAGAAATGCCTGGCCGTGTATCAGGCTGGCGCTAGAGAAGG CGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAAGACTGGGCCCT CTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTGGGATCTC TTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGGCGA GAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAG AGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGAGGCCGAAGTGCG CGCCAAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCT GAAGCCTTTCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGATATGCAGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGAACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACA ACCACTGA
211	APOE3b - APOE3-Jac -V2（杰克逊维尔，V236E）	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCCGG CTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGAGCCTGAG CCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAGAGAT GGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGTG CAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGC CAAGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGA AAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGAC CCCTGTGGCCGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCT GCAGGCCGCTCAAGCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGT

		GCGGCAGACTGGTGCAGTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCT GGGCCAGTCTACCGAGGAACTGAGAGTGCGGCTGGCCAGCCAC CTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGCTGAGAGATGCCGACGACC TGCAGAAACGCCTGGCCGTGTATCAGGCTGGCGCTAGAGAAGG CGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAAGACTGGGCCCT CTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTGGGATCTC TTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGGCGA GAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAG AGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGAGGCCGAAGTGCG CGCCAAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCT GAAGCCTTTCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGATATGCAGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGAACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACA ACCACTGA
[0112]	212 APOE2-V3	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC CTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA

[0113]

213	APOE3-V3	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC CTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA
214	APOE2 ch-V3（克赖斯特彻奇，R136S）	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGAGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC

[0114]

		CTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA
215	APOE3 ch-V3（克赖斯特彻奇，R136S）	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGAGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC CTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA
216	APOE2b - APOE2-Jac -V3（杰克	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG

[0115]

	逊维尔，V236E）	CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC CTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGAGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA
217	APOE3b - APOE3-Jac -V3（杰克逊维尔，V236E）	ATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACCTTTCTGGCAGG ATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGA GCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCG CTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGG TGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTC CCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATG AAAGAACTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGA CCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT GCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT GTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCC ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGAC CTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC CCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCC CTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCG AGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCG

[0116]

		CGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGAGGCGGAGGTGCG CGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCC GAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGG TGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGT GCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGAC AATCACTGA

[0117] 如本领域已知的,基因产物的表达需要存在表达控制和/或调节序列,如一个或多个启动子和表达所选择的核酸序列所必需的任何其他核酸序列,如内含子,全部可操作地连接至所选择的序列,并且可以包括增强子序列。因此,在一个实施例中,包含编码APOE2和APOE3中的至少一种的表达盒的表达构建体包含启动子。在替代实施例中,如本文所披露的表达盒包含核酸,其包含编码如本文所披露的第一RNA的序列和编码第二RNA的序列,其中第二RNA包含与APOE基因的一部分基本上互补的至少19个核苷酸的指导序列,并且其中第一RNA和第二RNA各自包含发夹;该表达盒进一步包含编码APOE2和APOE3中的至少一种的第二核酸,并且包含一个或多个启动子,优选一个启动子。考虑到与转染和表达相关的后下游加工的能力,诸位发明人将这样的设计鉴定为有利的。

[0118] 启动子

[0119] 包含如上文所定义的用于在哺乳动物细胞中表达的一种或多种表达盒的核苷酸序列进一步优选地包含至少一个哺乳动物细胞相容性表达控制序列(例如,启动子),其可操作地连接至编码目的基因产物的序列,从而形成用于在待通过用目的基因产物的基因疗法治疗的哺乳动物靶细胞中表达目的基因产物的表达盒。许多此类启动子是本领域已知的(参见Sambrook和Russel,2001,同上)。可以使用在许多细胞类型中广泛表达的组成型启动子,如CMV启动子。然而,更优选的将是诱导型、组织特异性、细胞类型特异性或细胞周期特异性的启动子。优选地,使用pol II启动子,如CAG启动子(SEQ ID NO.191)(例如,Miyazaki等人Gene[基因].79(2):269-77;Niwa,Gene[基因].108(2):193-9)、PGK启动子、CMV启动子(如例如在WO 2016102664的图2中所描绘,将其通过援引并入本文)或适配的/合成的启动子(P1,SEQ ID NO.192和P2,SEQ ID NO.193)。由于阿尔茨海默病主要影响脑,使用神经特异性启动子可能特别有用。因此,在一些实施例中,启动子是能够驱动在脑细胞中转录的启动子。合适的神经特异性启动子的实例是神经元特异性烯醇化酶(NSE)、人突触蛋白1、caMK激酶和微管蛋白启动子(Hioki等人Gene Ther.[基因疗法]2007年6月;14(11):872-82)。可以考虑的其他合适的启动子是诱导型启动子,即仅当宿主细胞暴露于一些特定刺激时才启动转录的启动子。

[0120] 如上文所述,用于表达至少APOE的表达盒进一步优选地编码包含在DNA表达盒中的聚A信号,该DNA表达盒可操作地连接至由转基因编码的RNA分子的3'端,如上文所述。优选地,所述聚A信号是猿猴病毒40多腺苷酸化信号(SV40聚A,SEQ ID NO.194)、合成的多腺苷酸化信号、牛生长激素多腺苷酸化信号(BGH聚A)或人生长激素多腺苷酸化信号(HGH聚A)。

[0121] 载体

[0122] 如本文所述的分离的核酸可以单独存在,作为表达盒的一部分和/或作为载体的一部分存在。通常,载体可以是质粒、粘粒、噬菌粒、细菌人工染色体(BAC)或病毒载体(如基

因疗法载体)。可以使用例如转染方法将根据本发明的表达盒或载体转移到细胞中。任何合适的手段都可能足以转移根据本发明的表达盒。优选地,使用将表达盒稳定地转移到细胞中的病毒载体,使得可以实现诱导如上文所述的对APOE基因的序列特异性抑制的双链RNA的稳定表达。合适的载体可以是慢病毒载体、基于逆转录转座子的载体系统或AAV载体。应理解,由于例如慢病毒载体携带RNA基因组,RNA基因组将编码所述表达盒,使得在转导细胞后,形成所述DNA序列和所述表达盒。优选地,使用病毒载体,如AAV。因此,在一些实施例中,如本文所披露的表达盒侧接反向末端重复。优选地,使用的AAV载体是血清型5的AAV载体。血清型5的AAV(也称为AAV5)对于转导人神经元和人星形胶质细胞可能特别有用,如实例中所示。因此,在一些实施例中,存在包含如本文所披露的表达盒的AAV。因此,AAV5可以有效地转导CNS的不同人细胞类型,包括FBN、多巴胺能神经元、运动神经元和星形胶质细胞,因此是将治疗基因递送至CNS以治疗神经系统变性疾病(包括但不限于如本文所述的经由靶向例如APOE治疗阿尔茨海默病)的合适载体候选物。包含任何目的表达盒的AAV载体的产生在以下专利中有充分描述:WO 2007/046703、WO2007/148971、WO 2009/014445、WO 2009/104964、WO 2011/122950、WO 2013/036118,将其以其全文并入本文。

[0123] 可以在本发明中用于产生AAV载体(例如,在昆虫或哺乳动物细胞系中产生)的AAV序列可以衍生自任何AAV血清型的基因组。通常,AAV血清型在氨基酸和核酸水平上具有同源性显著的基因组序列,提供相同的一组遗传功能,产生基本上物理和功能等效的病毒粒子,并且通过实际上相同的机制复制和组装。关于多种AAV血清型的基因组序列和基因组相似性的概述,参见例如GenBank登录号U89790;GenBank登录号J01901;GenBank登录号AF043303;GenBank登录号AF085716;Chlorini等人(1997,J.Vir.[病毒学杂志]71:6823-33);Srivastava等人(1983,J.Vir.[病毒学杂志]45:555-64);Chlorini等人(1999,J.Vir.[病毒学杂志]73:1309-1319);Rutledge等人(1998,J.Vir.[病毒学杂志]72:309-319);和Wu等人(2000,J.Vir.[病毒学杂志]74:8635-47)。AAV血清型1、2、3、4和5是用于在本发明的上下文中使用的AAV核苷酸序列的优选来源。优选地,用于在本发明的上下文中使用的AAV ITR序列衍生自AAV1、AAV2和/或AAV5。同样地,Rep52、Rep40、Rep78和/或Rep68编码序列优选地衍生自AAV1、AAV2和AAV5。然而,用于在本发明的上下文中使用的编码VP1、VP2和VP3衣壳蛋白的序列可以取自已知的42种血清型中的任一种,更优选地取自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9或通过例如衣壳改组技术和AAV衣壳文库获得的新开发的AAV样颗粒。AAV衣壳可以由VP1、VP2和VP3组成,但是也可以由VP1和VP3组成。在一些实施例中,根据本发明的AAV载体包含AAV5或AAV9衣壳蛋白。在一些实施例中,根据本发明的AAV载体包含AAV5衣壳蛋白。在一些实施例中,根据本发明的AAV载体包含AAV9衣壳蛋白。

[0124] 在另一个实施例中,提供了包含根据本发明的所述核酸或所述表达盒的宿主细胞。例如,所述表达盒或核酸可以包含在细菌中包含的质粒中。所述表达盒或核酸也可以包含在产生例如病毒载体的生产细胞中。所述表达盒也可以在杆状病毒载体中提供。

[0125] 如上文所定义的核苷酸序列(包括例如野生型AAV序列)为了在宿主细胞中正确表达而进行的多种修饰是通过应用熟知的遗传工程技术来实现的,这些技术如描述于例如Sambrook和Russell(2001)"Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册](第3版),Cold Spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室],Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],纽约中。编码区的多种另外的修饰是熟练技术

人员已知的,这些修饰可以增加所编码的蛋白质的产量。这些修饰在本发明的范围内。

[0126] 在一个实施例中,任何哺乳动物细胞都可以被本发明的AAV载体感染,例如但不限于肌肉细胞、肝细胞、神经细胞、神经胶质细胞和上皮细胞。在优选实施例中,待感染的细胞是人细胞。

[0127] 应理解,衣壳氨基酸序列和编码它们的核苷酸序列可以被工程化,例如,序列可以是杂合形式或可以是密码子优化的,例如像通过AcmNPv或草地贪夜蛾的密码子使用。衣壳蛋白可以例如经由DNA改组、易错PCR、生物信息学理性设计或位点饱和诱变来工程化。所得衣壳基于现有血清型,但是含有改善此类衣壳的特征的多种氨基酸或核苷酸变化。所得衣壳可以是现有血清型、"改组的衣壳"的不同部分的组合,或者含有完全新颖的变化,即一个或多个氨基酸或核苷酸的添加、缺失或取代,以分组组织或分布在基因或蛋白质的整个长度上。参见例如Schaffer和Maheshri;Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS[第26届IEEE EMBS国际年会论文集]美国加利福尼亚州旧金山;2004年9月1日-5日,第3520-3523页;Asuri等人,2012,Molecular Therapy[分子疗法]20(2):329-3389;Lisowski等人,2014,Nature[自然]506(7488):382-386,通过援引并入本文。

[0128] 在一些实施例中,本发明的AAV载体中的ITR和衣壳蛋白(或其部分)可以来自不同的AAV血清型。通过举例而非限制的方式,ITR可以衍生自AAV2,而衣壳蛋白可以衍生自不同的血清型,例如AAV5或AAV9。

[0129] 组合物

[0130] 在另一方面,本发明涉及药物组合物,该药物组合物包含根据本发明的AAV载体,即包含根据本发明的核酸或根据本发明的表达盒的AAV载体。在一个实施例中,本发明提供了组合物,该组合物包含根据本发明的AAV载体以及合适的赋形剂(如缓冲液和稳定剂、抗氧化剂等)。在一个特定实施例中,使用这些组合物来在体外或离体转导细胞,在这种情况下赋形剂将需要与细胞培养物相容。在其他优选实施例中,组合物用于治疗(人)受试者。为此目的,本发明提供了药物组合物,该药物组合物包含根据本发明的AAV载体以及至少一种药学上可接受的载剂。在AAV基因递送媒介物的情况下,药物组合物典型地包含生理缓冲液(例如像PBS),其包含另外的稳定剂,例如像蔗糖。此类组合物与随后的静脉内、鞘内、实质内、玻璃体内、视网膜下施用器官靶向血管递送(如孔内(intraporal)或冠状动脉内递送或隔离肢体灌注)相容,并且适合并旨在在其中使用。因此,在一些实施例中,本发明提供了用于如本文所披露的用途的根据本发明的核酸、或根据本发明的表达盒、或根据本发明的AAV载体、或根据本发明的药物组合物,其中将核酸、表达盒、AAV载体或药物组合物优选地通过脑内注射、实质内注射、鞘内注射、小脑延髓池内注射、脑室内注射或其组合,更优选地通过对流增强递送施用至中枢神经系统。

[0131] 用途

[0132] 本发明的另一方面涉及根据本发明的AAV载体或包含AAV载体的组合物的用途。在一个实施例中,提供了根据本发明的表达盒、根据本发明的AAV载体或根据本发明的药物组合物,用于作为药剂使用。在另外的实施例中,提供了根据本发明的核酸、根据本发明的表达盒、根据本发明的AAV载体或根据本发明的药物组合物,用于在治疗和/或预防受试者的τ蛋白病的治疗中使用。在另外的实施例中,提供了根据本发明的核酸、根据本发明的表达

盒、根据本发明的AAV载体或根据本发明的药物组合物,用于在治疗和/或预防受试者的阿尔茨海默病中使用。在另外的实施例中,提供了根据本发明的核酸、根据本发明的表达盒、根据本发明的AAV载体或根据本发明的药物组合物,用于作为药剂在治疗中使用,其中受试者是APOE4等位基因的携带者,其中优选地受试者是APOE4等位基因纯合的。

[0133] 宿主细胞和用于产生AAV载体的方法及其试剂盒

[0134] 在另外的方面,本发明涉及用于产生根据本发明的核酸、根据本发明的表达盒、根据本发明的AAV载体或根据本发明的药物组合物的方法。

[0135] 用于产生本发明的核酸的方法包括用于产生核酸的任何方法,包括但不限于从头合成,其全部将是技术人员清楚的。

[0136] 用于产生AAV载体的方法优选地包括以下步骤:a)在使得产生AAV载体的条件下培养如上文所定义的宿主细胞;以及b)任选地,回收、纯化和配制AAV载体中的一种或多种。

[0137] 宿主细胞优选地是适合于产生AAV载体的宿主细胞。因此,宿主细胞是适于体外培养、优选大规模培养的宿主细胞。适合于产生AAV载体的宿主细胞是本领域熟知的,并且将典型地是哺乳动物或昆虫细胞系。用于产生AAV载体的哺乳动物细胞系选自任何哺乳动物物种,包括但不限于诸如以下的细胞:A549、WEHI、3T3、10T1/2、BHK、MDCK、COS1、COS 7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、WI38、HeLa、HEK 293细胞(其表达功能性腺病毒E1)、Saos、C2C12、L细胞、HT1080、HepG2以及原代成纤维细胞、肝细胞和成肌细胞,其衍生自哺乳动物,包括人、猴、小鼠、大鼠、兔和仓鼠。提供细胞的哺乳动物物种的选择不是本发明的限制;哺乳动物细胞的类型(即,成纤维细胞、肝细胞、肿瘤细胞)也不是本发明的限制。用于产生AAV载体的哺乳动物细胞系特别包括广泛范围的HEK293细胞系,其中优选的是HEK293T细胞系。

[0138] 用于产生AAV载体的昆虫细胞系可以是适合于产生异源蛋白的任何细胞系。优选地,昆虫细胞允许杆状病毒载体的复制,并且可以维持在培养物中、更优选悬浮培养物中。在优选实施例中,昆虫细胞允许重组细小病毒载体(包括rAAV载体)的复制。例如,所使用的细胞系可以来自草地贪夜蛾、果蝇或蚊子,例如白纹伊蚊衍生的细胞系。优选的昆虫细胞或细胞系是来自易受杆状病毒感染的昆虫物种的细胞,包括例如S2(CRL-1963,ATCC)、Se301、SeIZD2109、SeUCR1、Sf9、Sf900+、Sf21、BTI-TN-5B1-4、MG-1、Tn368、HzAm1、Ha2302、Hz2E5、High Five(英杰公司(Invitrogen),美国加利福尼亚州)和*expres*SF+®(US 6,103,526;蛋白质科学公司(Protein Sciences Corp.),美国康涅狄格州)。

[0139] 因此,在一个实施例中,表达盒或构建体是昆虫细胞相容性载体或哺乳动物细胞相容性载体。“哺乳动物细胞相容性载体”应被理解为能够生产性转化或转染哺乳动物细胞或细胞系的核酸分子。哺乳动物细胞相容性载体是本领域熟知的。“昆虫细胞相容性载体”应被理解为能够生产性转化或转染昆虫或昆虫细胞的核酸分子。示例性昆虫细胞相容性载体包括质粒、线性核酸分子和重组病毒(如杆状病毒)。可以采用任何载体,只要它是昆虫细胞相容的。哺乳动物或昆虫细胞相容性载体可以整合到细胞的基因组中,但是载体在细胞中的存在不需要是永久的,并且还包括瞬时附加型载体。载体可以通过任何已知的手段引入,例如通过细胞的化学处理、电穿孔或感染引入。

[0140] 可以使用本领域技术人员已知的合适技术回收和/或纯化上清液中的AAV。例如,整体柱(例如,以离子交换、亲和或IMAC模式)、色谱法(例如,捕获色谱法、固定方法色谱法和膨胀床色谱法)、离心、过滤和沉淀可以用于纯化和浓缩。这些方法可以单独或组合使用。

在一个实施例中,捕获色谱方法(包括基于柱的或基于膜的系统)与过滤和沉淀组合利用。本领域技术人员可以容易地选择合适的沉淀方法,例如利用聚乙二醇(PEG)8000和NH_3SO_4。此后,可以将沉淀物用benzonase处理并且使用合适的技术纯化。此外,回收可以优选地包括使用抗AAV抗体(优选固定化抗体)亲和纯化重组细小病毒(rAAV)载体(包含其的病毒粒子)的步骤。抗AAV抗体优选地是单克隆抗体。特别合适的抗体是单链骆驼科抗体或其片段,如例如可从骆驼或美洲驼获得(参见例如Muyldermans,2001,Biotechnol.[生物技术]74:277-302)。用于rAAV的亲和纯化的抗体优选地是特异性结合AAV衣壳蛋白上的表位的抗体,由此优选地表位是存在于多于一种AAV血清型的衣壳蛋白上的表位。例如,可以基于与AAV2衣壳的特异性结合来产生或选择抗体,但是同时它还可以与AAV1、AAV3和AAV5衣壳特异性结合。

[0141] 通常,用于在哺乳动物或昆虫宿主细胞中产生根据本发明的AAV载体的合适方法以及因此的手段(如用于表达AAV rep蛋白的表达构建体)描述于以下文献中,对于哺乳动物细胞:Clark等人(1995,Hum.Gene Ther.[人类基因疗法]6,1329-134)、Gao等人(1998,Hum.Gene Ther.[人类基因疗法]9,2353-2362)、Inoue和Russell(1998,J.Virol.[病毒学杂志]72,7024-7031)、Grimm等人(1998,Hum.Gene Ther.[人类基因疗法]9,2745-2760)、Xiao等人(1998,J.Virol.[病毒学杂志]72,2224-2232)和Judd等人(Mol Ther Nucleic Acids.[分子疗法-核酸]2012;1:e54),并且对于昆虫细胞:Urabe等人(2002,Hum.Gene Ther.[人类基因疗法]13:1935-1943)、WO 2007/046703、WO 2007/148971、WO 2009/014445、WO 2009/104964、WO 2011/122950、WO 2013/036118、WO 2015/137802、WO 2019/016349以及共同未决申请EP 21177449.2、PCT/EP2021/058794和PCT/EP2021/058798,将其全部以其全文并入本文。

[0142] 在另外的方面,提供了试剂盒,该试剂盒包含根据本发明的核酸、根据本发明的表达盒、根据本发明的AAV载体或根据本发明的药物组合物,其中试剂盒进一步包含免疫抑制剂。

[0143] 在本发明的某些实施例中,免疫抑制化合物可以减少和/或预防通过施用本发明的核酸、AAV载体或药物组合物诱导的免疫应答。

[0144] 在另一方面,本发明涉及包含本发明的核酸或本发明的AAV的细胞,或宿主细胞。

[0145] 在一些实施例中,本发明的细胞是原核生物细胞。在一些具体实施例中,本发明的细胞是细菌细胞。在一些实施例中,本发明的细胞是真核生物细胞。在一些实施例中,本发明的细胞是哺乳动物细胞。在一些实施例中,本发明的细胞是昆虫细胞。

[0146] 本发明的核酸或本发明的AAV载体可以通过任何合适的方法递送到本发明的细胞中,这些方法包括但不限于转染、转化、转导、核转染、电穿孔、显微注射。例如,本发明的表达盒或核酸可以包含在细菌中包含的质粒中。本发明的表达盒或核酸也可以包含在产生例如病毒载体的生产细胞中。所述表达盒也可以在杆状病毒载体中提供。

[0147] 关于包含根据本发明的AAV载体的宿主细胞的进一步细节已经在本申请的其他地方提供。任何哺乳动物细胞都可以被本发明的AAV载体感染,包括但不限于肌肉细胞、肝细胞、神经细胞、神经胶质细胞或上皮细胞。在本发明的一些优选实施例中,待感染的细胞是人细胞。

[0148] 在另一方面,本发明涉及治疗或预防障碍的方法,其中该方法包括向受试者施用

本发明的核酸或本发明的AAV,从而治疗或预防障碍。

[0149] 在另一方面,本发明涉及本发明的核酸或本发明的AAV,用于在制造用以治疗如本文详述的障碍的药剂中使用。

[0150] 上文已经参考如附图中所示的多个示例性实施例描述了本发明。一些部分或要素的修改和替代实施方式是可能的,并且包括在如所附权利要求所定义的保护范围内。

[0151] 实例

[0152] 材料和方法

[0153] 靶向APOE的miRNA指导链的设计

[0154] 设计靶向人APOE转录物之一的编码或非编码RNA序列的miAPOE miRNA指导链(图1,SEQ ID NO.1)。鉴定人与非人灵长类动物之间保守的区域,并且选择22nt的靶序列(SEQ ID NO.2-93,表1),以产生不同的miRNA指导链(SEQ ID NO.94-185,表2)。设计加扰的miRNA指导链以产生阴性对照(SEQ ID NO.186-189)。此外,将先前为不同研究程序设计的加扰miRNA指导物(SEQ ID NO.294)用于体内测试。

[0155] DNA构建体

[0156] 将miAPOE和加扰的对照指导序列嵌入人前miR-451支架中(图2a,SEQ ID NO.190),侧接178或206nt的5'侧翼序列和139或205nt的3'侧翼序列。前miAPOE盒从融合至鸡β-肌动蛋白启动子(CAG启动子,SEQ ID NO.191)或适配的/合成的启动子(P1,SEQ ID NO.192和P2,SEQ ID NO.193)的CMV即早期增强子表达,并且以猿病毒40多腺苷酸化信号(SV40聚A,SEQ ID NO.194)终止。

[0157] APOE转基因从CAG启动子(SEQ ID NO.191)或适配的/合成的启动子(P1,SEQ ID NO.192和P2,SEQ ID NO.193)表达,并且以SV40聚A(SEQ ID NO.194)终止。使用来自赛默飞世尔公司(ThermoFisher)的在线密码子优化工具针对智人对APOE序列进行密码子优化,并且在密码子优化期间NheI、NotI和SpeI位点保持完整。将miAPOE(SEQ ID NO.108、116、146)或加扰的阴性对照(SEQ ID NO.186)和APOE转基因(SEQ ID NO.195、197、200、196、198、201、206、208、210、207、209、211、214、216、216)组合以促进同时敲减APOE4和过表达保护性APOE变体(组合方法)。用添加的5'(BlpI)和3'(EcoRV)序列合成含有P2启动子的内含子元件的携带前miAPOE盒和APOE转基因盒的质粒DNA构建体,并且由金唯智公司(Genewiz)(安升达生命科学公司(Azenta Life Sciences))对其进行亚克隆。组合方法构建体的表达由P4启动子(P3,SEQ ID NO.232加内含子元件,SEQ ID NO.231)驱动,并且以SV40聚A信号(SEQ ID NO.194)终止。通过测序确认每个构建体身份。

[0158] 产生含有融合至海肾萤光素酶(RL)基因的互补APOE靶区(1166bp,SEQ ID NO.218)的APOE4萤光素酶报告物(图3)。用添加的5'(XhoI)和3'(PmeI)序列合成所述靶区序列,并且由金唯智公司(安升达生命科学公司)将其克隆到psiCHECK-2载体(普洛麦格公司(Promega),威斯康星州麦迪逊)的海肾萤光素酶(RL)基因的3'UTR中。

[0159] AAV5载体

[0160] 通过用两种杆状病毒(一种编码Rep/Cap组合,且第二种携带转基因构建体)感染无血清SF+昆虫细胞(蛋白质科学公司,美国康涅狄格州梅里登)来产生重组AAV5颗粒。在快速蛋白质液相色谱系统(AKTA Avant 150,通用电气医疗集团(GE Healthcare))上使用AVB琼脂糖(通用电气医疗集团)进行标准蛋白质纯化程序后,使用QPCR确定纯化的AAV的滴度。

[0161] 还通过用编码Rep-Cap和转基因的两种质粒(西瑞恩生物科技公司(Sirion Biotech))对HEK293T细胞进行PEI转染来产生重组AAV5和AAV9。在用POROS™ CaptureSelect™ AAV-X树脂(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))初级捕获和碘克沙醇梯度进行两步纯化后,使用QPCR确定纯化的AAV的滴度。

[0162] 转染实验

[0163] 将人肝细胞癌(Huh7)、人胚肾293T(HEK293T)或U118星形细胞瘤细胞维持在补充有10%胎牛血清而无抗生素的杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)中。在转染或转导实验前一天,将细胞以1E+05个细胞/孔的密度接种在24孔板中。

[0164] 根据制造商的方案,使用Lipofectamine®2000或Lipofectamine®3000进行转染。

[0165] 萤光素酶测定

[0166] 用miAPOE或组合构建体连同萤光素酶报告物共转染HEK293T细胞,这些萤光素酶报告物含有融合至APOE靶序列的RL基因和萤火虫萤光素酶(FL)基因两者。添加pBluescript以转移等量的DNA。转染后48小时通过在室温下轻轻摇动15分钟在100μl 1x被动裂解缓冲液(普洛麦格公司,赛默飞世尔科技公司)中收获转染的细胞。将细胞裂解物以4,000rpm离心5分钟,并且用双萤光素酶报告物测定系统(普洛麦格公司,赛默飞世尔科技公司)使用10μl上清液来测量FL和RL活性。将相对萤光素酶活性计算为RL与FL活性之间的比率。

[0167] 转导实验

[0168] 对于转导,在转导前1天,将HEK293T细胞以1E+05个细胞/孔的密度接种在24孔板中。第二天,将细胞与AAV载体以1E+04、1E+05E和1E+06gc/细胞的感染复数(MOI)一起孵育。转导后2天收获细胞和培养上清液。

[0169] 为了转导U-118 MG细胞(ATCC®HTB-15™),在转导前1天,将细胞以2.63E+4个细胞/cm^2的密度接种在12孔或24孔板中。第二天,将细胞与AAV载体以1.55E+06gc/细胞的感染复数(MOI)一起孵育。转导后2天更换细胞培养基,并且转导后3天收获细胞用于分离DNA和RNA。

[0170] 使用低温粉碎系统粉碎小鼠组织

[0171] 使用自动化低温样品粉碎系统粉碎冷冻的组织样品。用CryoPREP系统型号CP02(科瓦里斯公司(Covaris))通过施加一个或几个不同冲击力的冲头来压碎快速冷冻的组织。在每次冲击之前和之后,将具有组织的tissueTUBE(科瓦里斯公司)浸入液氮中,重复该程序直到样品被粉碎。将粉末在-80℃下储存在冷冻小瓶(科瓦里斯公司或康宁公司(Corning))中直到进一步使用(例如,DNA和RNA提取、裂解物产生用于APOE蛋白测量)。

[0172] 载体DNA和mRNA分离和量化

[0173] 根据制造商的说明书,使用All prep 96 DNA/RNA分离试剂盒(凯杰公司(Qiagen),80311)、All Prep DNA/RNA迷你试剂盒(凯杰公司,80204)或MagMAX™ mirVana™总RNA分离试剂盒(赛默飞世尔科技公司)进行用于体外实验的DNA和RNA提取。根据制造商的方案,将细胞收获在裂解缓冲液中。

[0174] 使用All prep 96DNA/RNA分离试剂盒(凯杰公司,80311)或All Prep DNA/RNA迷你试剂盒(凯杰公司,80204)进行用于体内实验的DNA和RNA提取。通过将粉碎的组织添加到具有提供的RLT裂解缓冲液和β巯基乙醇(西格玛公司(Sigma))的Lysing Matrix D管(MP生

物医学公司(MP Biomedicals))中并根据制造商的方案在TissueLyser II(凯杰公司)中以30Hz的频率匀化60秒来产生组织裂解物。

[0175] 用分光光度计(NanoPhotometer®N120(因普兰公司(IMPLEN))或Take3微体积板中的Synergy HT(伯腾公司(BioTek))或NanoDrop One或2000(赛默科技公司(Thermo Scientific)))一式两份地量化DNA和RNA浓度和纯度比。将样品储存在-80℃下直到进一步使用。

[0176] 在提取后,将DNA浓度归一化以确保用于定量聚合酶链式反应(qPCR)的输入相等。通过使用TaqMan qPCR测定(SEQ ID NO.219-222和SEQ ID NO.277;表4)使用线性化质粒标准系(5E+0至5E+7)和ACTB TaqMan[人ACTB引物/探针混合物Hs01060665_g1(赛默飞世尔科技公司)]和(SEQ ID NO.225-227;表4)或SybrGreen qPCR(SEQ ID NO.223-224;表4)测定作为加载对照量化载体基因组拷贝。

[0177] 在提取后,在DNA酶处理前将RNA浓度归一化,以确保用于cDNA合成和随后qPCR的输入相等。通过使用RNA分离试剂盒(赛默飞世尔科技公司)中提供的TURBO DNAse™或与Maxima第一链cDNA合成试剂盒(K1672)一起提供的DNA酶进行分离的RNA的DNA酶处理,对于cDNA合成,根据制造商的说明书使用Maxima第一链cDNA合成试剂盒(赛默飞世尔科技公司)。使用单一或双重qPCR量化WT以及密码子优化的变体V2和V3 APOE mRNA表达,该单一或双重qPCR使用TaqMan qPCR测定(对于WT APOE为SEQ ID NO.228-230,并且对于密码子优化的变体为SEQ ID NO.287-291;表4)和β-肌动蛋白ACTB TaqMan[人ACTB引物/探针混合物Hs01060665_g1(赛默飞世尔科技公司)、小鼠ACTB引物/探针混合物mm01205647_g1(赛默飞世尔科技公司)]或SybrGreen qPCR测定(SEQ ID NO.223-224;表4)作为用于归一化的参考基因来进行。使用ddCT(利瓦克方法(Livak's Method))或使用线性化质粒标准系(1E+8至1E+3或1E+2)计算绝对或相对基因表达水平。

[0178] 使用QuantStudio 5实时PCR系统或7500快速实时PCR系统(赛默飞世尔公司)进行qPCR。通过计算标准系最低点的平均Ct值处的拷贝量来确定定量下限(LLOQ),并且根据所使用的(c)DNA的输入(ng)进行校正。

[0179] 表4.引物和探针。

[0180]

SEQ ID NO.	ID	序列
219	pr 启动子 FW	5'-AGTAACGCCAATAGGGACTTTC-3'
220	pr 启动子 RV	5'-GGCGTACTTGGCATATGATACA-3'
221	pBb 启动子 Cy5	Cy5 5'-TTACGGTAAACTGCCCACTTGGCA-3' MGBNFQ
222	pBb 启动子 FAM	FAM 5'-CTA GCG TGT AGA CTC T-3' MGBNFQ
223	prhACTB FW	5'-AGGTGCACAGTAGGTCTGAACAGA-3'
224	prhACTB RV	5'-TGCAAAGAACACGGCTAAGTGT-3'
225	prmsACTB FW	5'-GACACTGGCACSGCCAACTTT-3'
226	prmsACTB RV	5'-GTGTCTACACCGCGGGAATG-3'
227	pbmsACTB FAM	FAM 5'-CTA GCG TGT AGA CTC T-3' MGBNFQ
228	prAPOE FW	5'- GGAACTGAGGGCGCTGATG -3'
229	prAPOE RV	5'- GCCTGCAGCTCCTTGGAC -3'
230	pbAPOE	Cy5 5'- TCG GAA CTG GAG GAA CAA CTG ACC -3' MGBNFQ
277	pBb 启动子 56FAM	56FAM/TTACGGTAA/ZEN/ACTGCCCACTTGGCA/3IABkFQ
287	prAPOE coV2 FW	GACCCAAGAGCTGAGAGCC
288	prAPOE coV2 RV	CTGCAGCTCTTTGCTCAGTCTG
289	prAPOE coV3 FW	GGAACTGAGGGCGCTGATG
290	prAPOE coV3 RV	GCCTGCAGCTCCTTGGAC
291	pbAPOE co	FAM 5'-AAG AAC TCA AAG CTT ATA AGA GC-3' MGBEQ

[0181] miRNART-qPCR和量化

[0182] 根据制造商的说明书,使用Maxima第一链cDNA合成试剂盒(赛默飞世尔科技公司)和大肠杆菌聚(A)聚合酶试剂盒(新英格兰生物实验室(New England Biolabs))进行来自体内实验的分离的RNA的DNA酶处理和cDNA合成。对于逆转录,利用表5中所指示的RT引物。

[0183] 采用对每种miRNA具有特异性的SybrGreen qPCR测定(表5中的SEQ ID NO.278-286和SEQ ID NO.292-293)量化miRNA表达。对于体内hAPOE4-Tr小鼠研究,使用分别从每种RNA寡核苷酸获得的标准系计算相对miRNA表达(对于miAPOE-016、miAPOE-037和miAPOE-145为22NT,并且对于miSCR1-C90为23NT)。基于体外小RNA测序数据,针对体内WT小鼠研究优化测定,并且从具有丰度最高亚型大小的RNA寡核苷酸产生标准系(对于miAPOE-016为24NT,对于miAPOE-037为25NT,对于miAPOE-145为24NT,并且对于miAPOE_SCR为23NT)。

[0184] 定量下限(LLOQ)是样品中分析物的最低量,其可以以可接受的精度水平可靠地量化。这是使用标准系的下点(可靠地可量化的)并获得每ng RNA对应的拷贝来计算的。

[0185] 检测下限(LLOD)是样品中分析物的最低量,其可以可靠地检测但不一定量化。这是使用机器可检测到的最低Ct值并获得每ng RNA的对应拷贝来计算的。

[0186] 表5.用于miRNART-qPCR和量化的引物列表。

[0187]

SEQ ID NO.	ID	序列(5'->3')
278	RT引物	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTVN
279	prmiAPOE16FW22	AGCACAGAACCTTCATCTTC
280	prmiAPOE16RV22	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTGCAG
281	prmiAPOE37FW222324	GTGACCAGCAACGCA
282	prmiAPOE37RV23	AGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAGG
283	prmiAPOE145FW222324	CAGTCCAGTTCCGATTTGTAG
284	prmiAPOE145RV23	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTGAG
285	miSCR1-C9O_23nt-FW	AGGCGACTTGTAACGTCA
286	miSCR1-C9O_23nt-RV	CAGTTTTTTTTTTTTTTTACGCCTCT
292	prmiAPOESCRFW222324	CGCGTTCTCGCTGTTC
293	prmiAPOESCRRV22	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAGTC

[0188] 用于小RNA测序和聚A富集的mRNA测序的RNA分离

[0189] 对于体内,使用TissueLyser II(凯杰公司)在具有RLT裂解缓冲液和β巯基乙醇(西格玛公司)的Lysing Matrix D管(MP生物医学公司)中以30Hz的频率将粉碎的组织裂解60秒。根据制造商的方案,使用miRNeasy组织/细胞高级迷你试剂盒(凯杰公司)提取RNA。对于体外,收获转导的细胞,并且将其在TRIzol™试剂(英杰公司)中裂解。根据制造商的方案,使用Direct-zol™ RNA MiniPrep试剂盒(泽漠研究公司(Zymo Research)R2052)提取RNA。通过一式两份地测量核酸浓度和纯度比用NanoDrop™ One(赛默科技公司)进行RNA量化。在运送前使用安捷伦高灵敏度RNA筛选带(安捷伦公司(Agilent))分析RNA样品的质量。将样品储存在-80℃下,并且在干冰上运送至GenomeScan公司用于小RNA测序(Illumina NovaSeq6000测序,配对端,150bp。每个样品约3Gb,1000万个配对端读段)和聚A富集的mRNA测序(Illumina NovaSeq6000测序,配对端,150bp。每个样品约9Gb,3000万个配对端读段)。

[0190] RNAseq数据分析

[0191] 原始RNASeq数据由GenomeScan公司提供。对于数据分析,使用CLC Genomics Workbench 21.0.5版。对于体内和体外衍生的样品(分别给药hAPOE4-Tr小鼠尾皮质或转导的U-118MG细胞)两者的小RNA测序分析,将获得的数据比对并关于miAPOE或miSCR参考序列(SEQ ID no.295-297;表7)加注释。鉴定成熟miRNA亚型的长度和匹配,并且将其丰度计算为映射到参考miAPOE或miSCR序列的总读段的百分比。在分析期间,为方便起见,取成熟形式的2%为阈值。使用CLC Genomics Workbench Toolbox进行小RNA测序分析,通过校正读段(以每百万计数(CPM)计)进行内源表达的miRNA水平连同miAPOE或miSCR转录物水平的排序。将miR-29a-3p和miR-16-5p用作内部对照,其是在脑中表达的miRNA。

[0192] 对于体外衍生的样品(转导的U-118MG细胞)的mRNA测序分析,将获得的数据比对并关于宿主物种(对于转导的U-118MG实验为智人)加注释。使用CLC Genomics Workbench Toolbox得到用于RNA-Seq的差异表达,其中将从用AAV5组合方法或单一构建体转导的样品获得的数据集与从用AAV5-miSCR(对照)转导的样品获得的数据集进行比较。

[0193] 表7.miAPOE和miSCR参考序列

[0194]

SEQ ID NO.	ID	序列
295	miAPOE_016	CACAGAACCTTCATCTTCCTGCGAAGATGAAGGTTCTGT
296	miAPOE_037	AATGTGACCAGCAACGCAGCCCTGCGTTGCTGGTCACAT
297	miAPOE_145	TCCAGTTCCGATTTGTAGGCCTCTACAAATCGGAACTGG
298	miC9o_SCR	GCGACTTGTAACGTCAGAGGCGTCTGACGTTACAAGTCG
299	miAPOE_SCR	ATCGCGTTCTCGCTGTTCGACTGAACAGCGAGAACGCG

[0195] APOE蛋白测量

[0196] 使用人载脂蛋白E(APOE)ELISA试剂盒(ab108813,艾博抗公司(Abcam))来量化细胞培养上清液中的APOE浓度。此试剂盒识别所有三种人APOE亚型(APOE2、APOE3和APOE4)。测试细胞培养上清液样品的若干稀释液以在所提供的标准范围内准确地测量。对于用APOE表达构建体转染的HEK293T细胞,将细胞培养上清液在提供的ELISA测定缓冲液中稀释100倍。在样品制备后,使用试剂盒的提供的方案来测量APOE并且使用PRISM中的四参数逻辑曲线拟合来量化浓度。

[0197] 使用人载脂蛋白E(APOE)MSD R-PLEX测定(K1512IR-2,中尺度发现公司(Meso Scale Discovery))来量化组织裂解物中的APOE浓度。将组织在MSD Tris裂解缓冲液(R60TX-2,中尺度发现公司)中裂解,并且使用Pierce™ 660nm蛋白质测定试剂(22660,赛默飞世尔公司)校正总蛋白质浓度。将2mg/ml总蛋白的裂解物在MSD稀释剂100(R50AA-2,中尺度发现公司)中稀释50倍。在样品制备后,使用试剂盒的提供的方案来测量APOE并且使用MSD Discovery Workbench(软件版本4.0)来量化浓度。

[0198] 磷酸化τ蛋白(pTau181)和总τ蛋白测量

[0199] 使用人pTau181 MSD S-PLEX测定(K151AGMS,中尺度发现公司)来量化pTau181蛋白浓度,并且使用多点磷酸化(Thr231)/总τ蛋白测定(K15121D,中尺度发现公司)来测量小鼠海马组织裂解物中的总τ蛋白。将组织在MSD Tris裂解缓冲液(R60TX-2,中尺度发现公司)中裂解,并且使用Pierce™ 660nm蛋白质测定试剂(22660,赛默飞世尔公司)对总蛋白质浓度进行归一化。将海马裂解物在dPBS中稀释10000倍用于pTau181测定,或在dPBS中稀释200倍用于总τ蛋白测定。然后将样品在与各自的试剂盒一起提供的封闭缓冲液中进一步稀释2倍。在样品制备后,使用MSD Methodological Minds软件,使用两种试剂盒的提供的方案来测量pTau181和总τ蛋白浓度,并且使用MSD Discovery Workbench(软件版本4.0)进行进一步处理。

[0200] SDS-PAGE和蛋白质印迹

[0201] 在1x Laemmli样品缓冲液(1610747;伯乐公司(Bio-Rad))中制备样品,并且将其加热至95℃持续5分钟。将蛋白质在Mini-PROTEAN TGX免染蛋白凝胶4%-20%(4568093;伯乐公司)上分离,并且使用Trans-blot Turbo Mini PVDF转移包(1704156;伯乐公司)和Trans-Blot Turbo™ 转移系统(1704150;伯乐公司)转移到PVDF膜上。

[0202] 将PVDF膜用SuperBlock T20(PBS)封闭缓冲液(37516;伯乐公司)封闭,并且用封闭缓冲液中的一抗染色。在用磷酸缓冲盐水(PBS)中的0.5% Tween-20洗涤后,将膜与封闭缓冲液中的二抗一起孵育。在用PBS-0.5% Tween20充分洗涤后,使用SuperSignalTM West

Pico PLUS化学发光底物(34580;赛默科技公司)和ChemiDoc Touch凝胶成像系统(1708370;伯乐公司)使蛋白质可视化。

[0203] 使用针对各自的蛋白质的以下一抗和二抗:APOE(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich);HPA065539和HPA068768)、多克隆山羊抗兔免疫球蛋白-HRP(达科公司(DAKO),P0448)(达科公司)、多克隆兔抗小鼠免疫球蛋白-HRP(达科公司,P0260)

[0204] 将已知浓度的重组人APOE蛋白(西格玛奥德里奇公司;SRP4760、SRP4696、A3234)或来自人血浆的载脂蛋白E(西格玛奥德里奇公司;SRP6303)用作参考。

[0205] 动物研究

[0206] 为了研究miAPOE的效力,使用携带人APOE4基因的转基因模型B6.129P2-APOE$^{tm3(APOE*4)Mae}$ N8。在八周龄时,通过单次双侧纹状体内(IS)施用空AAV5、AAV5-miSCR(SEQ ID NO.186)、或AAV5-miAPOE_016(SEQ ID NO.108)(中等剂量和高剂量)、或AAV5-miQURE-miAPOE_037(SEQ ID NO.116)(中等剂量和高剂量)、或AAV5-miAPOE_145(中等剂量和高剂量)、或AAV9-miAPOE_145(中等剂量和高剂量)(SEQ ID NO.146)对雄性B6.129P2-Apoe$^{tm3(APOE*4)Mae}$ N8小鼠进行处理。每组含有8只动物。在处理前确定体重(个体),之后每周确定一次。在处理前,处理后3、6和8(处死)周,对小鼠进行血液样品收集以制备血浆。在收集的血浆样品中确定所有时间点的血浆总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)(全部都是每只个体小鼠)。处理后8周处死小鼠。收集多个器官和CSF用于通过qPCR分析AAV转导、APOE mRNA表达、hAPOE4表达水平和miAPOE转基因表达。

[0207] 为了研究APOE3ch在C57Bl6小鼠中的表达,向每组8只小鼠注射单次双侧纹状体内剂量的媒介物、AAV5或AAV9载体,或脑室内注射单次双侧剂量的AAV5或AAV9载体。所有AAV载体都携带具有双HA标签的APOE3ch表达盒。在给药前、施用后2周和4周(处死)取血液样品。在处理后第4周,处死动物。在灌注后,为每只动物取末梢血和CSF样品。收集每组5只动物的几个脑区、脊髓和肝脏,并且将其快速冷冻。对于每组3只动物,将脑固定用于免疫组织化学和FISH目的。

[0208] 通过单次双侧纹状体内注射AAV载体来评估编码不同APOE变体的AAV5载体改变τ蛋白病模型P301S小鼠(PS19,JAX品系:008169)的表型的功效。将在8周龄时对每组十二只雄性小鼠进行处理。将在处理前测量体重,之后每周测量一次。将在处理前以及处理后第2、4、12和20周取血液样品。将针对以下参数从血浆中分析一组标记物:末梢血浆样品上的LDL、HDL、胆固醇和甘油三酯。将对小鼠进行行为测试以评估运动和认知功能。在处理后28周处死时,将收集末梢血和CSF样品。将收集每组8只小鼠的动物的几个不同的脑区、不同的脊髓段和肝脏,并且将其快速冷冻。将灌注并固定剩余的4只动物的脑用于IHC和FISH目的。

[0209] 在WT小鼠中通过单次双侧纹状体内施用AAV载体来评估与单一构建体相比通过组合方法构建体实现的转基因的体内表达水平。在八周龄时对每组六只小鼠进行处理。处理后一个月处死动物。收集每组5-6只动物的多个脑区和肝脏,并且将其快速冷冻。

[0210] 在也携带hAPOE4(B6.129P2-$^{APOEtm3(APOE*4)Mae\ N8}$)的τ蛋白病模型P301S小鼠(PS19,JAX品系:008169)中使用AAV载体的单次双侧纹状体内施用来评估与单一构建体相比编码衍生自组合方法构建体的转基因的AAV的体内表达水平和对τ蛋白病的影响。在八周龄时对每组六只小鼠进行处理。处理后几个月处死动物。收集每组所有动物的多个脑区、肝脏和生物流体,并且将其快速冷冻。

[0211] miAPOE指导物的潜在脱靶转录物的计算机模拟评估

[0212] 使用针对人参考转录组的BLASTN(经由ENSEMBL,https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/Blast,关于说明参见表8,Bedell等人,2003)进行miAPOE miRNA指导序列的计算机模拟脱靶预测,以鉴定与22个核苷酸的miAPOE指导序列(SEQ ID NO.108、116和146)部分互补的转录物。

[0213] 表8:用于计算机模拟脱靶预测的BLASTN说明

[0214]

检索灵敏度:	短序列
检索类型	BLASTN
报告的最大命中数量	100
报告比对的最大E值	1000
用于为比对加种的字长	7
匹配/错配得分	1,-3
过滤低复杂度区	否
使用Repeat masker过滤查询序列	是

[0215] 使用“siRNA Seed Potential of Off-Target Reduction”工具(siSPOTR,Boudreau等人,2013)来预测miAPOE miRNA指导种子序列(核苷酸2-8)与脱靶转录物的结合。

[0216] 结果

[0217] 实例1:在APOE4 Luc报告物系统上miAPOE构建体的体外测试

[0218] 为了测试设计的miAPOE构建体的敲减效率,用miAPOE(SEQ ID NO.94-185)表达构建体和携带互补APOE靶区(SEQ ID NO.2-93)的APOE4萤光素酶报告物共转染HEK293T细胞。

[0219] 首先,由于miR-144(SEQ ID NO.235)的外源表达将导致副作用(例如,miR-144靶标接合)(Huang等人2021;H.Li等人2016;Lin等人2020),设计在支架内引入修饰以消除miR-144表达的新型策略。工程化miR-144(SEQ ID NO.236)发夹的突变型形式,其中在距Drosha切割位点的位置5处的腺苷被胸苷(T)取代,在切割位点附近产生凸起,其破坏miR-144的表达(S.Li等人2020,2021)。

[0220] 在距Drosha切割位点的位置4-8处引入的任何错配、凸起或GU摆动都损害Drosha的酶活性。4-8段内的双和三错配、凸起或摆动进一步降低Drosha的活性。因此,miR-144的4-8个核苷酸段内的任何以下SNP及其组合都可以改变(前体)miR-144表达。这些突变包括位置4处的U>G,和/或位置5处的A>U或G,和/或位置6处的U>A,和/或位置7处的C>G或U,和/或位置8处的A>U或G。

[0221] 接下来,产生表达来自miR-451的合成miRNA6(=miHTT)的一组支架,miRNA6表达为单个发夹(SEQ ID NO.238)或与miR-144野生型(miR-144WT辅助物)(SEQ ID NO.239)或miR-144突变型(miR-144A>T辅助物)(SEQ ID NO.240)相混。通过小RNA测序在不同支架中评估miRNA6表达(图3A)。引入的凸起消除miR-144 5p和3p表达,而不影响其对miR-451的辅助功能,如通过当与miR-144WT辅助物或miR-144A>T相混时miRNA6的表达值保持不受影响所示(图3A)。

[0222] 此后,还分析了从miR-451支架(不具有和具有miR-144A>T辅助物)(SEQ ID NO.190)表达的一批不同合成miRNA序列(SEQ ID NO.241-248)的表达值,证实了在miR-

144A>T(SEQ ID NO.236)的存在下miR-451表达的合成miRNA的出乎意料且巨大的改善(图3B)。因此,突变型辅助miR-144的使用使得能够利用miR-144-miR-451活性而不表达不想要的微RNA,并且允许较高的合成miRNA表达水平。因此,选择miR-144A>T突变型-miR-451簇用于使用。

[0223] 在用250ng miAPOE(SEQ ID NO.94-185)或miSCR构建体(SEQ ID NO.186-189)和50ng报告物构建体共转染的HEK293T细胞上进行初步筛选。转染后两天,收获细胞以测量萤光素酶表达。将在miSCR的存在下的萤光素酶表达设定为100%。

[0224] 与miSCR构建体(SEQ ID NO.186)相比,大多数转染的miAPOE构建体显示出相对萤光素酶活性的降低。具有SEQ ID NO.96、105、106、108、113、115、116、131、132、133、134、135、136、137、139、146、149的miAPOE导致报告物活性敲减≥70%(图4)。

[0225] 为了进一步准确地确定miAPOE构建体的效力,在滴定实验中使用2、10或50ng miAPOE(SEQ ID NO.96、99、100、105、106、108、109、113、114、115、116、117、131、132、133、134、135、136、137、139、143、146、149、151、185)或miSCR构建体(SEQ ID NO.186)和10ng报告物构建体测试具有更多≥60%敲减效率的有效miAPOE构建体(n=2)。将在miSCR的存在下的萤光素酶表达设定为100%。所有构建体都显示出剂量依赖性报告物敲减(图5)。

[0226] 实例2:miAPOE的体外测试-内源APOE(mRNA和蛋白质)的敲减

[0227] 在Huh7细胞中测试miAPOE候选物使内源表达的APOE mRNA沉默和降低APOE蛋白水平的能力。

[0228] 使用250ng miAPOE(SEQ ID NO.94-185)或miSCR构建体(SEQ ID NO.186-189)共转染Huh7细胞。使用RT-QPCR确定APOE mRNA表达,并且通过使用ddCT方法使用β-肌动蛋白基因表达作为参考基因来计算。与4种SCR构建体的平均值相比(pBluescript和未转染的设定为100%),大多数转染的miAPOE构建体的APOE mRNA减少。miAPOE SEQ ID NO.96、98、99、108、109、113、115、116、136、138、144、146、149、151、160、163、171和185将内源APOE mRNA表达减少>50%或更多(图6)。

[0229] 选择九种miAPOE构建体(其在先前的实验中显示出报告物活性降低≥60%)以便以较低的剂量测试靶向。如上文所述,使用50ng或250ng miAPOE(SEQ ID NO.96、108、116、133、136、138、146、151、185)或miSCR构建体(SEQ ID NO.186-187)和10ng pFI报告物构建体共转染Huh7细胞。将平均miSCR样品的APOE mRNA表达设定为100%表达。所有构建体都在用250ng质粒转染后显示出APOE mRNA降低≥60%,并且在用50ng质粒转染后显示出降低≥50%(图7)。此外,使用蛋白质印迹在250ng转染的样品中量化培养上清液中的APOE蛋白水平。相对于未转染的细胞量化转染的细胞上清液中的APOE蛋白水平,显示出所有测试的miAPOE都降低70%-90%(图8)。

[0230] 实例3:在用AAV-miAPOE转导后Huh7细胞中内源APOE mRNA表达的体外测试

[0231] 产生携带miAPOE_016(SEQ ID NO.108)、miAPOE_037(SEQ ID NO.116)、miAPOE_145(SEQ ID NO.146)和miSCR_144(SEQ ID NO.186)的表达盒的重组AAV(5或9)载体。通过以5E+06、3.6+06、1E+06、5E+05或5E+04gc/细胞的感染复数(MOI)转导Huh7细胞来测试获得的AAV转导和递送包装的表达盒的能力。转导后48h使用TaqMan qPCR双链体通过qPCR和RT-QPCR评价载体DNA拷贝和残余APOE mRNA。使用范围从1E+07至5E+01个拷贝的标准系量化载体DNA水平。观察到检测到的载体基因组DNA拷贝的剂量依赖性增加。在相同的MOI下所有

AAV5批次的Huh7细胞的转导效率是相当的。AAV9载体在转导后在Huh7细胞中显示出较低的载体基因组拷贝。与AAV5载体相似,在转导后检测到的载体拷贝有剂量依赖性增加(图9A)。

[0232] 使用β-肌动蛋白作为参考基因,通过使用ddCT方法计算内源APOE mRNA表达。将在AAV5-miSCR的存在下的APOE mRNA表达设定为100%表达。结果描绘在图9B中。

[0233] 所有AAV批次都导致APOE mRNA表达的剂量依赖性降低,这证实了AAV递送的表达盒的功能性和miAPOE的效力。AAV5-miAPOE_037(AAV5)和AAV5-miAPOE_016也显示出明显的剂量依赖性降低:miAPOE_037在MOI 5E+06gc/细胞(降低约55%)和MOI 1E+06gc/细胞(降低约35%)下显示出降低APOE mRNA表达的最大效力,在MOI 5E+05gc/细胞(降低约10%)下观察到很少降低,并且在MOI 5E+04gc/细胞下没有降低。类似地,miAPOE_016在MOI 5E+06(降低约35%)、MOI 1E+06(降低约25%)和对于MOI 5E+05的5E+05(降低约15%)下显示出最高的降低。

[0234] 对于AAV5-miAPOE_145,观察到在MOI 5E+06下APOE mRNA表达降低约15%并且在MOI 1E+06下降低约25%,在AAV9-miAPOE_145的情况下观察到相似的降低范围。

[0235] 实例4:在hAPOE4TR小鼠中靶向APOE的AAV-miAPOE的测试

[0236] 为了检查所选择的miAPOE候选物在体内使人APOE4表达沉默的能力,使用hAPOE4靶向替代(TR)小鼠模型。通过单次双侧纹状体内(IS)施用空AAV5、AAV5-miSCR(SEQ ID NO.294,先前被错误地标记为SEQ ID NO.186)、或AAV5-miAPOE_016(SEQ ID NO.108)(中等剂量和高剂量)、或AAV5-miQURE-miAPOE_037(SEQ ID NO.116)(中等剂量和高剂量)、或AAV5-miAPOE_145(中等剂量和高剂量)、或AAV9-miAPOE_145(中等剂量和高剂量)(SEQ ID NO.146)对雄性小鼠进行处理。将中等剂量设定为总共每只小鼠总6E10 gc,并且将高剂量设定为每只小鼠总3E11 gc。每组含有8只动物。在处理后第8周,处死动物,并且确定脑中载体DNA、APOE mRNA、miAPOE或miSCR和hAPOE4蛋白的水平。

[0237] 通过qPCR量化载体DNA水平以分析AAV转导。所有用AAV5-miSCR、AAV5-miAPOE_016、AAV5-miAPOE_037、AAV5-miAPOE_145和AAV9-miAPOE_145处理的小鼠都显示出纹状体和皮质中载体DNA水平的显著增加,分别达到高达2.05E+08gc/μg DNA和2.54E+07gc/μg DNA(图16A-图16B)。vDNA中不存在剂量依赖性增加表明两种剂量都达到转导饱和。

[0238] 经由RT-qPCR评估所选择的miAPOE候选物(miAPOE_016、miAPOE_037和miAPOE_145)对人APOE mRNA的沉默。在纹状体中,与空AAV5组(3.82E+07个拷贝/μg RNA)相比,AAV5-miSCR显示出相似的mRNA水平。与AAV5-miSCR相比,在注射AAV-miAPOE候选物的小鼠中观察到hAPOE4 mRNA水平的高达>80%-90%的显著降低(图17A-图17B)。在额皮质中,在注射空AAV5或AAV5-miSCR的小鼠中发现hAPOE4 mRNA水平之间的变异。与AAV5-miSCR相比,在注射AAV-miAPOE候选物的小鼠中观察到hAPOE4 mRNA的>50%-60%的减少(图17C-图17D)。

[0239] 另外,使用22或23个核苷酸长的成熟miAPOE和miSCR的特异性引物通过SYBR green RT-qPCR测定量化miRNA(miAPOE或miSCR)水平。注射AAV-miAPOE的小鼠纹状体中的miRNA水平达到高达2.45E+11个拷贝/μg总RNA(图18)。发现注射AAV5-miSCR的小鼠为1.45E+08个miRNA拷贝/μg总RNA。使用针对miAPOE或miSCR的特异性引物在所有RT-qPCR实验中还取注射空AAV5的小鼠的纹状体组织。在所有实验中,注射空AAV5的小鼠纹状体中miRNA拷贝/μg总RNA的量都低于LLOQ(未显示)。

[0240] 为了检查hAPOE4 mRNA的沉默是否与降低的hAPOE4蛋白水平相关,在额皮质组织上进行hAPOE-MSD。注射AAV5-miSCR的小鼠的hAPOE4蛋白水平等于41ng/mg的对照水平(空AAV5),再次证实AAV5-miSCR不影响hAPOE4蛋白水平(图19)。与AAV5-miSCR相比,在注射AAV-miAPOE候选物的小鼠中观察到高达>50%-60%的显著蛋白质减少。

[0241] 为了检查与内源miRNA的表达水平相比表达的miAPOE的加工和丰度,从来自高剂量组(AAV5-miAPOE_016、AAV5-miAPOE_037和AAV5-miAPOE_145)的两只小鼠的尾皮质中分离RNA,并且通过小RNA测序进行分析。数据分析揭示当与总miRNA读段相比时,预期的miAPOE转录物的读段计数范围为4.57%-0.32%(图20B)。由miAPOE_016、miAPOE_037和miAPOE_145产生的丰度最高的isomIR分别为23、25和24个核苷酸长(图20A)。将所有样品的总miSCR和miAPOE读段与内源miRNA的表达水平进行比较(图20C)。考虑到miAPOE不在丰度最高的内源表达的miRNA之列,miAPOE使RNAi途径过饱和的风险非常低。两种内部对照miR-29a-3p和miR-16-5p在所有样品中都分别展示出排序10.5±1(SD)和37.37±2.44(SD)的一致丰度(标记在图20C中)。总之,这些结果证明了体内高水平的vDNA和miRNA,以及AAV-miAPOE候选物的hAPOE4 mRNA和蛋白质水平的显著降低。因此,这些结果证明,在经由AAV递送的miAPOE表达后,高水平的miRNA正在被表达,导致hAPOE4 mRNA和蛋白质水平的显著降低。

[0242] 实例5:APOE变体的过表达的体外测试

[0243] 将APOE表达构建体转染到HEK293T细胞中,并且在转染后两天测量上清液中的APOE蛋白表达。测试以下APOE构建体:APOE2ch WT(R136S突变,SEQ ID NO.197)、APOE2ch v1和APOE2ch v2(使用来自赛默飞世尔公司的在线密码子优化工具针对智人进行密码子优化的变体,SEQ ID NO.204、208)、APOE2 WT(SEQ ID NO.195)以及APOE2 v1和v2(2种密码子优化的变体,SEQ ID NO.202、206)、APOE3 WT(SEQ ID NO.196)以及APOE3 v1和v2(密码子优化的变体,SEQ ID NO.203、207)以及APOE3ch WT(R136S突变,SEQ ID NO.198)、APOE3ch v1和APOE3ch v2(密码子优化的变体,SEQ ID NO.205、209)。

[0244] 在用不同APOE构建体转染的所有细胞中都检测到APOE蛋白表达(图10A)。重组APOE3蛋白充当阳性对照。APOE2ch、APOE3ch、APOE2和APOE3的所有构建体的WT形式在不同变体中都显示出最高的蛋白质表达。此外,还证实了APOE构建体在星形细胞瘤细胞中的表达(图10B)。

[0245] 实例6:体外测试-在用AAV5-APOE变体转导后HEK293T细胞中的APOE变体表达

[0246] 为了研究AAV5-APOE变体转导和递送包装的表达盒的能力,以1E+04、1E+05、1E+06gc/细胞的感染复数(MOI)转导HEK293T细胞(n=1)。通过qPCR量化细胞中的载体DNA水平。如先前所述,经由蛋白质印迹分析以1E+05、1E+06gc/细胞转导的细胞的培养上清液中的APOE变体蛋白表达。结果描绘在图11A中。所有五个测试的AAV5-APOE批次都导致细胞裂解物中的剂量依赖性载体DNA水平。未转导的细胞显示出约E3 gc/ug DNA的背景水平。经由蛋白质印迹在以1E+06gc/细胞转导的细胞的培养上清液中证实了APOE变体蛋白表达(图11B)。

[0247] 实例7:研究AAV5/AAV9 APOE3ch-HA的表达的WT小鼠研究。

[0248] 为了研究APOE3ch在C57B16小鼠中的表达,向每组8只小鼠注射单次双侧纹状体内剂量的AAV5或AAV9载体,或脑室内注射单次双侧剂量的AAV5或AAV9载体。所有AAV载体都携

带具有双HA标签的APOE3ch表达盒。在处理后第4周,处死动物,并且确定脑的纹状体中的载体DNA水平和mRNA水平。平均而言,纹状体内(IS)接受载体的AAV5和AAV9组表达6e7和2e7个基因组拷贝/ug DNA。脑室内(ICV)递送的AAV组显示出略低的载体基因组拷贝,分别地,AAV5为4e6个拷贝,并且AAV9为3e6个拷贝(12A)。确定所有动物的脑的纹状体中的mRNA拷贝数。IS AAV5和AAV9组在脑的纹状体中平均表达6e8和8e8个拷贝的mRNA,而ICV组显示出略低的mRNA表达水平;AAV5组为1.1e8个拷贝,并且AAV9组为1.5e8拷贝(图12B)。

[0249] 实例8:APOE过表达在P301Sτ蛋白病模型中在不同脑区中的作用

[0250] 通过单次双侧纹状体内注射AAV5载体来评估编码不同APOE变体的AAV5载体改变τ蛋白病模型P301S小鼠的表型的功效。通过单次双侧纹状体内施用媒介物(0.001％Pluronic F-68)以及剂量为3E11 gc/小鼠的空AAV5、AAV5-APOE2chWT、AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V2、AAV5-APOE3ch V2和AAV5-APOE3b V2(SEQ ID NO.197、208、210、209和211)对两月龄雄性小鼠进行处理。也包括未处理的野生型(WT)同窝仔畜对照组。将通过行为测试来评价AAV5-APOE载体的作用。在输注后七个月,对每组8-11只动物进行不同脑区、CSF、血浆和肝脏的分子分析。对于每组1-4只动物,将脑固定用于组织学目的。

[0251] 通过RT-qPCR量化纹状体中的载体DNA和APOE mRNA水平,以分析AAV转导和APOE转录物表达。与WT、媒介物和空AAV5组相比,用AAV5-APOE2chWT、AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V2、AAV5-APOE3ch V2和AAV5-APOE3b V2处理的小鼠都显示出高达4.67E+07gc/μg DNA的载体DNA水平和高达4.48E+09个拷贝/μg RNA的APOE mRNA水平的显著增加(图21A-图21B)。

[0252] 为了检查APOE变体处理组中mRNA拷贝水平升高是否与APOE蛋白表达增加一致,对海马和额皮质组织进行hAPOE-MSD(图21C-图21D)。在WT、媒介物和空AAV5组中检测不到hAPOE蛋白水平。在AAV5-APOE2ch WT、AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V2、AAV5-APOE3ch V2和AAV5-APOE3b V2组中,在海马(高达511.09ng/mg)和额皮质(高达2086.41ng/mg)两者中都检测到升高的hAPOE蛋白水平。与其他组相比,AAV5-APOE2ch WT施用导致APOE蛋白的产量最高,这是先前在体外观察到的模式(图15)。

[0253] 检查可溶性总τ蛋白和磷酸化τ蛋白以了解APOE变体的表达是否影响致病性磷酸化τ蛋白的水平。进行分开的MSD测定以量化海马组织上的总τ蛋白和pTau181。除了WT组之外,在所有P301S小鼠组中以相当的水平检测到总τ蛋白(图22A)。当与媒介物组相比时,在AAV5-APOE2ch WT、AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V2、AAV5-APOE3ch V2和AAV5-APOE3b V2组中检测到pTau181水平的显著降低(高达55％,图22B-图22C)。检查pTau181与总τ蛋白水平之间的定量关系(图22D-图22E),其揭示了当与媒介物组相比时,AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V2和AAV5-APOE3b V2组的pTau181/总τ蛋白比的高达70％的降低。

[0254] 基于这些结果,我们预期免疫组织化学将揭示与媒介物和/或空AAV5注射组相比,注射编码不同APOE变体的AAV5载体的小鼠的海马中磷酸化τ蛋白水平、神经原纤维缠结水平以及星形胶质细胞和小胶质细胞数量的变化。作为这些免疫组织化学研究的共同发现,我们期望检测到与WT组相比媒介物和/或空AAV5注射组的脑中的脑室腔大小的变化,以及与媒介物和/或空AAV5注射组相比注射编码不同APOE变体的AAV5载体的小鼠的脑中的脑室腔大小的变化。

[0255] 总之,这些结果证明,施用AAV5-APOE变体导致高且相当的vDNA和mRNA水平,导致

APOE蛋白水平升高和pTau181水平降低。

[0256] 实例9:组合构建体的体外测试-报告物降低

[0257] 为了测试同时使APOE4沉默和过表达APOE2或APOE3变体的能力,用组合表达构建体和APOE萤光素酶报告物共转染HEK293T细胞。将miAPOE或APOE变体表达质粒用作对照。

[0258] 在第一次筛选中,使用86.54fmol组合构建体(SEQ ID NO.255-276)、APOE变体(SEQ ID NO.197、208、210、211)或miAPOE(SEQ ID NO.108、116、146、186)和10fmol报告物共转染HEK293T细胞。所有组合构建体(SEQ ID NO.255-276;表6)的表达都导致萤光素酶报告物的敲减(图13)。为了进一步评估不同构建体的效力,使用0.69、3.46和17.31fmol(对应于2、10或50ng,参见实例1)的DNA构建体进行滴定实验。所有测试的构建体的剂量依赖性降低都是可见的(图14)。

[0259] 表6.组合构建体。

[0260]

SEQ ID NO.	ID	序列
255	1	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGCACAGA

[0261]

		ACCTTCATCTTCCTGCGAAGATGAAGGTTCTGTCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACA TTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTG AAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGACCCCGGTGGCGG AGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGC CCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGT ACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCT GCGGGTGCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCC TCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCC GGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGC GCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTG GGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGG CGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGC GACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCA AGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTC CAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCA GCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGC ACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA
256	2	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGCACAGA ACCTTCATCTTCCTGCGAAGATGAAGGTTCTGTCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT

[0262]

		GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACA TTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTG AAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGACCCCGGTGGCGG AGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGC CCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGT ACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCT GCGGGTGAGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCC TCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCC GGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGC GCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTG GGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGG CGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGC GACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCA AGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTC CAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCA GCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGC ACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA
257	3	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGCACAGA ACCTTCATCTTCCTGCGAAGATGAAGGTTCTGTCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACA

[0263]

		TTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTG AAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGACCCCGGTGGCGG AGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGC CCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGT ACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCT GCGGGTGCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCC TCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCC GGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGC GCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTG GGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGG CGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGC GACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGAGGCGGAGGTGCGCGCCA AGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTC CAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCA GCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGC ACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA
	258	4	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGCACAGA ACCTTCATCTTCCTGCGAAGATGAAGGTTCTGTCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACA TTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT

		GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTG AAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGACCCCGGTGGCGG AGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGC CCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGT ACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCT GCGGGTGCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCC TCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCC GGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGC GCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTG GGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGG CGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGC GACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCA AGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTC CAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCA GCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGC ACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA
[0264]	259	5	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGCACAGA ACCTTCATCTTCCTGCGAAGATGAAGGTTCTGTCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACA TTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTG AAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGACCCCGGTGGCGG

		AGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGC CCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGT ACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCT GCGGGTGAGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCC TCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCC GGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGC GCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTG GGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGG CGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGC GACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCA AGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTC CAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCA GCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGC ACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA
[0265]	260	6	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGCACAGA ACCTTCATCTTCCTGCGAAGATGAAGGTTCTGTCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACA TTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTG AAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGACCCCGGTGGCGG AGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGC CCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGT ACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCT

[0266]

		GCGGGTGCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCC TCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCC GGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGC GCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTG GGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGG CGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGC GACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGAGGCGGAGGTGCGCGCCA AGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTC CAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCA GCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGC ACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA
261	7	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGAATGTG ACCAGCAACGCAGCCCTGCGTTGCTGGTCACATCTCTTGCTATACCCA GAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTG GAAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGAT TGGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAG ATAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGG TTGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGAC CTTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCG AGCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCA GAGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGG TGCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCA AGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAA CTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGC CGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAA GCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCA GTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAAC TGAGAGTGCGGCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACT GCTGAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAATGCCTGGCCGTGTATCAGG CTGGCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAA

[0267]

		AGACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGT GGGATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGG GCGAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAG AGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCGCGCC AAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTT TCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGC AGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGG AACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
262	8	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGAATGTG ACCAGCAACGCAGCCCTGCGTTGCTGGTCACATCTCTTGCTATACCCA GAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTG GAAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGAT TGGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAG ATAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGG TTGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGAC CTTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCG AGCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCA GAGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGG TGCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCA AGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAA CTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGC CGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAA GCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCA GTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAAC TGAGAGTGTCTCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTG CTGAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAATGCCTGGCCGTGTATCAGGC TGGCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAA GACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTG GGATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGG CGAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAGA

		GACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCGCGCCA AGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTTT CAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGCA GAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGA ACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
263	9	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGAATGTG ACCAGCAACGCAGCCCTGCGTTGCTGGTCACATCTCTTGCTATACCCA GAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTG GAAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGAT TGGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAG ATAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGG TTGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGAC CTTTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAAGAACTC AAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCGGTGGCGGA GGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCC CGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGTA CCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC GGGTGAGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTC CGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGG GGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCC TGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGC TCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCGA GCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGAC CGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGC TGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAG GCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCAGCG

[0268]

[0269]

		CCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACC AGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA
264	10	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGAATGTG ACCAGCAACGCAGCCCTGCGTTGCTGGTCACATCTCTTGCTATACCCA GAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTG GAAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGAT TGGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAG ATAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGG TTGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGAC CTTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCG AGCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCA GAGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGG TGCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCA AGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAA CTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGC CGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAA GCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCA GTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAAC TGAGAGTGCGGCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACT GCTGAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAATGCCTGGCCGTGTATCAGG CTGGCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAA AGACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGT GGGATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGG GCGAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAG AGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGAGGCCGAAGTGCGCGCC AAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTT TCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGC AGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGG AACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
265	11	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC

[0270]

		TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGAATGTG ACCAGCAACGCAGCCCTGCGTTGCTGGTCACATCTCTTGCTATACCCA GAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTG GAAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGAT TGGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAG ATAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGG TTGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGAC CTTTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAAGAACTC AAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCGGTGGCGGA GGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCC CGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGTA CCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC GGGTGCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTC CGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGG GGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCC TGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGC TCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCGA GCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGAC CGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGAGGCGGAGGTGCGCGCCAAGC TGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAG GCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCAGCG CCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACC AGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA
266	12	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG

[0271]

		GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGAATGTG ACCAGCAACGCAGCCCTGCGTTGCTGGTCACATCTCTTGCTATACCCA GAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTG GAAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGAT TGGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAG ATAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGG TTGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGAC CTTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCG AGCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCA GAGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGG TGCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCA AGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAA CTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGC CGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAA GCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCA GTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAAC TGAGAGTGCGGCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACT GCTGAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAACGCCTGGCCGTGTATCAGG CTGGCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAA AGACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGT GGGATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGG GCGAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAG AGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCGCGCC AAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTT TCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGC AGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGG AACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
267	13	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG

[0272]

		TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGAATGTG ACCAGCAACGCAGCCCTGCGTTGCTGGTCACATCTCTTGCTATACCCA GAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTG GAAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGAT TGGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAG ATAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGG TTGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGAC CTTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCG AGCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCA GAGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGG TGCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCA AGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAA CTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGC CGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAA GCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCA GTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAAC TGAGAGTGTCTCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTG CTGAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAACGCCTGGCCGTGTATCAGGC TGGCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAA GACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTG GGATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGG CGAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAGA GACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCGCGCCA AGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTTT CAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGCA GAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGA ACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
268	14	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGAATGTG ACCAGCAACGCAGCCCTGCGTTGCTGGTCACATCTCTTGCTATACCCA GAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTG

[0273]

		GAAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGAT TGGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAG ATAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGG TTGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGAC CTTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCG AGCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCA GAGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGG TGCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCA AGTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAA CTCAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGC CGAGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAA GCTAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCA GTACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAAC TGAGAGTGCGGCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACT GCTGAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAACGCCTGGCCGTGTATCAGG CTGGCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAA AGACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGT GGGATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGG GCGAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAG AGACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGAGGCCGAAGTGCGCGCC AAGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTT TCAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGC AGAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGG AACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
269	15	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGTCCAGT TCCGATTTGTAGGCCTCTACAAATCGGAACTGGCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT

[0274]

		TGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACC TTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGA GCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAG AGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGT GCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCAA GTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAACT CAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGCCG AGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAAGC TAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCAGT ACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAACTG AGAGTGTCTCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGCT GAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAATGCCTGGCCGTGTATCAGGCTG GCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAAG ACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTGG GATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGGC GAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAGAG ACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCGCGCCAA GCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTTTC AGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGCAG AGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGAA CATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
270	16	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGTCCAGT TCCGATTTGTAGGCCTCTACAAATCGGAACTGGCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACC TTTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA

			GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAAGAACTC AAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCGGTGGCGGA GGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCC CGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGTA CCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC GGGTGAGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTC CGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGG GGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCC TGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGC TCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCGA GCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGAC CGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGC TGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAG GCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCAGCG CCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACC AGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA
[0275]	271	17	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGTCCAGT TCCGATTTGTAGGCCTCTACAAATCGGAACTGGCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACC TTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGA GCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAG AGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGT GCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCAA GTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAACT

		CAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGCCG AGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAAGC TAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCAGT ACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAACTG AGAGTGCGGCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGC TGAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAATGCCTGGCCGTGTATCAGGCT GGCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAA GACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTG GGATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGG CGAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAGA GACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGAGGCCGAAGTGCGCGCCA AGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTTT CAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGCA GAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGA ACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
[0276]	272	18	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGTCCAGT TCCGATTTGTAGGCCTCTACAAATCGGAACTGGCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACC TTTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAAGAACTC AAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCGGTGGCGGA GGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCC CGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGTA

		CCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC GGGTGCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTC CGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGG GGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCC TGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGC TCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCGA GCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGAC CGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGAGGCGGAGGTGCGCGCCAAGC TGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAG GCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCAGCG CCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACC AGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA
[0277]	273	19	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGTCCAGT TCCGATTTGTAGGCCTCTACAAATCGGAACTGGCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACC TTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGA GCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAG AGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGT GCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCAA GTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAACT CAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGCCG AGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAAGC TAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCAGT ACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAACTG AGAGTGCGGCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGC TGAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAACGCCTGGCCGTGTATCAGGCT

[0278]

		GGCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAA GACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTG GGATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGG CGAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAGA GACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCGCGCCA AGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTTT CAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGCA GAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGA ACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
	274	20	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGTCCAGT TCCGATTTGTAGGCCTCTACAAATCGGAACTGGCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACC TTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGA GCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAG AGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGT GCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCAA GTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAACT CAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGCCG AGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAAGC TAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCAGT ACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAACTG AGAGTGTCTCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGCT GAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAACGCCTGGCCGTGTATCAGGCTG GCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAAG ACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTGG GATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGGC

[0279]

		GAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAGAG ACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGTGGCCGAAGTGCGCGCCAA GCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTTTC AGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGCAG AGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGAA CATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
275	21	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGTCCAGT TCCGATTTGTAGGCCTCTACAAATCGGAACTGGCTCTTGCTATACCCAG AAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGG AAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATT GGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGA TAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGT TGGGCTAGCGCCACCATGAAAGTCCTCTGGGCCGCTCTCCTGGTGACC TTTCTGGCCGGCTGTCAGGCCAAAGTGGAACAGGCCGTGGAAACCGA GCCTGAGCCTGAACTGAGACAGCAGACAGAGTGGCAGTCCGGCCAG AGATGGGAACTTGCCCTGGGCAGATTCTGGGACTACCTGAGATGGGT GCAGACCCTGAGCGAACAGGTGCAAGAGGAACTGCTGAGCAGCCAA GTGACCCAAGAGCTGAGAGCCCTGATGGACGAGACAATGAAAGAACT CAAAGCTTATAAGAGCGAGCTCGAAGAGCAGCTGACCCCTGTGGCCG AGGAAACAAGAGCCAGACTGAGCAAAGAGCTGCAGGCCGCTCAAGC TAGACTGGGCGCCGATATGGAAGATGTGTGCGGCAGACTGGTGCAGT ACAGAGGCGAAGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCTACCGAGGAACTG AGAGTGCGGCTGGCCAGCCACCTGAGAAAGCTGCGGAAGAGACTGC TGAGAGATGCCGACGACCTGCAGAAACGCCTGGCCGTGTATCAGGCT GGCGCTAGAGAAGGCGCTGAGAGAGGACTGTCTGCCATCCGGGAAA GACTGGGCCCTCTGGTTGAACAGGGCAGAGTTAGAGCCGCCACAGTG GGATCTCTTGCAGGCCAGCCTCTGCAAGAAAGAGCCCAGGCTTGGGG CGAGAGACTGAGGGCCAGAATGGAAGAGATGGGCAGCAGAACCAGA GACAGACTGGACGAAGTGAAAGAACAGGAGGCCGAAGTGCGCGCCA AGCTCGAAGAACAAGCCCAGCAGATTCGGCTGCAGGCTGAAGCCTTT

[0280]

		CAGGCCCGGCTGAAGAGTTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGATATGCA GAGACAGTGGGCTGGACTGGTGGAAAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGA ACATCTGCTGCTCCAGTGCCTAGCGACAACCACTGA
276	22	GGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCC TCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAA GAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATGGGGCCCTG GCTGGGATTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAGTAT AGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGG AGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTG TCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGGATCGCG TTCTCGCTGTTCGACTGAACAGCGAGAACGCGACTCTTGCTATACCCA GAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTG GAAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGAT TGGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAG ATAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGG TTGGGCTAGCGCCACCATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCAC ATTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAG AGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCA GCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGT GCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTG AAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGACCCCGGTGGCGG AGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGC CCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGT ACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCT GCGGGTGAGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCC TCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCC GGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGC GCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTG GGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGG CGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGC GACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCA AGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTC CAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCA GCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGC ACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTGA

[0281] 实例10:组合构建体的体外测试-APOE表达

[0282] 此外,通过ELISA量化用组合构建体转染的细胞的上清液中的APOE蛋白表达。仅对

用最高量(例如,86.54fmol)的DNA构建体转染的细胞的上清液评估蛋白质量化。证实了所有转染的细胞的APOE蛋白表达(图15)。

[0283] 实例11:在P301S/hAPOE4-TR小鼠中由AAV递送的组合构建体的体内测试

[0284] 将通过单次双侧纹状体内注射AAV载体来评估编码组合表达构建体以及单一构建体的AAV5载体改变也携带hAPOE4基因的τ蛋白病模型P301S小鼠(P301S/hAPOE4-TR小鼠)的表型的功效。将通过行为测试以及不同脑区、CSF、血浆和肝脏的分子分析来评价AAV载体的作用。

[0285] 我们预期在施用AAV载体的组中,将在脑内检测到vDNA水平和APOE变体mRNA/miRNA表达。实际上,预期在注射含有miAPOE的构建体的组的脑中miRNA水平升高,而预测施用含有APOE变体转基因的构建体的组展示出升高的APOE变体mRNA。

[0286] 此外,与媒介物组相比,预期在注射AAV载体的组的脑中观察到hAPOE4、τ蛋白和磷酸化τ蛋白的水平降低或改变。

[0287] 实例12:在WT小鼠中由AAV递送的组合方法构建体的体内测试

[0288] 在WT小鼠中通过单次双侧纹状体内注射来评估由AAV5(4.3E10 gc/小鼠)递送介导的组合方法构建体和单一构建体的转基因的表达水平。用具有ID 2、3、16和18(分别为SEQ ID NO.256、257、270和272)的AAV5组合方法构建体和单一构建体(包括AAV5-APOE2ch V2表达变体(SEQ ID NO.208)、AAV5-miSCR(SEQ ID NO.186)、AAV5-miAPOE_016(SEQ ID No.108)和AAV5-miAPOE_037(SEQ ID NO.116))对雄性小鼠进行处理。包括空AAV5作为对照。处理后一个月处死动物。收集每组5-6只动物的多个脑区和肝脏,并且将其快速冷冻。

[0289] 通过qPCR量化载体DNA水平以分析AAV转导。除了空AAV5处理组之外,所有组都显示出纹状体中载体DNA水平的相当且显著的增加,达到高达3.74E+07gc/μg DNA(图23A)。通过SYBR green RT-qPCR测定使用23、24或25个核苷酸长的成熟miSCR和miAPOE的特异性引物量化miRNA水平(图23B)。基于先前的小RNA测序结果优化所选择的引物和标准系(图20A)。注射组合方法载体的组的纹状体中的miRNA水平达到高达1.48E+09个拷贝/μg总RNA(图23B)。AAV5-miSCR组的miRNA水平与组合方法构建体组相似。AAV5-miAPOE_016组中的miAPOE拷贝水平达到高达7.06E+09个拷贝/μg总RNA,而AAV5-miAPOE_037和空AAV5组的miRNA水平没有导致高于LLOQ的水平。不对AAV5-APOE2ch V2组的组织进行此测定,因为预期没有miRNA。

[0290] 经由RT-qPCR评估所有组的纹状体中的hAPOE mRNA表达(图23C)。在表达组合方法构建体的组中检测到高达1.22E+10个拷贝/μg RNA的hAPOE mRNA的升高的表达,并且在AAV5-APOE2ch V2组中检测到7.08E+08个拷贝/μg RNA。预期在WT、AAV5-miSCR、AAV5-miAPOE_016和AAV5-miAPOE_037组中检测不到mRNA,尽管该测定确实检测到略高于LLOQ的mRNA拷贝。

[0291] 为了检查注射组合方法载体和AAV5-APOE2ch V2的组中mRNA拷贝水平升高是否与APOE蛋白表达增加一致,在吻皮质组织上进行hAPOE-MSD(图23D)。在空AAV5、AAV5-miSCR、AAV5-miAPOE_016和AAV5-miAPOE_037组中检测不到hAPOE蛋白水平。在注射组合方法载体的组中检测到高达478.83ng/mg hAPOE蛋白水平,而AAV5-APOE2ch V2组中的hAPOE蛋白水平达到129.48ng/mg蛋白水平。

[0292] 总之,这些体内结果证明了所有组之间的高水平的vDNA,并且证明了与表达单一

转录物的构建体相比,组合方法构建体的相似或更高的转录物和蛋白质水平。

[0293] 实例13:AAV5组合方法构建体和AAV5-miAPOE的体外转导以检查miAPOE加工和脱靶效应

[0294] 为了检查由组合方法构建体和单一miAPOE构建体表达的miAPOE在人衍生的胶质母细胞瘤细胞中的加工和丰度,用AAV5组合方法构建体ID 2和16(SEQ ID NO.256和270)、AAV5-miSCR(SEQ ID NO.186)、AAV5-miAPOE_016(SEQ ID NO.108)、AAV5-miAPOE_037(SEQ ID NO.116)和AAV5-miAPOE_145(SEQ ID NO.146)转导U-118MG细胞。在组合方法构建体ID 2内编码miAPOE_016,并且在组合方法构建体ID 16内编码miAPOE_145。转导后三天,从这些细胞培养物中分离RNA,并且通过小RNA测序和聚A富集的mRNA测序进行分析。

[0295] 数据分析揭示当与总miRNA读段相比时,组合方法构建体、miAPOE_016和miAPOE_145的预期的miAPOE转录物的读段计数范围为2.68%-0.05%(图24B)。不存在miAPOE_037的读段计数。

[0296] 由组合方法构建体、miAPOE_016和miAPOE_145产生的丰度最高的isomIR都为24个核苷酸长(图24A)。将除了miAPOE_037之外的所有构建体的总miAPOE读段与内源miRNA的表达水平进行比较(图24C)。考虑到miAPOE不在丰度最高的内源表达的miRNA之列,miAPOE使RNAi途径过饱和的风险非常低。两种内部对照miR-29a-3p和miR-16-5p在所有样品中都分别展示出排序6.33±1.55(SD)和19.75±6.13(SD)的一致丰度(标记在图24C中)。

[0297] 进行差异表达分析以揭示组合方法、miAPOE_016和miAPOE_145构建体的潜在脱靶效应。将miSCR用作对照,并且进行分析以确定其他构建体在转录物水平上的区别程度。这揭示了所有样品的转录物表达差异非常小,FDR p值>0.05(图24D)。如所预期的,组合方法构建体具有显著增加的APOE转录物。虽然组合方法构建体ID 16没有其他差异表达的转录物,但ID 2具有转录物水平偏离对照的两个基因。miAPOE_016和miAPOE_145两者都具有一个且相同的差异表达基因。

[0298] 总之,这些体外结果揭示了由组合方法和单一构建体表达的miAPOE的正常加工。在表达这些miAPOE的样品的转录组内观察到最小至无脱靶效应。

[0299] 实例14:miAPOE miRNA指导物的潜在脱靶转录物的计算机模拟评估

[0300] 对miAPOE miRNA指导序列(BLASTN)和指导种子序列(siSPOTR)进行可能的脱靶基因转录物的计算机模拟分析。针对人参考转录组进行短序列的BLASTN(经由ENSEMBL),以鉴定在22个核苷酸的miAPOE指导序列(SEQ ID NO.108、116和146)内具有至少7个连续核苷酸的部分互补性的转录物。除APOE之外,没有发现与22个核苷酸的miAPOE miRNA指导序列完全互补的基因转录物。将具有部分互补性的基因转录物按比对得分进行排序,该比对得分是从匹配核苷酸的奖励以及错配和空位的罚分(匹配/错配:1/-3)的总和计算的。下文示出了前15个命中(表9)。

[0301] 使用siSPOTR工具(Boudreau等人,2013)来预测miAPOE miRNA指导种子序列(5'-3'指导序列的核苷酸2-8)与潜在脱靶基因转录物的结合,这些潜在脱靶基因转录物主要在靶转录物的3'UTR中发现。使用种子位点类型频率(8聚体、7聚体-M8、7聚体-1A和6聚体)计算潜在脱靶得分(POTS)(表10)。将可能的脱靶基因列表按单独转录物脱靶概率得分(tPOTS)进行排序。基于在单独转录物中发现的种子匹配的数量和类型计算tPOTS。潜在脱靶基因的前15个命中列于表11中。

[0302] miAPOE指导种子序列的潜在脱靶的前15个命中都没有与通过短序列的BLASTN实现的miAPOE指导序列的计算机模拟脱靶预测的前15个命中重叠。发现计算机模拟预测的转录物在来自AAV5组合方法构建体ID 2和16(SEQ ID NO.256和270)、AAV5-miAPOE_016(SEQ ID NO.108)和AAV5-miAPOE_145(SEQ ID NO.146)的RNA-seq数据中没有显著差异表达(图24D)。

[0303] 表9:通过短序列的BLASTN实现的miAPOE指导序列的计算机模拟脱靶预测的前15个命中。比对长度:与具有0、1或2个错配或空位的22个核苷酸的miAPOE指导序列互补的单独基因转录物的核苷酸数量;得分:从匹配核苷酸的奖励与错配或空位的罚分的总和计算的比对得分;ID%:相对于比对的序列长度,与miAPOE指导序列互补的同一性百分比。

[0304]

	miAPOE_016 - SEQ ID NO. 108			
	基因命中	**比对长度**	**得分**	**ID%**
	APOE	22	44	100
1	POLR3A	16	32.1	100
2	TTN	15	30.2	100
3	CCDC82	15	30.2	100
4	ACBD6	15	30.2	100
5	CCNDBP1	15	30.2	100
6	PCDH10	15	30.2	100
7	CALCOCO1	15	30.2	100

[0305]

8	ENSG00000267140	15	30.2	100
9	YWHABP2	14	28.2	100
10	SERPINH1P1	14	28.2	100
11	HMGB1P45	14	28.2	100
12	RCC2P1	14	28.2	100
13	ABCA17P	14	28.2	100
14	GPR161	22	28.2	90.91
15	DR1	19	28.2	94.74
	miAPOE_037 - SEQ ID NO.116			
	基因命中	**比对长度**	**得分**	**ID%**
	APOE	22	44	100
1	STIM2	16	32.1	100
2	TCP11L1	19	30.2	94.74
3	MEGF8	14	28.2	100
4	PHTF2	14	28.2	100
5	FDFT1	14	28.2	100
6	DSCAML1	14	28.2	100
7	SESN2	14	28.2	100
8	GPT2	14	28.2	100
9	SHMT2	14	28.2	100
10	TRIM80P	13	26.2	100
11	PAICSP1	13	26.2	100
12	ENSG00000232528	13	26.2	100
13	FN1	13	26.2	100
14	SYT13	13	26.2	100
15	ZSCAN31	13	26.2	100
	miAPOE_145 - SEQ ID NO.146			
	基因命中	**比对长度**	**得分**	**ID%**
	APOE	22	44	100
1	TICRR	14	28.2	100
2	ENSG00000235707	13	26.2	100
3	GDPD1	13	26.2	100
4	SH3TC1	21	26.2	90.48
5	RASIP1	13	26.2	100
6	STEAP4	13	26.2	100

[0306]

7	SVEP1	13	26.2	100
8	ATP7B	13	26.2	100
9	GDPD1	12	24.2	100
10	ENSG00000197550	12	24.2	100
11	ZNF355P	12	24.2	100
12	SLC25A5P8	12	24.2	100
13	SUPT4H1P2	12	24.2	100
14	MIB2	12	24.2	100
15	ACADM	12	24.2	100

[0307] 表10.通过SiSPOTR实现的miAPOE指导种子序列的计算机模拟脱靶预测:按种子匹配类型的潜在脱靶。种子匹配类型:8聚体位点(与核苷酸2-8完美匹配,之后是A)、7聚体-m8位点(与核苷酸2-8完美匹配)、7聚体-1A(与核苷酸2-7完美匹配,之后是A)、6聚体位点(与核苷酸2-7完美匹配);使用种子位点类型频率(8聚体、7聚体-M8、7聚体-1A和6聚体)计算潜在脱靶得分(POTS)。

[0308]

		在 3' UTR 中具有种子匹配的靶基因				
miAPOE/SEQ ID NO.	**预测总数靶基因**	**8 聚体**	**7 聚体-M8**	**7 聚体-1A**	**6 聚体**	**POTS**
miAPOE_016/108	8277	580	1916	2723	6414	649.5
miAPOE_037/116	4936	304	1067	1112	3605	297.3
miAPOE_145/146	4750	492	1057	1492	2802	314.6

[0309] 表11:通过siSPOTR实现的miAPOE指导种子序列的计算机模拟脱靶预测的前15个命中

[0310] tPOTS:脱靶概率得分;种子匹配类型的数量:8聚体位点(与核苷酸2-8完美匹配,之后是A)、7聚体-m8位点(与核苷酸2-8完美匹配)、7聚体-1A(与核苷酸2-7完美匹配,之后是A)、6聚体位点(与核苷酸2-7完美匹配);使用种子位点类型频率(8聚体、7聚体-M8、7聚体-1A和6聚体)计算潜在脱靶得分(POTS)。

[0311]

miAPOE/SEQ ID NO.	**基因符号**	**TPOTS**	**8 聚体**	**7 聚体-M8**	**7 聚体-1A**	**6 聚体**
miAPOE_016/108	AAK1	0.765	1	2	7	10

[0312]

	SLC5A3	0.661	2	1	4	11
	ZNF704	0.615	3	0	2	5
	FBXW2	0.57	1	3	3	5
	IKZF2	0.566	1	2	4	6
	TPPP	0.561	0	8	0	1
	RFX4	0.518	2	0	3	3
	KSR2	0.507	1	4	1	2
	ZNF621	0.5	1	2	3	5
	DPH3	0.5	1	3	2	0
	FOXN3	0.495	1	1	4	5
	ZC3H6	0.494	1	1	4	4
	MCCC2	0.481	3	0	0	1
	STK10	0.456	2	1	1	1
	NDFIP1	0.45	2	0	2	0
miAPOE_037/116	ONECUT2	0.593	2	2	2	3
	UHMK1	0.393	2	1	0	3
	RLIM	0.368	1	2	1	3
	DNM3	0.368	1	2	1	3
	INO80D	0.367	1	2	1	2
	CREB1	0.367	1	2	1	2
	OLFML2A	0.365	1	2	1	0
	MFAP3L	0.362	1	1	2	2
	ENAH	0.36	1	1	2	0
	QKI	0.354	0	5	0	4
	OSMR	0.345	0	4	1	0
	SH3TC2	0.343	0	3	2	3
	CDK6	0.322	2	0	0	2
	C6orf168	0.322	2	0	0	2
	PTAR1	0.321	2	0	0	1
miAPOE_145/146	N6AMT1	0.522	2	1	2	2
	ZNF704	0.433	1	2	2	3
	AP1G1	0.43	1	2	2	0
	SOX11	0.425	1	1	3	0
	QKI	0.423	1	0	4	3

[0313]

	SH3TC2	0.388	2	0	1	3
	HIC2	0.386	2	0	1	1
	C18orf1	0.386	2	0	1	1
	TNFRSF10B	0.385	2	0	1	0
	PLXDC1	0.385	2	0	1	0
	NSL1	0.368	1	2	1	3
	GFRA1	0.367	1	2	1	2
	PRKX	0.366	1	2	1	1
	C22orf46	0.365	1	2	1	0
	SGK269	0.36	1	1	2	0

[0314] 参考文献

[0315] Knouff C,Hinsdale ME,et al.Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice.J Clin Invest.1999Jun;103(11):1579-86.doi:10.1172/JCI6172.PMID:10359567;PMCID:PMC408371.

[0316] Sullivan PM,Mezdour H,et al.Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis.J Biol Chem.1997Jul 18;272(29):17972-80.doi:10.1074/jbc.272.29.17972.PMID:9218423.

[0317] Arboleda-Velasquez JF,Lopera F,et al.Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote:a case report.Nat Med.2019Nov;25(11):1680-1683.doi:10.1038/s41591-019-0611-3.Epub 2019Nov4.PMID:31686034.

[0318] van den Maagdenberg AM,Weng W,et al.Characterization of five new mutants in the carboxyl-terminal domain of human apolipoprotein E:no cosegregation with severe hyperlipidemia.Am J Hum Genet.1993May;52(5):937-46.PMID:8488843.

[0319] Liu CC,Murray ME,et al.APOE3-Jacksonville(V236E)variant reduces self-aggregation and risk of dementia.Sci Transl Med.2021Sep 29;13(613):eabc9375.doi:10.1126/scitranslmed.abc9375.Epub 2021Sep 29.PMID:34586832.

[0320] BLAST.Joseph Bedell,Ian Korf and Mark Yandell[OReilly&Associates,2003],Altschul SF,Gish W,Miller W,Myers EW,Lipman DJ.Basic local alignment search tool.J Mol Biol.1990;215(3):403-410.doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2

[0321] Boudreau RL,Spengler RM,Hylock RH,Kusenda BJ,Davis HA,Eichmann DA,Davidson BL.siSPOTR:a tool for designing highly specific and potent siRNAs for human and mouse.Nucleic Acids Res.2013Jan 7;41(1):e9.doi:10.1093/nar/gks797.Epub 2012Aug 31.PMID:22941647;PMCID:PMC3592398.

附图说明

[0322] 图1.作为以下NCBI参考序列的一部分的APOE4 cDNA序列的一部分的示意图:NM_000041。所描绘的序列在本文中被称为SEQ ID NO.1,并且对应于其核苷酸1-1166,并且代表剪接的APOE转录物(转录物2)(的一部分)的DNA序列。

[0323] 图2.指示第一RNA序列的支架RNA结构的示意图,如(a)和(b)所设计。

[0324] 图3.通过小mRNA测序对miR-144A>T突变型支架进行的验证。A)miR-451、miR-144野生型(WT)和miR-144A>T突变型支架中miRNA6(=miHTT)、miR-144 5p、miR-144 3p和miR-16表达水平的比较。B)插入miR-451和miR-144A>T突变型支架内的一组不同miRNA序列的表达值的比较。

[0325] 图4.在用250ng DNA构建体(SEQ ID NO.94-185)共转染后,HEK293T细胞中通过miAPOE实现的APOE4 Luc报告物的体外敲减。

[0326] 图5.在用2、10或50ng DNA构建体共转染后,通过25种miAPOE构建体(SEQ ID NO.96、99、100、105、106、108、109、113、114、115、116、117、131、132、133、134、135、136、137、139、143、146、149、151、185)实现的APOE4 Luc报告物的体外敲减。将miSCR441(SEQ ID NO.186)的相对海肾表达(RL/FL)设定为100%。

[0327] 图6.在用250ng miAPOE构建体(SEQ ID NO.94-185)转染后,Huh7细胞中内源APOE mRNA的体外表达和降低。

[0328] 图7.在用50或250ng miAPOE构建体(SEQ ID NO.96、108、116、133、136、138、146、151、185)或miSCR构建体(SEQ ID NO.186-187)转染后,内源APOE mRNA的体外表达和降低(n=2)。

[0329] 图8.(A)蛋白质印迹和(B)其相对量化,显示用miAPOE构建体(SEQ ID NO 96、108、116、136、146、185)或miSCR构建体(SEQ ID NO.186)转染的Huh7细胞的上清液中分泌的内源APOE蛋白(的降低)。

[0330] 图9.在用含有miAPOE表达盒(SEQ ID NO.108、116、146)的AAV5或AAV9转导后,Huh7细胞中载体DNA拷贝和APOE mRNA表达的敲减。以5E+06、3.6+06、1E+06、5E+05或5E+04gc/细胞的感染复数(MOI)转导Huh7细胞。(A)转导后48h确定载体DNA拷贝数和(B)APOE mRNA表达。将在AAV5-miSCR(SEQ ID No.186)的存在下的APOE mRNA表达设定为100%。

[0331] 图10.用250ng APOE变体表达构建体转染后48h在HEK293T细胞和星形细胞瘤细胞的培养上清液中APOE蛋白的体外蛋白质印迹。

[0332] 图11.用含有APOE变体表达盒(SEQ ID NO.197、208、210、209、211)的AAV5转导的HEK293T细胞的培养上清液中的载体DNA拷贝和APOE蛋白表达。以1E4、1E5或1E6的感染复数(MOI)转导HEK293T细胞。(A)转导的HEK293T细胞中的载体DNA拷贝。(B)通过蛋白质印迹在AAV转导的HEK293T细胞的上清液中进行的APOE蛋白检测。

[0333] 图12.在注射AAV-APOE3ch.-HA的C57B16小鼠的脑的纹状体中的载体DNA(A)和mRNA拷贝(B)的检测。

[0334] 图13.在用报告物(10fmol)和组合方法(SEQ ID NO.255-276,标记为1-22)或miAPOE构建体(SEQ ID NO.108、116、146)共转染后,通过组合方法和miAPOE构建体实现的APOE4 luc报告物的体外沉默。

[0335] 图14.在用报告物(2.18fmol)与0.69、3.46或17.31fmol组合方法DNA构建体(SEQ

ID NO.255-276,标记为1-22)或miAPOE构建体(SEQ ID NO.108、116、146)共转染后,通过组合方法构建体实现的APOE4 luc报告物的体外沉默。将含有miSCR441的组合方法的相对海肾表达(RL/FL)设定为100％。

[0336] 图15.用组合方法构建体(SEQ ID NO.255-276,标记为1-22)或APOE转基因构建体(SEQ ID NO.197、208、210、211)转染的Hek293T细胞的上清液中的APOE转基因表达。

[0337] 图16.载体DNA在注射高(灰色条)或中等(白色条)剂量的空AAV5、AAV5-miSCR、AAV5-miAPOE_016、AAV5-miAPOE_037、AAV5-miAPOE_145或AAV9-miAPOE_145的小鼠的纹状体(A)和额皮质(B)中的表达。

[0338] 图17.与空AAV5和AAV5-miSCR相比,注射高(灰色条)或中等(白色条)剂量的AAV5-miAPOE_016、AAV5-miAPOE_037、AAV5-miAPOE_145或AAV9-miAPOE_145的小鼠的纹状体(A-B)和额皮质(C-D)中的APOE4 mRNA的敲减。(B、D)将相对AAV5-miSCR拷贝水平设定为100％。

[0339] 图18.注射高(灰色条)或中等(白色条)剂量的AAV5-miSCR、AAV5-miAPOE_016、AAV5-miAPOE_037、AAV5-miAPOE_145或AAV9-miAPOE_145的小鼠的纹状体中的miRNA拷贝水平。

[0340] 图19.与空AAV5和AAV5-miSCR相比,注射高(灰色条)或中等(白色条)剂量的AAV5-miAPOE_016、AAV5-miAPOE_037、AAV5-miAPOE_145或AAV9-miAPOE_145的小鼠的额皮质中hAPOE4蛋白的减少。

[0341] 图20.(A)与在注射AAV5-miAPOE_016、AAV5-miAPOE_037和AAV5-miAPOE_145的hAPOE4-Tr小鼠的尾皮质中发现的总miAPOE读段相比,读段长度的丰度。miAPOE_016、miAPOE_037和miAPOE_145的丰度最高的读段长度分别为23、25和24个核苷酸。(B)miAPOE转录物的读段计数。(C)在注射AAV5-miSCR、AAV5-miAPOE_016、AAV5-miAPOE_037和AAV5-miAPOE_145的hAPOE4-Tr小鼠的尾皮质中检测到的内源miRNA和miAPOE的排序丰度。内部对照miR-29a-3p和miR-16-5p分别用单星号或双星号标记。

[0342] 图21.载体DNA(A)和APOE mRNA(B)在注射媒介物、空AAV5、AAV5-APOE2ch WT、AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V2、AAV5-APOE3ch V2和AAV5-APOE3b V2的WT或P301S小鼠的纹状体中的表达。虚线指示LLOQ。(C-D)在注射媒介物、空AAV5、AAV5-APOE2ch WT、AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V2、AAV5-APOE3ch V2和AAV5-APOE3b V2的WT或P301S小鼠的海马(C)和额皮质(D)中检测到的hAPOE蛋白水平。

[0343] 图22.(A)注射媒介物、空AAV5、AAV5-APOE2ch WT、AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V2、AAV5-APOE3ch V2和AAV5-APOE3b V2的WT或P301S小鼠的海马中的总τ蛋白水平。(B-C)注射媒介物、空AAV5、AAV5-APOE2ch WT、AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V2、AAV5-APOE3ch V2和AAV5-APOE3bV2的WT或P301S小鼠的海马中的pTau181蛋白水平。测量值(B)和归一化值(C)证明在注射AAV5-APOE变体的所有组中pTau181水平都显著降低。通过单因素方差分析,**P<0.01,***P<0.001。虚线标示50％。(D-E)注射媒介物、空AAV5、AAV5-APOE2ch WT、AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V2、AAV5-APOE3ch V2和AAV5-APOE3b V2的WT或P301S小鼠的海马中的pTau181/总τ蛋白比。测量值(D)和归一化值(E)揭示在注射AAV5-APOE2ch V2、AAV5-APOE2b V和AAV5-APOE3b V2的组中pTau181/总τ蛋白比显著降低。通过单因素方差分析,**P<0.01,****P<0.0001。虚线标示50％。

[0344] 图23.注射包封在AAV5中的组合方法和单一构建体的WT小鼠的纹状体中的载体

DNA表达(A)和miAPOE拷贝水平(B)。注射包封在AAV5中的组合方法和单一构建体的WT小鼠的纹状体中的APOE mRNA拷贝水平(C)和皮质中的APOE蛋白水平(D)。虚线指示LLOQ。

[0345] 图24.(A)与用AAV5组合方法构建体ID 2和16、AAV5-miAPOE_016和AAV5-miAPOE_145转导的U-118MG细胞培养物中发现的总miAPOE读段相比,读段长度的丰度。所有构建体的丰度最高的读段长度都为24个核苷酸。(B)miAPOE转录物的读段计数。(C)用AAV5组合方法构建体ID 2和16、AAV5-miSCR、AAV5-miAPOE_016和AAV5-miAPOE_145转导的U-118MG细胞培养物中检测到的内源miRNA和miAPOE的排序丰度。内部对照miR-29a-3p和miR-16-5p分别用单星号或双星号标记。(D)组合方法、miAPOE_016和miAPOE_145构建体的差异表达分析。

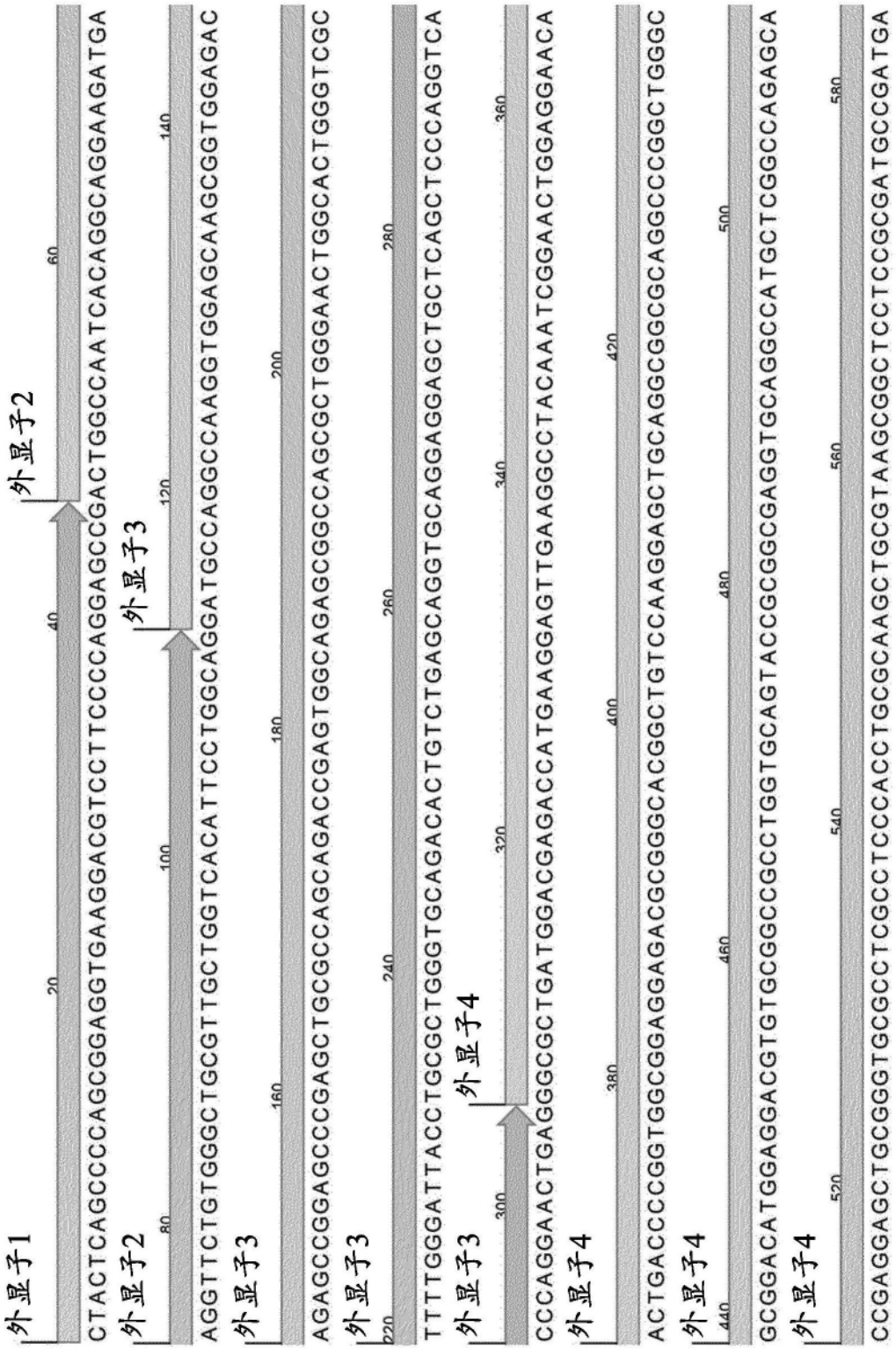

外显子1
外显子2
外显子3
外显子4
CTACTCAGCCCCAGCGGAGGTGAAGGACGTCCTTCCCCAGGAGCCGACTGGCCAATCACAGGCAGGAAGATGA
AGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGAC
AGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGC
TTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCA
CCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAAGTGGAGGAACA
ACTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGC
GCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCA
CCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGA

图1(1/2)


外显子4
600
620
640
CCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGC
外显子4
660
680
700
720
GAGCGCCTGGGGCCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGC
外显子4
740
760
780
800
TACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGA
外显子4
820
840
860
CCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCCAGCAGATACGC
外显子4
880
900
920
940
CTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCAGCGCCAGT
外显子4
960
980
1000
1020
GGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCACTG
外显子4
1040
1060
1080
AACGCCGAAGCCTGCAGCCATGCGACCCCACGCCACCCCGTGCCTCCTGCCTCCGCGCAGCCTGCAGCGGGAG
外显子4
1100
1120
1140
1160
ACCCTGTCCCCGCCCCAGCCGTCCTCCTGGGGTGGACCCTAGTTTAATAAAGATTCACCAAGTTTCACGCA

图1续(2/2)

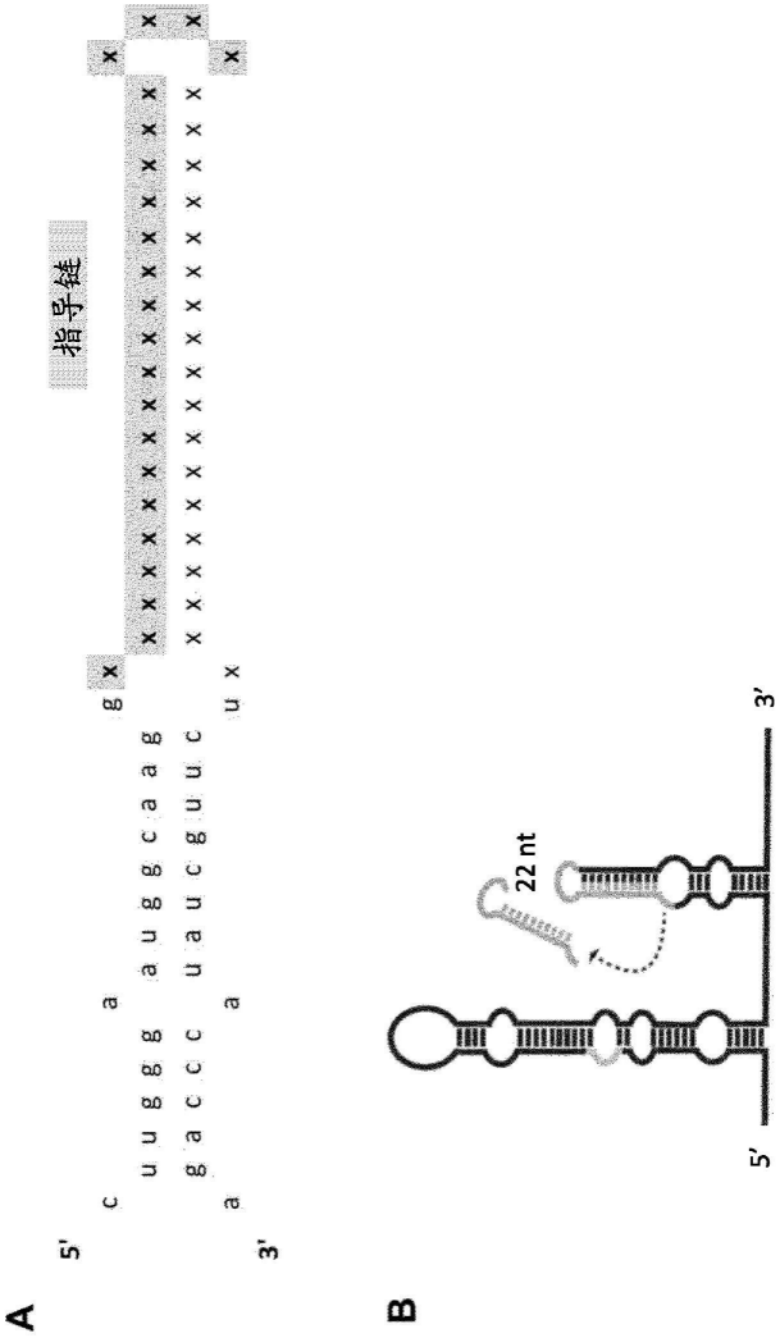


图2

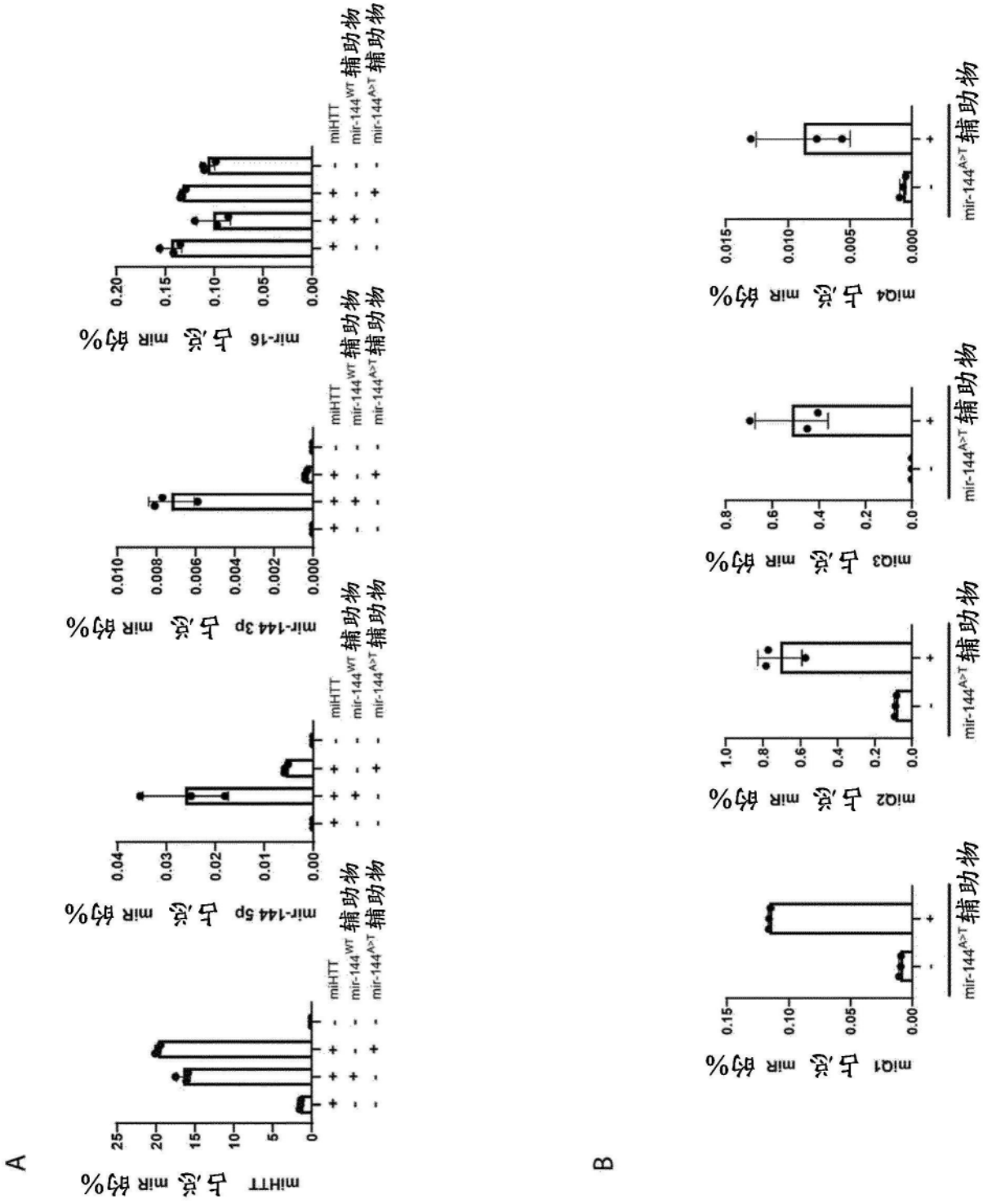

A
miHTT 占,总 mir 的%
mir-144 5p 占,总 mir 的%
mir-144 3p 占,总 mir 的%
mir-16 占,总 mir 的%
miHTT
mir-144WT
mir-144A>T
辅助物
B
mi01 占,总 mir 的%
mi02 占,总 mir 的%
mi03 占,总 mir 的%
mi04 占,总 mir 的%
mir-144A>T 辅助物

图3

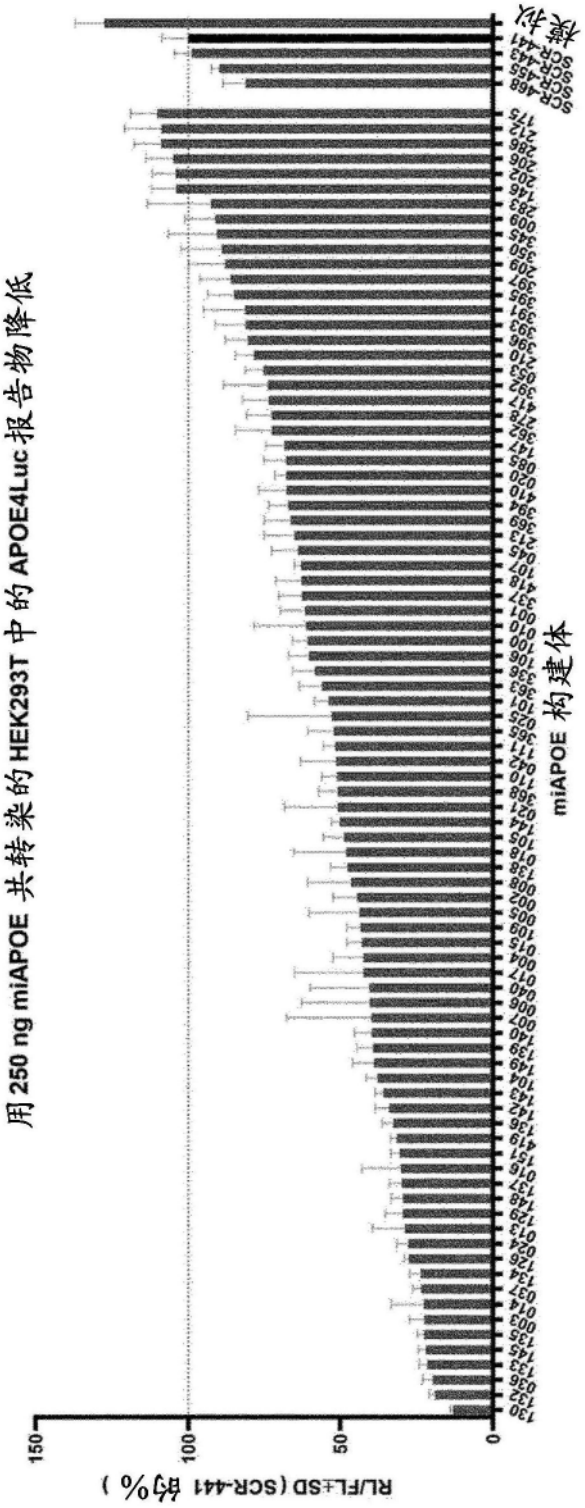

用 250 ng miAPOE 共转染的 HEK293T 中的 APOE4Luc 报告物降低
RLF/FL±SD (SCR-441 的%)
150
100
50
0
miAPOE 构建体
130
132
036
133
145
135
003
014
037
134
126
024
013
129
148
137
076
151
419
136
142
143
104
149
139
140
007
006
040
017
004
015
109
005
002
008
138
105
018
144
921
368
110
042
111
025
101
363
336
100
106
010
021
337
418
107
075
213
369
394
410
020
085
147
362
278
417
392
533
210
396
393
391
397
395
209
350
345
009
283
146
202
206
286
212
175
SCR468
SCR455
SCR443
SCR441
未转染

图4

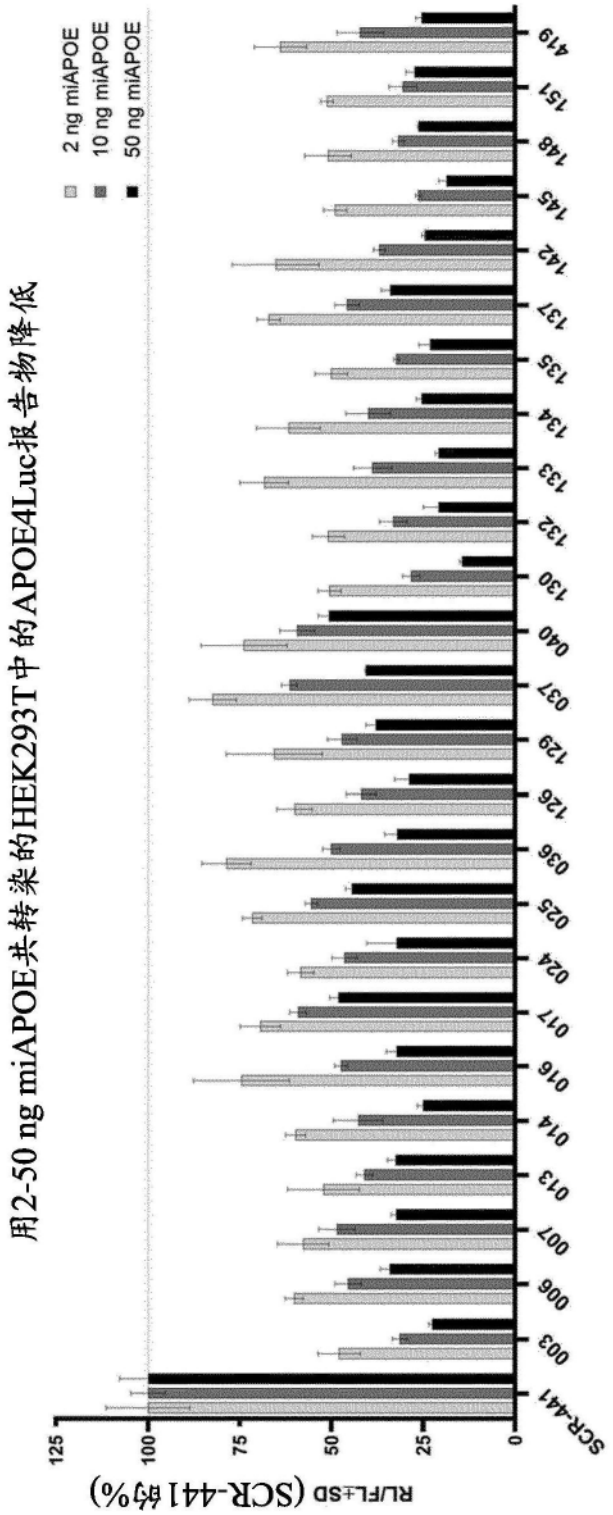

用2-50 ng miAPOE共转染的HEK293T中的APOE4Luc报告物降低
2 ng miAPOE
10 ng miAPOE
50 ng miAPOE
RLFL±SD (SCR-441的%)
125
100
75
50
25
0
SCR-441
003
006
007
013
014
016
017
024
025
036
126
129
037
040
130
132
133
134
135
137
142
145
148
151
419

图5

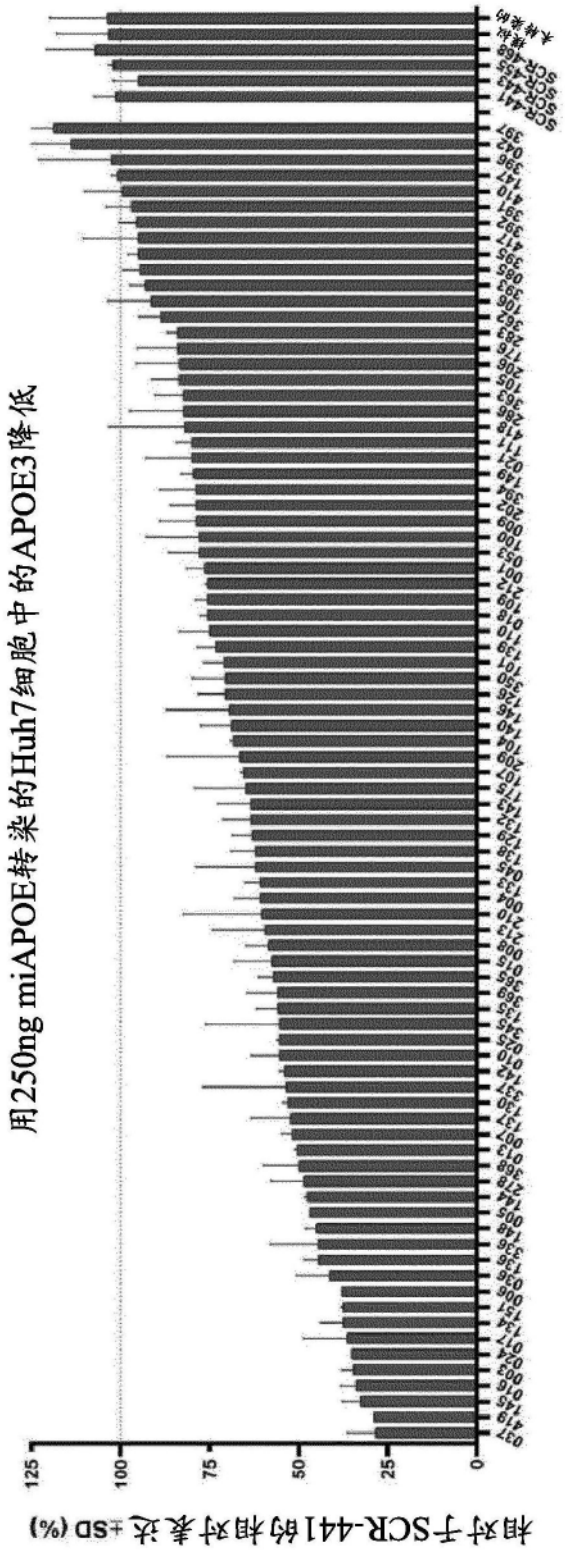

用250ng miAPOE转染的Huh7细胞中的APOE3降低
相对于SCR-441的相对表达±SD (%)
125
100
75
50
25
0

图6

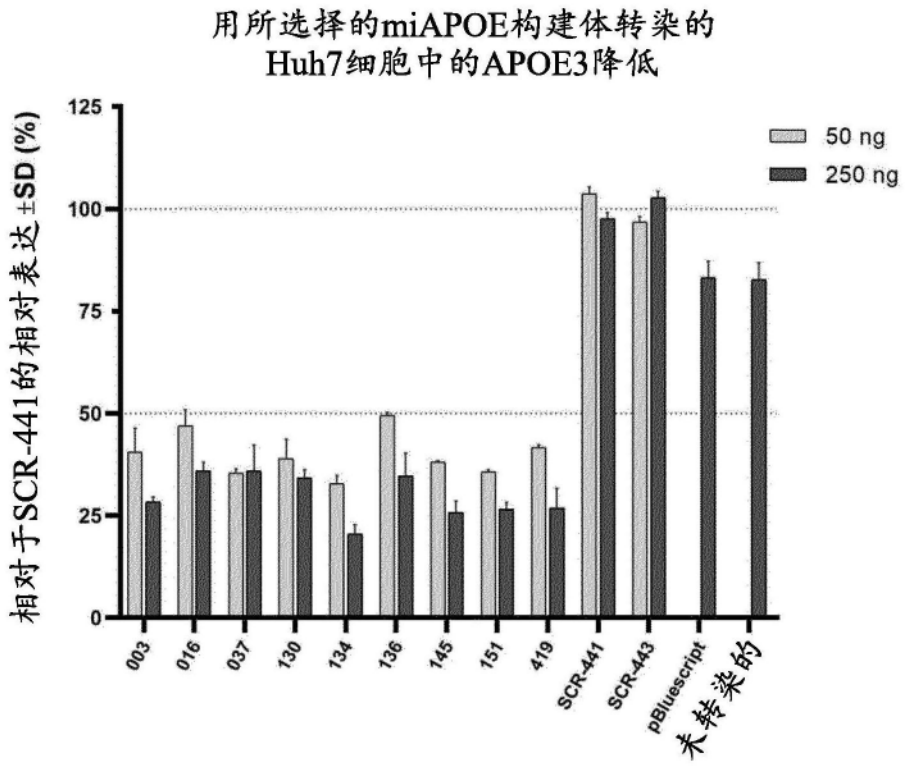

用所选择的miAPOE构建体转染的
Huh7细胞中的APOE3降低
相对于SCR-441的相对表达±SD (%)
125
100
75
50
25
0
50 ng
250 ng
003
016
037
130
134
136
145
151
419
SCR-441
SCR-443
pBluescript
未转染的

图7

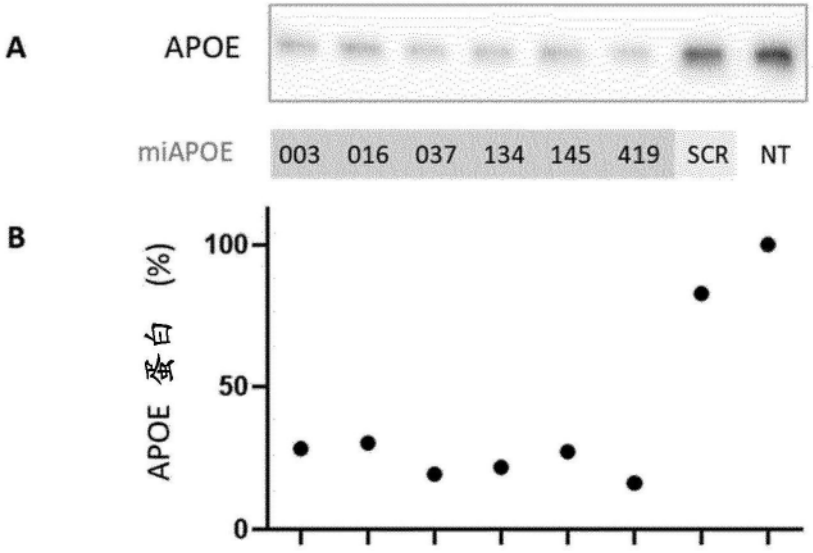

A
APOE
miAPOE
003
016
037
134
145
419
SCR
NT
B
APOE 蛋白 (%)
100
50
0

图8

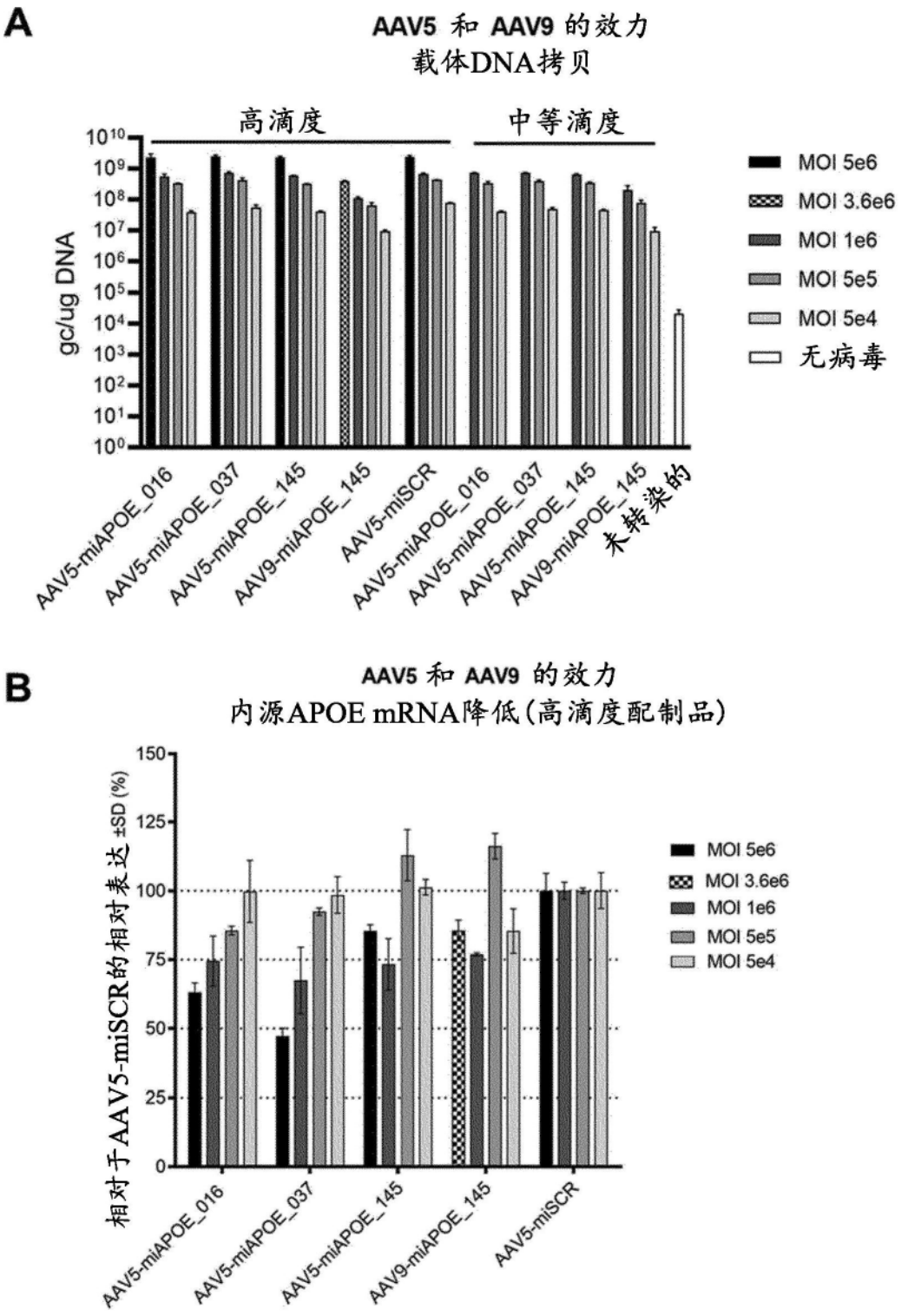

A
AAV5 和 AAV9 的效力
载体DNA拷贝
高滴度
中等滴度
gc/ug DNA
MOI 5e6
MOI 3.6e6
MOI 1e6
MOI 5e5
MOI 5e4
无病毒
AAV5-miAPOE_016
AAV5-miAPOE_037
AAV5-miAPOE_145
AAV9-miAPOE_145
AAV5-miSCR
未转染的
B
AAV5 和 AAV9 的效力
内源APOE mRNA降低(高滴度配制品)
相对于AAV5-miSCR的相对表达 ±SD (%)

图9

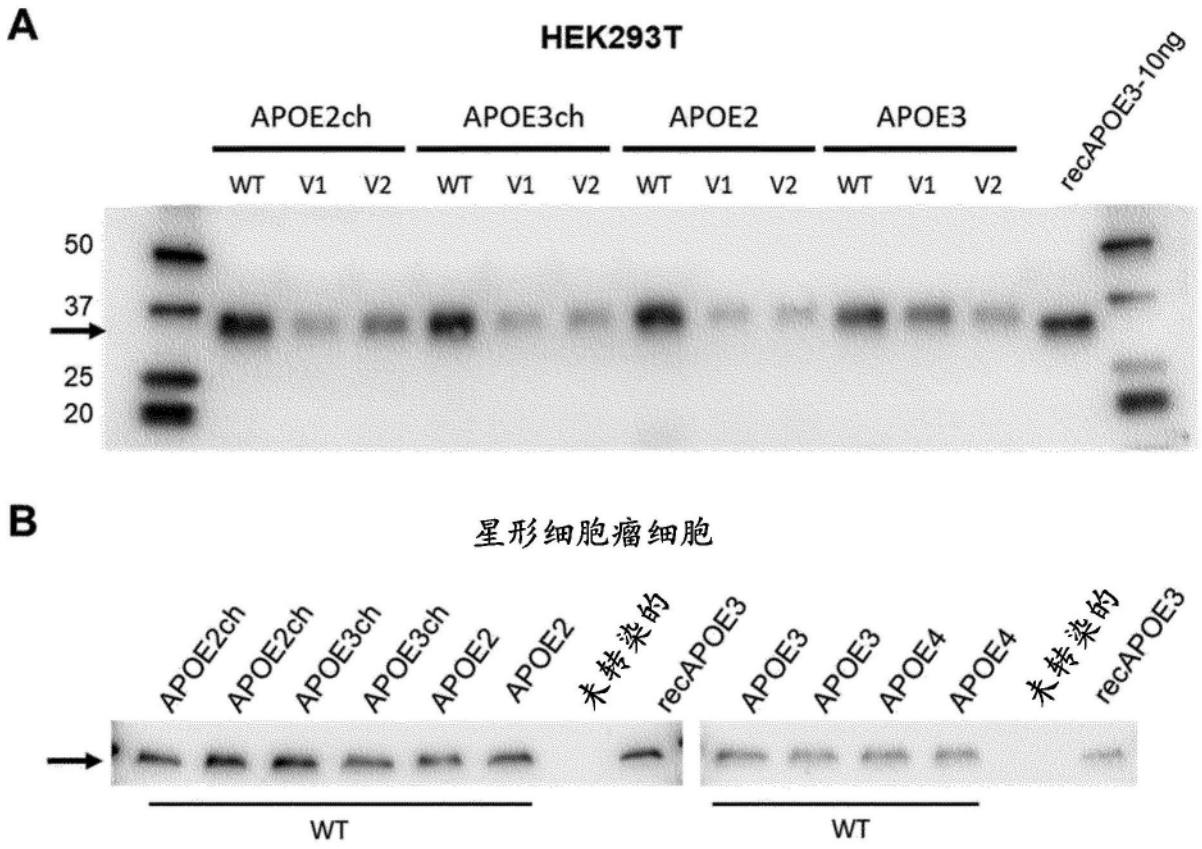
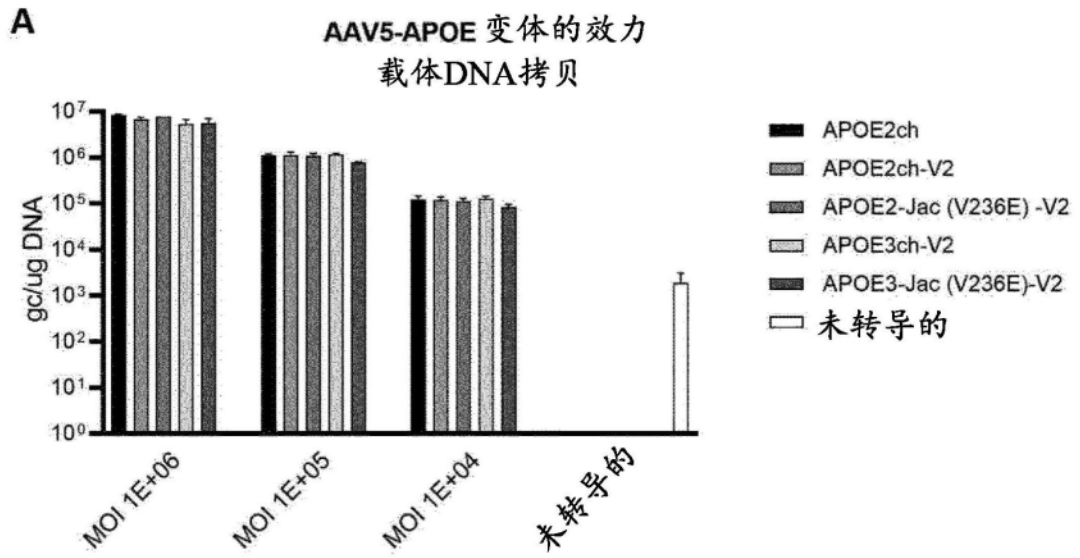
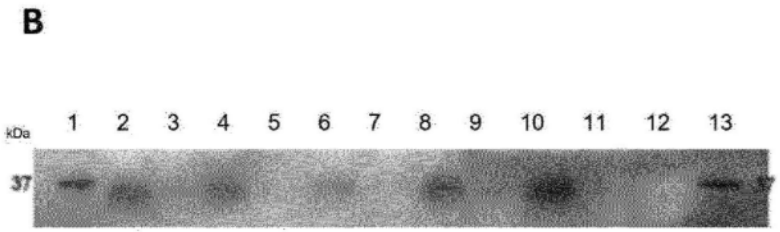

A
HEK293T
APOE2ch
APOE3ch
APOE2
APOE3
recAPOE3-10ng
WT V1 V2 WT V1 V2 WT V1 V2 WT V1 V2
50
37
25
20
B
星形细胞瘤细胞
APOE2ch
APOE2ch
APOE3ch
APOE3ch
APOE2
APOE2
未转染的
recAPOE3
APOE3
APOE3
APOE4
APOE4
未转染的
recAPOE3
WT
WT

图10





泳道	样品	MOI
1	标记物	
2	AAV5-APOE2ch	1E+06
3	AAV5-APOE2ch	1E+05
4	AAV5-APOE2ch-V2	1E+06
5	AAV5-APOE2ch-V2	1E+05
6	AAV5-APOE2-Jac (V236)-V2	1E+06
7	AAV5-APOE2-Jac (V236)-V2	1E+05
8	AAV5-APOE3ch-V2	1E+06
9	AAV5-APOE3ch-V2	1E+05
10	AAV5-APOE3-Jac (V236)-V2	1E+06
11	AAV5-APOE3-Jac (V236)-V2	1E+05
12	未转导的	
13	标记物	

图11

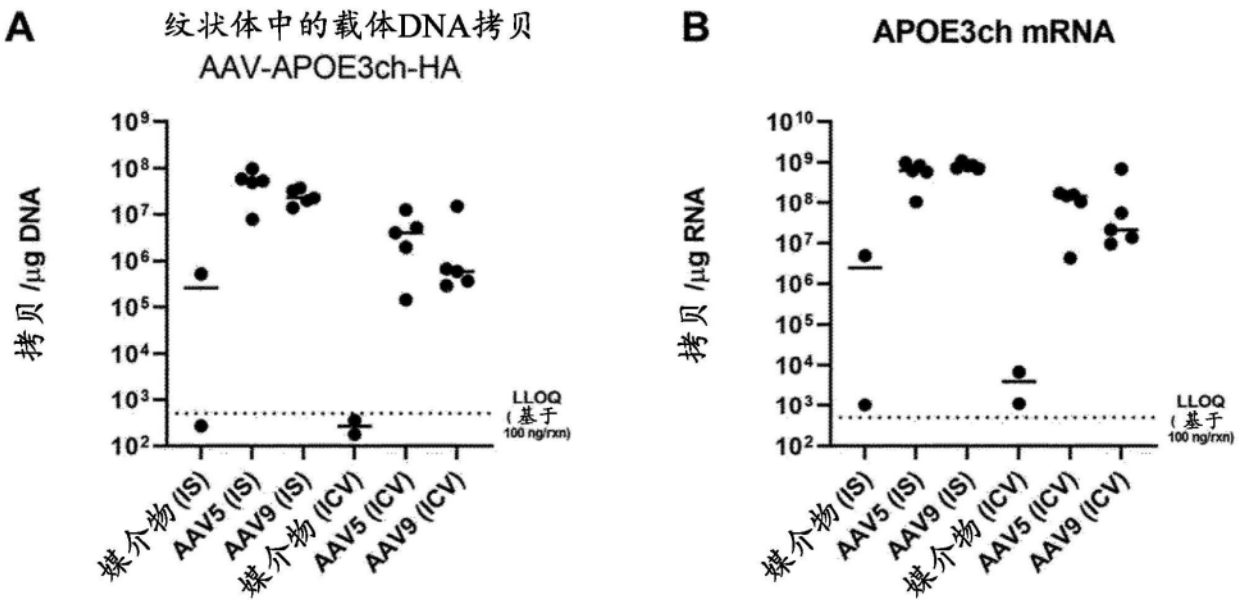

A
纹状体中的载体DNA拷贝
AAV-APOE3ch-HA
拷贝 /μg DNA
LLOQ
（基于
100 ng/rxn）
媒介物 (IS)
AAV5 (IS)
AAV9 (IS)
媒介物 (ICV)
AAV5 (ICV)
AAV9 (ICV)
B
APOE3ch mRNA
拷贝 /μg RNA
LLOQ
（基于
100 ng/rxn）
媒介物 (IS)
AAV5 (IS)
AAV9 (IS)
媒介物 (ICV)
AAV5 (ICV)
AAV9 (ICV)

图12

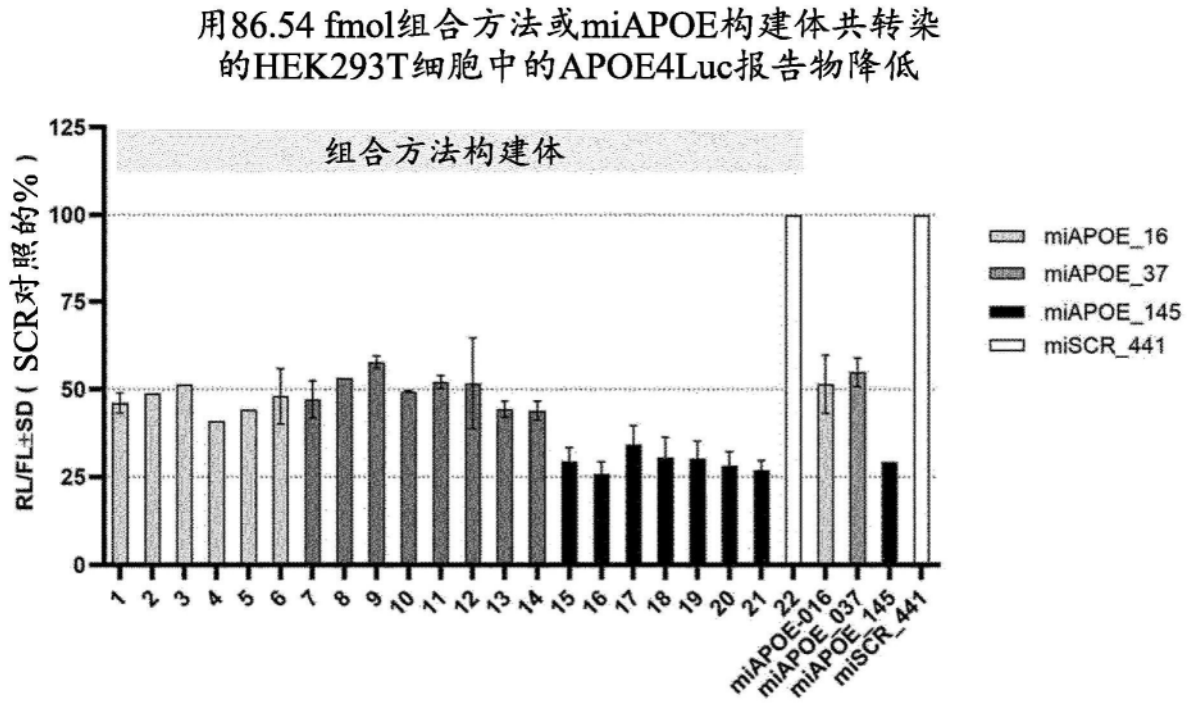

用86.54 fmol组合方法或miAPOE构建体共转染
的HEK293T细胞中的APOE4Luc报告物降低
组合方法构建体
RL/FL±SD（SCR对照的%）
miAPOE_16
miAPOE_37
miAPOE_145
miSCR_441
miAPOE-016
miAPOE_037
miAPOE_145
miSCR_441

图13

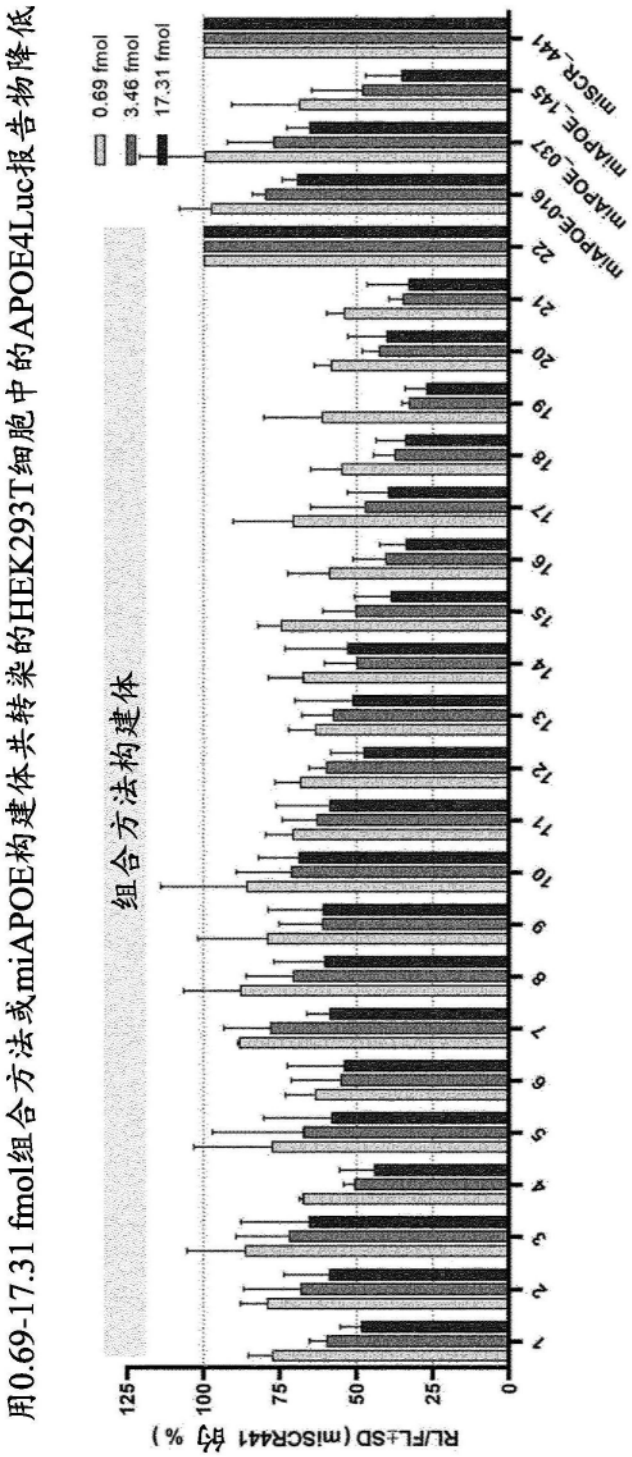

用0.69-17.31 fmol组合方法或miAPOE构建体共转染的HEK293T细胞中的APOE4Luc报告物降低
0.69 fmol
3.46 fmol
17.31 fmol
组合方法构建体
RL/FL±SD (miSCR441 的 %)
125
100
75
50
25
0
miAPOE-016
miAPOE_037
miAPOE_145
miSCR_441

图14

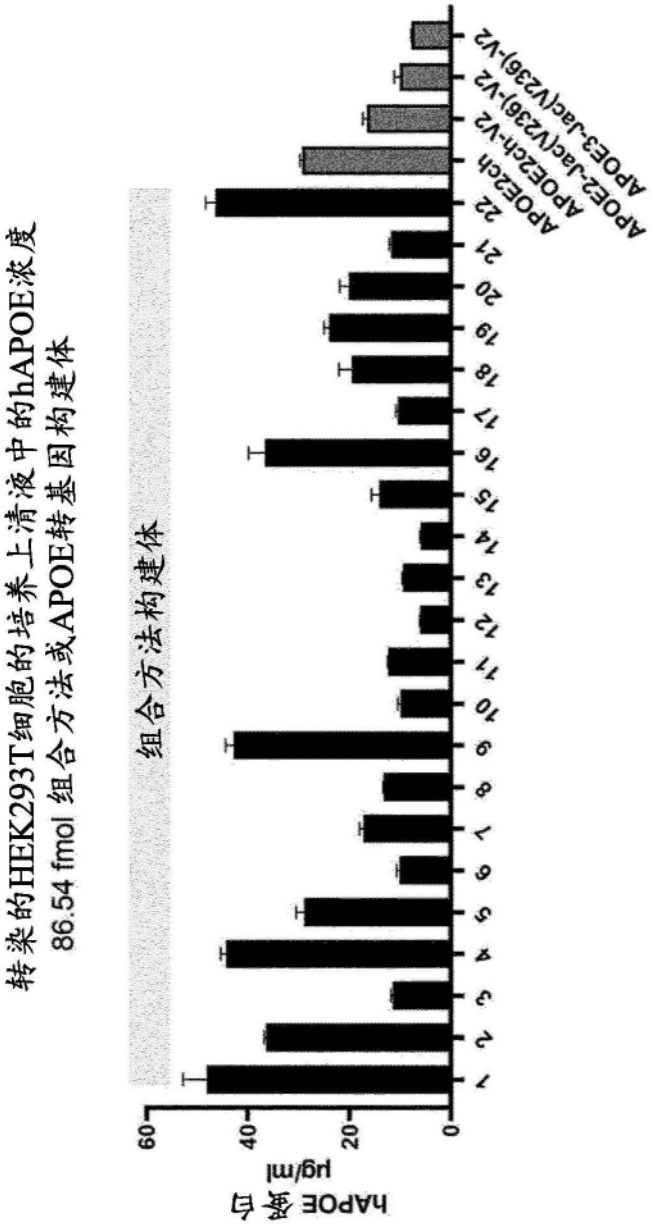

转染的HEK293T细胞的培养上清液中的hAPOE浓度
86.54 fmol 组合方法或APOE转基因构建体
组合方法构建体
hAPOE 蛋白
μg/ml
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
APOE2ch
APOE2-Jac(V236)-V2
APOE3-Jac(V236)-V2

图15

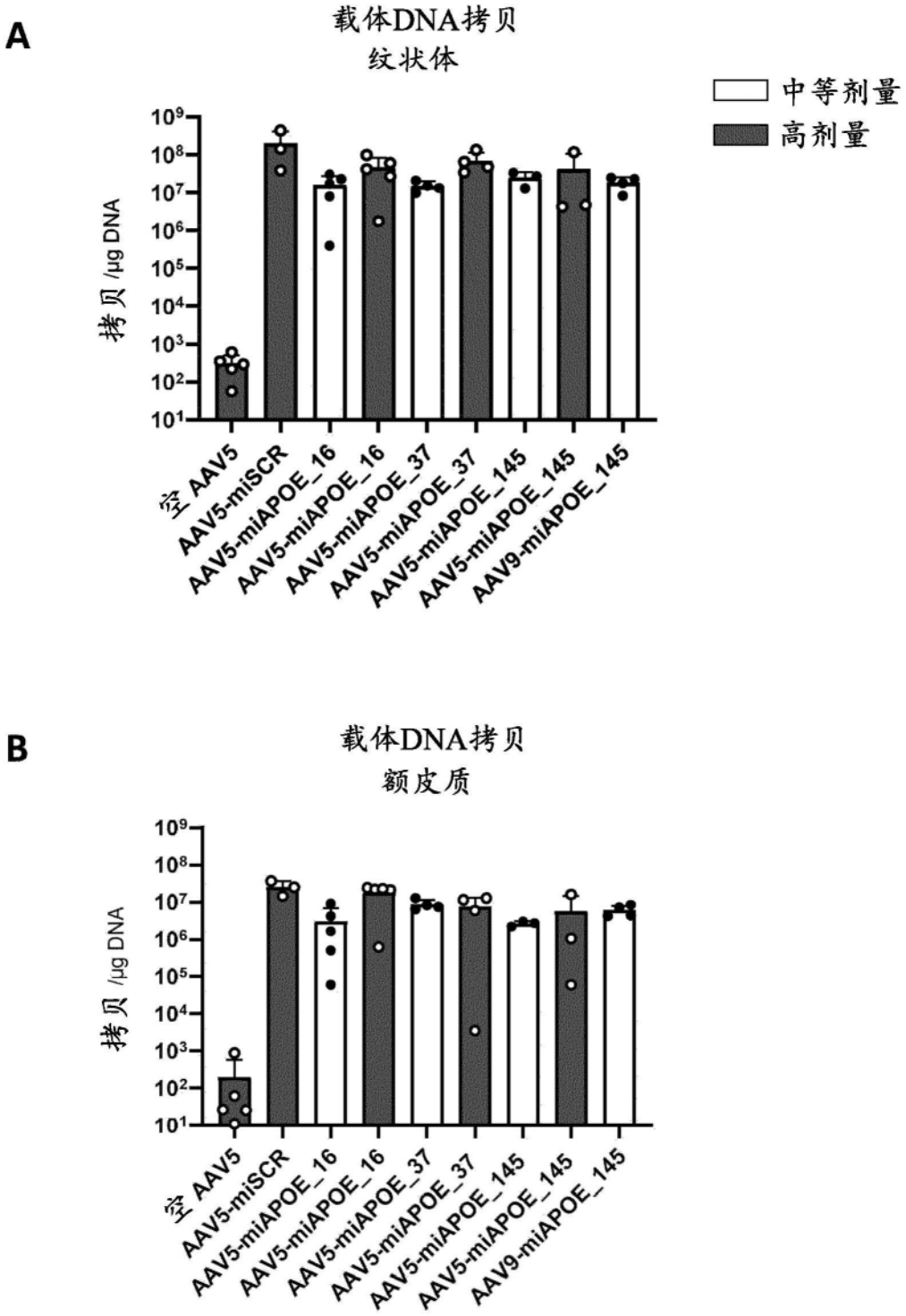

A
载体DNA拷贝
纹状体
中等剂量
高剂量
拷贝 /μg DNA
空 AAV5
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_145
AAV5-miAPOE_145
AAV9-miAPOE_145
B
载体DNA拷贝
额皮质
拷贝 /μg DNA
空 AAV5
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_145
AAV5-miAPOE_145
AAV9-miAPOE_145

图16

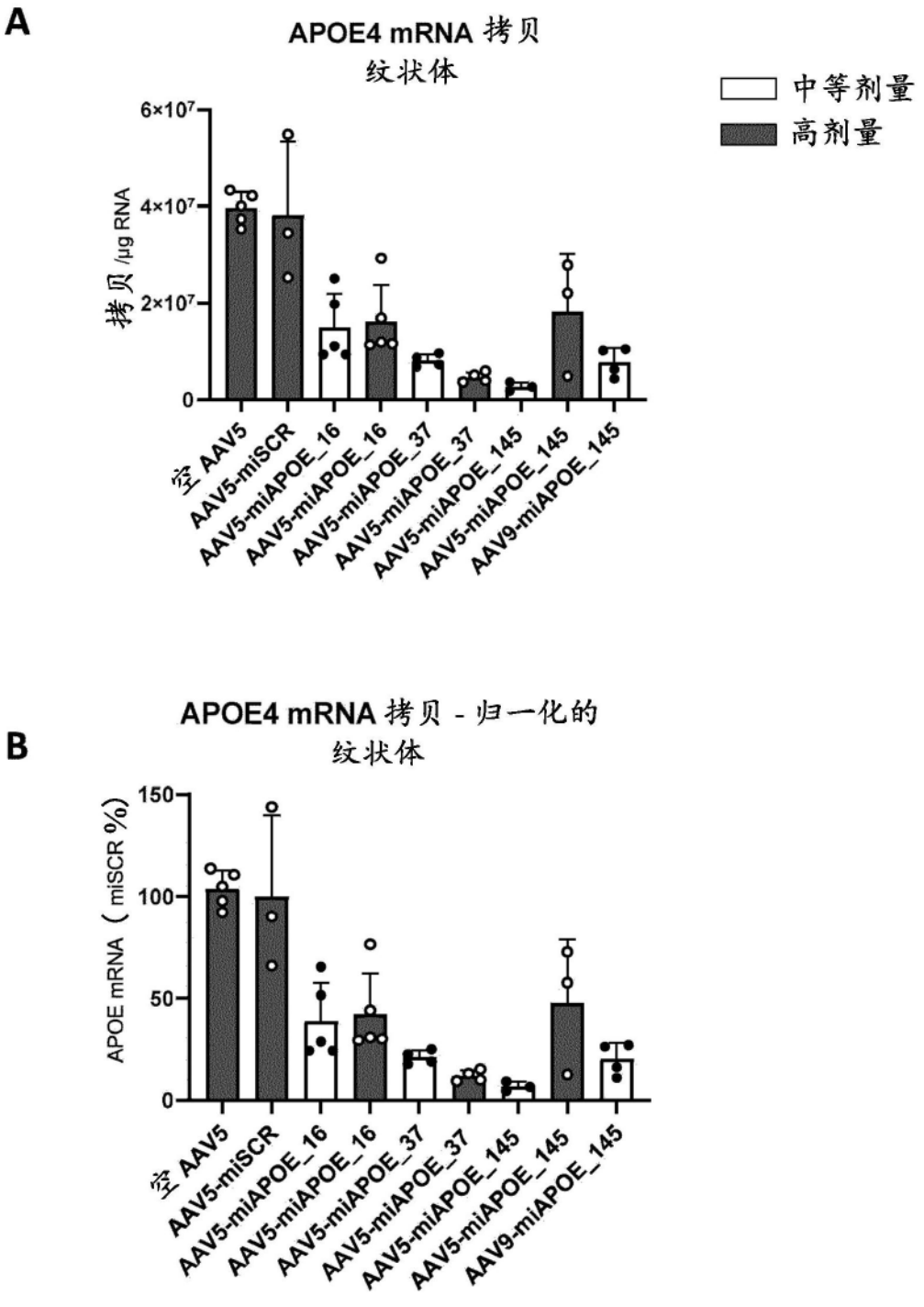

A
APOE4 mRNA 拷贝
纹状体
中等剂量
高剂量
拷贝 /μg RNA
6×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
0
空 AAV5
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_145
AAV5-miAPOE_145
AAV9-miAPOE_145
B
APOE4 mRNA 拷贝 - 归一化的
纹状体
APOE mRNA（miSCR %）
150
100
50
0
空 AAV5
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_145
AAV5-miAPOE_145
AAV9-miAPOE_145

图17(1/2)

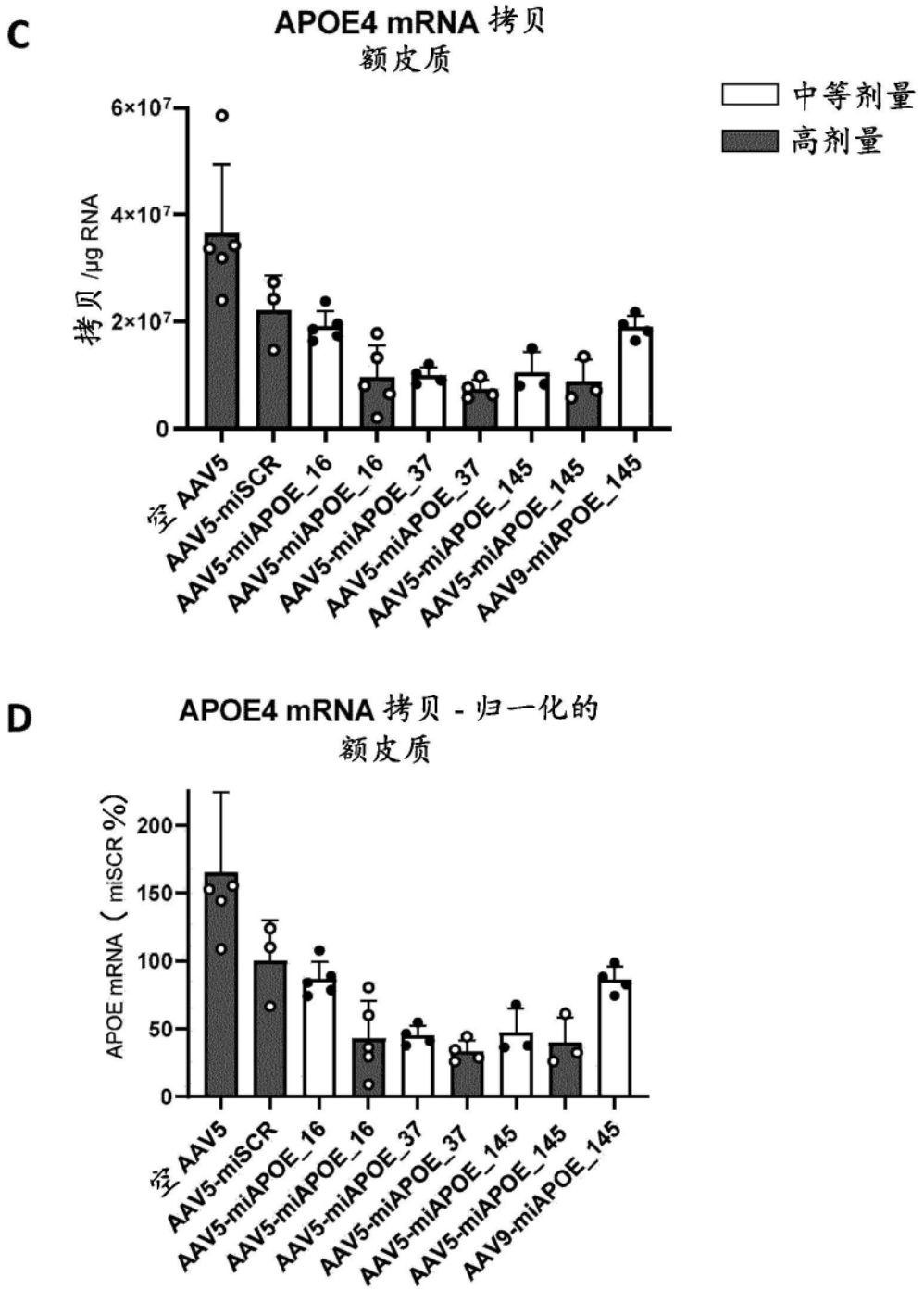

C
APOE4 mRNA 拷贝
额皮质
中等剂量
高剂量
拷贝 /μg RNA
6×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
0
空 AAV5
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_145
AAV5-miAPOE_145
AAV9-miAPOE_145
D
APOE4 mRNA 拷贝 - 归一化的
额皮质
APOE mRNA （miSCR %）
200
150
100
50
0
空 AAV5
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_145
AAV5-miAPOE_145
AAV9-miAPOE_145

图17续(2/2)

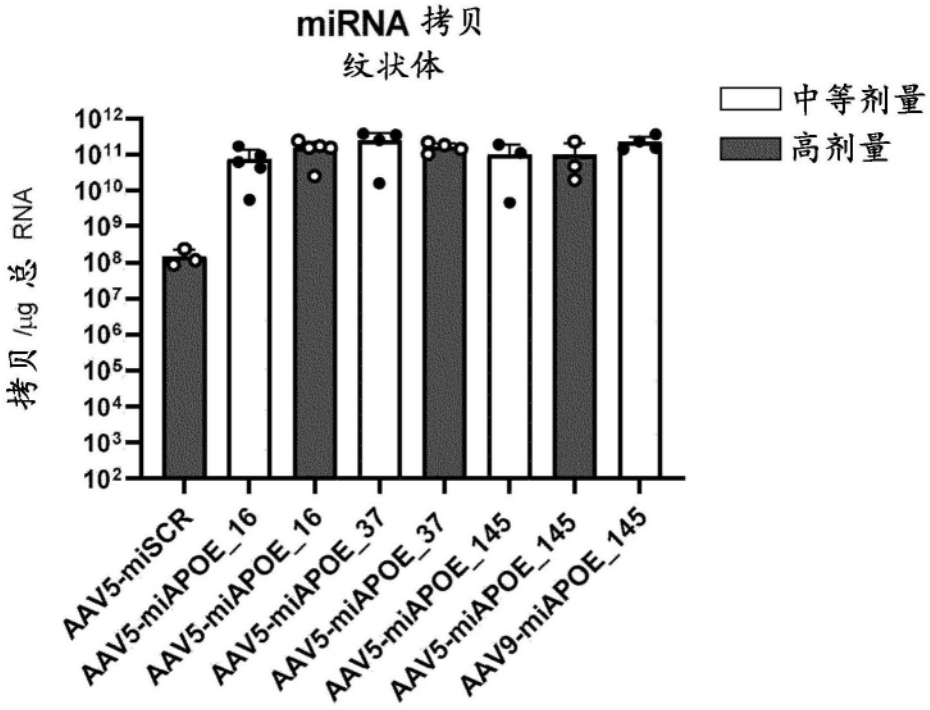

miRNA 拷贝
纹状体
中等剂量
高剂量
拷贝 /μg 总 RNA
10^{12}
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
10^{2}
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_16
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_37
AAV5-miAPOE_145
AAV5-miAPOE_145
AAV9-miAPOE_145

图18

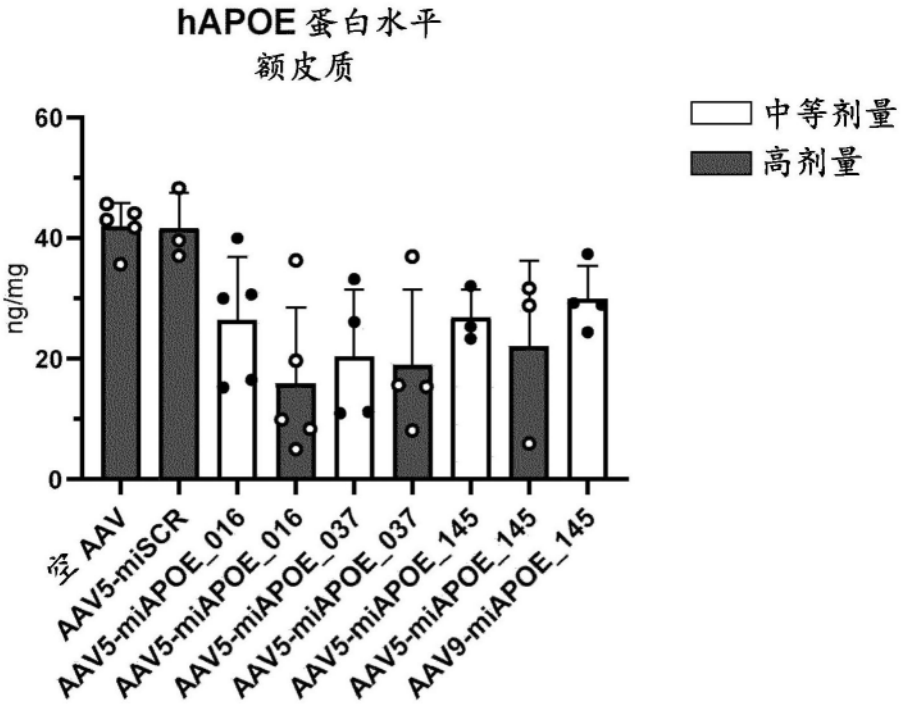
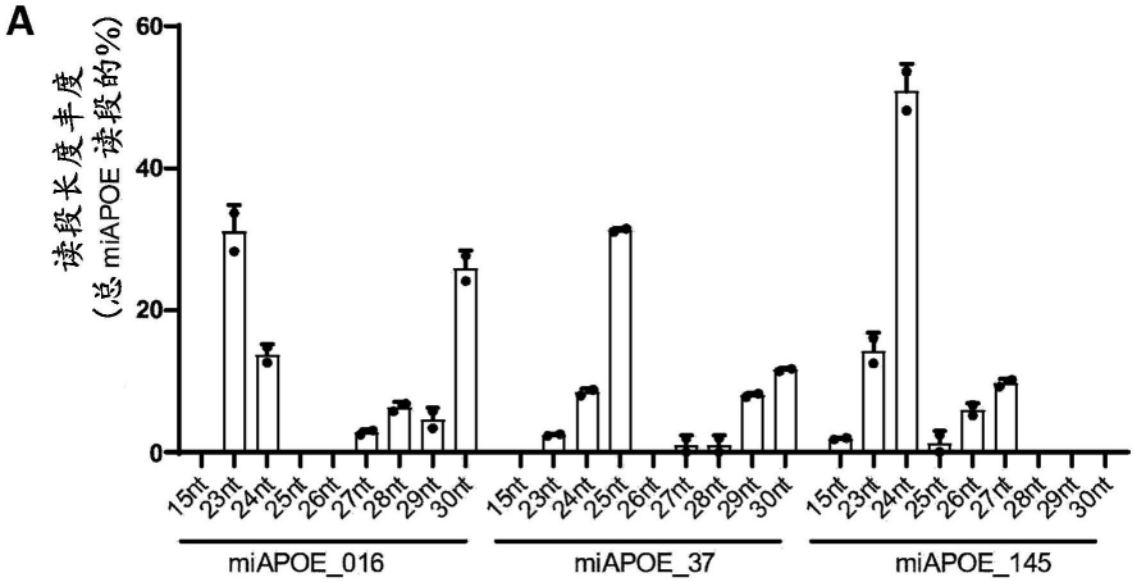

hAPOE 蛋白水平
额皮质
中等剂量
高剂量
ng/mg
60
40
20
0
空 AAV
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_016
AAV5-miAPOE_016
AAV5-miAPOE_037
AAV5-miAPOE_037
AAV5-miAPOE_145
AAV5-miAPOE_145
AAV9-miAPOE_145

图19

A



B

样品	总读段	miAPOE 读段	占总数的百分比
miAPOE_016-实验1	2,046,862	93,566	4.57%
miAPOE_016-实验2	2,790,428	66,647	2.38%
miAPOE_037-实验1	2,836,716	48,279	1.70%
miAPOE_037-实验2	2,376,713	36,894	1.55%
miAPOE_145-实验1	2,713,722	8,661	0.32%
miAPOE_145-实验2	2,945,059	1,475	0.50%

图20(1/2)

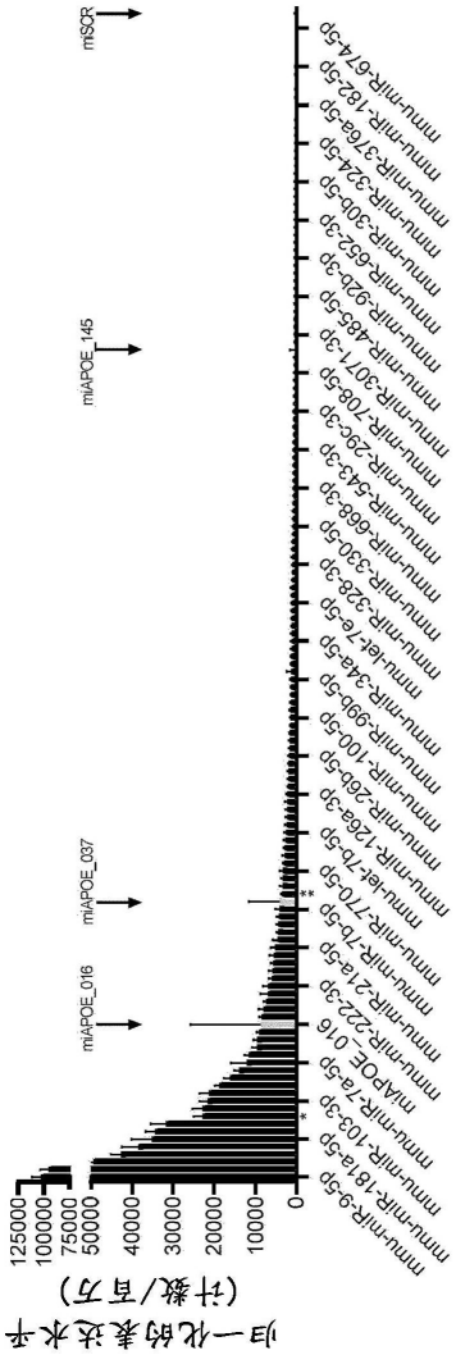

归一化的表达水平
(计数/百万)
125000
100000
75000
50000
40000
30000
20000
10000
0
miSOR
miAPOE_145
miAPOE_037
miAPOE_016
mmu-miR-9-5p
mmu-miR-181a-5p
mmu-miR-103-3p
mmu-miR-7a-5p
miAPOE_016
mmu-miR-222-3p
mmu-miR-21a-5p
mmu-miR-7b-5p
mmu-miR-770-5p
mmu-let-7b-5p
mmu-miR-126a-3p
mmu-miR-26b-5p
mmu-miR-100-5p
mmu-miR-99b-5p
mmu-miR-34a-5p
mmu-let-7e-5p
mmu-miR-328-3p
mmu-miR-330-5p
mmu-miR-668-3p
mmu-miR-543-3p
mmu-miR-29c-3p
mmu-miR-708-5p
mmu-miR-3071-3p
mmu-miR-485-5p
mmu-miR-926-3p
mmu-miR-652-3p
mmu-miR-30b-5p
mmu-miR-324-5p
mmu-miR-376a-5p
mmu-miR-182-5p
mmu-miR-674-5p

图20续(2/2)

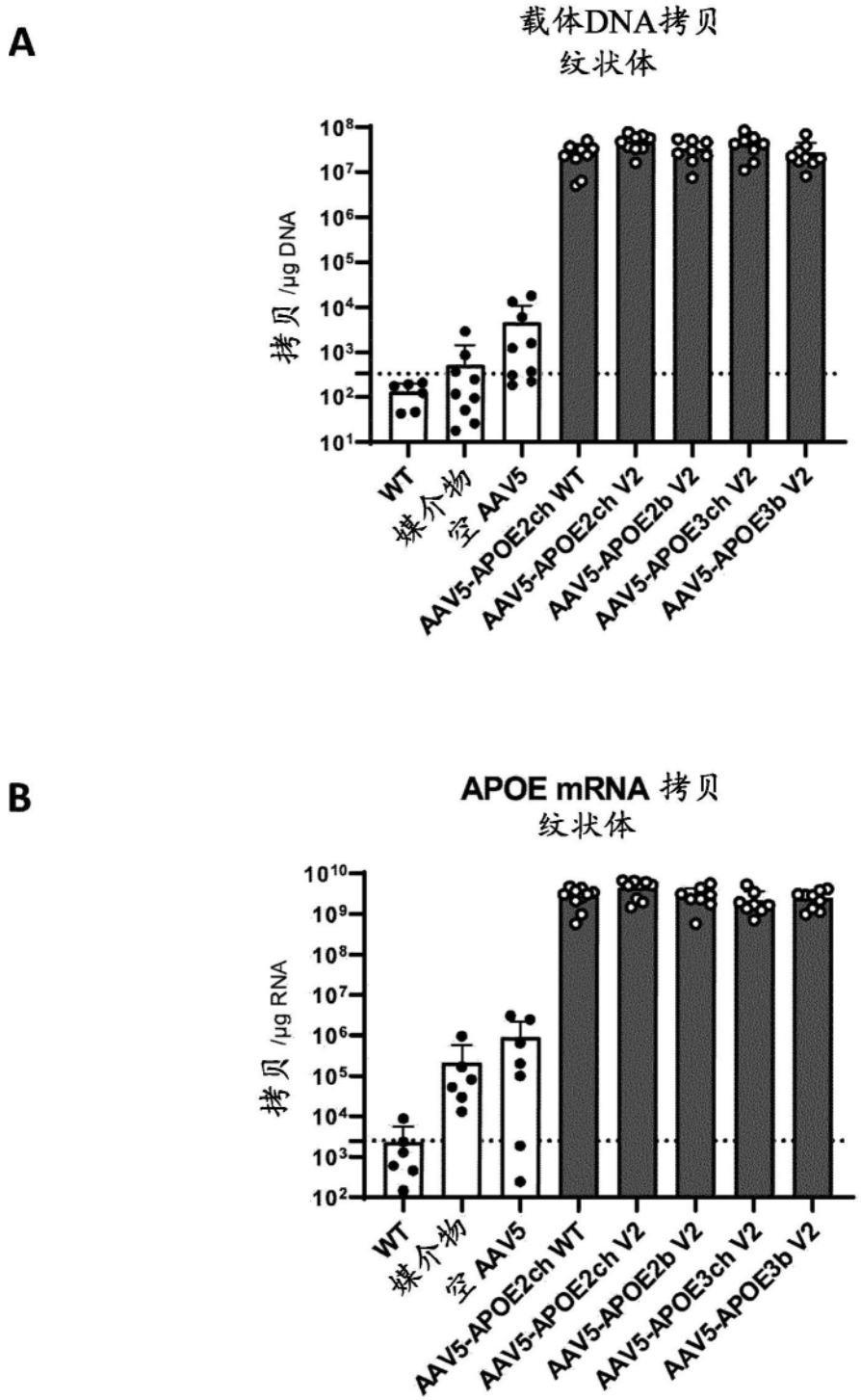
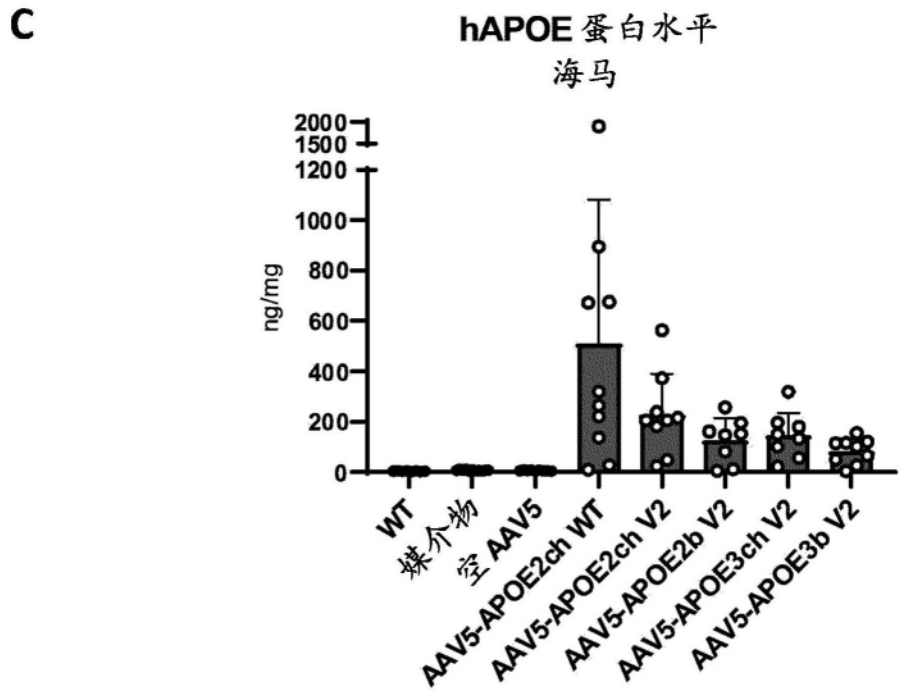

A
载体DNA拷贝
纹状体
拷贝 /μg DNA
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
WT
媒介物
空 AAV5
AAV5-APOE2ch WT
AAV5-APOE2ch V2
AAV5-APOE2b V2
AAV5-APOE3ch V2
AAV5-APOE3b V2
B
APOE mRNA 拷贝
纹状体
拷贝 /μg RNA
10^{10}
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
WT
媒介物
空 AAV5
AAV5-APOE2ch WT
AAV5-APOE2ch V2
AAV5-APOE2b V2
AAV5-APOE3ch V2
AAV5-APOE3b V2

图21(1/2)


C
hAPOE 蛋白水平
海马
ng/mg
2000
1500
1200
1000
800
600
400
200
0
WT
媒介物
空 AAV5
AAV5-APOE2ch WT
AAV5-APOE2ch V2
AAV5-APOE2b V2
AAV5-APOE3ch V2
AAV5-APOE3b V2

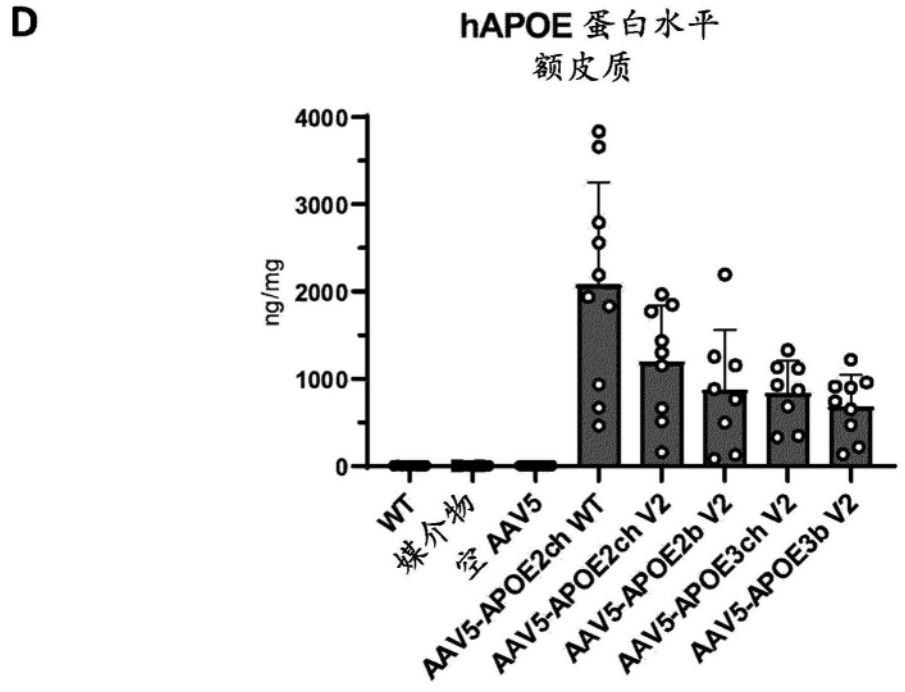

D
hAPOE 蛋白水平
额皮质
ng/mg
4000
3000
2000
1000
0
WT
媒介物
空 AAV5
AAV5-APOE2ch WT
AAV5-APOE2ch V2
AAV5-APOE2b V2
AAV5-APOE3ch V2
AAV5-APOE3b V2

图21续(2/2)

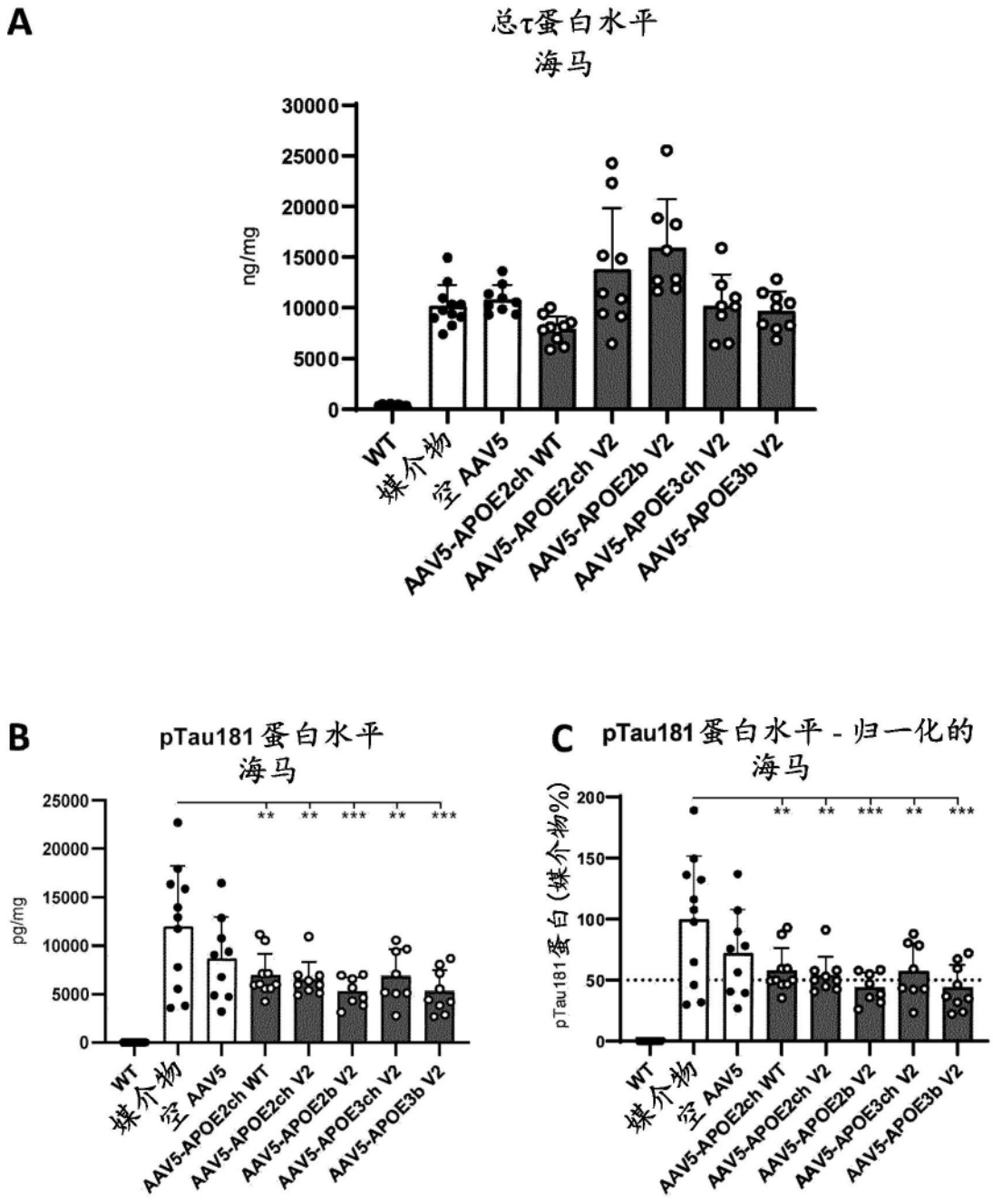
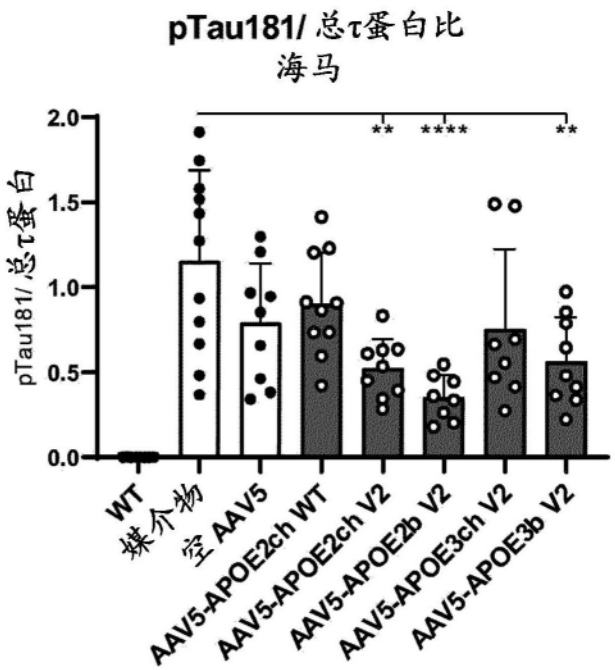

A
总τ蛋白水平
海马
ng/mg
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
WT
媒介物
空 AAV5
AAV5-APOE2ch WT
AAV5-APOE2ch V2
AAV5-APOE2b V2
AAV5-APOE3ch V2
AAV5-APOE3b V2
B
pTau181 蛋白水平
海马
pg/mg
25000
20000
15000
10000
5000
0
**
**
***
**
***
C
pTau181 蛋白水平 - 归一化的
海马
pTau181蛋白(媒介物%)
200
150
100
50
0

图22(1/2)

D


pTau181/总τ蛋白比
海马
pTau181/总τ蛋白
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
****
**
WT
媒介物
空 AAV5
AAV5-APOE2ch WT
AAV5-APOE2ch V2
AAV5-APOE2b V2
AAV5-APOE3ch V2
AAV5-APOE3b V2

E

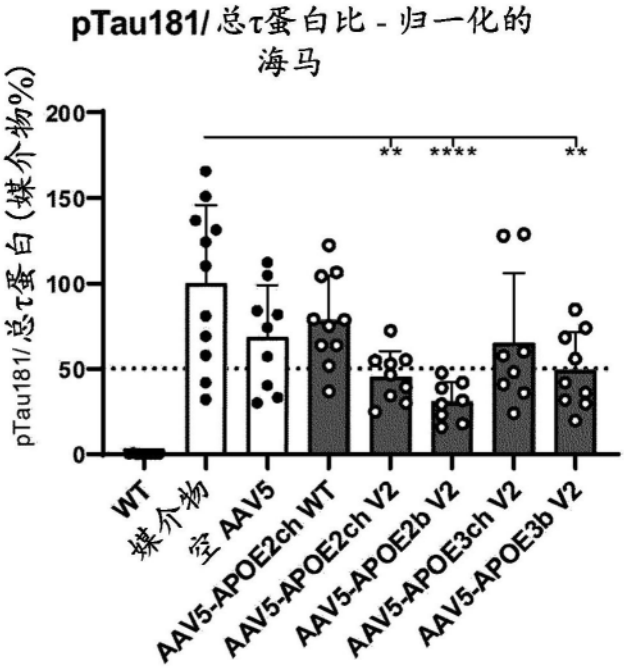

pTau181/总τ蛋白比 - 归一化的
海马
pTau181/总τ蛋白(媒介物%)
200
150
100
50
0
**
****
**
WT
媒介物
空 AAV5
AAV5-APOE2ch WT
AAV5-APOE2ch V2
AAV5-APOE2b V2
AAV5-APOE3ch V2
AAV5-APOE3b V2

图22续(2/2)

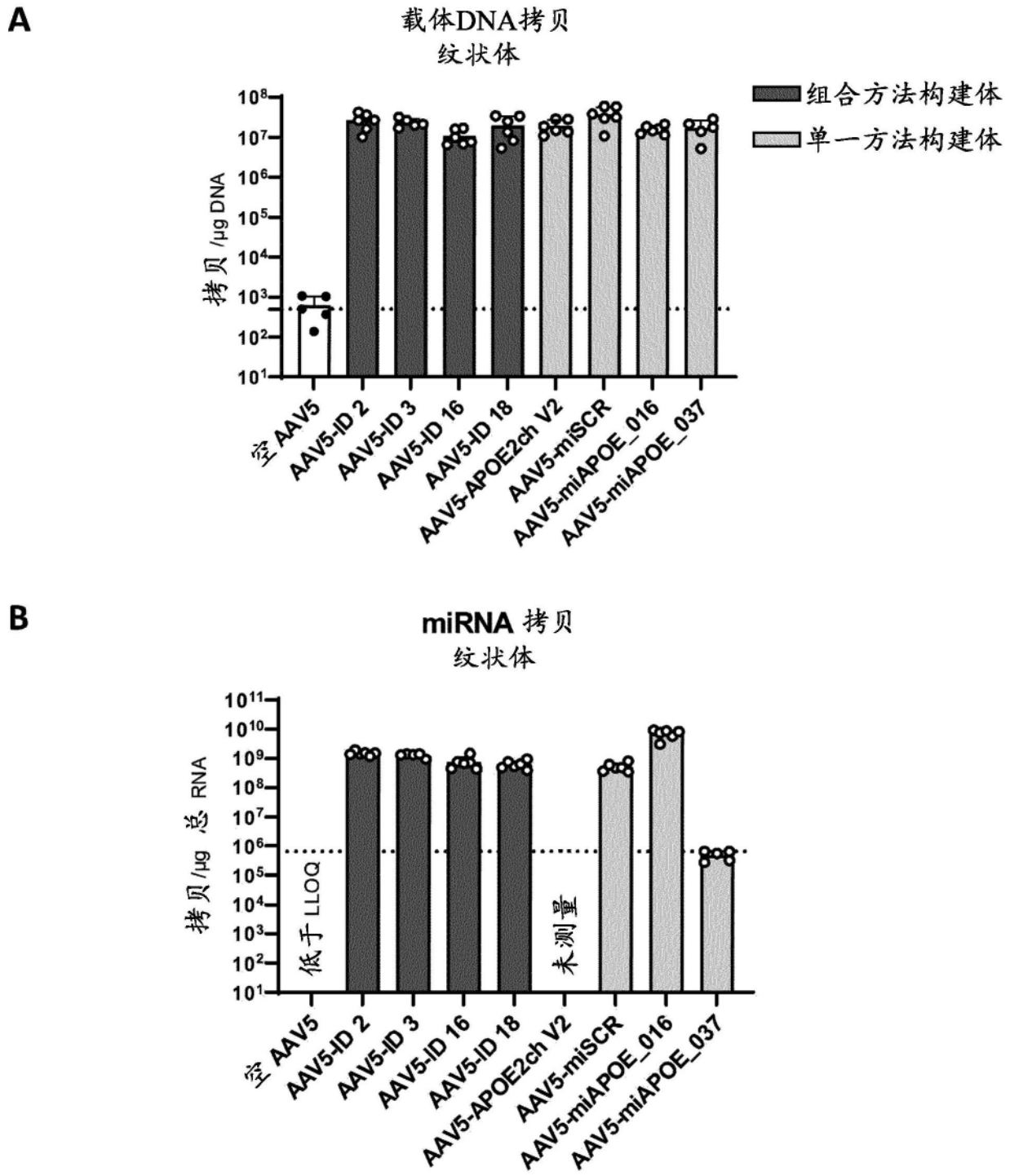

A
载体DNA拷贝
纹状体
组合方法构建体
单一方法构建体
拷贝/μg DNA
空AAV5
AAV5-ID 2
AAV5-ID 3
AAV5-ID 16
AAV5-ID 18
AAV5-APOE2ch V2
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_016
AAV5-miAPOE_037
B
miRNA 拷贝
纹状体
拷贝/μg 总 RNA
低于 LLOQ
未测量

图23(1/2)

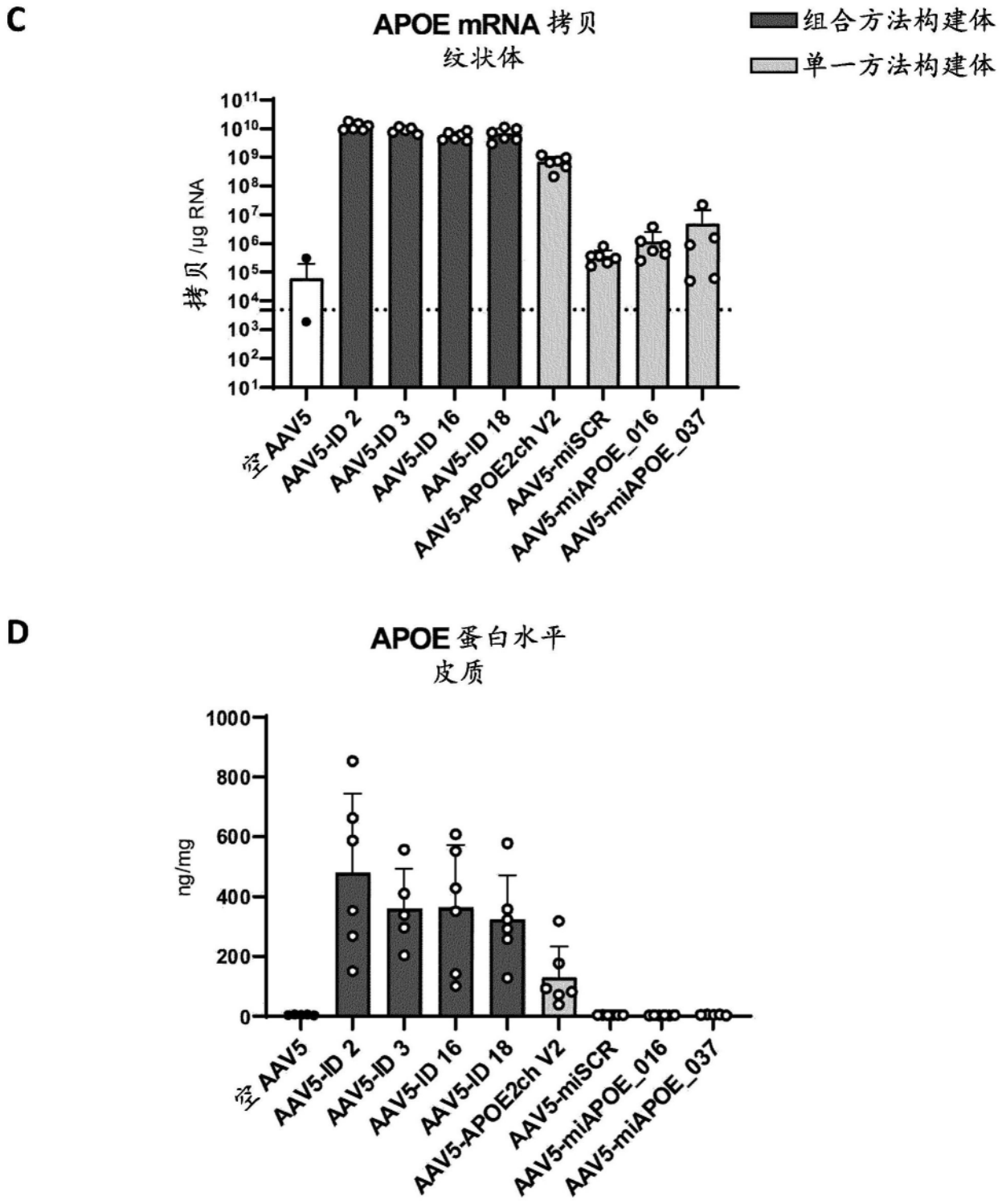
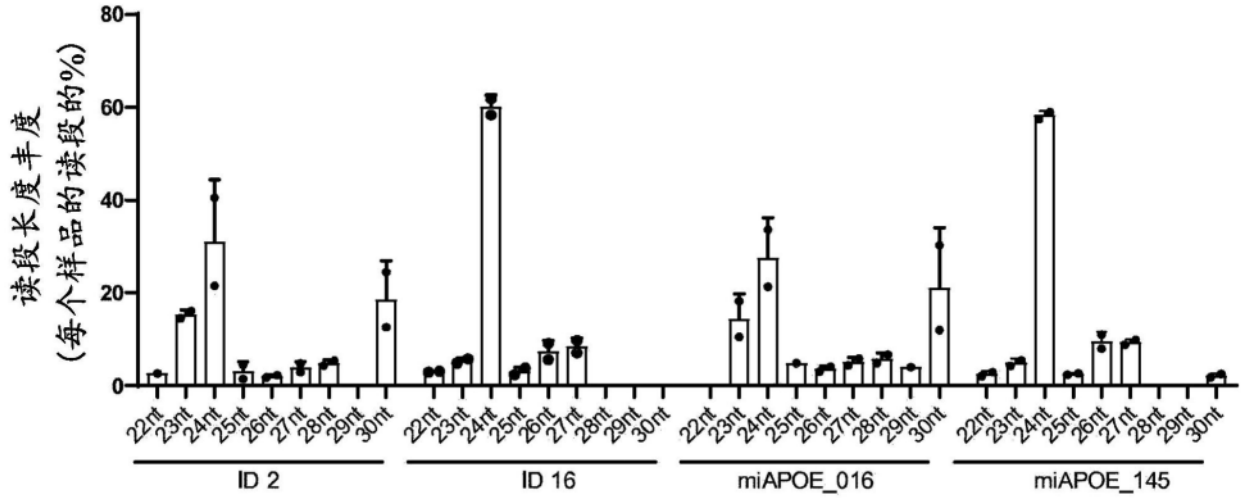

C
APOE mRNA 拷贝
纹状体
组合方法构建体
单一方法构建体
拷贝 /µg RNA
空 AAV5
AAV5-ID 2
AAV5-ID 3
AAV5-ID 16
AAV5-ID 18
AAV5-APOE2ch V2
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_016
AAV5-miAPOE_037
D
APOE 蛋白水平
皮质
ng/mg
空 AAV5
AAV5-ID 2
AAV5-ID 3
AAV5-ID 16
AAV5-ID 18
AAV5-APOE2ch V2
AAV5-miSCR
AAV5-miAPOE_016
AAV5-miAPOE_037

图23续(2/2)

A



B

样品	总读段	miAPOE 读段	占总数的百分比
组合方法构建体 ID 2 – 实验1	4,871,300	2,496	0.05%
组合方法构建体 ID 2 – 实验2	2,872,638	3,151	0.10%
组合方法构建体 ID 16 – 实验1	3,988,997	60,525	1.52%
组合方法构建体 ID 16 – 实验2	3,105,701	45,165	1.45%
miAPOE_016 – 实验1	7,466,258	17,275	0.23%
miAPOE_016 – 实验2	2,750,801	8,985	0.32%
miAPOE_037 – 实验1	4,903,928	2	0
miAPOE_037 – 实验2	3,888,092	0	0
miAPOE_145 – 实验1	2,830,491	74,316	2.62%
miAPOE_145 – 实验2	4,337,691	116,269	2.68%

图24(1/3)

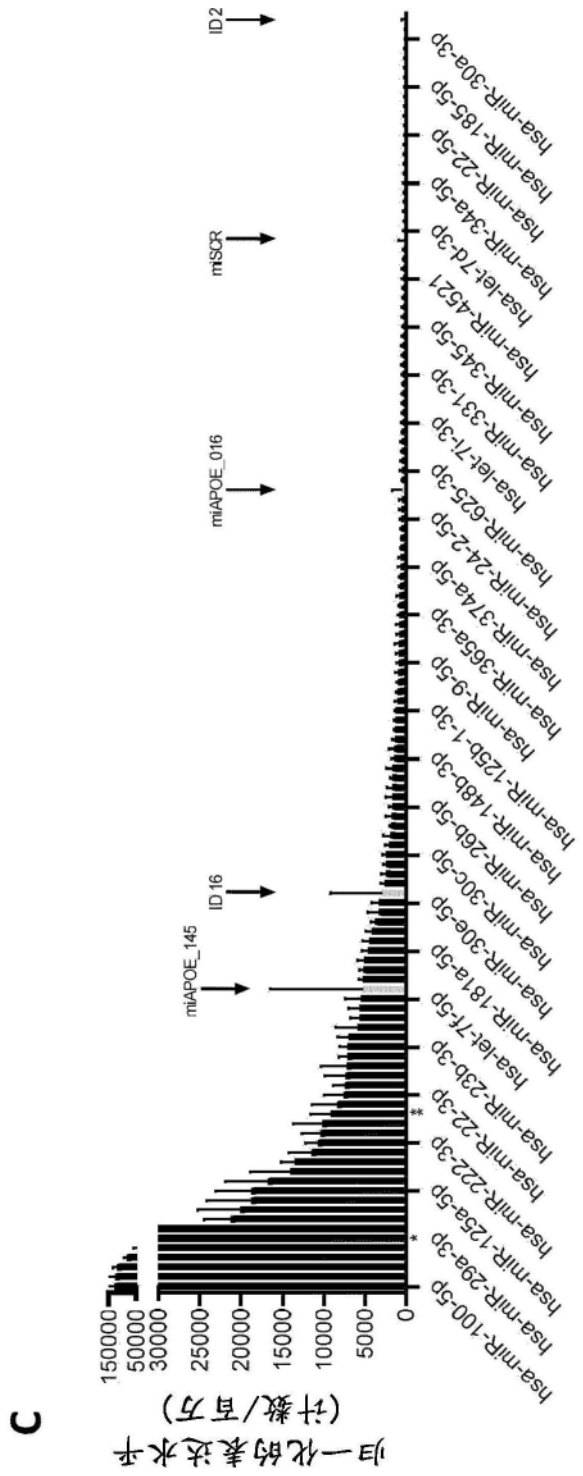
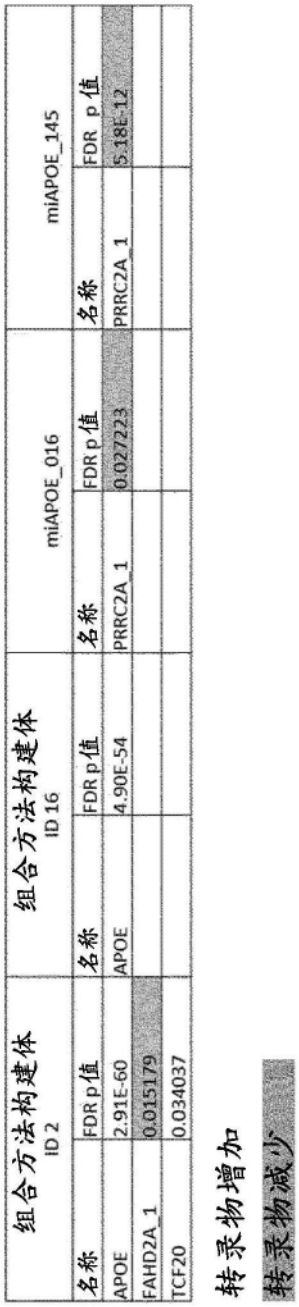

C
归一化的表达水平
(计数/百万)
150000
50000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
ID2
miSCR
miAPOE_016
ID 16
miAPOE_145
hsa-miR-100-5p
hsa-miR-298-3p
hsa-miR-125a-5p
hsa-miR-222-5p
hsa-miR-22-3p
hsa-miR-23b-3p
hsa-let-7f-5p
hsa-miR-181a-5p
hsa-miR-30e-5p
hsa-miR-30c-5p
hsa-miR-26b-5p
hsa-miR-148b-3p
hsa-miR-125b-1-3p
hsa-miR-9-5p
hsa-miR-365a-3p
hsa-miR-374a-5p
hsa-miR-24-2-5p
hsa-miR-625-3p
hsa-let-7i-3p
hsa-miR-331-3p
hsa-miR-345-5p
hsa-miR-4521
hsa-let-7d-3p
hsa-miR-34a-5p
hsa-miR-22-5p
hsa-miR-185-5p
hsa-miR-30a-3p

图24续(2/3)

D



组合方法构建体 ID 2		组合方法构建体 ID 16		miAPOE_016		miAPOE_145	
名称	FDR p值	名称	FDR p值	名称	FDR p值	名称	FDR p值
APOE	2.91E-60	APOE	4.90E-54	PRRC2A_1	0.027223	PRRC2A_1	5.18E-12
FAHD2A_1	0.015179						
TCF20	0.034037						

转录物增加

转录物减少

图24续(3/3)