



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119790153 A

(43) 申请公布日 2025.04.08

(21) 申请号 202380041546.9

(22) 申请日 2023.03.30

(30) 优先权数据

22165710.9 2022.03.30 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2023/050168 2023.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/191631 EN 2023.10.05

(71) 申请人 阿姆斯特丹大学医学中心基金会

地址 荷兰阿姆斯特丹

(72) 发明人 伊加尔-马丁·平托

安克·约翰娜·玛丽娜·泰森

迪伦·克里斯坦托·德·弗里斯

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

专利代理师 李海霞

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

权利要求书2页 说明书67页 附图27页

(54) 发明名称

用于LMNA突变携带者治疗的反义核酸

(57) 摘要

本发明涉及能抑制哺乳动物细胞LMNA基因的表达的分离的反义分子,其中所述反义分子包含与LMNA基因编码的转录物的靶区域基本上互补的反义核酸链,其中所述反义核酸链至少与所述靶区域中的SNP rs538089、SNP rs505058或SNP rs4641互补。

1. 一种分离的反义分子,所述反义分子能够抑制、减少哺乳动物细胞中LMNA基因的等位基因特异性表达,其中,所述反义分子包含与LMNA基因编码的转录物的靶区域基本上互补的反义核酸链,其中所述反义核酸链至少与所述靶区域中的SNP rs538089、rs505058或rs4641互补。

2. 根据权利要求1所述的分离的反义分子,其中所述反义分子选自:

双链核酸(dsNA)或其化学修饰版本;或

反义寡核苷酸(ASO)。

3. 根据权利要求1或2所述的分离的反义分子,其中所述靶区域包含选自由以下组成的群组:

GAUGACCUCCUCCAUCACCACCACGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA (SEQ ID NO:1);

GAUGACCUCCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA (SEQ ID NO:2);

GAUGACCUCCUCCAUCACCACCACGGCUGCCACUGCAGCAGCUC (SEQ ID NO:3);以及

GAUGACCUCCUCCAUCACCACCAUGGCUGCCACUGCAGCAGCUC (SEQ ID NO:4);或

与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4至少80%同源的序列。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的分离的反义分子,其中所述反义核酸链包含具有连续链的核酸序列,所述连续链中至少12个核苷酸选自SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153或SEQ ID NO:154所示的核酸序列。

5. 根据上述权利要求中任一项所述的分离的反义分子,其中所述反义核酸包含选自由SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74组成的群组中的核酸序列。

6. 根据上述权利要求中任一项所述的分离的反义分子,其中所述反义分子包含SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74所示的反义核酸。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的分离的反义分子,其中所述反义分子包含长度是15-30个核苷酸的正义核酸链;并且其中,所述正义核酸链与所述反义区互补,并且其中所述正义核酸链和反义核酸链形成双链体区域。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的分离的反义分子,其中所述反义链和所述正义链通过RNA环链可操作地连接以形成发卡结构,所述发卡结构包含双链体结构和环结构。

9. 一种编码根据上述权利要求中任一项所述的分离的反义分子的核酸。

10. 一种表达盒,所述表达盒包含编码上述权利要求中任一项所述的反义分子的核酸。

11. 一种包含权利要求10所述的表达盒的表达载体。

12. 一种药物组合物,包含权利要求1-8中任一项所述的分离的反义分子、权利要求9所述的核酸、权利要求10所述的表达盒或权利要求11所述的表达载体;以及药学上可接受的载体。

13. 一种权利要求1-8中任一项所述的分离的反义分子、权利要求9所述的核酸、权利要求10所述的表达盒、权利要求11所述的表达载体或权利要求12所述的药物组合物在医疗中的用途。

14. 一种权利要求1-8中任一项所述的分离的反义分子、权利要求9所述的核酸、权利要求10所述的表达盒、权利要求11所述的表达载体或权利要求12所述的药物组合物在治疗心力衰竭中的用途。

15. 一种选择适用于疾病的医疗的反义分子方法,所述疾病由在基因的突变等位基因

中出现的常染色体显性突变导致,所述方法包含:

提供患有疾病的受试者的核酸试样,所述疾病由基因的突变等位基因中出现的常染色体显性突变导致;

确定导致所述疾病的所述基因的所述突变等位基因的杂合性;

确定所述基因中存在杂合SNP;

确定靶区域的核酸序列,所述靶区域在所述基因的突变等位基因的转录物中包含所述杂合SNP;

选择与所述靶区域互补的分离的反义分子。

16. 一种体外抑制、减少细胞中突变LMNA等位基因的表达的方法,所述方法包含下述步骤:

向所述细胞引入本发明的反义分子,引入的所述反义分子与表达LMNA突变等位基因的细胞接触时,抑制、减少所述LMNA突变等位基因的表达;以及

维持步骤(a)产生的细胞足够长的时间,以实现所述LMNA突变等位基因的mRNA转录物的降解,由此抑制、减少所述细胞中所述LMNA突变等位基因的表达。

## 用于LMNA突变携带者治疗的反义核酸

### 技术领域

[0001] 本发明涉及适合治疗心脏疾病的反义分子。更具体地,本发明涉及适合用于治疗心脏核纤层蛋白病,特别是扩张型心肌病的siRNA和shRNA。

### 背景技术

[0002] 目前使用的治疗心力衰竭的方法已经成功地改善了大多数形式的心力衰竭的症状和存活率。但是,对于少数患者,这些循证治疗并未中断疾病进展,使得这些患者出现治疗抗性的心力衰竭。讽刺的是,这通常涉及遗传性心力衰竭的年轻患者,包括由纤层蛋白A/C(LMNA)基因的突变引起的心力衰竭的患者。

[0003] 目前,已经报道有超过450种LMNA突变,这些突变导致包括扩张型心肌病在内的大范围疾病(核纤层蛋白病)。

[0004] 本发明的目标是提供一种治疗由LMNA基因突变导致的可遗传形式的心力衰竭的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明提供一种分离的反义分子,其能减少(reducing)或抑制LMNA基因的等位基因在哺乳动物细胞的表达,所述反义分子包含反义核酸链,该反义核酸链与由LMNA基因编码的转录物的靶区域基本上互补,其中所述反义核酸链至少与所述靶区域中SNP rs538089、SNP rs505058或SNP rs4641互补。

[0006] 优选地,所述反义分子能减少突变LMNA等位基因的表达。在最优选的实施方案中,所述反义分子能减少突变LMNA等位基因的表达,同时让未突变的LMNA等位基因的表达减少。

[0007] 优选地,所述分离的反义分子选自:

[0008] a. 双链核酸(dsNA)或其化学修饰版本;或

[0009] b. 反义寡核苷酸(ASO)。

[0010] 优选地,所述dsNA是RNA,更优选地,所述dsNA是短发卡(shRNA)或小干扰RNA(siRNA)。优选地,所述dsNA是dsRNA。

[0011] 根据本发明,优选的分离的反义分子包含长度是15-30个核苷酸的反义核酸链。优选地,所述反义核酸链与所述靶区域中至少7个,更优选地8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个核苷酸互补。在一些实施方案中,如果反义分子特定地与突变LMNA等位基因结合,反义核酸链与靶区域之间可存在一个或两个错配。优选地,所述反义核酸链是与至少7个,更优选地8个、9个、10个、11个或12个连续核苷酸互补。优选地,所述靶区域至少包含所述靶区域的15个、16个、17个、18个或19个核苷酸。

[0012] 在所述分离的反义分子的优选实施方案中,所述靶区域包含选自以下序列构成的群组的核酸序列:

[0013] i. GAUGACCUGCUCCAUCACCACCACGUGAGUGGUAGCCGCCUGA (SEQ ID NO:1);

[0014] ii.GAUGACCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA (SEQ ID NO:2);

[0015] iii.GAUGACCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA (SEQ ID NO:3);和

[0016] iv.GAUGACCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA (SEQ ID NO:4);

[0017] 或与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4至少80%同源的核酸序列。更优选地,选自与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4至少81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同源的核酸序列。

[0018] 在另一个优选的实施方案中,所述靶区域包含选自由以下序列组成的群组中的核酸序列:

[0019] i.CCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA (SEQ ID NO:5);

[0020] ii.CCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA (SEQ ID NO:6);

[0021] iii.CCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA (SEQ ID NO:7);和

[0022] iv.CCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA (SEQ ID NO:8);或

[0023] 与SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8至少80%同源的核酸序列。更优选地,选自与SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8至少81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同源的核酸序列。

[0024] 根据本发明的分离的反义分子的优选实施方案中,所述反义核酸链包含具有至少12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个或19个核苷酸的连续链的核酸序列,该至少12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个或19个核苷酸选自根据SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153或SEQ ID NO:154的核酸序列。优选地,所述反义核酸链包含表1限定的反义链或其核酸类似物序列。优选地,所述反义核酸链还包含表1限定的正义链或其核酸类似物序列。优选地,所述分离的反义包含选自由SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74所示的序列组成的群组的核酸序列。

[0025] 在所述分离的dsNA的优选实施方案中,dsNA包含长度是15-30个核苷酸的正义核酸链;且其中正义核酸链与所述反义核酸链互补且正义核酸链和反义核酸链形成双链体区域。

[0026] 优选地,反义链和正义链可操作地通过环链连接从而形成发卡结构,该发卡结构包含双链体结构和环结构。环结构可包含4到13个核苷酸,例如4个、5个或6个核苷酸。优选地,所述环包含序列UCAAGAC。

[0027] 在所述分离的双链核酸(dsNA)或反义寡核苷酸(ASO)的优选实施方案中,所述反义核酸链的长度优选是15-30个核苷酸。优选地,所述dsNA是如下shRNA:包含长度是15-30个核苷酸,优选是19个核苷酸且具有5'末端和3'末端的RNA的分离的反义链,其中反义链是优选地与所述靶区域中至少15个核苷酸互补,且其中优选地,RNA正义链的5'末端可操作地与G核苷酸连接从而形成RNA的第一分段,且长度是15-30个核苷酸的RNA的分离的反义链具有5'末端和3'末端,其中优选地,反义链和正义链的至少12个核苷酸彼此互补且优选地在生理条件下形成小干扰RNA(siRNA)双链体。优选地,所述siRNA只使细胞中LMNA基因的一个等位基因沉寂。RNA的两条链形成的双链体长度可以是15到25个碱基对,优选地长度是19个碱基对。反义链的长度优选是19个核苷酸。正义链的长度优选是19个核苷酸。

[0028] 本发明中, RNA的正义链和反义链可操作地通过RNA环链连接, 从而形成发卡结构来形成“双链体结构”和“环结构”。这些环结构的长度可以是4到13个, 更优选地, 4到10个之间的核苷酸。例如, 环结构的长度可以是4个、5个或6个核苷酸。shRNA还可以包含单链突出端(overhang)区域。这样的单链突出端可以是3'单链突出端区域或5'单链突出端区域。单链突出端区域的长度可以, 例如, 是1-6个核苷酸。在优选实施方案中, 5'单链突出端具有核酸序列CCGG。在优选实施方案中, 3'单链突出端具有核酸序列G。

[0029] 本发明还提供一种编码本发明的分离的双链核酸或ASO的核酸。在优选实施方案中, 本发明的所述反义RNA, 诸如shRNA, 是由具有下述结构的寡核苷酸编码: 5'-CCGGAA-19bp正义链-TCAAGAC-19bp反义链-TTTTTTTG-3'和逆向5'-AATTCAAAAAAA-19bp正义链-GTCTTGA-19bp反义链-TT-3'。此处, 正义链正是mRNA的靶序列, 且反义链是逆向互补序列, 该逆向互补序列最终会与mRNA结合且会诱导其断裂和/或抑制。

[0030] 本发明还提供一种表达盒, 其包含编码根据本发明的所述反义核酸链的核酸。在优选实施方案中, 编码本发明所述反义核酸链的所述核酸包含SEQ ID NO: 75-150中任一序列所示的核酸序列。

[0031] 这些表达盒还可包含启动子。这种启动子可以是调控型启动子或组成型启动子。合适的启动子的示例包括CMV、RSV、pol II或pol III启动子。表达盒还可以包含多腺苷酸化信号, 诸如合成的最小多腺苷酸化信号。表达盒还可包含标记基因。在实施方案中, 所述表达盒包含编码根据本发明的所述反义核酸链的2个核酸, 其中第一核酸编码减少(reduces)核纤层蛋白A异构体的反义链, 且第二核酸编码能减少(reduces)核纤层蛋白C异构体的反义链。反义核酸链的表达优选地是调控型, 这样只有一个反义核酸链在或可在靶细胞表达。

[0032] 本发明提供一种包含上述表达盒的载体。另外, 载体可包含两个表达盒, 第一表达盒包含编码RNA双链体的反义链的核酸, 且第二表达盒包含编码RNA双链体的正义链的核酸。合适载体的示例包括腺病毒、慢病毒、腺相关病毒(AAV)、脊髓灰质炎病毒、HSV或鼠白血病病毒载体。在优选实施方案中, 载体是慢病毒载体。在另一个优选的实施方案中, 载体是AAV。优选地所述表达盒编码任意上述的ASO或dsNA。

[0033] 本发明还提供一种包含根据本发明的表达盒的细胞。优选地, 所述细胞是哺乳动物细胞, 优选是人体细胞。优选地, 所述细胞是心脏细胞, 优选是人类诱导性多能干细胞-衍生的心肌细胞(hiPSC-CM)。

[0034] 本发明还提供一种用于减少生物体中LMNA基因的表达的药物组合物, 其包含本发明的反义分子和药学上可接受的载体。

[0035] 本发明还包含根据本发明的用于医疗的分离的反义分子。

[0036] 本发明还提供根据本发明的分离的反义分子、编码本发明分离的反义分子的核酸、本发明的表达盒或本发明的表达载体, 根据本发明的用于治疗心力衰竭的药物组合物。优选地, 所述治疗是核纤层蛋白病, 优选地, 扩张型心肌病的治疗。

[0037] 本发明还提供一种选择反义分子的方法, 该反义分子适合治疗由基因中突变等位基因上出现的常染色体显性突变导致的疾病, 所述方法包含:

[0038] a. 提供受试者的核酸试样, 该受试者患有由基因中突变等位基因上出现的常染色体显性突变导致的疾病;

- [0039] b. 确定所述基因中作为所述疾病起因的突变等位基因的杂合性;
- [0040] c. 确定所述基因中杂合SNP的存在;
- [0041] d. 确定包含所述基因的突变等位基因的杂合SNP的靶区域的核酸序列;
- [0042] e. 选择与所述靶核酸链互补的分离的反义分子。
- [0043] 在优选实施方案中,所述反义分子如本文所述。优选地,所述基因是LMNA基因。优选地,所述SNP选自rs538089、rs505058或rs4641。
- [0044] 所述疾病是心力衰竭,具体是核纤层蛋白病,诸如扩张型心肌病。
- [0045] 本发明还提供体外减少细胞中突变LMNA等位基因的表达的方法,包含下述步骤:
- [0046] (a) 向细胞引入本发明的反义分子,将该反义分子引入到表达LMNA突变等位基因的细胞时,会减少LMNA突变等位基因的表达;和
- [0047] (b) 维持步骤(a)产生的细胞足够长时间,以获得LMNA突变等位基因的mRNA转录物的降解(degradation),由此减少细胞中LMNA突变等位基因的表达。优选地,所述LMNA突变基因的表达至少是20%。

## 附图说明

[0048] 图1示出对设计和测试的siRNA的概述。黑色轮廓长方形示出核纤层蛋白A与核纤层蛋白C异构体之间共同共享外显子10。SNP rs4641(黑体核苷酸,C核苷酸=C等位基因;T核苷酸=T等位基因)之后,核纤层蛋白C继续连接外显子10B(灰色阴影长方形),但核纤层蛋白A继续连接外显子11(灰色填充长方形)和外显子12(未示出)。shRNA为每个特定异构体设计且靶向C等位基因或T等位基因。

[0049] 图2示出RNA靶向LMNAH222P hiPSC-CM中核纤层蛋白C的结果的概述。图2A示出通过shRNA靶向核纤层蛋白C中rs4641的C等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白A的相对表达。图2B示出通过shRNA靶向核纤层蛋白C中rs4641的C等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白C的相对表达。图2C示出通过shRNA靶向核纤层蛋白C中rs4641的T等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白A的相对表达。图2D示出通过shRNA靶向核纤层蛋白C中rs4641的T等位基治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白C的相对表达。条形代表平均值且误差条形代表SEM。3-4次实验中N=4-12。

[0050] 图3示出shRNA靶向LMNA H222P和健康hiPSC-CM中核纤层蛋白A的rs4641的C等位基因的结果的概述。图3A示出通过shRNA靶向LMNAH222PhiPSC-CM中核纤层蛋白A的rs4641的C等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白A的相对表达。图3B示出通过shRNA靶向LMNA H222P hiPSC-CM中核纤层蛋白A的rs4641的C等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白C的相对表达。图3C示出通过shRNA靶向健康hiPSC-CM中核纤层蛋白A的rs4641的C等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白A的相对表达。图3D示出通过shRNA靶向健康hiPSC-CM中核纤层蛋白A的rs4641的C等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白C的相对表达。条形代表平均值且误差条形代表SEM。2-3次实验中N=4-9。

[0051] 图4示出shRNA靶向LMNA H222P和健康hiPSC-CM中核纤层蛋白A的rs4641的T等位基因的结果的概述。图4A示出通过shRNA靶向LMNA H222PhiPSC-CM中核纤层蛋白A的rs4641

的T等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白A的相对表达。图4B示出通过shRNA靶向LMNA H222P hiPSC-CM中核纤层蛋白A的rs4641的T等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白C的相对表达。图4C示出通过shRNA靶向健康hiPSC-CM中核纤层蛋白A的rs4641的T等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白A的相对表达。图4D示出通过shRNA靶向健康hiPSC-CM中核纤层蛋白A的rs641的T等位基因进行治疗后,C等位基因、T等位基因和总核纤层蛋白C的相对表达。条形代表平均值且误差条形代表SEM。2-3次实验中N=5-9。

[0052] 图5示出通过LMNAH222P hiPSC-CM的shRNAT17靶向rs4641的T等位基因下调突变LMNA等位基因后细胞核圆度的提升。使用阴性对照shRNA (NC) 治疗H222P hiPSC-CM, 等位基因-特异性的shRNA C17通过靶向rs4641 (C17) 的C等位基因下调野生型LMNA等位基因且等位基因-特异性的shRNA T17通过靶向rs4641 (T17) 的T等位基因下调突变LMNA等位基因。3次不同分化N=305-364。黑色条纹表示平均值,\*\*\*=p<0.001。

[0053] 图6示出靶向siRNA的示意图。LMNA基因编码2个mRNA剪接异构体,LMNA和LMNC。SNP rs4641(黑体表示)是外显子10中间的两个异构体共用的最后一个核苷酸,之后LMNC未剪接且在外显子10终止,同时LMNA在rs4641后立即剪接到外显子11。由于剪接,我们需要设计LMNA (siRNA的较低面) 和LMNC (siRNA的较高面) 特异性siRNA,我们测试该siRNA序列的等位基因-特异性在附图中显示。注意siRNA序列从3'开始写到5',同时所有其他序列从5'开始写到3'。

[0054] 图7示出shRNA设计和其转化为活性siRNA。病毒编码的shRNA由2个互补序列(灰色阴影)组成,中间是非互补序列。这些序列,当它们从病毒转录时,会形成发卡状结构,其中互补部分结合且非互补部分形成环。这个环被酶Dicer移除,从而形成siRNA双链体。对于这种双链体,所谓的向导链或反义链(深灰色阴影)被并入到RNA诱导的沉默复合体,从而结合和降解(degrade)靶向mRNA,同时siRNA双链体的其他乘客链或正义链被降解。

[0055] 图8示出shRNA靶向LMNA的C等位基因分别对LMNA剪接异构体和LMNC剪接异构体的等位基因-特异性表达的影响。A&C分别示出LMNA与LMNC的野生型(C)等位基因和突变(T)等位基因的等位基因特异性表达和总LMNA表达量对SCR阴性对照条件表达的影响。B&D分别示出LMNA和LMNC的突变(T)和野生型等位基(C)的表达百分比从而可视化两个等位基因表达之间的平衡。

[0056] 图9示意地示出靶向LMNA剪接异构体的shRNA-C17和shRNA-T17的错配。附图中表示的是原始序列和分别相应额外错配(黑体下划线表示)的shRNA。注意siRNA序列从3'开始写到5',同时所有其他序列从5'开始写到3'。

[0057] 图10示出靶向LMNA的C等位基因的shC17的另外错配的影响。A&C:分别示出LMNA与LMNC的野生型(C)等位基因和突变(T)等位基因的等位基因特异性表达和总LMNA/C表达量对SCR阴性对照条件表达的影响。B&D分别示出LMNA和LMNC的突变(T)和野生型等位基因(C)的表达百分比。

[0058] 图11分别示出shRNA靶向LMNA的T等位基因对LMNA和LMNC剪接异构体的等位基因-特异性表达的影响。A&C分别示出LMNA和LMNC的野生型(C)等位基因和突变(T)等位基因的等位基因特异性表达和总LMNA表达量对SCR阴性对照条件表达的影响。B&D分别示出LMNA和LMNC的突变(T)和野生型等位基因(C)的表达百分比,从而可视化两个等位基因表达之间的

平衡。

[0059] 图12示出靶向LMNA的T等位基因的hT17的另外错配的影响。A&C分别示出LMNA和LMNC的野生型(C)等位基因和突变(T)等位基因的等位基因特异性表达和总LMNA/C表达量对SCR阴性对照条件表达的影响。B&D分别示出LMNA和LMNC的突变(T)和野生型等位基因(C)的表达百分比,从而可视化两个等位基因表达之间的平衡。

[0060] 图13分别示出shRNA靶向LMNC的C等位基因对LMNC和LMNA剪接异构体的等位基因-特异性表达的影响。A&C分别示出LMNC和LMNA的野生型(C)等位基因和突变(T)等位基因的等位基因特异性表达和总LMNA/C表达量对SCR阴性对照条件的表达的影响。B&D分别示出LMNC和LMNA的突变(T)和野生型等位基因(C)的表达百分比,从而可视化两个等位基因表达之间的平衡。

[0061] 图14示意地示出shRNA-C11、shRNA-C13和shRNA-T14靶向LMNC剪接异构体的错配。附图中表示的是原始序列和具有相应额外错配(黑体下划线表示)的shRNA。注意siRNA序列从3'开始写到5',但是所有其他序列从5'开始写到3'。

[0062] 图15示出靶向LMNC的C等位基因的shC11的另外错配的影响。A&C分别示出LMNC和LMNA的野生型(C)等位基因和突变(T)等位基因的等位基因特异性表达和总LMNA/C表达量对SCR阴性对照条件的表达的影响。B&D分别示出LMNC和LMNA的突变(T)和野生型等位基因(C)的表达百分比,从而可视化两个等位基因表达之间的平衡。

[0063] 图16示出靶向LMNC的C等位基因的shC13的另外错配的影响。A&C分别示出LMNC和LMNA的野生型(C)等位基因和突变(T)等位基因的等位基因特异性表达和总LMNA/C表达量对SCR阴性对照条件表达的影响。B&D分别示出LMNC和LMNA的突变(T)和野生型等位基因(C)的表达百分比,从而可视化两个等位基因表达之间的平衡。

[0064] 图17分别示出shRNA靶向LMNC的T等位基因对LMNC和LMNA剪接异构体的等位基因-特异性表达的影响。A&C分别示出LMNC和LMNA的野生型(C)等位基因和突变(T)等位基因的等位基因特异性表达和总LMNA/C表达量对SCR阴性对照条件表达的影响。B&D分别示出LMNC和LMNA的突变(T)和野生型等位基因(C)的表达百分比,从而可视化两个等位基因表达之间的平衡。

[0065] 图18示出靶向LMNC的T等位基因的shT14的另外错配的影响。A&C分别示出LMNC和LMNA的野生型(C)等位基因和突变(T)等位基因的等位基因特异性表达和总LMNA/C表达量对SCR阴性对照条件表达的影响。B&D分别示出LMNC和LMNA的突变(T)和野生型等位基因(C)的表达百分比,从而可视化两个等位基因表达之间的平衡。

## 具体实施方式

[0066] 本发明是基于通过表达小干扰RNA(siRNA)对LMNA基因进行等位基因-特异性沉默的惊人发现。发明人通过靶向包含单核苷酸多态性rs4641的基因的区域,显著减少该基因的特异性等位基因的表达。发明人通过使用来自健康对照组和LMNA H222P人类诱导性多能干细胞(hiPSC)系的基因组DNA,测定包含rs4641的PCR扩增子的序列,然后发现两种hiPSC株系是SNP rs4641(C/T)的杂合子携带者且不携带其他变体。

[0067] SNP rs4641是来自LMNA的两个mRNA异构体,即核纤层蛋白A和核纤层蛋白C,的最后一个共享核苷酸。两种异构体共享第一批566个氨基酸但在外显子10之后因可选剪接会

产生差异。核纤层蛋白A继续连接外显子11和12,但是核纤层蛋白C继续连接外显子10B。由于SNP rs4641是两种异构体的最后一个共享核苷酸,发明人设计了异构体特异性siRNA。另外,LMNA突变,即引发疾病的突变,可被定位在SNP(C或T等位基因)的两个等位基因,意味着发明人在核纤层蛋白A和核纤层蛋白C异构体二者的两个SNP等位基因上设计siRNA。

[0068] 发明人示出通过shRNA靶向上述证明沉寂有效的区域来下调LMNA的突变等位基因后细胞核圆度的提升。

[0069] 本发明的一个目标是提供一种治疗方法,其中突变等位基因被抑制。为了将突变等位基因与野生型(=健康)等位基因区分,发明人使用LMNA的常见变体(SNP rs4641)。因此,为了确定需要被抑制的等位基因,需要确定突变所位于的等位基因。例如,如果某些突变位于SNP T等位基因(即突变和SNP T是顺式),则SNP T等位基因需要被抑制。然而,如果突变是位于SNP C等位基因(即突变和SNP C是顺式),则SNP C等位基因需要被抑制。由于发明人抑制独立于导致核纤层蛋白病的特定突变的突变等位基因,本发明分离的反义分子对LMNA基因中的所有突变都有效。

[0070] 发明人使用携带LMNA H222P突变的细胞系。H222P突变位于rs4641 T等位基因。因此,通过抑制rs4641 C等位基因,它们可能会使疾病恶化(因为野生型是健康等位基因),但是通过抑制rs4641 T等位基因,它们可能会使疾病缓和(抑制突变等位基因)。

[0071] I. 定义

[0072] 术语“反义分子”是指如下寡核苷酸分子:包含与靶RNA分子互补的序列,靶RNA分子诸如mRNA、病毒RNA或其他RNA种类;且在序列特异性结合后会减弱它们的靶RNA的功能。反义分子的示例通过术语反义寡核苷酸(ASO)、siRNA、shRNA、干扰RNA分子和反义寡聚体提供,这些术语可在下文交换使用。

[0073] 术语“核酸”是指单或双链形式的脱氧核苷酸或核糖核苷酸和其聚合物,由包含糖的单体(核苷酸)、磷酸盐和为嘌呤或嘧啶的碱基组成。除非有特别限制,术语涵盖包含天然核苷酸的已知类似物的核酸,这些天然核苷酸具有与参考核酸(reference nucleic acid)相似的结合性质且以与天然出现的核苷酸相似的方式被代谢。除非另有指示,特定核酸序列也涵盖其被保守地修饰的变体(例如,简并密码子取代)和互补序列,以及清楚说明的序列。具体地,简并密码子取代可通过生成如下序列实现:其中一种或多种选择的(或所有)密码子的第三位点被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等人,(1991)Nucleic Acids Research 19:5081;Ohtsuka等人,(1985)J Biol Chem 260:2605-2608;Rossolini等人,(1994)Mol Cell Probes 8:91-98)。

[0074] “核酸片段”是给定核酸分子的一部分。

[0075] 术语“核苷酸序列”是指可以是单链或双链的DNA或RNA的聚合物,可选地包含能并入DNA或RNA聚合物的合成的、非天然或改造的核苷酸碱基。

[0076] 术语“核酸”、“核酸分子”、“核酸片段”、“核酸序列或分段”或“聚核苷酸”可交换使用且也可与基因、基因编码的cDNA、基因编码的DNA和基因编码的RNA交换使用。

[0077] 术语“核酸类似物”是指与天然出现的RNA和DNA类似(结构类似)的化合物。例如,RNA是天然出现的DNA的核酸类似物。核酸是核苷酸链,其由三部分组成:磷酸盐骨架、戊糖、核糖或脱氧核糖;和四个核酸碱基之一。类似物可具有任意这些改造。通常,除了其他方面,类似物核酸碱基赋予不同的碱基配对和碱基堆积性质。示例包括能与所有四种标准碱基配

对的通用碱基,和诸如PNA的磷酸-糖骨架类似物。人工核酸包括肽核酸(PNA),吗啉基和锁核酸(LNA),以及甘油核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)和己糖核酸(HNA)。这些中的每一个通过改变分子骨架与天然出现的DNA或RNA区分。

[0078] 术语“某些SEQ ID NO的核酸序列的核酸类似物序列”是指与所述SEQ ID NO类似的核酸序列。例如SEQ ID NO:83是指DNA序列ccggaaatca ccaccacgtg agtgggtcaag acccactcac gtgggtgtga ttttttttg。其RNA类似物核酸具有与尿嘧啶互换的胸苷。SEQ ID NO:83的核酸序列的核酸类似物序列的另一个示例是具有相同碱基的PNA核酸序列。

[0079] 术语“核酸的化学修饰版本”是指不会减弱所述核酸与其互补链的结合的核酸中一种或多种核苷酸的化学修饰物。许多已知化学修饰物的冗长说明在PCT专利申请W0200370918公开,它们通过援引并入并且因此本文不再重述。适当修饰包括但不限于糖部分的修饰(即,糖部分的2'位点,诸如例如2'-O-(2-甲氧乙基)或2'-MOE)(Martin等人, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504)即,烷氧基)或碱基部分(即,维持与可选核苷酸链中另一个特定碱基配对的能力的非天然或修饰的碱基)。其他修饰包括所谓的“骨架”修饰,该“骨架”修饰包括但不限于替换磷酸酯基(将相邻核糖核苷酸与例如硫代磷酸、手性硫代磷酸或二硫代磷酸酯连接)。

[0080] 本发明的反义分子或dsNA分子可由天然出现的核苷酸组成或能包括至少一种修饰的核苷酸,诸如2'-O-甲基修饰核苷酸、包含5'-硫代磷酸基的核苷酸和与胆甾醇基衍生物或十二烷酸二癸酰胺基连接的终端核苷酸。或者,修饰的核苷酸可选自如下基团:2'-脱氧-2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、锁核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、磷酰胺和非天然碱基,包括核苷酸。

[0081] 术语“分离的和/或纯化”是指体外分离核酸,例如,来自其天然细胞环境和与细胞的其他组分关联的DNA或RNA分子,诸如核酸或多肽,这样其能被测定序列、复制和/或表达。例如,“分离的核酸”可为包含转录为siRNA的少于31个依序核苷酸的DNA分子。这种分离的siRNA可例如,形成具有长度是21个碱基对的双链体的发卡结构,该发卡结构与关注基因的序列互补或杂交且在严格条件下保持稳定结合。由此,RNA或DNA“分离的”是其未出现至少一种通常与RNA或DNA的天然来源相关的污染核酸且优选地基本上未出现其他哺乳动物RNA或DNA。短语“未出现至少一种通常与……相关的污染源核酸”包括如下情况:核酸重新被引入到污染源或天然细胞,但位于不同的染色体位置或两侧是通常不在源细胞中发现的核酸序列,例如,在载体或质粒中。

[0082] 公开的核苷酸序列的片段和变体,和由其编码的蛋白质或部分长度蛋白质也被本发明涵括。通过“片段”或“部分”是指核苷酸序列编码的全长或更小的全长,或多肽或蛋白质的氨基酸序列。请注意术语“多肽”和“蛋白质”交换使用。两个术语是指由通过共价肽键结合在一起的氨基酸残基链组成的分子。

[0083] 术语“基因”用于广泛地指与生物功能相关的任意核酸片段。由此,基因包括它们表达需要的编码序列和/或调控序列。例如,“基因”是指表达mRNA、功能性RNA或特定蛋白质的核酸片段,包括调控序列。“基因”也包括例如,形成其他蛋白质的识别序列的未表达的DNA分段。“基因”可由各种来源,包括由目标来源克隆或由已知或预测序列信息合成获取,且可包括设计为具有期望参数的序列。“等位基因”是占用染色体上给定基因座(locus)的基因的几种替代形式之一。

[0084] 分子的“变体”是与天然分子的序列基本上相似的序列。对于核苷酸序列,变体包括由于遗传密码简并,编码天然蛋白质的相同氨基酸序列的这些序列。诸如这些的天然出现的等位基因变体能够使用分子生物学技术鉴别,例如使用聚合酶链反应(PCR)和杂交技术。变体核苷酸序列也包括合成衍生的核苷酸序列,诸如生成的这些基因,例如,通过使用定点突变,它们编码天然蛋白质,以及编码具有氨基酸取代的多肽的这些。通常,本发明的核苷酸序列变体与天然(内源)核苷酸序列至少具有40%、50%、60%到70%、例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%到79%、通常至少具有80%、例如,81%-84%、至少85%、例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%到98%的序列一致性。

[0085] 特定核酸序列的“保守修饰的变异”是指编码相同或基本上相同氨基酸序列的这些核酸序列。由于遗传密码简并,大量功能性相同核酸编码任意给定多肽。例如,密码子CGT、CGC、CGA、CGG、AGA和AGG全部编码氨基酸精氨酸。由此,在由密码子指定的精氨酸的每个位点,密码子可改造为任意所述的对应密码子而不改变被编码的蛋白质。这种核酸变异是“沉默变异”,它们是“保守修饰的变异”中的一种。除非另有说明,本文描述的编码多肽的每个核酸序列也描述每个可能的沉默变异。本领域的技术人员会识别核酸中能通过标准技术被修饰从而产生功能性相同分子的每个密码子(ATG除外,其一般是用于甲硫氨酸的唯一密码子)。所以,编码多肽的核酸的每个“沉默变异”在每个描述的序列中隐含。

[0086] “重组DNA分子”是使用用于将描述的DNA序列组合到一起的重组DNA技术和程序而组合到一起的DNA序列的组合,例如,Sambrook和Russell(2001)“分子克隆”。CSHL Press:美国,长岛,纽约。

[0087] “同源”DNA或RNA序列是与其被引入的宿主细胞天然相关的序列。

[0088] “载体”限定为尤其包括任意病毒载体,及任意质粒、粘粒、双链或单链的线性或环状形式的噬菌体或二元载体,这些载体可能或不能自传送或可移动,并且可以通过整合到细胞基因组中或存在于染色体外来转化原核或真核宿主(例如,具有复制起点的自主复制质粒)。

[0089] 本文使用的“表达盒”意为能指导适合宿主细胞中特定核苷酸序列的表达的核酸序列,其可包括可操作地与目标核苷酸序列连接的启动子,该目标核苷酸序列可操作地与终止信号连接。它也可包括核苷酸序列适当转译需要的序列。编码区域经常编码目标蛋白质,但也可编码目标功能性RNA,例如根据本发明的反义分子、反义RNA、正义或反义方向的非转译RNA或siRNA。包括目标核苷酸序列的表达盒可以是嵌合的。表达盒也可是天然出现的,但获取为用于异源表达的重组形式。表达盒中核苷酸序列的表达可在组成型启动子的对照组或调控型启动子的对照组下进行,该组成型启动子或调控型启动子只有当宿主细胞暴露于某些特定刺激物时启动转录。多细胞生物体的情况下,启动子也能对特定组织或器官或发展阶段具有特异性。

[0090] “基因沉寂”是指抑制基因表达,例如,抑制转基因、异源基因和/或内源基因表达。基因沉寂可通过影响转录的过程和/或通过影响后转录机制的过程介导。在一些实施方案中,当siRNA通过RNA干扰以序列特异性方式启动目标基因的mRNA的降解时,基因沉寂出现。在一些实施方案中,基因沉寂可为等位基因-特异性。“等位基因-特异性”基因沉寂是指基因的一个等位基因的特异性沉寂。

[0091] “RNA干扰(RNAi)”是通过siRNA启动的序列特异性、后转录基因沉寂的过程。RNAi在诸如果蝇、线虫、真菌和植物的多种生物体中发现,且人们相信其涉及抗病毒防御、转座子活性的转调和基因表达的调控。在RNAi过程中,siRNA诱导靶标mRNA降解,从而导致序列特异性减少,或甚至抑制基因表达。

[0092] 根据本发明的“siRNA”或“小-干扰核糖核酸”具有本领域已知的意义,包括下述方面。siRNA由生理条件下沿互补区域进行杂交的核糖核苷酸的两条链组成。在某些实施方案中,链分离,但它们通过分子连接肽连接。单个核糖核苷酸可为未修饰的天然出现的核糖核苷酸,未修饰的天然出现的脱氧核苷酸,或如本文其他位置所描述的,它们可为化学修饰的或合成的。

[0093] “RNA双链体”或“dsRNA”是指通过RNA分子的两个区域之间的互补配对形成的结构。siRNA“靶向某”基因是指siRNA的双链体部分的核苷酸序列与LMNA基因的核苷酸序列互补。在一些实施方案中,siRNA的双链体的长度少于30个核苷酸。在一些实施方案中,双链体的长度可为29个、28个、27个、26个、25个、24个、23个、22个、21个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、或10个核苷酸。在一些实施方案中,双链体的长度是19-25个核苷酸。siRNA的RNA双链体部分可以是部分发卡结构。除双链体部分外,发卡结构可包含位于形成双链体的两个序列之间的环部分。环的长度可改变。在一些实施方案中,环的长度是5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个或13个核苷酸。发卡结构也能包含3'或5'单链突出端部分。在一些实施方案中,单链突出端是长度是0个、1个、2个、3个、4个或5个核苷酸的3'或5'单链突出端。

[0094] siRNA能由核酸序列编码,且核酸序列也能包括启动子。核酸序列也可以包括多腺苷酸化信号。在一些实施方案中,多腺苷酸化信号是合成的最小多腺苷酸化信号。

[0095] 在本文使用的“核苷酸单链突出端”是指未配对核苷酸或当dsRNA的一条链的3'-末端延伸超出其他链的5'-末端时从dsRNA的双链体结构突出的核苷酸,或反之亦然。“平端”或“平末端”意为在dsRNA的末端无未配对核苷酸,即,没有核苷酸单链突出端。“平端终止的”dsRNA是其全长都是双链的dsRNA,即,在分子的任一个末端都没有核苷酸单链突出端。

[0096] 术语“反义链”是指包括与靶序列基本上互补的区域的dsRNA的链。

[0097] 在本文中使用的术语“互补区域”是指是与序列,例如,如本文所描述的靶序列基本上互补的反义链上的区域。

[0098] 在本文中使用的术语“正义链”是指dsRNA的链,该链包括与反义链的区域基本上互补的区域。

[0099] 在本文中使用的“治疗”是指改善疾病或病症的至少一种症状,治愈和/或防止疾病或病症的发展。

[0100] 在本文中使用的术语“由……编码”意为基因或SEQ ID NO中的DNA序列被转录到目标RNA中。

[0101] 术语“能减少LMNA基因的表达”是指通过RNA干扰基本上使LMNA基因沉寂的过程。RNA干扰能在反义分子上被触发,包括通过双链核酸(dsNA)或通过单链的反义寡核苷酸(ASO)。

[0102] “核纤层蛋白A/C”基因也已知为LMNA基因。LMNA基因编码mRNA,该mRNA被剪接成一

些可选mRNA,这些mRNA编码不同的核纤层蛋白,例如,核纤层蛋白A或核纤层蛋白C。

[0103] 通过RNA干扰基本上使LMNA基因沉寂的所述过程优选地指向使LMNA基因的等位基因特异性地沉寂,同时第二等位基因的表达未被所述过程改变。在优选实施方案中,LMNA基因的一个等位基因被沉寂。其优势之一是其实现突变等位基因的沉寂,其缓和许多可遗传形式的心力衰竭的疾病表征型。当前,已经报导有多于450种LMNA突变,导致大范围的疾病(核纤层蛋白病变)包括扩张型心肌病。虽然不能为所有这些核纤层蛋白病变识别突变热区,它们确实共享的是这些突变的大多数具有显性负性作用,表明突变的基因产品导致野生型产品出现表征型。

[0104] 在本文中使用的术语“突变LMNA等位基因”或“突变LMNA基因”是指LMNA等位基因或基因的变体,其产物对细胞核结构和功能有负面影响。优选地,突变LMNA等位基因具有显性负性作用,意味着突变等位基因的杂合性表达对细胞核结构和功能具有负面影响。

[0105] 术语“反义寡聚体”或“反义化合物”或“反义寡核苷酸”或“寡核苷酸”可交换使用且是指环状亚基(即嘌呤或嘧啶)的序列,每个环状亚基携带碱基配对部分,通过亚基间键连接,其实现碱基配对部分通过沃森-克里克碱基配对杂交到核酸中的靶序列(通常是RNA)从而形成核酸:靶序列内的低聚物异源双链体。环状亚基可基于核糖或其他戊糖或,在某些实施方案中,基于吗啉代基。也考虑肽核酸(PNA),锁核酸(LNA)和2'-O-甲基寡核苷酸和本领域已知的其他反义试剂。

[0106] 这样的反义寡聚体能够被设计为阻断或抑制mRNA的转译或抑制天然前体pre-mRNA剪接加工,或诱导靶向mRNA的降解,且可为“指向”或“靶向”与其杂交的靶序列。在某些实施方案中,靶序列是围绕或包括mRNA的AUG起始密码子、前处理mRNA的3'或5'剪接位点或分支点的区域。靶序列可在外显子内或在内含子内或其组合。剪接位点的靶序列可包括mRNA序列,其在前处理mRNA的正常剪接受体接点的下游在其5'末端具有1到约25个碱基对。用于剪接的优选靶序列是前处理mRNA的任意区域,该前处理mRNA包括剪接位点或完全包含在外显子编码序列中或跨越剪接受体或供体位点。基因的靶区域内的所述优选靶序列包含单核苷酸多态性(SNP),这实现例如,携带突变的特定等位基因的降解。更普遍地说,寡聚体是“靶向”生物学相关的靶标,诸如,在本发明中,当寡聚体以上述方式靶向靶标的核酸时,,靶向编码核纤层蛋白A蛋白质的人体LMNA基因前体pre-mRNA。所述反义寡聚体是优选地设计为诱导人体LMNA基因的特定等位基因的降解,诸如携带顺式构型的引发疾病突变的SNP rs4641 T或SNP rs4641 C等位基因。在本文中使用的“反义寡核苷酸”(ASO)意为未修饰的或化学修饰的单链核酸分子(长度经常是15-30nt)的试剂,其可通过沃森-克里克碱基配对选择性地与mRNA内它们的靶互补序列杂交。ASO-mRNA异源双链体的形成诱导如下影响:1) 激活RNase H核酸内切酶或如细菌的内切核糖核酸酶-RNase III和RNase E-导致结合的mRNA的降解,且使ASO保持完整;2) 通过核糖体活性的空间位阻导致转译停滞;3) 抑制mRNA剪接;4) 起解前体pre-mRNA。事实上,会出现什么影响取决于ASO化学组分和杂交的位置,但后续结果是靶基因和蛋白质表达的特异性下调。

[0107] 在本文中使用的术语“rs4641”是指位于chr1:156137743 (GRCh38.p13)的SNP。参见2021年4月9日公开的<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4641>。如在本文中使用的,当它存在于由LMNA基因编码的转录物中时,它也指相应的核苷酸多态性。

[0108] 在本文中使用的术语“LMNA突变”是指LMNA基因中的突变,该突变优选地具有显性

负性影响且特异性地导致核纤层蛋白病,更具体地,心肌症。

[0109] 本文公开的是如下策略:经由RNA干扰导致特异性地被靶向的等位基因的基本上沉寂。使用该策略导致显著减少靶基因或等位基因的体外和体内表达。为了模仿生物进程或为人类疾病提供治疗,该策略用于减少靶基因或等位基因的表达。

[0110] 在本文中使用的使等位基因沉寂的背景下的术语“基本上沉寂”意为被靶向的等位基因的mRNA通过出现被引入的反义分子而被特异性地抑制和/或降解,与本发明的反义分子未出现时观察到的表达量相比,这样被靶向的等位基因的表达减少约10%到100%。通常,当等位基因基本上被沉寂时,其会至少具有40%、50%、60%、70%,例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、通常至少80%,例如,81%-84%、至少85%、例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或与当分离的反义分子未出现时相比甚至100%减少表达。相比之下,与本发明的反义分子未出现时观察的表达量相比,未被靶向的等位基因的表达并未基本上改造。在本文中使用的使基因沉寂的术语“基本上沉寂”意为通过出现被引入的分离的反义分子被靶向的等位基因的mRNA被抑制和/或被简并,与分离的反义分子未出现时观察的表达量相比,这样被靶向的等位基因的表达减少约10%到100%。通常,当等位基因基本上被沉寂时,其会至少具有40%、50%、60%至70%,例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%至79%,通常至少80%,例如,81%-84%、至少85%,例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或与当分离的反义分子未出现时相比,甚至100%的减少的表达。在本文中使用的术语“基本上正常活性”意为当分离的反义分子未被引入到细胞时,等位基因或基因的表达量。

[0111] 如图1中策略概述的,发明人开发了siRNA,该siRNA将特异性地消除来自突变等位基因(即具有引发疾病突变的等位基因)的核纤层蛋白A/C蛋白质的产生。通过利用野生型与突变等位基因之间的碱基对差异,发明人成功地等位基因-特异性地使突变LMNA mRNA的表达沉寂而不干扰野生型mRNA的表达。由于核纤层蛋白A/C是必要蛋白质,因此其对仅使突变等位基因沉寂极端重要。该等位基因-特异性策略对治疗由LMNA突变导致的疾病,特别是核纤层蛋白病变,包括扩张型心肌病具有显著的治疗潜力。

[0112] 在优选实施方案中,所述反义核酸链的长度是15-30个核苷酸。优选地,所述反义核酸链与所述靶区域中至少7个,更优选地8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个核苷酸互补。在一些实施方案中,反义核酸链与靶区域之间可存在一个或两个错配。优选地,不多于2个错配,更优选地,不多于1个错配。如果出现,所述错配不会干扰,例如,SNP rs538089、SNP rs505058或SNP rs4641的等位基因-特异性靶向。在某些优选的实施方案中不存在互补性的错配。适当地,取决于Huang等人描述的核苷酸变化的类型,本领域的技术人员可以设计具有最高区别潜力的错配位点[Nucleic Acids Res 2009,37,7560-7569,doi:10.1093/nar/gkp835]。优选地,所述反义核酸链与至少7个,更优选地8个、9个、10个、11个或12个连续核苷酸互补。优选地,所述靶区域包含至少15个、16个、17个、18个或19个核苷酸。

[0113] 在优选实施方案中,分离的反义分子选自:

[0114] a. 双链核酸(dsNA)或其化学修饰版本;或

[0115] b. 单链的反义寡核苷酸(ASO)。

[0116] dsNA的优选实施方案是合成的双链小干扰RNA (siRNA) 和载体驱动的短发卡RNA (shRNA)。siRNA和载体驱动的shRNA都被证明在体外和体内应用有效,每个都有它们各自的优势。多数siRNA的结构设计为促进有效并入到包含RISC的Ago 2,包含Dicer-底物设计的RNaseIII通过初期关联和处理前体pre-RISC改善siRNA的效率至少10倍。载体驱动的shRNA使用宿主微RNA生物起源通道,其看似非常高效。siRNA更容易被化学修饰,同时shRNA表达能通过特定启动子调节和调控。除此之外,通过shRNA进行的等位基因-特异性抑制可以持久,因为编码shRNA的载体可并入细胞的基因组。

[0117] 在实施方案中,为了实现治疗性siRNA的细胞内表达,优选地, RNA分子构建为包含两个互补链或发卡序列(诸如21-bp发卡)且代表如下序列:指向由包含SNP rs538089、SNP rs505058或SNP rs4641的部分LMNA基因编码的靶区域的序列。siRNA或编码siRNA的核酸被引入到靶细胞,诸如病变的心脏细胞。siRNA减少靶标mRNA和靶向、突变的等位基因的蛋白质表达。

[0118] 在实施方案中,本发明的dsRNA被化学修饰以增强稳定性。本发明的核酸可通过本领域广泛认可的方法被合成和/或修饰,诸如在“Current protocols in nucleic acid chemistry”, Beaucage, S.L. 等人, (Edrs.), John Wiley&Sons, Inc., 美国, 纽约中所描述的这些, 其通过援引并入本文。化学修饰物可包括但不限于2' 修饰、引入非天然碱基、与配体共价连接、用硫代磷酸盐键替代磷酸盐键和它们的组合。在该实施方案中, 双链体结构的完整性通过至少一个且优选地两个化学键加强。化学连接可通过任意各种已知技术实现, 例如通过引入共价键、离子键或氢键; 疏水相互作用、范德瓦尔斯力或堆积作用; 通过金属离子配位、或通过使用嘌呤类似物和它们的组合。优选地, 可用于修饰dsRNA的化学基团非限制地包括: 甲基蓝; 双功能性基团, 优选地, 双(2-氯乙基)胺; N-乙酰基-N'-(对乙醛基苯甲酰)脒胺; 4-硫代尿嘧啶; 和补骨脂素。在一个优选的实施方案中, 连接肽是六乙二醇连接肽。在这种情况下, 通过固相合成生产dsRNA, 且六乙二醇连接肽根据标准方法被并入(例如, Williams, D.J., and K.B.Hall, Biochem. (1996) 35:14665-14670)。在特定实施方案中, 反义链的5'-末端和正义链的3'-末端经由六乙二醇连接肽化学连接。在其他实施方案中, dsRNA的至少一个核苷酸包含硫代磷酸或二硫代磷酸酯基团。dsRNA的末端是优选地通过三重螺旋结构形成。

[0119] 编码治疗性siRNA的构建体被为配置使得siRNA的一条或多条链由紧邻启动子的核酸编码, 并且受所述启动子控制, 这意味着所述启动子将在引入靶细胞后驱动所述核酸的表达。构建体诸如通过注射被引入到靶细胞, 从而减少细胞中靶标-等位基因的表达。

[0120] 本发明提供一种包含至少编码所述反义核酸链的核酸的表达盒。在一些实施方案中, 所述表达盒包含编码根据本发明的完整分离的反义分子的核酸。

[0121] 在实施方案中, 本发明的siRNA可形成包含双链体结构和环结构的发卡结构。环结构可包含从4到13个, 更优选地4-10个核苷酸, 诸如4个、5个或6个核苷酸。优选地, 所述环包含序列UCAAGAC。双链体的长度少于30个核苷酸, 诸如从19到25个核苷酸。siRNA还可包含单链突出端区。这种单链突出端可为3'单链突出端区或5'单链突出端区。单链突出端区的长度可是, 例如, 从1到6个核苷酸。

[0122] 本发明还提供包含分离的核酸序列的表达盒, 该分离的核酸序列编码第一分段、紧邻第一分段的3'的第二分段和紧邻第二分段的3'的第三分段, 其中第一和第三分段各自

的长度少于30个碱基对,且第一和第三分段各自的长度多于10碱基对,且其中第三分段的序列是第一分段序列的补体,且其中分离的核酸序列发挥靶向目标基因的小干扰RNA分子(siRNA)的功能。表达盒可包含在载体中,诸如病毒载体。

[0123] 表达盒还可包含如本文说明的pol II启动子。pol II启动子的示例包括调控型启动子和组成型启动子。例如,启动子可为CMV或RSV启动子。表达盒还可包含多腺苷酸化信号,诸如合成的最小多腺苷酸化信号。核酸序列还可包含标记基因。表达盒可被包含在病毒载体中。适合本发明使用的病毒载体可为腺病毒、慢病毒、腺相关病毒(AAV)、脊髓灰质炎病毒、单纯疱疹病毒(HSV)或鼠白血病病毒载体。

[0124] 本发明提供通过将细胞与上述的表达盒接触来减少细胞中特定基因产品的表达的方法。本发明也提供向患者施用上述表达盒的组分来治疗患者的方法。

[0125] 本发明还提供通过将细胞与上述的表达盒接触来减少细胞中特定基因产品的表达的方法。

[0126] 本发明也提供通过向患者施用包含根据本发明的表达盒的组分来治疗患者的方法。所述表达盒优选地涵括实施例2所示的shC17、shC17mm5、shC17mm7、shC13mm17、shT14、shT17、shT17mm5和shT17mm7。

[0127] II. 本发明的核酸分子

[0128] 可获取该核酸分子的核苷酸序列的来源包括任意脊椎动物,优选地哺乳动物、细胞来源。

[0129] 除编码siRNA的DNA序列外,本发明的核酸分子包括单链和双链的干扰RNA分子,其也用于减少靶标等位基因的表达。

[0130] 寡核苷酸介导的诱变是用于制备取代物变体的方法。这种技术是本领域已知。简略地,编码siRNA的核酸能通过将编码期望突变的寡核苷酸与DNA模板杂交来改造,其中模板是包含未改造或天然基因序列的质粒或细菌噬菌体的单链形式。杂交后,DNA聚合酶用于合成模板的整个第二互补链,该第二互补链由此并入寡核苷酸引物,且会对编码siRNA的核酸中选择的改造进行编码。通常,使用长度是至少25个核苷酸的寡核苷酸。较佳的,寡核苷酸具有12到15个核苷酸,该12到15个核苷酸与编码所选择的改造的核苷酸的任一边上的模板完全互补。这就保证寡核苷酸会适当与单链DNA模板分子杂交。寡核苷酸使用本领域已知的技术容易地合成。

[0131] DNA模板能通过这些载体生成,这些载体来自细菌噬菌体M13载体(可商购的M13 mp 18和M13 mp 19载体是合适的),或包含复制的单链噬菌体原点的这些载体。由此,将要改造的DNA可被插入到这些载体,从而生成单链模板。

[0132] 或者,单链DNA模板可通过使用标准技术使双链质粒(或其他)DNA变性来产生。

[0133] 为了改造天然DNA序列,寡核苷酸在适当杂交条件下被杂交到单链模板。然后加入DNA聚合酶,通常是DNA聚合酶I的Klenow片段,以使用寡核苷酸作为合成引物合成模板的互补链。这样形成异源双链分子,使得一条DNA链编码DNA的改造形式,而另一条链(原始模板)编码DNA的天然、未改造的序列。该异源双链体分子随后转变为适当宿主细胞,经常是原核生物诸如,大肠杆菌JM101。细胞生长后,将它们接种在琼脂糖板上,并使用用<sup>32</sup>-磷酸盐放射性标记的寡核苷酸引物进行筛选,以鉴定含有改造DNA的细菌菌落。改造区域是随后被移除且放入适当载体中,通常是典型地用于适合宿主转变的类型的表达载体。

[0134] 上述描述的方法可被修正,这样同源双链体分子在质粒的两条链包含改造的情况下产生。修饰如下:如上所述,将单链寡核苷酸退火到单链模板上。三种脱氧核苷酸、脱氧核糖核酸腺苷(dATP)、脱氧核糖核酸鸟苷(dGTP)和脱氧核糖核酸胸苷(dTTP)的混合物与修饰的硫代脱氧核糖核酸胞嘧啶所谓的dCTP-(\*S)(其可从Amersham Corporation获取)组合。该混合物加入到模板-寡核苷酸复合物中。将DNA聚合酶加到该混合物后,生成与除改造碱基外模板相同的DNA的链。除此之外,DNA的该新链包含dCTP-(\*S)而非dCTP,其目的是防止其被限制性核酸内切酶消化。

[0135] 在用适当的限制性内切酶对双链异源双链体的模板链进行切口后,模板链可以用ExoIII核酸酶或包含超过待改造的位点的区域的其他适当的核酸酶消化。反应随后停止,留下仅部分单链的分子。完整双链DNA同源双链体随后在所有四种脱氧核苷酸三磷酸盐、ATP和DNA连接酶存在下使用DNA聚合酶形成。该同源双链体分子能随后转变为适当宿主细胞,诸如大肠杆菌JM101。

[0136] III. 本发明的表达盒

[0137] 为了制备表达盒,重组DNA序列或分段可为圆形或线性,双链或单链。通常,DNA序列或分段为嵌合DNA的形式,诸如质粒DNA或载体,该载体也可以包含编码区域,两侧是对照序列,这些序列促进所获得的转化细胞中存在的重组DNA的表达。

[0138] 在本文中使用的“嵌合”载体或表达盒是指包括来自至少两个不同物种的核酸序列的载体或盒,或具有来自同一物种的核酸序列,该序列以不存在于“天然”或野生型物种中的方式连接或关联。

[0139] 除了作为RNA转录物或其一部分的转录单元的重组DNA序列外,部分的重组DNA可以是未转录的,用于调控或结构性功能。例如,重组DNA可具有在哺乳动物细胞有活性的启动子。

[0140] 宿主细胞中发挥功能的其他要件,诸如内含子、增强子、聚腺苷酸化序列及类似物,也可以是重组DNA的部分。这种要件对DNA的功能是必须或不是必须的,但可通过影响siRNA的转录、稳定性等而改善DNA的表达。这种要件可包含在所述的DNA中以期获得细胞中siRNA的优化性能。

[0141] 控制序列(Control sequences)是在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。适合原核细胞的控制序列,例如,包括启动子和可选的操作序列和核糖体结合位点。已知真核细胞使用启动子、多腺苷酸化信号和增强子。

[0142] 可操作地连接核酸是与其他核酸序列具有功能性关系的核酸。例如,如果启动子或增强子影响序列的转录,则启动子或增强子是可操作地连接到编码序列;或如果其定位为促进转译,则核糖体结合位点可操作地连接到编码序列。通常,可操作地连接的DNA序列是指连接在一起且连续的DNA序列。然而,增强子不一定是连续的。连接通过在便利限制性位点连接完成。如果不存在这些位点,则按照常规做法使用合成寡核苷酸适配体或连接体。

[0143] 被引入到细胞的重组DNA可以包含选择性标记基因或报告基因或二者以促进从细胞群识别和选择表达细胞,该细胞群通过病毒载体被转染或被感染。在其他实施方案中,选择性标记可被携带在单片DNA上且用于共转染程序。选择性筛选标记和报告基因的两侧都可能有适当的调控序列,以便在宿主细胞中表达。有用的选择性标记筛选标记是本领域已知的且包括,例如,抗生素耐药性基因,诸如新近系及类似物。

[0144] 报告基因用于识别可能的转染细胞和用于评估调控序列的功能性。编码易于检测的蛋白质的报告基因是本领域众所周知的。一般来说,报告基因是不存在或不由受体生物体或组织表达的基因,它编码蛋白质,该蛋白质的表达表现为一些容易检测的特性,例如酶活性。例如,报告基因包括来自大肠杆菌的Tn9的氯霉素乙酰基转移酶基因(cat)和来自萤火虫photinus pyralis的荧光素酶基因。在DNA被引入受体细胞后的适当时间测定报告基因的表达。

[0145] 构建能转染靶细胞的重组DNA的常规方法是本领域的技术人员已知的,且构建的相同组分和方法可用于生产本文有用的DNA。例如,Sambrook和Russell,infra,提供了适当的构建方法。

[0146] 重组DNA能通过转染由DNA组成的表达载体容易地被引入到宿主细胞,例如,哺乳动物、细菌、酵母菌或昆虫细胞,该DNA通过用于引入到特定细胞的任意程序编码siRNA,例如物理或生物方法,从而产生具有重组DNA的细胞,该重组DNA被稳定地整合到其基因组或作为游离基因元件存在,这样本发明的DNA分子或序列通过宿主细胞表达。优选地,DNA经由载体被引入到宿主细胞。宿主细胞是优选地是真核来源,例如植物、哺乳动物、昆虫、酵母菌或真菌来源,但也可使用非真核来源的宿主细胞。

[0147] 将预选择的DNA引入到宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质体转染、粒子轰击法、显微注射、电穿孔法及类似方法。将目标DNA引入到宿主细胞的生物方法包括使用DNA和RNA病毒载体。如下文所述,对于哺乳动物基因治疗,期望使用将拷贝基因插入宿主基因组的高效手段。病毒载体,且特别是逆转录病毒载体已成为将基因插入哺乳动物(例如,人体细胞)的最广泛使用的方法。其他病毒载体来自痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒及类似物。

[0148] 如上所述,“已转染”或“已转导”宿主细胞或细胞系是指基因组因至少一个异源或重组核酸序列的存在而改变或增强的细胞系。本发明的宿主细胞通常通过用反义分子、质粒表达载体的DNA序列、病毒表达载体或分离的线性DNA序列转染生产。被转染的DNA能成为染色体整合的重组DNA序列,其由编码siRNA的序列组成。

[0149] 为了确认宿主细胞中存在重组DNA序列,可进行多种测试。这样的测试包括,例如,“分子生物”测试是本领域的技术人员已知的,诸如RDNA印迹法和NA印迹法,RT-PCR和PCR;“生物化学”测试,诸如检测存在或不存在特定肽,例如,通过免疫学手段(ELISA和免疫印迹法)或通过本文说明的测试从而识别落入本发明范围内的试剂。此类测试包括,例如,本领域技术人员所熟知的“分子生物学”测试,诸如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR;“生化”测试,诸如检测特定肽的存在与不存在,例如通过免疫学手段(ELISA和Western印迹)或通过本文中描述的测试来识别落入本发明范围内的试剂。

[0150] 为了检测和定量由被引入的重组DNA分段生产的RNA,可使用RT-PCR。使用该PCR时,首先需要将RNA逆向转录到DNA,使用诸如逆向转录酶的酶,且随后使用常规PCR技术扩增DNA。多数情况下,PCR技术虽然有用,但不会证明RNA产品的完整性。关于RNA产品性质的进一步信息可通过Northern印迹法获取。该技术证明RNA种类的存在且提供有关RNA完整性的信息。存在或缺少RNA种类也能通过使用印迹或狭线印迹Northern杂交确定。这些技术是Northern印迹法修饰且仅证明RNA种类的存在或缺失。

[0151] 虽然Southern印迹法和PCR可用于检测有问题的重组DNA分段,但是它们不会提供

预选择的DNA分段是否被表达的信息。表达如下评估：通过特异性地识别被引入的重组DNA序列的肽产品或评估由宿主细胞中被引入的重组DNA分段的表达带来的表型改变。

[0152] 本发明提供用于在哺乳动物受体中表达外源核酸材料的细胞表达系统。表达系统,也称为“基因修饰的细胞”,包含用于表达外源核酸材料的细胞和表达载体。基因修饰的细胞适合施用到哺乳动物受体,其中它们取代受体的内源细胞。由此,优选的基因修饰的细胞是非永生化且是非致瘤的。

[0153] 根据一个实施方案,细胞被转染或另外体外被基因修饰。细胞从哺乳动物(优选地人类)分离,被引入载体的核酸(即,体外已转导或已转染)用于表达编码表达反义分子治疗性试剂的异源(例如,重组体)基因,且随后被施用到哺乳动物受体用于原位输送治疗性试剂。哺乳动物受体可为人体且待修饰的细胞是自体细胞,即,细胞从哺乳动物受体分离。

[0154] 根据另一个实施方案,细胞被体内转染或转导或另外基因修饰。用含有外源核酸材料的载体在体内转导或转染来自哺乳动物受体的细胞,包含外源核酸材料的载体用于表达异源(例如,重组体)基因,该异源基因编码表达反义分子的治疗剂,并且治疗剂原位递送。

[0155] VI. 用于本发明的表达盒的递送载体

[0156] 选择和优化用于在细胞中表达特定siRNA的特定表达载体,可通过以下方法实现:获得siRNA的核酸序列,可使用一个或多个适当的控制区(如启动子、插入序列);制备包含载体的载体构建体,载体中插入编码siRNA的核酸序列;用载体构建体转染或转导体外培养的细胞;以及确定siRNA是否存在于培养细胞中。

[0157] 用于细胞基因治疗的载体包括病毒,诸如复制-缺陷病毒。示例性病毒载体来自Harvey肉瘤病毒、ROUS肉瘤病毒、(MPSV)、莫洛尼鼠白血病毒和DNA病毒(例如,腺病毒)。

[0158] 复制-缺陷逆转录病毒能直接合成所有病毒体蛋白质,但不能制作干扰粒子。因此,这些基因改造的逆转录病毒表达载体对于在培养细胞中高效转导核酸序列具有普遍的实用性,而对于本发明方法的使用则具有特殊的实用性。这种逆转录病毒还具有将核酸序列有效转导入体内细胞的实用性。逆转录病毒扩展地用于将核酸材料转染到细胞。

[0159] 使用逆转录病毒用于基因治疗的优势是病毒将编码siRNA的核酸序列插入到宿主细胞基因组,由此当其分割时实现编码siRNA的核酸序列转移到细胞的子代。已经报道LTR区域的启动子序列增强插入的编码序列在多种细胞类型中的表达。使用逆转录病毒表达载体的一些劣势是:(1)插入诱变,即,将编码siRNA的核酸序列插入到靶细胞基因组的非期望位置,该靶细胞基因组例如,导致未调控细胞生长;和(2)为了将编码由载体携带的siRNA的核酸序列整合到靶基因组需要进行靶细胞增殖。

[0160] 用于转变细胞的表达载体的另一个病毒候选物是腺病毒、双链DNA病毒。腺病毒在多种细胞类型中具有传染性,包括肌肉细胞和内皮细胞等。腺病毒也用作体内肌肉细胞的表达载体。

[0161] 腺病毒(Ad)是具有36kb基因组的双链线性DNA病毒。腺病毒的几个特性使它们可用作治疗应用的转基因递送载体,诸如促进体内基因递送。已经证明重组腺病毒载体能有效地将基因原位转移到各种器官的实质细胞,器官包括肺、脑、胰腺、胆囊和肝脏。这使得这些载体可用于治疗遗传性遗传病(如囊性纤维化)的方法,其中载体可以被递送到靶器官。除此之外,腺病毒载体实现原位肿瘤转导的能力实现了开发非播散性疾病的各种抗癌基因

治疗方法。这些方法中,载体遏制(containment)有利于癌细胞-特异性转导。

[0162] 与逆转录病毒相似,腺病毒基因组适合用作基因治疗的表达载体,即,通过移除控制病毒本身产生的遗传信息。由于腺病毒以染色体外的方式发挥作用,因此重组腺病毒不存在插入突变的理论问题。

[0163] 传统上,已经使用一些方法生成重组腺病毒。一种方法涉及将包含目标核酸序列的限制性核酸内切酶片段直接连接到部分腺病毒基因组。或者,目标核酸序列可通过同源重组结果插入到缺陷腺病毒。期望的重组体通过筛选在互补细胞的菌苔生成的单个噬斑而识别。

[0164] 多数腺病毒载体基于5型腺病毒(Ad5)骨架,其中包含目标核酸序列的表达盒替代早期区1(E1)或早期区3(E3)被引入。E1被删除的病毒进行复制有缺陷,且在人体互补细胞(例如,293或911细胞)繁殖,其提供缺失基因E1和反式pIX。

[0165] 由此,对本领域的技术人员显而易见的是,各种合适的病毒表达载体可将外源核酸材料转移到细胞。为适合基因沉默治疗的特定条件选择合适的表达载体来表达治疗剂,以及优化将所选择的表达载体插入到细胞内的条件,都属于本领域普通人员的范围内,不需要进行过度的实验。

[0166] 在其他实施方案中,表达载体是质粒形式,其通过多种方法之一转移到靶细胞:物理、电穿孔、刮载、微粒轰击或通过细胞摄取作为化学复合物(例如,钙或锶共沉淀、与脂质络合、与配体络合)。一些商业产品可用于阳离子脂肪体络合,脂质体络合包括Lipofectin™(Gibco-BRL, Gaithersburg, Md.)和Transfectam™(ProMega, Madison, Wis.)。然而,这些方法转染的效率高度地取决于靶细胞的性质,所以,使用上述程序将核酸最佳转染到细胞的条件必须优化。这种优化在本领域的技术人员的范围内而不需过度的实验。

[0167] VII. 选择反义分子的方法

[0168] 在常染色体显性突变导致的疾病中,基因的等位基因之一包含具有显性负性作用的突变。因此,期望抑制被影响的等位基因中出现的这种突变,同时实现所述基因的未受影响的等位基因被表达。为了选择能够选择性抑制,即减少,被影响的等位基因的适当反义分子,提供来自患有由常染色体显性突变导致的疾病的患者的核酸试样。许多这样的疾病是已知的。这样的疾病的非限制性示例包括结节性硬化症、乳腺癌、I型神经纤维有丝分裂、亨廷顿病、肥厚心肌症、多囊肾疾病、脆骨病、软骨发育不良、中央核肌病和马凡氏综合征。原则上,任意这样的疾病可通过根据本发明选择的反义分子治疗。本发明的方法需要核酸,优选患者的DNA试样。可使用来自患者的包含DNA的任意生物试样,包括但不限于,血液试样、唾液、颊粘膜等。在某些实施方案中可使用RNA。根据本领域已知的方法,可以从所述试样分离DNA。随后,通过确定存在的两个等位基因的所述基因的核酸序列来确定常染色体显性突变的存在。随后,对等位基因进行筛选,以确定所述基因的等位基因中是否存在杂合SNP。在优选实施方案中,杂合SNP是通过选择同义SNP来确定的,因为同义SNP预期具有最高次等位基因频率(MAF)。然后所述基因的所述SNP的正义链的核酸序列通过本领域已知的方法确定。随后,分离的反义分子选择为包含反义核酸链且基本上与所述基因编码的转录物的靶区域互补,其中所述反义核酸链至少与所述靶区域中所述SNP互补。

[0169] 在优选实施方案中,选择本发明的反义分子的所述方法还包含如下步骤:选择的反义分子在细胞中测试以确定对所述基因表达减少的影响。优选地,所述方法包含确定所

述基因的突变和/或未突变等位基因的表达减少的影响。优选地,所述方法包含确定所述基因的等位基因不平衡的变化的步骤。优选地,所述步骤在来自患者的细胞上进行。

[0170] 在优选实施方案中,分离的反义分子选自:

[0171] a. 双链核酸(dsNA)或其化学修饰版本;或

[0172] b. 反义寡核苷酸(ASO)。

[0173] 优选地,所述dsNA是RNA,更优选地,是短发卡(shRNA)或小干扰RNA(siRNA)。优选地,所述dsNA是dsRNA。

[0174] 如此处使用的术语iRNA是指由15-31个碱基对(bp),优选地,20-25bp构成,且包含两个RNA分子的双链RNA分子。如此处使用的术语shRNA是指形成发卡结构的单个RNA分子,该发卡结构包含由15-31bp,优选地,20-25bp构成的部分双链RNA分子和单链环。

[0175] 根据本发明,在分离的反义分子的优选实施方案中,所述反义核酸链的长度是15-30个核苷酸。优选地,所述反义核酸链是与所述靶区域中至少7个,更优选地与8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个核苷酸互补。在一些实施方案中,反义核酸链与靶区域之间可存在一个或两个错配。优选地,所述反义核酸链与至少7个,更优选地8个、9个、10个、11个或12个连续核苷酸互补。优选地,所述靶区域至少包含所述靶区域中的15个、16个、17个、18个或19个核苷酸。

[0176] 根据本发明,在分离的双链核酸(dsNA)的优选实施方案中,dsNA包含长度是15-30个核苷酸的正义核酸链;且正义核酸链与所述反义核酸链互补且正义与反义核酸链形成双链体区域。优选地,所述dsNA是如下shRNA:其包含长度是15-30个核苷酸,优选是长度是19个核苷酸且具有5'末端和3'末端的RNA的反义核酸链和长度是15-30个核苷酸、具有5'末端和3'末端的RNA的正义链,其中反义核酸链是优选与所述靶区域的至少个15核苷酸互补,并且其中优选地RNA的正义链的5'末端是可操作地连接到G核苷酸从而形成RNA的第一分段,其中优选地反义链和正义链的至少12个核苷酸彼此互补且优选地在生理条件下形成小干扰RNA(siRNA)双链体。

[0177] 优选地,反义链和正义链通过RNA环链可操作地连接以形成包含双链体结构和环结构的发卡结构。

[0178] 优选地,环结构优选地包含从4到13个,更优选地4与10个之间的核苷酸。在实施方案中,所述环结构包含4个、5个或6个核苷酸。优选地,所述环包含序列UCAAGAC。

[0179] 由RNA的两个链形成的双链体可以是15与25个碱基对之间的长度,优选地,长度是19个碱基对。反义链长度优选是19个核苷酸。正义链长度优选是19个核苷酸。shRNA还可包含单链突出端区。这种单链突出端可为3'单链突出端区或5'单链突出端区。单链突出端区可的长度可是,例如,从1到6个核苷酸。

[0180] 本发明还包含编码本发明的分离的反义分子的核酸。在优选实施方案中,本发明的所述shRNA是由具有下述结构的寡核苷酸编码:正向5'-CCGGAA-19bp正义链-TCAAGAC-19bp反义链-TTTTTTTG-3'和/或逆向5'-AATTCAAAAAAA-19bp正义链-GTCTTGA-19bp反义链-TT-3'。此处正义链具有与mRNA中靶序列相同的序列,且反义链是其逆向互补序列,具有会最终结合mRNA且诱导其断裂和/或抑制。

[0181] 优选地,所述基因选自LMNA、电压门控钾离子通道亚族Q成员1(KCNQ1)、神经纤维瘤蛋白1(NF1)、原纤蛋白1(FBN1)、乳腺癌基因1(BRCA1)、BRCA2、结节性硬化症复合物1

(TSC1)和TSC2基因。优选地,所述SNP选自rs1057128、rs8234和rs17215465。优选地,所述疾病是心力衰竭、结节性硬化症、乳腺癌、I型神经纤维有丝分裂、亨廷顿病、肥厚心肌症、多囊肾疾病、脆骨病、软骨发育异常、中央核肌病和马凡综合征。优选地,所述心力衰竭是核纤层蛋白病,优选是扩张型心肌病。

[0182] 下面通过下述非限制性实施例对本发明进行说明。

[0183] 实施例

[0184] 实施例1

[0185] 材料和方法

[0186] 人体iPSC培养基

[0187] 来自携带LMNA H222P突变的男性患者的LMNA H222P SV1122 hiPSC细胞系在德国汉堡生产。UN1-22细胞系来自健康男性且完整表征在之前公开(Shinnawi,2015Stem Cell Reports 2015;5:582-596.)。两个细胞系与定位在LMNA的SNP rs4641杂合。我们在用1:500稀释生长因子还原的基底胶涂敷的(Corning;FAL356231)的平皿上培养mTeSR-1(StemCellTechnologies;85850)中两个hiPSC细胞系的菌落。我们每4-6天通过使用0.5mM EDTA(Invitrogen;15575-038)离解使细胞传代,并将它们重新接种在补充有2 $\mu$ M噻唑威宁(Selleck Chemicals;S1459)的mTeSR-1中。除传代之后第一天,传代期间我们每天更换mTeSR-1培养基。

[0188] hiPSC的心脏分化

[0189] 我们按照先前发布的方案进行了心脏分化,并进行了轻微的调整(Burridge,2014年Nat方法,2014年;11:855-860)。通过变为补充有6 $\mu$ MCHIR99021(Stemgent;04-0004-10)的CDM3培养基(RPMI 1640,Gibco 21875;500 $\mu$ g/ml人血清白蛋白,Sigma A9731;213 $\mu$ g/ml L-抗坏血酸2磷酸盐,Sigma A8960;1%青霉素/链霉素)传代两天,接着变为补充有2 $\mu$ M Wnt-C59(Selleck Chemicals;S7037)的CDM3传代两天后,我们诱导分化3-5天。从第4天到第10天,我们每隔一天将培养基换为RPMI/B27培养基(RPMI-1640,2% B27补充剂(减胰岛素)(Gibco;A1895601),1%青霉素/链霉素)。之后第8天能识别出自发性收缩。第10天之后,我们每周将hiPSC-CM上的培养基换为无葡萄糖的CDM3培养基(RPMI-1640(无葡萄糖),Gibco;11879),该CDM3培养基补充有溶解于1M HEPES-溶液中的20mM乳酸钠(Sigma-Aldrich;L7022),持续至少2周以代谢性地选择心肌细胞。选择后,我们每周用含葡萄糖的CDM3培养基更换一次培养基。

[0190] 我们通过TrypLE Express(Gibco;12604)孵育15分钟来解离纯化的心肌细胞群,并将它们接种在含有2 $\mu$ M噻唑威宁的RPMI/B27基质胶包被板上,用于进一步实验。我们开始分化后在hiPSC-CM上进行所有实验40-60天,然后在使用来自不同分化的hiPSC-CM的2到4次独立实验中重复每次观察。

[0191] 质粒生成

[0192] 对于shRNA表达,我们使用具有嘌呤霉素的pLK0.1骨架作为筛选标记(pLK0.1puro;Addgene;8453)。为了克隆shRNA序列,我们设计下述寡核苷酸:正向5'-CCGGAA-19bp正义链-TCAAGAC-19bp反义链-TTTTTTTG-3'和逆向5'-AATCAAAAAA-19bp正义链-GTCTTGA-19bp反义链-TT-3'。当正义链正是mRNA靶序列时,反义链是最终会结合mRNA的逆向互补序列。我们根据Huang等人(2014)设计shRNA序列。我们退火1nmol的这些寡核苷

酸,然后将它们克隆到pLK0.1-puro质粒中的AgeI和EcoRI限制性位点。ShRNA序列在表1详细说明。我们通过桑格测序确证所有质粒序列且排除包含突变的质粒。

#### [0193] 病毒生产

[0194] 为了生产基于pLK0.1-puro构建体的第三代慢病毒,我们使用Gene jammer (Agilent;204130)根据生产商的协议利用4 $\mu$ g表达质粒、2.7 $\mu$ g pMDLg/pRRE、1 $\mu$ g pRSV-Rev、1.4 $\mu$ g pVSVG共转染 $4 \times 10^6$ 个HEK293T细胞。第二天,我们将HEK293T培养基更换为CDM3培养基。之前变化24小时后,我们收集包含产生的慢病毒的该培养基,然后将其直接用于hiPSC-CM转导。

#### [0195] HiPSC-CM感染

[0196] 我们在慢病毒转导前2至4天解离hiPSC-CMs,以确保不同条件下细胞群同质。我们向具有病毒的培养基的6-孔板中以2ml/孔加入新鲜的hiPSC-CM。24小时后,我们移除包含病毒的培养基,然后将其用新鲜CDM3培养基替换。5天后,我们更换培养基,开始进行嘌呤霉素选择,在CDM3培养基中加入8 $\mu$ g/ml嘌呤霉素,持续48小时。我们在嘌呤霉素选择后收获了细胞。

#### [0197] RNA分离

[0198] 我们使用1ml TriReagent (Sigma Aldrich;T9424)分离来自所有试样的总RNA。我们将TriReagent直接添加到培养皿上生长的活细胞中。我们根据生产商协议进行总RNA分离。

#### [0199] mRNA的等位基因-特异性qRT-PCR

[0200] 为了检测每个LMNA等位基因的mRNA表达,250ng到1 $\mu$ g RNA用脱氧核糖核酸酶I扩增等级 (Invitrogen;18068015)进行了脱氧核糖核酸酶处理,然后根据生产上商协议,使用具有寡-dT和随机引物的Superscript II逆转录酶 (Invitrogen;18064014)进行逆向转录。cDNA稀释5次且使用2 $\mu$ l作为qPCR的输入(input)。

[0201] 通过下述循环程序,在LightCycler 480系统II (Roche)上使用1 $\mu$ M引物(表2)和LightCycler 480SYBR Green master 1 (Roche;04887352001)进行qPCR:在95 $^{\circ}$ C预孵育5分钟;在95 $^{\circ}$ C变性10秒、退火(表2中的温度)20秒、在72 $^{\circ}$ C伸长20秒,进行40个循环。使用LinRegPCR定量PCR分析软件 (Ruijter,2009)分析数据,且通过该软件估计的转录物的初始浓度校正为三个参考基因GAPDH、HPRT和TBP的估计初始浓度的几何学平均数。

#### [0202] 表1.shRNA靶序列

[0203]

靶标	shRNA 编号	位置错配	正义链(5'-3')	反义链(5'-3')
阴性对照	175	-	GAAATGTA CTGCGTGG AGA SEQ ID NO:9	TCTCCACG CAGTACAT TTC SEQ ID NO:10
C 等位基 因 LMNC	209	C10	TCACCACC ACGTGAGT GGT SEQ ID NO:11	ACCACTCAC GTGGTGGT GA SEQ ID NO:12
	210	C11	CACCACC ACGTGAGT GTA SEQ ID NO:13	TACCACTCAC GTGGTGGT G SEQ ID NO:14
	211	C12	ACCACCAC GTGAGTGG TAG SEQ ID NO:15	CTACCACTCAC GTGGTGGT SEQ ID NO:16
	212	C13	CCACCAC GTGAGTGGT AGC SEQ ID NO:17	GCTACCACTCAC GTGGTGGT SEQ ID NO:18
T 等位基 因 LMNC	213	T9	ATCACCAC CATGTGAG TGG SEQ ID NO:19	CCACTCACAT GGTGGT GAT SEQ ID NO:20
	214	T10	TCACCACC ATGTGAGT GGT SEQ ID NO:21	ACCACTCACAT GGTGGT GA SEQ ID NO:22

[0204]

C 等位基因 LMNA	215	T11	CACCACCATGTGAGTG GTA SEQ ID NO:23	TACCACTCACATGGTGGTG SEQ ID NO:24
	216	T12	ACCACCATGTGAGTGG TAG SEQ ID NO:25	CTACCACTCACATGGTGGT SEQ ID NO:26
	217	T14	CACCATGTGAGTGGTA GCC SEQ ID NO:27	GGCTACCACTCACATGGTG SEQ ID NO:28
	230	C10	TCACCACCACGGCTCC CAC SEQ ID NO:29	GTGGGAGCCGTGGTGGTGA SEQ ID NO:30
	231	C11	CACCACCACGGCTCCC ACT SEQ ID NO:31	AGTGGGAGCCGTGGTGGTG SEQ ID NO:32
	232	C12	ACCACCACGGCTCCCA CTG SEQ ID NO:33	CAGTGGGAGCCGTGGTGGT SEQ ID NO:34
T 等位基因 LMNA	233	C13	CCACCACGGCTCCCAC TGC SEQ ID NO:35	GCAGTGGGAGCCGTGGTGG SEQ ID NO:36
	234	C14	CACCACGGCTCCCCT GCA SEQ ID NO:37	TGCAGTGGGAGCCGTGGTG SEQ ID NO:38
	235	C17	CACGGCTCCCCTGCA GCA SEQ ID NO:39	TGCTGCAGTGGGAGCCGTG SEQ ID NO:40
T 等位基因 LMNA	236	T9	ATCACCACCATGGCTC CCA SEQ ID NO:41	TGGGAGCCATGGTGGTGAT SEQ ID NO:42
	237	T10	TCACCACCATGGCTCC CAC SEQ ID NO:43	GTGGGAGCCATGGTGGTGA SEQ ID NO:44
	238	T11	CACCACCATGGCTCCC ACT SEQ ID NO:45	AGTGGGAGCCATGGTGGTG SEQ ID NO:46
	239	T12	ACCACCATGGCTCCCA CTG SEQ ID NO:47	CAGTGGGAGCCATGGTGGT SEQ ID NO:48
	240	T14	CACCATGGCTCCCCT GCA SEQ ID NO:49	TGCAGTGGGAGCCATGGTG SEQ ID NO:50
	241	T17	CATGGCTCCCCTGCA GCA SEQ ID NO:51	TGCTGCAGTGGGAGCCATG SEQ ID NO:52

[0205] 表2. 用于qRT-PCR的引物序列

[0206]

靶标(mRNA)	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	退火温度
C 等位基因 LMNA	ACCTGCTCCATCACCACC SEQ ID NO:53	AGCCGCTGGCAGATGCCTTG SEQ ID NO:54	66
T 等位基因 LMNA	ACCTGCTCCATCACCACAT SEQ ID NO:55	AGCCGCTGGCAGATGCCTTG SEQ ID NO:56	66
总 LMNA	ACCTGCTCCATCACCACC SEQ ID NO:57	AGCCGCTGGCAGATGCCTTG SEQ ID NO:58	66
C 等位基因	ACCTGCTCCATCACCACC	TGGCCCCAGTGCAGGCTC	66

	LMNC	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:60	
	T 等位基因 LMNC	ACCTGCTCCATCACCACCAT SEQ ID NO:61	TGGCCCCAGTGCAGGCTC SEQ ID NO:62	66
	总 LMNC	ACCTGCTCCATCACCACC SEQ ID NO:63	TGGCCCCAGTGCAGGCTC SEQ ID NO:64	66
[0207]	<i>GAPDH</i>	ACCCACTCCTCCACCTTTGA C SEQ ID NO:65	ACCCTGTTGCTGTAGCCAAAT T SEQ ID NO:66	60
	<i>HPRT</i>	TGACACTGGCAAAACAATG CA SEQ ID NO:67	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT SEQ ID NO:68	60
	<i>TBP</i>	GCTCACCCACCAACAATT A G SEQ ID NO:69	TCTGCTCTGACTTTAGCACCT G SEQ ID NO:70	60

## [0208] 结果

[0209] 为了测试通过等位基因-特异性siRNA靶向独立于因果突变的常见变体使突变等位基因沉寂的假设,我们在两个人类诱导性多能干细胞 (hiPSC) 系中搜索LMNA的常见变体。在LMNA3出现已知常见单核苷酸多态性 (SNP),即rs538089、rs505058和rs4641,它们分别具有21.8%、20.4%和32.8%的杂合性。我们通过使用来自我们hiPSC细胞系的基因组DNA对包含这些3个SNP的3个PCR扩增子测序,然后发现两个hiPSC细胞系是SNP rs4641 (C/T) 的杂合子携带者且不携带其他变体。为了这个原因,我们选择SNP rs4641作为LMNA中的可靶向变体。

[0210] SNP rs4641是来自LMNA的两个mRNA异构体 (即核纤层蛋白A和核纤层蛋白C) 的最后一个共享核苷酸。两种异构体共享第一批566个氨基酸,但由于外显子10后的可选剪接不同,核纤层蛋白A继续连接外显子11和12,而核纤层蛋白C继续连接外显子10B。由于SNP rs4641是两个异构体的最后一个共享核苷酸,我们需要设计异构体特异性siRNA。另外,LMNA突变可以定位在SNP (C或T等位基因) 的两个等位基因,意味着对于核纤层蛋白A和核纤层蛋白C异构体二者上的两个SNP等位基因我们需要siRNA。基于文献和获取的关于设计siRNA的知识,我们为每个异构体 (参见图1) 的每个等位基因设计构建体。由于我们预想经由使用短发卡RNA (shRNA) 的基因治疗递送我们的构建体,我们在我们的实验使用shRNA以立即测试来自心肌细胞 (hiPSC-CM) 的人类诱导性多能干细胞中shRNA的影响。

[0211] 未观察到下调核纤层蛋白C的shRNA的等位基因-特异性影响

[0212] 首先,我们开始测试我们靶向LMNA H222P hiPSC-CM中核纤层蛋白C的C等位基因的shRNA。如期望的,我们未观察到核纤层蛋白A异构体的C或T等位基因的下调,表明我们对核纤层蛋白C的C等位基因设计的shRNA是异构体特异性的 (图2,样本数据A)。我们通过shRNA C11观察到核纤层蛋白C的C等位基因的下调 (图2,样本数据B)。然而,我们也通过该shRNA观察到核纤层蛋白C的T等位基因的下调,表明该shRNA不是等位基因-特异性。所有其他测试的shRNA并未示出任何下调 (图2,样本数据B)。

[0213] 接着,我们继续测试我们的靶向LMNA H222P hiPSC-CM中核纤层蛋白C的T等位基因的shRNA。由于未观察到核纤层蛋白A异构体的下调 (图2,样本数据C),这些shRNA也是异构体特异性的。我们通过shRNA T14观察到核纤层蛋白C的T等位基因的下调 (图2,样本数据D)。然而,这种影响不是等位基因特异性的,因为在核纤层蛋白C的C等位基因上观察到相同量的下调。所有其他测试的shRNA均未显示任何下调 (图2,样本数据D)。

[0214] 总之,我们的设计的靶向C等位基因或T等位基因的shRNA未示出纤层蛋白C的等位

基因-特异性下调。

[0215] shRNA C17和T17提供核纤层蛋白A的异构体和等位基因-特异性下调

[0216] 接着,我们测试靶向核纤层蛋白A异构体的等位基因的shRNA,从靶向核纤层蛋白A的C等位基因开始。我们通过LMNA H222P hiPSC-CM中核纤层蛋白A的靶向C等位基因中40%的shRNA C17观察到下调(图3,样本数据A)。另外,由于我们并未观察到核纤层蛋白A的T等位基因的下调,该影响是等位基因-特异性。而且,等位基因-特异性影响也是异构体特异性的,由于shRNA C17未示出核纤层蛋白C等位基因的任何下调(图3,样本数据B)。所有其他测试的shRNA未示出核纤层蛋白A或核纤层蛋白C的下调。随后,我们测试了健康hiPSC-CM中相同的shRNA。我们观察shRNA C17的相同的影响,当前核纤层蛋白A的被靶向的C等位基因甚至被更高下调50%(图3,样本数据C和D)。然而,我们现在也观察到对核纤层蛋白A的T等位基因的轻微影响。

[0217] 最后,我们测试靶向核纤层蛋白A的T等位基因的shRNA。我们观察到通过LMNA H222P hiPSC-CM中shRNA T17获得的53%的下调(图4,样本数据A)。更重要的是,该观察到的影响是等位基因-特异性和异构体特异性的(图4,样本数据B)。其他测试的shRNA未示出下调。如之前一样,我们测试健康hiPSC-CM中的相同shRNA。相似地,shRNA T17示出异构体和55%的等位基因-特异性下调(图4,样本数据C和D)。

[0218] 总之,我们发现了2个shRNA,它们在2个不同的hiPSC-CMs细胞系中下调异构体和等位基因特异性地下调核纤层蛋白A的SNP rs4641的C或T等位基因,效率约为50%。

[0219] 通过shRNA T17下调突变H222P等位基因改善了细胞核圆度

[0220] 为了评估通过细胞核表型上的shRNA C17和T17下调C等位基因或T等位基因的影响,我们使用阴性对照shRNA,shRNA C17(C等位基因的下调)和shRNA T17(T等位基因的下调)治疗H222P hiPSC-CM。克隆LMNA PCR产品的质粒围绕SNP且H222P-细胞系上cDNA的突变和细菌克隆的桑格测序显示杂合H222P突变是位于与rs4641的T等位基因相同的等位基因。因此,H222P hiPSC-CM中rs4641 C等位基因的下调导致野生型等位基因的下调,期望其会恶化表型,但是rs4641 T等位基因的下调会下调突变等位基因,且预期会缓和表型。

[0221] 由于LMNA编码细胞核的核纤层蛋白A,其会支持细胞核膜,LMNA对细胞核构造很重要。因此,细胞核形状是细胞如何被某些突变严重影响的度量。我们评估了基于shRNAs的野生型或突变等位基因下调对细胞的细胞核圆度的影响。与阴性对照组相比,用2种不同条件治疗后我们测量了细胞核圆度。野生型等位基因的下调后,我们未观察到细胞核圆度降低。然而,治疗上更有趣的是,rs4641 T等位基因和由此突变等位基因的下调显著改善了细胞核圆度( $p < 0.001$ )。参见图5。由此,通过shRNA T17下调T等位基因和由此下调H222P突变等位基因导致LMNA H222P hiPSC-CM中细胞核圆度的提升,这表明这些LMNA H222P hiPSC-CM在通过shRNA-靶向SNP rs4641下调突变等位基因后受突变的影响较小。

[0222] 实施例2

[0223] 材料和方法

[0224] 参见实施例1和下述添加:

[0225] 如前所述进行hiPSC的心脏分化,或遵循CHIR稀释方案,包括第0天在3ml CDM3培养基中加入6mM CHIR99021,第1天加入2ml CDM3培养基,第2天加入另外1ml CDM3培养基,第3天在CDM3中加入2mM WNT-C59。从第4到5天(无稀释vs稀释方案)直到第10天,我们每隔

一天将培养基更换为RPMI/B27培养基(RPMI-1640,2% B27补充剂(减胰岛素)(Gibco; A1895601),1%青霉素/链霉素)。

[0226] 通过TrypLE Express(Gibco;12604)孵育心肌细胞15到45分钟后离解心肌细胞,之后将它们接种在含有2 $\mu$ M噻唑威宁的RPMI/B27基质胶包被板上,用于进一步实验。

[0227] 对于质粒生成,我们根据Huang等人(2014)设计shRNA序列,并且基于miRNA与它们的靶标之间的已知交互区域且基于原始shRNA选择的结果加入错配。用于qRT-PCR的额外shRNA靶向序列和引物序列分别包括在表3和4中。

[0228] 结果

[0229] 等位基因-特异性靶向的SNP识别

[0230] 为了通过靶向共同SNP来允许LMNA的等位基因特异性下调,我们在LMNA的编码区中搜索了同义SNP,因为预计这些SNP具有最高的次等位基因频率(MAF)。结果是,这些SNPs杂合子的患者数量最多,从而可以进行等位基因特异性靶向治疗。该研究揭示LMNA中的3个同义SNP(rs538089、rs505058和rs4641)在基因组聚合数据库(gnomAD)群中的MAF分别是18%、24%和21%。这些MAF表明,根据哈迪-温伯格平衡,29%的患者应为SNP rs538089杂合、36%的患者应为rs505058杂合,且33%的患者应为SNP rs4641杂合。这意味着靶向这些相应SNP将允许治疗相似数量的LMNA患者,而与引起突变的疾病无关。我们从AmsterdamUMC门诊部挑选8个LMNA突变携带者且挑选具有LMNA的H222P突变的hiPSC细胞系用于这些SNP的杂合性,其揭示5个患者和hiPSC细胞系对rs4641具有杂合性且对rs538089或rs505058不具有杂合性。因此,我们将等位基因特异性shRNA方法集中在SNP rs4641上。

[0231] 对LMNA和LMNC中rs4641的两个等位基因设计等位基因-特异性shRNALMNA基因编码两个mRNA剪接异构体,LMNA和LMNC,它们共享编码第一批566个氨基酸的序列。当LMNC异构体未剪接且在外显子10末端终止时,在外显子10中的可选剪接导致它们C端的两个异构体之间的差异,同时LMNA异构体在外显子10中间使用剪接位点以向外显子11和12剪接(图1和6)。SNP rs4641位于两个异构体之间共享的最后一个核苷酸。这与Huang等人(Huang等人,2009.Nucleic Acids Res 37:7560-7569)的数据组合,他们示出了,当区分两个等位基因的核苷酸位于siRNA的中间时,获得最高的等位基因特异性,这表明我们需要分别设计靶向LMNA和LMNC的等位基因特异性siRNA。另外,由于SNP的T等位基因和C等位基因二者能残留在不同患者中的突变等位基因上,我们不需设计靶向SNP rs4641的两个等位基因的siRNA。根据Huang等人的数据,我们选择了6条siRNA,这6条siRNA被预测为靶向LMNA的C等位基因,且在位点10、11、12、13、14和17与非靶向的T等位基因错配;以及6条siRNA被预测为靶向LMNA的T等位基因,且在位点9、10、11、12、14和17与非靶向的C等位基因错配(图6)。采用类似的方法,我们选择了5个预测为靶向LMNC的C等位基因的siRNA,它们在位点10、11、12、13和17与非靶向的T等位基因错配;以及7个预测为靶向LMNC的T等位基因的siRNA,它们在位点9、10、11、12、14、16和17与非靶向的C等位基因错配(图6)。由于我们设想,经由病毒介导的shRNA表达来治疗性递送这些siRNA,我们也根据图7描述的设计体外表达这些siRNA作为病毒shRNA构建体。

[0232] LMNA异构体中rs4641的等位基因-特异性靶向

[0233] 为了测试shRNA,我们慢病毒地转导来自H222P hiPSC细胞系的心肌细胞。该细胞系来自具有埃-德型肌营养不良表型的男性患者,该症会影响骨骼肌与心肌肌肉(Bonne et

al., 2000. *Ann Neurol* 48:170-80)。慢病毒shRNA转导后,我们将突变和野生型LMNA等位基因的等位基因-特异性qRT-PCR表达量与通过加扰阴性对照shRNA (Scr) 转导的细胞的表达量对比。靶向LMNA剪接异构体中rs4641的C等位基因,该C等位基因残留在野生型LMNA等位基因上的该H222P hiPSC细胞系,揭示一个shRNA, shC17,其下调野生型LMNA等位基因几乎50%,且非靶向突变等位基因仅下调10% (图8A) 因为LMNA中的多数突变,包括H222P突变,具有显性-负性行为模式,这就意味着突变的等位基因干扰野生型等位基因的功能,野生型与这种突变的等位基因之间的等位基因平衡确定疾病严重性。因此,我们也调查了靶向rs4641的C等位基因影响LMNA等位基因之间的等位基因平衡的程度 (图8B)。这揭示了SCR阴性对照细胞的该实验中两个等位基因几乎同等表达 (52:48%), 在shC17转导的细胞中,其转变为靶向的野生型LMNA等位基因的相对低表达 (40:60%)。令我们惊奇的是,其他shRNA并未下调任何LMNA等位基因,但另外导致野生型和突变LMNA等位基因二者的上调。虽然我们通过这些shRNA仅靶向LMNA剪接异构体,但是我们也在LMNC上进行等位基因-特异性qRT-PCR,这揭示了任何LMNC等位基因都未出现下调,并且因此也对突变与野生型LMNC异构体之间的平衡也没有强烈影响 (图8C/D)。

[0234] 之前研究表明,在shRNA的种子区域或Argonaute识别区域中引入额外的错配能提升靶向与非靶向的等位基因之间的差异。由于我们对LMNA通过shC17使LMNA剪接异构体的rs4641的非靶向的T等位基因的敲除率为10%, 我们加入另外错配到该shC17序列,尝试进一步减少该靶向性。我们在种子区域的位点5、6和7加入错配,且在argonaute识别区域的位点10、11加入错配 (图9)。我们以GC含量稳定的方式改变shRNA中的核苷酸,然而,我们预期其他变化具有相似影响。使用额外错配转导原始shC17序列和shRNA后进行等位基因-特异性qRT-PCR,揭示了shC17mm5更强地诱导LMNA异构体中rs4641的靶向C等位基因下调,但也能更强地诱导非靶向的T等位基因下调 (图10A)。与原始C17序列 (36:63% shC17mm5 and 39:61% shC17; 图10B) 相比,这就导致等位基因平衡的稍微更强移动。有趣的是,shC17mm7导致类似的LMNA的等位基因失衡 (40:60%), 这是由非靶向等位基因比靶向等位基因更强的上调诱导的。我们再次证明这些shRNA靶向LMNA剪接异构体并未影响LMNC剪接异构体水平。为了进一步研究突变等位基因的绝对水平或等位基因失衡是否是决定患者疾病严重程度和我们的hiPSC-CM表型的最重要因素,我们决定进一步研究shC17、shC17mm5和shC17mm7且比较它们对hiPSC-CM中疾病表征型的影响。

[0235] 由于SNP的两个等位基因都可以存在于不同患者的突变LMNA等位基因上,因此我们还靶向了LMNA中rs4641的T等位基因,在我们的H222PhiPSC-CMs中,该T等位基因位于突变等位基因上。这就揭示一种shRNA, shT17, 它使靶向T等位基因下调了53%, 非靶向等位基因下调了8% (图11A), 而所有其他shRNA再次诱导了两个LMNA等位基因的上调。靶向等位基因的53%下调也导致等位基因平衡从SCR阴性对照转导细胞中的45:55%转变为shT17转导细胞中的61:39%的比率,这意味着在这些细胞中,该比率从突变等位基因的小相对过表达转变为shT17突变等位基因的相对表达不足 (图11B)。shRNA靶向LMNA剪接异构体的T等位基因也不会影响LMNC剪接异构体的等位基因失衡。我们也再次在种子区域的位点5、6和7且在Argonaute识别区域的位点10和11将额外错配加入到shT17序列。有趣的是,将这些错配加入到shC17序列,我们观察到相似影响 (图9)。同样,在位点5的错配更强烈地诱导了靶向T等位基因的下调,甚至高达83%,但也更强烈地诱导了非靶向C等位基因的下调至44%。在位

点7的错配导致与该实验的原始T17序列相似的下调(20%),但再次导致未被靶向的C等位基因的强上调(图12A)。结果与原始T17序列(70:30%;图12B)相比,在位点5和7(76:24%和74:26%)具有错配的两个shRNA导致对等位基因失衡的更强影响。同样,这些shRNA不影响LMNC的等位基因失衡(图12C/D)。由于存在如下相同问题:突变等位基因的决绝水平或等位基因失衡是否是确定患者的疾病严重性和我们的hiPSC-CM的表征型的最重要因素,我们也进一步研究shT17、shT17mm5和shT17mm7且对比它们对hiPSC-CM的疾病表征型的影响。

[0236] 等位基因-特异性靶向LMNC异构体中的rs4641

[0237] 为了测试靶向LMNC的shRNA,我们用这些shRNA慢病毒转导来自H222P hiPSC系的心肌细胞,并将突变和野生型LMNC等位基因的等位基因特异性qRT-PCR表达量与加扰阴性对照shRNA(Scr)转导的细胞中的表达量进行比较。在LMNC剪接异构体中靶向rs4641的C等位基因,该C等位基因位于野生型LMNC等位基因上的该H222P hiPSC细胞系,揭示了3个shRNA,shC11、shC13和shC17的C等位基因分别具有31%、6%和16%的基因敲除(图13)。然而,shC11也具有30%的非靶向T等位基因的敲除和shC17也具有6%的基因敲除。这导致等位基因平衡的小位移:倒换已转导细胞的从48:51%到shC11的59:41%、到shC13的57:43%和到shC17的36:64%。这导致等位基因平衡从加扰转导细胞的48:51%小幅变化到shC11的59:41%、shC13的57:43%和shC17的36:64%。我们也确定这些shRNA对LMNA表达量的影响,且注意到shC11也非等位基因-特异性地抑制LMNA异构体25%且shC17提升了C和T等位基因两个的表达量,但T等位基因增加更大程度,其因此也导致LMNA的等位基因平衡的轻微位移(从SCR的48:52%到shC17的43:57%)。这暗示shC17可能是可影响两种剪接异构体的较好候选物。考虑到加入到靶向上述LMNA异构体的shC17的错配的结果,我们推测将错配5和7加入到靶向LMNC异构体的shC17也能进一步改善LMNC的等位基因-特异性靶向或等位基因失衡诱导,有可能其立即也影响LMNA,这减少分别靶向两种剪接异构体的需求。

[0238] 为了通过shC11和shC13靶向LMNC异构体的C等位基因进一步改善等位基因-特异性靶向,我们将错配加入到这些shRNA序列(图14)。错配加入到shC11,不会另外导致靶向或非靶向LMNC等位基因的下调(图15),shC11mm5导致在非靶向等位基因中更强的小上调,这导致稍微更强的等位基因失衡(40:60% scr;36:64% shC11;和30:70% shC11mm5)。将错配加入到C13shRNA序列确实导致shC13mm17中靶向的C等位基因的更强下调(图16)。然而,非靶向的等位基因的下调几乎同样强,这导致原始C13 shRNA与shC13mm17之间的等位基因平衡相当(66:34%相对65:35%)。然而,根据对LMNA靶向shRNA进行的表型分析结果,如果突变等位基因的绝对水平的损失比对等位基因平衡的影响更重要,则该shC13mm17可能是进一步表型分析的有趣候选者。

[0239] 同样,由于rs4641的两个等位基因都可以存在于不同患者的突变等位基因上,我们还测试了靶向LMNC异构体中rs4641的T等位基因的shRNA。这揭示了两个shRNA能下调shT14的靶向T等位基因33%且能下调T17的靶向T等位基因22%,同时它们也分别下调非靶向的C等位基因20%和15%。让我们惊奇的是,shT17的等位基因失衡移动到被更强下调的靶向T等位基因的相对过表达(scr是40:60%相对43:57%)。shT14确实将在期望方向的等位基因失衡移动到靶向T等位基因的相对表达不足(51:49%;图17)。两种shRNA并未影响LMNA剪接异构体的等位基因失衡。我们还未加入额外错配到靶向LMNC异构体的shT17,然而,基于加入错配到靶向LMNA剪接异构体的shT17后观察到的影响,我们能想象错配5和7也

能够通过shT17改善靶向。我们确实将额外错配加入到shT14(图18),其揭示了没有能更强烈地抑制靶向T等位基因或能进一步影响等位基因失衡的shRNA。

[0240] 表3.其他shRNA靶序

靶标	shRNA 编号	位置错配	正义链(5'-3')	反义链(5'-3')
C 等位基因 LMNC	324	C17	CACGTGAGTGGTAGCCGCC SEQ ID NO:179	GGCGGCTACCACTCACGTG SEQ ID NO:180
	327	C11mm5	CACCACCACGTGAGaGGTA SEQ ID NO:181	TACcTCTCACGTGGTGGTG SEQ ID NO:182
	328	C11mm6	CACCACCACGTGAeTGGTA SEQ ID NO:183	TACCAgTCACGTGGTGGTG SEQ ID NO:184
	329	C11mm7	CACCACCACGTGtGTGGTA SEQ ID NO:185	TACCACaCACGTGGTGGTG SEQ ID NO:186
	330	C11mm13	CACCACgACGTGAGTGGTA SEQ ID NO:187	TACCACTCACGTgGTGGTG SEQ ID NO:188
	331	C11mm17	CAgCACCACGTGAGTGGTA SEQ ID NO:189	TACCACTCACGTGGTGeTG SEQ ID NO:190
	332	C13mm5	CCACCACGTGAGTGeTAGC SEQ ID NO:191	GCTAgCACTCACGTGGTGG SEQ ID NO:192
	333	C13mm6	CCACCACGTGAGTcGTAGC SEQ ID NO:193	GCTACgACTCACGTGGTGG SEQ ID NO:194
	334	C13mm7	CCACCACGTGAGaGGTAGC SEQ ID NO:195	GCTACcTCTCACGTGGTGG SEQ ID NO:196
T 等位基因 LMNC	325	T16	CCATGTGAGTGGTAGCCGC SEQ ID NO:197	GCGGCTACCACTCACATGG SEQ ID NO:198
	326	T17	CATGTGAGTGGTAGCCGCC SEQ ID NO:199	GGCGGCTACCACTCACATG SEQ ID NO:200
	342	T14mm5	CACCATGTGAGTGGaAGCC SEQ ID NO:201	GGCTcCACTCACATGGTG SEQ ID NO:202
	343	T14mm6	CACCATGTGAGTGeTAGCC SEQ ID NO:203	GGCTAgCACTCACATGGTG SEQ ID NO:204
	344	T14mm7	CACCATGTGAGTcGTAGCC SEQ ID NO:205	GGCTACgACTCACATGGTG SEQ ID NO:206
	345	T14mm10	CACCATGTGtGTGGTAGCC SEQ ID NO:207	GGCTACCACaCACATGGTG SEQ ID NO:208
	346	T14mm11	CACCATGTcAGTGGTAGCC SEQ ID NO:209SEQ ID NO:200	GGCTACCACTgACATGGTG SEQ ID NO:210

[0241]

C 等位基因 LMNA	347	T14mm17	CAgCATGTGAGTGGTAGCC SEQ ID NO:211	GGCTACCACTCACATGeTG SEQ ID NO:212
	325	T16	CCATGTGAGTGGTAGCCGC SEQ ID NO:213	GCGGCTACCACTCACATGG SEQ ID NO:214
	314	C17mm5	CACGGCTCCCACTGGAGCA SEQ ID NO:215	TGCTCCAGTGGGAGCCGTG SEQ ID NO:216
	315	C17mm6	CACGGCTCCCACTCCAGCA SEQ ID NO:217	TGCTGGAGTGGGAGCCGTG SEQ ID NO:218
	316	C17mm7	CACGGCTCCCACTGAGCA SEQ ID NO:219	TGCTGCTGTGGGAGCCGTG SEQ ID NO:220
T 等位基因 LMNA	317	C17mm10	CACGGCTCCGACTGCAGCA SEQ ID NO:221	TGCTGCAGTCGGAGCCGTG SEQ ID NO:222
	318	C17mm11	CACGGCTCGCACTGCAGCA SEQ ID NO:223	TGCTGCAGTGCAGCCGTG SEQ ID NO:224
	319	T17mm5	CATGGCTCCCACTGGAGCA SEQ ID NO:225	TGCTCCAGTGGGAGCCATG SEQ ID NO:226
	320	T17mm6	CATGGCTCCCACTCCAGCA SEQ ID NO:227	TGCTGGAGTGGGAGCCATG SEQ ID NO:228
	321	T17mm7	CATGGCTCCCACTGAGCA SEQ ID NO:229	TGCTGCTGTGGGAGCCATG SEQ ID NO:230
322	T17mm10	CATGGCTCCGACTGCAGCA SEQ ID NO:231	TGCTGCAGTCGGAGCCATG SEQ ID NO:232	
323	T17mm11	CATGGCTCGCACTGCAGCA SEQ ID NO:233	TGCTGCAGTGCAGCCATG SEQ ID NO:234	

[0242]

[0243] 表4.寡核苷酸用于克隆pLK0-puro质粒的各个shRNA。正向引物包含加入的用于克

隆的单链突出端的全部shRNA序列。ShRNA在位点5/6用非大写aa开始且用非大写t-段终止。  
 Ref:参考编号。Fw:正向。Rv:逆向。

[0244]

Ref	靶基因	名称	方向	SEQ ID NO	序列
314	LMNA	C17m5	正向	235	ccggaaCACGGCTCCCCTGGAGCAteaagacTGCTCCAGTGGGAGCCGTGttttttg
			逆向	236	aattcaaaaaaaaaCACGGCTCCCCTGGAGCAgtcttgaTGCTCCAGTGGGAGCCGTGtt
315	LMNA	C17m6	正向	237	ccggaaCACGGCTCCCCTCCAGCAteaagacTGCTGGAGTGGGAGCCGTGttttttg
			逆向	238	aattcaaaaaaaaaCACGGCTCCCCTCCAGCAgtcttgaTGCTGGAGTGGGAGCCGTGtt
316	LMNA	C17m7	正向	239	ccggaaCACGGCTCCCACAGCAGCAteaagacTGCTGCTGTGGGAGCCGTGttttttg
			逆向	240	aattcaaaaaaaaaCACGGCTCCCACAGCAGCAgtcttgaTGCTGCTGTGGGAGCCGTGtt
317	LMNA	C17m10	正向	241	ccggaaCACGGCTCCGACTGCAGCAteaagacTGCTGCAGTCGGAGCCGTGttttttg
			逆向	242	aattcaaaaaaaaaCACGGCTCCGACTGCAGCAgtcttgaTGCTGCAGTCGGAGCCGTGtt
318	LMNA	C17m11	正向	243	ccggaaCACGGCTCGCACTGCAGCAteaagacTGCTGCAGTCGAGCCGTGttttttg
			逆向	244	aattcaaaaaaaaaCACGGCTCGCACTGCAGCAgtcttgaTGCTGCAGTCGAGCCGTGtt
319	LMNA	T17m5	正向	245	ccggaaCATGGCTCCCCTGGAGCAteaagacTGCTCCAGTGGGAGCCATGttttttg
			逆向	246	aattcaaaaaaaaaCATGGCTCCCCTGGAGCAgtcttgaTGCTCCAGTGGGAGCCATGtt
320	LMNA	T17m6	正向	247	ccggaaCATGGCTCCCCTCCAGCAteaagacTGCTGGAGTGGGAGCCATGttttttg
			逆向	248	aattcaaaaaaaaaCATGGCTCCCCTCCAGCAgtcttgaTGCTGGAGTGGGAGCCATGtt
321	LMNA	T17m7	正向	249	ccggaaCATGGCTCCCACAGCAGCAteaagacTGCTGCTGTGGGAGCCATGttttttg
			逆向	250	aattcaaaaaaaaaCATGGCTCCCACAGCAGCAgtcttgaTGCTGCTGTGGGAGCCATGtt
322	LMNA	T17m10	正向	251	ccggaaCATGGCTCCGACTGCAGCAteaagacTGCTGCAGTCGGAGCCATGttttttg

[0245]

			逆向	252	aattcaaaaaaaaaCATGGCTCCGACTGCAGCAgtcttgaTGCTGCAGTTCGGAGCCATGtt
323	LMNA	T17m11	正向	253	ccggaaCATGGCTCGACTGCAGCAAtcaagacTGCTGCAGTTCGGAGCCATGtttttttg
			逆向	254	aattcaaaaaaaaaCATGGCTCCGACTGCAGCAgtcttgaTGCTGCAGTTCGGAGCCATGtt
324	LMNC	C17	正向	255	ccggaaCACGTGAGTGGTAGCCGCCtcaagacGGCGGCTACCACTCACGTGtttttttg
			逆向	256	aattcaaaaaaaaaCACGTGAGTGGTAGCCGCCgtcttgaGGCGGCTACCACTCACGTGtt
325	LMNC	T16	正向	257	ccggaaCCATGTGAGTGGTAGCCGCCtcaagacGCGGCTACCACTCACATGtttttttg
			逆向	258	aattcaaaaaaaaaCCATGTGAGTGGTAGCCGCCgtcttgaGCGGCTACCACTCACATGtt
326	LMNC	T17	正向	259	ccggaaCATGTGAGTGGTAGCCGCCtcaagacGGCGGCTACCACTCACATGtttttttg
			逆向	260	aattcaaaaaaaaaCATGTGAGTGGTAGCCGCCgtcttgaGGCGGCTACCACTCACATGtt
327	LMNC	C11mm5	正向	261	ccggaaCACCACCACGTGAGaGGTAAtcaagacTACCtCTCACGTGGTGGTtttttttg
			逆向	262	aattcaaaaaaaaaCACCACCACGTGAGaGGTAgtcttgaTACCtCTCACGTGGTGGTtt
328	LMNC	C11mm6	正向	263	ccggaaCACCACCACGTGAeTGGTAAtcaagacTACCAGTCACGTGGTGGTtttttttg
			逆向	264	aattcaaaaaaaaaCACCACCACGTGAeTGGTAgtcttgaTACCAGTCACGTGGTGGTtt
329	LMNC	C11mm7	正向	265	ccggaaCACCACCACGTGtGTGGTAAtcaagacTACCACaCACGTGGTGGTtttttttg
			逆向	266	aattcaaaaaaaaaCACCACCACGTGtGTGGTAgtcttgaTACCACaCACGTGGTGGTtt
330	LMNC	C11mm13	正向	267	ccggaaCACCACgACGTGAGTGGTAAtcaagacTACCACTCACGTGtGTGGTtttttttg
			逆向	268	aattcaaaaaaaaaCACCACgACGTGAGTGGTAgtcttgaTACCACTCACGTGtGTGGTtt
331	LMNC	C11mm17	正向	269	ccggaaCAgCACCACGTGAGTGGTAAtcaagacTACCACTCACGTGGTGeTGtttttttg
			逆向	270	aattcaaaaaaaaaCAgCACCACGTGAGTGGTAgtcttgaTACCACTCACGTGGTGeTGtt
332	LMNC	C13mm5	正向	271	ccggaaCCACCACGTGAGTGeTAGCtcaagacGCTAgCACTCACGTGGTGGTtttttttg
			逆向	272	aattcaaaaaaaaaCCACCACGTGAGTGeTAGCgtcttgaGCTAgCACTCACGTGGTGGtt
333	LMNC	C13mm6	正向	273	ccggaaCCACCACGTGAGTcGTAGCtcaagacGCTACgACTCACGTGGTGGTtttttttg
			逆向	274	aattcaaaaaaaaaCCACCACGTGAGTcGTAGCgtcttgaGCTACgACTCACGTGGTGGtt
334	LMNC	C13mm7	正向	275	ccggaaCCACCACGTGAGaGGTAGCtcaagacGCTACCtCTCACGTGGTGGTtttttttg
			逆向	276	aattcaaaaaaaaaCCACCACGTGAGaGGTAGCgtcttgaGCTACCtCTCACGTGGTGGtt
335	LMNC	C13mm11	正向	277	ccggaaCCACCACGaGAGTGGTAGCtcaagacGCTACCACTCtCGTGGTGGTtttttttg
			逆向	278	aattcaaaaaaaaaCCACCACGaGAGTGGTAGCgtcttgaGCTACCACTCtCGTGGTGGtt
336	LMNC	C13mm17	正向	279	ccggaaCCtCCACGTGAGTGGTAGCtcaagacGCTACCACTCACGTGGaGGTtttttttg
			逆向	280	aattcaaaaaaaaaCCtCCACGTGAGTGGTAGCgtcttgaGCTACCACTCACGTGGaGGtt
342	LMNC	T14mm5	正向	281	ccggaaCACCATGTGAGTGGaAGCCtcaagacGGCTtCCACTCACATGGTtttttttg
			逆向	282	aattcaaaaaaaaaCACCATGTGAGTGGaAGCCgtcttgaGGCTtCCACTCACATGGTtt
343	LMNC	T14mm6	正向	283	ccggaaCACCATGTGAGTGeTAGCCtcaagacGGCTAgCACTCACATGGTtttttttg
			逆向	284	aattcaaaaaaaaaCACCATGTGAGTGeTAGCCgtcttgaGGCTAgCACTCACATGGTtt
344	LMNC	T14mm7	正向	285	ccggaaCACCATGTGAGTcGTAGCCtcaagacGGCTACgACTCACATGGTtttttttg
			逆向	286	aattcaaaaaaaaaCACCATGTGAGTcGTAGCCgtcttgaGGCTACgACTCACATGGTtt
345	LMNC	T14mm10	正向	287	ccggaaCACCATGTGtGTGGTAGCCtcaagacGGCTACCACaCACATGGTtttttttg
			逆向	288	aattcaaaaaaaaaCACCATGTGtGTGGTAGCCgtcttgaGGCTACCACaCACATGGTtt
346	LMNC	T14mm11	正向	289	ccggaaCACCATGTcAGTGGTAGCCtcaagacGGCTACCACTgACATGGTtttttttg
			逆向	290	aattcaaaaaaaaaCACCATGTcAGTGGTAGCCgtcttgaGGCTACCACTgACATGGTtt
347	LMNC	T14mm17	正向	291	ccggaaCAgCATGTGAGTGGTAGCCtcaagacGGCTACCACTCACATGcTtttttttg
			逆向	292	aattcaaaaaaaaaCAgCATGTGAGTGGTAGCCgtcttgaGGCTACCACTCACATGcTGtt

## 序列表

	<110> 学术医疗中心	
	<120> 用于 LMNA 突变携带者治疗的反义核酸	
	<130> 2021-066	
	<160> 178	
	<170> BiSSAP 1.3.6	
	<210> 1	
	<211> 45	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 目标核酸 1	
	<400> 1	
	gaugaccugc uccaucacca ccacgugagu gguagccgcc gcuga	45
	<210> 2	
	<211> 45	
[0246]	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 目标序列 2	
	<400> 2	
	gaugaccugc uccaucacca ccaugugagu gguagccgcc gcuga	45
	<210> 3	
	<211> 44	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 目标序列 3	
	<400> 3	
	gaugaccugc uccaucacca ccacggcucc cacugcagca gcuc	44
	<210> 4	
	<211> 44	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	目标序列 4	
	<400>	4	
		gaugaccugc uccaucacca ccauggcucc cacugcagca gcuc	44
	<210>	5	
	<211>	37	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	目标序列 5	
	<400>	5	
		ccugcuccau caccaccacg ugagugguag ccgccgc	37
	<210>	6	
	<211>	37	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
[0247]	<220>		
	<223>	目标序列 6	
	<400>	6	
		ccugcuccau caccaccaug ugagugguag ccgccgc	37
	<210>	7	
	<211>	37	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	目标序列 7	
	<400>	7	
		ccugcuccau caccaccacg gcucccacug cagcagc	37
	<210>	8	
	<211>	37	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	目标序列 8	

	<400> 8 ccugcuccau caccaccaug gcucccacug cagcagc	37
	<210> 9 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 175 正义链	
	<400> 9 gaaatgtact gcgtggaga	19
	<210> 10 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 175 反义	
[0248]	<400> 10 tctccacgca gtacatttc	19
	<210> 11 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 209 正义链	
	<400> 11 tcaccaccac gtgagtgt	19
	<210> 12 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 209 反义	
	<400> 12 accactcacg tgggtgtga	19

	<210> 13	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 210 正义链	
	<400> 13	
	caccaccacg tgagtggta	19
	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 210 反义	
	<400> 14	
	taccactcac gtggtggtg	19
[0249]	<210> 15	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 211 正义链	
	<400> 15	
	accaccacgt gagtggtag	19
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 211 反义	
	<400> 16	
	ctaccactca cgtggtggt	19
	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	212 正义链	
	<400>	17	
		ccaccacgtg agtggtagc	19
	<210>	18	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	212 反义	
	<400>	18	
		gctaccactc acgtggtgg	19
	<210>	19	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0250]	<220>		
	<223>	213 正义链	
	<400>	19	
		atcaccacca tgtgagtg	19
	<210>	20	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	213 反义	
	<400>	20	
		ccactcacat ggtggtgat	19
	<210>	21	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	214 正义链	

	<400> 21 tcaccacat gtgagtgt	19
	<210> 22 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 214 反义	
	<400> 22 accactcaca tgggtgga	19
	<210> 23 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 215 正义链	
[0251]	<400> 23 caccacatg tgagtggta	19
	<210> 24 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 215 反义	
	<400> 24 taccactcac atgggtgtg	19
	<210> 25 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 216 正义链	
	<400> 25 accacatgt gaggtag	19

	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 216 反义	
	<400> 26	
	ctaccactca catggtggt	19
	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 217 正义链	
	<400> 27	
	caccatgtga gtggtagcc	19
[0252]	<210> 28	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 217 反义	
	<400> 28	
	ggctaccact cacatggtg	19
	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 230 正义链	
	<400> 29	
	tcaccaccac ggctcccac	19
	<210> 30	
	<211> 19	
	<212> DNA	

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	230 反义	
<400>	30	
	gtgggagccg tgggtgtga	19
<210>	31	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	213 正义链	
<400>	31	
	caccaccaag gctcccact	19
<210>	32	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
[0253]		
<220>		
<223>	231 反义	
<400>	32	
	agtgggagcc gtgggtgtg	19
<210>	33	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	231 正义链	
<400>	33	
	accaccacgg ctcccactg	19
<210>	34	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

	<223> 232 反义	
	<400> 34 cagtgggagc cgtggtgt	19
	<210> 35 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 233 正义链	
	<400> 35 ccaccacggc tcccactgc	19
	<210> 36 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 233 反义	
[0254]	<400> 36 gcagtgggag ccgtggtgg	19
	<210> 37 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 234 正义链	
	<400> 37 caccacggct cccactgca	19
	<210> 38 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 234 反义	
	<400> 38 tgcagtggga gccgtggtg	19

	<210> 39	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 235 正义链	
	<400> 39	
	cacggctccc actgcagca	19
	<210> 40	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 235 反义	
	<400> 40	
	tgctgcagtg ggagccgtg	19
[0255]	<210> 41	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 236 正义链	
	<400> 41	
	atcaccacca tggctccca	19
	<210> 42	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 236 反义	
	<400> 42	
	tgggagccat ggtggtgat	19
	<210> 43	
	<211> 19	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 237 正义链	
	<400> 43	
	tcaccacat ggtcccac	19
	<210> 44	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 237 反义	
	<400> 44	
	gtgggagcca tgggtgtga	19
	<210> 45	
	<211> 19	
[0256]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 238 正义链	
	<400> 45	
	caccacatg gctcccact	19
	<210> 46	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 238 反义	
	<400> 46	
	agtgggagcc atggtgtg	19
	<210> 47	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	239 正义链	
	<400>	47	
		accaccatgg ctcccactg	19
	<210>	48	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	239 反义	
	<400>	48	
		cagtgggagc catggtgt	19
	<210>	49	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0257]	<220>		
	<223>	240 正义链	
	<400>	49	
		caccatgget cccactgca	19
	<210>	50	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	240 反义	
	<400>	50	
		tgcagtggga gccatggtg	19
	<210>	51	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	241 正义链	
	<400>	51	

catggctccc actgcagca	19
<210> 52	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 241 反义	
<400> 52	
tgctgcagtg ggagccatg	19
<210> 53	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> C LMNA FW	
<400> 53	
acctgctcca tcaccaccac	20
[0258]	
<210> 54	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> C LMNA REV	
<400> 54	
agccgctggc agatgccttg	20
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> T LMNA FW	
<400> 55	
acctgctcca tcaccacat	20
<210> 56	
<211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> T LMNA REV	
	<400> 56	
	agccgctggc agatgccttg	20
	<210> 57	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Total LMNA FW	
	<400> 57	
	acctgctcca tcaccacc	18
	<210> 58	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0259]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Total LMNA REV	
	<400> 58	
	agccgctggc agatgccttg	20
	<210> 59	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> C LMNC FW	
	<400> 59	
	acctgctcca tcaccacc	20
	<210> 60	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> C LMNC REV	
	<400> 60 tggccccagt gcaggctc	18
	<210> 61 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> T LMNC FW	
	<400> 61 acctgctcca tcaccacat	20
	<210> 62 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> T LMNC REW	
[0260]	<400> 62 tggccccagt gcaggctc	18
	<210> 63 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> Total LMNC FW	
	<400> 63 acctgctcca tcaccacc	18
	<210> 64 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> Total LMNC REV	
	<400> 64 tggccccagt gcaggctc	18

	<210> 65	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> GAPDH FW	
	<400> 65	
	accactct ccacttga c	21
	<210> 66	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> GAPDH REV	
	<400> 66	
	accctgtgc ttagcaaa tt	22
[0261]	<210> 67	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> HPRT FW	
	<400> 67	
	tgactggc aaaacaatgc a	21
	<210> 68	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> HPRT REW	
	<400> 68	
	ggtccttcc accagcaagc t	21
	<210> 69	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	TBP FW	
	<400>	69	
		gctcacccac caacaattta g	21
	<210>	70	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	TBP REV	
	<400>	70	
		tctgctctga ctttagcacc tg	22
	<210>	71	
	<211>	19	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
[0262]	<220>		
	<223>	C11-核纤层蛋白 C	
	<400>	71	
		uaccacucac gugguggug	19
	<210>	72	
	<211>	19	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	T14-核纤层蛋白 C	
	<400>	72	
		ggcuaccacu cacauggug	19
	<210>	73	
	<211>	19	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	C17-核纤层蛋白 A	

	<400> 73 ugcugcagug ggagccgug	19
	<210> 74 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> T17-核纤层蛋白 A	
	<400> 74 ugcugcagug ggagccaug	19
	<210> 75 <211> 59 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> LMNC-C1	
[0263]	<400> 75 ccggaacctg tcctcacc accactcaag acgtggtggt gatggagcag gttttttg	59
	<210> 76 <211> 59 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> LMNC-C2	
	<400> 76 ccggaactgc tccatcacca ccagtcgaag accgtggtgg tgatggagca gttttttg	59
	<210> 77 <211> 59 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> LMNC-C3	
	<400> 77 ccggaatgct ccatcaccac cacgttcaag acacgtggtg tgatggagc attttttg	59

	<210> 78	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C4	
	<400> 78	
	ccggaagctc catcaccacc acgtgtcaag accacgtggt ggtgatggag cttttttg	59
	<210> 79	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C5	
	<400> 79	
	ccggaactcc atcaccacca cgtgatcaag actcacgtgg tggatgatga gttttttg	59
[0264]	<210> 80	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C6	
	<400> 80	
	ccggaatcca tcaccaccac gtgagtcaag acctcacgtg ggtgatgg attttttg	59
	<210> 81	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C7	
	<400> 81	
	ccggaaccat caccaccacg tgagtcaag aactcacgt ggtgatg attttttg	59
	<210> 82	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	LMNC-C8	
	<400>	82	
		ccggaacatc accaccacgt gagtgtaag accactcacg tgggtgat gttttttg	59
	<210>	83	
	<211>	59	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	LMNC-C9	
	<400>	83	
		ccggaaatca ccaccacgtg agtggtaag accactcac ggggtgga tttttttg	59
	<210>	84	
	<211>	59	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0265]	<220>		
	<223>	LMNC-C10	
	<220>		
	<223>	LMNC-C10	
	<400>	84	
		ccggaatcac caccacgtga ggggtcaag acaccactca cgtgggtg attttttg	59
	<210>	85	
	<211>	59	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	LMNC-C11	
	<400>	85	
		ccggaacacc accacgtgag tggatcaag actaccactc acgtgggtg gttttttg	59
	<210>	86	
	<211>	59	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> LMNC-C12	
	<400> 86	
	ccggaaacca ccacgtgagt gtagtcaag acctaccact cacgtggtg tttttttg	59
	<210> 87	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C13	
	<400> 87	
	ccggaaccac cacgtgagt gtagtcaag acgctaccac tcacgtggtg gttttttg	59
	<210> 88	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C14	
[0266]	<400> 88	
	ccggaacacc acgtgagtgg tagcctcaag acggctacca ctcacgtggt gttttttg	59
	<210> 89	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C15	
	<400> 89	
	ccggaaacca cgtgagtgtg agccgtcaag accggctacc actcacgtgg tttttttg	59
	<210> 90	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C16	
	<400> 90	
	ccggaaccac gtgagtggta gccgtcaag acgggctac cactcacgtg gttttttg	59

	<210> 91	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C17	
	<400> 91	
	ccggaacacg tgagtggtag cgcctcaag acggcggcta ccactcacgt gttttttg	59
	<210> 92	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C18	
	<400> 92	
	ccggaacgt gagtggtagc cgcctcaag accggcggct accactcacg tttttttg	59
[0267]	<210> 93	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-C19	
	<400> 93	
	ccggaacgtg agtggtagcc gccctcaag acggcgggc taccactcac gttttttg	59
	<210> 94	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-T1	
	<400> 94	
	ccggaacctg ctccatcacc accattcaag acatggtggt gatggagcag gttttttg	59
	<210> 95	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

- <220>  
<223> LMNC-T2
- <400> 95  
ccggaactgc tccatcacca ccatgtcaag accatggtgg tgatggagca gttttttg 59
- <210> 96  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> LMNC-T3
- <400> 96  
ccggaatgct ccatcaccac catgttcaag acacatggtg gtgatggagc attttttg 59
- <210> 97  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- [0268] <220>  
<223> LMNC-T4
- <400> 97  
ccggaagctc catcaccacc atgtgtcaag accacatggt ggtgatggag cttttttg 59
- <210> 98  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> LMNC-T5
- <400> 98  
ccggaactcc atcaccacca tgtgatcaag actcacatgg tggatgga gttttttg 59
- <210> 99  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> LMNC-T6

	<400> 99	
	ccggaatcca tcaccacat gtgagtcaag acctcacatg gtggtgatgg attttttg	59
	<210> 100	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-T7	
	<400> 100	
	ccggaacat caccacatg tgagttcaag acaactacat ggtggtgatg gttttttg	59
	<210> 101	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-T8	
	<400> 101	
[0269]	ccggaacatc accacatgt gtagtcaag accactcaca tgggtgatg gttttttg	59
	<210> 102	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-T9	
	<400> 102	
	ccggaatca ccacatgtg agtggcaag accactcac atggtggtga tttttttg	59
	<210> 103	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNC-T10	
	<400> 103	
	ccggaatcac caccatgtga gtggtcaag acaccactca catggtggtg attttttg	59
	<210> 104	

- <211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> LMNC-T11
- <400> 104  
ccggaacacc accatgtgag tggatcaag actaccactc acatggtggt gttttttg 59
- <210> 105  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> LMNC-T12
- <400> 105  
ccggaacca ccatgtgagt gtagtcaag acctaccact cacatggtgg tttttttg 59
- [0270] <210> 106  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> LMNC-T13
- <400> 106  
ccggaaccac catgtgagt gtagtcaag acgctaccac tcacatggtg gttttttg 59
- <210> 107  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> LMNC-T14
- <400> 107  
ccggaacacc atgtgagtgg tagcctcaag acggctacca ctcacatggt gttttttg 59
- <210> 108  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列

	<220>		
	<223>	LMNC-T15	
	<400>	108	
		ccggaaacca tgtgagtggt agcgcgcaag accggctacc actcacatgg tttttttg	59
	<210>	109	
	<211>	59	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	LMNC-T16	
	<400>	109	
		ccggaacat gtgagtggtg gccgctcaag acggcgctac cactcacatg gttttttg	59
	<210>	110	
	<211>	59	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	LMNC-T17	
[0271]	<220>		
	<223>	LMNC-T17	
	<400>	110	
		ccggaacatg tgagtggtag ccgcctcaag acggcggcta ccactcacat gttttttg	59
	<210>	111	
	<211>	59	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	LMNC-T18	
	<400>	111	
		ccggaaatgt gtagtgtagc cgccgcaag accggcgct accactcaca tttttttg	59
	<210>	112	
	<211>	59	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	LMNC-T19	

	<400> 112	
	ccggaatgtg agtggtagcc gccgctcaag acgcggcggc taccactcac attttttg	59
	<210> 113	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C1	
	<400> 113	
	ccggaacctg ctccatcacc accactcaag acgtggtggt gatggagcag gttttttg	59
	<210> 114	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C2	
[0272]	<400> 114	
	ccggaactgc tccatcacca ccacgtcaag accgtggtgg tgatggagca gttttttg	59
	<210> 115	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C3	
	<220>	
	<223> LMNA-C3	
	<400> 115	
	ccggaatgct ccatcaccac cacgtcaag acccgtggtg gtgatggagc attttttg	59
	<210> 116	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C4	
	<400> 116	

ccggaagctc catcaccacc acggctcaag acgccgtggt ggtgatggag cttttttg 59

<210> 117  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LMNA-C5

<400> 117  
 ccggaactcc atcaccacca cggtctcaag acagccgtgg tggatgatga gttttttg 59

<210> 118  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LMNA-C6

<400> 118  
 ccggaatcca tcaccaccac ggctctcaag acgagccgtg tggatgatgg attttttg 59

[0273]

<210> 119  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LMNA-C7

<400> 119  
 ccggaacat caccaccaag gctcctcaag acggagccgt ggtggtgatg gttttttg 59

<210> 120  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LMNA-C8

<400> 120  
 ccggaacatc accaccacgg ctcctcaag acgggagccg tggggtgatg gttttttg 59

<210> 121  
 <211> 59

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C9	
	<400> 121	
	ccggaaatca ccaccacggc tcccatcaag actgggagcc gtggtggtga tttttttg	59
	<210> 122	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C10	
	<400> 122	
	ccggaatcac caccacggct ccactcaag acgtgggagc cgtggtggtg attttttg	59
	<210> 123	
	<211> 59	
	<212> DNA	
[0274]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C11	
	<400> 123	
	ccggaacacc accacggctc ccactcaag acagtgggag ccgtggtggt gttttttg	59
	<210> 124	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C12	
	<400> 124	
	ccggaaacca ccacggctcc cactgtcaag accagtggga gccgtggtgg tttttttg	59
	<210> 125	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> LMNA-C13	
	<400> 125	
	ccggaaccac cacggtccc actgctcaag acgcagtggg agccgtggtg gttttttg	59
	<210> 126	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C14	
	<400> 126	
	ccggaacacc acggtccca ctgcatcaag actgcagtgg gagccgtggt gttttttg	59
	<210> 127	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C15	
[0275]	<400> 127	
	ccggaacca cggtcccac tgcagtcaag acctgcagtg ggagccgtgg tttttttg	59
	<210> 128	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 128	
	ccggaaccac ggtcccaact gcagtcaag acgctgcagt gggagccgtg gttttttg	59
	<210> 129	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-C17	
	<400> 129	
	ccggaacacg gctcccactg cagcatcaag actgctgcag tgggagccgt gttttttg	59
	<210> 130	
	<211> 59	
	<212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> LMNA-C18

<400> 130

ccggaacgg ctccactgc agcagtcaag acctgctgca gtgaggagccg tttttttg 59

<210> 131

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LMNA-C19

<400> 131

ccggaacggc tccactgca gcagctcaag acgctgctgc agtgaggagcc gttttttg 59

<210> 132

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

[0276]

<220>

<223> LMNA-T1

<400> 132

ccggaactg ctccatcacc accattcaag acatggtggt gatggagcag gttttttg 59

<210> 133

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LMNA-T2

<400> 133

ccggaactgc tccatcacca ccatgcaag accatggtgg tgatggagca gttttttg 59

<210> 134

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LMNA-T3

	<400> 134 ccggaatgct ccatcaccac catggtcaag acccatggtg gfgatggagc attttttg	59
	<210> 135 <211> 59 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> LMNA-T4	
	<400> 135 ccggaagctc catcaccacc atggctcaag acgcatggt ggtgatggag cttttttg	59
	<210> 136 <211> 59 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> LMNA-T5	
[0277]	<400> 136 ccggaactcc atcaccacca tggcttcaag acagccatg tggatgga gttttttg	59
	<210> 137 <211> 59 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> LMNA-T6	
	<400> 137 ccggaatcca tcaccacat ggctctcaag acgagccatg ggtgatgg attttttg	59
	<210> 138 <211> 59 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> LMNA-T7	
	<400> 138 ccggaacct caccacatg gctcctcaag acggagccat ggtgatg attttttg	59

	<210> 139	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-T8	
	<400> 139	
	ccggaacatc accaccatgg ctccctcaag acgggagcca tgggtgat gttttttg	59
	<210> 140	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-T9	
	<400> 140	
	ccggaatca ccaccatggc tccatcaag actgggagcc atggtgga tttttttg	59
[0278]	<210> 141	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-T10	
	<400> 141	
	ccggaatcac caccatggct cccactcaag acgtgggagc catggtggtg attttttg	59
	<210> 142	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LMNA-T11	
	<400> 142	
	ccggaacacc accatggctc ccactcaag acagtgggag ccatggtggt gttttttg	59
	<210> 143	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

- <220>  
<223> LMNA-T12
- <400> 143  
ccggaaacca ccatggtccc cactgtcaag accagtggga gccatggtgg tttttttg 59
- <210> 144  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> LMNA-T13
- <400> 144  
ccggaaccac catggtcccc actgctcaag acgcagtggg agccatggtg gttttttg 59
- <210> 145  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- [0279] <220>  
<223> LMNA-T14
- <400> 145  
ccggaacacc atggctccca ctgcatcaag actgcagtgg gagccatggt gttttttg 59
- <210> 146  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> LMNA-T15
- <400> 146  
ccggaaacca tggctccac tgcagtcaag acctgcagtg ggagccatgg tttttttg 59
- <210> 147  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> LMNA-T16
- <400> 147

ccggaacct ggctcccact gcagctcaag acgctgcagt gggagccatg gttttttg 59

<210> 148  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LMNA-T17

<400> 148  
 ccggaacatg gctcccactg cagcatcaag actgctgcag tgggagccat gttttttg 59

<210> 149  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LMNA-T18

<400> 149  
 ccggaatgg ctcccactgc agcagctcaag acctgctgca gtgggagcca tttttttg 59

[0280]

<210> 150  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LMNA-T19

<400> 150  
 ccggaatggc tcccactgca gcagctcaag acgctgctgc agtgggagcc attttttg 59

<210> 151  
 <211> 37  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LMNC 的 C 变体的反义链

<400> 151  
 gcggcggcua ccacucacgu gguggugaug ggcagg 37

<210> 152  
 <211> 37

- <212> RNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> LMNC 的 U 变体的反义链
- <400> 152  
 gcggcggcua ccacucacau gguggugaug gagcagg 37
- <210> 153  
 <211> 37  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列
- [0281] <220>  
 <223> LMNA 的 C 变体的反义链
- <400> 153  
 gcugcugcag ugggagccgu gguggugaug gagcagg 37
- <210> 154  
 <211> 37  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> LMNA 的 U 变体的反义链
- <400> 154  
 gcugcugcag ugggagccau gguggugaug gagcagg 37

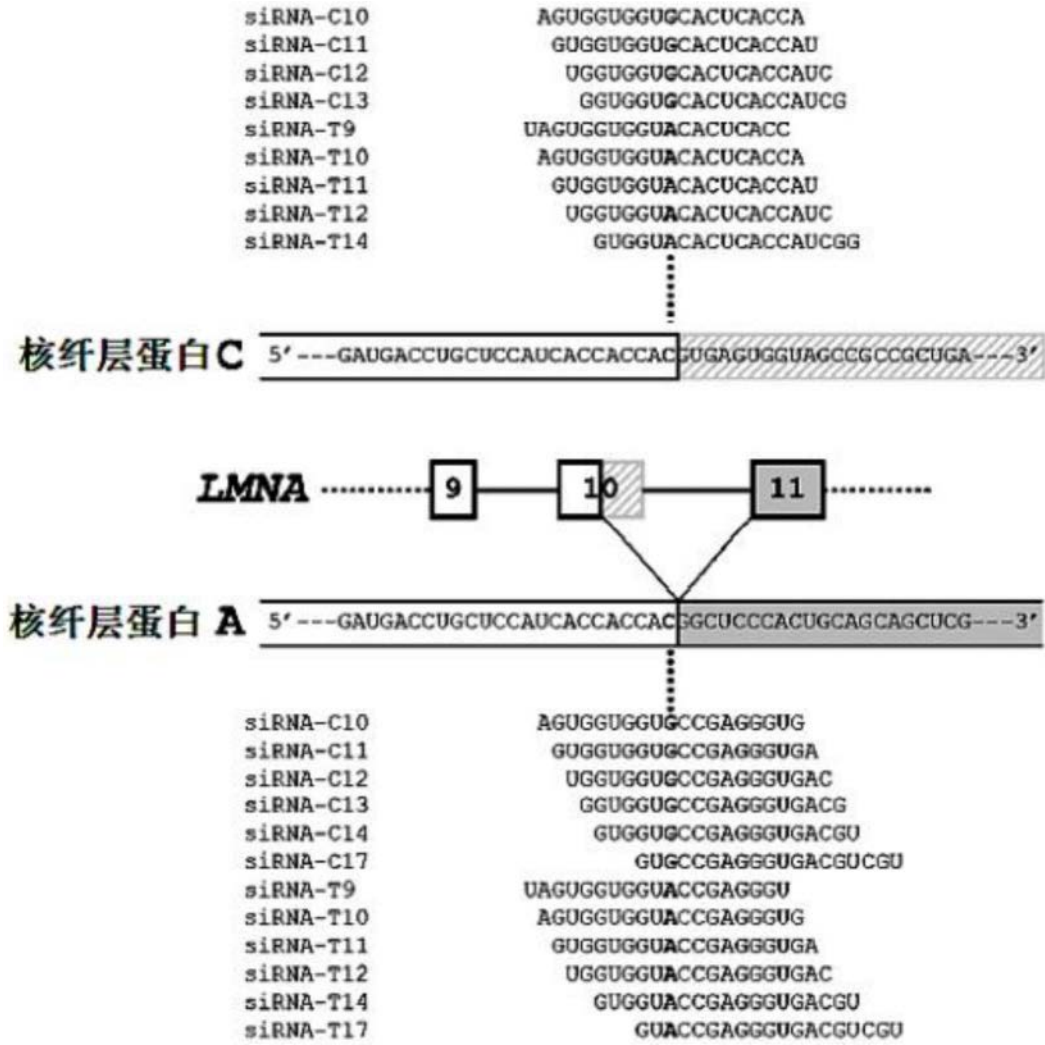


图1

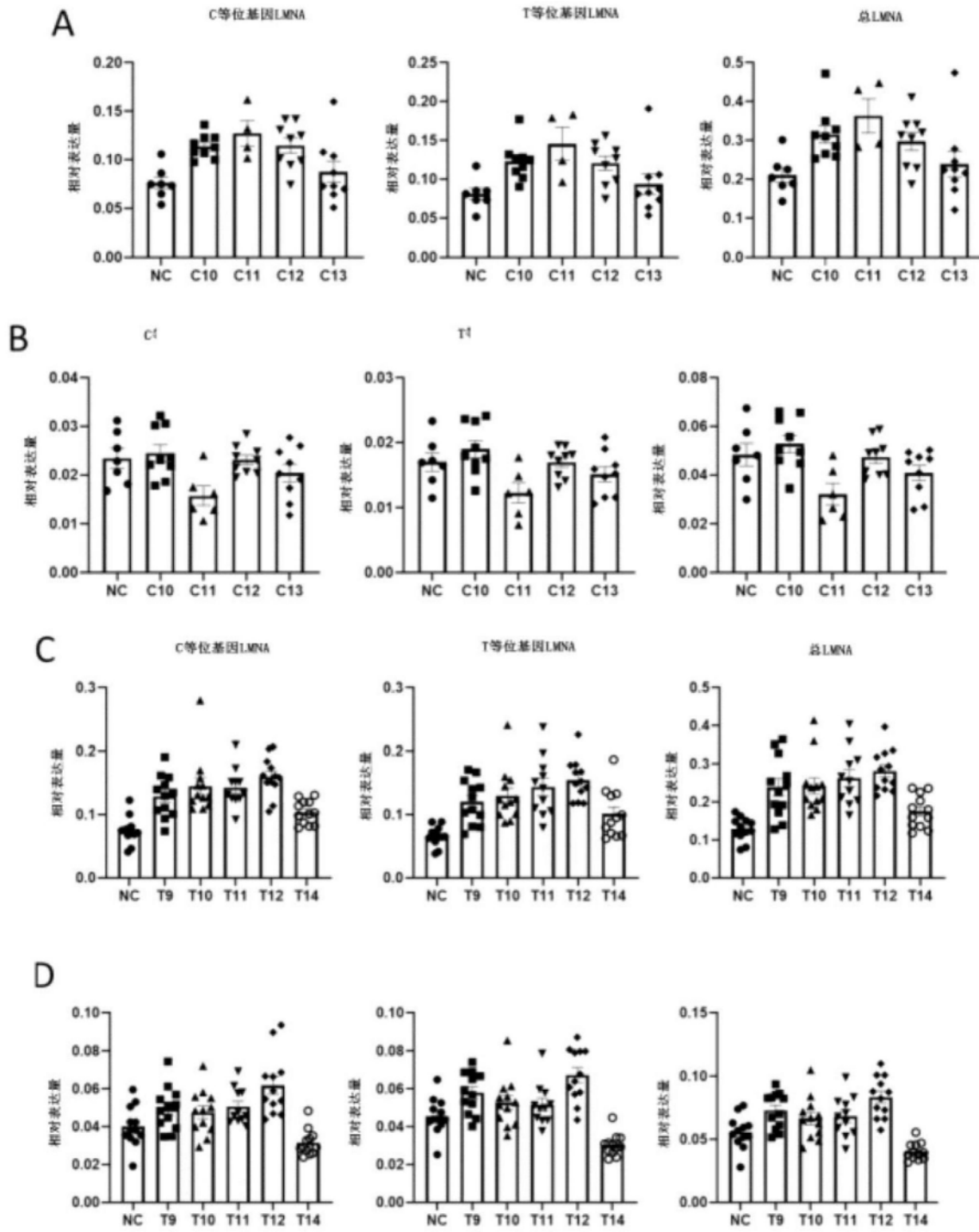


图2

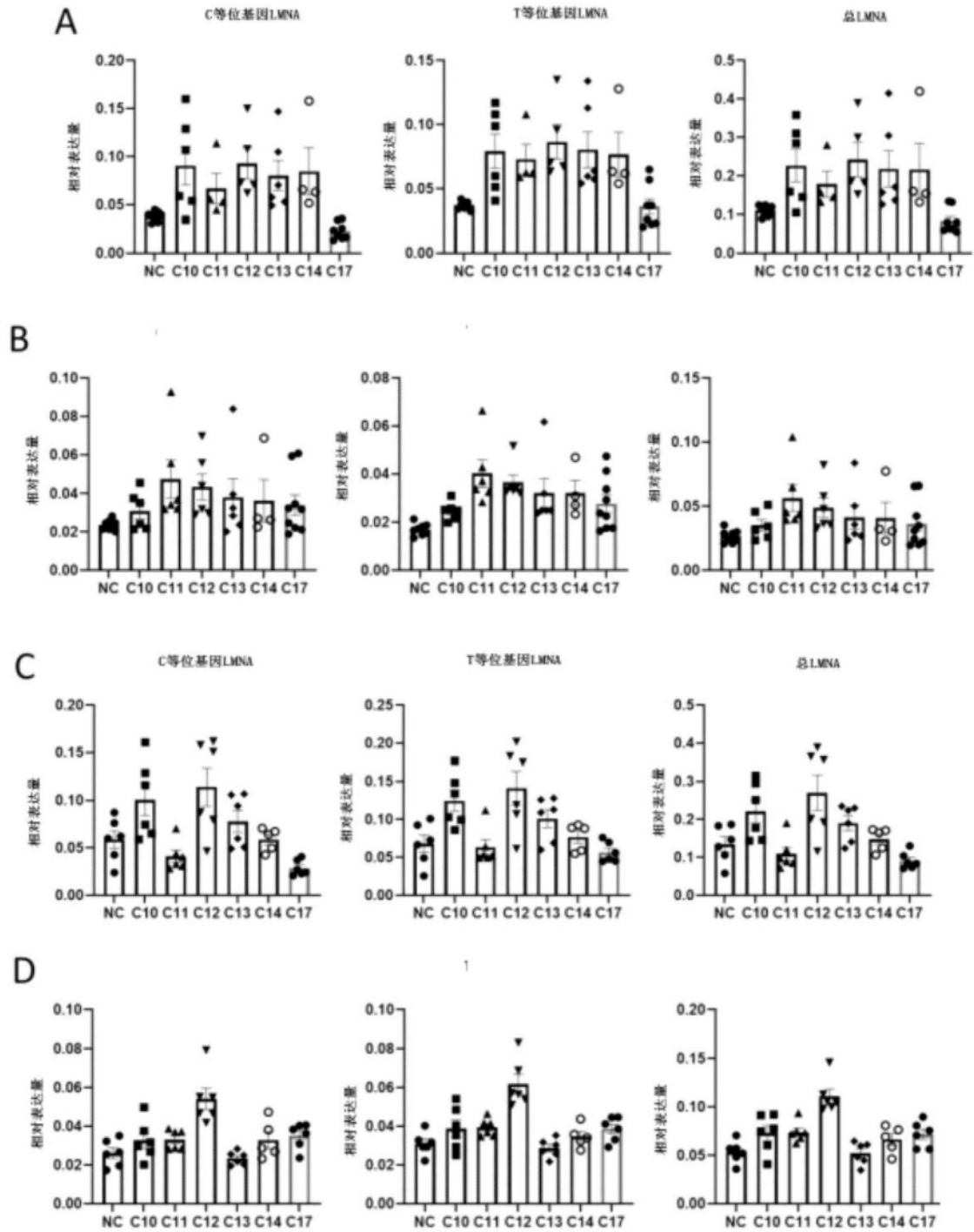


图3

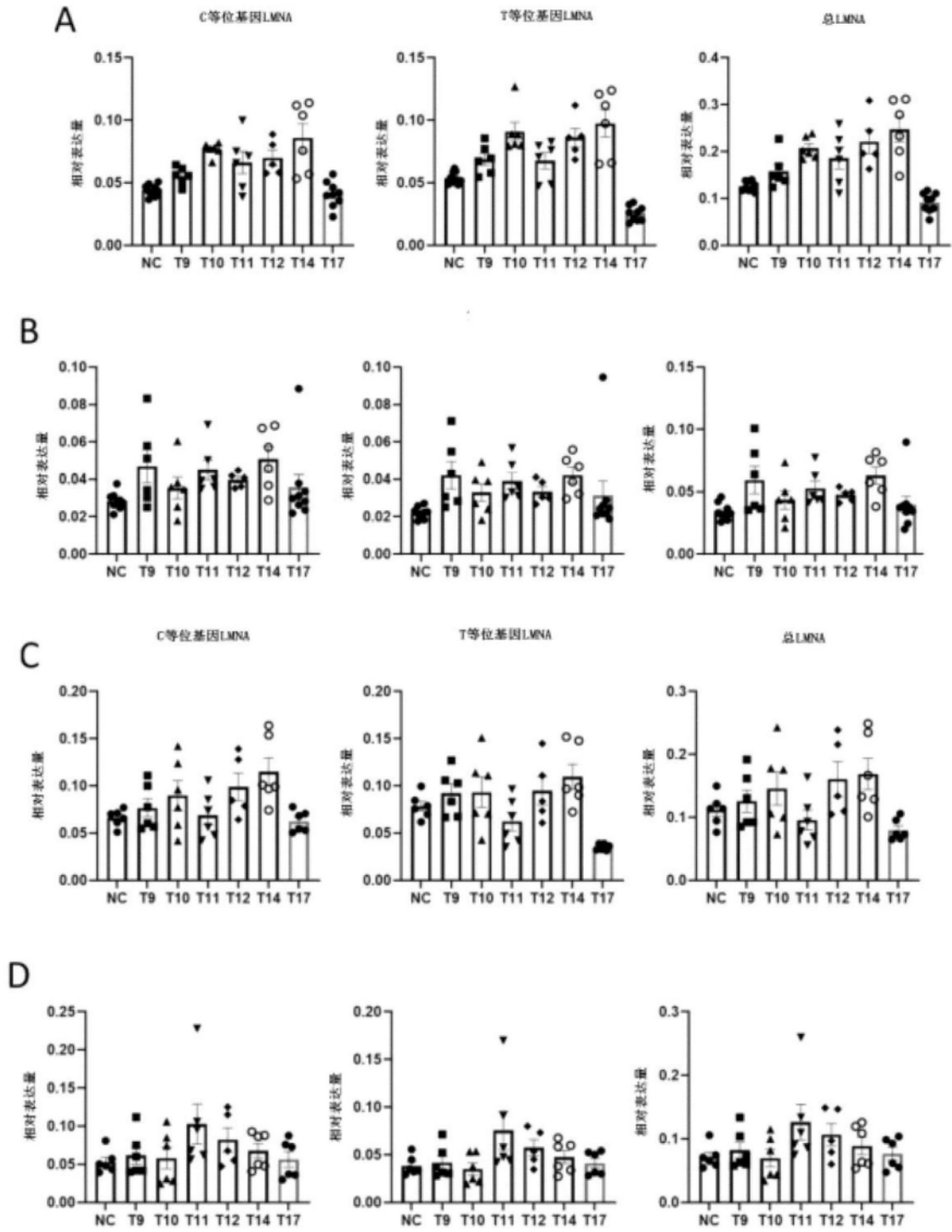


图4

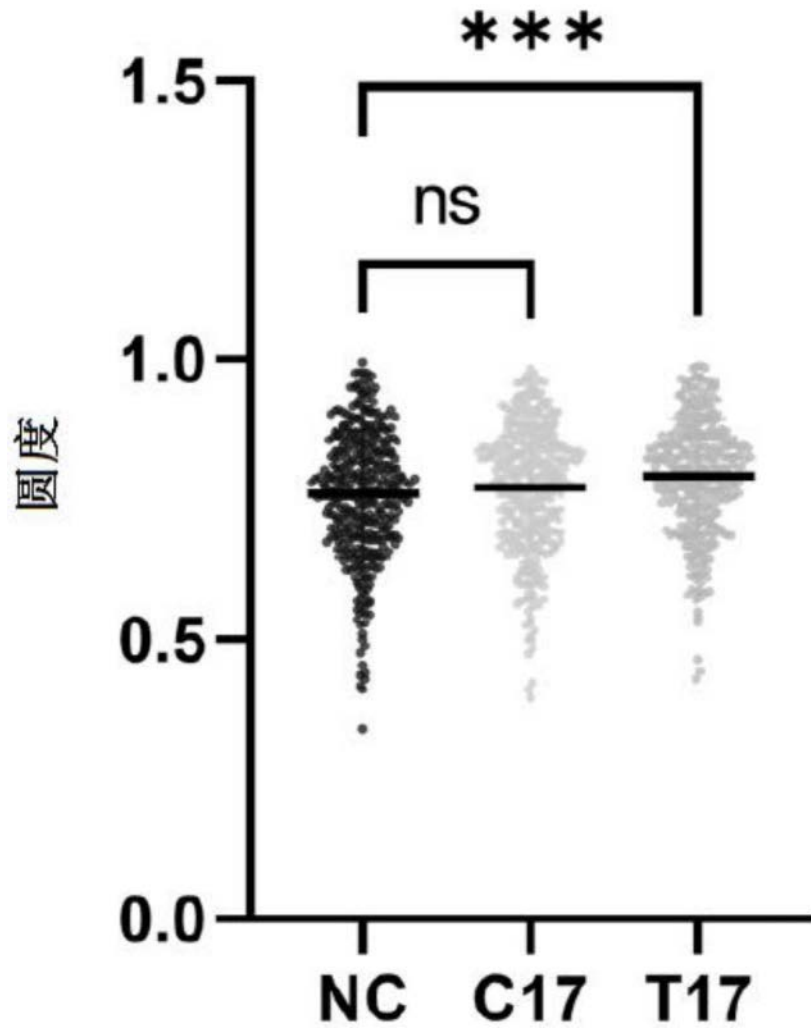


图5

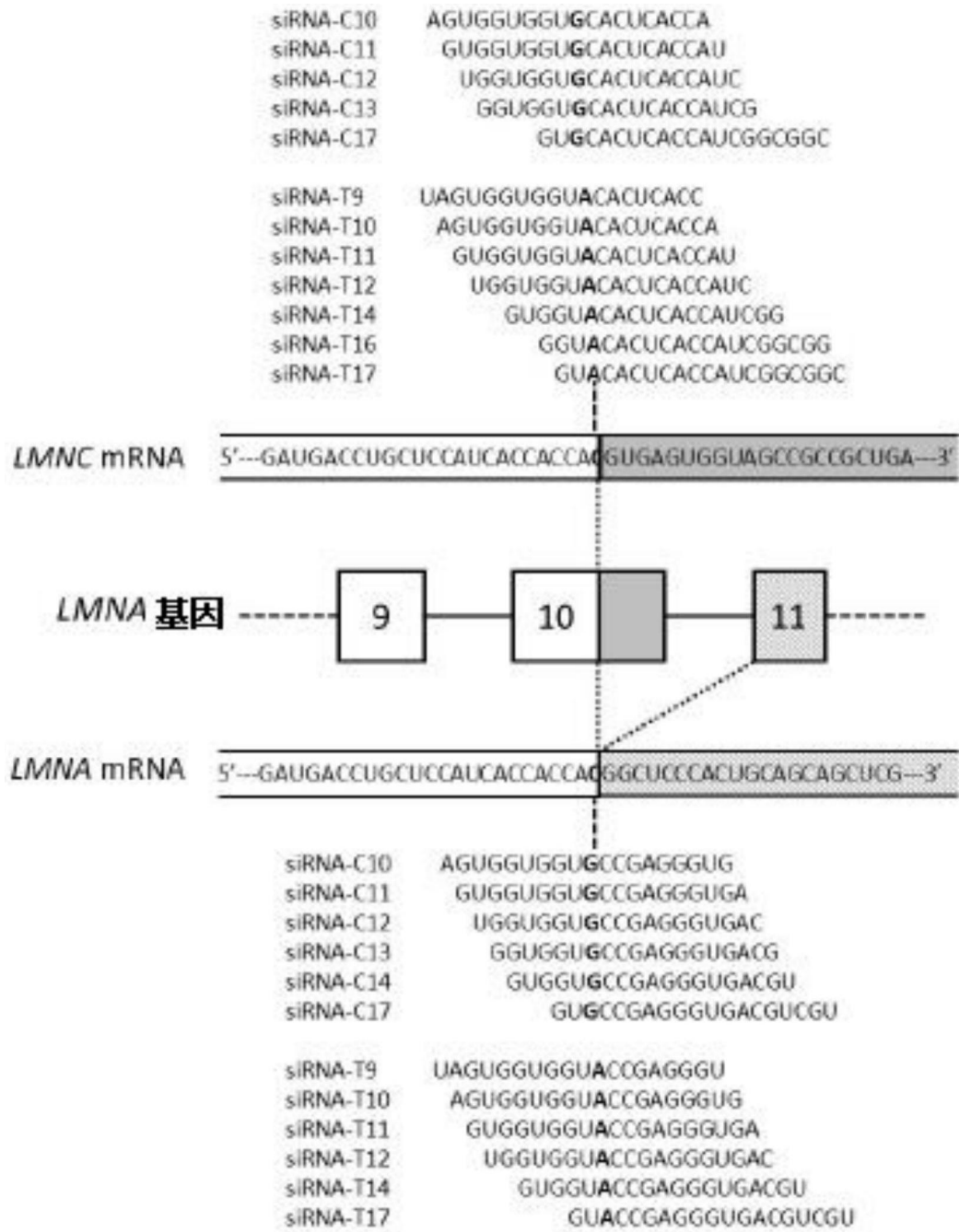


图6

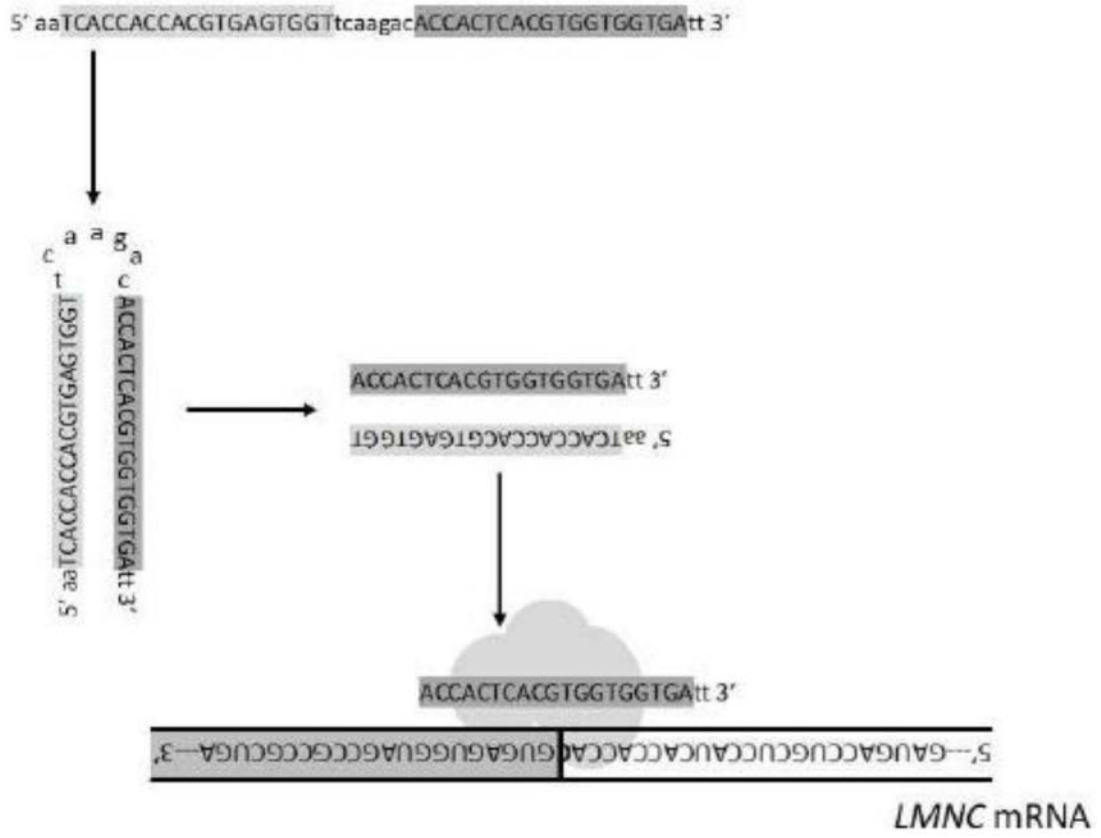


图7

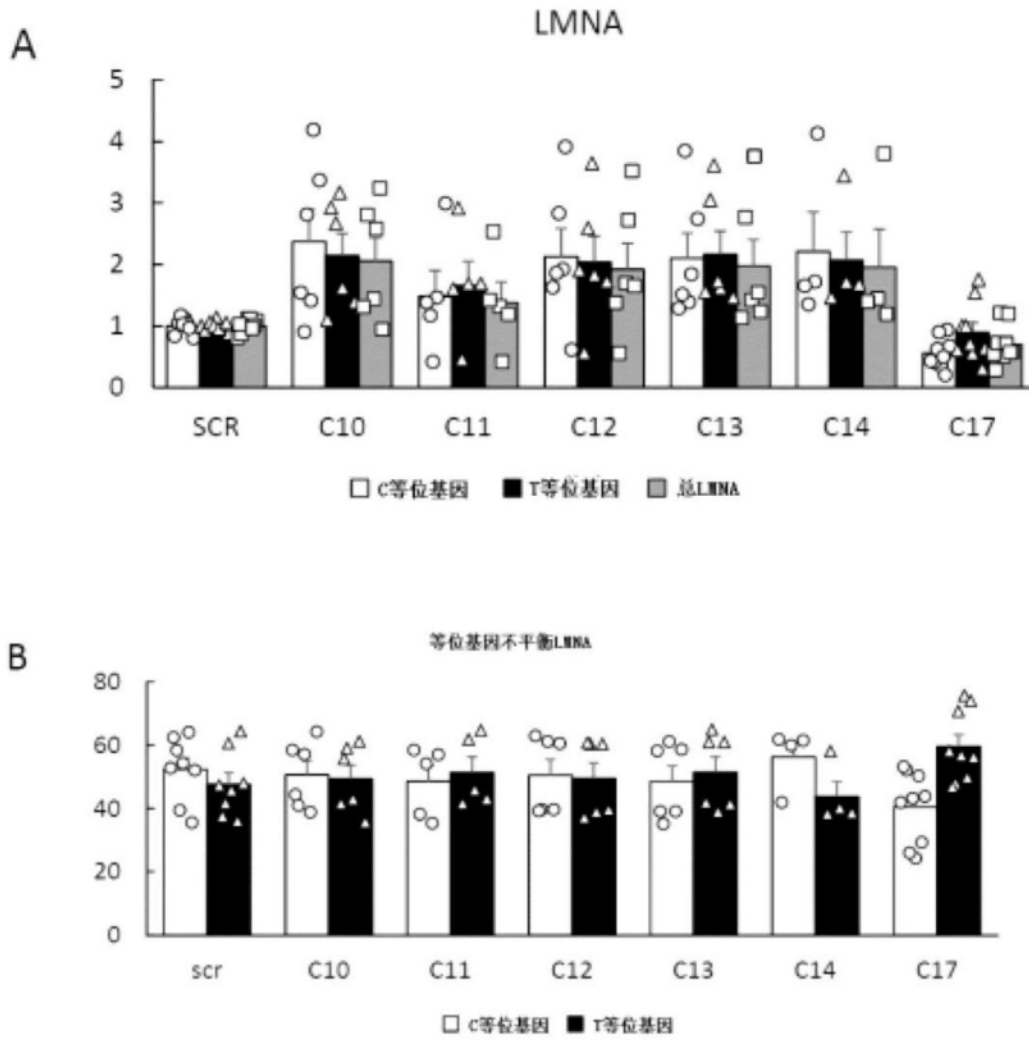


图8

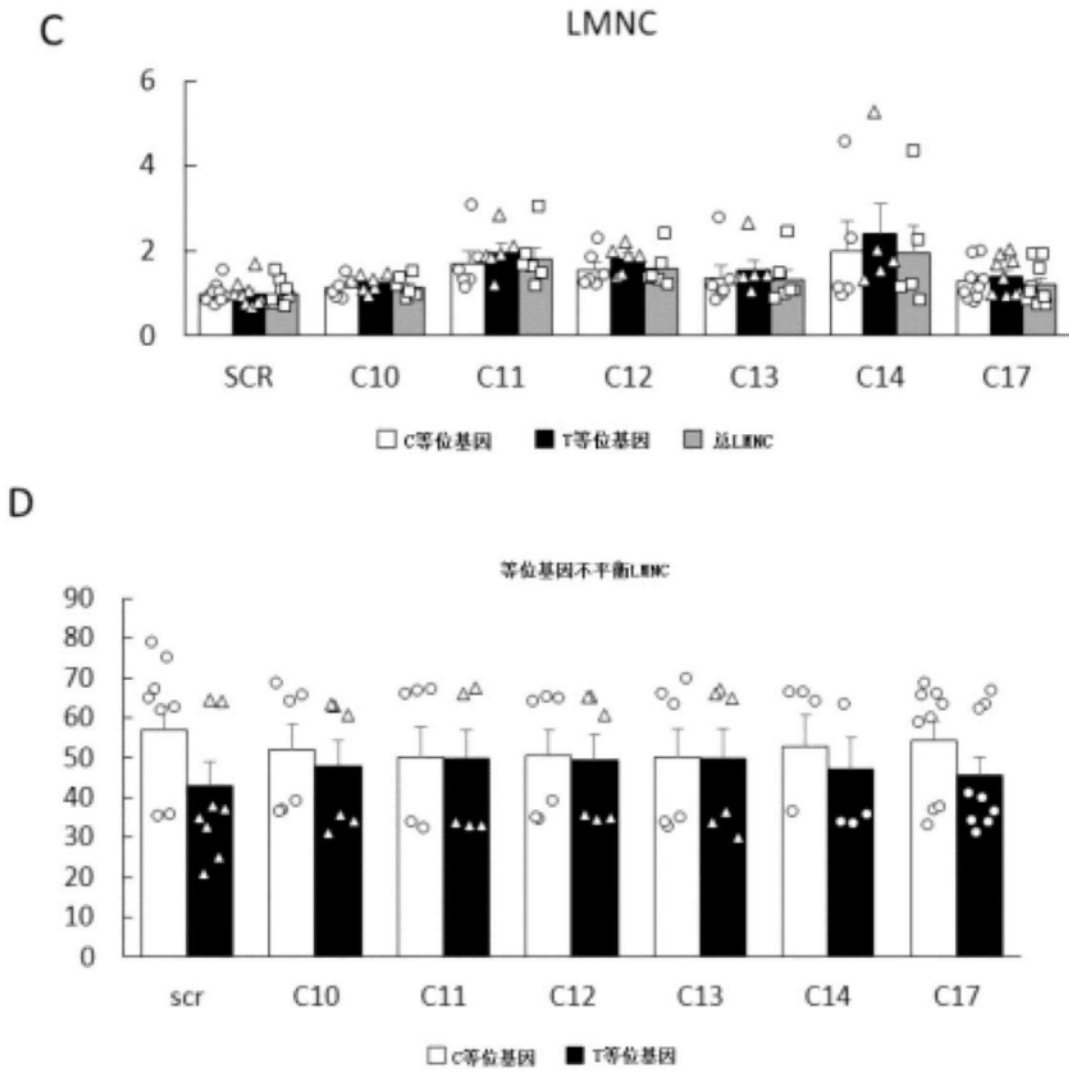


图8(续)

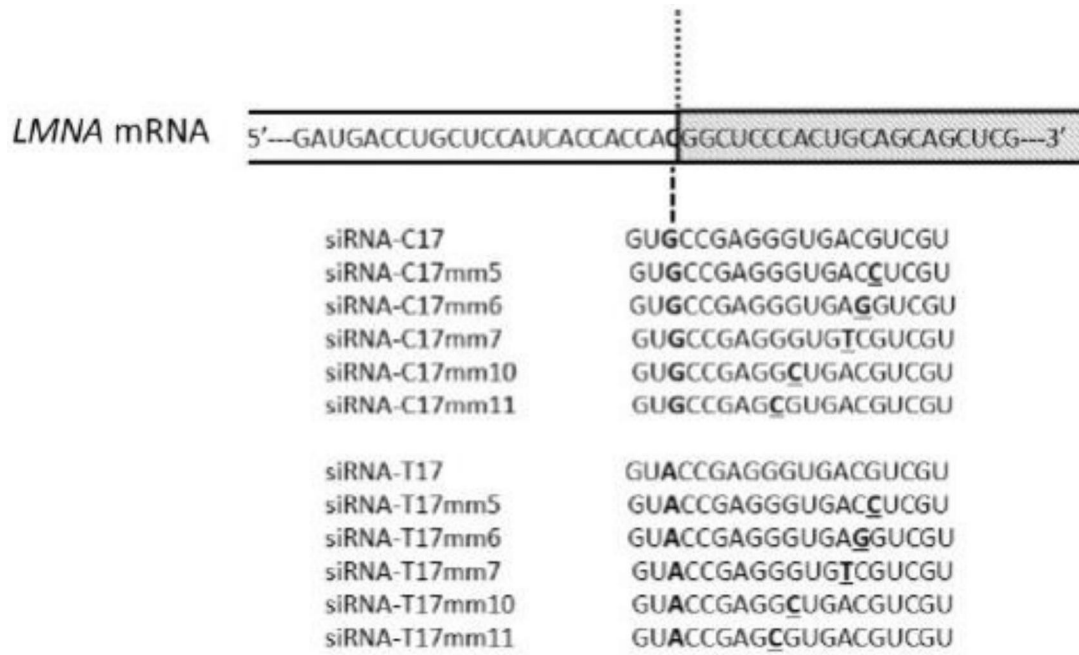


图9

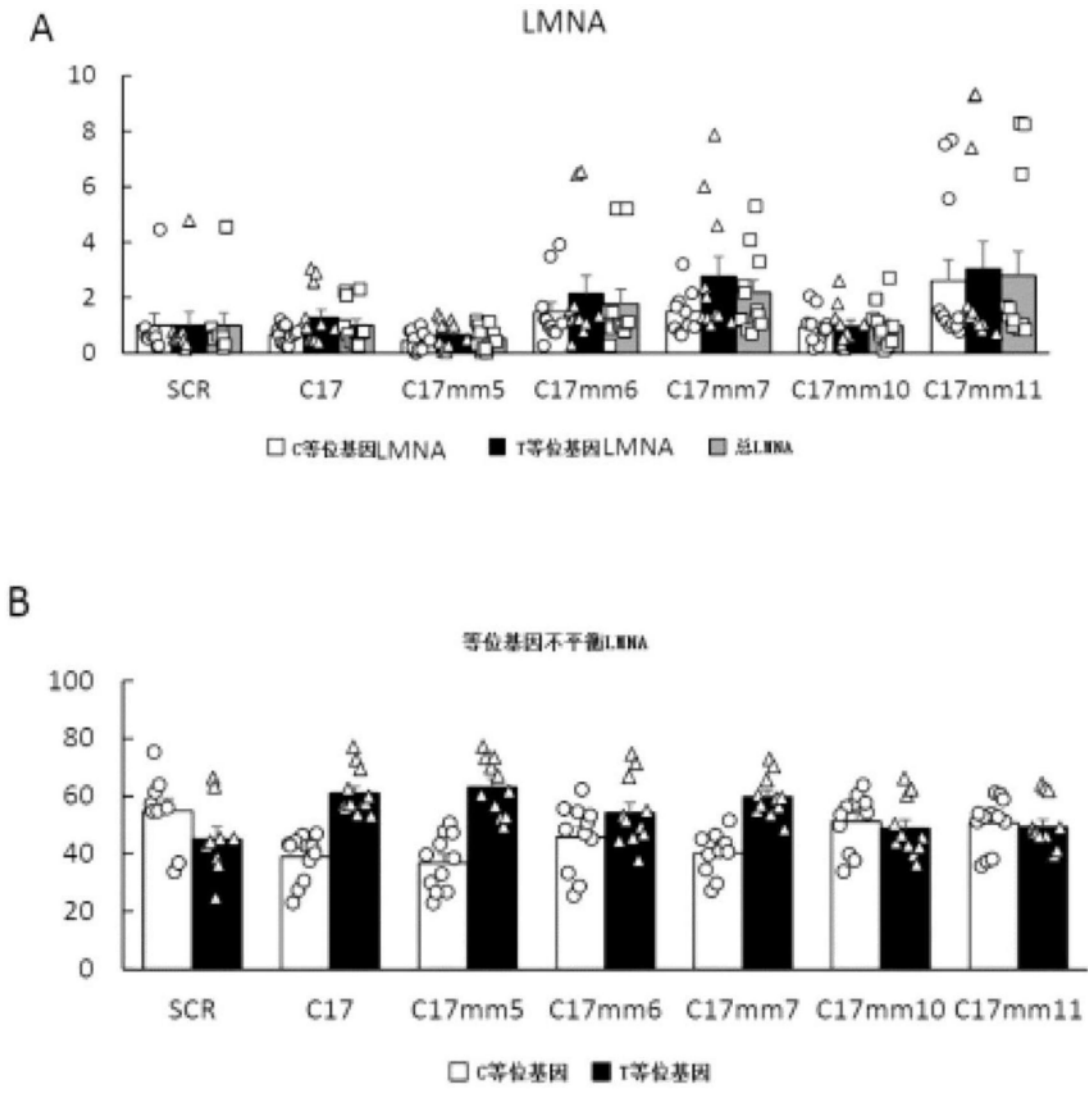


图10

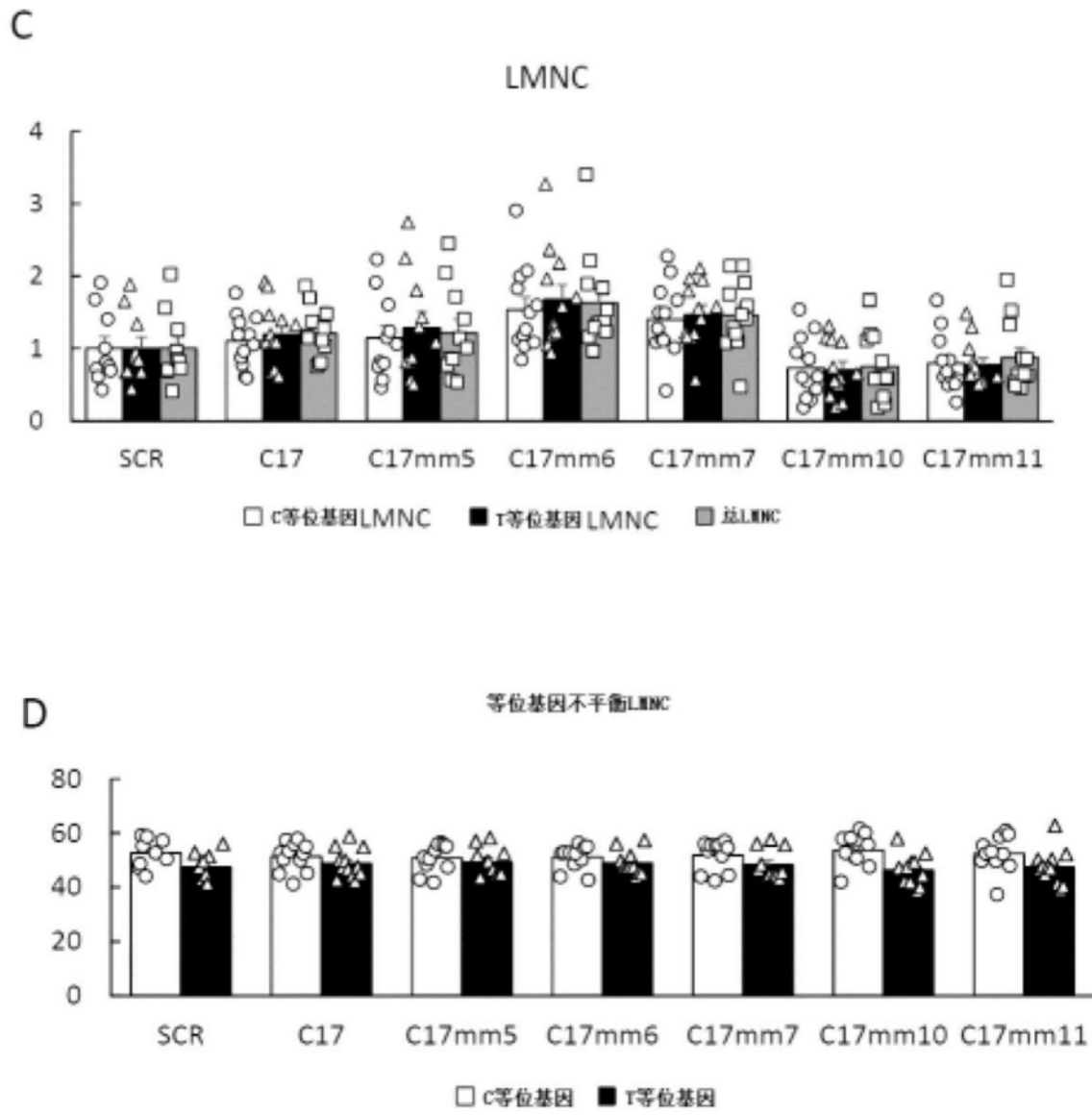


图10(续)

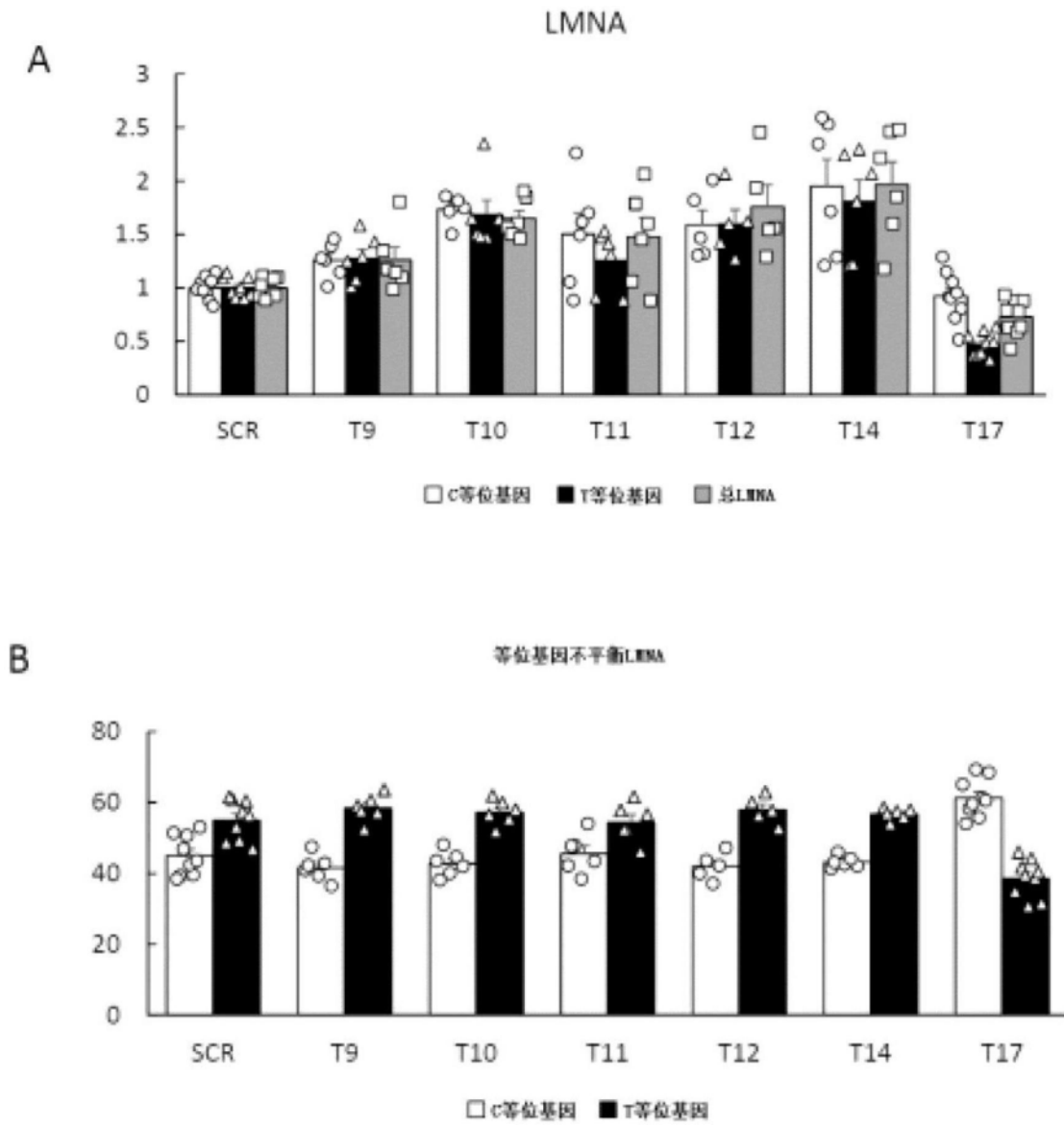


图11

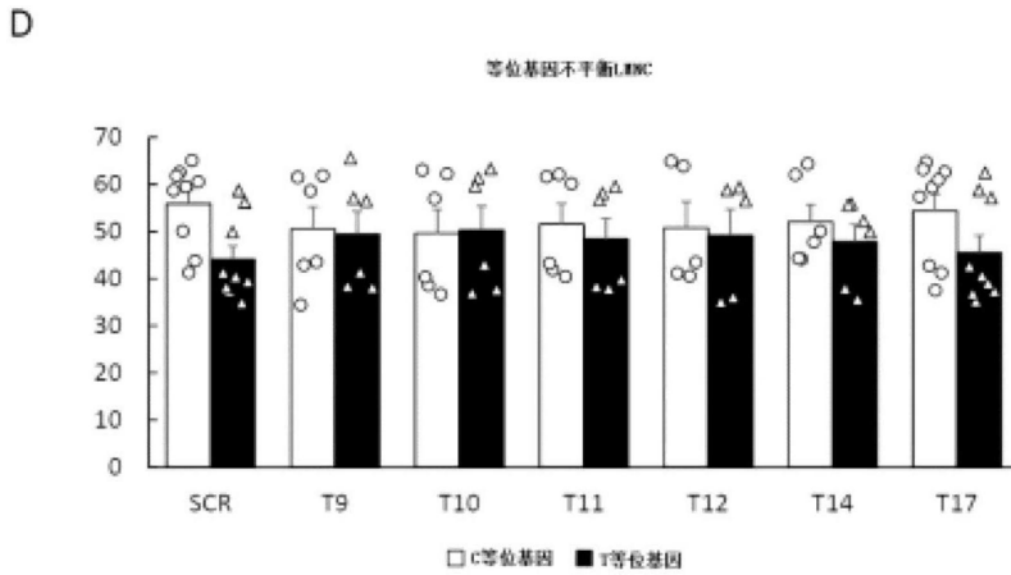
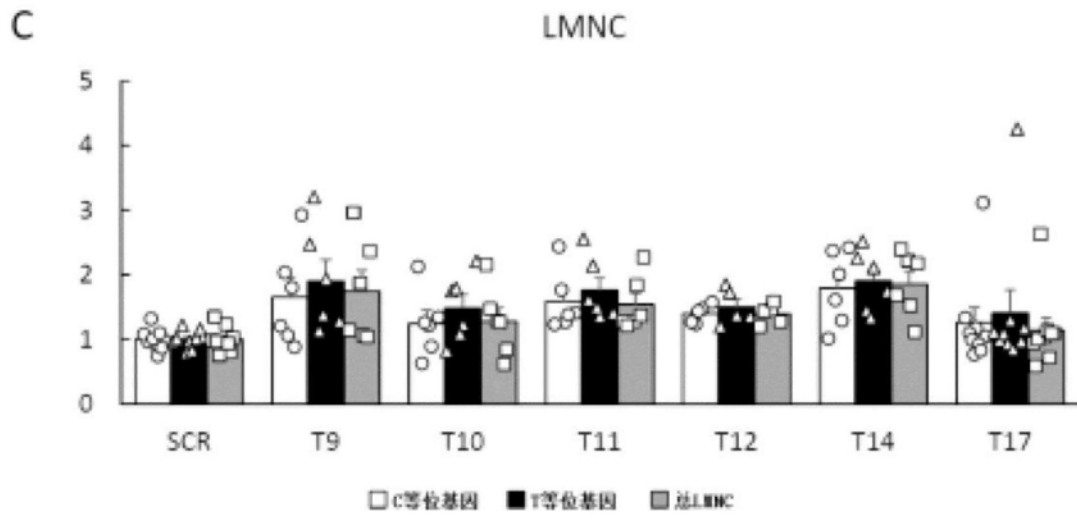


图11(续)

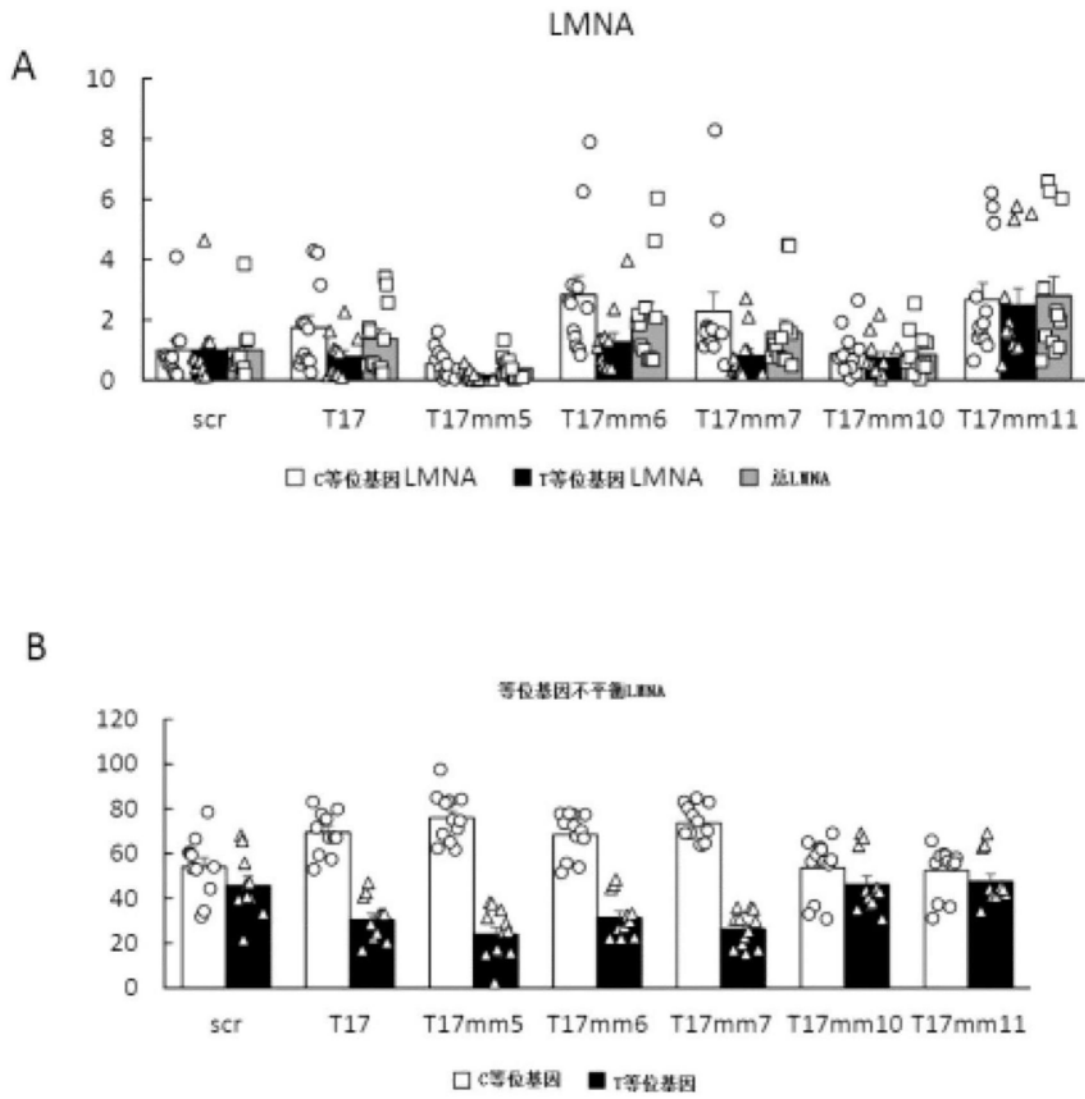


图12

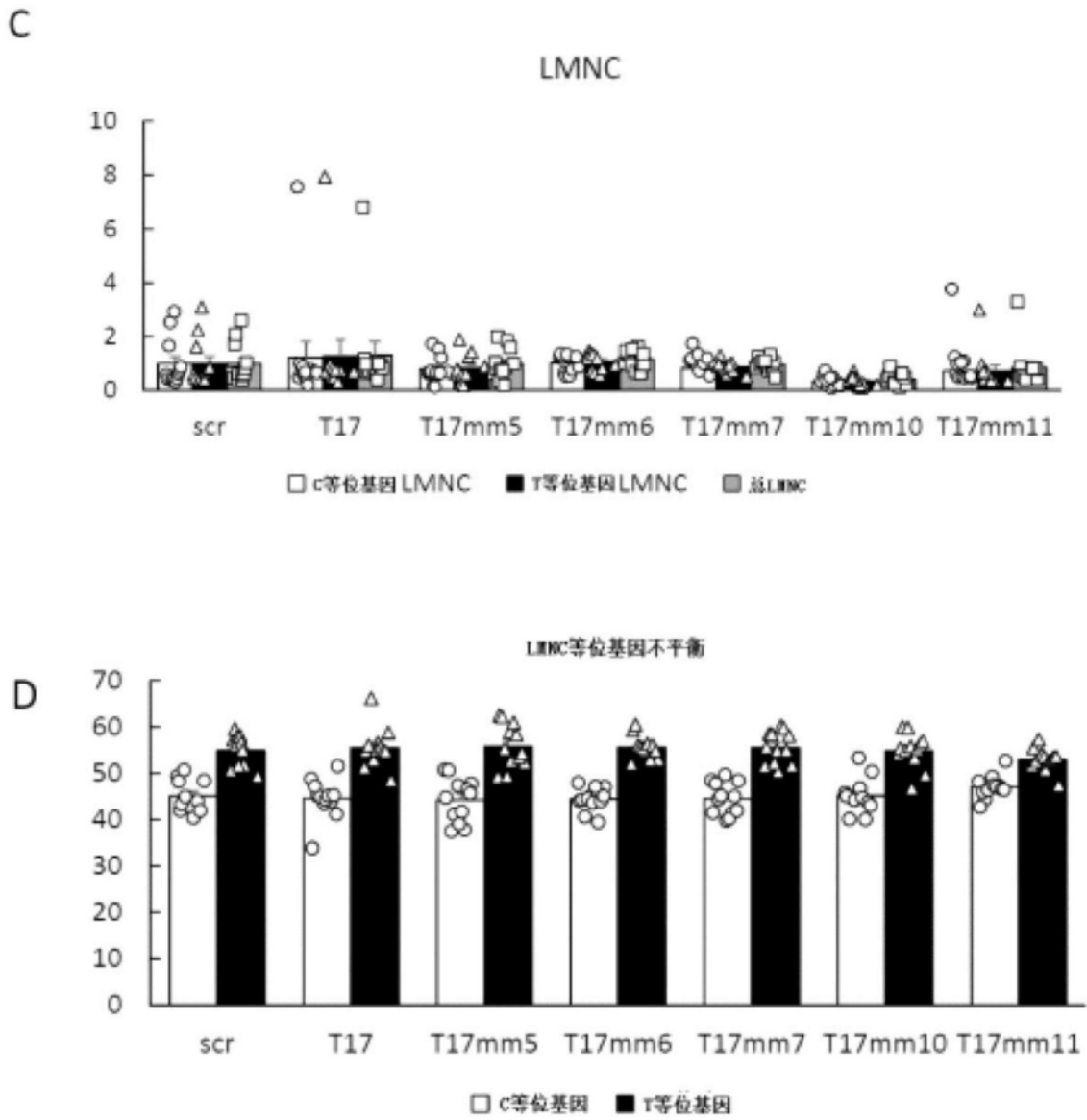


图12(续)

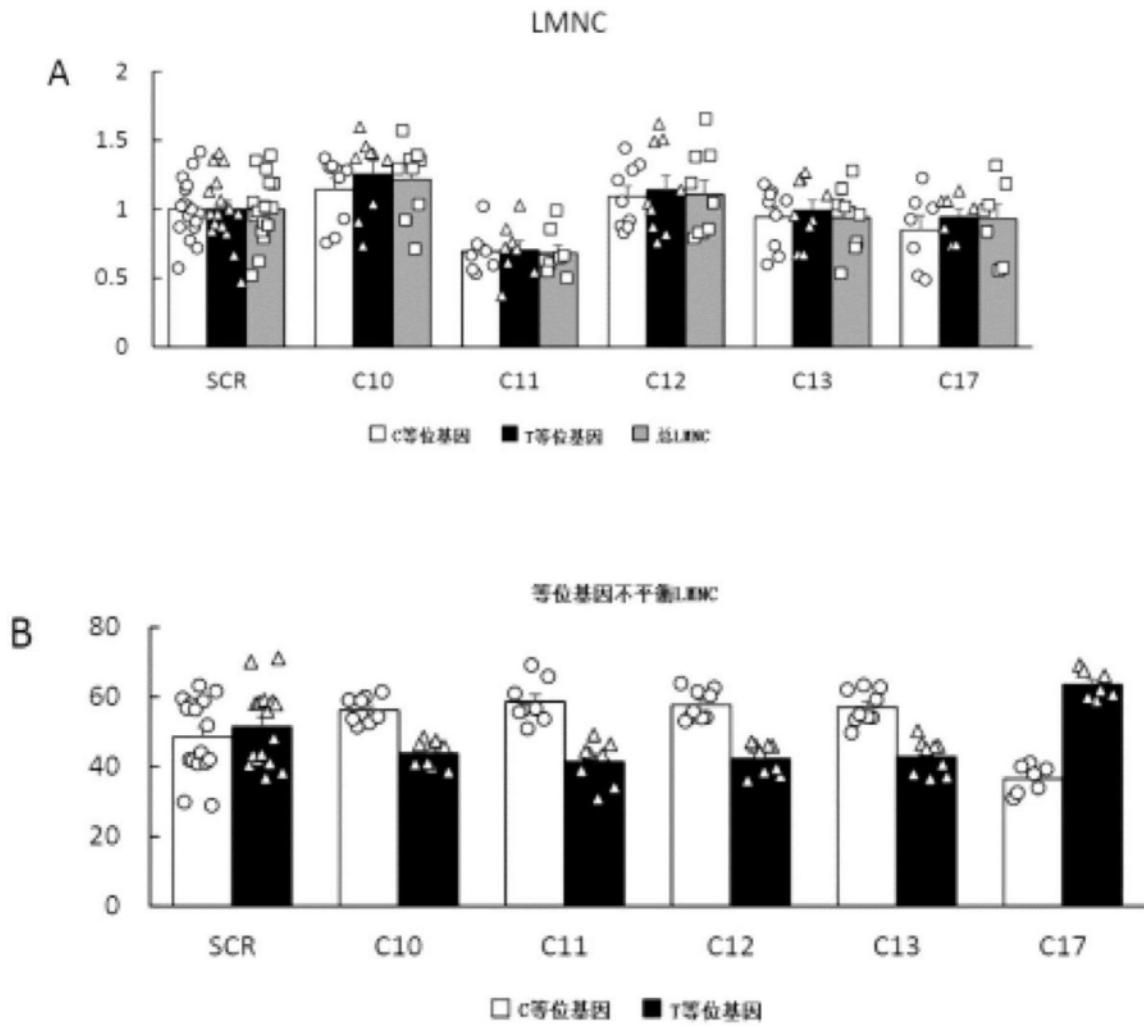


图13

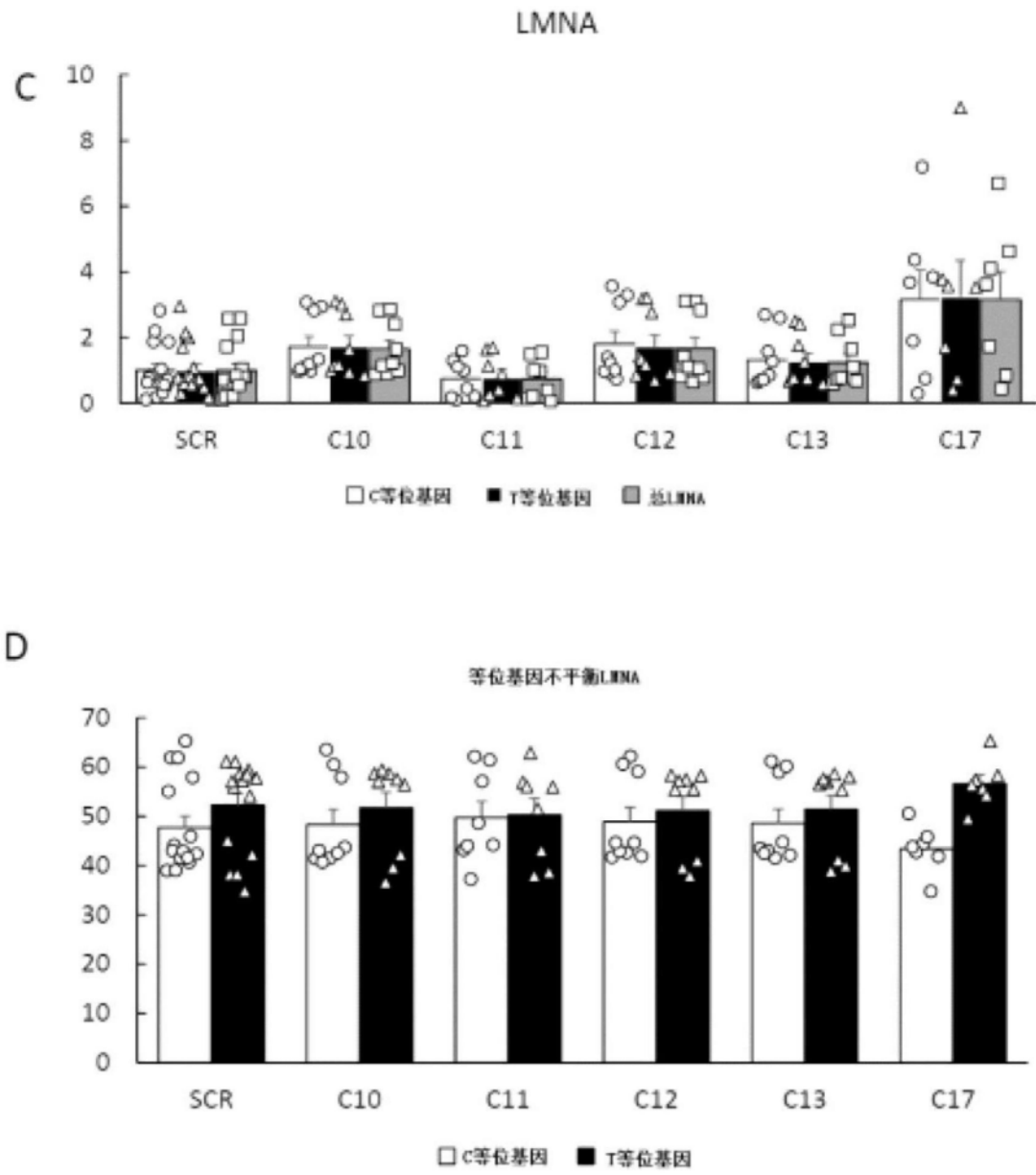


图13(续)

siRNA-C11	GUGGUGGUGCACUCACCAU
siRNA-C11mm5	GUGGUGGUGCACUC <u>T</u> CCAU
siRNA-C11mm6	GUGGUGGUGCACU <u>G</u> ACCAU
siRNA-C11mm7	GUGGUGGUGCAC <u>A</u> CACCAU
siRNA-C11mm13	GUGGUGGUG <u>C</u> UGCACUCACCAU
siRNA-C11mm17	GUGGUGGUG <u>C</u> UGGUGCACUCACCAU
siRNA-C13	GGUGGUGCACUCACCAUCG
siRNA-C13mm5	GGUGGUGCACUCAC <u>G</u> AUCG
siRNA-C13mm6	GGUGGUGCACUC <u>A</u> GCAUCG
siRNA-C13mm7	GGUGGUGCACUC <u>T</u> CCAUCG
siRNA-C13mm11	GGUGGUG <u>G</u> T <u>C</u> UCACCAUCG
siRNA-C13mm17	GG <u>A</u> GGUGCACUCACCAUCG
siRNA-T14	GUGGU <u>A</u> CACUCACCAUCG



图14

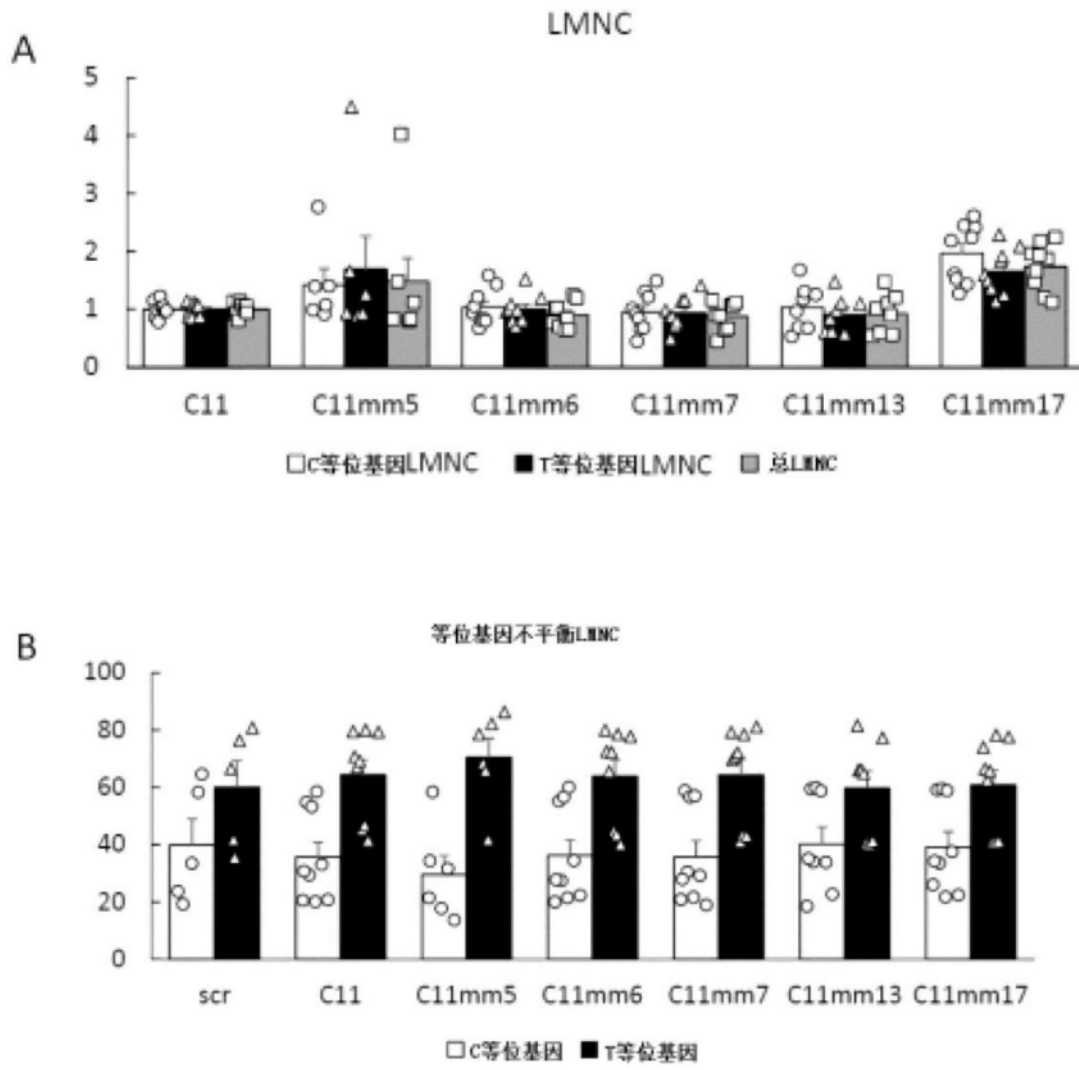


图15

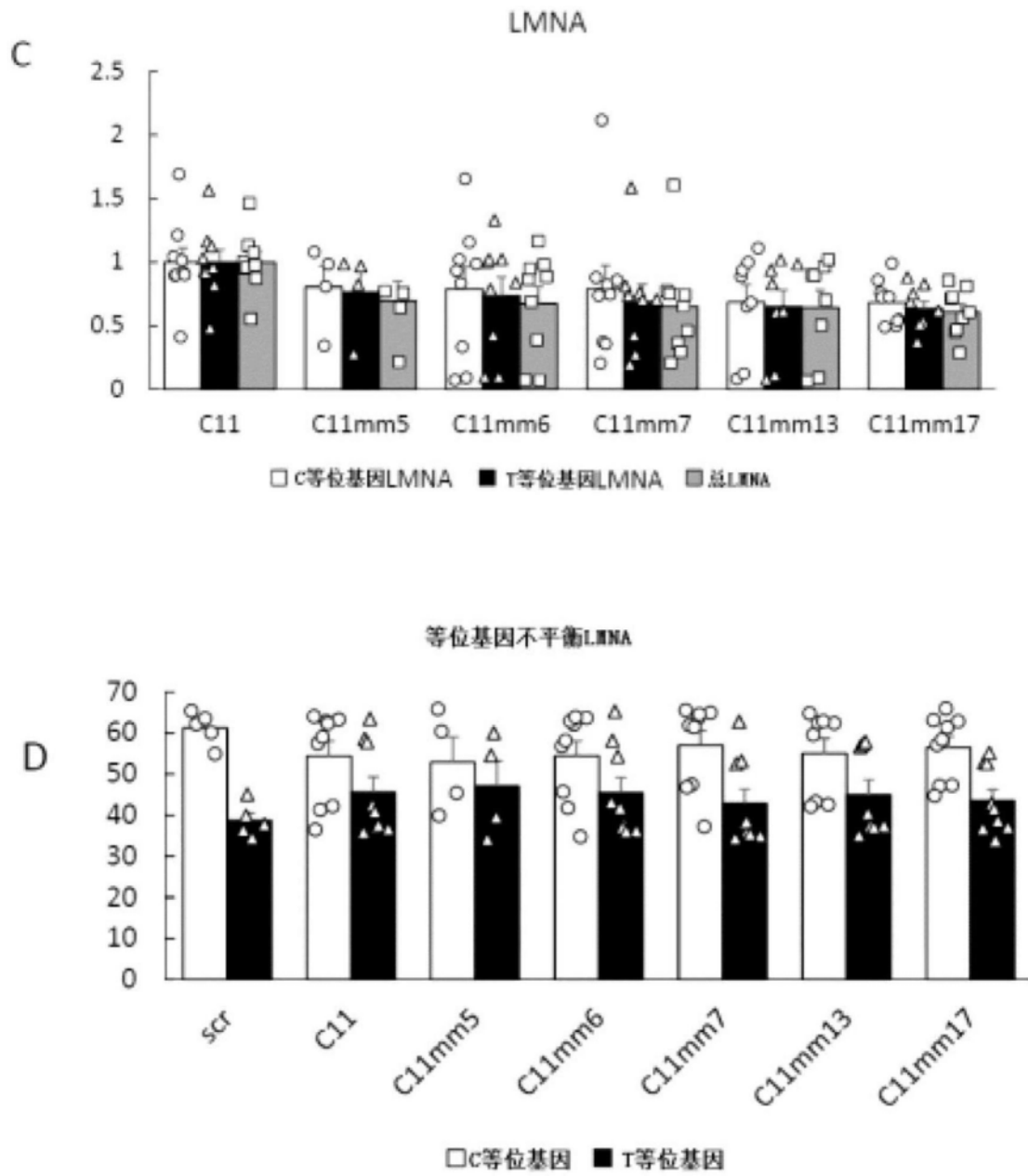


图15(续)

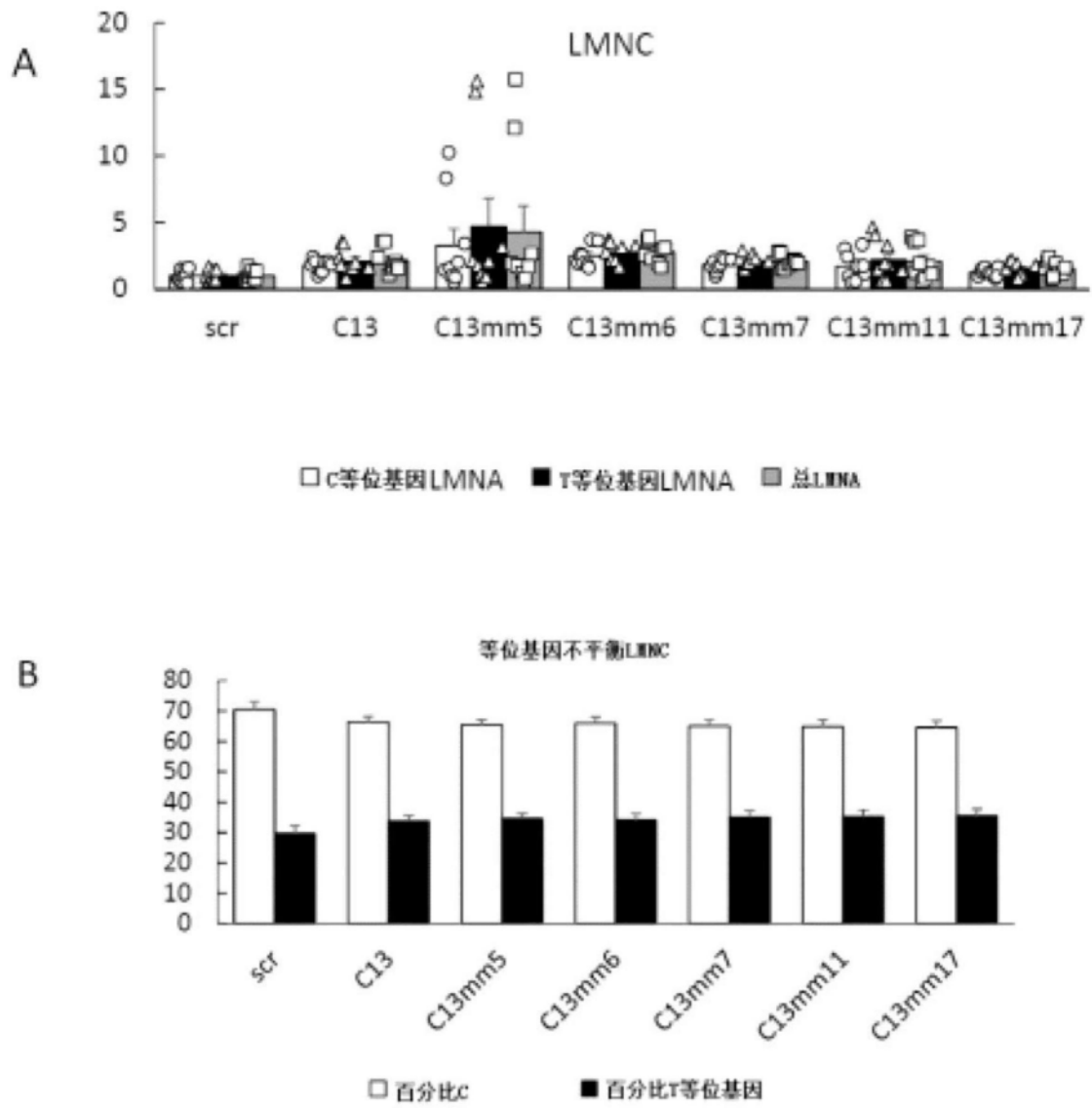


图16

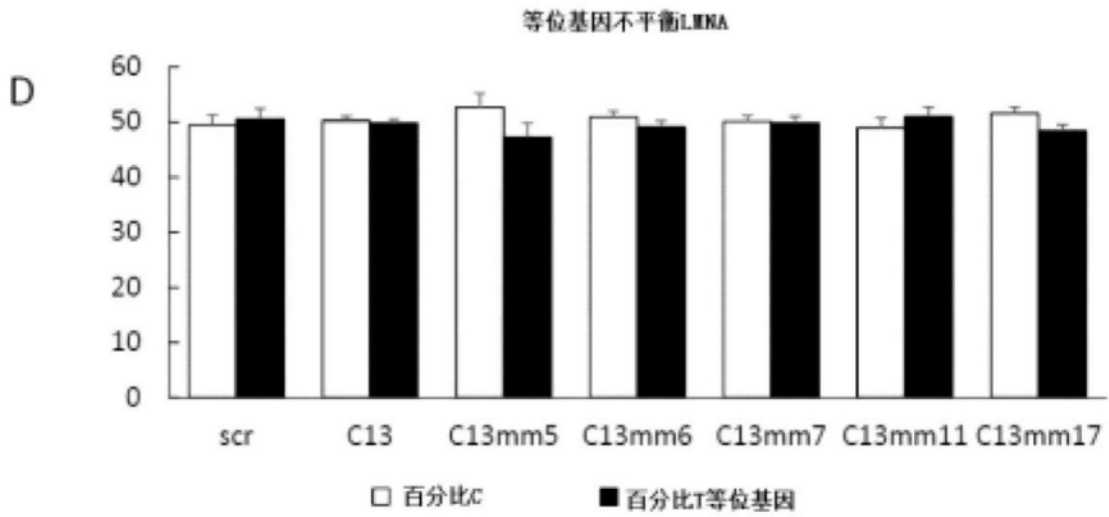
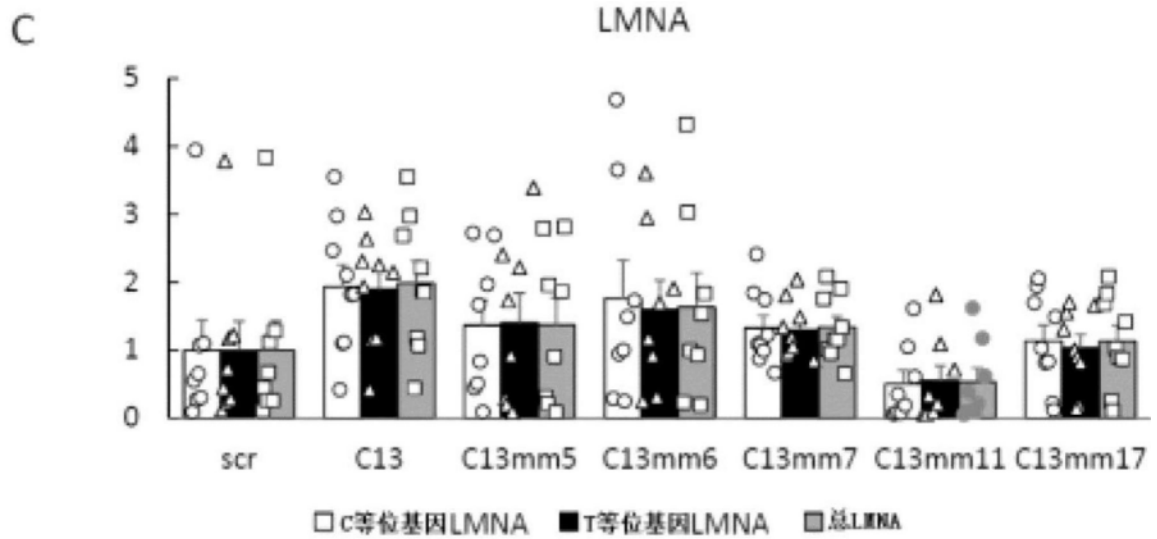


图16(续)

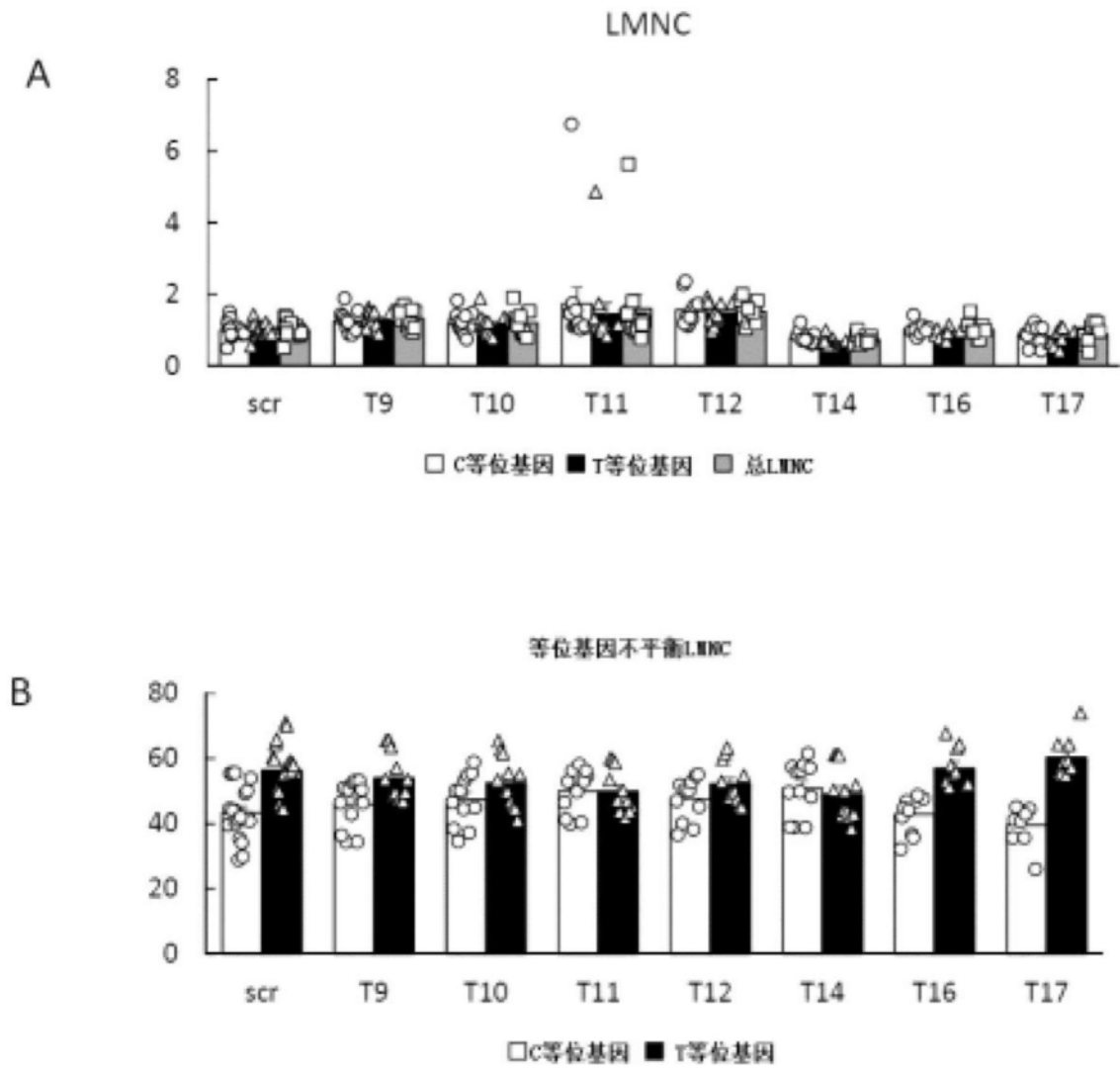


图17

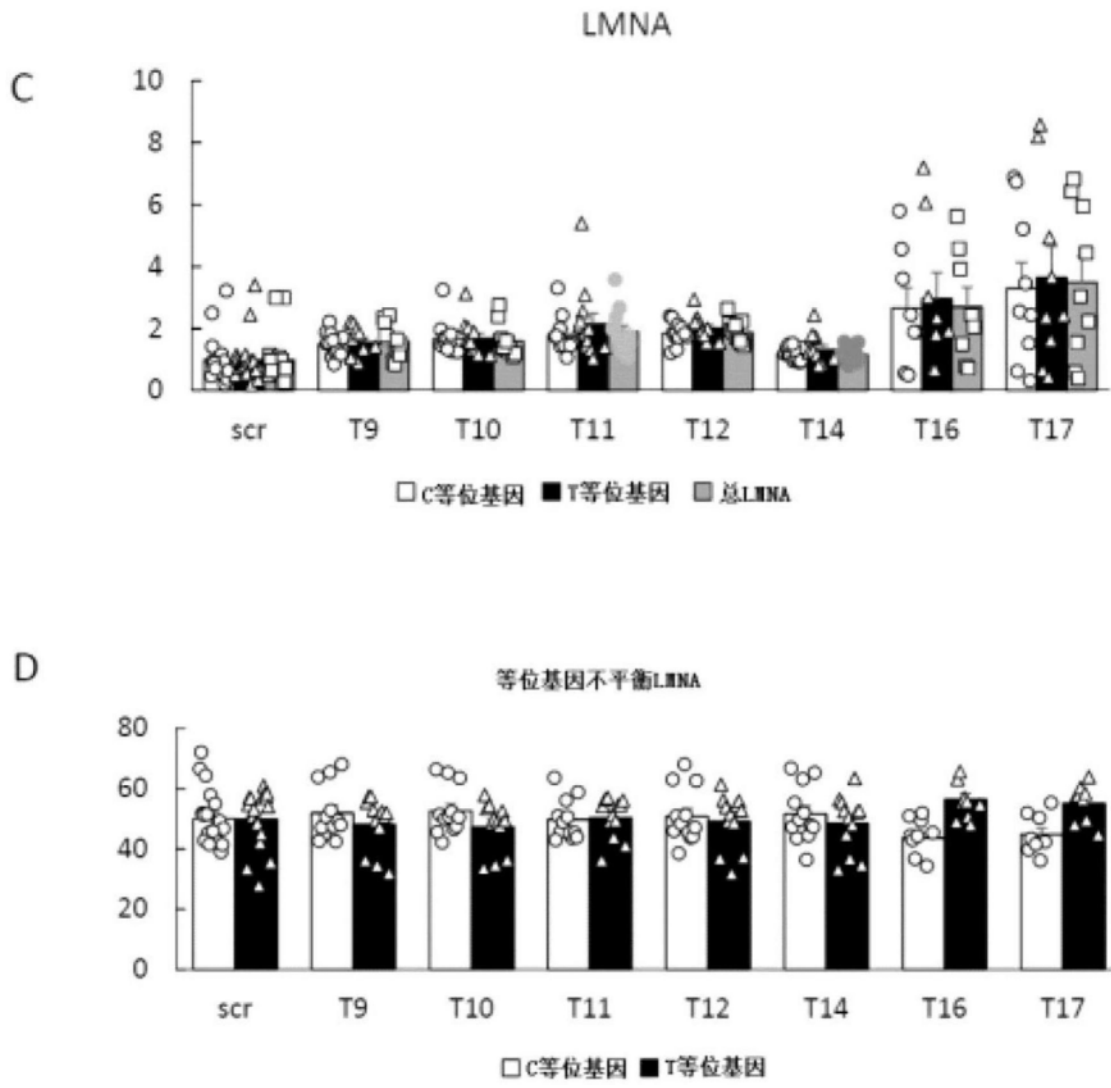


图17(续)

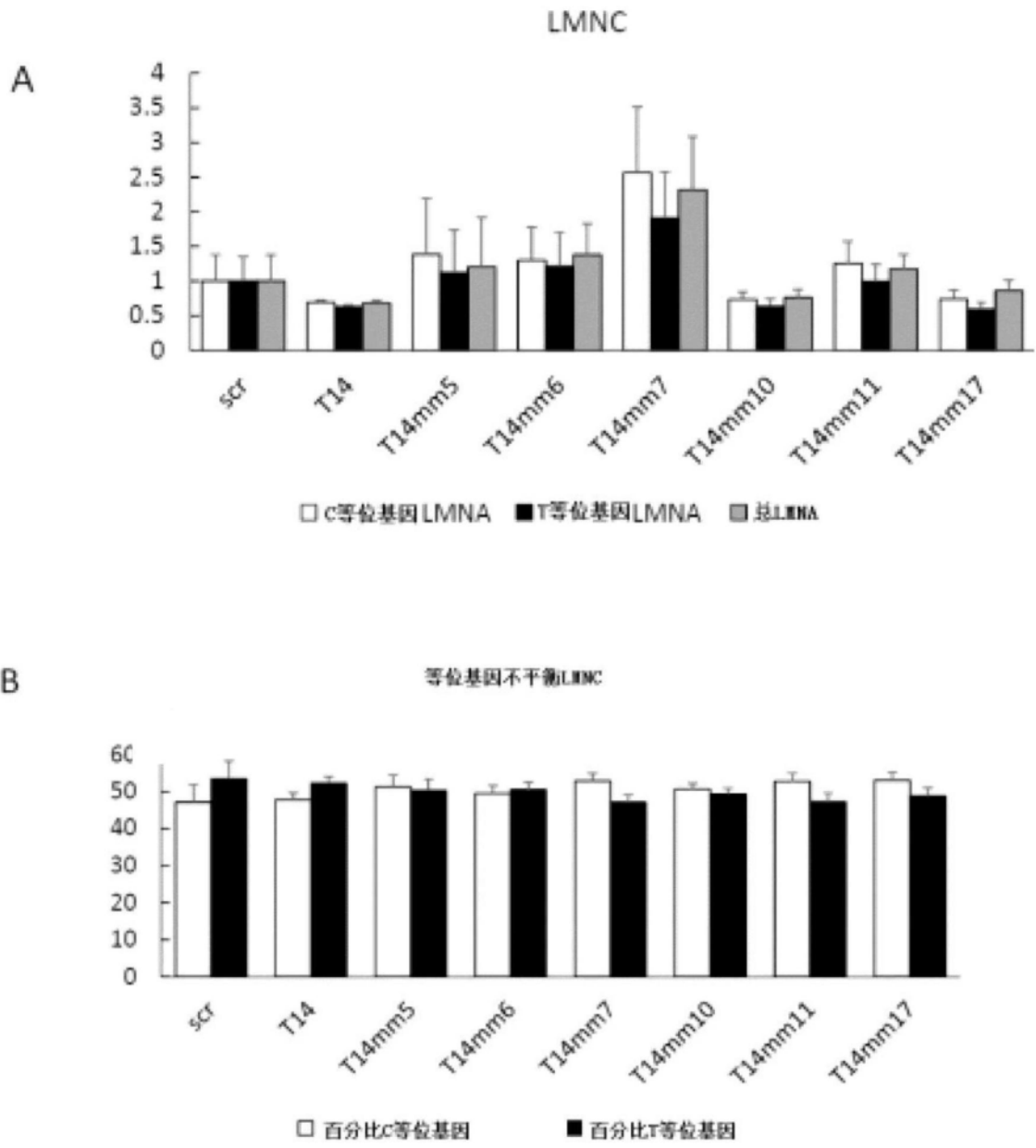


图18

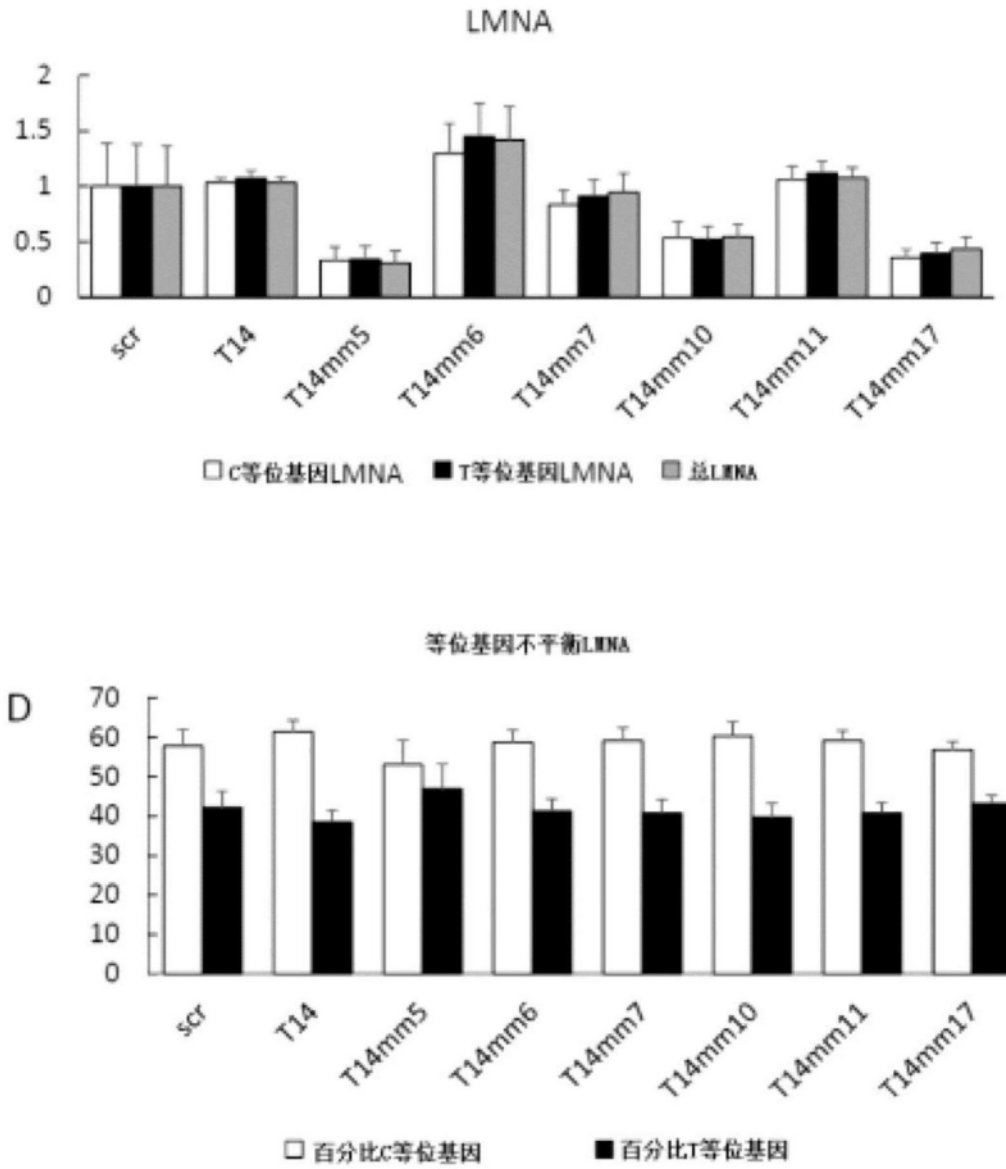


图18(续)