

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2008 年 12 月 11 日 (11.12.2008)

(10) 国际公布号
WO 2008/148304 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/11 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) *A61P 31/18* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2008/001074
- (22) 国际申请日: 2008 年 6 月 2 日 (02.06.2008)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200710105818.X
2007 年 5 月 31 日 (31.05.2007) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 厦门大学 (XIAMEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 养生堂有限公司 (YANG SHENG TANG COMPANY LIMITED) [CN/CN]; 中国海南省海口市金盘工业区金牛路 6 号, Hainan 570216 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 程通 (CHENG, Tong) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 张涛 (ZHANG, Tao) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 张雅丽 (ZHANG, Yali) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 苗季 (MIAO, Ji) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 张军 (ZHANG, Jun) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 夏宁邵 (XIA, Ningshao) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。
- (74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市阜成门外大街 2 号万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
— 包括以电子形式分开公布的说明书序列表部分, 应要求可从国际局获得。

(54) Title: RNA INTERFERENCE TARGET FOR TREATING AIDS

(54) 发明名称: 可用于艾滋病治疗的 RNA 干扰靶点

(57) Abstract: The RNAi target sequences, which could be used for treating AIDS through targeting HIV. Based on the target sequences, recombinant expression vectors, packaging vectors and cells were constructed, which express siRNA and/or miRNA and/or ribozyme and/or antisense oligonucleotide for targeting HIV. And the applications of said recombinant expression vectors, packaging vectors and cells in preparing medicament for treating AIDS.

(57) 摘要:

用于治疗艾滋病的靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点序列。基于上述靶点序列, 构建表达可用于靶向 HIV 的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸的重组表达载体、包装载体和细胞。上述重组表达载体、包装载体和重组细胞在制备治疗艾滋病药物中的应用。

WO 2008/148304 A1

可用于艾滋病治疗的 RNA 干扰靶点

技术领域

5 本发明涉及分子生物学、细胞生物学和基因治疗领域。更具体地，涉及可用于治疗艾滋病的 RNA 干扰 (RNAi) 的 32 个靶点以及应用这些靶点的重组表达载体和应用这些靶点以不同方式获得的用于制备治疗艾滋病的药物和方法。

背景技术

10 由艾滋病病毒 (HIV) 感染引起的获得性免疫缺陷综合症 (AIDS, 艾滋病) 是全世界面临的最主要健康威胁之一。目前艾滋病已几乎蔓延到世界各国，全球的艾滋病患者已超过 4000 万，已有近 3000 万人被夺去生命 (WHO, 全球艾滋病流行报告, 2004 年)。近年来，我国艾滋病传播呈快速增长趋势，现感染者累计已达 84
15 万人。目前，治疗 HIV 感染的方法主要是采用高强度的抗逆转录病毒治疗，如联合使用针对病毒逆转录酶和蛋白酶的抑制剂。但由于 HIV 的高突变率及复杂的致病机理，该类型方法无法彻底根除体内病毒。因此，迫切需要发展新的治疗手段以对付艾滋病的威胁。

20 RNA 干扰 (RNAi) 是一种由双链 RNA (dsRNA) 介导的细胞内抑制基因表达的机制，是 1998 年在线虫中进行基因表达抑制研究中被首次提出 (Fire A 等, 自然, 1998 年, 391 卷: 806-811 页)。之后进一步发现 RNAi 广泛存在于高等哺乳动物以及真菌、拟南芥、水螅、涡虫、锥虫、斑马鱼等几乎所有的真核生物中，是一种普遍存在和保守的抑制基因表达的机制，可起到调控基因表达、
25 抗病毒入侵、抑制转座子活动等作用 (Dykxhoorn DM 等, 自然分子细胞生物学综述, 2003 年, 4 卷: 457-467 页)。目前 RNAi 作

用的机制已基本阐明：内源或外源产生的 dsRNA 分子在细胞质中被属 RNA 酶 III 的 Dicer 切割成小干扰 RNA (siRNA)。典型的 siRNA 结构特征为：5' 端磷酸化，3' 端呈对称性突出 2-3nt 并带羟基，长度为 19-23nt 的 dsRNA。siRNA 分子与 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-inducing silencing complex, RISC) 的蛋白复合体进行结合，RISC 具有解螺旋酶和核酸内切酶活性。siRNA 分子在复合体中被解聚，其中反义链可与匹配的靶 mRNA 按碱基配对原则结合，并引导与之结合的 RISC 将靶 mRNA 在与反义链的结合区中部距 5' 端 10nt 的位置处酶解，从而抑制靶基因的表达。目前获得 siRNA 的方法主要有：可表达小发夹 RNA (shRNA) 的质粒和重组病毒载体、化学合成方法、体外转录等。

目前，RNAi 在包括艾滋病在内的病毒性疾病以及肿瘤等疾病的防治研究已显示出良好的应用前景。研究已显示靶向 HIV-1 mRNA 的 siRNA 可在体外培养的 HIV-1 易感细胞中抑制 HIV-1 的复制和病毒基因的表达 (Martinez MA 等，免疫学趋势，2002 年，23 卷：559-561 页)。由于 HIV 的致病机理复杂，要达到有效的治疗目的必须能够高效抑制病毒复制和基因表达。然而，并非所有符合常规设计要求的 RNAi 靶点都能够有效抑制靶基因的表达，不同靶点间的抑制效率各有差别。因此，选择获得合适的具有高抑制效率的 RNAi 靶点成为 RNAi 技术是否能够成功应用于艾滋病治疗的重要因素。选择合适的 RNAi 靶点需要从结构特征、抑制效率、非人类基因同源性等方面进行综合考虑。可使用的辅助方法包括目前已提出的 siRNA 辅助设计软件、RNA 分子结构分析、核酸序列分析比对以及实验经验等，并通过具体的抑制实验予以验证。

以 RNA 干扰技术为基础将有望开发出新型的更有效的艾滋病治疗方法，该类型的治疗方法需要提供可有效抑制 HIV 复制和表

达的 RNA 干扰靶点。本发明满足了这一要求，提供了可用于该目的的 RNA 干扰靶点、重组表达载体等。

发明简述

5 本发明提供了可高效靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点，可用于构建包含或导入了本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列的表达质粒、重组病毒载体和细胞，及可用于获得包含有由本发明涉及的 RNA 干扰靶点获得的艾滋病治疗药物。在一个具体方面，本发明具体涉及靶向 HIV GAG、POL、VIF、或者 VPU 基因的 RNA 干扰
10 靶点序列。

本发明提供的 RNA 干扰靶点可高效靶向 HIV，可高效抑制 HIV 的复制和病毒基因表达。本发明提供的 RNA 干扰靶点是通过以下方法获得的：选择设计可靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点序列，通过设计合适的引物构建 shRNA，并克隆入 pSUPER 载体获得相应的 shRNA
15 表达质粒，将该质粒分别与 HIV 感染性克隆质粒进行共转染实验，通过检测 HIV p24 蛋白的表达水平及鉴定抑制特异性等分析筛选获得高效的 RNA 干扰靶点。

本发明提供特异靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点序列，该序列选自：

(1) SEQ ID NO: 1 - 32 中任何一个所示的序列，或者

20 (2) 与 (1) 中序列具有至少 70% (优选至少 80%、85%、90%、95%、98% 或更高) 一致性的序列，或者

(3) 在严紧条件下或者高度严紧条件与 (1) 中序列能够杂交的核苷酸序列，或者

25 (4) 与 (1) 中序列仅有 1 - 3 个 (优选 1 - 2 个，更优选 1 个) 核苷酸不同的序列；或者

(5) 上述序列的片段或者互补序列。

在一个具体方面，所述 RNA 干扰靶点序列可以靶向 HIV GAG、

POL、VIF、或者 VPU 基因。

本发明提供的 RNA 干扰靶点可以是 DNA 或 RNA 序列。

在一个优选实施方案中，所述 RNA 干扰靶点选自 siVIF037 (SEQ ID NO: 24)、siPOL1102 (SEQ ID NO: 8)、siPOL1217 (SEQ ID NO: 10)、siPOL1327 (SEQ ID NO: 29)、和 siPOL2252 (SEQ ID NO: 22)。

本发明还提供包含该 RNA 干扰靶点序列的核酸构建体或载体如表达载体。

本发明还提供依据上述的 RNA 干扰靶点序列获得的、能够抑制 HIV 相应基因的表达和/或 HIV 的复制和/或感染的 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸。

本发明提供了改造后的重组表达载体，其可用于表达本发明的靶向 HIV 的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

在一个实施方案中，本发明重组表达载体具有以下特征：包含了本发明提供的 RNA 干扰靶点序列的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸的编码核酸序列，这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接，使得可在动物细胞（特别是哺乳动物细胞，如人细胞，如 HIV 受体细胞，优选 CD4+ 细胞，如哺乳动物干细胞，优选造血干细胞）中表达所述靶向 HIV 的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

本发明的重组表达载体可以是质粒载体或病毒载体，例如逆转录病毒载体，包括慢病毒载体。优选地，所述重组表达载体是逆转录病毒载体，更优选慢病毒载体。

本发明提供了改造后的用于生产逆转录病毒载体（例如慢病毒载体）的包装载体（如包装质粒），其含有突变后的来源于 HIV 的用于表达包装蛋白的基因序列，特别地改造后的基因序列可相互独立地具有如下序列特征：

包装载体的序列突变情况如下所示:

包装载体: -----GTAGACAGGATGAGGATTA-----

突变为: -----GTAGACAGGACGAAGATTA-----

5 包装载体: -----GGATTTACCACACCAGACA-----

突变为: -----GGATTTACCACCCCCGACA-----

包装载体: -----GCTGGACTGTCAATGACAT-----

突变为: -----GCTGGACTGTGAACGACAT-----

10

包装载体: -----GCACTAACAGAAGTAGTAC-----

突变为: -----GCACTAACAGAAGTGGTGC-----

包装载体: -----TAGTAGCCAGCTGTGATAA-----

15 突变为: -----TAGTAGCCAGCTGCCACAA-----

本发明还涉及分离的细胞, 其包含: (1) 本发明 RNA 干扰靶点序列, 或者 (2) 含有本发明 RNA 干扰靶点序列的核酸构建体或载体如表达载体。

20

本发明还涉及转化或转染或转导了重组表达载体的分离的细胞, 所述重组表达载体可表达本发明的靶向 HIV 的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

本发明还涉及转化或转染或转导了或包含了本发明的包装载体 (如包装质粒) 的分离的细胞。

25

本发明还涉及包含上述细胞的组织和生物, 如动物。

本发明还涉及一种改造的细胞 (包括动物例如哺乳动物优选人的细胞, 优选 HIV 受体细胞和干细胞, 如 CD4+细胞和 CD34+细

胞)，其可表达或包含有本发明 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸。

5 本发明还涉及在基因组中或者基因组外携带本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列的细胞，包括原核细胞（如细菌细胞，如大肠杆菌细胞）和真核细胞（如真菌细胞，昆虫细胞，植物细胞，动物细胞，优选哺乳动物如人的细胞，优选 HIV 受体细胞和干细胞，如 CD4+细胞和 CD34+细胞），其包含有本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列（这些编码核酸序列可与表达控制序列可操作地连接，使得可在该细胞中表达所述的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸）。

10 本发明还涉及导入了由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸的细胞，包括原核细胞（如细菌细胞，如大肠杆菌细胞）和真核细胞（如真菌细胞，昆虫细胞，植物细胞，动物细胞，优选哺乳动物如人的细胞，优选 HIV 受体细胞和干细胞，如 CD4+细胞和 CD34+细胞），其被导入了包含有由本发明涉及的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

20 在一个优选的实施方案中，含有本发明获得的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列的 shRNA 表达元件导入 HIV 受体细胞后可使细胞获得抑制 HIV 复制和病毒基因表达的能力。

本发明还涉及包含上述细胞的组织和生物，如动物。本发明还涉及包含本发明的细胞的药物组合物。

25 另一方面，本发明还涉及制备本发明改造细胞的方法，包括用本发明的重组表达载体转化或转染或转导细胞（包括动物例如哺乳动物优选人的细胞，优选 HIV 受体细胞和干细胞，如 CD4+细胞和 CD34+细胞）。

在一个实施方案中，所述方法包括用本发明重组逆转录病毒

载体（例如慢病毒载体，如慢病毒 Lenti-VIF037 等）转导哺乳动物优选人的 HIV 受体细胞和干细胞，如 CD4+细胞和 CD34+细胞。

在上述方法，所述细胞可以是分离的（或离体的），例如从感染 HIV 的患者或者正常个体分离的，或者是在体的，或者是体外培养的细胞株。

本发明还涉及 DNA 序列的组合，其包括或者由编码正义 RNA 片段的第一 DNA 序列和编码反义 RNA 片段的第二 DNA 序列组成，所述正义 RNA 片段包含本发明靶点序列所编码的 RNA 序列，反义 RNA 片段和正义 RNA 片段能形成双链 RNA，该双链 RNA 能抑制 HBV 基因的表达和/或 HBV 的复制和/或感染。

本发明还涉及小分子干扰核糖核酸（siRNA），其包括正义 RNA 片段和反义 RNA 片段，所述正义 RNA 片段包含本发明靶点序列编码的 RNA 序列，反义 RNA 片段和正义 RNA 片段能形成双链 RNA，且该双链 RNA 能抑制 HIV 相应基因的表达和/或 HIV 的复制和/或感染。

本发明还涉及由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸在制备治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的药物和/或药物组合物中的用途。

本发明还涉及由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸在制备抑制 HIV 复制或者 HIV 基因表达的药物和/或药物组合物中的用途。

本发明还涉及本发明 RNA 干扰靶点序列、或核酸构建体或载体、或重组表达载体在制备治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的药物中的用途。

本发明还涉及本发明的经改造的细胞（包括动物例如哺乳动物优选人的细胞，优选 HIV 受体细胞和造血干细胞，如 CD4+细胞和 CD34+细胞）在制备治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的药物和/或药

物组合物中的用途。

本发明还涉及本发明的 siRNA 靶序列在筛选抗 HIV 药物中的应用。

5 本发明还涉及治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的方法，包括向有需要的个体给予本发明的 RNA 干扰靶点序列、核酸构建体或载体、重组表达载体、siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、或细胞。

本发明还涉及本发明载体和细胞用于治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的用途。

10 本发明还涉及治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的方法，包括向患者给予治疗有效量的本发明所述 RNA 干扰靶点序列、核酸构建体或载体、siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、表达载体、细胞或 siRNA。

15 本发明还涉及抑制 HIV 复制或者 HIV 基因表达的方法，包括向有需要的个体给予有效量的本发明所述 RNA 干扰靶点序列、核酸构建体或载体、siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、表达载体、细胞或 siRNA。

20 本发明还涉及本发明所述 RNA 干扰靶点序列、核酸构建体或载体、siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、表达载体、细胞或 siRNA，用于治疗 HIV 感染或者 HIV 患者，或者用于抑制 HIV 复制或者 HIV 基因表达。

下面结合附图对本发明进行更详细的说明。从下文的详细描述中，本发明的上述方面和本发明的其他方面将是明显的。

附图说明

25 图 1 为 pSUPER-siRNA 系列表达质粒的构建流程示意图。

图 2 显示了分别靶向我们获得的 32 个 RNA 干扰靶点的 siRNA

表达质粒在与 HIV 感染性克隆质粒共转染实验中对 HIV 基因表达的抑制效果。结果显示, 这些 RNA 干扰靶点可抑制 HIV。

图 3 显示了构建获得的表达载体 pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 可有效表达所编码的 siRNA 序列, 且具有基因靶向特异性。pGL3-VIF 与表达载体 pDEST-VIF037 共转染时 luciferase 基因的表达受到了有效抑制, 而 pGL3-control 与表达载体 pDEST-VIF037 共转染时 luciferase 基因的表达不会受到抑制。pGL3-POL 分别与表达载体 pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 共转染时 luciferase 基因的表达受到了抑制, 而 pGL3-control 分别与表达载体 pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 共转染时 luciferase 基因的表达不会受到抑制。

图 4 显示了突变后的慢病毒包装载体的表达不会受到表达靶向 HIV 的 siRNA 的慢病毒表达载体的影响。

图 5 显示了经携带有靶向 HIV 的 siRNA 表达序列的重组慢病毒转导后的 HIV 受体细胞 MT-4 细胞对 HIV-1_{NL4-3} 复制的抑制作用。

图 6 显示了改造后的 HIV 受体细胞对 HIV-1_{NL4-3} 复制的抑制作用。

图 7 显示了合成的靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点的 siRNA 对 HIV 的抑制效果。siR-VIF037 转染后可抑制 HIV 在细胞中的复制表达。

图 8 显示了合成的并经 2'-Ome (2'-甲氧基) 修饰和/或磷酸化修饰和/或固醇修饰的靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点的 siRNA 对 HIV 的抑制效果。siRpo-VIF037、siRpo-POL1217、siRpoC-VIF037、siRpoC-POL1217 转染后可抑制 HIV 在细胞中的复制表达。

图 9 显示了靶向 HIV 的 siRNA 在 H²K-PBL-SCID 小鼠模型中具有抑制 HIV 复制的能力。VIF037 杂合小鼠可显示出抗 HIV 感染的

能力，相比对照组可显著降低血清中 HIV 蛋白的水平。

具体实施方式

除非特别说明，本发明的术语具有本领域通常使用的含义。

5 本发明提供了可高效靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点，包含如下序列或与其具有至少 70%（优选至少 80%、85%、90%、95%、98% 或更高）一致性的序列中的任何一个或几个序列：SEQ ID NO: 1 - 32。

10 一致性 (identity) 可以按照本领域公知的方法计算。适合于确定序列一致性和序列相似性百分数的算法的一个优选例子是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法，它们分别描述在 Altschul 等 (1977) Nucl. Acid. Res. 25: 3389-3402 和 Altschul 等 (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410。采用例如本文所述参数，BLAST 和 BLAST 2.0 可以用于确定本发明的多核苷酸和多肽的序列一致性百分数。执行 BLAST 分析的软件可以通过国立生物技术信息中心为公众所获得。

20 在其它实施方案中，所述 RNA 干扰靶点的序列具有在严紧条件下或者高度严紧条件与本文提供的多核苷酸、或其片段、或其互补序列能够杂交的多核苷酸序列。在分子生物学领域中杂交技术是熟知的。为了举例说明的目的，所述杂交的条件是严紧条件，例如与滤膜结合的 DNA 在 $6 \times$ 氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 中约 45°C 下杂交，之后在 $0.2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$ 中于约 $50 - 65^{\circ}\text{C}$ 下作一或多次洗涤；高度严紧条件，例如与滤膜结合的核酸在 $6 \times \text{SSC}$ 中约 45°C 下杂交，之后在 $0.1 \times \text{SSC}/0.2\% \text{ SDS}$ 中于约 68°C 下作一或多次洗涤；或本领域技术人员已知的其它严紧杂交条件（参见例如

25 Ausubel, F.M. 等编，1989, Current Protocols in Molecular Biology, 第 1 卷, Green Publishing Associates, Inc., 和 John

Wiley & Sons, Inc., 纽约, 第 6.3.1-6.3.6 和 2.10.3 页)。

本发明还涉及在严紧条件下或者高度严紧条件与 SEQ ID NO: 1-32 的任一序列、或其片段、或其互补序列能够杂交的核苷酸序列。

5 在本发明中, siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸可被设计成靶向目的基因或者调节序列, 例如需要抑制其表达的基因或其调控序列, 以便抑制或降低其表达。所针对的基因或其调控序列可以是需要抑制或降低其表达的任何基因或其调控序列, 例如来自病原体的、或者参与癌症形成和发展的那些, 特别
10 是靶向 HIV。本发明的 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸可按照常规方法设计。

“依据本发明 RNA 干扰靶点序列获得的 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸”指的是通过设计表达或设计合成等方式得到的 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸, 其所作用的靶序列 (可以
15 是 DNA 或 RNA 序列) 为或包含有本发明涉及的 RNA 干扰靶点序列。

siRNA 的常规设计方法可参考文献 (如: Reynolds A 等, 自然生物技术, 2004 年, 22 卷: 326-330) 或 Amhion、Qiagen 等公司网站的公开资料或实施例 1 中的描述。miRNA 的常规设计方法可参考文献 (Lo HL 等, 基因治疗, 2007 年, 14 卷: 1503-1512 页), 选择
20 靶序列的方法与 siRNA 的设计方法相似, 例如可将设计的含有靶序列的正义链及相应的反义链替换到 pri-microRNA 上, 使构建的 miRNA 可阻止含有靶序列的 mRNA 的表达。核酶的常规设计方法可参考文献 (Haseloff J 等, 自然, 1988 年, 334 卷: 585-591 页), 例如可将与靶序列的前后序列互补的核苷酸序列分别置于核酶保守性核心的序列 (如锤头结构) 前后, 使构建的核酶能在靶序列
25 处切割含有靶序列的核酸。反义寡核苷酸的常规设计方法可参考文献 (Matveeva OV 等, 核酸研究, 2003 年, 31 卷: 4989-4994 页)。

本发明使用的启动子可以是任何适于在目的细胞中表达目的基因的启动子。可以是组成型的，也可以是诱导型的。还可以是复合启动子，如双启动子。

“可操作地连接”是指所连接的分子的连接方式使得能够实现预期的功能。例如，表达控制序列与基因编码序列的可操作的连接可实现表达控制序列对基因编码序列的表达控制作用。

“表达控制序列”是实现基因表达所需要的控制序列，是本领域熟知的。通常必须包括启动子，常常也包括转录终止序列，也可以包含其他序列，如增强子序列。基因表达对于 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸等是指转录，也可以包括转录后加工；对于蛋白质编码序列通常是指转录和翻译，产生成熟的蛋白质。

本发明提供可高效靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点以及根据该靶点设计的 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸。本发明的 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸包括对构成 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸的磷酸骨架和/或核糖和/或碱基等构成部分进行化学修饰的修饰产物，修饰方法是本领域已知的，可以为硫代修饰和/或固醇修饰和/或 PEG 修饰和/或糖修饰和/或 LNA 修饰等，可参见文献：Dykxhoorn DM 等，生物医学工程年度综述，2006 年，8 卷：377-402 页；Behlke MA 等，分子治疗，2006 年，13 卷：644-670 页等。

在一个具体实施方案中，本发明涉及小分子干扰核糖核酸 (siRNA)，其包括正义 RNA 片段和反义 RNA 片段，所述正义 RNA 片段包含本发明 RNA 干扰靶点编码的 RNA 序列，反义 RNA 片段和正义 RNA 片段能形成双链 RNA，且该双链 RNA 能抑制 HIV 相应基因的表达和/或 HIV 的复制和/或感染。

在本发明中，术语“小分子核糖核酸”、“小分子干扰核糖核酸”或“siRNA”可互换使用，它们都指能够抑制 HIV 靶基因表

达、包括正义 RNA 片段区域和反义 RNA 片段区域的核糖核酸(RNA)。

相关地,本发明还提供 DNA 序列的组合,其包括或者由编码正义 RNA 片段的第一 DNA 序列和编码反义 RNA 片段的第二 DNA 序列组成,所述正义 RNA 片段包含本发明靶序列所编码的 RNA 序列,反义 RNA 片段和正义 RNA 片段能形成双链 RNA,且该双链 RNA 能(通过 RNA 干扰)抑制 HIV 基因的表达和/或 HIV 的复制和/或感染。

在本发明的这方面,所述正义 RNA 片段和反义 RNA 片段可以存在于两条不同的 RNA 链上或者存在于一条 RNA 链上,例如在一个单链 RNA 分子包含正义 RNA 片段和反义 RNA 片段。

例如,本发明的 siRNA 可以为发夹型单链 RNA 分子,其中正义 RNA 片段和反义 RNA 片段之间的互补区域形成双链 RNA 区域。

正义 RNA 片段和反义 RNA 片段的长度优选为 8-50 个核苷酸,优选 10-30 (更优选 15-27, 19-23, 如 19、20 或者 21) 个。但也可以更长或者更短。

在正义 RNA 片段和反义 RNA 片段形成的双链 RNA 的互补区域至少有 10 个 (优选 15 个,更优选 18 个,如 19、20 或者 21 个) 碱基对。优选地,所述正义 RNA 片段与反义 RNA 片段之间的互补区域含 19、20、或 21 对互补碱基。

在一个实施方案中,在正义 RNA 片段和反义 RNA 片段之间允许有少量的错配,例如 1-5 个,如 1 个或 2 个或 3 个或 4 个碱基错配。在一个优选实施方案中,正义 RNA 片段和反义 RNA 片段完全互补。

在一个实施方案中,本发明的 siRNA 为具有 10-30 (优选, 15-27, 更优选 19-23) 对碱基的双链 RNA 分子,所述双链中至少有 10 个 (优选 15 个,更优选 18 个) 碱基互补配对。

在一个优选的实施方案中,正义 RNA 片段和反义 RNA 片段的 GC 含量为 35%-75%,例如 40-60%、45-55%、48-52%,如

约 50%。

在一个优选的实施方案中，正义 RNA 片段和反义 RNA 片段与已知人类基因和基因表达片段无显著的一致性。显著的一致性是指至少 60%，例如 70、80、90% 一致性。

5 优选的是，所述正义 RNA 片段自 5'端开始的 19 个核苷酸序列中的碱基为鸟嘌呤 (G) 的核苷酸数量与碱基为胞嘧啶 (C) 的核苷酸数量之和占除去 3'端的 TT 以外的 19 个核苷酸数量的比例为 35% - 75% (即 G/C 比例)，所述反义 RNA 片段及其一个核苷酸的突变体与已知人类基因和基因表达片段无显著一致性。

10 在本发明重组表达载体的一个实施方案中，本发明重组表达载体包含本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列，这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接，使得可在动物细胞 (特别是哺乳动物细胞，如人细胞，如 HIV 受体细胞和干细胞) 中表达所述靶向 HIV 的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

15 类似地，在制备本发明改造细胞的方法中，可以通过用包含本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列的表达载体转化或转染或转导细胞 (包括动物例如哺乳动物优选人的细胞，优选 HIV 受体细胞和干细胞，如 CD4+细胞和 CD34+细胞) 来获得本发明改造细胞，只要最终得到的细胞包含本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列即可。

20 也可以通过在所述细胞中导入包含有由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸来获得本发明改造细胞，只要得到的细胞包含有由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸即可。

本发明的重组表达载体可以是质粒载体或病毒载体，例如逆

转录病毒载体, 包括慢病毒载体。优选地, 所述重组表达载体是逆转录病毒载体, 更优选慢病毒载体。

本发明的改造的细胞优选是哺乳动物(优选人)的细胞, 优选 HIV 受体细胞, 如 CD4+细胞, 优选干细胞, 特别是造血干细胞, 如 CD34+细胞。所述细胞在基因组中或基因组外携带本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列, 这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接, 使得可在该细胞中表达所述 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

本发明的重组载体和改造细胞可以用于对 HIV 感染的治疗。

在具体的实施方案中, 涉及以下内容:

1. 靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点序列:

siGAG0942 :	AAATTGGATGACAGAAACC	(SEQ ID NO.1)
siGAG1091 :	CTGAAGCAATGAGCCAAGT	(SEQ ID NO.2)
siGAG1273 :	GATTGTACTGAGAGACAGGCT	(SEQ ID NO.3)
siPOL0922 :	TGGAAAGGATCACCAGCAA	(SEQ ID NO.4)
siPOL0927 :	AGGATCACCAGCAATATTC	(SEQ ID NO.5)
siPOL0937 :	GCAATATTCCAGTGTAGCA	(SEQ ID NO.6)
siPOL1026 :	GTATGTAGGATCTGACTTA	(SEQ ID NO.7)
siPOL1102 :	GGATTTACCACACCAGACA	(SEQ ID NO.8)
siPOL1131 :	GAAAGAACCTCCATTCCTT	(SEQ ID NO.9)
siPOL1217 :	GCTGGACTGTCAATGACAT	(SEQ ID NO.10)
siPOL1223 :	CTGTCAATGACATACAGAA	(SEQ ID NO.11)
siPOL1402 :	CCGGTACATGGAGTGTATT	(SEQ ID NO.12)
siPOL1411 :	GGAGTGTATTATGACCCAT	(SEQ ID NO.13)
siPOL1468 :	GGCCAATGGACATATCAAA	(SEQ ID NO.14)
siPOL1470 :	CCAATGGACATATCAAATT	(SEQ ID NO.15)
siPOL1544 :	CCCACACTAATGATGTGAA	(SEQ ID NO.16)
siPOL1548 :	CACTAATGATGTGAAACAA	(SEQ ID NO.17)
siPOL1550 :	ACACTAATGATGTGAAACAATT	(SEQ ID NO.18)
siPOL1734 :	GAAGTTATGGTACCAGTTA	(SEQ ID NO.19)
siPOL1762 :	CCCATAATAGGAGCAGAAA	(SEQ ID NO.20)
siPOL2008 :	TCAGAGTTAGTCAGTCAAA	(SEQ ID NO.21)

siPOL2252 : TAGTAGCCAGCTGTGATAA (SEQ ID NO.22)
 siVIF009 : CAGATGGCAGGTGATGATT (SEQ ID NO.23)
 siVIF037 : GTAGACAGGATGAGGATTA (SEQ ID NO.24)
 siVIF038 : TAGACAGGATGAGGATTAA (SEQ ID NO.25)
 siGAG0432 : TCAGGCCATATCACCTAGA (SEQ ID NO.26)
 siGAG0738 : AATAGGATGGATGACACAT (SEQ ID NO.27)
 siGAG1438 : GGAGCCGATAGACAAGGAA (SEQ ID NO.28)
 siPOL1327 : GCACTAACAGAAGTAGTAC (SEQ ID NO.29)
 siVIF090 : TATTTCAAGGAAAGCTAAG (SEQ ID NO.30)
 siVIF344 : TTTCAGAATCTGCTATAAG (SEQ ID NO.31)
 siVPU164 : GAGTGAAGGAGAAGTATCA (SEQ ID NO.32)

2. 表达载体, 优选慢病毒载体, 可用于改造HIV受体细胞或造血干细胞。

A. 一个可表达 *MGMT* (P140K) 基因和单个或多个 siRNAs、和/或 miRNAs、和/或靶向HIV的核酶的重组慢病毒载体。

5 B. 一个改造后的用于生产慢病毒载体的包装载体 (如包装质粒),

其含有突变后的来源于HIV的用于表达包装蛋白的基因序列。

改造序列的例子为:

包装载体: -----GTAGACAGGATGAGGATTA-----

10 突变为: -----GTAGACAGGACGAAGATTA-----

包装载体: -----GGATTTACCACACCAGACA-----

突变为: -----GGATTTACCACCCCGACA-----

15 包装载体: -----GCTGGACTGTCAATGACAT-----

突变为: -----GCTGGACTGTGAACGACAT-----

包装载体: -----GCACTAACAGAAGTAGTAC-----

突变为: -----GCACTAACAGAAGTGGTGC-----

包装载体: -----TAGTAGCCAGCTGTGATAA-----

突变为: -----TAGTAGCCAGCTGCGACAA-----

5

该慢病毒在HIV受体细胞和/或造血干细胞上的应用。

A. 可用于稳定表达抗HIV的分子, 如可在HIV受体细胞和/或造血干细胞中特异阻断HIV复制的siRNA。

B. 可用于防止造血干细胞被BG/BCNU杀死。

10

3. 改造的细胞, 如 HIV 受体细胞和造血干细胞, 其包含有本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列, 可表达所述的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸; 或被导入了由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

15

RNA 干扰靶点的序列 (SEQ ID NO: 1-32)

实施例

实施例 1. siRNA 表达质粒的设计与构建

20

靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点序列的设计: 以 HIV 参考序列为靶序列, 选择保守性好的区域进行步移设计 siRNA 序列; 将初选获得的 siRNA 序列在 GenBank 中进行 BLAST 检索, 选择与非靶向序列具有 3 个或 3 个以上碱基相异的序列作为候选序列。

25

siRNA 表达质粒的构建: siRNA 的表达载体为 pSUPER 载体 (oligoengine 公司 Cat.No VEC-PBS-0001/0002), 具体的构建过程可参见该公司的 pSUPER 载体实验指南 (www.oligoengine.com), 构建简要流程可见示意图 1。分别合

成带有 RNA 干扰序列的引物，将互补引物经退火处理后连接到经 Bgl II 和 Hind III 双酶切的 pSUPER 载体，经酶切和测序鉴定获得正确的 siRNA 表达质粒。

对照 siRNA 表达质粒的构建：以特异靶向 luciferase 基因的 siRNA 序列 siRNA-luc(具体序列是 5'-GTGCGCTGCTGGTGCCAAC-3') 以及不与 HIV 和人类基因相匹配的无关 siRNA 序列 siRNA-Nk(具体序列是 5'-TGCATCGGAAAATAGATGT-3') 作为对照。通过上述方法合成引物构建至 pSUPER 载体上，经酶切和测序鉴定后获得相应的 siRNA 表达质粒。

实施例 2. 共转染实验筛选获得可高效抑制 HIV 的 RNA 干扰靶点

pNL4-3 质粒(来自于巴斯德研究所；也可以使用其它的 I 型 HIV 感染性克隆质粒)是 I 型 HIV 的感染性克隆质粒，在转染合适的哺乳细胞后(如 293FT 细胞)具有可表达 HIV 病毒蛋白及病毒粒子的能力。p24 是 HIV 病毒的壳蛋白，通过检测细胞培养上清中的 p24 蛋白的含量可以反映病毒蛋白和病毒粒子的表达水平，也与病毒效价呈正相关。因此可将 siRNA 表达质粒分别和 HIV 感染性克隆质粒(pNL4-3 质粒)在 293FT 细胞中进行共转染实验，通过检测共转染后细胞的 p24 蛋白的表达水平来对不同 siRNA 抑制 HIV-1 复制的效率进行检验。

293FT 细胞(Invitrogen, Catalog# R700-07)培养于 24 孔细胞培养板中，汇合率约为 70%。12h 后每孔细胞转染 0.1 μ g pNL4-3 质粒和 1 μ g 的 siRNA 表达质粒，转染试剂为 Lipofectamine 2000(Invitrogen Cat.No 11668-027)，转染方法参见该试剂的操作指南。在共转染 48h 后分别收集细胞培养上清，经梯度稀释后用 Murex HIV Antigen Mab(Cat.No. 8E77-02)检测细胞培养上清中 p24 蛋白的活性。以共转染了对照 siRNA 表达质粒和 HIV

感染性克隆质粒的 293FT 细胞的培养上清中的 p24 蛋白含量为对照，计算各 siRNA 对 HIV 的抑制效率。通过比较，获得了 32 个具有高效抑制能力的 RNA 干扰靶点。附图 2 显示了分别以这 32 个 RNA 干扰靶点序列构建获得的 siRNA 表达质粒在转染入细胞后对 HIV 病毒基因表达的抑制效率。

下面是我们获得的可用于有效抑制 HIV 的 RNA 干扰靶点序列：

siGAG0942	:	AAATTGGATGACAGAAACC	(SEQ ID NO.1)
siGAG1091	:	CTGAAGCAATGAGCCAAGT	(SEQ ID NO.2)
siGAG1273	:	GATTGTACTGAGAGACAGGCT	(SEQ ID NO.3)
siPOL0922	:	TGGAAAGGATCACCAGCAA	(SEQ ID NO.4)
siPOL0927	:	AGGATCACCAGCAATATTC	(SEQ ID NO.5)
siPOL0937	:	GCAATATTCCAGTGTAGCA	(SEQ ID NO.6)
siPOL1026	:	GTATGTAGGATCTGACTTA	(SEQ ID NO.7)
siPOL1102	:	GGATTTACCACACCAGACA	(SEQ ID NO.8)
siPOL1131	:	GAAAGAACCTCCATTCTT	(SEQ ID NO.9)
siPOL1217	:	GCTGGACTGTCAATGACAT	(SEQ ID NO.10)
siPOL1223	:	CTGTCAATGACATACAGAA	(SEQ ID NO.11)
siPOL1402	:	CCGGTACATGGAGTGTATT	(SEQ ID NO.12)
siPOL1411	:	GGAGTGTATTATGACCCAT	(SEQ ID NO.13)
siPOL1468	:	GGCCAATGGACATATCAAA	(SEQ ID NO.14)
siPOL1470	:	CCAATGGACATATCAAATT	(SEQ ID NO.15)
siPOL1544	:	CCCACACTAATGATGTGAA	(SEQ ID NO.16)
siPOL1548	:	CACTAATGATGTGAAACAA	(SEQ ID NO.17)
siPOL1550	:	ACACTAATGATGTGAAACAATT	(SEQ ID NO.18)
siPOL1734	:	GAAGTTATGGTACCAGTTA	(SEQ ID NO.19)
siPOL1762	:	CCCATAATAGGAGCAGAAA	(SEQ ID NO.20)
siPOL2008	:	TCAGAGTTAGTCAGTCAAA	(SEQ ID NO.21)

siPOL2252	:	TAGTAGCCAGCTGTGATAA	(SEQ ID NO.22)
siVIF009	:	CAGATGGCAGGTGATGATT	(SEQ ID NO.23)
siVIF037	:	GTAGACAGGATGAGGATTA	(SEQ ID NO.24)
siVIF038	:	TAGACAGGATGAGGATTAA	(SEQ ID NO.25)
siGAG0432	:	TCAGGCCATATCACCTAGA	(SEQ ID NO.26)
siGAG0738	:	AATAGGATGGATGACACAT	(SEQ ID NO.27)
siGAG1438	:	GGAGCCGATAGACAAGGAA	(SEQ ID NO.28)
siPOL1327	:	GCACTAACAGAAAGTAGTAC	(SEQ ID NO.29)
siVIF090	:	TATTTCAAGGAAAGCTAAG	(SEQ ID NO.30)
siVIF344	:	TTTCAGAATCTGCTATAAG	(SEQ ID NO.31)
siVPU164	:	GAGTGAAGGAGAAGTATCA	(SEQ ID NO.32)

通过上面的实验,我们证明了本发明的32个RNA干扰靶点可用于高效抑制HIV表达。

在以下的实验中,我们从上述RNA干扰靶点选取了siVIF037、
 5 siPOL1102、siPOL1217、siPOL1327、siPOL2252为例,进一步分别构建可表达靶向siVIF037、siPOL1102、siPOL1217、siPOL1327、siPOL2252的siRNA的重组慢病毒,构建方法见实施例3和实施例4。

实施例3. 表达siRNA的表达载体和慢病毒包装载体的构建

10 表达载体: 在该实施例中,我们使用的慢病毒系统的表达载体pDEST-MR(专利申请号: 200510112917.1;公开号: CN1948475)包含了由mPGK启动子控制的*MGMT* (P140K)基因及一个由H1启动子控制的可用于表达siRNA的表达框。

表达载体pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、
 15 pDEST-POL1327、pDEST-POL2252的构建方法:

分别合成 VIF037、POL1102、POL1217、POL1327、POL2252基因片段(这里分别包括了实施例2中所示的RNA干扰靶点序列

siVIF037 (SEQ ID NO: 24)、siPOL1102 (SEQ ID NO: 8)、siPOL1217 (SEQ ID NO: 10)、siPOL1327 (SEQ ID NO: 29)、siPOL2252 (SEQ ID NO: 22) 作为示例, 但是也可以包括其他本发明提供的 RNA 干扰靶点序列), 片段的 5'端添加 Age I 位点, 3'端添加 Sma I 位点; 基因片段经 Age I、Sma I 酶切后与经同样酶切的 pDEST-MR 质粒连接, 构建获得表达载体 pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252。

我们对构建获得的重组慢病毒表达载体 pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 的表达有效性进行了验证。在 pGL3-control 质粒 (购自 Promega 公司) 的 luciferase 基因的终止密码子与 PolyA 之间分别插入 VIF 基因序列、POL 基因序列构建了报告质粒 pGL3-VIF、pGL3-POL。以靶向 luciferase 的 siRNA-luc 表达质粒和靶向无关序列的 siRNA-Nk 表达质粒作为对照, 进行共转染抑制实验。结果如图 3 所示, pGL3-VIF 与表达载体 pDEST-VIF037 共转染时 luciferase 基因的表达受到了有效抑制, 而 pGL3-control 与表达载体 pDEST-VIF037 共转染时 luciferase 基因的表达不会受到抑制; pGL3-POL 分别与表达载体 pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 共转染时 luciferase 基因的表达受到了有效抑制, 而 pGL3-control 分别与表达载体 pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 共转染时 luciferase 基因的表达不会受到抑制。结果说明构建获得的表达载体 pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 可表达所编码的 siRNA 序列, 且具有基因靶向特异性。

慢病毒包装载体的改造: 由于慢病毒载体主要来源于 HIV-1。

慢病毒载体的体外包装需要几种HIV-1蛋白如HIV *POL*和*GAG*基因的产物。由于我们需要用慢病毒作为靶向HIV-1的siRNA的表达载体,为了防止表达载体上表达的siRNA会抑制慢病毒包装载体的表达,即为了正常获得重组慢病毒,在该实施例中我们对包装载体上
 5 来源于HIV-1的基因序列进行了相应的突变。因此,包装细胞中的由包装载体转录出的mRNA不会被所需要表达的siRNA(如本次实施例中作为示例所选的分别靶向siVIF037、siPOL1102、siPOL1217、siPOL1327、siPOL2252的siRNA)所降解。

包装载体的序列突变情况如下所示:

10 包装载体: -----GTAGACAGGATGAGGATTA-----
 突变为 -----GTAGACAGGACGAAGATTA-----

包装载体: -----GGATTTACCACACCAGACA-----
 突变为: -----GGATTTACCACCCCGACA-----

15 包装载体: -----GCTGGACTGTCAATGACAT-----
 突变为: -----GCTGGACTGTGAACGACAT-----

包装载体: -----GCACTAACAGAAGTAGTAC-----
 20 突变为: -----GCACTAACAGAAGTGGTGC-----

包装载体: -----TAGTAGCCAGCTGTGATAA-----
 突变为: -----TAGTAGCCAGCTGCGACAA-----

25 为了验证突变后的包装载体的表达是否会受表达载体所表达的siRNA的影响。我们进行了共转染验证实验,结果如附图4所示,突变后的包装载体的表达不会受到表达载体pDEST-VIF037、

pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 的影响。

5 实施例 4. 表达 siRNA 的重组慢病毒的构建及对 HIV 受体细胞的基因转移效率

除可表达靶向 HIV 的 siRNA 的表达载体质粒和经突变改造的包装载体质粒 pLP1-M1, 构建重组慢病毒所需的其它质粒为 pLP2、VSVG, 从 Invitrogen 公司购买, 品名为: pLenti4/V5-DEST Gateway Vector Kit, 货号: V469-10。

10 重组慢病毒的制备方法:

(1) 用氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心法大量提取四种质粒 pVSVG、pLP1-M1、pLP2、表达载体质粒(如该实施例中作为示例的 pDEST-VIF037 质粒、pDEST-POL1102 质粒、pDEST-POL1217 质粒、pDEST-POL1327 质粒、pDEST-POL2252 质粒)(提取方法参见《分子克隆实验指南》, J. 萨姆布鲁克 D.W. 拉塞尔 著, 科学出版社, 2002);

(2) 293FT 细胞培养于 DMEM 培养基中(添加 10%FBS, 2mM L-glutamine, 0.1mM MEM Non-Essential Amino Acids 及 1% penicillin-streptomycin);

20 (3) 将 293FT 细胞培养于直径 10cm 的细胞培养板上, 汇合率约 70%。12h 后用磷酸钙转染方法介导 10 μ g pLP1、10 μ g pLP2、10 μ g pVSVG、20 μ g 表达载体质粒共 4 种质粒进行共转染(方法参见《分子克隆实验指南》, J. 萨姆布鲁克 D.W. 拉塞尔 著, 科学出版社, 2002);

25 (4) 转染 48h 后收集细胞培养上清, 0.45 μ m 的滤膜过滤; 用 SW28 转头(BECKMAN 公司)以 25,000 rpm 在 4 $^{\circ}$ C 离心 90min;

(5) 弃去上清, 加 500 μ L PBS 溶解沉淀;

(6) 分装病毒收集液，贮存于-80℃备用。

MT-4 细胞是人源的 CD4 + T 淋巴细胞，可支持 HIV-1 的复制。将获得的重组慢病毒 Lenti-VIF037、Lenti-POL1102、Lenti-POL1217、Lenti-POL1327、Lenti-POL2252 以 moi=40 分别对 MT-4 细胞进行转导实验，培养 1 周后用免疫荧光染色和流式细胞仪检测靶细胞中 *MGMT* (P140K) 基因的表达效率 (表 1)。结果显示，重组慢病毒 Lenti-VIF037、Lenti-POL1102、Lenti-POL1217、Lenti-POL1327、Lenti-POL2252 可有效转导 MT-4 细胞。

重组慢病毒	对 MT-4 细胞的转导效率
Lenti-VIF037	65.02%
Lenti-POL1102	71.21%
Lenti-POL1217	70.63%
Lenti-POL1327	62.25%
Lenti-POL2252	75.18%

表 1

表 1 显示了重组慢病毒对 CD4+ HIV 受体细胞 MT-4 的转导效率。

实施例 5. 靶向 HIV 的 siRNA 通过重组慢病毒导入 HIV 受体细胞对 HIV 的抑制作用

我们应用 HIV 体外细胞感染模型验证 siRNA 抑制 HIV 的效果。

MT-4 细胞为人源的 CD4+T 淋巴细胞株，能够支持 HIV 的感染和复制，也可用于 HIV 的体外培养。

HIV-1_{NL4-5} 为 B 亚型、T 细胞嗜性的 HIV-1 病毒，可有效感染并在 MT-4 细胞中复制。

攻毒实验方法：慢病毒 Lenti-VIF037、Lenti-POL1102、Lenti-POL1217、Lenti-POL1327、Lenti-POL2252 以 $\text{moi} = 40$ 分别转导 MT-4 细胞，600g 离心 60min 后换液；带有靶向 luciferase 基因的 siRNA 表达元件的对照重组慢病毒 Lenti-luc（靶向 luciferase 基因的 siRNA 表达元件序列同实施例 1；按照实施例 3 和 4 的方法制备该对照病毒）以 $\text{moi} = 40$ 转导 MT-4 细胞，600g 离心 60min 后换液；转导后的 MT-4 细胞在 37℃ 培养 48h 后，分别以不同剂量的 HIV-1_{NL4-3}（100pg 和 500pg）进行攻毒实验，感染 12h 后换液培养；在感染后的不同的时间点采集细胞培养上清，用 Murex HIV Antigen Mab (Cat. No. 8E77-02) 检测试剂盒检测细胞培养上清中 p24 蛋白的含量。攻毒实验对照为未转导的 MT-4 细胞和对照重组慢病毒 Lenti-luc 转导的 MT-4 细胞。

结果如图 5 所示，重组慢病毒 Lenti-VIF037、Lenti-POL1102、Lenti-POL1217、Lenti-POL1327、Lenti-POL2252 转导后的 MT-4 细胞均可显示出抑制 HIV-1 复制的能力。这表明在携带有靶向 HIV 的 siRNA 表达序列的重组慢病毒载体转导后的 HIV 受体细胞中抗 HIV 的 siRNA 在这些细胞中进行了表达，从而导致对 HIV 的感染产生抗性。

实施例 6 改造获得可稳定表达靶向 HIV 的 siRNA 的 HIV 受体细胞

我们对重组慢病毒 Lenti-VIF037、Lenti-POL1102、Lenti-POL1217、Lenti-POL1327、Lenti-POL2252 转导后的 MT-4 细胞分别应用有限稀释方法进行克隆化筛选。由于慢病毒载体具有稳定整合能力，可将携带的靶向 HIV 的 siRNA 表达元件序列及药物筛选基因 *MGMT* (P140K) 表达元件序列整合至靶细胞基因组。通过筛选，用免疫荧光染色和流式细胞仪检测筛选后细胞中 *MGMT* (P140K) 基因的表达效率。结果如表 2 所示，经克隆化筛选后可在

超过 99%的细胞中检测到 *MGMT* (P140K) 基因的表达, 我们将改造后的细胞分别称为 MT-4-VIF037 细胞、MT-4-POL1102 细胞、MT-4-POL1217 细胞、MT-4-POL1327 细胞、MT-4-POL2252 细胞。

细胞	<i>MGMT</i> (P140K) 基因 的表达效率
MT-4-VIF037	99.90%
MT-4-POL1102	99.25%
MT-4-POL1217	99.92%
MT-4-POL1327	99.30%
MT-4-POL2252	99.21%

表 2

表 2 显示了药物筛选基因 *MGMT* (P140K) 在改造后的 HIV 受体细胞中的表达效率。

实施例 7 改造后的 HIV 受体细胞在高剂量 HIV 攻毒实验中对 HIV 的抑制作用

对经改造后的可表达靶向 HIV 的 siRNA 的 HIV 受体细胞进行高剂量的 HIV 攻毒实验。实验中 HIV-1_{NL4-3} 的攻毒剂量分别提高至 2500pg 和 12500pg。在攻毒后分别在不同的时间点采集细胞培养上清, 用 Murex HIV Antigen Mab (Cat. No. 8E77-02) 检测试剂盒检测细胞培养上清中 p24 蛋白的含量。结果显示 (图 6), 相比对照细胞, 经改造后的可稳定表达靶向 HIV 的 siRNA 的 HIV 受体细胞 (本实验中的 MT-4-POL1102 细胞、MT-4-POL1217 细胞、MT-4-POL1327 细胞、MT-4-POL2252 细胞、MT-4-VIF037 细胞) 在高攻毒条件可获得显著的抑制 HIV 的效果。这表明了经改造后的携带有靶向 HIV 的 siRNA 表达元件的 HIV 受体细胞具有了抑制 HIV 病毒复制表达的能力, 可对 HIV 的感染产生抗性。

实施例 8 化学合成的 siRNA 对 HIV 的抑制效果。

我们从上述 RNA 干扰靶点选取了 siVIF037 为例(这里包括了实施例 2 中所示的 RNA 干扰靶点序列 siVIF037 (SEQ ID NO. 24) 作为示例, 但是也可以包括其他本发明提供的 RNA 干扰靶点序列), 合成了可靶向 siVIF037 的 siRNA, siRNA 的正义 RNA 片段包含本发明靶序列 siVIF037 (SEQ ID NO. 24) 所编码的 RNA 序列, 反义 RNA 片段可与正义 RNA 片段互补形成双链 RNA (在本实施例中反义链与正义链完全互补, 但是也可以允许反义链和正义链有少量的错配, 如 1 个或 2 个或 3 个或 4 个), 在正义 RNA 片段和反义 RNA 片段的 3'末端分别添加 dTdT。合成好的 siRNA 命名为 siR-VIF037。通过相同方法合成了靶向 luciferase 基因的 siRNA (siR-luc) (siR-luc 的靶点序列同实施例 1) 作为对照。

siRNA 的合成方法简述如下: 采用 β -乙腈亚磷酸胺化学合成法, 使用全自动 DNA 合成仪分别合成 siRNA 的正义 RNA 片段和反义 RNA 片段, 合成好的正义 RNA 片段和反义 RNA 片段等摩尔比混合, 在 PCR 仪上经过变性、退火过程, 得到所需的 siRNA。

实验方法: 293FT 细胞培养于 24 孔细胞培养板中, 汇合率约为 70%。12h 后每孔细胞转染 0.1 μ g pNL4-3 质粒和 5ng 的化学合成的 siRNA, 转染试剂为 Lipofectamine 2000 (Invitrogen Cat.No 11668-027), 转染方法参见该试剂的操作指南。在共转染 48h 后分别收集细胞培养上清, 经梯度稀释后用 Murex HIV Antigen Mab (Cat.No. 8E77-02) 检测细胞培养上清中 p24 蛋白的活性。以共转染了 siR-luc 和 HIV 感染性克隆质粒的 293FT 细胞的培养上清中的 p24 蛋白含量为对照, 计算 siR-VIF037 对 HIV 的抑制效率。

结果如图 7 所示, 合成的 siR-VIF037 可抑制 HIV 在细胞内的

复制表达。

实施例 9. 化学合成并经修饰的 siRNA 对 HIV 的抑制效果

我们从上述 RNA 干扰靶点选取了 siVIF037、siPOL1217 为例
5 (这里分别包括了实施例 2 中所示的 RNA 干扰靶点序列 siVIF037
(SEQ ID NO.24), siPOL1217 (SEQ ID NO.10) 作为示例, 但是
也可以包括其他本发明提供的 RNA 干扰靶点序列), 合成了可
分别靶向 siVIF037、siPOL1217 的 siRNA, siRNA 的正义 RNA 片段
10 分别包含本发明靶序列 siVIF037 (SEQ ID NO.24), siPOL1217
(SEQ ID NO.10) 所编码的 RNA 序列, 反义 RNA 片段和正义 RNA
片段互补形成双链 RNA, 在正义 RNA 片段和反义 RNA 片段的 3' 末
端分别添加 dTdT。同时合成过程中分别采用了不同的修饰方式。
其中, siRpo-VIF037 和 siRpo-POL1217 为经过 2' -OMe 修饰(2'
-甲氧基修饰)和磷酸化修饰的分别靶向 siVIF037、siPOL1217 的
15 siRNA (合成方法: 采用 β -乙腈亚磷酸胺化学合成法, 使用全自
动 DNA 合成仪分别合成 siRNA 的正义 RNA 片段和反义 RNA 片段,
其中正义 RNA 片段和反义 RNA 片段的 5' 端三个碱基和 3' 端 dTdT
前面的三个碱基用 2' -OMe 修饰的单核苷酸合成, 反义 RNA 片段
的 5' 末端碱基进行磷酸化处理。合成好的正义 RNA 片段和反义
20 RNA 片段等摩尔比混合, 在 PCR 仪上经过变性、退火过程, 得到
所需的 siRNA); siRpoC-VIF037 和 siRpoC-POL1217 为经过 2'
-OMe 修饰和磷酸化修饰和固醇修饰的分别靶向 siVIF037、
siPOL1217 的 siRNA (合成方法同上, 不同的地方是在合成正义
RNA 片段时, 3' 端 dTdT 前面的三个碱基不进行 2' -OMe 修饰,
25 用含有胆固醇-氨基己酸-吡咯烷
(cholesterol-aminocaproic-acid-pyrrolidine)接头的 Glass
担体作为合成支持物, 在 3' 端 dTdT 前面的碱基通过硫代磷酸酯

连接胆固醇基团。其余步骤均与上述合成 siRpo-VIF037 和 siRpo-POL1217 的方法相同)。同时,分别合成了靶向不与 HIV 和人类基因相匹配的无关 RNA 干扰靶点 siRNA-Nk(序列同实施例 1)的并经同样修饰的 siRNA(siRpo-Nk 和 siRpoC-Nk)作为对照。
5 这里分别包括了对靶向实施例 2 中所示的 RNA 干扰靶点序列 siVIF037 (SEQ ID NO.24), siPOL1217 (SEQ ID NO.10) 的合成的 siRNA 进行 2' -OMe 修饰和/或磷酸化修饰和/或固醇修饰作为示例,但是也可以包括对靶向其他本发明提供的 RNA 干扰靶点序列的合成的 siRNA 进行其它不同方式的修饰。

10 实验方法: 293FT 细胞培养于 24 孔细胞培养板中,汇合率约为 70%。12h 后每孔细胞分别共转染 0.1 μ g pNL4-3 质粒和 5ng 合成并经修饰的 siRNA,转染试剂为 Lipofectamine 2000 (Invitrogen Cat.No 11668-027),转染方法参见该试剂的操作指南。在共转染 48h 后分别收集细胞培养上清,经梯度稀释后用
15 Murex HIV Antigen Mab(Cat.No. 8E77-02)检测细胞培养上清中 p24 蛋白的活性。分别以共转染了 siRpo-Nk、siRpoC-Nk 和 pNL4-3 质粒的 293FT 细胞的培养上清中的 p24 蛋白含量为对照,检测 siRpo-VIF037、siRpo-POL1217、siRpoC-VIF037、siRpoC-POL1217 对 HIV 的抑制效率。

20 结果如图 8 所示,合成的 siRpo-VIF037、siRpo-POL1217、siRpoC-VIF037、siRpoC-POL1217 均可抑制 HIV 在细胞内的复制表达。

实施例 10 在 H²K-PBL-SCID 小鼠模型上验证 siRNA 对 HIV 的抑制
25 效果。

我们从上述 RNA 干扰靶点选取了 siVIF037 为例(这里包括了实施例 2 中所示的 RNA 干扰靶点序列 siVIF037 (SEQ ID NO.24))

作为示例，但是也可以包括其他本发明提供的 RNA 干扰靶点序列），以慢病毒表达载体质粒 pDEST-MR（见实施例 3）为基础构建了质粒 pDEST-H²K-VIF037，该质粒具有 H²K 基因表达框和可表达靶向 siVIF037 的 siRNA 的表达框。同时进一步将 pDEST-H²K-VIF037 质粒上表达靶向 siVIF037 的 siRNA 的表达框替换为靶向 luciferase 的 siRNA（靶点序列同实施例 1）表达框，得到 pDEST-H²K-luc 质粒，作为对照。用 pDEST-H²K-VIF037 和 pDEST-H²K-luc 分别制备慢病毒 Lenti-H²K-VIF037 和 Lenti-H²K-luc（方法参见实施例 4）。

抽取人全血 40ml，用 Ficoll-paque plus（GE Healthcare cat. NO 17-1440-03）分离 PBMC 细胞后（方法见操作手册），在 AIM-V 培养基中（GIBCO cat. NO 12055）以 PHA 刺激培养 48h。然后，用慢病毒 Lenti-H²K-VIF037 和 Lenti-H²K-luc 分别转导 PHA 刺激的 PBMC 细胞（转导方法同实施例 5）。转导后的细胞在含有 IL-2 的 AIM-V 培养基中继续培养 72h。

用 MACSelect Kk transfected cell selection kit（Miltenyi Biotec cat. NO 130-091-986）分别分离上述被慢病毒 Lenti-H²K-VIF037 和 Lenti-H²K-luc 感染并稳定表达外源标记基因 H²K 的细胞（方法见操作手册）。阳性筛选细胞在含有 IL-2 的 AIM-V 培养基中继续培养 96h。

联合免疫缺陷型（SCID）小鼠（无菌级，7~8 周龄，体重约为 16~20g，每组 3 只小鼠），使用前 1 周腹腔注射 0.5ml 石蜡油，然后每只小鼠腹腔内注射经上述步骤获得后的 PBMC 细胞（ 5×10^5 /g 体重），得到 H²K-PBL-SCID 杂合小鼠。小鼠体内的人 PBMC 细胞如来源于 Lenti-H²K-VIF037 转导的细胞则简称其为 VIF037 杂合小鼠，如来源于 Lenti-H²K-luc 转导的细胞则简称其为 luc 杂合小鼠。

12h 后通过腹腔分别注射 HIV-1_{NL4-3} 到 VIF037 杂合小鼠和 luc 杂合小鼠体内。HIV-1_{NL4-5} 为 B 亚型、T 细胞嗜性的 HIV-1 病毒。感染病毒后 7d、14d 用眼球采血法采集 200 μ L 血液，经梯度稀释后用 Murex HIV Antigen Mab (Cat.No. 8E77-02) 检测细胞培养上清中 p24 蛋白的活性。以 luc 杂合小鼠体内的 p24 蛋白活性为实验对照。

结果如图 9 所示，VIF037 杂合小鼠具有抑制 HIV 复制的能力。

本领域的技术人员应当明了，尽管为了举例说明的目的本文描述了本发明的具体实施方案，但可以对其进行各种修改而不偏离本发明的精神和范围。因此，本发明的具体实施方案和实施例不应当视为限制本发明的范围。本发明仅受所附权利要求的限制。本申请中引用的所有文献均完整地并入本文作为参考。

权 利 要 求

1. 靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点序列，其选自：

(1) SEQ ID NO: 1 - 32 中任何一个所示的序列，或者

5 (2) 与 (1) 中序列具有至少 70% (优选至少 80%、85%、90%、95%、98% 或更高) 一致性的序列，或者

(3) 在严紧条件下或者高度严紧条件与 (1) 中序列能够杂交的核苷酸序列，或者

10 (4) 与 (1) 中序列仅有 1 - 3 个 (优选 1 - 2 个，更优选 1 个) 核苷酸不同的序列；或者

(5) 上述序列的片段或者互补序列。

2. 包含权利要求 1 的序列的核酸构建体或载体如表达载体。

3. 依据权利要求 1 所述的 RNA 干扰靶点序列获得的、能够抑制 HIV 相应基因的表达和/或 HIV 的复制和/或感染的 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸。

15 4. 一种重组表达载体，其可表达权利要求 3 的 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸。

5. 权利要求 4 的重组表达载体，其包含靶向 HIV 的 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸的编码核酸序列，这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接，使得可在动物细胞 (特别是哺乳动物细胞，如人细胞，优选 HIV 受体细胞和干细胞) 中表达所述的 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸。

20 6. 权利要求 4 或 5 的重组表达载体，其是质粒载体或病毒载体，例如逆转录病毒载体，包括慢病毒载体。

25 7. 改造后的用于生产逆转录病毒载体 (例如慢病毒载体) 的包装载体 (如包装质粒)，其含有来源于 HIV 的用于表达包装蛋白的基因序列，该序列具有如下突变之一：

包装载体: -----GTAGACAGGATGAGGATTA-----

突变为 -----GTAGACAGGACGAAGATTA-----

包装载体: -----GGATTTACCACACCAGACA-----

5 突变为: -----GGATTTACCACCCCGACA-----

包装载体: -----GCTGGACTGTCAATGACAT-----

突变为: -----GCTGGACTGTGAACGACAT-----

10 包装载体: -----GCACTAACAGAAGTAGTAC-----

突变为: -----GCACTAACAGAAGTGGTGC-----

包装载体: -----TAGTAGCCAGCTGTGATAA-----

突变为: -----TAGTAGCCAGCTGCGACAA-----

15

8. 转化或转染或转导了权利要求 4-6 任一项的重组表达载体的分离的细胞。

9. 转化或转染或转导了权利要求 7 的包装载体(如包装质粒)的细胞。

20

10. 一种改造的细胞(包括动物例如哺乳动物优选人的细胞, 优选 HIV 受体细胞和干细胞, 如 CD4+细胞和 CD34+细胞), 其可表达或包含有权利要求 3 的 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸。

25

11. 权利要求 10 的改造的细胞, 其在基因组中或者基因组外携带包含权利要求 1 中所述的 RNA 干扰靶点序列的编码核酸序列, 这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接, 使得可在该细胞(包括动物例如哺乳动物优选人的细胞, 优选 HIV 受体细胞和干

细胞, 如 CD4+细胞和 CD34+细胞) 中表达所述 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸。

12. 制备权利要求 8、10-11 任一项的细胞的方法, 包括用权利要求 4-6 的重组表达载体转化或转染或转导细胞(包括动物例如哺乳动物优选人的细胞, 优选 HIV 受体细胞和干细胞, 如 CD4+细胞和 CD34+细胞)。

13. DNA 序列的组合, 其包括或者由编码正义 RNA 片段的第一 DNA 序列和编码反义 RNA 片段的第二 DNA 序列组成, 所述正义 RNA 片段包含权利要求 1 的靶点序列所编码的 RNA 序列, 反义 RNA 片段和正义 RNA 片段能形成双链 RNA, 该双链 RNA 能抑制 HBV 基因的表达和/或 HBV 的复制和/或感染。

14. 小分子干扰核糖核酸 (siRNA), 其包括正义 RNA 片段和反义 RNA 片段, 所述正义 RNA 片段包含权利要求 1 的靶点序列编码的 RNA 序列, 反义 RNA 片段和正义 RNA 片段能形成双链 RNA, 且该双链 RNA 能抑制 HIV 相应基因的表达和/或 HIV 的复制和/或感染。

15. 权利要求 1 所述的 RNA 干扰靶点序列、或权利要求 2 的核酸构建体或载体、或权利要求 3 的 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、或权利要求 4-6 任一项的重组表达载体、或权利要求 8、10-11 任一项的细胞、或权利要求 14 的 siRNA 在制备治疗 HIV 感染或者 HIV 患者或者抑制 HIV 复制或者 HIV 基因表达的药物中的用途。

16. 治疗 HIV 感染或者 HIV 患者或者抑制 HIV 复制或者 HIV 基因表达的方法, 包括向患者给予治疗有效量的权利要求 1 所述的 RNA 干扰靶点序列、或权利要求 2 的核酸构建体或载体、或权利要求 3 的 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、或权利要求 4-6 任一项的重组表达载体、或权利要求 8、10-11 任一项的细

胞、或权利要求 14 的 siRNA。

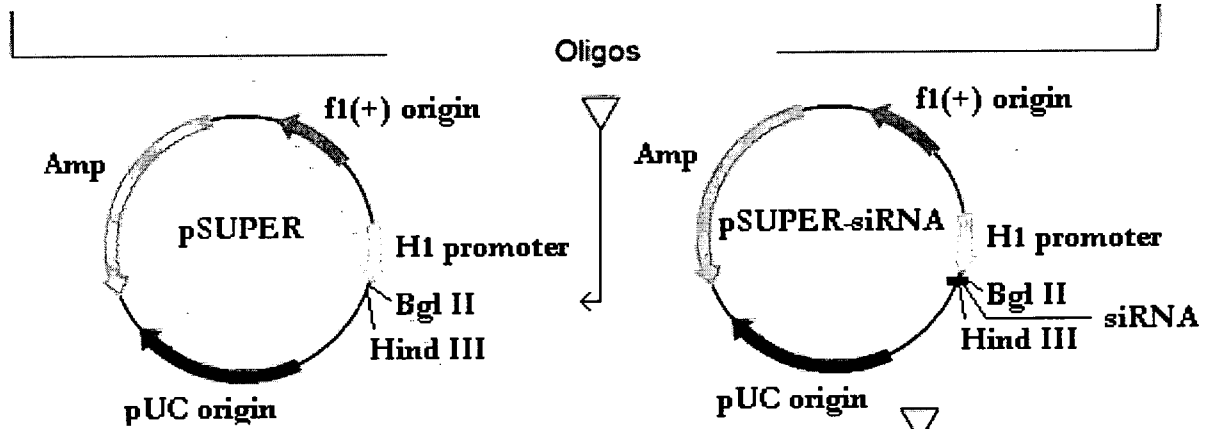
17. 权利要求 1 所述的 RNA 干扰靶点序列、或权利要求 2 的核酸构建体或载体、或权利要求 3 的 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、或权利要求 4-6 任一项的重组表达载体、或权利要求
5 8、10-11 任一项的细胞、或权利要求 14 的 siRNA, 用于治疗 HIV 感染或者 HIV 患者, 或者用于抑制 HIV 复制或者 HIV 基因表达。

18. 权利要求 1-4 任一项所述的 siRNA 靶序列在筛选抗 HIV 药物中的应用。

5

(Bgl II) 靶序列 (正义) (Hairpin) 靶序列 (反义)
 5' - GATCCCC GTAGACAGGATGAGGATTATTCAAGAGATAATCCTCATCCTGTCTACTTTTTTA -3'
 3' -GGG CATCTGTCCTACTCCTAATAAGTTCTCTATTAGGAGTAGGACAGATGAAAAATTCCA -5' (Hind III)

10



15

GUAGACAGGAUGAGGAUUAUUAAGAGAUAAUCCUCAUCCUGUCUACUU

20

GUAGACAGGAUGAGGAUUA^U^U^C^A
 UUCAUCUGUCCUACUCCUAAU^A^G^A^G

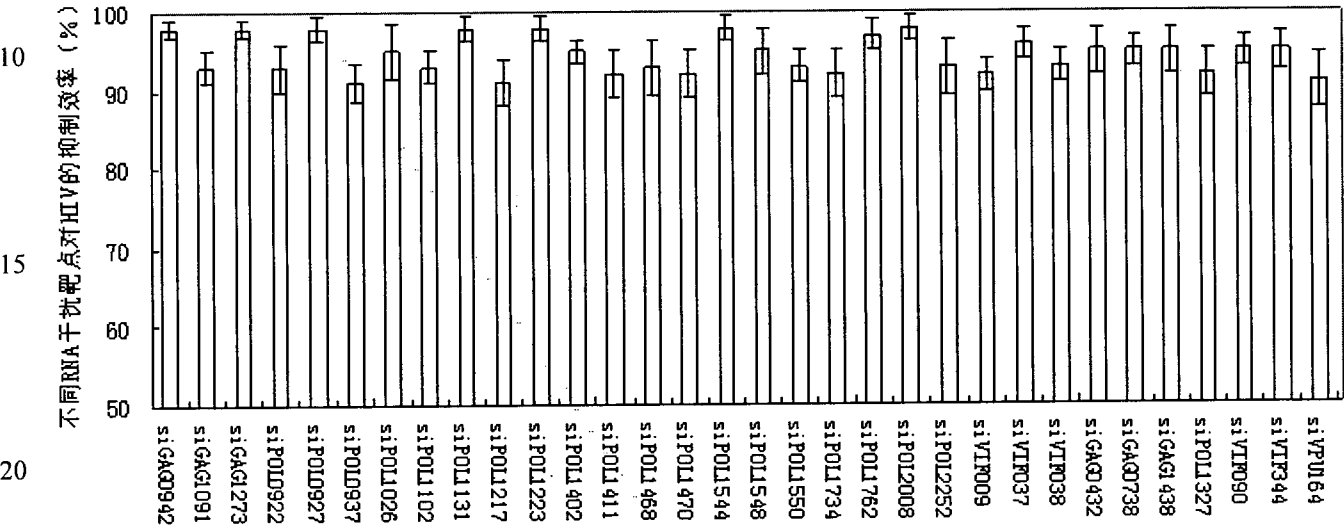


RNA 干扰作用途径

FIG. 1

25

5



25

FIG. 2

30

35

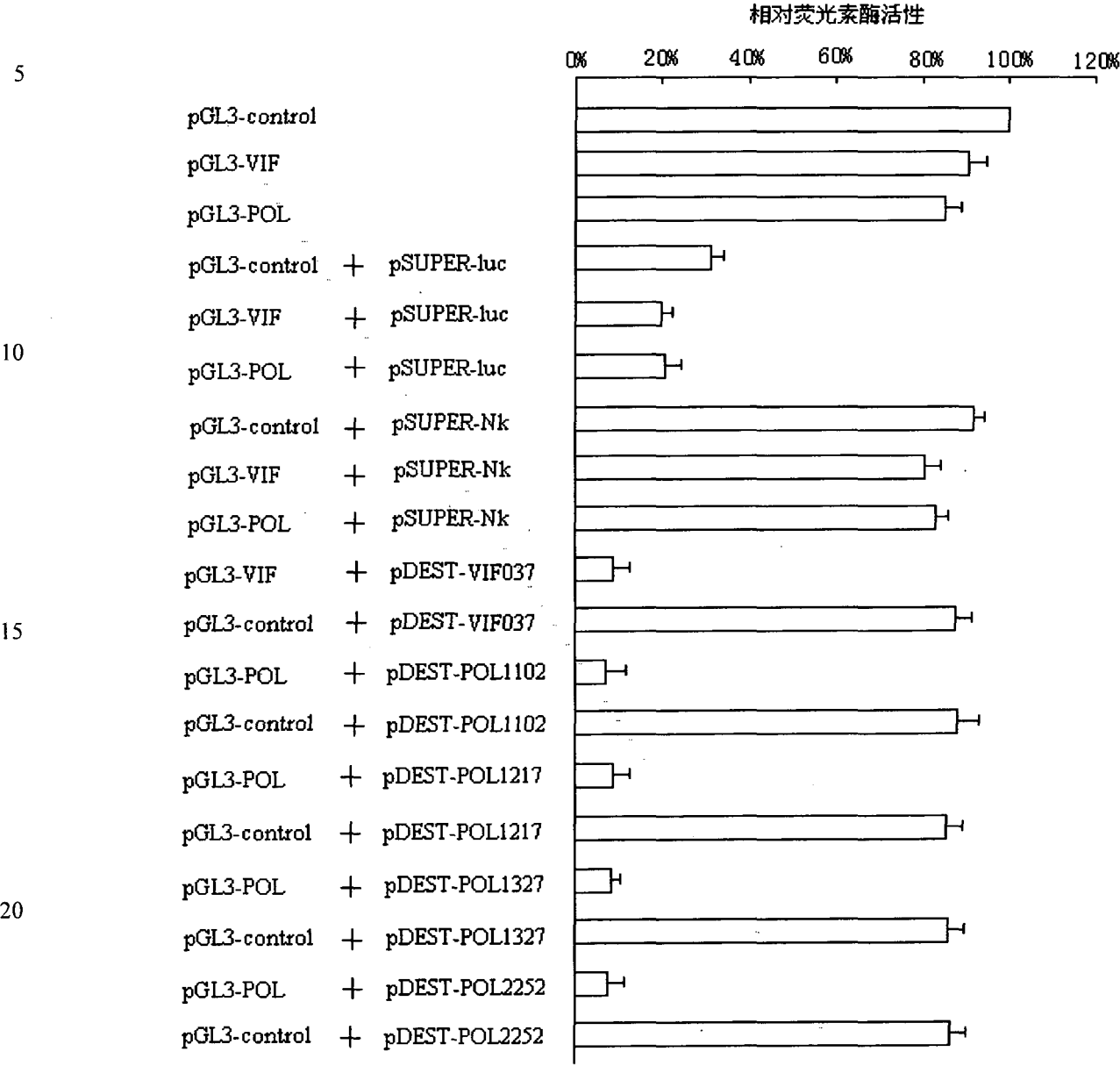


FIG. 3

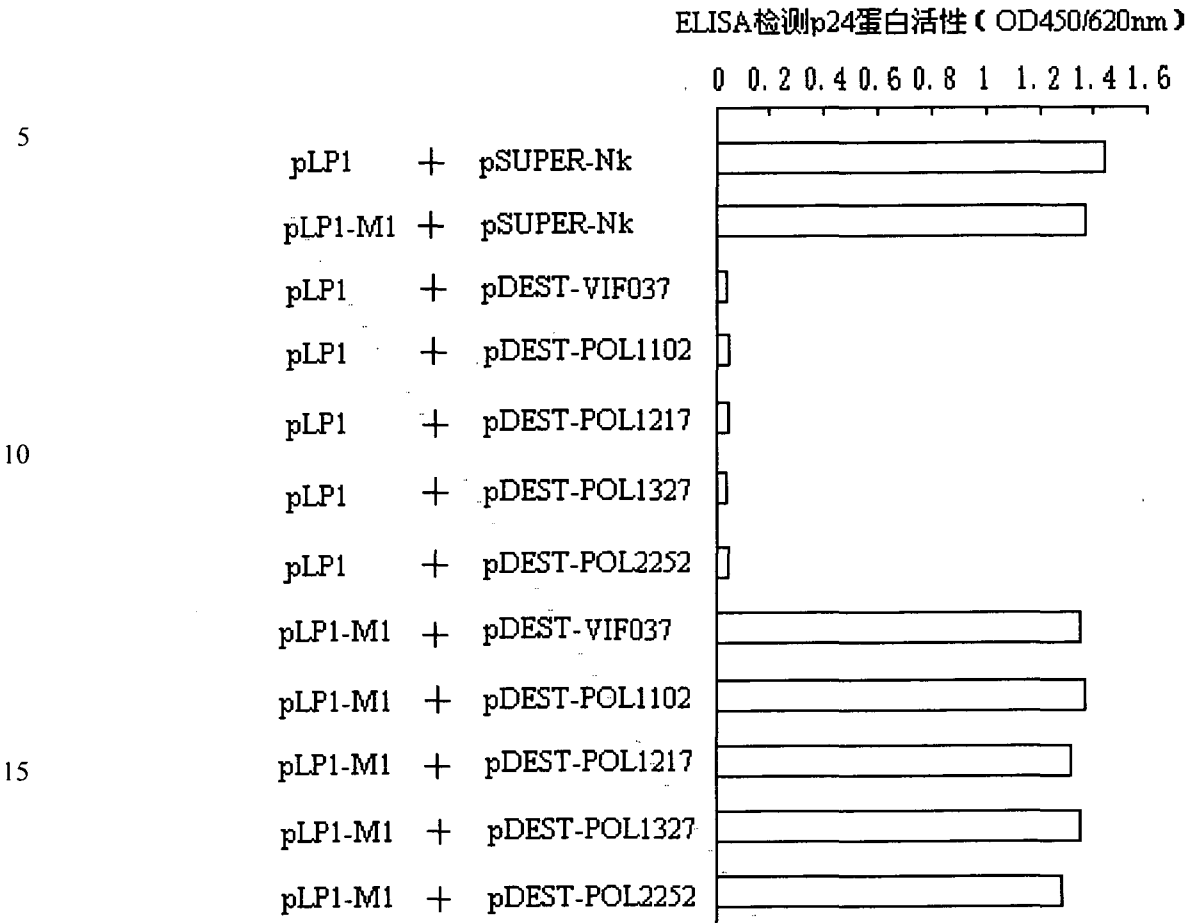


FIG. 4

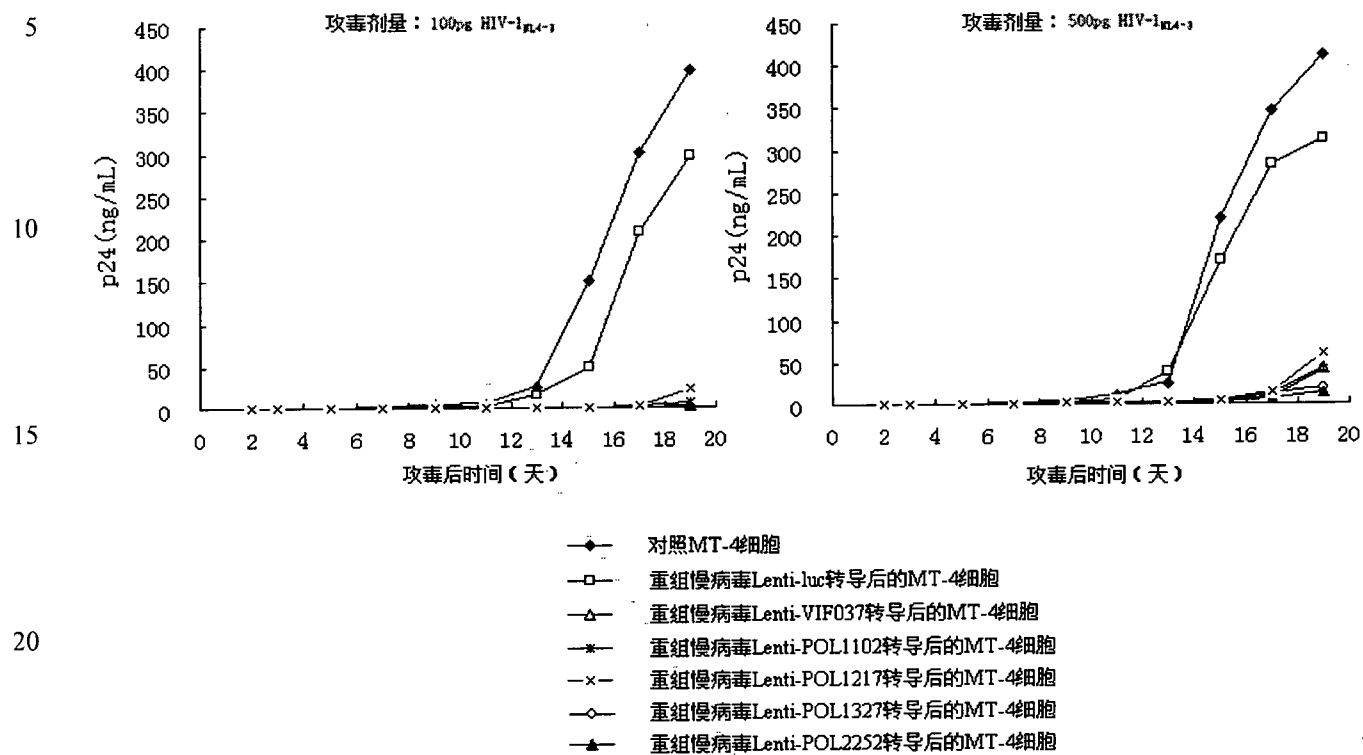


FIG. 5

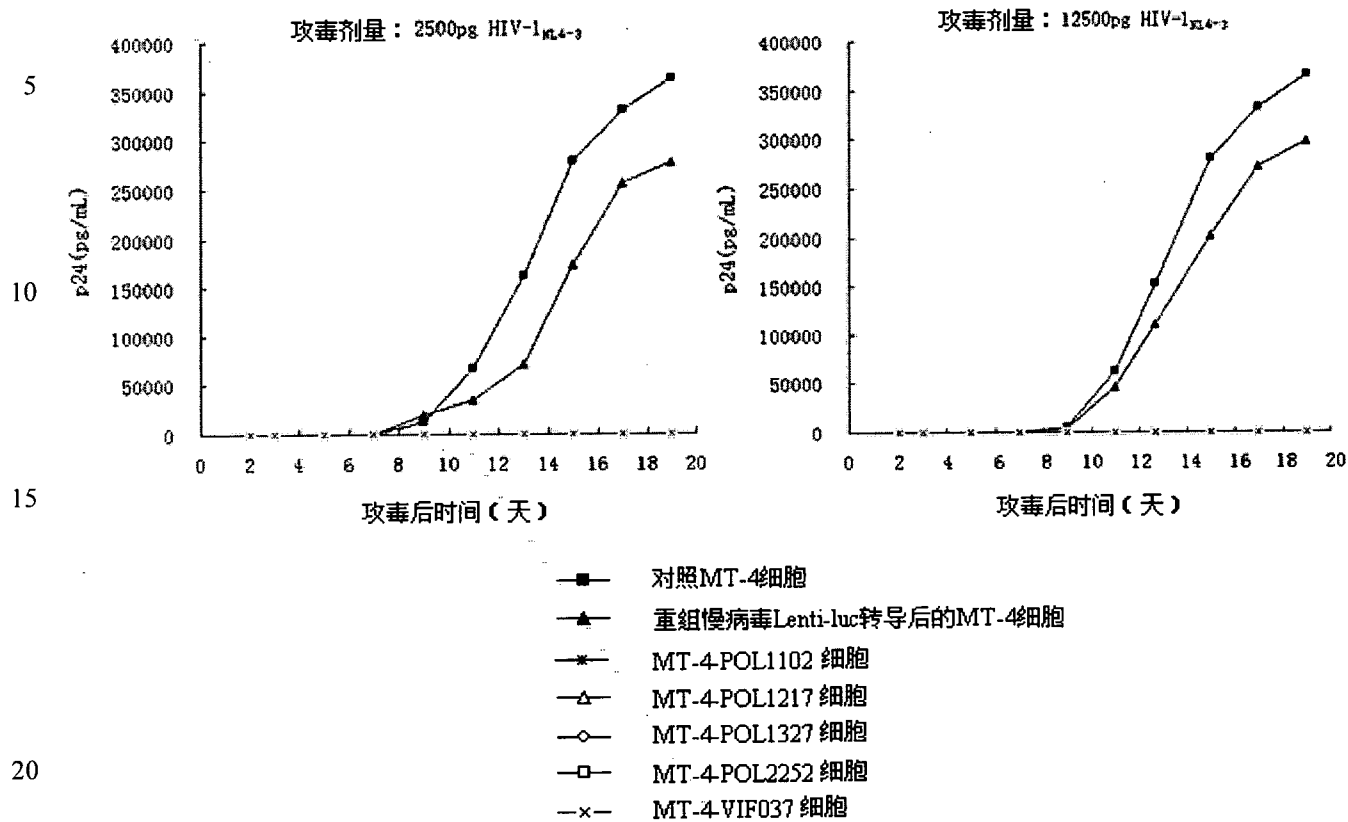


FIG. 6

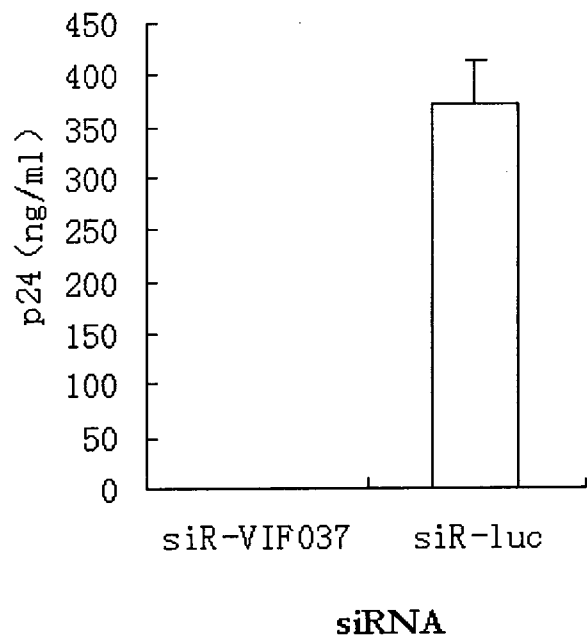


FIG. 7

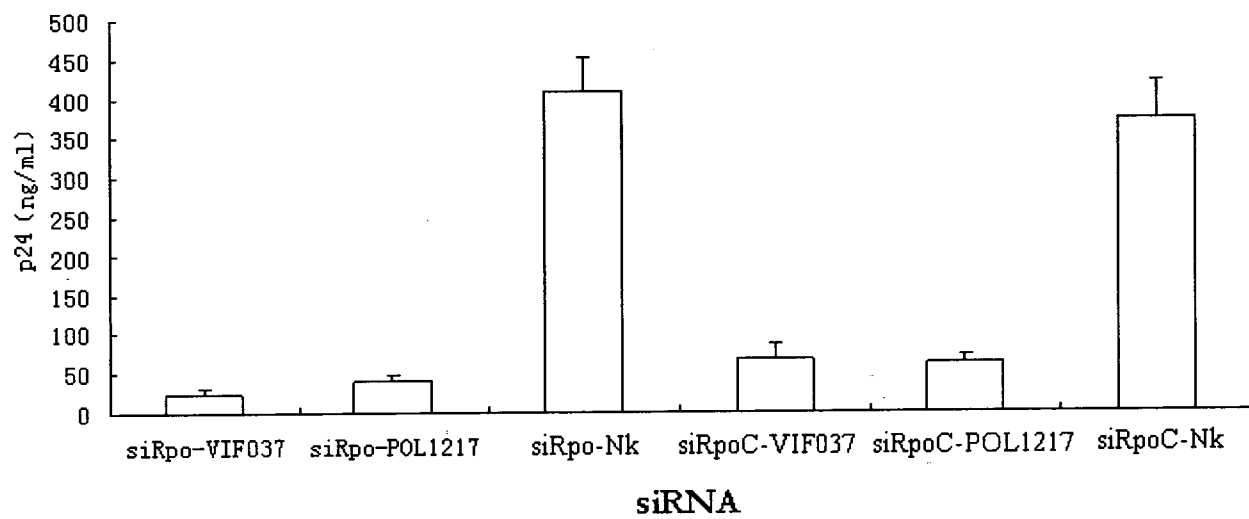


FIG. 8

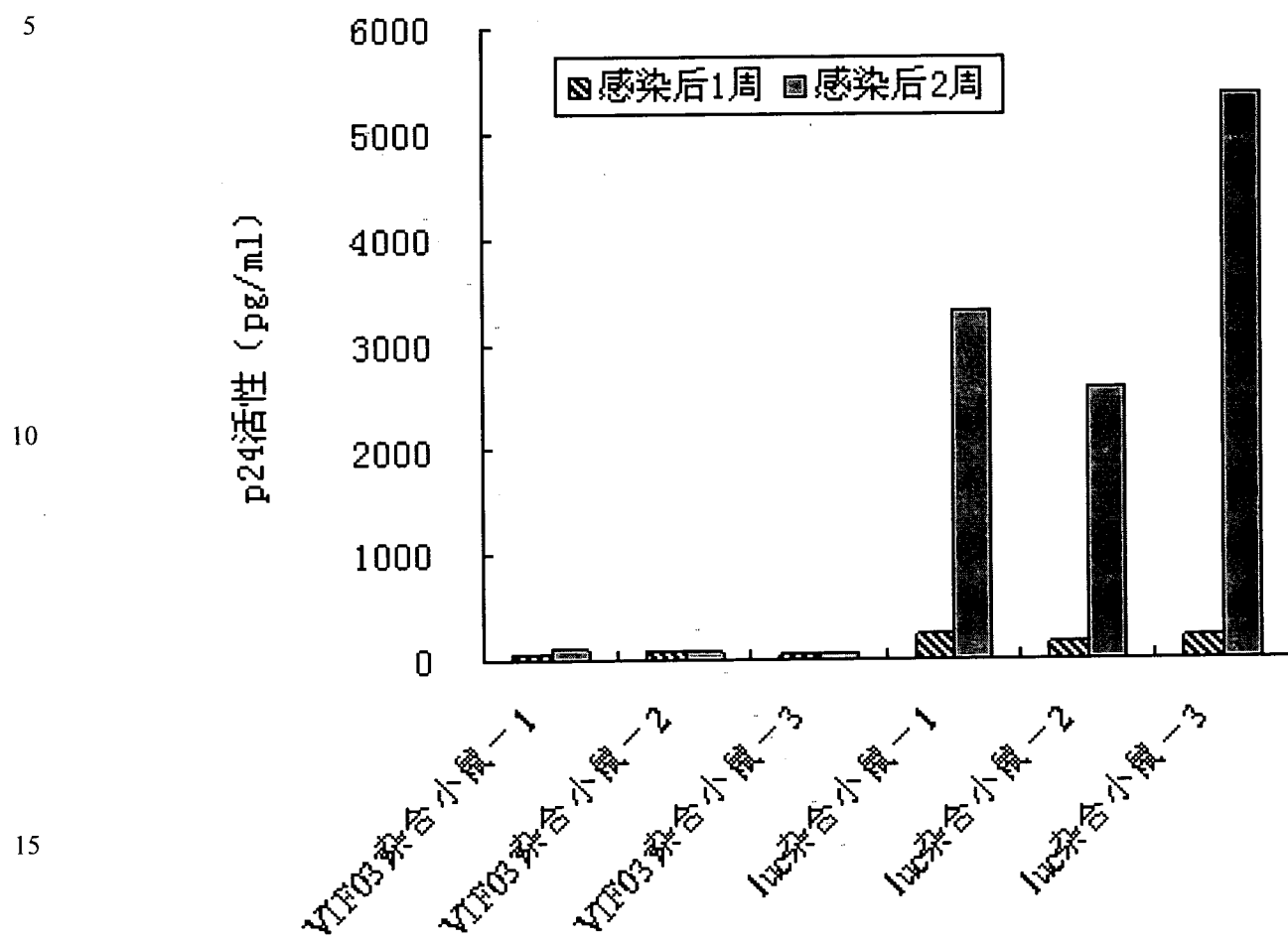


FIG. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/001074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C12N,A61K,A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
DATABASE: WPI, EPODOC, PAJ, CNKI, CNPAT(CPRS), CA, PUBMED, GenBank+EMBL+DDBJ		
SEARCH TERMS: HIV, AIDS, RNAi, siRNA, target site, small interfering RNA; Sequence search on SEQ ID NO 1-32		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Li fuluan et al., "RNA interference technique and its application in anti-HIV studies", Section Virology Foreign Med Sci, 31 December 2004(31.12.2004), v11(6), pages 165-167, see right column in page 166 and left column in page 167.	1-6,8,10-15,17-18
Y	DATABASE GenBank, Petropoulos C.J et al., "HIV-1, complete genome", ACCESSION No.AF033819, 28 August 2002(28.8.2002), see sequence 1-9181bp.	1-6,8,10-15,17-18
Y	WO03099298A1(MAX PLANCK GES FOERDERUNG WISSENSCHAFTE) 04 December 2003(04.12.2003) see claims.	1-6,8,10-15,17-18
A	WO2004029212A2(UNIV MASSACHUSETTS) 08 April 2004(08.04.2004) see the whole document.	1-15,17-18
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30. August 2008(30.08.2008)		11 Sep. 2008 (11.09.2008)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer RAO, Gang Telephone No. (86-10)62411079

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2008/001074

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO03099298A1	04.12.2003	AU2003237686A1	12.12.2003
WO2004029212A2	08.04.2004	AU2003282877 A1	19.04.2004
		US2005020521A1	27.01.2005
		EP1556402A2	27.07.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/001074

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 16

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Methods for Treatment of the Human or Animal Body by Therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/001074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/11(2006.01)i

C12N5/10(2006.01)i

C12N15/63(2006.01)i

A61K48/00(2006.01)i

A61P31/18(2006.01)i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2008/001074

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N,A61K,A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: WPI,EPODOC,PAJ,CNKI,CNPAT,CA,PUBMED, GenBank+EMBL+DDBJ

检索词: 艾滋病, 艾滋病病毒, 获得性免疫缺陷综合症, RNA 干扰, 靶点, 小干扰 RNA, HIV, AIDS,RNAi, siRNA,target site; 关于序列 SEQ ID NO:1-32 的检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	李付鸾等," RNA 干扰技术及其在抗 HIV 研究方面的应用",国外医学病毒学分册, 第 11 卷,第 6 期, 第 165-167 页, 31.12 月 2004(31.12.2004),参见第 166 页右栏和 167 页左栏	1-6,8,10-15,17-18
Y	GenBank 数据库, Petropoulos C.J 等,"HIV-1, complete genome", 登录号 AF033819, 28. 8 月 2002(28.8.2002), 参见序列 1-9181bp.	1-6,8,10-15,17-18
Y	WO03099298A1(MAX PLANCK GES FOERDERUNG WISSENSCHAFTE) 04.12 月 2003(04.12.2003) 参见权利要求书	1-6,8,10-15,17-18
A	WO2004029212A2(UNIV MASSACHUSETTS) 08.4 月 2004(08.04.2004) 参见全文	1-15,17-18

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

30.8 月 2008(30.08.2008)

国际检索报告邮寄日期

11.9 月 2008 (11.09.2008)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

饶刚

电话号码: (86-10) 62411079

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2008/001074

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO03099298A1	04.12.2003	AU2003237686A1	12.12.2003
WO2004029212A2	08.04.2004	AU2003282877 A1	19.04.2004
		US2005020521A1	27.01.2005
		EP1556402A2	27.07.2005

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☒ 权利要求: 16

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:
对人体或动物体的治疗方法。

2. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说, 是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明;
包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

A. 主题的分类

C12N15/11(2006.01)i

C12N5/10(2006.01)i

C12N15/63(2006.01)i

A61K48/00(2006.01)i

A61P31/18(2006.01)i