



(21)申請案號：112112926

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 04 月 06 日

(51)Int. Cl. :

A61K48/00 (2006.01)

A61K31/713 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

C12N15/64 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

A61P43/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/04/06 美國 63/328,241

2023/02/03 美國 63/483,075

(71)申請人：美商健臻公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：鄭 承興 CHEN, SENG (US) ；雅各布 莎拉 JACOBO, SARAH MELISSA (US) ；

森口隆子 MORIGUCHI, TAKAKO (JP) ；奧里奧丹 凱薩琳 O'RIORDAN,

CATHERINE (US) ；阮國祥 RUAN, GUOXIANG (CN)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：123 項 圖式數：14 共 198 頁

(54)名稱

用於 DM-1 肌強直性營養不良之靶向基因療法

(57)摘要

本文提供了用於治療肌強直性營養不良 1 型(DM1)的 RNAi 分子。本文進一步提供了含有所述 RNAi 的表現匣、載體(例如，rAAV)、病毒顆粒和醫藥組合物。本文又進一步提供了與使用所述 RNAi 例如治療 DM1 相關的方法和套組。

Provided herein are RNAi molecules for treating myotonic dystrophy type 1 (DM1). Further provided herein are expression cassettes, vectors (e.g.,rAAV), viral particles, and pharmaceutical compositions containing the RNAi. Yet further provided herein are methods and kits related to the use of the RNAi, for example, to treat DM1.

指定代表圖：

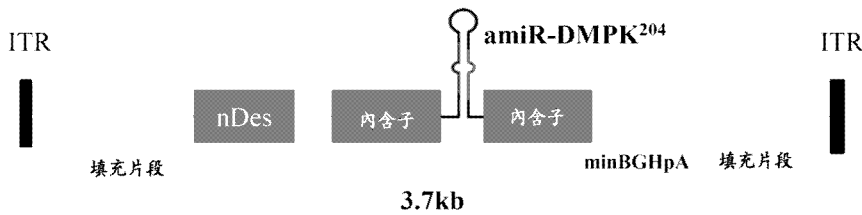


圖 1A

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於DM-1肌強直性營養不良之靶向基因療法

【英文發明名稱】 TARGETED GENE THERAPY FOR DM-1 MYOTONIC

DYSTROPHY

【中文】

本文提供了用於治療肌強直性營養不良1型(DM1)的RNAi分子。本文進一步提供了含有所述RNAi的表現匣、載體(例如，rAAV)、病毒顆粒和醫藥組合物。本文又進一步提供了與使用所述RNAi例如治療DM1相關的方法和套組。

【英文】

Provided herein are RNAi molecules for treating myotonic dystrophy type 1 (DM1). Further provided herein are expression cassettes, vectors (*e.g.*, rAAV), viral particles, and pharmaceutical compositions containing the RNAi. Yet further provided herein are methods and kits related to the use of the RNAi, for example, to treat DM1.

【指定代表圖】圖1A

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於DM-1肌強直性營養不良之靶向基因療法

【英文發明名稱】 TARGETED GENE THERAPY FOR DM-1 MYOTONIC

DYSTROPHY

【技術領域】

【0001】 本發明涉及變體RNAi分子。在一些態樣，本發明涉及用於治療肌營養不良的變體RNAi分子。

【先前技術】

【0002】 RNA干擾(RNAi)已經被證明是用於在基因功能基礎研究中使基因沈默的有用工具，並且作為抑制與許多疾病發展相關的基因的治療劑顯示出巨大前景。在自然界中，借助RNAi的基因調節藉由稱為微小RNA(miRNA)的小RNA進行(Ambros, (2004) *Nature* 431:350-355；Krol等人, (2010) *Nat. Rev. Genet.* 11:597-610)。微小RNA已經成為各種細胞過程的強大調節物，並且當藉由病毒載體遞送時，人工miRNA不斷表現，導致對靶基因的穩健且持續的抑制。對miRNA加工中涉及的機制的闡述已經允許科學家指派內源細胞RNAi機器並使用人工miRNA引導靶基因產物的降解(參見例如，美國授權前公開案2014/0163214和Davidson等人, (2012) *Cell* 150:873-875)。

【0003】 肌強直性營養不良1型(DM1)是一種由DMPK基因座中CTG重複擴增(> 50)引起的單基因常染色體顯性進行性疾病。具有重複的DMPK被轉錄成mRNA，mRNA形成髮夾並結合RNA結合蛋白，使RNA結合蛋白失去其正常功

能。這導致細胞核聚集點的出現、mRNA的錯誤剪接，並且最終導致肌強直。

DM1主要影響骨骼肌、心肌和平滑肌，導致嚴重的身體、認知和行為損害和殘疾。目前沒有經批准的DM1療法。因此，對治療DM1的療法有高度未滿足的醫療需求。

【0004】 將本文引用的所有參考文獻(包括專利申請和出版物)都藉由引用以其整體併入。

【發明內容】

【0005】 在一些態樣，本發明提供了一種包含第一股和第二股的RNAi，其中a) 所述第一股和所述第二股形成雙股體；b) 所述第一股包含指導區，其中所述指導區包含具有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)或具有與SEQ ID NO: 1的序列具有約90%同一性的序列的核酸；並且c) 所述第二股包含非指導區。在一些實施例中，所述非指導區包含具有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)或具有與SEQ ID NO: 2的序列具有約90%同一性的序列的核酸。在一些實施例中，所述第一股包含具有SEQ ID NO: 1的序列的核酸，並且所述非指導區包含具有SEQ ID NO: 2的序列的核酸。在一些實施例中，所述第一股和所述第二股借助能夠形成環結構的RNA連接子連接。在一些實施例中，所述RNA連接子包含約4至約50個核苷酸。在一些實施例中，所述環結構包含約4至約20個核苷酸。在一些實施例中，所述環結構包含具有SEQ ID NO: 3的序列或具有與SEQ ID NO: 3的序列具有約90%同一性的序列的核酸。在一些實施例中，所述RNAi從5'到3'包含所述第二股、所述RNA連接子和所述第一股。在一些實施例中，所述RNAi從5'到3'包含所述第一股、所述

RNA連接子和所述第二股。在一些實施例中，所述RNAi包含具有SEQ ID NO: 7的序列或具有與SEQ ID NO: 7的序列具有約90%同一性的序列的核酸。在一些實施例中，所述RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)或小髮夾RNA(shRNA)。

【0006】 在本發明的一些實施例中，所述RNAi進一步包含支架。在一些實施例中，所述支架包含SEQ ID NO: 11的核酸的全部或部分。在一些實施例中，所述miRNA嵌在所述支架內。在一些實施例中，所述支架具有5'臂，其中所述5'臂位於編碼所述RNAi的核酸的5'處；和3'臂，其中所述3'臂位於編碼所述RNAi的核酸的3'處。在一些實施例中，所述支架是miR-155支架。在一些實施例中，所述miR-155支架包含位於所述RNAi的5'處的SEQ ID NO: 9或與SEQ ID NO: 9的序列具有約90%同一性的序列的核酸。在一些實施例中，所述miR-155支架包含位於所述RNAi的3'處的SEQ ID NO: 10或與SEQ ID NO: 10的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【0007】 在本發明的一些實施例中，所述RNAi靶向編碼與肌強直性營養不良1(DM1)相關的多肽的RNA。在一些實施例中，所述多肽是肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)。在一些實施例中，所述DMPK包含與DM1相關的突變。在一些實施例中，編碼DMPK的基因包含五個或更多個CTG三核苷酸重複。

【0008】 在一些態樣，本發明提供了一種包含編碼本文所述的任何RNAi的核酸的表現匣。在一些實施例中，編碼所述RNAi的核酸可操作地連接至啟動子。在一些實施例中，所述啟動子是肌肉特異性啟動子。在一些實施例中，所述啟動子是結蛋白啟動子或其變體。在一些實施例中，所述結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。在一些實施例中，所述結蛋白

啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。在一些實施例中，所述結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。在一些實施例中，所述結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 21的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件和/或一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 22的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，所述結蛋白啟動子包含SEQ ID NO: 12的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 12的核苷酸序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，所述表現匣進一步包含內含子。在一些實施例中，所述內含子是兔 β -珠蛋白內含子。在一些實施例中，所述內含子包含SEQ ID NO: 13的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 13的序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，編碼所述RNAi的核酸嵌在所述內含子中。在一些實施例中，所述內含子包含5'臂和3'臂，其中所述5'臂位於編碼所述RNAi的核酸的5'處，並且所述3'臂位於編碼所述RNAi的核酸的3'處。在一些實施例中，所述內含子的5'臂包含SEQ ID NO: 14的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 14的序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，所述內含子的3'臂包含SEQ ID NO: 15的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 15的序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，所述表現匣進一步包含多腺苷酸化訊號。在一些實施例中，所述多腺苷酸化訊號是牛生長激素多腺苷酸化訊號、SV40多腺苷酸化訊號或HSV TK pA。在一些實施例中，所述多腺苷酸化訊號是最小牛生長激素多腺苷酸化訊號。在一些實施例中，所述牛生長激素多腺苷酸化訊號包含SEQ ID NO: 16的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 16的序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，所述表現匣包含SEQ ID NO: 17的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 17的序列具有約90%同一

性的序列。

【0009】 在一些態樣，本發明提供了一種表現匣，其中所述表現匣包含經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。在一些實施例中，所述經修飾的結蛋白啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。在一些實施例中，所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。在一些實施例中，所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 21的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件和/或一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 22的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，所述結蛋白啟動子包含SEQ ID NO: 12的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 12的核苷酸序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，所述表現匣進一步包含內含子。在一些實施例中，所述內含子是兔 β -珠蛋白內含子。在一些實施例中，所述內含子包含SEQ ID NO: 13的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 13的序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，編碼轉基因的核酸嵌在所述內含子中。在一些實施例中，所述內含子包含5'臂和3'臂，其中所述5'臂位於編碼所述轉基因的核酸的5'處，並且所述3'臂位於編碼所述轉基因的核酸的3'處。在一些實施例中，所述內含子的5'臂包含SEQ ID NO: 14的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 14的序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，所述內含子的3'臂包含SEQ ID NO: 15的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 15的序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，所述表現匣進一步包含多腺苷酸化訊號。在一些實施例中，所述多腺苷酸化訊號是牛生長激素多腺苷酸化訊號、SV40多腺苷酸化訊號或HSV TK

pA。在一些實施例中，所述多腺苷酸化訊號是最小牛生長激素多腺苷酸化訊號。在一些實施例中，所述牛生長激素多腺苷酸化訊號包含SEQ ID NO: 16的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 16的序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，所述轉基因編碼多肽或核酸。在一些實施例中，所述轉基因編碼RNAi。

【0010】 在一些態樣，本發明提供了一種包含本文所述的任何表現匣的載體。在一些實施例中，所述表現匣的側接是一個或多個填充核酸序列。在一些實施例中，所述一個或多個填充核酸序列源自人類Serpina1基因。在一些實施例中，位於所述表現匣的5'處的填充核酸序列源自人類Serpina1基因。在一些實施例中，位於所述表現匣的5'處的填充序列包含SEQ ID NO: 18的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 18的序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，位於所述表現匣的3'處的填充核酸序列源自人類Serpina1基因。在一些實施例中，位於所述表現匣的3'處的填充序列包含SEQ ID NO: 19的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 19的序列具有約90%同一性的序列。

【0011】 在本發明的一些實施例中，所述載體是重組腺相關病毒(rAAV)載體。在一些實施例中，所述表現匣的側接是一個或多個AAV反向末端重複(ITR)序列。在一些實施例中，所述表現匣的側接是兩個AAV ITR。在一些實施例中，所述AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。在一些實施例中，所述AAV ITR是AAV2 ITR。在一些實施例中，所述rAAV載體包含SEQ ID NO: 20的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 20的序列具有約90%同一性的序列。在一些實施例中，所述載體是自身互補的rAAV載體。

【0012】 在一些實施例中，本發明提供了一種包含本文所述的任何表現匣、本文所述的任何載體或本文所述的任何rAAV載體的細胞。

【0013】 在一些態樣，本發明提供了一種包含本文所述的任何載體的病毒顆粒。在一些態樣，本發明提供了一種包含本文所述的任何rAAV載體的重組AAV顆粒。在一些實施例中，所述AAV病毒顆粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74 N502I、AAVrh74 W505R、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、AAV2-HBKO、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣殼rAAV2/HBoV1血清型衣殼。在一些實施例中，所述rAAV病毒顆粒的ITR和衣殼源自相同的AAV血清型。在一些實施例中，所述rAAV病毒顆粒的ITR和衣殼源自不同的AAV血清型。在一些實施例中，所述AAV病毒顆粒包含AAVrh74 N502I血清型衣殼。在一些實施例中，所述ITR是AAV2 ITR，並且所述rAAV顆粒的衣殼是AAVrh74 N502I血清型衣殼。在一些實施例中，所述AAV病毒顆粒包含AAVrh74 W505R血清型衣殼。在一些實施例中，所述ITR是AAV2 ITR，並且所述rAAV顆粒的衣殼是AAVrh74 W505R血清型衣殼。在一些實施例中，本發明提供了一種包含rAAV載體和衣殼的rAAV顆粒，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：AAV2 ITR、編碼來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸、Byrne結蛋白增強子元件、Paulin結蛋白增強子元件、結蛋白啟動子、兔 β -珠蛋白內含子的5'臂、5' miR155 支架序列、DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列、miR155末端環序列、DMPK²⁰⁴ miRNA過客(passenger)序列、3' miR155 支架序列、兔 β -珠蛋白內含子的3'臂、最小牛生長

激素多腺苷酸化序列、編碼來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸以及 AAV2 ITR；並且其中所述衣殼是AAVrh74 N502I衣殼。在一些實施例中，本發明提供了一種包含rAAV載體的rAAV顆粒，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：含有SEQ ID NO: 43的多核苷酸序列的AAV2 ITR、編碼含有SEQ ID NO: 18的多核苷酸序列的來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸、含有SEQ ID NO: 21的多核苷酸序列的Byrne結蛋白增強子元件、含有SEQ ID NO: 22的多核苷酸序列的Paulin結蛋白增強子元件、含有SEQ ID NO: 23的多核苷酸序列的結蛋白啟動子、含有SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白內含子的5'臂、含有SEQ ID NO: 40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列、含有SEQ ID NO: 4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列、含有SEQ ID NO: 6的多核苷酸序列的miR155末端環序列、含有SEQ ID NO: 5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列、含有SEQ ID NO: 41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列、含有SEQ ID NO: 15的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白內含子的3'臂、含有SEQ ID NO: 16的多核苷酸序列的最小牛生長激素多腺苷酸化序列、編碼含有SEQ ID NO: 19的多核苷酸序列的來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸以及含有SEQ ID NO: 49的多核苷酸序列的AAV2 ITR；並且其中所述衣殼是AAVrh74 N502I衣殼。在一些實施例中，所述AAVrh74 N502I衣殼包含含有SEQ ID NO: 50的胺基酸序列的衣殼蛋白。

【0014】 在一些實施例中，本發明提供了一種包含rAAV載體和衣殼的rAAV顆粒，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：AAV2 ITR、編碼來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸、Byrne結蛋白增強子元件、Paulin結蛋白增強子元件、結蛋白啟動子、兔 β -珠蛋白內含子的5'臂、5' miR155支架序列、

DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列、miR155末端環序列、DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列、3' miR155支架序列、兔β-珠蛋白內含子的3'臂、最小牛生長激素多腺苷酸化序列、編碼來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸以及AAV2 ITR；並且其中所述衣殼是AAVrh74 W505R衣殼。在一些實施例中，本發明提供了一種包含rAAV載體的rAAV顆粒，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：含有SEQ ID NO: 43的多核苷酸序列的AAV2 ITR、編碼含有SEQ ID NO: 18的多核苷酸序列的來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸、含有SEQ ID NO: 21的多核苷酸序列的Byrne結蛋白增強子元件、含有SEQ ID NO: 22的多核苷酸序列的Paulin結蛋白增強子元件、含有SEQ ID NO: 23的多核苷酸序列的結蛋白啟動子、含有SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列的兔β-珠蛋白內含子的5'臂、含有SEQ ID NO: 40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列、含有SEQ ID NO: 4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列、含有SEQ ID NO: 6的多核苷酸序列的miR155末端環序列、含有SEQ ID NO: 5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列、含有SEQ ID NO: 41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列、含有SEQ ID NO: 15的多核苷酸序列的兔β-珠蛋白內含子的3'臂、含有SEQ ID NO: 16的多核苷酸序列的最小牛生長激素多腺苷酸化序列、編碼含有SEQ ID NO: 19的多核苷酸序列的來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸以及含有SEQ ID NO: 49的多核苷酸序列的AAV2 ITR；並且其中所述衣殼是AAVrh74 W505R衣殼。在一些實施例中，所述AAVrh74 W505R衣殼包含含有SEQ ID NO: 52的胺基酸序列的衣殼蛋白。

【0015】 在一些態樣，本發明提供了一種包含本文所述的任何病毒顆粒或rAAV顆粒的組合物。在一些實施例中，本發明提供了一種包含本文所述的任何病毒顆粒或rAAV顆粒的醫藥組合物。在一些實施例中，所述組合物進一步包含

醫藥上可接受的載劑。

【0016】 在一些態樣，本發明提供了一種經修飾的結蛋白啟動子(例如，用於在肌肉細胞中表現轉基因)，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。在一些實施例中，所述經修飾的結蛋白啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。在一些實施例中，所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。在一些實施例中，所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 21的序列具有約90%同一性的序列的增強子元件和/或一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 22的序列具有約90%同一性的序列的增強子元件。在一些實施例中，所述經修飾的結蛋白啟動子包含SEQ ID NO: 12的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 12的序列具有約90%同一性的序列。

【0017】 在一些態樣，本發明提供了包含如本文所述的RNAi、如本文所述的病毒顆粒、如本文所述的AAV顆粒或如本文所述的組合物中的一種或多種的套組。在一些實施例中，所述套組進一步包含使用說明書。

【0018】 在一些態樣，本發明提供了用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的本文所述的任何RNAi。在一些態樣，本發明提供了用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的本文所述的任何RNAi。在一些態樣，本發明提供了用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的本文所述的任何RNAi。

【0019】 在一些態樣，本發明提供了用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的如本文所述的任何病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)。在一些態樣，本發明提供了用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的如本文所述的任何病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)。在一些態樣，本發明提供了用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的如本文所述的任何病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)。

【0020】 在本發明的一些實施例中，所述病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的有效量是約 1×10^8 至約 2×10^{13} 個基因體拷貝/mL的劑量。在本發明的一些實施例中，所述劑量是約 5×10^{12} 個基因體拷貝/mL。在本發明的一些實施例中，所述劑量是約 1×10^{13} 個基因體拷貝/mL。在本發明的一些實施例中，所述劑量是約 2×10^{13} 個基因體拷貝/mL。

【0021】 在本發明的一些實施例中，所述病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的有效量是約 1×10^8 至約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重的劑量。在本發明的一些實施例中，所述劑量是約 5×10^{13} 個基因體拷貝/kg體重。在本發明的一些實施例中，所述劑量是約 1×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重。在本發明的一些實施例中，所述劑量是約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重。

【0022】 在一些態樣，本發明提供了用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的如本文所述的任何組合物。在一些態樣，本發明提供了用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的方法，所述方法包

括向所述哺乳動物投予有效量的如本文所述的任何組合物中的組合物。在一些態樣，本發明提供了用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的如本文所述的任何組合物。

【0023】 在本發明的一些實施例中，將所述RNAi與免疫抑制劑組合投予，其中在投予所述RNAi之前、同時和/或之後投予所述免疫抑制劑。在一些實施例中，將所述病毒顆粒或所述rAAV顆粒與免疫抑制劑組合投予，其中在投予所述病毒顆粒或所述rAAV顆粒之前、同時和/或之後投予所述免疫抑制劑。在一些實施例中，將所述組合物與免疫抑制劑組合投予，其中在投予所述組合物之前、同時和/或之後投予所述免疫抑制劑。

【圖式簡單說明】

【0024】 藉由結合附圖參考以下描述，可以理解本申請。

【0025】 圖1A描繪了nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴基因匣的序列示意圖。雜合肌肉啟動子位於miR155-amiR-DMPK²⁰⁴序列的上游。miRNA的下游是牛生長激素多腺苷酸化序列(minBGHpA)。來自A1AT內含子的填充序列側接於匣的兩側。所有這些的側接是兩個AAV2 ITR，得到3739 bp的組合載體基因體大小。

【0026】 圖1B描繪了用於選殖nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴基因匣的ITR質體。ITR質體含有A1AT填充序列，側接為AAV2 5'和3' ITR。A1AT填充序列包含用於選殖的NcoI和SphI限制性位點。

【0027】 圖1C描繪了為確認DC969-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴質體的包裝而在HEK 293細胞中進行的小規模包裝測定的結果。使用AAV rep/cap質體進

行小規模生產。y軸示出了與標準EGFP質體基因匣(CD627-CBA-GFP)相比，每個HEK 293細胞產生的載體的量。DRP：DNA酶抗性顆粒。

【0028】圖2A-圖2C描繪了在尾靜脈注射後對DMSXL小鼠中由AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴(amiR155-204)表現匣導致的DMPK敲減的評價。圖2A示出了如藉由量化不同器官中的轉基因拷貝數評價的AAV的轉導效率和生物分佈。qPCR結果表現為AAV拷貝數/細胞核的平均比率。圖2B示出了轉導組織中amiR-DMPK²⁰⁴的水平。將微小RNA輸入水平相對於U6小核RNA歸一化，並且相對於經BSS(平衡鹽溶液)處理的細胞設置。圖2C示出了轉導組織中DMPK的沈默。藉由qRT-PCR測定總DMPK。將mRNA輸入相對於TATA匣結合蛋白(TBP)歸一化，並且相對於經BSS處理的細胞設置。虛線指示相對於TBP表現的50% DMPK表現。對於圖2A-圖2C，使用配對學生t檢定評價資料： $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ， $***p < 0.001$ 和 $****p < 0.0001$ 。n = 13(BSS)，n = 12(amiR155-204)。

【0029】圖3A-圖3B描繪了AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴對人DMPK的抑制。為DMSXL小鼠以劑量依賴性方式全身注射AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴。在8周後對小鼠實施安樂死，收穫器官，並且測量amiR-DMPK²⁰⁴和DMPK轉錄物水平。圖3A描繪了不同組織中相對於U6歸一化的amiR-DMPK²⁰⁴的豐度。圖3B描繪了不同組織中相對於mTBP歸一化的hDMPK轉錄物的豐度。使用方差分析、多重比較檢定評價資料： $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ， $***p < 0.001$ 和 $****p < 0.0001$ 。(n = wt-10，BSS-7，低劑量5，中劑量13和高劑量7)。

【0030】圖4描繪了在用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴全身治療後DMSXL小鼠的剪接異常的校正。在治療8周後，在腓腸肌中使用RT-PCR評估LDB3中可變外顯子11的剪接。使用方差分析、多重比較檢定評價資料： $*p < 0.05$ ，

****p < 0.01** , *****p < 0.001**和******p < 0.0001**。(n = wt-10 , BSS-7 , 低劑量5 , 中劑量13和高劑量7)。

【0031】 圖5A和 圖5B示出了以劑量依賴性方式用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴治療的雌性DMSXL小鼠的增加的存活率和體重。圖5A示出了Kaplan-Meier存活曲線，其顯示與經低劑量或BSS治療的動物相比，在治療8周後在中劑量情況下的存活率提高。圖5B示出了與經BSS治療或經低劑量治療的動物相比，在用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴治療的DMSXL動物中觀察到的增加的體重。

【0032】 圖6描繪了在以劑量依賴性方式用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴全身治療DMSXL DM1小鼠模型後DM1疾病的電生理特徵的逆轉。使用方差分析、多重比較檢定評價資料：***p < 0.05** , ****p < 0.01** , *****p < 0.001**和******p < 0.0001**。(n = wt-10 , BSS-7 , 低劑量5 , 中劑量13和高劑量7)。

【0033】 圖7A示出了實驗方案的示意圖。在第-1天採集血液(●)，以再次確認中和抗體。在第0天，向NHP以1e13 vg/kg的劑量投予編碼GFP報導物的AAV，並且在D21進行屍檢並收集多個組織以評價生物分佈。圖7B-圖7E示出了對來自注射AAV9、AAV rh74和AAV rh74 N502I(rh74M)的動物的不同組織的GFP表現的量化。橫條圖表示藉由ELISA測量的在脛骨前肌(TA；圖7B)、股二頭肌(圖7C)、股四頭肌(圖7D)、心臟(圖7E)和肝臟(圖7F)中的GFP量。使用方差分析、多重比較檢定評價資料：***p < 0.05** , ****p < 0.01** , *****p < 0.001**和******p < 0.0001**。

【0034】 圖8A和圖8B示出了AAV rh74 N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴對人DMPK的抑制。為DMSXL小鼠以劑量依賴性方式全身注射AAV rh74 N502I

nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴。在8周後對小鼠實施安樂死，收穫器官，並且測量amiR-DMPK²⁰⁴和DMPK轉錄物水平。**圖8A**描繪了不同組織中相對於U6歸一化的amiR-DMPK²⁰⁴的豐度。**圖8B**描繪了不同組織中相對於mTBP歸一化的hDMPK轉錄物的豐度。使用方差分析、多重比較檢定評價資料： $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ， $***p < 0.001$ 和 $****p < 0.0001$ 。

【0035】 **圖9**示出了由AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴導致的內源DMPK的沈默。藉由對提取自從iPSC分化的人DM1心肌細胞的RNA進行qRT-PCR來測定總DMPK水平。將這些心肌細胞用AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴轉導。將mRNA輸入水平相對於TBP mRNA歸一化。miRCTL3充當陰性對照，並且被設定為1。配對學生t檢定： $**p < 0.01$ 。

【0036】 **圖10**是火山圖，其顯示經amiR-DMPK²⁰⁴處理的HEK293細胞中的全基因體基因表現變化(Benjamini Hochberg, $FDR < 1\%$)。表格以 $FDR < 1\%$ 和 $FDR < 5\%$ 顯示了具有3' UTR種子互補性的前四個差異表現(DE)基因。

【0037】 **圖11**示出了在多個序列中amiRDMPK²⁰⁴靶序列的保守。人靶標是SEQ ID NO: 28，獼猴靶標是SEQ ID NO: 29，小鼠靶標是SEQ ID NO: 30，大鼠靶標是SEQ ID NO: 31，並且狗靶標是SEQ ID NO: 32。

【0038】 **圖12**展示了所指示治療組中病毒基因體拷貝/細胞在多個組織中的生物分佈。

【0039】 **圖13**示出了所指示治療組中在不同肌肉組織中的劑量依賴性amiR-DMPK表現。

【0040】 **圖14**示出了每個指示治療組在治療後不同肌肉中的DMPK表現水平。

【實施方式】**【0041】 相關申請的交叉引用**

【0042】 本申請根據35 U.S.C. § 119 (e)要求2022年4月6日提交的美國臨時申請序號63/328,241和2023年2月3日提交的美國臨時申請序號63/483,075的優先權，將所述臨時申請的內容藉由引用併入本文。

【0043】 序列表的提交

【0044】 將以下提交的XML文檔的內容藉由引用以其整體併入本文：電腦可讀形式(CRF)的序列表(文檔名：737870_SA9-363PC_ST26.xml，創建日期：2023年4月3日，大小：82,900位元組)。

【0045】 在一些態樣，本發明提供了包含第一股和第二股的RNAi，其中a) 第一股和第二股形成雙股體；b) 第一股包含指導區，其中指導區包含具有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)或具有與SEQ ID NO: 1的序列具有約90%同一性的序列的核酸；並且c) 第二股包含非指導區，其中非指導區包含具有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)或具有與SEQ ID NO: 2的序列具有約90%同一性的序列的核酸。在一些實施例中，本發明提供了用於表現編碼RNAi的核酸的表現匣；例如，用於在哺乳動物的肌肉中表現RNAi。在一些實施例中，表現匣在rAAV載體中。

【0046】 在一些態樣，本發明提供了用於藉由向哺乳動物投予本發明的RNAi來治療哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM-1)的方法。在一些實施例中，所投予的RNAi抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在哺乳動物中的表現；從而改善哺乳動物的DM-1。

通用技術

【0047】 本文描述或引用的技術和程序是本領域技術人員普遍充分理解並且使用常規方法普遍採用的，例如像以下文獻中所述的廣泛利用的方法：*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(Sambrook等人, 第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012)；*Current Protocols in Molecular Biology*(F.M. Ausubel等人編輯, 2003)；系列*Methods in Enzymology*(Academic Press, Inc.)；*PCR 2: A Practical Approach*(M.J. MacPherson, B.D. Hames和G.R. Taylor編輯, 1995)；*Antibodies, A Laboratory Manual*(Harlow和Lane編輯, 1988)；*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*(R.I. Freshney, 第6版, J. Wiley and Sons, 2010)；*Oligonucleotide Synthesis*(M.J. Gait編輯, 1984)；*Methods in Molecular Biology*, Humana Press；*Cell Biology: A Laboratory Notebook*(J.E. Cellis編輯, Academic Press, 1998)；*Introduction to Cell and Tissue Culture*(J.P. Mather和P.E. Roberts, Plenum Press, 1998)；*Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*(A. Doyle, J.B. Griffiths和D.G. Newell編輯, J. Wiley and Sons, 1993-8)；*Handbook of Experimental Immunology*(D.M. Weir和C.C. Blackwell編輯, 1996)；*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*(J.M. Miller和M.P. Calos編輯, 1987)；*PCR: The Polymerase Chain Reaction*(Mullis等人編輯, 1994)；*Current Protocols in Immunology*(J.E. Coligan等人編輯, 1991)；*Short Protocols in Molecular Biology*(Ausubel等人編輯, J. Wiley and Sons, 2002)；*Immunobiology*(C.A. Janeway等人, 2004)；*Antibodies*(P. Finch, 1997)；*Antibodies: A Practical Approach*(D. Catty.編輯, IRL Press, 1988-1989)；*Monoclonal Antibodies: A Practical Approach*(P. Shepherd和C. Dean編輯, Oxford University

Press, 2000)；*Using Antibodies: A Laboratory Manual*(E. Harlow和D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)；*The Antibodies*(M. Zanetti和J. D. Capra編輯, Harwood Academic Publishers, 1995)；以及*Cancer: Principles and Practice of Oncology*(V.T. DeVita等人編輯, J.B. Lippincott Company, 2011)。

定義

【0048】如本文所用，「載體」是指包含待在體外或在體內遞送至宿主細胞中的核酸的重組質體或病毒。

【0049】如本文所用的術語「多核苷酸」或「核酸」是指任何長度的核苷酸(核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸)的聚合形式。因此，此術語包括但不限於單股、雙股或多股DNA或RNA；基因體DNA；cDNA；DNA-RNA雜合體；或者包含嘌呤和嘧啶鹼基或其他天然的核苷酸鹼基、經化學修飾的或經生化修飾的核苷酸鹼基、非天然的核苷酸鹼基或經衍生化的核苷酸鹼基的聚合物。多核苷酸的骨架可以包含糖和磷酸基團(如通常可以在RNA或DNA中發現的)或者經修飾或經取代的糖或磷酸基團。可替代地，多核苷酸的骨架可以包含合成亞基(如胺基磷酸酯)的聚合物，因此可以是寡去氧核苷胺基磷酸酯(P-NH₂)或混合的胺基磷酸酯-磷酸二酯寡聚物。另外，雙股多核苷酸可以從化學合成的單股多核苷酸產物藉由合成互補股並在適當條件下使股退火或者藉由使用DNA聚合酶用適當的引子從頭合成互補股來獲得。

【0050】術語「多肽」和「蛋白質」可互換地用於指涉胺基酸殘基的聚合物，並且不限於最小長度。胺基酸殘基的此類聚合物可以含有天然或非天然胺基酸殘基，並且包括但不限於胺基酸殘基的肽、寡肽、二聚體、三聚體和多聚體。所述定義涵蓋全長蛋白質及其片段兩者。所述術語還包括多肽的表現後修

飾，例如糖基化、唾液酸化、乙醯化、磷酸化等。此外，出於本發明的目的，「多肽」是指包括對天然序列的修飾如缺失、添加和取代(通常是保守性的)的蛋白質，只要蛋白質維持所需的活性即可。這些修飾可能是故意的(如藉由定點誘變)，或者可能是偶然的(如藉由產生蛋白質的宿主的突變或由於PCR擴增引起的錯誤)。

【0051】 「重組病毒載體」是指包含一個或多個異源序列(即，不是病毒來源的核酸序列)的重組多核苷酸載體。在重組AAV載體的情況下，重組核酸的側接是至少一個，並且在一些實施例中是兩個反向末端重複序列(ITR)。

【0052】 「重組AAV載體(rAAV載體)」是指包含一個或多個側接是至少一個，並且在一些實施例中是兩個AAV反向末端重複序列(ITR)的異源序列(即，不是AAV來源的核酸序列)的多核苷酸載體。當存在於已經感染合適的輔助病毒(或正在表現合適的協助工具)並且正在表現AAV rep和cap基因產物(即，AAV Rep和Cap蛋白)的宿主細胞中時，此類rAAV載體可以被複製並且包裝在感染性病毒顆粒中。當將rAAV載體摻入較大的多核苷酸中(例如，在染色體中或在用於選殖或轉染的另一種載體如質體中)時，則rAAV載體可以被稱為「前載體(pro-vector)」，其可以藉由在AAV包裝功能和合適的協助工具的存在下複製和衣殼化而被「挽救」。rAAV載體可以呈多種形式中的任一種，包括但不限於質體、線性人工染色體、與脂質複合、包封在脂質體內、和衣殼化於病毒顆粒(特別是AAV顆粒)中。rAAV載體可以被包裝在AAV病毒衣殼中，以產生「重組腺相關病毒顆粒(rAAV顆粒)」。

【0053】 「異源的」意指源自基因型不同於其所比較或者其所引入或摻入的實體的其餘部分的實體。例如，藉由基因工程技術引入不同細胞類型中的多

核苷酸是異源多核苷酸(並且在表現時可以編碼異源多肽)。類似地，摻入病毒載體中的細胞序列(例如，基因或其部分)是相對於載體的異源核苷酸序列。

【0054】術語「轉基因」是指引入細胞中並且能夠被轉錄成RNA並且任選地在適當條件下轉譯和/或表現的多核苷酸。在多個態樣，它賦予其所引入的細胞所需的特性，或以其他方式產生所需的治療或診斷結果。在另一個態樣，它可以被轉錄成介導RNA干擾的分子，如miRNA、siRNA或shRNA。

【0055】如關於病毒力價使用的術語「基因體顆粒(gp)」、「基因體當量」或「基因體拷貝(gc)」是指含有重組AAV DNA基因體的病毒體的數量，與感染性或功能性無關。特定載體製劑中基因體顆粒的數量可以藉由如本文實例中或例如Clark等人 (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039；Veldwijk等人 (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278中所述的程序來測量。

【0056】如本文所用的術語「載體基因體(vg)」可以指涉包含載體(例如，病毒載體)的一組多核苷酸序列的一種或多種多核苷酸。載體基因體可以衣殼化於病毒顆粒中。根據特定的病毒載體，載體基因體可以包含單股DNA、雙股DNA或者單股RNA或雙股RNA。載體基因體可以包括與特定病毒載體相關的內源序列和/或藉由重組技術插入特定病毒載體中的任何異源序列。例如，重組AAV載體基因體可以包括側接於啟動子的至少一個ITR序列、填充片段、目的序列(例如，RNAi)和多腺苷酸化序列。完整的載體基因體可以包括載體的全組多核苷酸序列。在一些實施例中，病毒載體的核酸力價可以按vg/mL測量。適用於測量此力價的方法是本領域已知的(例如，定量PCR)。

【0057】如本文所用，術語「抑制」可以指涉阻斷、減少、消除或以其他方式拮抗特定靶標的存在或活性的行為。抑制可以指涉部分抑制或完全抑制。

例如，抑制基因的表現可以指涉導致對基因表現的阻斷、減少、消除或任何其他拮抗作用的任何行為，包括mRNA豐度的降低(例如，使mRNA轉錄沈默)、mRNA的降解、mRNA轉譯的抑制等。在一些實施例中，抑制DMPK的表現可以指涉對DMPK表現的阻斷、減少、消除或任何其他拮抗作用，包括DMPK mRNA豐度的降低(例如，使DMPK mRNA轉錄沈默)、DMPK mRNA的降解、DMPK mRNA轉譯的抑制等。作為另一個例子，抑制蛋白質在細胞中的積累可以指涉導致對蛋白質表現的阻斷、減少、消除或其他拮抗作用的任何行為，包括mRNA豐度的降低(例如，使mRNA轉錄沈默)、mRNA的降解、mRNA轉譯的抑制、蛋白質的降解等。在一些實施例中，抑制DMPK蛋白在細胞中的積累是指對細胞中的DMPK蛋白表現的阻斷、減少、消除或其他拮抗作用，包括DMPK mRNA豐度的降低(例如，使DMPK mRNA沈默)、DMPK mRNA的降解、DMPK mRNA轉譯的抑制、DMPK蛋白的降解等。

【0058】 如關於病毒力價使用的術語「感染單位(iu)」、「感染性顆粒」或「複製單位」是指感染性和複製型重組AAV載體顆粒的數量，如藉由感染中心測定(也稱為複製中心測定)所測量的，如例如McLaughlin等人 (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973中所述。

【0059】 如關於病毒力價使用的術語「轉導單位(tu)」是指導致產生功能轉基因產物的感染性重組AAV載體顆粒的數量，如在功能測定中所測量的，如本文實例中或例如Xiao等人 (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124；或Fisher等人 (1996) *J. Virol.*, 70:520-532中所述。

【0060】 「反向末端重複」或「ITR」序列是本領域充分理解的術語，並且是指在病毒基因體末端發現的處於相反方向的相對較短的序列。

【0061】 「AAV反向末端重複(ITR)」序列為本領域充分理解的術語，是存在於天然單股AAV基因體的兩個末端處的大約145個核苷酸的序列。ITR的最外側的125個核苷酸可以以兩個替代方向中的任一個存在，導致不同AAV基因體之間以及單個AAV基因體兩端之間的異質性。最外側的125個核苷酸也含有幾個較短的自身互補的區域(指定為A、A'、B、B'、C、C'和D區)，允許在ITR的此部分內進行股內鹼基配對。

【0062】 「末端解股序列」或「trs」是AAV ITR的D區中的序列，其在病毒DNA複製期間被AAV rep蛋白切割。突變型末端解股序列難以被AAV rep蛋白切割。

【0063】 「AAV協助工具」是指允許AAV被宿主細胞複製和包裝的功能。AAV協助工具可以以多種形式中的任一種提供，包括但不限於協助AAV複製和包裝的輔助病毒或輔助病毒基因。其他AAV協助工具是本領域已知的，如基因毒性劑。

【0064】 AAV的「輔助病毒」是指允許AAV(其是缺陷型細小病毒)被宿主細胞複製和包裝的病毒。輔助病毒提供允許AAV複製的「協助功能」。已經鑒定出多種此類輔助病毒，包括腺病毒、疱疹病毒、和痘病毒(如牛痘)以及桿狀病毒。腺病毒涵蓋多個不同亞群，但亞群C的5型腺病毒(Ad5)是最常用的。人類、非人哺乳動物和禽類來源的許多腺病毒是已知的，並且可從諸如ATCC等保藏機構獲得。也可從諸如ATCC等保藏機構獲得的疱疹家族病毒包括例如單純疱疹病毒(HSV)、EB病毒(EBV)、巨細胞病毒(CMV)和偽狂犬病病毒(PRV)。用於複製AAV的腺病毒協助功能的例子包括E1A功能、E1B功能、E2A功能、VA功能和E4orf6功能。可從保藏機構獲得的桿狀病毒包括苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa*

californica)核型多角體病毒。

【0065】 如果感染性AAV顆粒與感染性輔助病毒顆粒的比率是至少約102 : 1、至少約104 : 1、至少約106 : 1、或至少約108 : 1或更多，則rAAV的製劑被稱為是「基本上不含」輔助病毒。在一些實施例中，製劑也不含當量的輔助病毒蛋白(即，如果上述輔助病毒顆粒雜質以受破壞形式存在，則將由於這樣水平的輔助病毒而存在蛋白質)。病毒和/或細胞蛋白污染通常可以在SDS凝膠上作為考馬斯染色條帶的存在而被觀察到(例如，出現不同於對應於AAV衣殼蛋白VP1、VP2和VP3的條帶的條帶)。

【0066】 將關於參考多肽或核酸序列的「序列同一性百分比(%)」定義為在比對序列並引入空位(如果需要)以實現最大序列同一性百分比之後，並且不將任何保守取代視為序列同一性的一部分，候選序列中與參考多肽或核酸序列中的胺基酸殘基或核苷酸相同的胺基酸殘基或核苷酸的百分比。用於測定胺基酸或核酸序列同一性百分比的目的的比對可以以在本領域技術範圍內的多種方式實現，例如使用可公開獲得的電腦軟體程式，例如Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人編輯, 1987), 增刊30, 第7.7.18章, 表7.7.1中所述的電腦軟體程式，並且包括BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體。優選的比對程式是ALIGN Plus(Scientific and Educational Software，賓夕法尼亞州)。本領域技術人員可以確定用於測量比對的適當參數，包括為了在被比較的序列的全長上實現最大比對所需的任何演算法。出於本文的目的，給定胺基酸序列A與(to、with或against)給定胺基酸序列B的胺基酸序列同一性%(其可以可替代地用短語表示為與(to、with或against)給定胺基酸序列B具有或包含一定胺基酸序列同一性%的給定胺基酸序列A)計算如下：100乘以分數X/Y，其中X是藉由序列比對

程式在該程式的A和B的比對中作為相同匹配得分的胺基酸殘基的數量，並且其中Y是B中胺基酸殘基的總數。將理解的是，在胺基酸序列A的長度不等於胺基酸序列B的長度的情況下，A與B的胺基酸序列同一性%將不等於B與A的胺基酸序列同一性%。出於本文的目的，給定核酸序列C與(to、with或against)給定核酸序列D的核酸序列同一性%(其可以可替代地用短語表示為與(to、with或against)給定核酸序列D具有或包含一定核酸序列同一性%的給定核酸序列C)計算如下：100乘以分數W/Z，其中W是藉由序列比對程式在該程式的C和D的比對中作為相同匹配得分的核苷酸的數量，並且其中Z是D中核苷酸的總數。將理解的是，在核酸序列C的長度不等於核酸序列D的長度的情況下，C與D的核酸序列同一性%將不等於D與C的核酸序列同一性%。

【0067】 「經分離的」分子(例如，核酸或蛋白質)或細胞意指它已經從其天然環境的組分中鑒定並分離和/或回收。

【0068】 「有效量」是足以實現有益或所需結果的量，所述結果包括臨床結果(例如，症狀的改善、臨床終點的實現等)。可以將有效量在一次或多次投予中投予。就疾病狀態而言，有效量是足以改善、穩定疾病或延遲疾病發展的量。

【0069】 「個體」或「受試者」是哺乳動物。哺乳動物包括但不限於家養動物(例如，牛、綿羊、貓、狗和馬)、靈長類動物(例如，人和非人靈長類動物如猴)、兔和齧齒動物(例如，小鼠和大鼠)。在某些實施例中，個體或受試者是人類。

【0070】 如本文所用，「治療」是用於獲得有益或所需臨床結果的途徑。出於本發明的目的，有益或所需的臨床結果包括但不限於減輕症狀、減小疾病的範圍、穩定疾病狀態(例如，不惡化)、防止疾病擴散(例如，轉移)、延遲或減

緩疾病進展、改善或緩和疾病狀態、以及緩解(無論是部分還是全部)，無論是可檢測的還是不可檢測的。「治療」也可以意指與如果不接受治療的預期存活時間相比延長存活時間。

【0071】如本文所用，術語「預防性治療」是指這樣的治療，其中已知或懷疑個體患有病症或具有患上病症的風險，但是尚未展示出病症的症狀或展示出病症的最小症狀。可以在症狀發作前治療經受預防性治療的個體。

【0072】如本文所用，術語「肌強直性營養不良1型」或「DM1」是指影響骨骼肌和平滑肌以及眼睛、心臟、內分泌系統和中樞神經系統的多系統病症。DM-1有三個重疊的類別(Bird, TD, *Myotonic Dystrophy Type 1*. 1999年9月17日 [2021年3月25日 更新]. 於: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA等人編輯. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022)。輕度DM1以白內障和輕度肌強直為特徵，經典DM1以肌肉無力和萎縮、肌強直、白內障以及常有心臟傳導異常為特徵。先天性DM1以出生時肌張力低下和嚴重全身無力為特徵，常伴有呼吸功能不全和早逝；常見智力殘疾。

【0073】如本文所用，術語「肌強直性營養不良蛋白激酶」、「DMPK」、「肌強直素(myotonin)蛋白激酶」、「MT-PK」、「肌強直性營養不良蛋白激酶」或「MDPK」可以指涉與大多數DM1病例相關的基因或其多肽產物。DMPK基因的3'非轉譯區含有5-37個CTG三核苷酸重複的拷貝。將這種不穩定模體擴增到50-1,000個拷貝引起肌強直性營養不良I型，其嚴重程度隨著重複元件拷貝數的增加而增加。

【0074】如本文所用，「RNAi」可以指涉在細胞中誘導RNA干擾的任何RNA分子。RNAi的例子包括但不限於小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)

和小髮夾RNA(shRNA)。

【0075】 「miRNA」可以指涉含有以下的多核苷酸：(i) 靶向目的基因以藉由RNAi敲滅的雙股序列，和 (ii) 形成類似於內源miRNA的莖-環結構的莖-環結構的另外的序列。在一些實施例中，miRNA包括側接於莖-環結構的核酸。這些側接序列被稱為「miRNA支架」。靶向目的基因以進行RNAi的序列(例如，約20 nt的短序列)可以連接至產生miRNA樣莖-環的序列和與目的序列鹼基配對的序列，從而在多核苷酸組裝成miRNA樣二級結構時，形成雙股體。如本文所述，此雙股體可以不完美地雜交，例如，它可以包含一個或多個未配對或錯配鹼基。在藉由Dicer切割此多核苷酸後，這個含有靶向目的基因的序列的雙股體可以展開並摻入RISC複合物中。miRNA支架可以指涉miRNA本身或編碼miRNA的DNA多核苷酸。miRNA支架的例子包括miR-155序列(Lagos-Quintana, M.等人 (2002) *Curr. Biol.* 12:735-9)和mirGE支架(WO 2014016817A2)。可商購獲得的用於將序列選殖到miRNA支架中的套組是本領域已知的(例如，Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi表現載體套組，來自Life Technologies，Thermo Fisher Scientific；麻塞諸塞州沃爾瑟姆)。

【0076】 如本文所用，術語「有義」核酸是包含編碼轉基因的全部或部分的序列的核酸。在一些例子中，轉基因的mRNA是有義核酸。

【0077】 如本文所用，「反義」核酸是與「有義」核酸互補的核酸序列。例如，反義核酸可以與編碼轉基因的mRNA互補。

【0078】 如本文所用，RNAi的「指導區」是RNAi中通常基於互補性結合靶mRNA的股。互補區可以涵蓋指導區的全部或部分。通常，互補區至少包括種子區。在許多情況下，RNAi的反義區是指導區。

【0079】如本文所用，本文互換使用的RNAi的「過客區」或「非指導區」是RNAi中與指導區互補的區域。在許多情況下，RNAi的有義區是過客區。

【0080】如本文所用，RNAi(例如，miRNA)的「種子區」是微小RNA的長度為約1-8個核苷酸的區域。在一些例子中，種子區和其靶mRNA的3' UTR可以是RNAi識別中的關鍵決定因素。

【0081】如本文所用，「脫靶基因沈默」是指RNAi的種子區與非期望mRNA的3' UTR配對，並且引導那些轉錄物的轉譯抑制和去穩定化(例如，減少非期望mRNA的表現)。

【0082】本文提及「約」某一值或參數包括(並且描述)涉及該值或參數本身的實施例。例如，涉及「約X」的描述包括對「X」的描述。

【0083】除非另外指示，否則如本文所用，冠詞的單數形式「一個/一種(a)」、「一個/一種(an)」和「所述(the)」包括複數指示物。

【0084】應理解，本文所述的本發明的態樣和實施例包括「包含多個態樣和實施例」、「由多個態樣和實施例組成」和/或「基本上由多個態樣和實施例組成」。

RNAi

【0085】在一些態樣，本發明提供了靶向DMPK RNA以治療肌強直性營養不良1型(DM1)的經改進的RNAi。在一些實施例中，RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)或小髮夾RNA(shRNA)。小抑制性或干擾性RNA(siRNA)在本領域中作為長度為大約19-25個(例如，19-23個)鹼基對的雙股RNA分子而已知，其在細胞中誘導RNAi。miRNA通常比siRNA小，可以具有多種靶標，並且發揮功能以抑制轉譯、降解mRNA並且在一些情況下內切核苷酸地

切割mRNA。小髮夾RNA(shRNA)在本領域中作為包含藉由短環(例如，約4-11個核苷酸)連接的雙股RNA的大約19-25個(例如，19-23個)鹼基對的RNA分子而已知，其在細胞中誘導RNAi。在一些實施例中，RNAi包含第一股和第二股，其中a) 第一股和第二股形成雙股體；b) 第一股包含指導區，其中指導區包含核酸序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)；並且c) 第二股包含非指導區。在一些實施例中，指導區包含核酸序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)，並且非指導區包含序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)。

【0086】 在一些實施例中，第一股包含指導區，其中指導區包含與5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)具有超過約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列。在一些實施例中，第一股包含指導區，其中指導區包含與5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)具有超過約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列，但是保留至少一個CpG模體。在一些實施例中，第二股包含非指導區，其中非指導區包含與5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)具有超過約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列。在一些實施例中，第二股包含非指導區，其中非指導區包含與5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)具有超過約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列，但是保留至少一個CpG模體。

【0087】 在一些實施例中，RNAi包含SEQ ID NO: 7的核酸序列。在一些實

施例中，RNAi包含與SEQ ID NO: 7具有超過約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列。在一些實施例中，RNAi包含與SEQ ID NO: 7具有超過約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列，但是保留至少一個序列(例如，在種子序列中)。

【0088】 在一些實施例中，本發明提供了編碼RNAi的核酸，所述RNAi包含第一股和第二股，其中a) 第一股和第二股形成雙股體；b) 第一股包含指導區，並且c) 第二股包含非指導區。在一些實施例中，編碼RNAi的核酸包含SEQ ID NO: 4的核酸序列和/或SEQ ID NO: 5的核酸。在一些實施例中，編碼RNAi的核酸包含與SEQ ID NO: 4具有超過約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列和/或與SEQ ID NO: 5具有超過約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列。在一些實施例中，RNAi由SEQ ID NO: 8的核酸序列編碼。在一些實施例中，RNAi由與SEQ ID NO: 8具有超過約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列編碼。

【0089】 微小RNA(miRNA)在本領域中作為在細胞中誘導RNAi的RNA分子而已知，其包含藉由環連接的雙股RNA的短(例如，19-25個鹼基對)序列，並且包含一個或多個含有一個或多個凸起(例如，錯配或未配對鹼基對)的雙股RNA的另外的序列。如本文所用，術語「miRNA」涵蓋內源miRNA以及外源或異源miRNA。在一些實施例中，「miRNA」可以指涉初級miRNA(pri-miRNA)或前體miRNA(pre-miRNA)。在miRNA加工期間，產生初級miRNA轉錄物。藉由Drosha-DGCR8加工初級miRNA，以藉由切除一個或多個序列產生前體miRNA，從而留下具有以下的前體miRNA：5'側接區、指導股、環區、非指導股和3'側接

區；或5'側接區、非指導股、環區、指導股和3'側接區。前體miRNA然後被輸出到細胞質中並藉由Dicer加工，以產生具有指導股和非指導(或過客)股的siRNA。然後，RISC複合物使用指導股催化基因沈默，例如藉由識別與指導股互補的靶RNA序列。對miRNA的進一步描述可見於例如WO 2008/150897。miRNA識別靶序列主要藉由靶標與miRNA種子序列(例如，指導股的核苷酸1-8(5'到3'))之間的配對來決定(參見例如，Boudreau, R.L.等人 (2013) *Nucleic Acids Res.* 41:e9)。

【0090】 在初級/前體miRNA結構中，雙股體中指導股:非指導股介面部分地藉由互補鹼基配對(例如，華生-克里克鹼基配對)形成。然而，在一些實施例中，這種互補鹼基配對並不延及整個雙股體。在一些實施例中，介面中的凸起可以存在於一個或多個核苷酸位置處。如本文所用，術語「凸起」可以指涉核酸中與在雙股體中相對的核酸不互補的區域。在一些實施例中，當互補核酸的區域彼此結合時形成凸起，而中心非互補區的區域不結合。在一些實施例中，當位於兩個互補區之間的兩條核酸股具有不同長度時形成凸起。如下所述，凸起可以包含1個或多個核苷酸。

【0091】 在miRNA加工期間，miRNA在與指導股:非指導股介面相鄰的切割位點處被切割，從而釋放指導股和非指導股的siRNA雙股體。在一些實施例中，miRNA在與切割位點相鄰的有義股或反義股中包含凸起。換言之，在一些實施例中，miRNA在與種子序列相鄰的指導股或非指導股中包含凸起。

【0092】 在一些實施例中，miRNA在指導股中包含與成熟非指導股的5'切割位點相對的凸起。在一些實施例中，miRNA包含與非指導股的5'核苷酸相對的凸起。在一些實施例中，miRNA在有義股中包含與成熟指導股的3'切割位點相對的凸起。在一些實施例中，miRNA包含與指導股的3'核苷酸相對的凸起。

【0093】基於RNAi的療法的安全性可能受到小抑制性RNA(siRNA)與非期望mRNA結合並減少其表現的能力(一種稱為脫靶基因沈默的效應)的阻礙。脫靶主要在種子區(小RNA的核苷酸2-8)與非期望mRNA的3' UTR中的序列配對並引導那些轉錄物的轉譯抑制和去穩定化時發生。可以藉由取代指導序列和非指導序列內的鹼基來設計脫靶減少的RNAi；例如，藉由產生CpG模體。可以使用SiSPOTR演算法評價可導致脫靶得分顯著下降的潛在取代，所述演算法是一種專注特異性的siRNA設計演算法，其鑒定具有最小脫靶可能性和強力沈默能力的候選序列(Boudreau等人, *Nucleic Acids Res.* 2013年1月; 41(1) e9)。SiSPOTR得分降低預示著與母體RNAi分子相比具有較少數量的潛在人類脫靶的序列。在本發明的一些實施例中，RNAi經改進以減少脫靶基因沈默。

【0094】在一些實施例中，第一股和第二股借助能夠形成環結構的RNA(例如，RNA連接子)連接。如本領域眾所周知的，當RNA分子包含鹼基配對在一起但被未鹼基配對在一起的一個RNA序列分開的兩個RNA序列時，形成RNA環結構(例如，莖-環或髮夾)。例如，如果序列A和序列C互補或部分互補，使得它們鹼基配對在一起，但是序列B中的鹼基未鹼基配對在一起，則RNA分子A-B-C中可以形成環結構。

【0095】在一些實施例中，能夠形成環結構的RNA包含4至50個核苷酸。在某些實施例中，能夠形成環結構的RNA包含13個核苷酸。在一些實施例中，能夠形成環的RNA中核苷酸的數量是4至50個核苷酸或其間的任何整數。在一些實施例中，環的0-50%可以與環的另一部分互補。如本文所用，術語「環結構」是連接兩條互補的核酸股的序列。在一些實施例中，環結構1-3個核苷酸與互補的核酸股鄰接，並且可以與環結構遠側部分的1-3個核苷酸互補。例如，環結構5'

端的三個核苷酸可以與環結構3'端的三個核苷酸互補。

【0096】 在一些實施例中，編碼本公開文本的RNAi的核酸包含異源miRNA支架。在一些實施例中，異源miRNA支架的用途是用於調節miRNA表現；例如，增加miRNA表現或減少miRNA表現。可以使用本領域已知的任何miRNA支架。在一些實施例中，miRNA支架源自miR-155支架(參見例如，Lagos-Quintana, M.等人 (2002) *Curr. Biol.* 12:735-9；和Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi表現載體套組，來自Life Technologies，Thermo Fisher Scientific；麻塞諸塞州沃爾瑟姆)或mirGE支架(WO 2014/016817)。

治療肌強直性營養不良1型(DM-1)的方法

【0097】 肌強直性營養不良1型(DM1)是一種由DMPK基因座(肌強直性營養不良蛋白激酶)中CTG重複擴增(> 50)引起的單基因常染色體顯性進行性疾病。具有重複的DMPK被轉錄成mRNA，mRNA形成髮夾並結合RNA結合蛋白，使RNA結合蛋白失去其正常功能。這導致細胞核聚集點的出現、錯誤剪接，並且最終導致肌強直。DM1主要影響骨骼肌、心肌和平滑肌，導致嚴重的身體、認知和行為損害和殘疾。

【0098】 在一些態樣，本發明提供了用於治療哺乳動物的肌強直性營養不良1型(DM1)的方法和組合物，其包括向哺乳動物投予本公開文本的醫藥組合物(例如，包含本公開文本的rAAV顆粒的醫藥組合物)。在一些態樣，本發明提供了用於抑制DMPK在患有DM-1的哺乳動物中的表現的方法和組合物，其包括向哺乳動物投予本公開文本的醫藥組合物(例如，包含本公開文本的rAAV顆粒的醫藥組合物)。在一些態樣，本發明提供了用於抑制DMPK在患有DM1的哺乳動物的細胞中的積累的方法和組合物，其包括向哺乳動物投予本公開文本的醫藥組

合物(例如，包含本公開文本的rAAV顆粒的醫藥組合物)。在一些態樣，本發明提供了用於改善DM1症狀的方法和組合物，其包括向哺乳動物的肌肉腦投予有效量的包含編碼本公開文本的RNAi的載體的rAAV顆粒。

【0099】 在一些態樣，本發明提供了用於靶向患有DM1的哺乳動物中的DMPK mRNA的RNAi。在一些實施例中，RNAi包含第一股和第二股，所述第一股包含含有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)的第一核酸，所述第二股包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)的第二核酸。本文所述的RNAi(例如，作為rAAV載體的一部分)尤其可用於治療DM1。

【0100】 在一些實施例中，RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)或小髮夾RNA(shRNA)。小抑制性或干擾性RNA(siRNA)在本領域中作為長度為大約19-25個(例如，19-23個)鹼基對的雙股RNA分子而己知，其在細胞中誘導RNAi。miRNA通常比siRNA小，可以具有多種靶標，並且發揮功能以抑制轉譯、降解mRNA並且在一些情況下內切核苷酸地切割mRNA。小髮夾RNA(shRNA)在本領域中作為包含藉由短環(例如，約4-11個核苷酸)連接的雙股RNA的大約19-25個(例如，19-23個)鹼基對的RNA分子而己知，其在細胞中誘導RNAi。

【0101】 在一些實施例中，miRNA包含與SEQ ID NO: 1約90%相同的指導序列。在一些實施例中，miRNA包含與SEQ ID NO: 1約90%相同、91%相同、92%相同、93%相同、94%相同、95%相同、96%相同、97%相同、98%相同、99%相同或100%相同中的任一個的指導序列。

【0102】 在一些實施例中，miRNA包含與SEQ ID NO: 2約90%相同的非指

導序列(過客股)。在一些實施例中，miRNA包含與SEQ ID NO: 2約90%相同、91%相同、92%相同、93%相同、94%相同、95%相同、96%相同、97%相同、98%相同、99%相同或100%相同中的任一個的非指導序列。

【0103】 在一些實施例中，第一股和第二股借助能夠形成環結構的RNA連接。如本領域眾所周知的，當RNA分子包含鹼基配對在一起但被未鹼基配對在一起的一個RNA序列分開的兩個RNA序列時，形成RNA環結構(例如，莖-環或髮夾)。例如，如果序列A和序列C互補或部分互補，使得它們鹼基配對在一起，但是序列B中的鹼基未鹼基配對在一起，則RNA分子A-B-C中可以形成環結構。

【0104】 在一些實施例中，能夠形成環結構的RNA包含4至50個核苷酸。在某些實施例中，能夠形成環結構的RNA包含13個核苷酸。在某些實施例中，能夠形成環結構的RNA包含核苷酸序列GUUUUGGCCACUGACUGAC(SEQ ID NO: 3)。在一些實施例中，載體基因體包含與SEQ ID NO: 3的序列至少約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一個相同的核苷酸序列。

【0105】 在一些態樣，本發明提供了包括向哺乳動物(例如，患有DM1的哺乳動物)授予RNAi的方法，所述RNAi包含第一股和第二股，所述第一股包含含有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)的第一核酸，所述第二股包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)的第二核酸。在一些實施例中，重組病毒顆粒包含RNAi。在一些實施例中，重組病毒顆粒是衣殼化rAAV載體的AAV顆粒，其中rAAV載體編碼RNAi。

【0106】 在一些實施例中，rAAV顆粒的遞送是藉由向哺乳動物全身注射rAAV顆粒。在一些實施例中，全身注射是靜脈內注射、動脈內注射、肌內注射、

腹膜內注射、皮內注射、或皮下注射、CSF內和鞘內投予(IT)。

【0107】 在一些態樣，本發明提供了用於治療哺乳動物的DM1的方法，所述方法包括向哺乳動物投予本公開文本的醫藥組合物。在一些態樣，本發明提供了用於抑制DMPK在患有DM1的哺乳動物的細胞中的積累的方法，所述方法包括向哺乳動物投予本公開文本的醫藥組合物。在一些態樣，本發明提供了用於抑制DMPK在患有DM1的哺乳動物中的表現的方法，所述方法包括向哺乳動物投予本公開文本的醫藥組合物。在一些實施例中，DMPK是突變型DMPK(例如，包含大於37或大於50個CTG重複的DMPK)。

【0108】 在一些實施例中，本發明提供了用於藉由投予有效量的包含編碼本公開文本的RNAi的rAAV載體的醫藥組合物以抑制突變型DMPK的活性來治療患有DM1的人類的方法。在一些實施例中，醫藥組合物包含一種或多種醫藥上可接受的賦形劑。

【0109】 在一些實施例中，所述方法包括投予有效量的包含編碼本公開文本的RNAi的rAAV載體的醫藥組合物，以抑制突變型DMPK的活性。在一些實施例中，rAAV顆粒的病毒力價是至少約 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 10×10^{12} 、 11×10^{12} 、 15×10^{12} 、 20×10^{12} 、 25×10^{12} 、 30×10^{12} 或 50×10^{12} 個基因體拷貝/mL中的任一個。在一些實施例中，rAAV顆粒的病毒力價是約 5×10^{12} 至 6×10^{12} 、 6×10^{12} 至 7×10^{12} 、 7×10^{12} 至 8×10^{12} 、 8×10^{12} 至 9×10^{12} 、 9×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 11×10^{12} 、 11×10^{12} 至 15×10^{12} 、 15×10^{12} 至 20×10^{12} 、 20×10^{12} 至 25×10^{12} 、 25×10^{12} 至 30×10^{12} 、 30×10^{12} 至 50×10^{12} 或 50×10^{12} 至 100×10^{12} 個基因體拷貝/mL中的任一個。在一些實施例中，rAAV顆粒的病毒力價是約 5×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 25×10^{12} 或 25×10^{12} 至 50×10^{12} 個基因體拷貝/mL中的

任一個。在一些實施例中，rAAV顆粒的病毒力價是至少約 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 10×10^9 、 11×10^9 、 15×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 或 50×10^9 個轉導單位/mL中的任一個。在一些實施例中，rAAV顆粒的病毒力價是約 5×10^9 至 6×10^9 、 6×10^9 至 7×10^9 、 7×10^9 至 8×10^9 、 8×10^9 至 9×10^9 、 9×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 11×10^9 、 11×10^9 至 15×10^9 、 15×10^9 至 20×10^9 、 20×10^9 至 25×10^9 、 25×10^9 至 30×10^9 、 30×10^9 至 50×10^9 或 50×10^9 至 100×10^9 個轉導單位/mL中的任一個。在一些實施例中，rAAV顆粒的病毒力價是約 5×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 15×10^9 、 15×10^9 至 25×10^9 或 25×10^9 至 50×10^9 個轉導單位/mL中的任一個。在一些實施例中，rAAV顆粒的病毒力價是至少約 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 10×10^{10} 、 11×10^{10} 、 15×10^{10} 、 20×10^{10} 、 25×10^{10} 、 30×10^{10} 、 40×10^{10} 或 50×10^{10} 個感染單位/mL中的任一個。在一些實施例中，rAAV顆粒的病毒力價是至少約 5×10^{10} 至 6×10^{10} 、 6×10^{10} 至 7×10^{10} 、 7×10^{10} 至 8×10^{10} 、 8×10^{10} 至 9×10^{10} 、 9×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 11×10^{10} 、 11×10^{10} 至 15×10^{10} 、 15×10^{10} 至 20×10^{10} 、 20×10^{10} 至 25×10^{10} 、 25×10^{10} 至 30×10^{10} 、 30×10^{10} 至 40×10^{10} 、 40×10^{10} 至 50×10^{10} 或 50×10^{10} 至 100×10^{10} 個感染單位/mL中的任一個。在一些實施例中，rAAV顆粒的病毒力價是至少約 5×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 15×10^{10} 、 15×10^{10} 至 25×10^{10} 或 25×10^{10} 至 50×10^{10} 個感染單位/mL中的任一個。

【0110】 在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 1×10^8 至約 2×10^{13} 個基因體拷貝/mL中的任一個。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 1×10^8 至約 5×10^8 、約 5×10^8 至約 10×10^8 、約 10×10^8 至約 20×10^8 、約 20×10^8 至約 30×10^8 、約 30×10^8 至約 40×10^8 、約 40×10^8 至約 50×10^8 或約 50×10^8 至約 100×10^8 個基因體拷貝/mL中的任一個。在一些實施例中，向個

體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 1×10^9 至約 5×10^9 、約 5×10^9 至約 10×10^9 、約 10×10^9 至約 20×10^9 、約 20×10^9 至約 30×10^9 、約 30×10^9 至約 40×10^9 、約 40×10^9 至約 50×10^9 或約 50×10^9 至約 100×10^9 個基因體拷貝/mL中的任一個。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 1×10^{10} 至約 5×10^{10} 、約 5×10^{10} 至約 10×10^{10} 、約 10×10^{10} 至約 20×10^{10} 、約 20×10^{10} 至約 30×10^{10} 、約 30×10^{10} 至約 40×10^{10} 、約 40×10^{10} 至約 50×10^{10} 或約 50×10^{10} 至約 100×10^{10} 個基因體拷貝/mL中的任一個。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 1×10^{11} 至約 5×10^{11} 、約 5×10^{11} 至約 10×10^{11} 、約 10×10^{11} 至約 20×10^{11} 、約 20×10^{11} 至約 30×10^{11} 、約 30×10^{11} 至約 40×10^{11} 、約 40×10^{11} 至約 50×10^{11} 或約 50×10^{11} 至約 100×10^{11} 個基因體拷貝/mL中的任一個。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 1×10^{12} 至約 5×10^{12} 、約 5×10^{12} 至約 10×10^{12} 、約 10×10^{12} 至約 20×10^{12} 、約 20×10^{12} 至約 30×10^{12} 、約 30×10^{12} 至約 40×10^{12} 、約 40×10^{12} 至約 50×10^{12} 或約 50×10^{12} 至約 100×10^{12} 個基因體拷貝/mL中的任一個。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 1×10^{13} 至約 2×10^{13} 個基因體拷貝/mL中的任一個。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 1×10^8 、約 5×10^8 、約 1×10^9 、約 5×10^9 、約 1×10^{10} 、約 5×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 5×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 5×10^{12} 、約 1×10^{13} 或約 2×10^{13} 個基因體拷貝/mL。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 5×10^{12} 個基因體拷貝/mL。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 1×10^{13} 個基因體拷貝/mL。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量濃度是約 2×10^{13} 個基因體拷貝/mL。

【0111】 在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量是至少約 1×10^8

至約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重中的任一個。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量在約 1×10^8 至約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重中的任一個之間。

在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量在約 1×10^8 至約 1×10^{14} 、 5×10^8 至約 1×10^{14} 、 1×10^9 至約 1×10^{14} 、 5×10^9 至約 1×10^{14} 、 1×10^{10} 至約 1×10^{14} 、 5×10^{10} 至約 1×10^{14} 、 1×10^{11} 至約 1×10^{14} 、 5×10^{11} 至約 1×10^{14} 、 1×10^{12} 至約 1×10^{14} 、 5×10^{12} 至約 1×10^{14} 、 1×10^{13} 至約 1×10^{14} 、 5×10^{13} 至約 1×10^{14} 、 1×10^8 至約 5×10^{13} 、 5×10^8 至約 5×10^{13} 、 1×10^9 至約 5×10^{13} 、 5×10^9 至約 5×10^{13} 、 1×10^{10} 至約 5×10^{13} 、 5×10^{10} 至約 5×10^{13} 、 1×10^{11} 至約 5×10^{13} 、 5×10^{11} 至約 5×10^{13} 、 1×10^{12} 至約 5×10^{13} 、 5×10^{12} 至約 5×10^{13} 、 1×10^{13} 至約 5×10^{13} 、 1×10^8 至約 1×10^{13} 、 5×10^8 至約 1×10^{13} 、 1×10^9 至約 1×10^{13} 、 5×10^9 至約 1×10^{13} 、 1×10^{10} 至約 1×10^{13} 、 5×10^{10} 至約 1×10^{13} 、 1×10^{11} 至約 1×10^{13} 、 5×10^{11} 至約 1×10^{13} 、 1×10^{12} 至約 1×10^{13} 、 5×10^{12} 至約 1×10^{13} 、 1×10^8 至約 5×10^{12} 、 5×10^8 至約 5×10^{12} 、 1×10^9 至約 5×10^{12} 、 5×10^9 至約 5×10^{12} 、 1×10^{10} 至約 5×10^{12} 、 5×10^{10} 至約 5×10^{12} 、 1×10^{11} 至約 5×10^{12} 、 5×10^{11} 至約 5×10^{12} 、 1×10^{12} 至約 5×10^{12} 、 1×10^8 至約 1×10^{12} 、 5×10^8 至約 1×10^{12} 、 1×10^9 至約 1×10^{12} 、 5×10^9 至約 1×10^{12} 、 1×10^{10} 至約 1×10^{12} 、 5×10^{10} 至約 1×10^{12} 、 1×10^{11} 至約 1×10^{12} 、 5×10^{11} 至約 1×10^{12} 、 1×10^8 至約 5×10^{11} 、 5×10^8 至約 5×10^{11} 、 1×10^9 至約 5×10^{11} 、 5×10^9 至約 5×10^{11} 、 1×10^{10} 至約 5×10^{11} 、 5×10^{10} 至約 5×10^{11} 、 1×10^{11} 至約 5×10^{11} 、 1×10^8 至約 1×10^{11} 、 5×10^8 至約 1×10^{11} 、 1×10^9 至約 1×10^{11} 、 5×10^9 至約 1×10^{11} 、 1×10^{10} 至約 1×10^{11} 、 5×10^{10} 至約 1×10^{11} 、 1×10^8 至約 5×10^{10} 、 5×10^8 至約 5×10^{10} 、 1×10^9 至約 5×10^{10} 、 5×10^9 至約 5×10^{10} 、 1×10^{10} 至約 5×10^{10} 、 5×10^{10} 至約 5×10^{10} 、 1×10^8 至約 1×10^{10} 、 5×10^8 至約 1×10^{10} 、 1×10^9 至約 1×10^{10} 、 5×10^9 至約 1×10^{10} 、 1×10^{10} 至約 1×10^{10} 、 5×10^9 至約 5×10^9 、 5×10^8 至約 5×10^9 、 1×10^9 至約 5×10^9 、

1×10^8 至約 1×10^9 、 5×10^8 至約 1×10^9 或 1×10^8 至約 5×10^8 gc/kg體重中的任一個之間。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量是約 1×10^9 、約 5×10^9 、約 1×10^{10} 、約 5×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 5×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 5×10^{12} 、約 1×10^{13} 、約 5×10^{13} 、約 1×10^{14} 或約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量是約 5×10^{13} 個基因體拷貝/kg體重。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量是約 1×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的劑量是約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重。

【0112】 在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的總量是至少約 1×10^9 至約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重中的任一個。在一些實施例中，向個體投予的rAAV顆粒的總量是約 1×10^9 至約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重中的任一個。在本發明的一些實施例中，注射至紋狀體的組合物的體積超過約10 μ l、25 μ l、50 μ l、75 μ l、100 μ l、200 μ l、300 μ l、400 μ l、500 μ l、600 μ l、700 μ l、800 μ l、900 μ l、1 mL、5 mL、10 mL、25 mL、50 mL、75 mL或100 mL或其間的任何量中的任一個。

【0113】 本發明的組合物(例如，包含編碼本公開文本的RNAi的載體的rAAV顆粒)可以單獨使用或與用於治療DM1的一種或多種另外的治療劑組合使用。依次投予之間的時間可以按至少(或者可替代地，少於)分鐘、小時、或天計。

【0114】 在一些實施例中，將治療DM1的RNAi與免疫抑制劑組合投予；例如，以抑制對RNAi的免疫反應。在一些實施例中，在投予RNAi之前投予免疫抑制劑。在一些實施例中，在投予RNAi的同時投予免疫抑制劑。在一些實施例中，在投予RNAi之後投予免疫抑制劑。在一些實施例中，以投予RNAi之前、期間或之後的任何組合投予免疫抑制劑。

【0115】 在一些實施例中，將治療DM1的rAAV顆粒與免疫抑制劑組合投予；例如，以抑制對rAAV顆粒和/或rAAV顆粒的轉基因產物的免疫反應。在一些實施例中，在投予rAAV顆粒之前投予免疫抑制劑。在一些實施例中，在投予rAAV顆粒的同時投予免疫抑制劑。在一些實施例中，在投予rAAV顆粒之後投予免疫抑制劑。在一些實施例中，以投予rAAV顆粒之前、期間或之後的任何組合投予免疫抑制劑。

【0116】 在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何RNAi在製造用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的藥劑中的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何RNAi在製造用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的藥劑中的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何RNAi在製造用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的藥劑中的用途。

【0117】 在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何RNAi用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何RNAi用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何RNAi用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的用途。

【0118】 在一些實施例中，本發明提供了用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的本文所述的RNAi。在一些實施例中，本發明提供了用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中

的表現的本文所述的任何RNAi。在一些實施例中，本發明提供了用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的本文所述的任何RNAi。

【0119】 在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何病毒顆粒(例如，AAV顆粒)在製造用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的藥劑中的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何病毒顆粒(例如，AAV顆粒)在製造用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的藥劑中的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何病毒顆粒(例如，AAV顆粒)在製造用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的藥劑中的用途。

【0120】 在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何病毒顆粒(例如，AAV顆粒)用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何病毒顆粒(例如，AAV顆粒)用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何病毒顆粒(例如，AAV顆粒)用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的用途。

【0121】 在一些實施例中，本發明提供了用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的本文所述的病毒顆粒(例如，AAV顆粒)。在一些實施例中，本發明提供了用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的本文所述的任何病毒顆粒(例如，AAV顆粒)。在

一些實施例中，本發明提供了用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的本文所述的任何病毒顆粒(例如，AAV顆粒)。

【0122】 在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何組合物在製造用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的藥劑中的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何組合物在製造用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的藥劑中的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何組合物在製造用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的藥劑中的用途。

【0123】 在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何組合物用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何組合物用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的用途。在一些實施例中，本發明提供了有效量的本文所述的任何組合物用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的用途。

【0124】 在一些實施例中，本發明提供了用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的本文所述的組合物。在一些實施例中，本發明提供了用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的本文所述的任何組合物。在一些實施例中，本發明提供了用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的本文所述的任何組合物。

RNAi表現構築體和載體

【0125】 本發明提供了用於表現本文所述的RNAi的表現構築體、載體和rAAV顆粒。

【0126】 在一些實施例中，編碼本公開文本的RNAi的核酸包含異源miRNA支架。在一些實施例中，異源miRNA支架的用途是用於調節miRNA表現；例如，增加miRNA表現或減少miRNA表現。可以使用本領域已知的任何miRNA支架。在一些實施例中，miRNA支架源自miR-155支架(參見例如，Lagos-Quintana, M.等人 (2002) *Curr. Biol.* 12:735-9；和Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi表現載體套組，來自Life Technologies，Thermo Fisher Scientific；麻塞諸塞州沃爾瑟姆)或mirGE支架(WO 2014/016817)。在一些實施例中，編碼本公開文本的RNAi的核酸包含miRNA支架。在一些實施例中，miRNA支架由SEQ ID NO: 11提供。在一些實施例中，miRNA支架包含與SEQ ID NO: 11的核酸序列具有大於80%、85%、90%、95%或99%同一性的核酸。

【0127】 在一些實施例中，RNAi靶向編碼與DM1相關的多肽(例如，突變型DMPK)的RNA。不希望受理論束縛，據認為可以使用RNAi減少或消除其功能獲得已經與DM1相關的多肽(例如，突變型DMPK)的表現和/或活性。

【0128】 在一些實施例中，轉基因(例如，編碼本公開文本的RNAi)可操作地連接至啟動子。例示性啟動子包括但不限於巨細胞病毒(CMV)立即早期啟動子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)啟動子、猿猴病毒40(SV40)啟動子和CK6啟動子、轉甲狀腺素蛋白啟動子(TTR)、TK啟動子、四環素應答性啟動子(TRE)、HBV啟動子、hAAT啟動子、LSP啟動子、嵌合肝臟特異性啟動子(LSP)、E2F啟動子、端粒酶(hTERT)啟動子、巨細胞病毒增強子/雞β-肌動蛋白/兔β-珠蛋白啟動子(CAG啟動子；Niwa等人, *Gene*, 1991, 108(2):193-9)和延伸因子

1- α 啟動子(EF1- α)啟動子(Kim等人, *Gene*, 1990, 91(2):217-23和Guo等人, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10)。在一些實施例中，啟動子包含人 β -葡糖醛酸糖苷酶啟動子或連接至雞 β -肌動蛋白(CBA)啟動子的巨細胞病毒增強子。啟動子可以是組成型、誘導型或阻抑型啟動子。

【0129】 誘導型啟動子允許調節基因表現，並且可以藉由外源提供的化合物、環境因素(如溫度)或存在特定生理狀態(例如，急性期)、細胞的特定分化狀態或僅在複製細胞中進行調節。由外源提供的啟動子調節的誘導型啟動子的例子包括鋅誘導型綿羊金屬硫蛋白(MT)啟動子、地塞米松(Dex)誘導型小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)啟動子、T7聚合酶啟動子系統(WO 98/10088)、蛻皮激素昆蟲啟動子(No等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996))、四環素阻抑型系統(Gossen等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992))、四環素誘導型系統(Gossen等人, *Science*, 268:1766-1769 (1995)，還參見Harvey等人, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998))、RU486誘導型系統(Wang等人, *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997)和Wang等人, *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997))和雷帕黴素誘導型系統(Magari等人, *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997))。在這種背景下可使用的仍其他類型的誘導型啟動子是藉由特定生理狀態(例如，溫度、急性期)、細胞的特定分化狀態或僅在複製細胞中調節的啟動子。

【0130】 在一些實施例中，調節序列賦予組織特異性基因表現能力。在一些情況下，組織特異性調節序列結合以組織特異性方式誘導轉錄的組織特異性轉錄因子。此類組織特異性調節序列(例如，啟動子、增強子等)是本領域熟知的。在一些實施例中，啟動子是肌肉特異性啟動子。在一些實施例中，啟動子是結蛋白啟動子。在一些實施例中，啟動子是人類結蛋白啟動子(例如，人類結蛋白

基因的-228至+75；例如，SEQ ID NO: 23)。在一些實施例中，啟動子是經修飾的結蛋白啟動子。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含對肌肉細胞中的高水平表現很重要的結蛋白啟動子元件(Li和Paulin等人 1991. *Journal of Biol Chem.*)。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含Byrne結蛋白增強子(例如，SEQ ID NO: 21)的至少一個拷貝。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含Paulin結蛋白增強子(例如，SEQ ID NO: 22)的至少一個拷貝(-973至-693)。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含Byrne結蛋白增強子的一個拷貝和Paulin結蛋白增強子的一個拷貝(-973至-693)。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含Byrne結蛋白增強子的一個拷貝和Paulin結蛋白增強子的一個拷貝(-973至-693)以及人類結蛋白基因的啟動子(-228至+75)。

【0131】 在一些態樣，本發明提供了表現匣(例如，用於在肌肉細胞中表現轉基因(例如，治療性轉基因)的表現匣)，其中表現匣包含經修飾的結蛋白啟動子，其中結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列的增強子元件和一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有與SEQ ID NO: 21的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的核苷酸序列的增強子元件。

在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有與SEQ ID NO: 22的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有與SEQ ID NO: 21的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的核苷酸序列的增強子元件和一個或多個含有與SEQ ID NO: 22的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的核苷酸序列的增強子元件。

【0132】 在一些實施例中，包含經修飾的結蛋白啟動子的表現匣進一步包含內含子。在一些實施例中，內含子是兔 β -珠蛋白內含子。在一些實施例中，內含子包含SEQ ID NO: 13的核苷酸序列。在一些實施例中，內含子包含與SEQ ID NO: 13的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，編碼轉基因(例如，治療性轉基因)的核酸嵌在內含子中。在一些實施例中，內含子包含5'臂和3'臂，其中5'臂位於編碼轉基因的核酸的5'處，並且3'臂位於編碼轉基因的核酸的3'處。在一些實施例中，內含子的5'臂包含具有SEQ ID NO: 14的序列的核酸。在一些實施例中，內含子的5'臂包含具有與SEQ ID NO: 14的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的序列的核酸。在一些實施例中，內含子的3'臂包含具有SEQ ID NO: 15的序列的核酸。在一些實施例中，內含子的3'臂包含具有與SEQ ID NO: 15的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的序列的核酸。在一些實施例中，內含子的5'臂包含具有SEQ ID NO: 14的序列的核酸，並且內含子的3'臂包含具有SEQ ID NO: 15的序列的核酸。在一些實施例中，內含子的5'臂包含具有與SEQ ID NO: 14的核苷酸序列具有至少約80%、

85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的序列的核酸，並且內含子的3'臂包含具有與SEQ ID NO: 15的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的序列的核酸。

【0133】 在一些實施例中，包含經修飾的結蛋白啟動子的表現匣進一步包含多腺苷酸化訊號。在一些實施例中，多腺苷酸化訊號是牛生長激素多腺苷酸化訊號、SV40多腺苷酸化訊號、或HSV TK pA。在一些實施例中，多腺苷酸化訊號是最小牛生長激素多腺苷酸化訊號。在一些實施例中，牛生長激素多腺苷酸化訊號包含具有SEQ ID NO: 16的序列的核酸。在一些實施例中，牛生長激素多腺苷酸化訊號包含具有與SEQ ID NO: 16的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的序列的核酸。

【0134】 在一些實施例中，本發明提供了包含用於在肌肉細胞中表現轉基因(例如，治療性轉基因)的經修飾的結蛋白啟動子的表現匣。在一些實施例中，轉基因編碼多肽(例如，治療性多肽)。在一些實施例中，轉基因編碼核酸(例如，治療性核酸)。在一些實施例中，轉基因編碼RNAi。在一些實施例中，轉基因編碼siRNA、shRNA或miRNA。

【0135】 在一些態樣，本發明提供了經修飾的結蛋白啟動子，其中結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動

子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列的增強子元件和一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有與SEQ ID NO: 21的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有與SEQ ID NO: 22的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的核苷酸序列的增強子元件。在一些實施例中，結蛋白啟動子包含一個或多個含有與SEQ ID NO: 21的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的核苷酸序列的增強子元件和一個或多個含有與SEQ ID NO: 22的核苷酸序列具有至少約80%、85%、90%、95%或99%中的任一個同一性的核苷酸序列的增強子元件。

【0136】 在一些態樣，本發明提供了包含重組自身互補的基因體(例如，自身互補的rAAV載體)的rAAV顆粒。具有自身互補的載體基因體的AAV病毒顆粒和使用自身互補的AAV基因體的方法描述於美國專利號6,596,535；7,125,717；7,465,583；7,785,888；7,790,154；7,846,729；8,093,054；和8,361,457；以及Wang Z.等人, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111中，將所述文獻中的每一個藉由引用以其整體併入本文。包含自身互補的基因體的rAAV將借助其部分互補的序列(例如，異源核酸的互補編碼股和非編碼股)迅速形成雙股DNA。在一些實施例中，載體包含編碼異源核酸的第一核酸序列和編碼核酸的互補體的第二核酸序列，其中第一核酸序列可以與第二核酸序列沿著其大部分或全部長度形成股內鹼基對。

【0137】 在一些實施例中，編碼RNAi的第一異源核酸序列和編碼RNAi的互補體的第二異源核酸序列藉由經突變的ITR(例如，正確的ITR)連接。在一些實施例中，ITR包含多核苷酸序列

5'-CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
GGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA
GCGCGCAGAGAGGGA-3'(SEQ ID NO: 27)。經突變的ITR包含含有末端解股序
列的D區的缺失。因此，在複製AAV病毒基因體時，rep蛋白將不在經突變的ITR
處切割病毒基因體，因此，以5'至3'順序包含以下的重組病毒基因體將被包裝在
病毒衣殼中：AAV ITR、包括調節序列的第一異源多核苷酸序列、經突變的AAV
ITR、與第一異源多核苷酸反向的第二異源多核苷酸和第三AAV ITR。

rAAV顆粒和產生rAAV顆粒的方法

【0138】 本發明提供了包含如本文所公開的RNAi的rAAV顆粒。在一些實
施例中，本發明提供了使用重組病毒顆粒遞送RNAi以治療DM1的方法。在一些
實施例中，rAAV顆粒包含側接為一個或兩個ITR的編碼本公開文本的RNAi的序
列。核酸被衣殼化於AAV顆粒中。AAV顆粒還包含衣殼蛋白。在一些實施例中，
核酸包含在轉錄方向上可操作連接組分的一個或多個目的編碼序列(例如，編碼
本公開文本的RNAi的核酸)、控制序列(包括轉錄起始序列和終止序列)，從而形
成表現匣。表現匣的5'和3'端的側接是至少一個功能AAV ITR序列。「功能AAV
ITR序列」意指旨在用於挽救、複製和包裝AAV病毒體的ITR序列功能。參見
Davidson等 人, *PNAS*, 2000, 97(7)3428-32; Passini等 人, *J. Virol.*, 2003,
77(12):7034-40; 和Pechan等人, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16，將其全部藉由引用以
其整體併入本文。為了實施本發明的一些態樣，重組載體至少包含為衣殼化所
必需的所有AAV序列和用於由rAAV感染的物理結構。用於在本發明的載體中使
用的AAV ITR不需要具有野生型核苷酸序列(例如，如Kotin, *Hum. Gene Ther.*,
1994, 5:793-801中所述)，並且可以藉由核苷酸的插入、缺失或取代而改變，或

者AAV ITR可以源自幾種AAV血清型中的任一種。目前已知超過40種AAV血清型，並且不斷鑒定出新的血清型和現有血清型的變體。參見Gao等人, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6；Gao等人, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6；和Bossis等人, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810。使用任何AAV血清型都被視為在本發明的範圍內。在一些實施例中，rAAV載體是源自AAV血清型的載體，包括但不限於，AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVrh74、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣殼血清型ITR等。在一些實施例中，AAV中的核酸包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣殼血清型ITR等的ITR。在一些實施例中，AAV中的核酸進一步編碼如本文所述的RNAi。例如，AAV中的核酸可以包含本文考慮的任何AAV血清型的至少一個ITR，並且可以進一步編碼包含含有指導區的一條股以及含有非指導區的另一條股的RNAi。在一個實施例中，AAV中的核酸可以包含任何AAV血清型的至少一個ITR，並且可以進一步編碼包含含有第一核酸的第一股和含有第二核酸的第二股的RNAi，所述第一核酸包含序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)或與SEQ ID NO: 1具有80%、85%、90%或95%同一性的序列，所述第二核酸包含序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)或與SEQ ID NO: 2具有80%、85%、90%或95%同一性的序列。

【0139】 在一些實施例中，AAV中的核酸從5'到3'包含編碼以下的核酸：ITR(例如，AAV2 ITR)、啟動子、編碼如本文所公開的RNAi的核酸、多腺苷酸

化訊號和AAV ITR(例如，AAV2 ITR)。在一些實施例中，AAV中的核酸從5'到3'包含編碼以下的核酸：ITR(例如，AAV2 ITR)；啟動子；編碼包含含有第一核酸的第一股和含有第二核酸的第二股的RNAi的核酸，所述第一核酸包含序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)或與SEQ ID NO: 1具有80%、85%、90%或95%同一性的序列，所述第二核酸包含序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)或與SEQ ID NO: 2具有80%、85%、90%或95%同一性的序列；多腺苷酸化訊號；以及AAV ITR(例如，AAV2 ITR)。

在一些實施例中，AAV中的核酸從5'到3'包含編碼以下的核酸：ITR(例如，AAV2 ITR)、結蛋白啟動子、編碼如本文所公開的RNAi的核酸、多腺苷酸化訊號(例如，牛生長激素聚A)和AAV ITR(例如，AAV2 ITR)。

在一些實施例中，AAV中的核酸從5'到3'包含編碼以下的核酸：ITR(例如，AAV2 ITR)的全部或功能部分；結蛋白啟動子；內含子(例如，嵌合內含子)；編碼包含含有第一核酸的第一股和含有第二核酸的第二股的RNAi的核酸，所述第一核酸包含序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)或與SEQ ID NO: 1具有80%、85%、90%或95%同一性的序列，所述第二核酸包含序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)或與SEQ ID NO: 2具有80%、85%、90%或95%同一性的序列；多腺苷酸化訊號(例如，牛生長激素聚A)；以及AAV ITR(例如，AAV2 ITR)。

在一些實施例中，第一股和第二股形成雙股體。

在一些實施例中，第一股藉由連接子連接至第二股。在一些實施例中，連接子包含SEQ ID NO: 3的核酸序列或與SEQ ID NO: 3具有80%、85%、90%或95%同一性的序列。

【0140】 在一些實施例中，AAV中的核酸從5'到3'包含編碼以下的核酸：

ITR(例如，AAV2 ITR)的全部或功能部分；填充序列(例如，人類 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列的全部或部分)；結蛋白啟動子；內含子(例如，兔 β -珠蛋白內含子)的5'臂；編碼包含含有第一核酸的第一股和含有第二核酸的第二股的RNAi的核酸，所述第一核酸包含序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)或與SEQ ID NO: 1具有80%、85%、90%或95%同一性的序列，所述第二核酸包含序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)或與SEQ ID NO: 2具有80%、85%、90%或95%同一性的序列；內含子(例如，兔 β -珠蛋白內含子)的3'臂；多腺苷酸化訊號(例如，牛生長激素聚A)；填充序列(例如，人類 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列的全部或部分)；以及AAV ITR(例如，AAV2 ITR)。

【0141】 在一些實施例中，AAV中的核酸從5'到3'包含編碼以下的核酸：ITR(例如，AAV2 ITR)；結蛋白啟動子；編碼包含含有第一核酸的第一股和含有第二核酸的第二股的RNAi的核酸，所述第一核酸包含序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)或與SEQ ID NO: 2具有80%、85%、90%或95%同一性的序列，所述第二核酸包含序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 1)或與SEQ ID NO: 1具有80%、85%、90%或95%同一性的序列；多腺苷酸化訊號(例如，牛生長激素聚A)；以及AAV ITR(例如，AAV2 ITR)。在一些實施例中，第一股和第二股形成雙股體。在一些實施例中，第一股藉由連接子連接至第二股。在一些實施例中，連接子包含SEQ ID NO: 6的核酸序列。

【0142】 在一些實施例中，AAV中的核酸從5'到3'包含編碼以下的核酸：ITR(例如，AAV2 ITR)的全部或功能部分；填充序列(例如，人類 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列的全部或部分)；結蛋白啟動子；內含子(例如，兔 β -珠蛋白內含

子)的5'臂；編碼包含含有第一核酸的第一股和含有第二核酸的第二股的RNAi的核酸，所述第一核酸包含序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)，所述第二核酸包含序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)；內含子(例如，兔 β -珠蛋白內含子)的3'臂；多腺苷酸化訊號(例如，牛生長激素聚A)；填充序列(例如，人類 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列的全部或部分)；以及AAV ITR(例如，AAV2 ITR)。

【0143】 在一些實施例中，載體可以包括(一種或多種)填充核酸。在一些實施例中，填充核酸可以包含編碼報導多肽的序列。如本領域技術人員將理解的，填充核酸可以位於載體內的多個區域中，並且在載體內可以由一個連續序列(例如，在單個位置中的單個填充核酸)或多個序列(例如，在超過一個位置(例如，2個位置、3個位置等)中的超過一個填充核酸)組成。在一些實施例中，填充核酸可以位於RNAi序列的下游。在實施例中，填充核酸可以位於RNAi序列的上游(例如，在啟動子與編碼RNAi的核酸之間)。如本領域技術人員還將理解的，可以使用各種核酸作為填充核酸。在一些實施例中，填充核酸包含人類 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列或C16 P1染色體16 P1殖株(人類C16)填充序列的全部或部分。在一些實施例中，填充序列包含基因的全部或部分。例如，填充序列包含人類AAT序列的一部分。本領域技術人員將理解，基因(例如，人類AAT序列)的不同部分可以用作填充片段。例如，填充片段可以來自基因的5'端、基因的3'端、基因的中間部分、基因的非編碼部分(例如，內含子)、基因的編碼區(例如，外顯子)或基因的非編碼部分和編碼部分的混合物。本領域技術人員還將理解，填充序列的全部或部分可以用作填充序列。在一些實施例中，載體包含5'填充序列，所述5'填充序列包含SEQ ID NO: 18的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 18的核苷酸序

列具有大於約80%、85%、90%、95%或99%同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含3'填充序列，所述3'填充序列包含SEQ ID NO: 19的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 19的核苷酸序列具有大於約80%、85%、90%、95%或99%同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含5'填充序列，所述5'填充序列包含SEQ ID NO: 18的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 18的核苷酸序列具有大於約80%、85%、90%、95%或99%同一性的核苷酸序列；並且包含3'填充序列，所述3'填充序列包含SEQ ID NO: 19的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 19的核苷酸序列具有大於約80%、85%、90%、95%或99%同一性的核苷酸序列。

【0144】 在另外的實施例中，rAAV顆粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh8R、AAVrh.10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74 N502I、AAVrh74 W505R的衣殼蛋白或這些衣殼蛋白的突變體。在一些實施例中，突變型衣殼蛋白保留形成AAV衣殼的能力。在一些實施例中，rAAV顆粒包含AAV5酪胺酸突變型衣殼(Zhong L.等人, (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7827-7832)。在另外的實施例中，rAAV顆粒包含來自進化枝A-F的AAV血清型的衣殼蛋白(Gao等人, *J. Virol.* 2004, 78(12):6381)。

【0145】 使用不同的AAV血清型優化特定靶細胞的轉導或靶向特定靶組織(例如，病變組織)內的特定細胞類型。rAAV顆粒可以包含相同血清型或混合血清型的病毒蛋白和病毒核酸。例如，在一些實施例中，rAAV顆粒可以包含AAV1衣殼蛋白和至少一個AAV2 ITR，或者它可以包含AAV2衣殼蛋白和至少一個AAV1 ITR。本文提供了用於產生rAAV顆粒的AAV血清型的任何組合，如同每個組合都已經在本文中明確說明一樣。在一些實施例中，本發明提供了rAAV顆粒，

所述rAAV顆粒包含AAV1衣殼和側接為至少一個AAV2 ITR的本公開文本的rAAV載體(例如，包含編碼本公開文本的RNAi的核酸的表現匣)。在一些實施例中，本發明提供了包含AAV2衣殼的rAAV顆粒。

【0146】 在一些態樣，本發明提供了包含重組自身互補的基因體的病毒顆粒。具有自身互補的基因體的rAAV顆粒和使用自身互補的AAV基因體的方法描述於美國專利號6,596,535;7,125,717;7,465,583;7,785,888;7,790,154;7,846,729;8,093,054;和8,361,457;以及Wang Z.等人,(2003) *Gene Ther* 10:2105-2111中，將所述文獻中的每一個藉由引用以其整體併入本文。包含自身互補的基因體的rAAV將借助其部分互補的序列(例如，轉基因的互補編碼股和非編碼股)迅速形成雙股DNA。在一些實施例中，本發明提供了包含AAV基因體的rAAV顆粒，其中rAAV基因體包含第一異源多核苷酸序列(例如，本公開文本的RNAi)和第二異源多核苷酸序列(例如，本公開文本的RNAi的反義股)，其中第一異源多核苷酸序列可以與第二多核苷酸序列沿著其大部分或全部長度形成股內鹼基對。在一些實施例中，第一異源多核苷酸序列和第二異源多核苷酸序列藉由促進股內鹼基配對的序列連接；例如，髮夾DNA結構。髮夾結構是本領域已知的，例如在miRNA或siRNA分子中。在一些實施例中，第一異源多核苷酸序列和第二異源多核苷酸序列藉由經突變的ITR(例如，正確的ITR)連接。在一些實施例中，ITR包含多核苷酸序列

5'-CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA
GCGCGCAGAGAGGGA-3'(SEQ ID NO: 27)。經突變的ITR包含含有末端解股序
列的D區的缺失。因此，在複製AAV病毒基因體時，rep蛋白將不在經突變的ITR

處切割病毒基因體，因此，以5'至3'順序包含以下的重組病毒基因體將被包裝在病毒衣殼中：AAV ITR、包括調節序列的第一異源多核苷酸序列、經突變的AAV ITR、與第一異源多核苷酸反向的第二異源多核苷酸和第三AAV ITR。在一些實施例中，本發明提供了包含重組病毒基因體的AAV病毒顆粒，所述重組病毒基因體包含功能AAV2 ITR、編碼本公開文本的RNAi的第一多核苷酸序列、含有D區缺失且缺少功能末端解股序列的經突變的AAV2 ITR、含有與第一多核苷酸序列的編碼本公開文本的RNAi的序列互補的序列的第二多核苷酸序列和功能AAV2 ITR。

【0147】 可以使用本領域已知的方法產生rAAV顆粒。參見例如，美國專利號6,566,118；6,989,264；和6,995,006。在實施本發明時，用於產生rAAV顆粒的宿主細胞包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、微生物和酵母。宿主細胞也可以是AAV rep和cap基因穩定地保留在宿主細胞中的包裝細胞或者穩定地保留AAV載體基因體的生產細胞。例示性包裝細胞和生產細胞源自293、A549或HeLa細胞。使用本領域已知的標準技術純化和配製AAV載體。

【0148】 本領域已知用於產生rAAV載體的方法包括但不限於轉染、穩定細胞株生產以及包括腺病毒-AAV雜合體、疱疹病毒-AAV雜合體(Conway, JE等人, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789)和桿狀病毒-AAV雜合體的感染性雜合病毒生產系統。用於產生rAAV病毒顆粒的rAAV生產培養物全部需要：1) 合適的宿主細胞，包括例如人源細胞株(如HeLa、A549或293細胞)，或在桿狀病毒生產系統的情況下為昆蟲源細胞株(如SF-9)；2) 由野生型或突變型腺病毒(如溫度敏感型腺病毒)、疱疹病毒、桿狀病毒或提供協助工具的質體構築體提供的合適輔助病毒功能；3) AAV rep和cap基因和基因產物；4) 側接為至少一個AAV ITR序列的核

酸(如治療性核酸)；和5) 支持rAAV產生的合適培養基和培養基組分。在一些實施例中，AAV rep和cap基因產物可以來自任何AAV血清型。通常但不是必須的，AAV rep基因產物與rAAV載體基因體的ITR具有相同血清型，只要rep基因產物可以發揮功能以複製和包裝rAAV基因體即可。本領域已知的合適培養基可以用於產生rAAV載體。這些培養基包括但不限於由Hyclone Laboratories和JRH生產的培養基，包括改良伊格爾培養基(MEM)、杜爾貝科改良伊格爾培養基(DMEM)；定制配製品，如描述於美國專利號6,566,118中的配製品；和如描述於美國專利號6,723,551中的Sf-900 II SFM培養基，將所述專利中的每一個(特別是關於用於在產生重組AAV載體中使用的定制培養基配製品)藉由引用以其整體併入本文。在一些實施例中，AAV協助工具由腺病毒或HSV提供。在一些實施例中，AAV協助工具由桿狀病毒提供，並且宿主細胞是昆蟲細胞(例如，草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(Sf9)細胞)。

【0149】 在一些實施例中，rAAV顆粒可以藉由三重轉染方法(如下文提供的例示性三重轉染方法)產生。簡而言之，可以將含有rep基因和衣殼基因的質體連同輔助腺病毒質體轉染(例如，使用磷酸鈣法)到細胞株(例如，HEK-293細胞)中，並且可以收集並任選地純化病毒。因此，在一些實施例中，藉由將編碼rAAV載體的核酸、編碼AAV rep和cap的核酸以及編碼AAV輔助病毒功能的核酸三重轉染到宿主細胞中來產生rAAV顆粒，其中核酸向宿主細胞的轉染產生能夠產生rAAV顆粒的宿主細胞。

【0150】 在一些實施例中，rAAV顆粒可以藉由生產細胞株方法(如下文提供的例示性生產細胞株方法)產生(還參見Martin等人, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269中引用的)。簡而言之，可以用含有rep基因、衣殼基

因和啟動子-異源核酸序列的質體穩定地轉染細胞株(例如，HeLa細胞株)。可以篩選細胞株以選擇用於rAAV產生的前導殖株，然後可以將其擴增至生產生物反應器，並且用作為輔助者的腺病毒(例如，野生型腺病毒)感染以啟動rAAV產生。隨後可以收穫病毒，可以使腺病毒失活(例如，藉由熱)和/或將其去除，並且可以純化rAAV顆粒。因此，在一些實施例中，藉由包含編碼rAAV載體的核酸、編碼AAV rep和cap的核酸和編碼AAV輔助病毒功能的核酸中的一種或多種的生產細胞株產生rAAV顆粒。

【0151】 在一些態樣，提供了用於產生如本文所公開的任何rAAV顆粒的方法，其包括 (a) 在產生rAAV顆粒的條件下培養宿主細胞，其中宿主細胞包含 (i) 一種或多種AAV包裝基因，其中每種所述AAV包裝基因編碼AAV複製蛋白和/或衣殼化蛋白；(ii) rAAV前載體，其包含側接為至少一個AAV ITR的編碼如本文所述的本公開文本的RNAi的核酸；和 (iii) AAV協助工具；以及 (b) 回收由宿主細胞產生的rAAV顆粒。在一些實施例中，RNAi包含SEQ ID NO: 7的核苷酸序列。在一些實施例中，所述至少一個AAV ITR選自：AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74 N502I、AAVrh74 W505R、AAV2R471A、AAVDJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣殼血清型ITR等。在一些實施例中，所述衣殼化蛋白選自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6(例如，野生型AAV6衣殼或變體AAV6衣殼如ShH10，如美國授權前公開案2012/0164106中所述)、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9(例如，野生型AAV9衣殼，或如美國授權前公開案2013/0323226中所述的經修飾的AAV9衣殼)、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74(例如，野生型AAVrh74衣

殼或變體AAVrh74衣殼，如WO 2019178412(藉由引用以其整體併入)中所述的AAVrh74 N502I或AAVrh74 W505R)、酪胺酸衣殼突變體、肝素結合衣殼突變體、AAV2R471A衣殼、AAVAAV2/2-7m8衣殼、AAV DJ衣殼(例如，AAV-DJ/8衣殼、AAV-DJ/9衣殼，或美國授權前公開案2012/0066783中所述的任何其他衣殼)、AAV2 N587A衣殼、AAV2 E548A衣殼、AAV2 N708A衣殼、AAV V708K衣殼、山羊AAV衣殼、AAV1/AAV2嵌合衣殼、牛AAV衣殼、小鼠AAV衣殼、rAAV2/HBoV1衣殼或者美國專利號8,283,151或國際公開號WO/2003/042397中所述的AAV衣殼。在一些實施例中，突變型衣殼蛋白保留形成AAV衣殼的能力。在一些實施例中，衣殼化蛋白是AAV5酪胺酸突變型衣殼蛋白。在另外的實施例中，rAAV顆粒包含來自進化枝A-F的AAV血清型的衣殼蛋白。在一些實施例中，rAAV顆粒包含AAVrh74 N502I衣殼以及重組基因體，所述重組基因體包含AAV2 ITR和編碼本公開文本的RNAi的核酸。在一些實施例中，rAAV顆粒包含AAVrh74 W505R衣殼以及重組基因體，所述重組基因體包含AAV2 ITR和編碼本公開文本的RNAi的核酸。在另一實施例中，純化rAAV顆粒。如本文所用的術語「經純化的」包括rAAV顆粒的製劑，其缺少至少一些也可以存在於rAAV顆粒天然存在或最初所製備的地方的其他組分。因此，例如，經分離的rAAV顆粒可以使用純化技術使其從源混合物(如培養裂解物或生產培養上清液)富集而製備。可以以多種方式測量富集情況，例如像根據溶液中存在的DNA酶抗性顆粒(DRP)或基因體拷貝(gc)的比例、或根據感染性，或者可以根據源混合物中存在的第二潛在干擾物質(如污染物，包括生產培養污染物或過程中污染物，包括輔助病毒、培養基組分等)來測量。

【0152】 本文還提供了包含rAAV顆粒以及醫藥上可接受的載劑的醫藥組

合物，所述rAAV顆粒包含編碼本公開文本的RNAi的轉基因。醫藥組合物可以適用於本文所述的任何投予方式。可以全身引入包含編碼本公開文本的RNAi的核酸的rAAV顆粒的醫藥組合物。例如，可以靜脈內、動脈內、皮下或腹膜內投予包含編碼本公開文本的RNAi的核酸的重組病毒顆粒。

【0153】 在一些實施例中，包含含有編碼本文所述的本公開文本的RNAi的轉基因的重組病毒顆粒以及醫藥上可接受的載劑的醫藥組合物適用於向人投予。此類載劑是本領域熟知的(參見例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 第15版, 第1035-1038頁和第1570-1580頁)。在一些實施例中，包含本文所述的rAAV和醫藥上可接受的載劑的醫藥組合物適用於向哺乳動物全身注射。

【0154】 此類醫藥上可接受的載劑可以是無菌液體，如水和油，所述油包括石油、動物、植物或合成源的油，如花生油、大豆油、礦物油等。鹽水溶液和右旋糖水溶液、聚乙二醇(PEG)和甘油溶液也可以用作液體載劑，特別是用於可注射溶液。醫藥組合物可以進一步包含另外的成分，例如防腐劑、緩衝劑、張力劑、抗氧化劑和穩定劑、非離子潤濕劑或澄清劑、增粘劑等。本文所述的醫藥組合物可以按單次單位劑量或按多劑量形式包裝。通常將組合物配製成無菌且基本上等滲的溶液。

製品和套組

【0155】 還提供了用於在本文所述的方法中使用的套組或製品。在多個態樣，套組包括在合適包裝中的本文所述的組合物(例如，包含編碼本公開文本的RNAi的核酸的本公開文本的rAAV顆粒)。本文所述的用於組合物的合適包裝是本領域已知的，並且包括例如小瓶(如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶子、廣口瓶、柔性包裝(例如，密封的聚酯薄膜或塑膠袋)等。可以進一步將這些製品滅菌和/

或密封。

【0156】 本發明還提供了包含本文所述的組合物的套組，並且可以進一步包括關於使用組合物的方法(如本文所述的用途)的一個或多個說明書。本文所述的套組可以進一步包括從商業和用戶角度所需的其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器和帶有用於實施本文所述的任何方法的說明的包裝說明書。例如，在一些實施例中，套組包含用於將有效量的rAAV顆粒遞送至哺乳動物的重組病毒顆粒的組合物，所述重組病毒顆粒含有編碼本公開文本的RNAi的轉基因；適用於向哺乳動物注射的醫藥上可接受的載劑；以及以下中的一種或多種：緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器和帶有用於向哺乳動物進行注射的說明的包裝說明書。在一些實施例中，套組包含用於用本文所述的rAAV顆粒治療DM-1的說明書。在一些實施例中，套組包含用於根據本文所述的任何一種方法使用本文所述的rAAV顆粒的說明書。

例示性實施例

【0157】 本發明包括以下列舉的例示性實施例。

【0158】 1. 一種RNAi，所述RNAi包含第一股和第二股，其中a) 所述第一股和所述第二股形成雙股體；b) 所述第一股包含指導區，其中所述指導區包含具有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)或具有與SEQ ID NO: 1的序列具有約90%同一性的序列的核酸；並且c) 所述第二股包含非指導區。

【0159】 2. 根據實施例1所述的RNAi，其中所述非指導區包含具有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)或具有與SEQ ID NO: 2的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【0160】 3. 根據實施例1或2所述的RNAi，其中所述第一股包含具有SEQ ID NO: 1的序列的核酸，並且所述非指導區包含具有SEQ ID NO: 2的序列的核酸。

【0161】 4. 根據實施例1-3中任一項所述的RNAi，其中所述第一股和所述第二股借助能夠形成環結構的RNA連接子連接。

【0162】 5. 根據實施例4所述的RNAi，其中所述RNA連接子包含約4至約50個核苷酸。

【0163】 6. 根據實施例4或5所述的RNAi，其中所述環結構包含約4至約20個核苷酸。

【0164】 7. 根據實施例4-6中任一項所述的RNAi，其中所述環結構包含具有SEQ ID NO: 3的序列或具有與SEQ ID NO: 3的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【0165】 8. 根據實施例4-7中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi從5'到3'包含所述第二股、所述RNA連接子、和所述第一股。

【0166】 9. 根據實施例4-7中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi從5'到3'包含所述第一股、所述RNA連接子、和所述第二股。

【0167】 10. 根據實施例1-8中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi包含具有SEQ ID NO: 7的序列或具有與SEQ ID NO: 7的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【0168】 11. 根據實施例1-10中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)或小髮夾RNA(shRNA)。

【0169】 12. 根據實施例1-11中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi進一

步包含支架。

【0170】 13. 根據實施例12所述的RNAi，其中所述支架包含SEQ ID NO: 11的核酸的全部或部分。

【0171】 14. 根據實施例13所述的RNAi，其中所述miRNA嵌在所述支架內。

【0172】 15. 根據實施例14所述的RNAi，其中所述支架具有5'臂，其中所述5'臂位於編碼所述RNAi的核酸的5'處；和3'臂，其中所述3'臂位於編碼所述RNAi的核酸的3'處。

【0173】 16. 根據實施例12-15中任一項所述的RNAi，其中所述支架是miR-155支架。

【0174】 17. 根據實施例12-16中任一項所述的RNAi，其中所述miR-155支架包含位於所述RNAi的5'處的SEQ ID NO: 9或與SEQ ID NO: 9的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【0175】 18. 根據實施例12-17中任一項所述的RNAi，其中所述miR-155支架包含位於所述RNAi的3'處的SEQ ID NO: 10或與SEQ ID NO: 10的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【0176】 19. 根據實施例1-18中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi靶向編碼與肌強直性營養不良1(DM1)相關的多肽的RNA。

【0177】 20. 根據實施例19所述的RNAi，其中所述多肽是肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)。

【0178】 21. 根據實施例20所述的RNAi，其中所述DMPK包含與DM1相關的突變。

【0179】 22. 根據實施例20或21所述的RNAi，其中編碼DMPK的基因包含五個或更多個CTG三核苷酸重複。

【0180】 23. 一種表現匣，所述表現匣包含編碼根據實施例1-22中任一項所述的RNAi的核酸。

【0181】 24. 根據實施例23所述的表現匣，其中編碼所述RNAi的核酸可操作地連接至啟動子。

【0182】 25. 根據實施例24所述的表現匣，其中所述啟動子是肌肉特異性啟動子。

【0183】 26. 根據實施例24或25所述的表現匣，其中所述啟動子是結蛋白啟動子或其變體。

【0184】 27. 根據實施例26所述的表現匣，其中所述結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【0185】 28. 根據實施例26或27所述的表現匣，其中所述結蛋白啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【0186】 29. 根據實施例26-28中任一項所述的表現匣，其中所述結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。

【0187】 30. 根據實施例26-29中任一項所述的表現匣，其中所述結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 21的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件和/或一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 22的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件。

【0188】 31. 根據實施例26-30中任一項所述的表現匣，其中所述結蛋白啟

動子包含SEQ ID NO: 12的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 12的核苷酸序列具有約90%同一性的序列。

【0189】 32. 根據實施例23-31中任一項所述的表現匣，其中所述表現匣進一步包含內含子。

【0190】 33. 根據實施例32所述的表現匣，其中所述內含子是兔 β -珠蛋白內含子。

【0191】 34. 根據實施例32或33所述的表現匣，其中所述內含子包含SEQ ID NO: 13的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 13的序列具有約90%同一性的序列。

【0192】 35. 根據實施例32-34中任一項所述的表現匣，其中編碼所述RNAi的核酸嵌在所述內含子中。

【0193】 36. 根據實施例35所述的表現匣，其中所述內含子包含5'臂和3'臂，其中所述5'臂位於編碼所述RNAi的核酸的5'處，並且所述3'臂位於編碼所述RNAi的核酸的3'處。

【0194】 37. 根據實施例36所述的表現匣，其中所述內含子的5'臂包含SEQ ID NO: 14的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 14的序列具有約90%同一性的序列。

【0195】 38. 根據實施例36或37所述的表現匣，其中所述內含子的3'臂包含SEQ ID NO: 15的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 15的序列具有約90%同一性的序列。

【0196】 39. 根據實施例23-38中任一項所述的表現匣，其中所述表現匣進一步包含多腺苷酸化訊號。

【0197】 40. 根據實施例39所述的表現匣，其中所述多腺苷酸化訊號是牛

生長激素多腺苷酸化訊號、SV40多腺苷酸化訊號、或HSV TK pA。

【0198】 41. 根據實施例40所述的表現匣，其中所述多腺苷酸化訊號是最小牛生長激素多腺苷酸化訊號。

【0199】 42. 根據實施例39-41中任一項所述的表現匣，其中所述牛生長激素多腺苷酸化訊號包含SEQ ID NO: 16的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 16的序列具有約90%同一性的序列。

【0200】 43. 根據實施例23-42中任一項所述的表現匣，其中所述表現匣包含SEQ ID NO: 17的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 17的序列具有約90%同一性的序列。

【0201】 44. 一種表現匣，其中所述表現匣包含經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【0202】 45. 根據實施例44所述的表現匣，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【0203】 46. 根據實施例44或45所述的表現匣，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。

【0204】 47. 根據實施例44-46中任一項所述的表現匣，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 21的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件和/或一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 22的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件。

【0205】 48. 根據實施例44-47中任一項所述的表現匣，其中所述結蛋白啟

動子包含SEQ ID NO: 12的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 12的核苷酸序列具有約90%同一性的序列。

【0206】 49. 根據實施例44-48中任一項所述的表現匣，其中所述表現匣進一步包含內含子。

【0207】 50. 根據實施例49所述的表現匣，其中所述內含子是兔 β -珠蛋白內含子。

【0208】 51. 根據實施例49或50所述的表現匣，其中所述內含子包含SEQ ID NO: 13的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 13的序列具有約90%同一性的序列。

【0209】 52. 根據實施例44-51中任一項所述的表現匣，其中編碼轉基因的核酸嵌在所述內含子中。

【0210】 53. 根據實施例52所述的表現匣，其中所述內含子包含5'臂和3'臂，其中所述5'臂位於編碼所述轉基因的核酸的5'處，並且所述3'臂位於編碼所述轉基因的核酸的3'處。

【0211】 54. 根據實施例53所述的表現匣，其中所述內含子的5'臂包含SEQ ID NO: 14的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 14的序列具有約90%同一性的序列。

【0212】 55. 根據實施例53或54所述的表現匣，其中所述內含子的3'臂包含SEQ ID NO: 15的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 15的序列具有約90%同一性的序列。

【0213】 56. 根據實施例44-55中任一項所述的表現匣，其中所述表現匣進一步包含多腺苷酸化訊號。

【0214】 57. 根據實施例56所述的表現匣，其中所述多腺苷酸化訊號是牛

生長激素多腺苷酸化訊號、SV40多腺苷酸化訊號、或HSV TK pA。

【0215】 58. 根據實施例57所述的表現匣，其中所述多腺苷酸化訊號是最小牛生長激素多腺苷酸化訊號。

【0216】 59. 根據實施例56-58中任一項所述的表現匣，其中所述牛生長激素多腺苷酸化訊號包含SEQ ID NO: 16的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 16的序列具有約90%同一性的序列。

【0217】 60. 根據實施例44-59中任一項所述的表現匣，其中所述轉基因編碼多肽或核酸。

【0218】 61. 根據實施例44-60中任一項所述的表現匣，其中所述轉基因編碼RNAi。

【0219】 62. 一種載體，所述載體包含根據實施例23-61中任一項所述的表現匣。

【0220】 63. 根據實施例62所述的載體，其中所述表現匣的側接是一個或多個填充核酸序列。

【0221】 64. 根據實施例63所述的載體，其中所述一個或多個填充核酸序列源自人類Serpina1基因。

【0222】 65. 根據實施例63或64所述的載體，其中位於所述表現匣的5'處的填充核酸序列源自人類Serpina1基因。

【0223】 66. 根據實施例63-65中任一項所述的載體，其中位於所述表現匣的5'處的填充序列包含SEQ ID NO: 18的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 18的序列具有約90%同一性的序列。

【0224】 67. 根據實施例63-66中任一項所述的載體，其中位於所述表現匣

的3'處的填充核酸序列源自人類Serpina1基因。

【0225】 68. 根據實施例63-67中任一項所述的載體，其中位於所述表現匣的3'處的填充序列包含SEQ ID NO: 19的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 19的序列具有約90%同一性的序列。

【0226】 69. 根據實施例62-68中任一項所述的載體，其中所述載體是重組腺相關病毒(rAAV)載體。

【0227】 70. 根據實施例69所述的rAAV載體，其中所述表現匣的側接是一個或多個AAV反向末端重複(ITR)序列。

【0228】 71. 根據實施例70所述的rAAV載體，其中所述表現匣的側接是兩個AAV ITR。

【0229】 72. 根據實施例70或71所述的rAAV載體，其中所述AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV、或小鼠AAV血清型ITR。

【0230】 73. 根據實施例70-72中任一項所述的rAAV載體，其中所述AAV ITR是AAV2 ITR。

【0231】 74. 根據實施例69-73中任一項所述的rAAV載體，其中所述rAAV載體包含SEQ ID NO: 20的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 20的序列具有約90%同一性的序列。

【0232】 75. 根據實施例69-74中任一項所述的rAAV載體，其中所述載體是自身互補的rAAV載體。

【0233】 76. 一種細胞，所述細胞包含根據實施例23-61中任一項所述的表

現匣、根據實施例62-68中任一項所述的載體、或根據實施例69-75中任一項所述的rAAV載體。

【0234】 77. 一種病毒顆粒，所述病毒顆粒包含根據實施例62-68中任一項所述的載體。

【0235】 78. 一種重組AAV顆粒，所述重組AAV顆粒包含根據實施例69-75中任一項所述的rAAV載體。

【0236】 79. 根據實施例78所述的rAAV顆粒，其中所述AAV病毒顆粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74 N502I、AAVrh74 W505R、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、AAV2-HBKO、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV、或小鼠AAV衣殼rAAV2/HBoV1血清型衣殼。

【0237】 80. 根據實施例78或79所述的rAAV顆粒，其中所述rAAV病毒顆粒的ITR和衣殼源自相同的AAV血清型。

【0238】 81. 根據實施例78或79所述的rAAV顆粒，其中所述rAAV病毒顆粒的ITR和衣殼源自不同的AAV血清型。

【0239】 82. 根據實施例78、79或81所述的rAAV顆粒，其中所述AAV病毒顆粒包含AAVrh74 N502I血清型衣殼。

【0240】 83. 根據實施例82所述的rAAV顆粒，其中所述ITR是AAV2 ITR，並且所述rAAV顆粒的衣殼是AAVrh74 N502I血清型衣殼。

【0241】 84. 根據實施例78、79或81所述的rAAV顆粒，其中所述AAV病毒

顆粒包含AAVrh74 W505R血清型衣殼。

【0242】 85. 根據實施例84所述的rAAV顆粒，其中所述ITR是AAV2 ITR，並且所述rAAV顆粒的衣殼是AAVrh74 W505R血清型衣殼。

【0243】 86. 一種rAAV顆粒，所述rAAV顆粒包含rAAV載體和衣殼，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：AAV2 ITR、編碼來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸、Byrne結蛋白增強子元件、Paulin結蛋白增強子元件、結蛋白啟動子、兔β-珠蛋白內含子的5'臂、5' miR155支架序列、DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列、miR155末端環序列、DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列、3' miR155支架序列、兔β-珠蛋白內含子的3'臂、最小牛生長激素多腺苷酸化序列、編碼來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸以及AAV2 ITR；並且其中所述衣殼是AAVrh74 N502I衣殼。

87. 一種rAAV顆粒，所述rAAV顆粒包含rAAV載體，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：含有SEQ ID NO: 43的多核苷酸序列的AAV2 ITR、編碼含有SEQ ID NO: 18的多核苷酸序列的來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸、含有SEQ ID NO: 21的多核苷酸序列的Byrne結蛋白增強子元件、含有SEQ ID NO: 22的多核苷酸序列的Paulin結蛋白增強子元件、含有SEQ ID NO: 23的多核苷酸序列的結蛋白啟動子、含有SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列的兔β-珠蛋白內含子的5'臂、含有SEQ ID NO: 40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列、含有SEQ ID NO: 4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列、含有SEQ ID NO: 6的多核苷酸序列的miR155末端環序列、含有SEQ ID NO: 5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列、含有SEQ ID NO: 41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列、含有SEQ ID NO: 15的多核苷酸序列的兔β-珠蛋白內含子的3'臂、含有SEQ ID NO: 16的多核苷酸序列的最小牛生長激素多腺苷酸化序列、編

碼含有SEQ ID NO: 19的多核苷酸序列的來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸以及含有SEQ ID NO: 49的多核苷酸序列的AAV2 ITR；並且其中所述衣殼是AAVrh74 N502I衣殼。

【0244】 88.根據實施例86或87所述的rAAV顆粒，其中所述AAVrh74 N502I衣殼包含含有SEQ ID NO: 50的胺基酸序列的衣殼蛋白。

【0245】 89. 一種rAAV顆粒，所述rAAV顆粒包含rAAV載體和衣殼，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：AAV2 ITR、編碼來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸、Byrne結蛋白增強子元件、Paulin結蛋白增強子元件、結蛋白啟動子、兔 β -珠蛋白內含子的5'臂、5' miR155支架序列、DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列、miR155末端環序列、DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列、3' miR155支架序列、兔 β -珠蛋白內含子的3'臂、最小牛生長激素多腺苷酸化序列、編碼來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸以及AAV2 ITR；並且其中所述衣殼是AAVrh74 W505R衣殼。

【0246】 90. 一種rAAV顆粒，所述rAAV顆粒包含rAAV載體，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：含有SEQ ID NO: 43的多核苷酸序列的AAV2 ITR、編碼含有SEQ ID NO: 18的多核苷酸序列的來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸、含有SEQ ID NO: 21的多核苷酸序列的Byrne結蛋白增強子元件、含有SEQ ID NO: 22的多核苷酸序列的Paulin結蛋白增強子元件、含有SEQ ID NO: 23的多核苷酸序列的結蛋白啟動子、含有SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白內含子的5'臂、含有SEQ ID NO: 40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列、含有SEQ ID NO: 4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列、含有SEQ ID NO: 6的多核苷酸序列的miR155末端環序列、含有SEQ ID NO: 5的多核苷酸序列

的DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列、含有SEQ ID NO: 41的多核苷酸序列的3' miR155 支架序列、含有SEQ ID NO: 15的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白內含子的3'臂、含有SEQ ID NO: 16的多核苷酸序列的最小牛生長激素多腺苷酸化序列、編碼含有SEQ ID NO: 19的多核苷酸序列的來自人類Serpina1基因的填充核酸序列的核酸以及含有SEQ ID NO: 49的多核苷酸序列的AAV2 ITR；並且其中所述衣殼是AAVrh74 W505R衣殼。

【0247】 91. 根據實施例89或90所述的rAAV顆粒，其中所述AAVrh74 W505R衣殼包含含有SEQ ID NO: 52的胺基酸序列的衣殼蛋白。

【0248】 92. 一種組合物，所述組合物包含根據實施例77所述的病毒顆粒或根據實施例78-91中任一項所述的rAAV顆粒。

【0249】 93. 一種醫藥組合物，所述醫藥組合物包含根據實施例77所述的病毒顆粒或根據實施例78-91中任一項所述的rAAV顆粒。

【0250】 94. 根據實施例92或93所述的組合物，其中所述組合物進一步包含醫藥上可接受的載劑。

【0251】 95. 一種經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【0252】 96. 根據實施例95所述的經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【0253】 97. 根據實施例95或96所述的經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。

【0254】 98. 根據實施例95-97中任一項所述的經修飾的結蛋白啟動子，其

中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 21的序列具有約90%同一性的序列的增強子元件和/或一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 22的序列具有約90%同一性的序列的增強子元件。

【0255】 99. 根據實施例95-98中任一項所述的經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含SEQ ID NO: 12的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 12的序列具有約90%同一性的序列。

【0256】 100. 一種套組，所述套組包含根據實施例1-22中任一項所述的RNAi。

【0257】 101. 一種套組，所述套組包含根據實施例77所述的病毒顆粒或根據實施例78-91中任一項所述的AAV顆粒。

【0258】 102. 一種套組，所述套組包含根據實施例92-94中任一項所述的組合物。

【0259】 103. 根據實施例100-102中任一項所述的套組，所述套組進一步包含使用說明書。

【0260】 104. 一種用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的根據實施例1-22中任一項所述的RNAi。

【0261】 105. 一種用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的根據實施例1-22中任一項所述的RNAi。

【0262】 106. 一種用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物

的細胞中的積累的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的根據實施例1-22中任一項所述的RNAi。

【0263】 107.一種用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的根據實施例77所述的病毒顆粒或根據實施例78-91中任一項所述的rAAV顆粒。

【0264】 108.一種用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的根據實施例77所述的病毒顆粒或有效量的根據實施例78-91中任一項所述的rAAV顆粒。

【0265】 109.一種用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的根據實施例77所述的病毒顆粒或有效量的根據實施例78-91中任一項所述的rAAV顆粒。

【0266】 110. 根據實施例102-104中任一項所述的方法，其中所述病毒顆粒或rAAV顆粒的有效量是約 1×10^8 至約 2×10^{13} 個基因體拷貝/mL的劑量。

【0267】 111. 根據實施例110所述的方法，其中所述劑量是約 5×10^{12} 個基因體拷貝/mL。

【0268】 112. 根據實施例110所述的方法，其中所述劑量是約 1×10^{13} 個基因體拷貝/mL。

【0269】 113. 根據實施例110所述的方法，其中所述劑量是約 2×10^{13} 個基因體拷貝/mL。

【0270】 114. 根據實施例107-109中任一項所述的方法，其中所述病毒顆粒或rAAV顆粒的有效量是約 1×10^8 至約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重的劑量。

【0271】 115. 根據實施例114所述的方法，其中所述劑量是約 5×10^{13} 個基因體拷貝/kg體重。

【0272】 116. 根據實施例114所述的方法，其中所述劑量是約 1×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重。

【0273】 117. 根據實施例114所述的方法，其中所述劑量是約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重。

【0274】 118. 一種用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的根據實施例92-94中任一項所述的組合物。

【0275】 119. 一種用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的根據實施例92-94中任一項所述的組合物。

【0276】 120. 一種用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的方法，所述方法包括向所述哺乳動物投予有效量的根據實施例92-94中任一項所述的組合物。

【0277】 121. 根據實施例104-106中任一項所述的方法，其中將所述RNAi與免疫抑制劑組合投予，其中在投予所述RNAi之前、同時、和/或之後投予所述免疫抑制劑。

【0278】 122. 根據實施例107-109中任一項所述的方法，其中將所述病毒顆粒或所述rAAV顆粒與免疫抑制劑組合投予，其中在投予所述病毒顆粒或所述rAAV顆粒之前、同時、和/或之後投予所述免疫抑制劑。

【0279】 123. 根據實施例118-120中任一項所述的方法，其中將所述組合物

與免疫抑制劑組合投予，其中在投予所述組合物之前、同時、和/或之後投予所述免疫抑制劑。

實例

【0280】藉由參考以下實例將更好地理解本發明公開的主題，所述實例是作為本發明的例示提供的，而不是藉由限制的方式提供的。

實例1：amiR-DMPK²⁰⁴表現匣的產生

【0281】產生編碼旨在靶向DMPK基因的微小RNA(amiR-DMPK²⁰⁴)的單股AAV病毒載體(圖1A)。這樣設計構築體，使得amiR-DMPK²⁰⁴微小RNA嵌在經優化的微小RNA骨架miR155(BLOCK-iT；Thermofisher目錄號K4935-00、K4936-00、K4937-00、K4938-00)中，並且在下文為「miR155 amiR-DMPK²⁰⁴」或「amiR155-DMPK²⁰⁴」。miR155 amiR-DMPK²⁰⁴的側接是兔β-珠蛋白內含子序列，並且將其置於雜合肌肉啟動子(nDes)的調節之下。

【0282】藉由常規寡核苷酸合成(Genscript，美國)合成包含Byrne結蛋白增強子、Paulin結蛋白增強子的一個拷貝(-973至-693)、和人類結蛋白基因的啟動子(-228至+75)的nDesmin啟動子。

【0283】將牛生長激素多腺苷酸化序列(minBGHpA)置於側接為內含子的amiR-DMPK²⁰⁴微小RNA的3'處。包括填充序列(「填充片段」)。整個基因匣的側接是野生型AAV血清型2反向末端重複(ITR)序列，用於DNA挽救和複製以及包裝到AAV衣殼中。將序列工程化到用於產生載體的ITR質體中以進行體內功效研究。

5'和3' ITR序列

【0284】ITR序列是145 bp的AAV2野生型序列。3' ITR(在表現匣的下游)

處於Flip方向(GenBank : LQ493091.1)。5' ITR(在表現匣的上游)處於Flop方向(145 bp)(Miller等人, 2004, *Nature Genetics* 36.7 (2004): 767-773)。藉由桑格測序確認序列的準確性。

nDes啟動子

【0285】 使用文獻(Li和Paulin等人 1991, *J Biol Chem.* 266.10: 6562-6570)中所示的結蛋白啟動子元件構建nDes啟動子。nDes啟動子包含Byrne結蛋白增強子的一個拷貝、Paulin結蛋白增強子的一個拷貝(-973至-693)和人類結蛋白基因的啟動子(-228至+75)。

兔 β -珠蛋白內含子的5'和3'臂

【0286】 使用此內含子側接於amiR-DMPK²⁰⁴匣，因為已知miRNA的內含子表現增強靶標敲減。

具有miR155支架的amiR-DMPK²⁰⁴(miR155-amiRDMPK²⁰⁴)

【0287】 內源miRNA是在許多初級RNA轉錄物(初級miRNA)中發現的髮夾樣二級結構。在細胞核中，微處理器Drosha/DGCR8複合物結合並切割初級miRNA的莖基部，以釋放莖-環前體miRNA(前體miRNA)。然後前體miRNA被從細胞核中輸出，在細胞核中環被Dicer/TRBP切割以形成成熟的RNA雙股體。將指導股(也稱為靶向股)與過客股分離並裝載到RNA誘導沈默複合物(RISC)中的Argonaute蛋白上，然後該複合物靶向互補的mRNA轉錄物以進行降解或轉譯抑制。

【0288】 amiR-DMPK²⁰⁴序列被鑒定為DM1療法的靶標。amiR-DMPK²⁰⁴的靶序列位於DMPK核苷酸序列的3' UTR內的「CUG」重複序列的上游。因此，amiR-DMPK²⁰⁴可以抑制野生型和突變型DMPK轉錄物兩者。

【0289】 此外，amiR-DMPK²⁰⁴靶區在非人靈長類動物(NHP-食蟹猴)和人類中是保守的，允許對NHP中的DMPK敲減進行臨床前評估(圖11)。評價amiR-DMPK²⁰⁴微小RNA，並且表明，miR155支架具有高效的指導股加工，具有最小的過客股加工，降低脫靶效應的可能性(參見以下實例2)。

【0290】 選擇進行開發的最終構築體是具有miR155支架的amiR-DMPK²⁰⁴(amiR155-DMPK²⁰⁴)，其中指導股在加工時靶向DMPK mRNA以進行降解。經工程化的前體miRNA序列結構基於鼠miR-155序列(Lagos-Quintana等人, 2002, *Current Biology*, 12:9, 735-739)。將源自miR-155轉錄物的5'和3'側接區插入載體中，以盡可能多地保留miR-155結構。將莖-環結構優化，並且與在天然miR-155分子中發現的5核苷酸/3核苷酸的內環相比，2核苷酸的內環導致敲減率更高(來源：BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi表現載體(Invitrogen))。在AAV衣殼的背景下，載體nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴顯示在DM1的DMSXL小鼠模型中具有強大的體內活性(參見以下實例3)。

minBGHpolyA

【0291】 將186 bp的最小BGH聚A位點插在amiR-DMPK²⁰⁴序列的下游，以允許mRNA的轉錄終止和多腺苷酸化。

來自A1AT內含子的填充序列

【0292】 使用來自α-1抗胰蛋白酶基因內含子序列4的填充序列使基因匣達到rAAV載體的包裝極限。

具有nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴匣的ITR質體
(nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴)的選殖

【0293】 設計表現構築體nDes-miR155-amiR-DMPK204-minBGHpolyA匣

的1938 bp ITR-ITR序列。將nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴-minBGHpolyA匣選殖到ITR質體中。經合成的nDes-miR155-amiR-DMPK204-minBGHpolyA包括用於選殖到ITR質體中的5' NcoI位點和3' SphI位點(圖1B)。簡而言之，用NcoI和SphI消化含有經合成的nDes-miR155-amiR-DMPK2⁰⁴-minBGHpolyA序列的質體，並且凝膠純化出1.9 kB片段。將ITR質體用NcoI和SphI消化，使用牛小腸鹼性磷酸酶(New England Biolabs；目錄號M0290)去磷酸化，並且凝膠純化出8.2 kB載體骨架片段。將含有表現匣的經消化的1.9 kB片段與經消化的ITR質體連接，以產生質體ITR-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴。

小規模rAAV載體生產

【0294】 在HEK 293細胞中進行小規模包裝測定，以確認ITR-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴質體的包裝。使用AAV rep/cap質體進行小規模生產。圖1C示出了與標準EGFP質體基因匣相比，每個HEK 293細胞產生的載體的量。

【0295】 為了確定amiR-DMPK²⁰⁴校正DM1表型的潛力，測試在來自DM1患者的骨骼肌成肌細胞培養物中使人DMPK轉錄物沈默和校正剪接缺陷的能力。由於DMPK基因的3' UTR中的CTG擴增，DMPK mRNA髮夾結構聚集為不溶性核糖核聚集點，並且隔離幾種RNA結合蛋白。由此產生的必需剪接因子(如盲肌樣蛋白1(MBNL1))的重新分佈導致負責肌肉組織分化的下游效應物的錯誤剪接。用amiR-DMPK²⁰⁴處理DM1患者細胞引起超過50%的DMPK mRNA沈默和剪接校正，如藉由MBNL1外顯子7增加(inclusion)所測量的。

實例2：miR155 amiR-DMPK²⁰⁴的加工

【0296】 將amiR-DMPK²⁰⁴包裝到AAV衣殼中，並且在體內分析DMPK敲減

功效、過客股活性、和加工模式。將具有nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴的構築體包裝到AAV中。將載體靜脈內注射到DMSXL成人人源化DM1小鼠模型中，該模型表現具有> 1,000個CTG重複的人DMPK。在八周後，對動物實施安樂死，收集多個組織以測量DMPK敲減功效，並且選擇心臟組織來測量過客股活性和加工模式。

【0297】 RT-PCR分析顯示出amiR-DMPK²⁰⁴在多個肌肉組織中的穩健表現，其中在心臟中的表現較高(圖2B)。與amiR-DMPK²⁰⁴表現相一致，RT-PCR分析證實了心臟中的穩健DMPK抑制(其平均值> 70%)以及不同骨骼肌中的約30%的DMPK抑制(圖2C)。在心臟組織中，相對於TBP(TATA結合蛋白)表現，DMPK表現低於50%。值得注意的是，相對於TBP表現低水平DMPK(約50%，由圖2C中的虛線指示)的DSMXL小鼠沒有明顯的DM1表型。有趣的是，儘管在肝臟中觀察到較高的轉導(圖2A)，但nDesmin啟動子在心臟組織中顯示出強活性，並且在骨骼肌中顯示出相似的水平(圖2B)。這表明，表現主要局限於心肌和骨骼肌，受到DM1病理學的影響。

【0298】 為了評估amiR-DMPK²⁰⁴的加工，藉由NGS分析心臟組織中指導股和過客股的成熟amiR-DMPK²⁰⁴長度和序列組成以進行小轉錄組分析。

【0299】 amiR-DMPK²⁰⁴的加工未產生過客股。amiR-DMPK²⁰⁴在小鼠心肌細胞中僅被加工成指導股(> 99%)，但是通常產生比根據miRBase資料庫預測的更長的股(表1)。miR155加工最經常產生22與26 nt之間長的成熟長度，但是在5'端準確地加工(表1)。映射到miR155 amiR-DMPK²⁰⁴的不同指導股長度(nt)的序列分佈以百分比(%讀段)計算。預期的amiR-DMPK²⁰⁴指導股帶底線，並且種子序列為粗體。星號指示與預期長度的amiR-DMPK²⁰⁴指導股對應的讀段。

表1.以百分比(%讀段)計算的映射到miR155 amiR-DMPK²⁰⁴的不同指導股長度(nt)的序列分佈。預期的amiR-DMPK²⁰⁴指導股帶底線。星號指示與預期長度的amiR-DMPK²⁰⁴指導股對應的讀段。

miR-155讀段序列	長度	%序列	SEQ ID NO
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGT	23	52	33
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGT	24	24	34
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGT	25	11	35
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGT*	22	6	36
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGT	26	3	37
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTG	22	4	38

【0300】 總體而言，藉由具有miR155的amiR-DMPK²⁰⁴未檢測到過客股(%指導股> 99%)。因此，選擇miR155作為臨床前研究的先導，因為miR155 miRNA 支架在RNAi方面得到了很好的驗證。

實例3：在轉基因小鼠中全身注射編碼miR155-amiRDMPK²⁰⁴的AAV對人DMPK的劑量依賴性抑制

【0301】 為了確定最有效的劑量，研究三種不同劑量的親肌性 AAV(WO/2019/207132)衣殼的遞送。在劑量遞增研究中評價編碼具有miR155 支架的amiR-DMPK²⁰⁴(amiR155-DMPK²⁰⁴)的表現匣的AAV。為八周齡DMSXL小鼠靜脈內注射5.0 × 10¹¹個載體基因體(vg)/kg、5 × 10¹² vg/kg和1.0 × 10¹³ vg/kg，對應於低劑量、中劑量和高劑量。在AAV輸注後8周，分析小鼠的臨床症狀，如體重、存活率、肌強直和心臟功能。在基因轉移後8周對小鼠實施安樂死，並且測量DMPK抑制和剪接校正。藉由小RNA TaqMan測量miR155-amiRDMPK²⁰⁴表現水平，並且將mRNA輸入水平相對於U6小核RNA歸一化。

【0302】 以劑量依賴性方式觀察到amiR155-DMPK²⁰⁴的表現(圖3A)，並且其導致多個組織中總DMPK表現的劑量依賴性減少(圖3B)。總體而言，觀察到約

10個amiR155-DMPK²⁰⁴拷貝/U6足以將心臟和橫膈中的DMPK減少≥ 50%，該量可能足以治療DM1患者。

【0303】 接下來，研究DMPK抑制對DM1特徵表型(如剪接異常)的影響。LIM結構域結合蛋白3(Ldb3)的異常剪接(導致Ldb3轉錄物中的外顯子11增加)已經被證明是由CUG重複RNA隔離RNA剪接機器引起的DM1特異性表型(Yamashita等人 2014. *Neurobiol Dis.* 69:200-5)。在用中劑量或高劑量AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴治療的小鼠中觀察到在腓腸肌中外顯子11增加的Ldb3轉錄物顯著減少，證實在用amiR155-DMPK²⁰⁴處理的肌肉中剪接缺陷被高效地校正(圖4)。

【0304】 除了這些分子校正，然後還測量AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴在疾病的生理和功能表現方面的功效。

【0305】 為了確定該治療是否可以提高存活率和減輕體重減輕，用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴以三種不同劑量治療DMSXL小鼠，並且監測其存活率和體重。在用中劑量和高劑量治療八周後，觀察到體重和存活率改善。另一方面，在低劑量或平衡鹽溶液(BSS)對照的情況下未觀察到改善(圖5A和圖5B)。

【0306】 接下來，測量AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴在疾病的功能表現(如預防肌強直和心臟異常)方面的功效。肌電描記術測量結果揭示，在用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴治療的小鼠中，肌強直顯著降低(表2)。具體地，在治療後，只有7.6%的用中劑量治療的動物患有肌強直。相比之下，在對照組(用BSS治療)或低劑量組中> 50%的小鼠患有持續性肌強直(得分1)。

表2.在用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴治療後患有肌強直的DMSXL DM1小鼠的數量。

組別	患有肌強直(腓腸肌)的動物的數量	
WT	0/10	 P < 0.05
DMSX1 對照(未經治療)	4/7	
DMSX1, 5111 VG/Kg(低劑量)	3/5	
DMSX1, 5112 VG/Kg(中劑量)	1/13	
DMSX1, 5113 VG/Kg(高劑量)	1/7	

按4分制對肌強直放電分級：0分，無肌強直；1分，在小於50%的穿刺中偶爾出現肌強直放電；2分，在大於50%的穿刺中出現肌強直放電；3分，幾乎每次穿刺都出現肌強直放電。

[(0307)] 還在治療後8周使用表面超聲心動圖監測DMSX1小鼠的心臟功能以及骨骼肌功能。與經BSS治療的對照相比，AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴提高心輸出量。在治療8周後，注意到中劑量組(5012 vg/kg)的心輸出量有顯著提高(圖6)。

實例4：AAVrh/4N502L衣殼具有提高的肌肉轉導和降低的肝臟轉導

[(0308)] 進行實驗，以測試含有AAVrh/4N502L VP1衣殼蛋白(WO 2019178412；SEQ ID NO: 50)的AAV衣殼在非人靈長類動物的不同組織中的轉導效率。實驗的概述示於圖7A中。用1 × 10¹³ vg/kg的AAV9、AAVrh/4或AAVrh/4N502L衣殼靜脈內治療非人靈長類動物，每種衣殼都含有cGFP表現組。在治療後三~五天，犧牲動物，並且測量脛骨前肌(TA)、股二頭肌、股四頭肌、心臟和肝臟中的cGFP表現水平。

[(0309)] 與比較衣殼相比，含有AAVrh/4N502L衣殼蛋白的衣殼在非人靈長

類動物中具有提高的肌肉轉導(圖7B-圖7E)和降低的肝臟轉導(圖7F)。(表3)。

表3.相對於用AAV9和AAVrh74衣殼治療的非人靈長類動物，用AAVrh74N502I衣殼治療的非人靈長類動物的組織中的eGFP水平增加。

組織	AAV9	AAVrh74
脛骨前肌	+13x	+178x
股二頭肌	+303x	+56x
股四頭肌	NS*	+32x
心臟	NS	+13x
肝臟	-15x	-2x

*NS = 不顯著

實例5：對AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴在DMSXL小鼠模型中的靶標接合的評價

【0310】 為了確定最有效的劑量，研究兩種不同劑量的AAVrh74N502I衣殼的遞送。在劑量遞增研究中評價編碼具有miR155支架的amiR-DMPK²⁰⁴(miR155-amiR-DMPK²⁰⁴)的表現匣的AAV。為八周齡DMSXL小鼠靜脈內注射 9×10^{13} 個載體基因體(vg)/kg和 1.8×10^{14} vg/kg，對應於低劑量和高劑量。在基因轉移後8周對小鼠實施安樂死，並且藉由小RNA TaqMan測量DMPK抑制和amiR-DMPK²⁰⁴表現水平，並且將mRNA輸入水平相對於U6小核RNA歸一化。

【0311】 以劑量依賴性方式觀察到amiR-DMPK²⁰⁴的表現(圖8A)，並且其導致多個組織中總DMPK表現的劑量依賴性減少(圖8B)。總體而言，觀察到約10個amiR-DMPK²⁰⁴拷貝/U6足以將心臟和橫膈中的DMPK減少 $\geq 50\%$ ，該量可能足以治療DM1患者。

【0312】 最後，在親肌性衣殼AAVrh74N502I(SEQ ID NO: 50)的情況下，

先導載體nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴顯示在心肌細胞源DM1 iPSC中具有強大的體外活性(圖9)。

實例6：對AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴對轉錄組的影響的評價

【0313】 為了確定amiR-DMPK²⁰⁴治療是否對轉錄組有任何重大影響，進行全基因體RNA測序(RNA-seq)，藉由將CBA miR155-amiR-DMPK²⁰⁴質體轉染到HEK293細胞株中，比較amiR-DMPK²⁰⁴治療與CTL3(亂序miRNA)。為了評價觀察到的非DMPK基因表現變化是否是由於amiR-DMPK²⁰⁴的脫靶效應，評價顯著下調靶標中種子互補性的富集。使用5%的錯誤發現率(FDR)顯著性閾值，有四個差異表現基因OPN4(12.5倍)、DMPK(1.7倍)、KRTAP21-2(1.7倍)、C8ORF44-SGK3(1.7倍)，其3' UTR含有TTCGAC種子互補體(表4)。對於1%的FDR，只有OPN4(12.5倍)、DMPK(1.7倍)顯示出差異表現(圖10)。正如預期的那樣，DMPK是mRNA水平受影響最顯著的基因之一(44%的沈默)。總體而言，在amiR-DMPK²⁰⁴過表現後，在HEK293細胞中觀察到最小的脫靶效應。

表4

基因名稱	204相比於CTL3 的log2倍數	204相比於 CTL3的倍數	P值	FDR_BH < 0.05	FDR_BH < 0.01
OPN4	-3.64	12.5	2.7746E-17	5E-13	是
DMPK	-0.77	1.7	3.4308E-10	2E-06	是
KRTAP21-2	-0.76	1.7	0.0001	0.0103	
C8orf44-SGK3	-0.79	1.7	0.0003	0.0191	

實例7：探索AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴在非人靈長類動物中的生物分佈和活性的劑量範圍發現研究

【0314】 為了確定AAVrh74MN502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴的生物分

佈和活性，向食蟹猴投予單次靜脈內輸注(IV)劑量。研究持續時間為單次注射後12周。

【0315】 共有十六隻食蟹猴(8只雄性，8只雌性；24至48月齡)在研究的第1天在隱靜脈中經由IV給藥一次。劑量指示於下表5中。基於劑量水平(vg/kg)，將動物分組(每組2只雄性和2只雌性)為四個類別：配製緩衝液(第1組)； 5×10^{13} vg/kg(第2組)； 1×10^{14} vg/kg(第3組)；和 2×10^{14} vg/kg(第4組)。在12周後，處死動物，並且收穫組織進行分析。

表5

組別	測試品或對照品	劑量水平 (vg/kg)	劑量濃度 (vg/mL)	動物數量	
				雄性	雌性
1	配製緩衝液	0	0	2	2
2	AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK ²⁰⁴	5×10^{13}	5×10^{12} vg/ml	2	2
3	AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK ²⁰⁴	1×10^{14}	1×10^{13} vg/ml	2	2
4	AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK ²⁰⁴	2×10^{14}	2×10^{13} vg/ml	2	2

【0316】 將經收穫的組織機械均質化以提取RNA和DNA，並且用數字PCR(dPCR)分析樣品。

【0317】 在幾個肌肉和非肌肉組織中證實了AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴的劑量依賴性生物分佈和活性。分析幾種骨骼肌(脛骨前肌(TA)；腓腸肌；股四頭肌；股二頭肌；比目魚肌；趾長伸肌(EDL)；橫隔)以及心肌和肝臟組織。在所測試的所有組織中都發現了病毒基因體拷貝，並且每個組織中的拷貝/細胞數呈劑量依賴性(圖12)。在不同肌肉組織、心臟組織和肝臟組織中，amiR-DMPK的表現(圖13)和DMPK的下調(圖14)也呈劑量依賴性。與對照組相比，發現DMPK表現的劑量依賴性減少高達90%減少。發現在動物中

測試的所有劑量都是安全的，並且動物耐受性良好。

序列

除非另外指示，否則所有多肽序列都以N末端到C末端呈現。除非另外指示，否則所有核酸序列都以5’到3’呈現。

Byrne結蛋白增強子序列

CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTG
CTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGT
GTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGG
GGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAAACTG
AAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTGAGGCCCCACC
CTCGA(SEQ ID NO: 21)

來源：Li和Paulin等人 1991. 「High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer.」
Journal of Biol Chem. 266.10: 6562-6570。
2號染色體上的智人(*Homo sapiens*)結蛋白基因座控制區(DES-LCR)(NCBI參考序列：NG_046330.1)
Byrne增強子序列對應於參考序列中的17767-18125。

Paulin結蛋白增強子序列

CCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGCGTTCTCCTCT
ATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGG
TTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTG
AGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGT
CTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAAACTGAA(SEQ ID NO: 22)

來源：Li和Paulin等人 1991. 「High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer.」
Journal of Biol Chem. 266.10: 6562-6570。
2號染色體上的智人結蛋白基因座控制區(DES-LCR)(NCBI參考序列：NG_046330.1)
Paulin增強子序列對應於參考序列中的17787-18063。

Paulin結蛋白啟動子序列(-228至+75)

CTGCAGACCTGTCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAGGA
CCCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCC
CACGGCCACGGGCGGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGCTGTCAGGGGAG
GGGAGGCGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGT
CTCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCGCC
CGCCAGCCTCGCCCG(SEQ ID NO: 23)

與所公開的序列有一個鹼基對的差異(C而不是A，以粗體顯示並帶底線)。

來源：Li和Paulin等人 1991. 「High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer.」
Journal of Biol Chem. 266.10: 6562-6570。
2號染色體上的智人結蛋白基因座控制區(DES-LCR)(NCBI參考序列：NG_046330.1)
Paulin啟動子序列對應於參考序列中的18535-18844。

完整的nDes啟動子序列

CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTG
CTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGT
GTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGGCGGGGGACCCAGG
GGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAACTG
AAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTGAGGCCCCACC
CTCGAGGTACCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGCG
TTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAG
ATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTG
GGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCC
ACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAACTGAAAGCTTCTGC
AGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAGGACCCC
CGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCCAGC
GCCACGGGCCGCCCTTTCTTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGCTGTCAGGGGAGGGGA
GGCGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCC
CCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCCTGCCCCGCCCTCCTCCGTGCGCCCGCC
AGCCTCGCCCG(SEQ ID NO: 12)

來源：Li和Paulin等人 1991. 「High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer.」
Journal of Biol Chem. 266.10: 6562-6570。

兔β-珠蛋白內含子

GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTATA
TGGAGGGGGCAAAGTTTTAGGGTGTGTTTGAAGATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACC
ATG**CATG**GACCCTCATGATAATTTTGTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATT
GTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCATT
TGTAACGAATTTTAAATTCACTTTTGTATTTGTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGATT
CCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTA
AATGATAAGGTAGAATATTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAATATTCTTATT
GGTAGAAACAACACTACA**T**CCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATA
TACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAACC
ATGTTTCATGCCTTCTTCT**T**TTTCCTACAG(SEQ ID NO: 13)

兔β-珠蛋白內含子的5'臂

GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTATA
TGGAGGGGGCAAAGTTTTAGGGTGTGTTTGAAGATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACC

ATG**CATG**GACCCTCATGATAATTTTGTTCCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATT
GTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCATT
TGTAACGAATTTTAAATTCACCTTTGTTTATTTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGATT
C(SEQ ID NO: 14)

來源：穴兔(*Oryctolagus cuniculus*)血紅蛋白，β(HBB2)基因ID 100009084
本發明的序列具有在基因ID 100009084中不存在的另外的CATG(以粗體顯示並帶底線)。

兔β-珠蛋白內含子的3'臂

CAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTA
AATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAAATATTCTTATT
GGTAGAAACAACACTACA**T**CCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATA
TACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAAC
C ATGTTTCATGCCTTCTTCT**T**TTTCCTACAG(SEQ ID NO: 15)

來源：穴兔血紅蛋白，β(HBB2)基因ID 100009084
本發明的序列具有兩個T殘基(在上方以粗體顯示並帶底線)，而不是基因ID 100009084中的兩個C殘基。

miR155-DMPK²⁰⁴序列：

5' miR155側接序列

RNA序列
CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCU(SEQ ID NO: 9)

DNA序列

CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCT(SEQ ID NO: 40)
來源：BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi表現載體套組目錄號K493500
經工程化的前體miRNA序列結構基於鼠miR-155序列(Lagos-Quintana等人, 2002, *Current Biology*, 12:9, 735-739)。

amiR-DMPK²⁰⁴指導DNA

AGTCGAAGACAGTTCTAGGGT(SEQ ID NO: 4)

miR155末端環DNA

GTTTTGGCCACTGACTGAC(SEQ ID NO: 6)
來源：BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi表現載體套組目錄號K493500
經工程化的前體miRNA序列結構基於鼠miR-155序列(Lagos-Quintana等人, 2002, *Current Biology*, 12:9, 735-739)。

amiR-DMPK²⁰⁴過客DNA

ACCCTAGATGTCTTCGATT(SEQ ID NO: 5)

amiR-DMPK²⁰⁴指導RNA-miR155末端環-amiR-DMPK²⁰⁴過客RNA

AGUCGAAGACAGUUCUAGGGUUGUUUUGGCCACUGACUGACACCCUAGAUGUCUUC
GAUU(SEQ ID NO: 7)

amiR-DMPK²⁰⁴指導DNA-miR155末端環-amiR-DMPK²⁰⁴過客DNA

AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGAT
T(SEQ ID NO: 8)

3' miR155側接序列

RNA序列

GACACAAGGCCUGUUACUAGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC(SEQ ID NO: 10)

DNA序列

GACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGGCC(SEQ ID NO: 41)

來源：BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi表現載體套組目錄號K493500

經工程化的前體miRNA序列結構基於鼠miR-155序列(Lagos-Quintana等人, 2002, *Current Biology*, 12:9, 735-739)。

miR155

RNA

CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGACACAAGGCCUGUUACUAGCACUCACAU
GGAACAAAUGGCC(SEQ ID NO: 11)

DNA

CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGG
AACAAATGGGCC(SEQ ID NO: 42)

完整的miR155-DMPK²⁰⁴雙股體序列-RNA

CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGAGUCGAAGACAGUUCUAGGGUGUUUUGG
CCACUGACUGACACCCUAGAUGUCUUCGAUUCAGGACACAAGGCCUGUUACUAGCA
CUCACAUGGAACAAAUGGCC(SEQ ID NO: 24)

完整的miR155-DMPK²⁰⁴雙股體序列-DNA

CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTTCCTGGCC
ACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCAC

ATGGAACAAATGGCC(SEQ ID NO: 25)

最小BGHpA序列

TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGG
TGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
GGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
AA GACAATAGC(SEQ ID NO: 16)

來源：家牛(*Bos taurus*)生長激素1(GH1)mRNA NCBI參考序列NM_180996.1

1138 bp A1AT內含子填充序列(在表現匣的上游)

TACGTACAATTGGGATCCTTCGAACTTGAGAGAAAACATCCCAGGGATTTACAGATCAC
ATGCAGGCAGGGACCAGCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGGAGGGGGCCAGGGAT
GGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGCAGTTATTTTTGGGTGGGATTACCACTTTTC
CCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCAATCATTAAAGAAGACAAAGGGTTTGTTG
AACTTGACCTCGGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGC
TTCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTGGAGGGGAGAGA
AGCAGAGACACGTTGTAAGGCTGATCCCAGGCCTCGAGCAAGGCTCACGTGGACACCTC
CCAGGAAGCGCTCACTCCCCCTGGACGGCCCTGGCCCTGCACATCCTCTCCCTCCCTGT
CACATAGGCCTTGCTCCTCCTCAAGGCTTTGGCTGATGGGGCTGGCTCCCCTCTGTCCA
TCTTCTGACAAGCGCTCTCCCCCTGCTCAGGTGCACCCACAACCTCAGAACAGGGAAG
AGCATCGTCACTCCACTAGTCTGCCTCCAGGGCTCTCTCCTTTCTAGTACACGGCTTGA
AGCTCCTTGAGGACACGGACCCTGGCAGTGACCTTCACAGTGCCCAGACCCCAAGATAA
TGCAGCCATTCATGGAAGTGCAGGTTGTTCAATTGGTCGCCTTTAGTTTTCCAAAATAAG
TGTCACTTTAGCTGAAATCATTCATTAATTCAGACACCAAATCTCACAGATCGAAGGAG
TCAGAAATTCCTTTGAAACAACCTTAGCCCCAACCTTTCTGTGTCAGTATGGATAAATCA
AGGCCCAATGTCTAGAAGGTCTTGGGCAAAGTTGAAATTCAGGGTCAGTGACACAACCT
CAAGGGAGGCCCCGAAAGTGCCAGCTGCACAGCAGCCCCTGCCTGGCTTTGCTGTTTGC
CCACCGTCCCGTGTGTCAGTGAATCACGGGCATCTTCAGGAGCTCAGCCTGGGTCTTCATT
TGTTTCCCTCGGCCCTTCCTCAGCCTCAGGACAGTGCTAGCAGCCCCACACATTCTT
CCCTACAGATACCATGG(SEQ ID NO: 18)

來源：質體DC 969(SerpinA1 = A1AT)14號染色體NG_008290.1

398 bp A1AT內含子填充序列(在表現匣的下游)

GCATGCAGAGTGGACAGGGGCCTCAGGGACCCCTGATCCCAGCTTTCTCATTGGACAGA
AGGAGGAGACTGGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCCCCACTAAGGCCACAGCAGAGCCAG
GACTTTAGCTGTGCTGACTGCAGCCTGGCTTGCCTCCACTGCCCTCCTTTGCCTCAAGA
GCAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCCCTGGCCTTGCCCTCCACCTCCCCTCCC
CTATGCTGTTTTCTGGGACAGTGGGAGCTGGCTTAGAATGCCCTGGGGCCCCCAGGAC
CCTGGCATTTTAACCCCTCAGGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATACAGAAGAGTCCATCA
CCTGCTGTATGCCACACACCATCCCCACAGTCGACATTTAAATT(SEQ ID NO: 19)

來源：質體DC 969(SerpinA1 = A1AT)14號染色體NG_008290.1

ITR-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴-BGHpA-填充片段-ITR(3739 bp)

**TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGG
CGTCGGGGCGAC
CTTTGGTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCA
TCACTAGGGGTT
CCTTACGTACAATTGGGATCCTTCGAACTTGAGAGAAAACATCCCAGGGATTTACAGATCACAT
GCAGGCA
GGGACCAGCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGT
TGAGGAGC
GAGAGGCAGTTATTTTTGGGTGGGATTCACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTT
TGTTCAA
TCATTAAGAAGACAAAGGGTTTGTTGAACTTGACCTCGGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCT
CTAAAAAC
ATGGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTGGA
GGGGAGA
GAAGCAGAGACACGTTGTAAGGCTGATCCCAGGCCTCGAGCAAGGCTCACGTGGACACCTCCC
AGGAAGCG
CTCACTCCCCCTGGACGGCCCTGGCCCTGCACATCCTCTCCCTCCCTGTCACATAGGCCTTGCTC
CTCCTC
AAGGCTTTGGCTGATGGGGCTGGCTCCCCTCTGTCCATCTTCCTGACAAGCGCCTCTCCCCCTGC
TCAGGT
GCACCCACAACCTCAGAACAGGGAAGAGCATCGTCACTCCACTAGTCTGCCTCCAGGGCTCTCTC
CTTTCTA
GTACACGGCTTGAAGCTCCTTGAGGACACGGACCCTGGCAGTGACCTTCACAGTGCCCAGACCC
CAAGATA
ATGCAGCCATTCATGGAACCTGCAGGTTGTTTCATTGGTCGCCTTTAGTTTTCCAAAATAAGTGTCA
CTTTAG
CTGAAATCATTCAATTAATTCAGACACCAAATCTCACAGATCGAAGGAGTCAGAAATTCCTTTGA
AACAACCT
TAGCCCAAACCTTTCTGTGTCAGTATGGATAAATCAAGGCCCAATGTCTAGAAGGTCTTGGGCA
AAGTTGA
AATTCAGGGTCAGTGACACAACCTCAAGGGAGGCCCCGAAAGTGCCAGCTGCACAGCAGCCCC
TGCTTGGC
TTTGCTGTTTGCCACCGTCCCGTGTCAGTGAATCACGGGCATCTTCAGGAGCTCAGCCTGGGT
CTTCATT
TGTTTCCCTCGGCCCCCTTCCTCAGCCTCAGGACAGTGCTAGCAGCCCCCACACATTCTTCCCTAC
AGATAC
CATGGCACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCC
CAGCCA
TGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGAT
GGTTGG**

GTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGT
AGGGGGAT
GAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGG
GAGCGCACA
TAGCAATTGGAACTGAAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTT
GAGGCCC
CACCTCGAGGTACCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGCGTT
CTCCTC
TATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGTGA
CATGCGG
CTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAAT
CAGGGAGG
GGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAG
CAATTGGAA
ACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTC
ACAGGAC
CCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCACGGC
CACGGGC
CGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCACTGTCAGGGGAGGGGAGGCGGGGGCTGAT
GTCAGGAG
GGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGG
CCGCCTG
CCCGCCGCCTCCTCCGTGCGCCCCGCCAGCCTCGCCCCGAGCTCTGAGTAGACGAAGCTAAGGCGC
GCCTGA
GAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCCTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGT
TATATG
GAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGCATG
GACCCTC
ATGATAATTTTGTTCCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTTGTCTCCTCTTATTTTCTTTCA
TTTT
CTGTAACCTTTTCGTAAACTTTAGCTTGCAATTTGTAACGAATTTTAAATTCACCTTTTGTTTATT
TGTC
GATTGTAAGATCCCATCGATTCGGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAG
ACAGTTC
TAGGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTCAGGACACAAGGCCTGTTAC
TAGCACT
CACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGGTATATTATATTGTAAGTTCAGCACAGTTTTAG
AGAACAA
TTGTTATAATTAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAATAT
TCTTATT
GGTAGAAACAACTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACACT
GTTTGA
GATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTC
TTTTTCC

TACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCG
TGCCTT
CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA
TTGTCTG
AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA
GACAATAG
CGCATGCAGAGTGGACAGGGGCCTCAGGGACCCCTGATCCCAGCTTTTCTCATTGGACAGAAGG
AGGAGACT
GGGGCTGGAGAGGGACCTGGGGCCCCACTAAGGCCACAGCAGAGCCAGGACTTTAGCTGTGCT
GACTGCAG
CCTGGCTTGCCTCCACTGCCCTCCTTTGCCTCAAGAGCAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCA
GCCCCTG
GCCTTGCCTCCCACCTCCCCTCCCCTATGCTGTTTTCTGGGACAGTGGGAGCTGGCTTAGAATG
CCCTGG
GGCCCCCAGGACCCTGGCATTTTAACCCCTCAGGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATACAGAAGA
GTCCATCA
CCTGCTGTATGCCACACACCATCCCCACAGTCGACATTTAAATTAGGAACCCCTAGTGATGGA
GTTGGCCA
CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCG
GCGACCTTTGGT
CGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA
(SEQ ID NO: 20)

表5.從5' ITR到3' ITR的ITR-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴序列注釋(3739 bp)

序列 編號	SEQ ID NO	注釋
1 - 145	43	5' ITR
146 - 1283	44	A1AT填充片段
1284 - 2238	12	nDes啟動子(詳情如下)
1284 - 1642	21	Byrne增強子
1643 - 1648	n/a	KpnI限制性位點
1647 - 1923	22	Paulin增強子
1923 - 1928	n/a	HindIII限制性位點
1929 - 1934	n/a	PstI限制性位點
1929 - 2238	23	Paulin啟動子
2268 - 2578	45	兔β珠蛋白內含子的5'臂
2579 - 2584	n/a	BamHI限制性位點
2585 - 2611	46	5' miR155側接序列

序列 編號	SEQ ID NO	注釋
2612	n/a	來自Invitrogen Block-IT套組的另外的鹼基
2613 - 2633	4	DMPK ²⁰⁴ miRNA指導序列
2634 - 2652	6	miR155末端環
2653 - 2671	5	DMPK ²⁰⁴ miRNA過客序列
2672 - 2674		來自Invitrogen Block-IT套組的另外的鹼基
2675 - 2716	41	3' miR155側接序列
2717 - 2722	n/a	XhoI限制性位點
2723 - 3005	47	兔β珠蛋白內含子的3'臂
3011 - 3196	16	minBGHpolyA
3197 - 3594	48	A1AT填充片段
3595 - 3739	49	3' ITR

所合成的nDes-miR155-204片段的序列：

AGATCTCCATGGCACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCT
TGTTTC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCA
GGGAGA
TGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGT
GTGAGTA
GGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCG
GGGGTGGGA
GCGCACATAGCAATTGGAACTGAAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTA
TAAACTT
GAGGCCCCACCCTCGAGGTACCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCC
ATGCGT
TCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTT
GGGTTGA
CATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGG
GATGAATC
AGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCG
CACATAGCA
ATTGGAACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTT
GCCCCGTC
ACAGGACCCCCGCTGGCTGACTCAGGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCC
CCCACGGC
CACGGGCCGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGACAGCTGTCAGGGGAGGGGAGGCGGG
GGCTGATG

TCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCTCGCCGCATCCACTCTC
CGGCCGG
CCGCCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCGCCCGCCAGCCTCGCCCGGAGCTCTGAGTAGACGAAGC
TAAGGCG
CGCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAAA
TTCATG
TTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACC
ATGCATG
GACCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTT
TCTTT
TCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTTAAATTCACTTTT
GTTTA
TTTGTGAGATTGTAAGATCCCATCGATTCCGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGA
GTCGAAG
ACAGTTCTAGGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTCAGGACACAAGGC
CTGTTAC
TAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACA
GTTTTAG
AGAACAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTG
GAAATAT
TCTTATTGGTAGAAACAACACTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGAT
ATACAC
TGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGC
CTTCTTC
TTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCC
TCCCCC
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTG
CATCGCA
TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGA
TTGGGAAG
ACAATAGCGCATGCGTCGACT(SEQ ID NO: 26)

nDes-miR155-204啟動子至聚A

CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCA
GGGAGA
TGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGT
GTGAGTA
GGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCG
GGGTGGGA
GCGCACATAGCAATTGGAAACTGAAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCCTGTTTA
TAAACTT
GAGGCCCCACCCTCGAGGTACCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCC

ATGCGT
TCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTT
GGGTTGA
CATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGG
GATGAATC
AGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCG
CACATAGCA
ATTGGAAACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGTCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTT
GCCCCGTC
ACAGGACCCCCGCTGGCTGACTCAGGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCC
CCCACGGC
CACGGGCCGCCCTTTCTTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGCTGTCAGGGGAGGGGAGGCGGG
GGCTGATG
TCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCTCGCCGCATCCACTCTC
CGGCCGG
CCGCCTGCCCCGCCGCTCCTCCGTGCGCCCCGCCAGCCTCGCCCCGAGCTCTGAGTAGACGAAGC
TAAGGCG
CGCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAAA
TTCATG
TTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACC
ATGCATG
GACCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTT
TCTTT
TCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTTAAATTCATTTT
GTTTA
TTTGTGAGATTGTAAGATCCCATCGATTCCGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGA
GTCGAAG
ACAGTTCTAGGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTCAGGACACAAGGC
CTGTTAC
TAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACA
GTTTTAG
AGAACAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTG
GAAATAT
TCTTATTGGTAGAAACAACACTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGAT
ATACAC
TGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGC
CTTCTTC
TTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCC
TCCCCC
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTCTTAATAAAATGAGGAAATTG
CATCGCA
TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGA
TTGGGAAG
ACAATAGC

(SEQ ID NO: 1')

AAV:rh/1變體的胺基酸序列(WO 2019178412)

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Gln	Asp	Asn	Leu	Ser	
1			5					10						15		
Gln	Gly	Ile	Arg	Gln	Trp	Trp	Asp	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Lys	Pro	
		20					25						30			
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Gln	Asp	Asn	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	
		35					40						45			
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Gln	Pro	
		50				55					60					
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Gln	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	
		65			70					75				80		
Gln	Gln	Leu	Gln	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala	
			85					90						95		
Asp	Ala	Gln	Phe	Gln	Gln	Arg	Leu	Gln	Gln	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	
		100						105					110			
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	
		115					120					125				
Leu	Gly	Leu	Val	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	
		130				135					140					
Pro	Val	Gln	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	
		145			150				155						160	
Gly	Lys	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	
			165					170						175		
Thr	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Gln	Pro	
		180				185						190				
Pro	Ala	Gly	Pro	Ser	Gly	Leu	Gly	Ser	Gly	Thr	Met	Ala	Ala	Gly	Gly	
		195				200					205					
Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Gln	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	
		210				215				220						
Ser	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	
		225			230					235					240	
Ile	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Phe	Thr	Tyr	Asn	Asp	His	
			245				250							255		
Leu	Lys	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Asp	
		260					265					270				
Asn	Thr	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	
		275				280						285				
Arg	Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Val	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	
		290				295					300					

Asn	Asn	Trp	Gly	Thr	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Thr	Lys	Leu	Thr	Asn
305					310				315						320
Thr	Gln	Val	Lys	Gln	Val	Thr	Gln	Asn	Gln	Gly	Thr	Lys	Thr	Thr	Ala
			325						330						335
Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Thr	Gln	Val	Thr	Thr	Asp	Ser	Gln	Val	Gln
			340					345					350		
Leu	Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	Thr	Gln	Gly	Cys	Leu	Thr	Thr	Thr
		355					360				365				
Thr	Ala	Asp	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn
		370			375						380				
Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Thr	Cys	Leu	Gln	Tyr	
		385			390					395					400
Thr	Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Thr	Gln	Thr	Ser	Tyr
			405						410					415	
Asn	Thr	Gln	Asp	Val	Pro	Thr	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Thr	Ser	Gln	Ser
		420						425					430		
Leu	Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Thr	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu
		435				440					445				
Ser	Arg	Thr	Gln	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Thr	Gln	Gln	Leu	Leu
	450				455					460					
Thr	Ser	Gln	Ala	Gly	Pro	Asn	Asn	Met	Ser	Ala	Gln	Ala	Lys	Asn	Trp
	465			470					475						480
Leu	Pro	Gly	Thr	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Leu	Ser
		485						490						495	
Gln	Asn	Asn	Asn	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Thr	Lys	Tyr	Thr
		500						505					510		
Leu	Asn	Gly	Arg	Asp	Ser	Leu	Val	Asn	Pro	Gly	Val	Ala	Met	Ala	Thr
		515					520				525				
Thr	Lys	Asp	Asp	Gln	Gln	Arg	Thr	Thr	Pro	Ser	Ser	Gly	Val	Leu	Met
	530					535					540				
Thr	Gly	Lys	Gln	Gly	Ala	Gly	Lys	Val	Asn	Val	Asp	Tyr	Ser	Ser	Val
	545				550					555					560
Met	Leu	Thr	Ser	Gln	Gln	Gln	Thr	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr
		565					570							575	

Gln	Gln	Tyr	Gly	Val	Val	Ala	Asp	Asn	Leu	Gln	Gln	Gln	Asn	Tyr	Thr
		580					585						590		
Gly	Ser	Arg	Gly	Ala	Val	Asn	Ser	Gln	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	Met	Val
		595					600					605			
Trp	Gln	Asn	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	Thr	Trp	Ala	Lys	Thr
	610					615					620				
Pro	His	Thr	Asp	Gly	Asn	Thr	His	Pro	Ser	Pro	Leu	Met	Gly	Gly	Thr
	625				630					635					640
Gly	Leu	Lys	His	Pro	Pro	Pro	Gln	Thr	Leu	Thr	Lys	Asn	Thr	Pro	Val
		645						650						655	
Pro	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Thr	Thr	Asn	Gln	Ala	Lys	Leu	Ala	Ser	Thr
	660						665						670		
Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Val	Gln	Thr	Gln	Trp	Gln
	675					680					685				
Leu	Gln	Lys	Gln	Asn	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	Gln	Thr	Gln	Tyr	Thr
	690					695				700					
Ser	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Thr	Asn	Val	Asp	Thr	Ala	Val	Asn	Thr	Gln
	705				710				715						720
Gly	Thr	Tyr	Ser	Gln	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Thr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg
		725					730							735	

Asn Leu (SEQ ID NO: 39)

AAV:rh/INS02.的膜具機序列

MAADGYLPDWLLEDNLSHGRIWWDILKPGA.PKPKANQQKQDNNGRGLVLPGYKYLCPI.NC
第 101 頁，共 104 頁(發明說明書)

LDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGR
AVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQT
GDSESVDPDPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSSGNWHCDSTWL
GDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSR
DWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFVDSEYQLPYVLG
SAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFE
DVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKN
WLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSIFAWTGATKYHLNGRDSL VNP G VAMATHKDDDEERFFPS
SGVLMFQKQAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAV
NSQ GALPGMVWQNRDVYLQGP IWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNT PVPAD
PPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTE
GTYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO: 50)

編碼AAVrh74 N502I衣殼的核苷酸序列

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCG
CGAGTGGTGGGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAAGCA
GGACAACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCTTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGA
CTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAG
GCCTACGACCAGCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAATCACGCCG
ACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCG
CGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGCGGGTTCTCGAACCTCTGGGCCTGGTTGAATCGCCG
GTTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCACCCAGCGCTCTCCAG
ACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAAAAAGAGACTCAATTT
TGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTCAACCAATCGGAGAACCACCA
GCAGGCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCTCCAATGG
CAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCCTCAGGAAATTGGCATTGCGA
TTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGCACCTGGGCCCTGCCC
ACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGGACCTCGGGAGGAAGCACCA
ACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCT
CACTGCCACTTTTACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCC
GGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGCAGAA
TGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGATTACAGTCTTTACGGAC
TCGGAATACCAGCTCCCGTACGTGCTCGGCTCGGCGCACCAAGGGCTGCCTGCCTCCGTT
CCCGGCGGACGTCTTCATGATTCCTCAGTACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTC
AGGCTGTGGGCCCGGTCGTCCTTCTACTGCCTGGAGTACTTTCCTTCTCAAATGCTGAGA
ACGGGCAACAACCTTTGAATTCAGCTACAACCTTCGAGGACGTGCCCTTCCACAGCAGCT
ACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGAACCCTCTCATCGACCAGTACTTGTA
CTACCTGTCCCGGACTCAAAGCACGGGCGGTACTGCAGGAACTCAGCAGTTGCTATTTT
CTCAGGCCGGGCCTAACAACATGTTCGGCTCAGGCCAAGAACTGGCTACCCGGTCCCTG
CTACCGGCAGCAACGCGTCTCCACGACACTGTCGAGAACAAACAGCATCTTTGCC
TGGACGGGTGCCACCAAGTATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCG
TTGCCATGGCTACCCACAAGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATCCAGCGGAGTCTT
AATGTTTGGGAAACAGGGAGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTGATGCT

AACCAGCGAGGAAGAAATAAAGACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGT
GGTGGCCGATAACCTGCAACAGCAAAACGCCGCTCCTATTGTAGGGGCGTCAATAGT
CAAGGAGCCTTACCTGGCATGGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCA
TCTGGGCCAAGATTCCTCATACGGACGGCAACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGC
TTTGGACTGAAGCATCCGCCTCCTCAGATCCTGATTAAAAACACACCTGTTCCCGCGGA
TCCTCCGACCACCTTCAATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTTCATCACGCAGTACAGTACCG
GCCAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAAACGCTGGA
ACCCAGAGATTTCAGTACACTTCCAATACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTC
AATACTGAGGGTACTTATTCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAA
TCTGTAA(SEQ ID NO: 51)

AAVrh74W505R的胺基酸序列

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNNGRLVLPGYKYLGPFG
LDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGR
AVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQPPAKKRLNFGQT
GDSESVDPDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWL
GDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSR
DWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLG
SAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFE
DVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLFSQAGPNNMSAQAKN
WLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFARTGATKYHLNNGRDSL VNPGVAMATHKDDDEERFFP
SSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGA
VNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGFGFLKHPPPQILIKNTPVPA
DPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYKSTNVDFAVNT
EGTYSEPRPIGTRYLTRNL(SEQ ID NO: 52)

編碼AAVrh74W505R的核苷酸序列

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCG
CGAGTGGTGGGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCA
GGACAACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGA
CTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAG
GCCTACGACCAGCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAATCACGCCG
ACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCG
CGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGCGGGTTCTCGAACCTCTGGGCCTGGTTGAATCGCCG
GTTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCACCCAGCGCTCTCCAG
ACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAAAAAGAGACTCAATTT
TGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTCAACCAATCGGAGAACCACCA
GCAGGCCCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCTCCAATGG
CAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCTCAGGAAATTGGCATTGCGA
TTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGCACCTGGGGCCCTGCCC
ACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGGACCTCGGGAGGAAGCACCA
ACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCCTGGGGGTATTTGACTTCAACAGATTC

CACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACACTGGGGATTCC
GGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGCAGAA
TGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGATTTCAGGTCTTTACGGAC
TCGGAATACCAGCTCCCGTACGTGCTCGGCTCGGCGCACCAGGGGCTGCCTGCCTCCGTT
CCCGGCGGACGTCTTCATGATTCTCAGTACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTC
AGGCTGTGGGCCCGGTCGTCCTTCTACTGCCTGGAGTACTTTCTTCTCAAATGCTGAGA
ACGGGCAACAACCTTTGAATTTCAGCTACAACCTTCGAGGACGTGCCCTTCCACAGCAGCT
ACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGAACCCTCTCATCGACCAGTACTTGTA
CTACCTGTCCCGGACTCAAAGCACGGGCGGTACTGCAGGAACTCAGCAGTTGCTATTTT
CTCAGGCCGGGCCTAACAACATGTCGGCTCAGGCCAAGAACTGGCTACCCGGTCCCTG
CTACCGGCAGCAACGCGTCTCCACGACACTGTCGCAGAACAAACAGCAACTTTGCC
AGGACGGGTGCCACCAAGTATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCG
TTGCCATGGCTACCCACAAGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATCCAGCGGAGTCTT
AATGTTTGGGAAACAGGGAGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTGATGCT
AACCAGCGAGGAAGAAATAAAGACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGT
GGTGGCCGATAACCTGCAACAGCAAAACGCCGCTCCTATTGTAGGGGCGGTCAATAGT
CAAGGAGCCTTACCTGGCATGGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCA
TCTGGGCCAAGATTCCTCATACGGACGGCAACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGC
TTTGGACTGAAGCATCCGCCTCCTCAGATCCTGATTAAAAACACACCTGTTCCCGCGGA
TCCTCCGACCACCTTCAATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTTCATCACGCAGTACAGTACCG
GCCAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAACGCTGGA
ACCCAGAGATTCAGTACACTTCCAACACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTC
AATACTGAGGGTACTTATTCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAA
TCTGTAA(SEQ ID NO: 53)

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="112103-seq.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-07-
10">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112112926</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-04-06</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/328, 241</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-04-06</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">美商健臻公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>GENZYME CORPORATION</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">用於DM-1肌強直性營養不良之靶向基因療法
</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>53</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
              <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>

```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q2">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agtcgaagacagttctagggt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q3">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>

```

```
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q4">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>accctagatgtcttcgatt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q5">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q6">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gttttggccactgactgac</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q7">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agtcgaagacagttctagggt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier id="q9">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q10">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>accctagatgtcttcgatt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 6" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q11">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q12">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gttttgccactgactgac</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>60</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..60</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q13">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..60</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q14">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agtcgaagacagttctagggttgTTTTGGCCactgactgacaccctagatgtcttcgatt</
INSDSeq_sequence>

```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>60</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..60</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q15">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..60</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q16">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agtcgaagacagttctagggttgttttggccactgactgacaccctagatgtcttcgatt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber=" 9" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="ql7">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ctggaggccttgctgaaggctgtatgct</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 10" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>42</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q19">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q20">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>69</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..69</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q21">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..69</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q22">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ctggaggcttgctgaaggctgtatgctgacacaaggcctgttactagcactcacatggaaca
aatggcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>955</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..955</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q23">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..955</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q24">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cacccatgcctcctcaggtacccccctgccccccacagctcctctcctgtgccttggtttccca
gccatgcgttctcctctataaatacccgctcttggtatttgggggtggcagctgttgctgccaggagatggttgggttga
catgcggctcctgacaaaacacaaacccctggtgtgtgtgggcgtgggtggtgtgagtagggggatgaatcaggaggagg
gcgggggacccagggggcaggagccacacaaagtctgtgcgggggtgggagcgcacatagcaattggaaactgaaagctt
atcagaccctttctggaaatcagcccactgtttataaacttgaggccccaccctcgaggtacccccctgccccccacagct
cctctcctgtgccttggtttccagccatgcgttctcctctataaatacccgctcttggtatttgggggtggcagctgttgc
tgccaggagatggttgggttgacatgcggctcctgacaaaacacaaacccctggtgtgtgtgggcgtgggtggtgtgag
taggggatgaatcaggaggggggcgggggacccagggggcaggagccacacaaagtctgtgcgggggtgggagcgcaca
tagcaattggaaactgaaagcttctgcagacctgcttgctgcctgccctggcgaaggattggcaggcttggccgtcacag
gaccccgctggctgactcaggggcgaggcctcttgcgggggagctggcctccccgccccacggccacgggcccgcct
ttcctggcaggacagcgggatcttgacagctgtcaggggaggggagggcggggctgatgtcaggagggatacaaatagtc
cgacggctgggggcccctgtctcccctcgccgcatccactctccggccggccgcctgcccgcgcctcctccgtgcgcccg
ccagcctcgccc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>561</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..561</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q25">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Oryctolagus cuniculus</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>穴兔</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gtgagtttggggacccttgattgttctttctttttcgctattgtaaaattcatgttatatgg
agggggcaaagttttcagggtgttgtagaatgggaagatgtcccttgatcaccatgcatggaccctcatgataattt
tggttctttcactttctactctgttgacaaccattgtctcctcttattttcttttcattttctgtaactttttcggttaa
cttagcttgcatgtgtaacgaattttaaaattcacttttggttatttgtcagattgtaagatcccatcgattccaatca
gggtatatttatattgtacttcagcacagtttagagaacaattgttataattaaatgataaggtagaatatttctgcata
taaattctggctggcgtggaaatattcttattggtagaacaactacatcctggtcacatcctgcctttctctttatgg
ttacaatgatatacactgtttgagatgaggataaaatactctgagtccaaaccggggccctctgctaaccatgttcatgc
cttcttcttttctacag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>296</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..296</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q26">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..296</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q27">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gtgagtttggggacccttgattgttctttctttttcgctattgtaaaattcatgttatatgg
agggggcaaagttttcagggtgttgtagaatgggaagatgtcccttgatcaccatgcatggaccctcatgataattt
tggttctttcactttctactctgttgacaaccattgtctcctcttattttcttttcattttctgtaacttttcgttaaa
cttagcttgcatgtgtaacgaatttttaaattcacttttggttatttgtcagattgtaagatcccatcgattc</INSD
Seq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>265</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..265</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q28">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..265</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q29">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caatcagggtatatttatattgtacttcagcacagttttagagaacaattgtttataattaaat
gataaggtagaatatttctgcatataaattctggctggcgtggaaatattctttatttggtagaacaactacatcctggtc
atcatcctgccttttcttttatggttacaatgatatacactgtttgagatgaggataaaatactctgagtccaaaccggg
cccctctgctaaccatgtttcatgccttcttcttttcttacag</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>186</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```

<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..186</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q30">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..186</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q31">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tctagttgccagccatctgttgtttgccccctccccgtgccttccttgaccctggaaggtgc
cactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtg
gggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1913</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>

```

```
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..1913</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q32">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..1913</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q33">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
```

</INSDSeq_feature-table>

```
<INSDSeq_sequence>cacccatgcctcctcaggtacccccctgccccccacagctcctctcctgtgccttggtttccca
gcatgcgttctcctctataaatacccgctcttggtatttgggggttggcagctgttgctgccaggagatggttgggttga
catgcggctcctgacaaaacacaaacccctggtgtgtgtgggcgtgggtggtgtgagtagggggatgaatcaggaggagg
gcgggggacccagggggcaggagccacacaaagctgtgtgcgggggtgggagcgcacatagcaattggaaactgaaagctt
atcagaccctttctggaaatcagcccactgtttataaacttgaggccccaccctcgaggtacccccctgccccccacagct
cctctcctgtgccttggtttccagccatgcgttctcctctataaatacccgctcttggtatttgggggttggcagctgttgc
tgccaggagatggttgggttgacatgcggctcctgacaaaacacaaacccctggtgtgtgtgggcgtgggtggtgtgag
taggggatgaatcaggagaggggcgggggacccagggggcaggagccacacaaagctgtgtgcgggggtgggagcgcaca
tagcaattggaaactgaaagcttctgcagacctgcttgctgcctgcccgggaaggattggcaggcttggccgtcacag
gacccccgctggctgactcaggggcgaggcctcttgcgggggagctggcctccccgccccacggccacgggcccgcct
ttcctggcaggacagcgggatcttgcagctgtcaggggaggggagggcggggctgatgtcaggagggatacaaatagtg
cgacggctgggggcccctgtctcccctcgccgcattccactctccggccggccgcctgcccgcgcctcctccgtgcgccc
ccagcctcgccccggagctctgagtagacgaagctaaggcgccgctgagaacttcagggtgagtttggggaccccttgattg
```

```
ttctttcttttcgctattgtaaaattcatgttatatggagggggcaaagttttcagggtgtttgtagaatgggaagat
gtcccttgatcaccatgcatggaccctcatgataattttgtttctttcactttctactctgttgacaaccattgtctcc
tcttattttcttttcattttctgtaactttttcgttaaacttttagcttgcatttgaacgaatttttaaattcacttttg
tttatttgtcagattgtaagatcccatcgattcggatccctggaggcttgctgaaggctgtatgctgagtcgaagacagt
tctagggtgttttggccactgactgacaccctagatgtcttcgattcaggacacaaggcctgttactagcactcacatgg
aacaatggccctcgagcaatcagggtatattatattgtacttcagcacagtttttagagaacaattgttataattaaatg
ataaggtagaatatttctgcatataaattctggctggcgtggaaatattcttatttggtagaacaactacatcctgggtca
tcacctgcctttctctttatggtttacaatgatatacactgtttgagatgaggataaaaatactctgagtccaaaccgggc
ccctctgctaaccatgttcatgccttcttcttttttctacagctcctgggcaacgtgctgaccgggtctagttgccagcca
tctgttgtttgccccctccccctgccttcccttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttttctaataaaatgagga
aattgcatcgcatgtgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattggg
aagacaatagc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1138</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1138</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier id="q34">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1138</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
```

```
<INSDQualifier id="q35">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tacgtacaattgggatccttcgaacttgagagaaaacatcccagggtttacagatcacatg
caggcaggaccagctcaacccttctttaatgtcatccaggaggggggccagggtggaggggagggttgaggagcgag
aggcagttatTTTTGGGTGGGATCACCCTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTGTTCAATCATTAAAGAAG
CAAAGGTTTGTGAACCTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCTTCAGTC
CCTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTGGAGGGGAGAGAAGCAGAGACACGTTGTAAGGCTGATCCC
AGGCCTCGAGCAAGGCTCACGTGGACACCTCCAGGAAGCGCTCACTCCCCCTGGACGGCCCTGGCCCTGCACATCCTCT
CCCTCCCTGTCACATAGGCCTTGCTCCTCCTCAAGGCTTTGGCTGATGGGGCTGGCTCCCCCTGTGCCATCTTCTTGACA
AGCGCCTCTCCCCCTGCTCAGGTGCACCCACAACTCAGAACAGGGAAGAGCATCGTCACTCCACTAGTCTGCCTCCAGGG
CTCTCTCCTTTCTAGTACACGGCTTGAAGCTCCTTGAGGACACGGACCCTGGCAGTGACCTTCACAGTGCCCAGACCCCA
AGATAATGCAGCCATTGATGAAGTGCAGGTTGTTTCAATTGGTCGCCCTTTAGTTTTCCAAAATAAGTGTCACTTTAGCTGA
AATCATTCATTAAATTCAGACACCAAATCTCACAGATCGAAGGAGTCAGAAATTCCTTTGAAACAACCTAGCCCCAACCTT
TCTGTGTCAGTATGGATAAATCAAGGCCAATGTCTAGAAGGTCTTGGGCAAAGTTGAAATTCAGGGTCAGTGACACAAC
CTCAAGGGAGGCCCGAAAGTGCCAGCTGCACAGCAGCCCCCTGCCTGGCTTTGCTGTTTGCCACCCTCCCGTGTGTCAGTG
AATCAGGGCATCTTCAGGAGCTCAGCCTGGGTCTTCAATTTGTTTCCCTCGGCCCTTCTCAGCCTCAGGACAGTGCTA
GCAGCCCCACACATTCTTCCCTACAGATACCATGG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>398</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..398</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q36">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..398</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q37">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gcatgcagagtggacaggggacctcagggacccctgatcccagctttctcattggacagaagg
aggagactggggctggagaggacctgggccccactaaggccacagcagagccaggacttttagctgtgctgactgcagc
ctggcttgccctccactgccctcctttgcctcaagagcaaggagacctcagagtggaggaagcagccccctggccttgccctc
ccacctcccctcccctatgctgttttctgggacagtgggagctggcttagaatgccctggggccccccaggaccctggca
ttttaaccctcaggggcaggaaggcagcctgagatacagaagagtccatcacctgctgtatgccacacaccatccccac
agtcgacatttaaatt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>3739</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..3739</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q38">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

```

<INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..3739</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q39">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcg
tcgggcgaccttttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtggccaactccatcactaggggtt
ccttacgtacaattgggatccttcgaacttgagagaaaacatcccagggtattacagatcacatgcaggcagggaccagc
tcaacccttctttaatgtcatccagggagggggccagggttgagggggaggggttgaggagcgagaggcagttatTTTTG
ggtgggattcaccacttttcccatgaagaggggagacttggtatTTTgttcaatcattaagaagacaaagggtttgttga
acttgacctcggggggtagacatgggtatggcctctaaaaacatggccccagcagcttcagtcctttctcgtcgatg
gtcagcacagccttatgcacggcctggaggggagagaagcagagacacgttgtaaggctgatcccaggcctcgagcaagg
ctcacgtggacacctcccaggaagcgctcactccccctggacggcctggcctgcacatcctctccctccctgtcacat
aggccttgctcctcctcaaggctttggctgatggggctggctccccctgtgccatcttcttgacaagcgctctccccct
gctcaggtgcaccacaactcagaacagggaagagcatcgctcactccactagtctgcctccagggtctctcctttctag
tacacggcttgaagctccttgaggacacggacctggcagtgaccttcacagtgccagaccccaagataatgcagccat
tcatggaactgcaggttggtcattggctgccttttagttttccaaaataagtgtcacttttagctgaaatcattcattaatt
cagacaccaaattctcacagatcgaaggagtgcgaattcctttgaaacaacttagcccaaacctttctgtgtcagtatgg
ataaatcaaggcccaatgtctagaaggctttgggcaaagttgaaattcagggtcagtgacacaacctcaaggaggcccc
gaaagtgccagctgcacagcagccccctgcctggctttgctgtttgccaccgtcccgtgtcagtgaaatcacgggcattctt
caggagctcagcctgggtcttcatTTTgtttccctcgcccccttctcagcctcaggacagtgctagcagccccacacat
tcttccctacagataccatggcacccatgcctcctcaggtacccccctgccccccacagctcctctcctgtgccttgttt
ccagccatgcgttctcctctataaatacccgccttggtatTTTggggttggcagctgttgctgccaggggagatggttgggt
tgacatgcggctcctgacaaaacacaaaccctgggtgtgtgtgggcgtgggtggtgtgagtagggggatgaatcaggggag

ggggcgggggacccagggggcaggagccacacaaagtctgtgcgggggtgggagcgcacatagcaattggaaactgaaag
cttatcagaccctttctggaaatcagcccactgtttataaacttgaggccccaccctcgaggtacccccctgccccccaca
gctcctctcctgtgccttgtttccagccatgcgttctcctctataaatacccgcctctgggtatttgggggtggcagctgt
tgctgccaggagatgggttgggttgacatgcggctcctgacaaaacacaaacccctgggtgtgtgtgggcgtgggtgggtgt
gagtaggggatgaatcaggagggggcgggggacccagggggcaggagccacacaaagtctgtgcgggggtgggagcgc
acatagcaattggaaactgaaagcttctgcagacctgttgcctgccttggcgaaggattggcaggcttggccgtca
caggacccccgctggctgactcaggggcgcaggcctcttgcgggggagctggcctccccgccccacggccacgggcccgc
cctttcctggcaggacagcgggatcttgcagctgtcaggggaggggagggcgggggctgatgtcaggagggatacaaatag
tgccgacggctgggggccctgtctccccctgcgcgcattccactctccggccggccgcttggccgcgctcctccgtgcgc
ccgccagcctcgcccgagctctgagtagacgaagctaaggcgcgccctgagaacttcagggtgagtttggggacccttga
ttgttctttctttttcgtattgtaaaattcatgttatatggagggggcaaagtttccagggtgttgtttagaatgggaa
gatgtcccttgtatcccatgcatggacctcatgataattttgtttctttcactttctactctgttgacaaccattgtc
tcctcttattttcttttcattttctgtaactttttcgttaaacttttagcttgcatttgaacgaatttttaaattcactt
ttgtttatttgtcagattgtaagatcccatcgattcggatccctggaggcttgcctgaaggctgtatgctgagtcgaagac
agttctagggtgttttggccactgactgacaccctagatgtcttcgattcaggacacaaggcctgttactagcactcaca
tggaacaaatggccctcgagcaatcagggtatattatattgtacttcagcacagttttagagaacaattgtttataattaa
atgataaggtagaatatttctgcatataaattctggctggcgtggaaatattcttattggtagaaacaactacatcctgg
tcatcatcctgcctttctctttatggttacaatgatatacactgtttgagatgaggataaaatactctgagtccaaaccg
ggccctctgctaaccatgttcatgccttcttctttttctacagctcctgggcaacgtgctgaccggtctagttgccag
ccatctgtttgtttgccccctccccctgccttcccttgaccttggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatga
ggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggatt
gggaagacaatagcgcattgcagagtggacaggggctcagggacccctgatcccagctttctcattggacagaaggagga
gactggggctggagagggacctgggccccccactaaggccacagcagagccaggacttttagctgtgtgctgactgcagcctgg
cttgccctccactgccttctttgcctcaagagcaaggagacctcagagtggaggaagcagccccctggccttgcctcccac
ctccccctcccctatgctgttttctgggacagtgggagctggcttagaatgccctggggccccccaggaccctggcatttt
aaccctcaggggcaggaaggcagcctgagatacagaagagtccatccctgtgtatgccacacaccatccccacagtc
gacatttaaattaggaacccttagtgatggagtggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgg
gcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggctgccccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgggccaa</I

```
NSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>359</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..359</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q40">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..359</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q41">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cacccatgcctcctcaggtacccccctgccccccacagctcctctcctgtgccttggtttccca
gcatgcgttctcctctataaataccgcctctggtatttgggggtggcagctgttgctgccaggagatggttgggttga
catgcggctcctgacaaaacacaaacccctggtgtgtgtgggcgtgggtggtgtgagtagggggatgaatcaggaggagg
gcgggggacccagggggcaggagccacacaaagtcgtgcgggggtgggagcgcacatagcaattggaaactgaaagctt
atcagaccctttctggaaatcagcccactgtttataaacctgaggccccaccctcga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>277</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
```

```

<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..277</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q42">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..277</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q43">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ccccctgccccccacagctcctctcctgtgccttggtttcccagccatgcgttctcctctata
aatacccgctctggtatttgggggtggcagctgttgctgccaggagatgggtgggttgacatgcggctcctgacaaaac
acaaaccctggtgtgtgtgggcgtgggtggtgtgagtaggggatgaatcaggaggggggcggggggacccagggggcag
gagccacacaaagtctgtgcgggggtgggagcgcacatagcaattggaaactgaa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="23">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>310</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```

```
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..310</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q44">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..310</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q45">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ctgcagacctgcttgctgcctgccctggcgaaggattggcaggcttgcctgcacaggaccc
ccgctggctgactcaggggcgcaggcctcttgcgggggagctggcctccccgccccacggccacgggccccttctct
ggcaggacagcgggatcttgcagctgtcaggggaggggagggcgggggctgatgtcaggagggtatacaaatagtgccgacg
gctggggggccctgtctcccctcgccgcattccactctccggccggccgcctgcccgcgcctcctccgtgcgcccgcgcagc
ctcgcccg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>132</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..132</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q46">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..132</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q47">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ctggaggcttgctgaaggctgtatgctgagtcgaagacagttctagggtgttttggccactg
actgacaccctagatgtcttcgattcaggacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggcc</INSDSeq_
sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>132</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..132</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q48">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..132</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q49">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ctggaggcttgctgaaggctgtatgctgagtcgaagacagttctagggtgttttggccactg
actgacaccctagatgtcttcgattcaggacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggcc</INSDSeq_
sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1938</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..1938</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q50">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..1938</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q51">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agatctccatggcaccatgcctcctcaggtacccccctgccccccacagctcctctcctgtg
ccttgtttccagccatgcgttctcctctataaataccgcctctggtatttgggggttggcagctgttgctgccagggaga
tggttgggttgacatgcggctcctgacaaaacacaaacccctggtgtgtgtgggcgtgggtggtgtgagtagggggatga
atcaggaggggggcgggggaccagggggcaggagccacacaaagctctgtgcgggggtgggagcgcacatagcaattgga
aactgaaagcttatcagacccttctggaatcagcccactgtttataaacttgaggccccaccctcgaggtacccccctg
ccccccacagctcctctcctgtgccttggttccagccatgcgttctcctctataaataccgcctctggtatttgggggtt
ggcagctgttgctgccagggagatggttgggttgacatgcggctcctgacaaaacacaaacccctggtgtgtgtgggcgt
gggtggtgtgagtagggggatgaatcaggaggggggcgggggaccagggggcaggagccacacaaagctctgtgcggggg
tgggagcgcacatagcaattggaactgaaagcttctgcagacctgcttgctgcctgccctggcgaaggattggcaggct
tgcccgtcacaggacccccgctggctgactcaggggcgcaggcctcttgcgggggagctggcctccccgccccccacggcc
acggggccgccccttcttggcaggacagcgggatcttgacagctgtcaggggaggggaggcgggggctgatgtcaggaggga
tacaaatagtgcgacggctgggggcccctgtctccccctgcgcgcatccactctccggccggccgctgcccgcgcctcc
tccgtgcgcccgcagcctcgccccggagctctgagtagacgaagctaaggcgcgccctgagaacttcagggtgagtttggg
gaccttgattgttctttcttttctgctattgtaaaattcatgttatatggagggggcaaagttttcagggtgtgttta
gaatgggaagatgtccctgtatcaccatgcatggaccctcatgataattttgtttctttcactttctactctgttgaca
```

```
accattgtctcctcttattttcttttcattttctgtaactttttcgttaaacttttagcttgcatttgtaacgaattttta
aattcactttttgtttattttgtcagattgtaagatcccatcgattcggaatccctggaggcttgctgaaggctgtatgctga
gtcgaagacagttctagggtgttttggccactgactgacaccctagatgtcttcgattcaggacacaaggcctgttacta
gcactcacatggaacaaatggccctcgagcaatcagggtatattatattgtacttcagcacagttttagagaacaattgt
tataattaaatgataaggtagaatattttctgcatataaattctggctggcgtggaaatattcttatttggtagaacaact
acatcctgggtcatcatcctgcctttctctttatggttacaatgatatacactgtttgagatgaggataaaaatactctgag
tccaaaccggggccctctgctaaccatgttcatgccttcttcttttttctacagctcctgggcaacgtgctgaccggctct
agttgccagccatctgttgtttgccccctccccgtgccttcttggacctggaaggtgccactcccactgtcctttccta
ataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagg
gggaggattgggaagacaatagcgcgcgtcgact</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier id="q52">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q53">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgcgc
ccgggctttgccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 28" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q54">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>accctagaactgtcttcgact</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 29" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q99">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Macaca mulatta</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>獼猴</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>accctagaactgtcttcgact</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q100">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>小家鼠</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>accctaagactccaagccatc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 31" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q101">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Rattus rattus</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>黑家鼠</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>accctaagactccaagccatt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 32" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q102">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Canis lupus</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>狼</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>accctagagccccaagccgga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q103">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q104">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agtcgaagacagttctagggtgt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q105">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q106">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agtcgaagacagttctagggtgtt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>25</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q107">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q108">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agtcgaagacagttctagggtgttt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 36" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q109">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q110">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agtcgaagacagttctagggt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 37" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>26</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="ql11">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql12">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

```

    <INSDSeq_sequence>agtcgaagacagttctagggtgtttt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 38" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="ql13">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql14">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>agtcgaagacagttctagggtg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

<SequenceData sequenceIDNumber=" 39" >
 <INSDSeq>
 <INSDSeq_length>738</INSDSeq_length>
 <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
 <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
 <INSDSeq_feature-table>
 <INSDFeature>
 <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>1..738</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_qual>
 <INSDQualifier id="ql15">
 <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
 <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
 <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
 </INSDQualifier>
 </INSDFeature_qual>
 </INSDFeature>
 <INSDFeature>
 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>1..738</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_qual>
 <INSDQualifier>
 <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
 <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
 </INSDQualifier>
 <INSDQualifier id="ql16">
 <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
 <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
 <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
 </INSDQualifier>
 </INSDFeature_qual>
 </INSDFeature>
 </INSDSeq_feature-table>
 <INSDSeq_sequence>MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKG
EPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGK
KRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGV
GSSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRL
INNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLSTSIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLT
LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQ
LLFSQAGPNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTSLQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDERFFPSSGV

```
LMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNYIGSRGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWA
KIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQ
YTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 40" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="ql17">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql18">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ctggaggcttgctgaaggctgtatgct</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 41">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>42</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q119">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q120">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 42">
```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>69</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..69</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier id="ql21">
          <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..69</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="ql22">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ctggaggcttgctgaaggctgtatgctgacacaaggcctgttactagcactcacatggaaca
aatggcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="43">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>145</INSDSeq_length>

```

```
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..145</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q123">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..145</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q124">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcg
tcgggcgaccttttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtggtccaactccatcactaggggtt
cct</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="44">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1138</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1138</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="ql25">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1138</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql26">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>tacgtacaattgggatccttcgaacttgagagaaaacatcccagggatttacagatcacatg
caggcagggaccagctcaacccttctttaatgtcatccaggaggaggggccagggatggaggggaggggttgaggagcgag
aggcagttatTTTTGGGTGGGATTcaccacttttcccatgaagaggggagacttggtatTTTgttcaatcattaagaaga
caaagggtttgttgaaacttgacctcggggggatagacatgggtatggcctctaaaaacatggccccagcagcttcagtc
cctttctcgtcgatggtcagcacagccttatgcacggcctggaggggagagaagcagagacacgttgtaaggctgatccc
aggcctcgagcaaggctcacgtggacacctcccaggaagcgctcactccccctggacggccctggccctgcacatcctct
ccctccctgtcatataggccttgctcctcctcaaggctttggctgatggggctggctccccctctgtccatcttcttgaca
agcgctctccccctgctcaggtgcaccacaactcagaacagggaagagcatcgctcactccactagtctgcctccaggg
ctctctcctttctagtacaggcttgaagctccttgaggacacggaccctggcagtgaccttcacagtgcccagaccca
agataatgcagccattcatggaactgcaggttggtcattggctgccttttagttttccaaaataagtgtcacttttagctga
aatcattcattaattcagacaccaaattcacagatcgaaggagtcagaaattcctttgaaacaacttagcccaaacctt
```

```
tctgtgtcagttatggataaatcaaggcccaatgtctagaaggtcttgggcaaagttgaaattcagggtcagtgacacaac
ctcaagggaggccccgaaagtgccagctgcacagcagccccctgcctggctttgctgtttgccaccgtcccgtgtcagtg
aatcacgggcatcttcaggagctcagcctgggtcttcatttgtttccctcggcccccttctcagcctcaggacagtgcta
gcagccccacacattcttcctacagataccatgg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="45">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>311</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..311</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql27">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Oryctolagus cuniculus</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>穴兔</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cctgagaacttcagggtgagtttggggacccttgattgttctttcttttcgctattgtaaa
attcatgttatatggagggggcaaagtttcagggtgttgtttagaatgggaagatgtcccttgatcaccatgcatgga
ccctcatgataattttgtttctttcactttctactctgttgacaaccattgtctcctcttattttcttttcattttctgt
aacttttcgttaaacttttagcttgcatttgaacgaatttttaaattcacttttgtttatttgtcagattgtaagatcc
catcgattc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="46">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>34</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..34</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="ql28">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..34</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql29">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cggatcccctggaggcttgctgaaggctgtatgct</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="47">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>283</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..283</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql30">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Oryctolagus cuniculus</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>穴兔</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caatcagggtatattatattgtacttcagcacagttttagagaacaattgtttataattaaat
gataaggtagaatatttctgcatataaattctggctggcgtggaaatattctttattggtagaaacaactacatcctggtc
atcatcctgcctttctctttatggttacaatgatatacactgtttgagatgaggataaaatactctgagtccaaaccggg
cccctctgctaaccatgttcatgccttcttcttttctacagctcctgggcaacgtgctg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="48">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>398</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..398</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="ql31">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..398</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql32">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gcatgcagagtggacaggggcctcagggacccctgatcccagctttctcattggacagaagg
aggagactggggctggagaggacctgggccccactaaggccacagcagagccaggacttttagctgtgctgactgcagc
ctggcttgccctccactgccctcctttgcctcaagagcaagggagcctcagagtggaggaagcagcccctggccttgccctc
ccacctcccctcccctatgctgttttctgggacagtgggagctggcttagaatgccctggggccccccaggaccctggca
ttttaaccctcaggggcaggaaggcagcctgagatacagaagagtccatcacctgctgtatgccacacaccatccccac
agtcgacatttaaatt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="49">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>145</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..145</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="ql33">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic Construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
```

```
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..145</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="ql34">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aggaacccttagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggcc
gcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcgagagaggaggagtggc
caa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="50">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>738</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..738</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql35">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```

    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNNGRLVLPGYKYLGPFNGLDKG
EPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGK
KRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGV
GSSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRL
INNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLT
LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQ
LLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSIFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGV
LMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGP IWA
KIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
YTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="51">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>2217</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..2217</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql36">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

<INSDSeq_sequence>atggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcatttcgca
gtggtgggacctgaaacctggagccccgaaacccaaagccaaccagcaaaagcaggacaacggccgggtctggtgcttc
ctggctacaagtacctcggaaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcgagcgcagcgccctcgag
cacgacaaggcctacgaccagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataatcacgccgacgccgagtttca
ggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgcgcagctcttccaggccaaaaagcgggttctcgaa
ctctgggcctggttgaatcgccggttaagacggctcctggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcgctctcca
gactcctctacgggcatcggcaagaaaggccagcagcccgcaaaaaagagactcaattttgggcagactggcgactcaga
gtcagtccccgacctcaaccaatcggaaccaccagcaggccccctctggtctgggatctggtacaatggctgcaggcg
gtggcgctccaatggcagacaataacgaaggcgcgcagcaggtgggtagtctcctcaggaaattggcattgcgattccaca
tggctgggcgacagagtcatcaccaccagcaccgcacctgggccccctgccacctacaacaaccacctctacaagcaaat
ctccaacgggacctcgggaggaagcaccaacgacaacacctacttcggctacagcaccacctgggggtattttgacttca
acagattccactgccacttttaccacgtgactggcagcgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagaggctc
aacttcaagctcttcaacatccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccaagaccatcgccaataaccttaccag
cacgattcaggtctttacggactcggaataccagctcccgctacgtgctcggtcggcgccaccagggtgcctgcctccgt
tcccggcggacgtcttcatgattcctcagtcacgggtacctgactctgaacaatggcagtcaggctgtgggcgggtcgctcc
ttctactgcctggagtactttctcttcaaatgctgagaacgggcaacaactttgaattcagctacaacttcaggagcgt
gcccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaacctctctatcgaccagtacttgtactacc
tgtcccgactcaaagcacgggcgggtactgcaggaactcagcagttgctattttctcaggccgggcctaacaacatgtcg
gctcaggccaagaactggctacccggtccctgctaccggcagcaacgcgtctccacgacactgtcgcagaacaacaacag
catctttgcctggacgggtgccaccaagtatcatctgaatggcagagactctctggtgaatcctggcggttgccatggcta
cccacaaggacgacgaagagcgattttttccatccagcggagtcttaatgtttgggaaacaggagctggaaaagacaac
gtggactatagcagcgtgatgctaaccagcaggaagaaataaagaccaccaaccagtgggccacagaacagtacggcgt
ggtggccgataacctgcaacagcaaaacgccgtcctattgttaggggccgtcaatagtcaggagccttacctggcatgg
tgtggcagaaccgggacgtgtacctgcagggtcccatctgggccaagattcctcatacggacggcaactttcatccctcg
ccgctgatgggaggctttggactgaagcatccgcctcctcagatcctgattaaaaacacacctgttcccgcggatcctcc
gaccaccttcaatcaggccaagctggcttctttcatcacgcagtcagtcaccggccagggtcagcgtggagatcgagtggg
agctgcagaaggagaacagcaaacgctggaaccagagattcagtcacctccaactactacaaatctacaaatgtggac
tttgctgtcaatactgagggtacttattccgagcctcgccccattggcacccggttacctcacccgtaatctgttaa</INS
DSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="52">
 <INSDSeq>
 <INSDSeq_length>738</INSDSeq_length>
 <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
 <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
 <INSDSeq_feature-table>
 <INSDFeature>
 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```
<INSDFeature_location>1..738</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql37">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKG
EPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGK
KRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGV
GSSSGNWHCDSTWLGDRIITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRL
INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLT
LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFSYNFEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQ
LLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFARTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDDEERFFPSSGV
LMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGP IWA
KIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
YTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="53">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>2217</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..2217</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="ql38">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcatttcgca
gtggtgggacctgaaacctggagccccgaaacccaaagccaaccagcaaaagcaggacaacggccgggggtctggtgcttc
ctggctacaagtacctcggaaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcgagcgcagcgccctcgag
cacgacaaggcctacgaccagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataatcacgccgacgccgagtttca
ggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgcgagctcttccaggccaaaaagcgggttctcgaa
ctctgggcctggttgaatcgccggttaagacggctcctggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcgtctcca
gactcctctacgggcatcggaagaaaggccagcagcccgcaaaaaagagactcaattttgggcagactggcgactcaga
gtcagtccccgacctcaaccaatcggaagaaccaccagcaggccccctctggtctgggatctggtacaatggctgcaggcg
gtggcgctccaatggcagacaataacgaaggcgccgacggagtgggtagttcctcaggaaattggcattgcgattccaca
tggctgggcgacagagtcataccaccagcacccgcacctgggccccctgccacctacaacaaccacctctacaagcaaat
ctccaacgggacctcgggaggaagcaccaacgacaacacctacttcggctacagcacccccctgggggtattttgacttca
acagattccactgccacttttaccacgtgactggcagcgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagaggctc
aacttcaagctcttcaacatccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccaagaccatcgccaataaccttaccag
cacgattcaggtctttacggactcggaataccagctccccgtacgtgctcggtcggcgcaccagggtgcctgcctccgt
tccccggcgagcttctcatgattcctcagtaggggtacctgactctgaacaatggcagtcaggctgtgggcccgtcgctc
ttctactgcctggagtactttccttctcaaatgctgagaacgggcaacaactttgaattcagctacaacttcaggacgt
gcccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaacctctcatcgaccagtacttgtactacc
tgtcccgactcaaagcacgggcgggtactgcaggaactcagcagttgctattttctcaggccgggcctaacaacatgtcg
gctcaggccaagaactggctacccgggtccctgctaccggcagcaacgcgtctccacgacactgtcgagaacaacaacag
caactttgccaggacgggtgccaccaagtatcatctgaatggcagagactctctggtgaatcctggcggttgccatggcta
cccacaaggacgacgaagagcgatttttccatccagcggagtcttaatgtttgggaaacaggagctggaaaagacaac
gtggactatagcagcgtgatgctaaccagcgaggaagaaataaagaccaccaaccagtgggccacagaacagtacggcgt
ggtggccgataacctgcaacagcaaaacgccgctcctattgtagggggccgtcaatagtcgaaggagccttacctggcatgg
tgtggcagaaccgggacgtgtacctgcagggtcccatctgggccaagattcctcatagcgacggcaactttcatccctcg
ccgctgatgggaggctttggactgaagcatccgcctcctcagatcctgattaaaaacacacctgttcccgcggatcctcc
gaccaccttcaatcaggccaagctggcttctttcatcacgcagtagcagtagccggccagggtcagcgtggagatcgagtggg
agctgcagaaggagaacagcaaacgctggaaccagagattcagtagacttccaactactacaaatctacaaatgtggac
tttgctgtcaatactgagggtacttattccgagcctcgccccattggcacccgttacctcacccgtaatctgttaa</INS
DSeq_sequence>
</INSDSeq>
```

</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種RNAi，所述RNAi包含第一股和第二股，其中

- a) 所述第一股和所述第二股形成雙股體；
- b) 所述第一股包含指導區，其中所述指導區包含具有序列

5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO: 1)或具有與SEQ ID NO: 1的序列具有約90%同一性的序列的核酸；並且

- c) 所述第二股包含非指導區。

【請求項2】 如請求項1所述的RNAi，其中所述非指導區包含具有序列

5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO: 2)或具有與SEQ ID NO: 2的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【請求項3】 如請求項1或2所述的RNAi，其中所述第一股包含具有SEQ ID NO: 1的序列的核酸，並且所述非指導區包含具有SEQ ID NO: 2的序列的核酸。

【請求項4】 如請求項1-3中任一項所述的RNAi，其中所述第一股和所述第二股借助能夠形成環結構的RNA連接子連接。

【請求項5】 如請求項4所述的RNAi，其中所述RNA連接子包含約4至約50個核苷酸。

【請求項6】 如請求項4或5所述的RNAi，其中所述環結構包含約4至約20個核苷酸。

【請求項7】 如請求項4-6中任一項所述的RNAi，其中所述環結構包含具有SEQ ID NO: 3的序列或具有與SEQ ID NO: 3的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【請求項8】 如請求項4-7中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi從5'到3'包含所述第二股、所述RNA連接子和所述第一股。

【請求項9】 如請求項4-7中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi從5'到3'包含所述第一股、所述RNA連接子和所述第二股。

【請求項10】 如請求項1-8中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi包含具有SEQ ID NO: 7的序列或具有與SEQ ID NO: 7的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【請求項11】 如請求項1-10中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)或小髮夾RNA(shRNA)。

【請求項12】 如請求項1-11中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi進一步包含支架。

【請求項13】 如請求項12所述的RNAi，其中所述支架包含SEQ ID NO: 11的核酸的全部或部分。

【請求項14】 如請求項13所述的RNAi，其中所述miRNA嵌在所述支架內。

【請求項15】 如請求項14所述的RNAi，其中所述支架具有5'臂，其中所述5'臂位於編碼所述RNAi的核酸的5'處；和3'臂，其中所述3'臂位於編碼所述RNAi的核酸的3'處。

【請求項16】 如請求項12-15中任一項所述的RNAi，其中所述支架是miR-155支架。

【請求項17】 如請求項12-16中任一項所述的RNAi，其中所述miR-155支架包含位於所述RNAi的5'處的SEQ ID NO: 9或與SEQ ID NO: 9的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【請求項18】 如請求項12-17中任一項所述的RNAi，其中所述miR-155支架包含位於所述RNAi的3'處的SEQ ID NO: 10或與SEQ ID NO: 10的序列具有約90%同一性的序列的核酸。

【請求項19】 如請求項1-18中任一項所述的RNAi，其中所述RNAi靶向編碼與肌強直性營養不良1(DM1)相關的多肽的RNA。

【請求項20】 如請求項19所述的RNAi，其中所述多肽是肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)。

【請求項21】 如請求項20所述的RNAi，其中所述DMPK包含與DM-1相關的突變。

【請求項22】 如請求項20或21所述的RNAi，其中編碼DMPK的基因包含五或更多個CTG三核苷酸重複。

【請求項23】 一種表現匣，所述表現匣包含編碼如請求項1-22中任一項所述的RNAi的核酸。

【請求項24】 如請求項23所述的表現匣，其中編碼所述RNAi的核酸可操作地連接至啟動子。

【請求項25】 如請求項24所述的表現匣，其中所述啟動子是肌肉特異性啟動子。

【請求項26】 如請求項24或25所述的表現匣，其中所述啟動子是結蛋白啟動子或其變體。

【請求項27】 如請求項26所述的表現匣，其中所述結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【請求項28】 如請求項26或27所述的表現匣，其中所述結蛋白啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【請求項29】 如請求項26-28中任一項所述的表現匣，其中所述結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。

【請求項30】 如請求項26-29中任一項所述的表現匣，其中所述結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 21的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件和/或一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 22的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件。

【請求項31】 如請求項26-30中任一項所述的表現匣，其中所述結蛋白啟動子包含SEQ ID NO: 12的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 12的核苷酸序列具有約90%同一性的序列。

【請求項32】 如請求項23-31中任一項所述的表現匣，其中所述表現匣進一步包含內含子。

【請求項33】 如請求項32所述的表現匣，其中所述內含子是兔 β -珠蛋白內含子。

【請求項34】 如請求項32或33所述的表現匣，其中所述內含子包含SEQ ID NO: 13的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 13的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項35】 如請求項32-34中任一項所述的表現匣，其中編碼所述RNAi的核酸嵌在所述內含子中。

【請求項36】 如請求項35所述的表現匣，其中所述內含子包含5'臂和3'臂，其中所述5'臂位於編碼所述RNAi的核酸的5'處，並且所述3'臂位於編碼所述RNAi的核酸的3'處。

【請求項37】 如請求項36所述的表現匣，其中所述內含子的5'臂包含SEQ ID NO: 14的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 14的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項38】 如請求項36或37所述的表現匣，其中所述內含子的3'臂包含SEQ ID NO: 15的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 15的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項39】 如請求項23-38中任一項所述的表現匣，其中所述表現匣進一步包含多腺苷酸化訊號。

【請求項40】 如請求項39所述的表現匣，其中所述多腺苷酸化訊號是牛生長激素多腺苷酸化訊號、SV40多腺苷酸化訊號、或HSV TK pA。

【請求項41】 如請求項40所述的表現匣，其中所述多腺苷酸化訊號是最小牛生長激素多腺苷酸化訊號。

【請求項42】 如請求項39-41中任一項所述的表現匣，其中所述牛生長激素多腺苷酸化訊號包含SEQ ID NO: 16的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 16的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項43】 如請求項23-42中任一項所述的表現匣，其中所述表現匣包含SEQ ID NO: 17的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 17的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項44】 一種表現匣，其中所述表現匣包含經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【請求項45】 如請求項44所述的表現匣，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【請求項46】 如請求項44或45所述的表現匣，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。

【請求項47】 如請求項44-46中任一項所述的表現匣，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 21的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件和/或一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 22的序列具有約90%同一性的核苷酸序列的增強子元件。

【請求項48】 如請求項44-47中任一項所述的表現匣，其中所述結蛋白啟動子包含SEQ ID NO: 12的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 12的核苷酸序列具有約90%同一性的序列。

【請求項49】 如請求項44-48中任一項所述的表現匣，其中所述表現匣進一步包含內含子。

【請求項50】 如請求項49所述的表現匣，其中所述內含子是兔 β -珠蛋白內含子。

【請求項51】 如請求項49或50所述的表現匣，其中所述內含子包含SEQ ID NO: 13的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 13的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項52】 如請求項44-51中任一項所述的表現匣，其中編碼轉基因的核酸嵌在所述內含子中。

【請求項53】 如請求項52所述的表現匣，其中所述內含子包含5'臂和3'臂，其中所述5'臂位於編碼所述轉基因的核酸的5'處，並且所述3'臂位於編碼所述轉基因的核酸的3'處。

【請求項54】 如請求項53所述的表現匣，其中所述內含子的5'臂包含SEQ ID NO: 14的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 14的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項55】 如請求項53或54所述的表現匣，其中所述內含子的3'臂包含SEQ ID NO: 15的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 15的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項56】 如請求項44-55中任一項所述的表現匣，其中所述表現匣進一步包含多腺苷酸化訊號。

【請求項57】 如請求項56所述的表現匣，其中所述多腺苷酸化訊號是牛生長激素多腺苷酸化訊號、SV40多腺苷酸化訊號、或HSV TK pA。

【請求項58】 如請求項57所述的表現匣，其中所述多腺苷酸化訊號是最小牛生長激素多腺苷酸化訊號。

【請求項59】 如請求項56-58中任一項所述的表現匣，其中所述牛生長激素多腺苷酸化訊號包含SEQ ID NO: 16的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 16的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項60】 如請求項44-59中任一項所述的表現匣，其中所述轉基因編碼多肽或核酸。

【請求項61】 如請求項44-60中任一項所述的表現匣，其中所述轉基因編碼RNAi。

【請求項62】 一種載體，所述載體包含如請求項23-61中任一項所述的表現匣。

【請求項63】 如請求項62所述的載體，其中所述表現匣的側接是一個或多個填充核酸序列。

【請求項64】 如請求項63所述的載體，其中所述一個或多個填充核酸序列源自人類Serpina1基因。

【請求項65】 如請求項63或64所述的載體，其中位於所述表現匣的5'處的填充核酸序列源自人類Serpina1基因。

【請求項66】 如請求項63-65中任一項所述的載體，其中位於所述表現匣的5'處的填充序列包含SEQ ID NO: 18的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 18的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項67】 如請求項63-66中任一項所述的載體，其中位於所述表現匣的3'處的填充核酸序列源自人類Serpina1基因。

【請求項68】 如請求項63-67中任一項所述的載體，其中位於所述表現匣的3'處的填充序列包含SEQ ID NO: 19的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 19的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項69】 如請求項62-68中任一項所述的載體，其中所述載體是重組腺相關病毒(rAAV)載體。

【請求項70】 如請求項69所述的rAAV載體，其中所述表現匣的側接是一個或多個AAV反向末端重複(ITR)序列。

【請求項71】 如請求項70所述的rAAV載體，其中所述表現匣的側接是兩個 AAV ITR。

【請求項72】 如請求項70或71所述的rAAV載體，其中所述AAV ITR是 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV、或小鼠AAV血清型ITR。

【請求項73】 如請求項70-72中任一項所述的rAAV載體，其中所述AAV ITR 是AAV2 ITR。

【請求項74】 如請求項69-73中任一項所述的rAAV載體，其中所述rAAV載體包含SEQ ID NO: 20的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 20的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項75】 如請求項69-74中任一項所述的rAAV載體，其中所述載體是自身互補的rAAV載體。

【請求項76】 一種細胞，所述細胞包含如請求項23-61中任一項所述的表現匣、如請求項62-68中任一項所述的載體、或如請求項69-75中任一項所述的rAAV載體。

【請求項77】 一種病毒顆粒，所述病毒顆粒包含如請求項62-68中任一項所述的載體。

【請求項78】 一種重組AAV顆粒，所述重組AAV顆粒包含如請求項69-75中任一項所述的rAAV載體。

【請求項79】 如請求項78所述的rAAV顆粒，其中所述AAV病毒顆粒包含 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、

AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74 N502I、AAVrh74 W505R、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、AAV2-HBKO、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣殼rAAV2/HBoV1血清型衣殼。

【請求項80】 如請求項78或79所述的rAAV顆粒，其中所述rAAV病毒顆粒的ITR和衣殼源自相同的AAV血清型。

【請求項81】 如請求項78或79所述的rAAV顆粒，其中所述rAAV病毒顆粒的ITR和衣殼源自不同的AAV血清型。

【請求項82】 如請求項78、79或81所述的rAAV顆粒，其中所述AAV病毒顆粒包含AAVrh74 N502I血清型衣殼。

【請求項83】 如請求項82所述的rAAV顆粒，其中所述ITR是AAV2 ITR，並且所述rAAV顆粒的衣殼是AAVrh74 N502I血清型衣殼。

【請求項84】 如請求項78、79或81所述的rAAV顆粒，其中所述AAV病毒顆粒包含AAVrh74 W505R血清型衣殼。

【請求項85】 如請求項83a所述的rAAV顆粒，其中所述ITR是AAV2 ITR，並且所述rAAV顆粒的衣殼是AAVrh74 W505R血清型衣殼。

【請求項86】 一種rAAV顆粒，其包含rAAV載體和衣殼，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：

AAV2 ITR，

編碼來自人類serpinA1基因的填充核酸序列的核酸，

Byrne結蛋白增強子元件，

Paulin結蛋白增強子元件，

結蛋白啟動子，

兔 β -珠蛋白內含子的5'臂，

5' miR155支架序列，

DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列，

miR155末端環序列，

DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列，

3' miR155支架序列，

兔 β -珠蛋白內含子的3'臂，

最小牛生長激素多腺苷酸化序列，

編碼來自人類serpinA1基因的填充核酸序列的核酸，以及

AAV2 ITR；

並且其中所述衣殼是AAVrh74 N502I衣殼。

【請求項87】 一種rAAV顆粒，其包含rAAV載體，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：

含有SEQ ID NO: 43的多核苷酸序列的AAV2 ITR，

編碼含有SEQ ID NO: 18的多核苷酸序列的來自人類serpinA1基因的填充核酸序列的核酸，

含有SEQ ID NO: 21的多核苷酸序列的Byrne結蛋白增強子元件，

含有SEQ ID NO: 22的多核苷酸序列的Paulin結蛋白增強子元件，

含有SEQ ID NO: 23的多核苷酸序列的結蛋白啟動子，

含有SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白內含子的5'臂，

含有SEQ ID NO: 40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列，
 含有SEQ ID NO: 4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列，
 含有SEQ ID NO: 6的多核苷酸序列的miR155末端環序列，
 含有SEQ ID NO: 5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列，
 含有SEQ ID NO: 41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列，
 含有SEQ ID NO: 15的多核苷酸序列的兔β-珠蛋白內含子的3'臂，
 含有SEQ ID NO: 16的多核苷酸序列的最小牛生長激素多腺苷酸化序列，
 編碼含有SEQ ID NO: 19的多核苷酸序列的來自人類serpinA1基因的填充核
 酸序列的核酸，以及
 含有SEQ ID NO: 49的多核苷酸序列的AAV2 ITR；
 並且其中所述衣殼是AAVrh74 N502I衣殼。

【請求項88】 如請求項86或87所述的rAAV顆粒，其中所述AAVrh74 N502I衣殼包含含有SEQ ID NO: 50的胺基酸序列的衣殼蛋白。

【請求項89】 一種rAAV顆粒，其包含rAAV載體和衣殼，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：AAV2 ITR、編碼來自人類serpinA1基因的填充核酸序列的核酸、Byrne結蛋白增強子元件、Paulin結蛋白增強子元件、結蛋白啟動子、兔β-珠蛋白內含子的5'臂、5' miR155支架序列、DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列、miR155末端環序列、DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列、3' miR155支架序列、兔β-珠蛋白內含子的3'臂、最小牛生長激素多腺苷酸化序列、編碼來自人類serpinA1基因的填充核酸序列的核酸、以及AAV2 ITR；並且其中所述衣殼是AAVrh74 W505R衣殼。

【請求項90】 一種rAAV顆粒，其包含rAAV載體，其中所述rAAV載體從5'到3'包含以下核酸：含有SEQ ID NO: 43的多核苷酸序列的AAV2 ITR、編碼含有SEQ ID NO: 18的多核苷酸序列的來自人類serpinA1基因的填充核酸序列的核酸、含有SEQ ID NO: 21的多核苷酸序列的Byrne結蛋白增強子元件、含有SEQ ID NO: 22的多核苷酸序列的Paulin結蛋白增強子元件、含有SEQ ID NO: 23的多核苷酸序列的結蛋白啟動子、含有SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列的兔β-珠蛋白內含子的5'臂、含有SEQ ID NO: 40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列、含有SEQ ID NO: 4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指導序列、含有SEQ ID NO: 6的多核苷酸序列的miR155末端環序列、含有SEQ ID NO: 5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA過客序列、含有SEQ ID NO: 41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列、含有SEQ ID NO: 15的多核苷酸序列的兔β-珠蛋白內含子的3'臂、含有SEQ ID NO: 16的多核苷酸序列的最小牛生長激素多腺苷酸化序列、編碼含有SEQ ID NO: 19的多核苷酸序列的來自人類serpinA1基因的填充核酸序列的核酸、以及含有SEQ ID NO: 49的多核苷酸序列的AAV2 ITR；並且其中所述衣殼是AAVrh74 W505R衣殼。

【請求項91】 如請求項86a或86b所述的rAAV顆粒，其中所述AAVrh74 W505R衣殼包含含有SEQ ID NO: 52的胺基酸序列的衣殼蛋白。

【請求項92】 一種組合物，所述組合物包含如請求項77所述的病毒顆粒或如請求項78-86中任一項所述的rAAV顆粒。

【請求項93】 一種醫藥組合物，所述醫藥組合物包含如請求項77所述的病毒顆粒或如請求項78-86中任一項所述的rAAV顆粒。

【請求項94】 如請求項87或88所述的組合物，其中所述組合物進一步包含醫藥上可接受的載劑。

【請求項95】 一種經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【請求項96】 如請求項90所述的經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含兩個增強子元件和人類結蛋白基因的啟動子。

【請求項97】 如請求項90或91所述的經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個Byrne增強子元件和/或一個或多個Paulin增強子元件。

【請求項98】 如請求項90-92中任一項所述的經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含一個或多個含有SEQ ID NO: 21的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 21的序列具有約90%同一性的序列的增強子元件和/或一個或多個含有SEQ ID NO: 22的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 22的序列具有約90%同一性的序列的增強子元件。

【請求項99】 如請求項90-93中任一項所述的經修飾的結蛋白啟動子，其中所述經修飾的結蛋白啟動子包含SEQ ID NO: 12的核苷酸序列或與SEQ ID NO: 12的序列具有約90%同一性的序列。

【請求項100】 一種套組，所述套組包含如請求項1-22中任一項所述的RNAi。

【請求項101】 一種套組，所述套組包含如請求項77所述的病毒顆粒或如請求項78-86中任一項所述的AAV顆粒。

【請求項102】 一種套組，所述套組包含如請求項87-89中任一項所述的組合物。

【請求項103】 如請求項95-97中任一項所述的套組，所述套組進一步包含使用說明書。

【請求項104】 一種用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的方法，其包括向所述哺乳動物投予有效量的如請求項1-22中任一項所述的RNAi。

【請求項105】 一種用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的方法，其包括向所述哺乳動物投予有效量的如請求項1-22中任一項所述的RNAi。

【請求項106】 一種用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的方法，其包括向所述哺乳動物投予有效量的如請求項1-22中任一項所述的RNAi。

【請求項107】 一種用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的方法，其包括向所述哺乳動物投予有效量的如請求項77所述的病毒顆粒或如請求項78-86中任一項所述的rAAV顆粒。

【請求項108】 一種用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的方法，其包括向所述哺乳動物投予有效量的如請求項77所述的病毒顆粒或有效量的如請求項78-86中任一項所述的rAAV顆粒。

【請求項109】 一種用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的方法，其包括向所述哺乳動物投予有效量的如請求項77所述的病毒顆粒或有效量的如請求項78-86中任一項所述的rAAV顆粒。

【請求項110】 如請求項102-104中任一項所述的方法，其中所述病毒顆粒或rAAV顆粒的有效量是約 1×10^8 至約 2×10^{13} 個基因體拷貝/mL的劑量。

【請求項111】 如請求項105所述的方法，其中所述劑量是約 5×10^{12} 個基因體拷貝/mL。

【請求項112】 如請求項105所述的方法，其中所述劑量是約 1×10^{13} 個基因體拷貝/mL。

【請求項113】 如請求項105所述的方法，其中所述劑量是約 2×10^{13} 個基因體拷貝/mL。

【請求項114】 如請求項102-104中任一項所述的方法，其中所述病毒顆粒或rAAV顆粒的有效量是約 1×10^8 至約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重的劑量。

【請求項115】 如請求項109所述的方法，其中所述劑量是約 5×10^{13} 個基因體拷貝/kg體重。

【請求項116】 如請求項109所述的方法，其中所述劑量是約 1×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重。

【請求項117】 如請求項109所述的方法，其中所述劑量是約 2×10^{14} 個基因體拷貝/kg體重。

【請求項118】 一種用於治療有需要的哺乳動物的肌強直性營養不良1(DM1)的方法，其包括向所述哺乳動物投予有效量的如請求項87-89中任一項所述的組合物。

【請求項119】 一種用於抑制肌強直性營養不良蛋白激酶(DMPK)在有需要的患有DM-1的哺乳動物中的表現的方法，其包括向所述哺乳動物投予有效量的如請求項87-89中任一項所述的組合物。

【請求項120】 一種用於抑制DMPK RNA在有需要的患有DM-1的哺乳動物的細胞中的積累的方法，其包括向所述哺乳動物投予有效量的如請求項87-89中任一項所述的組合物。

【請求項121】 如請求項99-101中任一項所述的方法，其中將所述RNAi與免疫抑制劑組合投予，其中在投予所述RNAi之前、同時、和/或之後投予所述免疫抑制劑。

【請求項122】 如請求項102-104中任一項所述的方法，其中將所述病毒顆粒或所述rAAV顆粒與免疫抑制劑組合投予，其中在投予所述病毒顆粒或所述rAAV顆粒之前、同時、和/或之後投予所述免疫抑制劑。

【請求項123】 如請求項113-115中任一項所述的方法，其中將所述組合物與免疫抑制劑組合投予，其中在投予所述組合物之前、同時、和/或之後投予所述免疫抑制劑。

