(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119955780 A
(43)申请公布日 2025.05.09

(21)申请号 202411915548.9
(22)申请日 2020.10.30
(30)优先权数据
62/929,428 2019.11.01 US
(62)分案原申请数据
202080090997.8 2020.10.30
(71)申请人 特瓦德生物科学股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 P·M·埃蒙 S·马克法兰 Y-H·陈
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 涂滔
(51)Int.Cl.
C12N 15/11(2006.01)
C12N 15/864(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 25/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书165页
序列表（电子公布） 附图26页

(54)发明名称

用于治疗提前终止密码子介导的病症的方法和组合物

(57)摘要

本发明一般涉及修饰的tRNA和修饰的tRNA在哺乳动物细胞中表达由含有提前终止密码子的基因编码的功能性基因产物和/或治疗由提前终止密码子介导的疾病例如Dravet综合征的用途。

CN 119955780 A

1.tRNA,其包含表2中所列的核苷酸序列。

2.权利要求1所述的tRNA,其中所述tRNA包含选自SEQ ID NO: 19-21、37、39、40、44、179、181、182和186的核苷酸序列。

3.权利要求1或2所述的tRNA,其中所述tRNA包含天然存在的核苷酸修饰。

4.权利要求1-3中任一项所述的tRNA,其中所述tRNA包含选自5-甲基尿苷、5-氨基甲酰基甲基尿苷、5-氨基甲酰基-甲基-2-O-甲基尿苷、5-甲氧基-羰基甲基尿苷、5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷、假尿苷、二氢尿苷、1-甲基腺苷和肌苷的一种或多种核苷酸修饰。

5.表达载体,其包含编码权利要求1-4中任一项所述的tRNA的核苷酸序列。

6.权利要求5所述的表达载体,其中所述表达载体包含1、2、3、4或多于4个拷贝数的编码所述tRNA的所述核苷酸序列。

7.权利要求5或6所述的表达载体,其中所述表达载体进一步包含表4中所列的核苷酸序列。

8.权利要求7所述的表达载体,其中所述表达载体包含选自SEQ ID NO: 869-888的核苷酸序列。

9.表达载体,其包含编码表3中所列tRNA的核苷酸序列,其中所述表达载体包含1、2、3、4或多于4个拷贝数的编码所述tRNA的所述核苷酸序列。

10.表达载体,其包含编码表3中所列的tRNA的核苷酸序列,其中所述表达载体进一步包含表4中所列的核苷酸序列。

用于治疗提前终止密码子介导的病症的方法和组合物

[0001] 本申请是中国发明专利申请(申请日:2020年10月30日;申请号:2020800909978(国际申请号:PCT/US2020/058415);发明名称:用于治疗提前终止密码子介导的病症的方法和组合物)的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2019年11月1日提交的美国临时专利申请号62/929,428的权益和优先权,其通过引用整体并入本文以用于所有目的。

发明领域

[0004] 本发明一般涉及用于表达由含有提前终止密码子的基因编码的基因产物和/或治疗由提前终止密码子介导的病症的方法和组合物。

背景技术

[0005] 蛋白质合成由遗传密码指导,该遗传密码包括61种编码被掺入正在合成的蛋白质中的氨基酸的三碱基对密码子和3种终止蛋白质合成的三碱基对密码子(称为停止或终止密码子)。当编码蛋白质的核酸序列突变为含有提前终止密码子而不是下一个氨基酸的密码子时,所得蛋白质被提前终止,其通常无功能性或功能低于未截短或全长蛋白质。这种突变,称为无义突变,通常与许多不同的遗传疾病有关,或者是许多不同遗传疾病的病原体。

[0006] 许多病症与无义突变相关或由无义突变引起。这些包括癫痫,例如Dravet综合征、遗传性癫痫伴热性惊厥(GEFS)、良性家族性婴儿癫痫(BFIE)、早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)、Lennox-Gastaut综合征、Rett综合征、PPM-X综合征、大田原综合征、发作性共济失调、偏瘫性偏头痛、特发性全身性癫痫、FOXG1综合征、家族性局灶性癫痫伴可变病灶(FFEVF)、儿童期发作癫痫性脑病、SYNGAP1相关智力障碍、吡哆醇依赖性癫痫、家族性婴儿肌阵挛癫痫(FIME)、肌阵挛站立不能性癫痫、X连锁智力障碍、部分性癫痫和发作性共济失调、热性惊厥、伴听觉特征的常染色体显性部分性癫痫(ADPEAF)、PNPO缺乏、进行性肌阵挛癫痫、动作性肌阵挛-肾功能衰竭(AMRF)、CDKL5缺乏症、和良性家族性婴儿惊厥(BFIS)。

[0007] 例如,Dravet综合征是一种罕见且灾难性形式的难治性癫痫,始于婴儿期。最初,患者会经历持续很久的惊厥。在他们的第二年,开始出现其他类型的惊厥,这通常与发育衰退同时发生,可能是由于反复的脑缺氧。这会导致语言和运动技能发育不良。SCN1A (编码电压门控钠通道α亚基Nav1.1)、SCN1B(编码电压门控钠通道β1亚基)、SCN2A (编码Nav1.2)、SCN3A (编码Nav1.3)、SCN9A (编码Nav1.7)、GABRG2(编码γ-氨基丁酸受体γ2亚基)、GABRD(编码γ-氨基丁酸受体Δ亚基)和/或PCDH19(编码原钙粘蛋白-19)基因的突变与Dravet综合征有关。

[0008] Dravet综合征可能由例如SCN1A基因中的无义突变导致,其产生提前终止密码子和未截短或功能性蛋白质的缺乏或量减少所引起。SCN1A基因通常编码神经元电压门控钠通道α亚基Na(V)1.1。在小鼠模型中,已经观察到SCN1A中的功能丧失突变导致钠电流减少和海马体GABA能中间神经元的兴奋性受损。

[0009] 尽管迄今为止做出了努力,但本领域需要改良的组合物和方法来治疗由提前终止密码子介导的疾病,包括Dravet综合征。

发明内容

[0010] 本发明部分基于tRNA (例如,抑制性tRNA)的发现,该tRNA允许在否则将导致由基因中的提前终止密码子(PTC)引起的截短基因产物的位置处将氨基酸掺入由哺乳动物细胞中的基因编码的基因产物中。本发明进一步部分基于tRNA能够用于治疗受试者由基因中的PTC介导的疾病的发现,该tRNA允许在否则将导致由基因中的PTC引起的截短基因产物的位置处将氨基酸掺入由基因编码的基因产物中,例如,本文所述的tRNA。

[0011] 因此,在一个方面,本发明提供了包含表2中所列核苷酸序列的tRNA。在某些实施方案中,tRNA包含tRNA包含选自SEQ ID NO: 19-21、37、39、40、44、179、181、182和186的核苷酸序列。

[0012] 在某些实施方案中,tRNA包含,例如,选自5-甲基尿苷、5-氨基甲酰基甲基尿苷、5-氨基甲酰基-甲基-2-O-甲基尿苷、5-甲氧基-羰基甲基尿苷、5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷、假尿苷、二氢尿苷、1-甲基腺苷和肌苷的一种或多种天然存在的核苷酸修饰。

[0013] 另一方面,本发明提供了包含编码任何前述tRNA的核苷酸序列的表达载体。在某些实施方案中,表达载体包含1、2、3、4或多于4个拷贝数的编码所述tRNA的核苷酸序列。在某些实施方案中,表达载体包含对应于野生型tRNA基因侧翼的基因组DNA序列的核苷酸序列。例如,在某些实施方案中,表达载体包含表4中所列的核苷酸序列。在某些实施方案中,表4中所列的核苷酸序列选自SEQ ID NO: 869-888。在某些实施方案中,表4中所列的核苷酸序列与编码所述tRNA的核苷酸序列可操作地连接。在某些实施方案中,在表达载体中,表4中所列的核苷酸序列位于编码所述tRNA的核苷酸序列的5'。在某些实施方案中,在表达载体中,表4中所列的核苷酸序列紧邻编码所述tRNA的核苷酸序列的5'(即,相邻)。

[0014] 另一方面,本发明提供了包含编码表3中所列tRNA的核苷酸序列的表达载体,其中表达载体包含1、2、3、4或多于4个拷贝数的编码所述tRNA的核苷酸序列。在某些实施方案中,tRNA包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列。

[0015] 在另一方面,本发明提供了包含编码表3中所列tRNA的核苷酸序列的表达载体,其中表达载体进一步包含表4中所列的核苷酸序列。在某些实施方案中,tRNA包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列。在某些实施方案中,表4中所列的核苷酸序列选自SEQ ID NO: 869-888。在某些实施方案中,表4中所列的核苷酸序列与编码所述tRNA的核苷酸序列可操作地连接。在某些实施方案中,在表达载体中,表4中所列的核苷酸序列位于编码tRNA的核苷酸序列的5'。在某些实施方案中,在表达载体中,表4中所列的核苷酸序列紧邻编码tRNA的核苷酸序列的5'(即,相邻)。

[0016] 在任何前述表达载体的某些实施方案中,所述表达载体是病毒载体,例如DNA病毒载体,例如腺相关病毒(AAV)载体。

[0017] 另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含任何前述tRNA或任何前述表达载体,以及药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中,tRNA或表达载体不与另一部分,例如载体颗粒,例如氨基脂质颗粒缀合或缔合。在某些实施方案中,组合物不包含纳米颗粒和/或氨

基脂质递送化合物。

[0018] 另一方面,本发明提供在哺乳动物细胞中表达由含有提前终止密码子的基因编码的功能性基因产物的方法,该方法包括将有效量的任何前述tRNA或表达载体引入细胞中,从而允许在否则将导致由提前终止密码子引起的截短基因产物的位置处将氨基酸掺入基因产物中。在任何前述方法的某些实施方案中,该基因选自表5或表6中所列的基因。在某些实施方案中,该基因是SCN1A基因。

[0019] 另一方面,本发明提供了在哺乳动物细胞中表达由含有提前终止密码子的基因编码的功能性基因产物的方法,该方法包括将有效量的表3中所列的tRNA (例如,包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列的tRNA),或包含编码tRNA的核苷酸序列的表达载体引入细胞中,从而允许在否则将导致由提前终止密码子引起的截短基因产物的位置处将氨基酸掺入基因产物中,其中该基因是表5中所列的基因。在某些实施方案中,该基因是SCN1A基因。

[0020] 在任何前述方法的某些实施方案中,所述细胞相比没有所述tRNA的细胞含有更少的截短基因产物。在某些实施方案中,所述细胞相比没有所述tRNA的细胞含有更大量的功能性基因产物。

[0021] 在另一方面,本发明提供了在细胞中增加由含有提前终止密码子的SCN1A基因编码的电压门控钠通道活性的方法,该方法包括将有效量的任何前述tRNA或任何前述表达载体引入细胞中,从而允许在否则将导致由提前终止密码子引起的截短的SCN1A基因产物的位置处将氨基酸掺入SCN1A基因产物中。

[0022] 在另一方面,本发明提供了在细胞中增加由含有提前终止密码子的SCN1A基因编码的电压门控钠通道活性的方法,该方法包括将有效量的表3中所列的tRNA (例如,包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列的tRNA),或包含编码所述tRNA的核苷酸序列的表达载体引入细胞中,从而允许在否则将导致由提前终止密码子引起的截短的SCN1A基因产物的位置处将氨基酸掺入SCN1A基因产物中。

[0023] 在任何前述方法的某些实施方案中,其中基因是SCN1A基因,用所述tRNA产生的SCN1A基因产物是功能性SCN1A基因产物。在某些实施方案中,功能性SCN1A基因产物相比截短的SCN1A基因产物具有更大的活性。在某些实施方案中,功能性SCN1A基因产物是$Na_v1.1$蛋白。在某些实施方案中,功能性SCN1A基因产物包含SEQ ID NO: 863-868中任一个的氨基酸序列。

[0024] 在任何前述方法的某些实施方案中,细胞是人细胞。在某些实施方案中,细胞是中枢神经系统细胞,例如神经元。在某些实施方案中,tRNA在细胞中变为氨酰化。

[0025] 在另一个方面,本发明提供了在有此需要的受试者中治疗提前终止密码子介导的病症的方法,其中受试者具有含有提前终止密码子的基因,该方法包括向受试者施用有效量的任何前述tRNA或任何前述表达载体,从而治疗受试者的病症。在某些实施方案中,病症选自表5或表6中所列的病症。

[0026] 在另一个方面,本发明提供了在有此需要的受试者中治疗提前终止密码子介导的病症的方法,其中受试者具有含有提前终止密码子的基因,该方法包括向受试者施用有效量的表3中所列的tRNA (例如,包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列的tRNA) ,或包含编码所述tRNA的核苷酸序列的表达载体,从而治

疗受试者的病症,其中病症是表5中所列的病症。

[0027] 在任何前述治疗方法的某些实施方案中,病症是癫痫,例如,Dravet综合征。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,该方法进一步包括向受试者施用有效量的另一种药剂,例如DIACOMIT®(司替戊醇)、EPIODOLEX®(大麻二酚)、生酮饮食、ONFI®(氯巴占)、TOPAMAX®(托吡酯)、芬氟拉明或丙戊酸。

[0028] 在任何前述方法的某些实施方案中,其中基因是SCN1A基因,SCN1A基因中的提前终止密码子由选自c.664C>T、c.1129C>T、c.1492A>T、c.1624C>T、c.1738C>T、c.1837C>T、c.2134C>T、c.2593C>T、c.3637C>T、c.3733C>T、c.3985C>T、c.4573C>T、c.5656C>T和c.5734C>T的突变或突变的组合引起。在某些实施方案中,提前终止密码子由选自c.1738C>T和c.3985C>T的突变引起。

[0029] 本发明的这些和其他方面和特征在以下详细描述和权利要求中描述。

[0030] 本发明涉及以下实施方案:

[0031] 1. tRNA,其包含表2中所列的核苷酸序列。

[0032] 2. 实施方案1所述的tRNA,其中所述tRNA包含选自SEQ ID NO: 19-21、37、39、40、44、179、181、182和186的核苷酸序列。

[0033] 3. 实施方案1或2所述的tRNA,其中所述tRNA包含天然存在的核苷酸修饰。

[0034] 4. 实施方案1-3中任一项所述的tRNA,其中所述tRNA包含选自5-甲基尿苷、5-氨基甲酰基甲基尿苷、5-氨基甲酰基-甲基-2-O-甲基尿苷、5-甲氧基-羰基甲基尿苷、5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷、假尿苷、二氢尿苷、1-甲基腺苷和肌苷的一种或多种核苷酸修饰。

[0035] 5. 表达载体,其包含编码实施方案1-4中任一项所述的tRNA的核苷酸序列。

[0036] 6. 实施方案5所述的表达载体,其中所述表达载体包含1、2、3、4或多于4个拷贝数的编码所述tRNA的所述核苷酸序列。

[0037] 7. 实施方案5或6所述的表达载体,其中所述表达载体进一步包含表4中所列的核苷酸序列。

[0038] 8. 实施方案7所述的表达载体,其中所述表达载体包含选自SEQ ID NO: 869-888的核苷酸序列。

[0039] 9. 表达载体,其包含编码表3中所列tRNA的核苷酸序列,其中所述表达载体包含1、2、3、4或多于4个拷贝数的编码所述tRNA的所述核苷酸序列。

[0040] 10. 表达载体,其包含编码表3中所列的tRNA的核苷酸序列,其中所述表达载体进一步包含表4中所列的核苷酸序列。

[0041] 11. 实施方案9或10所述的表达载体,其中所述tRNA包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列。

[0042] 12. 实施方案10或11所述的表达载体,其中所述表达载体包含选自SEQ ID NO: 869-888的核苷酸序列。

[0043] 13. 实施方案5-12中任一项所述的表达载体,其中所述表达载体是病毒载体。

[0044] 14. 实施方案13所述的表达载体,其中所述病毒载体是DNA病毒载体。

[0045] 15. 实施方案13或14所述的表达载体,其中所述病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。

[0046] 16. 药物组合物,其包含实施方案1-4中任一项所述的tRNA或实施方案5-15中任

一项所述的表达载体,以及药学上可接受的赋形剂。

[0047] 17. 实施方案16所述的药物组合物,其中所述tRNA或表达载体不与另一部分缀合或缔合。

[0048] 18. 实施方案17所述的药物组合物,其中所述tRNA或表达载体不与载体颗粒缀合或缔合。

[0049] 19. 实施方案8所述的药物组合物,其中所述载体颗粒是氨基脂质颗粒。

[0050] 20. 实施方案15-19中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物不包含纳米颗粒。

[0051] 21. 实施方案15-20中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物不包含氨基脂质递送化合物。

[0052] 22. 在哺乳动物细胞中表达由含有提前终止密码子的基因编码的功能性基因产物的方法,所述方法包括将有效量的实施方案1-4中任一项所述的tRNA或实施方案5-15中任一项所述的表达载体引入所述细胞中,从而允许在否则将导致由所述提前终止密码子引起的截短基因产物的位置处将氨基酸掺入所述基因产物中。

[0053] 23. 实施方案22所述的方法,其中所述细胞相比没有所述tRNA的细胞含有更少的截短基因产物。

[0054] 24. 实施方案22或23所述的方法,其中所述细胞相比没有所述tRNA的细胞含有更大量的功能性基因产物。

[0055] 25. 实施方案22-24中任一项所述的方法,其中所述基因是表5或表6中所列的基因。

[0056] 26. 实施方案25所述的方法,其中所述基因是表5中所列的基因。

[0057] 27. 在哺乳动物细胞中表达由含有提前终止密码子的基因编码的功能性基因产物的方法,所述方法包括将有效量的表3中所列的tRNA或包含编码所述tRNA的核苷酸序列的表达载体引入所述细胞中,从而允许在否则将导致由所述提前终止密码子引起的截短基因产物的位置处将氨基酸掺入所述基因产物中,其中所述基因是表5中所列的基因。

[0058] 28. 实施方案27所述的方法,其中所述tRNA包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列。

[0059] 29. 实施方案22-28中任一项所述的方法,其中所述基因是SCN1A基因。

[0060] 30. 在细胞中增加由含有提前终止密码子的SCN1A基因编码的电压门控钠通道活性的方法,所述方法包括将有效量的实施方案1-4任一项所述的tRNA或实施方案5-15中任一项所述的表达载体引入所述细胞中,从而允许在否则将导致由所述提前终止密码子引起的截短的SCN1A基因产物的位置处将氨基酸掺入所述SCN1A基因产物中。

[0061] 31. 在细胞中增加由含有提前终止密码子的SCN1A基因编码的电压门控钠通道活性的方法,所述方法包括将有效量的表3中所列的tRNA,或包含编码所述tRNA的核苷酸序列的表达载体引入所述细胞中,从而允许在否则将导致由所述提前终止密码子引起的截短的SCN1A基因产物的位置处将氨基酸掺入所述SCN1A基因产物中。

[0062] 32. 实施方案31所述的方法,其中所述tRNA包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列。

[0063] 33. 实施方案29-32中任一项所述的方法,其中用所述tRNA产生的所述SCN1A基因

产物是功能性SCN1A基因产物。

[0064] 34．实施方案33所述的方法,其中所述功能性SCN1A基因产物相比所述截短的SCN1A基因产物具有更大的活性。

[0065] 35．实施方案33或34所述的方法,其中所述功能性SCN1A基因产物是$Na_v1.1$蛋白。

[0066] 36．实施方案33-35中任一项所述的方法,其中所述功能性SCN1A基因产物包含SEQ ID NO: 863-868中的任一项。

[0067] 37．实施方案36所述的方法,其中所述功能性SCN1A基因产物包含SEQ ID NO: 863或SEQ ID NO: 864。

[0068] 38．实施方案22-37中任一项所述的方法,其中所述细胞是人细胞。

[0069] 39．实施方案22-38中任一项所述的方法,其中所述tRNA在所述细胞中变为氨酰化。

[0070] 40．在有此需要的受试者中治疗提前终止密码子介导的病症的方法,其中所述受试者具有含有提前终止密码子的基因,所述方法包括向所述受试者施用有效量的实施方案1-4中任一项所述的tRNA或实施方案5-15中任一项所述的表达载体,从而治疗所述受试者的所述病症。

[0071] 41．实施方案40所述的方法,其中所述病症是表5或表6中所列的病症。

[0072] 42．实施方案41所述的方法,其中所述病症是表5中所列的病症。

[0073] 43．在有此需要的受试者中治疗提前终止密码子介导的病症的方法,其中所述受试者具有含有提前终止密码子的基因,所述方法包括向所述受试者施用有效量的表3中所列的tRNA,或包含编码所述tRNA的核苷酸序列的表达载体,从而治疗所述受试者的所述病症,其中所述病症是表5中所列的病症。

[0074] 44．实施方案43所述的方法,其中所述tRNA包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列。

[0075] 45．实施方案40-44中任一项所述的方法,其中所述病症是Dravet综合征。

[0076] 46．实施方案45所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用司替戊醇、大麻二酚、生酮饮食、氯巴占、托吡酯、芬氟拉明或丙戊酸。

[0077] 47．实施方案45或46所述的方法,其中所述基因是SCN1A。

[0078] 48．实施方案40-47中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

[0079] 49．实施方案29-39或47中任一项所述的方法,其中所述SCN1A基因中的所述提前终止密码子由选自c.664C>T、c.1129C>T、c.1492A>T、c.1624C>T、c.1738C>T、c.1837C>T、c.2134C>T、c.2593C>T、c.3637C>T、c.3733C>T、c.3985C>T、c.4573C>T、c.5656C>T和c.5734C>T的突变引起。

[0080] 50．实施方案49所述的方法,其中所述SCN1A基因中的所述提前终止密码子由选自c.1738C>T和c.3985C>T的突变引起。

附图说明

[0081] 参考以下附图可以更完整地理解本发明。

[0082] 图1是含有提前终止密码子(PTC)的转录物(例如,SCN1A转录物)的示意图,该提前终止密码子导致截短的蛋白质产物(例如,患有Dravet综合征的受试者中的蛋白质产物)。

天然终止密码子表示为阴影圆圈,提前终止密码子表示为无阴影圆圈。带有其同源氨基酸(A.A.)的抑制物tRNA (例如,反密码子修饰的精氨酸tRNA)的表达允许PTC的通读并促进全长蛋白质的表达。

[0083] 图2A是共有tRNA二级结构。残基的编号基于Steinberg et al. (1993) NUCLEIC ACIDS RES. 21:3011-15中描述的tRNA编号系统。图2B是显示来自某些真核生物的胞质溶胶的tRNA序列的修饰谱的表格。表格中的比率表示图2A所示编号位置处所列核苷酸的出现频率。修饰残基的缩写在Motorin et al. (2005) "Transfer RNA Modification," ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, John Wily & Sons, Inc中定义。

[0084] 图3是双荧光报告基因构建体的示意图,该构建体含有三个拷贝的红色荧光蛋白(tdTomato)、TEV蛋白酶、包含PTC+/-8个侧翼密码子的51 bp接头区和三个拷贝的绿色荧光蛋白(EGFP)。表达由位于第一个拷贝的tdTomato上游的延伸因子EF-1α的启动子驱动。所有拷贝的tdTomato、EGFP和TEV蛋白酶通过TEV蛋白酶切割位点(Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser))彼此分开。

[0085] 图4是描绘Arg_{TCA}抑制物tRNA在稳定表达具有受试者S-PTC接头区(SEQ ID NO: 29)的双荧光报告基因的Flp-In-293细胞系中的通读活性的图,该受试者S-PTC接头区衍生自与Dravet综合征相关的临床相关SCN1A无义突变。用指示的Arg_{TCA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 1-25和35)转染细胞,并在转染后24小时在两个独立实验中通过流式细胞术测量通读活性。"亲本"表示没有荧光报告基因的原始Flp-In-293细胞系,"无PTC"表示稳定表达具有缺少PTC的受试者S-PTC接头区型式(SEQ ID NO: 194)的双荧光报告基因的Flp-In-293细胞系,"EV"(空载体)表示用不含tRNA的表达构建体转染的细胞,"TCG"表示用含有具有TCG反密码子的野生型Arg-tRNA的表达构建体转染的细胞。通读活性表示为表达tdTomato和EGFP二者高于背景的活细胞的百分比("双阳性%")。误差棒代表数据的标准偏差。

[0086] 图5是描绘Arg_{TCA}抑制物tRNA在稳定表达具有R1407X-PTC接头区(SEQ ID NO: 30)的双荧光报告基因的Flp-In-3T3细胞系中的通读活性的图,该R1407X-PTC接头区衍生自与Dravet综合征相关的临床相关SCN1A无义突变。用指示的Arg_{TCA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 1-25)转染细胞,并在转染后24小时在三个独立实验中通过流式细胞术测量通读活性。"亲本"表示没有荧光报告基因的原始3T3细胞系,"无PTC"表示稳定表达具有缺少PTC的R1407X-PTC接头区型式(SEQ ID NO: 195)的双荧光报告基因的3T3细胞系,"模拟"表示模拟转染的细胞,"EV"(空载体)表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体转染的细胞,"TCG"表示用含有具有TCG反密码子的野生型Arg-tRNA的表达构建体转染的细胞。通读活性表示为表达tdTomato和EGFP二者高于背景的活细胞的百分比("双阳性%")。误差棒代表数据的标准偏差。

[0087] 图6是描绘Arg_{TCA}抑制物tRNA在用具有受试者N-PTC接头区(SEQ ID NO: 28)的双荧光报告基因瞬时转染的Flp-In-3T3细胞中的通读活性的图,该受试者N-PTC接头区衍生自与Dravet综合征相关的临床相关SCN1A无义突变。用指示的Arg_{TCA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 1-25和35)共转染细胞,并通过流式细胞术测量通读活性。"模拟"表示模拟转染的细胞,"无PTC"表示用具有缺少PTC的受试者N-PTC接头区型式(SEQ ID NO: 193)的双荧光报告基因转染的细胞,"EV"(空载体)表示用不含tRNA的表达构建体共转染的细胞,"TCG"表示用含有具有TCG反密码子的野生型Arg-tRNA的表达构建体共转染的细胞。通读活性通过流

式细胞术测量,并表示为表达tdTomato和EGFP二者高于背景的活细胞的百分比(“双阳性%”)。

[0088] 图7是描绘指示的Arg_{TCA}抑制物tRNA在Neuro-2a (N2a)和Flp-In-293 (293)细胞中的通读活性(通过百分比阳性GFP细胞测量)的图。用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)的表达构建体和含有指示的Arg_{TCA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 1-22)的表达构建体共转染细胞。“EGFP”表示用缺少PTC的EGFP报告基因型式转染的细胞,“EGFP-PTC”表示用单独的EGFP-R96X-TGA报告基因转染的细胞。在转染后约24小时在293细胞中和转染后约48小时在N2a细胞中通过流式细胞术分析EGFP表达。通读活性表示为表达EGFP高于背景的活细胞的百分比(“%GFP+”),所有值均归一化至表达缺乏PTC的EGFP的细胞。

[0089] 图8A是使用含有具有PTC和抑制物tRNA的EGFP报告基因的构建体来测量抑制物tRNA活性的实验方法的描绘。天然终止密码子表示为阴影圆圈,提前终止密码子表示为无阴影圆圈。标准的Arg-tRNA (具有结合CGA的反密码子)将导致EGFP中的PTC没有通读,以及非功能性的截短EGFP蛋白。抑制物tRNA (具有结合UGA的反密码子)允许通读EGFP中的PTC,产生全长的功能性EGFP蛋白。图8B是示例性报告基因构建体的示意图,其含有具有PTC的EGFP和4个拷贝的抑制物tRNA。

[0090] 图9描绘了用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)和指示拷贝数的指示Arg_{TCA}抑制物tRNA的表达构建体转染的Neuro-2a细胞的荧光图像。抑制物tRNA是TCA-001 (SEQ ID NO: 11)、TCA-113 (SEQ ID NO: 16)和TCA-115 (SEQ ID NO: 18)。每个拷贝的抑制物tRNA还含有来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的104 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 32)。转染后约24小时拍摄图像。从左到右,GFP对照物是1) 单独的野生型EGFP,2) 在包括单个拷贝的Arg_{TCA}抑制物tRNA #001 (SEQ ID NO: 11)的表达构建体上的野生型EGFP,3) 单独的EGFP-R96X-TGA报告基因,和4) 在包括四个拷贝的具有未修饰的TCG反密码子的野生型Arg-tRNA的表达构建体上的EGFP-R96X-TGA报告基因。

[0091] 图10描绘了用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)和指示拷贝数的指示Arg_{TCA}抑制物tRNA的表达构建体转染的Flp-In-293细胞的荧光图像。抑制物tRNA是TCA-001 (SEQ ID NO: 11)、TCA-113 (SEQ ID NO: 16)和TCA-115 (SEQ ID NO: 18)。每个拷贝的抑制物tRNA还含有来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA(SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的104 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 32)。转染后约48小时拍摄图像。从左到右,GFP对照物是1) 单独的野生型EGFP,2) 在包括单个拷贝的Arg_{TCA}抑制物tRNA #001 (SEQ ID NO: 11)的表达构建体上的野生型EGFP,3) 单独的EGFP-R96X-TGA报告基因,和4) 在包括四个拷贝的具有未修饰的TCG反密码子的野生型Arg-tRNA的表达构建体上的EGFP-R96X-TGA报告基因。

[0092] 图11显示了通过流式细胞术测量的用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 177)和Arg_{TCA}抑制物tRNA #001 (SEQ ID NO: 11)的表达构建体转染的Neuro-2a和Flp-In-293细胞的荧光。表达构建体包括一(1x)、两(2x)或四(4x)个拷贝的抑制物tRNA,其在以下背景中:或是(i)U6启动子,其包括来自tRNA-Arg-TCG-1-1的19 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 33)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的46 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 34)(“U6”),或是(ii)来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 26)

和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 27)(“侧翼”)。“空载体”表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体转染的细胞,“EF1a:EGFP”表示用缺少PTC的EGFP报告基因型式转染的细胞。转染后约48小时进行分析。数据表示为直方图,显示相对于表达EGFP高于背景的活细胞的荧光强度的数据频率分布。

[0093] 图12描绘了通过流式细胞术测量的用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 177)和具有指示拷贝数的Arg_{TCA}抑制物tRNA #001(SEQ ID NO: 11)的表达构建体转染的Neuro-2a细胞的所有活细胞中EGFP阳性细胞的百分比和平均EGFP强度,该Arg_{TCA}抑制物tRNA #001在以下背景中:或是(i)U6启动子,其包括来自tRNA-Arg-TCG-1-1的19 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 33)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的46 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 34) (“U6”),或是(ii)来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 27)(“侧翼”)。“空载体”表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体转染的细胞,“EF1a:EGFP”表示用缺少PTC的EGFP报告基因型式转染的细胞。转染后约48小时进行分析。这些图汇总了图11中Neuro-2a细胞的数据。

[0094] 图13显示了通过流式细胞术测量的用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)和Arg_{TCA}抑制物tRNA #001 (SEQ ID NO: 11)的表达构建体转染的Neuro-2a细胞的荧光。表达构建体包括一(1x)、二(2x)、三(3x)或四(4x)个拷贝的抑制物tRNA。每个拷贝抑制基因tRNA还含有来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的104 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 32) (“侧翼”)。“CAG:EGFP”表示用缺少PTC的EGFP报告基因型式转染的细胞,“模拟”表示用单独的EGFP-R96X-TGA报告基因转染的细胞。转染后约48小时进行分析。数据显示为直方图,显示相对于所有活细胞(“G1门”)和表达EGFP高于背景的活细胞(“GFP+门”)的荧光强度的数据频率分布。

[0095] 图14显示了通过流式细胞术测量的用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)和Arg_{TCA}抑制物tRNA #113(SEQ ID NO: 16)的表达构建体转染的Neuro-2a细胞的荧光。表达构建体包括一(1x)、二(2x)、三(3x)或四(4x)个拷贝的抑制物tRNA。抑制基因tRNA的每个拷贝还含有来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的104 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 32) (“侧翼”)。“CAG:EGFP”表示用缺少PTC的EGFP报告基因型式转染的细胞,“模拟”表示用单独的EGFP-PTC报告基因转染的细胞。转染后约48小时进行分析。数据以直方图的形式呈现,数据显示为直方图,显示相对于所有活细胞(“G1门”)和表达EGFP高于背景的活细胞(“GFP+门”)的荧光强度的数据频率分布。

[0096] 图15显示了通过流式细胞术测量的用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)和Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18)的表达构建体转染的Neuro-2a细胞的荧光。表达构建体包括一(1x)、二(2x)、三(3x)或四(4x)个拷贝的抑制物tRNA。每个拷贝的抑制基因tRNA还含有来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的104 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 32) (“侧翼”)。“CAG:EGFP”表示用缺少PTC的EGFP报告基因型式转染的细胞,“模拟”表示用单独的EGFP-R96X-TGA报告基因转染的细胞。转染后约48小时进行分析。数据显示为直方图,显示相对于所有活细胞(“G1门”)和表达EGFP高于背景的活细胞(“GFP+门”)的荧光强度的数据频率分

布。

[0097] 图16描绘了所有活细胞中EGFP阳性细胞的百分比(“%细胞GFP+”)和EGFP阳性细胞中的平均EGFP强度(“GFP+门”),如通过流式细胞术对用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)和指示拷贝数的指示抑制物tRNA的表达构建体转染的Neuro-2a细胞所测量的。抑制物tRNA是TCA-001 (SEQ ID NO: 11)、TCA-113 (SEQ ID NO: 16)和TCA-115 (SEQ ID NO: 18)。“CAG:EGFP”表示用缺少PTC的EGFP报告基因型式转染的细胞,“CAG:EGFP-PTC”表示用单独的EGFP-R96X-TGA报告基因转染的细胞。这些图汇总了图13-15中的数据。

[0098] 图17描绘了通过流式细胞术测量的用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)和具有指示拷贝数和侧翼序列的指示Arg_{TCA}抑制物tRNA的表达构建体转染的Neuro-2a细胞的EGFP阳性细胞百分比。抑制物tRNA是TCA-001 (SEQ ID NO: 11)、TCA-113 (SEQ ID NO: 16)和TCA-115 (SEQ ID NO: 18)。“U6”表示U6启动子,其包括来自tRNA-Arg-TCG-1-1的19 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 33)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的46 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 34),“侧翼(±200 bp)”表示来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 27),“侧翼(+200/-100 bp)”表示来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的104 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 32)(“侧翼”)。“模拟”表示模拟转染细胞,“空载体”表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体转染的细胞,“4xTCG”表示用含有EGFP-R96X-TGA报告基因和4个拷贝的具有TCG反密码子的野生型Arg-tRNA的表达构建体转染的细胞,“CAG:EGFP”表示用缺少PTC的EGFP报告基因型式转染的细胞。所有数据均归一化至阳性对照物(CAG:EGFP)。图表显示了表达GFP高于背景的活细胞的百分比。

[0099] 图18是描绘Gln_{TTA}抑制物tRNA在两个独立衍生的稳定表达具有Dmd^{mdx}-PTC接头区(SEQ ID NO: 192)的双荧光报告基因的Flp-In-293细胞系(#2和#10)中的通读活性的图,该Dmd^{mdx}-PTC接头区衍生自与Duchenne肌营养不良相关的临床相关DMD无义突变。用指示的Gln_{TTA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 36-48)转染细胞,并在转染后24小时通过流式细胞术测量通读活性。“亲本”表示没有荧光报告基因的原始Flp-In-293细胞系,“无PTC”表示稳定表达具有缺乏PTC的Dmd^{mdx}-PTC接头区型式(SEQ ID NO: 191)的双荧光报告基因的Flp-In-293细胞系,“TTG”表示用含有具有TTG反密码子的野生型Gln-tRNA的表达构建体转染的细胞。通读活性通过流式细胞术测量,并表示为表达tdTomato和EGFP两者超过基线的活细胞的百分比(“%双+细胞”)。

[0100] 图19是描绘指示的Gln_{TTA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 36-48)在用含有EGFP-Q69X-TAA报告基因(SEQ ID NO: 175)的表达构建体共转染的Neuro-2a细胞中的通读活性的图。“模拟”表示模拟转染的细胞,“EGFP”表示用缺少PTC的EGFP报告基因型式转染的细胞,“EV”(空载体)表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体转染的细胞,“TTG”表示用EGFP-Q69X-TAA报告基因和含有具有TTG反密码子的野生型Gln-tRNA的表达构建体共转染的细胞。通读活性通过流式细胞术测量,并表示为表达GFP高于背景的活细胞的百分比。误差棒代表数据的标准偏差。

[0101] 图20是描绘指示的Gln_{TTA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 78-90)在用含有EGFP-Q69X-TAG报告基因(SEQ ID NO: 176)的表达构建体共转染的Neuro-2a细胞中的通读活性的图。

“模拟”表示模拟转染的细胞,“EGFP”表示用缺少PTC的EGFP报告基因型式转染的细胞,“EV”(空载体)表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体转染的细胞,“TTG”表示用EGFP-Q69X-TAG报告基因和含有具有TTG反密码子的野生型Gln-tRNA的表达构建体共转染的细胞。通读活性通过流式细胞术测量,并表示为表达GFP高于背景的活细胞的百分比。误差棒代表数据的标准偏差。

[0102] 图21描绘了用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(“GFP-PTC”)的表达构建体转染后约24小时的Neuro-2a细胞的荧光图像,其中或是(i)在同一构建体上包括指示拷贝数的Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18),或是(ii)用指示浓度的阿塔鲁伦(ataluren)处理,(iii)用指示浓度的庆大霉素(gentamicin)处理,或(iv)用指示浓度的G418处理。对于所有实验条件,在转染后约6小时将细胞培养基替换为新鲜培养基,在该点添加指示浓度的指示药物。左栏中的对照物用含有野生型EGFP (“WT-GFP”)和指示药物或指示拷贝数的Arg_{TCA}抑制物tRNA的表达构建体转染。

[0103] 图22是描绘在转染后约48小时通过流式细胞术测量的GFP阳性细胞百分比的图。Neuro-2a细胞用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(“GFP-PTC”)的表达构建体转染,并且体或是(i)在同一构建体上包括指示拷贝数的Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18),或是(ii)用指示浓度的阿塔鲁伦处理,(iii)用指示浓度的庆大霉素处理,或(iv)用指示浓度的G418处理。对于所有实验条件,在转染后约6小时将细胞培养基替换为新鲜培养基,在该点添加指示浓度的指示药物。将含有野生型的不含PTC的EGFP的报告基因(“WT-GFP”)用作对照物。“模拟”表示模拟转染的细胞。“4XTCG”表示用含有四个拷贝的具有TCG反密码子的野生型Arg-tRNA和EGFP-R96X-TGA报告基因的表达构建体转染的细胞。图显示了表达EGFP高于背景的活细胞的百分比。对于表达Arg_{TCA}抑制物的细胞,表达GFP的细胞百分比范围为73.0%至76.2%,相对于阴性对照物为0.7%至1.6%,用阿塔鲁伦处理的细胞为0.9%至4.9%,用庆大霉素处理的细胞为1.2%至6.5%,并且用G418处理的细胞为6.7%至26.7%。

[0104] 图23是描绘在转染后约48小时通过流式细胞术测量的来自图22的细胞活力的图。Neuro-2a细胞用包含EGFP-R96X-TGA报告基因(“GFP-PTC”)的表达构建体转染,并且或是(i)用在同一构建体上包括指示拷贝数的Arg_{TCA}抑制物tRNA #115(SEQ ID NO: 18)的表达构建体转染,或是(ii)用指示浓度的阿塔鲁伦处理,(iii)用指示浓度的庆大霉素处理,或(iv)用指示浓度的G418处理。对于所有实验条件,转染后约6小时将细胞培养基替换为新鲜培养基,此时添加指示浓度的指示药物。将含有野生型的没有PTC的GFP的报告基因(“WT-GFP”)用作对照物。“模拟”表示模拟转染的细胞。“4XTCG”表示用含有四个拷贝的具有TCG反密码子的野生型Arg-tRNA和EGFP-R96X-TGA报告基因的表达构建体转染的细胞。使用通常从活细胞中排除的膜不透性染料,7-氨基放线菌素D(7-AAD)通过流式细胞术评估细胞活力。

[0105] 图24是描绘指示的Gln_{CTA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 178-190)在用含有接头区(SEQ ID NO: IDNO:889、891和893)的指示双荧光报告基因构建体瞬时共转染的Flp-In-293细胞中的通读活性的图,该接头区衍生自与Dravet综合征相关的SCN1A中的三个临床相关Gln(Q)-to-TAG PTC突变(Q1397*、Q1504*和Q1810*)。“模拟”表示模拟转染的细胞,“无PTC”表示用缺少PTC(SEQ ID No:890、892和894)的双荧光报告基因构建体型式转染的细胞,“EV”(空载体)表示用不含tRNA或荧光报告基因的表达构建体转染的细胞,“TTG”表示用

指示的双荧光报告基因构建体和含有具有TTG反密码子的野生型Gln-tRNA的表达构建体共转染的细胞。在转染后约24小时通过流式细胞术测量通读活性,并表示为表达tdTomato和EGFP两者超过基线的活细胞的百分比(“%双+细胞”)。

[0106] 图25是描绘指示的Gln_{CTA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 178-190)在包含含有接头区(SEQ ID NO: 889)的整合的双荧光报告基因构建体的Flp-In-293细胞系中的通读活性的图,该接头区衍生自与Dravet综合征相关的SCN1A中的临床相关PTC突变(Q1397*)。“模拟”表示模拟转染的细胞,“RFP-EGFP”表示含有缺少PTC(SEQ ID NO: 890)的双荧光报告基因构建体的整合型式的Flp-In-293细胞系,“EV”(空载体)表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体转染的细胞,“TTG”表示用具有TTG反密码子的野生型Gln-tRNA转染的细胞。在转染后约24小时通过流式细胞术测量通读活性,并表示为表达tdTomato和EGFP二者高于背景的细胞的百分比(“%双+细胞”)。

[0107] 图26A显示了通过流式细胞术测量的用含有EGFP-R96X-TGA报告基因和单个拷贝Arg_{TCA}抑制物tRNA #115的表达构建体转染的Neuro-2a细胞的荧光,该Arg_{TCA}抑制物tRNA #115在以下背景中:(i)来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的104 bp下游侧翼基因组DNA(SEQ ID NO: 32)(“侧翼300”),(ii)来自tRNA-Arg-TCG-1-1的20 bp上游侧翼基因组(SEQ ID NO: 895)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的17 bp下游侧翼基因组DNA(SEQ ID NO: 896)(“侧翼20”),(iii)来自tRNA-Arg-TCG-1-1的10 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 897)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的17 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 896)(“侧翼10”),或(iv)来自tRNA-Arg-TCG-1-1的0 bp上游侧翼基因组DNA和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的17 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 896)(“侧翼0”)。表达载体的详细信息显示在表11中。“GFP-PTC”表示用单独的EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)转染的细胞,“GFP”表示用缺少PTC 的EGFP报告基因型式转染的细胞。在转染后约24小时通过流式细胞术测量通读活性。数据显示为直方图,显示相对于表达EGFP高于背景的细胞的荧光强度的数据频率分布。图26B显示了对于图26A中描绘的细胞,所有活细胞中EGFP阳性细胞的百分比(“% GFP+”)和表达EGFP高于背景的活细胞中的平均EGFP强度(“平均GFP信号”)。

[0108] 图27是用于测试5’前导序列对抑制物tRNA对提前终止密码子(PTC)的通读的影响的构建体的示意图。构建体含有(i)衍生自位于在HEK293细胞中高表达的tRNA基因上游的基因组DNA的100bp 5’前导序列,(ii)单个拷贝的Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18)或Gln_{TTA}抑制物tRNA #163 (SEQ ID NO: 45),和(iii)RNA聚合酶III终止信号(“Term”)。

[0109] 图28是描绘在转染后约24小时在Flp-In-293细胞中通过流式细胞术测量的指示Arg_{TCA}抑制物tRNA表达构建体的通读活性的图。在指示的100 bp上游基因组DNA前导序列(SEQ ID NO: 869-888)的背景中,用含有(i)EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)和(ii)Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18)的构建体共转染细胞。“WT-EGFP”表示用含有没有PTC的野生型GFP的报告基因转染的细胞,“EV”(空载体)表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体共转染的细胞, “26/27”表示用在来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA(SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp下游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 27)的背景中的ArgTCA抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18)共转染的细胞。该

图显示了表达EGFP高于背景的活细胞的百分比。对于表达Arg_{TCA}抑制物的细胞,表达EGFP的细胞的百分比范围为17.2%至33.7%,相对于空载体对照为0.4%。

[0110] 图29是描绘在转染后约24小时在Flp-In-293细胞中通过流式细胞术测量的指示Arg_{TCA}抑制物tRNA表达构建体的通读活性的图。在指示的100 bp上游基因组DNA前导序列(SEQ ID NO: 869-888)的背景中,用含有(i)EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)和(ii)Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18)的构建体共转染细胞。"WT-EGFP"表示用含有没有PTC的野生型GFP的报告基因转染的细胞,"EV"(空载体)表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体共转染的细胞, "26/27"表示用在来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA(SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp下游侧翼基因组DNA(SEQ ID NO: 27)的背景中的ArgTCA抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18)共转染的细胞。该图显示了表达EGFP高于背景的细胞中的平均EGFP强度。表达Arg_{TCA}抑制物的细胞的平均EGFP强度范围为1990至4319,相对于空载体对照为602。

[0111] 图30是描绘在转染后约24小时在Flp-In-293细胞中通过流式细胞术测量的指示Gln_{TTA}抑制物tRNA表达构建体的通读活性的图。在指示的100 bp上游基因组DNA前导序列(SEQ ID NO: 869-888)的背景中,用含有(i)EGFP-Q69X-TAA报告基因(SEQ ID NO: 175)和(ii) Gln_{TTA}抑制物tRNA #163 (SEQ ID NO: 45)的构建体共转染细胞。"WT-EGFP"表示用含有没有PTC的野生型GFP的报告基因转染的细胞,"EV"(空载体)表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体共转染的细胞,"173/174"表示用在来自tRNA-Gln-TTG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA(SEQ ID NO: 173)和来自tRNA-Gln-TTG-1-1的200 bp下游侧翼基因组DNA(SEQ ID NO: 174)的背景中的Gln_{TTA}抑制物tRNA #163 (SEQ ID NO: 45)共转染的细胞。该图显示了表达EGFP高于背景的活细胞的百分比。对于表达Gln_{TTA}抑制物的细胞,表达EGFP的细胞的百分比范围为21.4%至35.7%,相对于空载体对照为0.3%。

[0112] 图31是描绘在转染后约24小时在Flp-In-293细胞中通过流式细胞术测量的指示Gln_{TTA}抑制物tRNA表达构建体的通读活性的图。在指示的100 bp上游基因组DNA前导序列(SEQ ID NO: 869-888)的背景中,用含有(i)EGFP-Q69X-TAA报告基因(SEQ ID NO: 175)和(ii) Gln_{TTA}抑制物tRNA #163 (SEQ ID NO: 45)的构建体共转染细胞。"WT-EGFP"表示用含有没有PTC的野生型GFP的报告基因转染的细胞,"EV"(空载体)表示用不含tRNA或EGFP报告基因的表达构建体共转染的细胞, "173/174"表示用在来自tRNA-Gln-TTG-1-1的200 bp上游侧翼基因组DNA(SEQ ID NO: 173)和来自tRNA-Gln-TTG-1-1的200 bp下游侧翼基因组DNA(SEQ ID NO: 174)的背景中的Gln_{TTA}抑制物tRNA #163 (SEQ ID NO: 45)共转染的细胞。该图显示了表达EGFP高于背景的细胞中的平均EGFP强度。表达Gln_{TTA}抑制物的细胞的平均EGFP强度范围为1702至3822,相对于空载体对照为387。

[0113] 图32是汇总图28-31的结果的表格,其中值已经归一化至用没有PTC的野生型GFP转染的细胞。

[0114] 图33是描绘在转染后约48小时在三个独立实验中通过流式细胞术测量的EGFP阳性细胞百分比的图。Neuro-2a细胞用含有EGFP-Q69X-TAA报告基因("EGFP-PTC") (SEQ ID NO: 175)的表达构建体转染,并且或是(i)在同一构建体上包括指示拷贝数的Gln_{TTA}抑制物tRNA #002 (SEQ ID NO: 36),或是(ii)用指示浓度的阿塔鲁伦处理,(iii)用指示浓度的庆大霉素处理,或(iv)用指示浓度的G418处理。对于所有实验条件,在转染后约6小时将细

胞培养基替换为新鲜培养基,此时添加指示浓度的指示药物。将含有野生型EGFP而没有PTC的报告基因(“EGFP”)用作对照物。“模拟”表示模拟转染的细胞,“无tRNA”表示用单独的指示的EGFP表达构建体转染的细胞,“4X-Gln-TTG”表示用含有四个拷贝的具有TTG反密码子的野生型Gln-tRNA和EGFP-Q69X-TAA报告基因的表达构建体转染的细胞。该图显示了表达GFP高于背景的活细胞的百分比。误差棒代表数据的标准偏差。对于表达Gln_{TTA}抑制物的细胞,表达GFP的细胞百分比范围为64.7%至67.3%,相对于阴性对照为0.2%至0.7%,用阿塔鲁伦处理的细胞为0.4%至0.6%,用庆大霉素处理的细胞为0.4%,和用G418处理的细胞为1.7%至4.5%。

[0115] 图34是描绘来自在转染后约48小时通过流式细胞术测量的图33的细胞活力的图。Neuro-2a细胞用含有EGFP-Q69X-TAA报告基因(“EGFP-PTC”)(SEQ ID NO: 175)的表达构建体转染,并且或是(i)在同一构建体上包括指示拷贝数的Gln_{TTA}抑制物tRNA #002 (SEQ ID NO: 36),或是(ii)用指示浓度的阿塔鲁伦处理,(iii)用指示浓度的庆大霉素处理,或(iv)用指示浓度的G418处理。对于所有实验条件,在转染后约6小时将细胞培养基替换为新鲜培养基,此时添加指示浓度的指示药物。将含有野生型EGFP而没有PTC的报告基因(“EGFP”)用作对照物。“模拟”表示模拟转染的细胞,“无tRNA”表示用单独的指示的EGFP表达构建体转染的细胞,“4X-Gln-TTG”表示用含有四个拷贝的具有TTG反密码子的野生型Gln-tRNA和EGFP-Q69X-TAA报告基因的表达构建体转染的细胞。使用通常从活细胞中排除的膜不透性染料7-氨基放线菌素D (7-AAD)通过流式细胞术评估细胞活力。

[0116] 图35是描绘在转染后约48小时在三个独立实验中通过流式细胞术测量的EGFP阳性细胞百分比的图。Neuro-2a细胞用含有EGFP-Q69X-TAG报告基因(“EGFP-PTC”)(SEQ ID NO: 176)的表达构建体转染,并且或是(i)在同一构建体上包括指示拷贝数的Gln_{CTA}抑制物tRNA #196 (SEQ ID NO: 178),或是(ii)用指示浓度的阿塔鲁伦处理,(iii)用指示浓度的庆大霉素处理,或(iv)用指示浓度的G418处理。对于所有实验条件,在转染后约6小时将细胞培养基替换为新鲜培养基,此时添加指示浓度的指示药物。将含有野生型EGFP而没有PTC的报告基因(“EGFP”)用作对照物。“模拟”表示模拟转染的细胞,“无tRNA”表示用单独的指示的EGFP表达构建体转染的细胞,“4X-Gln-TTG”表示用含有四个拷贝的具有TTG反密码子的野生型Gln-tRNA和EGFP-Q69X-TAA报告基因的表达构建体转染的细胞。图显示了表达GFP高于背景的活细胞的百分比。对于表达Gln_{CTA}抑制物的细胞,表达GFP的细胞百分比范围为73.1%至78.2%,相对于阴性对照为0.5%至0.8%,用阿塔鲁伦处理的细胞为0.5%至0.7%,用庆大霉素处理的细胞为0.5%至1.1%,和用G418处理的细胞为13.6%至20.6%。

[0117] 图36是描绘来自在转染后约48小时通过流式细胞术测量的图35的细胞活力的图。Neuro-2a细胞用含有EGFP-Q69X-TAG报告基因(“EGFP-PTC”)(SEQ ID NO: 176)的表达构建体转染,并且或是(i)在同一构建体上包括指示拷贝数的Gln_{CTA}抑制物tRNA #196 (SEQ ID NO: 178),或是(ii)用指示浓度的阿塔鲁伦处理,(iii)用指示浓度的庆大霉素处理,或(iv)用指示浓度的G418处理。对于所有实验条件,在转染后约6小时将细胞培养基替换为新鲜培养基,此时添加指示浓度的指示药物。将含有野生型EGFP而没有PTC的报告基因(“EGFP”)用作对照物。“模拟”表示模拟转染的细胞,“无tRNA”表示用单独的指示的EGFP表达构建体转染的细胞,“4X-Gln-TTG”表示用含有四个拷贝的具有TTG反密码子的野生型Gln-tRNA和EGFP-Q69X-TAA报告基因的表达构建体转染的细胞。使用通常从活细胞中排除

的膜不透性染料7-氨基放线菌素D (7-AAD)通过流式细胞术评估细胞活力。

[0118] 图37A是描绘抑制物tRNA对全长SCN1A蛋白表达的挽救的Western印迹。Flp-In-293细胞用含有具有Arg(R)至TGA的PTC (R1407X)的小鼠SCN1A和在C端的3xFLAG标签肽(DYKDHD-G-DYKDHD-I-DYKDDDDK)的表达构建体(SEQ ID NO: 899) (“SCN1a(R1407*)”)转染,并且或是(i)与包含Arg_{TCA}抑制物tRNA #115(SEQ ID NO: 18)的表达构建体(“Arg>TGA #115”)共转染,或是(ii)用指示浓度的阿塔鲁伦处理,(iii)用指示浓度的庆大霉素处理,或(iv)用指定浓度的G418处理。“SCN1a (w.t.)”表示用含有野生型小鼠SCN1A和在C端的3xFLAG标签肽的表达构建体(SEQ ID NO: 898)转染的细胞。在转染后24小时分离蛋白质,并使用单克隆抗FLAG M2抗体检测SCN1A。基于蛋白质分子量标志物的分子量表示在凝胶的左侧。图37B是图37A中所示的Western印迹的量化。使用ImageJ测量与全长SCN1A蛋白大小相对应的条带强度,并将所有强度值归一化至野生型SCN1A蛋白(“SCN1a (w.t.)”泳道)。用含有突变SCN1A的表达载体和Arg_{TCA}抑制物tRNA的表达载体共转染的细胞表达用含有野生型SCN1A的表达构建体转染的细胞表达的全长SCN1A的超过70%。

[0119] 图38A是描绘抑制物tRNA对全长SCN1A蛋白表达的挽救的Western印迹。Flp-In-293细胞用(i)含有具有精氨酸至TGA的PTC (R1407X)的小鼠SCN1A和在C端的3xFLAG标签肽(DYKDHD-G-DYKDHD-I-DYKDDDDK)的表达构建体(SEQ ID NO: 899) (“SCN1a(R1407*)”)以及(ii)#104 Arg_{TCA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 6) (“Sup#104”)、#106 Arg_{TCA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 8) (“Sup#106”),或Arg_{TCA}抑制物tRNA #115(SEQ ID NO: 18) (“Sup #115”)共转染。“SCN1a (w.t.)”表示用含有野生型小鼠SCN1A和在C端的3xFLAG标签肽的表达构建体(SEQ ID NO: 898)转染的细胞。在转染后24小时分离蛋白质,并使用单克隆抗FLAG M2抗体检测SCN1A。基于蛋白质分子量标志物的分子量表示在凝胶的左侧。图38B是图38A中所示的Western印迹的量化。使用ImageJ测量与全长SCN1A蛋白大小相对应的条带强度,并将所有强度值归一化至野生型SCN1A蛋白(“SCN1a (w.t.)”泳道)。用含有突变SCN1A的表达载体和Arg_{TCA}抑制物tRNA共转染的细胞表达了用含有野生型SCN1A的表达构建体转染的细胞表达的全长SCN1A的超过30% (Sup#104)、超过60% (Sup#106)或超过70% (Sup#115)。

[0120] 图39A是描绘抑制物tRNA对全长SCN1A蛋白表达的挽救的Western印迹。Flp-In-293细胞在6孔细胞培养板中培养,并用(i)含有具有精氨酸至TGA的PTC (R1407X)的小鼠SCN1A和在C端的3xFLAG标签肽(DYKDHD-G-DYKDHD-I-DYKDDDDK)的表达构建体(SEQ ID NO: 899) (“SCN1a(R1407*)”)以及(ii)指示浓度的Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18) (“Arg>TGA#115”)共转染。1x表示每孔400 ng的Arg_{TCA}抑制物tRNA构建体,0.3x表示每孔133 ng的Arg_{TCA}抑制物tRNA构建体,0.1x表示每孔40 ng的Arg_{TCA}抑制物tRNA构建体,0.03x表示每孔13 ng的Arg_{TCA}抑制物tRNA构建体。“SCN1a (w.t.)”表示用含有野生型小鼠SCN1A和在C端的3xFLAG标签肽的表达构建体(SEQ ID NO: 898)转染的细胞。在转染后24小时分离蛋白质,并使用单克隆抗FLAG M2抗体检测SCN1A。基于蛋白质分子量标志物的分子量表示在凝胶的左侧。图39B是图39A中所示的Western印迹的量化。使用ImageJ测量与全长SCN1A蛋白大小相对应的条带的强度,并将所有强度值归一化至野生型SCN1A蛋白(“SCN1a (w.t.)”泳道)。

[0121] 图40是包装到AAV-PHP.eB衣壳中的构建体的示意图。构建体262含有由EF1a启动子驱动的野生型EGFP。构建体269含有由EF1a启动子驱动的EGFP-R96X-TGA (SEQ ID NO:

177)和在来自tRNA-Tyr-GTA-5-1的55 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 900)的背景中的两个拷贝的Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18) ("TCA-115")。两种构建体均含有来自AAV2的5'和3' ITR序列,它们为AAV复制和包装提供顺式作用元件。

[0122] 图41描绘了由AAV递送的抑制物tRNA的通读活性。含有图40所示构建体的AAV-PHP.eB由Vigene Biosciences生产。在AAV转导前48小时,用含有LY6A基因的表达构建体预转染293个细胞,这是通过AAV-PHP.eB进行稳健转导所必需的。以1E5 vg/细胞的MOI转导细胞。在指出的情况下,还用含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)的表达构建体和含有Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18)的表达构建体转染细胞。在转导后72小时,通过免疫荧光量化EGFP信号。在EVOS FL Auto2成像系统上捕捉活细胞图像。使用CellProfiler软件以分割和提取每个图像中细胞核的累积(integrated)EGFP强度。对每种条件下所有细胞核的这些值取平均值。从这些平均值中减去来自阴性对照条件的背景平均累积EGFP强度,并将所有值归一化。该图描绘了归一化% GFP强度,所有值均归一化至用含有构建体262的AAV-PHP.eB转导的细胞。

[0123] 图42显示了通过流式细胞术测量的用于核糖体足迹谱分析的Neuro-2a细胞的荧光。用(i)含有在同一构建体上的EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 177)和Arg_{TCA}抑制物tRNA #001 (SEQ ID NO: 11)的表达构建体("Arg_{TCA}EGFP-PTC")或(ii)含有缺少PTC的EGFP报告基因型式的表达构建体("WT-EGFP")转染细胞。

[0124] 图43描绘了图42中所示的两种Neuro-2a细胞群之间的3' UTR读段密度分布(如通过核糖体谱分析测定)的倍数变化。用(i)在含有同一构建体上的EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 177)和Arg_{TCA}抑制物tRNA #001(SEQ ID NO: 11)的表达构建体("Arg_{TCA}EGFP-PTC")或(ii)含有缺少PTC的EGFP报告基因型式的表达构建体("WT-EGFP")转染细胞。在转染后约48小时裂解细胞并进行核糖体足迹谱分析。原始读段使用Trimmomatic修剪衔接物,然后通过使用bowtie2针对Ensembl的小鼠mm10 ncRNA参考对齐来消减非编码RNA。剩余的读段针对UCSC的mm10小鼠参考组件对齐,再次使用bowtie2。丢弃多定位读段。使用R中的RiboProfiling包和自定义Python脚本对生成的最终对齐读段集进行量化。使用Python以生成检查每个基因的3' UTR占有率和倍数变化的图,每个基因具有20个或更多独特的定位读段,并使用2样本Kolmogorov-Smirnov检验比较具有每个天然终止密码子的基因的分布。

发明详述

[0126] 本发明部分基于tRNA (例如,抑制性tRNA)的发现,其允许在否则将导致由基因中的提前终止密码子(PTC)引起的截短基因产物的位置处将氨基酸掺入哺乳动物细胞中的由该基因编码的基因产物中。本发明进一步部分基于tRNA可以用以治疗受试者由基因中的PTC介导的疾病的发现,所述tRNA允许在否则将导致由基因中的PTC引起的截短基因产物的位置处将氨基酸掺入由基因编码的基因产物中。

[0127] 因此,在一个方面,本发明提供了包含表2中所列核苷酸序列的tRNA (例如,分离的tRNA)。

[0128] 另一方面,本发明提供了包含编码tRNA(例如,如表1-3中所列)的核苷酸序列的表达载体。在某些实施方案中,表达载体包含1、2、3、4或多于4个拷贝数的编码tRNA的核苷酸序列。在某些实施方案中,表达载体包含对应于野生型tRNA基因侧翼的基因组DNA序列的核

苷酸序列。例如,在某些实施方案中,表达载体包含表4中所列的核苷酸序列。

[0129] 另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含任何上述tRNA或任何上述表达载体和药学上可接受的赋形剂。

[0130] 另一方面,本发明提供了在哺乳动物细胞中表达由含有提前终止密码子的基因编码的功能性基因产物的方法,该方法包括将有效量的tRNA (例如,如下表1-3中所示,例如,包含SEQ ID NO: 6-9、11、16-22、35-40、44、45、178-182、186或187),或包含编码tRNA的核苷酸序列的表达载体引入细胞中,从而允许在否则将导致由提前终止密码子引起的截短基因产物的位置处将氨基酸掺入基因产物中。

[0131] 在任何前述方法的某些实施方案中,细胞相比没有所述tRNA的细胞含有更少的截短基因产物。例如,在某些实施方案中,所述细胞含有相对于没有所述tRNA的细胞的小于约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%的截短基因产物。在某些实施方案中,细胞含有相对于没有所述tRNA的细胞的约5%至约80%、约5%至约60%、约5%至约40%、约5%至约20%、约5%至约10%、约10%至约80%、约10%至约60%、约10%至约40%、约10%至约20%、约20%至约80%、约20%至约60%、约20%至约40%、约40%至约80%、约40%至约60%或约60%至约80%的截短基因产物。在某些实施方案中,细胞中没有可检测到的截短基因产物。可以通过本领域已知的任何方法,例如Western印迹或ELISA测量截短基因产物的量或表达。

[0132] 在某些实施方案中,细胞相比没有所述tRNA的细胞含有更大量的功能性基因产物。例如,在某些实施方案中,相对于没有所述tRNA的细胞、组织或受试者,该方法将细胞、组织或受试者中功能性基因产物的量增加约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约110%、约120%、约130%、约140%、约150%、约160%、约170%、约180%、约190%、约200%、约250%、约300%、约350%、约400%、约450%或约500%。在某些实施方案中,相对于没有所述tRNA的细胞、组织或受试者,该方法将细胞、组织或受试者中功能性基因产物的量增加约20%至约200%、约20%至约180%、约20%至约160%、约20%至约140%、约20%至约120%、约20%至约100%、约20%至约80%、约20%至约60%、约20%至约40%、约40%至约200%、约40%至约180%、约40%至约160%、约40%至约140%、约40%至约120%、约40%至约100%、约40%至约80%、约40%至约60%、约60%至约200%、约60%至约180%、约60%至约160%、约60%至约140%、约60%至约120%、约60%至约100%、约60%至约80%、约80%至约200%、约80%至约180%、约80%至约160%、约80%至约140%、约80%至约120%、约80%至约100%、约100%至约200%、约100%至约180%、约100%至约160%、约100%至约140%、约100%至约120%、约120%至约200%、约120%至约180%、约120%至约160%、约120%至约140%、约140%至约200%、约140%至约180%、约140%至约160%、约160%至约200%、约160%至约180%或约180%至约200%。可以通过本领域已知的任何方法,例如Western印迹或ELISA测量功能基因产物的量或表达。

[0133] 在某些实施方案中,所述tRNA允许在对应于提前终止密码子的位置处将氨基酸掺入基因产物中(即,tRNA允许通读提前终止密码子),但tRNA不允许在对应于天然终止密码子的位置处将大量氨基酸掺入基因产物中(即,tRNA不允许通读天然终止密码子)。例如,在某些实施方案中,相对于尚未与所述tRNA接触的细胞、组织或受试者,所公开的tRNA不增加细胞、组织或受试者中天然终止密码子(或所有天然终止密码子)的通读,或增加通读小于约1%,约2%、约3%、约4%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。可以通过本领域已知的任何方法,例如,如本文实施例13中所述的核糖体谱分析来测量天然终止密码子的通读。

[0134] 在任何上述方法的某些实施方案中,基因选自表5或表6中列出的基因。在某些实施方案中,基因是SCN1A基因。

[0135] 在另一方面,本发明提供了在细胞中表达由含有提前终止密码子的SCN1A基因编码的功能性SCN1A基因产物的方法,该方法包括将有效量的tRNA (例如,如下表1-3所示,例如,包含SEQ ID NO: 6-9、11、16-22、35-40、44、45、178-182、186或187),或包含编码所述tRNA的核苷酸序列的表达载体引入细胞中,从而允许在否则将导致由提前终止密码子引起的截短的SCN1A基因产物的位置处将氨基酸掺入SCN1A基因产物中。

[0136] 在另一个方面,本发明提供了在细胞中增加由含有提前终止密码子的SCN1A基因编码的电压门控钠通道活性的方法,该方法包括将有效量的tRNA (例如,如下表1-3中所示,例如,包含SEQ ID NO: 6-9、11、16-22、35-40、44、45、178-182、186或187),或包含编码tRNA的核苷酸序列的表达载体引入细胞中,从而允许在否则将导致由提前终止密码子引起的截短的SCN1A基因产物的位置处将氨基酸掺入SCN1A基因产物中。

[0137] 在另一个方面,本发明提供了在有此需要的受试者中治疗提前终止密码子介导的病症的方法,其中该受试者具有包含提前终止密码子的基因,该方法包括向该受试者施用有效量的tRNA (例如,如下表1-3中所示,例如,包含SEQ ID NO: 6-9、11、16-22、35-40、44、45、178-182、186或187),或包含编码tRNA的核苷酸序列的表达载体,从而治疗受试者的病症。在某些实施方案中,该病症选自表5或表6中所列的病症。

[0138] 在另一个方面,本发明提供了在有此需要的受试者中治疗Dravet综合征的方法,其中该受试者具有包含提前终止密码子的SCN1A基因,该方法包括向该受试者施用有效量的tRNA (例如,如下表1-3中所示,例如,包含SEQ ID NO: 6-9、11、16-22、35-40、44、45、178-182、186或187),或包含编码tRNA的核苷酸序列的表达载体,从而治疗受试者的Dravet综合征。

[0139] I. tRNA和抑制物tRNA

[0140] 在蛋白质合成期间,转运RNA (tRNA)将氨基酸递送至核糖体以掺入正在增长的蛋白质(多肽)链中。tRNA的长度通常为约70到100个核苷酸,活性tRNA含有3' CCA序列,其可以在tRNA合成过程中被转录至tRNA中,或者可以在转录后加工过程中稍后被添加。在氨酰化过程中,与给定tRNA分子附接的氨基酸被共价附接到3'端核糖的2'或3'羟基上以形成氨酰-tRNA (aa-tRNA)。可以理解,氨基酸可以自发地从2'-羟基迁移到3'-羟基,反之亦然,但它从3'-OH位置在核糖体处被掺入正在增长的蛋白质链中。折叠的aa-tRNA分子另一端的环含有称为反密码子的三个碱基的序列。当该反密码子序列与核糖体结合的信使RNA (mRNA)中的互补三碱基密码子序列杂交或碱基配对时,aa-tRNA与核糖体结合,并且其氨基酸掺入到正在由核糖体合成的多肽链中。由于所有与特定密码子碱基配对的tRNA均被单个特定氨基酸氨酰化,因此遗传密码的翻译受tRNA影响。mRNA中的61个非终止密码子中的每一个均指导其同源(cognate)aa-tRNA的结合,并将单个特定氨基酸添加到正在由核糖体合成的增长的多肽链中。

[0141] tRNA通常高度保守并且通常跨物种发挥功能。因此,衍生自细菌tRNA、非哺乳动物真核tRNA或哺乳动物(例如人)tRNA的tRNA可以用于本发明的实践。编码天然存在的人tRNA的核苷酸序列是已知的并且本领域技术人员通常通过来源诸如Genbank可获得。也参见Sprinzl et al. (2005) Nucleic Acids Res. 33: D139-40; Buckland et al. (1996)

Genomics 35(1):164-71; Schimmel et al. (Eds.) (1979) “Transfer-RNA: Structure, Properties, and Recognition,” Cold Spring Harbor Laboratory; Agris (1983) ″The Modified Nucleosides of Transfer RNA, II,” Alan R. Liss Inc。tRNA通常高度保守,并且通常跨物种发挥功能。

[0142] 抑制物tRNA是经修饰的tRNA,其在蛋白质编码基因中的突变位点,例如PTC,插入合适的氨基酸。在抑制物中使用这个词是基于在某些情况下经修饰的tRNA“抑制”编码突变的表型效应的事实。抑制物tRNA通常在改变密码子特异性的反密码子中,或在改变tRNA氨酰化特性(identity)的某些位置处含有突变(修饰)。

[0143] 在某些实施方案中,tRNA (例如,抑制物tRNA)含有经修饰的反密码子区域,使得经修饰的反密码子相对于相应的天然存在的反密码子与不同的密码子杂交。在某些实施方案中,经修饰的反密码子与终止密码子例如PTC杂交,因此,tRNA将氨基酸掺入基因产物中而不是终止蛋白质合成。在某些实施方案中,经修饰的反密码子与提前终止密码子杂交,因此,tRNA在否则将导致由提前终止密码子引起的截短基因产物的位置处将氨基酸掺入基因产物中。

[0144] 在某些实施方案中,tRNA包括与选自UAG(即“amber”终止密码子)、UGA (即“opal”终止密码子)和UAA (即“ ochre”终止密码子)的密码子杂交的反密码子。在某些实施方案中,反密码子与选自UGA至UAA的密码子杂交。在某些实施方案中,反密码子与UGA杂交。在某些实施方案中,tRNA包含与非标准终止密码子杂交的反密码子,例如4核苷酸的密码子(参见,例如,Moore et al. (2000) J. Mol. Biol. 298:195, and Hohsaka et al. (1999) J. Am. Chem. Soc. 121:12194)。

[0145] 在某些实施方案中,tRNA经氨酰化或能够被任何天然氨基酸氨酰化。例如,tRNA可能能够被丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸氨酰化。在某些实施方案中,tRNA能够被丝氨酸、亮氨酸、谷氨酰胺或精氨酸氨酰化。在某些实施方案中,tRNA能够被谷氨酰胺或精氨酸氨酰化。在某些实施方案中,tRNA能够被精氨酸氨酰化。

[0146] 在某些实施方案中,tRNA (i)包含与表1中所示的密码子杂交的反密码子,并且(ii) 被如表1中所示的氨基酸氨酰化或能够被表1中所示的氨基酸氨酰化。

[0147] 表1

[0148]

密码子：UAG 氨基酸：丙氨酸	密码子：UGA 氨基酸：丙氨酸	密码子：UAA 氨基酸：丙氨酸
密码子：UAG 氨基酸：精氨酸	密码子：UGA 氨基酸：精氨酸	密码子：UAA 氨基酸：精氨酸
密码子：UAG 氨基酸：天冬酰胺	密码子：UGA 氨基酸：天冬酰胺	密码子：UAA 氨基酸：天冬酰胺
密码子：UAG 氨基酸：天冬氨酸	密码子：UGA 氨基酸：天冬氨酸	密码子：UAA 氨基酸：天冬氨酸
密码子：UAG 氨基酸：半胱氨酸	密码子：UGA 氨基酸：半胱氨酸	密码子：UAA 氨基酸：半胱氨酸
密码子：UAG 氨基酸：谷氨酰胺	密码子：UGA 氨基酸：谷氨酰胺	密码子：UAA 氨基酸：谷氨酰胺
密码子：UAG 氨基酸：谷氨酸	密码子：UGA 氨基酸：谷氨酸	密码子：UAA 氨基酸：谷氨酸
密码子：UAG 氨基酸：甘氨酸	密码子：UGA 氨基酸：甘氨酸	密码子：UAA 氨基酸：甘氨酸
密码子：UAG 氨基酸：组氨酸	密码子：UGA 氨基酸：组氨酸	密码子：UAA 氨基酸：组氨酸
密码子：UAG 氨基酸：异亮氨酸	密码子：UGA 氨基酸：异亮氨酸	密码子：UAA 氨基酸：异亮氨酸
密码子：UAG 氨基酸：亮氨酸	密码子：UGA 氨基酸：亮氨酸	密码子：UAA 氨基酸：亮氨酸

[0149]

密码子：UAG 氨基酸：赖氨酸	密码子：UGA 氨基酸：赖氨酸	密码子：UAA 氨基酸：赖氨酸
密码子：UAG 氨基酸：甲硫氨酸	密码子：UGA 氨基酸：甲硫氨酸	密码子：UAA 氨基酸：甲硫氨酸
密码子：UAG 氨基酸：苯丙氨酸	密码子：UGA 氨基酸：苯丙氨酸	密码子：UAA 氨基酸：苯丙氨酸
密码子：UAG 氨基酸：脯氨酸	密码子：UGA 氨基酸：脯氨酸	密码子：UAA 氨基酸：脯氨酸
密码子：UAG 氨基酸：丝氨酸	密码子：UGA 氨基酸：丝氨酸	密码子：UAA 氨基酸：丝氨酸
密码子：UAG 氨基酸：苏氨酸	密码子：UGA 氨基酸：苏氨酸	密码子：UAA 氨基酸：苏氨酸
密码子：UAG 氨基酸：色氨酸	密码子：UGA 氨基酸：色氨酸	密码子：UAA 氨基酸：色氨酸
密码子：UAG 氨基酸：酪氨酸	密码子：UGA 氨基酸：酪氨酸	密码子：UAA 氨基酸：酪氨酸
密码子：UAG 氨基酸：缬氨酸	密码子：UGA 氨基酸：缬氨酸	密码子：UAA 氨基酸：缬氨酸

[0150] 在某些实施方案中,tRNA包含表2所示的核苷酸序列、基本上由表2所示的核苷酸序列组成或由表2所示的核苷酸序列组成。在某些实施方案中,tRNA包含与表2中所示的核苷酸序列具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含选自SEQ ID NO: 19-21、37、39、40、44、179、181、182和186的核苷酸序列或与选自SEQ ID NO: 19-21、37、39、40、44、179、181、182和186的核苷酸序列具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。应理解,在整篇描述中,在tRNA包含包括一个或多个胸腺嘧啶(T)的核苷酸序

列、基本上由其组成或由其组成的每种情况下,还考虑tRNA包含包括代替胸腺嘧啶(T) 中的一个或多个的尿嘧啶(U),或代替所有胸腺嘧啶(T)的尿嘧啶(U)的相同核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。类似地,在tRNA包含包括一个或多个尿嘧啶(U)的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成的每种情况下,也考虑tRNA包含包括代替尿嘧啶(U)中的一个或多个的胸腺嘧啶(T),或代替所有尿嘧啶(U)的胸腺嘧啶(T)的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0151] 表2

[0152]

SEQ ID NO	抑制物 tRNA 序列(反密码子小写)
2	GGGCCAGTGGCGCAATGGATAACGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGATTGTAGGTTCGACTCCTACCTGGCTCG
5	GGCCGCGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGATTtcaGATCAGAAGATTGGGGGTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG
14	GACCACGTGGCCTAACGGATAAGGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGATTGAGGGTTCGAATCCCTTCGTGGTTA
15	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAGTGACGAGAAAGCGATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAATCCCACCAGAGTCG
19	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAGCATGATTGAGAGATTCAAAGGTTGCGGGTTCGAGTCCCGCCAGAGTCG
20	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGGTTGCGGGTTCGAGTCCCGCCAGAGTCG
21	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAGACAAATGGAGGCATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG
23	GTCTCTGTGGCGCAATGGACGAGCGCGCTGGACTtcaAATCCAGAGGTTCTGGGTTCGAGTCCCGGCAGAGATG
24	GGCTCTGTGGAGCAATGGATAGCACATTGGACTtcaAGCATGACCGAGAGATTCAAAGGTTGCGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTTG
25	GGCTCTGTGGAGCAATGGATAGCACATTGGACTtcaAATTCAAAGGTTGCGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTTG
37	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
39	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGAACCT
40	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
41	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT

[0153]

42	GGTTCCATGGTGTAATGGCTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGATTT
43	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCCATACAAGTTCAAATCTCAGTGGAACCT
44	GGTTCCTTGGTGTAAGATGAGCACTCTGGATTttaAATCCAGCGATCAGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
46	GGCCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
47	GGTCTCATGGTGTAATGGTTAGCACACTGGACTttaAGTCCAGCAATCCGAGTTCGAGTCTTGGTGAGACCA
48	GGACCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCAATCCAAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
49	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTctaGCTATGGCTTCCTCGCTCTGAGGGTTCTGGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
50	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTctaGCTTAGCTTCCCTGTCTGGGGATTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
51	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTctaGGTGACAAGCCTTACCTACGGGTGTTCTGGTCTCCGAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
52	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTctaGCGTTCGCTTCCTCTACTGAGGGTTCTGGTCTCCGTGTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
53	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTtcaGCTATGGCTTCCTCGCTCTGAGGGTTCTGGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA

[0154]

54	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTtcaGCTTAGCTTCCCTGTCTGGGGATTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
55	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTtcaGGTGACAAGCCTTACCTACGGGTGTTCTGGTCTCCGAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
56	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTtcaGCGTTCGCTTCCTCTACTGAGGGTTCTGGTCTCCGTGTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
57	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTttaGCTATGGCTTCCTCGCTCTGAGGGTTCTGGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
58	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTttaGCTTAGCTTCCCTGTCTGGGGATTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
59	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTttaGGTGACAAGCCTTACCTACGGGTGTTCTGGTCTCCGAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
60	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTttaGCGTTCGCTTCCTCTACTGAGGGTTCTGGTCTCCGTGTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
61	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGAGTTACTAGAATAGTGATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
62	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGTCAGTACAATATGGTAATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
63	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGGCTTGTGGCTGTGGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
64	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGCTAACTCCCCGTTAGAAGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGACTCCGGCTCGAAGGA

[0155]

65	CTTTCGATAGTTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGAGTATTAACGTTGGTGATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAGTCCGGCTCGAAGGA
66	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGAGTTACTAGAATAGTGATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
67	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGTCAGTACAATATGGTAATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
68	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGGCTTGTGGCTGTGGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
69	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGCTAACTCCCCGTTAGAAGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGACTCCGGCTCGAAGGA
70	CTTTCGATAGTTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGAGTATTAACGTTGGTGATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAGTCCGGCTCGAAGGA
71	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
72	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGATGCCCCCT
73	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGTATTTGGCTtcaGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
74	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCTTGGTTCAAATCCAGGTGTCCCCT
75	GGGGGTATAGCTCAGAGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGATCTCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
76	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTAGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
77	GGTGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGATCCCTGGTTCGAATCCAGGTGCCCCCT
78	GGGGGTATAACTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT

[0156]

79	TGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCC TGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
80	GGGGGTATAGCTCAGAGGAAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCC TGATTCAAATCCAGGTGCCCCCT
81	GGGGGTAAAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATTAAGAGGTCCC TGGTTCAAATCCAGGTACCCCCT
83	GGGGTTATAGCTCAGGTGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCC TGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
84	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCACGAGGTCCC TGGTTCAAATCGAGGTGCCCCCT
85	GGGGGTATAGCTCAGGGGTGGAGCATTTGACTtcaGATCAAGGGGTCCC TGTTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
86	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCC CGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT
88	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCC TGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT
89	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCC TGGTTCAAATCCAGGTACCCCCT
91	GGGGGCATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCC CGGTTCAAATCCGGGTGCTCCCT
92	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATTAAGAGGTCCC TGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
94	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTTGGCGCTctaACCGCCGCGGCCT GGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA
95	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGCTTTGGTGCTctaACCTCCATGGCCC AGGTTTGATTCCTGGTCAGGGAA
97	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTTGGCGCTttaACCGCCGCGGCCT GGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA

[0157]

98	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGCTTTGGTGCTttaACCTCCATGGCCCAGGTTTGATTCCTGGTCAGGGAA
100	TCCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTctaACCCAGGCGGCCCGGGTTCGACTCCCGGTATGGGAA
103	TCCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTttaACCCAGGCGGCCCGGGTTCGACTCCCGGTATGGGAA
105	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTAGCGCGTTCGCCTtcaAAAGCGAAAGGTCCCCGGTTCGAAACCGGGCGGAAACA
107	GCATTGGTAGTTCAATGGTAGAATTCTCGCCTtcaACGCGGGTGACCCGGGTTCGATTCCCGGCCAATGCA
108	GCATTGGTGGTTCAATGGTAGAATTCTCGCCTtcaACGCGGGTGACCCGGGTTCGATTCCCGGCCAATGCA
109	GCATTGGTGGTTCAATGGTAGAATTCTCGCCTtcaACTCGGGTGACCCGGGTTCGATTCCCGGCCAATGCA
112	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTtcaACGCGGGAGGCCCGGGTTTGATTCCCGGCCAATGCA
113	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTtcaACGCGGGAGGCCCGGGTTCGGTTCCCGGCCAATGCA
115	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
116	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
118	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTtcaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
119	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTtcaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
121	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA

[0158]

122	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
124	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
126	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCGAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
127	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCGTGTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
128	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTtcaGTTCTGGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
130	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTtcaGTTCTGGTCTCCGAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
131	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTtcaGTTCTGGTCTCCGTGTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
132	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
134	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCGAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
135	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCGTGTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
136	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGCGTTctaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCCTGACA
137	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGCGTTctaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
138	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGAGCTGTGTTctaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCCTGACA
139	GTCAGGATGGCCGAGCAGTCTAAGGCACTGCGTTctaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGATTCGAATCCCACTCCTGACA

[0159]

140	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGCGTTTcaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCCTGACA
141	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGCGTTTcaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
142	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGAGCTGTGTTTcaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCCTGACA
143	GTCAGGATGGCCGAGCAGTCTAAGGCACTGCGTTTcaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGATTCGAATCCCACTCCTGACA
144	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGCGTTTtaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCCTGACA
145	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGCGTTTtaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
146	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGAGCTGTGTTTtaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCCTGACA
147	GTCAGGATGGCCGAGCAGTCTAAGGCACTGCGTTTtaGTCGCAGTCTCCCCTGGAGGCGTGGATTCGAATCCCACTCCTGACA
148	ACCAGAATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTctaGATCCAATGGATTTATATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTCTGGTA
149	ACCAGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTctaGATCCAATGGACATATGTCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCTGGTA
150	ACTGGGATGGCTGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTctaGATCCAATGGGCGGTTGCCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCCAGTA
151	GATGGGATGGCTGAGAGGTTAAGGCTTTGGACTctaGATCCAATGGGCAGATGCCTGCGTGGGTTTGAACCCCACTCCCAATA
152	ACCAGAATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTtcaGATCCAATGGATTTATATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTCTGGTA
153	ACCAGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTtcaGATCCAATGGACATATGTCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCTGGTA

[0160]

154	ACTGGGATGGCTGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTtcaGATCCAATGGGCGGTTGCCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCCAGTA
155	GATGGGATGGCTGAGAGGTTAAGGCTTTGGACTtcaGATCCAATGGGCAGATGCCTGCGTGGGTTTGAACCCCACTCCCAATA
156	ACCAGAATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTttaGATCCAATGGATTTATATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTCTGGTA
157	ACCAGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTttaGATCCAATGGACATATGTCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCTGGTA
158	ACTGGGATGGCTGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTttaGATCCAATGGGCGGTTGCCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCCAGTA
159	GATGGGATGGCTGAGAGGTTAAGGCTTTGGACTttaGATCCAATGGGCAGATGCCTGCGTGGGTTTGAACCCCACTCCCAATA
161	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA
164	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTtcaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA
167	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA
169	GCCCAGCTAGCTCAGTTGGTAGAGCGTGGGACTctaAATCCTAGGGTCGTGGGTTCGAACCCCACGTTGGGCG
170	GCCCAGCTAGCTCAGTCTGTAGAGCATGAGACTctaAGTCTCAGGGTCATGGGTTGGAGCCCCATGTTGTGCA
171	GCCTAGCTAGTTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTctaAATCTCAGGTTCATGAGTTTGAGCCCCATGTTGGTTTGGCA
172	CCCCGGCTAGCTCAGTCAGTAGAGCTTGAGAATctaAATCTCAGGGTCGTGGGTTGGAGCCCCACGTTGGGCG
179	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGACCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT

[0161]

181	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGATCC GAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
182	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGATCC GAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
183	GGTTCCATGGTGTAATGGCTAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGATCC GAGTTCAAATCTCGGTGGGATTT
184	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCCATAC AAGTTCAAATCTCAGTGGAACCT
185	GGTTCCTTGGTGTAAGATGAGCACTCTGGATTctaAATCCAGCGATCAG AGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
186	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCAATCT GAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
188	GGTCTCATGGTGTAATGGTTAGCACACTGGACTctaAGTCCAGCAATCC GAGTTCGAGTCTTGGTGAGACCA
189	GGACCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCAATCC AAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
190	GTTTCCATGGTGTAATGGTTGGCACTCTGGACTctaAATCCAGCAATCC AAGTTCAAGTCTCTGTGGGACCT
196	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTctaAATCCCAGGGTCG TGGGTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
197	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTctaAATCTCAGGGTCG TGGGTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
198	GCCCAGCTAGCTCAGTCTGTAGAGCATGAGACTctaAATCTCAGGGTCG TGAGTTCGAGCCCCACGTTGGGTG
199	GCCCAGATAGCTCAGTGGGTAGAGCATGAGACTctaAATCTCAGGGTCA TGGGTTCATGCCCCATGTTGGGTA
200	GTCCTGCTGGCTCAGTCGGTACAGCATGGGACTctaAATCCCAGGGTCG TGGGTTCGAGCTCCACGTTGGGTA

[0162]

201	GCCTGGCTAGCTCAGTCCATAGAGCATGGGACTctaAATCCCAGGGTCATGGGTTCGAGCCCCATATTAGGCA
202	GCCCAGCTAGCTTAGTTGGTAGAGCATGAGACTctaAATCTCAGAGTCATGGGTTCAGGCCTCATGTTTGGCA
203	AACCTGGCTAGGTCAGTTGGTAGATCATGAGACTctaAATCTCAGGGTCATGGGTTCAAGCCCCATGTTGGTTT
204	GCCCAGCTAGCTCAGTTGGTAGAGCGTGGGACTttaAATCCTAGGGTCGTGGGTTCGAACCCCACGTTGGGCG
205	GCCCAGCTAGCTCAGTCTGTAGAGCATGAGACTttaAGTCTCAGGGTCATGGGTTGGAGCCCCATGTTGTGCA
206	GCCTAGCTAGTTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTttaAATCTCAGGTTCATGAGTTTGAGCCCCATGTTGGTTTGGCA
207	CCCCGGCTAGCTCAGTCAGTAGAGCTTGAGAATttaAATCTCAGGGTCGTGGGTTGGAGCCCCACGTTGGGCG
208	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTttaAATCCCAGGGTCGTGGGTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
209	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTttaAATCTCAGGGTCGTGGGTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
210	GCCCAGCTAGCTCAGTCTGTAGAGCATGAGACTttaAATCTCAGGGTCGTGAGTTCGAGCCCCACGTTGGGTG
211	GCCCAGATAGCTCAGTGGGTAGAGCATGAGACTttaAATCTCAGGGTCATGGGTTCATGCCCCATGTTGGGTA
212	GTCCTGCTGGCTCAGTCGGTACAGCATGGGACTttaAATCCCAGGGTCGTGGGTTCGAGCTCCACGTTGGGTA
213	GCCTGGCTAGCTCAGTCCATAGAGCATGGGACTttaAATCCCAGGGTCATGGGTTCGAGCCCCATATTAGGCA
214	GCCCAGCTAGCTTAGTTGGTAGAGCATGAGACTttaAATCTCAGAGTCATGGGTTCAGGCCTCATGTTTGGCA

[0163]

215	AACCTGGCTAGGTCAGTTGGTAGATCATGAGACTttaAATCTCAGGGTCATGGGTTCAAGCCCCATGTTGGTTT
216	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCGGGCG
218	GCCTGGATAGCTCAATTGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGGTTCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG
219	GCCCAGCCAGCTCAGTAGGTAGAGTATGAGACTctaAATCTCAGGGTGGTGGGTTCGAGCCCCATGTTGGGGG
220	TGTGGTGTAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAGGTCCCTGTTCGGGTGCCAAAA
221	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCGGGCG
223	GCCTGGATAGCTCAATTGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGGTTCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG
224	GCCCAGCCAGCTCAGTAGGTAGAGTATGAGACTttaAATCTCAGGGTGGTGGGTTCGAGCCCCATGTTGGGGG
225	TGTGGTGTAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAGGTCCCTGTTCGGGTGCCAAAA
228	GTAGTCGTGGCCAAGTGAGTAAGGCAATGGACTctaAATCCATTGGGGTCTCCCAGCACAGGTTCAAATCCTGCTGACTATG
231	GTAGTCGTGGCCAAGTGAGTAAGGCAATGGACTtcaAATCCATTGGGGTCTCCCAGCACAGGTTCAAATCCTGCTGACTATG
234	GTAGTCGTGGCCAAGTGAGTAAGGCAATGGACTttaAATCCATTGGGGTCTCCCAGCACAGGTTCAAATCCTGCTGACTATG
237	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTctaAATCCAATGGGTTCTTCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG
240	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTtcaAATCCAATGGGTTCTTCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG

[0164]

243	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTttaAATCCAATGGGTTCTTCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG
245	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGTGCTCTGCACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
246	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGTGCTTTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
247	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
248	GATGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGTGCTCTGCACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTCATCG
250	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGTGCTCTGCACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
251	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGTGCTTTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
252	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
253	GATGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGTGCTCTGCACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTCATCG
255	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGTGCTCTGCACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
256	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGTGCTTTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
257	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
258	GATGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGTGCTCTGCACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTCATCG
259	GCTGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCATTAGACTctaGATCTAAAGGTCCCTGGTTTGATCCCGGGTTTCGGCA

[0165]

260	GCTGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCATTAGACTtcaGATCTAAAGGTCC CTGGTTTGATCCCGGGTTTCGGCA
261	GCTGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCATTAGACTttaGATCTAAAGGTCC CTGGTTTGATCCCGGGTTTCGGCA
265	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGTTGC GTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
270	GACCTCGTGGCACAATGGTAGCACGTCTGACTctaGATCAGAAGGTTGC GTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
280	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGGTCG CTGGTTCGACTCCGGCTCGAAGGA
281	CTTTCGATAGTTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGGTCG CTGGTTCGAGTCCGGCTCGAAGGA
285	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGTCG CTGGTTCGACTCCGGCTCGAAGGA
286	CTTTCGATAGTTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGTCG CTGGTTCGAGTCCGGCTCGAAGGA

[0166] 在某些实施方案中,tRNA包含表3所示的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含与表3中所示的核苷酸序列具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列或与选自6-9、11、16-18、22、35、36、38、45、178、180和187的核苷酸序列具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0167] 表3

[0168]

SEQ ID NO	抑制物 tRNA 序列
1	GGGCCAGTGGCGCAATGGATAACGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGATTCCAG GTTCGACTCCTGGCTGGCTCG
3	GGGCCAGTGGCGCAATGGATAACGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGATTCTAG GTTCGACTCCTGGCTGGCTCG
4	GGCCGCGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGATTtcaGATCAGAAGATTGAGG GTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG
6	GACCCAGTGGCCTAATGGATAAGGCATCAGCCTtcaGAGCTGGGGATTGTGG GTTCGAGTCCCATCTGGGTCG
7	GCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGGCACTGGCCTtcaAAGCCAGGGATTGTGG GTTCGAGTCCCACCTGGGGTA
8	GCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGGCACTGGCCTtcaAAGCCAGGGATTGTGG GTTCGAGTCCCACCTGGGGTG
9	GCCCCGGTGGCCTAATGGATAAGGCATTGGCCTtcaAAGCCAGGGATTGTGG GTTCGAGTCCCACCCGGGGTA
10	GCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGGCATTGGCCTtcaAAGCCAGGGATTGTGG GTTCGAGTCCCATCTGGGGTG
11	GGCCGCGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGATTGCAG GTTCGAGTCCTGCCGCGGTCG
12	GACCGCGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGATTGAGG GTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG
13	GACCACGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGATTGAGG GTTCGAATCCCTTCGTGGTTG
16	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGGTTGTGG GTTCGAATCCCACCAGAGTCG
17	GGCTCCGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAGAGGCTGAAGGCATT CAAAGGTTCCGGGTTCGAGTCCCGGCGGAGTCG
18	GGCTCCGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGGTTCCGG GTTCGAGTCCCGGCGGAGTCG

[0169]

22	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGGTTGTGG GTTCGAGTCCCACCAGAGTCG
35	GTCTCTGTGGCGCAATGGACGAGCGCGCTGGACTtcaAATCCAGAGGTTCCG GGTTCGAGTCCCGGCAGAGATG
36	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGGACCT
38	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGAACCT
45	GGCCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGGACCT
178	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGGACCT
180	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGAACCT
187	GGCCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGGACCT
287	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGGG TTCAAATCCCGTCGGGGTCA
288	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTACGGG TTCAAATCCCGTCGGGGTCA
289	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTCCGGG TTCAAATCCCGGCGGGGTCA
290	CGTCGGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAATTCAAAGGTT GTGGGTTCGAGTCCCAGAGTCG
291	CGTCGCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGGCACTGGCCTTCAAAGCCAGGGATT GTGGGTTCGAGTCCCACCTGGGGTG
292	CGTCGGCTCCGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAATTCAAAGGTT CCGGGTTCGAGTCCCGGCGGAGTCG

[0170]

293	CGTCGCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGGCATTGGCCTTCAAAGCCAGGGATTGTGGGTTCGAGTCCCATCTGGGGTG
294	CGTCGGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAATCCCACCAGAGTCG
295	CGTCGGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAGCTGAGCCTAGTGTGGTCATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG
296	CGTCGCCCCGGTGGCCTAATGGATAAGGCATTGGCCTTCAAAGCCAGGGATTGTGGGTTCGAGTCCCACCCGGGGTA
297	CGTCGGCTCCGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAGAGGCTGAAGGCATTCAAAGGTTCCGGGTTCGAGTCCCGGCGGAGTCG
298	CGTCGGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAGTGACGAATAGAGCAATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAATCCCACCAGAGTCG
299	CGTCGGCCGCGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGATTGCAGGTTCGAGTCCTGCCGCGGTCG
300	CGTCGACCGCGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGATTGAGGGTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG
301	CGTCGGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAGATAGTTAGAGAAATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG
302	CGTCGGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAGTTCGAGTCTCGGTGGAACCT
303	CGTCGGCCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
304	CGTCGGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCAATCCGAGTTCGAATCTCGGTGGGACCT
305	CGTCGGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
306	CGTCGGCCCCATGGTGTAATGGTCAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCC

[0171]

307	CGTCGGTTCCATGGTGTAATGGTAAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATC CGAGTTCGAGTCTCGGTGGAACCT
308	CGTCGGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCGGTAATC CGAGTTCAAATCTCGGTGGAACCT
309	CGTCGGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATC CGAGTTCAAGTCTCGGTGGAACCT
310	CGTCGGTTCCATGGTGTAATGGTAAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATC CGAGTTCGAGTCTCGGTGGAACCT
311	CGTCGGCCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATC CGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
312	CGTCGGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATC CGAGTTCGAGTCTCGGTGGAACCT
313	CGTCGGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATC CGAGTTCAAATCTCGGTGGAACCT
314	CGTCGGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATC CGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
315	CGTCGGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCAATC CGAGTTCGAATCTCGGTGGGACCT
316	CGTCGGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCGGTAATC CGAGTTCAAATCTCGGTGGAACCT
317	CGTCGGCCCCATGGTGTAATGGTCAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATC CGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCC
318	CGTCGGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATC CGAGTTCAAGTCTCGGTGGAACCT
319	CGTCGACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTCTAGATCAGAAGGTTG CGTGTTCAAGTCACGTCGGGGTCA
320	CGTCGACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTCTAGATCAGAAGGTTG CGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA

[0172]

321	CGTCGGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTCTAGATCAGAAGGTTG CGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
322	CGTCGACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTCTAGATCAGAAGGCTG CGTGTTCGAATCACGTCGGGGTCA
323	CGTCGACCTCGTGGCGCAACGGCAGCGCGTCTGACTCTAGATCAGAAGGTTG CGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
324	CGTCTCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTCTAACCCAGGCGGCC CGGGTTCGACTCCCGGTGTGGGAA
325	CGTCTCCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTCTAACCCAGGTGGCC CGGGTTCGACTCCCGGTATGGGAA
326	CGTCTCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCGCGGCC CGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA
327	CGTCTCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCGCGGCC CGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA
328	CGTCTCCCTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCGCGGCCCGG GTTCGATTCCCGGCCAGGGAA
329	CGTCTCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTCTAACCCAGGCGGCC CGGGTTCGACTCCCGGTGTGGGAA
330	CGTCTCCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTCTAACCCAGGTGGCC CGGGTTCGACTCCCGGTATGGGAA
331	CGTCTCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCGCGGCC CGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA
332	CGTCTCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCGCGGCC CGGGTTCGATTCCCGGTCAGGAAA
333	CGTCTCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCGCGGCC CGGGTTCGATTCCCGGCCAGGGAA
334	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA

[0173]

335	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAGTCACGTCGGGGTCA
336	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
337	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGCTGCGTG TTCGAATCACGTCGGGGTCA
338	GACCTCGTGGCGCAACGGCAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
339	GCGTTGGTGGTATAGTGGTTAGCATAGCTGCCTTCAAAGCAGTTGACCCGGG TTCGATTCCCGGCCAACGCA
340	GCGTTGGTGGTATAGTGGTGAGCATAGCTGCCTTCAAAGCAGTTGACCCGGG TTCGATTCCCGGCCAACGCA
341	GCGTTGGTGGTATAGTGGTAAGCATAGCTGCCTTCAAAGCAGTTGACCCGGG TTCGATTCCCGGCCAACGCA
342	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
343	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAGTCACGTCGGGGTCA
344	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
345	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGCTGCGTG TTCGAATCACGTCGGGGTCA
346	GACCTCGTGGCGCAACGGCAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
347	GGCCTCATGGTGCAACAGTAGTGTGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGTATG TTCAAATCACGTAGGGGTCA
348	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTCTAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA

[0174]

349	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTCTAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAGTCACGTCGGGGTCA
350	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTCTAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
351	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTCTAGATCAGAAGGCTGCGTG TTCGAATCACGTCGGGGTCA
352	GACCTCGTGGCGCAACGGCAGCGCGTCTGACTCTAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
353	GGCCTCATGGTGCAACAGTAGTGTGTCTGACTCTAGATCAGAAGGTTGTATG TTCAAATCACGTAGGGGTCA
354	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTTCAACGCGGGAGACCCGGGT TCAATTCCCGGCCAATGCA
355	GCGCCGCTGGTGTAGTGGTATCATGCAAGATTTCAATTCTTGCGACCCGGGT TCGATTCCCGGGCGGCGCA
356	GCATTGGTGGTTCAATGGTAGAATTCTCGCCTTCAACGCAGGAGACCCAGGT TCGATTCCTGGCCAATGCA
357	GCGTTGGTGGTTTAGTGGTAGAATTCTCGCCTTCAATGCGGGAGACCCGGGT TCAATTCCCGGCCACTGCA
358	GCCTTGGTGGTGCAGTGGTAGAATTCTCGCCTTCAACGTGGGAGACCCGGGT TCAATTCCCGGCCAATGCA
359	GGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTTCAACGCGGGAGACCCGGGTTTAAT TCCCGGTCA
360	GTGGTCTAGTGGTTAGGATTCAGCGCTTCAACCGCCGCAGCCCGGGTTCGAT TCCCGGTCA
361	GCGTCAGTGGTTTAGTGGTGGAATTCCTGCCTTCAATGCACGAGATCCGTGT TCAACTCCTGGTTGGTGCA
362	GCGTCAGTGGTTTTAGTGGTGGAATTCCTGCCTTCAATGCACGAGATCCGTG TTCAACTCCTGGTTGGTGCA

[0175]

363	GCGTTGGCAGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTTCAACCCGGGAGACCTGGATTCCATTTCCGGCAAATGCA
364	GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTTCAACGCGGGAGGCCCGGGTTCGATTCCCGGCCCATGCA
365	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTTCAACGCGGGAGGCCCGGGTTCGATTCCCGGCCAATGCA
366	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTTCAACGCGGGAGGCCCGGGTTTGATTCCCGGCCAGTGCA
367	GCATAGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTTGCCTTCAACGCAGGAGGCCCAGGTTTGATTCCTGGCCCATGCA
368	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTTCAATGCGGGCGGCCGGGCTTCGATTCCTGGCCAATGCA
369	GCATGGGTGATTCAGTGGTAGAATTTTCACCTTCAATGCAGGAGGTCCAGGTTCATTTCCTGGCCTATGCA
370	GCGTTGGTGGTATAGTGGTTAGCATAGCTGCCTTCAAAGCAGTTGACCCGGGTTCGATTCCCGGCCAACGCA
371	GCGTTGGTGGTATAGTGGTGAGCATAGCTGCCTTCAAAGCAGTTGACCCGGGTTCGATTCCCGGCCAACGCA
372	GCGTTGGTGGTATAGTGGTAAGCATAGCTGCCTTCAAAGCAGTTGACCCGGGTTCGATTCCCGGCCAACGCA
373	GCGTTGGTGGTATAGTGGTGAGCATAGTTGCCTTCAAAGCAGTTGACCCGGGCTCGATTCCCGCCCAACGCA
374	GCGTTGGTGGTATAGTGGTGAGCATAGTTGCCTTCAAAGCAGTTGACCCGGGCTCGATTCCCGGCCAACGCA
375	GGGCCAGTGGCGCAATGGATAACGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGATTCCAGGTTCGACTCCTGGCTGGCTCG
376	GGGCCAGTGGCGCAATGGATAACGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGATTCTAGGTTCGACTCCTGGCTGGCTCG

[0176]

377	GGCCGCGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGATTTCAGATCAGAAGATTGAGG GTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG
378	GACCCAGTGGCCTAATGGATAAGGCATCAGCCTTCAGAGCTGGGGATTGTGG GTTCGAGTCCCATCTGGGTCG
379	GCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGGCACTGGCCTTCAAAGCCAGGGATTGTGG GTTCGAGTCCCACCTGGGGTA
380	GCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGGCACTGGCCTTCAAAGCCAGGGATTGTGG GTTCGAGTCCCACCTGGGGTG
381	GCCCCGGTGGCCTAATGGATAAGGCATTGGCCTTCAAAGCCAGGGATTGTGG GTTCGAGTCCCACCCGGGGTA
382	GCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGGCATTGGCCTTCAAAGCCAGGGATTGTGG GTTCGAGTCCCATCTGGGGTG
383	GCCCCAGTGGCCTGATGGATAAGGTACTGGCCTTCAAAGCCAGGGATTGTGG GTTCGAGTTCCACCTGGGGTA
384	GGCCGCGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGATTGCAG GTTCGAGTCCTGCCGCGGTCG
385	GACCACGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGATTGAGG GTTCGAATCCCTCCGTGGTTA
386	GACCGCGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGATTGAGG GTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG
387	GACCACGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGATTGAGG GTTCGAATCCCTTCGTGGTTA
388	GACCACGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGATTGAGG GTTCGAATCCCTTCGTGGTTG
389	GGCCGTGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACTTCAGATCAAAAGATTGCAG GTTTGAGTTCTGCCACGGTCG
390	GGCTCCGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAGAGGCTGAAGGCATT CAAAGGTTCCGGGTTCGAGTCCCGGCGGAGTCG

[0177]

391	GGCTCCGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAATTCAAAGGTTCCGGGTTCGAGTCCCGGCGGAGTCG
392	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAGTGACGAATAGAGCAATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAATCCCACCAGAGTCG
393	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAATCCCACCAGAGTCG
394	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAGCTGAGCCTAGTGTGGTCATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG
395	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG
396	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAGATAGTTAGAGAAATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG
397	GTCTCTGTGGCGCAATGGACGAGCGCGCTGGACTTCAAATCCAGAGGTTCCGGGTTCGAGTCCCGGCAGAGATG
398	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAGCCTAAATCAAGAGATTCAAAGGTTGCGGGTTCGAGTCCCTCCAGAGTCG
399	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTTCAAATTCAAAGGTTGCGGGTTCGAGTCCCTCCAGAGTCG
400	GGCAGCATAGCAGAGTGGTTCAGGTTACAGGTTCAAGATGTAAACTGAGTTCAAATCCCAGTTCTGCCA
401	TGGTGTAATAGGTAGCACAGAGAATTCTAGATTCTCAGGGGTAGGTTCAATTCCTAT
402	TAGGACATGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTCTAGATTCTCAGGGGTAGGTTCAATTCCTACAGTTCTAG
403	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCATGGGGAATTCTAGATTCTCAGGGGTGGGTTCAATTCCTATAGTTCTAG
404	TAGGACGTGGTGTAGTAGGTAGCATGGAGAATGCTAAATTCTCAGGGGTAGGTTCAATTCCTATAGTTCTAG

[0178]

405	TAGGACATGGTGTAATAGGTAGAATGGAGAATTCTAAATTCTCAGGGGTAGG TTCAATTCCTATAGTTCTAG
406	TAGGATGTGGTGTATTAGGTAGCACAGAGAATTCTAGATTCTCAGGGGTAGG TTCGATTCCTATAATTCTAC
407	TAGGACTTGGTGTAATGGGTAGCACAGAGAATTCTAGATTCTCAGGGGTGGG TTCAATTCCTTTCGTCCTAG
408	TCTAGGATGTGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTCTAGATTCTCAGGGGTA GGTTCAATTCCTATATTCTAGAA
409	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTCTAGATTCTCAGGGATGGG TTCAATTCCTATAGTCCTAG
410	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCACGGAGAATTCTAGATTCTCAGGGATGGG TTCAATTCCTGTAGTTCTAG
411	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGAACCT
412	GGTTCCATGGTGTAATGGTGACCACTTTGGACTCTAAATACAGTGATCAGAG TTCAAGTCTCACTGGAACCT
413	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGGGCTTTGGACTCTAACTACAGTGATCAGAG TTCAAGTCTCAGTGGGACCT
414	GGTTCCATGGTGTAATGGTAAGCACCCTGGACTCTAAATCCAGCAACCAGAG TTCCAGTCTCAGCGTGGACCT
415	GGTAGTGTAGTCTACTGGTTAAACGCTTGGGCTCTAACATTAACGTCCTGGG TTCAAATCCCAGCTTTGTCA
416	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAG TTCAAGTCTCGGTGGAACCT
417	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAG TTCGAGTCTCGGTGGAACCT
418	GGTTCCATGGTGTAATGGTAAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAG TTCGAGTCTCGGTGGAACCT

[0179]

419	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCGGTAATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGAACCT
420	GGCCCCATGGTGTAATGGTCAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGGACCC
421	GGTTCCATGGTGTAATGGTAAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCCATCTGAG TTCGAGTCTCTGTGGAACCT
422	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTTTGGACTCTAAATACAGTGATCAGAG TTCAAGTCTCACTGGGACCT
423	GGTTCCATGGGTTAATGGTGAGCACCCTGGACTCTAAATCAAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGTACCT
424	GTTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGAAATACATT CAAAGAATTAAGAACA
425	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGGACCT
426	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCAATCCGAG TTCGAATCTCGGTGGGACCT
427	GGCCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGGACCT
428	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGGCTCTAAATCCAGCAATCCGAG TTCGAATCTTGGTGGGACCT
429	GGCTGTGTACCTCAGTGGGCAAGGGTATGGACTCTAAAGCCAGACTATTTGG GTTCAAATCCCAGCTTGGCCT
430	GACCATGTGGCCTAAGGGAAAAGACATCTCACTCTAGGTCAGAAGATTGAGG GTTCAAGTCCTTTCATGGTCA
431	GGTACAGTGTTAAAGGGGAGAAAAATTGCTGACTCTAAATACAGTAGACCTA GGTTTGAATCCTGGCTTTACCA
432	TGGTGTAATAGGTAGCACAGAGAATTTTAGATTCTCAGGGGTAGGTTCAATT CCTAT

[0180]

433	TAGGACATGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTTTAGATTCTCAGGGGTAGG TTCAATTCCTACAGTTCTAG
434	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCATGGGGAATTTTAGATTCTCAGGGGTGGG TTCAATTCCTATAGTTCTAG
435	TAGGACGTGGTGTAGTAGGTAGCATGGAGAATGTTAAATTCTCAGGGGTAGG TTCAATTCCTATAGTTCTAG
436	TAGGACATGGTGTAATAGGTAGAATGGAGAATTTTAAATTCTCAGGGGTAGG TTCAATTCCTATAGTTCTAG
437	TAGGATGTGGTGTATTAGGTAGCACAGAGAATTTTAGATTCTCAGGGGTAGG TTCGATTCCTATAATTCTAC
438	TAGGACTTGGTGTAATGGGTAGCACAGAGAATTTTAGATTCTCAGGGGTGGG TTCAATTCCTTTCGTCCTAG
439	TCTAGGATGTGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTTTAGATTCTCAGGGGTA GGTTCAATTCCTATATTCTAGAA
440	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTTTAGATTCTCAGGGATGGG TTCAATTCCTATAGTCCTAG
441	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCACGGAGAATTTTAGATTCTCAGGGATGGG TTCAATTCCTGTAGTTCTAG
442	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGAACCT
443	GGTTCCATGGTGTAATGGTGACCACTTTGGACTTTAAATACAGTGATCAGAG TTCAAGTCTCACTGGAACCT
444	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGGGCTTTGGACTTTAACTACAGTGATCAGAG TTCAAGTCTCAGTGGGACCT
445	GGTTCCATGGTGTAATGGTAAGCACCCTGGACTTTAAATCCAGCAACCAGAG TTCCAGTCTCAGCGTGGACCT
446	GGTAGTGTAGTCTACTGGTTAAACGCTTGGGCTTTAACATTAACGTCCTGGG TTCAAATCCCAGCTTTGTCA

[0181]

447	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATCCGAG TTCAAGTCTCGGTGGAACCT
448	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATCCGAG TTCGAGTCTCGGTGGAACCT
449	GGTTCCATGGTGTAATGGTAAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATCCGAG TTCGAGTCTCGGTGGAACCT
450	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCGGTAATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGAACCT
451	GGCCCCATGGTGTAATGGTCAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGGACCC
452	GGTTCCATGGTGTAATGGTAAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCCATCTGAG TTCGAGTCTCTGTGGAACCT
453	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTTTGGACTTTAAATACAGTGATCAGAG TTCAAGTCTCACTGGGACCT
454	GGTTCCATGGGTTAATGGTGAGCACCCTGGACTTTAAATCAAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGTACCT
455	GTTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGAAATACATT CAAAGAATTAAGAACA
456	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGGACCT
457	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCAATCCGAG TTCGAATCTCGGTGGGACCT
458	GGCCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGGACCT
459	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGGCTTTAAATCCAGCAATCCGAG TTCGAATCTTGGTGGGACCT
460	GGCTGTGTACCTCAGTGGGCAAGGGTATGGACTTTAAAGCCAGACTATTTGG GTTCAAATCCCAGCTTGGCCT

[0182]

461	GACCATGTGGCCTAAGGGAAAAGACATCTCACTTTAGGTCAGAAGATTGAGG GTTCAAGTCCTTTCATGGTCA
462	GGTACAGTGTTAAAGGGGAGAAAAATTGCTGACTTTAAATACAGTAGACCTA GGTTTGAATCCTGGCTTTACCA
463	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTTTAACCGCCGCGGCCCGGG TTCGATTCCCGGTCAGGGAA
464	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTTTAACCGCCGCGGCCCGGG TTCGATTCCCGGTCAGGAAA
465	CCCCTGGTGGTCTAGTGCTTAGGATTCGGTGCTTTAACCGCTGCTGCCTGCG TTCGATTCCCGGTCAGGGAA
466	TCCTTGATGTCTAGTGGTTAGGATTTGGTGCTTTAACTGCAGCAGCCTGGGT TCATTTCTCAGTCAGGGAA
467	TCCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTTTAACCCAGGTGGCCCGGG TTCGACTCCCGGTATGGGAA
468	TCCGTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTTTAACCGCCTGCAGCTCGA GTTCGATTCCTGGTCAGGGAA
469	CCCTGTGGTCTAGTGGCTAAGACTTTGTGCTTTAATTGCTGCATCCTAGGTT CAATTCCCAGTCAGGGA
470	TCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTTTAACCCAGGCGGCCCGGG TTCGACTCCCGGTGTGGGAA
471	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTTTAACCGCCGCGGCCCGGG TTCGATTCCCGGCCAGGGAA
472	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTTTAACCGCCGCGGCCCGGG TTCGATTCCCGGTCAGGGAA
473	GCGTTGGTGGTGTAGTGGTGAGCACAGCTGCCTTTAAAGCAGTTAACGCGGG TTCGATTCCCGGGTAACGAA
474	TCCTTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGTGCTTTAACCTGTGCGGCCCGGG TTCAATTCCCGATGAAGGAA

[0183]

475	TGTCTGGTGGTCAAGTGGCTAGGATTTGGCGCTTTAACTGCCGCGGCCCGCG TTCGATTCCCGGTCAGGGAA
476	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTTTAACCGCCTGCAGCTCGA GTTCGATTCCTGGTCAGGGAA
477	GCAATGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTTTAACACAGGAGACCCGGGT TCAATTCCTGACCCATGTA
478	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCGCGGCCCGGG TTCGATTCCCGGTCAGGGAA
479	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCGCGGCCCGGG TTCGATTCCCGGTCAGGAAA
480	CCCCTGGTGGTCTAGTGCTTAGGATTCGGTGCTCTAACCGCTGCTGCCTGCG TTCGATTCCCGGTCAGGGAA
481	TCCTTGATGTCTAGTGGTTAGGATTTGGTGCTCTAACTGCAGCAGCCTGGGT TCATTTCTCAGTCAGGGAA
482	TCCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTCTAACCCAGGTGGCCCGGG TTCGACTCCCGGTATGGGAA
483	TCCGTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCTGCAGCTCGA GTTCGATTCCTGGTCAGGGAA
484	CCCTGTGGTCTAGTGGCTAAGACTTTGTGCTCTAATTGCTGCATCCTAGGTT CAATTCCCAGTCAGGGA
485	TCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTCTAACCCAGGCGGCCCGGG TTCGACTCCCGGTGTGGGAA
486	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCGCGGCCCGGG TTCGATTCCCGGCCAGGGAA
487	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCGCGGCCCGGG TTCGATTCCCGGTCAGGGAA
488	GCGTTGGTGGTGTAGTGGTGAGCACAGCTGCCTCTAAAGCAGTTAACGCGGG TTCGATTCCCGGGTAACGAA

[0184]

489	TCCTTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGTGCTCTAACCTGTGCGGCCCGGG TTCAATTCCCGATGAAGGAA
490	TGTCTGGTGGTCAAGTGGCTAGGATTTGGCGCTCTAACTGCCGCGGCCCGCG TTCGATTCCCGGTCAGGGAA
491	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCTCTAACCGCCTGCAGCTCGA GTTCGATTCCTGGTCAGGGAA
492	GCAATGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTCTAACACAGGAGACCCGGGT TCAATTCCTGACCCATGTA
493	CCTTCAATAGTTCAGCTGGTAGAGCAGAGGACTTTAGCTACTTCCTCAGTAG GAGACGTCCTTAGGTTGCTGGTTCGATTCCAGCTTGAAGGA
494	CCTTCAATAGTTCAGCTGGTAGAGCAGAGGACTTTAGGTCCTTAGGTTGCTG GTTCGATTCCAGCTTGAAGGA
495	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCTTTAGACTTTAAATCTAAAGAGAGATTGAGCT CTCTTTTTACCA
496	GGTAAAATGACTGAGTAAGCATTAGACTTTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG ACCTCTTTTTACCA
497	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTTTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG GCCTCTTTTTACCA
498	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTTTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG GCCTTTTTACCA
499	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGTTGGCTGTGTCCTTA GACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
500	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
501	GGGGGTATAGCTCAGGGCTAGAGCTTTTTGACTTTAGAGCAAGAGGTCCCTG GTTCAAATCCAGGTTCTCCCT
502	TATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTAACTTTAGATCAAGAGGTCCCTGGATCAA CTCTGGGTG

[0185]

503	GTCAGTGTTGCACAACGGTTAAGTGAAGAGGCTTTAAACCCAGACTGGATGG GTTCAATTCCCATCTCTGCCG
504	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGTGGATAGGGCGTGGC AATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
505	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
506	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGGCTCATTAAGCAAGG TATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA
507	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGAATCCGGCTCGGAGGA
508	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATTGTATAGACATTT GCGGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCAGCTCGAAGGA
509	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCAGCTCGAAGGA
510	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGCTACTTCCTCAGCAG GAGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
511	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
512	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGGCGCGCGCCCGTGGC CATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
513	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
514	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGCCTGTAGAAACATTT GTGGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
515	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
516	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATTGTACAGACATTT GCGGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA

[0186]

517	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
518	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGTACTTAATGTGTGGT CATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
519	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
520	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGGGGTTTGAATGTGGT CATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA
521	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGAATCCGGCTCGGAGGA
522	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGACTGCGGAAACGTTT GTGGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCAATTCCGGCTCGAAGGA
523	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCAATTCCGGCTCGAAGGA
524	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGGTTCATTAAACTAAG GCATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
525	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
526	TCTTCAATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGGTGCACGCCCGTGGC CATTCTTAGGTGCTGGTTTGATTCCGACTTGGAGAG
527	TCTTCAATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTTTAGATTCTTAGGTGCTGG TTTGATTCCGACTTGGAGAG
528	GGTAAAATGGCTGAGTGAAGCATTGGACTTTAAATCTAAAGACAGGGGTTAA GCCTCTTTTTACCA
529	GGTAAAATGGCTGAGCAAGCATTGGACTTTAAATCTAAAGACAGATGTTGAG CCATCTTTTTAGCA
530	GGTAAAATGGCTGAGTGAAGCATTGGACTTTAAATCTAAAGACAGGGGCTAA GCCTCTTTTTACCA

[0187]

531	GGTAAAATGGCTGAGCAAGCATTAGACTTTAAATCTAAAGACAGAGGTTAAG GCCTCTTTTTACCA
532	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTTTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG GCCTCTTTTTTCCT
533	GGTAAAATGGCTGAGCAAGCATTAGACTTTAAATCTGAAAACAGAGGTCAAA GGTCTCTTTTTACCA
534	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTTTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG GCCTCTTTTTACCA
535	GGTAAAATGACTGAATAAGCCTTAGACTTTAAATCTGAAGACAGAGGTCAAG GCCTCTTTTTACCA
536	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTGGACTTTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG ACCTCTTTTTACCA
537	GGTAAAATGGCTGAGTAAAGCATTAGACTTTAAATCTAAGGACAGAGGCTAA ACCTCTTTTTACCA
538	CCTTCAATAGTTCAGCTGGTAGAGCAGAGGACTCTAGCTACTTCCTCAGTAG GAGACGTCCTTAGGTTGCTGGTTCGATTCCAGCTTGAAGGA
539	CCTTCAATAGTTCAGCTGGTAGAGCAGAGGACTCTAGGTCCTTAGGTTGCTG GTTCGATTCCAGCTTGAAGGA
540	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCTTTAGACTCTAAATCTAAAGAGAGATTGAGCT CTCTTTTTACCA
541	GGTAAAATGACTGAGTAAGCATTAGACTCTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG ACCTCTTTTTACCA
542	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTCTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG GCCTCTTTTTACCA
543	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTCTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG GCCTTTTTACCA
544	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGTTGGCTGTGTCCTTA GACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA

[0188]

545	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
546	GGGGGTATAGCTCAGGGCTAGAGCTTTTTGACTCTAGAGCAAGAGGTCCCTG GTTCAAATCCAGGTTCTCCCT
547	TATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTAACTCTAGATCAAGAGGTCCCTGGATCAA CTCTGGGTG
548	GTCAGTGTTGCACAACGGTTAAGTGAAGAGGCTCTAAACCCAGACTGGATGG GTTCAATTCCCATCTCTGCCG
549	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGTGGATAGGGCGTGGC AATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
550	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
551	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGGCTCATTAAGCAAGG TATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA
552	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGAATCCGGCTCGGAGGA
553	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATTGTATAGACATTT GCGGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCAGCTCGAAGGA
554	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCAGCTCGAAGGA
555	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGCTACTTCCTCAGCAG GAGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
556	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
557	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGGCGCGCGCCCGTGGC CATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
558	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA

[0189]

559	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGCCTGTAGAAACATTTGTGGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
560	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
561	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATTGTACAGACATTTGCGGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
562	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
563	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGTACTTAATGTGTGGTCATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
564	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
565	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGGGGTTTGAATGTGGTCATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA
566	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA
567	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGACTGCGGAAACGTTTGTGGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCAATTCCGGCTCGAAGGA
568	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTGGTTCAATTCCGGCTCGAAGGA
569	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGGTTCATTAAACTAAGGCATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
570	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
571	TCTTCAATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGGTGCACGCCCGTGGCCATTCTTAGGTGCTGGTTTGATTCCGACTTGGAGAG
572	TCTTCAATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTCTAGATTCTTAGGTGCTGGTTTGATTCCGACTTGGAGAG

[0190]

573	GGTAAAATGGCTGAGTGAAGCATTGGACTCTAAATCTAAAGACAGGGGTTAA GCCTCTTTTTACCA
574	GGTAAAATGGCTGAGCAAGCATTGGACTCTAAATCTAAAGACAGATGTTGAG CCATCTTTTTAGCA
575	GGTAAAATGGCTGAGTGAAGCATTGGACTCTAAATCTAAAGACAGGGGCTAA GCCTCTTTTTACCA
576	GGTAAAATGGCTGAGCAAGCATTAGACTCTAAATCTAAAGACAGAGGTTAAG GCCTCTTTTTACCA
577	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTCTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG GCCTCTTTTTTCCT
578	GGTAAAATGGCTGAGCAAGCATTAGACTCTAAATCTGAAAACAGAGGTCAAA GGTCTCTTTTTACCA
579	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTCTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG GCCTCTTTTTACCA
580	GGTAAAATGACTGAATAAGCCTTAGACTCTAAATCTGAAGACAGAGGTCAAG GCCTCTTTTTACCA
581	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTGGACTCTAAATCTAAAGACAGAGGTCAAG ACCTCTTTTTACCA
582	GGTAAAATGGCTGAGTAAAGCATTAGACTCTAAATCTAAGGACAGAGGCTAA ACCTCTTTTTACCA
583	GTTAAGATGGCAGAGCCTGGTAATTGCATTAAACTTAAAATTTTATAATCAG AGGTTCAACTCCTCTTCTTAACA
584	GTTAAGATGGCAGAGCCCGGCAATTGCATTAGACTTAAAACTTTATAATCAG AGGTTCAACTCCTCTCATTAACA
585	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTTTAGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCAAATCCCACCGCTGCCA
586	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGACGCTGGATTTTAGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTTGAATCCCACCGCTGCCA

[0191]

587	GGGCCAGTGGCTCAATGGATAATGCGTCTGACTTTAAATCAGAAGATTCCAGCCTTGACTCCTGGCTGGCTCA
588	GGTAGGGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCACTGTATTTTAACTCCAGTCTCTTCAGAGGCATGGGTTTGAATCCCACTGCTGCCA
589	GCCGAGCGGTCTAAGGCTCCGGATTTTAGCGCCGGTGTCTTCGGAGGCATGGGTTCGAATTCCAC
590	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTTAGCTAAGCTTCCTCCGCGGTGGGGATTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
591	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTTAGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
592	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTTAGCTTGGCTTCCTCGTGTTGAGGATTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
593	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTTAGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
594	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTTAGCTTACTGCTTCCTGTGTTCGGGTCTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
595	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTTAGTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
596	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTTAGTTGCTACTTCCCAGGTTTGGGGCTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
597	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTTAGTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
598	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTTAGGTAAGCACCTTGCCTGCGGGCTTTCTGGTCTCCGGATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA

[0192]

599	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTTAGTTTCTGGTCTCCGGATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
600	GCCTCCTTAGTGCAGTAGGTAGCGCATCAGTCTTTAAATCTGAATGGTCCTGAGTTCAAGCCTCAGAGGGGGCA
601	GTCAGGATGGCCGAGCAGTCTTAAGGCGCTGCGTTTTAATCGCACCCTCCGCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTTTGACA
602	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTTTAAATCCAGAAGTAGTGCTGGAACAA
603	GTCAGGGTGGCTGAGCAGTCTGAGGGGCTGCGTTTTAGTCGCAGTCTGCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCCTGAAA
604	ACCAGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTTAGATCCAATGGACATATGTCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCTGGTA
605	ACCGGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTTAGATCCAATGGGCTGGTGCCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCTCGGTA
606	ACCAGAATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTTAGATCCAATGGATTCATATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTCTGGTA
607	ACCGGGATGGCTGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTTAGATCCAATGGACAGGTGTCCGCGTGGGTTCGAGCCCCACTCCCGGTA
608	ACTCATTTGGCTGAGTGGTTAAGGCATTGGACTTTAGATCCAATGGAGTAGTGGCTGTGTGGGTTTAAACCCCACTACTGGTA
609	GAGAAAGTCATCGTAGTTACGAAGTTGGCTTTAACCCAGTTTTGGGAGGTTCAATTCCTTCCTTTCTCT
610	ACCAGGATGGCCAAGTAGTTAAAGGCACTGGACTTTAGAGCCAATGGACATATGTCTGTGTGGGTTTGAACCCCACTCCTGGTG
611	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTTTAGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
612	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTTTAGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA

[0193]

613	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCTGGATTTTAGCTCCAGTCATTTCGATGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
614	GGTAGTGTGGTTGAATGGTCTAAGGCACTGAATTTTAGCTCCAGTCTCTTTGGGGACGTGGGTTTAAATCCCACTGCTGCAA
615	GTTAAGATGGCAGAGCCTGGTAATTGCACTAAACTTAAAATTTTATAATCAGAGGTTCAACTCCTCTTCTTAACA
616	GTTAAGATGGCAGAGCCCGGCAATTGCACTAGACTTAAAACTTTATAATCAGAGGTTCAACTCCTCTCATTAACA
617	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTCTAGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCAAATCCCACCGCTGCCA
618	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGACGCTGGATTCTAGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTTGAATCCCACCGCTGCCA
619	GGGCCAGTGGCTCAATGGATAATGCGTCTGACTCTAAATCAGAAGATTCCAGCCTTGACTCCTGGCTGGCTCA
620	GGTAGGGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCACTGTATTCTAACTCCAGTCTCTTCAGAGGCATGGGTTTGAATCCCACTGCTGCCA
621	GCCGAGCGGTCTAAGGCTCCGGATTCTAGCGCCGGTGTCTTCGGAGGCATGGGTTCGAATTCCAC
622	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTCTAGCTAAGCTTCCTCCGCGGTGGGGATTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
623	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTCTAGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
624	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTCTAGCTTGGCTTCCTCGTGTTGAGGATTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
625	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTCTAGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA

[0194]

626	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTCTAGCTTACTGCTTCCTGTGTTCGGGTCTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
627	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTCTAGTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
628	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTCTAGTTGCTACTTCCCAGGTTTGGGGCTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
629	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTCTAGTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
630	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTCTAGGTAAGCACCTTGCCTGCGGGCTTTCTGGTCTCCGGATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
631	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTCTAGTTTCTGGTCTCCGGATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
632	GCCTCCTTAGTGCAGTAGGTAGCGCATCAGTCTCTAAATCTGAATGGTCCTGAGTTCAAGCCTCAGAGGGGGCA
633	GTCAGGATGGCCGAGCAGTCTTAAGGCGCTGCGTTCTAATCGCACCCTCCGCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTTTGACA
634	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTCTAAATCCAGAAGTAGTGCTGGAACAA
635	GTCAGGGTGGCTGAGCAGTCTGAGGGGCTGCGTTCTAGTCGCAGTCTGCCCTGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCCTGAAA
636	ACCAGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTCTAGATCCAATGGACATATGTCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCTGGTA
637	ACCGGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTCTAGATCCAATGGGCTGGTGCCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCTCGGTA
638	ACCAGAATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTCTAGATCCAATGGATTCATATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTCTGGTA

[0195]

639	ACCGGGATGGCTGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTCTAGATCCAATGGACAGGT GTCCGCGTGGGTTCGAGCCCCACTCCCGGTA
640	ACTCATTTGGCTGAGTGGTTAAGGCATTGGACTCTAGATCCAATGGAGTAGT GGCTGTGTGGGTTTAAACCCCACTACTGGTA
641	GAGAAAGTCATCGTAGTTACGAAGTTGGCTCTAACCCAGTTTTGGGAGGTTC AATTCCTTCCTTTCTCT
642	ACCAGGATGGCCAAGTAGTTAAAGGCACTGGACTCTAGAGCCAATGGACATA TGTCTGTGTGGGTTTGAACCCCACTCCTGGTG
643	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTCTAGCTCCAGTCTCTTCG GAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
644	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTCTAGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA
645	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCTGGATTCTAGCTCCAGTCATTTCG ATGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
646	GGTAGTGTGGTTGAATGGTCTAAGGCACTGAATTCTAGCTCCAGTCTCTTTG GGGACGTGGGTTTAAATCCCACTGCTGCAA
647	GTTAAGATGGCAGAGCCTGGTAATTGCATCAAACTTAAAATTTTATAATCAG AGGTTCAACTCCTCTTCTTAACA
648	GTTAAGATGGCAGAGCCCGGCAATTGCATCAGACTTAAAACTTTATAATCAG AGGTTCAACTCCTCTCATTAACA
649	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTTCAGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCAAATCCCACCGCTGCCA
650	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGACGCTGGATTTCAGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTTGAATCCCACCGCTGCCA
651	GGGCCAGTGGCTCAATGGATAATGCGTCTGACTTCAAATCAGAAGATTCCAG CCTTGACTCCTGGCTGGCTCA
652	GGTAGGGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCACTGTATTTCAACTCCAGTCTCTTCA GAGGCATGGGTTTGAATCCCACTGCTGCCA

[0196]

653	GCCGAGCGGTCTAAGGCTCCGGATTTCAGCGCCGGTGTCTTCGGAGGCATGGGTTCGAATTCCAC
654	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTCAGCTAAGCTTCCTCCGCGGTGGGGATTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
655	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTCAGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
656	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTCAGCTTGGCTTCCTCGTGTTGAGGATTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
657	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTCAGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
658	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTCAGCTTACTGCTTCCTGTGTTCGGGTCTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
659	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTCAGTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
660	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTCAGTTGCTACTTCCCAGGTTTGGGGCTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
661	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTCAGTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
662	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTCAGGTAAGCACCTTGCCTGCGGGCTTTCTGGTCTCCGGATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
663	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACTTCAGTTTCTGGTCTCCGGATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA
664	GCCTCCTTAGTGCAGTAGGTAGCGCATCAGTCTTCAAATCTGAATGGTCCTGAGTTCAAGCCTCAGAGGGGGCA

[0197]

665	GTCAGGATGGCCGAGCAGTCTTAAGGCGCTGCGTTTCAATCGCACCCTCCGC TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTTTGACA
666	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTTCAAATCCAGAAGTAGTGC TGGAACAA
667	GTCAGGGTGGCTGAGCAGTCTGAGGGGCTGCGTTTCAGTCGCAGTCTGCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCCTGAAA
668	ACCAGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTCAGATCCAATGGACATAT GTCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCTGGTA
669	ACCGGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTCAGATCCAATGGGCTGGT GCCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCTCGGTA
670	ACCAGAATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTCAGATCCAATGGATTCAT ATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTCTGGTA
671	ACCGGGATGGCTGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTCAGATCCAATGGACAGGT GTCCGCGTGGGTTCGAGCCCCACTCCCGGTA
672	ACTCATTTGGCTGAGTGGTTAAGGCATTGGACTTCAGATCCAATGGAGTAGT GGCTGTGTGGGTTTAAACCCCACTACTGGTA
673	GAGAAAGTCATCGTAGTTACGAAGTTGGCTTCAACCCAGTTTTGGGAGGTTC AATTCCTTCCTTTCTCT
674	ACCAGGATGGCCAAGTAGTTAAAGGCACTGGACTTCAGAGCCAATGGACATA TGTCTGTGTGGGTTTGAACCCCACTCCTGGTG
675	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTTCAGCTCCAGTCTCTTCG GAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
676	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTTCAGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA
677	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCTGGATTTCAGCTCCAGTCATTTCG ATGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
678	GGTAGTGTGGTTGAATGGTCTAAGGCACTGAATTTCAGCTCCAGTCTCTTTG GGGACGTGGGTTTAAATCCCACTGCTGCAA

[0198]

679	GAGAAGGTCACAGAGGTTATGGGATTGGCTTTAAACCAGTCTGTGGGGGGTTCGATTCCCTCCTTTTTCA
680	GAGAAGGTCATAGAGGTTATGGGATTGGCTTTAAACCAGTCTCTGGGGGGTTCGATTCCCTCCTTTTTCA
681	GAAAAAGTCATAGGGGTTATGAGGCTGGCTTTAAACCAGCCTTAGGAGGTTCAATTCCTTCCTTTTTTG
682	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGTGCTGCTTTAAATGCCAGGGTCGAGGTTTCGATCCCCGTACGGGCCT
683	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTTAAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
684	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTTAAATCCATTGGGGTTTCCCCACGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
685	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGTGATGGACTTTAAACCCATTGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
686	GGGTGTATGGCTCAGGGGTAGAGAATTTGACTTTAGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
687	AGTTGTAGCTGAGTGGTTAAGGCAACGAGCTTTAAATTCGTTGGTTTCTCTCTGTGCAGGTTTGAATCCTGCTAATTA
688	CAAGAAATTCATAGAGGTTATGGGATTGGCTTTAAACCAGTTTCAGGAGGTTCGATTCCTTCCTTTTTGG
689	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTTAAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCTCACAGCG
690	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTTAAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG
691	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGTGTTGGACTTTAAATCCAATGGGGGTTCCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG
692	GTCACGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTTAAATCCAATGGGGTTTCCCCGCACAGGTTCGAATCCTGTTCGTGACG

[0199]

693	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTTAAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCACCCTCGTCG
694	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTTAAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCACCTTCGTCG
695	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGTGCTTTAACTAATGCCAGGGTCGAG GTTTCGATCCCCGTACGGGCCT
696	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTTAAATCCATTGTGCTCTG CACACGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
697	GAGGCCTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTTAAATCCATTGTGCTCTGC ACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCG
698	GCAGCGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTTAAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAACCCTGCTCGCTGCG
699	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTTAAATCCATTGGGGTTTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
700	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTTAAATCCATTGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
701	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTTAAATCCATTGGGGTTTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGTCGGCTACG
702	GAGAAGGTCACAGAGGTTATGGGATTGGCTCTAAACCAGTCTGTGGGGGGTT CGATTCCCTCCTTTTTCA
703	GAGAAGGTCATAGAGGTTATGGGATTGGCTCTAAACCAGTCTCTGGGGGGTT CGATTCCCTCCTTTTTCA
704	GAAAAAGTCATAGGGGTTATGAGGCTGGCTCTAAACCAGCCTTAGGAGGTTC AATTCCTTCCTTTTTTG
705	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGTGCTGCTCTAAATGCCAGGGTCGAG GTTTCGATCCCCGTACGGGCCT
706	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTCTAAATCCATTGGGGTTTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG

[0200]

707	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTCTAAATCCATTGGGGTTTC CCCACGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
708	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGTGATGGACTCTAAACCCATTGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
709	GGGTGTATGGCTCAGGGGTAGAGAATTTGACTCTAGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCAGGTGCCCCCT
710	AGTTGTAGCTGAGTGGTTAAGGCAACGAGCTCTAAATTCGTTGGTTTCTCTC TGTGCAGGTTTGAATCCTGCTAATTA
711	CAAGAAATTCATAGAGGTTATGGGATTGGCTCTAAACCAGTTTCAGGAGGTT CGATTCCTTCCTTTTTGG
712	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTCTAAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCTCACAGCG
713	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTCTAAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG
714	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGTGTTGGACTCTAAATCCAATGGGGGTTC CCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG
715	GTCACGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTCTAAATCCAATGGGGTTTC CCCGCACAGGTTCGAATCCTGTTCGTGACG
716	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTCTAAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCACCCTCGTCG
717	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTCTAAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCACCTTCGTCG
718	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGTGCTCTAACTAATGCCAGGGTCGAG GTTTCGATCCCCGTACGGGCCT
719	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTCTAAATCCATTGTGCTCTG CACACGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
720	GAGGCCTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTCTAAATCCATTGTGCTCTGC ACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCG

[0201]

721	GCAGCGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTCTAAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAACCCTGCTCGCTGCG
722	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTCTAAATCCATTGGGGTTTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
723	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTCTAAATCCATTGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
724	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTCTAAATCCATTGGGGTTTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGTCGGCTACG
725	GAGAAGGTCACAGAGGTTATGGGATTGGCTTCAAACCAGTCTGTGGGGGGTT CGATTCCCTCCTTTTTCA
726	GAGAAGGTCATAGAGGTTATGGGATTGGCTTCAAACCAGTCTCTGGGGGGTT CGATTCCCTCCTTTTTCA
727	GAAAAAGTCATAGGGGTTATGAGGCTGGCTTCAAACCAGCCTTAGGAGGTTC AATTCCTTCCTTTTTTG
728	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGTGCTGCTTCAAATGCCAGGGTCGAG GTTTCGATCCCCGTACGGGCCT
729	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTCAAATCCATTGGGGTTTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
730	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTCAAATCCATTGGGGTTTC CCCACGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
731	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGTGATGGACTTCAAACCCATTGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
732	GGGTGTATGGCTCAGGGGTAGAGAATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCAGGTGCCCCCT
733	AGTTGTAGCTGAGTGGTTAAGGCAACGAGCTTCAAATTCGTTGGTTTCTCTC TGTGCAGGTTTGAATCCTGCTAATTA
734	CAAGAAATTCATAGAGGTTATGGGATTGGCTTCAAACCAGTTTCAGGAGGTT CGATTCCTTCCTTTTTGG

[0202]

735	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTCAAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCTCACAGCG
736	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTCAAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG
737	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGTGTTGGACTTCAAATCCAATGGGGGTTC CCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG
738	GTCACGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTCAAATCCAATGGGGTTTC CCCGCACAGGTTCGAATCCTGTTCGTGACG
739	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTCAAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCACCCTCGTCG
740	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTCAAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCACCTTCGTCG
741	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGTGCTTCAACTAATGCCAGGGTCGAG GTTTCGATCCCCGTACGGGCCT
742	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTCAAATCCATTGTGCTCTG CACACGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG
743	GAGGCCTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTCAAATCCATTGTGCTCTGC ACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCG
744	GCAGCGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTTCAAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAACCCTGCTCGCTGCG
745	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTCAAATCCATTGGGGTTTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
746	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTCAAATCCATTGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
747	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTCAAATCCATTGGGGTTTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGTCGGCTACG
748	GCCCAGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATAAGACTTTAAATCTCAGGGTTGTGG ATTCGTGCCCCATGCTGGGTG

[0203]

749	CTGCAGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTTTAAATCTCAGGGTCATGG GTTCGTGCCCCATGTTGGG
750	CCAGCATGTCTCAGTCGGTATAGTGTGAGACTTTAAATCTCAGGGTCGTGGG TTCAAGCCCCACATTGGG
751	GTCTAGCTAGATCAGTTGGTAGAGCATAAGACTTTAAATCTCAGGGTCATGG GTTTGAGCCCTACGTTGGGCG
752	GCCCAGCTAGCTCAGCCGGTAGAGCACAAGACTTTAAATCTCAGGGTCGTGG GTTTGAGCCCTGTGTTGAGCA
753	CCGAATAGCTTAGTTGATGAAGCGTGAGACTTTAAATCTCAGGGTAGTGGGT TCAAGCCCCACATTGGA
754	GCCTGGCTACCTCAGTTGGTAGAGCATGGGACTTTAAATCCCAGAGTCAGTG GGTTCAAGCCTCACATTGAGTG
755	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACCTTAAATCTCAGGGTCGTGG GTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
756	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTTTAAATCTCAGGGTCGTGG GTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
757	GCCCGGCTAGCTCAGTCGATAGAGCATGAGACTTTAAATCTCAGGGTCGTGG GTTCGAGCCGCACGTTGGGCG
758	GCCCAGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTTTAAATCTCAGGGTCATGG GTTTGAGCCCCACGTTTGGTG
759	GCCTGGCTAGCTCAGTCGGCAAAGCATGAGACTTTAAATCTCAGGGTCGTGG GCTCGAGCTCCATGTTGGGCG
760	GCCCGACTACCTCAGTCGGTGGAGCATGGGACTTTACATCCCAGGGTTGTGG GTTCGAGCCCCACATTGGGCA
761	CCCCGGCTGGCTCAGTCAGTAGATCATGAGACTTTAAATCTCAGGGTCGTGG GTTCACGCCCCACACTGGGCG
762	GCGCTAGTCAGTAGAGCATGAGACTTTAAATCTCAGGGTCGTGGGTTCGAGC CCCACATCGGGCG

[0204]

763	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACTTTAAATCTGAGGGTCCAGG GTTCAAGTCCCTGTTCAGGCA
764	GCCAGGATAGTTCAGGTGGTAGAGCATCAGACTTTAAACCTGAGGGTTCAGG GTTCAAGTCTCTGTTTGGGCG
765	ACCCAGATAGCTCAGTCAGTAGAGCATCAGACTTTAAATCTGAGGGTCCAAG GTTCATGTCCCTTTTTGGGTG
766	ACCTGGGTAGCTTAGTTGGTAGAGCATTGGACTTTAAATTTGAGGGCCCAGG TTTCAAGTCCCTGTTTGGGTG
767	GCCTGGGTAGCTCAGTCGGTAGAGCTATCAGACTTTAAGCCTGAGGATTCAG GGTTCAATCCCTTGCTGGGGCG
768	GATAGCTCAGTTGATAGAGCATCAGACTTTAAATCTGAGGGTCCAGGGTTCA TGTCCCTGTT
769	GTTGGGGTAACTCAGTTGGTAGAGTAGCAGACTTTACATCTGAGGGTCCAGG GTTTAAGTCCATGTCCAGGCA
770	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACTTTAAATCTGAGGGTCCAGG GTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG
771	GCCTGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTTTAAATCTGAGGGTCCAGG GTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG
772	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTTTAAATCTGAGGGTCCGGG GTTCAAGTCCCTGTTCGGGCG
773	GCCTGGGTAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTTTAAATCTGAGGGTCCAGG GTTCAAGTCCCTGTCCAGGCG
774	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAACATCAGACTTTAAATCTGACGGTGCAGG GTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG
775	GCCCGGAGAGCTCAGTGGGTAGAGCATCAGACTTTAAATCTGAGGGTCCAGG GTTCAAGTCCTCGTTCGGGCA
776	ACCTGGGTAGCTCAGTAGGTAGAACATCAGACTTTAAATCTGAGGGTCTAGG GTTCAAGTCCCTGTCCAGGCG

[0205]

777	GCCTGGATAGCTCCTTCGGTAGAGCATCATCAGACTTTAAATGTGAGGGTCC AGGGTTCAAGTTCCTGTTTGGGCG
778	GCCCAGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATAAGACTCTAAATCTCAGGGTTGTGG ATTCGTGCCCCATGCTGGGTG
779	CTGCAGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTCTAAATCTCAGGGTCATGG GTTCGTGCCCCATGTTGGG
780	CCAGCATGTCTCAGTCGGTATAGTGTGAGACTCTAAATCTCAGGGTCGTGGG TTCAAGCCCCACATTGGG
781	GTCTAGCTAGATCAGTTGGTAGAGCATAAGACTCTAAATCTCAGGGTCATGG GTTTGAGCCCTACGTTGGGCG
782	GCCCAGCTAGCTCAGCCGGTAGAGCACAAGACTCTAAATCTCAGGGTCGTGG GTTTGAGCCCTGTGTTGAGCA
783	CCGAATAGCTTAGTTGATGAAGCGTGAGACTCTAAATCTCAGGGTAGTGGGT TCAAGCCCCACATTGGA
784	GCCTGGCTACCTCAGTTGGTAGAGCATGGGACTCTAAATCCCAGAGTCAGTG GGTTCAAGCCTCACATTGAGTG
785	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACCCTAAATCTCAGGGTCGTGG GTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
786	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTCTAAATCTCAGGGTCGTGG GTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
787	GCCCGGCTAGCTCAGTCGATAGAGCATGAGACTCTAAATCTCAGGGTCGTGG GTTCGAGCCGCACGTTGGGCG
788	GCCCAGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTCTAAATCTCAGGGTCATGG GTTTGAGCCCCACGTTTGGTG
789	GCCTGGCTAGCTCAGTCGGCAAAGCATGAGACTCTAAATCTCAGGGTCGTGG GCTCGAGCTCCATGTTGGGCG
790	GCCCGACTACCTCAGTCGGTGGAGCATGGGACTCTACATCCCAGGGTTGTGG GTTCGAGCCCCACATTGGGCA

[0206]

791	CCCCGGCTGGCTCAGTCAGTAGATCATGAGACTCTAAATCTCAGGGTCGTGG GTTCACGCCCCACACTGGGCG
792	GCGCTAGTCAGTAGAGCATGAGACTCTAAATCTCAGGGTCGTGGGTTCGAGC CCCACATCGGGCG
793	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACTCTAAATCTGAGGGTCCAGG GTTCAAGTCCCTGTTCAGGCA
794	GCCAGGATAGTTCAGGTGGTAGAGCATCAGACTCTAAACCTGAGGGTTCAGG GTTCAAGTCTCTGTTTGGGCG
795	ACCCAGATAGCTCAGTCAGTAGAGCATCAGACTCTAAATCTGAGGGTCCAAG GTTCATGTCCCTTTTTGGGTG
796	ACCTGGGTAGCTTAGTTGGTAGAGCATTGGACTCTAAATTTGAGGGCCCAGG TTTCAAGTCCCTGTTTGGGTG
797	GCCTGGGTAGCTCAGTCGGTAGAGCTATCAGACTCTAAGCCTGAGGATTCAG GGTTCAATCCCTTGCTGGGGCG
798	GATAGCTCAGTTGATAGAGCATCAGACTCTAAATCTGAGGGTCCAGGGTTCA TGTCCCTGTT
799	GTTGGGGTAACTCAGTTGGTAGAGTAGCAGACTCTACATCTGAGGGTCCAGG GTTTAAGTCCATGTCCAGGCA
800	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACTCTAAATCTGAGGGTCCAGG GTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG
801	GCCTGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTCTAAATCTGAGGGTCCAGG GTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG
802	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTCTAAATCTGAGGGTCCGGG GTTCAAGTCCCTGTTCGGGCG
803	GCCTGGGTAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTCTAAATCTGAGGGTCCAGG GTTCAAGTCCCTGTCCAGGCG
804	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAACATCAGACTCTAAATCTGACGGTGCAGG GTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG

[0207]

805	GCCCGGAGAGCTCAGTGGGTAGAGCATCAGACTCTAAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTCCTCGTTCGGGCA
806	ACCTGGGTAGCTCAGTAGGTAGAACATCAGACTCTAAATCTGAGGGTCTAGGGTTCAAGTCCCTGTCCAGGCG
807	GCCTGGATAGCTCCTTCGGTAGAGCATCATCAGACTCTAAATGTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTTCCTGTTTGGGCG
808	GGCAGAATGGTGCAGCGGTTCAGCACCCAGGCTCTTCAGCCAGCTGTTGCCTGGGCTCAAATCCCAGCTCTGCCA
809	GGCTGTATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTTCAGAATCCTATACTCAGGGGAAGGAGAACTGGGGGTTTCTCAGTGGGTCAAAGGACTTGTAGTGGTAAATCAAAAGCAACTCTATAAGCTATGTAACAAACTTTAAAGTCATATGTAGCTGGGTTCAAATCCTGTTTCTGCCA
810	GGCTGTATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTTCAGCTTTAAAGTCATATGTAGCTGGGTTCAAATCCTGTTTCTGCCA
811	GGGGGCATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
812	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCC
813	GGGGGTATAGCTTAGCGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT
814	GGGGGTATAGCTTAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAAAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCTT
815	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCAGTTCAAATCTGGGTGCCCCCT
816	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAAGTCCCCGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT
817	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCTCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT

[0208]

818	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCACTTGACTTCAGATCAAGAAGTCCTTGG TTCAAATCCAGGTGCCCCCT
819	GGGGATATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCGG TTCAAATCCGGGTGCCCCCC
820	GGGGGTATAGTTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCAGGTGCCCCCT
821	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAAATCAAGAGGTCCCTGA TTCAAATCCAGGTGCCCCCT
822	GGGCGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCAG TTCAAATCTGGGTGCCCCCT
823	GGGGGTATAGCTCACAGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCGG TTCAAATCTGGGTGCCCCCT
824	GGGCGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCAG TTCAAATCTGGGTGCCCA
825	GGGGGTATAGCTCACAGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCGG TTCAAATCCGGTTACTCCCT
826	GGGGGTAGGGCTCAGGGATAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCGG TTCGAATCTAGGTGCCCCCT
827	GGTATATCTCAGGGGGCAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCGGTT GAAATCCGGGTGCT
828	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCACTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCAGGTGCCCCCT
829	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCGGGTGCCCCCT
830	GGGGGTATAGCTCAGTGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCG GTTCAAATCCGGGTGCCCCCT
831	GGGGGTGTAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCAGGTGCCCCCT

[0209]

832	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCCGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT
833	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTTCAGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
834	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
835	GACCTCGTGGCACAATGGTAGCACGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
836	GAAGCGGTGGCTCAATGGTAGAGCTTTCGACTTCAATTAAATCTTGGAAATTCCACGGAATAAGATTGCAATCGAAGGGTTGCAGGTTCAATTCCTGTCCGTTTCA
837	GAAGCGGTGGCTCAATGGTAGAGCTTTCGACTTCAAATCGAAGGGTTGCAGGTTCAATTCCTGTCCGTTTCA
838	GGCCTCATGGTGCAACAGTAGTGTGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGTATGTTCAAATCACATAGGGGTCA
839	GACCTCGTGGTGAAATGGTAGCATGTTTGACTTCAAATCAGGAGGTTGTGTGTTCAAGTCACATCAGGGTCA
840	GACCTTGTGGCGCAATGGTAGCATGTTTGACTTCAAATCAGGAGGTTGTGTGTTCAAGTCACATCAGGGTCA
841	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGCTGCGTGTTCGAATCACGCCGGGGTCA
842	GACCTTGTGGCTCAATGGTAGCGCATCTGACTTCAGATCAGGAGGTTGCACGTTCAAATCATGCCGGGGTCA
843	GACCTTGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
844	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTATTCAAATCACGTCGGGGTCA
845	GACCTCGTGGCGCAACGGCAGCGCGTCTGACTTCACATTAGAAGGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA

[0210]

846	GACCTCATGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACATCGGGGTCA
847	GACCTCGTGGTGCAACGGTAGCGCGTATGATTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
848	GACCTCGTAGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
849	AGGGGTATAGCTCAATTGGCAGAGCGTCGGTCTTCAAAACCGAAGGTTGTAG GTTCGATTCCTACTGCCCCTGCCA
850	GACCTCATGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
851	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTAACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
852	ACGGGAGTAGCTCAGTTGGTAGAGCACCGGTCTTCAAAACCGGGTGTCGGGA GTTCGAGCCTCTCCTCCCGTG
853	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCATG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
854	GACTCCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCCGACTTCAGATCGGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
855	GACTCCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
856	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTCCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
857	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCACGTCTGACTCCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
858	CGGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCACGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGT GTTCAAATCACGTCGGGGTCA
859	GGCCTCGTCGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTCCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA

[0211]

860	GGCCTCGTCGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
861	GGCCTCGTCGCGCAACGGTAGCACGTCTGACTCCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
862	GGCCTCGTCGCGCAACGGTAGCACGTCTGACTTCAGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA

[0212] 在某些实施方案中,tRNA包含如表8-10中任一个所示的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含与表8-10中任一个中的核苷酸序列具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0213] 在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 6的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 7的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 8的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 9的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 11的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 16的核苷酸序列、基本上由其组成其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 17的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 18的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 19的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 20的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 21的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 22的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 35的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 36的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 37的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 38的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 39的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 40的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 44的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 45的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 178的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 179的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 180的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 181的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 182的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 186的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,tRNA包含SEQ ID NO: 187的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0214] 在某些实施方案中,相对于参考tRNA序列(例如,本文公开的tRNA),tRNA可以包含一个或多个突变(例如,核苷酸替代、缺失或插入)。在某些实施方案中,tRNA可以包含单一突变或2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个或超过15个突变的组合、由由其组成或基本上由其组成。考虑tRNA可以包含1-15、1-10、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-15、2-10、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-15、3-10、3-7、3-6、3-5或3-4个突变、由其组成或基本上由其组成。

[0215] 序列同一性可以以本领域技术范围内的各种方式确定,例如,使用公众可得的计算机软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)软件。使用由程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx(Karlin et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268;Altschul (1993) J. Mol. Evol. 36, 290-300;Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)所采用的算法的BLAST(基本局部比对检索工具)分析是为序列相似性检索定制的。关于检索序列数据库中基本问题的讨论,参见Altschul et al. (1994) Nature Genetics 6:119-129。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在正在比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。直方图、描述、比对、期望(即报告与数据库序列匹配的统计显著性阈值)、截止值、矩阵和过滤器的检索参数处于默认设置。blastp、blastx、tblastn和tblastx使用的默认评分矩阵是BLOSUM62矩阵(Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919)。四个blastn参数可以调整如下:Q=10(间隙创建惩罚);R=10(间隙扩展惩罚);wink=1(在查询中的每个wink.sup.th位置生成单词命中);和gapw=16(设置生成间隙比对的窗口宽度)。等同的Blastp参数设置可以是Q=9;R=2;wink =1;和gapw=32。也可以使用NCBI(国家生物技术信息中心)BLAST高级选项参数进行检索(例如:-G,开放间隙成本[整数]:默认=5用于核苷酸/11用于蛋白质;-E,扩展间隙成本[整数]:默认=2用于核苷酸/1用于蛋白质;-q,对核苷酸不匹配的惩罚[整数]:默认=-3;-r,对核苷酸匹配的奖励[整数]:默认=1;-e,期望值[实数]:默认=10;-W,字长[整数]:默认=11用于核苷酸/28用于megablast/3用于蛋白质;-y,blast扩展的衰减(X),以位为单位:默认=20用于blastn/7用于其他;-X,间隙对齐的X衰减值(以位为单位):默认=15用于所有程序,不适用于blastn;和-Z,间隙对齐的最终X衰减值(以位为单位):50用于blastn,25用于其他)。也可以使用用于成对蛋白质比对的ClustalW(默认参数可包括,例如,Blosum62矩阵和间隙开放惩罚=10和间隙扩展惩罚=0.1)。GCG软件包版本10.0中提供的序列之间的Bestfit比较使用DNA参数GAP=50(间隙创建惩罚)和LEN=3(间隙扩展惩罚),并且蛋白质比较中的等同设置是GAP=8和LEN=2。

[0216] 考虑tRNA可以包含一个或多个修饰。示例性的经修饰的tRNA包括:酰化tRNA;烷基化tRNA;含有一个或多个不同于腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤或尿嘧啶的碱基的tRNA;通过附接特定配体或抗原性、荧光性、亲和性、反应性、光谱或其他的探针部分而共价修饰的tRNA;含有一个或多个被甲基化或以其他方式修饰的核糖部分的tRNA;用不同于20种天然氨基酸的氨基酸进行氨酰化的aa-tRNA,包括用作试剂、特异性配体的载体或作为抗原性、荧光性、反应性、亲和性、光谱或其他的探针的非天然氨基酸;或这些组成的任何组合。示例性的经修饰的tRNA分子描述于Soll et al. (1995) “tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function,” ASM Press; El Yacoubi et al. (2012) Annu. Rev. Genet. 46:69-95; Grosjean et al. (1998) “Modification and Editing of RNA.” ASM Press; Hendrickson et al. (2004) Annu. Rev. Biochem. 73:147-176, 2004; Ibba et al.

(2000) Annu. Rev. Biochem. 69:617-650; Johnson et al. (1995) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 60:71-82; Johnson et al. (1982) J. Mol. Biol. 156: 113-140; Crowley et al. (1994) Cell 78:61-71; Beier et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29:4767-4782; Torres et al. (2014) Trends Mol. Med. 20:306-314; Bjork et al. (1987) Annu. Rev. Biochem. 56:263-287; Schaffrath et al. (2017) RNA Biol. 14(9):1209-1222;和Johansson et al. (2008) Mol. Cell. Biol. 28(10): 3301-12。

[0217] 在某些实施方案中,tRNA包含天然存在的核苷酸修饰。天然存在的tRNA含有很多种转录后修饰的核苷酸,其描述于例如,在Machnicka et al. (2014) RNA Biology 11 (12): 1619-1629中,并且包括如图2B中所示的残基中的一种或多种。在某些实施方案中,tRNA包含选自下组的残基中一个或多个:第0位的2'-O-甲基鸟苷或G;第1位的假尿苷或U;第4位的2'-O-甲基腺苷、A、2'-O-甲基尿苷、U、2'-O-甲基胞苷、C、2'-O-甲基鸟苷或G;第6位的N2-甲基鸟苷或G;第7位的N2-甲基鸟苷或G;第9位的1-甲基腺苷、A、1-甲基鸟苷、G、或经修饰的G;第10位的N2-甲基鸟苷或G;第12位的N4-乙酰胞苷或C;第13位的假尿苷、U、2'-O-甲基胞苷或C;第14位的1-甲基腺苷、A或经修饰的A;第16位的二氢尿苷(D)或U;第17位的D或U;18位的2'-O-甲基鸟苷或G;第20位的3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷、D或U;第20a位的3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷、D、假尿苷,U或经修饰的U;第20b位的D、假尿苷或U;第25位的假尿苷或U;第26位的假尿苷、U、N2、N2-二甲基鸟苷、N2-甲基鸟苷、G或经修饰的G;第27位的假尿苷、U、N2、N2-二甲基鸟苷或G;第28位的假尿苷或U;第30位的假尿苷或U;第31位的假尿苷或U;第32位的2'-O-甲基假尿苷、2'-O-甲基尿苷、假尿苷、U、2'-O-甲基胞苷、3-甲基胞苷、C或经修饰的C;第34位的肌苷、A、2-硫代尿苷、2'-O-甲基尿苷、5-(羧基羟甲基)尿苷甲酯、5-氨基甲酰基甲基尿苷、5-羧甲基氨基甲基-2'-O-甲基尿苷,5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷,5-甲氧基羰基甲基尿苷、假尿苷、U、经修饰的U、2'-O-甲基胞苷、5-甲酰基-2'-O-甲基胞苷、5-甲基胞苷、C、经修饰的C、喹啉、甘露糖基-喹啉、半乳糖基-喹啉、2'-O-甲基鸟苷或G;第35位的假尿苷或U;第36位的假尿苷、U或经修饰的U;第37位的1-甲基肌苷、2-甲基硫代-N6-苏氨酰氨基甲酰腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-甲基-N6-苏氨酰氨基甲酰腺苷、N6-苏氨酰氨基甲酰腺苷、A、经修饰的A、1-甲基鸟苷、过氧怀丁苷、怀丁苷、G或经修饰的G;第38位的假尿苷、U、5-甲基胞苷、C或经修饰的C;第39位的1-甲基假尿苷、2'-O-甲基假尿苷、2'-O-甲基尿苷、假尿苷、U、2'-O-甲基鸟苷或G;第40位的假尿苷、U、5-甲基胞苷或C;第44位的2'-O-甲基尿苷,U或经修饰的U;第e11位的假尿苷或U;第e12位的假尿苷或U;第e14位的假尿苷或U;第e2位的3-甲基胞苷或C;第46位的7-甲基鸟苷或G;第47位的D、U或经修饰的U;第48位的D、U、5-甲基胞苷、C或经修饰的C;第49位的A、经修饰的A、5-甲基胞苷C或经修饰的C;第50位的假尿苷、U、5-甲基胞苷或C;第54位的5,2'-O-二甲基尿苷、5-甲基尿苷、假尿苷或U;第55位的假尿苷或U;第58位的 1-甲基腺苷、A或经修饰的A;第64位的2'-O-核糖基腺苷(磷酸)、A、2'-O-核糖基鸟苷(磷酸)、G或经修饰的G;第65位的假尿苷或U;第67位的假尿苷、U、N2-甲基鸟苷或G;第68位的假尿苷或U;和第72位的假尿苷、U、5-甲基胞苷或C。A、C、G和U分别指未修饰的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和尿嘧啶。残基的编号基于Steinberg et al., (1993) Nucleic Acids Res. 21:3011-15中描述的tRNA编号系统。

[0218] 在某些实施方案中,tRNA包含选自5-甲基尿苷、5-氨基甲酰基甲基尿苷、5-氨基甲

酰基-甲基-2-O-甲基尿苷、5-甲氧基-羰基甲基尿苷、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷、假尿苷、二氢尿苷、1-甲基腺苷和肌苷的一种或多种核苷酸修饰。

[0219] II. 制备tRNA的方法

[0220] 预期用于本发明实践的tRNA分子(例如,抑制物tRNA)可以通过本领域已知的方法生产,包括通过合成化学方法的细胞外生产、通过重组DNA方法的细胞内生产,或从天然来源纯化。

[0221] 例如,编码tRNA的DNA分子可以化学合成或通过重组DNA方法合成。例如,可以使用合适的合成核酸引物,通过常规杂交技术或聚合酶链式反应(PCR)技术从文库中合成或克隆tRNA的序列。所得编码tRNA的DNA分子可以连接到其他合适的核苷酸序列,包括例如表达控制序列以产生编码tRNA的常规基因表达构建体(即表达载体)。定义的基因构建体的生产在本领域的常规技术范围内。可以将编码期望tRNA的核酸掺入(连接)到表达载体,诸如下一节中描述的表达载体中,所述表达载体可以通过常规转染或转化技术引入宿主细胞。示例性宿主细胞是大肠杆菌(E. coli)细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚肾293 (HEK293)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,HepG2)和骨髓瘤细胞。转化的宿主细胞可以在允许宿主细胞表达编码tRNA的基因的条件下生长。具体的表达和纯化条件将根据所采用的表达系统而变化。

[0222] 或者,tRNA可以通过本领域已知的方法化学合成或从天然来源纯化。当tRNA在引入细胞或施用于受试者之前被氨酰化时,tRNA可以通过本领域已知的任何方法用期望的氨基酸氨酰化,包括化学或酶氨酰化。

[0223] III. 表达载体

[0224] 可以通过将编码感兴趣的tRNA的基因掺入合适的表达载体中而在感兴趣的细胞中表达感兴趣的tRNA。如本文所用,“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,该重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其他元件可以由宿主细胞或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域已知的所有载体,诸如掺入感兴趣重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸的或包含在脂质体中)、反转录转座子(例如背驮式(piggyback)、睡美人(sleeping beauty)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0225] 在某些实施方案中,表达载体是病毒载体。本文使用的术语“病毒”是指没有蛋白质合成或能量生成机制的专性细胞内寄生物。示例性病毒载体包括逆转录病毒载体(例如慢病毒载体)、腺病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体、epstein-barr病毒(EBV)载体、多瘤病毒载体(例如猿猴空泡病毒40(SV40)载体)、痘病毒载体和假型病毒载体。

[0226] 病毒可以是RNA病毒(具有由RNA组成的基因组)或DNA病毒(具有由DNA组成的基因组)。在某些实施方案中,病毒载体是DNA病毒载体。示例性DNA病毒包括细小病毒(例如腺相关病毒)、腺病毒、asfarviruses、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒1和2(HSV-1和HSV-2)、epstein-barr病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV))、乳头状病毒(例如,HPV)、多瘤病毒(例如,猿猴空泡病毒40(SV40))和痘病毒(例如,痘苗病毒、牛痘病毒、天花病毒、鸡痘病毒、绵羊痘病毒、粘液瘤病毒)。在某些实施方案中,病毒载体是RNA病毒载体。示例性的RNA病毒包括布尼亚病毒(例如汉坦病毒)、冠状病毒、黄病毒(例如黄热病病毒、西尼罗河病毒、登革热病毒)、肝炎病毒(例如甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒)、流感病毒(例如,A型流感病

毒、B型流感病毒、C型流感病毒)、麻疹病毒、腮腺炎病毒、诺如病毒(例如,诺瓦克病毒)、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、逆转录病毒(例如人免疫缺陷病毒-1(HIV-1))和凸隆病毒 (toroviruses)。

[0227] 在某些实施方案中,表达载体包含与编码tRNA的核苷酸序列可操作地连接的调节序列或启动子。术语“可操作地连接”是指多核苷酸元件在功能关系中的连接。当核酸序列与另一个核酸序列形成功能关系时,它是“可操作地连接的”。例如,如果启动子或增强子影响基因的转录,则它与基因可操作地连接。可操作地连接的核苷酸序列通常是连续的。然而,由于增强子通常在与启动子相隔几千个碱基时起作用,并且内含子序列可能具有可变长度,所以一些多核苷酸元件可以是可操作地连接但不直接位于侧翼,甚至可能从不同的等位基因或染色体反式起作用。

[0228] tRNA基因优选具有在多种细胞类型中有活性的强启动子。真核生物tRNA基因的启动子通常存在于编码tRNA分子本身的结构序列中。尽管在5’上游区域内存在调节转录活性的元件,但活性转录单位的长度可能远小于500个碱基对。

[0229] 可以采用的其他示例性启动子包括但不限于逆转录病毒LTR、SV40启动子、人巨细胞病毒(CMV)启动子、U6启动子或任何其他启动子(例如,细胞启动子,诸如真核细胞启动子,包括但不限于组蛋白、pol III和β-肌动蛋白启动子)。可以采用的其他病毒启动子包括但不限于腺病毒启动子、TK启动子和B19细小病毒启动子。对本领域技术人员而言,根据本文包含的教导,选择合适的启动子将是显而易见的。

[0230] 在某些实施方案中,表达载体包含编码tRNA的tRNA编码序列,该tRNA包含表2或表3中所示的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,表达载体包含编码tRNA的tRNA编码序列,该tRNA包含与表2或表3中所示核苷酸序列具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的核苷酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0231] 在某些实施方案中,除了tRNA编码序列之外,表达载体还包含对应于野生型tRNA基因侧翼的基因组DNA序列的核苷酸序列(即,来自与野生型tRNA基因相同基因组的DNA序列,并且其是基因组中野生型tRNA基因的5’或3’,例如,紧邻基因组中野生型tRNA基因的5’或3’)。在某些实施方案中,除了tRNA编码序列之外,表达载体还包含对应于外源性启动子的核苷酸序列。

[0232] 在某些实施方案中,表达载体包含表4中所示的核苷酸序列。在某些实施方案中,表达载体包含与表4中所示核苷酸序列具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。在某些实施方案中,在表达载体中,表4中所列的核苷酸序列与编码tRNA的核苷酸序列可操作地连接。在某些实施方案中,在表达载体中,表4中所列的核苷酸序列位于编码tRNA的核苷酸序列的5’或3’(例如,紧邻5’或紧邻3)。在某些实施方案中,表达载体包含选自SEQ ID NO: 869-888的核苷酸序列,或与选自SEQ ID NO: 869-888的序列具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0233] 在某些实施方案中,表达载体是本文实施例8或实施例9中描述的表达载体。

[0234] 表4

[0235]

SEQ ID NO	位置 (相对于 tRNA)	核苷酸序列
26	5′	CTACCCAGAGGCAGGCGGGAGACTCCCCCGAGCGTCCAATAAGAGC GCCGCCAATGGAGCCGCCCGCCCGCGGGGGTGCAGAGGGACTTCCG GGTGAGGTCCTCCGCTACTTCCCTCCCCACGGAAAAGATAGACCAG TCTGACGCGAGCCTGAAGGCGGCTACACGCTTTAAGCTAAGTAAAG GCACCTTCTCGCTGGC
27	3′	ACTTGTATGTTGTTTTTATCTGTCAGTTTGTTAATCCCAAGATTCC CTTTGGAAATAAAGCGAAATTGACCGTAGTGGTTATGACCAACTTC TAGTCTAAACTTAATTCTTGGAACTCAAGGATCTGAGCAAACAACT GTCAGGGTGACACATTGCTTAAACGGTGACAGCGGTCGAGAGCCTT GTCCCGGATGGAGAGT
32	3′	ACTTGTATGTTGTTTTTATCTGTCAGTTTGTTAATCCCAAGATTCC CTTTGGAAATAAAGCGAAATTGACCGTAGTGGTTATGACCAACTTC TAGTCTAAACTT
33	5′	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAA GATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGG TAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGC TTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTT GTGGAAAGGACGGGCGGAGGAAGGCACCTTCTCGCTGGC
34	3′	ACTTGTATGTTGTTTTTATCTGTCAGTTTGTTAATCCCAAGATTCC
173	5′	GATCACCGGAAGAGGTGACAGACACCTCGGGGCCCATGAACGTTTG GAATTCGTAAGGACATGAGAATCTCGGTGGTTCCGTGTCTGCCCGC CATCGCGGCCACCGGCCACGGGCCCAAGCCAAGTGTAGCGAAGCTT AGAAAAGGTTGCCCAACGTCATGTGGCTTGAGAAGGCTGCCGGGCG CCTTAAGCCGCCAGCA

[0236]

174	3’	CACTGAACCTTTTTTTGGCCTTAGAATCCCTGTTTTGGGGCCTGCAGGAAGTAGCAACCAACCCGAGCCTCCGCAGGGAATGCACTGACCTGTAGAATGGACGTTCAGCTTCCCTCCCTGTGTCTCAACACGATTACATTTCAGGAACAGCCTGGGCTGGGAGGCACTGCGCACGCGCGCCGAGTCGGGCGGAAAAATAA
869	5’	CCAAAACATCTTTTACTGTAGTATCTACTTACCATACTACCCAAGAATGGCACACTGCTCACATCTTCAAAAGCTTAAACCAAGAGCACTACACAGGTGC
870	5’	TGTGTGTCGGGGCCGGTACCCTGCTTCCGGTTCCCGCACGCATTCCCGGATTGCAGTGCGGACCCCTTCTGTAAGCGCGCGATAAAGCGCGGTTTTGGAA
871	5’	TCATGTCATATAAGTAGAACCATACAATATATATATAAAATCCAGGTTAATAGCCAATCTTACAACATTTCTCATATTTTTTGCAGTTGCTAAGCCATGG
872	5’	ACATTACAATACATATCAACATATCACCATAATTAAATTGCAAGTCTTCGTCAAAAGCAAGCCTTAAAGGAGTATCCCAAAAACACATTTTCCCCAGAAG
873	5’	AGACCTTTAGAGCGTGGTTAAACCCATATGTTGGGATTTATGCTGCTTTTATGGTAGCAATACCCTATATTAAGATTTGAAGTAGACCCGGAAAGTTAGT
874	5’	GTTCATGAAAGAATAAATAAATGTTTAAAAAAAAAAAAAACTGAGGTAAATTTCTATATTCTTTCATAAAAGCAGTTTAAAGACGAACGTTTTTCGAGGT
875	5’	GCTGGGTCTCGGTGACACTGACGACGGGAGGCGCGGTCGGAAGAGCGCGGGGCCGTCGCCTCTGGCTTAACATAGCAGATGCGCTGAGACTCCAACAGGT
876	5’	CAGTGGCGGCGAAAACTCTCTGCGTTCTGGAGGGAGGGTGCGGGCAGGAGGAGGTAGAGGATGCCTTGTAAGCGGAGCAAAAACAAGGTTCAACGTCTGC

[0237]

877	5′	CAAATCACTTGCCTCTCGGCGCGAGACCGCGATGCGCGGGGGCGGGAGCGTGATGATGGCATCGCGTAAGGAGAGGGTGTGAGAAGCCGGATCCTGTGGT
878	5′	CCCTGTGTCCGAAGAGGTCTGCGTTGCGACTTACGTGGTAGTGCTTGGAAGGTGCGGAGTAGATGAGAGATAAGTGAATGTGGACAAACCTGTCACGTAG
879	5′	GAGCGGAGCTCAGAGGGTGCGCGCTCCGCCCTTTCGCGGGCCTGGCATGAGCGCAGTGGTTGTTACACTAAAGTGTCTCCGCCTGTCGAATATTCTCGTG
880	5′	GTGTCACTGGTTTCAAATCAACCTCAATTTTTTTGGAGACGTGAGTGCTGAGCATTTTTTCTTCAGTGAAGTGACTTGGCAGCCAAAATCGCCAACGCCC
881	5′	TCCTGGCATGTCCCGCCCAAGTCCCTTAGCCCCGCTCCCCAACCCTGCCCCATTCCCACTCTAGTACCCGTAAGCTACAAGACGCCGCCGTTCGTCGGGT
882	5′	TGCTCAGTCGTCCTGCCGGGCGGGCCCTGAGGTTGCAAGGGACGGAGGAAGTTTCGTGCGTGCGCCCTTCCTATAGCGCCCAGTAGAACTGACAGTACCT
883	5′	TCCTCGGATTACGCATGCTCAGTGCAATCTTCGGTTGCCTGGACTAGCGCTCCGGTTTTTCTGTGCTGAACCTCAGGGGACGCCGACACACGTACACGTC
884	5′	GATAATTTCCTGAAAGAAAAGATCAATTCGATGTTACCAAATCTGGGATATCCAGAAAAATTTTCTTCTTCTCCTAGGAGAAAAACTATCAAATGTCAGG
885	5′	TCTCTCACGGCAAACTGTTGCAGACTGTAGAGACGCTATGCCAAGAATCTTTTACTTAAAAGCAGGAATAGATTCAATAGGCAACTTCACTGCACATGTA

[0238]

886	5′	CAACCTCCCCTTCTCAAGGAGCAGGTGGATTGGTCCCGAGCTAGCT GGTGGGCGGAGGTGACGTTTTTATAAGTTGCTCAAGAGACGGTAAC AACCGACG
887	5′	GTGGAACTTCCACTGAATTACTCTTTTCGCATGTAAGATCACTGAA CCGTGATAATCATTGATCCTATTTGTAGAACTGTATGAAACAGTTC CCTAAGGA
888	5′	TCGCTCAACAGGCGGCCAGGGTGCGAGCAGTGAAGCTGCGGCACGC CGGAGCGTTTAATGGCCATCAAATTGGCCTCTCTAGGAGGTAGCTG CAGCCGGA
895	5′	AAAGGCACCTTCTCGCTGGC
896	3′	ACTTGTATGTTGTTTTT
897	5′	TCTCGCTGGC
900	5′	AGCGCTCCGGTTTTTCTGTGCTGAACCTCAGGGGACGCCGACACAC GTACACGTC

[0239] 腺相关病毒(AAV)载体

[0240] 在某些实施方案中,表达载体是腺相关病毒(AAV)载体。AAV是一种小的、无包膜的二十面体病毒,属于依赖细小病毒属和细小病毒科。AAV具有约4.7 kb的单链线性DNA基因组。AAV能够感染几种组织类型的分裂细胞和静止细胞,不同的AAV血清型表现出不同的组织趋性。

[0241] AAV包括许多血清学可区分的类型,包括血清型AAV-1至AAV-12,以及来自非人灵长类的超过100种血清型(参见,例如,Srivastava (2008) J. Cell Biochem., 105(1): 17-24,和Gao et al. (2004) J. Virol., 78(12), 6381-6388)。本发明中使用的AAV载体的血清型可以由本领域技术人员根据递送效率、组织趋性和免疫原性来选择。例如,AAV-1、AAV-2、AAV-4、AAV-5、AAV-8、AAV-9可以用于递送至中枢神经系统;AAV-1、AAV-8、AAV-9可以用于递送至心脏;AAV-2可以用于递送至肾脏;AAV-7、AAV-8和AAV-9可以用于递送至肝脏;AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-9可以用于递送至肺,AAV-8可以用于递送至胰腺,AAV-2、AAV-5和AAV-8可以用于递送至感光细胞;AAV-1、AAV-2、AAV-4、AAV-5和AAV-8可以用于递送至视网膜色素上皮;AAV-1、AAV-6、AAV-7、AAV-8和AAV-9可以用于递送至骨骼肌。在某些实施方案中,AAV衣壳蛋白包含如美国专利号7,198,951中公开的序列,诸如但不限于AAV-9 (美国专利号7,198,951的SEQ ID NO: 1-3)、AAV-2 (美国专利号7,198,951的SEQ ID NO: 4)、AAV-1 (美国专利号7,198,951的SEQ ID NO: 5)、AAV-3 (美国专利号7,198,951的SEQ ID NO: 6)和AAV-8 (美国专利号7,198,951的SEQ ID NO: 7)。从恒河猴鉴定的AAV血清型,例如rh.8、rh.10、rh.39、rh.43和rh.74,也涵盖在本发明中。除了天然AAV血清型外,还开发了修饰的AAV衣壳用于提高递送效率、组织趋性和免疫原性。示例性天然和修饰的AAV衣壳在美国专利号7,906,111、9,493,788和7,198,951以及PCT公开号WO2017189964A2中公开。

[0242] 野生型AAV基因组含有两个145个核苷酸反向末端重复(ITR),其含有指导AAV复

制、基因组衣壳化和整合的信号序列。除了ITR,三个AAV启动子p5、p19和p40驱动编码rep和cap基因的两个开放阅读框的表达。两个rep启动子,加上单个AAV内含子的差异剪接,导致从rep基因产生四种rep蛋白(Rep78、Rep68、Rep52和Rep40)。Rep蛋白负责基因组复制。Cap基因由p40启动子表达,并编码三种衣壳蛋白(VP1、VP2和VP3),它们是cap基因的剪接变体。这些蛋白质形成AAV颗粒的衣壳。

[0243] 因为用于复制、衣壳化和整合的顺式作用信号包含在ITR中, 4.3 kb内部基因组的一些或全部可以被外源DNA替换,例如,用于外源性感兴趣的基因的表达盒。因此,在某些实施方案中,AAV载体包含基因组,该基因组包含外源性基因的表达盒,其两侧为5’ ITR和3’ ITR。ITR可以衍生自与衣壳或其衍生物相同的血清型。可替代地,ITR可能与衣壳具有不同的血清型,从而生成假型AAV。在某些实施方案中,ITR衍生自AAV-2。在某些实施方案中,ITR衍生自AAV-5。可以修饰至少一个ITR以突变或删除末端解离位点(terminal resolution site),从而允许产生自身互补的AAV载体。

[0244] 可以反式例如在质粒上提供rep和cap蛋白,以产生AAV载体。允许AAV复制的宿主细胞系必须表达rep和cap基因、ITR侧翼表达盒和辅助病毒提供的辅助功能,例如腺病毒基因E1a、E1b55K、E2a、E4orf6和VA (Weitzman et al., Adeno-associated virus biology. Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols, pp. 1-23, 2011)。已经详细描述了生成和纯化AAV载体的方法(参见,例如Mueller et al., (2012) Current Protocols in Microbiology, 14D.1.1-14D.1.21, Production and Discovery of Novel Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors)。许多细胞类型适用于生产AAV载体,包括HEK293细胞、COS细胞、HeLa细胞、BHK细胞、Vero细胞以及昆虫细胞(参见例如美国专利号6,156,303、5,387,484、5,741,683、5,691,176、5,688,676和8,163,543,美国专利公开号20020081721和PCT公开号WO00/47757、WO00/24916和WO96/17947)。AAV载体通常在这些细胞类型中由含有ITR侧接的表达盒的一种质粒和提供额外AAV和辅助病毒基因的一种或多种额外质粒产生。

[0245] 任何血清型的AAV均可以用于本发明。类似地,预期可以使用任何腺病毒类型,并且本领域技术人员将能够鉴定适合生产其期望的重组AAV载体(rAAV)的AAV和腺病毒类型。可以例如通过亲和层析、碘克沙醇梯度或CsCl梯度来纯化AAV颗粒。

[0246] AAV载体可以具有4.7 kb大小或大于或小于4.7 kb的单链基因组,包括大至5.2 kb或小至3.0 kb的超大基因组。因此,在待从AAV载体表达的外源性感兴趣基因很小的情况下,AAV基因组可以包含填充序列。此外,载体基因组可以基本上是自身互补的,从而允许在细胞中快速表达。在某些实施方案中,自身互补AAV载体的基因组包含从5’到3’:5’ ITR;第一核酸序列,其包含与感兴趣基因的编码序列可操作地连接的启动子和/或增强子;经修饰的ITR,其不具有功能性末端解离位点;第二核酸序列,其与第一核酸序列互补或基本互补;和3’ ITR。含有所有类型基因组的AAV载体均适用于本发明的方法。

[0247] AAV载体的非限制性实例包括pAAV-MCS (Agilent Technologies)、pAAVK-EF1α-MCS (System Bio 目录号 AAV502A-1)、pAAVK-EF1α-MCS1-CMV-MCS2 (System Bio 目录号 AAV503A-1)、pAAV-ZsGreen1 (Clontech 目录号6231)、pAAV-MCS2 (Addgene质粒#46954)、AAV-Stuffer (Addgene质粒#106248)、pAAVscCBPIGpluc (Addgene质粒#35645)、AAVS1_Puro_PGK1_3xFLAG_Twin_Strep (Addgene质粒#68375)、pAAV-RAM-d2TTA::TRE-MCS-WPRE-pA (Addgene质粒#63931)、pAAV-UbC (Addgene质粒#62806)、pAAVS1-P-MCS (Addgene质

粒#80488)、pAAV-Gateway (Addgene质粒#32671)、pAAV-Puro_siKD (Addgene质粒#86695)、pAAVS1-Nst-MCS (Addgene质粒#80487)、pAAVS1-Nst-CAG-DEST (Addgene质粒#80489)、pAAVS1-P-CAG-DEST (Addgene质粒#80490)、pAAVf-EnhCB-lacZnls (Addgene质粒#35642)和pAAVS1-shRNA (Addgene质粒#82697)。这些载体可以经修饰以适用于治疗性用途。例如,可以将外源性感兴趣的基因插入多克隆位点,并且选择标志物(例如,puro或编码荧光蛋白的基因)可以缺失或经另一个(相同或不同的)外源性感兴趣的基因替换。AAV载体的其他实例公开于美国专利号5,871,982、6,270,996、7,238,526、6,943,019、6,953,690、9,150,882和8,298,818,美国专利公开号2009/0087413和PCT公开号WO2017075335A1、WO2017075338A2和WO2017201258A1中。

[0248] 在某些实施方案中,表达载体是能够靶向受试者例如人受试者的神经系统例如中枢神经系统的AAV载体。可以靶向神经系统的示例性AAV载体包括AAV9变体AAV-PHP.B(参见,例如,Deverman et al. (2016) Nat. Biotechnol. 34(2):204-209)、AAV-AS (参见,例如,Choudhury et al. (2016) Mol. Ther. 24:726-35)和AAV-PHP.eB (参见,例如,Chan et al. (2017) Nat. Neurosci. 20:1172-79)。用于靶向神经系统的其他示例性基于AAV的策略描述于Bedrook et al. (2018) Annu Rev Neurosci. 41:323-348。在某些实施方案中,AAV载体是AAV-PHP.eB载体。

[0249] 慢病毒载体

[0250] 在某些实施方案中,病毒载体可以是逆转录病毒载体。逆转录病毒载体的实例包括莫洛尼鼠白血病病毒载体、脾坏死病毒载体和衍生自逆转录病毒诸如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生性肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒的载体。逆转录病毒载体可用作介导逆转录病毒介导的基因转移到真核细胞中的药剂。

[0251] 在某些实施方案中,逆转录病毒载体是慢病毒载体。示例性的慢病毒载体包括衍生自人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)、人免疫缺陷病毒-2(HIV-2)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)、Jembrana病病毒(JDV)、马传染性贫血病毒(EIAV)和山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)的病毒。

[0252] 通常构建逆转录病毒载体,使得编码病毒结构基因的大部分序列被删除并被感兴趣的一种或多种基因替换。通常,使用本领域已知的基因工程技术从逆转录病毒骨架中去除结构基因(即gag、pol和env)。因此,最小逆转录病毒载体包含从5’到3’:5’长末端重复(LTR)、包装信号、任选的外源性启动子和/或增强子、外源性感兴趣的基因和3’ LTR。如果没有提供外源性启动子,则基因表达由5’ LTR驱动,5’ LTR是弱启动子并且需要Tat的存在以激活表达。可以在用于制造慢病毒的单独多个载体中提供结构基因,从而使产生的病毒粒复制缺陷。具体而言,对于慢病毒,包装系统可包含编码Gag、Pol、Rev和Tat基因的单一包装载体,以及编码包膜蛋白Env的第三个单独载体(通常是VSV-G,因为它具有广泛的感染性)。为了提高包装系统的安全性,可以分裂包装载体,从一个载体表达Rev,从另一个载体表Gag和Pol。也可以通过使用包含嵌合5’ LTR的逆转录病毒载体从包装系统中消除Tat,其中5’ LTR的U3区经异源调节元件替换。

[0253] 可以以几种通用方式将基因掺入前病毒骨架中。最直接的结构是将逆转录病毒的结构基因替换为在LTR内的病毒调节序列控制下转录的单个基因。还构建了可以将一种以上基因引入靶细胞的逆转录病毒载体。通常,在此类载体中,一个基因在病毒LTR的调节控

制之下,而第二个基因或是通过剪接信息表达,或是在其自身的内部启动子的调节之下。

[0254] 因此,新基因的侧翼为5’和3’ LTR,它们分别用于促进病毒粒RNA的转录和多聚腺苷酸化。术语“长末端重复”或“LTR”是指位于逆转录病毒DNA末端的碱基对的结构域,在其天然序列背景中,它们是直接重复并含有U3、R和U5区。LTR通常为逆转录病毒基因的表达(例如,基因转录物的促进、起始和多聚腺苷酸化)和病毒复制提供基本功能。LTR包含许多调节信号,包括转录控制元件、多聚腺苷酸化信号以及病毒基因组复制和整合所需的序列。U3区含有增强子和启动子元件。U5区是引物结合位点和R区之间的序列并且含有多聚腺苷酸化序列。R(重复)区的侧翼为U3和U5区。在某些实施方案中,R区包含反式激活响应(TAR)遗传元件,其与反式激活因子(tat)遗传元件相互作用以增强病毒复制。在其中5’ LTR的U3区经异源启动子替换的实施方案中不需要该元件。

[0255] 在某些实施方案中,逆转录病毒载体包含经修饰的5’ LTR和/或3’ LTR。3’ LTR的修饰通常通过使病毒复制缺陷来提高慢病毒或逆转录病毒系统的安全性。在具体实施方案中,逆转录病毒载体是自灭活(SIN)载体。如本文所用,SIN逆转录病毒载体是指复制缺陷的逆转录病毒载体,其中3’ LTR U3区已经修饰(例如,通过缺失或替代)以防止病毒转录超过第一轮病毒复制。这是因为在病毒复制期间3’ LTR U3区被用作5’ LTR U3区的模板,因此,在没有U3增强子-启动子的情况下,病毒转录物无法制备。在进一步的实施方案中,3’ LTR经修饰,使得U5区经替换,例如,经理想的多腺苷酸化序列替换。应当注意,对LTR的修饰,诸如对3’ LTR、5’ LTR或3’和5’ LTR两者的修饰,也被认为在本发明的实践中是有用的。

[0256] 在某些实施方案中,5’ LTR的U3区经异源启动子替换以在病毒颗粒产生期间驱动病毒基因组的转录。可以使用的异源启动子的实例包括例如病毒猿猴病毒40(SV40)(例如早期或晚期)、巨细胞病毒(CMV)(例如即早期)、莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)和单纯疱疹病毒(HSV)(胸苷激酶)启动子。典型的启动子能够以Tat非依赖性的方式驱动高水平的转录。这种替换降低重组以生成复制能力病毒的可能性,因为病毒生产系统中没有完整的U3序列。

[0257] 与5’ LTR相邻的是基因组逆转录所必需的序列(tRNA引物结合位点)和病毒RNA高效包装到颗粒中所必需的序列(Psi位点)。如本文所用,术语“包装信号”或“包装序列”是指位于逆转录病毒基因组内的序列,其是病毒颗粒形成过程中逆转录病毒RNA链的衣壳化所必需的(参见,例如,Clever et al., 1995 J. Virology, 69(4):2101-09)。包装信号可以是病毒基因组的衣壳化所需的最小包装信号(也称为psi [Ψ]序列)。

[0258] 在某些实施方案中,逆转录病毒载体(例如,慢病毒载体)还包含FLAP。如本文所用,术语“FLAP”指其序列包括逆转录病毒例如HIV-1或HIV-2的中央多嘌呤束(central polypurine tract)和中央终止序列(cPPT和CTS)的核酸。合适的FLAP元件描述于美国专利号6,682,907和Zennou et al. (2000) Cell, 101:173中。在逆转录过程中,正链DNA在cPPT的中心起始和CTS的中心终止导致形成三链DNA结构:中心DNA瓣(flap)。虽然不希望受任何理论的束缚,但DNA瓣可以充当慢病毒基因组核输入的顺式活性决定子和/或可以增加病毒的滴度。在特定实施方案中,逆转录病毒载体主链包含载体中异源感兴趣基因上游或下游的一种或多种FLAP元件。例如,在特定实施方案中,转移质粒包括FLAP元件。在一个实施方案中,本发明的载体包含从HIV-1分离的FLAP元件。

[0259] 在某些实施方案中,逆转录病毒载体(例如,慢病毒载体)进一步包含输出元件。在

一个实施方案中,逆转录病毒载体包含一种或多种输出元件。术语“输出元件”是指调节RNA转录物从细胞核转运至细胞质的顺式转录后调节元件。RNA输出元件的实例包括但不限于人免疫缺陷病毒(HIV) RRE(参见例如,Cullen et al., (1991) J. Virol. 65: 1053;和Cullen et al., (1991) Cell 58: 423)和乙型肝炎病毒转录后调节元件(HPRE)。通常,将RNA输出元件置于基因的3’ UTR内,并且可以作为一个或多个拷贝插入。

[0260] 在某些实施方案中,逆转录病毒载体(例如,慢病毒载体)进一步包含转录后调节元件。多种转录后调节元件可以增加异源核酸的表达,例如土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE;参见Zufferey et al., (1999) J. Virol., 73:2886);存在于乙型肝炎病毒(HPRE)中的转录后调节元件Huang et al., Mol. Cell. Biol., 5:3864);等等(Liu et al., (1995), Genes Dev., 9:1766)。转录后调节元件通常位于异源核酸序列的3’末端。这种构型导致mRNA转录物的合成,其5’部分包含异源核酸编码序列并且其3’部分包含转录后调节元件序列。在某些实施方案中,本发明的载体缺少或不包含转录后调节元件诸如WPRE或HPRE,因为在一些情况下,这些元件增加细胞转化的风险和/或不实质或显著增加mRNA转录物的量或增加mRNA稳定性。因此,在某些实施方案中,本发明的载体缺少或不包含WPRE或HPRE作为额外的安全措施。

[0261] 指导异源核酸转录物的高效终止和多聚腺苷酸化的元件增加异源基因表达。转录终止信号通常在多腺苷酸化信号的下游发现。因此,在某些实施方案中,逆转录病毒载体(例如,慢病毒载体)进一步包含多聚腺苷酸化信号。如本文所用,术语“多腺苷酸化信号”或“多腺苷酸化序列”表示指导RNA聚合酶H对新生RNA转录物的终止和多腺苷酸化两者的DNA序列。重组转录物的高效多腺苷酸化是期望的,因为缺乏多腺苷酸化信号的转录物不稳定并迅速降解。可以用于本发明载体的多腺苷酸化信号的说明性实例包括理想的多腺苷酸化序列(例如,AATAAA, ATTAAA AGTAAA)、牛生长激素多腺苷酸化序列(BGHpA)、兔β-珠蛋白多腺苷酸化序列(rβgpA),或本领域已知的其他合适的异源或内源性多聚腺苷酸化序列。

[0262] 在某些实施方案中,逆转录病毒载体进一步包含绝缘子元件。绝缘子元件可能有助于保护逆转录病毒表达的序列(例如治疗性基因)免受整合位点效应的影响,整合位点效应可能由基因组DNA中存在的顺式作用元件介导并导致转移序列的表达失调(即位置效应;参见,例如,Burgess-Beusse et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99: 16433;和Zhan et al., 2001, Hum. Genet., 109:471)。在某些实施方案中,逆转录病毒载体在一个或两个LTR中或在整合到细胞基因组中的载体区域的别处包含绝缘子元件。适用于本发明的绝缘子包括但不限于鸡β-珠蛋白绝缘子(参见Chung et al., (1993). Cell 74:505;Chung et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:575;和Bell et al., 1999. Cell 98:387)。绝缘子元件的实例包括但不限于来自β-珠蛋白基因座的绝缘子,诸如鸡HS4。

[0263] 慢病毒载体的非限制性实例包括pLVX-EF1alpha-AcGFP1-C1 (Clontech 目录号631984)、pLVX-EF1alpha-IRES-mCherry (Clontech 目录号631987)、pLVX-Puro (Clontech 目录号632159)、pLVX-IRES-Puro (Clontech 目录号632186)、pLenti6/V5-DEST™ (Thermo Fisher)、pLenti6.2/V5-DEST™ (Thermo Fisher)、pLKO.1 (Addgene的质粒#10878)、pLKO.3G (Addgene的质粒#14748)、pSico (Addgene的质粒#11578)、pLJM1-EGFP (Addgene的质粒#19319)、FUGW (Addgene的质粒#14883)、pLVTHM (Addgene的质粒#

12247)、pLVUT-tTR-KRAB (Addgene的质粒#11651)、pLL3.7 (Addgene的质粒#11795)、pLB (Addgene的质粒#11619)、pWPXL (Addgene的质粒#12257)、pWPI (Addgene的质粒#12254)、EF.CMV.RFP (Addgene的质粒#17619)、pLenti CMV Puro DEST (Addgene的质粒#17452)、pLenti-puro (Addgene的质粒#39481)、pULTRA (Addgene的质粒#24129)、pLX301 (Addgene的质粒#25895)、pHIV-EGFP (Addgene的质粒#21373)、pLV-mCherry (Addgene的质粒#36084)、pLionII (Addgene的质粒#1730)、pInducer10-mir-RUP-PheS (Addgene的质粒#44011)。这些载体可以经修饰以适用于治疗性用途。例如,选择标志物(例如puro、EGFP或mCherry) 可以缺失或经第二个外源性感兴趣的基因替换。慢病毒载体的其他实例公开于美国专利号7,629,153、7,198,950、8,329,462、6,863,884、6,682,907、7,745,179、7,250,299、5,994,136、6,287,814、6,013,516、6,797,512、6,544,771、5,834,256、6,958,226、6,207,455、6,531,123和6,352,694,和PCT 公开号WO2017/091786。

[0264] 腺病毒载体

[0265] 在某些实施方案中,病毒载体可以是腺病毒载体。腺病毒是中等大小(90-100 nm)、无包膜(裸的)的二十面体病毒,由核衣壳和双链线性DNA基因组组成。术语“腺病毒”是指腺病毒属中的任何病毒,包括但不限于人、牛、绵羊、马、犬、猪、鼠和猿猴腺病毒亚属。通常,通过将一个或多个突变(例如,缺失、插入或替代)引入腺病毒的腺病毒基因组来生成腺病毒载体,以适应非天然核酸序列的插入,例如,用于基因转移至腺病毒。

[0266] 人腺病毒可以用作腺病毒载体的腺病毒基因组的来源。例如,腺病毒可以是亚组A(例如血清型12、18和31)、亚组B(例如血清型3、7、1、1、14、16、21、34、35和50)、亚组C(例如,血清型1、2、5和6),亚组D(例如,血清型8、9、10、13、15、17、19、20、22-30、32、33、36-39和42-48)、亚组E(例如血清型4)、亚组F(例如血清型40和41)、未分类的血清型(例如血清型49和51),或任何其他腺病毒血清组或血清型。腺病毒血清型1至51可从美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, Virginia)获得。非C组腺病毒载体、生产非C组腺病毒载体的方法和使用非C组腺病毒载体的方法公开于例如美国专利号5,801,030、5,837,511和5,849,561以及PCT公开号WO1997/012986和WO1998/053087。

[0267] 可以使用非人腺病毒(例如猿、猿猴、禽、犬、绵羊或牛腺病毒)以生成腺病毒载体(即,作为腺病毒载体的腺病毒基因组的来源)。例如,腺病毒载体可以基于猿猴腺病毒,包括新大陆和旧大陆猴(参见,例如,Virus Taxonomy: VHIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2005))。感染灵长类的腺病毒的系统发育分析公开于例如Roy et al. (2009) PLoS Pathog. 5(7):e1000503。大猩猩腺病毒可以用作腺病毒载体的腺病毒基因组的来源。大猩猩腺病毒和腺病毒载体描述于例如PCT公开号WO2013/052799、WO2013/052811和WO2013/052832中。腺病毒载体还可以包含亚型的组合,从而为“嵌合”腺病毒载体。

[0268] 腺病毒载体可以是有复制能力的、有条件性复制能力的或复制缺陷的。有复制能力的腺病毒载体可以在典型的宿主细胞,即通常能够被腺病毒感染的细胞中复制。有条件性复制能力的腺病毒载体是经过工程化改造以在预定条件下复制的腺病毒载体。例如,复制必需的基因功能,例如由腺病毒早期区域编码的基因功能,可以可操作地连接到可诱导的、可抑制的或组织特异性转录控制序列,例如启动子。美国专利号5,998,205中进一步描述了条件性复制的腺病毒载体。复制缺陷的腺病毒载体是需要复制所需的腺病毒基因组的

一个或多个基因功能或区域的补足的腺病毒载体,其是由于例如一种或多种复制必需基因功能或区域的缺陷,使得腺病毒载体不在典型的宿主细胞中复制,尤其是在被腺病毒载体感染的人体内的那些细胞中复制。

[0269] 优选地,腺病毒载体是复制缺陷的,使得复制缺陷的腺病毒载体需要腺病毒基因组的一个或多个区域的至少一种复制必需基因功能的补足用于繁殖 (例如,以形成腺病毒载体颗粒)。腺病毒载体可以是仅腺病毒基因组的早期区域(即E1-E4区域)、仅腺病毒基因组的晚期区域(即L1-L5区域)、腺病毒基因组的早期和晚期区域,或所有腺病毒基因(即高容量腺载体(HC-Ad))的一种或多种复制必需基因功能缺陷的。参见,例如,Morsy et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 965-976, Chen et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1645-1650,和Kochanek et al. (1999) Hum. Gene Ther. 10(15): 2451-9。复制缺陷的腺病毒载体的实例公开于美国专利号5,837,511、5,851,806、5,994,106、6,127,175、6,482,616和7,195,896,和PCT公开号WO1994/028152、WO1995/002697、WO1995/016772、WO1995/034671、WO1996/022378、WO1997/012986、WO1997/021826和WO2003/022311。

[0270] 本发明的复制缺陷的腺病毒载体可以在补足细胞系中产生,所述细胞系以适当的水平提供在复制缺陷的腺病毒载体中不存在但病毒繁殖所需的基因功能,以产生高滴度的病毒载体原种。这样的补足细胞系是已知的并且包括但不限于293细胞(描述于例如Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36: 59-72)、PER.C6细胞(描述于例如,PCT公开号WO1997/000326和美国专利号5,994,128和6,033,908),以及293-ORF6细胞(描述于例如,PCT公开号WO1995/034671和Brough et al. (1997) J. Virol. 71: 9206-9213)。产生本发明的复制缺陷腺病毒载体的其他合适的补足细胞系包括已经生成以繁殖腺病毒载体的补足细胞,所述腺病毒载体编码其表达抑制宿主细胞中的病毒生长的转基因(参见,例如,美国专利公开号2008/0233650)。其他合适的补足细胞描述于例如美国专利号6,677,156和6,682,929以及PCT公开号WO2003/020879中。含有腺病毒载体的组合物的制剂进一步描述于例如美国专利号6,225,289和6,514,943以及PCT公开号WO2000/034444中。

[0271] 另外的示例性腺病毒载体和/或用于制备或繁殖腺病毒载体的方法描述于美国专利号5,559,099、5,837,511、5,846,782、5,851,806、5,994,106、5,994,128、5,965,541、5,981,225、6,040,174、6,020,191、6,083,716、6,113,913、6,303,362、7,067,310和9,073,980。

[0272] 可商购的腺病毒载体系统包括可从Thermo Fisher Scientific获得的ViraPower™腺病毒表达系统、可从Agilent Technologies获得的AdEasy™腺病毒载体系统和可从Takara Bio USA, Inc.获得的Adeno-X™表达系统3。

[0273] 病毒载体生产

[0274] 生产病毒载体的方法是本领域已知的。通常,使用常规技术在合适的宿主细胞系中产生感兴趣的病毒,包括在合适的条件下培养转染或感染的宿主细胞以允许生产感染性病毒颗粒。编码病毒基因和/或tRNA的核酸可以掺入质粒并通过常规转染或转化技术引入宿主细胞。用于产生所公开病毒的示例性合适宿主细胞包括人细胞系,诸如HeLa、Hela-S3、HEK293、911、A549、HER96或PER-C6细胞。具体的生产和纯化条件将根据病毒和所采用的生产系统而有所不同。

[0275] 在某些实施方案中,生产细胞可以直接施用于受试者,然而,在其他实施方案中,在生产后,从培养物中回收感染性病毒颗粒并任选地纯化。典型的纯化步骤可包括噬斑(plaque)纯化、离心例如氯化铯梯度离心、澄清、酶处理例如benzonase或蛋白酶处理、色谱步骤例如离子交换色谱或过滤步骤。

[0276] IV. 药物组合物

[0277] 对于治疗用途,tRNA和/或表达载体优选与药学上可接受的载体组合。如本文所用,术语"药学上可接受的"是指在合理的医学判断范围内,适用于与人类和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的那些化合物、材料、组合物和/或剂型,具有合理的收益/风险比。

[0278] 如本文所用,术语"药学上可接受的载体"是指适用于与人类和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的缓冲剂、载体和赋形剂,具有合理的收益/风险比。药学上可接受的载体包括任何标准药用载体,诸如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂(例如,诸如油/水或水/油乳剂)和各种类型的润湿剂。该组合物还可以包括稳定剂和防腐剂。对于载体、稳定剂和佐剂的实例,参见例如Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975]。药学上可接受的载体包括与药物施用相容的缓冲剂、溶剂、分散介质、包衣剂、等渗剂和吸收延迟剂等。此类介质和药剂用于药物活性物质的用途在本领域中是已知的。

[0279] 在某些实施方案中,药物组合物可以含有用于改变、维持或保存例如组合物的pH、渗透压、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的制剂材料。在此类实施方案中,合适的制剂材料包括但不限于氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(诸如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(诸如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);填充剂(诸如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(诸如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(诸如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、β-环糊精或羟丙基-β-环糊精);填充剂;单糖;二糖;和其他碳水化合物(诸如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐反离子(诸如钠);防腐剂(诸如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂(诸如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(诸如甘露醇或山梨糖醇);悬浮剂;表面活性剂或润湿剂(诸如普朗尼克(pluronics)、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨酯诸如聚山梨酯20、聚山梨酯、曲拉通(triton)、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapal));稳定性增强剂(诸如蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(诸如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾,甘露醇山梨糖醇);递送媒介物;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂(参见Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990)。

[0280] 在某些实施方案中,药物组合物可以包含纳米颗粒,例如聚合物纳米颗粒、脂质体或胶束(参见Anselmo et al. (2016) Bioeng. Transl. Med. 1: 10-29)。在某些实施方案中,组合物不包含(或基本上不含,例如,该组合物包含小于5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的)纳米颗粒或氨基脂质递送化合物,例如,如美国专利公开号2017/0354672中所述。在某些实施方案中,引入细胞或施用于受试者的tRNA或表达载体不与另一部分,例如载体颗粒,

例如氨基脂质颗粒缀合或缔合。如本文所用,术语“缀合的”,当用于两个或更多个部分时,是指这些部分直接或经由一个或多个充当连接剂的附加部分物理相互缔合或连接,以形成足够稳定的结构,使得这些部分在使用结构的条件下,例如生理条件下保持物理缔合。通常,这些部分通过一个或多个共价键或通过涉及特异性结合的机制附接。或者,足够数量的较弱相互作用可以为部分提供足够的稳定性以保持物理结合。

[0281] 在某些实施方案中,药物组合物可以包含持续或受控递送制剂。用于配制持续或受控递送方式,诸如脂质体载体、生物可侵蚀微粒或多孔珠和储库注射剂的技术,也是本领域技术人员已知的。缓释制剂可以包括例如多孔聚合物微粒或成型制品形式的半透性聚合物基质,例如薄膜或微胶囊。缓释基质可以包括聚酯、水凝胶、聚丙交酯、L-谷氨酸和L-谷氨酸-γ-乙酯的共聚物、聚(甲基丙烯酸-2-羟乙酯)、乙烯醋酸乙烯酯或聚-D(-)-3-羟基丁酸。缓释组合物还可以包括可以通过本领域已知的几种方法中的任何一种制备的脂质体。

[0282] 含有本文公开的tRNA和/或表达载体的药物组合物可以以剂量单位形式存在并且可以通过任何合适的方法制备。药物组合物应配制成与其预期的施用途径相容。施用途径的实例是静脉内(IV)、皮内、吸入、经皮、局部、经粘膜、鞘内和直肠施用。在某些实施方案中,tRNA和/或表达载体经鞘内施用。在某些实施方案中, tRNA和/或表达载体通过注射施用。有用的制剂可以通过制药领域已知的方法制备。例如,参见Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990)。适用于胃肠外施用的制剂组分包括无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如EDTA;缓冲剂,诸如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的试剂,诸如氯化钠或葡萄糖。

[0283] 对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。载体在制造和贮存条件下应该是稳定的,并且应该抵抗微生物进行保存。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇),以及其合适的混合物。

[0284] 通常,递送核酸分子的任何方法可以适用于与tRNA一起使用(参见例如Akhtar et al. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144和PCT公开号WO94/02595)。tRNA可以被修饰或可替代地使用药物递送系统进行递送,以防止tRNA在体内被内切核酸酶和外切核酸酶迅速降解。tRNA分子可以通过与亲脂基团诸如胆固醇化学缀合进行修饰,以增强细胞摄取并防止降解。tRNA分子也可以与适体缀合或以其他方式缔合。也可以使用药物递送系统,诸如纳米颗粒、树枝状聚合物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统递送tRNA。带正电荷的阳离子递送系统促进tRNA分子(带负电荷)的结合,并增强带负电荷的细胞膜上的相互作用,以允许细胞高效摄取tRNA。阳离子脂质、树枝状聚合物或聚合物可以与RNA,例如tRNA结合,或被诱导形成包裹RNA的囊泡或胶束(参见例如Kim et al. (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116)。制备和施用阳离子-RNA复合物的方法完全在本领域技术人员的能力范围内(参见,例如,Sorensen et al. (2003) J. Mol. Biol 327:761-766; Verma et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold et al. (2007) J. Hypertens. 25:197-205)。可用于全身递送RNA,例如tRNA的药物递送系统的一些非限制性实例包括DOTAP (Sorensen et al. (2003)同上;Verma et al. (2003),同上)、

Oligofectamine、固体核酸脂质颗粒(Zimmermann et al. (2006) Nature 441:111-114)、心磷脂(Chien et al. (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328; Pal et al. (2005) Int J. Oncol. 26:1087-1091)、聚乙烯亚胺(Bonnet et al. (2008) Pharm. Res. 25(12):2972-82; Aigner (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659)、Arg-Gly-Asp (RGD)肽(Liu (2006) Mol. Pharm. 3:472-487),和聚酰胺胺(Tomalia et al. (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67; Yoo et al.(1999) Pharm. Res. 16:1799-1804)。在某些实施方案中,tRNA与环糊精形成复合物用于全身施用。RNA和环糊精的施用方法和药物组合物可以在美国专利号7,427,605中找到。

[0285] 药物制剂优选是无菌的。可以通过任何合适的方法完成灭菌,例如通过无菌过滤膜过滤。在组合物被冻干的情况下,可以在冻干和重构之前或之后进行过滤灭菌。

[0286] 本文所述的组合物可以局部或全身施用。施用通常是胃肠外施用。在优选的实施方案中,药物组合物经皮下施用,并且在甚至更优选的实施方案中经静脉内施用。用于胃肠外施用的制备物包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳剂。

[0287] 通常,活性组分例如tRNA和/或表达载体的治疗有效量在0.1 mg/kg至100 mg/kg的范围内,例如1 mg/kg至100 mg/kg、1 mg/kg至10 mg/kg。在某些实施方案中,病毒表达载体的治疗有效量在10^2至10^{15}个噬斑形成单位(pfus)的范围内,例如10^2至10^{10}、10^2至10^5、10^5至10^{15}、10^5至10^{10}或10^{10}至10^{15}个噬斑形成单位。施用量将取决于变量诸如待治疗的疾病或适应症的类型和程度、患者的整体健康状况、抗体的体内效力、药物制剂和施用途径。初始剂量可以增加到超过上限,以快速达到期望的血液水平或组织水平。可替代地,初始剂量可以小于最佳剂量,并且可以在治疗过程中逐渐增加每日剂量。可以优化人体剂量,例如,在设计为从0.5 mg/kg到20 mg/kg的常规I期剂量递增研究中。给药频率可能取决于因素诸如施用途径、剂量、血清半衰期和所治疗疾病有所不同。示例性的给药频率是每天一次、每周一次和每两周一次。优选的施用途径是胃肠外的,例如静脉内输注。在某些实施方案中,多肽和/或多聚体蛋白被冻干,然后在施用时在缓冲盐水中重构。

[0288] 在某些实施方案中,tRNA或表达载体不与另一部分,例如载体颗粒,例如氨基脂质颗粒缀合或缔合。在某些实施方案中,将tRNA或表达载体以缺少纳米颗粒的剂型引入细胞或施用于受试者。在某些实施方案中,将tRNA或表达载体以缺少氨基脂质递送化合物的剂型引入细胞或施用于受试者,例如,如美国专利公开号2017/0354672中所述。

[0289] V. 治疗用途

[0290] 本文公开的组合物和方法可以用于治疗受试者的提前终止密码子(PTC)介导的病症。如本文所用,术语“PTC介导的病症”是指由基因中的PTC介导、增强、恶化或以其他方式促进或与之相关的病症。

[0291] 本发明提供了在有此需要的受试者中治疗PTC介导的病症的方法。该方法包括向受试者施用单独或联合另一种治疗剂的有效量的tRNA和/或表达载体,例如本文公开的tRNA和/或表达载体,以治疗受试者的PTC介导的疾病。

[0292] 在某些实施方案中,提前终止密码子介导的病症是下表5中列出的病症,和/或具有提前终止密码子的基因是下表5相应行中所列的基因。

[0293] 表5

[0294]

基因	病症
SCN1A	Dravet 综合征；遗传性癫痫伴热性惊厥(GEFS)
KCNQ2	良性家族性婴儿癫痫(BFIE)；早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
SCN2A	良性家族性婴儿癫痫(BFIE)；早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
CDKL5	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)；Lennox-Gastaut 综合征；CDKL5 缺乏症
MECP2	Rett 综合征；PPM-X 综合征
STXBP1	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)；Ohtahara 综合征；Dravet 综合征
SCN8A	良性家族性婴儿癫痫(BFIE)；早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
CACNA1A	发作性共济失调；偏瘫型偏头痛
SLC2A1	特发性全身性癫痫
FOXG1	FOXG1 综合征
PCDH19	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
GRIN2B	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
DEPDC5	家族性局灶性癫痫伴可变病灶(FFEVF)
GRIN2A	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)；Lennox-Gastaut 综合征

CHD2	儿童期发作的癫痫性脑病
SCN9A	先天性对疼痛不敏感等
SYNGAP1	SYNGAP1 相关智力残疾
ALDH7A1	吡哆醇依赖性癫痫
GRIN1	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)；Lennox-Gastaut 综合征
TBC1D24	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)；家族性婴儿肌阵挛癫痫(FIME)
SLC6A1	肌阵挛站立不能性癫痫
DNM1	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
ARX	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)；X 连锁智力障碍
KCNB1	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
KCNA1	部分性癫痫和发作性共济失调
GABRG2	遗传性癫痫伴热性惊厥(GEFS)；早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)；热性惊厥
WWOX	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
γ-氨基丁酸	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)；Lennox-Gastaut 综合征
SZT2	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
LGI1	伴听觉特征的常染色体显性部分性癫痫(ADPEAF)

[0295]

[0296]

PNPO	PNPO 缺乏
SCN1B	遗传性癫痫伴热性惊厥(GEFS)；早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
UBA5	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
KCTD7	进行性肌阵挛癫痫
SCARB2	肌阵挛-肾衰竭(AMRF)；进行性肌阵挛癫痫
SLC13A5	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
CSTB	进行性肌阵挛癫痫
EPM2A	进行性肌阵挛癫痫
PRRT2	良性家族性婴儿惊厥(BFIS)
NHLRC1	进行性肌阵挛癫痫
SLC25A22	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)
PRRT2	良性家族性婴儿惊厥(BFIS)
ALG13	早期婴儿癫痫性脑病(EIEE)

[0297] 在某些实施方案中,提前终止密码子介导的病症是下表6中列出的病症,和/或具有提前终止密码子的基因是下表6相应行中列出的基因。

[0298] 表6

[0299]

基因	疾病
β 珠蛋白	β-地中海贫血
CHM	无脉络膜
CFTR	囊性纤维化
抗肌萎缩蛋白	杜氏肌营养不良
α-L-艾杜糖醛酸酶	Hurler 综合征
KIF1A	KIF1A
FBN1	马方综合征
ARSB	Maroteaux-Lamy 综合征
SMPD1	尼曼–皮克病
NAGLU	Sanfilippo 综合征
DHCR7	Smith-Lemli-Opitz 综合征
SCN5A	Brugada 综合征
KCNH2 (hERG)	2 型长 QT 综合征
KCNQ1	1 型长 QT 综合征
TTN	扩张型心肌病
MYBPC3	家族性肥厚型心肌病
LMNA	扩张型心肌病(有时为 Emery-Dreifuss 肌营养不良)
PKP2	家族性致心律失常性右心室

[0300]

	发育不良
PLN	家族性孤立性扩张型心肌病
TSC1/2	结节性硬化症
LDLR	家族性高胆固醇血症
SMN1	脊髓性肌萎缩

[0301] 在某些实施方案中,PTC介导的病症是癫痫(例如,Dravet综合征),其中该方法降低受试者的惊厥频率、惊厥严重性和/或认知障碍。例如,在某些实施方案中,该方法在例如,一天、一周或一个月的时间段内将受试者的惊厥频率降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在某些实施方案中,该方法在例如一天、一周或一个月的时间段内将惊厥频率降低50%。

[0302] 在某些实施方案中,PTC介导的病症是Dravet和/或具有提前终止密码子的基因是SCN1A。在某些实施方案中,SCN1A基因中的提前终止密码子由选自以下的突变或突变组合引起:c.5745C>G、c.5713G>T、c.5701C>T、c.5677C>T、c.5641C>T、c.5629C>T、c.5623C>T、c.5503A>T、c.5473G>T、c.5437G>T、c.5428C>T、c.5403G>A、c.5402G>A、c.5383G>T、c.5371G>T、c.5049T>G、c.4921G>T、c.4900C>T、c.4873C>T、c.4779del、c.4778G>A、c.4774G>T、c.4761T>G、c.4648G>T、c.4540C>T、c.4516A>T、c.4514C>A、c.4508T>G、c.4488C>G、c.4471G>T、c.4300A>T、c.4269G>A、c.4268G>A、c.4233T>A、c.4222G>T、c.4191G>A、c.4190G>A、c.4186C>T、c.4159A>T、c.4155C>A、c.3964del、c.3952C>T、c.3825G>A、c.3824G>A、c.3819G>A、c.3818G>A、c.3795T>A、c.3789T>G、c.3779G>A、c.3750C>G、c.3724G>T、c.3700C>T、c.3697C>T、c.3657dup、c.3624G>A、c.3604C>T、c.3582G>A、c.3578G>A、c.3574C>T、c.3463C>T、c.3454del、c.3424G>T、c.3422C>A、c.3406G>T、c.3328G>T、c.3273C>A、c.3262G>T、c.3073C>T、c.3060T>A、c.2844T>A、c.2749C>T、c.2695C>T、c.2645T>A、c.2560C>T、c.2551C>T、c.2546C>A、c.2462G>A、c.2298del、c.2228G>A、c.2181G>A、c.2180G>A、c.2101C>T、c.2038A>T、c.1958T>A、c.1837C>T、c.1834C>T、c.1804G>T、c.1795G>T、c.1738C>T、c.1702C>T、c.1660C>T、c.1624C>T、c.1516C>T、c.1378C>T、c.1363C>T、c.1354A>T、c.1348C>T、c.1345G>T、c.1344dup、c.1306G>T、c.1278C>A、c.1278C>G、c.1151G>A、c.1129C>T、c.1118T>A、c.942del、c.751del、c.644T>A、c.327C>G、c.249C>A、c.121A>T、c.4846_4850dup、c.4787_4788del、c.4578_4612dup、 c.4211_4212del、c.4125_4130delinsATAATCATACTGATTGCCTAAAACTAAT、c.3690_3693del、c.3338_3339del、c.1247_1248insGTAGA、c.825_826insGTATA和c.278_279dup。在某些实施方案中,SCN1A基因中的提前终止密码子由选自以下的突变或突变组合引起:c.58G>T、c.575G>A、c.664C>T、c.962C>G、c.1095dupT、c.1129C>T、c.1315C>T、c.1348C>T、c.1366G>T、c.1492A>T、c.1537G>T、c.1624C>T、c.1738C>T、c.1804G>T、c.1837C>T、c.2134C>T、c.2370T>A、c.2495G>A、c.2593C>T、c.2635delC、c.2904C>A、c.3295G>T、c.3311C>A、c.3452C>G、c.3637C>T、c.3656G>A、c.3733C>T、c.3783C

>A、c.3829C>T、c.3985C>T、c.4359T>G、c.4547C>A、c.4573C>T、c.4721C>G、c.4954G>T、c.5641G>T、c.5656C>T和c.5734C>T。在某些实施方案中,SCN1A基因中的提前终止密码子由选自以下的突变引起:c.664C>T、c.1129C>T、c.1492A>T、c.1624C>T、c.1738C>T、c.1837C>T、c.2134C>T、c.2593C>T、c.3637C>T、c.3733C>T、c.3985C>T、c.4573C>T、c.5656C>T和c.5734C>T。在某些实施方案中,SCN1A基因中的提前终止密码子由选自c.1738C>T和c.3985C>T的突变引起。

[0303] 在某些实施方案中,SCN1A基因中的提前终止密码子由表7中列出的突变或表7中列出的突变的组合引起。

[0304] 表7

[0305]

突变 (编码 DNA)	突变 (蛋白质)	抑制物 类别
c.664C>T	Arg222Ter	Arg>TGA
c.3637C>T	Arg1213Ter	Arg>TGA
c.3733C>T	Arg1245Ter	Arg>TGA
c.2134C>T	Arg712Ter	Arg>TGA
c.1837C>T	Arg613Ter	Arg>TGA
c.4188C>A	Cys1396Ter	Cys>TGA
c.2877T>A	Cys959Ter	Cys>TGA
c.3183T>A	Cys1061Ter	Cys>TGA
c.3607C>T	Gln1203Ter	Gln>TAA
c.2782C>T	Gln928Ter	Gln>TAA
c.3829C>T	Gln1277Ter	Gln>TAA
c.2893C>T	Gln965Ter	Gln>TAA
c.3106C>T	Gln1036Ter	Gln>TAG
c.3496C>T	Gln1166Ter	Gln>TAG
c.5662C>T	Gln1888Ter	Gln>TAG
c.5461C>T	Gln1821Ter	Gln>TAG
c.3730C>T	Gln1244Ter	Gln>TAG
c.5506G>T	Glu1836Ter	Glu>TAA
c.5470G>T	Glu1824Ter	Glu>TAA
c.3757G>T	Glu1253Ter	Glu>TAA
c.3439G>T	Glu1147Ter	Glu>TAA
c.1345G>T	Glu449Ter	Glu>TAA
c.5404G>T	Glu1802Ter	Glu>TAG
c.1804G>T	Glu602Ter	Glu>TAG
c.5416G>T	Glu1806Ter	Glu>TAG
c.1795G>T	Glu599Ter	Glu>TAG
c.1549G>T	Glu517Ter	Glu>TAG

[0306]

突变 (编码 DNA)	突变 (蛋白质)	抑制物 类别
c.4255G>T	Gly1419Ter	Gly>TGA
c.4954G>T	Gly1652Ter	Gly>TGA
c.4807G>T	Gly1603Ter	Gly>TGA
c.487G>T	Gly163Ter	Gly>TGA
c.1843G>T	Gly615Ter	Gly>TGA
c.539T>A	Leu180Ter	Leu>TAA
c.2678T>A	Leu893Ter	Leu>TAA
c.644T>A	Leu215Ter	Leu>TAG
c.1958T>A	Leu653Ter	Leu>TAG
c.1118T>A	Leu373Ter	Leu>TAG
c.4541T>G	Leu1514Ter	Leu>TGA
c.2627T>G	Leu876Ter	Leu>TGA
c.4549A>T	Lys1517Ter	Lys>TAA
c.5536A>T	Lys1846Ter	Lys>TAA
c.121A>T	Lys41Ter	Lys>TAA
c.4192A>T	Lys1398Ter	Lys>TAA
c.1354A>T	Lys452Ter	Lys>TAA
c.2071A>T	Lys691Ter	Lys>TAG
c.3455C>A	Ser1152Ter	Ser>TAA
c.2579C>A	Ser860Ter	Ser>TAA
c.1883C>A	Ser628Ter	Ser>TAA
c.4547C>A	Ser1516Ter	Ser>TAG
c.2213G>A	Trp738Ter	Trp>TAG
c.3611G>A	Trp1204Ter	Trp>TAG
c.4811G>A	Trp1604Ter	Trp>TAG
c.4223G>A	Trp1408Ter	Trp>TAG
c.5435G>A	Trp1812Ter	Trp>TAG

[0307]

突变 (编码 DNA)	突变 (蛋白质)	抑制物 类别
c.3615G>A	Trp1205Ter	Trp>TGA
c.4224G>A	Trp1408Ter	Trp>TGA
c.4302G>A	Trp1434Ter	Trp>TGA
c.3858G>A	Trp1286Ter	Trp>TGA
c.5436G>A	Trp1812Ter	Trp>TGA
c.3762T>A	Tyr1254Ter	Tyr>TAA
c.3828T>A	Tyr1276Ter	Tyr>TAA
c.4266T>A	Tyr1422Ter	Tyr>TAA
c.3306C>A	Tyr1102Ter	Tyr>TAA
c.249C>A	Tyr83Ter	Tyr>TAA
c.5082T>G	Tyr1694Ter	Tyr>TAG
c.4794T>G	Tyr1598Ter	Tyr>TAG
c.4521C>G	Tyr1507Ter	Tyr>TAG
c.3822T>G	Tyr1274Ter	Tyr>TAG
c.5778C>G	Tyr1926Ter	Tyr>TAG

[0308] 其他示例性突变,包括导致基因(例如 SCN1A 基因)中提前终止密码子的示例性突变,可以在 ClinVar(可在万维网ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/上获得),“A catalog of SCN1A variants” Lossin et al. (2009) Brain Dev. 2009 31(2):114-30、SCN1A注册表(可在万维网scn1a.net/scn1a-registry/上获得)、SCN1A 突变数据库(可在万维网gzneurosci.com/scn1adatabase上获得)和Leiden开放变异数据库(LOVD v.3.0;可在万维网的databases.lovd.nl/shared/genes/SCN1A上获得)中找到。除非另有说明,本文所述的任何SCN1A突变均是相对于SCN1a同等型1(NCBI参考序列NM_001165963, SEQ ID NO: 863)。

[0309] 在另一个方面,本发明提供了在有此需要的受试者中治疗Dravet综合征的方法,其中该受试者具有具有表7中连续列出的突变的SCN1A基因,该方法包括向该受试者施用有效量的在表7的同一行中指示的抑制物类别作为突变的抑制物tRNA,或包含编码tRNA的核苷酸序列的表达载体。如表7中所用,“抑制物类别”(例如,Arg>TGA)是指从其衍生抑制物tRNA的内源性tRNA类型(例如,精氨酸tRNA)和由抑制物tRNA识别的终止密码子(例如,TGA)。示例性Arg>TGA抑制物tRNA包括包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、19-22和35的核苷酸序列的tRNA。示例性Gln>TAA抑制物tRNA包括包含选自SEQ ID NO: 36-40、44和45的核苷酸序列的tRNA。示例性Gln>TAG抑制物tRNA包括包含选自SEQ ID NO: 178-182、186和187

的核苷酸序列的tRNA。

[0310] 例如,在某些实施方案中,受试者具有具有选自c.664C>T、c.3637C>T、c.3733C>T、c.2134C>T和c.1837C>T的提前终止密码子的SCN1A基因,并且该方法包括向受试者施用有效量的抑制物tRNA,其包含选自SEQ ID NO: 6-9、11、16-18、19-22和35的核苷酸序列。在某些实施方案中,受试者具有具有选自c.3607C>T、c.2782C>T、c.3829C>T和c.2893C>T的提前终止密码子的SCN1A基因,并且该方法包括向受试者施用有效量的抑制物tRNA,其包含选自SEQ ID NO: 36-40、44和45的核苷酸序列。在某些实施方案中,受试者具有具有选自c.3106C>T、c.3496C>T、c.5662C>T、c.5461C>T和c.3730C>T的提前终止密码子的SCN1A基因,并且该方法包括向受试者施用有效量的抑制物tRNA,其包含选自SEQ ID NO: 178-182、186和187的核苷酸序列。

[0311] 在某些实施方案中,其中基因是SCN1A基因,用tRNA产生的SCN1A基因产物是功能性SCN1A基因产物。在某些实施方案中,功能性SCN1A基因产物相比截短的SCN1A基因产物具有更大的活性,例如更大的电压门控钠通道活性。在某些实施方案中,相对于没有tRNA的细胞、组织或受试者,该方法将细胞、组织或受试者中的电压门控钠通道活性增加约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约110%、约120%、约130%、约140%、约150%、约160%、约170%、约180%、约190%、约200%、约250%、约300%、约350%、约400%、约450%、约500%、约600%、约700%、约800%、约900%或约1000%。在某些实施方案中,相对于没有tRNA的细胞、组织或受试者,该方法将细胞、组织或受试者中的电压门控钠通道活性增加约20%至约200%、约20%至约180%、约20%至约160%、约20%至约140%、约20%至约120%、约20%至约100%、约20%至约80%、约20%至约60%、约20%至约40%、约40%至约200%、约40%至约180%、约40%至约160%、约40%至约140%、约40%至约120%、约40%至约100%、约40%至约80%、约40%至约60%、约60%至约200%、约60%至约180%、约60%至约160%、约60%至约140%、约60%至约120%、约60%至约100%、约60%至约80%、约80%至约200%、约80%至约180%、约80%至约160%、约80%至约140%、约80%至约120%、约80%至约100%、约100%至约200%、约100%至约180%、约100%至约160%、约100%至约140%、约100%至约120%、约120%至约200%、约120%至约180%、约120%至约160%、约120%至约140%、约140%至约200%、约140%至约180%、约140%至约160%、约160%至约200%、约160%至约180%或约180%至约200%。电压门控钠通道活性可以通过本领域已知的任何方法测量,例如,如描述于Kalume et al. (2007) J. Neurosci. 27(41):11065-74, Yu et al. (2007) Nat. Neurosci. 9(9): 1142-9和Han et al. (2012) Nature 489(7416): 385-390中。

[0312] 在某些实施方案中,功能性SCN1A基因产物是$Na_v1.1$蛋白。在某些实施方案中,功能性SCN1A基因产物包含以下、基本上由或由以下组成:氨基酸序列中的任一氨基酸序列,或与以下氨基酸序列中的任一项(每个对应到不同的SCN1A异构体)具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列:

[0313] MEQTVLVPPGPDSFNFFTRESLAAIERRIAEEKAKNPKPDKKDDDENGPKPNSDLEAGKNLPFIYGDIPPEMVSEPLEDLDPYYINKKTFIVLNKGKAIFRFSATSALYILTPFNPLRKIAIKILVHSLFSMLIMCTILTNCVFMTMSNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLIKIIARGFCLEDFTFLRDPWNWLDFTVITFAYVTEFVDLGNVSALRTFRVLRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRNKCIQWPPTNASLEEHSIEKNITVNYNGTLINETVFEFDWKSYIQDSRYHYFLEGFLDALLCGNSSDAGQCPEGYMCVKAGRNPNYGYTSFDTFSWAF

LSLFRLMTQDFWENLYQLTLRAAGKTYMIFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEEQNQATLEEAEQKEAEFQQMI
EQLKKQQEAAQQAATATASEHSREPSAAGRLSDSSSEASKLSSKSAKERRNRRKKRKQKEQSGGEEKDEDEFQKSE
SEDSIRRKGFRFSIEGNRLTYEKRYSSPHQSLLSIRGSLFSPRRNSRTSLFSFRGRAKDVGSENDFADDEHSTFED
NESRRDSLFVPRRHGERRNSNLSQTSRSSRMLAVFPANGKMHSTVDCNGVVSLVGGPSVPTSPVGQLLPEVIIDKP
ATDDNGTTTETEMRKRRSSSFHVSMDFLEDPSQRQRAMSIASILTNTVEELEESRQKCPPCWYKFSNIFLIWDCSP
YWLKVKHVVNLVVMDPFVDLAITICIVLNTLFMAMEHYPMTDHFNNVLTVGNLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYYYF
QEGWNIFDGFIVTLSLVELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNMLIKIIGNSVGALGNLTLVLAIIVFIF
AVVGMQLFGKSYKDCVCKIASDCQLPRWHMNDFFHSFLIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCLTVFMMVMVIGN
LVVLNLFLALLLSSFSADNLAATDDDNEMNNLQIAVDRMHKGVAYVKRKIYEFIQQSFIRKQKILDEIKPLDDLNN
KKDSCMSNHTAEIGKDLDYLKDVNGTTSGIGTGSSVEKYIIDESDYMSFINNPSLTVTVPIAVGESDFENLNTEDF
SSESDLEESKEKLNESSSSSEGSTVDIGAPVEEQPVVEPEETLEPEACFTEGCVQRFKCCQINVEEGRGKQWWNLR
RTCFRIVEHNWFETFIVFMILLSSGALAFEDIYIDQRKTIKTMLEYADKVFTYIFILEMLLKWVAYGYQTYFTNAW
CWLDFLIVDVSLVSLTANALGYSELGAIKSLRTLRALRPLRALSRFEGMRVVVNALLGAIPSIMNVLLVCLIFWLI
FSIMGVNLFAGKFYHCINTTTGDRFDIEDVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVNFDNVGFGYLSLLQVATFKGWMD
IMYAAVDSRNVELQPKYEESLYMYLYFVIFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNQQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMK
KLGSKKPQKPIPRPGNKFQGMVFDFVTRQVFDISIMILICLNMVTMMVETDDQSEYVTTILSRINLVFIVLFTGEC
VLKLISLRHYYFTIGWNIFDFVVVILSIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIRLARIGRILRLIKGAKGIRTLLFALM
MSLPALFNIGLLLFLVMFIYAIFGMSNFAYVKREVGIDDMFNFETFGNSMICLFQITTSAGWDGLLAPILNSKPPD
CDPNKVNPGSSVKGDCGNPSVGIFFFVSYIIISFLVVVNMYIAVILENFSVATEESAEPLSEDDFEMFYEVWEKFD
PDATQFMEFEKLSQFAAALEPPLNLPQPNKLQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDALRIQMEER
FMASNPSKVSYQPITTTLKRKQEEVSAVIIQRAYRRHLLKRTVKQASFTYNKNKIKGGANLLIKEDMIIDRINENS
ITEKTDLTMSTAACPPSYDRVTKPIVEKHEQEGKDEKAKGK (SEQ ID NO: 863);

[0314] MEQTVLVPPGPDSFNFFTRESLAAIERRIAEEKAKNPKPDKKDDDENGPKPNSDLEAGKNLPFIYGDI
PPEMVSEPLEDLDPYYINKKTFIVLNKGKAIFRFSATSALYILTPFNPLRKIAIKILVHSLFSMLIMCTILTNCVF
MTMSNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLIKIIARGFCLEDFTFLRDPWNWLDFTVITFAYVTEFVDLGNVSALRTFRV
LRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRNKCIQWPPTNASLEEHSIEKNI
TVNYNGTLINETVFEFDWKSYIQDSRYHYFLEGFLDALLCGNSSDAGQCPEGYMCVKAGRNPNYGYTSFDTFSWAF
LSLFRLMTQDFWENLYQLTLRAAGKTYMIFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEEQNQATLEEAEQKEAEFQQMI
EQLKKQQEAAQQAATATASEHSREPSAAGRLSDSSSEASKLSSKSAKERRNRRKKRKQKEQSGGEEKDEDEFQKSE
SEDSIRRKGFRFSIEGNRLTYEKRYSSPHQSLLSIRGSLFSPRRNSRTSLFSFRGRAKDVGSENDFADDEHSTFED
NESRRDSLFVPRRHGERRNSNLSQTSRSSRMLAVFPANGKMHSTVDCNGVVSLVGGPSVPTSPVGQLLPEGTTTET
EMRKRRSSSFHVSMDFLEDPSQRQRAMSIASILTNTVEELEESRQKCPPCWYKFSNIFLIWDCSPYWLKVKHVVNL
VVMDPFVDLAITICIVLNTLFMAMEHYPMTDHFNNVLTVGNLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYYYFQEGWNIFDGFI
VTLSLVELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNMLIKIIGNSVGALGNLTLVLAIIVFIFAVVGMQLFGKS
YKDCVCKIASDCQLPRWHMNDFFHSFLIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCLTVFMMVMVIGNLVVLNLFLALL
LSSFSADNLAATDDDNEMNNLQIAVDRMHKGVAYVKRKIYEFIQQSFIRKQKILDEIKPLDDLNNKKDSCMSNHTA
EIGKDLDYLKDVNGTTSGIGTGSSVEKYIIDESDYMSFINNPSLTVTVPIAVGESDFENLNTEDFSSESDLEESKE
KLNESSSSSEGSTVDIGAPVEEQPVVEPEETLEPEACFTEGCVQRFKCCQINVEEGRGKQWWNLRRTCFRIVEHNW
FETFIVFMILLSSGALAFEDIYIDQRKTIKTMLEYADKVFTYIFILEMLLKWVAYGYQTYFTNAWCWLDFLIVDVS

LVSLTANALGYSELGAIKSLRTLRALRPLRALSRFEGMRVVVNALLGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAG
KFYHCINTTTGDRFDIEDVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVNFDNVGFGYLSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNV
ELQPKYEESLYMYLYFVIFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNQQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPI
PRPGNKFQGMVFDFVTRQVFDISIMILICLNMVTMMVETDDQSEYVTTILSRINLVFIVLFTGECVLKLISLRHYY
FTIGWNIFDFVVVILSIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIRLARIGRILRLIKGAKGIRTLLFALMMSLPALFNIGL
LLFLVMFIYAIFGMSNFAYVKREVGIDDMFNFETFGNSMICLFQITTSAGWDGLLAPILNSKPPDCDPNKVNPGSS
VKGDCGNPSVGIFFFVSYIIISFLVVVNMYIAVILENFSVATEESAEPLSEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFMEFEK
LSQFAAALEPPLNLPQPNKLQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDALRIQMEERFMASNPSKVSY
QPITTTLKRKQEEVSAVIIQRAYRRHLLKRTVKQASFTYNKNKIKGGANLLIKEDMIIDRINENSITEKTDLTMST
AACPPSYDRVTKPIVEKHEQEGKDEKAKGK (SEQ ID NO: 864);

[0315] MEQTVLVPPGPDSFNFFTRESLAAIERRIAEEKAKNPKPDKKDDDENGPKPNSDLEAGKNLPFIYGDI
PPEMVSEPLEDLDPYYINKKTFIVLNKGKAIFRFSATSALYILTPFNPLRKIAIKILVHSLFSMLIMCTILTNCVF
MTMSNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLIKIIARGFCLEDFTFLRDPWNWLDFTVITFAYVTEFVDLGNVSALRTFRV
LRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRNKCIQWPPTNASLEEHSIEKNI
TVNYNGTLINETVFEFDWKSYIQDSRYHYFLEGFLDALLCGNSSDAGQCPEGYMCVKAGRNPNYGYTSFDTFSWAF
LSLFRLMTQDFWENLYQLTLRAAGKTYMIFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEEQNQATLEEAEQKEAEFQQMI
EQLKKQQEAAQQAATATASEHSREPSAAGRLSDSSSEASKLSSKSAKERRNRRKKRKQKEQSGGEEKDEDEFQKSE
SEDSIRRKGFRFSIEGNRLTYEKRYSSPHQSLLSIRGSLFSPRRNSRTSLFSFRGRAKDVGSENDFADDEHSTFED
NESRRDSLFVPRRHGERRNSNLSQTSRSSRMLAVFPANGKMHSTVDCNGVVSLGTTTETEMRKRRSSSFHVSMDFL
EDPSQRQRAMSIASILTNTVEELEESRQKCPPCWYKFSNIFLIWDCSPYWLKVKHVVNLVVMDPFVDLAITICIVL
NTLFMAMEHYPMTDHFNNVLTVGNLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYYYFQEGWNIFDGFIVTLSLVELGLANVEGLS
VLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNMLIKIIGNSVGALGNLTLVLAIIVFIFAVVGMQLFGKSYKDCVCKIASDCQLPRW
HMNDFFHSFLIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCLTVFMMVMVIGNLVVLNLFLALLLSSFSADNLAATDDDNE
MNNLQIAVDRMHKGVAYVKRKIYEFIQQSFIRKQKILDEIKPLDDLNNKKDSCMSNHTAEIGKDLDYLKDVNGTTS
GIGTGSSVEKYIIDESDYMSFINNPSLTVTVPIAVGESDFENLNTEDFSSESDLEESKEKLNESSSSSEGSTVDIG
APVEEQPVVEPEETLEPEACFTEGCVQRFKCCQINVEEGRGKQWWNLRRTCFRIVEHNWFETFIVFMILLSSGALA
FEDIYIDQRKTIKTMLEYADKVFTYIFILEMLLKWVAYGYQTYFTNAWCWLDFLIVDVSLVSLTANALGYSELGAI
KSLRTLRALRPLRALSRFEGMRVVVNALLGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCINTTTGDRFDIE
DVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVNFDNVGFGYLSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNVELQPKYEESLYMYLYFV
IFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNQQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPGNKFQGMVFDFVTR
QVFDISIMILICLNMVTMMVETDDQSEYVTTILSRINLVFIVLFTGECVLKLISLRHYYFTIGWNIFDFVVVILSI
VGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIRLARIGRILRLIKGAKGIRTLLFALMMSLPALFNIGLLLFLVMFIYAIFGMSNF
AYVKREVGIDDMFNFETFGNSMICLFQITTSAGWDGLLAPILNSKPPDCDPNKVNPGSSVKGDCGNPSVGIFFFVS
YIIISFLVVVNMYIAVILENFSVATEESAEPLSEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFMEFEKLSQFAAALEPPLNLPQP
NKLQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDALRIQMEERFMASNPSKVSYQPITTTLKRKQEEVSAV
IIQRAYRRHLLKRTVKQASFTYNKNKIKGGANLLIKEDMIIDRINENSITEKTDLTMSTAACPPSYDRVTKPIVEK
HEQEGKDEKAKGK (SEQ ID NO: 865);

[0316] MEQTVLVPPGPDSFNFFTRESLAAIERRIAEEKAKNPKPDKKDDDENGPKPNSDLEAGKNLPFIYGDI
PPEMVSEPLEDLDPYYINKKTFIVLNKGKAIFRFSATSALYILTPFNPLRKIAIKILVHSLFSMLIMCTILTNCVF

MTMSNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLIKIIARGFCLEDFTFLRDPWNWLDFTVITFAYVTEFVDLGNVSALRTFRV
LRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRNKCIQWPPTNASLEEHSIEKNI
TVNYNGTLINETVFEFDWKSYIQDSRYHYFLEGFLDALLCGNSSDAGQCPEGYMCVKAGRNPNYGYTSFDTFSWAF
LSLFRLMTQDFWENLYQLTLRAAGKTYMIFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEEQNQATLEEAEQKEAEFQQMI
EQLKKQQEAAQAATATASEHSREPSAAGRLSDSSSEASKLSSKSAKERRNRRKKRKQKEQSGGEEKDEDEFQKSES
EDSIRRKGFRFSIEGNRLTYEKRYSSPHQSLLSIRGSLFSPRRNSRTSLFSFRGRAKDVGSENDFADDEHSTFEDN
ESRRDSLFVPRRHGERRNSNLSQTSRSSRMLAVFPANGKMHSTVDCNGVVSLVGGPSVPTSPVGQLLPEGTTTETE
MRKRRSSSFHVSMDFLEDPSQRQRAMSIASILTNTVEELEESRQKCPPCWYKFSNIFLIWDCSPYWLKVKHVVNLV
VMDPFVDLAITICIVLNTLFMAMEHYPMTDHFNNVLTVGNLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYYYFQEGWNIFDGFIV
TLSLVELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNMLIKIIGNSVGALGNLTLVLAIIVFIFAVVGMQLFGKSY
KDCVCKIASDCQLPRWHMNDFFHSFLIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCLTVFMMVMVIGNLVVLNLFLALLL
SSFSADNLAATDDDNEMNNLQIAVDRMHKGVAYVKRKIYEFIQQSFIRKQKILDEIKPLDDLNNKKDSCMSNHTAE
IGKDLDYLKDVNGTTSGIGTGSSVEKYIIDESDYMSFINNPSLTVTVPIAVGESDFENLNTEDFSSESDLEESKEK
LNESSSSSEGSTVDIGAPVEEQPVVEPEETLEPEACFTEGCVQRFKCCQINVEEGRGKQWWNLRRTCFRIVEHNWF
ETFIVFMILLSSGALAFEDIYIDQRKTIKTMLEYADKVFTYIFILEMLLKWVAYGYQTYFTNAWCWLDFLIVDVSL
VSLTANALGYSELGAIKSLRTLRALRPLRALSRFEGMRVVVNALLGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGK
FYHCINTTTGDRFDIEDVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVNFDNVGFGYLSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNVE
LQPKYEESLYMYLYFVIFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNQQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIP
RPGNKFQGMVFDFVTRQVFDISIMILICLNMVTMMVETDDQSEYVTTILSRINLVFIVLFTGECVLKLISLRHYYF
TIGWNIFDFVVVILSIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIRLARIGRILRLIKGAKGIRTLLFALMMSLPALFNIGLL
LFLVMFIYAIFGMSNFAYVKREVGIDDMFNFETFGNSMICLFQITTSAGWDGLLAPILNSKPPDCDPNKVNPGSSV
KGDCGNPSVGIFFFVSYIIISFLVVVNMYIAVILENFSVATEESAEPLSEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFMEFEKL
SQFAAALEPPLNLPQPNKLQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDALRIQMEERFMASNPSKVSYQ
PITTTLKRKQEEVSAVIIQRAYRRHLLKRTVKQASFTYNKNKIKGGANLLIKEDMIIDRINENSITEKTDLTMSTA
ACPPSYDRVTKPIVEKHEQEGKDEKAKGK (SEQ ID NO: 866);

[0317] MEQTVLVPPGPDSFNFFTRESLAAIERRIAEEKAKNPKPDKKDDDENGPKPNSDLEAGKNLPFIYGDI
PPEMVSEPLEDLDPYYINKKTFIVLNKGKAIFRFSATSALYILTPFNPLRKIAIKILVHSLFSMLIMCTILTNCVF
MTMSNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLIKIIARGFCLEDFTFLRDPWNWLDFTVITFAYVTEFVDLGNVSALRTFRV
LRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRNKCIQWPPTNASLEEHSIEKNI
TVNYNGTLINETVFEFDWKSYIQDSRYHYFLEGFLDALLCGNSSDAGQCPEGYMCVKAGRNPNYGYTSFDTFSWAF
LSLFRLMTQDFWENLYQLTLRAAGKTYMIFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEEQNQATLEEAEQKEAEFQQMI
EQLKKQQEAAQAATATASEHSREPSAAGRLSDSSSEASKLSSKSAKERRNRRKKRKQKEQSGGEEKDEDEFQKSES
EDSIRRKGFRFSIEGNRLTYEKRYSSPHQSLLSIRGSLFSPRRNSRTSLFSFRGRAKDVGSENDFADDEHSTFEDN
ESRRDSLFVPRRHGERRNSNLSQTSRSSRMLAVFPANGKMHSTVDCNGVVSLGTTTETEMRKRRSSSFHVSMDFLE
DPSQRQRAMSIASILTNTVEELEESRQKCPPCWYKFSNIFLIWDCSPYWLKVKHVVNLVVMDPFVDLAITICIVLN
TLFMAMEHYPMTDHFNNVLTVGNLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYYYFQEGWNIFDGFIVTLSLVELGLANVEGLSV
LRSFRLLRVFKLAKSWPTLNMLIKIIGNSVGALGNLTLVLAIIVFIFAVVGMQLFGKSYKDCVCKIASDCQLPRWH
MNDFFHSFLIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCLTVFMMVMVIGNLVVLNLFLALLLSSFSADNLAATDDDNEM
NNLQIAVDRMHKGVAYVKRKIYEFIQQSFIRKQKILDEIKPLDDLNNKKDSCMSNHTAEIGKDLDYLKDVNGTTSG

IGTGSSVEKYIIDESDYMSFINNPSLTVTVPIAVGESDFENLNTEDFSSESDLEESKEKLNESSSSSEGSTVDIGA
PVEEQPVVEPEETLEPEACFTEGCVQRFKCCQINVEEGRGKQWWNLRRTCFRIVEHNWFETFIVFMILLSSGALAF
EDIYIDQRKTIKTMLEYADKVFTYIFILEMLLKWVAYGYQTYFTNAWCWLDFLIVDVSLVSLTANALGYSELGAIK
SLRTLRALRPLRALSRFEGMRVVVNALLGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCINTTTGDRFDIED
VNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVNFDNVGFGYLSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNVELQPKYEESLYMYLYFVI
FIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNQQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPGNKFQGMVFDFVTRQ
VFDISIMILICLNMVTMMVETDDQSEYVTTILSRINLVFIVLFTGECVLKLISLRHYYFTIGWNIFDFVVVILSIV
GMFLAELIEKYFVSPTLFRVIRLARIGRILRLIKGAKGIRTLLFALMMSLPALFNIGLLLFLVMFIYAIFGMSNFA
YVKREVGIDDMFNFETFGNSMICLFQITTSAGWDGLLAPILNSKPPDCDPNKVNPGSSVKGDCGNPSVGIFFFVSY
IIISFLVVVNMYIAVILENFSVATEESAEPLSEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFMEFEKLSQFAAALEPPLNLPQPN
KLQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDALRIQMEERFMASNPSKVSYQPITTTLKRKQEEVSAVI
IQRAYRRHLLKRTVKQASFTYNKNKIKGGANLLIKEDMIIDRINENSITEKTDLTMSTAACPPSYDRVTKPIVEKH
EQEGKDEKAKGK (SEQ ID NO: 867); or

[0318] MFLKIIAMDPYYYFQEGWNIFDGFIVTLSLVELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNMLIKI
IGNSVGALGNLTLVLAIIVFIFAVVGMQLFGKSYKDCVCKIASDCQLPRWHMNDFFHSFLIVFRVLCGEWIETMWD
CMEVAGQAMCLTVFMMVMVIGNLVVLNLFLALLLSSFSADNLAATDDDNEMNNLQIAVDRMHKGVAYVKRKIYEFI
QQSFIRKQKILDEIKPLDDLNNKKDSCMSNHTAEIGKDLDYLKDVNGTTSGIGTGSSVEKYIIDESDYMSFINNPS
LTVTVPIAVGESDFENLNTEDFSSESDLEESKEKLNESSSSSEGSTVDIGAPVEEQPVVEPEETLEPEACFTEGCV
QRFKCCQINVEEGRGKQWWNLRRTCFRIVEHNWFETFIVFMILLSSGALAFEDIYIDQRKTIKTMLEYADKVFTYI
FILEMLLKWVAYGYQTYFTNAWCWLDFLIVDVSLVSLTANALGYSELGAIKSLRTLRALRPLRALSRFEGMRVVVN
ALLGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCINTTTGDRFDIEDVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVN
FDNVGFGYLSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNVELQPKYEESLYMYLYFVIFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNQQK
KKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPGNKFQGMVFDFVTRQVFDISIMILICLNMVTMMVETDDQS
EYVTTILSRINLVFIVLFTGECVLKLISLRHYYFTIGWNIFDFVVVILSIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIRLAR
IGRILRLIKGAKGIRTLLFALMMSLPALFNIGLLLFLVMFIYAIFGMSNFAYVKREVGIDDMFNFETFGNSMICLF
QITTSAGWDGLLAPILNSKPPDCDPNKVNPGSSVKGDCGNPSVGIFFFVSYIIISFLVVVNMYIAVILENFSVATE
ESAEPLSEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFMEFEKLSQFAAALEPPLNLPQPNKLQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFA
FTKRVLGESGEMDALRIQMEERFMASNPSKVSYQPITTTLKRKQEEVSAVIIQRAYRRHLLKRTVKQASFTYNKNK
IKGGANLLIKEDMIIDRINENSITEKTDLTMSTAACPPSYDRVTKPIVEKHEQEGKDEKAKGK (SEQ ID NO:
868)。

[0319] 如本文所用,术语“有效量”是指足以产生有益或期望结果的活性剂(例如,根据本发明的tRNA或表达载体或组合疗法中的第二活性剂)的量。有效量可以在一次或多次施用、应用或剂量中施用,并且不旨在限于特定的制剂或施用途径。

[0320] 如本文所用,“治疗”是指治疗受试者例如人的疾病。这包括:(a)抑制疾病,即阻止其发展;(b)缓解疾病,即引起疾病状态的消退。如本文所用,术语“受试者”和“患者”是指将通过本文所述的方法和组合物治疗的生物体。此类生物体优选包括但不限于哺乳动物(例如鼠科动物、猿猴类、马科动物、牛科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物等),并且更优选包括人。

[0321] 本文所述的方法和组合物可以单独使用或联合其他治疗剂和/或模式使用。如本

文所用,术语“联合”施用应理解为在受试者患有病症期间向受试者递送两种(或多种)不同的治疗,使得治疗对患者的影响在某个时间点重叠。在某些实施方案中,一种治疗的递送在第二种治疗的递送开始时仍发生,因此在施用方面存在重叠。这有时在本文中被称为“同时”或“共同递送”。在其他实施方案中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一情况的某些实施方案中,由于组合施用,治疗更有效。例如,相比于如果在不存在第一种治疗的情况下施用第二种治疗所看到的,或者在第一种治疗时观察到类似的情况,第二种治疗更有效,例如,第二种治疗较少看到等同的作用,或者第二种治疗在更大程度上减轻症状。在某些实施方案中,递送使得与病症相关的症状或其他参数的减少大于在不存在另一种治疗的情况下递送的一种治疗所看到的。两种治疗的作用可以是部分相加的、完全相加的或大于相加的。递送可以使得所递送的第一种治疗的作用在递送第二种治疗时仍然可检测到。

[0322] 在某些实施方案中,本文所述的方法或组合物联合一种或多种额外的治疗剂,例如DIACOMIT® (司替戊醇)、EPIODOLEX® (大麻二酚)、生酮饮食、ONFI® (氯巴占)、TOPAMAX® (托吡酯)、芬氟拉明或丙戊酸施用。例如,在治疗Dravet综合征期间,本文所述的方法或组合物联合一种或多种其他治疗剂,例如DIACOMIT® (司替戊醇)、EPIODOLEX® (大麻二酚)、生酮饮食、ONFI® (氯巴占)、TOPAMAX® (托吡酯)、芬氟拉明或丙戊酸施用。

[0323] 在整篇描述中,在组合物被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下,或者在加工和方法被描述为具有、包括或包括特定步骤的情况下,预期另外地,本发明的组合物基本上由或由所述组分组成,并且根据本发明存在的加工和方法基本上由或由所述加工步骤组成。

[0324] 在本申请中,当元素或组分被称为包括在列举的元素或组分的列表中和/或从列表中选择时,应该理解该元素或组分可以是列举的元素或组分中的任何一个,或者该元素或组分可以选自由两个或更多个所列举的元素或组分组成的组。

[0325] 此外,应当理解,本文所述的组合物或方法的元素和/或特征可以以多种方式组合,而不脱离本发明的精神和范围,无论本文是明确的还是暗示的。例如,当提及特定化合物时,该化合物可以用于本发明组合物的各种实施方案和/或本发明方法中,除非从上下文中另有理解。换言之,在本申请中,实施方案已经以使得能够书写和绘制清晰和简洁的申请的方式被描述和描绘,但是意图并且将理解的是,可以以各种方式组合或分离实施方案,而不脱离本教导和发明。例如,应当理解,本文描述和描绘的所有特征可以适用于本文描述和描绘的本发明的所有方面。

[0326] 应当理解,除非从上下文和使用中另有理解,表述“至少一个”包括在表述之后的每个列举对象以及两个或更多个列举对象的各种组合。除非从上下文中另有理解,与三个或更多所列举的对象有关的表述“和/或”应被理解为具有相同的含义。

[0327] 术语“包括”、“具有”或“含有”,包括其语法等同物的使用,除非另有特别说明或从上下文中理解,应将其一般理解为开放式和非限制性的,例如,不排除附加的未列举的元素或步骤。

[0328] 当术语“约”的使用在定量值之前时,本发明还包括具体的定量值本身,除非另有明确说明。如本文所用,除非另有说明或推断,否则术语“约”是指相对于标称值的±10%变化。

[0329] 应该理解,只要本发明保持可操作,步骤的顺序或执行某些动作的顺序是无关紧要的。此外,可以同时进行两个或更多个步骤或动作。

[0330] 在此使用任何和所有示例或示例性语言,例如,“诸如”或“包括”仅旨在更好地说明本发明并且不对本发明的范围构成限制,除非要求保护。说明书中的任何语言都不应被解释为指示任何未要求保护的元素对于本发明的实践是必不可少的。

实施例

[0331] 以下实施例仅是说明性的,并不旨在以任何方式限制本发明的范围或内容。

[0332] 实施例1

[0333] 本实施例描述了促进提前终止密码子(PTC)的通读的精氨酸氨酰化抑制物tRNA。

[0334] 从内源性小鼠精氨酸-tRNA通过将其正常反密码子转化为识别TGA终止密码子的TCA反密码子而生成抑制物tRNA (称为Arg_{TCA}抑制物tRNA)。内源性精氨酸-tRNA中的五个含有内含子,所述内含子必须被剪出才能产生成熟的tRNA;生成了相应的具有和不具有这些内含子序列的Arg_{TCA}抑制物tRNA。抑制物tRNA序列显示在表8中。

[0335] 表8

[0336]

SEQ ID NO	抑制物 tRNA ID 编号	抑制物 tRNA 名称	抑制物 tRNA 序列(反密码子小写)
1	089	tRNA-Arg-ACG-1-1-TCA-SUP	GGGCCAGTGGCGCAATGGATAACG CGTCTGACTtcaGATCAGAAGATTC CAGGTTCGACTCCTGGCTGGCTCG
2	090	tRNA-Arg-ACG-2-1-TCA-SUP	GGGCCAGTGGCGCAATGGATAACG CGTCTGACTtcaGATCAGAAGATTG TAGGTTCGACTCCTACCTGGCTCG
3	101	tRNA-Arg-ACG-3-1-TCA-SUP	GGGCCAGTGGCGCAATGGATAACG CGTCTGACTtcaGATCAGAAGATTC TAGGTTCGACTCCTGGCTGGCTCG
4	102	tRNA-Arg-CCG-1-1-TCA-SUP	GGCCGCGTGGCCTAATGGATAAGG CGTCTGATTtcaGATCAGAAGATTG AGGGTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG
5	103	tRNA-Arg-CCG-2-1-TCA-SUP	GGCCGCGTGGCCTAATGGATAAGG CGTCTGATTtcaGATCAGAAGATTG GGGGTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG
6	104	tRNA-Arg-CCG-3-1-TCA-SUP	GACCCAGTGGCCTAATGGATAAGG CATCAGCCTtcaGAGCTGGGGATTG TGGGTTCGAGTCCCATCTGGGTCG
7	105	tRNA-Arg-CCT-1-1-TCA-SUP	GCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGG CACTGGCCTtcaAAGCCAGGGATTG TGGGTTCGAGTCCCACCTGGGGTA
8	106	tRNA-Arg-CCT-2-1-TCA-SUP	GCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGG CACTGGCCTtcaAAGCCAGGGATTG TGGGTTCGAGTCCCACCTGGGGTG

[0337]

9	107	tRNA-Arg-CCT-3-1-TCA-SUP	GCCCCGGTGGCCTAATGGATAAGGC ATTGGCCTtcaAGCCAGGGATTGTG GGTTCGAGTCCCACCCGGGGTA
10	108	tRNA-Arg-CCT-4-1-TCA-SUP	GCCCCAGTGGCCTAATGGATAAGGC ATTGGCCTtcaAAGCCAGGGATTGTG GGTTCGAGTCCCATCTGGGGTG
11	001	tRNA-Arg-TCG-1-1-TCA-SUP	GGCCGCGTGGCCTAATGGATAAGGC GTCTGACTtcaGATCAGAAGATTGCA GGTTCGAGTCCTGCCGCGGTCG
12	109	tRNA-Arg-TCG-2-1-TCA-SUP	GACCGCGTGGCCTAATGGATAAGGC GTCTGACTtcaGATCAGAAGATTGAG GGTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG
13	110	tRNA-Arg-TCG-3-1-TCA-SUP	GACCACGTGGCCTAATGGATAAGGC GTCTGACTtcaGATCAGAAGATTGAG GGTTCGAATCCCTTCGTGGTTG
14	111	tRNA-Arg-TCG-4-1-TCA-SUP	GACCACGTGGCCTAACGGATAAGGC GTCTGACTtcaGATCAGAAGATTGAG GGTTCGAATCCCTTCGTGGTTA
15	112	tRNA-Arg-TCT-1-1-TCA-SUP_含有内含子	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGC ATTGGACTtcaAGTGACGAGAAAGCG ATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAATCCC ACCAGAGTCG
16	113	tRNA-Arg-TCT-1-1-TCA-SUP_无内含子	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGC ATTGGACTtcaAATTCAAAGGTTGTG GGTTCGAATCCCACCAGAGTCG
17	114	tRNA-Arg-TCT-2-1-TCA-SUP_含有内含子	GGCTCCGTGGCGCAATGGATAGCGC ATTGGACTtcaAGAGGCTGAAGGCAT TCAAAGGTTCCGGGTTCGAGTCCCGG CGGAGTCG

[0338]

18	115	tRNA-Arg-TCT-2-1-TCA-SUP_无内含子	GGCTCCGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGGTTCCGGGTTCGAGTCCCGGCGGAGTCG
19	116	tRNA-Arg-TCT-3-1-TCA-SUP_含有内含子	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAGCATGATTGAGAGATTCAAAGGTTGCGGGTTCGAGTCCCGCCAGAGTCG
20	117	tRNA-Arg-TCT-3-1-TCA-SUP_无内含子	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGGTTGCGGGTTCGAGTCCCGCCAGAGTCG
21	118	tRNA-Arg-TCT-4-1-TCA-SUP_含有内含子	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAGACAAATGGAGGCATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG
22	119	tRNA-Arg-TCT-4-1-TCA-SUP_无内含子	GGCTCTGTGGCGCAATGGATAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGGTTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG
23	120	tRNA-Arg-TCT-5-1-TCA-SUP	GTCTCTGTGGCGCAATGGACGAGCGCGCTGGACTtcaAATCCAGAGGTTCTGGGTTCGAGTCCCGGCAGAGATG
24	121	tRNA-Arg-TCT-6-1-TCA-SUP_含有内含子	GGCTCTGTGGAGCAATGGATAGCACATTGGACTtcaAGCATGACCGAGAGATTCAAAGGTTGCGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTTG
25	122	tRNA-Arg-TCT-6-1-TCA-SUP_无内含子	GGCTCTGTGGAGCAATGGATAGCACATTGGACTtcaAATTCAAAGGTTGCGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTTG

[0339]

35	179	tRNA-Arg-TCT-5-1-TCA-SUP_T51C	GTCTCTGTGGCGCAATGGACGAGCGCGCTGGACTtcaAATCCAGAGGTTCCGGGTTCGAGTCCCGGCAGAGATG

[0340] 在本实施例中,所有成熟tRNA序列(如GtRNAdb所预测的;http://gtrnadb.ucsc.edu)均在来自tRNA-Arg-TCG-1-1(一种高表达的精氨酸-tRNA)的上游和下游基因组侧翼序列(±200 bp)的背景中表达,即tRNA序列用SEQ ID NO: 26的5'侧翼序列和SEQ ID NO: 27的3'侧翼序列表达。所有成熟的包括上游和下游基因组侧翼序列的tRNA

序列在pGL4载体骨架中生成。

[0341] 在含有双荧光通读报告基因的细胞系中通过流式细胞术测试Arg_{TCA}抑制物的PTC通读活性。这些报告基因包括三个拷贝的红色荧光蛋白(tdTomato)、TEV蛋白酶、含有PTC的接头区和三个拷贝的绿色荧光蛋白(EGFP)。报告基因构建体的示意图显示于图3。在不存在抑制物tRNA导致的任何PTC通读的情况下,翻译将由接头区内的PTC终止,并且仅表达tdTomato(并且因此只检测到红色荧光)。作为抑制物tRNA的结果的PTC通读活性将允许翻译通过接头区中的PTC进行,并且tdTomato和EGFP均被表达(并且因此检测到红色和绿色荧光)。因此,可以通过量化表达高于背景的红色和绿色荧光报告基因的活细胞的百分比(双阳性%)来评估通读。

[0342] 为了筛选在与Dravet综合征相关的PTC处具有通读活性的抑制物tRNA,从在SCN1A基因中具有无义突变的两名患者(受试者N和受试者S)的SCN1A转录物生成含有PTC和PTC两侧的八个侧翼密码子的接头区。

[0343] 衍生自受试者N SCN1A转录物的接头区如下,并且包括该接头区的报告基因称为受试者N-PTC报告基因:CTGAGACCTCTAAGAGCCTTATCTtgaTTTGAAGGGATGAGGGTGGTTGTG (SEQ ID NO: 28)。用野生型Arg密码子代替PTC的相应接头用作对照物,并具有以下序列:CTGAGACCTCTAAGAGCCTTATCTcgaTTTGAAGGGATGAGGGTGGTTGTG (SEQ ID NO: 193)。

[0344] 衍生自受试者S SCN1A转录物的接头区如下,并且包括该接头区的报告基因称为受试者S-PTC报告基因:ACAAGCCTTTTCAGCTTTAGAGGGtgaGCAAAGGATGTGGGATCTGAGAAC (SEQ ID NO: 29)。用野生型Arg密码子代替PTC的相应接头用作对照物,并具有以下序列:ACAAGCCTTTTCAGCTTTAGAGGGcgaGCAAAGGATGTGGGATCTGAGAAC (SEQ ID NO: 194)。

[0345] 另外的51个碱基对接头区衍生自由SCN1A中的R1407X无义突变引起的Dravet综合征小鼠模型(Ogiwara et al., 2007, Neurobiology of Disease)。衍生自SCN1A R1407X转录物的接头区如下,并且包含该接头区的报告基因称为R1407X-PTC报告基因:CTAATAGAAAGAAATGAGACCGCCtgaTGGAAAAATGTGAAAGTAAACTTT (SEQ ID NO: 30)。用野生型Arg密码子代替PTC的相应接头用作对照物,并具有以下序列:CTAATAGAAAGAAATGAGACCGCCcggTGGAAAAATGTGAAAGTAAACTTT (SEQ ID NO: 195)。

[0346] 在多种测定背景中测试Arg_{TCA}抑制物,包括(i)稳定表达受试者S-PTC报告基因并用编码Arg_{TCA}抑制物的质粒瞬时转染的人Flp-In-293细胞系(结果显示于图4),(ii)稳定表达R1407X-PTC报告基因并用编码Arg_{TCA}抑制物的质粒瞬时转染的鼠Flp-In-3T3细胞系(结果显示于图5),和(iii)用编码受试者N-PTC报告基因的质粒和Arg_{TCA}抑制物tRNA的质粒瞬时共转染的Flp-In-293细胞(结果显示于图6)。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000转染试剂进行转染。

[0347] 生成了另外的报告基因构建体,其包括具有核定位信号(NLS)的EGFP,并且在EGFP开放阅读框内含有精氨酸至TGA突变(R96X),其在不存在PTC通读的情况下消除荧光。一般实验方法显示于图8A。EGFP表达由CMV早期增强子/鸡β肌动蛋白(CAG)启动子驱动。报告基因构建体称为CAG:NLS-EGFP (R96X-TGA),并且其序列如下:

[0348] CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC

GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA
TTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTA
TTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGG
CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTC
CTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTG
CCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAG
GTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGT
GGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGC
CGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGG
CAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTT
TTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTGCGGCCCAACGGTA
CCGGATCCACCGGCCGCCACCATGGGAAGCCCAAAGAAGAAGCGTAAGGTAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT
TCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG
CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCT
TCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGTGAACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC
AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG
GCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA
CACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC
TGTACAAGGGAAGCCCCAAGAAAAAGCGGAAGGTGTAA (SEQ ID NO: 31)。

[0349] 在用编码Arg_{TCA}抑制物tRNA的质粒和编码CAG:NLS-EGFP (R96X-TGA)报告基因的质粒瞬时共转染的HEK293细胞和鼠Neuro-2a细胞(广泛用于研究神经元分化的神经嵴衍生细胞系)中评估Arg_{TCA}抑制物的活性。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000转染试剂进行转染。使用等量的指示抑制物质粒和CAG:NLS-EGFP (R96X-TGA)报告基因质粒进行共转染。转染后约24小时在293细胞中和转染后约48小时在Neuro-2a细胞中通过流式细胞术分析EGFP表达。结果显示于图7。

[0350] 通常,Arg_{TCA}抑制物tRNA的相对通读活性在多种测定形式中保持一致。以下抑制物可靠地显示出高于基线的通读活性:TCA-001 (SEQ ID NO: 11)、TCA-89 (SEQ ID NO: 1)、TCA-90 (SEQ ID NO: 2)、TCA-105 (SEQ ID NO: 7)、TCA-106 (SEQ ID NO: 8)、TCA-107 (SEQ ID NO: 9)、TCA-113 (SEQ ID NO: 16)、TCA-114 (SEQ ID NO: 17)、TCA-115 (SEQ ID NO: 18)、TCA-116 (SEQ ID NO: 19)、TCA-117 (SEQ ID NO: 20)、TCA-118 (SEQ ID NO: 21)和TCA-119 (SEQ ID NO: 22)。

[0351] 总之,这些结果表明,所描述的抑制物tRNA可以促进含有与病症例如Dravet综合征相关的提前终止密码子的转录物例如SCN1A转录物的表达。

[0352] 实施例2

[0353] 本实施例描述了表达载体特征对由精氨酸氨酰化抑制物tRNA通读提前终止密码子(PTC)的影响。

[0354] 在pGL4载体骨架中生成了在同一质粒上含有Arg_{TCA}抑制物tRNA和EGFP (R96X-TGA)报告基因两者的表达构建体。这些构建体包括1、2、3或4个拷贝的Arg_{TCA}抑制物tRNA 113 (SEQ ID NO: 16)、115 (SEQ ID NO: 18)和001 (SEQ ID NO: 11) (如实施例1中所述和表8中所示)。每个拷贝的tRNA序列在以下背景中表达:或是(i)来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游基因组侧翼序列(SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp下游基因组侧翼序列 (SEQ ID NO: 27),(ii)来自tRNA-Arg-TCG-1-1的200 bp上游基因组侧翼序列(SEQ ID NO: 26)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的104 bp下游基因组侧翼序列(SEQ ID NO: 32),或是(iii)上游U6启动子,包括来自tRNA-Arg-TCG-1-1的19 bp上游侧翼基因组序列(SEQ ID NO: 33)和来自tRNA-Arg-TCG-1-1的46 bp下游侧翼基因组序列(SEQ ID NO: 34)。一般实验方法显示于图8A,含有4个拷贝的抑制物tRNA的示例性报告基因构建体的示意图显示于图8B。报告基因构建体是CAG:NLS-EGFP (R96X-TGA)报告基因构建体(如实施例1中所述)或EF1a:NLS-EGFP (R96X-TGA)报告基因构建体,其中CAG启动子用延长因子-1 α(EF1a)启动子替换,其序列如下:

[0355] GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGT
CGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTT
TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCACTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCG
CCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTG
AATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGTGG
CCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGTGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAA
TCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGC
GACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCAGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCC
GCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAA
TCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGCCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTG
GGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGC
ACAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCT
CAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCCAGCTTTTGGAG
TACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTT
AGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGC
CTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGTACCGGATCCACCGGCCGCCACCATGG
GAAGCCCAAAGAAGAAGCGTAAGGTAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGT
CGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAG
CTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACG
GCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA
CGTCCAGGAGTGAACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC
ACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGT
ACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCG
CCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTG
CTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGG
TCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAAGCCCCAAGAAAAA

GCGGAAGGTGTAA (SEQ ID NO: 177)。

[0356] 用这些构建体转染Neuro-2a细胞或HEK293 (FlpIn-293)细胞,并在转染后约24小时或48小时通过荧光成像或流式细胞术测定通读。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000转染试剂进行转染。

[0357] 结果显示于图9-10(荧光图像)和图11-17(通过流式细胞术测量的荧光信号的量化)。对于001和113抑制物,可以看到拷贝数增加后的通读改善。总之,结果表明,增加报告基因构建体中抑制物tRNA模块的拷贝数通常导致增强的通读活性。此外,含有U6的构建体表现出PTC通读活性,尽管通常不如在侧翼基因组背景中表达的等同抑制物tRNA所看到的那样多。

[0358] 实施例3

[0359] 本实施例描述了促进转录物中提前终止密码子(PTC)的通读的功能性精氨酸氨酰化抑制物tRNA的设计。

[0360] C57BL/6J小鼠在Arg-TCT-5-1的T环(位置51)中具有天然发生的C至T突变,其已显示影响pre-tRNA加工和功能(Ryuta Ishimura et al., Science, 2014)。Arg_{TCA}抑制物120(如实施例1中所述和表8中所示)在第51位含有T。生成了修饰的抑制物tRNA,其包括在Arg_{TCA}抑制物120的第51位用C替换T (称为Arg_{TCA}抑制物179并且具有SEQ ID NO: 35的核苷酸序列)。通过转染到稳定表达受试者S-PTC报告基因的Flp-In-293细胞系和通过与编码受试者N-PTC报告基因的质粒共转染到Flp-In-3T3细胞中来测试Arg_{TCA}抑制物120和179。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000转染试剂进行转染。结果显示于图4和图6。虽然Arg_{TCA}抑制物120无功能,但仅含有单个替换的Arg_{TCA}抑制物179显示出PTC通读活性。

[0361] 实施例4

[0362] 本实施例描述了促进提前终止密码子(PTC)通读的谷氨酰胺氨酰化抑制物tRNA。

[0363] 从内源性小鼠谷氨酰胺-tRNA通过将其正常反密码子转化为TTA或CTA反密码子生成抑制物tRNA (分别称为Gln_{TTA}或Gln_{CTA}抑制物tRNA)。抑制物tRNA序列显示在表9中。

[0364] 表9

[0365]

SEQ ID NO	抑制物 tRNA ID 编号	抑制物 tRNA 名称	抑制物 tRNA 序列(反密码子小写)
36	002	tRNA-Gln-TTG-1-1-TTA-SUP	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
37	155	tRNA-Gln-CTG-1-1-TTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGACCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
38	156	tRNA-Gln-CTG-2-1-TTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGAACCT
39	157	tRNA-Gln-CTG-3-1-TTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
40	158	tRNA-Gln-CTG-4-1-TTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT
41	159	tRNA-Gln-CTG-5-1-TTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGCTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGATCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGATTT
42	160	tRNA-Gln-CTG-6-1-TTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCCATACAAGTTCAAATCTCAGTGGAACCT
43	161	tRNA-Gln-CTG-7-1-TTA-SUP	GGTTCCTTGGTGTAAGATGAGCACTCTGGATTttaAATCCAGCGATCAGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT

[0366]

44	162	tRNA-Gln-TTG-2-1-TTA-SUP	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTttaAATCCAGC AATCTGAGTTCAAATCTCGGTG GGACCT
45	163	tRNA-Gln-TTG-3-1-TTA-SUP	GGCCCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTttaAATCCAGC GATCCGAGTTCAAATCTCGGTG GGACCT
46	164	tRNA-Gln-TTG-4-1-TTA-SUP	GGTCTCATGGTGTAATGGTTAG CACACTGGACTttaAGTCCAGC AATCCGAGTTCGAGTCTTGGTG AGACCA
47	165	tRNA-Gln-TTG-5-1-TTA-SUP	GGACCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTttaAATCCAGC AATCCAAGTTCAAATCTCGGTG GGACCT
48	166	tRNA-Gln-TTG-6-1-TTA-SUP	GTTTCCATGGTGTAATGGTTGG CACTCTGGACTttaAATCCAGC AATCCAAGTTCAAGTCTCTGTG GGACCT
178	196	tRNA-Gln-CTG-1-1-CTA-SUP	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTctaAATCCAGC GATCCGAGTTCAAATCTCGGTG GGACCT
179	189	tRNA-Gln-CTG-2-1-CTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTctaAATCCAGC GACCCGAGTTCAAATCTCGGTG GGACCT

[0367]

180	190	tRNA-Gln-CTG-3-1-CTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTctaAATCCAGC GATCCGAGTTCAAATCTCGGTG GAACCT
181	191	tRNA-Gln-CTG-4-1-CTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTctaAATCCAGC GATCCGAGTTCAAATCTCGGTG GGACCT
182	192	tRNA-Gln-CTG-5-1-CTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGTGAG CACTCTGGACTctaAATCCAGC GATCCGAGTTCAAATCTCGGTG GGACCT
183	193	tRNA-Gln-CTG-6-1-CTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGCTAG CACTCTGGACTctaAATCCAGC GATCCGAGTTCAAATCTCGGTG GGATTT
184	194	tRNA-Gln-CTG-7-1-CTA-SUP	GGTTCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTctaAATCCAGC CATACAAGTTCAAATCTCAGTG GAACCT
185	195	tRNA-Gln-TTG-1-1-CTA-SUP	GGTTCCTTGGTGTAAGATGAGC ACTCTGGATTctaAATCCAGCG ATCAGAGTTCAAATCTCGGTGG GACCT
186	197	tRNA-Gln-TTG-2-1-CTA-SUP	GGTCCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTctaAATCCAGC AATCTGAGTTCAAATCTCGGTG GGACCT

[0368]

187	198	tRNA-Gln-TTG-3-1-CTA-SUP	GGCCCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTctaAATCCAGC GATCCGAGTTCAAATCTCGGTG GGACCT
188	199	tRNA-Gln-TTG-4-1-CTA-SUP	GGTCTCATGGTGTAATGGTTAG CACACTGGACTctaAGTCCAGC AATCCGAGTTCGAGTCTTGGTG AGACCA
189	200	tRNA-Gln-TTG-5-1-CTA-SUP	GGACCCATGGTGTAATGGTTAG CACTCTGGACTctaAATCCAGC AATCCAAGTTCAAATCTCGGTG GGACCT
190	201	tRNA-Gln-TTG-6-1-CTA-SUP	GTTTCCATGGTGTAATGGTTGG CACTCTGGACTctaAATCCAGC AATCCAAGTTCAAGTCTCTGTG GGACCT

[0369] 在本实施例中,所有成熟tRNA序列均在来自tRNA-Gln-TTG-1-1(一种高表达的谷氨酰胺-tRNA)的上游和下游基因组侧翼序列(±200 bp)的背景中表达,即tRNA序列用SEQ ID NO: 173的5'侧翼序列和SEQ ID NO: 174的3'侧翼序列表达。所有成熟的包括上游和下游基因组侧翼序列的tRNA序列均在pGL4载体骨架中生成。

[0370] 在两个独立衍生的含有整合的荧光通读报告基因的Flp-In-293细胞系中通过流式细胞术测试Gln_{TTA}抑制物的PTC通读活性。结果显示于图18。报告基因包括三个拷贝的红色荧光蛋白(tdTomato)、TEV蛋白酶、含有PTC的接头区和三个拷贝的绿色荧光蛋白(EGFP)。报告基因构建体的示意图显示于图3。在不存在抑制物tRNA导致的任何PTC通读的情况下,翻译将由连头区内的PTC终止,并且仅表达tdTomato (并且因此只检测到红色荧光)。作为抑制物tRNA的结果的PTC通读活性将允许翻译通过接头区中的PTC进行,并且tdTomato和EGFP均被表达(并且因此检测到红色和绿色荧光)。因此,通过量化表达高于背景的红色和绿色荧光报告基因的活细胞的百分比(双阳性%),用流式细胞术评估通读。接头衍生自小鼠Dmd^{mdx}转录物,并具有以下序列:CTGCAAAGTTCTTTGAAAGAGCAAtaaAATGGCTTCAACTATCTGAGTGAC (SEQ ID NO: 192)。用野生型Gln密码子代替PTC的相应接头用作对照物,并具有以下序列:CTGCAAAGTTCTTTGAAAGAGCAACAAAATGGCTTCAACTATCTGAGTGAC (SEQ ID NO: 191)。

[0371] 在pGL4载体骨架中生成了另外的报告基因构建体,其包括具有核定位信号(NLS)的EGFP,并且含有在不存在PTC通读的情况下消除荧光的谷氨酰胺至TAA的突变(Q69X)。EGFP表达由CMV早期增强子/鸡β肌动蛋白(CAG)启动子驱动。报告基因构建体称为CAG:NLS-EGFP (Q69X-TAA),其序列如下:

[0372] CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAA

TAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA
TTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTA
TTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGG
CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTC
CTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTG
CCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAG
GTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGT
GGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGC
CGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGG
CAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTT
TTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTGCGGCCCAACGGTA
CCGGATCCACCGGCCGCCACCATGGGAAGCCCAAAGAAGAAGCGTAAGGTAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT
TCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG
CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGTAATGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCT
TCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC
AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG
GCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA
CACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC
TGTACAAGGGAAGCCCCAAGAAAAAGCGGAAGGTGTAA (SEQ ID NO: 175)。

[0373] 通过流式细胞术在用编码Gln_{TTA}抑制物tRNA和CAG:NLS-EGFP (Q69X-TAA)报告基因的质粒瞬时共转染的Neuro-2a细胞中评估Gln_{TTA}抑制物的活性。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000转染试剂进行转染。结果显示于图19。

[0374] 在pGL4载体骨架中生成了另外的报道构建体,其包括具有核定位信号(NLS)的EGFP并且含有在不存在PTC通读的情况下消除荧光的谷氨酰胺至TAG的突变(Q69X)。EGFP表达由CMV早期增强子/鸡β肌动蛋白(CAG)启动子驱动。报告基因构建体称为CAG:NLS-EGFP(Q69X-TAG),并且其序列如下:

[0375] CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAA
TAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA
TTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTA
TTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGG
CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTC
CTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTG

CCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAG
GTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGT
GGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGC
CGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGG
CAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTT
TTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTGCGGCCCAACGGTA
CCGGATCCACCGGCCGCCACCATGGGAAGCCCAAAGAAGAAGCGTAAGGTAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT
TCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG
CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGTAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCT
TCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC
AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG
GCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA
CACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC
TGTACAAGGGAAGCCCCAAGAAAAAGCGGAAGGTGTAA (SEQ ID NO: 176)。

[0376] 在用编码Gln_{CTA}抑制物tRNA的质粒和编码CAG:NLS-EGFP (Q69X-TAG)报告基因的质粒瞬时共转染的Neuro-2a细胞中评估Gln_{CTA}抑制物的活性。结果显示于图20。

[0377] 总之,这些结果表明,所描述的抑制物tRNA能促进含有与病症相关的提前终止密码子的转录物的表达。

[0378] 实施例5

[0379] 本实施例描述了所公开的抑制物tRNA和小分子无义抑制疗法的通读活性。

[0380] 所公开的抑制物tRNA与无义抑制药物translarna(阿塔鲁伦)、庆大霉素和G418(遗传霉素)一起进行测试。在用含有CAG:NLS-EGFP (R96X-TGA)报告基因的表达构建体(如实施例1中所述)转染并且或是(i)在相同构建体上包括指示的拷贝数的Arg_{TCA}抑制物tRNA,或是(ii)用阿塔鲁伦处理,(iii)用庆大霉素处理,或(iv)用G418处理后约48小时的Neuro-2a 细胞中测量PTC通读活性。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000转染试剂进行转染。对于所有实验条件,在转染后约6小时将细胞培养基替换为新鲜培养基,此时添加指示浓度的指示药物。PTC通读活性被测量为EGFP阳性细胞的百分比。将含有野生型EGFP而没有PTC的报告基因用作对照物。在用通常从活细胞中排除的膜不透性染料7-氨基放线菌素D(7-AAD; Thermo Fisher Scientific #006993-50)染色(根据制造商的方案使用)后,通过流式细胞术评估接受同一组处理的细胞中的细胞活力。结果如图21-23所示。总之,结果表明Arg_{TCA}抑制物tRNA #115(SEQ ID NO: 18)比无义抑制药物中的任何一种产生更大的通读。此外,结果表明,与任何无义抑制药物不同,用Arg_{TCA}抑制物tRNA处理不伴随细胞活力的降低。

[0381] 实施例6

[0382] 本实施例描述了促进提前终止密码子(PTC)通读的氨酰化抑制物tRNA。

[0383] 从内源性小鼠tRNA通过将其正常反密码子转化为识别提前终止密码子(PTC)的反

密码子而生成抑制物tRNA。抑制物tRNA序列显示在表10中。

[0384] 表10

SEQ ID NO	抑制物 tRNA 名称	抑制物 tRNA 序列
49	pre-tRNA-Leu-CAA->cta--1-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTctaGCTATGGCTTCCTCG CTCTGAGGGTTCTGGTCTCCCCTGGA GGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGA CA
50	pre-tRNA-Leu-CAA->cta--2-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTctaGCTTAGCTTCCCTGT CTGGGGATTCTGGTCTCCGTATGGAG GCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGAC A
51	pre-tRNA-Leu-CAA->cta--3-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTctaGGTGACAAGCCTTAC CTACGGGTGTTCTGGTCTCCGAATGG AGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTG ACA
52	pre-tRNA-Leu-CAA->cta--4-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTctaGCGTTCGCTTCCTCT ACTGAGGGTTCTGGTCTCCGTGTGGA GGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGA CA
53	pre-tRNA-Leu-CAA->tca--1-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTtcaGCTATGGCTTCCTCG CTCTGAGGGTTCTGGTCTCCCCTGGA GGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGA CA

[0385]

[0386]

54	pre-tRNA-Leu-CAA->tca--2-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTtcaGCTTAGCTTCCCTGT CTGGGGATTCTGGTCTCCGTATGGAG GCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGAC A
55	pre-tRNA-Leu-CAA->tca--3-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTtcaGGTGACAAGCCTTAC CTACGGGTGTTCTGGTCTCCGAATGG AGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTG ACA
56	pre-tRNA-Leu-CAA->tca--4-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTtcaGCGTTCGCTTCCTCT ACTGAGGGTTCTGGTCTCCGTGTGGA GGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGA CA
57	pre-tRNA-Leu-CAA->tta--1-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTttaGCTATGGCTTCCTCG CTCTGAGGGTTCTGGTCTCCCCTGGA GGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGA CA
58	pre-tRNA-Leu-CAA->tta--2-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTttaGCTTAGCTTCCCTGT CTGGGGATTCTGGTCTCCGTATGGAG GCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGAC A

[0387]

59	pre-tRNA-Leu-CAA->tta--3-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTttaGGTGACAAGCCTTAC CTACGGGTGTTCTGGTCTCCGAATGG AGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTG ACA
60	pre-tRNA-Leu-CAA->tta--4-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTttaGCGTTCGCTTCCTCT ACTGAGGGTTCTGGTCTCCGTGTGGA GGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGA CA
61	pre-tRNA-Tyr-GTA->cta--1-1	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTctaGAGTTACTAGAATAGT GATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCC GGCTCGAAGGA
62	pre-tRNA-Tyr-GTA->cta--2-1	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTctaGTCAGTACAATATGGT AATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCC GGCTCGAAGGA
63	pre-tRNA-Tyr-GTA->cta--3-1	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCG GAGGACTctaGGCTTGTGGCTGTGGA CATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCC GGCTCGAAGGA
64	pre-tRNA-Tyr-GTA->cta--4-1	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCG GAGGACTctaGCTAACTCCCCGTTAG AAGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGA CTCCGGCTCGAAGGA

[0388]

65	pre-tRNA-Tyr-GTA->cta--5-1	CTTTCGATAGTTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTctaGAGTATTAACGTTGGT GATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAGTCC GGCTCGAAGGA
66	pre-tRNA-Tyr-GTA->tta--1-1	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTttaGAGTTACTAGAATAGT GATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAATCC GGCTCGAAGGA
67	pre-tRNA-Tyr-GTA->tta--2-1	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTttaGTCAGTACAATATGGT AATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCC GGCTCGAAGGA
68	pre-tRNA-Tyr-GTA->tta--3-1	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCG GAGGACTttaGGCTTGTGGCTGTGGA CATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCC GGCTCGAAGGA
69	pre-tRNA-Tyr-GTA->tta--4-1	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCG GAGGACTttaGCTAACTCCCCGTTAG AAGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCGA CTCCGGCTCGAAGGA
70	pre-tRNA-Tyr-GTA->tta--5-1	CTTTCGATAGTTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTttaGAGTATTAACGTTGGT GATCCTTAGGTCGCTGGTTCGAGTCC GGCTCGAAGGA
71	tRNA-Cys-GCA->tca--1-1	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCAT TTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCAGGTGCCCCCT

[0389]

72	tRNA-Cys-GCA->tca--10-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGATGCCCCCT
73	tRNA-Cys-GCA->tca--11-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGTATTTGGCTtcaGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
74	tRNA-Cys-GCA->tca--12-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCTTGGTTCAAATCCAGGTGTCCCCT
75	tRNA-Cys-GCA->tca--13-1	GGGGGTATAGCTCAGAGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGATCTCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
76	tRNA-Cys-GCA->tca--14-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTAGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
77	tRNA-Cys-GCA->tca--15-1	GGTGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGATCCCTGGTTCGAATCCAGGTGCCCCCT
78	tRNA-Cys-GCA->tca--16-1	GGGGGTATAACTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
79	tRNA-Cys-GCA->tca--17-1	TGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
80	tRNA-Cys-GCA->tca--18-1	GGGGGTATAGCTCAGAGGAAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGATTCAAATCCAGGTGCCCCCT

[0390]

81	tRNA-Cys-GCA->tca--19-1	GGGGGTAAAGCTCAGGGGTAGAGCAT TTGACTtcaGATTAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCAGGTACCCCCT
82	tRNA-Cys-GCA->tca--2-1	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCAT TTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCGGGTGCCCCCT
83	tRNA-Cys-GCA->tca--21-1	GGGGTTATAGCTCAGGTGTAGAGCAT TTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCAGGTGCCCCCT
84	tRNA-Cys-GCA->tca--24-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCAT TTGACTtcaGATCACGAGGTCCCTGG TTCAAATCGAGGTGCCCCCT
85	tRNA-Cys-GCA->tca--25-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTGGAGCAT TTGACTtcaGATCAAGGGGTCCCTGT TTCAAATCCAGGTGCCCCCT
86	tRNA-Cys-GCA->tca--3-1	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCAT TTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCCGG TTCAAATCCGGGTGCCCCCT
87	tRNA-Cys-GCA->tca--4-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCAT TTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCAGGTGCCCCCT
88	tRNA-Cys-GCA->tca--5-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCAT TTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCGGGTGCCCCCT
89	tRNA-Cys-GCA->tca--6-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCAT TTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCTGG TTCAAATCCAGGTACCCCCT

[0391]

90	tRNA-Cys-GCA->tca--7-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCCGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT
91	tRNA-Cys-GCA->tca--8-1	GGGGGCATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGTCCCCGGTTCAAATCCGGGTGCTCCCT
92	tRNA-Cys-GCA->tca--9-1	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATTAAGAGGTCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT
93	tRNA-Glu-CTC->cta--1-1	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTctaACCGCCGCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA
94	tRNA-Glu-CTC->cta--2-1	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTTGGCGCTctaACCGCCGCGGCCTGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA
95	tRNA-Glu-CTC->cta--5-1	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGCTTTGGTGCTctaACCTCCATGGCCCAGGTTTGATTCCTGGTCAGGGAA
96	tRNA-Glu-CTC->tta--1-1	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTttaACCGCCGCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA
97	tRNA-Glu-CTC->tta--2-1	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTTGGCGCTttaACCGCCGCGGCCTGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA
98	tRNA-Glu-CTC->tta--5-1	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGCTTTGGTGCTttaACCTCCATGGCCCAGGTTTGATTCCTGGTCAGGGAA

[0392]

99	tRNA-Glu-TTC->cta--1-1	TCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATT CCTGGTTctaACCCAGGCGGCCCGGG TTCGACTCCCGGTGTGGGAA
100	tRNA-Glu-TTC->cta--2-1	TCCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATT CCTGGTTctaACCCAGGCGGCCCGGG TTCGACTCCCGGTATGGGAA
101	tRNA-Glu-TTC->cta--3-1	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATT CGGCGCTctaACCGCCGCGGCCCGGG TTCGATTCCCGGTCAGGGAA
102	tRNA-Glu-TTC->tta--1-1	TCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATT CCTGGTTttaACCCAGGCGGCCCGGG TTCGACTCCCGGTGTGGGAA
103	tRNA-Glu-TTC->tta--2-1	TCCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATT CCTGGTTttaACCCAGGCGGCCCGGG TTCGACTCCCGGTATGGGAA
104	tRNA-Glu-TTC->tta--3-1	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATT CGGCGCTttaACCGCCGCGGCCCGGG TTCGATTCCCGGTCAGGGAA
105	tRNA-Gly-ACC->tca--1-1	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTAGCGCG TTCGCCTtcaAAAGCGAAAGGTCCCC GGTTCGAAACCGGGCGGAAACA
106	tRNA-Gly-CCC->tca--1-1	GCGCCGCTGGTGTAGTGGTATCATGC AAGATTtcaATTCTTGCGACCCGGGT TCGATTCCCGGGCGGCGCA
107	tRNA-Gly-CCC->tca--2-1	GCATTGGTAGTTCAATGGTAGAATTC TCGCCTtcaACGCGGGTGACCCGGGT TCGATTCCCGGCCAATGCA

[0393]

108	tRNA-Gly-CCC->tca--3-1	GCATTGGTGGTTCAATGGTAGAATTC TCGCCTtcaACGCGGGTGACCCGGGT TCGATTCCCGGCCAATGCA
109	tRNA-Gly-CCC->tca--4-1	GCATTGGTGGTTCAATGGTAGAATTC TCGCCTtcaACTCGGGTGACCCGGGT TCGATTCCCGGCCAATGCA
110	tRNA-Gly-GCC->tca--1-1	GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTC TCGCCTtcaACGCGGGAGGCCCGGGT TCGATTCCCGGCCCATGCA
111	tRNA-Gly-GCC->tca--2-1	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTC TCGCCTtcaACGCGGGAGGCCCGGGT TCGATTCCCGGCCAATGCA
112	tRNA-Gly-GCC->tca--3-1	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTC TCGCCTtcaACGCGGGAGGCCCGGGT TTGATTCCCGGCCAATGCA
113	tRNA-Gly-GCC->tca--4-1	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTC TCGCCTtcaACGCGGGAGGCCCGGGT TCGGTTCCCGGCCAATGCA
114	tRNA-Gly-TCC->tca--1-1	GCGTTGGTGGTATAGTGGTGAGCATA GCTGCCTtcaAAGCAGTTGACCCGGG TTCGATTCCCGGCCAACGCA
115	tRNA-Leu-AAG->cta--1-1	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCT GCCA
116	tRNA-Leu-AAG->cta--2-1	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCT GCCA

[0394]

117	tRNA-Leu-AAG->cta--3-1	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACT GCCA
118	tRNA-Leu-AAG->tca--1-1	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTtcaGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCT GCCA
119	tRNA-Leu-AAG->tca--2-1	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTtcaGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCT GCCA
120	tRNA-Leu-AAG->tca--3-1	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTtcaGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACT GCCA
121	tRNA-Leu-AAG->tta--1-1	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCT GCCA
122	tRNA-Leu-AAG->tta--2-1	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCT GCCA
123	tRNA-Leu-AAG->tta--3-1	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCG GGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACT GCCA

[0395]

124	tRNA-Leu-CAA->cta--1-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTC TGACA
125	tRNA-Leu-CAA->cta--2-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCGTA TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTT CTGACA
126	tRNA-Leu-CAA->cta--3-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCGAA TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTT CTGACA
127	tRNA-Leu-CAA->cta--4-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCGTG TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTT CTGACA
128	tRNA-Leu-CAA->tca--1-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTtcaGTTCTGGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTC TGACA
129	tRNA-Leu-CAA->tca--2-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTtcaGTTCTGGTCTCCGTA TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTT CTGACA
130	tRNA-Leu-CAA->tca--3-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTtcaGTTCTGGTCTCCGAA TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTT CTGACA

[0396]

131	tRNA-Leu-CAA->tca--4-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTtcaGTTCTGGTCTCCGTG TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTT CTGACA
132	tRNA-Leu-CAA->tta--1-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTC TGACA
133	tRNA-Leu-CAA->tta--2-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCGTA TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTT CTGACA
134	tRNA-Leu-CAA->tta--3-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCGAA TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTT CTGACA
135	tRNA-Leu-CAA->tta--4-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCGTG TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTT CTGACA
136	tRNA-Leu-CAG->cta--1-1	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGCGTTctaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCC TGACA
137	tRNA-Leu-CAG->cta--2-1	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGCGTTctaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTC TGACA

[0397]

138	tRNA-Leu-CAG->cta--3-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGA GCTGTGTTctaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCC TGACA
139	tRNA-Leu-CAG->cta--4-1	GTCAGGATGGCCGAGCAGTCTAAGGC ACTGCGTTctaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGATTCGAATCCCACTCC TGACA
140	tRNA-Leu-CAG->tca--1-1	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGCGTTtcaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCC TGACA
141	tRNA-Leu-CAG->tca--2-1	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGCGTTtcaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTC TGACA
142	tRNA-Leu-CAG->tca--3-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGA GCTGTGTTtcaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCC TGACA
143	tRNA-Leu-CAG->tca--4-1	GTCAGGATGGCCGAGCAGTCTAAGGC ACTGCGTTtcaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGATTCGAATCCCACTCC TGACA
144	tRNA-Leu-CAG->tta--1-1	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGCGTTttaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCC TGACA

[0398]

145	tRNA-Leu-CAG->tta--2-1	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGCGTTttaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTC TGACA
146	tRNA-Leu-CAG->tta--3-1	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGA GCTGTGTTttaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTCC TGACA
147	tRNA-Leu-CAG->tta--4-1	GTCAGGATGGCCGAGCAGTCTAAGGC ACTGCGTTttaGTCGCAGTCTCCCCT GGAGGCGTGGATTCGAATCCCACTCC TGACA
148	tRNA-Leu-TAA->cta--1-1	ACCAGAATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTctaGATCCAATGGATTTAT ATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTC TGGTA
149	tRNA-Leu-TAA->cta--2-1	ACCAGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTctaGATCCAATGGACATAT GTCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCC TGGTA
150	tRNA-Leu-TAA->cta--3-1	ACTGGGATGGCTGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTctaGATCCAATGGGCGGTT GCCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCC CAGTA
151	tRNA-Leu-TAA->cta--4-1	GATGGGATGGCTGAGAGGTTAAGGCT TTGGACTctaGATCCAATGGGCAGAT GCCTGCGTGGGTTTGAACCCCACTCC CAATA

[0399]

152	tRNA-Leu-TAA->tca--1-1	ACCAGAATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTtcaGATCCAATGGATTTAT ATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTC TGGTA
153	tRNA-Leu-TAA->tca--2-1	ACCAGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTtcaGATCCAATGGACATAT GTCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCC TGGTA
154	tRNA-Leu-TAA->tca--3-1	ACTGGGATGGCTGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTtcaGATCCAATGGGCGGTT GCCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCC CAGTA
155	tRNA-Leu-TAA->tca--4-1	GATGGGATGGCTGAGAGGTTAAGGCT TTGGACTtcaGATCCAATGGGCAGAT GCCTGCGTGGGTTTGAACCCCACTCC CAATA
156	tRNA-Leu-TAA->tta--1-1	ACCAGAATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTttaGATCCAATGGATTTAT ATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTC TGGTA
157	tRNA-Leu-TAA->tta--2-1	ACCAGGATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTttaGATCCAATGGACATAT GTCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCC TGGTA
158	tRNA-Leu-TAA->tta--3-1	ACTGGGATGGCTGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTttaGATCCAATGGGCGGTT GCCTGCGTGGGTTCGAACCCCACTCC CAGTA

[0400]

159	tRNA-Leu-TAA->tta--4-1	GATGGGATGGCTGAGAGGTTAAGGCTTTGGACTttaGATCCAATGGGCAGATGCCTGCGTGGGTTTGAACCCCACTCCCAATA
160	tRNA-Leu-TAG->cta--1-1	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
161	tRNA-Leu-TAG->cta--2-1	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA
162	tRNA-Leu-TAG->cta--3-1	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTCATTTCGATGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
163	tRNA-Leu-TAG->tca--1-1	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTtcaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA
164	tRNA-Leu-TAG->tca--2-1	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCTGGATTtcaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA
165	tRNA-Leu-TAG->tca--3-1	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCTGGATTtcaGCTCCAGTCATTTCGATGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA

[0401]

166	tRNA-Leu-TAG->tta--1-1	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCG GAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCT GCCA
167	tRNA-Leu-TAG->tta--2-1	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTCTAAGGC GCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCG GAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACT GCCA
168	tRNA-Leu-TAG->tta--3-1	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGGC GCTGGATTttaGCTCCAGTCATTTCG ATGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCT GCCA
169	tRNA-Lys-CTT->cta--1-1	GCCCAGCTAGCTCAGTTGGTAGAGCG TGGGACTctaAATCCTAGGGTCGTGG GTTCGAACCCCACGTTGGGCG
170	tRNA-Lys-CTT->cta--12-1	GCCCAGCTAGCTCAGTCTGTAGAGCA TGAGACTctaAGTCTCAGGGTCATGG GTTGGAGCCCCATGTTGTGCA
171	tRNA-Lys-CTT->cta--13-1	GCCTAGCTAGTTCAGTCGGTAGAGCA TGAGACTctaAATCTCAGGTTCATGA GTTTGAGCCCCATGTTGGTTTGGCA
172	tRNA-Lys-CTT->cta--14-1	CCCCGGCTAGCTCAGTCAGTAGAGCT TGAGAATctaAATCTCAGGGTCGTGG GTTGGAGCCCCACGTTGGGCG
196	tRNA-Lys-CTT->cta--2-1	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCA TGGGACTctaAATCCCAGGGTCGTGG GTTCGAGCCCCACGTTGGGCG

[0402]

197	tRNA-Lys-CTT->cta--3-1	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCA TGAGACTctaAATCTCAGGGTCGTGG GTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
198	tRNA-Lys-CTT->cta--4-1	GCCCAGCTAGCTCAGTCTGTAGAGCA TGAGACTctaAATCTCAGGGTCGTGA GTTCGAGCCCCACGTTGGGTG
199	tRNA-Lys-CTT->cta--5-1	GCCCAGATAGCTCAGTGGGTAGAGCA TGAGACTctaAATCTCAGGGTCATGG GTTCATGCCCCATGTTGGGTA
200	tRNA-Lys-CTT->cta--6-1	GTCCTGCTGGCTCAGTCGGTACAGCA TGGGACTctaAATCCCAGGGTCGTGG GTTCGAGCTCCACGTTGGGTA
201	tRNA-Lys-CTT->cta--7-1	GCCTGGCTAGCTCAGTCCATAGAGCA TGGGACTctaAATCCCAGGGTCATGG GTTCGAGCCCCATATTAGGCA
202	tRNA-Lys-CTT->cta--8-1	GCCCAGCTAGCTTAGTTGGTAGAGCA TGAGACTctaAATCTCAGAGTCATGG GTTCAGGCCTCATGTTTGGCA
203	tRNA-Lys-CTT->cta--9-1	AACCTGGCTAGGTCAGTTGGTAGATC ATGAGACTctaAATCTCAGGGTCATG GGTTCAAGCCCCATGTTGGTTT
204	tRNA-Lys-CTT->tta--1-1	GCCCAGCTAGCTCAGTTGGTAGAGCG TGGGACTttaAATCCTAGGGTCGTGG GTTCGAACCCCACGTTGGGCG
205	tRNA-Lys-CTT->tta--12-1	GCCCAGCTAGCTCAGTCTGTAGAGCA TGAGACTttaAGTCTCAGGGTCATGG GTTGGAGCCCCATGTTGTGCA

[0403]

206	tRNA-Lys-CTT->tta--13-1	GCCTAGCTAGTTCAGTCGGTAGAGCA TGAGACTttaAATCTCAGGTTCATGA GTTTGAGCCCCATGTTGGTTTGGCA
207	tRNA-Lys-CTT->tta--14-1	CCCCGGCTAGCTCAGTCAGTAGAGCT TGAGAATttaAATCTCAGGGTCGTGG GTTGGAGCCCCACGTTGGGCG
208	tRNA-Lys-CTT->tta--2-1	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCA TGGGACTttaAATCCCAGGGTCGTGG GTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
209	tRNA-Lys-CTT->tta--3-1	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCA TGAGACTttaAATCTCAGGGTCGTGG GTTCGAGCCCCACGTTGGGCG
210	tRNA-Lys-CTT->tta--4-1	GCCCAGCTAGCTCAGTCTGTAGAGCA TGAGACTttaAATCTCAGGGTCGTGA GTTCGAGCCCCACGTTGGGTG
211	tRNA-Lys-CTT->tta--5-1	GCCCAGATAGCTCAGTGGGTAGAGCA TGAGACTttaAATCTCAGGGTCATGG GTTCATGCCCCATGTTGGGTA
212	tRNA-Lys-CTT->tta--6-1	GTCCTGCTGGCTCAGTCGGTACAGCA TGGGACTttaAATCCCAGGGTCGTGG GTTCGAGCTCCACGTTGGGTA
213	tRNA-Lys-CTT->tta--7-1	GCCTGGCTAGCTCAGTCCATAGAGCA TGGGACTttaAATCCCAGGGTCATGG GTTCGAGCCCCATATTAGGCA
214	tRNA-Lys-CTT->tta--8-1	GCCCAGCTAGCTTAGTTGGTAGAGCA TGAGACTttaAATCTCAGAGTCATGG GTTCAGGCCTCATGTTTGGCA

[0404]

215	tRNA-Lys-CTT->tta--9-1	AACCTGGCTAGGTCAGTTGGTAGATCATGAGACTttaAATCTCAGGGTCATGGGTTCAAGCCCCATGTTGGTTT
216	tRNA-Lys-TTT->cta--1-1	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCGGGCG
217	tRNA-Lys-TTT->cta--2-1	GCCTGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG
218	tRNA-Lys-TTT->cta--3-1	GCCTGGATAGCTCAATTGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGGTTCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG
219	tRNA-Lys-TTT->cta--4-1	GCCCAGCCAGCTCAGTAGGTAGAGTATGAGACTctaAATCTCAGGGTGGTGGGTTCGAGCCCCATGTTGGGGG
220	tRNA-Lys-TTT->cta--5-1	TGTGGTGTAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAGGTCCCTGTTCGGGTGCCAAAA
221	tRNA-Lys-TTT->tta--1-1	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCGGGCG
222	tRNA-Lys-TTT->tta--2-1	GCCTGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG
223	tRNA-Lys-TTT->tta--3-1	GCCTGGATAGCTCAATTGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGGTTCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG

[0405]

224	tRNA-Lys-TTT->tta--4-1	GCCCAGCCAGCTCAGTAGGTAGAGTATGAGACTttaAATCTCAGGGTGGTGGGTTCGAGCCCCATGTTGGGGG
225	tRNA-Lys-TTT->tta--5-1	TGTGGTGTAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAGGTCCCTGTTCGGGTGCCAAAA
226	tRNA-Ser-AGA->cta--1-1	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
227	tRNA-Ser-AGA->cta--2-1	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
228	tRNA-Ser-AGA->cta--3-1	GTAGTCGTGGCCAAGTGAGTAAGGCAATGGACTctaAATCCATTGGGGTCTCCCAGCACAGGTTCAAATCCTGCTGACTATG
229	tRNA-Ser-AGA->tca--1-1	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
230	tRNA-Ser-AGA->tca--2-1	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG

[0406]

231	tRNA-Ser-AGA->tca--3-1	GTAGTCGTGGCCAAGTGAGTAAGGCAATGGACTtcaAATCCATTGGGGTCTCCCAGCACAGGTTCAAATCCTGCTGACTATG
232	tRNA-Ser-AGA->tta--1-1	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
233	tRNA-Ser-AGA->tta--2-1	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG
234	tRNA-Ser-AGA->tta--3-1	GTAGTCGTGGCCAAGTGAGTAAGGCAATGGACTttaAATCCATTGGGGTCTCCCAGCACAGGTTCAAATCCTGCTGACTATG
235	tRNA-Ser-CGA->cta--1-1	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTctaAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCTCACAGCG
236	tRNA-Ser-CGA->cta--2-1	GTCACGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTctaAATCCAATGGGGTTTCCCCGCACAGGTTCGAATCCTGTTCGTGACG
237	tRNA-Ser-CGA->cta--3-1	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCGTTGGACTctaAATCCAATGGGTTCTTCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG

[0407]

238	tRNA-Ser-CGA->tca--1-1	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTtcaAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCTCAC AGCG
239	tRNA-Ser-CGA->tca--2-1	GTCACGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTtcaAATCCAATGGGGTTTC CCCGCACAGGTTCGAATCCTGTTCGT GACG
240	tRNA-Ser-CGA->tca--3-1	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTtcaAATCCAATGGGTTCTT CCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCAC AGCG
241	tRNA-Ser-CGA->tta--1-1	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTttaAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCTCAC AGCG
242	tRNA-Ser-CGA->tta--2-1	GTCACGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTttaAATCCAATGGGGTTTC CCCGCACAGGTTCGAATCCTGTTCGT GACG
243	tRNA-Ser-CGA->tta--3-1	GCTGTGATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTttaAATCCAATGGGTTCTT CCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCAC AGCG
244	tRNA-Ser-GCT->cta--1-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTctaAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCACCTTC GTCG

[0408]

245	tRNA-Ser-GCT->cta--2-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTctaAATCCATTGTGCTCTG CACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTC GTCG
246	tRNA-Ser-GCT->cta--3-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTctaAATCCATTGTGCTTTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTC GTCG
247	tRNA-Ser-GCT->cta--4-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTctaAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTC GTCG
248	tRNA-Ser-GCT->cta--5-1	GATGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTctaAATCCATTGTGCTCTG CACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTC ATCG
249	tRNA-Ser-GCT->tca--1-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTtcaAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCACCTTC GTCG
250	tRNA-Ser-GCT->tca--2-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTtcaAATCCATTGTGCTCTG CACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTC GTCG
251	tRNA-Ser-GCT->tca--3-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTtcaAATCCATTGTGCTTTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTC GTCG

[0409]

252	tRNA-Ser-GCT->tca--4-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTtcaAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTC GTCG
253	tRNA-Ser-GCT->tca--5-1	GATGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTtcaAATCCATTGTGCTCTG CACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTC ATCG
254	tRNA-Ser-GCT->tta--1-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTttaAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCACCTTC GTCG
255	tRNA-Ser-GCT->tta--2-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTttaAATCCATTGTGCTCTG CACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTC GTCG
256	tRNA-Ser-GCT->tta--3-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTttaAATCCATTGTGCTTTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTC GTCG
257	tRNA-Ser-GCT->tta--4-1	GACGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTttaAATCCATTGTGCTCTG CACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTC GTCG
258	tRNA-Ser-GCT->tta--5-1	GATGAGGTGGCCGAGTGGTTAAGGCG ATGGACTttaAATCCATTGTGCTCTG CACGCATGGGTTCGAATCCCATCCTC ATCG

[0410]

259	tRNA-Ser-GGA->cta--1-1	GCTGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCA TTAGACTctaGATCTAAAGGTCCCTG GTTTGATCCCGGGTTTCGGCA
260	tRNA-Ser-GGA->tca--1-1	GCTGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCA TTAGACTtcaGATCTAAAGGTCCCTG GTTTGATCCCGGGTTTCGGCA
261	tRNA-Ser-GGA->tta--1-1	GCTGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCA TTAGACTttaGATCTAAAGGTCCCTG GTTTGATCCCGGGTTTCGGCA
262	tRNA-Ser-TGA->cta--1-1	GCAGCGATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTctaAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAACCCTGCTCGC TGCG
263	tRNA-Ser-TGA->tca--1-1	GCAGCGATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTtcaAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAACCCTGCTCGC TGCG
264	tRNA-Ser-TGA->tta--1-1	GCAGCGATGGCCGAGTGGTTAAGGCG TTGGACTttaAATCCAATGGGGTCTC CCCGCGCAGGTTCGAACCCTGCTCGC TGCG
265	tRNA-Trp-CCA->cta--1-1	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGT CTGACTctaGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
266	tRNA-Trp-CCA->cta--2-1	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGT CTGACTctaGATCAGAAGGCTGCGTG TTCGAATCACGTCGGGGTCA

[0411]

267	tRNA-Trp-CCA->cta--3-1	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
268	tRNA-Trp-CCA->cta--4-1	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
269	tRNA-Trp-CCA->cta--5-1	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAGTCACGTCGGGGTCA
270	tRNA-Trp-CCA->cta--6-1	GACCTCGTGGCACAATGGTAGCACGTCTGACTctaGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
271	tRNA-Trp-CCA->tca--1-1	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
272	tRNA-Trp-CCA->tca--2-1	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGCTGCGTGTTCGAATCACGTCGGGGTCA
273	tRNA-Trp-CCA->tca--3-1	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
274	tRNA-Trp-CCA->tca--4-1	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA
275	tRNA-Trp-CCA->tca--5-1	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGTTGCGTGTTCAAGTCACGTCGGGGTCA

[0412]

276	tRNA-Trp-CCA->tca--6-1	GACCTCGTGGCACAATGGTAGCACGT CTGACTtcaGATCAGAAGGTTGCGTG TTCAAATCACGTCGGGGTCA
277	tRNA-Tyr-GTA->cta--1-1	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTctaGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
278	tRNA-Tyr-GTA->cta--2-1	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTctaGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
279	tRNA-Tyr-GTA->cta--3-1	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCG GAGGACTctaGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
280	tRNA-Tyr-GTA->cta--4-1	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCG GAGGACTctaGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGACTCCGGCTCGAAGGA
281	tRNA-Tyr-GTA->cta--5-1	CTTTCGATAGTTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTctaGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGAGTCCGGCTCGAAGGA
282	tRNA-Tyr-GTA->tta--1-1	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTttaGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGAATCCGGCTCGAAGGA
283	tRNA-Tyr-GTA->tta--2-1	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTttaGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA
284	tRNA-Tyr-GTA->tta--3-1	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCG GAGGACTttaGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA

[0413]

285	tRNA-Tyr-GTA->tta--4-1	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCG GAGGACTttaGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGACTCCGGCTCGAAGGA
286	tRNA-Tyr-GTA->tta--5-1	CTTTCGATAGTTCAGTTGGTAGAGCG GAGGACTttaGATCCTTAGGTCGCTG GTTCGAGTCCGGCTCGAAGGA

[0414] 通过流式细胞术在含有双荧光通读报告基因的细胞系中测试抑制物tRNA的PTC通读活性。这些报告基因包括三个拷贝的红色荧光蛋白(tdTomato)、TEV蛋白酶、含有PTC的接头区和三个拷贝的绿色荧光蛋白(EGFP)。图3显示了报告基因构建体的示意图。在不存在抑制物tRNA导致的任何PTC通读的情况下,翻译将由接头区内的PTC终止,并且仅表达tdTomato(并且因此只检测到红色荧光)。作为抑制物tRNA的结果的PTC通读活性将允许翻译通过接头区中的PTC进行,并且tdTomato和EGFP均被表达(并且因此检测到红色和绿色荧光)。因此,可以通过量化表达高于背景的红色和绿色荧光报告基因的活细胞的百分比(双阳性%)来评估通读。

[0415] 实施例7

[0416] 本实施例描述了促进提前终止密码子(PTC)通读的谷氨酰胺氨酰化抑制物tRNA。

[0417] 在本实施例中,所有成熟tRNA序列均在来自tRNA-Gln-TTG-1-1(一种高表达的谷氨酰胺-tRNA)的上游和下游基因组侧翼序列(±200 bp)的背景中表达,即tRNA序列用SEQ ID NO: 173的5'侧翼序列和SEQ ID NO: 174的3'侧翼序列表达。所有成熟的包括上游和下游基因组侧翼序列的tRNA序列均在pGL4载体骨架中生成。

[0418] 通过流式细胞术在含有整合的双荧光通读报告基因或用含有双荧光通读报告基因的表达构建体瞬时共转染的Flp-In-293细胞中测试Gln_{CTA}抑制物tRNA的PTC通读活性。报告基因包括三个拷贝的红色荧光蛋白(tdTomato)、TEV蛋白酶、含有PTC的接头区和三个拷贝的绿色荧光蛋白(EGFP)。图3显示了报告基因构建体的示意图。在不存在抑制物tRNA导致的任何PTC通读的情况下,翻译将由接头区内的PTC终止,并且仅表达tdTomato(并且因此只检测到红色荧光)。作为抑制物tRNA的结果的PTC通读活性允许翻译通过接头区中的PTC进行,并且tdTomato和EGFP均被表达(并且因此检测到红色和绿色荧光)。因此,通过量化表达高于背景的红色和绿色荧光报告基因的活细胞的百分比(双阳性%),用流式细胞术评估通读。为了筛选在与Dravet综合征相关的PTC上具有通读活性的抑制物tRNA,从在SCN1A中具有Gln(Q)至TAG无义突变的三名患者(患者3 (W1397X)、患者4 (S1505X)和患者5 (Q1810X))的SCN1A转录物中生成含有PTC和PTC两侧的八个侧翼密码子的接头区。

[0419] 衍生自患者3 SCN1A转录物的接头区如下,并且包括该接头区的报告基因称为患者3-Gln-TAG (W1397X)报告基因:ATAGAAAGAAATGAGACTGCTCGAtagAAAAATGTGAAAGTAAACTTTGAT (SEQ ID NO: 889)。用野生型Trp(W)密码子代替PTC的相应接头用作对照物,并具有以下序列:ATAGAAAGAAATGAGACTGCTCGACAGAAAAATGTGAAAGTAAACTTTGAT (SEQ ID NO: 890)。

[0420] 衍生自患者4 SCN1A转录物的接头区如下,并且包括该接头区的报告基因称为患

者4-Gln-TAG (S1505X)报告基因:TATAATGCAATGAAAAAATTAGGAtagAAAAAACCGCAAAAGCCTATACCT (SEQ ID NO: 891)。用野生型Ser(S)密码子代替PTC的相应接头用作对照物,并具有以下序列:TATAATGCAATGAAAAAATTAGGACAGAAAAAACCGCAAAAGCCTATACCT (SEQ ID NO: 892)。

[0421] 衍生自患者5 SCN1A转录物的接头区如下,并且包括该接头区的报告基因称为患者5-Gln-TAG (Q1810X)报告基因:GAGAAGTTTGATCCCGATGCAACTtagTTCATGGAATTTGAAAAATTATCT (SEQ ID NO: 893)。用野生型Gln密码子代替PTC的相应接头用作对照物,并具有以下序列:GAGAAGTTTGATCCCGATGCAACTCAGTTCATGGAATTTGAAAAATTATCT (SEQ ID NO: 894)。

[0422] 在多种测定背景中通过流式细胞术测试Gln_{CTA}抑制物tRNA (SEQ ID NO: 178-190)的PTC通读活性,包括(i)用患者3-Gln-TAG (W1397X)报告基因、患者4-Gln-TAG (S1505X)报告基因或患者5-Gln-TAG (Q1810X)报告基因瞬时共转染的人Flp-In-293细胞(结果显示于图24)和(ii)稳定表达患者3-Gln-TAG (W1397X)报告基因并用编码Gln_{CTA}抑制物tRNA的质粒瞬时转染的人Flp-In-293细胞系(结果显示于图25)。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000转染试剂进行转染。

[0423] 总之,这些结果证明所描述的抑制物tRNA能够促进含有与病症例如Dravet综合征相关的提前终止密码子的转录物例如SCN1A转录物的表达。

[0424] 实施例8

[0425] 本实施例描述了抑制物tRNA侧翼的核苷酸序列对抑制物tRNA通读提前终止密码子(PTC)的影响。

[0426] 生成了编码EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31,如实施例1中所述)和单个拷贝的Arg_{TCA}抑制物tRNA #115(tRNA-Arg-TCT-2-1-TCA-SUP_无内含子,SEQ ID NO: 18,如实施例1中所述)的表达载体。表达载体包括紧邻tRNA编码序列的5'和3'的序列,这些序列在每种情况下均衍生自为小鼠tRNA-Arg-TCG-1-1基因的5'和3'的基因组DNA但具有不同长度。表达载体的详细信息如表11所示。

[0427] 表11

[0428]

名称	tRNA 编码序列的 5’	tRNA编码序列	tRNA 编码序列的 3’
侧翼 300	小鼠 tRNA-Arg-TCG-1-1 基因 5’的 200 nt (SEQ ID NO: 26)	TCA-115 (SEQ ID NO: 18)	小鼠 tRNA-Arg-TCG-1-1 基因 3’的 104 nt (SEQ ID NO: 32)
侧翼 20	小鼠 tRNA-Arg-TCG-1-1 基因 5’的 20 nt (SEQ ID NO: 895)	TCA-115 (SEQ ID NO: 18)	小鼠 tRNA-Arg-TCG-1-1 基因 3’的 17 nt (SEQ ID NO: 896)
侧翼 10	小鼠 tRNA-Arg-TCG-1-1 基因 5’的 10 nt (SEQ ID NO: 897)	TCA-115 (SEQ ID NO: 18)	小鼠 tRNA-Arg-TCG-1-1 基因 3’的 17 nt (SEQ ID NO: 896)
侧翼 0	随机序列	TCA-115 (SEQ ID NO: 18)	小鼠 tRNA-Arg-TCG-1-1 基因 3’的 17 nt (SEQ ID NO: 896)

[0429] 通过流式细胞术在Neuro-2a细胞中测试表11中的表达载体的PTC通读活性。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000转染试剂进行转染。结果显示在图26A和26B中,并证明尽管Arg_{TCA}抑制物tRNA #115甚至使用随机5’前导序列表现出活性,但使用来自内源性tRNA基因的5’前导序列能够增加抑制物tRNA活性。

[0430] 实施例9

[0431] 本实施例描述了抑制物tRNA侧翼的核苷酸序列对抑制物tRNA通读提前终止密码子(PTC)的影响。

[0432] 生成了表达载体文库,其包括(i)衍生自人基因组DNA的20个独特的100 nt前导序列(紧邻tRNA编码序列5’的序列)之一,其紧邻内源性tRNA基因的5’,联合(ii)编码TCA-115(tRNA-Arg-TCT-2-1-TCA-SUP_无内含子,SEQ ID NO: 18,如实施例1中所述)或TTA-163(tRNA-Gln-TTG-3-1-TTA-SUP,SEQ ID NO: 45,如实施例4中所述)的核苷酸序列。文库中表达载体构建体设计的示意图描绘于图27。20个独特的100 nt前导序列包括衍生自人HEK293细胞中最高丰度tRNA的序列,并包括衍生自以下的前导序列:Arg-TCT-1-1 (SEQ ID NO: 875)、Tyr-GTA-5-1 (SEQ ID NO: 883)、Ser-GCT-3-1 (SEQ ID NO: 878)、Arg-TCG-1-1 (SEQ ID NO: 886)、Arg-TCG-3-1 (SEQ ID NO: 888)、Ser-TGA-1-1 (SEQ ID NO: 879)、Arg-TCG-5-1 (SEQ ID NO: 871)、Lys-TTT-6-1 (SEQ ID NO: 887)、Asn-GTT-1-1 (SEQ ID NO: 880)、Arg-CCG-2-1 (SEQ ID NO: 877)、Ala-AGC-4-1 (SEQ ID NO: 874)、Leu-TAA-1-1 (SEQ ID NO: 876)、Ser-CGA-4-1 (SEQ ID NO: 870)、Ser-TGA-4-1 (SEQ ID NO: 869)、Ser-GCT-2-1 (SEQ ID NO: 872)、Arg-TCT-2-1 (SEQ ID NO: 881)、Thr-TGT-1-1 (SEQ ID NO: 885)、Ile-AAT-4-1 (SEQ ID NO: 873)、Val-CAC-2-1 (SEQ ID NO: 884)或Asn-GTT-3-1 (SEQ ID NO: 882)基因。

[0433] 通过流式细胞术在用EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 31)(用于Arg_{TCA}构建体)或用EGFP-Q69X-TAA报告基因(SEQ ID NO: 175) (用于Gln_{TTA}构建体)共转染的细胞系中测试前导序列联合Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (SEQ ID NO: 18)或Gln_{TTA}抑制物tRNA #163 (SEQ ID NO: 45)的PTC通读活性。结果显示在图28-32中,并表明(i)抑制物tRNA的活性受前导序列影响,和(ii)当联合经鉴定的前导序列时,抑制物tRNA (包括不同类别的抑制物tRNA)显示高通读活性。

[0434] 实施例10

[0435] 本实施例描述了本文公开的某些抑制物tRNA和小分子无义抑制疗法的通读活性。

[0436] 抑制物tRNA与无义抑制药物translarna(阿塔鲁伦)、庆大霉素和G418(geneticin)一起进行测试。在用含有CAG:NLS-EGFP (Q69X-TAA)报告基因的表达构建体(如实施例4中所述,SEQ ID NO: 175)转染后约48小时的Neuro-2a 细胞中测量PTC通读活性,并且所述细胞或是(i)在相同构建体上包括指示的拷贝数的Gln抑制物tRNA(或是#002, tRNA-Gln-TTG-1-1-TTA-SUP, SEQ ID NO: 36, 或是#196, tRNA-Gln-TTG-1-1-CTA-SUP, SEQ ID NO: 178,两者均如实施例4中所述),或是(ii)用阿塔鲁伦处理,(iii)用庆大霉素处理,或(iv)用G418处理。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000转染试剂进行转染。对于所有实验条件,在转染后约6小时将细胞培养基替换为新鲜培养基,此时添加指示浓度的指示药物。PTC通读活性被测量为通过流式细胞术测量的EGFP阳性细胞的百分比。在用通常从活细胞中排除的膜不透性染料7-氨基放线菌素D (7-AAD; Thermo Fisher Scientific #006993-50)染色(根据制造商的方案使用)后,通过流式细胞术评估接受同一组处理的细胞中的细胞活力。图33-34显示了Gln_{TTA}抑制物tRNA #002 (SEQ ID NO: 36)的结果和图35-36显示了Gln_{CTA}抑制物tRNA #196 (SEQ ID NO: 178)的结果。总之,结果表明抑制物tRNA比无义抑制药物中的任何一种产生更大的通读。此外,结果表明,与无义抑制药物的任何一种不同,抑制物tRNA的治疗不伴随细胞活力的降低。

[0437] 实施例11

[0438] 本实施例描述了通过本文公开的某些抑制物tRNA对全长SCN1a蛋白表达的挽救。

[0439] Flp-In-293细胞(i)用含有具有Arg(R)至TGA的PTC (R1407X)的小鼠SCN1A和在C端的3xFLAG标签肽(DYKDHD-G-DYKDHD-I-DYKDDDDK)的表达构建体(SEQ ID NO: 899)转染,并且(ii)或是用包含Arg_{TCA}抑制物tRNA #115(tRNA-Arg-TCT-2-1-TCA-SUP_无内含子,SEQ ID NO: 18)的表达构建体共转染,或是用G418、庆大霉素或阿塔鲁伦处理。将含有野生型小鼠SCN1A和在C端的3xFLAG标签肽的表达构建体(SEQ ID NO: 898)用作对照。SEQ ID NO: 898和899如下:

[0440] ATGGAGCAAACAGTGCTTGTACCACCAGGACCTGACAGCTTCAACTTCTTCACCAGAGAATCCCTTGCAGCTATTGAAAGGCGCATTGCAGAAGAGAAGGCTAAGAATCCCAAGCCAGACAAAAAAGATGATGATGAAAATGGCCCAAAGCCAAACAGTGACTTGGAAGCTGGGAAGAACCTTCCATTTATCTATGGAGACATTCCTCCAGAGATGGTGTCGGAGCCTCTGGAGGACCTGGACCCCTACTATATCAATAAGAAGACTTTTATAGTATTGAATAAAGGGAAGGCCATCTTCCGGTTCAGTGCCACCTCCGCCCTGTACATTTTAACACCCTTCAATCCTCTTAGGAAAATAGCTATTAAGATTTTGGTACACTCATTATTCAGCATGTTAATCATGTGCACTATTTTGACAAACTGTGTATTTATGACAATGAGTAACCCTCCCGACTGGACAAAGAATGTGGAGTACACCTTCACAGGAATATATACTTTTGAATCACTAATAAAAATTATTGCAAGGGGCTTCTGTTTAGAAGATTTTACTTTCCTTCGCGACCCATGGAACTGGCTGGACTTCACTGTCATTACATTC

GCATATGTGACGGAGTTTGTGGACCTGGGCAATGTCTCAGCATTGAGAACATTCAGAGTTCTTCGAGCATTGAAAA
CTATTTCAGTCATTCCAGGCCTGAAGACCATCGTGGGGGCCCTGATCCAGTCGGTGAAGAAGCTGTCTGACGTCAT
GATACTCACTGTGTTCTGTCTCAGTGTGTTCGCACTCATCGGGTTGCAGCTCTTCATGGGCAACCTGAGGAATAAA
TGTGTACAGTGGCCTCCCACCAACGCTTCCCTTGAGGAACATAGCATAGAGAAGAATATAACTATGGATTACAATG
GCACACTTGTAAATGAAACCGTGTTCGAGTTTGACTGGAAATCATACATTCAAGACTCAAGATATCATTATTTCCT
GGAGGGTGTTTTAGATGCACTGCTGTGTGGAAATAGCTCTGATGCAGGCCAATGTCCAGAAGGATATATGTGTGTA
AAAGCTGGTAGAAACCCTAATTATGGTTACACAAGCTTTGATACCTTCAGTTGGGCATTTTTGTCCCTGTTTCGAC
TGATGACTCAGGACTTCTGGGAAAATCTATACCAACTGACATTGCGTGCTGCTGGCAAAACCTACATGATATTTTT
TGTGCTGGTCATTTTCTTGGGCTCATTCTACCTGATAAACTTGATCCTGGCTGTGGTGGCCATGGCCTATGAGGAG
CAGAATCAGGCCACACTGGAGGAGGCTGAACAGAAAGAGGCAGAATTTCAGCAGATGTTGGAGCAACTTAAGAAGC
AGCAAGAGGCTGCACAGCAGGCAGCGGCTACAACAGCCTCAGAACATTCCAGGGAGCCCAGTGCAGCAGGCAGGCT
CTCAGATAGCTCTTCAGAAGCCTCTAAGTTGAGTTCGAAGAGTGCTAAAGAAAGACGAAATCGGAGGAAAAAAAGG
AAACAGAAAGAGCAGTCTGGAGGAGAAGAGAAAGATGATGATGAATTCCACAAGTCTGAGTCTGAAGACAGCATCA
GGAGGAAGGGGTTTCGCTTCTCCATAGAAGGGAATAGACTGACATATGAAAAGAGGTACTCTTCCCCGCATCAGTC
TCTGTTAAGCATTCGTGGTTCCCTGTTCTCCCCAAGACGCAATAGCAGAACAAGTCTTTTCAGCTTTAGAGGGCGA
GCCAAGGATGTGGGGTCTGAGAATGACTTTGCTGATGATGAACACAGCACCTTTGAGGATAATGAGAGCCGTAGAG
ACTCACTGTTCGTTCCCCGAAGACACGGAGAGCGACGCAACAGTAACCTGAGCCAGACCAGCAGGTCCTCCCGAAT
GCTGGCGGTGTTTCCAGCCAATGGGAAGATGCACAGCACGGTGGATTGCAATGGTGTGGTTTCCTTGGTTGGTGGA
CCCTCAGTTCCCACATCGCCAGTTGGACAGCTTCTGCCAGAGGGAACAACCACTGAAACTGAGATGAGAAAGAGGA
GGTCGAGCTCTTTCCATGTTTCCATGGACTTTCTAGAAGATCCTTCCCAGAGGCAAAGGGCAATGAGCATAGCCAG
CATCTTAACAAATACAGTAGAAGAACTAGAAGAATCCAGGCAGAAATGTCCACCCTGTTGGTATAAATTTTCCAAC
ATATTCTTAATTTGGGACTGTTCTCCATATTGGCTGAAAGTTAAACATATTGTCAACCTGGTGGTGATGGACCCAT
TTGTTGATCTGGCCATTACCATCTGCATTGTGTTAAATACGCTCTTCATGGCTATGGAGCACTACCCCATGACTGA
ACATTTCAACCATGTTCTTACAGTGGGAAACTTGGTCTTCACTGGGATTTTCACAGCAGAAATGTTCCTGAAAATC
ATCGCAATGGATCCTTACTATTACTTCCAAGAAGGCTGGAATATCTTTGATGGTTTCATTGTGACACTCAGCCTGG
TAGAACTTGGCCTTGCCAATGTGGAAGGATTGTCAGTTCTCCGTTCATTTCGACTGCTCCGAGTGTTCAAGTTGGC
AAAGTCTTGGCCCACACTGAATATGCTCATTAAGATCATTGGTAACTCGGTGGGAGCACTGGGCAACCTGACTCTG
GTGTTGGCCATCATTGTCTTTATTTTTGCCGTGGTTGGCATGCAGCTGTTTGGAAAAAGTTACAAAGATTGTGTCT
GCAAAATTGCCACTGACTGCAAACTCCCACGTTGGCACATGAACGACTTCTTCCACTCGTTCCTGATCGTGTTCCG
CGTGCTGTGTGGGGAGTGGATAGAGACCATGTGGGACTGCATGGAGGTGGCAGGACAAGCTATGTGCCTTACTGTC
TTCATGATGGTCATGGTGATTGGGAACCTTGTGGTCTTGAACCTCTTTCTGGCCTTGCTTCTGAGCTCATTTAGTG
CAGACAACCTTGCAGCCACTGATGATGACAATGAGATGAACAACCTGCAGATTGCTGTGGACAGGATGCACAAAGG
AATAGCTTATGTAAAAAGAAAAATATATGAATTCATTCAACAATCCTTTGTTAAGAAACAGAAGATTCTAGATGAA
ATTAAGCCACTTGATGATCTAAACAACAGAAAAGACAATTGTATCTCTAACCACACAACAGAAATTGGGAAAGATC
TGGACTGTCTGAAAGATGTGAATGGAACCACAAGTGGCATAGGGACGGGCAGCAGTGTGGAGAAGTACATCATTGA
TGAGAGTGATTATATGTCATTCATAAACAACCCCAGCCTCACTGTGACTGTGCCCATTGCTGTGGGAGAGTCTGAC
TTTGAGAACTTAAACACAGAAGACTTTAGCAGTGAATCAGATCTAGAAGAAAGCAAAGAGAAACTCAACGAAAGCA
GTAGCTCCTCAGAGGGAAGCACAGTAGACATTGGGGCGCCTGCAGAGGAACAGCCTGTCATTGAACCAGAAGAAAC
CCTTGAGCCCGAAGCTTGCTTCACTGAAGGCTGTGTCCAGAGATTCAAGTGCTGTCAAATCAGCGTGGAAGAAGGA

AGAGGGAAACAGTGGTGGAACCTACGGAGGACGTGCTTCCGAATAGTTGAACACAACTGGTTTGAGACCTTCATTG
TGTTCATGATTCTCCTGAGTAGTGGTGCCCTGGCCTTTGAGGATATATATATTGATCAGCGAAAGACGATCAAAAC
CATGCTGGAGTATGCTGACAAAGTCTTCACTTACATTTTCATCCTGGAGATGCTCCTCAAATGGGTGGCCTATGGC
TATCAAACATACTTCACCAATGCCTGGTGTTGGCTAGACTTCTTAATTGTTGATGTTTCATTGGTCAGTTTAACAG
CAAATGCCTTGGGTTACTCTGAACTCGGGGCCATCAAATCCCTAAGGACACTAAGAGCTCTGAGACCCCTAAGAGC
CTTATCACGATTTGAAGGGATGAGGGTGGTTGTGAATGCCCTGTTAGGAGCAATTCCATCCATCATGAATGTGCTT
CTGGTTTGCCTTATATTCTGGCTAATTTTCAGCATCATGGGCGTAAATTTGTTTGCTGGCAAATTCTACCACTGTG
TTAACACCACAACTGGTGACATATTTGAGATCAGCGAAGTCAATAATCATTCTGATTGCCTAAAACTAATAGAAAG
AAATGAGACCGCCCGGTGGAAAAATGTGAAAGTAAACTTTGATAATGTAGGATTTGGGTATCTTTCTTTGCTTCAA
GTTGCCACATTTAAGGGCTGGATGGATATCATGTATGCTGCAGTTGATTCCAGAAATGTTGAACTACAGCCTAAGT
ATGAGGAAAGCCTGTACATGTATTTGTACTTCGTCATCTTCATCATCTTCGGGTCCTTCTTTACCCTGAACCTGTT
TATTGGTGTCATTATCGACAATTTCAACCAGCAAAAGAAGAAGTTTGGAGGTCAAGACATCTTTATGACAGAAGAA
CAGAAGAAATACTATAATGCAATGAAGAAATTAGGATCAAAAAAGCCACAAAAGCCTATCCCTCGACCTGGAAACA
AATTTCAAGGAATGGTTTTTGACTTTGTAACCAGACAAGTGTTTGATATCAGCATCATGATCCTCATCTGTCTGAA
CATGGTGACCATGATGGTGGAAACGGATGACCAGAGCGATTATGTGACAAGCATTTTGTCACGCATCAACCTGGTG
TTCATCGTCCTGTTCACCGGCGAGTGTGTGCTCAAGCTCATCTCGCTCCGCCATTATTATTTCACCATTGGATGGA
ACATTTTCGATTTTGTGGTGGTCATCCTCTCCATTGTAGGGATGTTTCTTGCGGAGCTAATAGAAAAGTATTTTGT
GTCTCCTACCCTGTTCCGAGTCATCCGCCTGGCCAGGATTGGACGAATCCTACGCCTGATCAAAGGTGCCAAGGGG
ATCCGCACGCTGCTCTTTGCTCTGATGATGTCCCTTCCTGCGCTGTTTAACATCGGCCTCCTGCTTTTTCTCGTCA
TGTTCATCTACGCCATCTTTGGGATGTCCAACTTTGCCTATGTTAAGAGGGAAGTTGGGATTGATGACATGTTCAA
CTTTGAGACCTTCGGCAACAGCATGATCTGCCTGTTCCAAATCACCACCTCTGCGGGCTGGGATGGACTGCTGGCC
CCCATCCTCAACAGCAAACCCCCTGACTGTGACCCTAATAAAGTTAACCCTGGAAGCTCGGTGAAGGGAGACTGTG
GGAACCCATCTGTGGGGATTTTCTTTTTTGTCAGCTACATCATCATATCCTTCCTGGTTGTGGTGAACATGTACAT
TGCTGTCATCCTGGAGAACTTCAGCGTTGCCACAGAAGAAAGTGCAGAGCCTCTGAGTGAGGACGACTTTGAGATG
TTCTACGAGGTCTGGGAGAAGTTCGACCCTGACGCCACCCAGTTCATGGAATTTGAAAAATTATCTCAGTTTGCAG
CTGCTCTAGAACCCCCTCTCAATTTGCCACAACCAAACAAACTTCAGCTCATTGCCATGGACCTGCCCATGGTGAG
TGGAGACCGCATCCACTGCCTGGACATCTTATTTGCTTTTACAAAGCGGGTGTTGGGTGAGAGTGGAGAGATGGAT
GCTCTTCGAATCCAGATGGAAGAGCGGTTCATGGCTTCCAACCCCTCCAAGGTCTCTTATCAGCCCATCACTACTA
CATTAAAACGCAAACAAGAGGAGGTGTCAGCTGTTATCATTCAGCGAGCTTATAGGCGCCACCTTTTGAAGCGAAC
AGTAAAACAAGCTTCATTCACATACAATAAGAACAAACTCAAAGGTGGGGCTAATCTTCTTGTAAAAGAAGACATG
CTCATTGACAGAATAAACGAAAACTCTATTACGGAGAAAACTGACCTGACAATGTCCACAGCAGCTTGTCCGCCCT
CCTACGATCGGGTGACAAAGCCAATCGTGGAGAAACACGAGCAGGAAGGGAAGGATGAAAAAGCCAAAGGGAAAGA
CTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGTAA (SEQ ID NO: 898);和

[0441] ATGGAGCAAACAGTGCTTGTACCACCAGGACCTGACAGCTTCAACTTCTTCACCAGAGAATCCCTTGC
AGCTATTGAAAGGCGCATTGCAGAAGAGAAGGCTAAGAATCCCAAGCCAGACAAAAAAGATGATGATGAAAATGGC
CCAAAGCCAAACAGTGACTTGGAAGCTGGGAAGAACCTTCCATTTATCTATGGAGACATTCCTCCAGAGATGGTGT
CGGAGCCTCTGGAGGACCTGGACCCCTACTATATCAATAAGAAGACTTTTATAGTATTGAATAAAGGGAAGGCCAT
CTTCCGGTTCAGTGCCACCTCCGCCCTGTACATTTTAACACCCTTCAATCCTCTTAGGAAAATAGCTATTAAGATT

TTGGTACACTCATTATTCAGCATGTTAATCATGTGCACTATTTTGACAAACTGTGTATTTATGACAATGAGTAACC
CTCCCGACTGGACAAAGAATGTGGAGTACACCTTCACAGGAATATATACTTTTGAATCACTAATAAAAATTATTGC
AAGGGGCTTCTGTTTAGAAGATTTTACTTTCCTTCGCGACCCATGGAACTGGCTGGACTTCACTGTCATTACATTC
GCATATGTGACGGAGTTTGTGGACCTGGGCAATGTCTCAGCATTGAGAACATTCAGAGTTCTTCGAGCATTGAAAA
CTATTTCAGTCATTCCAGGCCTGAAGACCATCGTGGGGGCCCTGATCCAGTCGGTGAAGAAGCTGTCTGACGTCAT
GATACTCACTGTGTTCTGTCTCAGTGTGTTCGCACTCATCGGGTTGCAGCTCTTCATGGGCAACCTGAGGAATAAA
TGTGTACAGTGGCCTCCCACCAACGCTTCCCTTGAGGAACATAGCATAGAGAAGAATATAACTATGGATTACAATG
GCACACTTGTAAATGAAACCGTGTTCGAGTTTGACTGGAAATCATACATTCAAGACTCAAGATATCATTATTTCCT
GGAGGGTGTTTTAGATGCACTGCTGTGTGGAAATAGCTCTGATGCAGGCCAATGTCCAGAAGGATATATGTGTGTA
AAAGCTGGTAGAAACCCTAATTATGGTTACACAAGCTTTGATACCTTCAGTTGGGCATTTTTGTCCCTGTTTCGAC
TGATGACTCAGGACTTCTGGGAAAATCTATACCAACTGACATTGCGTGCTGCTGGCAAAACCTACATGATATTTTT
TGTGCTGGTCATTTTCTTGGGCTCATTCTACCTGATAAACTTGATCCTGGCTGTGGTGGCCATGGCCTATGAGGAG
CAGAATCAGGCCACACTGGAGGAGGCTGAACAGAAAGAGGCAGAATTTCAGCAGATGTTGGAGCAACTTAAGAAGC
AGCAAGAGGCTGCACAGCAGGCAGCGGCTACAACAGCCTCAGAACATTCCAGGGAGCCCAGTGCAGCAGGCAGGCT
CTCAGATAGCTCTTCAGAAGCCTCTAAGTTGAGTTCGAAGAGTGCTAAAGAAAGACGAAATCGGAGGAAAAAAAGG
AAACAGAAAGAGCAGTCTGGAGGAGAAGAGAAAGATGATGATGAATTCCACAAGTCTGAGTCTGAAGACAGCATCA
GGAGGAAGGGGTTTCGCTTCTCCATAGAAGGGAATAGACTGACATATGAAAAGAGGTACTCTTCCCCGCATCAGTC
TCTGTTAAGCATTCGTGGTTCCCTGTTCTCCCCAAGACGCAATAGCAGAACAAGTCTTTTCAGCTTTAGAGGGCGA
GCCAAGGATGTGGGGTCTGAGAATGACTTTGCTGATGATGAACACAGCACCTTTGAGGATAATGAGAGCCGTAGAG
ACTCACTGTTCGTTCCCCGAAGACACGGAGAGCGACGCAACAGTAACCTGAGCCAGACCAGCAGGTCCTCCCGAAT
GCTGGCGGTGTTTCCAGCCAATGGGAAGATGCACAGCACGGTGGATTGCAATGGTGTGGTTTCCTTGGTTGGTGGA
CCCTCAGTTCCCACATCGCCAGTTGGACAGCTTCTGCCAGAGGGAACAACCACTGAAACTGAGATGAGAAAGAGGA
GGTCGAGCTCTTTCCATGTTTCCATGGACTTTCTAGAAGATCCTTCCCAGAGGCAAAGGGCAATGAGCATAGCCAG
CATCTTAACAAATACAGTAGAAGAACTAGAAGAATCCAGGCAGAAATGTCCACCCTGTTGGTATAAATTTTCCAAC
ATATTCTTAATTTGGGACTGTTCTCCATATTGGCTGAAAGTTAAACATATTGTCAACCTGGTGGTGATGGACCCAT
TTGTTGATCTGGCCATTACCATCTGCATTGTGTTAAATACGCTCTTCATGGCTATGGAGCACTACCCCATGACTGA
ACATTTCAACCATGTTCTTACAGTGGGAAACTTGGTCTTCACTGGGATTTTCACAGCAGAAATGTTCCTGAAAATC
ATCGCAATGGATCCTTACTATTACTTCCAAGAAGGCTGGAATATCTTTGATGGTTTCATTGTGACACTCAGCCTGG
TAGAACTTGGCCTTGCCAATGTGGAAGGATTGTCAGTTCTCCGTTCATTTCGACTGCTCCGAGTGTTCAAGTTGGC
AAAGTCTTGGCCCACACTGAATATGCTCATTAAGATCATTGGTAACTCGGTGGGAGCACTGGGCAACCTGACTCTG
GTGTTGGCCATCATTGTCTTTATTTTTGCCGTGGTTGGCATGCAGCTGTTTGGAAAAAGTTACAAAGATTGTGTCT
GCAAAATTGCCACTGACTGCAAACTCCCACGTTGGCACATGAACGACTTCTTCCACTCGTTCCTGATCGTGTTCCG
CGTGCTGTGTGGGGAGTGGATAGAGACCATGTGGGACTGCATGGAGGTGGCAGGACAAGCTATGTGCCTTACTGTC
TTCATGATGGTCATGGTGATTGGGAACCTTGTGGTCTTGAACCTCTTTCTGGCCTTGCTTCTGAGCTCATTTAGTG
CAGACAACCTTGCAGCCACTGATGATGACAATGAGATGAACAACCTGCAGATTGCTGTGGACAGGATGCACAAAGG
AATAGCTTATGTAAAAAGAAAAATATATGAATTCATTCAACAATCCTTTGTTAAGAAACAGAAGATTCTAGATGAA
ATTAAGCCACTTGATGATCTAAACAACAGAAAAGACAATTGTATCTCTAACCACACAACAGAAATTGGGAAAGATC
TGGACTGTCTGAAAGATGTGAATGGAACCACAAGTGGCATAGGGACGGGCAGCAGTGTGGAGAAGTACATCATTGA
TGAGAGTGATTATATGTCATTCATAAACAACCCCAGCCTCACTGTGACTGTGCCCATTGCTGTGGGAGAGTCTGAC

TTTGAGAACTTAAACACAGAAGACTTTAGCAGTGAATCAGATCTAGAAGAAAGCAAAGAGAAACTCAACGAAAGCA
GTAGCTCCTCAGAGGGAAGCACAGTAGACATTGGGGCGCCTGCAGAGGAACAGCCTGTCATTGAACCAGAAGAAAC
CCTTGAGCCCGAAGCTTGCTTCACTGAAGGCTGTGTCCAGAGATTCAAGTGCTGTCAAATCAGCGTGGAAGAAGGA
AGAGGGAAACAGTGGTGGAACCTACGGAGGACGTGCTTCCGAATAGTTGAACACAACTGGTTTGAGACCTTCATTG
TGTTCATGATTCTCCTGAGTAGTGGTGCCCTGGCCTTTGAGGATATATATATTGATCAGCGAAAGACGATCAAAAC
CATGCTGGAGTATGCTGACAAAGTCTTCACTTACATTTTCATCCTGGAGATGCTCCTCAAATGGGTGGCCTATGGC
TATCAAACATACTTCACCAATGCCTGGTGTTGGCTAGACTTCTTAATTGTTGATGTTTCATTGGTCAGTTTAACAG
CAAATGCCTTGGGTTACTCTGAACTCGGGGCCATCAAATCCCTAAGGACACTAAGAGCTCTGAGACCCCTAAGAGC
CTTATCACGATTTGAAGGGATGAGGGTGGTTGTGAATGCCCTGTTAGGAGCAATTCCATCCATCATGAATGTGCTT
CTGGTTTGCCTTATATTCTGGCTAATTTTCAGCATCATGGGCGTAAATTTGTTTGCTGGCAAATTCTACCACTGTG
TTAACACCACAACTGGTGACATATTTGAGATCAGCGAAGTCAATAATCATTCTGATTGCCTAAAACTAATAGAAAG
AAATGAGACCGCCTGATGGAAAAATGTGAAAGTAAACTTTGATAATGTAGGATTTGGGTATCTTTCTTTGCTTCAA
GTTGCCACATTTAAGGGCTGGATGGATATCATGTATGCTGCAGTTGATTCCAGAAATGTTGAACTACAGCCTAAGT
ATGAGGAAAGCCTGTACATGTATTTGTACTTCGTCATCTTCATCATCTTCGGGTCCTTCTTTACCCTGAACCTGTT
TATTGGTGTCATTATCGACAATTTCAACCAGCAAAAGAAGAAGTTTGGAGGTCAAGACATCTTTATGACAGAAGAA
CAGAAGAAATACTATAATGCAATGAAGAAATTAGGATCAAAAAAGCCACAAAAGCCTATCCCTCGACCTGGAAACA
AATTTCAAGGAATGGTTTTTGACTTTGTAACCAGACAAGTGTTTGATATCAGCATCATGATCCTCATCTGTCTGAA
CATGGTGACCATGATGGTGGAAACGGATGACCAGAGCGATTATGTGACAAGCATTTTGTCACGCATCAACCTGGTG
TTCATCGTCCTGTTCACCGGCGAGTGTGTGCTCAAGCTCATCTCGCTCCGCCATTATTATTTCACCATTGGATGGA
ACATTTTCGATTTTGTGGTGGTCATCCTCTCCATTGTAGGGATGTTTCTTGCGGAGCTAATAGAAAAGTATTTTGT
GTCTCCTACCCTGTTCCGAGTCATCCGCCTGGCCAGGATTGGACGAATCCTACGCCTGATCAAAGGTGCCAAGGGG
ATCCGCACGCTGCTCTTTGCTCTGATGATGTCCCTTCCTGCGCTGTTTAACATCGGCCTCCTGCTTTTTCTCGTCA
TGTTCATCTACGCCATCTTTGGGATGTCCAACTTTGCCTATGTTAAGAGGGAAGTTGGGATTGATGACATGTTCAA
CTTTGAGACCTTCGGCAACAGCATGATCTGCCTGTTCCAAATCACCACCTCTGCGGGCTGGGATGGACTGCTGGCC
CCCATCCTCAACAGCAAACCCCCTGACTGTGACCCTAATAAAGTTAACCCTGGAAGCTCGGTGAAGGGAGACTGTG
GGAACCCATCTGTGGGGATTTTCTTTTTTGTCAGCTACATCATCATATCCTTCCTGGTTGTGGTGAACATGTACAT
TGCTGTCATCCTGGAGAACTTCAGCGTTGCCACAGAAGAAAGTGCAGAGCCTCTGAGTGAGGACGACTTTGAGATG
TTCTACGAGGTCTGGGAGAAGTTCGACCCTGACGCCACCCAGTTCATGGAATTTGAAAAATTATCTCAGTTTGCAG
CTGCTCTAGAACCCCCTCTCAATTTGCCACAACCAAACAAACTTCAGCTCATTGCCATGGACCTGCCCATGGTGAG
TGGAGACCGCATCCACTGCCTGGACATCTTATTTGCTTTTACAAAGCGGGTGTTGGGTGAGAGTGGAGAGATGGAT
GCTCTTCGAATCCAGATGGAAGAGCGGTTCATGGCTTCCAACCCCTCCAAGGTCTCTTATCAGCCCATCACTACTA
CATTAAAACGCAAACAAGAGGAGGTGTCAGCTGTTATCATTCAGCGAGCTTATAGGCGCCACCTTTTGAAGCGAAC
AGTAAAACAAGCTTCATTCACATACAATAAGAACAAACTCAAAGGTGGGGCTAATCTTCTTGTAAAAGAAGACATG
CTCATTGACAGAATAAACGAAAACTCTATTACGGAGAAAACTGACCTGACAATGTCCACAGCAGCTTGTCCGCCCT
CCTACGATCGGGTGACAAAGCCAATCGTGGAGAAACACGAGCAGGAAGGGAAGGATGAAAAAGCCAAAGGGAAAGA
CTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGTAA (SEQ ID NO: 899)。

[0442] 如下通过Western印迹检测SCN1A。根据制造商的方案,在转染后24小时在含有Halt蛋白酶抑制剂混合物(Thermo Fisher Scientific #89900)的RIPA裂解和提取缓冲液

(Thermo Fisher Scientific #89900)中分离蛋白质。使用Pierce BCA蛋白检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific #23225)测定蛋白质浓度。在NuPAGE 4-12% Bis-Tris(Thermo Fisher Scientific #NP0322BOX)或NuPAGE 3-8%, Tris-醋酸盐(Thermo Fisher Scientific #EA0375BOX)蛋白凝胶上以150V分离30μg蛋白质1.5小时,并转移至PVDF膜以30V过夜,然后在4°C下以250 mA进行30分钟。印迹在室温下在SuperBlock T20封闭缓冲液(Thermo Fisher Scientific #37536)中封闭1小时,用TBST中的抗FLAG M2一抗(Sigma, F1804-200UG,1:1000)在4°C下温育过夜,用TBST清洗3次,并用山羊抗小鼠IgG(H+L)二抗、HRP二抗(Thermo Fisher Scientific #31431,1:30,000)在室温下温育1小时。通过应用SuperSignal West Femto最大灵敏度底物(Thermo Fisher Scientific #34094)显影印迹,并通过iBright成像系统检测信号。结果显示在图37中,并且证明Arg_{TCA}抑制物tRNA #115,而不是小分子药物,能够挽救全长SCN1A蛋白表达。

[0443] Flp-In-293细胞也用(i)含有具有Arg(R)至TGA的PTC (R1407X)的小鼠SCN1A和在C端的3xFLAG标签肽的表达构建体(SEQ ID NO: 899)和(ii)含有Arg_{TCA}抑制物tRNA #104(tRNA-Arg-CCG-3-1-TCA-SUP, SEQ ID NO: 6)、Arg_{TCA}抑制物tRNA #106 (tRNA-Arg-CCT-2-1-TCA-SUP, SEQ ID NO: 8)或Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (tRNA-Arg-TCT-2-1-TCA-SUP_无内含子, SEQ ID NO: 18)的表达构建体共转染。如本实施例中以上所述,使用抗FLAG抗体通过Western印迹测量SCN1A表达。结果显示在图38中并证明所测试的每个抑制物tRNA均挽救了全长SCN1A蛋白表达。

[0444] Flp-In-293细胞也用(i)含有具有Arg(R)至TGA的PTC (R1407X)的小鼠SCN1A和在C端的3xFLAG标签肽的表达构建体(SEQ ID NO: 899)和(ii)一定剂量范围(每孔13 ng、每孔40 ng、每孔113 ng,或每孔400 ng;6孔细胞培养板)的含有Arg_{TCA}抑制物tRNA #115(tRNA-Arg-TCT-2-1-TCA-SUP_无内含子,SEQ ID NO: 18)的表达构建体共转染。如本实施例中以上所述,使用抗FLAG抗体通过Western印迹测量SCN1A表达。结果显示在图39中并证明tRNA 115能够在较宽的剂量范围内挽救全长SCN1A蛋白表达。

[0445] 实施例12

[0446] 本实施例描述了由腺相关病毒(AAV)载体递送的所公开抑制物tRNA的通读活性。

[0447] 包装到AAV-PHP.eB衣壳中的构建体描绘于图40。构建体262含有由EF1a启动子驱动的野生型EGFP。构建体269含有由EF1a启动子(SEQ ID NO: 177)驱动的EGFP-R96X-TGA和在来自tRNA-Tyr-GTA-5-1的55 bp上游侧翼基因组DNA (SEQ ID NO: 900)的背景中的两个拷贝的Arg_{TCA}抑制物tRNA #115 (tRNA-Arg-TCT-2-1-TCA-SUP_无内含子,SEQ ID NO: 18,如实施例1中所述)。两种构建体均含有来自AAV2的5'和3' ITR序列,它们为AAV复制和包装提供顺式作用元件。含有构建体262和构建体269的AAV-PHP.eB由Vigene Biosciences生产。

[0448] 在AAV转导之前,用含有由CMV早期增强子/鸡β肌动蛋白(CAG)启动子驱动的LY6A基因(CCDS ID 27540.1)的表达构建体预转染293细胞(Agilent #240073),这是AAV-PHP.eB稳健转导必需的。对于预转染,根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000转染试剂用LY6A表达构建体瞬时转染细胞。在转染后约24小时,将培养基替换为新鲜培养基,并在病毒转导之前让细胞再恢复24小时。然后以1E5 vg/细胞的MOI转导细胞。结果如图41所示。AAV递送的Arg_{TCA}抑制物tRNA #115导致基于GFP强度的约13.2% PTC通读。当通过AAV或瞬时

转染递送时,抑制物tRNA显示出相当的通读活性。

[0449] 实施例13

[0450] 本实施例描述了证明所公开的抑制物tRNA不引起大量的脱靶天然终止密码子通读的核糖体谱分析实验。

[0451] 为了确定抑制物tRNA是否导致天然终止密码子的通读,使用核糖体谱分析来量化在mRNA的3’ UTR中发现的核糖体数量,这些mRNA来自(i)用含有抑制物tRNA的表达构建体转染的细胞,相对于(ii)用缺少抑制物tRNA的表达构建体转染的细胞。核糖体通常在遇到终止密码子时终止翻译,因此如果抑制物tRNA导致天然终止密码子的通读增加,这将表现为在表达抑制物tRNA的细胞中mRNA的3’ UTR中发现的核糖体密度增加,尤其是在含有由所表达抑制物tRNA识别的天然终止密码子的3’ UTR mRNA中。

[0452] Neuro-2a细胞用(i)在同一构建体上含有EGFP-R96X-TGA报告基因(SEQ ID NO: 177)和Arg_{TCA}抑制物tRNA #001(SEQ ID NO: 11)的表达构建体或(ii)缺少抑制物tRNA并含有野生型EGFP报告基因的表达构建体转染。EGFP的表达如图42所示。在转染后约48小时,细胞进行如下核糖体足迹谱分析。在裂解缓冲液(10 mM Tris-HCl pH7.5、5 mM $MgCl_2$、100 mM KCl、1% Triton X-100、1 Mm DTT、50 μg/mL依米丁(Sigma #324693)和500 U/mL RNAsin (Promega #N2615))中裂解细胞并且用25号针头剪切细胞裂解物10次,然后在4°C下以20,000 g离心10分钟。上清液在室温下用微球菌核酸酶(MNase;120单位/OD A260裂解物;New England Biolabs #M0247S)消化30分钟,然后添加5 uL SuperAse-IN (Thermo Fisher Scientific #AM2694)以停止反应。将MNase处理的提取物加载到15-45%蔗糖梯度中,并在SW 41Ti浮桶式转头(swinging-bucket rotor) (Beckman Coulter #331362)中以41,000rpm在4°C下按密度分离2:26小时。在分级和收集含有单体的级分后,用1.25 mL 95%乙醇在-20°C下过夜从蔗糖中沉淀出核糖体保护的mRNA片段。mRNA片段用10 mM Tris-HCl, pH8.0重悬浮,并在15%变性聚丙烯酰胺凝胶(TBE-尿素凝胶;Thermo Fisher Scientific #EC68852BOX)上分离。从凝胶中切下大小范围为26至34 nt的RNA片段并分离以生成核糖体保护的片段文库。在3’接头连接、用TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold Kit (Illumina #20020598)中的Ribo-Zero试剂消减rRNA、逆转录、环化和用索引引物进行PCR扩增后,在8%非变性聚丙烯酰胺凝胶(Thermo Fisher Scientific #EC62152BOX)上分离PCR产物。从凝胶中提取带条形码的cDNA文库,并通过具有单读运行类型的NextSeq 550测序系统进行测序。测序后,原始读段使用Trimmomatic修剪衔接物,然后通过使用bowtie2针对Ensembl的小鼠mm10 ncRNA参考对齐来消减非编码RNA。剩余的读段针对UCSC的mm10小鼠参考组件对齐,再次使用bowtie2。丢弃多定位读段。使用R中的RiboProfiling包和自定义Python脚本对生成的最终对齐读段集进行量化。使用Python以生成检查每个基因的3’ UTR占有率和倍数变化的图,每个基因具有20个或更多独特的定位读段,并使用2样本Kolmogorov-Smirnov检验比较具有每个天然终止密码子的基因的分布。结果描绘于图43。

[0453] 总之,这些结果表明抑制物tRNA可以促进含有提前终止密码子的转录物,例如EGFP-R96X-TGA的表达,同时不在表达细胞中引起大量的脱靶天然终止密码子通读。

[0454] 通过引用并入

[0455] 出于所有目的,本文引用的每篇专利和科学文献的全部公开内容通过引用并入本文。

[0456] 等同物

[0457] 在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,本发明可以以其他特定形式实施。因此,前述实施方案在所有方面都被认为是说明性的,而不是限制本文所述的本发明。因此,本发明的范围由所附权利要求而不是由前面的描述来指示,并且所有落入权利要求的等同意义和范围内的变化都旨在包含在其中。

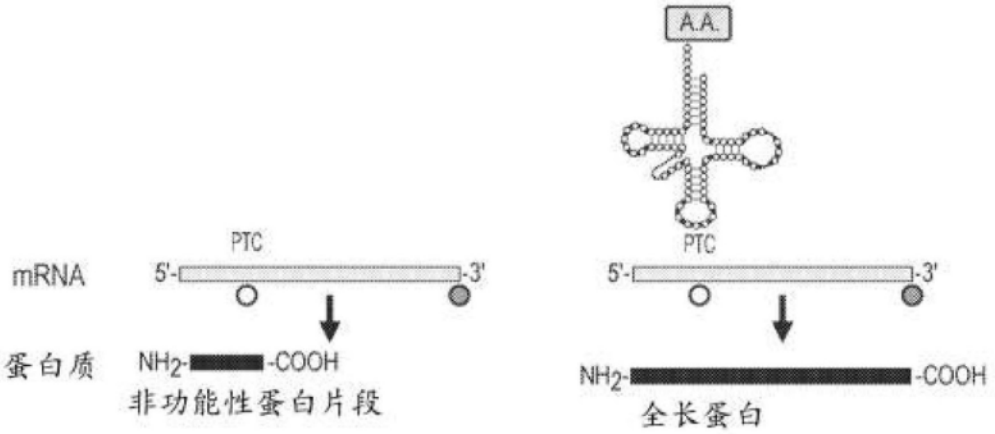

A.A.
PTC
mRNA
5'-
-3'
蛋白质
NH2-
-COOH
非功能性蛋白片段
PTC
5'-
-3'
NH2-
-COOH
全长蛋白

图 1

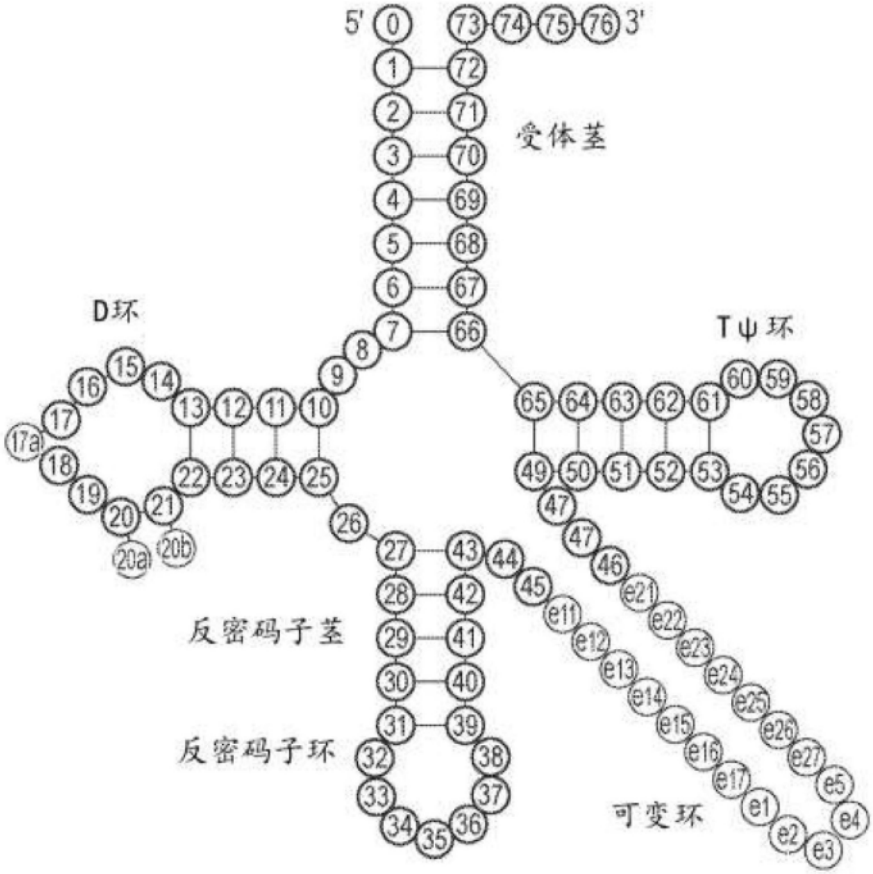

5'
3'
受体茎
D环
Tψ环
反密码子茎
反密码子环
可变环

图 2A

位置	残基	比率
0	Gm/G	1/4
1	Ψ/U	3/14
4	Am/A	2/28
4	Um/U	5/45
4	Cm/C	4/51
4	Gm/G	2/41
6	m^2G/G	20/36
7	m^2G/G	1/69
9	m^1A/A	1/69
9	m^1G/xG/G	56/1/43
10	m^2G/G	103/70
12	ac^4C/C	32/21
13	Ψ/U	47/8
13	Cm/C	1/83
14	m^1A/xA/A	9/1/165
16	D/U	123/25
17	D/U	39/0
18	Gm/G	40/138
20	acp^3U/D/U	4/118/11
20a	acp^3U/D/Ψ/xU/U	6/64/2/2/2
20b	D/Ψ/U	8/6/2
25	Ψ/U	1/28
26	Ψ/U	1/24
26	$m^{22}G/m^2G$/xG/G	90/16/2/8
27	Ψ/U	70/10
27	$m^{22}G$/G	3/14
28	Ψ/U	37/38
30	Ψ/U	1/4
31	Ψ/U	4/2
32	Ψm/Um/Ψ/U	2/6/24/8
32	Cm/m^3C/xC/C	40/16/2/80
34	I/A	32/0
34	s^2U/Um/$mchm^5U$/ ncm^5U/cmnm^{5}Um/ mcm^5s^2U/mcm^5U/ ψ/xU/U	1/3/1/ 3/1/ 7/4/ 1/11/5
34	Cm/f^5Cm/m^5C/xC/C	8/1/1/2/44
34	QtRNA/manQtRNA/ galQtRNA/GmG	5/4/ 3/17/20

位置	残基	比率
35	Ψ/U	7/50
36	Ψ/xU/U	2/3/50
37	$m^1I/ms^2t^5A/i^6A$/ m^6t^6A/t^6A/xA/A	6/2/22/ 2/48/4/45
37	m^1G/02yW/xG/ yW/G	33/6/2/ 7/1
38	Ψ/U	17/1
38	m^5C/xC/C	10/1/26
39	$m^7Ψ/Ψm$/ Um/Ψ/U	2/6/ 1/79/2
39	Gm/G	4/32
40	Ψ/U	6/1
40	m^5C/C	3/139
44	Um/xU/U	20/2/18
e11	Ψ/U	2/4
e12	Ψ/U	6/11
e14	Ψ/U	2/6
e2	m^3C/C	7/7
46	m^7G/G	86/39
47	D/xU/U	83/1/16
48	D/U	1/25
48	m^5C/xC/C	95/1/46
49	xA/A	1/19
49	m^5C/xC/C	64/1/13
50	Ψ/U	4/45
50	m^5C/C	15/71
54	m^5Um/m^5U/Ψ/U	16/111/11/17
55	Ψ/U	166/12
58	m^7A/xA/A	151/1/26
64	Ar(p)/A	2/43
64	Gr(p)/xG/G	1/1/87
65	Ψ/U	1/32
67	Ψ/U	2/63
67	m^2G/G	2/64
68	Ψ/U	1/37
72	Ψ/U	1/16
72	m^5C/C	5/132

图 2B

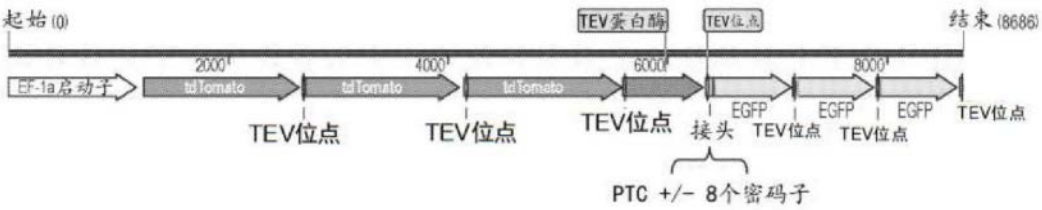


图 3

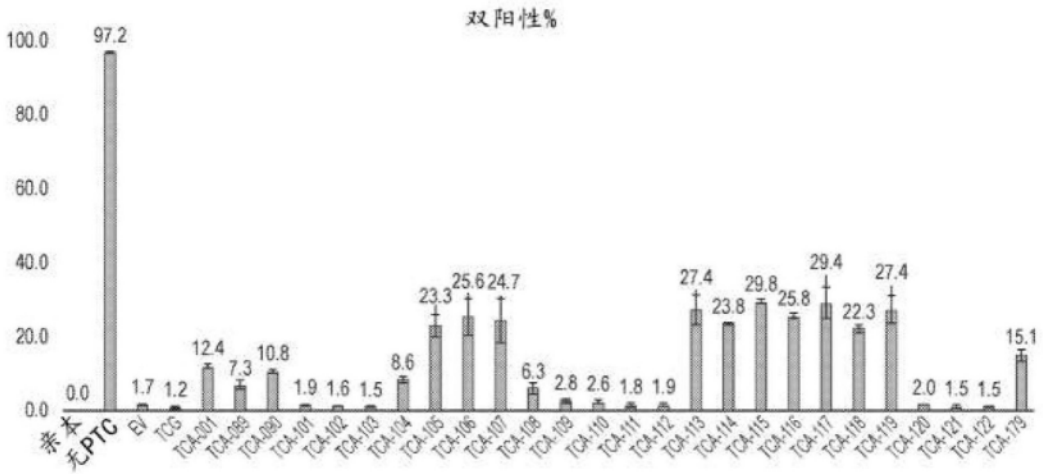

双阳性%
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
97.2
0.0
1.7
1.2
12.4
7.3
10.8
1.9
1.6
1.5
8.6
23.3
25.6
24.7
6.3
2.8
2.6
1.8
1.9
27.4
23.8
29.8
25.8
29.4
22.3
27.4
2.0
1.5
1.5
15.1
亲本
无PTC
EV
TCG
TCA-001
TCA-089
TCA-090
TCA-101
TCA-102
TCA-103
TCA-104
TCA-105
TCA-106
TCA-107
TCA-108
TCA-109
TCA-110
TCA-111
TCA-112
TCA-113
TCA-114
TCA-115
TCA-116
TCA-117
TCA-118
TCA-119
TCA-120
TCA-121
TCA-122
TCA-179

图 4

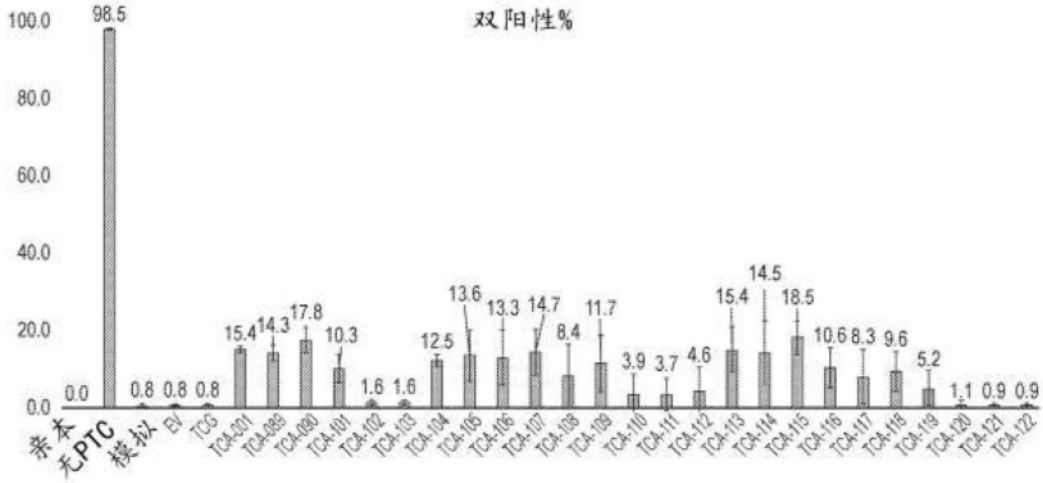

双阳性%
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
98.5
0.0
0.8
0.8
0.8
15.4
14.3
17.8
10.3
1.6
1.6
12.5
13.6
13.3
14.7
8.4
11.7
3.9
3.7
4.6
15.4
14.5
18.5
10.6
8.3
9.6
5.2
1.1
0.9
0.9
亲本
无PTC
模拟
EV
TCG
TCA-001
TCA-089
TCA-090
TCA-101
TCA-102
TCA-103
TCA-104
TCA-105
TCA-106
TCA-107
TCA-108
TCA-109
TCA-110
TCA-111
TCA-112
TCA-113
TCA-114
TCA-115
TCA-116
TCA-117
TCA-118
TCA-119
TCA-120
TCA-121
TCA-122

图 5

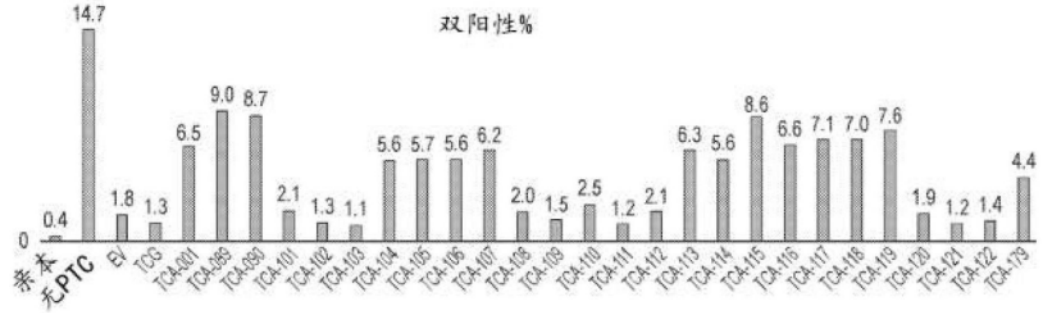

双阳性%
0
14.7
0.4
1.8
1.3
6.5
9.0
8.7
2.1
1.3
1.1
5.6
5.7
5.6
6.2
2.0
1.5
2.5
1.2
2.1
6.3
5.6
8.6
6.6
7.1
7.0
7.6
1.9
1.2
1.4
4.4
亲本
无PTC
EV
TCG
TCA-001
TCA-089
TCA-090
TCA-101
TCA-102
TCA-103
TCA-104
TCA-105
TCA-106
TCA-107
TCA-108
TCA-109
TCA-110
TCA-111
TCA-112
TCA-113
TCA-114
TCA-115
TCA-116
TCA-117
TCA-118
TCA-119
TCA-120
TCA-121
TCA-122
TCA-179

图 6

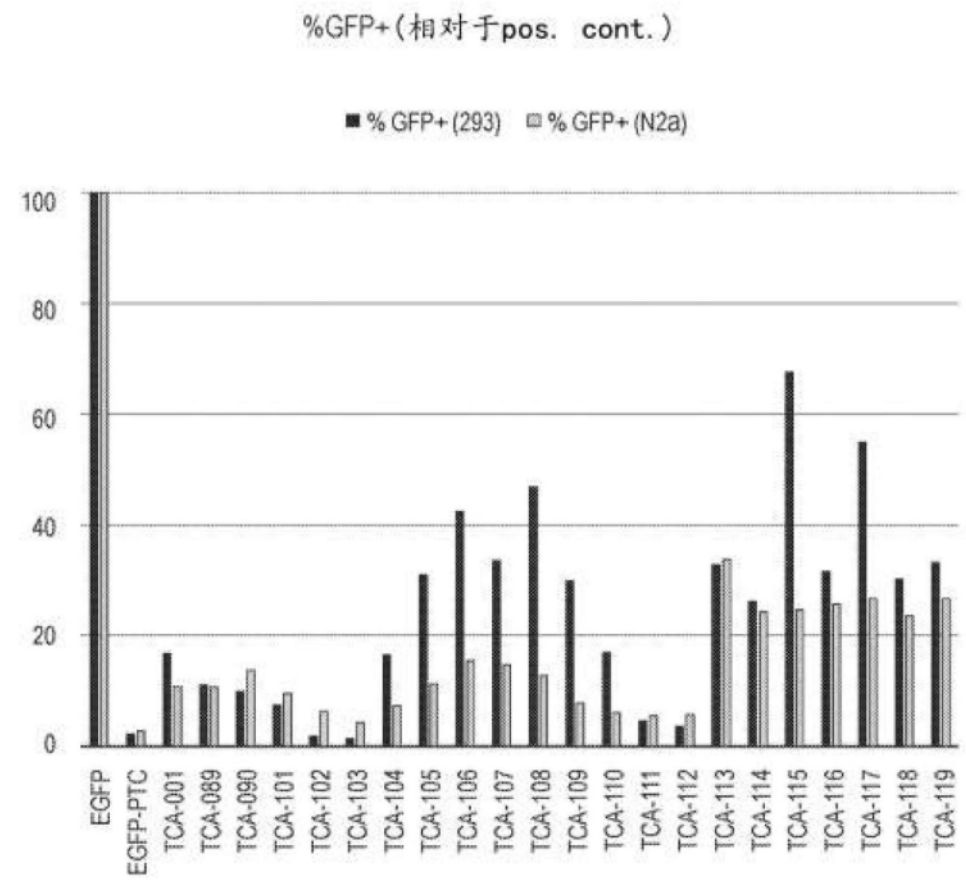

%GFP+(相对于pos. cont.)
% GFP+ (293)
% GFP+ (N2a)
100
80
60
40
20
0
EGFP
EGFP-PTC
TCA-001
TCA-089
TCA-090
TCA-101
TCA-102
TCA-103
TCA-104
TCA-105
TCA-106
TCA-107
TCA-108
TCA-109
TCA-110
TCA-111
TCA-112
TCA-113
TCA-114
TCA-115
TCA-116
TCA-117
TCA-118
TCA-119

图 7

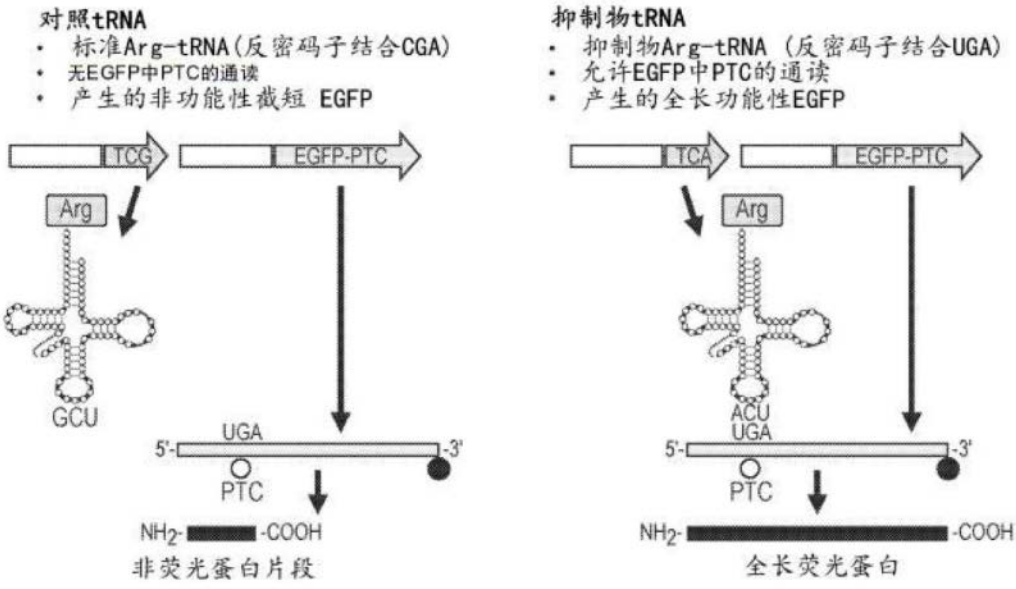

对照tRNA
• 标准Arg-tRNA(反密码子结合CGA)
• 无EGFP中PTC的通读
• 产生的非功能性截短 EGFP
TCG
EGFP-PTC
Arg
GCU
UGA
5'-
-3'
PTC
NH2-
-COOH
非荧光蛋白片段
抑制物tRNA
• 抑制物Arg-tRNA (反密码子结合UGA)
• 允许EGFP中PTC的通读
• 产生的全长功能性EGFP
TCA
EGFP-PTC
Arg
ACU
UGA
5'-
-3'
PTC
NH2-
-COOH
全长荧光蛋白

图 8A

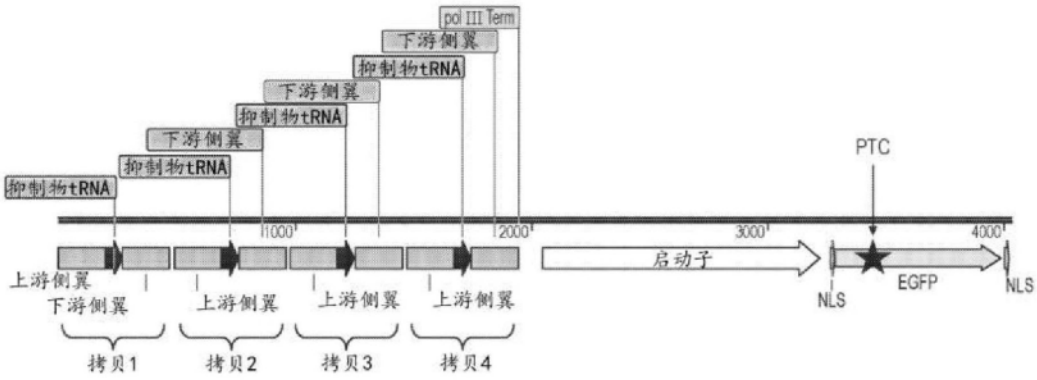

pol III Term
下游侧翼
抑制物tRNA
下游侧翼
抑制物tRNA
下游侧翼
抑制物tRNA
下游侧翼
抑制物tRNA
PTC
1000'
2000'
3000'
4000'
启动子
EGFP
NLS
NLS
上游侧翼
下游侧翼
上游侧翼
上游侧翼
上游侧翼
拷贝1
拷贝2
拷贝3
拷贝4

图 8B

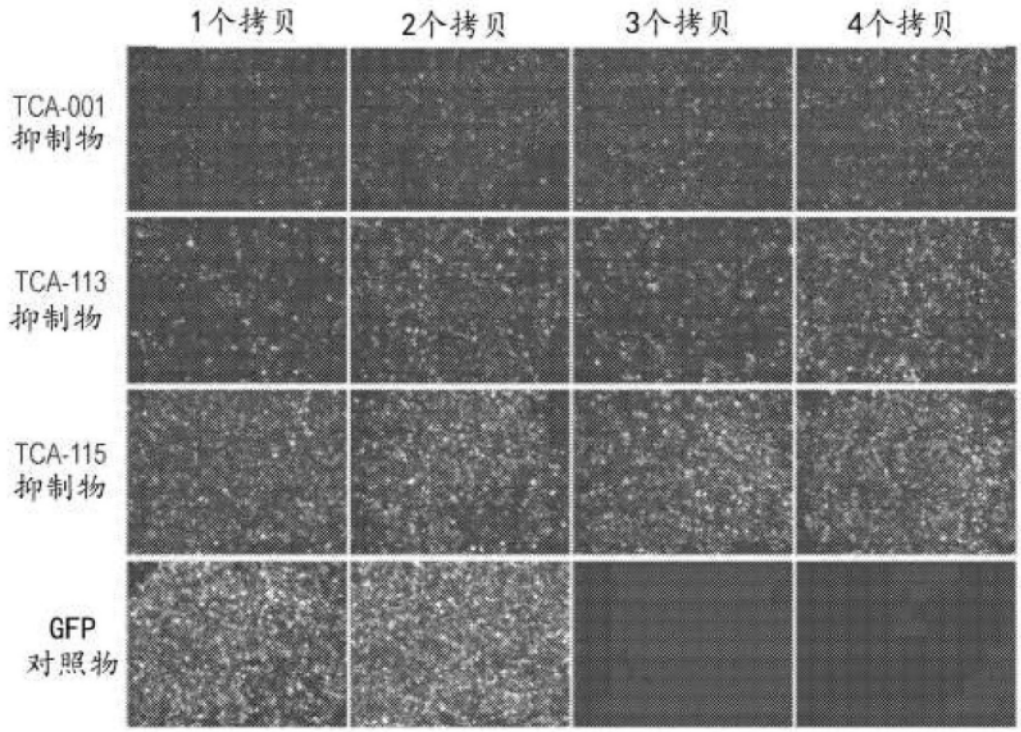

1个拷贝
2个拷贝
3个拷贝
4个拷贝
TCA-001
抑制物
TCA-113
抑制物
TCA-115
抑制物
GFP
对照物

图 9

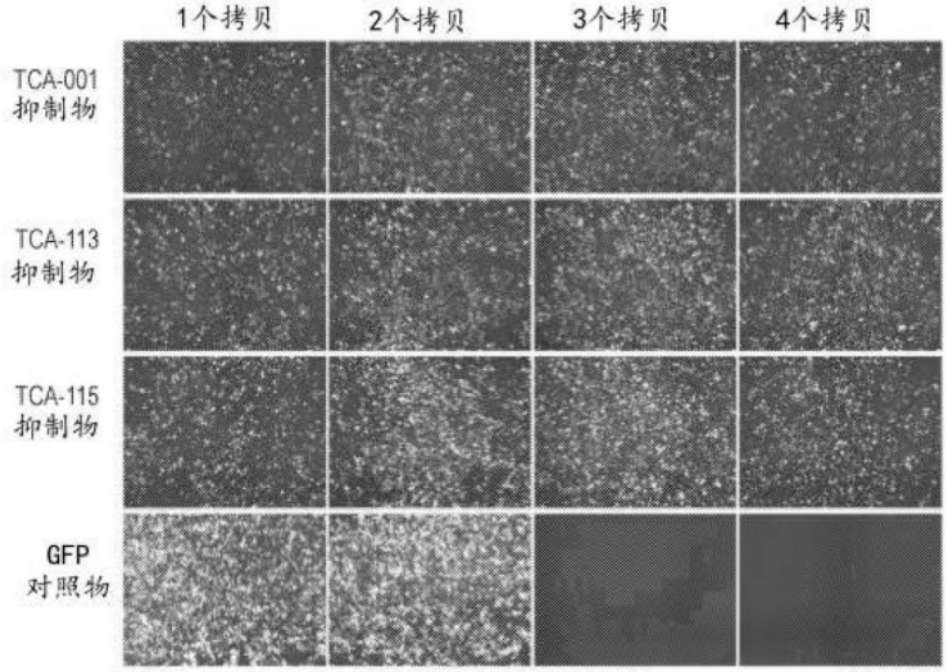

1个拷贝
2个拷贝
3个拷贝
4个拷贝
TCA-001
抑制物
TCA-113
抑制物
TCA-115
抑制物
GFP
对照物

图 10

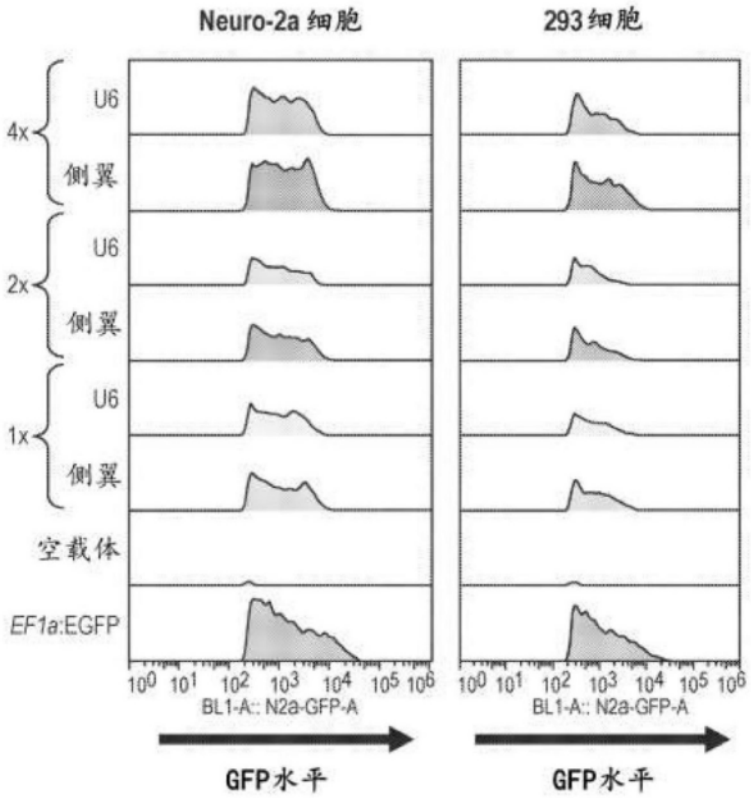

Neuro-2a 细胞
293 细胞
4x
2x
1x
U6
侧翼
空载体
EF1a:EGFP
BL1-A:: N2a-GFP-A
GFP水平

图 11

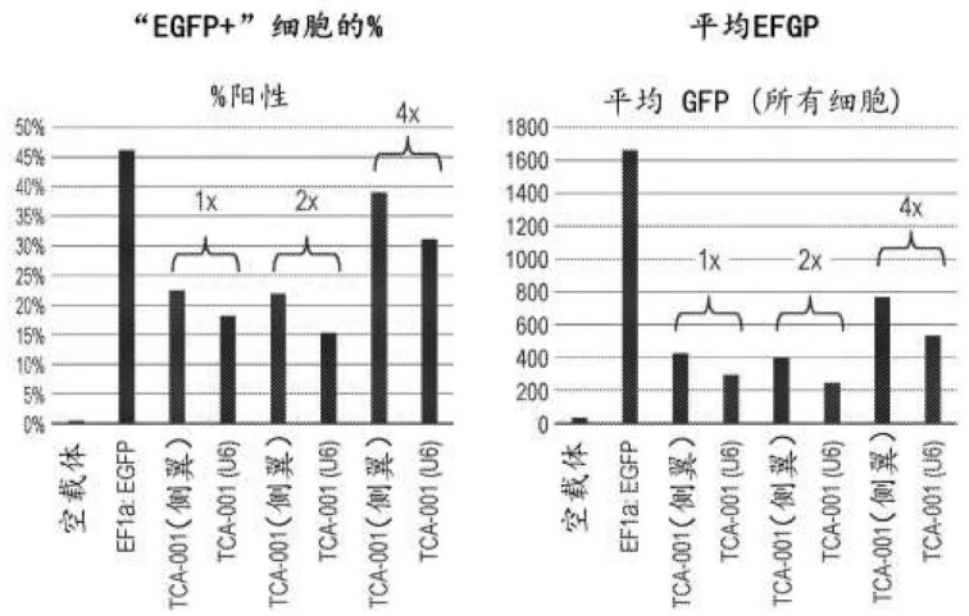

“EGFP+”细胞的%
%阳性
50%
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
1x
2x
4x
空载体
EF1a:EGFP
TCA-001(侧翼)
TCA-001(U6)
TCA-001(侧翼)
TCA-001(U6)
TCA-001(侧翼)
TCA-001(U6)
平均EFGP
平均 GFP (所有细胞)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
1x
2x
4x
空载体
EF1a:EGFP
TCA-001(侧翼)
TCA-001(U6)
TCA-001(侧翼)
TCA-001(U6)
TCA-001(侧翼)
TCA-001(U6)

图 12

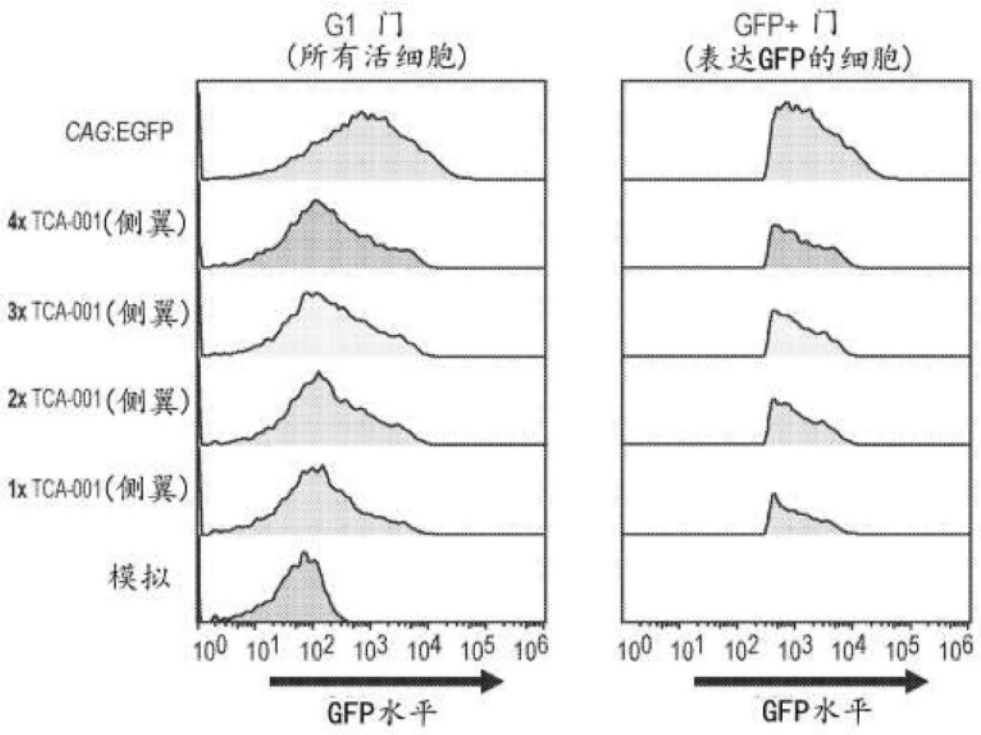

G1 门
(所有活细胞)
GFP+ 门
(表达GFP的细胞)
CAG:EGFP
4x TCA-001(侧翼)
3x TCA-001(侧翼)
2x TCA-001(侧翼)
1x TCA-001(侧翼)
模拟
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
GFP水平
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
GFP水平

图 13

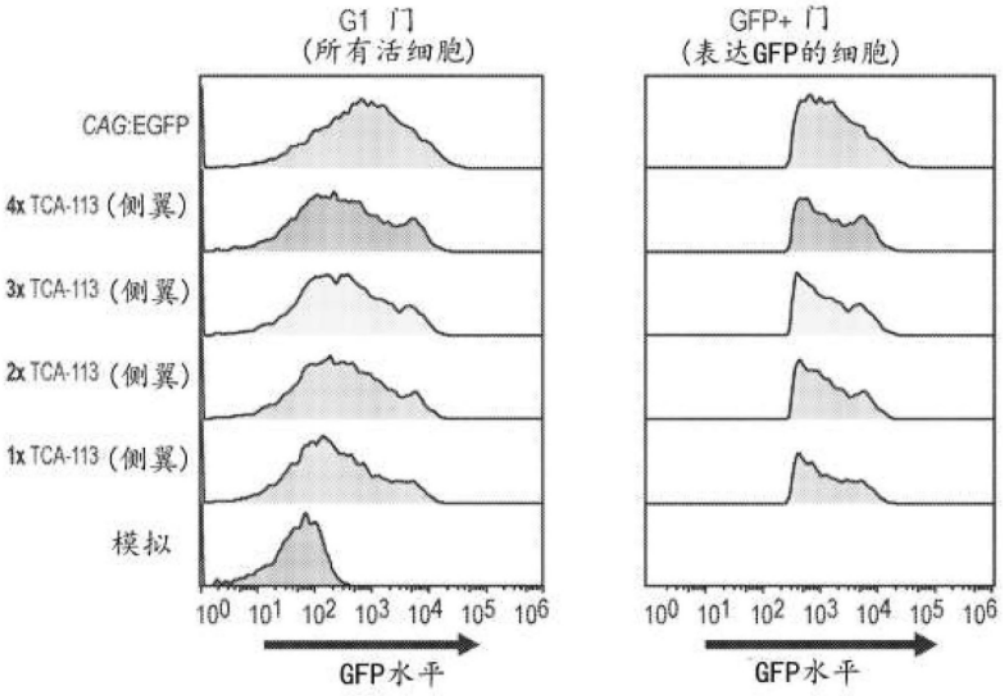

G1 门
(所有活细胞)
GFP+ 门
(表达GFP的细胞)
CAG:EGFP
4x TCA-113 (侧翼)
3x TCA-113 (侧翼)
2x TCA-113 (侧翼)
1x TCA-113 (侧翼)
模拟
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
GFP水平

图 14

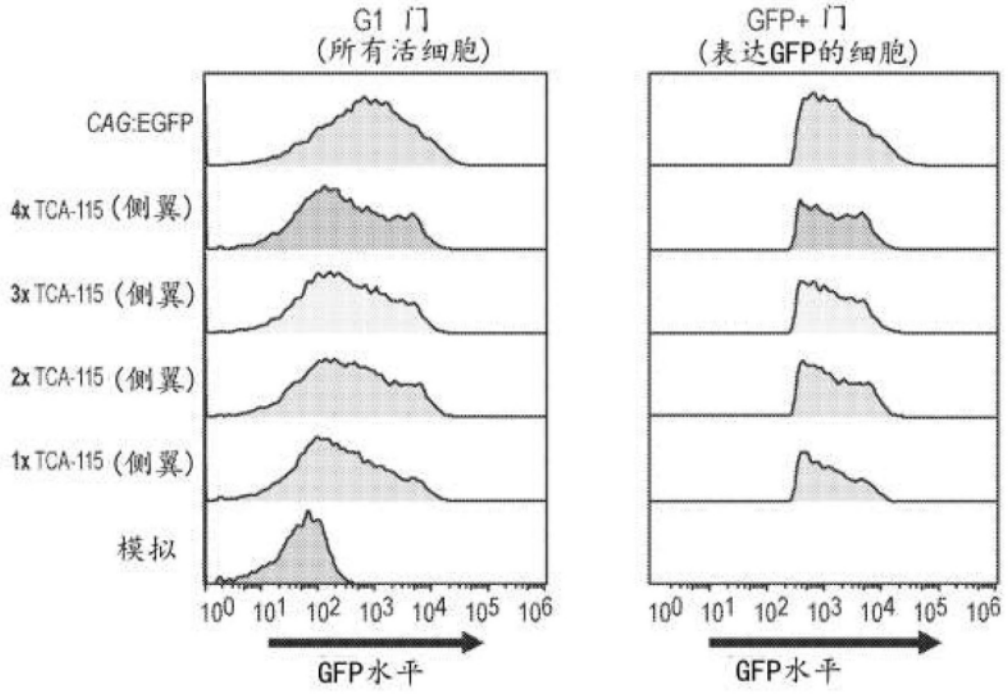

G1 门
(所有活细胞)
GFP+ 门
(表达GFP的细胞)
CAG:EGFP
4x TCA-115 (侧翼)
3x TCA-115 (侧翼)
2x TCA-115 (侧翼)
1x TCA-115 (侧翼)
模拟
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
GFP水平

图 15

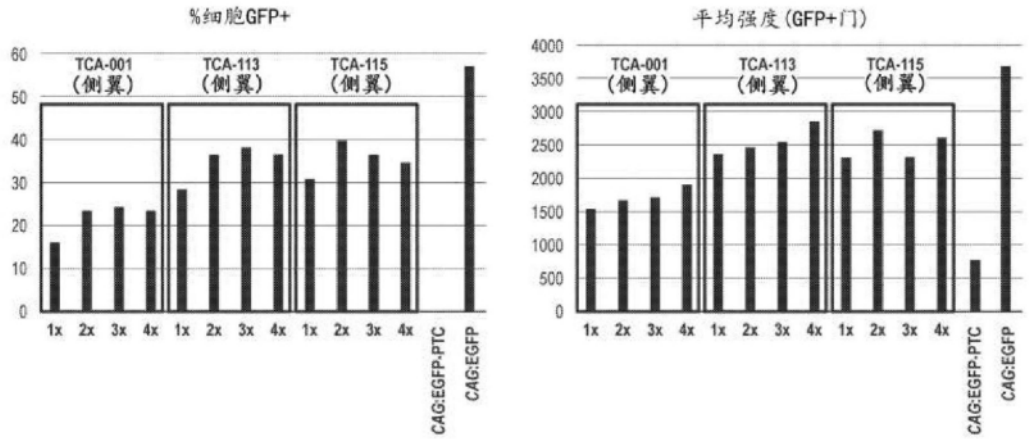

%细胞GFP+
TCA-001 (侧翼)
TCA-113 (侧翼)
TCA-115 (侧翼)
1x 2x 3x 4x
CAG:EGFP-PTC
CAG:EGFP
平均强度(GFP+门)

图 16

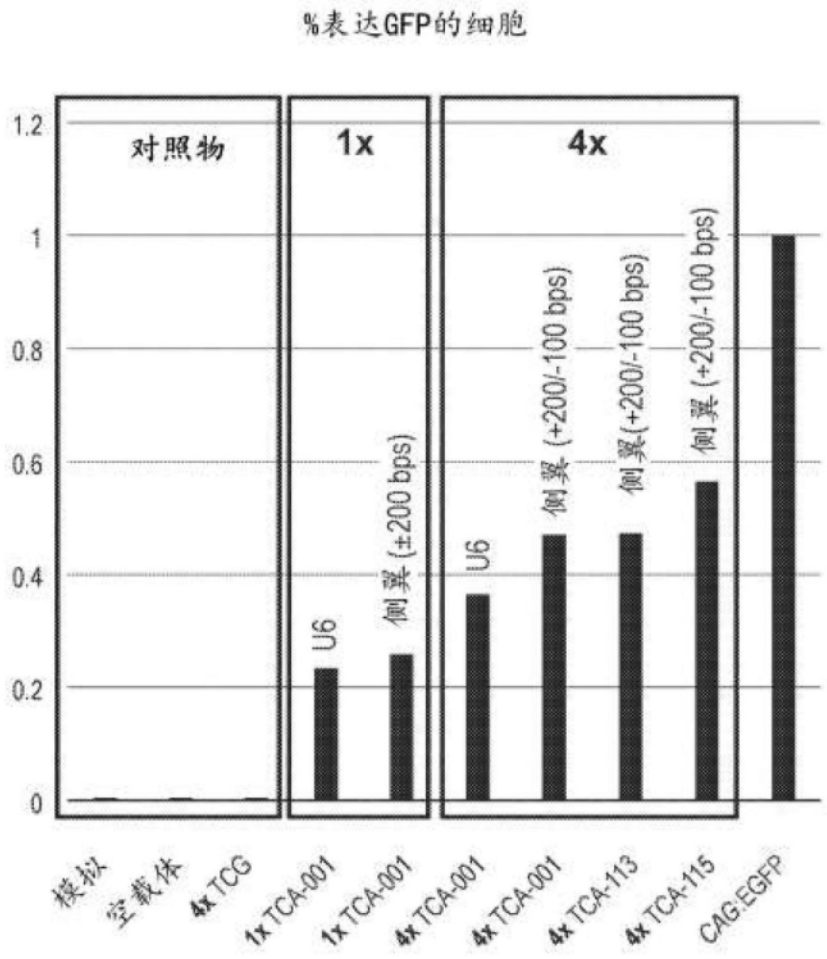

%表达GFP的细胞
对照物
1x
4x
U6
侧翼 (±200 bps)
侧翼 (+200/-100 bps)
模拟
空载体
4x TCG
1x TCA-001
1x TCA-001
4x TCA-001
4x TCA-001
4x TCA-113
4x TCA-115
CAG:EGFP

图 17

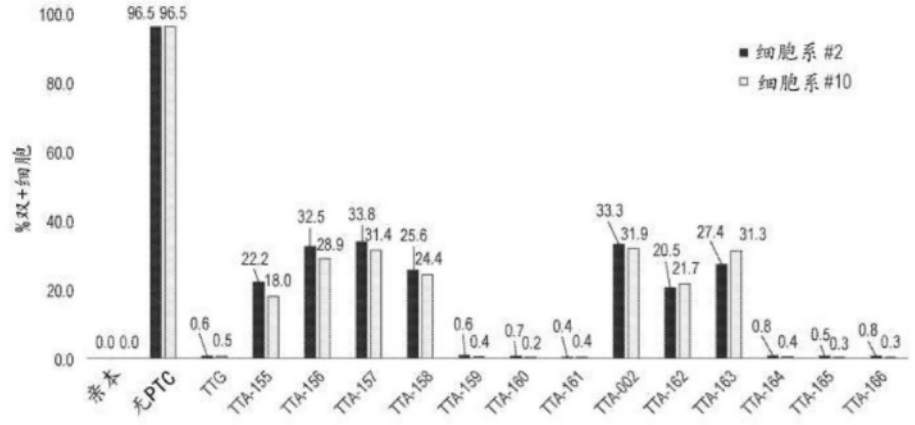

%双+细胞
细胞系#2
细胞系#10
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
96.5 96.5
0.0 0.0
0.6 0.5
22.2 18.0
32.5 28.9
33.8 31.4
25.6 24.4
0.6 0.4
0.7 0.2
0.4 0.4
33.3 31.9
20.5 21.7
27.4 31.3
0.8 0.4
0.5 0.3
0.8 0.3
未转
无PTC
TTG
TTA-155
TTA-156
TTA-157
TTA-158
TTA-159
TTA-160
TTA-161
TTA-002
TTA-162
TTA-163
TTA-164
TTA-165
TTA-166

图 18

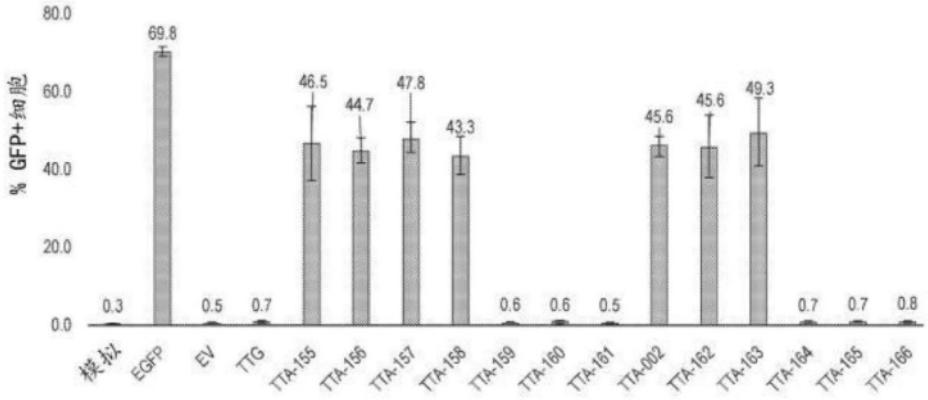

% GFP+细胞
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0.3
69.8
0.5
0.7
46.5
44.7
47.8
43.3
0.6
0.6
0.5
45.6
45.6
49.3
0.7
0.7
0.8
模拟
EGFP
EV
TTG
TTA-155
TTA-156
TTA-157
TTA-158
TTA-159
TTA-160
TTA-161
TTA-002
TTA-162
TTA-163
TTA-164
TTA-165
TTA-166

图 19

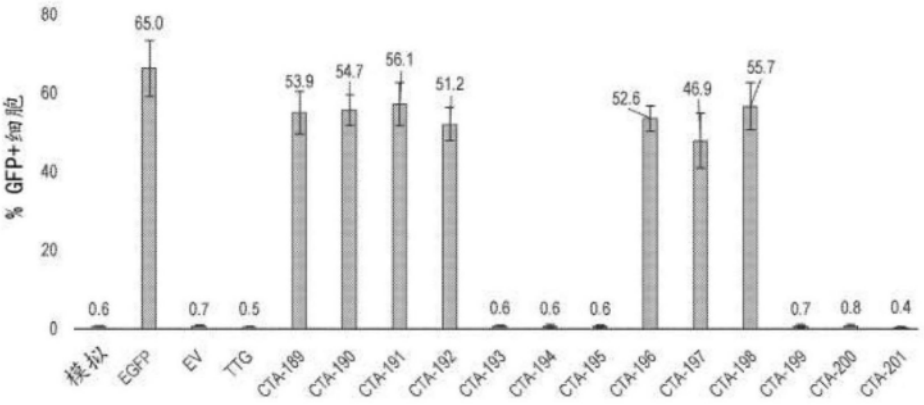

% GFP+细胞
80
60
40
20
0
0.6
65.0
0.7
0.5
53.9
54.7
56.1
51.2
0.6
0.6
0.6
52.6
46.9
55.7
0.7
0.8
0.4
模拟
EGFP
EV
TTG
CTA-189
CTA-190
CTA-191
CTA-192
CTA-193
CTA-194
CTA-195
CTA-196
CTA-197
CTA-198
CTA-199
CTA-200
CTA-201

图 20

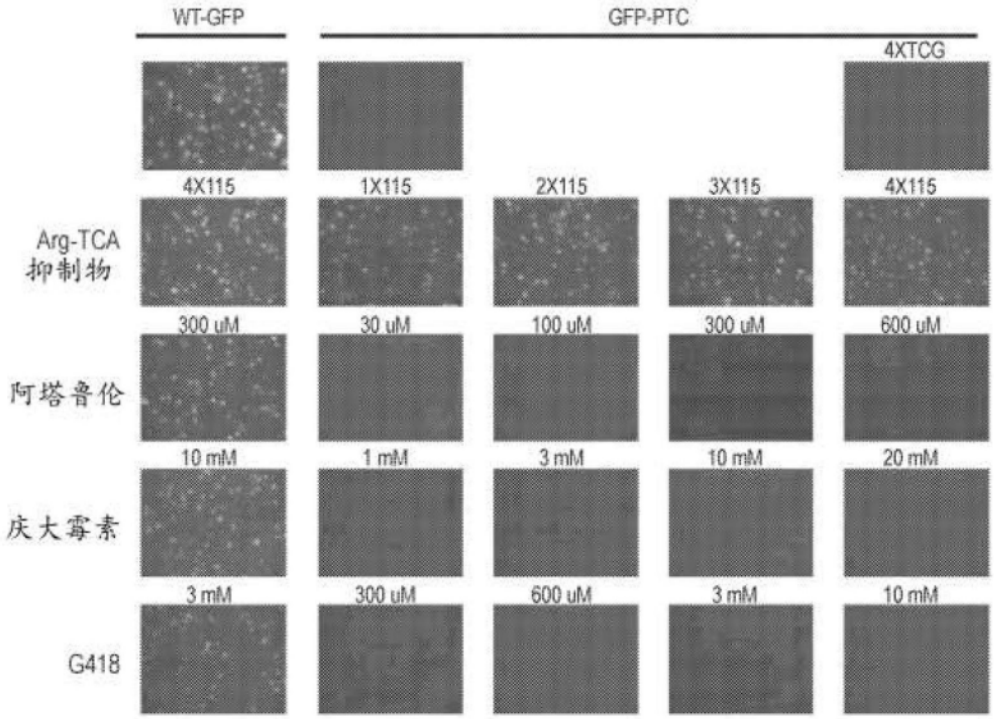

WT-GFP
GFP-PTC
4XTCG
4X115
1X115
2X115
3X115
4X115
Arg-TCA
抑制物
300 uM
30 uM
100 uM
300 uM
600 uM
阿塔鲁伦
10 mM
1 mM
3 mM
10 mM
20 mM
庆大霉素
3 mM
300 uM
600 uM
3 mM
10 mM
G418

图 21

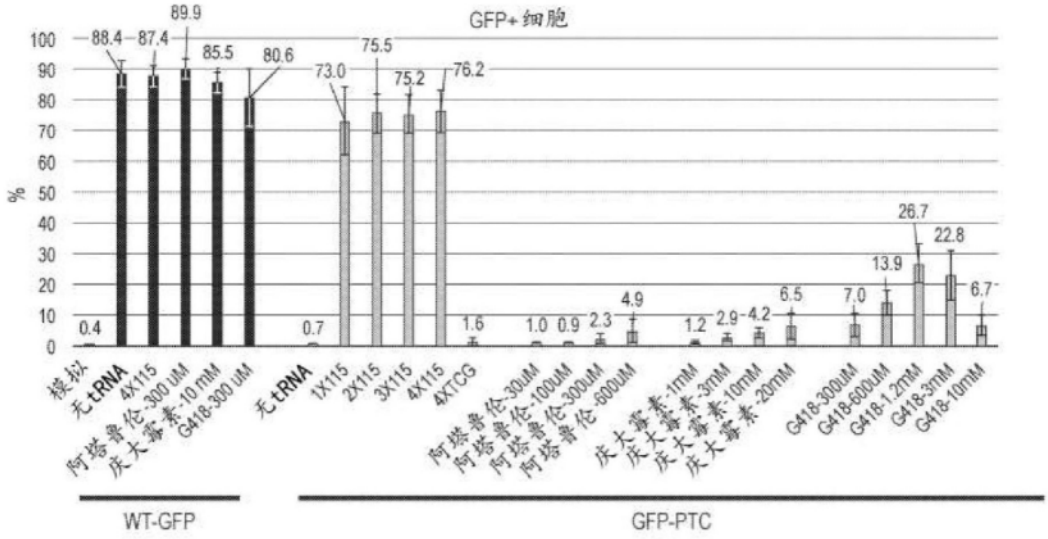

GFP+细胞
%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
88.4
87.4
89.9
85.5
80.6
0.4
73.0
75.5
75.2
76.2
0.7
1.6
1.0
0.9
2.3
4.9
1.2
2.9
4.2
6.5
7.0
13.9
26.7
22.8
6.7
模拟
无tRNA
4X115
阿塔鲁伦-300 uM
庆大霉素-10 mM
G418-300 uM
无tRNA
1X115
2X115
3X115
4X115
4XTCG
阿塔鲁伦-30uM
阿塔鲁伦-100uM
阿塔鲁伦-300uM
阿塔鲁伦-600uM
庆大霉素-1mM
庆大霉素-3mM
庆大霉素-10mM
庆大霉素-20mM
G418-300uM
G418-600uM
G418-1.2mM
G418-3mM
G418-10mM
WT-GFP
GFP-PTC

图 22

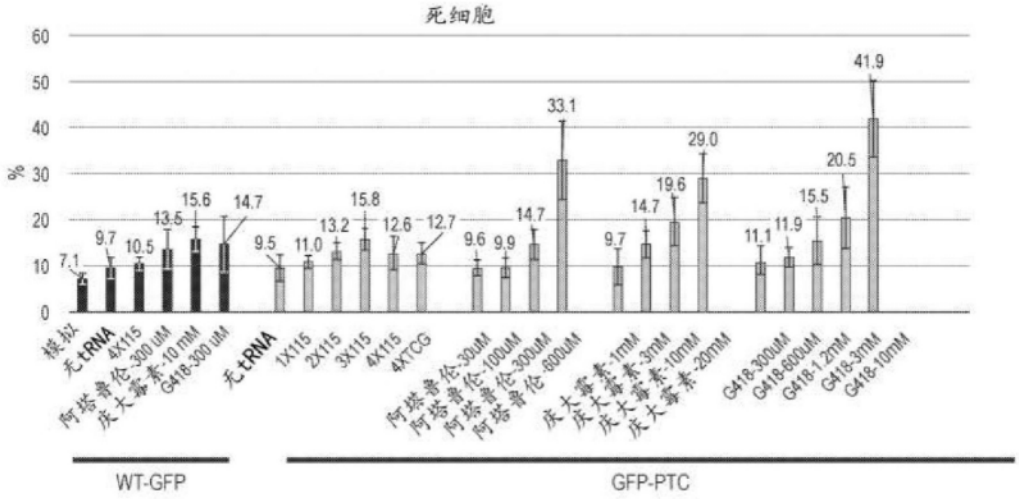

死细胞
%
60
50
40
30
20
10
0
7.1
9.7
10.5
13.5
15.6
14.7
9.5
11.0
13.2
15.8
12.6
12.7
9.6
9.9
14.7
33.1
9.7
14.7
19.6
29.0
11.1
11.9
15.5
20.5
41.9
模拟
无tRNA
4X115
阿塔鲁伦-300 uM
庆大霉素-10 mM
G418-300 uM
无tRNA
1X115
2X115
3X115
4X115
4XTCG
阿塔鲁伦-30uM
阿塔鲁伦-100uM
阿塔鲁伦-300uM
阿塔鲁伦-600uM
庆大霉素-1mM
庆大霉素-3mM
庆大霉素-10mM
庆大霉素-20mM
G418-300uM
G418-600uM
G418-1.2mM
G418-3mM
G418-10mM
WT-GFP
GFP-PTC

图 23

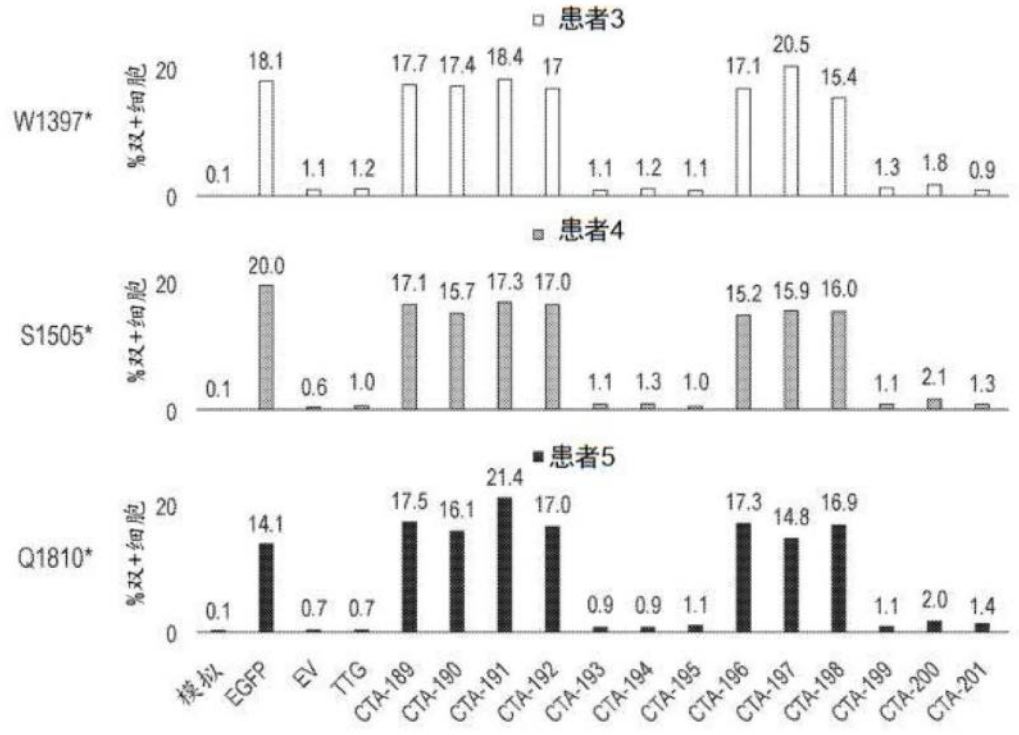

患者3
W1397*
%双+细胞
20
0
0.1
18.1
1.1
1.2
17.7
17.4
18.4
17
1.1
1.2
1.1
17.1
20.5
15.4
1.3
1.8
0.9
患者4
S1505*
%双+细胞
20
0
0.1
20.0
0.6
1.0
17.1
15.7
17.3
17.0
1.1
1.3
1.0
15.2
15.9
16.0
1.1
2.1
1.3
患者5
Q1810*
%双+细胞
20
0
0.1
14.1
0.7
0.7
17.5
16.1
21.4
17.0
0.9
0.9
1.1
17.3
14.8
16.9
1.1
2.0
1.4
模拟
EGFP
EV
TTG
CTA-189
CTA-190
CTA-191
CTA-192
CTA-193
CTA-194
CTA-195
CTA-196
CTA-197
CTA-198
CTA-199
CTA-200
CTA-201

图 24

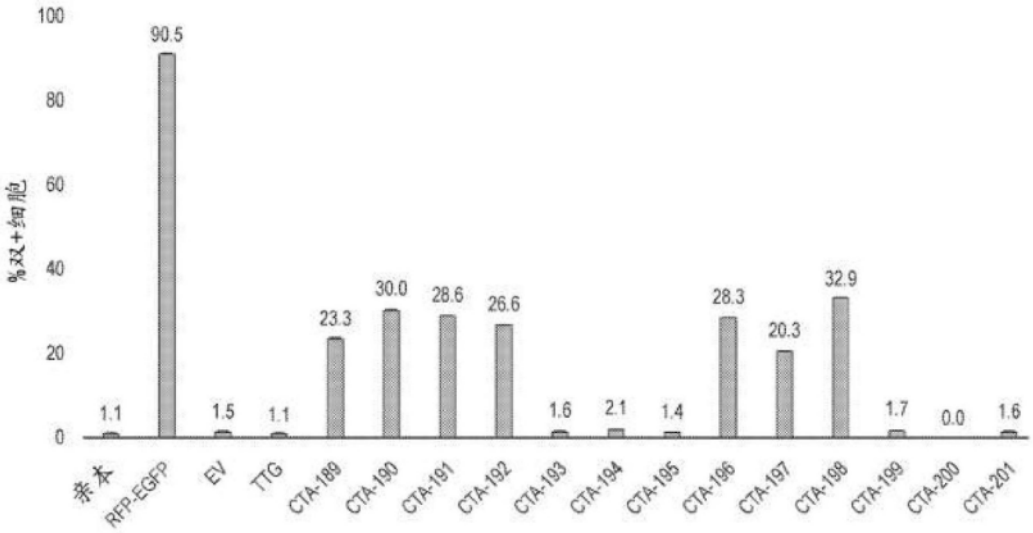

%双+细胞
100
80
60
40
20
0
1.1
90.5
1.5
1.1
23.3
30.0
28.6
26.6
1.6
2.1
1.4
28.3
20.3
32.9
1.7
0.0
1.6
亲本
RFP-EGFP
EV
TTG
CTA-189
CTA-190
CTA-191
CTA-192
CTA-193
CTA-194
CTA-195
CTA-196
CTA-197
CTA-198
CTA-199
CTA-200
CTA-201

图 25

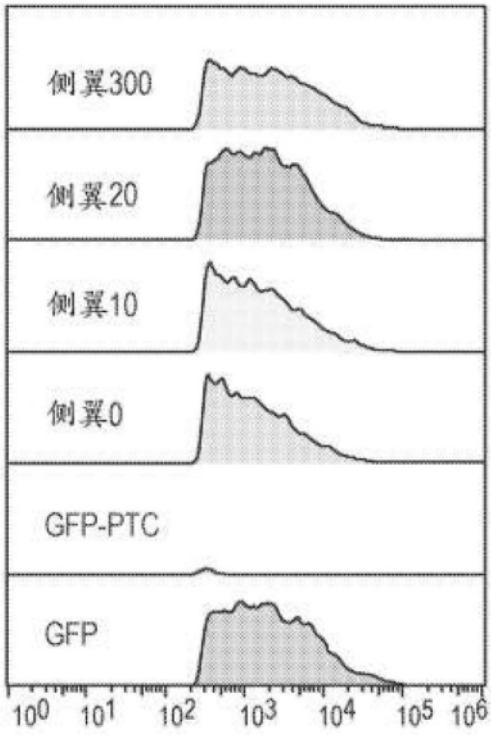

侧翼300
侧翼20
侧翼10
侧翼0
GFP-PTC
GFP
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6

图 26A

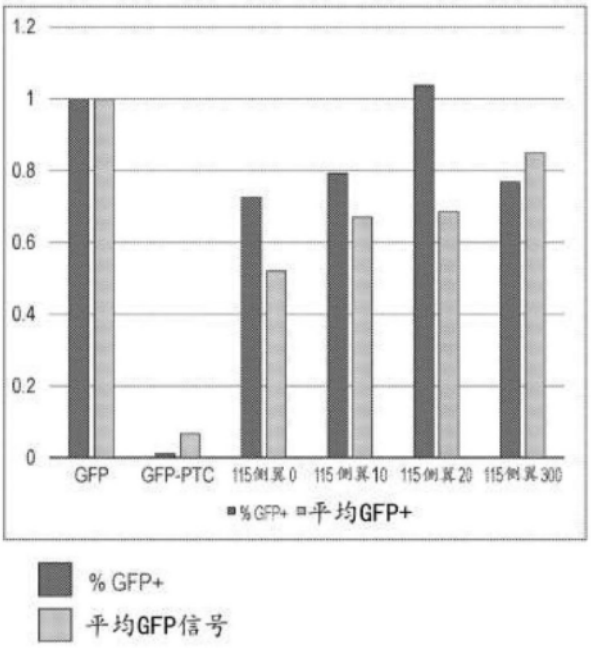

1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
GFP
GFP-PTC
115 例其 0
115 例其 10
115 例其 20
115 例其 300
% GFP+
平均GFP+
% GFP+
平均GFP信号

图 26B

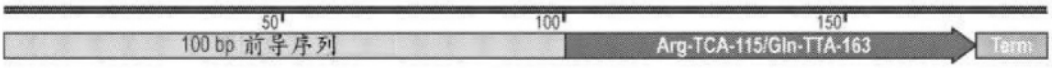

50
100
150
100 bp 前导序列
Arg-TCA-115/Gln-TTA-163
Term

图 27

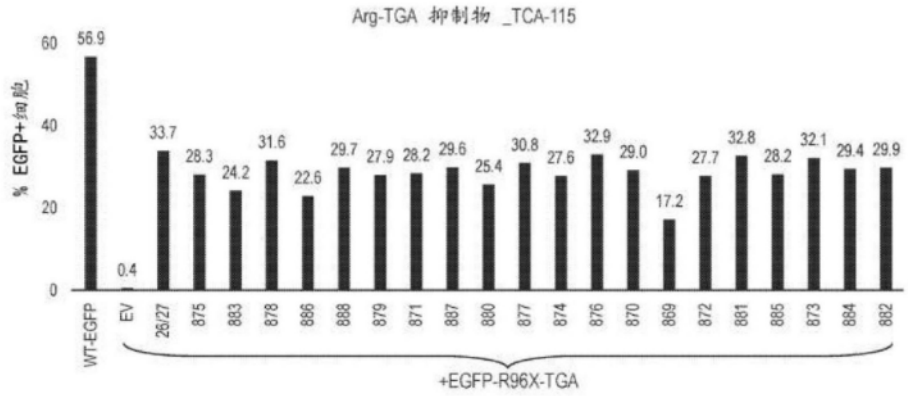

Arg-TGA 抑制物 _TCA-115
% EGFP+细胞
60
40
20
0
56.9
0.4
33.7
28.3
24.2
31.6
22.6
29.7
27.9
28.2
29.6
25.4
30.8
27.6
32.9
29.0
17.2
27.7
32.8
28.2
32.1
29.4
29.9
WT-EGFP
EV
26/27
875
883
878
886
888
879
871
887
880
877
874
876
870
869
872
881
885
873
884
882
+EGFP-R96X-TGA

图 28

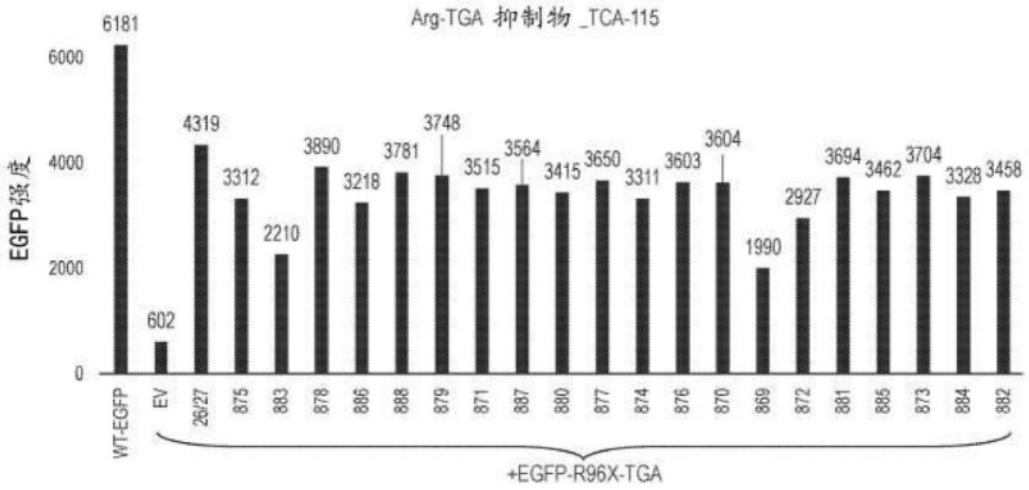

Arg-TGA 抑制物 _TCA-115
EGFP强度
6000
4000
2000
0
6181
602
4319
3312
2210
3890
3218
3781
3748
3515
3564
3415
3650
3311
3603
3604
1990
2927
3694
3462
3704
3328
3458
WT-EGFP
EV
26/27
875
883
878
886
888
879
871
887
880
877
874
876
870
869
872
881
885
873
884
882
+EGFP-R96X-TGA

图 29

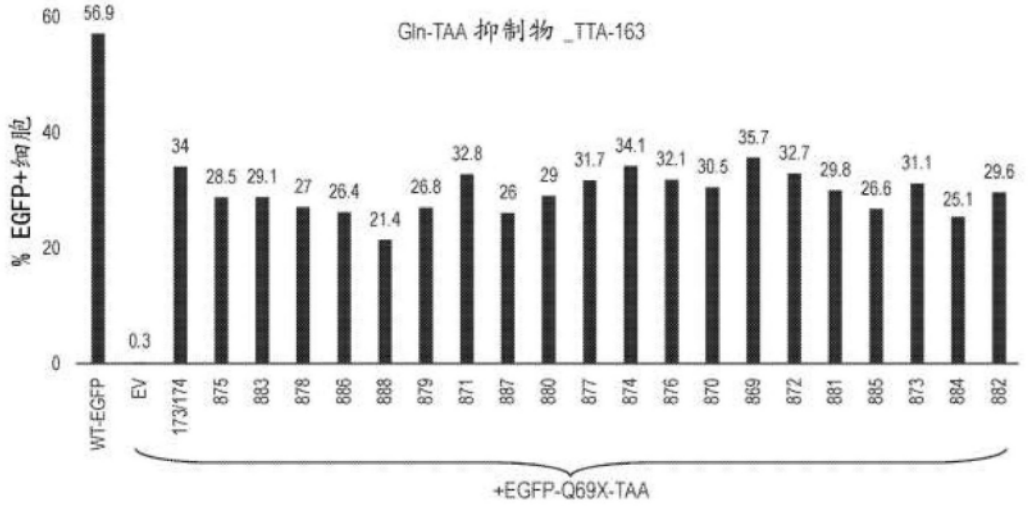

Gln-TAA 抑制物 _TTA-163
% EGFP+细胞
60
40
20
0
56.9
0.3
34
28.5
29.1
27
26.4
21.4
26.8
32.8
26
29
31.7
34.1
32.1
30.5
35.7
32.7
29.8
26.6
31.1
25.1
29.6
WT-EGFP
EV
173/174
875
883
878
886
888
879
871
887
880
877
874
876
870
869
872
881
885
873
884
882
+EGFP-Q69X-TAA

图 30



图 31

SEQ ID NO	前导名称	GlnTTA (%GFP+)	GlnTTA (平均强度)	ArgTCA (%GFP+)	ArgTCA (平均强度)
869	Ser-TGA-4-1	62.74%	57.40%	30.23%	32.20%
870	Ser-CGA-4-1	53.60%	56.87%	50.97%	58.31%
871	Arg-TCG-5-1	57.64%	55.07%	49.56%	56.87%
872	Ser-GCT-2-1	57.47%	53.97%	48.68%	47.35%
873	Ile-AAT-4-1	54.66%	53.13%	56.41%	59.93%
874	Ala-AGC-4-1	59.93%	50.78%	48.51%	53.57%
875	Arg-TCT-1-1	50.09%	50.22%	49.74%	53.58%
876	Leu-TAA-1-1	56.41%	49.91%	57.82%	58.29%
877	Arg-CCG-2-1	55.71%	48.81%	54.13%	59.05%
878	Ser-GCT-3-1	47.45%	45.48%	55.54%	62.93%
879	Ser-TGA-1-1	47.10%	45.46%	49.03%	60.64%
880	Asn-GTT-1-1	50.97%	43.37%	44.64%	55.25%
881	Arg-TCT-2-1	52.37%	40.67%	57.64%	59.76%
882	Asn-GTT-3-1	52.02%	40.28%	52.55%	55.95%
883	Tyr-GTA-5-1	51.14%	38.55%	42.53%	35.75%
884	Val-CAC-2-1	44.11%	37.73%	51.67%	53.84%
885	Thr-TGT-1-1	46.75%	36.77%	49.56%	56.01%
886	Arg-TCG-1-1	46.40%	36.14%	39.72%	52.06%
887	Lys-TTT-6-1	45.69%	35.77%	52.02%	57.66%
888	Arg-TCG-3-1	37.61%	27.54%	52.20%	61.17%

图 32

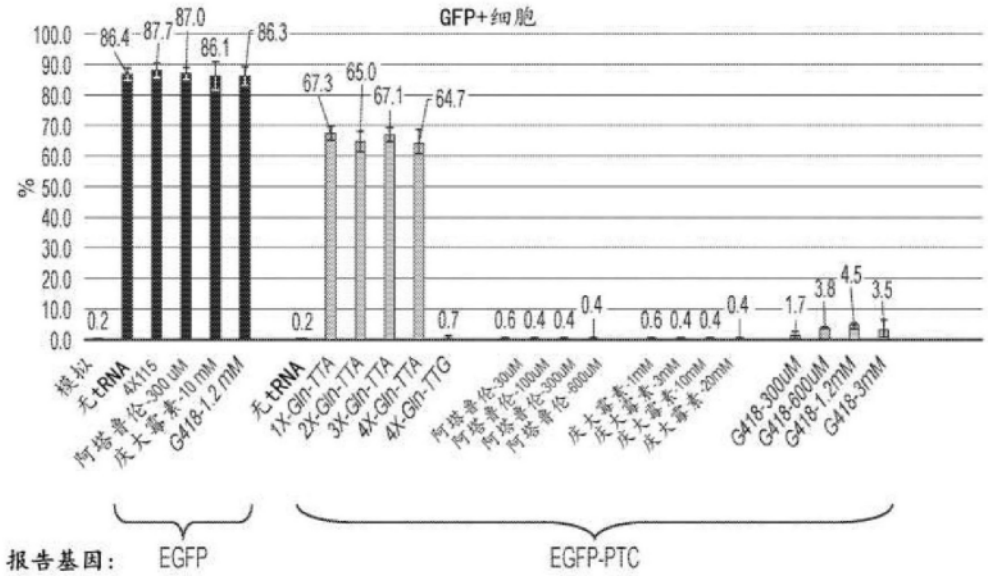

GFP+细胞
%
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
86.4
87.7
87.0
86.1
86.3
67.3
65.0
67.1
64.7
0.2
0.2
0.7
0.6 0.4 0.4 0.4
0.6 0.4 0.4 0.4
1.7 3.8 4.5 3.5
模拟
无tRNA
4X115
阿塔鲁伦-300 uM
庆大霉素-10 mM
G418-1.2 mM
无tRNA
1X-Gln-TTA
2X-Gln-TTA
3X-Gln-TTA
4X-Gln-TTA
4X-Gln-TTG
阿塔鲁伦-30uM
阿塔鲁伦-100uM
阿塔鲁伦-300uM
阿塔鲁伦-600uM
庆大霉素-1mM
庆大霉素-3mM
庆大霉素-10mM
庆大霉素-20mM
G418-300uM
G418-600uM
G418-1.2mM
G418-3mM
报告基因:
EGFP
EGFP-PTC

图 33

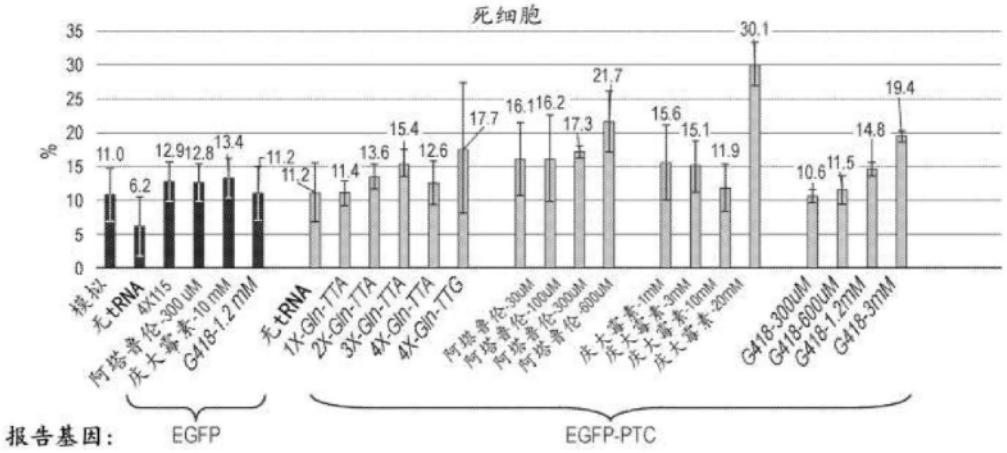

死细胞
%
35
30
25
20
15
10
5
0
11.0
6.2
12.9
12.8
13.4
11.2
11.2
11.4
13.6
15.4
12.6
17.7
16.1
16.2
17.3
21.7
15.6
15.1
11.9
30.1
10.6
11.5
14.8
19.4
模拟
无tRNA
4X115
阿塔鲁伦-300 uM
庆大霉素-10 mM
G418-1.2 mM
无tRNA
1X-Gln-TTA
2X-Gln-TTA
3X-Gln-TTA
4X-Gln-TTA
4X-Gln-TTG
阿塔鲁伦-30uM
阿塔鲁伦-100uM
阿塔鲁伦-300uM
阿塔鲁伦-600uM
庆大霉素-1mM
庆大霉素-3mM
庆大霉素-10mM
庆大霉素-20mM
G418-300uM
G418-600uM
G418-1.2mM
G418-3mM
报告基因:
EGFP
EGFP-PTC

图 34

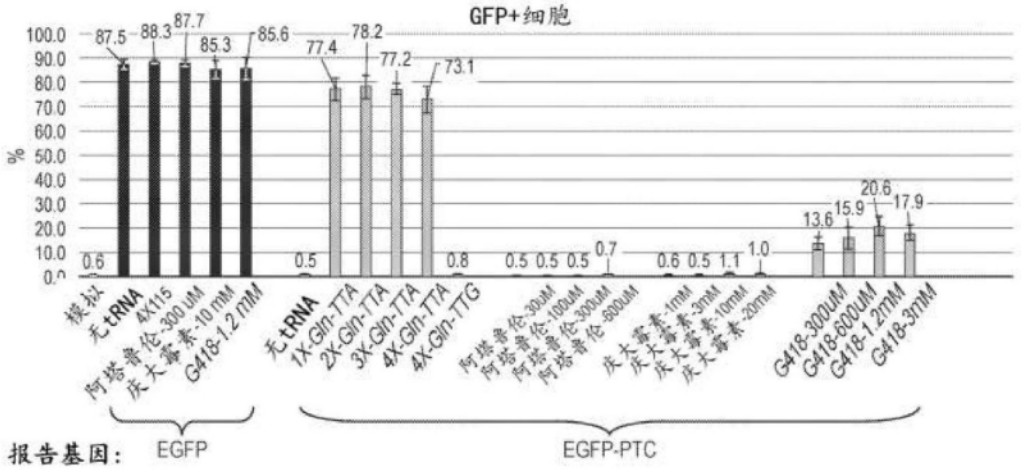

GFP+细胞
%
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
87.5
88.3
87.7
85.3
85.6
77.4
78.2
77.2
73.1
0.6
0.5
0.8
0.5
0.5
0.5
0.7
0.6
0.5
1.1
1.0
13.6
15.9
20.6
17.9
模拟
无tRNA
4X115
阿塔鲁伦-300 uM
庆大霉素-10 mM
G418-1.2 mM
无tRNA
1X-Gln-TTA
2X-Gln-TTA
3X-Gln-TTA
4X-Gln-TTA
4X-Gln-TTG
阿塔鲁伦-30uM
阿塔鲁伦-100uM
阿塔鲁伦-300uM
阿塔鲁伦-600uM
庆大霉素-1mM
庆大霉素-3mM
庆大霉素-10mM
庆大霉素-20mM
G418-300uM
G418-600uM
G418-1.2mM
G418-3mM
报告基因:
EGFP
EGFP-PTC

图 35

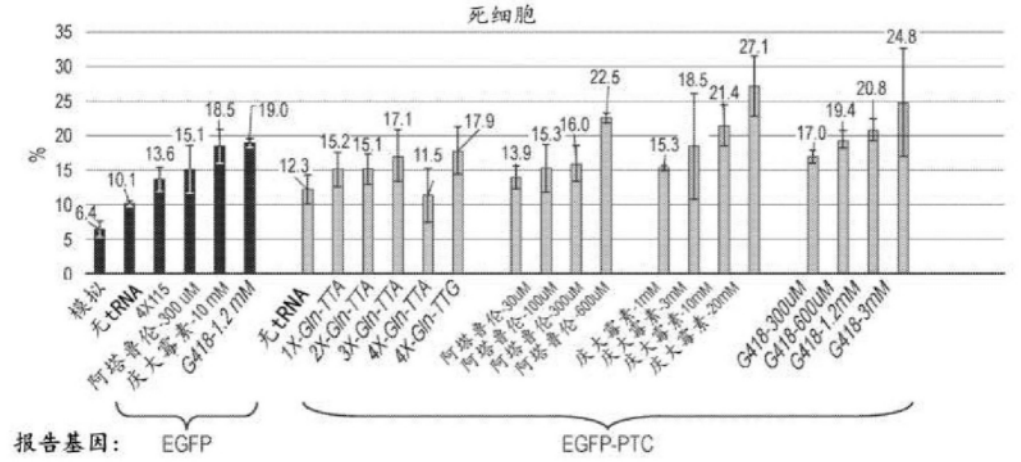

死细胞
%
35
30
25
20
15
10
5
0
6.4
10.1
13.6
15.1
18.5
19.0
12.3
15.2
15.1
17.1
11.5
17.9
13.9
15.3
16.0
22.5
15.3
18.5
21.4
27.1
17.0
19.4
20.8
24.8
模拟
无tRNA
4X115
阿塔鲁伦-300 uM
庆大霉素-10 mM
G418-1.2 mM
无tRNA
1X-Gln-TTA
2X-Gln-TTA
3X-Gln-TTA
4X-Gln-TTA
4X-Gln-TTG
阿塔鲁伦-30uM
阿塔鲁伦-100uM
阿塔鲁伦-300uM
阿塔鲁伦-600uM
庆大霉素-1mM
庆大霉素-3mM
庆大霉素-10mM
庆大霉素-20mM
G418-300uM
G418-600uM
G418-1.2mM
G418-3mM
报告基因:
EGFP
EGFP-PTC

图 36

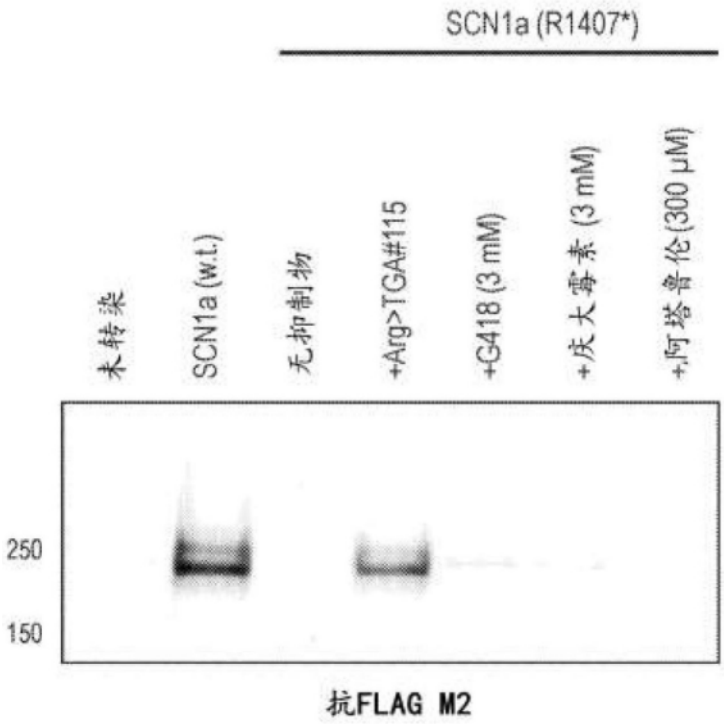

SCN1a (R1407*)
未转染
SCN1a (w.t.)
无抑制物
+Arg>TGA#115
+G418 (3 mM)
+庆大霉素 (3 mM)
+阿塔鲁伦 (300 μM)
250
150
抗FLAG M2

图 37A

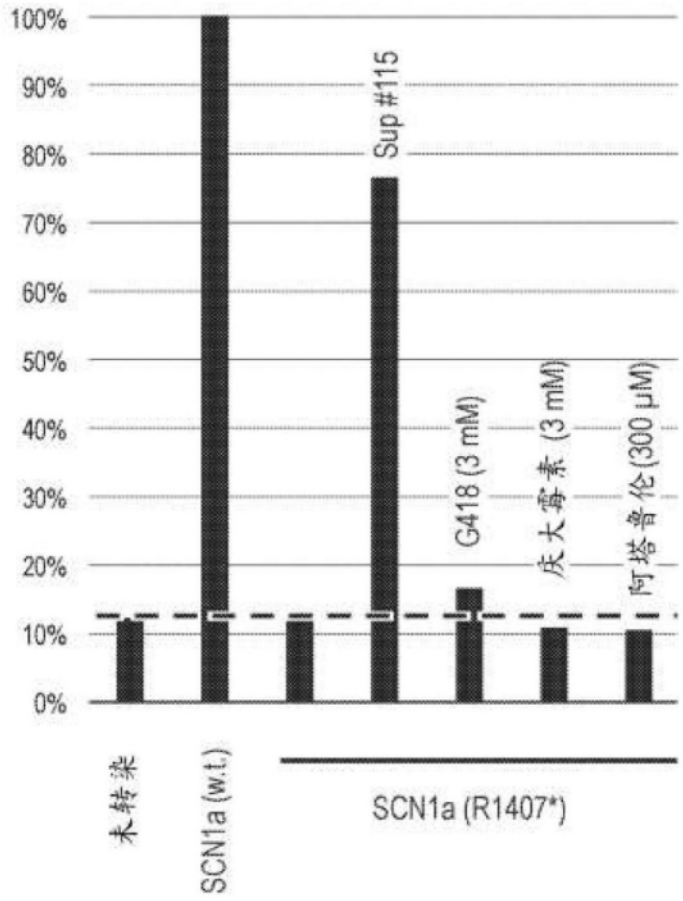

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Sup #115
G418 (3 mM)
庆大霉素 (3 mM)
阿塔鲁伦 (300 μM)
未转染
SCN1a (w.t.)
SCN1a (R1407*)

图 37B

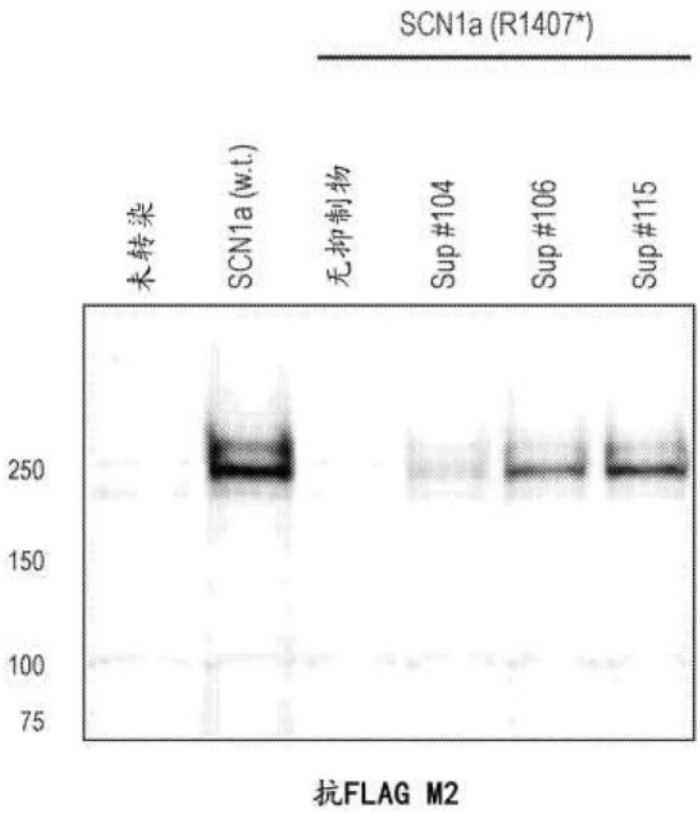

SCN1a (R1407*)
未转染
SCN1a (w.t.)
无抑制物
Sup #104
Sup #106
Sup #115
250
150
100
75
抗FLAG M2

图 38A

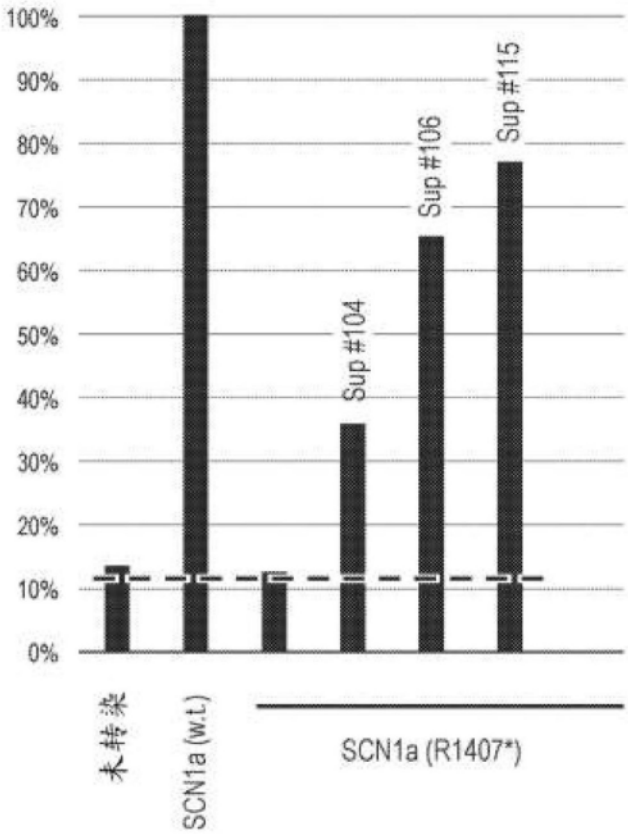

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Sup #104
Sup #106
Sup #115
未转染
SCN1a (w.t)
SCN1a (R1407*)

图 38B

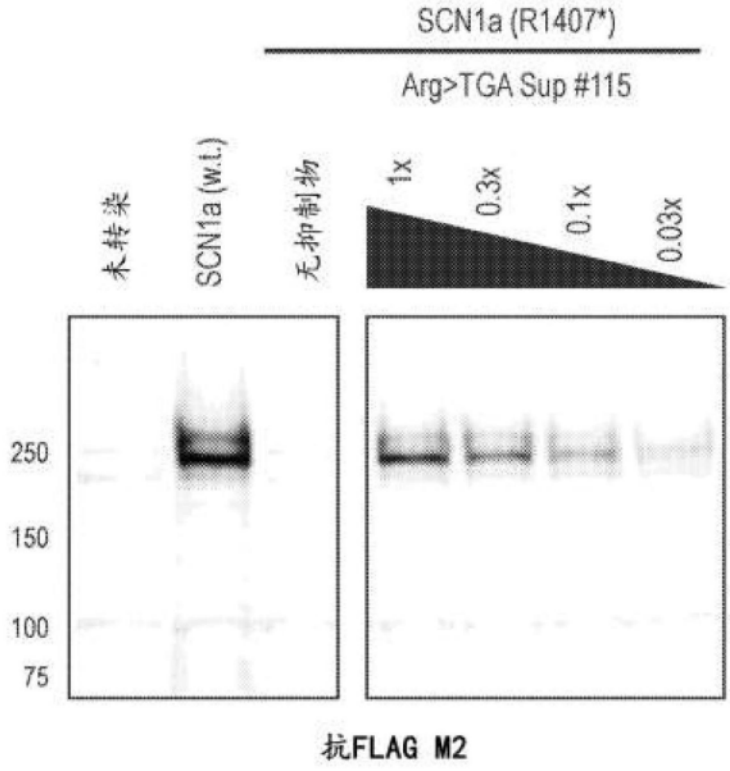

SCN1a (R1407*)
Arg>TGA Sup #115
未转染
SCN1a (w.t.)
无抑制物
1x
0.3x
0.1x
0.03x
250
150
100
75
抗FLAG M2

图 39A

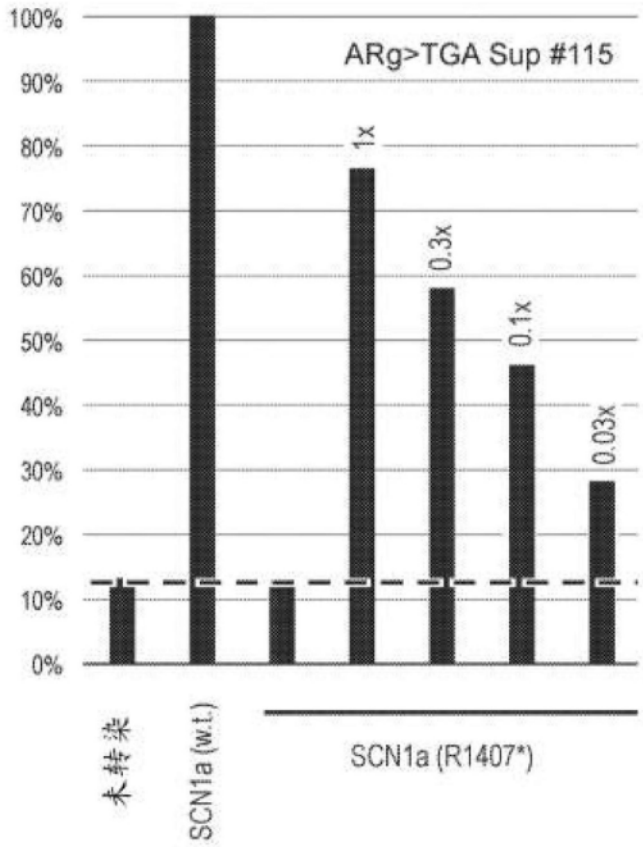

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
ARg>TGA Sup #115
1x
0.3x
0.1x
0.03x
未转染
SCN1a (w.t.)
SCN1a (R1407*)

图 39B

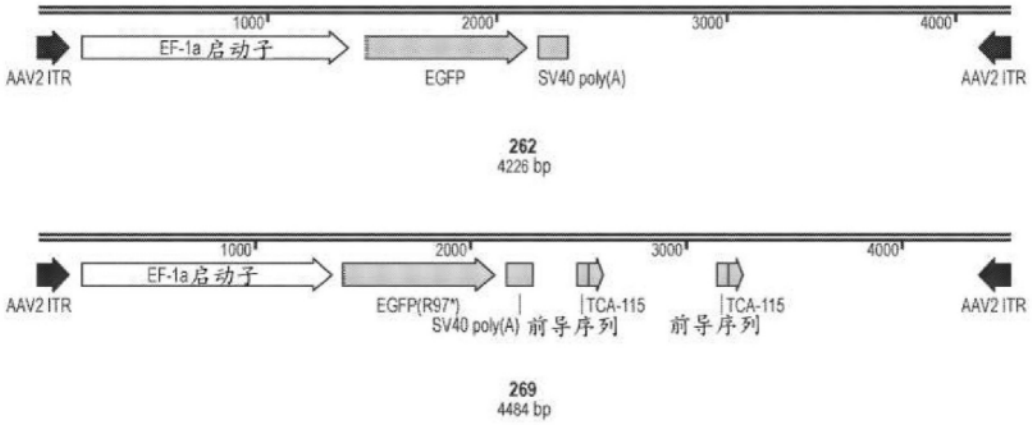

1000
2000
3000
4000
EF-1a 启动子
AAV2 ITR
EGFP
SV40 poly(A)
AAV2 ITR
262
4226 bp
1000
2000
3000
4000
EF-1a启动子
AAV2 ITR
EGFP(R97*)
SV40 poly(A)
TCA-115
前导序列
TCA-115
前导序列
AAV2 ITR
269
4484 bp

图 40

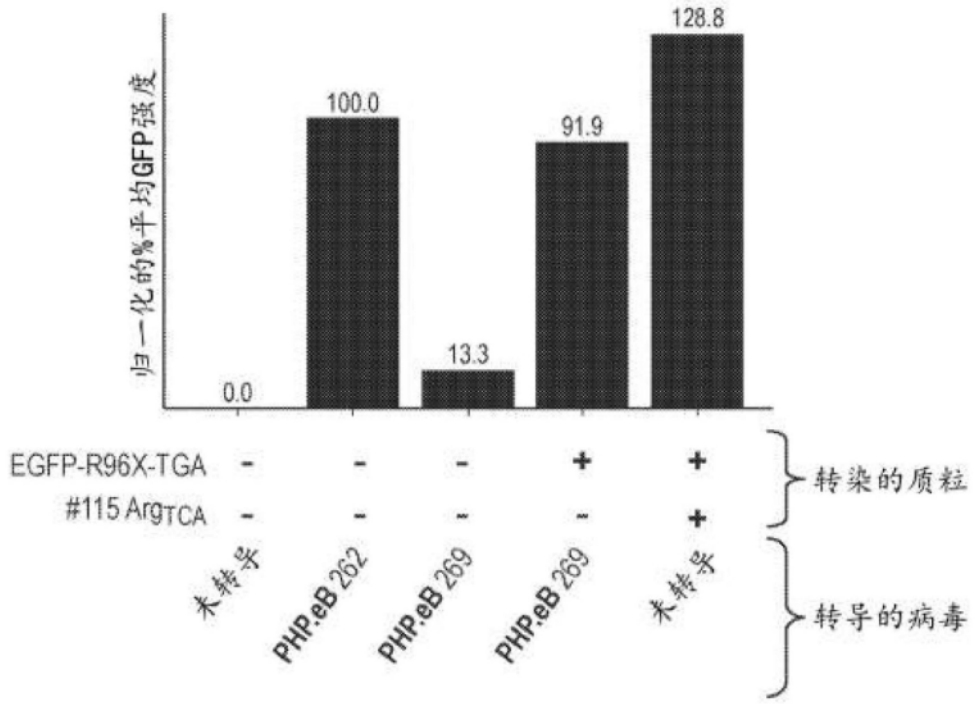

归一化的%平均GFP强度
128.8
100.0
91.9
13.3
0.0
EGFP-R96X-TGA - - - + +
#115 ArgTCA - - - - +
转染的质粒
未转导
PHP.eB 262
PHP.eB 269
PHP.eB 269
未转导
转导的病毒

图 41

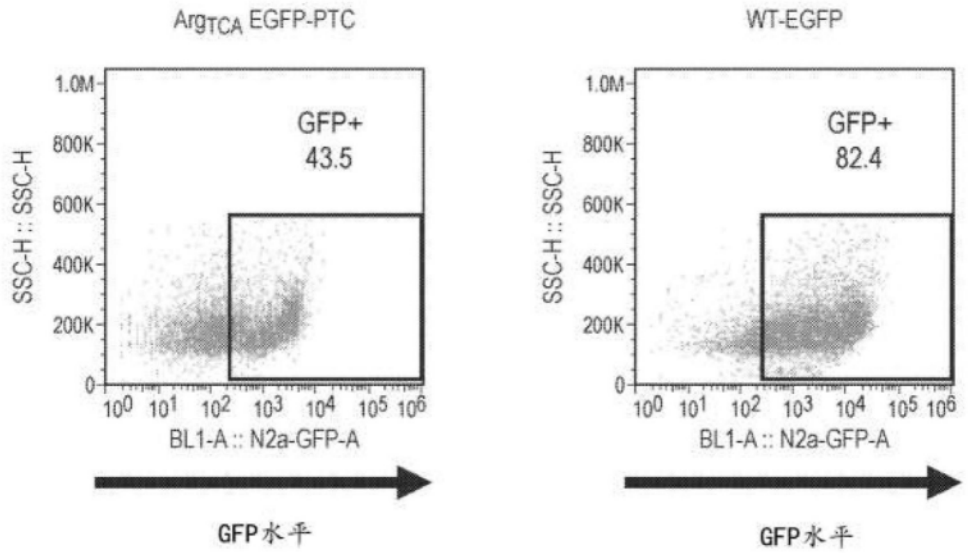

ArgTCA EGFP-PTC
WT-EGFP
GFP+
43.5
GFP+
82.4
SSC-H :: SSC-H
BL1-A :: N2a-GFP-A
GFP水平
GFP水平

图 42

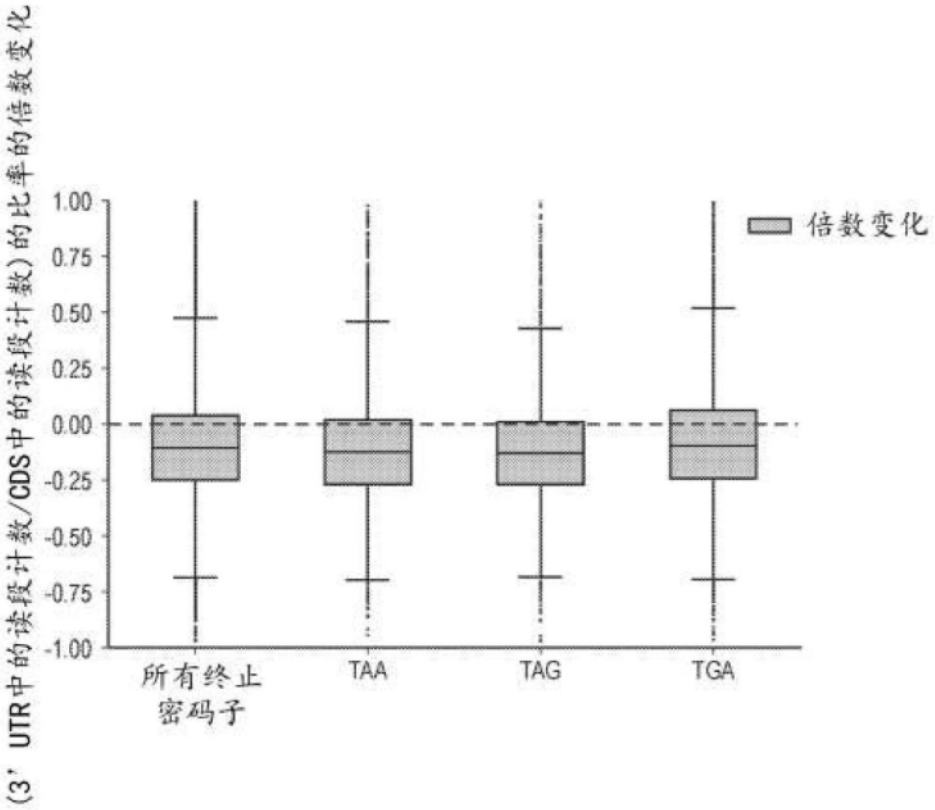

(3' UTR中的读段计数/CDS中的读段计数)的比率的倍数变化
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
-0.25
-0.50
-0.75
-1.00
倍数变化
所有终止密码子
TAA
TAG
TGA

图 43