



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116490216 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 25

(21) 申请号 202180058670.7 (72) 发明人 李龙承 姜武林 吴建成
(22) 申请日 2021.07.29 (74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
(66) 本国优先权数据 司 31100
PCT/CN2020/106200 2020.07.31 CN 专利代理师 杨昀 李政璋
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 (51) Int.Cl.
2023.01.30 A61K 48/00 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2021/109146 2021.07.29
(87) PCT国际申请的公布数据
W02022/022617 EN 2022.02.03
(71) 申请人 中美瑞康核酸技术(南通)研究院有
限公司
地址 226400 江苏省南通市如东县掘港街
道珠江路888号如东高新区生命健康
产业园18号楼
权利要求书2页 说明书45页
序列表79页
序列表(电子公布) 附图26页

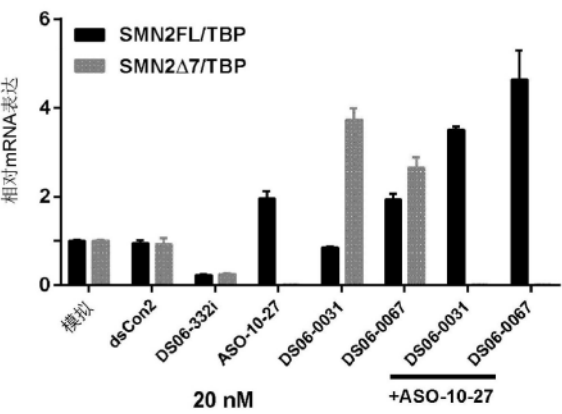
(54) 发明名称

SARNA和MRNA调节剂联合治疗SMA

(57) 摘要

本文提供了与(a)和(b)的组合相关的方法和组合物:(a)增加SMN2基因或蛋白表达的试剂和(b)增加功能性SMN2mRNA和SMN蛋白产生的SMN2mRNA剪接或稳定性调节剂,以及它们在治疗SMA和相关病症或疾病中的用途。在某些实施方式中,这些方法涉及使用SMN2saRNA和SMN2mRNA调节剂来减轻/减少SMA的症状。

GM03813中的RT-qPCR
(第3天)



1. 一种药物组合物,其包含下述的组合:
 - (a) 一种或多种增加SMN2基因或蛋白表达的试剂,和
 - (b) 一种或多种通过调节SMN2 mRNA剪接或稳定性来增加功能性SMN蛋白产生的试剂(SMN2 mRNA调节剂)。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中,所述一种或多种增加SMN2基因或蛋白表达的试剂中的至少一种选自saRNA、编码saRNA的重组载体和小分子化合物。
3. 如权利要求2所述的组合物,其中,所述一种或多种增加SMN2基因或蛋白表达的试剂中的至少一种是saRNA,并且其中所述saRNA包含正义链和反义链,或包含单链,或其混合物。
4. 如权利要求1所述的组合物,其中,所述一种或多种SMN2 mRNA调节剂是反义寡核苷酸(ASO)或小分子化合物。
5. 如权利要求4所述的组合物,其中,所述一种或多种SMN2 mRNA调节剂中的至少一种选自诺西那生(Nusinersen)、利司扑兰(Risdiplam)和布拉扑兰(Branaplam)。
6. 如权利要求2-3中任一项所述的组合物,其中,至少一种saRNA包含与下述区域中的片段在序列上至少90%相同的第一链:
 - (a) SMN2基因启动子-1639到-1481的区域(SEQ ID NO:472),
 - (b) SMN2基因启动子-1090到-1008的区域(SEQ ID NO:473),
 - (c) SMN2基因启动子-994到-180的区域(SEQ ID NO:474),或
 - (d) SMN2基因启动子-144到-37的区域(SEQ ID NO:475)。
7. 如权利要求6所述的组合物,其中,所述saRNA的第一链与长度为16-35个核苷酸的SMN2基因启动子区的片段具有至少75%的序列同源性或互补性。
8. 如权利要求6所述的组合物,其中,所述第一链的长度为16-35个核苷酸,并且当最佳比对时,与(a)、(b)、(c)或(d)之一中序列在序列上至少75%相同。
9. 如权利要求6-7中任一项所述的组合物,其中,所述saRNA的第一链与选自SEQ ID NO:315-471的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性或互补性。
10. 如权利要求6-7中任一项所述的组合物,其中,所述saRNA的正义链与选自SEQ ID NO:1-157的任何核苷酸序列具有至少75%的同源性,并且所述saRNA的反义链与选自SEQ ID NO:158-314的任何核苷酸序列具有至少75%的同源性。
11. 如权利要求10所述的组合物,其中,所述saRNA的正义链包含选自SEQ ID NO:1-157中任一项的核苷酸序列,并且其中所述saRNA的反义链包含选自SEQ ID NO:158-314中任一项的核苷酸序列。
12. 如权利要求6-11中任一项所述的组合物,其中,所述saRNA的至少一个核苷酸是经化学修饰的核苷酸。
13. 如权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物包含至少一种药学上可接受的运载体。
14. 如权利要求13所述的组合物,其中,所述至少一种药学上可接受的运载体选自水性运载体、脂质体、高分子聚合物和多肽。
15. 如权利要求1和13中任一项所述的组合物,其中,所述组合物包含下述组合:
 - a) 1-150nM的saRNA,和

b) 1-50nM的SMN2 mRNA调节剂。

16. 一种用于治疗个体中SMN缺陷相关病症或延缓其发作或进展的方法, 所述方法包括向所述个体给予有效量的权利要求1的药物组合物。

17. 如权利要求16所述方法, 其中, 所述药物组合物包含:

(a) 一种或多种增加SMN2基因或蛋白表达的试剂, 和

(b) 一种或多种通过调节SMN2 mRNA剪接或稳定性来增加功能性SMN蛋白产生的试剂(SMN2 mRNA调节剂);

其中所述一种或多种增加SMN2基因或蛋白表达的试剂中的至少一种是saRNA, 并且其中所述一种或多种SMN2 mRNA调节剂中的至少一种是反义寡核苷酸(ASO)。

18. 如权利要求17所述的方法, 其中, 所述一种或多种SMN2 mRNA调节剂中的至少一种选自诺西那生、利司扑兰和布拉扑兰。

19. 如权利要求16所述的方法, 其中, 所述个体患有SMA病症。

20. 如权利要求19所述的方法, 其中, 所述患有SMA的个体的SMN全长蛋白表达降低或异常。

21. 如权利要求17所述的方法, 其中, 至少一种saRNA包含与下述区域中的片段在序列上至少90%相同的第一链:

(a) SMN2基因启动子-1639到-1481的区域(SEQ ID NO:472),

(b) SMN2基因启动子-1090到-1008的区域(SEQ ID NO:473),

(c) SMN2基因启动子-994到-180的区域(SEQ ID NO:474), 或

(d) SMN2基因启动子-144到-37的区域(SEQ ID NO:475)。

22. 如权利要求21所述的方法, 其中, 所述saRNA的第一链与选自SEQ ID NO:315-471的任何核苷酸序列具有至少75%的序列同源性或互补性。

23. 如权利要求21-22中任一项所述的方法, 其中, 所述saRNA的正义链与选自SEQ ID NO:1-157的任何核苷酸序列具有至少75%的同源性, 并且所述saRNA的反义链与选自SEQ ID NO:158-314的任何核苷酸序列具有至少75%的同源性。

24. 如权利要求23所述的方法, 其中, 所述saRNA的正义链包含选自SEQ ID NO:1-157中任一项的核苷酸序列, 并且其中所述saRNA的反义链包含选自SEQ ID NO:158-314中任一项的核苷酸序列。

25. 如权利要求21-24中任一项所述的方法, 其中, 所述saRNA的至少一个核苷酸是经化学修饰的核苷酸。

SARNA和MRNA调节剂联合治疗SMA

1. 交叉引用

[0001] 本申请要求2020年7月31日提交的PCT专利申请号PCT/CN2020/106200的优先权，其公开内容通过引用其全文纳入本文。

2. 通过引用纳入以文本文件提供的序列列表

[0002] 本文以创建于2021年7月30日且大小为81Kb的“SMN2-Combo sequence listing_ST25 final”文本文件提交序列列表。该文本文件的内容通过引用其全文方式纳入本文。

3. 背景技术

[0003] 脊髓性肌萎缩症(SMA)是一种常染色体隐性遗传病，其以约1/6000-8000影响新生儿，是婴儿死亡的主要遗传原因。SMA由存活运动神经元(survival motor neuron, SMN)蛋白水平降低引起，该降低是由于染色体5q13.4上存活运动神经元基因(SMN1)端粒拷贝的纯合缺失或突变所致。

[0004] SMN蛋白由两个SMN基因(SMN1和SMN2)编码，两者的本质区别在于其编码序列的外显子7中的一个核苷酸的差异，其中SMN2基因中的胞嘧啶(C)变为胸腺嘧啶(T) (Covert, D.D., 等, 脊髓性肌萎缩症中的存活运动神经元蛋白(The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy). Human Mol Genet(1997))。这一关键差异产生了隐匿剪接位点并导致约90%转录自SMN2基因的成熟SMN mRNA中的外显子7被跳读。缺少外显子7的SMN2mRNA (SMN2 Δ 7) 产生截短的SMN蛋白，该蛋白不稳定并且会迅速降解。在SMA患者中，SMN1基因不再产生任何SMN蛋白，并且SMN2所产生的全长SMN蛋白的数量不足以弥补SMN1的丢失，这导致骨髓前角中运动神经元的细胞凋亡性死亡、骨骼肌萎缩以及随之而来的虚弱(Monani, U.R., 等, 人着丝粒存活运动神经元基因(SMN2)挽救Smn(-/-)小鼠的胚胎致死率并在小鼠中导致脊髓性肌萎缩症(). Human Mol Genet(2000))。SMA患者症状的严重程度取决于患者细胞中SMN2基因的拷贝数——拷贝数越多，严重症状越轻(Harada, Y., 等SMN2拷贝数与脊髓性肌萎缩症临床表型之间的相关性: 三个SMN2拷贝无法使一些患者免受疾病严重程度的影响(Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity). J Neurol(2002))。

[0005] 为了开发SMA的治疗方法，一种策略是使用剪接调节剂(SM)在剪接过程中刺激外显子7包含。就此而言，反义寡核苷酸(ASO)药物**Spinraza®**已获美国食品和药物管理局(FDA)批准上市(Hua, Y. 和A.R.Krainer. 反义介导的外显子包含. Methods Mol Biol(2012) 和Stein, C.A. 和D.Castanotto. 2017年FDA批准的寡核苷酸疗法(FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017). Mol Thera(2017))。另一种药物利司扑兰(Risdiplam, RG7916)是一种在研口服小分子药物，其正在向FDA提交新药申请(NDA) (Ramdas, S. 和L.Servais. 脊髓性肌萎缩症的新治疗: 当前可用数据综述(New treatments in spinal muscular atrophy: an overview of currently available data). Expert Opin Pharmac(2020))。这两种药物通过显著延长患者的生存期并改善运动里程碑改变了

SMA的治疗。尽管存在这些改善,但是接受治疗的患者,特别是儿童,仍远未过上正常生活。几个似乎合理的原因可以解释SM的功效不足。一个是天花板效应,其限制了通过治疗恢复的全长SMN蛋白可达到的最大水平。SM对SMN2转录没有影响,因此不会增加可用SMN2前体mRNA的数量。为了使SMN蛋白恢复至其正常生理水平,SM在将SMN2 Δ 7mRNA转化为全长mRNA的体内效率最好达到100%,这是现实中不太可能发生的理想效果。因此,SM可为患者提供的最大功效受到SMN2前体mRNA可用性的限制。

[0006] 治疗SMA的另一种治疗方法涉及刺激SMN2转录以增加全长SMN蛋白的水平。此前,已在体外和小鼠SMA模型中测试了各种表观遗传修饰剂,诸如组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂(例如丁酸钠、丙戊酸)和非HDAC抑制剂(例如羟基脲、塞来昔布、沙丁胺醇等),但它们都未能证明显著的临床疗效(Lunke, S. 和 A. El-Osta. 表观遗传修饰和染色质重塑在脊髓性肌萎缩症中的新兴作用(The emerging role of epigenetic modifications and chromatin remodeling in spinal muscular atrophy). J Neurochem(2009))。对于失败的一个解释是表观遗传修饰剂缺少靶标特异性。需要改进的方法和组合物来治疗SMN缺陷相关病症,例如脊髓性肌萎缩症。

4. 发明概述

[0007] 已证明靶向基因调控序列(包括启动子)的双链RNA(dsRNA)通过称为RNA激活(RNAa)的机制在转录水平上以序列特异性方式上调靶基因(Li, L.C., 等, 小dsRNA在人细胞中诱导转录激活(Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells). PNAS(2006))。这类dsRNA称为小激活RNA(saRNA)。通过引用其全部内容纳入本文的先前的专利公开(PCT/CN2019/129025)描述了靶向SMN2启动子的功能性saRNA的鉴定,并描述了它们在正常人细胞和源自SMA患者的原代细胞中诱导SMN2 mRNA表达中的活性。

[0008] 本公开的实施方式部分基于令人惊讶的发现,即(a)一种或多种激活或上调细胞中SMN2基因表达的小激活核糖核酸(saRNA)(本文称为“SMN2saRNA”)和(b)一种或多种增加功能性SMN2 mRNA产生的SMN2 mRNA剪接或稳定性调节剂(本文称为“SMN2 mRNA调节剂”),这两者的组合可以实现全长SMN2 mRNA和全长SMN蛋白水平的显著增加。相较于单一疗法,该联合治疗策略可以提供治疗益处增强,并因此可以使治疗结果最大化,例如,对于SMA患者。

[0009] 在某些方面中,提供了用于治疗个体中SMN缺陷相关病症诸如SMA或延缓所述病症发作或进展的药物组合物,该组合物包含这样的组合:

(a) 一种或多种增加SMN2基因或蛋白表达的试剂,和

(b) 一种或多种增加功能性SMN2 mRNA产生的SMN2 mRNA剪接或稳定性调节剂。

[0010] 在某些实施方式中,增加SMN2基因或蛋白表达的试剂可以包括具有这类活性的任何合适的试剂,包括大分子和小分子。大分子的示例是蛋白质、蛋白质复合物和糖蛋白、核酸,例如DNA、RNA和PNA(肽核酸)。小分子的示例是肽、模拟肽(例如类肽)、氨基酸、氨基酸类似物、多核苷酸、多核苷酸类似物、核苷酸、核苷酸类似物、有机或无机化合物,例如杂有机或有机金属化合物。可以通过本文所述的方法连续或同时组合使用这些试剂中的任一种。

[0011] 在某些实施方式中,增加SMN2基因或蛋白表达的试剂是至少一种saRNA(本文称为“SMN2 saRNA”)或其重组载体或至少一种小分子化合物。在特定实施方式中,增加SMN2基因或蛋白表达的试剂是至少一种SMN2 saRNA。在某些实施方式中,SMN2 saRNA包含正义链和

反义链,或包含单链,或其混合物。

[0012] 在本公开的某些实施方式中,SMN2 mRNA调节剂是反义寡核苷酸(ASO)或小分子,例如哒嗪衍生物。在本公开的某些实施方式中,SMN2 mRNA调节剂选自诺西那生(Nusinersen) (**Spinraza®**,本文中也称为ASO-10-27)、利司扑兰(Risdiplam)、瑞格色替(Rigosertib)和布拉扑兰(Branaplam)。

[0013] 在本公开的某些实施方式中,SMN2 saRNA包含第一链,其与如下区域至少90%相同:(a) SMN2基因启动子-1639到-1481的区域(SEQ ID NO:472), (b) SMN2基因启动子-1090至-1008的区域(SEQ ID NO:473), (c) SMN2基因启动子-994至-180的区域(SEQ ID NO:474), 或(d) SMN2基因启动子-144到-37的区域(SEQ ID NO:475)。

[0014] 在本公开的某些实施方式中,SMN2 saRNA的第一链与长度为16-35个核苷酸的SMN2基因启动子区域片段具有至少75%的同源性或互补性。

[0015] 在本公开的某些实施方式中,SMN2 saRNA分子的第一链与选自SEQ ID NO:315-471的任何核苷酸序列具有至少75%的同源性或互补性。

[0016] 在本公开的某些实施方式中,正义链与选自SEQ ID NO:1-157的任何核苷酸序列具有至少75%的同源性,反义链与选自SEQ ID NO:158-314的任何核苷酸序列具有至少75%的同源性。

[0017] 在本公开的某些实施方式中,正义链包含选自SEQ ID NO:1-157中任一项的核苷酸序列,并且其中反义链包含选自SEQ ID NO:158-314中任一项的核苷酸序列。

[0018] 在本公开的某些实施方式中,至少一种核苷酸是化学修饰的核苷酸。

[0019] 在某些实施方式中,本文提供的组合物还包含一种或多种药学上可接受的运载体,例如水性运载体、脂质体、高分子聚合物或多肽。

[0020] 在本公开的某些实施方式中,组合物包含1-150nM的SMN2 saRNA和1-50nM的ASO SMN2 mRNA调节剂。

[0021] 在本公开的某些实施方式中,组合物包含1-150nM的SMN2 saRNA和1-3000nM的小分子哒嗪衍生物SMN2 mRNA调节剂,例如利司扑兰。在某些实施方式中,组合物包含300-2000nM利司扑兰;相较于处理前进行的基线测量值或相较于未处理的细胞群,该组合物使经处理的细胞中全长SMN蛋白的量增加至少10%。在进一步的实施方式中,相较于处理前采集的基线测量值,本公开的组合物降低经处理的细胞中SMN2 $\Delta 7$ 的量。

[0022] 在本公开的某些实施方式中,SMN2 saRNA是DS06-0004(也称为RAG6-281)、DS06-0031(也称为RAG6-1266)或DS06-0067(也称为RAG6-293)。

[0023] 本公开的某些实施方式涉及用于治疗个体中SMN缺陷相关病症或延缓其发作或进展的方法,该方法包括给予所述个体有效量的药物组合物,所述药物组合物包含(a)一种或多种增加SMN2基因或蛋白表达的试剂,和(b)一种或多种增加功能性SMN2 mRNA产生的SMN2 mRNA剪接或稳定性调节剂。在本文提供的方法的某些实施方式中,增加SMN2基因或蛋白表达的试剂是saRNA(本文称为“SMN2 saRNA”)或其重组载体,或者是小分子化合物。在本文提供的方法的某些实施方式中,SMN2 mRNA调节剂是反义寡核苷酸(ASO)或小分子化合物,例如哒嗪衍生物。在本公开的某些实施方式中,SMN2 mRNA调节剂选自诺西那生(Nusinersen) (**Spinraza®**,本文也称为ASO-10-27)、利司扑兰(Risdiplam)、瑞格色替(Rigosertib)和布拉扑兰(Branaplam)。

[0024] 在本文提供的方法的某些实施方式中,SMN2 saRNA包含一条链,其与如下区域至少90%相同:SMN2基因启动子-1639到-1481的区域(SEQ ID NO:472)、SMN2基因启动子-1090至-1008的区域(SEQ ID NO:473)、SMN2基因启动子-994至-180的区域(SEQ ID NO:474)或SMN2基因启动子-144到-37的区域(SEQ ID NO:475)。

[0025] 在本文提供的方法的某些实施方式中,SMN2 saRNA的一条链与长度为16-35个核苷酸的SMN2基因启动子区域片段具有至少75%的同源性或互补性。

[0026] 在本文所述的任何实施方式中,个体患有SMA病症。在进一步的实施方式中,患有SMA的个体的SMN全长蛋白表达降低或异常。

5.附图简要说明

[0027] 图1显示了SMN2基因结构、saRNA靶位置和PCR引物位置。图1A显示了SMN2基因结构及其2kb启动子区域。saRNA DS06-0004、DS06-0067和DS06-0031的靶位点分别在相对于SMN2转录起始位点(TSS)的-281、-293和-1266位置指示。图1B显示了用于RT-qPCR(SMN2FL F+SMN2FL R, SMN Δ 7F+SMN Δ 7R)和半定量RT-PCR(SMN-exon6-F+SMN-exon8-R)的PCR引物的位置。

[0028] 图2显示了SMN1和SMN2基因之间的差异和半定量RT-PCR/DdeI消化试验的示意图。SMN2外显子8中的G $\rightarrow$ A变体为DdeI限制酶(A)创建了识别位点。PCR引物对SMN-exon6-F和SMN-exon8-R扩增507bp产物(SMN2FL)和453bp产物(SMN Δ 7)。为了区分SMN1和SMN2产品,DdeI消化将SMN2FL产物切割成392bp和115bp片段(B),并将SMN Δ 7产物切割成338bp和115bp片段(C)。

[0029] 图3A-3G显示了saRNA(DS06-0004)、ASO-10-27和利司扑兰对GM03813细胞中全长(SMN2FL)和外显子7跳读(SMN Δ 7) SMN2 mRNA表达的作用。用指定浓度的ASO-10-27、saRNA(DS06-0004)和利司扑兰处理GM03813细胞72小时。模拟样品作为对照处理,在寡核苷酸不存在的情况下进行转染。在单独的PCR反应中使用两对引物通过RT-qPCR确定SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图3A-3C显示了通过RT-qPCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图3D显示了通过半定量PCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。SMN2的PCR产物通过DdeI酶消化并在2%琼脂糖凝胶上分离。还扩增了TBP基因作为RNA加载的对照。图3E-3G显示了源自图3D中PCR产物条带强度定量的SMN2FL和SMN Δ 7水平。值(y轴)是在标准化至TBP条带强度后相对于模拟处理的SMN2条带强度。SMN2FL,消化后的SMN2全长PCR产物(392bp);SMN Δ 7,消化后的SMN外显子7跳读PCR产物(338bp);梯标:100bp DNA标志物。

[0030] 图4A-4E显示了saRNA(DS06-0004)和ASO-10-27对GM00232细胞中SMN2FL和SMN Δ 7 SMN2 mRNA表达的联合作用。ASO-10-27和DS06-0004以指定浓度单独或组合转染到GM00232细胞中72小时。模拟样品作为对照处理,在寡核苷酸不存在的情况下进行转染。使用Qiagen RNeasy试剂盒从经处理的细胞中提取总细胞RNA用于逆转录以获得cDNA,然后通过RT-qPCR测定SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图4A和4D显示了通过RT-qPCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图4B显示了通过半定量PCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。SMN2的PCR产物通过DdeI酶消化并在2%琼脂糖凝胶上分离。还扩增了TBP基因作为RNA加载的对照。图4C和4E显示了源自图4B中PCR产物条带强度定量的SMN2FL和SMN Δ 7水平。值(y轴)是标准化至TBP后相对于模拟处理的SMN2FL和SMN Δ 7条带强度。SMN2FL,消化后的SMN2全长PCR产物(392bp);SMN Δ 7,消化后的SMN外显子7跳读PCR产物(338bp),ASO,ASO-10-27。

[0031] 图5A-5C显示了saRNA(DS06-0004)和ASO-10-27对I型SMA细胞GM00232中全长SMN蛋白表达的联合作用。ASO-10-27和DS06-0004以指定浓度单独或组合转染到GM00232细胞中72小时。模拟样品作为对照处理,在寡核苷酸不存在的情况下进行转染。从经处理的细胞收获蛋白质,并使用针对人SMN蛋白的抗体通过Western印迹试验进行免疫印迹。针对 α/β -微管蛋白的抗体也经印迹以用作蛋白质加载的对照。图5A显示了模拟处理和经ASO-10-27单独处理或其与DS06-0004的组合处理的细胞的SMN蛋白表达。图5B显示了模拟处理和经DS06-0004单独处理或其与ASO-10-27的组合处理的细胞的SMN蛋白表达。图5C显示源自图5A和5B条带强度定量的SMN蛋白水平的相对倍数变化。值(y轴)是标准化至 α/β -微管蛋白条带强度后SMN蛋白的相对条带强度。ASO, ASO-10-27。

[0032] 图6A-6E显示了saRNA(DS06-0004)和ASO-10-27对GM03813细胞中SMN2FL和SMN Δ 7 SMN2 mRNA表达的联合作用。ASO-10-27和DS06-0004以指定浓度单独或组合转染到GM03813细胞中72小时。模拟样品作为对照处理,在寡核苷酸不存在的情况下进行转染。使用Qiagen RNeasy试剂盒从经处理的细胞中提取总细胞RNA用于逆转录以获得cDNA,然后通过RT-qPCR测定SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图6A和6D显示了通过RT-qPCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图6B显示了通过半定量PCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。SMN2的PCR产物通过DdeI酶消化并在2%琼脂糖凝胶上分离。还扩增了TBP基因作为RNA加载的对照。图6C和6E显示了源自图6B中PCR产物条带强度定量的SMN2FL和SMN Δ 7水平。值(y轴)是标准化至TBP后相对于模拟处理的SMN2FL和SMN Δ 7条带强度。SMN2FL,消化后的SMN2全长PCR产物(392bp); SMN Δ 7,消化后的SMN外显子7跳读PCR产物(338bp), ASO, ASO-10-27。

[0033] 图7A-7C显示了saRNA(DS06-0004)和ASO-10-27对II型SMA细胞GM03813中全长SMN蛋白表达的联合作用。ASO-10-27和DS06-0004以指定浓度单独或组合转染到GM00232细胞中72小时。模拟样品作为对照处理,在寡核苷酸不存在的情况下进行转染。从经处理的细胞收获蛋白质,并使用针对人SMN蛋白的抗体通过Western印迹试验进行免疫印迹。针对 α/β -微管蛋白的抗体也经印迹以用作蛋白质加载的对照。图7A显示了模拟处理和经ASO-10-27单独处理或其与DS06-0004的组合处理的细胞的SMN蛋白表达。图7B显示了模拟处理和经DS06-0004单独处理或其与ASO-10-27的组合处理的细胞的SMN蛋白表达。图7C显示源自图7A和7B条带强度定量的SMN蛋白水平的相对倍数变化。值(y轴)是标准化至 α/β -微管蛋白条带强度后SMN蛋白的相对条带强度。ASO, ASO-10-27。

[0034] 图8A-8F显示了saRNA(DS06-0004)和利司扑兰对GM00232细胞中SMN2FL和SMN Δ 7 SMN2 mRNA表达的联合作用。利司扑兰和DS06-0004以指定浓度单独或组合转染到GM00232细胞中72小时。DMSO样品用作利司扑兰的载剂对照,作为saRNA转染对照的模拟处理在寡核苷酸不存在的情况下进行转染。使用Qiagen RNeasy试剂盒从经处理的细胞中提取总细胞RNA用于逆转录以获得cDNA,然后通过RT-qPCR测定SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图8A显示了通过RT-qPCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图8B和8C显示了用不同浓度的DS06-0004和利司扑兰联合处理的细胞中的相对SMN2FL mRNA水平。图8D显示了通过半定量PCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。SMN2的PCR产物通过DdeI酶消化并在2%琼脂糖凝胶上分离。还扩增了TBP基因作为RNA加载的对照。图8E和8F显示了源自图8D中PCR产物条带强度定量的SMN2FL水平。值(y轴)是在标准化至TBP条带强度后相对于模拟或DMSO处理的SMN2FL和SMN Δ 7条带强度。SMN2FL,消化后的SMN2全长PCR产物(392bp); SMN Δ 7,消化后的SMN外显

子7跳读PCR产物(338bp)。

[0035] 图9A-9B显示了saRNA(DS06-0004)和利司扑兰对I型SMA细胞GM00232中全长SMN蛋白表达的联合作用。利司扑兰和DS06-0004以指定浓度单独或组合转染到GM00232细胞中72小时。DMSO样品用作利司扑兰的载剂对照,作为saRNA转染对照的模拟处理在寡核苷酸不存在的情况下进行转染。从经处理的细胞收获蛋白质,并使用针对人SMN蛋白的抗体通过Western印迹试验进行免疫印迹。针对 α/β -微管蛋白的抗体也经印迹以用作蛋白质加载的对照。图9A显示了DMSO处理和经利司扑兰单独处理或其与DS06-0004的组合处理的细胞的SMN蛋白表达。图9B显示源自图9A条带强度定量的SMN蛋白水平的相对倍数变化。值(y轴)是标准化至 α/β -微管蛋白条带强度后SMN蛋白的相对条带强度。

[0036] 图10A-10F显示了saRNA(DS06-0004)和利司扑兰对GM03813细胞中SMN2FL和SMN Δ 7 SMN2 mRNA表达的联合作用。利司扑兰和DS06-0004以指定浓度单独或组合转染到GM03813细胞中72小时。DMSO样品用作利司扑兰的载剂对照,作为saRNA转染对照的模拟处理在寡核苷酸不存在的情况下进行转染。使用Qiagen RNeasy试剂盒从经处理的细胞中提取总细胞RNA用于逆转录以获得cDNA,然后通过RT-qPCR测定SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图10A显示了通过RT-qPCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图10B和6C显示了用不同浓度的DS06-0004和利司扑兰联合处理的细胞中的相对SMN2FL mRNA水平。图10D显示了通过半定量PCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。SMN2的PCR产物通过DdeI酶消化并在2%琼脂糖凝胶上分离。还扩增了TBP基因作为RNA加载的对照。图10E和10F显示了源自图10D中PCR产物条带强度定量的SMN2FL水平。值(y轴)是在标准化至TBP后相对于模拟或DMSO处理的SMN2FL和SMN Δ 7条带强度。

SMN2FL,消化后的SMN2全长PCR产物(392bp);SMN Δ 7,消化后的SMN外显子7跳读PCR产物(338bp)。

[0037] 图11A-11B显示了saRNA(DS06-0004)和利司扑兰对II型SMA细胞GM03813中全长SMN蛋白表达的联合作用。利司扑兰和DS06-0004以指定浓度单独或组合转染到GM03813细胞中72小时。DMSO样品用作利司扑兰的载剂对照,作为saRNA转染对照的模拟处理在寡核苷酸不存在的情况下进行转染。从经处理的细胞收获蛋白质,并使用针对人SMN蛋白的抗体通过Western印迹试验进行免疫印迹。针对 α/β -微管蛋白的抗体也经印迹以用作蛋白质加载的对照。图11A显示了模拟处理和经利司扑兰单独处理或其与DS06-0004的组合处理的细胞的SMN蛋白表达。图11B显示源自图11A定量条带强度的SMN蛋白水平的相对倍数变化。值(y轴)是标准化至 α/β -微管蛋白条带强度后SMN蛋白的相对条带强度。

[0038] 图12A-12E显示了saRNA(DS06-0031和DS06-0067)和ASO-10-27对GM03813细胞中SMN2FL和SMN Δ 7 SMN2 mRNA表达的联合作用。DS06-0031或DS06-0067单独或与ASO-10-27联合以10nM转染到GM03813细胞中72小时。模拟样品作为对照处理,在寡核苷酸不存在的情况下进行转染。dsCon2作为不相关的寡核苷酸对照转染。DS06-332i是SMN2的siRNA并作为对照处理进行转染。使用Qiagen RNeasy试剂盒从经处理的细胞中提取总细胞RNA用于逆转录以获得cDNA,然后通过RT-qPCR或半定量RT-PCR测定SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。从经处理的细胞收获蛋白质,并使用针对人SMN蛋白的抗体通过Western印迹试验进行免疫印迹。针对 α/β -微管蛋白的抗体也经印迹以用作蛋白质加载的对照。图12A显示了通过RT-qPCR确定的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图12B显示了通过半定量PCR确定并在2%琼脂糖凝胶上

分离的SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。还扩增了TBP基因作为RNA加载的对照。图12C显示了源自图12B中定量PCR产物条带强度的SMN2FL和SMN2 Δ 7 mRNA水平。值(y轴)是标准化至TBP后相对于模拟处理的SMN2FL和SMN2 Δ 7条带强度。SMN2FL, SMN2全长PCR产物(507bp); SMN Δ 7, SMN外显子7跳读PCR产物(453bp)。图12D显示了SMN蛋白表达的Western印迹。图12E显示源自图12D条带强度定量的SMN蛋白水平的相对倍数变化。值(y轴)是标准化至 α/β -微管蛋白条带强度后SMN蛋白的相对条带强度。

[0039] 图13A-13C显示了saRNA (LNP-R6-04M1) 和LNP-ASO-10-27或利司扑兰对SMA III型小鼠中全长(SMN2FL) 和外显子7跳读(SMN2 Δ 7) SMN2 mRNA表达的联合作用。三组SMA III型小鼠这样处理: 处理组1 (n=3) ——在出生后第1天(P1, 10 μ g) 和出生后第3天(P3, 10 μ g) 单独给予LNP-R6-04M1; 处理组2 (n=3) ——给予与LNP-ASO-10-27联合的LNP-R6-04M1 (P1, 10 μ g和P3, 10 μ g); 和处理组3 (n=3) ——以指定浓度通过侧脑室注射(ICV) 给予LNP-R6-04M1和利司扑兰(0.3mg/kg、1mg/kg和3mg/kg)。用生理盐水处理的小鼠用作非处理对照。处理后, 使用Qiagen RNeasy试剂盒从两个组织(大脑和肝脏) 分离RNA用于逆转录以获得cDNA, 然后通过RT-qPCR确定SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图13A显示了通过RT-qPCR确定的SMA III型小鼠中SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图13B显示了通过RT-qPCR确定的SMA III型小鼠中SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。图13C显示了通过RT-qPCR确定的SMA III型小鼠脊髓中SMN2FL和SMN Δ 7的mRNA水平。SMN2FL和SMN2 Δ 7 mRNA水平显示为标准化至Tbp参考水平后相对于生理盐水处理的三只动物/组(n=3~7) 的平均值。

6. 具体实施方式

[0040] 本发明基于与激活/上调SMN2基因表达和增加全长SMN2表达量以改善SMN缺陷相关病症的治疗效果的方法相关的研究。

[0041] 在本公开中, 我们进一步表明, 用SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂(例如ASO, 诸如诺西那生或小啞嗪衍生物(包括但不限于利司扑兰和布拉扑兰)) 联合治疗SMA患者细胞可以实现相比单独使用任一化合物所能达到的水平显著更高的全长SMN2 mRNA和SMN蛋白水平。该联合治疗策略相较于单一疗法可以提供增强的治疗益处, 例如, 改善诊断患有SMN缺陷相关病症的患者的临床症状, 或减少与单一疗法相关联的不良副作用, 并因此使患者例如SMA患者的治疗结果最大化。

[0042] 除非另外定义, 本文中所使用的所有技术和科学术语都具有本发明所属领域普通技术人员通常所理解的同样含义。

[0043] 在本申请中, 单数形式, 例如“一个/种”和“该”包括复数对象, 除非在上下文中另行明确说明。

6.1. 定义

[0044] 如本文所用, 术语“SMN缺陷相关病症”指由任何原因所致SMN全长蛋白缺陷所引起的疾病。“SMN缺陷相关病症”包括但不限于脊髓性肌萎缩症(SMA)、神经源性多发性先天性关节挛缩症(先天性AMC) 和肌萎缩侧索硬化症(ALS)。对于SMN1(人), GenBank基因参考是Gene ID: 6606。

[0045] 术语“脊髓性肌萎缩症”或“SMA”包括但不限于1型至4型脊髓性肌萎缩症(SMA); 近端脊髓性肌萎缩症; 儿童期初发型I型SMA(沃德尼格霍夫曼病(Werdnig-Hoffmann

disease));II型(中间、慢性型)、III型(库格尔伯格病(Kugelberg-Welander disease)或青少年脊髓性肌萎缩症)和相对较新分类的成人发作型形式——IV型。会议报告:国际SMA联盟会议(International SMA Consortium meeting).Neuromuscul Disord.;2:423-428。该术语SMA还包括迟发性SMA(也称为3型和4型SMA、轻度SMA、成人发作型SMA和库格尔伯格病)。该术语SMA还包括其他形式的SMA,包括X连锁疾病、伴有呼吸窘迫的脊髓性肌萎缩症(SMARD)、脊髓性和延髓性肌萎缩症(肯尼迪病或球状脊髓性肌萎缩症)和远端脊髓性肌萎缩症。该术语SMA包括如下文献中描述的所有形式SMA:Arnold,W.D.,Kassar,D.&Kissel,J.T.脊髓性肌萎缩症:新治疗时代的诊断和管理(Spinal muscular atrophy:Diagnosis and management in a new therapeutic era).Muscle and Nerve(2015);Butchbach,M.E.R.运动神经元存活基因中的拷贝数变异:对脊髓性肌萎缩症和其他神经退行性疾病的影响(Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes:Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases).Front.Mol.Biosci.(2016)。

[0046] 当SMA症状在出生时或6月龄时出现时,该疾病称为1型SMA(也称为婴儿期初发型或沃德尼格霍夫曼病)。通常,婴儿全身肌肉无力、哭声微弱并呼吸困难。他们通常难以吞咽和吸吮,并且达不到能够独立坐起的发育里程碑。这些婴儿呼吸和发育不良的风险增加。通常,这些婴儿有两个或三个SMN2基因拷贝(Butchbach,M.E.R.运动神经元存活基因中的拷贝数变异:对脊髓性肌萎缩症和其他神经退行性疾病的影响(Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes:Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases).Front.Mol.Biosci.(2016),将其通过引用其全文纳入本文)。

[0047] 当SMA在3-15个月龄之间且在儿童可以独立站立或行走之前发作时,称为2型SMA或中间型SMA或杜博维茨病(Dubowitz disease)。患有2型SMA的儿童通常具有三个SMN2基因拷贝(Arnold,W.D.,Kassar,D.&Kissel,J.T.脊髓性肌萎缩症:新治疗时代的诊断和管理(Spinal muscular atrophy:Diagnosis and management in a new therapeutic era).Muscle and Nerve(2015),通过引用其全文纳入本文)。肌肉无力主要发生在近端(靠近身体中心)并涉及下肢多于上肢。通常,面部和眼部肌肉不受影响(Butchbach,M.E.R.运动神经元存活基因中的拷贝数变异:对脊髓性肌萎缩症和其他神经退行性疾病的影响(Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes:Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases).Front.Mol.Biosci.(2016),将其通过引用其全文纳入本文)。

[0048] 迟发性SMA(也称为3型和4型SMA、轻度SMA、成人发作型SMA和库格尔伯格病)会导致不同程度的无力。患有3型SMA的患者有3到4个SMN2基因拷贝。3型SMA(青年发作)占SMA病例总数的30%(Arnold,W.D.,Kassar,D.&Kissel,J.T.脊髓性肌萎缩症:新治疗时代的诊断和管理(Spinal muscular atrophy:Diagnosis and management in a new therapeutic era).Muscle and Nerve(2015))。症状通常在18个月到成年之间出现。受影响的个人实现独立行动。然而,这些患者的近端无力可能导致跌倒和爬楼困难。随着时间推移,许多人丧失站立和行走能力,因此只能使用轮椅四处移动。这些患者中的大多数会出现足部畸形、脊柱侧弯和呼吸肌无力。

[0049] 4型SMA是迟发性的,占SMA病例总数不到5%。这些患者有四到八个SMN2基因拷贝(Butchbach, M.E.R. 运动神经元存活基因中的拷贝数变异:对脊髓性肌萎缩症和其他神经退行性疾病的影响(Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases). Front. Mol. Biosci. (2016))。发病年龄尚未确定,但通常在30岁后。4型是轻微形式的SMA,因此寿命保持正常。患者可以实现运动里程碑并在一生中保持活动能力。

[0050] 如本文所用,术语“对象”和“个体”在本文中可互换使用并意指可用本公开的化合物处理/治疗的任何活生物体。术语“患者”意指人对象或个体,包括婴儿、儿童和成人。

[0051] 组合物的“治疗有效量”是足以实现所需治疗效果的量,因此并不需要治愈或完全缓解。在本公开的实施方式中,治疗功效是任何疾病指标的改善,并且治疗有效量足以在经处理/治疗的个体中导致临床上显著的病症/症状改善。本文所用短语“治疗有效量”和“有效量”意指足以使接受治疗/处理的个体在活动、功能和反应方面存在的临床上显著的缺陷减少至少约15%、优选至少50%、更优选至少90%、最优选预防的量。

[0052] 有效量可根据例如对象的大小和体重、疾病的类型或本发明的特定化合物的因素而变化。例如,本发明化合物的选择会影响“有效量”的组成。本领域普通技术人员能够研究本文所包含的因素,且不经过度实验即可确定有关本发明化合物的有效量。

[0053] 给药方案可影响有效量的组成。本发明的化合物可在SMN缺陷相关病症发作之前或之后给予对象。此外,可每天或依次给予数个分开的剂量,以及交错剂量,或者该剂量可连续输注,或可推注。此外,本发明化合物的剂量可根据治疗或预防情况的紧急程度成比例地增加或减少。本申请的组合物可以给予的剂量可以在宽范围内变化并且当然将适合各种情况下的个体需求。

[0054] 本文使用的术语“治疗”、“处理”、“治疗方法”或“疗法”具有医学领域通常理解的含义,因此不需要治愈或完全缓解,并且包括任何有益或期望的临床结果。这类有益或期望的临床结果的非限制性示例是相较于未经治疗的预期生存期的生存期延长,症状减轻包括下述一种或多种:近端骨骼肌无力和萎缩,无法独立坐或走,吞咽困难,呼吸困难等。

[0055] 如本文所用,“预防”或“延缓”疾病指抑制疾病的全面发展。

[0056] 术语“生物样品”指源自生物体(例如,人对象)的任何组织、细胞、体液或其他材料。在某些实施方式中,生物样品是血清或血液。

[0057] 如本文所用,术语“序列相同性/同一性”或“序列同源性”意指saRNA的一条寡核苷酸链(正义或反义)与靶基因启动子序列的模板链或编码链上的区域具有至少80%的相似性。

[0058] 在本公开的实施例中,靶基因是SMN2。述及“靶序列”意指靶基因启动子序列中与SMN2 saRNA的正义寡核苷酸链或反义寡核苷酸同源或互补的序列片段。“靶基因启动子序列”指靶基因的非编码序列,在本公开的上下文中,“与靶基因启动子序列互补”指该序列的编码链,也指非模板链,即与基因编码序列相同的核酸序列。

[0059] 如本文所用,术语“正义链”和“正义寡核苷酸链”是可互换的,并且小激活核糖核酸(saRNA)分子的正义寡核苷酸链指saRNA双链体中包含靶基因启动子序列编码链的第一核酸链。

[0060] 如本文所用,术语“反义链”和“反义寡核苷酸链”是可互换的,并且saRNA分子的反

义寡核苷酸链指saRNA双链体中与正义寡核苷酸链互补的第二核酸链。

[0061] 如本文所用,术语“第一寡核苷酸链”可以是正义链或反义链。saRNA的正义链指saRNA双链体中与靶基因启动子DNA序列的编码链具有同源性的寡核苷酸链。反义链指saRNA双链体中与正义链互补的寡核苷酸链。

[0062] 如本文所用,术语“第二寡核苷酸链”也可以是正义链或反义链。如果第一寡核苷酸链是正义链,那么第二寡核苷酸链是反义链;如果第一寡核苷酸链是反义链,那么第二寡核苷酸链是正义链。

[0063] 本文所用术语“启动子”指这样的核酸序列,其不编码蛋白质并且通过在空间上与蛋白质编码或RNA编码核酸序列相关联来对蛋白质编码或RNA编码核酸序列的转录起调节作用。通常,真核启动子包含100-5,000个碱基对,但该长度范围并不旨在限制本文所用的术语“启动子”。虽然启动子序列通常位于蛋白质编码序列或RNA编码序列的5'末端,但其也存在于外显子和内含子序列中。

[0064] 如本文所用,术语“编码链”指靶基因中无法转录的DNA链,其核苷酸序列与转录产生的RNA序列相同(在RNA中,DNA中的T被U代替)。本公开中所述的靶基因启动子的双链DNA序列的编码链指与靶基因DNA编码链位于同一DNA链的启动子序列。

[0065] 如本文所用,术语“模板链”指靶基因双链DNA链的另一条,其与编码链互补并且可以作为模板转录成与转录的RNA碱基互补的RNA(A-U,G-C)。转录过程中,RNA聚合酶结合模板链并沿模板链3'→5'方向移动,以5'→3'方向催化RNA合成。本公开中所述的靶基因启动子的双链DNA序列的模板链指与靶基因DNA模板链位于同一DNA链的启动子序列。

[0066] 如本文所用,术语“转录起始位点”或TSS指标记基因模板链上转录起始的核苷酸。转录起始位点可以存在于启动子区域的模板链上。基因可以有多个转录起始位点。

[0067] 如本文所用,术语“突出端”指这样的寡核苷酸链末端(5'或3'),其具有由延伸超过双链寡核苷酸内任一条链的另一条链产生的一个或多个非碱基配对核苷酸。延伸超过双链体3'和/或5'端的单链区域称为突出端。在某些实施方式中,突出端的长度为0-6个核苷酸。应当理解的是,0个核苷酸的突出端意味着没有突出端。

[0068] 如本文所用,术语“基因激活”、“激活基因表达”、“基因上调”和“上调基因表达”可互换使用,并意指特定核酸序列转录、翻译、表达或活性的增加或上调,如通过测量基因的转录水平、mRNA水平、蛋白质水平、酶活性、甲基化状态、染色质状态或构型、翻译水平或细胞或生物系统中的活性或状态所确定的。可以直接或间接确定这些活动或状态。此外,“基因激活”或“激活基因表达”指与核酸序列相关的活性增加,无论这类激活的机制如何。例如,基因激活发生在转录水平以增加转录成RNA,而将RNA翻译成蛋白质,从而增加蛋白质的表达。

[0069] 如本文所用,术语“小激活RNA”、“saRNA”和“小激活核糖核酸”可互换使用,并指可上调靶基因表达的核糖核酸分子。其可以是第一核酸链和第二核酸链组成的双链核酸分子,所述第一核酸链含有与靶基因非编码核酸序列(如启动子和增强子)具有序列同源性的核糖核苷酸序列,所述第二核链含有与第一链互补的核苷酸序列。saRNA还可以由合成的或载体表达的单链RNA分子组成,其可以通过分子内两个互补区域形成发夹结构,其中第一区域包含与基因的启动子的靶序列具有序列同源性的核糖核苷酸序列,并且包含在第二区域中的核糖核苷酸序列与第一区域互补。saRNA分子的双链体区域的长度通常为约10~约50、

约12~约48、约14~约46、约16~约44、约18~约42、约20~约40、约22~约38、约24~约36、约26~约34和约28~约32个碱基对,并且通常为约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45或约50个碱基对。此外,术语“小激活RNA”、“saRNA”和“小激活核糖核酸”还包含核糖核苷酸以外的核酸,包括但不限于修饰的核苷酸或类似物。

[0070] 如本文所用,术语“合成的”指合成寡核苷酸的方式,包括能够合成或化学修饰RNA的任何方式,例如化学合成、体外转录、载体表达等。

6.2. saRNA和mRNA调节剂组合的组合物

[0071] 本公开的某些实施方式提供了组合物,其包含(a)一种或多种增加SMN2基因或蛋白表达的试剂和(b)一种或多种增加功能性SMN2 mRNA产生的SMN2 mRNA剪接或稳定性调节剂。

[0072] 向患者给予该组合以治疗SMN缺陷相关病症(例如脊髓性肌萎缩症)或延缓其发作。在某些实施方式中,所述组合通过例如激活/上调SMN2转录结合调节剪接外显子7包含来增加全长SMN2 mRNA的量来增加全长SMN蛋白的量。在某些实施方式中,全长SMN蛋白增加至足以减少与SMN缺陷相关病症相关的症状的量。在某些实施方式中,全长SMN蛋白增加至少10%。

6.2.1. 增加SMN2基因或蛋白表达的试剂

[0073] 在某些实施方式中,增加SMN2基因或蛋白表达的一种或多种试剂中的至少一种是saRNA。SMN2 saRNA激活或上调SMN2基因在其中SMN2基因正常表达的细胞中的表达。

[0074] 在典型的实施方式中,SMN2 saRNA的第一链包含与SMN2基因启动子区域16-35个核苷酸片段具有至少75%序列同一性或序列互补性的区段,从而实现激活或上调基因的表达。

[0075] 具体而言,SMN2 saRNA的第一链与SMN2基因启动子-1639到-1481的区域(SEQ ID NO:472),SMN2基因启动子-1090至-1008的区域(SEQ ID NO:473)、SMN2基因启动子-994至-180的区域(SEQ ID NO:474)或SMN2基因启动子-144到-37的区域(SEQ ID NO:475)具有同源性或互补性,并且具有至少75%,例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%或约99%的同源性或互补性。更具体地,SMN2 saRNA的一条链与选自SEQ ID NO:315-471的任何核苷酸序列具有至少75%,例如至少约79%或约99%的同源性或互补性。

[0076] 在本公开中,SMN2 saRNA包含正义核酸片段和反义核酸片段。正义核酸片段和反义核酸片段包含能够形成双链核酸结构的互补区域,该双链核酸结构通过RNA激活机制促进SMN2基因在细胞中的表达。saRNA的正义核酸片段和反义核酸片段可以存在于两条不同的核酸链上或可以存在于相同的核酸链上。当正义和反义核酸片段存在于两条链上时,saRNA的至少一条链具有长度为0-6个核苷酸的3'突出端,优选两条链具有长度为2或3个核苷酸的3'突出端,并且优选地,突出端的核苷酸是脱氧胸腺嘧啶(dT)。当saRNA的正义核酸片段和反义核酸片段存在于同一核酸链上时,优选地,saRNA是单链发夹结构的核酸分子,其中正义核酸片段的互补区域和反义核酸片段形成双链核酸结构。在这类saRNA中,正义核酸片段和反义核酸片段的长度为16-35个核苷酸并且可以是16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个核苷酸。

[0077] 在一个实施方式中,本公开的SMN2 saRNA的正义链与选自SEQ ID NO:1-157的任何核苷酸序列具有至少75%,例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%的同源性,

或约99%同源性,并且其反义链与选自SEQ ID NO:158-314的任何核苷酸序列具有至少75%或约99%的同源性。具体地,本公开的SMN2 saRNA的正义链包含选自SEQ ID NO:1-157的任何核苷酸序列或或由选自SEQ ID NO:1-157的任何核苷酸序列组成或为选自SEQ ID NO:1-157的任何核苷酸序列;本公开的SMN2 saRNA的反义链包含选自SEQ ID NO:158-314的任何核苷酸序列,或者由选自SEQ ID NO:158-314的任何核苷酸序列组成或为SEQ ID NO:158-314的任何核苷酸序列。

[0078] 在本公开的某些实施方式中,SMN2 saRNA包含正义核酸链和反义核酸链,所述正义核酸链包含与反义核酸上至少一个区域互补的至少一个区域,以形成能够激活细胞中SMN2基因表达的双链核酸结构。

[0079] 在本公开的某些实施方式中,正义核酸链和反义核酸链位于两条不同的核酸链上。

[0080] 在本公开的某些实施方式中,正义核酸片段和反义核酸片段位于同一核酸链上,形成发夹单链核酸分子,其中反义核酸片段和正义核酸的互补区域片段形成双链核酸结构。

[0081] 在本公开的某些实施方式中,至少一条核酸链具有长度为0至6个核苷酸的3'突出端。

[0082] 在本公开的某些实施方式中,两条核酸链都具有长度为2-3个核苷酸的3'突出端。

[0083] 在本公开的某些实施方式中,正义和反义核酸链的长度分别为16至35个核苷酸。

[0084] 本文所述的SMN2 saRNA的所有核苷酸可以是天然的,即非化学修饰的核苷酸,或者至少一个核苷酸可以经化学修饰的核苷酸,所述化学修饰是下述修饰之一或组合:

- (1)对SMN2 saRNA核苷酸序列中核苷酸的磷酸二酯键的修饰;
- (2)对SMN2 saRNA核苷酸序列中核糖的2'-OH的修饰;
- (3)对SMN2 saRNA核苷酸序列中的碱基的修饰。

[0085] 本公开的核苷酸或saRNA的化学修饰为本领域技术人员所熟知,所述对磷酸二酯键的修饰指磷酸二酯键中氧的修饰,包括硫代磷酸酯修饰和硼化磷酸酯修饰。两种修饰都稳定了SMN2 saRNA结构,保持了碱基配对的高特异性和高亲和力。

[0086] 核糖修饰指核苷酸戊糖中的2'-OH的修饰,即在核糖的羟基位置引入某些取代基,例如2'-氟代修饰、2'-氧甲基修饰、2'-氧亚乙基甲氧基修饰、2,4'-二硝基苯酚修饰、锁核酸(LNA)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰。

[0087] 碱基修饰意指核苷酸碱基的修饰,例如5'-溴尿嘧啶修饰、5'-碘尿嘧啶修饰、N-甲基尿嘧啶修饰、2,6-二氨基嘌呤修饰。

[0088] 这些修饰可能会增加SMN2 saRNA的生物利用度,增加对靶序列的亲和力,并增强对细胞中核酸酶水解的抗性。

[0089] 此外,为了促进SMN2 saRNA进入细胞,可以在上述修饰的基础上将亲脂基团如胆固醇引入SMN2 saRNA正义链或反义链的末端,以促进通过由脂质双层组成的细胞膜和核膜和细胞核内的基因启动子区域。

[0090] 本公开的SMN2 saRNA在与细胞接触后有效激活或上调细胞中SMN2基因的表达,优选至少10%。

[0091] 本公开的一个方面提供了包含本公开的SMN2 saRNA或编码本公开的SMN2 saRNA

的核酸的细胞。在一个实施方式中,细胞是哺乳动物细胞,优选人细胞。这类细胞可以是离体的,例如细胞系或细胞系等,或者可以存在于哺乳动物体内,例如人,包括婴儿、儿童或成人。

[0092] 本发明的另一方面提供药物组合物,其包含如上所述的SMN2saRNA或编码根据本发明的SMN2 saRNA的核酸、SMN2 mRNA调节剂和一种或多种药学上可接受的运载体。在一个实施方式中,药学上可接受的运载体包括一种或多种水性运载体、脂质体、高分子聚合物和多肽。在一个实施方式中,药学上可接受的运载体包括一种或多种水性运载体、脂质体、高分子聚合物或多肽。在一个实施方式中,水性运载体可以是例如无RNA酶水或无RNA酶缓冲液。该组合物可以含有1-150nM,例如1-100nM,例如1-50nM,例如1-20nM,例如10-100nM、10-50nM、20-50nM、20-100nM,例如50nM的前述SMN2 saRNA或编码根据本发明的SMN2 saRNA的核酸。

[0093] 本公开的另一方面涉及如本文所述的SMN2 saRNA、编码如本文所述的SMN2 saRNA的核酸、或包含此类SMN2 saRNA或编码如本文所述的SMN2 saRNA的核酸的组合物联合SMN2 mRNA调节剂在制备一种或多种用于增加细胞表达全长SMN蛋白的量的组合物的用途。

[0094] 在另一方面中,本发明提供了分离的SMN2基因saRNA靶向位点,其在SMN2基因启动子区域上具有任何连续的16-35个核苷酸序列,优选地在选自SEQ ID NO:472-475的任一序列上任何连续的16-35个核苷酸序列。特别地,作用位点包含或选自SEQ ID NO:315-471的任何核苷酸序列中所示的序列。

[0095] 另一实施方式提供了包含本发明化合物和治疗惰性运载体、稀释剂或药学上可接受的赋形剂的药物组合物或药物,以及使用本发明化合物制备此类组合物和药物的方法。在某些实施方式中,本发明的SMN2 saRNA和SMN2mRNA调节剂在分开的药物组合物中。在其他实施方式中,SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂在同一药物组合物中。

[0096] 本公开的组合物以符合良好医疗实践的方式配制、给药和给予。就此而言的考量因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、患者个体临床状况、病因、试剂递送部位、给药方法、给药安排,以及医务人员所知的其它因素。

[0097] 包含本文所述的任何小分子化合物(例如,利司扑兰或布拉扑兰)的组合物可以通过任何合适的方式与SMN2 saRNA组合物分开给予,包括口服、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道、经皮、肠胃外、皮下、腹膜内、肺内、皮内、鞘内和硬膜外和鼻内,以及如果需要,局部治疗、病灶内给药。对于SMN2 saRNA组合物,递送可以通过肠胃外输注,包括鞘内、肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给予。在一些实施方式中,本公开的组合物的给予可以任选地通过肠胃外输注,包括鞘内、肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、膀胱内、脑室内、玻璃体内或皮下给予;或通过口服给药、鼻内给药、吸入给药、阴道给药或直肠给药。

[0098] 本文所述的小分子化合物,例如,利司扑兰和布拉扑兰,可以以任何方便的给药形式给予,例如片剂、粉末、胶囊、溶液、分散剂、混悬剂、糖浆、喷雾、栓剂、凝胶、乳液、贴剂等。这类组合物可以包含药物制剂中的常规组分,例如稀释剂、运载体、pH调节剂、防腐剂、增溶剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、调味剂、用于改变渗透压的盐、缓冲剂、掩蔽剂、抗氧化剂和其他活性剂。这类组合物还可以包含其他有治疗价值的物质。

[0099] 典型的制剂通过将本发明的化合物与运载体或赋形剂混合来制备。合适的运载体和赋形剂为本领域技术人员所周知并且详述于例如Ansel H.C.等,《安塞尔药物剂型和药

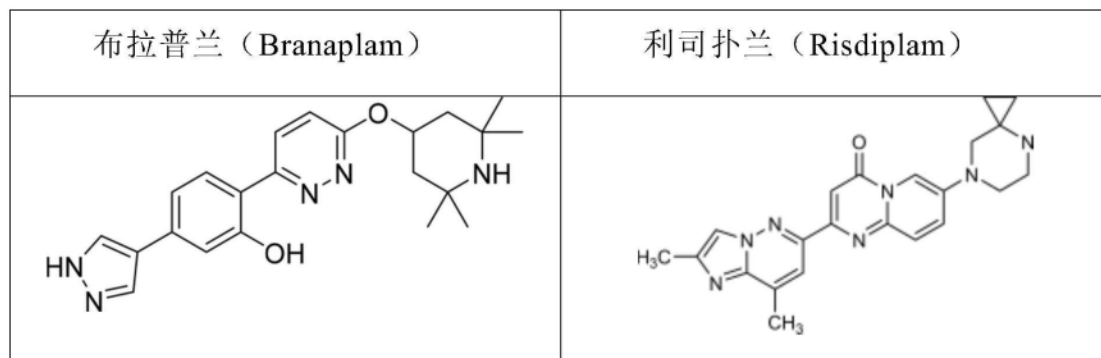
物输送系统 (2004)》((Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (2004))LWW出版社 (Lippincott, Williams&Wilkins), 费城; Gennaro A.R.等,《雷明顿:科学与药学实践 (2000)》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000))LWW出版社, 费城; 和Rowe R.C,《药学赋形剂手册 (2005)》(Handbook of Pharmaceutical Excipients (2005))医药出版社 (Pharmaceutical Press), 芝加哥中。制剂还可以包括一种或多种缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、润湿剂、润滑剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、助流剂、加工助剂、着色剂、甜味剂、芳香剂、调味剂、稀释剂和其他已知的添加剂, 以提供药物 (即, 本发明的化合物或其药物组合物) 的精良呈递或有助于药物产品 (即, 药剂) 的制造。

[0100] 另一方面, 本发明提供了根据本文所述任一实施方式的组合或根据本文所述任一实施方式的组合物在制备用于在个体中治疗SMN缺陷相关病症的药物中的用途。根据某些实施方式的用途, SMN缺陷相关病症包括遗传性神经肌肉疾病, 优选脊髓性肌萎缩症。还提供了根据某些实施方式的用途, 其中个体是哺乳动物, 优选人。

6.2.2. SMN2 mRNA调节剂

[0101] 如本文所用, 术语“SMN2 mRNA调节剂”指增加功能性SMN2 mRNA和功能性SMN蛋白产生的SMN2 mRNA剪接或稳定性调节剂。术语“SMN2mRNA调节剂”包括这样的试剂, 其改变SMN2前体mRNA剪接方式, 以使其包含制备功能性全长SMN蛋白所需的所有信息, 例如, 通过阻断SMN2基因内含子7内含子抑制剪接区域的作用。SMN2 mRNA调节剂包括那些通过稳定剪接体和SMN2前体mRNA之间的相互作用来增加所需剪接和后续蛋白质生产的试剂 (J Med Chem, 2018年12月27日; 61 (24) : 11021-11036), 以及增强SMN2前体mRNA和U1小核糖核酸蛋白 (snRNP) 复合物形成的瞬时双链RNA结构稳定性的试剂 (Nat Chem Biol, 2015Jul; 11 (7) : 511-7)。在某些示例中, SMN2mRNA调节剂将调节SMN2前体mRNA的剪接以在加工的转录物中包括外显子7。或者, 本公开的SMN2 mRNA调节剂包括具有通过防止外显子7在剪接过程中被从成熟SMN mRNA剪接而增加功能性SMN蛋白水平的能力的试剂。根据本公开的SMN2 mRNA调节剂还包括美国专利10,436,802和美国专利10,420,753中描述的那些, 其各自的全部内容通过引用纳入本文。

[0102] 根据本公开的SMN2 mRNA调节剂的示例包括吡嗪衍生物, 例如W02014028459A1中描述的那些, 其全部内容通过引用纳入本文。SMN2 mRNA调节剂的具体示例包括布拉扑兰 (也称为LMI070) 和利司扑兰 (也称为RG7916或R07034067)。



根据本公开的SMN2 mRNA调节剂的其他示例包括反义寡核苷酸, 例如能够反义靶向、置换和/或破坏SMN2基因中的内含子序列以增强剪接过程中SMN2全长 (SMN2FL) 转录物

(包含外显子7的转录物)产生的反义寡核苷酸。在某些实施方式中,诺西那生(以Spinraza®销售)适合根据所公开的组合使用。

6.3. 治疗SMA和相关病症的方法

[0103] 本发明的另一个方面涉及治疗个体中SMN缺陷相关病症或延缓其发作的方法,该方法包括给予个体治疗有效量的如本文所述的SMN2 saRNA,编码如本文所述的SMN2 saRNA的核酸,或包含本发明的SMN2 saRNA或编码如本文所述的SMN2 saRNA的核酸的组合物。对象可以是哺乳动物,例如人。对象可以是婴儿、儿童或成人。在一个实施方式中,因SMN全长蛋白表达不足或SMN1基因突变所致疾病可以包括例如SMA。在一个实施方式中,因SMN全长蛋白表达不足、SMN1基因突变或缺失和/或全长SMN蛋白表达不足所致疾病为SMA。在一个实施方式中,本发明的SMA包括I型SMA、II型SMA、III型SMA和IV型SMA。

[0104] 本发明的另一个方面涉及使用本公开的SMN2 saRNA、编码本公开的SMN2 saRNA的核酸或包含本公开的SMN2 saRNA或编码本公开的SMN2saRNA的核酸的组合物联合本公开的SMN2 mRNA调节剂来制备用于治疗SMN缺陷相关病症或延缓其发作的药物。对象可以是哺乳动物,例如人。对象可以是婴儿、儿童或成人。在一个实施方式中,SMN缺陷相关病症可以包括例如SMA。在一个实施方式中,本发明的SMA包括I型SMA、II型SMA、III型SMA和IV型SMA。

[0105] 还提供了根据本文所述的SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的任何一种组合或根据本文所述的SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的任何一种组合的组合物在制备用于增加细胞中全长SMN蛋白的量的制剂中的用途。在某些实施方式中,细胞是哺乳动物细胞,优选人细胞。在某些实施方式中,细胞存在于人体内。在某些实施方式中,人是患有因SMN缺陷相关病症所致症状的患者。在某些实施方式中,组合或其组合物以有效治疗SMN缺陷相关病症的量给予。在某些实施方式中,因SMN缺陷相关病症引起的症状是与遗传性神经肌肉疾病(优选脊髓性肌萎缩症)相关的症状。

[0106] 在某些实施方式中,SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的组合实现了全长SMN蛋白的增加,其大于通过单独使用相同量的任意物质的给予所实现的量,且毒性降低或不需要的副作用减少。在某些实施方式中,SMN2saRNA和SMN2 mRNA调节剂的组合实现了全长SMN蛋白的增加,其大于单独使用相同量的任意物质的治疗的累加效应。在某些实施方式中,当用于本文所述组合的实施方式中时,以小于常规治疗所用量的量给予SMN2 saRNA或SMN2 mRNA调节剂。

[0107] 在某些实施方式中,相较于单独使用相同量的任意物质的作用,SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的组合的作用实现更大的临床改善。在某些实施方式中,相较于单独使用相同量的任意物质的作用,SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的组合的作用实现比其更大的附加临床改善。

[0108] 本公开还涉及增加细胞中全长SMN蛋白的量的方法,包括给予细胞1) SMN2 mRNA调节剂和2) 如本文所述的SMN2 saRNA,编码如本文所述的SMN2 saRNA的核酸,或包含如本文所述的SMN2 saRNA或编码SMN2 saRNA的核酸的组合物至少一种。

[0109] 在本文提供的任何实施方式中,可以将这类SMN2 saRNA、编码本公开的SMN2 saRNA的核酸、或包含这类SMN2 saRNA或编码本公开的SMN2saRNA的核酸的组合物直接引入细胞中,或者可以在将编码SMN2 saRNA的核苷酸序列引入细胞后在细胞内产生,所述细胞优选哺乳动物细胞,更优选人细胞。这类细胞可以是离体的,例如细胞系等,或者可以存在

于哺乳动物中,例如人。在一些实施方式中,人是患有SMN缺陷相关病症的患者或个体。在某些实施方式中,本发明的编码SMN2 saRNA的核酸或包含上述saRNA或编码SMN2 saRNA的核酸的组合物与包含至少一种SMN2 mRNA调节剂的组合物以各自足以影响SMN缺陷相关病症治疗的量联合给予。在一个实施方式中,SMN缺陷相关病症是SMA。在一个实施方式中,本公开的SMA包括I型SMA、II型SMA、III型SMA和IV型SMA。

[0110] 在某些实施方式中,SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的组合实现了全长SMN蛋白的增加,其大于通过单独使用相同量的任意物质的给药所实现的量。在某些实施方式中,相较于通过单一疗法的治疗,SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的组合降低毒性和/或减少不需要的副作用。在某些实施方式中,SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的组合实现了全长SMN蛋白的增加,其大于单独使用相同量的任意物质的治疗的累加效应。在某些实施方式中,以小于将用于常规单一疗法治疗的量的量给予SMN2 saRNA或SMN2 mRNA调节剂之一或两者。

[0111] 在某些实施方式中,相较于单独使用相同量的任意物质的作用,SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的组合实现更大的临床改善。在某些实施方式中,相较于单独使用相同量的任任意一种物质,SMN2 saRNA和SMN2mRNA调节剂的组合实现大于累加作用的临床改善。

[0112] 在某些实施方式中,基线测量值获自如本文定义的生物样品,获自给予本文所述疗法之前的个体。在某些实施方式中,生物样品是外周血单核细胞、血浆、血清、皮肤组织、脑脊液(CSF)。在某些实施方式中,外周血单核细胞和皮肤中SMN蛋白水平的增加与其在中枢神经系统(CNS)神经元中的水平相关,表明血液或皮肤中的这些水平的变化可以用作非侵入性替代物来确定CNS中SMN蛋白水平的变化。在其他实施方式中,相较于基线测量值,本文提供的组合使全长SMN蛋白的量增加至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少155%、至少160%、至少165%、至少170%、至少175%、至少180%、至少185%、至少190%、至少195%、至少200%、至少210%、至少215%、至少220%、至少225%、至少230%、至少235%、至少240%、至少245%、至少250%、至少255%、至少260%、至少265%、至少270%、至少275%、至少280%、至少285%、至少290%、至少295%、至少300%、至少310%、至少315%、至少320%、至少325%、至少330%、至少335%、至少340%、至少345%、至少350%、至少355%、至少360%、至少365%、至少370%、至少375%、至少380%、至少385%、至少390%、至少395%、至少400%。

[0113] 在本公开的上下文中,术语“联合/共同给予”一种或多种SMN2saRNA和一种或多种SMN2 mRNA调节剂可以是同时的(即在15分钟内、30分钟内或在1小时内)、几乎同时(即2小时内、4小时内、6小时内、8小时内、10小时内、或12小时内、24小时内)或时间上延迟几天或几周,例如最多4或5周。

[0114] 在本公开的上下文中,术语“联合/共同给予”包含一种或多种SMN2saRNA的组合物和包含一种或多种SMN2 mRNA调节剂的组合物可以是同时的或在相同时间给予(即在15分钟内、30分钟内或在1小时内)、几乎同时或大致相同的时间(即2小时内、4小时内、6小时内、8小时内、10小时内、或12小时内、24小时内)或时间上延迟几天或几周,例如最多4或5周。

[0115] 本公开的组合物可以给予的剂量可以在宽范围内变化并且当然将适合各种情况

下的个体需求。

[0116] 在特定实施方式中,SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的组合在治疗、预防、延缓进展和/或改善因SMN1基因中失活突变或缺失所致疾病和/或与SMN1基因功能丧失或缺陷相关的疾病方面表现出大于累加作用或表现出协同作用,并且还用于保护与疾病的病理生理学有关的细胞,特别是用于脊髓性肌萎缩症(SMA)的治疗、预防、延缓进展和/或改善。

[0117] 在某些实施方式中,在对象小于1周龄大、小于1月龄、小于3月龄、小于6月龄、小于1岁、小于2岁、小于15岁或大于15岁时给予根据本公开的药物组合物的第一剂。

[0118] 在某些实施方式中,至少一种包含SMN2 saRNA的药物组合物和至少一种包含SMN2 mRNA调节剂的药物组合物同时、几乎同时或在不同的时间共同/联合给予。在某些实施方式中,包含SMN2 mRNA调节剂的药物组合物和包含SMN2 saRNA的药物组合物在彼此相隔1小时内、彼此相隔2个小时内、彼此相隔3个小时内、彼此相隔4个小时内、彼此相隔5个小时内、彼此相隔6个小时、彼此相隔7小时内、彼此相隔8小时内、彼此相隔9小时内、彼此相隔10小时内、彼此相隔11小时内、彼此相隔12小时内、彼此相隔1天内、彼此相隔2天内、彼此相隔3天内、彼此相隔4天内、彼此相隔5天内、彼此相隔6天内、彼此相隔1周内、彼此相隔2周内、彼此相隔3周内、彼此相隔4周内或彼此相隔5周内共同/联合给予。单剂量可以是SMN2 saRNA,并且可以是单个0.1至15毫克剂量、单个1毫克剂量、单个2毫克剂量、单个3毫克剂量、单个4毫克剂量、单个5毫克剂量、单个6毫克剂量、单个7毫克剂量、单个8毫克剂量、单个9毫克剂量、单个10毫克剂量、单个11毫克剂量、单个12毫克剂量、单个13毫克剂量、单个14毫克的单剂量或单个15毫克剂量。单剂量可以是SMN2 saRNA调节剂,并且可以是单个0.1至15毫克剂量、单个1毫克剂量、单个2毫克剂量、单个3毫克剂量、单个4毫克剂量、单个5毫克剂量、单个6毫克剂量、单个7毫克剂量、单个8毫克剂量、单个9毫克剂量、单个10毫克剂量、单个11毫克剂量、单个12毫克剂量、单个13毫克剂量、单个14毫克的单剂量或单个15毫克剂量。

[0119] 在某些实施方式中,4.8毫克的单剂量SMN2 mRNA调节剂是ASO并且通过腰椎穿刺以鞘内注射给予。在某些实施方式中,SMN2 mRNA调节剂是诺西那生。在某些实施方式中,其可以是单个5.16毫克剂量、单个5.40毫克剂量、单个7.2毫克剂量、单个7.74毫克剂量、单个8.10毫克剂量、单个9.6毫克剂量、单个10.32毫克剂量、单个10.80毫克剂量、单个11.30毫克剂量、单个12毫克剂量、单个12.88毫克剂量、单个13.5毫克剂量、单个14.13毫克剂量、单个10毫克剂量、单个11毫克剂量、单个12毫克剂量、单个13毫克剂量、单个14毫克剂量、单个15毫克剂量、单个16毫克剂量、单个17毫克剂量、单个18毫克剂量、单个19毫克剂量或单个20毫克剂量。

[0120] 在某些实施方式中,当通过腰椎穿刺以鞘内注射给予一剂SMN2 saRNA和/或SMN2 mRNA时,使用较小规格的针可以减少或改善与腰椎穿刺手术相关的一种或多种症状。在某些实施方式中,与腰椎穿刺相关的症状包括但不限于腰椎穿刺后综合征、头痛、背痛、发热、便秘、恶心、呕吐和穿刺部位疼痛。在某些实施方式中,使用24号或25号针头进行腰椎穿刺可减少或改善一种或多种腰椎穿刺后症状。在某些实施方式中,使用21、22、23、24或25号针头进行腰椎穿刺可减少或改善腰椎穿刺后综合征、头痛、背痛、发热、便秘、恶心、呕吐和/或穿刺部位疼痛。

[0121] 建议的剂量频率是近似的,例如,在某些实施方式中,如果建议的剂量频率是第1天一剂和第29天第二剂,那么SMA患者可以在接受第一剂后的25、26、27、28、29、30、31、32、

33或34天接受第二剂。在某些实施方式中,如果建议的剂量频率是第1天一剂和第15天第二剂,那么SMA患者可以在接受第一剂后的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天后接受第二剂。在某些实施方式中,如果建议的剂量频率是第1天一剂和第85天第二剂,那么SMA患者可以在接受第一剂后的80、81、82、83、84、85、86、87、88、89或90天后接受第二剂。

[0122] 在某些实施方式中,将根据患者的年龄、患者的CSF体积或患者的年龄和/或估计的CSF体积来调整注射的剂量和/或体积(例如,参见Matsuzawa J,Matsui M,Konishi T,Noguchi K,Gur R C,Bilker W,Miyawaki T.健康婴儿和儿童大脑灰质和白质的年龄相关体积变化(Age-related volumetric changes of brain gray and white matter in healthy infants and children).Cereb Cortex 2001年4月;11(4):335-342,通过引用其全文内容纳入本文)。

7. 实施例

[0123] 以下实施例中进一步说明本发明。这些实施例仅用于说明目的,并不应解释为以任何方式限制本发明的范围或内容。

7.1. 实施例1:saRNA(DS06-0004)、ASO(诺西那生)和利司扑兰对GM03813细胞中全长和外显子7跳读SMN2 mRNA表达的作用。

[0124] 为了确定用于细胞处理的saRNA(DS06-0004)、诺西那生(ASO-10-27)和利司扑兰的最佳浓度,将不同浓度的saRNA和ASO分别转染到GM03813细胞中。将利司扑兰溶解在DMSO中,并以不同浓度添加到培养的GM03813细胞中。

[0125] “GM03813细胞”指科利埃尔医学研究所(Coriell Institute for Medical Research)提供的成纤维细胞。该细胞系描述为脊髓性肌萎缩症,II型;SMA2运动神经元1存活,端粒化;SMN1。相关基因为SMN1;染色体位置是5q12.2-q13.3,等位基因变体描述为1外显子7和8缺失,脊髓性肌肉萎缩,I型;和确定的突变是EX7-8DEL。源自下述对象皮肤(手臂)的成纤维细胞的表型数据表征为:临床上受影响;足月无并发症妊娠后出生;6月龄时翻身;9月龄时开始牙牙学语;到12月龄时,明显的肌肉萎缩和无力;无深腱反射;便秘;供体对象有3个拷贝的SMN2基因;PCR分析表明该供体对象是SMN1基因中外显子7和8缺失的纯合子;受同样影响的兄弟(不在库中);母亲是GM03814(成纤维细胞)/GM24474(iPSC);父亲是GM03815(成纤维细胞);参见GM23240(iPSC-慢病毒)和GM24468(iPSC-游离型);先前分类为SMAI,但先证者的发病特征和SMN2剂量等数据支持将其重新分类为SMAII。

[0126] 72小时后,从经处理的细胞中分离总细胞RNA,并逆转录成cDNA。使用SMN2FL或SMN2 Δ 7特异性引物对通过RT-qPCR评估SMN2 mRNA表达。SMN2 mRNA表达还使用扩增SMN2FL和SMN2 Δ 7的引物对通过半定量RT-PCR评估,然后进行DdeI消化(PCR/消化)。PCR产生了两个产物条带:507bp(SMN2FL)和453bp(SMN2 Δ 7)。消化后,两个条带均减少115bp,产生两种产物:392bp(SMN2FL)和338bp(SMN2 Δ 7),如图3D的凝胶所示。图3A-3D显示了分别通过RT-qPCR和PCR/消化评估的SMN2FL和SMN Δ 7mRNA的剂量依赖性变化。如图3E-3G是来自对图3D中条带强度进行定量的数据的图表。

[0127] 如图3A所示,1nM的ASO-10-27处理使SMN2FL增加到1.5倍,5nM使得峰值增加到2.0倍并同时减少SMN2 Δ 7,而更高的剂量并不会导致SMN2FL的进一步诱导或SMN2 Δ 7的减少。类似地,PCR/消化分析显示,当用10nM的ASO处理细胞时,SMN2FL的表达达到其峰值,而SMN Δ 7的表达几乎接近最低值5nM(图3E)。100nM和1000nM的利司扑兰处理使SMN2FL的mRNA水平分

别增加到1.2和1.8倍,并使SMN2 Δ 7分别减少36%和98% (图3C和3G)。由于包括ASO-10-27和利司扑兰在内的SMN2 mRNA调节剂通过调节SMN2剪接以包括更多的外显子7来增加SMN2FL mRNA,因此它们可以诱导的SMN2FL的最大量取决于SMN2前体mRNA的可用量,所述SMN2前体mRNA不会被SMN2 mRNA调节剂改变。与此观点一致,数据显示ASO-10-27和利司扑兰对剪接调节剂诱导的SMN2FL增加有上限效应(最大增加到约2倍)。

[0128] 与之相反,saRNA (DS06-0004) 诱导SMN2FL和SMN2 Δ 7的表达水平高于SMN2 mRNA调节剂,并且在1nM至50nM的浓度范围内呈剂量依赖性,最高倍数变化为分别为2.9倍和2.7倍。100nM的DS06-0004并没有进一步增加SMN2 mRNA表达(图3B和3F)。通过PCR/消化分析获得了一致的结果(图3D和图3F)。

[0129] 不同于通过转化(降低)SMN2 Δ 7水平来增加SMN2FL水平的SMN2mRNA调节剂(ASO-10-27和利司扑兰),本公开的SMN2 saRNA通过作用于SMN2转录来增加SMN2 mRNA水平,使得SMN2FL和SMN2 Δ 7同时增加。图3中显示的数据清楚地证明了SMN2 mRNA调节剂和SMN2 saRNA之间的机制差异。

7.2. 实施例2:saRNA (DS06-0004) 和ASO-10-27对GM00232细胞中全长和外显子7跳读SMN2 mRNA表达的联合作用。

[0130] 为了确定saRNA (DS06-0004) 和ASO-10-27的组合对I型SMA细胞中的SMN2FL诱导是否具有增强作用,用不同浓度的DS06-0004和ASO-10-27单独或组合转染GM00232细胞72小时。通过RT-qPCR(图4A和4D) 和PCR/消化(图4B、4C和4E) 评估经处理的细胞中的SMN2表达。

[0131] “GM00232细胞”指科利埃尔医学研究所(Coriell Institute for Medical Research)提供的成纤维细胞。该细胞系描述为脊髓性肌萎缩症I;SMA1。该供体对象有2个SMN2基因拷贝(数据来自多个来源,包括Stabley等2015,PMID26247043) 并且是SMN1基因外显子7和8缺失的纯合子。相关基因为SMN1;染色体位置是5q12.2-q13.3,等位基因变体描述为外显子7和8缺失,脊髓性肌肉萎缩,I型;和确定的突变是EX7-8DEL。源自下述对象皮肤(手臂)的成纤维细胞的表型数据表征为:进行性肌肉萎缩;无深腱反射;异常EMG;供体对象有2个SMN2基因拷贝(数据来自多个来源,包括包括Stabley等2015,PMID26247043) 并且是SMN1基因外显子7和8缺失的纯合子。

[0132] 如图4A所示,1nM、5nM和25nM的ASO-10-27分别使SMN2FL增加到1.3、1.8和1.9倍,同时使SMN2 Δ 7减少。1nM、5nM和25nM的DS06-0004使SMN2FL分别增加到1.7、2.4和2.4倍,并使SMN2 Δ 7分别增加到1.5、1.9和2.1倍。

[0133] 当1nM的ASO-10-27在细胞转染中与增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 联合时,其分别诱导2.2、2.6和2.9倍的SMN2FL,同时使SMN2 Δ 7分别改变1.1、0.7和0.4倍。此外,用5nM ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 处理细胞分别诱导2.8、3.4和3.7倍的SMN2FL并使SMN2 Δ 7分别改变0.09、0.05和0.04倍。此外,用25nM ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 处理细胞分别诱导3.1、4.0和4.0倍的SMN2FL,并完全消除SMN2 Δ 7表达。相较于诱导1.9倍SMN2FL的25nM ASO-10-27单一处理,ASO-10-27和DS06-0004的联合处理使SMN2FL增加到4倍,使ASO-10-27单独使用的作用加倍。

[0134] 图4A所示RT-qPCR结果进一步被PCR/DdeI消化验证。与RT-qPCR结果一致,单独的ASO-10-27在25nM下使SMN2FL mRNA增加到2.3倍,而ASO-10-27 (25nM) 和DS06-0004 (25nM) 的组合诱导最高的SMN2FL (4.1倍) 并同时使SMN2 Δ 7减少 (0.14倍) (图4B、4C和4E)。

[0135] 综上,图4中显示的数据证明,单独的saRNA DS06-0004在诱导SMN2mRNA表达方面有很强的活性,特别是在具有2个SMN2基因拷贝的I型SMA细胞中的SMN2FL表达。当SMN2 saRNA与ASO-10-27联合时,可以实现SMN2FL的最大诱导。

7.3. 实施例3:saRNA (DS06-0004) 和ASO-10-27对GM00232细胞中SMN蛋白水平的联合作用。

[0136] 为了进一步验证ASO-10-27和DS06-0004单独或组合对SMN2基因表达的作用,在用ASO-10-27和DS06-0004单独或组合转染的GM00232细胞中进行Western印迹分析。如图5A和5C所示,1nM、5nM和25nM的ASO-10-27分别使SMN蛋白增加到1.4、2.3和2.9倍。1nM、5nM和25nM的DS06-0004使SMN2FL分别增加到1.2、1.3和1.7倍(图5B和5C)。预期大小为35kDa的蛋白条带是全长SMN蛋白(图5A和5B),而SMN Δ 7蛋白则不会出现在Western印迹上,因为其被快速降解(Le, TT, 等SMN Δ 7, 着丝粒存活运动神经元(SMN2)基因的主要产物,延长患有脊髓性肌萎缩症的小鼠的存活时间与全长SMN相关。Human Mol Genet (2005)。

[0137] 用1nM的ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 处理细胞分别诱导2.4、2.6和2.9倍的SMN蛋白(图5A-5C, 5A和5B包含联合处理的两次重复)。

[0138] 进一步用5nM的ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 处理细胞分别诱导3.1、3.0和3.3倍的SMN蛋白(图5A-5C, 5A和5B包含联合处理的两次重复)。

[0139] 此外,用25nM的ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 处理细胞分别诱导3.1、3.3和2.6倍的SMN蛋白(图5A-5C, 5A和5B包含联合处理的两次重复)。

[0140] 综上,这些数据证实联合ASO-10-27和DS06-0004可以诱导比单独使用它们中的任何一种更高的SMN蛋白水平。

7.4. 实施例4:saRNA (DS06-0004) 和ASO-10-27对GM03813细胞中全长和外显子7跳读SMN2 mRNA表达的联合作用。

[0141] 为了确定saRNA (DS06-0004) 和ASO-10-27的组合是否对II型SMA细胞中的SMN2FL诱导具有增强作用,用DS06-0004和ASO-10-27以不同浓度单独或组合转染GM03813细胞72小时,并通过RT-qPCR(图6A和6D) 和PCR/消化(图6B、6C和6E) 评估经处理的细胞中的SMN2表达。如图6A和6D所示,1nM、5nM和25nM的ASO-10-27分别使SMN2FL增加到1.2、2.1和2.1倍,同时使SMN2 Δ 7减少。1nM、5nM和25nM的DS06-0004使SMN2FL分别增加到2.1、2.6和2.2倍,并使SMN2 Δ 7分别增加到2.5、2.5和2.1倍。

[0142] 如图6A和6D所示,用1nM ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 处理细胞分别诱导2.6、2.8和3.0倍的SMN2FL以及分别为1.7、1.4和0.8倍的SMN2 Δ 7。此外,用5nM ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 处理细胞分别诱导3.3、4.2和4.8倍的SMN2FL以及分别为0.2、0.2和0.1倍的SMN2 Δ 7。此外,用25nM ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 处理细胞分别诱导3.8、4.7和4.0倍的SMN2FL,并完全消除SMN2 Δ 7表达。相较于诱导2.1倍SMN2FL的25nM ASO-10-27单一处理,ASO-10-27和DS06-0004的联合处理使SMN2FL增加到4.7倍,超过ASO-10-27单独使用时作用的两倍。

[0143] 图6A所示RT-qPCR结果通过半定量RT-PCR以及后续DdeI消化进一步验证。与RT-qPCR结果一致,单独的ASO-10-27在25nM下使SMN2FL mRNA增加到2.1倍,而ASO-10-27 (25nM) 和DS06-0004 (5nM) 的组合诱导最高的SMN2FL (2.7倍) 并同时使SMN2 Δ 7减少(0.18倍)(图6B、6C和6E)。

[0144] 综上,图6中显示的数据证明,单独的SMN2 saRNA DS06-0004在诱导SMN2 mRNA表达方面有很强的活性,特别是在具有3个SMN2基因拷贝的II型SMA细胞中的SMN2FL表达。当SMN2 saRNA与ASO-10-27联合时,实现了SMN2FL的最大诱导。该数据证实,相较于同一II型SMA细胞(GM03813细胞)中通过ASO-10-27和DS06-0004任一试剂单独地处理所诱导的SMN蛋白水平,ASO-10-27和DS06-0004的组合在II型SMA细胞(GM03813细胞)中诱导更高的SMN蛋白水平。相较于未经处理的GM03813细胞群,该数据还建立了在用根据本公开的组合处理的细胞中诱导的SMN蛋白水平。如本文所述,GM03813细胞具有两个SMN2拷贝并用作SMA模型。

7.5. 实施例5:saRNA (DS06-0004) 和ASO-10-27对GM03813细胞中SMN蛋白水平的联合作用。

[0145] 为了进一步验证ASO-10-27和DS06-0004单独或组合对SMN2基因表达的作用,在用ASO-10-27和DS06-0004单独或组合转染的GM03813细胞中进行Western印迹分析。如图7A和7C所示,1nM、5nM和25nM的ASO-10-27分别使SMN蛋白增加1.2、1.5和1.9倍。1nM、5nM和25nM的DS06-0004使SMN2FL分别增加到1.5、1.5和1.6倍(图7B和7C)。

[0146] 用1nM的ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞分别诱导1.4、1.6和1.8倍的SMN蛋白(图7A-7C,7A和7B包含联合处理的两次重复)。

[0147] 进一步用5nM的ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞使SMN蛋白分别增加2.0、2.2和2.4倍(图7A-7C,7A和7B包含联合处理的两次重复)。

[0148] 此外,用25nM的ASO-10-27联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞使SMN蛋白分别增加到2.2、2.9和2.8倍(图7A-7C,7A和7B包含联合处理的两次重复)。

[0149] 综上,这些数据证实联合ASO-10-27和DS06-0004在II型SMA细胞中诱导更高的SMN蛋白水平。该数据证实,相较于同一II型SMA细胞(GM03813细胞)中通过ASO-10-27和DS06-0004任一试剂单独地处理所诱导的SMN蛋白水平,ASO-10-27和DS06-0004的组合在II型SMA细胞(GM03813细胞)中诱导更高的SMN蛋白水平。相较于未经处理的GM03813细胞群,该数据还建立了在用根据本公开的组合处理的细胞中诱导的SMN蛋白水平。如本文所述,GM03813细胞具有两个SMN2拷贝并用作SMA模型。

7.6. 实施例6:saRNA (DS06-0004) 和利司扑兰对I型SMA GM00232细胞中全长和外显子7跳读SMN2 mRNA表达的联合作用。

[0150] 为了确定saRNA (DS06-0004) 和小分子SMN2 mRNA调节剂利司扑兰的组合对I型SMA细胞中的SMN2FL诱导是否具有增强作用,用不同浓度的DS06-0004和利司扑兰单独或组合转染GM00232细胞72小时。通过RT-qPCR(图8A-8C)和PCR/消化(图8D-8F)评估经处理的细胞中的SMN2 mRNA表达。如图8A-8C所示,50nM、250nM和1250nM的利司扑兰分别使SMN2FL增加1.2、1.8和1.9倍,同时使SMN2 Δ 7减少。1nM、5nM和25nM的DS06-0004使SMN2FL分别增加到1.8、2.1和2.0倍,并使SMN2 Δ 7分别增加到1.6、1.6和1.7倍。

[0151] 用50nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞使SMN2FL分别增加到2.2、2.6和2.5倍,并使SMN2 Δ 7分别增加到1.3、1.3和1.2倍。此外,用250nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞使SMN2FL分别增加到3.0、3.4和3.4倍,并使SMN2 Δ 7分别改变0.3、0.3和0.3倍。此外,用1250nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和3.6nM)处理细胞使SMN2FL分别增加3.6、3.9和4.0倍,并完全消除SMN2 Δ 7表达。相较于诱导1.9倍SMN2FL的1250nM利司扑兰单一处理,利司扑兰

和DS06-0004的联合处理使SMN2FL增加到4倍,超过利司扑兰单独使用时作用的两倍。

[0152] 图8A所示RT-qPCR结果通过PCR/DdeI消化进一步验证。与RT-qPCR结果一致,单独的利司扑兰在1250nM下使得SMN2FL mRNA增加2.3倍,而利司扑兰(1250nM)和DS06-0004(1nM)的组合使得观测到的SMN2FL诱导最高(3.2倍)(图8D-8F)。

[0153] 综上,图8中显示的数据证明,单独的saRNA DS06-0004在诱导SMN2mRNA表达方面有很强的活性,特别是在I型SMA细胞中的SMN2FL表达。当SMN2 saRNA与利司扑兰联合时,实现了SMN2FL的最大诱导。

7.7.实施例7:saRNA(DS06-0004)和利司扑兰对GM00232细胞中SMN蛋白水平的联合作用。

[0154] 为了进一步验证利司扑兰和DS06-0004单独或组合对I型SMA细胞GM00232中SMN2基因表达的作用,在用利司扑兰单独以及其与DS06-0004或组合转染的GM00232细胞中进行Western印迹分析。如图9A和9B所示,50nM、250nM和1250nM的利司扑兰分别使SMN蛋白增加到1.7、1.9和2.6倍。

[0155] 用50nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞分别诱导2.3、2.9和3.3倍的SMN蛋白(图9A和9B)。

[0156] 进一步用250nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞分别诱导2.6、2.9和2.7倍的SMN蛋白(图9A和9B)。

[0157] 此外,用1250nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞分别诱导2.4、2.7和2.7倍的SMN蛋白(图9A和9B)。

[0158] 综上,这些数据证实了saRNA和利司扑兰在增加SMN2表达方面的联合作用可以在蛋白质水平上得到验证。

7.8.实施例8:saRNA(DS06-0004)和利司扑兰对II型SMA GM03813细胞中全长和外显子7跳读SMN2 mRNA表达的联合作用。

[0159] 为了确定saRNA(DS06-0004)和利司扑兰的组合是否对II型SMA细胞中的SMN2FL诱导具有增强作用,用DS06-0004和利司扑兰以不同浓度单独或组合转染GM03813细胞72小时,并通过RT-qPCR(图10A-10C)和PCR/消化(图10D-10F)评估经处理的细胞中的SMN2 mRNA表达。如图10A-10C所示,50nM、250nM和1250nM的利司扑兰分别使SMN2FL增加到1.0、1.4和2.1倍,同时使SMN2 Δ 7减少。1nM、5nM和25nM的DS06-0004使SMN2FL分别增加到1.7、2.2和2.3倍,并使SMN2 Δ 7分别增加到1.8、2.3和2.3倍。

[0160] 用50nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞使SMN2FL分别增加到1.9、2.5和2.3倍,并使SMN2 Δ 7分别增加到1.2、1.7和1.4倍。进一步用250nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞分别诱导2.5、3.1和3.4倍的SMN2FL并分别诱导0.4、0.6和0.6倍的SMN2 Δ 7。此外,用1250nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004(1nM、5nM和25nM)处理细胞诱导3.2、3.6和3.3倍的SMN2FL,并完全消除SMN2 Δ 7表达。相较于诱导2.1倍SMN2FL的1250nM利司扑兰单一处理,利司扑兰和DS06-0004的联合处理使SMN2FL增加3.6倍,几乎是利司扑兰单独使用时作用的两倍。

[0161] 图10A所示RT-qPCR结果通过PCR/DdeI消化进一步验证。与RT-qPCR结果一致,单独的利司扑兰在1250nM下使SMN2FL mRNA增加到2.1倍,而利司扑兰(1250nM)和DS06-0004(25nM)的组合使得SMN2FL的诱导最高(3.8倍)(图10D-10F)。

[0162] 综上,图10中显示的数据证明,单独的saRNA DS06-0004在诱导SMN2mRNA表达方面有很强的活性,特别是在II型SMA细胞中的SMN2FL表达。当SMN2 saRNA与利司扑兰联合时,可以实现SMN2FL观察到的最大增加。

7.9. 实施例9:saRNA (DS06-0004) 和利司扑兰对II型SMA GM03813细胞中SMN蛋白水平的联合作用。

[0163] 为了进一步验证利司扑兰和DS06-0004单独或组合对II型SMA细胞GM03813中SMN2基因表达的作用,在用利司扑兰和DS06-0004单独或组合处理的GM03813细胞中进行Western印迹分析。如图11A和11B所示,50nM和250nM的利司扑兰分别使SMN蛋白增加到1.1和1.7倍。

[0164] 用50nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 处理细胞分别诱导1.3、1.4和1.8倍的SMN蛋白(图11A和11B)。

[0165] 进一步用250nM的利司扑兰联合增加浓度的DS06-0004 (1nM、5nM和25nM) 处理细胞分别诱导2.1、2.3和2.0倍的SMN蛋白(图11A和11B)。

[0166] 综上,这些数据证实了saRNA和利司扑兰在诱导SMN2表达方面的联合作用可以在蛋白质水平上得到验证。

7.10. 实施例10:saRNA (DS06-0031和DS06-0067) 和ASO-10-27对GM03813细胞中全长和外显子7跳读SMN2 mRNA表达的联合作用。

[0167] 为了确定ASO-10-27与两种saRNA (DS06-0031和DS06-0067,两者在II型SMA细胞中诱导的SMN2 Δ 7比SMN2FL mRNA表达更多,推定是由于转录偶联的剪接调制机制)的联合作用(图12A和12B),用DS06-0031或DS06-0067和ASO-10-27以10nM单独或组合转染GM03813细胞72小时。通过RT-qPCR(图12A) 和半定量RT-PCR(图12B和12C) 评估经处理的细胞中的SMN2表达。如图12A所示,10nM的DS06-0031和DS06-0067使SMN2FL分别改变0.9倍和1.3倍并使SMN2 Δ 7分别改变1.9倍和2.4倍,而ASO-10-27使SMN2FL和SMN2 Δ 7分别改变1.4倍和0.3倍。

[0168] 当DS06-0031或DS06-0067在细胞转染中联合10nM的ASO-10-27时,分别诱导2.0倍和3.2倍的SMN2FL,并使SMN2 Δ 7分别减少0.3倍和0.05倍。

[0169] 图12A所示RT-qPCR结果通过半定量RT-PCR进一步验证。与RT-qPCR结果一致,单独的ASO-10-27在10nM下使SMN2FL mRNA增加到1.4倍,而与DS06-0031和DS06-0067的组合使SMN2FL增加到1.8和2.3倍并同时使SMN2 Δ 7减少到0.3和0.02倍(图12B和12C)。

[0170] 此外,通过Western印迹分析评估SMN蛋白水平。与SMN2FL表达一致,相较于单独使用时到增加2.3倍,在DS06-0031和DS06-0067存在的情况下,ASO-10-27使SMN蛋白水平增加到3.6倍和3.3倍(图12D和12E)。

[0171] 综上,图12中显示的数据证明,单独的saRNA (DS06-0031和DS06-0067) 在诱导SMN2表达,尤其是SMN Δ 7方面具有很强的活性。当它们与ASO-10-27联合时,可以实现最大诱导SMN2FL和减少SMN2 Δ 7。该数据还表明,虽然某些saRNA诱导的转录激活和后续前体mRNA增加主要通过SMN2 Δ 7的增加反映,但是前体mRNA的增加为SMN2 mRNA调节剂(例如ASO) 提供外显子7包含的其他底物,这使SMN2FL mRNA和蛋白质表达大大增强。

7.11. 实施例11:saRNA (LNP-R6-04M1) 与LNP-ASO-10-27或利司扑兰的组合对III型SMA小鼠中SMN2FL和SMN2 Δ 7表达的联合作用。

[0172] 在III型SMA小鼠中进行LNP-R6-04M1与LNP-ASO-10-27或利司扑兰的联合作用的体

内评估。将新生小鼠分为10个处理组：

[0173] 处理组1：通过ICV注射给予LNP-R6-04M1（分别在P1和P3注射两次，每次10ug的LNP-R6-04M1）；

[0174] 处理组2：通过ICV注射给予LNP-ASO-10-27（分别在P1和P3注射两次，每次10ug的LNP-ASO-10-27）；

[0175] 处理组3：通过IP注射在P1时以0.3mg/kg的浓度给予利司扑兰；

[0176] 处理组4：通过IP注射在P1时以1mg/kg的浓度给予利司扑兰；

[0177] 处理组5：通过IP注射在P1时以3mg/kg的浓度给予利司扑兰；

[0178] 处理组6：通过给予LNP-R6-04M1和LNP-ASO-10-27进行联合处理。LNP-R6-04M1通过ICV注射在P1时给予（10ug），而LNP-ASO-10-27通过ICV注射在P3时给予（10ug）；

[0179] 处理组7：通过给予LNP-ASO-10-27和LNP-R6-04M1进行联合处理。LNP-ASO-10-27通过ICV注射在P1时给予（10ug），而LNP-R6-04M1通过ICV注射在P3时给予（10ug）；

[0180]

[0181] 处理组8：LNP-R6-04M1和利司扑兰的联合处理。LNP-R6-04M1通过ICV注射在P1时（10ug）注射，而利司扑兰通过IP注射在P3时以0.3mg/kg的浓度注射；

[0182] 处理组9：LNP-R6-04M1和利司扑兰的联合处理。LNP-R6-04M1通过ICV注射在P1时（10ug）注射，而利司扑兰通过IP注射在P3时以1mg/kg的浓度注射；

[0183] III型SMA小鼠通过皮下（SC）注射在P1时（5μL）和P3时（5μL）注射两次生理盐水。P1和P3表示出生后第1天和第3天；

[0184] 处理组10：用生理盐水处理小鼠，在大脑、肝脏和脊髓组织中通过RT-qPCR对SMN2FL和SMN2 Δ 7mRNA水平进行定量。

P1和P3表示出生后第1天和第3天。

结果

[0185] 如图13A所示，LNP-R6-04M1（处理组1）相对于对照（处理组10）诱导脑中SMN2 Δ 7mRNA表达增加到1.2倍，并且不上调脑中SMN2FL mRNA表达。LNP-ASO-10-27（处理组2）相对于对照（处理组10）诱导脑中SMN2FL mRNA表达增加到1.6倍，并诱导脑中SMN2 Δ 7mRNA表达降低到0.7倍。浓度为0.3mg/kg（处理组3）、1mg/kg（处理组4）和3mg/kg（处理组5）的利司扑兰分别相对于对照组诱导脑中SMN2FL mRNA表达增加到1.1、1.3和1.0倍，并相对于对照组（处理组10）诱导脑中SMN2 Δ 7mRNA表达增加到1.0倍。

[0186] 在P1时以LNP-R6-04M1（10ug）并在P3时以LNP-ASO-10-27（10ug）的联合处理（处理组6）相对于对照组（处理组10）诱导脑中SMN2FL mRNA表达增加到1.8倍，并相对于对照组（处理组10）降低脑中SMN2 Δ 7mRNA表达至0.8倍。

[0187] 在P1时以LNP-ASO-10-27（10ug）并在P3时以LNP-R6-04M1（10ug）的联合处理（处理组7）相对于对照组（处理组10）诱导脑中SMN2FL mRNA表达增加到2.0倍和脑中SMN2 Δ 7mRNA表达降低至0.6倍。

[0188] 在P1时以LNP-R6-04M1（10ug）处理和浓度为0.3mg/kg的利司扑兰的联合处理（处理组8）相对于对照组（处理组10）分别诱导脑中SMN2FL mRNA表达增加到1.2倍和脑中SMN2 Δ 7mRNA表达为1.0倍。

[0189] 在P1时以LNP-R6-04M1（10ug）处理与浓度为1mg/kg的利司扑兰的联合处理（处理

组9) 相对于对照组 (处理组10) 分别诱导脑中SMN2FL mRNA表达增加1.3倍和脑中SMN2 Δ 7mRNA表达为1.0倍。

[0190] 如图13B所示, LNP-R6-04M1 (处理组1) 并未诱导肝脏中SMN2FL mRNA表达增加。LNP-ASO-10-27 (处理组2) 相对于对照 (处理组10) 诱导肝脏中SMN2FL mRNA表达增加到1.7倍, 并诱导肝脏中SMN2 Δ 7mRNA表达降低至0.9倍。浓度为0.3mg/kg (处理组3)、1mg/kg (处理组4) 和3mg/kg (处理组5) 的利司扑兰相对于对照组 (处理组10) 分别诱导肝脏中SMN2FL mRNA表达增加到1.1、1.5和1.0倍, 并相对于对照组 (处理组10) 诱导肝脏中SMN2 Δ 7mRNA表达分别增加到1.0、0.9、1.0倍。

[0191] 在P1时以LNP-R6-04M1 (10ug) 与在P3时以LNP-ASO-10-27 (10ug) 的联合处理 (处理组6) 相对于对照组 (处理组10) 诱导肝脏中SMN2FL mRNA表达增加到1.0倍, 并相对于对照组 (处理组10) 降低肝脏中SMN2 Δ 7mRNA表达至0.9倍。

[0192] 在P1时以LNP-ASO-10-27 (10ug) 与在P3时以LNP-R6-04M1 (10ug) 的联合处理 (处理组7) 相对于对照组 (处理组10) 诱导肝脏中SMN2FL mRNA表达增加到1.6倍和肝脏中SMN2 Δ 7mRNA表达为1.0倍。

[0193] 在P1时以LNP-R6-04M1 (10ug) 处理与浓度为0.3mg/kg的利司扑兰的联合处理 (处理组8) 分别诱导肝脏中SMN2FL mRNA表达增加到1.6倍和肝脏中SMN2 Δ 7mRNA表达增加到1.1倍。

[0194] 在P1时以LNP-R6-04M1 (10ug) 处理与浓度为1mg/kg的利司扑兰的联合处理 (处理组9) 分别诱导肝脏中SMN2FL mRNA表达增加到1.5倍和肝脏中SMN2 Δ 7mRNA表达增加到1.1倍。

[0195] 如图13C所示, LNP-R6-04M1 (处理组1) 并未诱导脊髓中SMN2FL mRNA表达的增加。LNP-ASO-10-27 (处理组2) 相对于对照诱导脊髓中SMN2FL mRNA表达增加到1.3倍, 并诱导脊髓中SMN2 Δ 7mRNA表达降低至0.8倍。

[0196] 在P1时以LNP-R6-04M1 (10ug) 与在P3时以LNP-ASO-10-27 (10ug) 的联合处理 (处理组6) 相对于对照组诱导脊髓中SMN2FL mRNA表达增加到1.8倍, 并相对于对照组增加脊髓中SMN2 Δ 7mRNA表达至1.2倍。

[0197] 在P1时以LNP-ASO-10-27 (10ug) 与在P3时以LNP-R6-04M1 (10ug) 的联合处理 (处理组7) 相对于对照组诱导脊髓中SMN2FL mRNA表达增加到2.2倍和脊髓中SMN2 Δ 7mRNA表达增加到1.1倍。

[0198] 如图13A-13C所示, SMN2 saRNA和SMN2 mRNA调节剂的联合处理使得SMN2FL mRNA表达和SMN2 Δ 7mRNA表达增加。

7.12. 材料和方法

[0199] 寡核苷酸设计与合成

[0200] 针对SMN2的saRNA包括DS06-0004 (也称为RAG6-281)、DS06-0031 (也称为RAG6-1266) 和DS06-0067 (也称为RAG6-293), 它们被设计成分别在相对于SMN2转录起始位点的-281、-1266和-293位置处靶向SMN2基因启动子 (图1)。通过使用固相技术在K&A DNA合成仪 (K&A Laborgeraete GbR, 德国沙夫海姆市) 上合成SMN2 saRNA。简言之, 将亚磷酰胺单体依次添加到固体支持物上以生成所需的全长寡核苷酸。各碱基添加循环包括四个化学反应: 脱三苯甲基化、偶联、氧化/硫醇化和封端。合成后, 将固体支持物转移到螺旋盖微量离心管

中。对于1 μ M合成规模,添加33%甲胺的乙醇溶液和1ml氢氧化铵的混合物。然后将含有固体支持物的试管在60℃至65℃的烘箱中加热2小时,然后冷却至室温。收集裂解溶液并在speedvac中蒸发至干燥。将仍带有2'-TBDMS基团的粗制RNA寡核苷酸溶解在0.1ml的DMSO中。添加1ml三乙胺3HF后,盖上试管盖,剧烈摇动混合物以确保完全溶解。将瓶子在60℃至65℃的烘箱中加热3至3.5小时。将试管从烘箱中取出并冷却至室温。将含有完全去甲硅烷基化的寡核苷酸的溶液在干冰上冷却。以每份0.5ml将2ml冰冷的正丁醇(-20℃)小心地添加,以沉淀寡核苷酸。过滤沉淀物并用1ml冰冷的正丁醇洗涤,然后将沉淀物溶解在1M TEAA(乙酸三乙铵)中。然后使用source 15Q柱通过交换(IEC)HPLC将粗制寡核苷酸纯化。并使用DNA PacTMPA100柱通过离子交换(IEC)HPLC分析级分的纯度。在生成脱盐的纯化单链溶液后,通过使两条互补的单链寡核苷酸退火来制备双链体,并冻干成粉末。

[0201] ASO-10-27:反义寡核苷酸(ASO)ASO-10-27,也称为诺西那生(**Spinraza®**),使用与上述相同的技术合成,只是省略了最后的退火步骤。ASO-10-27为单链并经2'-O-2-甲氧基乙基(MOE)修饰的ASO,其通过靶向SMN2基因内含子7处的内含子剪接沉默子(ISS)诱导外显子7包含(Hua,Y,等反义掩蔽hnRNP A1/A2内含子剪接沉默子纠正转基因小鼠中的SMN2剪接(Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice). "Am J Human Genet(2008))。ASO-10-27的序列是:meU*meC*meA*meC*meU*meU*meU*meC*meA*meU*meA*meA*meU*meG*me C*meU*meG*meG,其中,me是2' MOE,*是硫代磷酸酯(PS)主链修饰,所有的胞嘧啶(C)均为5'甲基胞嘧啶。将冻干的寡核苷酸悬浮在不含RNA酶的水中用于细胞转染或用生理盐水稀释至体内注射合适的浓度。

[0202] 细胞培养和处理

[0203] SMA患者来源的成纤维细胞获自利埃尔研究所(Coriell Institute)(美国新泽西州卡姆登),包括GM00232(I型SMA,具有2个SMN2基因拷贝)和GM03813(II型SMA,具有3个SMN2基因拷贝)。这些细胞在补充有15%小牛血清(西伽马奥里奇公司(Sigma-Aldrich))、1% NEAA(吉布可公司(Gibco))和1%青霉素/链霉素(吉布可公司)的改良型MEM培养基(吉布可公司,赛默飞世尔科学公司(Thermo Fisher Scientific),加利福尼亚州卡尔斯巴德)中以5% CO₂和37℃培养。为了转染包括saRNA、siRNA和ASO在内的寡核苷酸,将细胞以1×10⁵个细胞/孔的密度接种到6孔板中,并根据生产商提供的反向转染方案使用RNAiMax(英杰公司(Invitrogen),加利福尼亚州卡尔斯巴德)以不同浓度的寡核苷酸转染72小时(除非另有说明)。表1列出了saRNA、SMN2 siRNA(DS06-332i)、对照dsRNA(dsCon2)和ASO的序列。对于细胞的利司扑兰处理,除非另有说明,将溶解在DMSO中的利司扑兰(HY-109101,MedChem Express公司,新泽西州蒙茅斯章克申Monmouth Junction)以所需浓度直接添加到细胞中72小时。

[0204] 表1:寡核苷酸链序列和双链组成

标题	序列编号	序列 (5'-3')	长度
DS06-0004	SEQ ID NO: 476 SEQ ID NO: 477	AGACGAGGCCUAAGCAACATT UGUUGCUUAGGCCUCGUCUTT	21 nt 21 nt
DS06-0031	SEQ ID NO: 478 SEQ ID NO: 479	UUGUACACUUGGUCAACAUTT AUGUUGACCAAGUGUACAATT	21 nt 21 nt
DS06-0067	SEQ ID NO: 480 SEQ ID NO: 481	CACUGGAGUUCGAGACGAGTT CUCGUCUCGAACUCCAGUGTT	21 nt 21 nt
DS06-332i	SEQ ID NO: 482 SEQ ID NO: 483	GGUGACAUUUGUGAAACUUTT AAGUUUCACAAAUGUCACCTT	21 nt 21 nt
dsCon2	SEQ ID NO: 484 SEQ ID NO: 485	ACUACUGAGUGACAGUAGATT UCUACUGUCACUCAGUAGUTT	21 nt 21 nt
ASO-10-27	SEQ ID NO: 486	meU*meC*meA*meC*meU*meU*meU*meC*me A*meU*meA*meA*meU*meG*meC*meU*meG* meG	18 nt
LNP-R6-04M1	SEQ ID NO:488 SEQ ID NO:496	mG*fA*mCfGmAfGmGfCfUfAfAmGfCmAfA* mC*fA VpmU*fG*mUfUmGfCmUfUmAfGmGfCmC*fU* mC*fG*mU*fC*mU*fC	18 nt 20 nt
LNP-ASO-10-27	SEQ ID NO:486	meU*meC*meA*meC*meU*meU*meU*meC*me A*meU*meA*meA*meU*meG*meC*meU*meG* meG	18 nt

注意:m, 2'-O-甲基 (2'-OMe); me, 2'-O-甲氧基乙基 (2'MOE); f, 2'-氟; *, 硫代磷酸酯 (PS) 主链修饰; 带下划线的C, 5' 甲基胞嘧啶; Vp, 5' - (E) - 乙烯基膦酸酯

[0205] RNA分离和逆转录-定量聚合酶链反应 (RT-qPCR)

[0206] 为了从培养的细胞中分离RNA, 使用RNeasy Plus Mini试剂盒 (凯杰公司 (Qiagen), 德国希尔登) 根据其手册从经处理的细胞中分离总细胞RNA。为了从动物组织分离RNA, 收集组织并将其储存在RNA later中 (AM7021, 赛默飞世尔公司 (Thermo Fisher))。然后使用MagPure Total RNA Micro LQ试剂盒 (Magen公司, R6621, 中国) 通过auto-pure96 机器 (ALLSHENG公司, 中国) 分离总RNA。使用包含gDNA Eraser的PrimeScript RT试剂盒 (宝生物公司 (Takara), 日本志贺) 将所得RNA (1μg) 逆转录成cDNA。使用SYBR Premix Ex Taq II (宝生物公司, 日本志贺) 试剂和特异性扩增全长 (SMN2FL) 或 Δ 7SMN2 mRNA (SMN2 Δ 7) 的引物在ABI 7500快速实时PCR系统 (应用生物系统公司 (Applied Biosystems), 加利福尼亚州福斯特城) 中扩增所得cDNA (图1)。反应条件为: 95℃ 下3秒 (1个循环) 和60℃ 下30秒 (40个循环)。TBP基因的扩增用作内部对照。所有引物序列列于表2中。RT和RT-qPCR反应在表3和表4中显示。

[0207] 表2: 用于RT-qPCR检测的引物序列

引物名称	序列编号	序列 (5'-3')	产物大小
SMN2FL F SMN2FL R	SEQ ID NO: 487 SEQ ID NO: 489	TCATACTGGCTATTATATGGGTTTT TGCTCTATGCCAGCATTCTC	95 bp
SMNΔ7 F SMNΔ7 R	SEQ ID NO: 490 SEQ ID NO: 491	GCTATTATATGGAAATGCTGGCATAG TTCCAGATCTGTCTGATCGTTTCT	73 bp
TBP F TBP R	SEQ ID NO: 492 SEQ ID NO: 493	TGCTCACCCACCAACAATTTAG TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG	139 bp
Tbp F Tbp R	SEQ ID NO: 497 SEQ ID NO: 498	GCTCTGGAATTGTACCGCAG CTGCAGCAAATCGCTTGGA	126 bp

[0208] 表3:RT反应

RT 反应-1 (宝生物公司, RR047A)	体积 (μl)
5×gDNA Eraser 缓冲液	2
gDNA Eraser	1
总 RNA (1 μg) + 无 RNA 酶的 dH ₂ O	7
总计	10
42°C 下 5 分钟, 储存在 4°C	

试剂-2 (宝生物公司, RR047A)	体积 (μl)
5 × PrimeScript 缓冲液 2	4
PrimeScript RT 酶混合物 I	1
RT 引物混合物	1
无 RNA 酶的 dH ₂ O	4
RT 反应-1	10

总计	20
37°C 下 15 分钟, 85°C 下 5 秒, 储存于 4°C	

表4:RT-qPCR反应

试剂(宝生物公司, RR820A)	体积 (μl)
SYBR Premix Ex Taq II (2×)	5
PCR引物 (F+R) 5μM	1
cDNA (RT产物)	4
总计	10

[0209] 半定量RT-PCR/DdeI消化试验

[0210] 为了在一个反应中同时扩增SMN2FL和SMN2 Δ 7, 使用跨过SMN2外显子7的引物通过半定量RT-PCR扩增cDNA(表5)(图2)。PCR反应条件为: 94°C下2分钟(1个循环), 98°C下10秒, 60°C下15秒, 72°C下32秒, 循环30次, 最后5分钟在72°C下延伸。PCR反应列于表6。为了进一步区分SMN1 mRNA和SMN2, 将SMN的PCR产物用DdeI限制酶(R0175L, NEB) 消化, 然后用2%琼脂糖凝胶分离。由于SMN2外显子8上的核苷酸变异, 扩增自SMN2基因而非SMN1基因的PCR产物中存在DdeI识别位点, DdeI消化从SMN2FL和SMN2 Δ 7释放115bp的片段, 得到3个片段: 507 (SMN1FL)、338 (SMN2 Δ 7)、392 (SMN2FL) 和115bp(图2)。还扩增TBP基因, 作为RNA加载对照。DdeI消化反应条件为: 37°C下60分钟, 65°C下20分钟, 1个循环。DdeI消化反应列于表7中。

[0211] 表5:用于半定量RT-qPCR检测的引物序列

引物名称	序列编号	序列 (5'-3')	产物大小
SMN-外显子 6 F SMN-外显子 8 R	SEQ ID NO: 494 SEQ ID NO: 495	CCCCACCCACCTCCCATATG CCCTTCTCACAGCTCATAAAAT TAC	507 bp 和 453 bp

[0212] 表6:半定量RT-PCR反应

试剂（宝生物公司，R010A）	体积（ μl ）
5 $\times$ Prime STAR 缓冲液	5
dNTP 混合物	2
e 引物 F+R（5 μM ）	1
模板	2
PrimeSTAR HS DNA 聚合酶	0.25
DD-水	14.75
总计	25

[0213] 表7:DdeI消化反应

试剂 (NEB,R0175L)	体积 (μl)
限制酶	1
10 $\times$ NEB缓冲液	1
cDNA	6
DD-水	2
总计	10

[0214] Western印迹

[0215] 使用包含蛋白酶抑制剂的1 $\times$ RIPA缓冲液从转染的细胞中收获蛋白质,并通过BCA蛋白质测定试剂盒(碧云天公司(Beyotime),P0010,中国)检测蛋白质浓度。为了从动物组织中分离蛋白质,收集组织并使用1 $\times$ RIPA缓冲液裂解。使用BCA蛋白质测定试剂盒测量蛋白质浓度。使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶进行蛋白质电泳(10 μg 蛋白质/孔),然后将其转移到聚偏二氟乙烯(0.45 μm PVDF)膜。用一抗抗SMN(CST公司,19276,美国)或抗 α/β -微管蛋白(CST公司,2148s,美国)抗体在4 $^{\circ}\text{C}$ 下对膜进行印迹过夜。在用TBST缓冲液洗涤三次后,将膜与抗IgG、辣根过氧化物酶偶联的二抗(CST公司,7074s和7076s,美国)在室温(RT)下孵育1小时。然后用TBST缓冲液将膜洗涤3次,每次10分钟,并通过Image Lab(伯乐公司(BIO-RAD),Chemistry Doctm MP成像系统)进行分析。使用ImageJ软件量化SMN蛋白和 α/β -微管蛋白的条带密度。

[0216] 动物程序

[0217] 所有动物程序均由经过认证的实验室人员使用符合当地和州法规并经机构动物护理和使用委员会批准的协议进行。通过纯合敲除小鼠Smn外显子7创建并具有如Hsieh-Li等(Hsieh-Li,H.M.,等.脊髓性肌萎缩症小鼠模型(A mouse model for spinal muscular atrophy).Nature Genet(2000))之前所述人SMN2转基因的SMA样小鼠(Smn $^{-/-}$ -SMN2 $^{+/-}$)获自杰克逊实验室公司(Jackson Laboratories)。在出生后第0天(P0)收集剪尾,通过爪子纹身识别各幼崽并使用下述3个特异性引物的组通过PCR分析进行基因分型:S1:5'-ATAACACCACCACTCTTACTC-3';和S2:5'-GTAGCCGTGATGCCATTGTCA-3'(野生型等位基因为1,150bp条带);和S1和H1:5'-AGCCTGAAGAACGAGATCAGC-3'(突变等位基因为950bp条带)。PCR产物通过1%琼脂糖凝胶检测。生成严重型SMA小鼠(Smn $^{-/-}$,SMN $^{+/0}$)。将Smn小鼠的同窝杂合子(Smn1 $^{+/-}$,SMN2 $^{+/-}$)用作对照。

[0218] 脂质纳米颗粒(LNP) 制备

[0219] 将具有溶解在100%乙醇中的DLin-KC2-DMA (50mg/mL)、胆固醇 (10mg/mL)、DSPC (7.5mg/mL) 和PEG2000-DMPE (20mg/mL) 的脂质储液通过微流控芯片与寡核苷酸原液 (20mg/mL, 0.05mM柠檬酸盐缓冲液, pH 4.0) 以1:3的体积比12mL/分钟的流速快速混合。DLin-KC2-DMA、胆固醇、DSPC和PEG2000-DMPE的摩尔比为50:38.5:10:1.5。然后,使用透析管在1X PBS (pH7.4) 中透析该预形成的囊泡12小时。使用Brookhaven NanoBrook 90Plus ζ (Zeta) 通过动态光散射测试LNP的颗粒大小。RNA浓度使用NanoPhotometer N50通过A260测试。

[0220] 脑室内(ICV) 注射

在出生后第0天 (PND0) 收集剪尾,用于通过PCR进行基因分型,并分为I型SMA小鼠 (Smn^{-/-}, SMN2^{+/-})、III型SMA小鼠 (Smn^{-/-}, SMN2^{+/+}) 和杂合子 (Het) 对照 (Smn1^{+/-}, SMN2^{+/-})。双侧脑室内 (ICV) 注射在通过2%异氟醚的麻醉下分别在P1和P3时使用幼崽用29号注射器 (各侧2 μ L, 5mg/ml) 在1.5mm或3.6mm的深度进行。在新生小鼠下腹部区域进行腹膜内 (IP) 注射。表1列出了saRNA (LNP-R6-04M1) 和LNP-ASO-10-27的序列。

表 8.SMN2 启动子靶向 saRNA 的序列及其靶 DNA 序列

RAG6-176 3	ATCTGTGAGATGTACCTTT (SEQ ID NO:315)	AUCUGUGAGAUGUACCUUU[dT][dT] (SEQ ID NO:1)	AAAGGUACAUCACAGAU[dT][dT] (SEQ ID NO:158)
RAG6-163 4	CACTCTGTCACTCAGGCTG (SEQ ID NO:316)	CACUCUGUCACUCAGGCUG[dT][dT] (SEQ ID NO:2)	CAGCCUGAGUGACAGAGUG[dT][dT] (SEQ ID NO:159)
RAG6-163 3	ACTCTGTCACTCAGGCTGG (SEQ ID NO:317)	ACUCUGUCACUCAGGCUGG[dT][dT] (SEQ ID NO:3)	CCAGCCUGAGUGACAGAGU[dT][dT] (SEQ ID NO:160)
RAG6-163 1	TCTGTCACTCAGGCTGGAG (SEQ ID NO:318)	UCUGUCACUCAGGCUGGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:4)	CUCCAGCCUGAGUGACAGA[dT][dT] (SEQ ID NO:161)
RAG6-162 3	TCAGGCTGGAGTGCAGTGG (SEQ ID NO:319)	UCAGGCUGGAGUGCAGUGG[dT][dT] (SEQ ID NO:5)	CCACUGCACUCCAGCCUGA[dT][dT] (SEQ ID NO:162)
RAG6-161 5	GAGTGCAGTGGCGTGATCT (SEQ ID NO:320)	GAGUGCAGUGGCGUGAUCU[dT][dT] (SEQ ID NO:6)	AGAUCACGCCACUCGACUC[dT][dT] (SEQ ID NO:163)
RAG6-161 2	TGCAGTGGCGTGATCTTGG (SEQ ID NO:321)	UGCAGUGGCGUGAUCUUGG[dT][dT] (SEQ ID NO:7)	CCAAGAUCACGCCACUGCA[dT][dT] (SEQ ID NO:164)
RAG6-161 1	GCAGTGGCGTGATCTTGGC (SEQ ID NO:322)	GCAGUGGCGUGAUCUUGGC[dT][dT] (SEQ ID NO:8)	GCCAAGAUCACGCCACUGC[dT][dT] (SEQ ID NO:165)
RAG6-160 6	GGCGTGATCTTGGCTCACT (SEQ ID NO:323)	GGCGUGAUCUUGGCUCACU[dT][dT] (SEQ ID NO:9)	AGUGAGCCAAAGAUCACGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:166)
RAG6-160 3	GTGATCTTGGCTCACTGCA (SEQ ID NO:324)	GUGAUCUUGGCUCACUGCA[dT][dT] (SEQ ID NO:10)	UGCAGUGAGCCAAAGAUCAC[dT][dT] (SEQ ID NO:167)
RAG6-160 2	TGATCTTGGCTCACTGCAA (SEQ ID NO:325)	UGAUCUUGGCUCACUGCAA[dT][dT] (SEQ ID NO:11)	UUGCAGUGAGCCAAAGAUCA[dT][dT] (SEQ ID NO:168)

RAG6-160 0	ATCTTGGCTCACTGCAACC (SEQ ID NO:326)	AUCUUGGCUCACUGCAACC[dT][dT] (SEQ ID NO:12)	GGUUGCAGUGAGCCAAAGAU[dT][dT] (SEQ ID NO:169)
RAG6-159 8	CTTGGCTCACTGCAACCTC (SEQ ID NO:327)	CUUGGCUCACUGCAACCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:13)	GAGUUGCAGUGAGCCAAAG[dT][dT] (SEQ ID NO:170)
RAG6-159 7	TTGGCTCACTGCAACCTCC (SEQ ID NO:328)	UUGGCUCACUGCAACCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:14)	GGAGUUUGCAGUGAGCCAA[dT][dT] (SEQ ID NO:171)
RAG6-157 8	GCCTCCCGAGTTCAAGTGA (SEQ ID NO:329)	GCCUCCCGAGUUCAAGUGA[dT][dT] (SEQ ID NO:15)	UCACUUGAACUCGGGAGGC[dT][dT] (SEQ ID NO:172)
RAG6-157 7	CCTCCCGAGTTCAAGTGAT (SEQ ID NO:330)	CCUCCCGAGUUC AAGUGAU[dT][dT] (SEQ ID NO:16)	AUCACUUUGAACUCGGGAGG[dT][dT] (SEQ ID NO:173)
RAG6-157 6	CTCCCGAGTTCAAGTGATT (SEQ ID NO:331)	CUCCCGAGUUC AAGUGAUU[dT][dT] (SEQ ID NO:17)	AAUCACUUGAACUCGGGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:174)
RAG6-157 5	TCCCGAGTTCAAGTGATTC (SEQ ID NO:332)	UCCCGAGUUC AAGUGAUUC[dT][dT] (SEQ ID NO:18)	GAAUCACUUGAACUCGGGA[dT][dT] (SEQ ID NO:175)
RAG6-156 7	TCAAGTGATTCTCCTGGCT (SEQ ID NO:333)	UCAAGUGAUUCUCCUGGCU[dT][dT] (SEQ ID NO:19)	AGCCAGGAGAAUCACUUGA[dT][dT] (SEQ ID NO:176)
RAG6-156 5	AAGTGATTCTCCTGGCTCA (SEQ ID NO:334)	AAGUGAUUCUCCUGGCUCA[dT][dT] (SEQ ID NO:20)	UGAGCCAGGAGAAUCACUU[dT][dT] (SEQ ID NO:177)
RAG6-156 4	AGTGATTCTCCTGGCTCAG (SEQ ID NO:335)	AGUGAUUCUCCUGGCUCA[dT][dT] (SEQ ID NO:21)	CUGAGCCAGGAGAAUCACU[dT][dT] (SEQ ID NO:178)
RAG6-156 3	GTGATTCTCCTGGCTCAGC (SEQ ID NO:336)	GUGAUUCUCCUGGCUCA[dT][dT] (SEQ ID NO:22)	GCUGAGCCAGGAGAAUCAC[dT][dT] (SEQ ID NO:179)
RAG6-154 8	CAGCCTCCCAAGCAGCTGT (SEQ ID NO:337)	CAGCCUCCCAAGCAGCUGU[dT][dT] (SEQ ID NO:23)	ACAGCUGCUUGGGAGGCUG[dT][dT] (SEQ ID NO:180)

RAG6-154 5	CCTCCCAAGCAGCTGTGTCAT (SEQ ID NO:338)	CCUCCCAAGCAGCUGUCAU[dT][dT] (SEQ ID NO:24)	AUGACAGCUGCUUGGGAGG[dT][dT] (SEQ ID NO:181)
RAG6-154 3	TCCCAAGCAGCTGTTCATTA (SEQ ID NO:339)	UCCCAAGCAGCUGUCAUU[dT][dT] (SEQ ID NO:25)	UAAUGACAGCUGCUUGGGA[dT][dT] (SEQ ID NO:182)
RAG6-153 5	AGTGTTCATTACAGGCCTG (SEQ ID NO:340)	AGCUGUCAUACAGGCCUG[dT][dT] (SEQ ID NO:26)	CAGGCCUGUAAUGACAGCU[dT][dT] (SEQ ID NO:183)
RAG6-153 4	GCTGTCATTACAGGCCTGC (SEQ ID NO:341)	GCUGUCAUACAGGCCUGC[dT][dT] (SEQ ID NO:27)	GCAGGCCUGUAAUGACAGC[dT][dT] (SEQ ID NO:184)
RAG6-153 3	CTGTCAATTACAGGCCTGCA (SEQ ID NO:342)	CUGUCAUACAGGCCUGCA[dT][dT] (SEQ ID NO:28)	UGCAGGCCUGUAAUGACAG[dT][dT] (SEQ ID NO:185)
RAG6-148 3	GGAGAAACAGGGTTTCACC (SEQ ID NO:343)	GGAGAAACAGGGUUUCACC[dT][dT] (SEQ ID NO:29)	GGUGAAACCCUGUUUCUCC[dT][dT] (SEQ ID NO:186)
RAG6-148 1	AGAAACAGGGTTTCACCAT (SEQ ID NO:344)	AGAAACAGGGUUUCACCAU[dT][dT] (SEQ ID NO:30)	AUGGUGAAACCCUGUUUCU[dT][dT] (SEQ ID NO:187)
RAG6-140 3	AAGTGCTGGATTATAGGC (SEQ ID NO:345)	AAGUGCUGGGAUUAUAGGC[dT][dT] (SEQ ID NO:31)	GCCUAUAAUCCAGCACUU[dT][dT] (SEQ ID NO:188)
RAG6-139 2	TTATAGGCATGAGCCACCG (SEQ ID NO:346)	UUAUAGGCAUGAGCCACCG[dT][dT] (SEQ ID NO:32)	CGGUGGCUCAUGCCUAUAA[dT][dT] (SEQ ID NO:189)
RAG6-124 1	ATTCTCCCTTCCTCCACA (SEQ ID NO:347)	AUUCUCCCUUCCUCCACA[dT][dT] (SEQ ID NO:33)	UGUGGAGGAAGGGGAGAAU[dT][dT] (SEQ ID NO:190)
RAG6-123 9	TCTCCCTTCCTCCACAGA (SEQ ID NO:348)	UCUCCCUUCCUCCACAGA[dT][dT] (SEQ ID NO:34)	UCUGUGGAGGAAGGGGAGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:191)
RAG6-111 9	CATTAGCAACCCCTAGATG (SEQ ID NO:349)	CAUUUAGCAACCCUAGAUG[dT][dT] (SEQ ID NO:35)	CAUCUAGGGGUUGCUAAAUG[dT][dT] (SEQ ID NO:192)

RAG6-111 8	ATTAGCAACCCTAGATGC (SEQ ID NO:350)	AUUAGCAACCCUAGAUGC[dT][dT] (SEQ ID NO:36)	GCAUCUAGGGUUGCUAAAU[dT][dT] (SEQ ID NO:193)
RAG6-111 7	TTTAGCAACCCTAGATGCT (SEQ ID NO:351)	UUUAGCAACCCUAGAUGC[dT][dT] (SEQ ID NO:37)	AGCAUCUAGGGUUGCUAAA[dT][dT] (SEQ ID NO:194)
RAG6-111 6	TTAGCAACCCTAGATGCTT (SEQ ID NO:352)	UUAGCAACCCUAGAUGC[dT][dT] (SEQ ID NO:38)	AAGCAUCUAGGGUUGCUAA[dT][dT] (SEQ ID NO:195)
RAG6-111 5	TAGCAACCCTAGATGCTTA (SEQ ID NO:353)	UAGCAACCCUAGAUGC[dT][dT] (SEQ ID NO:39)	UAGCAUCUAGGGUUGCUA[dT][dT] (SEQ ID NO:196)
RAG6-108 9	ATACTGGAGGCCCGGTGTG (SEQ ID NO:354)	AUACUGGAGGCCCGGUGUG[dT][dT] (SEQ ID NO:40)	CACACCGGGCCUCCAGUAU[dT][dT] (SEQ ID NO:197)
RAG6-107 5	GTGTGGTGGCTCACACCTG (SEQ ID NO:355)	GUGUGGUGCUCACACCUG[dT][dT] (SEQ ID NO:41)	CAGGUGUGAGCCACCACAC[dT][dT] (SEQ ID NO:198)
RAG6-107 2	TGGTGGCTCACACCTGTAA (SEQ ID NO:356)	UGGUGGCUCACACCUGUA[dT][dT] (SEQ ID NO:42)	UUACAGGUGUGAGCCACCAC[dT][dT] (SEQ ID NO:199)
RAG6-107 1	GGTGGCTCACACCTGTAAT (SEQ ID NO:357)	GGUGGCUCACACCUGUAU[dT][dT] (SEQ ID NO:43)	AUUACAGGUGUGAGCCACC[dT][dT] (SEQ ID NO:200)
RAG6-107 0	GTGGCTCACACCTGTAAATC (SEQ ID NO:358)	GUGGCUCACACCUGUAU[dT][dT] (SEQ ID NO:44)	GAUUACAGGUGUGAGCCAC[dT][dT] (SEQ ID NO:201)
RAG6-106 8	GGCTCACACCTGTAATCCC (SEQ ID NO:359)	GGCUCACACCUGUAUCCC[dT][dT] (SEQ ID NO:45)	GGGAUUACAGGUGUGAGGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:202)
RAG6-106 4	CACACCTGTAATCCCAGCA (SEQ ID NO:360)	CACACCUGUAUCCCAGCA[dT][dT] (SEQ ID NO:46)	UGCUGGGAUUACAGGUGUG[dT][dT] (SEQ ID NO:203)
RAG6-106 3	ACACCTGTAATCCCAGCAC (SEQ ID NO:361)	ACACCUGUAUCCCAGCAC[dT][dT] (SEQ ID NO:47)	GUGCUGGGAUUACAGGUGU[dT][dT] (SEQ ID NO:204)

RAG6-106 1	ACCTGTAAATCCCAAGCACTT (SEQ ID NO:362)	ACCUGUAAUCCCAAGCACUU[dT][dT] (SEQ ID NO:48)	AAGUCUGGGGAUUAACAGGU[dT][dT] (SEQ ID NO:205)
RAG6-105 7	GTAATCCCAAGCACTTTGGG (SEQ ID NO:363)	GUAAUCCCAAGCACUUUGGG[dT][dT] (SEQ ID NO:49)	CCCAAAGUCUGGGGAUUAAC[dT][dT] (SEQ ID NO:206)
RAG6-105 6	TAATCCCAAGCACTTTGGGA (SEQ ID NO:364)	UAAUCCCAAGCACUUUGGA[dT][dT] (SEQ ID NO:50)	UCCCAAAGUCUGGGGAUUA[dT][dT] (SEQ ID NO:207)
RAG6-105 5	AATCCCAAGCACTTTGGGAG (SEQ ID NO:365)	AAUCCCAAGCACUUUGGGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:51)	CUCCCAAAGUCUGGGGAUUA[dT][dT] (SEQ ID NO:208)
RAG6-105 0	CAGCACTTTGGGAGGCCGA (SEQ ID NO:366)	CAGCACUUUGGGAGGCCGA[dT][dT] (SEQ ID NO:52)	UCGGCCUCCCAAGUGCUG[dT][dT] (SEQ ID NO:209)
RAG6-103 3	GAGCGGTCGGATTACGAG (SEQ ID NO:367)	GAGCGGUCGGAUUAACGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:53)	CUCGUAAUCCCAAGCCGCCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:210)
RAG6-103 1	GGCGGTCGGATTACGAGGT (SEQ ID NO:368)	GGCGGUCGGAUUAACGAGGU[dT][dT] (SEQ ID NO:54)	ACCUCGUAAUCCCAAGCCGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:211)
RAG6-103 0	GCGGTCGGATTACGAGGTC (SEQ ID NO:369)	GCGGUCGGAUUAACGAGGUC[dT][dT] (SEQ ID NO:55)	GACCUUGUAAUCCCAAGCCGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:212)
RAG6-102 9	CGGTCGGATTACGAGGTCA (SEQ ID NO:370)	CGGUCGGAUUAACGAGGUCA[dT][dT] (SEQ ID NO:56)	UGACCUUGUAAUCCCAAGCCGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:213)
RAG6-102 8	GGTCGGATTACGAGGTCAG (SEQ ID NO:371)	GGUCGGAUUAACGAGGUCAG[dT][dT] (SEQ ID NO:57)	CUGACCUUGUAAUCCCAAGCCGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:214)
RAG6-102 7	GTCGGATTACGAGGTCAGG (SEQ ID NO:372)	GUCGGAUUAACGAGGUCAGG[dT][dT] (SEQ ID NO:58)	CCUGACCUUGUAAUCCCAAGCCGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:215)
RAG6-102 6	TCGGATTACGAGGTCAGGA (SEQ ID NO:373)	UCGGAUUAACGAGGUCAGGA[dT][dT] (SEQ ID NO:59)	UCCUGACCUUGUAAUCCCAAGCCGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:216)

RAG6-102 5	CGGATTACGAGGTCAGGAG (SEQ ID NO:374)	CGGAUACGAGGUCAGGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:60)	CUCCUGACCUCGUAUCCG[dT][dT] (SEQ ID NO:217)
RAG6-102 2	ATTACGAGGTCAGGAGTTC (SEQ ID NO:375)	AUACGAGGUCAGGAGUUC[dT][dT] (SEQ ID NO:61)	GAACUCCUGACCUCGUAU[dT][dT] (SEQ ID NO:218)
RAG6-102 1	TTACGAGGTCAGGAGTTCA (SEQ ID NO:376)	UUACGAGGUCAGGAGUUCA[dT][dT] (SEQ ID NO:62)	UGAACUCCUGACCUCGUAU[dT][dT] (SEQ ID NO:219)
RAG6-102 0	TACGAGGTCAGGAGTTCAA (SEQ ID NO:377)	UACGAGGUCAGGAGUUCAA[dT][dT] (SEQ ID NO:63)	UUGAACUCCUGACCUCGUA[dT][dT] (SEQ ID NO:220)
RAG6-101 9	ACGAGGTCAGGAGTTCAAG (SEQ ID NO:378)	ACGAGGUCAGGAGUUCAAAG[dT][dT] (SEQ ID NO:64)	CUUGAACUCCUGACCUCGU[dT][dT] (SEQ ID NO:221)
RAG6-101 6	AGGTCAGGAGTTCAAAGACC (SEQ ID NO:379)	AGGUCAGGAGUUCAAAGACC[dT][dT] (SEQ ID NO:65)	GGUCUUGAACUCCUGACCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:222)
RAG6-100 8	AGTTCAAGACCAGCCTGGC (SEQ ID NO:380)	AGUUCAAAGACCAGCCUGGC[dT][dT] (SEQ ID NO:66)	GCCAGGCGGUCUUGAACU[dT][dT] (SEQ ID NO:223)
RAG6-980	GAAACCCCATCTTTACTAA (SEQ ID NO:381)	GAAACCCCAUCUUUACUAA[dT][dT] (SEQ ID NO:67)	UUAGUAAAGAUGGGGUUUC[dT][dT] (SEQ ID NO:224)
RAG6-951	ATTAGCCGGGTGTGGTGGT (SEQ ID NO:382)	AUUAGCCGGGUGUGUGGU[dT][dT] (SEQ ID NO:68)	ACCACCACACCCCGCUAAU[dT][dT] (SEQ ID NO:225)
RAG6-937	GTGGTGGCGCCTGTAAATC (SEQ ID NO:383)	GUGGUGGCGCCUGUAAUUC[dT][dT] (SEQ ID NO:69)	GAUUACAGGCGCCACCAC[dT][dT] (SEQ ID NO:226)
RAG6-931	GGCGCCTGTAAATCCAGCT (SEQ ID NO:384)	GGCGCCUGUAAUCCAGCU[dT][dT] (SEQ ID NO:70)	AGCUGGGAUUACAGGGGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:227)
RAG6-923	TAATCCCAGCTACTCGGGG (SEQ ID NO:385)	UAAUCCAGCUACUCGGGG[dT][dT] (SEQ ID NO:71)	CCCCGAGUAGCUGGGAUUA[dT][dT] (SEQ ID NO:228)

RAG6-905	GGGCTGAGGCAGAAATTGCT (SEQ ID NO:386)	GGCUGAGGCAGAAUUGCU[dT][dT] (SEQ ID NO:72)	AGCAAUUCUGCCUCAGCCCC[dT][dT] (SEQ ID NO:229)
RAG6-898	GGCAGAAATTGCTTGAACCT (SEQ ID NO:387)	GGCAGAAUUGCUUGAACCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:73)	AGGUCAAGCAAUUCUGGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:230)
RAG6-896	CAGAAATTGCTTGAACCTGG (SEQ ID NO:388)	CAGAAUUGCUUGAACCUGG[dT][dT] (SEQ ID NO:74)	CCAGGUUCAAAGCAAUUCUG[dT][dT] (SEQ ID NO:231)
RAG6-886	TGAACCTGGGAGGCAGAGG (SEQ ID NO:389)	UGAACUUGGGAGGCAGAGG[dT][dT] (SEQ ID NO:75)	CCUCUGCCUCCCCAGGUUCA[dT][dT] (SEQ ID NO:232)
RAG6-885	GAACCTGGGAGGCAGAGGT (SEQ ID NO:390)	GAACUUGGGAGGCAGAGGU[dT][dT] (SEQ ID NO:76)	ACCUCUGCCUCCCCAGGUUC[dT][dT] (SEQ ID NO:233)
RAG6-883	ACCTGGGAGGCAGAGGTTG (SEQ ID NO:391)	ACCUGGAGGCAGAGGUUG[dT][dT] (SEQ ID NO:77)	CAACCUCUGCCUCCCCAGGU[dT][dT] (SEQ ID NO:234)
RAG6-866	TGCAGTGAGCTGAGATCAC (SEQ ID NO:392)	UGCAGUGAGCUGAGAUCAC[dT][dT] (SEQ ID NO:78)	GUGAUCUCAGCUCACUGCA[dT][dT] (SEQ ID NO:235)
RAG6-857	CTGAGATCACGCCACTGCA (SEQ ID NO:393)	CUGAGAUCACGCCACUGCA[dT][dT] (SEQ ID NO:79)	UGCAGUGGCGUGAUCUCAG[dT][dT] (SEQ ID NO:236)
RAG6-852	ATCACGCCACTGCATTCCA (SEQ ID NO:394)	AUCACGCCACUGCAUUCUCA[dT][dT] (SEQ ID NO:80)	UGGAAUGCAGUGGCGUGGAU[dT][dT] (SEQ ID NO:237)
RAG6-829	GGGTGACAGAGCAATACTC (SEQ ID NO:395)	GGUGACAGAGCAAUACUC[dT][dT] (SEQ ID NO:81)	GAGUAUUGCUCUGUCACCCC[dT][dT] (SEQ ID NO:238)
RAG6-826	TGACAGAGCAATACTCTGT (SEQ ID NO:396)	UGACAGAGCAAUACUCUGU[dT][dT] (SEQ ID NO:82)	ACAGAGUAUUGCUCUGUCA[dT][dT] (SEQ ID NO:239)
RAG6-822	AGAGCAATACTCTGTGCGCA (SEQ ID NO:397)	AGAGCAAUACUCUGUCGCA[dT][dT] (SEQ ID NO:83)	UGCGACAGAGUAUUGCUCU[dT][dT] (SEQ ID NO:240)

RAG6-796	AAAAGAAATACTGGAGGCTG (SEQ ID NO:398)	AAAAGAAUACUGGAGGCUG[dT][dT] (SEQ ID NO:84)	CAGCCUCCAGUAUUUCUUUU[dT][dT] (SEQ ID NO:241)
RAG6-795	AAAGAAATACTGGAGGCTGG (SEQ ID NO:399)	AAAGAAUACUGGAGGCUGG[dT][dT] (SEQ ID NO:85)	CCAGCCUCCAGUAUUUCUUUU[dT][dT] (SEQ ID NO:242)
RAG6-790	ATACTGGAGGCTGGGCGAG (SEQ ID NO:400)	AUACUGGAGGCUGGGCGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:86)	CUCGCCAGCCUCCAGUAU[dT][dT] (SEQ ID NO:243)
RAG6-775	CGAGGTGGCTCACACCTGT (SEQ ID NO:401)	CGAGGUGGCUCACACCUGU[dT][dT] (SEQ ID NO:87)	ACAGGUGAGCCACCUCG[dT][dT] (SEQ ID NO:244)
RAG6-772	GGTGGCTCACACCTGTAAT (SEQ ID NO:402)	GGUGGCUCACACCUGUAAU[dT][dT] (SEQ ID NO:88)	AUACAGGUGUGAGCCACC[dT][dT] (SEQ ID NO:245)
RAG6-769	GGCTCACACCTGTAAATCCC (SEQ ID NO:403)	GGCUCACACCUGUAAUCCC[dT][dT] (SEQ ID NO:89)	GGGAUUACAGGUGUGAGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:246)
RAG6-768	GCTCACACCTGTAAATCCCA (SEQ ID NO:404)	GCUCACACCUGUAAUCCCA[dT][dT] (SEQ ID NO:90)	UGGGAUUACAGGUGUGAGC[dT][dT] (SEQ ID NO:247)
RAG6-765	CACACCTGTAATCCCAGCA (SEQ ID NO:405)	CACACCUGUAAUCCCAGCA[dT][dT] (SEQ ID NO:91)	UGCUGGGAUUACAGGUGUG[dT][dT] (SEQ ID NO:248)
RAG6-757	TAATCCCAGCATTTTGGGA (SEQ ID NO:406)	UAAUCCCAGCAUUUUGGGA[dT][dT] (SEQ ID NO:92)	UCCCAAAAUGCUGGGAUUA[dT][dT] (SEQ ID NO:249)
RAG6-728	GGGCGGAATATCTTGAGCT (SEQ ID NO:407)	GGGCGGAAUAUCUUUGAGCU[dT][dT] (SEQ ID NO:93)	AGCUCAAAGUAUUUCCGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:250)
RAG6-722	AATATCTTGAGCTCAGGAG (SEQ ID NO:408)	AAUAUCUUUGAGCUCAGGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:94)	CUCCUGAGCUCAAAGUAUUA[dT][dT] (SEQ ID NO:251)
RAG6-703	TTCGAGACCAGCCTACACA (SEQ ID NO:409)	UUCGAGACCAGCCUACACA[dT][dT] (SEQ ID NO:95)	UGUGUAGGCUGGUCUCGAA[dT][dT] (SEQ ID NO:252)

RAG6-696	CCAGCCTACACAATATGCT (SEQ ID NO:410)	CCAGCCUACACAUAUAGCU[dT][dT] (SEQ ID NO:96)	AGCAUAUUGUGUAGGCUGG[dT][dT] (SEQ ID NO:253)
RAG6-689	ACACAATATGCTCCAAACG (SEQ ID NO:411)	ACACAAUAGCUCCAAACG[dT][dT] (SEQ ID NO:97)	CGUUUGGAGCAUAUUGUGU[dT][dT] (SEQ ID NO:254)
RAG6-688	CACAATATGCTCCAAACGC (SEQ ID NO:412)	CACAAUAUGCUCCAAACGC[dT][dT] (SEQ ID NO:98)	GCGUUUGGAGCAUAUUGUG[dT][dT] (SEQ ID NO:255)
RAG6-687	ACAATATGCTCCAAACGCC (SEQ ID NO:413)	ACAUAUGCUCCAAACGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:99)	GGCGUUUGGAGCAUAUUGU[dT][dT] (SEQ ID NO:256)
RAG6-676	CAACGCGCCTCTACAAA (SEQ ID NO:414)	CAACGCGCCUCUACAAA[dT][dT] (SEQ ID NO:100)	UUUGUAGAGCGCGGUUUG[dT][dT] (SEQ ID NO:257)
RAG6-622	CTGTGTCTTAGCTACTTG (SEQ ID NO:415)	CUGUGUCCUAGCUACUUG[dT][dT] (SEQ ID NO:101)	CAAGUAGCUAGGACCACAG[dT][dT] (SEQ ID NO:258)
RAG6-591	GGGAGGATCGCTTGAGCTC (SEQ ID NO:416)	GGGAGAUCCGUUGAGCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:102)	GAGCUCAAAGCGAUCCUCCC[dT][dT] (SEQ ID NO:259)
RAG6-589	GAGATCGCTTGAGCTCGG (SEQ ID NO:417)	GAGGAUCGUUGAGCUCGG[dT][dT] (SEQ ID NO:103)	CCGAGCUCAAAGCGAUCCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:260)
RAG6-571	GGAGGTCGAGGCTGCAATG (SEQ ID NO:418)	GGAGGUCGAGGCGUGCAAUG[dT][dT] (SEQ ID NO:104)	CAUUGCAGCCUCGACCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:261)
RAG6-568	GGTCGAGGCTGCAATGAGC (SEQ ID NO:419)	GGUCGAGGCGUGCAAUGAGC[dT][dT] (SEQ ID NO:105)	GCUCAUUGCAGCCUCGACC[dT][dT] (SEQ ID NO:262)
RAG6-557	CAATGAGCCGAGATGGTGC (SEQ ID NO:420)	CAUAGAGCCGAGAUUGGUGC[dT][dT] (SEQ ID NO:106)	GCACCAUUCGCGCUCAUUG[dT][dT] (SEQ ID NO:263)
RAG6-556	AATGAGCCGAGATGGTGCC (SEQ ID NO:421)	AAUGAGCCGAGAUUGGUGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:107)	GGCACCAUUCGCGCUCAUU[dT][dT] (SEQ ID NO:264)

RAG6-550	CCGAGATGTTGCCACTGCA (SEQ ID NO:422)	CCGAGAUGGUGCCACUGCA[dT][dT] (SEQ ID NO:108)	UGCAGUGGCACCAUCUCGG[dT][dT] (SEQ ID NO:265)
RAG6-548	GAGATGTTGCCACTGCACT (SEQ ID NO:423)	GAGAUGGUGCCACUGCACU[dT][dT] (SEQ ID NO:109)	AGUGCAGUGGCACCAUCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:266)
RAG6-547	AGATGTTGCCACTGCACTC (SEQ ID NO:424)	AGAUGGUGCCACUGCACUC[dT][dT] (SEQ ID NO:110)	GAGUGCAGUGGCACCAUCU[dT][dT] (SEQ ID NO:267)
RAG6-545	ATGGTGCCACTGCACTCTG (SEQ ID NO:425)	AUGGUGCCACUGCACUCUG[dT][dT] (SEQ ID NO:111)	CAGAGUGCAGUGGCACCAU[dT][dT] (SEQ ID NO:268)
RAG6-539	CCACTGCACTCTGACGACA (SEQ ID NO:426)	CCACUGCACUCUGACGACA[dT][dT] (SEQ ID NO:112)	UGUCGUCAGAGUGCAGUGG[dT][dT] (SEQ ID NO:269)
RAG6-538	CACTGCACTCTGACGACAG (SEQ ID NO:427)	CACUGCACUCUGACGACAG[dT][dT] (SEQ ID NO:113)	CUGUCGUCAGAGUGCAGUG[dT][dT] (SEQ ID NO:270)
RAG6-530	TCTGACGACAGAGCGAGAC (SEQ ID NO:428)	UCUGACGACAGAGCGAGAC[dT][dT] (SEQ ID NO:114)	GUCUCGUCUCUGUCGUCAGA[dT][dT] (SEQ ID NO:271)
RAG6-529	CTGACGACAGAGCGAGACT (SEQ ID NO:429)	CUGACGACAGAGCGAGACU[dT][dT] (SEQ ID NO:115)	AGUCUCGUCUCUGUCGUCAG[dT][dT] (SEQ ID NO:272)
RAG6-516	GAGACTCCGTCTCAAAACA (SEQ ID NO:430)	GAGACUCCGUCUCUCAAACA[dT][dT] (SEQ ID NO:116)	UGUUUUGAGACGGAGUCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:273)
RAG6-515	AGACTCCGTCTCAAAACAA (SEQ ID NO:431)	AGACUCCGUCUCUCAAACA[dT][dT] (SEQ ID NO:117)	UUGUUUUGAGACGGAGUCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:274)
RAG6-465	TCTAGTGTTTAAGGATCTG (SEQ ID NO:432)	UCUAGUGUUUUAAGGAUCUG[dT][dT] (SEQ ID NO:118)	CAGAUCCUUAAACACUAGA[dT][dT] (SEQ ID NO:275)
RAG6-463	TAGTGTTTAAGGATCTGCC (SEQ ID NO:433)	UAGUGUUUUAAGGAUCUGGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:119)	GGCAGAUCCUUAAACACUA[dT][dT] (SEQ ID NO:276)

RAG6-460	TGTTTAAGGATCTGCCTTC (SEQ ID NO:434)	UGUUUAAGGAUCUGCCUUC[dT][dT] (SEQ ID NO:120)	GAAGCAGAUCCUUAACA[dT][dT] (SEQ ID NO:277)
RAG6-453	GGATCTGCCCTTCCTCCTG (SEQ ID NO:435)	GGAUCUGCCUUCUCCUG[dT][dT] (SEQ ID NO:121)	CAGGAAGGAAGGCAGAUCC[dT][dT] (SEQ ID NO:278)
RAG6-425	TTGTCTTTCTCTTGTTTGTC (SEQ ID NO:436)	UUGUCUUCCUUGUUUGUC[dT][dT] (SEQ ID NO:122)	GACAAACAAGGAAAGACAA[dT][dT] (SEQ ID NO:279)
RAG6-423	GTCTTTCTCTTGTTTGCTT (SEQ ID NO:437)	GUCUUCCUUGUUUGUCU[dT][dT] (SEQ ID NO:123)	AAGACAAACAAGGAAAGAC[dT][dT] (SEQ ID NO:280)
RAG6-395	CAAGCAGGTTTTAAATTCC (SEQ ID NO:438)	CAAGCAGGUUUUAAAUUCC[dT][dT] (SEQ ID NO:124)	GGAAUUUAAAACCCGCUUG[dT][dT] (SEQ ID NO:281)
RAG6-392	GCAGGTTTTAAATTCCTAG (SEQ ID NO:439)	GCAGGUUUUAAAUUCCUAG[dT][dT] (SEQ ID NO:125)	CUAGGAAUUUAAAACCCGC[dT][dT] (SEQ ID NO:282)
RAG6-364	ACATTACTTTTCCAAGGG (SEQ ID NO:440)	ACAUUACUUUCCCAAGGG[dT][dT] (SEQ ID NO:126)	CCCUUGGAAAAGUAAAUGU[dT][dT] (SEQ ID NO:283)
RAG6-294	ACACTGGAGTTCGAGACGA (SEQ ID NO:441)	ACACUGGAGUUCGAGACGA[dT][dT] (SEQ ID NO:127)	UCGUCUGAACUCCAGUGU[dT][dT] (SEQ ID NO:284)
RAG6-291	CTGGAGTTCGAGACGAGGC (SEQ ID NO:442)	CUGGAGUUCGAGACGAGGC[dT][dT] (SEQ ID NO:128)	GCCUCGUCUGAACUCCAG[dT][dT] (SEQ ID NO:285)
RAG6-285	TTCGAGACGAGGCTAAGC (SEQ ID NO:443)	UUCGAGACGAGGCCUAAAGC[dT][dT] (SEQ ID NO:129)	GCUUAGGCCUUCGUCGAA[dT][dT] (SEQ ID NO:286)
RAG6-282	GAGACGAGGCTAAGCAAC (SEQ ID NO:444)	GAGACGAGGCCUAAAGCAAC[dT][dT] (SEQ ID NO:130)	GUUGCUUAGGCCUUCGUCUC[dT][dT] (SEQ ID NO:287)
RAG6-281	AGACGAGGCTAAGCAACA (SEQ ID NO:445)	AGACGAGGCCUAAAGCAACA[dT][dT] (SEQ ID NO:131)	UGUUGCUUAGGCCUUCGUCU[dT][dT] (SEQ ID NO:288)

RAG6-280	GACGAGGCCTAAGCAACAT (SEQ ID NO:446)	GACGAGGCCUAAAGCAACAU[dT][dT] (SEQ ID NO:132)	AUGUUGCUUAGGCCUCGUC[dT][dT] (SEQ ID NO:289)
RAG6-273	CCTAAGCAACATGCCGAAA (SEQ ID NO:447)	CCUAAAGCAACAUGCCGAAA[dT][dT] (SEQ ID NO:133)	UUUCGGCAUGUUGCUUAGG[dT][dT] (SEQ ID NO:290)
RAG6-272	CTAAGCAACATGCCGAAAC (SEQ ID NO:448)	CUAAGCAAC AUGCCGAAAC[dT][dT] (SEQ ID NO:134)	GUUUCGGCAUGUUGCUUAG[dT][dT] (SEQ ID NO:291)
RAG6-271	TAGCAACATGCCGAAACC (SEQ ID NO:449)	UAAAGCAACAUGCCGAAACC[dT][dT] (SEQ ID NO:135)	GGUUUCGGCAUGUUGCUUUA[dT][dT] (SEQ ID NO:292)
RAG6-219	TGGTGGCGCACGCCTATAG (SEQ ID NO:450)	UGGUGGCGCACGCCUAUAG[dT][dT] (SEQ ID NO:136)	CUAUAGGCGUGCGCCACCA[dT][dT] (SEQ ID NO:293)
RAG6-218	GGTGGCGCACGCCTATAGT (SEQ ID NO:451)	GGUGGCGCACGCCUAUAGU[dT][dT] (SEQ ID NO:137)	ACUAUAGGCGUGCGCCACC[dT][dT] (SEQ ID NO:294)
RAG6-206	CTATAGTCCTAGCTACTGG (SEQ ID NO:452)	CUAUAGUCCUAGCUACUGG[dT][dT] (SEQ ID NO:138)	CCAGUAGCUAGGACUAUAG[dT][dT] (SEQ ID NO:295)
RAG6-205	TATAGTCCTAGCTACTGGG (SEQ ID NO:453)	UAUAGUCCUAGCUACUGGG[dT][dT] (SEQ ID NO:139)	CCCAGUAGCUAGGACUAUA[dT][dT] (SEQ ID NO:296)
RAG6-181	TGAGGTGGGAGGATCGCTT (SEQ ID NO:454)	UGAGGUGGGAGGAUCGCUU[dT][dT] (SEQ ID NO:140)	AAGCGAUCCUCCACCUCUA[dT][dT] (SEQ ID NO:297)
RAG6-144	CTGCAGTGAGCCGAGATCG (SEQ ID NO:455)	CUGCAGUGAGCCGAGAUCCG[dT][dT] (SEQ ID NO:141)	CGAUCUCGGCUCACUGCAG[dT][dT] (SEQ ID NO:298)
RAG6-143	TGCAGTGAGCCGAGATCGC (SEQ ID NO:456)	UGCAGUGAGCCGAGAUCCG[dT][dT] (SEQ ID NO:142)	GCGAUCUCGGCUCACUGCAG[dT][dT] (SEQ ID NO:299)
RAG6-119	TGCACTCCAGCCTGAGCGA (SEQ ID NO:457)	UGCACUCCAGCCUGAGCGA[dT][dT] (SEQ ID NO:143)	UCGCUCAGGCGUGGAGUGCA[dT][dT] (SEQ ID NO:300)

RAG6-117	CACTCCAGCCTGAGCGACA (SEQ ID NO:458)	CACUCCAGCCUGAGCGACA[dT][dT] (SEQ ID NO:144)	UGUCGCUCAGGCUGGAGUG[dT][dT] (SEQ ID NO:301)
RAG6-101	ACAGGGCAGGCTCTGTCT (SEQ ID NO:459)	ACAGGGCAGGCUCUCUGUCU[dT][dT] (SEQ ID NO:145)	AGACAGAGCCUCGCCUCUGU[dT][dT] (SEQ ID NO:302)
RAG6-98	GGCGAGGCTCTGTCTCAA (SEQ ID NO:460)	GGCGAGGCUCUCUGUCUCAA[dT][dT] (SEQ ID NO:146)	UUGAGACAGAGCCUCGCCC[dT][dT] (SEQ ID NO:303)
RAG6-97	GGCGAGGCTCTGTCTCAA (SEQ ID NO:461)	GGCGAGGCUCUCUCUCAA[dT][dT] (SEQ ID NO:147)	UUUGAGACAGAGCCUCGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:304)
RAG6-96	GCGAGGCTCTGTCTCAAAA (SEQ ID NO:462)	GCGAGGCUCUCUCUCAAAA[dT][dT] (SEQ ID NO:148)	UUUGAGACAGAGCCUCGC[dT][dT] (SEQ ID NO:305)
RAG6-93	AGGCTCTGTCTCAAAACAA (SEQ ID NO:463)	AGGCUCUCUCUCAAACAA[dT][dT] (SEQ ID NO:149)	UUUUUUUGAGACAGAGCCU[dT][dT] (SEQ ID NO:306)
RAG6-92	GGCTCTGTCTCAAAACAAA (SEQ ID NO:464)	GGCUCUCUCUCAAACAAA[dT][dT] (SEQ ID NO:150)	UUUUUUUGAGACAGAGCC[dT][dT] (SEQ ID NO:307)
RAG6-91	GCTCTGTCTCAAAACAAAC (SEQ ID NO:465)	GCUCUCUCUCAAACAAAC[dT][dT] (SEQ ID NO:151)	GUUUUUUUUGAGACAGAGC[dT][dT] (SEQ ID NO:308)
RAG6-90	CTCTGTCTCAAAACAAACA (SEQ ID NO:466)	CUCUGUCUCAAACAAACA[dT][dT] (SEQ ID NO:152)	UGUUUUUUUGAGACAGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:309)
RAG6-45	AACACAGTGAAATGAAAGG (SEQ ID NO:467)	AACACAGUGAAAUGAAAAGG[dT][dT] (SEQ ID NO:153)	CCUUUCAUUUCACUGUGUU[dT][dT] (SEQ ID NO:310)
RAG6-44	ACACAGTGAAATGAAAGGA (SEQ ID NO:468)	ACACAGUGAAAUGAAAAGGA[dT][dT] (SEQ ID NO:154)	UCCUUUCAUUUCACUGUGU[dT][dT] (SEQ ID NO:311)
RAG6-41	CAGTGAAATGAAAGGATTG (SEQ ID NO:469)	CAGUGAAAUGAAAAGGAUUG[dT][dT] (SEQ ID NO:155)	CAAUCCUUUCAUUUCACUG[dT][dT] (SEQ ID NO:312)

RAG6-39	GTGAAATGAAAGGATTGAG (SEQ ID NO:470)	GUGAAAUGAAAGGAUUGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:156)	CUCAUCCUUUCAUUUCAC[dT][dT] (SEQ ID NO:313)
RAG6-37	GAAATGAAAGGATTGAGAG (SEQ ID NO:471)	GAAAUGAAAGGAUUGAGAG[dT][dT] (SEQ ID NO:157)	CUCUCAAUCCUUUCAUUUC[dT][dT] (SEQ ID NO:314)

表 9. SMN2 启动子上 saRNA 热点区域的 DNA 序列

[illegible]

8. 等同和通过引用纳入

[0221] 本文引用的所有参考文献均通过引用纳入,如同各单独的出版物、数据库条目(例

如Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或专利都具体且单独地表明,通过引用其全文纳入用于所有目的。根据37CFR§1.57(b)(1)之规定,申请人的该通过引用纳入声明旨在关联各个单独的出版物、数据库条目(例如Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或专利,其各自都根据37CFR§1.57(b)(2)进行了明确标识,即使这类引用没有紧邻专用的通过引用纳入声明。说明书中包括通过引用纳入的专用声明,如果有的话,则完全不削弱该通过引用并入的一般性声明。本文对参考文献的引用并旨在承认该参考文献是相关的现有技术,也不构成对这些出版物或文件内容或日期的任何承认。

[0222] 虽然已参照优选实施方式和各种替代实施方式具体示出和描述了本发明,但相关领域的技术人员应当理解,可在不脱离本发明精神和范围的情况下在形式和细节上进行各种改变。

序列表

<110>	中美瑞康核酸技术(南通)研究院有限公司(Ractigen Therapeutics)	
<120>	SARNA和MRNA调节剂联合治疗SMA	
<130>	RAG-ZL-202006-01	
<150>	PCT/CN2020/106200	
<151>	2020-07-31	
<160>	498	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	1	
	aucugugaga uguaccuuut t	21
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	cacucuguca cucaggcugt t	21
<210>	3	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
	acucugucac ucaggcuggt t	21
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	4	
	ucugucacuc aggcuggagt t	21
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	5	
	ucaggcugga gugcaguggt t	21

<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	6	
gagugcagug gcgugaucut t		21
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	7	
ugcaguggcg ugaucuuggt t		21
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	8	
gcaguggcgu gaucuuggct t		21
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	9	
ggcgugaucu uggcucacut t		21
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	10	
gugaucuugg cucacugcat t		21
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	11	
ugaucuuggc ucacugcaat t		21
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 12	
aucuuggcuc acugcaacct t	21
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
cuuggcucac ugcaaccuct t	21
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
uuggcucacu gcaaccucct t	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 15	
gccucccgag uucaagugat t	21
<210> 16	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 16	
ccucccgagu ucaagugaut t	21
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
cucccgaguu caagugauut t	21
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 18	
ucccgaguuc aagugauuct t	21

<210>	19	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	19	
ucaagugauu cuccuggc	cut t	21
<210>	20	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	20	
aagugauucu ccuggc	ucac t	21
<210>	21	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	21	
agugauucuc cuggc	ucac t	21
<210>	22	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	22	
gugauucucc uggc	ucac t	21
<210>	23	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	23	
cagccuccca agc	agc t	21
<210>	24	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	24	
ccucccaagc agc	agc t	21
<210>	25	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 25	
ucccaagcag cugucauuat t	21
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 26	
agcugucauu acaggccugt t	21
<210> 27	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 27	
gcugucauuu caggccugct t	21
<210> 28	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 28	
cugucauuac aggccugcat t	21
<210> 29	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 29	
ggagaaacag gguuucacct t	21
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 30	
agaaacaggg uuucaccaut t	21
<210> 31	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 31	
aagugcuggg auuauaggct t	21

<210>	32	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	32	
uuauaggcau gagccaccgt t		21
<210>	33	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	33	
auucuccccu uccuccacat t		21
<210>	34	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	34	
ucucuccuuc cuccacagat t		21
<210>	35	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	35	
cauuuagcaa ccuagaugt t		21
<210>	36	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	36	
auuuagcaac ccuagaugct t		21
<210>	37	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	37	
uuuagcaacc cuagaugcut t		21
<210>	38	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 38	
uuagcaacccc uaugcuut t	21
<210> 39	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 39	
uagcaacccu agaugcuuat t	21
<210> 40	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 40	
auacuggagg cccggugugt t	21
<210> 41	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 41	
gugugguggc ucacaccugt t	21
<210> 42	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 42	
ugguggcuca caccuguaat t	21
<210> 43	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 43	
gguggcucac accuguaaut t	21
<210> 44	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 44	
guggcucaca ccuguaauct t	21

<210>	45	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	45	
ggcucacacc	uguaaucct t	21
<210>	46	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	46	
cacaccugua	aucccagcat t	21
<210>	47	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	47	
acaccuguaa	ucccagcact t	21
<210>	48	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	48	
accuguaauc	ccagcacuut t	21
<210>	49	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	49	
guaaucccag	cacuuugggt t	21
<210>	50	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	50	
uaaucccagc	acuuugggat t	21
<210>	51	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 51	
aaucccagca cuuugggagt t	21
<210> 52	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 52	
cagcacuuug ggaggccgat t	21
<210> 53	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 53	
gaggcggucg gauuacgagt t	21
<210> 54	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 54	
ggcggucgga uuacgaggut t	21
<210> 55	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 55	
gcggucggau uacgagguct t	21
<210> 56	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 56	
cggucggauu acgaggucat t	21
<210> 57	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 57	
ggucggauua cgaggucagt t	21

<210>	58	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	58	
gucggaauuac gaggucaggt t		21
<210>	59	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	59	
ucggaauuacg aggucaggat t		21
<210>	60	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	60	
cggauuacga ggucaggagt t		21
<210>	61	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	61	
auuacgaggu caggaguuct t		21
<210>	62	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	62	
uuacgagguc aggaguucat t		21
<210>	63	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	63	
uacgagguca ggaguucaat t		21
<210>	64	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 64	
acgaggucag gaguucaagt t	21
<210> 65	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 65	
aggucaggag uucaagacct t	21
<210> 66	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 66	
aguucaagac cagccuggct t	21
<210> 67	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 67	
gaaaccccau cuuuacuaat t	21
<210> 68	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 68	
auuagccggg ugugguggut t	21
<210> 69	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 69	
guggugggcg ccuguaauct t	21
<210> 70	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 70	
ggcgccugua aucccagcut t	21

<210>	71	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	71	
uaaucccagc uacucggggt t		21
<210>	72	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	72	
gggcugaggc agaauugcut t		21
<210>	73	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	73	
ggcagaauug cuugaaccut t		21
<210>	74	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	74	
cagaauugcu ugaaccuggt t		21
<210>	75	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	75	
ugaaccuggg aggcagaggt t		21
<210>	76	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	76	
gaaccuggga ggcagaggut t		21
<210>	77	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 77	
accugggagg cagagguugt t	21
<210> 78	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 78	
ugcagugagc ugagaucact t	21
<210> 79	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 79	
cugagaucac gccacugcat t	21
<210> 80	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 80	
aucacgccac ugcauuccat t	21
<210> 81	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 81	
gggugacaga gcaauacuct t	21
<210> 82	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 82	
ugacagagca auacucugut t	21
<210> 83	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 83	
agagcaauac ucugucgcat t	21

<210>	84	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	84	
aaaagaauac uggaggcugt t		21
<210>	85	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	85	
aaagaauacu ggaggcuggt t		21
<210>	86	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	86	
auacuggagg cugggcgagt t		21
<210>	87	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	87	
cgagguggcu cacaccugut t		21
<210>	88	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	88	
gguggcucac accuguaaut t		21
<210>	89	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	89	
ggcucacacc uguaaucct t		21
<210>	90	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 90	
gcucacaccu guaaucocat t	21
<210> 91	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 91	
cacaccugua aucccagcat t	21
<210> 92	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 92	
uaaucccagc auuuugggat t	21
<210> 93	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 93	
gggcggaaua ucuugagcat t	21
<210> 94	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 94	
aaauaucuuga gcucaggagt t	21
<210> 95	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 95	
uucgagacca gccuacacat t	21
<210> 96	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 96	
ccagccuaca caauaugcat t	21

<210>	97	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	97	
acacaauaug cuccaaacgt t		21
<210>	98	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	98	
cacaauaugc uccaaacgct t		21
<210>	99	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	99	
acaauaugcu ccaaacgcct t		21
<210>	100	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	100	
caaacgccgc cucuacaaat t		21
<210>	101	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	101	
cugugguccu agcuacuugt t		21
<210>	102	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	102	
gggaggau cg cuugagcuct t		21
<210>	103	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 103	
gaggaucgcu ugagcucggt t	21
<210> 104	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 104	
ggaggucgag gcugcaaugt t	21
<210> 105	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 105	
ggucgaggcu gcaaugagct t	21
<210> 106	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 106	
caaugagccg agauggugct t	21
<210> 107	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 107	
aaugagccga gauggugcct t	21
<210> 108	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 108	
ccgagauggu gccacugcat t	21
<210> 109	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 109	
gagauggugc cacugcacut t	21

<210>	110	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	110	
agauggugcc acugcacuct t		21
<210>	111	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	111	
auggugccac ugcacucugt t		21
<210>	112	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	112	
ccacugcacu cugacgacat t		21
<210>	113	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	113	
cacugcacuc ugacgacagt t		21
<210>	114	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	114	
ucugacgaca gagcgagact t		21
<210>	115	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	115	
cugacgacag agcgagacut t		21
<210>	116	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 116	
gagacuccgu cucaaaacat t	21
<210> 117	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 117	
agacuccguc ucaaaacaat t	21
<210> 118	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 118	
ucuaguguuu aaggaucugt t	21
<210> 119	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 119	
uaguguuuaa ggaucugcct t	21
<210> 120	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 120	
uguuuaagga ucugccuuct t	21
<210> 121	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 121	
ggaucugccu uccuuccugt t	21
<210> 122	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 122	
uugucuucc uuguuguct t	21

<210>	123	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	123	
gucuuuccuu guuugucuut t		21
<210>	124	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	124	
caagcagguu uuaaaauucct t		21
<210>	125	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	125	
gcagguuuua aaauccuagt t		21
<210>	126	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	126	
acauuuacuu uuccaagggt t		21
<210>	127	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	127	
acacuggagu ucgagacgat t		21
<210>	128	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	128	
cuggaguucg agacaggct t		21
<210>	129	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 129	
uucgagacga ggccuaagct t	21
<210> 130	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 130	
gagacgaggc cuaagcaact t	21
<210> 131	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 131	
agacgaggcc uaagcaacat t	21
<210> 132	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 132	
gacgaggccu aagcaacaut t	21
<210> 133	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 133	
ccuaagcaac augccgaaat t	21
<210> 134	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 134	
cuaagcaaca ugccgaaact t	21
<210> 135	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 135	
uaagcaacau gccgaaacct t	21

<210>	136	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	136	
ugguggcgca cgccuauagt t		21
<210>	137	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	137	
gguggcgcac gccuauagut t		21
<210>	138	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	138	
cuauaguccu agcuacuggt t		21
<210>	139	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	139	
uauaguccua gcuacugggt t		21
<210>	140	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	140	
ugagguggga ggaucgcuut t		21
<210>	141	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	141	
cugcagugag ccgagaucgt t		21
<210>	142	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 142	
ugcagugagc cgagaucgct t	21
<210> 143	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 143	
ugcacuccag ccugagcgat t	21
<210> 144	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 144	
cacuccagcc ugagcgacat t	21
<210> 145	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 145	
acagggcgag gcucugucut t	21
<210> 146	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 146	
gggcgaggcu cugucucaat t	21
<210> 147	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 147	
ggcgaggcuc ugucucaaaat t	21
<210> 148	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 148	
gcgaggcucu gucucaaaaat t	21

<210>	149	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	149	
aggcucuguc	ucaaaacaat t	21
<210>	150	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	150	
ggcucugucu	caaaacaaat t	21
<210>	151	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	151	
gcucugucuc	aaaacaaact t	21
<210>	152	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	152	
cucugucuca	aaacaaacat t	21
<210>	153	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	153	
aacacaguga	aaugaaaggt t	21
<210>	154	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	154	
acacagugaa	augaaaggat t	21
<210>	155	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213>	人工序列	
<400>	155	
cagugaaaug	aaaggauugt	t
<210>	156	21
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	156	
gugaaaugaa	aggauugagt	t
<210>	157	21
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	157	
gaaaugaaaag	gauugagagt	t
<210>	158	21
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	158	
aaagguacau	cucacagaut	t
<210>	159	21
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	159	
cagccugagu	gacagagugt	t
<210>	160	21
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	160	
ccagccugag	ugacagagut	t
<210>	161	21
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	161	
cuccagccug	agugacagat	t
		21

<210>	162	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	162	
ccacugcacu ccagccugat t		21
<210>	163	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	163	
agaucacgcc acugcacuct t		21
<210>	164	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	164	
ccaagaucac gccacugcat t		21
<210>	165	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	165	
gccaagauca cgccacugct t		21
<210>	166	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	166	
agugagccaa gaucacgcct t		21
<210>	167	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	167	
ugcagugagc caagaucact t		21
<210>	168	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 168	
uugcagugag ccaagaucat t	21
<210> 169	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 169	
gguugcagug agccaagaut t	21
<210> 170	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 170	
gagguugcag ugagccaagt t	21
<210> 171	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 171	
ggagguugca gugagccaat t	21
<210> 172	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 172	
ucacuugaac ucgggaggct t	21
<210> 173	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 173	
aucacuugaa cucgggaggt t	21
<210> 174	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 174	
aaucacuuga acucgggagt t	21

<210>	175	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	175	
gaaucacuug aacucgggat t		21
<210>	176	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	176	
agccaggaga aucacuugat t		21
<210>	177	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	177	
ugagccagga gaaucacuut t		21
<210>	178	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	178	
cugagccagg agaaucacut t		21
<210>	179	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	179	
gcugagccag gagaaucaact t		21
<210>	180	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	180	
acagcugcuu gggaggcugt t		21
<210>	181	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 181	
augacagcug cuugggaggt t	21
<210> 182	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 182	
uaaugacagc ugcuuugggat t	21
<210> 183	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 183	
caggccugua augacagcut t	21
<210> 184	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 184	
gcaggccugu aaugacagct t	21
<210> 185	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 185	
ugcaggccug uaaugacagt t	21
<210> 186	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 186	
ggugaaaccc uguuucucct t	21
<210> 187	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 187	
auggugaaac ccuguuucut t	21

<210>	188	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	188	
gccuauaauc	ccagcacuut t	21
<210>	189	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	189	
cgguggcuca	ugccuauaat t	21
<210>	190	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	190	
uguggaggaa	ggggagaaat t	21
<210>	191	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	191	
ucuguggagg	aaggggagat t	21
<210>	192	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	192	
caucuagggu	ugcuaaaagt t	21
<210>	193	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	193	
gcaucuaggg	uugcuaaaat t	21
<210>	194	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 194	
agcaucuagg guugcuaaat t	21
<210> 195	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 195	
aagcaucuag gguugcuaat t	21
<210> 196	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 196	
uaagcaucua ggguugcuat t	21
<210> 197	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 197	
cacaccgggc cuccaguaut t	21
<210> 198	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 198	
caggugugag ccaccacact t	21
<210> 199	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 199	
uuacaggugu gagccaccat t	21
<210> 200	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 200	
auuacaggug ugagccacct t	21

<210>	201	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	201	
gauuacaggu gugagccact t		21
<210>	202	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	202	
gggauuacag gugugagcct t		21
<210>	203	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	203	
ugcugggauu acaggugut t		21
<210>	204	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	204	
gugcugggau uacaggugut t		21
<210>	205	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	205	
aagugcuggg auuacaggut t		21
<210>	206	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	206	
cccaaagugc ugggauuact t		21
<210>	207	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 207	
ucccaaagug cugggauuat t	21
<210> 208	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 208	
cucccaaagu gcugggauut t	21
<210> 209	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 209	
ucggccuccc aaagugcugt t	21
<210> 210	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 210	
cucguaaucc gaccgccuct t	21
<210> 211	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 211	
accucguaau ccgaccgcct t	21
<210> 212	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 212	
gaccucguaa uccgaccgt t	21
<210> 213	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 213	
ugaccucgua auccgaccgt t	21

<210>	214	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	214	
cugaccucgu	aauccgacct t	21
<210>	215	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	215	
ccugaccucg	uaauccgact t	21
<210>	216	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	216	
uccugaccuc	guaauccgat t	21
<210>	217	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	217	
cuccugaccu	cguaauccgt t	21
<210>	218	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	218	
gaacuccuga	ccucguaaut t	21
<210>	219	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	219	
ugaacuccug	accucguaat t	21
<210>	220	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 220	
uugaacuccu gaccucguat t	21
<210> 221	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 221	
cuugaacucc ugaccucgut t	21
<210> 222	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 222	
ggucuugaac uccugaccut t	21
<210> 223	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 223	
gccaggcugg ucuugaacut t	21
<210> 224	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 224	
uuaguaaaga ugggguuuct t	21
<210> 225	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 225	
accaccacac ccggcuaaut t	21
<210> 226	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 226	
gauuacaggc gcccaccact t	21

<210>	227	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	227	
agcugggauu acaggcgcct t		21
<210>	228	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	228	
ccccgaguag cugggauuat t		21
<210>	229	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	229	
agcaauucug ccucagccct t		21
<210>	230	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	230	
agguucaagc aaucugcct t		21
<210>	231	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	231	
ccagguuca gcaauucugt t		21
<210>	232	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	232	
ccucugccuc ccagguucat t		21
<210>	233	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 233	
accucugccu cccagguuct t	21
<210> 234	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 234	
caaccucugc cucccaggut t	21
<210> 235	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 235	
gugaucucag cucacugcat t	21
<210> 236	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 236	
ugcaguggcg ugaucucagt t	21
<210> 237	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 237	
uggaaugcag uggcgugaut t	21
<210> 238	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 238	
gaguauugcu cugucaccet t	21
<210> 239	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 239	
acagaguauu gcucugucat t	21

<210>	240	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	240	
ugcgacagag	uauugcucut	t
		21
<210>	241	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	241	
cagccuccag	uauucuuuut	t
		21
<210>	242	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	242	
ccagccucca	guauucuuut	t
		21
<210>	243	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	243	
cucgcccagc	cuccaguaut	t
		21
<210>	244	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	244	
acagguguga	gccaccucgt	t
		21
<210>	245	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	245	
auuacaggug	ugagccacct	t
		21
<210>	246	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 246	
gggauuacag gugugagcct t	21
<210> 247	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 247	
ugggauuaca ggugugagct t	21
<210> 248	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 248	
ugcugggauu acaggugugt t	21
<210> 249	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 249	
ucccaaaaug cugggauuat t	21
<210> 250	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 250	
agcucaagau auuccgccct t	21
<210> 251	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 251	
cuccugagcu caagauauut t	21
<210> 252	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 252	
uguguaggcu ggucucgaat t	21

<210>	253	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	253	
agcauauugu	guaggcuggt t	21
<210>	254	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	254	
cguuuggagc	auauugugt t	21
<210>	255	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	255	
gcguuuggag	cauauugugt t	21
<210>	256	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	256	
ggcguuugga	gcauauugut t	21
<210>	257	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	257	
uuuguagagg	cggcguuugt t	21
<210>	258	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	258	
caaguagcua	ggaccacagt t	21
<210>	259	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213>	人工序列	
<400>	259	
	gagcucaagc gauccuccct t	21
<210>	260	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	260	
	ccgagcucaa gcgauccuct t	21
<210>	261	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	261	
	cauugcagcc ucgaccucct t	21
<210>	262	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	262	
	gcucauugca gccucgacct t	21
<210>	263	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	263	
	gcaccaucuc ggcucauugt t	21
<210>	264	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	264	
	ggcaccaucu cggcucauut t	21
<210>	265	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	265	
	ugcaguggca ccaucucggt t	21

<210>	266	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	266	
agugcagugg	caccaucuct t	21
<210>	267	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	267	
gagugcagug	gcaccaucut t	21
<210>	268	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	268	
cagagucgag	uggcaccaut t	21
<210>	269	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	269	
ugucgucaga	gugcaguggt t	21
<210>	270	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	270	
cugucgucag	agugcagugt t	21
<210>	271	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	271	
gucucgcucu	gucgucagat t	21
<210>	272	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 272	
agucucgcuc ugucgucagt t	21
<210> 273	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 273	
uguuuugaga cggagucuct t	21
<210> 274	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 274	
uuguuuugag acggagucut t	21
<210> 275	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 275	
cagauccuua aacacuagat t	21
<210> 276	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 276	
ggcagauccu uaaacacuat t	21
<210> 277	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 277	
gaaggcagau ccuuaaacat t	21
<210> 278	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 278	
caggaaggaa ggcagaucct t	21

<210>	279	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	279	
gacaaacaag gaaagacaat t		21
<210>	280	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	280	
aagacaaaca aggaaagact t		21
<210>	281	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	281	
ggaauuuaaa accugcuugt t		21
<210>	282	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	282	
cuaggaauuu aaaaccugct t		21
<210>	283	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	283	
cccuuggaaa aguaaaugut t		21
<210>	284	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	284	
ucgucucgaa cuccagugut t		21
<210>	285	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213>	人工序列	
<400>	285	
gccucgucuc	gaacuccagt t	21
<210>	286	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	286	
gcuuaggccu	cgucucgaat t	21
<210>	287	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	287	
guugcuuagg	ccucgucuct t	21
<210>	288	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	288	
uguugcuuag	gccucgucut t	21
<210>	289	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	289	
auguugcuua	ggccucguct t	21
<210>	290	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	290	
uuucggcaug	uugcuuaggt t	21
<210>	291	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	291	
guuucggcau	guugcuuagt t	21

<210>	292	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	292	
gguuucggca uguugcuuat t		21
<210>	293	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	293	
cuauaggcgu gcgccaccat t		21
<210>	294	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	294	
acuauaggcg ugcgccacct t		21
<210>	295	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	295	
ccaguagcua ggacuauagt t		21
<210>	296	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	296	
cccaguagcu aggacuauat t		21
<210>	297	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	297	
aagcgauccu cccaccucat t		21
<210>	298	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213>	人工序列	
<400>	298	
cgaucucggc	ucacugcagt t	21
<210>	299	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	299	
gcgaucucgg	cucacugcat t	21
<210>	300	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	300	
ucgcucaggc	uggagugcat t	21
<210>	301	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	301	
ugucgcucag	gcuggagugt t	21
<210>	302	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	302	
agacagagcc	ucgcccugut t	21
<210>	303	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	303	
uugagacaga	gccucgccet t	21
<210>	304	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	304	
uuugagacag	agccucgcet t	21

<210>	305	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	305	
uuuugagaca	gagccucgct t	21
<210>	306	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	306	
uuguuuugag	acagagccut t	21
<210>	307	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	307	
uuuguuuuga	gacagagcct t	21
<210>	308	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	308	
guuuguuuug	agacagagct t	21
<210>	309	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	309	
uguuuguuuu	gagacagagt t	21
<210>	310	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	310	
ccuuucauuu	cacuguguut t	21
<210>	311	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> 人工序列	
<400> 311	
uccuuucauu ucacugugut t	21
<210> 312	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 312	
caauccuuuc auuucacugt t	21
<210> 313	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 313	
cucaauccuu ucauuucact t	21
<210> 314	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 314	
cucucaaucc uuucuuuuct t	21
<210> 315	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 315	
atctgtgaga tgtaccttt	19
<210> 316	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 316	
cactctgtca ctcaggctg	19
<210> 317	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 317	
actctgtcac tcaggctgg	19

<210>	318	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	318	
tctgtcactc	aggctggag	19
<210>	319	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	319	
tcaggctgga	gtgcagtgg	19
<210>	320	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	320	
gagtgcagtg	gcgtgatct	19
<210>	321	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	321	
tgcagtggcg	tgatcttgg	19
<210>	322	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	322	
gcagtggcgt	gatcttggc	19
<210>	323	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	323	
ggcgtgatct	tggtcact	19
<210>	324	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 324	
gtgatcttgg ctcaactgca	19
<210> 325	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 325	
tgatcttggc tcactgcaa	19
<210> 326	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 326	
atcttggtc actgcaacc	19
<210> 327	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 327	
cttggtcac tgcaacctc	19
<210> 328	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 328	
ttggctcact gcaacctcc	19
<210> 329	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 329	
gcctcccgag ttcaagtga	19
<210> 330	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 330	
cctcccgagt tcaagtgat	19

<210>	331	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	331	
ctccccgagtt	caagtgatt	19
<210>	332	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	332	
tccccgagttc	aagtgattc	19
<210>	333	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	333	
tcaagtgatt	ctcctggct	19
<210>	334	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	334	
aagtgattct	cctggctca	19
<210>	335	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	335	
agtgattctc	ctggctcag	19
<210>	336	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	336	
gtgattctcc	tggtcagc	19
<210>	337	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 337	
cagcctccca agcagctgt	19
<210> 338	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 338	
cctcccaagc agctgtcat	19
<210> 339	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 339	
tcccaagcag ctgtcatta	19
<210> 340	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 340	
agctgtcatt acaggcctg	19
<210> 341	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 341	
gctgtcatta caggcctgc	19
<210> 342	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 342	
ctgtcattac aggcctgca	19
<210> 343	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 343	
ggagaaacag ggtttcacc	19

<210>	344	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	344	
agaaacaggg ttccacat		19
<210>	345	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	345	
aagtgcctggg attataggc		19
<210>	346	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	346	
ttataggcat gagccaccg		19
<210>	347	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	347	
attctcccct tcctccaca		19
<210>	348	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	348	
tctccccttc ctccacaga		19
<210>	349	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	349	
catttagcaa ccctagatg		19
<210>	350	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 350	
atttagcaac cctagatgc	19
<210> 351	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 351	
tttagcaacc ctagatgct	19
<210> 352	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 352	
ttagcaaccc tagatgctt	19
<210> 353	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 353	
tagcaaccct agatgctta	19
<210> 354	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 354	
atactggagg cccggtgtg	19
<210> 355	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 355	
gtgtggtggc tcacacctg	19
<210> 356	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 356	
tggtggctca cacctgtaa	19

<210>	357	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	357	
ggtggctcac	acctgtaat	19
<210>	358	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	358	
gtggctcaca	cctgtaatc	19
<210>	359	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	359	
ggctcacacc	tgtaatccc	19
<210>	360	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	360	
cacacctgta	atcccagca	19
<210>	361	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	361	
acacctgtaa	tcccagcac	19
<210>	362	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	362	
acctgtaatc	ccagcactt	19
<210>	363	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 363	
gtaatcccag cactttggg	19
<210> 364	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 364	
taatcccagc actttggga	19
<210> 365	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 365	
aatcccagca ctttgggag	19
<210> 366	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 366	
cagcactttg ggaggccga	19
<210> 367	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 367	
gaggcggtcg gattacgag	19
<210> 368	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 368	
ggcggtcggg ttacgaggt	19
<210> 369	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 369	
gcggtcggat tacgaggtc	19

<210>	370	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	370	
cggtcggatt acgaggtca		19
<210>	371	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	371	
ggtcggatta cgaggtcag		19
<210>	372	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	372	
gtcggattac gaggtcagg		19
<210>	373	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	373	
tcggattacg aggtcagga		19
<210>	374	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	374	
cggattacga ggtcaggag		19
<210>	375	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	375	
attacgaggt caggagttc		19
<210>	376	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 376	
ttacgaggtc aggagttca	19
<210> 377	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 377	
tacgaggta ggagttcaa	19
<210> 378	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 378	
acgaggtcag gaggttcaag	19
<210> 379	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 379	
aggtcaggag ttcaagacc	19
<210> 380	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 380	
agttcaagac cagcctggc	19
<210> 381	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 381	
gaaaccccat ctttactaa	19
<210> 382	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 382	
attagccggg tgtggtggt	19

<210>	383	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	383	
gtggtgggcg	cctgtaatc	19
<210>	384	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	384	
ggcgcctgta	atcccagct	19
<210>	385	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	385	
taatcccagc	tactcgggg	19
<210>	386	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	386	
gggctgaggc	agaattgct	19
<210>	387	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	387	
ggcagaattg	cttgaacct	19
<210>	388	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	388	
cagaattgct	tgaacctgg	19
<210>	389	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 389	
tgaacctggg aggcagagg	19
<210> 390	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 390	
gaacctggga ggcagaggt	19
<210> 391	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 391	
acctgggagg cagaggttg	19
<210> 392	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 392	
tgcagtgagc tgagatcac	19
<210> 393	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 393	
ctgagatcac gccactgca	19
<210> 394	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 394	
atcacgccac tgcattcca	19
<210> 395	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 395	
gggtgacaga gcaatactc	19

<210>	396	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	396	
tgacagagca	atactctgt	19
<210>	397	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	397	
agagcaatac	tctgtcgca	19
<210>	398	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	398	
aaaagaatac	tggaggctg	19
<210>	399	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	399	
aaagaatact	ggaggctgg	19
<210>	400	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	400	
atactggagg	ctgggcgag	19
<210>	401	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	401	
cgaggtggct	cacacctgt	19
<210>	402	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 402	
ggtggctcac acctgtaat	19
<210> 403	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 403	
ggctcacacc tgtaatccc	19
<210> 404	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 404	
gctcacacct gtaatccca	19
<210> 405	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 405	
cacacctgta atcccagca	19
<210> 406	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 406	
taatcccagc attttgga	19
<210> 407	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 407	
gggcggaata tcttgagct	19
<210> 408	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 408	
aatatcttga gctcaggag	19

<210>	409	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	409	
ttcgagacca gcctacaca		19
<210>	410	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	410	
ccagcctaca caatatgct		19
<210>	411	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	411	
acacaatatg ctccaaacg		19
<210>	412	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	412	
cacaatatgc tccaaacgc		19
<210>	413	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	413	
acaatatgct ccaaacgcc		19
<210>	414	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	414	
caaacgccgc ctctacaaa		19
<210>	415	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 415	
ctgtggtcct agctacttg	19
<210> 416	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 416	
gggaggatcg cttgagctc	19
<210> 417	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 417	
gaggatcgct tgagctcgg	19
<210> 418	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 418	
ggaggtcgag gctgcaatg	19
<210> 419	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 419	
ggtcgaggct gcaatgagc	19
<210> 420	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 420	
caatgagccg agatggtgc	19
<210> 421	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 421	
aatgagccga gatggtgcc	19

<210>	422	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	422	
ccgagatggt gccactgca		19
<210>	423	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	423	
gagatggtgc cactgcact		19
<210>	424	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	424	
agatggtgcc actgcactc		19
<210>	425	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	425	
atggtgccac tgcactctg		19
<210>	426	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	426	
ccactgcact ctgacgaca		19
<210>	427	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	427	
cactgcactc tgacgacag		19
<210>	428	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 428	
tctgacgaca gagcgagac	19
<210> 429	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 429	
ctgacgacag agcgagact	19
<210> 430	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 430	
gagactccgt ctcaaaaca	19
<210> 431	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 431	
agactccgtc tcaaaacaa	19
<210> 432	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 432	
tctagtgttt aaggatctg	19
<210> 433	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 433	
tagtgtttaa ggatctgcc	19
<210> 434	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 434	
tgtttaagga tctgccttc	19

<210>	435	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	435	
ggatctgcct	tccttcctg	19
<210>	436	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	436	
ttgtctttcc	ttgtttgtc	19
<210>	437	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	437	
gtctttcctt	gtttgtctt	19
<210>	438	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	438	
caagcaggtt	ttaaattcc	19
<210>	439	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	439	
gcaggtttta	aattcctag	19
<210>	440	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	440	
acatttactt	ttccaagg	19
<210>	441	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 441	
acactggagt tcgagacga	19
<210> 442	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 442	
ctggagttcg agacgaggc	19
<210> 443	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 443	
ttcgagacga ggcctaagc	19
<210> 444	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 444	
gagacgaggc ctaagcaac	19
<210> 445	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 445	
agacgaggcc taagcaaca	19
<210> 446	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 446	
gacgaggcct aagcaacat	19
<210> 447	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 447	
cctaagcaac atgccgaaa	19

<210>	448	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	448	
ctaagcaaca tgccgaaac		19
<210>	449	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	449	
taagcaacat gccgaaacc		19
<210>	450	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	450	
tggtggcgca cgcctatag		19
<210>	451	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	451	
ggtggcgcac gcctatagt		19
<210>	452	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	452	
ctatagtcct agctactgg		19
<210>	453	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	453	
tatagtccta gctactggg		19
<210>	454	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 454	
tgaggtggga ggatcgctt	19
<210> 455	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 455	
ctgcagtgag ccgagatcg	19
<210> 456	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 456	
tgcagtgagc cgagatcgc	19
<210> 457	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 457	
tgcactccag cctgagcga	19
<210> 458	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 458	
cactccagcc tgagcgaca	19
<210> 459	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 459	
acagggcgag gctctgtct	19
<210> 460	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 460	
gggcgaggct ctgtctcaa	19

<210>	461	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	461	
ggcgaggctc	tgtctcaaa	19
<210>	462	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	462	
gcgaggctct	gtctcaaaa	19
<210>	463	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	463	
aggctctgtc	tcaaaacaa	19
<210>	464	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	464	
ggctctgtct	caaaacaaa	19
<210>	465	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	465	
gctctgtctc	aaaacaaac	19
<210>	466	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	466	
ctctgtctca	aaacaaaca	19
<210>	467	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<400> 467	
aacacagtga aatgaaagg	19
<210> 468	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 468	
acacagtgaa atgaaagga	19
<210> 469	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 469	
cagtgaaatg aaaggattg	19
<210> 470	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 470	
gtgaaatgaa aggattgag	19
<210> 471	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 471	
gaaatgaaag gattgagag	19
<210> 472	
<211> 159	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 472	
agtcgcactc tgtcactcag gctggagtgc agtggcgtga tcttggetca ctgcaacctc	60
cgctcccga gttcaagtga ttctcctggc tcagcctccc aagcagctgt cattacaggc	120
ctgcaccacc acacccggct gattttttgta tttttagga	159
<210> 473	
<211> 82	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	

<400> 473	
aatactggag gcccggtgtg gtggctcaca cctgtaatcc cagcactttg ggaggccgag	60
gcggtcggat tacgaggtca gg	82
<210> 474	
<211> 815	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 474	
ctggccaaca tggtgaaacc ccactctttac taaaaatata aaaattagcc ggggtgtggtg	60
gtggggcgctt gtaatcccag ctactcgggg ggctgaggca gaattgcttg aacctgggag	120
gcagaggttg cagtgaagtg agatcacgcc actgcattcc agcctgggtg acagagcaat	180
actctgtcgc aaaaaaaaaa aagaatactg gaggtgggc gaggtggctc acacctgtaa	240
tcccagcatt ttgggatgcc agaggcgggc ggaatatctt gagctcagga gttcgagacc	300
agcctacaca atatgctcca aacgccgcct ctacaaaaca tacagaaact agccgggtgt	360
gggtggcgtgc ccctgtggct ctagctactt gggaggttga ggcgggagga tcgcttgagc	420
tcgggagggtc gaggtgcaa tgagccgaga tgggtgccact gcactctgac gacagagcga	480
gactccgtct caaaacaaac aacaaataag gttgggggat caaatatctt ctagtggtta	540
aggatctgcc ttcttctctg ccccatgtt tgtctttcct tgtttgtctt tatatagatc	600
aagcaggttt taaattccta gtaggagctt acatttactt ttccaagggg gagggggaat	660
aaatatctac acacacacac acacacacac acacacacac aactggagt tcgagacgag	720
gcctaagcaa catgccgaaa cccgtctct actaaatata aaaaatagct gagcttggtg	780
gcgcacgcct atagtcctag ctactgggga ggctg	815
<210> 475	
<211> 108	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 475	
ctgcagttag cagagatcgc gccgctgcac tccagcctga gcgacagggc gaggtctgtg	60
ctcaaaacaa acaaacacaaa aaaaaaggaa aggaatatata acacagtg	108
<210> 476	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 476	
agacgaggcc uaagcaacat t	21
<210> 477	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	

<400> 477	
uguugcuuag gccucgucut t	21
<210> 478	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 478	
uuguacacuu ggucaacaut t	21
<210> 479	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 479	
auguugacca aguguacaat t	21
<210> 480	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 480	
cacuggaguu cgagacgagt t	21
<210> 481	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 481	
cucgucucga acuccagugt t	21
<210> 482	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 482	
ggugacauuu gugaaacuut t	21
<210> 483	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> 人工序列	
<400> 483	
aaguuucaca aaugucacct t	21
<210> 484	

<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	484	
acuacugagu	gacaguagat	t
		21
<210>	485	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	人工序列	
<400>	485	
ucuacuguca	cucaguagut	t
		21
<210>	486	
<211>	18	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18)	
<223>	2'-O-甲氧乙基	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17)	
<223>	硫代磷酸酯骨架修饰	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(2) .. (2)	
<223>	5' 甲基胞嘧啶	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(4) .. (4)	
<223>	5' 甲基胞嘧啶	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(8) .. (8)	
<223>	5' 甲基胞嘧啶	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(15) .. (15)	
<223>	5' 甲基胞嘧啶	

<400> 486	
ucacuuucau aaugcugg	18
<210> 487	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 487	
tcatactggc tattatatgg gtttt	25
<210> 488	
<211> 18	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (1,3,5,7,13,15,17)	
<223> 2'-O-甲基	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (1) .. (2)	
<223> 硫代磷酸酯骨架修饰	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (2,4,6,8,9,10,11,12,14,16,18)	
<223> 2'-氟代	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (16) .. (17)	
<223> 硫代磷酸酯骨架修饰	
<400> 488	
gacgaggccu aagcaaca	18
<210> 489	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 489	
tgctctatgc cagcatttct c	21
<210> 490	
<211> 26	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<400> 490	
gctattatat ggaaatgctg gcatag	26
<210> 491	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 491	
ttccagatct gtctgatcgt ttct	24
<210> 492	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 492	
tgctcaccca ccaacaattt ag	22
<210> 493	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 493	
tctgctctga ctttagcacc tg	22
<210> 494	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 494	
ccccccaccac ctcccatatg	20
<210> 495	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 495	
cccttctcac agctcataaa attac	25
<210> 496	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 修饰的碱基	

<222>	(1,3,5,7,9,11,13,15,17,19)	
<223>	2'-O-甲基	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(1,2,13,14,15,16,17,18,19)	
<223>	硫代磷酸酯骨架修饰	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5' - (E) - 乙烯基磷酸酯	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(2,4,6,8,10,12,14,16,18,20)	
<223>	2'-氟代	
<400>	496	
	uguugcuuag gccucgucuc	20
<210>	497	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	497	
	gctctggaat tgtaccgcag	20
<210>	498	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	498	
	ctgcagcaaa tcgcttgga	20

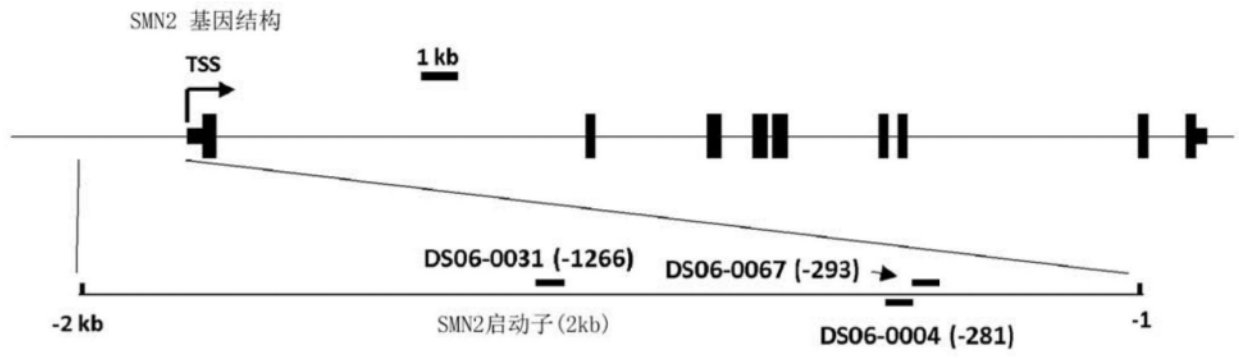


图1A

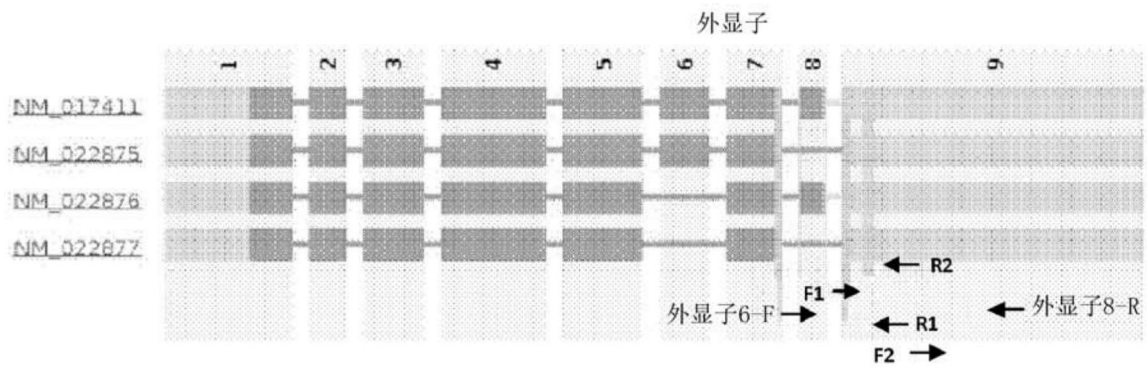


图1B

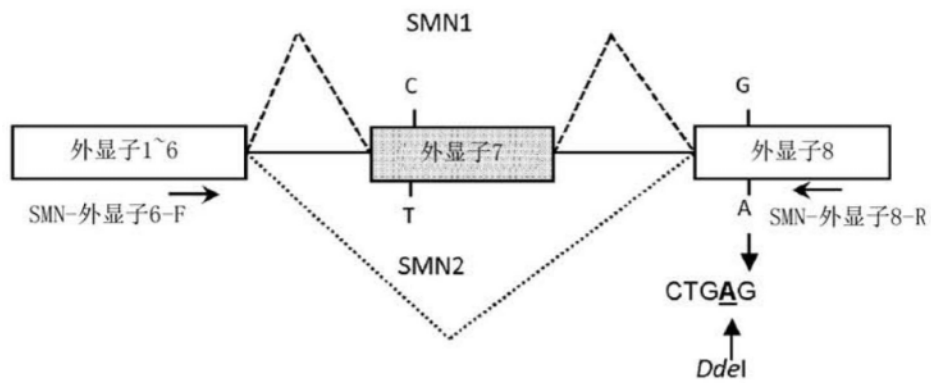


图2A

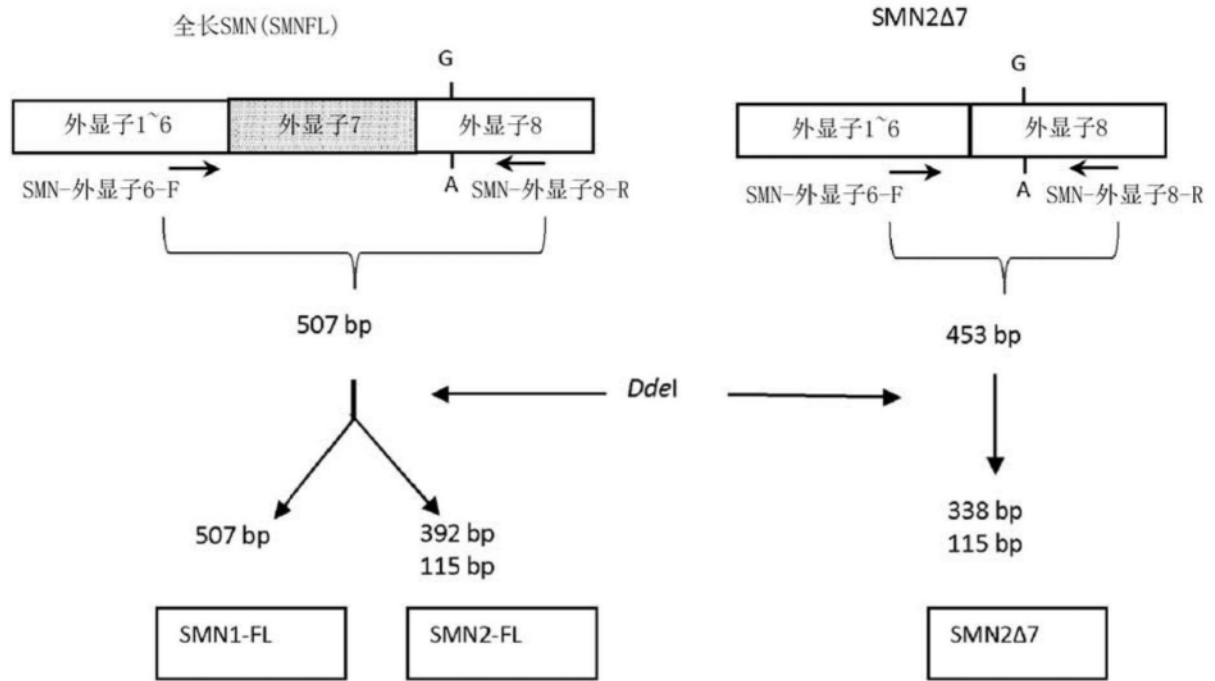


图 2B

图 2C

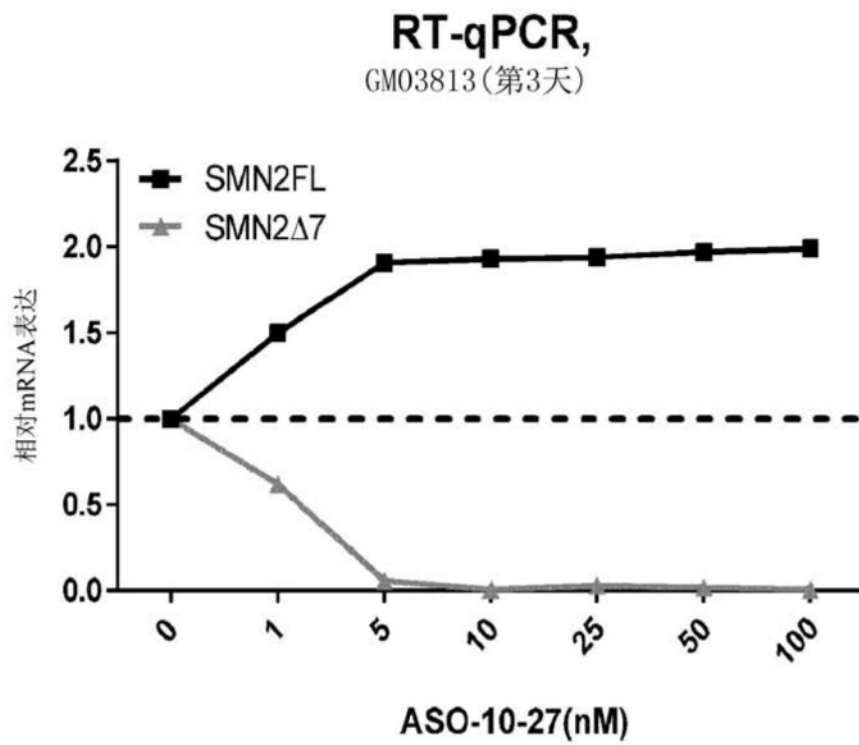


图3A

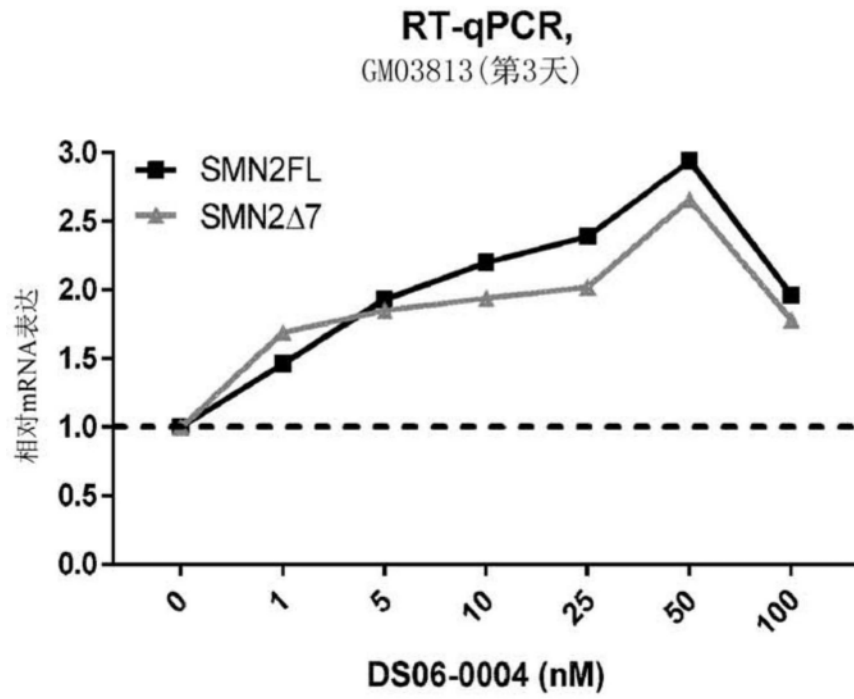


图3B

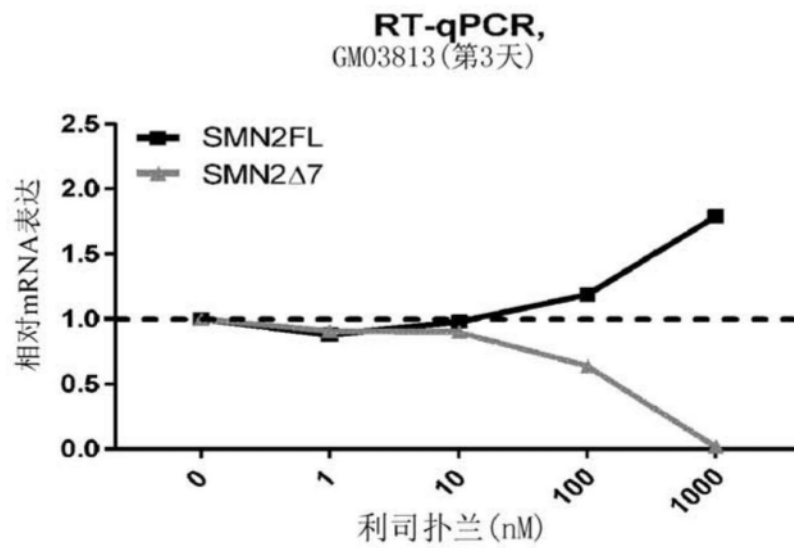


图3C

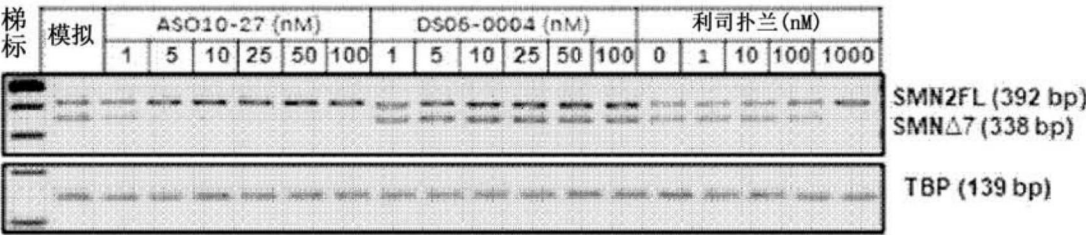


图3D

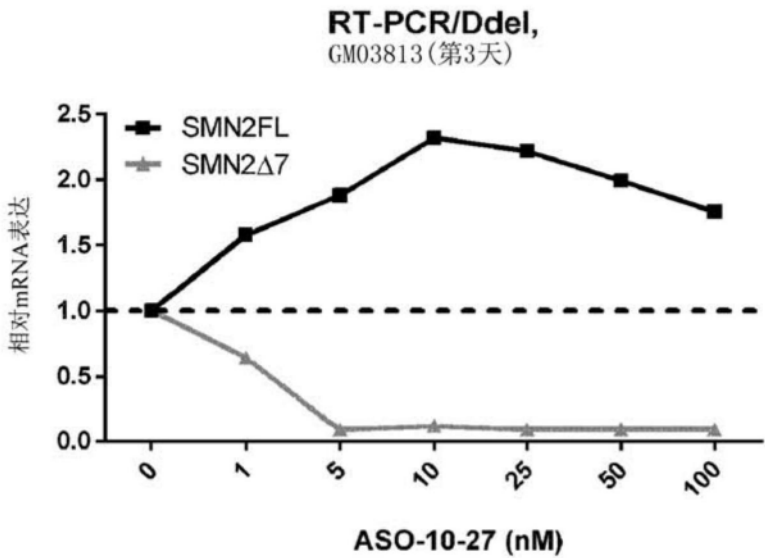


图3E

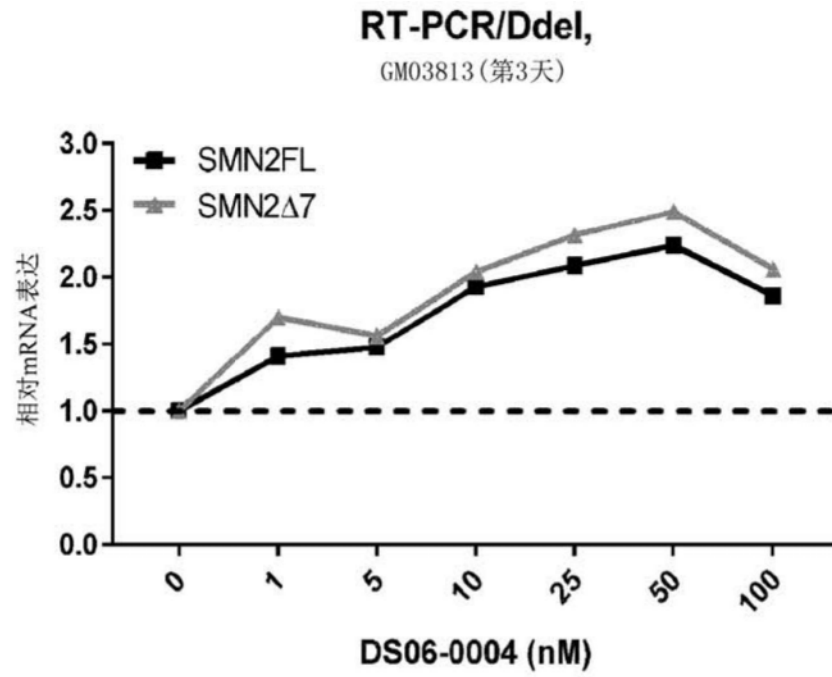


图3F

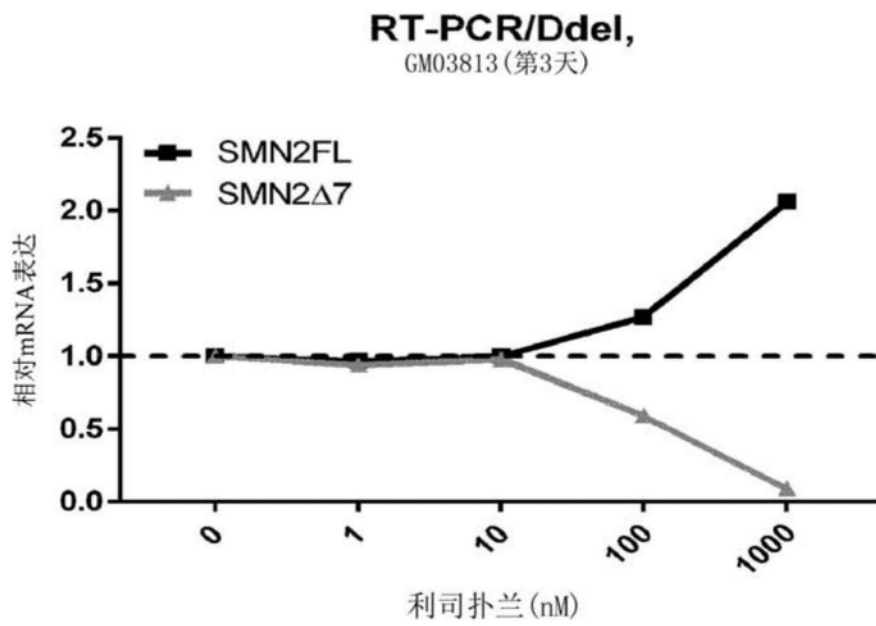


图3G

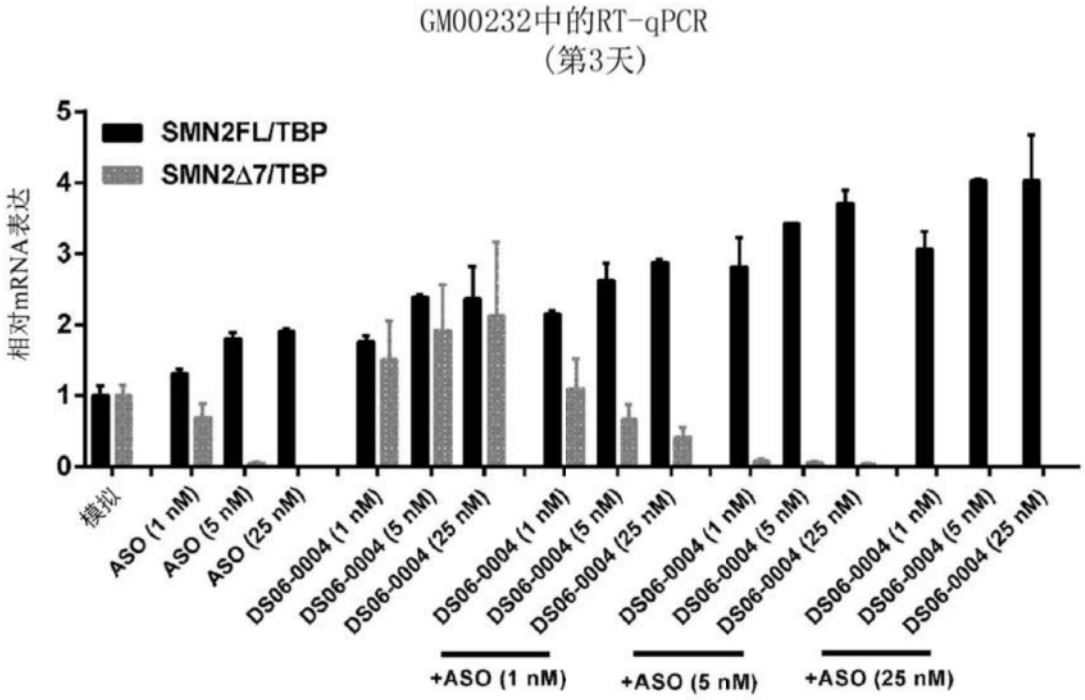


图4A

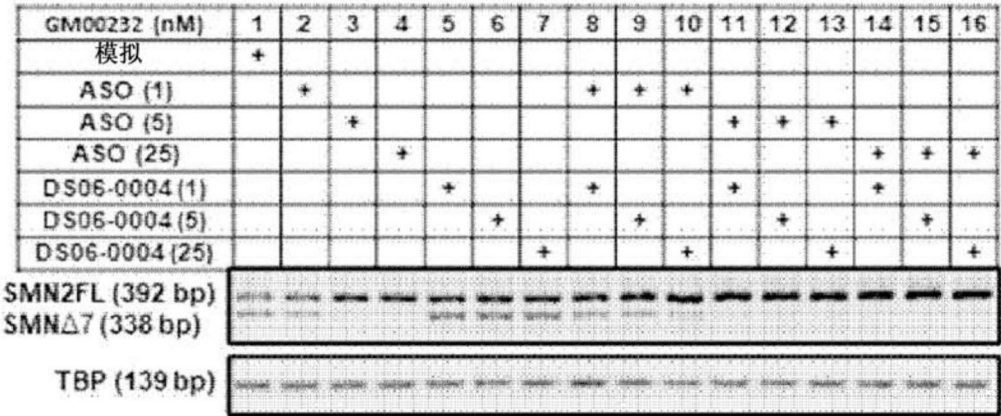


图4B

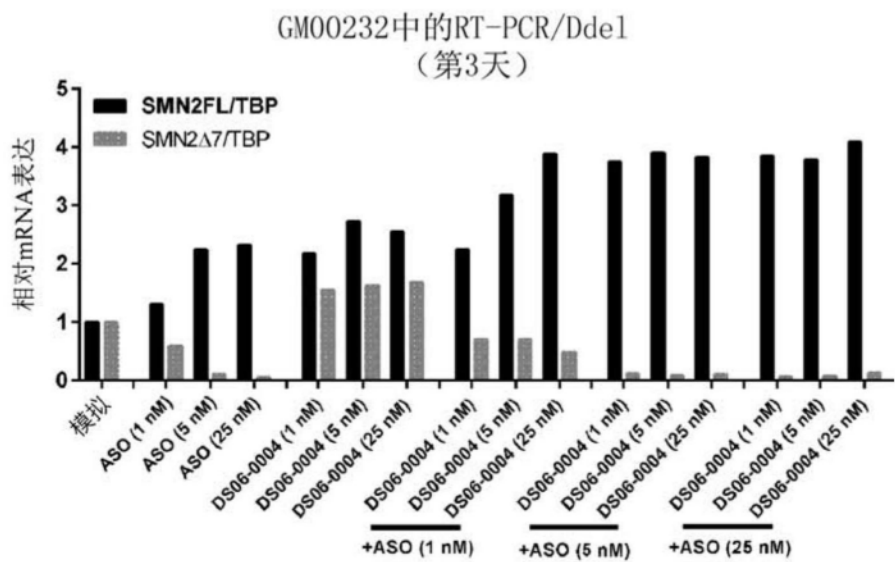


图4C

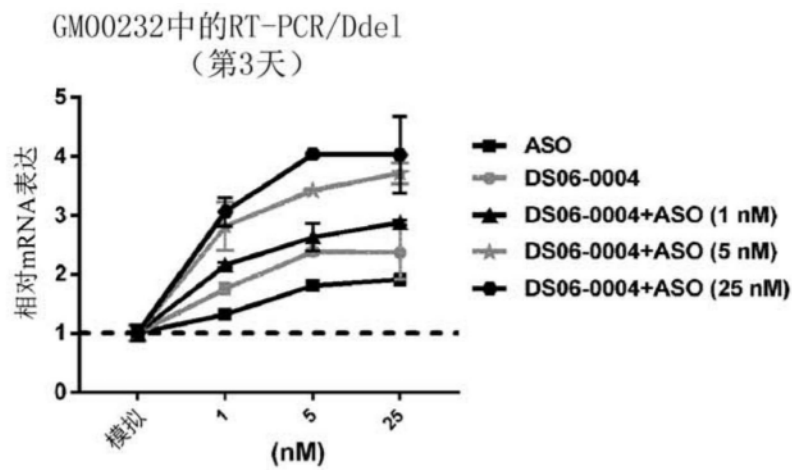


图4D

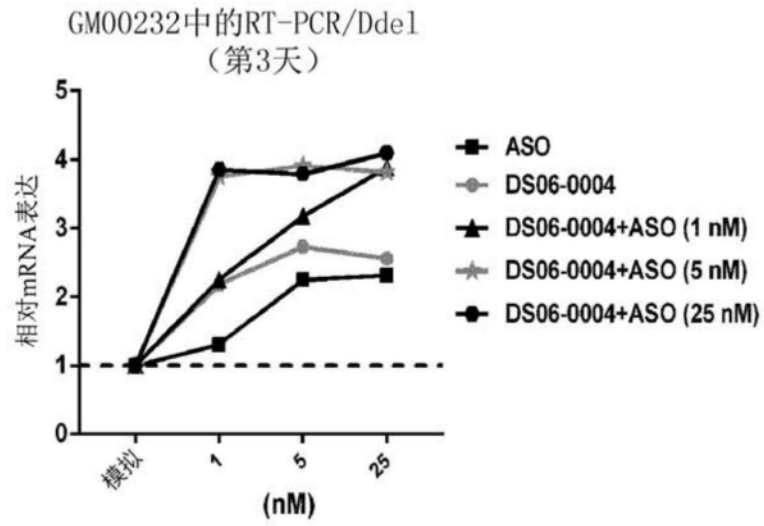


图4E

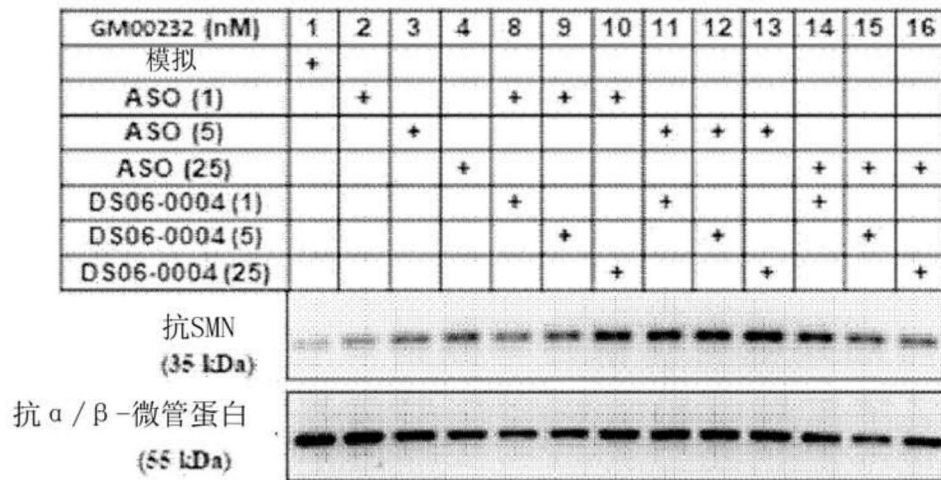


图5A

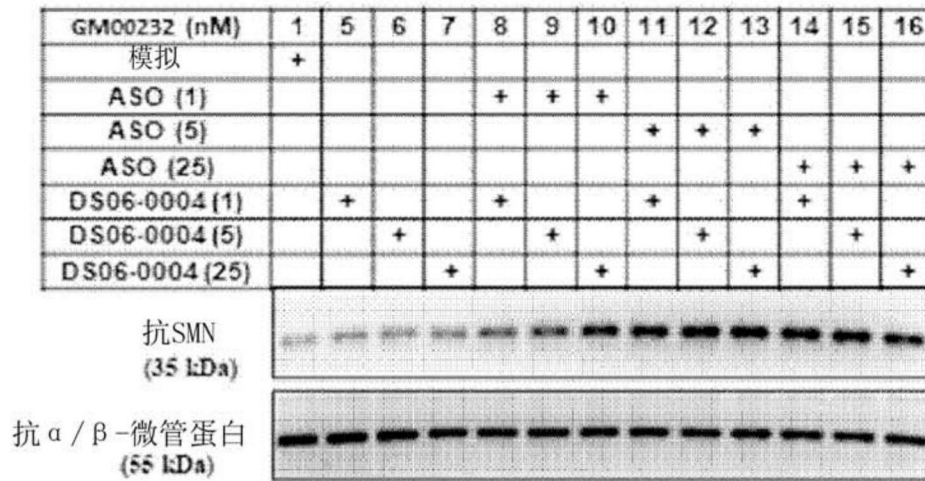


图5B

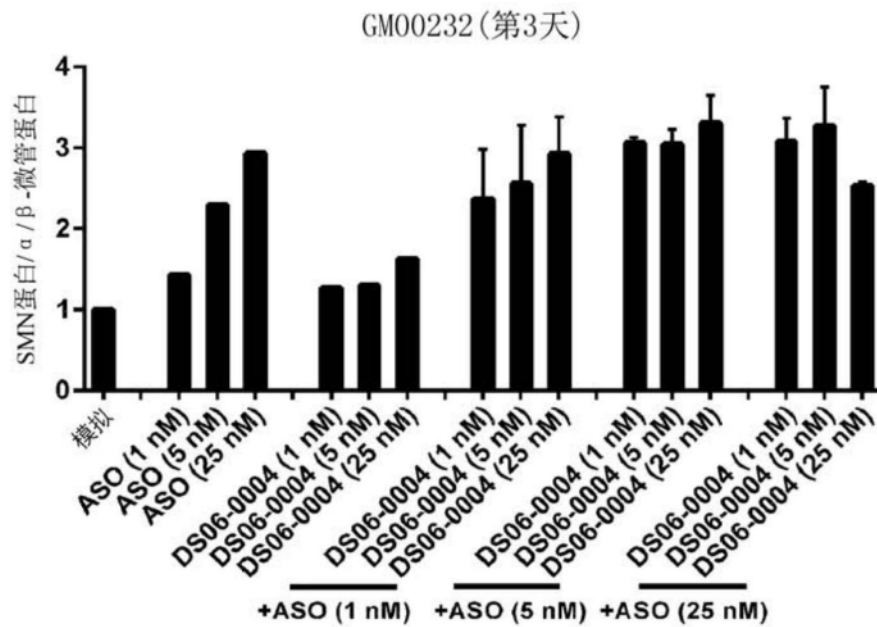


图5C

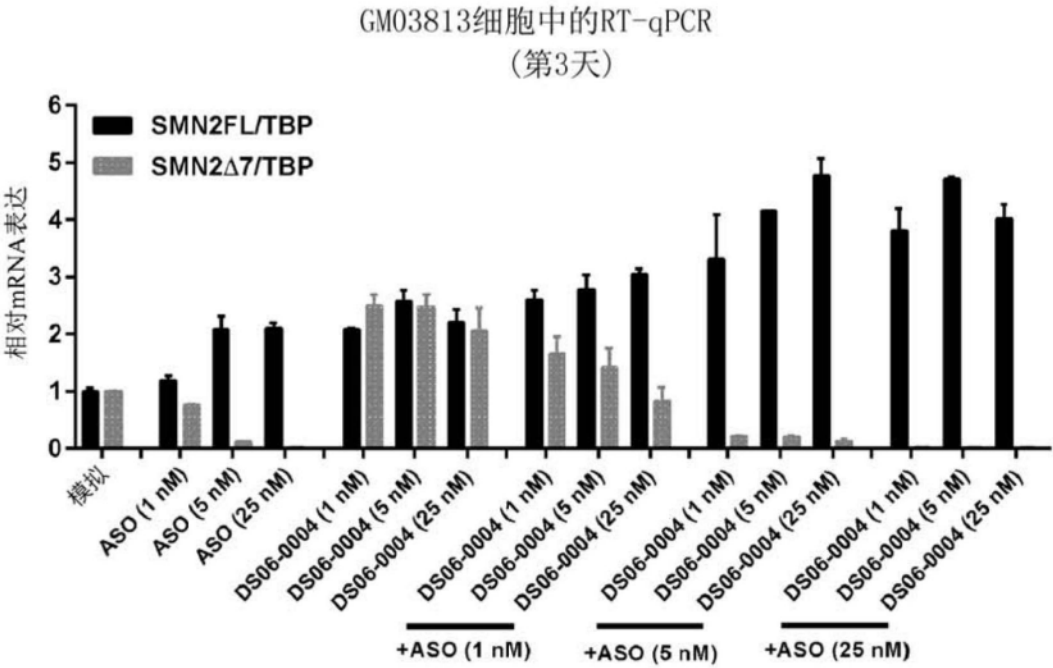


图6A

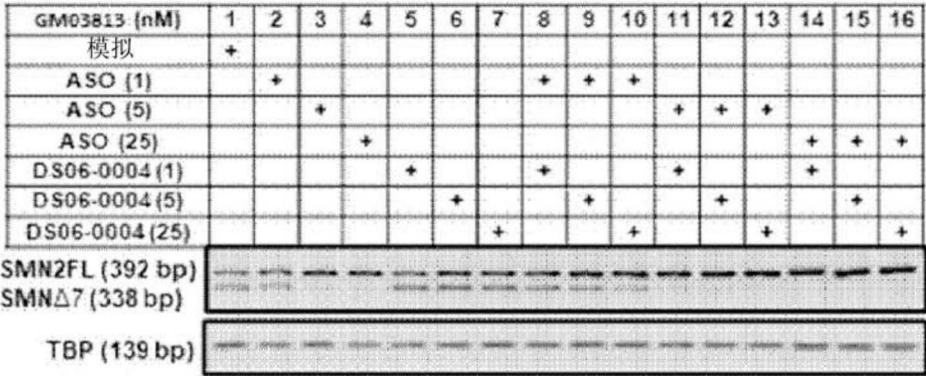


图6B

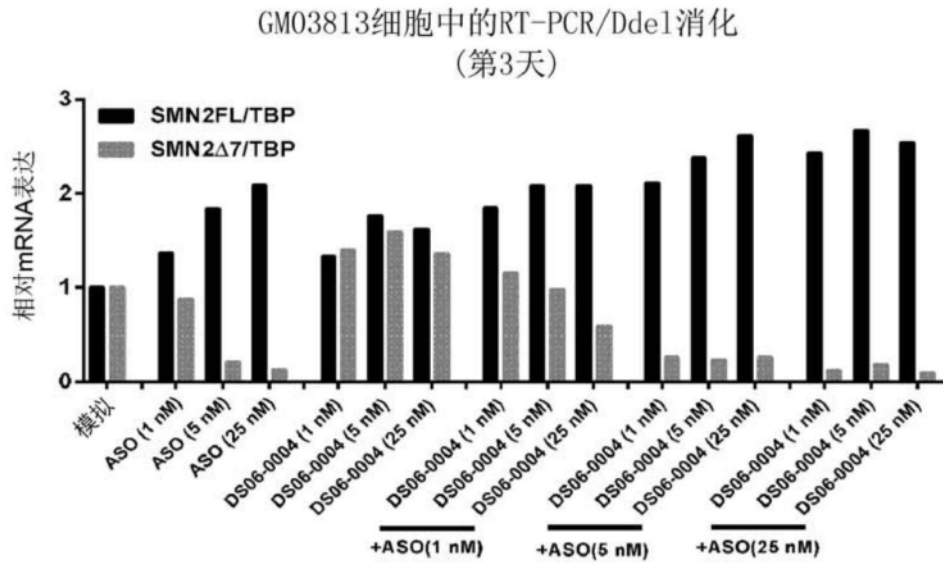


图6C

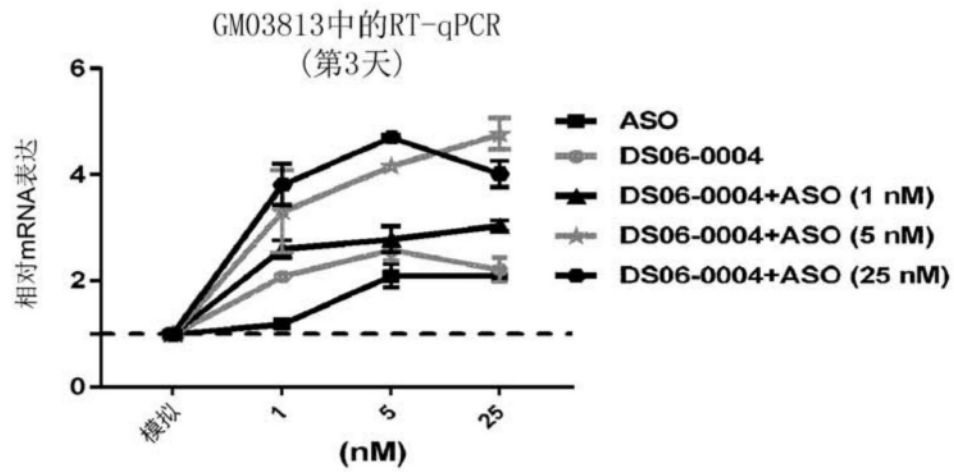


图6D

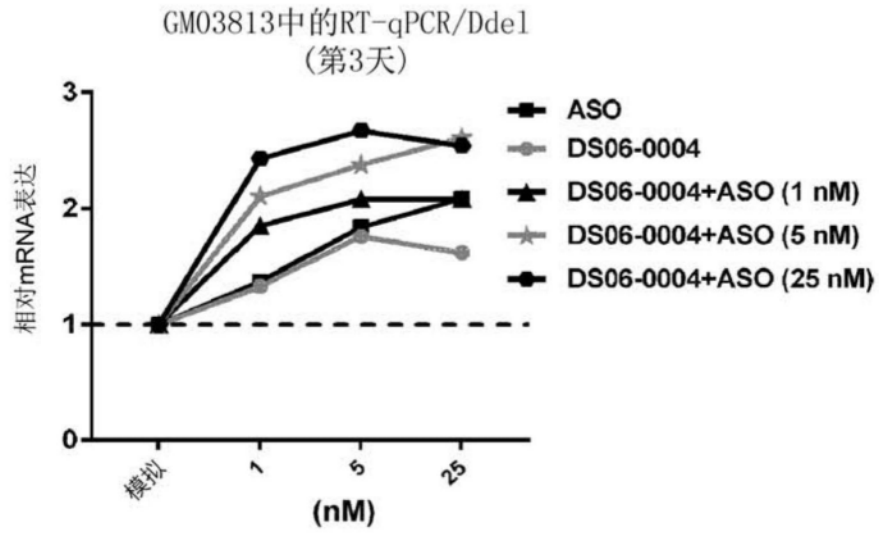


图6E

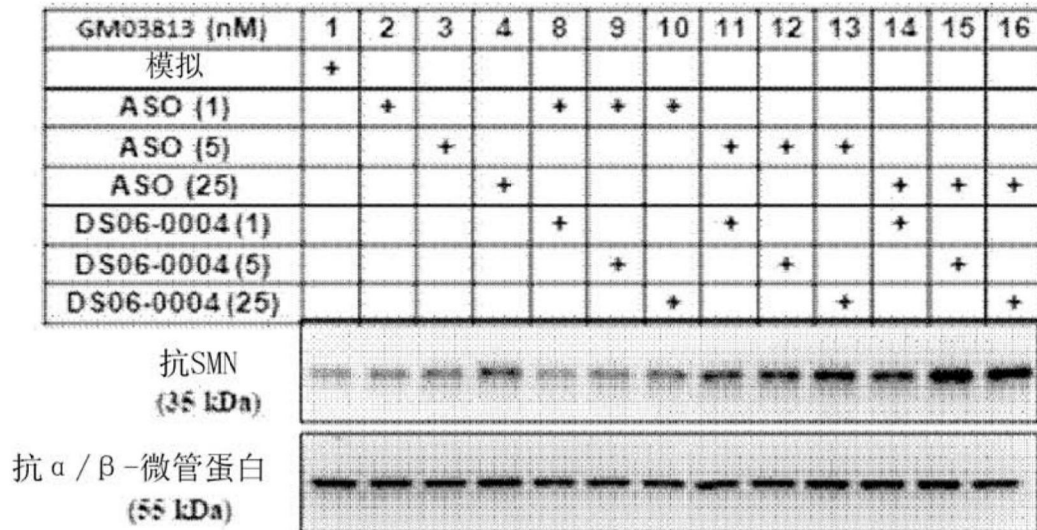


图7A

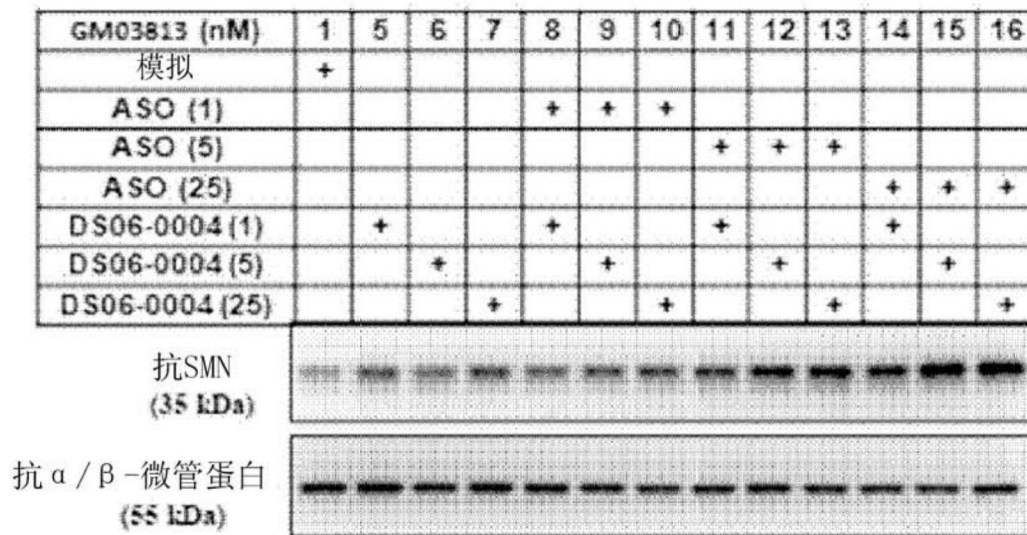


图7B

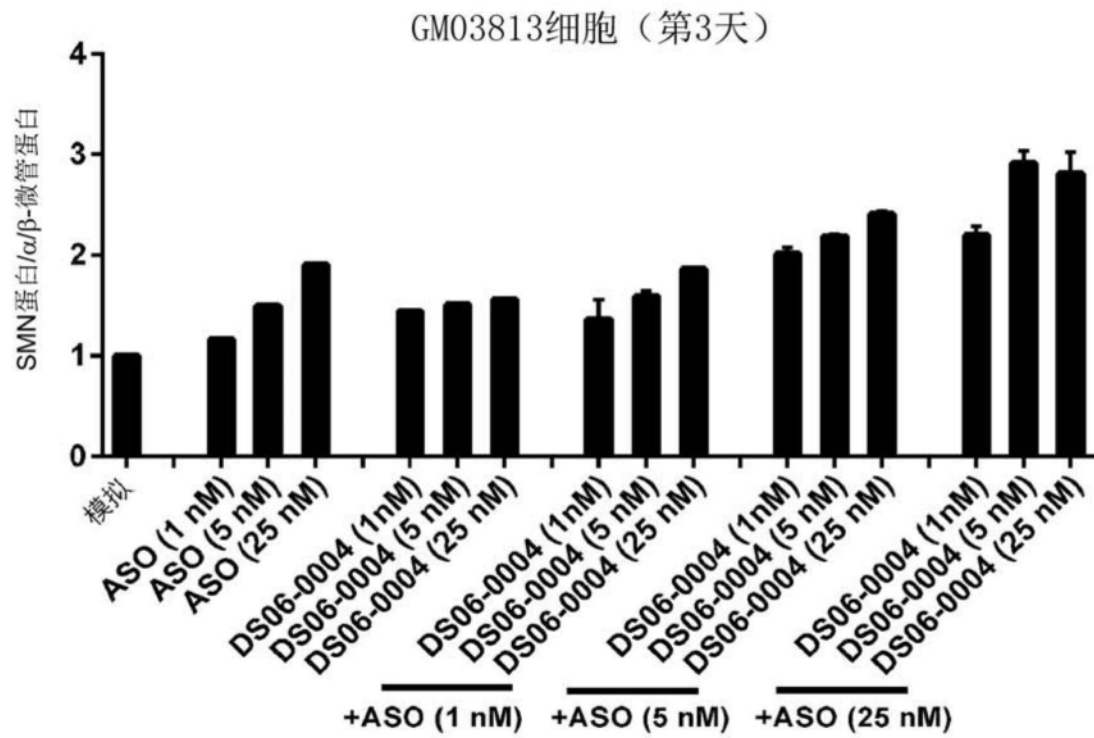


图7C

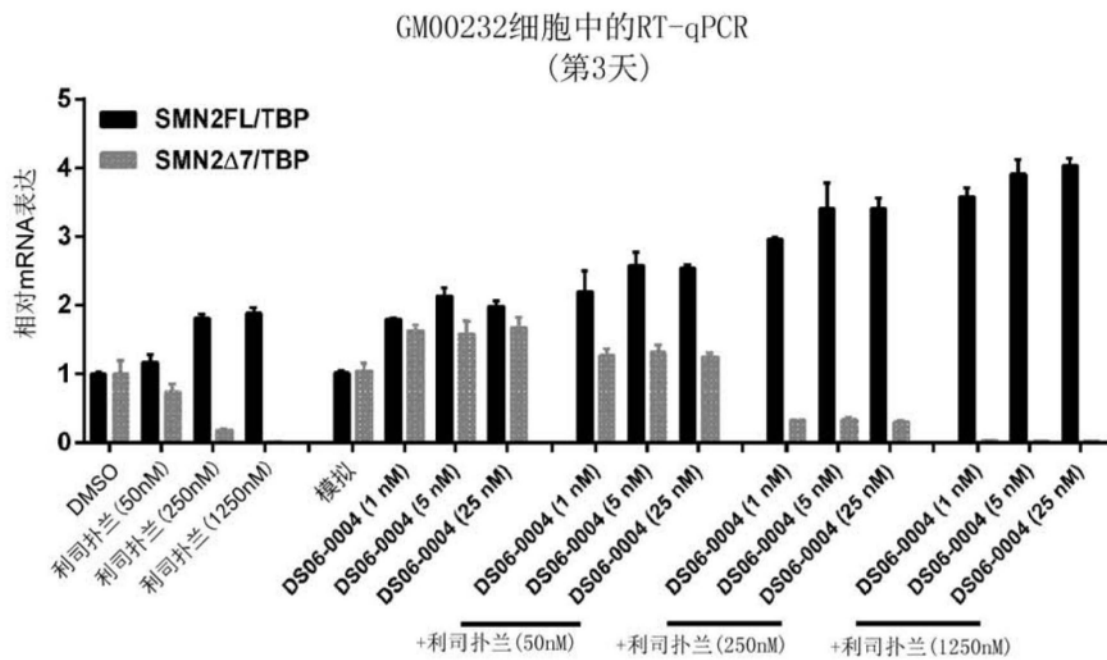


图8A

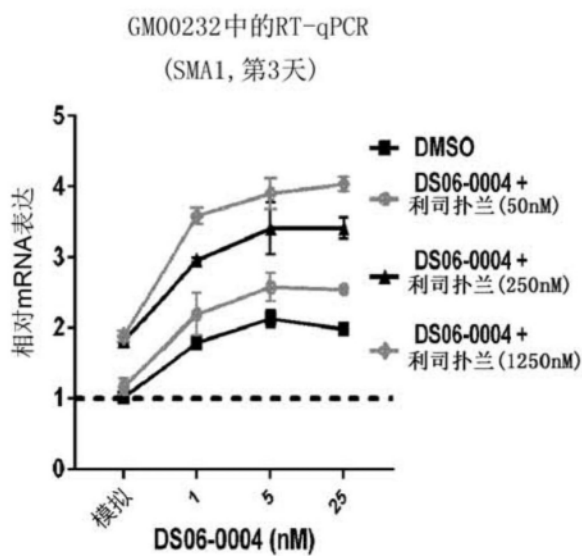


图8B

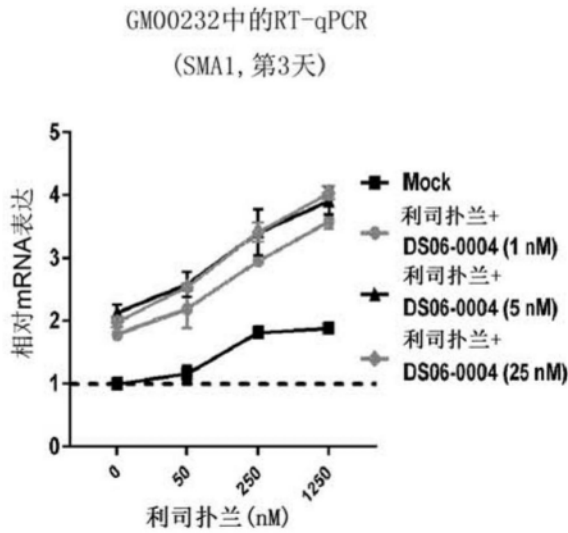


图8C

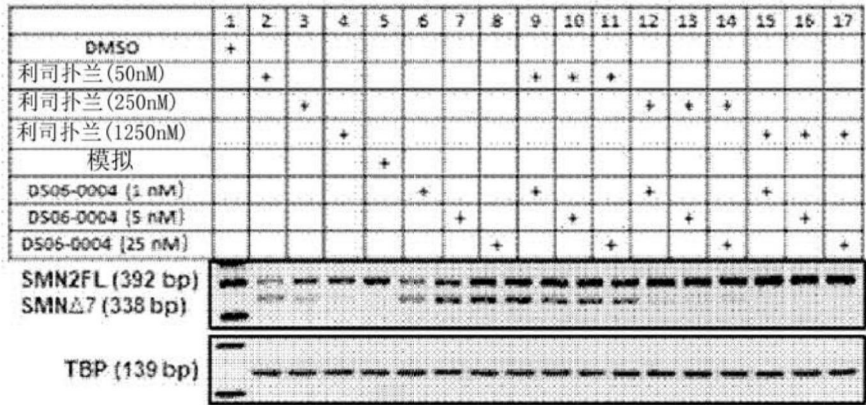


图8D

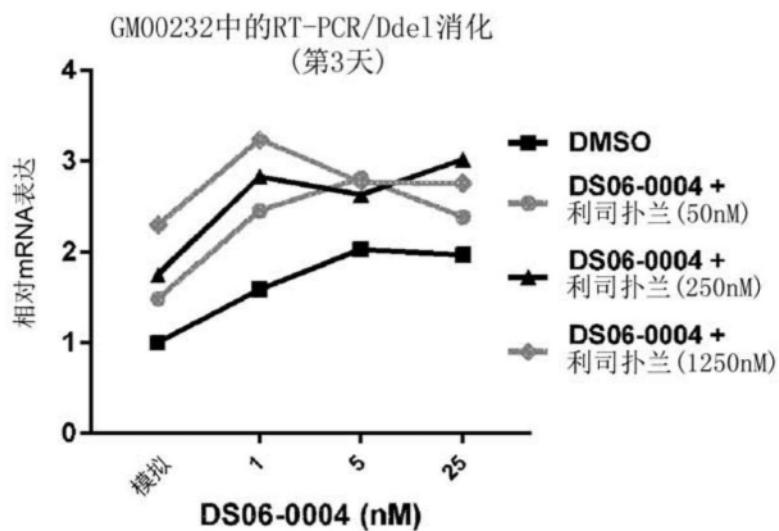


图8E

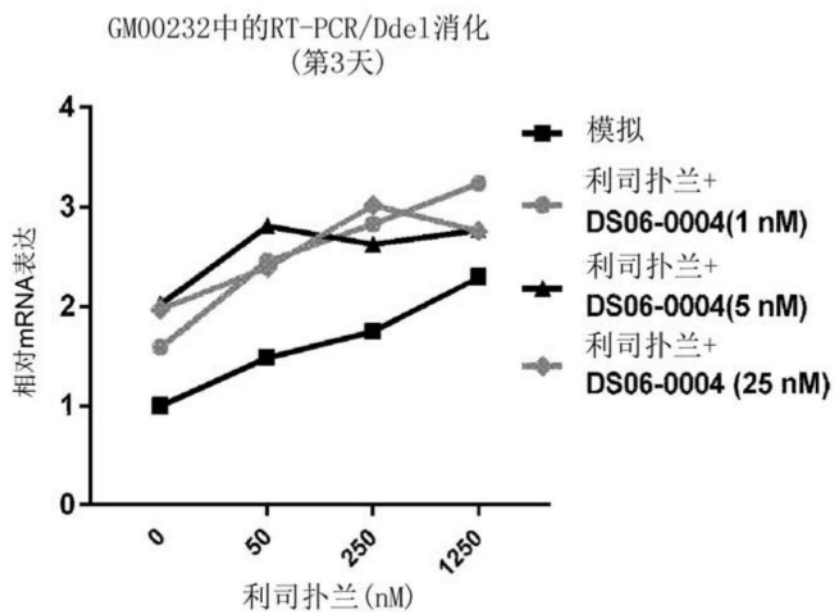


图8F

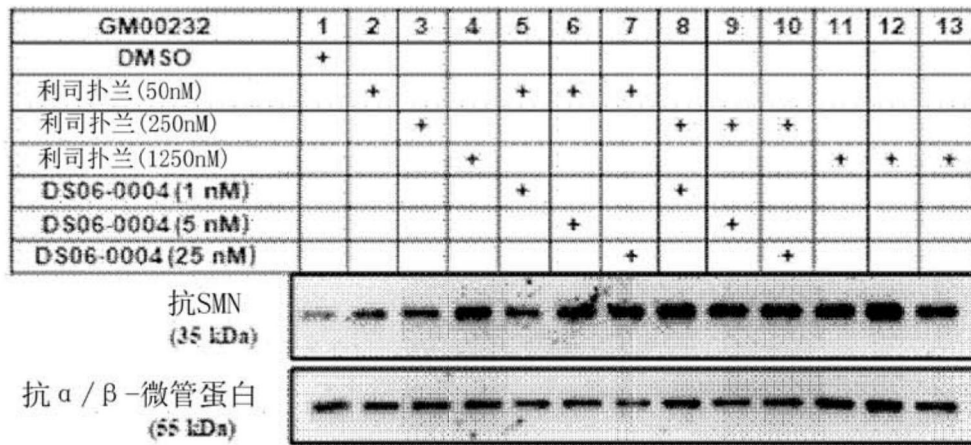


图9A

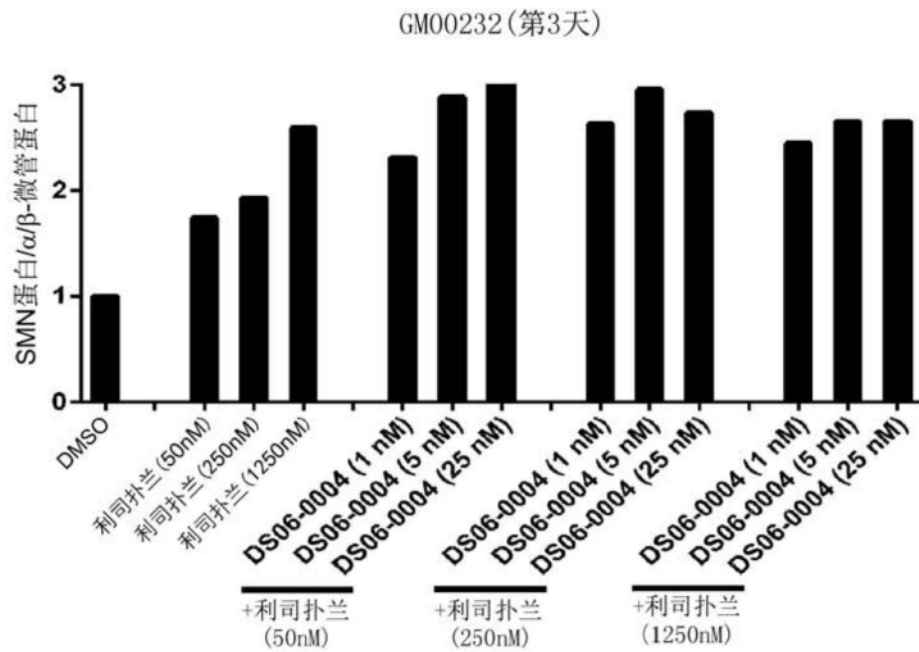


图9B

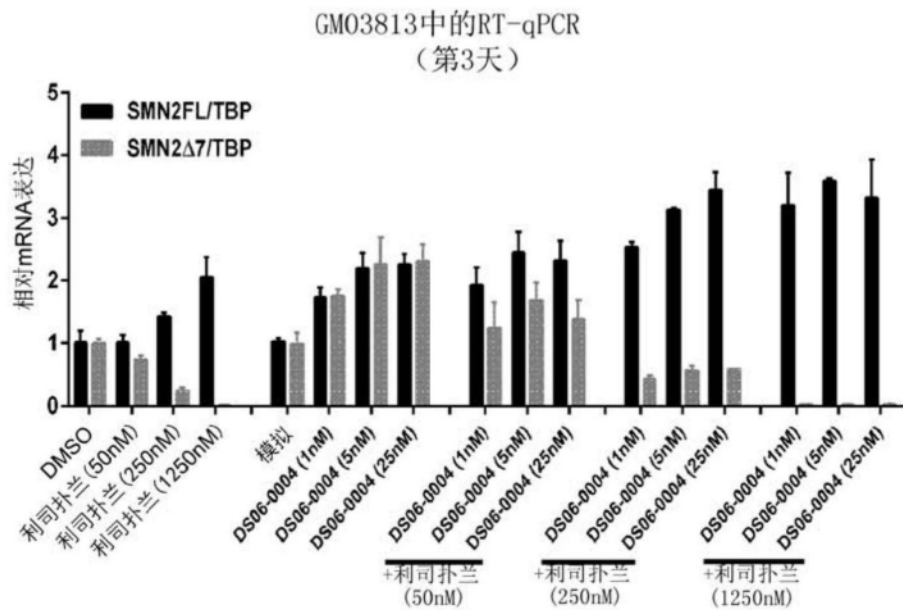


图10A

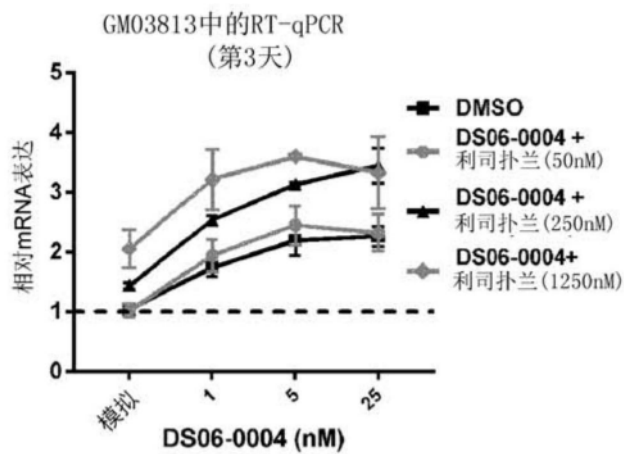


图10B

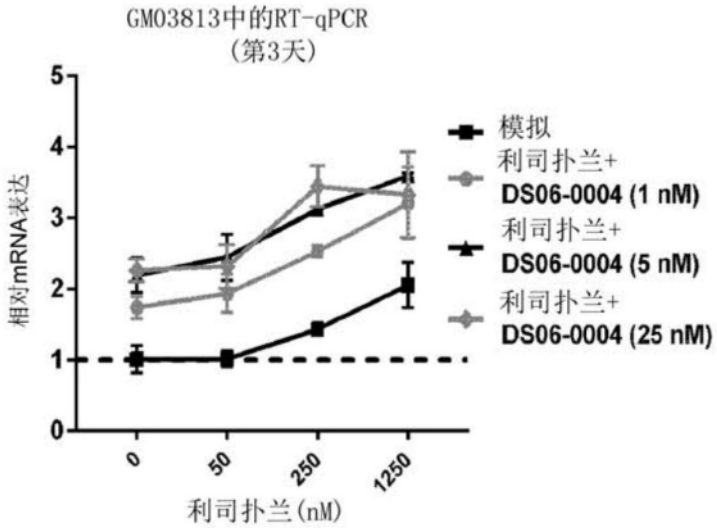


图10C

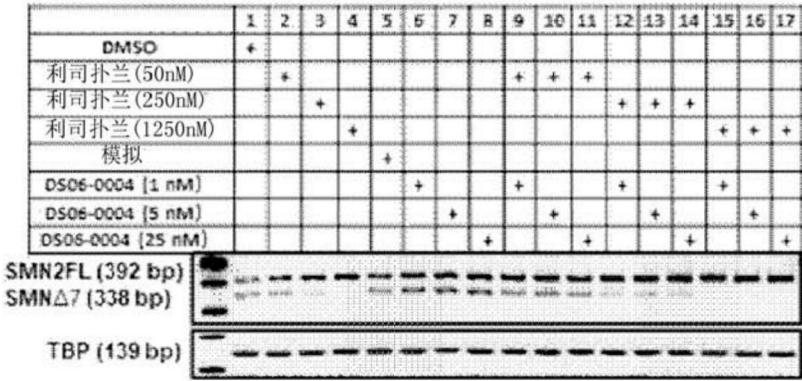


图10D

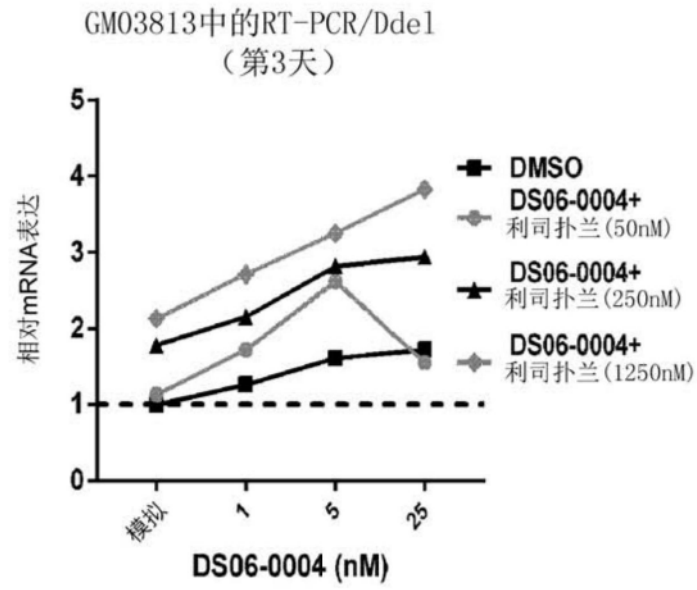


图10E

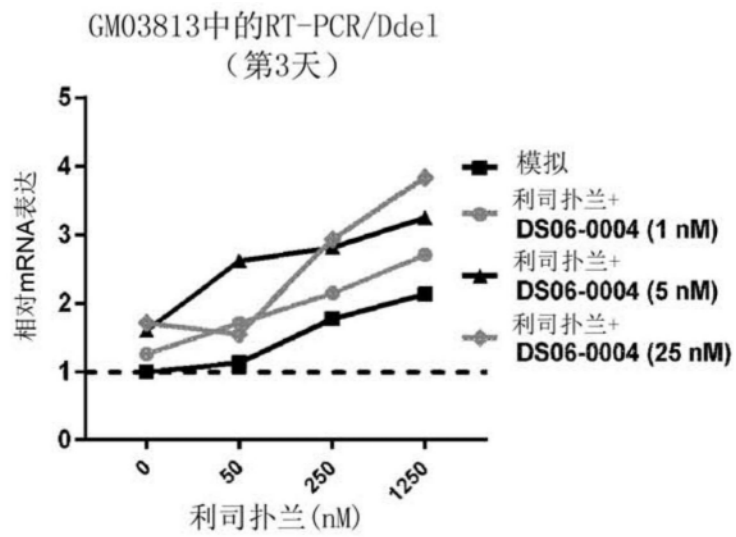


图10F

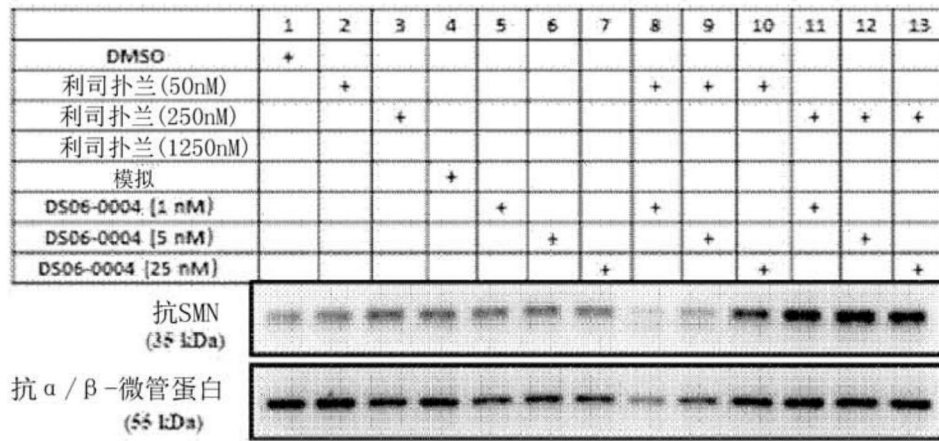


图11A

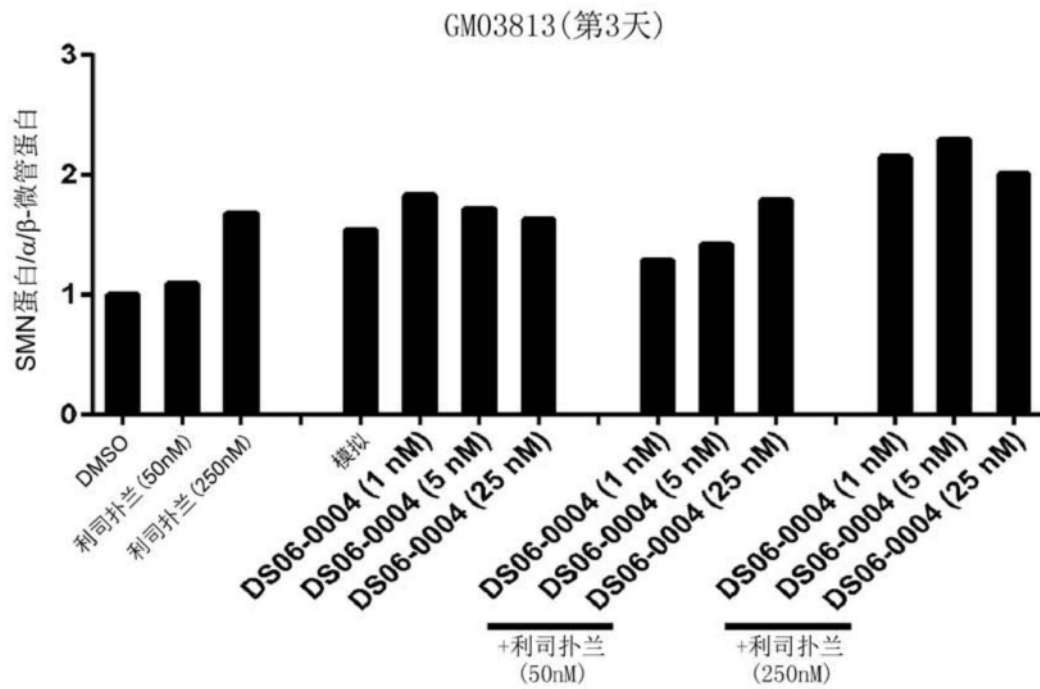


图11B

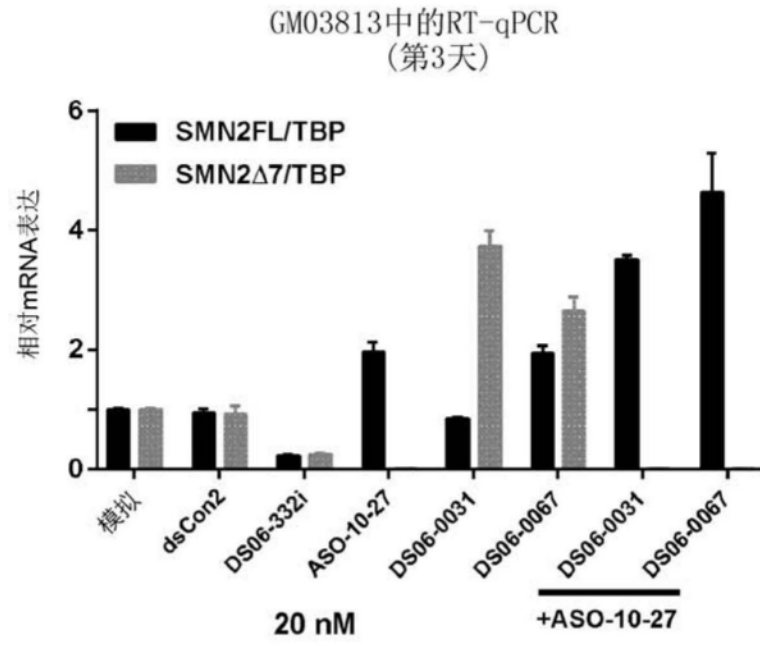


图12A

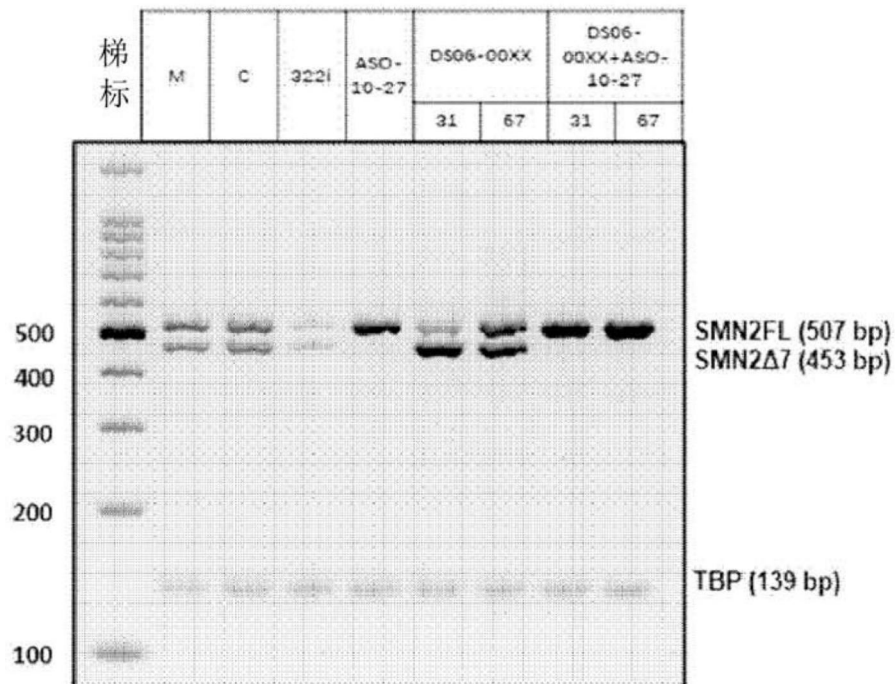


图12B

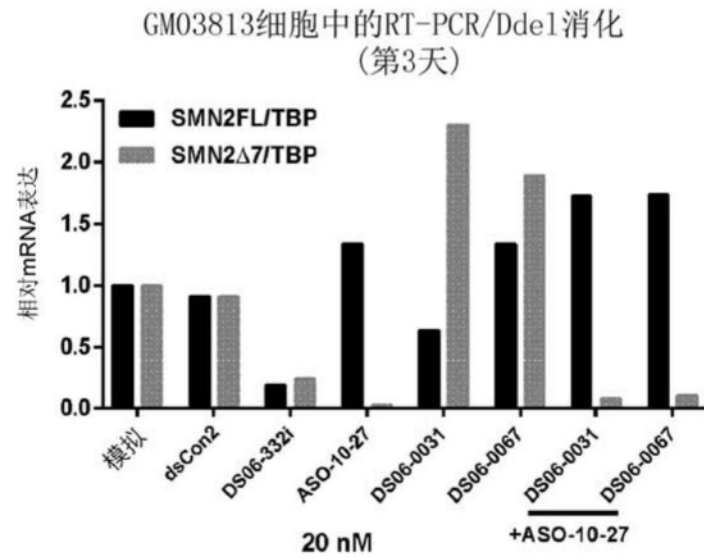


图12C



图12D

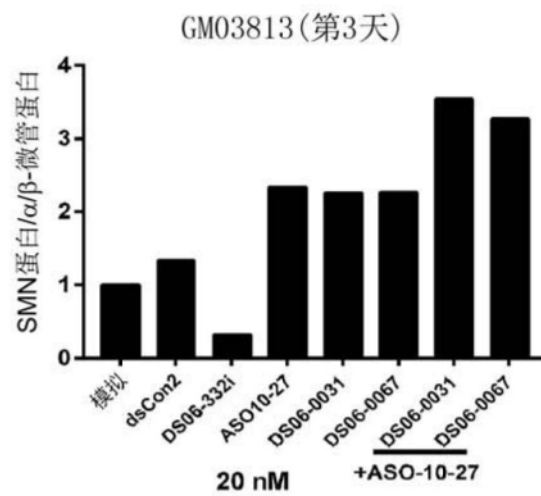


图12E

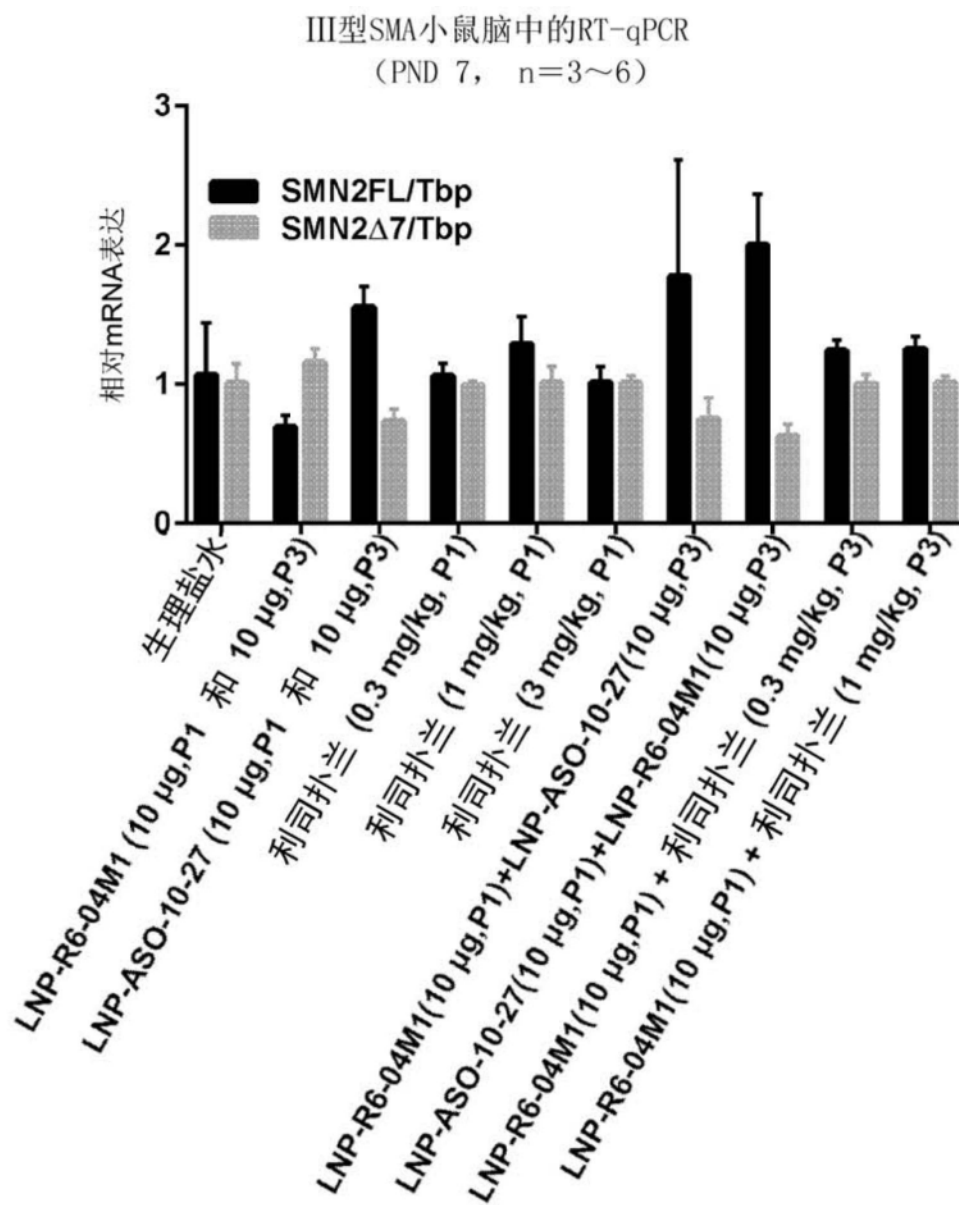


图13A

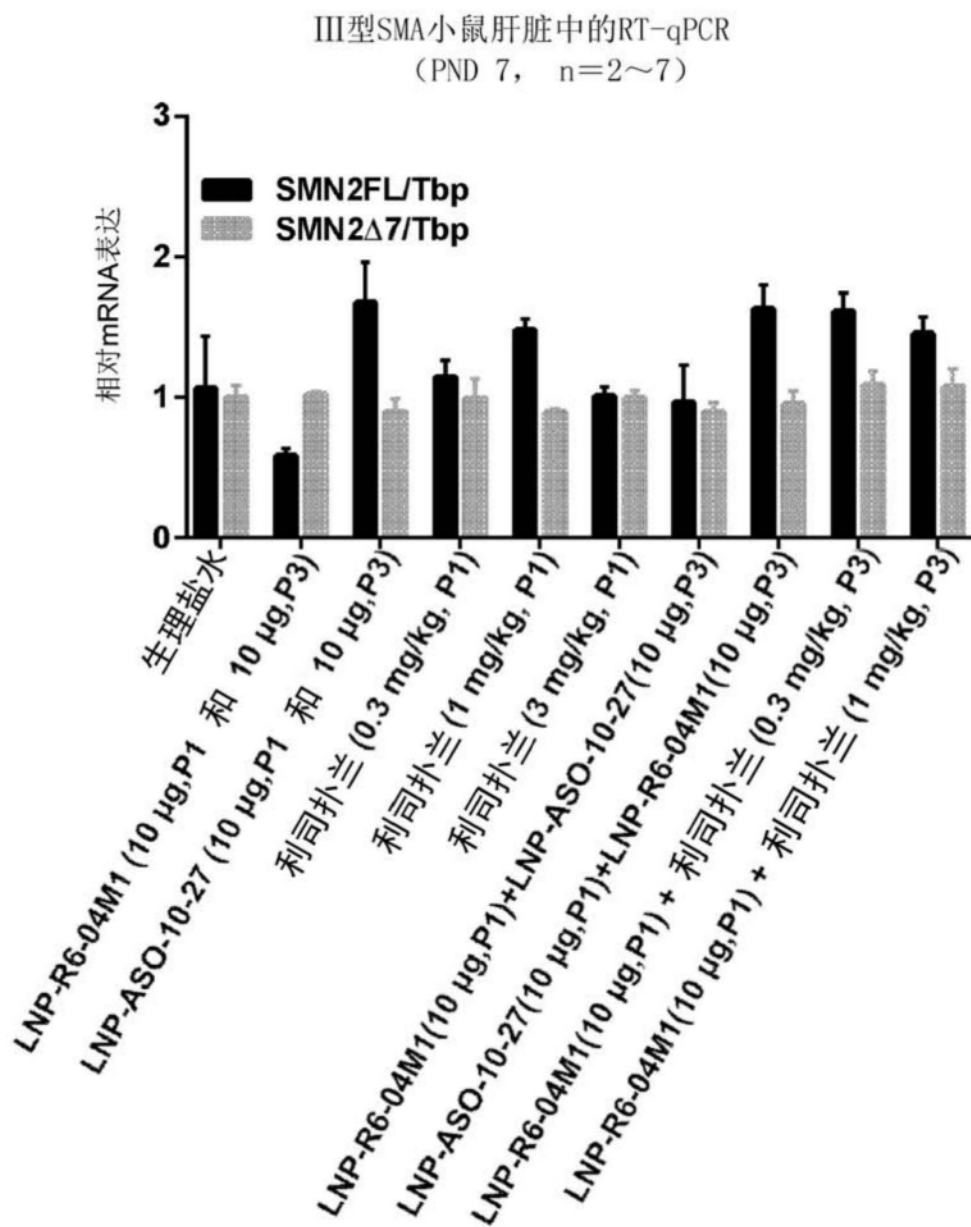


图13B

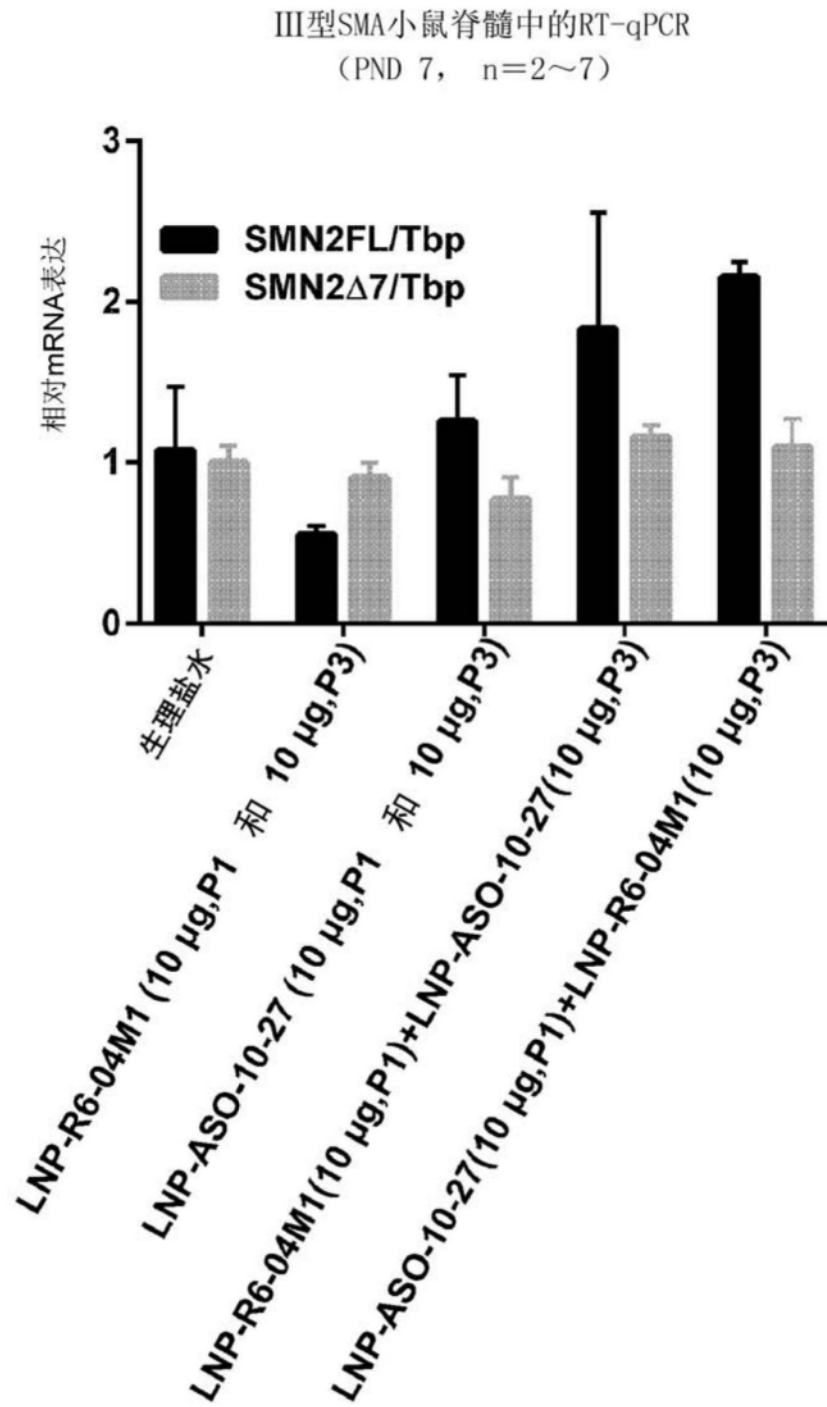


图13C