



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116949041 A

(43) 申请公布日 2023.10.27

(21) 申请号 202310388098.1

C12P 21/00 (2006.01)

(22) 申请日 2023.04.12

(71) 申请人 上海吉量医药工程有限公司

地址 201601 上海市松江区泗泾镇望东中路1号10幢101、201、301室

申请人 浙江吉量科技有限公司  
上海细胞治疗集团有限公司

(72) 发明人 刘韬 张平静 王佩 钱其军

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理师 陶启长 韦东

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页  
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

人工设计mRNA UTR核苷酸序列及其用途

(57) 摘要

本发明涉及基因表达更为高效的mRNA UTR多核苷酸序列、其构建方法和应用。

1. 一种多核苷酸,所述多核苷酸包含:

(1) 3'UTR核苷酸,所述3'UTR核苷酸序列如SEQ ID NO:1-18任一所示或与其具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性,和/或

(2) (1)的互补序列。

2. 如权利要求1所述的多核苷酸,其特征在于,

所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1-18任一所示或与SEQ ID NO:1-18具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性,

优选地,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1-5、7-12、16-17任一所示或与SEQ ID NO:1-5、7-12、16-17具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性,

更优选地,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1、3、7-10、12任一所示或与SEQ ID NO:1、3、7-10、12具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性,

最优选地,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1或9所示或与SEQ ID NO:1或9具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性。

3. 一种多核苷酸,所述多核苷酸包含:

(1) 5'UTR核苷酸,所述5'UTR核苷酸序列如SEQ ID NO:20所示或与其具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性,和/或

(2) (1)的互补序列,

优选地,所述多核苷酸如SEQ ID NO:20所示或与其具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性。

4. 一种核酸构建物,包含:

(1) 任意的待表达基因,和

(2) 权利要求1或2所述的多核苷酸,和/或权利要求3所述的多核苷酸,所述权利要求1或2所述的多核苷酸位于所述待表达基因的3'端,所述权利要求3所述的多核苷酸位于所述待表达基因的5'端,

优选地,所述核酸构建物还包含选自以下的一个或多个元件:启动子、kozak序列、Poly (A)。

5. 一种mRNA,在5'-3'方向上包含:5'帽结构、5'UTR、开放阅读框(ORF)、3'UTR和Poly (A),所述3'UTR的核苷酸序列如SEQ ID NO:23-40任一所示或与SEQ ID NO:23-40具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性,和/或

所述5'UTR的核苷酸序列如SEQ ID NO:41所示或与SEQ ID NO:41具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性,

优选地,所述mRNA还包括kozak序列。

6. 一种宿主细胞,包含权利要求1-3任一项所述的多核苷酸、权利要求4所述的核酸构建物、或权利要求5所述的mRNA,

优选地,所述宿主细胞是CHO细胞、DC细胞或T细胞。

7. 一种药物组合物,包含权利要求1-3任一项所述的多核苷酸、权利要求4所述的核酸构建物、权利要求5所述的mRNA、或权利要求6所述的宿主细胞,和药学上可接受的辅料。

8. 一种提高基因表达强度、延长基因表达时间、提高基因的mRNA启动翻译能力或维持翻译活性时长的方法,包括:使携带有权利要求1或2所述的多核苷酸和/或权利要求3所述

的多核苷酸的基因表达的步骤,权利要求1或2所述的多核苷酸位于所述基因的3'端,权利要求3所述的多核苷酸位于所述基因的5'端。

9. 权利要求1-3任一项所述的多核苷酸、权利要求4所述的核酸构建物、权利要求5所述的mRNA、或权利要求6所述的宿主细胞在制备用于治疗疾病的药物中的应用,所述基因的表达有助于所述疾病的治疗。

10. 权利要求1-3任一项所述的多核苷酸、权利要求4所述的核酸构建物、权利要求5所述的mRNA在控制基因表达中的应用。

## 人工设计mRNA UTR核苷酸序列及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于蛋白表达技术领域,具体涉及提高mRNA翻译的人工设计mRNA UTR核苷酸序列及其用途。

### 背景技术

[0002] 随着生物医药领域的发展,以信使核糖核酸(mRNA)表达蛋白质为基础的药物,例如mRNA疫苗、mRNA抗体或蛋白替代疗法,已经大规模进入临床应用,其中COVID-19mRNA疫苗在新冠病毒流行期间获得了巨大的成功。然而,相比于传统药物,这类新型大分子药物制造起来既费时又昂贵,且产量往往不高。因此,如何降低生产成本、提高单位剂量mRNA效率成为了限制mRNA药物发展的一大挑战。

[0003] mRNA除了含有翻译蛋白所必须的编码序列(coding sequences,CDS)外,还有必要的非翻译序列,如m7G帽子、5'端非翻译区(5'untranslated region,5'-UTR)、3'端非翻译区(3'untranslated region,3'UTR)与多聚腺苷酸尾(poly(A) tail)。长期以来,科学家们一直在尝试各种设计方法提高mRNA在真核细胞和/或体内翻译蛋白质效率的方法,例如引入增强子元件,密码子优化以及添加Kozak序列、UTR序列筛选、Poly(A)序列筛选等等。其中业内领域熟知,UTR序列对mRNA蛋白翻译效率的影响最为显著。

[0004] 目前已有报道从内源性基因中筛选HSP70 mRNA 5'UTR、 $\alpha$ -globin 5'UTR、CYBA UTR、S27a 3'UTR等可以提升mRNA翻译效率。例如,辉瑞和BioNtech公司开发新冠疫苗BNT162b2直接选取human $\alpha$ -globin mRNA的5'UTR。3'UTR通常与mRNA稳定性有关,同时存在microRNA结合位点可能造成抑制翻译/RNA降解,与5'UTR类似选取天然存在的序列进行一定修饰,例如BioNTech使用了人源AES/TLE5的3'UTR片段并引入两个点突变。

[0005] 除了利用来自内源性基因的UTRs,还可以从头设计mRNA UTR。从头设计时一般会尽量减少二级结构从而减少翻译起始复合物扫描识别过程中的阻碍;减少miRNA靶向效应等设计原则。例如,Moderna公司开发的新冠疫苗mRNA-1273的序列为从头设计的序列。

[0006] 尽管众多的mRNA医药公司根据不同的设计原理和方法已经筛选了一大批效果较好的mRNA UTR序列,但是开发新的、促进mRNA更高效翻译的UTR序列、进一步降低mRNA给药单位剂量降低成本,仍然是该领域内的一个研究重点。

### 发明内容

[0007] 本发明基于人工从头设计mRNA UTR序列的方法,设计并筛选到比本领域内公知的Hba-a1 mRNA 3'UTR更高效的核苷酸序列,同时优化设计了5'UTR序列,应用于mRNA药物。

[0008] 本发明第一方面提供第一种多核苷酸,所述多核苷酸包含:

[0009] (1) 3'UTR核苷酸,所述3'UTR核苷酸序列如SEQ ID NO:1-18任一所示或与其具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性,和/或

[0010] (2) (1)的互补序列。

[0011] 优选地,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1-5、7-12、16-17任一所示或与SEQ ID

NO:1-5、7-12、16-17具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性。

[0012] 更优选地,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1、3、7-10、12任一所示或与SEQ ID NO:1、3、7-10、12具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性。

[0013] 最优选地,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1 (73H1U) 或9 (36H3U) 所示或与SEQ ID NO:1 (73H1U) 或9 (36H3U) 具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性。

[0014] 在一个或多个实施方案中,所述多核苷酸是DNA。

[0015] 本发明的第二方面还提供第二种多核苷酸,所述多核苷酸包含:

[0016] (1) 5'UTR核苷酸,所述5'UTR核苷酸序列如SEQ ID NO:20所示或与其具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性,和/或

[0017] (2) (1)的互补序列。

[0018] 在一个或多个实施方案中,所述多核苷酸是DNA。

[0019] 本发明还提供一种核酸构建物,包含本发明第一方面的多核苷酸和/或本发明第二方面的多核苷酸;和任选的待表达基因。

[0020] 在一个或多个实施方案中,所述核酸构建物是载体,例如克隆载体或表达载体。

[0021] 在一个或多个实施方案中,所述核酸构建物还包含选自以下的一个或多个元件:启动子、kozak序列、Poly(A)。

[0022] 在一个或多个实施方案中,所述启动子是T7启动子。

[0023] 在一个或多个实施方案中,所述待表达基因是eGFP基因。

[0024] 本发明还提供一种mRNA,在5'-3'方向上包含:5'帽结构、5'UTR、开放阅读框(ORF)、3'UTR和Poly(A),所述3'UTR的核苷酸序列如SEQ ID NO:23-40任一所示或与SEQ ID NO:23-40具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性,和/或

[0025] 所述5'UTR的核苷酸序列如SEQ ID NO:41所示或与SEQ ID NO:41具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性。

[0026] 在一个或多个实施方案中,所述mRNA还包括kozak序列。

[0027] 在一个或多个实施方案中,所述mRNA包含至少一种修饰的或非天然存在的核苷酸。

[0028] 在一个或多个实施方案中,所述修饰的或非天然存在的核苷酸为假尿苷三磷酸( $\Psi$ )或N1-甲基-假尿苷三磷酸( $m^1\Psi$ )。

[0029] 本发明还提供一种宿主细胞,包含本文任一实施方案所述的多核苷酸、核酸构建物、或mRNA。

[0030] 在一个或多个实施方案中,所述宿主细胞是CHO细胞、DC细胞或T细胞。

[0031] 本发明还提供一种药物组合物,包含本文任一实施方案所述的多核苷酸、核酸构建物、mRNA或宿主细胞,和药学上可接受的辅料。

[0032] 本发明还提供一种提高基因表达强度、延长基因表达时间、提高mRNA启动翻译能力或维持翻译活性时长的方法,包括使携带有本发明第一方面的多核苷酸和/或本发明第二方面的多核苷酸的基因表达的步骤。

[0033] 在一个或多个实施方案中,所述第一种多核苷酸位于所述基因的3'端,第二种多核苷酸位于所述基因的5'端。

[0034] 在一个或多个实施方案中,所述基因是eGFP基因。

[0035] 本发明还提供本文任一实施方案所述的多核苷酸、核酸构建物和/或宿主细胞在制备用于提高基因表达强度、延长基因表达时间、提高mRNA启动翻译能力或维持翻译活性时长的试剂中的应用。

[0036] 在一个或多个实施方案中,所述第一种多核苷酸位于所述基因的3'端,第二种多核苷酸位于所述基因的5'端。

[0037] 本发明还提供本文任一实施方案所述的多核苷酸、核酸构建物、mRNA或宿主细胞在制备用于治疗疾病的药物中的应用,所述基因的表达有助于所述治疗疾病。

[0038] 本发明还提供本文任一实施方案所述的多核苷酸在控制基因表达中的应用。

## 附图说明

[0039] 图1显示的是A17 eGFP mRNA转录模板质粒DNA图谱。

[0040] 图2显示的是不同UTR eGFP mRNA在蛋白表达细胞CHO-S中的不同表达水平。

[0041] 图3显示的是不同UTR eGFP mRNA在免疫细胞DC2.4中的不同表达水平。

## 具体实施方式

[0042] 应理解,在本发明范围内,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成优选的技术方案。

[0043] 本文和所附权利要求书所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数含义,除非上下文另有明确说明。同样,术语“一个”(或“一种”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。术语“包括”及其变化形式不具有限制意义,其中这些术语出现在本说明书和权利要求中。因此,术语“包括”、“包含”、和“含有”可互换使用。

[0044] 本发明基于人工从头设计mRNA UTR序列的方法,筛选到比本领域内公知的Hba-a1 mRNA 3'UTR更高效的核苷酸序列。

[0045] 本发明第一方面提供第一种多核苷酸,所述多核苷酸包含:

[0046] (1) 3'UTR核苷酸,所述3'UTR核苷酸序列如SEQ ID NO:1-18任一所示或与其具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性的序列所示,和/或

[0047] (2) (1)的互补序列。

[0048] 在一个或多个实施方案中,本发明包含人工从头设计的3'UTR多核苷酸,构建上述3'UTR序列的方法是通过人工设计直接合成获得。

[0049] 示例性的所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1-18中任一所示。

[0050] 优选地,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1-5、7-12、16-17任一序列所示;更优选地,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1、3、7-10、12任一序列所示;最优选地,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1或9所示。

[0051] 本发明还提供了一种人工从头设计5'UTR序列,与本发明提供的3'UTR配套使用,构建上述5'UTR序列的方法是通过人工设计直接合成获得。

[0052] 本发明的第二方面,还提供第二种多核苷酸,所述多核苷酸包含:

[0053] (1) 5'UTR核苷酸,所述5'UTR核苷酸序列如SEQ ID NO:20所示或与其具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性的序列所示,和/或

[0054] (2) (1)的互补序列。

[0055] 在一个或多个实施方案中,所述多核苷酸如SEQ ID NO:20所示或与其具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列相同性的序列所示。

[0056] 本文中,多核苷酸可以是DNA或RNA。DNA可以是单链的或是双链的。因此,本文的多核苷酸一般是分离的多核苷酸形式。提到核酸时,本文所用术语“变体”可以是天然发生的等位变体或非天然发生的变体。这些核苷酸变体包括简并变体、取代变体、缺失变体和插入变体。本发明核酸可包含与所述核酸序列的序列相同性为至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%的核苷酸序列。本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。本文所述的多核苷酸通常可以用PCR扩增法获得。或者,也可直接合成本文所述的核酸分子。

[0057] 在两种或多种多肽或核酸分子序列中,术语“相同性”或“相同性百分数”指在比较窗口或指定区域上,采用本领域已知方法如序列比较算法,通过手工比对和目测检查来比较和比对最大对应性时,两个或多个序列或子序列相同或其中在指定区域有一定百分数的氨基酸残基或核苷酸相同(例如,至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同)。例如,适合测定序列相同性百分数和序列相似性百分数的优选算法是BLAST和BLAST 2.0算法,分别可参见Altschul等(1977) *Nucleic Acids Res.* 25:3389和Altschul等(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403。

[0058] 本领域技术人员公知,在基因克隆操作中,常常需要设计合适的酶切位点,这势必在多核苷酸末端引入了一个或多个酶切位点,而这并不影响3'UTR或5'UTR多核苷酸或目的蛋白的活性。本发明范围涵盖本文所述序列及其两端添加有一个或多个酶切位点的序列。

[0059] 本发明的3'UTR多核苷酸和5'UTR多核苷酸可以改善关联基因的表达。所述表达的改善通过在细胞中导入载有本文所述多核苷酸的基因的核酸构建物实现。因此,本发明还提供所述多核苷酸的核酸构建物。该核酸构建物可以是表达框,含有本文所述3'UTR多核苷酸和/或5'UTR多核苷酸。核酸构建物还可以包括多克隆位点,以及与之操作性连接的一个或多个调控序列,例如复制起点、多克隆位点、启动子(例如T1启动子)、kozak序列、标记基因或翻译控制元件,包括增强子、操纵子、终止序列例如Poly(A)、核糖体结合位点。在一个或多个实施方案中,所述核酸构建物还包含选自以下的一个或多个元件:启动子、kozak序列、Poly(A)。优选地,所述Poly(A)的核苷酸序列如SEQ IDNO:21所示。

[0060] 待表达基因的编码序列可插入核酸构建物中所述3'UTR多核苷酸的5'端。本发明所述的多核苷酸可以多种方式被操作以保证所述基因的表达。在将核酸构建物插入载体之前可根据载体的不同或要求而对核酸构建物进行操作。利用重组DNA方法来改变多核苷酸序列的技术是本领域已知的。

[0061] 在重组表达载体中,“操作性连接”是指目的的核苷酸序列与调节序列以允许核苷酸序列表达的方式连接。本领域的技术人员熟知能用于构建含本文所述3'UTR多核苷酸和任选的目的基因的编码序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体的方法。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。

[0062] 调控序列可以是合适的启动子序列。启动子序列通常与待表达蛋白的编码序列操作性连接。启动子可以在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列,包括突变的、截短的和杂合启动子,并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽

的基因获得。合适的启动子的例子为T7启动子序列。该启动子序列是能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于T3启动子,SP6启动子。

[0063] 调控序列也可以是合适的转录终止序列,由宿主细胞识别以终止转录的序列。终止序列与本文所述的3'UTR多核苷酸的3'末端操作性连接。在选择宿主细胞中有功能的任何终止序列都可用于本发明。

[0064] 调控序列也可以是合适的前导序列,对宿主细胞翻译重要的mRNA的5'非翻译区。前导序列与待表达基因的5'末端可操作连接。在选择宿主细胞中有功能的任何5'非翻译区都可用于本发明。

[0065] 在某些实施方案中,所述核酸构建物是载体。载体可以是克隆载体,也可以是表达载体,或者是同源重组载体。本发明的多核苷酸可被克隆入许多类型的载体,例如,质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。克隆载体可用于提供外源基因和本文所述多核苷酸的编码序列。表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。通常通过可操作地连接本发明的多核苷酸至启动子,并将构建体并入表达载体,实现基因表达。该载体对于复制和整合真核细胞可为合适的。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。病毒载体技术在本领域中是公知的并在例如Sambrook等(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。同源重组载体用于将本文所述的表达框整合到宿主基因组中。

[0066] 通常,合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记。例如,在某些实施方案中,本发明使用pA17-eGFP载体,该载体含有复制起始位点,启动子,本文所述的多核苷酸,以及任意的可选择的标记。其中的eGFP可根据需要替换为其它目的基因。

[0067] 本发明还提供一种mRNA,由本文所述的DNA多核苷酸转录得到,在5'-3'方向上包含:5'帽结构、5'UTR、开放阅读框(ORF)、3'UTR和Poly(A)。

[0068] 在一个或多个实施方案中,mRNA中所述3'UTR由本发明第一方面的多核苷酸转录得到。

[0069] 在一个或多个实施方案中,mRNA中3'UTR的核苷酸序列如SEQ ID NO:23-40任一所示,分别与本发明第一方面的3'UTR的核苷酸序列NO:1-18对应。根据mRNA中3'UTR的核苷酸序列,也可以直接合成。

[0070] 在一个或多个实施方案中,mRNA中所述5'UTR由本发明第二方面的多核苷酸转录得到。

[0071] 在一个或多个实施方案中,mRNA中5'UTR的核苷酸序列如SEQ ID NO:41所示,与本发明第二方面的5'UTR的核苷酸序列SEQ ID NO:20对应。根据mRNA中3'UTR的核苷酸序列,也可以直接合成。

[0072] 在一个或多个实施方案中,Poly(A)的核苷酸序列如SEQ ID NO:21所示。

[0073] 在一个或多个实施方案中,所述mRNA还包括kozak序列。本发明的5'UTR(SEQ ID NO:20)的末端包括了GCCACC,在5'UTR之后增加ATG序列,即可形成kozak序列,从而在转录

得到的mRNA中形成kozak序列,增强翻译效率。

[0074] 在一个或多个实施方案中,所述mRNA包含至少一种修饰的或非天然存在的核苷酸。

[0075] 在一个或多个实施方案中,所述修饰的或非天然存在的核苷酸为假尿苷三磷酸( $\Psi$ )或N1-甲基-假尿苷三磷酸( $m^1\Psi$ )。

[0076] 为了评估治疗用蛋白、多肽或其部分的表达,被引入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因或报道基因中的任一个或两者,以便于从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面,可选择的标记可被携带在单独一段DNA上并用于共转染程序。可选择的标记和报道基因两者的侧翼都可具有适当的调节序列,以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记包括Flag、HA或V5。报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评价调节序列的功能性。在DNA已经被引入受体细胞后,报道基因的表达在合适的时间下进行测定。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因。合适的表达系统是公知的并可利用已知技术制备或从商业上获得。

[0077] 将基因引入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。载体可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞,例如,哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。

[0078] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔、电转等,例如直接将体外转录好的mRNA通过电转引入细胞。将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠;和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。

[0079] 将多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用病毒载体,特别是逆转录病毒载体,例如源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺伴随病毒的载体。可利用本领域中已知的技术将选择的基因插入载体并包装入逆转录病毒颗粒。该重组病毒可随后被分离和传递至体内或离体的对象细胞。许多反转录病毒系统在本领域中是已知的。慢病毒是逆转录病毒科下的属。用于慢病毒包装的试剂为本领域所周知,如常规的慢病毒载体系统包括pRsv-REV、pMD1g-pRRE、pMD2G和目的干扰质粒。

[0080] 本文中,宿主细胞含有本文所述的多核苷酸、核酸构建物或mRNA。宿主细胞既包括表达目标基因的细胞,例如CHO、DC细胞或T细胞,也包括生产该表达用细胞过程中使用到的各种细胞,如大肠杆菌细胞,以用于如提供本发明多核苷酸或提供本文所述的载体。适用于本发明的细胞可以是各种来源的各种类型的细胞,包括原核细胞和真核细胞,例如细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞,包括但不限于,sf9、BHK21、COS1、COS3、COS7、293T、Vero。所述宿主细胞优选各种利于基因产物表达或发酵生产的细胞,此类细胞已为本领域熟知并常用。

[0081] 本文还包括细胞制品,包含本文所述的细胞或其提取物。例如,所述细胞制品可以是包含本文所述细胞或其提取物以及合适的培养基的细胞培养物、药物组合物、试剂盒、装置、介质或系统,例如芯片等。培养各类细胞的合适培养基本领域周知。

[0082] 本文所述核酸构建物或细胞的功能取决于其中所携带的待表达基因,例如若待表达基因是荧光蛋白,则本文所述核酸构建物或细胞可用于细胞示踪。若待表达基因是

于疾病治疗的试剂,则本文所述核酸构建物或细胞可用于治疗疾病。

[0083] 本发明提供药物组合物,其包含本发明所述多核苷酸、核酸构建物、mRNA或细胞,以及药学上可接受的稀释剂、载剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂 and/或佐剂,所述核酸构建物或细胞可产生治疗有效量的活性分子(例如核酸构建物中目标基因的表达产物)。在某些实施方案中,药物组合物中可接受的稀释剂、载剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂等优选地在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。在某些实施方案中,药物组合物可含有用于改善、维持或保留例如组合物的pH、渗透性、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸收或渗透的这类物质。这些物质为现有技术已知,例如可参见REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版,A.R.Genrmo编,1990,Mack Publishing Company。可视预期的施用途径、递送方式和所需的剂量来确定最佳的药物组合物。

[0084] 药物组合物的施用途径是根据已知方法,例如经口、通过静脉内、腹膜内、脑内(脑实质内)、脑室内、肌肉内、眼内、动脉内、门静脉或病灶内途径注射;通过持续释放系统或通过植入装置。可选择本发明的药物组合物用于肠胃外递送。或者,可选择组合物用于吸入或通过消化道(诸如经口)递送。所述药学上可接受的组合物的制备在本领域的技术内。用于配制多种其它持续或可控传递方式的技术(诸如脂质体载剂、生物易蚀微粒或多孔珠粒和积存注射)也为本领域技术人员所知。

[0085] 用于体内施用的药物组合物通常以无菌制剂的形式提供。通过经无菌过滤膜过滤来实现灭菌。在组合物冻干时,可在冻干和复水之前或之后使用此方法进行灭菌。用于肠胃外施用的组合物可以冻干形式或在溶液中储存。肠胃外组合物通常放在具有无菌进入孔的容器中,例如具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液带或小瓶。

[0086] 药物组合物一经配制,就以溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体、晶体或以脱水或冻干粉的形式储存在无菌小瓶中。所述配制物可储存成即用形式或在施用前复水的形式(例如,冻干)。本发明还提供用于产生单剂量施用单位的试剂盒。本发明的试剂盒可各自含有具有干燥蛋白的第一容器和具有含水配制物的第二容器。在本发明的某些实施方案中,提供含有单腔和多腔预填充注射器(例如,液体注射器和冻干注射器)的试剂盒。

[0087] 本发明也提供通过施用本发明任一实施方案所述的多核苷酸、核酸构建物、mRNA、细胞或其药物组合物来治疗患者的方法。本文中,术语“患者”、“受试者”、“个体”、“对象”在本文中可互换使用,包括任何生物体,优选动物,更优选哺乳动物(例如大鼠、小鼠、狗、猫、兔等),且最优选的是人。“治疗”指向受试者采用本文所述治疗方案以达到至少一种阳性治疗效果。有效治疗患者的治疗方案可根据多种因素(比如患者的疾病状态、年龄、体重及疗法激发受试者的抗癌反应的能力)而变。

[0088] 将采用的含有本发明的多核苷酸、核酸构建物、mRNA或细胞的药物组合物的治疗有效量将取决于例如治疗程度和目标。本领域技术人员将了解,用于治疗的适当剂量水平将部分取决于所递送的分子(例如核酸构建物中目标基因表达的产物)、适应症、施用途径和患者的大小(体重、体表或器官大小)和/或状况(年龄和一般健康状况)而变化。在某些实施方案中,临床医生可滴定剂量并改变施用途径来获得最佳的治疗效果。

[0089] 给药频率将取决于所用配制物中特定目标产物(例如核酸构建物中目标基因表达的产物)的药物动力学参数。临床医生典型地施用组合物直到达到实现所需效果的剂量。组合物因此可作为单次剂量施用,或随时间以作为两次或多次剂量(可含有或不含有相同量

的所需分子)施用,或通过植入装置或导管以连续输液的方式施用。

[0090] 如下实施例所证实,本文所述3'UTR和5'UTR多核苷酸可以提高基因表达强度、延长基因表达时间、提高mRNA启动翻译能力或维持翻译活性时长。因此,本发明还提供提高基因表达强度、延长基因表达时间、提高mRNA启动翻译能力或维持翻译活性时长的方法,包括使携带有本文任一实施方案所述的3'UTR多核苷酸的基因表达的步骤。通常,所述3'UTR多核苷酸位于所述基因的3'端,所述5'UTR多核苷酸位于所述基因的5'端。示例性地,表达通过上述将核酸构建物引入细胞并在所述基因表达的条件下孵育细胞的过程实现。实施例中使用EGFP仅作为待表达基因的示例。

[0091] 本发明还提供本文任一实施方案所述的多核苷酸、核酸构建物、mRNA或细胞在制备用于治疗疾病的药物中的应用,所述3'UTR多核苷酸位于基因的3'端,,所述5'UTR多核苷酸位于所述基因的5'端,所述基因的表达有助于所述治疗疾病。可通过如上所述的方法,将包含所述基因和多核苷酸的核酸构建物导入细胞,通过在所述基因表达的条件下孵育细胞来使基因表达。所述基因的表达有助于所述治疗疾病可以是基因或其产物直接产生治疗效果,或者也可以是基因或其产物的表达引起其他能产生治疗效果的基因或蛋白的表达或活化。

[0092] 实施例

[0093] 实施例1,3'UTR的序列设计方案及筛选

[0094] 设计pA17-eGFP质粒,包含人工设计合成A17-5'UTR序列(SEQ ID NO:20),源自序列号为NM\_008218的Mus musculus hemoglobin alpha mRNA(mmu Hba-a1)3'UTR的A17-3'UTR核苷酸序列(SEQ ID NO:19),含有A60GGA60基序的人工设计合成的poly A序列(SEQ ID NO:21)。将上述RNA转录模板质粒DNA线性化后转录合成和加帽后的RNA命名为A17 eGFP mRNA或A17mRNA。其中A17 eGFP mRNA的转录模板质粒载体pA17-eGFP如图1所示,DNA序列如SEQ ID NO:22所示。

[0095] 将A17 eGFP mRNA转录模板质粒DNA中mmu Hba-a1 3'UTR替换为人工设计合成的不同3'UTR序列(SEQ ID NO:1-18),转录合成和加帽后的RNA以替换的3'UTR的名称命名mRNA,例如用73H1U替换的mRNA命名为73H1U mRNA,编号及对应序列如表1所示,其它所有核苷酸序列保持不变。参考专利“RNA修饰嵌合蛋白及其应用”(CN115197327A)所述方法将上述质粒制备成对应的mRNA,在CHO-S及DC2.4细胞中进行表达水平验证实验。

[0096] 表1 3'实施例1涉及的序列及名称

类型	名称	序列	SEQ ID NO
3' UTR	73H1U	TCTGACACAGACACGTTACTAACACAGTTAGTAACCACTCT ATCACCGATAGACACATGATATCCCATATCAT	1
3' UTR	73H2U	ACCTTCACTCTGACAAGAGTGACACCCTCAAGTCCACTTAC ATATACAATATATATGTAACCACCACTTGAGA	2
3' UTR	73H3U	CCACGCTAATCCATCTATACCAATAGAATGGATTGAGCCAC CTTAGTCTATCTACCAACGTAGATAACTAACA	3
3' UTR	73L1U	AGGCAACGACTAAAATATACACTCACGACCATTCAAATCTT CCCAACCCGACCCTTAAGACTGTTAGTATTAT	4
3' UTR	73L2U	ATGAACAGCGAACTTACTAAGTCCTCCCATATTTCTAAAAC CTCTACTAATATCCACCGAGCCATAAGCAGAT	5
3' UTR	73L3U	CTTCTACCTACACAGCCTTAAGCCTCATCAAGACAGTTCAA TCCATACATTAGTACCCAGTAATTAACAGG	6
3' UTR	36H1U	ATTCACAGAGCAGACACTGCTCTTGAATGTAATACA	7
3' UTR	36H2U	TGAGAAATCGGCTATACAATAGCCGATCTATCTCAA	8
[0097] 3' UTR	36H3U	CACTCGGTACAATAGTTAACAACCTATACGTATCGAG	9
3' UTR	36L1U	CATCTCGATCGAATGTATAAACAGTTGTCACAGAA	10
3' UTR	36L2U	TAGGAACTTCACGTATGCACTATAAACACTAGCGAT	11
3' UTR	36L3U	AGTACAGAGCTTCCCACCGTAAACAGATATATATTG	12
3' UTR	36U6	GGTGCAGGTGCACGGAAAAACCGTGCACCTGCACC	13
3' UTR	36U8	GGCGGCGTGGCGGCGAACAACGCCGCCACGCCGCC	14
3' UTR	72U6	GCAGGTGCAGCAGCAAAAAAGCGTGCTGCACCTGCAAGGT GCAGGTGCACGGAAAAACCGTGCACCTGCACC	15
3' UTR	72U8	GCCGCGGTGCCGCGGAACAACCGCGGCACCGCGCAAGGC GGCGTGGCGGCGAACAACGCCGCCACGCCGCC	16
3' UTR	G4U1	TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAATCGGGTTGCGGGCGCAGG GCACGGGCGGGTGGTGGTGGTGTGGTGGTGGTGG	17
3' UTR	G4U2	TGGGGAGGGTTTTTAGGGTGGGGAAGGGCGCGGGAGGAAT TGGGCGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	18
3' UTR	A17-3'	GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTC	19
	UTR	TCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTG AGTAGGAAG	
[0098] 5' UTR	A17-5' UTR	GGGAATAAGAATCAAATAGAAGTAAGTACACAAGAAACCT CAAGAAGCCACC	20
PolyA	A17-62 GG	AA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAA AA AAAAA	21

[0099] 实施例2, CHO-S细胞中筛选优势3' UTR序列

[0100] 细胞培养、mRNA电转及筛选方法:

[0101] 细胞培养程序: 将配置好的45% DMEM+45% 1640+10% FBS完全培养基放入37℃水浴锅中预热; 取出已经预热好的培养基, 用酒精棉球擦拭好后放入超净工作台内; 从培养箱内取出贴壁细胞, 放置于倒置显微镜下观察细胞密度。当细胞密度达到80%~90%左右时, 吸去培养基; 加入适量用无菌的PBS、注射用生理盐水或无血清培养液洗涤细胞, 以出去残留血清;

[0102] 加入适量的胰蛋白酶消化液, 略盖过细胞即可。根据细胞的特性可以增加或减少胰酶用量, 放置于CO<sub>2</sub>培养箱中进行细胞消化; 显微镜下观察, 细胞明显收缩, 并且肉眼观察培养器皿底部细胞的形态发生明显的变化呈白茫茫; 或者轻轻拍打培养瓶, 发现细胞刚好

有滑落迹象;此时加入含血清的完全细胞培养液,终止胰酶的消化作用,轻轻吹下细胞,1200rpm离心5min,弃上清;加入适量DPBS重悬细胞沉淀,取10 $\mu$ L细胞悬液于1.5mL EP中,向其中加入10 $\mu$ L台盼蓝染色液吹打混匀,吸取10 $\mu$ L混合液加至一次性计数板中,置入计数仪计数;取1.5mL离心管,每管加入 $2.5 \times 10^6$ 个细胞,1200rpm离心5min,弃上清。

[0103] 电转mRNA程序:从-20 $^{\circ}$ C取出mRNA样本放置于冰上溶解;取电转试剂盒(来自Lonza公司),按2B电转试剂盒说明书,另取一支新的1.5mL EP管,加入电转试剂共100 $\mu$ L,用100 $\mu$ L微量移液器轻柔吹打2~3次充分混匀。

[0104] 随后向电转体系中加入mRNA样本轻轻混匀,备用。将电转混合液转移至细胞沉淀中,轻轻吹打混匀,将待转细胞悬液转移至100 $\mu$ L电转杯,左手拿100 $\mu$ L电转杯,右手使用100 $\mu$ L微量移液器取100 $\mu$ L电转细胞悬液沿着两电极中间轻柔加入至电转杯,细胞悬液自动流至电转杯底部,不要震动电转杯。转移完成后快速电转,电转程序H-014。电转完毕立即用配套移液管将细胞悬液转移至预热的6孔板中。将6孔板放置在培养箱中,在培养箱原位上下、左右晃动3次使其均匀铺在培养板底进行培养。电转24h后收集细胞流式检测EGFP阳性水平。

[0105] 检测结果如图2所示,在CHO细胞中的3批次重复实验表明,人工合成设计的3'UTR的mRNA与A17 mRNA相比,36L1U、36L2U、36L3U、36H1U、36H2U、36H3U、73L1U、73L2U、73H1U、73H2U、73H3U、36U6均优于A17,G4U1与A17基本相当。36L1U、36L3U、36H1U、36H2U、36H3U、73H1U、73H3U均显著优于A17 ( $p < 0.05$ );其中36H3U及73H1U与A17相比,呈现极其显著的差异 ( $p < 0.0001$ )。

[0106] 实施例3,DC 2.4细胞电转验证

[0107] 细胞培养、mRNA电转及筛选方法:

[0108] 细胞培养程序:将配置好的90%DMEM+10%FBS完全培养基放入37 $^{\circ}$ C水浴锅中预热;取出已经预热好的培养基,用酒精棉球擦拭好后放入超净工作台内;从培养箱内取出贴壁细胞,放置于倒置显微镜下观察细胞密度。当细胞密度达到80%~90%左右时,吸去培养基;加入适量用无菌的PBS、注射用生理盐水或无血清培养液洗涤细胞,以出去残留血清;

[0109] 加入适量的胰蛋白酶消化液,略盖过细胞即可。根据细胞的特性可以增加或减少胰酶用量,放置于CO<sub>2</sub>培养箱中进行细胞消化;显微镜下观察,细胞明显收缩,并且肉眼观察培养器皿底部细胞的形态发生明显的变化呈白茫状;或者轻轻拍打培养瓶,发现细胞刚好有滑落迹象;此时加入含血清的完全细胞培养液,终止胰酶的消化作用,轻轻吹下细胞,1200rpm离心5min,弃上清;加入适量DPBS重悬细胞沉淀,取10 $\mu$ L细胞悬液于1.5mL EP中,向其中加入10 $\mu$ L台盼蓝染色液吹打混匀,吸取10 $\mu$ L混合液加至一次性计数板中,置入计数仪计数;取1.5mL离心管,每管加入 $2.5 \times 10^6$ 个细胞,1200rpm离心5min,弃上清。

[0110] 电转mRNA程序:从-20 $^{\circ}$ C取出mRNA样本放置于冰上溶解;取电转试剂盒(来自Lonza公司),按2B电转试剂盒说明书,另取一支新的1.5mL EP管,加入电转试剂共100 $\mu$ L,用100 $\mu$ L微量移液器轻柔吹打2~3次充分混匀。

[0111] 随后向电转体系中加入mRNA样本轻轻混匀,备用。将电转混合液转移至细胞沉淀中,轻轻吹打混匀,将待转细胞悬液转移至100 $\mu$ L电转杯,左手拿100 $\mu$ L电转杯,右手使用100 $\mu$ L微量移液器取100 $\mu$ L电转细胞悬液沿着两电极中间轻柔加入至电转杯,细胞悬液自动流至电转杯底部,不要震动电转杯。转移完成后快速电转,电转程序AN-001。电转完毕立即用

配套移液管将细胞悬液转移至预热的6孔板中。将6孔板放置在培养箱中,在培养箱原位上下、左右晃动3次使其均匀铺在培养板底进行培养。电转24h后收集细胞流式检测EGFP阳性水平。

[0112] 检测结果如图3所示,在DC 2.4细胞中的3批次重复实验表明,人工合成设计的3' UTR的mRNA与A17 mRNA相比,36L1U、36L2U、36L3U、36H1U、36H2U、36H3U、73L1U、73L2U、73H1U、73H2U、73H3U、36U6均优于A17,72U8、G4U1与A17基本相当。36L3U、36H1U、36H2U、36H3U、73H1U和73H3U均显著优于A17 ( $p < 0.05$ );其中73H1U与A17相比,呈现极其显著的差异 ( $p < 0.0001$ )。

[0113] 本文序列

[0114]

			SEQ I D NO:
3'UTR	73H1U	TCTGACACAGACACGTTACTAACACAGTTAGTAACCACTCTATCACCGATAGACACA TGATATCCCATATCAT	1
3'UTR	73H2U	ACCTTCACTCTGACAAGAGTGACACCCTCAAGTCCACTTACATATACAATATATATGT AACCACCACTTGAGA	2
3'UTR	73H3U	CCACGCTAATCCATCTATACCAATAGAATGGATTGAGCCACCTTAGTCTATCTACCAA CGTAGATAACTAACA	3
3'UTR	73L1U	AGGCAACGACTAAAATATACACTCACGACCATTCAAATCTTCCCAACCCGACCCCTTA AGACTGTTAGTATTAT	4
3'UTR	73L2U	ATGAACAGCGAACTTACTAAGTCTCCCATATTTCTAAAACCTCTACTAATATCCACC GAGCCATAAGCAGAT	5
3'UTR	73L3U	CTTCTACCTACACAGCCTTAAGCCTCATCAAGACAGTTCAATCCATACATTAGTACCC AGTAATTAACAGG	6
3'UTR	36H1U	ATTCACAGAGCAGACACTGCTCTGAATGTAATACA	7
3'UTR	36H2U	TGAGAAATCGGCTATACAATAGCCGATCTATCTCAA	8
3'UTR	36H3U	CACTCGGTACAATAGTTAACAACATATACGTATCGAG	9
3'UTR	36L1U	CATCTCGATCGAATGTATAAACAGTTGTCACAGAA	10
3'UTR	36L2U	TAGGAACTTCACGTATGCACTATAAACACTAGCGAT	11
3'UTR	36L3U	AGTACAGAGCTTCCACCGTAAACAGATATATATTG	12
3'UTR	36U6	GGTGCAGGTGCACGGAAAAACCGTGACCTGCACC	13

3'UTR	36U8	GGCGGCGTGGCGGCGAACAAACGCCGCCACGCCGCC	14
3'UTR	72U6	GCAGGTGCAGCACGCAAAAAGCGTGCTGCACCTGCAAGGTGCAGGTGCACGGAAA AACCGTGCACCTGCACC	15
3'UTR	72U8	GCCGCGGTGCCGCGGAACAACCGCGGCACCGCGCAAGGCGGCGTGGCGGCGAA CAACGCCGCCACGCCGCC	16
3'UTR	G4U1	TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAATCGGGTTGCGGGCGCAGGGCACGGGCGGGTG GTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG	17
3'UTR	G4U2	TGGGGAGGGTTTTAGGGTGGGGAAGGGCGGGGAGGAATTGGGCGGGTTAGGG TTAGGGTTAGGGTTAGGG	18
3'UTR	A17-3'UTR	GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGCCATGCCCTTCTTCTCCTTGACCTGT ACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAG	19
5'UTR	A17-5'UTR	GGGAATAAGAATCAAATAGAAGTAAGTACACAAGAAACCTCAAGAAGCCACC	20
PolyA	A17-62GG	AA AAAAAGGAAA AAAAAAAAAAAAA	21
	pA17-eGFP 质粒	taatacgaactcactataggggaataagaatcaaatagaagtaagtacacaagaacctcaagaagccacatg gtgagcaagggcgaggagctgttaccgggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgagctaaacggc cacaagttcagcgtgtccggcgaggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgca ccaccggcaagctgccgtgccctggcccacctcgtgaccacctgacctacggcgtgacgtctcagccgc taccggaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcgccatgccgaaggctacgtccaggagcgacca tcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcccggaggtagaagttcgaggcgacacctggtgaacc gcatcgagctgaagggcatcgactcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactaca acagccacaacgtctatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgcaca acatcgaggacggcagcgtcagctcggaccactaccagcagaacccccatcggcagcggcccgctgc tgcgcccacaaccaactcctgagcaccagtcgccctgagcaaaagcccaagcagaagcgcgcatcaca tggctcgtgtaggttctgtagccgcccggatcactctggcatggacgagctgtacaagtaaggatcctgc actagctgtcagcgtcctctcggggcttgcctctggccatgcccttctctccttgcacctgtacct ctggtcttgaataaagcctgagtaggaagcttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaggaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaggagaccgtagcacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacc gtaaaaggccgctgtgctggcgttttccataggtcggccccctgacgagcatcacaanaatcgagctca agttagagggtggcgaacccgacaggactataagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtcgt ctcctgtccgacctgcccgttacggatacctgtcccttctccttcgggaagcgtggcgctttctcatag ctcagctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgtcctcaagctgggctgtgtagcagaacccccgttca gcccagcgtgccccttaccggaactatcgtcttgatccaaccggtaagacagacttatcgccactgg cagcagcactggtaacaggattagcagagcaggtatgtagcggtgctacagagttctgaaagtggcgc taactacggctacactagaagaacagtttgggtatctgcgctctgtaagcagttacctcggaaaagag ttgtagctctgatccgcaaaacacccgctggtagcgggttttttttgaagcagcagattacgc gcagaaaaaaggatcgaagaagatccttgatctttctacgggctgagcgtcagtggaacgaaactc acgttaaggatgttgctagatcgaatacaaaaaggatctcacctagatcctttaaataaaaatgaagttt taaatcaatctaaagtataatgagtaaaactggctgacagttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaact gcaatttcatatcaggatatacaatacattttgaaaaagccgtttctgtaataagaggagaaactcac cgaggcagttccataggatggcaagatcctggtatcggtctgcgattccgactcgtccaatcaatacaact attaattcccctcgtcaaaaataaggtatcaagtgagaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgaga atggcaaaagttagcatttctccagactttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaatcactcg catcaaccaaaccgttattcatctgtagtgcctgagcagagcaaacgcgatcgctgtaaaaggaca attacaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaacactccagcgcatacaaatatttccactgaaatca ggatattcttcaataactggaatgctgtttccagggatcgagtggtgagtaacctgcatcaggagta cggataaaatgcttaggtcggaaaggcataaaatccgtcagccagtttagctgacctctcatctgtaac atcattggcaacgctaccttggcatgttcagaacaactctggcgcacgggctccatacaatcgatagat tgtcgcacctgattgcccagattatcgcgagccattataccatataaatcagatcattgtggaatttaac cgggcctagagcaagcgttcccggtgaatggctcactcttcttcaatatttagaagcattatca gggtattgtctatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataacaaataggggttccgcgcat ttccccgaaaagtgcacctgacgtc	22
3'UTR	73H1U mRNA	UCUGACACAGACAGUUACUAACACAGUUAGUAACCACUCUAUCACCGAUAGAC ACAUGAUAUCCAUUAUCAU	23
3'UTR	73H2U mRNA	ACCUACUCUCUGACAAGAGUGACACCCUCAAGUCCACUUAUAUAUAUAUAU AUGUAACCACCACUUGAGA	24
3'UTR	73H3U mRNA	CCACGCUAAUCCAUCUAUACCAUAGAUAUGGAUUCAGCCACCUUAGUCUAUCUA CCAACGUAGUAACUAACA	25

[0115]

[0116]

3'UTR	73L1U mRNA	AGGCAACGACUAAAAUUAACACUCACGACCAUUCAAAUCUCCCAACCCGACCCU UAAGACUGUUAGUAUUAU	26
3'UTR	73L2U mRNA	AUGAACAGCGAACUUACUAAGUCCUCCCAUUAUUUCUAAAACCUACUAAUAUC CACCGAGCCAUAAGCAGAU	27
3'UTR	73L3U mRNA	CUUCUACCUACACAGCCUUAAGCCUCAUCAAGACAGUUCAAUCCAUAUAUAGU ACCCAGUAAUUAAAACAGG	28
3'UTR	36H1U mRNA	AUUCACAGAGCAGACACUGCUCUUGAAUGUAAUACA	29
3'UTR	36H2U mRNA	UGAGAAAUCGGCUAUACAUAJGCGGAUCUAUCUCAA	30
3'UTR	36H3U mRNA	CACUCGGUACAAUAGUUAACAACUAUACGUUUCGAG	31
3'UTR	36L1U mRNA	CAUCUCGAUCGAAUGUAUAAACAGUUGUCACAGAA	32
3'UTR	36L2U mRNA	UAGGAACUUCACGUUAGCACAUAUAAACACUAGCGAU	33
3'UTR	36L3U mRNA	AGUACAGAGCUUCCACCGUAAACAGAUUAUUAUUG	34
3'UTR	36U6 mRNA	GGUGCAGGUGCACGGAAAAACCGUGCACCUGCACC	35
3'UTR	36U8 mRNA	GGCGGCGUGGCGGCGAACAACGCGCCACGCCGCC	36
3'UTR	72U6 mRNA	GCAGGUGCAGCACGCAAAAAGCGUGCUGCACCUGCAAGGUGCAGGUGCACGGA AAAACCGUGCACCUGCACC	37
3'UTR	72U8 mRNA	GCCGCGGUGCCGCGGAACAACCGCGGCACCGCGGCAAGGCGGCGUGGCGGCGAA CAACGCCGCCACGCCGCC	38
3'UTR	G4U1 mRNA	UGAGGGUGGGGAGGGUGGGAAUCGGGUUGCGGGCGCAGGGCAGGGCGGG UGGUGGUGGUUGUGGUGGUGGUGG	39
3'UTR	G4U2 mRNA	UGGGGAGGGUUUUUAGGGUGGGGAAGGGCGCGGGAGGAAUUGGGCGGGUUA GGGUUAGGGUUAGGGUUAGGG	40
5'UTR	A17-5'UTR m RNA	GGGAAUAAGAAUCAAAUAGAAGUAAGUACACAAGAAACCUCAAGAAGCCACC	41

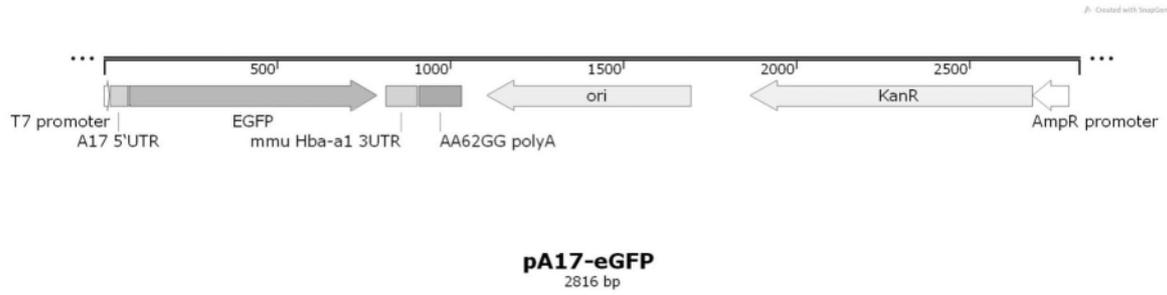


图1

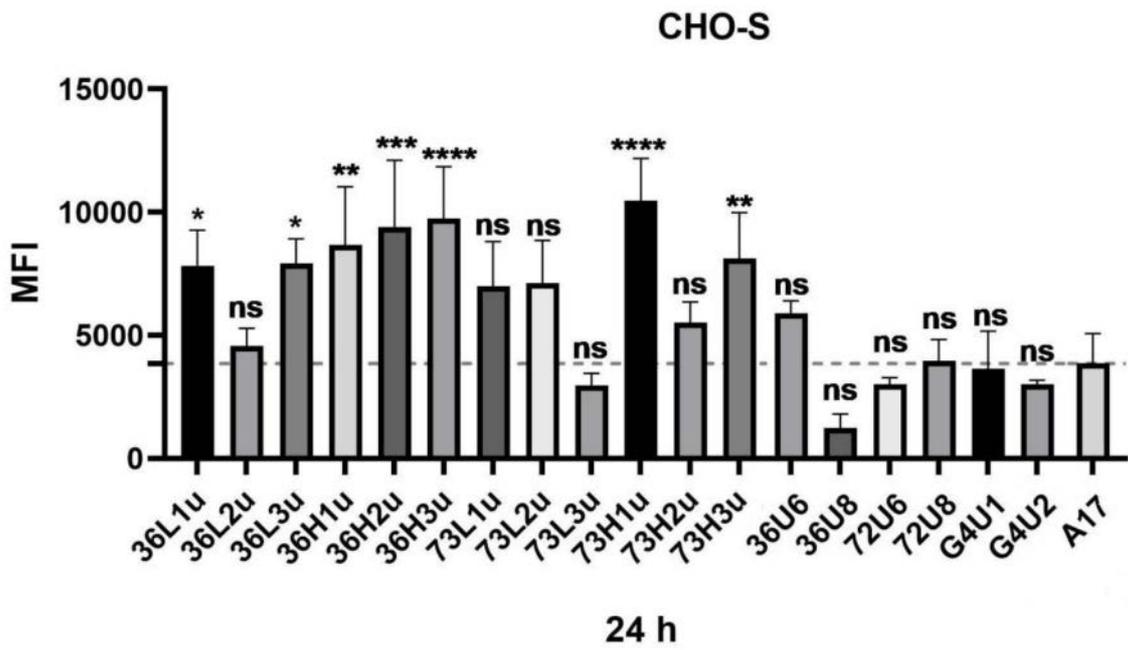


图2

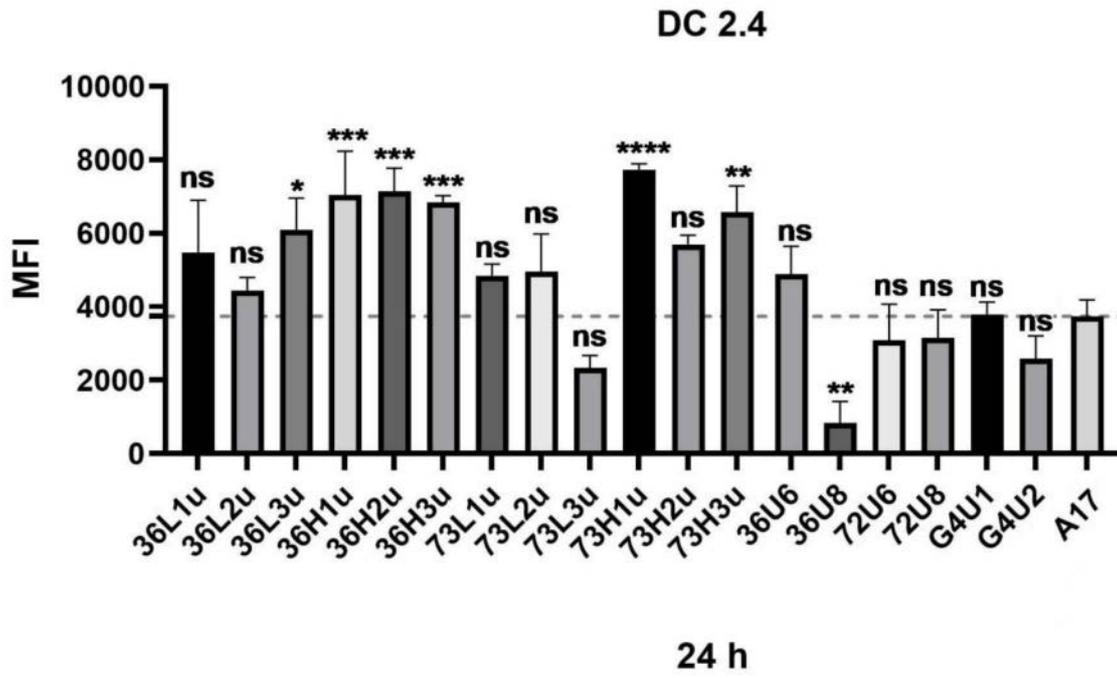


图3