



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108778344 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201780014078.0

(22)申请日 2017.03.01

(30)优先权数据

62/302,548 2016.03.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/020241 2017.03.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/151795 EN 2017.09.08

(71)申请人 里兰斯坦福初级大学理事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·S·格伦 R·哈吉 E·范姆

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

A61K 31/7056(2006.01)

A61K 31/545(2006.01)

A61K 31/5377(2006.01)

A61K 31/43(2006.01)

A61K 31/165(2006.01)

权利要求书3页 说明书36页 附图29页

(54)发明名称

抗流感病毒的泛基因型药剂和其使用方法

(57)摘要

本发明提供了抑制样本中的甲型流感病毒的方法。所述方法的一个方面包含使包括具有PSL2基序的病毒RNA(vRNA)的样本与有效量的药剂接触,所述有效量的药剂特异性结合所述PSL2基序以抑制所述甲型流感病毒。还提供了治疗或预防受试者内的甲型流感病毒感染的方法。还提供了用于筛选候选药剂的抑制细胞中的甲型流感病毒的能力的方法,所述方法包括:使样本与候选药剂接触;以及确定所述候选药剂是否特异性结合到vRNA的所述PSL2基序。还提供了化合物和药物组合物,所述化合物和药物组合物包括与PB2vRNA区域互补的寡核苷酸序列,可用于主题方法。

1. 一种寡核苷酸化合物,其包括与PB2 vRNA区域互补的寡核苷酸序列,其中所述区域包括所述PB2 vRNA的5'末端编码区域的(-)-有义符号中的核苷酸34-87,或其盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其包括寡核苷酸序列,所述寡核苷酸序列包括与所述PB2 vRNA区域的包装茎-环2(PSL2)基序的区域互补的至少8个核苷亚单位。

3. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述寡核苷酸包括选自以下的核苷间键:硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、氨基磷酸酯键和硫代氨基磷酸酯键。

4. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述寡核苷酸包括锁核酸(LNA)核苷酸。

5. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述寡核苷酸包括选自以下的序列:

5'ACCAAAAGAAT 3'(SEQ ID NO:45);

5'TGGCCATCAAT 3'(SEQ ID NO:46);

5'TAGCATACTTA 3'(SEQ ID NO:47);

5'CCAAAAGA 3'(SEQ ID NO:48);

5'CATACTTA 3'(SEQ ID NO:49);

5'CAGACACGACCAAAA 3'(SEQ ID NO:50);

5'TACTTACTGACAGCC 3'(SEQ ID NO:51);

5'AGACACGACCAAAAAG 3'(SEQ ID NO:52);

5'ACCAAAAGAAT 3'(SEQ ID NO:53);

5'TGGCCATCAAT 3'(SEQ ID NO:54);

5'TAGCATACTTA 3'(SEQ ID NO:55);

5'CGACCAAAAGAATTC 3'(SEQ ID NO:56);

5'CGACCAAAAGAATTC 3'(SEQ ID NO:57);

5'GATGGCCATCAATTA 3'(SEQ ID NO:58);

5'GATGGCCATCAATTA 3'(SEQ ID NO:59);

5'TCTAGCATACTTACT 3'(SEQ ID NO:60);

5'TCTAGCATACTTACT 3'(SEQ ID NO:61);

5'GAATTCGGATGGCCA 3'(SEQ ID NO:62);

5'GGCCATCAATTAGTG 3'(SEQ ID NO:63);

5'TTCGGATGGCCATCA 3'(SEQ ID NO:64);

5'AGCCAGACAGCGA 3'(SEQ ID NO:65);以及

5'GACAGCCAGACAGCA 3'(SEQ ID NO:66)。

6. 根据权利要求5所述的化合物,其中所述寡核苷酸包括至少5个脱氧核糖核苷酸单元并且能够募集RNase。

7. 根据权利要求5所述的化合物,其中所述寡核苷酸包括选自以下的序列:

LNA 1:5'AccAaaAGaaT 3'(SEQ ID NO:67);

LNA 2:5'TggCcAtcaaT 3'(SEQ ID NO:68);

LNA 3:5'TagCAtActtA 3'(SEQ ID NO:69);

LNA 4:5'CCAAAAGA 3'(SEQ ID NO:70);

LNA 5:5'CATACTTA 3'(SEQ ID NO:71);

LNA 6:5'CagaCaCGaCCaaAA 3'(SEQ ID NO:72);

LNA 7:5'TAcTtaCTgaCagCC 3' (SEQ ID NO:73);
LNA 8:5'AGACacgaccaAAAG 3' (SEQ ID NO:74);
LNA 9:5'TACTtactgacaGCC 3' (SEQ ID NO:75);
LNA 9.2:5'TACttactgacAGCC 3' (SEQ ID NO:76);
LNA 10:5'ACCaaaagAAT 3' (SEQ ID NO:77);
LNA 11:5'TGGccatcAAT 3' (SEQ ID NO:78);
LNA 12:5'TAGcatacTTA 3' (SEQ ID NO:79);
LNA 13:5'CgacCAaaAGaattC 3' (SEQ ID NO:80);
LNA 14:5'CGACcaaaagaATTC 3' (SEQ ID NO:81);
LNA 15:5'GaTGgCcATcaAtta 3' (SEQ ID NO:82);
LNA 16:5'GATGgccatcaATTA 3' (SEQ ID NO:83);
LNA 17:5'TcTAGCaTActTacT 3' (SEQ ID NO:84);
LNA 18:5'TCTAGcataactTACT 3' (SEQ ID NO:85);
LNA 19:5'GAAttcggatgGCCA 3' (SEQ ID NO:86);
LNA 20:5'GGCCatcaattaGTG 3' (SEQ ID NO:87);
LNA 21:5'TTCGgatggccaTCA 3' (SEQ ID NO:88);
LNA 22:5'AGCCagacagCGA 3' (SEQ ID NO:89);
LNA 23:5'GACAgccagacaGCA 3' (SEQ ID NO:90);
LNA 9.G74C:5'TACTtactgacaGTC 3' (SEQ ID NO:91);以及
LNA 9.T80C:5'TACTtaccgacaGCC 3' (SEQ ID NO:92);

其中大写字母表示LNA核苷酸且小写字母表示DNA核苷酸。

8. 一种抑制细胞内的甲型流感病毒的方法,所述方法包括:

使包括具有PSL2基序的病毒RNA (vRNA) 的样本与有效量的药剂接触,所述有效量的药剂特异性结合到所述PSL2基序以抑制所述甲型流感病毒。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述药剂是根据权利要求1所述的寡核苷酸化合物。

10. 根据权利要求8所述的方法,其中使所述样本与药剂接触造成所述病毒的至少 $2\log_{10}$ 滴度缺损,并且所述药剂破坏所述vRNA的所述PSL2基序的整体结构。

11. 根据权利要求8的方法,其中所述vRNA与病毒粒子或细胞隔离。

12. 一种治疗或预防受试者内的甲型流感病毒感染的方法,所述方法包括:

向有需要的受试者施用药物组合物,所述药物组合物包括有效量的活性药剂,所述有效量的活性药剂特异性结合到病毒RNA (vRNA) 的PSL2基序。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述活性药剂是包括寡核苷酸序列的化合物,所述寡核苷酸序列包括与PB2 vRNA区域互补的至少8个核苷亚单位。

14. 根据权利要求12所述的方法,其中所述药剂是根据权利要求1所述的寡核苷酸化合物。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述受试者有感染甲型流感病毒的风险,并且施用所述寡核苷酸化合物保护所述受试者免受感染达1周或更长(例如,2周或更长、3周或更长、1个月或更长、2个月或更长、3个月或更长等)。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述施用包括每周、每两周或每月施用有效剂量的寡核苷酸化合物。

17. 根据权利要求12所述的方法,其中所述药物组合物进一步包括选自第二寡核苷酸活性药剂和抗病毒药物的另外的活性药剂。

18. 根据权利要求12所述的方法,其中所述受试者被诊断为感染或疑似感染甲型流感病毒。

抗流感病毒的泛基因型药剂和其使用方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2016年3月2日提交的美国临时专利申请第62/302,548号的权益,该申请的全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0003] 甲型流感病毒(IAV)是分段RNA病毒,它在全世界范围内都导致了显著的发病率和死亡率。所有目前批准的IAV抗病毒药物都靶向于病毒蛋白,是受亚型限制的,并且因对所有药物类成员的抗病毒抗性提高而受到挑战。

[0004] IAV基因组由8个单链负义病毒RNA(vRNA)片段组成,其编码了最少14种已知的病毒蛋白。vRNA与核蛋白(NP)和异源三聚体聚合酶复合物(其由PB2、PB1和PA蛋白组成)一起形成完整病毒核糖核蛋白(vRNP)。为了完全的感染性,IAV病毒粒子必须结合每个片段的vRNP中的至少一个。每个vRNP与至少一个其它配偶体相互作用以形成超分子复合物,超分子复合物可能由假设的片段间RNA-RNA和/或蛋白-RNA相互作用维持以引导包装过程。

发明内容

[0005] 本公开的方面提供泛基因型组合物,泛基因型组合物被设计来破坏在基因组片段PB2的5'包装信号区域内的称为包装茎-环2(PSL2)的IAV RNA结构元素。PSL2结构的破坏显著抑制IAV。PSL2在所有受试甲型流感病毒亚型中都是保守性的。

[0006] 提供抑制样本中的甲型流感病毒的方法。方法的方面包含使包括具有PSL2基序的病毒RNA(vRNA)的样本与有效量的药剂接触,有效量的药剂特异性结合PSL2基序以抑制甲型流感病毒。在一些情况下,vRNA与病毒粒子或细胞隔离。在一些情况下,vRNA在病毒粒子中。在一些情况下,vRNA在受感染细胞中。还提供了治疗或预防受试者内甲型流感病毒感染的方法。还提供了用于筛选候选药剂的抑制细胞中的甲型流感病毒的能力的方法,方法包括:使样本与候选药剂接触;以及确定候选药剂是否特异性结合到vRNA的PSL2基序。还提供了化合物和药物组合物,所述化合物和药物组合物包括与PB2 vRNA区域互补的寡核苷酸序列,其可用于主题方法。

附图说明

[0007] 本领域的技术人员将理解,以下所述的附图仅用于说明目的。附图不意图以任何方式限制本教义的范围。

[0008] 图1A到图1F描绘了野生型PB2(SEQ ID NO:1)和包装突变体vRNA、PB2m757(SEQ ID NO:2)、m745(SEQ ID NO:3)、1918年大流行的(H1N1)(SEQ ID NO:4)、高致病性禽(H5M=N1)(SEQ ID NO:5)和2009年猪(H1N1)(SEQ ID NO:6)的RNA二级结构。

[0009] 图2,小图A和B,描绘了全长PB2 vRNA的反应性。

[0010] 图3A到图3E描绘了通过包装缺陷的突变、PB2m744b(SEQ ID NO:8)、PB2m745(SEQ ID NO:9)、PB2m55c(SEQ ID NO:10)和PB2m757(SEQ ID NO:11)对野生型反应性(SEQ ID

NO:7)的破坏。

[0011] 图4描绘了含有PSL2结构的核苷酸序列的保守性。

[0012] 图5A到图5D描绘了PSL2 RNA二级结构的二维突变和映射分析(图5C,SEQ ID NO:12)。

[0013] 图6,小图A到B,描绘了对先前所述的PR8 PB2突变体的补偿突变的设计(小图A,SEQ ID NO:13)。

[0014] 图7,小图A到D,描绘了PR8 PB2 vRNA的单个高度保守的密码子的同义突变(小图A,SEQ ID NO:14到15;小图B,从上到下为SEQ ID NO:16到23)。

[0015] 图8描绘了表明PB2包装突变体命名和对应突变位点的表。

[0016] 图9A到图9C描绘了同义突变对PSL2结构、PB2m731(SEQ ID NO:24)、PB2m751(SEQ ID NO:25)和PB2m748(SEQ ID NO:26)的影响。

[0017] 图10,小图A到I,描绘了PR8 PB2包装缺陷突变体中的补偿突变对病毒包装和滴度的影响。

[0018] 图11,小图A到D,描绘了PB2包装缺陷突变配偶体和补偿突变配偶体的多维化学映射(小图B,SEQ ID NO:27)。

[0019] 图12,小图a到t,描绘了二维突变-映射-挽救分析。

[0020] 图13描绘了用于二维突变-映射-挽救突变体的引物序列的设计。序列对应于SEQ ID NO:28到43(从上到下)。

[0021] 图14,小图A到B,描绘了包装缺陷病毒在体内减弱。

[0022] 图15,小图A到D,描绘了靶向PSL2 RNA结构的锁核酸的抗病毒活性(小图A,SEQ ID NO:44)。

[0023] 图16A到图16B描绘了对LNA-RNA结合的分析。

[0024] 图17,小图A到B,示出在鼻内施用单一剂量的示例性化合物LNA9之后的小鼠随时间的%存活率和%体重减轻。

[0025] 图18,小图A到D,示出在药物压力下连续传代之后的流感病毒对奥司他韦的易感性。

[0026] 图19,小图A到C,示出流感病毒(包括在药物压力和抗药性病毒下连续传代之后的病毒)对示例性化合物LNA9的易感性。

具体实施方式

[0027] 定义

[0028] 在更详细地描述示例性实施例之前,阐述以下定义以说明和定义本说明书中使用的术语的含义和范围。

[0029] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属的领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。Singleton等人,《微生物学和分子生物学词典(DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY)》,第2版,John Wiley和Sons,New York(1994)和Hale&Markham,《哈珀科林斯生物学词典(THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY)》,Harper Perennial,NY(1991年)向技术人员提供了具有本文使用的许多术语的一般含义。虽然如此,为了清楚和易于参考,以下定义某些术语。

[0030] 必须注意,如本文和随附权利要求中所使用,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包含复数指称,除非在上下文另有明确说明。例如,术语“引物”是指一种或多种引物,即,单一引物和多种引物。还将注意,权利要求可起草为排除任何可选元素。因此,本声明意图用作使用与权利要求元素的叙述结合的专用术语(例如“单独地”、“仅”等等)或使用“否定”限制的先行基础。

[0031] 如本文所使用的术语“样本”涉及含有一种或多种感兴趣组分的材料或材料的混合物,典型地但不一定是流体形式。

[0032] 如本文所使用,术语“有效量”是指产生一些期望局部或全身作用的物质(例如,感兴趣药剂)的量。有效量的感兴趣活性药剂取决于多种因素(包含但不限于受试者的体重和年龄、待治疗的病症、病症的严重程度、给药方式等等)而变化,并且可容易地确定,例如,使用数据(例如以下实验部分中提供的数据)凭经验地确定。

[0033] 如本文所使用的术语“样本”涉及含有一种或多种感兴趣组分的材料或材料的混合物,典型地但不一定是流体(即,水性)形式。样本可衍生自多种来源,例如来自生物样本或固体,例如与个体隔离的组织或液体,包含但不限于例如血浆、血清、脊髓液、精液、淋巴液、皮肤外部、呼吸道、肠道和泌尿生殖道、泪液、唾液、乳汁、血细胞、肿瘤、器官,以及体外细胞培养成分样本(包含但不限于由细胞培养基中的细胞生长得到的条件培养基、推定的被病毒感染的细胞、重组细胞和细胞成分)。样本中的组分在本文中称为“分析物”。在许多实施例中,样本是含有至少约 10^2 、 5×10^2 、 10^3 、 5×10^3 、 10^4 、 5×10^4 、 10^5 、 5×10^5 、 10^6 、 5×10^6 、 10^7 、 5×10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 或更多物种的分析物的复合样本。

[0034] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,例如完整抗体的抗原结合或可变区域。抗体片段的实例包含:Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双体;线性抗体(Zapata等人,《蛋白工程(Protein Eng.)》,第8卷,第10期,第1057到1062页(1995年));单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同抗原结合片段,一个称为“Fab”片段,每个片段具有单个抗原结合位点,并且另一个是残余“Fc”片段,此名称反映了易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,F(ab')₂片段具有两个抗原结合位点且仍然能够交联抗原。

[0035] 本文可互换地使用的术语“多肽”和“蛋白”是指任何长度的聚合形式的氨基酸,其可包括编码和非编码氨基酸、化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸,以及具有经修饰的肽骨架的多肽。术语“融合蛋白”或其语法性等同物是指由多个多肽组分组成的蛋白,虽然其典型地在其天然状态下未联接,但是其典型地通过肽键连接其相应的氨基和羧基末端以形成单个连续多肽。融合蛋白可以是两种、三种或甚至四种或更多种不同蛋白的组合。术语多肽包含:融合蛋白(包含但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白),与异源和同源前导序列的融合(在具有或不具有N-末端甲硫氨酸残基的情况下);免疫标记的蛋白;具有可检测融合配偶体的融合蛋白,例如包括作为融合配偶体的荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶等的融合蛋白;等等。

[0036] 通常,多肽可以是任何长度的,例如,大于2个氨基酸、大于4个氨基酸、大于约10个氨基酸、大于约20个氨基酸、大于约50个氨基酸、大于约100个氨基酸,大于约300个氨基酸,通常高达约500或1000个或更多个氨基酸。“肽”一般大于2个氨基酸、大于4个氨基酸、大于约10个氨基酸、大于约20个氨基酸,通常高达约50个氨基酸。在一些实施例中,肽的长度为5

到30个氨基酸。

[0037] 术语“特异性结合”是指药剂优先地结合到存在于不同的分析物的均匀的混合物中的特定的靶(例如PSL2)的能力。在一些情况下,特异性结合相互作用将区分样本中的期望和非期望分析物(典型地是大于约10到100倍或更多倍(例如,大于约1000倍))。在一些情况下,感兴趣药剂和分析物(例如,PSL2)在它们特异性结合在捕获剂/分析物复合物中时的亲和力为至少 10^{-8} M,至少 10^{-9} M,通常高达约 10^{-10} M。特异性结合可以包含杂交、多肽-核酸相互作用或小分子-核酸相互作用。

[0038] “寡核苷酸”是指具有约2到约200个连续亚单位的核糖和/或脱氧核糖核苷亚单位聚合物。核苷亚单位可以通过多种亚单位间键联接,包括但不限于磷酸二酯键、磷酸三酯键、甲基磷酸酯键、P3'→N5'氨基磷酸酯键、N3'→P5'氨基磷酸酯键、N3'→P5'硫代氨基磷酸酯键和硫代磷酸酯键。此外,“寡核苷酸”包含本领域的技术人员已知的对糖(例如,2'取代)、碱(参见下文对“核苷”的定义)和3'和5'末端的修饰。在寡核苷酸部分包括多个亚单位间键的实施例中,每个键可以使用相同的化学物质形成,或可以使用键联化学物质的混合物。术语“寡核苷酸”、“核酸”、“核酸分子”、“核酸片段”、“核酸序列或片段”或“多核苷酸”可互换地使用,并且也可与基因、cDNA、DNA和由基因编码的RNA互换地使用。

[0039] “锁核酸”(LNA)是经修饰的RNA核苷酸,其中核糖部分用连接2'氧和4'碳的额外的桥修饰。桥将核糖“锁定”在3'内构象中,这通常会发生在A型双链体中。每当需要时,LNA核苷酸可以与任何方便的核苷酸或核苷酸类似物(例如寡核苷酸中的DNA或RNA残基)混合。根据Watson-Crick碱基配对规则,LNA与DNA或RNA杂交。此类低聚物可以化学地合成。通常,锁核糖构象增强碱基堆积和骨架预组织以增加寡核苷酸的杂交性质(解链温度)。

[0040] 本公开包括隔离或基本上纯化的核酸核酸分子和含有这些分子的组合物。在本公开的上下文中,“隔离的”或“纯化的”DNA分子或RNA分子是与之天然环境分开存在的DNA分子或RNA分子,并且因此不是天然产物。隔离的DNA分子或RNA分子可以以纯化形式存在或可以存在于非天然环境(例如像转基因宿主细胞)中。例如,“隔离的”或“纯化的”核酸分子或其生物活性部分当通过重组技术产生时,基本上不含其它细胞物质或培养基,或当化学合成时,基本上不含化学前体或其它化学物质。在一个实施例中,“隔离的”核酸不含在生物的衍生核酸的基因组DNA中天然位于核酸侧翼的序列(即,位于核酸的5'和3'末端的序列)。例如,在各种实施例中,隔离的核酸分子可以含有少于约5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb或0.1kb的核苷酸序列,核苷酸序列在衍生核酸的细胞的基因组DNA中天然位于核酸分子侧翼。本公开还涵盖所公开的核苷酸序列的片段和变体。“片段”或“部分”是指核苷酸序列的全长或不到全长。本公开的siRNA可以通过本领域已知的任何方法产生,例如,通过体外转录、重组或通过合成手段产生。在一个实例中,siRNA可以通过使用重组酶(例如T7RNA聚合酶)和DNA寡核苷酸模板在体外产生。

[0041] “小干扰”或“短干扰RNA”或siRNA是靶向感兴趣基因的核苷酸的RNA双链体。“RNA双链体”是指由RNA分子的两个区域之间的互补配对形成的结构。siRNA“靶向”基因,因为siRNA的双链体部分的核苷酸序列与靶向基因的核苷酸序列互补。在一些实施例中,siRNA的双链体的长度小于30个核苷酸。在一些实施例中,双链体的长度可以是29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11或10个核苷酸。在一些实施例中,双链体的长度为19到25个核苷酸。siRNA的RNA双链体部分可以是发夹结构的部分。除了双链体部分

之外,发夹结构可以含有定位在形成双链体的两个序列之间的环部分。环的长度可以变化。在一些实施例中,环的长度为5、6、7、8、9、10、11、12或13个核苷酸。发夹结构还可含有3'或5'悬突部分。在一些实施例中,悬突是长度为0、1、2、3、4或5个核苷酸的3'或5'悬突。

[0042] 术语“脂质”在本文中广泛用于涵盖可溶于有机溶剂但微溶于水(如果发生的话)的物质。术语脂质包含但不限于烃、油、脂肪(例如脂肪酸、甘油酯)、甾醇、类固醇,以及这些化合物的衍生物的形式。优选的脂质是脂肪酸及其衍生物、烃及其衍生物、以及甾醇,例如胆固醇。如本文所使用,术语脂质还包含含有脂质和亲水部分的两亲化合物。脂肪酸通常在直链中含有偶数个碳原子(常为12到24个碳)且可以是饱和或不饱和的,并且可以含有或被修饰为含有多种取代基。为了简单起见,术语“脂肪酸”还涵盖脂肪酸衍生物,例如通过缀合反应(例如,与寡核苷酸的修饰末端的缀合反应)而产生的脂肪酰胺。

[0043] 术语的其它定义可以出现在整个本说明书中。

[0044] 示例性实施例的描述

[0045] 在描述各种实施例之前,将理解,本公开的教义不限于所述的特定实施例,并且因此当然可以变化。还将理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而不意图进行限制,因为本教义的范围仅受到随附权利要求的限制。

[0046] 本文使用的小节标题仅用于组织的目的,而不应被解释为以任何方式限制所述的主题。虽然结合各种实施例描述了本教义,但是本教义不意图限制于此类实施例。相比之下,如本领域的技术人员将理解,本教义涵盖各种替代、修改和等同物。

[0047] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属的领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然与本文所述的那些类似或等同的任何方法和材料也可用于本教义的实践或测试,但是现在描述的是一些示例性方法和材料。

[0048] 对任何出版物的引用是为了其在申请日之前的公开内容,并且不应被解释为承认本发明的权利要求无权凭借在先发明而先于此类出版物。此外,所提供的出版日期可以与可独立地确认的实际出版日期不同。

[0049] 在阅读本公开后,将对本领域的技术人员显而易见的是,本文所述和所示的每个单独实施例具有离散的部件和特征,在不脱离本教义的范围或精神的情况下,它们可容易地与其它若干实施例中的任一个实施例的特征分离或组合。任何表述方法都可按表述事件的顺序或按逻辑上可能的任何其它顺序执行。

[0050] 本文提及的所有专利和出版物,包含在此类专利和出版物中公开的有序列,明确地以引用方式并入本文。

[0051] 用于抑制甲型流感病毒的方法

[0052] 如上概述,本公开的方面包含泛基因型组合物,泛基因型组合物被设计来破坏在基因组片段PB2的5'包装信号区域内的称为包装茎-环2(PSL2)的IAV RNA结构元素。“泛基因型”是指组合物在各种不同类型IAV中有效,其中PSL2结构元素是保守性的。在一些情况下,主题组合物可以称为广谱。如本文所使用,术语“广谱”是指针对两种或更多种不同病毒(例如三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、八种或更多、10种或更多种不同病毒)具有活性的单一部分的抗病毒活性。两种或更多种不同病毒可以选自不同病毒亚组(例如,甲型流感病毒组1或甲型流感病毒组2),或可以从同一组中选择(例如,H1、H2、H5、H6、H8和H9组1甲型流感病毒中的两种或更多种,或H3、H4、H7和H10组2甲型流感病毒

中的两种或多种)。

[0053] PSL2结构的破坏显著抑制IAV。PSL2在所有受试甲型流感病毒亚型中都是保守性的。图1,小图a示出可在主题方法中靶向的PSL2结构的实例。图4示出了含有PSL2结构的感兴趣核苷酸序列的保守性。在一些情况下,主题组合物具有针对IAV的广谱活性,例如针对选自H1N1、H3N2和H5N中的2种或更多种IAV的活性。

[0054] 本公开的方面包括用于抑制样本中的甲型流感病毒(IAV)的方法。在一些实施例中,方法包括使包括具有PSL2基序的病毒RNA(vRNA)的样本与有效量的药剂接触,有效量的药剂特异性结合PSL2基序以抑制甲型流感病毒。在一些情况下,样本在体外。在某些情况下,样本在体内。样本中的vRNA可以包括在病毒粒子中。在一些情况下,vRNA包括在细胞(例如被病毒颗粒感染的细胞)中。

[0055] 本公开的方面包括用于抑制细胞中的甲型流感病毒(IAV)的方法。在一些实施例中,方法包括使包括具有PSL2基序的病毒RNA(vRNA)的细胞与有效量的药剂接触,有效量的药剂特异性结合PSL2基序以抑制甲型流感病毒。在一些情况下,细胞在体外。在某些情况下,细胞在体内。

[0056] 在一些实施例中,样本(例如细胞)中的vRNA包括PB2 vRNA。如本文所使用,“PB2 vRNA”是指病毒RNA(例如IAV RNA),其包含称为包装茎-环2(PSL2)的保守RNA结构元素。药剂可结合到PSL2基序的特定位点以破坏vRNA的整体结构,从而抑制病毒(参见例如图14)。例如,图1示出了野生型PB2和包装突变体vRNA的RNA二级结构。

[0057] 在一些实施例中,使样本(例如,细胞)与药剂接触造成病毒的至少 $2\log_{10}$ 滴度缺损,例如病毒的至少2.5、至少3、至少3.5、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少 $10\log_{10}$ 滴度缺损。在一些实施例中,药剂是寡核苷酸化合物(例如,如本文所述),其包括与vRNA的PSL2基序互补的序列或其盐。

[0058] 在方法的一些情况下,寡核苷酸化合物(例如,上述序列之一)与PB2 vRNA区域的结合(例如,经由杂交)破坏PB2 vRNA的整体二级RNA结构。在一些情况下,主题化合物靶向由PB2vRNA的5'末端编码区域的(-)-有义符号中的核苷酸34到87限定的区域的至少一部分。在一些情况下,化合物靶向由PB2 vRNA的5'末端编码区域的(-)-有义符号中的核苷酸1到14限定的区域的至少一部分。在方法的一些情况下,方法进一步包含将RNA酶募集到PSL2以降解vRNA。

[0059] 本公开的方面包括治疗或预防受试者内甲型流感病毒感染的方法。在一些实施例中,方法包括向有需要的受试者施用药物组合物,药物组合物包括有效量的活性药剂,有效量的活性药剂特异性结合到病毒RNA(vRNA)的PSL2基序(例如,如本文所述)。因此,在一些情况下,受试者是已经感染病毒的受试者。在某些情况下,受试者是有感染的风险或疑似感染病毒的受试者。在一些实施例中,vRNA是PB2 vRNA。

[0060] 可以采用用于将药剂施用到受试者的任何方便的方案。所采用的特定方案可以变化,例如,这取决于给药部位以及药剂是否是例如寡核苷酸、抗体、蛋白、肽或小分子。对于体内方案,可以采用任何方便的给药方案。可以取决于药剂的特性和结合亲和力、期望反应、给药方式(例如,部分或全身、眼内、眼周、脊柱后、肌内、静脉内、腹膜内、皮下、结膜下、鼻内、局部、滴眼、i.v.s.c.、i.p.、口服等)、半衰期、细胞数量或移植床或移植组织的大小而采用各种方案。

[0061] 还提供了包含主题药剂的药物组合物。在组合物中可以利用任何方便的赋形剂、载体等。可用于组合物中的药学上可接受的载体可以包含无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)和可注入的有机酯(例如油酸乙酯)。含水载体包含水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包含盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或固定油类。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的补充剂)等等。还可存在防腐剂和/或其它添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等等。还可将药剂组合物冻干以用于后续的重构和使用。组合物还可包含如本文所述的载体。可使用的载体的实例包含但不限于明矾、微粒、脂质体和纳米颗粒。任何方便的添加剂可以包含在主题组合物中以增强对主题活性药剂的递送。感兴趣添加剂包含细胞摄取增强剂、载体蛋白、脂质、树枝状大分子载体、碳水化合物等等。

[0062] 在一些情况下,药物组合物进一步包含一种或多种另外的活性药剂。感兴趣活性药剂包含本公开的另外的寡核苷酸化合物和任何方便的抗病毒化合物或感兴趣药物,包含但不限于金刚烷胺、金刚乙胺、扎那米韦、奥塞米韦、帕拉米韦等等。

[0063] 药剂

[0064] 任何方便的药剂可以用作主题方法和组合物中的感兴趣靶(例如PSL2)的药剂。感兴趣药剂包含但不限于PSL-2的配体、PSL2结合抗体、PSL2的支架式蛋白结合剂、寡核苷酸、小分子和肽;或其片段、变体或衍生物;或前述项的任何项的组合。

[0065] 可结合与本公开用作药剂的抗体可以涵盖但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、双特异性抗体、Fab抗体片段、F(ab)₂抗体片段、Fv抗体片段(例如V_H或V_L)、单链Fv抗体片段和dsFv抗体片段。此外,抗体分子可以完全地是人类抗体、人源化抗体或嵌合抗体。可与本公开结合使用的抗体可以包含链接到任何免疫球蛋白恒定区域的任何成熟或未处理的抗体可变区域。本公开涵盖抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列的微小变化,只要氨基酸序列的变化维持序列的75%或更多(例如80%或更多,90%或更多,95%或更多,或99%或更多)即可。具体地讲,构想出了保守氨基酸替代。保守替代是它们侧链中相关的氨基酸家族中发生的那些。氨基酸变化是否产生功能肽可通过测定多肽衍生物的比活性来确定。在一些实施例中,药剂是抗体片段(例如,如本文所述)。

[0066] 在一些实施例中,药剂是支架式多肽结合剂。支架是指从多肽药剂产生的基础肽框架(例如,共有序列或结构基序)。基础支架序列包含固定的那些残基和可赋予所得多肽药剂不同功能(例如特异性结合到靶受体)的变体残基。此类结构基序可以结构上表征为特定二级结构元素和三级结构元素的组合,或替代地结构上表征为可比较的一级氨基酸残基序列并且在结构上进行比较。任何方便的支架和支架式多肽可以用作主题方法中的药剂。在一些实施例中,可利用重组筛选方法(例如噬菌体展示筛选)来鉴定此类药剂。感兴趣支架式多肽结合剂包含但不限于合成小蛋白和重组小蛋白,例如亲和体。

[0067] 在一些情况下,药剂是结合PSL2的小分子。感兴趣小分子包含但不限于具有大于50且小于约2,500道尔顿(Da)(例如大于50且小于约1000Da的,或大于50且小于约500Da)的分子量(MW)的小有机或无机化合物。“小分子”涵盖许多生物和化学类别,包含合成、半合成或天然存在的无机或有机分子,包含合成、重组或天然存在的多肽和核酸。感兴趣小分子可以包括与蛋白进行结构相互作用(具体地是氢键合)必需的官能基团,并且可以包含至少

胺、羰基、羟基或羧基,并且可以含有至少两个官能化学基团。小分子可以包括环状碳或杂环结构和/或被以上官能基团中的一个或多个取代的芳族或多芳族结构。在包含肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物或其组合的生物分子中也发现了小分子。

[0068] 寡核苷酸化合物

[0069] 在一些实施例中,药剂是寡核苷酸或其衍生物,或其盐(例如,药学上可接受的盐)。在一些情况下,寡核苷酸与PSL2基序的特定片段互补(例如,如本文所述)。可用于主题方法的互补寡核苷酸在某些情况下为至少5,例如至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、约12、至少13、至少14、至少15、或甚至更多。在一些情况下,互补寡核苷酸的长度为30个核苷酸或更少,例如长度为25个核苷酸或更少,长度为20个核苷酸或更短,或长度为15个核苷酸或更少,其中长度受抑制效率、特异性(包含缺少交叉反应性等)的控制。本公开提供短寡核苷酸(例如长度为从7或8到15个核苷酸的短寡核苷酸),其可以是PSL2功能的强力且可选的抑制剂。在一些实施例中,活性药剂是包含寡核苷酸序列的化合物,寡核苷酸序列包括与PB2 vRNA区域互补的至少8个核苷酸亚单位。在一些实施例中,活性药剂是包含寡核苷酸序列的化合物,寡核苷酸序列包括与PB2 vRNA区域互补的至少8个和20个或更少(例如,15个或更少)的核苷酸亚单位。

[0070] 内源链PSL2序列中的一个特定区域或多个特定区域经选择以由寡核苷酸药剂补充。寡核苷酸的特定序列的选择可以使用经验方法进行,其中基于结构分析(例如,如本文所述),在体外或动物模型中测定用于靶IAV的抑制的若干候选序列。还可使用寡核苷酸和序列的组合,其中靶PSL2的若干区域经选择以用于反义互补。

[0071] 在一些实施例中,药剂是包括与vRNA的PSL2基序或其盐互补的至少5个核苷酸亚单位(例如,至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少12个、至少14个、至少16个、至少18、或至少20)的寡核苷酸化合物。在某些实施例中,寡核苷酸的键中的一个或多个选自以下:甲基磷酸酯键、P3'→N5'氨基磷酸酯键、N3'→P5'氨基磷酸酯键、N3'→P5'硫代氨基磷酸酯键、二硫代磷酸酯键和硫代磷酸酯键。在某些情况下,寡核苷酸序列是锁核酸。在某些情况下,寡核苷酸序列包含一个或多个锁核酸核苷酸,例如2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个、7个或更多个、8个或更多个、9个或更多个、10个或更多个,或甚至更多。

[0072] 在一些实施例中,药剂是包括至少5个(例如至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少12个、至少14个、至少16个、至少18个、至少20个)脱氧核糖核苷酸单元(例如与PSL2基序互补的单元)的寡核苷酸且能够募集RNase。在一些情况下,寡核苷酸募集RNase以催化靶vRNA降解成更小组分。用于募集RNase的任何方便的方法和部分可以结合到主题药剂(例如寡核苷酸)中。在一些情况下,寡核苷酸药剂进一步包括募集感兴趣RNase的序列。将理解,除非另有说明,否则本文所述的寡核苷酸序列意在包含DNA序列、RNA序列(例如,其中U可任选地替代T)、混合RNA/DNA序列及其类似物,包含其中序列的一个或多个核苷酸是经修饰的核苷酸的类似物(例如LNA类似物)和/或其中一个或多个核苷间键被替换(例如,用非天然存在的键来替换)的类似物(例如硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、氨基磷酸酯键或硫代氨基磷酸酯键)。

[0073] 在一些实施例中,寡核苷酸包括选自以下的序列:

[0074] 5'ACCAAAAGAAT 3'(SEQ ID NO:45);

- [0075] 5'TGGCCATCAAT 3'(SEQ ID NO:46);
[0076] 5'TAGCATACTTA 3'(SEQ ID NO:47);
[0077] 5'CCAAAAGA 3'(SEQ ID NO:48);
[0078] 5'CATACTTA 3'(SEQ ID NO:49);
[0079] 5'CAGACACGACCAAAA 3'(SEQ ID NO:50);
[0080] 5'TACTTACTGACAGCC 3'(SEQ ID NO:51);
[0081] 5'AGACACGACCAAAAG 3'(SEQ ID NO:52);
[0082] 5'ACAAAAGAAT 3'(SEQ ID NO:53);
[0083] 5'TGGCCATCAAT 3'(SEQ ID NO:54);
[0084] 5'TAGCATACTTA 3'(SEQ ID NO:55);
[0085] 5'CGACCAAAAAGAATTC 3'(SEQ ID NO:56);
[0086] 5'CGACCAAAAAGAATTC 3'(SEQ ID NO:57);
[0087] 5'GATGGCCATCAATTA 3'(SEQ ID NO:58);
[0088] 5'GATGGCCATCAATTA 3'(SEQ ID NO:59);
[0089] 5'TCTAGCATACTTACT 3'(SEQ ID NO:60);
[0090] 5'TCTAGCATACTTACT 3'(SEQ ID NO:61);
[0091] 5'GAATTCGGATGGCCA 3'(SEQ ID NO:62);
[0092] 5'GGCCATCAATTAGTG 3'(SEQ ID NO:63);
[0093] 5'TTCGGATGGCCATCA 3'(SEQ ID NO:64);
[0094] 5'AGCCAGACAGCGA 3'(SEQ ID NO:65);以及
[0095] 5'GACAGCCAGACAGCA 3'(SEQ ID NO:66)。

[0096] 在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'ACAAAAGAAT 3'(SEQ ID NO:45)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'TGGCCATCAAT 3'(SEQ ID NO:46)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'TAGCATACTTA 3'(SEQ ID NO:47)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'CCAAAAGA 3'(SEQ ID NO:48)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'CATACTTA 3'(SEQ ID NO:49)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'CAGACACGACCAAAA 3'(SEQ ID NO:50)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'TACTTACTGACAGCC 3'(SEQ ID NO:51)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'AGACACGACCAAAAG 3'(SEQ ID NO:52)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'ACAAAAGAAT 3'(SEQ ID NO:53)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'TGGCCATCAAT 3'(SEQ ID NO:54)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'TAGCATACTTA 3'(SEQ ID NO:55)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'CGACCAAAAAGAATTC 3'(SEQ ID NO:56)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'CGACCAAAAAGAATTC 3'(SEQ ID NO:57)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'GATGGCCATCAATTA 3'(SEQ ID NO:58)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'GATGGCCATCAATTA 3'(SEQ ID NO:59)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'TCTAGCATACTTACT 3'(SEQ ID NO:60)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'TCTAGCATACTTACT 3'(SEQ ID NO:61)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'GAATTCGGATGGCCA 3'(SEQ ID NO:62)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'GGCCATCAATTAGTG 3'(SEQ ID NO:63)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'TTCGGATGGCCATCA 3'(SEQ ID NO:64)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5'

AGCCAGACAGCGA 3' (SEQ ID NO:65)。在某些实施例中,寡核苷酸包括序列:5' GACAGCCAGACAGCA 3' (SEQ ID NO:66)。

[0097] 在一些情况下,寡核苷酸化合物(例如,上述序列之一)与PB2 vRNA区域的结合(例如,经由杂交)破坏PB2 vRNA的整体二级RNA结构。

[0098] 寡核苷酸序列可以包含任何方便数量的DNA、RNA和LNA核苷酸。在本文所述的寡核苷酸序列的一些情况下,序列是混合RNA/DNA序列。在本文所述的寡核苷酸序列的一些情况下,序列是混合LNA/DNA序列。在本文所述的寡核苷酸序列的一些情况下,序列是混合LNA/RNA序列。在本文所述的寡核苷酸序列的一些情况下,序列是仅LNA核苷酸。在本文所述的寡核苷酸序列的一些情况下,序列是仅DNA核苷酸。在本文所述的寡核苷酸序列的一些情况下,序列是仅RNA核苷酸。

[0099] 在某些情况下,主题寡核苷酸具有序列(例如,SEQ ID NO:45到66之一)中的核苷酸类型的以下布置之一:

[0100] A,其中A是8个或更多个LNA核苷酸的序列;

[0101] A-B-A,其中B是6到8个DNA核苷酸的序列,并且每个A是3到4个LNA核苷酸的序列;

[0102] A-B-A,其中B是7到8个DNA核苷酸的序列,并且每个A是4个LNA核苷酸的序列;

[0103] L-D-L-D-L-D-L,其中每个L是1到2个LNA核苷酸的序列,并且每个D是2个DNA核苷酸的序列;

[0104] L-D-L-D-L-D-L,其中每个L是1到2个LNA核苷酸的序列,并且每个D是1到2个DNA核苷酸的序列;

[0105] L-D-L-D-L-D-L,其中每个L是1到2个LNA核苷酸的序列,并且每个D是1到3个DNA核苷酸的序列;

[0106] L-D-L-D-L-D-L-D-L,其中每个L是1到2个LNA核苷酸的序列,并且每个D是1到3个DNA核苷酸的序列;并且

[0107] L-D-L-D-L-D-L-D-L,其中每个L是1到2个LNA核苷酸的序列,并且每个D是1到2个DNA核苷酸的序列。

[0108] 主题寡核苷酸序列可以进一步包含一个或多个经修饰的核苷间键,例如硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、氨基磷酸酯键和/或硫代氨基磷酸酯键。非天然存在的核苷间键可以包含在主题寡核苷酸的序列的任何方便位置处。

[0109] 在某些实施例中,寡核苷酸具有以下序列之一,其中大写字母表示LNA核苷酸且小写字母表示DNA核苷酸(即,脱氧核糖核苷酸单元):

[0110] LNA 1:5' AccAaaAGaaT 3' (SEQ ID NO:67);

[0111] LNA 2:5' TggCcATcaaT 3' (SEQ ID NO:68);

[0112] LNA 3:5' TagCAtActtA 3' (SEQ ID NO:69);

[0113] LNA 4:5' CCAAAAGA 3' (SEQ ID NO:70);

[0114] LNA 5:5' CATACTTA 3' (SEQ ID NO:71);

[0115] LNA 6:5' CagaCaCGaCCaaAA 3' (SEQ ID NO:72);

[0116] LNA 7:5' TAcTtaCTgaCagCC 3' (SEQ ID NO:73);

[0117] LNA 8:5' AGACacgaccaAAAG 3' (SEQ ID NO:74);

[0118] LNA 9:5' TACTtactgacaGCC 3' (SEQ ID NO:75);

- [0119] LNA9.2:5'TACttactgacAGCC 3' (SEQ ID NO:76) ;
[0120] LNA 10:5'ACCaaaagAAT 3' (SEQ ID NO:77) ;
[0121] LNA 11:5'TGGccatcAAT 3' (SEQ ID NO:78) ;
[0122] LNA 12:5'TAGcatacTTA 3' (SEQ ID NO:79) ;
[0123] LNA 13:5'CgacCAaaAGaattC 3' (SEQ ID NO:80) ;
[0124] LNA 14:5'CGACcaaaaagaATTC 3' (SEQ ID NO:81) ;
[0125] LNA 15:5'GaTGgCcATcaAttA 3' (SEQ ID NO:82) ;
[0126] LNA 16:5'GATGgccatcaATTA 3' (SEQ ID NO:83) ;
[0127] LNA 17:5'TcTAgCaTActTacT 3' (SEQ ID NO:84) ;
[0128] LNA 18:5'TCTAgcatactTACT 3' (SEQ ID NO:85) ;
[0129] LNA 19:5'GAAttcggatgGCCA 3' (SEQ ID NO:86) ;
[0130] LNA 20:5'GGCCatcaattaGTG 3' (SEQ ID NO:87) ;
[0131] LNA 21:5'TTCGgatggccaTCA 3' (SEQ ID NO:88) ;
[0132] LNA 22:5'AGCCagacagCGA 3' (SEQ ID NO:89) ;以及
[0133] LNA 23:5'GACAgccagacaGCA 3' (SEQ ID NO:90) 。

[0134] 上述寡核苷酸序列的序列突变体也涵盖在本公开中。将理解,在本文所述的任何序列中,1、2、3、4个或更多个核苷酸可突变以提供期望性质,例如增强的抑制活性、与修饰剂的缀合等。

[0135] 在一些情况下,本文所述的序列中的任一序列(例如,SEQ ID NO:45到96之一)包括在更长序列中,例如包括另外5'和/或3'核苷酸。在某些情况下,主题寡核苷酸的长度为30个核苷酸或更少,例如其长度为25个或更少、20个或更少、19个或更少、18个或更少、17个或更少、16个或更少、15个或更少、14个或更少、13或更少、12或更少、11或更少或10个或更少的核苷酸。

[0136] 在一些情况下,主题寡核苷酸化合物包括相对于本文所述的序列之一而具有缺失的序列(例如,SEQ ID NO:45到96之一)。例如,从序列的5'和/或3'末端删除1、2或3个核苷酸的序列,例如SEQ ID NO:45到96之一。在一些情况下,缺失序列具有从SEQ ID NO:45到96之一的5'末端丢失的一个核苷酸。在一些情况下,缺失序列具有从SEQ ID NO:45到96之一的3'末端丢失的一个核苷酸。在一些情况下,缺失序列具有从SEQ ID NO:45到96之一的5'末端丢失的两个核苷酸。在一些情况下,缺失序列具有从SEQ ID NO:45到96之一的3'末端丢失的两个核苷酸。

[0137] 在某些情况下,寡核苷酸序列可以包含被设计来覆盖靶PSL2序列中的单核苷酸多态性(SNP)的突变。在一些情况下,寡核苷酸是具有单一突变位点的LNA9的修饰形式,其进行保护以免受含有LNA9靶序列的核苷酸变化的PLS2靶序列影响。将理解,感兴趣SNP突变可应用于本文所述的任何序列。感兴趣突变序列包含但不限于以下:

- [0138] 5'TACTTACTGACAGTC 3' (SEQ ID NO:91) ;
[0139] 5'TACTTACCGACAGCC 3' (SEQ ID NO:92) ;以及
[0140] 5'GGATTTCCGATGGCCA 3' (SEQ ID NO:93) 。

[0141] 在某些实施例中,寡核苷酸具有以下序列之一,其中大写字母表示LNA核苷酸且小写字母表示DNA核苷酸:

[0142] LNA9.G74C:5'TACTtactgacaGTC 3'(SEQ ID NO:94);

[0143] LNA9.T80C:5'TACTtaccgacaGCC 3'(SEQ ID NO:95);以及

[0144] LNA19.U56C:5'GGATttcggatggCCA 3'(SEQ ID NO:96)。

[0145] 在某些情况下,寡核苷酸具有对应于PSL2结构的特定区域(例如,对应于核苷酸34到87的亚区域)的最大长度。在某些情况下,寡核苷酸的长度为20个核苷酸或更少,例如15个核苷酸或更少、14个核苷酸或更少、13个核苷酸或更少、12个核苷酸或更少、11个核苷酸或更少、10个核苷酸或更少、9个核苷酸或更少、8个核苷酸或更少、7个核苷酸或更少、或甚至更少的。

[0146] 寡核苷酸可以通过本领域已知的方法来化学地合成(参见Wagner等人(1993年),见于上文,以及Milligan等人,见于上文)。寡核苷酸可以从天然磷酸二酯结构化学地修饰,以便增加其细胞内稳定性和结合亲和力。在文献中已描述了许多此类修饰,其改变了骨架、糖或杂环碱的化学性质。

[0147] 在骨架化学物质中有用的变化是:硫代磷酸酯;二硫代磷酸酯,其中两个非桥接氧被硫取代;亚磷酰胺;烷基磷酸三酯;以及硼烷磷酸酯。非手性磷酸酯衍生物包括3'-0'-5'-S-硫代磷酸酯、3'-S-5'-0-硫代磷酸酯、3'-CH₂-5'-0-磷酸酯、3'-NH-5'-0-氨基磷酸酯和硫代氨基磷酸酯。肽核酸用肽键替代整个核糖磷酸二酯骨架。糖修饰也会用于增强稳定性和亲和力。可以使用脱氧核糖的 α -端基异构体 β ,其中碱基相对于天然 β -端基异构体而反向。可更改核糖的2'-OH以形成2'-O-甲基或2'-O-烯丙基糖,其提供了对降解的抗性而不包括亲和力。杂环碱基的修饰必须维持适当的碱基配对。一些有用取代包括:脱氧尿苷取代脱氧胸苷;5-甲基-2'-脱氧胞苷和5-溴-2'-脱氧胞苷取代脱氧胞苷。已经表明,当分别取代脱氧胸苷和脱氧胞苷时,5-丙炔基-2'-脱氧尿苷和5-丙炔基-2'-脱氧胞苷增加亲和力和生物活性。

[0148] 寡核苷酸药剂可以用任何方便的修饰剂来衍生,例如,通过将修饰剂与寡核苷酸序列的5'和/或3'末端缀合。在一些情况下,修饰剂是增强细胞摄取的部分(例如,脂质)。任何方便的脂质都可以与主题寡核苷酸缀合。在一些情况下,修饰剂是脂肪酸,其经由连接到任选接头与5'或3'末端。脂质基团可以是脂族烃或脂肪酸,包含但不限于烃和脂肪酸的衍生物,其中实例是具有14到20个碳的饱和直链化合物,例如肉豆蔻酸(十四烷酸)、棕榈酸(十六烷酸)和硬脂酸(十八烷酸)和它们对应的脂族烃形式、十四烷、十六烷和十八烷。可采用的其它合适的脂质基团的实例是甾醇(例如胆固醇)和取代的脂肪酸和烃,具体地是这些基团的多氟化形式。脂质基团的范围包括衍生物,例如胺、酰胺、酯和氨基甲酸酯衍生物。

[0149] 在一些情况下,修饰剂是具有期望活性的另外的核酸序列(例如,RNase的募集,如本文所述)。在一些情况下,修饰剂具有特异性结合活性,其提供寡核苷酸向特定的靶(例如细胞特异性蛋白)的递送。在一些情况下,修饰剂是感兴趣抗体,其特异性结合感兴趣细胞特异性靶。在一些情况下,抗体修饰剂特异性结合血凝素(HA)靶。

[0150] 寡核苷酸活性药剂可以以任何方便的形式利用。在一些情况下,寡核苷酸活性药剂是单链的。在一些情况下,寡核苷酸活性药剂是双链的。在一些情况下,寡核苷酸活性药剂是siRNA。在一些情况下,寡核苷酸活性药剂是shRNA。在一些情况下,寡核苷酸活性药剂是ssRNA。在一些情况下,ssRNA的一个或多个核苷酸可以用LNA核苷酸来替代。在一些情况下,寡核苷酸活性药剂是ssDNA。在一些情况下,ssDNA的一个或多个核苷酸可以用LNA核苷

酸来替代。

[0151] 治疗方法

[0152] 本公开的方面包含治疗或预防受试者内甲型流感病毒感染的方法。本发明的寡核苷酸化合物可以用作新一类的抗病毒治疗剂,其可有效地破坏包装且完全地预防体内其它致命疾病。如实施例部分所证明,在体内,示例性寡核苷酸化合物的鼻内给药造成强效抗病毒功效并且预防小鼠体内的致死性IAV感染。

[0153] 方法的方面包含向有需要的受试者施用治疗上有效的量的主题化合物以治疗受试者感染或预防受试者感染。“治疗上有效的量”是指足以引发期望生物效应(例如治疗或预防病症或疾病、甲型流感病毒感染)的化合物的浓度。“治疗”是指至少实现与折磨宿主的病症相关联的症状的改善,其中改善在广义上使用来指至少与所治疗的病症相关联的参数(例如症状)的量值的减小。因此,治疗还包含其中病理状况或至少与之相关联的症状被完全地抑制的情况,例如,预防发生或停止(例如终止),使得宿主不再患有病症、或至少表征病症的症状。因此,治疗包括:(i) 预防,即,降低临床症状发展风险,包含致使临床症状不发展,例如预防疾病进展到危害状态;(ii) 抑制,即,阻止临床症状发展或进一步发展,例如减轻或完全地抑制活动性疾病(例如感染);和/或(iii) 缓解,即,致使临床症状消退。在甲型流感病毒感染的上下文中,术语“治疗”包含以下中的任一种或全部:减少患者样本中的病毒细胞的数量、抑制病毒细胞的复制,以及改善与感染相关联的一种或多种症状。

[0154] 待治疗的受试者可以是需要治疗的受试者,其中待治疗的宿主是适合使用主题化合物治疗的受试者。在一些实施例中,受试者是疑似感染甲型流感病毒的受试者。在某些实施例中,受试者被诊断为感染甲型流感病毒。因此,在一些情况下,受试者是已经感染病毒的受试者。

[0155] 在某些情况下,受试者是有感染的风险或疑似感染病毒的受试者。在一些实施例中,vRNA是PB2 vRNA。主题方法可以用于预防受试者感染甲型流感病毒。“预防”是指尽管在通常将会引起感染的状况下暴露于病毒,但是不会感染有感染甲型流感病毒的风险的受试者。在一些情况下,施用主题活性药剂(例如,寡核苷酸化合物)保护受试者免受感染达1周或更长,例如2周或更长、3周或更长、1个月或更长、2个月或更长时间、3个月或更长等。可根据主题方法施用多个剂量的主题化合物以长时间地保护受试者免受感染。可容易地使用常规方法确定定时和剂量。

[0156] 在一些情况下,主题治疗方法包括确定或诊断受试者是否感染甲型流感病毒的步骤。可以使用任何方便的方法执行确定步骤。在一些情况下,确定步骤包括从受试者中获得生物样本,并且测定样本中病毒细胞的存在。样本可以是细胞样本。确定步骤可以包括识别包括特定突变的病毒细胞。

[0157] 因此,各种受试者可以适合使用本文公开的主题化合物和药物组合物进行治疗。如本文所使用,术语“受试者”和“宿主”可互换地使用。一般,这些受试者是“哺乳动物”,其中人类是令人感兴趣的。其它受试者可以包含家养宠物(例如狗和猫)、家畜(例如牛、猪、羊、马等等)、啮齿动物(例如小鼠、豚鼠和大鼠,例如如在动物疾病模型中),以及非人类灵长类(例如黑猩猩和猴子)。

[0158] 所施用的主题化合物的量可以使用任何方便的方法确定为其量足以产生与药学上可接受的稀释剂、载体或媒介物相关联的期望效果。本公开的单位剂型的规格将取决于

所采用的特定化合物和要实现的效果,以及与宿主体内的每种化合物相关联的药效。

[0159] 在一些实施例中,主题化合物的有效量是一定量,其范围为从约50ng/ml到约50 μ g/ml(例如从约50ng/ml到约40 μ g/ml、从约30ng/ml到约20 μ g/ml、从约50ng/ml到约10 μ g/ml、从约50ng/ml到约1 μ g/ml、从约50ng/ml到约800ng/ml、从约50ng/ml到约700ng/ml、从约50ng/ml到约600ng/ml、从约50ng/ml到约500ng/ml、从约50ng/ml到约400ng/ml、从约60ng/ml到约400ng/ml、从约70ng/ml到约300ng/ml、从约60ng/ml到约100ng/ml、从约65ng/ml到约85ng/ml、从约70ng/ml到约90ng/ml、从约200ng/ml到约900ng/ml、从约200ng/ml到约800ng/ml、从约200ng/ml到约700ng/ml、从约200ng/ml到约600ng/ml、从约200ng/ml到约500ng/ml、从约200ng/ml到约400ng/ml、或从约200ng/ml到约300ng/ml)。

[0160] 在一些实施例中,主题化合物的有效量是一定量,其范围为从约10pg到约100mg,例如从约10pg到约50pg、从约50pg到约150pg、从约150pg到约250pg、从约250pg到约500pg、从约500pg到约750pg、从约750pg到约1ng、从约1ng到约10ng、从约10ng到约50ng、从约50ng到约150ng、从约150ng到约250ng、从约250ng到约500ng、从约500ng到约750ng、从约750ng到约1 μ g、从约1 μ g到约10 μ g、从约10 μ g到约50 μ g、从约50 μ g到约150 μ g、从约150 μ g到约250 μ g、从约250 μ g到约500 μ g、从约500 μ g到约750 μ g、从约750 μ g到约1mg、从约1mg到约50mg、从约1mg到约100mg、或从约50mg到约100mg。该量可以是单一剂量或可以是每日总量。每日总量可以是10pg到100mg,或者可以是100mg到约500mg,或可以是500mg到约1000mg。

[0161] 在一些实施例中,施用单一剂量的主题化合物。在其它实施例中,施用多个剂量的主题化合物。在一段时间内施用多个剂量的情况下,主题化合物可以在一段时间内每天两次(qid)、每天(qd)、隔天(qod)、每隔三天、每周三次(tiw)或每周两次(biw)进行施用。例如,化合物可以在从1天到约2年或更长的时段内以qid、qd、qod、tiw或biw的方式进行施用。例如,取决于各种因素,化合物可以以前述频率中的任一频率施用达一周、两周、一个月、两个月、六个月、一年或两年或更长的时间。

[0162] 可以使用多种方法中的任何方法来确定治疗方法是否有效。例如,可以测定从用主题方法治疗的个体获得的生物样本中病毒细胞的存在和/或水平。对受试者的治疗方法的有效性的评估可以包含使用任何方便的方法在治疗之前、期间和/或之后评估受试者。本方法的方面进一步包含以下步骤:评估受试者对治疗的治疗反应。

[0163] 在一些实施例中,方法包括评估受试者的状况,包含诊断或评估受试者的与待治疗的感兴趣疾病或病症相关联的一种或多种症状(例如,如本文所述)。在一些实施例中,方法包含从受试者中获得生物样本并且测定样本,例如,测定样本中与感兴趣疾病或病症相关联的病毒细胞或其组分的存在(例如,如本文所述)。样本可以是细胞样本。主题方法的评估步骤可以使用任何方便的方法在施用主题化合物之前、期间和/或之后执行一次或多次。在某些情况下,评估步骤包含病毒细胞的鉴定和/或定量。在某些情况下,评估受试者包含诊断受试者是否感染病毒或患有其症状。

[0164] 筛选方法

[0165] 本公开的方面还包含筛选测定,筛选测定被配置成鉴定可用于本发明的方法的药剂,例如,如上所述。本公开的方面包含用于筛选候选药剂的抑制细胞中的甲型流感病毒的能力的方法。在一些情况下,方法包括:使包括具有PSL2基序的病毒RNA(vRNA)的样本与候选药剂接触;以及确定候选药剂是否特异性结合到PSL2基序。在一些情况下,特异性结合到

PSL2基序的药剂将治疗受甲型流感病毒感染的受试者。评估或确定是指至少预测给定测试化合物将具有期望活性,使得期望在另外的测定(例如动物模型和/或临床测定)中进一步测试化合物。

[0166] 候选药剂选自:小分子、寡核苷酸、抗体和多肽。在一些情况下,确定步骤包括检测细胞参数,其中细胞中的参数相较未与候选药剂接触的细胞来说的变化指明候选药剂特异性结合PSL2基序。在一些情况下,主题筛选方法是SHAPE分析方法(通过引物延伸分析的选择性2'-羟基酰化)。在某些情况下,候选药剂是寡核苷酸。

[0167] 可使用体外模型、遗传性更改的细胞或动物、或纯化PSL2蛋白来执行药物筛选。可以鉴定与铅药剂的作用竞争、调节铅药剂的作用或模拟铅药剂的作用的配体。药物筛选鉴定结合到PSL2基序的特定位点的药剂。为此目的可以使用多种测定法,包括标记的体外结合测定法、电泳迁移率变动测定法、用于蛋白结合的免疫测定法等等。源自本文所述的结构研究的PSL2的三维结构的知识也可产生特异性抑制IAV活性的小药物的合理设计。

[0168] 如本文所使用的术语“药剂”描述具有结合PSL2以抑制IAV的能力的任何分子,例如寡核苷酸、蛋白或药物。一般,多种测定混合物与不同药剂浓度平行地进行试验以获得对各种浓度的差异反应。典型地,这些浓度中的一种用作阴性对照,即,在零浓度或低于检测水平下。

[0169] 候选药剂包括许多化学类别,例如寡核苷酸、抗体、多肽和有机分子,例如具有大于50且小于约2,500道尔顿的分子量的小有机化合物。候选药剂包括与蛋白进行结构相互作用(具体地是氢键合)必需的官能基团,并典型地包含至少胺、羰基、羟基或羧基,优选地是官能化学基团中的至少两个。候选药剂通常包括环状碳或杂环结构和/或被以上官能基团中的一个或多个取代的芳族或多芳族结构。在包含肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物或其组合的生物分子中也发现了候选药剂。

[0170] 候选药剂得自多种来源,包含合成或天然化合物库。例如,许多手段都可用于多种有机化合物和生物分子的随机和定向合成,包括随机化寡核苷酸和寡肽的表达。或者,可获得或容易地产生呈细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库。另外,天然或合成产生的文库和化合物易于通过常规化学,物理和生物化学方法修饰,并可用于产生组合文库。已知的药学药剂可以经受定向或随机化学修饰,例如酰化、烷基化、酯化、酰胺化等,以产生结构类似物。在某些实施例中所感兴趣的是通过血脑屏障的化合物。

[0171] 在筛选测定是结合测定的情况下,可以将分子中的一个或多个联接到信号产生系统的成员,例如标记,其中标记可以直接地或间接地提供可检测信号。各种标记包含但不限于:放射性同位素、荧光剂、化学发光剂、酶、特异性结合的分子、颗粒(例如磁性颗粒)等等。特异性结合的分子包含对,例如生物素和链霉抗生物素蛋白、地高辛和抗地高辛等。对于特异性结合的成员,通常根据已知过程用提供用于进行检测的分子标记互补成员。

[0172] 在筛选测定中可以包含多种其它药剂。这些包含像盐、中性蛋白的药剂,例如白蛋白、清洗剂等,用于促进最佳蛋白-蛋白结合和/或减少非特异性或背景相互作用。可以使用提高测定效率的试剂,例如蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、抗微生物剂等。组分的混合物以提供用于必要结合的任何顺序添加。温育在任何合适的温度下执行,典型地是在4°C到40°C之间。温育期经选择以获得最佳活性,但是也可进行优化以促进快速高通量筛选。典型地,在0.1小时到1小时之间将是足够的。

[0173] 实例

[0174] 提出以下实例,以便向本领域的普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的完整的公开和描述,并且不意图限制本发明人视为其发明的范围,也不意图表示以下实验是全部或唯一的实验。已经努力确保关于所使用的数字(例如量、温度等)的准确性,但是应考虑到一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份数,分子量是重均分子量,温度是摄氏度,压力是大气压或近大气压。可以使用标准缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pl,微微升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌肉内的(肌肉内地);i.p.,腹膜内的(腹膜内地);s.c.,皮下的(皮下地);等等。

[0175] 材料和方法

[0176] **细胞和病毒**:HEK293T和MDCK细胞得自美国典型培养物保藏所(American Type Culture Collection)(弗吉尼亚州马纳萨斯市),并且维持在含10%胎牛血清和青霉素-链霉素(Gibco)的Dulbecco改良的Eagle培养基中。使用八质粒反向遗传系统产生甲型流感病毒/PR/8/34(PR8)H1N1病毒。组织培养的适应性流感A/香港/8/68(HK68)H3N2病毒得自从ATCC(ATCC-VR-1679)。病毒在35°C下在10日龄无特定病原体的鸡胚中生长和扩增(Charles River实验室;SPAELAS)。

[0177] **质粒构建和克隆**:使用含有来自流感病毒A/波多黎各/8/34(H1N1)[PR8]、A/纽约/470/2004(H3N2)[NY470]、A/纽约/312/2001(H1N1)[NY312]、A/布瑞维格米申/1/1918(H1N1)[1918]、A/加利福尼亚州/04/2009(H1N1)[CA09]、A/越南/03/2004(H5N1)[VN1203]和A/安徽/1/2013(H7N9)的野生型PB2片段的质粒。为了产生PR8包装突变体vRNA,我们利用Stratagene QuickChange XL定点诱变药剂盒(Stratagene)诱变含有PR8的PB2基因的pDZ质粒。通过自动测序来确认每个突变的构建体的序列。

[0178] **反向遗传和病毒滴定**:使用八质粒反向遗传系统产生甲型流感/波多黎各/8/34(PR8)病毒(Hoffman等人,2000年)。简而言之,为了产生重组PR8病毒,293T/MDCK共培养物的 10^6 个细胞是Lipofectamine 3000(Invitrogen),其用质粒内含有的8个片段中的每个片段中的一个的1 μ g转染,质粒利用在双向双Po1 I/II启动子系统来用于基因组vRNA和mRNA的同时合成。转染后24小时收集细胞并接种到10日龄鸡胚(Charles River,研究级无特定病原体的卵)的尿囊腔中。通过血细胞凝集活性来评估重组病毒的挽救。每个新挽救的病毒进一步斑块滴定,并且通过突变基因的测序来确认突变。如先前所述(Szretter等人,2006年),在融合MDCK细胞上执行斑块测定。使用50 μ l病毒稀释液和50 μ l的0.5%火鸡红细胞在磷酸盐缓冲的盐水(PBS)中的悬浮液在室温下在96孔圆底板中执行血细胞凝集(HA)测定。

[0179] **病毒生长动力**:通过用100个斑块形成病毒单元(PFU)接种10日龄鸡蛋来确定PR8病毒的生长动力。在接种后72小时上,通过在MDCK细胞上滴定斑块来确定尿囊液中的病毒滴度。

[0180] **包装vRNA的隔离**:为了分析PR8突变病毒的包装vRNA,用约1000PFU重组病毒接种10日龄卵并温度72小时。收获尿囊液,并且通过低速离心澄清上清液。然后将澄清的上清液在30%蔗糖垫上分层,并且以30,000RPM超离心达2.5小时(Beckman Rotor SW41)。将沉淀病毒重悬于PBS中,并且萃取TRIzol(Invitrogen)。将沉淀vRNA重悬于最终体积为20 μ l的10mM Tris-HCl(pH8.0)中,并且在-80°C下储存。

[0181] 包装vRNA的qPCR分析:使用通用3'引物(5'-AGGGCTCTTCGGCCAGCRAAAGCAGG)(SEQ ID NO:97)和Superscript III反转录酶(RT)(Invitrogen)反转录约200ng的提取的vRNA。将RT产物稀释10,000倍且用作定量PCR(qPCR)的模板。然后如前所述(Marsh等人,2007)用片段特异性引物执行单独PCR。10 μ l反应混合物含有1 μ l稀释的RT产物、0.5 μ M引物浓度和SYBR Select Master Mix(Applied Biosystems),SYBR Select Master Mix包含SYBR GreenER染料、200 μ M脱氧核苷三磷酸、热不稳定UDG、优化SYBR Green Select缓冲液和AmpliTaq DNA聚合酶UP酶。通过分析循环阈值来确定相对vRNA浓度,通过均衡HA vRNA水平来归一化vRNA总量,并且然后相对于wtvRNA包装水平来计算掺入的百分比。病毒包装结果表示vRNA掺入的平均水平 \pm 得自两次独立病毒纯化的标准偏差,其中vRNA水平一式三份进行定量,n=6。

[0182] 小鼠感染:用异氟烷轻度地麻醉6到8周龄雌性BALB/C小鼠(Jackson Laboratory)组,并且用50 μ l 1000PFU野生型小鼠适应性PR8(H1N1)病毒(ATCC)、PB2突变的PR8重组病毒或无菌PBS进行鼻内感染。每天测量体中,并且在第10天或当体重减轻超过20%时人道地处死动物。所有动物护理和实验程序均遵照了《美国国立卫生研究院实验室动物护理和使用健康指南(National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals)》,并且经斯坦福大学实验室动物护理管理委员会批准。

[0183] 锁核酸(LNA)设计和制备:含有锁核酸(LNA)的寡核苷酸从Exiqon定制合成。大写字母表示LNA。小写字母表示典型(非锁)DNA核苷酸。所有寡核苷酸都含有硫代磷酸酯核苷间键。LNA被设计为与片段PB2的PSL2结构中含有的不同序列互补。LNA 8和9被设计为含有一段6到8个DNA核苷酸以用于RNase-H募集。所有LNA的序列如下所示。

[0184] LNA 1:5'AccAaaAGaaT 3'(SEQ ID NO:67)

[0185] LNA 2:5'TggCcATcaaT 3'(SEQ ID NO:68)

[0186] LNA 3:5'TagCaTActtA 3'(SEQ ID NO:69)

[0187] LNA 4:5'CCAAAAGA 3'(SEQ ID NO:70)

[0188] LNA 5:5'CATACTTA 3'(SEQ ID NO:71)

[0189] LNA 6:5'CagaCaCGaCCaaAA 3'(SEQ ID NO:72)

[0190] LNA 7:5'TAcTtaCTgaCagCC 3'(SEQ ID NO:73)

[0191] LNA 8:5'AGACacgaccaAAAG 3'—具有RNase-H活性(SEQ ID NO:74)

[0192] LNA 9:5'TACTtactgacaGCC 3'—具有RNase-H活性(SEQ ID NO:75)

[0193] LNA9.2:5'TACttactgacAGCC 3'(SEQ ID NO:76)

[0194] LNA 10:5'ACCaaaagAAT 3'(SEQ ID NO:77)

[0195] LNA 11:5'TGGccatcAAT 3'(SEQ ID NO:78)

[0196] LNA 12:5'TAGcatacTTA 3'(SEQ ID NO:79)

[0197] LNA 13:5'CgacCAaaAGaattC 3'(SEQ ID NO:80)

[0198] LNA 14:5'CGACcaaaagaATTC 3'(SEQ ID NO:81)

[0199] LNA 15:5'GaTGgCcATcaAttA 3'(SEQ ID NO:82)

[0200] LNA 16:5'GATGgccatcaATTA 3'(SEQ ID NO:83)

[0201] LNA 17:5'TcTAgCaTActTacT 3'(SEQ ID NO:84)

[0202] LNA 18:5'TCTAgcatactTACT 3'(SEQ ID NO:85)

[0203] LNA 19:5'GAAttcggatgGCCA 3' (SEQ ID NO:86)

[0204] LNA 20:5'GGCCatcaattaGTG 3' (SEQ ID NO:87)

[0205] LNA 21:5'TTCGgatggccaTCA 3' (SEQ ID NO:88)

[0206] LNA 22:5'AGCCagacagCGA 3' (SEQ ID NO:89)

[0207] LNA 23:5'GACAgccagacaGCA 3' (SEQ ID NO:90)

[0208] 以下寡核苷酸被设计为涵盖PSL2序列中的单核苷酸多态性(SNP)。以下示例性序列是具有单一突变位点的LNA9的修饰形式,其将会进行保护以免受所具有的PLS2序列含有LNA9靶序列的核苷酸变化的少数禽类和蝙蝠菌株的影响。讲理解,类似设计可应用于本文所述的任何序列。

[0209] LNA9.G74C:5'TACTtactgacaGTC 3' (SEQ ID NO:94)

[0210] LNA9.T80C:5'TACTtaccgacaGCC 3' (SEQ ID NO:95)

[0211] LNA19.U56C:5'GGATttcggatggCCA 3' (SEQ ID NO:96)

[0212] 抗病毒测定:将LNA在100 μ M的不含RNase的水中重构、等分,并且在单次使用之前在-20 $^{\circ}$ C下进行储存。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 3000 (Life Technology)将LNA转染到终浓度为1 μ M、100nM、10nM和1nM的细胞中。对于预防性抗病毒测定,在用指定LNA进行转染之前的24小时将10⁶个MDCK细胞接种在6孔板中。然后用0.01MOI的PR8 (H1N1)或HK68 (H3N2)病毒在转染后4小时、2小时或1小时感染细胞。对于感染后、治疗性抗病毒评估,如所述的用PR8或HK68感染MDCK细胞。然后在感染后4小时、2小时或1小时转染LNA。在感染后48小时之后,收集上清液,并且通过斑块测定来确定病毒滴度。

[0213] vRNA的体外转录:对于每种野生型隔离株 (PR8、1918、VN1203、NY470、NY312、CA09和A/安徽/1/2013H7N9)和PR8包装突变体克隆,使用在T7启动子下的片段特异性引物从质粒扩增PB2cDNA。使用Invitrogen DNA凝胶药剂盒凝胶纯化扩增cDNA。然后使用T7-MEGAscript通过体外转录产生vRNA。通过MEGAclean (ThermoFisher, 目录号AM1908)纯化用于SHAPE的vRNA,其中纯度和长度是通过毛细管电泳检验。

[0214] vRNA的sf-SHAPE分析:将PB2vRNA在100mM HEPES (pH=8)中折叠(100mM NaCl; 2.5mM MgCl₂; 65 $^{\circ}$ C达1分钟,在室温下冷却5分钟,在37 $^{\circ}$ C下达20到30分钟)。用NMIA进行2分钟酰化(Wilkinson等人,2006年)并且在45 $^{\circ}$ C反下执行转录(RT)引物延伸达1分钟,在52 $^{\circ}$ C下达25分钟,在65 $^{\circ}$ C下达5分钟,如先前所述(Mortimer和Weeks,2009年)。6FAM用于所有标记引物。这些方案的例外情况如下:(i)使用RNA C&C柱(Zymo Research)执行在酰化之后的RNA纯化,而非使用乙醇沉淀执行;(ii)在加入SHAPE引物缓冲液之前和之后,将混合物在室温下放置2到5分钟,这显著地增强RT转录产率;(iii)使用呈96孔形式的Sephadex G-50大小排阻树脂执行DNA纯化,然后通过真空离心使其浓缩,从而造成更大量的引物去除;(iv)在ddGTP RNA测序反应中使用2pmol RNA。

[0215] 将ABI 3100遗传分析仪(填充有POP6基质的50cm毛细管)设定为以下参数:电压15kV,T=60 $^{\circ}$ C,注入时间=15秒。GeneScan程序用于获取每个样本的数据,该数据由重悬于9.75 μ l Hi-Di甲酰胺中的纯化DNA组成,向其中添加了0.25 μ l的ROX 500内大小标准(ABI Cat.602912)。将PeakScanner参数设定为以下参数:平滑=无;窗口大小=25;大小调用=局部Southern;基线窗口=51;峰值阈值=15。片段250和340在计算上被排除于ROX500标准(Akbari等人,2008年)。然后,通过使用FAST(SHAPE痕迹的快速分析)、自定义程序(Pang等

人,2011年)将来自PeakScanner的数据处理成SHAPE数据。FAST自动地校正因处理错误引起的信号差异、调整信号衰减,并且使用ddGTP阶梯作为外部大小设定标准和局部Southern方法(Pang等,2011年,以及Pang等,2012年)将片段长度转换为核苷酸位置。

[0216] RNA结构参数:最初尝试2.6和-0.8千卡/摩尔的斜率和截距参数,如所提出(Deigan等人,2009年);发现接近0.0kcal/mol(例如~-0.3)的较小截距以产生较少的不是最佳的结构(在10%的最大能量差内)。此次要参数差异可能是由于通过自动FAST算法在实验数据和对照数据集之间实现的精确拟合而造成。在其当前的实现方式中,FAST整合到RNA结构中,其需要MFC(Microsoft基础类)。使用RNAviz 2(De Rijk等人,2003年)绘制RNA结构并为其着色,并且在Adobe Illustrator中最终定型。

[0217] 用于突变和映射实验的构建设计、RNA合成和化学修饰:通过如先前所述的自动MATLAB脚本设计的DNA寡聚体的PCR组装制备双链DNA模板(NA_Thermo,在“https:”后接“//github.”再接“com/DasLab/NA_thermo”处提供)(Kladwang和Cordero等人,2011年)。用于突变和映射(M^2)的构建体包括Watson-Crick对应物的所有单突变体。基于建议二级结构中的碱基配对而设计了用于突变/挽救的补偿突变体(Tian等人,2014年)。体外转录反应、RNA纯化和定量步骤如先前所述(Kladwang和Cordero等人,2011年)。如先前所述的一维化学映射、突变和映射(M^2)、以及突变/挽救以96孔格式执行(Kladwang和VanLang等人,2011年;Kladwang和Cordero等人,2011年;Cordero等人,2013年)。简而言之,将RNA加热并冷却以去除二级结构的异质性;然后适当地折叠并用SHAPE试剂(5mg/mL 1-甲基-7-硝基异酸酐(1M7))(Mortimer和Weeks,2007年)温育;猝灭修饰反应且通过聚(dT)磁珠(Ambion)和FAM标记的Tail2-A20引物来恢复RNA;用70%乙醇(EtOH)洗涤RNA两次且将其重悬于ddH₂O中;接着反转录成cDNA且进行加热NaOH处理以去除RNA。通过磁珠分离、冲洗、用ROX-350阶梯在Hi-Di甲酰胺(Applied Biosystems)中洗脱、加载到毛细管电泳测序仪(ABI3100)来恢复最终cDNA库。数据处理、结构建模和数据存储:HiTRACE软件包2.0版用于分析CE数据(MATLAB工具箱和Web服务器两者均可用(Yoon等人,2011年;Kim等人,2013年))。如先前所述的,完成迹线对准、基线减法、序列分配、轮廓拟合、衰减校正和归一化(Kim等人,2009年;Kladwang等人,2014年)。通过从测序阶梯的验证来手动地完成序列分配。使用RNA结构包5.4版的折叠程序(Mathews等人,2004年)来获得数据驱动的二级结构模型,具有2.6kcal/mol和-0.8kcal/mol的伪能量斜率和截距参数。如先前所述的计算 M^2 数据集的二维Z得分矩阵和在螺旋方向上自举置的信度值(Tian等人,2014年;Kladwang和VanLang等人,2011年)。Z得分矩阵用作碱基对的伪自由能,其斜率和截距为1.0kcal/mol和0kcal/mol。二级结构图像由VARNA(Darty等人,2009年)产生。所有化学映射数据集,包含一维映射、突变和映射、以及突变/挽救都已存放在RNA映射数据库(“http:”后接“//rmdb.stanford.”,再接“edu”)(Cordero等人,2012年)。

[0218] LNA靶向vRNA的SHAPE分析:通过DNA寡聚体的PCR组装制备PR8片段PB2的DNA模板,并且体外转录反应\RNA纯化和定量步骤如先前所述的(Kladwang和VanLang等人,2011年)。以96孔板形式执行一维SHAPE化学映射,如上所述,除了以下例外之外:一旦RNA变性且如所述的那样重新折叠,将100nM的每种制备的LNA添加到折叠的RNA中并与5mg/mL SHAPE试剂1M7(1-甲基-7-硝基异酸酐)一起温育。如所述的进行修饰猝灭、RNA恢复、重悬、反转录、cDNA测序和数据处理,参见Kladwang和VanLang等人,2011年。

[0219] 实例1:

[0220] IAV片段PB2包装信号的SHAPE表征鉴定保守结构

[0221] 通过引物延伸 (SHAPE) 分析的选择性2'-羟基酰化和计算建模被应用于IAV片段PB2基因组vRNA以搜索结构化RNA结构域。来自菌株A/波多黎各/8/1934 (H1N1) “PR8”的体外转录的全长(-)-有义PB2 vRNA在溶液中折叠 (Pang等人, 2011年) 且使用优先地与存在于柔性、单链状态下的核苷酸反应的亲电子SHAPE试剂进行询问。与存在于柔性单链状态的核苷酸反应 (Wilkinson等人, 2006年) (图1)。此分析揭示2341-nt vRNA中的大部分在很大程度上是非结构化的 (图2), 其与最近的生物信息学研究一致, 最近的生物信息学研究发现对于所有片段 (包含PB2) 来说, 在(-)-有义RNA上比在(-)-有义RNA上更有可能是RNA二级结构保守的 (Priore等人, 2012年; Moss等人, 2011年)。这些先前的研究没有分析末端编码区域 (TCR), 而是在PB2 5' TCR短短结束时停止80个核苷酸。SHAPE引导的建模提出此区域中的若干区域含有稳定RNA二级结构、最显著地是茎-环基序, 在本文中称为包装茎-环2 (PSL2) (图1A), 包括核苷酸34到87 ((-)-有义符号)。此片段包含先前经由未鉴定的机制通过突变分析暗指的一组核苷酸 (图1A到1B, 参见带圆圈的核苷酸) (Gao等人, 2012年; Marsh等人, 2008年; Liang等人, 2008年; Gog等人, 2007年)。支持这些先前突变通过破坏PSL2结构起作用的假设, 突变体的SHAPE分析产生不同构象, 这些构象都消除了野生型PSL2结构 (图1C, 图3)。涵盖PSL2的60个核苷酸区域在季节性的以及不同亚型和物种起源的大流行的菌株之间的单核苷酸水平上显示接近100%的序列保守性 (图4), 表明存在严格的生物学要求以维持完整的PSL2结构体。因为PB2 vRNA内的不同下游序列可以更改PSL2的二级结构, 因此通过对与多种IAV菌株和亚型隔离的全长野生型PB2 vRNA执行SHAPE分析来探索PSL2的结构保守性, 包括高致病性禽H5N1和大流行1918年H1N1菌株。虽然在茎-环内存在两个不同驱动的核苷酸并且在侧翼序列中存在显著差异, 但是在穿过这些不同物种和亚型 (图1D到1F) 的PB2 RNA的SHAPE引导模型中恢复了PSL2茎-环结构 (图1D-1F)。

[0222] 图1A到图1F示出了对全长(-)-有义野生型PB2 vRNA执行的SHAPE化学映射。颜色表示SHAPE反应性, 其与核苷酸是单链的概率成比例。所有结构被截断以突出显示5'末端序列结构。能量=由使用SHAPE伪自由能参数的RNA结构建模算法生成的确定结构的 ΔG 自由能值。(图1A) 来自菌株A/Puerto Rico/8/1934 “PR8” (H1N1) 的野生型PB2 RNA二级结构对应于其中同义突变体被报告为影响PB2包装的核苷酸位点 (Gao等人, 2012年; Marsh等人, 2011年)。(图1B) 通过qPCR确定的 (图1a) 中的同义突变体的包装效率。结果一式三份执行。误差条=±SD。以下的框表示突变体名称和对应的突变变化。核苷酸编号在基因组(-)-有义方向上示出。(图1C) PB2包装缺陷突变体vRNA、m757 (G44C) 和m745 (A80U) 的SHAPE确定的结构。黑框=同义突变的位点, (图1D到图1F) 来自大流行和高致病性菌株的野生型PB2的SHAPE确定的结构, 包含不同亚型: (图1D) 1918年大流行 (A/Brevig Mission/1/1918 (H1N1))、(图1E) 高致病性禽 (A/越南/1203/2004 (H5N1))、(图1F) 2009年大流行 '猪' (A/加利福尼亚州/04/2009 (H1N1))。

[0223] 图2, 小板A到B示出全长PB2 vRNA的SHAPE反应性。(图2, 小图A) 作为来自IAV菌株A/波多黎各/8/1934 (H1N1) 的全长(-)-有义PB2 vRNA的核苷酸位置的函数的平均SHAPE反应性 (窗仓大小=100nt)。PSL2区域 (以蓝色突出显示, nts 34到86) 涵盖5'包装信号域, 其具有高密度密码子, 高密度密码子的第三位置是保守的, 并且具有vRNA内最低的SHAPE反应

性之一。在PSL2之后的区域是相对非结构化的,但是含有的1核苷酸在存在在400与1500个之间的情况下的另一潜在位点。令人感兴趣的是,此第二内部区域也通过2011年生物信息学研究被预测为含有结构元素(参考文献19)。

[0224] (图2,小图B)来自(图2a)的PSL2区域的视图放大。窗仓大小=10nt。

[0225] 图3A到图3E示出了包装缺陷突变破坏野生型SHAPE反应性。左侧:将突变SHAPE反应性绘制为随WT的变化。核苷酸编号从(-)-有义vRNA的5'末端开始。橙色条表示突变位点。能量值表示由使用SHAPE伪自由能参数的RNA结构建模算法产生的预测结构的 ΔG 自由能。右侧:来自PR8菌属(H1N1)的全长(-)-有义突变PB2 vRNA的SHAPE确定的结构截断图像以突出显示5'末端区域。(图3A)野生型包装缺陷突变体:(图3B)m744b(AG83,85UA)。(图3C)m745(A80U)。(图3D)m55c(CU35,36UC)。(图3E)m757(G44C)。

[0226] 图4示出了含有PSL2结构的核苷酸序列的保守性。跨多种甲型流感病毒亚型和菌株的核酸序列比对的图形表示(“weblogo.”后接“berkeley”再接“.edu”)。总高度表示该核苷酸位置的序列保守性,而每个位置内的符号的高度表示在该位点处的每个核苷酸的相对频率。黑框=PSL2区域。比对中包含的序列:高致病性A/布瑞维格米申/1/1918(H1N1)、大流行“猪流感”A/加利福尼亚州/04/2009(H1N1)、现代人类A/纽约/470/2004(H3N2)、人类A/波多黎各/8/1934(H1N1)、高致病性禽A/越南/03/2004(H5N1)、人类A/香港/8/1968(H3N2)和人类A/纽约/312/2001(H1N1)。RNA核苷酸按(-)-有义方向编号。对应于以上序列的PB2的末端5'区域进行序列比对。带阴影的蓝框涵盖PSL2 RNA二级结构元件。黑点表示不同的核苷酸位点。

[0227] 突变和映射策略验证PSL2结构且预测新颖包装突变体。

[0228] 为了进一步测试PSL2 RNA结构的SHAPE分析且揭示体内测试所需的另外的信息性突变,将多维化学映射(Kladwang和Das,2010年)方法应用于PSL2片段。首先,突变和映射(M^2)测量确认在每个茎残基的系统性突变后化学反应性模式的破坏,包括先前发现对PB2包装很关键的核苷酸的变化(图5A,参见指出领域)(Marsh等人,2009年;Gog等,2007年)。基于这些 M^2 数据的自动计算分析以高置信度恢复SHAPE引导的PSL2结构(图1C、图3、图5B到图5D)而进一步验证结构模型。其次,作为预测测试,设计补偿突变以恢复野生型茎-环结构中被初始包装缺陷突变破坏的碱基对(图6,小图A到B)。这些突变-挽救变体确实恢复PSL2SHAPE模式,从而提供建模结构的碱基对分辨率体外验证且提出测试PSL2结构在体内的作用的序列变体。

[0229] 图5A到图5D示出PSL2 RNA二级结构的二维突变和映射(M^2)分析。(图5A)系统性单核苷酸突变和所得化学可及性的映射揭示RNA的三维结构中的相互作用。在来自PR8菌株PB2的PSL2元素的单核苷酸分辨率下跨88个单一突变以灰度(黑色=最高SHAPE反应性)绘制化学可及性。反应性峰(从左至右)对应于来自PB2 RNA的5'至3'末端的核苷酸。对应于已知包装突变的核苷酸位点(如Marsh等人,2008年所报告)在右侧以蓝色指示。红色箭头表示通过 M^2 分析预测的主要包装缺陷突变位点。(图5B)通过Z得分分析的隔离的突变和映射数据的强力特征(与每个残基的平均值的标准偏差的数量)。通过在所有突变体中减去此核苷酸的平均反应性并除以标准偏差(在HiTRACE中的output_zscore_from_rdat)来计算每个核苷酸反应性的Z得分。正方形示出由突变和映射数据引导的二级结构模型。暗信号突出显示结构化核苷酸配对证据。(图5C)用于得自将Z-得分结合到RNA结构建模算法中的5'包

装信号区域(nts 30到93):作为绿色百分比值而给出的自举置信度估计。自举值提供数字上准确的结构置信度指标。低自举置信度值表明存在替代结构模型。(图5D)被示出为灰度阴影的每个碱基对的自举支持值。

[0230] 图6示出体对先前描述的PR8 PB2突变的补偿突变的设计。(图6,小图A)先前描述的同义突变体(m757、m745、m55c)映射到PSL2结构上。(图6,小图B)补偿突变(m55c-补偿、m745-补偿和m757-补偿)基于SHAPE以及突变和映射化学分析而设计在被预测为恢复野生型PSL2结构的位点处。加有黑框

[0231] 核苷酸表示补偿突变的位点。示出(-)-有义vRNA取向。对于需要非同义变化来恢复结构的突变,指示编码的蛋白质序列的改变。

[0232] 为了测试在溶液中观察到的PSL2茎-环结构是否与细胞环境中的病毒包装相关,由Gog等人,2007年和Marsh等人,2008年报告的相的九个同义突变(图1A到图1B,图7,小图A)以及通过M²分析表征的四个新的同义突变(图7,小图B)被克隆到含有PR8 PB2基因的pDZ质粒中(Marsh等人,2008年;Liang等人,2008年;Gog等人,2007年)(图8)。现在在PR8背景中的9种先前已知的突变体的包装效率与最初在WSN33病毒中描述的那些相当¹⁵(图7,小图C)。其中,基于突变体m55c、m757、m745和m744b在PSL2茎区域内的位置而对它们进行预测以显示出最显著的损伤(图1C、图3A到图3F、图7)。相比之下,所公布的突变对映射到非结构化顶环或落在PSL2外的PB2包装(例如m731)无影响,并且没有更改其结构完整性(图9A)。(Marsh等人,2008年)。通过M²分析鉴定为对体外PSL2结构(图5A)有显著影响的三种新颖同义突变体(m74-1、m74-2和m68)示出在PB2包装中的显著损失,而造成SHAPE活性的可忽略不计的变化的突变位点相较野生型PSL2结构来说给出了野生型包装效率水平(例如,m56)(例如(图7,小图D))。

[0233] 图7示出了子PR8 PB2 vRNA的单个高度保守的密码的同义突变。(图7,小图A)涉及PB2包装的先前公布的同义突变。上线是亲本PR8vRNA序列((+)-有义方向),并且突变的单核苷酸在下面的线上不用红色加粗。引入突变的编号和命名基于Marsh等人,2008和Gog等人,2007年的报告。黄色突出显示区域指示含有PSL2结构的序列。(图7,小图B)用于克隆从M²分析鉴定的同义突变(参见补充图4a)到pDZ质粒中的引物序列的设计。序列在(+)-有义方向上。突出显示的核苷酸=突变位点。(图7,小图C到D)(图7,小图C,先前公布的同义突变体)和(图7,小图D,M²分析鉴定的同义突变体)的表示突变体PB2包装相对于亲本野生型PB2的百分比的包装效率。来自两个独立实验的结果,一式三份执行测定(n=6)。误差条表示±SD。

[0234] 图8描绘表明PB2包装突变体命名和对应的突变位点的表。突变命名图表指示来自以下的突变的名称和位点:1)基于Marsh等人,2008年和Gog等人,2007年的报告,先前公布的PB2包装中涉及的同义突变(以蓝色显示);以及2)PSL2结构设计的单突变体(如黑色显示)和双补偿突变体(以红色显示)。引入突变的编号和命名基于基因组(-)-有义vRNA。其中突变导致蛋白编码变化的实例由同义(SYN)或非同义(非SYN)字段指示。

[0235] 图9A到图9C示出同义突变对PSL2结构的影响。左侧:通过对来自PR8菌株的全长(-)-有义PB2 vRNA的sf-SHAPE分析来确定PB2包装突变体的预测的RNA二级结构。仅为了清楚起见,野生型结构示出在右上角框中。右侧:SHAPE反应性图被示出为突变性反应性相对于野生型的变化。能量值和%包装效率如在下图标题中所示。突变体:(图9A)m731。(图9B)

m751。(图9C)m748。对于先前所述的突变体中的每种,PB2掺入的%包装效率以蓝色突出显示。

[0236] 补偿突变不仅挽救片段PB2的病毒包装(图10,小图A到C图6,小图A到B),还挽救了先前报告受有害突变的影响的其它片段,在IAV包装中与PB2的所提出的分层作用一致(Muramoto等人,2006年;Gao等人,2012年;Marsh等人,2008年)(图10,小图D到F)。除了回收PB2包装外,补偿突变还完全地或几乎完全地挽救由缺陷突变导致的病毒滴度损失(图10,小图G到I)。一些非同义补偿突变能够比其它更好地恢复PB2包装(m745-补偿和m55c-补偿,相较于m757-补偿来说)(图10,小图A到C),从而可能反映PB2蛋白功能的通过外源性添加的不完全地恢复。这种外源性添加是必要的,因为一些非同义突变影响PSL2结构和蛋白序列两者。对PSL2结构的最精准的测试来自不需要添加补充的野生型PB2蛋白的包装实验。基于计算枚举和多维突变-挽救实验(Tian等人,2014年),发现单一突变-挽救对取代物,它们都是同义词,从而避免野生型PB2蛋白的添加(m52/m65,图11,小图A到B,图12,小图s,图13)。单独进行每个突变(m52和m65)造成低于4%PB2掺入的包装效率和超过 $4\log_{10}$ 的滴度损失-超出先前报告的极度损害(即, $2\log_{10}$)以用于包装缺陷病毒(图11,小图C到D,图7,小图c,图10)。当一起引入恢复PSL2结构的双重突变的m52/65-补偿菌株时,虽然序列发生更改,但是补偿突变将包装效率和病毒滴度恢复到野生型水平。

[0237] 图10,小图A到,示出PR8 PB2包装缺陷突变体中的补偿突变对病毒包装和滴度的影响。(图10,小图A到C)包装缺陷和补偿突变PB2 vRNA的包装效率。对于需要非同义变化的补偿突变来说,在病毒挽救期间共转染野生型PB2蛋白表达质粒。pWT=针对野生型PR8 PB2蛋白的表达质粒编码。相较wt亲本PR8病毒,值以PB2vRNA包装的百分比给出。来自两个独立实验的结果,一式三份执行测定(n=6)。(图,小图D到F)包装缺陷和补偿突变病毒的包装效率及其对其它相互作用片段PB1、PA、NP和MX的包装的影响。一式三份执行测定(n=6)。(图10,小图G到I)通过斑块测定的病毒滴度。结果以PFU/mL表示,一式三份执行测定。

[0238] 图11示出多维化学映射揭示新颖PB2包装缺陷和补偿突变配偶体。(图11,小图A)电泳图谱源自与个体和补偿双突变的挽救(突变-映射-挽救)分析的系统单核苷酸突变映射以测试来自1-D数据引导模型的碱基配对且鉴定经预测的成功同义PSL2缺陷和补偿突变的。在来自PR8菌株PB2的PSL2元素的单核苷酸分辨率下跨88个单一突变以灰度(黑色=最高SHAPE反应性)绘制化学可及性。。反应性峰(从左至右)对应于来自PB2 RNA的5'至3'末端的核苷酸。参见图12获得突变-挽救对的完整列表。(图11,小图B)单突变体m52(G52U)和m65(C65A)的突变设计,以及PSL2结构上的双m52/65挽救对。(图11,小图C)同义单突变体和双突变体。相较wt亲本PR8病毒,值以PB2 vRNA包装的百分比给出。来自两个独立实验的结果,一式三份执行测定(n=6)。(图11,图D)以PFU/mL计的病毒滴度,一式三份。误差条表示 \pm SD。

[0239] 图12,小图a到t,示出了二维突变-映射-挽救分析。突变/挽救结果验证PSL2 RNA二级结构。具有补偿双突变的SHAPE分析的电泳图用于测试来自1-D数据引导模型的碱基配对且鉴定成功PSL2缺陷和补偿突变体对。在来自PR8菌株PB2的PSL2元素的单核苷酸分辨率下跨88个单一突变以灰度(黑色=最高SHAPE反应性)绘制化学可及性。。对于每个测试的配对,将野生型、单突变体1、单突变体2和补偿双突变体的“四联体”分组以用于比较。(图12,图a到r)非同义突变-挽救对。所有非框式电泳图都是用于未观察到破坏和/或挽救的配对。

蓝框表示成功缺陷和挽救突变。(图12,小图s) 双同义突变和挽救对。绿框=成功同义缺陷和救援对。(图12,小图t) 用于非同义突变和救援对的包装效率。相较wt亲本PR8病毒,值以PB2 vRNA包装的百分比给出。来自两个独立实验的结果,一式三份执行测定(n=6)。误差条表示±S.D.。

[0240] 图13示出了二维突变-映射-挽救(M2R)突变体的引物序列的设计。SEQ ID NO:(28-43)从上到下。引物序列用于将M2R突变体QuickChange突变克隆成pDZ质粒。序列在(+)-有义方向上。左侧字段表明同义(Syn.)或非同义(Non-syn.)更改。突出显示的核苷酸=突变位点。加框的突变引物组表示双同义突变配偶体,即m52和m65。

[0241] 为了测试PSL2结构在体内模型中的相关性,用1000PFU野生型PR8病毒或用1000PFU的携带被预测为破坏或恢复PSL2结构的菌株鼻内接种6到8周龄BALB/C小鼠。用PSL2破坏突变-m745突变株(20%包装效率)或严密包装缺陷的单突变体病毒感染m52的小鼠(<4%包装效率)分别示出,相较PBS对照来说在体重减轻或存活率上具有少到没有疾病的临床症状(图14,小图A到B)。值得注意的是,包含恢复PSL2结构的补偿突变挽救病毒致病性:用m52/65-补偿和m745-补偿感染的动物,显示与野生型PR8感染的小鼠相当的死亡率谱和存活率曲线(图14,小图A到B)。与APLAC指南一致地,所有小鼠在达到超过20%的体重减轻时被人道地处死。

[0242] 图14,小图A到B示出了包装缺陷病毒在体内衰减。受到单个PSL2破坏和补偿、PSL2恢复双突变体病毒感染的小鼠的%体重减轻和%存活率。6到8周龄BALB/C雌性小鼠鼻内感染1000PFU的PR8野生型(wt)病毒,包装缺陷的单突变病毒者、m52和m745、补偿性双突变病毒、m52/65和m745-补偿,或PBS控制。每天监测小鼠的第0天%体重减轻和%存活率。结果为两次独立实验的平均值,在每个状况下6只小鼠。(图14,小图A)重量减轻%。(图14,小图B)在(图14,小图A)中描绘的单独团组的Kaplan-Meier存活率曲线图。

[0243] 实例2:

[0244] PSL2结构的治疗设计和靶向体外和体内的IAV感染

[0245] 为了探索靶向PSL2介导的病毒包装的治疗潜力,针对被预测为破坏元素的整体RNA二级结构且由此抑制病毒产生的关键残基设计9种含有硫代磷酸酯核苷间键的锁核酸(LNA)(Vester和Wengel,2004年)(图15,小图A)。经设计的LNA中的两个,即LNA8和LNA9,分别与LNA6和LNA7的序列相同,但是具有针对RNase-H活化优化的6到7个未修饰的(非锁)DNA核苷酸。首先,为了评估LNA结合对PSL2 RNA二级结构的影响,在LNA存在下对PB2 vRNA执行了趾纹检测和SHAPE化学映射。在用抗病毒测定结果的确证中,LNA 6到9中编码的序列呈现结合且破坏野生型PSL2结构的最大能力(图16)。

[0246] 图15,小图A-D示出靶向PSL2 RNA结构的锁核酸在体外和体内显示有效的抗病毒活性。(图15,小图A)针对PSL2结构的不同区域设计的互补锁核酸(LNA)的位置。(图15,小图B)为了筛选LNA的抗病毒活性,通过Lipofectamine转染用100nM的每个指定的LNA预处理MDCK细胞达1小时,然后用0.01MOI的PR8(H1N1)病毒或A/香港/感染/8/68(H3N2)病毒感染。感染后48小时,收集上清液且通过斑块测定确定病毒滴度。结果来自2个独立实验,一式三份执行测定(n=6)。(图15,小图C)在滴定浓度(100nM、10nM、1nM)下用LNA9进行预处理(RX)与感染后处理的时间过程。WT+Lipo=用Lipofectamine对照物感染。预处理:在感染前2小时或4小时,用LNA9处理6孔板中的融合MDCK细胞。在指定的时间点上去除处理过的上清液,

并且用0.01MOI wt PR8病毒感染细胞达1小时。对于感染后治疗：用0.01MOI PR8病毒感染MDCK细胞达1小时，然后更换上清液，并且在感染后2或4小时用LNA9处理细胞。48小时后收集上清液，并且通过一式三份进行斑块测定来确定测定病毒滴度。图15，小图d示出鼻内LNA处理对感染病毒的小鼠的存活率的影响。在感染PR8病毒之前12小时，小鼠鼻内施用20ug LNA9、乱序LNA或PBS（未感染对照物）。所有小鼠在8hpi和36hpi下接受另外两次治疗（在每个状况下，n=7只小鼠）。

[0247] 图16A到图16B示出对LNA-RNA结合的SHAPE分析。（图16A）在PR8 PB2 vRNA存在下对LNA 1、2、4、5、6/8和7/9（100nM）执行的SHAPE分析的电泳图谱。加入S1，即，与丙型肝炎病毒IRES RNA相互作用的小分子，作为RNA结合的对照。左侧的列，没有SHAPE试剂的未标记反应，1M7。右侧：带标记试剂。（图16B）在滴定LNA浓度时对LNA-vRNA组合执行的SHAPE的电泳图谱。对于每个LNA来说，左侧列组没有标记试剂。

[0248] 然后，在第一中试试验中，确定LNA介导的PSL2靶向在两种不同IAV亚型上的抗病毒潜力，用100nM的每个LNA预处理MDCK细胞，并且通过Lipofectamine™转染递送达1小时，然后感染0.01MOI野生型PR8（H1N1）病毒或组织培养的适应性A/香港/8/68（HK68）（H3N2）病毒。感染后48小时，收集上清液，并且通过斑块测定来测量病毒产生（图15，小图B）。仅针对PSL2（LNA1、LNA4）的顶环的LNA对病毒滴度的影响少到没有。类似地，靶向PSL2的3'碱基的LNA 3和5也无法抑制病毒产生。相比之下，LNA6对顶环和中部凸块两者的核苷酸覆盖造成PR8的大于2log₁₀的滴度缺损（图15，小图A到B）。LNA8，即，RNA-H活化的LNA6拷贝，对两种病毒产生了更高的抗病毒活性，最高达3个对数。最引人注目的是，LNA9，即，RNA-H激活的LNA7拷贝，具有最强的抗病毒能力，从而使病毒生产分别针对PR8和HK68降低近5个对数和4个对数的病毒。

[0249] 在鉴定最佳候选LNA后，进一步研究了LNA9抗病毒活性的治疗时程和浓度参数。在感染之前2小时或4小时，或在用0.01MOI野生型PR8病毒感染之后2或4小时用一剂10倍稀释的LNA9处理MDCK细胞。用LNA预处理的细胞具有最有效抗病毒反应（大于4个对数），并且即使在最低稀释度（1nM）下也显示出强烈的病毒抑制（大于2个对数）（图15，小图C）。随着感染后治疗时间增加，存在降低抗病毒活性的趋势，但是即使在最近测试的添加时间点上，也实现了大于3个对数的病毒滴度抑制。

[0250] 实例3：

[0251] 体内功效实验：延长单剂量预防性

[0252] Ba1b/C雌性小鼠（5只小鼠/组）在用致死剂量的野生型PR8型病毒感染之前3天（第3天）或感染之前1天（第-1天）用单剂量20ug LNA9来鼻内预处理。每天监测小鼠的体重减轻、临床评分和存活率。图17，小图A示出小鼠随时间的%存活率。图17，小图B示出在施用后随时间的%体重减轻。

[0253] 在感染之前三天单次施用20ug LNA9完全地保护小鼠免于致命的流感疾病。平均5.5天，当未治疗的对照小鼠体重减轻超过25%时进行人道处死。相比之下，预处理组示出最小的体重减轻、少到没有的疾病临床症状，并且完全地恢复到感染前体重。

[0254] 此结果表明，在感染之前几天施用的单次可吸入剂量的LNA9可以提供针对致命疾病的持久保护，并且表明主题化合物可以用于在流感爆发和大流行期间的预防性治疗。

[0255] 实例4：

[0256] 在药物存在下连续传代之后,流感病毒对奥塞米韦和LNA9的易感性:药物选择实验

[0257] 奥塞米韦(Tamiflu)是市场上最广泛地使用和储存的神经氨酸酶抑制剂(NAI)。就如所有NAI一样,奥司他韦需要在病毒神经氨酸酶(NA)蛋白中进行构象重排以适应药物。NA蛋白中影响此重排的任何突变都会降低奥司他韦的结合亲和力,从而降低药效。值得注意,H274Y突变体(也被称为H275Y突变,这取决于命名法)最通常地与奥司他韦抗性相关联。免疫功能低下患者体内的H274Y突变的快速选择可能引起最后一种NAI药物帕拉米韦的临床失败,这表明了免疫受损宿主体内的多药耐药病毒的选择可能比先前认为的更常见。这与最近在流通中耐奥司他韦和耐NAI的病毒的传播一起一般表明需要重新估计NAI的使用率。为了减少当前和未来流感大流行可能对人类健康造成的影响,必须发展新一类的抗病毒剂。

[0258] 含有PSL2茎-环的片段PB2中的序列区域在来自多种宿主物种的IAV亚型、菌株和隔离物上高度地保守,并且可能反映其遵从的严格生物学要求。此区域的SHAPE分析确认对不同亚型和宿主来源的季节性和大流行病毒之间PSL2结构的维持,其强烈地表明此结构元素可能是新的泛基因型治疗靶(并且因此LNA9具有广谱抗IAV隔离的潜力)。另外,由于受试者LNA针对高度保守的病毒基因组RNA靶,高度保守的病毒基因组RNA靶明显地对其突变能力有强烈限制,因此预期靶向PSL2的受试者LNA具有与NAI相比更高抗性发展屏障。

[0259] 已研究了在药物压力下连续传代之后的流感病毒对LNA9与奥司他韦的易感性。奥塞米韦具有在药物治疗的第1代上针对PR8的41nM的起始IC₅₀,通过斑块减少测定。在仅六次病毒传代且药物的量增大后,奥司他韦的IC₅₀跃升到50uM-增大1000倍。参见图18,小图A-D。相比之下,在LNA9存在下传代10次之后,IC₅₀在18到16pM下保持稳定。图19,小图A和B。

[0260] LNA9也可用于治疗耐药病毒。使用反转基因病毒挽救系统产生A/WSN/33(H1N1)病毒的抗药性突变体,反转基因病毒挽救系统使NA基因突变以含有H274Y抗性突变。针对这种病毒,奥司他韦具有53uM的IC₅₀。重要地,LNA9维持其对具有皮摩尔活性的WSN H274Y病毒的效力和功效。图19,小图C。此结果是用PSL2靶向LNA对抗NAI病毒的治疗性治疗的有力证据。此结果还突出了LNA9针对不同IAV隔离株的活性。

[0261] 参考文献

[0262] 1.M.J.Memoli,R.J.Hrabal,A.Hassantoufighi,M.C.Eichelberger,J.K.Taubenberger,《在2种免疫受损宿主的治疗期间快速地选择耐奥司他韦和帕拉米韦的大流行H1N1病毒(Rapid selection of oseltamivir-and peramivir-resistant pandemic H1N1 virus during therapy in 2 immunocompromised hosts)》,《临床感染疾病(Clin Infect Dis)》,第50卷,第1252到1255页(2010年);电子版5月1日在线出版(10.1086/651605)。

[0263] 2.R.Hai,M.Schmolke,V.H.Leyva-Grado,R.R.Thangavel,I.Margine,E.L.Jaffe,F.Krammer,A.Solorzano,A.Garcia-Sastre,P.Palese,N.M.Bouvier,《甲型流感(H7N9)病毒在不损失体内致病性或传染性的情况下得到神经氨酸酶抑制剂抗性(Influenza A (H7N9)virus gains neuraminidase inhibitor resistance without loss of in vivo virulence or transmissibility)》,《自然通讯(Nature Communications)》,第4卷,第2854页(2013年)10.1038/ncomms3854)。

- [0264] 3.F.G.Hayden,M.D.de Jong,《新发抗流感病毒抗性威胁 (Emerging influenza antiviral resistance threats)》,《感染疾病杂志 (J Infect Dis)》,第203卷,第6到10页 (2011年);电子版1月1日在线出版 (10.1093/infdis/jiq012)。
- [0265] 4.X.Liu,T.Li,Y.Zheng,K.W.Wong,S.Lu,H.Lu,《甲型流感 (H7N9) 病毒感染患者对奥司他韦治疗的反应不良 (Poor responses to oseltamivir treatment in a patient with influenza A (H7N9) virus infection)》,《新发微生物和感染物 (Emerging microbes&infections)》,第2卷,第27期 (2013年);电子版5月在线出版 (10.1038/emi.2013.30)。
- [0266] 5.J.Parsons,M.P.Castaldi,S.Dutta,S.M.Dibrov,D.L.Wyles,T.Hermann,《丙型肝炎病毒内部核糖体进入位点RNA的构象抑制 (Conformational inhibition of the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA)》,《自然化学生物 (Nat Chem Biol)》,第5卷,第823到825页 (2009年);电子版11月在线出版 (10.1038/nchembio.217)。
- [0267] 6.C.Romero-Lopez,A.Berzal-Herranz,《揭开编码为病毒RNA基因组结构基序的信息:潜在抗病毒靶 (Unmasking the information encoded as structural motifs of viral RNA genomes:a potential antiviral target)》,《医学病毒学杂志 (Rev Med Virol)》,第23卷,第340到354页 (2013年);电子版11月在线出版 (10.1002/rmv.1756)。
- [0268] 7.P.S.Palese,M.L.,《菲尔德病毒学 (Fields Virology)》,D.M.e.a.Knipe编著,《正粘病毒科 (Orthomyxoviridae)》(Lippincott Williams&Wilkins编著,第5版,2007年)。
- [0269] 8.R.W.Compans,J.Content,P.H.Duesberg,《流感病毒核糖核蛋白的结构 (Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus)》,《病毒学杂志 (J Virol)》,第10卷,第795到800页 (1972年);电子版10月在线出版 (
- [0270] 9.E.C.Hutchinson,J.C.von Kirchbach,J.R.Gog,P.Digard,《甲型流感病毒的基因组包装 (Genome packaging in influenza A virus)》,《普通病毒学杂志 (J Gen Virol)》,第91卷,第313到328页 (2010年);电子版2月在线出版 (10.1099/vir.0.017608-0)。
- [0271] 10.T.Noda,Y.Kawaoka,《流感病毒核糖核蛋白复合物的结构及其包装成病毒粒子 (Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions)》,《医学病毒学杂志 (Rev Med Virol)》,第20卷,第380到391页 (2010年);电子版11月在线出版 (10.1002/rmv.666)。
- [0272] 11.Y.Muramoto,A.Takada,K.Fujii,T.Noda,K.Iwatsuki-Horimoto,S.Watanabe,T.Horimoto,H.Kida,Y.Kawaoka,《病毒RNA (vRNA) 片段间的分层结构在vRNA结合到甲型流感病毒粒子中的作用 (Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions)》,《病毒学杂志 (J Virol)》,第80卷,第2318到2325页 (2006年);电子版3月在线出版 (10.1128/jvi.80.5.2318-2325.2006)。
- [0273] 12.Q.Gao,Y.Y.Chou,S.Doganay,R.Vafabakhsh,T.Ha,P.Palese,《甲型流感病毒 PB2、PA、NP和M片段在基因组包装期间起关键作用 (The influenza A virus PB2,PA,NP, and M segments play a pivotal role during genome packaging)》,《病毒学杂志 (JVirology)》,第86卷,第7043到7051页 (2012年);电子版7月在线出版 (10.1128/jvi.00662-12)。

[0274] 13.G.A.Marsh,R.Rabadan,A.J.Levine,P.Palese,《高度保守的甲型流感病毒区域聚合酶基因片段对于有效病毒RNA包装是关键 (Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging)》,《病毒学杂志 (J Virol)》,第82卷,第2295到2304页 (2008年);电子版3月在线出版 (10.1128/jvi.02267-07)。

[0275] 14.E.Fournier,V.Moules,B.Essere,J.C.Paillart,J.D.Sirbat,C.Isel,A.Cavalier,J.P.Rolland,D.Thomas,B.Lina,R.Marquet,《由甲型流感病毒基因组RNA片段形成的超分子组装体 (A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments)》,《核酸研究 (Nucleic Acids Res)》,第40卷,第2197到2209页 (2012年);电子版3月在线出版 (10.1093/nar/gkr985)。

[0276] 15.C.Gavazzi,C.Isel,E.Fournier,V.Moules,A.Cavalier,D.Thomas,B.Lina,R.Marquet,《禽H5N2甲型流感病毒的病毒RNA片段之间的分子间相互作用的体外网络:与人类H3N2病毒的比较 (An in vitro network of intermolecular interactions between viral RNA segments of an avian H5N2 influenza A virus:comparison with a human H3N2 virus)》,《核酸研究 (Nucleic Acids Res)》,第41卷,第1241到1254页 (2013年);电子版1月在线出版 (10.1093/nar/gks1181)。

[0277] 16.J.R.Gog,S.Afonso Edos,R.M.Dalton,I.Leclercq,L.Tiley,D.Elton,J.C.von Kirchbach,N.Naffakh,N.Escriou,P.Digard,《甲型流感病毒基因组中的密码子保守性限定RNA包装信号 (Codon conservation in the influenza A virus genome defines RNA packaging signals)》,《核酸研究 (Nucleic Acids Res)》,第35卷,第1897到1907页 (2007年) (10.1093/nar/gkm087)。

[0278] 17.W.N.Moss,S.F.Priore,D.H.Turner,《在整个甲型流感病毒编码区域中鉴定潜在保守RNA二级结构 (Identification of potential conserved RNA secondary structure throughout influenza A coding regions)》,《核糖核酸 (Rna)》,第17卷,第991到1011页 (2011年);电子版6月在线出版 (10.1261/rna.2619511)。

[0279] 18.Y.Liang,T.Huang,H.Ly,T.G.Parslow,《流感病毒PA、PB1和PB2基因组RNA片段中的包装信号的突变分析 (Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA,PB1,and PB2 genomic RNA segments)》,《病毒学杂志 (J Virol)》,第82卷,第229到236页 (2008年);电子版1月在线出版 (10.1128/JVI.01541-07)。

[0280] 19.K.A.Wilkinson,E.J.Merino,K.M.Weeks,《通过引物延伸 (SHAPE) 分析的选择性2'-羟基酰化:在单核苷酸分辨率下的定量RNA结构分析 (Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE):quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution)》,《自然-实验室指南 (Nature Protocols)》,第1卷,第1610到1616页 (2006年) (10.1038/nprot.2006.249)。

[0281] 20.P.S.Pang,M.Elazar,E.A.Pharm,J.S.Glenn,《通过SHAPE数据分析的自动化进行的简化RNA二级结构映射 (Simplified RNA secondary structure mapping by automation of SHAPE data analysis)》,《核酸研究 (Nucleic Acids Res)》,第39卷,第151期 (2011年);电子版12月在线出版 (10.1093/nar/gkr773)。

[0282] 21.S.F.Priore,W.N.Moss,D.H.Turner,《甲型流感病毒编码区域呈现宿主特异性

全局有序RNA结构 (Influenza A virus coding regions exhibit host-specific global ordered RNA structure)》,《公共科学图书馆·综合 (PLoS One)》,第7卷,第35989期 (2012年) (10.1371/journal.pone.0035989)。

[0283] 22.W.Kladwang,R.Das,《用于推断结构化核酸中的碱基对的突变和映射策略:DNA/RNA螺旋上的概念论证 (A mutate-and-map strategy for inferring base pairs in structured nucleic acids:proof of concept on a DNA/RNA helix)》,《生物化学 (Biochemistry)》,第49卷,第7414到7416页 (2010年);电子版9月7日在线出版 (10.1021/bi101123g)。

[0284] 23.S.Tian,P.Cordero,W.Kladwang,R.Das,《高通量突变-映射-挽救估计SHAPE定向的RNA结构且揭示激发态 (High-throughput mutate-map-rescue evaluates SHAPE-directed RNA structure and uncovers excited states)》,《核糖核酸 (Rna)》,第20卷,第1815到1826页 (2014年);电子版11月在线出版 (10.1261/rna.044321.114)。

[0285] 24.B.Vester,J.Wengel,《LNA (锁核酸):互补RNA和DNA的高亲和力靶向 (LNA (locked nucleic acid):high-affinity targeting of complementary RNA and DNA)》,《生物化学 (Biochemistry)》,第43卷,第13233到13241页 (2004年);电子版10月26日在线出版 (10.1021/bi0485732)。

[0286] 25.K.Klump,R.W.Ruigrok,F.Baudin,《流感病毒聚合酶和核蛋白在形成功能RNP结构中的作用 (Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure)》,《欧洲分子生物学会杂志 (Embo J)》,第16卷,第1248到1257页 (1997年);电子版3月17日在线出版 (10.1093/emboj/16.6.1248)。

[0287] 26.R.Coloma,J.M.Valpuesta,R.Arranz,J.L.Carrascosa,J.Ortin,J.Martin-Benito,《生物活性流感病毒核糖核蛋白复合物的结构 (The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex)》,《公共科学图书馆·病原体 (PLoS Pathog)》,第5卷,第1000491期 (2009年);电子版6月在线出版 (10.1371/journal.ppat.1000491)。

[0288] 27.F.Baudin,C.Bach,S.Cusack,R.W.Ruigrok,《流感病毒RNP的结构:I.流感病毒核蛋白将柄状RNA中的二级结构解链且将碱暴露于溶剂 (Structure of influenza virus RNP.I.Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent)》,《欧洲分子生物学会杂志 (Embo J)》,第13卷,第3158到3165页 (1994年);电子版7月1日在线出版 (

[0289] 28.T.Coelho,D.Adams,A.Silva,P.Lozeron,P.N.Hawkins,T.Mant,J.Perez,J.Chiesa,S.Warrington,E.Tranter,M.Munisamy,R.Falzone,J.Harrop,J.Cehelsky,B.R.Bettencourt,M.Geissler,J.S.Butler,A.Sehgal,R.E.Meyers,Q.Chen,T.Borland,R.M.Hutabarat,V.A.Clausen,R.Alvarez,K.Fitzgerald,C.Gamba-Vitalo,S.V.Nochar,A.K.Vaishnav,D.W.Sah,J.A.Gollob,O.B.Suhr,《用于转甲状腺素蛋白淀粉样变性的RNAi治疗的安全性和有效性 (Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis)》,《新英格兰医学杂志 (N Engl J Med)》,第369卷,第819到829页 (2013年);电子版8月29日在线出版 (10.1056/NEJMoal208760)。

[0290] 29.K.Fitzgerald,M.Frank-Kamenetsky,S.Shulga-Morskaya,A.Liebow,

B.R.Bettencourt, J.E.Sutherland, R.M.Hutabarat, V.A.Clausen, V.Karsten, J.Cehelsky, S.V.Noichur, V.Kotelianski, J.Horton, T.Mant, J.Chiesa, J.Ritter, M.Munisamy, A.K.Vaishnav, J.A.Gollob, A.Simon, 《RNA干扰药物对健康的志愿者体内前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/KEXIN 9型(PCSK9)合成和血清LDL胆固醇浓度的影响:随机、单盲、安慰剂对照的1期试验(Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9(PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers:a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial)》, 《柳叶刀(Lancet)》, 第383卷, 第60到68页(2014年); 电子版1月4日在线出版(10.1016/S0140-6736(13)61914-5)。

[0291] 30. J.Gottlieb, M.R.Zamora, T.Hodges, A.W.Musk, U.Sommerwerk, D.Dilling, S.Arcasoy, J.DeVincenzo, V.Karsten, S.Shah, B.R.Bettencourt, J.Cehelsky, S.Noichur, J.Gollob, A.Vaishnav, A.R.Simon, A.R.Glanville, 《用于预防肺移植受者在呼吸道合胞病毒感染之后的闭塞性细支气管炎综合征的ALN-RSV01(ALN-RSV01 for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome after respiratory syncytial virus infection in lung transplant recipients)》, 《心肺移植杂志(J Heart Lung Transplant)》, 第35卷, 第213到221页(2016年); 电子版2月在线出版(10.1016/j.healun.2015.08.012)。

[0292] 31. E.Hoffmann, G.Neumann, Y.Kawaoka, G.Hobom, R.G.Webster, 《用于从八种质粒产生甲型流感病毒的DNA转染系统(A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids)》, 《美国国家科学院学报(Proc Natl Acad Sci USA)》, 第97卷, 第6108到6113页(2000年); 电子版5月23日在线出版(10.1073/pnas.100133697)。

[0293] 32. K.J.Szretter, A.L.Balish, J.M.Katz, 《流感:传播、量化和储存(Influenza: propagation, quantification, and storage)》, 《微生物学实验指南(Current protocols in microbiology)》, 第15章, 第15G 11节(2006年); 电子版12月在线出版(10.1002/0471729256.mc15g01s3)。

[0294] 33. G.A.Marsh, R.Hatami, P.Palese, 《甲型流感病毒血凝素病毒RNA的特定残基对于有效包装到芽殖病毒粒子中是重要的(Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions)》, 《病毒学杂志(J Virol)》, 第81卷, 第9727到9736页(2007年); 电子版9月在线出版(10.1128/jvi.01144-07)。

[0295] 34. S.A.Mortimer, K.M.Weeks, 《时间分辨RNA SHAPE化学:在一秒快照中且在单核苷酸分辨率下进行的定量RNA结构分析(Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one-second snapshots and at single-nucleotide resolution)》, 《自然-实验室指南(Nature Protocols)》, 第4卷, 第1413到1421页(2009年)(10.1038/nprot.2009.126)。

[0296] 35. A.Akbari, G.Marthinsen, J.T.Lifjeld, F.Albregtsen, L.Wennerberg, N.C.Stenseth, K.S.Jakobsen, 《毛细管电泳中的改进的DNA片段长度估计(Improved DNA fragment length estimation in capillary electrophoresis)》, 《电泳(Electrophoresis)》, 第29卷, 第1273到1285页(2008年); 电子版3月在线出版(10.1002/

elpl.200700523)。

[0297] 36. P. S. Pang, E. A. Pham, M. Elazar, S. G. Patel, M. R. Eckart, J. S. Glenn, 《微型 RNA-122 的结构图: 丙型肝炎病毒复合物 (Structural map of a microRNA-122: hepatitis C virus complex)》, 《病毒学杂志 (J Virol)》, 第 86 卷, 第 1250 到 1254 页 (2012 年); 电子版 1 月在线出版 (10.1128/JVI.06367-11)。

[0298] 37. K. E. Deigan, T. W. Li, D. H. Mathews, K. M. Weeks, 《准确的 SHAPE 定向的 RNA 结构测定 (Accurate SHAPE-directed RNA structure determination)》, 《美国国家科学院学报 (Proc Natl Acad Sci USA)》, 第 106 卷, 第 97 到 102 页 (2009 年); 电子版 1 月 6 日在线出版 (10.1073/pnas.0806929106)。

[0299] 38. P. De Rijk, J. Wuyts, R. De Wachter, 《RnaViz 2: RNA 二级结构的改进表示 (RnaViz 2: an improved representation of RNA secondary structure)》, 《生物信息学 (Bioinformatics)》, 第 19 卷, 第 299 到 300 页 (2003 年); 电子版 1 月 22 日在线出版。

[0300] 39. W. Kladwang, C. C. VanLang, P. Cordero, R. Das, 《用于非编码 RNA 结构的二维突变和映射策略 (A two-dimensional mutate-and-map strategy for non-coding RNA structure)》, 《自然化学 (Nature chemistry)》, 第 3 卷, 第 954 到 962 页 (2011 年); 电子版 12 月在线出版 (10.1038/nchem.1176)。

[0301] 40. W. Kladwang, P. Cordero, R. Das, 《突变和映射策略准确地推断 35 个核苷酸模型 RNA 的碱基对 (A mutate-and-map strategy accurately infers the base pairs of a 35-nucleotide model RNA)》, 《核糖核酸 (Rna)》, 第 17 卷, 第 522 到 534 页 (2011 年); 电子版 3 月在线出版 (10.1261/rna.2516311)。

[0302] 41. P. Cordero, W. Kladwang, C. C. VanLang, R. Das, 《在 RAN 折叠中 (in RNA Folding)》(《分子生物学方法 (Methods in Molecular Biology)》), C. Waldsich 编著 (2013 年), 出版页数。

[0303] 42. S. A. Mortimer, K. M. Weeks, 《用于通过 SHAPE 化学法准确地分析 RNA 二级和三级结构的快速作用的试剂 (A fast-acting reagent for accurate analysis of RNA secondary and tertiary structure by SHAPE chemistry)》, 《美国化学社会杂志 (J Am Chem Soc)》, 第 129 卷, 第 4144 到 4145 页 (2007 年); 电子版 4 月 11 日在线出版 (10.1021/ja0704028)。

[0304] 43. S. Yoon, J. Kim, J. Hum, H. Kim, S. Park, W. Kladwang, R. Das, 《HiTRACE: 用于毛细管电泳的高通量稳健分析 (HiTRACE: high-throughput robust analysis for capillary electrophoresis)》, 《生物信息学 (Bioinformatics)》, 第 27 卷, 第 1798 到 1805 页 (2011 年); 电子版 7 月 1 日在线出版 (10.1093/bioinformatics/btr277)。

[0305] 44. H. Kim, P. Cordero, R. Das, S. Yoon, 《HiTRACE-Web: 用于高通量毛细管电泳的稳健分析的在线工具 (HiTRACE-Web: an online tool for robust analysis of high-throughput capillary electrophoresis)》, 《核酸研究 (Nucleic Acids Research)》, 第 41 卷, 第 W492 到 W498 页 (2013 年); 电子版 2013 年 7 月 1 日在线出版 (10.1093/nar/gkt501)。

[0306] 45. J. Kim, S. Yu, B. Shim, H. Kim, H. Min, E.-Y. Chung, R. Das, S. Yoon, 《用于通过高通量接触映射进行 RNA 结构推断的稳健峰直检测方法 (A robust peak detection method for RNA structure inference by high-throughput contact mapping)》, 《生物信息学

(Bioinformatics)》,第25卷,第1137到1144页(2009年);电子版2009年5月1日在线出版(10.1093/bioinformatics/btp110)。

[0307] 46.W.Kladwang,T.H.Mann,A.Becka,S.Tian,H.Kim,S.Yoon,R.Das,《RNA化学映射实验的标准化(Standardization of RNA chemical mapping experiments)》,《生物化学(Biochemistry)》,第53卷,第3063到3065页(2014年);电子版5月20日在线出版(10.1021/bi5003426)。

[0308] 47.D.H.Mathews,M.D.Disney,J.L.Childs,S.J.Schroeder,M.Zuker,D.H.Turner,《将化学修饰约束结合到用于预测RNA二级结构的动态编程算法中(Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure)》,《美国国家科学院学报(Proc Natl Acad Sci USA)》,第101卷,第7287到7292卷(2004年);电子版5月11日在线出版(10.1073/pnas.0401799101)。

[0309] 48.K.Darty,A.Denise,Y.Ponty,《VARNA:RNA二级结构的交互式绘图和编辑(VARNA:Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure)》,《生物信息学(Bioinformatics)》,第25卷,第1974到1975页(2009年);电子版8月1日在线出版(10.1093/bioinformatics/btp250)。

[0310] 49.P.Cordero,J.B.Lucks,R.Das,《用于策划RNA结构映射实验的RNA映射数据库(An RNA Mapping DataBase for curating RNA structure mapping experiments)》,《生物信息学(Bioinformatics)》,第28卷,第3006到3008页(2012年);电子版11月15日在线出版(10.1093/bioinformatics/bts554)。

[0311] 虽然出于清楚理解目的,已经通过图式和实例在一定程度上详细地描述了前述发明,但是对于本领域的普通技术人员来说显而易见的是,鉴于本发明的教义,在不脱离随附权利要求书的精神或范围的情况下,可以对其做出某些改变和修改。

[0312] 因此,前面仅说明了本发明的原理。将理解,本领域的技术人员将能够设计各种布置,这些布置虽然未在本文中明确地描述或示出,但是体现本发明的原理且包含在其精神和范围内。此外,本文表述的所有实例和条件语言主要意图帮助读者理解本发明的原理和本发明人为推动领域发展而提供的概念,并且将被解释为不限于此类特定表述的实例和条件。此外,本文表述本发明的原理、方面和实施例及其特定实例的所有陈述意图涵盖其结构和功能等同物。另外,此类等同物意图包含当前已知的等同物和将来发展的等同物,即,不管如何都结构执行相同功能的任何要发展的要素。因此,本发明的范围不意图限制于本文所示和所述的实施例。相反,本发明的范围和精神由随附实施例体现。

[0313] 虽然附有随附权利要求书,但是本文阐述的公开内容也由以下条款描述:

[0314] 条款1.一种寡核苷酸化合物,所述寡核苷酸化合物包括与PB2 vRNA区域互补的寡核苷酸序列,其中所述区域包括所述PB2 vRNA的5'末端编码区域的(-)-有义符号中的核苷酸34-87或其盐。

[0315] 条款2.根据条款1所述的化合物,其包括寡核苷酸序列,所述寡核苷酸序列包括与PB2 vRNA区域互补的至少8个核苷酸亚单位。

[0316] 条款3.根据条款1到2中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸与所述PB2vRNA区域的包装茎-环2(PSL2)基序的区域互补。

[0317] 条款4.根据条款1到3中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸包括选自以下的核苷间键:硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、氨基磷酸酯键和硫代氨基磷酸酯键。

[0318] 条款5.根据条款1到4中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸的所述核苷间键全都选自:硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键和磷酸二酯键。

[0319] 条款6.根据条款1到5中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸包括锁核酸(LNA)核苷酸。

[0320] 条款7.根据条款1到6中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸包括选自以下的序列:

[0321] 5'ACCAAAAGAAT 3'(SEQ ID NO:45);

[0322] 5'TGGCCATCAAT 3'(SEQ ID NO:46);

[0323] 5'TAGCATACTTA 3'(SEQ ID NO:47);

[0324] 5'CCAAAAGA 3'(SEQ ID NO:48);

[0325] 5'CATACTTA 3'(SEQ ID NO:49);

[0326] 5'CAGACACGACCAAAA 3'(SEQ ID NO:50);

[0327] 5'TACTTACTGACAGCC 3'(SEQ ID NO:51);

[0328] 5'AGACACGACCAAAAAG 3'(SEQ ID NO:52);

[0329] 5'ACCAAAAGAAT 3'(SEQ ID NO:53);

[0330] 5'TGGCCATCAAT 3'(SEQ ID NO:54);

[0331] 5'TAGCATACTTA 3'(SEQ ID NO:55);

[0332] 5'CGACCAAAAGAATTC 3'(SEQ ID NO:56);

[0333] 5'CGACCAAAAGAATTC 3'(SEQ ID NO:57);

[0334] 5'GATGGCCATCAATTA 3'(SEQ ID NO:58);

[0335] 5'GATGGCCATCAATTA 3'(SEQ ID NO:59);

[0336] 5'TCTAGCATACTTACT 3'(SEQ ID NO:60);

[0337] 5'TCTAGCATACTTACT 3'(SEQ ID NO:61);

[0338] 5'GAATTCGGATGGCCA 3'(SEQ ID NO:62);

[0339] 5'GGCCATCAATTAGTG 3'(SEQ ID NO:63);

[0340] 5'TTCGGATGGCCATCA 3'(SEQ ID NO:64);

[0341] 5'AGCCAGACAGCGA 3'(SEQ ID NO:65);以及

[0342] 5'GACAGCCAGACAGCA 3'(SEQ ID NO:66)。

[0343] 条款8.根据条款7所述的化合物,其中所述寡核苷酸的所述核苷酸全都包括锁核酸(LNA)核苷酸。

[0344] 条款9.根据条款7所述的化合物,其中所述寡核苷酸包括选自以下的序列:

[0345] LNA 1:5'AccAaaAGaaT 3'(SEQ ID NO:67);

[0346] LNA 2:5'TggCcATcaaT 3'(SEQ ID NO:68);

[0347] LNA 3:5'TagCAtActtA 3'(SEQ ID NO:69);

[0348] LNA 4:5'CCAAAAGA 3'(SEQ ID NO:70);

[0349] LNA 5:5'CATACTTA 3'(SEQ ID NO:71);

- [0350] LNA 6:5' CagaCaCGaCCaaAA 3' (SEQ ID NO:72);
- [0351] LNA 7:5' TAcTtaCTgaCagCC 3' (SEQ ID NO:73);
- [0352] LNA 8:5' AGACacgaccaAAAG 3' (SEQ ID NO:74);
- [0353] LNA 9:5' TACTtactgacaGCC 3' (SEQ ID NO:75);
- [0354] LNA 9.2:5' TACttactgacAGCC 3' (SEQ ID NO:76);
- [0355] LNA 10:5' ACCaaaagAAT 3' (SEQ ID NO:77);
- [0356] LNA 11:5' TGGccatcAAT 3' (SEQ ID NO:78);
- [0357] LNA 12:5' TAGcatacTTA 3' (SEQ ID NO:79);
- [0358] LNA 13:5' CgacCAaaAGAattC 3' (SEQ ID NO:80);
- [0359] LNA 14:5' CGACcaaaagaATTC 3' (SEQ ID NO:81);
- [0360] LNA 15:5' GaTGgCcATcaAttA 3' (SEQ ID NO:82);
- [0361] LNA 16:5' GATGgcatcaATTA 3' (SEQ ID NO:83);
- [0362] LNA 17:5' TcTAgCaTActTacT 3' (SEQ ID NO:84);
- [0363] LNA 18:5' TCTAgcatactTACT 3' (SEQ ID NO:85);
- [0364] LNA 19:5' GAAttcggatgGCCA 3' (SEQ ID NO:86);
- [0365] LNA 20:5' GGCCatcaattaGTG 3' (SEQ ID NO:87);
- [0366] LNA 21:5' TTCGgatggccaTCA 3' (SEQ ID NO:88);
- [0367] LNA 22:5' AGCCagacagCGA 3' (SEQ ID NO:89);
- [0368] LNA 23:5' GACAgccagacaGCA 3' (SEQ ID NO:90);
- [0369] LNA 9.G74C:5' TACTtactgacaGTC 3' (SEQ ID NO:91); 以及
- [0370] LNA 9.T80C:5' TACTtaccgacaGCC 3' (SEQ ID NO:92);
- [0371] 其中大写字母表示LNA核苷酸且小写字母表示DNA核苷酸。
- [0372] 条款10. 根据条款1到9中任一项所述的化合物, 其中所述寡核苷酸包括至少5个脱氧核糖核苷酸单元并且能够募集RNase。
- [0373] 条款11. 根据条款1到10中任一项所述的化合物, 其中所述化合物与所述PB2vRNA区域的结合破坏所述PB2 vRNA的整体二级RNA结构。
- [0374] 条款12. 根据条款1到11中任一项所述的化合物, 其中所述化合物是具有增强的细胞摄取的寡核苷酸缀合物。
- [0375] 条款13. 根据条款12所述的化合物, 其中所述化合物是寡核苷酸-脂质缀合物。
- [0376] 条款14. 根据条款1到12中任一项所述的化合物, 其中所述化合物是具有细胞特异性蛋白的寡核苷酸缀合物。
- [0377] 条款15. 一种抑制细胞内的甲型流感病毒的方法, 所述方法包括: 使包括具有PSL2基序的病毒RNA (vRNA) 的样本与有效量的药剂接触, 所述有效量的药剂特异性结合所述PSL2基序以抑制所述甲型流感病毒。
- [0378] 条款16. 根据条款15所述的方法, 其中所述药剂是寡核苷酸化合物, 所述寡核苷酸化合物包括与所述vRNA的PSL2基序互补的至少8个核苷酸亚单位或其盐。
- [0379] 条款17. 根据条款15或16所述的方法, 其中所述药剂是根据条款1到14中的一项的寡核苷酸化合物。
- [0380] 条款18. 根据条款15到17中任一项所述的方法, 其中所述样本中的所述vRNA是PB2

vRNA。

[0381] 条款19.根据条款15到18中任一项所述的方法,其中使所述样本与所述药剂接触造成所述病毒的至少 $2\log_{10}$ 滴度缺损。

[0382] 条款20.根据条款15到19中任一项所述的方法,其中所述药剂破坏所述vRNA的所述PSL2基序的整体结构。

[0383] 条款21.根据条款15到19中任一项所述的方法,其中所述vRNA是与病毒粒子或细胞隔离。

[0384] 条款22.根据条款15到19中任一项所述的方法,其中所述vRNA包括在病毒粒子或受感染细胞中。

[0385] 条款23.根据条款15到22中任一项所述的方法,其中所述样本在体外。

[0386] 条款24.根据条款15到19或22中任一项所述的方法,其中所述样本在体内。

[0387] 条款25.一种治疗或预防受试者内甲型流感病毒感染的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用药物组合物,所述药物组合物包括有效量的活性药剂,所述有效量的活性药剂特异性结合到病毒RNA(vRNA)的PSL2基序。

[0388] 条款26.根据条款25所述的方法,其中所述vRNA是PB2 vRNA。

[0389] 条款27.根据条款25到26中任一项所述的方法,其中所述活性药剂是包括寡核苷酸序列的化合物,所述寡核苷酸序列包括与PB2 vRNA区域互补的至少8个核苷酸亚单位。

[0390] 条款28.根据条款25到27中任一项所述的方法,其中所述药剂是根据条款1到14中的一项的寡核苷酸化合物。

[0391] 条款29.根据条款25到28中任一项所述的方法,其中所述受试者有感染甲型流感病毒的风险,并且所述寡核苷酸化合物的所述施用保护所述受试者免受感染达1周或更长(例如,2周或更长、3周或更长、1个月或更长、2个月或更长、3个月或更长等)。

[0392] 条款30.根据条款29所述的方法,其中所述施用包括每周、每两周或每月施用有效剂量的寡核苷酸化合物。

[0393] 条款31.根据条款25到30中任一项所述的方法,其中所述施用造成所述受试者的样本中的所述病毒的至少 $2\log_{10}$ 滴度缺损。

[0394] 条款32.根据条款25到30中任一项所述的方法,其中所述活性药剂是具有增强的细胞摄取的寡核苷酸缀合物。

[0395] 条款33.根据条款25到31中任一项所述的方法,其中所述活性药剂是具有细胞特异性蛋白的寡核苷酸缀合物。

[0396] 条款34.根据条款25到31中任一项所述的方法,其中所述药物组合物包括细胞摄取增强剂。

[0397] 条款35.根据条款25到31中任一项所述的方法,其中所述药物组合物进一步包括选自第二寡核苷酸活性药剂和抗病毒药物的另外的活性药剂。

[0398] 条款36.根据条款25到31中任一项所述的方法,其中所述活性药剂是siRNA、shRNA、反义RNA或反义DNA。

[0399] 条款37.根据条款25到31中任一项所述的方法,其中所述受试者有感染甲型流感病毒的风险,并且所述方法预防感染。

[0400] 条款38.根据条款25到31中任一项所述的方法,其中所述受试者被诊断为感染或

疑似感染甲型流感病毒,并且所述方法治疗感染。

[0401] 条款39.一种筛选候选药剂以抑制细胞中的甲型流感病毒的能力的方法,所述方法包括:

[0402] 使包括具有PSL2基序的病毒RNA (vRNA) 的样本与候选药剂接触;以及

[0403] 确定所述候选药剂是否特异性结合到所述PSL2基序;

[0404] 其中特异性结合到所述PSL2基序的药剂将抑制细胞中的甲型流感病毒。

[0405] 条款40.根据条款39所述的方法,其中所述候选药剂选自:小分子、核酸和多肽。

[0406] 条款41.根据条款40所述的方法,其中所述确定步骤包括检测细胞参数,其中所述细胞中的参数相较未与候选药剂接触的细胞来说的变化指明所述候选药剂特异性结合所述PSL2基序。

[0407] 条款42.根据条款39到41中任一项所述的方法,其中特异性结合到所述PSL2基序的药剂将治疗受甲型流感病毒感染的受试者。

野生型PR8 (H1N1)
能量 = -591.5

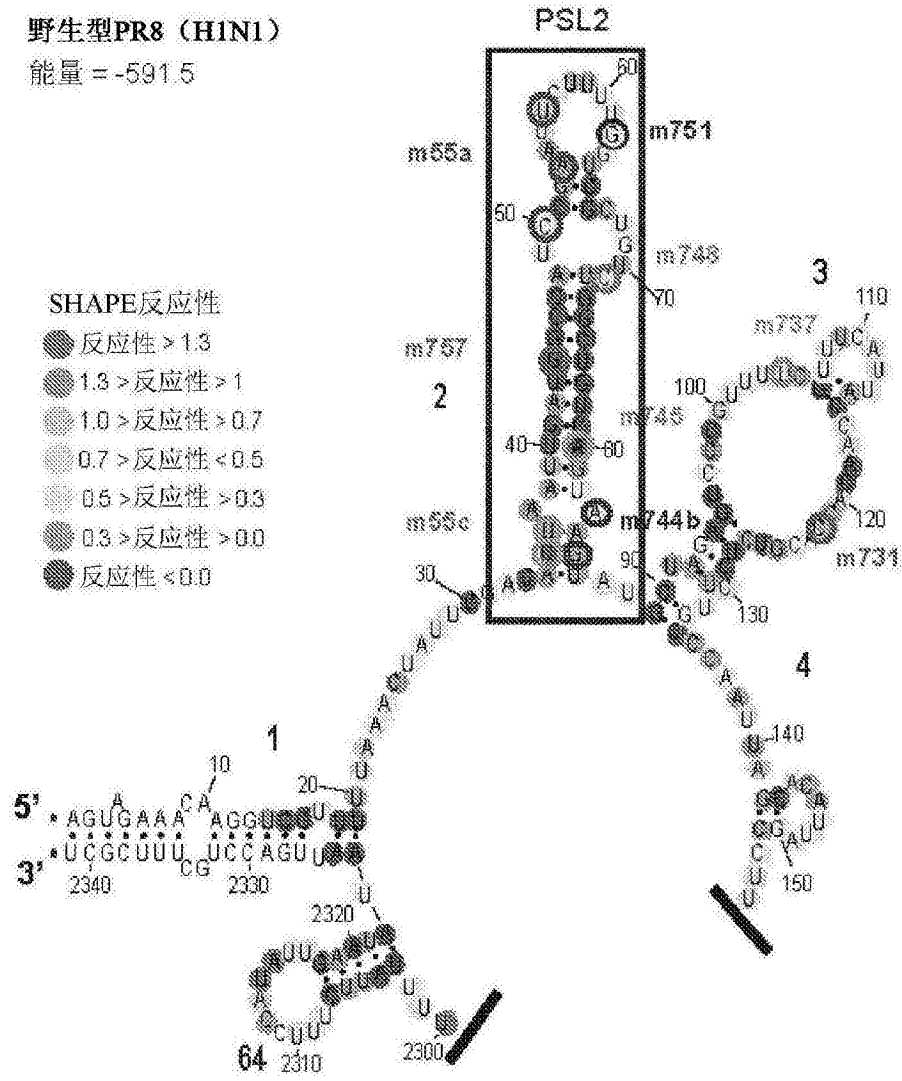
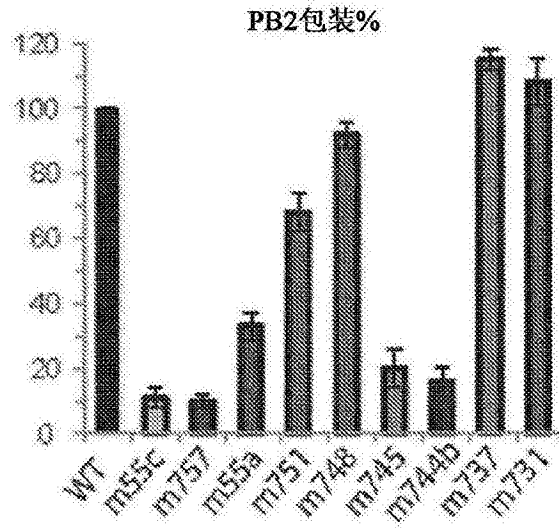


图1A



突变体名称	突变位点
m55c	CU35,36UC
m757	G44C
m55a	CAU50,53,56
m751	G82C
m748	C71U
m745	A80U
m744b	AG83,85UA
m737	U104A
m731	C122G

图1B

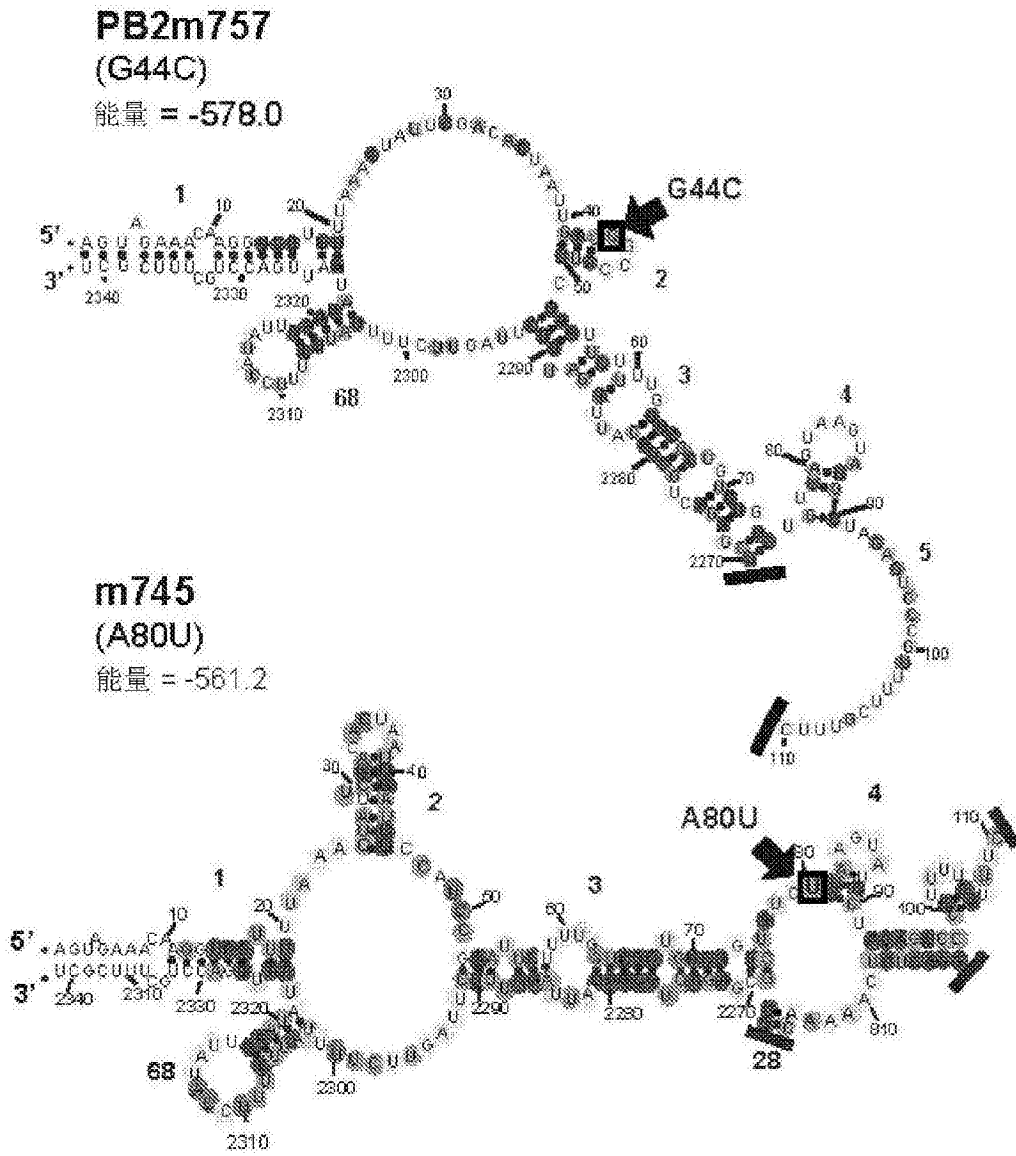


图1C

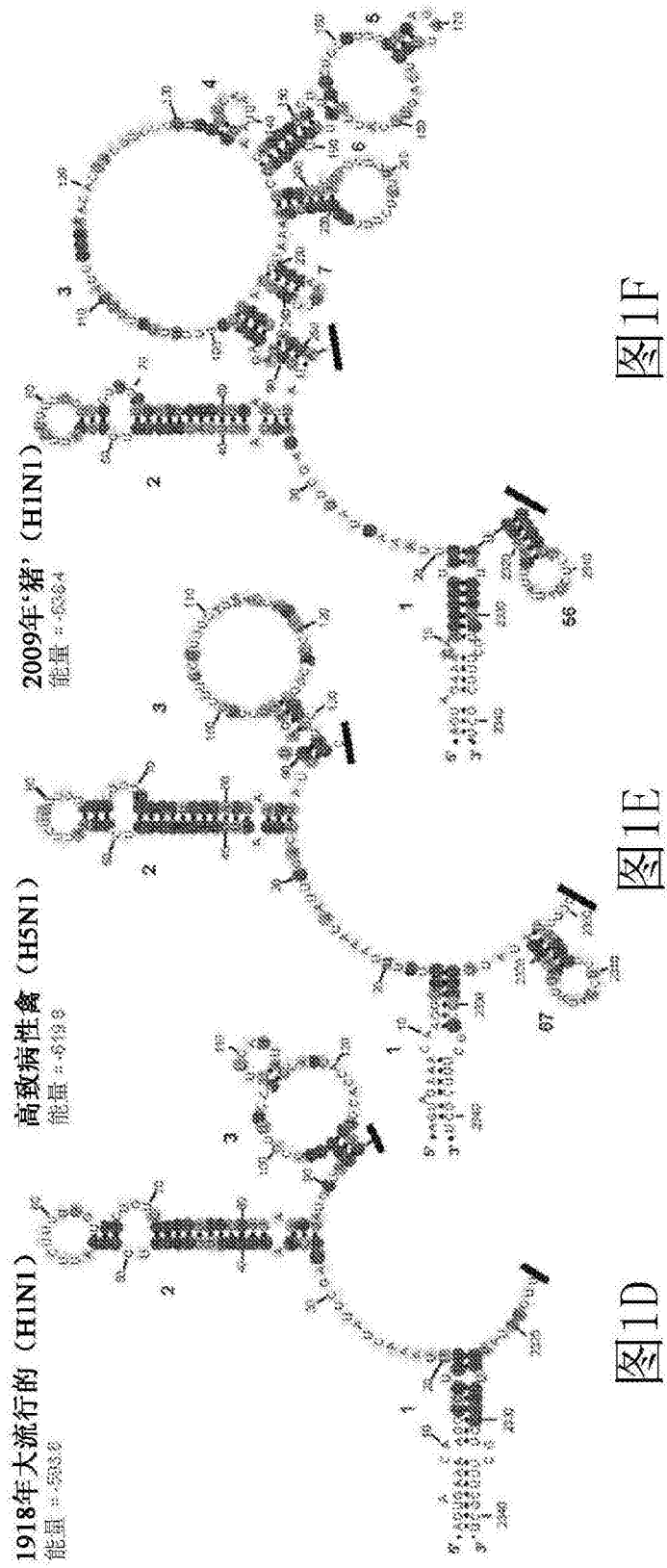


图1D

图1E

图1F

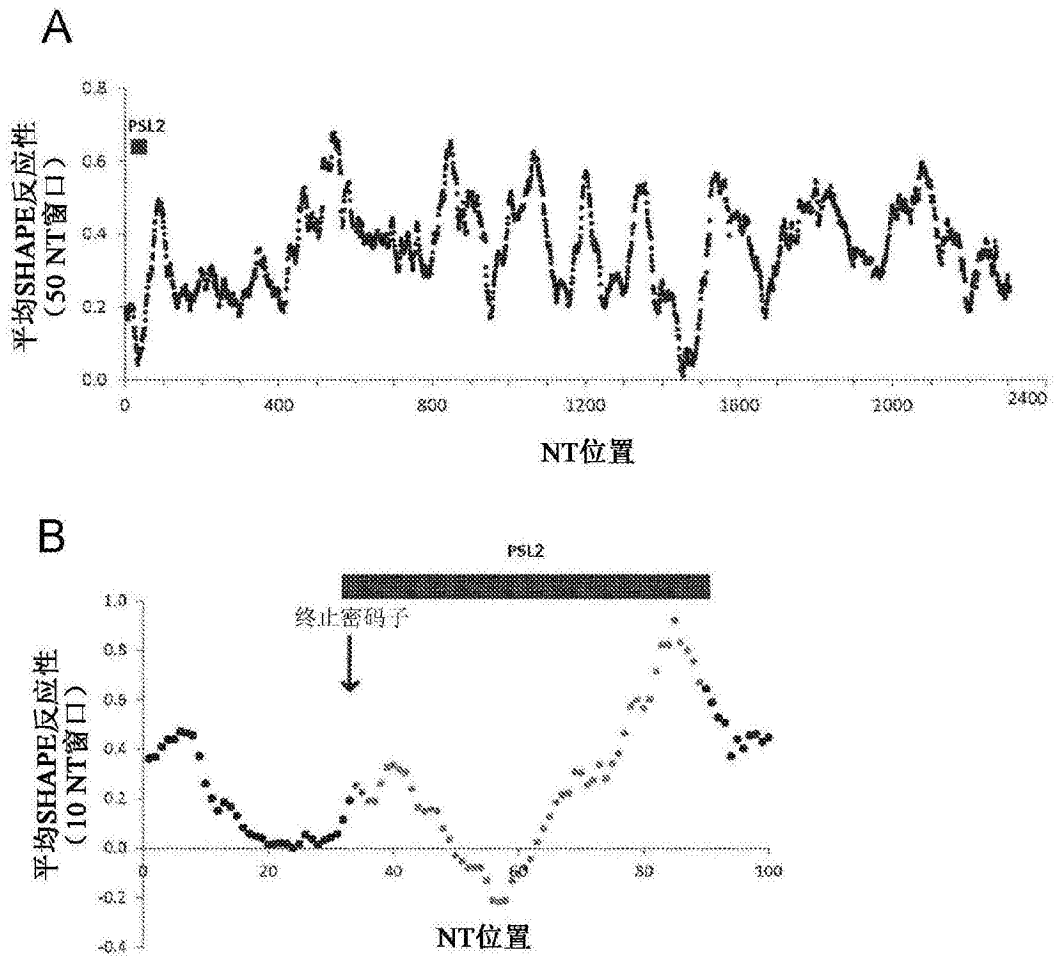


图2

野生型
能量 = -591.5

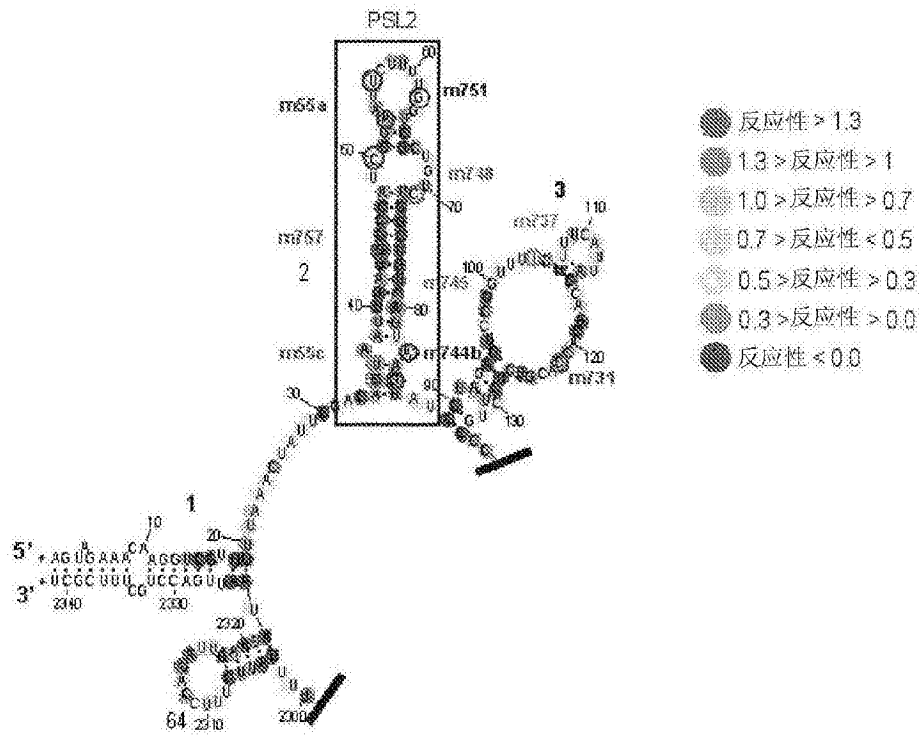
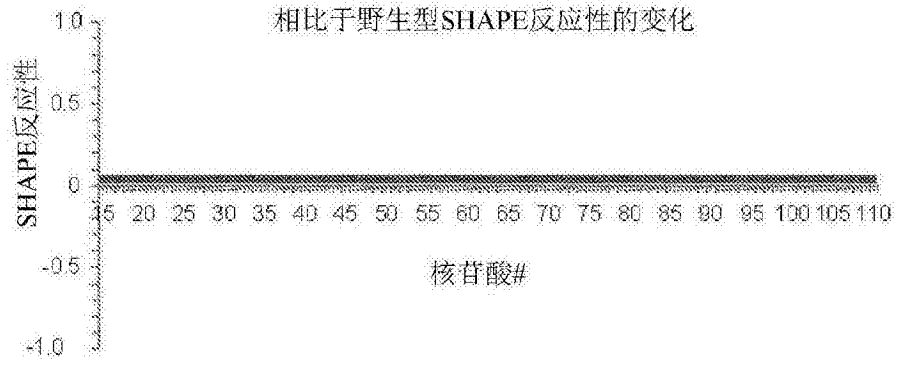


图3A

PB2m744b

能量 = -553.0

包装% = 17%

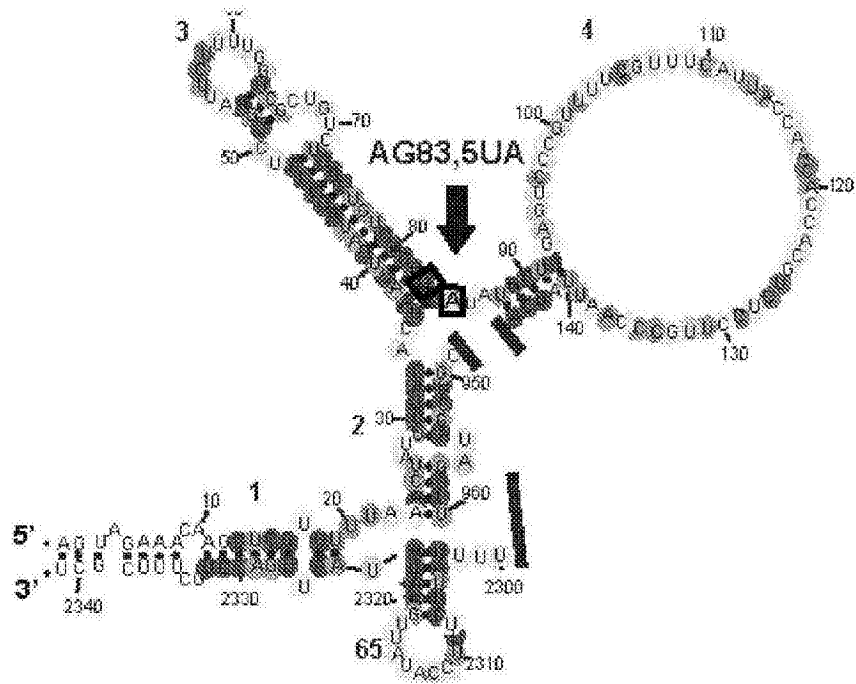
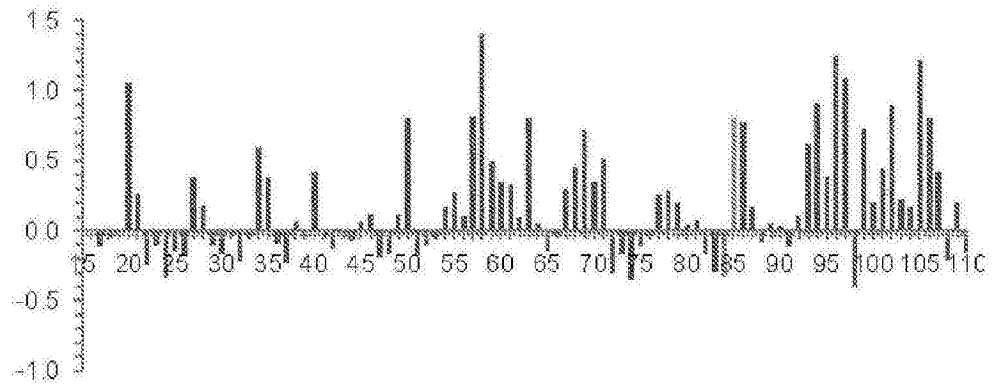


图3B

PB2m745

能量 = -561.2

包装% = 20%

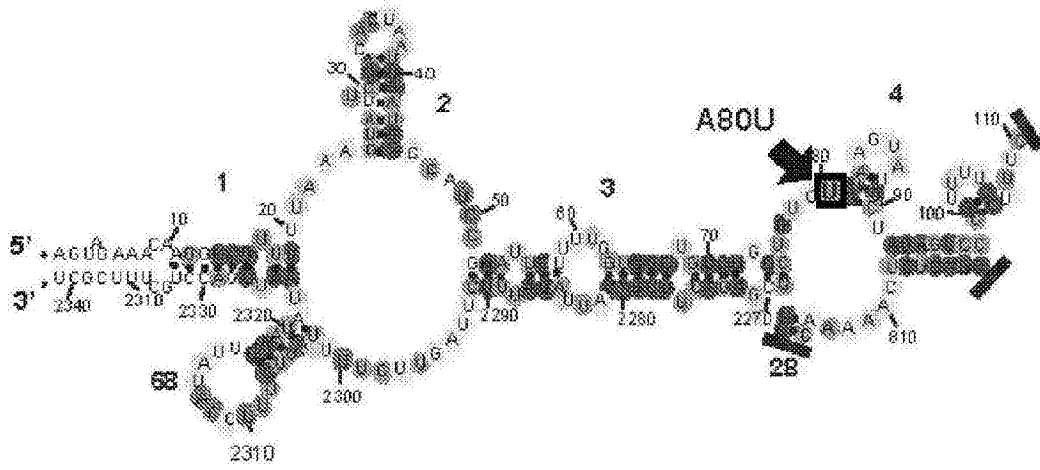
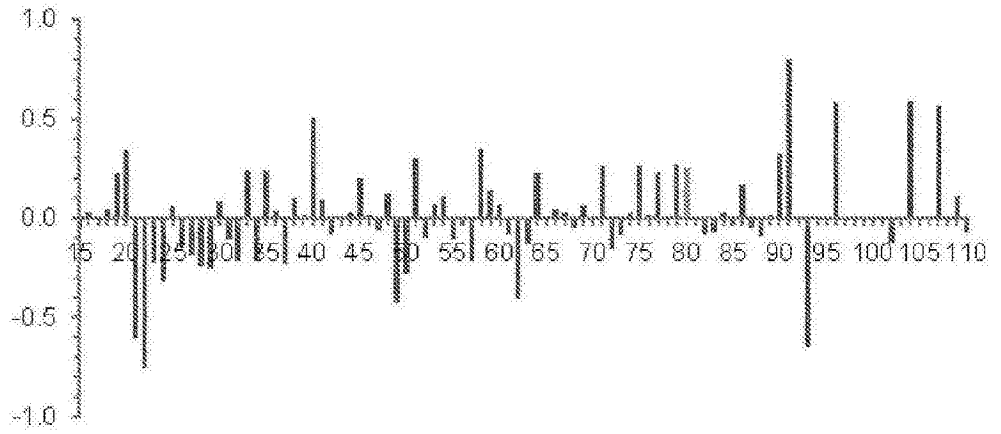


图3C

PB2m55c
能量 = -568.0
包装% = 12%

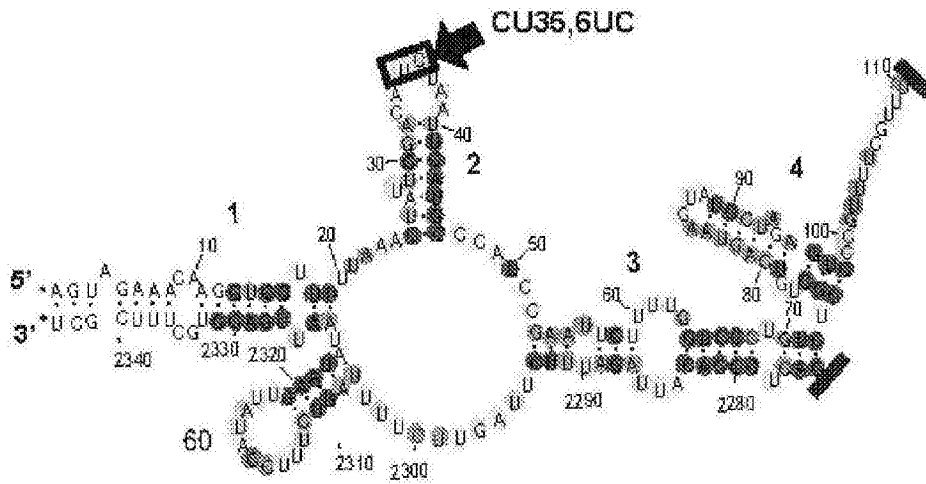
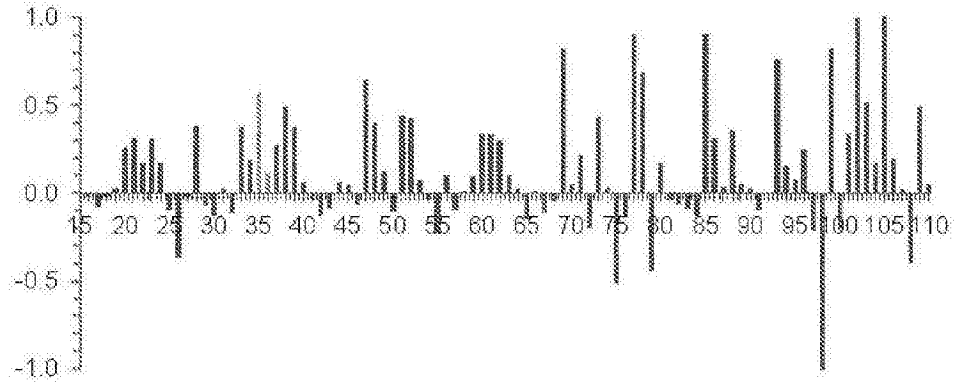


图3D

PB2m757

能量 = -573.0

包装% = 9%

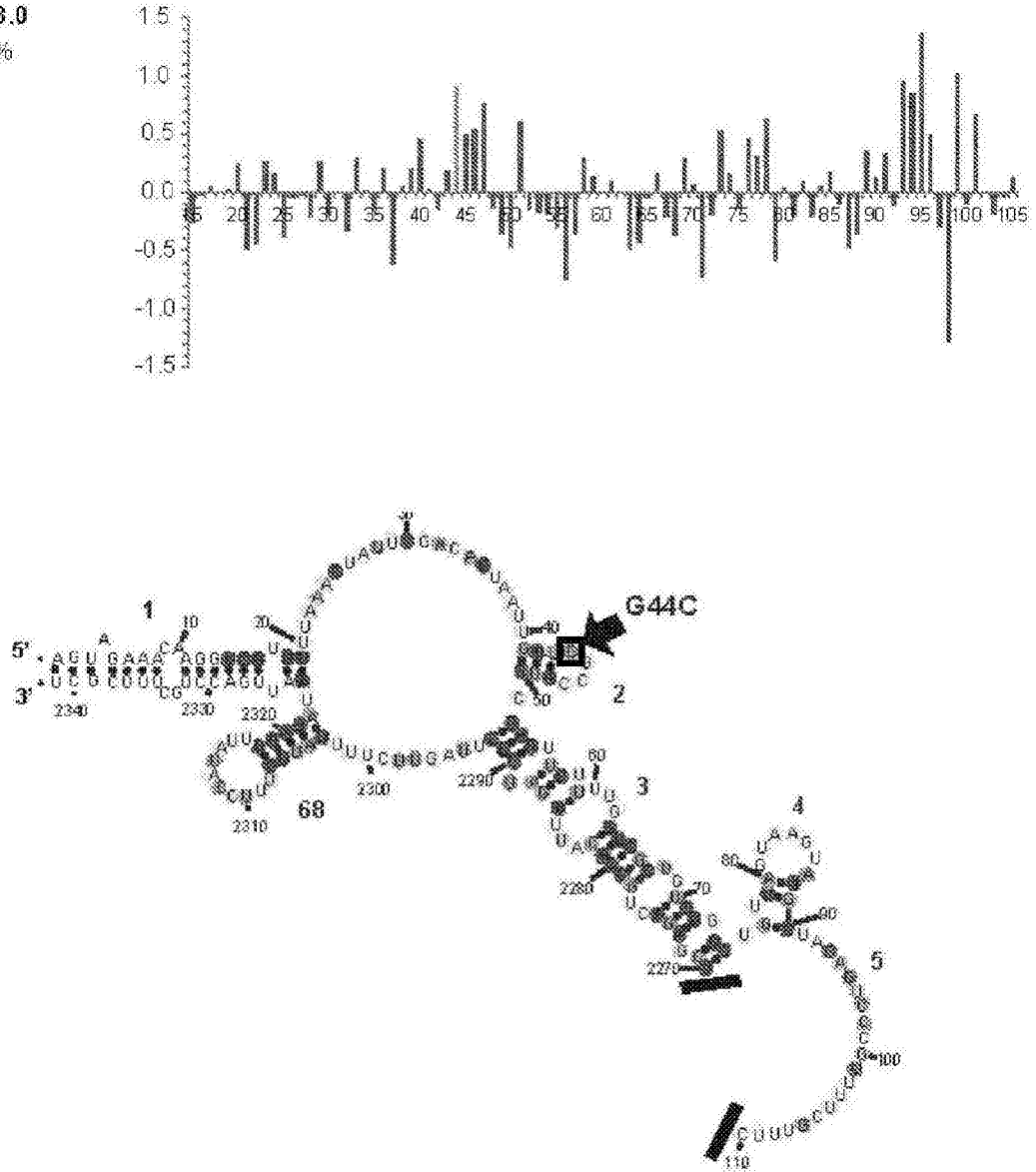


图3E

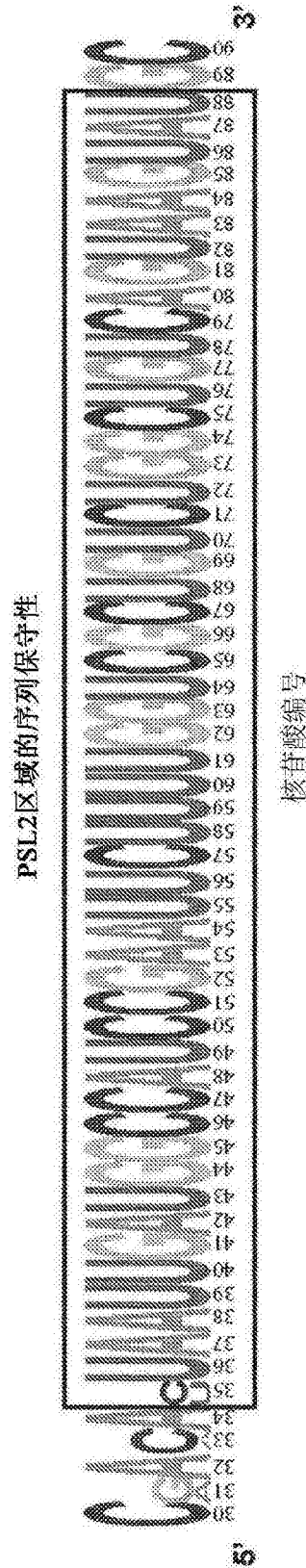


图4

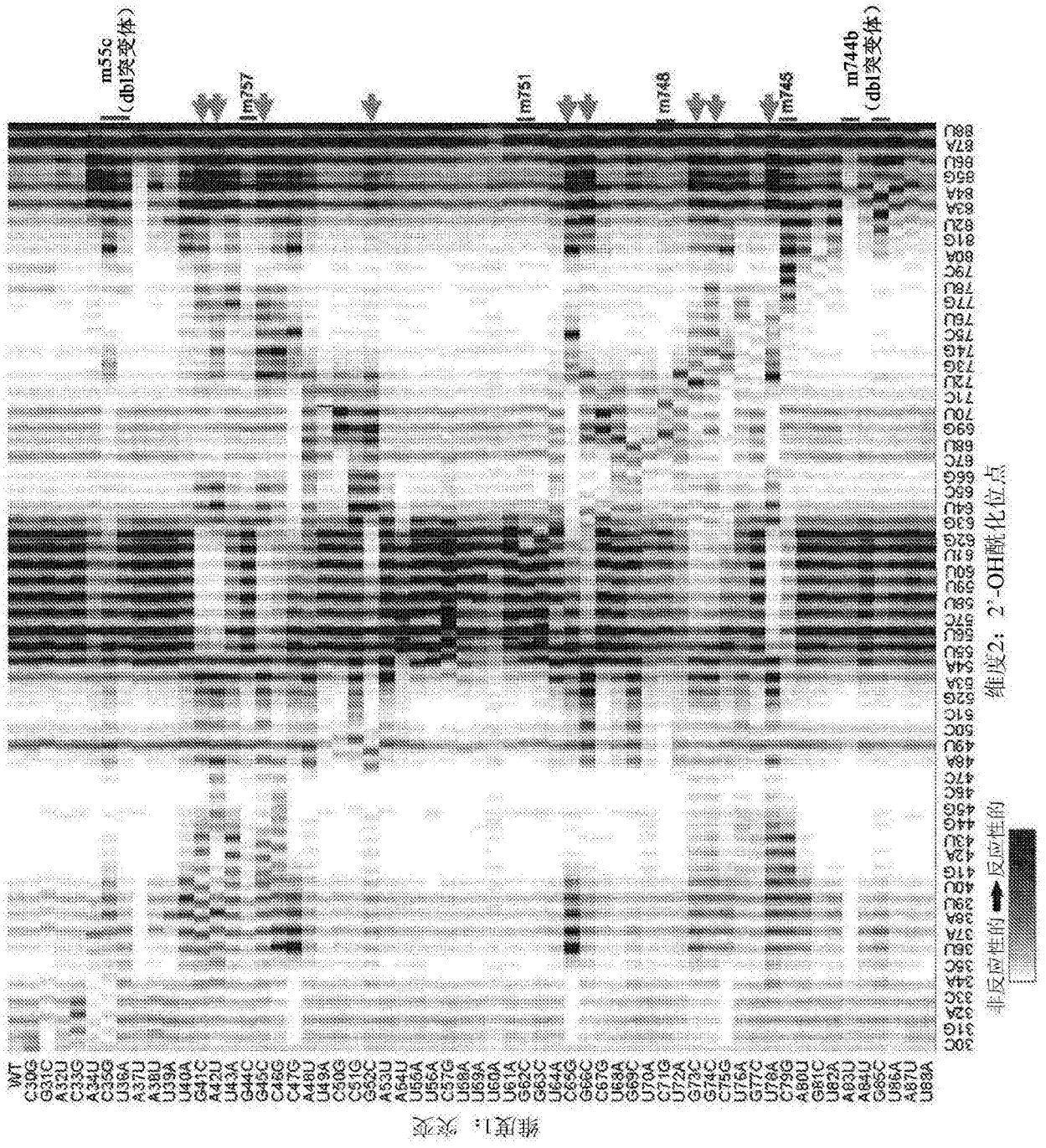


图5A

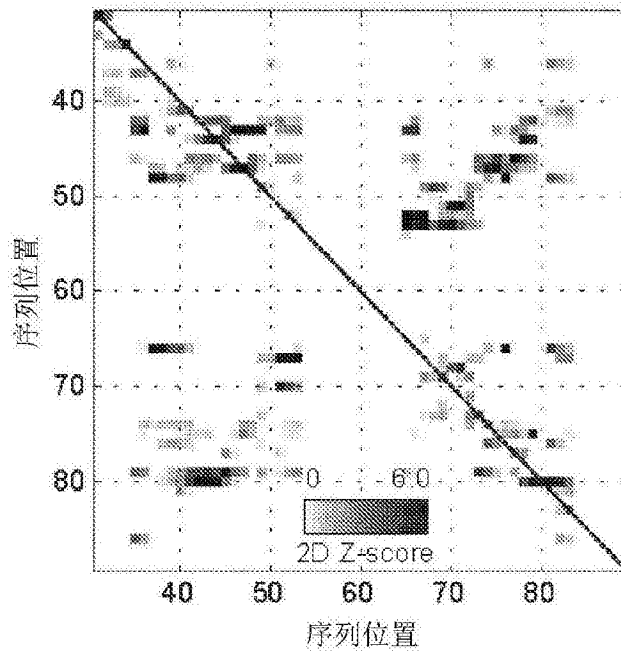


图5B

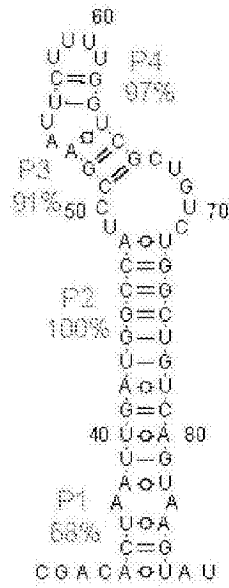


图5C

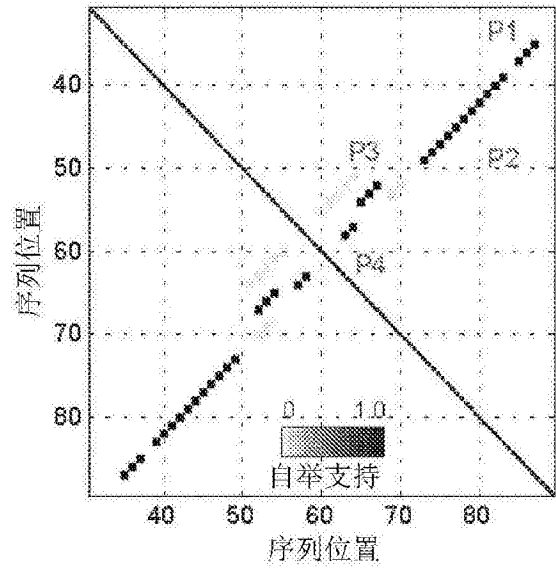


图5D

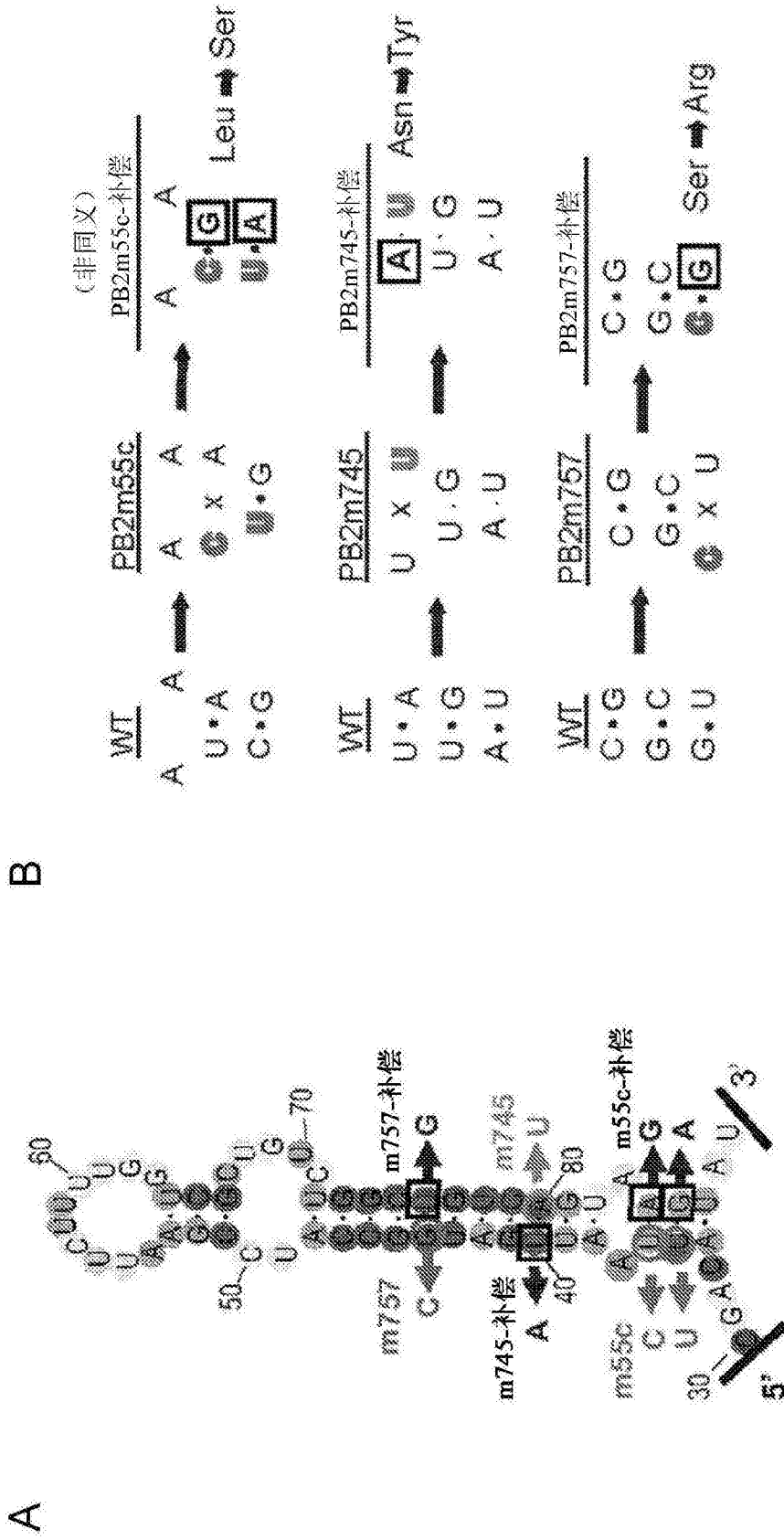


图6

A

```

2203          2215          2227
ATTGGG CAA GGA GAC GTG GTG TTG GTA ATG AAA CGG
ATTGGG CAA GGA GAC GTC GTG TTG GTA ATG AAA CGG
                               m731

2239          2251          2263
AAA CGG AAC TCT AGC ATA CTT ACT GAC AGC CAG ACA
AAA CGG AAC TCT AGC ATA TTA ACA GAC AGC CAA ACA
                               m744b m745 m748

2275          2287          2299
GCG ACC AAA AGA ATT CGG ATG GCC ATC AAT TAG TGT
GCG ACC AAA AGA ATT CGG ATG GCC ATC AAT TGA TGT
                               m751 m757 m55c
    
```

B

突变和映射预测的PB2突变体

(同义) m74-1 (C2268T)-F: TAC TTA CTG ACA **GTC** AGA CAG CG

(同义) m74-1 (C2268T)-RC: CGC TGT CTG ACT GTC AGT AAG TA

(同义) m74-2 (AGC2266-8UCG)-F: TAC TTA CTG ACT **TCGC** AGA CAG CG

(同义) m74-2 (AGC2266-8UCG)-RC: CGC TGT CTG CGA GTC AGT AAG TA

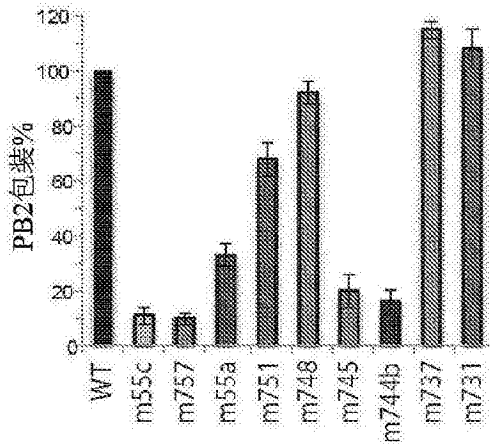
(同义) m68-1 (A2262T)-F: TGA CAG CCA GAC **TGC** GAC CAA AAG AAT TCG

(同义) m68-1 (A2262T)-RC: CGA ATT CTT TTG GTC GCA GTC TGG CTG TCA

(同义) m56 (A2286C)-F: AGC GAC CAA AAG **CAT** TCG GAT GGC

(同义) m56 (A2286C)-RC: GCC ATC CGA ATG GTT TTG GTC GCT

C



D

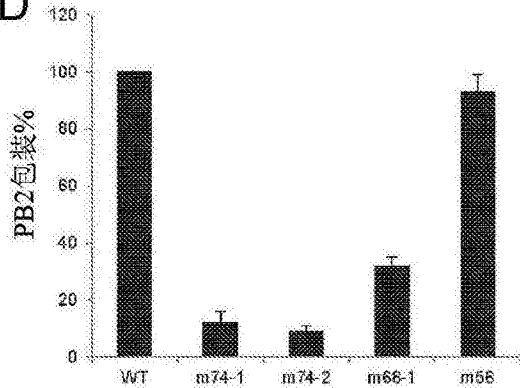


图7

突变体命名和突变位点

突变体名称	突变位点 [(-)-有义取向]	SYN或 Non-SYN	注释
m55c	CU35,36UC	SYN	
m757	G44C	SYN	
m55a	CAU50,53,56	SYN	
m751	G62C	SYN	
m748	C71U	SYN	
m745	A80U	SYN	
m744b	AG83,85UA	SYN	
m737	U104	SYN	
m731	C122G	SYN	
m83,84	AG83,84GA	Non-SYN	
m55c-补偿	CU35,36UC / AG83,84GA	Non-SYN	Dbl突变体
m76	U76G	Non-SYN	
m757-补偿	G44C / U76G	Non-SYN	Dbl突变体
m40	U40A	Non-SYN	
m745-补偿	A80U / U40A	Non-SYN	Dbl突变体
m74-1	G74A	SYN	
m74-2	UCG74AGC	SYN	
m68	U68A	SYN	
m56	U56G	SYN	
m41	G41C	Non-SYN	
m79	C79G	Non-SYN	
m41/79-补偿	GC41,79CG	Non-SYN	Dbl突变体
m45	G45C	Non-SYN	
m75	C75G	Non-SYN	
m45/75-补偿	GC45,75CG	Non-SYN	Dbl突变体
m46	C46G	Non-SYN	
m74	G74C	Non-SYN	
m46/74-补偿	CG46,74GC	Non-SYN	Dbl突变体
m52	G52U	SYN	
m65	C65A	SYN	
m52/65-补偿	GC52,65UA	SYN	Dbl突变体

SYN=同义突变, Non-SYN=非同义突变

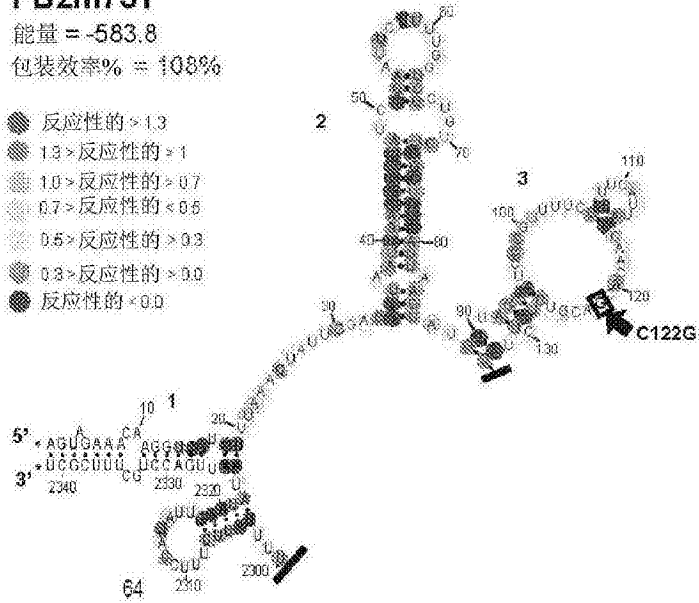
图8

PB2m731

能量 = -583.8

包装效率% = 108%

- 反应性的 > 1.3
- 1.3 > 反应性的 > 1
- 1.0 > 反应性的 > 0.7
- 0.7 > 反应性的 > 0.5
- 0.5 > 反应性的 > 0.3
- 0.3 > 反应性的 > 0.0
- 反应性的 < 0.0



相比于野生型SHAPE反应性的变化

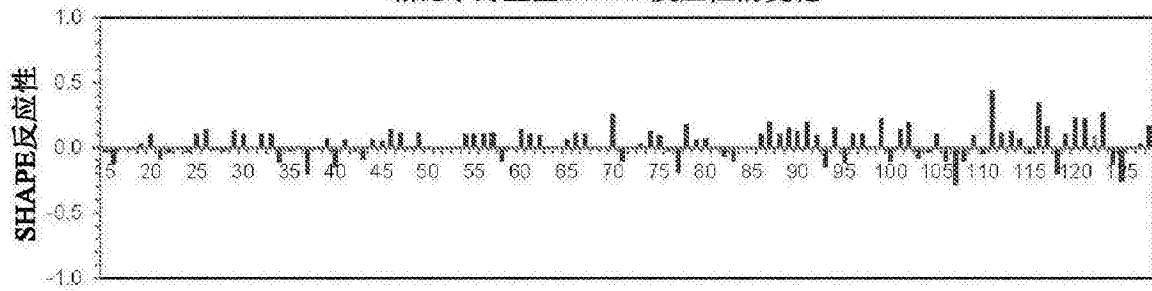
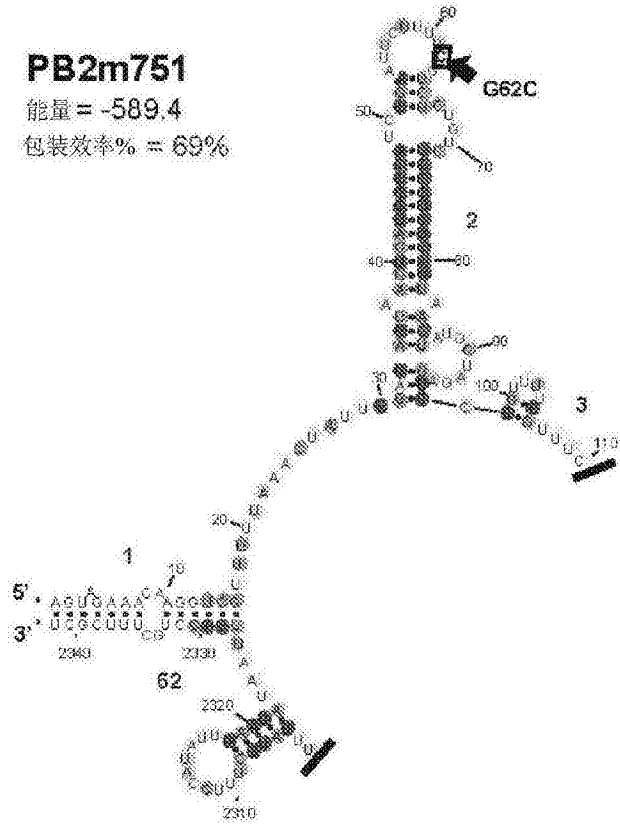


图9A



相比于野生型SHAPE反应性的变化

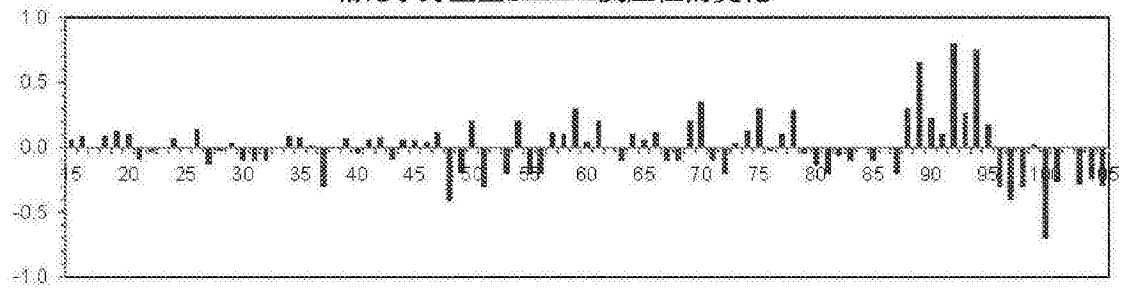


图9B

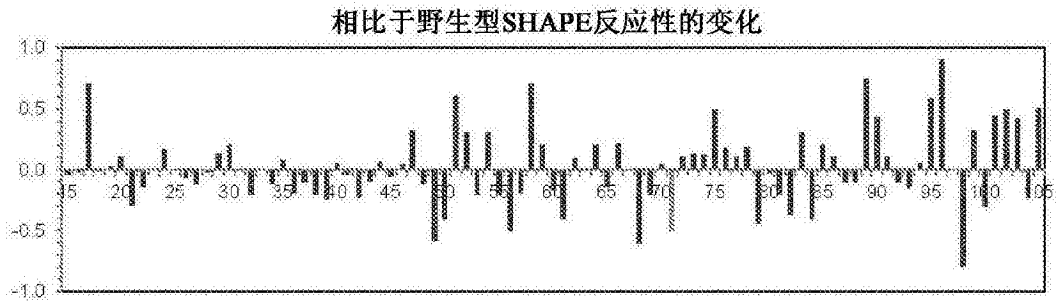
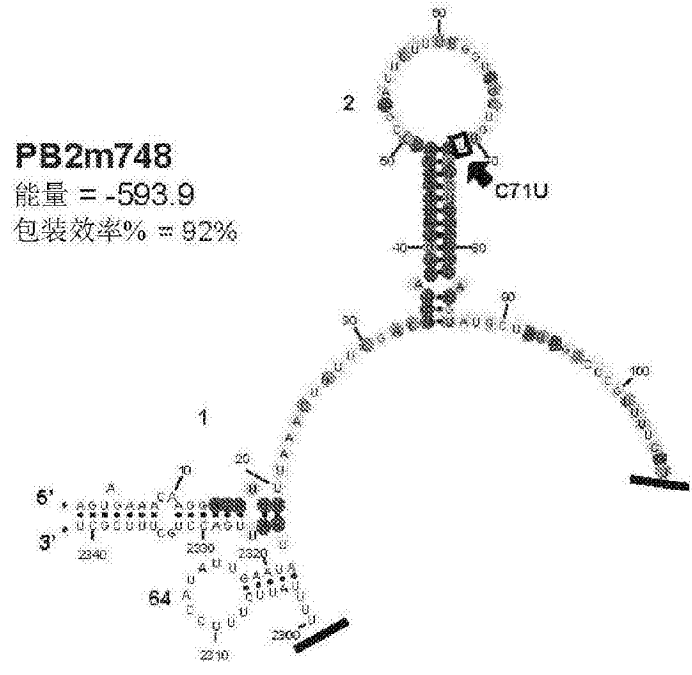


图9C

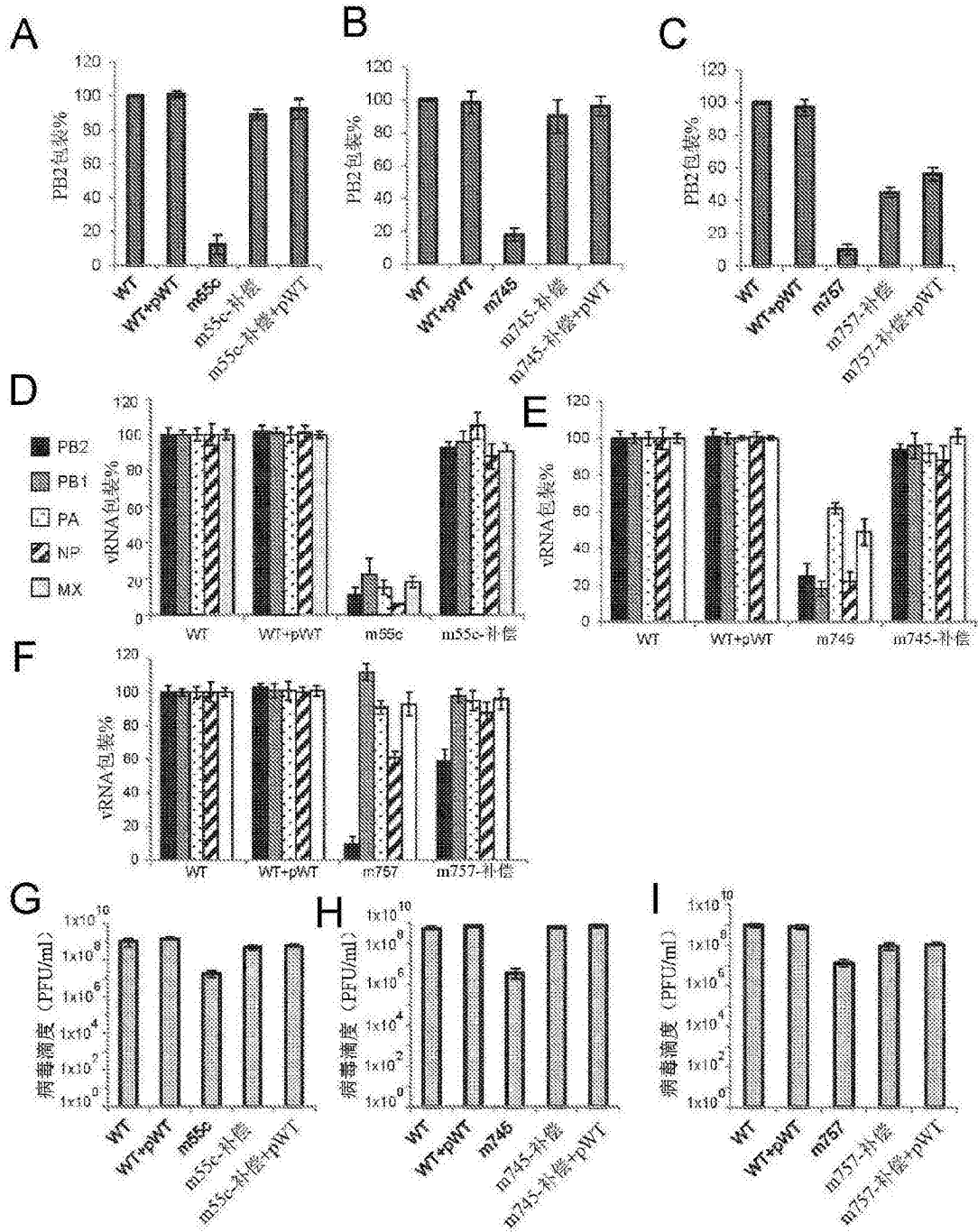


图10

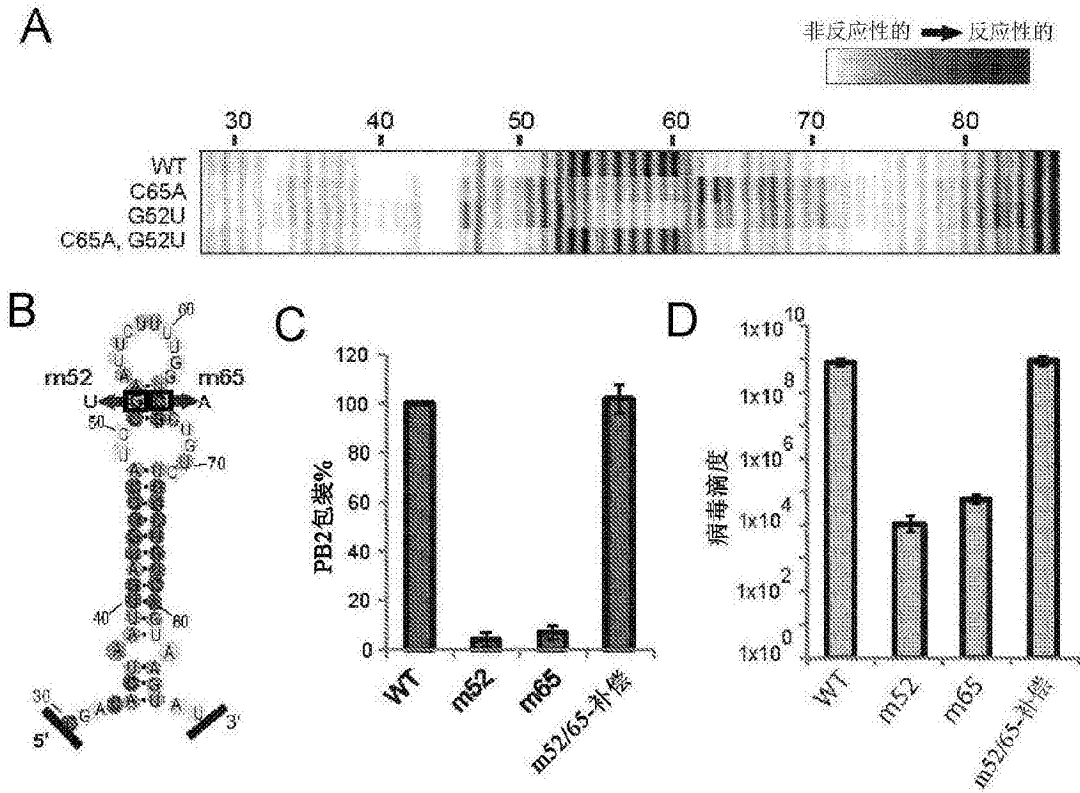


图11

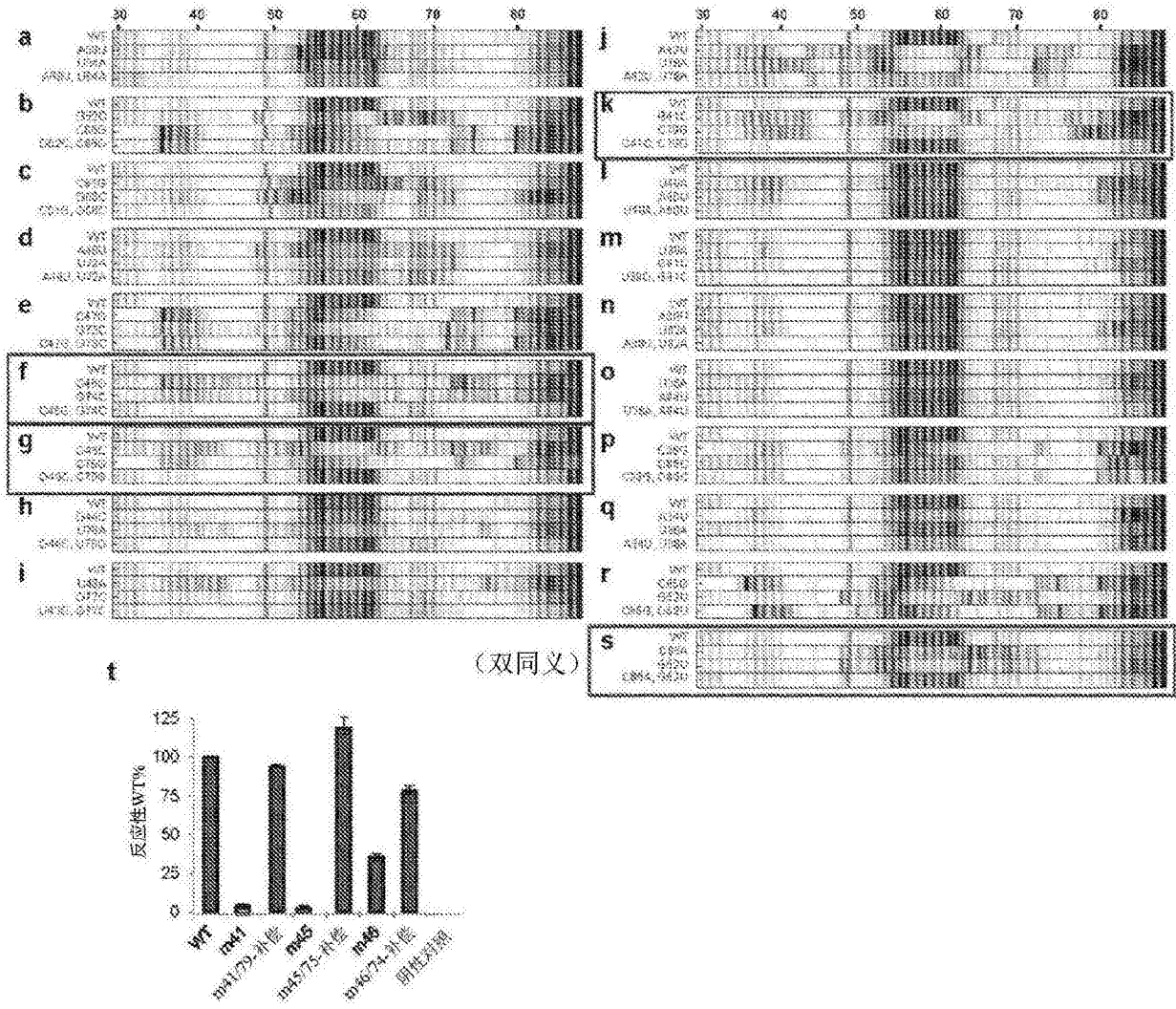


图12

(非同义) m46-F (G2296C):	AGA ATT CGG ATG CCC ATC AAT TAG TGT CG
(非同义) m46-RC (G2296C):	CGA CAC TAA TTG ATG GCC ATC CGA ATT CT
(同义) m46/74-补偿 (C2268G)-F:	TAC TTA CTG ACA GGC AGA CAG CG
(同义) m46/74-补偿 (C2268G)-RC:	CGC TGT CTG CCT GTC AGT AAG TA
(非同义) m45-F (G2297C):	TTC GGA TGG GCA TCA ATT AGT GTC G
(非同义) m45-RC (G2297C):	CGA CAC TAA TTG ATG CCC ATC CGA A
(非同义) m45/75-补偿 (G2267C)-F:	ATA CTT ACT GAC ACC CAG ACA GCG
(非同义) m45/75-补偿 (G2267C)-RC:	CGC TGT CTG GGT GTC AGT AAG TAT
(非同义) m41-F (C2301G):	TCG GAT GGC CAT GAA TTA GTG TCG
(非同义) m41-RC (C2301G):	CGA CAC TAA TTD ATG GCC ATC CGA
(同义) m41/79-补偿 (G2263C)-F:	AGC ATA CTT ACT CAC AGC CAG ACA GC
(同义) m41/79-补偿 (G2263C)-RC:	GCT STC TGG CTG TGA GTA AGT ATG CT
(同义) m52-F (C2290A):	CCA AAA GAA TTA GGA TGG CCA TCA ATT AGT GTC G
(同义) m52-RC (C2290A):	CGA CAC TAA TTG ATG GCC ATC CTA ATT CTT TTG G
(同义) m65-F (G2277T):	GAC ACC CAG ACA GCT ACC AAA AGA ATT CG
(同义) m65-RC (G2277T):	CGA ATT CTT TTG GTA GCT GTC TGG CTG TC

双同义突变体对

图13

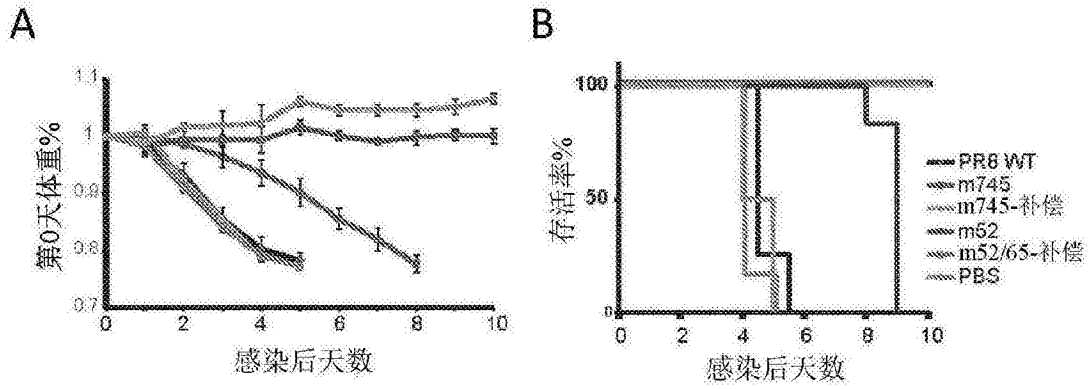


图14

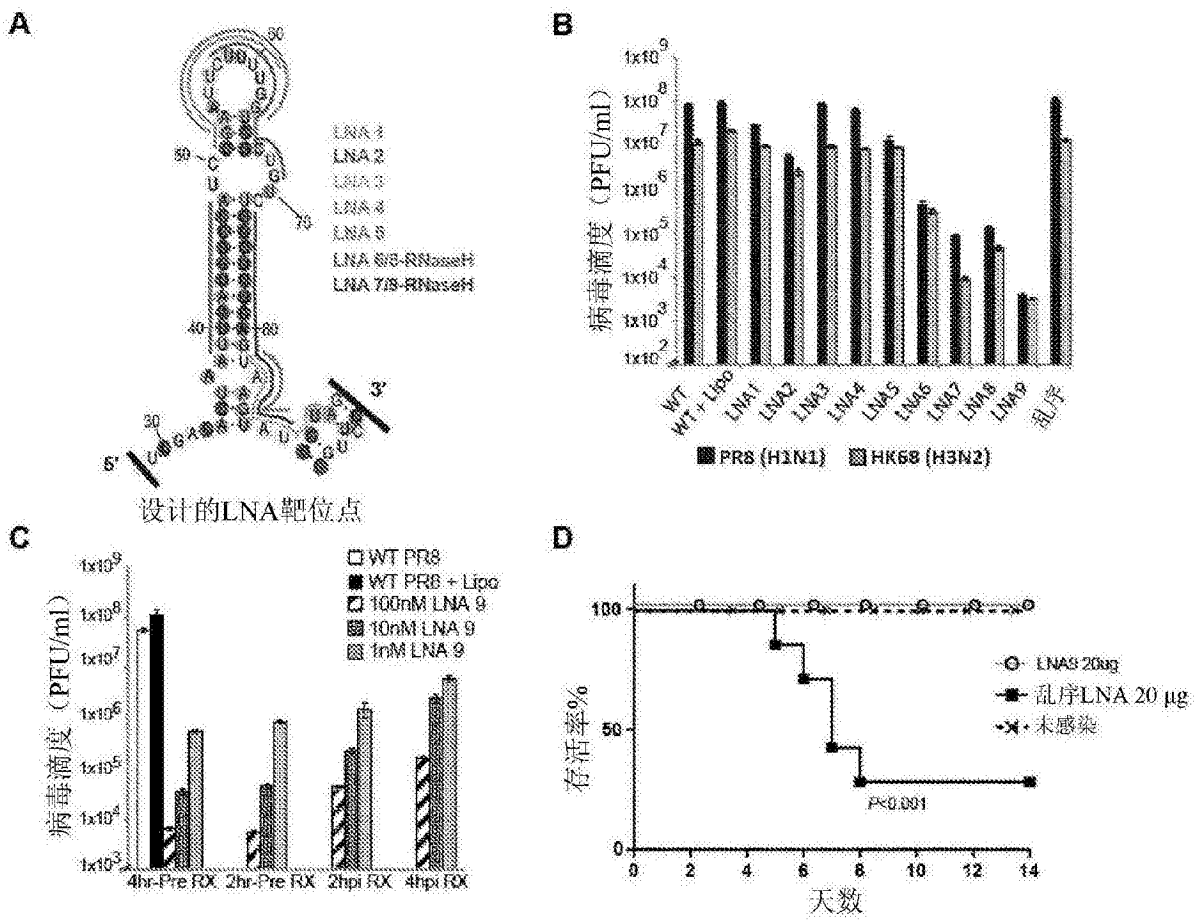


图15

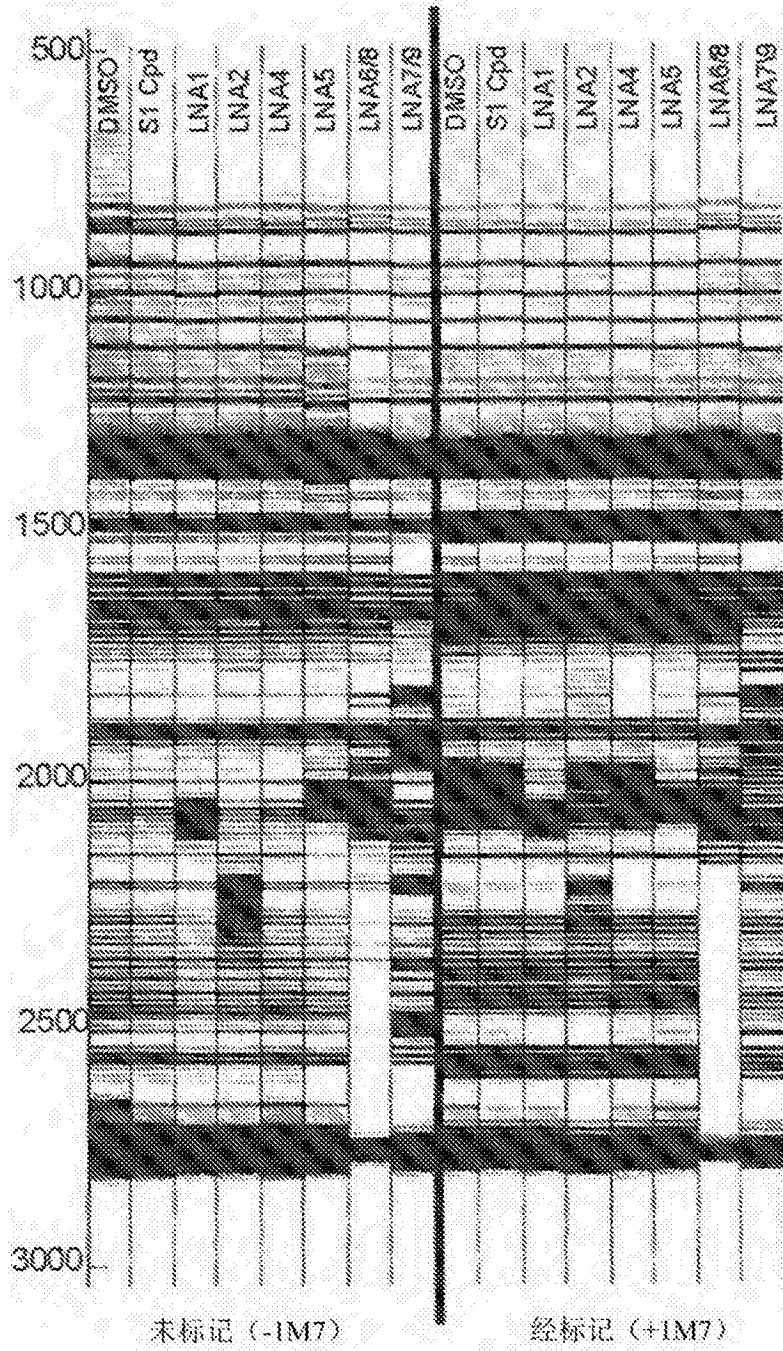


图16A

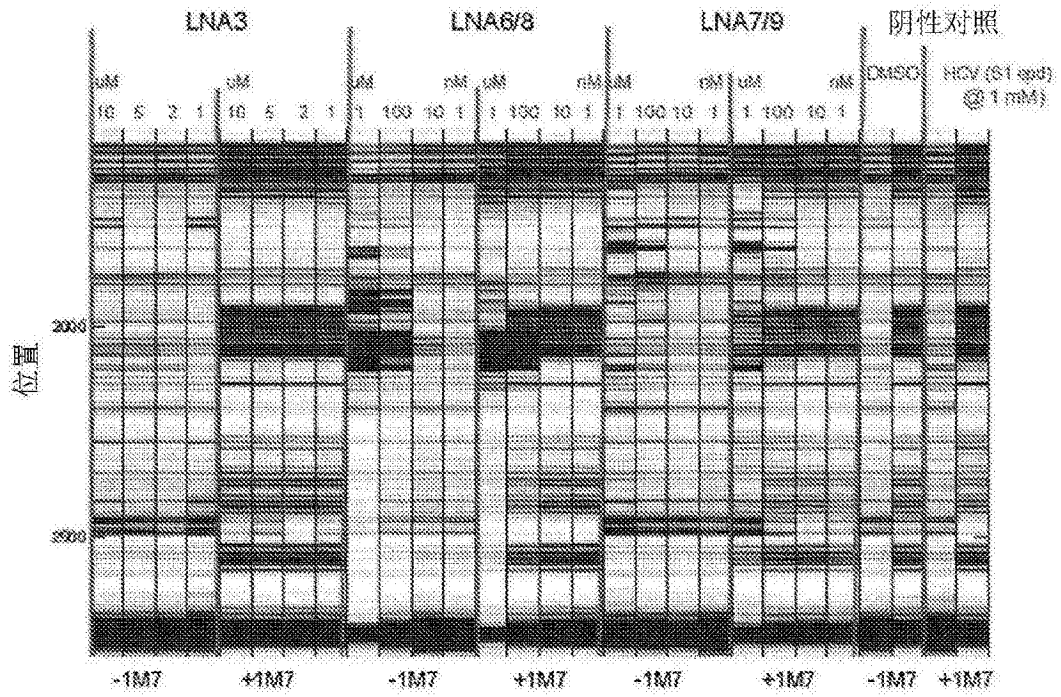


图16B

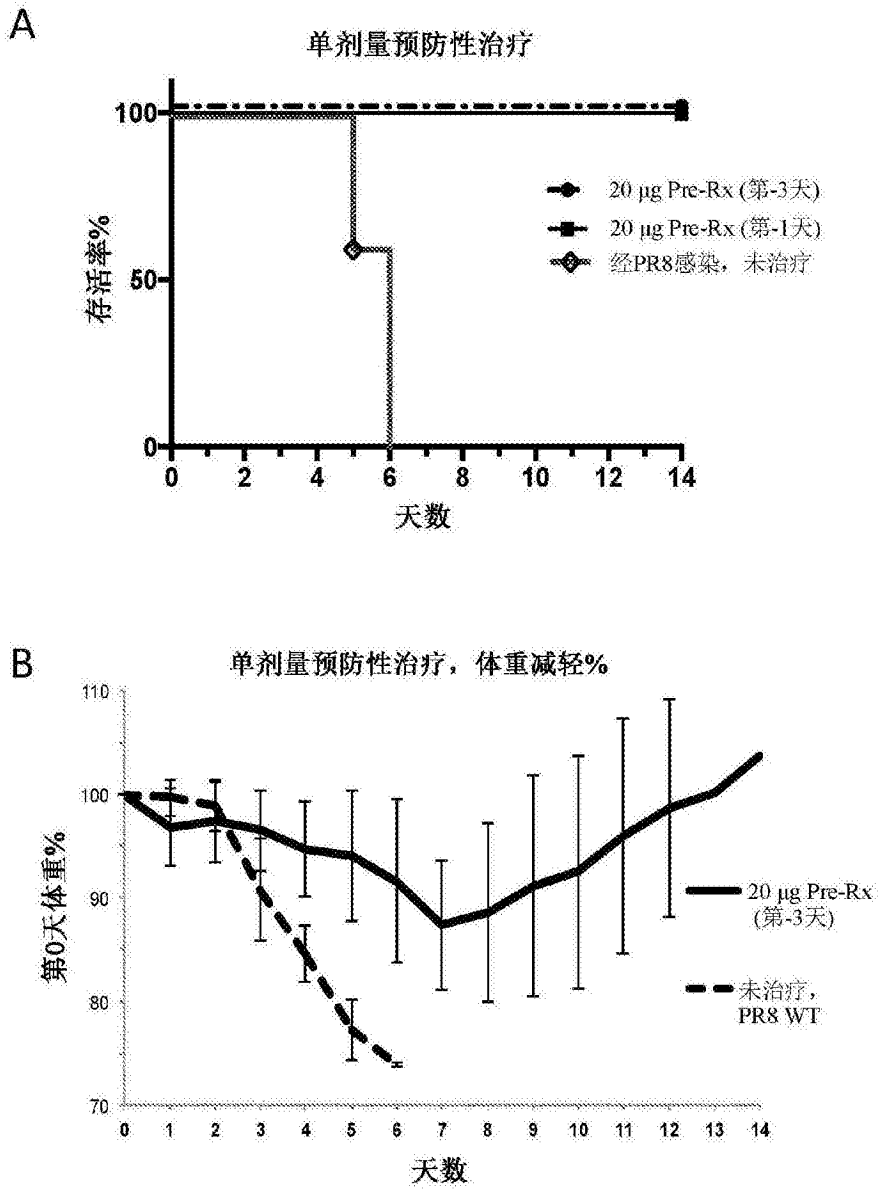


图17

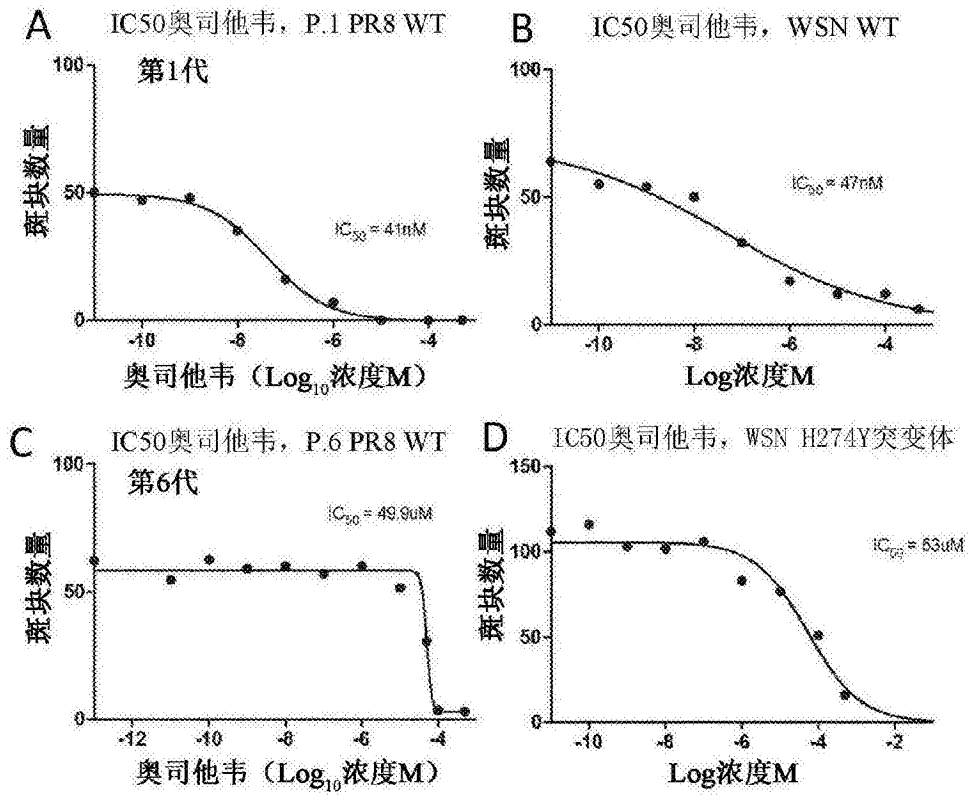


图18

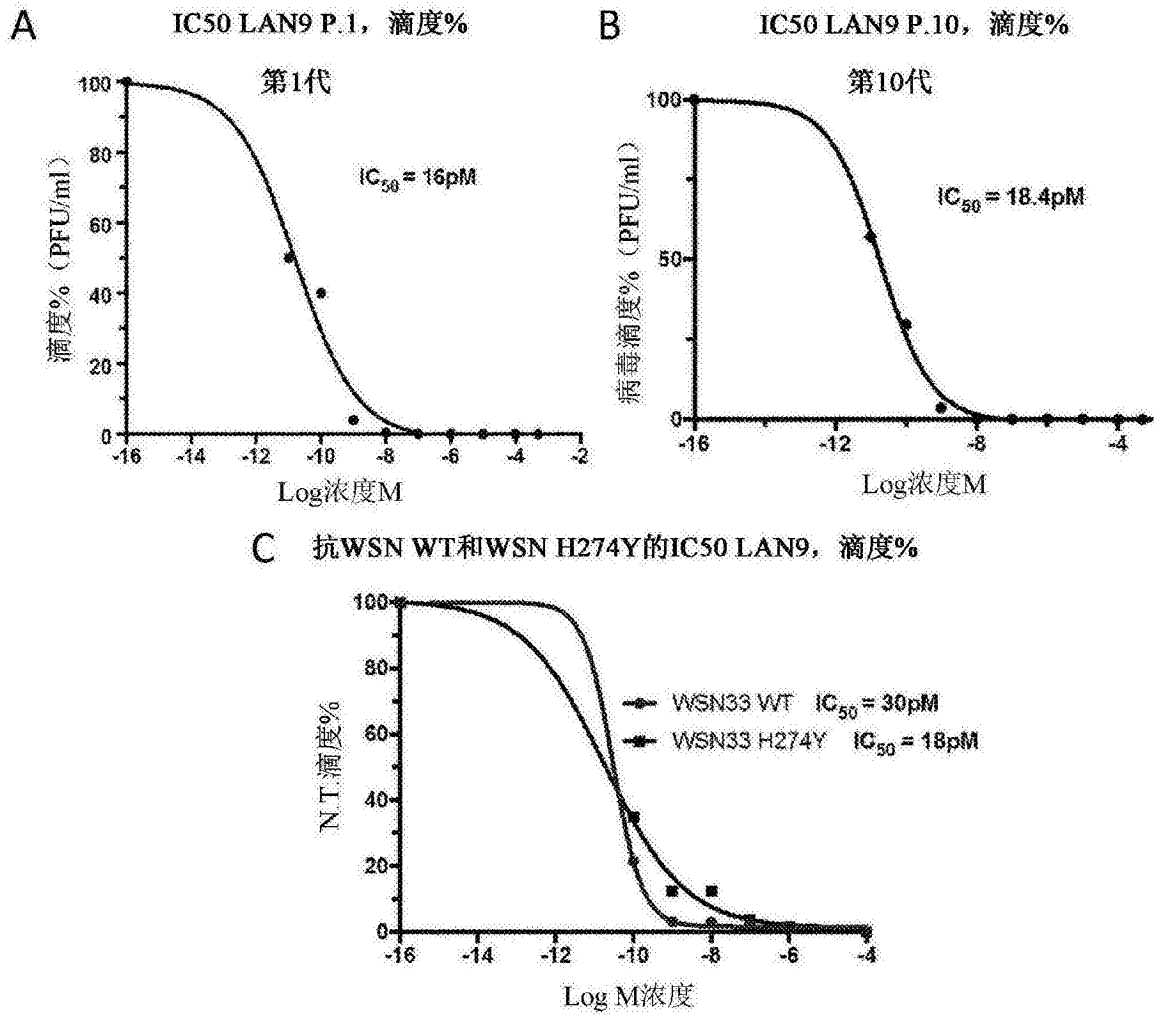


图19