



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101314775 B

(45) 授权公告日 2013.02.06

(21) 申请号 200810110007.3 *C12N 5/10*(2006.01)
(22) 申请日 2008.06.02 *A61K 31/713*(2006.01)
(66) 本国优先权数据 *A61K 38/46*(2006.01)
200710105818.X 2007.05.31 CN *A61K 48/00*(2006.01)
(73) 专利权人 厦门大学 *A61P 31/18*(2006.01)
地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路 *C12Q 1/68*(2006.01)
422 号
专利权人 养生堂有限公司
(72) 发明人 程通 张涛 张雅丽 苗季 张军
夏宁邵
(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 罗菊华

审查员 张颖

(51) Int. Cl.
C12N 15/11(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
C12N 15/867(2006.01)
C12N 9/22(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 6 页

(54) 发明名称

可用于艾滋病治疗的 RNA 干扰靶点

(57) 摘要

本发明涉及可用于治疗艾滋病的 32 个不同的靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点,可用于制备治疗艾滋病的药物和方法。本发明提供了经改造的可用于表达靶向 HIV 的 siRNA 和 / 或 miRNA 和 / 或核酶和 / 或反义寡核苷酸的重组表达载体和包装载体 (特别是慢病毒)。本发明涉及具有抑制 HIV 复制和病毒基因表达能力的可表达和 / 或被导入了以本发明提供的 RNA 干扰靶点为依据获得的 siRNA 和 / 或 miRNA 和 / 或核酶和 / 或反义寡核苷酸和 / 或药物的细胞。

1. 靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点,其序列选自:
 - (1) SEQ ID NO :1 序列 ;或者
 - (2) 上述序列的互补序列。
2. 包含权利要求 1 的 RNA 干扰靶点的核酸构建体。
3. 包含权利要求 1 的 RNA 干扰靶点的载体。
4. 依据权利要求 1 所述的 RNA 干扰靶点获得的、能够抑制 HIV 相应基因的表达和 / 或 HIV 的复制和 / 或感染的 siRNA,其序列是 AAAUUGGAUGACAGAAACC UUCAAGAGA GGUUUCUGUCAUCCAAUUU UU。
5. 一种重组表达载体,其可表达权利要求 4 的 siRNA。
6. 权利要求 5 的重组表达载体,其包含靶向 HIV 的 siRNA 的编码核酸序列,这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接,使得可在动物细胞中表达所述的 siRNA。
7. 权利要求 6 的重组表达载体,其中所述动物细胞是哺乳动物细胞。
8. 权利要求 7 的重组表达载体,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。
9. 权利要求 6 的重组表达载体,其中所述动物细胞是 HIV 受体细胞,所述 HIV 受体细胞是 CD4+ 细胞或 CD34+ 细胞。
10. 权利要求 5 的重组表达载体,其是质粒载体或病毒载体。
11. 权利要求 10 的重组表达载体,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
12. 权利要求 11 的重组表达载体,其中所述逆转录病毒载体是慢病毒载体。
13. 转化或转染或转导了权利要求 5-12 任一项的重组表达载体的分离的细胞。
14. 一种改造的分离的细胞,其可表达或包含有权利要求 4 的 siRNA。
15. 权利要求 14 的改造的细胞,其在基因组中或者基因组外携带权利要求 1 中所述的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列,这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接,使得可在该细胞中表达所述 siRNA。
16. 权利要求 15 的改造的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。
17. 权利要求 16 的改造的细胞,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。
18. 权利要求 15 的改造的细胞,其中所述细胞是 HIV 受体细胞,所述 HIV 受体细胞是 CD4+ 细胞或 CD34+ 细胞。
19. 制备权利要求 13-18 任一项的细胞的方法,包括用权利要求 5-12 任一项的重组表达载体转化或转染或转导细胞。
20. 权利要求 4 的 siRNA、或权利要求 5-12 任一项的重组表达载体、或权利要求 13-18 任一项的细胞在制备治疗 HIV 感染或者 HIV 患者或者抑制 HIV 复制或者 HIV 基因表达的药物中的用途。

可用于艾滋病治疗的 RNA 干扰靶点

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学、细胞生物学和基因治疗领域。更具体地,涉及可用于治疗艾滋病的 RNA 干扰 (RNAi) 的 32 个靶点以及应用这些靶点的重组表达载体和应用这些靶点以不同方式获得的用于制备治疗艾滋病的药物和方法。

背景技术

[0002] 由艾滋病毒 (HIV) 感染引起的获得性免疫缺陷综合症 (AIDS, 艾滋病) 是全世界面临的最主要健康威胁之一。目前艾滋病已几乎蔓延到世界各国,全球的艾滋病患者已超过 4000 万,已有近 3000 万人被夺去生命 (WHO, 全球艾滋病流行报告, 2004 年)。近年来,我国艾滋病传播呈快速增长趋势,现感染者累计已达 84 万人。目前,治疗 HIV 感染的方法主要是采用高强度的抗逆转录病毒治疗,如联合使用针对病毒逆转录酶和蛋白酶的抑制剂。但由于 HIV 的高突变率及复杂的致病机理,该类型方法无法彻底根除体内病毒。因此,迫切需要发展新的治疗手段以对付艾滋病的威胁。

[0003] RNA 干扰 (RNAi) 是一种由双链 RNA (dsRNA) 介导的细胞内抑制基因表达的机制,是 1998 年在线虫中进行基因表达抑制研究中被首次提出 (Fire A 等, 自然, 1998 年, 391 卷 :806-811 页)。之后进一步发现 RNAi 广泛存在于高等哺乳动物以及真菌、拟南芥、水螅、涡虫、锥虫、斑马鱼等几乎所有的真核生物中,是一种普遍存在和保守的抑制基因表达的机制,可起到调控基因表达、抗病毒入侵、抑制转座子活动等作用 (Dykxhoorn DM 等, 自然分子细胞生物学综述, 2003 年, 4 卷 :457-467 页)。目前 RNAi 作用的机制已基本阐明:内源或外源产生的 dsRNA 分子在细胞质中被属 RNA 酶 III 的 Dicer 切割成小干扰 RNA (siRNA)。典型的 siRNA 结构特征为:5' 端磷酸化,3' 端呈对称性突出 2-3nt 并带羟基,长度为 19-23nt 的 dsRNA。siRNA 分子与 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-inducing silencing complex, RISC) 的蛋白复合体进行结合, RISC 具有解螺旋酶和核酸内切酶活性。siRNA 分子在复合体中被解聚,其中反义链可与匹配的靶 mRNA 按碱基配对原则结合,并引导与之结合的 RISC 将靶 mRNA 在与反义链的结合区中部距 5' 端 10nt 的位置处酶解,从而抑制靶基因的表达。目前获得 siRNA 的方法主要有:可表达小发夹 RNA (shRNA) 的质粒和重组病毒载体、化学合成方法、体外转录等。

[0004] 目前, RNAi 在包括艾滋病在内的病毒性疾病以及肿瘤等疾病的防治研究已显示出良好的应用前景。研究已显示靶向 HIV-1 mRNA 的 siRNA 可在体外培养的 HIV-1 易感细胞中抑制 HIV-1 的复制和病毒基因的表达 (Martinez MA 等, 免疫学趋势, 2002 年, 23 卷 :559-561 页)。由于 HIV 的致病机理复杂,要达到有效的治疗目的必须能够高效抑制病毒复制和基因表达。然而,并非所有符合常规设计要求的 RNAi 靶点都能够有效抑制靶基因的表达,不同靶点间的抑制效率各有差别。因此,选择获得合适的具有高抑制效率的 RNAi 靶点成为 RNAi 技术是否能够成功应用于艾滋病治疗的重要因素。选择合适的 RNAi 靶点需要从结构特征、抑制效率、非人类基因同源性等方面进行综合考虑。可使用的辅助方法包括目前已提出的 siRNA 辅助设计软件、RNA 分子结构分析、核酸序列分析比对以及实验经验等,并

通过具体的抑制实验予以验证。

[0005] 以 RNA 干扰技术为基础将有望开发出新型的更有效的艾滋病治疗方法,该类型的治疗方法需要提供可有效抑制 HIV 复制和表达的 RNA 干扰靶点。本发明满足了这一要求,提供了可用于该目的的 RNA 干扰靶点、重组表达载体等。

发明内容

[0006] 本发明提供了可高效靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点,可用于构建包含或导入了本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列的表达质粒、重组病毒载体和细胞,及可用于获得包含有由本发明涉及的 RNA 干扰靶点获得的艾滋病治疗药物。在一个具体方面,本发明具体涉及靶向 HIVGAG、POL、VIF、或者 VPU 基因的 RNA 干扰靶点序列。

[0007] 本发明提供的 RNA 干扰靶点可高效靶向 HIV,可高效抑制 HIV 的复制和病毒基因表达。本发明提供的 RNA 干扰靶点是通过以下方法获得的:选择设计可靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点序列,通过设计合适的引物构建 shRNA,并克隆入 pSUPER 载体获得相应的 shRNA 表达质粒,将该质粒分别与 HIV 感染性克隆质粒进行共转染实验,通过检测 HIV p24 蛋白的表达水平及鉴定抑制特异性等分析筛选获得高效的 RNA 干扰靶点。

[0008] 本发明提供特异靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点序列,该序列选自:

[0009] (1) SEQ ID NO:1-32 中任何一个所示的序列,或者

[0010] (2) 与 (1) 中序列具有至少 70% (优选至少 80%、85%、90%、95%、98% 或更高) 一致性的序列,或者

[0011] (3) 在严紧条件下或者高度严紧条件与 (1) 中序列能够杂交的核苷酸序列,或者

[0012] (4) 与 (1) 中序列仅有 1-3 个 (优选 1-2 个,更优选 1 个) 核苷酸不同的序列;或者

[0013] (5) 上述序列的片段或者互补序列。

[0014] 在一个具体方面,所述 RNA 干扰靶点序列可以靶向 HIV GAG、POL、VIF、或者 VPU 基因。

[0015] 本发明提供的 RNA 干扰靶点可以是 DNA 或 RNA 序列。

[0016] 在一个优选实施方案中,所述 RNA 干扰靶点选自 siVIF037 (SEQ ID NO:24)、siPOL1102 (SEQ ID NO:8)、siPOL1217 (SEQ ID NO:10)、siPOL1327 (SEQ ID NO:29)、和 siPOL2252 (SEQ ID NO:22)。

[0017] 本发明还提供包含该 RNA 干扰靶点序列的核酸构建体或载体如表达载体。

[0018] 本发明还提供依据上述的 RNA 干扰靶点序列获得的、能够抑制 HIV 相应基因的表达和/或 HIV 的复制和/或感染的 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸。

[0019] 本发明提供了改造后的重组表达载体,其可用于表达本发明的靶向 HIV 的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

[0020] 在一个实施方案中,本发明重组表达载体具有以下特征:包含了本发明提供的 RNA 干扰靶点序列的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸的编码核酸序列,这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接,使得可在动物细胞 (特别是哺乳动物细胞,如人细胞,如 HIV 受体细胞,优选 CD4⁺ 细胞,如哺乳动物干细胞,优选造血干细胞) 中表达所述靶向 HIV 的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

[0021] 本发明的重组表达载体可以是质粒载体或病毒载体,例如逆转录病毒载体,包括慢病毒载体。优选地,所述重组表达载体是逆转录病毒载体,更优选慢病毒载体。

[0022] 本发明提供了改造后的用于生产逆转录病毒载体(例如慢病毒载体)的包装载体(如包装质粒),其含有突变后的来源于 HIV 的用于表达包装蛋白的基因序列,特别地改造后的基因序列可相互独立地具有如下序列特征:

[0023] 包装载体的序列突变情况如下所示:

[0024] 包装载体:-----GTAGACAGGATGAGGATTA-----

[0025] 突变为:-----GTAGACAGGACGAAGATTA-----

[0026] 包装载体:-----GGATTTACCACACCAGACA-----

[0027] 突变为:-----GGATTTACCACCCCGACA-----

[0028] 包装载体:-----GCTGGACTGTCAATGACAT-----

[0029] 突变为:-----GCTGGACTGTGAACGACAT-----

[0030] 包装载体:-----GCACTAACAGAAGTAGTAC-----

[0031] 突变为:-----GCACTAACAGAAGTGGTGC-----

[0032] 包装载体:-----TAGTAGCCAGCTGTGATAA-----

[0033] 突变为:-----TAGTAGCCAGCTGCGACAA-----

[0034] 本发明还涉及分离的细胞,其包含:(1) 本发明 RNA 干扰靶点序列,或者(2) 含有本发明 RNA 干扰靶点序列的核酸构建体或载体如表达载体。

[0035] 本发明还涉及转化或转染或转导了重组表达载体的分离的细胞,所述重组表达载体可表达本发明的靶向 HIV 的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

[0036] 本发明还涉及转化或转染或转导了或包含了本发明的包装载体(如包装质粒)的分离的细胞。

[0037] 本发明还涉及包含上述细胞的组织和生物,如动物。

[0038] 本发明还涉及一种改造的细胞(包括动物例如哺乳动物优选人的细胞,优选 HIV 受体细胞和干细胞,如 CD4+ 细胞和 CD34+ 细胞),其可表达或包含有本发明 siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸。

[0039] 本发明还涉及在基因组中或者基因组外携带本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列的细胞,包括原核细胞(如细菌细胞,如大肠杆菌细胞)和真核细胞(如真菌细胞,昆虫细胞,植物细胞,动物细胞,优选哺乳动物如人的细胞,优选 HIV 受体细胞和干细胞,如 CD4+ 细胞和 CD34+ 细胞),其包含有本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列(这些编码核酸序列可与表达控制序列可操作地连接,使得可在该细胞中表达所述的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸)。

[0040] 本发明还涉及导入了由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸的细胞,包括原核细胞(如细菌细胞,如大肠杆菌细胞)和真核细胞(如真菌细胞,昆虫细胞,植物细胞,动物细胞,优选哺乳动物如人的细胞,优选 HIV 受体细胞和干细胞,如 CD4+ 细胞和 CD34+ 细胞),其被导入了包含有由本发明涉及的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸。

[0041] 在一个优选的实施方案中,含有本发明获得的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列的 shRNA 表达元件导入 HIV 受体细胞后可使细胞获得抑制 HIV 复制和病毒基因表达的能力。

[0042] 本发明还涉及包含上述细胞的组织和生物,如动物。本发明还涉及包含本发明的细胞的药物组合物。

[0043] 另一方面,本发明还涉及制备本发明改造细胞的方法,包括用本发明的重组表达载体转化或转染或转导细胞(包括动物例如哺乳动物优选人的细胞,优选 HIV 受体细胞和干细胞,如 CD4⁺ 细胞和 CD34⁺ 细胞)。

[0044] 在一个实施方案中,所述方法包括用本发明重组逆转录病毒载体(例如慢病毒载体,如慢病毒 Lenti-VIF037 等)转导哺乳动物优选人的 HIV 受体细胞和干细胞,如 CD4⁺ 细胞和 CD34⁺ 细胞。

[0045] 在上述方法,所述细胞可以是分离的(或离体的),例如从感染 HIV 的患者或者正常个体分离的,或者是在体的,或者是体外培养的细胞株。

[0046] 本发明还涉及 DNA 序列的组合,其包括或者由编码正义 RNA 片段的第一 DNA 序列和编码反义 RNA 片段的第二 DNA 序列组成,所述正义 RNA 片段包含本发明靶点序列所编码的 RNA 序列,反义 RNA 片段和正义 RNA 片段能形成双链 RNA,该双链 RNA 能抑制 HBV 基因的表达和/或 HBV 的复制和/或感染。

[0047] 本发明还涉及小分子干扰核糖核酸(siRNA),其包括正义 RNA 片段和反义 RNA 片段,所述正义 RNA 片段包含本发明靶点序列编码的 RNA 序列,反义 RNA 片段和正义 RNA 片段能形成双链 RNA,且该双链 RNA 能抑制 HIV 相应基因的表达和/或 HIV 的复制和/或感染。

[0048] 本发明还涉及由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸在制备治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的药物和/或药物组合物中的用途。

[0049] 本发明还涉及由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和/或 miRNA 和/或核酶和/或反义寡核苷酸在制备抑制 HIV 复制或者 HIV 基因表达的药物和/或药物组合物中的用途。

[0050] 本发明还涉及本发明 RNA 干扰靶点序列、或核酸构建体或载体、或重组表达载体在制备治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的药物中的用途。

[0051] 本发明还涉及本发明的经改造的细胞(包括动物例如哺乳动物优选人的细胞,优选 HIV 受体细胞和造血干细胞,如 CD4⁺ 细胞和 CD34⁺ 细胞)在制备治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的药物和/或药物组合物中的用途。

[0052] 本发明还涉及本发明的 siRNA 靶序列在筛选抗 HIV 药物中的应用。

[0053] 本发明还涉及治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的方法,包括向有需要的个体给予本发明的 RNA 干扰靶点序列、核酸构建体或载体、重组表达载体、siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、或细胞。

[0054] 本发明还涉及本发明载体和细胞用于治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的用途。

[0055] 本发明还涉及治疗 HIV 感染或者 HIV 患者的方法,包括向患者给予治疗有效量的本发明所述 RNA 干扰靶点序列、核酸构建体或载体、siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、表达载体、细胞或 siRNA。

[0056] 本发明还涉及抑制 HIV 复制或者 HIV 基因表达的方法,包括向有需要的个体给予有效量的本发明所述 RNA 干扰靶点序列、核酸构建体或载体、siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、表达载体、细胞或 siRNA。

[0057] 本发明还涉及本发明所述 RNA 干扰靶点序列、核酸构建体或载体、siRNA 或 miRNA 或核酶或反义寡核苷酸、表达载体、细胞或 siRNA, 用于治疗 HIV 感染或者 HIV 患者, 或者用于抑制 HIV 复制或者 HIV 基因表达。

[0058] 下面结合附图对本发明进行更详细的说明。从下文的详细描述中, 本发明的上述方面和本发明的其他方面将是明显的。

附图说明

[0059] 图 1 为 pSUPER-siRNA 系列表达质粒的构建流程示意图。

[0060] 图 2 显示了分别靶向我们获得的 32 个 RNA 干扰靶点的 siRNA 表达质粒在与 HIV 感染性克隆质粒共转染实验中对 HIV 基因表达的抑制效果。结果显示, 这些 RNA 干扰靶点可抑制 HIV。

[0061] 图 3 显示了构建获得的表达载体 pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 可有效表达所编码的 siRNA 序列, 且具有基因靶向特异性。pGL3-VIF 与表达载体 pDEST-VIF037 共转染时 luciferase 基因的表达受到了有效抑制, 而 pGL3-control 与表达载体 pDEST-VIF037 共转染时 luciferase 基因的表达不会受到抑制。pGL3-POL 分别与表达载体 pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 共转染时 luciferase 基因的表达受到了抑制, 而 pGL3-control 分别与表达载体 pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 共转染时 luciferase 基因的表达不会受到抑制。

[0062] 图 4 显示了突变后的慢病毒包装载体的表达不会受到表达靶向 HIV 的 siRNA 的慢病毒表达载体的影响。

[0063] 图 5 显示了经携带有靶向 HIV 的 siRNA 表达序列的重组慢病毒转导后的 HIV 受体细胞 MT-4 细胞对 HIV-1_{NL4-3} 复制的抑制作用。

[0064] 图 6 显示了改造后的 HIV 受体细胞对 HIV-1_{NL4-3} 复制的抑制作用。

[0065] 图 7 显示了合成的靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点的 siRNA 对 HIV 的抑制效果。siR-VIF037 转染后可抑制 HIV 在细胞中的复制表达。

[0066] 图 8 显示了合成的并经 2'-Ome (2'-甲氧基) 修饰和 / 或磷酸化修饰和 / 或固醇修饰的靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点的 siRNA 对 HIV 的抑制效果。siRpo-VIF037、siRpo-POL1217、siRpoC-VIF037、siRpoC-POL1217 转染后可抑制 HIV 在细胞中的复制表达。

[0067] 图 9 显示了靶向 HIV 的 siRNA 在 H²K-PBL-SCID 小鼠模型中具有抑制 HIV 复制的能力。VIF037 杂合小鼠可显示出抗 HIV 感染的能力, 相比对照组可显著降低血清中 HIV 蛋白的水平。

具体实施方式

[0068] 除非特别说明, 本发明的术语具有本领域通常使用的含义。

[0069] 本发明提供了可高效靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点, 包含如下序列或与其具有至少 70% (优选至少 80%、85%、90%、95%、98% 或更高) 一致性的序列中的任何一个或几个序列: SEQ ID NO: 1-32。

[0070] 一致性 (identity) 可以按照本领域公知的方法计算。适合于确定序列一致性和

序列相似性百分数的算法的一个优选例子是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法,它们分别描述在 Altschul 等 (1977) Nucl. Acid. Res. 25 :3389-3402 和 Altschul 等 (1990) J. Mol. Biol. 215 :403-410。采用例如本文所述参数, BLAST 和 BLAST 2.0 可以用于确定本发明的多核苷酸和多肽的序列一致性百分数。执行 BLAST 分析的软件可以通过国立生物技术信息中心为公众所获得。

[0071] 在其它实施方案中,所述 RNA 干扰靶点的序列具有在严紧条件下或者高度严紧条件与本文提供的多核苷酸、或其片段、或其互补序列能够杂交的多核苷酸序列。在分子生物学领域中杂交技术是熟知的。为了举例说明的目的,所述杂交的条件是严紧条件,例如与滤膜结合的 DNA 在 $6\times$ 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中约 45°C 下杂交,之后在 $0.2\times$ SSC/0.1% SDS 中于约 $50-65^{\circ}\text{C}$ 下作一或多次洗涤;高度严紧条件,例如与滤膜结合的核酸在 $6\times$ SSC 中约 45°C 下杂交,之后在 $0.1\times$ SSC/0.2% SDS 中于约 68°C 下作一或多次洗涤;或本领域技术人员已知的其它严紧杂交条件(参见例如 Ausubel, F. M. 等编,1989, Current Protocols in Molecular Biology, 第 1 卷, Green Publishing Associates, Inc., 和 John Wiley & Sons, Inc., 纽约, 第 6.3.1-6.3.6 和 2.10.3 页)。

[0072] 本发明还涉及在严紧条件下或者高度严紧条件与 SEQ ID NO :1-32 的任一序列、或其片段、或其互补序列能够杂交的核苷酸序列。

[0073] 在本发明中, siRNA 和 / 或 miRNA 和 / 或核酶和 / 或反义寡核苷酸可被设计成靶向目的基因或者调节序列,例如需要抑制其表达的基因或其调控序列,以便抑制或降低其表达。所针对的基因或其调控序列可以是需要抑制或降低其表达的任何基因或其调控序列,例如来自病原体的、或者参与癌症形成和发展的那些,特别是靶向 HIV。本发明的 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸可按照常规方法设计。

[0074] “依据本发明 RNA 干扰靶点序列获得的 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸”指的是通过设计表达或设计合成等方式得到的 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸,其所作用的靶序列(可以是 DNA 或 RNA 序列)为或包含有本发明涉及的 RNA 干扰靶点序列。

[0075] siRNA 的常规设计方法可参考文献(如: Reynolds A 等, 自然生物技术, 2004 年, 22 卷 :326-330) 或 Amhion、Qiagen 等公司网站的公开资料或实施例 1 中的描述。miRNA 的常规设计方法可参考文献(Lo HL 等, 基因治疗, 2007 年, 14 卷 :1503-1512 页), 选择靶序列的方法与 siRNA 的设计方法相似, 例如可将设计的含有靶序列的正义链及相应的反义链替换到 pri-microRNA 上, 使构建的 miRNA 可阻止含有靶序列的 mRNA 的表达。核酶的常规设计方法可参考文献(Haseloff J 等, 自然, 1988 年, 334 卷 :585-591 页), 例如可将与靶序列的前后序列互补的核苷酸序列分别置于核酶保守性核心的序列(如锤头结构)前后, 使构建的核酶能在靶序列处切割含有靶序列的核酸。反义寡核苷酸的常规设计方法可参考文献(Matveeva OV 等, 核酸研究, 2003 年, 31 卷 :4989-4994 页)。

[0076] 本发明使用的启动子可以是任何适于在目的细胞中表达目的基因的启动子。可以是组成型的, 也可以是诱导型的。还可以是复合启动子, 如双启动子。

[0077] “可操作地连接”是指所连接的分子的连接方式使得能够实现预期的功能。例如, 表达控制序列与基因编码序列的可操作的连接可实现表达控制序列对基因编码序列的表达控制作用。

[0078] “表达控制序列”是实现基因表达所需要的控制序列, 是本领域熟知的。通常必须

包括启动子,常常也包括转录终止序列,也可以包含其他序列,如增强子序列。基因表达对于 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸等是指转录,也可以包括转录后加工;对于蛋白质编码序列通常是指转录和翻译,产生成熟的蛋白质。

[0079] 本发明提供可高效靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点以及根据该靶点设计的 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸。本发明的 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸包括对构成 siRNA、miRNA、核酶和反义寡核苷酸的磷酸骨架和 / 或核糖和 / 或碱基等构成部分进行化学修饰的修饰产物,修饰方法是本领域已知的,可以为硫代修饰和 / 或固醇修饰和 / 或 PEG 修饰和 / 或糖修饰和 / 或 LNA 修饰等,可参见文献 :Dykxhoorn DM 等,生物医学工程年度综述,2006 年,8 卷 :377-402 页 ;Behlke MA 等,分子治疗,2006 年,13 卷 :644-670 页等。

[0080] 在一个具体实施方案中,本发明涉及小分子干扰核糖核酸 (siRNA),其包括正义 RNA 片段和反义 RNA 片段,所述正义 RNA 片段包含本发明 RNA 干扰靶点编码的 RNA 序列,反义 RNA 片段和正义 RNA 片段能形成双链 RNA,且该双链 RNA 能抑制 HIV 相应基因的表达和 / 或 HIV 的复制和 / 或感染。

[0081] 在本发明中,术语“小分子核糖核酸”、“小分子干扰核糖核酸”或“siRNA”可互换使用,它们都指能够抑制 HIV 靶基因表达、包括正义 RNA 片段区域和反义 RNA 片段区域的核糖核酸 (RNA)。

[0082] 相关地,本发明还提供 DNA 序列的组合,其包括或者由编码正义 RNA 片段的第一 DNA 序列和编码反义 RNA 片段的第二 DNA 序列组成,所述正义 RNA 片段包含本发明靶序列所编码的 RNA 序列,反义 RNA 片段和正义 RNA 片段能形成双链 RNA,且该双链 RNA 能 (通过 RNA 干扰) 抑制 HIV 基因的表达和 / 或 HIV 的复制和 / 或感染。

[0083] 在本发明的这方面,所述正义 RNA 片段和反义 RNA 片段可以存在于两条不同的 RNA 链上或者存在于一条 RNA 链上,例如在一个单链 RNA 分子包含正义 RNA 片段和反义 RNA 片段。

[0084] 例如,本发明的 siRNA 可以为发夹型单链 RNA 分子,其中正义 RNA 片段和反义 RNA 片段之间的互补区域形成双链 RNA 区域。

[0085] 正义 RNA 片段和反义 RNA 片段的长度优选为 8-50 个核苷酸,优选 10-30 (更优选 15-27,19-23,如 19、20 或者 21) 个。但也可以更长或者更短。

[0086] 在正义 RNA 片段和反义 RNA 片段形成的双链 RNA 的互补区域至少有 10 个 (优选 15 个,更优选 18 个,如 19、20 或者 21 个) 碱基对。优选地,所述正义 RNA 片段与反义 RNA 片段之间的互补区域含 19、20、或 21 对互补碱基。

[0087] 在一个实施方案中,在正义 RNA 片段和反义 RNA 片段之间允许有少量的错配,例如 1-5 个,如 1 个或 2 个或 3 个或 4 个碱基错配。在一个优选实施方案中,正义 RNA 片段和反义 RNA 片段完全互补。

[0088] 在一个实施方案中,本发明的 siRNA 为具有 10-30 (优选,15-27,更优选 19-23) 对碱基的双链 RNA 分子,所述双链中至少有 10 个 (优选 15 个,更优选 18 个) 碱基互补配对。

[0089] 在一个优选的实施方案中,正义 RNA 片段和反义 RNA 片段的 GC 含量为 35% -75%,例如 40-60%、45-55%、48-52%,如约 50%。

[0090] 在一个优选的实施方案中,正义 RNA 片段和反义 RNA 片段与已知人类基因和基因表达片段无显著的一致性。显著的一致性是指至少 60%,例如 70,80,90% 一致性。

[0091] 优选的是,所述正义 RNA 片段自 5' 端开始的 19 个核苷酸序列中的碱基为鸟嘌呤 (G) 的核苷酸数量与碱基为胞嘧啶 (C) 的核苷酸数量之和占除去 3' 端的 TT 以外的 19 个核苷酸数量的比例为 35% -75% (即 G/C 比例),所述反义 RNA 片段及其一个核苷酸的突变体与已知人类基因和基因表达片段无显著一致性。

[0092] 在本发明重组表达载体的一个实施方案中,本发明重组表达载体包含本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列,这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接,使得可在动物细胞 (特别是哺乳动物细胞,如人细胞,如 HIV 受体细胞和干细胞) 中表达所述靶向 HIV 的 siRNA 和 / 或 miRNA 和 / 或核酶和 / 或反义寡核苷酸。

[0093] 类似地,在制备本发明改造细胞的方法中,可以通过用包含本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列的表达载体转化或转染或转导细胞 (包括动物例如哺乳动物优选人的细胞,优选 HIV 受体细胞和干细胞,如 CD4+ 细胞和 CD34+ 细胞) 来获得本发明改造细胞,只要最终得到的细胞包含本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列即可。

[0094] 也可以通过在所述细胞中导入包含有由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和 / 或 miRNA 和 / 或核酶和 / 或反义寡核苷酸来获得本发明改造细胞,只要得到的细胞包含有由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和 / 或 miRNA 和 / 或核酶和 / 或反义寡核苷酸即可。

[0095] 本发明的重组表达载体可以是质粒载体或病毒载体,例如逆转录病毒载体,包括慢病毒载体。优选地,所述重组表达载体是逆转录病毒载体,更优选慢病毒载体。

[0096] 本发明的改造的细胞优选是哺乳动物 (优选人) 的细胞,优选 HIV 受体细胞,如 CD4+ 细胞,优选干细胞,特别是造血干细胞,如 CD34+ 细胞。所述细胞在基因组中或基因组外携带本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列,这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接,使得可在该细胞中表达所述 siRNA 和 / 或 miRNA 和 / 或核酶和 / 或反义寡核苷酸。

[0097] 本发明的重组载体和改造细胞可以用于对 HIV 感染的治疗。

[0098] 在具体的实施方案中,涉及以下内容:

[0099] 1. 靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点序列:

[0100] siGAG0942 :AAATTGGATGACAGAAACC (SEQ ID NO. 1)

[0101] siGAG1091 :CTGAAGCAATGAGCCAAGT (SEQ ID NO. 2)

[0102] siGAG1273 :GATTGTA CTGAGAGACAGGCT (SEQ ID NO. 3)

[0103] siPOL0922 :TGGAAAGGATCACCAGCAA (SEQ ID NO. 4)

[0104] siPOL0927 :AGGATCACCAGCAATATTC (SEQ ID NO. 5)

[0105] siPOL0937 :GCAATATTCAGTGTAGCA (SEQ ID NO. 6)

[0106] siPOL1026 :GTATGTAGGATCTGACTTA (SEQ ID NO. 7)

[0107] siPOL1102 :GGATTTACCACACCAGACA (SEQ ID NO. 8)

[0108] siPOL1131 :GAAAGAACCCTCCATTCCTT (SEQ ID NO. 9)

[0109] siPOL1217 :GCTGGACTGTCAATGACAT (SEQ ID NO. 10)

[0110] siPOL1223 :CTGTCAATGACATACAGAA (SEQ ID NO. 11)

[0111] siPOL1402 :CCGGTACATGGAGTGTATT (SEQ ID NO. 12)

[0112] siPOL1411 :GGAGTGTATTATGACCCAT (SEQ ID NO. 13)

- [0113] siPOL1468 :GGCCAATGGACATATCAAA (SEQ ID NO. 14)
- [0114] siPOL1470 :CCAATGGACATATCAAATT (SEQ ID NO. 15)
- [0115] siPOL1544 :CCCACACTAATGATGTGAA (SEQ ID NO. 16)
- [0116] siPOL1548 :CACTAATGATGTGAAACAA (SEQ ID NO. 17)
- [0117] siPOL1550 :ACACTAATGATGTGAAACAATT (SEQ ID NO. 18)
- [0118] siPOL1734 :GAAGTTATGGTACCAGTTA (SEQ ID NO. 19)
- [0119] siPOL1762 :CCCATAATAGGAGCAGAAA (SEQ ID NO. 20)
- [0120] siPOL2008 :TCAGAGTTAGTCAGTCAAA (SEQ ID NO. 21)
- [0121] siPOL2252 :TAGTAGCCAGCTGTGATAA (SEQ ID NO. 22)
- [0122] siVIF009 :CAGATGGCAGGTGATGATT (SEQ ID NO. 23)
- [0123] siVIF037 :GTAGACAGGATGAGGATTA (SEQ ID NO. 24)
- [0124] siVIF038 :TAGACAGGATGAGGATTAA (SEQ ID NO. 25)
- [0125] siGAG0432 :TCAGGCCATATCACCTAGA (SEQ ID NO. 26)
- [0126] siGAG0738 :AATAGGATGGATGACACAT (SEQ ID NO. 27)
- [0127] siGAG1438 :GGAGCCGATAGACAAGGAA (SEQ ID NO. 28)
- [0128] siPOL1327 :GCACTAACAGAAGTAGTAC (SEQ ID NO. 29)
- [0129] siVIF090 :TATTTCAAGGAAAAGCTAAG (SEQ ID NO. 30)
- [0130] siVIF344 :TTTCAGAATCTGCTATAAG (SEQ ID NO. 31)
- [0131] siVPU164 :GAGTGAAGGAGAAGTATCA (SEQ ID NO. 32)
- [0132] 2. 表达载体, 优选慢病毒载体, 可用于改造 HIV 受体细胞或造血干细胞。
- [0133] A. 一个可表达 MGMT (P140K) 基因和单个或多个 siRNAs、和 / 或 miRNAs、和 / 或靶向 HIV 的核酶的重组慢病毒载体。
- [0134] B. 一个改造后的用于生产慢病毒载体的包装载体 (如包装质粒), 其含有突变后的来源于 HIV 的用于表达包装蛋白的基因序列。
- [0135] 改造序列的例子为:
- [0136] 包装载体 :-----GTAGACAGGATGAGGATTA-----
- [0137] 突变为 :-----GTAGACAGGACGAAGATTA-----
- [0138] 包装载体 :-----GGATTTACCACACCAGACA-----
- [0139] 突变为 :-----GGATTTACCACCCCGACA-----
- [0140] 包装载体 :-----GCTGGACTGTCAATGACAT-----
- [0141] 突变为 :-----GCTGGACTGTGAACGACAT-----
- [0142] 包装载体 :-----GCACTAACAGAAGTAGTAC-----
- [0143] 突变为 :-----GCACTAACAGAAGTGGTGC-----
- [0144] 包装载体 :-----TAGTAGCCAGCTGTGATAA-----
- [0145] 突变为 :-----TAGTAGCCAGCTGCGACAA-----
- [0146] 该慢病毒在 HIV 受体细胞和 / 或造血干细胞上的应用。
- [0147] A. 可用于稳定表达抗 HIV 的分子, 如可在 HIV 受体细胞和 / 或造血干细胞中特异阻断 HIV 复制的 siRNA。
- [0148] B. 可用于防止造血干细胞被 BG/BCNU 杀死。

[0149] 3. 改造的细胞,如 HIV 受体细胞和造血干细胞,其包含有本发明涉及的 RNA 干扰靶点的编码核酸序列,可表达所述的 siRNA 和 / 或 miRNA 和 / 或核酶和 / 或反义寡核苷酸 ;或被导入了由本发明提供的 RNA 干扰靶点获得的 siRNA 和 / 或 miRNA 和 / 或核酶和 / 或反义寡核苷酸。

[0150] RNA 干扰靶点的序列 (SEQ ID NO :1-32)

[0151] 实施例

[0152] 实施例 1. siRNA 表达质粒的设计与构建

[0153] 靶向 HIV 的 RNA 干扰靶点序列的设计 :以 HIV 参考序列为靶序列,选择保守性好的区域进行步移设计 siRNA 序列 ;将初选获得的 siRNA 序列在 GenBank 中进行 BLAST 检索,选择与非靶向序列具有 3 个或 3 个以上碱基相异的序列作为候选序列。

[0154] siRNA 表达质粒的构建 :siRNA 的表达载体为 pSUPER 载体 (oligoengine 公司 Cat. No VEC-PBS-0001/0002),具体的构建过程可参见该公司的 pSUPER 载体实验指南 (www. oligoengine. com),构建简要流程可见示意图 1。分别合成带有 RNA 干扰序列的引物,将互补引物经退火处理后连接到经 Bgl II 和 Hind III 双酶切的 pSUPER 载体,经酶切和测序鉴定获得正确的 siRNA 表达质粒。

[0155] 对照 siRNA 表达质粒的构建 :以特异靶向 luciferase 基因的 siRNA 序列 siRNA-luc (具体序列是 5'-GTGCGCTGCTGGTGCAC-3') 以及不与 HIV 和人类基因相匹配的无关 siRNA 序列 siRNA-Nk (具体序列是 5'-TGCATCGGAAAATAGATGT-3') 作为对照。通过上述方法合成引物构建至 pSUPER 载体上,经酶切和测序鉴定后获得相应的 siRNA 表达质粒。

[0156] 实施例 2. 共转染实验筛选获得可高效抑制 HIV 的 RNA 干扰靶点

[0157] pNL4-3 质粒 (来自于巴斯德研究所 ;也可以使用其它的 I 型 HIV 感染性克隆质粒) 是 I 型 HIV 的感染性克隆质粒,在转染合适的哺乳细胞后 (如 293FT 细胞) 具有可表达 HIV 病毒蛋白及病毒粒子的能力。p24 是 HIV 病毒的壳蛋白,通过检测细胞培养上清中的 p24 蛋白的含量可以反映病毒蛋白和病毒粒子的表达水平,也与病毒效价呈正相关。因此可将 siRNA 表达质粒分别和 HIV 感染性克隆质粒 (pNL4-3 质粒) 在 293FT 细胞中进行共转染实验,通过检测共转染后细胞的 p24 蛋白的表达水平来对不同 siRNA 抑制 HIV-1 复制的效率进行检验。

[0158] 293FT 细胞 (Invitrogen, Catalog#R700-07) 培养于 24 孔细胞培养板中,汇合率约为 70%。12h 后每孔细胞转染 0.1 μ g pNL4-3 质粒和 1 μ g 的 siRNA 表达质粒,转染试剂为 Lipofectamine 2000 (Invitrogen Cat. No 11668-027),转染方法参见该试剂的操作指南。在共转染 48h 后分别收集细胞培养上清,经梯度稀释后用 MurexHIV Antigen Mab (Cat. No. 8E77-02) 检测细胞培养上清中 p24 蛋白的活性。以共转染了对照 siRNA 表达质粒和 HIV 感染性克隆质粒的 293FT 细胞的培养上清中的 p24 蛋白含量为对照,计算各 siRNA 对 HIV 的抑制效率。通过比较,获得了 32 个具有高效抑制能力的 RNA 干扰靶点。附图 2 显示了分别以这 32 个 RNA 干扰靶点序列构建获得的 siRNA 表达质粒在转染入细胞后对 HIV 病毒基因表达的抑制效率。

[0159] 下面是我们获得的可用于有效抑制 HIV 的 RNA 干扰靶点序列 :

[0160] siGAG0942 :AAATTGGATGACAGAAACC (SEQ ID NO. 1)

[0161] siGAG1091 :CTGAAGCAATGAGCCAAGT (SEQ ID NO. 2)

- [0162] siGAG1273 :GATTGTTACTGAGAGACAGGCT (SEQ ID NO. 3)
[0163] siPOL0922 :TGGAAAGGATCACCAGCAA (SEQ ID NO. 4)
[0164] siPOL0927 :AGGATCACCAGCAATATTC (SEQ ID NO. 5)
[0165] siPOL0937 :GCAATATTCCAGTGTAGCA (SEQ ID NO. 6)
[0166] siPOL1026 :GTATGTAGGATCTGACTTA (SEQ ID NO. 7)
[0167] siPOL1102 :GGATTTACCACACCAGACA (SEQ ID NO. 8)
[0168] siPOL1131 :GAAAGAACCCTCCATTCCTT (SEQ ID NO. 9)
[0169] siPOL1217 :GCTGGACTGTCAATGACAT (SEQ ID NO. 10)
[0170] siPOL1223 :CTGTCAATGACATACAGAA (SEQ ID NO. 11)
[0171] siPOL1402 :CCGGTACATGGAGTGTATT (SEQ ID NO. 12)
[0172] siPOL1411 :GGAGTGTATTATGACCCAT (SEQ ID NO. 13)
[0173] siPOL1468 :GGCCAATGGACATATCAAA (SEQ ID NO. 14)
[0174] siPOL1470 :CCAATGGACATATCAAATT (SEQ ID NO. 15)
[0175] siPOL1544 :CCCACACTAATGATGTGAA (SEQ ID NO. 16)
[0176] siPOL1548 :CACTAATGATGTGAAACAA (SEQ ID NO. 17)
[0177] siPOL1550 :ACACTAATGATGTGAAACAATT (SEQ ID NO. 18)
[0178] siPOL1734 :GAAGTTATGGTACCAGTTA (SEQ ID NO. 19)
[0179] siPOL1762 :CCCATAATAGGAGCAGAAA (SEQ ID NO. 20)
[0180] siPOL2008 :TCAGAGTTAGTCAGTCAAA (SEQ ID NO. 21)
[0181] siPOL2252 :TAGTAGCCAGCTGTGATAA (SEQ ID NO. 22)
[0182] siVIF009 :CAGATGGCAGGTGATGATT (SEQ ID NO. 23)
[0183] siVIF037 :GTAGACAGGATGAGGATTA (SEQ ID NO. 24)
[0184] siVIF038 :TAGACAGGATGAGGATTAA (SEQ ID NO. 25)
[0185] siGAG0432 :TCAGGCCATATCACCTAGA (SEQ ID NO. 26)
[0186] siGAG0738 :AATAGGATGGATGACACAT (SEQ ID NO. 27)
[0187] siGAG1438 :GGAGCCGATAGACAAGGAA (SEQ ID NO. 28)
[0188] siPOL1327 :GCACTAACAGAAGTAGTAC (SEQ ID NO. 29)
[0189] siVIF090 :TATTTCAAGGAAAAGCTAAG (SEQ ID NO. 30)
[0190] siVIF344 :TTTCAGAATCTGCTATAAG (SEQ ID NO. 31)
[0191] siVPU164 :GAGTGAAGGAGAAGTATCA (SEQ ID NO. 32)

[0192] 通过上面的实验,我们证明了本发明的 32 个 RNA 干扰靶点可用于高效抑制 HIV 表达。

[0193] 在以下的实验中,我们从上述 RNA 干扰靶点选取了 siVIF037、siPOL1102、siPOL1217、siPOL1327、siPOL2252 为例,进一步分别构建可表达靶向 siVIF037、siPOL1102、siPOL1217、siPOL1327、siPOL2252 的 siRNA 的重组慢病毒,构建方法见实施例 3 和实施例 4。

[0194] 实施例 3. 表达 siRNA 的表达载体和慢病毒包装载体的构建

[0195] 表达载体:在该实施例中,我们使用的慢病毒系统的表达载体 pDEST-MR(专利申请号:200510112917.1;公开号:CN1948475)包含了由 mPGK 启动子控制的 MGMT(P140K)基

因及一个由 H1 启动子控制的可用于表达 siRNA 的表达框。

[0196] 表达载体 pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 的构建方法：

[0197] 分别合成 VIF037、POL1102、POL1217、POL1327、POL2252 基因片段（这里分别包括了实施例 2 中所示的 RNA 干扰靶点序列 siVIF037 (SEQ ID NO :24)、siPOL1102 (SEQ ID NO :8)、siPOL1217 (SEQ IDNO :10)、siPOL1327 (SEQ ID NO :29)、siPOL2252 (SEQ ID NO :22) 作为示例,但是也可以包括其他本发明提供的 RNA 干扰靶点序列),片段的 5'端添加 Age I 位点,3'端添加 Sma I 位点;基因片段经 Age I、Sma I 酶切后与经同样酶切的 pDEST-MR 质粒连接,构建获得表达载体 pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252。

[0198] 我们对构建获得的重组慢病毒表达载体 pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 的表达有效性进行了验证。在 pGL3-control 质粒（购自 Promega 公司）的 luciferase 基因的终止密码子与 PolyA 之间分别插入 VIF 基因序列、POL 基因序列构建了报告质粒 pGL3-VIF、pGL3-POL。以靶向 luciferase 的 siRNA-luc 表达质粒和靶向无关序列的 siRNA-Nk 表达质粒作为对照,进行共转染抑制实验。结果如图 3 所示,pGL3-VIF 与表达载体 pDEST-VIF037 共转染时 luciferase 基因的表达受到了有效抑制,而 pGL3-control 与表达载体 pDEST-VIF037 共转染时 luciferase 基因的表达不会受到抑制;pGL3-POL 分别与表达载体 pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 共转染时 luciferase 基因的表达受到了有效抑制,而 pGL3-control 分别与表达载体 pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 共转染时 luciferase 基因的表达不会受到抑制。结果说明构建获得的表达载体 pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 可表达所编码的 siRNA 序列,且具有基因靶向特异性。

[0199] 慢病毒包装载体的改造:由于慢病毒载体主要来源于 HIV-1。慢病毒载体的体外包装需要几种 HIV-1 蛋白如 HIV POL 和 GAG 基因的产物。由于我们需要用慢病毒作为靶向 HIV-1 的 siRNA 的表达载体,为了防止表达载体上表达的 siRNA 会抑制慢病毒包装载体的表达,即为了正常获得重组慢病毒,在该实施例中我们对包装载体上来源于 HIV-1 的基因序列进行了相应的突变。因此,包装细胞中的由包装载体转录出的 mRNA 不会被所需要表达的 siRNA (如本次实施例中作为示例所选的分别靶向 siVIF037、siPOL1102、siPOL1217、siPOL1327、siPOL2252 的 siRNA) 所降解。

[0200] 包装载体的序列突变情况如下所示：

[0201] 包装载体：-----GTAGACAGGATGAGGATTA-----

[0202] 突变为：-----GTAGACAGGACGAAGATTA-----

[0203] 包装载体：-----GGATTTACCACACCAGACA-----

[0204] 突变为：-----GGATTTACCACCCCGACA-----

[0205] 包装载体：-----GCTGGACTGTCAATGACAT-----

[0206] 突变为：-----GCTGGACTGTGAACGACAT-----

[0207] 包装载体：-----GCACTAACAGAAGTAGTAC-----

[0208] 突变为：-----GCACTAACAGAAGTGGTGC-----

[0209] 包装载体 :-----TAGTAGCCAGCTGTGATAA-----

[0210] 突变为 : -----TAGTAGCCAGCTGCGACAA-----

[0211] 为了验证突变后的包装载体的表达是否会受表达载体所表达的 siRNA 的影响。我们进行了共转染验证实验,结果如附图 4 所示,突变后的包装载体的表达不会受到表达载体 pDEST-VIF037、pDEST-POL1102、pDEST-POL1217、pDEST-POL1327、pDEST-POL2252 的影响。

[0212] 实施例 4. 表达 siRNA 的重组慢病毒的构建及对 HIV 受体细胞的基因转移效率

[0213] 除可表达靶向 HIV 的 siRNA 的表达载体质粒和经突变改造的包装载体质粒 pLP1-M1,构建重组慢病毒所需的其它质粒为 pLP2、VSVG,从 Invitrogen 公司购买,品名为:pLenti4/V5-DEST Gateway VectorKit,货号:V469-10。

[0214] 重组慢病毒的制备方法:

[0215] (1) 用氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心法大量提取四种质粒 pVSVG、pLP1-M1、pLP2、表达载体质粒(如该实施例中作为示例的 pDEST-VIF037 质粒、pDEST-POL1102 质粒、pDEST-POL1217 质粒、pDEST-POL1327 质粒、pDEST-POL2252 质粒)(提取方法参见《分子克隆实验指南》,J. 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔著,科学出版社,2002);

[0216] (2) 293FT 细胞培养于 DMEM 培养基中(添加 10% FBS, 2mM-glutamine, 0.1mM MEM Non-Essential Amino Acids 及 1% penicillin-streptomycin);

[0217] (3) 将 293FT 细胞培养于直径 10cm 的细胞培养板上,汇合率约 70%。12h 后用磷酸钙转染方法介导 10 μg pLP1、10 μg pLP2、10 μg gpVSVG、20 μg 表达载体质粒共 4 种质粒进行共转染(方法参见《分子克隆实验指南》,J. 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔著,科学出版社,2002);

[0218] (4) 转染 48h 后收集细胞培养上清,0.45 μm 的滤膜过滤;用 SW28 转头(BECKMAN 公司)以 25,000rpm 在 4℃ 离心 90min;

[0219] (5) 弃去上清,加 500 μL PBS 溶解沉淀;

[0220] (6) 分装病毒收集液,贮存于 -80℃ 备用。

[0221] MT-4 细胞是人源的 CD4+T 淋巴细胞,可支持 HIV-1 的复制。将获得的重组慢病毒 Lenti-VIF037、Lenti-POL1102、Lenti-POL1217、Lenti-POL1327、Lenti-POL2252 以 moi = 40 分别对 MT-4 细胞进行转导实验,培养 1 周后用免疫荧光染色和流式细胞仪检测靶细胞中 MGMT(P140K) 基因的表达效率(表 1)。结果显示,重组慢病毒 Lenti-VIF037、Lenti-POL1102、Lenti-POL1217、Lenti-POL1327、Lenti-POL2252 可有效转导 MT-4 细胞。

[0222]

重组慢病毒	对 MT-4 细胞的转导效率
Lenti-VIF037	65.02%
Lenti-POL1102	71.21%
Lenti-POL1217	70.63%
Lenti-POL1327	62.25%

Lenti-POL2252	75.18%
---------------	--------

[0223]

表 1

[0224] 表 1 显示了重组慢病毒对 CD4+HIV 受体细胞 MT-4 的转导效率。

[0225] 实施例 5. 靶向 HIV 的 siRNA 通过重组慢病毒导入 HIV 受体细胞对 HIV 的抑制作用

[0226] 我们应用 HIV 体外细胞感染模型验证 siRNA 抑制 HIV 的效果。

[0227] MT-4 细胞为人源的 CD4+T 淋巴细胞株,能够支持 HIV 的感染和复制,也可用于 HIV 的体外培养。

[0228] HIV-1_{NL4-5} 为 B 亚型、T 细胞嗜性的 HIV-1 病毒,可有效感染并在 MT-4 细胞中复制。

[0229] 攻毒实验方法:慢病毒 Lenti-VIF037、Lenti-POL1102、Lenti-POL1217、Lenti-POL1327、Lenti-POL2252 以 $moi = 40$ 分别转导 MT-4 细胞,600g 离心 60min 后换液;带有靶向 luciferase 基因的 siRNA 表达元件的对照重组慢病毒 Lenti-luc(靶向 luciferase 基因的 siRNA 表达元件序列同实施例 1;按照实施例 3 和 4 的方法制备该对照病毒) $moi = 40$ 转导 MT-4 细胞,600g 离心 60min 后换液;转导后的 MT-4 细胞在 37°C 培养 48h 后,分别以不同剂量的 HIV-1_{NL4-3}(100pg 和 500pg) 进行攻毒实验,感染 12h 后换液培养;在感染后的不同的时间点采集细胞培养上清,用 Murex HIV Antigen Mab(Cat. No. 8E77-02) 检测试剂盒检测细胞培养上清中 p24 蛋白的含量。攻毒实验对照为未转导的 MT-4 细胞和对照重组慢病毒 Lenti-luc 转导的 MT-4 细胞。

[0230] 结果如图 5 所示,重组慢病毒 Lenti-VIF037、Lenti-POL1102、Lenti-POL1217、Lenti-POL1327、Lenti-POL2252 转导后的 MT-4 细胞均可显示出抑制 HIV-1 复制的能力。这表明在携带有靶向 HIV 的 siRNA 表达序列的重组慢病毒载体转导后的 HIV 受体细胞中抗 HIV 的 siRNA 在这些细胞中进行了表达,从而导致对 HIV 的感染产生抗性。

[0231] 实施例 6 改造获得可稳定表达靶向 HIV 的 siRNA 的 HIV 受体细胞

[0232] 我们对重组慢病毒 Lenti-VIF037、Lenti-POL1102、Lenti-POL1217、Lenti-POL1327、Lenti-POL2252 转导后的 MT-4 细胞分别应用有限稀释方法进行克隆化筛选。由于慢病毒载体具有稳定整合能力,可将携带的靶向 HIV 的 siRNA 表达元件序列及药物筛选基因 MGMT(P140K) 表达元件序列整合至靶细胞基因组。通过筛选,用免疫荧光染色和流式细胞仪检测筛选后细胞中 MGMT(P140K) 基因的表达效率。结果如表 2 所示,经克隆化筛选后可在超过 99% 的细胞中检测到 MGMT(P140K) 基因的表达,我们将改造后的细胞分别称为 MT-4-VIF037 细胞、MT-4-POL1102 细胞、MT-4-POL1217 细胞、MT-4-POL1327 细胞、MT-4-POL2252 细胞。

[0233]

细胞	MGMT(P140K) 基因的表达效率
MT-4-VIF037	99.90%
MT-4-POL1102	99.25%

MT-4-POL1217	99.92%
MT-4-POL1327	99.30%
MT-4-POL2252	99.21%

[0234]

表 2

[0235] 表 2 显示了药物筛选基因 MGMT (P140K) 在改造后的 HIV 受体细胞中的表达效率。

[0236] 实施例 7 改造后的 HIV 受体细胞在高剂量 HIV 攻毒实验中对 HIV 的抑制作用

[0237] 对经改造后的可表达靶向 HIV 的 siRNA 的 HIV 受体细胞进行高剂量的 HIV 攻毒实验。实验中 HIV-1_{NL4-3} 的攻毒剂量分别提高至 2500pg 和 12500pg。在攻毒后分别在不同的时间点采集细胞培养上清,用 Murex HIV Antigen Mab (Cat.No. 8E77-02) 检测试剂盒检测细胞培养上清中 p24 蛋白的含量。结果显示 (图 6), 相比对照细胞, 经改造后的可稳定表达靶向 HIV 的 siRNA 的 HIV 受体细胞 (本实验中的 MT-4-POL1102 细胞、MT-4-POL1217 细胞、MT-4-POL1327 细胞、MT-4-POL2252 细胞、MT-4-VIF037 细胞) 在高攻毒条件可获得显著的抑制 HIV 的效果。这表明了经改造后的携带有靶向 HIV 的 siRNA 表达元件的 HIV 受体细胞具有了抑制 HIV 病毒复制表达的能力, 可对 HIV 的感染产生抗性。

[0238] 实施例 8 化学合成的 siRNA 对 HIV 的抑制效果。

[0239] 我们从上述 RNA 干扰靶点选取了 siVIF037 为例 (这里包括了实施例 2 中所示的 RNA 干扰靶点序列 siVIF037 (SEQ ID NO. 24) 作为示例, 但是也可以包括其他本发明提供的 RNA 干扰靶点序列), 合成了可靶向 siVIF037 的 siRNA, siRNA 的正义 RNA 片段包含本发明靶序列 siVIF037 (SEQ ID NO. 24) 所编码的 RNA 序列, 反义 RNA 片段可与正义 RNA 片段互补形成双链 RNA (在本实施例中反义链与正义链完全互补, 但是也可以允许反义链和正义链有少量的错配, 如 1 个或 2 个或 3 个或 4 个), 在正义 RNA 片段和反义 RNA 片段的 3' 末端分别添加 dTdT。合成好的 siRNA 命名为 siR-VIF037。通过相同方法合成了靶向 luciferase 基因的 siRNA (siR-luc) (siR-luc 的靶点序列同实施例 1) 作为对照。

[0240] siRNA 的合成方法简述如下: 采用 β -乙腈亚磷酸胺化学合成法, 使用全自动 DNA 合成仪分别合成 siRNA 的正义 RNA 片段和反义 RNA 片段, 合成好的正义 RNA 片段和反义 RNA 片段等摩尔比混合, 在 PCR 仪上经过变性、退火过程, 得到所需的 siRNA。

[0241] 实验方法: 293FT 细胞培养于 24 孔细胞培养板中, 汇合率约为 70%。12h 后每孔细胞转染 0.1 μ g pNL4-3 质粒和 5ng 的化学合成的 siRNA, 转染试剂为 Lipofectamine 2000 (Invitrogen Cat.No11668-027), 转染方法参见该试剂的操作指南。在共转染 48h 后分别收集细胞培养上清, 经梯度稀释后用 Murex HIV Antigen Mab (Cat.No. 8E77-02) 检测细胞培养上清中 p24 蛋白的活性。以共转染了 siR-luc 和 HIV 感染性克隆质粒的 293FT 细胞的培养上清中的 p24 蛋白含量为对照, 计算 siR-VIF037 对 HIV 的抑制效率。

[0242] 结果如图 7 所示, 合成的 siR-VIF037 可抑制 HIV 在细胞内的复制表达。

[0243] 实施例 9. 化学合成并经修饰的 siRNA 对 HIV 的抑制效果

[0244] 我们从上述 RNA 干扰靶点选取了 siVIF037、siPOL1217 为例 (这里分别包括了实施例 2 中所示的 RNA 干扰靶点序列 siVIF037 (SEQ ID NO. 24), siPOL1217 (SEQ ID NO. 10) 作为示例, 但是也可以包括其他本发明提供的 RNA 干扰靶点序列), 合成了可分别靶向

siVIF037、siPOL1217的siRNA, siRNA的正义RNA片段分别包含本发明靶序列siVIF037(SEQ ID NO. 24), siPOL1217(SEQ ID NO. 10)所编码的RNA序列, 反义RNA片段和正义RNA片段互补形成双链RNA, 在正义RNA片段和反义RNA片段的3'末端分别添加dTdT。同时合成过程中分别采用了不同的修饰方式。其中, siRpo-VIF037和siRpo-POL1217为经过2'-OMe修饰(2'-甲氧基修饰)和磷酸化修饰的分别靶向siVIF037、siPOL1217的siRNA(合成方法:采用 β -乙腈亚磷酸胺化学合成法, 使用全自动DNA合成仪分别合成siRNA的正义RNA片段和反义RNA片段, 其中正义RNA片段和反义RNA片段的5'端三个碱基和3'端dTdT前面的三个碱基用2'-OMe修饰的单核苷酸合成, 反义RNA片段的5'末端碱基进行磷酸化处理。合成好的正义RNA片段和反义RNA片段等摩尔比混合, 在PCR仪上经过变性、退火过程, 得到所需的siRNA); siRpoC-VIF037和siRpoC-POL1217为经过2'-OMe修饰和磷酸化修饰和固醇修饰的分别靶向siVIF037、siPOL1217的siRNA(合成方法同上, 不同的地方是在合成正义RNA片段时, 3'端dTdT前面的三个碱基不进行2'-OMe修饰, 用含有胆固醇-氨基己酸-吡咯烷(cholesterol-aminocaproic-acid-pyrrolidine)接头的Glass担体作为合成支持物, 在3'端dTdT前面的碱基通过硫代磷酸酯连接胆固醇基团。其余步骤均与上述合成siRpo-VIF037和siRpo-POL1217的方法相同)。同时, 分别合成了靶向不与HIV和人类基因相匹配的无关RNA干扰靶点siRNA-Nk(序列同实施例1)的并经同样修饰的siRNA(siRpo-Nk和siRpoC-Nk)作为对照。这里分别包括了对靶向实施例2中所示的RNA干扰靶点序列siVIF037(SEQ ID NO. 24), siPOL1217(SEQ ID NO. 10)的合成的siRNA进行2'-OMe修饰和/或磷酸化修饰和/或固醇修饰作为示例, 但是也可以包括对靶向其他本发明提供的RNA干扰靶点序列的合成的siRNA进行其它不同方式的修饰。

[0245] 实验方法: 293FT细胞培养于24孔细胞培养板中, 汇合率约为70%。12h后每孔细胞分别共转染0.1 μ g pNL4-3质粒和5ng合成并经修饰的siRNA, 转染试剂为Lipofectamine 2000(Invitrogen Cat. No11668-027), 转染方法参见该试剂的操作指南。在共转染48h后分别收集细胞培养上清, 经梯度稀释后用Murex HIV Antigen Mab(Cat. No. 8E77-02)检测细胞培养上清中p24蛋白的活性。分别以共转染了siRpo-Nk、siRpoC-Nk和pNL4-3质粒的293FT细胞的培养上清中的p24蛋白含量为对照, 检测siRpo-VIF037、siRpo-POL1217、siRpoC-VIF037、siRpoC-POL1217对HIV的抑制效率。

[0246] 结果如图8所示, 合成的siRpo-VIF037、siRpo-POL1217、siRpoC-VIF037、siRpoC-POL1217均可抑制HIV在细胞内的复制表达。

[0247] 实施例10在H²K-PBL-SCID小鼠模型上验证siRNA对HIV的抑制效果。

[0248] 我们从上述RNA干扰靶点选取了siVIF037为例(这里包括了实施例2中所示的RNA干扰靶点序列siVIF037(SEQ ID NO. 24)作为示例, 但是也可以包括其他本发明提供的RNA干扰靶点序列), 以慢病毒表达载体质粒pDEST-MR(见实施例3)为基础构建了质粒pDEST-H²K-VIF037, 该质粒具有H²K基因表达框和可表达靶向siVIF037的siRNA的表达框。同时进一步将pDEST-H²K-VIF037质粒上表达靶向siVIF037的siRNA的表达框替换为靶向luciferase的siRNA(靶点序列同实施例1)表达框, 得到pDEST-H²K-luc质粒, 作为对照。用pDEST-H²K-VIF037和pDEST-H²K-luc分别制备慢病毒Lenti-H²K-VIF037和Lenti-H²K-luc(方法参见实施例4)。

[0249] 抽取人全血40ml, 用Ficoll-paque plus(GE Healthcare cat. N017-1440-03)分离

PBMC 细胞后（方法见操作手册），在 AIM-V 培养基中（GIBCO cat. NO 12055）以 PHA 刺激培养 48h。然后，用慢病毒 Lenti-H²K-VIF037 和 Lenti-H²K-luc 分别转导 PHA 刺激的 PBMC 细胞（转导方法同实施例 5）。转导后的细胞在含有 IL-2 的 AIM-V 培养基中继续培养 72h。

[0250] 用 MACSelect Kk transfected cell selection kit (MiltenyiBiotec cat. NO 130-091-986) 分别分离上述被慢病毒 Lenti-H²K-VIF037 和 Lenti-H²K-luc 感染并稳定表达外源标记基因 H²K 的细胞（方法见操作手册）。阳性筛选细胞在含有 IL-2 的 AIM-V 培养基中继续培养 96h。

[0251] 联合免疫缺陷型 (SCID) 小鼠（无菌级，7~8 周龄，体重约为 16~20g，每组 3 只小鼠），使用前 1 周腹腔注射 0.5ml 石蜡油，然后每只小鼠腹腔内注射经上述步骤获得后的 PBMC 细胞 (5×10^5 /g 体重)，得到 H²K-PBL-SCID 杂合小鼠。小鼠体内的人 PBMC 细胞如来源于 Lenti-H²K-VIF037 转导的细胞则简称其为 VIF037 杂合小鼠，如来源于 Lenti-H²K-luc 转导的细胞则简称其为 luc 杂合小鼠。

[0252] 12h 后通过腹腔分别注射 HIV-1_{NL4-3} 到 VIF037 杂合小鼠和 luc 杂合小鼠体内。HIV-1_{NL4-5} 为 B 亚型、T 细胞嗜性的 HIV-1 病毒。感染病毒后 7d、14d 用眼球采血法采集 200 μ L 血液，经梯度稀释后用 Murex HIVAntigen Mab (Cat. No. 8E77-02) 检测细胞培养上清中 p24 蛋白的活性。以 luc 杂合小鼠体内的 p24 蛋白活性为实验对照。

[0253] 结果如图 9 所示，VIF037 杂合小鼠具有抑制 HIV 复制的能力。

[0254] 本领域的技术人员应当明了，尽管为了举例说明的目的本文描述了本发明的具体实施方案，但可以对其进行各种修改而不偏离本发明的精神和范围。因此，本发明的具体实施方案和实施例不应当视为限制本发明的范围。本发明仅受所附权利要求的限制。本申请中引用的所有文献均完整地并入本文作为参考。

[0255] 序列列表

[0256]

<110> 厦门大学
 <120> 可用于艾滋病治疗的 RNA 干扰靶点
 <130> IDC070060
 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 1
 aaattggatg acagaaacc 19

<210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 2
 ctgaagcaat gagccaagt 19

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 3
 gattgtactg agagacaggc t 21

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 4
 tggaaaggat caccagcaa 19

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 5
 aggatcacca gcaatattc 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 6
 gcaatattcc agtgtagca 19

<210> 7
 <211> 19
 <212> DNA

[0257]

<213> 人工序列	
<400> 7	
gtatgtagga tctgactta	19
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
ggatttacca caccagaca	19
<210> 9	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
gaaagaacct ccattcctt	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 10	
gctggactgt caatgacat	19
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
ctgtcaatga catacagaa	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 12	
ccggtacatg gagtgtatt	19
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
ggagtgtatt atgacccat	19
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
ggccaatgga catatcaaa	19

[0258]

<210> 15	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 15	
ccaatggaca tatcaaatt	19
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 16	
cccacactaa tgatgtgaa	19
<210> 17	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
cactaatgat gtgaaacaa	19
<210> 18	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 18	
acactaatga tgtgaaacaa tt	22
<210> 19	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 19	
gaagttatgg taccagtta	19
<210> 20	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 20	
cccataatag gagcagaaa	19
<210> 21	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 21	
tcagagttag tcagtcaaa	19
<210> 22	
<211> 19	

[0259]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 22	
tagtagccag ctgtgataa	19
<210> 23	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 23	
cagatggcag gtgatgatt	19
<210> 24	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 24	
gtagacagga tgaggatta	19
<210> 25	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 25	
tagacaggat gaggattaa	19
<210> 26	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 26	
tcaggccata tcacctaga	19
<210> 27	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 27	
aataggatgg atgacacat	19
<210> 28	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 28	
ggagccgata gacaaggaa	19
<210> 29	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 29	

[0260]

gcactaacag aagtagtac	19
<210> 30	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 30	
tatttcaagg aaagctaag	19
<210> 31	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 31	
tttcagaatc tgctataag	19
<210> 32	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 32	
gagtgaagga gaagtatca	19

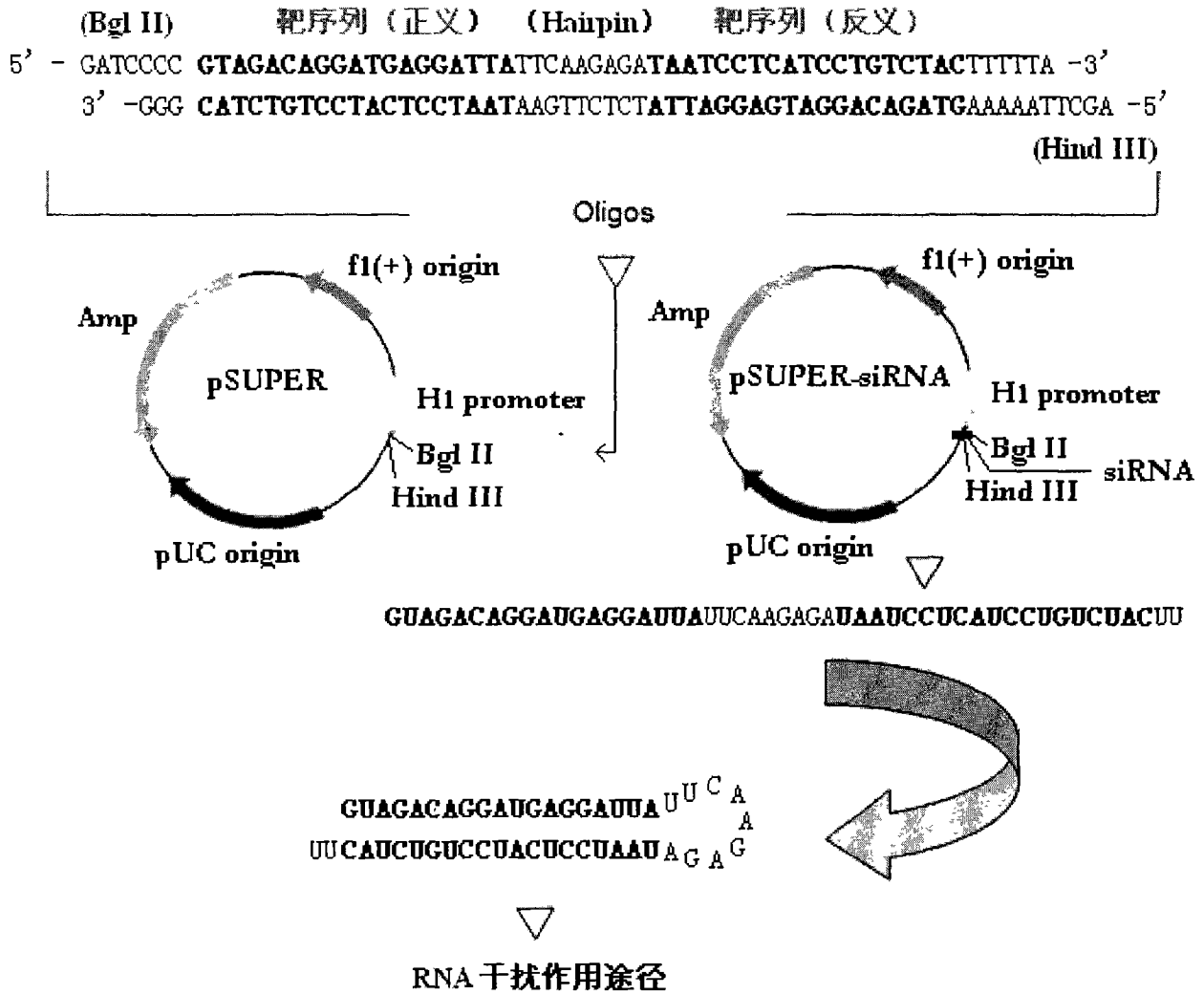


图 1

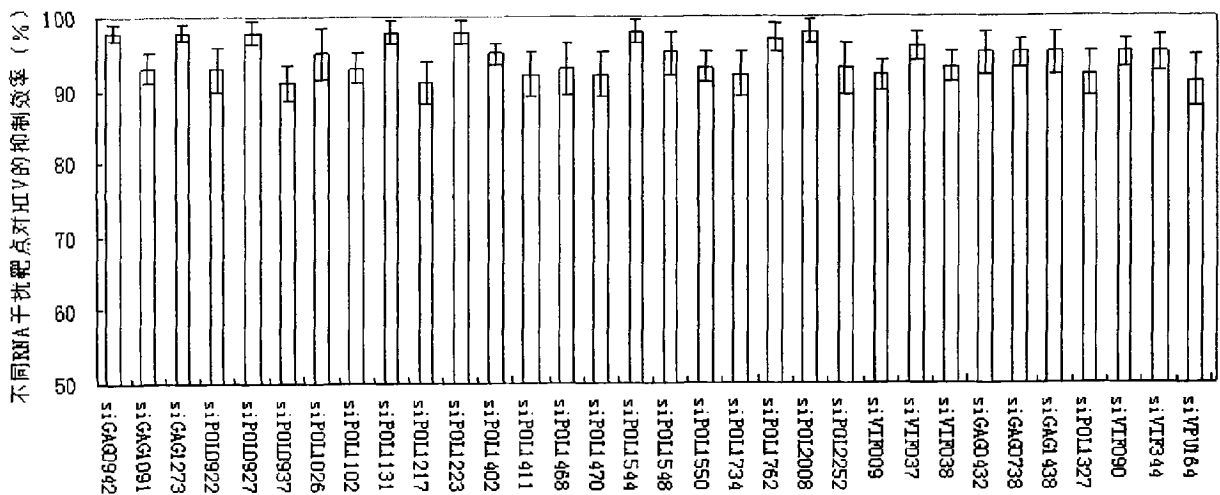


图 2

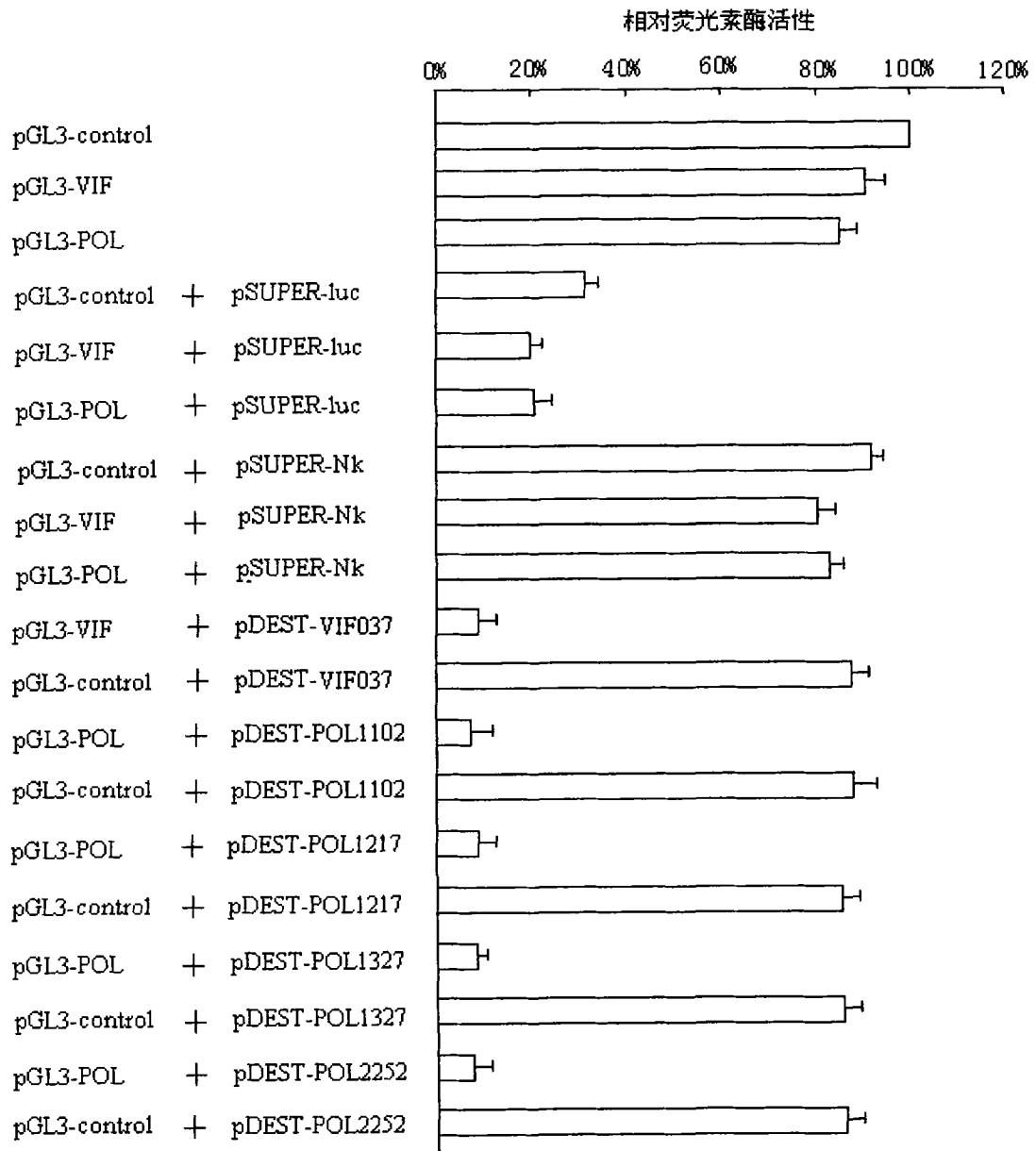


图 3

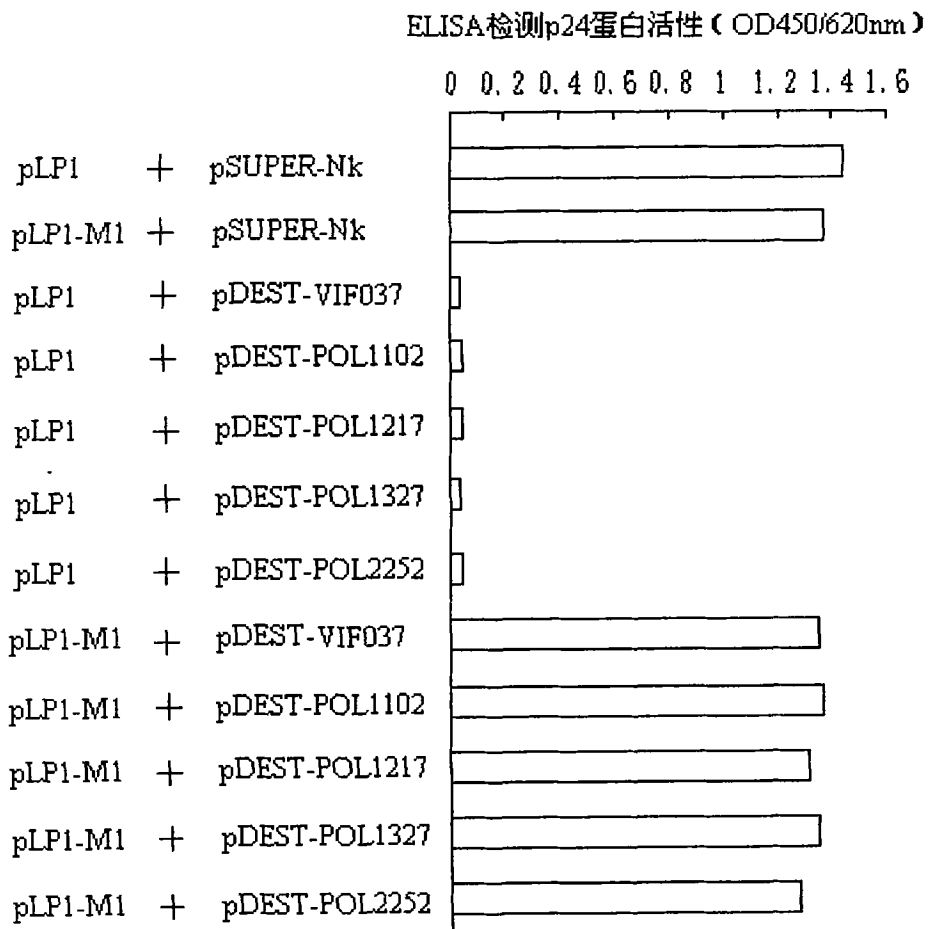


图 4

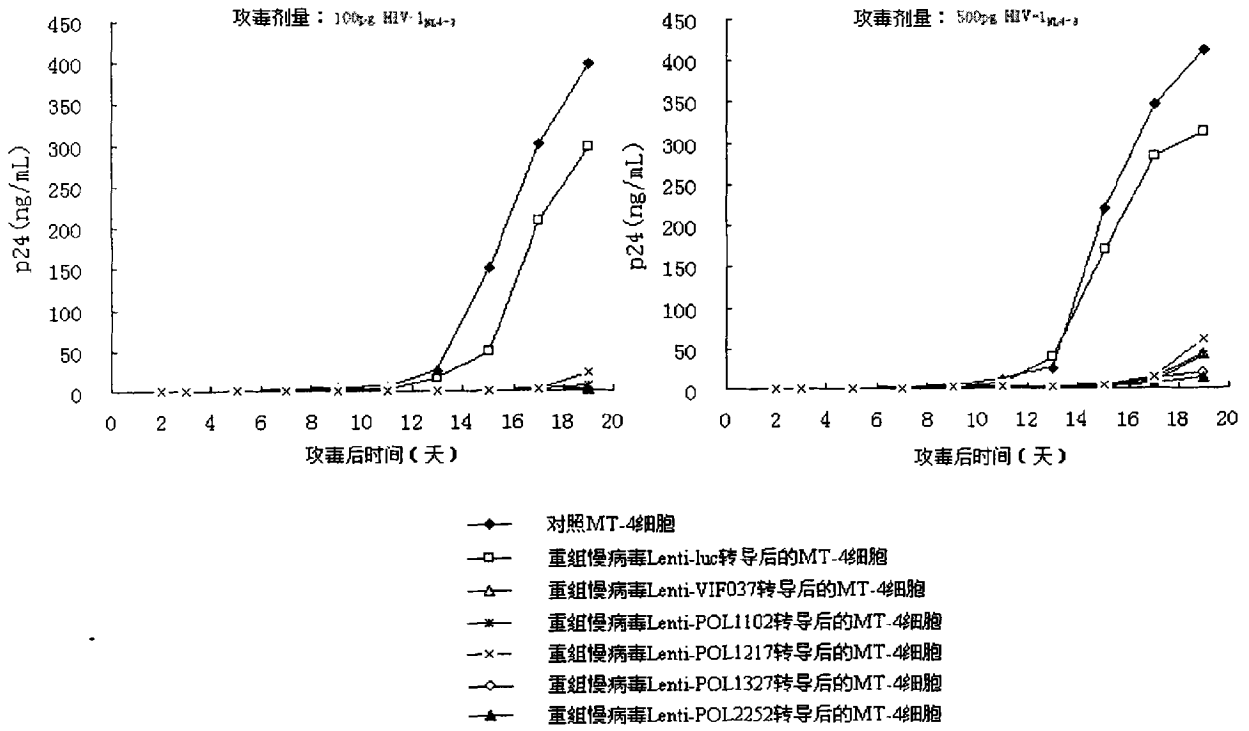


图 5

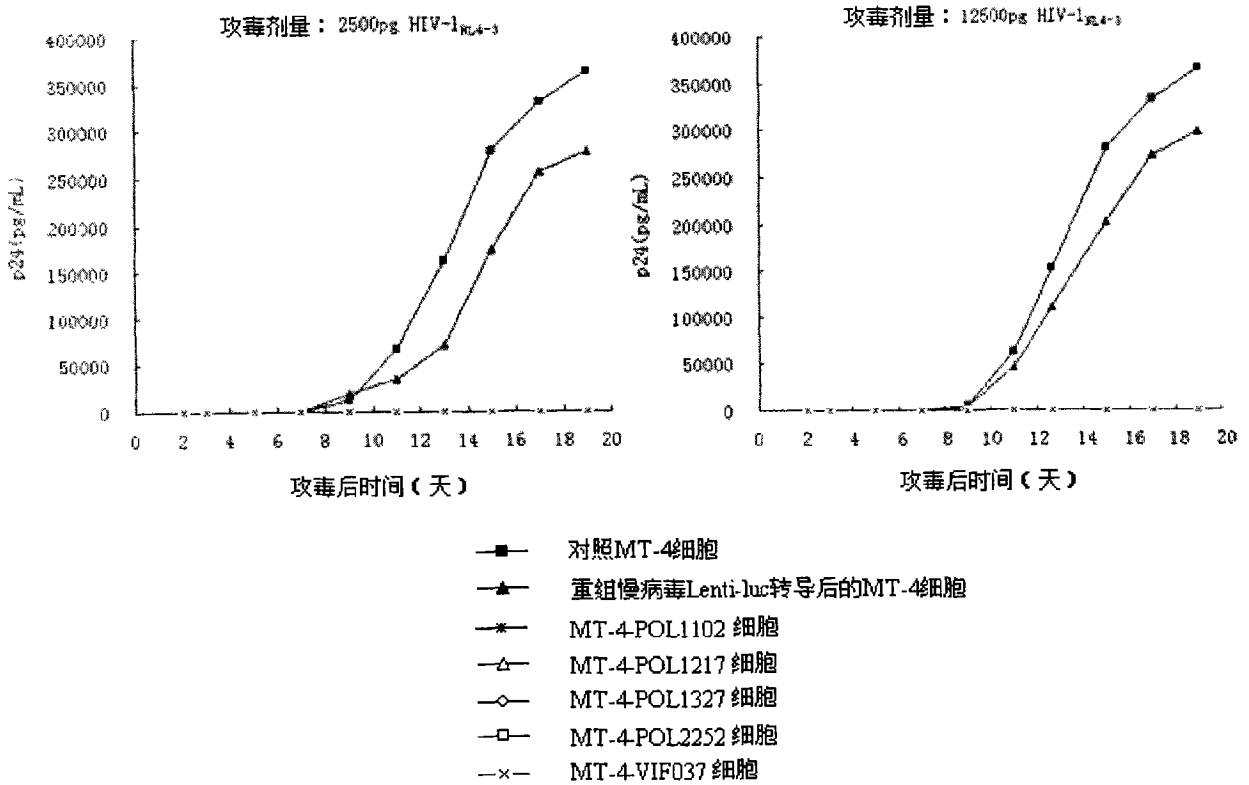


图 6

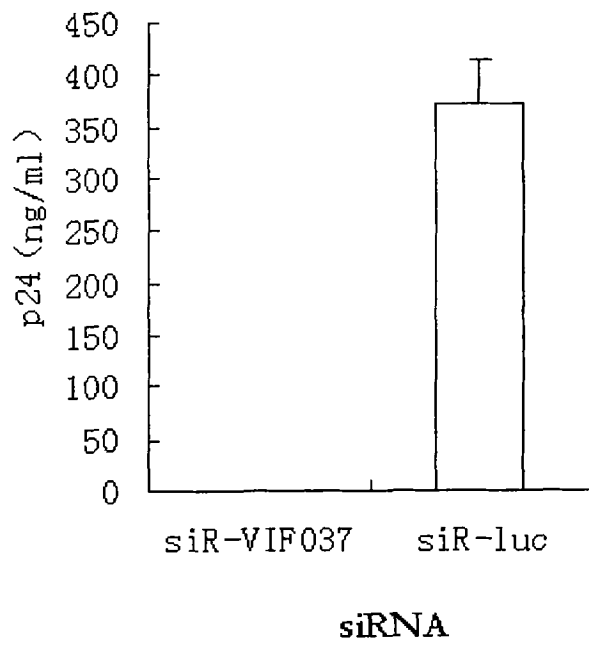


图 7

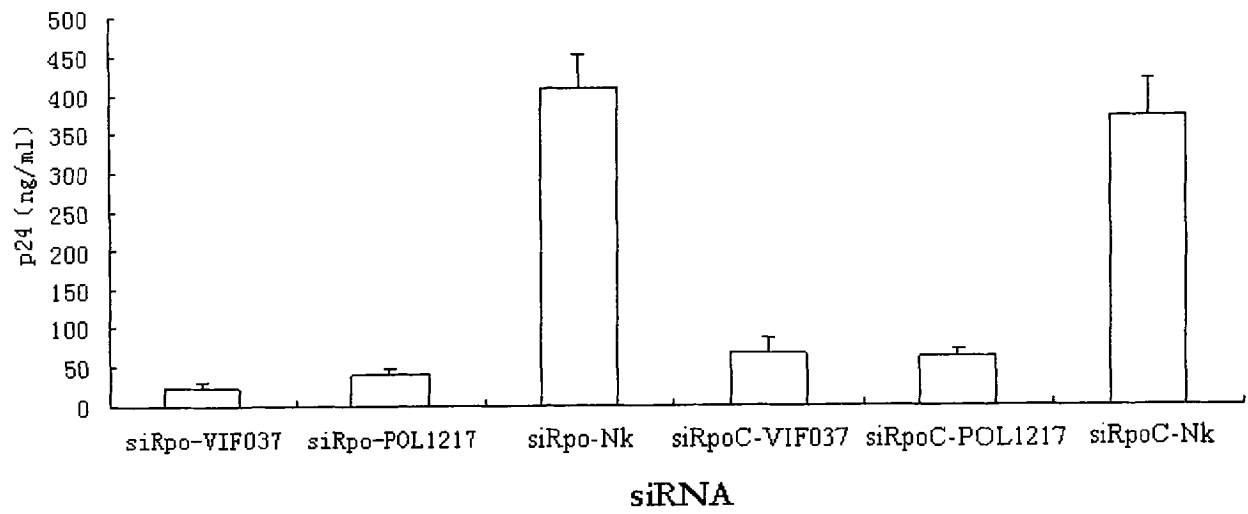


图 8

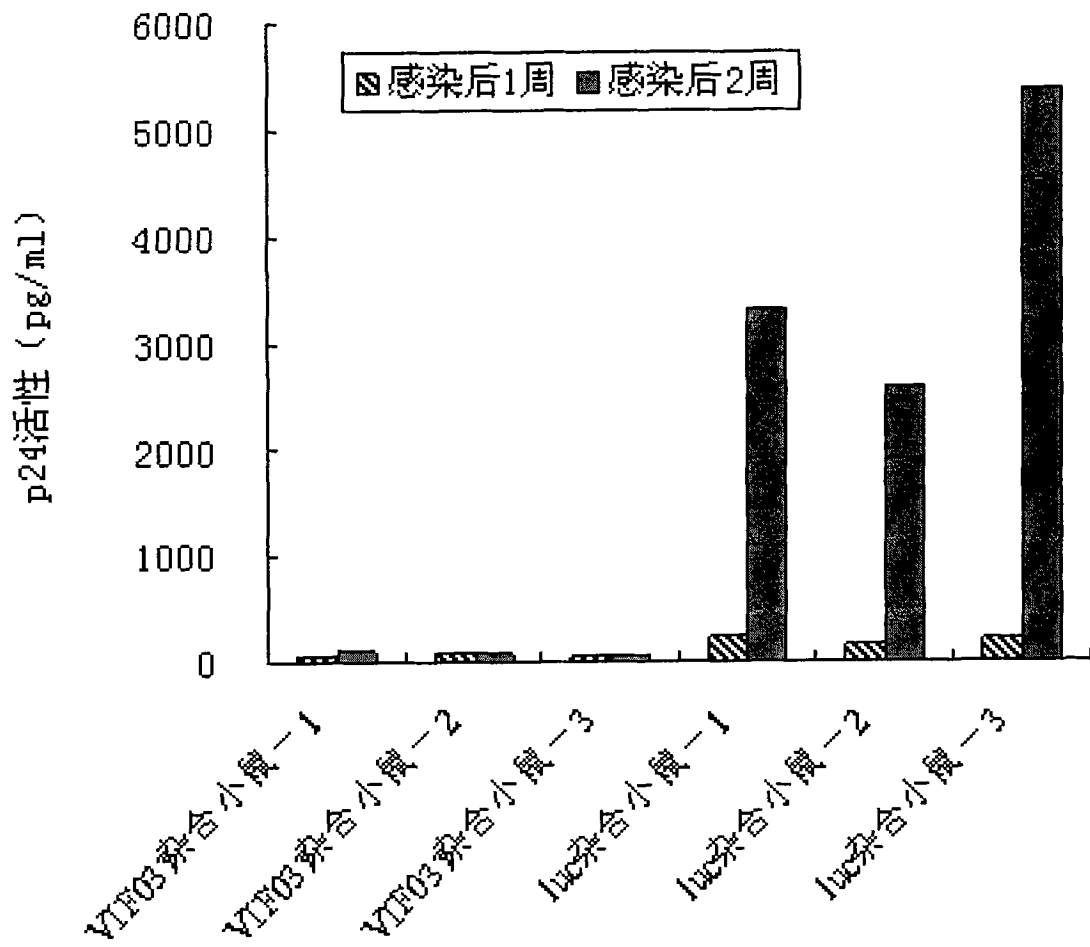


图 9