权 利 要 求 书

1、一种 shRNA 表达框，其中，按照 5’-3’的顺序，所述 shRNA 表达框依次含表达 shRNA 的 DNA 序列及填充序列，所述 shRNA 表达框序列长度接近野生型 AAV 基因组长度；所述填充序列可选为人非编码序列。

2、根据权利要求 1 所述的 shRNA 表达框，其中，所述人非编码序列为人因子 IX 的内含子序列、人粘粒 C346 的序列或 HPRT-intron 序列的一段序列或多段序列组合形式。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的 shRNA 表达框，其中，所述人非编码序列为 HPRT-intron 序列的一段序列。

4、根据权利要求 1-3 中任一项所述的 shRNA 表达框，其中，所述 shRNA 表达框在使用单链 AAV 病毒载体进行表达或直接使用时，所述 shRNA 表达框序列长度为 3.2kb-5.2kb，可选为 3.8kb-5.1kb。

5、根据权利要求 1-3 中任一项所述的 shRNA 表达框，其中，所述 shRNA 表达框在使用双链 AAV 病毒载体进行表达时，所述 shRNA 表达框序列长度为使用单链 AAV 病毒载体进行表达或直接使用时所述 shRNA 表达框序列长度的一半。

6、根据权利要求 1-5 中任一项所述的 shRNA 表达框，其中，所述 shRNA 表达框中，表达 shRNA 的 DNA 序列 5’端含有启动子。

7、根据权利要求 6 所述的 shRNA 表达框，其中，所述启动子包含选自 RNA 聚合酶 II 启动子和 RNA 聚合酶 III 启动子中的一种或多种。

8、根据权利要求 7 所述的 shRNA 表达框，其中，所述 RNA 聚合酶 II 启动子为组织特异性启动子；可选地所述 RNA 聚合酶 II 启动子为肝脏特异性启动子；可选地，所述肝脏特异性启动子为 LP1、ApoE/hAAT、DC172、DC190、ApoA-I、TBG、LSP1 或 HD-IFN。

9、根据权利要求 7 所述的 shRNA 表达框，其中，所述 RNA 聚合酶 III 启动子为 U6 启动子、H1 启动子、7SK 启动子；可选地所述 RNA 聚合酶 III 启动子为 H1 启动子。

10、根据权利要求 1-9 中任一项所述的 shRNA 表达框，其中，表达 shRNA

的 DNA 序列为表达任意可用于治疗疾病的 shRNA 的 DNA 序列；可选地，所述表达任意可用于治疗疾病的 shRNA 的 DNA 序列为序列表 SEQ ID No:1 至序列表 SEQ ID No:3 中的任一个或多个。

11、一种多核苷酸序列，其携带权利要求 1-10 中任一项所述的 shRNA 表达框，其中，所述 shRNA 表达框的两端分别为 AAV 末端反向重复序列。

12、根据权利要求 11 所述的多核苷酸序列，其中，所述 AAV 末端反向重复序列选自不同血清型的 AAV，可选地所述 AAV 末端反向重复序列选自进化支 A-F 中的任意血清型的 AAV 或 AAV1 型、AAV2 型、AAV3 型、AAV4 型、AAV5 型、AAV6 型、AAV7 型、AAV8 型、AAV9 型或其杂交/嵌合型中的任意一个，可选地所述 AAV 末端反向重复序列来源于 AAV2 血清型的末端反向重复序列。

13、根据权利要求 12 所述的多核苷酸序列，其中，所述多核苷酸序列中，两个末端反向重复序列间的序列长度可选为 3.2kb-5.2kb；当其中一个末端反向重复序列中的 trs 被改造，通过插入、缺失、或替代等方式导致 Rep 蛋白切割位点突变不能进行有效切割时，两个末端反向重复序列间的序列长度可选为 3.2kb-5.2kb 的一半。

14、根据权利要求 11-13 中任一项所述的多核苷酸序列，其中，所述多核苷酸序列中 5’末端反向重复序列缺失 D 序列，所述多核苷酸序列两个末端反向重复序列间的序列长度可选为 4.6kb-5.1kb 的一半。

15、一种重组载体质粒，其携带权利要求 1-10 中任一项所述的 shRNA 表达框、或权利要求 11-14 中任一项所述的多核苷酸序列。

16、根据权利要求 15 所述的重组载体质粒，其中，所述重组载体质粒为腺相关病毒载体。

17、根据权利要求 16 所述的重组载体质粒，其中，所述腺相关病毒载体为 AAV2/8 型，即所述腺相关病毒载体的外壳蛋白为血清型 VIII 型、所述腺相关病毒载体的末端反向重复序列为血清型 II 型的 AAV2/8 载体。

18、一种 shRNA，其是由权利要求 1-10 中任一项所述的 shRNA 表达框、权利要求 11-14 中任一项所述的多核苷酸序列、或权利要求 15-17 中任一项所述的重组载体质粒表达得到的。

19、一种宿主，其含有权利要求 15-17 中任一项所述的重组载体质粒。

20、根据权利要求 19 所述的宿主，其中，所述宿主为选自大肠杆菌、HEK293 细胞系、HEK293T 细胞系、HEK293A 细胞系、HEK293S 细胞系、HEK293FT 细胞系、HEK293F 细胞系、HEK293H 细胞系、HeLa 细胞系、SF9 细胞系、SF21 细胞系、SF900 细胞系和 BHK 细胞系中的一种或几种。

21、一种病毒颗粒，其包括权利要求 15-17 中任一项所述的重组载体质粒或权利要求 19-20 中任一项所述的宿主中的重组载体质粒的载体基因组。

22、根据权利要求 21 所述的病毒颗粒，其中，所述病毒颗粒非选择性或选择性地在肝组织或肝癌细胞中表达。

23、一种分离的改造的细胞，其中，所述细胞表达或包含权利要求 1-10 中任一项所述的 shRNA 表达框、权利要求 11-14 中任一项所述的多核苷酸序列、权利要求 15-17 中任一项所述的重组载体质粒、权利要求 21 或 22 所述的病毒颗粒。

24、根据权利要求 23 所述的改造的细胞，其中，所述细胞是哺乳动物细胞，可选为人细胞，甚至可选为人干细胞或肝细胞。

25、一种药物组合物，其包括活性成分和药学上可接受的赋形剂，其中活性成分为选自权利要求 1-10 中任一项所述的 shRNA 表达框、权利要求 11-14 中任一项所述的多核苷酸序列、权利要求 15-17 中任一项所述的重组载体质粒、权利要求 18 所述的 shRNA、权利要求 21 或 22 所述的病毒颗粒和权利要求 23 或 24 所述的分离的改造的细胞中的一种或几种。

26、根据权利要求 25 所述的药物组合物，其中，所述药物组合物为注射液，所述注射液包括药学上可接受的赋形剂以及所述活性成分。

27、权利要求 1-10 中任一项所述的 shRNA 表达框、权利要求 11-14 中任一项所述的多核苷酸序列、权利要求 15-17 中任一项所述的重组载体质粒重组载体质粒、权利要求 18 所述的 shRNA、权利要求 21 或 22 所述的病毒颗粒或权利要求 23 或 24 所述的分离的改造的细胞在制备预防和治疗乙型肝炎、获得性免疫缺陷综合征、治疗 Duchenne 型肌营养不良症（DMD）、治疗高胆固醇血症的药物中的应用。

28、包装权利要求 15-17 所述的重组载体质粒的载体制备系统，其为常

规 AAV 载体制备系统，包括两质粒包装系统、三质粒包装系统、杆状病毒包装系统和以 Ad 或 HSV 为辅助病毒的 AAV 包装系统等。

29、根据权利要求 28 所述的制备系统，其中，所述三质粒包装系统包括质粒 pscAAV-H1-shRNA-Stuffer、质粒 pHelper 和质粒 pAAV-R2CX；其中，

所述质粒 pHelper 提供腺病毒的 E2A、E4 和 VA 区域；

所述质粒 pAAV-R2CX 提供含 rep 和 cap 基因序列；

所述质粒 pscAAV-H1-shRNA-Stuffer 含有权利要求 11-14 中任一项所述的多核苷酸序列，

X 指代构成 pAAV-R2CX 重组载体质粒的 Cap 基因来源所对应的 AAV 血清型名称。