

包含 UTR 的核酸构建体及其应用

本公开要求如下专利申请的优先权：于 2022 年 05 月 13 日提交，申请号为 CN202210522056.8，发明名称为“包含 UTR 的核酸构建体及其应用”的中国专利申请；上述专利申请的全部内容通过引用结合在本公开中。

技术领域

本公开属于核酸领域，涉及包含 UTR 的核酸构建体及其用于预防或治疗疾病的用途。所述核酸构建体可包含表达人肝细胞生长因子(hHGF)的核酸序列，用于严重下肢缺血、糖尿病足等疾病的基因治疗药物。

背景技术

基因治疗和基因接种疫苗可以为多种疾病提供高度特异性和个性化治疗、预防方案，包括遗传病、自身免疫疾病、癌或肿瘤相关疾病以及炎症性疾病等。

DNA、RNA 均可用作基因治疗或基因接种疫苗。DNA 稳定、易操作，但存在 DNA 片段插入患者基因组导致突变事件(如受损基因功能丧失)等的风险。RNA 能避免不希望的基因组整合，但因为遍在的 RNA 酶，RNA 易被降解。因此，需要提高 RNA 的稳定性，使其编码的蛋白产物在体内积累，以实现疾病的治疗或预防，以及，在储存、施用的过程中保持 RNA 结构和功能的完整性。已经发现天然存在的真核 mRNA 分子中含有稳定化元件，例如，其 5'端、3'端的非翻译区(UTR)，以及如 5'帽结构或 3'聚腺苷酸尾的其它结构特征。5'UTR 和 3'UTR 是成熟前(premature)mRNA 元件，在 mRNA 加工过程中，成熟 mRNA 特有的结构特征(如 5'帽和 3'聚腺苷酸尾)被添加于转录的(成熟前)mRNA。关于 UTR 和 mRNA 稳定性的相关性，已有研究显示， α -球蛋白 mRNA 的 3'UTR 是 α -球蛋白 mRNA 稳定性的重要因素(Nancy D Rodgers et al, RNA. 2002 Dec;8(12):1526-37; Z Wang et al, Mol Cell Biol. 1999 Jul;19(7):4552-60.)。

外周动脉疾病(Peripheral artery disease, PAD)是指由一系列由供应肢体动脉、内脏器官及脑部的结构和功能异常导致的非冠状动脉系统综合征，其特征非冠状动脉血液循环发生狭窄、闭塞和瘤样病变，累及主动脉及分支动脉。在 PAD 中，下肢缺血性疾病在临床上最为常见，主要病因包括动脉粥样硬化(Atherosclerosis obliterans, ASO)、糖尿病性动脉硬化闭塞症(Diabetic artery obliterans, DAO)和血栓闭塞性脉管炎(Thrombosis angiitis obliterans, TAO)。严重下肢缺血(Critical limb ischemia, CLI)属于 ASO 发展的晚期阶段，糖尿病足(Diabetic foot ulcer, DFU)属于 DAO 的一种，两者均属于外周血管病变性疾病，其发病特征均为下肢血管狭窄或闭塞、远端血液灌注不足导致的双足疼痛、溃疡及坏死。目前治疗 CLI 和 DFU 的有效措施是通过手术或者腔内介入进行血运重建，但超 40%的患者因为年龄、合

并发症等不满足血运重建要求，只能通过药物保守治疗。药物治疗仅能延缓疾病进程，无法治愈。

肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)是一种多功能间质源性生长因子，当其与细胞膜表面受体 c-met 结合后，引起胞内酪氨酸残基磷酸化，招募衔接蛋白，促进激酶活性，进而激活下游信号通路。HGF 是胚胎发育、组织器官再生、伤口愈合和血管发生等过程的重要调节因子，能促进内皮细胞和平滑肌细胞增殖和迁移，促进缺血部位微血管网络重建，抑制细胞凋亡。研究结果显示，裸质粒肌肉注射递送 hHGF-cDNA 能有效促进鼠和家兔缺血下肢的血流灌注(Y Taniyama et al. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. Gene Ther . 2001 Feb;8(3):181-9)。临床数据显示，小腿肌肉注射裸质粒可促进患者创面愈合(S Cui et al. Clinical Safety and Preliminary Efficacy of Plasmid pUDK-HGF Expressing Human Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Patients with Critical Limb Ischemia. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2015 Oct;50(4):494-501.)。但是，使用裸质粒递送药物存在体内转染效率低、给药剂量负担大、DNA 整合风险高及治疗费用成本高等不足，且临床数据显示并未改善趾肱指数、经皮氧分压及截肢率，因此药物仍有较大提升空间。

本公开提供这样的 mRNA，其含有新结构的 5'UTR、3'UTR，降低 mRNA 的早期降解或稳定 mRNA 的降解，但不损失更或增强蛋白翻译效率。所述 mRNA 稳定性更高，可应用于基因治疗、基因接种疫苗。以及，本公开提供能够表达人肝细胞生长因子(Human Hepatocyte growth factor, hHGF)的 mRNA，及其脂质纳米颗粒(Lipid nanoparticles, LNP)递送系统，可以实现外源 hHGF 蛋白在体内高效、快速转化，具有无整合风险、易于工业级放大的优点，是较裸质粒更为理想的治疗方案，可用作 CLI、DFU 等多种疾病的基因治疗药物。

发明内容

本公开提供一种核酸构建体，其包含至少一个可调节目的基因表达的核酸元件，所述核酸元件为 UTR。以及，所述核酸构建体可含有一个或多个目的基因，所述目的基因例如为 HGF。

核酸构建体

本公开提供核酸构建体，其包含：

- (a) 开放阅读框(ORF)，和
- (b) 非翻译区元件(UTR)。

一些实施方案中，核酸构建体为 DNA 分子；一些实施方案中，核酸构建体为 RNA 分子(例如，mRNA)。

一些实施方案中，所述 ORF 为编码目的基因的多核苷酸序列。

一些实施方案中,所述目的基因为异源的。另一些实施方案中,所述目的基因为内源的。一些实施方案中,所述目的基因为一个或多个(例如,2、3、4个)。

一些实施方案中,所述 UTR 源自基因 ACTG1、ATP6V0B、ATP6V0E1、CFL1、COX4I1、CTSB、FAM166A、NDUFB9、CHCHD10、SLC38A2、NDUFA11、NDUFV3、
5 PRDX5、GUK1、IAH1、ABHD16A、SLC25A39、ATPIF1、ANAPC11、CCDC12、MRPL14 或 APOA1BP 的 UTR。一些实施方案中,上述基因是人基因。

一些实施方案中,所述 UTR 为 3'非翻译区元件(3'UTR)或 5'非翻译区元件(5'UTR)。

一些实施方案中,所述 3'UTR 和 5'UTR 是相同或不同来源的,例如源自相同
10 或不同的基因。例如,3'UTR 源自基因 ACTG1 的 3'UTR,5'UTR 源自基因 ACTG1 的 5'UTR。又例如,3'UTR 源自基因 CTSB 的 3'UTR,5'UTR 源自基因 CHCHD10 的 5'UTR。一些实施方案中,所述 5'UTR 和 3'UTR 源自相同物种或不同物种。

一些实施方案中,所述 5'UTR 位于 ORF 的上游。一些实施方案中,所述核酸构建体中的 5'UTR 位于 ORF 的 5'末端。一些实施方案中,所述 3'UTR 位于 ORF
15 的下游。一些实施方案中,所述核酸构建体中的 3'UTR 位于 ORF 的 3'末端。

一些实施方案中,前述核酸构建体中,其包含:

(a) 开放阅读框(ORF),

(b-1) 3'UTR,所述 3'UTR 源自基因 ACTG1、ATP6V0B、ATP6V0E1、CFL1、COX4I1、CTSB、FAM166A 或 NDUFB9 的 3'UTR; 和

20 (b-2) 5'UTR,所述 5'UTR 源自基因 ACTG1、ATP6V0B、ATP6V0E1、CFL1、COX4I1、CTSB、FAM166A、NDUFB9、CHCHD10、SLC38A2、NDUFA11、NDUFV3、PRDX5、GUK1、IAH1、ABHD16A、SLC25A39、ATPIF1、ANAPC11、CCDC12、MRPL14 或 APOA1BP 的 5'UTR。

一些实施方案中,前述核酸构建体中,其包含:

25 (a) 开放阅读框(ORF),

(b-1) 3'UTR,所述 3'UTR 源自基因 CTSB、FAM166A 或 NDUFB9 的 3'UTR;
和

(b-2) 5'UTR,所述 5'UTR 源自基因 ACTG1、CHCHD10 或 NDUFA11 的 5'UTR。

一些实施方案中,前述核酸构建体(例如,DNA 或 RNA 分子)中,所述 3'UTR
30 源自基因 ACTG1 的 3'UTR,其含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:58 所示或与之任一具有同一性的序列;

所述 3'UTR 源自基因 ATP6V0B 的 3'UTR,其含有 SEQ ID NO:2、3 或 SEQ ID NO:59、60 所示或与之任一具有同一性的序列;

所述 3'UTR 源自基因 ATP6V0E1 的 3'UTR,其含有 SEQ ID NO:4、5 或 SEQ
35 ID NO:61、62 所示或与之任一具有同一性的序列;

所述 3'UTR 源自基因 CFL1 的 3'UTR,其含有 SEQ ID NO:6、7、8 或 SEQ ID

NO:63、64、65 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 3'UTR 源自基因 COX4I1 的 3'UTR, 其含有 SEQ ID NO:9、10、11 或 SEQ ID NO:66、67、68 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 3'UTR 源自基因 CTSB 的 3'UTR, 其含有 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69
5 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 3'UTR 源自基因 FAM166A 的 3'UTR, 其含有 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性的序列；或

所述 3'UTR 源自基因 NDUFB9 的 3'UTR, 其含有 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性的序列。

10 一些实施方案中, 前述核酸构建体(例如, DNA 或 RNA 分子)中, 所述 5'UTR 源自基因 ACTG1 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:72 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 ATP6V0B 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:16、17 或 SEQ ID NO:73、74 所示或与之任一具有同一性的序列；

15 所述 5'UTR 源自基因 ATP6V0E1 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:18、19 或 SEQ ID NO:75、76 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 CFL1 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:20、21、22 或 SEQ ID NO:77、78、79 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 COX4I1 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:23、24、25 或
20 SEQ ID NO:80、81、82 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 CTSB 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:83 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 FAM166A 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:84 所示或与之任一具有同一性的序列；

25 所述 5'UTR 源自基因 NDUFB9 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:85 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 CHCHD10 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:29、30 或 SEQ ID NO:86、87 所示或与之任一具有同一性的序列；

30 所述 5'UTR 源自基因 SLC38A2 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:31 或 SEQ ID NO:88 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 NDUFA11 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:89 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 NDUFV3 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:33 或 SEQ ID NO:90 所示或与之任一具有同一性的序列；

35 所述 5'UTR 源自基因 PRDX5 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:34 或 SEQ ID NO:91 所示的序列；

所述 5'UTR 源自基因 GUK1 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:35、36、37 或 SEQ ID NO:92、93、94 所示或与之任一具有同一性的序列;

所述 5'UTR 源自基因 IAH1 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:38 或 SEQ ID NO:95 所示或与之任一具有同一性的序列;

5 所述 5'UTR 源自基因 ABHD16A 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:39 或 SEQ ID NO:96 所示或与之任一具有同一性的序列;

所述 5'UTR 源自基因 SLC25A39 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:40 或 SEQ ID NO:97 所示或与之任一具有同一性的序列;

10 所述 5'UTR 源自基因 ATP1F1 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:41 或 SEQ ID NO:98 所示或与之任一具有同一性的序列;

所述 5'UTR 源自基因 ANAPC11 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:42、43 或 SEQ ID NO:99、100 所示或与之任一具有同一性的序列;

所述 5'UTR 源自基因 CCDC12 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:44 或 SEQ ID NO:101 所示或与之任一具有同一性的序列;

15 所述 5'UTR 源自基因 MRPL14 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:45 或 SEQ ID NO:102 所示或与之任一具有同一性的序列; 或

所述 5'UTR 源自基因 APOA1BP 的 5'UTR, 其含有 SEQ ID NO:46、47 或 SEQ ID NO:103、104 所示或与之任一具有同一性的序列。

一些实施方案中, 提供核酸构建体(例如, DNA 或 RNA 分子), 其包含:

20 (a) 开放阅读框(ORF),

(b-1) 3'UTR, 和

(b-2) 5'UTR;

其中, 所述 3'UTR 和 5'UTR 选自如下任一组合:

25 1) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:58 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

2) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:59 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

30 3) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:60 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

4) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:61 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

35 5) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:62 所示或与之任一具有同一

性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

6) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:63 所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

7) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:64 所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

8) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:65 所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

9) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:66 所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

10) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:67 所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

11) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:68 所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

12) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69 所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

13) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

14) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列;

15) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:72 所示或与之任一具有同一性的序列;

16) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列,所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:73 所示或与之任一具有同一性的序列;

17) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与

之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:74 所示或与之任一具有同一性的序列；

18) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:75 所示或与之任一具有同一性的序列；

19) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:76 所示或与之任一具有同一性的序列；

20) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:77 所示或与之任一具有同一性的序列；

21) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:78 所示或与之任一具有同一性的序列；

22) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:79 所示或与之任一具有同一性的序列；

23) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:23 或 SEQ ID NO:80 所示或与之任一具有同一性的序列；

24) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:24 或 SEQ ID NO:81 所示或与之任一具有同一性的序列；

25) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:82 所示或与之任一具有同一性的序列；

26) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:83 所示或与之任一具有同一性的序列；

27) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:84 所示或与之任一具有同一性的序列；

28) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:85 所示或与之任一具有同一性的序列；

29) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与

之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:86 所示或与之任一具有同一性的序列；

30) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:87 所示或与之任一具有同一性的序列；

31) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:31 或 SEQ ID NO:88 所示或与之任一具有同一性的序列；

32) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:89 所示或与之任一具有同一性的序列；

33) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:33 或 SEQ ID NO:90 所示或与之任一具有同一性的序列；

34) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:34 或 SEQ ID NO:91 所示或与之任一具有同一性的序列；

35) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:35 或 SEQ ID NO:92 所示或与之任一具有同一性的序列；

36) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:36 或 SEQ ID NO:93 所示或与之任一具有同一性的序列；

37) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:37 或 SEQ ID NO:94 所示或与之任一具有同一性的序列；

38) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:38 或 SEQ ID NO:95 所示或与之任一具有同一性的序列；

39) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:39 或 SEQ ID NO:96 所示或与之任一具有同一性的序列；

40) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:40 或 SEQ ID NO:97 所示或与之任一具有同一性的序列；

41) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列；

之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:41 或 SEQ ID NO:98 所示或与之任一具有同一性的序列；

42) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:42 或 SEQ ID NO:99 所示或与之任一具有同一性的序列；

43) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:100 所示或与之任一具有同一性的序列；

44) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:44 或 SEQ ID NO:101 所示或与之任一具有同一性的序列；

45) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:45 或 SEQ ID NO:102 所示或与之任一具有同一性的序列；

46) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:46 或 SEQ ID NO:103 所示或与之任一具有同一性的序列；或

47) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:104 所示或与之任一具有同一性的序列。

一些实施方案中，提供核酸构建体(例如，DNA 或 RNA 分子)，其包含：

(a) 开放阅读框(ORF)，

(b-1) 3'UTR，和

(b-2) 5'UTR；

所述 3'UTR 源自基因 CTSB、FAM166A 或 NDUFB9 的 3'UTR，所述 5'UTR 源自基因 ACTG1、CHCHD10 或 NDUFA11 的 5'UTR；

例如，所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12、13、14 任一或 SEQ ID NO:69、70、71 任一或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:15、29、30、32 任一或 SEQ ID NO:72、86、87、89 任一或与之任一具有同一性的序列；

又例如，所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69 所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:72 所示或与之任一具有同一性的序列，

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:72 所示或与之任一具有同一性的序列，

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性

的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:72 所示或与之任一具有同一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:86 所示或与之任一具有同一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:86 所示或与之任一具有同一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:86 所示或与之任一具有同一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:87 所示或与之任一具有同一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:87 所示或与之任一具有同一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:87 所示或与之任一具有同一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:89 所示或与之任一具有同一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:89 所示或与之任一具有同一性的序列, 或

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:89 所示或与之任一具有同一性的序列。

以上实施方案中, “具有同一性” 涵盖具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100% 同一性、以及前述任意两个数值之间的范围, 包括整数和小数。例如 “具有至少 90% 同一性” 或 “具有至少 95% 同一性”。

一些实施方案中, 所述 3'UTR 和/或 5'UTR 为上述 3'UTR 和/或 5'UTR 的变体, 所述变体例如为截短体、核苷酸突变体, 所述变体仍然保持与前述本公开的 3'UTR 和/或 5'UTR 相似的活性或功能, 例如仍然保持调控 ORF 编码目的基因表达蛋白的功能。

一些实施方案中，前述本公开提供的核酸构建体中，还包含：

(c) 多聚腺苷酸(poly-A)尾。

一些具体实施方案中，所述核酸构建体中的 poly-A 尾位于 3'UTR 的下游。一些具体实施方案中，所述核酸构建体中的 poly-A 尾位于 3'UTR 的 3'末端。一些具体实施方案中，所述 poly-A 尾在所述核酸构建体的 3'末端。一些具体实施方案中，poly-A 尾的长度为至少约 50、100、150、200、300、400、500 个核苷酸。

一些具体实施方案中，所述 poly-A 尾选自 A120、A30L70、HGH polyA、SV40polyA、BGH polyA、rbGlob polyA 或 SV40late polyA。例如，所述 A30L70 为 SEQ ID NO:52 所示的序列。

一些实施方案中，前述本公开提供的核酸构建体中，表达的目的基因(即，开放阅读框 ORF)为肝细胞生长因子(HGF)、抗体或其抗原结合片段。例如，与肿瘤抗原结合的抗体或其抗原结合片段、与病毒抗原结合的抗体或其抗原结合片段等。

一些具体实施方案中，所述 ORF 编码的多肽或蛋白是荧光蛋白或荧光素酶(luciferase)，例如 SEQ ID NO:126 所示的序列。

一些具体实施方案中，所述 HGF 为人肝细胞生长因子(hHGF)。

一些具体实施方案中，hHGF 的编码序列包含选自如下 1)-3)的任一项：

1) 编码如 SEQ ID NO: 109 所示氨基酸序列的核酸序列或经密码子优化的核酸序列；

2) 如 SEQ ID NO: 110-113 所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列；

3) 如 SEQ ID NO:128-131 任一所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 RNA 序列。

一些具体实施方案中，所述表达 HGF 作为目的基因的核酸构建体中包含 SEQ ID NO:115、116、127 任一所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的序列。

一些具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段为抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。

一些具体实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段的编码序列包含选自如下 1)-4)的任一项：

1) 编码如 SEQ ID NO: 117 所示重链氨基酸序列的核酸序列或经密码子优化的核酸序列，和编码如 SEQ ID NO: 118 所示轻链氨基酸序列的核酸序列或经密码子优化的核酸序列；

2) 编码如 SEQ ID NO: 117 所示重链氨基酸序列中 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的核酸序列或经密码子优化的核酸序列，和编码如 SEQ ID NO: 118 所示轻链氨基酸序列中 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的核酸序列或经密码子优化的核酸序列，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，例如，

是根据 Kabat 编号系统定义的；

3) 如 SEQ ID NO: 119 所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列，和如 SEQ ID NO: 120 所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列；

4) 如 SEQ ID NO: 121 所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列，和如 SEQ ID NO: 122 所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列。

10 一些具体实施方案中，所述表达抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段的核酸构建体中包含 SEQ ID NO:124 和 125 所示的序列，或与 SEQ ID NO:124 和 125 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的序列。

一些实施方案中，前述本公开提供的核酸构建体为 DNA 或 RNA，例如，为 mRNA。

15 一些实施方案中，从 5'至 3'方向上，前述本公开提供的核酸构建体(DNA 或 RNA)含有如下 1)-6)中任一：

1) 5'UTR，和 ORF；

2) ORF，和 3'UTR；

3) 5'UTR，ORF，和 3'UTR；

20 4) 5'UTR，ORF，3'UTR，和 poly-A 尾巴；

5) 5'UTR，ORF，和 poly-A 尾巴；

6) ORF，3'UTR，和 poly-A 尾巴；

所述 5'UTR 和 3'UTR 可以源自相同或不同的基因。

25 一些实施方案中，从 5'至 3'方向上，前述本公开提供的核酸构建体(DNA) 含有如下 1)-4)中任一：

1) 5'UTR，和 ORF；

2) ORF，和 3'UTR；

3) 5'UTR，ORF，和 3'UTR；

4) 5'UTR，ORF，3'UTR，和 poly-A 尾巴；

30 所述 5'UTR 和 3'UTR 可以源自相同或不同的基因。

一些具体实施方案中，所述 1)、3)、4)中的 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:15-47 任一所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中，所述 1)-4)中的 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:110 所示或其密码子优化的核苷酸序列(例如 SEQ ID NO:111-113)。一些具体实施方案中，所述 1)-4)中的 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:119 和 120 所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中，所述 2)-4)中的 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:1-14 任一所示的核苷酸序列。

一些实施方案中, 前述本公开提供的核酸构建体(RNA 或 mRNA)还包含:

(d) 5'帽结构(5'Cap)。

一些具体实施方案中, 所述 RNA 分子中的 5'Cap 结构位于 5'UTR 的上游。一些实施方案中, 所述 RNA 分子中的 5'Cap 结构位于 5'UTR 的 5'末端。在一些实施方案中, 5'帽结构是本领域技术人员已知的帽结构, 如 Cap0(第一个核碱基的甲基化, 例如 m⁷GpppN)、Cap1(m⁷GpppN 的相邻核苷酸的核糖的额外甲基化, 例如 m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG)、Cap2(m⁷GpppN 下游第 3 个核苷酸的核糖的额外甲基化)、Cap3(m⁷GpppN 下游第 3 个核苷酸的核糖的额外甲基化)、Cap4(m⁷GpppN 下游第 4 个核苷酸的核糖的额外甲基化)、ARCA(抗反向帽类似物)、修饰的 ARCA(例如, 硫代磷酸酯修饰的 ARCA)、肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'-氟代-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和 2-叠氮基-鸟苷。

一些具体实施方案中, 使用化学 RNA 合成或 RNA 体外转录(共转录加帽)形成 5' Cap 结构(如 Cap0 或 Cap1)。

一些具体实施方案中, 使用加帽酶(例如牛痘病毒加帽酶和/或帽依赖性 2'-O 甲基转移酶)经由酶促加帽来形成 5'-帽结构(如 Cap0 或 Cap1)。一些实施方案中, 使用固定化加帽酶, 添加 5'帽结构(Cap0 或 Cap1)。此处全文引入 WO2016/193226 中的加帽方法和手段。

一些具体实施方案中, 所述 5'Cap 选自 ARCA、3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G、m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU、m⁷Gppp(A2'O-MOE)pG、m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG、m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG、m⁷(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeG)pG 或 m⁷(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG。一些具体实施方案中, 所述 5'Cap 为 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G 或 m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG。

一些实施方案中, 从 5'至 3'方向上, 前述本公开提供的核酸构建体(RNA 或 mRNA)含有如下 1)-5)中任一:

- 1) 5'UTR, 和 ORF;
 - 2) ORF, 和 3'UTR;
 - 3) 5'UTR, ORF, 和 3'UTR;
 - 4) 5'UTR, ORF, 3'UTR, 和 poly-A 尾巴;
 - 5) 5'Cap, 5'UTR, ORF, 3'UTR, 和 poly-A 尾;
- 所述 5'UTR 和 3'UTR 可以源自相同或不同的基因。

一些具体实施方案中, 所述 1)、3)、4)、5)中的 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:72-104 任一所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中, 所述 1)-5)中的 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:128-131 任一所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中, 所述 2)-5)中的 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:58-71 任一所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中, 结构包括但不限于 Cap0、Cap1(例如 m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG)、Cap2、Cap3、Cap4、ARCA。

一些实施方案中,本公开提供核酸构建体(DNA),从 5'至 3'方向上,依次包含 5'UTR、ORF、3'UTR,可选地,可在 3'方向上进一步包含 poly-A 尾。一些实施方案中,所述 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:15-47 任一所示的核苷酸序列,所述 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:110 所示或其密码子优化的核苷酸序列(例如 SEQ ID NO:111-113),所述 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:1-14 任一所示的核苷酸序列。一些实施方案中,所述 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:15-47 任一所示的核苷酸序列,所述 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:119 和 120 所示的核苷酸序列,所述 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:1-14 任一所示的核苷酸序列。

一些实施方案中,本公开提供核酸构建体(RNA 或 mRNA),从 5'至 3'方向上,依次包含 5'UTR、ORF、3'UTR,可选地,可在 3'方向上进一步包含 poly-A 尾。一些实施方案中,所述 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:72-104 任一所示的核苷酸序列,所述 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:128-131 任一所示的核苷酸序列,所述 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:58-71 任一所示的核苷酸序列,和所述 poly-A 尾巴包含或为 120 个连续的腺苷酸或如 SEQ ID NO:52 所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中,所述核酸构建体包含如 SEQ ID NO:115、116 或 127 所示的核苷酸序列。

一些实施方案中,所述 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:72-104 任一所示的核苷酸序列,所述 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:121 和 122 所示的核苷酸序列,所述 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:58-71 任一所示的核苷酸序列,和所述 poly-A 尾巴包含或为 120 个连续的腺苷酸或如 SEQ ID NO:52 所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中,所述核酸构建体包含如 SEQ ID NO:124 或 125 所示的核苷酸序列。

一些实施方案中,前述任一种核酸构建体(DNA 或 RNA 分子),其中,所述 UTR 用于提高所述 ORF 表达蛋白的表达水平。示例性地,一些具体的实施方案中,与 SEQ ID NO:48 或 50 所示的 5'UTR 相比,本公开中 SEQ ID NO:15-47、72-104 任一序列所示的 5'UTR 具有提高的调控 ORF 表达目标蛋白的表达量。一些具体的实施方案中,与 SEQ ID NO:49 或 51 所示的 5'UTR 相比,本公开中 SEQ ID NO:1-14、58-71 任一序列所示的 3'UTR 具有提高的调控 ORF 表达目标蛋白的表达量。一些具体的实施方案中,与 SEQ ID NO:48 和 49 所示的 5'UTR 和 3'UTR 的组合相比,本公开中 SEQ ID NO:15-47、72-104 任一序列所示的 5'UTR,与 SEQ ID NO:1-14、58-71 任一序列所示的 3'UTR 的组合,具有提高的调控 ORF 表达目标蛋白的表达量。一些具体的实施方案中,与 SEQ ID NO:50 和 51 所示的 5'UTR 和 3'UTR 的组合相比,本公开中 SEQ ID NO:15-47、72-104 任一序列所示的 5'UTR,与 SEQ ID NO:1-14、58-71 任一序列所示的 3'UTR 的组合,具有提高的调控 ORF 表达目标蛋白的表达量。

一些实施方案中,本公开中的核酸构建体,其表达目标蛋白的表达量是 BioN 载体的约 1-约 20 倍,例如约 1 倍、约 1.1 倍、约 1.2 倍、约 1.3 倍、约 1.4 倍、约 1.5 倍、约 1.6 倍、约 1.7 倍、约 1.8 倍、约 1.9 倍、约 2 倍、约 2.1 倍、约 2.3 倍、

约 2.5 倍、约 2.8 倍、约 3 倍、约 3.2 倍、约 3.4 倍、约 3.8 倍、约 4 倍、约 4.5 倍、约 5 倍、约 5.2 倍、约 5.5 倍、约 5.8 倍、约 6 倍、约 7 倍、约 8 倍、约 10 倍、约 12 倍、约 15 倍等。一些具体的实施方案中，本公开中的核酸构建体为表达目标蛋白的 mRNA 分子，所述 mRNA 分子表达目标蛋白的表达量是 BioN 载体的约 1-约 20 倍。一些具体的实施方案中，所述 BioN 载体包含 SEQ ID NO:50 或 107 所示的 5'UTR；和/或，包含 SEQ ID NO:51 或 108 所示的 3'UTR。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体，其表达目标蛋白的表达量是 Mod 载体的约 1-约 20 倍，例如约 1 倍、约 1.1 倍、约 1.2 倍、约 1.3 倍、约 1.4 倍、约 1.5 倍、约 1.6 倍、约 1.7 倍、约 1.8 倍、约 1.9 倍、约 2 倍、约 2.1 倍、约 2.3 倍、约 2.5 倍、约 2.8 倍、约 3 倍、约 3.2 倍、约 3.4 倍、约 3.8 倍、约 4 倍、约 4.5 倍、约 5 倍、约 5.2 倍、约 5.5 倍、约 5.8 倍、约 6 倍、约 7 倍、约 8 倍、约 10 倍、约 12 倍、约 15 倍等。一些具体的实施方案中，本公开中的核酸构建体为表达目标蛋白的 mRNA 分子，所述 mRNA 分子表达目标蛋白的表达量是 BioN 载体的约 1-约 20 倍。一些具体的实施方案中，所述 Mod 载体包含 SEQ ID NO:48 或 105 所示的 5'UTR；和/或，包含 SEQ ID NO:49 或 106 所示的 3'UTR。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体被递送于受试者体内，在约 0.5-1.5h 后表达目标蛋白(例如，hHGF 蛋白)。一些实施方案中，本公开中的核酸构建体被递送于受试者体内，在约 2h-10h(例如，约 2h、约 3h、约 4h、约 5h、约 6h、约 7h、约 8h、约 10h 等)达到表达峰值。一些具体的实施方案中，本公开中的核酸构建体为表达目标蛋白的 mRNA 分子，例如，所述核苷酸构建体为表达 hHGF 蛋白的 mRNA 分子。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体被递送于受试者体内，具有高于 Collatogene 质粒的药代动力学性能。一些具体的实施方案中，核酸构建体为 mRNA 分子，所述 mRNA 分子与 Collatogene 质粒相比，具有提高的药代动力学性能(例如，C_{max}、AUC_{0-inf}、MRT_{0-inf})。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体(例如，表达 hHGF 蛋白的 m-A16-B12 (hHGF))，能够改善缺血受试者血下肢的血流灌注比率。示例性地，注射 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF) 的下肢缺血小鼠可实现改善的血流灌注比率。其中，注射约 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF) 的下肢缺血小鼠可实现恢复至约 90% 以上的血流灌注。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体(例如，表达 hHGF 蛋白的 m-A16-B12 (hHGF))，能够改善诱导下肢缺血的受试者的缺血性坏死。示例性地，注射 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF) 的下肢缺血小鼠的下肢均能保持良好的完整性且并未出现下肢坏死情况。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体(例如，表达 hHGF 蛋白的 m-A16-B12 (hHGF))，可促进各组缺血下肢肌肉中的血管新生。示例性地，在给予

50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)治疗的情况下，均可显著促进各组缺血下肢肌肉中的血管新生，且新生血管数量相对 PBS 组具有明显的统计学差异 ($p<0.05$)。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体(例如，表达 hHGF 蛋白的 m-A16-B12 (hHGF))，能够改善糖尿病受试者的创面愈合。示例性地，在注射 50 ng/只、200 ng/只和 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)的 Db/Db 糖尿病小鼠模型，小鼠的创面均得到良好的愈合。其中，在第 14 天，50 ng/只剂量的 m-A16-B12 (hHGF)创面愈合率达 66%，200 ng/只和 500 ng/只剂量的 m-A16-B12 (hHGF)能够实现 100% 的伤口愈合。

本公开提供的 mRNA，其含有新结构的 5'UTR、3'UTR，使得 mRNA 的早期降解降低或稳定降解，但不损失更或增强蛋白翻译效率。所述 mRNA 稳定性更高，可应用于基因治疗、基因接种疫苗。以及，本公开提供能够表达人肝细胞生长因子(Human Hepatocyte growth factor, hHGF)的 mRNA，及其脂质纳米颗粒(Lipid nanoparticles, LNP)递送系统，可以实现外源 hHGF 蛋白在体内高效、快速转化，具有无整合风险、易于工业级放大的优点，是较裸质粒更为理想的治疗方案，可用作 CLI、DFU 等多种疾病的基因治疗药物。

多核苷酸

本公开还提供经分离的多核苷酸，其包含(a) 开放阅读框(ORF)。示例性地，开放阅读框(ORF)编码肝细胞生长因子(HGF)，例如人肝细胞生长因子(hHGF)。

一些实施方案中，所述 hHGF 的编码序列包含选自如下 1)-3)的任一项：

- 1) 编码如 SEQ ID NO: 109 所示氨基酸序列的核酸序列或其密码子优化的序列；
- 2) 如 SEQ ID NO: 110-113 任一所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列；
- 3) 如 SEQ ID NO:128-131 任一所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 RNA 序列。

一些具体实施方案中，所述多核苷酸的 5'端可以包含前述本公开提供的任意 5'UTR，和/或所述多核苷酸的 3'端可以包含前述本公开提供的任意 3'UTR。

一些具体实施方案中，所述多核苷酸的 5'端可以包含前述本公开提供的任意 5'Cap，和/或所述多核苷酸的 3'端可以包含前述本公开提供的任意 poly-A 尾。

一些实施方案中，所述多核苷酸是 RNA，例如 mRNA。

修饰

为了进一步改善本公开的 RNA 或多核苷酸的关于蛋白质表达的稳定性，所述 RNA 或多核苷酸可进一步包含一种或多种修饰(包括化学修饰)，例如骨架修饰、糖修饰、碱基修饰和/或脂质修饰等。在一些实施方案中，所述 RNA 或多核苷酸被均匀地修饰成某个特定修饰(例如，在整个序列中完全修饰)。例如，可以用假尿苷(例如，N1-甲基假尿苷)均匀地修饰 RNA，使得序列中的每个 U 是假尿苷。

与本公开有关的骨架修饰是指本公开 RNA 或多核苷酸中包含的核苷酸的骨架的磷酸酯的化学修饰。一些实施方案中，所述骨架修饰包括但不限于用修饰的磷酸酯完全取代骨架中未修饰的磷酸酯部分，例如可以通过用不同的取代基取代一个或多个氧原子来修饰主链的磷酸基团。一些实施方案中，所述修饰的磷酸酯包
5 括但不限于硫代磷酸酯、亚磷酸硒酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯、膦酸氢酯、氨基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯和磷酸三酯。

与本公开有关的糖修饰是指本公开 RNA 或多核苷酸中包含的核苷酸的糖的化学修饰。一些实施方案中，所述糖修饰包括但不限于将 RNA 分子的 2'羟基(OH)修饰或替换为许多不同的"氧基"或"脱氧"取代基。一些实施方案中，所述"
10 氧基"修饰包括但不限于烷氧基、芳氧基、聚乙二醇(PEG)等的取代修饰。一些实施方案中，"脱氧"修饰包括但不限于氢、氨基(例如 NH₂、烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、二杂芳基氨基或氨基酸)修饰。

与本公开有关的碱基修饰是指本公开 RNA 或多核苷酸中包含的核苷酸的碱基部分的化学修饰。一些实施方案中，所述碱基修饰包括对核苷酸中腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶的修饰。例如，本文所述的核苷和核苷酸可在主凹槽表面上被化学修饰。一些实施方案中，主要的凹槽化学修饰可包括氨基、硫醇基、烷基或卤素基团。一些实施方案中，所述碱基修饰包括但不限于用假尿苷、1-甲基-伪尿苷、5-氮杂胞苷、5-甲基胞嘧啶-5'-三磷酸或 2-甲氧基腺嘌呤修饰。一些实施方案中，所述碱基修饰为假尿苷修饰。例如，可以用假尿苷均匀地修饰 RNA，使得
15 序列中的每个 U 是假尿苷。

与本公开有关的脂质修饰是指本公开 RNA 或多核苷酸中包含脂质修饰。一些实施方案中，所述脂质修饰包括但不限于本公开的 RNA 或多核苷酸共价连接至少一个接头，以及相应的接头与至少一个脂质共价连接。一些实施方案中，所述脂质修饰包括但不限于本公开的 RNA 或多核苷酸与至少一个脂质共价连接(无接头)。
25

UTRs

UTRs(5'UTR 和/或 3'UTR)可以作为侧翼区域提供给本公开的核酸构建体、RNA 或多核苷酸分子。UTRs 可以与在本公开的核酸构建体、RNA 或多核苷酸分子中的编码区同源或异源。侧翼区域可以包含一个或多个 5'UTR 和/或 3'UTR，所述 UTRs 可以是相同的或不同的序列。侧翼区域的任何部分可以进行密码子优化。在密码子优化之前和/或之后，侧翼区域的任何部分可以独立地包含一个或多个不同的结构或化学修饰。
30

为了改变本公开的核酸构建体、RNA 或多核苷酸的一种或多种特性，将与本公开的 ORF 异源的 UTRs 引入或工程化合成到本公开的核酸构建体、RNA 或多核苷酸中。然后将所述重组核酸构建体、RNA 或多核苷酸施用于细胞、组织或生物体，并测量结果，如蛋白质水平、定位和/或半衰期，以评估异源 UTR 对本公开的、
35

RNA 或多核苷酸产生的有益影响。一些实施方案中，所述 UTR 包括野生 UTR 或其变体，所述 UTR 变体包括在末端添加或去除一个或多个核苷酸，包括 A、T、C 或 G。一些实施方案中，所述 UTR 变体也包括任何方式进行的密码子优化或修改。一些实施方案中，所述 UTR 变体也包括本公开任何实施方式的衍生序列，例如在天然 UTR 序列的基础上，将部分核苷酸进行点突变，突变后的变体的对目的基因表达量、稳定性维持不变或得到提高。所述对目的基因表达量、稳定性的检测方法是本领域常规的，例如本公开实施例 3、4 中的检测方法。

载体

本公开还提供载体，其包含前述任一项所述的核酸构建体、RNA 或多核苷酸。其中核酸构建体、RNA 或多核苷酸可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可为表达载体，即可提供核酸构建体、RNA 或多核苷酸编码多肽表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的核酸，其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、终止子等)。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的编码多肽的表达有用或必需的调控元件及其他元件例如为启动子、终止子、选择标记物、前导序列、报告基因等。

一些实施方案中，所述载体是能表达本公开目的基因(例如 HGF)的治疗载体，例如质粒(例如裸质粒)，腺病毒载体，腺相关病毒载体，和慢病毒载体。

本公开的核酸构建体可基于本公开的核苷酸序列的信息通过已知的方式(例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术)制备或获得，和/或可从适合的天然来源加以分离。

一些实施方案中，本公开的载体还包含启动子，例如所述启动子在所述核酸构建体 5'UTR 的 5'末端，例如所述启动子为 T7 启动子、T7 lac 启动子、Tac 启动子、Lac 启动子、Trp 启动子。

宿主细胞

本公开还提供一种宿主细胞，其包含前述任一项所述的核酸构建体、RNA 或多核苷酸。一些实施方案中，所述细胞能够表达一种或多种本公开核酸构建体、RNA 或多核苷酸编码的多肽。一些实施方案中，所述宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属(*Aspergillus*)的物种的细胞；或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母

(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而，本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

生产或制备方法

本公开提供一种制备本公开核酸构建体、RNA 或多核苷酸的方法，以及制备其编码多肽的方法。

用于制备产生核酸构建体、RNA 或多核苷酸，及其编码多肽的方法及试剂，例如特定适合载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。类似地，适用于制造本公开的编码多肽的方法中的蛋白分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。

一些实施方案中，所述制备核酸构建体或多核苷酸的方法包括培养前述的宿主细胞，并从培养物中回收产生的核酸构建体或多核苷酸。本公开的核酸构建体或多核苷酸，及其编码多肽也可以通过本领域已知的其它产生方法获得，例如化学合成，包括固相或液相合成。

一些实施方案中，制备 RNA 分子的方法包括：制备核酸构建体或载体，然后利用所述核酸构建体或载体进行逆转录，得到 RNA 分子。一些具体的实施方案中，所述方法还包括对所述 RNA 分子的 5'端添加 5'Cap。

一些实施方案中，RNA 可进一步包含一种或多种修饰(包括化学修饰)，例如骨架修饰、糖修饰、碱基修饰和/或脂质修饰等。在一些实施方案中，所述 RNA 或多核苷酸被均匀地修饰成某个特定修饰(例如，在整个序列中完全修饰)。例如，可以用假尿苷(例如，N1-甲基假尿苷)均匀地修饰 RNA，使得序列中的每个 U 是假尿苷(例如，N1-甲基假尿苷)。

递送媒介物

本公开还提供递送媒介物，其包含前述任一项所述的核酸构建体、前述任意的 RNA 分子、多核苷酸或载体，其中所述递送媒介物是阳离子脂质递送颗粒。一些实施方案中，其中所述颗粒是纳米颗粒。一些实施方案中，所述递送媒介物是纳米脂质颗粒。本公开中的核酸构建体、RNA 分子多核苷酸或载体可以使用本领域任意类型的纳米脂质颗粒实现向细胞内和/或体内的递送，示例性地，纳米脂质颗粒包括但不限于 WO2017075531、WO2018081480A1、WO2017049245A2、WO2017099823A1、WO2022245888A1、WO2022150717A1、CN101291653A、CN102119217A、WO2011000107A1、CN107028886A、US9868692B2 中所公开的脂质颗粒，上述专利通过引用全文并入本公开。

一些实施方案中，递送媒介物包含 US9868692B2 中示出的纳米脂质颗粒，例如，式 B 所示的可离子化脂质(又称，SM-102)。一些实施方案中，递送媒介物包含纳米脂质颗粒、磷脂、结构脂质、和/或 PEG 脂质。示例性地，递送媒介物包含脂质组分包含约 50mol%的所述可电离脂质(例如，SM-102)、约 10mol%的磷脂(例如，DSPC)、约 38.5mol%的结构脂质(例如，胆固醇)和约 1.5mol%的 PEG 脂质(例如，PEG-DMG)。

药物组合物

本公开还提供药物组合物，其包含本公开前述任意的核酸构建体、前述任意的 RNA 分子、前述任意的多核苷酸、前述任意的载体，和/或前述任意的递送媒介物，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂，具体地，所述药物组合物为固体制剂、注射剂、外用制剂、喷剂、液体制剂、或复方制剂。

产品或试剂盒

本公开提供产品或试剂盒，其包含前述任一项所述的核酸构建体、前述任意的 RNA 分子、前述任一项所述的多核苷酸、前述任一项所述的疫苗、前述任一项所述的载体、前述任一项所述的递送媒介物，和/或前述任一项所述的药物组合物。所述试剂盒可用于提供相关检测或诊断用途。

治疗和/或预防疾病的方法和制药用途

本公开还提供治疗或预防疾病的方法，包括向有需要的受试者使用治疗和/或预防有效量的前述任意的核酸构建体、前述任意的 RNA 分子、前述任意的多核苷酸、前述任意的载体、前述任意的递送媒介物，前述任意的药物组合物，和/或前述任意的产品或试剂盒。

本公开同时提供前述任意的核酸构建体、前述任意的 RNA 分子、前述任意的多核苷酸、前述任意的载体、前述任意的递送媒介物，前述任意的药物组合物，和/或前述任意的产品或试剂盒用于制备治疗和/或预防疾病的药物的用途。

一些实施方案中，所述疾病为受试者可受益于天然 hHGF 的活性的疾病。

一些实施方案中，所述疾病选自缺血性疾病、代谢综合征、糖尿病及其并发症、再狭窄，以及神经损伤。一些具体实施方案中，所述疾病为缺血性疾病，例如冠状动脉疾病(CAD)或外周动脉疾病(Peripheral artery disease, PAD)，例如心肌梗死或下肢动脉缺血。一些具体实施方案中，所述疾病为糖尿病或其并发症，例如糖尿病周围神经病变。一些具体实施方案中，所述疾病为再狭窄，例如手术后再狭窄和灌注后再狭窄。一些具体实施方案中，所述疾病为神经损伤，例如神经退行性疾病(例如肌萎缩性侧索硬化(ALS)，帕金森氏病，痴呆病)、创伤性神经损伤、周围神经病变(例如糖尿病周围神经病变)。一些具体实施方案中，所述疾病选自下肢动脉缺血、心肌梗死和糖尿病周围神经病变。

一些实施方案中，所述疾病选自外周动脉疾病(PAD)、动脉粥样硬化(Atherosclerosis obliterans, ASO)、糖尿病性动脉硬化闭塞症(Diabetic artery

obliterans, DAO)、血栓闭塞性脉管炎(Thrombosis angiitis obliterans, TAO)。一些实施方案中,所述疾病选自肢体缺血(例如,下肢缺血、严重下肢缺血(Critical limb ischemia, CLI))、糖尿病足(Diabetic foot ulcer, DFU)。

一些实施方案中,提供了促进内皮细胞(例如脐静脉内皮细胞)生长和/或迁移的方法,包括向有需要的内皮细胞或受试者施用有效量的本公开前述任意的多核苷酸、前述任意的载体、前述任意的递送媒介物,前述任意的药物组合物,和/或前述任意的产品或试剂盒。同时提供相关制备促进内皮细胞生长和/或迁移药物的制药用途。

一些实施方案中,提供了促进血管发生的方法,包括向有需要的内皮细胞或受试者施用有效量的本公开前述任意的多核苷酸、前述任意的载体、前述任意的递送媒介物,前述任意的药物组合物,和/或前述任意的产品或试剂盒。一些实施方案中,所述血管发生为微小血管发生。同时提供相关制备促进血管发生(例如微小血管发生)药物的制药用途。

有益效果

本公开提供的目的基因为 HGF 的核酸构建体、载体、递送媒介物、药物组合物、产品或试剂盒可有利地应用于以下一个或多个方面:促进内皮细胞生长和/或迁移;促进血管(例如微小血管)发生;治疗缺血性疾病,例如冠状动脉疾病(CAD)或外周动脉疾病(PAD),例如肢体缺血(例如下肢缺血、严重下肢缺血);治疗代谢综合征和糖尿病及其并发症(例如,糖尿病周围神经病变、糖尿病足);抑制再狭窄;和促进神经损伤(例如,神经退行性疾病,创伤性神经损伤,周围神经病变)修复。

附图说明

图 1A 至图 1C 为载体构建示意图。其中,图 1A 为 5'UTR 元件筛选载体构建的示意图,对照为含有 Moderna 公司的 5'UTR 及 3'UTR 元件的 mRNA 序列,即 5'UTR-Fluc- α 球蛋白 3'UTR-120A (简称为 Mod.),其 5'-UTR 为人工核酸序列,3'UTR 源自人 α 球蛋白的 mRNA。构建 5'UTR 筛选载体时,通过合适的酶切位点替换 5'UTR 区域。*PmeI* 为线性化酶切位点。图 1B 为 3'UTR 元件筛选载体构建的示意图,对照为 Mod.,构建 3'UTR 筛选载体时,通过合适的酶切位点替换 3'UTR 区域。图 1C 为 5'及 3'UTR 元件组合筛选载体构建的示意图,对照为 Mod.,构建 5'UTR 及 3'UTR 元件组合筛选载体时,通过合适的酶切位点替换 5'及 3'UTR 区域或全基因合成。

图 2 为本公开不同的 3'UTR 元件在不同细胞系中的效果评估结果。将含有不同 3'UTR 元件的 mRNA 转染至 HEK293、HeLa 和 A549 细胞中,在转染后 24h 检测荧光素酶表达,评估 3'UTR 序列对蛋白表达量的影响。使用 Mod.作为对照,并将 Mod.的表达水平设为 1。结果显示,在不同细胞系中,3'UTR 元件对蛋白表达量的影响具有一致性。

图 3 为本公开不同 3'UTR 元件对 mRNA 表达效率的影响结果。将含有不同 3'UTR 元件的 mRNA 通过脂转染转导至 HEK293 细胞中，在转染 6h、24h、48h 和 72h 后检测荧光素酶的表达水平。使用 Mod.作为对照，将其表达水平设为 1。结果显示，编号为 B9、B10、B12、B13、B14 的 3'UTR 元件可显著提高蛋白的表达量。

图 4 为本公开不同 5'UTR 元件对 mRNA 表达效率的影响结果。将含有不同 5'UTR 元件的 mRNA 通过脂转染转导至 HEK293 细胞中，在转染 6h、24h、48h 和 72h 后检测荧光素酶的表达水平。使用 Mod.作为对照，将其表达水平设为 1。结果显示，编号为 A1、A3-A7、A9-A14 的 5'UTR 元件可显著提高蛋白的表达量。

图 5 为本公开不同 5'UTR 元件对 mRNA 表达效率的影响结果。将含有不同 5'UTR 元件的 mRNA 通过脂转染转导至 HEK293 细胞中，在转染 6h、24h、48h 和 72h 后检测荧光素酶的表达水平。使用 Mod.作为对照，将其表达水平设为 1。结果显示，编号为 A15、A16、A18-A19、A21、A24、A27、A28、A30-A33 的 5'UTR 元件可显著提高蛋白的表达量。

图 6 为本公开不同 5'UTR 元件对 mRNA 表达效率的影响结果。将含有不同 5'UTR 元件的 mRNA 通过脂转染转导至 HEK293 细胞中，在转染 6h、24h 和 48h 后检测荧光素酶的表达水平。使用 BioN.作为对照，将其表达水平设为 1。结果显示，编号为 A1、A15、A16 和 A18 的 5'UTR 元件相较于对照的核酸分子均可显著提高蛋白的表达量。

图 7 为本公开 UTR 元件组合对 mRNA 表达效率的影响结果。将含有不同 5'UTR 和 3'UTR 元件的 mRNA 通过脂转染转导至 HEK293 细胞中，在转染 6h、24h、48h 和 72h 后检测荧光素酶的表达水平。使用 Mod.作为对照，将其表达水平设为 1。结果显示，编号为 A1、A15、A16、A18 的 5'UTR 元件与编号为 B12、B13、B14 的 3'UTR 元件进行组合均可显著提高蛋白的表达量。

图 8A 至图 8B 为本公开 UTR 元件组合对不同目的蛋白的表达效率的影响结果。图 8A 为 HEK293 细胞中，含有本公开筛选出的 5' UTR 及 3'UTR 元件的 mRNA 对 hHGF 表达量的调控，结果显示，相较于对照 Mod.，编号为 A1 A15、A16、A18 的 5'UTR 元件与编号为 B12、B13、B14 的 3'UTR 元件进行组合可显著提高 hHGF 的表达量。图 8B 为 HEK293 细胞中，含有本公开筛选出的 5' UTR 及 3'UTR 元件的 mRNA 对抗 PD-1 抗体表达量的调控，结果显示，相较于对照 Mod.，A1-B12、A15-B12 的 UTR 组合可显著提高抗 PD-1 抗体的表达量。

图 9 为本公开 m-A16-B12 (hHGF)及对照质粒在小鼠肌肉组织中 hHGF 蛋白表达水平随时间变化的实验结果示意图。结果显示，注射 m-A16-B12 (hHGF)及 Collatogene 质粒均可有效表达 hHGF 蛋白，m-A16-B12 (hHGF)于肌肉注射 1 h 后即可表达 hHGF，注射后 6 h，出现 hHGF 的表达峰值，呈剂量依赖，且低剂量的 m-A16-B12 (hHGF)即可达到与 Collatogene 表达 $AUC_{inf}(hr*pg/mg\ protein)$ 相当的水平。

图 10A 至图 10B 为本公开 m-A16-B12(hHGF)及对照质粒对下肢缺血小鼠模型治疗结果的结果。图 10A 为表明 m-A16-B12(hHGF)及 Collatogene 质粒对下肢缺血小鼠模型血流灌注影响的研究方案示意图及实验结果照片。图 10B 为表明 m-A16-B12 (hHGF)及 Collatogene 质粒对下肢缺血小鼠模型血流灌注比率的统计结果。结果显示, 在 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)和 200 ng/只的 Collatogene 裸质粒进行治疗的情况下, 各小鼠缺血下肢的血流灌注比率相对于对照组有明显的改善, 且缺血下肢的血流灌注比率随时间的进展逐渐得到恢复; 50 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)组表现出与 200 ng/只 Collatogene 裸质粒组相近的血流恢复效果; 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)组显著优于 200 ng/只 Collatogene 裸质粒组的血流恢复效果, 可实现恢复至 90%以上的血流灌注情况。

图 11A 至图 11B 为本公开 m-A16-B12 (hHGF)及对照质粒对下肢缺血小鼠模型治疗结果的结果。图 11A 为下肢缺血小鼠模型下肢坏死不同程度的评分标准及代表性照片。图 11B 为表明 m-A16-B12 (hHGF)及 Collatogene 质粒对下肢缺血小鼠模型下肢坏死影响的统计结果。实验结果显示, 在注射 m-A16-B12 (hHGF)和 Collatogene 裸质粒治疗组中, 各小鼠的下肢均能保持良好的完整性且并未出现下肢坏死情况。

图 12 为本公开 m-A16-B12 (hHGF)及对照质粒对下肢缺血小鼠模型血管新生影响的代表性照片及统计结果。结果显示, 给予 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)和 200 ng/只的 Collatogene 裸质粒治疗的情况下, 均可显著促进缺血下肢肌肉中的血管新生。

图 13 为本公开 m-A16-B12 (hHGF)及对照质粒对全皮层损伤的 Db/Db 小鼠模型创口影响的治疗方案、代表性照片及统计结果。结果显示, 在 50 ng/只、200 ng/只和 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)和 200 μg/只 Collatogene 裸质粒的处理下, 相对于对照组, 小鼠的创面均得到良好的愈合, 且 m-A16-B12 (hHGF)的促创面愈合情况显著优于 200 μg/只 Collatogene 裸质粒。

图 14 为本公开 m-A16-B12 (hHGF) 及对照质粒对全皮层损伤的 Db/Db 小鼠模型组织重构影响的代表性照片。结果显示, 在 m-A16-B12 (hHGF)的治疗下, 各组小鼠创面上皮均完成上皮全覆盖, 完成组织重构。而对照组及 200μg/只 Collatogene 裸质粒组均未完成上皮再覆盖, 创口处胶原蛋白异常增生, 结构紊乱。

30

具体实施方式

术语

为了更容易理解本公开, 以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义, 本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

35

本公开的“HGF”涵盖天然或野生型 HGF 及其不同物种来源的同源物, 包括

具有生物学活性的、天然存在的人肝细胞生长因子(human hepatocyte growth factor, hHGF)及其变体。可方便地从各种公共数据库(例如, GenBank 数据库)获得天然或野生型 hHGF 的氨基酸序列。例如, 天然 hHGF 的氨基酸序列可见于 GenBank 数据库登录号:NP_000592.3。又例如, 本公开提供氨基酸序列如 SEQ ID NO:109、DNA 序列如 SEQ ID NO:110、密码子优化序列如 SEQ ID NO:111-113 所示的 hHGF。HGF 具有多种生物学活性, 包括但不限于以下的一种或多种活性:(1)促进内皮细胞生长和/或迁移;(2)促进血管(例如微小血管)发生; 和/或, (3)促进神经损伤(例如周围神经病变, 例如糖尿病周围神经病变)修复。因此, HGF 可在多个方面具有应用前景, 包括但不限于:(1)促进内皮细胞生长和/或迁移;(2)促进血管(例如微小血管)发生;(3)治疗缺血性疾病, 例如冠状动脉疾病(CAD)或外周动脉疾病(PAD), 例如下肢动脉缺血;(4)治疗代谢综合征和糖尿病及其并发症(例如, 糖尿病周围神经病变); (5)抑制再狭窄; 和(6)促进神经损伤(例如, 神经退行性疾病, 创伤性神经损伤, 周围神经病变)修复。因此, 术语“可受益于天然 hHGF 的活性的疾病”的实例包括但不限于上述疾病, 例如, 缺血性疾病, 代谢综合征, 糖尿病及其并发症, 再狭窄, 神经损伤等。

“核酸”或“核苷酸”包括 RNA、DNA 和 cDNA 分子。应当理解, 由于遗传密码的简并性, 可以产生编码给定蛋白质的大量核苷酸序列。术语核酸可以与术语“多核苷酸”互换使用。“寡核苷酸”是短链核酸分子。“引物”是寡核苷酸, 无论是天然存在于纯化的限制酶切消化中还是合成产生, 当置于诱导与核酸链互补的引物延伸产物的合成的条件(即在核苷酸和诱导剂例如 DNA 聚合酶的存在下, 并在合适的温度和 pH 下)下能够充当合成起始点。为了最大化扩增效率, 引物优选是单链的, 但另外可选地可以是双链的。如果是双链的, 则在用于制备延伸产物之前, 首先对引物进行处理以分离其链。优选地, 引物是脱氧核糖核苷酸。引物必须足够长以在诱导剂的存在下引发延伸产物的合成。引物的确切长度将取决于许多因素, 包括温度、引物来源和使用的方法。

“载体”或“表达载体”是指复制子, 例如质粒、杆粒、噬菌体、病毒、病毒体或粘粒, 可连接另一个 DNA 区段, 即“插入物”以实现连接区段在细胞中的复制。载体可以是设计用于递送至宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所用, 载体在起源和/或最终形式上可以是病毒或非病毒的, 如本文所用的 PUC57 DNA 载体。术语“载体”涵盖与适当的控制元件结合时能够复制并且可以将基因序列转移至细胞的任何遗传元件。在一些实施方案中, 载体可以是表达载体或重组载体。

“启动子”是指通过驱动核酸序列的转录来调节另一核酸序列表达的任何核酸序列, 其可以是编码蛋白质或 RNA 的异源靶基因。启动子可以是组成型的、诱导型的、阻遏型的、组织特异性的或其任何组合。启动子是核酸序列的控制区域, 在此核酸序列的其余部分的启动和转录速率是受控的。

“基因”是指涉及产生多肽链的 DNA 片段，可以包括或不包括在前和在后的编码区域，例如，5'非翻译(5'UTR)或“先导”序列和 3'UTR 或“非转录尾区”序列，以及在各自编码片段(外显子)之间的插入序列(内含子)。

“重组”是指多核苷酸是克隆、限制或连接步骤的各种组合的产物，以及导致与天然存在的多核苷酸差异和/或不同的构建体的其他步骤的产物。

“引入”，在将核酸序列插入细胞的内容中，意思为“转染”、“转化”或“转导”和包括参考核酸序列并入真核或原核细胞中，其中核酸序列可以并入细胞的基因组(例如，染色体、质粒、质体，或线粒体 DNA)，转入自主复制，或暂时表达(例如，转染 mRNA)。

“核酸构建体”是指单链或双链的核酸分子。一些实施方案中，核酸构建为 DNA 分子，其被修饰或合成为以天然本来不存在的方式包含核酸区段，所述核酸分子包含一个或多个控制序列或调控元件。一些实施方案中，核酸构建为 DNA 转录后形成的 RNA 分子。在本公开的上下文中，核酸构建体含有重组核苷酸序列，该重组核苷酸序列基本上由任选地一个、两个、三个或多个分离的核苷酸序列组成:包括 5'UTR、开放阅读框(ORF)、3'UTR。在涉及包括两个或更多个序列的构建体的实施方式中，序列在构建体中彼此可操作地连接。

“衍生序列”是指与本公开 UTR 序列高度同源(例如与本公开 UTR 序列至少 80%、85%、88%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性)且仍保留与本公开 UTR 序列具有相似功能活性的核苷酸序列。一些实施方案中，所述衍生序列为在天然 UTR 序列的基础上经过一个或多个核苷酸的取代、缺失或添加得到的核苷酸序列。一些实施方案中，所述衍生序列为在天然 UTR 序列的基础上经过截短的得到的核苷酸序列。

“可操作地连接”在本文中定义为如下结构:其中控制序列即启动子序列和/或 5'UTR 序列，被适当地置于相对于编码 DNA 序列的位置处，使得控制序列指导编码序列的转录和 mRNA 翻译成由编码 DNA 编码的多肽序列。

“开放阅读框架”缩写为“ORF”，是指编码多肽的核酸序列的片段或区域。ORF 包括连续的非重叠的框架内密码子，在 mRNA 序列中从起始密码子开始并用终止密码子结束，由核糖体翻译。

“内源的”是指来自或在生物体、细胞、组织或系统内部产生的任何物质。

“外源的”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入或产生的任何物质。

“同一性的序列”或“序列同一性”是指基因或蛋白质之间分别在核苷酸或氨基酸水平上的序列同一性。“同一性的序列”或“序列同一性”是蛋白质之间在氨基酸水平上的同一性量度以及核酸之间在核苷酸水平上的同一性量度。蛋白质序列同一性可以通过在比对序列时比较每个序列中给定位置的氨基酸序列来确定。类似地，核酸序列同一性可以通过在比对序列时比较每个序列中给定位置的核苷酸序列来确定。用于比对序列以供比较的方法是本领域所熟知的，此类方法

包括 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA。一些实施方案中，比对序列的方法为 BLAST，BLAST 算法计算序列同一性百分比并对两个序列之间的相似性进行统计学分析。用于进行 BLAST 分析的软件可通过国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 网站公开获得。

5 “同源性”或“同源”定义为，在对准序列且必要时引入空位以实现最大序列一致性百分比之后，与靶染色体上的相应序列中的核苷酸残基一致的核苷酸残基的百分比。为了确定核苷酸序列同源性百分比的比对可以用本领域技术范围内的各种方式来实现，例如使用公开可用的计算机软件，例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ClustalW2 或 Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于
10 比对的合适参数，包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。在一些实施方案中，当同源臂的例如核酸序列(例如 DNA 序列)与宿主细胞的相应原生或未经编辑的核酸序列(例如基因组序列)至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或更多一致时，所述序列
15 被视为“同源”。

“替换”定义为氨基酸或核苷酸序列的如下变化:与参比多肽的氨基酸序列或核苷酸序列相比，分别由不同氨基酸或核苷酸替换一个或多个氨基酸或核苷酸产生。如果替换是保守的，则替换成多肽的氨基酸具有与其替换的氨基酸相似的结构或化学性质(例如，电荷、极性、疏水性等)。在一些实施方案中，多肽变体可具
20 有“非保守”变化，其中替换的氨基酸在结构和/或化学性质上不同。

“缺失”定义为氨基酸或核苷酸序列的如下变化:与参比多肽的氨基酸序列或核苷酸序列相比，分别缺少一个或多个氨基酸或核苷酸残基。在多肽或多核苷酸序列的情况下，考虑到被修饰的多肽或多核苷酸序列的长度，缺失可涉及缺失 2
25 个、5 个、10 个、高至 20 个、高至 30 个或高至 50 个或更多个氨基酸或核苷酸残基。

“插入”或“添加”是指氨基酸或核苷酸序列的如下变化:与参比多肽的氨基酸序列或核苷酸序列相比，该变化导致分别加入了一个或多个氨基酸或核苷酸残基。”插入”通常是指多肽的氨基酸序列内添加一个或多个氨基酸残基(或多核苷酸内的核苷酸残基)，而”添加”可以是插入或指在多肽的 N-或 C-末端添加的氨基酸残基(或在多核苷酸的 5'或 3'末端添加的核苷酸残基)。在多肽或多核苷酸序列的情况下，插入或添加可以是高至 10 个、高至 20 个、高至 30 个、高至 50 个或更多
30 个氨基酸(或核苷酸残基)。

“密码子优化”是指将目标序列中存在的在给定物种的高度表达的基因中一般罕见的密码子替换为在这类物种的高度表达的基因中一般常见的密码子，而替换
35 前后的密码子编码相同的氨基酸。各种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特定的偏好。密码子偏好(生物体之间密码子使用的差异)通常与信使 RNA(mRNA)

的翻译效率相关，继而认为所述信使 RNA 尤其取决于翻译的密码子的特性和具体的转运 RNA(tRNA)分子的利用度。选择的 tRNA 在细胞中的优势通常是肽合成中最常使用的密码子的反映。因此，基于密码子优化，基因可以针对给定生物体中的最佳基因表达进行修改。因此，最佳密码子的选择取决于宿主基因组的密码子使用偏好。

“细胞”或“宿主细胞”包括易于被本公开内容的核酸构建体或载体转化、转染、转导等的任何细胞类型。作为非限制性实例，宿主细胞可以是分离的原代细胞、多能干细胞、CD34+细胞、诱导的多能干细胞或许多永生化细胞系(例如 HepG2 细胞)中的任何一种。或者，宿主细胞可以是组织、器官或生物体中的原位或体内细胞。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，例如包含本公开的任一种核酸构建体的组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。

“有效量”或“药理学上的有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化:例如，待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。一些实施方案中，“有效量”是一种有效的 RNA 的剂量，可以产生抗原特异性免疫应答。

“药学上可接受的”是指这些治疗剂、材料、组合物和/或剂型，在合理的医学判断范围内，适用于与患者组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，具有合理的获益/风险比，并且对预期的用途是有效。

“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义，可互换使用。

“受试者”是指哺乳动物，包括但不限于，人、啮齿类动物(小鼠、大鼠、豚鼠)、狗、马、牛、猫、猪、猴、黑猩猩)等。优选地，受试者是人。

实施例

以下结合实施例用于进一步描述本公开，但这些实施例并非限制本公开的范围。本公开实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1. 5'UTR 和 3'UTR 的筛选

为了筛选到可提高蛋白表达效率的 3'-非翻译区元件(3'UTR 元件)、5'-非翻译区元件(5'UTR 元件), 本实施例筛选了管家基因 mRNA 中的 UTR 序列。

首先, 通过数据库
5 (https://esbl.nhlbi.nih.gov/helixweb/Database/NephronRNAseq/Housekeeping_Genes.html)确定了包括 Abhd16a 等 301 个候选人管家基因。然后, 通过生物信息学方法对上述基因的表达水平进行分析及表达量排序, 并调取基因的转录本及 UTR 序列信息。进一步根据基因的表达水平及 UTR 序列长短对 UTR 元件进行筛选, 获得了多个候选 UTR 序列, 从中筛选获得了编号为 A1 至 A33 的 33 个 5'UTR, 和编号为 B1 至 B14 的 14 个 3'UTR, 基因来源和序列号如表 1 和表 2 所示。
10

表 1. 筛选获得的新 3'UTR

3'UTR 编号	基因来源 (均为智人(Homo sapiens))	对应 DNA 的 序列号	对应 mRNA 的 序列号
B1	ACTG1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:58
B2	ATP6V0B	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:59
B3	ATP6V0B	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:60
B4	ATP6V0E1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:61
B5	ATP6V0E1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:62
B6	CFL1	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:63
B7	CFL1	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:64
B8	CFL1	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:65
B9	COX4I1	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:66
B10	COX4I1	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:67
B11	COX4I1	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:68
B12	CTSB	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:69
B13	FAM166A	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:70
B14	NDUFB9	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:71

表 2. 筛选获得的新 5'UTR

5'UTR 编号	基因来源 (均为智人(Homo sapiens))	对应 DNA 的 序列号	对应 mRNA 的 序列号
A1	ACTG1	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:72
A2	ATP6V0B	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:73
A3	ATP6V0B	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:74
A4	ATP6V0E1	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:75
A5	ATP6V0E1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:76
A6	CFL1	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:77
A7	CFL1	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:78
A8	CFL1	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:79
A9	COX4I1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:80

A10	COX4I1	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:81
A11	COX4I1	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:82
A12	CTSB	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:83
A13	FAM166A	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:84
A14	NDUFB9	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:85
A15	CHCHD10	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:86
A16	CHCHD10	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:87
A17	SLC38A2	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:88
A18	NDUFA11	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:89
A19	NDUFV3	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:90
A20	PRDX5	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:91
A21	GUK1	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:92
A22	GUK1	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:93
A23	GUK1	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:94
A24	IAH1	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:95
A25	ABHD16A	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:96
A26	SLC25A39	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:97
A27	ATPIF1	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:98
A28	ANAPC11	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:99
A29	ANAPC11	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:100
A30	CCDC12	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:101
A31	MRPL14	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:102
A32	APOA1BP	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:103
A33	APOA1BP	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:104

实施例 2. mRNA 的制备

将实施例 1 筛选获得的 UTR 构建至用于体外转录的 DNA 载体中，以获得稳定表达 5'UTR 及 3'UTR 元件的 mRNA。所述载体含有 T7 启动子，作为开放阅读框(ORF)的编码萤火虫荧光素酶(Firefly Luciferase, Fluc)的序列(SEQ ID NO:126)，和多聚腺苷酸(polyA)序列，polyA 序列后接用于线性化载体的限制性位点。所述 polyA 选自 A120(即，120 个连续的腺苷酸)或 A30L70 (SEQ ID NO:52)。通过合适的酶切位点将 5'UTR 及 3'UTR 元件构建分别构建至开放阅读框 ORF (Fluc)的 5'端及 3'端。构建好的载体示例如图 1A 至图 1C，5'UTR 和 3'UTR 的组合方式参见表 3。

本实施例中所使用的对照载体包括 polyA 为 A120 Mod.-120A (SEQ ID NO:53)、polyA 为 A30L70 的 Mod.-A30L70 (SEQ ID NO:54)和 BioN.-A30L70 (SEQ ID NO:55)，目的基因均为 Fluc，通过全基因合成构建。不同 UTR 元件分别通过酶切的方法构建至上述载体，其中，载体 V-B1 至 V-B14 的构建载体为 Mod.-120A，

选用酶切位点为 *AgeI* 和 *SacII*, 其 polyA 均为 A120, 其使用的对照为 Mod.-120A (SEQ ID NO:53); 载体 V-A1 至 V-A14 的构建载体为 Mod.-120A (SEQ ID NO:53), 选用酶切位点为 *BamHI* 和 *NheI*, 其 polyA 均为 A120, 其使用的对照也为 Mod.-120A (SEQ ID NO:53); V-A15 至 V-A33 的构建载体为 Mod.-A30L70 (SEQ ID NO:54), 5 选用酶切位点为 *BamHI* 和 *NheI*, 其 polyA 均为 A30L70, 其使用的对照为 Mod.-A30L70 (SEQ ID NO:54); 载体 V-A1-B12、V-A1-B13 和 V-A1-B14 的构建载体为 Mod.-A30L70 (SEQ ID NO:54), 选用酶切位点为 *BamHI* 和 *SacII*, 其 polyA 均为 A30L70, 其使用的对照为 Mod.-A30L70 (SEQ ID NO:54)和 BioN.-A30L70 (SEQ ID NO:55)。插入的 UTR 元件基因片段均为全基因合成(苏州金唯智生物科技有限公司), 10 片段通过酶切连接构建至相应载体, 载体构建完成后需进行酶切及测序鉴定, 鉴定正确后用于下一步实验。

表 3. 载体中 5'UTR 和 3'UTR 的组合方式

载体编号 (对应的 mRNA 编号)	5'UTR	3'UTR
Mod.	Mod. 5'UTR (SEQ ID NO:48)	α -球蛋白 3'UTR (SEQ ID NO:49)
V-B1 (m-B1)		B1 (SEQ ID NO:1)
V-B2 (m-B2)		B2 (SEQ ID NO:2)
V-B3 (m-B3)		B3 (SEQ ID NO:3)
V-B4 (m-B4)		B4 (SEQ ID NO:4)
V-B5 (m-B5)		B5 (SEQ ID NO:5)
V-B6 (m-B6)		B6 (SEQ ID NO:6)
V-B7 (m-B7)		B7 (SEQ ID NO:7)
V-B8 (m-B8)		B8 (SEQ ID NO:8)
V-B9 (m-B9)		B9 (SEQ ID NO:9)
V-B10 (m-B10)		B10 (SEQ ID NO:10)
V-B11 (m-B11)		B11 (SEQ ID NO:11)
V-B12 (m-B12)		B12 (SEQ ID NO:12)
V-B13 (m-B13)		B13 (SEQ ID NO:13)
V-B14 (m-B14)		B14 (SEQ ID NO:14)
V-A1 (m-A1)	A1 (SEQ ID NO:15)	α -球蛋白 3'UTR (SEQ ID NO:49)
V-A2 (m-A2)	A2 (SEQ ID NO:16)	
V-A3 (m-A3)	A3 (SEQ ID NO:17)	
V-A4 (m-A4)	A4 (SEQ ID NO:18)	
V-A5 (m-A5)	A5 (SEQ ID NO:19)	
V-A6 (m-A6)	A6 (SEQ ID NO:20)	
V-A7 (m-A7)	A7 (SEQ ID NO:21)	
V-A8 (m-A8)	A8 (SEQ ID NO:22)	
V-A9 (m-A9)	A9 (SEQ ID NO:23)	
V-A10 (m-A10)	A10 (SEQ ID NO:24)	
V-A11 (m-A11)	A11 (SEQ ID NO:25)	
V-A12 (m-A12)	A12 (SEQ ID NO:26)	

V-A13 (m-A3)	A13 (SEQ ID NO:27)	
V-A14 (m-A14)	A14 (SEQ ID NO:28)	
V-A15 (m-A15)	A15 (SEQ ID NO:29)	
V-A16 (m-A16)	A16 (SEQ ID NO:30)	
V-A17 (m-A17)	A17 (SEQ ID NO:31)	
V-A18 (m-A18)	A18 (SEQ ID NO:32)	
V-A19 (m-A19)	A19 (SEQ ID NO:33)	
V-A20 (m-A20)	A20 (SEQ ID NO:34)	
V-A21 (m-A21)	A21 (SEQ ID NO:35)	
V-A22 (m-A22)	A22 (SEQ ID NO:36)	
V-A23 (m-A23)	A23 (SEQ ID NO:37)	
V-A24 (m-A24)	A24 (SEQ ID NO:38)	
V-A25 (m-A25)	A25 (SEQ ID NO:39)	
V-A26 (m-A26)	A26 (SEQ ID NO:40)	
V-A27 (m-A27)	A27 (SEQ ID NO:41)	
V-A28 (m-A28)	A28 (SEQ ID NO:42)	
V-A29 (m-A29)	A29 (SEQ ID NO:43)	
V-A30 (m-A30)	A30 (SEQ ID NO:44)	
V-A31 (m-A31)	A31 (SEQ ID NO:45)	
V-A32 (m-A32)	A32 (SEQ ID NO:46)	
V-A33 (m-A33)	A33 (SEQ ID NO:47)	
V-A1-B12 (m-A1-B12)	A1 (SEQ ID NO:15)	B12 (SEQ ID NO:12)
V-A1-B13 (m-A1-B13)	A1 (SEQ ID NO:15)	B13 (SEQ ID NO:13)
V-A1-B14 (m-A1-B14)	A1 (SEQ ID NO:15)	B14 (SEQ ID NO:14)
BioN.	α -1-球蛋白 5'UTR (SEQ ID NO:50)	haplogroup U8b1b1 mitochondrion (SEQ ID NO:51)

将表 3 中的载体(即, DNA 模板)通过限制性内切酶处理消化,使 DNA 模板线性化,再使用 T7-RNA 聚合酶体外转录。对于体外转录,使用 T7 RNA 聚合酶(Roche)、相应的反应缓冲液、焦磷酸酶、RNase 抑制剂和 NTP。为了有效加帽 RNA,向反应中加入过量的帽类似化合物 ARCA (3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G, Trilink, N-7003-1)或 CleanCap (m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, Trilink, N-7113),其中图 2 至图 5 中所用的 RNA 生产选用 ARCA 进行加帽,图 6 至图 9 中所用的 RNA 选用 CleanCap 进行加帽。同时,为了降低 mRNA 的免疫源性并提高翻译效率,本公开中的 mRNA 均进行了核酸修饰,将反应体系中的尿苷-三磷酸(Uridine triphosphate, 简称为 UTP)全部替换为 N1-甲基-假尿苷-三磷酸(N1-methyl-pseudouridine triphosphate, 简称为 1m- ψ UTP, 购于 ThermoFisher),该修饰方法参考专利 US 2014/0194494 A1。体外转录体系在 37°C 下孵育 2.5 小时后,通过羧化磁珠(Invitrogen)来纯化 RNA 并重悬于无核酶水中,通过分光光度法和在 5200 生物分析仪(Agilent)上分析来评估 RNA 的浓度和质量。经检测,获得目的 mRNA。

本公开 Mod.的 5'UTR 至 polyA 的序列如 SEQ ID NO: 53、54 所示, BioN.的 5'UTR 至 polyA 的序列如 SEQ ID NO:55 所示。Mod.中的 5'UTR 及 3'UTR 序列与

Moderna 公司的专利及发表文献中的序列一致(US10849920B2、WO2013151667A1、US10730924B2、DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.017), BioN.的 5'UTR 及 3'UTR 序列源自于专利 WO 2018/160540。

示例性的给出 V-B1 线性化后序列, 5'UTR 至 polyA 的序列如 SEQ ID NO: 56 所示; V-A1 线性化后的序列, 5'UTR 至 polyA 的序列如 SEQ ID NO: 57 所示。

实施例 3. 5'UTR、3'UTR 及其组合的功能验证

本实施例使用 mRNA 脂质转染的荧光素酶表达系统进行 UTR 的功能验证。

实验方法:将人胚胎肾细胞(HEK293, 购自 ATCC)以 4×10⁴ 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板。次日, 通过 Lipofectamine™ MessengerMAX™ mRNA 转染试剂进行转染, 每孔转染 100ng 前述实施例 2 中制备获得的加帽 mRNA, 转染 6 小时后, 更换新鲜培养基。吸出 100 μL 培养基并加入 50 μL 荧光素酶底物, 使用 PerkinElmer 多功能酶标仪检测发光强度。人宫颈癌细胞(HeLa, 购自 ATCC)和人肺癌细胞(A549, 购自 ATCC)的实验方法同 HEK293。

评估方法:表 4 至表 7、表 9 至表 11 中, 将参比的阳性对照 Mod.在不同细胞系中的荧光素表达量设置为 1, 计算不同 mRNA 相对阳性对照 Mod.的表达量倍数。表 8 中, 将参比的阳性对照 BioN.在不同细胞系中的荧光素表达量设置为 1, 计算不同 mRNA 相对阳性对照 BioN.的表达量倍数。表格中的数值均为检测平均值的倍数。

1) 3'UTR 在不同细胞系中调控目的基因表达能力的检测

为验证不同 3'UTR 在不同细胞系中调控目的基因的表达能力, 用实施例 2 的方法生产表达荧光素酶(Fluc)的 mRNA, 将生产的 RNA 进行 ARCA 加帽, polyA 尾结构为 A120。将 RNA 转染至人 HeLa、HEK293 和 A549 细胞染, 并在转染后 24 小时测量荧光素酶水平, 结果参见表 4 和图 2。

表 4. 携带不同 3'UTR 的 mRNA 表达荧光素酶(Fluc)的表达量 (ARCA 加帽, 目的基因均为 Fluc, polyA 均为 A120)

mRNA 编号	5'UTR 的 mRNA 序列号	3'UTR 的 mRNA 序列号	细胞系		
			HeLa	HEK293	A549
Mod.	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 106	1	1	1
m-B1		SEQ ID NO: 58	1.25	1.52	1.55
m-B2		SEQ ID NO: 59	1.72	1.85	1.94
m-B3		SEQ ID NO: 60	1.56	1.66	1.83
m-B4		SEQ ID NO: 61	1.63	1.68	1.77
m-B5		SEQ ID NO: 62	0.99	1.01	1.08
m-B6		SEQ ID NO: 63	1.13	1.30	1.40
m-B7		SEQ ID NO: 64	1.41	1.72	1.69
m-B8		SEQ ID NO: 65	1.31	1.40	1.57

m-B9		SEQ ID NO: 66	2.04	1.71	2.13
m-B10		SEQ ID NO: 67	1.72	1.83	1.82
m-B11		SEQ ID NO: 68	1.65	1.61	1.63
m-B12		SEQ ID NO: 69	2.29	2.22	2.24
m-B13		SEQ ID NO: 70	2.21	2.27	2.28
m-B14		SEQ ID NO: 71	2.07	1.92	2.27

结果显示，在不同细胞系中，相较于 Mod.阳性对照，B1 至 B14 的 3'UTR 对蛋白表达量的影响具有一致性，不同细胞系间无显著性差异($p>0.05$)，说明本公开筛选获得的 3'UTR 元件对蛋白表达量的影响具有普适性，能够用于提高目的基因的蛋白表达水平。

5 2) 3'UTR 在细胞中的调控目的基因表达时长的检测

为检测不同 3'UTR 在细胞中调控目的基因表达时间的能力，将表 4 中的 mRNA 转染至 HEK293 细胞中，并在转染后 6h、24h、48h 和 72h 测量荧光素酶表达水平，结果参见表 5 和图 3。

表 5. 携带不同 3'UTR 的 mRNA 表达荧光素酶(Fluc)的表达量

mRNA 编号	HEK293			
	6h	24h	48h	72h
Mod.	1	1	1	1
m-B1	2.61	1.88	1.73	1.40
m-B2	2.26	1.94	1.78	1.38
m-B3	2.09	1.95	1.67	1.51
m-B4	2.08	1.80	1.93	2.10
m-B5	1.41	1.05	1.04	0.98
m-B6	1.59	1.47	1.44	1.29
m-B7	1.77	1.76	1.78	1.53
m-B8	1.69	1.75	1.64	1.41
m-B9	1.99	3.39	2.32	1.78
m-B10	2.96	2.83	2.36	2.05
m-B11	2.52	2.13	1.99	1.68
m-B12	2.95	2.54	2.71	2.01
m-B13	2.44	2.77	2.56	2.54
m-B14	2.99	2.44	2.68	2.51

10 结果显示，在 HEK293 细胞中，3'UTR 元件的改变可影响目的蛋白的表达量，除 B5-3'UTR 元件，其他 3'UTR 元件均可提高蛋白表达量 1.2 倍以上，且在不同检测时间点均具有显著性差异($p<0.05$)，其中 B12、B13、B14 的 3'UTR 元件效果最佳，可提高蛋白表达量 2 倍以上，且具有较好的时间延续性。

3) 5'UTR 在细胞中的调控目的基因表达的检测

15 为检测不同 5'UTR 在细胞中调控目的基因表达时间的能力，用前述方法制备

m-A26	SEQ ID NO:97		0.70	0.69	0.93	0.89
m-A27	SEQ ID NO:98		1.62	1.62	2.09	1.94
m-A28	SEQ ID NO:99		1.39	1.34	1.76	1.65
m-A29	SEQ ID NO:100		1.01	1.04	1.28	1.34
m-A30	SEQ ID NO:101		1.37	1.27	1.13	1.06
m-A31	SEQ ID NO:102		1.17	1.09	1.34	1.43
m-A32	SEQ ID NO:103		1.31	1.41	1.64	1.60
m-A33	SEQ ID NO:104		1.31	1.20	1.44	1.42

图 4 和图 5 分别通过不同的加帽方式和 polyA 尾结构进行筛选，结果显示，在不同的筛选载体中，5'UTR 元件的改变均可影响目的蛋白的表达量，5'UTR 元件对目标蛋白表达水平的提高具有通用性。其中，编号 A1、A3 至 A7、A9 至 A16、A18、A21、A24、A27、A28、A32、A33 的 5'UTR 元件，均可提高蛋白表达量 1.2 倍以上，且在 24h、48h、72h 的检测时间点均具有显著性差异($p < 0.05$)，其中 A1、A15、A16、A18 的 5'UTR 元件效果最佳，可提高蛋白表达量 2 倍以上，且具有较好的时间延续性。

4) 候选 5'UTR 相较于阳性对照 BioN.载体调控目的基因表达强度的检测

为检测不同候选 5'UTR 相较于阳性对照 BioN.载体调控目的基因表达强度的能力，将前述筛选到的较佳的 A1、A15、A16、A18 的 5'UTR 元件构建至含有 A30L70 polyA 尾元件的载体中，用前述方法生产表达荧光素酶(Fluc)的 mRNA 并转染至 HEK293 细胞中，在转染后 6h、24h、48h 和 72h 测量荧光素酶表达水平，结果参见表 8 和图 6。

表 8. 携带不同 5'UTR 的 mRNA 表达荧光素酶(Fluc)的表达量 (CleanCap 加帽，目的基因均为 Fluc，polyA 均为 A30L70)

mRNA 编号	5'UTR 的 mRNA 序列号	3'UTR 的 mRNA 序列号	HEK293		
			6h	24h	48h
BioN.	SEQ ID NO:107	SEQ ID NO:108	1	1	1
m-A1	SEQ ID NO:72	α -球蛋白 (SEQ ID NO:106)	1.34	1.78	1.92
m-A15	SEQ ID NO:86		1.32	1.58	1.76
m-A16	SEQ ID NO:87		1.01	1.37	1.54
m-A18	SEQ ID NO:89		1.07	1.29	1.49

结果显示，候选的 5'UTR 元件均相较于 BioN.载体，在 24h 和 48h 时均可提高蛋白表达量至少高于 1.2 倍，且均具有显著性差异($p < 0.05$)。

5) 不同 5'UTR 和 3'UTR 组合在细胞中的调控目的基因表达的检测

为了研究不同的 5'-UTR 和 3'UTR 组合对 mRNA 中目的蛋白表达的影响，将含有不同 5'UTR 和 3'-UTR 元件组合的 mRNA 与 Moderna 公司选用的 5'UTR 和 3'UTR 相比，结果参见表 9 和图 7。

表 9. 携带不同 5'UTR 和 3'UTR 组合的 mRNA 的表达量

(Cleancap 加帽，目的基因均为 Fluc，polyA 均为 A30L70)

mRNA 编号	5'UTR 的 mRNA 序列号	3'UTR 的 mRNA 序列号	HEK293			
			6h	24h	48h	72h
Mod.	SEQ ID NO:105	SEQ ID NO:106	1	1	1	1
m-A1-B12	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:69	2.78	3.06	2.46	2.96
m-A1-B13		SEQ ID NO:70	2.62	2.67	2.30	2.57
m-A1-B14		SEQ ID NO:71	2.20	2.14	1.74	1.90
m-A15-B12	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:69	2.11	2.14	1.78	1.90
m-A15-B13		SEQ ID NO:70	2.04	2.15	1.74	1.87
m-A15-B14		SEQ ID NO:71	2.09	1.90	1.68	1.68
m-A16-B12	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:69	2.32	2.02	1.82	1.81
m-A16-B13		SEQ ID NO:70	2.43	1.96	1.78	1.89
m-A16-B14		SEQ ID NO:71	2.30	1.79	1.63	1.68
m-A18-B12	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:69	1.87	1.90	1.27	1.41
m-A18-B13		SEQ ID NO:70	2.17	2.31	1.71	2.08
m-A18-B14		SEQ ID NO:71	1.40	1.66	1.31	1.51

结果显示，本公开筛选的 5'UTR 和 3'-UTR 元件组合相较于 Moderna 公司选用的 5'UTR 和 3'UTR 元件，在 24h、48h 及 72h 检测时间点，均可提高蛋白表达量 1.3 倍以上，且均具有显著性差异($p<0.05$)。以上 1)-5)中的目的蛋白均为荧光素酶(Fluc)，以下 6)中的目的蛋白为分泌型蛋白(例如 hHGF，抗 PD-1 抗体)。

6) 不同 5'UTR 和 3'UTR 组合调控分泌型目的蛋白表达的检测

为了研究不同的 5'-UTR 和 3'UTR 组合对 mRNA 表达分泌型蛋白的影响，这里将 mRNA 构建为 ORF 表达的目的蛋白为人肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, hHGF)或抗 PD-1 抗体。

所述 hHGF 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 109 所示，其 DNA 序列为 SEQ ID NO: 110 所示，经密码子优化后获得 mRNA OS1、OS2、OS3，其优化的密码子序列为 SEQ ID NO:129-131 所示。

所述 PD-1 抗体的重链和轻链的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO: 117、118 所示，重链和轻链的 DNA 序列分别为 SEQ ID NO: 119、120 所示，重链和轻链的 mRNA 序列分别为 SEQ ID NO:121、122 所示。

首先，为了提高 hHGF 蛋白的翻译效率，本公开对野生型 hHGF(SEQ ID NO: 110)的核苷酸序列进行了密码子优化，优化后的序列有 hHGF-OS1(SEQ ID NO: 111)、hHGF-OS2(SEQ ID NO: 112)和 hHGF-OS3(SEQ ID NO: 113)，相应的 mRNA 序列分别为 SEQ ID NO:129-131 所示。将上述天然 hHGF 及密码子序列优化后的 hHGF 序列构建至载体中，生产 mRNA。通过 ELISA 检测 hHGF 蛋白的表达量，证明 hHGF 密码子优化序列能够提高 hHGF 蛋白的表达量。

将含有不同 5'UTR 和 3'-UTR 元件组合的表达 hHGF-OS2 的 mRNA(对应的 DNA 序列为 SEQ ID NO:112), 与含有 Moderna 公司的 5'UTR 和 3'UTR 元件组合的表达 hHGF-OS2 的 mRNA Mod.(hHGF) (对应的 DNA 序列为 SEQ ID NO:114)相比。用所述编码 hHGF 的 mRNA 转染 HEK293 细胞, 在转染后 6h、24h、48h 和 72h 收集上清并通过 ELISA 检测 hHGF 蛋白的表达量, 评估候选载体表达 HGF 的增加/延长。结果参见表 10 和图 8A。

表 10. 携带不同 5'UTR 和 3'UTR 组合的 mRNA 的目的蛋白表达量
(Cleancap 加帽, 目的基因均为 hHGF, polyA 均为 A30L70)

mRNA 编号 (序列号)	5'UTR 的 mRNA 序列号	3'UTR 的 mRNA 序列号	hHGF 蛋白量 (ng/mL)			
			6h	24h	48h	72h
Mod.(hHGF) (SEQ ID NO:114)	SEQ ID NO:105	SEQ ID NO:106	1.16	21.83	26.89	15.37
m-A1-B12(hHGF) (SEQ ID NO:115)		SEQ ID NO:69	2.06	38.65	41.49	23.76
m-A1-B13(hHGF)		SEQ ID NO:70	1.98	30.19	30.57	19.00
m-A1-B14(hHGF)		SEQ ID NO:71	2.27	34.61	37.75	19.33
m-A15-B12(hHGF) (SEQ ID NO:116)	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:69	1.84	33.15	36.79	19.06
m-A15-B13(hHGF)		SEQ ID NO:70	2.14	31.68	36.60	25.04
m-A15-B14(hHGF)		SEQ ID NO:71	1.74	30.08	26.85	14.81
m-A16-B12(hHGF) (SEQ ID NO:127)	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:69	2.34	40.39	42.82	24.50
m-A16-B13(hHGF)		SEQ ID NO:70	1.95	30.53	32.31	20.36
m-A16-B14(hHGF)		SEQ ID NO:71	2.22	33.56	37.61	21.10
m-A18-B12(hHGF)	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:69	2.45	49.06	55.14	30.24
m-A18-B13(hHGF)		SEQ ID NO:70	1.94	38.38	38.05	25.52
m-A18-B14(hHGF)		SEQ ID NO:71	1.93	36.75	38.37	23.25

将含有不同 5'UTR 和 3'UTR 元件组合的表达抗 PD-1 抗体全长的 mRNA(对应的 DNA 序列为 SEQ ID NO:124-125), 与含有 Moderna 公司的 5'UTR 和 3'UTR 元件组合的表达抗 PD-1 抗体的 mRNA(对应的 DNA 序列为 SEQ ID NO:123)相比。用编码抗 PD-1 抗体全长的 mRNA 转染 HEK293 细胞, 在转染后 6h、24h、48h 和 72h 收集上清并通过 ELISA 检测抗 PD-1 抗体的表达量, 评估候选载体表达抗 PD-1 抗体的增加/延长, 结果参见表 11 和图 8B。

表 11. 携带不同 5'UTR 和 3'UTR 组合的 mRNA 的目的蛋白表达量
(Cleancap 加帽, 目的基因均为抗 PD-1 抗体的重链和轻链, polyA 均为 A30L70)

mRNA 编号 (相应的 DNA 序列号)	抗 PD-1 抗体(ng/mL)			
	6h	24h	48h	72h
Mod.(PD-1 Ab) (SEQ ID NO:123)	2.79	23.11	30.04	28.23
m-A1-B12(PD-1 Ab) (SEQ ID NO:124)	3.22	33.47	52.50	43.19
m-A15-B12(PD-1 Ab) (SEQ ID NO:125)	2.77	34.39	45.72	49.90

以上结果显示，持续表达分泌蛋白 hHGF 和抗 PD-1 抗体 72 小时后，本公开筛选得到的 5'UTR 和 3'UTR 组合相较于 Moderna 公司选用的 5'UTR 和 3'UTR 元件能够显著提高分泌蛋白的表达量($p<0.05$)。

5

实施例 4. 表达 hHGF 的 mRNA 在小鼠体内表达 hHGF 蛋白的验证

为了确定 mRNA 分子 m-A16-B12 (hHGF) (对应 DNA 序列为 SEQ ID NO:127) 在动物体内表达 hHGF 的能力，使用脂质纳米颗粒 LNP(包含 50 mol % 可离子化脂质(SM-102)，10 mol% DSPC，38.5 mol% 胆固醇，1.5 mol% PEG-DMG)进行 mRNA 的递送，以下实施例 5 和实施例 6 中也使用相同的脂质纳米颗粒 LNP。阳性对照为 Collatogene 质粒 (AnGes 公司)，通过裸质粒给药方式。Balb/c 小鼠(6-8w，雄)随机分成 4 组，每组 33 只，对小鼠腓肠肌肌肉注射不同剂量的 m-A16-B12(hHGF) 及 Collatogene 质粒，而后按表 12 方案安排如下各实验组：1)注射 1.0 μg /只的 m-A16-B12 (hHGF)；2)注射 0.3 μg /只的 m-A16-B12 (hHGF)；3)注射 0.1 μg /只的 m-A16-B12 (hHGF)；4)注射 200 μg /只的 Collatogene 裸质粒。在 1 h、2 h、4 h、6 h、24 h、48 h、72 h、96 h、168 h、216 h 及 336 h 获取小鼠腓肠肌标本，使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液将肌肉组织匀浆裂解，离心取上清，使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定 hHGF 蛋白浓度，使用 ELISA 方法评价 hHGF 的表达水平。各组数据用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示，使用 Graphpad Prism 9.0 软件作图及统计。

表 12. m-A16-B12 (hHGF)及 Collatogene 在体内表达 hHGF 的实验分组情况

组别	G1	G2	G3	G4
动物数量	33	33	33	33
待测药物	Plasmid (Collatogene)	m-A16-B12 (hHGF)	m-A16-B12 (hHGF)	m-A16-B12 (hHGF)
给药剂量	200 μg	0.1 μg	0.3 μg	1.0 μg
给药途径	i.m.			
给药频率	Single-dose			
检测指标	血浆、肌肉取材，检测 hHGF 蛋白含量			
样品收集	给药后 1 h/2 h/4 h/6 h/24 h/48 h/72 h/96 h/D7/D10/D14 取材			

实验结果如图 9 的 A 所示，m-A16-B12 (hHGF)于肌肉注射 1 h 后即可表达 hHGF 蛋白，注射后 6 h 达到表达峰值，呈剂量依赖。如图 9 的 B 所示，Collatogene 于注射后 7 天达到表达峰值；m-A16-B12 (hHGF)递送 48 h 后蛋白表达量下降，1 μg /只剂量 m-A16-B12 (hHGF)在 72 h 时的蛋白表达量与 Collatogene 相当。同时，对 25 各组 PK 数据进行统计发现，即使是最低剂量 0.1 μg 的 m-A16-B12 (hHGF)，其 C_{max} 也是 Collatogene 的 5 倍以上，且 0.1 μg 的 m-A16-B12 (hHGF)其 $\text{AUC}_{\text{inf}}(\text{hr}\cdot\mu\text{g}/\text{mg protein})$ 也与 Collatogene 相当(表 13)。因此，m-A16-B12 (hHGF)可实现 hHGF 在动物体内

的高效表达，且各时间点血浆中未检测到 hHGF 表达。

表 13. m-A16-B12 (hHGF)及 Collategene 在体内表达 hHGF 的结果

途径	待测药物	剂量(μg)	C _{max} (pg/mg 蛋白)	AUC _{0-inf} (hr*pg/mg 蛋白)	MRT _{0-inf} (h)
I.M.	m-A16-B12 (hHGF)	0.1 μg	369.1±24.8	16158.3±978.7	201.5±73.8
		0.3 μg	463.1±16.5	20133.6±770.2	125.9±26.4
		1 μg	570.6±42.5	29652.8±2555.9	142.8±71.9
	Collategene	200 μg	78.0±5.7	15300.4±491.2	183.5±3.0

实施例 5. 表达 hHGF 的 mRNA 对下肢缺血小鼠模型的治疗功能验证

5 下肢缺血小鼠模型是模拟人的严重下肢缺血的经典小鼠模型，建模使用 6-8 周的雄性 Balb/c 小鼠，方法如下：1)麻醉动物，取仰卧位放置在手术台上，后肢彻底脱毛，固定后肢，消毒手术部位皮肤；2)从膝盖向大腿内侧切开一个约 1 厘米长的皮肤切口，依次切开、解剖皮下脂肪组织，充分显露股动脉；3)使用显微弯镊，轻轻刺穿膜状股鞘，暴露神经血管包，分离股动脉与股静脉和神经处腹股沟附近的近端位置，分离干净后，在股动脉近端下方用 6-0 缝合线结扎股动脉近端；4) 10 在靠近膝盖的远端将股动脉和股静脉分开，在远端下方用 6-0 缝合线结扎股动脉的末端在腘动脉的近端；5)缝合创口。

 使用实施例 4 中的 LNP 作为载体递送 m-A16-B12 (hHGF), Collategene 以裸质粒形式给药。将下肢缺血模型小鼠随机分成 4 组，每组 5 只，分别对小鼠腓肠肌 15 进行肌肉注射 m-A16-B12 (hHGF)和 Collategene 裸质粒，实验分组如下：1)注射 500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)；2)注射 50 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)；3)注射 200 μg/只的 Collategene 裸质粒；4)注射等体积 PBS 作为对照组。造模当日计为第 0 天，在进行各实验组治疗后的第 0 天、第 4 天、第 7 天、第 10 天、第 12 天以及第 14 天观察腿部状况，使用血流仪检测小鼠下肢血流灌注情况，拍照记录。

20 按以下公式计算各组的血流灌注比率：血流灌注比率=当日小鼠下肢血流灌注量/该小鼠第 0 天的下肢血流灌注量* 100 %；各组数据用平均值±标准差(Mean ± SD)表示，使用 Graphpad Prism 9.0 软件作图及统计。

 结果如图 10A 和图 10B 所示，在注射 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF) 和 200 ng/只的 Collategene 裸质粒进行治疗的情况下，各小鼠缺血下肢的血流灌注 25 比率相对于对照组有明显的改善，且缺血下肢的血流灌注比率随时间的进展逐渐得到恢复。在其中，注射 50 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)组表现出与注射 200 ng/只 Collategene 裸质粒组相近的血流恢复效果；尤其，注射 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)

组显著优于 200 ng/只 Collatogene 裸质粒组的血流恢复效果,可实现恢复至 90%以上的血流灌注情况。

为了进一步确定 m-A16-B12 (hHGF)对下肢缺血小鼠模型下肢坏死程度的治疗效果,在给药之后的第 14 天,对小鼠的腿部状况进行观察,拍照记录,并通过如图 11A 的基准对小鼠的下肢坏死程度进行评分,此时使用的基准如下: 0=下肢自我脱离; 1=腿部坏死; 2=脚坏死; 3=>2 个脚趾变色; 4=1 个脚趾变色; 5=>2 个指甲变色; 6=1 个指甲变色; 7=无坏死。各组数据用平均值±标准差(Mean ± SD)表示,使用 Graphpad Prism 9.0 软件作图及统计。

结果如图 11B 所示,在诱导小鼠下肢缺血后,对照组的小鼠在术后 2 周内,下肢发生明显的缺血坏死情况,至第 14 天,部分小鼠的下肢发生完全脱落;而在注射 m-A16-B12 (hHGF)和 Collatogene 裸质粒治疗组中,各小鼠的下肢均能保持良好的完整性且并未出现下肢坏死情况,表明 m-A16-B12 (hHGF)具有与对照 Collatogene 裸质粒相当的下肢缺血改善能力。

CD31 是血管新生的中要标志物,为了确定 m-A16-B12 (hHGF)在促进下肢缺血小鼠模型血管新生中的作用,在给药后第 14 天,取小鼠缺血组织附近的腓肠肌样本,制备石蜡切片,通过 CD31 抗体对切片样本中的 CD31 进行免疫组化染色,拍照,经 ImageJ(NIH)软件分析,计算 CD31 染色面积。各组数据用平均值±标准差(Mean ± SD)表示,使用 Graphpad Prism 9.0 软件作图及统计。

结果如图 12 所示,在给予 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)和 200 ng/只的 Collatogene 裸质粒治疗的情况下,均可显著促进各组缺血下肢肌肉中的血管新生,且新生血管数量相对 PBS 组具有明显的统计学差异($p<0.05$), 50 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)组表现出与 200 ng/只的 Collatogene 裸质粒相当的促血管新生作用,且 m-A16-B12 (hHGF)给药组表现出剂量依赖的促血管新生情况。

实施例 6. 表达 hHGF 的 mRNA 对全皮层损伤 Db/Db 小鼠模型的治疗功能验证

Db/Db 小鼠模型是经典的糖尿病小鼠模型,因其 Leptin 受体基因缺陷小鼠,致使小鼠随周龄增长表现出与糖尿病病人相似的高血糖、高血脂及胰岛素抵抗等特征。本实验通过全皮层损伤模型模拟糖尿病足患者难以愈合的皮肤损伤。上述 Db/Db 小鼠模型的制造方法如下:小 Db/Db 鼠麻醉后脱毛膏脱毛,75 %酒精棉球消毒。使用直径 8 mm 皮肤取材器 biopunch 在腰背部造成全层皮肤创伤。

为了确定 m-A16-B12 (hHGF)对全皮层损伤小鼠模型创面愈合的治疗效果,而用实施例 4 中的 LNP 递送 m-A16-B12 (hHGF),对照 Collatogene 以裸质粒形式给药,给药方式为分 4 点的皮下注射。将全皮层损伤模型的 Db/Db 小鼠按体重及血糖水平分成 5 组,每组 7 只。实验分组如下: 1)注射 500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF); 2)注射 200 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF); 3)注射 50 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF); 4)

注射 200 μg/只的 Collatogene 裸质粒；5)注射等体积 PBS 的对照组。造模当日计为第 0 天，在进行各实验组治疗后，分别在第 0 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天、第 10 天、第 12 天以及第 14 天观察疮口恢复状况，对创伤部位进行拍照，图像经 ImageJ(NIH)软件分析，计算创面面积。

5 按以下公式计算创面愈合百分率： $P = (AD - A0) / A0 \times 100\%$ (P: 创口愈合百分率；AD: 拍照日创口面积；A0: 术后当日创口面积)。

各组创面愈合百分率用平均值±标准差(Mean ± SD)表示，使用 Graphpad Prism 9.0 软件作图及统计。

结果如图 13 所示，在注射 50 ng/只、200 ng/只和 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF) 10 和 200 μg/只 Collatogene 裸质粒的处理下，相较于对照组，小鼠的创面均得到良好的愈合。而且，m-A16-B12 (hHGF)对小鼠创面愈合情况的促进呈剂量依赖性，在第 14 天，50 ng/只剂量的 m-A16-B12 (hHGF)创面愈合率达 66 %，200 ng/只和 500 ng/只剂量的 m-A16-B12 (hHGF)能实现 100 %的伤口愈合情况；同时，m-A16-B12 (hHGF)的促创面愈合情况显著优于 200 μg/只 Collatogene 裸质粒($p < 0.05$)，即使是 15 较低剂量(50 ng/只)的 m-A16-B12 (hHGF)也表现出与 200 μg/只 Collatogene 裸质粒具有显著性差异的创面愈合百分率($p < 0.05$)。

为了确定 m-A16-B12 (hHGF)对全皮层损伤小鼠模型组织重构的治疗效果，而通过马松染色评价上皮再生、组织重构情况。在给药之后第 17 天，获取小鼠全皮层标本，制备石蜡切片，使用马松染色对小鼠皮肤组织进行染色。

20 结果如图 14 所示，在 m-A16-B12 (hHGF)的治疗下，各组小鼠创面上皮均完成上皮全覆盖，且低剂量组创口处上皮异常增厚，胶原蛋白增生；中高剂量组上皮恢复至正常厚度，胶原蛋白有序排列，完成组织重构。而对照组及 200μg/只 Collatogene 裸质粒组均未完成上皮再覆盖，创口处胶原蛋白异常增生，结构紊乱。

25

序列表

>B1 (ACTG1 3'UTR)
CCGACTACCTCATGAAGATCCTCACTGAGCGAGGCTACAGCTTCACCACCACGGCCGAG
CGGGAAATCGTGCGCGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC
30 AGGAGATGGCCACCGCCGCATCCTCCTTCTCTTGAGAAAGAGCTACGAGCTGCCCCGAT
GGCCAGGTCATCACCATTGGCAATGAGCGGTTCCGGTGTCCGAGGCGCTGTTCCAGCC
TTCCTTCCTGGGTATGGAATCTTGCGGCATCCACGAGACCACCTTCAACTCCATCATGA
AGTGTGACGTGGACATCCGCAAAGACCTGTACGCCAACACGGTGCTGTCGGGCGGCAC
CACCATGTACCCGGGCATTGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACCGCCCTGGCGCCC
35 AGCACCATGAAGATCAAGATCATCGACCCCCAGAGCGCAAGTACTCGGTGTGGATCG
GTGGCTCCATCCTGGCCTCACTGTCCACCTCCAGCAGATGTGGATTAG

SEQ ID NO:1

>B2 (ATP6V0B 3'UTR)
ATGATATGTGTGGGTGGGGCCGTGCCTCACTTTTATTTATTGCTGGTTTTCTGGGACAG

CTGGAGCTGTGTCCCTTAGCCTTTCAGAGGCTTGGTGTTCAGGGCCCTCCCTGCACTCCC
CTCTTGCTGCGTGTGATTGAGGCACTGCAGTCCAGGCCGAGTCCTCAGTGCGGGGA
GCAGGCTGCTGCTGCTGACTCTGTGCAGCTGCGCACCTGTGTCCCCCACCTCCACCCTCA
ACCCATCTTCCTAGTGTTGTGAAATAAACTTGGTATTTGTCT

5 SEQ ID NO:2

>B3 (ATP6V0B 3'UTR)

GTTGAAGAACTTCTCTCTACCGAGCAGCCCGTAACCCCTTTTTCTCCCTCACTGCTGCA
GGAGTCTGCTACACCATTTTTGATTTGGGCTTCCGCTTTGATGTGGCATGGTTCCTGACG
GAGACTTCGCCCTTCATGTGGTCCAACCTGGGCATTGGCCTAGCTATCTCCCTGTCTGTG
10 GTTGGGGCAGCCTGGGGCATCTATATTACCGGCTCCTCCATCATTGGTGGAGGAGTGAA
GGCCCCAGGATCAAGACCAAGAACCTGGTCAGCATCATCTTCTGTGAGGCTGTGGCCA
TCTACGGCAT

SEQ ID NO:3

>B4 (ATP6V0E1 3'UTR)

15 GGAAGAAGACATGCTCTACAGTGCTCAGTCTTTGAGGTGACTATGCTTGTGACCTTTCTT
ATCAGTATGGTCAGGCAGTCAGAGTTTGCCTTGACTTTTTCTCACATTTTATGGCCATTT
TAACACGTGGCAAGGGCAAGCTGCTGAATGCAAACACGATCTGAAGAGCAGAAATAAA
ATTGGAACCTTAAGCCTTAGCTTACCTAAATCTCATTAAGATTCTTTTT

SEQ ID NO:4

20 >B5 (ATP6V0E1 3'UTR)

ATGCAAAATCACCTCCAAACCAGACCACTTTTCTTGACTTGCCGTGTTTTGGCCATTAGCT
GCCTTAAACGTAAACAGCACATTTGAATGCCTTATTCTACAATGCAGCGTGTTCCTTT
GCCTTTTTTGCACCTTTGGTGAATTACGTGCCTCCATAACCTGAACTGTGCCGACTCCACA
AAACGATTATGTACTCTTCTGAGATAGAAGATGCTGTTCTTCTGAGAGATACGTTACTCT
25 CTCCTTGGAATCTGTGGATTTGAAGATGGCTCCTGCCTTCTCACGTGGGAATCAGTGAA
GTGTTTAGAACTGCTGCAAGACAAACAAGACTCCAGTGGGGTGGTCAGTAGGAGAGC
ACGTTACAGAGGGAAGAGCCATCTCAACAGAATCGCACCAAACCTATACTTTCAGGATGA
ATTTCTTCTTTCTGCCATCTTTTGAATAAATATTTTCCTCCTTTC

SEQ ID NO:5

30 >B6 (CFL1 3'UTR)

GCCCCCTTCTGGCCCCCTGCCTGGAGCATCTGGCAGCCCCACACCTGCCCTTGGGGGTTG
CAGGCTGCCCCCTTCTGCCAGACCGGAGGGGCTGGGGGGATCCCAGCAGGGGGAGGG
CAATCCCTTCACCCAGTTGCCAAACAGACCCCCACCCCTGGATTTTCTTCTCCCTC
CATCCCTTGACGGTTCTGGCCTTCCCAAACCTGCTTTTGATCTTTTGATTCTTCTGGGCTG
35 AAGCAGACCAAGTTCCCCCAGGCACCCAGTTGTGGGGGAGCCTGTATTTTTTTAAC
AACATCCCCATTCCCCACCTGGTCCTCCCCCTTCCCATGCTGCCAACTTCTAACCGCAAT
AGTGACTCTGTGCTTGTCTGTTTAGTTCTGTGTATAAATGGAATGTTGTGGAGATGACCC
CTCCCTGTGCCGGCTGGTTCTCTCCCTTTTCCCCTGGTCACGGCTACTCATGGAAGCAG
GACCAGTAAGGGACCTTCGATT

40 SEQ ID NO:6

>B7 (CFL1 3'UTR)

GCCCCCTTCTGGCCCCCTGCCTGGAGCATCTGGCAGCCCCACACCTGCCCTTGGGGGTTG
CAGGCTGCCCCCTTCTGCCAGACCGGAGGGGCTGGGGGGATCCCAGCAGGGGGAGGG
CAATCCCTTCACCCAGTTGCCAAACAGACCCCCACCCCTGGATTTTCTTCTCCCTC
45 CATCCCTTGACGGTTCTGGCCTTCCCAAACCTGCTTTTGATCTTTTGATTCTTCTGGGCTG
AAGCAGACCAAGTTCCCCCAGGCACCCAGTTGTGGGGGAGCC

SEQ ID NO:7

- >B8 (CFL1 3'UTR)
GCCCCCTTCTGGCCCCCTGCCTGGAGCATCTGGCAGCCCCACACCTGCCCTTGGGGGTTG
CAGGCTGCCCCCTTCTGCCAGACCGGAGGGCTGGGGGGATCCCAGCAGGGGGAGGG
CAATCCCTTCACCCAGTTGCCAAACAGACCCCCACCCCTGGATTTTCCTTCTCCCTC
5 CATCCCTTGACGGTTCTGGCCTTCCCAAAGTGTCTTTGATCTTTGATTCTTGGGCTG
AAGCAGACCAAGTCCCCCAGGCACCCAGTTGTGGGGGAGCCTGTATTTTTTTAAC
AACATCCCCATTCCCCACCTGGTCCTCCCCCTTCCCATGCTGCCAACTTCTAACCGCAAT
AGTG
SEQ ID NO:8
- 10 >B9 (COX4I1 3'UTR)
GAGATGCTGGCCTGCGCCTGCACCTGCGCCTGGCTCTGTCACCGCCATGCAACTCCATG
CCTATTTACTGGAAACCTGTTATGCCAAACAGTTGTACCACTGCTAATAAATGACCAGT
TTACCTGAAA
SEQ ID NO:9
- 15 >B10 (COX4I1 3'UTR)
AGGGACCCACAGGCGCGCCAGCAGCTCTCGGAAGCGTTGTATCGCATTAAAGTTCAAG
GAGAGCTTTGCTGAGATGAACAGGGGCTCGAACGAGTGGAAGACGGTTGTGGGCGGTG
CCATGTTCTTCATCGGTTTACCGCGCTCGTTATCATGTGGCAGAAGCACTATGGGCTTA
GCCTCCAAGTGGGACTACGAAAAGAACGAGTGGAAGAAGTGAGAGATGCTGGCCTGCG
20 CCTGCACCTGCGCCTGGCTCTGTCACCGCCATGCAACTCCATGCCTATTTACTGGAAACC
TGTTATGCCAAACAGTTGTACCACT
SEQ ID NO:10
- >B11 (COX4I1 3'UTR)
AGAGGACCTTCTGCTTTTAGCTTATTTTGTGCTAACTTTTACAAACAAAGGGCTAATT
25 TTAATAATGTACAGTGTGTCAGTGGTCAGAAACCGTGTGTTTGAGCGGGTGTGAGTGGC
AGGTGGCTCTGCTGACCTGGTGGCTGGTGTGTCGGGAGGATTTAACCTGTGTGAGGGAT
TGGCCTAGAAACAACCTGTTGAGATAGTCTTGCCCCATAACCTGTCTCACACCGTAGTG
TACGGCCCCCTCCCGCAAAGCTTTGACAAAGAGTGGGTGGCCAAGCAGACCAAGAGGA
TGCTGGAC
30 SEQ ID NO:11
- >B12 (CTSB 3'UTR)
TCTGCCGTGGGCCTGTCGTGCCAGTCCTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCTGGA
ACTGCATGTTCTTGCAGCTCTTGGGACTTCATCTTAACCTTCTCGCTGCCCCAGCCATGTT
TTCAACCATGGCATCCCTCCCCAATTAGTTCCCTGTCATCCTCGTCAACCTTCTCTGTA
35 AGTGCCTGGTAAGCTTGCCCTTGCTTAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTA
SEQ ID NO:12
- >B13 (FAM166A 3'UTR)
AAATGCTTTAATGGTGGTGTCTGTACAGCATGGATGTGGACAGGGAAAACAGCAAGTG
CACACAGTGGGACAGGCCACAGGACAGGCTGGGAGTGAATAAAGAGTTCACACTGCT
40 SEQ ID NO:13
- >B14 (NDUFB9 3'UTR)
TATCTAAGTGTATCAATTTAACATTTATAATCACCTTACAAGTAAGTTAAAGTGCATTCC
CTGGTCGTTTTGGCTTTGTCTTTGATTTTGCTTCAGATCTCCTTCTCTTTAGTCCTTTGTCT
GACTTTTTTGCCCTTCTGCTATACTTTCCCTCAACCTGCCTCTCCACTATTTCTTAGGCA
45 TTTTTCAGTCATG
SEQ ID NO:14
- >A1 (ACTG1 5'UTR)

- CTCTCGCACTCTGTTCTTCCGCCGCTCCGCCGTCGCGTTTCTCTGCCGGTCGCA
SEQ ID NO:15
- >A2 (ATP6V0B 5'UTR)
GGGCGGGCGGACAGACTGCGGGACGGACGGTGGACGCTGGGACGCGTTTGTAGCTCCG
5 GCCCCGCCGTTCCGACCCCCGCCGCCGTCGCCGCCATGACGGGGCTAGCACTGCTCTAC
TCCGGGGTCTTCGTGGCCTTCTGGGCCTGCGCGCTGGCCGTGGGTTCCCTGACGGAGACT
TCGCCCTTC
SEQ ID NO:16
- >A3 (ATP6V0B 5'UTR)
10 AGACTGCGGGACGGACGGTGGACGCTGGGACGCGTTTGTAGCTCCGGCCCCGCCGTTCC
GACCCCCGCCGCCGTCGCCGCC
SEQ ID NO:17
- >A4 (ATP6V0E1 5'UTR)
GGGGTAGGGGTGGCGCTCAGGCGGCGACC
15
SEQ ID NO:18
- >A5 (ATP6V0E1 5'UTR)
GTCACGCGGTCACTATTGACACTTCCTGGTGGGATCCGAGTGAGGCGACGGGGTAGG
GGTTGGCGCTCAGGCGGCGACC
SEQ ID NO:19
- >A6 (CFL1 5'UTR)
20 GGCCGGCGGGAAGACTCCGTTACCCAGCGAGCGAGGCGGCGGCGCAGGGCCAGCGGA
CTCCATTTCGGCTCGCGGTGGGAGCGCCGGAAGCCCCCCCCACCCCTCATTGTG
CGGCTCCTACTAAACGGAAGGGGCCGGGAGAGGCCGCGTTTCAGTCGGGTCCCGGCAGC
GGCTGCAGCGCTCTCGTCTTCTGCGGCTCTCGGTGCCCTCTCCTTTTCGTTTCCGGAAC
25
SEQ ID NO:20
- >A7 (CFL1 5'UTR)
CTCCTGGCTCGGGCACCCCGAAGCACGACGCAGAGTAGGAAGAGTTTAAAGACCTCGA
GGCCTCTGGGCACCTTGAGTTTGGCCTCCGGTGTGGCTGTCTCTGATGGTGTCAAGGT
GTTCAACGAC
30
SEQ ID NO:21
- >A8 (CFL1 5'UTR)
ACGTGGCCGGCTTCTTCTGCAGTTCCGGGGAGTTTGGGGGACCAGATTTACCTTGATT
GCCCCCTCCCTCTCCTGGCTCGGGCACCCCGAAGCACGACGCAGAGCCTCCGGTGTGGCT
GTCTCTGATGGTGTCAAGGTGTTCAACGAC
35
SEQ ID NO:22
- >A9 (COX4I1 5'UTR)
GCGGCCTTGCTCTCTTCCGGTCGCGGGACACCGGGTGTAGAGGGCGGTGCGGCGGGC
AGTGGCGGCAGA
SEQ ID NO:23
- >A10 (COX4I1 5'UTR)
40 GGGACACCGGGTGTAGAGGGCGGTGCGGCGGGCAGTGGCGGCAGA
SEQ ID NO:24
- >A11 (COX4I1 5'UTR)
CGCGGCCTTGCTCTCTTCCGGTCGCGGGACACCGGGTGTAGAGGGCGGTGCGGCGGGC
45 AGTGGCGGCAGA
SEQ ID NO:25
- >A12 (CTSB 5'UTR)

GGCCGGGGCTGGCCCAGGCTACGGCGGCTGCAGGGCTCCGGCAACCGCTCCGGCAACG
 CCAACCGCTCCGCTGCGCGCAGGCTGGGCTGCAGGCTCTCGGCTGCAGCGCTGGGTGGA
 TCTAGGATCCGGCTTCCAAC

SEQ ID NO:26

5 >A13 (FAM166A 5'UTR)

AAGGGAGCTGGATGCCGGGAGGGACTGGAGCCAGCAAGGCCAGAGTGAAAGCAAA

SEQ ID NO:27

>A14 (NDUFB9 5'UTR)

GCAGCAGGCGTGCAAGTTCCCGGCTCTCCGCGCGGCCGGGGAAGGTCAGCGCCGTA

10 SEQ ID NO:28

>A15 (CHCHD10 5'UTR)

GGCATTGTCCCCGCGACAGCACCGCTGCCGCCGTCTCTAAGGTCGCCCCGGGTCCCACC
 GCCGCCACC

SEQ ID NO:29

15 >A16 (CHCHD10 5'UTR)

CCGCTGCCGCCGTCTCTAAGGTCGCCCCGGGTCCCACCGCCGCCACC

SEQ ID NO:30

>A17 (SLC38A2 5'UTR)

ATGTCTTTTTTGTGTGTTTGTTCATGGTATTCCTATGAA

20 SEQ ID NO:31

>A18 (NDUFA11 5'UTR)

GCTCCCCGAGCTGGCGGGGTCCGTGGTGCGGGATCGAGATTGCGGGCT

SEQ ID NO:32

>A19 (NDUFV3 5'UTR)

25 GCGCGCTGTTCAAGCGCGGGTGCGCGCGCAGCTGCTGTGGCCCTGCTTGGTGCGCCCGC
 TGTCACCGCC

SEQ ID NO:33

>A20 (PRDX5 5'UTR)

CGCGCCTGCGCAGTGAGGGCGGCCAGGCCCGCCTTCCGCAGGGTGTCGCCGCTGTGCC
 30 GCTAGCGGTGCCCCGCCTGCTGCGGTGGCACCAGCCAGGAGGCGGAGTGGAAGTGGCC
 GTGGGGCGGGT

SEQ ID NO:34

>A21 (GUK1 5'UTR)

CAGCAGATGGGGACTAGAGGCCGCACTGCTATCCACAGCCTCTCTTCTACCCCCAGGC

35 SEQ ID NO:35

>A22 (GUK1 5'UTR)

GCTGGCCGGGCTGGCTGCGGCCGCCCTGGGCCGGGCCCCACCGGACGCCTCTCTTCTCA
 CCCCCAGGC

SEQ ID NO:36

40 >A23 (GUK1 5'UTR)

AGAGGTGGCCCCGGATGCTGCGGCGCCCGCTGGCCGGGCTGGCTGCGGCCGCCCTGGG
 CCGGGCCCCACCGGACGCCTCTCTTCTACCCCCAGGC

SEQ ID NO:37

>A24 (IAH1 5'UTR)

45 TGGCTGGCGGCCCCGCCCCGCCCCGCGGCTGCTCC

SEQ ID NO:38

>A25 (ABHD16A 5'UTR)

- GGAGGGCGGGGCCGGCAGGGGGACCTGCTGCTGGAAGAGCAGCGGCCCGAGCCGGGG
CC
SEQ ID NO:39
- >A26 (SLC25A39 5'UTR)
5 TTTCGGCGTCGGCCTAGGTGCGCTGCGAGCGCGCGCGGACCGCGCACAGGCGGCGGAG
CCGGTATGGGCCCCGCTGACCCTGGGCGCCGCGCCGCACGAGCACCAGCCTAGAGCCA
GGAAGAAGCTTCAAG
SEQ ID NO:40
- >A27 (ATPIF1 5'UTR)
10 CGAGAGACTGCTTGCTGCGGCAGAGACGCCAGAGGTGCAGCTCCAGCAGCA
SEQ ID NO:41
- >A28 (ANAPC11 5'UTR)
CGGAGTTTCGTCATGTTGGCCAGGCCCATTTGAGATCTTTGAAGATATCCTCAACGTGA
GGCTCTGCTGCC
15
SEQ ID NO:42
- >A29 (ANAPC11 5'UTR)
GGGCGCGGCTTCGGCGGGCGGCAGCCGCTGCAGACGAGCTGCGGGCTCTGCTGCC
SEQ ID NO:43
- >A30 (CCDC12 5'UTR)
20 GCCTGCGCGATGCAAGACGGGAGAAAAGGAGGGGCGTACGCGGGCAAG
SEQ ID NO:44
- >A31 (MRPL14 5'UTR)
ATCGCGTCCGCCGGGCTGGGCCTGGCGCGCAGGCGCTAGGAAGAGGCCGCGTGGGGCG
AAGGCGGCGCTTGGCTGGTGGGGCCCCGCGCGGGATTTCCCGGGCGGCGAGAGCGGA
25 TCTATCTTGGGATCCC
SEQ ID NO:45
- >A32 (APOA1BP 5'UTR)
GCCGGGGGCGCGCGCTCTGCGAGCTGG
SEQ ID NO:46
- >A33 (APOA1BP 5'UTR)
30 GCCGGGGCCGGGCCGGGCCGGGGGCGCGCGCTCTGCGAGCTGG
SEQ ID NO:47
- > Mod. 5'UTR
GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC
35
SEQ ID NO:48
- > α -球蛋白 3'UTR
TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGGGCC
TCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTT
TGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC
40
SEQ ID NO:49
- > α -1 球蛋白 5'UTR
AGACGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC
SEQ ID NO:50
- > haplogroup U8b1b1 mitochondrion 3'UTR
45 CTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTCCCGTCCTGGGTACCCC
GAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCA

CCTCTGCTAGTTCCAGACACCTGCTATACTAATCGCTAGCCGCGTCGCTCCCCAGGGTTG
GTCAATTTCTGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGCCCAAGCACGCCACACCCCC
ACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAACAGCAATG
CA GCTCAAAACGCTTAGCCTAG

5 SEQ ID NO:51

> A30L70 PolyA

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAA
AA

SEQ ID NO:52

10 >5'UTR-Fluc- α 球蛋白 3'UTR-120A (Mod.-120A)

GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAAGACG
CCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGG
AGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTA
CAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCG
15 TTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAAATCGTCGTATGCA
GTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAG
TTGCGCCCCGGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTCTG
CAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAA
AAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGATTACCAGGGAT
20 TTCAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATT
TTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGA
TCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCG
CATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTT
GTTCCATTCCATCACGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTT
25 CGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTA
CAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGCCAACCCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCT
GATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTC
TAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGA
TATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCC
30 GGGCGCGGTTCGTTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCG
GGAACACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCTATGATTAT
GTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGG
CTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCG
CCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCA
35 TCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGAC
GCCGGTGAACCTCCCGCCGCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAA
AAGAGATCGTGGATTACGTGCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGG
AGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAA
ATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGGATTACAAGG
40 ATGACGACGATAAGTAAGGGCCCACCGGTTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCAT
GCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCTCCTCCCTTCCTGCACCCGTACCCCG
TGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCCTCGAGCCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAA
AAATTATTGTTT
45 AAACATTTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:53

>5'UTR-Fluc- α 球蛋白 3'UTR-A30L70 (Mod.-A30L70)

GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAAGACG
CCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGG
AGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTA
5 CAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCG
TTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCA
GTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAG
TTGCGCCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTCG
CAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAA
10 AAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGATTACCAGGGAT
TTCAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATT
TTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGA
TCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCG
CATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTT
15 GTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATT
CGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTA
CAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGCCAACCTTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCT
GATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCTCTC
TAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGA
20 TATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCC
GGGCGCGGTTCGTTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCG
GGAACACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAAGTGTGTGTGAGAGGTCTATGATTAT
GTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGG
CTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCG
25 CCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCA
TCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGAC
GCCGGTGAAGTTCCTCCCGCCGCTTGTGTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAA
AAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGG
AGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAA
30 ATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGGATTACAAGG
ATGACGACGATAAGTAAGGGCCCACCGGTTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCAT
GCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCG
TGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCCTCGAGCCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
35 AAATTATTGTTAAACATTTAA
ATTCTAGA

SEQ ID NO:54

> α -1-球蛋白 5'UTR-Fluc- haplogroup U8b1b1 mitochondrion 3'UTR-A30L70 (BioN.)

AGACGAACUAGUUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCATGGA
40 AGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACC
GCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTG
CTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCC
GTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCG
TATGCAGTGAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAG
45 TTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGC
ATTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTGAACGT

GCAAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACC
AGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAAT
ACGATTTTGTGCCAGAGTCCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCC
TCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAG
5 ATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTT
AAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATG
TGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTC
AGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAA
AGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCT
10 CCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAG
GCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATG
ATAAACCGGGCGCGGTTCGTTAAAGTTGTTCCATTTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTG
GATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTA
TGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGAT
15 GGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGT
TGACCGCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGG
AATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGAC
GATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAGACGATGAC
GGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTGCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGC
20 GGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAA
GAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGGATTA
CAAGGATGACGACGATAAGTAAGGGCCCACCGGCTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCA
ATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAG
GTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTGCTAT
25 ACTAATCGCTAGCCGCGTCGCTCCCCAGGGTTGGTCAATTCGTGCCAGCCACACCGAG
ACCTGGTCCAGAGCCCCAAGCACGCCACACCCACCGGAAAACAGCAGTGATTAACCTT
TAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAACAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCTC
GAGCCGCGGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
AAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
30 AAAAAAATTATTGTTTAAACATTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:55

>5'UTR-Fluc- ACTG1 3'UTR-120A (B1)
GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAAGACG
CCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGG
35 AGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTA
CAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGG
TTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCA
GTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAG
TTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTCG
40 CAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAA
AAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGAT
TTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATT
TTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGA
TCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCG
45 CATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAAGTGT
GTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTT
CGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTA

CAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCT
GATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGCGCTCCCCTCTC
TAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGA
TATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACC
5 GGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCG
GGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTAT
GTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGG
CTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCG
CCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCA
10 TCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGAC
GCCGGTGAAGTTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAA
AAGAGATCGTGGATTACGTGCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGG
AGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAAGGTCTTACCGAAAACTCGACGCAAGAAAA
ATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGGATTACAAGG
15 ATGACGACGATAAGTAAGGGCCACCGGCCGACTACCTCATGAAGATCCTCACTGAGC
GAGGCTACAGCTTACCACCACGGCCGAGCGGGAAATCGTGCGCGACATCAAGGAGAA
GCTGTGCTACGTGCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCCGCATCCTCCTCTT
CTCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCCGATGGCCAGGTCATCACCATTGGCAATGAGCG
GTTCCGGTGTCCGGAGGCGCTGTTCCAGCCTTCCTTCCTGGGTATGGAATCTTGCGGCAT
20 CCACGAGACCACCTTCAACTCCATCATGAAGTGTGACGTGGACATCCGCAAAGACCTGT
ACGCCAACACGGTGTGTCGGGCGGCACCACCATGTACCCGGGCATTGCCGACAGGAT
GCAGAAGGAGATCACCGCCCTGGCGCCAGCACCATGAAGATCAAGATCATCGCACCC
CCAGAGCGCAAGTACTCGGTGTGGATCGGTGGCTCCATCCTGGCCTCACTGTCCACCTT
CCAGCAGATGTGGATTAGCTCGAGCCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
25 AAA
AAATTATTGTTTAAACATTTAA
TTCTAGA

SEQ ID NO:56

>ACTG1 5'UTR-Fluc- α 球蛋白 3'UTR-120A (A1)
30 CTCTCGCACTCTGTTCTTCCGCCGCTCCGCCGTCGCGTTTCTCTGCCGGTTCGACGCCACC
ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATG
GAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCTGGAAC
AATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAA
TGTCGGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATC
35 GTCGTATGCAGTGAAAACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATC
GGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTAT
GGGCATTTTCGAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGA
ACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGAT
TACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAAT
40 GAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAA
CTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGT
GAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTGGCAATCAAAATCATTCCGGATACTGCGA
TTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTGGAAATGTTTACTACACTCGGATATTTGAT
ATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCC
45 TTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCA
AAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGC

GCTCCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTAT
CAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGG
GATGATAAACCGGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGA
TCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGT
5 CCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAA
GGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCA
TCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAA
TTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTGCGCAGGTCTTCCC
GACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGAT
10 GACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTG
CGCGGAGGAGTTGTGTTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACG
CAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGG
ATTACAAGGATGACGACGATAAGTAAGGGCCCACCGGTTGATAATAGGCTGGAGCCTC
GGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCCTCCTGCACCC
15 GTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCCTCGAGCCGCGGAAAAAAA
AA
AA
ATTATTGTTTAAACATTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:57

20

>B1 mRNA 序列(ACTG1 3'UTR)

CCGACUACCUCAUGAAGAUCUCACUGAGCGAGGCUACAGCUUACCAACCACGGCCG
AGCGGGAAAUCGUGCGCGACAUCAAGGAGAAGCUGUGCUACGUCGCCUUGGACUUCG
AGCAGGAGAUGGCCACCGCCGCAUCCUCCUCUUCUCUGGAGAAGAGCUACGAGCUGC
25 CCGAUGGCCAGGUCAUCACCAUUGGCAAUGAGCGGUUCCGGUGUCCGGAGGCGCUGU
UCCAGCCUUCUUCUUGGGUAUGGAAUCUUGCGGCAUCCACGAGACCACCUUCAACU
CCAUCAUGAAGUGUGACGUGGACAUCGCAAAGACCUGUACGCCAACACGGUGCUGU
CGGGCGGCACCACCAUGUACCCGGGCAUUGCCGACAGGAUGCAGAAGGAGAUCACCG
CCCUGGCGCCAGCACCAUGAAGAUAAGAUAUCGCACCCCCAGAGCGCAAGUACU
30 CGGUGUGGAUCGGUGGCUCCAUCCUGGCCUCACUGUCCACCUUCCAGCAGAUGUGGA
UUAG

SEQ ID NO:58

>B2 mRNA 序列(ATP6V0B 3'UTR)

AUGAUUAUGUGUGGGUGGGGCCGUGCCUCACUUUUUUUUUUAUUGCUGGUUUUCCUGGG
35 ACAGCUGGAGCUGUGUCCCUUAGCCUUUCAGAGGCUUGGUGUUCAGGGCCCUCCCUG
CACUCCCCUCUUGCUGCGUGUUGAUUUUGGAGGCACUGCAGUCCAGGCCGAGUCCUCA
GUGCGGGGAGCAGGCUGCUGCUGCUGACUCUGUGCAGCUGCGCACCUGUGUCCCCCA
CCUCCACCCUCAACCCAUUCUCCUAGUGUUUGUGAAUAAACUUGGUUUUUGUCU

SEQ ID NO:59

40 >B3 mRNA 序列(ATP6V0B 3'UTR)

GUUGAAGAACUUCUCUCUACCGAGCAGCCCGUAACCCCUUUUUUCUCCUCACUGCU
GCAGGAGUCUGCUACACCAUUUUUGAUUUUGGGCUUCCGCUUUGAUGUGGCAUGGUU
CCUGACGGAGACUUCGCCCUUCAUGUGGUCCAACCUGGGCAUUGGCCUAGCUAUCUC
CCUGUCUGUGGUUGGGGCAGCCUGGGGCAUCUAUAUUAACCGGCUCCUCAUAUUGG
45 UGGAGGAGUGAAGGCCCCCAGGAUCAAGACCAAGAACCUGGUCAGCAUCAUCUUCUG
UGAGGCUGUGGCCAUUCUACGGCAU

SEQ ID NO:60

>B4 mRNA 序列(ATP6V0E1 3'UTR)

GGAAGAAGACAUGCUCUACAGUGCUCAGUCUUUGAGGUGACUAUGCUUGUGACCUU
UCUUAUCAGUAUGGUCAGGCAGUCAGAGUUUGCCUUGACUUUUUCACAUUUUAU
5 GGCCAUUUUAAACACGUGGCAAGGGCAAGCUGCUGAAUGCAAACACGAUCUGAAGAGC
AGAAAUAAAAUUGGAACUUAAGCCUAGCUUACCUAAAUCUCAUUAAGAUUCUUUU
U

SEQ ID NO:61

>B5 mRNA 序列(ATP6V0E1 3'UTR)

AUGCAAAAUCACCUCCAAACCAGACCACUUUUUCUUGACUUGCCUGUUUUUGGCCAUUA
10 GCUGCCUUAACGUAACAGCACAUUUGAAUGCCUUAUUCUACAAUGCAGCGUGUUU
UCCUUUGCCUUUUUUGCACUUUGGUGAAUUAACGUGCCUCCAUAACCUGAACUGUGCC
GACUCCACAAAACGAUUAUGUACUCUUCUGAGAUAGAAGAUGCUGUUCUUCUGAGA
GAUACGUUACUCUCUCCUUGGAAUCUGUGGAUUUGAAGAUGGCUCCUGCCUUCUCAC
15 GUGGGAAUCAGUGAAGUGUUUAGAAACUGCUGCAAGACAAACAAGACUCCAGUGGG
GUGGUCAGUAGGAGAGCACGUUCAGAGGGAAGAGCCAUCUCAACAGAAUCGCACCAA
ACUAUACUUUCAGGAUGAAUUCUUCUUCUGCCAUCUUUUGGAAUAAAUUUUUC
CUCCUUUC

SEQ ID NO:62

20 >B6 mRNA 序列(CFL1 3'UTR)

GCCCCUUCUGGCCCCCUGCCUGGAGCAUCUGGCAGCCCCACACCUGCCCCUUGGGGGU
UGCAGGCUGCCCCCUUCCUGCCAGACCGGAGGGGCUGGGGGGAUCCCAGCAGGGGGA
GGGCAAUCCCUUCACCCCAGUUGCCAAACAGACCCCCACCCCCUGGAUUUUCUUCU
CCCUCUAUCCCUUGACGGUUCUGGCCUUCCCAAACUGCUUUUGAUCUUUUGAUUCCU
25 CUUGGGCUGAAGCAGACCAAGUUCUCCCCAGGCACCCCAGUUGUGGGGGAGCCUGUA
UUUUUUUUAACAACAUCCCCAUCCCCACCUGGUCCUCCCCCUUCCCAUGCUGCCAAC
UUCUAACCGCAAUAGUGACUCUGUGCUUGUCUGUUUAGUUCUGUGUAUAAAUUGGAA
UGUUGUGGAGAUGACCCCUCCCUGUGCCGGCUGGUUCCUCUCCCUUUUCCCCUGGUC
ACGGCUACUCAUGGAAGCAGGACCAGUAAGGGACCUUCGAUU

30 SEQ ID NO:63

>B7 mRNA 序列 (CFL1 3'UTR)

GCCCCUUCUGGCCCCCUGCCUGGAGCAUCUGGCAGCCCCACACCUGCCCCUUGGGGGU
UGCAGGCUGCCCCCUUCCUGCCAGACCGGAGGGGCUGGGGGGAUCCCAGCAGGGGGA
GGGCAAUCCCUUCACCCCAGUUGCCAAACAGACCCCCACCCCCUGGAUUUUCUUCU
35 CCCUCCAUCCCUUGACGGUUCUGGCCUUCCCAAACUGCUUUUGAUCUUUUGAUUCCU
CUUGGGCUGAAGCAGACCAAGUUCUCCCCAGGCACCCCAGUUGUGGGGGAGCC

SEQ ID NO:64

>B8 mRNA 序列 (CFL1 3'UTR)

GCCCCUUCUGGCCCCCUGCCUGGAGCAUCUGGCAGCCCCACACCUGCCCCUUGGGGGU
40 UGCAGGCUGCCCCCUUCCUGCCAGACCGGAGGGGCUGGGGGGAUCCCAGCAGGGGGA
GGGCAAUCCCUUCACCCCAGUUGCCAAACAGACCCCCACCCCCUGGAUUUUCUUCU
CCCUCCAUCCCUUGACGGUUCUGGCCUUCCCAAACUGCUUUUGAUCUUUUGAUUCCU
CUUGGGCUGAAGCAGACCAAGUUCUCCCCAGGCACCCCAGUUGUGGGGGAGCCUGUA
UUUUUUUUAACAACAUCCCCAUCCCCACCUGGUCCUCCCCCUUCCCAUGCUGCCAAC
45 UUCUAACCGCAAUAGUG

SEQ ID NO:65

>B9 mRNA 序列 (COX4I1 3'UTR)

GAGAUGCUGGCCUGCGCCUGCACCUGCGCCUGGCUCUGUCACCGCCAUGCAACUCCA
UGCCUAUUUACUGGAAACCUGUUAUGCCAAACAGUUGUACCACUGCUAAUAAAUGAC
CAGUUUACCGUAAA

5

SEQ ID NO:66

>B10 mRNA 序列 (COX4I1 3'UTR)

AGGGACCCACAGGCGCGCCAGCAGCUCUCGGAAGCGUUGUAUCGCAUUAAGUUCAA
GGAGAGCUUUGCUGAGAUGAACAGGGGCUCGAACGAGUGGAAGACGGUUGUGGGCG
GUGCCAUGUUCUUCUACGGUUUACCGCGCUCGUUAUCAUGUGGCAGAAGCACUAUG
10 GGCUUAGCCUCCAAGUGGGACUACGAAAAGAAGAGUGGAAGAAGUGAGAGAUGCU
GGCCUGCGCCUGCACCUGCGCCUGGCUCUGUCACCGCCAUGCAACUCCAUGCCUAUU
UACUGGAAACCGUUAUGCCAAACAGUUGUACCACU

SEQ ID NO:67

>B11 mRNA 序列 (COX4I1 3'UTR)

15 AGAGGACCUUCUGCUUUUAGCUUAUUUUGUUGCUAACUUUUUACAAACAAAGGGCU
AAUUUUAAAAUGUCAGUGUUGUCAGUGGUCAGAAACCGUGUGUUUGAGCGGGUGUU
GAGUGGCAGGUGGCUCUGCUGACCUGGUGGCUGGUGUGUCGGGAGGAUUUAACCUG
UGUGAGGGAUUGGCCUAGAAACAACCUGUUGAGAUAGUCUUGCCCCAUAAACCUGUCU
CACACCGUAGUGUACGGCCCCCUCCCGCAAAGCUUUGACAAAGAGUGGGUGGCCAAG
20 CAGACCAAGAGGAUGCUGGAC

SEQ ID NO:68

>B12 mRNA 序列 (CTS3 3'UTR)

UCUGCCGUGGGCCUGUCGUGCCAGUCCUGGGGGCGAGAUCCGGGAGAAUCACGUCCUG
GAACUGCAUGUUCUUGCGACUCUUGGGACUUAUCUUAACUUCUCGCUGCCCCAGCC
25 AUGUUUUAACCAUGGCAUCCCUCCCCCAAUUAGUUCUGUCAUCCUCGUCAACCU
UCUCUGUAAGUGCCUGGUAAGCUUGCCCUUGCUUAAGAACUCAAACAUAAGCUGUGC
UCUA

SEQ ID NO:69

>B13 mRNA 序列 (FAM166A 3'UTR)

30 AAAUGCUUUAUUGGUGGUGUCUGUACAGCAUGGAUGUGGACAGGGAAAACAGCAAG
UGCACACAGUGGGACAGGCCACAGGACAGGCUGGGAGUGAAUAAAGAGUUCACACU
GCU

SEQ ID NO:70

>B14 mRNA 序列 (NDUFB9 3'UTR)

35 UAUCUAAGUGUAUCAAUUUAACAUUUAUAUACACCUUACAAGUAAGUUAAGUGCA
UCCCCUGGUCGUUUUGGCUUUGUCUUUGAUUUUGCUUCAGAUCCUUCUCUUUAGU
CCUUUGUCUGACUUUUUUGCCUUCUUGCUAUACUUUCCCUCAACCUGCCUCUCCACU
AUUUUCUUAGGCAUUUUUCAGUCAUG

SEQ ID NO:71

40 >A1 mRNA 序列 (ACTG1 5'UTR)

CUCUCGCACUCUGUUCUUCGCGCCGCUCCGCCGUCGCGUUUCUCUGCCGGUCGCA

SEQ ID NO:72

>A2 mRNA 序列 (ATP6V0B 5'UTR)

GGGCGGGCGGACAGACUGCGGGACGGACGGUGGACGCGUGGGACGCGUUUGUAGCUCC
45 GGCCCCGCCGUUCCGACCCCCGCCGCCGUCGCCGCCAUGACGGGGCUAGCACUGCUCU
ACUCCGGGGUCUUCGUGGCCUUCUGGGCCUGCGCGCUGGCCGUGGGUUCUGACGGA

	GACUUCGCCCUUC	SEQ ID NO:73
	>A3 mRNA 序列 (ATP6V0B 5'UTR)	
5	AGACUGCGGGACGGACGGUGGACGCGUUGUAGCUCCGGCCCCGCCGUU CCGACCCCCGCCCGCCGUCGCCGCC	SEQ ID NO:74
	>A4 mRNA 序列 (ATP6V0E1 5'UTR)	
	GGGGUAGGGGUUGGCGCUCAGGCGGCGACC	SEQ ID NO:75
10	>A5 mRNA 序列 (ATP6V0E1 5'UTR)	
	GUCACGCGGUCAGCUAUUGACACUCCUGGUGGGAUCCGAGUGAGGCGACGGGGUAG GGGUUGGCGCUCAGGCGGCGACC	SEQ ID NO:76
	>A6 mRNA 序列 (CFL1 5'UTR)	
15	GGCCGGCGGGAAGACUCCGUUACCCAGCGAGCGAGGCGGCGGCAGGGCCAGCGGA CUCCAUUUCCTGUCGGCUCGCGGUGGGAGCGCCGGAAGCCCGCCCCACCCCUCAUUG UGCGGCUCUACUAAACGGAAGGGGCCGGGAGAGGCCGCGUUCAGUCGGGUCCCGGC AGCGGCUCGAGCGCUCUCGUCUUCUGCGGCUCUCGGUGCCUCUCCUUUUCGUUUC GGAAAC	SEQ ID NO:77
20	>A7 mRNA 序列 (CFL1 5'UTR)	
	CUCCUGGCUCGGGCACCCCGAAGCACGACGCAGAGUAGGAAGAGUUUAAAGACCUCG AGGCCUCUGGGCACUUGAGUUUGGCCUCCGGUGUGGCUGUCUCUGAUGGUGUCAUCA AGGUGUUAACGAC	SEQ ID NO:78
25	>A8 mRNA 序列 (CFL1 5'UTR)	
	ACGUGGCCGGCUUCUUCUGCAGUUCGGGGAGUUUGGGGGACCAGAUUUACCUUGGA UUGCCCCUCCCUUCCUGGCUCGGGCACCCCGAAGCACGACGCAGAGCCUCCGGUGU GGCUGUCUCUGAUGGUGUCAUCAAGGUGUUAACGAC	SEQ ID NO:79
30	>A9 mRNA 序列 (COX4I1 5'UTR)	
	GCGGCCUUGCUCUCUCCGGUCGCGGGACACCGGGUGUAGAGGGCGGUCGCGGCGGG CAGUGGCGGCAGA	SEQ ID NO:80
35	>A10 mRNA 序列 (COX4I1 5'UTR)	
	GGGACACCGGGUGUAGAGGGCGGUCGCGGCGGGCAGUGGCGGCAGA	SEQ ID NO:81
	>A11 mRNA 序列 (COX4I1 5'UTR)	
40	CGCGGCCUUGCUCUCUCCGGUCGCGGGACACCGGGUGUAGAGGGCGGUCGCGGCGG GCAGUGGCGGCAGA	SEQ ID NO:82
	>A12 mRNA 序列 (CUSB 5'UTR)	
45	GGCCGGGGCUGGCCAGGCUACGGCGGCUGCAGGGCUCCGGCAACCGCUCCGGCAAC GCCAACCUCUCCGUCGCGCAGGCUGGGCUAGGCUUCGCGUCAGCGCUGGGU GGAUCUAGGAUCCGGCUUCCAAC	

- SEQ ID NO:83
>A13 mRNA 序列 (FAM166A 5'UTR)
AAGGGAGCUGGAUGCCGGGAGGGACUGGAGCCAGCAAGGCCAGAGUGAAAGCAAA
SEQ ID NO:84
- 5 >A14 mRNA 序列 (NDUFB9 5'UTR)
GCAGCAGGCGUGCAGUUUCCCGGCUCUCCGCGCGGCCGGGAAGGUCAGCGCCGUA
SEQ ID NO:85
- >A15 mRNA 序列 (CHCHD10 5'UTR)
GGCAUUUGUCCCCGCGACAGCACCGCUGCCGCCGUCUCUAAGGUCGCCCAGGUGCCCA
10 CCGCCGCCACC
SEQ ID NO:86
- >A16 mRNA 序列 (CHCHD10 5'UTR)
CCGCUGCCGCCGUCUCUAAGGUCGCCCAGGUGCCCGCCGCCACC
SEQ ID NO:87
- 15 >A17 mRNA 序列 (SLC38A2 5'UTR)
AUGUCUUUUUGUGUGUUUGUUUCAUGGUAUUCUAUGAA
SEQ ID NO:88
- >A18 mRNA 序列 (NDUFA11 5'UTR)
GCUUCCCGAGCUGGCGGGGUGCGUGGUGCGGGAUCGAGAUUGCGGGCU
20 SEQ ID NO:89
- >A19 mRNA 序列 (NDUFV3 5'UTR)
GGCGGCUGUUCAGGCGGGUGCGCGCGCAGCUGCUGUGGCCUGCUUGGUGCGCCC
GCUGUCACCGCC
SEQ ID NO:90
- 25 >A20 mRNA 序列 (PRDX5 5'UTR)
CGCGCCUGCGCAGUGGAGGCGGCCAGGCCCGCCUCCGCAGGGUGUCGCCGUGUG
CCGCUAGCGGUGCCCCGCCUGCUGCGGUGGCACCAGCCAGGAGGCGGAGUGGAAGUG
GCCGUGGGGCGGGU
SEQ ID NO:91
- 30 >A21 mRNA 序列 (GUK1 5'UTR)
CAGCAGAUGGGGACUAGAGGCCGCACUGCUAUCCACAGCCUCUCUUCUCACCCCCAG
GC
SEQ ID NO:92
- >A22 mRNA 序列 (GUK1 5'UTR)
35 GCUGGCCGGGCUGGCUGCGGCCGCCUGGGCCGGGCCCCACCGGACGCCUCUCUUCUC
ACCCCCAGGC
SEQ ID NO:93
- >A23 mRNA 序列 (GUK1 5'UTR)
AGAGGUGGCCCCGGAUGCUGCGGCGCCCGCUGGCCGGGCGGCGCGGCCGCCUGG
40 GCCGGGCCCCACCGGACGCCUCUCUUCUCACCCCCAGGC
SEQ ID NO:94
- >A24 mRNA 序列 (IAH1 5'UTR)
UGGCUGGCGGCCCCGCCCGCCCCGCCCGGCUGCUCC
SEQ ID NO:95
- 45 >A25 mRNA 序列 (ABHD16A 5'UTR)

GGAGGGCGGGGCCGGCAGGGGGACCUGCUGCUGGAAGAGCAGCGGCCCCGAGCCGGGG
CC

SEQ ID NO:96

>A26 mRNA 序列 (SLC25A39 5'UTR)

5 UUUCGGCGUCGGCCUAGGUGCGCUGCGAGCGCGCGGACCGCGCACAGGCGGCGGA
GCCGGUAUUGGGCCCCGCCUGACCCUGGGCGCCGCGCCGCACGAGCACCAGCCUAGAGC
CAGGACUGAAGCUUCAAG

SEQ ID NO:97

>A27 mRNA 序列 (AUP1F1 5'UTR)

10 CGAGAGACUGCUUGCUGCGGCAGAGACGCCAGAGGUGCAGCUCCAGCAGCA

SEQ ID NO:98

>A28 mRNA 序列 (ANAPC11 5'UTR)

CGGAGUUUCGUCAUGUUGGCCAGGCCCAUUUGAGAUCUUUGAAGAUAUCCUCAACGU
GAGGCUCUGCUGCC

15 SEQ ID NO:99

>A29 mRNA 序列 (ANAPC11 5'UTR)

GGGCGCGGCUUCGGCGGGCGGCAGCCGUCGACGAGCUGCGGGCUCUGCUGCC

SEQ ID NO:100

>A30 mRNA 序列 (CCDC12 5'UTR)

20 GCCUGCGCGAUGCAAGACGGGAGAAAAGGAGGGGGCGUACGCGGGCAAG

SEQ ID NO:101

>A31 mRNA 序列 (MRPL14 5'UTR)

AUCGCGUCCGCCGGGCGUGGGCCUGGCGCGCAGGCGCUAGGAAGAGGCCGCGUGGGGC
GAAGGCGGCGCUUGGCGUGUGGGGGCCGCGGCGGGAUUUCCCCGGGCGGCGAGAGCG
25 GAUCUAUCUUGGGAUCCC

SEQ ID NO:102

>A32 mRNA 序列 (APOA1BP 5'UTR)

GCCGGGGGCGCGCGCUCUGCGAGCUGG

SEQ ID NO:103

30 >A33 mRNA 序列 (APOA1BP 5'UTR)

GCCGGGGCCGGGCCGGGCCGGGGCGCGCGCUCUGCGAGCUGG

SEQ ID NO:104

> Mod. 5'UTR mRNA 序列

35 GGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAAAGAGCCACC

SEQ ID NO:105

> α -球蛋白 3'UTR mRNA 序列

UGAAUAAUAGGCUAGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCC
UCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUU
UGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC

40 SEQ ID NO:106

> α -1 球蛋白 5'UTR mRNA 序列

AGACGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC

SEQ ID NO:107

> haplogroup U8b1b1 mitochondrion 3'UTR mRNA 序列

45 CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACC

CCGAGUCUCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCACCUGCCCCACUCA
 CCACCUCUGCUAGUUCACAGACACCUGCUAUACUAAUCGCUAGCCGCGUCGCUCCCCA
 GGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGCCCCAAGCACGCC
 ACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUA
 5 ACAGCAAUGCA GCUAAAAACGCUUAGCCUAG

SEQ ID NO:108

>hHGF 氨基酸序列

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIKTKK
 VNTADQCANRCTRNGKLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDLYENKD
 10 YIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRNPRGEEGG
 PWCFTSNPEVRYEVCIDIPQCSEVECMTNCGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTTPHRHKFLP
 ERYPDKGFFDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTDVPLETTECIQ
 GQGEYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPDGSESPWCFT
 TDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNKGNYMGNLSQTRSGLTCSMWDKNMEDLHRHIF
 15 WEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCA
 KTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSRDLDYEAWLGI
 HDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSIDLVLMLARPAVLDDFVSTIDLPNYGCTIPEKTS
 CSVYGWGYTGILNYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICAGAEEKIGSGPCEGD
 YGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRPgifrvayyakWIHKIILTYKVPQS

SEQ ID NO:109

>hHGF 核苷酸序列

ATGTGGGTGACCAAACCTCCTGCCAGCCCTGCTGCTGCAGCATGTCCTCCTGCATCTCCTC
 CTGCTCCCCATCGCCATCCCCTATGCAGAGGGACAAAGGAAAAAGAAGAAATACAATTCAT
 GAATTCAAAAAATCAGCAAAGACTACCCTAATCAAAATAGATCCAGCACTGAAGATAAA
 25 AACCAAAAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCTAATAGATGTACTAGGAATAAAGGACT
 TCCATTCACCTTGCAAGGCTTTTGTGTTTTGATAAAGCAAGAAAACAATGCCTCTGGTTCCC
 CTTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAGAATTTGGCCATGAATTTGACCTCTATGA
 AAACAAAGACTACATTAGAACTGCATCATTGGTAAAGGACGCAGCTACAAGGGAACAG
 TATCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGCCCTGGAGTTCCATGATACCACACGAAC
 30 ACAGCTTTTTGCCTTCGAGCTATCGGGGTAAAGACCTACAGGAAAACCTACTGTGCAATC
 CTCGAGGGGAAGAAGGGGGACCCCTGGTGTTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGA
 AGTCTGTGACATTCCTCAGTGTTTCAAGTTGAATGCATGACCTGCAATGGGGAGAGTTA
 TCGAGGTCTCATGGATCATAAGAATCAGGCAAGATTTGTCAGCGCTGGGATCATCAGAC
 ACCACACCGGCACAAATCTTGCCTGAAAGATATCCCACAAAGGGCTTTGATGATAATTA
 35 TTGCCGCAATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCATGGTGCTATACTCTTGACCCTCACACCCG
 CTGGGAGTACTGTGCAATTAACATGCGCTGACAATACTATGAATGACACTGATGTTCC
 TTTGGAAACAACCTGAATGCATCCAAGGTCAAGGAGAAGGCTACAGGGGCACTGTCAATA
 CCATTTGGAATGGAATTCATGTCAGCGTTGGGATTCTCAGTATCCTCACGAGCATGACAT
 GACTCCTGAAAATTTCAAGTGCAAGGACCTACGAGAAAATTACTGCCGAAATCCAGATG
 40 GGTCTGAATCACCTGGTGTGTTTACCCTGATCCAAACATCCGAGTTGGCTACTGCTCCC
 AAATTCAAAACCTGTGATATGTCACATGGACAAGATTGTTATCGTGGGAATGGCAAAAATTA
 TATGGGCAACTTATCCCAAACAAGATCTGGACTAACATGTTCAATGTGGGACAAGAATTA
 GGAAGACTTACATCGTCATATCTTCTGGGAACCAGATGCAAGTAAGCTGAATGAGAATTA
 CTGCCGAAATCCAGATGATGATGCTCATGGACCCTGGTGCTACACGGGAAATCCACTCAT
 45 TCCTTGGGATTATTGCCCTATTTCTCGTTGTGAAGGTGATACCACACCTACAATAGTCAATT
 TAGACCATCCCGTAATATCTTGTGCCAAAACGAAACAATTGCGAGTTGTAAATGGGATTC

CAACACGAACAAACATAGGATGGATGGTTAGTTTGAGATACAGAAATAAACATATCTGCG
GAGGATCATTGATAAAGGAGAGTTGGGTTCTTACTGCACGACAGTGTTCCTTCTCGAG
ACTTGAAAGATTATGAAGCTTGGCTTGGAATTCATGATGTCCACGGAAGAGGAGATGAG
AAATGCAAACAGGTTCTCAATGTTCCAGCTGGTATATGGCCCTGAAGGATCAGATCTG
5 GTTTTAATGAAGCTTGCCAGGCCTGCTGTCCTGGATGATTTTGTTAGTACGATTGATTAC
CTAATTATGGATGCACAATTCCTGAAAAGACCAGTTGCAGTGTTTATGGCTGGGGCTACA
CTGGATTGATCAACTATGATGGCCTATTACGAGTGGCACATCTCTATATAATGGGAAATGA
GAAATGCAGCCAGCATCATCGAGGGAAGGTGACTCTGAATGAGTCTGAAATATGTGCTG
GGGCTGAAAAGATTGGATCAGGACCATGTGAGGGGGATTATGGTGGCCCACTTGTTTGTG
10 AGCAACATAAAATGAGAATGGTCTTGGTGTCTTGTTCCTGGTCGTGGATGTGCCATTCC
AAATCGTCCTGGTATTTTGTCCGAGTAGCATATTATGCAAATGGATACACAAAATTATTT
TAACATATAAGGTACCACAGTCATAG

SEQ ID NO:110

>hHGF 密码子优化序列 1(hHGF-OS1)

15 ATGTGGGTGACCAAACTGCTCCCCGCTCTGCTGCTGCAGCATGTGCTGCTCCACCTGCTG
CTGCTGCCAATCGCCATCCCCTACGCTGAAGGACAGCGGAAGCGCAGAAACACAATTCA
CGAATTCAAGAAGTCCGCCAAAACAACACTGATCAAGATCGACCCTGCCCTGAAAATCA
AAACCAAGAAGGTGAACACTGCCGATCAGTGCGCCAACAGATGCACAAGAAACAAAGG
CCTGCCCTTCACATGCAAGGCCTTTGTGTTGACAAGGCCAGAAAGCAGTGCCTGTGGT
20 TCCCTTTCAACAGCATGAGCTCTGGCGTGAAGAAAGAGTTCGGCCACGAATTCGACCTG
TACGAGAACAAGGATTACATCAGAAATTGTATCATCGGCAAGGGCAGAAGCTACAAAGG
CACAGTGTCCATCACCAAAAGCGGCATTAAGTGTACGCTTGGAGCAGCATGATCCCTCA
CGAGCACAGCTTCCTGCCTAGCTCTTACAGAGGCAAGGACCTGCAGGAGAATTACTGCC
GGAACCCCTAGAGGCGAGGAAGGCGGCCCTTGGTGCTTTACCAGCAACCCCTGAGGTGCG
25 GTACGAGGTGTGTGACATCCCCCAGTGCAGCGAAGTGGAATGCATGACCTGTAATGGCG
AGAGCTACAGAGGCCTCATGGACCATACAGAGAGCGGAAAGATTTGTCAAAGATGGGAT
CACCAGACACCTCACAGACACAAATTCCTGCCCCGAAAGATATCCTGACAAGGGCTTCGA
CGACAATACTACTGCAGAAATCCTGATGGCCAACCCAGACCTTGGTGCTACACCCTGGATCC
TCATACCAGATGGGAGTACTGTGCCATCAAGACCTGCGCTGATAATACCATGAACGACAC
30 CGATGTGCCTCTGGAAACAACCGAGTGCATCCAGGGACAGGGCGAAGGCTACCGGGGC
ACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATCCCCTGCCAGAGATGGGACAGCCAGTACCCCCA
CGAACACGATATGACCCCTGAGAACTTCAAGTGCAAGGACCTGAGAGAAAATTACTGCA
GAAACCCAGACGGAAGCGAGTCTCCTTGGTGTTTTACCACCGACCCCAACATCCGGGTG
GGTACTGCAGCCAAATCCCCAATTGCGACATGAGCCACGGCCAGGACTGCTACCGGGG
35 AAACGGCAAAAACCTACATGGGCAATCTGAGCCAGACCCGGAGCGGTCTGACCTGCTCCA
TGTGGGATAAGAACATGGAAGATCTGCACCGGCACATCTTCTGGGAGCCTGACGCTTCTA
AGCTGAACGAGAACTACTGTAGGAACCCAGACGACGATGCCACGGTCCCTGGTGCTAC
ACCGGCAACCCGCTGATCCCTTGGGACTATTGTCCTATCAGCCGCTGCGAGGGCGATACA
ACACCTACCATCGTGAACCTGGACCACCCTGTGATCTCTTGCGCCAAGACCAAGCAGCT
40 GAGAGTGGTGAACGGCATCCCAACACGGACCAACATCGGATGGATGGTCTCCCTGAGAT
ACCGGAACAAGCACATCTGCGGCGGCTCTCTGATCAAGGAATCTTGGGTCTGACCGCC
AGACAGTGCTTCCCCAGCCGGGACCTGAAGGACTATGAGGCCTGGCTGGGAATCCACGA
CGTGACGGCAGAGGCGACGAGAAGTGCAAGCAAGTGCTGAACGTGTCCAGCTGGTG
TACGGCCCTGAGGGATCTGATCTGGTCTGATGAAACTGGCCAGACCCGCCGTGCTGGA
45 CGACTTTGTGTCCACCATCGACCTGCCTAACTACGGCTGCACCATCCCTGAAAAGACCAG
CTGCAGCGTGTACGGCTGGGGCTATACAGGCCTGATCAACTACGACGGTCTGCTGCGGGT

TGCTCACCTGTACATCATGGGCAACGAGAAGTGCAGCCAGCACCACAGAGGAAAGGTTA
CACTTAACGAGAGCGAGATCTGCGCCGGCGCCGAGAAAATCGGCTCCGGCCCTTGTGAA
GGCGACTACGGAGGCCCTCTGGTGTGCGAACAGCACAAGATGAGAATGGTGCTGGGCGT
GATCGTGCCCGGAAGAGGCTGTGCAATCCCTAATAGGCCCGGCATTTTCGTGCGGGTGGC
5 CTACTACGCCAAGTGGATCCACAAGATCATCCTGACGTACAAGGTGCCTCAGAGCTGA

SEQ ID NO:111

>hHGF 密码子优化序列 2(hHGF-OS2)

ATGTGGGTCACCAAAGTCTGCCCCGCCCTGCTGCTGCAGCACGTGCTCCTGCACCTGCT
GCTGCTGCCTATCGCCATCCCTTACGCCGAAGGCCAGAGAAAGCGGAGAAATACCATTCA
10 CGAATTTAAGAAGAGCGCCAAGACCACACTGATCAAGATCGACCCTGCCCTGAAAATCA
AGACCAAGAAAGTGAACACAGCCGACCAATGCGCTAATAGATGCACAAGAAACAAAGG
CCTGCCTTTCACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGATAAGGCCAGAAAGCAGTGCCTGTGGTT
CCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAAGAATTTCGGTCACGAGTTCGACCTGT
ACGAGAATAAGGACTACATTAGAAACTGCATCATCGGCAAGGGCCGGAGCTACAAGGGC
15 ACCGTGAGCATCACCAAGTCTGGCATCAAGTGCCAGCCATGGAGTTCATGATCCCTCAT
GAGCACAGCTTCTGCCAAGCTCTTACCGGGGAAAGGATCTGCAGGAGAACTATTGTAG
AAATCCCAGAGGCGAGGAAGGAGGACCCTGGTGTTCCTACCAGCAACCCAGAGGTGCGG
TACGAGGTGTGCGACATACCCAGTGCAGCGAGGTGGAATGCATGACATGCAACGGCGA
GAGCTACCGGGGCTGATGGACCACACAGAGAGCGGCAAAATCTGCCAAAGATGGGATC
20 ACCAGACCCCTCATAGGCACAAGTTCCTGCCCGAGAGATAACCTGACAAGGGCTTCGAC
GACAATTACTGCCGGAACCCCTGATGGACAGCCTAGACCTTGGTGCTACACCCTGGACCCT
CACACCAGATGGGAATACTGCGCCATCAAGACATGTGCCGATAACACCATGAACGACAC
CGATGTGCCACTCGAGACAACTGAGTGTATCCAGGGCCAGGGCGAGGGCTACAGGGGC
ACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATCCCTTGTTCAGCGGTGGGACAGCCAATACCCCCA
25 CGAACATGATATGACCCCAGAAAACCTTCAAGTGCAAAAGATCTGCGGGAAAACTACTGTA
GAAACCCTGACGGCTCCGAGAGCCCTTGGTGCTTCACCACCGACCCTAACATCAGGGTG
GGCTACTGTAGCCAGATCCCCAACTGCGACATGAGCCACGGTCAGGACTGCTACAGAGG
AAACGGCAAGAATTACATGGGCAACCTGAGCCAGACCAGAAGCGGCCTGACCTGCAGC
ATGTGGGACAAAAACATGGAAGATCTGCACCGGCACATCTTTTGGGAGCCTGACGCCAG
30 CAAGCTGAATGAGAACTACTGTGGAACCCCTGACGACGATGCTCACGGCCCTTGGTGCT
ACACAGGCAACCCCTCTGATCCCTTGGGACTATTGTCCTATTAGCAGGTGTGAAGGCGACA
CGACCCCTACAATCGTGAACCTGGATCACCCAGTGATCAGCTGTGCTAAACAAAGCAA
CTGAGAGTGGTGAATGGTATCCCGACCCGGACCAACATCGGATGGATGGTCAGCCTGCG
GTACAGAAACAAGCACATCTGCGGCGGTAGCCTGATCAAGGAATCCTGGGTGTTGACAG
35 CCAGACAGTGTTCCTCCAGCAGAGATCTGAAGGACTACGAGGCCTGGCTGGGCATCCAC
GACGTGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGTGCAAGCAGGTTCTGAACGTGTCCAGCTGG
TGACGGCCCCGAGGGCTCTGATCTGGTTCTGATGAAGCTTGCTAGACCCGCTGTGCTGG
ATGACTTCGTGTCCACCATCGACCTGCCAAATTACGGATGTACAATTCCTGAAAAGACCT
CCTGTTCTGTGTACGGCTGGGGCTACACCGGACTCATCAACTATGACGGCCTGCTGAGAG
40 TGGCCACCTGTATATCATGGGCAACGAGAAGTGCAGCCAGCACCATAGAGGCAAGGTG
ACCCTGAACGAGTCTGAAATCTGCGCCGGAGCCGAGAAAATCGGATCTGGCCCTGCGA
AGGAGATTACGGCGGCCCTCTGGTCTGCGAGCAGCACAAGATGAGAATGGTGCTGGGCG
TGATCGTGCCCGCAGAGGCTGCGCCATCCCTAACCAGGCTGGAATCTTCGTGCGCGTGG
CCTATTACGCCAAATGGATCCACAAAATCATCCTGACATACAAGGTCCCACAGTCTTGA

SEQ ID NO:112

>hHGF 密码子优化序列 3(hHGF-OS3)

ATGTGGGTGACCAAGCTGCTGCCCCGCCCTGCTCCTGCAGCACGTGCTGCTGCACCTGCT
 CCTGCTGCCCATCGCCATCCCCTACGCCGAGGGGCAGAGAAAGAGAAGAAACACCATCC
 ACGAGTTCAAGAAGAGCGCCAAGACCACCCTGATCAAGATCGACCCCGCCCTGAAGATC
 AAGACCAAGAAGGTGAACACCGCCGATCAGTGCGCCAACAGATGCACAAGAAACAAGG
 5 GCCTGCCCTTCACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGACAAGGCTAGAAAGCAGTGCCTGTGG
 TTCCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAGGAGTTCGGCCACGAGTTCGACCT
 GTACGAGAAACAAGGACTACATCAGAAACTGCATCATCGGCAAGGGCAGAAGCTACAAG
 GGCACCGTGAGCATCACCAAGAGCGGCATCAAGTGTGAGCCCTGGAGCAGCATGATCCC
 CCATGAGCACAGCTTCCTGCCTAGCAGCTACAGAGGGAAGGACCTGCAAGAGAACTACT
 10 GCAGAAACCCTAGAGGCGAGGAGGGCGGCCCTTGGTGTTTCACAAGCAATCCCGAGGT
 GAGATACGAGGTGTGCGACATCCCTCAGTGCAGCGAGGTGGAGTGCATGACCTGCAACG
 GCGAAAGCTATAGAGGCCCTGATGGACCACACCGAGAGCGGCAAGATTTGTCAGCGGTGG
 GATCACCAAACCCCCACAGACACAAGTTCTTGCCCGAGAGATACCCCGACAAGGGCTT
 CGACGACAATTACTGTAGAAACCCCGACGGGCAGCCTAGACCCTGGTGTTACACCCTGG
 15 ACCCCACACAAGATGGGAGTACTGCGCCATCAAGACCTGCGCCGACAACACCATGAAC
 GACACCGACGTGCCCTGGAGACCACCGAGTGCATCCAAGGCCAAGGCGAGGGCTACA
 GAGGCACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATTCCCTGTCAGAGATGGGACAGCCAATAC
 CCCCATGAACACGATATGACCCCGAGAAGTTCAAGTGAAGGACCTGAGAGAGAACTA
 CTGCCGGAACCCCGATGGCAGCGAATCCCCTTGGTGCTTACCACCGACCCCAACATCA
 20 GAGTGGGCTACTGCAGCCAAATCCCCAACTGCGACATGAGCCACGGCCAAGACTGTTAC
 AGAGGGAACGGCAAGAACTACATGGGCAACCTGAGCCAAACAAGAAGCGGCCTGACCT
 GCAGCATGTGGGACAAGAACATGGAGGACCTGCACAGACACATCTTCTGGGAGCCCGA
 CGCTAGCAAGCTGAACGAGAACTACTGTGGAACCCCGACGACGATGCCACGGCCCCT
 GGTGCTACACCGGAACCCCTGATCCCCTGGGACTACTGCCCCATCAGCAGATGCGAG
 25 GGCAGACACACCCCAACCATCGTGAACCTGGACCACCCCGTATCAGCTGTGCCAAGAC
 CAAGCAACTGAGAGTGGTGAACGGCATCCCCACAAGAACCAACATTGGCTGGATGGTG
 AGCCTGAGATACAGAAACAAGCACATCTGCGGCGGCAGCCTGATCAAGGAGAGCTGGG
 TGCTGACCGCTAGACAGTGCTTCCCTAGCAGAGACCTGAAGGACTACGAGGCCTGGCTG
 GGCATCCACGACGTGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGTGTAACAAGTGTGAACGTGA
 30 GCCAACTGGTGTACGGCCCCGAGGGCAGCGACCTGGTGCTGATGAAGCTGGCTAGACCC
 GCCGTGCTGGACGACTTCGTGAGCACCATCGACCTGCCCAACTACGGCTGCACCATCCC
 CGAGAAGACAAGCTGCAGCGTGACGGCTGGGGCTACACCGGCCTGATCAACTACGACG
 GCCTGCTGAGAGTGGCCACCTGTACATCATGGGCAACGAGAAGTGCAGCCAACACCAC
 CGGGGCAAAGTGACCTGAACGAGAGCGAGATCTGCGCCGGGGCTGAGAAAATCGGCA
 35 GCGGCCCTGCGAGGGGGACTACGGGGGCCCCCTGGTGTGCGAGCAGCACAAGATGAG
 AATGGTGCTGGGCGTGATCGTGCCCGGCAGAGGCTGCGCCATCCCCAACAGACCCGGCA
 TCTTCGTGAGAGTGGCCTACTACGCCAAGTGGATCCACAAGATCATCCTGACCTACAAGG
 TGCCTCAGAGCTGA

SEQ ID NO:113

40 >5'UTR-hHGF- α 球蛋白 3'UTR-A30L70 (Mod.-hHGF-OS2)
 GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCGCTAGCCTTA
 AGGCCACCATGTGGGTCACCAAAGTCTGCCCCGCCCTGCTGCTGCAGCACGTGCTCCTG
 CACCTGCTGCTGCTGCCTATCGCCATCCCTTACGCCGAAGGCCAGAGAAAGCGGAGAA
 ATACCATTACGAATTTAAGAAGAGCGCCAAGACCACACTGATCAAGATCGACCCTGC
 45 CCTGAAAATCAAGACCAAGAAAGTGAACACAGCCGACCAATGCGCTAATAGATGCACA
 AGAAACAAAGGCCTGCCTTTCACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGATAAGGCCAGAAAGC

AGTGCCTGTGGTTCCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAAGAATTCGGTCAC
GAGTTCGACCTGTACGAGAATAAGGACTACATTAGAAACTGCATCATCGGCAAGGGCC
GGAGCTACAAGGGCACCGTGAGCATCACCAAGTCTGGCATCAAGTGCCAGCCATGGAG
TTCCATGATCCCTCATGAGCACAGCTTCTGCCAAGCTCTTACCGGGGAAAGGATCTGC
5 AGGAGAACTATTGTAGAAATCCCAGAGGCGAGGAAGGAGGACCCTGGTGTTTTACCAG
CAACCCAGAGGTGCGGTACGAGGTGTGCGACATACCCAGTGCAGCGAGGTGGAATGC
ATGACATGCAACGGCGAGAGCTACCGGGGCCTGATGGACCACACAGAGAGCGGCAAA
ATCTGCCAAAGATGGGATCACCAGACCCCTCATAGGCACAAGTTCCTGCCCGAGAGAT
ACCCTGACAAGGGCTTCGACGACAATTACTGCCGGAACCCTGATGGACAGCCTAGACCT
10 TGGTGCTACACCCTGGACCCTCACACCAGATGGGAATACTGCGCCATCAAGACATGTGC
CGATAACACCATGAACGACACCGATGTGCCACTCGAGACAACTGAGTGTATCCAGGGC
CAGGGCGAGGGCTACAGGGGCACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATCCCTTGTACGC
GGTGGGACAGCCAATACCCCCACGAACATGATATGACCCCAGAAAACCTCAAGTGCAA
AGATCTGCGGGAAAACTACTGTAGAAACCCTGACGGCTCCGAGAGCCCTTGGTGCTTCA
15 CCACCGACCCTAACATCAGGGTGGGCTACTGTAGCCAGATCCCCAACTGCGACATGAGC
CACGGTCAGGACTGCTACAGAGGAAACGGCAAGAATTACATGGGCAACCTGAGCCAGA
CCAGAAGCGGCCTGACCTGCAGCATGTGGGACAAAAACATGGAAGATCTGCACCGGCA
CATCTTTTGGGAGCCTGACGCCAGCAAGCTGAATGAGAACTACTGTGCGGAACCCTGACG
ACGATGCTCACGGCCCTTGGTGCTACACAGGCAACCCTCTGATCCCTTGGGACTATTGT
20 CCTATTAGCAGGTGTGAAGGCGACACGACCCCTACAATCGTGAACCTGGATCACCCAGT
GATCAGCTGTGCTAAAACAAAGCAACTGAGAGTGGTGAATGGTATCCCGACCCGGACC
AACATCGGATGGATGGTCAGCCTGCGGTACAGAAACAAGCACATCTGCGGCGGTAGCC
TGATCAAGGAATCCTGGGTGTTGACAGCCAGACAGTGTTTTCCCAGCAGAGATCTGAAG
GACTACGAGGCCTGGCTGGGCATCCACGACGTGCACGGCAGAGGCGACGAGAAAGTGCA
25 AGCAGGTTCTGAACGTGTCCAGCTGGTGTACGGCCCCGAGGGCTCTGATCTGGTTCTG
ATGAAGCTTGCTAGACCCGCTGTGCTGGATGACTTCGTGTCCACCATCGACCTGCCAAA
TTACGGATGTACAATTCCTGAAAAGACCTCCTGTTCTGTGTACGGCTGGGGCTACACCG
GACTCATCAACTATGACGGCCTGCTGAGAGTGGCCACCTGTATATCATGGGCAACGAG
AAGTGCAGCCAGCACCATAGAGGCAAGGTGACCCTGAACGAGTCTGAAATCTGCGCCG
30 GAGCCGAGAAAAATCGGATCTGGCCCCCTGCGAAGGAGATTACGGCGGCCCTCTGGTCTG
CGAGCAGCACAAAGATGAGAATGGTGCTGGGCGTGATCGTGCCCGGCAGAGGCTGCGCC
ATCCCTAACCGGCCTGGAATCTTCGTGCGCGTGGCCTATTACGCCAAATGGATCCACAA
AATCATCCTGACATACAAGGTCCCACAGTCTTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCA
TGCTTCTTGCCCCCTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCCTCCTGCACCCGTACCCCC
35 GTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCCTCGAGCCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAGTTTAAACATTAAATTC
TAGA

SEQ ID NO:114

40 >ACTG1 5'UTR-hHGF-CTSB 3'UTR-A30L70 (A1B12-hHGF-OS2)
CTCTCGCACTCTGTTCTTCCGCCGCTCCGCCGTGCGGTTTCTCTGCCGGTGCAGCTAGC
GCCACCATGTGGGTACCAAACCTGCTGCCCGCCCTGCTGCTGCAGCACGTGCTCCTGCA
CCTGTGCTGCTGCCTATCGCCATCCCTTACGCCGAAGGCCAGAGAAAGCGGAGAAATA
CCATTACGAATTTAAGAAGAGCGCCAAGACCACACTGATCAAGATCGACCCTGCCCTG
45 AAAATCAAGACCAAGAAAGTGAACACAGCCGACCAATGCGCTAATAGATGCACAAGA
AACAAAGGCCTGCCTTTCACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGATAAGGCCAGAAAGCAGTG
CCTGTGGTTCCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAAGAATTCGGTCACGAGT

TCGACCTGTACGAGAATAAGGACTACATTAGAACTGCATCATCGGCAAGGGCCGGAG
CTACAAGGGCACCGTGAGCATCACCAAGTCTGGCATCAAGTGCCAGCCATGGAGTTCC
ATGATCCCTCATGAGCACAGCTTCCTGCCAAGCTCTTACCGGGGAAAGGATCTGCAGGA
GAACTATTGTAGAAATCCCAGAGGCGAGGAAGGAGGACCCTGGTGTTTTACCAGCAAC
5 CCAGAGGTGCGGTACGAGGTGTGCGACATACCCAGTGCAGCGAGGTGGAATGCATGA
CATGCAACGGCGAGAGCTACCGGGGCCTGATGGACCACACAGAGAGCGGCAAAATCTG
CCAAAGATGGGATCACCAGACCCCTCATAGGCACAAGTTCCTGCCCCGAGAGATACCCT
GACAAGGGCTTCGACGACAATTACTGCCGGAACCCTGATGGACAGCCTAGACCTTGGT
GCTACACCCTGGACCCTCACACCAGATGGGAATACTGCGCCATCAAGACATGTGCCGAT
10 AACACCATGAACGACACCGATGTGCCACTCGAGACAACTGAGTGTATCCAGGGCCAGG
GCGAGGGCTACAGGGGCACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATCCCTTGTGAGCGGTG
GGACAGCCAATACCCCCACGAACATGATATGACCCCAGAAAACTTCAAGTGCAAAAGAT
CTGCGGGAAAACTACTGTAGAAACCCTGACGGCTCCGAGAGCCCTTGGTGCTTACCAC
CGACCCTAACATCAGGGTGGGCTACTGTAGCCAGATCCCCAACTGCGACATGAGCCAC
15 GGTGAGGACTGCTACAGAGGAAACGGCAAGAATTACATGGGCAACCTGAGCCAGACCA
GAAGCGGCCTGACCTGCAGCATGTGGGACAAAAACATGGAAGATCTGCACCGGCACAT
CTTTTGGGAGCCTGACGCCAGCAAGCTGAATGAGAACTACTGTGCGGAACCCTGACGAC
GATGCTCACGGCCCTTGGTGCTACACAGGCAACCCTCTGATCCCTTGGGACTATTGTCTT
ATTAGCAGGTGTGAAGGCGACACGACCCCTACAATCGTGAACCTGGATCACCCAGTGA
20 TCAGCTGTGCTAAAACAAAGCAACTGAGAGTGGTGAATGGTATCCCGACCCGGACCAA
CATCGGATGGATGGTCAGCCTGCGGTACAGAAACAAGCACATCTGCGGCGGTAGCCTG
ATCAAGGAATCCTGGGTGTTGACAGCCAGACAGTGTTTTCCAGCAGAGATCTGAAGG
ACTACGAGGCCTGGCTGGGCATCCACGACGTGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGTGCAA
GCAGGTTCTGAACGTGTCCCAGCTGGTGTACGGCCCCGAGGGCTCTGATCTGGTTCTGA
25 TGAAGCTTGCTAGACCCGCTGTGCTGGATGACTTCGTGTCCACCATCGACCTGCCAAAT
TACGGATGTACAATTCCTGAAAAGACCTCCTGTTCTGTGTACGGCTGGGGCTACACCGG
ACTCATCAACTATGACGGCCTGCTGAGAGTGGCCACCTGTATATCATGGGCAACGAGA
AGTGCAGCCAGCACCATAGAGGCAAGGTGACCCTGAACGAGTCTGAAATCTGCGCCGG
AGCCGAGAAAAATCGGATCTGGCCCTGCGAAGGAGATTACGGCGGCCCTCTGGTCTGC
30 GAGCAGCACAAGATGAGAATGGTGTGGGCGTGATCGTGCCCGGCAGAGGCTGCGCCA
TCCCTAACCGGCCTGGAATCTTCGTGCGCGTGGCCTATTACGCCAAATGGATCCACAAA
ATCATCCTGACATACAAGGTCCCACAGTCTTGATAAGGGCCCACCGTTCTGCCGTGGG
CCTGTCGTGCCAGTCTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCCTGGAACATGCATGTTT
TTGCGACTCTTGGGACTTCATCTTAACCTCTCGCTGCCCCAGCCATGTTTTCAACCATGG
35 CATCCCTCCCCCAATTAGTTCCTGTATCCTCGTCAACCTTCTCTGTAAGTGCCTGGTA
AGCTTGCCCTTGCTTAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTACCGCGGAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTTAAACATTTA
AATTCTAGA

40

SEQ ID NO:115

>CHCHD10 5'UTR-hHGF-CTSB 3'UTR-A30L70 (A15B12-hHGF-OS2)
GGCATTGTCCCCGCGACAGCACCGCTGCCGCCGTCTCTAAGGTCGCCCCGGTCCCACC
GCCGCCACCGCTAGCGCCACCATGTGGGTACCAAACCTGCTGCCCCGCCCTGCTGCTGCA
GCACGTGCTCCTGCACCTGCTGCTGCTGCCTATCGCCATCCCTTACGCCGAAGGCCAGA
45 GAAAGCGGAGAAATACCATTCACGAATTTAAGAAGAGCGCCAAGACCACACTGATCAA
GATCGACCCTGCCCTGAAAATCAAGACCAAGAAAGTGAACACAGCCGACCAATGCGCT
AATAGATGCACAAGAAACAAAGGCCTGCCTTTCACCTGCAAGGCCTTCGTGTTCGATAA

GGCCAGAAAGCAGTGCCTGTGGTTCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAA
GAATTCGGTCACGAGTTCGACCTGTACGAGAATAAGGACTACATTAGAAACTGCATCAT
CGGCAAGGGCCGGAGCTACAAGGGCACCGTGAGCATACCAAGTCTGGCATCAAGTGC
CAGCCATGGAGTTCCATGATCCCTCATGAGCACAGCTTCCTGCCAAGCTCTTACCGGGG
5 AAAGGATCTGCAGGAGAACTATTGTAGAAATCCCAGAGGCGAGGAAGGAGGACCCTGG
TGTTTTACCAGCAACCCAGAGGTGCGGTACGAGGTGTGCGACATAACCCAGTGCAGCG
AGGTGGAATGCATGACATGCAACGGCGAGAGCTACCGGGGCCTGATGGACCACACAGA
GAGCGGCAAAATCTGCCAAAGATGGGATCACCAGACCCCTCATAGGCACAAGTTCCCTG
CCCGAGAGATAACCTGACAAGGGCTTCGACGACAATTACTGCCGGAACCCCTGATGGAC
10 AGCCTAGACCTTGGTGCTACACCCTGGACCCTCACACCAGATGGGAATACTGCGCCATC
AAGACATGTGCCGATAACACCATGAACGACACCGATGTGCCACTCGAGACAACCTGAGT
GTATCCAGGGCCAGGGCGAGGGCTACAGGGGCACCGTGAACACCATCTGGAACGGCAT
CCCTTGTGACGCGGTGGGACAGCCAATACCCCCACGAACATGATATGACCCCAAGAAAAC
TTCAAGTGCAAAGATCTGCGGGAAAACCTACTGTAGAAAACCTGACGGCTCCGAGAGCC
15 CTTGGTGCTTCACACCGACCCTAACATCAGGGTGGGCTACTGTAGCCAGATCCCCAAC
TGCGACATGAGCCACGGTCAGGACTGCTACAGAGGAAACGGCAAGAATTACATGGGCA
ACCTGAGCCAGACCAGAAGCGGCCTGACCTGCAGCATGTGGGACAAAAACATGGAAGA
TCTGCACCGGCACATCTTTTGGGAGCCTGACGCCAGCAAGCTGAATGAGAACTACTGTC
GGAACCCCTGACGACGATGCTCACGGCCCTTGGTGCTACACAGGCAACCCCTCTGATCCCT
20 TGGGACTATTGTCTATTAGCAGGTGTGAAGGCGACACGACCCCTACAATCGTGAACCT
GGATCACCCAGTGATCAGCTGTGCTAAAACAAAGCAACTGAGAGTGGTGAATGGTATC
CCGACCCCGACCAACATCGGATGGATGGTCAGCCTGCGGTACAGAAACAAGCACATCT
GCGGCGGTAGCCTGATCAAGGAATCCTGGGTGTTGACAGCCAGACAGTGTTCCTCCAGC
AGAGATCTGAAGGACTACGAGGCCTGGCTGGGCATCCACGACGTGCACGGCAGAGGCG
25 ACGAGAAAGTGCAAGCAGGTTCTGAACGTGTCCCAGCTGGTGTACGGCCCCGAGGGCTC
TGATCTGGTTCTGATGAAGCTTGCTAGACCCGCTGTGCTGGATGACTTCGTGTCCACCAT
CGACCTGCCAAATTACGGATGTACAATTCCTGAAAAGACCTCCTGTTCTGTGTACGGCT
GGGGCTACACCGGACTCATCAACTATGACGGCCTGCTGAGAGTGGCCACCTGTATATC
ATGGGCAACGAGAAGTGCAGCCAGCACCATAGAGGCAAGGTGACCCTGAACGAGTCTG
30 AAATCTGCGCCGGAGCCGAGAAAATCGGATCTGGCCCTGCGAAGGAGATTACGGCGG
CCCTCTGGTCTGCGAGCAGCACAAGATGAGAATGGTGCTGGGCGTGATCGTGCCCGGC
AGAGGCTGCGCCATCCCTAACCGGCCTGGAATCTTCGTGCGCGTGGCCTATTACGCCAA
ATGGATCCACAAAATCATCCTGACATACAAGGTCCCACAGTCTTGATAAGGGCCCACCG
GTTCTGCCGTGGGCCTGTCGTGCCAGTCTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCCCTG
35 GAACTGCATGTTCTTGCGACTCTTGGGACTTCATCTTAACTTCTCGCTGCCCCAGCCATG
TTTTCAACCATGGCATCCCTCCCCAATTAGTTCCCTGTCATCCTCGTCAACCTTCTCTGT
AAGTGCCTGGTAAGCTTGCCCTTGCTTAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTACCGCG
GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAG
40 TTAAACATTTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:116

>PD-1 抗体重链氨基酸序列

MEWSWVFLFSLVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAP
GKGLEWVATISGGGANTYYPDVSKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLY
45 YFDYWQGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPP

CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTT
 LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
 DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

5

SEQ ID NO:117

>PD-1 抗体轻链氨基酸序列

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCLASQTIGTWLTWYQQKPG
 KAPKLLIYTATSLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGGTKV
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

SEQ ID NO:118

>PD-1 抗体重链 DNA 序列

ATGGAATGGTCTGCGGTGTTCTTCTCCTGTCCGTGACCACCGCGTGCCTCCGAA
 GTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTC
 15 TTGTGCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACATGATGAGCTGGGTGCGACAGGCCC
 CTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCCACAATCTCTGGCGGAGGCGCCAACACCTACTA
 CCCCAGCTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGACAACGCCAAGAATCCCTGT
 ACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCGCA
 GCTGTACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTGCTTCTA
 20 CCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCCACCG
 CTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAC
 TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCAGCAGTGCTGCAGTCTCCGGCCCTG
 TACTCCCTGTCTCCGTCTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACC
 TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGAATCTAAGT
 25 ACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGTCTGCCCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCTGTGTTTC
 TGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGC
 GTGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG
 GCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTA
 CCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC
 30 AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCTGCCCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGG
 CCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGAT
 GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCG
 CCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGT
 GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAAGTCCCGGTG
 35 GCAGGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC
 ACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGAAAG

SEQ ID NO:119

>PD-1 抗体轻链 DNA 序列

ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATG
 40 CGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGA
 CCATCACCTGTCTGGCCTCCAGACCATCGGCACCTGGCTGACCTGGTATCAGCAGAAG
 CCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACACCGCCACCAGTCTGGCCGATGGCGTGCC
 CTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCA
 GCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTGTACTCCATCCCCTGGACCTTTG
 45 GCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTC
 CCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCAGTGTCTGCTGCTGAACAA

CTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGC
AACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTC
CACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTG
ACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGC

5

SEQ ID NO:120

>PD-1 抗体重链 mRNA 序列

AUGGAAUGGUCCUGGGUGUUCUGUUCUUCUGUCCGUGACCACCGGCGUGCACUCC
GAAGUGCAGCUGGUGGAAUCUGGCGGCGGACUGGUGCAGCCUGGCGGAUCUCUGAG
ACUGUCUUGUGCCGCCUCCGGCUUCACCUUCUCCAGCUACAUGAUGAGCUGGGUGCG
10 ACAGGCCCCUGGCAAGGGACUGGAAUGGGUGGCCACAAUCUCUGGCGGAGGCGCCAA
CACCUACUACCCCGACUCUGUGAAGGGCCGGUUCACCAUCUCUCGGGACAACGCCAA
GAACUCCUGUACCUGCAGAUGAACAGCCUGCGGGCCGAGGACACCGCCGUGUACUA
CUGUGCCCCGGCAGCUGUACUACUUCGACUACUGGGGCCAGGGCACCACCGUGACCGU
GUCCUCUGCUUCUACCAAGGGCCCCUCCGUGUUCUCCUCUGGCUCUUGCUCACAGAUC
15 CACCUCCGAGUCCACCGCUGCUCUGGGCUGCCUCGUGAAGGACUACUUCUCCCGAGCC
UGUGACAGUGUCCUGGAACUCUGGCGCCUGACCUCUGGCGUGCACACCUUUCAGC
AGUGCUGCAGUCCUCCGGCCUGUACUCCUGUCCUCCGUCGUGACAGUGCCCUCCAG
CUCUCUGGGCACCAAGACCUACACCUUGUAACGUGGACCACAAGCCUCCAACACCAA
GGUGGACAAGAGAGUGGAAUCUAAGUACGGCCCCUCCUGCCCCCUUGUCCUGCCCC
20 UGAAUUUCUGGGCGGACCCUCUGUGUUUCUGUUCUCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCU
GAUGAUCUCCCGGACCCCCGAAGUGACCUGCGUGGUGGUGGAUGUGUCCAGGAAGA
UCCCGAGGUGCAGUUCAAUUGGUACGUGGACGGCGUGGAAGUGCACAAGCCAAGAC
CAAGCCUAGAGAGGAACAGUUAACUCCACCUACCGGGUGGUGUCCGUGCUGACCGU
GCUGCAUCAGGACUGGCUGAACGGCAAAGAGUACAAGUGCAAGGUGUCCAACAAGG
25 GCCUGCCCAGCUCCAUCGAAAAGACCAUCUCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAAC
CCCAGGUGUACACACUGCCUCCAAGCCAGGAAGAGAUGACCAAGAACCAGGUGUCCC
UGACCUGCCUCGUGAAAGGCUUCUACCCUCCGAUAUCGCCGUGGAAUGGGAGUCCA
ACGGCCAGCCUGAGAACAACUACAAGACCACCCCCCUGUGCUGGACUCCGACGGCU
CCUUCUUUCUGUACUCUCGCCUGACCGUGGACAAGUCCCGGUGGCAGGAAGGCAACG
30 UGUUCUCCUGCAGCGUGAUGCACGAGGCCUUGCACAACCACUACACCCAGAAGUCC
UGUCCUGUCUCUGGGAAAG

SEQ ID NO:121

>PD-1 抗体轻链 mRNA 序列

AUGUCCGUGCCUACCCAGGUGCUGGGACUGCUGCUGCUGUGGCUGACCGACGCCAGA
35 UGCGACAUCAGAUAGACCCAGUCCCCUCCAGCCUGUCUGCCUCUGUGGGCGACAGA
GUGACCAUACCCUGUCUGGCCUCCAGACCAUCGGCACCUGGCUGACCUGGUAUCAG
CAGAAGCCUGGCAAGGCCCCCAAGCUGCUGAUCUACACCGCCACCAGUCUGGCCGAU
GGCGUGCCCUCUAGAUUCUCCGGCUCUGGCUCUGGCACCGACUUUACCCUGACCAUC
AGCUCUCCUGCAGCCCAGGACUUCGCCACCUACUACUGCCAGCAGGUGUACUCCAUC
40 CCCUGGACCUUUGGCGGAGGCACCAAGGUGGAAAUCAAGCGGACCGUGGCCGCUCCC
UCCGUGUUAUCUUCUCCACCUUCCGACGAGCAGCUGAAGUCCGGAACCGCCAGUGUC
GUGUGCCUGCUGAACAACUUCUACCCCCGCGAGGCCAAGGUGCAGUGGAAGGUGGAC
AACGCCUGCAGUCCGGCAACUCCAGGAUCCGUGACCGAGCAGGACUCCAAGGAC
AGCACCUACUCCUUGUCCUCCACCCUGACCCUGUCCAAGGCCGACUACGAGAAGCAC
45 AAGGUGUACGCCUGCGAAGUGACCCACCAGGGCCUGUCUAGCCCCGUGACCAAGUCU
UUCAACCGGGGCGAGUGC

SEQ ID NO:122

>5'UTR-anti PD-1- α 球蛋白 3'UTR-A30L70 (Mod.- anti PD-1)

GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAATGGT
CCTGGGTGTTCTTCTTCTTCTGTCCTGTCCGTGACCACCGCGTGCCTCCGAAGTGCAGCTGG
5 TGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCC
TCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACATGATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGCAAGGG
ACTGGAATGGGTGGCCACAATCTCTGGCGGAGGCGCCAACACCTACTACCCCGACTCTG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATG
AACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCGGCAGCTGTACTACTT
10 CGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGCCCCCT
CCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCCACCGCTGCTCTGGGCT
GCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCCTG
ACCTCTGGCGTGCACACCTTTCAGCAGTGTCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC
TCCGTCGTGACAGTGCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGA
15 CCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGAATCTAAGTACGGCCCTCCC
TGCCCCCTTGTCTGCCCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCTGTGTTTCTGTTCCCCCA
AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG
ATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT
GCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTG
20 TCCGTGCTGACCGTGTCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGG
TGTCACAACAAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCA
GCCCCGGGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAAC
CAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATG
GGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAATAAGACCAACCCCCCTGTGCTGGACTCC
25 GACGGCTCCTTCTTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGG
CAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT
CCCTGTCCCTGTCTCTGGGAAAGGCCACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCGGCGAC
GTGGAGGAGAACCCCGGCCCATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCT
GTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTG
30 CCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTGGCCTCCCAGACCATCGGCACCTGG
CTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACACCGCCAC
CAGTCTGGCCGATGGCGTGGCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTTAC
CCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTGT
ACTCCATCCCCTGGACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGC
35 CGTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCA
GTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG
GACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGG
ACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
AAGGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTT
40 CAACCGGGGCGAGTGCTGATAAGGGCCCACCGTTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTG
GCCATGCTTCTTGGCCCTTGGGCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCTTCTGACCCGTAC
CCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCCTCGAGCCGCGGAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AATTATTGTTTAAACA
45 TTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:123

>ACTG1 5'UTR- anti PD-1-CTSB 3'UTR-A30L70 (A1B12- anti PD-1)
CTCTCGCACTCTGTTCTTCCGCCGCTCCGCCGTGCGGTTTCTCTGCCGGTTCGCACCA
TGGAATGGTCCTGGGTGTTCTTCTTCTGTCCTGTGACCAACCGGCGTGCACCTCCGAAG
TGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCT
5 TGTGCCGCCCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACATGATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCC
TGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCCACAATCTCTGGCGGAGGCGCCAACACCTACTAC
CCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA
CCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCGGCAG
CTGTACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTGCTTCTACC
10 AAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCCACCGCT
GCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTC
TGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTTCAGCAGTGTGACAGTCTCCGGCCTGT
ACTCCCTGTCTCCGTCTGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACCT
GTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAATCTAAGTA
15 CGGCCCTCCCTGCCCCCTTGTCTGCCCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCTGTGTTTCT
GTTCCCCCAAAGGCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC
GTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACC
GGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAA
20 GTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCC
AAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGA
CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCC
GTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGC
25 AGGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGAAAGGCCACCAACTTCTCCCTGTGAAGCAGG
CCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACT
GCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCA
GCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTGGCCTCCAGACCATC
30 GGCACCTGGCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTA
CACCGCCACCAGTCTGGCCGATGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCA
CCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC
CAGCAGGTGTACTCCATCCCCTGGACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGC
GGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCC
35 GGAACCGCCAGTGTCTGTGCTGTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTA
CGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTG
ACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGCTGATAAGGGCCACCGGTCTGCCGTGGGCCTG
40 TCGTGCCAGTCTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCTGGAACCTGCATGTTCTTGC
GACTCTTGGGACTTCATCTTAACCTTCTCGCTGCCCCAGCCATGTTTTCAACCATGGCATC
CCTCCCCCAATTAGTTCCTGTCTCCTCGTCAACCTTCTCTGTAAGTGCCTGGTAAGCT
TGCCCTTGCTTAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTACTCGAGCCGCGGAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
45 AAATTATTGTTTAA
CATTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:124

SEQ ID NO:125

>萤火虫荧光素酶核苷酸序列(Firefly Luciferase, Fluc)

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATG
GAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAAC
AATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAA
5 TGTCGGTTCGGTTGGCAGAAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATC
GTCGTATGCAGTGAAAACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATC
GGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTAT
GGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTGCAAAAAATTTTGA
ACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGAT
10 TACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTCTGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAAT
GAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAA
CTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAAGTGCCTGCGT
GAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGA
TTTTAAGTGTGTTCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGAT
15 ATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCC
TTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCA
AAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGC
GCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTAT
CAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGG
20 GATGATAAACC GGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGA
TCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGT
CCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAA
GGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCA
TCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAA
25 TTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTGCGAGGTCTTCCC
GACGATGACGCCCGGTGAACCTCCCGCCGCCGTTGTGTGTTTGGAGCACGGAAAGACGAT
GACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTG
CGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACG
CAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGT
30 AA

SEQ ID NO:126

>HGF-OS2 表达载体 CHCHD10 5'UTR- hHGF-CTSB 3'UTR-A30L70(A16B12-HGF-OS2)
CCGCTGCCGCCGTCTCTAAGGTCGCCCGGGTCCACCCGCCGCCACCGCTAGCGCCACCA
TGTTGGGTACCAAACCTGCTGCCCCGCCCTGCTGCTGCAGCACGTGCTCCTGCACCTGCTG
35 CTGCTGCCTATCGCCATCCCTTACGCCGAAGGCCAGAGAAAGCGGAGAAATACCATTCA
CGAATTTAAGAAGAGCGCCAAGACCACACTGATCAAGATCGACCCTGCCCTGAAAATC
AAGACCAAGAAAGTGAACACAGCCGACCAATGCGCTAATAGATGCACAAGAAACAAA
GGCCTGCCTTTACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGATAAGGCCAGAAAGCAGTGCCTGTG
GTTCCCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAAGAATTCGGTCACGAGTTCGAC
40 CTGTACGAGAATAAGGACTACATTAGAAACTGCATCATCGGCAAGGGCCGGAGCTACA
AGGGCACCGTGAGCATCACCAAGTCTGGCATCAAGTGCCAGCCATGGAGTTCCATGATC
CCTCATGAGCACAGCTTCTGCCAAGCTCTTACCGGGGAAAGGATCTGCAGGAGAACTA
TTGTAGAAATCCCAGAGGGCGAGGAAGGAGGACCCTGGTGTGTTTACCAGCAACCCAGAG
GTGCGGTACGAGGTGTGCGACATACCCCAGTGCAGCGAGGTGGAATGCATGACATGCA
45 ACGGCGAGAGCTACCGGGGCTGATGGACCACACAGAGAGCGGCAAAATCTGCCAAAG
ATGGGATCACCAGACCCCTCATAGGCACAAGTTCCTGCCCAGAGATACCCTGACAAG

GGCTTCGACGACAATTACTGCCGGAACCCTGATGGACAGCCTAGACCTTGGTGCTACAC
CCTGGACCCTCACACCAGATGGGAATACTGCGCCATCAAGACATGTGCCGATAACACC
ATGAACGACACCGATGTGCCACTCGAGACAACTGAGTGTATCCAGGGCCAGGGCGAGG
GCTACAGGGGACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATCCCTTGTGACGCGTGGGACAG
5 CCAATACCCCCACGAACATGATATGACCCAGAAAACTTCAAGTGCAAAGATCTGCGG
GAAAACTACTGTAGAAACCCTGACGGCTCCGAGAGCCCTTGGTGCTTACCACCGACCC
TAACATCAGGGTGGGCTACTGTAGCCAGATCCCCAACTGCGACATGAGCCACGGTCAG
GACTGCTACAGAGGAAACGGCAAGAATTACATGGGCAACCTGAGCCAGACCAGAAGCG
GCCTGACCTGCAGCATGTGGGACAAAAACATGGAAGATCTGCACCGGCACATCTTTTGG
10 GAGCCTGACGCCAGCAAGCTGAATGAGAACTACTGTCGGAACCCTGACGACGATGCTC
ACGGCCCTTGGTGCTACACAGGCAACCCTCTGATCCCTTGGGACTATTGTCCTATTAGC
AGGTGTGAAGGCGACACGACCCCTACAATCGTGAACCTGGATCACCCAGTGATCAGCT
GTGCTAAAACAAAGCAACTGAGAGTGGTGAATGGTATCCCGACCCGGACCAACATCGG
ATGGATGGTCAGCCTGCGGTACAGAAACAAGCACATCTGCGGCGGTAGCCTGATCAAG
15 GAATCCTGGGTGTTGACAGCCAGACAGTGTTCCTCCAGCAGAGATCTGAAGGACTACGA
GGCCTGGCTGGGCATCCACGACGTGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGTGCAAGCAGGTT
CTGAACGTGTCCAGCTGGTGTACGGCCCCGAGGGCTCTGATCTGGTTCTGATGAAGCT
TGCTAGACCCGCTGTGCTGGATGACTTCGTGTCCACCATCGACCTGCCAAATTACGGAT
GTACAATTCCTGAAAAGACCTCCTGTTCTGTGTACGGCTGGGGCTACACCGGACTCATC
20 AACTATGACGGCCTGCTGAGAGTGGCCACCTGTATATCATGGGCAACGAGAAGTGCA
GCCAGCACCATAGAGGCAAGGTGACCTGAACGAGTCTGAAATCTGCGCCGGAGCCGA
GAAAATCGGATCTGGCCCCCTGCGAAGGAGATTACGGCGGCCCTCTGGTCTGCGAGCAG
CACAAGATGAGAATGGTGTGGGCGTGATCGTGCCCGGCAGAGGCTGCGCCATCCCTA
ACCGGCCTGGAATCTTCGTGCGCGTGGCCTATTACGCCAAATGGATCCACAAAATCATC
25 CTGACATAACAAGTCCACAGTCTTGATAAGGGCCCACCGTTCTGCCGTGGGCCTGTC
GTGCCAGTCTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCCTGGAAGTGCATGTTCTTGCGA
CTCTTGGGACTTCATCTTAACTTCTCGCTGCCCCAGCCATGTTTTCAACCATGGCATCCC
TCCCCAATTAGTTCCTGTATCCTCGTCAACCTTCTCTGTAAGTGCCTGGTAAGCTTG
CCCTTGCTTAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTACCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAA
30 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAGTTTAAACATTTAAATTCT
AGA

SEQ ID NO:127

>hHGF 蛋白的 mRNA 序列

35 AUGUGGGUGACCAAACUCCUGCCAGCCCUGCUGCUGCAGCAUGUCCUCCUGCAUCUC
CUCCUGCUCCCCAUCGCCAUCCCCUAUGCAGAGGGACAAAGGAAAAGAAGAAUACA
AUUCAUGAAUUCAAAAAUCAGCAAAGACUACCCUAAUCAAUAGAUCACAGCACUG
AAGAUAAAAACCAAAAAGUGAAUACUGCAGACCAAUGUGCUAAUAGAUGUACUAG
GAAUAAAGGACUCCAUUCACUUGCAAGGCUUUUGUUUUUGAUAAAGCAAGAAAAC
40 AAUGCCUCUGGUUCCCCUCAAUAGCAUGUCAAGUGGAGUGAAAAAAGAAUUUGGC
CAUGAAUUUGACCUCUAUGAAAACAAAGACUACAUUAGAAACUGCAUCAUUGGUAA
AGGACGCAGCUACAAGGGAACAGUAUCUAUCACUAAGAGUGGCAUAAAUGUCAGCC
CUGGAGUUCUAGAUACCACACGAACACAGCUUUUUGCCUUCGAGCUAUCGGGGUAA
AGACCUACAGGAAAACUACUGUCGAAAUCCUCGAGGGGAAGAAGGGGGACCCUGGU
45 GUUUCACAAGCAAUCCAGAGGUACGCUACGAAGUCUGUGACAUUCCUCAGUGUUCAG
AAGUUGAAUGCAUGACCUGCAAUGGGGAGAGUUAUCGAGGUCUCAUGGAUCAUACA

GAAUCAGGCAAGAUUUGUCAGCGCUGGGAUCAUCAGACACCACACCGGCACAAAUUC
UUGCCUGAAAAGAUAUCCCGACAAGGGCUUUGAUGAUAAUUUUGCCGCAAUCCCGAU
GGCCAGCCGAGGCCAUGGUGCUAUACUCUUGACCCUCACACCCGCUGGGAGUACUGU
GCAAUUAACAUGCGCUGACAAUACUAUGAAUGACACUGAUGUCCUUGGAAAC
5 AACUGAAUGCAUCCAAGGUCAAGGAGAAGGCUACAGGGGCACUGUCAAUACCAUUU
GGAAUGGAAUUGCAUGUCAGCGUUGGGAUUCUCAGUAUCCUCACGAGCAUGACAUG
ACUCCUGAAAAUUUCAAGUGCAAGGACCUACGAGAAAAUUACUGCCGAAAUCCAGAU
GGGUCUGAAUACCCUGGUGUUUUACCACUGAUCCAACAACUCCGAGUUGGCUACUGC
UCCCAAAUUCCAAACUGUGAUUUGUCACAUGGACAAGAUUGUUAUCGUGGGAAUGG
10 CAAAAUUUAUUGGGCAACUUAUCCCAAACAAGAUUCUGGACUAACAUGUCAAUGU
GGGACAAGAACAUGGAAGACUUACAUCGUCAUUUCUUGGGAACCAGAUCAAGU
AAGCUGAAUGAGAAUUACUGCCGAAAUCCAGAUGAUGAUGCUCAUUGGACCCUGGUG
CUACACGGGAAAUCCACUCAUUCUUGGGAUUAUUGCCCUAUUUCUGUUGAAGG
UGAUACCACACCUACAAGUCAAUUUAGACCAUCCCGUAAUAUCUUGUGCCAAAAC
15 GAAACAAUUGCGAGUUGUAAAUGGGAUCCAACACGAACAAACAUAAGGAUGGAUGG
UUAGUUUGAGAUACAGAAAUAACAUAUCUGCGGAGGAUCAUUGAUAAAGGAGAGU
UGGGUUCUACUGCACGACAGUGUUUCCCUUCUCGAGACUUGAAAGAUUAUGAAGC
UUGGCUUGGAAUUCAUGAUGUCCACGGAAGAGGAGAUGAGAAAUGCAAACAGGUUC
UCAAGUUUCCCGCUGGUUAUUGGCCUGAAGGAUCAGAUUCUGGUUUUAUGAAG
20 CUUGCCAGGCCUGCUGUCCUGGAUGAUUUUGUUAUGUACGAUUGAUUUACCUAAUUA
UGGAUGCACAAUCCUGAAAAGACCAGUUGCAGUGUUUAUGGCUGGGGCUACACUG
GAUUGAUCAACUAUGAUGGCCUAUUACGAGUGGCACAUCUCUAUUAUAAUGGGAAAU
GAGAAUUGCAGCCAGCAUCAUCGAGGGAAGGUGACUCUGAAUGAGUCUGAAAUAUG
UGCUGGGGCGUAAAAGAUUGGAUCAGGACCAUGUGAGGGGGAUUAUGGUGGCCCCAC
25 UUGUUUGUGAGCAACAUAUAAUUGAGAAUGGUUCUUGGUGUCAUUGUUCUGGUCGU
GGAUGUGCCAUCCAAAUCGUCCUGGUUUUUUGUCCGAGUAGCAUAUUUAUGCAA
AUGGAUACACAAAUAUUUUAACAUAUAAGGUACCACAGUCAUAG

SEQ ID NO:128

30 >hHGF 密码子优化 mRNA 序列 1(hHGF-OS1)
AUGUGGGUGACCAAACUGCUCUCCCGCUCUGCUGCUGCAGCAUGUGCUGCUCCACCUG
CUGCUGCUGCCAAUCGCCAUCCCCUACGCUGAAGGACAGCGGAAGCGCAGAAACACA
AUUCACGAAUUAAGAAGUCCGCCAAAACAACACUGAUCAAGAUCGACCCUGCCUG
AAAUAUAAAACCAAGAAGGUGAACACUGCCGAUCAGUGCGCCAACAGAUGCACAAGA
35 AACAAAGGCCUGCCCUUACAUGCAAGGCCUUUGUGUUCGACAAGGCCAGAAAGCAG
UGCCUGUGGUUCCCUUUAACAGCAUGAGCUCUGGCGUGAAGAAAGAGUUCGGCCAC
GAAUUCGACCUGUACGAGAACAAGGAUUACAUCAGAAAUUGUAUCAUCGGCAAGGG
CAGAAGCUACAAAGGCACAGUGUCCAUCACCAAAGCGGCAUUAAGUGUCAGCCUUG
GAGCAGCAUGAUCCUCACGAGCACAGCUUCCUGCCUAGCUCUACAGAGGCAAGGA
40 CCUGCAGGAGAAUACUGCCGGAACCCUAGAGGCGAGGAAGGCGGCCCUUGGUGCUU
UACCAGCAACCCUGAGGUGCGGUACGAGGUGUGUGACAUCCCCAGUGCAGCGAAGU
GGAUUGCAUGACCUGUAAUGGCGAGAGCUACAGAGGCCUCAUGGACCAUACAGAGA
GCGGAAAGAUUUGUCAAAAGAUUGGAUACACAGACACCUCACAGACACAAAUCCUGC
CCGAAAGAUUCCUGACAAGGGCUUCGACGACAACUACUGCAGAAAUCCUGAUGGCC
45 AACCCAGACCUUGGUGCUACACCCUGGAUCCUCAUACCAGAUUGGAGUACUGUGCCA
UCAAGACCUGCGCUGAUAAUACCAUGAACGACACCGAUGUGCCUCUGGAAACAACCG

AGUGCAUCCAGGGACAGGGCGAAGGCUACCGGGGCACCGUGAACACCAUCUGGAACG
GCAUCCCCUGCCAGAGAUGGGACAGCCAGUACCCCCACGAACACGAUAUGACCCUG
AGAACUUAAGUGCAAGGACCUGAGAGAAAAUUACUGCAGAAACCCAGACGGAAGC
GAGUCUCCUUGGUGUUUUACCACCGACCCCAACAUCGGGUGGGUUACUGCAGCCAA
5 AUCCCCAAUUGCGACAUGAGCCACGGCCAGGACUGCUACCGGGGAAACGGCAAAAAC
UACAUGGGCAAUCUGAGCCAGACCCGGAGCGGUCUGACCUGCUCCAUGUGGGUAAG
AAUUGGAAGAUUCUGCACCGGCACAUCUUCUGGGAGCCUGACGCUUCUAAGCUGAAC
GAGAACUACUGUAGGAACCCAGACGACGAUGCCACGGUCCCUUGGUGCUACACCGGC
AACCCGUGAUUCCUUGGGACUAUUGUCCUAUCAGCCGUGCGAGGGCGAUACAACA
10 CCUACCAUCGUGAACCUGGACCACCCUGUGAUUCUUGCGCCAAGACCAAGCAGCUG
AGAGUGGUGAACGGCAUCCCAACACGGACCAACAUCGGAUGGAUGGUCUCCUGAGA
UACCGGAACAAGCACAUUCGCGCGGCUCUCUGAUCAAGGAAUCUUGGGUCCUGACC
GCCAGACAGUGCUUCCCCAGCCGGGACCUGAAGGACUAUGAGGCCUGGCUGGGAAUC
CACGACGUGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGUGCAAGCAAGUGCUGAACGUGUCCAG
15 CUGGUGUACGGCCUGAGGGAUCUGAUCUGGUCCUGAUGAAACUGGCCAGACCCGCC
GUGCUGGACGACUUUGUGUCCACCAUCGACCUGCCUAACUACGGCUGCACCAUCCCU
GAAAAGACCAGCUGCAGCGUGUACGGCUGGGGCUAUACAGGCCUGAUCAACUACGAC
GGUCUGCUGCGGUUGCUCACCUGUACAUAUGGGCAACGAGAAGUGCAGCCAGCAC
CACAGAGGAAAGGUUACACUUAACGAGAGCGAGAUUCGCGCCGGCGCCGAGAAAAUC
20 GGCUCGGGCCUUGUGAAGGCGACUACGGAGGCCUCUGGUGUGCGAACAGCACAAAG
AUGAGAAUGGUGCUGGGCGUGAUCGUGCCCGGAAGAGGCUGUGCAAUCCCUAAUAG
GCCCCGCAUUUUCGUGCGGGUGGCCUACUACGCCAAGUGGAUCCACAAGAUAUCCU
GACGUACAAGGUGCCUCAGAGCUGA

SEQ ID NO:129

25 >hHGF 密码子优化 mRNA 序列 2(hHGF-OS2)
AUGUGGGUCACCAAACUGCUGCCCCGCCUGCUGCUGCAGCACGUGCUCCUGCACCUG
CUGCUGCUGCCUAUCGCCAUCCCUUACGCCGAAGGCCAGAGAAAGCGGAGAAAUACC
AUUCACGAUUUAAGAAGAGCGCCAAGACCACACUGAUCAAGAUCGACCCUGCCCCUG
AAAUAAGACCAAGAAAGUGAACACAGCCGACCAUUGCGCUAAUAGAUGCACAAGA
30 AACAAAGGCCUGCCUUUCACCUGCAAGGCCUUCGUGUUCGAUAAGGCCAGAAAGCAG
UGCCUGUGGUUCCCCUUAACAGCAUGAGCAGCGGCGUGAAGAAAGAAUUCGGUCAC
GAGUUCGACCUGUACGAGAAUAAGGACUACAUAAGAAACUGCAUCAUCGGCAAGGG
CCGGAGCUACAAGGGCACCGUGAGCAUACCAAGUCUGGCAUCAAGUGCCAGCCAUG
GAGUCCAUGAUCCCUCAUGAGCACAGCUUCCUGCCAAGCUCUUAACGGGGAAAGGA
35 UCUGCAGGAGAACUAUUGUAGAAAUCCAGAGGCGAGGAAGGAGGACCCUGGUGUU
UUACCAGCAACCCAGAGGUGCGGUACGAGGUGUGCGACAUACCCAGUGCAGCGAGG
UGGAAUGCAUGACAUGCAACGGCGAGAGCUACCGGGGCCUGAUGGACCACACAGAGA
GCGGCAAAUUCGCCAAAGAUGGGAUACCCAGACCCCUCAUAGGCACAAGUCCUGC
CCGAGAGAUACCCUGACAAGGGCUUCGACGACAAUACUGCCGGAACCCUGAUGGAC
40 AGCCUAGACCUUGGUGCUACACCCUGGACCCUCACACCAGAUGGGAAUACUGCGCCA
UCAAGACAUGUGCCGAUAACACCAUGAACGACACCGAUGUGCCACUCGAGACAACUG
AGUGUAUCCAGGGCCAGGGCGAGGGCUACAGGGGCACCGUGAACACCAUCUGGAACG
GCAUCCCUUGUCAGCGGUGGGACAGCCAAUACCCCCACGAACAUGAUUAGACCCAG
AAAACUUAAGUGCAAAGAUCUGCGGGAAAACUACUGUAGAAACCCUGACGGCUCGG
45 AGAGCCCUUGGUGCUUACACACCGACCCUAAACAUCAGGGUGGGCUACUGUAGCCAGA
UCCCCAACUGCGACAUGAGCCACGGUCAGGACUGCUACAGAGGAAACGGCAAGAAUU

ACAUGGGCAACCUGAGCCAGACCAGAAGCGGCCUGACCUGCAGCAUGUGGGACAAAA
ACAUGGAAGAUCUGCACCAGGACAUUUUUGGGAGCCUGACGCCAGCAAGCUGAAUG
AGAACUACUGUCGGAACCCUGACGACGAUGCACGGCCCUUGGUGCUACACAGGCA
ACCCUCUGAUCCCUUGGGACUAUUGUCCUAUAGCAGGUGUGAAGGCGACACGACCC
5 CUACAAUCGUGAACCUGGAUACCCAGUGAUCAGCUGUGCUAAAACAAAGCAACUGA
GAGUGGUGAAUGGUUAUCCCGACCCGACCAACAUCGGAUGGAUGGUCAGCCUGCGGU
ACAGAAACAAGCACAUUCUGCGGCGGUAGCCUGAUCAAGGAAUCCUGGGUGUUGACAG
CCAGACAGUGUUUUC CAGCAGAGAUCUGAAGGACUACGAGGCCUGGCUGGGCAUCC
ACGACGUGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGUGCAAGCAGGUUCUGAACGUGUCC CAGC
10 UGGUGUACGGCCCCGAGGGCUCUGAUCUGGUUCUGAUGAAGCUUGCUAGACCCGCUG
UGCUGGAUGACUUCGUGUCCACCAUCGACCUGCCAAAUACGGAUGUACAAUUCUG
AAAAGACCUCUGUUCUGUGUACGGCUGGGGCUACACCGGACUCAUCAACUAUGACG
GCCUGCUGAGAGUGGGCCACCUGUAUAUCAUGGGCAACGAGAAGUGCAGCCAGCACC
AUAGAGGCAAGGUGACCCUGAACGAGUCUGAAAUUCGCGCCGAGCCGAGAAAAUCG
15 GAUCUGGGCCCUUGCGAAGGAGAUUACGGCGGCCUCUGGUCUGCGAGCAGCACAAGA
UGAGAAUGGUGCUGGGCGUGAUCGUGCCCGGCAGAGGCUGCGCAUCCCUAACCGGC
CUGGAAUCUUCGUGCGCGUGGCCUAUUCGCCAAAUUGGAUCCACAAAUAUCCUGA
CAUACAAGGUCCACAGUCUUGA

SEQ ID NO:130

20 >hHGF 密码子优化 mRNA 序列 3(hHGF-OS3)
AUGUGGGUGACCAAGCUGCUGCCCCGCCUGCUCCUGCAGCACGUGCUGCUGCACCUG
CUCCUGCUGCCCAUCGCCAUCCCCUACGCCGAGGGGCAGAGAAAGAGAAGAAACACC
AUCCACGAGUUAAGAAGAGCGCCAAGACCACCCUGAUCAAGAUCGACCCCGCCUG
AAGAUAAGACCAAGAAGGUGAACACCGCCGAUCAGUGCGCCAACAGAUGCACAAGA
25 AACAAGGGCCUGCCCUUACCCUGCAAGGCCUUCGUGUUCGACAAGGCUAGAAAGCAG
UGCCUGUGGUUCCCCUUAACAGCAUGAGCAGCGGCGUGAAGAAGGAGUUCGGCCAC
GAGUUCGACCUGUACGAGAACAAGGACUACAUCAGAAACUGCAUCAUCGGCAAGGGC
AGAAGCUACAAGGGCACCGUGAGCAUACCAAGAGCGGCAUCAAGUGUCAGCCUGG
AGCAGCAUGAUCCCCCAUGAGCACAGCUUCCUGCCUAGCAGCUACAGAGGGAAGGAC
30 CUGCAAGAGAACUACUGCAGAAACCCUAGAGGCGAGGAGGGCGGCCCUUGGUGUUUC
ACAAGCAAUCCCGAGGUGAGAUACGAGGUGUGCGACAUCCCUAGUGCAGCGAGGUG
GAGUGCAUGACCUGCAACGGCGAAAGCUAUAGAGGCCUGAUGGACCACCCGAGAGC
GGCAAGAUUUGUCAGCGGUGGGAUACCAAACCCCCACAGACACAAGUUCUGCCC
GAGAGAUACCCCGACAAGGGCUUCGACGACAAUACUGUAGAAACCCCGACGGGCAG
35 CCUAGACCCUGGUGUUAACCCUGGACCCCCACACAAGAUGGGAGUACUGCGCCAUC
AAGACCUGCGCCGACAACACCAUGAACGACACCGACGUGCCCCUGGAGACCACCGAG
UGCAUCCAAGGCCAAGGCGAGGGCUACAGAGGCACCGUGAACACCAUCUGGAACGGC
AUUCCUGUCAGAGAUUGGGACAGCCAAUACCCCCAUGAACACGAUAUGACCCCGAG
AACUUAAGUGCAAGGACCUAGAGAGAGAACUACUGCCGGAACCCCGAUGGCAGCGAA
40 UCCCCUUGGUGCUUACACCACCGACCCCAACAUCAGAGUGGGCUACUGCAGCCAAAUC
CCCAACUGCGACAUGAGCCACGGCCAAGACUGUACAGAGGGAACGGCAAGAACUAC
AUGGGCAACCUGAGCCAAACAAGAAGCGGCCUGACCUGCAGCAUGUGGGACAAGAAC
AUGGAGGACCUGCACAGACACAUCUUCUGGGAGCCCGACGCUAGCAAGCUGAACGAG
AACUACUGUCGGAACCCCGACGACGAUGCCACGGCCCCUGGUGCUACACCGGCAAC
45 CCCUGAUCCCCUGGGACUACUGCCCCAUCAGCAGAUGCGAGGGCGACACCACCCCA
CCAUCGUGAACCCUGGACCACCCCGUGAUCAGCUGUGCCAAGACCAAGCAACUGAGAG

UGGUGAACGGCAUCCCCACAAGAACCAACAUUGGCUGGAUGGUGAGCCUGAGAUACA
GAAACAAGCACAUUCUGCGGCGGCAGCCUGAUAAGGAGAGCUGGGUGUCUGACCGCUA
GACAGUGCUUCCCUAGCAGAGACCUGAAGGACUACGAGGCCUGGCUGGGCAUCCACG
ACGUGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGUGUAAACAAGUGCUGAACGUGAGCCAACUG
5 GUGUACGGCCCCGAGGGCAGCGACCUGGUGCUGAUGAAGCUGGCUAGACCCGCCGUG
CUGGACGACUUCGUGAGCACCAUCGACCUGCCCAACUACGGCUGCACCAUCCCGAG
AAGACAAGCUGCAGCGUGUACGGCUGGGGCUACACCGGCCUGAUAACUACGACGGC
CUGCUGAGAGUGGGCCACCUGUACAUCAUGGGCAACGAGAAGUGCAGCCAACACCAC
CGGGGCAAAGUGACCCUGAACGAGAGCGAGAUUCUGCGCCGGGGCUGAGAAAAUCGGC
10 AGCGGCCCCUGCGAGGGGGACUACGGGGGCCCCCUGGUGUGCGAGCAGCACAAGAUG
AGAAUGGUGCUGGGCGUGAUCGUGCCCGGCAGAGGCUGCGCCAUCCCAACAGACCC
GGCAUCUUCGUGAGAGUGGCCUACUACGCCAAGUGGAUCCACAAGAUAUCCUGACC
UACAAGGUGCCUCAGAGCUGA

SEQ ID NO:131.

权利要求书:

1. 核酸构建体, 其包含:
 - (a) 开放阅读框(ORF), 和
 - (b) 非翻译区元件(UTR), 所述 UTR 包含如下序列:
 - 5 SEQ ID NO:12、26 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
 - SEQ ID NO:1、15 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
 - SEQ ID NO:4-5、18-19 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
 - SEQ ID NO:6-8、20-22 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
 - SEQ ID NO:9-11、23-25 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
 - 10 SEQ ID NO:13、27 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
 - SEQ ID NO:14、28 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
 - SEQ ID NO:29、30 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
 - SEQ ID NO:35-37 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
 - SEQ ID NO:42、43 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
 - 15 SEQ ID NO:46、47 任一或与之具有至少 90%同一性的序列, 或
 - SEQ ID NO:31-34、38-41、44-45 任一或与之具有至少 90%同一性的序列。
2. 如权利要求 1 所述的核酸构建体, 其中, (b)包含选自如下任一的 3'非翻译区元件(3'UTR)和 5'非翻译区元件(5'UTR)的组合:
 - 20 1) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;
 - 2) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:2 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;
 - 3) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:3 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;
 - 25 4) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:4 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;
 - 5) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:5 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;
 - 30 6) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:6 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;
 - 7) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:7 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;
 - 8) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:8 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;
 - 35 9) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:9 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所

述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

10) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:10 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

5 11) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:11 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

12) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:12 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

13) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:13 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

14) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:14 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

15) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

16) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:16 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

17) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:17 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

18) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:18 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

19) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:19 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

20) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:20 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

21) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:21 所示或与之具有至少 90%同一性的

序列;

22) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:22 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

5 23) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:23 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

24) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:24 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

10 25) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:25 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

26) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:26 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

27) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:27 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

20 28) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:28 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

29) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:29 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

25 30) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:30 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

31) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:31 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

32) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:32 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

35 33) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:33 所示或与之具有至少 90%同一性的

序列；

34) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:34 所示或与之具有至少 90%、95%同一性的序列；

5 35) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:35 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

36) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:36 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

10 37) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:37 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

38) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:38 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

15 39) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:39 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

20 40) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:40 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

41) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:41 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

25 42) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:42 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

43) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:43 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

30 44) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:44 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

35 45) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:45 所示或与之任一具有至少 90%同一

性的序列；

46) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:46 所示或与之任一具有至少 90%的序列；或

5 47) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:47 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列。

3. 如权利要求 1 所述的核酸构建体，其中，

10 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:15、29、30、32 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；

优选地，

15 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:15、29、30、32 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:13 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO: 15、29、30、32 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

20 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:14 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO: 15、29、30、32 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12-14 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO: 15 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

25 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12-14 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO: 29 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12-14 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO: 30 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，或

30 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12-14 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO: 32 所示或与之具有至少 90%同一性的序列。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的核酸构建体，其还包含：

(c) 多聚腺苷酸(poly-A)尾；

35 优选地，所述 poly-A 尾选自 A120、A30L70、HGH polyA、SV40polyA、BGH polyA、rbGlob polyA 或 SV40late polyA；

优选地，所述 poly-A 尾选自 A120 或 A30L70，所述 A120 包含 120 个腺嘌呤

核苷酸,所述 A30L70 包含 SEQ ID NO:52 所示或与之具有至少 90%同一性的序列。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的核酸构建体,其中,所述 ORF 编码肝细胞生长因子(HGF)、抗体或其抗原结合片段,优选为人肝细胞生长因子(hHGF)、抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。

6. 如权利要求 5 所述的核酸构建体,所述 ORF 包含选自如下 1)-2)中的任一项:

- 1) 编码如 SEQ ID NO: 109 所示氨基酸序列的多核苷酸序列;
- 10 2) 如 SEQ ID NO: 110-113 中任一项所示或与之具有至少 90%同一性的多核苷酸序列;

或者,所述 ORF 包含选自如下 1)-3)的任一项:

- 1) 编码如 SEQ ID NO: 117 所示重链氨基酸序列的多核苷酸序列,和/或编码如 SEQ ID NO: 118 所示轻链氨基酸序列的多核苷酸序列;
- 15 2) 编码如 SEQ ID NO: 117 所示重链氨基酸序列中 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的多核苷酸序列,和编码如 SEQ ID NO: 118 所示轻链氨基酸序列中 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的多核苷酸序列,所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的,优选根据 Kabat 编号系统定义的;
- 20 3) 如 SEQ ID NO: 119 所示或与之具有至少 90%同一性的多核苷酸序列,和/或如 SEQ ID NO: 120 所示或与之具有至少 90%同一性的多核苷酸序列。

7. 如权利要求 5-6 任一项所述的核酸构建体,其包含 SEQ ID NO:115、116、127 中任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列;或,包含 SEQ ID NO:124 所示或与之具有至少 90%同一性的序列和/或 SEQ ID NO:125 所示或与之具有至少 25 90%同一性的序列。

8. RNA 分子,其包含:

(a) 开放阅读框(ORF),和

(b) 非翻译区元件(UTR),所述 UTR 包含如下序列:

- 30 SEQ ID NO:69、83 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
- SEQ ID NO:58、72 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
- SEQ ID NO:59-60、73-74 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
- SEQ ID NO:61-62、75-76 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
- SEQ ID NO:63-65、77-79 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
- 35 SEQ ID NO:66-68、80-82 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,
- SEQ ID NO:70、84 任一或与之具有至少 90%同一性的序列,

SEQ ID NO:71、85 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:86、87 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:92-94 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:99、100 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
5 SEQ ID NO:103、104 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，或
SEQ ID NO:88-91、95-98、101-102 任一或与之具有至少 90%同一性的序列。

9. 如权利要求 8 所述的 RNA 分子，其中，(b)包含选自如下任一的 3'非翻译区元件(3'UTR)和 5'非翻译区元件(5'UTR)的组合：
- 10 1) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:58 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；
2) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:59 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；
3) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:60 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
15 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；
4) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:61 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；
5) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:62 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；
20 6) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:63 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；
7) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:64 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；
8) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:65 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
25 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；
9) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:66 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；
10) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:67 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序
30 列；
11) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:68 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；
12) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:69 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序
35 列；
13) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:70 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；

14) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:71 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；

15) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

16) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:73 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

17) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:74 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

18) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:75 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

19) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:76 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

20) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:77 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

21) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:78 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

22) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:79 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

23) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:80 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

24) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:81 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

25) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:82 所示或与之具有至少 90%同一性的

序列；

26) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:83 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

5 27) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:84 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

10 28) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:85 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

29) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:86 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

15 30) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:87 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

31) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:88 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

20 32) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:89 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

25 33) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:90 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

34) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:91 所示或与之任一具有至少 90%、95%同一性的序列；

30 35) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:92 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

36) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:93 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

35 37) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:94 所示或与之具有至少 90%同一性的

序列；

38) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:95 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

5 39) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:96 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

40) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:97 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

10 41) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:98 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

42) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:99 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

43) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:100 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

20 44) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:101 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

45) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:102 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

25 46) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:103 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；或

30 47) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:104 所示或与之具有至少 90%同一性的序列。

10. 如权利要求 8 所述的 RNA 分子，其中，

35 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:69-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:72、86、87、89 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；

优选地，

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:69 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO: 72、86、87、89 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

5 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:70 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO: 72、86、87、89 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:71 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO: 72、86、87、89 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO: 69-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:72 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO: 69-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:86 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

15 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO: 69-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:87 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，或
所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO: 69-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:89 所示或与之具有至少 90%同一性的序列。

20 11. 如权利要求 8-10 任一项所述的 RNA 分子，其还包含：

(c) 多聚腺苷酸(poly-A)尾；

优选地，所述 poly-A 尾选自 A120、A30L70、HGH polyA、SV40polyA、BGH polyA、rbGlob polyA 或 SV40late polyA；

25 优选地，所述 poly-A 尾选自 A120 或 A30L70，所述 A120 包含 120 个腺嘌呤核苷酸，所述 A30L70 包含 SEQ ID NO:52 所示或与之具有至少 90%、95%同一性的序列。

12. 如权利要求 8-11 任一项所述的 RNA 分子，其中，所述 ORF 编码肝细胞生长因子(HGF)、抗体或其抗原结合片段，优选为人肝细胞生长因子(hHGF)、抗
30 PD-1 抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述 ORF 包含选自如下 1)-2)中的任一项：

1) 编码如 SEQ ID NO: 109 所示氨基酸序列的核酸序列；或者，

2) 如 SEQ ID NO:128-131 中任一所示或与之具有至少 90%，优选至少 95%同一性的 RNA 序列；或者，

35 所述 ORF 包含选自如下 1)-3)的任一项：

1) 编码如 SEQ ID NO: 117 所示重链氨基酸序列的核酸序列，和/或编码如 SEQ

ID NO: 118 所示轻链氨基酸序列的核酸序列;

2) 编码如 SEQ ID NO: 117 所示重链氨基酸序列中 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的核酸序列, 和编码如 SEQ ID NO: 118 所示轻链氨基酸序列中 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的核酸序列, 所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact
5 编号系统定义的, 优选根据 Kabat 编号系统定义的;

3) 如 SEQ ID NO: 121 所示或与之具有至少 90% 同一性的 RNA 序列, 和/或如 SEQ ID NO: 122 所示或与之具有至少 90% 同一性的 RNA 序列。

13. 如权利要求 8-12 任一项所述的 RNA 分子, 其包含:

10 (d) 5'帽结构(5'Cap);

优选地, 所述 5'Cap 选自 Cap0、Cap1、Cap2、Cap3、Cap4、ARCA、修饰的 ARCA、肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'-氟代-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和 2-叠氮基-鸟苷;

更优选地, 所述 5'Cap 选自 ARCA、3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G、
15 m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU、m⁷Gppp(A2'O-MOE)pG、m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG、
m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG、m⁷(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeG)pG 或
m⁷(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG。

14. 如权利要求 8-13 任一项所述的 RNA 分子, 其包含一种或多种修饰, 优选
20 地, 所述修饰包括骨架修饰、糖修饰、碱基修饰和/或脂质修饰; 更优选地, 所述
碱基修饰为尿嘧啶修饰。

15. 如权利要求 8-14 任一项所述的 RNA 分子, 其中, 所述 RNA 分子用于提
高所述 ORF 表达目标蛋白的表达量。

25

16. 经分离的多核苷酸, 其包含(a) 开放阅读框(ORF), 所述 ORF 包含 SEQ ID
NO:111-113 和 129-131 中任一所示或与之具有至少 90% 同一性的序列;

优选地, 所述多核苷酸包含如下(b)-(d)中的任一项或其任意组合:

(b) 5'UTR 和/或 3'UTR,

30 (c) poly-A 尾,

(d) 5'Cap;

优选地, 所述 poly-A 尾选自 A120、A30L70、HGH polyA、SV40polyA、BGH
polyA、rbGlob polyA 或 SV40late polyA; 更优选地, 所述 poly-A 尾为 A120 或
A30L70;

35 优选地, 所述 5'Cap 选自 ARCA、3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G、
m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU、m⁷Gppp(A2'O-MOE)pG、m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG、

$m^7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG$ 、 $m^7(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeG)pG$ 或 $m^7(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG$;

优选地, 所述多核苷酸包含选自骨架修饰、糖修饰、碱基修饰和/或脂质修饰的一种或多种修饰, 其中, 所述碱基修饰优选为假尿苷修饰。

5

17. 核酸构建体, 其包含:

(a) 开放阅读框(ORF), 和

(b) 非翻译区元件(UTR), 所述 UTR 源自 CTSB、FAM166A、NDUFB9、ACTG1、CHCHD10、NDUFA11、ATP6V0B、ATP6V0E1、CFL1、COX4I1、CTSB、SLC38A2、
10 NDUFV3、PRDX5、GUK1、IAH1、ABHD16A、SLC25A39、ATPIF1、ANAPC11、CCDC12、MRPL14 或 APOA1BP 的 UTR, 所述 UTR 为 3'非翻译区元件(3'UTR)或 5'非翻译区元件(5'UTR);

优选地, 所述 UTR 包含 SEQ ID NO:1-47 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列。

15

18. RNA 分子, 其包含:

(a) 开放阅读框(ORF), 和

(b) 非翻译区元件(UTR), 所述 UTR 源自 CTSB、FAM166A、NDUFB9、ACTG1、CHCHD10、NDUFA11、ATP6V0B、ATP6V0E1、CFL1、COX4I1、CTSB、SLC38A2、
20 NDUFV3、PRDX5、GUK1、IAH1、ABHD16A、SLC25A39、ATPIF1、ANAPC11、CCDC12、MRPL14 或 APOA1BP 的 UTR, 所述 UTR 为 3'非翻译区元件(3'UTR)或 5'非翻译区元件(5'UTR);

优选地, 所述 UTR 包含 SEQ ID NO:58-104 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列。

25

19. 载体, 其包含权利要求 1-7 和 17 中任一项所述的核酸构建体、权利要求 8-15 和 18 中任一项所述的 RNA 分子, 或权利要求 16 所述的多核苷酸。

20. 宿主细胞, 其包含权利要求 19 所述的载体。

30

21. 如权利要求 1-7 和 17 中任一项所述的核酸构建体的制备方法, 包括培养权利要求 20 所述的宿主细胞, 并从培养物中回收产生的核酸构建体。

22. 如权利要求 8-15 和 18 中任一项所述的 RNA 分子的制备方法, 包括将权利要求 1-7 和 17 中任一项所述的核酸构建体, 或权利要求 19 所述的载体进行逆转录, 得到 RNA 分子; 优选地, 所述方法还包含对所述 RNA 分子的 5'端添加 5'Cap。

35

23. 递送媒介物，其包含权利要求 1-7 和 17 中任一项所述的核酸构建体、权利要求 8-15 和 18 中任一项所述的 RNA 分子、权利要求 16 所述的多核苷酸，或权利要求 19 所述的载体；所述递送媒介物优选为阳离子脂质递送颗粒或纳米脂质颗粒。

5

24. 药物组合物，其包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂，和选自如下的任一项或其任意组合：

权利要求 1-7 和 17 中任一项所述的核酸构建体、权利要求 8-15 和 18 中任一项所述的 RNA 分子、权利要求 16 所述的多核苷酸、权利要求 19 所述的载体或权利要求 23 所述的递送媒介物。

10

25. 产品或试剂盒，其包含选自如下的任一项或其任意组合：

权利要求 1-7 和 17 中任一项所述的核酸构建体、权利要求 8-15 和 18 中任一项所述的 RNA 分子、权利要求 19 所述的多核苷酸、权利要求 23 所述的递送媒介物、权利要求 24 所述的药物组合物。

15

26. 权利要求 1-7 和 17 中任一项所述的核酸构建体或权利要求 8-15 和 18 中任一项所述的 RNA 分子在用于提高 ORF 表达蛋白的表达量，或制备用于提高 ORF 表达蛋白的表达量的产品中的用途。

20

27. 治疗和/或预防疾病的方法，包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1-7 和 17 中任一项所述的核酸构建体、权利要求 8-15 和 18 中任一项所述的 RNA 分子、权利要求 16 所述的多核苷酸、权利要求 23 所述的递送媒介物和/或权利要求 24 所述的药物组合物，所述疾病选自缺血性疾病、代谢综合征、糖尿病及其并发症、再狭窄，以及神经损伤；

25

优选地，所述缺血性疾病选自冠状动脉疾病(CAD)、外周动脉疾病(PAD)、心肌梗死、肢体缺血、血栓闭塞性脉管炎(TAO)、糖尿病性动脉硬化闭塞症(DAO)；更优选地，所述肢体缺血为下肢缺血，最优选地，所述肢体缺血为严重下肢缺血(CLI)；

30

优选地，所述糖尿病及其并发症选自糖尿病周围神经病变、糖尿病足(DFU)、糖尿病性动脉硬化闭塞症(DAO)；

优选地，所述再狭窄选自手术后再狭窄、灌注后再狭窄；

优选地，所述神经损伤选自神经退行性疾病、创伤性神经损伤、周围神经病变；更优选地，所述神经退行性疾病选自肌萎缩性侧索硬化(ALS)、帕金森氏病、痴呆病，所述周围神经病变为糖尿病周围神经病变。

35

28. 促进内皮细胞生长和/或迁移的方法，包括向有需要的受试者施用有效量

的权利要求 1-7 和 17 中任一项所述的核酸构建体、权利要求 8-15 和 18 中任一项所述的 RNA 分子、权利要求 16 所述的多核苷酸、权利要求 23 所述的递送媒介物和/或权利要求 24 所述的药物组合物。

- 5 29. 促血管发生的方法，包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求 1-7 和 17 中任一项所述的核酸构建体、权利要求 8-15 和 18 中任一项所述的 RNA 分子、权利要求 16 所述的多核苷酸、权利要求 23 所述的递送媒介物和/或权利要求 24 所述的药物组合物。