



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113518628 B

(45) 授权公告日 2025.04.29

(21) 申请号 202080007863.5

(22) 申请日 2020.01.03

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113518628 A

(43) 申请公布日 2021.10.19

(30) 优先权数据

62/788,324 2019.01.04 US

62/834,830 2019.04.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/012131 2020.01.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/142653 EN 2020.07.09

(73) 专利权人 阿尔特拉吉尼克斯制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 克里斯蒂娜·利文斯顿

塞缪尔·沃兹沃思

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

专利代理人 高丽娜 张启程

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2018126116 A1, 2018.07.05

WO 2023230466 A1, 2023.11.30

Shanmugavel KP等. Copper relay path through N-terminus of Wilson disease protein, ATP7B.《Metallomics》.2019, 第11卷(第9期), 第1472–1480页.

夏艳等. 基因治疗: 肝豆状核变性治愈的新希望.《中国医药导刊》.2023, 第25卷(第11期), 第1085–1091页.

Hasan NM等. Molecular events initiating exit of a copper-transporting ATPase ATP7B from the trans-Golgi network.《The Journal of Biological Chemistry》.2012, 第287卷(第43期), 摘要、第36042页右栏、第36042页左栏和第36044页Fig1.

Daneshjoo O等. copper-transporting ATPase 2 isoform a [Homo sapiens]. GenBank Database. 2018, Accession NO.NP\_000044.

Leng Y等. Long-term correction of copper metabolism in Wilson's Disease mice with AAV8 vector delivering truncated ATP7B.《Human Gene Therapy》.2019, 第30卷(第12期), 第1494–1504页.

审查员 叶繁

权利要求书4页 说明书18页

序列表28页 附图9页

(54) 发明名称

治疗威尔逊病的基因疗法构建体

(57) 摘要

本申请涉及编码截短的但功能正常的ATP7B的腺相关病毒载体，其用于在治疗威尔逊病(WD)的基因疗法中使用。本文描述的截短的ATP7B与野生型ATP7B相比具有几个优点，比如更高的功效和改善的生产产量。

CN



1. 一种重组核酸构建体,其包含:
  - (a) 5' -末端反向重复 (ITR) 序列;
  - (b) 启动子序列;
  - (c) 编码SEQ ID NO:8中示出的氨基酸序列的截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的核酸序列,该截短的人铜转运ATP酶2中缺失金属结合结构域(MBD)1-3,但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基S340和S341的富含丝氨酸的环;以及
  - (d) 3' -ITR序列。
2. 根据权利要求1所述的重组核酸构建体,其中该启动子序列选自甲状腺素转运蛋白(TTR)启动子序列、鸡 $\beta$ -肌动蛋白(CBA)启动子序列、巨细胞病毒立即早期基因(CMV)启动子序列、甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子序列、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶(A1AT)启动子序列和CAG启动子序列。
3. 根据权利要求2所述的重组核酸构建体,其中该启动子序列是TTR启动子序列。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的重组核酸构建体,其中该5' -ITR序列来自AAV2。
5. 根据权利要求1-3中任一项所述的重组核酸构建体,其中该3' -ITR序列来自AAV2。
6. 根据权利要求1-3中任一项所述的重组核酸构建体,其中该5' -ITR序列和该3' -ITR序列来自AAV2。
7. 根据权利要求6所述的重组核酸构建体,其中该5' -ITR序列和该3' -ITR序列包含SEQ ID NO:2。
8. 根据权利要求1-3中任一项所述的重组核酸构建体,其中该5' -ITR序列和/或该3' -ITR序列来自非AAV2来源。
9. 根据权利要求1-3中任一项所述的重组核酸构建体,其中该重组核酸构建体还包含一个或多个增强子序列。
10. 根据权利要求9所述的重组核酸构建体,其中该增强子序列选自甲状腺素转运蛋白增强子(enTTR)序列、巨细胞病毒立即早期基因(CMV)增强子序列、鸡 $\beta$ -肌动蛋白(CBA)增强子序列、En34增强子序列和载脂蛋白ApoE增强子序列。
11. 根据权利要求10所述的重组核酸构建体,其中该增强子序列是enTTR增强子序列。
12. 根据权利要求11所述的重组核酸构建体,其中该增强子序列包含SEQ ID NO:3。
13. 根据权利要求10-12中任一项所述的重组核酸构建体,其中该增强子序列位于该启动子序列的上游。
14. 根据权利要求1-3中任一项所述的重组核酸构建体,其中该重组核酸构建体还包含一个或多个内含子序列。
15. 根据权利要求14所述的重组核酸构建体,其中该内含子序列选自SV40小T内含子序列、兔血红蛋白亚基 $\beta$ (rHBB)内含子序列、人 $\beta$ 珠蛋白IVS2内含子序列、普洛麦格嵌合内含子序列和hFIX内含子序列。
16. 根据权利要求15所述的重组核酸构建体,其中该内含子序列是SV40小T内含子序列。
17. 根据权利要求16所述的重组核酸构建体,其中该内含子序列包含SEQ ID NO:4。
18. 根据权利要求15所述的重组核酸构建体,其中该内含子序列是rHBB内含子序列。
19. 根据权利要求18所述的重组核酸构建体,其中该内含子序列包含SEQ ID NO:5。

20. 根据权利要求1-3中任一项所述的重组核酸构建体,其中该重组核酸构建体还包含聚腺苷酸化信号序列。

21. 根据权利要求20所述的重组核酸构建体,其中该聚腺苷酸化信号序列选自SV40聚腺苷酸化信号序列、牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化信号序列和兔β珠蛋白聚腺苷酸化信号序列。

22. 根据权利要求21所述的重组核酸构建体,其中该聚腺苷酸化信号序列是牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化信号序列。

23. 根据权利要求22所述的重组核酸构建体,其中该聚腺苷酸化信号序列包含SEQ ID NO:6。

24. 根据权利要求21所述的重组核酸构建体,其中该聚腺苷酸化信号序列是SV40聚腺苷酸化信号序列。

25. 根据权利要求24所述的重组核酸构建体,其中该聚腺苷酸化信号序列包含SEQ ID NO:7。

26. 一种用于治疗威尔逊病的重组腺相关病毒(rAAV),所述rAAV包含AAV衣壳和包装在其中的载体基因组,所述载体基因组包含:

a. AAV 5' -末端反向重复(ITS)序列;

b. 启动子序列;

c. 编码SEQ ID NO:8中示出的氨基酸序列的截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的核酸序列,该截短的人铜转运ATP酶2中缺失金属结合结构域(MBD)1-3,但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基S340和S341的富含丝氨酸的环;以及

d. AAV 3' -ITS序列。

27. 根据权利要求26所述的rAAV,其中该AAV衣壳是来自血清型9、8、1、2、3、4、5、6、7、10、11、12、rh10或hu37的AAV。

28. 根据权利要求27所述的rAAV,其中该AAV衣壳来自AAV9。

29. 根据权利要求27所述的rAAV,其中该AAV衣壳来自AAV8。

30. 根据权利要求28所述的rAAV,其中该AAV衣壳是AAV9变体衣壳。

31. 根据权利要求26-30中任一项所述的rAAV,其中该启动子序列选自甲状腺素转运蛋白(TTR)启动子序列、鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子序列、巨细胞病毒立即早期基因(CMV)启动子序列、甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子序列、α-1抗胰蛋白酶(A1AT)启动子序列和CAG启动子序列。

32. 根据权利要求31所述的rAAV,其中该启动子序列是TTR启动子序列。

33. 根据权利要求26-30中任一项所述的rAAV,其中该5' -ITS序列来自AAV2。

34. 根据权利要求26-30中任一项所述的rAAV,其中该3' -ITS序列来自AAV2。

35. 根据权利要求26-30中任一项所述的rAAV,其中该5' -ITS序列和该3' -ITS序列来自AAV2。

36. 根据权利要求26-30中任一项所述的rAAV,其中该5' -ITS序列和该3' -ITS序列包含SEQ ID NO:2。

37. 根据权利要求26-30中任一项所述的rAAV,其中该5' -ITS序列和/或该3' -ITS序列来自非AAV2来源。

38. 根据权利要求26-30中任一项所述的rAAV,其中包装的载体基因组还包含一个或多个增强子序列。

39. 根据权利要求38所述的rAAV,其中包装的载体基因组还包含增强子序列,并且其中该增强子序列选自甲状腺素转运蛋白增强子(enTTR)序列、巨细胞病毒立即早期基因(CMV)增强子序列、鸡β-肌动蛋白(CBA)增强子序列、En34增强子序列和载脂蛋白ApoE增强子序列。

40. 根据权利要求39所述的rAAV,其中该增强子序列是enTTR增强子序列。

41. 根据权利要求40所述的rAAV,其中该增强子序列包含SEQ ID NO:3。

42. 根据权利要求40-41中任一项所述的rAAV,其中该增强子序列位于该启动子序列的上游。

43. 根据权利要求26-30中任一项所述的rAAV,其中包装的载体基因组还包含一个或多个内含子序列。

44. 根据权利要求43所述的rAAV,其中该内含子序列选自SV40小T内含子序列、兔血红蛋白亚基β(rHBB)内含子序列、人β珠蛋白IVS2内含子序列、普洛麦格嵌合内含子序列和hFIX内含子序列。

45. 根据权利要求44所述的rAAV,其中该内含子序列是SV40小T内含子序列。

46. 根据权利要求45所述的rAAV,其中该内含子序列包含SEQ ID NO:4。

47. 根据权利要求44所述的rAAV,其中该内含子序列是rHBB内含子序列。

48. 根据权利要求47所述的rAAV,其中该内含子序列包含SEQ ID NO:5。

49. 根据权利要求26-30中任一项所述的rAAV,其中包装的载体基因组还包含聚腺苷酸化信号序列。

50. 根据权利要求49所述的rAAV,其中该聚腺苷酸化信号序列选自SV40聚腺苷酸化信号序列、牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化信号序列和兔β珠蛋白聚腺苷酸化信号序列。

51. 根据权利要求50所述的rAAV,其中该聚腺苷酸化信号序列是牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化信号序列。

52. 根据权利要求51所述的rAAV,其中该聚腺苷酸化信号序列包含SEQ ID NO:6。

53. 根据权利要求50所述的rAAV,其中该聚腺苷酸化信号序列是SV40聚腺苷酸化信号序列。

54. 根据权利要求53所述的rAAV,其中该聚腺苷酸化信号序列包含SEQ ID NO:7。

55. 一种rAAV,其包含根据权利要求1-25中任一项所述的重组核酸构建体。

56. 一种重组核酸构建体,其包含:

a. SEQ ID NO:2的AAV 5' -末端反向重复(ITR)序列;

b. SEQ ID NO:3的增强子序列;

c. SEQ ID NO:12的启动子序列;

d. 编码具有SEQ ID NO:8中示出的氨基酸序列的截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15核酸序列;以及

e. SEQ ID NO:2的AAV 3' -ITR序列。

57. 根据权利要求56所述的重组核酸构建体,其中该编码截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的核酸序列是SEQ ID NO:1。

58. 根据权利要求56所述的重组核酸构建体,其中该编码截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的核酸序列是SEQ ID NO:15。

59. 一种rAAV,其包含AAV衣壳和包装在其中的载体基因组,所述载体基因组包含:

- a. SEQ ID NO:2的AAV 5' -末端反向重复 (ITR) 序列;
- b. SEQ ID NO:3的增强子序列;
- c. SEQ ID NO:12的启动子序列;
- d. 编码具有SEQ ID NO:8中示出的氨基酸序列的截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15核酸序列;以及
- e. SEQ ID NO:2的AAV 3' -ITR序列。

60. 根据权利要求59所述的rAAV,其中该包装的载体基因组包含SEQ ID NO:1的编码截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的核酸序列。

61. 根据权利要求59所述的rAAV,其中该包装的载体基因组包含SEQ ID NO:15的编码截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的核酸序列。

62. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求1-25或56-58中任一项所述的重组核酸构建体或根据权利要求26-55或59-61中任一项所述的rAAV。

63. 一种组合物,其包含根据权利要求26-55或59-61中任一项所述的rAAV和药学上可接受的载剂。

64. 一种重组载体,其包含根据权利要求1-25或56-58中任一项所述的重组核酸构建体。

65. 根据权利要求64所述的重组载体,其中该载体是腺相关病毒 (AAV) 载体。

66. 根据权利要求65所述的重组载体,其中该AAV载体是AAV血清型9 (AAV9) 载体。

67. 一种增加rAAV产量的方法在制备用于治疗威尔逊病的药物中的用途,包括向真核宿主细胞培养物递送根据权利要求64至66中任一项所述的重组载体,以及从真核细胞培养物收获该rAAV。

68. 根据权利要求26-55或59-61中任一项所述的rAAV或其根据权利要求63所述的组合物在制备用于治疗人受试者的威尔逊病的药物中的用途,该治疗包括向该人受试者施用治疗有效量的所述的rAAV或其所述的组合物。

69. 根据权利要求68所述的用途,其中该药物用于皮下、肌内、皮内、腹膜内或静脉内施用。

70. 根据权利要求69所述的用途,其中该药物用于静脉内施用。

71. 根据权利要求1所述的重组核酸构建体、根据权利要求26所述的rAAV、根据权利要求63所述的组合物、根据权利要求62所述的宿主细胞、根据权利要求64所述的重组载体或根据权利要求67或68所述的用途,其中该编码截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的核酸序列包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15。

72. 一种编码SEQ ID NO:8中示出的氨基酸序列的截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的重组核酸,该重组核酸包含与SEQ ID NO:14至少80%相同的核酸序列。

73. 根据权利要求72所述的重组核酸,其中该核酸序列包含SEQ ID NO:14。

## 治疗威尔逊病的基因疗法构建体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年1月4日提交的美国临时专利申请号62/788,324,以及2019年4月16日提交的美国临时专利申请号62/834,830的权益和优先权,出于所有目的,其披露内容通过引用以其全文并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已以ASCII格式电子提交,并通过引用以其全文特此并入。所述ASCII副本创建于2019年12月31日,名为ULP-003W0\_SL\_ST25.txt,大小为49,846字节。

### 技术领域

[0005] 本申请总体上涉及腺相关病毒载体及其用于在治疗威尔逊病(WD)的基因疗法中使用的方法。

### 背景技术

[0006] 威尔逊病(Wilson disease,WD)是常染色体隐性遗传障碍,其导致铜主要在肝脏中积累,并随后在神经系统和其他组织中积累。WD是一种罕见障碍,约每30,000个体中有1例,是由13号染色体上的铜转运ATP酶2(ATP7B)基因的突变引起的。存在600多个独特的ATP7B突变。ATP7B主要在肝细胞中表达并在铜的跨膜转运中起作用。ATP7B蛋白功能的缺乏或降低导致肝细胞向胆汁中的铜排泄减少,引起肝病。在没有适当治疗的情况下,随着时间的推移,高铜水平可导致危及生命的器官损伤。

[0007] 患者的肝WD通常出现在童年末期或青春期,并且表现出急性肝炎、暴发性肝衰竭或进行性慢性肝病的特征。WD的神经系统表现通常晚于肝病出现,最常见于20岁或30岁,并且包括锥体外系、小脑和大脑相关症状。

[0008] WD的医学治疗目的是从体内除去有毒的铜沉积物并防止其再积累。目前用于WD的治疗方法是每日口服螯合剂(D-青霉胺、曲恩汀和锌盐)进行治疗。药物疗法在大多数但并非所有WD患者中是有效的。对于出现暴发性肝衰竭或进行性肝衰竭的WD患者,肝移植是一种治疗选择。然而,移植接受者需要维持恒定的免疫抑制方案以防止排斥。

[0009] 通过用腺相关病毒载体向患者递送表达截短的但功能正常的ATP7B的基因,本发明解决了对改善和可持续治疗WD的需求。本发明的截短的ATP7B在治疗WD方面具有改善的功效,并且与野生型和其他截短形式的ATP7B蛋白相比具有生产容易和高效的优点。

### 发明内容

[0010] 本发明提供了组合物及其用于基因疗法的方法。本文提供了用于治疗WD的腺相关病毒(AAV)载体。在一方面,本发明提供了重组核酸构建体,其包含:5' -末端反向重复(ITR)序列;启动子序列;编码截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的核酸序列,该截短的人铜转运ATP酶2中缺失金属结合结构域(MBD)1-3,但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基(S340

和S341)的富含丝氨酸的环;和3' - ITR序列。

[0011] 在另一方面,本发明提供了用于治疗威尔逊病的重组腺相关病毒(rAAV),其中rAAV包含AAV衣壳和包装在其中的载体基因组,该载体基因组包含5' -末端反向重复(ITR)序列;启动子序列;编码截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)的核酸序列,该截短的人铜转运ATP酶2中缺失金属结合结构域(MBD)1-3,但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基(S340和S341)的富含丝氨酸的环;和3' - ITR序列。

[0012] 本申请的以下部分描述了本发明的这些和其他方面和特征。

## 附图说明

[0013] 参考以下附图可以更全面地理解本发明。

[0014] 图1是显示包含编码截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)(其中缺失金属结合结构域(MBD)1-3,但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基(S340和S341)的富含丝氨酸的环(“ATP7B Δ 1-3-SS”或“天然ATP7B del1-3”))的核苷酸序列的示例性载体基因组构建体的示意图。下面提供了示例性载体基因组构建体的特征:

	<b>开始 (核苷 酸位置)</b>	<b>结束 (核苷 酸位置)</b>	<b>说明</b>
	1	145	末端反向重复 (ITR);
	146	245	增强子
[0015]	246	435	启动子
	436	530	内含子
	531	536	共有 Kozak 序列
	540	4142	天然 ATP7B del1-3 (野生型) cDNA
	4143	4340	聚 A 信号
[0016]	4341	4485	末端反向重复 (ITR);

[0017] 图2是示例性AAV载体(DTC319)的示意图,其中显示了各种关键组分。

[0018] 图3是示例性质粒pAAV2/8.KanR(p2123FH)AAV Rep/Cap质粒的示意图,当与AAV载体共转染到宿主细胞中时,该质粒在包装rAAV中提供Rep和Cap功能。

[0019] 图4是当与AAV载体和Rep/Cap质粒共转染到宿主细胞中时用于rAAV生产的示例性质粒pAdDeltaF6(Kan)腺病毒辅助质粒的示意图。

[0020] 图5是注射10<sup>9</sup>、10<sup>10</sup>或10<sup>11</sup>基因组拷贝(GC)/kg ATP7BcoFL(已进行密码子优化的全长人ATP7B)的C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>雌性小鼠(用圆圈表示)和注射10<sup>10</sup>或10<sup>11</sup>GC/kg相同载体的C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>雄性小鼠(用正方形表示)中肝铜(μg/g)的散点图。来自年龄匹配的未经注射的雄性和雌性杂合(Het)和C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠的铜水平也表示在此散点图中。

[0021] 图6是显示转染编码人ATP7B的完整或部分编码序列的AAV载体(携带用于编码全长(FL)人ATP7B的核苷酸序列的AAV载体;携带用于编码人ATP7B(其中缺失MBD 1-3,但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基(S340和S341)的富含丝氨酸的环(ATP7B Δ 1-3-SS)的核苷酸序列的AAV载体;或携带用于编码其中缺失MBD 1-4的人ATP7B(ATP7B Δ 1-4)的

核苷酸序列的AAV载体)后宿主细胞产生的总产量rAAV(GC滴度)的条形图。

[0022] 图7是向C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠注射携带全长人ATP7B(ATP7B FL)、ATP7BΔ1-3-SS或ATP7BΔ1-4的AAV8后测定的、分别由正方形和圆形表示的尿铜和肝铜水平(μg/g)的散点图。施用磷酸盐缓冲盐水(PBS)的C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠用作对照(媒介物)。

[0023] 图8是显示转染编码截短的人ATP7B(其中缺失金属结合结构域(MBD)1-3,但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基(S340和S341)的富含丝氨酸的环,编码AAV8或AAV9衣壳)的AAV载体(DTC319)后宿主细胞产生的总产量rAAV(GC滴度)的条形图。

[0024] 图9是施用静脉内注射媒介物对照(稀释缓冲液;WD)或输注携带天然ATP7BΔ1-3-SS(De1A)的AAV8的C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠中肝铜积累水平(μg/g干重)的条形图。此条形图中表示的未经注射的野生型小鼠(WT)中肝铜积累水平用作阴性对照。值表示为平均值±SEM(平均值的标准误差)。

[0025] 图10是施用静脉内注射媒介物对照(稀释缓冲液;WD)或输注携带天然ATP7BΔ1-3-SS(De1A)的AAV8的C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠中铜蓝蛋白活性的条形图,如通过基于酶反应的比色活性测定法所测量的。如通过相同的基于酶反应的比色活性测定法所测量的,未经注射的野生型(WT)小鼠中铜蓝蛋白活性也表示在此条形图中。

[0026] 图11是对苏木精和伊红(H&E)切片进行核增大和肝细胞肥大、组织破坏、炎性浸润和肝细胞坏死的标准评估后的平均得分的条形图。

[0027] 图12是显示示例性载体基因组构建体DTC327的示意图,该构建体包含具有PPIA聚A的AAV9衣壳、具有含145bp ITR的完整p5启动子的AAV2Rep/ITR、以及编码截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B)(其中缺失金属结合结构域(MBD)1-3,但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基(S340和S341)的富含丝氨酸的环)的核苷酸序列。

## 具体实施方式

[0028] 本发明提供用于在治疗威尔逊病(WD)中使用的药剂和组合物。如本文描述的本发明的核酸序列、载体、重组病毒和相关组合物可用于改善、预防或治疗WD。

[0029] 除非另有说明,技术术语均按惯例使用。分子生物学中常用术语的定义可以在以下中找到:Benjamin Lewin,GenesV[基因V],由Oxford University Press[牛津大学出版社出版]出版,1994(ISBN 0-19-854287-9);Kendrew等人(编辑.),The Encyclopedia of Molecular Biology[分子生物学百科全书],由Blackwell Science Ltd.[布莱克威尔科学公司]出版,1994(ISBN 0-632-02182-9);和Robert A.Meyers(编辑),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference[分子生物学和生物技术:综合案头参考],由VCH Publishers[VCH出版公司]出版,1995(ISBN 1-56081-569-8)。

[0030] 为便于查阅本披露的各个实施方案,提供以下对特定术语的解释:

[0031] 腺相关病毒(AAV):一种小的、复制缺陷的、无包膜的病毒,可感染人和其他一些灵长类动物。AAV已知不会引起疾病并引发非常温和的免疫应答。利用AAV的基因疗法载体可以感染分裂细胞和休眠细胞,并且能以染色体外状态持续存在而不整合到宿主细胞的基因组中。这些特征使AAV成为一种有吸引力的基因疗法病毒载体。目前有12种公认的AAV血清型(AAV1-12)。

[0032] 施用(Administration/Administer):通过任何有效途径向受试者提供或给予药

剂,比如治疗剂(例如,重组AAV)。示例性施用途径包括但不限于注射(比如皮下、肌内、皮内、腹膜内和静脉内)、口服、管内、舌下、直肠、透皮、鼻内、阴道和吸入途径。

[0033] ATP7B Δ 1 - 3 - SS: 如本文所用,ATP7B Δ 1 - 3 - SS是指截短的人铜转运ATP酶2(ATP7B),其中缺失金属结合结构域(MBD)1-3,但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基(S340和S341)的富含丝氨酸的环。

[0034] 密码子优化的:“密码子优化的”核酸是指已被改变的核酸序列,使得密码子对于在特定系统(比如特定物种或物种组)中的表达是最佳的。例如,可以优化核酸序列以在哺乳动物细胞或特定哺乳动物物种(比如人细胞)中表达。密码子优化不会改变编码蛋白质的氨基酸序列。

[0035] 增强子:通过增加启动子的活性来增加转录速率的核酸序列。

[0036] 内含子:基因中不包含蛋白质编码信息的一段DNA。内含子在信使RNA翻译之前去除。

[0037] 末端反向重复(ITS):有效复制所需的腺相关病毒基因组中的对称核酸序列。ITS序列位于AAV DNA基因组的每一端。ITS作为病毒DNA合成的复制起点,并且是载体衣壳化所必需的。

[0038] 分离的:“分离的”生物组分(比如核酸分子、蛋白质、病毒或细胞)已与生物体的细胞或组织中的其他生物组分或生物体本身(其中组分天然地存在,如其他染色体和染色体外DNA和RNA、蛋白质和细胞)基本分离或纯化。已“分离”的核酸分子和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的那些。此术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸分子和蛋白质以及化学合成的核酸分子和蛋白质。

[0039] 可操作地连接:当第一核酸序列被放置成与第二核酸序列有功能关系时,该第一核酸序列与该第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则该启动子与该编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区时,在同一阅读框中。

[0040] 药学上可接受的载剂:可用于本披露的药学上可接受的载剂(媒介物)是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿制药科学](E.W.Martin,Mack Publishing Co.[麦克出版公司],Easton,Pa.[宾夕法尼亚州伊斯顿],第15版(1975))描述了适用于一种或多种治疗性化合物、分子或药剂的药物递送的组合物和制剂。

[0041] 一般而言,载剂的性质将取决于所采用的特定施用方式。例如,肠胃外制剂通常包含可注射流体,其包括药学上和生理学上可接受的流体,比如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为媒介物。对于固体组合物(例如粉末、丸剂、片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载剂可以包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物中性载剂之外,要施用的药物组合物可含有少量无毒辅助物质,比如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0042] 预防、治疗或改善疾病:“预防”疾病(比如WD)是指抑制疾病的全面发展。“治疗”是指在疾病或病理病症(比如WD)开始发展后改善其体征或症状的治疗性干预。“改善”是指疾病(比如WD)体征或症状的数量或严重程度的降低。

[0043] 启动子:指导/启动核酸(例如基因)转录的DNA区域。启动子包括靠近转录起始位点的必要核酸序列。

[0044] 纯化的:术语“纯化的”并不要求绝对纯度;相反,它旨在作为一个相对术语。因此,例如,纯化的肽、蛋白质、病毒或其他活性化合物是从天然相关蛋白质和其他污染物中完全或部分分离的肽、蛋白质、病毒或其他活性化合物。在某些实施方案中,术语“基本上纯化的”是指已从细胞、细胞培养基或其他粗制剂中分离并进行分级以除去初始制剂的各种组分(比如蛋白质、细胞碎片和其他组分)的肽、蛋白质、病毒或其他活性化合物。

[0045] 重组:重组核酸分子是一种具有非天然存在的序列或具有通过人工组合两个在其他情况下分离的序列片段而制成的序列的核酸分子。这种人工组合可以通过化学合成或通过核酸分子的分离片段的人工操作来实现,比如通过基因工程技术。

[0046] 类似地,重组病毒是包含非天然存在的或通过至少两个不同来源的序列的人工组合制成的序列(比如基因组序列)的病毒。术语“重组”还包括仅通过添加、取代或缺失天然核酸分子、蛋白质或病毒的一部分而改变的核酸、蛋白质和病毒。如本文所用,“重组AAV”是指其中包装了重组核酸分子(比如编码截短的人ATP7B的重组核酸分子(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15))的AAV颗粒。

[0047] 序列同一性:两个或更多个核酸序列或两个或更多个氨基酸序列之间的同一性或相似性以序列之间的同一性或相似性表示。序列同一性可以用同一性百分比来衡量;百分比越高,序列越相同。序列相似性可以用百分比相似性来衡量(考虑到保守的氨基酸取代);百分比越高,序列越相似。当使用标准方法比对时,核酸或氨基酸序列的同源物或直系同源物具有相对高程度的序列同一性/相似性。当直系同源蛋白质或cDNA衍生自更密切相关的物种(比如人和小鼠序列)时,与亲缘关系更远的物种(比如人和线虫序列)相比,这种同源性更显著。

[0048] 用于比较的序列比对方法是本领域熟知的。各种程序和对准算法描述于:Smith和Waterman,Adv.Appl.Math.[应用数学进展]2:482,1981;Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443,1970;Pearson和Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国科学院院刊]85:2444,1988;Higgins和Sharp,Gene[基因],73:237-44,1988;Higgins和Sharp,CABIOS5:151-3,1989;Corpet等人,Nuc.Acids Res.[核酸研究]16:10881-90,1988;Huang等人Computer Appl.s.in the Biosciences[计算机在生物科学中的应用]8,155-65,1992;以及Pearson等人,Meth.Mol.Rio.[数学分子比]24:307-31,1994;Altschul等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-10,1990给出了序列比对方法和同源性计算的详细考虑。

[0049] NCBI基本局部比对搜索工具(BLAST)(Altschul等人.,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-10,1990)可从几个来源获得,包括美国国家生物信息中心(NCBI)和互联网上,用于与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。更多信息可以在NCBI网站上找到。

[0050] 血清型:一组密切相关的微生物(比如病毒),以特征抗原组来区分。

[0051] 填充序列:指包含在较大核酸分子(比如载体)中的核苷酸序列,通常用于在两个核酸特征之间(比如启动子和编码序列之间)产生所需的间距,或延长核酸分子,使其具有所期望的长度。填充序列不包含蛋白质编码信息并且可以是未知/合成来源和/或与较大核酸分子内的其他核酸序列无关。

[0052] 受试者:活的多细胞脊椎动物生物体,这一类别包括人和非人哺乳动物。

[0053] 合成的:在实验室中通过人工方式产生,例如合成的核酸可以在实验室中化学合成。

[0054] 治疗有效量:一定量的特定药物或治疗剂(例如,重组AAV)足以在用药剂治疗的受试者或细胞中实现所期望的效果。药剂的有效量将取决于几个因素,包括但不限于被治疗的受试者或细胞,以及治疗性组合物的施用方式。

[0055] 载体:载体是允许插入外源核酸而不破坏载体在宿主细胞中复制和/或整合的能力的核酸分子。载体可包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,比如复制起点。载体还可包括一种或多种选择标记基因和其他遗传元件。表达载体是包含必要的调控序列以允许插入的一个或多个基因的转录和翻译的载体。在本文的一些实施方案中,载体是AAV载体。

[0056] 除非另外解释,本文所用的全部技术术语和科学术语具有与本披露所属领域的普通技术人员通常所理解的相同意义。除非上下文另外清楚指出,单数术语“一个(a)”、“一种(an)”、“该(the)”包含复数指代。“包含A或B”意指包括A或B、或A和B。进一步应理解,对于核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子量值是近似的,并提供用于说明。虽然与本文描述的那些方法和材料类似或等同的方法和材料可以用于本披露的实践或测试,但是以下描述合适的方法和材料。所有的公开物、专利申请、专利、以及本文提及的其他参考文献通过引用以其全文并入。在有矛盾的情况下,将以本说明书(包括术语的解释)为准。此外,材料、方法和实施例仅为说明性的并且不旨在是限制性的。

[0057] 病毒载体:

[0058] 在一些方面,本披露提供了含有基因组的重组腺相关病毒(AAV)载体,该基因组包含AAV 5' -末端反向重复(ITR)序列、启动子序列、编码ATP7B Δ 1-3-SS的核酸序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)和AAV 3' -末端反向重复序列(ITR)。

[0059] 在一些实施方案中,基因组可进一步包含如本文描述的增强子、内含子、共有Kozak序列和/或聚腺苷酸化信号。在一些实施方案中,重组载体可以进一步包含一个或多个填充核酸序列。在一个实施方案中,填充核酸序列位于内含子和ATP7B的部分或完整编码序列之间。

[0060] 在本文描述的各种实施方案中,重组病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。AAV载体可以是血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12的AAV载体(即AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或AAV12),以及从人和非人灵长类动物组织分离的100多种变体中的任一种(参见,例如,Choi等人,2005,Curr Gene Ther.[当代基因治疗]5:299-310,2005和Gao等人,2005,Curr Gene Ther.[当代基因治疗]5:285-297)。任何血清型的AAV载体均可用于本发明,并且AAV血清型的选择将部分取决于基因疗法靶向的一种或多种细胞类型。对于WD的治疗,肝脏是相关靶器官之一。在一些实施方案中,AAV载体选自血清型9(AAV9)、血清型8(AAV8)、血清型5(AAV5)或其变体。在示例性实施方案中,AAV载体是血清型9(AAV9)或其变体。

[0061] 在一些实施方案中,重组AAV载体包括AAV ITR序列,当AAV和腺病毒辅助功能以反式提供时,AAV ITR序列既起载体DNA复制起点作用,又起载体基因组的包装信号作用。此外,ITR是大Rep蛋白单链核酸内切的靶,从复制中间体拆分单个基因组。

[0062] 在一些实施方案中,5' -ITR序列来自AAV2。在一些实施方案中,3' -ITR序列来自AAV2。在一些实施方案中,5' -ITR序列和3' -ITR序列来自AAV2。在一些实施方案中,5' -ITR

序列和/或3' - ITR序列来自AAV2并且包含SEQ ID NO:2或由SEQ ID NO:2组成。在其他实施方案中,5' - ITR序列和/或3' - ITR序列来自非AAV2来源。

[0063] 在一些示例性实施方案中,AAV载体是AAV血清型9(AAV9)载体,并且该载体包括本文描述的增强子、启动子、内含子、编码ATP7B Δ 1-3-SS的核酸序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)和聚腺苷酸化信号。在一些实施方案中,AAV9载体进一步包含两个AAV2、AAV8或AAV9末端反向重复(ITR)序列:一个在增强子的5' 和另一个在聚腺苷酸化信号的3'。在一个示例性实施方案中,AAV9载体包含两个AAV2末端反向重复(ITR)序列:一个在增强子的5' 和另一个在聚腺苷酸化信号的3'。在一些实施方案中,AAV2 ITR序列包含SEQ ID NO:2或由SEQ ID NO:2组成。在另一个示例性实施方案中,AAV9载体包含两个AAV9末端反向重复(ITR)序列:一个在增强子的5' 和另一个在聚腺苷酸化信号的3'。

[0064] 在一些示例性实施方案中,本披露提供了包含载体基因组的重组核酸,该载体基因组包含AAV 5' - 末端反向重复(ITR)序列、启动子序列、由SEQ ID NO:1表示的编码天然ATP7B Δ 1-3-SS的核酸序列、和AAV 3' - 末端反向重复序列(ITR)。在一些示例性实施方案中,本披露提供了包含载体基因组的重组核酸,该载体基因组包含AAV 5' - 末端反向重复(ITR)序列、启动子序列、由SEQ ID NO:15表示的编码密码子优化的ATP7B Δ 1-3-SS的核酸序列、和AAV 3' - 末端反向重复序列(ITR)。在一些示例性实施方案中,本披露提供了包含SEQ ID NO:14的载体基因组,该载体基因组包含AAV 5' - 末端反向重复(ITR)序列、启动子序列、由SEQ ID NO:1表示的编码天然ATP7B Δ 1-3-SS的核酸序列、或包含其的腺相关病毒(AAV)载体。

[0065] 在其他方面,本申请提供了对应于可用于治疗WD的载体基因组的重组核酸序列。在一些实施方案中,本申请提供与SEQ ID NO:1480%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同的重组核酸。因此,本申请提供与SEQ ID NO:14至少80%(例如,80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)相同的重组核酸。在示例性实施方案中,本申请提供了对应于载体基因组的重组核酸序列,该载体基因组包含AAV 5' - 末端反向重复(ITR)序列、启动子序列、由SEQ ID NO:1表示的编码天然ATP7B Δ 1-3-SS的核酸序列、和AAV 3' - 末端反向重复序列(ITR),其中该载体基因组包含SEQ ID NO:14或由SEQ ID NO:14组成。在示例性实施方案中,本申请提供了对应于载体基因组的重组核酸序列,该载体基因组包含AAV 5' - 末端反向重复(ITR)序列、启动子序列、由SEQ ID NO:15表示的编码密码子优化的ATP7B Δ 1-3-SS的核酸序列、和AAV 3' - 末端反向重复序列(ITR)。

[0066] 启边子:

[0067] 在本文描述的各个方面,提供了AAV载体,其包含有助于驱动和调节转基因表达,例如ATP7B Δ 1-3-SS(例如,由SEQ ID NO:8表示的ATP7B Δ 1-3-SS的氨基酸序列)的表达的启动子序列。在示例性实施方案中,启动子序列位于选择的5' - ITR序列和ATP7B Δ 1-3-SS的编码序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)之间。在一些实施方案中,启动子序列位于增强子序列的下游。在一些实施方案中,启动子序列位于内含子序列的上游。在一些说明性实施方案中,本文描述的载体使用甲状腺素转运蛋白(TTR)启动子,其可任选地位于甲状腺素转运蛋白增强子(enTTR)的下游。

[0068] 在一些实施方案中,启动子选自甲状腺素转运蛋白(TTR)启动子、鸡 $\beta$ -肌动蛋白(CBA)启动子、巨细胞病毒立即早期基因(CMV)启动子、甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶(A1AT)启动子和CAG启动子(使用CMV早期增强子元件、启动子、CBA基因的第一外显子和第一内含子、以及兔 $\beta$ -珠蛋白基因的剪接受体构建)。在示例性实施方案中,启动子是TTR启动子。在一个实施方案中,TTR启动子包含SEQ ID NO:12或由SEQ ID NO:12组成。

[0069] 除启动子外,AAV载体可含有其他合适的转录起始、终止、增强子序列和有效的RNA加工信号。如下文进一步详述的,此类序列包括剪接和聚腺苷酸化(聚A)信号、增强表达的调节元件(即WPRE)、稳定细胞质mRNA的序列、增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列)和增强蛋白质稳定性的序列。

[0070] 在一些实施方案中,AAV载体含有还包含共有Kozak序列的载体基因组。在一些实施方案中,共有Kozak序列位于内含子序列的下游。在一个实施方案中,共有Kozak序列是GCCGCC(SEQ ID NO:11)。如本领域技术人员所理解的,共有Kozak序列通常紧邻编码序列的上游;在这种情况下,紧邻截短的ATP7B(ATP7B $\Delta$  1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)的上游。如本领域技术人员将理解的,共有Kozak序列可被认为共享对应于治疗性多肽(例如截短的ATP7B(ATP7B $\Delta$  1-3-SS)(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15))的起始密码子的ATG残基。为了披露内容简单起见,如本文描述的共有Kozak序列包含对应于不与编码治疗性多肽(例如截短的ATP7B(由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15编码的ATP7B $\Delta$  1-3-SS))的核酸共享的区域的六核苷酸序列。

[0071] ATP7B多肽:

[0072] 如本文描述的,本发明的方面提供了包含基因组的重组载体,该基因组包含AAV 5' -末端反向重复序列(ITR)、启动子序列、具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$  1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)、和AAV 3' -末端反向重复序列(ITR)。ATP7B具有八个跨膜结构域,其形成用于铜易位的穿过细胞膜的路径;和大N-末端,其具有六个金属结合结构域(MBD),每个结构域包含约70个氨基酸和高度保守的金属结合基序GMxCxxC(其中x是任何氨基酸)。除了规范序列(也称为同工型a,其是最长的同工型;NCBI参考序列:NP\_000044.2),四种其他同工型是已知的:NCBI参考序列四种其他同工型是已知的:NCBI参考序列NP\_001005918.1、NP\_001230111.1、NP\_001317507.1、NP\_001317508.1。本文描述的组合物和方法可用于治疗具有引起疾病的非功能性ATP7B变体蛋白的受试者。

[0073] 在一个实施方案中,截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$  1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)编码具有如SEQ ID NO:8中描述的氨基酸的蛋白质。SEQ ID NO:1提供了缺失MBD 1-3的天然人ATP7B的cDNA。SEQ ID NO:8表示天然DEL1-3或ATP7B $\Delta$  1-3-SS蛋白,其中存在对应于野生型ATP7B全长蛋白序列的位置340和341的两个丝氨酸残基。

[0074] 在本文描述的各种实施方案中,提供了含有基因组的载体,该基因组包含截短的ATP7B(ATP7B $\Delta$  1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)。

[0075] 在一些实施方案中,提供了含有基因组的载体,该基因组包含经密码子优化的人ATP7B的工程化cDNA(例如SEQ ID NO:15)。用本文描述的载体递送的多肽涵盖其中缺失MBD 1-3的截短的ATP7B(ATP7B $\Delta$  1-3-SS),适用于在治疗WD中使用。

[0076] 在一些实施方案中,用本文描述的载体表达的多肽是截短的人ATP7B(SEQ ID NO:8)。

[0077] 载体元件:

[0078] 在一些实施方案中,AAV载体含有进一步包含一个或多个增强子序列的基因组。在一个实施方案中,增强子选自甲状腺素转运蛋白增强子(enTTR)、巨细胞病毒立即早期基因(CMV)增强子、鸡β-肌动蛋白(CBA)增强子、En34增强子和载脂蛋白(ApoE)增强子。在示例性实施方案中,增强子是enTTR增强子。在一个实施方案中,enTTR增强子包含SEQ ID NO:3或由SEQ ID NO:3组成。

[0079] 在一些实施方案中,AAV载体含有进一步包含一个或多个内含子序列的基因组。在一个实施方案中,内含子选自SV40小T内含子、兔血红蛋白亚基β(rHBB)内含子、人β珠蛋白IVS2内含子、β-珠蛋白/IgG嵌合内含子(普洛麦格(Promega)嵌合内含子)或hFIX内含子。在一个示例性实施方案中,内含子是SV40小T内含子。在一个实施方案中,SV40小T内含子序列包含SEQ ID NO:4或由SEQ ID NO:4组成。在另一个示例性实施方案中,内含子是rHBB内含子。在一个实施方案中,rHBB内含子序列包含SEQ ID NO:5或由SEQ ID NO:5组成。

[0080] 在一些实施方案中,AAV载体含有进一步包含聚腺苷酸化信号序列的基因组。在一个实施方案中,聚腺苷酸化信号序列选自SV40聚腺苷酸化信号序列、牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化信号序列和兔β珠蛋白聚腺苷酸化信号序列。在示例性实施方案中,聚腺苷酸化信号序列是牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化信号序列。在一个实施方案中,BGH聚腺苷酸化信号序列包含SEQ ID NO:6或由SEQ ID NO:6组成。在另一个示例性实施方案中,聚腺苷酸化信号序列是SV40聚腺苷酸化信号序列。在一个实施方案中,SV40聚腺苷酸化信号序列包含SEQ ID NO:7或由SEQ ID NO:7组成。

[0081] AAV衣壳:

[0082] 在另一方面,本申请提供了重组腺相关病毒(rAAV),其可用作治疗WD的基因疗法的药剂,其中所述rAAV包含AAV衣壳和如本文描述的载体基因组。在一些实施方案中,AAV衣壳来自血清型9、8、1、2、3、4、5、6、7、10、11、12、rh10或hu37的AAV(即AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh10或AAVhu37)。在示例性实施方案中,AAV载体是AAV血清型9(AAV9)载体、AAV9变体载体、AAV血清型8(AAV8)载体、AAV血清型5(AAV5)载体或AAV血清型2(AAV2)载体。在某些实施方案中,AAV衣壳和载体来自AAV9血清型。在某些实施方案中,AAV衣壳和载体来自AAV8血清型。

[0083] AAV9衣壳是由多种AAV9 VP蛋白组成的自组装AAV衣壳。AAV9 VP蛋白通常表达为由SEQ ID NO:9的核酸序列或其至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%的序列编码的选择性剪接变体,该序列编码SEQ ID NO:10的衣壳蛋白VP1氨基酸序列(GenBank登录号:AAS99264)。这些剪接变体产生SEQ ID NO:10的长度不同的蛋白质。在某些实施方案中,AAV9衣壳包括与AAS9926499%相同或与SEQ ID NO:1099%相同的氨基酸序列的AAV9衣壳蛋白。还参见美国专利号7,906,111和国际公开号W0/2005/033321。如本文所用,AAV9变体包括例如国际公开号W0/2016/049230、美国专利号8,927,514、美国专利公开号2015/0344911和美国专利号8,734,809中描述的那些。

[0084] 如本文所指示,AAV9衣壳序列和由该序列编码的衣壳蛋白(例如,编码AAV9衣壳蛋白VP1的SEQ ID NO:9的核酸序列或SEQ ID NO:10的氨基酸序列)可用于产生rAAV。然而,在

其他实施方案中,选择另一种AAV衣壳。组织特异性由衣壳类型决定。转导合适靶标(例如肝、肌肉、肺或CNS)的AAV血清型可被选作AAV病毒载体衣壳的来源,包括例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVrh64R1、AAVrh64R2、AAVrh8。参见,例如,美国专利公开号2007/0036760;美国专利公开号2009/0197338;和EP 1310571。还参见国际申请号WO 2003/042397(AAV7和其他猿猴AAV)、美国专利号7,282,199和7,790,449(AAV8)。此外,尚未发现的AAV或基于其的重组AAV可用作AAV衣壳的来源。这些文献还描述了可被选择用于产生AAV的其他AAV,并通过引用并入本文。在一些实施方案中,用于在病毒载体中使用的AAV衣壳可以通过诱变(即通过插入、缺失或取代)上述AAV衣壳之一或其编码核酸来产生。

[0085] 包含重组核酸分子的宿主细胞:

[0086] 在一些方面,本文提供了包含本文披露的重组核酸分子、病毒载体(例如AAV载体)或rAAV的宿主细胞。在具体的实施方案中,宿主细胞可以适合AAV的繁殖。

[0087] 可以使用多种宿主细胞,比如细菌、酵母、昆虫、哺乳动物细胞等。在一些实施方案中,宿主细胞可以是适合于产生重组AAV(rAAV)的细胞(或细胞系),例如HeLa、Cos-7、HEK293、A549、BHK、Vero、RD、HT-1080、ARPE-19或MRC-5细胞。在某些实施方案中,本发明的宿主细胞系是HeLa细胞系(例如HeLa S3)。在另一个实施方案中,本发明的宿主细胞系是HEK293细胞系。

[0088] 可以使用本领域已知的任何合适的方法将重组核酸分子或载体递送到宿主细胞培养物中。在一些实施方案中,产生了具有插入其基因组中的重组核酸分子或载体的稳定宿主细胞系。在一些实施方案中,产生稳定的宿主细胞系,其含有本文描述的AAV载体。将AAV载体转染至宿主培养物后,可以通过多种方法(比如抗生素选择、荧光激活细胞分选、蛋白质印迹、基于PCR的检测、荧光原位杂交)测定rAAV进入宿主基因组的整合,如Nakai等人,Nature Genetics[自然遗传学](2003)34:297-302;Philpott等人,Journal of Virology[病毒学杂志](2002)76(11):5411-5421和Howden等人,J Gene Med[基因药物杂志]2008;10:42-50中描述。此外,稳定细胞系可以根据本领域熟知的方案建立,比如在Clark,Kidney International[国际肾脏杂志]第61卷(2002):S9-S15和Yuan等人,Human Gene Therapy[人基因疗法](2011)22(5):613-24中描述的那些。

[0089] 用于基因疗法的重组AAV:

[0090] 腺相关病毒(AAV)属于细小病毒科(Parvoviridae)和依赖病毒属(Dependovirus)。AAV是一种小型无包膜病毒,其包装线性单链DNA基因组。AAV DNA的有义链和反义链都以相同的频率包装到AAV衣壳中。

[0091] AAV基因组的特征是两个末端反向重复(ITS),它们位于两个开放阅读框(ORF)的侧翼。AAV2基因组,例如ITS的前125个核苷酸是回文,它自身折叠以最大碱基配对并形成T形发夹结构。ITS的其他20个碱基,称为D序列,保持未配对状态。ITS是对AAV DNA复制很重要的顺式作用序列;ITS是复制起点,并作为DNA聚合酶合成第二链的引物。在此合成过程中形成的双链DNA,称为复制型单体,用于第二轮自引发复制并形成复制型二聚体。这些双链中间体通过链置换机制进行处理,产生用于包装的单链DNA和用于转录的双链DNA。位于ITS内的是Rep结合元件和末端解离位点(TRS)。在AAV复制过程中,病毒调节蛋白Rep使用这些特征来处理双链中间体。除了在AAV复制中的作用外,ITS对于AAV基因组包装、转录、非许可

条件下的负调节和位点特异性整合也必不可少(Days和Berns,Clin Microbiol Rev[临床微生物学评论](2008)21(4):583-593)。

[0092] AAV的左侧ORF包含Rep基因,其编码四种蛋白质-Rep78、Rep68、Rep52和Rep40。右侧ORF包含Cap基因,其产生三种病毒衣壳蛋白(VP1、VP2和VP3)。AAV衣壳包含60个病毒衣壳蛋白,它们排列成二十面体对称.VP1、VP2和VP3以1:1:10的摩尔比存在(Daya和Berns,Clin Microbiol Rev[临床微生物学评论](2008)21(4):583-593)。

[0093] AAV是目前基因治疗中最常用的病毒之一。尽管AAV会感染人和其他一些灵长类动物,但它已知不会引起疾病并引发非常温和的免疫应答。利用AAV的基因疗法载体可以感染分裂细胞和休眠细胞,并且以染色体外状态持续存在而不整合到宿主细胞的基因组中。由于AAV的有利特征,本披露考虑将AAV用于本文披露的重组核酸分子和方法。

[0094] AAV具有基因疗法载体的几个令人期望的特征,包括结合并进入靶细胞、进入细胞核的能力,在细胞核中长时间表达的能力以及低毒性。然而,AAV基因组的小尺寸限制了可以掺入的异源DNA的大小。为了尽量最小化这个问题,已经构建了不编码Rep和整合效率元件(IEE)的AAV载体。ITR被保留,因为它们是包装所需的顺式信号(Daya和Berns,Clin Microbiol Rev[临床微生物评论],(2008)21(4):583-593)。

[0095] 生产适用于基因疗法的rAAV的方法是本领域熟知的(参见,例如,美国专利申请号2012/0100606;2012/0135515;2011/0229971;和2013/0072548;和Ghosh等人,Gene Ther.[基因疗法](2006)13(4):321-329),并且可以与本文披露的重组核酸分子和方法一起使用。

[0096] 在一些方面,本申请涉及本文披露的rAAV用于治疗威尔逊病(WD)的用途,其中该rAAV包含AAV衣壳和包装在其中的载体基因组。在一些实施方案中,载体含有基因组,该基因组按5'至3'顺序包含可操作地连接的组分:5' -末端反向重复序列(ITR)、启动子序列、截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)、和3' -末端反向重复序列(ITR)。在示例性实施方案中,载体基因组还包含启动子序列上游的增强子序列、启动子下游的内含子和3' -ITR上游的聚腺苷酸化序列。因此,在另一个示例性实施方案中,载体基因组按5'至3'顺序包含可操作地连接的组分:5' -末端反向重复序列(ITR)、增强子序列、启动子序列、内含子序列、截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)、聚腺苷酸化信号序列、和3' -末端反向重复序列(ITR)。在另一个示例性实施方案中,载体基因组按5'至3'顺序包含可操作地连接的组分:AAV25' -ITR序列、enTTR增强子、TTR启动子、SV40小T内含子、截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)、SV40聚腺苷酸化信号序列、和AAV23' -ITR。在一些实施方案中,载体基因组还包含位于内含子序列下游的共有Kozak序列。在一些实施方案中,衣壳是AAV9衣壳。

[0097] 在一些方面,本申请涉及本文披露的rAAV用于治疗威尔逊病(WD)的用途,其中该rAAV包含AAV衣壳和包装在其中的载体基因组。在一些实施方案中,载体基因组按5'至3'顺序包含可操作地连接的组分:5' -末端反向重复序列(ITR)、启动子序列、截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:1)和3' -末端反向重复序列(ITR)。在示例性实施方案中,载体基因组还包含启动子序列上游的增强子序列、启动子下游的内含子和3' -ITR上游的聚腺苷酸化序列。因此,在另一个示例性实施方案中,载体含有基因组,该基

因组按5'至3'顺序包含可操作地连接的组分:5' -末端反向重复序列(ITS)、增强子序列、启动子序列、内含子序列、截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:1)、聚腺苷酸化信号序列、和3' -末端反向重复序列(ITS)。在另一个示例性实施方案中,载体含有基因组,该基因组按5'至3'顺序包含可操作地连接的组分:AAV2 5' -ITS序列、enTTR增强子、TTR启动子、SV40小T内含子、截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:1)、SV40聚腺苷酸化信号序列、和AAV2 3' -ITS。在一些实施方案中,包装的基因组还包含位于内含子序列下游的共有Kozak序列。在一些实施方案中,衣壳是AAV9衣壳。

[0098] 在一些方面,本申请涉及本文披露的rAAV用于治疗威尔逊病(WD)的用途,其中该rAAV包含AAV衣壳和包装的载体基因组。在一些实施方案中,载体含有包装的基因组,该基因组按5'至3'顺序包含可操作地连接的组分:5' -末端反向重复序列(ITS)、启动子序列、截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:15)和3' -末端反向重复序列(ITS)。在示例性实施方案中,包装的基因组还包含启动子序列上游的增强子序列、启动子下游的内含子、和3' -ITS上游的聚腺苷酸化序列。因此,在另一个示例性实施方案中,载体含有包装的基因组,该基因组按5'至3'顺序包含可操作地连接的组分:5' -末端反向重复序列(ITS)、增强子序列、启动子序列、内含子序列、截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:15)、聚腺苷酸化信号序列、和3' -末端反向重复序列(ITS)。在另一个示例性实施方案中,载体含有包装的基因组,该基因组按5'至3'顺序包含可操作地连接的组分:AAV2 5' -ITS序列、enTTR增强子、TTR启动子、SV40小T内含子、截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如,SEQ ID NO:15)、SV40聚腺苷酸化信号序列、和AAV2 3' -ITS。在一些实施方案中,包装的基因组还包含位于内含子序列下游的共有Kozak序列。在一些实施方案中,衣壳是AAV9衣壳。

[0099] 图1提供了显示用于表达保留MBD4、5和6的截短的ATP7B的示例性包装的载体基因组构建体的示意图。5' -ITS由核苷酸1-145表示;enTTR增强子由核苷酸146-245表示;TTR启动子由核苷酸246-435表示;SV40小T内含子由核苷酸436-530表示;共有Kozak序列由核苷酸531-536表示;截短的ATP7B编码序列由核苷酸540-4142表示;SV40聚腺苷酸化信号序列由核苷酸4143-4340表示;以及3' -ITS由核苷酸4341-4485表示。

[0100] 在某些实施方案中,编码ATP7B $\Delta$ 1-3-SS的核酸序列是天然人序列(由SEQ ID NO:1表示)。可替代地,在一些实施方案中,编码ATP7B $\Delta$ 1-3-SS的核酸序列是密码子优化的人序列(由SEQ ID NO:15表示)。

[0101] 改善治疗WD的功效:

[0102] 在某些实施方案中,本文描述的由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15编码的截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)比全长或其他截短形式的ATP7B(例如ATP7B $\Delta$ 1-4,SEQ ID NO:13)更有效。在一些方面,本披露的ATP7B $\Delta$ 1-3-SS定位于反面高尔基网(TGN)。在某些实施方案中,包含编码ATP7B $\Delta$ 1-3-SS的SEQ ID NO:1的核酸序列的rAAV在注射到诊断患有铜代谢障碍(例如威尔逊病)的哺乳动物后降低了哺乳动物的肝脏和尿液中的铜水平。

[0103] 改善包含截短的ATP7B的AAV载体的产量:

[0104] 在一方面,包含本文描述的包装在AAV8或AAV9中的编码ATP7B $\Delta$ 1-3-SS的核酸序列的rAAV具有比全长ATP7B或ATP7B $\Delta$ 1-4高约1.1至约10倍(例如,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3倍、约4倍、约5

倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍或约10倍)的生产产量。

[0105] 改善包含AAV9衣壳的AAV载体的产量:

[0106] 在一方面,包含AAV9衣壳的rAAV具有比包含AAV8衣壳的rAAV高约1.1-约10倍(例如,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3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍或约10倍)的滴度产量。

[0107] 药物组合物:

[0108] 本披露提供了包含本文披露的rAAV和药学上可接受的载剂的组合物。可在例如美国专利申请公开号2012/0219528中找到用于施用rAAV的合适药物制剂。可用于本披露的药学上可接受的载剂(媒介物)是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿制药科学](E.W.Martin,Mack Publishing Co.[麦克出版公司],Easton,Pa.[宾夕法尼亚州伊斯顿],第15版(1975))描述了适用于一种或多种治疗性化合物、分子或药剂的药物递送的组合物和制剂。

[0109] 如前述段落描述的,本申请在一些方面涉及包含本发明的rAAV的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含药学上可接受的载剂或赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物被配制用于皮下、肌内、皮内、腹膜内或静脉内施用。在示例性实施方案中,药物组合物被配制用于静脉内施用。

[0110] 在一些实施方案中,rAAV在适合输注人受试者的缓冲液/载剂中配制。缓冲液/载剂应包括防止rAAV粘附在输液管上,但不会干扰rAAV体内结合活性的组分。各种合适的溶液可能包括以下中的一个或多个:缓冲盐水、表面活性剂和生理上相容的盐或盐的混合物(其离子强度被调节至相等于约100mM氯化钠(NaCl)至约250mMNaCl)、或被调节至相等离子浓度的生理上相容的盐。pH值可以在6.5到8.5、或7到8.5、或7.5到8的范围内。合适的表面活性剂或表面活性剂的组合可选自泊洛沙姆,即由聚氧丙烯10(聚(环氧丙烷))的中心疏水链和侧翼的两个聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))亲水链构成的非离子三嵌段共聚物、SOLUTOLHS 15(Macrogol-15羟基硬脂酸酯)、LABRASOL(聚氧辛酸甘油酯)、聚氧10油基醚、TWEEN(聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯)、乙醇和聚乙二醇。

[0111] 治疗威尔逊病的方法:

[0112] 在又另一方面,本申请涉及治疗人受试者的WD的方法,该方法包括向该人受试者施用治疗有效量的包含本文披露的编码截短的ATP7B(ATP7B Δ 1-3-SS)的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15的rAAV。

[0113] 在一个实施方案中,本申请提供了治疗WD的方法,该方法包括施用包含AAV衣壳和包装的载体基因组的rAAV,其中该载体基因组包含截短的人ATP7B(ATP7B Δ 1-3-SS)的编码序列(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)。

[0114] 在又另一方面,本申请涉及治疗人受试者的WD的方法,该方法包括向诊断为具有至少一个ATP7B中突变的人受试者施用治疗有效量的至少一种rAAV,该rAAV包含载体基因组,该载体基因组包含截短的人ATP7B(ATP7B Δ 1-3-SS)的编码序列(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)。在一个实施方案中,本申请提供在诊断为具有至少一个ATP7B中突变的人受试者中治疗WD的方法,该方法包括施用rAAV,该rAAV包含AAV衣壳和包装的载体基因组,其中该载体基因组包含截短的人ATP7B(ATP7B Δ 1-3-SS)的编码序列(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:15)。由SEQ ID NO:1表示的编码序列编码由SEQ ID NO:8表示的截短的ATP7B。

在一些实施方案中,衣壳是AAV9衣壳。

[0115] 在又另一方面,本申请涉及治疗人受试者的WD的方法,该方法包括向诊断为具有至少一个ATP7B中突变的人受试者施用治疗有效量的至少一种rAAV,该rAAV包含载体基因组,该载体基因组包含截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如SEQ ID NO:1)。在一个实施方案中,本申请提供在诊断为具有至少一个ATP7B中突变的人受试者中治疗WD的方法,该方法包括施用rAAV,该rAAV包含AAV衣壳和包装的载体基因组,其中该载体基因组包含截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如SEQ ID NO:1)。由SEQ ID NO:1表示的编码序列编码由SEQ ID NO:8表示的截短的ATP7B。在一些实施方案中,衣壳是AAV9衣壳。

[0116] 在又另一方面,本申请涉及治疗人受试者的WD的方法,该方法包括向诊断为具有至少一个ATP7B中突变的人受试者施用治疗有效量的至少一种rAAV,该rAAV包含载体基因组,该载体基因组包含截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如SEQ ID NO:15)。在一个实施方案中,本申请提供在诊断为具有至少一个ATP7B中突变的人受试者中治疗WD的方法,该方法包括施用rAAV,该rAAV包含AAV衣壳和包装的载体基因组,其中该载体基因组包含截短的人ATP7B(ATP7B $\Delta$ 1-3-SS)的编码序列(例如SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,衣壳是AAV9衣壳。

[0117] 可以使用任何合适的方法或途径来施用本文描述的rAAV或含有rAAV的组合物。施用途径包括例如全身、口服、吸入、鼻内、气管内、动脉内、眼内、静脉内、肌内、皮下、皮内和其他肠胃外施用途径。在一些实施方案中,静脉内施用rAAV或包含rAAV的组合物。

[0118] 施用的特定剂量对于每个患者可以是均一剂量,例如 $1.0 \times 10^{11}$ - $1.0 \times 10^{14}$ 个病毒基因组/千克患者体重(vg)/kg。可替代地,患者的剂量可以根据患者的大致体重或表面积进行调整。确定合适剂量的其他因素可包括要治疗或预防的疾病或病症,疾病的严重程度,施用途径,以及患者的年龄、性别和医学病症。确定合适的治疗剂量所需的计算的进一步细化由本领域技术人员常规地进行,尤其是根据本文披露的剂量信息和测定。剂量也可以通过使用已知的用以确定剂量的测定结合适当的剂量-应答数据来确定。当监测疾病的进展时,也可以调整个体患者的剂量。

[0119] 在一些实施方案中,rAAV以例如约 $1.0 \times 10^{11}$ vg/kg至约 $1 \times 10^{14}$ vg/kg、约 $5 \times 10^{11}$ vg/kg至约 $5 \times 10^{13}$ vg/kg、或约 $1 \times 10^{12}$ 至约 $1 \times 10^{13}$ vg/kg的剂量施用,如通过qPCR或数字液滴PCR(ddPCR)所测量的。在一些实施方案中,rAAV以约 $2 \times 10^{12}$ vg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,rAAV以约 $5 \times 10^{12}$ vg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,rAAV以约 $6 \times 10^{12}$ vg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,rAAV以约 $1 \times 10^{13}$ vg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,rAAV以约 $7 \times 10^{13}$ vg/kg的剂量施用。rAAV可以根据所期望治疗结果的需要以单剂量或多剂量(比如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个剂量)施用。在一些示例性实施方案中,仅施用单剂量的特定rAAV。

[0120] 在整个说明书中,在组合物被描述为具有、包括或包含具体组分的情况下,或在工艺和方法被描述为具有、包括、或包含具体步骤的情况下,考虑到另外地,存在本发明的组合物,其基本上由或由叙述的组分组成,并且存在根据本发明的工艺和方法,其基本上由或由叙述的加工步骤组成。

[0121] 在本申请中,当元件或组分被称为包括在和/或选自所列举的元件或组分的列表中时,应理解该元件或组分可以是所列举的元件或组分中的任何一个,或元件或组分可以

从由两个或更多个该元件或组分组成的组中选择。

[0122] 此外,应当理解,本文描述的组合物或方法的要素和/或特征可以以多种方式组合而不脱离本发明的精神和范围,无论是本文明确的还是隐含的。例如,当提及特定化合物时,除非从上下文另有理解,否则该化合物可用于本发明组合物的各种实施方案和/或本发明方法中。换句话说,在本申请中,已经以能够编写和绘制清晰简洁的应用的方式描述和描绘了实施方案,但是意图是并且将理解实施方案可以在不脱离本申请教导和一个或多个发明的情况下以各种方式组合或分离。例如,应当理解,这里描述和描绘的所有特征可以适用于这里描述和描绘的一个或多个发明的所有方面。

[0123] 应当理解,除非从上下文和使用中另有理解,否则表述“至少一个”单独地包括表述之后所列举的对象中的每一个以及所列举的对象中的两个或更多个的各种组合。除非根据上下文另有理解,否则与三个或更多个列举的对象相关的表述“和/或”应被理解为具有相同的含义。

[0124] 应理解术语“包括(include、includes、including)”、“具有(have、has、having)”、“包含(contain、contains或containing)”的使用,包括其语法等价物通常作为开放式和非限制性的,例如,不排除另外的未列举的元件或步骤,除非另有明确说明或从上下文中理解。

[0125] 如果术语“约”的使用在数量值之前,则本发明还包括特定数量值本身,除非另有特别说明。如本文所用,除非另有说明或推断,术语“约”是指标称值的±10%变化。

[0126] 应当理解,只要本发明保持可操作,步骤的顺序或执行某些动作的顺序是无关紧要的。此外,可以同时进行两个或更多个步骤或动作。

[0127] 此处使用的任何和所有示例或示例性语言,例如“比如”或“包括”仅旨在更好地说明本发明,除非声明,否则不对本发明的范围构成限制。说明书中的语言不应当被解释为指示任何未要求保护的要素为实践本发明所必需的。

#### [0128] 实施例

[0129] 现在通过参考以下实施例,将更容易理解正总体上描述的本发明,仅出于说明本发明的某些方面和实施方案的目的包括这些实施例,而不意在限制本发明。

#### [0130] 实施例1-AAV载体和从载体产生的rAAV

##### [0131] AAV载体

[0132] 此实施例描述了具有由SEQ ID NO:1表示的核酸序列的AAV载体的构建,该载体由两个AAV2末端反向重复序列(ITR, SEQ ID NO:2)限制。SEQ ID NO:1表示缺失MBD 1-3的天然人ATP7B的cDNA。SEQ ID NO:1中的核苷酸223-225编码丝氨酸残基S340, SEQ ID NO:1中的核苷酸226-228编码丝氨酸残基S341(基于野生型全长ATP7B蛋白序列进行编号)。

[0133] 如图1所示,在AAV载体中,ATP7B表达盒含有增强子(EnTTR)、启动子(TTR)、内含子(SV40小T内含子)、SEQ ID NO:1的核苷酸序列(其编码截短的人ATP7B(ATP7B Δ 1-3-SS))和SV40聚(A)信号。图2示出了说明各种组分的载体的环状图。

[0134] AAV载体DTC319含有截短的人ATP7B序列,其中保留了金属结合结构域4、5和6。截短的人ATP7B序列编码由SEQ ID NO:8表示的包含两个丝氨酸残基S340和S341的蛋白质(根据NCBI参考序列编号:NP\_000044.2)。

[0135] 猿猴病毒40(SV40)晚期聚腺苷酸化信号(Genbank登录号J02400(SEQ ID NO:7)提

供了顺式序列,用于ATP7B mRNA的有效聚腺苷酸化。该元件用作新生转录物3'端特定切割事件并添加长聚腺苷酸尾的信号。

[0136] 将每个截短的ATP7B表达盒克隆到AAV载体中。所有AAV载体都具有编码卡那霉素抗性基因的骨架。图2显示了示例性AAV载体DTC319。图1描述了用于表达ATP7B (ATP7B Δ 1-3-SS) 的DTC319的表达盒。

[0137] rAAV病毒粒子

[0138] AAV载体基因组是单链DNA基因组。只有ITR序列之间的和包含ITR序列的序列被包装到AAV病毒粒子中。病毒粒子是通过将三种质粒转染到人胚胎肾293 (HEK293) 细胞中产生的,这些细胞提供E1a和E1b基因产物。第一质粒可以是本文描述的AAV载体。第二质粒可以是包装质粒,其含有野生型AAV2 rep和AAV8或AAV9 cap基因。第三质粒是辅助腺病毒质粒。

[0139] 示例性包装质粒pAAV2/8.KanR (p2123FH) 质粒的图解显示于图3中。在该质粒中,腺相关Rep/Cap质粒pAAV2/8.KanR (p2123FH) (8354bp) 编码四种野生型AAV2病毒复制(Rep)蛋白和来自血清型8的三种野生型AAVVP衣壳(cap)蛋白。在该质粒中,通常驱动Rep基因表达的AAVp5启动子已从Rep区域的5'端移动到AAV8 cap区域的3'端。这种排列在启动子和Rep基因之间引入了间隔区(即,质粒骨架),导致Rep表达的下调和支持高滴度rAAV生产的能力的增加。卡那霉素抗性基因和MB1起点都被包括用于大肠杆菌中的质粒生产。

[0140] 示例性辅助质粒pAdDeltaF6 (Kan) 的图解显示于图4中。在该质粒中,提供了对AAV复制重要的腺病毒基因组区域,即E2A、E4和VA RNA。腺病毒E1功能也是必需的,但由HEK293宿主细胞提供。图4中所示的质粒不包含其他腺病毒复制、结构基因或对腺病毒复制至关重要的顺式元件,比如腺病毒ITR,因此,预计不会产生感染性腺病毒。卡那霉素抗性基因和MB1起点都被包括用于大肠杆菌中的质粒生产。

[0141] 实施例2-人ATP7B中金属结合结构域(MBD)1-3的缺失改善了生产产量

[0142] 此实施例描述的实验证明了ATP7B Δ 1-3-SS具有比全长ATP7B或截短形式的ATP7B Δ 1-4更高的产量。

[0143] 功能性ATP7B的缺乏导致铜在肝脏和其他组织中积累,这表现为具有神经学或精神病学症状的肝病。WD可以通过减少铜吸收或从身体中除去过量的铜来治疗。C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠不表达功能性Atp7b,因此用作WD的小鼠模型。将含有密码子优化的全长人ATP7B序列的AAV载体用于用Rep/Cap质粒(其编码四种野生型AAV2病毒复制(Rep)蛋白和来自血清型8的三种野生型AAV VP衣壳(cap)蛋白)和辅助质粒转染HEK293细胞,以获得ATP7BcoFL病毒颗粒。

[0144] 向雄性C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠静脉内(i.v.)注射10<sup>10</sup>或10<sup>11</sup>GC/kg的ATP7BcoFL(经密码子优化的全长人ATP7B)。向雌性C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠静脉内注射10<sup>9</sup>、10<sup>10</sup>或10<sup>11</sup>GC/kg的相同载体。通过电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)评估雄性(用正方形表示)和雌性(用圆圈表示)中的肝铜水平,并与来自年龄匹配的未经注射的雄性和雌性杂合(Het)和C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠的铜水平进行比较。在约9月龄时对小鼠进行尸体解剖并收获肝脏。数据示于图5中。

[0145] 利用AAV载体的基因疗法可用于治疗WD。然而,可包装在AAV载体衣壳内的cDNA的大小存在限制。野生型AAV基因组为4.7kb,包装较大的基因组可潜在地降低包封在AAV衣壳内的DNA序列的产量和完整性。因此,将编码ATP7B Δ 1-3-SS的核苷酸序列包装在AAV8衣壳

内，并测试ATP7B Δ 1-3-SS的生产产量。将编码全长 (FL) 人ATP7B、其中缺失MBD 1-3但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基 (S340和S341) 的富含丝氨酸的环的人ATP7B (ATP7B Δ 1-3-SS)、或其中缺失MBD 1-4的人ATP7B (ATP7B Δ 1-4) 的AAV载体转染到HEK293细胞中。将编码四种野生型AAV2病毒复制 (Rep) 蛋白和来自血清型8的三种野生型AAV VP衣壳 (cap) 蛋白的Rep/Cap质粒和辅助质粒与表达各种ATP7B蛋白的AAV载体共转染。图6是显示转染各种AAV载体后宿主细胞产生的rAAV滴度的条形图。Y轴指示基因组拷贝 (GC) 中每个rAAV滴度的总产量。数据显示ATP7B Δ 1-3-SS具有比全长或截短形式的ATP7B Δ 1-4更高的产量。

[0146] 实施例3-ATP7B Δ 1-3-SS在恢复铜代谢方面与ATP7B FL相比更有效

[0147] 此实施例描述的实验证明了ATP7B Δ 1-3-SS在恢复C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠的铜代谢方面比ATP7B全长 (ATP7B FL) 或ATP7B Δ 1-4更有效。

[0148] 如实施例2描述的，将大量cDNA序列包装在AAV载体衣壳内可降低DNA序列的完整性并具有潜在的质量问题。因此，将截短形式的人ATP7B包装在AAV8衣壳中，并测试其恢复铜代谢的功效。向C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠施用涵盖全长或截短的人ATP7B的 $1.0 \times 10^{13}$ GC/kg的AAV8载体。通过电感耦合等离子体-质谱评估肝铜和尿铜水平。图7是向C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠注射携带全长人ATP7B (ATP7B FL)、ATP7B Δ 1-3-SS或ATP7B Δ 1-4的AAV8后测定的、分别由正方形和圆形表示的尿铜和肝铜水平 ( $\mu\text{g/g}$ ) 的散点图。图7显示ATP7B Δ 1-3-SS在恢复C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠的铜代谢方面比ATP7B全长 (ATP7B FL) 或ATP7B Δ 1-4更有效。施用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 的C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠用作对照 (媒介物)。

[0149] 实施例4-包含AAV9衣壳的AAV载体显示较高的病毒生产

[0150] 此实施例描述的实验表明，与包含AAV8衣壳的AAV载体的生产相比，包含AAV9衣壳的AAV载体的生产具有更高的产量。通过qPCR定量DNase抗性颗粒 (DRP) 来滴定不同的AAV载体。图8显示了转染编码截短的人ATP7B的AAV载体 (DTC319) (其中缺失金属结合结构域 (MBD) 1-3，但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基 (S340和S341) 的富含丝氨酸的环) 以及共转染编码AAV8衣壳或AAV9衣壳的质粒后，从宿主细胞产生的rAAV的总产量 (基因组拷贝 (GC) 的滴度)。

[0151] 实施例5-ATP7B Δ 1-3-SS的治疗特性

[0152] 此实施例描述的动物研究证明了，ATP7B Δ 1-3-SS (例如，DTC319，一种编码截短的人ATP7B的rAAV载体，其中缺失金属结合结构域 (MBD) 1-3，但在MBD3和MBD4之间存在包含两个丝氨酸残基 (S340和S341) 的富含丝氨酸的环) 在改善小鼠模型 (C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>) 中的症状和治疗威尔逊病 (WD) 方面的功效。在此实施例中，评估了三组雄性小鼠：施用AAV输注的编码ATP7B Δ 1-3-SS的AAV8载体 (例如，DTC319) 或静脉内注射媒介物对照 (稀释缓冲液) 的WD小鼠 (C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠)，以及用作阴性对照的野生型 (WT) 小鼠。对于输注，rAAV通过三次瞬时转染贴壁HEK细胞而产生，并通过氯化铯梯度超速离心 (本领域熟知的纯化方法) 进行纯化。在研究终点 (输注后4周)，评估每组小鼠的肝铜积累、铜蓝蛋白活性和肝病理学。

[0153] 通过电感耦合等离子体-质谱 (ICP-MS) 测量肝铜积累，并且证明在施用ATP7B Δ 1-3-SS (例如，DTC319) 的WD小鼠中肝铜水平与媒介物对照相比显著降低 (参见图9, De1A的条图)。图9显示C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠在施用静脉内注射的媒介物对照 (稀释缓冲液, WD的条图) 或输注携带天然ATP7B Δ 1-3-SS的AAV8 (De1A的条图) 后的肝铜积累水平 ( $\mu\text{g/g}$ )。此条形图

中表示的未经注射的野生型小鼠(WT)中肝铜积累水平用作阴性对照。值以平均值±SEM表示。

[0154] 在施用ATP7B Δ 1-3-SS(例如,DTC319)后,WD小鼠中铜蓝蛋白活性显著增加(参见图10,De1A的条图)。使用本领域熟知的基于酶反应的比色活性测定法来检测铜蓝蛋白活性(参见Schosinsky等人,Clin Chem.[临床化学]1974;20(12):1556-63)。图10显示接受静脉内注射的媒介物对照(稀释缓冲液,WD的条图)或AAV输注的编码ATP7B Δ 1-3-SS的AAV8载体(De1A的条图)后C3He-Atp7b<sup>tx-j</sup>小鼠中的铜蓝蛋白活性,如通过基于酶反应的比色活性测定法所测量的。如通过相同的基于酶反应的比色活性测定法所测量的,未经注射的野生型(WT)小鼠中铜蓝蛋白活性也表示在此条形图中。该图显示了铜蓝蛋白的活性,如在540nm读取的光密度OD所测量的。值以平均值±SEM表示。

[0155] 从每组中所有动物收获肝脏并用H&E(苏木精和伊红染色)进行染色。由委员会认证的病理学家根据0-4评分系统评估H&E切片的核增大和肝细胞肥大、组织破坏、炎性浸润和肝细胞坏死。对一组中每只小鼠的评分取平均值。图11显示了在对每组动物的H&E切片进行标准评估后获得的平均得分。

[0156] 实施例6-AAV9基因疗法作为威尔逊病(WD)的可行疗法

[0157] 此实施例描述了包含ATP7B Δ 1-3-SS的rAAV颗粒在治疗受试者的WD中的用途。将含有编码截短的人ATP7B(ATP7B Δ 1-3-SS)的核苷酸序列的AAV载体如DTC319(图2),编码四种野生型AAV2病毒复制(Rep)蛋白和来自血清型9(AAV9)的三种野生型AAVVP衣壳(cap)蛋白的Rep/Cap质粒,和如实施例1描述的辅助质粒共转染到宿主细胞中。然后向需要WD治疗的受试者静脉内施用收获的rAAV颗粒。可替代地,向受试者施用从用图12表示的载体转染的宿主细胞收获的rAAV颗粒,用于治疗WD。

[0158] 通过引用并入

[0159] 本文提及的每个专利文献和科学文章的全部披露内容出于所有目的通过引用并入。

[0160] 等同物

[0161] 在不脱离本披露的精神或基本特征的情况下,本披露可以以其他特定形式实施。因此,前述实施方案在所有方面都被认为是说明性的而不是限制本文描述的披露内容。不同实施方案的各种结构元件和各种披露的方法步骤可以以各种组合和排列来使用,并且所有此类变型都被认为是本披露的形式。因此,本披露的范围由所附权利要求而不是由前述说明书来指示,并且在权利要求的等效含义和范围内的所有变化旨在包含在其中。

## 序列表

<110> 阿尔特拉吉尼克斯制药公司

<120> 治疗威尔逊病的基因疗法构建体

<130> ULP-003WO

<140> PCT/US20/12131

<141> 2020-01-03

<150> 62/788,324

<151> 2019-01-04

<150> 62/834,830

<151> 2019-04-16

<160> 15

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 3603

<212> DNA

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> 人工序列的描述：天然Del 1-3 ATP7B

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (223)..(225)

<223> 核苷酸223-225编码丝氨酸残基S340（基于野生型蛋白质序列进行编号）

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (226)..(228)

<223> 核苷酸226-228编码丝氨酸残基S341（基于野生型蛋白质序列进行编号）

<400> 1

atgcctgagc aggagagaca gatcacagcc agagaagggg ccagtcggaa aatcttatct 60

aagctttctt tgcctacccg tgcctggaa ccagcaatga agaagagtgg ttctttgac 120

aatgttggtatgtt atgaagggtgg tctggatggc ctggccctt cttctcaggt ggccaccagc 180

acagtcaggg atggagccga agggagtggg acagatcaca ggtttccag ttctcattcc 240

cctggctccc caccgagaaa ccaggtccag ggcacatgca gtaccactct gattgccatt 300

gccggcatga cctgtgcatt ctgtgtccat tccattgaag gcatgatctc ccaactggaa 360

gggtgcagc aaatatcggt gtcttggcc gaaggactg caacagtct ttataatccc	420
tctgttaatta gcccagaaga actcagagct gctatagaag acatgggatt tgaggcttca	480
gtcgttctg aaagctgttc tactaaccct cttggaaacc acagtgcgg gaattccatg	540
gtgcaaacta cagatggta acctacatct gtgcaggaag tggctccccca cactgggagg	600
ctccctgcaa accatgcccc ggacatctt gcaaagtccc cacaatcaac cagagcagt	660
gcaccgcaga agtgcttctt acagatcaaa ggcacatgacct gtgcacccctg tgtgtcta	720
atagaaagga atctgcagaa agaagctggt gttctctccg tgggtttgc cttgatggca	780
ggaaaggcag agatcaagta tgacccagag gtcacccagc ccctcgagat agtcagttc	840
atccaggacc tgggtttga ggcacatgactc atggaggact acgcaggctc cgatggcaac	900
attgagctga caatcacagg gatgacccatgc gcgtccctgtg tccacaacat agagtccaaa	960
ctcacgagga caaatggcat cacttatgcc tccgttgcctt ttgccaccag caaagccctt	1020
gttaagtttgc acccgaaat tatcggtcca cggatattttt tcaaaatttt tgaggaaattt	1080
ggctttcatg ctccctggc ccagagaaac cccaaacgctc atcacttggaa ccacaagatg	1140
[0002] gaaataaaaggc agtggaaagaa gtctttctg tgcacccatgg tgggtttgc catgttgc	1200
gccttaatga tctatatgct gatacccgac aacgagcccc accagtccat ggtcctggac	1260
cacaacatca ttccaggact gtcatttcta aatctcatct tctttatctt gtgtaccc	1320
gtccagctcc tcgggtgggtg gtacttctac gttcaggcct acaaattctt gagacacagg	1380
tcagccaaca tggacgtgct catcgccctg gccacaagca ttgcttatgt ttattctctg	1440
gtcatccctgg tgggttgcgt ggctgagaag gcggagagga gccctgtgac attcttcgac	1500
acgcccccca tgcttttgt gttcattgcc ctggccgggt ggctgaaaca ctggcaaag	1560
agcaaaacct cagaaggccct ggctaaactc atgtctctcc aagccacaga agccaccgtt	1620
gtgacccttg gtgaggacaa tttaatcatc agggaggagc aagtcccat ggagctgggt	1680
cagcggggcg atatcgtaa ggtggccct gggggaaagt ttccagtgaa tggaaagtc	1740
ctggaaaggca ataccatggc tcatgacttcc ctcatcacag gagaagccat gccagtcact	1800
aagaaacccg gaagcactgt aattgcgggg tctataatgc cacatggctc tgtgctcatt	1860
aaagctaccc acgtggccaa tgacaccact ttggctcaga ttgtgaaact ggtgaaagag	1920
gctcagatgt caaaggcacc cattcagcag ctggctgacc ggtagtgg atatttgtc	1980

	ccatttatca tcatcatgtc aactttgacg ttgggtggat ggattgtaat cggttttac	2040
	gattttggtg ttgttcagag atactttcct aaccccaaca agcacatctc ccagacagag	2100
	gtgatcatcc gggttgctt ccagacgtcc atcacggtgc tgtgcattgc ctgcccgtc	2160
	tccctggggc tggccacgcc cacggctgtc atggtggca cgggggtggc cgcgagaac	2220
	ggcatcctca tcaagggagg caagccccgt gагатggcgc acaagataaa gactgtgatg	2280
	tttгасаагаа ctggcaccat tacccatggc gtccccaggg tcatgcgggt gctcctgctg	2340
	ggggatgtgg ccacactgcc cctcaggaag gttctggctg tggтggggac tgccgaggcc	2400
	агсагтгааа accccttggg cgtggcагtc accaaatact гтaaагагга acttggaaaca	2460
	gagaccttgg gatactgcac ggacttccag gcagtgccag gctgtggaaat тgggtgcaa	2520
[0003]	gtcагcааcг tggaggcat cctggccac agtggcгccc cttgагtgc accggccагt	2580
	cacctgaatg aggctggcаг cttcccgca gaaaaагatg cагtccccca gaccttctct	2640
	gtgctgattg gaaaccgtga gtggctgagg cgcaacggtt taaccatttc tagcgtgtc	2700
	агtгасcгtta tgacагacca cgагatgaaa ggacагacag ccacccctggt ggctattgac	2760
	ggтgtgctct gtggatgtat cgcaatcgca gacgctgtca agcaggaggc tgccctggct	2820
	gtgcacacgc tgcагagcat gggтgtggac gtggttctga tcacggggga caaccggaa	2880
	acagccagag ctattgccac ccaggttggc atcaacaaag tctttcaga ggtgctgcct	2940
	tcgcacaagg tggccaaggat ccaggagctc cagaataaag ggaагaaагt cgccatggt	3000
	ggggatgggg tcaatgactc cccggcttg gcccaggcag acatgggtgt ggccattggc	3060
	accggcacgg atgtggccat cgaggcагcc gacgtcgtcc ttatcагaaa tgatttgc	3120
	gatgtggtgg ctагcattca cctttccaag aggactgtcc gaaggatacg catcaacctg	3180
	gtcctggcac tgatttataa cctggttggg ataccattt cagcagggtgt cttcatgccc	3240
	atcggcattt tgctgcagcc ctggatgggc tcagcggcca tggcагcctc ctctgtgtct	3300
	gtggтgctct catccctgca gctcaагtgc tataagaагc ctgacctgga gaggtatgag	3360
	gcacaggcgc atggccacat gaagccccgt acggcatccc aggtcагtgt gcacataggc	3420
	atggatgaca ggtggggga ctccccagg gccacaccat gggaccaggc cagctatgtc	3480
	agccaggtgt cgctgtcctc cctgacgtcc gacaагccat ctcggcacag cgctgcagca	3540

gacgatgatg gggacaagtg gtctctgctc ctgaatggca gggatgagga gcagtagatc	3600
tga	3603
<210> 2	
<211> 145	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: AAV2 ITR	
<400> 2	
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc	60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg	120
gccaactcca tcacttagggg ttccct	145
<210> 3	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
[0004] <220>	
<223> 人工序列的描述: enTTR增强子序列	
<400> 3	
ctacctcgta atcgcccgcc ccctgttcaa acatgtccta atactctgtc tctgcaaggg	60
tcatcagtag tttccatct tactcaacat cctcccagtg	100
<210> 4	
<211> 95	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: SV40小T内含子	
<400> 4	
gctctaagg aaatataaaa ttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg	60
tttctctttt ttagattcca acctttggaa ctgat	95
<210> 5	
<211> 315	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: rHBB内含子

&lt;400&gt; 5

gtgagcgggc gggacggccc ttctcctccg ggctgttaatt agcgcttgg ttaatgacgg 60

cttgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc cttgagggc tccgggagg ccctttgtgc 120

ggggggagcg gctcggggct gtccgcgggg ggacggctgc ctccgggggg gacggggcag 180

ggcggggttc ggcttctggc gtgtgaccgg cggtcaaga gcctctgcta accatgttca 240

tgcccttc ttttcctac agtcctggg caacgtgctg gttattgtgc tgtctcatca 300

tttggcaaa gaatt 315

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 215

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: BGH聚腺苷酸化信号序列

[0005]

&lt;400&gt; 6

gcctcgactg tgccctctag ttgccagcca tctgttgttt gcccccccc cgtgccttcc 60

ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctccctaat aaaatgagga aattgcatcg 120

cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtgggg tggggcagga cagcaagggg 180

gaggattggg aagacaatag caggcatgct gggga 215

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 198

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: SV40聚腺苷酸化信号序列

&lt;400&gt; 7

gatccagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga 60

aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtat gctattgctt tatttgtaac cattataagc 120

tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcattttta tgtttcaggt tcagggggag 180

gtgtgggagg ttttttag 198

<210> 8  
<211> 1200  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：天然DEL 1-3 ATP7B，蛋白质

<220>  
<221> 尚未归类的特征  
<222> (75)..(75)  
<223> 第75位的氨基酸残基对应于丝氨酸S340（基于野生型蛋白质序列进行编号）

<220>  
<221> 尚未归类的特征  
<222> (76)..(76)  
<223> 第76位的氨基酸残基对应于丝氨酸S341（基于野生型蛋白质序列进行编号）

<400> 8

Met Pro Glu Gln Glu Arg Gln Ile Thr Ala Arg Glu Gly Ala Ser Arg  
1 5 10 15

[0006] Lys Ile Leu Ser Lys Leu Ser Leu Pro Thr Arg Ala Trp Glu Pro Ala  
20 25 30

Met Lys Lys Ser Phe Ala Phe Asp Asn Val Gly Tyr Glu Gly Gly Leu  
35 40 45

Asp Gly Leu Gly Pro Ser Ser Gln Val Ala Thr Ser Thr Val Arg Asp  
50 55 60

Gly Ala Glu Gly Ser Gly Thr Asp His Arg Ser Ser Ser Ser His Ser  
65 70 75 80

Pro Gly Ser Pro Pro Arg Asn Gln Val Gln Gly Thr Cys Ser Thr Thr  
85 90 95

Leu Ile Ala Ile Ala Gly Met Thr Cys Ala Ser Cys Val His Ser Ile  
100 105 110

Glu Gly Met Ile Ser Gln Leu Glu Gly Val Gln Gln Ile Ser Val Ser  
115 120 125

Leu Ala Glu Gly Thr Ala Thr Val Leu Tyr Asn Pro Ser Val Ile Ser  
 130 135 140

Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ala Ile Glu Asp Met Gly Phe Glu Ala Ser  
 145 150 155 160

Val Val Ser Glu Ser Cys Ser Thr Asn Pro Leu Gly Asn His Ser Ala  
 165 170 175

Gly Asn Ser Met Val Gln Thr Thr Asp Gly Thr Pro Thr Ser Val Gln  
 180 185 190

Glu Val Ala Pro His Thr Gly Arg Leu Pro Ala Asn His Ala Pro Asp  
 195 200 205

Ile Leu Ala Lys Ser Pro Gln Ser Thr Arg Ala Val Ala Pro Gln Lys  
 210 215 220

[0007] Cys Phe Leu Gln Ile Lys Gly Met Thr Cys Ala Ser Cys Val Ser Asn  
 225 230 235 240

Ile Glu Arg Asn Leu Gln Lys Glu Ala Gly Val Leu Ser Val Leu Val  
 245 250 255

Ala Leu Met Ala Gly Lys Ala Glu Ile Lys Tyr Asp Pro Glu Val Ile  
 260 265 270

Gln Pro Leu Glu Ile Ala Gln Phe Ile Gln Asp Leu Gly Phe Glu Ala  
 275 280 285

Ala Val Met Glu Asp Tyr Ala Gly Ser Asp Gly Asn Ile Glu Leu Thr  
 290 295 300

Ile Thr Gly Met Thr Cys Ala Ser Cys Val His Asn Ile Glu Ser Lys  
 305 310 315 320

Leu Thr Arg Thr Asn Gly Ile Thr Tyr Ala Ser Val Ala Leu Ala Thr  
 325 330 335

Ser Lys Ala Leu Val Lys Phe Asp Pro Glu Ile Ile Gly Pro Arg Asp  
340 345 350

Ile Ile Lys Ile Ile Glu Glu Ile Gly Phe His Ala Ser Leu Ala Gln  
355 360 365

Arg Asn Pro Asn Ala His His Leu Asp His Lys Met Glu Ile Lys Gln  
370 375 380

Trp Lys Lys Ser Phe Leu Cys Ser Leu Val Phe Gly Ile Pro Val Met  
385 390 395 400

Ala Leu Met Ile Tyr Met Leu Ile Pro Ser Asn Glu Pro His Gln Ser  
405 410 415

Met Val Leu Asp His Asn Ile Ile Pro Gly Leu Ser Ile Leu Asn Leu  
420 425 430

Ile Phe Phe Ile Leu Cys Thr Phe Val Gln Leu Leu Gly Gly Trp Tyr  
435 440 445

[0008]

Phe Tyr Val Gln Ala Tyr Lys Ser Leu Arg His Arg Ser Ala Asn Met  
450 455 460

Asp Val Leu Ile Val Leu Ala Thr Ser Ile Ala Tyr Val Tyr Ser Leu  
465 470 475 480

Val Ile Leu Val Val Ala Val Ala Glu Lys Ala Glu Arg Ser Pro Val  
485 490 495

Thr Phe Phe Asp Thr Pro Pro Met Leu Phe Val Phe Ile Ala Leu Gly  
500 505 510

Arg Trp Leu Glu His Leu Ala Lys Ser Lys Thr Ser Glu Ala Leu Ala  
515 520 525

Lys Leu Met Ser Leu Gln Ala Thr Glu Ala Thr Val Val Thr Leu Gly  
530 535 540

Glu Asp Asn Leu Ile Ile Arg Glu Glu Gln Val Pro Met Glu Leu Val

545	550	555	560
Gln Arg Gly Asp Ile Val Lys Val Val Pro Gly Gly Lys Phe Pro Val			
565		570	575
Asp Gly Lys Val Leu Glu Gly Asn Thr Met Ala Asp Glu Ser Leu Ile			
580		585	590
Thr Gly Glu Ala Met Pro Val Thr Lys Lys Pro Gly Ser Thr Val Ile			
595		600	605
Ala Gly Ser Ile Asn Ala His Gly Ser Val Leu Ile Lys Ala Thr His			
610		615	620
Val Gly Asn Asp Thr Thr Leu Ala Gln Ile Val Lys Leu Val Glu Glu			
625		630	635
Ala Gln Met Ser Lys Ala Pro Ile Gln Gln Leu Ala Asp Arg Phe Ser			
645		650	655
[0009]			
Gly Tyr Phe Val Pro Phe Ile Ile Ile Met Ser Thr Leu Thr Leu Val			
660		665	670
Val Trp Ile Val Ile Gly Phe Ile Asp Phe Gly Val Val Gln Arg Tyr			
675		680	685
Phe Pro Asn Pro Asn Lys His Ile Ser Gln Thr Glu Val Ile Ile Arg			
690		695	700
Phe Ala Phe Gln Thr Ser Ile Thr Val Leu Cys Ile Ala Cys Pro Cys			
705		710	715
Ser Leu Gly Leu Ala Thr Pro Thr Ala Val Met Val Gly Thr Gly Val			
725		730	735
Ala Ala Gln Asn Gly Ile Leu Ile Lys Gly Gly Lys Pro Leu Glu Met			
740		745	750
Ala His Lys Ile Lys Thr Val Met Phe Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr			
755		760	765

His Gly Val Pro Arg Val Met Arg Val Leu Leu Leu Gly Asp Val Ala  
770 775 780

Thr Leu Pro Leu Arg Lys Val Leu Ala Val Val Gly Thr Ala Glu Ala  
785 790 795 800

Ser Ser Glu His Pro Leu Gly Val Ala Val Thr Lys Tyr Cys Lys Glu  
805 810 815

Glu Leu Gly Thr Glu Thr Leu Gly Tyr Cys Thr Asp Phe Gln Ala Val  
820 825 830

Pro Gly Cys Gly Ile Gly Cys Lys Val Ser Asn Val Glu Gly Ile Leu  
835 840 845

Ala His Ser Glu Arg Pro Leu Ser Ala Pro Ala Ser His Leu Asn Glu  
850 855 860

[0010] Ala Gly Ser Leu Pro Ala Glu Lys Asp Ala Val Pro Gln Thr Phe Ser  
865 870 875 880

Val Leu Ile Gly Asn Arg Glu Trp Leu Arg Arg Asn Gly Leu Thr Ile  
885 890 895

Ser Ser Asp Val Ser Asp Ala Met Thr Asp His Glu Met Lys Gly Gln  
900 905 910

Thr Ala Ile Leu Val Ala Ile Asp Gly Val Leu Cys Gly Met Ile Ala  
915 920 925

Ile Ala Asp Ala Val Lys Gln Glu Ala Ala Leu Ala Val His Thr Leu  
930 935 940

Gln Ser Met Gly Val Asp Val Val Leu Ile Thr Gly Asp Asn Arg Lys  
945 950 955 960

Thr Ala Arg Ala Ile Ala Thr Gln Val Gly Ile Asn Lys Val Phe Ala  
965 970 975

Glu Val Leu Pro Ser His Lys Val Ala Lys Val Gln Glu Leu Gln Asn  
 980 985 990

Lys Gly Lys Lys Val Ala Met Val Gly Asp Gly Val Asn Asp Ser Pro  
 995 1000 1005

Ala Leu Ala Gln Ala Asp Met Gly Val Ala Ile Gly Thr Gly Thr  
 1010 1015 1020

Asp Val Ala Ile Glu Ala Ala Asp Val Val Leu Ile Arg Asn Asp  
 1025 1030 1035

Leu Leu Asp Val Val Ala Ser Ile His Leu Ser Lys Arg Thr Val  
 1040 1045 1050

Arg Arg Ile Arg Ile Asn Leu Val Leu Ala Leu Ile Tyr Asn Leu  
 1055 1060 1065

Val Gly Ile Pro Ile Ala Ala Gly Val Phe Met Pro Ile Gly Ile  
 1070 1075 1080

Val Leu Gln Pro Trp Met Gly Ser Ala Ala Met Ala Ala Ser Ser  
 1085 1090 1095

Val Ser Val Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Lys Cys Tyr Lys Lys  
 1100 1105 1110

Pro Asp Leu Glu Arg Tyr Glu Ala Gln Ala His Gly His Met Lys  
 1115 1120 1125

Pro Leu Thr Ala Ser Gln Val Ser Val His Ile Gly Met Asp Asp  
 1130 1135 1140

Arg Trp Arg Asp Ser Pro Arg Ala Thr Pro Trp Asp Gln Val Ser  
 1145 1150 1155

Tyr Val Ser Gln Val Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Lys Pro  
 1160 1165 1170

Ser	Arg	His	Ser	Ala	Ala	Ala	Asp	Asp	Asp	Gly	Asp	Lys	Trp	Ser
1175							1180							1185

Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Arg	Asp	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ile		
1190						1195					1200		

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 2211

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：编码AAV9衣壳蛋白VP1的核酸序列

&lt;400&gt; 9

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc 60

gagtgggtggg ctttgaacc tggagccctt caacccaagg caaatcaaca acatcaagac 120

aacgctcgag gtcttgct tccgggttac aaataccctt gaccggcaa cgactcgac 180

aaggggggagc cggtaacgc agcagacgca gcggccctcg agcacgacaa ggctacgac 240

[0012] cagcagctca aggccggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgcccga cgccgagttc 300

caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360

gc当地aaaaaga ggcttcttga acctcttggt ctgggttggg aagcggctaa gacggctcct 420

ggaaagaaga ggctgttaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc 480

aaatcgggtg cacagccgc taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540

tcagtcctcag accctcaacc aatcgagaa cctccgcag cccctcagg tgtggatct 600

tttacaatgg ttccaggtgg tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660

gtgggttagtt ctcggaaa ttggcattgc gattccaat ggctggggga cagagtcatc 720

accaccagca cccgaacctg gcccctgcc acctacaaca atcacctcta caagcaaatac 780

tccaacagca catctggagg atcttcaaatac gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840

tggggtagtt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga 900

ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcactca acttcaagct cttcaacatt 960

caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ctttaccagc 1020

acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080

	gagggctgcc tcccgccgtt cccagcggac gtttcatga ttccctagta cgggtatctg	1140
	acgcttaatg atggaagcca ggcgcgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc	1200
	ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta	1260
	ccttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc	1320
	gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg	1380
	ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaaagaaa ctacataacct	1440
	ggacccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaaacaa caacagcgaa	1500
	tttgcttggc ctggagcttc ttcttggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct	1560
	ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tcttccttt gtctggatct	1620
	ttaatttttgc gcaaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata	1680
	accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccaa tggacaagtgc	1740
	gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag ggcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga	1800
[0013]	atacttccgg gtatggtttgc caggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc	1860
	aaaattcctc acacggacgg caactttcac ctttctccgc tggatggagg gtttggaaatg	1920
	aagcacccgc ctcctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg	1980
	gccttcaaca aggacaagct gaactcttc atcaccagt attctactgg ccaagtccgc	2040
	gtggagatcg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggAACCC ggagatccag	2100
	tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaagggtgt	2160
	tatagtgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgtaa	2211
	<210> 10	
	<211> 736	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：编码AAV9衣壳蛋白VP1的氨基酸序列	
	<400> 10	

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro  
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro  
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro  
115 120 125

[0014]

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly  
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro  
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser  
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

225	230	235	240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu 245 250 255			
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn 260 265 270			
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg 275 280 285			
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn 290 295 300			
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile 305 310 315 320			
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn 325 330 335			
<b>[0015]</b>			
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu 340 345 350			
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro 355 360 365			
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp 370 375 380			
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe 385 390 395 400			
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu 405 410 415			
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu 420 425 430			
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser 435 440 445			

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser  
 450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro  
 465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn  
 485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn  
 500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys  
 515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly  
 530 535 540

[0016] Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile  
 545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser  
 565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln  
 580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln  
 595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His  
 610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met  
 625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala  
 645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr  
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln  
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn  
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val  
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
725 730 735

<210> 11

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

[0017] <220>

<223> 人工序列的描述：共有Kozak序列

<400> 11

gcccggcc

6

<210> 12

<211> 190

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：TTR启动子序列

<400> 12

atttcataga acgaatgttc cgatgctcta atctctctag acaaggttca tatttgtatg 60

ggttacttat tctctctttg ttgactaagt caataatcag aatcagcagg tttgcagtca 120

gattggcagg gataaggcagc ctagctcagg agaagtgagt ataaaagccc caggctggga 180

gcagccatca 190

<210> 13

<211> 1120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: 天然DEL 1-4 ATP7B, 蛋白质

&lt;400&gt; 13

Met	Pro	Glu	Gln	Glu	Arg	Gln	Ile	Thr	Ala	Arg	Glu	Gly	Ala	Ser	Arg
1															15

Lys	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Ser	Leu	Pro	Thr	Arg	Ala	Trp	Glu	Pro	Ala
															30
20															25

Met	Lys	Lys	Ser	Phe	Ala	Phe	Asp	Asn	Val	Gly	Tyr	Glu	Gly	Gly	Leu
															45
35															40

Asp	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Ser	Gln	Val	Ala	Thr	Ser	Thr	Val	Arg	Ser
															50
50															55

Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Glu	Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala	Ser
															80
65															70

[0018]

Val	Val	Ser	Glu	Ser	Cys	Ser	Thr	Asn	Pro	Leu	Gly	Asn	His	Ser	Ala
															95
85															90

Gly	Asn	Ser	Met	Val	Gln	Thr	Thr	Asp	Gly	Thr	Pro	Thr	Ser	Val	Gln
															110
100															105

Glu	Val	Ala	Pro	His	Thr	Gly	Arg	Leu	Pro	Ala	Asn	His	Ala	Pro	Asp
															125
115															120

Ile	Leu	Ala	Lys	Ser	Pro	Gln	Ser	Thr	Arg	Ala	Val	Ala	Pro	Gln	Lys
															140
130															135

Cys	Phe	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly	Met	Thr	Cys	Ala	Ser	Cys	Val	Ser	Asn
															160
145															150

Ile	Glu	Arg	Asn	Leu	Gln	Lys	Glu	Ala	Gly	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Val
															175
165															170

Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Ile	Lys	Tyr	Asp	Pro	Glu	Val	Ile
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

180

185

190

Gln Pro Leu Glu Ile Ala Gln Phe Ile Gln Asp Leu Gly Phe Glu Ala  
 195 200 205

Ala Val Met Glu Asp Tyr Ala Gly Ser Asp Gly Asn Ile Glu Leu Thr  
 210 215 220

Ile Thr Gly Met Thr Cys Ala Ser Cys Val His Asn Ile Glu Ser Lys  
 225 230 235 240

Leu Thr Arg Thr Asn Gly Ile Thr Tyr Ala Ser Val Ala Leu Ala Thr  
 245 250 255

Ser Lys Ala Leu Val Lys Phe Asp Pro Glu Ile Ile Gly Pro Arg Asp  
 260 265 270

Ile Ile Lys Ile Ile Glu Glu Ile Gly Phe His Ala Ser Leu Ala Gln  
 275 280 285

[0019]

Arg Asn Pro Asn Ala His His Leu Asp His Lys Met Glu Ile Lys Gln  
 290 295 300

Trp Lys Lys Ser Phe Leu Cys Ser Leu Val Phe Gly Ile Pro Val Met  
 305 310 315 320

Ala Leu Met Ile Tyr Met Leu Ile Pro Ser Asn Glu Pro His Gln Ser  
 325 330 335

Met Val Leu Asp His Asn Ile Ile Pro Gly Leu Ser Ile Leu Asn Leu  
 340 345 350

Ile Phe Phe Ile Leu Cys Thr Phe Val Gln Leu Leu Gly Gly Trp Tyr  
 355 360 365

Phe Tyr Val Gln Ala Tyr Lys Ser Leu Arg His Arg Ser Ala Asn Met  
 370 375 380

Asp Val Leu Ile Val Leu Ala Thr Ser Ile Ala Tyr Val Tyr Ser Leu  
 385 390 395 400

Val Ile Leu Val Val Ala Val Ala Glu Lys Ala Glu Arg Ser Pro Val  
405 410 415

Thr Phe Phe Asp Thr Pro Pro Met Leu Phe Val Phe Ile Ala Leu Gly  
420 425 430

Arg Trp Leu Glu His Leu Ala Lys Ser Lys Thr Ser Glu Ala Leu Ala  
435 440 445

Lys Leu Met Ser Leu Gln Ala Thr Glu Ala Thr Val Val Thr Leu Gly  
450 455 460

Glu Asp Asn Leu Ile Ile Arg Glu Glu Gln Val Pro Met Glu Leu Val  
465 470 475 480

Gln Arg Gly Asp Ile Val Lys Val Val Pro Gly Gly Lys Phe Pro Val  
485 490 495

[0020] Asp Gly Lys Val Leu Glu Gly Asn Thr Met Ala Asp Glu Ser Leu Ile  
500 505 510

Thr Gly Glu Ala Met Pro Val Thr Lys Lys Pro Gly Ser Thr Val Ile  
515 520 525

Ala Gly Ser Ile Asn Ala His Gly Ser Val Leu Ile Lys Ala Thr His  
530 535 540

Val Gly Asn Asp Thr Thr Leu Ala Gln Ile Val Lys Leu Val Glu Glu  
545 550 555 560

Ala Gln Met Ser Lys Ala Pro Ile Gln Gln Leu Ala Asp Arg Phe Ser  
565 570 575

Gly Tyr Phe Val Pro Phe Ile Ile Ile Met Ser Thr Leu Thr Leu Val  
580 585 590

Val Trp Ile Val Ile Gly Phe Ile Asp Phe Gly Val Val Gln Arg Tyr  
595 600 605

Phe Pro Asn Pro Asn Lys His Ile Ser Gln Thr Glu Val Ile Ile Arg  
 610 615 620

Phe Ala Phe Gln Thr Ser Ile Thr Val Leu Cys Ile Ala Cys Pro Cys  
 625 630 635 640

Ser Leu Gly Leu Ala Thr Pro Thr Ala Val Met Val Gly Thr Gly Val  
 645 650 655

Ala Ala Gln Asn Gly Ile Leu Ile Lys Gly Gly Lys Pro Leu Glu Met  
 660 665 670

Ala His Lys Ile Lys Thr Val Met Phe Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr  
 675 680 685

His Gly Val Pro Arg Val Met Arg Val Leu Leu Leu Gly Asp Val Ala  
 690 695 700

[0021] Thr Leu Pro Leu Arg Lys Val Leu Ala Val Val Gly Thr Ala Glu Ala  
 705 710 715 720

Ser Ser Glu His Pro Leu Gly Val Ala Val Thr Lys Tyr Cys Lys Glu  
 725 730 735

Glu Leu Gly Thr Glu Thr Leu Gly Tyr Cys Thr Asp Phe Gln Ala Val  
 740 745 750

Pro Gly Cys Gly Ile Gly Cys Lys Val Ser Asn Val Glu Gly Ile Leu  
 755 760 765

Ala His Ser Glu Arg Pro Leu Ser Ala Pro Ala Ser His Leu Asn Glu  
 770 775 780

Ala Gly Ser Leu Pro Ala Glu Lys Asp Ala Val Pro Gln Thr Phe Ser  
 785 790 795 800

Val Leu Ile Gly Asn Arg Glu Trp Leu Arg Arg Asn Gly Leu Thr Ile  
 805 810 815

Ser Ser Asp Val Ser Asp Ala Met Thr Asp His Glu Met Lys Gly Gln  
820 825 830

Thr Ala Ile Leu Val Ala Ile Asp Gly Val Leu Cys Gly Met Ile Ala  
835 840 845

Ile Ala Asp Ala Val Lys Gln Glu Ala Ala Leu Ala Val His Thr Leu  
850 855 860

Gln Ser Met Gly Val Asp Val Val Leu Ile Thr Gly Asp Asn Arg Lys  
865 870 875 880

Thr Ala Arg Ala Ile Ala Thr Gln Val Gly Ile Asn Lys Val Phe Ala  
885 890 895

Glu Val Leu Pro Ser His Lys Val Ala Lys Val Gln Glu Leu Gln Asn  
900 905 910

Lys Gly Lys Lys Val Ala Met Val Gly Asp Gly Val Asn Asp Ser Pro  
915 920 925

[0022]

Ala Leu Ala Gln Ala Asp Met Gly Val Ala Ile Gly Thr Gly Thr Asp  
930 935 940

Val Ala Ile Glu Ala Ala Asp Val Val Leu Ile Arg Asn Asp Leu Leu  
945 950 955 960

Asp Val Val Ala Ser Ile His Leu Ser Lys Arg Thr Val Arg Arg Ile  
965 970 975

Arg Ile Asn Leu Val Leu Ala Leu Ile Tyr Asn Leu Val Gly Ile Pro  
980 985 990

Ile Ala Ala Gly Val Phe Met Pro Ile Gly Ile Val Leu Gln Pro Trp  
995 1000 1005

Met Gly Ser Ala Ala Met Ala Ala Ser Ser Val Ser Val Val Leu  
1010 1015 1020

Ser Ser Leu Gln Leu Lys Cys Tyr Lys Lys Pro Asp Leu Glu Arg

1025	1030	1035
Tyr Glu Ala Gln Ala His Gly His Met Lys Pro Leu Thr Ala Ser 1040	1045	1050
Gln Val Ser Val His Ile Gly Met Asp Asp Arg Trp Arg Asp Ser 1055	1060	1065
Pro Arg Ala Thr Pro Trp Asp Gln Val Ser Tyr Val Ser Gln Val 1070	1075	1080
Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Lys Pro Ser Arg His Ser Ala 1085	1090	1095
Ala Ala Asp Asp Asp Gly Asp Lys Trp Ser Leu Leu Leu Asn Gly 1100	1105	1110
Arg Asp Glu Glu Gln Tyr Ile 1115	1120	
 [0023]		
<210> 14		
<211> 4485		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述：示例性载体DTC319的表达盒		
<400> 14		
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc	60	
cgacgcccgg gctttgccccg ggccggcctca gtgagcgcgc gagcgcgcag agagggagtg	120	
gccaactcca tcacttagggg ttccctctacc tcgtgatcgc ccggcccccctg ttcaaacatg	180	
tcctaatact ctgtctctgc aagggtcatc agtagtttc catcttactc aacatcctcc	240	
cagtgatttc atagaacgaa tggccgatg ctctaattc tctagacaag gttcatat	300	
gtatgggtta cttattctct ctttgttgc taagtcaata atcagaatca gcagggttgc	360	
agtcaaggatg gcagggtataa gcagcctagc tcaggagaag tgagtataaa agccccaggc	420	
tgggagcgc catcagctct aaggtaataaaaatttt aagtgtataa tgtgttaaac	480	
tactgattct aattgtttct ctcttttaga ttccaacctt tggaactgat gccgccacca	540	

[0024]	tgcctgagca ggagagacag atcacagcca gagaagggc cagtcggaaa atcttatcta	600
	agctttcttt gcctaccgt gcctggaaac cagcaatgaa gaagagtittt gctttgaca	660
	atgttgctta tgaagggttgt ctggatggcc tggcccttc ttctcaggtg gccaccagca	720
	cagtcagggta tggagccgaa gggagtggaa cagatcacag gtctccagt tctcattccc	780
	ctggctcccc accgagaaac caggtccagg gcacatcgag taccactctg attgccattg	840
	ccggcatgac ctgtgcatcc tgtgtccatt ccattgaagg catgatctcc caactggaag	900
	gggtgcagca aatatcggtg tccttggccg aaggactgc aacagttctt tataatccct	960
	ctgtaattag cccagaagaa ctcagagctg ctatagaaga catggattt gaggcttcag	1020
	tcgtttctga aagctgttct actaaccctc ttggaaacca cagtgtggg aattccatgg	1080
	tgcaaactac agatggtaca cctacatctg tgcaagaaat ggctccccac actgggaggc	1140
	tccctgcaaa ccatgccccg gacatcttgg caaatcccc acaatcaacc agagcagtgg	1200
	caccgcagaa gtgcttctta cagatcaaag gcatgacctg tgcattctgt gtgtctaaca	1260
	tagaaaggaa tctgcagaaaa gaagctggtg ttctctccgt gttgggtgcc ttgatggcag	1320
	gaaaggcaga gatcaagtat gaccagagg tcatccagcc cctcgagata gctcagttca	1380
	tccaggacct gggtttgag gcagcagtca tggaggacta cgccaggctcc gatggcaaca	1440
	ttgagctgac aatcacaggg atgacactgac cgccctgtgt ccacaacata gagtccaaac	1500
	tcacgaggac aaatggcatc acttatgcct ccgttgcct tgcaccaggc aaagcccttg	1560
	ttaagtttga cccggaaatt atcggtccac gggatattat caaaattatt gaggaaattt	1620
	gctttcatgc ttccctggcc cagagaaacc ccaacgctca tcacttggac cacaagatgg	1680
	aaataaagca gtggaagaag tccttcgtt gcagccgtt gttggcatc cctgtcatgg	1740
	ccttaatgtat cttatgtt atacccagca acgagcccc ccagtccatg gtcctggacc	1800
	acaacatcat tccaggactg tccattctaa atctcatctt ctttatcttg tgtacctttg	1860
	tccagctcct cgggggtgg tacttctacg ttcaggccta caaatctctg agacacaggt	1920
	cagccaaat ggacgtgctc atcgtcctgg ccacaagcat tgcttatgtt tattctctgg	1980
	tcatcctgggt ggttgctgtg gctgagaagg cggagaggag ccctgtgaca ttcttcgaca	2040
	cgcggccat gctctttgtt ttcattgccc tggccgggtg gctggaacac ttggcaaaga	2100

	gcaaaacctc agaagccctg gctaaactca tgtctctcca agccacagaa gccaccgttg	2160
	tgacccttgg tgaggacaat ttaatcatca gggaggagca agtccccatg gagctggtgc	2220
	agcggggcga tatcgtaag gtggccctg gggaaagt tccagtggat gggaaagtcc	2280
	tggaaggcaa taccatggct gatgagtccc tcatacacagg agaagccatg ccagtcacta	2340
	agaaaacccgg aagcactgta attgcggggt ctataaatgc acatggctct gtgctcatta	2400
	aagctaccca cgtggcaat gacaccactt tggctcagat tgtgaaactg gtggaagagg	2460
	ctcagatgtc aaaggcaccc attcagcagc tggctgaccg gtttagtgtt tattttgtcc	2520
	catttatcat catcatgtca acittgacgt tgggtgtatg gattgtatc gtttttatcg	2580
	attttgtgt tgttcagaga tactttcta accccaacaa gcacatctcc cagacagagg	2640
	tgatcatccg gtttgcttc cagacgtcca tcacggtgct gtgcattgcc tgccctgct	2700
	ccctggggct ggccacgccc acggctgtca tgggtggcac cgggggtggcc ggcagaacg	2760
	gcatcctcat caagggaggc aagccctgg agatggcgca caagataaaag actgtgatgt	2820
	ttgacaagac tggcaccatt acccatggcg tccccagggt catcggtgt ctccgtctgg	2880
[0025]	gggatgtggc cacactgccc ctcaggaagg ttctggctgt ggtggggact gcggaggcca	2940
	gcagtgaaca ccccttggc gtggcagtca ccaaatactg taaagaggaa cttggaacag	3000
	agaccttggg atactgcacg gacttccagg cagtgcagg ctgtggatt gggtgcaaag	3060
	tcagcaacgt ggaaggcatc ctggcccaca gtgagcgtccc tttgagtgc cggccagtc	3120
	acctgaatga ggctggcagc cttccgcag aaaaagatgc agtccccag acttctctg	3180
	tgctgattgg aaaccgtgag tggctgaggc gcaacggttt aaccattct agcgatgtca	3240
	gtgacgctat gacagaccac gagatgaaag gacagacagc catcctggtg gctattgacg	3300
	gtgtgctctg tggatgatc gcaatgcag acgctgtcaa gcaggaggct gccctggctg	3360
	tgcacacgct gcagagcatg ggtgtggacg tggctctgat cacgggggac aaccggaaga	3420
	cagccagagc tattgccacc caggttggca tcaacaaagt cttgcagag gtgctgcctt	3480
	cgcacaaggt ggccaaggc caggagctcc agaataaagg gaagaaaagtc gccatggtg	3540
	gggatggggt caatgactcc ccggccttgg cccaggcaga catgggtgtg gccattggca	3600
	ccggcacgga tgtggccatc gaggcagccg acgtcgtcct tatcagaaat gatttgcgg	3660
	atgtggtggc tagcattcac ctttccaaga ggactgtccg aaggatacgc atcaacctgg	3720

tcctggcaact gatttataac ctgggtggga tacccattgc agcaggtgtc ttcatgccc	3780
tcggcattgt gctgcagccc tggatgggct cagcggccat ggcagcctcc tctgtgtctg	3840
tggtgctctc atccctgcag ctcaagtgcataaagaagcc tgacctggag aggtatgagg	3900
cacaggcgca tggccacatg aagccccatg cgccatccc ggtcagtgtc cacataggca	3960
tggatgacag gtggcgggac tccccccatg ccacaccatg ggaccagggtc agctatgtca	4020
gccagggtgtc gctgtcctcc ctgacgtccg acaagccatc tcggcacagc gctgcagcag	4080
acgatgatgg ggacaagtgg tctctgctcc tgaatggcag ggatgaggag cagtacatct	4140
gagatccaga catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt	4200
aaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgc atgctattgc tttatttgta accattataa	4260
gctgcaataa acaagttAAC aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg	4320
aggtgtggga ggttttttag aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctg	4380
cgctcgctcg ctcactgagg ccgccccggc aaagccccgg cgtcgggcga cctttggc	4440
cccgccctca gtgagcgcagc gagcgcgcag agagggagtg gccaa	4485

[0026]

<210> 15	
<211> 3603	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述：密码子优化的Del 1-3 ATP7B	
<400> 15	
atgccccgagc aggaaagaca gatcaccgccc agagagggcg ccagccggaa gatcctgagc	60
aagctgagcc tgcccaccag agcctggag cccgccccatga agaagtcctt cgccttcgac	120
aacgtgggct acggggcgcc cctggacggc ctgggaccat cttctcagggt ggccacaaggc	180
accgtgcgcg acggagccga gggctccggc acagatcaca gaagcagcagc cagccacagc	240
cctggcagcc cccctagaaa tcaggtgcag ggcacctgtta gcaccaccct gatcgccatt	300
gccggcatga catgcgccag ctgcgtgcac tctattgagg gcatgatctc ccagctggaa	360
ggcgtgcagc agatcagtgt gtctctggcc gagggcaccgc ccacagtgtc gtacaaccct	420
acggtgatca gccccgaaga actgagagcc gccattgagg acatgggatt cgaagccagc	480

gtggtgtccg agagctgctc caccaaccct ctgggcaatc acagcgccgg caacagcatg	540
gtgcagacca ccgacggcac ccccaccagc gtgcaggaag tggccccaca tacaggcaga	600
ctgcccgc当地 atcacgcccc cgatatacctg gccaagagcc cccagagtac aagagccgtg	660
gccccccaga agtgcttcct gcagatcaag ggcatgactt gtgcctcttg tgtgtccat	720
atcgagcggaa acctgcagaa agaggccggc gtgctgtctg tgctggtggc tctgatggcc	780
ggcaaggccg agatcaaata cgaccccgaa gtgattcagc ccctggaaat cgcccagttt	840
atccaggacc tgggcttga agccgccgtg atggaagatt acgcccggctc cgacggcaac	900
atcgagctga ccatcaccgg aatgacctgc gcctcctgtg tgcacaacat tgagtccaaag	960
ctgacccgga ccaacggcat cacctacgccc tctgtggctc tggccacccctc caaggccctc	1020
gtgaagttcg atcccgagat catcgcccc agggacatca tcaagatcat cgaagagatc	1080
ggcttccacg ccagcctggc ccagaggaac cctaacgccc accacctgga ccacaagatg	1140
gaaatcaagc agtggaaagaa aagcttcctg tgcagcctgg tggcggcat cccctgtatg	1200
gccctgtatga tctacatgct gatccccagc aacgagcccc accagtccat ggtgctggat	1260
[0027] cacaacatca tccccggcct gtctatcctg aacctgatct tcttcattcct gtgcacccctc	1320
gtgcagctgc tggcggctg gtacttctac gtgcaggcct acaagtccct gcggcacaga	1380
tccgccaaca tggacgtgct gatcgtgctg gccacatcta tcgcctacgt gtactccctc	1440
gtgatcctgg tggtggccgt ggccgagaaa gccgagagaa gccctgtgac cttcttcgac	1500
acccccccta tgctgttcgt gtttatcgcc ctggccgggt ggctggaaaca cctggccaaa	1560
agcaagacca gcgaggccct ggctaagctg atgagttctgc aggccaccga ggccacagtc	1620
gtgaccctgg gcgaggacaa cctgatcatc cgcgaggaac aggtgccaat ggaactggtg	1680
cagcggggcg acatcgtgaa ggtggtgccct ggccggcaagt tccccgtgga cggaaaagtg	1740
ctggaaggga ataccatggc cgacgagagc ctgatcacag gcgaggccat gcccgtgacc	1800
aagaaacctg gcagcacagt gatcgccggc agcatcaatg cccacggcag cgtgctgatt	1860
aaggccacac acgtggccaa cgataccacc ctggctcaga ttgtgaagct ggtggaaagag	1920
gcccgatga gcaaggcccc cattcagcag ctggctgacc gggtcagcgg ctacttcgtg	1980
ccctttatca tcatcatgag caccctgaca ctggctgtgt ggatcgtgat cggctttatc	2040
gacttcggag tgggtgcagag atacttcccc aaccctaaca agcacatcag ccagacagaa	2100

[0028]	gtgatcatca gattcgccctt tcagaccaggc atcacccgtgc tgtgtatcgc ctgcccctgt	2160
	agcctgggac tggccacacc taccgctgtg atgggtggaa caggcgtggc cgctcagaac	2220
	ggcatcctga tcaagggggg caagcctctg gaaatggctc acaagatcaa gaccgtgatg	2280
	ttcgacaaga ccggcaccat cacccacggc gtgcccagag tgatgagagt gctgctgctg	2340
	ggggatgtgg ccaccctgcc tctgagaaag gtgctggctg tcgtggcac agccgaggct	2400
	agctctgaac acccactggg agtggccgtg acaaagtact gcaaagagga actgggcacc	2460
	gaaaccctgg gctactgcac cgactttcag gccgtgcctg gctgtggcat cggctgcaag	2520
	gtgtccaacg tggaaggcat cctggccac agcgagaggc cactgtctgc ccctgccagc	2580
	cacctgaacg aggccggatc tctgcccggc gaaaaggacg ctgtgccccca gacccctct	2640
	tgctgattg gcaacagaga gtggctgcgg cggaacggcc tgaccatctc ctccgatgtg	2700
	tccgacgcca tgaccgacca cgagatgaag ggccagaccc ccattctggt ggccattgac	2760
	ggggtgctgt gcggcatgtat cgcaatcgcc gatgccgtga aacaggaagc agcaactggcc	2820
	gtgcacaccc tgcagtctat gggagtggat gtgggtgctga tcaccggcga caacagaaag	2880
	accgccagg ccattgccac ccaggtgggc atcaacaagg tggccatcgaa ggtgctgccc	2940
	agccacaaag tggccaaggt gcaggaactg cagaacaaag gcaaaaaggt ggccatggtg	3000
	ggagatggcg tgaacgactc tcctgctctg gcccaggcag atatggcgt ggccatcgcc	3060
	acaggcaccg acgtggcaat tgaggctgct gacgtggtgc tgattcggaa cgacctgctg	3120
	gacgtggtgg cctccatcca cctgtccaag agaacccgtgc ggcggatcag aatcaacctg	3180
	tgctggcac tggatctataa cctcgtggc atccctatcg ccgtggcgt gttcatgcct	3240
	atcggaatcg tgctgcagcc ctggatggc tctgcccga tggctgcaag ctccgtgtct	3300
	gtgggtgctgt ccagcctgca gctgaagtgc tacaagaagc ccgacctgga aagatacgg	3360
	gcccaggccc acggacacat gaagcctctg acagcctccc aggtgtccgt gcacatcgcc	3420
	atggacgaca gatggcggga cagccctaga gccacccctt gggatcaggt gtcatacgtg	3480
	tcacaggtgt ccctgagcag cctgaccaggc gacaagccca gcagacatag cgccgctgcc	3540
	gacgacgatg gggacaagtg gtccctgctg ctgaacggcc gggatgagga acagtagatc	3600
	tga	3603

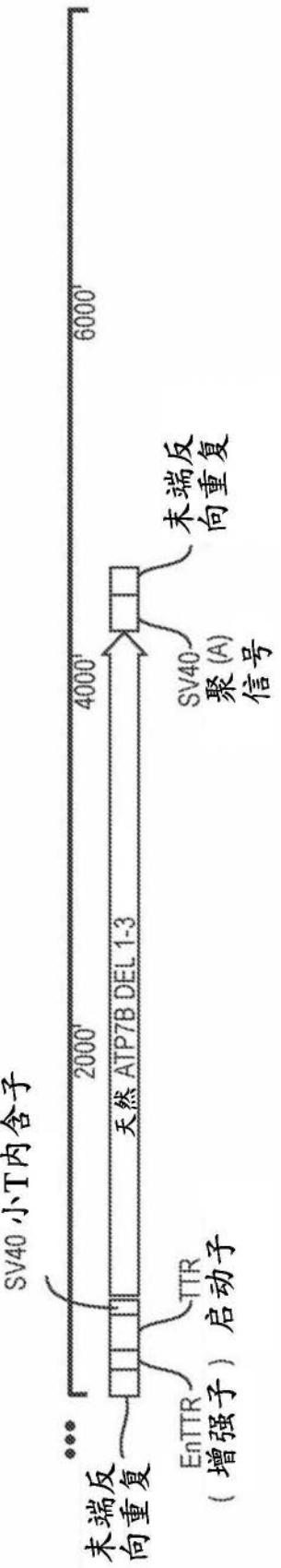


图1

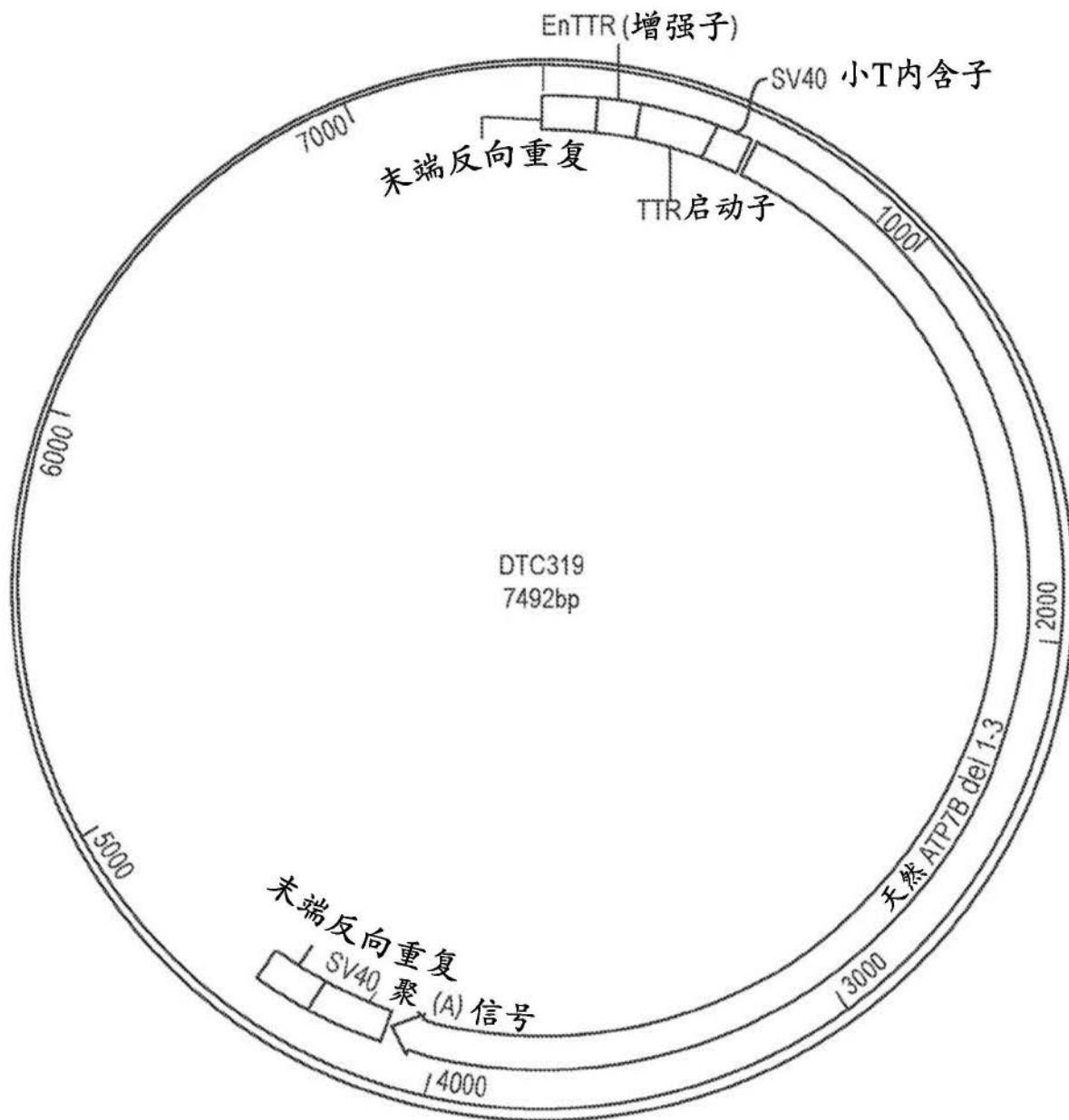


图2

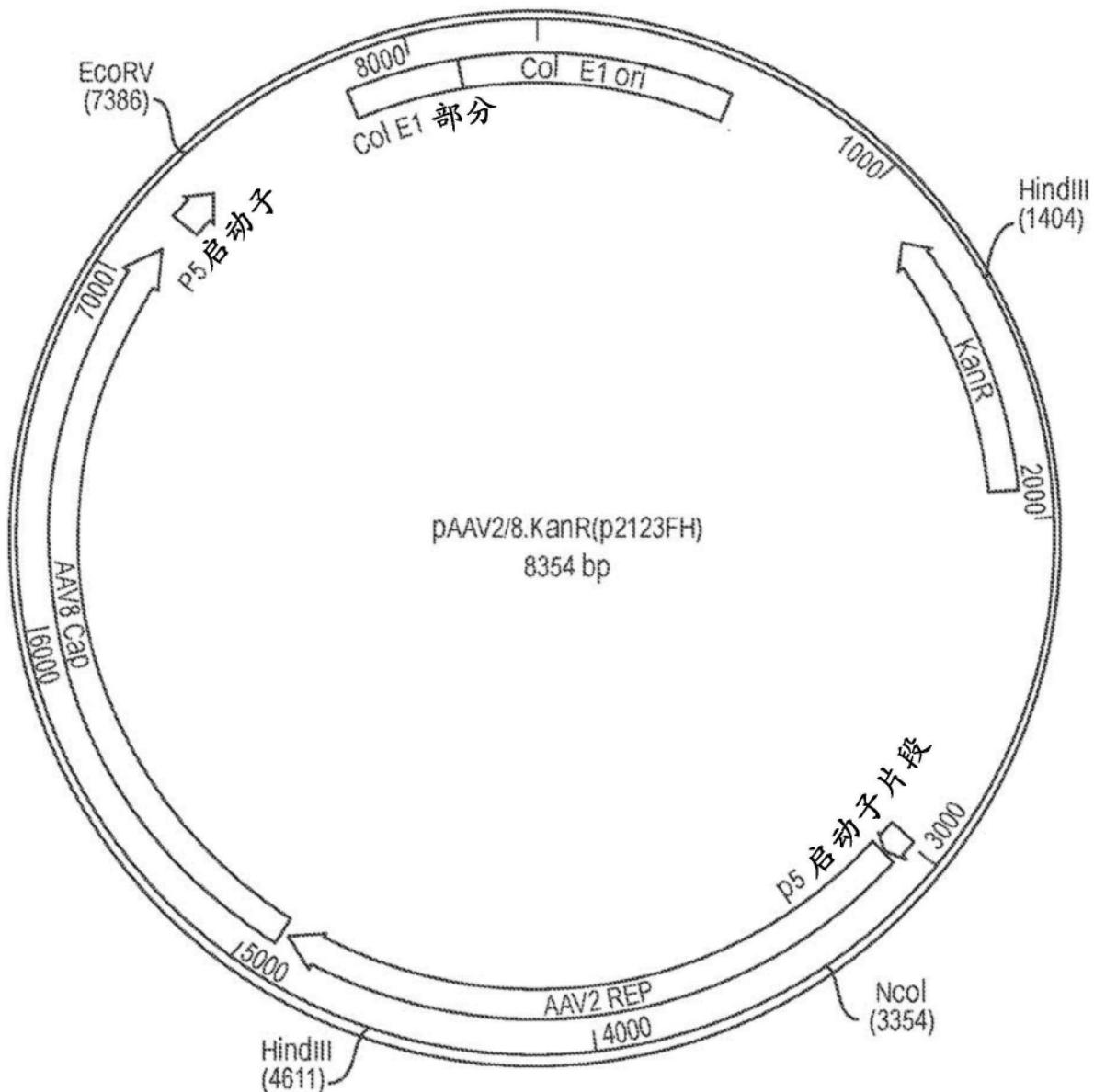


图3

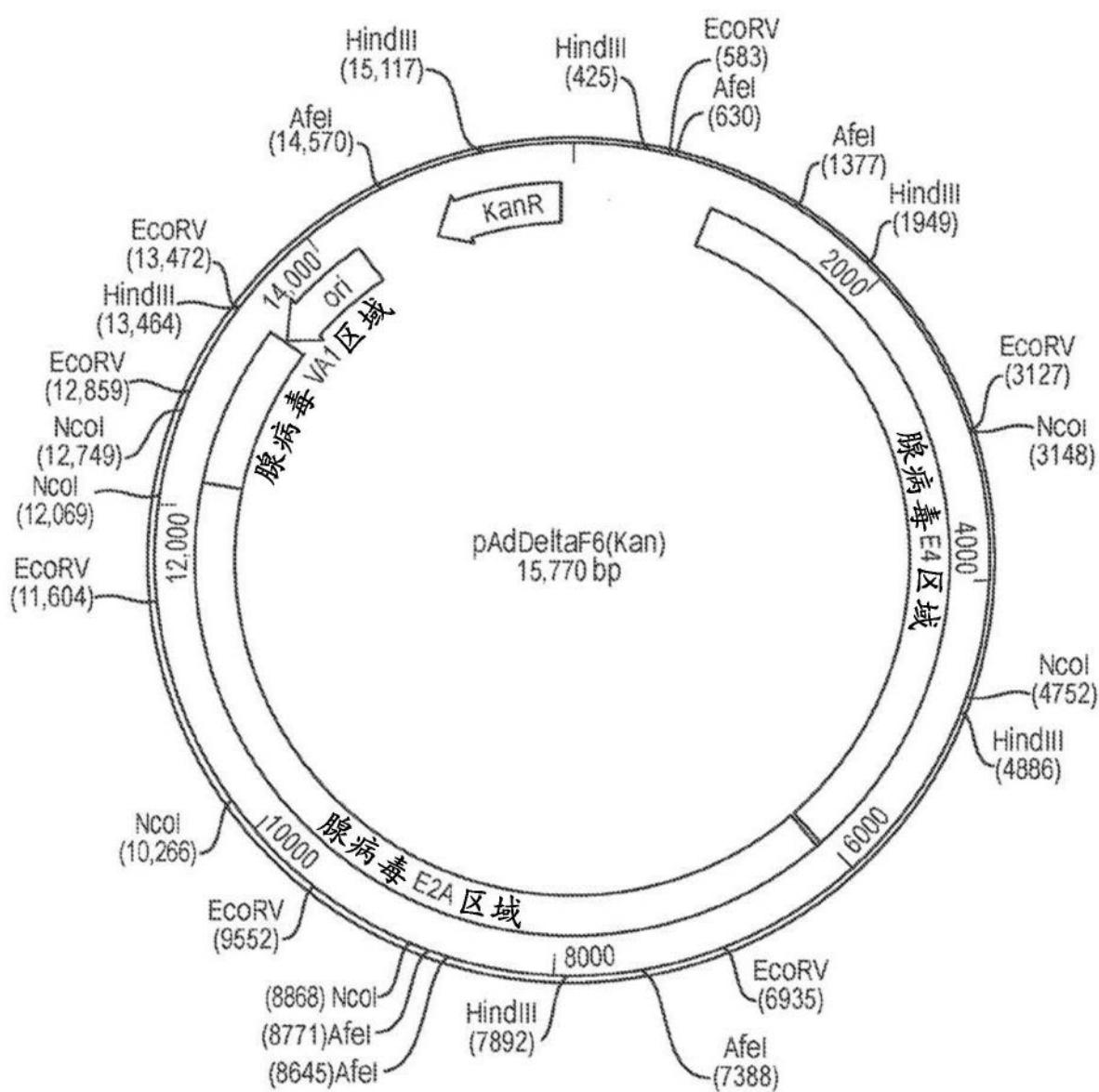


图4

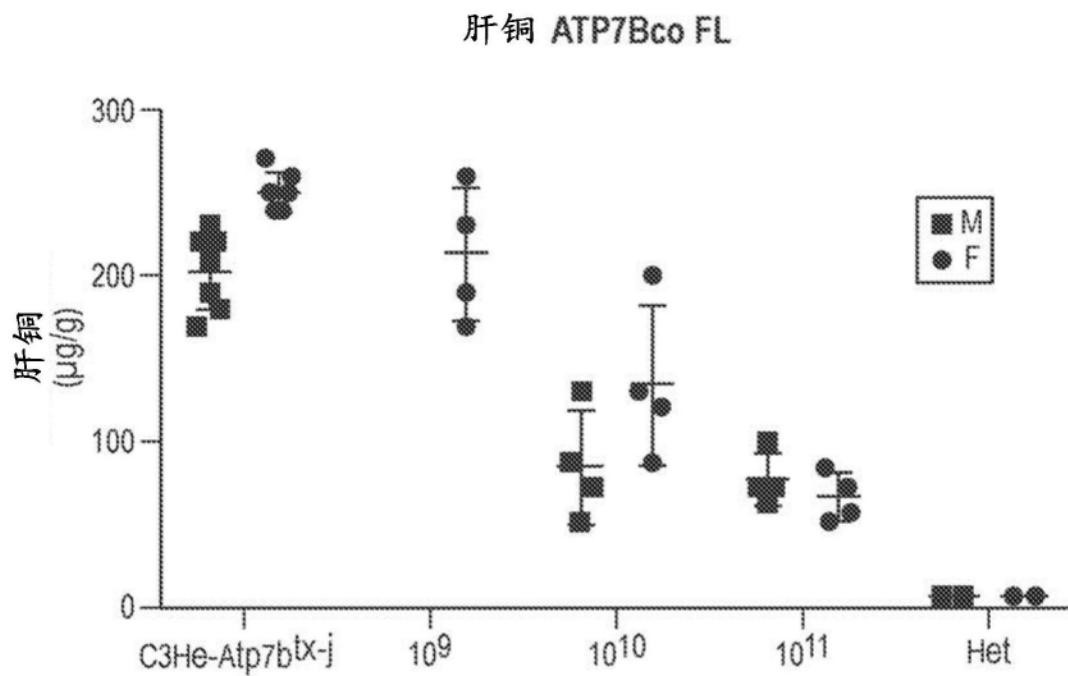


图5

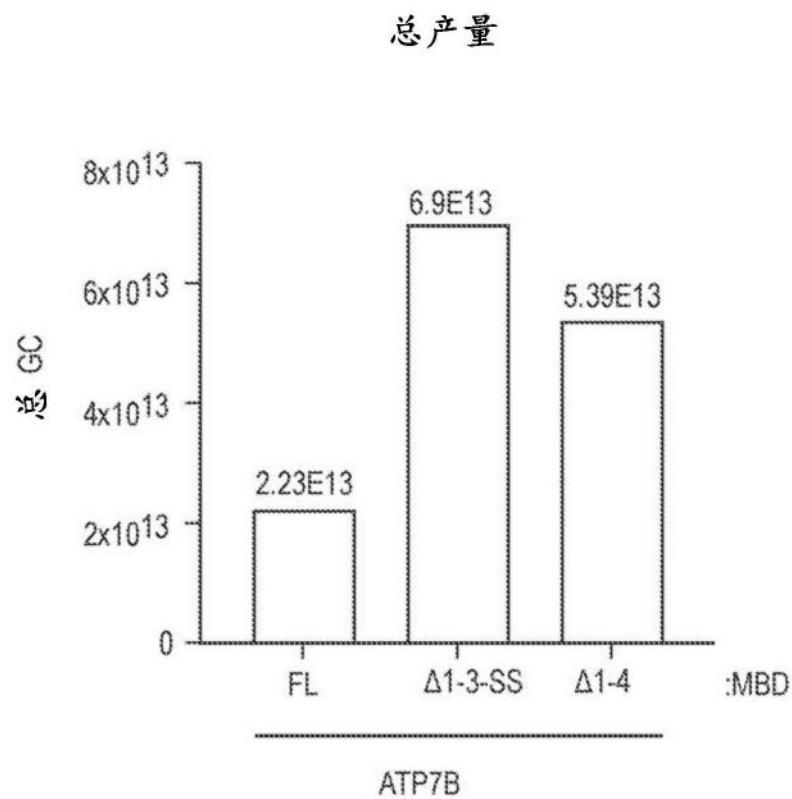


图6

## AFTER AAV-ATP7B 治疗后铜代谢改善

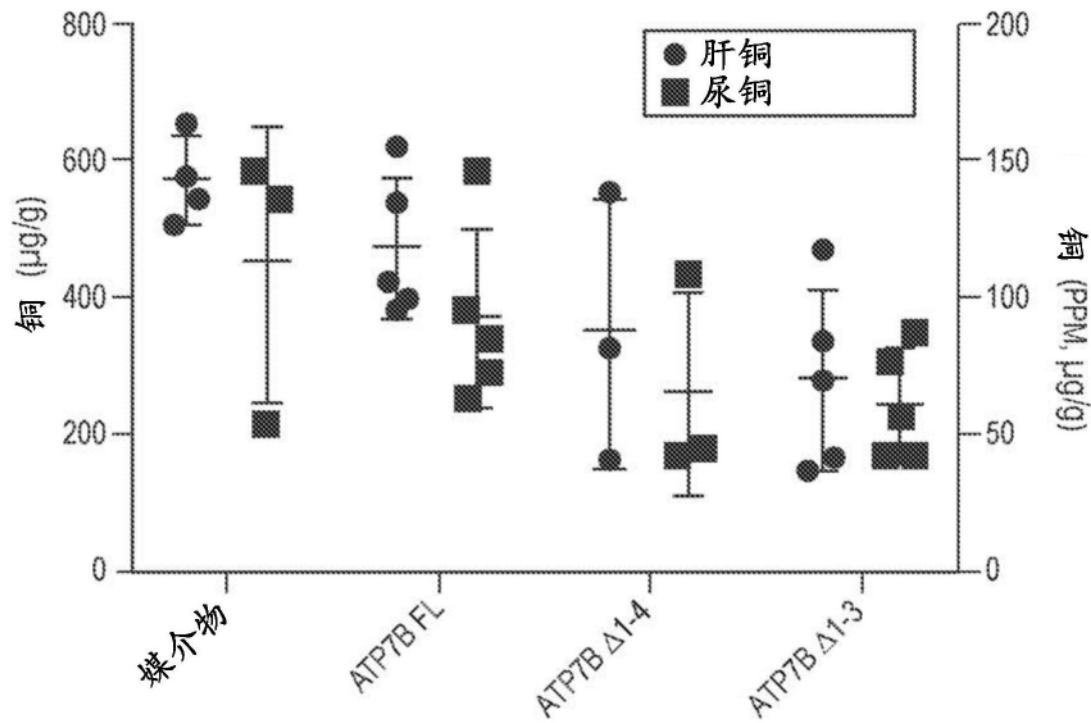


图7

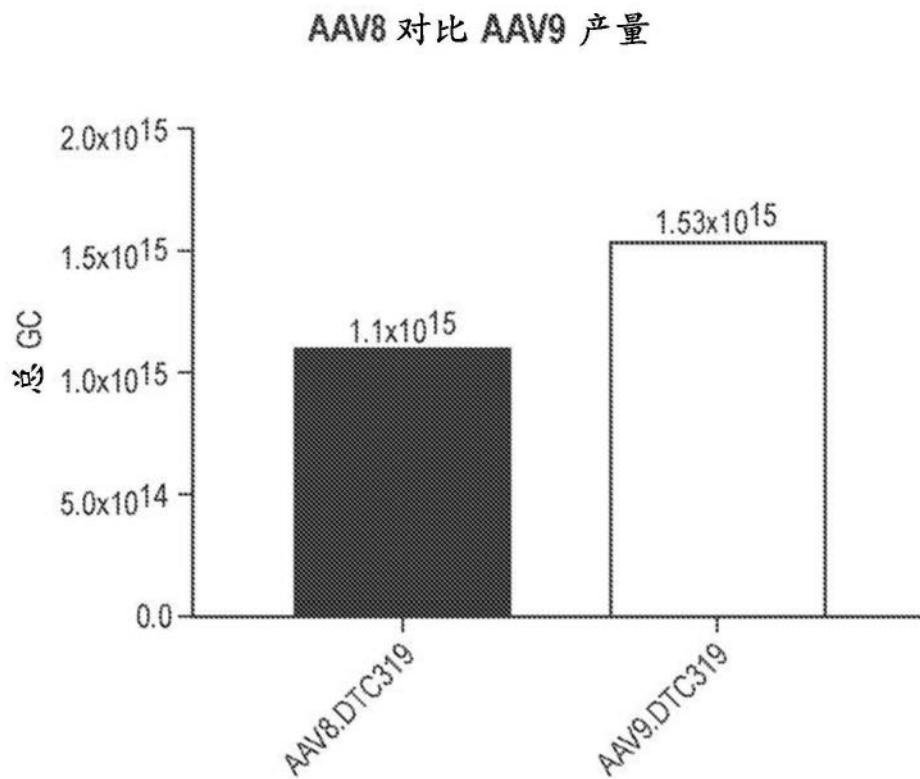


图8

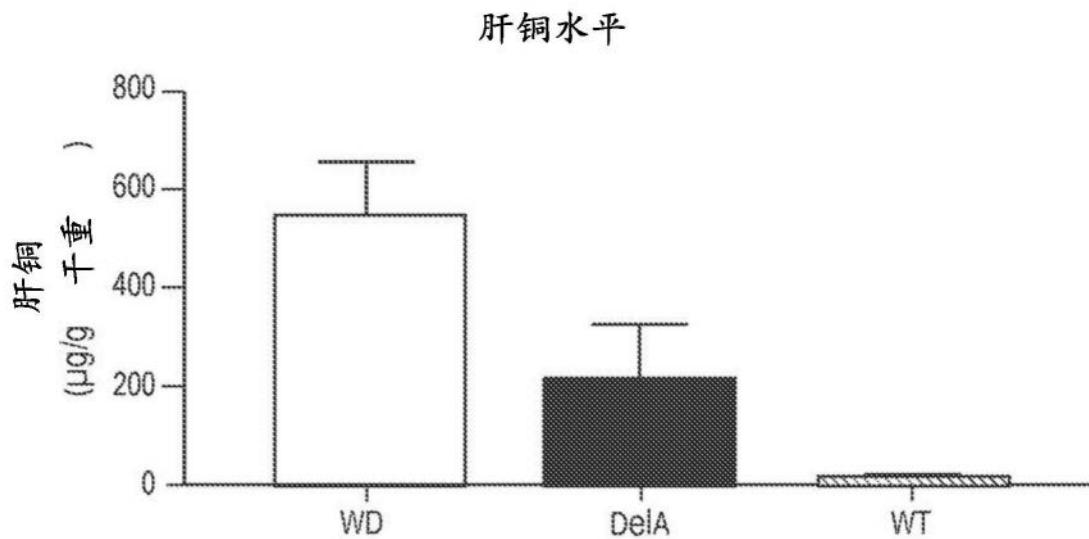


图9

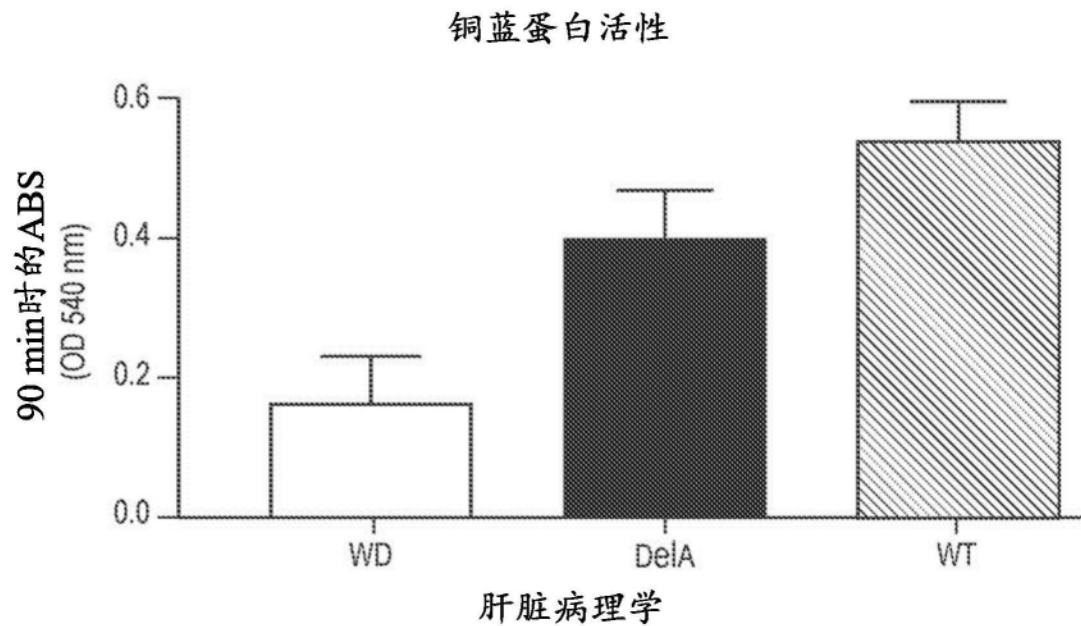


图10

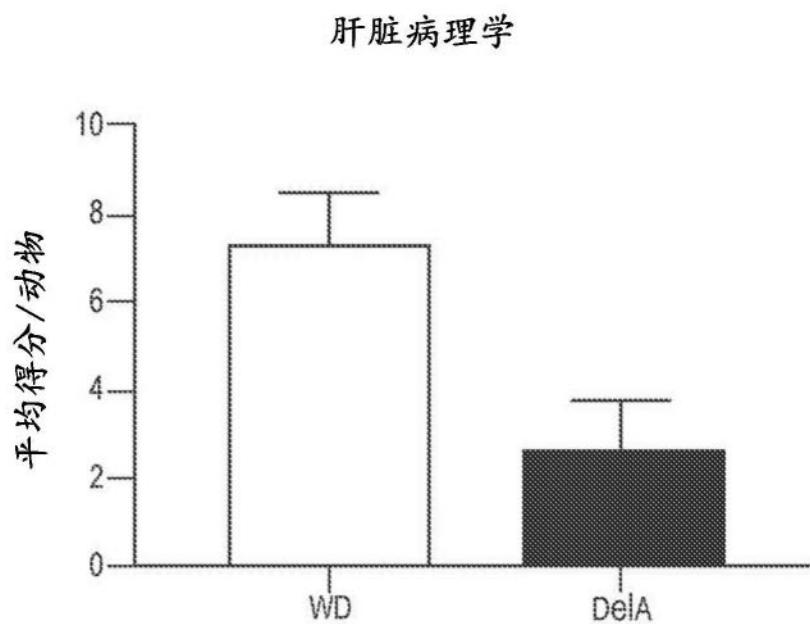


图11

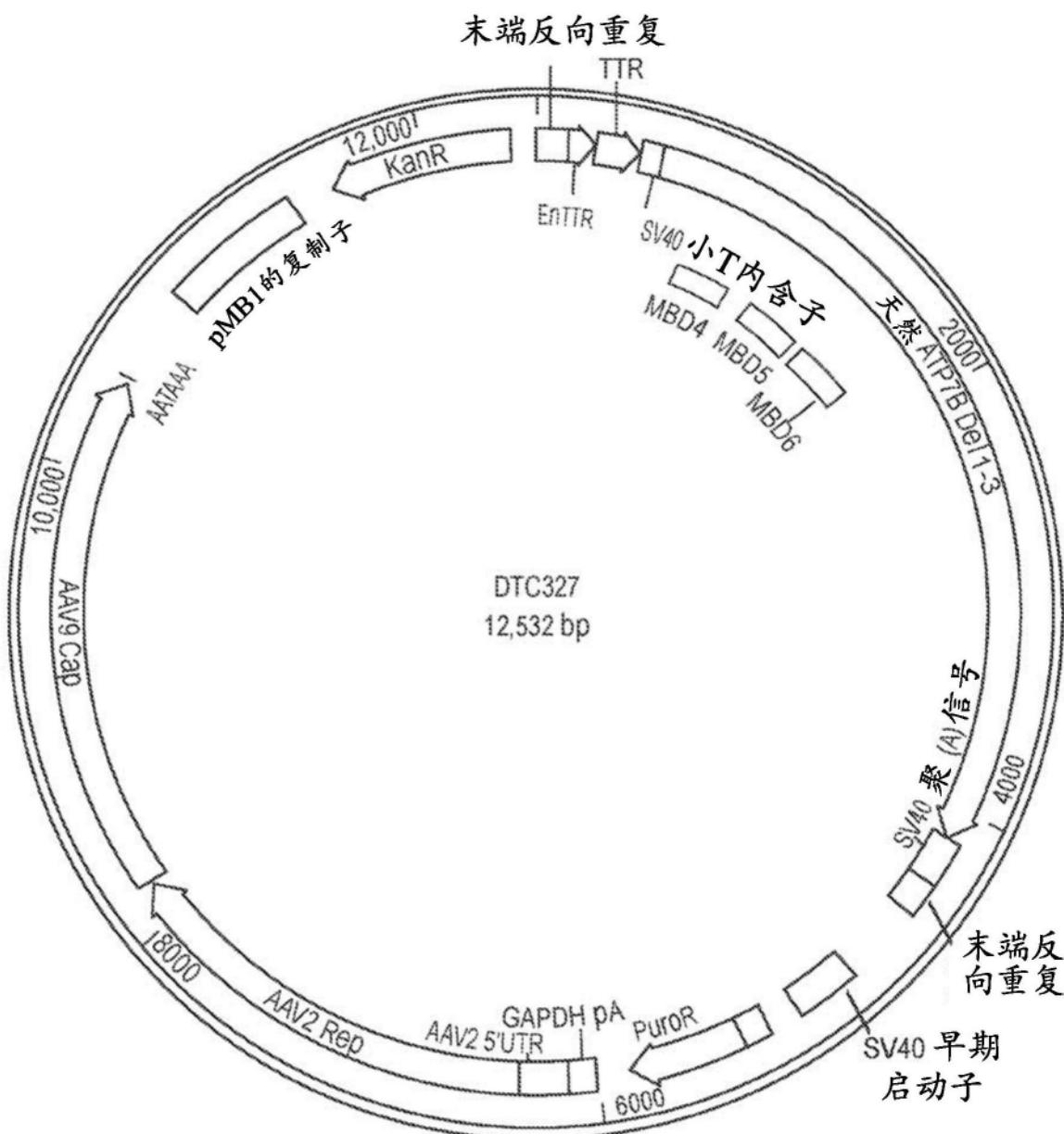


图12