



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111936621 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 13

(21) 申请号 201980015960.6

(72) 发明人 J·T·格雷

(22) 申请日 2019.02.05

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111936621 A

11256

专利代理师 邵红 刘盈盈

(43) 申请公布日 2020.11.13

(51) Int.Cl.

C12N 7/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/626,561 2018.02.05 US

C12N 15/86 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.08.28

(56) 对比文件

US 2010120152 A1, 2010.05.13

US 2017275649 A1, 2017.09.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/016692 2019.02.05

审查员 蔡兴

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/153009 EN 2019.08.08

(73) 专利权人 奥登茨治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

权利要求书1页 说明书33页

序列表13页 附图12页

## (54) 发明名称

转录调控元件和它的用途

## (57) 摘要

本发明提供调控元件以及含有所述调控元件的载体,所述调控元件和所述载体可用于刺激相关基因在某些组织类型中的转录。本文所述的转录调控元件可操作连接到转基因,例如酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA),以促进所述GAA转基因在细胞,例如肌细胞、肝细胞或神经元中的表达。本文所述的转录调控元件可操作连接到治疗性转基因且可用于治疗多种病症,例如溶酶体贮积病,特别是庞贝氏病。



1. 一种核酸调控元件,所述核酸调控元件由SEQ ID NO:12的核酸序列组成。
2. 一种载体,所述载体包含根据权利要求1所述的核酸调控元件,其中所述核酸调控元件可操作连接到转基因,且其中所述核酸调控元件在将所述载体引入细胞中后诱导所述转基因的表达。
3. 根据权利要求2所述的载体,其中所述转基因是酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA)。
4. 根据权利要求2所述的载体,其中所述细胞是肌细胞、神经元或肝细胞。
5. 根据权利要求2所述的载体,其中所述载体是病毒载体。
6. 根据权利要求5所述的载体,其中所述病毒载体选自由以下组成的组:腺相关病毒(AAV)、腺病毒、反转录病毒、痘病毒、杆状病毒、单纯疱疹病毒和牛痘病毒。
7. 根据权利要求5所述的载体,其中所述病毒载体是慢病毒。
8. 根据权利要求6所述的载体,其中所述病毒载体是AAV。
9. 根据权利要求8所述的载体,其中所述AAV是AAV1血清型、AAV2血清型、AAV3血清型、AAV4血清型、AAV5血清型、AAV6血清型、AAV7血清型、AAV8血清型、AAV9血清型或AAVrh74血清型。
10. 根据权利要求5所述的载体,其中所述病毒载体是假型化AAV。
11. 根据权利要求10所述的载体,其中所述假型化AAV是rAAV2/8或rAAV2/9。
12. 一种组合物,所述组合物包含核酸分子,所述核酸分子包含根据权利要求1所述的核酸调控元件,其中所述组合物是脂质体、囊泡、胞外体或树枝状聚合物。
13. 一种组合物,所述组合物包含核酸分子,所述核酸分子包含根据权利要求1所述的核酸调控元件,其中所述组合物是合成囊泡或合成胞外体。
14. 一种组合物,所述组合物包含核酸分子,所述核酸分子包含根据权利要求1所述的核酸调控元件,其中所述组合物是纳米颗粒。
15. 根据权利要求12-14任一项所述的组合物,其中所述核酸调控元件可操作连接到转基因,且其中所述核酸调控元件在将所述组合物引入细胞中后诱导所述转基因的表达。
16. 权利要求2的载体或权利要求12-14任一项的组合物在制备一种在细胞中表达转基因的治疗庞贝氏病的药物中的用途,其中所述载体或组合物与细胞接触足以模拟所述转基因在所述细胞中的转录的时间,其中所述转基因是GAA。
17. 治疗有效量的根据权利要求2所述的载体或根据权利要求12-14任一项所述的组合物在制备用于治疗有需要的人患者的庞贝氏病的药物中的用途,其中所述载体包含根据权利要求1所述的核酸调控元件,所述组合物包含核酸分子,所述核酸分子包含根据权利要求1所述的核酸调控元件,其中所述核酸调控元件可操作连接到转基因,其中所述转基因是GAA。
18. 一种试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求2所述的载体或根据权利要求12-14任一项所述的组合物,其中所述试剂盒还包含包装插页,所述包装插页指导所述试剂盒的使用者使所述载体或所述组合物与细胞接触,由此表达可操作连接到所述调控控制元件的转基因。

## 转录调控元件和它的用途

### 发明领域

[0001] 本发明涉及核酸生物技术领域,并提供了用于促进相关基因表达的组合物和方法。

### [0002] 发明背景

[0003] 庞贝氏病(Pompe disease)是由酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA)基因的突变引起的溶酶体贮积症,所述酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因编码负责加工溶酶体糖原的酶。患有庞贝氏病的患者展现多种组织的临床表型,包括细胞中的糖原积累、心脏、呼吸和骨骼肌功能的缺陷和中枢神经系统病状。这些缺陷中的一些通过使用重组人GAA(rhGAA)的酶替代疗法(ERT)显著改善。临床效能受到rhGAA ERT的免疫原性和rhGAA未摄取到一些受侵袭组织中的限制。基因疗法也已通过研究为这种疾病的潜在治疗范例。与实现受侵袭组织中治疗有效量的GAA的表达、同时防止免疫系统引起抗GAA免疫应答相关的困难阻碍了治疗庞贝氏病的基因疗法的开发。仍需要能够实现这种平衡的转录调控元件。

### 发明内容

[0004] 本发明提供用于促进相关基因(例如酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA))在某些组织(包括受庞贝氏病侵袭的那些组织)的细胞中的表达的组合物和方法。本文所述的组合物和方法涉及刺激转基因(例如GAA)在肌细胞(例如心肌细胞)、肝细胞和/或中枢神经系统细胞中的转录的核酸调控元件。本文所述的核酸调控元件可操作连接到转基因(例如GAA),且可施用于患者(例如人患者)来治疗溶酶体贮积症,例如庞贝氏病。有利地,本文所述的组合物和方法可用于促进GAA在患者(例如患有庞贝氏病的那些患者)中、在受溶酶体贮积症侵袭的肌细胞和/或神经元中的表达,且可同时刺激肝中的表达。这提供令人惊奇的治疗益处。不受机制的限制,本公开部分地基于以下发现:本文所述的转录调控元件可(i)促进转基因在受溶酶体贮积症侵袭的细胞中的表达以改善病状,和(ii)刺激肝中的表达,这用于促进免疫耐受性。因此,本文所述的组合物和方法可用于以减轻患者中溶酶体酶缺乏(例如GAA缺乏)的有害作用、同时防止或减少引起对通过基因疗法引入的酶的免疫应答的方式治疗溶酶体贮积症,例如庞贝氏病。

[0005] 在第一方面,本发明的特征在于含有可操作连接到第二区段的第一区段的核酸调控元件,其中第一区段含有载脂蛋白E肝控制区(ApoE-HCR)或它的功能部分,且第二区段含有结蛋白启动子或它的功能部分。第一区段的3'末端可操作连接到第二区段的5'末端。在一些实施方案中,第一区段的5'末端可操作连接到第二区段的3'末端。

[0006] 在一些实施方案中,第一区段含有ApoE-HCR增强子,所述ApoE-HCR增强子具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列;或所述ApoE-HCR增强子的功能部分,所述ApoE-HCR增强子的功能部分具有与SEQ ID NO:4的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段含

有ApoE-HCR增强子,所述ApoE-HCR增强子具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少90%的核酸序列;或所述ApoE-HCR增强子的功能部分,所述ApoE-HCR增强子的功能部分具有与SEQ ID NO:4的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段含有ApoE-HCR增强子,所述ApoE-HCR增强子具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少95%的核酸序列;或所述ApoE-HCR增强子的功能部分,所述ApoE-HCR增强子的功能部分具有与SEQ ID NO:4的核酸序列至少95%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段含有具有SEQ ID NO:3的核酸序列的ApoE-HCR增强子或具有SEQ ID NO:4的核酸序列的所述ApoE-HCR增强子的功能部分。

[0007] 在一些实施方案中,第一区段含有ApoE-HCR增强子,所述ApoE-HCR增强子具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列;或所述ApoE-HCR增强子的功能部分,所述ApoE-HCR增强子的功能部分具有与SEQ ID NO:1的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段含有ApoE-HCR增强子,所述ApoE-HCR增强子具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少90%的核酸序列;或所述ApoE-HCR增强子的功能部分,所述ApoE-HCR增强子的功能部分具有与SEQ ID NO:1的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段含有ApoE-HCR增强子,所述ApoE-HCR增强子具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少95%的核酸序列;或所述ApoE-HCR增强子的功能部分,所述ApoE-HCR增强子的功能部分具有与SEQ ID NO:1的核酸序列至少95%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段含有具有SEQ ID NO:3的核酸序列的ApoE-HCR增强子或具有SEQ ID NO:1的核酸序列的所述ApoE-HCR增强子的功能部分。

[0008] 在一些实施方案中,第一区段含有ApoE-HCR增强子,所述ApoE-HCR增强子具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列;或所述ApoE-HCR增强子的功能部分,所述ApoE-HCR增强子的功能部分具有与SEQ ID NO:2的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段含有ApoE-HCR增强子,所述ApoE-HCR增强子具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少90%的核酸序列;或所述ApoE-HCR增强子的功能部分,所述ApoE-HCR增强子的功能部分具有与SEQ ID NO:2的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段含有ApoE-HCR增强子,所述ApoE-HCR增强子具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少95%的核酸序列;或所述ApoE-HCR增强子的功能部分,所述ApoE-HCR增强子的功能部分具有与SEQ ID NO:2的核酸序列至少95%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段含有具有SEQ ID NO:3的核酸序列的ApoE-HCR增强子或具有SEQ ID NO:2的核酸序列的所述ApoE-HCR增强子的功能部分。

[0009] 在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:4的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:4的核酸

序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:4的核酸序列至少95%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:4的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,第一区段可含有SEQ ID NO:4中所示的核酸。

[0010] 在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:1的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:1的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:1的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,第一区段可具有SEQ ID NO:1的核酸序列。

[0011] 在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:2的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。第一区段可具有与SEQ ID NO:2的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:2的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,第一区段可具有SEQ ID NO:2的核酸序列。

[0012] 在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。第一区段可具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:3的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,第一区段可具有SEQ ID NO:3的核酸序列。

[0013] 在一些实施方案中,第二区段含有5'区,所述5'区具有与SEQ ID NO:5的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,5'区具有与SEQ ID NO:5的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,5'区具有与SEQ ID NO:5的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,5'区可具有SEQ ID NO:5的核酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,第二区段可含有3'区,所述3'区具有与SEQ ID NO:6的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,3'区具有与SEQ ID NO:6的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,3'区具有与SEQ ID NO:6的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,3'区可具有SEQ ID NO:6的核酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,第二区段具有与SEQ ID NO:7的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,第二区段具有与SEQ ID NO:7的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第二区段具有与SEQ ID NO:7的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,3'区可具有SEQ ID NO:7的核酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,核酸调控元件具有与SEQ ID NO:10的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,核酸调控元件具有与SEQ ID NO:10的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,核酸调控元件具有与SEQ ID NO:10的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,核酸调控元件可具有SEQ ID NO:10的核酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,核酸调控元件具有与SEQ ID NO:12的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,核酸调控元件具有与SEQ ID NO:12的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,核酸调控元件具有与SEQ ID NO:12的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,核酸调控元件可具有SEQ ID NO:12的核酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,核酸调控元件还包括相对于第一区段和第二区段位于5'或3'的第三区段。第三区段可操作连接到第一区段和第二区段。

[0019] 在一些实施方案中,第三区段含有启动子,所述启动子刺激可操作连接到所述启动子的转基因在中枢神经系统细胞(例如尤其神经元、神经胶质细胞或星形胶质细胞)中的表达。在一些实施方案中,第三区段含有选自以下的启动子:突触蛋白启动子、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶III启动子、微管蛋白(tubulin) $\alpha$ I启动子、微管蛋白(microtubulin)相关蛋白IB(MAP IB)启动子、神经元特异性烯醇化酶启动子、血小板源生长因子 $\beta$ 链启动子、神经丝轻链启动子、神经元特异性VGF基因启动子、神经元核(NeuN)启动子、腺瘤性结肠息肉病(APC)启动子、结合离子化钙的衔接分子1(Iba-1)启动子和同源异形盒蛋白9(HB9)启动子,或所述启动子的变体(例如与野生型启动子基因座的核酸序列具有至少85%序列一致性(例如,85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或更大的序列一致性)且能够在引入中枢神经系统细胞中后刺激可操作连接到它的转基因的转录的变体)或它的功能部分。

[0020] 在一些实施方案中,第三区段含有启动子,所述启动子刺激可操作连接到所述启动子的转基因在神经元中的表达。在一些实施方案中,第三区段含有突触蛋白启动子或它的功能部分。

[0021] 在一些实施方案中,第三区段具有与SEQ ID NO:8的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,第三区段具有与SEQ ID NO:8的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第三区段具有与SEQ ID NO:8的核酸序列至少95%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第三区段具有SEQ ID NO:8的核酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,核酸调控元件具有与SEQ ID NO:11的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,核酸调控元件具有与SEQ ID NO:11的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,核酸调控元件具有与SEQ ID NO:11的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,核酸调控元件可具有SEQ ID NO:11的核酸序列。

[0023] 在另一方面,本发明的特征在于含有可操作连接到第二区段的第一区段的核酸调控元件,其中第一区段含有结蛋白启动子或它的功能部分,且第二区段含有启动子或它的功能部分,所述启动子或它的功能部分刺激可操作连接到所述启动子或它的功能部分的转基因在中枢神经系统细胞(例如尤其神经元、神经胶质细胞或星形胶质细胞)中的表达。在一些实施方案中,第二区段含有选自以下的启动子:突触蛋白启动子、GFAP启动子、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶III启动子、微管蛋白 $\alpha$ I启动子、MAP IB启动子、神经元特异性烯醇化

酶启动子、血小板源生长因子 $\beta$ 链启动子、神经丝轻链启动子、神经元特异性VGF基因启动子、NeuN启动子、APC启动子、Iba-1启动子和HB9启动子,或所述启动子的变体(例如与野生型启动子基因座的核酸序列具有至少85%序列一致性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或更大的序列一致性)且能够在引入中枢神经系统细胞中后刺激可操作连接到它的转基因的转录的变体)或它的功能部分。

[0024] 在一些实施方案中,第二区段含有启动子,所述启动子刺激可操作连接到所述启动子的转基因在神经元中的表达。在一些实施方案中,第二区段含有突触蛋白启动子或它的功能部分。

[0025] 在一些实施方案中,第一区段的3'末端可操作连接到第二区段的5'末端。在一些实施方案中,第一区段的5'末端可操作连接到第二区段的3'末端。

[0026] 在一些实施方案中,第一区段含有5'区,所述5'区具有与SEQ ID NO:5的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,5'区具有与SEQ ID NO:5的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,5'区具有与SEQ ID NO:5的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,5'区可具有SEQ ID NO:5的核酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,第一区段含有3'区,所述3'区具有与SEQ ID NO:6的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,3'区具有与SEQ ID NO:6的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,3'区具有与SEQ ID NO:6的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,3'区可具有SEQ ID NO:6的核酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:7的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:7的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第一区段具有与SEQ ID NO:7的核酸序列至少95%一致的核酸序列。例如,第一区段可具有SEQ ID NO:7的核酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,第二区段具有与SEQ ID NO:8的核酸序列至少85%一致(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致)的核酸序列。在一些实施方案中,第二区段具有与SEQ ID NO:8的核酸序列至少90%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第二区段具有与SEQ ID NO:8的核酸序列至少95%一致的核酸序列。在一些实施方案中,第二区段具有SEQ ID NO:8的核酸序列。

[0030] 在另一方面,本发明的特征在于含有前述方面或所述方面的实施方案中的任一个的核酸调控元件的载体。核酸调控元件可操作连接到转基因,且可在将载体引入细胞(例如哺乳动物细胞,例如人细胞)中后诱导转基因的表达。细胞可为例如肌细胞(例如心肌细胞或骨骼肌细胞)、神经元或肝细胞。在一些实施方案中,转基因编码溶酶体酶,例如GAA。在一些实施方案中,载体是病毒载体,例如腺相关病毒(AAV)、腺病毒、慢病毒、反转录病毒、痘病毒、杆状病毒、单纯疱疹病毒或牛痘病毒。在一些实施方案中,病毒载体是AAV,例如AAV1血清型、AAV2血清型、AAV3血清型、AAV4血清型、AAV5血清型、AAV6血清型、AAV7血清型、AAV8血清型、AAV9血清型或AAVrh74血清型。病毒载体可为假型化AAV,例如重组AAV(rAAV) 2/8或

rAAV2/9。

[0031] 在另一方面,本发明的特征在于含有上述方面或所述方面的实施方案中的任一个的核酸调控元件的组合物。组合物可为例如脂质体、囊泡、合成囊泡、胞外体、合成胞外体、树枝状聚合物或纳米颗粒。在组合物中,核酸调控元件可操作连接到转基因(例如编码溶酶体酶(例如GAA)的转基因)。

[0032] 在另一方面,本发明的特征在于在细胞中表达转基因的方法,所述方法通过使细胞与前述方面或所述方面的实施方案中的任一个的载体或组合物接触足以模拟转基因在细胞中的转录的时间来进行。

[0033] 在另一方面,本发明的特征在于治疗有需要的患者(例如哺乳动物患者,例如人患者)的溶酶体贮积病(例如庞贝氏病)的方法,所述方法通过向患者施用治疗有效量的本文所述载体或组合物来进行。

[0034] 在另一方面,本发明的特征在于含有本文所述载体或组合物的试剂盒。试剂盒可含有包装插页,例如,所述包装插页指导试剂盒的使用者使载体或组合物与细胞(例如哺乳动物细胞,例如人细胞)接触,由此表达可操作连接到调控元件的转基因。

[0035] 定义

[0036] 如本文所用的术语“约”是指在所述值上或下10%内的值。

[0037] 如本文所用的术语“ApoE-HCR增强子”是指人载脂蛋白E肝控制区,所述人载脂蛋白E肝控制区的核酸序列示于SEQ ID NO:3中,以及与SEQ ID NO:3的核酸序列具有至少85%一致性(例如85%、86%,例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.9%或更大一致性)且在转基因可操作连接到增强子时促进转基因在细胞(例如真核细胞,例如哺乳动物细胞、人细胞或人肝细胞)中的表达的核酸。

[0038] 如本文所用的术语“保守突变”、“保守取代”或“保守氨基酸取代”是指一个或多个氨基酸被展现相似物理化学性质(例如极性、静电荷和立体体积)的一个或多个不同氨基酸取代。下表1中汇总20种天然氨基酸中的每一种的这些性质。

[0039] 表1.天然氨基酸的代表性物理化学性质

[0040]

氨基酸	3字母代码	1字母代码	侧链极性	生理 pH (7.4) 下的静电特征	立体体积 <sup>†</sup>
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	小
精氨酸	Arg	R	极性	阳离子型	大
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	中等
天冬氨酸	Asp	D	极性	阴离子型	中等
半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性	中等
谷氨酸	Glu	E	极性	阴离子型	中等
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	中等
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	小
组氨酸	His	H	极性	在 pH 7.4 下平衡的中性和阳离子形式	大
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	大
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	大
赖氨酸	Lys	K	极性	阳离子型	大
甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性	大
苯丙氨酸	Phe	F	非极	中性	大

氨基酸	3字母代码	1字母代码	侧链极性	生理 pH (7.4) 下的静电特征	立体体积 <sup>†</sup>
			性		
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	中等
[0041] 丝氨酸	Ser	S	极性	中性	小
苏氨酸	Thr	T	极性	中性	中等
色氨酸	Trp	W	非极性	中性	巨大
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	大
缬氨酸	Val	V	非极性	中性	中等

[0042] †基于以A<sup>3</sup>计的体积:50-100为小,100-150为中等,

[0043] 150-200为大,且>200为巨大

[0044] 根据此表应了解,保守氨基酸家族包括例如(i)G、A、V、L、I、P和M;(ii)D和E;(iii)C、S和T;(iv)H、K和R;(v)N和Q;和(vi)F、Y和W。因此,保守突变或取代是一个氨基酸被同一氨基酸家族的成员取代的突变或取代(例如Ser取代Thr或Lys取代Arg)。

[0045] 如本文所用的术语“结蛋白启动子”是指SEQ ID NO:7中所示的核酸,以及与SEQ ID NO:7的核酸序列具有至少85%一致性(例如85%、86%,例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.9%或更大一致性)且在转基因可操作连接到增强子时促进转基因在细胞(例如真核细胞,例如哺乳动物细胞、人细胞或人肌细胞)中的表达的核酸。

[0046] 如本文在转录调控元件的上下文中所用,术语“功能部分”是指较大核酸的保留刺激相关基因在靶细胞中的转录能力的部分。例如,载脂蛋白E肝控制区(ApoE-HCR)是774核苷酸增强子,所述774核苷酸增强子的序列示于SEQ ID NO:3中。此基因座的含有193个核苷酸的部分(所述部分的核酸序列示于SEQ ID NO:1中)能够保留较大基因座的转录激活性质。因此,SEQ ID NO:1中所示的含193个核苷酸的部分是ApoE-HCR基因座的“功能部分”。作为另一实例,ApoE-HCR基因座的能够保留全长增强子的转录激活性质的另一部分是SEQ ID NO:2中所示的含320个核苷酸的区段。因此,SEQ ID NO:2中所示的含320个核苷酸的部分是ApoE-HCR基因座的“功能部分”。作为另一实例,ApoE-HCR基因座的能够保留全长增强子的转录激活性质的另一部分是SEQ ID NO:4中所示的含50个核苷酸的区段。因此,SEQ ID NO:4中所示的含50个核苷酸的部分也是ApoE-HCR基因座的“功能部分”。

[0047] 如本文所用的术语“可操作连接”是指第一分子连结到第二分子,其中所述分子的排列使得第一分子影响第二分子的功能。两个分子可为或可不为单个邻接分子的一部分且可为或可不为相邻的。例如,如果启动子调节相关可转录的多核苷酸分子在细胞中的转录,那么启动子可操作连接到可转录的多核苷酸分子。另外,如果连结转录调控元件的两部分使得一部分的转录激活功能不受另一部分的存在的不利影响,那么所述转录调控元件的两

部分彼此可操作连接。两个转录调控元件可借助接头核酸(例如间插的非编码核酸)彼此可操作连接或可在间插的核苷酸不存在下彼此可操作连接。

[0048] 相对于参考多核苷酸或多肽序列的“序列一致性百分比(%)”定义为在比对序列且引入空位(如果需要)以实现最大序列一致性百分比后,候选序列中与参考多核苷酸或多肽序列中的核酸或氨基酸一致的核酸或氨基酸的百分比。用于测定核酸或氨基酸序列一致性百分比目的的比对可以在所属领域技术人员的能力内的多种方式,例如使用可公开获得的计算机软件(例如BLAST、BLAST-2或Megalign软件)实现。所属领域技术人员可确定适用于比对序列的参数,包括实现所比较序列的全长内的最大比对所需的任何算法。例如,序列一致性百分比值可使用序列比较计算机程序BLAST来生成。作为说明,如下计算给定核酸或氨基酸序列A对、与或针对给定核酸或氨基酸序列B的序列一致性百分比(可替代地表达为对、与或针对给定核酸或氨基酸序列B具有一定序列一致性百分比的给定核酸或氨基酸序列A):

[0049]  $100 \times (\text{分数} X/Y)$

[0050] 其中X是通过序列比对程序(例如BLAST)在此程序的A和B比对中评定为一致匹配的核苷酸或氨基酸的数量,且其中Y是B中核酸的总数。应了解,当核酸或氨基酸序列A的长度不等于核酸或氨基酸序列B的长度时,A对B的序列一致性百分比将不等于B对A的序列一致性百分比。

[0051] 如本文所用的术语“药物组合物”是指欲施用于受试者(例如哺乳动物,例如人)以预防、治疗或控制侵袭或可能侵袭受试者的特定疾病或疾患的含有治疗性化合物的混合物。

[0052] 如本文所用的术语“药学上可接受的”是指适于与受试者(例如哺乳动物,例如人)的组织接触而无过度毒性、刺激、过敏反应和其它问题并发症并与合理效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0053] 如本文所用的术语“样品”是指从受试者分离的样本(例如血液、血液组分(例如血清或血浆)、尿液、唾液、羊水、脑脊髓液、组织(例如胎盘或皮肤)、胰液、绒毛膜绒毛样品或细胞)。受试者可例如患有本文所述疾病(例如溶酶体贮积症,例如庞贝氏病)的患者。

[0054] 如本文所用的短语“特异性结合”和“结合”是指测定特定分子(例如多肽)在多肽和其它生物分子的异质群体中的存在的结合反应,所述特定分子被例如配体(例如抗体或它的抗原结合片段)特异性识别。特异性结合到蛋白质的配体(例如互补多核苷酸)可例如以小于100nM的 $K_D$ 结合到所述蛋白质。例如,特异性结合到蛋白质的配体可以高达100nM(例如介于1pM与100nM之间)的 $K_D$ 结合到所述蛋白质。不展现与另一分子或所述另一分子的结构域的特异性结合的配体可展现对此特定分子或所述特定分子的结构域大于100nM(例如大于200nM、300nM、400nM、500nM、600nm、700nM、800nM、900nM、1 $\mu$ M、100 $\mu$ M、500 $\mu$ M或1mM)的 $K_D$ 。可使用多种测定形式来测定配体对特定蛋白质的亲和力。例如,通常使用固相ELISA测定来鉴别特异性结合靶蛋白的配体。关于可用于测定特定蛋白质结合的测定形式和条件的描述参见例如Harlow和Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1988) 以及Harlow和Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1999)。

[0055] 如本文所用的术语“受试者”和“患者”是指接受如本文所述的特定疾病或疾患(例

如溶酶体贮积症,例如庞贝氏病)的治疗的生物体。受试者和患者的实例包括接受本文所述的疾病或疾患的治疗的哺乳动物,例如人。

[0056] 如本文所用的术语“突触蛋白启动子”是指SEQ ID NO:8中所示的核酸,以及与SEQ ID NO:8的核酸序列具有至少85%一致性(例如85%、86%,例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.9%或更大一致性)且在转基因可操作连接到增强子时促进转基因在细胞(例如真核细胞,例如哺乳动物细胞、人细胞或人神经元)中的表达的SEQ ID NO:8中所示的核酸的变体。

[0057] 如本文所用的术语“转录调控元件”是指至少部分地控制相关基因的转录的核酸。转录调控元件可包括控制或帮助控制基因转录的启动子、增强子和其它核酸(例如多聚腺苷酸化信号)。转录调控元件的实例描述于例如Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185(Academic Press, San Diego, CA, 1990)中。

[0058] 如本文所用的术语“治疗(treat或treatment)”是指治疗性治疗,其中目的是预防或减缓(减轻)不合意的生理变化或病症,例如尤其溶酶体贮积症(例如庞贝氏病)的进展。有益或合意的临床结果包括(但不限于)症状的减轻、疾病程度的减小、稳定(即不恶化)的疾病状态、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和以及缓解(无论部分或整体),无论可检测或不可检测。在溶酶体贮积症(例如庞贝氏病)的上下文中,患者的治疗可表现在一个或多个可检测变化中,例如酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA)蛋白或编码GAA的核酸(例如DNA或RNA,例如mRNA)浓度增加或GAA活性增加(例如增加1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、500倍、1,000倍或更大。GAA蛋白的浓度可使用此项技术中已知的蛋白质检测测定(包括本文所述的ELISA测定)来测定。编码GAA的核酸的浓度可使用本文所述的核酸检测测定(例如RNA Seq测定)来测定。用于检测GAA蛋白和核酸的例示性方案提供于下文实施例1中。另外,患有溶酶体贮积症(例如庞贝氏病)的患者的治疗可表现在患者的肌肉功能(例如心肌或骨骼肌功能)的改善以及肌肉协调的改善。用于测量肌肉功能的例示性程序描述于下文实施例1中。

[0059] 如本文所用的术语“载体”是指可用作将相关基因递送到细胞(例如哺乳动物细胞,例如人细胞)中、例如用于复制和/或表达目的的媒介物的核酸,例如DNA或RNA。可与本文所述的组合物和方法结合使用的例示性载体是质粒、DNA载体、RNA载体、病毒粒子或其它适宜复制子(例如病毒载体)。已开发出多种载体用于将编码外源蛋白质的多核苷酸递送到原核或真核细胞中。所述表达载体的实例公开于例如WO 1994/11026中,所述专利的公开内容以引用方式并入本文中。本文所述的表达载体含有多核苷酸序列以及例如用于表达蛋白质和/或将这些多核苷酸序列整合到哺乳动物细胞的基因组中的其它序列元件。可用于表达本文所述转基因的某些载体包括含有引导基因转录的调控序列(例如启动子区和增强子区)的质粒。其它可用于表达转基因的载体含有增强这些基因的翻译速率或改善源自基因转录的mRNA的稳定性或核输出的多核苷酸序列。这些序列元件包括例如5'和3'非翻译区、内部核糖体进入位点(IRES)和多聚腺苷酸化信号位点以引导表达载体上携带的基因的有效转录。本文所述的表达载体也可含有编码用于选择含有所述载体的细胞的标记物的多核苷酸。适宜标记物的实例包括编码抗生素(例如氨苄青霉素(ampicillin)、氯霉素

(chloramphenicol)、卡那霉素(kanamycin)或诺尔斯菌素(nourseothricin))抗性的基因。

### 附图说明

[0060] 图1是显示各个载体中的元件排列的图。GAAco, 人密码子优化的酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因(GAA); ITR, 反向末端重复; SD, 剪接供体; SA, 剪接受体。

[0061] 图2是显示对于以 $1 \times 10^{13}$  vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠, 在雄性小鼠(黑色圆点)和雌性小鼠(灰色三角形)的四头肌组织中在给药后一个月评价的GAA活性的图。

[0062] 图3是显示对于以 $1 \times 10^{13}$  vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠, 通过RNA-seq分析在雄性小鼠(圆点)和雌性小鼠(三角形)的肝组织中测量的hGAA转录物的图。水平线指示内源鼠类GAA的中值表达水平。

[0063] 图4是显示对于以 $1 \times 10^{13}$  vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠, 在雄性小鼠(黑色圆点)和雌性小鼠(灰色三角形)的肝组织中在给药后一个月评价的GAA活性的图。

[0064] 图5A和图5B是显示对于以 $1 \times 10^{13}$  vg/kg(图5A)或 $3 \times 10^{13}$  vg/kg(图5B)给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠, 在雄性小鼠(圆点)和雌性小鼠(三角形)的血清中在给药后一个月评价的抗GAA抗体水平的图。

[0065] 图6A和图6B是显示对于以 $1 \times 10^{13}$  vg/kg(图6A)或 $3 \times 10^{13}$  vg/kg(图6B)给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠, 在雄性小鼠(圆点)和雌性小鼠(三角形)的血清中在给药后一个月评价的GAA活性的图。

[0066] 图7A和图7B是显示对于以 $1 \times 10^{13}$  vg/kg(图7A)或 $3 \times 10^{13}$  vg/kg(图7B)给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠, 在给药后一个月评价的雄性小鼠(圆点)和雌性小鼠(三角形)的制成切片的四头肌组织的病理评分(报告于表5中)的图。

[0067] 图8显示代表性小鼠的H&E和PAS染色的切片的图像且显示相应的测量结果, 所述测量结果指示用含有由杂合启动子和肝定向启动子定向的hGAA转基因的载体给药的小鼠中升高的GAA活性、降低的糖原水平和肌肉病理修复。分析以 $3 \times 10^{13}$  vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠的血清GAA活性和四头肌GAA活性以及四头肌中的糖原累积。评价根据标准程序制成切片且用H&E和PAS染色的异戊烷冷冻的四头肌的组织切片的糖原累积评分。

[0068] 图9是显示对于以 $3 \times 10^{13}$  vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠, 在雄性小鼠(黑色圆点)和雌性小鼠(灰色三角形)的脊髓中在给药后一个月评价的GAA活性的图。

[0069] 图10是显示对于以 $1 \times 10^{13}$  vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠, 通过RNA-seq分析在雄性小鼠(圆点)和雌性小鼠(三角形)的脊髓组织中测量的hGAA转录物的量化的图。水平线指示内源鼠类GAA的中值表达水平。

[0070] 图11是显示通过RNA-Seq分析测定的在给药后一个月肝和脊髓中的RNA表达水平除以肝或脑组织中的平均载体拷贝数(VCN)以分别估计肝或CNS组织中的每载体表达水平的比率的图。

## 具体实施方式

[0071] 本文描述刺激相关基因(例如编码溶酶体酶(例如酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA))的基因)在某些组织的细胞中的转录的转录调控元件。具体来说,本文所述的转录调控元件可促进靶溶酶体酶基因在受溶酶体贮积症(例如庞贝氏病)侵袭的组织中的表达。所述组织包括肌肉组织(例如心肌组织和骨骼肌组织)和中枢神经系统组织。本文所述的核酸调控元件可操作连接到转基因,例如GAA,且纳入媒介物中以施用于患者(例如人患者)来治疗溶酶体贮积症,例如庞贝氏病。递送媒介物可为载体,例如本文所述的病毒载体,或将核酸引入相关细胞中的其它剂(例如本文所述的脂质体、囊泡、胞外体、树枝状聚合物或纳米颗粒)。

[0072] 本发明部分地基于以下发现:核酸调控元件可用于(i)促进转基因在受溶酶体贮积症侵袭的细胞中的表达以改善病状和(ii)刺激肝中的表达,这用于促进免疫耐受性。因此,本文所述的组合物和方法可用于治疗溶酶体贮积症,例如庞贝氏病,以治疗对溶酶体酶缺乏(例如GAA缺乏)的肌肉组织的有害作用,同时预防或减轻对所引入酶(例如GAA)的免疫应答。

[0073] 以下部分提供展现前述有利性质的转录调控元件的描述。以下部分还描述可与本文所述的转录调控元件结合使用的各种转基因、病毒载体和转染剂以及使用本文所述的组合物治疗各种病症的方法。

### [0074] 转录调控元件

[0075] 可与本文所述的组合物和方法结合使用的转录调控元件可含有彼此可操作连接的多个部分。例如,本文所述的转录调控元件可含有如SEQ ID NO:3中所示的载脂蛋白E肝控制区(ApoE-HCR)或它的功能部分。ApoE-HCR的例示性功能部分是Dang等, J.Biol.Chem.270:22577-22585(1995)中所述的SEQ ID NO:2中所示的含320个核苷酸的部分,所述文献涉及ApoE-HCR基因座和它的功能部分的公开内容以引用方式并入本文中。可与本文所述的组合物和方法结合使用的ApoE-HCR核酸的另一实例是ApoE-HCR的含193个核苷酸的区段,所述含193个核苷酸的区段的核酸序列示于SEQ ID NO:1中。可与本文所述的组合物和方法结合使用的ApoE-HCR核酸的另一实例是SEQ ID NO:4中所示的含50个核苷酸的区段。可与本文所述的组合物和方法结合使用的其它核酸调控元件包括相对于上述核酸序列具有至少85%序列一致性(例如86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或更大的序列一致性)的核酸分子。

[0076] 另外或替代地,本文所述的转录调控元件可含有结蛋白启动子或它的功能部分。例如,调控元件可含有结蛋白启动子,所述结蛋白启动子含有人结蛋白基因座的相对于结蛋白转录起始位点的核酸-984到-644。此构建体的核酸序列示于SEQ ID NO:5中。调控元件可含有结蛋白启动子,所述结蛋白启动子含有人结蛋白基因座的相对于结蛋白转录起始位点的核酸-269到+76。此构建体的核酸序列示于SEQ ID NO:6中。调控元件可含有融合到SEQ ID NO:6的核酸的SEQ ID NO:5的核酸且无间插的核酸,以形成含有人结蛋白基因座的相对于结蛋白转录起始位点的核苷酸-984到核苷酸-644和核苷酸-269到核苷酸+76的结蛋白启动子。此调控元件的核酸序列示于SEQ ID NO:7中。可与本文所述的组合物和方法结合使用的其它核酸调控元件包括相对于上述核酸序列具有至少85%序列一致性(例如86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或更大的序列一致性)的核酸分子。

[0077] 可与本文所述的组合物和方法结合使用的转录调控元件包括启动子,所述启动子刺激可操作连接到所述启动子的转基因在中枢神经系统细胞(例如尤其神经元、神经胶质细胞或星形胶质细胞)中的表达。此类启动子的实例是突触蛋白启动子、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶III启动子、微管蛋白 $\alpha$ I启动子、微管蛋白相关蛋白IB(MAP IB)启动子、神经元特异性烯醇化酶启动子、血小板源生长因子 $\beta$ 链启动子、神经丝轻链启动子、神经元特异性VGF基因启动子、神经元核(NeuN)启动子、腺瘤性结肠息肉病(APC)启动子、结合离子化钙的衔接分子1(Iba-1)和同源异形盒蛋白9(HB9)启动子,或所述启动子的变体(例如与野生型启动子基因座的核酸序列具有至少85%序列一致性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或更大的序列一致性)且能够在引入中枢神经系统细胞中后刺激可操作连接到它的转基因的转录的变体)或它的功能部分。

[0078] 例如,可与本文所述的组合物和方法结合使用的转录调控元件可含有突触蛋白启动子或它的功能部分。含有突触蛋白启动子区的例示性调控元件示于SEQ ID NO:8中。此构建体含有人突触蛋白基因座的相对于突触蛋白转录起始位点的核苷酸-465到核苷酸-90。可与本文所述的组合物和方法结合使用的其它核酸调控元件包括相对于此核酸序列具有至少85%序列一致性(例如86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或更大的序列一致性)的核酸分子。

[0079] 下表2中汇总前述核酸调控元件。

[0080] 表2. 例示性核酸调控元件

[0081]

SEQ ID NO.	转录调控元件的描述	核酸序列
1	ApoE HCR 基因座的含 193 个核苷酸的区段	CCCCTAAAATGGGCAAACATTGC AAGCAGCAAACAGCAAACACAC AGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTT GGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAG ACCTCTCTGGGCCCATGCCACCT CCAACATCCACTCGACCCCTTGG AATTTCGGTGGAGAGGAGCAGA GGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGT AGTGTGAGAGGG
2	ApoE-HCR 基因座的含 320 个核苷酸的区段	GGCTCAGAGGCACACAGGAGTT TCTGGGCTCACCCCTGCCCCCTTC CAACCCCTCAGTTCCCATCCTCC AGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTC TGAAGTCCACACTGAACAACT TCAGCCTACTCATGTCCCTAAAA TGGGCAAACATTGCAAGCAGCA AACAGCAAACACACAGCCCTCC CTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGG

SEQ ID NO.	转录调控元件的描述	核酸序列
		GGCAGAGGTCAGAGACCTCTCT GGGCCCATGCCACCTCCAACATC CACTCGACCCCTTGGAATTTTCGG TGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCC TGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAG AGGG
3	全长 ApoE-HCR 基 因座	CTGCAGGCTCAGAGGCACACAG GAGTTTCTGGGCTCACCCCTGCCC CCTTCCAACCCCTCAGTTCCCAT CCTCCAGCAGCTGTTTGTGTGCT GCCTCTGAAGTCCCACTGAAC AACTTCAGCCTACTCATGTCCC TAAAATGGGCAAACATTGCAAG CAGCAAACAGCAAACACACAGC CCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGA GCTGGGGCAGAGGTCAGAGACC TCTCTGGGCCCATGCCACCTCCA ACATCCACTCGACCCCTTGGAAT TTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGT TGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGT GTGAGAGGGTCCGGGTTCAAAA CCACTTGCTGGGTGGGGAGTCG TCAGTAAGTGGCTATGCCCCGAC CCCGAAGCCTGTTTCCCCATCTG TACAATGGAAATGATAAAGACGC CCATCTGATAGGGTTTTTGTGGC AAATAAACATTTGGTTTTTTTGT TTGTTTTGTTTTGTTTTTTGAGAT GGAGGTTTGCTCTGTCGCCAGG CTGGAGTGCAGTGACACAATCTC ATCTCACCACAACCTTCCCCTGC CTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGA TTACAAGCATGTGCCACCACACC TGGCTAATTTTCTATTTTATAGTAG AGACGGGTTTCTCCATGTTGGTC AGCCTCAGCCTCCCAAGTAACTG GGATTACAGGCCTGTGCCACCAC ACCCGGCTAATTTTTTCTATTTT GACAGGGACGGGGTTTCACCAT

[0082]

SEQ ID NO.	转录调控元件的描述	核酸序列
		GTTGGTCAGGCTGGTCTAGA
4	ApoE-HCR 基因座的含 50 个核苷酸的区段	CCCCTAAAATGGGCAAACATTGC AAGCAGCAAACAGCAAACACAC AGCCC
5	含有相对于结蛋白转录起始位点的核苷酸-984到-644的结蛋白启动子区段	TACCCCTGCCCCACAGCTCC TCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGC CATGCGTTCTCCTCTATAAATACC CGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCA GCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGT TGGGTTGACATGCGGCTCCTGAC AAAACACAAACCCCTGGTGTGT GTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTA GGGGGATGAATCAGGGAGGGGG CGGGGACCCAGGGGGCAGGAG CCACACAAAGTCTGTGCGGGGG TGGGAGCGCACATAGCAATTGG AAACTGAAAGCTTATCAGACCCT TTCTGGAAATCAGCCCCTGTTT ATAAACTTGAGGCCCCACCCTCG AG
6	含有相对于结蛋白转录起始位点的核苷酸-269到+76的结蛋白启动子区段	CGAGATAACCAGGGCTGAAAGA GGCCCGCCTGGGGGCTGGAGAC ATGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGA AGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCA CAGGACCCCGCTGGCTGACTC AGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGG GGAGCTGGCCTCCCCGCCCCCA CGGCCACGGGCCGCCCTTTCCTG GCAGGACAGCGGGATCTTGCA CTGTGAGGGGAGGGGAGGCGGG GGCTGATGTCAGGAGGGATACA AATAGTGCCGACGGCTGGGGGC CCTGTCTCCCCTCGCCGCATCCA CTCTCCGGCCGGCCGCTGTCCG CCGCTCCTCCGTGCGCCCGCCA GCCTCGCCCCG
7	含有融合到 SEQ ID NO: 6	TACCCCTGCCCCACAGCTCC TCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGC

[0083]

[0084]

SEQ ID NO.	转录调控元件的描述	核酸序列
	的 SEQ ID NO: 5 的结蛋白启动子区段	CATGCGTTCTCCTCTATAAATACC CGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCA GCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGT TGGGTTGACATGCGGCTCCTGAC AAAACACAAACCCCTGGTGTGT GTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTA GGGGGATGAATCAGGGAGGGGG CGGGGGACCCAGGGGGCAGGAG CCACACAAAGTCTGTGCGGGGG TGGGAGCGCACATAGCAATTGG AAAGTAAAGCTTATCAGACCCT TTCTGGAAATCAGCCCACTGTTT ATAACTTGAGGCCCCACCCTCG AGCGAGATAACCAGGGCTGAAA GAGGCCCGCCTGGGGGCTGGAG ACATGCTTGCTGCCTGCCCTGGC GAAGGATTGGCAGGCTTGCCCG TCACAGGACCCCCGCTGGCTGA CTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGC GGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCC CCACGGCCACGGGCCGCCCTTTC CTGGCAGGACAGCGGGATCTTG CAGCTGTCAGGGGAGGGGAGGC GGGGGCTGATGTCAGGAGGGAT ACAAATAGTGCCGACGGCTGGG GGCCCTGTCTCCCCTCGCCGCAT CCACTCTCCGGCCGGCCGCCTGT CCGCCGCCTCCTCCGTGCGCCCG CCAGCCTCGCCCG
8	包括相对于突触蛋白转录起始位点的核苷酸-465到-90的突触蛋白启动子	AAAATGCCTTCTGAGTTGAATAT CAACACTACAAACCGAGTATCTG CAGAGGGCCCTGCGTATGAGTG CAAGTGGGTTTTAGGACCAGGAT GAGGCGGGGTGGGGGTGCCTAC CTGACGACCGACCCCGACCCAC TGGACAAGCACCCAACCCCAT CCCCAAATTGCGCATCCCCTATC AGAGAGGGGGAGGGGAAACAG GATGCGGCGAGGCGCGTGCGCA CTGCCAGCTTCAGCACCGCGGA

SEQ ID NO.	转录调控元件的描述	核酸序列
[0085]		CAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGC GGCGCGCGCCACCGCCGCCTCA GCACTGAAGGCGCGCTGACGTC ACTCGCCGGTCCCCCGCAAATC CCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGC GTCCGCGCCGCCGCCG

[0086] 除上述调控元件外,本文所述的调控元件包括通过组合ApoE-HCR元件或它的功能部分与结蛋白启动子和/或突触蛋白启动子或它的功能部分形成的那些调控元件。例如,可与本文所述的组合物和方法结合使用的调控元件包括含有可操作连接到结蛋白启动子或它的功能部分的SEQ ID NO:1中所示的ApoE-HCR的含193个核苷酸的区段的那些调控元件。结蛋白启动子的功能部分可为例如相对于结蛋白转录起始位点跨越核苷酸-984到-644的核酸或相对于结蛋白转录起始位点跨越核苷酸-269到+76的核酸。在一些实施方案中,ApoE-HCR元件或它的功能部分可操作连接到结蛋白启动子,所述结蛋白启动子含有人结蛋白基因座的相对于结蛋白转录起始位点的核苷酸-984到核苷酸-644和核苷酸-269到核苷酸+76。本文所述的转录调控元件还可包括突触蛋白启动子或它的功能部分与ApoE-HCR和/或结蛋白调控元件的组合。

[0087] 下表3示出转录调控元件的例示性组合。

[0088] 表3. 组合转录调控元件

SEQ ID NO.	转录调控元件的描述	核酸序列
[0089] 10	从5'到3': (i) ApoE HCR 基因座的含 193 个核苷酸的区段, 融合到 (ii) 结蛋白启动子 (相对于结蛋白转录	CCCCTAAAATGGGCAAACATT GCAAGCAGCAAACAGCAAAC ACACAGCCCTCCCTGCCTGCT GACCTTGGAGCTGGGGCAGAG GTCAGAGACCTCTCTGGGCCC ATGCCACCTCCAACATCCACTC GACCCCTTGGAATTTTCGGTGG

[0090]

SEQ ID NO.	转录调控元件的描述	核酸序列
	起始位点跨越核苷酸-984 到-644 和核苷酸-269 到+76)	AGAGGAGCAGAGGTTGTCCTG GCGTGGTTTAGGTAGTGTGAG AGGGTACCCCCTGCCCCCAC AGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTT TCCCAGCCATGCGTTCTCCTCT ATAAATACCCGCTCTGGTATTT GGGGTTGGCAGCTGTTGCTGC CAGGGAGATGGTTGGGTTGAC ATGCGGCTCCTGACAAAACAC AAACCCCTGGTGTGTGTGGGC GTGGGTGGTGTGAGTAGGGGG ATGAATCAGGGAGGGGGCGGG GGACCCAGGGGGCAGGAGCC ACACAAAGTCTGTGCGGGGGT GGGAGCGCACATAGCAATTGG AAAGTAAAGCTTATCAGACC CTTTCTGGAAATCAGCCCACT GTTTATAAACTTGAGGCCCCAC CCTCGAGCGAGATAACCAGGG CTGAAAGAGGCCCGCCTGGGG GCTGGAGACATGCTTGCTGCC TGCCCTGGCGAAGGATTGGCA GGCTTGCCCGTCACAGGACCC CCGCTGGCTGACTCAGGGGCG CAGGCTCTTGCGGGGGAGCT GGCTCCCCGCCCCACGGCC ACGGGCCGCCCTTTCCTGGCA GGACAGCGGGATCTTGCAGCT GTCAGGGGAGGGGAGGCGGG GGCTGATGTCAGGAGGGATAC AAATAGTGCCGACGGCTGGGG GCCCTGTCTCCCCTCGCCGCAT CCACTCTCCGGCCGGCCGCCT GTCCGCGCCTCCTCCGTGCG CCCGCCAGCCTCGCCCCG
11	从 5'到 3': (i)突触蛋白启动子 (相对于突触蛋白转录起始位点跨越核苷酸-465 到-90), 融	AAAATGCCTTCTGAGTTGAATA TCAACACTACAAACCGAGTAT CTGCAGAGGGCCCTGCGTATG AGTGCAAGTGGGTTTTAGGAC CAGGATGAGGCGGGGTGGGG

SEQ ID NO.	转录调控元件的描述	核酸序列
	合到 (ii) ApoE HCR 基因座的含 193 个核苷酸的区段, 融合到 (iii) 结蛋白启动子 (相对于结蛋白转录起始位点跨越核苷酸-984 到-644 和核苷酸-269 到+76)	GTGCCTACCTGACGACCGACC CCGACCCACTGGACAAGCACC CAACCCCCATTCCCCAAATTGC GCATCCCCTATCAGAGAGGGG GAGGGGAAACAGGATGCGGC GAGGCGCGTGCGCACTGCCAG CTTCAGCACCGCGGACAGTGC CTTCCGCCCCCGCCTGGCGGGC CGCGCCACCGCCGCCTCAGCA CTGAAGGCGCGCTGACGTCAC TCGCCGGTCCCCCGCAAACCTC CCCTTCCCGGCCACCTTGGTC GCGTCCGCGCCGCCGCCGCC CTAAAATGGGCAAACATTGCA AGCAGCAAACAGCAAACACA CAGCCCTCCCTGCCTGCTGAC CTTGGAGCTGGGGCAGAGGTC AGAGACCTCTCTGGGCCCATG CCACCTCCAACATCCACTCGA CCCCTTGGAATTTCCGGTGGAG AGGAGCAGAGGTTGTCCTGGC GTGGTTTAGGTAGTGTGAGAG GGTACCCCCTGCCCCACAG CTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTC CCAGCCATGCGTTCTCCTCTAT AAATACCCGCTCTGGTATTTGG GGTTGGCAGCTGTTGCTGCCA GGGAGATGGTTGGGTTGACAT GCGGCTCCTGACAAAACACAA ACCCCTGGTGTGTGTGGGCGT GGGTGGTGTGAGTAGGGGGAT GAATCAGGGAGGGGGCGGGG GACCCAGGGGGCAGGAGCCA CACAAAGTCTGTGCGGGGGTG GGAGCGCACATAGCAATTGGA AACTGAAAGCTTATCAGACCC TTTCTGGAAATCAGCCCCTG TTTATAAACTTGAGGCCCCACC CTCGAGCGAGATAACCAGGGC TGAAAGAGGCCCGCCTGGGG GCTGGAGACATGCTTGCTGCC

[0091]



SEQ ID NO.	转录调控元件的描述	核酸序列
[0093]		AGGGGCGCAGGCCTCTTGCGG GGGAGCTGGCCTCCCCGCCCC CACGGCCACGGGCCGCCCTTT CCTGGCAGGACAGCGGGATCT TGCAGCTGTCAGGGGAGGGG AGGCGGGGGCTGATGTCAGGA GGGATACAAATAGTGCCGACG GCTGGGGGCCCTGTCTCCCCT CGCCGCATCCACTCTCCGGCC GGCCGCCTGTCCGCCGCCTCC TCCGTGCGCCCGCCAGCCTCG CCCC

[0094] 可与本文所述的组合物和方法结合使用的其它核酸调控元件包括相对于表3中所示的核酸序列具有至少85%序列一致性(例如86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或更大的序列一致性)的核酸分子。

[0095] 将外源核酸递送到靶细胞的方法

[0096] 转染技术

[0097] 可用于将转基因(例如可操作连接到本文所述的转录调控元件的转基因)引入靶细胞中的技术为此项技术中已知。例如,可使用电穿孔通过将静电势施加到相关细胞对哺乳动物细胞(例如人靶细胞)进行可渗透化处理。以此方式经受外部电场的哺乳动物细胞(例如人细胞)随后易于摄取外源核酸。哺乳动物细胞的电穿孔详细描述于例如Chu等, *Nucleic Acids Research* 15:1311(1987)中,所述文献的公开内容以引用方式并入本文中。类似技术Nucleofection™利用施加的电场来刺激外源多核苷酸摄取到真核细胞的核中。Nucleofection™和可用于进行此技术的方案详细描述于例如Distler等, *Experimental Dermatology*14:315(2005)以及US 2010/0317114中,所述文献各自的公开内容以引用方式并入本文中。

[0098] 可用于转染靶细胞的其它技术包括挤压穿孔方法。此技术诱导细胞的快速机械变形,以刺激通过响应于所施加的应力而形成的膜孔摄取外源DNA。此技术的有利之处在于,载体并非将核酸递送到细胞(例如人靶细胞)中所必需。挤压穿孔详细描述于例如Sharei等, *Journal of Visualized Experiments* 81:e50980(2013)中,所述文献的公开内容以引用方式并入本文中。

[0099] 脂转染代表可用于转染靶细胞的另一技术。此方法涉及将核酸加载到脂质体中,所述脂质体通常具有朝向脂质体外部的阳离子型官能团(例如季胺或质子化胺)。此因细胞膜的阴离子性质而促进脂质体与细胞之间的静电相互作用,最终引起外源核酸的摄取,例如通过脂质体与细胞膜的直接融合或通过复合物的胞吞作用。脂转染详细描述于例如美国专利第7,442,386号中,所述专利的公开内容以引用方式并入本文中。利用与细胞膜的离子相互作用来引起外源核酸摄取的类似技术包括使细胞与阳离子聚合物-核酸复合物接触。

与多核苷酸缔合以赋予有利于与细胞膜相互作用的正电荷的例示性阳离子型分子是激活的树枝状聚合物(描述于例如Dennig, *Topics in Current Chemistry* 228:227 (2003)中,所述文献的公开内容以引用方式并入本文中)和二乙基氨基乙基(DEAE)-葡聚糖,使用所述二乙基氨基乙基(DEAE)-葡聚糖作为转染剂详细描述于例如Gulick等, *Current Protocols in Molecular Biology* 40:1:9.2:9.2.1 (1997)中,所述文献的公开内容以引用方式并入本文中。磁珠是可用于以温和且有效的方式转染靶细胞的另一工具,这是因为此方法利用施加的磁场来引导核酸的摄取。此技术详细描述于例如US 2010/0227406中,所述专利的公开内容以引用方式并入本文中。

[0100] 另一可用于诱导靶细胞对外源核酸的摄取的工具是激光转染(laserfection),所述技术涉及将细胞暴露于特定波长的电磁辐射以温和地对细胞进行可渗透化处理并允许多核苷酸透过细胞膜。此技术详细描述于例如Rhodes等, *Methods in Cell Biology* 82:309 (2007)中,所述文献的公开内容以引用方式并入本文中。

[0101] 微囊泡代表可用于根据本文所述的方法修饰靶细胞基因组的另一潜在媒介物。例如,可使用通过共过表达糖蛋白VSV-G与例如基因组修饰蛋白(例如核酸酶)引起的微囊泡将蛋白质有效地递送到细胞中,随后催化内源多核苷酸序列的位点特异性裂解以制备用于共价纳入相关多核苷酸(例如基因或调控序列)的细胞的基因组。使用此类囊泡(也称为Gesicle)进行真核细胞的遗传修饰详细描述于例如Quinn等, *Genetic Modification of Target Cells by Direct Delivery of Active Protein*[摘要]. *Methylation changes in early embryonic genes in cancer*[摘要], *Proceedings of the 18th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy*; 2015年5月13日,摘要编号122中。

[0102] 通过基因编辑技术纳入靶基因

[0103] 除上述工具外,已开发出可用于将相关基因纳入靶细胞(例如人细胞)中的多种工具。可用于将编码靶基因的多核苷酸纳入靶细胞中的一种此类方法涉及使用转座子。转座子是编码转座酶且含有两侧为5'和3'切除位点的相关多核苷酸序列或基因的多核苷酸。一旦转座子递送到细胞中,转座酶基因的表达便立即开始并产生从转座子裂解相关基因的活性酶。此活性通过转座酶对转座子切除位点的位点特异性识别来介导。在一些情况下,这些切除位点可为末端重复或反向末端重复。一旦从转座子切除,相关基因便立即可通过存在于细胞核基因组内的相似切除位点的转座酶催化的裂解整合到哺乳动物细胞的基因组中。这允许相关基因在互补切除位点插入到裂解的核DNA中,且将相关基因连结到哺乳动物细胞基因组的DNA的磷酸二酯键的后续共价连接完成纳入过程。在某些情况下,转座子可为反转录转座子,使得编码靶基因的基因首先转录成RNA产物且然后在纳入哺乳动物细胞基因组中之前反转录成DNA。例示性转座子系统是piggybac转座子(详细描述于例如WO 2010/085699中)和睡美人转座子(详细描述于例如US 2005/0112764中),所述专利各自涉及转座子于基因递送到相关细胞的用途的公开内容以引用方式并入本文中。

[0104] 将靶基因整合到靶细胞基因组中的另一工具是成簇规则间隔的短回文重复(CRISPR)/Cas系统,所述系统最初进化为细菌和古菌抵抗病毒感染的适应性防御机制。CRISPR/Cas系统包括质粒DNA内的回文重复序列和相关Cas9核酸酶。此DNA和蛋白质系综通过首先将外源DNA纳入CRISPR基因座中来引导靶序列的位点特异性DNA裂解。含有这些外源

序列和CRISPR基因座的重复间隔体元件的多核苷酸进而在宿主细胞中转录以产生向导RNA,所述向导RNA随后可与靶序列退火并使Cas9核酸酶定位于此位点。以此方式,可在外源多核苷酸中引起高位点特异性cas9介导的DNA裂解,这是因为使cas9紧密靠近靶DNA分子的相互作用是由RNA:DNA杂交来管控。因此,可设计CRISPR/Cas系统以裂解任何相关靶DNA分子。已利用此技术来编辑真核基因组(Hwang等,Nature Biotechnology 31:227(2013))且可用作位点特异性编辑靶细胞基因组的有效方式以在纳入编码靶基因的基因之前裂解DNA。使用CRISPR/Cas调节基因表达已描述于例如美国专利第8,697,359中,所述专利涉及使用CRISPR/Cas系统进行基因组编辑的公开内容以引用方式并入本文中。在将相关基因纳入靶细胞中之前用于位点特异性裂解基因组DNA的替代性方法包括使用锌指核酸酶(ZFN)和转录活化剂样效应物核酸酶(TALEN)。与CRISPR/Cas系统不同,这些酶不含用来定位于特定靶序列的向导多核苷酸。而靶特异性由这些酶内的DNA结合结构域控制。ZFN和TALEN在基因组编辑应用中的用途描述于例如Urnov等,Nature Reviews Genetics 11:636(2010);和Joung等,Nature Reviews Molecular Cell Biology 14:49(2013)中,所述文献各自涉及用于基因组编辑的组合物和方法的公开内容以引用方式并入本文中。

[0105] 可用于将编码靶基因的多核苷酸纳入靶细胞基因组中的其它基因组编辑技术包括使用可被合理设计以位点特异性裂解基因组DNA的ARCUS<sup>TM</sup>大范围核酸酶(meganuclease)。根据已对此类酶建立的所定义的结构-活性关系,使用这些酶将编码靶基因的基因纳入哺乳动物细胞的基因组中是有利的。单链大范围核酸酶可在某些氨基酸位置经修饰以产生在所需位置选择性裂解DNA的核酸酶,从而使得靶基因位点特异性纳入靶细胞的核DNA中。这些单链核酸酶已广泛描述于例如美国专利第8,021,867号和US 8,445,251中,所述专利各自涉及用于基因组编辑的组合物和方法的公开内容以引用方式并入本文中。

[0106] 用于将外源核酸递送到靶细胞的载体

[0107] 用于核酸递送的病毒载体

[0108] 病毒基因组提供可用于将相关基因有效递送到靶细胞(例如哺乳动物细胞,例如人细胞)基因组中的丰富载体源。病毒基因组是尤其可用于基因递送的载体,这是因为含于此类基因组内的多核苷酸通常通过一般化或专门的转导纳入靶细胞的基因组中。这些过程作为天然病毒复制周期的一部分进行,且不需要添加蛋白质或试剂来诱导基因整合。病毒载体的实例包括AAV、反转录病毒、腺病毒(例如Ad5、Ad26、Ad34、Ad35和Ad48)、细小病毒(例如腺相关病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒例如正粘液病毒(例如流行性感冒病毒)、棒状病毒(例如狂犬病病毒和水疱性口炎病毒)、副粘液病毒(例如麻疹病毒和仙台(Sendai)病毒)、正链RNA病毒(例如微小RNA病毒和 $\alpha$ 病毒)和双链DNA病毒,包括腺病毒、疱疹病毒(例如1型和2型单纯疱疹病毒、艾司坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、巨细胞病毒)和痘病毒(例如牛痘、改良型安卡拉牛痘(modified vaccinia Ankara,MVA)、鸡痘和金丝雀痘)。可用于递送编码本发明的抗体轻链和重链或抗体片段的多核苷酸的其它病毒包括例如诺沃克病毒(Norwalk virus)、披膜病毒(togavirus)、黄病毒、里奥病毒(reovirus)、乳多泡病毒、嗜肝性DNA病毒和肝炎病毒。反转录病毒的实例包括:禽白血病肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV群、慢病毒、泡沫病毒(Coffin,J.M.,Retroviridae:The viruses and their replication,Fundamental Virology,第3版,B.N.Fields等编,Lippincott-Raven

Publishers, Philadelphia, 1996)。其它实例包括鼠类白血病病毒、鼠类肉瘤病毒、小鼠乳房肿瘤病毒、牛白血病病毒、猫白血病病毒、猫肉瘤病毒、禽白血病病毒、人T细胞白血病病毒、狒狒内源病毒、长臂猿白血病病毒、Mason Pfizer猴病毒、猿猴免疫缺陷病毒、猿猴肉瘤病毒、劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)和慢病毒。载体的其它实例描述于例如美国专利第5,801,030号中,所述专利涉及用于基因疗法的病毒载体的公开内容以引用方式并入本文中。

[0109] 用于核酸递送的AAV载体

[0110] 在一些实施方案中,将本文所述组合物和方法的核酸纳入rAAV载体和/或病毒粒子中以促进所述核酸引入细胞中。可用于本发明的rAAV载体是重组核酸构建体,所述重组核酸构建体包括(1)欲表达的转基因(例如编码GAA蛋白的多核苷酸)和(2)促进异源基因整合和表达的病毒核酸。病毒核酸可包括AAV的将DNA顺式复制和包装(例如功能性ITR)到病毒粒子中所需的那些序列。在典型应用中,转基因编码GAA,这可用于校正患有溶酶体贮积症(例如庞贝氏病)的患者中的GAA缺乏。此类rAAV载体还可含有标记物或报导基因。有用的rAAV载体具有一个或多个整体或部分缺失的AAV WT基因,但保留功能性侧接ITR序列。AAV ITR可具有适于特定应用的任一血清型(例如衍生自血清型2)。使用rAAV载体的方法描述于例如Tal等,J.Biomed.Sci.7:279-291(2000)以及Monahan和Samulski,Gene Delivery 7:24-30(2000)中,所述文献各自涉及用于基因递送的AAV载体的公开内容以引用方式并入本文中。

[0111] 本文所述的核酸和载体可纳入rAAV病毒粒子中以促进核酸或载体引入细胞中。AAV的衣壳蛋白构成病毒粒子的外部非核酸部分且由AAV cap基因编码。cap基因编码病毒粒子组装所需的三种病毒外壳蛋白VP1、VP2和VP3。rAAV病毒粒子的构建已描述于例如美国专利第5,173,414号;第5,139,941号;第5,863,541号;第5,869,305号;第6,057,152号;和第6,376,237号;以及Rabinowitz等,J.Virol.76:791-801(2002)和Bowles等,J.Virol.77:423-432(2003)中,所述文献各自涉及用于基因递送的AAV载体的公开内容以引用方式并入本文中。

[0112] 可与本文所述的组合物和方法结合使用的rAAV病毒粒子包括衍生自多种AAV血清型(包括AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8和AAV 9)的那些病毒粒子。对于靶向肌细胞,包括至少一种血清型1衣壳蛋白的rAAV病毒粒子可为尤其有用的。包括至少一种血清型6衣壳蛋白的rAAV病毒粒子也可为尤其有用的,这是因为血清型6衣壳蛋白的结构类似于血清型1衣壳蛋白,且因此预期也使GAA在肌细胞中高表达。还发现rAAV血清型9是肌细胞的有效转导体。不同血清型的AAV载体和AAV蛋白的构建和使用描述于例如Chao等,Mol.Ther.2:619-623(2000);Davidson等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:3428-3432(2000);Xiao等,J.Virol.72:2224-2232(1998);Halbert等,J.Virol.74:1524-1532(2000);Halbert等,J.Virol.75:6615-6624(2001);和Auricchio等,Hum.Molec.Genet.10:3075-3081(2001)中,所述文献各自涉及用于基因递送的AAV载体的公开内容以引用方式并入本文中。

[0113] 假型化rAAV载体也可与本文所述的组合物和方法结合使用。假型化载体包括给定血清型(例如AAV9)的AAV载体,所述载体因衣壳基因衍生自除给定血清型之外的血清型(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8等)而假型化。例如,代表性假型化载体是

编码治疗性蛋白的AAV8载体或AAV9载体,所述载体因衣壳基因衍生自AAV血清型2而假型化。涉及假型化rAAV病毒粒子的构建和使用的技术为此项技术中已知且描述于例如Duan等,J.Virol.75:7662-7671(2001);Halbert等,J.Virol.74:1524-1532(2000);Zolotukhin等,Methods,28:158-167(2002);和Auricchio等,Hum.Molec.Genet.,10:3075-3081(2001)中。

[0114] 可使用在病毒粒子衣壳内具有突变的AAV病毒粒子比非突变衣壳病毒粒子更有效地感染特定细胞类型。例如,适宜AAV突变体可具有促进AAV靶向特定细胞类型的配体插入突变。AAV衣壳突变体(包括插入突变体、丙氨酸筛选突变体和表位标签突变体)的构建和表征描述于Wu等,J.Virol.74:8635-45(2000)中。可用于本发明方法中的其它rAAV病毒粒子包括通过病毒的分子育种以及通过外显子改组生成的那些衣壳杂合体。参见例如Soong等,Nat.Genet.,25:436-439(2000)以及Kolman和Stemmer,Nat.Biotechnol.19:423-428(2001)。

[0115] 治疗方法

[0116] 庞贝氏病

[0117] 庞贝氏病(也称为II型糖原贮积病或GSD II)是由缺乏溶酶体酶GAA引起。所述疾病是其中GAA缺乏最终引起所有组织、尤其横纹肌细胞中的糖原累积的先天性代谢错误。另外,糖原累积在中枢神经系统内的作用和糖原累积对骨骼肌功能的作用已有记载。

[0118] 已知此病症的三种临床形式:小儿庞贝氏病、青少年庞贝氏病和成人庞贝氏病。小儿庞贝氏病在出生后不久发作且呈现进行性肌无力和心力衰竭。小儿形式的庞贝氏病的特征还在于心肌病的快速发展,且患者通常显示肌病和神经病变,导致通常在生命的第一年死亡。成人和青少年患者的症状在生命后期出现,且主要涉及骨骼肌和神经元。展现此形式庞贝氏病的患者最终因呼吸功能不全而死亡。患者可能异常地存活超过60年。所述疾病的严重程度与残余酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性相关,所述活性在所述疾病的迟发形式中为正常活性的10-20%且在所述疾病的早发形式中小于正常活性的2%。

[0119] 人酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶

[0120] 野生型GAA的氨基酸序列示于下文SEQ ID NO:14中:

```

MGVRHPPCSHRLLAVALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQQGASRPGRDAQA
HPGRPRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKL
ENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMETENRHLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLY
SVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWN
RDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAGHVLLNSNAMDVVLQSPALSWRSTGGILDVYIFLGPPEPKSV
VQQYLDVVGYPFMPYWGGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRDRDFTFN
KDGFRDFPAMVQELHQGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVVPGSTA
[0121] FPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVGGTLQ
AATICASSHQFLSTHYNLHNLVGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWE
QLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPMRHNHNSLLSLPQEPYSFSEPA
QQAMRKALTRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKA
EVTGYFPLGTWYDLQTVPEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLOGPGLT
TTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSEGAGLQLQ
KVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLVDICVSLLMGEQFLVSWC
(SEQ ID NO: 14)

```

[0122] 编码可与本文所述的组合物和方法结合使用的GAA多肽的例示性基因包括编码SEQ ID NO:14中所示的野生型GAA蛋白以及与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少85%一致性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%一致性)的功能性GAA酶的基因。编码可与本文所述的组合物和方法结合使用的GAA多肽的基因进一步包括具有一个或多个氨基酸取代的那些基因,例如相对于SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列具有一个或多个保守氨基酸取代的那些基因。例如,可与本文所述的组合物和方法结合使用的GAA多肽包括相对于SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个或更多个保守氨基酸取代的那些GAA多肽。

[0123] 本文所述的转录调控元件可操作连接到转基因,例如溶酶体贮积病患者(例如患有庞贝氏病的那些患者)中缺乏的GAA。可将含有在本文所述的调控元件的转录控制下的溶酶体酶的构建体纳入载体(或本文所述的其它转染剂)中并施用于患者来治疗溶酶体贮积症。有利地,本文所述的转录调控元件可促进编码缺乏的溶酶体酶(例如GAA)的基因在受所述疾病侵袭的那些细胞(例如肌细胞和中枢神经系统细胞)中的转录。另外,本文所述的调控元件带来了减少或消除免疫应答的额外益处,所述免疫应答原本可能伴随编码患者缺乏的酶的基因的引入。本文所述的转录调控元件的有利性质进一步详细报告于下文实施例1中。

[0124] 药物组合物、施用途径和单位剂量

[0125] 本文所述的转录调控元件可操作连接到转基因(例如溶酶体酶(例如GAA))并纳入媒介物中以施用于患者(例如患有溶酶体贮积症(例如庞贝氏病)的人患者)中。含有可操作连接到治疗性转基因的本文所述转录调控元件的载体(例如病毒载体)的药物组合物可使用此项技术中已知的方法来制备。例如,此类组合物可使用例如生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Science第16版,Osol, A.编(1980);以引用方式并入本文中)并以所需形式、例如以冻干制剂或水溶液形式来制备。

[0126] 含有可操作连接到治疗性转基因的转录调控元件的病毒载体(例如AAV载体和本文所述的其它载体)可通过多种施用途径施用于患者(例如人患者)。施用途径可随着例如疾病的发作和严重程度而变化,且可包括例如真皮内施用、经皮施用、非经肠施用、静脉内施用、肌肉内施用、鼻内施用、皮下施用、经皮施用、气管内施用、腹膜内施用、动脉内施用、血管内施用、吸入、灌注、灌洗和口服施用。血管内施用包括递送到患者的血管系统中。在一些实施方案中,施用是施用于视为静脉的血管中(静脉内),且在一些施用中,施用是施用于视为动脉的血管中(动脉内)。静脉包括(但不限于)颈内静脉、外周静脉、冠状静脉、肝静脉、门静脉、大隐静脉、肺静脉、上腔静脉、下腔静脉、胃静脉、脾静脉、肠系膜下静脉、肠系膜上静脉、头静脉和/或股静脉。动脉包括(但不限于)冠状动脉、肺动脉、肱动脉、颈内动脉、主动脉弓、股动脉、外周动脉和/或睫动脉。预期递送可通过或到达微动脉或毛细血管。

[0127] 治疗方案可发生变化,且通常取决于疾病严重程度和患者的年龄、体重和性别。治疗可包括施用可用于将相关基因以不同单位剂量引入靶细胞中的本文所述载体(例如病毒载体)或其它剂。每个单位剂量通常将含有预定量的治疗性组合物。欲施用的量以及具体施用途径和制剂在临床领域技术人员的技能范围内。单位剂量无需作为单个注射施用,但可包含设定时间段内的连续输注。本文所述病毒载体的单位剂量可便捷地根据病毒构建体的

噬菌斑形成单位 (pfu) 来描述。单位剂量可介于例如 $10^3$ pfu、 $10^4$ pfu、 $10^5$ pfu、 $10^6$ pfu、 $10^7$ pfu、 $10^8$ pfu、 $10^9$ pfu、 $10^{10}$ pfu、 $10^{11}$ pfu、 $10^{12}$ pfu到 $10^{13}$ pfu和更高的范围内。另外或替代地,根据病毒的类型和可达到的效价,可递送1到100个、10到50个、100-1,000个或高达约或至少约 $1 \times 10^4$ 个、 $1 \times 10^5$ 个、 $1 \times 10^6$ 个、 $1 \times 10^7$ 个、 $1 \times 10^8$ 个、 $1 \times 10^9$ 个、 $1 \times 10^{10}$ 个、 $1 \times 10^{11}$ 个、 $1 \times 10^{12}$ 个、 $1 \times 10^{13}$ 个、 $1 \times 10^{14}$ 个或 $1 \times 10^{15}$ 个或更多个感染性病毒颗粒 (vp), 包括它们之间的所有值和范围。

[0128] 本文所述核酸和病毒载体的混合物可在适当地与一种或多种赋形剂、载体或稀释剂混合的水中制备。分散液也可于甘油、液体聚乙二醇和它们的混合物以及于油中制备。在普通储存和使用条件下,这些制剂可含有防腐剂以防止微生物生长。适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末(描述于US 5,466,468中,所述专利的公开内容以引用方式并入本文中)。在任一情况下,制剂可为无菌的且可为流体,达到存在容易可注射性的程度。制剂可在制造和储存条件下稳定且可被保存以抵抗微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。载体可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们的适宜混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。可例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、在分散液情况下通过维持所需粒径和通过使用表面活性剂来维持适当流动性。可通过多种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞等)来预防微生物的作用。在许多情况下,优选地包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可通过在组合物中使用延迟吸收剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来延长可注射组合物的吸收。

[0129] 例如,如果需要,可适当地将含有本文所述药物组合物的溶液缓冲,且首先用足量盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定水溶液尤其适于静脉内施用、肌肉施用、皮下施用和腹膜内施用。就此而言,根据本公开,可采用的无菌水性介质将为所属领域技术人员已知。例如,可将一个剂量溶解于1ml等渗NaCl溶液中且添加到100ml皮下输液流体中或在所建议输注位点注射。根据所治疗受试者的疾患,将必要地出现一定的剂量变化。在任一情况中,负责施用的人将决定适用于个别受试者的剂量。此外,对于人施用,制剂可满足FDA生物制剂标准办公室(FDA Office of Biologics standards)要求的无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0130] 实施例

[0131] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供如何使用、制备和评估本文所述的组合物和方法的描述,并且这些实施例仅旨在作为本发明的示例而不旨在限制发明人认为是他们的发明的范围。

[0132] 实施例1. 在庞贝氏病患者中建立用于酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因递送的最佳组织表达

[0133] 目标

[0134] 设计几种腺相关病毒(AAV)载体以靶向在小鼠庞贝氏病模型中在一定剂量范围内不同组织(例如肌肉和肝)中的表达。在庞贝氏病小鼠模型中全身施用6种腺相关病毒(AAV)载体后比较结果,所述6种腺相关病毒(AAV)载体被设计以在一定剂量范围内将人酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因(hGAA)的表达引导到不同组织和/或组织的组合。选择具有最佳多组织表达谱的载体以平移到全身性施用AAV-GAA来治疗庞贝氏病的临床试验。

[0135] 在此研究中,检查载体剂量和靶组织表达谱以确定他们如何影响在此模型中与患者的庞贝氏病相关的多个终点,包括呼吸功能、心脏功能和骨骼肌功能以及组织中的GAA活性和糖原累积。本文所述的发现支持用于AAV基因疗法的优化的hGAA载体的临床平移。

[0136] 材料和方法

[0137] 载体和载体制造

[0138] 通过标准分子生物学技术克隆载体2 (AAV9-Des-hGAAco)、载体3 (AAV8-LDes-hGAAco)、载体4 (AAV8-LNDes-hGAAco)、载体5 (AAV8-LDes2-hGAAco) 和载体6 (AAV8-Des3-hGAAco) 并基于2质粒瞬时转染到哺乳动物细胞中以按比例制造方法来制造。通过ddPCR测定每种载体的基因组效价。下表4中汇总候选载体。图1显示构建体的反向末端重复 (ITR) 区的一般构造的示意图。

[0139] 表4. 候选载体

[0140]

载体	描述	转录调控元件的核酸序列	血清型	启动子元件	载体投用(vg/kg)*
1	AAV8-LP1c-hGAAco	SEQ ID NO: 9	AAV8	肝定向启动子	最小剂量 ( $3 \times 10^{12}$ vg/kg); 低剂量 ( $1 \times 10^{13}$ vg/kg)
2	AAV9-Des-hGAAco	SEQ ID NO: 7	AAV9	结蛋白启动子	低剂量 ( $1 \times 10^{13}$ vg/kg); 高剂量 ( $3 \times 10^{13}$ vg/kg)
3	AAV8-LDes-hGAAco	SEQ ID NO: 10	AAV8	结蛋白/肝推定的杂合启动子	低剂量 ( $1 \times 10^{13}$ vg/kg); 高剂量 ( $3 \times 10^{13}$ vg/kg)

	AAV8-LNDes-hGAAco	SEQ ID NO: 11	AAV8	结蛋白/肝/CNS推定的杂合启动子	低剂量 ( $1 \times 10^{13}$ vg/kg); 高剂量 ( $3 \times 10^{13}$ vg/kg)
[0141]	AAV8-LDes2-hGAAco	SEQ ID NO: 12	AAV8	结蛋白/肝推定的杂合启动子	低剂量 ( $1 \times 10^{13}$ vg/kg); 高剂量 ( $3 \times 10^{13}$ vg/kg)
	AAV8-Des3-hGAAco	SEQ ID NO: 7	AAV8	结蛋白启动子	低剂量 ( $1 \times 10^{13}$ vg/kg); 高剂量 ( $3 \times 10^{13}$ vg/kg)

[0142] \*为标准化强AAV8肝向性和表达,载体1的投用剂量比载体2-6低3倍。

[0143] 转录调控元件

[0144] 可操作连接到载体编号1中的GAA转基因的转录调控元件的核酸序列从5'到3'含有ApoE-HCR的含193个核苷酸的区段(示于SEQ ID NO:1中),所述含193个核苷酸的区段可操作连接到人 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶启动子(示于下文SEQ ID NO:13中)。此构建体中使用的组合ApoE-HCR/人 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶调控元件的核酸序列示于SEQ ID NO:9中。

CCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCT  
TGGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCT  
TGAATTTCCGTGGAGAGGAGCAGAGTTGTCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGAATGA  
CTCCTTTCCGTAAGTGCAGTGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCG  
GGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGcACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGG  
TTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAG  
GGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATC (SEQ ID NO: 9)

[0145]

GAATGACTCCTTTCCGTAAGTGCAGTGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGT  
AGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGcACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGA  
CCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGA  
GGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATC (SEQ ID NO:  
13)

[0146] 可操作连接到载体编号2中的GAA转基因的转录调控元件的核酸序列是缩短的结蛋白启动子。此缩短的结蛋白启动子含有具有SEQ ID NO:5的核酸序列(相对于结蛋白转录起始位点含有核苷酸-984到-644)的5'区,所述5'区融合到具有SEQ ID NO:6的核酸序列(相对于结蛋白转录起始位点含有核苷酸-269到+70)的3'区。此构建体中使用的转录调控元件的核酸序列示于SEQ ID NO:7中。

[0147] 可操作连接到载体编号3中的GAA转基因的转录调控元件的核酸序列从5'到3'含有ApoE-HCR的含193个核苷酸的区段(示于SEQ ID NO:1中),所述含193个核苷酸的区段可操作连接到缩短的结蛋白启动子。此缩短的结蛋白启动子含有具有SEQ ID NO:5的核酸序

列(相对于结蛋白转录起始位点含有核苷酸-984到-644)的5'区,所述5'区融合到具有SEQ ID NO:6的核酸序列(相对于结蛋白转录起始位点含有核苷酸-269到+70)的3'区。此构建体中使用的组合的结蛋白启动子的核酸序列示于SEQ ID NO:7中。此构建体中使用的组合的ApoE-HCR/结蛋白转录调控元件的核酸序列示于SEQ ID NO:10中。

[0148] 可操作连接到载体编号4中的GAA转基因的转录调控元件的核酸序列从5'到3'含有突触蛋白启动子,所述突触蛋白启动子可操作连接到ApoE-HCR的含193个核苷酸的区段,所述含193个核苷酸的区段可操作连接到缩短的结蛋白启动子。此构建体中使用的突触蛋白启动子的核酸序列示于SEQ ID NO:8(相对于突触蛋白转录起始位点含有核苷酸-465到-90)中。此构建体中使用的ApoE-HCR区的区段的核酸序列示于SEQ ID NO:1中。此构建体中使用的缩短的结蛋白启动子含有具有SEQ ID NO:5的核酸序列(相对于结蛋白转录起始位点含有核苷酸-984到-644)的5'区,所述5'区融合到具有SEQ ID NO:6的核酸序列(相对于结蛋白转录起始位点含有核苷酸-269到+70)的3'区。此构建体中使用的组合的结蛋白启动子的核酸序列示于SEQ ID NO:7中。此构建体中使用的组合的突触蛋白/ApoE-HCR/结蛋白转录调控元件的核酸序列示于SEQ ID NO:11中。

[0149] 可操作连接到载体编号5中的GAA转基因的转录调控元件的核酸序列从5'到3'含有ApoE-HCR的含50个核苷酸的区段(示于SEQ ID NO:4中),所述含50个核苷酸的区段可操作连接到缩短的结蛋白启动子。此缩短的结蛋白启动子含有具有SEQ ID NO:5的核酸序列(相对于结蛋白转录起始位点含有核苷酸-984到-644)的5'区,所述5'区融合到具有SEQ ID NO:6的核酸序列(相对于结蛋白转录起始位点含有核苷酸-269到+70)的3'区。此构建体中使用的组合的结蛋白启动子的核酸序列示于SEQ ID NO:7中。此构建体中使用的组合的ApoE-HCR/结蛋白转录调控元件的核酸序列示于SEQ ID NO:12中。

[0150] 可操作连接到载体编号6中的GAA转基因的转录调控元件的核酸序列是缩短的结蛋白启动子。此缩短的结蛋白启动子含有具有SEQ ID NO:5的核酸序列(相对于结蛋白转录起始位点含有核苷酸-984到-644)的5'区,所述5'区融合到具有SEQ ID NO:6的核酸序列(相对于结蛋白转录起始位点含有核苷酸-269到+70)的3'区。此构建体中使用的转录调控元件的核酸序列示于SEQ ID NO:7中。

[0151] 体内研究

[0152] 所有动物程序都由Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME的制度性动物照顾和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)批准且在Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME进行。从Jackson Laboratories获得B6.129-Gaa<sup>wt</sup>小鼠和B6.129-Gaa<sup>tm1Rabn</sup>纯合突变体小鼠。通过在媒介物中稀释来制备AAV批次用于注射,且在称量小鼠后,如所指示以 $3 \times 10^{12}$ vg/kg、 $1 \times 10^{13}$ vg/kg、 $3 \times 10^{13}$ vg/kg或 $1 \times 10^{14}$ vg/kg通过单次静脉内施用载体或媒介物来施用剂量。从施用到研究结束每天进行临床观察和死亡率观察。在给药后4周或12周时,杀死小鼠并验尸。处理收获的组织并送到第三方合同研究组织以供后续分析。

[0153] GAA活性

[0154] 在小鼠组织(例如肝、心脏、脑和脊柱)和血清中评价 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA)活性。将血清或组织均质物与荧光底物4-甲基伞形酮基 $\alpha$ -D-葡萄糖吡喃糖苷(4-MUG)一起培育,所述荧光底物4-甲基伞形酮基 $\alpha$ -D-葡萄糖吡喃糖苷被GAA水解以产生水解产物4-甲基伞形酮(4-

MU)。用荧光读板仪检测4-MU,且使用4-MU标准曲线量化样品中的酶活性。

[0155] 抗GAA抗体分析

[0156] 用重组hGAA蛋白(R&D Systems)包覆Maxisorp 96孔板(Thermo Fisher Scientific)。封闭后,将以1:200稀释的血浆样品添加到板中并在37°C培育1hr。将缀合到HRP的抗小鼠二级抗体用于检测。然后,将荧光底物添加到孔中并在读板仪上评价光强度。

[0157] RNA-Seq分析

[0158] 从组织分离总RNA,并使用标准Illumina股特异性方案和聚A选择来制备测序文库。对每个样品进行文库索引,根据组织类型汇集,并在Illumina HiSeq上跨4个泳道(2×150bp读数)测序。首先使用Skewer从FASTQ文档中剪除衔接子序列,然后使用Salmon从剪除的FASTQ文档中量化包括hGAA的转录物丰度(考虑GC偏离量和股信息),最后使用来自Bioconductor的DESeq2包将转录物计数针对文库大小标准化。

[0159] 病理评价

[0160] 根据标准程序将异戊烷冷冻的组织制成切片并用H&E和PAS染色。然后由经过训练的病理学家以盲化方式分析切片,并根据以下惯例评价评分(也参见表5):1.正常;2.在10-49%的纤维中可见大糖原聚集体和小糖原聚集体;3.在50-90%的纤维中可见大糖原聚集体和小糖原聚集体;4.在>90%的纤维中可见小糖原聚集体,且仅在少数纤维中可见大糖原聚集体;5.在>90%的纤维中可见小糖原聚集体,且在>30%的纤维中可见大糖原聚集体。

[0161] 结果

[0162] 杂合启动子调谐肝和肌肉中的GAA表达平衡

[0163] 在肌肉和肝组织中评价GAA活性。为测定肌肉中的GAA活性,对于以 $1 \times 10^{13}$ vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠,在雄性小鼠(黑色圆点)和雌性小鼠(灰色三角形)的四头肌组织中在给药后一个月(参见材料和方法)评价GAA活性(图2)。为测定肝组织中的GAA活性,对于以 $1 \times 10^{13}$ vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠,在雄性小鼠(黑色圆点)和雌性小鼠(灰色三角形)的肝组织中在给药后一个月评价GAA活性(图4)。另外,对于以 $1 \times 10^{13}$ vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠,通过RNA-seq分析在雄性小鼠(圆点)和雌性小鼠(三角形)的肝组织中测量hGAA转录物(图3)。水平线指示内源鼠类GAA的中值表达水平。

[0164] 这些结果显示,杂合启动子构建体在肝和肌肉中表达。GAA活性在具有肌肉定向杂合启动子构建体的四头肌中得以保持。与经工程改造的肝增强的启动子设计一致,载体1以及杂合载体3和杂合载体4在肝中展现最高的表达和活性水平。

[0165] 还评估了肝表达对hGAA的抗体反应性的影响。对于以 $1 \times 10^{13}$ vg/kg(图5A)或 $3 \times 10^{13}$ vg/kg(图5B)给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠,在雄性小鼠(黑色圆点)和雌性小鼠(灰色三角形)的血清中在给药后一个月评价抗GAA抗体水平。此外,对于以 $1 \times 10^{13}$ vg/kg(图6A)或 $3 \times 10^{13}$ vg/kg(图6B)给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠,在雄性小鼠(黑色圆点)和雌性小鼠(灰色三角形)的血清中在给药后一个月评价GAA活性。

[0166] 升高的肝表达产生降低的hGAA抗体反应性。在载体1、载体3和载体4中,降低的hGAA抗体反应性产生升高的血清GAA。总之,升高的启动子肝活性导致抗GAA免疫原性以剂量依赖性方式降低且血清GAA活性水平升高。

[0167] 相对于仅肝启动子载体,来自杂合启动子的四头肌中改善的病理

[0168] 肌肉病理传统上难以通过酶替代疗法在人中进行校正。为确定每种载体在改善肌肉病理方面的影响,对于以 $1 \times 10^{13}$ vg/kg (图7A) 或 $3 \times 10^{13}$ vg/kg (图7B) 给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠,评价雄性小鼠(黑色圆点)和雌性小鼠(灰色三角形)的制成切片的四头肌组织中的病理评分(表5)。

[0169] 在投用含有由杂合启动子定向的hGAA转基因的载体的小鼠中评价GAA活性、糖原水平和肌肉病理修复。分析以 $3 \times 10^{13}$ vg/kg给药的代表性对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠的血清和四头肌中的GAA活性以及四头肌中的糖原累积,它们的值报告于图8中。评价根据标准程序制成切片并用H&E和PAS染色的异戊烷冷冻的四头肌的组织切片的糖原累积评分,且各值报告于图8中。代表性小鼠的H&E和PAS染色的切片的图像也显示于图8中。

[0170] 肌肉表达为改善体内肌肉病理所必需。在GAA小鼠模型中,投用杂合启动子的小鼠实现改善的肌肉病理评分。几种载体在雄性小鼠和雌性小鼠中在 $3 \times 10^{13}$ vg/kg剂量下产生改善的病理评分。

[0171] 表5. 病理评分

评分	病理(Lawlor 评分惯例)
1	正常
2	在 10-49%的纤维中可见大糖原聚集体和小糖原聚集体
3	在 50-90%的纤维中可见大糖原聚集体和小糖原聚集体
4	在>90%的纤维中可见小糖原聚集体,且仅在少数纤维中可见大糖原聚集体
5	在>90%的纤维中可见小糖原聚集体,且在>30%的纤维中可见大糖原聚集体

[0173] 脊髓中GAA活性和从头合成GAA转录物与载体3相关的证据

[0174] 为评价杂合载体修复基于CNS的庞贝氏病表现的能力,对于以 $3 \times 10^{13}$ vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠,在雄性小鼠(黑色圆点)和雌性小鼠(灰色三角形)的脊髓中在给药后一个月评价GAA活性(图9)。另外,对于以 $1 \times 10^{13}$ vg/kg给药的对照治疗的小鼠和载体治疗的小鼠,通过RNA-seq分析在雄性小鼠(圆点)和雌性小鼠(三角形)的脊髓组织中测量hGAA转录物(图10)。水平线指示内源鼠类GAA的中值表达水平。用如通过RNA-Seq分析测定的肝和脊髓中的RNA表达水平除以肝或脑组织中的平均载体拷贝数(VCN)来分别估计肝或CNS组织中的每载体表达水平的比率(图11)。

[0175] 结果显示脊髓组织中来自载体3的GAA活性和从头合成GAA转录物的证据。基于每VCN(on a per-VCN basis),载体3的脊髓中的表达等效于肝中的表达。

[0176] 结论

[0177] 如此实施例所显示,经工程改造的合成杂合启动子(例如载体3中的经工程改造的合成杂合启动子)指导hGAA在肌肉、肝和CNS组织中的真正表达。肝贡献产生有利的免疫原性谱,例如对于载体3。肌肉贡献也在肌肉中产生有利的GAA活性、糖原恢复和病理观察,例如对于载体3。另外,如基于脊髓中的GAA活性和从头合成转录物,存在CNS活性(例如对于载体3)的证据。这些发现支持本文所述的载体作为用于庞贝氏病的AAV基因疗法的优化的hGAA载体的临床平移。

[0178] 实施例2.通过施用含有可操作连接到转录控制元件的GAA转基因的载体来治疗庞贝氏病

[0179] 使用此项技术中已知的惯用分子生物学技术,编码治疗性蛋白(例如GAA)的基因可操作连接到转录调控元件(例如上文实施例1中所述的转录调控元件)。随后可将基因纳入载体(例如病毒载体)中,并施用于患有与所述基因缺乏相关的疾病的患者。例如,可向患有庞贝氏病(特征在于GAA缺乏的溶酶体贮积症)的患者施用含有在转录调控元件控制下的GAA基因的病毒载体,所述转录调控元件促进GAA在肌细胞、神经元和肝细胞中的表达。例如,可生成在载体的5'反向末端重复与3'反向末端重复之间纳入GAA基因的AAV载体(例如假型化AAV2/8或AAV2/9载体),且所述基因可置于上文实施例1中所述的转录调控元件的控制下。AAV载体可通过多种施用途径(例如尤其静脉内、肌内或皮下)施用于受试者。

[0180] 在将载体施用于患者后,所属领域技术人员可通过多种方法监测GAA基因的表达和患者对疗法的响应的改善。例如,医师可监测患者的肌肉功能(例如心肌功能)和/或糖原累积以确定患者对疗法的响应。在施用疗法后患者的肌肉功能已改善和/或糖原累积水平已降低的发现可指示,患者有利地响应治疗。可视需要确定和施用后续剂量。

[0181] 其它实施方案

[0182] 本说明书中所提到的所有出版物、专利和专利申请都以引用方式并入本文中,并入程度如同明确地且个别地指出将每一独立出版物或专利申请以引用方式并入一般。

[0183] 尽管已经结合本发明的具体实施方案描述了本发明,但应理解,本发明能够进一步修改,并且本申请旨在覆盖本发明的任何变化、使用或改编,所述变化、使用或改编通常遵循本发明的原理,并且包括在本发明所属领域内的已知或常规实践中的对本发明的所述偏离,并且可应用于上文所示的基本特征,并且在权利要求的范围内。

[0184] 其它实施方案在权利要求内。

## 序列表

	<110> 奥登茨治疗公司(Audentes Therapeutics, Inc.)	
	<120> 转录调控元件和它的用途	
	<130> 51037-038W02	
	<150> US 62/626,561	
	<151> 2018-02-05	
	<160> 14	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 193	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
[0001]	<400> 1	
	ccctaaaaat gggcaaacat tgcaagcagc aaacagcaaa cacacagccc tcctgcctg	60
	ctgaccttgg agctggggca gaggtcagag acctctctgg gcccatgcca cctccaacat	120
	ccactcgacc ccttggaaatt tcggtggaga ggagcagagg ttgtcctggc gtggtttagg	180
	tagtgtgaga ggg	193
	<210> 2	
	<211> 320	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 2	
	ggctcagagg cacacaggag tttctgggct caccctgccc cttccaacc cctcagttcc	60
	catcctccag cagctgtttg tgtgtgcct ctgaagtcca cactgaacaa acttcagcct	120

actcatgtcc ctaaaatggg caaacattgc aagcagcaaa cagcaaacac acagccctcc	180
ctgcctgctg accttggagc tggggcagag gtcagagacc tctctgggcc catgccacct	240
ccaacatcca ctgaccctt tggaaatttcg gtggagagga gcagaggttg tcttggcgtg	300
gttttaggtag tgtgagaggg	320
<210> 3	
<211> 774	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成构建体	
<400> 3	
ctgcaggctc agaggcacac aggagtttct gggctcacce tgcccccttc caaccctca	60
gttcccatcc tccagcagct gtttgtgtgc tgcctctgaa gtccacactg aacaaacttc	120
[0002] agcctactca tgtccctaaa atgggcaaac attgcaagca gcaaacagca aacacacagc	180
cctccctgcc tgetgacctt ggagctgggg cagaggtcag agacctctct gggcccatgc	240
cacctccaac atccactcga ccccttggaa tttcgggtgga gaggagcaga gttgtcctg	300
gcgtggttta gtagtgtga gagggtccgg gttcaaac accctgctggg tggggagtcg	360
tcagtaagtg gctatgcccc gaccccgaag cctgtttccc catctgtaca atggaaatga	420
taaagacgcc catctgatag ggttttgtg gcaaataaac atttggtttt tttgtttgt	480
tttgtttgt ttttgagat ggaggtttgc tctgtcgccc aggetggagt gcagtgcac	540
aatctcatct caccacaacc ttcccctgcc tcagcctccc aagtagctgg gattacaagc	600
atgtgccacc acacctggct aattttctat ttttagtaga gacgggtttc tccatgttgg	660
tcagcctcag cctcccaagt aactgggatt acaggcctgt gccaccacac ccgctaatt	720
ttttctattt ttgacagga cggggtttca ccatgttggc caggctggtc taga	774

	<210> 4	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 4	
	cccctaaaat gggcaaacat tgcaagcagc aaacagcaaa cacacagccc	50
	<210> 5	
	<211> 342	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 5	
	tacccccctgc cccccacagc tcctctcctg tgcccttgttt cccagccatg cgttctcctc	60
[0003]	tataaatacc cgctctggta tttgggggtg gcagctgttg ctgccagga gatggttggg	120
	ttgacatgcg gctcctgaca aaacacaaac cctgggtgtg tgtgggcgtg ggtggtgtga	180
	gtagggggat gaatcagga gggggcgggg gaccagggg gcaggagcca cacaaagtct	240
	gtgcgggggt gggagcgac atagcaattg gaaactgaaa gcttatcaga ccctttctgg	300
	aatcagccc actgtttata aacttgagge cccaccctcg ag	342
	<210> 6	
	<211> 346	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 6	
	cgagataacc agggctgaaa gagcccccc tggggctgg agacatgctt gctgcctgcc	60
	ctggcgaagg attggcagc ttgcccgtca caggacccc gctggctgac tcaggggcgc	120

	aggcctcttg cgggggagct ggccctccccg cccccacggc cacgggcccgc cctttcctgg	180
	caggacagcg ggatcttgca gctgtcaggg gaggggaggc gggggctgat gtcaggaggg	240
	atacaaatag tgccgacggc tgggggccct gtctcccctc gccgcatcca ctctccggcc	300
	ggccgctgt cgccgcctc ctccgtgcgc ccgccagcct cgcccc	346
	<210> 7	
	<211> 688	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 7	
	taccccctgc cccccacage tctctcctg tgcttgttt ccagccatg cgttctctc	60
	tataaatacc cgctctgta tttggggtg gcagctgtt ctgccaggga gatggttggg	120
[0004]	ttgacatgcg gctcctgaca aaacacaaac ccttggtgtg tgtgggcgtg ggtggtgtga	180
	gtaggggat gaatcaggga gggggcgggg gaccagggg gcaggagcca cacaaagtct	240
	gtgcgggggt gggagcgcac atagcaattg gaaactgaaa gcttatcaga ccctttctgg	300
	aaatcagccc actgtttata aacttgaggc cccaccctcg agcgagataa ccagggtga	360
	aagaggccc cctgggggct ggagacatgc ttgctgcctg ccctggcga gattggcag	420
	gcttcccgt cacaggacc ccgctggctg actcagggc gcaggcctct tgcgggggag	480
	ctggcctccc cgccccacg gccacgggc gcctttcct ggcaggacag cgggatcttg	540
	cagctgtcag gggaggggag gcggggctg atgtcaggag ggatacaaat agtgccgacg	600
	gctgggggcc ctgtctccc tcgcccatc cactctcgg ccggccgct gtccgccgc	660
	tctccgtgc gccgccage ctgcccg	688
	<210> 8	
	<211> 375	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 8	
	aaaatgcctt ctgagttgaa tatcaacact acaaaccgag tatctgcaga gggccctgcg	60
	tatgagtgca agtgggtttt aggaccagga tgaggcgggg tgggggtgcc tacctgacga	120
	ccgaccccga cccactggac aagcacccaa ccccattcc ccaaattgcg catcccctat	180
	cagagagggg gaggggaaac aggatgcggc gaggcgcgtg cgactgcca gttcagcac	240
	cgcgacagct gccttcgcc ccgcctggcg gcgcgcgcca ccgccctc agcactgaag	300
	gcgcgtgac gtcactgcc ggtccccgc aaactccct tccggccac cttggtgcg	360
	tccgcgccgc cgccg	375
[0005]	<210> 9	
	<211> 449	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 9	
	cccctaaaat gggcaaacat tgcaagcagc aaacagcaa cacacagccc tcctgcctg	60
	ctgaccttg agctggggca gaggtcagag acctctctgg gccatgcca cctccaacat	120
	ccactcgacc ccttgaatt tcggtggaga ggagcagagg ttgtcctggc gtggttttagg	180
	tagtgtgaga ggggaatgac tcctttcggt aagtgcagtg gaagctgtac actgcccagg	240
	caaagcgtcc gggcagcgtg ggcgggcgac tcagatcca gccagtgcac ttagccctg	300
	tttgetctc cgataactgg ggtgacctg gtaaatatc accagcagcc tccccgttg	360
	cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacagg cctgtctcc tcagcttcag	420

	gcaccaccac tgacctggga cagtgaatc	449
	<210> 10	
	<211> 881	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 10	
	cccctaaaat gggcaaacat tgcaagcagc aaacagcaaa cacacagccc tcctgcctg	60
	ctgaccttgg agctggggca gaggtcagag acctctctgg gcccatgcca cctccaacat	120
	ccactcgacc ccttgaatt tcggtggaga ggagcagagg ttgtcctggc gtggtttagg	180
	tagtgtgaga gggtagcccc tgccccccac agctcctctc ctgtgccttg tttcccagcc	240
	atgcgttctc ctctataaat acccgctctg gtatttgggg ttggcagctg ttgctgccag	300
[0006]	ggagatggtt gggttgacat gcggctcctg acaaaacaca aaccctggt gtgtgtgggc	360
	gtgggtggtg tgagtagggg gatgaatcag ggagggggcg ggggaccag ggggcaggag	420
	ccacacaaag tctgtcggg ggtgggagcg cacatagcaa ttgaaactg aaagcttacc	480
	agaccctttc tgaaatcag cccactgttt ataaacttga ggccccacc tcgagcgaga	540
	taaccagggc tgaagagggc ccgctgggg gctggagaca tgcttctgc ctgccctggc	600
	gaaggattgg caggcttccc cgtcacagga cccccgctgg ctgactcagg ggcgcaggcc	660
	tcttgcgggg gagctggcct ccccgcccc acggccacgg gccgcccttt cctggcagga	720
	cagcgggatc ttgcagctgt caggggaggg gaggcggggg ctgatgtcag gagggataca	780
	aatagtccc acggctgggg gcctgtctc ccctcgccgc atccactctc cgcccgccg	840
	cctgtccgcc gcctcctccg tgcgcccgcc agcctcgccc g	881
	<210> 11	
	<211> 1256	
	<212> DNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 11

aaaatgcctt ctgagttgaa tatcaacct acaaaccgag tatctgcaga gggccctgcg	60
tatgagtgca agtgggtttt aggaccagga tgaggcgggg tgggggtgcc tacctgacga	120
ccgaccccgga cccactggac aagcacccaa cccccattcc ccaaattgcg catccctat	180
cagagagggg gaggggaaac aggatgcggc gaggcgctg cgcaactgcca gcttcagcac	240
cgcgacagct gccttcgccc ccgcttgccg gcgcgcgcca ccgcccctc agcaactgaag	300
gcgcgctgac gtcactgcc ggtccccgc aaactcccct tcccggccac cttggtcgcg	360
tccgcgccgc cgccgccct aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaaca gcaaacacac	420
agccctccct gcctgctgac cttggagctg gggcagaggt cagagacctc tctgggcca	480
[0007] tgccacctcc aacatccact cgaccccttg gaatttcggt ggagaggagc agaggttgc	540
ctggcgtggt ttaggtagtg tgagaggta cccctgccc cccacagctc ctctcctgtg	600
cttgtttcc cagccatgcg ttctcctcta taaatacccg ctctgttatt tggggttggc	660
agctgttgct gccagggaga tggttgggtt gacatgcggc tcctgacaaa acacaaacc	720
ctggtgtgtg tggcggtggg tgggtgagt aggggatga atcagggagg gggcggggga	780
cccagggggc aggagccaca caaagtctgt gcgggggtgg gagcgacat agcaattgga	840
aactgaaagc ttatcagacc ctttctgaa atcagccac tgtttataaa cttgaggccc	900
caccctcgag cgagataacc agggctgaaa gagccccgc tgggggctgg agacatgctt	960
gctgcctgcc ctggcgaagg attgacagc ttgcccgtca caggacccc gctggctgac	1020
tcaggggcgc aggcctcttg cgggggagct ggcctcccc cccccaggc cacgggccgc	1080
cctttcctgg caggacagcg gcatcttgca gctgtcaggg gaggggagc gggggctgat	1140

	gtcaggaggg atacaaatag tgccgacggc tgggggcct gtctcccctc gccgcatcca	1200
	ctctccggcc ggccgcctgt ccgccgcctc ctccgtgcgc ccgccagcct cgcccc	1256
	<210> 12	
	<211> 738	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 12	
	cccctaaaat gggcaaacat tgcaagcagc aaacagcaaa cacacagccc taccctctgc	60
	ccccacagc tcctctcttg tgccttgttt ccagccatg cgttctctc tataaatacc	120
	cgctctggta ttgggggtg gcagctgtg ctgccagga gatggttggg ttgacatgcg	180
	gctcctgaca aaacacaaac ccctggtgtg tgtgggcgtg ggtggtgtga gtaggggat	240
[0008]	gaatcaggga gggggcgggg gaccagggg gcaggagcca cacaagtct gtgcgggggt	300
	gggagcgcac atagcaattg gaaactgaaa gcttatcaga ccctttcttg aaatcagccc	360
	actgtttata aacttgagge cccaccctcg agcgagataa ccagggtga aagaggccc	420
	cctgggggct ggagacatgc ttgtgcctg ccctggcgaa ggattggcag gcttgcccgt	480
	cacaggaccc ccgctggetg actcaggggc gcaggcctct tgcgggggag ctggcctccc	540
	cgccccacg gccacgggcc gcccttctc ggcaggacag cgggatcttg cagctgtcag	600
	gggaggggag gcgggggctg atgtcaggag ggatacaaat agtgccgacg gctgggggcc	660
	ctgtctcccc tcgccgcatc cactctccgg ccggccgctt gtccgccgcc tcctccgtgc	720
	gccccccagc ctgccccg	738
	<210> 13	
	<211> 256	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	



Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser  
 130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe  
 145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu  
 165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu  
 180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu  
 195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg  
 210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe  
 225 230 235 240

[0010] Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr  
 245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser  
 260 265 270

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly  
 275 280 285

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly  
 290 295 300

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val  
 305 310 315 320

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile  
 325 330 335

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln  
 340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly

	355	360	365
	Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr		
	370	375	380
	Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val		
	385	390	395 400
	Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe		
	405	410	415
	Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His		
	420	425	430
	Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser		
	435	440	445
	Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg		
	450	455	460
[0011]	Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val		
	465	470	475 480
	Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu		
	485	490	495
	Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe		
	500	505	510
	Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly		
	515	520	525
	Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val		
	530	535	540
	Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser		
	545	550	555 560
	Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly		
	565	570	575
	Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly		
	580	585	590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg  
 595 600 605

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu  
 610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro  
 625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu  
 645 650 655

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg  
 660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser  
 675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala  
 690 695 700

[0012] Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly  
 705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser  
 725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile  
 740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro  
 755 760 765

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly  
 770 775 780

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser  
 785 790 795 800

Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val  
 805 810 815

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr  
 820 825 830

Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr  
 835 840 845

Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser  
 850 855 860

Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala  
 865 870 875 880

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

[0013]

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala  
 900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr  
 915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly  
 930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys  
 945 950

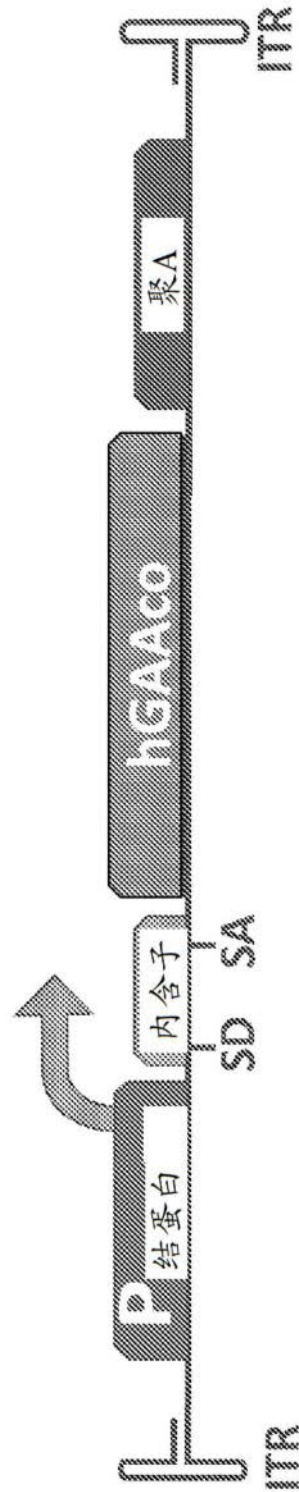


图1

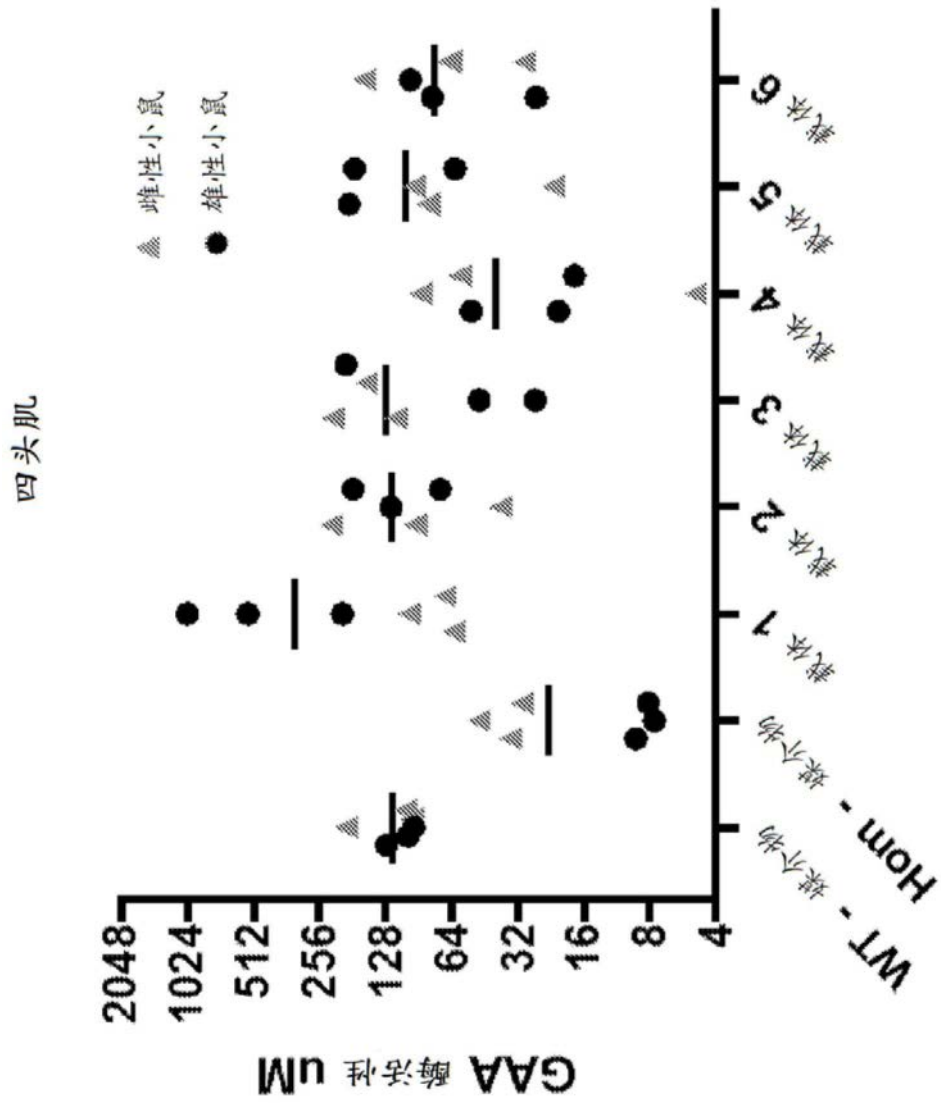


图2

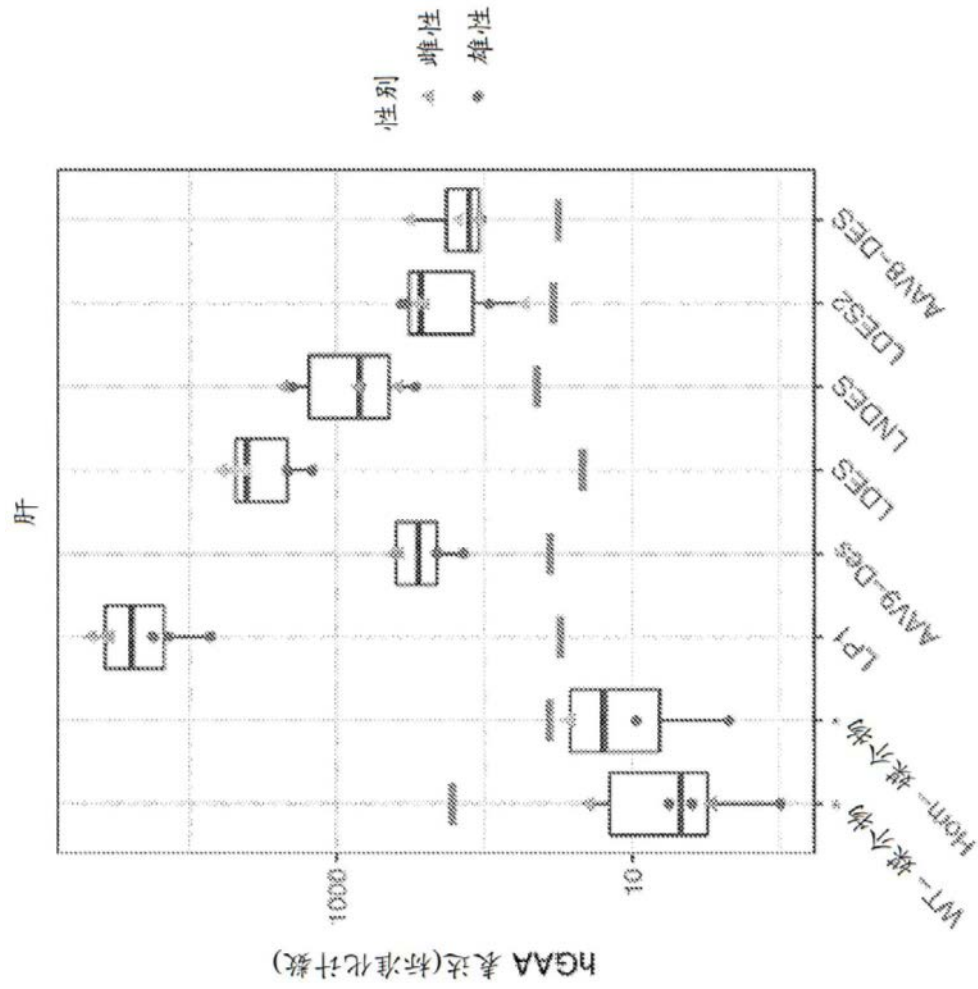


图3

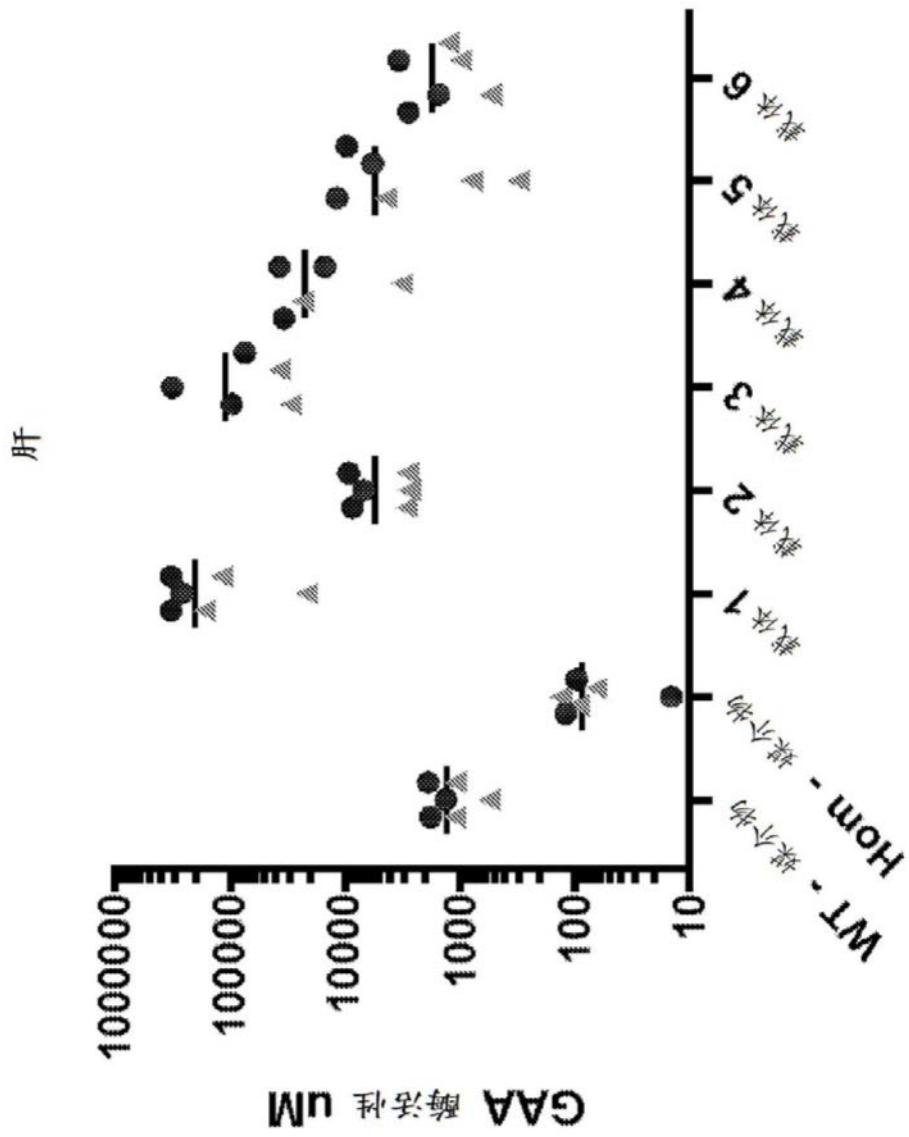


图4

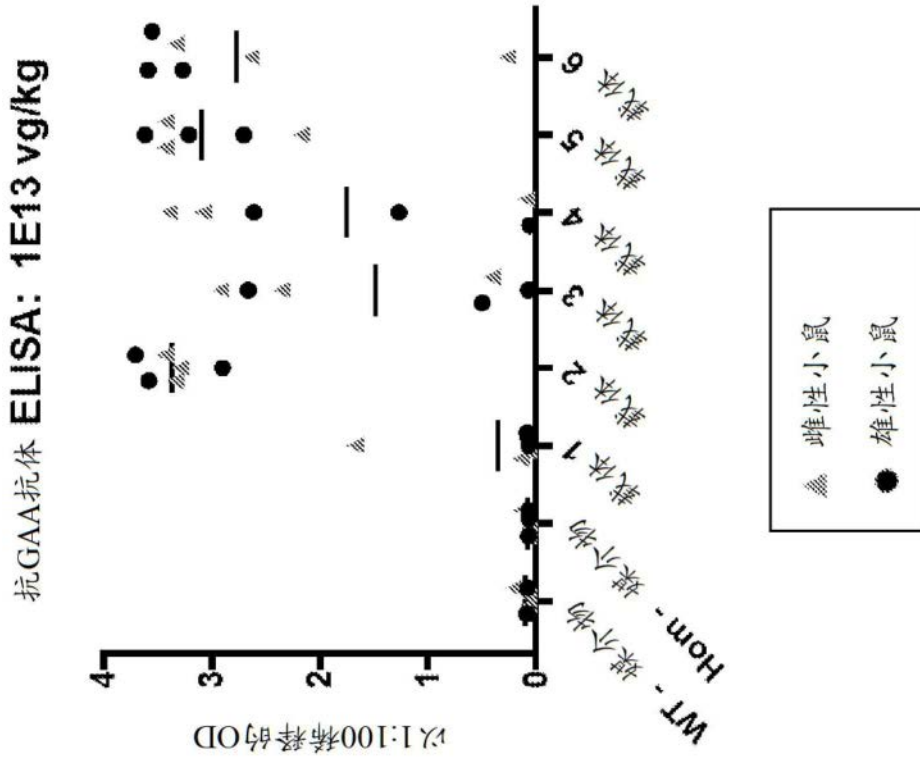


图5A

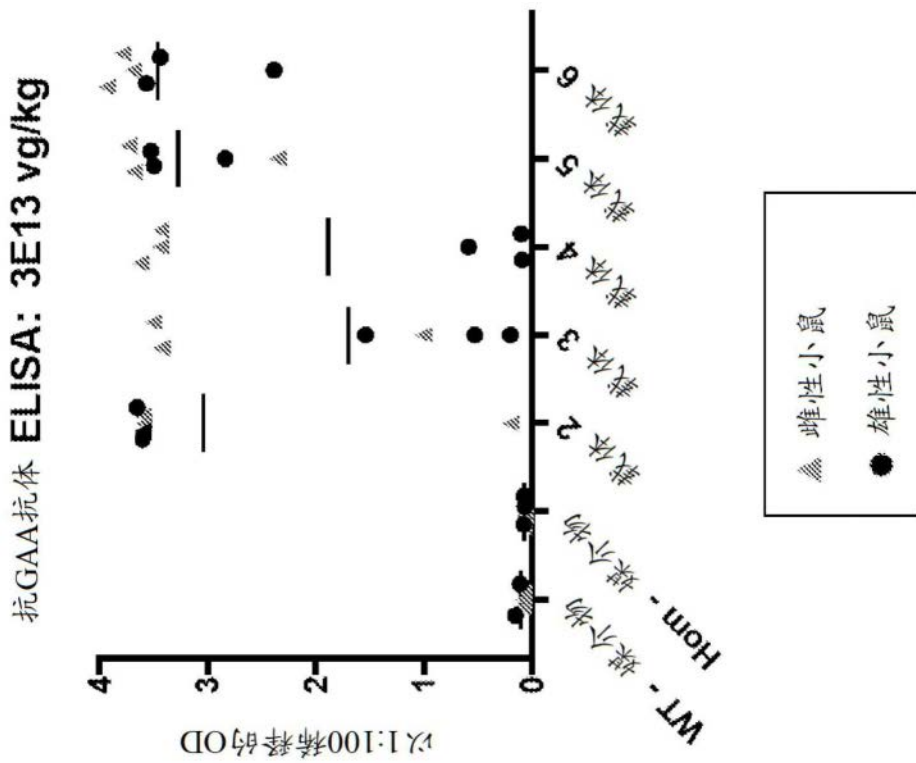


图5B

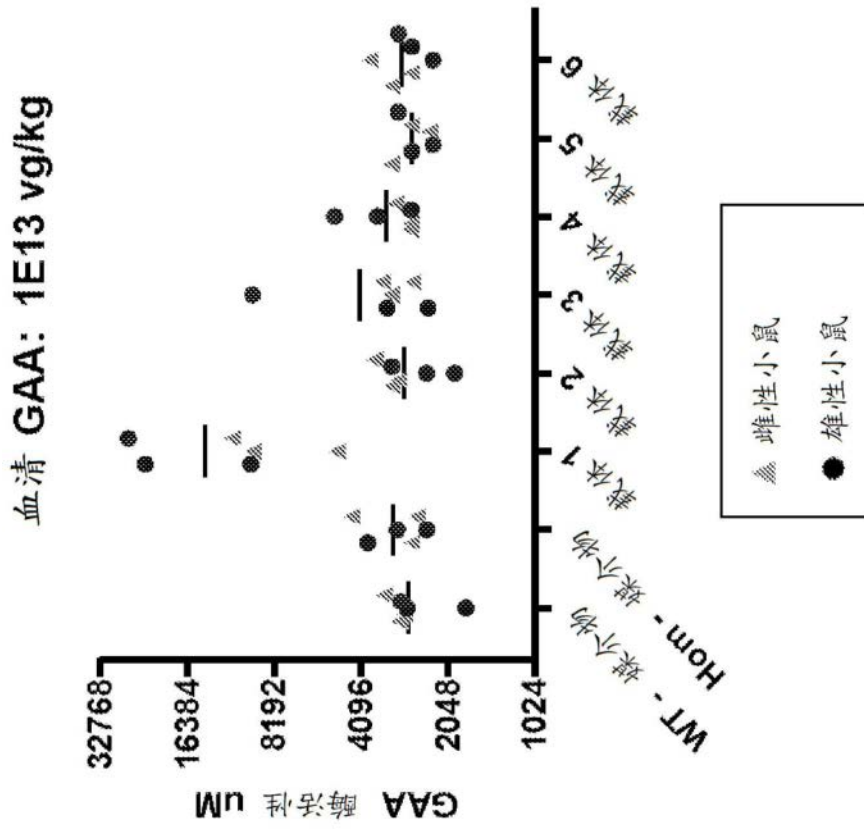


图6A

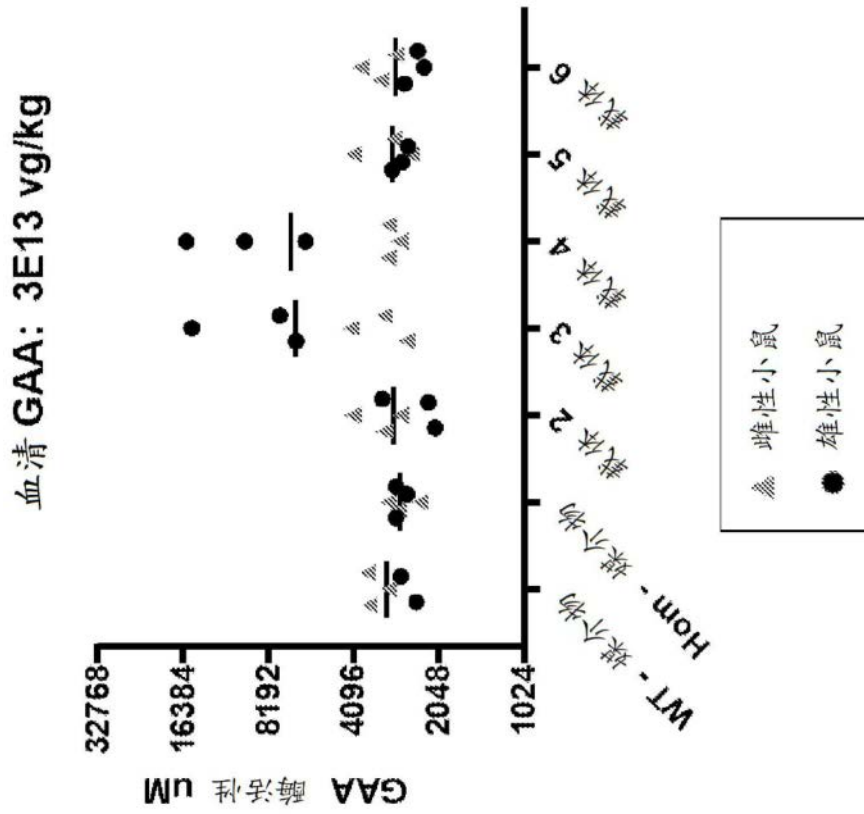


图6B

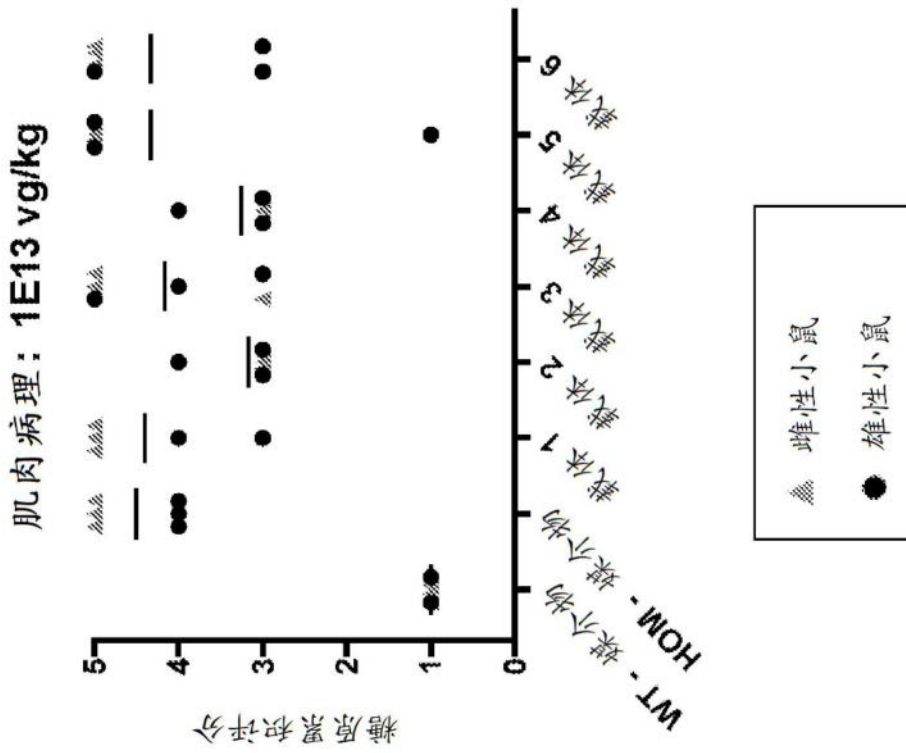


图7A

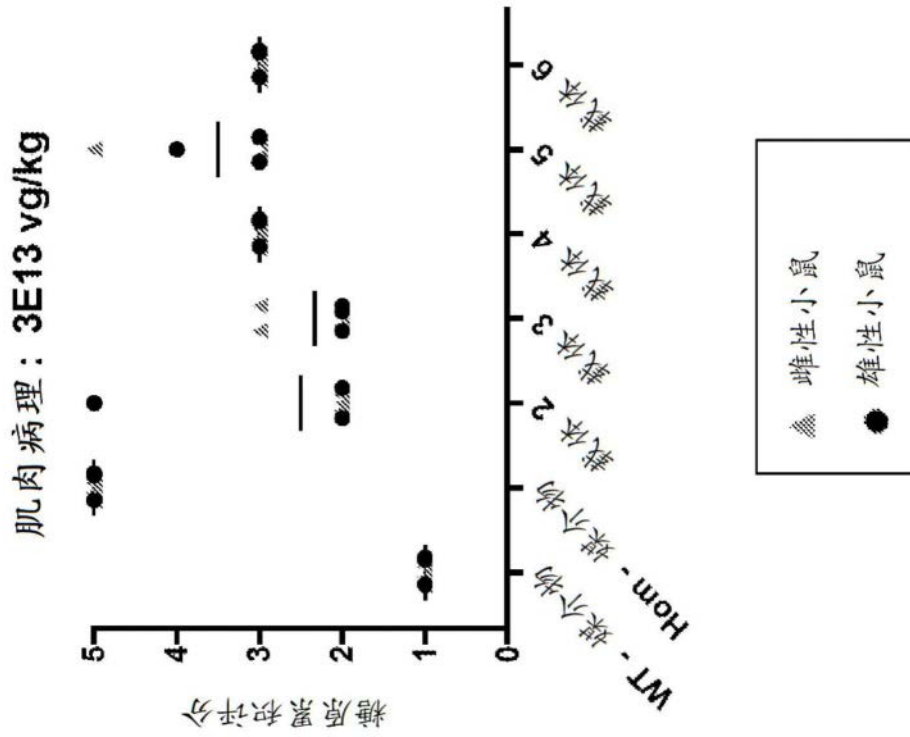


图7B

	WT 小鼠 67	载体 3 (3E13 vg/kg) 雄性编号 29	$\delta$ 6-Neo HOM 小鼠 9
血清中的 GAA	3679.9	15266	2898.3
四头肌中的 GAA	101.9	1108.6	10.6
四头肌中的 糖原	5.52	11.59	65.4
糖原评分	1	2	5

图8

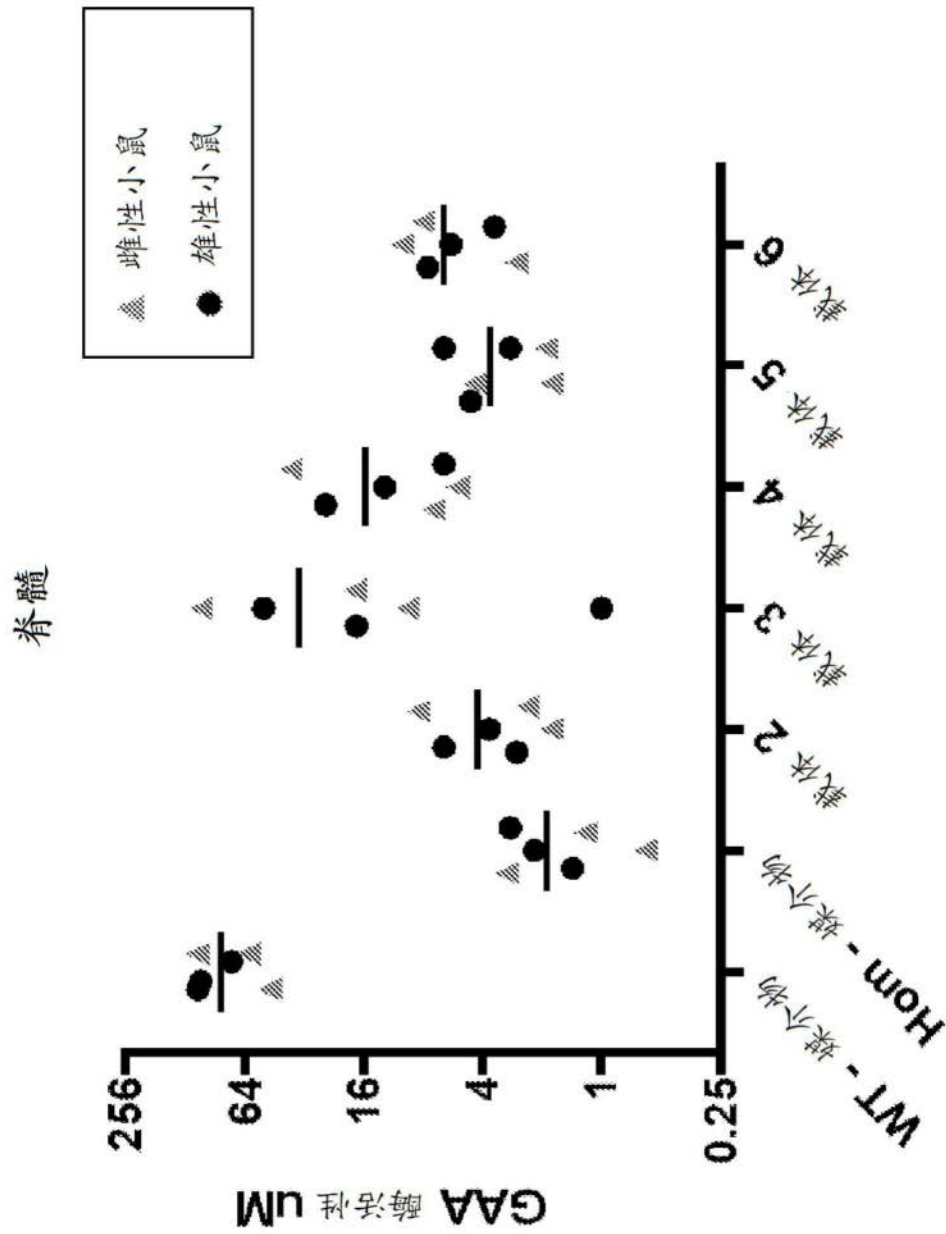


图9

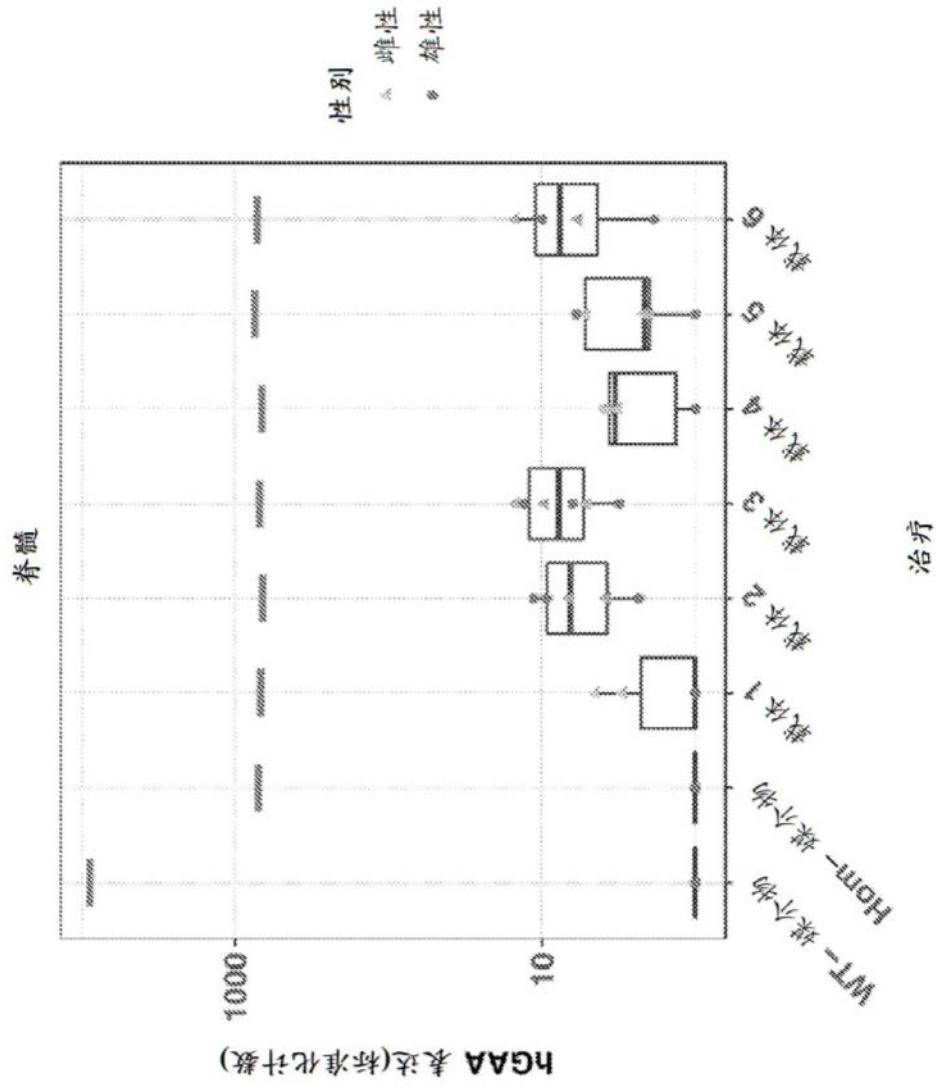


图10

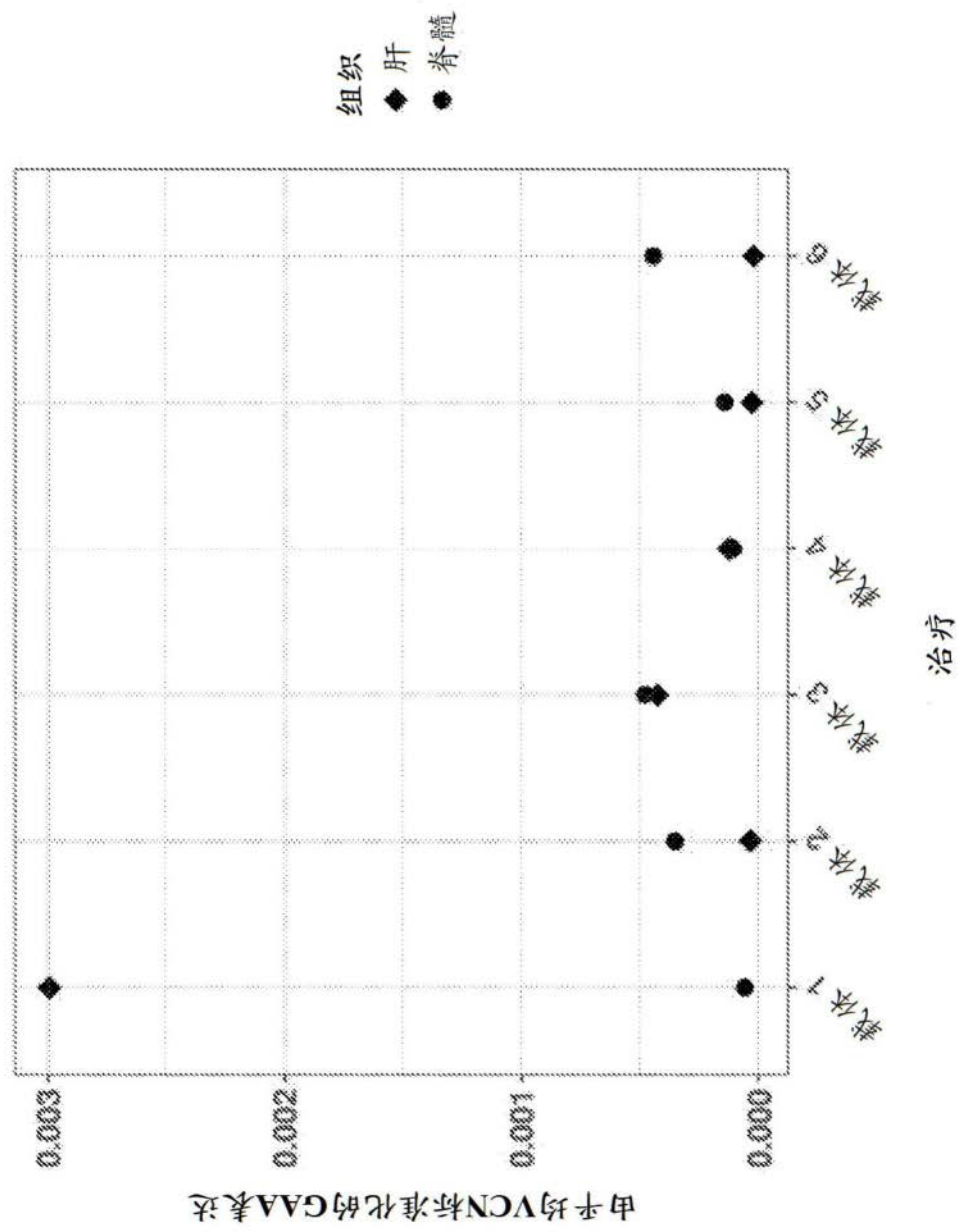


图11