



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119770682 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 08

(21) 申请号 202411834411.0

C12N 15/12 (2006.01)

(22) 申请日 2019.01.30

C07K 14/47 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/17 (2006.01)

62/624,616 2018.01.31 US

A61P 21/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201980009966.2 2019.01.30

(71) 申请人 国家儿童医院研究所

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 路易丝·R·罗迪诺·克拉帕克

(74) 专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理

事务所(普通合伙) 44348

专利代理师 何锦标 张玉颖

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

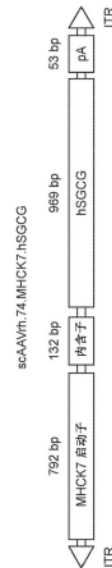
权利要求书3页 说明书37页
序列表(电子公布) 附图18页

(54) 发明名称

2C型肢带型肌营养不良的基因疗法

(57) 摘要

本公开涉及包含编码 γ -肌聚糖(SGCG)的多核苷酸的基因疗法载体(例如AAV载体),以及使用此类基因疗法载体来治疗患有肌营养不良(例如2C型肢带型肌营养不良(LGMD2C))的对象的方法。



1. rAAV载体在制备用于以下作用的药物中的应用:

- a) 治疗对象中的 γ -肌聚糖病;
- b) 治疗对象中的2C型肢带型肌营养不良;或者
- c) 治疗肌纤维萎缩和肥大,

其中所述rAAV载体包含编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列,其中所述多核苷酸序列编码如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中所述编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列经过密码子优化。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其中所述编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:1。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的应用,其中所述rAAV载体是自身互补的AAV载体基因组,其包含缺少AAV rep和cap DNA的基因组,并且是血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV rh74载体、或其变体。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的应用,其中所述rAAV载体是血清型AAV rh74载体。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的应用,其中所述rAAV载体包含AAV rh.74衣壳。

7. 根据权利要求6所述的应用,其中所述AAV rh.74衣壳包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的应用,其中所述编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列与肌肉特异性控制元件可操作地连接。

9. 根据权利要求8所述的应用,其中所述肌肉特异性控制元件选自人骨骼肌动蛋白基因元件、心脏肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子mef元件、肌肉肌酸激酶(MCK)、截短的MCK (tMCK) 启动子、肌球蛋白重链(MHC) 元件、MHCK7启动子、C5-12、鼠肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白c基因元件、慢缩心脏肌钙蛋白c基因元件、慢缩肌钙蛋白i基因元件、缺氧诱导性核因子、类固醇诱导性元件、以及糖皮质激素反应元件(gre)。

10. 根据权利要求8所述的应用,其中所述肌肉特异性控制元件是截短的MCK (tMCK) 启动子。

11. 根据权利要求8所述的应用,其中所述肌肉特异性控制元件是MHCK7启动子。

12. 根据权利要求11所述的应用,其中所述MHCK7启动子由SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列组成。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的应用,其中所述rAAV载体被配制用于肌肉内或静脉内使用。

14. 根据权利要求1-8中任一项所述的应用,其中所述rAAV载体被配制用于全身性使用。

15. 根据权利要求1-8中任一项所述的应用,其中所述rAAV载体被配制用于肠胃外使用。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的应用,其中SEQ ID NO:2的氨基酸序列编码具有 γ -肌聚糖活性的蛋白质。

17. 根据权利要求16所述的应用,其中所述蛋白质增加患有肌营养不良的对象的一个或多个肌肉的肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量。

18. 根据权利要求17所述的应用,其中所述一个或多个肌肉选自心脏、隔膜、大腿、小腿、盆骨肩带和手臂。

19. 根据权利要求16或17所述的应用,其中与未经治疗的对照对象相比,肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量增加至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少50%、或至少80%。

20. 根据权利要求16所述的应用,其中所述蛋白质在患有肌营养不良的对象中:

减少变性纤维、坏死纤维、或炎症;

升高肌酸激酶水平;或者

减少营养不良性钙化。

21. 一种多核苷酸,其具有密码子优化的与SEQ ID NO:1至少95%相同的核苷酸序列。

22. 根据权利要求21所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列。

23. 一种重组腺相关病毒(AAV)载体,其包含权利要求21或22所述的多核苷酸。

24. 根据权利要求23所述的rAAV载体,其中所述rAAV载体是自身互补的AAV载体基因组,其包含缺少AAV rep和cap DNA的基因组,并且是血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV rh74载体、或其变体。

25. 根据权利要求24所述的rAAV,其中所述rAAV载体是血清型AAV rh74载体。

26. 根据权利要求24或25所述的rAAV,其中所述rAAV载体包含AAV rh.74衣壳。

27. 根据权利要求26所述的rAAV,其中所述AAV rh.74衣壳包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

28. 根据权利要求23至27中任一项所述的rAAV,其中所述rAAV载体的基因组进一步包含肌肉特异性控制元件。

29. 根据权利要求28所述的rAAV,其中所述肌肉特异性控制元件选自人骨骼肌动蛋白基因元件、心脏肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子mef元件、肌肉肌酸激酶(MCK)、截短的MCK (tMCK) 启动子、肌球蛋白重链(MHC)元件、MHCK7启动子、C5-12、鼠肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白c基因元件、慢缩心脏肌钙蛋白c基因元件、慢缩肌钙蛋白i基因元件、缺氧诱导性核因子、类固醇诱导性元件、以及糖皮质激素反应元件(gre)。

30. 根据权利要求23至29中任一项所述的rAAV,其中所述rAAV载体的基因组包含内含子,所述内含子包含SEQ ID NO:5所示的核苷酸序列。

31. 根据权利要求23至28中任一项所述的rAAV,其进一步包含MHCK7启动子。

32. 根据权利要求31所述的rAAV,其中所述MHCK启动子包含SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列。

33. 根据权利要求23-32中任一项所述的rAAV,其中所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:3至少95%相同的核苷酸序列。

34. 根据权利要求23-33中任一项所述的rAAV,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列。

35. 根据权利要求23-34中任一项所述的rAAV,其用于在对象中治疗 γ -肌聚糖病;增加肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量;减少纤维化;或者减少收缩引起的损伤。

36. 根据权利要求23-34中任一项所述的rAAV,其用于在患有肌营养不良的对象中治疗

肌营养不良或肌纤维萎缩和肥大;减少变性纤维、坏死纤维、或炎症;升高肌酸激酶水平;或者减少营养不良性钙化。

37. 根据权利要求36所述的rAAV,其中所述肌营养不良是肢带型肌营养不良。

38. 根据权利要求37所述的rAAV,其中所述肢带型肌营养不良是2C型肢带型肌营养不良。

39. 根据权利要求36-38中任一项所述的rAAV,其中所述治疗包括通过肌肉内注射或静脉内注射;全身性地、或者通过注射、输注或植入来肠胃外地施用所述rAAV载体或包含所述rAAV载体和药学上可接受的载体的组合物。

40. 根据权利要求36-39中任一项所述的rAAV,其中该应用增加对象的一个或多个肌肉的肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量。

41. 根据权利要求40所述的rAAV,其中所述一个或多个肌肉选自心脏、隔膜、大腿、小腿、盆骨肩带和手臂。

42. 根据权利要求40或41所述的rAAV,其中与未经治疗的对照对象相比,肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量增加至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少50%、或至少80%。

43. 包含密码子优化的与SEQ ID NO:1至少95%相同的核苷酸序列的多核苷酸在制备用于在有需要的对象中治疗 γ -肌聚糖病;增加肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量;或减少纤维化或者减少收缩引起的损伤的药物中的应用。

44. 包含密码子优化的与SEQ ID NO:1至少95%相同的核苷酸序列的多核苷酸在制备用于在患有肌营养不良的对象中治疗肌营养不良或肌纤维萎缩和肥大;减少变性纤维、坏死纤维、或炎症;升高肌酸激酶水平;或者减少营养不良性钙化的药物中的应用。

2C型肢带型肌营养不良的基因疗法

[0001] 本申请为2020年07月24日进入中国国家阶段、申请号为201980009966.2、申请日为2019年01月30日、发明名称为“2C型肢带型肌营养不良的基因疗法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关专利申请的交叉引用

[0003] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2018年1月31日提交的美国临时专利申请62/624,616号的优先权,其全文以引用的方式并入本文。

[0004] 序列列表

[0005] 本申请包含序列列表,该序列列表已经以ASCII格式电子提交,并且通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2019年1月25日,名为106887-7141_SL.txt,大小为18,760字节。

技术领域

[0006] 本发明涉及基因疗法。更具体地,本公开提供了用于治疗肌营养不良(例如2C型肢带型肌营养不良(limb-girdle muscular dystrophy type 2C, LGMD2C))的基因疗法载体,例如腺相关病毒(AAV)载体。

背景技术

[0007] 肌营养不良(muscular dystrophy, MD)是一组遗传疾病。该组的特征是进行性肌无力和控制运动的骨骼肌退化。某些形式的MD会发展于婴儿期或儿童时期,而另一些则可能直到中年或更晚才出现。这些疾病在肌肉无力的分布和程度方面有所不同——某些形式的MD也影响心肌、发病年龄、进展速度和遗传模式。

[0008] 一个群组的MD是MD的肢带型分组(LGMD)。LGMD是罕见病,在发病年龄、肌肉无力区域、心脏和呼吸器官受累、进展速度和严重程度方面,在不同人群中表现不同。LGMD可以开始于童年、青春期、成年早期甚至更晚。无论男女同等地受到影响。LGMD会导致肩膀和骨盆带无力,有时大腿和手臂附近的肌肉也会随着时间而减弱。腿部无力通常先于手臂。面部肌肉通常不受影响。随着病情的发展,受影响的个体可能会出现行走问题,并可能需要长时间使用轮椅。肩膀和手臂肌肉的涉及可能导致举起手臂超过头顶和举起物体的困难。在某些类型的LGMD中,可能会涉及心脏和呼吸肌肉。

[0009] LGMD2C(2C型肢带型肌营养不良)是由 γ -肌聚糖(sarcoglycan, SGCG)缺乏引起的。像其他肌聚糖病一样,它表现为进行性肌营养不良,始于肢带肌肉,然后延伸至下肢和上肢肌肉。展现通常发生在青少年中后期。在尝试治疗LGMD2C时,没有任何药物疗法(甚至包括皮质类固醇)能够改变疾病的进程。

[0010] 患有LGMD2C和其他肌肉营养不良的患者的功能改善既需要基因恢复又需要减少纤维化。本领域需要用于治疗LGMD2C和其他肌肉营养不良的组合物和方法。

发明概述

[0012] 本文描述了编码 γ -肌聚糖的基因疗法载体(例如重组腺相关病毒(AAV)载体),以及将编码 γ -肌聚糖的此类载体递送至肌肉的方法,从而减少或预防纤维化、维持或改善肌肉功能、增加肌肉力量、增加肌肉耐力、或在患有肌营养不良的哺乳动物对象中治疗 γ -肌聚糖病(sarcoglycanopathy)。

[0013] 此外,本发明提供了使用基因疗法载体来递送 γ -肌聚糖以解决在LGMD2C(2C型肢带型肌营养不良)中观察到的基因缺陷的疗法和方法。在一个方面,本文提供了一种用于以下中的一种或多种的方法:在有需要的对象中治疗 γ -肌聚糖病;增加肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量;减少纤维化;减少收缩引起的损伤;减少脂肪浸润;和/或减少中央成核(central nucleation),和/或在患有肌营养不良症的对象中治疗肌营养不良减少变性纤维或坏死纤维;减轻炎症;升高肌酸激酶水平;治疗肌纤维萎缩和肥大和/或减少营养不良性钙化,该方法包括向所述对象施用治疗有效量的重组腺相关病毒(AAV)载体、或者基本上该步骤组成、或者由该步骤组成,其中所述rAAV载体包含基因表达盒、或基本上由基因表达盒组成、或由基因表达盒组成,该基因表达盒包含在启动子的转录控制下编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列、或基本上由该序列组成、或由该序列组成,所述盒的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复。

[0014] 在一个方面,本文描述了一种重组AAV(rAAV)载体,其包含在启动子的转录控制下编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。在一些实施方案中,编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的序列,或基本上由该序列组成,或由该序列组成,并编码保留 γ -肌聚糖活性的蛋白质。在一些实施方案中,编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。在一些实施方案中,编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的序列组成,其编码保留 γ -肌聚糖活性的蛋白质,其在一个方面,保留了与编码 γ -肌聚糖的野生型人多核苷酸中的相应的核苷酸相比SEQ ID NO:1的核苷酸变化。

[0015] 在另一方面,本文所述的rAAV载体包含编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列、或基本上由该序列组成、或由该序列组成,该 γ -肌聚糖与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性,并且该蛋白质保留了 γ -肌聚糖活性。

[0016] γ -肌聚糖活性对于肌肉功能至关重要。 γ -肌聚糖是与肌营养不良蛋白相互作用并形成肌营养不良蛋白-糖蛋白复合物的几种肌膜跨膜糖蛋白之一,该复合物跨肌膜,并且由肌营养不良蛋白、间质蛋白、 α -肌钙蛋白和 β -肌钙蛋白以及包括 γ -肌聚糖的肌聚糖组成。肌营养不良蛋白-糖蛋白复合物提供了肌膜下细胞骨架与肌细胞的细胞外基质之间的结构联系。肌细胞的非限制性实例包括心脏、隔膜(diaphragm)、腿、骨盆带、肩和臂肌细胞。 γ -肌聚

糖活性和 γ -肌聚糖病的后果的其他非限制性实例描述于Blake et al. (2002) *Physiol Rev.*;82(2):291-329 and Tarakci et al. (2016) *Front Biosci (Landmark Ed)*;21:744-56。

[0017] 在另一方面,本文所述的rAAV载体可以可操作地连接至启动子和/或肌肉特异性控制元件,以将表达限制至肌肉。例如,肌肉特异性控制元件是人骨骼肌动蛋白基因元件(GenBank登录号NG_006672.1)、心脏肌动蛋白基因元件(GenBank登录号NG_007553.1)、肌细胞特异性增强子结合因子MEF(GenBank登录号No.NG_016443.2)、肌肉肌酸激酶(MCK)(GenBank登录号AF188002.1)、tMCK(截短的MCK)、肌球蛋白重链(MHC)、MHCK7(MHC和MCK的混合版本)、C5-12(合成的启动子)、鼠肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩(fast-twitch)肌钙蛋白C基因元件、慢缩(slow-twitch)心脏肌钙蛋白C基因元件、慢缩肌钙蛋白I基因元件、低氧诱导性核因子、类固醇诱导性元件、或糖皮质激素反应元件(GRE)。

[0018] 在一些实施方案中,肌肉特异性启动子是MHCK7(SEQ ID NO:4)或其等效物。本文描述的示例性rAAV载体是pAAV.MHCK7.hSCGC,其包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列或其等效物、或基本上由该序列组成、或由该序列组成,其中MHCK7启动子跨越核苷酸136-927,CMV内含子跨越核苷酸937-1084, γ -肌聚糖序列跨越核苷酸1094-1968,并且polyA跨越核苷酸1976-2028。在某些情况下,pAAV.MHCK7.hSCGC包装在AAV rh74衣壳中。

[0019] AAV可以是任何血清型,例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13或AAV rh74。在一些实施方案中,rAAV载体包含AAV2的反向末端重复(ITR)序列。

[0020] 在例如WO 01/83692中公开了假型rAAV的生产。也可以考虑其他类型的rAAV变体,例如具有衣壳突变的rAAV。参见,例如Marsic et al., *Molecular Therapy*,22(11):1900-1909(2014)。

[0021] 还考虑了包含本文所述的任何rAAV载体或基本上由该载体组成的组合物。

[0022] 还提供了产生重组AAV载体颗粒的方法,该方法包括培养已经用本文所述的任何重组AAV载体转染的细胞,并从经转染的细胞的上清液中回收重组AAV颗粒。还考虑了包含本文所述的任何重组AAV载体或基本上由该载体组成的病毒颗粒。

[0023] 还提供了减少有需要的哺乳动物对象中的纤维化的方法。在这方面,该方法包括向哺乳动物对象施用治疗有效量的本文所述的AAV载体(或包含本文所述的AAV载体或基本上由该载体组成的组合物),或基本上由该步骤组成,或由该步骤组成。在一些实施方案中,哺乳动物对象患有肌营养不良。在一些实施方案中,施用本文所述的AAV载体(或包含本文所述的AAV载体或基本上由该载体组成的组合物)可减轻对象的骨骼肌或心肌中的纤维化。

[0024] 在另一方面,本文描述了一种增加哺乳动物对象中的肌肉力量或肌肉质量或肌肉耐力的方法,该方法包括向哺乳动物对象施用治疗有效量的本文所述的AAV载体(或包含本文所述的AAV载体或基本上由该载体组成的组合物),或基本上由该步骤组成,或由该步骤组成。

[0025] 在本公开的任何方法中,所述对象可能患有肌营养不良,例如肢带型肌肉营养不良或任何其他与肌营养不良蛋白相关的肌营养不良。

[0026] 还提供了一种治疗哺乳动物对象中的肌营养不良的方法,该方法包括向哺乳动物对象施用治疗有效量的本文所述的AAV载体(或包含本文所述的AAV载体或基本上由该载体

组成的组合物),或基本上由该步骤组成,或由该步骤组成。在一些实施方案中,所述肌营养不良是肢带型肌营养不良。

[0027] 在本公开的任何方法中,通过任何合适的施用方式(例如肌肉内注射或静脉内注射)施用rAAV。另外,在本公开内容的任何方法中,rAAV被全身性施用,例如通过注射、输注或植入进行肠胃外施用。

[0028] 本公开的组合物被配制用于肌肉内注射或静脉内注射。另外,本发明的组合物被配制用于全身性施用,例如通过注射、输注或植入进行的肠胃外施用。

[0029] 另外,配制用于向患有肌营养不良(例如肢带型肌营养不良或任何其他与肌营养不良蛋白相关的肌营养不良)的对象施用的任何组合物。本文还描述了联合疗法,其包含本文公开的一种或多种组合物和皮质类固醇,或基本上由其组成。本文提供了包含本公开的rAAV载体的宿主细胞。本文进一步提供了试剂盒,其包含本文公开的一个或多个实施方案中的任一个以及使用说明。试剂盒可以包含本文公开的一种或多种组合物和皮质类固醇或本文提供的一种或多种联合疗法,或基本上由其组成。在本公开的任何应用中,药物被配制用于施用,例如肌肉内注射或静脉内注射。另外,在本公开的任何应用中,药物被配制用于全身性施用,例如通过注射、输注或植入进行肠胃外施用。另外,可以制备任何药物以施用至患有肌营养不良(例如肢带型肌营养不良或任何其他与肌营养不良蛋白相关的肌营养不良)的对象。

[0030] 前述段落并非旨在定义本发明的每个方面,并且其他方面在诸如“详细说明”的其他部分中进行了描述。整个文档旨在作为统一的公开内容进行关联,并且应该理解,考虑了本文所述特征的所有组合,即使在本文档的同一句子、段落或部分中未一起找到特征的组合。作为一个附加方面,本发明包括本其范围在任何方面都比上述特定段落所定义的变体更窄的发明的所有实施例。例如,在被描述为属的本发明的某些方面的情况下,应当理解,属的每个成员分别是本发明的一个方面。

附图说明

[0031] 图1描绘了AAV载体(scAAVrh74.MHCK7.hSGCG),其包含密码子优化的全长人 γ -肌聚糖(hSCGB) cDNA (SEQ ID NO:1)。该构建体的侧翼是两个~100bp的AAV反向末端重复(ITR),包括密码子优化的人 γ -肌聚糖cDNA(hSGCG)、嵌合内含子(内含子)、合成的聚腺苷酸化信号(pA),并受骨骼和心脏肌肉特异性MHCK7启动子驱动。

[0032] 图2描绘了8周龄BL6 WT小鼠和 γ -肌聚糖敲除(γ -SGKO)小鼠胫前(TA)肌肉的苏木精和曙红(H&E)染色,显示患病小鼠的营养不良表型。

[0033] 图3A-3C描绘了体内载体效价(potency)。将scAAVrh74.MHCK7.hSGCG以 3×10^{10} vg的总剂量注射到 γ -SG KO小鼠的胫前(TA)肌肉中。图3A显示了 γ -SG KO小鼠中TA肌肉的免疫荧光染色。在肌膜处接近100%的 γ -肌聚糖蛋白表达是由载体递送引起的。图3B显示了来自经处理的小鼠#794、795的经注射的TA肌肉中 γ -肌聚糖表达的蛋白质印迹。图3C显示了对照野生型小鼠(“BL6 WT TA”)或未经注射的对照 γ -SG KO小鼠(“GSG KO TA”)以及未染色的样品(“GSG KO无一抗”)中TA肌肉的免疫荧光染色。

[0034] 图4A-4B描绘了BL6野生型(WT)小鼠中的体内载体效价和毒性。图4A显示了免疫荧光染色,表明通过膜和细胞内染色来过度表达 γ -肌聚糖。图4B显示了蛋白质印迹,表明在经

注射的LTA肌肉中 γ -肌聚糖的过表达。

[0035] 图5描绘了BL6野生型(WT)小鼠中的体内载体效价和毒性。未经注射和经注射的BL6 WT TA肌肉的H&E染色显示无毒性,完全不存在任何中央核、坏死纤维、炎性浸润、或纤维化组织。

[0036] 图6描绘了TA、腓肠肌(GAS)、四头肌(QUAD)、臀肌(GLUT)、PSOAS、TRICEP、隔膜和心肌上的 γ -肌聚糖的免疫荧光染色,证实了 γ -肌聚糖的广泛表达。

[0037] 图7描绘了IV效价组织的免疫荧光染色。在全身递送scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG后6周,各种骨骼肌、隔膜和心脏中的 γ -肌聚糖的IF染色证明了强烈表达,少有阴性纤维。

[0038] 图8A-8B显示了在IV处理的动物中SGCG的表达。代表性20X图像中显示了静脉注射总剂量为 $1e13$ vg scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG的SGCG $-/-$ 小鼠的骨骼肌、隔膜和心脏的免疫荧光成像(图8A)。蛋白质印迹显示,在静脉内注射scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG的小鼠中,hSGCG在所有骨骼肌和心脏中均表达(图8B)。

[0039] 图9A-9B显示了全身处理后的组织的组织学评估。BL6 WT、未处理的SGCG $-/-$ 和AAV.MHCK7.hSGCG处理的SGCG $-/-$ 小鼠中的TRI和DIA骨骼肌的苏木精和曙红染色显示出处理后营养不良病理的逆转(图9A)。具有中央成核的纤维百分比的定量显示了经处理的肌肉中的减少。BL6 WT ($n=5$)、未经处理的SGCG $-/-$ ($n=6$)、经AAV.MHCK7.hSGCG处理的($n=5$) (图9B)。***= $p<0.001$,****= $p<0.0001$ 。

[0040] 图10A-10F示出了纤维直径的量化。在BL6 WT ($n=5$)、未经处理的SGCG $-/-$ ($n=6$)和经AAV.MHCK7.hSGCG处理的SGCG $-/-$ ($n=5$)小鼠的GAS(图10A)、PSOAS(图10B)和TRI(图10C)中进行纤维直径的量化,并在处理后对纤维直径分布进行均一化。在未经处理的SGCG $-/-$ 小鼠的GAS(图10D)、PSOAS(图10E)和TRI(图10F)肌肉中,平均纤维直径减小,而在SGCG $-/-$ 小鼠中AAV.MHCK7.hSGCG处理后,每个肌肉的平均纤维直径增加到WT水平。****= $p<0.0001$ 。

[0041] 图11A-11C示出了TA和隔膜生理学。BL6 WT ($n=5$)、未经处理的SGCG $-/-$ ($n=6$)和经AAV.MHCK7.hSGCG处理的($n=5$)小鼠的TA和DIA肌肉经受了标准化比力(specific force)生成的测量。TA肌肉经受了离心收缩损伤方案(图11A)。在经处理的SGCG $-/-$ 小鼠中观察到TA比力输出和对收缩诱导的损伤的抗性得到改善(图11B)。在经处理的SGCG $-/-$ 小鼠中,DIA比力输出恢复到WT水平(图11C)。*= $p<0.05$,****= $p<0.0001$ 。

[0042] 图12示出了旷场笼活动的激光监测。x和y平面中的总体移动(ambulation)在SGCG $-/-$ 小鼠中减少,而在经AAV.MHCK7.hSGCG处理的小鼠中改善。BL6 WT ($n=6$)、未经处理的SGCG $-/-$ ($n=6$)和经AAV.MHCK7.hSGCG处理的($n=5$)。

[0043] 图13显示了载体基因组的生物分布。在IV递送总剂量为 $1e13$ vg的scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG 3个月后,在两只SGCG $-/-$ 小鼠的各种组织中测量了每微克基因组DNA(gDNA)的平均vg拷贝数的载体基因组分布。

[0044] 图14A-14B显示了血清ALT和AST的比较。分析了来自BL6 WT小鼠($n=6$)、未经处理的SGCG $-/-$ 小鼠($n=6$)和经AAV.MHCK7.hSGCG IV处理的SGCG $-/-$ 小鼠($n=5$)($1e13$ vg总剂量)的血清的生化成分水平。肝酶碱性氨基转移酶(ALT,图14A)和天冬氨酸氨基转移酶(AST,图14B)在患病的SGCG $-/-$ 小鼠中升高,而在处理后恢复至接近WT水平。*= $p<0.05$ 。虚线表示正常范围的下限和上限。

详细说明

[0046] 本公开涉及施用包含表达 γ -肌聚糖的多核苷酸的重组腺相关病毒(rAAV)载体,以减少或完全逆转患有肢带型肌营养不良的个体的肌肉纤维化。如在“实施例”部分中证明的,本文所述rAAV载体的施用导致基因敲除小鼠中 γ -肌聚糖表达的恢复。本文所述的rAAV载体的施用将会导致营养不良特征的逆转,包括更少的变性纤维、减少的炎症和通过用增加的力生成来防止偏心收缩而改善的功能恢复。本公开内容包括通过施用本文所述的rAAV载体治疗对象(例如人对象)的肢带型肌营养不良。

[0047] 在本说明书中,任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数的值、以及在适当时其分数(例如整数的十分之一和百分之一),除非另有说明。应当理解,除非另外指出,否则本文所用的术语“一个”和“一种”是指所列举的组分的“一个或多个”。替代方案(例如“或”)的使用应理解是指替代方案之一、两者或它们的任何组合。如本文所使用的,术语“包括”和“包含”是同义词。如本文所用,“多个”可以指一种或多种组分(例如一种或多种miRNA靶序列)。在本申请中,除非另外说明,否则“或”的使用表示“和/或”。

[0048] 如在本申请中使用的,术语“大约”和“近似地”用作等效物。在本申请中使用的具有或不具有大约/近似的任何数字旨在涵盖相关领域的普通技术人员所理解的任何正常波动。在某些实施例中,术语“大约”或“近似”是指落入陈述的参考值的任一方向(大于或小于)25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的范围内的值的范围,除非另有说明或从上下文中可以明显看出(除非该数字超过可能值的100%)。

[0049] “减少”或“降低”是指与参考值相比,特定值的至少5%(例如5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%)的减少或降低。特定值的减小或降低也可以表示为与参考值相比的值的倍数变化,例如与参考值相比至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000倍或更多的减少。

[0050] “增加”是指与参考值相比,特定值的至少5%(例如5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%、200%、300%、400%、500%或更多)的增加。特定值的增加也可以表示为与参考值相比的值的倍数变化,例如与参考值相比至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000倍或更多的增加。

[0051] “互补的”是指通过碱基堆积和特异性氢键在包括天然或非天然存在的(例如如上所述地修饰的)碱基(核苷)或其类似物的两个序列之间配对的能力。例如,如果核酸的一个位置处的碱基能够与靶标的相应位置处的碱基氢键合,则认为该碱基在该位置处彼此互补。核酸可以包含通用碱、或惰性无碱基间隔子,它们对氢键合不提供正或负贡献。碱基配对可以包括规范的Watson-Crick碱基配对和非Watson-Crick碱基配对(例如Wobble碱基配对和Hoogsteen碱基配对)。应当理解,对于互补碱基配对,腺苷型碱基(A)与胸苷型碱基(T)或尿嘧啶型碱基(U)互补,胞嘧啶型碱基(C)与鸟苷型碱基(G)互补,并且诸如3-硝基吡咯或5-硝基吡咯之类的通用碱基可以与任何A、C、U或T杂交并被认为是互补的。Nichols et al., Nature, 1994; 369: 492-493 and Loakes et al., Nucleic Acids Res., 1994; 22: 4039-

4043。肌苷(I)在本领域中也被认为是通用碱基,并且被认为与任何A、C、U或T互补。参见Watkins and SantaLucia, Nucl. Acids Research, 2005; 33 (19): 6258-6267。

[0052] 术语“受试者/对象”包括动物,例如哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是灵长类动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。在一些实施方案中,对象是牲畜,例如牛、绵羊、山羊、奶牛、猪等;或驯养的动物,例如狗和猫。在一些实施方案中(例如特别是在研究背景下),对象是啮齿动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠)、兔、灵长类动物、或猪(例如近交系猪)等。术语“对象”和“患者”在本文可互换使用。

[0053] “施用”在本文中是指将药剂或组合物引入对象中。

[0054] 如本文所用,“治疗”是指将药剂或组合物递送至对象以影响生理结果。在一些实施方案中,治疗是指在对象(例如在人)中的疾病的治疗,包括(a)抑制疾病,例如阻止疾病的发展或预防疾病的进展;(b)减轻疾病,例如引起疾病状态的消退;(c)治愈疾病;以及(d)预防疾病发作,例如,在被鉴定为遗传缺陷携带者的无症状对象中阻止疾病发展。在一方面,治疗不包括防治或预防。

[0055] 当疾病是肌营养不良时,以下临床终点是治疗的非限制性实例:比力的降低,对损伤的抗性的增加,肌肉力量的增加,肌肉耐力的增加,肌肉质量的增加,收缩引起的损伤的减少,脂肪浸润的减少,中央成核的减少,变性纤维或坏死纤维的减少,炎症的减少,肌酸激酶水平的升高,肌纤维萎缩和肥大的减少和/或营养不良性钙化的减少。

[0056] 当疾病是纤维化时,以下临床终点是治疗的非限制性实例:纤维化组织的减少,炎症的减少,成纤维细胞病变的减少,活化的成纤维细胞增殖的减少,成肌纤维细胞发生的减少,用力肺活量(FVC)的下降率的减少(其中FVC是肺功能测试期间呼出的空气总量),FVC相对于基线的绝对和相对增加,FVC相对于基线的绝对增加(预测的百分比),无进展生存时间的增加,在圣乔治呼吸问卷(SGRQ)总分中相对于基线的减少(其中SGRQ是与健康相关的生活质量问卷,分为3个部分:症状、活动和影响,总分(总权重)的范围为0到100,分数越低表示健康状况越好),以及高分辨率计算机断层扫描(HRCT)定量肺纤维化(QLF)评分中相对于基线的相对下降(其中QLF评分的范围是0到100%,数值越大表示肺纤维化的数量越多,并且被认为是较差的健康状况)。下列临床试验中描述了非限制性示例性纤维化治疗的临床终点以及可以执行来测量所述临床终点的测试:NCT03733444(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03733444)(上次访问时间为2019年1月9日)、NCT00287729(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00287729)(上次访问时间为2019年1月9日)、NCT00287716(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00287716)(上次访问时间为2019年1月9日)、NCT02503657(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02503657)(上次访问时间为2019年1月9日)、NCT00047645(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00047645)(上次访问时间为2019年1月9日)、NCT02802345(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02802345)(上次访问时间为2019年1月9日)、NCT01979952(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01979952)(上次访问时间为2019年1月9日)、NCT00650091(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00650091)(上次访问时间为2019年1月9日)、NCT01335464(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01335464)(上次访问时间为2019年1月9日)、NCT01335477(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01335477)(上次访问时间为2019年1月9日)、NCT01366209(clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01366209)(上次访问时间为2019年1月9日)。用于纤维化治疗的其他非限制性实

例和可以执行来测量所述临床终点的测试描述于King et al, (2014) N Engl J Med. May 29; 370(22):2083-92和Richeldi et al., (2014) N Engl J Med. May 29; 370(22):2071-82。

[0057] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指产生特定生理作用所需的试剂或组合物的最小量(例如增加、激活或增强特定生理作用所需的量)。特定试剂的有效量或治疗有效量可以根据试剂的性质以多种方式表示,例如质量/体积、细胞的#/体积、颗粒/体积、(试剂的质量)/(对象的质量)、细胞的#/(对象的质量)、或颗粒/(对象的质量)。特定试剂的有效量或治疗有效量也可以表示为半数最大有效浓度(EC₅₀),它是指导致特定生理反应幅度介于参考水平和最大反应水平中间的试剂浓度。

[0058] 细胞的“群体”是指大于1的任何数目的细胞,但优选至少1x10³个细胞、至少1x10⁴个细胞、至少至少1x10⁵个细胞、至少1x10⁶个细胞、至少1x10⁷个细胞、至少1x10⁸个细胞、至少1x10⁹个细胞、至少1x10¹⁰个细胞、或更多个细胞。细胞群体可以指体外群体(例如培养基中的细胞群体)或体内群体(例如位于特定组织中的细胞群体)。

[0059] 本文使用的短语“药学上可接受的”是指这样的化合物、材料、组合物和/或剂型,其在合理的医学判断范围内,适合与人和动物的组织接触使用,没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,且具有合理的获益/风险比。

[0060] 如本文所用,“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于经美国食品和药物管理局批准可用于人类和/或家畜的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、湿润剂、分散剂、悬浮剂稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂。

[0061] 如本文所用,“载体(vector)”是指能够将核酸分子与一种或多种病毒蛋白(在病毒载体中)(例如对于封装病毒,则为病毒衣壳)一起转移或转运至细胞的核酸分子。转移的核酸通常与载体核酸分子连接(例如插入其中)。载体可以包含指导细胞中自主复制或逆转录的序列,或可以包含足以允许整合入宿主细胞DNA的序列。“载体”包括基因疗法载体。如本文所用,术语“基因疗法载体”是指能够用于进行基因疗法(例如向对象递送编码治疗性多肽的多核苷酸序列)的载体。基因疗法载体可以包含编码蛋白质(例如γ-肌聚糖)的多核苷酸(“转基因”)。

[0062] 如本文所用,术语“表达盒”是指整合在所述表达盒中的能够在适当的条件下驱动编码蛋白质(例如γ-肌聚糖)的多核苷酸(例如转基因)的表达的DNA片段。当导入宿主细胞后,表达盒尤其能够指导细胞将转基因转录为RNA的机制,然后通常对其进行进一步加工,最后翻译为具有治疗活性的多肽。基因疗法载体可以包含表达盒或基本上由表达盒组成。术语表达盒不包括5'至5' ITR和3'至3' ITR的多核苷酸序列。本文提供了包含本公开的rAAV载体或基本上由该载体组成或由该载体组成的宿主细胞。细胞可以是任何合适的物种的,例如哺乳动物细胞。

[0063] 如本文所用,关于多核苷酸的短语“可操作地连接”或“在转录控制下”可互换地是指启动子或肌肉特异性控制元件和多核苷酸的构型,该构型使得多核苷酸能够被能够结合启动子的聚合酶转录。在一方面,肌肉特异性控制元件是将表达限制至肌肉。肌肉特异性控制元件的非限制性实例是人骨骼肌动蛋白基因元件(GenBank登录号NG_006672.1)、心脏肌动蛋白基因元件(GenBank登录号NG_007553.1)、肌细胞特异性增强子结合因子MEF(GenBank登录号No.NG_016443.2)、肌肉肌酸激酶(MCK)(GenBank登录号AF188002.1)、tMCK

(截短的MCK)、肌球蛋白重链(MHC)、MHCK7(MHC和MCK的混合版本)、C5-12(合成的启动子)、鼠肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白C基因元件、慢缩心脏肌钙蛋白C基因元件、慢缩肌钙蛋白I基因元件、低氧诱导性核因子、类固醇诱导性元件、或糖皮质激素反应元件(GRE)。

[0064] 分子和细胞生物化学中的一般方法可以在以下标准教科书中找到:Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd Ed.(Sambrook et al.,Harbor Laboratory Press 2001);Short Protocols in Molecular Biology,4th Ed.(Ausubel et al.ed.,John Wiley&Sons1999);Protein Methods(Bollag et al.,John Wiley&Sons 1996);Nonviral Vectors for Gene Therapy(Wagner et al.ed.,Academic Press 1999);Viral Vectors (Kaplift&Loewy eds.,Academic Press 1995);Immunology Methods Manual (I.Lefkovits ed.,Academic Press 1997);以及Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology(Doyle&Griffiths,John Wiley&Sons 1998),其公开内容通过引用并入本文。

[0065] 如本文所用,术语“AAV”是腺相关病毒的标准缩写。腺相关病毒是一种单链DNA细小病毒,仅在其中通过共感染辅助病毒提供某些功能的细胞中生长。有关AAV的一般信息和评论可以在例如Carter,1989,Handbook of Parvoviruses,Vol.1,pp.169-228以及Berns,1990,Virology,pp.1743-1764,Raven Press,(New York)中找到。完全可以预期,这些评价中描述的相同原理将适用于在评价发表日期之后表征的其他AAV血清型,因为众所周知,即使在遗传学水平上,各种血清型在结构和功能上都具有密切的关系。(参见,例如Blacklowe,1988,pp.165-174of Parvoviruses and Human Disease,J.R.Pattison,ed.;以及Rose,Comprehensive Virology 3:1-61(1974))。例如,所有AAV血清型显然都表现出由同源rep基因介导的非常相似的复制特性;并且都带有三种相关的衣壳蛋白,例如在AAV2中表达的。异源双链分析进一步表明了相关性的程度,该分析揭示了沿基因组长度的血清型之间广泛的交叉杂交,以及在末端存在与“反向末端重复序列”(ITR)相对应的类似自退火片段。相似的感染性模式还表明,每种血清型中的复制功能都处于相似的调节控制之下。

[0066] 如本文所用,“AAV载体”是指包含侧翼为AAV末端重复序列(ITR)的一个或多个目的多核苷酸(或转基因)的载体。当存在于已经用编码和表达rep和cap基因产物的载体转染的宿主细胞中时,这样的AAV载体可以被复制并包装成感染性病毒颗粒。

[0067] “AAV病毒体”或“AAV病毒颗粒”或“AAV载体颗粒”是指由至少一种AAV衣壳蛋白和衣壳化的多核苷酸AAV载体组成的病毒颗粒。如果颗粒包含异源多核苷酸(即野生型AAV基因组以外的多核苷酸,例如要递送至哺乳动物细胞的转基因),则通常称为“AAV载体颗粒”或简称为“AAV载体”。因此,AAV载体颗粒的产生必然包括AAV载体的产生,因为这种载体被包含在AAV载体颗粒内。

[0068] 腺相关病毒(AAV)是复制缺陷的细小病毒,其单链DNA基因组的长度为约4.7kb,包括两个145个核苷酸的反向末端重复(ITR)。AAV有多种血清型。AAV血清型的基因组的核苷酸序列是已知的。例如,在GenBank登录号NC_002077中提供了AAV-1的完整基因组;在GenBank登录号NC_001401和Srivastava et al.,J.Virol.,45:555-564(1983)中提供了AAV-2的完整基因组;在GenBank登录号NC_1829提供了AAV-3的完整基因组;在GenBank登录号NC_001829中提供了AAV-4的完整基因组;在GenBank登录号AF085716提供了AAV-5基因

组;在GenBank登录号NC_001862中提供了AAV-6的完整基因组;在GenBank登录号AX753246和AX753249中分别提供了AAV-7和AAV-8基因组的至少一部分;在Gao et al., *J. Virol.*, 78:6381-6388 (2004) 中提供了AAV-9基因组;在Mol. Ther., 13 (1) :67-76 (2006) 中提供了AAV-10基因组;并且在Virology, 330 (2) :375-383 (2004) 中提供了AAV-11基因组。AAVrh.74基因组的序列在美国专利9,434,928中提供,该专利在此引为参考。指导病毒DNA复制(rep)、衣壳化/包装和宿主细胞染色体整合的顺式作用序列包含在AAV ITR中。三个AAV启动子(其相对图谱位置分别命名为p5、p19和p40)驱动两个编码rep和cap基因的AAV内部开放阅读框的表达。两个rep启动子(p5和pi 9),加上单个AAV内含子的差异剪接(核苷酸2107和2227),导致产生四个rep蛋白(rep78、rep 68、rep 52和rep 40)。Rep蛋白具有多种酶促特性,最终负责复制病毒基因组。cap基因是从p40启动子表达的,它编码三种衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。替代的剪接和非共有的翻译起始位点负责产生三个相关的衣壳蛋白。单个共有多聚腺苷酸化位点位于AAV基因组的图谱位置95。AAV的生命周期和遗传学综述于Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158:97-129 (1992)。

[0069] AAV具有独特的特征,使其有吸引力作为例如在基因疗法中将外源DNA递送至细胞的载体。培养物中细胞的AAV感染是非细胞病变的,人类和其他动物的自然感染是沉默且无症状的。而且,AAV感染许多哺乳动物细胞,从而有可能在体内靶向许多不同的组织。此外,AAV转导缓慢分裂和未分裂的细胞,并且可以作为转录活性核附加体(染色体外元件)在这些细胞的生命周期中持续存在。将AAV前病毒基因组作为克隆的DNA插入质粒中,这使得重组基因组的构建成为可能。此外,由于指导AAV复制和基因组衣壳化的信号包含在AAV基因组的ITR中,因此可以将基因组内部大约4.3kb的部分或全部(编码复制和结构衣壳蛋白,rep-cap)替换为外源DNA。为了产生AAV载体,可以反式提供rep和cap蛋白。AAV的另一个重要特征是,它是一种非常稳定且令人振奋的病毒。它可以轻松承受用于灭活腺病毒的条件(56°C至65°C持续数小时),从而使AAV的冷藏变得不那么关键。AAV甚至可以冻干。最后,AAV感染的细胞对超级感染没有抗性。

[0070] 多项研究已证明肌肉中长期(>1.5年)重组AAV介导的蛋白表达。参见Clark et al., *Hum Gene Ther*, 8:659-669 (1997); Kessler et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:14082-14087 (1996); 以及Xiao et al., *J Virol*, 70:8098-8108 (1996)。也参见Chao et al., *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) 和Chao et al., *Mol Ther*, 4:217-222 (2001)。而且,由于肌肉高度血管化,重组AAV转导导致肌肉内注射后全身循环中转基因产物的出现,如Herzog et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:5804-5809 (1997) 和Murphy et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:13921-13926 (1997) 中所描述的。此外,Lewis et al., *J Virol*, 76:8769-8775 (2002) 证明了骨骼肌纤维具有正确的抗体糖基化、折叠和分泌所必需的细胞因子,表明肌肉能够稳定表达分泌的蛋白质治疗剂。本公开的重组AAV(rAAV)基因组包含编码 γ -肌聚糖的核酸分子(例如SEQ ID NO:1)和位于该核酸分子侧翼的一个或多个AAV ITR,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。rAAV基因组中的AAV DNA可以来自可衍生重组病毒的任何AAV血清型,包括但不限于AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13和AAV rh74。假型rAAV的产生公开于例如WO 01/83692。也可以考虑其他类型的rAAV变体,例如具有衣壳突变的rAAV。参见,例如Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11):1900-1909 (2014)。各种AAV血清型的基因组

的核苷酸序列是本领域已知的。为了促进骨骼肌特异性表达,可以使用AAV1、AAV5、AAV6、AAV8或AAV9。因此,在一个方面,本文描述了一种重组AAV载体,其包含在启动子和/或肌肉特异性控制元件的转录控制下编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列,或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列包含与密码子优化的人 γ -肌聚糖的核苷酸序列(其示出于SEQ ID NO:1中)(参见表1)具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的序列,或基本上由该序列组成,或由该序列组成,并编码保留 γ -肌聚糖活性的蛋白质。在一些实施方案中,编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO:1具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的编码保留 γ -肌聚糖活性的蛋白质的序列。

[0071] 术语“序列同一性”是指两个多核苷酸或多肽序列之间的相同且相对位置相同的碱基或氨基酸的百分比。因此,与另一多核苷酸或多肽序列相比,一个多核苷酸或多肽序列具有一定百分比的序列同一性。为了进行序列比较,通常将一个序列用作参考序列,将其与测试序列进行比较。术语“参考序列”是指与测试序列进行比较的分子。与参考序列具有一定百分比(例如60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)的“序列同一性”的多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域)是指,在对齐后,该百分比的测试序列中每个位置的碱基(或氨基酸)与参考序列中相同位置的碱基(或氨基酸)相同。可以使用本领域已知的软件程序,例如在Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*中描述的软件,来确定这种比对和同源性或序列同一性百分比。优选地,使用默认参数来进行对齐。一种对齐程序是BLAST,使用默认参数。特别是,程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;过滤器=无;strand=两者;临界值=60;期望=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序方式=高分;数据库=非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详细信息可以在以下Internet地址找到:ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi。多肽或蛋白质的“等效物”是与参考多肽或蛋白质具有一定序列同一性(例如与参考相比具有60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的同一性),并且与参照多肽或蛋白质相比保留了相似的活性或功能的多肽或蛋白质。

[0072] “包含”或“包括”旨在表示包括所列举的要素但不排除其他要素的组合物(例如介质)和方法。当用于定义组合物和方法时,“基本上由……组成”应表示排除对于所述目的而言对组合具有任何实质意义的其他元素。因此,基本上由本文定义的元素组成的组合物将不排除不会实质上影响所要求保护的发明的基本和新颖特征的其他材料或步骤。“由……组成”是指排除超过痕量元素的其他成分和实质性的方法步骤。由这些过渡术语中的每一个限定的实施方案在本公开的范围內。

[0073] 在一方面,本公开内容的rAAV载体的基因表达盒的侧翼是一个或多个AAV反向末端重复。在另一方面,rAAV载体的编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1至少95%相同的核苷酸序列和/或SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列、或基本上由该序列组成、或由该序列组成,并编码保留 γ -肌聚糖活性的蛋白质。在另一方面,rAAV载体的编码 γ -肌聚糖

的多核苷酸序列编码与SEQ ID NO:2至少95%相同、至少99%相同或100%相同的氨基酸序列,并编码保留 γ -肌聚糖活性的蛋白质。

[0074] 在一些实施方案中,本文公开的rAAV载体是血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13或AAV rh74的载体。在其他实施方案中,rAAV载体的基因组包含或基本上由肌肉特异性控制元件组成,并且其中肌肉特异性控制元件可操作地连接至多核苷酸序列。肌肉特异性控制元件的非限制性实例是人骨骼肌动蛋白基因元件、心脏肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子mef、肌肉肌酸激酶(MCK)、截短的MCK(tMCK)、肌球蛋白重链(MHC)、MHCK7、C5-12、鼠肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白c基因元件、慢缩心脏肌钙蛋白c基因元件、慢缩肌钙蛋白I基因元件、低氧诱导性核因子、类固醇诱导性元件、以及糖皮质激素反应元件(gre)。在一方面,rAAV载体的肌肉特异性控制元件是截短的MCK(tMCK)。在另一方面,rAAV载体的启动子和/或肌肉特异性控制元件是MHCK7启动子。在另一方面,MHCK启动子包含SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列或其等效物,或基本上由该序列组成,或由该序列组成,并提供启动子功能。在一个实施方案中,本文公开的rAAV载体的基因组包含含有SEQ ID NO:5所示的核苷酸序列的内含子,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。

[0075] 在一些实施方案中,编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、或89%、更通常至少90%、91%、92%、93%、或94%、甚至更通常至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性并保留 γ -肌聚糖活性的编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列组成。

[0076] 在另一方面,本文所述的重组AAV载体包含编码与人 γ -肌聚糖的氨基酸序列(如SEQ ID NO:2所示(见表1))具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、或89%、更通常至少90%、91%、92%、93%、或94%、甚至更通常至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的 γ -肌聚糖的多核苷酸序列,或基本上由该序列组成,并且该蛋白质保留了 γ -肌聚糖活性。

[0077] 表1:蛋白质和核苷酸序列的非限制性例子

[0078]

序列说明	序列	SEQ ID NO
人 γ -肌聚糖核苷酸序列 (密码子优化)	ATGGTGAGGGAGCAGTACACCACAGCAACCGAGG GAATCTGCATCGAGAGGCCAGAGAACCAGTACGT GTATAAGATCGGCATCTACGGCTGGCGGAAGAGA TGTCTGTATCTGTTTCGTGCTGCTGCTGATCATC CTGGTGGTGAATCTGGCCCTGACCATCTGGATCCT GAAAGTGATGTGGTTTTCCCAGCAGGAATGGGA CACCTGTGCGTGACAAAGGACGGACTGCGGCTGG AGGGAGAGTCTGAGTTCCTGTTTCCCCTGTATGCC AAGGAGATCCACAGCAGAGTGGATAGCTCCCTGC TGCTGCAGTCCACCCAGAACGTGACAGTGAACGC AAGGAATAGCGAGGGAGAGGTGACCGGCAGACT GAAGGTCGGCCCCAAGATGGTGGAGGTGCAGAAT CAGCAGTTCAGATCAACTCCAATGACGGCAAGC CTCTGTTTACAGTGGATGAGAAGGAGGTGGTGGT GGGCACCGACAAGCTGAGGGTGACAGGACCTGAG GGCGCCCTGTTTCGAGCACTCTGTGGAGACCCACT GGTGCGCGCAGACCCTTTTCAGGATCTGAGGCTG GAGAGCCCAACACGCAGCCTGTCCATGGACGCAC CCAGAGGCGTGCACATCCAGGCACACGCAGGCAA GATCGAGGCCCTGAGCCAGATGGATATCCTGTTCC ACTCTAGCGACGGCATGCTGGTGCTGGATGCCGA GACCGTGTGCCTGCCTAAGCTGGTGCAGGGCACA TGGGGCCCATCTGGCTCCTCTCAGAGCCTGTACGA GATCTGCGTGTGCCAGATGGCAAGCTGTATCTGT CCGTGGCCGGCGTGTCTACCACATGCCAGGAGCA CAACCACATCTGTCTGTGA	1
人 γ -肌聚糖, 氨基酸序列	MVREQYTTATEGICIERPENQYVYKIGIYGWRKRCL YLFVLLLLLILVNLALTIWILKVMWFSPAGMGHLC VTKDGLRLEGESEFLFPLYAKEIHSRVDSSLLQSTQ NVTVNARNSEGEVTGRLKVGPKMVEVQNQQFQINS NDGKPLFTVDEKEVVVGTDKLRVTGPEGALFEHSV ETPLVRADPFQDLRLESPTLSMDAPRGVHIQAHA GKIEALSQMDILFHSSDGMLVLDAETVCLPKLVQGT WGPSGSSQSLYEICVCPDGKLYLSVAGVSTTCQEHN HICL	2

[0079]

<p>5'ITR-MHCK7-嵌 合内含子- hSGCG-PolyA- 3'ITR (ITR 之 间的完整序列)</p>	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGC AAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGGGTTAACCAATTGGCGCGGCCGCAAGCTTG CATGTCTAAGCTAGACCCTTCAGATTAATAAATAAC TGAGGTAAGGGCCTGGGTAGGGGAGGTGGTGTGA GACGCTCCTGTCTCTCTCTATCTGCCCATCGGCC CTTTGGGGAGGAGGAATGTGCCAAGGACTAAAA AAAGGCCATGGAGCCAGAGGGGCGAGGGCAACA GACCTTTCATGGGCAAACCTTGGGGCCCTGCTGTC TAGCATGCCCCACTACGGGTCTAGGCTGCCCATGT AAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCT GGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCCCCC CCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAAAATAACCCTG TCCCTGGTGGATCCCCTGCATGCGAAGATCTTCGA ACAAGGCTGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAAC AGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGA CTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAA GGCCAGCTGTCCCCCGCAGCTAGACTCAGCAC TTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCCTTG GGCAGCCATAACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAG CTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCC GGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGG GCCCCTCCCTGGGGACAGCCCCTCCTGGCTAGTCA CACCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCAC AGGGGCTGCCCTATTCTACCACCACCTCCACAGC ACAGACAGACACTCAGGAGCAGCCAGCGGCGCGC CCAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTATTTAGG TCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGA ACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCT GTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGG AATTGTACCCGGTACCACCATGGTGAGGGAGCAG TACACCACAGCAACCGAGGGAATCTGCATCGAGA GGCCAGAGAACCAGTACGTGTATAAGATCGGCAT CTACGGCTGGCGGAAGAGATGTCTGTATCTGTTCC TGCTGCTGCTGCTGATCATCCTGGTGGTGAATCTG GCCCTGACCATCTGGATCCTGAAAGTGATGTGGTT TTCCCCAGCAGGAATGGGACACCTGTGCGTGACA AAGGACGGACTGCGGCTGGAGGGAGAGTCTGAGT TCCTGTTTCCCCTGTATGCCAAGGAGATCCACAGC AGAGTGGATAGCTCCCTGCTGCTGCAGTCCACCCA GAACGTGACAGTGAACGCAAGGAATAGCGAGGG AGAGGTGACCGGCAGACTGAAGGTCGGCCCCAAG ATGGTGGAGGTGCAGAATCAGCAGTTCCAGATCA ACTCCAATGACGGCAAGCCTCTGTTTACAGTGGAT GAGAAGGAGGTGGTGGTGGGCACCGACAAGCTGA GGGTGACAGACCTGAGGGCGCCCTGTTTCGAGCA CTCTGTGGAGACCCCACTGGTGCGCGCAGACCCTT TTCAGGATCTGAGGCTGGAGAGCCCAACACGCAG CCTGTCCATGGACGCACCCAGAGGCGTGCACATC</p>	<p>3</p>
--	---	----------

[0080]

	CAGGCACACGCAGGCAAGATCGAGGCCCTGAGCC AGATGGATATCCTGTTCCACTCTAGCGACGGCATG CTGGTGTGGATGCCGAGACCGTGTGCCTGCCTAA GCTGGTGCAGGGCACATGGGGCCCATCTGGCTCC TCTCAGAGCCTGTACGAGATCTGCGTGTGCCAGA TGGCAAGCTGTATCTGTCCGTGGCCGGCGTGTCTA CCACATGCCAGGAGCACAACCACATCTGTCTGTG ACTCGAGGGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCAT TAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTCCTGCAG GGGCGCGCCTAATCTAGAGCATGGCTACGTAGAT AAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGG AACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTG CGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA AGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	
MHCK7 启动子	AAGCTTGCATGTCTAAGCTAGACCCTTCAGATTAA AAATAACTGAGGTAAGGGCCTGGGTAGGGGAGGT GGTGTGAGACGCTCCTGTCTCTCCTCTATCTGCC ATCGGCCCTTTGGGGAGGAGGAATGTGCCAAGG ACTAAAAAAGGCCATGGAGCCAGAGGGGGCGAG GGCAACAGACCTTTCATGGGCAAACCTTGGGGCC CTGCTGTCTAGCATGCCCCACTACGGGTCTAGGCT GCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCG AGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCT GCCCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAAAA TAACCCTGTCCCTGGTGGATCCCCTGCATGCGAAG ATCTTCGAACAAGGCTGTGGGGGACTGAGGGCAG GCTGTAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGT GCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTT CCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAGA CTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAAGTGAGCAAGTC AGCCCTTGGGGCAGCCATAACAAGGCCATGGGGC TGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCA CGGTGCCCGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGC TCTCAGGGGCCCTCCCTGGGGACAGCCCCTCCTG GCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCC AGGGGCACAGGGGCTGCCCTCATTCTACCACCAC CTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCAGCCA GC	4
嵌合内含子	AGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTC CCGGATCCGGTGGTGGTCAAATCAAAGAAGTGC TCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGT ACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGA ATTGTACCC	5
PolyA	GGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCT GTGTGTTGGTTTTTTGTG	6
5' ITR	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGC AAAGCCCAGGGCGTCCGGCGACCTTTGGTCGCCCG	7

	GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGGGTT	
3' ITR	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACCCCCGGGCT TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG C	8
人 γ -肌聚糖核苷 酸序列（野生 型）， GenBank U34976.1	ATGGTGCGTGAGCAGTACACTACAGCCACAGAAG GCATCTGCATAGAGAGGCCAGAGAATCAGTATGT CTACAAAATTGGCATTATATGGCTGGAGAAAGCGC TGTCTCTACTTGTGTTTCTTCTTTTACTCATCATC CTCGTTGTGAATTTAGCTCTTACAATTTGGATTCTT AAAGTGATGTGGTTTTCTCCAGCAGGAATGGGCC ACTTGTGTGTAACAAAAGATGGACTGCGCTTGGGA AGGGGAATCAGAATTTTTATTCCCATTGTATGCCA AAGAAATACACTCCAGAGTGGACTCATCTCTGCT GCTACAATCAACCCAGAATGTGACTGTAAATGCG CGCAACTCAGAAGGGGAGGTCACAGGCAGGTTAA AAGTCGGTCCCAAATGGTAGAAGTCCAGAATCA ACAGTTTCAGATCAACTCCAACGACGGCAAGCCA CTATTTACTGTAGATGAGAAGGAAGTTGTGGTTGG TACAGATAAACTTCGAGTAACTGGGCCTGAAGGG GCTTTTTTGAACATTCAGTGGAGACACCCCTTGT CAGAGCCGACCCGTTTCAAGACCTTAGATTAGAA TCCCCACTCGGAGTCTAAGCATGGATGCCCAA GGGGTGTGCATATTCAAGCTCACGCTGGGAAAAT TGAGGCGCTTCTCAAATGGATATTCTTTTTTCATA GTAGTGATGGAATGCTTGTGCTTGATGCTGAAACT GTGTGCTTACCCAAGCTGGTGCAGGGGACGTGGG GTCCCTCTGGCAGCTCACAGAGCCTCTACGAAATC TGTGTGTGTCCAGATGGGAAGCTGTACCTGTCTGT GGCCGGTGTGAGCACCACGTGCCAGGAGCACAGC CACATCTGCCTCTGA	9
AAV rh.74 衣壳氨 基酸序列	MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWL GDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTND NTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRQDWQLINNNW GFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQ VFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGY LTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSY NFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQ STGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYR QQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVP GVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVD YSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNA APIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVY LQGPIWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTT FNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNP EIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTR NL	10

[0081]

[0082]

rAAV 载体多核苷酸序列	ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGA GGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGG GACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCA ACCAGCAAAGCAGGACAACGGCCGGGGTCTGGT GCTTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGGCGGA CGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGAC CAGCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGC GGTATAATCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCG TCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACCTCG GGCGCGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGCGGGTTCT CGAACCTCTGGGCCTGGTTGAATCGCCGGTTAAG ACGGCTCCTGGAAGAAGAGACCGGTAGAGCCAT CACCCAGCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATC GGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCCGAAAAAAGAGA CTCAATTTTGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGT CCCCAGCCCTCAACCAATCGGAGAACCACCAGCA GGCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGC AGGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAA GGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCCTCAGGAAATT GGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGT CATCACCACCAGCACCCGCACCTGGGCCCTGCC ACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA ACGGGACCTCGGGAGGAAGCACCACGACAACAC CTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTG ACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGT GACTGGCAGCGACTCATCAACAACAAGTGGGGAT TCCGGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTTTCAAC ATCCAAGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCA CCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGAT TCAGGTCTTACGGACTCGGAATACCAGCTCCCGT ACGTGCTCGGCTCGGCGCACCCAGGGCTGCCTGCCT CCGTTCCTGGCGGACGTCTTTCATGATTCTCAGTA CGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCT GTGGGCCGGTTCGTCCTTCTACTGCCTGGAGTACTT TCCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAATTTG AATTCAGCTACAATTCGAGGACGTGCCCTTCCAC AGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGC TGATGAACCTCTCATCGACCAGTACTTGTACTAC CTGTCCCGGACTCAAAGCACGGGCGGTACTGCAG GAACTCAGCAGTTGCTATTTTCTCAGGCCGGGCCT AACAAATGTCGGCTCAGGCCAAGAACTGGCTAC CCGGTCCCTGCTACCGGCAGCAACGCGTCTCCACG AACTGTCGAGAACAACAACAGCAACTTTGCCT GGACGGGTGCCACCAAGTATCATCTGAATGGCAG AGACTCTCTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATGGCTA CCCACAAGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATC CAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAGGGAGCT GGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTGATGC TAACCAGCGAGGAAGAAATAAAGACCACCAACCC	11
---------------	---	----

[0083]	AGTGGCCACAGAACAGTACGGCGTGGTGGCCGAT AACCTGCAACAGCAAACGCCGCTCCTATTGTAG GGGCCGTCAATAGTCAAGGAGCCTTACCTGGCAT GGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGT CCCATCTGGGCCAAGATTCTCATAACGGACGGCA ACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGA CTGAAGCATCCGCCTCCTCAGATCCTGATTA AAAAA CACACCTGTTCCCGCGGATCCTCCGACCACCTTCA ATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTCATCACGCAGTAC AGTACCGGCCAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGG AGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAACGCTGGAACCC AGAGATTACAGTACACTTCCA ACTACTACAAATCTA CAAATGTGGACTTTGCTGTCAATACTGAGGGTACT TATTCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCT CACCCGTAATCTGTAA
--------	--

[0084] 在另一方面,本文描述了一种重组AAV载体,其包含编码功能性 γ -肌聚糖的多核苷酸序列,其包含在严格条件下与SEQ ID NO:1的核酸序列或其互补序列杂交的核苷酸序列,或基本上该序列其组成,或由该序列组成。功能性 γ -肌聚糖是指保留 γ -肌聚糖活性的 γ -肌聚糖多肽。 γ -肌聚糖活性对于肌肉功能至关重要。 γ -肌聚糖是与肌营养不良蛋白相互作用并形成肌营养不良蛋白-糖蛋白复合物的几种肌膜跨膜糖蛋白之一,该复合物跨肌膜,并且由肌营养不良蛋白、间质蛋白、 α -肌钙蛋白和 β -肌钙蛋白以及包括 γ -肌聚糖的肌聚糖组成。肌营养不良蛋白-糖蛋白复合物提供了肌膜下细胞骨架与肌细胞的细胞外基质之间的结构联系。肌细胞的非限制性实例包括心脏、隔膜、腿、骨盆带、肩和臂肌细胞。 γ -肌聚糖活性和 γ -肌聚糖病的后果的其他非限制性实例描述于Blake et al. (2002) *Physiol Rev.*; 82(2): 291-329 and Tarakci et al. (2016) *Front Biosci (Landmark Ed)*; 21:744-56。

[0085] 术语“严格”用于指本领域通常理解为严格的条件。杂交严格性主要由温度、离子强度和变性剂(例如甲酰胺)的浓度决定。杂交和洗涤的严格条件的例子是65-68°C下0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠,或42°C下0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠和50%甲酰胺。参见Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)。也可以使用更严格的条件(例如较高的温度、较低的离子强度、较高浓度的甲酰胺或其他变性剂),但是,杂交速率将受到影响。在涉及脱氧寡核苷酸杂交的情况下,其他示例性严格杂交条件包括在37°C(对于14个碱基的寡核苷酸)、48°C(对于17个碱基的寡核苷酸)、55°C(对于20个碱基的寡核苷酸)和60°C(对于23个碱基的寡核苷酸)下在6x SSC 0.05%焦磷酸钠中洗涤。

[0086] 为了减少非特异性和/或背景杂交,在杂交和洗涤缓冲液中可以包括其他试剂。例子有0.1%的牛血清白蛋白、0.1%的聚乙烯吡咯烷酮、0.1%的焦磷酸钠、0.1%的十二烷基硫酸钠、NaDodSO₄ (SDS)、ficoll、Denhardt溶液、超声处理的鲑鱼精子DNA(或其他非互补性DNA)和右旋糖酐,尽管也可以使用其他合适的试剂。可以改变这些添加剂的浓度和类型,而基本上不影响杂交条件的严格性。杂交实验通常在pH6.8-7.4下进行,但是,在典型的离子强度条件下,杂交速率几乎与pH无关。参见Anderson et al., *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, Ch.4, IRL Press Limited (Oxford, England)。杂交条件可以由本领域技术人员调节,以适应这些变量并使不同序列相关性的DNA形成杂交体。

[0087] 在另一方面,本文所述的重组AAV载体可以包含与启动子和/或肌肉特异性控制元件可操作地连接的编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列,或基本由该序列组成,或由该序列组成。例如,肌肉特异性控制元件是人骨骼肌动蛋白基因元件、心脏肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子MEF、肌肉肌酸激酶(MCK)、tMCK(截短的MCK)、肌球蛋白重链(MHC)、MHCK7(MHC和MCK的混合版本)、C5-12(合成的启动子)、鼠肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白C基因元件、慢缩心脏肌钙蛋白C基因元件、慢缩肌钙蛋白I基因元件、低氧诱导性核因子、类固醇诱导性元件、或糖皮质激素反应元件(GRE)。在一个实施方案中,rAAV载体包含MHCK7启动子(SEQ ID NO:4)。

[0088] 本文描述的示例性rAAV载体是pAAV.MHCK7.hSCGC,其包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列,其中MHCK7启动子跨越核苷酸136-927(SEQ ID NO:4),内含子跨越核苷酸937-1084(SEQ ID NO:5), γ -肌聚糖序列跨越核苷酸1094-1969(SEQ ID NO:1),并且polyA跨越核苷酸1976-2028(SEQ ID NO:6)。参见图1。在某些情况下,rAAV载体中唯一包含的病毒序列是反向末端重复,这是病毒DNA复制和包装所必需的。在一些情况下,跨越核苷酸7-116的内含子(SEQ ID NO:5)和跨越核苷酸2128-2231的5' UTR(SEQ ID NO:7)源自质粒pCMV β (Clontech)。在某些情况下,3' UTR包含SEQ ID NO:8中列出的序列。在某些情况下,pAAV.MHCK7.hSCGC被包装在AAV rh.74衣壳中。

[0089] 本公开的DNA质粒包含rAAV基因组。将DNA质粒转移至允许被AAV的辅助病毒(例如腺病毒、E1缺失的腺病毒或疱疹病毒)感染的细胞,以将rAAV基因组组装成感染性病毒颗粒。产生rAAV颗粒的技术是本领域的标准技术,其中将要包装的AAV基因组、rep和cap基因以及辅助病毒功能提供给细胞。生产rAAV要求在单个细胞(在本文中称为包装细胞)内存在以下成分:rAAV基因组,与rAAV基因组分离(即不在rAAV基因组中)的AAV rep和cap基因,以及辅助病毒功能。AAV rep和cap基因可以来自可衍生重组病毒的任何AAV血清型,并且可以来自与rAAV基因组ITR不同的AAV血清型,包括但不限于AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13和AAV rh.74。在一些实施方案中,rAAV载体包含AAV2的反向末端重复(ITR)序列。假型rAAV的产生在例如WO 01/83692中公开,其通过引用整体并入本文。在某些方面,rAAV载体包含AAV2的反向ITR序列,并且被衣壳化在AAVrh.74的衣壳中。在某些情况下,rAAV载体的基因组包含SEQ ID NO:11所示的多核苷酸序列。在某些情况下,AAV rh.74衣壳包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。在某些情况下,rAAV载体包含这样的多核苷酸,该多核苷酸包含与SEQ ID NO:11所示的核苷酸序列具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的序列、或基本上由该序列组成、或由该序列组成,并且编码rAAV的衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。在一些实施方案中,rAAV载体包含多肽,该多肽包含与SEQ ID NO:10所示的AAV rh.74VP3的氨基酸序列具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的序列,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。

[0090] 产生包装细胞系的方法是产生稳定地表达用于生产AAV颗粒的所有必需组分的细胞系。例如,将包含缺少AAV rep和cap基因的rAAV基因组、与rAAV基因组分离的AAV rep和

cap基因、以及选择标记(例如新霉素抗性基因)的质粒(或多个质粒)整合到细胞的基因组中。已经通过以下方法将AAV基因组引入细菌质粒中:例如GC拖尾(Samulski et al.,1982, Proc.Natl.Acad.S6.USA,79:2077-2081)、添加含有限制性核酸内切酶切割位点的合成接头(Laughlin et al.,1983,Gene,23:65-73)、或通过直接的平末端连接(Senapathy& Carter,1984,J.Biol.Chem.,259:4661-4666)。然后用辅助病毒(例如腺病毒)感染包装细胞系。该方法的优点是细胞是可选择的并且适合于大规模生产rAAV。合适方法的其他例子采用腺病毒或杆状病毒而非质粒,以将rAAV基因组和/或rep和cap基因引入包装细胞。在某些情况下,rAAV载体的基因组包含SEQ ID NO:11所示的多核苷酸序列。在某些情况下,AAV rh.74衣壳包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。在某些情况下,rAAV载体包含多核苷酸,该多核苷酸包含与SEQ ID NO:11所示的核苷酸序列具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的序列、或基本上由该序列组成、或由该序列组成,并且编码rAAV的衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。在一些实施方案中,rAAV载体包含多肽,该多肽包含与SEQ ID NO:10所示的AAV rh.74VP3的氨基酸序列具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的序列,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。

[0091] rAAV生产的一般原理在例如以下文献中综述:Carter,1992,Current Opinions in Biotechnology,15:33-539;以及Muzyczka,1992,Curr.Topics in Microbial, and Immunol.,158:97-129)。各种方法描述于以下文献中:Ratschin et al., Mol.Cell.Biol.4:2072(1984);Hermonat et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6466(1984);Tratschin et al.,Mol.Cell.Biol.5:3251(1985);McLaughlin et al., J.Virol.,62:1963(1988);以及Lebkowski et al.,1988Mol.Cell.Biol.,7:349(1988)。Samulski et al.(1989,J.Virol.,63:3822-3828);美国专利号5,173,414;WO 95/13365以及美国专利号5,658,776;WO 95/13392;WO 96/17947;PCT/US98/18600;WO 97/09441(PCT/US96/14423);WO 97/08298(PCT/US96/13872);WO 97/21825(PCT/US96/20777);WO 97/06243(PCT/FR96/01064);WO 99/11764;Perrin et al.(1995)Vaccine 13:1244-1250; Paul et al.(1993)Human Gene Therapy 4:609-615;Clark et al.(1996)Gene Therapy 3:1124-1132;美国专利号5,786,211;美国专利号5,871,982;以及美国专利号6,258,595。前述文件在此全文以引用方式并入本文,尤其着重于文件中与rAAV生产有关的部分。

[0092] 因此,本公开提供了产生感染性rAAV的包装细胞。在一个实施方案中,包装细胞可以是稳定转化的癌细胞,例如HeLa细胞、293细胞和PerC.6细胞(同源293细胞系)。在另一个实施方案中,包装细胞是不为转化的癌细胞的细胞,例如低传代293细胞(用腺病毒的E1转化的人胎儿肾细胞)、MRC-5细胞(人胎儿成纤维细胞)、WI-38细胞(人胎儿成纤维细胞)、Vero细胞(猴肾细胞)和FRhL-2细胞(恒河猴胎肺细胞)。

[0093] 本发明的重组AAV(即感染性衣壳化rAAV颗粒)包含rAAV基因组。实施方案包括但不限于名为pAAV.MHCK7.hSCGC的rAAV,其包含SEQ ID NO:3所示的多核苷酸序列。

[0094] 可以通过本领域标准的方法(例如通过柱色谱法或氯化铯梯度)纯化rAAV。从辅助病毒中纯化rAAV载体的方法是本领域已知的,并且包括在以下文献中公开的方法:例如

Clark et al., Hum. Gene Ther., 10 (6) :1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002); 美国专利号6,566,118以及WO 98/09657。

[0095] 在另一个实施方案中,本发明涵盖包含本发明的rAAV或基本上由该rAAV组成的组合物。本文所述的组合物包含在药学上可接受的载体中的rAAV或基本上由该rAAV组成。在一个特定的实施方案中,本公开的组合物包含乳酸林格氏液(Lactated Ringer's Solution, LRS)或基本上由其组成。所述组合物还可以包含其他成分,例如稀释剂和佐剂。可接受的载体、稀释剂和佐剂对受体无毒,优选在所用的剂量和浓度下为惰性,并且包括:缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐、或其他有机酸;抗氧化剂,例如抗坏血酸;低分子量多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖醇,例如甘露醇或山梨糖醇;盐形式的抗衡离子,例如钠;和/或非离子表面活性剂,例如吐温、普卢尼克(pluronic)或聚乙二醇(PEG)。所公开的组合物可以用于以下中的一种或多种:在有需要的对象中治疗 γ -肌聚糖病;增加肌肉力量、肌肉耐力、和/或肌肉质量;减少纤维化;减少收缩引起的损伤;减少脂肪浸润;和/或减少中央成核,和/或在患有肌营养不良的对象中治疗肌营养不良减少变性纤维或坏死纤维;减轻炎症;升高肌酸激酶水平;治疗肌纤维萎缩和肥大,和/或减少营养不良性钙化。

[0096] 在本公开的方法中待施用的rAAV的滴度将根据例如特定的rAAV、施用方式、治疗目标、个体、以及所靶向的细胞类型而变化,并且可以由本领域标准方法确定。rAAV的滴度可以在每ml约 1×10^6 、约 1×10^7 、约 1×10^8 、约 1×10^9 、约 1×10^{10} 、约 1×10^{11} 、约 1×10^{12} 、约 1×10^{13} 至约 1×10^{14} 或更多个DNase抗性颗粒(DRP)的范围内。剂量也可以以病毒基因组(vg)为单位表达。

[0097] 本公开考虑了在体内或体外用rAAV转导靶细胞的方法。术语“转导”用于指通过描述的复制缺陷型rAAV在体内或体外将目的多核苷酸(例如编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列)施用/递送至受体细胞,导致受体细胞表达 γ -肌聚糖。

[0098] 在一个方面,本文提供了用于以下中的一种或多种的方法:在有需要的对象中治疗 γ -肌聚糖病;增加肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量;减少纤维化;减少收缩引起的损伤;减少脂肪浸润;和/或减少中央成核,和/或在患有肌营养不良的对象中治疗肌营养不良减少变性纤维或坏死纤维;减轻炎症;升高肌酸激酶水平;治疗肌纤维萎缩和肥大和/或减少营养不良性钙化,该方法包括向所述对象施用治疗有效量的重组腺相关病毒(AAV)载体、或者基本上该步骤组成、或者由该步骤组成,其中所述rAAV载体包含基因表达盒、或基本上由该基因表达盒组成、或由该基因表达盒组成,该基因表达盒包含在启动子的转录控制下编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列、或基本上由该序列组成、或由该序列组成,所述盒的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复。在一些实施方案中,所述启动子是肌肉特异性控制元件。在一个实施方案中,本文公开的方法增加对象的一个或多个肌肉的肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量。肌肉的非限制性示例包括心脏、隔膜、大腿、小腿、骨盆带肩和手臂肌肉。在一个特定的实施方案中,与未治疗的对照对象相比,肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约50%、或至少约80%。

[0099] 在一个特定方面,所述对象患有肢带型肌营养不良。在另一方面,所述对象患有的肢带型肌营养不良是2C型肢带型肌营养不良。

[0100] 涉及将多核苷酸递送至对象的术语“施用”或“给药”包括将多核苷酸引入或递送

至对象以执行预期功能的任何途径。可以通过任何合适的途径进行施用,包括口服、鼻内、肠胃外(静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下)、颅内、或局部施用。其他施用途径包括眶内、输注、动脉内、囊内、心内、皮内、肺内、脊柱内、胸骨内、鞘内、子宫内、静脉内、蛛网膜下、囊下、皮下、经粘膜或经气管。施用包括自己施用和他人施用。

[0101] 在一个方面,本文公开的方法包含以下步骤,或基本上由以下步骤组成,或由以下步骤组成:施用组合物,所述组合物包含rAAV载体和药学上可接受的载体,或基本上由其组成,或由其组成。在另一方面,本文公开的方法包含以下步骤,或基本上由以下步骤组成,或由以下步骤组成:通过肌肉内注射或静脉内注射施用rAAV载体或组合物,所述组合物包含rAAV载体和药学上可接受的载体、或基本上由其组成、或由其组成。在又一方面,本文公开的方法包含以下步骤,或基本上由以下步骤组成,或由以下步骤组成:全身地施用rAAV载体或组合物,所述组合物包含rAAV载体和药学上可接受的载体、或基本上由其组成、或由其组成。在一个特定方面,本文公开的方法包含以下步骤,或基本上由以下步骤组成,或由以下步骤组成:通过注射、输注或植入来施用rAAV载体或组合物,所述组合物包含rAAV载体和药学上可接受的载体、或基本上由其组成、或由其组成。

[0102] 在一方面,用于本文描述的方法的rAAV载体的编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。在另一方面,rAAV载体的编码 γ -肌聚糖的多核苷酸序列编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在另一方面,用于本文公开的方法的rAAV载体包含自我互补的AAV载体基因组,或基本上由该基因组组成,或由该基因组组成。在一个特定的实施方案中,rAAV载体包含缺少AAV rep和cap DNA的基因组,或基本上由该基因组组成,或由该基因组组成。在另一个实施方案中,rAAV载体为血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13或AAV rh74载体。在另一方面,rAAV载体是血清型AAV rh74载体,并且rAAV载体包含AAV rh.74衣壳、或基本上由其组成、或由其组成。在另一方面,rAAV载体的AAV rh.74衣壳包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或其等效物,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。

[0103] 用于本文公开的方法中的rAAV载体可以进一步包含或基本上由启动子和/或肌肉特异性控制元件组成,并且其中所述肌肉特异性控制元件可操作地连接至编码 γ -肌聚糖的多核苷酸。非限制性实例一些肌肉特异性控制元件是人骨骼肌动蛋白基因元件、心脏肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子mef、肌肉肌酸激酶(MCK)、截短的MCK(tMCK)、肌球蛋白重链(MHC)、MHCK7、C5-12、鼠肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白c基因元件、慢缩心脏肌钙蛋白c基因元件、慢缩肌钙蛋白I基因元件、低氧诱导性核因子、类固醇诱导性元件、以及糖皮质激素反应元件(gre)。在一方面,rAAV载体的肌肉特异性控制元件是截短的MCK(tMCK)。在另一方面,rAAV载体的启动子和/或肌肉特异性控制元件是MHCK7启动子。在另一方面,MHCK启动子包含SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列或其等效物,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。

[0104] 在一个实施方案中,本文公开的rAAV载体的基因组包含含有SEQ ID NO:5所示的核苷酸序列的内含子。

[0105] 体内方法包括以下步骤,或基本上由以下步骤组成,或由以下步骤组成:向有需要的动物(包括人类)施用有效剂量或有效多次剂量的组合物,所述组合物包含本公开的rAAV、或基本上该rAAV组成、或由该rAAV组成。如果在病症/疾病发展之前施用该剂量,则该

施用是预防性的。如果在病症/疾病发生后施用该剂量,则该施用是治疗性的。在本公开的实施方案中,有效剂量是缓解(消除或减轻)与所治疗的病症/疾病状态有关的至少一种症状、减慢或防止向病症/疾病状态的进展、减慢或防止病症/疾病状态的进展、减轻疾病的程度、导致疾病(部分或全部)缓解、和/或延长生存期的剂量。预期用本公开的方法预防或治疗的疾病的实例是肌营养不良,例如肢带型肌营养不良。在一些实施方案中,预期用本公开的方法预防或治疗的疾病是2C型肢带型肌营养不良(LGMD2C)。

[0106] 如本文所用,术语“肌营养不良”是指力量和肌肉体积逐渐下降的疾病。肌营养不良疾病的非限制性实例可以包括贝克尔(Becker)肌营养不良、胫骨肌营养不良、杜兴(Duchenne)肌营养不良、埃默里-德里弗斯(Emery-Dreifuss)肌营养不良、面肩肱型(facioscapulohumeral)肌营养不良、肌聚糖病、先天性肌营养不良(例如LAMA2部分缺乏引起的先天性肌营养不良)、缺乏铁蛋白的先天性肌营养不良、ID型先天性肌营养不良、福山先天性肌营养不良、肢带型1A肌营养不良、肢带型2A肌营养不良、肢带型2B肌营养不良、肢带型2C肌营养不良、肢带型2D肌营养不良、肢带型2E肌营养不良、肢带型2F肌营养不良、肢带型2G肌营养不良、肢带型2H肌营养不良、肢带型2I肌营养不良、肢带型2J肌营养不良、肢带型2K肌营养不良、肢带型IC肌营养不良、刚性脊柱肌营养不良伴单纯大疱性表皮松解、眼咽肌营养不良、Ullrich先天性肌营养不良、以及Ullrich硬化性肌营养不良。在一些实施方案中,所述对象患有肢带型肌营养不良。在一些实施方案中,所述对象患有2C型肢带型肌营养不良(LGMD2C)。

[0107] 至少存在十九种形式的LGMD,并且根据其相关的遗传缺陷对其进行分类。

[0108]	类型	继承方式	基因或染色体
--------	----	------	--------

	LGMD1A	常染色体显性	Myotilin 基因
	LGMD1B	常染色体显性	核纤层蛋白 A/C 基因
	LGMD1C	常染色体显性	小凹蛋白基因
	LGMD1D	常染色体显性	染色体 7
	LGMD1E	常染色体显性	染色体 6
	LGMD1F	常染色体显性	染色体 7
	LGMD1G	常染色体显性	染色体 4
	LGMD2A	常染色体隐性	钙蛋白酶-3 基因
	LGMD2B	常染色体隐性	Dysferlin 基因
[0109]	LGMD2C	常染色体隐性	γ -肌聚糖基因
	LGMD2D	常染色体隐性	α -肌聚糖基因
	LGMD2E	常染色体隐性	β -肌聚糖基因
	LGMD2F	常染色体隐性	δ -肌聚糖基因
	LGMD2G	常染色体隐性	Telethonin 基因
	LGMD2H	常染色体隐性	TRIM32
	LGMD2I	常染色体隐性	FKRP 基因
	LGMD2J	常染色体隐性	Titin 基因
	LGMD2K	常染色体隐性	POMT1 基因
	LGMD2L	常染色体隐性	ANO5 基因

[0110] 在一些方面,本公开涉及一种治疗对象中的肌营养不良(例如LGMD2C)的方法,该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:向对象施用治疗有效量的如本文所述的编码 γ -肌聚糖的rAAV载体或包含或基本上由此类rAAV载体组成的组合物。

[0111] 在一些方面,本公开涉及一种增加患有肌营养不良(例如LGMD2C)的对象中的肌肉力量、肌肉耐力和/或肌肉质量的方法,该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:向对象施用治疗有效量的如本文所述的编码 γ -肌聚糖的rAAV载体或包含或基本上由此类rAAV载体组成的组合物。

[0112] 在一些方面,本公开包括一种减少患有肌营养不良(例如LGMD2C)的对象中的收缩引起的损伤的方法,该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:向对象施用治疗有效量的如本文所述的编码 γ -肌聚糖的rAAV载体或包含或基本上由此类rAAV载体组成的组合物。

[0113] 在一些方面,本公开包括一种治疗对象中的 γ -肌聚糖病的方法,该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:向对象施用治疗有效量的如本文所述的编码 γ -肌聚糖的rAAV载体或包含或基本上由此类rAAV载体组成的组合物。

[0114] 在一些方面,本公开还包括一种减少患有肌营养不良(例如LGMD2C)的对象中的纤维化的方法,该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:向对象施用治疗有效量的如本文所述的编码 γ -肌聚糖的rAAV载体或包含或基本上由此类rAAV载体组成的组合物。如本文所用,术语“纤维化”是指细胞外基质(ECM)组分的过度或不受调节的沉积以及受损伤后在组织(包括骨骼肌、心肌、肝、肺、肾和胰腺)中的异常修复过程。沉积的ECM组分包括胶原蛋白(例如胶原蛋白1、胶原蛋白2或胶原蛋白3)以及纤连蛋白。

[0115] 在某些实施方案中,通过本文描述的方法治疗的对象可以是哺乳动物。在某些情况下,对象是人类、非人类灵长类动物、猪、马、牛、狗、猫、兔、小鼠或大鼠。对象可以是人类女性或人类男性。在某些情况下,对象是年龄在1-7岁、7-15岁、16-25岁、26-50岁、50-70岁之间或大于70岁的人类对象。预期其他年龄范围包括但不限于5-10岁、10-15岁、15-20岁、20-25岁、25-30岁、30-40岁、40-50岁、60-70岁或大于70岁、以及前述包含的任何范围。

[0116] 如本文所用,术语“有需要的患者”或“有需要的对象”是指处于可通过包含编码 γ -肌聚糖的核酸序列的rAAV或包含本文提供的此类rAAV或基本上由其组成的组合物治疗或改善的疾病、病症或病况的风险中或患有其的患者或对象。有需要的患者或对象例如可以是被诊断患有与 γ -肌聚糖的功能障碍相关的疾病(例如LGMD2C)的患者或对象。对象可以具有在 γ -肌聚糖基因或蛋白质中的突变或功能异常。“对象”和“患者”在本文可互换使用。

[0117] 本公开还考虑了联合疗法,其包含一种或多种本文公开的组合物和皮质类固醇、或基本上由其组成、或由其组成。本文所用的组合/联合包括同时治疗或按顺序治疗。特别考虑了本公开的方法与标准药物治疗(例如皮质类固醇)的组合,以及与新疗法的组合。在一些实施方案中,可以用类固醇(例如泼尼松、泼尼松龙、地夫可特)治疗对象,以预防或减少对本文所述的rAAV的施用的免疫应答。在某些情况下,如果对象表达针对本文所述的rAAV的抗体,则对象可以接受血液分离术或另一种免疫调节剂。

[0118] 在一些实施方案中,rAAV载体的治疗有效量为一次或多次给药中rAAV范围的剂量,该范围为约 1×10^{13} vg/kg至约 5×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 2×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 3×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 4×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 5×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 6×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 7×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 8×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 9×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 1×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 2×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 3×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{13} 至约 4×10^{14} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 4×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 5×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 6×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 7×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 8×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 9×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 1×10^{14} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 2×10^{14} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 3×10^{14} vg/kg、或约 3×10^{13} 至约 4×10^{14} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 5×10^{14} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 6×10^{13} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 7×10^{13} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 8×10^{13} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 9×10^{13} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 1×10^{14} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 2×10^{14} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 3×10^{14} vg/kg、或约 5×10^{13} 至约 4×10^{14} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 5×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{14} vg/kg至约 2×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{14} vg/kg至约 3×10^{14} vg/kg。

kg、或约 $1e14$ 至约 $4e14$ vg/kg、或约 $1e14$ vg/kg至约 $5e14$ vg/kg。本公开还包含组合物、或基本上由该组合物组成、或由组合物组成,该组合物包含这些范围的rAAV载体、或基本上由该载体组成、或由该载体组成。

[0119] 例如,治疗有效量的rAAV载体的剂量为 $1e13$ vg/kg、约 $2e13$ vg/kg、约 $3e13$ vg/kg、约 $4e13$ vg/kg、约 $5e13$ vg/kg、约 $6e13$ vg/kg、约 $7e13$ vg/kg、约 $8e13$ vg/kg、约 $9e13$ vg/kg、约 $1e14$ vg/kg、约 $2e14$ vg/kg、约 $3e14$ vg/kg、约 $4e14$ vg/kg以及 $5e14$ vg/kg。本公开还包含组合物、或基本上由该组合物组成、或由该组合物组成,该组合物包含这些范围的rAAV载体、或基本上由该载体组成、或由该载体组成。

[0120] 在一些实施方案中,rAAV的治疗有效量是约 $1e14$ vg/kg至约 $1e15$ vg/kg或约 $1e15$ vg/kg至约 $1e16$ vg/kg的rAAV剂量。在一些实施方案中,本发明提供了以以下剂量向对象施用本发明的rAAV载体的方法:约 $1e14$ vg/kg、约 $1.5e14$ vg/kg、约 $2e14$ vg/kg、约 $2.5e14$ vg/kg、约 $3e14$ vg/kg、约 $3.5e14$ vg/kg、约 $4e14$ vg/kg、约 $4.5e14$ vg/kg、约 $5e14$ vg/kg、约 $5.5e14$ vg/kg、约 $6e14$ vg/kg、约 $6.5e14$ vg/kg、约 $7e14$ vg/kg、约 $7.5e14$ vg/kg、约 $8e14$ vg/kg、约 $8.5e14$ vg/kg、约 $9e14$ vg/kg、约 $9.5e14$ vg/kg、约 $1e15$ vg/kg、约 $1.5e15$ vg/kg、约 $2e15$ vg/kg、约 $2.5e15$ vg/kg、约 $3e15$ vg/kg、约 $3.5e15$ vg/kg、约 $4e15$ vg/kg、约 $4.5e15$ vg/kg、或约 $5e15$ vg/kg。在一些实施方案中,本发明提供了以以下总剂量向对象施用本发明的rAAV载体的方法:约 $4.0e14$ vg/kg、约 $4.1e14$ vg/kg、约 $4.2e14$ vg/kg、约 $4.3e14$ vg/kg、约 $4.4e14$ vg/kg、约 $4.5e14$ vg/kg、约 $4.6e14$ vg/kg、约 $4.7e14$ vg/kg、约 $4.8e14$ vg/kg、约 $4.9e14$ vg/kg、约 $5.0e14$ vg/kg、约 $5.1e14$ vg/kg、约 $5.2e14$ vg/kg、约 $5.3e14$ vg/kg、约 $5.4e14$ vg/kg、约 $5.5e14$ vg/kg、约 $5.6e14$ vg/kg、约 $5.7e14$ vg/kg、约 $5.8e14$ vg/kg、约 $5.9e14$ vg/kg、或约 $6e14$ vg/kg。

[0121] 在各个实施方案中,施用步骤可以包括以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个分开的剂量施用总剂量。例如,可以通过注射将总剂量递送至对象的多个部位或递送至在几分钟、几小时或几天内隔开的对象。

[0122] 有效剂量的组合物的给药可以通过本领域中的标准途径进行,包括但不限于肌肉内、肠胃外、静脉内、口服、颊、鼻、肺、颅内、骨内、眼内、直肠或阴道。考虑到感染和/或要治疗的疾病状态以及要表达 γ -肌聚糖的靶细胞/组织,本领域技术人员可以选择和/或匹配本公开的rAAV的AAV组分(特别是AAV ITR和衣壳蛋白)的给药途径和血清型。

[0123] 本公开提供了有效剂量的rAAV和本公开的组合物的局部施用和全身性施用。例如,全身性施用是指施用进循环系统,以至全身受到影响。全身性施用包括肠内施用(例如通过胃肠道吸收)和通过注射、输注或植入的肠胃外施用。

[0124] 特别地,本公开的rAAV的实际施用可以通过使用将rAAV重组载体运输到动物的靶组织中的任何物理方法来完成。根据本发明的施用包括但不限于注射入肌肉、血流和/或直接进入肝。已证明简单地将rAAV重悬浮在磷酸盐缓冲盐水中足以提供可用于肌肉组织表达的媒介物,并且对可与rAAV共同施用的载体或其他成分没有已知限制(尽管在使用rAAV的常规方式中应该避免降解DNA的成分)。

[0125] 可以修饰rAAV的衣壳蛋白,从而使rAAV靶向特定的目标靶组织,例如肌肉。参见例如W0 02/053703,其公开内容通过引用并入本文。药物组合物可以制备为可注射制剂或局部制剂,以通过透皮运输递送至肌肉。先前已经开发了用于肌肉内注射和透皮运输的多种

制剂,并且可以用于本公开的实践中。rAAV可以与任何药学上可接受的载体一起使用,以易于给药和处理。

[0126] 为了肌肉内注射的目的,可以使用佐剂(例如芝麻油或花生油)中或丙二醇水溶液中的溶液以及无菌水溶液。如果需要,则可以缓冲这样的水溶液,并且首先使液体稀释剂与盐水或葡萄糖等渗。作为游离酸(DNA包含酸性磷酸基团)或药理学上可接受的盐的rAAV的溶液可以在水中与表面活性剂(例如羟丙基纤维素)适当混合来制备。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备rAAV的分散体。在常规的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。就此而言,所采用的无菌水性介质均可以通过本领域技术人员众所周知的标准技术容易地获得。

[0127] 适用于注射用途的药物形式包括用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌水溶液或分散液和无菌粉末。在所有情况下,该形式都必须是无菌的,并且必须具有一定的流动性,以达到易于注射的目的。它必须在生产和储存条件下保持稳定,并且必须进行防腐处理,以防止微生物(例如细菌和真菌)的污染。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等)、其合适的混合物、以及植物油。可以例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过维持所需的粒径、以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂来预防微生物的作用,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可以通过使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0128] 通过将所需量的rAAV与所需的上述各种其他成分掺入适当的溶剂中,然后进行过滤灭菌来制备无菌注射溶液。通常,通过将灭菌的活性成分掺入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物包含基础分散介质和以上列举的那些所需的其他成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。

[0129] rAAV的转导也可以在体外进行。在一个实施方案中,将所需的靶肌肉细胞从对象中移除,用rAAV转导并再引入对象中。替代地,可以使用同种或异种肌肉细胞,其中这些细胞不会在对象中产生不适当的免疫应答。

[0130] 用于将转导的细胞转导和再导入对象的合适方法是本领域已知的。在一个实施方案中,可以通过将rAAV与肌肉细胞结合(例如在合适的培养基中),并使用常规技术(例如Southern印迹和/或PCR)、或通过使用选择标记来筛选具有目的DNA的细胞,从而在体外转导细胞。然后将转导的细胞配制成药物组合物,并通过各种技术将组合物引入对象,例如通过肌肉内、静脉内、皮下和腹膜内注射,或通过使用例如导管注射入平滑肌和心肌。

[0131] 用本发明的rAAV转导细胞导致 γ -肌聚糖的持续表达。因此,本公开提供了向哺乳动物对象(优选人)施用/递送表达 γ -肌聚糖的rAAV的方法。这些方法包括用本公开内容的一种或多种rAAV转导组织(包括但不限于组织(例如肌肉)、器官(例如肝和脑)、以及腺体(例如唾液腺))。可以用包含组织特异性控制元件的基因盒进行转导。例如,本公开的一个实施方案提供了由肌肉特异性控制元件指导的转导肌肉细胞和肌肉组织的方法,所述肌肉特异性控制元件包括但不限于源自肌动蛋白和肌球蛋白基因家族的元件,诸如源自myoD基因家族的元件[参见Weintraub et al, Science, 251:761-766(1991)]、肌细胞特异性增强

子结合因子MEF-2[Cserjesi and Olson,Mol Cell Biol 11:4854-4862(1991)]、衍生自人骨骼肌动蛋白基因的控制元件[Muscat et al,Mol Cell Biol,7:4089-4099(1987)]、心脏肌动蛋白基因、肌肉肌酸激酶序列元件[参见Johnson et al,Mol Cell Biol,9:3393-3399(1989)]以及鼠肌酸激酶增强子(mCK)元件、来自骨骼快缩肌钙蛋白C基因、慢缩心脏肌钙蛋白C基因和慢缩肌钙蛋白I基因的控制元件:低氧诱导性核因子(Semenza et al,Proc Natl Acad Sci USA,88:5680-5684(1991))、类固醇诱导性元件以及包括糖皮质激素反应元件(GRE)的启动子(参见Mader and White,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5603-5607(1993))和其他控制元件。

[0132] 肌肉组织是体内DNA递送的有吸引力的靶标,因为它不是重要的器官并且易于接近。本公开涵盖了来自转导的肌纤维的转基因(例如 γ -肌聚糖)的持续表达。

[0133] “肌肉细胞”或“肌肉组织”是指源自任何种类的肌肉(例如骨骼肌和平滑肌,例如来自消化道、膀胱、血管或心脏组织的细胞)的细胞或细胞群组。这样的肌肉细胞可以是分化的或未分化的,例如成肌细胞、肌细胞、肌管、心肌细胞和成心肌细胞。

[0134] 因此,本文中描述了向有需要的哺乳动物对象施用有效剂量(或基本上同时施用的剂量或间隔给予的剂量)的编码 γ -肌聚糖的rAAV的方法。

[0135] 本文进一步提供了试剂盒,其包含本文公开的一个或多个实施方案中的任一个以及任选的使用说明,或基本上由其组成,或由其组成。试剂盒可以包含本文公开的一种或多种组合物和皮质类固醇或本文提供的联合疗法中的一种或多种和任选的使用说明,或基本上由其组成,或由其组成。

[0136] 应该理解,本公开不限于所描述的特定方面,因为它们当然可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,而无意于限制本发明,因为本公开的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0137] 已经描述了本公开的多个实施例。然而,将理解的是,可以在不脱离本公开的精神和范围的情况下进行各种修改。因此,以下实施例旨在说明而非限制权利要求中描述的公开范围。

[0138] 在没有明确叙述和除非另有说明的情况下可以推断出,当本技术涉及多肽、蛋白质、多核苷酸或抗体时,其等效物或生物学等效物应在本技术范围内。

[0139] 引用任何专利、专利申请、出版物或任何其他文件并不意味着承认上述任何内容是相关的现有技术,也不构成对这些出版物或文件的内容或日期的承认。

[0140] 本文公开的所有特征可以以任何组合进行组合。说明书中公开的每个特征可以由具有相同、等效或相似目的的替代特征代替。因此,除非另有明确说明,否则所公开的特征(例如抗体)是等效或相似特征的属的一个例子。

[0141] 如本文所使用的,除非上下文另外明确指出,否则所有数值或数值范围包括该范围内的整数和范围内的数值或整数的分数。此外,当在此描述值的列表时(例如大约50%、60%、70%、80%、85%或86%),该列表包括其所有中间值和分数值(例如54%,85.4%)。因此,举例来说,提及80%或更多的指代包括81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%等、以及81.1%、81.2%、81.3%、81.4%、81.5%等、82.1%、82.2%、82.3%、82.4%、82.5%等,依此类推。

[0142] 具有大于(多于)或小于的整数的引用分别包括大于或小于该参考数字的任何数

字。因此,例如,对小于100的引用包括99、98、97等,一直下降到数字一(1);而小于10则包括9、8、7等,一直下降到数字一(1)。

[0143] 如本文所使用的,除非上下文另外明确指出,否则所有数值或范围均包括该值的分数和该范围内的整数以及该范围内的整数的分数。因此,为说明起见,对数字范围的提及(例如1-10)包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以及1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等等。因此,对1-50的范围的提及包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20,直至并且包括50,以及1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等,2.1、2.2、2.3、2.4、2.5等。

[0144] 对一系列范围的提及包括组合该系列内不同范围的边界的值的范围。因此,为了说明对一系列范围提及,例如1-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-75、75-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-400、400-500、500-750、750-1,000、1,000-1,500、1,500-2,000、2,000-2,500、2,500-3,000、3,000-3,500、3,500-4,000、4,000-4,500、4,500-5,000、5,500-6,000、6,000-7,000、7,000-8,000或8,000-9,000,包括10-50、50-100、100-1,000、1,000-3,000、2,000-4,000等的范围。

[0145] 在不脱离本技术的基本方面的情况下,可以对前述内容进行修改。尽管已经参考一个或多个特定实施例对本技术进行了详细描述,但是本领域普通技术人员将认识到,可以对本申请中具体公开的实施例进行改变,但是这些修改和改进在本技术的范围和精神之内。

[0146] 本文说明性地描述的技术可以在不存在本文未具体公开的任何要素的情况下适当地实践。因此,例如,在本文的每种情况下,术语“包括”、“基本上由……组成”和“由……组成”中的任何一个都可以用其他两个术语中的任一个代替。已经采用的术语和表达用作描述的术语,而不是限制,并且此类术语和表达的使用不排除所示出和描述的特征或其片段的任何等同形式,并且在请求保护的技术的范围内可以进行各种修改。

[0147] 本文所提及的所有出版物和专利均通过引用全文并入本文,如同每个单独的出版物或专利均被明确地和单独地指出通过引用并入。在发生冲突的情况下,以本申请(包括本文的任何定义)为准。但是,本文中引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请的提及并非、也不应被视为对它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家的公知常识的一部分的认可或任何形式的暗示。

[0148] 在本说明书中,任何浓度范围、百分比范围、比率范围、或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数的值、以及在适当时其分数(例如整数的十分之一和百分之一),除非另有说明。术语“约”在紧跟数字或数值之前时是指该数字或数值范围正负10%。应当理解,除非另外指出,否则本文所用的术语“一个”和“一种”是指所列举的组分中的“一个或多个”。替代(例如“或”)的使用应理解为是指替代方案之一、两者或它们的任何组合。术语“和/或”应被理解为是指替代方案中的一个或两个。如本文所使用的,术语“包括”和“包含”是 synonym。

[0149] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,并且不应被解释为限制所描述的主题。

[0150] 在以下实施例中进一步描述本公开,其不限制权利要求中描述的本公开的范围。

实施例

[0151] 实施例1:scAAVrh74.tMCK.hSGCB的构建和载体效价

[0152] 构建了如图1所示的包含密码子优化的全长人 γ -肌聚糖 (SCGB) cDNA (SEQ ID NO: 1) 的SGCG AAV构建体。该SGCG AAV构建体被配置来使用自互补AAV骨架进行包装,以实现更高效的转导效率。SGCG cDNA (969) 被配置来由MHCK7启动子 (792bp) 驱动。内含子和5' UTR来源于质粒pCMV β (Clontech)。SGCG AAV构建体具有在起始ATG之前紧接着的共有Kozak,以及小的53bp的合成polyA信号用于mRNA终止。该cDNA经过密码子优化以供人类使用,并由GenScript (Piscataway, NJ) 合成。该载体中包含的唯一的病毒序列是AAV2的反向末端重复,这是病毒DNA复制和包装所必需的。

[0153] 用于该研究的载体是在研究等级条件下利用HEK293细胞的三重转染方法生产的。产生后载体的表征包括通过qPCR用超螺旋标准液测定滴度、内毒素水平测定 (U/mL) 和无菌评估。通过SDS-PAGE分析产生的载体,以验证条带模式与预期的rAAV的一致性。用线性质粒标准品滴定载体制备物,并用超螺旋质粒标准品再次滴定。使用含有以下成分的质粒生产载体:全长人 γ -肌聚糖cDNA (NC_000013.11)、肌肉特异性MHCK7启动子以驱动表达、共有Kozak序列 (CCACC)、SV40嵌合内含子、合成多腺苷酸化位点 (53bp) (图1)。将SGCG表达盒克隆到包装在自互补 (sc)AAVrh.74载体中的AAV2 ITR之间,以增强心脏组织的转导。

[0154] 表2提供了研究设计的概述。通过qPCR估计载体基因组 (vg) 的总数来确定剂量值。在载体制剂中包含至少一些部分完整的AAV衣壳可能会导致qPCR方法高估剂量。因此,在给定量 (例如 $5E+13$) 下的效能 (efficacy) 测定表明,当纯化载体以去除部分完整的AAV衣壳时,可以在较低的qPCR测量的载体剂量下观察到效能。表2和整个“实施例”部分中列出的总剂量 (vg) 和以每千克对象的载体基因组为单位的剂量 (vg/kg) 未计算部分完整的AAV衣壳。

[0155] 表2:scAAVrh74.MHCK7.hSGCG研究设计的概述

[0156]

研究目的	递送途径	动物品系	总剂量 (vg)	剂量 (vg/kg)	小鼠数	治疗终点 (月)	分析
效价	IM	SGCG-/-	3E+11	N/A	2	1	IF
效价	IV	SGCG-/-	1E+13	5E+14	1	1.5	IF
效能	IV	SGCG-/-	1E+12	5E+13	6	3	IF, H&E, 蛋白质印迹, TA Phys, Dia Phys, 活动笼, 组织病理学, 生物分布, qPCR, 血清化学
效能	IV	SGCG-/-	4E+12	2E+14	6	3	IF, H&E, 蛋白质印迹, TA Phys, Dia Phys, 活动笼, 组织病理学, 生物分布, qPCR, 血清化学
效能	IV	SGCG-/-	1E+13	5E+14	5	3	IF, H&E, 蛋白质印迹, TA Phys, Dia Phys, 活动笼, 组织病理学, 生物分布, qPCR, 血清化学
效能	IV	SGCG-/-	--	--	6	--	IF, H&E, 蛋白质印迹, TA Phys, Dia Phys, 活动笼, 组织病理学, 血清化学
效能	IV	C57BL/6	LRS	--	6	3	IF, H&E, 蛋白质印迹, TA Phys, Dia Phys, 活动笼, 组织病理学, 血清

[0157]

							化学
--	--	--	--	--	--	--	----

[0158] N/A: 不适用

[0159] IF:免疫荧光;H&E:苏木精&曙红染色;TA Phys:TA肌肉的比力测量和对ECC损伤的抗性;Dia Phys:隔膜的比力测量;组织病理学:正式的组织病理学评论;‘—’:未注射。

[0160] 所有效能动物在4-8周龄时进行处理,并在注射后3个月进行尸检。在4个月大时对SGCG^{-/-}阴性对照小鼠进行尸检。

[0161] scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG测试物品的效价测定是通过将载体肌肉内和全身注射到SGCG^{-/-}小鼠中来实现的。注射了乳酸林格氏液(LRS)的野生型小鼠用作阳性对照,未经注射的SGCG^{-/-}小鼠用作阴性对照。

[0162] 提取来自8周龄BL6野生型(WT)小鼠和 γ -肌聚糖敲除(γ -SG KO)小鼠的胫前(TA)肌肉,并用苏木精和曙红(H&E)染色组织切片以观察每个肌肉的组织学。甚至在这个很小的年龄, γ -SGKO小鼠在肌肉中就显示出疾病表型,其中有坏死的肌纤维、炎性浸润和纤维化组织的存在。(图2)。

[0163] 将SGCG AAV构建体包装到rh.74血清型的AAV中,以产生称为scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG的重组AAV(rAAV)。总共注射3只小鼠以确定scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG的效价。一只注射有LRS的C57BL/6WT小鼠和一只未经注射的SGCG^{-/-}小鼠分别作为阳性对照和阴性对照。其余三只小鼠为SGCG^{-/-},并通过LTA中的IM(n=2)或尾静脉中的IV(n=1)注射scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG以确定载体批次是否有效。表3总结了研究设计。

[0164] 表3:scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG效价测定

小鼠数	小鼠品系	注射材料	剂量(总 vg)	递送途径	体积(μ L)
1	SGCG ^{-/-}	N/A	阴性对照	N/A	N/A
1	C57BL/6	LRS	阳性对照	IV	200
2	SGCG ^{-/-}	AAV.hSGCG	3×10^{11} vg	IM	30
1	SGCG ^{-/-}	AAV.hSGCG	1×10^{13} vg	IV	460 (230/230)

[0166] γ -SG KO小鼠通过肌肉内(IM)注射在4周龄时以 3×10^{11} vg的总剂量将scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG注射到TA肌肉中。在注射后第4周(8周龄)对小鼠实施安乐死,提取TA肌肉并在液氮冷却的甲基丁烷中新鲜冷冻。 γ -肌聚糖的免疫荧光(IF)染色显示,未经注射的右TA(RTA)肌肉中不存在 γ -肌聚糖,并且在经注射的左TA(LTA)肌肉中膜 γ -肌聚糖蛋白表达几乎完全恢复(图3A)。 γ -肌聚糖的蛋白质印迹(图3B)显示:在两个BL6 WT TA肌肉中 γ -肌聚糖的表达; γ -SG KO TA肌肉中不存在蛋白质;经注射的鼠#794和#795的TA肌肉中 γ -肌聚糖蛋白表达恢复。

[0167] 以 3×10^{11} vg总剂量的指定剂量通过IM向SGCG^{-/-}小鼠递送scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG,导致所注射的LTA肌肉中hSGCG的表达为93.03%,这与我们先前研究过的 β -肌聚糖(scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB)载体的水平相似。给予载体的小鼠(动物ID:794、795)的免疫荧光成像证实了hSGCG转基因的表达(图3A)。包括了20X图像以使经注射的肌肉中的表达量可视化。如预期的那样,C57BL/6WT小鼠表现出100%的 γ -肌聚糖蛋白表达,而SGCG^{-/-}小鼠完全不存在 γ -肌聚糖表达(图3C)。

[0168] 通过尾静脉全身注射至一只SGCG^{-/-}小鼠(#797)导致hSGCG转基因的高水平表达。申请人能够在以 1×10^{13} vg总剂量(5×10^{14} vg/kg) scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG处理的该效价小鼠的所有骨骼肌中完成 $\geq 94.00\%$ 的转导。在分析的所有骨骼肌中,AAV递送的hSGCG转基

因的平均表达百分比为95.98%。申请人还能够在全身体递送时在心脏中实现非常高的转导水平。图7显示了所有骨骼肌以及隔膜和心脏的代表性20X免疫荧光图像,说明了hSGCG的广泛表达。

[0169] 实施例2:scAAVrh74.tMCK.hSGCB载体在BL6 WT小鼠中的效价和毒性

[0170] 通过肌肉内(IM)注射对BL6 WT小鼠在4周龄时以总剂量 3×10^{10} vg的剂量将scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG注射到TA肌肉中。在注射后第4周(8周龄)对小鼠实施安乐死,提取TA肌肉并在液氮冷却的甲基丁烷中新鲜冷冻。 γ -肌聚糖的免疫荧光(IF)染色显示未经注射的右TA(RTA)肌肉中的 γ -肌聚糖的膜染色,并显示细胞内的染色,表明经注射的左TA(LTA)肌肉中 γ -肌聚糖蛋白的过表达(图4A)。 γ -肌聚糖的蛋白质印迹(图4B)显示了在经注射的LTA肌肉中 γ -肌聚糖蛋白的过表达。在未经注射的RTA或经注射的LTA中,TA肌肉的H&E染色未显示毒性,完全没有任何中央核、坏死纤维、炎性浸润或纤维化组织。(图5)。

[0171] 实施例3:全身递送scAAVrh.74.tMCK.hSGCB后的基因表达

[0172] 将 γ -SG KO小鼠在4-5周龄时以 1×10^{12} vg总剂量(5×10^{13} vg/kg)静脉内注射到尾静脉中。治疗6周后对小鼠实施安乐死。对TA、腓肠肌(GAS)、四头肌(QUAD)、臀肌(GLUT)、PSOAS、TRICEP、隔膜和心肌的免疫荧光染色证实了 γ -肌聚糖的广泛表达(图6)。

[0173] 通过使用单剂量(1×10^{13} vg总剂量, 5×10^{14} vg/kg)在SGCG-/-小鼠(基因型:sgcgC57)中进行全身注射来实现scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG测试物品的效能测定。以临床剂量(1×10^{12} vg总剂量(5×10^{13} vg/kg))、中剂量(4×10^{12} vg总剂量(2×10^{14} vg/kg))和高剂量(1×10^{13} vg总剂量(5×10^{14} vg/kg))全身注射scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG注入SGCG-/-小鼠的尾静脉,注射后3个月实施安乐死。

[0174] 根据我们的scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG效价测定的结果,申请人通过尾静脉注射将载体以 1×10^{13} vg总剂量(5×10^{14} vg/kg)的效价剂量递送至5只SGCG-/-小鼠以评估在3个月的延长时间点全身递送时,我们的载体的转基因表达和效能。在4周龄时注射小鼠,并且在注射后3个月进行完整的尸检。抽出上述效价测定中讨论的所有骨骼肌以及隔膜和心脏,以进行分析。还去除了包括肺、肾、肝、脾和性腺在内的器官,以进行毒理学和生物分布研究。简而言之,在治疗3个月后,hSGCG转基因表达仍然很高,并且再次高度转导了来自治疗小鼠的所有肌肉。这伴随着改善的肌肉组织病理学以及改善的TA和隔膜肌功能。scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG载体的全身递送未在肌肉或器官中引起任何毒性。

[0175] γ -肌聚糖表达

[0176] 使用对人 γ -肌聚糖的免疫荧光染色来确定全身注射scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG载体的所有SGCG-/-小鼠的除了隔膜和心脏之外在左右两侧的六个骨骼肌中的hSGCG转基因表达。这些肌肉包括TA、GAS、QUAD、GLUT、PSOAS、TRI。为了表达分析和转导效率的目的,使用来自5只经处理的小鼠的左右肌肉的图像进行定量。对每个肌肉拍摄四张20X图像,并为每张图像确定hSGCG阳性纤维的百分比(阳性表达纤维数/纤维总数),从而得出每只小鼠的每个肌肉的平均转导百分比。图8A显示了来自经处理的小鼠的代表性图像,并显示了在所有定量的包括隔膜在内的肌肉上平均表达为92.26%的高水平。申请人再次在所有用载体处理的小鼠中也看到了心肌中高水平的转导。图8B显示了蛋白质印迹,其证实了在静脉内递送scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG载体的小鼠的所有骨骼肌和心脏中hSGCG转基因的表达。表4列出了来自每只小鼠的每个肌肉的四张20X图像中的平均表达百分数,以及所有5只小鼠中的

每个肌肉的平均值。

[0177] 表4. γ -肌聚糖转基因表达平均百分比

动物ID	5229	5230	5231	5232	5233	平均
肌肉						
TA	97.79	97.79	99.54	99.13	96.59	98.17
GAS	90.88	90.88	74.14	97.67	93.49	89.41
QUAD	88.37	88.37	96.85	95.01	76.15	88.95
GLUT	96.19	96.19	91.12	100	92.83	95.27
PSOAS	97.55	97.55	99.01	49.88	97.92	88.38
TRI	97.32	97.32	99.31	94.98	93.31	96.45
DIA	93.02	93.02	75.56	97.14	87.22	89.19

[0179] 经处理肌肉的组织病理学

[0180] 来自SGCG-/-小鼠的骨骼和心脏肌肉都表现出广泛的肌病,包括明显的肌纤维萎缩和肥大,具有多个坏死灶区域。还存在越来越多的单核细胞炎症(淋巴细胞和巨噬细胞,中性粒细胞分散)和增加的营养不良性钙化、脂肪浸润、中心成核和纤维化。图9A中的苏木精和曙红染色说明了与常规WT小鼠相比SGCG-/-小鼠中的这种营养不良表型和治疗后肌肉病理学的改善。组织学参数的量化显示,SGCG-/-小鼠骨骼肌中中央成核纤维的数量显著增加,随后由于 γ -肌聚糖基因转移,许多不同骨骼肌中的中央成核减少(图9B)。对肌肉组织病理学的更深入分析显示,在接受检查的所有三个肌肉(GAS、PSOAS和TRI)中,用载体治疗的患病SGCG-/-小鼠中,纤维大小分布均正常化,同时平均纤维直径增加(图10A-10F)。从每只小鼠分析了各个肌肉的各个中央核数和平均纤维直径。

[0181] 实施例4: γ -SG KO小鼠的生理缺陷

[0182] 将会进行天狼星红染色以量化纤维化组织的量。将会在4个月大时对 γ -SG KO小鼠和BL6 WT小鼠进行测试,以评估骨骼肌是否存在力量不足。将会测试胫前(TA)肌肉的比力和对损伤的抗性与对照组相比是否显著降低。隔膜也将会以类似的方式进行测试以检测任何明显的减少。这种可测量的下降将会为确定AAV.hSGCB疗法的效能提供功能性结果指标。

[0183] 实施例5:scAAVrh74.tMCK.hSGCB处理后的功能性结果

[0184] 将会对 γ -SG KO小鼠进行滚动注射以进行为期三个月的研究,以量化效能和毒性(表5)。安乐死之前将会对小鼠进行活动笼分析,以确定与 γ -SG KO对照相比治疗小鼠的总体活性。将会对TA和隔膜进行生理分析,以确定比力输出和对伤害/疲劳的抗性。将会将 γ -SG KO肌肉与BL6 WT对照进行比较,以建立功能性结果指标,这些指标将会用于确定经处理小鼠的治疗的效能。将会对所有骨骼肌进行IF(免疫荧光)染色以检测 γ -肌聚糖的表达,进行H&E染色以进行组织病理学检查。将会对注射小鼠的肌肉和器官进行定量聚合酶链反应(qPCR),以确定载体基因组的生物分布。

[0185] 表5

小鼠品系	测试物品	人类剂量	样品大小	终点
C57/BL6	LR*	NA	6	12周
SGCG KO	LR	NA	6	12周
SGCG KO	scAAVrh74.MHCK7.SGCG	5×10^{13} vg/kg	6	12周

SGCG KO	scAAVrh74.MHCK7.SGCG	1x 10 ¹⁴ vg/kg	6	12周
SGCG KO	scAAVrh74.MHCK7.SGCG	2x 10 ¹⁴ vg/kg	6	12周

[0187] 实施例6:全身性递送的功能性评估

[0188] 为了确定hSGCG基因转移是否对患病的肌肉提供功能性益处,申请人评估了用scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG治疗的SGCG^{-/-}小鼠的TA和隔膜肌的功能性特性。如实施例1至5中概述的,申请人首先在缺乏 γ -肌聚糖的小鼠的肢体骨骼肌和隔膜中证实了组织病理学。对未经处理的SGCG^{-/-}小鼠的TA肌肉进行原位分析显示,与BL6 WT TA肌肉相比,标准化比力生成在统计学上显著地下降37.68% (BL6 WT:291.65mN/mm² vs.SGCG^{-/-}:181.77mN/mm²)。在治疗之后,与SGCG^{-/-}肌肉相比,比力输出显著地增加至正常WT水平 (SGCG^{-/-}:181.77mN/mm² vs.治疗后:266.02mN/mm²) (图11A和图11C)。确定hSGCG基因转移的功能性益处的另一项功能性结果指标是评估反复偏心收缩后TA肌肉中对收缩诱导的损伤的抗性。正常BL6 WT小鼠未经处理的SGCG^{-/-}小鼠的TA肌肉在经过一轮10次离心收缩后仅损失了18%的力生成,相比之下,未经处理的SGCG^{-/-}TA肌肉则损失了37%的力。经过载体处理的SGCG^{-/-}肌肉改善至WT水平以上,在偏心收缩(ECC)方案之后,仅看到10%的力损失(图11B)。

[0189] 为了进一步测试由治疗性hSGCG转基因的全身性递送和最终改善SGCG^{-/-}小鼠的疾病表型产生的潜在功能性益处,对所有小鼠组进行了旷场笼活动的激光监测。图12中的图表显示,与正常的BL6 WT相比,SGCG^{-/-}小鼠在x和y平面上的总体移动减少了23.64% (BL6 WT:7655.42次光束中断/小时vs.SGCG^{-/-}:5846.00次光束中断/小时)。通过定性观察,经scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG处理的小鼠总体上比SGCG^{-/-}小鼠更活跃,并且旷场笼活动的定量测量显示,移动增加了24.90% (SGCG^{-/-}:5846.00次光束中断/小时vs经处理:7301.80次光束中断/小时)。还测量了个体小鼠中每个参数的详细值。

[0190] 实施例7:毒理学和载体生物分布

[0191] 这项研究的目的是利用上述相同的动物来评估在递送测试物品scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG后3个月的SGCG^{-/-}小鼠中hSGCG基因疗法的任何潜在毒性或安全性问题。在4周龄时,在上午和下午,以分为两个单独的230 μ L注射剂的460 μ L的体积,通过静脉内(IV)途径,以1.0x10¹³ vg总剂量(5x10¹⁴ vg/kg),将测试物品给予5SGCG^{-/-}。六只未注射的SGCG^{-/-}小鼠用作未治疗的患病对照,而五只C57BL/6WT小鼠用作正常健康对照(表6)。对所有小鼠进行完整的尸检,以提取左侧和右侧的六块骨骼肌(TA、GAS、QUAD、GLUT、PSOAS和TRI)、隔膜和心脏以及包括肺、肾、肝、脾和性腺在内的内部器官。为了评估我们载体的安全性,在肌肉组织的冰冻切片上进行了苏木精和曙红染色,所有收获的器官均被福尔马林固定,并同样用苏木精和曙红染色。然后由独立的兽医病理学家对这些切片的毒性进行正式检查,未发现不良反应,结果总结于下表7中,并准备了详细的组织病理学报告。进行定量PCR以评估载体的生物分布,这些结果显示在下表7和图13中。

[0192] 载体转导组织的组织病理学综述

[0193] 为了确定使用全身递送的scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG的安全性和毒理学特征,对来自该临床前研究的施用载体的SGCG^{-/-}小鼠组和对照所收获的所有骨骼肌(包括隔膜)、以及心脏和其他五个器官都用H&E进行染色,并由独立的兽医病理学家对每个组织的切片进行正式检查。群组的详细信息和研究设计如表6所示。

[0194] 表6.scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG基因转移组织病理学研究队列总结

	基因型	队列	剂量(vg)	性别	注射时年龄	验尸时年龄	治疗时间
[0195]	SGCG ^{-/-}	测试物品	1.0x10 ¹³	雌性	1个月	4个月	3个月
				雌性	1个月	4个月	3个月
				雌性	1个月	4个月	3个月
				雌性	1个月	4个月	3个月
				雌性	1个月	4个月	3个月
[0195]	BL6 WT	载体对照	LRS	雄性	1个月	4个月	3个月
				雄性	1个月	4个月	3个月
				雄性	1个月	4个月	3个月
				雄性	1个月	4个月	3个月
				雄性	1个月	4个月	3个月
[0195]	SGCG ^{-/-}	疾病对照	N/A	雌性	N/A	4个月	N/A
				雌性	N/A	4个月	N/A
				雄性	N/A	4个月	N/A
				雄性	N/A	4个月	N/A

[0196] 总之,IV注射scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG不会引起所检查的任何骨骼肌的肌纤维的任何微观变化(表7)。此外,在组织学评估的任何组织中均未见与治疗相关的病变,表明该测试物品耐受性良好,请参见附录J中的完整报告(报告编号AAVrh74-SGCG-MOUSE-001.1)。在治疗和对照小鼠中均观察到任何注意到的变化,并被认为是偶然发现。此外,独立审查表明,相对于对照小鼠的参考标本,施用测试物品scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG可以大大减少肌纤维萎缩、变性和破坏,这表明该载体可以改善患病小鼠中与缺乏SGCG相关的肌病的程度。

[0197] 表7.SGCG^{-/-}小鼠中scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG安全性研究的组织病理学结果

	测试物品 (载体剂量)	注射时年龄	治疗长度	分析的组织	正式组织病理学
[0198]	scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG (1e13vg 总剂量 - 5e14vg/kg) 分析了5只动物	1个月	3个月	骨骼肌, 心脏, 肺, 肾, 肝, 脾, 性腺	无发现

[0199] 载体基因组生物分布

[0200] 使用实时定量PCR测定法(qPCR)检查了测试物品特异性DNA序列的存在。对从两只载体给药SGCG^{-/-}动物收集的组织样品进行生物分布分析。阳性信号表明等于或大于100个单链DNA拷贝/μg检测的基因组DNA。尸检时收获组织,并利用对MHCK7启动子序列特异的载体特异性引物探针组。表8和图13描述了从注射scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG的小鼠的每个组织样品中检测到的载体基因组拷贝数。

[0201] 在所有收集的组织的不同水平检测到scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG转录物。不出所料,由于静脉内递送途径的性质,在肝脏中检测到高水平的载体,但在骨骼肌和心脏中发现最高水平。在肺、肾脏和脾脏中检测到最低水平。这些数据表明测试物品被有效地递送到载体给药小鼠的所有研究的组织中。

[0202] 表8.在SGCG^{-/-}小鼠中全身递送大剂量scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG后的定量PCR结果

组织	载体基因组拷贝数/ μg	
	5229	5231
心脏	1.56E+06	1.30E+06
肺	1.15E+05	2.29E+05
肾	1.74E+05	2.48E+05
[0203] 肝	9.23E+06	1.50E+07
脾	1.58E+05	9.05E+04
隔膜	4.63E+05	1.60E+06
TRI	3.35E+05	3.48E+05
TA	6.23E+05	6.70E+05

[0204] 血清化学分析

[0205] 为了进一步评估肝功能,申请人评估了两种肝酶的水平,它们是正常的血清化学参数,即碱性氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。这些酶中任何一种的升高均可指示肝细胞损伤和肝功能受损。申请人分析了所有6只C57BL/6WT小鼠、所有6只未经处理的SGCG^{-/-}小鼠和所有5只scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG给药小鼠的血清。图14A显示了未经处理的SGCG^{-/-}小鼠中的ALT升高至健康的BL6 WT小鼠中观察到的水平的两倍(BL6 WT: 44.20U/L vs. SGCG^{-/-}: 89.00U/L)。将scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG IV递送到SGCG^{-/-}小鼠导致ALT水平降低了32.02% (SGCG^{-/-}: 89.00U/L vs. 经处理: 60.50U/L)。图14B显示在所有三组小鼠中的AST水平表明在未经处理的SGCG^{-/-}小鼠中113.27%的显著升高(BL6 WT: 326.00U/L vs. SGCG^{-/-}: 695.25U/L)。在全身递送scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG后,这些AST水平降低了41.10% (图14B)。一起来说,虽然在患病的SGCG^{-/-}小鼠中被认为是肝损伤生物标志物的肝酶升高,但在SGCG^{-/-}患病小鼠中全身性hSGCG基因转移使ALT和AST的水平正常化。确定了所有小鼠中每种酶的个体值。

[0206] 总之,显示了携带hSGCB转基因的AAV病毒的两种不同剂量的全身递送是安全且无毒的。测试的剂量包括 1.2×10^{13} vg总剂量 (6.0×10^{14} vg/kg) 和 1.0×10^{13} vg总剂量 (5.0×10^{14} vg/kg)。特别是,通过SGCG^{-/-}的尾静脉全身递送高剂量 (1.0×10^{13} vg总剂量- 5.0×10^{14} vg/kg) 的scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG可安全且有效地恢复 γ -肌聚糖的表达并逆转患病肌肉的营养不良性组织病理学。

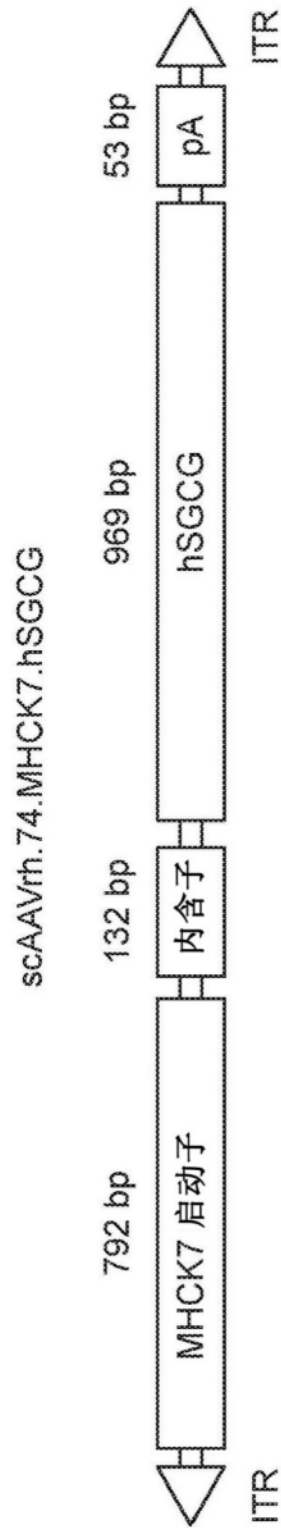


图1

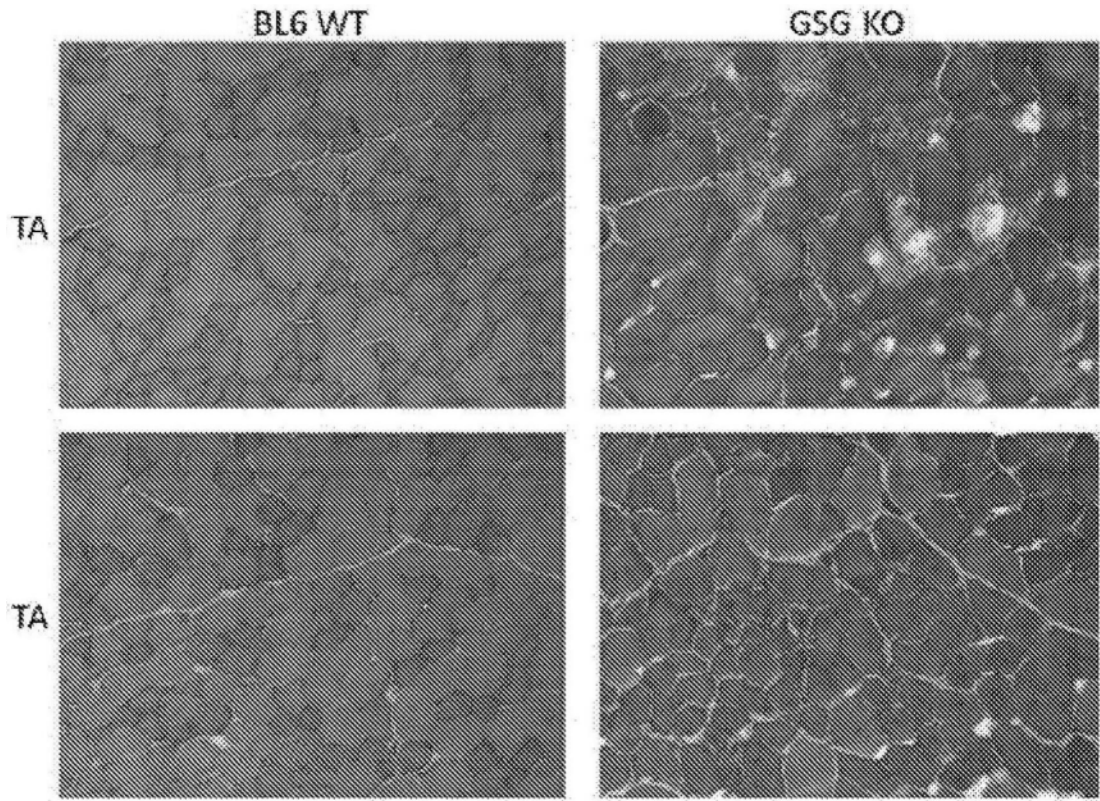


图2

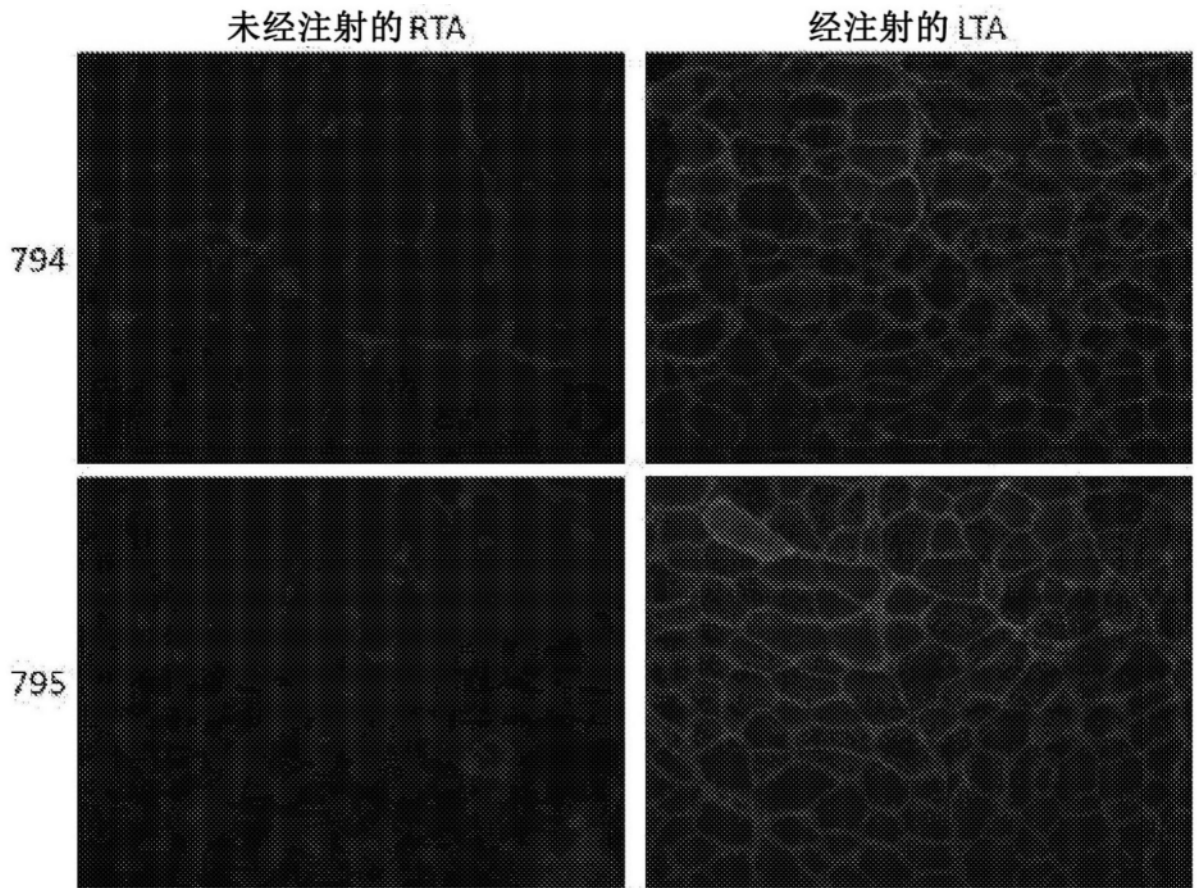


图3A

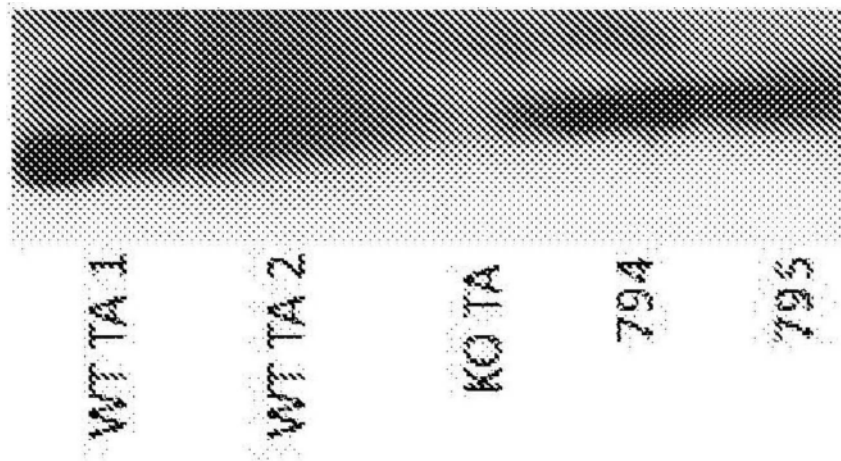


图3B

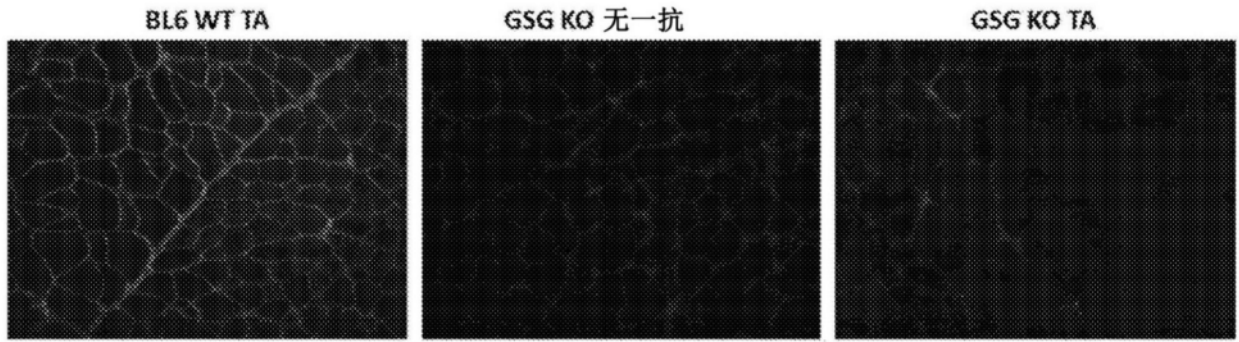


图3C

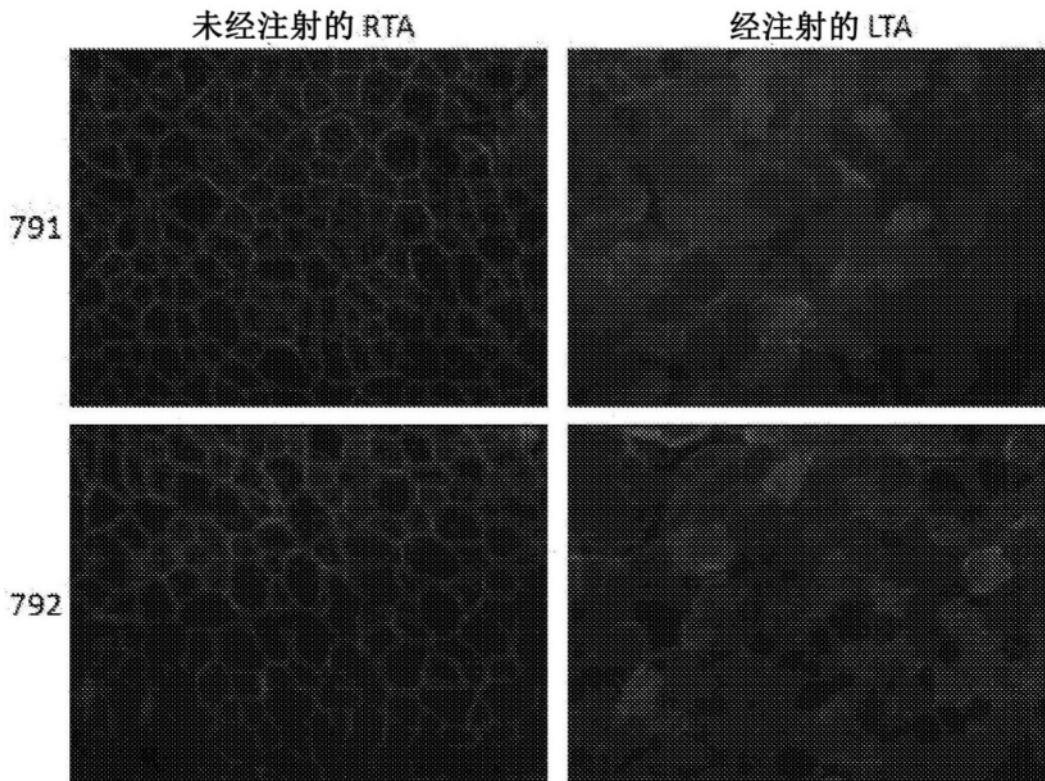


图4A

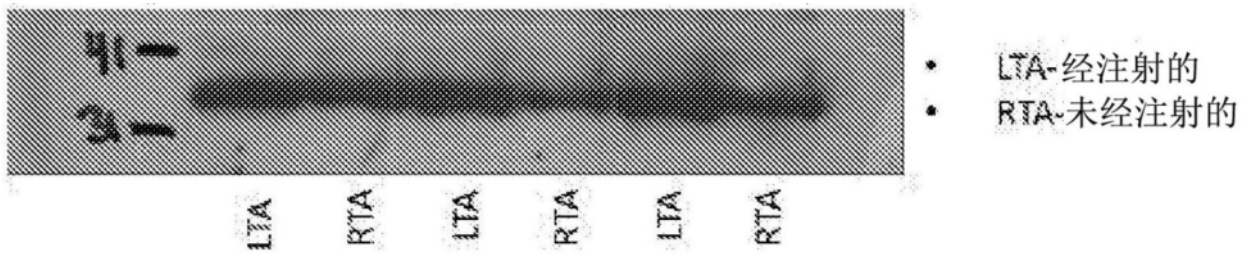


图4B

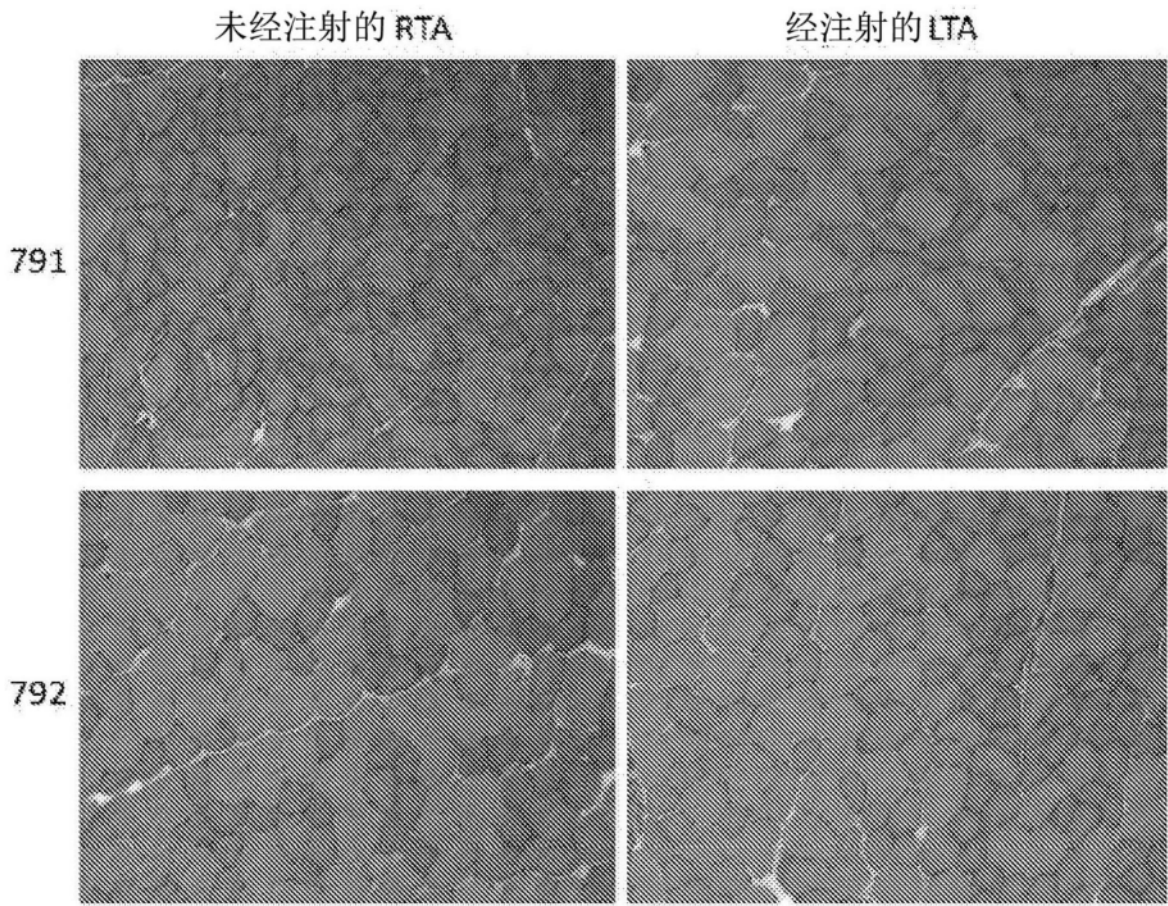


图5

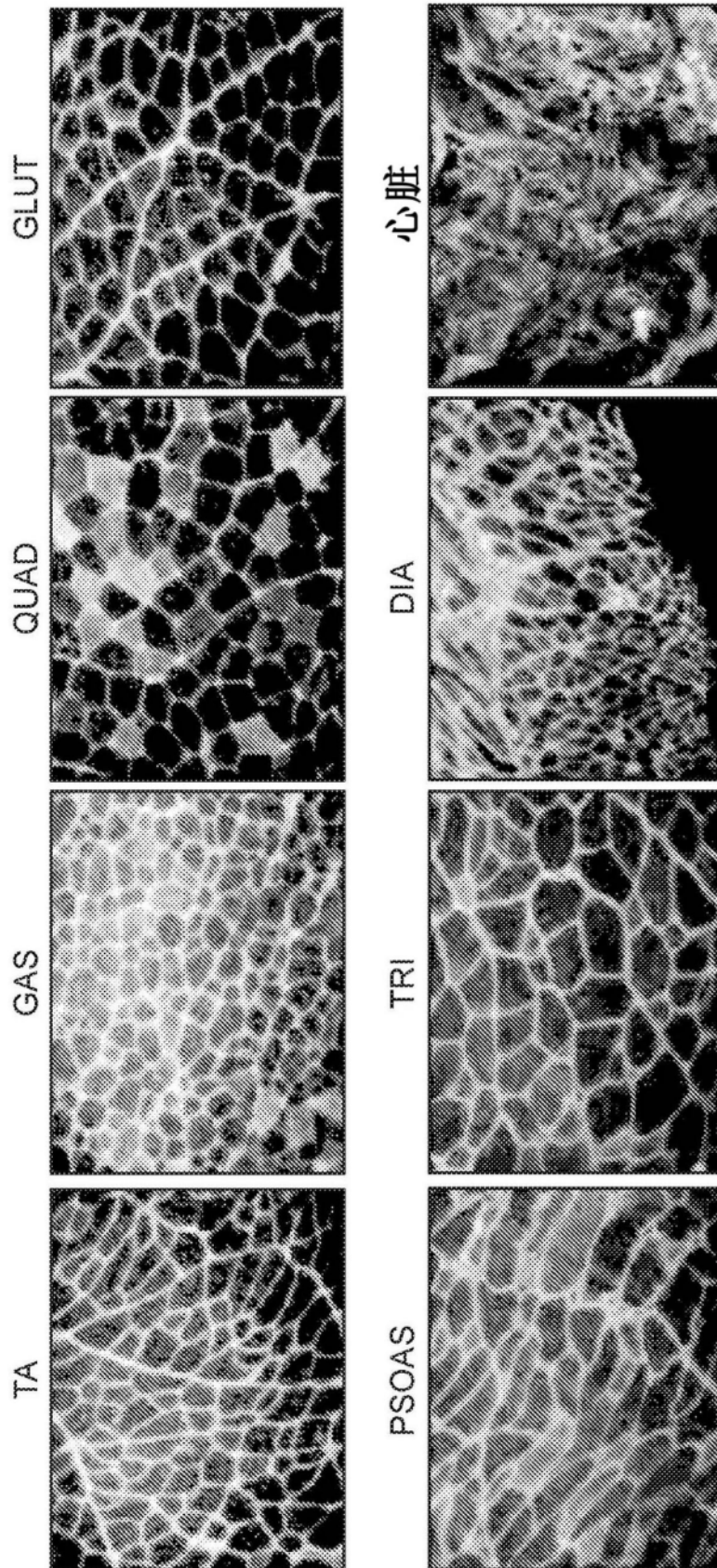


图6

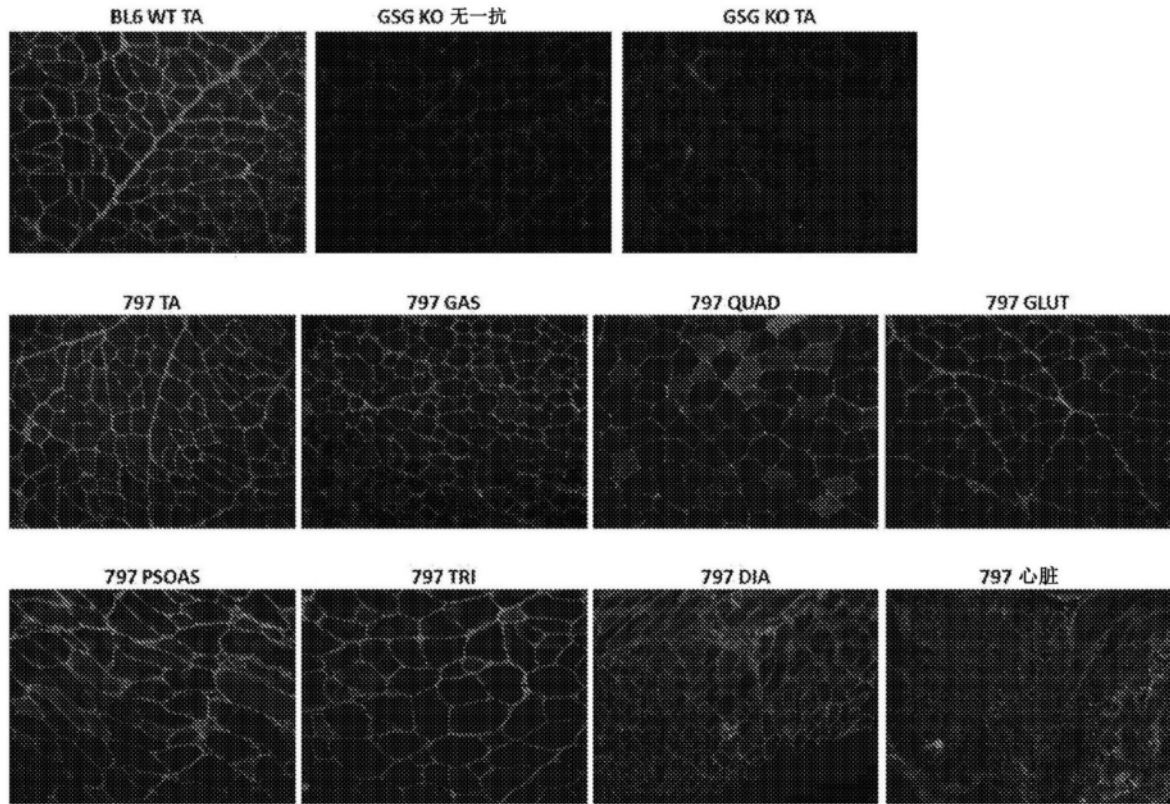


图7

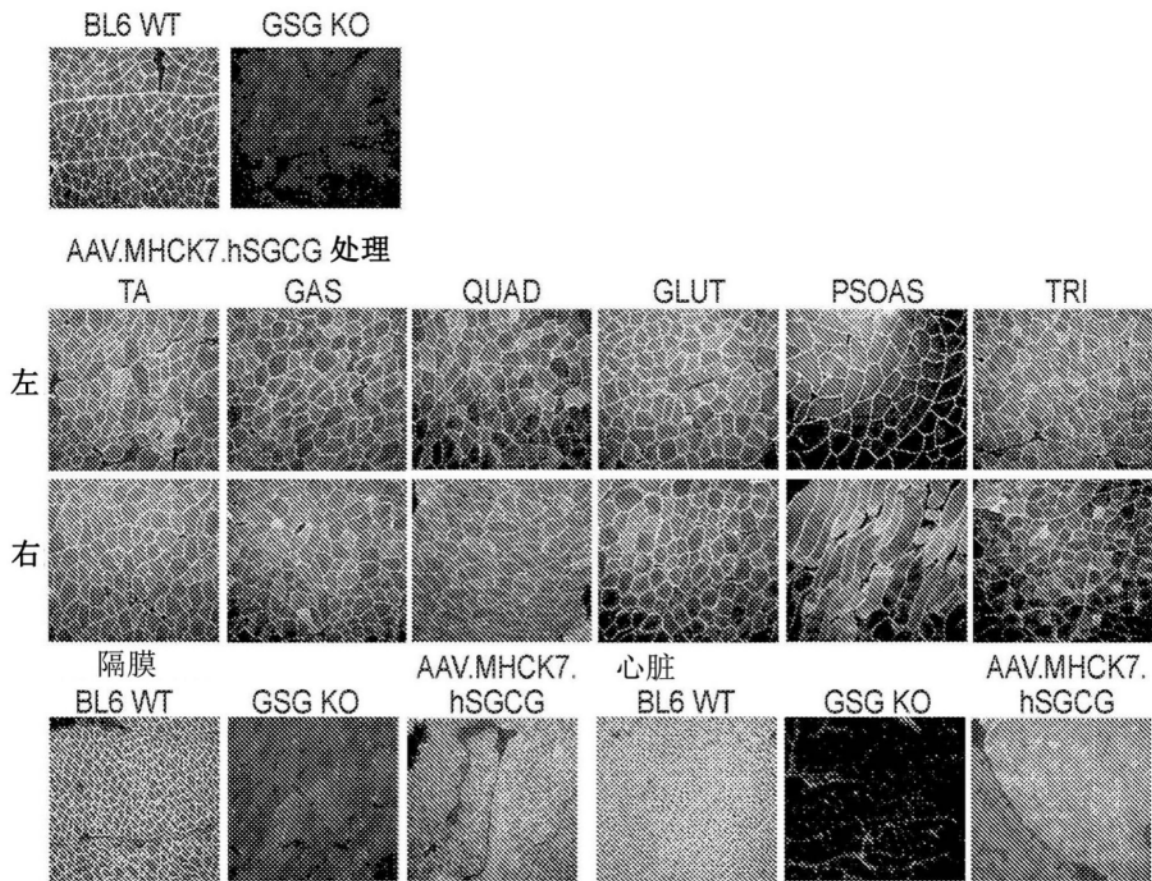


图8A

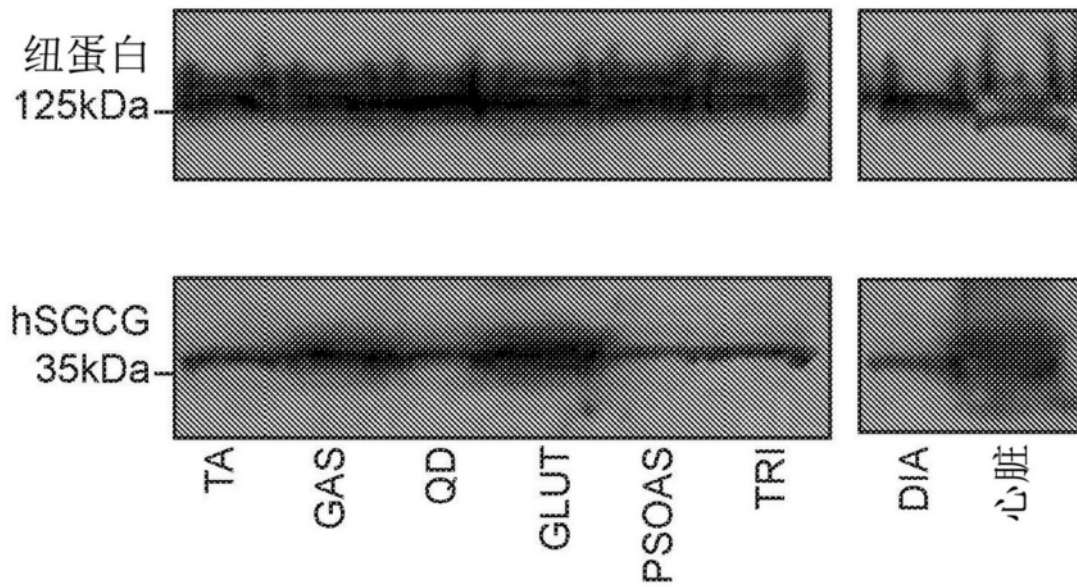


图8B

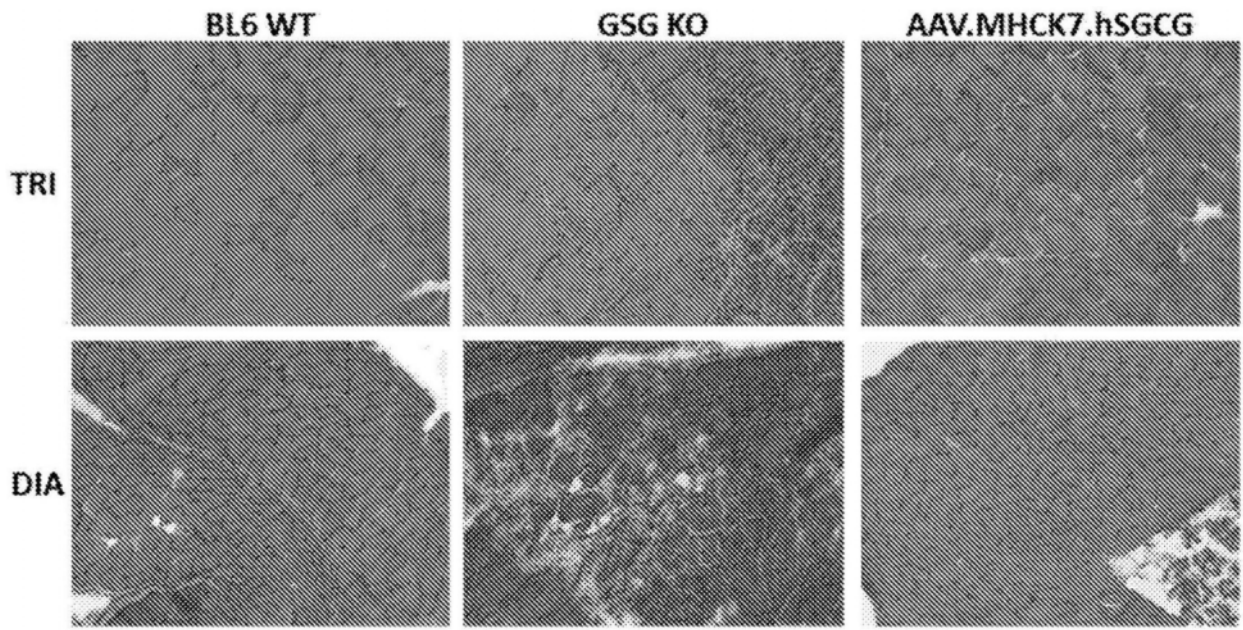


图9A

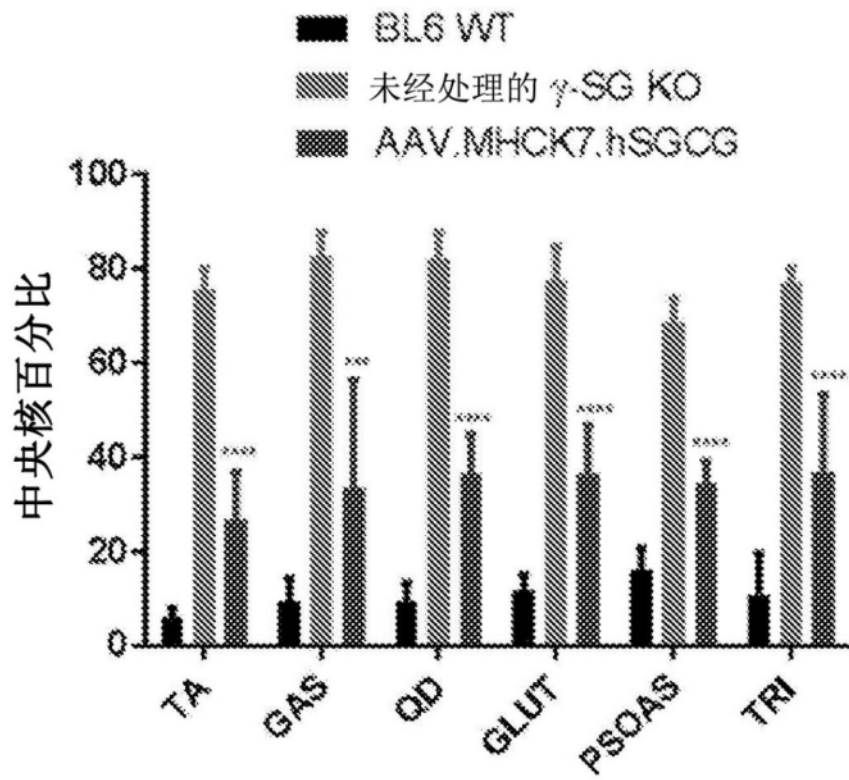


图9B

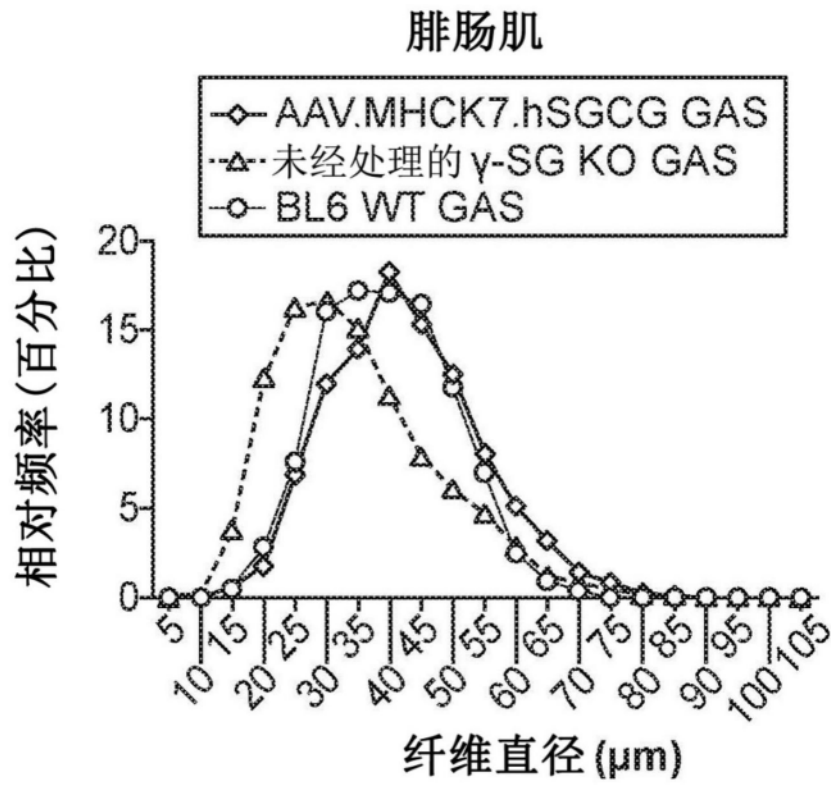


图10A

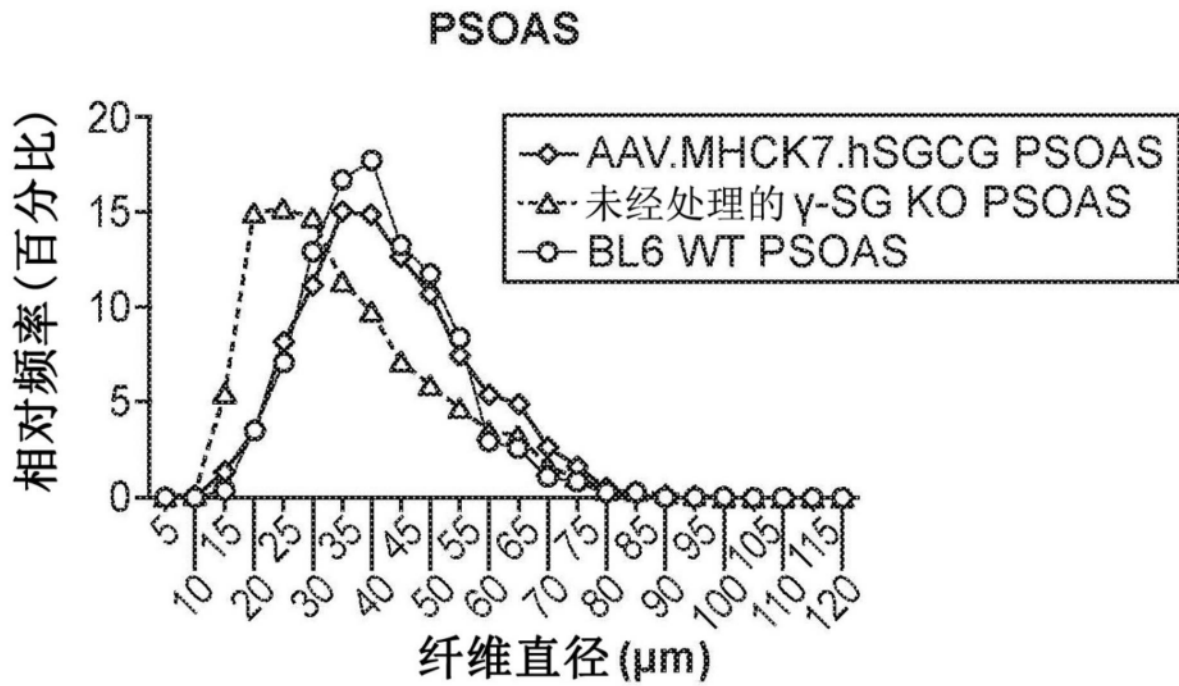


图10B

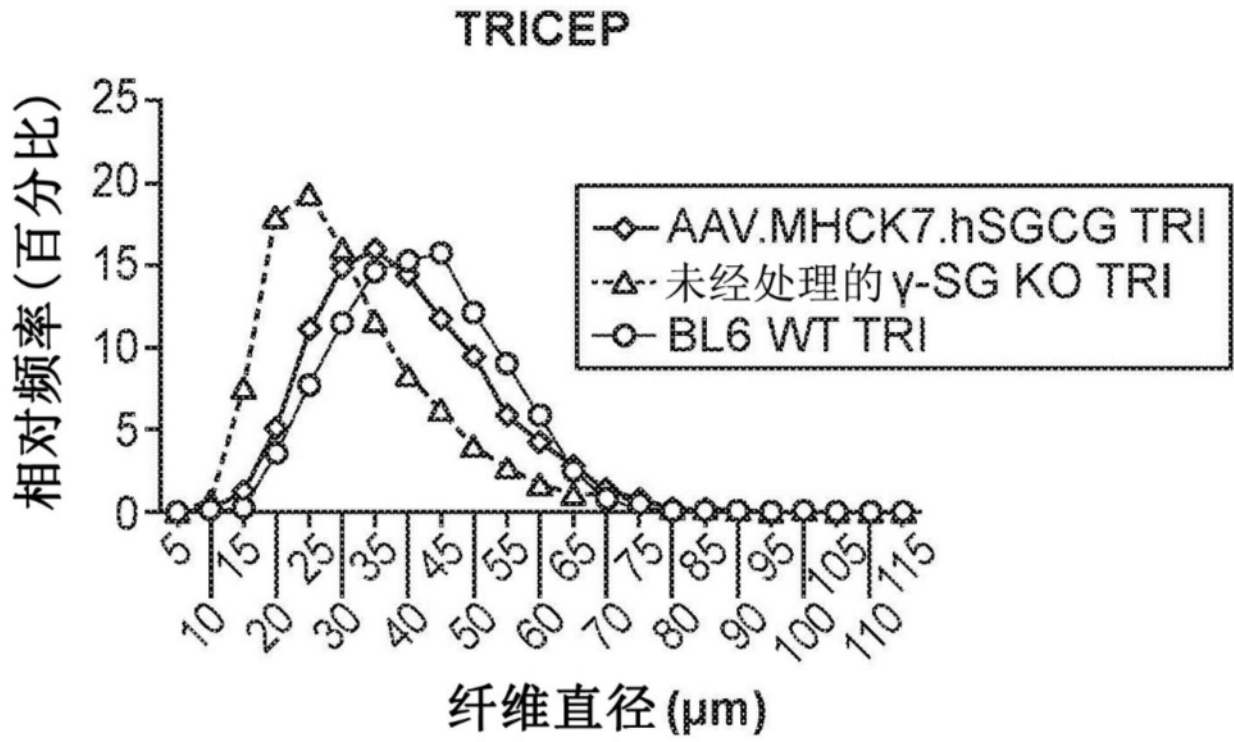


图10C

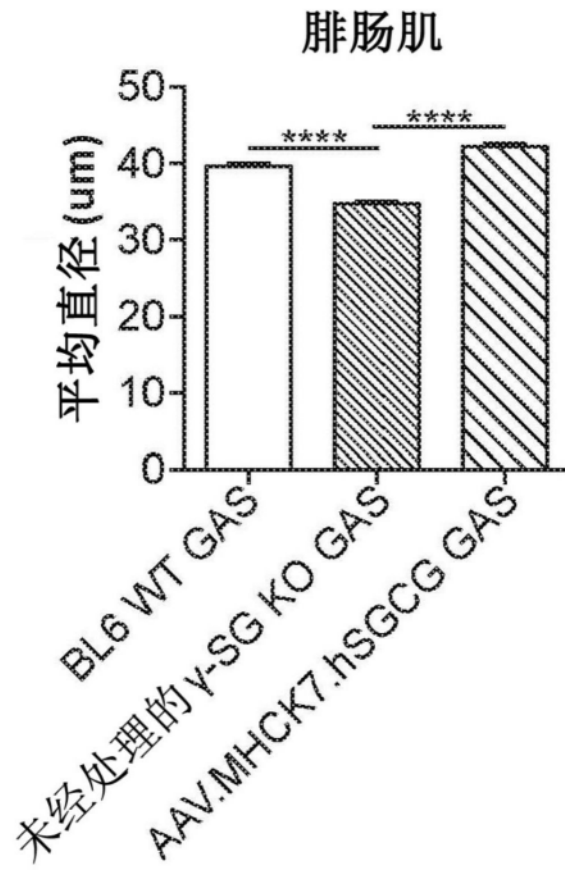


图10D

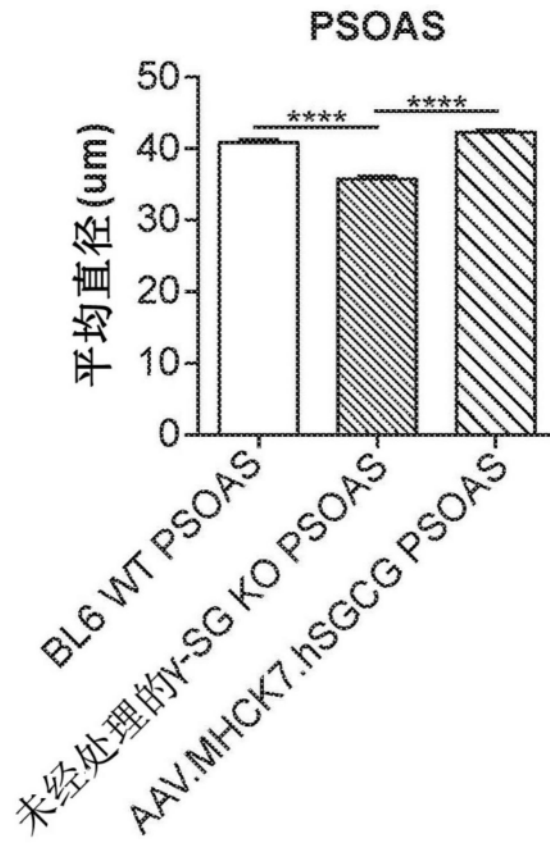


图10E

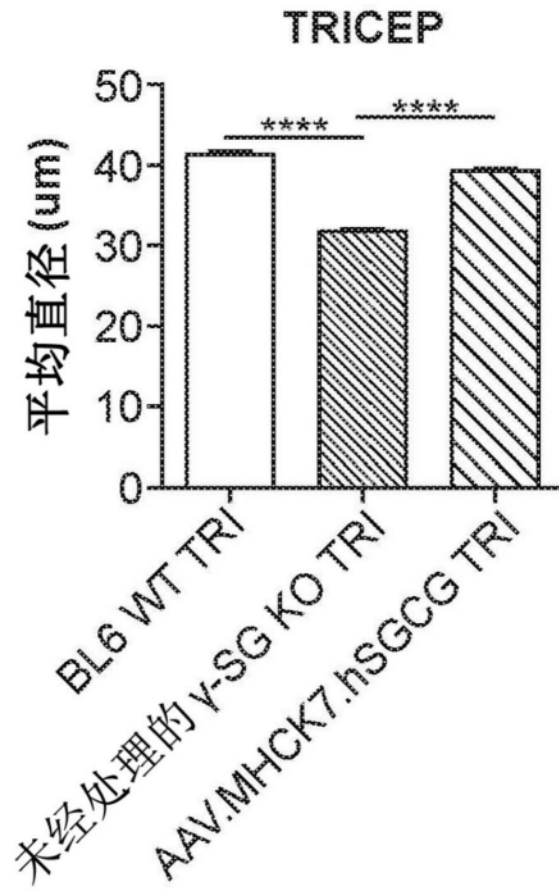


图10F

比力- TA

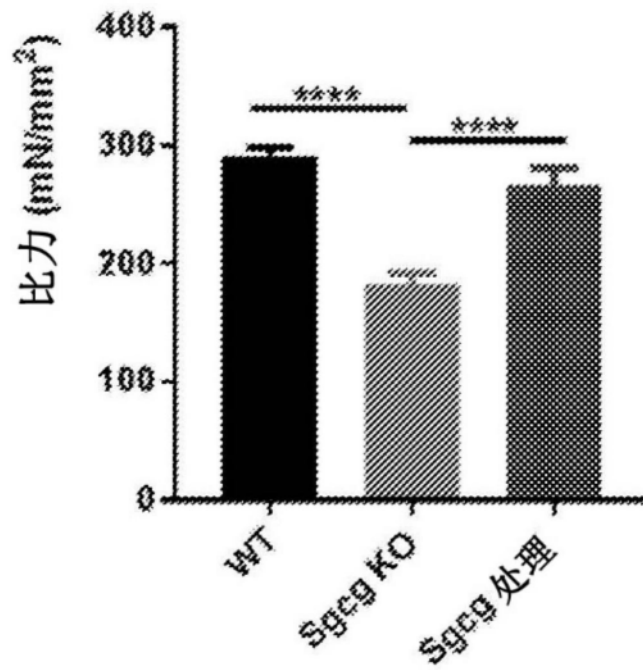


图11A

ECC-TA

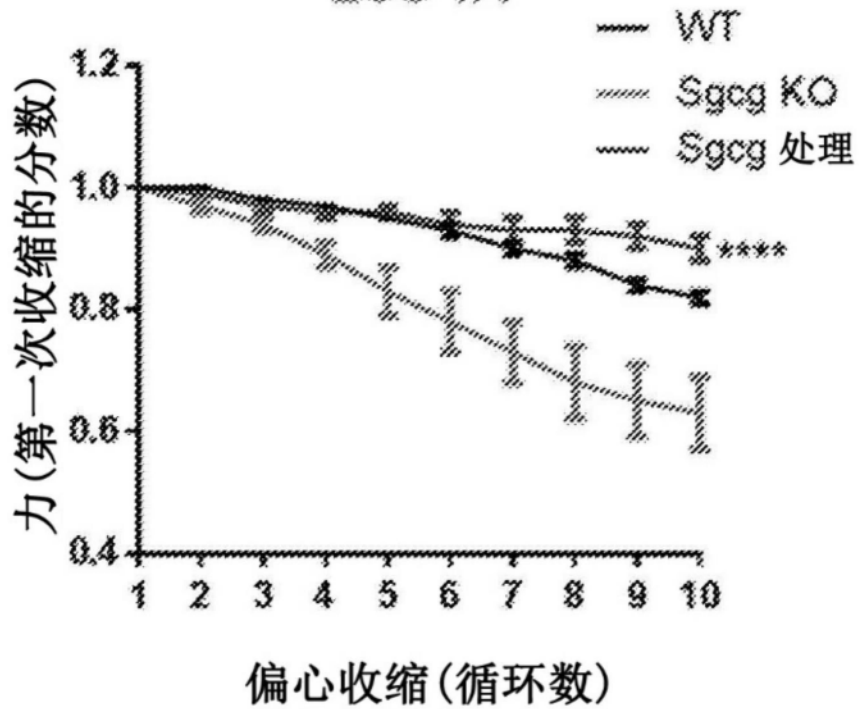


图11B

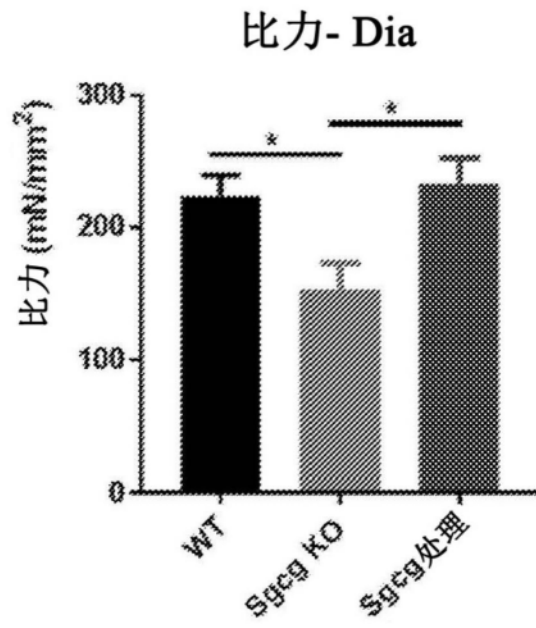


图11C

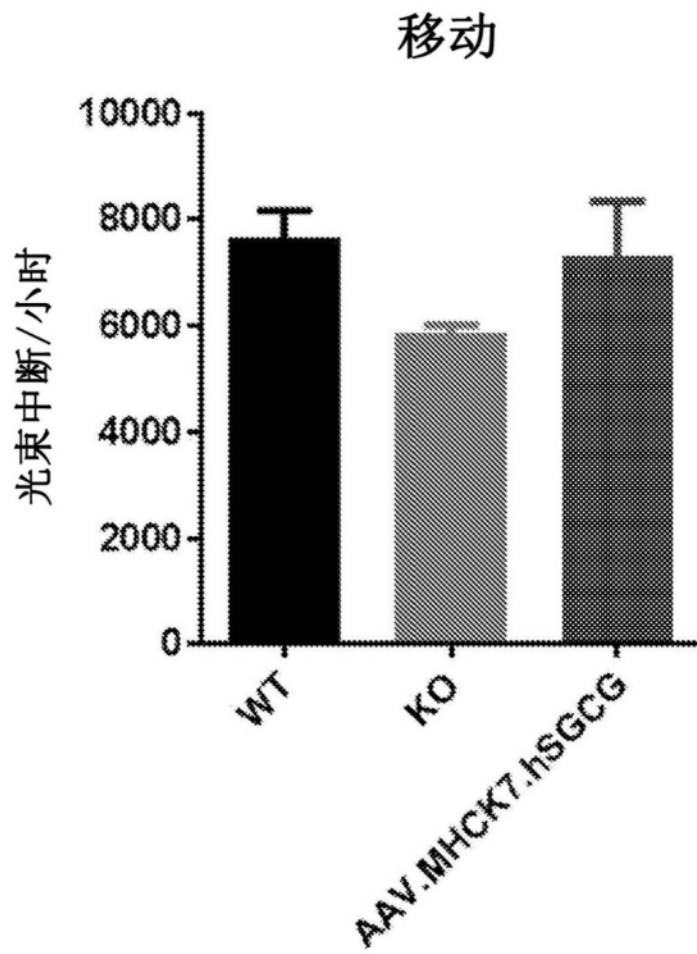


图12

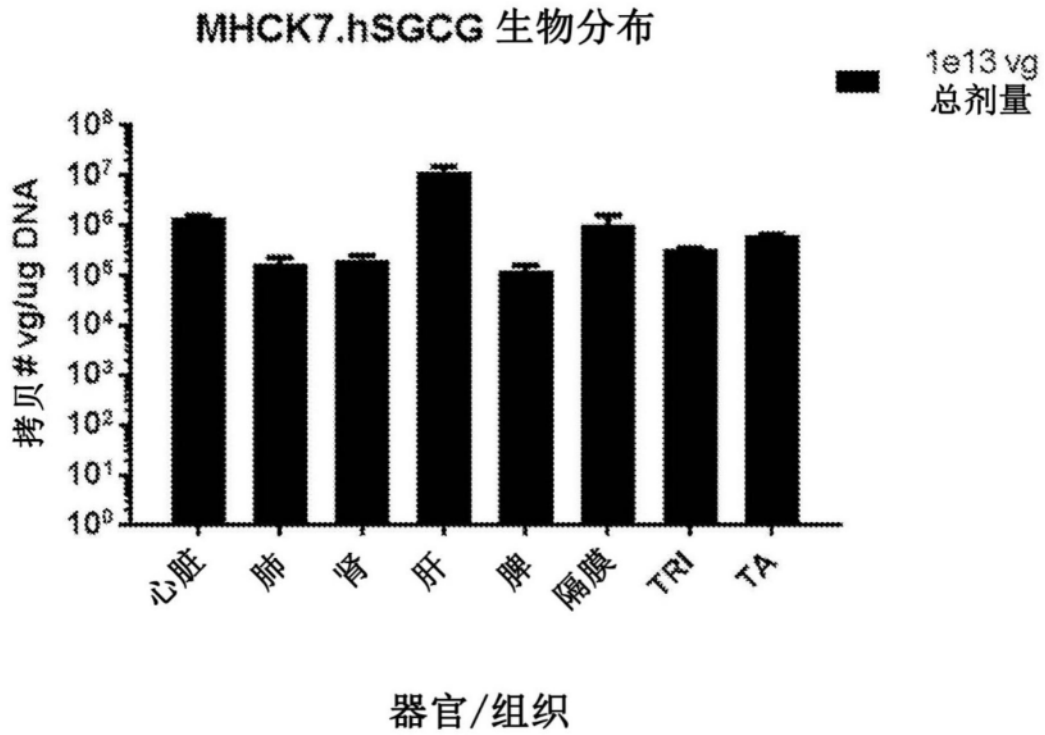


图13

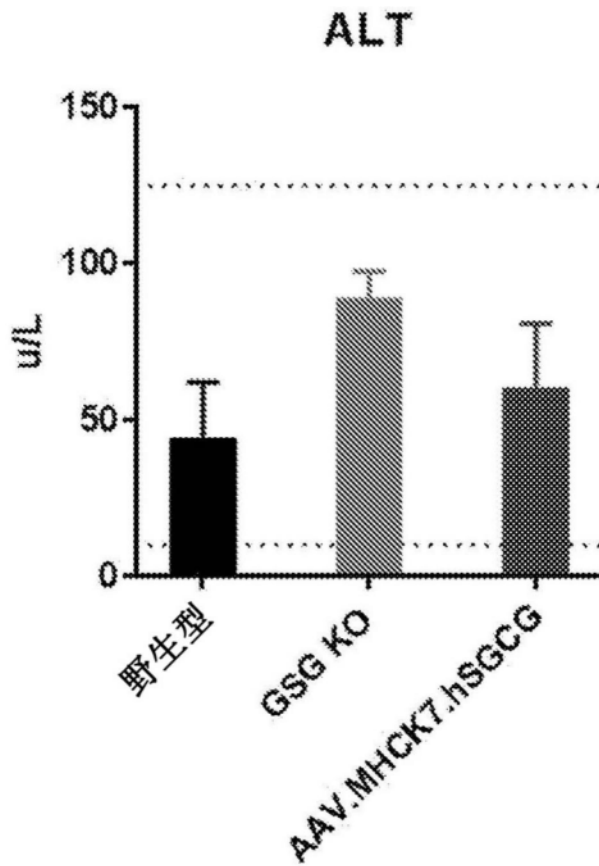


图14A

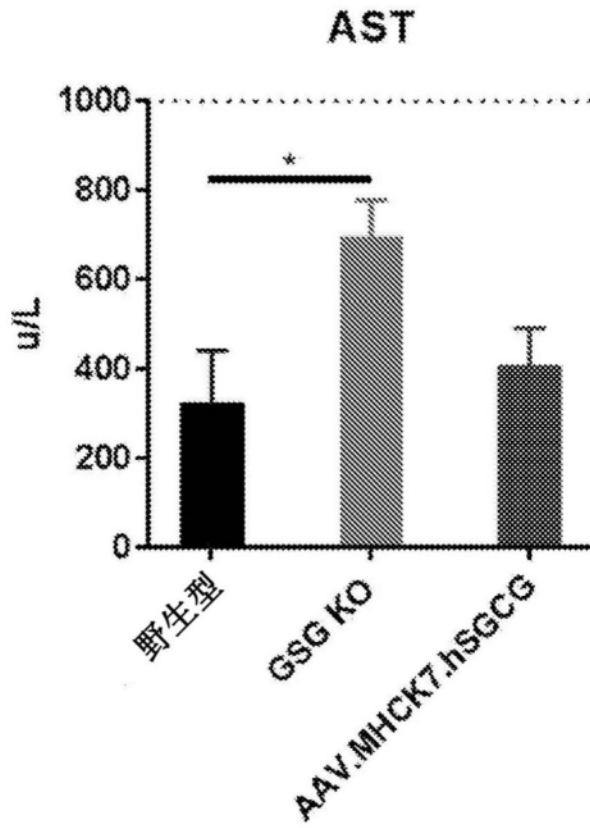


图14B