



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108136049 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680054261.9

(22)申请日 2016.09.16

(30)优先权数据

62/220,107 2015.09.17 US

62/221,068 2015.09.20 US

62/301,260 2016.02.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/052051 2016.09.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/049031 EN 2017.03.23

(71)申请人 全国儿童医院研究所

地址 美国俄亥俄州哥伦布

(72)发明人 P·T·马丁

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 冯冲

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

A61P 21/00(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页
序列表6页

(54)发明名称

GALGT2基因治疗的方法和材料

(57)摘要

本公开涉及GALGT2多核苷酸的重组腺相关病毒(rAAV)递送。本公开提供rAAV和使用rAAV用于神经肌肉疾病的GALGT2基因治疗的方法。示例性的神经肌肉疾病包括但不限于肌营养不良,如杜氏肌营养不良、先天性肌营养不良1A型和肢带型肌营养不良2D型。

1. 一种治疗有需要的人类受试者的神经肌肉疾病的方法,其包括向所述人类受试者给予重组腺相关病毒(rAAV) rAAVrh74.MCK.GALGT2的步骤,其中:

给药途径是肌肉途径并且给药的rAAV的剂量为约 3×10^{11} vg/注射至约 5×10^{12} vg/注射,
给药途径是肌肉途径并且给药的rAAV的剂量为约 3×10^{11} vg/注射,
给药途径是肌肉途径并且给药的rAAV的剂量为约 1×10^{12} vg/注射,
给药途径是肌肉途径并且给药的rAAV的剂量为约 5×10^{12} vg/注射,
给药途径是动脉间肢体灌注并且给药的rAAV的剂量为约 6×10^{12} vg/kg/肢至约 4.8×10^{13} vg/kg/肢,
给药途径是动脉间肢体灌注并且给药的rAAV的剂量为约 6×10^{12} vg/kg/肢,
给药途径是动脉间肢体灌注并且给药的rAAV的剂量为约 1.2×10^{13} vg/kg/肢,
给药途径是动脉间肢体灌注并且给药的rAAV的剂量为约 2.4×10^{13} vg/kg/肢,
给药途径是动脉间肢体灌注并且给药的rAAV的剂量为约 4.8×10^{13} vg/kg/肢,
给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 2×10^{14} vg/kg至约 6×10^{15} vg/kg,
给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 4×10^{14} vg/kg至约 6×10^{15} vg/kg,
给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 4×10^{14} vg/kg,
给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 8×10^{14} vg/kg,
给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 2×10^{15} vg/kg或
给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 6×10^{15} vg/kg。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述神经肌肉疾病是杜氏肌营养不良(DMD);贝克肌营养不良;先天性肌营养不良(MDC) 1A型、1B型、1C型和1D型;肢带型肌营养不良(LGMD) 1A型、1B型、1C型、1D型、1E型、1F型、1G型、1H型、2A型、2B型、2C型、2D型、2E型、2F型、2G型、2H型、2I型、2J型、2K型、2L型、2M型、2N型、2O型和2Q型;Bethlem肌病;Ullrich先天性肌营养不良;肌-眼-脑病;福山型先天性肌营养不良;沃克-沃伯格综合征;强直性肌营养不良;肌无力综合征;先天性肌无力症;包涵体肌病;包涵体肌炎;Emery-Dreifuss型肌营养不良;远端肌营养不良;皮炎;中央核肌病;面肩肱型肌营养不良;Myoshi型肌病;线粒体肌病;线状体肌病;Nonaka肌病;重症肌无力和多肌炎。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述神经肌肉疾病是肌营养不良。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述肌营养不良是杜氏肌营养不良。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述肌营养不良是先天性肌营养不良1A型。

6. 根据权利要求3所述的方法,其中所述肌营养不良是肢带型肌营养不良2D型。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述人类受试者在以下方面得到改善:绝对肌比力;离心肌肉收缩时力量衰减;血清CK水平;血清心肌肌钙蛋白水平;血清MMP9水平;握力;肢体扭力;肢体活动度或灵活性;步行;6分钟步行试验;膝屈肌或伸肌力量;最大等长随意肌收缩;北极星移动评价;通过肢体T2加权MRI测量的肌肉质量、脂肪减少或水肿;肌肉挛缩;四肢关节角度;心脏功能(心率、心输出量、缩短百分率、每搏输出量);呼吸(包括呼吸频率、血氧、补充氧气需要);肌肉坏死;肌肉再生;肌肉萎缩;肌肉炎症;肌肉钙化;肌肉中心成核;肌肉大小或肌纤维大小;寿命;和肌营养不良蛋白或层粘连蛋白 $\alpha 2$ 替代蛋白表达(肌营

养相关蛋白 (utrophin)、网蛋白 (plectin) 1、层粘连蛋白 α 5和集聚蛋白 (agrin))。

8. 包含在SEQ ID NO:2中列出的GALGT2基因盒的rAAV.rh74.MCK.GALGT2。

GALGT2基因治疗的方法和材料

[0001] 政府利益声明

[0002] 本发明是在由美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的 U54 NS055959 和 R01 AR049722 的政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

[0003] 引用序列表并入本发明

[0004] 本申请作为公开的单独部分包含以计算机可读形式提交的序列表 (文件名: 49885PCT_Seqlisting.txt; 14,467 字节—ASCII 文本文件; 2016 年 9 月 15 日创建), 并据此通过引用将该序列表整体并入本发明。

技术领域

[0005] 本公开涉及 GALGT2 多核苷酸的重组腺相关病毒 (rAAV) 递送。本公开提供 rAAV 和使用 rAAV 用于神经肌肉疾病的 GALGT2 基因治疗的方法。示例性的神经肌肉疾病包括但不限于肌营养不良, 如杜氏肌营养不良、先天性肌营养不良 1A 型和肢带型肌营养不良 2D 型。

背景技术

[0006] 肌营养不良 (MD) 是一组遗传性疾病。该组的特点是控制运动的骨骼肌的进行性衰弱和退化。有些形式的 MD 在婴儿期或童年时期形成, 而另一些则可能在中年以后才出现。这些疾病在肌肉无力 (一些形式的 MD 也影响心肌) 的分布和程度、发病年龄、进展速度和遗传模式方面不同。

[0007] 杜氏肌营养不良 (DMD) 是一种类型的 MD, 是肌营养不良最常见的严重儿童期形式, 影响每 5000 名新生男性中的 1 名, 其遗传方式称为 X 连锁隐性遗传。DMD 是由 DMD 基因的突变引起的, 导致骨骼肌和心肌以及胃肠道和视网膜中缺少肌营养不良蛋白 (427KDa)。肌营养不良蛋白不仅保护肌纤维膜不受偏心收缩的影响, 而且还将许多信号蛋白锚定在肌纤维膜附近。DMD 的临床症状通常在 3 至 5 岁首先被注意, 步态改变和运动技能降低通常导致诊断评估。DMD 是持续进行的, 在患者在十二岁时失去步行。从历史上看, 患者在第二个十年后期死于呼吸系统并发症, 但是改善支持性护理, 特别是明智地使用夜间通气支持, 使预期寿命延长了近十年。延长寿命揭示了心脏功能的普遍下降, 伴有扩张型心肌病的并发症。这带来了进一步的临床挑战, 并需要以前不存在的认知和医疗干预。DMD 也可能存在非进行性认知功能障碍。尽管在 DMD 中进行了数百个临床试验, 但是使用皮质类固醇进行治疗仍然是唯一一贯表现出疗效的治疗。当前的 DMD 护理标准包括使用强的松或地夫可特, 其可以延长几年的步行, 代价是有显著的副作用, 并且对生存的任何影响的证据有限。

[0008] 先天性肌营养不良 1A 型 (MCD1A) 是另一类的 MD。MCD1A 属于一组出现在出生或婴儿期的神经肌肉疾病, 其特征为肌张力减退、肌肉无力和肌肉萎缩。MCD1A 代表 30-40% 的先天性肌营养不良, 有一定的区域性差异。患病率预计为 1/30,000。该疾病在出生时或在生命的头几个月出现, 伴随四肢和躯干张力减退和肌肉无力。呼吸和饮食障碍也可能发生。运动发育是延迟和有限的 (坐着或站立只能在有帮助的情况下进行)。婴儿出现早期脊柱僵硬、脊柱侧凸和呼吸功能不全。典型的拉长肌病性面容和眼睛眼肌麻痹的面部受累可能会出现在

以后。癫痫发作是可能的,虽然发生在不到三分之一的受试者中。智力发育是正常的。MCD1A由编码层粘连蛋白 α -2链的LAMA2基因突变引起,是常染色体隐性遗传。目前的治疗是有症状的,包括多学科的方法,物理治疗师、职业治疗师和言语治疗师,目标是优化每个受试者的能力。癫痫发作或其他神经系统并发症需要特殊治疗MDC1A的预后非常严重,大部分患病的儿童不能活到青春期。目前,预后只能通过专心的多学科(尤其是骨科和呼吸)管理来改善。

[0009] 肢带型肌营养不良 (LGMD) 是另一种类型的MD。LGMD是罕见的情况,不同的人发病时间、肌无力区域、心脏和呼吸受累、进展速度和严重程度不同,LGMD的表现不同。LGMD发生在儿童期、青春期、青年期或更迟的时期。男性和女性的患病可能性相等。LGMD导致肩部和骨盆带无力,伴随大腿和手臂附近的肌肉有时也会随时间变弱。腿部的无力往往出现在手臂之前。面部肌肉通常不受影响。随着病情的发展,患者可能会出现行走问题,而且随着时间的推移,患者可能需要使用轮椅。肩部和手臂肌肉的受累可能导致难以抬起手臂过头部和举起物体。在一些类型的LGMD中,可能涉及心脏和呼吸肌肉。

[0010] 至少有十九种形式的LGMD并且其形式通过其相关的遗传缺陷进行分类。

类型	遗传模式	基因或染色体
LGMD1A	常染色体显性	肌收缩蛋白基因
LGMD1B	常染色体显性	层粘连蛋白 A/C 基因
LGMD1C	常染色体显性	小窝蛋白基因
LGMD1D	常染色体显性	染色体 7
LGMD1E	常染色体显性	肌间线蛋白基因
LGMD1F	常染色体显性	染色体 7
[0011] LGMD1G	常染色体显性	染色体 4
LGMD1H	常染色体显性	染色体 3
LGMD2A	常染色体隐性	钙蛋白酶-3 基因
LGMD2B	常染色体隐性	Dysferlin 基因
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	视松蛋白基因
	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	肌联蛋白基因
[0012]	LGMD2K	常染色体隐性	POMT1 基因
	LGMD2L	常染色体隐性	Fukutin 基因
	LGMD2M	常染色体隐性	Fukutin 基因
	LGMD2N	常染色体隐性	POMT2 基因
	LGMD2O	常染色体隐性	POMGnT1 基因
	LGMD2Q	常染色体隐性	网蛋白 (plectin) 基因

[0013] LGMD的专业测试现在可通过国家调试组(NCG)的国家方案诊断获得。

[0014] GALGT2基因(也被称为B4GALNT2)编码 β 1-4-N-乙酰-D-半乳糖胺(β GalNAc)糖基转移酶。已经在三种不同的肌营养不良模型中研究了GALGT2过表达:DMD、LGMD2D和MDC1A[Xu等人,Am.J.Pathol.,175:235-247(2009);Xu等人,Am.J.Pathol.,171:181-199(2007);Xu等人,Neuromuscul.Disord.,17:209-220(2007);Martin等人,Am.J.Physiol.Cell.Physiol.,296:C476-488(2009);和Nguyen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:5616-5621(2002)]。据报道,骨骼肌中的GALGT2过表达可诱导含有 α 1-4-N-乙酰-D-半乳糖胺(GalNAc)碳水化合物的 α 肌营养不良蛋白聚糖的糖基化来生成CT糖类抗原(Neu5Ac/Gc α 2-3[GalNAc β 1-4]Gal β α 1-4GlcNAc β -)。产生的GALGT2糖基转移酶和CT碳水化合物通常限于已经研究的成年人、非人灵长类动物、啮齿动物和所有其他哺乳动物的骨骼肌中的神经肌肉和肌腱结合部[Martin等人,J.Neurocytol.,32:915-929(2003)]。据报道,GALGT2在骨骼肌中的过表达刺激突触外膜的异位糖基化,刺激正常突触蛋白支架的异位过量表达,所述正常突触蛋白是在各种形式的肌营养不良中缺失的蛋白质的直系同源物或同系物,包括肌营养不良蛋白替代物(例如,肌营养相关蛋白(utrophin)、网蛋白1)和层粘连蛋白 α 2替代物(层粘连蛋白 α 5和集聚蛋白(agrins)) [Xu等人2009,上文;Xu等人,Am.J.Pathol.2007,上文;Xu等人,Neuromuscul.Disord.2007,上文;Nguyen等人,上文;Chicoine等人,Mol.Ther.,22:713-724.(2014)。总体来讲,据报道GALGT2对这些替代物的诱导加强了肌纤维膜完整性,防止了肌营养不良蛋白缺失肌肉以及野生型肌肉的肌肉损伤[Martin等人,上文]。据报道,骨骼肌中GALGT2过表达可预防肌肉损伤并抑制肌肉疾病。这在用于DMD的mdx小鼠模型中是真实的[Xu等人,Neuromuscul.Disord.2007,上文;Martin

等人(2009),上文;Nguyen等人,上文],尽管只有一半的纤维被转导,应该注意到改善情况与抗肌萎缩蛋白小基因转移的改善是相等的[Martin等人(2009),上文]。值得注意的是,GALGT2基因转移也被报道在先天性肌营养不良1A型的dy^w模型[Xu等人,Am.J.Path.2007,上文]和肢带型肌营养不良2D型的Sgca^{-/-}小鼠模型中[Xu等人2009,上文]是预防性的。

[0015] 腺相关病毒(AAV)是复制缺陷型细小病毒,其单链DNA基因组长约4.7kb,包括145个核苷酸的反向末端重复序列(ITRs)。有多种血清型的AAV。AAV血清型的基因组的核苷酸序列是已知的。例如,GenBank登录号NC_002077中提供了AAV-1的完整基因组;GenBank登录号NC_001401和文献[Srivastava等人,J.Virol.,45:555-564(1983)]中提供了AAV-2的完整基因组;GenBank登录号NC_1829中提供了AAV-3的完整基因组;GenBank登录号NC_001829中提供了AAV-4的完整基因组;GenBank登录号AF085716中提供了AAV-5基因组;GenBank登录号NC_001862中提供了AAV-6的完整基因组;AAV-7和AAV-8基因组的至少一部分分别以GenBank登录号AX753246和AX753249提供;文献中[Gao等人,J.Virol.,78:6381-6388(2004)]提供了AAV-9基因组;文献[Mol.Ther.,13(1):67-76(2006)]中提供了AAV-10基因组;文献[Virology,330(2):375-383(2004)]中提供了AAV-11基因组。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的ITRs内。三个AAV启动子(基于相对图谱定位命名为p5、p19和p40)驱动两个AAV内部开放阅读框的表达来编码rep和cap基因的。两个rep启动子(p5和p19),外加单个AAV内含子(核苷酸2107和2227)的差别剪接,导致产生来自rep基因的四种rep蛋白(rep 78、rep 68、rep 52和rep 40)。Rep蛋白具有最终负责复制病毒基因组的多种酶学特性。cap基因由p40启动子表达,编码三种衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。选择性剪接和非共有翻译起始位点负责产生三种相关的衣壳蛋白。单一共有腺苷酸化位点位于AAV基因组的图位95上。AAV的生命周期和遗传学参见文献[Muzyczka,Current Topics in Microbiology and Immunology,158:97-129(1992)]。

[0016] AAV具有独特的特征,使其作为用于将外源DNA递送至细胞的载体具有吸引力,例如在基因治疗中。培养细胞的AAV感染是非致细胞病变,人类和其他动物的自然感染是沉默的和无症状的。此外,AAV感染许多哺乳动物细胞,使得在体内靶向许多不同组织成为可能。此外,AAV转导缓慢分裂和非分裂细胞并且可以作为转录活性核附加体(染色体外元件)基本持续这些细胞的寿命。AAV原病毒基因组在感染性上与质粒中克隆的DNA一致,这使重组基因组的构建成为可能。此外,因为指导AAV复制、基因组衣壳化和整合的信号包含在AAV基因组的ITRs内,所以一些或全部约4.3kb的基因组内部(编码复制和结构衣壳蛋白,rep-cap)也许可以取代外源DNA。rep和cap蛋白可以反式提供。AAV的另一个显著特点是它是一个非常稳定和健壮的病毒。它可以轻易承受用于灭活腺病毒的条件(56℃至65℃几个小时)且AAV的冷保存不那么关键。AAV甚至可以被冻干。最后,AAV感染的细胞不能抵抗超感染。

[0017] 称为rh.74的AAV已被用于递送编码各种蛋白质的DNAs。文献[Xu等人,Neuromuscular Disorders,17:209-220(2007)]和文献[Martin等人,Am.J.Physiol.Cell.Physiol.,296:476-488(2009)]涉及杜氏肌营养不良的rh.74表达的细胞毒性T细胞GalNAc转移酶。文献[Rodino-Klapac等人,Mol.Ther.,18(1):109-117(2010)]描述了在通过血管肢体灌注递送AAV rh.74后,抗肌萎缩蛋白小FLAG蛋白标签融合物的AAV rh.74表达。

[0018] 肌营养不良是一组没有可以确认的治疗方式的疾病,严重影响个人、家庭和社区。

成本是不可预料的。个人会遭受情绪紧张、生活质量下降和失去自尊。由肢体功能丧失导致的极度身体上的挑战在日常生活中造成了困难。家庭动力学遭受经济损失和人际关系的挑战。患者同自己的兄弟姐妹疏远,配偶之间的冲突常常导致离婚,特别是如果肌营养不良可以归因于父母亲其中一人。寻求治疗的负担常常变成终生的、高度集中的努力,降低和挑战生活的每一个方面。除了家庭,社区承担财政负担,需要增加设施来使肌营养不良人群适应特殊教育、特殊交通,承担经常住院治疗反复呼吸道感染和心脏并发症的费用。由州和联邦政府机构分担财务责任,将责任扩大到纳税社区。

[0019] 因此,在本领域中仍然需要治疗神经肌肉疾病,包括但不限于肌营养不良如DMD、MDC1A和LGMD2D。

发明内容

[0020] 本发明提供了治疗有需要的受试者的神经肌肉疾病的方法,将重组腺相关病毒(rAAV)如rAAVrh74.MCK.GALGT2给予给受试者,其中:给药途径是肌肉途径并且给药的rAAV的剂量为约 3×10^{11} vg/注射至约 5×10^{12} vg/注射,给药途径是肌肉途径并且给药的rAAV的剂量为约 3×10^{11} vg/注射,给药途径是肌肉途径并且给药的rAAV的剂量为约 1×10^{12} vg/注射,给药途径是肌肉途径并且给药的rAAV的剂量为约 5×10^{12} vg/注射,给药途径是动脉间肢体灌注并且给药的rAAV的剂量为约 6×10^{12} vg/kg/肢至约 4.8×10^{13} vg/kg/肢,给药途径是动脉间肢体灌注并且给药的rAAV的剂量为约 6×10^{12} vg/kg/肢,给药途径是动脉间肢体灌注并且给药的rAAV的剂量为约 1.2×10^{13} vg/kg/肢,给药途径是动脉间肢体灌注并且给药的rAAV的剂量为约 2.4×10^{13} vg/kg/肢,给药途径是动脉间肢体灌注并且给药的rAAV的剂量为约 4.8×10^{13} vg/kg/肢,给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 2×10^{14} vg/kg至约 6×10^{15} vg/kg,给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 4×10^{14} vg/kg至约 6×10^{15} vg/kg,给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 4×10^{14} vg/kg,给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 8×10^{14} vg/kg,给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 2×10^{15} vg/kg或给药途径是全身性静脉给药并且给药的rAAV的剂量为约 6×10^{15} vg/kg。

[0021] 神经肌肉障碍的治疗是预期的,例如杜氏肌营养不良(DMD);贝克肌营养不良;先天性肌营养不良(MDC)1A型、1B型、1C型和1D型;肢带型肌营养不良(LGMD)1A型、1B型、1C型、1D型、1E型、1F型、1G型、1H型、2A型、2B型、2C型、2D型、2E型、2F型、2G型、2H型、2I型、2J型、2K型、2L型、2M型、2N型、2O型和2Q型;Bethlem肌病;Ullrich先天性肌营养不良;肌-眼-脑病;福山型先天性肌营养不良;沃克-沃伯格综合征;强直性肌营养不良;肌无力综合征;先天性肌无力症;包涵体肌病;包涵体肌炎;Emery-Dreifuss型肌营养不良;远端肌营养不良;皮肌炎;中央核肌病;面肩肱型肌营养不良;Myoshi型肌病;线粒体肌病;线状体肌病;Nonaka肌病;重症肌无力和多肌炎。因此,其中肌营养不良是预期的神经肌肉疾病。

[0022] 该方法使得受试者在以下方面得到改善:例如绝对肌比力;离心肌肉收缩时力量衰减;血清CK水平;血清心肌肌钙蛋白水平;血清MMP9水平;握力;肢体扭力;肢体活动度或灵活性;步行;6分钟步行试验;膝屈肌或伸肌力量;最大等长随意肌收缩;北极星移动评价;通过肢体T2加权MRI测量的肌肉质量、脂肪减少或水肿;肌肉挛缩;四肢关节角度;心脏功能(心率、心输出量、缩短百分率、每搏输出量);呼吸(包括呼吸频率、血氧、补充氧气需要);肌

肉坏死;肌肉再生;肌肉萎缩;肌肉炎症;肌肉钙化;肌肉中心成核;肌肉大小或肌纤维大小;寿命;和/或肌营养不良蛋白或层粘连蛋白 $\alpha 2$ 替代蛋白表达(肌营养相关蛋白、网蛋白1、层粘连蛋白 $\alpha 5$ 和集聚蛋白)。

[0023] 本发明还提供了编码GALGT2多肽的rAAV,例如rAAVrh74.MCK.GALGT2。

具体实施方式

[0024] 本公开提供了用于治疗神经肌肉疾病的方法和产品。该方法涉及使用AAV作为基因递送载体将GALGT2多核苷酸递送至受试者中的肌肉细胞。受试者包括但不限于哺乳动物诸如狗、猫和人。在一些实施例中,受试者是人类患者。在一些实施例中,受试者是人类儿科患者。

[0025] 在一个方面,提供了用于治疗神经肌肉疾病的方法,包括给药给受试者重组腺相关病毒(rAAV)编码GALGT2。

[0026] 本发明考虑的神经肌肉疾病包括但不限于肌营养不良症(MD)。本发明考虑的神经肌肉病症还包括MD以外的神经肌肉疾病。因此,在一些实施例中,本发明考虑的神经肌肉疾病包括但不限于杜氏肌营养不良(DMD);贝克肌营养不良;先天性肌营养不良(MDC) 1A型、1B型、1C型和1D型;肢带型肌营养不良(LGMD) 1A型、1B型、1C型、1D型、1E型、1F型、1G型、1H型、2A型、2B型、2C型、2D型、2E型、2F型、2G型、2H型、2I型、2J型、2K型、2L型、2M型、2N型、2O型和2Q型;Bethlem肌病;Ullrich先天性肌营养不良;肌-眼-脑病;福山型先天性肌营养不良;沃克-沃伯格综合征;强直性肌营养不良;肌无力综合征;先天性肌无力症;包涵体肌病;包涵体肌炎;Emery-Dreifuss型肌营养不良;远端肌营养不良;皮肌炎;中央核肌病;面肩肱型肌营养不良;Myoshi型肌病;线粒体肌病;线状体肌病;Nonaka肌病;重症肌无力和多肌炎。在一些实施例中,MD是DMD。在一些实施例中,MD是MDC1A。在一些实施例中,MD是LGMD2D。

[0027] 在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者至少1岁(例如,至少1岁、2岁、3岁、4岁、5岁、6岁、7岁、8岁、9岁、10岁、11岁、12岁、13岁、14岁、15岁、16岁、17岁、18岁、19岁或20岁)或更老。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者是男性。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者是女性。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者在治疗时是可走动的。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者在治疗开始时是不可走动的。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者是使用临床上接受的定义突变的技术在DMD基因中具有确认的突变的受试者。肌营养不良蛋白基因突变产生DMD表型在本领域中是众所周知的,在受试者中识别它们的方法也是众所周知的。参见例如荷兰莱顿大学医学中心莱顿杜氏肌营养不良突变数据库和文献[Aartsma-Rus等人, Hum. Mut., 30:293-299 (2009)]。

[0028] 在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者通过趾短伸肌(EDB)肌肉的磁共振成像显示足够肌肉质量的保存以允许转染或基因转移。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,例如在开始治疗前至少4(例如5、6、7、8、9、8、9、10、11或12)周,所述受试者正在接受稳定剂量的皮质类固醇治疗(例如,地夫可特、强的松或其一般形式)。在某些实施例中,所述受试者进行背景类固醇治疗(例如,间歇性或慢性/持续背景类固醇治疗)。本领域技术人员将会理解,这样的受试者是正在使用类固醇(或皮质类固醇)的受试者,在其上施用另一种治疗,例如本发明所述的基因疗法。

[0029] 在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者是不具有活性病毒感染的受试者。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者在没有功能缺陷或功能丧失的情况下不具有DMD突变。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者没有表现出心肌病的症状,例如劳力性呼吸困难、足部水肿、平躺时呼吸短促或肺部啰音。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者通过超声心动图不具有低于约40%的射血分数。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者不是血清学证明在治疗HIV感染(因为所述受试者可能处于免疫受损状态)或A型、B型或C型肝炎(因为受试者可能有转氨酶升高)时的受试者。

[0030] 在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者尚未被诊断,没有或未被治疗过自身免疫性疾病。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者不具有持续性白细胞减少症或白细胞增多症(白细胞计数 $\leq 3.5\text{K}/\mu\text{L}$ 或 $\geq 20.0\text{K}/\mu\text{L}$)或绝对嗜中性粒细胞计数 $< 1.5\text{K}/\mu\text{L}$ 。

[0031] 在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者不具有伴随疾病(例如,病毒感染或自身免疫疾病)或慢性药物治疗的要求,据执业医师的见解,所述慢性药物治疗产生不必要的基因转移风险。

[0032] 在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者不具有通过ELISA免疫测定法确定的rAAVrh74结合抗体滴度 $\leq 1:400$ 。在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者不具有通过ELISA免疫测定法确定的rAAVrh74结合抗体滴度 $\leq 1:50$ 。

[0033] 在本发明所述的任何方法的一些实施例中,所述受试者不具有例如通过受试者生物样品ELISA免疫测定法确定的可检测的循环抗Sda抗体[Blood groups: P, I, Sda, and Pr. AABB (1991)]。Sda聚糖是由GALGT2生成的人类血型结构。Sda血型抗原与小鼠中GALGT2生成的CT聚糖结构[GalNAcb1,4[Neu5Aca2,3]Galb1,4GlcNAc-]是相同的。尽管本公开不受任何特定理论或作用机制的束缚,但预期在表达GALGT2的细胞中可增强CT聚糖结构的存在或含量,并且发明人相信具有此类Sda抗体的受试者估计为受试者群体的0.2%,在rAAVrh74.MCK.GALGT2治疗后可能处于抗体介导的组织排斥的风险中。

[0034] 用于本发明所述的方法中的合适的生物样品包括例如任何生物体液。生物样品可以是例如从受试者(例如,哺乳动物如人类)获得的样品,或者可以来源于这样的受试者。生物样品可以来自肌肉活组织检查。生物样品也可以是生物体液,例如尿液、全血或其中的部分(例如血浆或血清)、唾液、精液、痰液、脑脊液、眼泪或粘液。如果需要,可以将生物样品进一步分馏成含有特定分析物(例如蛋白质)的分馏物。例如,可以将全血样品分馏成血清或含有特定类型蛋白质的分馏物。如果需要,生物样品可以是来自受试者的不同生物样品的组合,例如两种不同体液的组合。

[0035] 适用于本发明的生物样品可以是受试者收集的新鲜或冷冻样品,或具有已知的诊断、治疗和/或结果历史的档案样品。生物样品可以从受试者获得,例如,怀疑患有或有风险发展成癌症或感染(例如病毒感染)的受试者。可以采用任何合适的获得生物样品的方法,尽管示例性方法包括,例如,开放式肌肉活组织检查、静脉切开术、拭子(例如口腔拭子)、灌洗或细针吸取活组织检查程序。生物样品也可以从骨髓或脾脏中获得。

[0036] 在一些实施例中,可以从生物样品制备蛋白质提取物。在一些实施例中,蛋白质提取物含有总蛋白质含量。蛋白质提取方法在本领域是众所周知的。参见例如文献[Roe

“Protein Purification Techniques: A Practical Approach”, 第2版, Oxford University Press (2001)]。许多不同的和通用的试剂盒可以用于从体液和组织中提取蛋白质并且所述试剂盒可以从例如美国加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐生命医学产品公司 [BioRad Laboratories (Hercules, CA)]、美国加利福尼亚州山景城的碧迪医疗器械有限公司 [BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA)]、美国加利福尼亚州特曼库拉的 Chemicon 国际有限公司 [Chemicon International, Inc. (Temecula, CA)]、美国加利福尼亚州圣地亚哥的 Calbiochem 公司 [Calbiochem (San Diego, CA)]、美国伊利诺伊州罗克福德的 Pierce 生物技术公司 [Pierce Biotechnology (Rockford, IL)] 和美国加利福尼亚州卡尔斯巴德市的英杰生命技术有限公司 [Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA)] 购买。

[0037] 获得和/或保存生物样品的方法保存生物样品中细胞的活性或完整性是本领域技术人员熟知的。例如, 生物样品可以进一步与一种或多种另外的试剂接触, 例如合适的缓冲液和/或抑制剂, 包括蛋白酶抑制剂, 所述试剂旨在保持或最小化蛋白质结构中的变化 (例如, 渗透压或 pH 的变化)。这类抑制剂包括例如乙二胺四乙酸 (EDTA)、乙二醇四乙酸 (EGTA) 等螯合剂, 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、抑肽酶和亮抑酶肽等蛋白酶抑制剂。例如, 在文献 [Pollard 和 Walker, “Basic Cell Culture Protocols,” Methods in Molecular Biology 第75卷, Humana Press (1997); Masters, “Animal cell culture: a practical approach,” Practical Approach Series 第232卷, Oxford University Press (2000); 以及 Jones “Human cell culture protocols,” Methods in Molecular Medicine 第2卷, Humana Press (1996).] 所描述的合适的缓冲液和储存条件或者操作全细胞。

[0038] 本公开的治疗神经肌肉疾病的方法导致用 GALGT2 多核苷酸转导肌肉细胞 (例如骨骼肌、平滑肌或心肌细胞)。本公开的包含 rAAV 的组合物对于受试者的有效剂量或有效多剂量是防止和减缓进展或改善 (消除或减少) 与被治疗的神经肌肉障碍相关的肌肉病理学。对肌肉病理学的影响可以通过本领域中一个或多个测量标准的改进来证明, 例如: 绝对肌比力; 离心肌肉收缩时力量衰减; 血清 CK 水平; 血清心肌肌钙蛋白水平; 血清 MMP9 水平; 握力; 肢体扭力; 肢体活动度或灵活性; 步行; 6 分钟步行试验; 膝屈肌或伸肌力量; 最大等长随意肌收缩; 北极星移动评价; 通过肢体 T2 加权 MRI 测量的肌肉质量、脂肪减少或水肿; 肌肉挛缩; 四肢关节角度; 心脏功能 (心率、心输出量、缩短百分率、每搏输出量); 呼吸 (包括呼吸频率、血氧、补充氧气需要); 肌肉坏死; 肌肉再生; 肌肉萎缩; 肌肉炎症; 肌肉钙化; 肌肉中心成核; 肌肉大小或肌纤维大小; 寿命; 和肌营养不良蛋白或层粘连蛋白 $\alpha 2$ 替代蛋白表达 (肌营养相关蛋白、网蛋白 1、层粘连蛋白 $\alpha 5$ 和集聚蛋白)。参见例如文献 [Forbes 等人, Radiology, 269 (1): 198-207 (2013); Govoni 等人, Cell Mol. Life Sci., 70 (23): 4585-4602 (2013)]; 和文献 [Chandrasekharan and Martin, Methods Enzymol., 479: 291-322 (2010)]。如果在发生神经肌肉障碍之前给予剂量, 则给药是预防性的。如果在发生神经肌肉疾病之后给予剂量, 则给药是治疗性的。因此, 用本发明所述的方法治疗所述受试者被认为是预防、减缓或防止神经肌肉疾病的进展、减少神经肌肉疾病的程度、缓解 (部分或全体) 神经肌肉疾病和/或延长神经肌肉疾病存活。

[0039] 在一些实施例中, 本发明所述的任何方法可进一步包括检测或测量用 GALGT2 转基因转导的细胞中 GALGT2 的表达水平。测量 mRNA 或蛋白质表达的方法在本领域中是众所周知的 (例如免疫测定法, 如免疫印迹)。

[0040] 在一些实施例中,本发明所述的任何方法可进一步包括检测或测量用GALGT2多核苷酸转导的细胞中表达的CT抗原的含量[Chicoine等人,上文]。

[0041] 在一些实施例中,本发明所述的任何方法可进一步包括检测或测量用GALGT2多核苷酸转导的细胞中表达的肌营养相关蛋白的含量[Chicoine等人,上文]。

[0042] 在一些实施例中,本发明所述的任何方法可以进一步包括检测或测量含有中央核的纤维的数量,所述纤维用GALGT2多核苷酸转导。

[0043] 因此,上述方法中考虑的rAAV的给药途径包括但不限于腹膜内(IP),肌肉内(IM)和血管内[包括例如动脉间肢体灌注(ILP)和静脉内(IV)]途径。

[0044] 在本公开的方法中待给药的rAAV的剂量将根据例如具体的rAAV、给药模式、治疗目标、个体和所针对的细胞类型而变化并且可以由本领域标准的方法确定。可以给予多于一剂的剂量,例如一次、两次、三次或更多次剂量。rAAV的剂量滴度可以是每毫升约 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} 、约 1×10^{14} 或约 1×10^{15} 或更多的DNA酶耐受颗粒(DRP)。剂量也可以以病毒基因组(vg)单位表示(即分别为 1×10^7 vg、 1×10^8 vg、 1×10^9 vg、 1×10^{10} vg、 1×10^{11} vg、 1×10^{12} vg、 1×10^{13} vg、 1×10^{14} vg、 1×10^{15} vg)。AAV滴定的方法在文献[Clark等人, Hum. Gene Ther., 10:1031-1039 (1999)]中描述。

[0045] 在上述的方法一些实施中,给药途径是IM途径,所给予的rAAV的剂量为约 3×10^{11} 至至少约 5×10^{12} vg/注射。(本发明中的所有范围旨在表示范围中的每个单独的值以及每个范围的单独的上限值和下限值)。在上述的方法一些实施中,给药途径是IM途径,所给予的rAAV的剂量是 3×10^{11} vg/注射。在上述的方法一些实施中,给药途径是IM途径,所给予的rAAV的剂量是 1×10^{12} vg/注射。在上述的方法一些实施中,给药途径是IM途径,所给予的rAAV的剂量是 5×10^{12} vg/注射。

[0046] 在上述的方法一些实施中,给药途径是ILP途径,所给予的rAAV的剂量为约 6×10^{12} 至至少约 4.8×10^{13} vg/kg。(本发明中的所有范围旨在表示范围中的每个单独的值以及每个范围的单独的上限值和下限值)。在上述的方法一些实施中,给药途径是ILP途径,所给予的rAAV的剂量是 6×10^{12} vg/kg/肢。在上述的方法一些实施中,给药途径是ILP途径,所给予的rAAV的剂量是 1.2×10^{13} vg/kg/肢。在上述的方法一些实施中,给药途径是ILP途径,所给予的rAAV的剂量是 2.4×10^{13} vg/kg/肢。在上述的方法一些实施中,给药途径是ILP途径,所给予的rAAV的剂量是 4.8×10^{13} vg/kg/肢。

[0047] 在上述的方法一些实施中,给药途径是全身IV途径,所给予的rAAV的剂量为约 2×10^{14} 至至少约 6×10^{15} vg/kg。在上述方法的一些实施例中,给药途径是全身IV途径,所给予的rAAV的剂量为约 4×10^{14} 至至少约 6×10^{15} vg/kg。(本发明中的所有范围旨在表示范围中的每个单独的值以及每个范围的单独的上限值和下限值)。在上述方法的一些实施例中,给药途径是全身IV途径,所给予的rAAV的剂量是 4×10^{14} vg/kg。在上述的方法一些实施中,给药途径是全身IV途径,所给予的rAAV的剂量是 8×10^{14} vg/kg。在上述的方法一些实施中,给药途径是全身IV途径,所给予的rAAV的剂量是 2×10^{15} vg/kg。在上述的方法一些实施中,给药途径是全身IV途径,所给予的rAAV的剂量是 6×10^{15} vg/kg。

[0048] 人类患者是本发明考虑的用于治疗的患者。人类患者是本发明考虑的通过IM递送治疗的患者。这些患者包括那些患者例如:(i)年龄在9岁或以上,(ii)是男性,(iii)是

可走动的或不可走动的；(iv) 使用临床上接受的定义突变的技术在DMD基因中具有确认的突变；(v) 通过对趾短伸肌 (EDB) 肌肉的磁共振成像显示保持足够的肌肉质量以允许转染或基因转移；(vi) 属于任何民族；(vii) 有能力配合所有学习程序；(viii) 如果适当的话，性成熟和/或性活跃，愿意进行可靠的避孕方法；和/或 (ix) 在基因转移之前至少12周接受稳定剂量的皮质类固醇治疗 (例如，地夫可特、强的松或其一般形式)。合适的患者可以不包括例如：(i) 具有临床观察的活性病毒感染；(ii) 具有无功能虚弱或丧失的DMD突变；(iii) 出现心肌病症状，例如劳力性呼吸困难，足部水肿、平躺时呼吸短促或肺部啰音；(iv) 通过超声心动图，射血分数低于约40%的人；(v) 血清学证明感染HIV或A型、B型或C型肝炎；(vi) 已经患有或已经被诊断为患有 (或正在接受治疗) 的自身免疫性疾病的人；(vii) 持续性白细胞减少症或白细胞增多症 (白细胞计数 $\leq 3.5\text{K/L}$ 或 $\geq 20.0\text{K/L}$) 或绝对嗜中性粒细胞计数 $< 1.5\text{K/L}$ ；(viii) 具有伴随疾病 (例如，病毒感染或自身免疫疾病) 或慢性药物治疗的要求的人，据执业医师的见解，所述慢性药物治疗产生不必要的基因转移风险。(ix) 通过ELISA免疫测定法确定的rAAVrh74结合抗体滴度 $\geq 1:400$ ；或 (x) 存在循环抗Sda抗体。在一个示例性的临床方案中，DMD患者接受双侧注射，每个患者的一个趾短伸肌 (EDB) 肌肉接受载体 rAAVrh74.MCK.GALGT2，每个患者的另一个EDB肌肉单独接受盐水。受试者接受 $1 \times 10^{12}\text{vg}$ (总剂量) 剂量的载体。

[0049] 上文和下文所述方法的细胞转导效率可以是至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些涉及IV肢灌注递送的实施例中，通过增加递送rAAV的组合物的量、递送rAAV之前的预冲洗和/或增加所述rAAV的停留时间来增加转导效率。

[0050] 另一方面，本发明提供了rAAV基因组。所给予的rAAV的基因组包含在转录控制序列控制下的GALGT2多核苷酸。rAAV基因组缺少AAV rep和cap DNA。在rAAV基因组中的AAV DNA可能来自可以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和AAVrh74。这些AAV血清型的基因组的核苷酸序列在本领域中是已知的，如上文背景技术部分所述。在一些实施例中，rAAV基因组中的AAV DNA来自AAV rh.74。AAV rh.74基因组的多核苷酸序列在SEQ ID NO:1中列出，其中核苷酸210-2147是Rep 78基因开放阅读框，882-208是Rep52开放阅读框，2079-2081是Rep78终止，2145-2147是Rep78终止，1797-1800是剪接受体位点，2094-2097是剪接受体位点，2121-2124是剪接受体位点，174-181是p5启动子+1预测，145-151是p5TATA盒，758-761是p19启动子+1预测，732-738是p19TATA盒，1711-1716是p40TATA盒，2098-4314是VP1 Cap基因开放阅读框，2509-2511是VP2起始，2707-2709是VP3起始，4328-4333是polyA信号。

[0051] 在一些实施例中，rAAV基因组的转录控制序列是肌肉特异性的控制元件，包括但不限于来源于肌动蛋白和肌球蛋白基因家族，例如来自myoD基因家族[Weintraub等人，Science, 251:761-766 (1991)]、肌细胞特异性增强子结合因子MEF-2[Cserjesi和Olson, Mol.Cell.Biol., 11:4854-4862 (1991)]、源自骨骼肌肌动蛋白基因的控制元件[Muscat等人，Mol.Cell.Biol., 7:4089-4099 (1987)]、心脏肌动蛋白基因、肌肉肌酸激酶基因 (MCK) 启动子[Johnson等人，Mol.Cell.Biol., 9:3393-3399 (1989)]和MCK增强子、MHCK7启动子 (改良版MCK启动子包含肌球蛋白重链的增强子[Salva等人，Mol.Ther., 15:320-329 (2007)])、肌间线蛋白启动子、源自骨骼肌快肌肌钙蛋白C基因、慢肌心肌肌钙蛋白C基因和慢肌肌钙

蛋白I基因的调控因子:缺氧诱导核因子[Semenza等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:5680-5684(1991)]、类固醇诱导元件和启动子包括糖皮质激素响应元件(GRE)[Mader和White,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:5603-5607(1993)]和其他控制元件。在一些实施例中,转录调控元件包括MCK启动子。在一些实施例中,转录控制元件包括MHCK7启动子。

[0052] 在一些实施例中,rAAV基因组中的GALGT2多核苷酸是Genbank登录号#AJ517771列出的GALGT2 cDNA(作为SEQ ID NO:2的核苷酸1002-2522列出)。在一些实施例中,rAAV基因组中的GALGT2多核苷酸是Genbank登录号#AJ517771中列出的GALGT2cDNA,或者是具有与GALGT2 cDNA80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一些实施例中,变体GALGT2多核苷酸编码的GALGT2多肽与Genbank登录号为#AJ517771中列出的GALGT2 cDNA编码的多肽相同。在Genbank登录号为#AJ517771中列出的GALGT2 cDNA编码的GALGT2多肽的氨基酸序列在SEQ ID NO:3中列出。在一些实施例中,变体GALGT2多核苷酸编码具有至少一个氨基酸序列变异的变体GALGT2多肽对比在Genbank登录号为#AJ517771中列出的GALGT2 cDNA编码的多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。氨基酸序列改变可以是例如一个或多个氨基酸的取代、缺失或插入,优选保守的取代。变体GALGT2多肽可具有保留多肽的糖基转移酶活性的氨基酸取代、缺失或插入的任何组合。一方面,变体GALGT2多肽可以具有许多氨基酸改变,使得其氨基酸序列与由Genbank登录号为#AJ517771中列出的GALGT2 cDNA编码氨基酸序列(SEQ ID NO:3)具有至少60、70、80、85、90、95、97、98、99或99.5%的同一性。

[0053] 在一些实施例中,rAAV基因组是MCK.GALGT2基因组,GALGT2基因盒的序列在SEQ ID NO:2中列出,并且有如下注释。

[0054]

起始核苷酸	终止核苷酸	名称	描述
53	230	5'末端反向重复序列	野生型 AAV2 末端反向重复序列
236	442	MCK 增强子	小鼠肌肌酸激酶基因增强子
443	793	MCK 核心启动子	小鼠肌肌酸激酶基因核心启动子
794	846	Mu MCK 外显子 1	小鼠肌肌酸激酶基因外显子 1 原生转录起始点 (非翻译的)
847	943	SV40 内含子	SV40 晚期 16S/19S 剪接供体和受体部位

[0055]

944	1000	5'非翻译区	来自 pCMVb 质粒的 5'非翻译区
1002	2522	人 GALGT2 cDNA	人 GALGT2 cDNA
2531	2579	Syn pA	人工多聚腺苷酸化信号
2581	2762	3'末端反向重复序列	野生型 AAV2 末端反向重复序列

[0056] 另一方面,提供了包含SEQ ID NO:2中所描述的核苷酸序列的分离的核酸。在一些实施例中,分离的核酸由SEQ ID NO:2中所描述的核苷酸序列组成。

[0057] 还提供了分离的核酸,其从5'至3'依次包含:(i)第一AAV2末端反向重复序列(ITR);(ii)肌肉肌酸激酶启动子序列;(iii)编码人GALGT2多肽的核苷酸序列;和(iv)第二

AAV2末端反向重序列,其中所述人GALGT2多肽具有与SEQ ID NO:3至少90%相同的氨基酸序列,与SEQ ID NO:3 100%相同或者是由SEQ ID NO:2核苷酸1002-2522编码的。

[0058] 考虑包含上述核酸的重组AAV以及包含与SEQ ID NO:2中描述的核苷酸序列至少90%相同的核苷酸序列的rAAV。

[0059] 提供了包含本公开的rAAV基因组的DNA质粒。所述DNA质粒包含本发明考虑的rAAV基因组。将所述DNA质粒转移到允许用AAV辅助病毒(例如,腺病毒、E1缺失的腺病毒或疱疹病毒)感染的细胞中来将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,其中将要包装的AAV基因组,rep和cap基因和辅助病毒功能提供给细胞。rAAV的产生需要以下组分存在于单个细胞(本发明称为包装细胞)内:rAAV基因组,从所述rAAV基因组中分离(即不在rAAV基因组中)的AAVrep和cap基因以及辅助病毒功能。所述的AAV rep和cap基因可以来自重组病毒可以衍生重组病毒的任何AAV血清型,可以来自与rAAV基因组ITRs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和AAVrh74。例如,假病毒rAAV的产生公开于WO 01/83692中。也考虑了其他类型的rAAV变体,例如具有衣壳突变的rAAV。参见例如文献[Marsic等人,Molecular Therapy,22(11):1900-1909(2014)]。

[0060] 产生包装细胞的方法是产生稳定表达AAV颗粒生产所需的所有组分的细胞系。例如,将包含缺乏AAV rep和cap基因的rAAV基因组的质粒(或多个质粒)、从所述rAAV基因组分离的AAV rep和cap基因以及选择标记如新霉素抗性基因整合到细胞中的基因组中。通过例如GC加尾的程序(Samulski等人,1982,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,79:2077-2081)、加入含有限制性内切酶切割位点的合成接头(Laughlin等人,1983,Gene,23:65-73)或直接和平端连接(Senapathy&Carter,1984,J.Biol.Chem.,259:4661-4666)将AAV基因组引入细菌质粒中。然后用辅助病毒如腺病毒感染包装细胞系。这种方法的优点在于所述细胞是可选择的并且适合rAAV大规模生产。合适方法的其他例子使用腺病毒或杆状病毒而不是质粒将rAAV基因组和/或rep和cap基因引入包装细胞。产生具有自身互补基因组的rAAV的方法也是本领域已知的。

[0061] rAAV生产的一般原理在例如文献[Carter,1992,Current Opinions in Biotechnology,1533-539;和Muzyczka,1992,Curr.Topics in Microbial.and Immunol.,158:97-129]进行了综述。多种方法在文献[Ratschin等人,Mol.Cell.Biol.4:2072(1984); Hermonat等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6466(1984);Tratschin等人,Mol.Cell.Biol.5:3251(1985);McLaughlin等人,J.Virol.,62:1963(1988);和Lebkowski等人,1988Mol.Cell.Biol.,7:349(1988)。Samulski等人(1989,J.Virol.,63:3822-3828)];美国专利号5,173,414;WO 95/13365和相应的美国专利号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;文献[Perrin等人(1995)Vaccine 13:1244-1250;Paul等人(1993)Human Gene Therapy 4:609-615];文献[Clark等人(1996)Gene Therapy 3:1124-1132];美国专利号5,786,211;美国专利号5,871,982;美国专利号6,258,595中描述。上述文献在此通过引用整体并入本发明,特别强调与rAAV生产相关的文献的那些部分。

[0062] 另一方面,本公开因此提供了产生感染性rAAV的包装细胞。在一个实施例中,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系)。在另一个实施例中,包装细胞不是转化癌细胞的细胞,例如低传代293细胞(用腺病毒E1转化的人胚胎肾细胞)、MRC-5细胞(人胚胎成纤维细胞)、WI-38细胞(人胚胎成纤维细胞)、Vero细胞(猴肾细胞)和FRhL-2细胞(恒河猴胚胎肺细胞)。

[0063] 所述rAAV可以通过本领域的标准方法纯化,例如通过柱色谱或氯化铯梯度。从辅助病毒纯化rAAV载体的方法是本领域已知的并且包括在例如文献[Clark等人, Hum. Gene Ther., 10 (6) :1031-1039 (1999); Schenpp和Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002)]和美国专利号6,566,118和WO 98/09657中公开的方法。

[0064] 因此,另一方面,本公开考虑包含GALGT2多核苷酸的rAAV。在一些实施例中,所述rAAV包含AAV rh74衣壳和GALGT2多核苷酸。在一些实施例中,rAAV的基因组缺乏AAV rep和cap DNA。在所述方法的一些实施例中,所述rAAV是rAAVrh74.MCK.GALGT2。在一些实施例中,所述rAAV是自我互补的基因组。

[0065] 另一方面,本公开考虑包含本发明所述的rAAV的组合物。本公开的组合物包含药学上可接受的载体中的rAAV。所述组合物还可以包含其它成分如稀释剂。可接受的载体和稀释剂对接受者是无毒的并且优选在所用的剂量和浓度下是惰性的,包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐或其它有机酸;抗氧化剂如抗坏血酸;低分子量多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、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;螯合剂如EDTA;糖醇如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐平衡离子如钠;和/或非离子表面活性剂如吐温、普朗尼克类或聚乙二醇(PEG)。在一些实施例中,将所述rAAV在Tris、MgCl₂、NaCl和普朗尼克F68中配制。在一些实施例中,将所述rAAV在含有0.001%普朗尼克F68的20mM Tris (pH8.0)、1mM MgCl₂和200mM NaCl中配制。

[0066] 本发明也考虑组合治疗。如本发明所使用的组合包括同时治疗或序贯治疗。本公开的方法与标准医学治疗(例如,皮质类固醇和/或免疫抑制药物)的组合是特别考虑的,与和新治疗的组合一样。在不同的实施例中,受试者在皮质类固醇治疗之前、之中或之后(或以三种可能性中的两种或更多种的组合的任意排列),受试者根据本发明所考虑的方法治疗。

[0067] 无菌可注射溶液通过将在合适溶剂中的rAAV以需要的含量和与以上列举的各种其他成分进行合并,如果需要,再进行过滤除菌。一般来说,通过将灭菌的活性成分合并入含有基本分散介质和所需的以上列举的各种其他成分的无菌载体中来制备分散体。在用于制备无菌可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。所述方法从先前的无菌过滤溶液中产生活性成分加任何另外的所需成分的粉末。

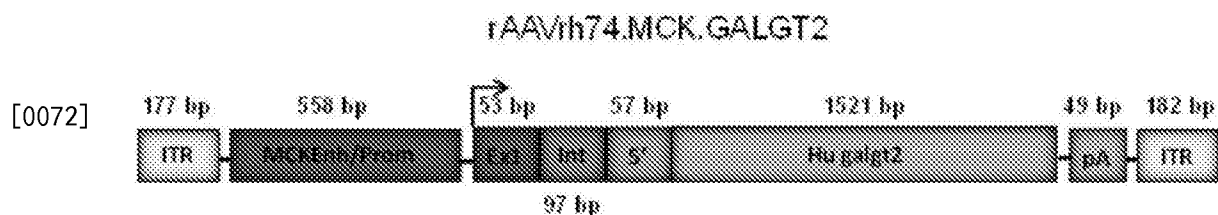
[0068] 实施例

[0069] 因此,通过以下实施例来说明本发明的方面和实施方式。

[0070] 实施例1

[0071] 生成称为rAAVrh74.MCK.GALGT2的非复制型rAAV。rAAV载体在肌肉肌酸激酶基因启动子(MCK;肌肉特异性启动子)的控制下含有完整的人GALGT2 cDNA (Genbank登录号为# AJ517771)。使用MCK启动子/增强子序列驱动肌肉特异性基因表达并且MCK启动子/增强子序列由与351bp MCK核心启动子(近端)融合的小鼠MCK核心增强子(206bp)组成。在核心启

动子后,存在53bp的内源小鼠MCK外显子1(非翻译的)用于有效的转录起始,接着是SV40后期16S/19S剪接信号(97bp)和小的5'UTR(61bp)。内含子和5'UTR来源于质粒pCMV β (Clontech)。GALGT2盒具有ATG启动前的共有Kozak序列和mRNA终止小53bp合成polyA信号。所述人GALGT2盒先前在文献[Martin等人(2009),上文]中进行描述。所包含的唯一病毒序列是病毒DNA复制和包装所需的AAV2的末端反向重复序列(ITR)。pAAVrh74.MCK.GALGT2质粒含有侧接AAV2末端反向重复序列(ITR)的人GALGT2 cDNA表达盒。基因盒包括MCK启动子、具有用于优化基因表达的Kozak序列的嵌合内含子、人GALGT2编码序列和polyA信号。具有侧接AAV ITR的基因盒的序列在SEQ ID NO:2中列出。



[0073] 包含GALGT2多核苷酸的AAV载体通过在HEK293细胞中的无腺病毒三重质粒DNA转染(CaPO₄沉淀)方法的修饰的交叉包装方法中产生[Rabinowitz等人,J.Virol.,76:791-801(2002)]。通过以与之前描述的相似的方式通过共转染含有GALGT2多核苷酸的质粒与AAV辅助质粒rep2-cap rh.74和腺病毒辅助质粒来产生载体[Wang等人,Gene.Ther.,10:1528-1534(2003)]。质粒rep2-cap rh.74编码野生型AAV2rep基因和rh.74 cap基因并且腺病毒辅助质粒(pAdhelper)表达高滴度rAAV生产的腺病毒5型E2A、E4ORF6和VA I/II RNA基因。

[0074] 通过如之前所述的顺序碘克沙醇梯度纯化和线性NaCl盐梯度阴离子交换柱层析法[Clark等人,Hum.Gene Ther,10:1031-1039(1999)],载体从澄清的293细胞裂解物中纯化。使用如之前所述的带MCK特异性引物/探针组和Prism 7500 Taqman检测器系统(PE Applied Biosystems)基于QPCR的检测(Clark等人,上文)来测量载体基因组(vg)的滴度。载体滴度介于 $1-40 \times 10^{12}$ vg/mL之间。

[0075] 载体在含有0.001%普朗尼克F68的20mM Tris(pH8.0)、1mM MgCl₂和200mMNaCl中配制。载体以冷冻液体的形式提供,该冷冻液体在临床给药前解冻。

[0076] 实施例2

[0077] DMD受试者IM递送

[0078] 人类患者是本发明考虑的通过IM递送治疗的受试者。在一个示例性的临床方案中,DMD患者接受双侧注射,每个患者的一个趾短伸肌(EDB)肌肉接受载体rAAVrh74.MCK.GALGT2,每个患者的另一个EDB肌肉单独接受盐水。第一组中的受试者接受 3×10^{11} vg(总剂量)的低剂量载体。第二组中的受试者接受更高剂量的 1×10^{12} vg(总剂量)的载体。

[0079] 在运输至临床环境之前,制备适当的载体稀释液。注射用稀释液用生理盐水按1:1稀释。将载体保持在冰上(不冷冻)直至给药并在制备8小时内给予受试者。rAAVrh74.MCK.GALGT2的处理遵循生物安全1级载体的合规标准。参见www4.od.nih.gov/oba/RAC/guidelines_02/APPENDIX_G.htm#_Toc7246561。

[0080] 通过临床检查受试者具有肌无力。在适当的临床病史环境下,DMD的基因诊断的建

立基于与DMD相一致的DMD基因突变。在这项研究中,所有受试者都是不可走动的,在诊断为DMD的年龄范围内(即在不使用类固醇治疗的情况下小于12岁或者在长期使用类固醇治疗的情况下小于15岁)丧失了步行。受试者在治疗前接受12周稳定剂量的皮质类固醇治疗(强的松或地夫可特或其一般形式)。

[0081] 载体或对照通过直接肌肉注射递送到受试者一只脚的趾短伸肌(EDB)肌肉中,而另一只脚单独接受盐水。对12岁以下的参与者使用清醒镇静剂。基因转移前至少1小时,12岁以上的患者可能接受清醒镇静剂或镇静剂(如氯羟去甲安定)。此外,将基因转移位点上的皮肤用结合在乳膏基质(EMLA乳膏)或纤维素盘(EMLA贴剂)中的利多卡因/丙胺卡因低共熔混合物进行预处理。可以使用可比较的基于乳膏的麻醉,例如利多卡因乳膏。程序在无菌条件下进行。注射部位用连续三次用不含碘的手术准备棉签进行清洗并用一次性无菌盖布覆盖。使用标准的临床多普勒超声与转导器周围的无菌护套以维持注射区域的无菌性。为了向EDB载体注射rAAVrh74.MCK.GALGT2或安慰剂,使用同时进行肌电图记录和流体注射的一次性MyoJect针提高肌肉注射的精度。所述肌肉的解剖中线点在皮肤上被识别并且2-6个单独的载体注射被分布在肌肉中。所述注射距离肌肉表面0.5厘米。载体的总剂量在低剂量组为 3×10^{11} vg每1.5ml,在高剂量组为 1×10^{12} vg每1.5ml。通过超声测定的载体递送的近端和远端范围用不可消除的放射照相标记物标记以供在基因转移后肌肉活检时参考。

[0082] 受试者跟着进行密切的生命体征监测。注射后联合用药进行了监测和记录。受试者在基因转移两天后出院(如果没有观察到副作用)。

[0083] 受试者返回进行随访。肌肉活组织检查在第45天或第90天进行。在基因转移后第45天和第75天以及第9、12、18和24个月的免疫研究包括检测rAAVrh74结合抗体和GALGT2抗体以及ELISpot来检测T细胞对衣壳抗原的反应。在第一年和第二年结束时,受试者进行体格检查、力量测试和免疫研究。

[0084] 实施例3

[0085] 功效结果测量

[0086] 肌肉活组织检查取自EDB肌肉。对样品进行编码以在所有随后注射rAAVrh74.MCK.GALGT2的分析中保持盲样。

[0087] 功效结果测量包括:如用抗CT表位抗体所证实的GALGT2的表达;蛋白质印迹定量的和光密度法评估的GALGT2蛋白表达;通过来自肌肉的GALGT转基因的qPCR测量的和针对基因组单拷贝对照标准化的载体基因组表达的转导效率;通过配对t检验比较肌肉中包含中央核的纤维的数量;并且分析还将包括:肌营养不良蛋白表达(具有针对N端、C端和杆结构域的抗体)、肌营养相关蛋白表达以及包括CD45、CD3、CD4、CD8和MAC 387的白细胞标记物。检查肌肉的组织学外观。在长达两年的研究期间的不同时间点对rAAVrh74和PBMC ELISpots对rAAVrh74衣壳和GALGT蛋白质的抗体进行评估。基因表达和炎症的肌肉分析也在不破坏盲样情况下完成。

[0088] 在来自单个受试者的两个EDB肌肉之间以及在第45天或第90天受试者的活组织检查之间盲目比较转基因表达。使用载体特异性引物探针组来扩增转基因的独特的5'非翻译前导序列,这将区分转基因表达GALGT2蛋白的与内源性GALGT2。使用肌肉组织的直接免疫荧光法(IF)和蛋白质印迹(WB)研究来完成蛋白质的定量。通过免疫染色定量CD4+和CD8+单核细胞并报告为细胞数/mm²面积。在肌肉切片上评估MHC I和MHC II抗原表达。也将进行肌肉

形态测量,包括纤维尺寸直方图和中心成核量化。分析还包括病毒DNA的PCR分析。

[0089] 通过GALGT2和AAV衣壳的IFN- γ ELISpots来评估免疫应答。IFN- γ >2SD的升高对病毒或转基因是显著的。AAV的结合抗体测定是免疫应答的另一种测量。

[0090] 用于改善下列一种或多种指标的测量是考虑的:绝对肌比力;离心肌肉收缩时力量衰减;血清CK水平;血清心肌肌钙蛋白水平;血清MMP9水平;握力;肢体扭力;肢体活动度或灵活性;步行;6分钟步行试验;膝屈肌或伸肌力量;最大等长随意肌收缩;北极星移动评价;通过肢体T2加权MRI测量的肌肉质量、脂肪减少或水肿;肌肉挛缩;四肢关节角度;心脏功能(心率、心输出量、缩短百分率、每搏输出量);呼吸(包括呼吸频率、血氧、补充氧气需要);肌肉坏死;肌肉再生;肌肉萎缩;肌肉炎症;肌肉钙化;肌肉中心成核;肌肉大小或肌纤维大小;寿命;和肌营养不良蛋白或层粘连蛋白 $\alpha 2$ 替代蛋白表达(肌营养相关蛋白、网蛋白1、层粘连蛋白 $\alpha 5$ 和集聚蛋白)。参见例如文献[Forbes等人,Radiology,269(1):198-207(2013);Govoni等人,Cell Mol.Life Sci.,70(23):4585-4602(2013);和Chandrasekharan and Martin,Methods Enzymol.,479:291-322(2010)]。

[0091] 对于每种测量,使用配对t检验分析进行基于前后基因转移检查(临床或肌肉活组织检查)之间差异的统计分析,p值<0.05表示显著性。

[0092] 实施例4

[0093] 肢体隔离性灌注的血管递送

[0094] 也考虑称为肢体隔离性灌注(ILP)的血管递送途径用于治疗人类患者。ILP可通过股动脉递送到多个腿部肌肉。该方法允许从全身循环中隔离肢体,增加转导效率并防止病毒逃逸到全身循环[Rodino-Klapac等人,Mol.Ther.,18:109-117(2010)]。下面列出了一个示例性的临床方案。

[0095] 如实施例1和2所述制备rAAVrh74.MCK.GALGT2。

[0096] 所述受试者在治疗之前12周接受稳定剂量的皮质类固醇治疗(强的松或地夫可特或其一般形式)。基因转移后,还继续进行强的松治疗。镇静和麻醉的受试者被固定在手术床上。近端和远端的止血带松散地位于恒河猴膝盖之上和腓肠肌之下。在股三角切开小切口,识别股动脉并进行自由解剖并用近端和远端结扎成环来控制出血并促进引入导管。通过改良的Seldinger方法,将预冲刷的套管穿过先前放置在动脉中的丝线,将股动脉插入3.0Fr插管器护套。所述护套仅推进几厘米并用3.0编织丝线缝合固定。

[0097] 在护套置于股动脉和静脉之后,给予100-200u/kg未分级肝素并使其循环3-5分钟。Choice PT冠状动脉导丝首先放置在右股静脉和动脉,然后最终进入左股静脉和动脉。直径4mm的Tyshak微型球囊导管通过右侧股动脉进入股骨骼动脉交界处穿过3.3-法式护套。8mm直径为2cm长的Tyshak微型球囊导管通过4-法式护套到右股髂静脉交界处适当的位置。进行稀释的对照物小手注射以确认左股动脉和右股静脉的适当阻塞。如果需要,护套和球囊可以替换成更大的尺寸。例如,可以将右股静脉中的4-法式护套替换为6-法式护套并且可以将12mm $\times$ 2cm长的Tyshak II球囊导管穿过Choice PT导丝进入合适的位置。进行通过护套的侧臂的小手注射以确认股静脉的位置和完全闭塞。

[0098] 在右股动脉和股静脉球囊充气后,同时隔离右腿,输入2mL/kg林格氏乳酸盐肝素化溶液的预冲洗液。1分钟后,完成2mL/kg的林格氏乳酸盐冲洗。接下来,在1-1/2分钟内,以 2×10^{12} vg/kg/肢至 4.8×10^{13} vg/kg/肢的剂量输入体积为8mL/kg LR的

rAAVrh74.MCK.GALGT2载体(进行双侧肢体灌注导致总患者剂量在 4×10^{12} vg/kg和 9.6×10^{13} vg/kg之间)。递送rAAVrh74.MCK.GALGT2后,停留时间为10分钟,然后在1分钟内通过右侧股动脉护套输入2mL/kg肝素化林格氏乳酸盐。然后球囊进行放气,导管和导丝被移除。

[0099] 然后左腿作为相同过程的目标。左股动脉在3.3-法式护套中维持。同样,使用ChoicePT冠状动脉导丝上的左股动脉中直径为4mm的Tyshak微型球囊导管以及在压力高达3个大气压通过左股静脉中的5-法式护套的12mm $\times$ 2cm长的Tyshak微型球囊导管,证明适当的闭塞。重复输液方案,在1分钟内输入2mL/kg的肝素化林格氏乳酸盐,在1分15秒内输入 2×10^{12} vg/kg/肢至 4.8×10^{13} vg/kg/肢剂量的rAAVrh74.MCK.GALGT2,停留时间为10分钟。最后,通过左侧股动脉护套输入2mL/kg肝素化林格氏乳酸盐,然后用压迫止血方法和HemCon贴片把所述护套从所有4个接近部位取出。

[0100] 根据需要该方案的变化可以用于经由其他动脉将rAAVrh74.MCK.GALGT2递送至替代的肌肉组。例如,考虑通过膈动脉、肋间动脉和/或肋下动脉的递送来供应膈膜肌或者考虑通过冠状动脉来供应心脏。每个程序可以用类似的剂量而且可以在一个病人身上或甚至在一个病人入院时完成多个程序。

[0101] 在给药完成时,移除止血带和导管并将直接压力施加到伤口10分钟以控制出血。用连续皮下4.0 Vicryl缝线封闭伤口。将压力敷料施用于该部位并保持在适当位置直到受试者从麻醉中醒来。

[0102] 在ILP载体递送方案之后,进行与上文描述的IM治疗的受试者类似的受试者随访和功效结果测量/分析。

[0103] 实施例5

[0104] 全身血管递送

[0105] 另一个考虑的将rAAVrh74.MCK.GALGT2载体递送至肌肉的途径是全身血管递送。检查功效的示例性剂量递增研究可以如下进行。

[0106] 剂量范围的确定

[0107] 在1天年龄的时候,(通过尾静脉)注射 1.4×10^{15} vg/kg rAAVrh74.MCK.GALGT2IV导致野生型小鼠中所有肢体骨骼肌的超过90%的转导,包括胫骨前肌、腓肠肌、股四头肌和三头肌,并且同样导致野生型小鼠心脏中所有心肌细胞以及在mdx模型小鼠心脏中超过70%的心肌细胞的超过50%的转导。值得注意的是,相对于模拟治疗的mdx对照动物,治疗3个月后总体mdx小鼠心脏功能的分析显示,在有或者没有多巴酚丁胺(一种刺激心率的 β 激动剂)的刺激下,由于使用该剂量的载体的rAAVrh74.MCK.GALGT2治疗,心脏输出量几乎是两倍。因此,当在疾病相关的心脏病理学发作之前给予载体时,rAAVrh74.MCK.GALGT2处理后,肌营养不良蛋白缺失的心脏的血流量增加了80%。 5×10^{15} vg/kg被认为是使用静脉注射在整个身体中转导全部心脏和骨骼肌细胞的最大治疗剂量。因此,考虑约 5×10^{13} vg/kg至约 5×10^{15} vg/kg剂量范围将覆盖在临床IV研究中针对整个患者的rAAVrh74.MCK.GALGT2治疗的最低有效剂量和最佳有效剂量。

[0108] 方案

[0109] 如实施例1和2所述,制备rAAVrh74.MCK.GALGT2。

[0110] 在rAAVrh74.MCK.GALGT2给药前一天,所述受试者开始接受预防性肠内强的松(糖皮质激素)(约1mg/kg/天)。基因转移后,还继续进行强的松治疗。

[0111] 在rAAVrh74.MCK.GALGT2输液之前的基因转移当天(第0天),进行采集维持生命的重要器官的数据的身体检查。

[0112] 如果受试者在PI的判断中出现不充分的水合作用,则在入院和基因转移之间的时间期间可给予10-20mL/kg生理盐水的丸剂。在基因转移前8个小时,受试者保持正常的饮食,之后他们不再摄入固体食物。在基因转移之前两个小时允许摄入清液,之后他们将彻底禁食。他们恢复到预先镇静的基线后,恢复正常的口服采食。基因转移将在无菌条件下进行,在合格麻醉师的指导下进行轻度至中度镇静。镇静可能有所不同,但在通过静脉注射丙泊酚前,受试者可以使用吸入一氧化二氮进行镇静并持续吸入七氟醚或丙泊酚滴注射液。在PI认为以及(和麻醉师协商),为了安全输送载体而确定不需要镇静的那些受试者中,可以推迟镇静。

[0113] 试验中的所有受试者通过外周肢静脉接受rAAVrh74.MCK.GALGT2的静脉内注射。考虑的剂量范围在 5×10^{13} vg/kg和 5×10^{15} vg/kg之间。

[0114] 作为一个实施例,将每个载体剂量不经稀释,分成50mL或更少,以装在由NCH Investigational Drug Pharmacy制备的60mL容量的Becton Dickinson聚丙烯注射器。载体盐溶液约为400mOsmol/L。使用拥有PharmGuard输液管理软件套件的Smiths Medical Medfusion 4000注射器输液泵进行输液,通过Smiths Medical MX563输液管进行输送。任何受试者的输液速度不得超过2ml/kg/min。输液大约进行10到20分钟。在输液结束时使用生理盐水从输液管冲洗载体。考虑可以根据需要载体剂量可以分开并进行不同的给药。

[0115] 在输液期间密切监测受试者的副作用,包括连续心率、呼吸速率和脉搏血氧饱和度监测;和间歇性血压监测。在输液之前和之后,立即测量心率、呼吸速率、脉搏血氧饱和度、温度和血压,在输液过程中每五分钟测量一次,并在输液后15分钟重复测量。

[0116] 受试者在基因转移后待在重症监护室床上并在基因转移后保持住院48小时。注射后4小时内,每小时获取生命体征,然后每4小时获取生命体征直至出院。如果PI没有问题,可以在输液后监测的最初24小时后转出重症监护室。

[0117] 在载体递送方案之后,进行与上文描述的IM治疗的受试者类似的受试者随访和功效结果分析。

[0118] 虽然已经根据具体实施例描述了本发明,但是应该理解,本领域技术人员将会想到很多改变和修改。因此,只有权利要求中出现的这样的限制才应该放在本发明。

[0119] 本申请中引用的所有文献都通过引用整体并入,特别关注它们所涉及的内容。而且,本申请要求2015年9月17日提交的美国临时申请No.62/220,107的优先权;2015年9月20日提交的62/221,068和2016年2月提交的62/301,260;其全部内容通过整体引用并入本发明。

序列表

<110> Research Institute at Nationwide Children's Hospital

<120> GALGT2基因治疗的方法和材料

<130> 28335/49985PCT

<141> 2018-03-16

<150> US 62/220,107

<151> 2015-09-17

<150> US 62/221,068

<151> 2015-09-20

<150> US 62/301,260

<151> 2016-02-29

<160> 3

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 4472

<212> DNA

<213> adeno-associated virus

<400> 1

```

ctccatcact aggggtaacc gcgaagcgcc tcccacgctg ccgcgtcagc gctgacgtaa 60
attacgtcat aggggagtggt tcctgtatta gctgtcacgt gagtgcctttt gcgacatttt 120
gcgacaccac gtggccattc atggtatata tggccgagtg agcgagcagg atctccattt 180
tgaccgcgaa atttgaacga gcagcagcca tgccgggctt ctacgagatc gtgcttaagg 240
tgccgagcga cctggacgag cacctgccgg gcatttctga ctgcgtttgtg aactgggtgg 300
cagagaagga atgggagctg cccccggatt ctgacatgga tcggaatctg attgagcagg 360
cacccttgac cgtggccgag aagctacagc gcgacttctt ggtccaatgg cgccgcgtga 420
gtaaggcccc ggaggccctc ttctttgttc agttcgagaa gggcgagtcc tacttccacc 480
tccatattct gtagagacc acgggggtca aatccatggt gctgggcccgc ttcttgagtc 540
agattcgggga caagctgggt cagaccatct accgcgggat cgagccgacc ctgcccact 600
ggttcgcggt gacaaaagacg cgtaatggcg ccggaggggg gaacaagggt gtggacgagt 660
gctacatccc caactacctg ctgcccaga ctcagcccga gctgcagtgg gcgtggacta 720
acatggagga gtatataagc gcgtgcttga acctggccga gcgcaaaccg ctctggcgcc 780
agcacctgac ccacgtcagc cagaccagc agcagaacaa ggagaatctg aaccgaatt 840
ctgacgcgcc tgtcatccgg tcaaaaacct ccgcgcgcta catggagctg gtcgggtggc 900
tggtggaccg gggcatcacc tccgagaagc agtggatcca ggaggaccag gcctcgtaca 960
tctccttcaa cgccgcctcc aactcgcggt ctcagatcaa ggccgcgctg gacaatgccg 1020
gcaagatcat ggcgctgacc aaatccgcgc ccgactacct ggtaggcccc gctctgcccc 1080
cggacattaa atccaaccgc atctaccgca tcctggagct gaatggctac gaccctgcct 1140
acgccggttc cgtctttctc ggctggggccc agaaaaagtt tggcaaaagg aacaccatct 1200

```

```

ggctgttttg gccggccacc acgggcaaga ccaacatcgc ggaagccatc gccacgccc 1260
tgcccttcta cggtcgcgtc aactggacca atgagaactt tcccttcaac gattgcgtcg 1320
acaagatggg gatctgggtg gaggagggca agatgacggc caaggtcgtg gagtccgcca 1380
aggccattct cggcggcagc aaggtgcgcg tggacaaaa gtgcaagtcg tccgcccaga 1440
tcgatcccac ccccgatgac gtcacctcca acaccaacat gtgcgccgtg attgacggga 1500
acagcaccac cttcgagcac cagcagccgt tgcaggaccg gatgttcaaa ttggaactta 1560
cccgcggtct ggagcacgac tttggcaagg tgacaaagca ggaagtcaaa gagttcttcc 1620
gctgggcgca ggatcacgtg accgaggtgg cgcattgatt ctacgtcaga aagggtggag 1680
ctaacaaaag acccgcccc gatgacgcgg atataagcga gccaagcgg gcctgcccct 1740
cagtcgcgga tccatcgacg tcagacgcgg aaggagctcc ggtggacttt gccgacaggt 1800
acaaaaacaa atgttctcgt cacgcgggca tgcttcagat gctgtttccc tgcaaacat 1860
gcgagagaat gaatcagaat ttcaacattt gcttcacgca cgggaccaga gactgttcag 1920
aatgtttccc tggcgtgtca gaattcgaac cggtcgtcag aaaaagacg tatcggaac 1980
tctgtcgat tcatcatctg ctggggcggg caccgagat tgcttgctcg gcctgcgacc 2040
tggtcaacgt ggacctggat gactgtgttt ctgagcaata aatgacttaa accaggtatg 2100
gctgccgatg gttatcttcc agattggctc gaggacaacc tctctgaggg cattcgcgag 2160
tggtgggacc tgaaacctgg agccccgaaa ccaaagcca accagcaaaa gcaggacaac 2220
ggccggggtc tggtgcttcc tggctacaag tacctcgac cttcaacgg actcgacaag 2280
ggggagcccc tcaacgcggc ggacgcagc gccctcgag acgacaaggc ctacgaccag 2340
cagctccaag cgggtgacaa tccgtacctg cggtataatc acgccgacgc cgagtttcag 2400
gagcgtctgc aagaagatac gtcttttggg ggcaacctcg ggcgcgcagt ctccaggcc 2460
aaaaagcggg ttctcgaacc tctgggcctg gttgaatcgc cggttaagac ggctcctgga 2520
aagaagagac cggtagagcc atcaccccag cgtctccag actcctctac gggcatcggc 2580
aagaaaggcc agcagcccgc aaaaaagaga ctcaattttg ggcagactgg cgactcagag 2640
tcagtccccg accctcaacc aatcggagaa ccaccagcag gcccctctgg tctgggatct 2700
ggtacaatgg ctgcaggcgg tggcgtcca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga 2760
gtgggtagtt cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggca cagagtcac 2820
accaccagca cccgcacctg ggccctgccc acctacaaca accacctcta caagcaaatc 2880
tccaacggga cctcgggagg aagcaccac gacaacacct acttcggcta cagcaccccc 2940
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccactttt caccacgtga ctggcagcga 3000
ctcatcaaca acaactgggg attccggccc aagaggctca acttcaagct cttcaacatc 3060
caagtcaagg aggtcacgca gaatgaaggc accaagacca tcgccaataa cttaccagc 3120
acgattcagg tctttacgga ctcggaatac cagctccgt acgtgctcgg ctcggcgcac 3180
cagggtgcc tgctccgtt cccggcgac gtcttcatga ttctcagta cgggtacctg 3240
actctgaaca atggcagtc ggctgtgggc cggtcgtct tctactgct ggagtacttt 3300
ccttctcaaa tgctgagaac gggcaacaac ttgaattca gctacaactt cgaggacgtg 3360
cccttcaca gcagctacgc gcacagccag agcctggacc ggctgatgaa ccctctcatc 3420
gaccagtact gtactacct gtcccggact caaagcacgg gcggtactgc aggaactcag 3480
cagttgctat ttctcaggc cgggcctaac aacatgtcgg ctcaggccaa gaactggcta 3540

```

cccggtcctt gctaccggca gcaacgcgtc tccacgacac tgtcgcagaa caacaacagc 3600
 aactttgcct ggacgggtgc caccaagtat catctgaatg gcagagactc tctggtgaat 3660
 cctggcggtg ccatggctac ccacaaggac gacgaagagc gattttttcc atccagcgga 3720
 gtcttaaatgt ttgggaaaca gggagctgga aaagacaacg tggactatag cagcgtgatg 3780
 ctaaccagcg aggaagaaat aaagaccacc aaccagtggt ccacagaaca gtacggcgtg 3840
 gtggccgata acctgcaaca gcaaaacgcc gctcctattg taggggccgt caatagtcaa 3900
 ggagccttac ctggcatggt gtggcagaac cgggacgtgt acctgcaggg tcccatctgg 3960
 gccaaagattc ctcatacgga cggcaacttt catccctcgc cgctgatggg aggctttgga 4020
 ctgaagcatc cgcctcctca gatcctgatt aaaaacacac ctgttcccgc ggatcctccg 4080
 accaccttca ctaaggccaa gctggcttct ttcacacgc agtacagtac cggccaggtc 4140
 agcgtggaga tcgagtggga gctgcagaag gagaacagca aacgctggaa cccagagatt 4200
 cagtacactt ccaactacta caaatctaca aatgtggact ttgctgtcaa tactgagggt 4260
 acttattccg agcctcgccc cattggcacc cgttacctca cccgtaatct gtaattacat 4320
 gttaatcaat aaaccgggta attcgtttca gttgaacttt ggtctcctgt ccttcttate 4380
 ttatcggtta ccatagaaac tggttactta ttaactgctt ggtgcgcttc gcgataaaag 4440
 acttacgtca tcgggttacc cctagtgatg ga 4472

<210> 2

<211> 2762

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gcccataacg caaacgcctt ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgcgcgc 60
 tcgctcgctc actgaggccg cccgggcaaa gcccgggcgt cgggacgacct ttggtcgccc 120
 ggccctcagt agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 180
 cttgtagtta atgattaacc cgccatgcta cttatctacg tagccatgct ctagacagcc 240
 actatgggtc taggctgccc atgtaaggag gcaaggcctg gggacacccg agatgcctgg 300
 ttataattaa cccagacatg tggtgctcc cccccccca acacctgctg cctgagcctc 360
 acccccaccc cgggtgcctg gtcttaggct ctgtacacca tggaggagaa gctcgctcta 420
 aaaataaccc tgtccctggt gggctgtggg ggactgaggg caggctgtaa caggcttggg 480
 ggccagggtt tatacgtgcc tgggactccc aaagtattac tgttccatgt tcccgcgaa 540
 gggccagctg tcccccgcca gctagactca gcacttagtt taggaaccag tgagcaagtc 600
 agcccttggg gcagcccata caaggccatg gggctgggca agctgcacgc ctgggtccgg 660
 ggtgggcacg gtgcccgggc aacgagctga aagctcatct gctctcaggg gcccctcctt 720
 ggggacagcc cctcctggtt agtcacaccc tgtaggtcc tctatataac ccaggggcac 780
 aggggctgcc cccgggtcac caccacctcc acagcacaga cagacactca ggagccagcc 840
 agccaggtaa gtttagtctt tttgtctttt atttcaggtc ccggtaccgg tgggtggtga 900
 aatcaaagaa ctgctcctca gtggatgttg cctttacttc taggcctgta cggaagtgtt 960
 acttctgctc taaaagctgc ggaattgtac ccgcggccgc gatgacttcg ggcggtctga 1020
 gatttctgtg gctcctcaag atatttgtca taatcctggt acttggcatt gttggattta 1080

tgttcggaag catgttcctt caagcagtgt tcagcagccc caagccagaa ctcccaagtc 1140
 ctgccccggg tgtccagaag ctgaagcttc tgcctgagga acgtctcagg aacctctttt 1200
 cctacgatgg aatctggctg ttccccaaaa atcagtgcaa atgtgaagcc aacaaagagc 1260
 aggagaggta caactttcag gatgcctatg gccagagcga cctcccagcg gtgaaagcga 1320
 ggagacaggc tgaatttgaa cactttcaga ggagagaagg gctgccccgc cactgcccc 1380
 tgctgggtcca gcccacctc ccttttgggt acccagtcca cggagtggag gtgatgcccc 1440
 tgcacacggg tcccatccca ggctccagt ttgaaggacc cgatgcccc gtctatgagg 1500
 tcaccctgac agcttctctg gggacactga acacccttg tgatgtccca gacagtgtgg 1560
 tgcagggcag aggccagaag cagctgatca tttctaccag tgaccggaag ctgttgaagt 1620
 tcattcttca gcacgtgaca tacaccagca cggggtacca gcaccagaag gtagacatag 1680
 tgagtctgga gtccagggtc tcagtggcca agtttccagt gaccatccgc catcctgtca 1740
 tacccaagct atacgacctt ggaccagaga ggaagctcag aaacctgggt accattgcta 1800
 ccaagacttt cctccgcccc cacaagetca tgatcatget ccggagtatt cgagagtatt 1860
 acccagactt gaccgtaata gtggtgatg acagccagaa gcccctggaa attaaagaca 1920
 accacgtgga gtattacact atgccctttg ggaagggttg gtttgctggg aggaacctgg 1980
 ccatactca ggtcaccacc aaatacgttc tctgggtgga cgatgatttt ctcttcaacg 2040
 aggagaccaa gattgagggt ctggtggatg tcctggagaa aacagaactg gacgtggtag 2100
 gcggcagtgt gctgggaaat gtgttccagt ttaagttgtt gctggaacag agtgagaatg 2160
 gggcctgcct tcacaagagg atgggatttt tccaaccctt ggatggcttc cccagctgcg 2220
 tggtgaccag tggcgtggtc aacttcttcc tggccacac ggagcgactc caaagagttg 2280
 gctttgatcc ccgctgcaa cgagtggctc actcagaatt cttcattgat gggctagga 2340
 ccctactcgt ggggtcatgc ccagaagtga ttataggtca ccagtctcgg tctccagtgg 2400
 tggactcaga actggctgcc ctagagaaga ctacaatac ataccggtcc aacaccctca 2460
 cccgggtcca gtcaagctg gccctccact acttcaagaa ccatctccaa tgtgccgcat 2520
 aagcgccgc aataaaagat ctttattttc attagatctg tgtgttggtt ttttgtgtgt 2580
 ctagagcatg gctacgtaga taattagcat ggcggttaa tcattaacta caaggaacct 2640
 ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgtcgtc cgctcactga ggccgggcga 2700
 ccaaaggtcg cccgacgccc gggtttgcc cggcggcct cagtgagcga gcgagcgcg 2760
 ag 2762

<210> 3

<211> 506

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Thr Ser Gly Gly Ser Arg Phe Leu Trp Leu Leu Lys Ile Leu Val

1 5 10 15

Ile Ile Leu Val Leu Gly Ile Val Gly Phe Met Phe Gly Ser Met Phe

20 25 30

Leu Gln Ala Val Phe Ser Ser Pro Lys Pro Glu Leu Pro Ser Pro Ala

35					40					45						
Pro	Gly	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Pro	Glu	Glu	Arg	Leu	Arg	Asn	
50					55					60						
Leu	Phe	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ile	Trp	Leu	Phe	Pro	Lys	Asn	Gln	Cys	Lys	
65					70					75					80	
Cys	Glu	Ala	Asn	Lys	Glu	Gln	Gly	Gly	Tyr	Asn	Phe	Gln	Asp	Ala	Tyr	
85					90					95						
Gly	Gln	Ser	Asp	Leu	Pro	Ala	Val	Lys	Ala	Arg	Arg	Gln	Ala	Glu	Phe	
100					105					110						
Glu	His	Phe	Gln	Arg	Arg	Glu	Gly	Leu	Pro	Arg	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu	
115					120					125						
Val	Gln	Pro	Asn	Leu	Pro	Phe	Gly	Tyr	Pro	Val	His	Gly	Val	Glu	Val	
130					135					140						
Met	Pro	Leu	His	Thr	Val	Pro	Ile	Pro	Gly	Leu	Gln	Phe	Glu	Gly	Pro	
145					150					155					160	
Asp	Ala	Pro	Val	Tyr	Glu	Val	Thr	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Gly	Thr	Leu	
165					170					175						
Asn	Thr	Leu	Ala	Asp	Val	Pro	Asp	Ser	Val	Val	Gln	Gly	Arg	Gly	Gln	
180					185					190						
Lys	Gln	Leu	Ile	Ile	Ser	Thr	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Leu	Lys	Phe	Ile	
195					200					205						
Leu	Gln	His	Val	Thr	Tyr	Thr	Ser	Thr	Gly	Tyr	Gln	His	Gln	Lys	Val	
210					215					220						
Asp	Ile	Val	Ser	Leu	Glu	Ser	Arg	Ser	Ser	Val	Ala	Lys	Phe	Pro	Val	
225					230					235					240	
Thr	Ile	Arg	His	Pro	Val	Ile	Pro	Lys	Leu	Tyr	Asp	Pro	Gly	Pro	Glu	
245					250					255						
Arg	Lys	Leu	Arg	Asn	Leu	Val	Thr	Ile	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	
260					265					270						
Pro	His	Lys	Leu	Met	Ile	Met	Leu	Arg	Ser	Ile	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Pro	
275					280					285						
Asp	Leu	Thr	Val	Ile	Val	Ala	Asp	Asp	Ser	Gln	Lys	Pro	Leu	Glu	Ile	
290					295					300						
Lys	Asp	Asn	His	Val	Glu	Tyr	Tyr	Thr	Met	Pro	Phe	Gly	Lys	Gly	Trp	
305					310					315					320	
Phe	Ala	Gly	Arg	Asn	Leu	Ala	Ile	Ser	Gln	Val	Thr	Thr	Lys	Tyr	Val	
325					330					335						
Leu	Trp	Val	Asp	Asp	Asp	Phe	Leu	Phe	Asn	Glu	Glu	Thr	Lys	Ile	Glu	
340					345					350						

Val	Leu	Val	Asp	Val	Leu	Glu	Lys	Thr	Glu	Leu	Asp	Val	Val	Gly	Gly
355				360				365							
Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Val	Phe	Gln	Phe	Lys	Leu	Leu	Leu	Glu	Gln	Ser
370				375				380							
Glu	Asn	Gly	Ala	Cys	Leu	His	Lys	Arg	Met	Gly	Phe	Phe	Gln	Pro	Leu
385				390				395				400			
Asp	Gly	Phe	Pro	Ser	Cys	Val	Val	Thr	Ser	Gly	Val	Val	Asn	Phe	Phe
405				410				415							
Leu	Ala	His	Thr	Glu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val	Gly	Phe	Asp	Pro	Arg	Leu
420				425				430							
Gln	Arg	Val	Ala	His	Ser	Glu	Phe	Phe	Ile	Asp	Gly	Leu	Gly	Thr	Leu
435				440				445							
Leu	Val	Gly	Ser	Cys	Pro	Glu	Val	Ile	Ile	Gly	His	Gln	Ser	Arg	Ser
450				455				460							
Pro	Val	Val	Asp	Ser	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Thr	Tyr	Asn	Thr
465				470				475				480			
Tyr	Arg	Ser	Asn	Thr	Leu	Thr	Arg	Val	Gln	Phe	Lys	Leu	Ala	Leu	His
485				490				495							
Tyr	Phe	Lys	Asn	His	Leu	Gln	Cys	Ala	Ala						
500				505											