(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118696126 A
(43)申请公布日 2024.09.24

(21)申请号 202380019725.2
(22)申请日 2023.01.31
(30)优先权数据
2201242.1 2022.01.31 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.07.31
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2023/050207 2023.01.31
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/144565 EN 2023.08.03
(71)申请人 爱丁堡大学董事会
地址 英国爱丁堡
(72)发明人 斯图尔特·罗伯特·科布
保罗·罗斯
拉尔夫·戴维·赫克托
(74)专利代理机构 深圳紫藤知识产权代理有限公司 44570
专利代理师 苏蕾
(51)Int.Cl.
C12N 15/86(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)

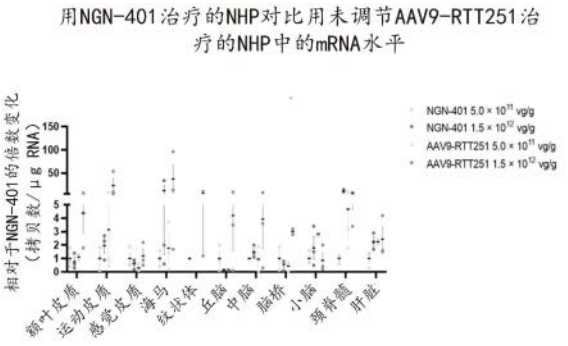
权利要求书3页 说明书42页
序列表（电子公布） 附图42页

(54)发明名称

用于治疗雷特综合征及相关病症的重组优化的MECP2盒和方法

(57)摘要

本公开提供了用于替换或补偿雷特综合征患者中MeCP2功能丧失的优化的治疗性MECP2多核苷酸构建体。适当地,本公开提供了能够更好地调控MeCP2蛋白的基因治疗盒,包括可调系统,该可调系统允许MECP2基因治疗以所需的中等水平表达,并在窗口内展示出载体衍生转基因的表达,其减轻致病遗传缺陷,而不会产生包括过表达毒性在内的不良副作用。



用NGN-401或AAV9-RTT251以5.0×10^11 vg/g脑重或1.5×10^12 vg/g脑重治疗，在给药后第29/30天进行评估的NHP中的转基因mRNA水平。使用靶向由NGN-401载体产生的MECP2转录本的WPRE3元件的检测，通过qRT-PCR确定治疗NHP中的mRNA水平。绘制了每只动物相对于NGN-401低剂量组平均值的转基因mRNA水平。n=3/组。vg=载体基因组。

CN 118696126 A

1.一种多核苷酸,从5’到3’包含:

• 启动子;

• 至少一个在内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA;

• 蛋白质翻译起始位点(Kozak序列);

• 人类MECP2编码序列,所述人类MECP2编码序列包含与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的序列,任选地包含SEQ ID NO:7,或其功能活性片段;

• 至少一个3’稳定性元件;

• 至少三个用于所述非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点;任选地,所述miRNA结合位点包含一到六个错配,任选地,单个错配;

• 以及多腺苷酸化信号。

2.一种多核苷酸,从5’到3’包含:

• 启动子;

• 至少一个在内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA;

• 蛋白质翻译起始位点(Kozak序列);

• 密码子优化的或野生型人类MECP2编码序列;

• 至少一个3’稳定性元件;

• 三个用于所述非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点;任选地,其中所述miRNA结合位点包含单个错配;

• 以及多腺苷酸化信号。

3.权利要求1或2所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含一个在内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA。

4.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述非哺乳动物或合成miRNA包含SEQ ID NO:4。

5.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述人类MECP2编码序列或密码子优化的编码序列包含与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的核苷酸序列,任选地与SEQ ID NO:7具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或与SEQ ID NO:7具有100%同一性的核苷酸序列,或其功能活性片段。

6.权利要求2所述的多核苷酸,其中MECP2序列是密码子优化的人类MECP2序列。

7.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述蛋白质翻译起始位点是包含SEQ ID NO:13的Kozak序列。

8.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述启动子包含CBM或CBE(SEQ ID NO:21或22)。

9.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述CBM启动子包含与SEQ ID NO:21具有至少90%同一性的核苷酸序列。

10.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述CBE启动子包含与SEQ ID NO:22具有至少90%同一性的核苷酸序列。

11.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中至少一个3’稳定性元件是WPRE。

12.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含三个用于所述非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点。

13.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述miRNA结合位点包含SEQ ID NO:8。

14.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述miRNA结合位点包含一个错配。

15.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述多腺苷酸化信号是猿猴空泡病毒40多腺苷酸化信号(SV40pA)。

16.权利要求15所述的多核苷酸,其中所述SV40pA信号包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列。

17.权利要求1或2所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含:CBM启动子、一个在内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA、具有优化的Kozak序列的野生型人类MECP2编码序列、WPRE稳定性元件、三个用于所述非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点和SV40pA信号。

18.权利要求2所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含:CBM启动子、一个在内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA、具有优化的Kozak序列的密码子优化的人类MECP2编码序列、WPRE稳定性元件、三个用于所述非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点和SV40pA信号。

19.权利要求17所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸构建体包含SEQ ID NO:25(RTT254/NGN-401)。

20.前述权利要求中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸还包含至少一个腺相关病毒(AAV)末端反向重复(ITR)。

21.权利要求20所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含两个AAV ITR。

22.一种载体,包含前述权利要求中任一项所述的多核苷酸。

23.权利要求22所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

24.权利要求23所述的病毒载体,其中所述载体是腺相关病毒(AAV)载体。

25.权利要求24所述的AAV载体,其中所述AAV载体是AAV9载体。

26.一种重组腺相关病毒(rAAV),包含前述权利要求中任一项所述的多核苷酸或载体。

27.权利要求26所述的rAAV,其中所述rAAV是AAV9。

28.一种病毒体,包含权利要求26或27所述的rAAV。

29.一种转化细胞,包含前述权利要求中任一项所述的多核苷酸、载体、rAAV或病毒体。

30.一种药物组合物,包含前述权利要求中任一项所述的多核苷酸、载体、rAAV或病毒体,以及任选地药学上可接受的载体。

31.一种治疗受试者的MECP2相关病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的前述权利要求中任一项所述的多核苷酸、载体、rAAV或病毒体或药物组合物。

32.权利要求31所述的方法,其中所述受试者表现出与MECP2相关病症相关的一种或多种症状的改善。

33.权利要求31或32所述的方法,其中以1.0×10^{15}vg对所述受试者给药,所述1.0×10^{15}vg包含NGN-401(SEQ ID NO:25)并且通过10mL ICV注射以1.0×10^{14}vg/mL递送。

34.权利要求33所述的方法,其中有效剂量为8.3×10^{11}vg/g脑。

35.权利要求31-34中任一项所述的方法,其中所述受试者基本上没有MECP2过表达毒性。

36.有效量的权利要求1-21中任一项所述的多核苷酸、权利要求22-25中任一项所述的

载体、权利要求26或27所述的重组腺相关病毒(rAAV)、权利要求28所述的病毒体或权利要求30所述的药物组合物用作药物的用途。

37.有效量的权利要求1-21中任一项所述的多核苷酸、权利要求22-25中任一项所述的载体、权利要求26或27所述的重组腺相关病毒(rAAV)、权利要求28所述的病毒体或权利要求30所述的药物组合物,用于治疗受试者的MECP2相关病症的用途。

38.权利要求37所述的用作用途的多核苷酸、载体、rAAV、病毒体或药物组合物,其中所述受试者表现出与MECP2相关病症相关的一种或多种症状的改善。

39.权利要求37或38所述的用作用途的多核苷酸、载体、rAAV、病毒体或药物组合物,其中以1.0×10^{15}vg对所述受试者给药,所述1.0×10^{15}vg包含NGN-401(SEQ ID NO:25),通过10mLICV注射以1.0×10^{14}vg/mL递送。

40.权利要求39所述的用作用途的多核苷酸、载体、rAAV、病毒体或药物组合物,其中有效剂量为8.3×10^{11}vg/g脑。

41.权利要求37至40中任一项所述的用作用途的多核苷酸、载体、rAAV、病毒体或药物组合物,其中所述受试者基本没有MECP2过表达毒性。

用于治疗雷特综合征及相关病症的重组优化的MECP2盒和方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年1月31日提交的英国专利申请No.GB2201242.1的优先权,其全文内容以引用的方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含具有25个序列的序列表,该序列表已经以XML格式电子提交并且其全文以引用的方式并入本文中。所述XML副本于2023年1月24日创建,名为P265708.WO.01_sequencelisting.xml,并且大小为90KB。

背景技术

[0005] DNA甲基化是真核基因组的主要修饰,并且在哺乳动物发育中起着至关重要的作用。人类蛋白质MeCP2、MBD1、MBD2、MBD3和MBD4构成一个核蛋白家族,这些核蛋白因各自存在甲基-CpG结合域(MBD)而相关。除MBD3外,这些蛋白质中的每一种都能够特异性地与甲基化DNA结合。MeCP2、MBD1和MBD2还可以抑制甲基化基因启动子的转录。与其他MBD家族成员相比,MeCP2(甲基CpG结合蛋白2)是X连锁的,并且容易发生X失活。MeCP2在干细胞中是可有可无的,但对胚胎发育至关重要。

[0006] 雷特综合征(Rett syndrome)(RTT)是一种由甲基CpG结合蛋白2(MECP2)基因突变引起的神经发育障碍。目前尚无获批的RTT治疗方法。雷特综合征是一种进行性神经发育障碍,是女性认知障碍的最常见原因之一。可变剪接导致编码不同同种型的多个转录变体。

[0007] 尽管基因治疗提供了治疗性转基因的递送以影响遗传疾病的改善,但是许多基因(例如MECP2)对剂量高度敏感,因此基因产物表达过少或过多都会产生有害影响。病毒介导的基因转移是将治疗性转基因递送到目标组织和细胞(包括神经系统细胞)的有力手段。然而,高病毒滴度通常是必要的,以实现有效的全系统转导从而实现最大的治疗效果。因此,这些相同的高滴度可能由于在某些细胞中实现的超生理水平的转基因表达而导致过表达毒性。WO/2022/003348中描述了一种提供治疗性转基因剂量控制的转基因系统。仍然需要额外的治疗构建体,其提供适合治疗雷特综合征的MeCP2的最佳表达水平和进一步控制。

发明内容

[0008] 本公开提供了用于替换或补偿雷特综合征患者的MeCP2功能丧失的优化的治疗性MECP2多核苷酸构建体。适当地,本公开提供了能够更好地调节控制MeCP2蛋白的基因治疗盒,包括可调系统,该可调系统允许MECP2基因治疗以所需的中等水平表达,如图5A-C所示。适当地,MECP2基因治疗构建体可在RTT小鼠模型中展现出功效,并在运动和呼吸表型各领域中展现出明显改善(图6A-B和图7A-F)。适当地,包括RTT252、RTT253、RTT254(也称为NGN-401)、RTT269、RTT270、RTT271和RTT272在内的多核苷酸构建体可以在窗口内展现出载体衍生转基因的表达,其减轻致病的遗传缺陷,而不会产生包括过表达毒性在内的不良副作用(图3A-C和图4A-C)。

[0009] 适当地,本文提供了多核苷酸,从5’到3’包含:

[0010] • 启动子;

[0011] • 至少一个在内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA;

[0012] • 蛋白质翻译起始位点(Kozak序列);

[0013] • SEQ ID NO:7的人类MECP2编码序列、与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的核苷酸序列、密码子优化或野生型的人类MECP2编码序列;

[0014] • 至少一个3’稳定性元件;

[0015] • 至少三个用于非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点;任选地,miRNA结合位点包含一到六个错配,任选地单个错配;

[0016] • 以及多腺苷酸化信号。

[0017] 在某些方面中,本文提供了一种多核苷酸,从5’到3’包含:

[0018] • 启动子;

[0019] • 至少一个在内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA;

[0020] • 蛋白质翻译起始位点(Kozak序列);

[0021] • 密码子优化或野生型的人类MECP2编码序列;

[0022] • 至少一个3’稳定性元件;

[0023] • 至少三个用于非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点;任选地,miRNA结合位点包含至少一个错配,任选地包含单个错配,任选地包含三个用于非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点;任选地,其中miRNA结合位点包含单个错配;

[0024] • 以及多腺苷酸化信号。

[0025] 微小RNA(miRNA)是一类长度为约22个核苷酸的小型单链非编码RNA。大多数miRNA由RNA聚合酶II转录,要么作为独立转录本,要么作为嵌入mRNA内含子的RNA。初级miRNA转录本被两种RNase II酶(Drosha和Dicer)加工成~70nt发夹结构前体miRNA,然后最终加工成~22nt的成熟miRNA。miRNA通过调节蛋白质水平、靶向信使RNA(mRNA)进行翻译抑制和/或mRNA降解来发挥作用。发明人已开发出能够敲减含有各自结合区的转录本的表达的非哺乳动物或合成miRNA。在某些情况下,这些是最初设计用于靶向萤火虫荧光素酶蛋白的昆虫衍生miRNA序列。在其他情况下,它们是合成miRNA序列,与天然存在的miRNA没有直系同源性。在某些情况下,合成miRNA序列被设计为靶向密码子优化的编码序列,其中编码序列在DNA水平上发生改变,同时保留相同的氨基酸序列。在基因治疗背景下,这允许外源递送的转基因被该合成miRNA专门靶向,而内源基因不受影响。适当地,miRNA可以嵌入不同的内含子内。

[0026] 适当地,多核苷酸可以包含一个在内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA。适当地,非哺乳动物或合成miRNA可以包含SEQ ID NO:4。适当地,人类MECP2编码序列可以包含与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性、至少100%同一性的核苷酸序列。适当地,MECP2序列可以是密码子优化的人类MECP2序列。适当地,蛋白质翻译起始位点可以是包含SEQ ID NO:13的Kozak序列。适当地,多核苷酸可以包括人类MECP2编码序列或其任何活性的、适当地功能活性类似于完整序列的片段,包括编码此类功能片段的小基因,其中该编码序列包含与SEQ ID NO:7、或SEQ ID NO:23(其编码MeCP2的甲基-CpG结合域(MBD))、或SEQ ID NO:24(其编码MeCP2的NCoR/SMRT相互作用域

(NID))具有至少90%同一性的核苷酸序列。

[0027] >SEQ ID NO:23

[0028] TCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCCACCCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGAC

[0029] >SEQ ID NO:24

[0030] AAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGG

[0031] 适当地,启动子可以包含CBM或CBE(SEQ ID NO:21或22)。

[0032] 适当地,CBM启动子可包含与SEQ ID NO:21具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性、至少100%同一性的核苷酸序列。适当地,CBE启动子可包含与SEQ ID NO:22具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性、至少100%同一性的核苷酸序列。适当地,至少一个3'稳定性元件可以为WPRE。适当地,多核苷酸包含三个用于非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点。适当地,miRNA结合位点可包含SEQ ID NO:8。适当地,miRNA结合位点可包含一个错配。适当地,多腺苷酸化信号可为猿猴空泡病毒40多腺苷酸化信号(SV40pA)。适当地,SV40pA信号包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列。

[0033] 适当地,多核苷酸可以包含:CBM启动子、一个在内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA、具有优化的Kozak序列的野生型人类MECP2编码序列、WPRE稳定性元件、三个用于非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点和SV40pA信号。

[0034] 适当地,多核苷酸可以包含:CBM启动子、一个在内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA、具有优化的Kozak序列的密码子优化的人类MECP2编码序列、WPRE稳定性元件、三个用于非哺乳动物或合成miRNA的miRNA结合位点和SV40pA信号。

[0035] 适当地,多核苷酸构建体可以包含SEQ ID NO:25(RTT254)。适当地,多核苷酸构建体可以包含与SEQ ID NO:25具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少97%同一性或至少99%同一性的核苷酸序列。

[0036] 适当地,多核苷酸还可以包含至少一个腺相关病毒(AAV)末端反向重复(ITR)。

[0037] 适当地,多核苷酸可以包含两个AAV ITR。

[0038] 适当地,本公开提供了一种载体,包含本文所述任一实施方式的多核苷酸。

[0039] 适当地,载体可以是病毒载体。

[0040] 适当地,载体可以是腺相关病毒(AAV)载体。

[0041] 适当地,AAV载体可以是AAV9载体。

[0042] 在另一个方面,本公开提供了重组腺相关病毒(rAAV),其包含本文所述任一多核苷酸或载体。在某些实施方式中,rAAV是AAV9。

[0043] 在另一个方面,本公开提供了一种病毒体,包含本文所述的rAAV。

[0044] 在另一个方面,本公开提供了一种转化细胞,包含本文所述的任意多核苷酸、本文所述的任意载体、本文所述的任意rAAV或本文所述的任意病毒体。

[0045] 在另一个方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含本文所述的任意多核苷酸、本文所述的任意载体、本文所述的任意rAAV或本文所述的任意病毒体,以及任选的药学上

可接受的载体。

[0046] 在另一个方面,本公开提供了一种治疗受试者的MECP2相关病症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的任意多核苷酸、本文所述的任意载体、本文所述的任意rAAV或本文所述的任意病毒体,或本文所述的任意药物组合物。

[0047] 还提供了有效量本文所述的任意多核苷酸、本文所述的任意载体、本文所述的任意rAAV、或本文所述的任意病毒体、或本文所述的任意药物组合物用作药物,特别是用于治疗受试者的MECP2相关病症的用途。

[0048] 还提供了本文所述的任意多核苷酸、本文所述的任意载体、本文所述的任意rAAV、或本文所述的任意病毒体、或本文所述的任意药物组合物在制备用于治疗受试者的MECP2相关病症的药物中的用途。

[0049] 在另一个方面,经治疗的受试者表现出与MECP2相关病症相关的一种或多种症状的改善。

[0050] 在另一个方面,以1.0×10^{15}vg对受试者给药,所述1.0×10^{15}vg包含NGN-401并且通过10mL ICV注射以1.0×10^{14}vg/mL递送。适当地,受试者是人类。适当地,以1.0×10^{14}至1.0×10^{16}vg的剂量范围对受试者给药。适当地,以1.0×10^{14}至1.0×10^{16}vg的范围对受试者给药,所述范围包含NGN-401(SEQ ID NO:25)。适当地,剂量通过ICV注射递送,特别是通过10mL ICV注射。适当地,将包含NGN-401的剂量通过ICV注射递送,特别是通过10mL ICV注射。适当地,剂量通过10mL ICV注射以1.0×10^{13}至1.0×10^{15}vg/mL的范围递送。

[0051] 在另一个方面,有效剂量为8.3×10^{11}vg/g脑。适当地,有效剂量为8.2×10^{11}g/g脑至8.4×10^{11}vg/g脑。适当地,有效剂量为8.3×10^{10}vg/g脑至8.3×10^{12}vg/g脑。适当地,受试者是人类。适当地,多核苷酸构建体可以包含SEQ ID NO:25(NGN-401/RTT254)。

[0052] 在另一个方面,受试者基本上没有MECP2过表达毒性。

[0053] 附图简要说明

[0054] 图1A是示出MeCP2剂量敏感基因治疗盒的图示,该治疗盒被设计为降低剂量敏感性、防止过表达并实现治疗设定点转基因水平。

[0055] 图1B示出了流式细胞术数据的图,示出了治疗盒(前馈回路)的不同更改对调节MeCP2蛋白表达水平的影响。报告基因构建体(其中报告基因mNeonGreen与hMeCP2融合)和允许测量mRuby作为转染对照的第二表达盒被转染到HEK细胞中,并在48小时后处理细胞,通过流式细胞术分析并测量mRuby(转染效率)和mNeonGreen(MeCP2)的水平。

[0056] 图2描绘了显示多核苷酸盒元件的示意图,这些元件被调节以调整剂量不敏感性和MeCP2表达的设定点。

[0057] 图3A-C示出了描绘MeCP2构建体的模块化多核苷酸序列元件和设计策略(图3A)以及MeCP2表达数据的表格。在对野生型小鼠给药AAV9-RTT252、AAV9-RTT253、AAV9-RTT254、AAV9-RTT269、AAV9-RTT270、AAV9-RTT271或AAV9-RTT272后21-23天,收集组织样本并通过蛋白质印迹法进行分析,以确定WT皮质(图3B)和WT海马(图3C)中MeCP2的表达水平。

[0058] 图4A-C是在以$3x10^{11}$ vg/小鼠的剂量在P1注射治疗性AAV9-MECP2构建体后,比较治疗性MEPC2构建体对$Mecp2^{-/y}$(KO)小鼠的存活率(图4A)、体重(图4B)和RTT临床评分(图4C)的图示。RTT临床评分是一种观察性评分系统,用于确定小鼠雷特表型的严重程度。表型的每个组成部分的评分范围从0(如野生型)到5(最严重)。

[0059] 图5A-C描绘了使用不同的多核苷酸盒成分进行系统调整,以识别和滴定表达水平从而获得最佳疗效(即中间或中等的表达水平)。图中显示了$Mecp2^{-/y}$动物的生存图和RTT临床评分,这些动物以$3x10^{11}$ vg/小鼠的剂量给药了表达弱(图5A)、中等(图5B)或强(图5C)水平的转基因MeCP2的AAV9-MECP2构建体。

[0060] 图6A-B描绘了AAV9-RTT254治疗KO动物与载剂治疗KO动物相比,存活率(图6A)和疗效(RTT表型评分,图6B)的改善。

[0061] 图7A-F描绘了RTT评分各个组成部分的细分,包括与对照组相比,在两种剂量($1x10^{11}$ vg和$3x10^{11}$ vg)下AAV9-RTT254治疗KO小鼠的活动和呼吸表型改善的图示结果。

[0062] 图8是描绘构建体SEQ ID NO:14(RTT252_CBE-ffluc1-hsaMECP2-3×结合-SV40pA)的元件的质粒图。

[0063] 图9是描绘构建体SEQ ID NO:15(RTT253_CBE-ffluc1-hsaMECP2-3×结合-WPRE3-SV40pA)的元件的质粒图。

[0064] 图10是描绘构建体SEQ ID NO:16(RTT254_CBM-ffluc1-hsaMECP2-3×结合-WPRE3-SV40pA)的元件的质粒图。

[0065] 图11是描绘构建体SEQ ID NO:17(RTT269_CBE-ffluc1-hsaMECP2-3×结合_mut3-WPRE3-SV40pA)的元件的质粒图。

[0066] 图12是描绘构建体SEQ ID NO:18(RTT270_CBE-ffluc1-hsaMECP2-3×结合_mut6-WPRE3-SV40pA)的元件的质粒图。

[0067] 图13是描绘构建体SEQ ID NO:19(RTT271_CBE-ran1g-hsaMECP2-3×结合-WPRE3-SV40pA)的元件的质粒图。

[0068] 图14是描绘构建体SEQ ID NO:20(RTT272_CBE-ran2g-hsaMECP2-3×结合-WPRE3-SV40pA)的元件的质粒图。

[0069] 图15是示出NGN-401治疗$Mecp2^{-/y}$小鼠与载剂治疗小鼠相比的存活率曲线的图。

[0070] 图16是示出在P0-2时ICV递送载剂或NGN-401后每周体重评估的图。从P28开始,每周对动物进行称重。组规模的数量显示在图例中。

[0071] 图17是示出在P0-2时ICV递送载剂或NGN-401后每周评估RTT表型评分的图。从P28(4周龄)开始,每周对动物的每个参数进行从0(正常)到5(最严重)的评分。将评分合并以得出总体RTT表型评分。

[0072] 图18是用载剂治疗的WT小鼠和用NGN-401或AAV9-RTT251治疗的$Mecp2^{+/-}$小鼠(剂量分别为1.0×10^{11}vg/小鼠或3.0×10^{11}vg/小鼠)26周的生命期安全性存活率曲线。

[0073] 图19是示出每周评估NGN-401治疗$Mecp2^{+/-}$小鼠和载剂治疗WT和$Mecp2^{+/-}$小鼠的体重的图。

[0074] 图20是示出在P1/2对$Mecp2^{+/-}$雌性小鼠施用的调节NGN-401或未调节AAV9-RTT251载体的MeCP2过表达毒性的每周评估的图。

[0075] 图21是示出NGN-401治疗$Mecp2^{+/-}$小鼠的载体生物分布的图。

[0076] 图22是示出AAV9-RTT251治疗$Mecp2^{+/-}$小鼠的载体生物分布的图。

[0077] 图23A-C是NGN-401治疗$Mecp2^{+/-}$小鼠在皮质(图24A)、小脑(图24B)和肝脏(图24C)中的蛋白质印迹蛋白表达数据的图。

[0078] 图24A-B是AAV9-RTT251治疗$Mecp2^{+/-}$小鼠在皮质(图25A)和肝脏(图25C)中的蛋白

质印迹蛋白表达数据的图。

[0079] 图25示出在P1/2对$Mecp2^{+/-}$雌性小鼠以7.4×10^{11}vg/小鼠的剂量ICV施用NGN-401后的生命期存活率的数据。

[0080] 图26是示出在P1/2对雌性小鼠以7.4×10^{11}vg/小鼠的剂量ICV施用NGN-401后的生命期体重数据图。在P28(4周龄)后每周对小鼠进行评估。

[0081] 图27是示出在P1/2对$Mecp2^{+/-}$雌性小鼠以7.4×10^{11}vg/小鼠的剂量ICV施用NGN-401后的MeCP2过表达毒性评分数据的图。在P28(4周龄)后每周对小鼠进行评估。

[0082] 图28是示出在P1/2对$Mecp2^{+/-}$雌性小鼠ICV施用NGN-401后的RTT表型评分数据(生命期数据)的图。在P28(4周龄)后每周对小鼠进行评估。

[0083] 图29是示出以7.4×10^{11}vg/小鼠的剂量ICV递送NGN-401后,在8周时间点皮质、小脑、胸脊髓和肝脏中的载体DNA生物分布水平的图。结果表示为载体基因组拷贝数/二倍体基因组,其是通过靶向NGN-401载体的WPRE3元件的qPCR检测确定并且使用靶向小鼠肌动蛋白基因的检测对每个二倍体基因组进行归一化。组规模的数量显示在图例中。vg＝载体基因组。

[0084] 图30是示出以7.4×10^{11}vg/小鼠的剂量ICV递送NGN-401后,在8周时间点皮质、小脑和肝脏中MeCP2蛋白水平的蛋白质印迹定量的图。结果表示为MeCP2水平对比载剂治疗$Mecp2^{+/-}$小鼠中水平的比值。组规模的数量显示在图例中。

[0085] 图31是示出用NGN-401或AAV9-RTT251以5.0×10^{11}或1.5×10^{12}vg/g脑重的剂量治疗的NHP中转基因mRNA水平的数据的图,在给药后第29/30天进行评估。使用靶向由NGN-401载体产生的MECP2转录本的WPRE3元件的检测,通过qRT-PCR确定治疗NHP中的mRNA水平。绘制了每只动物相对于NGN-401低剂量组平均值的转基因mRNA水平。n＝3/组。vg＝载体基因组。

[0086] 具体的实施方式

[0087] 雷特综合征(RTT)是一种由X连锁MECP2基因突变引起的神经系统疾病。Mecp2缺陷小鼠重现了该疾病的主要特征,使用条件等位基因的基因再激活研究可实现强大的表型校正。虽然这使得RTT成为有吸引力的基因治疗靶点,但MECP2是一种剂量敏感基因,动物研究和人类重复障碍都表明,MeCP2水平需要保持在一个狭窄的范围内才能达到疗效,同时避免过表达相关的毒性。这些挑战因常用的AAV载体的生物分布模式而放大,这导致敏感细胞类型中出现表达热点以及过度转基因表达。

[0088] 为了克服这些挑战,申请人利用单基因回路开发了优化的多核苷酸盒,其中转基因表达由基于miRNA的前馈回路调节。该回路提供了一种细胞自主机制,以防止强转导细胞中的过表达,同时仍允许在较适度转导的靶标中表达治疗性蛋白质水平。重要的是,miRNA序列不基于任何现有的哺乳动物miRNA,因此可防止干扰转导细胞中的内源性miRNA-mRNA基因调节。提供了优化的治疗性多核苷酸MECP2构建体和用于治疗受试者的雷特综合征和相关疾病的方法。编码序列(包括人类MECP2的剪接变体)可在NCBI数据库中找到,其基因ID为4204。

[0089] 在某些实施方式中,利用本文描述的治疗构建体中的野生型MEPC2基因表现出改善的蛋白质表达,例如,与在其他方面相同的治疗性多核苷酸盒中由各种密码子优化的MECP2提供的蛋白质表达水平相比,由此编码的蛋白质在细胞中以更理想或更有利的水平

表达。

[0090] 定义

[0091] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语均具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。本文使用的术语仅用于描述特定实施方式,并不旨在限制本发明。以下术语具有给定的含义:

[0092] AAV“rep”和“cap”基因是指编码腺相关病毒复制和衣壳蛋白的多核苷酸序列。AAV rep和cap在本文中称为AAV“包装基因”。

[0093] “AAV”是腺相关病毒的缩写,可用于指病毒本身或其修饰、衍生物或假型。除非另有要求,该术语涵盖所有亚型以及天然存在和重组形式。缩写“rAAV”是指重组腺相关病毒。术语“AAV”包括1型AAV(AAV1)、2型AAV(AAV2)、3型AAV(AAV3)、4型AAV(AAV4)、5型AAV(AAV5)、6型AAV(AAV6)、7型AAV(AAV7)、8型AAV(AAV 8)、9型AAV(AAV9)、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV和绵羊AAV,及其修饰形式、衍生物或伪型。“灵长类AAV”是指感染灵长类的AAV,“非灵长类AAV”是指感染非灵长类哺乳动物的AAV,“牛AAV”是指感染牛类哺乳动物的AAV,等等。在一些实施方式中,AAV颗粒是AAV1、AAV2、rAAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV 10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV 14、AAV 15和AAV16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-1、AAV.hu37、AAV.Anc80、AAV.Anc80L65、AAV.7m8、AAV.PHP.B、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、AAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15或AAV.HSC16。在一些实施方式中,rAAV颗粒是AAV1、AAV2、rAAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV 10、AAV11、AAV 12、AAV 13、AAV 14、AAV 15和AAV16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-1、AAV.hu37、AAV.Anc80、AAV.Anc80L65、AAV.7m8、AAV-PHP.B、AAV-PHP.eB、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、AAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15或AAV.HSC16的衍生物、修饰或假型。

[0094] AAV的各种血清型之所以具有吸引力,有几个原因,最突出的是AAV被认为是非致病性的,并且野生型病毒可以将其基因组位点特异性地整合到人类19号染色体中(Linden等,1996,Proc Natl Acad Sci USA 93:11288-11294)。AAV插入人类基因组的位点称为AAVS1。与随机整合相反,位点特异性整合被认为可能导致可预测的长期表达谱。

[0095] 本领域已知各种AAV血清型的基因组序列以及天然末端重复序列(TR)、Rep蛋白和衣壳亚基的序列。此类序列可在文献或公共数据库(例如GenBank)中找到。参见(例如)GenBank登录号NC-002077(AAV-1)、AF063497(AAV-1)、NC-001401(AAV-2)、AF043303(AAV-2)、NC-001729(AAV-3)、NC-001829(AAV-4)、U89790(AAV-4)、NC-006152(AAV-5)、AF513851(AAV-7)、AF513852(AAV-8)和NC-006261(AAV-8);其公开内容以引用的方式并入本文。还参见,例如,Srivistava等,1983,J.Virology 45:555;Chiorini等,1998,J.Virology 71:6823;Chiorini等,1999,J.Virology 73:1309;Bantel-Schaal等,1999,J.Virology 73:939;肖等,1999,J.Virology 73:3994;Muramatsu等,1996,Virology 221:208;Shade等,1986,J.Virol.58:921;高等,2002,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 99:11854;Moris等,2004,Virology 33:375-383;国际专利公开WO00/28061、WO99/61601、WO98/11244、WO2013/

063379、WO2014/194132、WO2015/121501和美国专利No.6,156,303和7,906,111。

[0096] 本文使用的“rAAV载体”是指包含非AAV来源的多核苷酸序列(即,与AAV异源的多核苷酸)的AAV载体,通常是用于细胞遗传转化的目的序列。在一些实施方式中,异源多核苷酸可由至少一个、有时是两个AAV末端反向重复序列(ITR)侧翼连接。术语rAAV载体涵盖rAAV载体颗粒和rAAV载体质粒。rAAV载体可以是单链(ssAAV)或自身互补(scAAV)的。“AAV病毒”或“AAV病毒颗粒”或“rAAV载体颗粒”是指由至少一个AAV衣壳蛋白(通常由野生型AAV的所有衣壳蛋白组成)和衣壳化多核苷酸rAAV载体组成的病毒颗粒。如果颗粒包含异源多核苷酸(即,除野生型AAV基因组之外的多核苷酸,例如用于递送至哺乳动物细胞的转基因),通常称为“rAAV载体颗粒”或简称为“rAAV载体”。因此,rAAV颗粒的生产必然包括rAAV载体的生产,因为这种载体包含在rAAV颗粒内。

[0097] “载体”是指包含要递送至宿主细胞(体外或体内)的多核苷酸的重组质粒或病毒。

[0098] 本文使用的“重组”是指载体、多核苷酸、多肽或细胞是克隆、限制或连接步骤(例如与其中包含的多核苷酸或多肽有关)和/或其他程序的各种组合的产物,这些程序产生的构建体不同于自然界中发现的产物。重组病毒或载体是包含重组多核苷酸的病毒颗粒。这些术语分别包括原始多核苷酸构建体的复制品和原始病毒构建体的后代。

[0099] “重组病毒载体”是指包含一个或多个异源序列(即非病毒来源的多核苷酸序列)的重组多核苷酸载体。

[0100] “重组”应用于AAV颗粒时,是指AAV颗粒是经过一个或多个程序产生的产物,这些程序产生的AAV颗粒构建体在性质上不同于AAV颗粒。

[0101] “AAV Rep”是指AAV复制蛋白及其类似物。

[0102] “AAV Cap”是指AAV衣壳蛋白VP1、VP2和VP3及其类似物。在野生型AAV病毒中,三个衣壳基因vp1、vp2和vp3相互重叠。参见Grieger和Samulski,2005年,J.Virol.79(15):9933-9944。单个P40启动子可使所有三种衣壳蛋白(分别为vp1、vp2、vp3)以约1:1:10的比例表达,与rAAV产生互补。对于重组AAV载体的产生,VP1:VP2:VP3的期望比例在约1:1:1至约1:1:100的范围内,优选在约1:1:2至约1:1:50的范围内,更优选在约1:1:5至约1:1:20的范围内。虽然VP1:VP2的期望比例为1:1,但VP1:VP2的比例范围可以从1:50到50:1不等。

[0103] Marsic等,2014,Molecular Therapy 22(11):1900-1909中提供了已知AAV血清型衣壳的氨基酸序列的完整列表和比对,尤其是补充图1。

[0104] 仅供示例的目的,野生型AAV2包含小的(20-25纳米)二十面体AAV病毒衣壳,由序列重叠的三种蛋白质(VP1、VP2和VP3;总共60个衣壳蛋白组成AAV衣壳)组成。蛋白质VP1(735aa;Genbank登录号AAC03780)、VP2(598aa;Genbank登录号AAC03778)和VP3(533aa;Genbank登录号AAC03779)在衣壳中以1:1:10的比例存在。也就是说,对于AAV,VP1是全长蛋白,而VP2和VP3是逐渐缩短的VP1版本,相对于VP1,其N端截短程度增加。

[0105] “AAV TR”是指位于AAV基因组末端或附近的回文末端重复序列,主要包含互补的对称排列的序列,包括天然AAVTR的类似物及其类似物。在重组细小病毒载体的情况下,重组多核苷酸的侧翼有至少一个、优选两个末端反向重复序列(ITR)。

[0106] “顺式基序”包括保守序列,例如位于基因组序列末端或末端附近并被识别为复制起始的序列;可能用于转录起始、剪接或终止的隐蔽启动子或内部位置的序列。

[0107] “治疗有效量”是指赋予受试者治疗益处所必需的活性剂的最小量。例如,对患者

而言,“治疗有效量”是指诱导、改善、稳定、减缓进展或以其他方式改善与病症相关的病理症状、疾病进展或生理状况或抵抗疾病的量。

[0108] “基因”是指含有至少一个开放阅读框的多核苷酸,其能够在转录和翻译后编码特定的多肽或蛋白质。

[0109] “编码序列”是指编码特定蛋白质的序列”或“编码核酸”,表示当置于(可操作地连接到)适当的调节序列的控制下时,在体外或体内转录(就DNA而言)和翻译(就mRNA而言)成多肽的核酸序列。编码序列的边界由5’(氨基)末端的起始密码子和3’(羧基)末端的翻译终止密码子决定。编码序列可以包括但不限于原核或真核mRNA的cDNA、原核或真核DNA的基因组DNA序列,甚至合成DNA序列。

[0110] 就病毒衣壳或颗粒而言,“嵌合”是指,衣壳或颗粒包括来自不同细小病毒、优选不同AAV血清型的序列,如Rabinowitz等的美国专利No.6,491,907所述,其公开内容以引用的方式整体并入本文。另见Rabinowitz等,2004,J.Virol.78(9):4421-4432。特别优选的嵌合病毒衣壳是AAV2.5衣壳,其具有AAV2衣壳的序列,但具有以下突变:263Q至A;265插入T;705N至A;708V至A;和716T至N。其中编码此类衣壳的核苷酸序列定义为SEQ ID NO:15,如WO2006/066066中所述。其他优选的嵌合AAV包括但不限于WO2010/093784中描述的AAV2i8、WO2014/144229中描述的AAV2G9和AAV8G9以及AAV9.45(Pulicherla等,2011,Molecular Therapy 19(6):1070-1078)。

[0111] 就侧翼有其它元件的序列而言,“侧翼有”表示在相对该序列的上游和/或下游(即5’和/或3’)存在一个或多个侧翼元件。术语“侧翼有”并非旨在表示序列必须是连续的。例如,在编码转基因的核酸和侧翼元件之间可能存在间插序列。“侧翼有”两个其他元件(例如,TR)的序列(例如,转基因)表示一个元件位于序列的5’处,另一个元件位于序列的3’处;但是,它们之间可能存在间插序列。

[0112] “多核苷酸”是指通过磷酸二酯键连接的核苷酸序列。本文中以从5’到3’的方向呈现多核苷酸。本发明的多核苷酸可以是脱氧核糖核酸(DNA)分子或核糖核酸(RNA)分子。当多核苷酸是DNA分子时,该分子可以是基因或cDNA分子。核苷酸碱基在本文中用单字母代码表示:腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、肌苷(I)和尿嘧啶(U)。本发明的多核苷酸可使用本领域技术人员熟知的标准技术来制备。

[0113] 病毒对细胞的“转导”是指核酸从病毒颗粒转移到细胞。

[0114] “密码子优化的MECP2”是指编码MECP2基因的修饰核酸,其与编码MECP2(SEQ ID NO:7)的野生型核酸相比,至少有一个修饰,其中修饰包括但不限于GC含量降低或CpG含量降低的MECP2基因。人类MECP2可在NCBI数据库中以基因ID 4204(视为野生型)找到。

[0115] 细胞的“转染”是指将遗传物质引入细胞以对细胞进行遗传修饰。转染可通过本领域已知的多种方法(例如磷酸钙、聚乙烯亚胺、电穿孔等)实现。

[0116] “多肽”包括肽和蛋白质,除非另有说明。

[0117] “基因转移”或“基因递送”是指将外来核酸(例如DNA或RNA)可靠地插入宿主细胞的方法或系统。此类方法可导致非整合转移DNA的瞬时表达、染色体外复制和转移复制子(例如附加体)的表达,或转移遗传物质整合到宿主细胞的基因组DNA中。

[0118] “转基因”用于表示被整合到载体(包括病毒载体)中的任何异源核苷酸序列(用于递送至靶细胞(本文也称为“宿主细胞”)中并在靶细胞中表达),以及相关的表达控制序列,

例如启动子。本领域技术人员应理解,表达控制序列将基于促进转基因在靶细胞中表达的能力进行选择。转基因的一个例子是编码治疗性多肽的核酸。

[0119] 术语“细胞培养”是指在生物反应器、滚瓶、超堆叠、微球、大球、烧瓶等中以粘附或悬浮方式生长的细胞,以及上清液或悬浮液本身的成分,包括但不限于rAAV颗粒、细胞、细胞碎片、细胞污染物、胶体颗粒、生物分子、宿主细胞蛋白、核酸和脂质以及絮凝剂。大规模方法(例如生物反应器),包括悬浮培养物和附着在搅拌生物反应器中的微载体或大载体上生长的粘附细胞,也包括在术语“细胞培养”中。本公开内容涵盖了大规模和小规模生产蛋白质的细胞培养程序。

[0120] 本文使用的术语“纯化(purifying)”、“纯化(purification)”、“分离(separate)”、“分离(separating)”、“隔离(separation)”、“分离(isolate、isolating或isolation)”是指提高来自包含目标产物和一种或多种杂质的样品的rAAV颗粒的纯度。通常,rAAV颗粒的纯度通过从样品中(完全或部分)去除至少一种杂质来增加目标产物。在一些实施方式中,通过使用本文所述方法从样品中(完全或部分)去除一种或多种杂质来增加样品中rAAV的纯度。

[0121] 用于指肽的“同源”是指两种肽之间的氨基酸序列相似性。当两种肽中的氨基酸位置由相同的氨基酸占据时,它们在该位置是同源的。因此,“基本同源”是指氨基酸序列在很大程度上(但不是完全)同源,并且保留与其同源的序列的大部分或全部活性。

[0122] 如本文所用,“基本同源”是指序列与参考肽至少50%相同,并且优选至少75%同源且更优选95%同源。其包括额外的肽序列修饰,例如对本文公开的序列的氨基酸序列进行微小变化、缺失、替换或衍生化,只要该肽具有与未修饰肽基本相同的活性或功能。氨基酸的衍生物可以包括但不限于:三氟亮氨酸、六氟亮氨酸、5,5,5-三氟异亮氨酸、4,4,4-三氟缬氨酸、对氟苯丙氨酸、邻氟酪氨酸、间氟酪氨酸、2,3-二氟酪氨酸、4-氟组氨酸、2-氟组氨酸、2,4-二氟组氨酸、氟脯氨酸、二氟脯氨酸、4-羟基脯氨酸、硒代甲硫氨酸、碲代甲硫氨酸、硒代半胱氨酸、硒色氨酸、4-氨基色氨酸、5-氨基色氨酸、5-羟基色氨酸、7-氮杂色氨酸、4-氟色氨酸、5-氟色氨酸、6-氟色氨酸、高烯丙基甘氨酸、高炔丙基甘氨酸、2-丁炔甘氨酸、顺式-巴豆甘氨酸、烯丙基甘氨酸、脱氢亮氨酸、脱氢脯氨酸、2-氨基-3-甲基-4-戊烯酸、叠氮基高丙氨酸、叠氮基丙氨酸、叠氮基正亮氨酸、对乙炔基苯丙氨酸、对叠氮基苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对乙酰基苯丙氨酸和苯并呋喃基丙氨酸。值得注意的是,修饰的肽将保留与未修饰的肽相关的活性或功能,修饰的肽通常具有与未修饰序列的氨基酸序列“基本同源”的氨基酸序列。

[0123] 在某些实施方式中,治疗性多核苷酸构建体包含野生型MECP2基因。在替代实施方式中,本文提供了修饰的MECP2基因。本文提供的其他实施方式包括核酸构建体(例如载体),其序列的一部分包括修饰的MECP2基因,例如,GC含量优化的MECP2基因序列,其与野生型MECP2基因序列相比包含更多或更少的GC核苷酸,和/或与野生型MECP2基因中存在的CpG二核苷酸水平相比具有降低或增加的CpG二核苷酸水平的MECP2基因序列。例如,实施方式包括质粒和/或其他载体,其包括野生型或修饰的MECP2序列以及其他元件,例如调节元件。进一步的实施方式提供包装的基因递送载体(例如病毒衣壳),其包括野生型或修饰的MECP2序列。本文还提供了递送方法,以及优选地通过将修饰的序列连同促进细胞中表达所需的元件一起递送到细胞中来表达野生型或修饰的MECP2基因的方法。本发明还提供了基

因治疗方法,其中将野生型或修饰的MECP2基因序列施用于受试者,例如作为载体的组分和/或包装为病毒基因递送载体的组分。特定的实施方式包括其中修饰的核酸序列与SEQ ID NO:7(野生型人MECP2)具有90%同一性的那些实施方式。在某些实施方式中,MECP2构建体与SEQ ID NO:7(野生型人MECP2)具有大于90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0124] 例如,可以进行治疗以增加受试者体内的MeCP2水平,其量提供治疗水平的MeCP2,而不会产生不良毒性作用。

[0125] 用于表达MECP2的修饰核酸

[0126] "优化"或"密码子优化"在本文中可互换使用,是指相对于野生型编码序列(例如,MECP2的编码序列)进行了优化的编码序列,以增加编码序列的表达,例如,通过最小化稀有密码子的使用、减少CpG二核苷酸的数量、去除隐蔽的剪接供体或受体位点、去除Kozak序列、去除核糖体进入位点等进行。

[0127] "同一性百分比"在本文中使用时,是指两个给定的多核苷酸和/或多肽在相同位置内具有相同的核酸和/或氨基酸的数值得分,如由典型的序列比对程序(即BLAST方法)给出。适当地,"同一性百分比"是在多核苷酸和/多肽的整个长度上或多核苷酸和/或多肽的功能片段的长度上确定的。功能片段可以作为多核苷酸和/或多肽的较短部分提供,其提供与多核苷酸和/或多肽的整个长度相同的期望功能。

[0128] 密码子优化

[0129] 有六十四种不同的密码子。其中六十一种编码二十种标准氨基酸,而另外三种用作终止密码子。相对于它们编码的氨基酸数量,密码子的数量越多,意味着单个氨基酸可以由多个密码子编码。事实上,一些常见的氨基酸,如精氨酸和亮氨酸,由多达6个密码子编码。

[0130] 对于相同的氨基酸,不同的生物体表现出对使用某些密码子的偏好。已知有些物种几乎完全避免使用某些密码子。这种偏好可能会影响蛋白质表达。因此,在某些实施方式中,在设计基因治疗构建体时考虑密码子优化是有用的。

[0131] 虽然许多因素都有助于蛋白质表达的成功,但密码子优化起着至关重要的作用,特别是当蛋白质在异源系统中表达时。例如,如果要在大肠杆菌中表达人类基因,选择细菌优先使用的密码子可以提高蛋白质表达的成功率。当消除稀有密码子时尤其如此。

[0132] 在如下所述的某些实施方式中,已确定野生型MECP2编码序列在某些治疗盒中提供最佳的适度表达,如本文所示和所述。

[0133] 序列修饰和多核苷酸盒元件

[0134] 修饰的例子包括消除一个或多个顺式作用基序和引入一个或多个Kozak序列。在一个实施方式中,消除一个或多个顺式作用基序并引入一个Kozak序列。

[0135] 可以消除的顺式作用基序的例子包括内部TATA盒;chi位点;核糖体进入位点;ARE、INS和/或CRS序列元件;重复序列和/或RNA二级结构;(隐秘的)剪接供体和/或受体位点、分支点;以及限制位点,(例如,SalI)。

[0136] 在某些实施方式中,MeCP2基因序列还可以包括侧翼限制位点以促进亚克隆到表达载体中。许多此类限制位点是本领域众所周知的。

[0137] 本公开包括核酸载体,该核酸载体包括MECP2基因序列和各种调节或控制元件。用

于基因表达的调节元件的确切性质将因生物体和细胞类型而异。一般而言,它们包括引导目标细胞中RNA转录起始的启动子。启动子可以是组成型或调节型的。组成型启动子是那些导致可操作连接的基因基本上始终表达的启动子。调节型启动子是那些可以被激活或失活的启动子。调节型启动子包括诱导型启动子,其通常处于“关闭”状态,但可被诱导而“开启”,以及“抑制型”启动子,其通常处于“开启”状态,但可被“关闭”。已知有许多不同的调节因子,包括温度、激素、细胞因子、重金属和调节蛋白。这些区别并不是绝对的;组成型启动子通常可受到一定程度的调节。在某些情况下,可利用内源途径来调节转基因表达,例如,使用在病理状况改善时自然下调的启动子进行。

[0138] 合适启动子的例子包括腺病毒启动子,例如腺病毒主要晚期启动子;异源启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子;呼吸道合胞病毒启动子;劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子;白蛋白启动子;诱导型启动子,例如小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子;金属硫蛋白启动子;热休克启动子;α-1-抗胰蛋白酶启动子;乙肝表面抗原启动子;转铁蛋白启动子;载脂蛋白A-1启动子;鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子、CBh启动子和CAG启动子(巨细胞病毒早期增强子元件和鸡β-肌动蛋白基因的启动子、第一外显子和第一内含子和兔β-珠蛋白基因的剪接受体)(Alexopoulou等,2008,BioMed.Central Cell Biol.9:2)、CBE启动子(巨细胞病毒早期增强子元件和鸡β-肌动蛋白的启动子,和人延伸因子1α的第一外显子、第一内含子和第二外显子)、CBM启动子(巨细胞病毒早期增强子元件和鸡β-肌动蛋白的启动子,和MINIX的第一外显子、第一内含子和第二外显子)和人MECP2启动子。启动子可以是组织特异性的启动子(例如小鼠白蛋白启动子),其在肝细胞中具有活性,以及甲状腺素转运蛋白启动子(TTR)。在某些实施方式中,可以使用肝脏脱靶向启动子。本领域技术人员将清楚如何利用和调整本文所述的任何这些特征。

[0139] 在另一个方面,编码MECP2的修饰核酸还包括增强子以增加蛋白质的表达。本领域已知许多增强子,包括但不限于巨细胞病毒主要即刻早期增强子。更具体地说,CMV MIE启动子包括三个区域:调节子、独特区域和增强子(Isomura和Stinski,2003,J.Virol.77(6):3602-3614)。CMV增强子区域可以与其他启动子或其一部分组合以形成杂交启动子,以进一步增加与其可操作连接的核酸的表达。例如,鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子或其一部分可以与CMV启动子/增强子或其一部分以及鸡β-肌动蛋白(CBA)和小鼠微小病毒(MMV)内含子的混合内含子组合,以形成称为“CBh”启动子的CBA版本,其代表鸡β-肌动蛋白混合启动子,如Gray等所述(2011,Human Gene Therapy 22:1143-1153)。

[0140] 在一些实施方式中,合成RNA回路可用于调节转基因的表达。该回路包括基于单基因microRNA(miRNA)的前馈回路。它提供在内含子内表达的非哺乳动物或合成(非天然存在)miRNA,该miRNA靶向其自身转录本,其中miRNA预计不会靶向人类mRNA。miRNA是非哺乳动物或合成的。在不同的内含子(hEF1a对比MINIX)中表达miRNA可用于微调回路。表达不同的miRNA(EXACT1对比EXACT2对比EXACT3)可用于微调回路。构建体mRNA的3’UTR中的结合位点特异于在回路内含子内表达的非哺乳动物或合成miRNA,并对转基因的表达进行控制。非哺乳动物或合成miRNA结合位点预计不允许结合任何人类内源性miRNA。提供不同数量的miRNA结合位点(一个或多个)可用于微调回路。

[0141] 内含子还可用于提高哺乳动物表达载体的效率。内含子的例子有鼠巨细胞病毒(MCMV)即刻早期(IE)启动子、人巨细胞病毒(HCMV)即刻早期(IE)启动子和人类延伸因子一

α(EF-1α)启动子。内含子可以根据目标基因而变化。

[0142] 此外,控制元件可以包括胶原稳定序列(CSS)、终止密码子、终止序列和多腺苷酸化信号序列(例如但不限于牛生长激素多聚A信号序列(bGHpA)),以驱动在真核mRNA的3'端有效添加多腺苷酸"尾"(参见,例如,Goodwin和Rottman,1992,J.Biol.Chem.267(23):16330-16334)。

[0143] 多聚A尾是一条长链腺嘌呤核苷酸,在RNA加工过程中添加到信使RNA(mRNA)分子中以增加分子的稳定性。这类似于体内发生的情况。多聚A尾使RNA分子更稳定并防止其降解。此外,多聚A尾使成熟的信使RNA分子能够从细胞核中输出,并通过细胞质中的核糖体翻译成蛋白质。

[0144] 土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)可增加各种病毒载体的转基因表达。WPRE放置在转基因下游、靠近多腺苷酸化信号时最有效。WPRE可以通过改善转录终止来减少病毒mRNA的通读转录,这反过来又会增加病毒滴度和表达。(Gene Therapy Volume 14,第1298-1304页(2007年))。

[0145] 非病毒载体

[0146] 在特定实施方式中,根据本发明使用的载体是非病毒载体。通常,非病毒载体可以是包括编码MECP2或其变体的核酸序列的质粒。

[0147] 包装的MECP2序列

[0148] MECP2基因序列也可以作为包装病毒载体的组成部分提供。一般而言,包装病毒载体包括包装在衣壳中的病毒载体。病毒载体和病毒衣壳将在后续部分中讨论。包装在rAAV载体中的核酸可以是单链(ss)、自身互补(sc)或双链(ds)。预期包含本文所述任何多核苷酸构建体的构建体能够进行所需的包装和表达。此外,单链载体表现出类似的理想包装能力。

[0149] 病毒载体

[0150] 通常,携带转基因的病毒载体由编码转基因的多核苷酸、合适的调节元件和产生介导细胞转导的病毒蛋白所必需的元件组装而成。病毒载体的例子包括但不限于腺病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒和腺相关病毒(AAV)载体。

[0151] 根据本发明方法制备的包装病毒载体的病毒载体组分包括至少一种转基因(例如MECP2基因序列)和用于控制修饰的MECP2治疗盒表达的相关表达控制序列。

[0152] 在优选实施方式中,病毒载体包括细小病毒基因组的一部分(例如具有rep和cap删除和/或由MECP2基因序列替换的AAV基因组)及其相关表达控制序列。MECP2基因序列通常临近一个或两个AAV TR或TR元件插入(即侧翼有)适合病毒复制的元件(Xiao等,1997,J.Virol.71(2):941-948),代替编码病毒rep和cap蛋白的核酸。还可以包括其他适合于促进MECP2盒在靶细胞中组织特异性表达的调节序列。

[0153] 本领域技术人员将理解,包含转基因且缺乏病毒复制所需的病毒蛋白(例如cap和rep)的AAV载体无法复制,因为这些蛋白是病毒复制和包装所必需的。此外,AAV是一种依赖性病毒(Dependovirus),因为它没有辅助病毒对细胞的共同感染就不能在该细胞中复制。辅助病毒通常包括腺病毒或单纯疱疹病毒。或者,如下讨论,辅助功能(E1a、E1b、E2a、E4和VA RNA)可提供给包装细胞(包括通过用编码各种辅助元件的一种或多种核酸转染细胞)和/或细胞可包含编码辅助蛋白的核酸。例如,HEK 293是通过用腺病毒5DNA转化人类细胞

而产生的,现在表达许多腺病毒基因,包括但不限于E1和E3(参见,例如,Graham等,1977,J.Gen.Virol.36:59-72)。因此,这些辅助功能可由HEK 293包装细胞提供,而无需通过(例如)编码它们的质粒将它们提供给细胞。

[0154] 病毒载体可以是任何合适的核酸构建体,例如DNA或RNA构建体,并且可以是单链、双链或双股的(即,如WO2001/92551中所述的自身互补)。

[0155] 本领域技术人员将理解,rAAV载体还可以包括“填充”或“填充物”序列(填充物/填充),其中包含转基因的核酸的大小小于约4.1至4.9kb,以便将核酸最佳地包装到AAV衣壳中。参见Grieger和Samulski,2005年,J.Virol.79(15):9933-9944。也就是说,AAV载体通常接受具有确定大小范围的DNA插入物,该大小范围通常为约4kb至约5.2kb,或略大。因此,对于较短的序列,在插入片段中包含填充物/填充序列,以便将长度调整到接近或等于AAV载体包装成病毒颗粒所可接受的病毒基因组序列的正常大小。在各种实施方式中,填充物/填充核酸序列是未翻译的(非蛋白质编码)核酸片段。在rAAV载体的特定实施方式中,异源多核苷酸序列的长度小于4.7Kb,并且填充物/填充多核苷酸序列的长度在与异源多核苷酸序列组合(例如,插入载体)时总长度在约3.0-5.5Kb之间,或在约4.0-5.0Kb之间,或在约4.3-4.8Kb之间。

[0156] 内含子还可以用作填充物/填充多核苷酸序列,以便实现AAV载体包装成病毒颗粒的长度。用作填充物/填充多核苷酸序列的内含子和内含子片段也可以增强表达。例如,与没有内含子元件的表达相比,包含内含子元件可以增强表达(Kurachi等,1995,J.Biol.Chem.270(10):5276-5281)。此外,填充物/填充多核苷酸序列是本领域众所周知的,包括但不限于WO2014/144486中描述的那些序列。

[0157] 病毒衣壳

[0158] 包装病毒载体的病毒衣壳组分可以是细小病毒衣壳。优选AAV Cap和嵌合衣壳。合适的细小病毒衣壳组分的例子是来自细小病毒科的衣壳组分,例如自主细小病毒或依赖性病毒。例如,病毒衣壳可以是AAV衣壳(例如,AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV1.1、AAV2.5、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV9.45、AAVrh10、AAVrh74、RHM4-1(WO2015/013313的SEQ ID NO:5)、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B-S312N、AAV-LK03、AAVrh10、AAV-PHP.B、AAV-PHP.eB、AAV-PHP.S、AAV2.GL、AAV2.NN、蛇AAV、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、绵羊AAV、山羊AAV、虾AAV和现在已知或后来发现的任何其他AAV。参见(例如)Fields等,VIROLOGY,第2卷,第69章(第4版,Lippincott-Raven Publishers)。衣壳可以源自美国专利No.7,906,111;Gao等,2004,J.Virol.78:6381;Moris等,2004,Virol.33:375;WO2013/063379;WO2014/194132中公开的多种AAV血清型;并且包括WO2015/121501中公开的真型AAV(AAV-TT)变体,以及WO2015/013313中公开的RHM4-1、RHM15-1至RHM15-6及其变体,并且本领域技术人员知道可能存在尚未鉴定的其他变体,其具有相同或相似的功能,或者可能包括来自两个或更多个AAV衣壳的组分。AAV Cap蛋白的完整补体包括VP1、VP2和VP3。包含编码AAV VP衣壳蛋白的核苷酸序列的ORF可包含少于完整补体的AAV Cap蛋白,或者可以提供完整补体的AAV Cap蛋白。

[0159] 一种或多种AAV Cap蛋白可以是嵌合蛋白,包括来自两种或更多种病毒、优选两种或更多种AAV的AAV Cap的氨基酸序列,如Rabinowitz等的美国专利No.6,491,907所述,其全部公开内容以引用的方式并入本文。例如,嵌合病毒衣壳可以包括AAV1 Cap蛋白或亚基

以及至少一个AAV2 Cap或亚基。嵌合衣壳可以(例如)包括具有一个或多个B19 Cap亚基的AAV衣壳,例如,AAV Cap蛋白或亚基可以被B19 Cap蛋白或亚基替换。例如,在优选实施方式中,AAV衣壳的Vp3亚基可以被B19的Vp2亚基替换。

[0160] 另一个实施方式包括合成的嵌合病毒株,包括来自AAV2、AAV3、AAV6、AAV8等的AAV骨架与来自AAV9的半乳糖(Gal)结合足迹的组合。腺相关病毒(AAV)是辅助依赖型细小病毒,其利用硫酸肝素(HS)、半乳糖(Gal)或唾液酸(Sia)作为细胞表面结合的主要受体。例如,AAV血清型2和3b利用HS。AAV1、4和5以不同的连接特异性结合Sia,AAV血清型6可识别Sia和HS,而AAV9利用Gal进行宿主细胞附着。具体而言,AAV9的半乳糖(Gal)结合足迹被移植到结合硫酸肝素的AAV血清型2上,并且仅移植正交聚糖结合足迹即可提高转导效率。通过使用结构比对和定点诱变将AAV9的Gal结合足迹整合到AAV2 VP3主链或嵌合AAV2i8衣壳模板中,生成了一种新的双重聚糖结合菌株(AAV2G9)和一种嵌合肌肉嗜性菌株(AAV2i8G9)。体外结合和转导测试证实AAV2G9利用HS和Gal受体进入细胞。随后对转基因表达动力学和载体基因组生物分布谱进行的体内表征表明,这种合理设计的嵌合AAV菌株具有快速、持续和增强的转基因表达。在肝脏脱靶向、肌肉特异性AAV2i8G9嵌合体中观察到了类似的、改进的转导谱(Shen等,2013,J.Biol.Chem.288(4):28814-28823)。这种新的移植组合在WO2014/144229中有完整描述,其内容以引用的方式并入本文。其他肝脏脱靶向AAV(例如AAV9.45)在Pulicherla等,2011,Molecular Therapy 19(6):1070-1078中有描述,其内容以引用的方式并入本文,如同其全部内容在文本中阐述一样。

[0161] 在又一个实施方式中,本发明提供了祖先AAV载体在治疗性体内基因治疗中的应用。具体而言,从头合成了计算机实验衍生序列并表征了生物活性。这种尝试导致生成了九种功能性假定祖先AAV,并鉴定了Anc80,即AAV血清型1、2、8和9的预测祖先(Zinn等,2015,Cell Reports 12:1056-1068)。除了组装成病毒颗粒外,还可以使用WO2015/054653中描述的方法预测和合成此类祖先序列,其内容以引用的方式并入本文。值得注意的是,使用由祖先病毒序列组装的病毒颗粒比当代病毒或其部分表现出对当今人类群体中预先存在的免疫力的敏感性降低。

[0162] 包装病毒载体的生产

[0163] 本发明包括包装细胞,其包含在“宿主细胞”中,可培养该宿主细胞以生产本发明的包装病毒载体。本发明的包装细胞通常包括具有异源(1)病毒载体功能、(2)包装功能和(3)辅助功能的细胞。这些组件功能中的每一个将在后续部分中讨论。

[0164] 最初,载体可以通过本领域技术人员已知的几种方法制备(参见,例如,WO2013/063379)。优选方法在Grieger等,2015,《Molecular Therapy》24(2):287-297中进行了描述,其内容以引用的方式并入本文中用于所有目的。简而言之,以HEK293细胞的有效转染为起点,其中使用来自合格临床主细胞库的粘附HEK293细胞系在摇瓶和WAVE生物反应器中在无动物成分的悬浮条件下生长,从而实现快速且可扩展的rAAV生产。使用三重转染方法(例如WO96/40240),悬浮HEK293细胞系在转染后48小时收获时产生大于1×10^{5}个含载体基因组的颗粒(vg)/细胞或大于1×10^{14}vg/L的细胞培养物。更具体地说,三重转染是指包装细胞被三种质粒转染:一种质粒编码AAV rep和cap基因,另一种质粒编码各种辅助功能蛋白(例如腺病毒或HSV蛋白,如E1a、E1b、E2a、E4和VA RNA),另一种质粒编码转基因及其各种控制元件(例如MECP2基因和CBM或CBE启动子)。

[0165] 为了获得所需的产率,优化了许多变量,例如选择支持生长和转染的兼容无血清悬浮培养基、选择转染试剂、转染条件和细胞密度。还开发了一种基于离子交换层析法的通用纯化策略,从而获得AAV血清型1-6、8、9和各种嵌合衣壳的高纯度载体制剂。这个用户友好的过程可以在一周内完成,从而实现高的满颗粒与空颗粒比(>90%完整颗粒),提供适合临床应用的纯化后产率(>1×10^{13}vg/L)和纯度,并且对于所有血清型和嵌合颗粒都是通用的。这种可扩展的制造技术已被用于制造用于视网膜新生血管(AAV2)、血友病B(scAAV8)、巨轴突神经病变(scAAV9)和视网膜色素变性(AAV2)的GMP I期临床AAV载体,这些载体已施用到患者体内。此外,通过实施灌注方法,总载体产量至少增加5倍,该灌注方法需要在转染后的多个时间点从培养基中收获rAAV。

[0166] 病毒载体功能

[0167] 本发明的包装细胞包括病毒载体功能以及包装和载体功能。病毒载体功能通常包括细小病毒基因组的一部分,例如AAV基因组,在该AAV基因组中,rep和cap被删除并由野生型或优化的MECP2序列及其相关的表达控制序列替换。病毒载体功能包括足够的表达控制序列,以导致病毒载体复制用于包装。通常,病毒载体包括细小病毒基因组的一部分,例如AAV基因组,在该AAV基因组中,rep和cap被删除并由转基因及其相关表达控制序列替换。转基因的侧翼通常有两个AAV TR,以取代删除的病毒rep和cap ORF。转基因包括适当的表达控制序列,例如组织特异性启动子和适用于促进转基因在靶细胞中组织特异性表达的其他调节序列。转基因通常是可以表达以产生治疗性多肽或标记多肽的核酸序列。

[0168] "双股载体"在本文中可以互换地称为"二聚体"或"自身互补"载体。双股细小病毒颗粒可以(例如)包括含有病毒体DNA(vDNA)的细小病毒衣壳。vDNA是自身互补的,使得其可以在从病毒衣壳释放时形成发夹结构。双股vDNA似乎为宿主细胞提供了双链DNA,该双链DNA可由宿主细胞表达(即转录和可选翻译),而无需第二链合成,而常规细小病毒载体则需要第二链合成。双股/自身互补rAAV载体在本领域中是众所周知的,并在例如WO2001/92551、WO2015/006743和许多其他文献中进行了描述。

[0169] 病毒载体功能可以适当地以双股载体模板的形式提供,如Samulski等的美国专利No.7,465,583中所述(对于其关于双股载体的教导,该专利的全部公开内容以引用的方式并入本文中)。双股载体是二聚自身互补(sc)多核苷酸(通常是DNA)。双股载体基因组优选含有足够的包装序列,用于在所选细小病毒衣壳(例如,AAV衣壳)内进行包装。本领域技术人员将理解,双股vDNA可能并非在所有条件下都以双链形式存在,但在有利于互补核苷酸碱基退火的条件下具有这样做的能力。"双股细小病毒颗粒"包括杂交、嵌合和靶向病毒颗粒。优选地,双股细小病毒颗粒具有AAV衣壳,其还可以是嵌合或靶向衣壳,如上所述。

[0170] 病毒载体功能可以适当地以双股载体模板的形式提供,如Samulski等的美国专利No.7,465,583中所述(对于其关于双股载体的教导,该专利的全部公开内容以引用的方式并入本文中)。双股载体是二聚自身互补(sc)多核苷酸(通常是DNA)。例如,可以选择双股载体的DNA,以便由于链内碱基配对而形成双链发夹结构。双股DNA载体的两条链都可以包装在病毒衣壳内。双股载体提供与双链DNA病毒载体相当的功能,并且可以减轻靶细胞合成与病毒通常包封的单链基因组互补DNA的需要。

[0171] 选择用于病毒载体的TR(可解析和不可解析)优选为AAV序列,其中血清型1、2、3、4、5和6为优选。可解析AAV TR不需要具有野生型TR序列(例如,可以通过插入、删除、截断或

错义突变来改变野生型序列),只要TR介导所需功能即可,例如病毒包装、整合和/或原病毒拯救等。TR可以是作为AAV末端反向重复序列发挥作用的合成序列,例如Samulski等的美国专利No.5,478,745描述的“双D序列”(其全部公开内容以引用的方式并入本文)。通常但不一定,TR来自相同的细小病毒,例如,两个TR序列都来自AAV2。

[0172] 包装功能包括衣壳组分。衣壳组分优选来自细小病毒衣壳,例如AAV衣壳或嵌合AAV衣壳功能。合适的细小病毒衣壳组分的例子是来自细小病毒科的衣壳组分,例如自主细小病毒或依赖性病毒。例如,衣壳组分可以选自AAV衣壳,例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh10、AAVrh74、RHM4-1、RHM15-1、RHM15-2、RHM15-3/RHM15-5、RHM15-4、RHM15-6、AAV Hu.26、AAV1.1、AAV2.5、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV9.45、AAV2i8、AAV2G9、AAV2i8G9、AAV2-TT AAV2-TT-S312N)、AAV3B-S312N和AAV-LK03(参见美国专利No.10,548,947),以及尚未鉴定或来自非人类灵长类动物来源的其他新型衣壳。衣壳组分可以包括来自两种或更多种AAV衣壳的组分。

[0173] 在另一个实施方式中,一种或多种VP衣壳蛋白是嵌合蛋白,包含来自两种或更多种病毒(优选两种或更多种AAV)的氨基酸序列,如Rabinowitz等的美国专利No.6,491,907所述。嵌合衣壳在本文中被描述为具有来自一种血清型的至少一个氨基酸残基与另一种血清型的组合,所述另一种血清型足以改变a)病毒产量、b)免疫反应、c)靶向、d)脱靶向等。

[0174] 可以按照Li等,2008,Mol.Ther.16(7):1252-1260中所述的说明制备其它的嵌合蛋白,其内容以引用的方式并入本文中。具体而言,通过定向进化,使用基于DNA改组的方法开发细胞类型特异性载体。将腺相关病毒(AAV)血清型1-9的衣壳基因组随机分割,并使用PCR重新组装以生成嵌合衣壳文库。从之前显示对AAV具有低容忍性的整合素减仓鼠黑色素瘤细胞系中分离出包含来自AAV1、2、8和9的基因组片段的单独感染性克隆(chimeric-1829)。分子建模研究表明,AAV2有助于二十面体三重对称轴的表面环,而AAV1和9分别有助于二重和五重对称相互作用。通过合理的诱变,C端结构域(AAV9)被确定为黑色素瘤趋向性的关键结构决定因素。Chimeric-1829利用硫酸肝素作为主要受体,比所有血清型更有效地转导黑色素瘤细胞。将该技术应用于使用AAV或其他病毒衣壳序列的替代细胞/组织类型可能会产生一类新的生物纳米颗粒作为人类基因转移的载体。

[0175] 包装病毒载体通常包括野生型或修饰的MECP2序列和侧翼有TR元件的表达控制序列(本文称为“转基因”或“转基因表达盒”),这足以导致载体DNA的包装和随后在转导细胞中表达野生型或修饰的MECP2序列。病毒载体功能可以(例如)作为质粒或扩增子的组分提供给细胞。

[0176] 病毒载体功能可以存在于细胞系内的染色体外和/或可以整合到细胞的染色体DNA中。

[0177] 可以采用将携带病毒载体功能的核苷酸序列引入细胞宿主进行复制和包装的任何方法,包括但不限于电穿孔、磷酸钙沉淀、显微注射、阳离子或阴离子脂质体以及脂质体与核定位信号的组合。在通过使用病毒载体转染提供病毒载体功能的实施方式中,可以使用产生病毒感染的标准方法。

[0178] 包装功能

[0179] 包装功能包括用于病毒载体复制和包装的基因。因此,例如,包装功能可以根据需要包括病毒基因表达、病毒载体复制、从整合状态拯救病毒载体、病毒基因表达和将病毒载

体包装成病毒颗粒所必需的功能。可以使用遗传构建体(例如质粒或扩增子、杆状病毒或HSV辅助构建体)将包装功能一起或单独地提供给包装细胞。包装功能可以存在于包装细胞的染色体外,但优选整合到细胞的染色体DNA中。其例子包括编码AAV Rep和Cap蛋白的基因。

[0180] rAAV生产系统

[0181] 本领域已知许多基于细胞培养的系统用于生产rAAV颗粒,其中任何一种都可用于实施本文公开的方法。基于细胞培养的系统包括转染、稳定细胞系生产和传染性杂交病毒生产系统(其中包括腺病毒-AAV杂交体、疱疹病毒-AAV杂交体和杆状病毒-AAV杂交体)。用于生产rAAV病毒颗粒的rAAV生产培养物都需要;(1)合适的宿主细胞,包括(例如)人类细胞系,如HeLa、A549或HEK293细胞及其衍生物(HEK293T细胞、HEK293F细胞)、哺乳动物细胞系,如Vero、CHO细胞或CHO衍生细胞,或昆虫衍生细胞系,如杆状病毒生产系统中的SF-9;(2)合适的辅助病毒功能,由野生型或突变型腺病毒(如温度敏感腺病毒)、疱疹病毒、杆状病毒或提供辅助功能的质粒构建体提供;(3)AAV rep和cap基因及基因产物;(4)侧翼有AAV ITR序列的转基因(如治疗性转基因);以及(5)支持rAAV生产的合适培养基和培养基成分。

[0182] 本领域技术人员知道,可通过多种方法将AAV rep和cap基因、AAV辅助基因(例如腺病毒E1a基因、E1b基因、E4基因、E2a基因和VA基因)和rAAV基因组(包含一个或多个目标基因,其侧翼有末端反向重复(ITR))引入细胞,以产生或包装rAAV。短语“腺病毒辅助功能”是指在细胞中表达的多个病毒辅助基因(作为RNA或蛋白质),以使AAV在细胞中有效生长。本领域技术人员理解,辅助病毒(包括腺病毒和单纯疱疹病毒(HSV))可促进AAV复制,并且已鉴定出某些基因可提供基本功能,例如,辅助病毒可诱导细胞环境变化,从而促进此类AAV基因表达和复制。在一些实施方式中,通过转染编码AAV rep和cap基因、辅助基因和rAAV基因组的一个或多个质粒载体,将AAV rep和cap基因、辅助基因和rAAV基因组引入细胞。在一些实施方式中,可以通过用病毒载体(例如,编码AAVrep和cap基因、辅助基因和rAAV基因组的rHSV载体)转导将AAV rep和cap基因、辅助基因和rAAV基因组引入细胞。在一些实施方式中,通过用rHSV载体转导将AAV rep和cap基因、辅助基因和rAAV基因组中的一种或者多种引入细胞。在一些实施方式中,rHSV载体编码AAV rep和cap基因。在一些实施方式中,rHSV载体编码辅助基因。在一些实施方式中,rHSV载体编码rAAV基因组。在一些实施方式中,rHSV载体编码AAV rep和cap基因。在一些实施方式中,rHSV载体编码辅助基因和rAAV基因组。在一些实施方式中,rHSV载体编码辅助基因以及AAV rep和cap基因。

[0183] 本领域已知的任何合适培养基均可用于生产rAAV颗粒。这些培养基包括但不限于Hyclone Laboratories和JRH生产的培养基,包括改良Eagl培养基(MEM)、Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)和Sf-900 II SFM培养基,如美国专利No.6,723,551所述,该专利的全部内容以引用的方式全文并入本文中。在一些实施方式中,培养基包含来自Invitrogen/ThermoFisher的Dynamis™培养基、FreeSt yle™293表达培养基或Expi293™表达培养基。在一些实施方式中,培养基包含Dynamis™培养基。在一些实施方式中,本文公开的方法使用包含无血清培养基、无动物成分培养基或化学成分确定的培养基的细胞培养物。在一些实施方式中,培养基是无动物成分培养基。在一些实施方式中,培养基包含血清。在一些实施方式中,培养基包含胎牛血清。在一些实施方式中,培养基是无谷氨酰胺培养基。在一些实施方式中,培养基包含谷氨酰胺。在一些实施方式中,培养基补充有营养物、盐、缓冲剂和添加

剂(例如消泡剂)中的一种或多种。在一些实施方式中,培养基补充有谷氨酰胺。在一些实施方式中,培养基补充有血清。在一些实施方式中,培养基补充有胎牛血清。在一些实施方式中,培养基中补充有泊洛沙姆,例如Kolliphor®P 188Bio。在一些实施方式中,培养基是基础培养基。在一些实施方式中,培养基是补料培养基。

[0184] rAAV生产培养物可以在适合所用特定宿主细胞的各种条件下常规生长(在宽温度范围内、不同时间长度等)。如本领域所知,rAAV生产培养物包括附着依赖性培养物,其可以在合适的附着依赖性容器(例如滚瓶、中空纤维过滤器、多层或多托盘组织培养瓶(或堆叠,例如超堆叠)、微载体和填充床或流化床生物反应器)中培养。rAAV载体生产培养物还可以包括悬浮适应的宿主细胞,例如HeLa细胞、HEK293细胞、HEK293衍生细胞(例如HEK293T细胞、HEK293F细胞)、Vero细胞、CHO细胞、CHO-K1细胞、CHO衍生细胞、EB66细胞、BSC细胞、HepG2细胞、LLC-MK细胞、CV-1细胞、COS细胞、MDBK细胞、MDCK细胞、CRFK细胞、RAF细胞、RK细胞、TCMK-1细胞、LLPK细胞、PK15细胞、LLC-RK细胞、MDOK细胞、BHK细胞、BHK-21细胞、NS-1细胞、MRC-5细胞、WI-38细胞、BHK细胞、3T3细胞、293细胞、RK细胞、Per.C6细胞、鸡胚细胞和SF-9细胞,这些细胞可以以多种方式培养,包括(例如)旋转烧瓶、搅拌槽生物反应器和一次性系统(例如Wave袋系统)培养。本领域已知多种悬浮培养物用于生产rAAV颗粒,包括(例如)美国专利No.6,995,006、9,783,826和美国专利申请公开No.20120122155(每个的全文均以引用的方式并入本文中)公开的培养物。

[0185] 包装细胞

[0186] 本领域已知生产rAAV颗粒的任何细胞或细胞系均可用于本文公开的任何一种方法。在一些实施方式中,本文公开的生产rAAV颗粒或增加rAAV颗粒生产的方法使用HeLa细胞、HEK293细胞、HEK293衍生细胞(例如,HEK293T细胞、HEK293F细胞)、Vero细胞、CHO细胞、CHO-K1细胞、CHO衍生细胞、EB66细胞、BSC细胞、HepG2细胞、LLC-MK细胞、CV-1细胞、COS细胞、MDBK细胞、MDCK细胞、CRFK细胞、RAF细胞、RK细胞、TCMK-1细胞、LLPK细胞、PK15细胞、LLC-RK细胞、MDOK细胞、BHK细胞、BHK-21细胞、NS-1细胞、MRC-5细胞、WI-38细胞、BHK细胞、3T3细胞、293细胞、RK细胞、Per.C6细胞、鸡胚细胞或SF-9细胞。在一些实施方式中,本文公开的方法使用哺乳动物细胞。在一些实施方式中,本文公开的方法使用昆虫细胞,例如SF-9细胞。在一些实施方式中,本文公开的方法使用HEK293细胞。在一些实施方式中,本文公开的方法使用适合悬浮培养生长的HEK293细胞。

[0187] 在一些实施方式中,本文公开的细胞培养物是悬浮培养物。在一些实施方式中,本文公开的细胞培养物是包含HEK293的悬浮培养物。在一些实施方式中,本文公开的细胞培养物是包含适合悬浮培养生长的HEK293细胞的悬浮培养物。在一些实施方式中,本文公开的细胞培养物包含无血清培养基、无动物成分培养基或化学成分确定的培养基。在一些实施方式中,本文公开的细胞培养物包含无血清培养基。在一些实施方式中,悬浮适应细胞在摇瓶、旋转瓶、细胞袋或生物反应器中培养。

[0188] 在一些实施方式中,本文公开的细胞培养物包括附着于基质(例如,微载体)的细胞,这些细胞本身悬浮在培养基中。在一些实施方式中,细胞是HEK293细胞。

[0189] 在一些实施方式中,本文公开的细胞培养物是贴壁培养物。在一些实施方式中,本文公开的细胞培养物是包含HEK293的贴壁培养物。在一些实施方式中,本文公开的细胞培养物包含无血清培养基、无动物成分培养基或化学成分确定的培养基。在一些实施方式中,

本文公开的细胞培养物包含无血清培养基。

[0190] 在一些实施方式中,本文公开的细胞培养物包含高密度细胞培养物。在一些实施方式中,培养物的总细胞密度介于约1x10E+06细胞/ml和约30x10E+06细胞/ml之间。在一些实施方式中,超过约50％的细胞是活细胞。在一些实施方式中,细胞是HeLa细胞、HEK293细胞、HEK293衍生细胞(例如,HEK293T细胞、HEK293F细胞)、Vero细胞或SF-9细胞。在进一步的实施方式中,细胞是HEK293细胞。在进一步的实施方式中,细胞是适合悬浮培养生长的HEK293细胞。

[0191] 用作包装细胞的细胞系包括昆虫细胞系。根据本发明,可以使用允许AAV复制并且可以在培养中维持的任何昆虫细胞。其例子包括草地贪夜蛾(例如Sf9或Sf21细胞系)、果蝇属细胞系或蚊子细胞系,例如白纹伊蚊衍生细胞系。优选的细胞系是草地贪夜蛾Sf9细胞系。以下参考文献被并入本文中,以了解它们关于使用昆虫细胞表达异源多肽、将核酸引入此类细胞的方法以及在培养中维持此类细胞的方法的教导:Methods in Molecular Biology,ed.Richard,Humana Press,N J(1995);O'Reilly等,Baculovirus Expression Vectors:A Laboratory Manual,Oxford Univ.Press(1994);Samulski等,1989,J.Virol.63:3822-3828;Kajigaya等,1991,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 88:4646-4650;Ruffing等,1992年,J.Virol.66:6922-6930;Kimbauer等,1996年,Virol.219:37-44;Zhao等,2000年,Virol.272:382-393;以及Samulski等,美国专利No.6,204,059。

[0192] 例如,本文所述实施方式中所用的病毒衣壳可使用本领域已知的任何方法产生,例如通过杆状病毒表达产生(Brown等,(1994)Virology 198:477-488)。作为另一种选择,可在昆虫细胞中使用杆状病毒载体递送rep/cap基因和rAAV模板来产生本发明的病毒载体,例如,如Urabe等,2002,Human Gene Therapy 13:1935-1943中所述。

[0193] 在另一方面,本文提供了在昆虫细胞中产生rAAV的方法,其中可通过下列方法构建杆状病毒包装系统或载体以携带AAV Rep和Cap编码区:将这些基因改造到杆状病毒载体的多角体编码区中,并通过转染到宿主细胞中产生病毒重组体。值得注意的是,当使用杆状病毒产生AAV(优选地,AAV DNA)时,载体产物是自身互补的AAV样分子,而不使用AAV ITR突变。这似乎是昆虫细胞中AAV rep切口无效的副产物,由于缺乏功能性Rep酶活性,导致自身互补的DNA分子。宿主细胞是杆状病毒感染的细胞,或者已在其中引入编码杆状病毒辅助功能的额外核酸,或者在其中包含这些杆状病毒辅助功能。这些杆状病毒可以表达AAV成分,随后促进衣壳的产生。

[0194] 在生产过程中,包装细胞通常包括一种或多种病毒载体功能以及足以导致病毒载体复制和包装的辅助功能和包装功能。这些各种功能可以使用遗传构建体(例如质粒或扩增子)一起或单独提供给包装细胞,并且它们可以存在于细胞系内的染色体外或整合到细胞的染色体中。

[0195] 细胞可以具有已整合的所述功能中的任一个或多个,例如,具有染色体外整合或整合到细胞染色体DNA中的一个或多个载体功能的细胞系、具有染色体外整合或整合到细胞染色体DNA中的一个或多个包装功能的细胞系、或具有染色体外整合或整合到细胞染色体DNA中的辅助功能的细胞系。

[0196] rAAV纯化

[0197] 可以使用本领域已知的方法分离产生的rAAV颗粒。在一些实施方式中,分离rAAV

颗粒的方法包括下游处理,例如,收获细胞培养物、澄清收获的细胞培养物(例如,通过离心或深度过滤)、切向流过滤、亲和层析、阴离子交换层析、阳离子交换层析、尺寸排阻层析、疏水相互作用层析、羟基磷灰石层析、无菌过滤或其任何组合。在一些实施方式中,下游处理包括以下至少2个、至少3个、至少4个、至少5个或至少6个:收获细胞培养物、澄清收获的细胞培养物(例如,通过离心或深度过滤)、切向流过滤、亲和层析、阴离子交换层析、阳离子交换层析、尺寸排阻层析、疏水相互作用层析、羟基磷灰石层析和无菌过滤。在一些实施方式中,下游处理包括收获细胞培养物、澄清所收获的细胞培养物(例如,通过深层过滤)、无菌过滤、切向流过滤、亲和层析和阴离子交换层析。在一些实施方式中,下游处理包括澄清收获的细胞培养物、无菌过滤、切向流过滤、亲和层析和阴离子交换层析。在一些实施方式中,下游处理包括通过深层过滤、无菌过滤、切向流过滤、亲和层析和阴离子交换层析来澄清收获的细胞培养物。在一些实施方式中,澄清收获的细胞培养物包括无菌过滤。在一些实施方式中,下游处理不包括离心。

[0198] 在一些实施方式中,分离rAAV颗粒的方法包括收获细胞培养物、澄清收获的细胞培养物(例如,通过深层过滤)、第一无菌过滤、第一切向流过滤、亲和层析、阴离子交换层析(例如,使用季胺配体的整装阴离子交换层析或AEX层析)、第二切向流过滤和第二无菌过滤。在一些实施方式中,本文公开的分离rAAV颗粒的方法包括收获细胞培养物、澄清收获的细胞培养物(例如,通过深层过滤)、第一无菌过滤、亲和层析、阴离子交换层析(例如,使用季胺配体的整装阴离子交换层析或AEX层析)、切向流过滤和第二无菌过滤。在一些实施方式中,分离rAAV颗粒的方法包括澄清收获的细胞培养物、第一无菌过滤、第一切向流过滤、亲和层析、阴离子交换层析(例如,使用季胺配体的整装阴离子交换层析或AEX层析)、第二切向流过滤和第二无菌过滤。在一些实施方式中,本文公开的分离rAAV颗粒的方法包括澄清收获的细胞培养物、第一无菌过滤、亲和层析、阴离子交换层析(例如,使用季胺配体的整装阴离子交换层析或AEX层析)、切向流过滤和第二无菌过滤。在一些实施方式中,分离rAAV颗粒的方法包括通过深层过滤、第一无菌过滤、第一次切向流过滤、亲和层析、阴离子交换层析(例如,使用季胺配体的整装阴离子交换层析或AEX层析)、第二切向流过滤和第二无菌过滤来澄清收获的细胞培养物。在一些实施方式中,本文公开的分离rAAV颗粒的方法包括通过深层过滤、第一无菌过滤、亲和层析、阴离子交换层析(例如,使用季胺配体的整装阴离子交换层析或AEX层析)、切向流过滤和第二无菌过滤来澄清收获的细胞培养物。在一些实施方式中,该方法不包括离心。在一些实施方式中,澄清收获的细胞培养物包括无菌过滤。

[0199] 可以通过收获包含宿主细胞的生产培养物或通过收获生产培养物的废培养基从rAAV生产培养物中收获重组AAV颗粒,前提是这些细胞在本领域已知的条件下培养,以促使rAAV颗粒从完整的宿主细胞释放到培养基中。还可以通过裂解生产培养物的宿主细胞从rAAV生产培养物中收获重组AAV颗粒。裂解细胞的合适方法也是本领域已知的,并且包括(例如)多次冻融循环、超声处理、微流化和用化学品(例如洗涤剂和/或蛋白酶)处理。

[0200] 在收获时,rAAV生产培养物可以包含以下一种或多种:(1)宿主细胞蛋白;(2)宿主细胞DNA;(3)质粒DNA;(4)辅助病毒;(5)辅助病毒蛋白;(6)辅助病毒DNA;和(7)培养基组分,包括(例如)血清蛋白、氨基酸、转铁蛋白和其他低分子量蛋白。rAAV生产培养物还可含有与产品相关的杂质,例如失活的载体形式、空病毒衣壳、聚集的病毒颗粒或衣壳、错误折叠的病毒衣壳、降解的病毒颗粒。

[0201] 在一些实施方式中,澄清rAAV生产培养收获物以去除宿主细胞碎片。在一些实施方式中,通过一系列深度过滤器过滤澄清生产培养收获物。澄清也可以通过本领域已知的各种其他标准技术来实现,例如,离心或通过本领域已知的任何孔径为0.2mm或更大的醋酸纤维素过滤器过滤。在一些实施方式中,澄清收获的细胞培养物包括无菌过滤。在一些实施方式中,通过离心澄清生产培养收获物。在一些实施方式中,澄清生产培养收获物不包括离心。

[0202] 在一些实施方式中,使用过滤澄清收获的细胞培养物。在一些实施方式中,澄清收获的细胞培养物包括深度过滤。在一些实施方式中,澄清收获的细胞培养物还包括深度过滤和无菌过滤。在一些实施方式中,使用包含一种或多种不同过滤介质的过滤器组澄清收获的细胞培养物。在一些实施方式中,过滤器组包含深层过滤介质。在一些实施方式中,过滤器组包含一种或多种深层过滤介质。在一些实施方式中,过滤器组包含两种深层过滤介质。在一些实施方式中,过滤器组包含无菌过滤介质。在一些实施方式中,过滤器组包含2种深层过滤介质和一种无菌过滤介质。在一些实施方式中,深层过滤介质是多孔深层过滤器。在一些实施方式中,过滤器组包含Clarisolve®20MS、Millistak+®COHC和无菌级过滤介质。在一些实施方式中,过滤器组包含Clarisolve®20MS、Millistak+®COHC和Sartopore®2XLG 0.2pm。在一些实施方式中,在将收获的细胞培养物与深层过滤器接触之前对其进行预处理。在一些实施方式中,预处理包括向收获的细胞培养物中添加盐。在一些实施方式中,预处理包括向收获的细胞培养物中添加化学絮凝剂。在一些实施方式中,在收获的细胞培养物与深层过滤器接触之前,不对其进行预处理。

[0203] 在一些实施方式中,澄清的进料在施加到层析介质(例如亲和层析介质)之前通过切向流过滤(“TFF”)浓缩。Paul等,Human Gene Therapy 4:609-615(1993)中描述了使用TFF超滤进行病毒的大规模浓缩。澄清进料的TFF浓缩使得澄清进料能够以技术上可控的体积进行层析,并且允许更合理地确定柱的尺寸,而无需长时间的再循环时间。在一些实施方式中,将澄清进料浓缩至少两倍到至少十倍之间。在一些实施方式中,将澄清进料浓缩至少十倍到至少二十倍之间。在一些实施方式中,将澄清进料浓缩至少二十倍到至少五十倍之间。在一些实施方式中,将澄清进料浓缩约二十倍。本领域的普通技术人员还将认识到,TFF还可用于通过渗滤从澄清进料中去除小分子杂质(例如,包含培养基成分、血清白蛋白或其他血清蛋白的细胞培养污染物)。在一些实施方式中,对澄清进料进行渗滤以去除小分子杂质。在一些实施方式中,渗滤包括使用约3至约10渗滤体积之间的缓冲液。在一些实施方式中,渗滤包括使用约5渗滤体积的缓冲液。本领域的普通技术人员还将认识到,TFF还可用于纯化过程中的任何步骤,其中需要在执行纯化过程中的下一步之前交换缓冲液。在一些实施方式中,本文公开的从澄清进料中分离rAAV的方法包括使用TFF来交换缓冲液。

[0204] 亲和层析可用于从组合物中分离rAAV颗粒。在一些实施方式中,亲和层析用于从澄清的进料中分离rAAV颗粒。在一些实施方式中,亲和层析用于从已进行切向流过滤的澄清的进料中分离rAAV颗粒。合适的亲和层析介质是本领域已知的,包括但不限于:AVB Sepharose™、POROS™CaptureSelect™AAVX亲和树脂、POROS™CaptureSelect™AAV9亲和树脂和POROS™CaptureSelect™AAV8亲和树脂。在一些实施方式中,亲和层析介质是POROS™CaptureSelect™AAV9亲和树脂。在一些实施方式中,亲和层析介质是POROS™CaptureSelect™AAV8亲和树脂。在一些实施方式中,亲和层析介质是

POROS™CaptureSelect™AAV9亲和树脂。在一些实施方式中,亲和层析介质是POROS™CaptureSelect™AAV8亲和树脂。亲和层析介质是POROS™CaptureSelect™AAVX亲和树脂。

[0205] 阴离子交换层析可用于从组合物中分离rAAV颗粒。在一些实施方式中,在亲和层析之后使用阴离子交换层析作为最终浓缩和精制步骤。合适的阴离子交换层析介质是本领域已知的,包括但不限于:Unosphere Q(Biorad,Hercules,Calif.)和N带电氨基或亚氨基树脂,例如POROS 50PI,或任何DEAE、TMAE、叔胺或季胺,或本领域已知的PEI基树脂(美国专利No.6,989,264;Brument等,Mol.Therapy 6(5):678-686(2002);Gao等,Hum.Gene Therapy 11:2079-2091(2000))。在一些实施方式中,阴离子交换层析介质包含季胺。在一些实施方式中,阴离子交换介质是整装阴离子交换层析树脂。在一些实施方式中,整装阴离子交换层析介质包含甲基丙烯酸缩水甘油酯-乙烯二甲基丙烯酸酯或苯乙烯-二乙烯基苯聚合物。在一些实施方式中,整装阴离子交换层析介质选自CIMmultus™QA-1高级复合柱(季胺)、CIMmultus™DEAE-1高级复合柱(二乙氨基)、CIM®QA Disk(季胺)、CIM®DEAE和CIM®EDA Disk(乙二氨基)。在一些实施方式中,整装阴离子交换层析介质是CIMmultus™QA-1高级复合柱(季胺)。在一些实施方式中,整装阴离子交换层析介质是CIM®QA Disk(季胺)。在一些实施方式中,阴离子交换层析介质是CIM QA(BIA Separations,斯洛文尼亚)。在一些实施方式中,阴离子交换层析介质是BIA CIM®QA-80(柱体积为80毫升)。本领域的普通技术人员可以理解,可以识别具有合适离子强度的洗涤缓冲液,使得rAAV保持与树脂结合,同时去除杂质(包括但不限于可能由上游纯化步骤引入的杂质)。

[0206] 在另外的实施方式中,本公开提供了包含根据本文公开的方法生产的分离的rAAV颗粒的组合物。在一些实施方式中,该组合物是包含药学上可接受的载体的药物组合物。

[0207] 本文所用的术语“药学上可接受”是指生物上可接受的气态、液态或固态制剂,或其混合物,其适用于一种或多种施用途径、体内递送或接触。“药学上可接受的”组合物是生物上或其他方面无不良影响的材料,例如,该材料可以施用于受试者而不会引起显著的不良生物学效应。因此,这种药物组合物可用于(例如)将根据所公开的方法分离的rAAV施用于受试者。这种组合物包含与药物给药或体内接触或递送相容的溶剂(水性或非水性)、溶液(水性或非水性)、乳剂(例如,油包水或水包油)、悬浮液、糖浆、酏剂、分散和悬浮介质、涂层、等渗和吸收促进剂或延迟剂。水性和非水性溶剂、溶液和悬浮液可以包含悬浮剂和增稠剂。此类药学上可接受的载体包括片剂(包衣或未包衣)、胶囊(硬胶囊或软胶囊)、微珠、粉末、颗粒和晶体。还可以将补充活性化合物(例如防腐剂、抗菌剂、抗病毒剂和抗真菌剂)加入到组合物中。可以将药物组合物配制为与特定施用或递送途径兼容,如本文所述或本领域技术人员所知。因此,药物组合物包含适合通过各种途径施用的载体、稀释剂或赋形剂。

[0208] 适用于rAAV颗粒以及本发明的方法和用途的药物组合物和递送系统是本领域中已知的(例如,参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy(2003)20thed.,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.;Remington's Pharmaceutical Sciences(1990)18th ed.,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.;The Merck Index(1996)12th ed.,Merck Publishing Group,Whitehouse,N.J.;Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms(1993),Technonic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,Pa.;Ansel和Stoklosa,

Pharmaceutical Calculations(2001)1 1th ed.,Lippincott Williams&Wilkins,Baltimore,Md.;以及Poznansky等,Drug Delivery Systems(1980),R.L.Juliano,ed.,Oxford,N.Y.,pp.253-315)。

[0209] 如本文所述,所述rAAV可用作治疗MECP2缺陷的基因治疗。治疗方法包括将所述rAAV注射到需要治疗的受试者体内。本领域技术人员将理解治疗MECP2缺陷所需的量,因为其取决于包括受试者的大小、年龄和性别在内的多个因素。

[0210] 治疗方法

[0211] 另一方面,提出了治疗方法。该方法包括向有需要的患者施用有效量的包含上述任何所需构建体或rAAV病毒体的药物组合物。

[0212] 在一些实施方式中,有效量是至少1×10^{8}个病毒基因组/剂量。在一些实施方式中,有效量是至少5×10^{8}个病毒基因组/剂量、7.5×10^{8}个病毒基因组/剂量、至少1×10^{9}个病毒基因组/剂量、至少2.5×10^{9}个病毒基因组/剂量、至少5×10^{9}个病毒基因组/剂量。

[0213] 在一些实施方式中,有效量是至少1×10^{11}个病毒基因组/kg患者体重、至少5×10^{11}个病毒基因组/kg、至少1×10^{12}个病毒基因组/kg、至少5×10^{12}个病毒基因组/kg,至少1×10^{13}个病毒基因组/kg、至少1×10^{14}个病毒基因组/kg、或至少5×10^{14}个。在一些实施方式中,rAAV基于脑重量而不是体重来给药。在一些实施方式中,考虑rAAV剂量为低剂量并且对于CNS适应症特别有益。

[0214] 在一些实施方式中,rAAV通过静脉内施用。在一些实施方式中,rAAV通过鞘内施用。在一些实施方式中,rAAV通过脑室内注射来施用。在一些实施方式中,rAAV通过脑池内施用来施用。在一些实施方式中,rAAV通过玻璃体内注射来施用。

[0215] 在各种实施方式中,公开了治疗受试者中的MECP2相关病症(Rett综合征)的方法,其中该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的任何多核苷酸构建体、或载体、或包含载体的rAAV、或病毒体、或包含本文所述的任何这些元件的任何药物组合物。

[0216] 在某些实施方式中,作为治疗盒的额外更改,按照密码子优化和野生型的方式测试目标基因(GOI)。确定将几种不同的密码子优化的MECP2序列与野生型人MECP2序列(SEQ ID NO:7)进行比较,并且确定密码子优化的MECP2表达相对于野生型MECP2序列(SEQ ID NO:7)没有改善。因此,在先导治疗盒中,使用野生型人MECP2密码子。

实施例

[0217] 以下是用于实施本发明的具体实施方式的实施例。提供这些实施例仅用于示意目的,并不旨在以任何方式限制本发明的范围。已经尽力确保所用数字的准确性(例如:量、温度等),但当然应该允许一些实验误差和偏差。

[0218] 除非另有说明,本发明的实践将采用本领域技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学的常规方法。这些技术在文献中有充分的解释。

[0219] 实施例1优化MECP2表达盒

[0220] 图1A示出MeCP2剂量敏感基因治疗盒,其被设计为降低剂量敏感性、防止过表达并达到治疗设定点转基因水平。图1B示出流式细胞术数据图,示意了治疗盒的不同修饰(前馈回路)对于调节MeCP2蛋白表达水平的影响。将报告基因构建体(其中报告基因mNeonGreen与hMeCP2融合)和第二表达盒(允许将mRuby作为转染对照进行测量)转染至HEK细胞中,48

小时后处理细胞,通过流式细胞术进行分析,并且测量mRuby(转染效率)和mNeonGreen(MeCP2)的水平。

[0221] 图2是示出被调节以调整MeCP2的剂量不敏感性和表达设定点的多核苷酸盒元件的示例的示意图。

[0222] 实施例2示例使用治疗性MECP2盒的疗效的小鼠模型数据

[0223] 疗效:为了证明体内疗效,使用AAV将受调节或未调节的MECP2构建体递送至雄性Mecp2敲除小鼠。包装到AAV9中的EXACT调节的MECP2构建体显示出高效的病毒基因组包装。这种严重的小鼠模型显示出寿命缩短(中位存活期为约11周)以及明显的呼吸和运动障碍。以1e11 vg/小鼠的剂量通过脑室内注射(ICV)给药先导调节MECP2构建体的小鼠显示出生存率显著改善(中位存活期延长=14周),并且伴随着RTT样临床评分的改善。相比之下,给药未调节的构建体的小鼠没有表现出任何生存改善,可能是由于过表达毒性所致。在3×10^{11}vg/小鼠的较高剂量下,用受调节的先导构建体治疗的小鼠显示出寿命的显著改善(35周后存活率为75%),并且RTT样表型显著改善。在较高剂量下,用未调节的构建体治疗的小鼠表现出严重的MeCP2过表达迹象,并在约3周后被安乐死。这些数据证明了EXACT回路能够实现强大的疗效并显著提高MECP2基因治疗载体的安全性。在通过Labcorp进行的单独毒性研究中,在以治疗相关剂量治疗的非人类灵长类动物中证明了安全性。最后,还通过RNAseq评估了非哺乳动物miRNA元件在人类细胞系中的安全性,结果表明,当转染miRNA时,最重要的预测人类基因靶标的表达没有变化。

[0224] 这些结果在图3A-C中,其示意了MeCP2构建体的模块化多核苷酸序列元件和设计策略(图3A)以及MeCP2表达数据。在给野生型小鼠给药AAV9-RTT252、AAV9-RTT253、AAV9-RTT254(也称为NGN-401)、AAV9-RTT269、AAV9-RTT270、AAV9-RTT271或AAV9-RTT272后21-23天,收集组织样本并通过蛋白质印迹分析以确定在WT皮质(图3B)和WT海马(图3C)中MeCP2表达水平。

[0225] 图4A-C是在P1时以$3x10^{11}$ vg/小鼠的剂量注射治疗性AAV9-MECP2构建体后,比较治疗性MEPC2构建体对$Mecp2^{-/y}$(KO)小鼠的存活率(图4A)、体重(图4B)和RTT临床评分(图4C)的图示。RTT临床评分是一种观察性评分系统,用于确定小鼠雷特表型的严重程度。对于表型的每个组成部分,评分范围从0(如野生型)到5(最严重)。

[0226] 图5A-C示出了使用不同的多核苷酸盒成分进行系统调整,以识别和滴定表达水平从而获得最佳疗效(即中间或中等的表达水平)。图中显示了$Mecp2^{-/y}$动物的生存图和RTT临床评分,这些动物以$3x10^{11}$ vg/小鼠的剂量给药了表达弱(图5A)、中等(图5B)或强(图5C)水平的转基因MeCP2的AAV9-MECP2构建体。

[0227] 图6A-B示出了AAV9-RTT254治疗的KO动物与载剂治疗KO动物相比,生存率(图6A)和疗效(RTT表型评分,图6B)的改善。

[0228] 图7A-F示出了在两种剂量($1x10^{11}$ vg和$3x10^{11}$ vg)下,与对照组相比,AAV9-RTT254治疗的KO小鼠运动和呼吸表型域改善的图形结果。

[0229] 实施例3:半合子雄性小鼠模型中的剂量选择:注射后52周的RTT254/NGN-401存活和评分数据

[0230] 雷特综合征(RTT)的半合子雄性小鼠模型的每个细胞均完全敲除Mecp2(Mecp2$^{-/y}$),从而快速发展出稳健且可重复的RTT样表型,例如呼吸障碍、衰弱性呼吸暂停事件、痉

挛、运动不协调和行走能力丧失。小鼠通常只能存活到5-20周龄,中位存活期约为10周。

[0231] 进行了体内疗效研究,以在雄性Mecp2$^{-/y}$小鼠模型中测试NGN-401。在出生后第P0-2天通过脑室内(ICV)注射对Mecp2$^{-/y}$小鼠给药NGN-401或载剂。以总1.0×10^{11}或3.0×10^{11}vg/小鼠的剂量水平施用NGN-401,这是根据早期体内概念验证研究选择的。对给药NGN-401的小鼠进行随访,以追踪存活期和疾病表型。

[0232] 将每组总共10-29只动物纳入研究中,以评估存活期和RTT表型改善情况。使用爱丁堡大学开发的评分系统评估RTT表型。用NGN-401治疗动物显示出存活率的显著增加(在NGN-401剂量为1.0×10^{11}和3.0×10^{11}vg/小鼠时,中位存活期从载剂对照Mecp2$^{-/y}$小鼠的9周分别延长至23周和37周)。与载剂治疗小鼠相比,还观察到RTT表型的改善,同时RTT样表型减少。NGN-401剂量越高,观察到越好的疗效。

[0233] 表1:研究设计

[0234]

组	性别	表型	测试物品	剂量(vg/小鼠)	数量(尸检/存活
1	M	WT	载剂	-	6/27
2	M	*Mecp2*$^{-/y}$	载剂	-	6/28
3	M	*Mecp2*$^{-/y}$	NGN-401	1.0×10^{11}	6/10
4	M	*Mecp2*$^{-/y}$	NGN-401	3.0×10^{11}	6/15

[0235] 所有临床评估均由对基因型和治疗均不知情的人员进行。动物管理员每天对每只动物进行笼侧观察,并且记录异常发现。从P28开始每周记录一次体重。使用台面秤测量个体体重。从P28开始,每周使用RTT评分(一种非侵入性观察评分系统,由爱丁堡大学的Jacky Guy博士开发的评分系统的修改版本(Guy等,2007年(DOI:10.1126/science.1138389))评估RTT表型。盲法研究人员对动物的下列6个参数分别给予0-5分:活动性、步态、后肢抱紧、震颤、呼吸和一般状况。0分表示野生型动物的表型,5分表示最严重的表型。然后将这些分数组合起来得出RTT表型总分。收集每只动物的详细记录。当动物达到安乐死的人道终点标准或在30周的计划终末处死期时,将动物捕杀。由于接受NGN-401治疗的Mecp2$^{-/y}$小鼠的存活延长,将这些队列延长至52周,以全面评估存活期和表型改善。

[0236] 生命期评估:存活率

[0237] 与载剂治疗小鼠相比,用NGN-401治疗的小鼠显示出存活率的显著增加(图15)。在1.0×10^{11}vg/小鼠的剂量下,中位存活期从载剂对照Mecp$^{2-/y}$小鼠的9周延长至23周,以及在3.0×10^{11}vg/小鼠的剂量下,延长至37周($p<0.0001$,Mantel-Cox检验)。在研究的第20周,载剂治疗组中的所有小鼠均被发现死亡或达到人道终点。相比之下,在两种剂量的NGN-401治

疗下,寿命最长的小鼠均达到52周龄,研究此时结束。在P0-2 ICV递送载剂或NGN-401后发现死亡或达到人道终点的具有类似RTT表型的动物的生存率曲线。断奶前发现失踪的幼崽或因与RTT表型无关的原因而被捕杀的小鼠不包括在内。组规模的数量显示在图例中。**** p<0.0001Mantel-Cox检验。

[0238] 生命期评估:体重

[0239] 从P28开始每周记录每只动物的体重。载剂治疗WT小鼠和载剂治疗Mecp2$^{-/y}$小鼠之间的体重存在显著差异,从8周龄到13周龄各组之间存在显著差异(混合效应模型(REML),采用Sidak多重比较检验)(图16)。与载剂治疗Mecp2$^{-/y}$小鼠相比,以1.0×10^{11}或3.0×10^{11}vg/小鼠的剂量用NGN-401治疗的Mecp2$^{-/y}$小鼠在体重方面没有表现出显著差异(混合效应模型(REML),采用Sidak多重比较检验)。NGN-401治疗Mecp2$^{-/y}$小鼠在整个研究过程中体重持续增加。

[0240] 在P0-2,在ICV递送载剂或NGN-401后的生命期体重。从P28开始每周对动物进行称重。组规模的数量显示在图例中。

[0241] 生命期评估:RTT表型评分

[0242] 雄性Mecp2$^{-/y}$小鼠从约4周龄起,当出现明显的运动、自主神经和呼吸障碍时,就会出现快速进展的RTT样表型。从P28开始,每周使用观察评分系统评估小鼠的RTT样表型。RTT总分反映了所有六个评估参数(活动性、步态、后肢抱紧、震颤、呼吸和一般状况)的个体得分的总和。

[0243] 在整个研究过程中,载剂治疗WT小鼠和载剂治疗Mecp2$^{-/y}$小鼠之间的总RTT评分存在显著差异,从5周龄到13周龄,各组之间存在显著差异(混合效应模型(REML),采用Sidak多重比较检验)(图17)。同样,与载剂治疗Mecp2$^{-/y}$小鼠相比,在整个研究过程中,以1.0×10^{11}或3.0×10^{11}vg/小鼠的剂量用NGN-401治疗的Mecp2$^{-/y}$小鼠表现出表型评分的强劲改善,从5周到13周龄,NGN-401治疗和载剂治疗小鼠之间存在显著差异(混合效应模型(REML),采用Sidak多重比较检验)。由于载剂治疗Mecp2$^{-/y}$队列中剩余的小鼠不足,无法在13周龄后进行统计比较。

[0244] 在P0-2,在ICV递送载体或NGN-401后的综合RTT表型评分。从P28开始,每周对动物的每个参数进行从0(正常)到5(最严重)的评分。将分数组合起来得出RTT表型总分。组规模的数量如图例所示(图17)。

[0245] 生命期评估:个体RTT表型

[0246] NGN-401治疗动物表现出表型评分的显著改善。如图7A-F所示,对六个RTT参数中每一个的分析(即活动性、步态、后肢抱紧、震颤、呼吸和一般状况)表明,ICV递送NGN-401导致所有参数下降,特别是活动性、步态和呼吸。用载剂治疗的动物在活动性、步态和后肢抱紧参数方面的临床评分迅速上升至最高水平(评分=5),表现出非常严重的运动丧失和双后肢抱紧的表型。NGN-401治疗阻止了临床评分的快速上升。同样,在呼吸参数方面,NGN-401治疗降低了可见呼吸暂停的频率。

[0247] 实施例4

[0248] 杂合雌性小鼠模型的耐受性:至注射后25周的存活率和评分

[0249] 雌性杂合Mecp2$^{+/-}$小鼠模型表现出温和且可变的表型,使其不适合作为稳健的疗效模型。然而,这些动物中MeCP2表达的性别、基因型和嵌合性更能代表女性雷特综合征

(RTT)患者。

[0250] 在雌性杂合小鼠中进行了一项体内研究,以评估NGN-401的耐受性,NGN-401是一种MECP2基因治疗构建体,其中表达水平由EXACT miRNA回路调节。将NGN-401与AAV9-RTT251进行了比较,其中AAV9-RTT251是一种未调节的MECP2载体,不包含EXACT miRNA调节回路。使用杆状病毒生产系统制造载体,并在P1/P2时以1.0×10^{11}vg/小鼠或3.0×10^{11}vg/小鼠的剂量通过脑室内(ICV)注射施用该载体。

[0251] 每组总共注射9-20只动物,并使用爱丁堡大学开发的MeCP2过表达毒性评分系统评估NGN-401的耐受性。如图20所示,用NGN-401治疗的动物在研究的26周生命期部分中没有显示出毒性的迹象。相比之下,用未调节的MECP2载体(AAV9-RTT251)治疗的小鼠在约3周龄时表现出严重的毒性,导致死亡或出于人道目的而被安乐死。

[0252] 如图21-22所示,载体DNA生物分布分析和蛋白质印迹分析表明,用NGN-401或AAV9-RTT251治疗的小鼠在同等剂量下表现出相似水平的载体基因组拷贝。然而,如图23A-C-24A-B所示,MeCP2表达水平明显不同。用NGN-401治疗的小鼠表达的载体衍生MeCP2蛋白最多为$Mecp2^{+/-}$小鼠内源蛋白水平的120%,而AAV9-RTT251治疗小鼠中载体衍生MeCP2蛋白水平高达$Mecp2^{+/-}$小鼠内源蛋白水平的1,900%。总之,NGN-401在杂合$Mecp2^{+/-}$小鼠模型(该小鼠模型密切模拟相关患者群体)中具有良好的耐受性,并克服了使用等效的未调节载体观察到的严重毒性。

[0253] 表2:研究设计

[0254]

组	性别	表型	测试物品	剂量(vg/小鼠)	存活(实际纳入)
1	F	WT	载剂	-	20
2	F	*Mecp2*$^{+/-}$	载剂	-	13
3	F	*Mecp2*$^{+/-}$	NGN-401	1.0×10^{11}	11
4	F	*Mecp2*$^{+/-}$	NGN-401	3.0×10^{11}	17
5	F	*Mecp2*$^{+/-}$	AAV9-RTT251	1.0×10^{11}	9
6	F	*Mecp2*$^{+/-}$	AAV9-RTT251	3.0×10^{11}	10

[0255] 所有临床评估均由对基因型和治疗均不知情的人员进行。动物管理员每天对每只动物进行笼侧观察,并且对异常发现进行标记。对于用NGN-401治疗的小鼠,从P28开始每周记录一次体重。用AAV9-RTT251治疗小鼠在P28之前死亡或达到人道终点,因此未获得体重。对于用NGN-401治疗的小鼠,从P28开始每周使用爱丁堡大学Kamal Gadalla开发的6分评分系统评估MeCP2过表达毒性。用AAV9-RTT251治疗的小鼠在计划开始毒性评分之前死亡或达到人道终点。在捕杀之前,对达到人道终点的小鼠进行MeCP2过表达毒性评分。

[0256] 生命期评估:存活率

[0257] 对生命期安全性进行了为期26周的监测。用NGN-401以1.0×10^{11}vg/小鼠或3.0×

10^{11}vg/小鼠治疗的WT小鼠和Mecp2$^{+/-}$小鼠没有遭受任何自发死亡,并且没有动物因达到人道终点而必须被捕杀。相比之下,所有用AAV9-RTT251以3.0×10^{11}vg/小鼠治疗的Mecp2$^{+/-}$小鼠均被发现死亡或到P19时达到人道终点。在1.0×10^{11}vg/小鼠的较低剂量下,超过一半的用AAV9-RTT251治疗小鼠被发现死亡或到P23时达到人道终点,此时该研究因伦理原因而停止,并且将其余的老鼠捕杀。对于载剂治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠,一只动物因在大约10周龄时达到人道终点而被捕杀。所有其他载剂治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠均存活至26周的研究终点(图18)。

[0258] 生命期评估:体重

[0259] 对于NGN-401和载剂治疗小鼠,从P28开始每周记录体重。观察到强烈的表型效应。与载剂治疗WT动物相比,载剂治疗Mecp2$^{+/-}$体重增加(在26周时,载剂治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠的平均体重为29.1g,相比之下载剂治疗WT动物的平均体重为21.2g)。与此形成对比的是,用NGN-401治疗的Mecp2$^{+/-}$小鼠显示出体重对WT水平的矫正。对于AAV9-RTT251治疗小鼠,由于在开始表型分析之前发现小鼠死亡或达到人道终点,因此未测量体重(图19)。

[0260] 生命期评估:MeCP2过表达毒性评分

[0261] 使用由爱丁堡大学的Kamal Gadalla博士开发的评分系统监测毒性表型,以对与MeCP2过表达相关的有害影响进行分类。在两个未调节的AAV9-RTT251治疗组中均观察到严重毒性。对于用最高剂量3.0×10^{11}vg/小鼠治疗的动物,到P19时所有小鼠要么被发现死亡,要么达到最大毒性评分6,并且因人道原因被捕杀。对于用较低剂量1.0×10^{11}vg/小鼠治疗的动物,到P23超过一半的小鼠被发现死亡或达到最大毒性评分6。此时,AAV9-RTT251研究组因伦理原因终止。相比之下,用同等剂量的NGN-401治疗动物没有表现出可观察到的生命期毒性,并且在从0至26周龄保持接近0的平均毒性评分(图20)。

[0262] 载体生物分布

[0263] 使用靶向NGN-401和AAV9-RTT251载体的WPRE3成分的TaqMan qPCR检测来确定载体DNA在各个区域的水平。对于NGN-401治疗小鼠(图21),在26周龄时(研究的生命期部分结束时)测量了生物分布。在所有NGN-401治疗动物的皮质、小脑和肝脏中以剂量依赖性方式检测到载体基因组的存在,其中皮质水平最高,小脑水平最低。对于载剂治疗小鼠,一些背景信号在个体样本中被放大,表明可能在组织收集或核酸提取过程中引入痕量载体DNA,但它通常低于定量测定限。

[0264] 对于AAV9-RTT251治疗小鼠,在约3周龄时测量生物分布,此时由于过表达毒性,小鼠必须在达到人道终点后被捕杀。在所有AAV9-RTT251治疗动物的皮质和肝脏中以剂量依赖性方式检测到载体基因组的存在(图22)。在同等剂量下,NGN-401和AAV9-RTT251的载体基因组水平在皮质中大致相似。这表明NGN-401毒性的预防与表达水平的EXACT调节有关,而不是由于载体生物分布的差异。

[0265] MeCP2表达:蛋白质印迹数据

[0266] 将使用抗MeCP2抗体的蛋白质印迹分析用于测量各个区域的蛋白质表达。抗MeCP2抗体识别小鼠和人类版本的蛋白质,因此测量的蛋白质水平是小鼠内源性MeCP2蛋白质和载体衍生人类蛋白质的组合。结果显示,虽然用NGN-401或AAV9-RTT251治疗的小鼠在同等剂量下表现出相似水平的载体基因组拷贝,但MeCP2表达水平却存在显著差异。在具有最高水平的载体生物分布的皮质中,在1.0×10^{11}和3.0×10^{11}vg/小鼠的剂量下,用NGN-401治疗的小鼠(图23A)分别表达载体衍生MeCP2蛋白的水平比载剂治疗Mecp2$^{+/-}$中水平高98%和

115％。在小脑中,水平较低,在较低剂量下没有可检测到的载体衍生蛋白,而在较高剂量下表达水平比载剂治疗Mecp2$^{+/-}$中水平高35％(图23B)。至关重要的是,即使在转导良好的皮质中使用最高剂量,NGN-401治疗也导致MeCP2总体蛋白水平仅仅比载剂治疗WT小鼠中水平高70％。这证明了NGN-401将蛋白质表达维持在生理限度内的能力。

[0267] 相反,对于1.0×10^{11}和3.0×10^{11}vg/小鼠的剂量,用AAV9-RTT251治疗的小鼠(图24A)在皮质中表达载体衍生MeCP2蛋白的水平分别比载剂治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠中水平高1,200％和1,900％。肝脏中的差异不太明显(图24B),在最高剂量下,NGN-401治疗小鼠表达载体衍生MeCP2蛋白的水平比Mecp2$^{+/-}$小鼠的内源性MeCP2水平高约70％,相比之下AAV9-RTT251治疗小鼠中相应表达水平高190％。这表明,在不存在NGN-401中具有的调节回路的情况下,载体衍生MeCP2蛋白水平显著高于正常生理水平。

[0268] 实施例5

[0269] 杂合雌性小鼠模型中的最大可行剂量:直到注射后8周的存活率&评分,加上表达(蛋白质印迹)和组织病理学

[0270] 在雌性杂合Mecp2$^{+/-}$小鼠中进行了进一步的体内研究,以评估NGN-401的耐受性(NGN-401是一种MECP2基因治疗构建体,其中表达水平由EXACT miRNA回路调节)。在本研究中,使用了7.4×10^{11}vg/小鼠的极高剂量(图25),这是基于载体滴度和注射体积限制可实现的最大剂量。之前使用较低剂量1.0×10^{11}和3.0×10^{11}vg/小鼠的研究并未显示任何MeCP2过表达毒性效应的证据。

[0271] 使用杆状病毒生产系统制造该载体,并且在出生后第1天或第2天(P1/P2)通过脑室内(ICV)注射进行施用。每组总共使用8-12只动物进行为期8周的生命期研究臂。使用爱丁堡大学开发的MeCP2毒性评分系统(MeCP2过表达评分)评估NGN-401的耐受性。在这项研究中,接受高剂量NGN-401治疗动物表现出非常轻微的表型,表现为当尾巴基部提起时后肢异常抱紧。这代表分数1,即过表达毒性分数可达到的最低分数。表型在6周时稳定,然后趋于平台期。

[0272] 8周龄时对载体DNA的评估显示,其在中枢神经系统各个区域具有广泛的生物分布,其中皮质中的水平最高,小脑中的水平最低。蛋白质印迹分析显示出类似的模式,在皮质中观察到最高的MeCP2水平。重要的是,即使在高度转导的皮质中,NGN-401治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠中转基因衍生MeCP2水平也维持在生理水平内,并且与未治疗的WT小鼠中的MeCP2水平相似。

[0273] 为了确定轻度后肢表型的任何组织病理学相关性,在8周龄时每组处死8只小鼠,并由兽医神经病理学家专家评估组织。结果表明,NGN-401没有在评估的组织中引起不良结果。

[0274] 总之,即使在可施用的最大可行载体剂量下,NGN-401治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠也仅显示出非常轻微的生命期后肢表型,与任何组织病理学变化无关。这与未调节的载体形成鲜明对比,此前显示出该载体即使在1.0×10^{11}vg/小鼠的剂量下也具有高毒性,该剂量比当前研究中NGN-401使用的剂量低7.4倍。这凸显了EXACT调节的NGN-401构建体显著改善的安全窗口。

[0275] 表3:研究设计

[0276]

组	性别	表型	测试物品	剂量（vg/小鼠）	6-月/2-月尸检
1	F	WT	载剂	-	12/8
2	F	*Mecp2*$^{+/-}$	载剂	-	8/8
3	F	*Mecp2*$^{+/-}$	NGN-401	7.4×10^{11}	9/8

[0277] 所有临床评估均由对基因型和治疗均不知情的人员进行。动物管理员每天对每只动物进行笼侧观察，并且标记异常发现。从P28开始每周记录一次体重。从P28开始，每周使用由爱丁堡大学开发的6分评分系统评估MeCP2过表达毒性。从P28开始，每周使用RTT评分(一种非侵入性观察评分系统，由爱丁堡大学开发的早期评分系统(Guy等，2007年)修改)评估RTT表型。盲法研究人员对动物的下列6个参数分别给予0-5分：活动性、步态、后肢抱紧、震颤、呼吸和一般状况。0分表示野生型动物的表型，5分表示最严重的表型。然后将这些分数组合起来得出RTT表型总分。

[0278] 生命期评估：存活率

[0279] 监测生命期安全性，直到注射后8周(图25)。用7.4×10^{11}vg/小鼠的NGN-401治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠没有发生任何自发死亡，并且没有动物因达到人道终点而必须被捕杀。对于载剂治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠，一只动物因在大约7周龄时达到人道终点而被捕杀，并且在尸检时发现患有脑积水。对于载剂治疗WT小鼠，一只小鼠在大约5周龄时被发现死亡，一只小鼠在大约6周龄时由于严重脑积水而达到人道终点。

[0280] 生命期评估：体重

[0281] 从P28开始每周记录每只动物的体重(图26)。与WT动物相比，NGN-401治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠体重略有降低(8周时，NGN-401治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠的平均体重为15.2g，相比之下，载剂治疗WT动物的平均体重为16.8g)。与此形成对比的是，载剂治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠的体重稍高，为17.4g。这些结果表明，NGN-401治疗会导致体重轻微下降。

[0282] 生命期评估：MeCP2过表达评分

[0283] 使用爱丁堡大学开发的毒性评分系统监测毒性表型，以对与MeCP2过表达相关的有害影响进行分类。从5周起，在以7.4×10^{11}vg/小鼠的剂量用NGN-401治疗的大多数Mecp2$^{+/-}$小鼠中可检测到非常轻微的表型(图27)。这表现为当小鼠从尾巴的基部悬吊时后肢定位异常，并且满足MeCP2过表达评分最低评分1的标准。除了这种特定的表型之外，小鼠在其他方面似乎都是健康和正常的。在载剂治疗WT或Mecp2$^{+/-}$中未观察到该表型。为了确定这种轻度后肢表型的任何组织病理学相关性，在第8周时捕杀了小鼠队列，并收集了大量组织供兽医病理学家评估。

[0284] 生命期评估：RTT分数

[0285] 与更严重的雄性小鼠模型相比，Mecp2$^{+/-}$雌性小鼠表现出微妙且高度可变的表型。对于用载剂治疗的WT和Mecp2$^{+/-}$小鼠，RTT表型可以忽略不计，8周龄时得分约为2.5(满分30)。在相同年龄，用NGN-401治疗的Mecp2$^{+/-}$小鼠表现出温和的表型，评分为5(图28)。NGN-401治疗小鼠的RTT评分增加是由于存在轻度后肢表型。后肢抱紧表型均被RTT评分和MeCP2

过表达评分捕获,因为它们通常在5-6个月大的Mecp2$^{+/-}$小鼠中观察到,但也可能由于过表达毒性而发生。该表型是可检测到的,但较轻微。

[0286] 载体生物分布

[0287] 使用靶向NGN-401载体的WPRE3成分的qPCR检测来确定载体DNA在各个区域的水平。对于NGN-401治疗小鼠(图29),在尸检的研究臂中在8周龄时测量了生物分布。在所有NGN-401治疗动物的皮质、小脑、胸脊髓和肝脏中均检测到不同水平的载体基因组存在,其中皮质水平最高(5.4个NGN-401拷贝/二倍体基因组),小脑最低(0.14个NGN-401拷贝/二倍体基因组)。

[0288] 在图29中,示出了以7.4×10^{11}vg/小鼠的剂量ICV递送NGN-401后,皮质、小脑、胸脊髓和肝脏中在8周时间点的载体DNA生物分布水平。结果以通过靶向NGN-401载体的WPRE3元件的qPCR检测测定的载体基因组拷贝数/二倍体基因组表示,并使用靶向小鼠肌动蛋白基因的测定对每个二倍体基因组进行归一化。组规模的数量显示在图例中。vg=载体基因组。

[0289] MeCP2表达:蛋白质印迹

[0290] 将使用抗MeCP2抗体的蛋白质印迹分析用于测量各个区域的蛋白质表达。抗MeCP2抗体识别小鼠和人类版本的蛋白质,因此测量的蛋白质水平是小鼠内源性MeCP2蛋白质和载体衍生人类蛋白质的组合。在具有最高水平的载体生物分布的皮质中,用NGN-401治疗的小鼠(图30)表达载体衍生MeCP2蛋白的水平比载剂治疗Mecp2$^{+/-}$中的水平高200%。在小脑中,水平较低,载体衍生MeCP2蛋白水平仅比载体治疗Mecp2$^{+/-}$中水平高16%。重要的是,即使在转导良好的皮质中采用如此高的剂量,NGN-401治疗也仅仅导致MeCP2总蛋白水平比载剂治疗WT小鼠中的水平高出约10%。这证明了即使在用非常高剂量的NGN-401治疗后,NGN-401也能够将蛋白质表达维持在生理限度内。

[0291] 组织病理学

[0292] 由神经病理学家专家对两个月临时处死时收集的组织进行组织病理学评估。NGN-401未在大脑(注射部位)或下列任何其他评估的器官中产生不良结果:自主神经节(各种,位于椎骨的侧面和/或腹侧)、带有骨髓的骨(椎骨)、脑(一个半球)、前脑(主要区域:大脑皮质[额叶、顶叶、颞叶、枕叶]、纹状体、海马、下丘脑、丘脑)、中脑、后脑(主要区域:小脑、脑桥或偶尔延髓)、背根神经节(DRG,用于颈和腰脊髓分区-带有脊神经根[主要用于尾侧腰切片])、心脏(穿过心室的一个纵向切片)、肠:大-结肠横截面(位于腰椎脊髓切片)、肠,小-空肠(或偶尔十二指肠)横截面、肾脏(穿过肾门的一个横截面)、肝脏、肺、神经(尾侧(尾部)、坐骨干和胫骨干的多个横截面,以及坐骨神经的一个纵切面)、卵巢、输卵管、脊髓(颈、胸、腰[可变]和骶骨区域的横截面)、骨骼肌(腓肠肌、股四头肌、各种尾部肌肉)、脾脏(一个纵切面)、子宫(一个纵切面)。

[0293] 实施例6:NHP安全性(Labcorp);安全性以及调节表达对比未调节表达的数据

[0294] 在食蟹猴中启动了安全性和生物分布研究,以在大型动物模型中比较在递送调节NGN-401构建体(相当于RTT254)与其他等效的、未调节MECP2构建体(AAV9-RTT251)后的安全性、载体生物分布和MECP2表达水平。

[0295] 以使用靶向人MECP2转基因的合格ddPCR滴度检测确定的间隔半对数的两个剂量,通过ICV注射施用NGN-401或AAV9-RTT251(表4)。使用Virovek的杆状病毒系统制造本研究中使用的NGN-401和AAV9-RTT251载体。选择的剂量在Mecp2$^{-/y}$疗效研究中显示有效的NGN-

401剂量范围内。该研究旨在通过评估比之前在NHP中测试的更高的剂量,并包括与上述未调节载体AAV9-RTT251进行比较,揭示任何潜在的NGN-401相关毒性,包括由于MeCP2过表达而导致的潜在毒性。考虑到之前小鼠研究中观察到的已知毒性,在载体给药一个月后将AAV9-RTT251治疗组处死,以避免潜在的严重毒性。动物在载体给药前两周开始每日口服泼尼松龙(1mg/kg),并在整个研究期间持续进行。

[0296] 表4:NGN-2021-012在NHP中的安全性和生物分布研究的设计

[0297]

组	N	测试物品	剂量水平（基于 GOI ddPCR）				处死时间点
			浓度（vg/mL）	体积（ml）	总剂量（vg）[a]	剂量（vg/g脑）[b]	
1	2M/1F	NGN-401	2.85×10^{13}	1.3	3.7×10^{13}	5.0×10^{11}	30 天
2	1M/2F	NGN-401	8.50×10^{13}	1.3	1.1×10^{14}	1.5×10^{12}	30 天
3	1M/2F	NGN-401	8.50×10^{13}	1.3	1.1×10^{14}	1.5×10^{12}	92 天
4	2M/1F	AAV9-RTT251	2.85×10^{13}	1.3	3.7×10^{13}	5.0×10^{11}	30 天
5	2M/1F	AAV9-RTT251	1.10×10^{14}	1.0	1.1×10^{14}	1.5×10^{12}	30 天

[0298] [a]使用合格MECP2 ddPCR检测进行评估后,给药时使用的滴度没有变化

[0299] [b]食蟹猴脑重量＝74克

[0300] 该研究包括临床病理学和神经行为观察以及解剖病理学的评估。所有动物均存活至预定处死时间,并且NGN-401或AAV9-RTT251均未观察到与测试对象相关的临床或神经行为、体重或食物消耗的变化,或宏观发现。

[0301] NGN-401和AAV9-RTT251的临床病理学效应包括血小板、白细胞、中性粒细胞绝对值和单核细胞绝对值、纤维蛋白原浓度和丙氨酸转氨酶(ALT)活性轻微或轻度增加。血小板和白细胞计数以及纤维蛋白原浓度增加提示炎症反应。在第92天收集的动物中,到该时间点时,值通常下降到基线。AAV9研究中报道了丙氨酸转氨酶活性短暂增加,但缺乏相关的肝脏重量变化或肝脏的显微镜检查结果。ALT无症状升高是AAV基因治疗的预期效果。在涉及静脉内(IV)和鞘内(IT)施用途径且肝脏暴露量更大的AAV研究中报告了ALT活性短暂增加,通过类固醇治疗对其进行了成功控制。

[0302] 在颈、胸和/或腰背根神经节(单核细胞浸润、神经元细胞损失和/或轴突变性)和/或脊髓(神经根和/或白质中的轴突变性)中观察到两种载体的与测试对象相关的显微镜观察结果。这些发现与发生率或严重程度没有剂量关系,在中期和末期处死时相似,并且被认为不是不利的。这与目前对AAV基因治疗安全性的理解是一致的。背根神经节(DRG)的组织病理学发现是AAV基因治疗的预期效果,因为施用NHP的AAV研究报告了这些临床无症状发现。目前可用的数据表明,在使用NHP的非临床研究中,AAV基因治疗后DRG病理几乎是普遍存在的,并且在治疗性转基因剂量治疗后并未导致临床症状。

[0303] 在研究的第3/4周和第13周,对上感觉神经(桡神经和正中神经)和下感觉神经(腓

肠神经、腓神经和隐神经)进行神经传导测量。神经传导速度(NCV)距基线降低>3m/s被认为是NCV减慢。表5总结了每个治疗组中感觉NCV减慢的发生率。

[0304] 表5:NGN-2021-012中表现出感觉NCV减慢的NHP数量

[0305]

组	桡神经	正中神经	腓肠神经	腓神经	隐神经
NGN-401 5.0×10^{11} vg/g (n=3)					
NGN-401 1.5×10^{12} vg/g (n=6)			6只中1只[a] 3只中1只[b]	6只中1只[a]	
AAV9-RTT251			3只中3只[a] (2只中无	3只中3只[a]	

[0306]

组	桡神经	正中神经	腓肠神经	腓神经	隐神经
5.0×10^{11} vg/g (n=3)			反应)		
AAV9-RTT251 1.5×10^{12} vg/g (n=3)			3只中2只[a]		3只中1只[a]

[0307] [a]第3/4周的发现

[0308] [b]第13周的发现

[0309] 在任何时间点均未发现桡神经或正中神经感觉功能丧失。在第3/4周,接受低剂量AAV9-RTT251的两只动物表现出腓肠神经无反应,一只动物表现出NCV减慢。与其他组相比,这种情况被认为是严重的并且发生率更高。所有其他研究结果表明,对各神经功能的轻微或中度影响的发生率较低,并且预计各自的神经将保持在生理功能参数范围内。值得注意的是,低剂量AAV9-RTT251组中的一只动物在第3/4周期间观察到F-M波潜伏期差异较小的潜伏期延长,这可能表明胫神经近端部分的运动传导减慢。

[0310] 总体而言,腓肠NCV数据突显了NGN-401与不包含EXACT自调节技术的其它等效MECP2载体相比的安全性差异,因为九只NGN-401治疗动物中有两只表现出腓肠NCV减慢,而AAV9-RTT251治疗六只动物中有五只表现出腓肠NCV减慢。

[0311] ICV施用NGN-401和AAV9-RTT251后1个月,收集选定的组织(脑、肝、脊髓)以评估mRNA表达。使用靶向MECP2 mRNA的3'UTR中的WPRE3元件的qRT-PCR检测评估转基因表达。当

直接比较AAV9-RTT251产生的mRNA水平与NGN-401产生的mRNA水平时,EXACT技术对NGN-401的影响显而易见。将每个剂量组的转基因mRNA水平(拷贝数/μg RNA)归一化为评估的每个区域中的NGN-401低剂量组(图31)。在大多数区域,AAV9-RTT251产生的mRNA水平比接受同等剂量NGN-401的相应组的水平高出几倍,并且在动物之间也表现出更大的变异性。这些数据证明EXACT技术能够调节大型动物模型中CNS组织中的表达水平。

[0312] 这些数据表明,几种优化的治疗性多核苷酸盒是雷特综合征有效基因治疗的良好候选者,并且避免了安全/毒性问题。

[0313] 临床设计

[0314] 已经设计了临床剂量并建议用于临床试验,其中受试者接受1.0×10^{15}vg的剂量给药,通过10mL ICV注射以1.0×10^{14}vg/mL递送。

[0315] 根据女性平均大脑重量,1E15vg可以调整为8.3×10^{11}vg/g脑,但由于脑尺寸较小,患有雷特综合征的女性每克脑重量的实际剂量可能更高。对于某些患者来说,有效剂量为约8.3×10^{11}vg/g脑。预期给药的受试者将基本上没有MECP2过表达毒性,这与上文提供的GLP和NHP安全性和毒性研究一致。此外,根据动物模型各个领域的改进,将终点映射到临床前数据,如下所示。

[0316] 将终点映射到临床前数据

[0317]

雷特动物模型各领域的改进	可映射到动物数据的人类中的测量
呼吸暂停/呼吸	呼吸暂停/呼吸-CGI 呼吸，Emerald/RSBQ
运动改善/步态	运动改善–CGI 运动、方面、RSBQ、雷特综合征粗运动量表
自主神经功能障碍	来自 CGI 和 RSBQ 的呼吸项目、心率变异性、GI 症状、Emerald 结果、便秘、心率和血压变异性

[0318] 序列表和特征

[0319]

SEQ ID NO	构建体
SEQ ID NO：1	CMV/CBA
SEQ ID NO：2	MINIX_内含子
SEQ ID NO：3	EF1a_内含子
SEQ ID NO：4	EXACT 1（ffluc1）

[0320]

SEQ ID NO：5	EXACT2（ran1g）
SEQ ID NO：6	EXACT3（ran2g）
SEQ ID NO：7	人类 MECP2
SEQ ID NO：8	3xEXACT1_结合位点（ffluc1）
SEQ ID NO：9	3xEXACT2_结合位点（ran1g）
SEQ ID NO：10	3xEXACT3_结合位点（ran2g）
SEQ ID NO：11	WPRE3
SEQ ID NO：12	Sv40polyA
SEQ ID NO：13	优选 Kozak 序列
SEQ ID NO：14	RTT252_CBE-ffluc1-hsaMECP2-3×结合-SV40pA
SEQ ID NO：15	RTT253_CBE-ffluc1-hsaMECP2-3×结合-WPRE3-SV40pA
SEQ ID NO：16	RTT254_CBM-ffluc1-hsaMECP2-3×结合-WPRE3-SV40pA
SEQ ID NO：17	RTT269_CBE-ffluc1-hsaMECP2-3×结合_mut3-WPRE3-SV40pA
SEQ ID NO：18	RTT270_CBE-ffluc1-hsaMECP2-3×结合_mut6-WPRE3-SV40pA
SEQ ID NO：19	RTT271_CBE-ran1g-hsaMECP2-3×结合-WPRE3-SV40pA
SEQ ID NO：20	RTT272_CBE-ran2g-hsaMECP2-3×结合-WPRE3-SV40pA
SEQ ID NO：21	CBM 启动子
SEQ ID NO：22	CBE 启动子
SEQ ID NO：23	MeCP2 的甲基-CpG 结合域（MBD）
SEQ ID NO：24	MeCP2 的 NCoR/SMRT 相互作用域（NID）

[0321]

SEQ ID NO：25	RTT254/NGN-401

[0322] SEQ ID NO:1

[0323] 启动子

[0324] >CMV/CBA

[0325] CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACAT
AACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC
ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA
TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT
ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGC
CCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATT
TTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGG
CGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGG
CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG

[0326] SEQ ID NO:2

[0327] 内含子

[0328] >MINIX_内含子

[0329] GTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTACCTGCAGCCCAAGCTTGCTGCACGTCTAGGGCCTCACCGGG
TTTCCTTGATGAGGTACCGACATACTTATCCTGTCCCTTTTTTTTCCACAG

[0330] SEQ ID NO:3

[0331] >EF1a_内含子

[0332] GTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATT
ACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGC
CTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATC
TGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGAC
GCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGG
GCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGA
CGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGC
AAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAAT
GGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCG
CTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGATACGTCGTCTT
TAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGG
CACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGT
TCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAG

[0333] 微小RNA表达

[0334] SEQ ID NO:4

[0335] >EXACT1(ffluc1)

[0336] TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTA
CTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAAACGATATGGGCTGAAT
ACAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGTATTCAGCCCATATCGTTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA
TTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA

TGGTATAAATTAAATCACTTT

[0337] SEQ ID NO:5

[0338] >EXACT2(ran1g)

[0339] TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATT
ACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAAAGCGCCAAAGGAGT
CTGTGATAGTGAAGCCACAGATGTATCACAGACTCCTTTGGCGCTTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTA
GAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATT
AAAATGGTATAAATTAAATCACTTTSEQ ID NO:6

[0340] >EXACT3(ran2g)

[0341] TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATT
ACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAAAGTGCGGATTTCGT
ATTTGCTAGTGAAGCCACAGATGTAGCAAATACGAAATCCGCACTTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTA
GAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATT
AAAATGGTATAAATTAAATCACTTT转基因

[0342] SEQ ID NO:7

[0343] >hMECP2

[0344] ATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGGAGGAGAGACTGGAAGAA
AAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTTAAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGA
AGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCCACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAG
AGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATC
CGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCCACCCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGG
CCGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTG
CGTACTTCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGCCCC
TCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGGCCGGGGACGCCC
CAAAGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCCTGGAGAAAAGTC
CTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACTTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCC
ACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCGAAAAGCTGAGGCCGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACG
GGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCC
GATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTG
GTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAA
AAGCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCACCACCACCATCACC
ACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCC
GAGGACCCCACCAGCCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGG
CTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGCAG
AAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGACATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAG
CCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCTGA

[0345] 结合位点

[0346] SEQ ID NO:8

[0347] >3×EXACT1_结合位点(ffluc1)

[0348] GCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAG

[0349] SEQ ID NO:9

[0350] >3×EXACT2_结合位点(ran1g)

[0351] GCTATGAAAGCGCCAAAGGAGTCTGTGAATCACAGGCTATGAAAGCGCCAAAGGAGTCTGTGAATCACAGGCTATGAAAGCGCCAAAGGAGTCTGTGAATCACAG

[0352] SEQ ID NO:10

[0353] >3xEXACT3_结合(ran2g)

[0354] GCTATGAAAGTGCGGATTTCGTATTTGCATCACAGGCTATGAAAGTGCGGATTTCGTATTTGCATCACAGGCTATGAAAGTGCGGATTTCGTATTTGCATCACAG

[0355] 稳定性元件

[0356] SEQ ID NO:11

[0357] >WPRE3

[0358] ATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGT

[0359] 多腺苷酸化信号

[0360] SEQ ID NO:12

[0361] >SV40pA

[0362] ACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGT

[0363] SEQ ID NO:13

[0364] Kozak序列

[0365] GCCACCATGG

[0366] SEQ ID 14-20在图8-14中。

[0367] SEQ ID NO:21

[0368] >CBM启动子

[0369] CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGATTCTTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTACCTGCAGCCCAAGCTTGCTGCACGTCTAGGGCCTCA

CCGGGTTTCCTTGATGAGGTACCGACATACTTATCCTGTCCCTTTTTTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGGACAAACTC
TTC

[0370] SEQ ID NO:22

[0371] >CBE启动子

[0372] CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACAT
AACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC
ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA
TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT
ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGC
CCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATT
TTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGG
CGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGG
CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGC
CGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGG
CTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGC
CCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCG
CCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAA
GATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCG
TGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAG
CTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCG
GCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTC
GGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCA
CGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAG
GGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATT
CTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTC
TTCCATTTCAGGTGTCGTGA

[0373] SEQ ID NO:23

[0374] >MeCP2的甲基-CpG结合域(MBD)

[0375] TCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCCACCCTG
CCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTGATCAA
TCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGAC

[0376] SEQ ID NO:24

[0377] >MeCP2的NCoR/SMRT相互作用域(NID)

[0378] AAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAG
ACCCGG

[0379] SEQ ID NO:25

[0380] RTT254/NGN-401

[0381] CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT
TTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTGCGGC

CGCACGCGTACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTAC
ATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTC
CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCA
GTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGA
GCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTA
TTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGG
GGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGC
GGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGATTCTTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGA
AGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTCGGAAACCC
GTCGGCCTCCGAACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTACCTGCAGCCCAAGCTTGCTGCACGTCTAGGGCGG
ACTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA
CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAAACGATATGGGCTGAATACAATA
GTGAAGCCACAGATGTATTGTATTCAGCCCATATCGTTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATTCGAG
CAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATGGTAT
AAATTAAATCACTTTCAGCTCACCGGGTTTCCTTGATGAGGTACCGACATACTTATCCTGTCCCTTTTTTTTCCACA
GCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCACCGGTCGCCACCATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCGCCGAGCGGAGGAGGA
GGAGGAGGCGAGGAGGAGAGACTGGAAGAAAAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAA
GTTTAAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCCACCACT
CTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCT
GCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCCACCCTGCCTGAAGGCTG
GACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAA
AAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTT
GACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGCCCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAGC
TCCAGGAACTGGCAGAGGCCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTG
TGCAGGTGAAAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACTTCGCCAGGGGGC
AAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCGAAAAGCTGA
GGCCGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCA
AAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGG
GAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGG
ACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAAGCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCAC
CCCCCAAGAAGGAGCACCACCACCATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTG
CCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCCACCAGCCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGT
CTGCAAAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGC
CCGCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGACATTGTTTCA
TCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCTGAGGATC
CTAATGCTGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACA
GGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGGTAGCTAGCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGA
AAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG

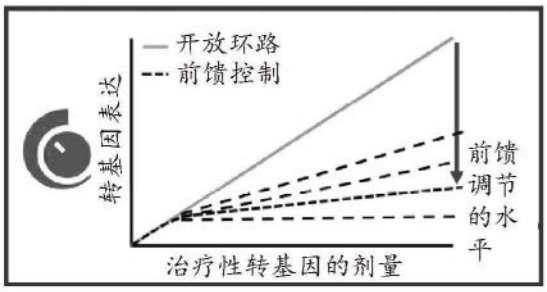
CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATC
GCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGAGCTCACTTGTTTA
TTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCT
AGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTCCGGACACGTGCGGACCGAGCGGCCGCAGGA
ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCC
GACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

[0382] 等同物和引用并入

[0383] 对于任何目的,本文中提及的所有文献均以相同的程度以引用的方式全部并入,如同在引用每份单独的出版物、数据库条目(例如Genbank序列或GeneID条目)、专利或专利申请时都特别单独注明其以引用的方式的方式全文并入一样。本引用并入声明由申请人根据37C.F.R.制定,与每个单独的出版物、数据库条目(例如,Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或专利有关(其中每一项均根据37C.F.R.§1.57(b)(2)明确标识),即使此类引用并非紧邻专用的引用并入声明也是如此。如果有的话,在说明书中包含专用的引用并入声明不会以任何方式削弱这种引用并入的一般声明。本文对参考文献的引用并不意味着承认该参考文献是相关的现有技术,也不构成对这些出版物或文件的内容或日期的任何承认。

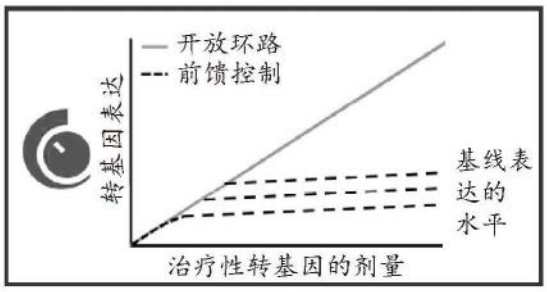
[0384] 虽然已经参考优选实施方式和各种替代实施方式具体示出和描述了本发明,但是相关领域的技术人员应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。

设定前馈调节的适当水平（剂量不敏感性）



已经确认赋予优良的剂量不敏感性，同时仍然确保均匀的细胞表达的前馈回路

设定基线调节的适当水平（治疗性和安全/耐受设定点）



已经设计构建体来重新设定基线水平表达以优化功效

图1A

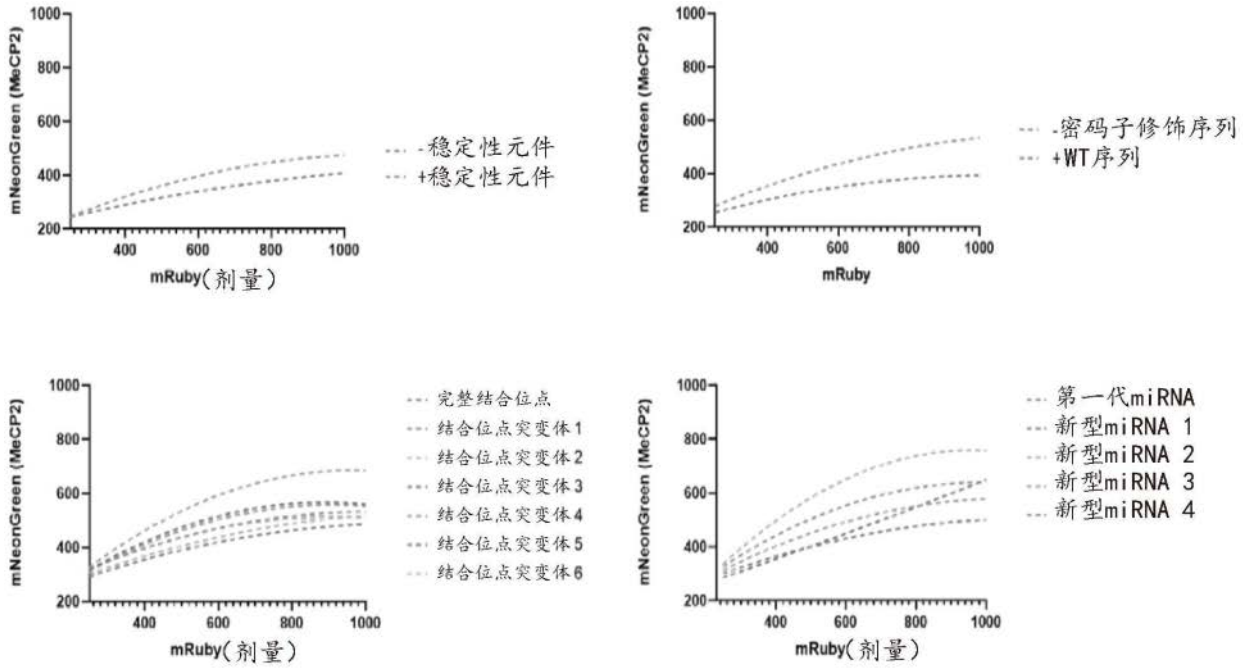


图1B

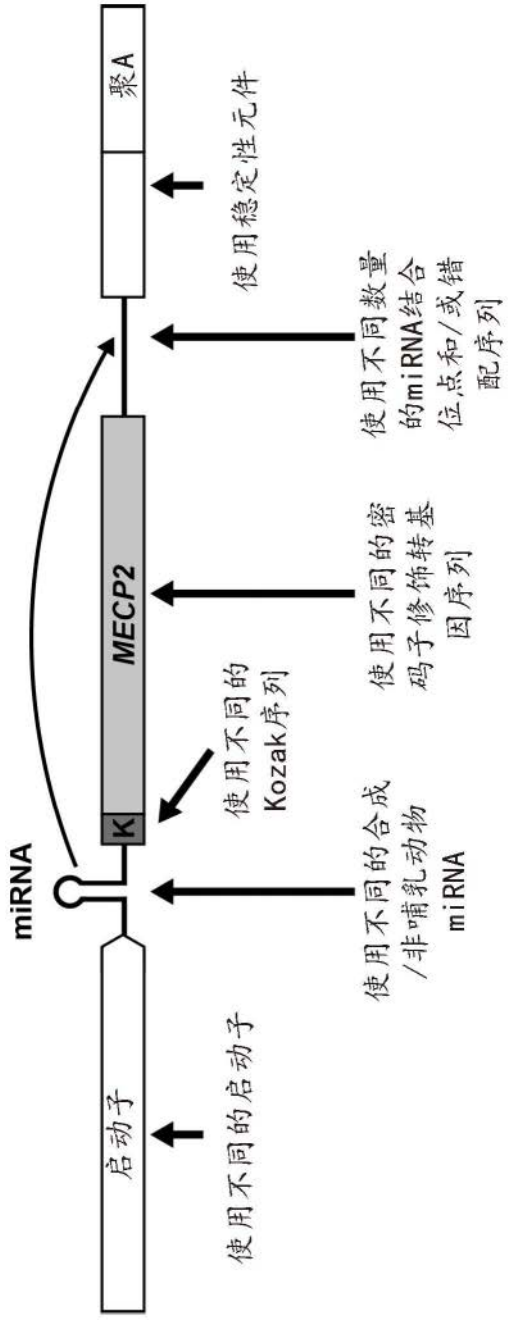
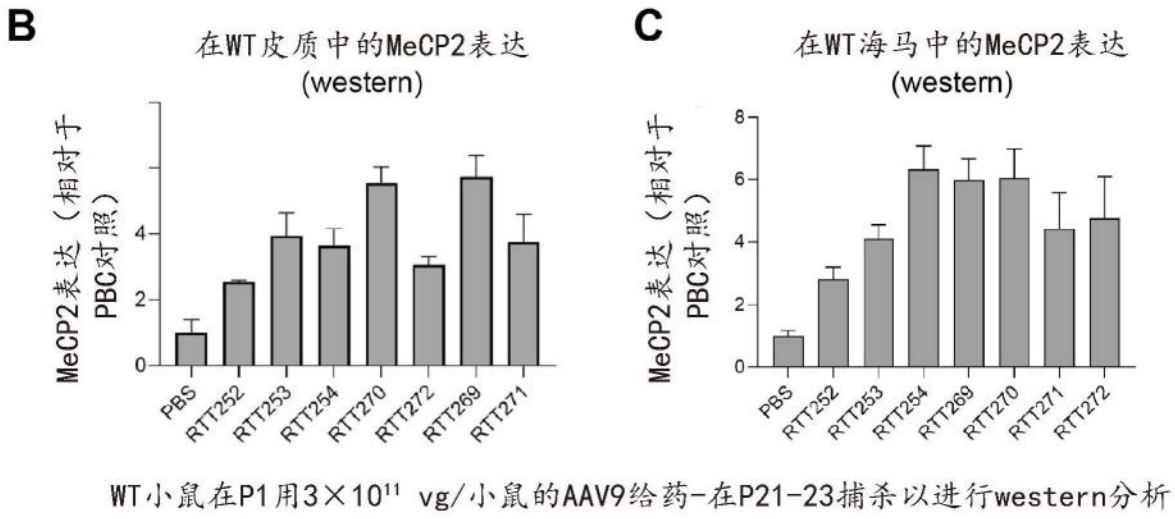

聚A
使用稳定性元件
使用不同数量
的miRNA结合
位点和/或错
配序列
MECP2
使用不同的密
码子修饰转基
因序列
K
使用不同的
Kozak序列
miRNA
使用不同的合成
/非哺乳动物
miRNA
启动子
使用不同的启动子

图2

A

构建体	启动子	调节	转基因	结合	WPRE3
RTT252	CBE	EXACT1	*hMECP2*	3x	-
RTT253	CBE	EXACT1	*hMECP2*	3x	+
RTT254	CBM	EXACT1	*hMECP2*	3x	+
RTT269	CBE	EXACT1	*hMECP2*	3xmut3	+
RTT270	CBE	EXACT1	*hMECP2*	3xmut6	+
RTT271	CBE	EXACT2	*hMECP2*	3x	+
RTT272	CBE	EXACT3	*hMECP2*	3x	+



WT小鼠在P1用3×10^{11} vg/小鼠的AAV9给药-在P21-23捕杀以进行western分析

图3A-C

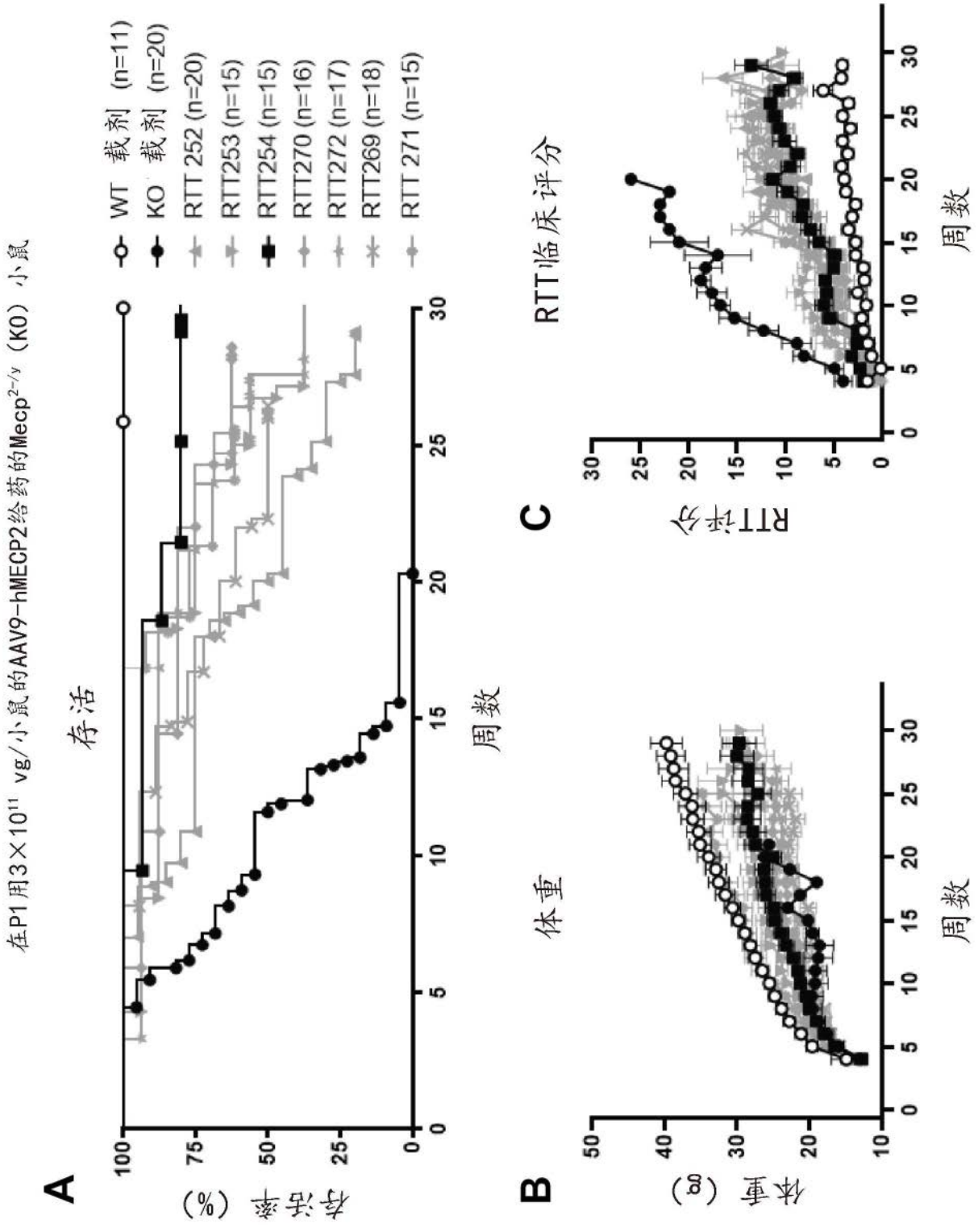

在P1用3×10¹¹ vg/小鼠的AAV9-hMECP2给药的Mecp²⁻/y（KO）小鼠
A
存活
存活率（%）
周数
WT 载剂 (n=11)
KO 载剂 (n=20)
RTT 252 (n=20)
RTT253 (n=15)
RTT254 (n=15)
RTT270 (n=16)
RTT272 (n=17)
RTT269 (n=18)
RTT 271 (n=15)
B
体重
体重（g）
周数
C
RTT临床评分
RTT评分
周数

图4A-C

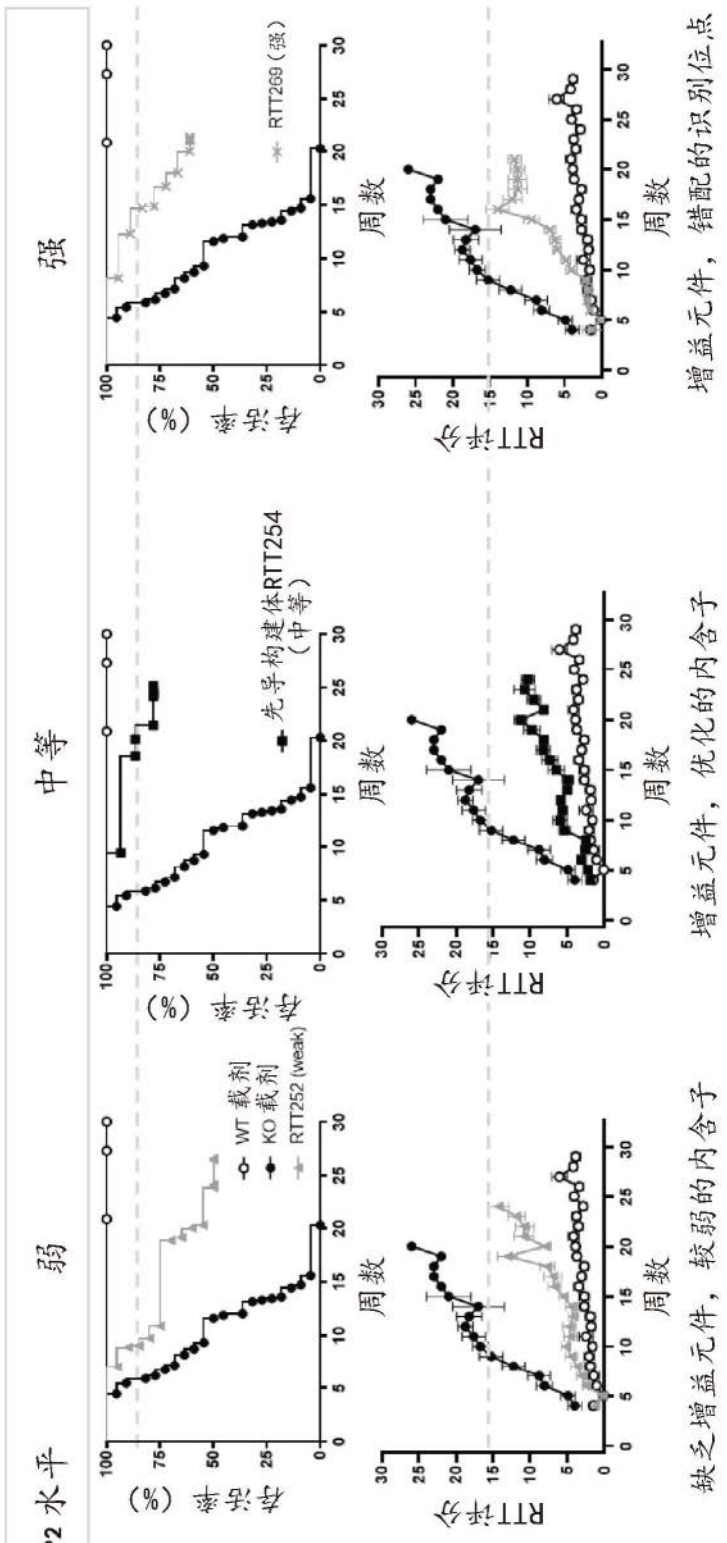

A
B
C
MeCP2 水平
弱
中等
强
WT 载剂
KO 载剂
RTT252 (weak)
先导构建体RTT254（中等）
RTT269（强）
存活率（%）
周数
RTT评分
缺乏增益元件，较弱的内含子
增益元件，优化的内含子
增益元件，错配的识别位点

图5A-C

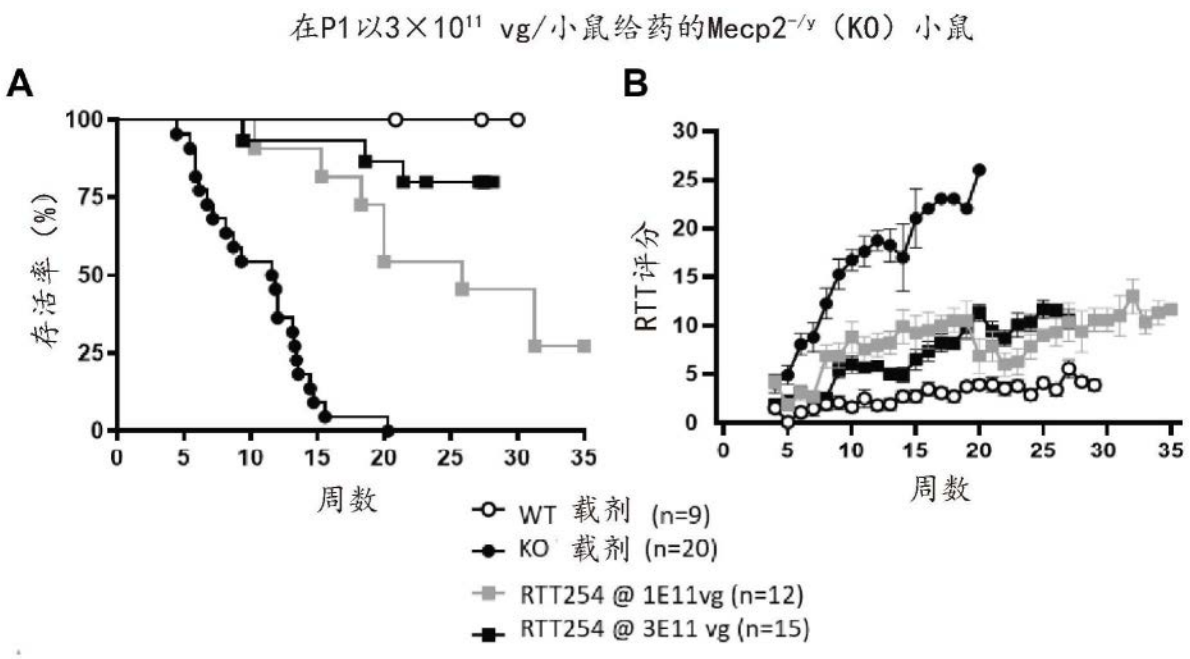
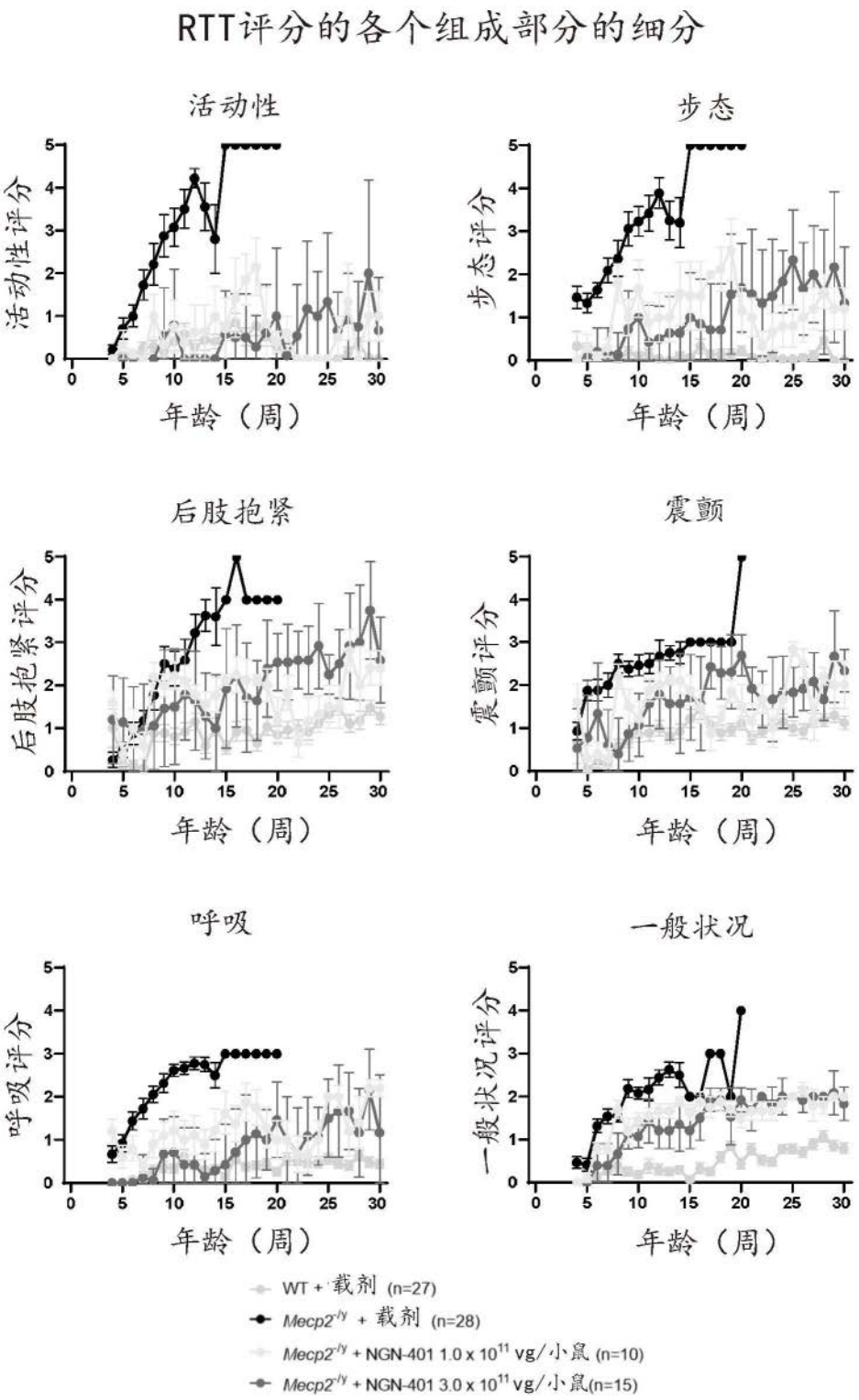
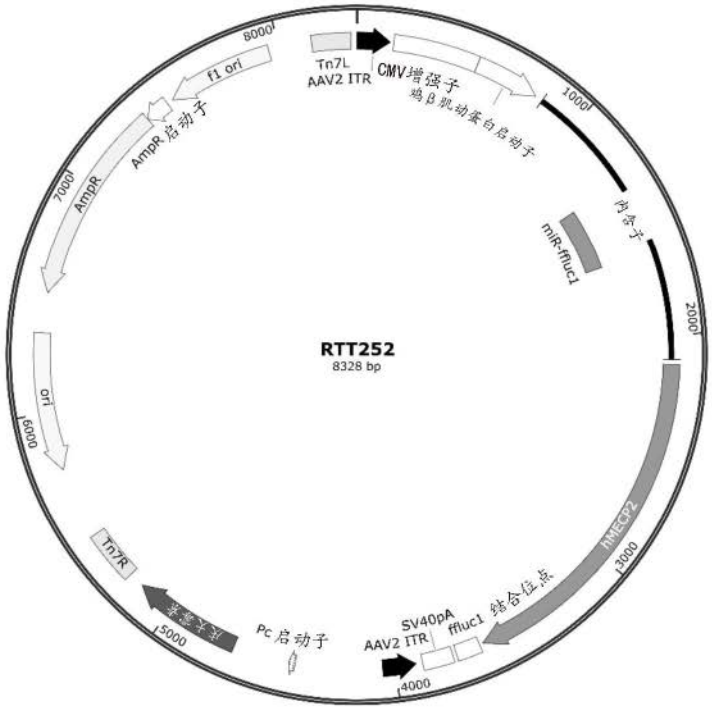

在P1以3×10¹¹ vg/小鼠给药的Mecp2-/y（KO）小鼠
A
B
存活率（%）
周数
RTT评分
周数
WT 载剂 (n=9)
KO 载剂 (n=20)
RTT254 @ 1E11vg (n=12)
RTT254 @ 3E11 vg (n=15)

图6A-B



在 P0-2 ICV递送载剂或NGN-401后，评分系统每个参数的RTT评分。从第4周开始，每周对动物进行每个参数的评分，从0（正常）到5（最严重）。组规模的数量显示在图例中。

图7A-F



SEQ ID NO:14

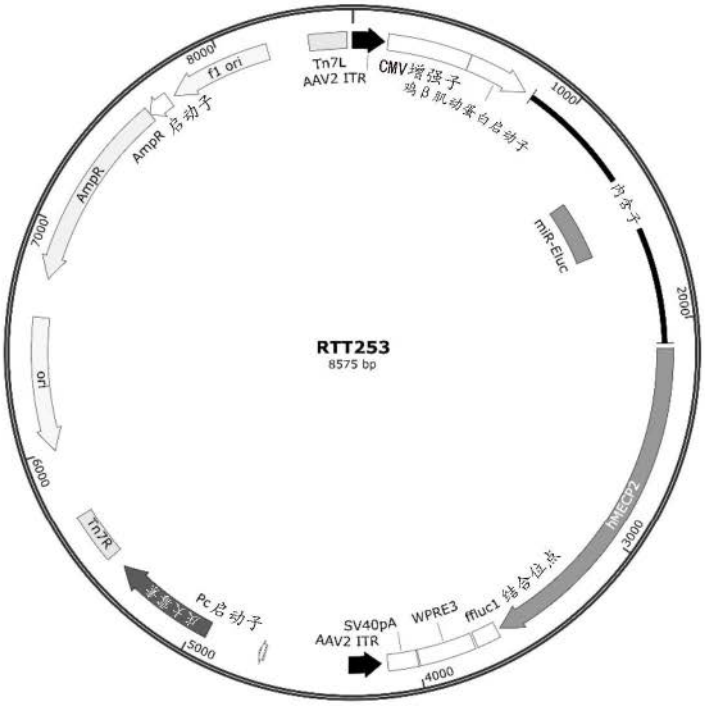
> RTT252_CBE-ffluc1-hsaMECP2- 3×结合 -SV40pA

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC
TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG
TTCCTGCGGCCGCACGCGTACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT
ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC
CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG
CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT
GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGG
GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT
GGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGCTTTTTCGCAACGGGT
TTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGC
CCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG
TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAG
GCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTT
CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC
TTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCC
CGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGG
GTAGTCTCAAGCGGACTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGA
AACACTTGCTGGGATTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGAC
AGTGAGCGAAACGATATGGGCTGAATACAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGTATTCAGCCCATATCG
TTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAAT

ACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTCAC
TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGG
CCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA
TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCC
TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
CTTTTGGATACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG
GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGT
TTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCG
TGAACCGGTCGCCACCATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGG
AGGAGAGACTGGAAGAAAAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTT
AAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCCA
CCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTG
TGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGAT
GACCCCACCCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAA
GTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACT
TCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGC
CCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGG
CCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGA
AAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACTTCGCCAGGGGGC
AAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCCGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAG
CCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTA
CTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCT
GCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAA
GCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCACCACCAC
CATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCCACCTCCACC
TGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCCACCAGCCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCA
AAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACT
CAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAA
AGACATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGA
CCGAGAGAGTTAGCTGAGGATCCTAATGCTGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGCT
ATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGG
GTAGCTAGCGAGCTCACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAAT
TTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA
TCATGTCTGTTCCGGACACGTGCGGACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC
CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCC
CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGCATGCTCTGAGACAATAACCCTGAT
AAATGCTTCAATAATGTAGCCAACCACTAGAACTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAAACGATGCTCG
CCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGG
CCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCA
AGGCCGCCAATGCCTGACGATGCGTGGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAAT
GCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAAC
CCAGTTGACATAAGCCTGTTCGGTTCGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGT
CCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGT
TTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGAT
GTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGTGGCTCAAGTA
TGGGCATCATTCGCACATGTAGGCTCGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTT
TTCGGTCGTGAGTTCGGAGACGTAGCCACCTACTCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAA
CTTGCTCCGTAGTAAGACATTCATCGCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCG
CGGCTTACGTTCTGCCCAGGTTTGAGCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCC
GGCGAGCACCGGAGGCAGGGCATTGCCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCT

TGGTGCTTATGTGATCTACGTGCAAGCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGT
TGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCACTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACAATTCGTTCAA
GCCGAGATCGGCTTCCCGGCCGCGGAGTTGTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTA
CCATGCCCTTGGCCACGCCCCTCTTTAATACGACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGC
TTTAGCCATAACAAAAGTCCAGTATGCTTTTTCACAGCATAACTGGACTGATTTCAGTTTACAACTAT
TCTGTCTAGTTTAAGACTTTATTGTCATAGTTTAGATCTATTTTGTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCC
GCCCACACCCGCTTACGCAGGGCATCCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGG
CTGGTCTGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCT
TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGC
GGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAA
AGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCAT
CACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCC
CCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC
TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTT
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTA
TCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTA
GCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGA
AGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG
ATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA
AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCA
CGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATG
AAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTG
AGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATA
ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC
GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTT
TATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT
TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATT
CAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCT
CCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
CTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAA
GTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCG
CGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGG
ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTT
TACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGG
CGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTAT
TGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATT
TCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACC
GAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGT
CAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTT
TGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGG
GGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGC
AAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGT
CCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATAAGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTAATAACGAAGAGA
TGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGACAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTT
GGCAGGATGTTTGATTAAAAACATAACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAATAGTTGG
GAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGTTTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAAC
TGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATACGAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTT
ATCTGGTTCGGATCTCCTAGAGCTTACAGCTT

图8



SEQ ID NO:15

> RTT253_CBE-ffluc1-hsaMECP2- 3×结合 -WPRE3-SV40pA

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC
TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG
TTCCTGCGGCCGCACGCGTACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT
ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC
CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG
CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT
GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGG
GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT
GGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGCTTTTTCGCAACGGGT
TTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGC
CCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG
TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAG
GCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTT
CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC
TTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCC
CGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGG
GTAGTCTCAAGCGGACTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGA
AACACTTGCTGGGATTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGAC
AGTGAGCGAAACGATATGGGCTGAATACAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGTATTCAGCCCATATCG
TTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAAT

ACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTCAC
TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGG
CCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA
TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCC
TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
CTTTTGGATACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG
GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGT
TTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCG
TGAACCGGTCGCCACCATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGG
AGGAGAGACTGGAAGAAAAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTT
AAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCCA
CCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTG
TGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGAT
GACCCCACCCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAA
GTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACT
TCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGC
CCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGG
CCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGA
AAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACTTCGCCAGGGGGC
AAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCCGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAG
CCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTA
CTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCT
GCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAA
GCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCACCACCAC
CATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCCACCTCCACC
TGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCCACCAGCCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCA
AAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACT
CAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAA
AGACATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGA
CCGAGAGAGTTAGCTGAGGATCCTAATGCTGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGCT
ATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGG
GTAGCTAGCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTT
GCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGC
TTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCC
TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGAGCTCACTTGTTTAT
TGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCAC
TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTCCGGACACGTGCGG
ACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG
CGCGCAGCTGCCTGCAGGCATGCTCTGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATGTAGCCAACC
ACTAGAACTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAA
CCACTTCATCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGC
CAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGATGCGT
GGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGG
TTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTCGGTT
CGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGG
TGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGG
CATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACG
CAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTCGCACATGTAGGCT
CGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTTCGGTCGTGAGTTCGGAGACGTAG

CCACCTACTCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACTTGCTCCGTAGTAAGACATTCATC
GCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGGCTTACGTTCTGCCCAGGTTTGA
GCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGAGCACCGGAGGCAGGGCATTG
CCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTTATGTGATCTACGTGCAA
GCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCA
CTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACAATTCGTTCAAGCCGAGATCGGCTTCCCGGCCGCGG
AGTTGTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTACCATGCCCTTGGCCACGCCCCTCTT
TAATACGACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCAGTAT
GCTTTTTCACAGCATAACTGGACTGATTTCAGTTTACAACTATTCTGTCTAGTTTAAGACTTTATTGT
CATAGTTTAGATCTATTTTGTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCCACACCCGCTTACGCAGGGCAT
CCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCTGGTCTGCGGTGTGAAATACCGCA
CAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGC
GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
TCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
AACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC
TACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGT
AGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT
TATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
ATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA
TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTA
CAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGG
CGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAG
AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGG
CGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT
GCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGA
GCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG
AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATT
GTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATA
GGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAG
TTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAG
GGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACT
AAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAA
AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTA
ACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATA
AGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTAATAACGAAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGA
CAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTAAAAACATA
ACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAATAGTTGGGAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGT
TTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATAC

GAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGAGCTT
ACAGCTT

图9



SEQ ID NO:16

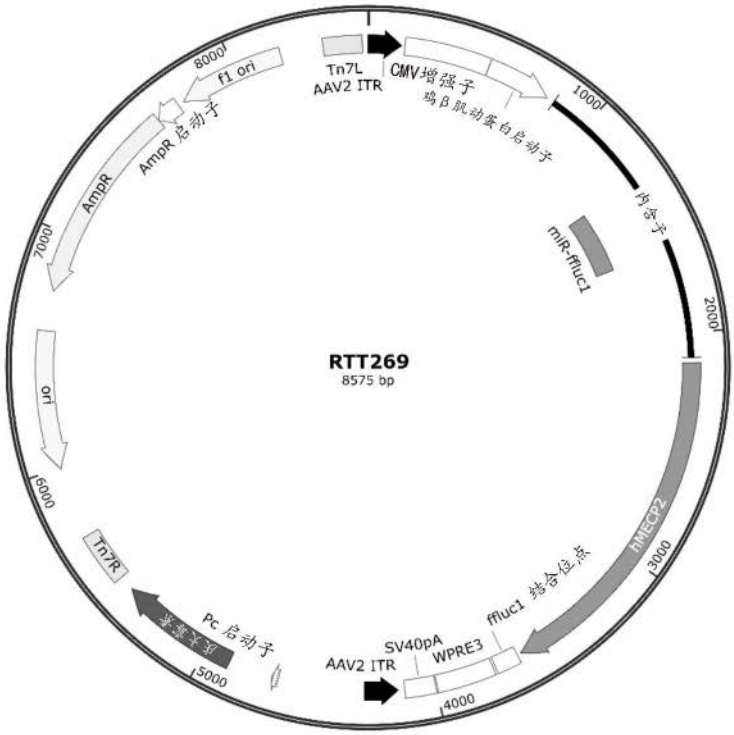
> RTT254_CBM-ffluc1-hsaMECP2- 3×结合 -WPRE3-SV40pA

CCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATAAGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTAATAACGAAGAGA
TGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGACAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTT
GGCAGGATGTTTGATTAAAAACATAACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAATAGTTGG
GAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGTTTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAAC
TGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATACGAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTT
ATCTGGTTCGGATCTCCTAGAGCTTACATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCAGACCTGCA
GGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT
CGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTG
CGGCCGCACGCGTACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG
AGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA
GTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG
ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACT
TGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCAC
TCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAG
CGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGG
GCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAG
GCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGATTCTTCTGACACAACAGTCT
CGAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGCT
CTTAAGGCTAGAGTACTCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTT
ACCTGCAGCCCAAGCTTGCTGCACGTCTAGGGCGGACTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAA
TCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCG
AGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAAACGATATGGGCTGAATACAATAGTGAAGCCACAGATG

TATTGTATTCAGCCCATATCGTTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATTCGAGCAATTA
TCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATGG
TATAAATTAAATCACTTTCAGCTCACCGGGTTTCCTTGATGAGGTACCGACATACTTATCCTGTCCCT
TTTTTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCACCGGTCGCCACCATGGCCGCCGCCGCCGCC
GCCGCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGGAGGAGAGACTGGAAGAAAAGTCAGAAGACCAGGA
CCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTTAAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAG
AGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCCACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCA
GAGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCG
CTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCCACCCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGC
TTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAAAA
GCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAA
TGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGCCCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGC
CCAAATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGGCCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGA
CCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTGGGAAGCTCCT
TGTCAAGATGCCTTTTCAAACTTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCC
AGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCGAAAAGCTGAGGCCGACCCTCAGGCCATTCCCAAG
AAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAA
GGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGG
TCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAA
GGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAAGCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAG
CGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCACCACCACCATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCG
TGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCCACCAGCCCC
CCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTCACTGGA
GAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGCAG
AAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGACATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAAC
AGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCTGAGGATCCTAATGCTGCTA
TGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGC
TATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGGGTAGCTAGCATAATCAACCTCTGGATTACAAAAT
TTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAA
TGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTA
GTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG
CACTGACAATTCCGTGGTGAGCTCACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC
ATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAA
TGTATCTTATCATGTCTGTTCCGGACACGTGCGGACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGT
TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCG
GGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGCATGCAAGCTGTAGCC
AACCACTAGAACTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATG
CGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTG
AAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGAT
GCGTGGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCC
AAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTC
GGTTCGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCA
GCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCT
CGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGT
TACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTCGCACATGTA
GGCTCGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTTCGGTCGTGAGTTCGGAGAC
GTAGCCACCTACTCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACTTGCTCCGTAGTAAGACATT
CATCGCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGGCTTACGTTCTGCCCAAGT
TTGAGCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGAGCACCGGAGGCAGGGC
ATTGCCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTTATGTGATCTACGT
GCAAGCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGA

TGCACTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACAATTCGTTCAAGCCGAGATCGGCTTCCCGGCC
GCGGAGTTGTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTACCATGCCCTTGGCCACGCCCC
TCTTTAATACGACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCA
GTATGCTTTTTCACAGCATAACTGGACTGATTTCAGTTTACAACTATTCTGTCTAGTTTAAGACTTTA
TTGTCATAGTTTAGATCTATTTTGTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCCACACCCGCTTACGCAGG
GCATCCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCTGGTCTATGCGGTGTGAAAT
ACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGC
TGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAA
GGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAA
GTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTG
CGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGC
GCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTG
TGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCT
GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC
GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAA
AGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGAT
CTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCT
TACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTC
TATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCA
TTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGA
TCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGT
TGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTG
TCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGT
ATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTT
AAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGAT
CCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCT
GGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAAT
ACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACA
TATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT
AAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAC
CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGT
TCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTA
TCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAG
CACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCG
AGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCG
CGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTC

图10



SEQ ID NO:17

> RTT269_CBE-ffluc1-hsaMECP2- 3×结合 _mut3-WPRE3-SV40pA

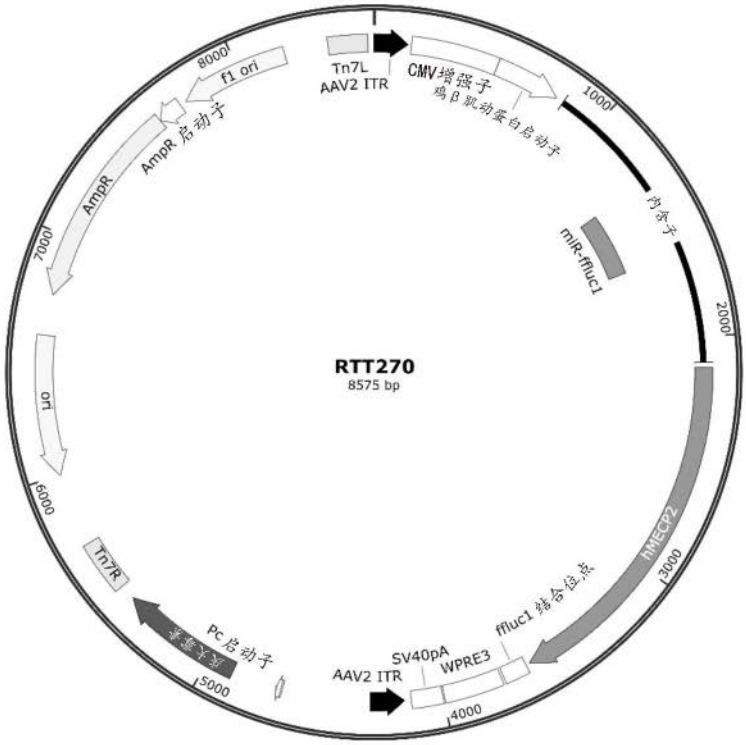
CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC
TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG
TTCCTGCGGCCGCACGCGTACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT
ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC
CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG
CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTTAATTATTTT
GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGG
GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT
GGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGCTTTTTCGCAACGGGT
TTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGC
CCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG
TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAG
GCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTT
CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC
TTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCC
CGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGG
GTAGTCTCAAGCGGACTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGA
AACACTTGCTGGGATTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGAC
AGTGAGCGAAACGATATGGGCTGAATACAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGTATTCAGCCCATATCG

TTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAAT
ACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTCAC
TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGG
CCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA
TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCC
TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
CTTTTGGATACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG
GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGT
TTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCG
TGAACCGGTCGCCACCATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGG
AGGAGAGACTGGAAGAAAAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTT
AAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCCA
CCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTG
TGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGAT
GACCCCACCCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAA
GTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACT
TCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGC
CCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGG
CCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGA
AAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACTTCGCCAGGGGGC
AAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCCGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAG
CCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTA
CTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCT
GCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAA
GCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCACCACCAC
CATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCCACCTCCACC
TGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCCACCAGCCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCA
AAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACT
CAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAA
AGACATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGA
CCGAGAGAGTTAGCTGAGGATCCTAATGCTGCTATGAAACGATATGGGCTCAATACAAATCACAGGCT
ATGAAACGATATGGGCTCAATACAAATCACAGGCTATGAAACGATATGGGCTCAATACAAATCACAGG
GTAGCTAGCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTT
GCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGC
TTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCC
TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGAGCTCACTTGTTTAT
TGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCAC
TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTCCGGACACGTGCGG
ACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG
CGCGCAGCTGCCTGCAGGCATGCTCTGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATGTAGCCAACC
ACTAGAACTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAA
CCACTTCATCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGC
CAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGATGCGT
GGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGG
TTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTCGGTT
CGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGG
TGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGG
CATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACG
CAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTCGCACATGTAGGCT

CGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTTCGGTCGTGAGTTCGGAGACGTAG
CCACCTACTCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACTTGCTCCGTAGTAAGACATTCATC
GCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGGCTTACGTTCTGCCCAGGTTTGA
GCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGAGCACCGGAGGCAGGGCATTG
CCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTTATGTGATCTACGTGCAA
GCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCA
CTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACAATTCGTTCAAGCCGAGATCGGCTTCCCGGCCGCGG
AGTTGTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTACCATGCCCTTGGCCACGCCCCTCTT
TAATACGACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCAGTAT
GCTTTTTCACAGCATAACTGGACTGATTTCAGTTTACAACTATTCTGTCTAGTTTAAGACTTTATTGT
CATAGTTTAGATCTATTTTGTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCCACACCCGCTTACGCAGGGCAT
CCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCTGGTCTGCGGTGTGAAATACCGCA
CAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGC
GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
TCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
AACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC
TACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGT
AGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT
TATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
ATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA
TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTA
CAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGG
CGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAG
AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGG
CGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT
GCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGA
GCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG
AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATT
GTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATA
GGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAG
TTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAG
GGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACT
AAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAA
AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTA
ACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATA
AGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTAATAACGAAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGA
CAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTAAAAACATA
ACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAATAGTTGGGAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGT

TTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATAC
GAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGAGCTT
ACAGCTT

图11



SEQ ID NO:18

> RTT270_CBE-ffluc1-hsaMECP2- 3×结合 _mut6-WPRE3-SV40pA

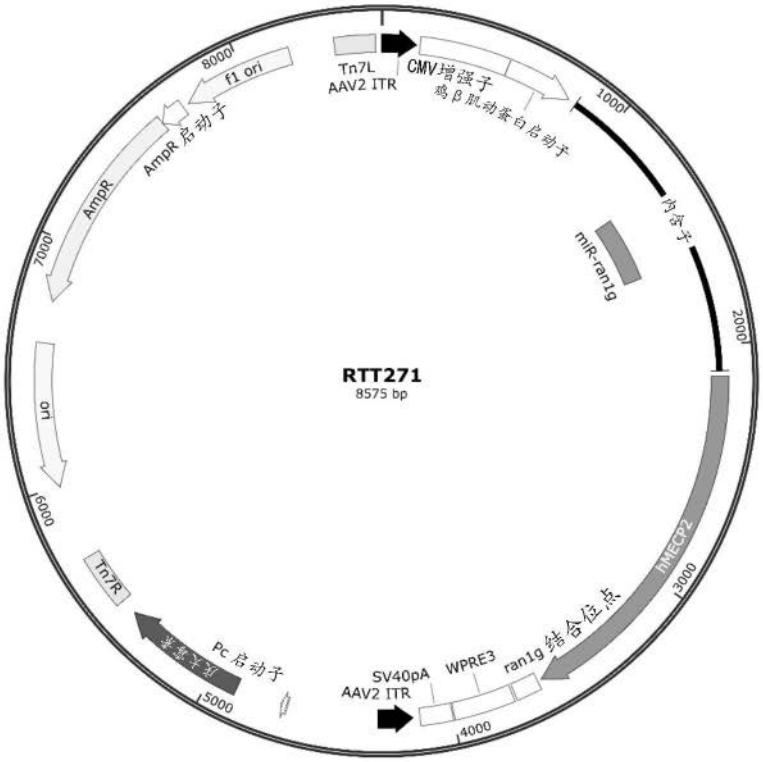
CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC
TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG
TTCCTGCGGCCGCACGCGTACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT
ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC
CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG
CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT
GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGG
GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT
GGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGCTTTTTCGCAACGGGT
TTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGC
CCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG
TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAG
GCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTT
CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC
TTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCC
CGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGG
GTAGTCTCAAGCGGACTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGA
AACACTTGCTGGGATTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGAC
AGTGAGCGAAACGATATGGGCTGAATACAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGTATTCAGCCCATATCG

TTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAAT
ACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTCAC
TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGG
CCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA
TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCC
TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
CTTTTGGATACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG
GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGT
TTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCG
TGAACCGGTCGCCACCATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGG
AGGAGAGACTGGAAGAAAAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTT
AAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCCA
CCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTG
TGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGAT
GACCCCACCCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAA
GTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACT
TCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGC
CCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGG
CCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGA
AAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACTTCGCCAGGGGGC
AAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCCGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAG
CCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTA
CTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCT
GCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAA
GCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCACCACCAC
CATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCCACCTCCACC
TGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCCACCAGCCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCA
AAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACT
CAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAA
AGACATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGA
CCGAGAGAGTTAGCTGAGGATCCTAATGCTGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACTAATCACAGGCT
ATGAAACGATATGGGCTGAATACTAATCACAGGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACTAATCACAGG
GTAGCTAGCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTT
GCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGC
TTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCC
TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGAGCTCACTTGTTTAT
TGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCAC
TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTCCGGACACGTGCGG
ACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG
CGCGCAGCTGCCTGCAGGCATGCTCTGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATGTAGCCAACC
ACTAGAACTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAA
CCACTTCATCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGC
CAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGATGCGT
GGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGG
TTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTCGGTT
CGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGG
TGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGG
CATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACG
CAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTCGCACATGTAGGCT

CGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTTCGGTCGTGAGTTCGGAGACGTAG
CCACCTACTCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACTTGCTCCGTAGTAAGACATTCATC
GCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGGCTTACGTTCTGCCCAGGTTTGA
GCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGAGCACCGGAGGCAGGGCATTG
CCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTTATGTGATCTACGTGCAA
GCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCA
CTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACAATTCGTTCAAGCCGAGATCGGCTTCCCGGCCGCGG
AGTTGTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTACCATGCCCTTGGCCACGCCCCTCTT
TAATACGACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCAGTAT
GCTTTTTCACAGCATAACTGGACTGATTTCAGTTTACAACTATTCTGTCTAGTTTAAGACTTTATTGT
CATAGTTTAGATCTATTTTGTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCCACACCCGCTTACGCAGGGCAT
CCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCTGGTCTGCGGTGTGAAATACCGCA
CAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGC
GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
TCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
AACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC
TACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGT
AGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT
TATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
ATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA
TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTA
CAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGG
CGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAG
AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGG
CGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT
GCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGA
GCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG
AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATT
GTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATA
GGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAG
TTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAG
GGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACT
AAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAA
AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTA
ACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATA
AGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTAATAACGAAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGA
CAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTAAAAACATA
ACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAATAGTTGGGAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGT

TTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATAC
GAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGAGCTT
ACAGCTT

图12



SEQ ID NO:19

> RTT271_CBE-ran1g-hsaMECP2- 3×结合 -WPRE3-SV40pA

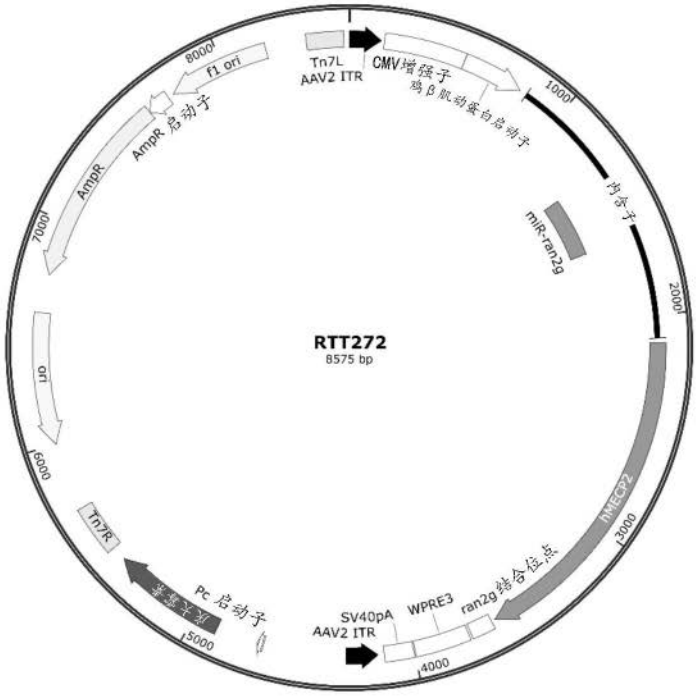
CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC
TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG
TTCCTGCGGCCGCACGCGTACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT
ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC
CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG
CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTTAATTATTTT
GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGG
GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT
GGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGCTTTTTCGCAACGGGT
TTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGC
CCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG
TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAG
GCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTT
CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC
TTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCC
CGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGG
GTAGTCTCAAGCGGACTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGA

AACACTTGCTGGGATTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGAC
AGTGAGCGAAAGCGCCAAAGGAGTCTGTGATAGTGAAGCCACAGATGTATCACAGACTCCTTTGGCGC
TTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAAT
ACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTCAC
TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGG
CCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA
TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCC
TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
CTTTTGGATACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG
GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGT
TTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCG
TGAACCGGTCGCCACCATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGG
AGGAGAGACTGGAAGAAAAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTT
AAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCCA
CCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTG
TGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGAT
GACCCCACCCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAA
GTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACT
TCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGC
CCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGG
CCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGA
AAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACTTCGCCAGGGGGC
AAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCCGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAG
CCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTA
CTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCT
GCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAA
GCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCACCACCAC
CATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCCACCTCCACC
TGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCCACCAGCCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCA
AAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACT
CAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAA
AGACATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGA
CCGAGAGAGTTAGCTGAGGATCCTAATGCTGCTATGAAAGCGCCAAAGGAGTCTGTGAATCACAGGCT
ATGAAAGCGCCAAAGGAGTCTGTGAATCACAGGCTATGAAAGCGCCAAAGGAGTCTGTGAATCACAGG
GTAGCTAGCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTT
GCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGC
TTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCC
TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGAGCTCACTTGTTTAT
TGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCAC
TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTCCGGACACGTGCGG
ACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG
CGCGCAGCTGCCTGCAGGCATGCTCTGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATGTAGCCAACC
ACTAGAACTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAA
CCACTTCATCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGC
CAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGATGCGT
GGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGG
TTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTCGGTT
CGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGG
TGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGG

CATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACG
CAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTCGCACATGTAGGCT
CGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTTCGGTCGTGAGTTCGGAGACGTAG
CCACCTACTCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACTTGCTCCGTAGTAAGACATTCATC
GCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGGCTTACGTTCTGCCCAGGTTTGA
GCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGAGCACCGGAGGCAGGGCATTG
CCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTTATGTGATCTACGTGCAA
GCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCA
CTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACAATTCGTTCAAGCCGAGATCGGCTTCCCGGCCGCGG
AGTTGTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTACCATGCCCTTGGCCACGCCCCTCTT
TAATACGACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCAGTAT
GCTTTTTCACAGCATAACTGGACTGATTTCAGTTTACAACTATTCTGTCTAGTTTAAGACTTTATTGT
CATAGTTTAGATCTATTTTGTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCCACACCCGCTTACGCAGGGCAT
CCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCTGGTCTGCGGTGTGAAATACCGCA
CAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGC
GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
TCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
AACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC
TACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGT
AGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT
TATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
ATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA
TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTA
CAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGG
CGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAG
AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGG
CGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT
GCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGA
GCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG
AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATT
GTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATA
GGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAG
TTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAG
GGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACT
AAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAA
AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTA
ACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATA
AGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTAATAACGAAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGA

CAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTAAAAACATA
ACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAATAGTTGGGAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGT
TTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATAC
GAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGAGCTT
ACAGCTT

图13



SEQ ID NO:20

> RTT272_CBE-ran2g-hsaMECP2- 3×结合 -WPRE3-SV40pA

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC
TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG
TTCCTGCGGCCGCACGCGTACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT
ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC
CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG
CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT
GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGG
GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT
GGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGCTTTTTCGCAACGGGT
TTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGC
CCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG
TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAG
GCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTT
CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC
TTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCC
CGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGG
GTAGTCTCAAGCGGACTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGA
AACACTTGCTGGGATTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGAC
AGTGAGCGAAAGTGCGGATTTCGTATTTGCTAGTGAAGCCACAGATGTAGCAAATACGAAATCCGCAC
TTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAAT

ACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTCAC
TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGG
CCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA
TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCC
TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
CTTTTGGATACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG
GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGT
TTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCG
TGAACCGGTCGCCACCATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGG
AGGAGAGACTGGAAGAAAAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTT
AAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCCA
CCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTG
TGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGAT
GACCCCACCCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAA
GTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACT
TCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGC
CCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGG
CCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGA
AAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACTTCGCCAGGGGGC
AAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCCGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAG
CCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTA
CTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCT
GCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAA
GCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCACCACCAC
CATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCCACCTCCACC
TGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCCACCAGCCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCA
AAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACT
CAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAA
AGACATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGA
CCGAGAGAGTTAGCTGAGGATCCTAATGCTGCTATGAAAGTGCGGATTTCGTATTTGCATCACAGGCT
ATGAAAGTGCGGATTTCGTATTTGCATCACAGGCTATGAAAGTGCGGATTTCGTATTTGCATCACAGG
GTAGCTAGCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTT
GCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGC
TTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCC
TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGAGCTCACTTGTTTAT
TGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCAC
TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTCCGGACACGTGCGG
ACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG
CGCGCAGCTGCCTGCAGGCATGCTCTGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATGTAGCCAACC
ACTAGAACTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAA
CCACTTCATCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGC
CAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGATGCGT
GGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGG
TTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTCGGTT
CGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGG
TGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGG
CATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACG
CAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTCGCACATGTAGGCT
CGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTTCGGTCGTGAGTTCGGAGACGTAG

CCACCTACTCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACTTGCTCCGTAGTAAGACATTCATC
GCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGGCTTACGTTCTGCCCAGGTTTGA
GCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGAGCACCGGAGGCAGGGCATTG
CCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTTATGTGATCTACGTGCAA
GCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCA
CTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACAATTCGTTCAAGCCGAGATCGGCTTCCCGGCCGCGG
AGTTGTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTACCATGCCCTTGGCCACGCCCCTCTT
TAATACGACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCAGTAT
GCTTTTTCACAGCATAACTGGACTGATTTCAGTTTACAACTATTCTGTCTAGTTTAAGACTTTATTGT
CATAGTTTAGATCTATTTTGTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCCACACCCGCTTACGCAGGGCAT
CCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCTGGTCTGCGGTGTGAAATACCGCA
CAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGC
GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
TCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
AACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC
TACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGT
AGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT
TATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
ATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA
TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTA
CAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGG
CGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAG
AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGG
CGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT
GCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGA
GCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG
AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATT
GTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATA
GGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAG
TTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAG
GGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACT
AAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAA
AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTA
ACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATA
AGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTAATAACGAAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGA
CAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTAAAAACATA
ACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAATAGTTGGGAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGT
TTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATAC

GAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGAGCTT
ACAGCTT

图14

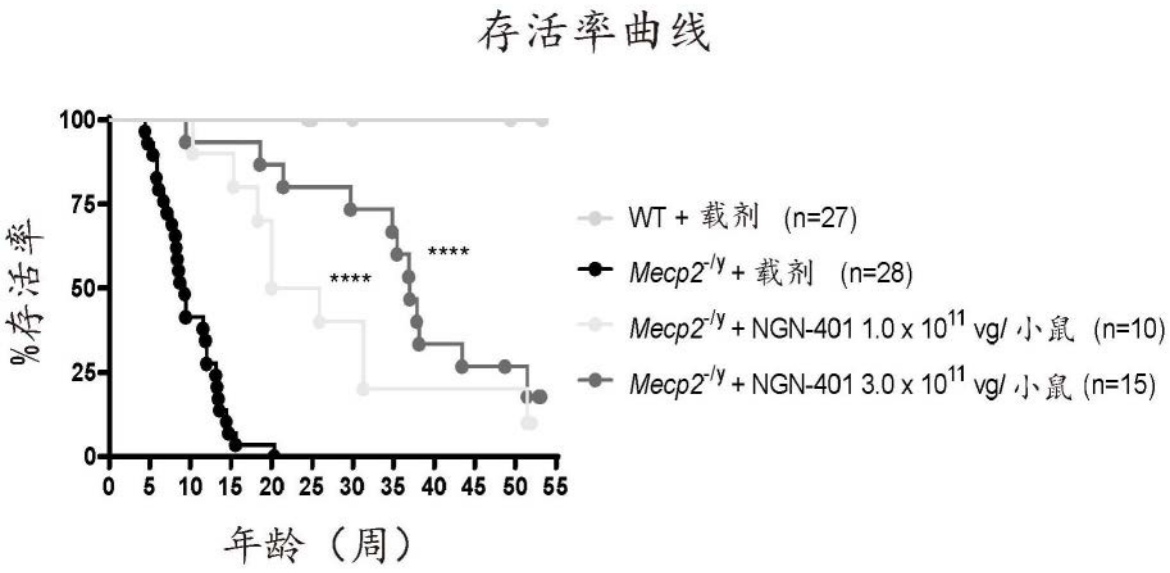


图15

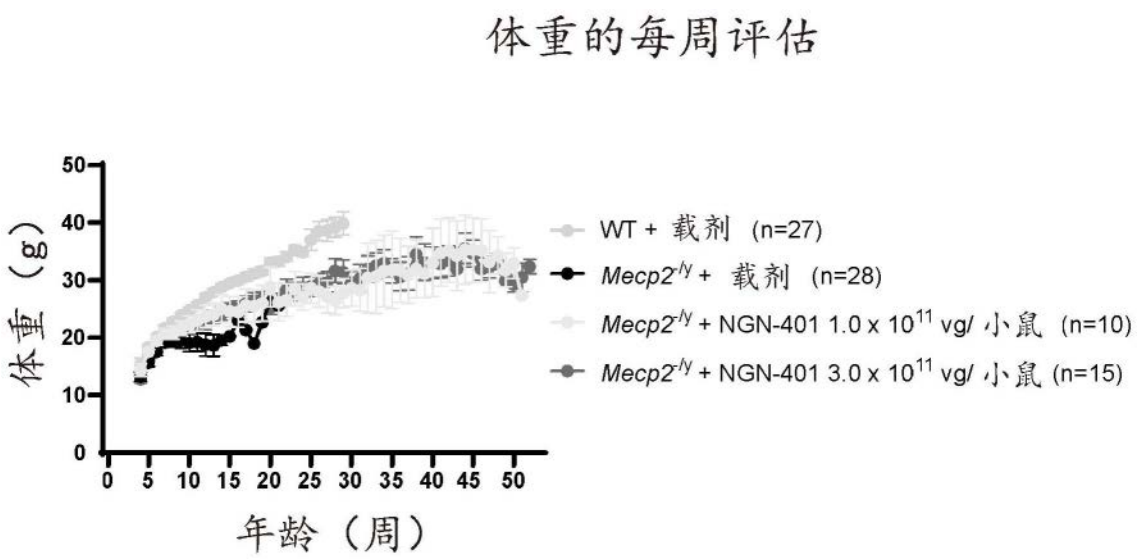


图16

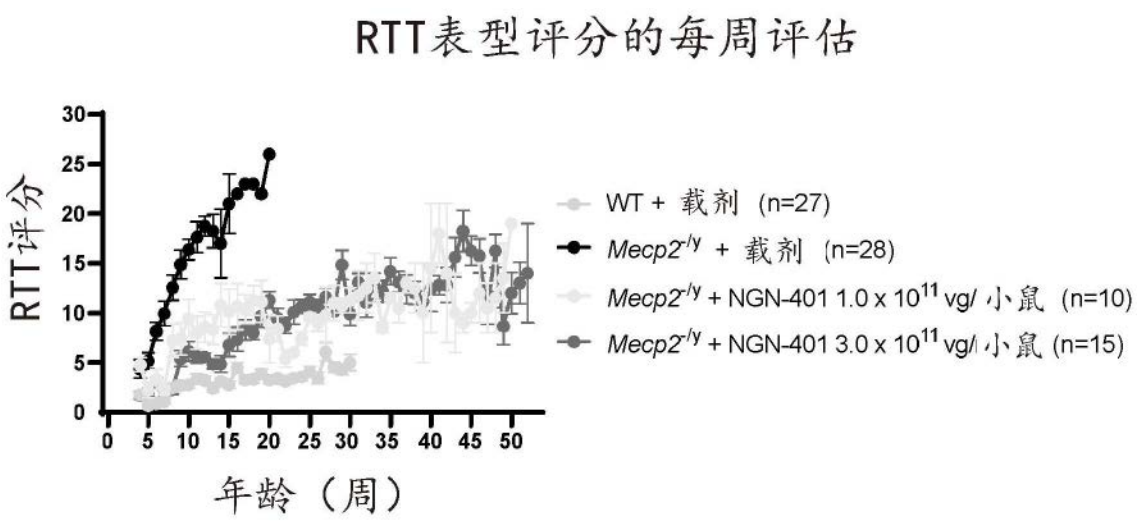
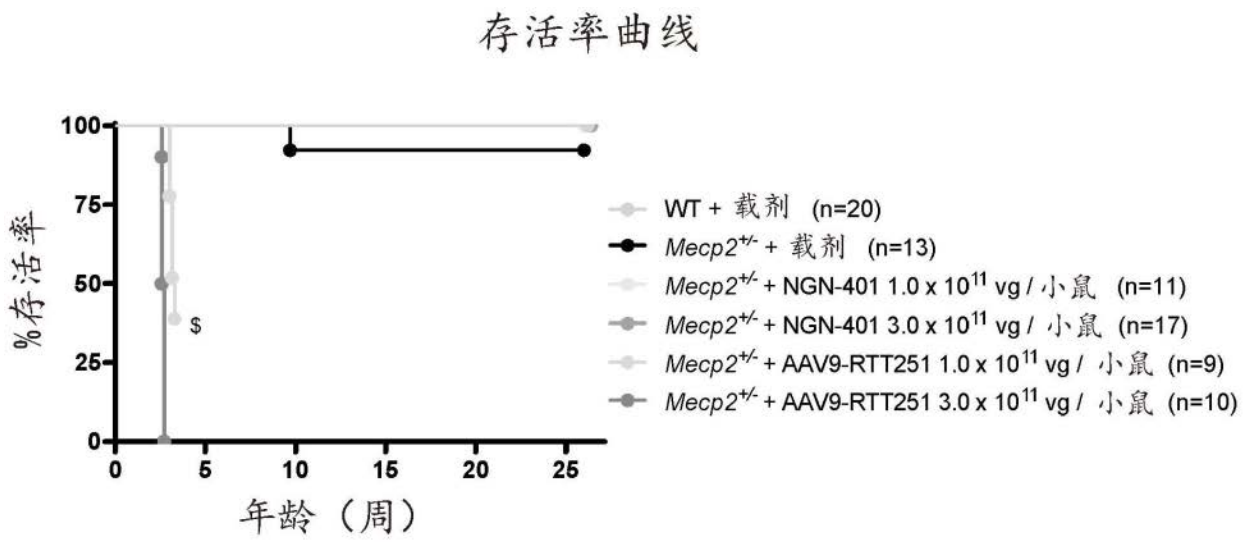
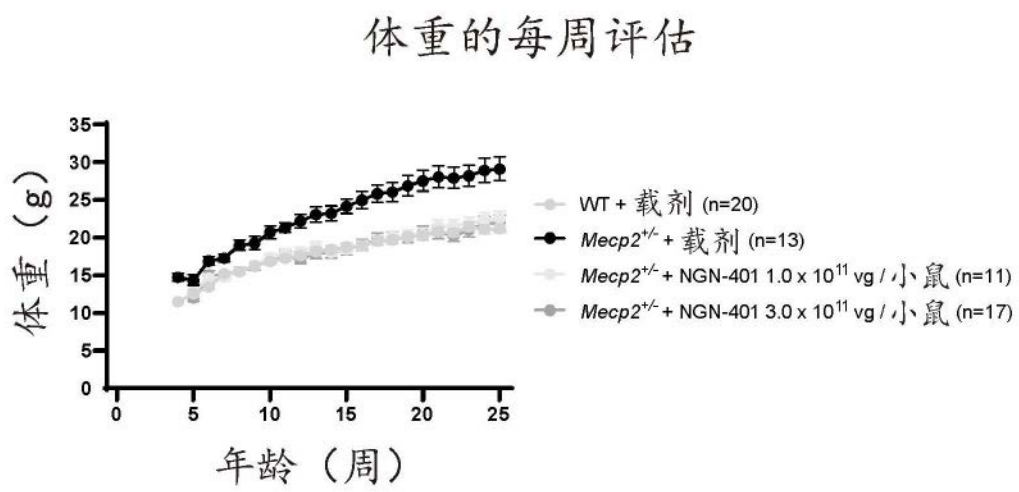


图17



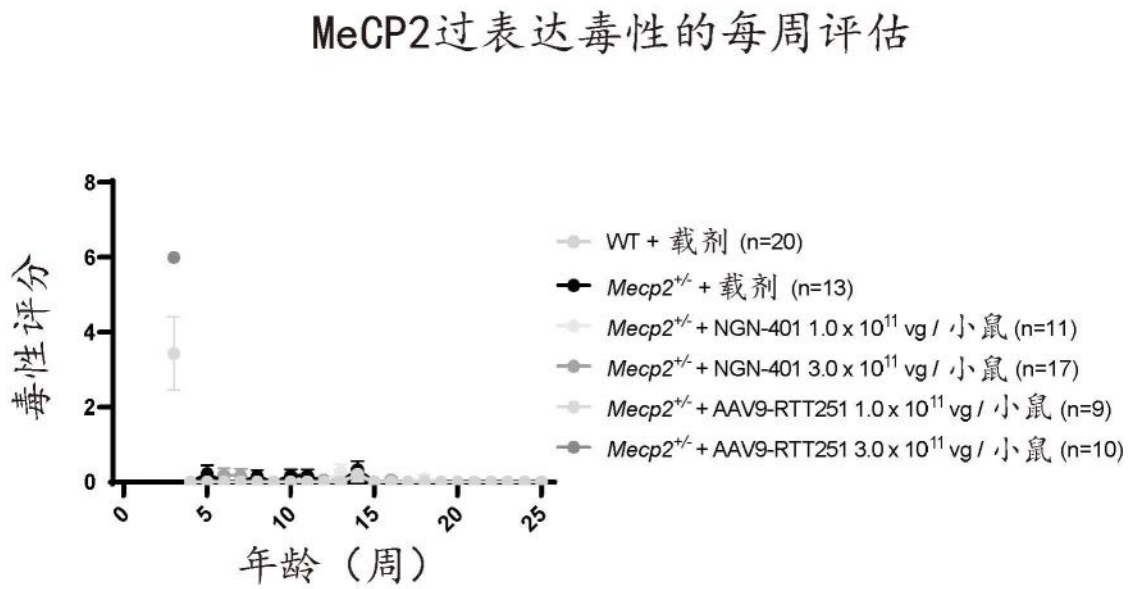
在 P1/2对Mecp2$^{+/-}$ 雌性小鼠ICV施用调节NGN-401或未调节AAV9-RTT251载体后的生命期存活率数据。$ 第5组（Mecp2$^{+/-}$小鼠中1.0×10^{11} vg/g AAV9-RTT251）的研究因严重毒性而终止。

图18



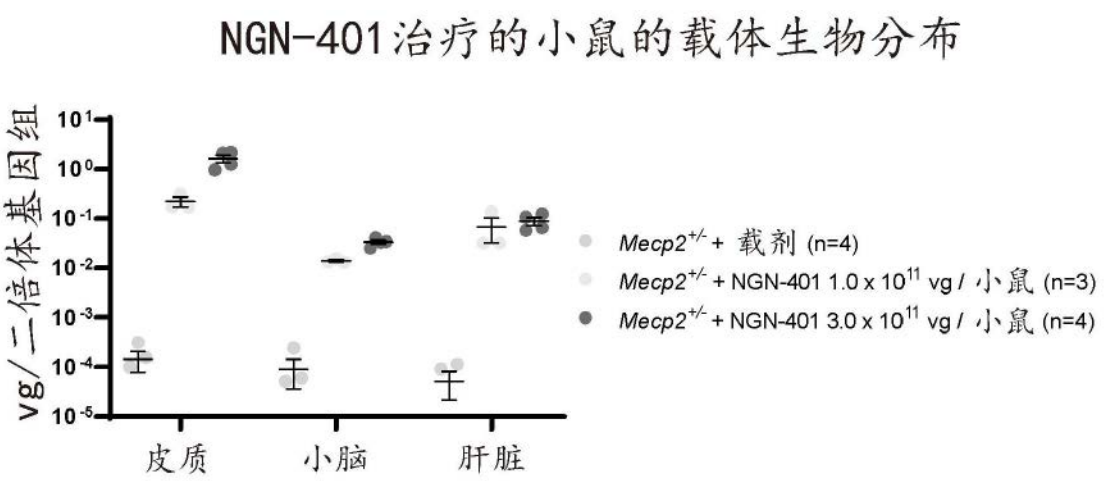
在P1/2对Mecp2$^{+/-}$ 雌性小鼠ICV施用调节NGN-401载体后的生命期体重数据。在P28后每周评估小鼠。没有收集AAV9-RTT251治疗动物的体重数据，因为该研究臂在约3周时因严重的过表达毒性而终止。

图19



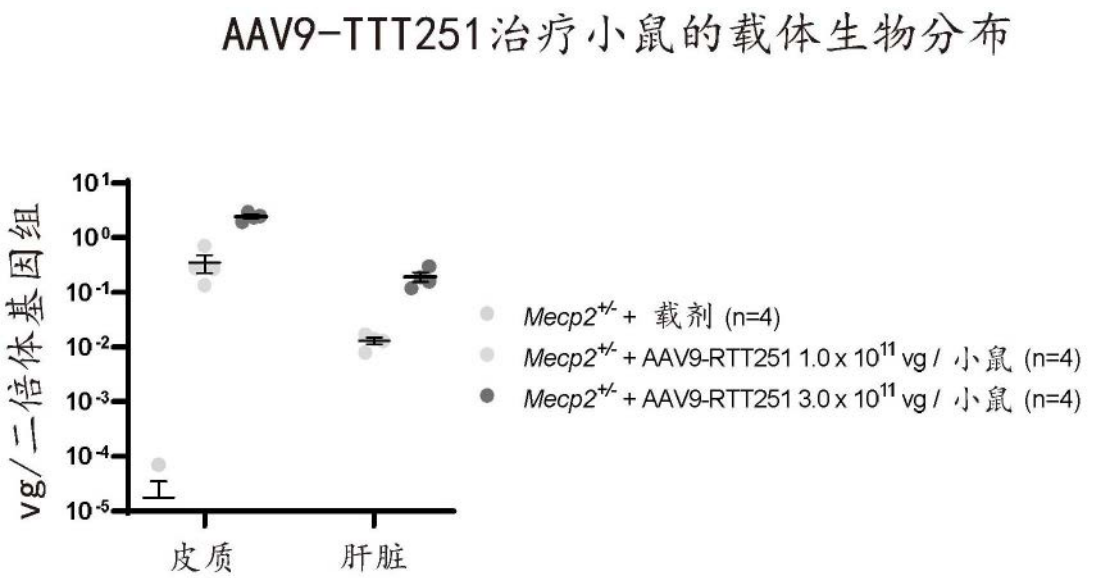
在 P1/2对 Mecp2$^{+/-}$ 雌性小鼠ICV施用调节NGN-401或未调节AAV9-RTT251载体后的生命期过表达毒性评分数据。在P28后每周对小鼠进行评估，除AAV9-RTT251治疗的动物之外，因为该研究因严重的过表达毒性而终止。

图20



在以1.0×10¹¹ vg/小鼠或3.0×10¹¹ vg/小鼠的剂量的ICV递送NGN-401后，在26周时间点的皮质、小脑和肝脏中的载体DNA生物分布水平。结果表示为通过靶向NGN-401载体的WPRE3 元件的TaqMan检测确定的载体基因组拷贝数/二倍体基因组。组规模的数量显示在图例中。vg=载体基因组

图21



在以1.0×10¹¹ vg/小鼠或3.0×10¹¹ vg/小鼠的剂量ICV递送AAV9-RTT251后，在3周时间点的皮质和肝脏中的载体DNA生物分布水平。结果表示为通过靶向AAV9-RTT251载体的WPRE3元件的TaqMan检测确定的载体基因组拷贝数/二倍体基因组。组规模的数量显示在图例中。vg=载体基因组

图22

NGN-401治疗的小鼠的蛋白质印迹蛋白表达

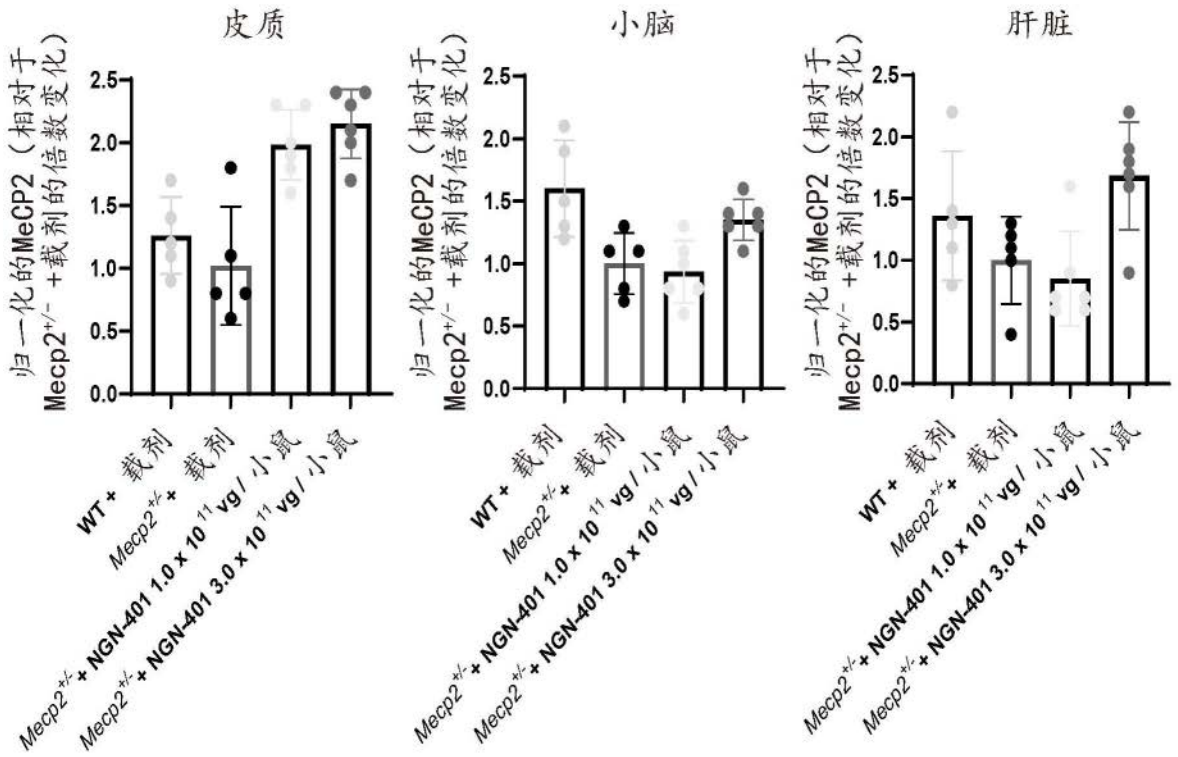


图 23A 图 23B 图 23C

在以1.0×10[11] vg/小鼠或3.0×10[11] vg/小鼠的剂量的ICV递送NGN-401后，在26周时间点的皮质、小脑和肝脏中的MeCP2蛋白水平的蛋白质印迹定量。结果表示为MeCP2水平相比载剂治疗Mecp2[+/-]小鼠中水平的比。对于载剂治疗组，组规模的数量为n=5。对于NGN-401治疗组，组规模的数量为n=6。

AAV9-RTT251治疗小鼠的蛋白质印迹蛋白表达

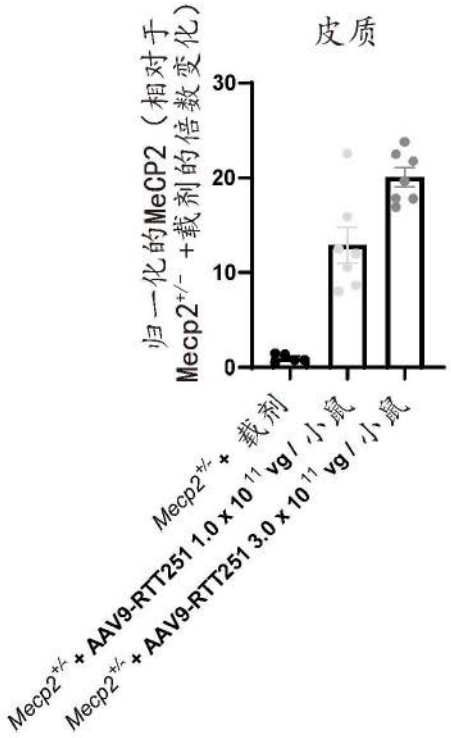


图 24A

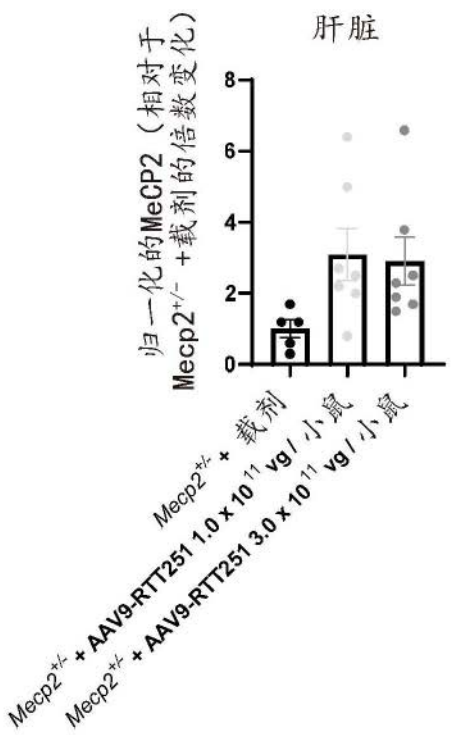
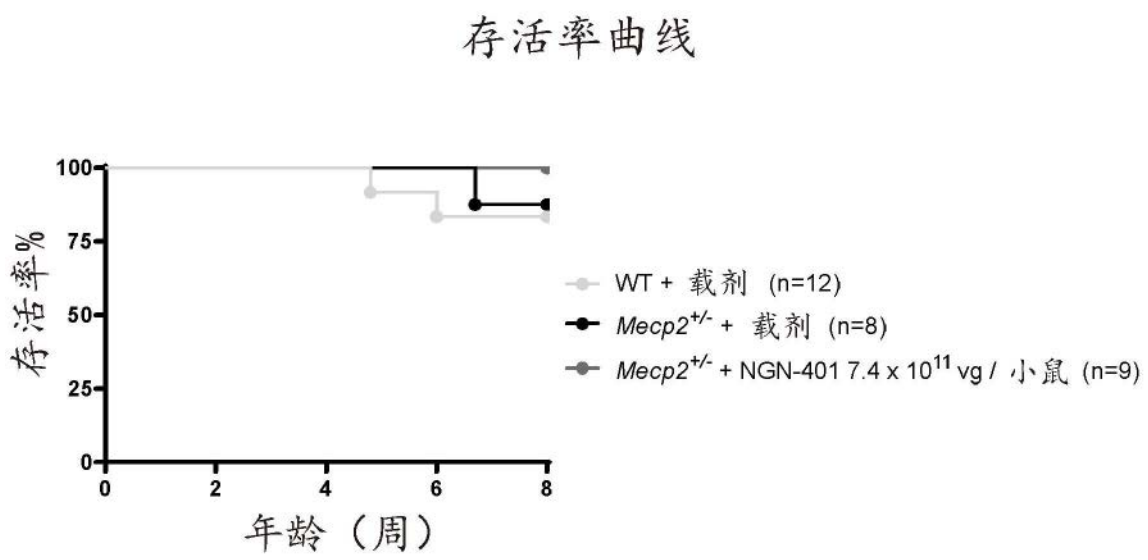


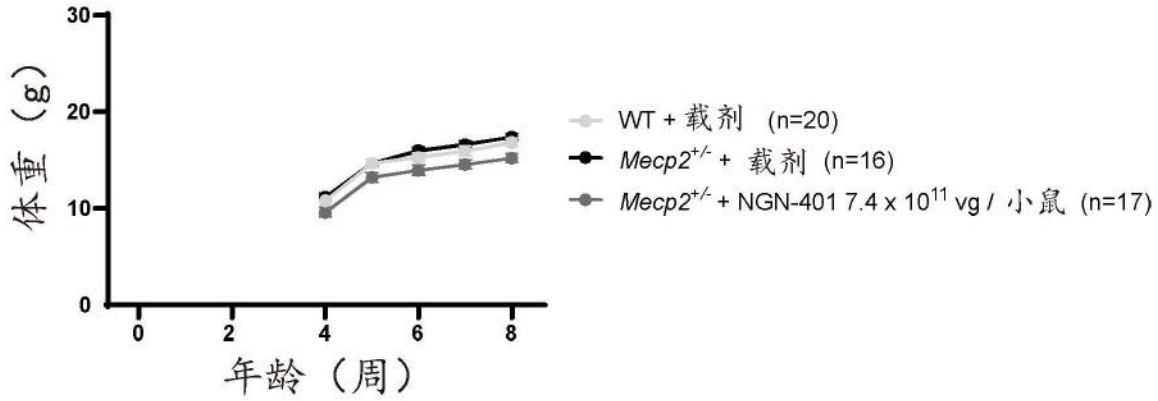
图 24B

在以1.0×10^{11} vg/小鼠或3.0×10^{11} vg/小鼠的剂量的ICV递送AAV9-RTT251后，在3周时间点的皮质和肝脏中的MeCP2蛋白水平的蛋白质印迹定量。结果表示为MeCP2水平相比载剂治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠中水平的比。对于载剂治疗组，组规模的数量为n=5。对于AAV9-RTT251治疗组，组规模的数量为n=7。



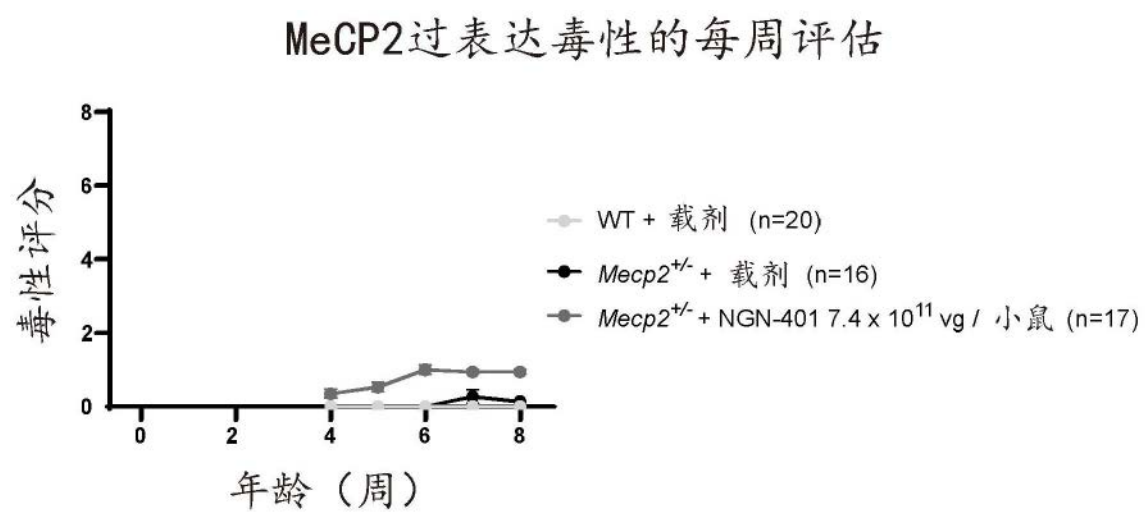
在P1/2对Mecp2$^{+/-}$雌性小鼠以7.4×10^{11} vg/小鼠的剂量的ICV施用NGN-401后的生命期存活率的数据。组规模的数量显示于图例中。

图25



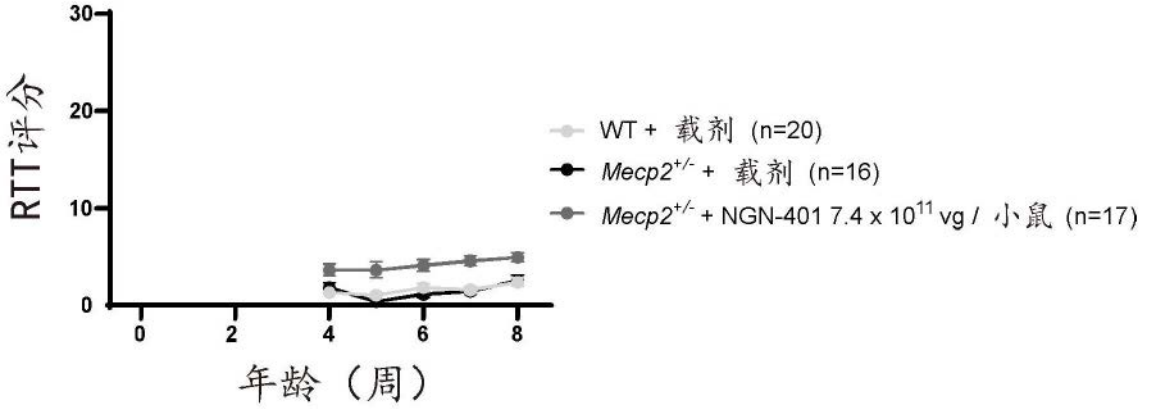
在P1/2对雌性小鼠以7.4×10^{11} vg/小鼠的剂量ICV施用NGN-401后的生命期体重数据。在P28（4周龄）后每周对小鼠进行评估。组数量列在图例中。

图26



在P1/2对Mecp2$^{+/-}$雌性小鼠以7.4×10^{11} vg/小鼠的剂量ICV施用NGN-401后的MeCP2过表达毒性评分数据。在P28（4周龄）后每周对小鼠进行评估。组数量列在图例中。

图27



在P1/2对Mecp$^{2+/-}$雌性小鼠以7.4×10^{11} vg/小鼠的剂量的ICV施用NGN-401后的生命期数据RTT表型评分数据。在P28（4周龄）后每周对小鼠进行评估。组数量列在图例中。

图28

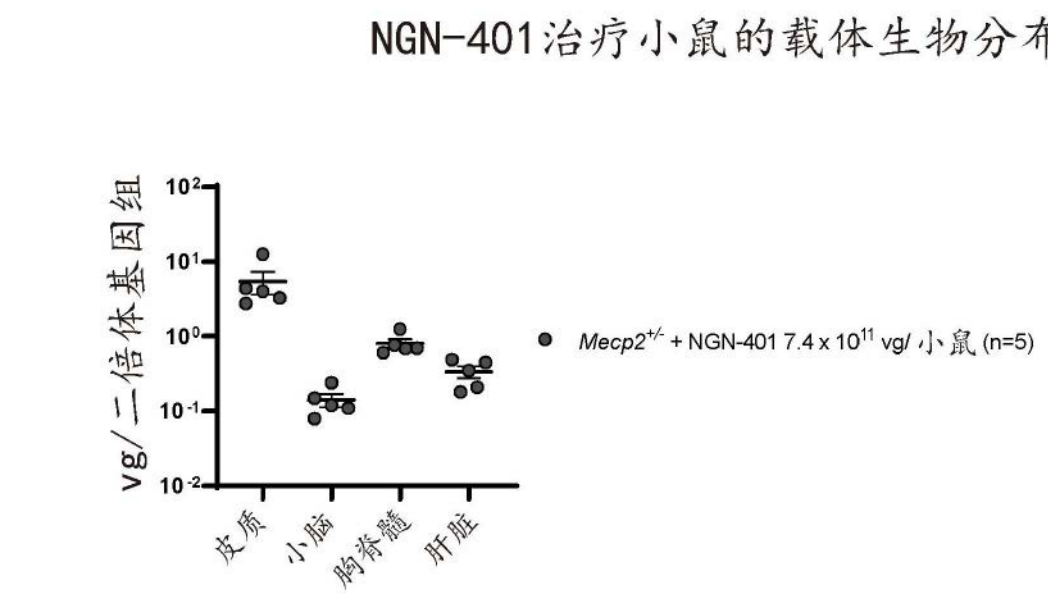
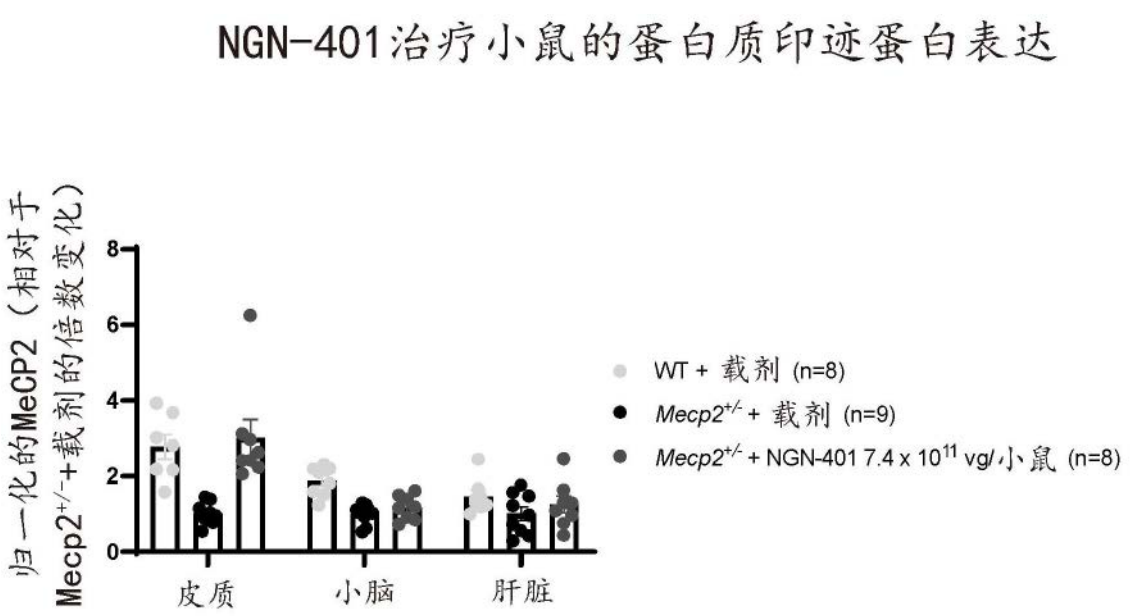
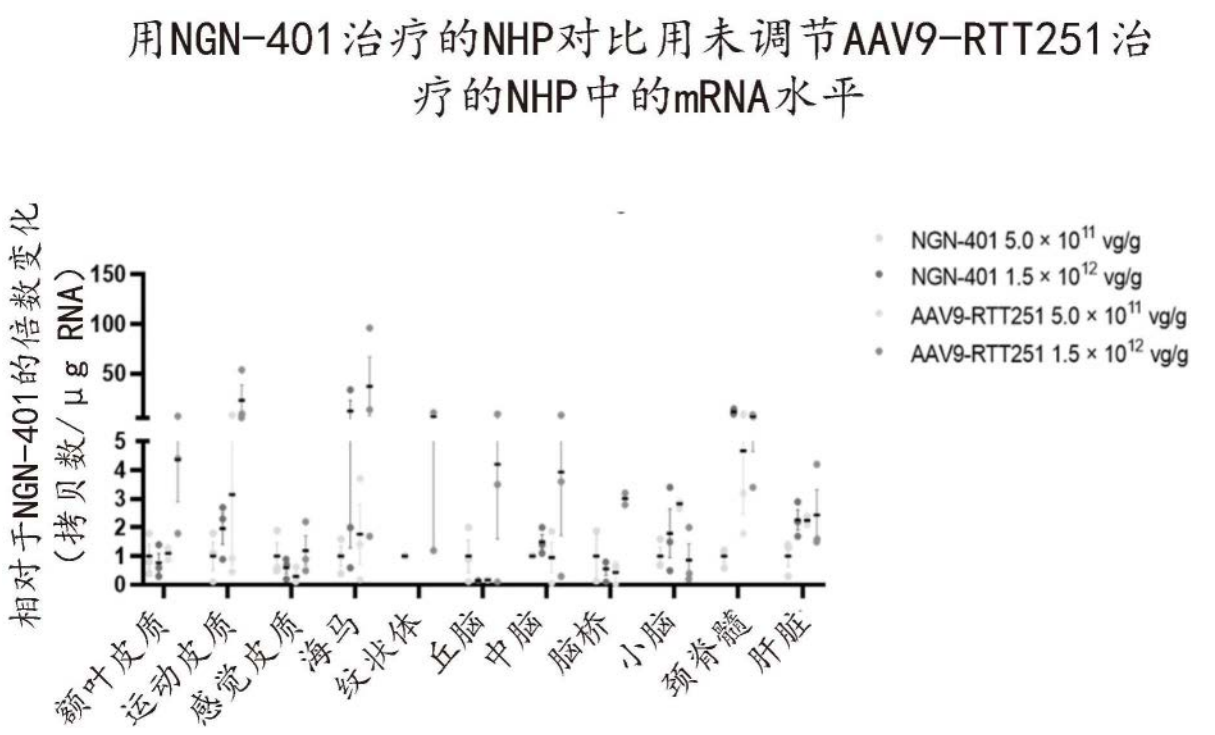


图29



以7.4×10^{11} vg/小鼠的剂量ICV递送NGN-401后，在8周时间点的皮质、小脑和肝脏中MeCP2蛋白水平的蛋白质印迹定量。结果表示为MeCP2水平相比载剂治疗Mecp2$^{+/-}$小鼠中水平的比。组规模的数量显示在图例中。

图30



用NGN-401或AAV9-RTT251以5.0×10^{11}vg/g脑重或1.5×10^{12} vg/g脑重治疗，在给药后第29/30天进行评估的NHP中的转基因mRNA水平。使用靶向由NGN-401载体产生的MECP2转录本的WPRE3元件的检测，通过qRT-PCR确定治疗NHP中的mRNA水平。绘制了每只动物相对于NGN-401低剂量组平均值的转基因mRNA水平。n=3/组。vg=载体基因组。

图31