



(12) 发明专利申请

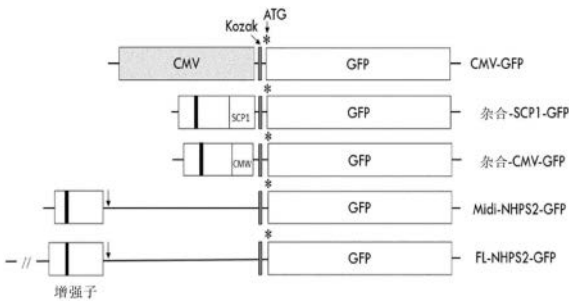
(10) 申请公布号 CN 119677849 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 21

(21) 申请号 202380051659.7	尼尼微治疗有限公司
(22) 申请日 2023.04.28	(72) 发明人 A·梅塞格尔·纳瓦罗
(30) 优先权数据 22382421.0 2022.05.02 EP	M·西庸·罗德里格斯
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2025.01.02	J·P·阿雷瓦洛·巴蒂斯塔
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2023/061388 2023.04.28	G·费尔南德斯·米兰达
(87) PCT国际申请的公布数据 W02023/213738 EN 2023.11.09	M·拉米斯·卡斯特托特
(71) 申请人 瓦尔德西布伦大学基金会医院德雷 塞卡研究所	(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224
地址 西班牙巴塞罗那	专利代理师 陈习
申请人 巴塞罗那自治大学 加泰罗尼亚高级研究院	(51) Int.Cl.
	C12N 15/11 (2006.01)
	C12N 15/86 (2006.01)
	C12N 5/10 (2006.01)
	A61K 48/00 (2006.01)
	权利要求书2页 说明书17页 附图6页

(54) 发明名称
用于足细胞特异性表达的核酸构建体和载体

(57) 摘要
本发明涉及一种新的足细胞特异性杂合启动子以及包含该启动子的基因构建体。本发明还涵盖新的药物组合物。它们均用作药物,特别是用于预防和/或治疗肾脏疾病。



1. 一种足细胞特异性杂合启动子,其包含:

(a) 包含SEQ ID NO:13(AAAAACAGAAGTTAGACCAGACCCCTTCCTGCCTATGATTCTTCAAGAAGCA TTGCA TCATCAACATCAGGCATAAGCATTAATAAAGACCCTAAATAATAACAGAGACGAAACACA TCGCAAAGA GAGTTTTCTTTTATCCCCCTTTAAATGTAAATACTCCAGGAGGAATCAGC CAACATCATTAGGGGTTAATGCATATG)的足细胞特异性增强子序列,或与SEQ ID NO:13具有至少85%的同一性百分比的序列;和

(b) 选自以下的核心启动子序列:

(b1) 长度为81个核苷酸的最小核心启动子,其与SEQ ID NO:2(GTACTTATATAAGGGGGTG GGGGCGCGTTCGTCCTCAGTCGCGATCGAACACTCGAGC CGAGCAGACGTGCCTACGGACCG)具有85%至100%的同一性百分比,以及

(b2) 长度为56个核苷酸的最小核心启动子,其与SEQ ID NO:20(GGCGTTTACTATGGGAGG TCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC)具有85%至100%的同一性百分比。

2. 根据权利要求1所述的足细胞特异性杂合启动子,其由多核苷酸序列SEQ ID NO:1(AAAAACAGAAGTTAGACCAGACCCCTTCCTGCCTATGATTCTTCAAGAAGCATTGCAT CATCAACATCAGGCAT AAGCATTAATAAAGACCCTAAATAATAACAGAGACGAAACACATCGCAAAGAGAGTTTTCTTTTATCCCCCTTAAATGTAAATACTCCAGGAGGAATCAGCCAACATCATTAGGGGTTAATGCATATGTAGAATACTAGGGCGTACTTA TATAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCTCAGTCGCGATCGAACACTCGAGCCGAGCAGACGTGCCTACGGACCG)组成,或由与所述SEQ ID NO:1具有至少85%的同一性百分比的核苷酸序列组成。

3. 一种多核苷酸构建体,其包含根据权利要求1至2中任一项所述的分离的多核苷酸杂合启动子,以及可操作地连接到所述足细胞特异性杂合启动子的感兴趣基因或基因片段的核苷酸序列。

4. 根据权利要求3所述的多核苷酸构建体,还包含以下中的一种或多种:

- (a) 多腺苷酸化信号核苷酸序列;
- (b) 蛋白质翻译起始位点共有核苷酸序列;
- (c) 转录后调控元件核苷酸序列;和
- (d) 5'和3'反向末端重复核苷酸序列。

5. 根据权利要求3或4中任一项所述的多核苷酸构建体,按5'至3'的方向包含:

- (i) 5'反向末端重复核苷酸序列;
- (ii) 根据权利要求1至2中任一项所述的分离的多核苷酸杂合启动子;
- (iii) 蛋白质翻译起始位点共有核苷酸序列;
- (iv) 感兴趣基因或基因片段的核苷酸序列;
- (v) 转录后调控元件核苷酸序列;
- (vi) 多腺苷酸化信号核苷酸序列;以及
- (vii) 3'反向末端重复核苷酸序列。

6. 根据权利要求3至5中任一项所述的多核苷酸构建体,其中所述蛋白质翻译起始位点共有核苷酸序列是kozak共有序列。

7. 根据权利要求3至6中任一项所述的多核苷酸构建体,其中所述转录后调控元件核苷酸序列是土拨鼠肝炎转录后调控元件(WPRE)。

8. 根据权利要求3至7中任一项所述的多核苷酸构建体,其中所述多腺苷酸化信号核苷

酸序列选自牛生长激素 (bGH) 多腺苷酸化信号、早期SV40多腺苷酸化信号、合成多腺苷酸化信号 (SpA) 和相对于感兴趣基因或基因片段的多核苷酸序列的3'位置非翻译序列 (3'-UTR), 所述3'位置非翻译序列 (3'-UTR) 包含相距少于50个核苷酸的至少两个细胞质多腺苷酸化元件以及与第一细胞质多腺苷酸化元件或第二细胞质多腺苷酸化元件相距少于100个核苷酸的细胞质多腺苷酸化信号。

9. 根据权利要求3至8中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中可操作地连接到所述足细胞特异性杂合启动子的所述感兴趣基因选自:

- 与一种或多种肾脏疾病相关的基因, 和/或
- 长度为至多4.0至5.0千碱基 (kb) 的基因。

10. 一种载体, 其包含根据权利要求1或2中任一项所述的足细胞特异性杂合启动子, 或根据权利要求3至9中任一项所述的多核苷酸构建体。

11. 根据权利要求10所述的载体, 其为腺相关病毒载体 (AAV), 对肾细胞和足细胞具有趋向性, 具体地选自血清型AAV19、AAV2、AAV3B、AAV4、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAV-LK03、AAV-DJ和AAV-DJ/8中的一种或多种。

12. 一种细胞, 其包含根据权利要求1或2任一项所述的足细胞特异性杂合启动子、或根据权利要求3至9中任一项所述的多核苷酸构建体、或根据权利要求10至11任一项所述的载体。

13. 一种药物组合物, 其包含治疗有效量的根据权利要求3至9中任一项所述的多核苷酸构建体、根据权利要求10至11任一项所述的载体或根据权利要求12所述的细胞, 以及一种或多种药学上可接受的赋形剂和/或运载体。

14. 权利要求3至9中任一项所述的多核苷酸构建体、权利要求10至11任一项所述的载体、或权利要求12所述的细胞、或权利要求13所述的药物组合物, 用作药物使用。

15. 根据权利要求14使用的所述多核苷酸构建体、所述载体、所述细胞或所述药物组合物, 其用于预防和/或治疗肾脏疾病。

用于足细胞特异性表达的核酸构建体和载体

技术领域

[0001] 本发明涉及用于肾脏足细胞的基因治疗的基因选择性表达领域。

背景技术

[0002] 在基因治疗领域,例如为了替换导致蛋白质不起作用或无功能的突变基因,其中一个主要关注点在于将基因的拷贝提供给感兴趣的细胞(即靶标),然后在其中表达正确的形式以发挥其功能。

[0003] 基因治疗是针对许多疾病(例如许多肾脏疾病)提出的方法之一。

[0004] 这种在所需组织中或组织中的所需细胞中的靶向表达通常用包含与对靶细胞具有特异性或主要作用于靶细胞的表达启动子可操作连接的感兴趣基因的基因构建体(即多核苷酸构建体)来执行。

[0005] 在公开号为W02020148548的国际专利申请(布里斯托大学)中公开了一个这样的示例,其中提出了一种腺相关病毒载体,该载体包含受最小肾素启动子NPHS1控制或受足细胞蛋白启动子NPHS2控制的肾病综合征(NS)转基因。作者的目的在于选择性地获得足细胞来执行基因治疗。

[0006] 因此,待翻译成功能性蛋白的基因构建体通常嵌入表达载体中,例如前文提及的腺相关病毒(AAV)。

[0007] 使用这种表达载体的其中一个主要问题是由于允许表达所需的元件以及转录本(前mRNA或mRNA)的初始稳定性,可装载的基因或片段是低千碱基的。因此,如果基因治疗的目的是替代超过约1kb的不起作用的基因,则需要使用若干互补构建体(即为基因的不同片段的反式剪接和连接所制备的构建体),从而治疗较为复杂。

[0008] 为了导入更高千碱基的基因,最常用的策略之一是使用最小启动子,并减少AAV中的调控元件的数量或类型。然而,这有时意味着表达受到严重损害。由于包装限制,AAV载体基因组的长度被限制在4.8千碱基(kb)。无论质粒编码载体的大小或衣壳类型如何,长度超过4.8kb的AAV载体基因组都会出现截短的基因组和严重的制造/生产问题。

[0009] 在公开号为W02021181118A1的国际专利申请(布里斯托尔大学等)中公开了针对肾脏疾病(奥尔波特综合征)的基因治疗的另一文献示例。该文献使用了具有最小肾素启动子(265bp)的构建体,作者利用该构建体成功地转导了具有超过5kb的完整基因(即COL4a3和COL4a5)的人足细胞。尽管其表明了表达是在足细胞中进行的,但没有说明在受损或无功能的足细胞中刺激表达的情况以及选择性和包装病毒的基因组完整性。

[0010] 基因治疗的另一个目的是进一步靶向相同组织的细胞组内的缺陷细胞。在肾脏疾病领域,这一需求仍未得到满足,即使在例如表达在足细胞中占主导地位,所有足细胞都表达转基因的情况下,与此同时,还期望刺激这些受损或无功能的足细胞更程度的表达。

[0011] 因此,尽管已经付出了许多努力,但仍然存在未涵盖的需求以及对成功和有效的基因治疗的替代方法的需求。

发明内容

[0012] 发明人出乎意料地发现,包含NPHS2基序Lmx1b-FoxC2的被称为足蛋白基因增强子(NPHS2增强子)的片段与包含TATA盒基序(即SCP1)的超级核心启动子相结合,比现有技术中的其他启动子能够在足细胞和肾细胞系中选择性地表达更多的感兴趣基因。利用核心启动子,特别是源自巨细胞病毒启动子的最小启动子,可以获得类似的结果。

[0013] 包含增强子元件和核心区域的杂合启动子是已知的,但它们在细胞特异性和表达能力方面的行为是不可预测的。

[0014] 最小启动子(即使是杂合启动子),通常包含距离转录起始起始密码子不远的元件。

[0015] 因此,本发明的第一方面是一种足细胞特异性杂合启动子,其包含:

[0016] (a) 包含SEQ ID NO:13(AAAAACAGAAGTTAGACCAGACCCCTTCCTGCCTATGATTCTTCAAGAAGCATTGCA TCATCAACATCAGGCATAAGCATTAAATAAAGACCCTAAATAAACAGAGACGAAACACA TCGCA AAGAGAGTTTCTTTTATCCCCCTTTAAATGTAAATACTCCAGGAGGAATCAGC CAACATCATTAGGGGTTAATGCATATG)的足细胞特异性增强子序列,或与SEQ ID NO:13具有至少85%的同一性百分比的序列;和

[0017] (b) 选自以下的核心启动子序列:

[0018] (b1) 长度为81个核苷酸的最小核心启动子,其与SEQ ID NO:2(GTACTTATATAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCTCAGTCGCGATCGAACACTCGAGC CGAGCAGACGTGCCTACGGACCG)具有85%至100%的同一性百分比,以及

[0019] (b2) 长度为56个核苷酸的最小核心启动子,其与SEQ ID NO:20(GGCGTTTACTATGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC)具有85%至100%的同一性百分比。

[0020] 实际上,该足细胞特异性杂合启动子包含:

[0021] (a) 足细胞特异性增强子序列,所述增强子序列包含从人编码足细胞蛋白(NPHS2)基因启动子中分离的200至250个核苷酸(或碱基对),该分离序列包含SEQ ID NO:7(TTAATAAAGACCCTAAATA),SEQ ID NO:7为包含在NPHS2基因启动子中的转录因子Lmx1b和Foxc2结合基序的序列;和

[0022] (b) 核心启动子序列,其TATA盒基序与增强子中SEQ ID NO:7的最后一个核苷酸相距80至350个核苷酸(或碱基对),特别是相距123至126个核苷酸。SEQ ID NO:7包含在前文段落的SEQ ID NO:13中。

[0023] 不受任何理论的约束,发明人认为所述SEQ ID NO:7与TATA盒之间的距离(以核苷酸或相同碱基对为单位)与表达的引导相关;并且与现有技术中的其他杂合启动子或天然存在的启动子相比,特定核心的选择促进以选择性方式在足细胞中表达或在足细胞中以更高程度表达。

[0024] 本发明的第二方面是一种多核苷酸构建体,其包含如第一方面所定义的分离的足细胞特异性杂合启动子,以及与足细胞特异性杂合启动子可操作地连接的感兴趣基因或基因片段的核苷酸序列(即感兴趣的多核苷酸)。

[0025] 本发明的第三方面是一种载体,其包含如第一方面所定义的足细胞特异性杂合启动子,或如第二方面所定义的多核苷酸构建体。

[0026] 本发明的第四方面是一种细胞,其包含如第一方面所定义的足细胞特异性杂合启

动子、或如第二方面所定义的多核苷酸构建体或根据第三方面的载体。

[0027] 在第五方面,本发明涵盖药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的根据第二方面的多核苷酸构建体、根据第三方面的载体或根据第四方面的细胞,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂和/或运载体。

[0028] 当本发明的杂合启动子、构建体或细胞包含可操作地连接到启动子的基因,所述基因是与疾病相关的基因(例如由于某些突变导致的疾病)时,前文列出的所有方面均可用作药物,从而允许由可操作地连接到杂合启动子的所述基因表达功能性蛋白。因此,在第六方面,本发明涉及用作药物使用的如第一方面所定义的启动子、如第二方面所定义的多核苷酸构建体、如第三方面所定义的载体、如第四方面所定义的细胞、或如第五方面所定义的药物组合物。

附图说明

[0029] 图1与实施例1相关,其示出了根据本发明以及来自现有技术的多核苷酸构建体的方案,所有多核苷酸构建体都含有绿色荧光蛋白(GFP)的基因。

[0030] 图2与实施例1相关,显示了在共聚焦显微镜下,用图1的构建体转导的细胞中绿色荧光蛋白(GFP)发出的荧光。

[0031] 图3与实施例1相关,描绘了Lmx1b和Foxc2转录因子在所选细胞系中的表达。

[0032] 图4与实施例2相关,是启动子和荧光素酶基因的示意图,用于确定该蛋白在足细胞中的表达(每个所测定构建体在足细胞中的相对荧光素酶单位(RLU))。

[0033] 图5与实施例3相关,示出了本发明的构建体(具有SEQ ID NO.1的杂合启动子)的元件(方框)的示意图,其中多腺苷酸化信号不同(即SV40多聚A或CPE多聚A)。该图显示了在内质网应激(ER应激)条件下HEK293细胞中的表达。提供了随ER应激时间包括蛋白质表达(相对荧光素酶表达)和mRNA水平(相对mRNA表达)的数据。

[0034] 图6是与携带巨细胞病毒启动子(CMV)的构建体相比,使用具有SEQ ID NO:1启动子的多核苷酸构建体Crumbs细胞极性复合物组分2基因(CRB2,UniProtKB/Swiss-Prot:Q5IJ48,序列版本2(2006年10月17日))在HEK293细胞中的相对表达以条形体示出的图。

具体实施方式

[0035] 除非另有说明,否则在本申请中本文使用的所有术语应以其在本领域已知的普通含义来理解。除非另外明确列出的定义提供了更广泛的定义,否则如本申请中所使用的某些术语的其他更具体的定义如下所述,并且旨在在整个说明书和权利要求书中统一应用。

[0036] 如本文所使用的,不定冠词“一种”和“一个”与“至少一个”或“一个或多个”同义。除非另有说明,否则本文使用的定冠词,例如“该”,也包括名词的复数形式。

[0037] 术语“启动子”是指与某些蛋白质结合的DNA序列,允许从其下游的DNA启动单个RNA的转录。启动子由三个主要部分组成:核心启动子、近端启动子和远端启动子。核心启动子区位于起始密码子最近端,并且包含RNA聚合酶结合位点、TATA盒和转录起始位点(TSS)。RNA聚合酶将稳定地结合该核心启动子区域,并且可以启动模板链的转录。TATA盒是核心启动子区域内的DNA序列(5'-TATAAA-3'),可以结合通用转录因子蛋白和组蛋白。组蛋白是真核细胞中发现的将DNA包装成核小体的蛋白质。组蛋白结合阻止转录的启动,而转录因子促

进转录的启动。核心启动子的最3'部分(最靠近基因的起始密码子)是TSS,转录实际上从TSS开始。然而,只有真核生物和古细菌含有这种TATA盒。大多数原核生物都含有被认为功能等同的称为普里布诺盒(Pribnow box)的序列,其通常由六个核苷酸TATAAT组成。在核心启动子的上游可以找到包含许多主要调控元件的近端启动子。近端启动子位于TSS上游约250个碱基对处,它是通用转录因子结合的位点。启动子区域的最后一部分称为远端启动子,其位于近端启动子的上游。远端启动子也包含转录因子结合位点,但主要包含调节元件。

[0038] 术语“最小启动子”是指可以表达下游基因的天然启动子(主要是核心启动子)的最小序列。

[0039] 表述“杂合启动子”应理解为源自不同启动子(即天然存在的启动子)的元件的组合。例如,杂合启动子可以包含源自一个早先存在的启动子的近端或远端启动子区域和源自另一个早先存在的启动子的核心启动子,以实现所需的转基因表达。

[0040] “增强子或增强子序列”是DNA的短(15-1500bp)区域,可以与蛋白质(激活剂)结合,以增加特定基因发生转录的可能性。这些蛋白质通常被称为转录因子。增强子是顺式作用的。它们可位于距基因最多1Mbp(1,000,000bp)处,在起始位点的上游或下游。

[0041] 当指示多核苷酸序列时,它们指的是信息分子并且只显示一条链。尽管如此,本领域技术人员将理解,它们可以是单链或双链核酸聚合物的形式,例如包含模板和互补链的脱氧核糖核酸,或单链核糖核酸,例如信使RNA。本说明书中表示的多核苷酸序列以其长度(以核苷酸)公开,或以碱基、核碱基或其倍数(如千碱基,kb)公开,它们是相同的,因为碱基是核苷酸的一部分。当使用表述“碱基对”时,它涉及由通过氢键相互结合的两个核碱基组成的双链核酸的基本单位。当将多核苷酸是指双链分子时,碱基对的数量是表示多核苷酸长度的另一种等效方式。

[0042] 如前所述,本发明的第一方面是一种足细胞特异性杂合启动子,其包含:

[0043] (a) 包含SEQ ID NO:13(AAAAACAGAAGTTAGACCAGACCCCTTCCTGCCTATGATTCTTCAAGAAGCATTGCA TCATCAACATCAGGCATAAGCATTAATAAAGACCCTAAATAAACAGAGACGAAACACA TCGCA AAGAGAGTTTTCTTTTATCCCCCTTTAAAATGTAAATACTCCCAGGAGGAATCAGCCAACATCATTAGGGGTTAATGCATATG)的足细胞特异性增强子序列,或与SEQ ID NO:13具有至少85%的同一性百分比的序列;和

[0044] (b) 选自以下的核心启动子序列:

[0045] (b1) 长度为81个核苷酸的最小核心启动子,其与SEQ ID NO:2(GTACTTATATAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCTCAGTCGCGATCGAACACTCGAGC CGAGCAGACGTGCCTACGGACCG)具有85%至100%的同一性百分比,以及

[0046] (b2) 长度为56个核苷酸的最小核心启动子,其与SEQ ID NO:20(GGCGTTTACTATGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC)具有85%至100%的同一性百分比。

[0047] 实际上,该足细胞特异性杂合启动子包含:

[0048] (a) 足细胞特异性增强子序列,所述增强子序列包含从人编码足细胞蛋白(NPHS2)基因启动子中分离的200至250个核苷酸(或碱基对),所述分离序列包含SEQ ID NO:7(TTAATAAAGACCCTAAATA),SEQ ID NO:7为包含在NPHS2基因启动子中的转录因子Lmx1b和Foxc2结合基序的序列;和

[0049] (b) 核心启动子序列,其TATA盒基序与增强子中SEQ ID NO:7的最后一个核苷酸相距80至350个核苷酸(或碱基对),特别是相距123至126个核苷酸。SEQ ID NO:7包含在前文段落的SEQ ID NO:13中。

[0050] 在足细胞特异性杂合启动子的具体实施方式中,足细胞特异性增强子序列是长度为219个核苷酸的序列,其与SEQ ID NO:3具有85%至100%的同一性百分比。该SEQ ID NO:3包含SEQ ID NO:13。

[0051] 在足细胞特异性杂合启动子的具体实施方式中,其包含:

[0052] (a) 包含SEQ ID NO:3或由SEQ ID NO:3组成的足细胞特异性增强子序列;和

[0053] (b) 长度为81个核苷酸的最小核心启动子,其与SEQ ID NO:2(SCP1) (GTACTTATAT AAGGGGTGGGGGCGGTCGTCCTCAGTCGCGATCGAACACTCGAGCC GAGCAGACGTGCCTACGGACCG) 具有85%至100%的同一性百分比。

[0054] 在更具体的实施方式中,足细胞特异性启动子包含SEQ ID NO:1或与所述SEQ ID NO:1具有至少85%同一性百分比的核苷酸序列,或由其组成。

[0055] AAAAAACAGAAGTTAGACCAGACCCCTTCCTGCCTATGATTCTTCAAGAAGCATTGCATCATCAACATCA GGCATAAGCATTATAATAAGACCCTAAATAATAACAGAGACGAAACACATCGCAAAGAGAGTTTTCTTTTATCCCCTT TAAATGTAAATACTCCCAGGAGGAATCAGCCAACATCATTAGGGGTAAATGCATATGTAGAATAACTAGGGCGTAC TTATATAAGGGGTGGGGGCGGTCGTCCTCAGTCGCGATCGAACACTCGAGCCGAGCAGACGTGCCTACGGACCG

[0056] (SEQ ID NO.1在本说明书中也缩写为0.3NPHS2-SCP1-300bp)

[0057] 该分离的足细胞特异性杂合启动子也可定义为长度为300至330个核苷酸(或碱基对)的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:1或与该SEQ ID NO:1具有至少85%同一性百分比的序列或由其组成。

[0058] 从该SEQ ID NO:1的详细分析来看,足细胞特异性杂合启动子包含多核苷酸序列,其包含:

[0059] -长度为81个核苷酸的最小核心启动子,其与SEQ ID NO:2

[0060] (GTACTTATATAAGGGGTGGGGGCGGTCGTCCTCAGTCGCGATCGAACACTCGA

[0061] GCCGAGCAGACGTGCCTACGGACCG) 具有85%至100%的同一性百分比;和

[0062] -长度为219个核苷酸的足细胞特异性增强子,其与SEQ ID NO:3

[0063] (AAAAACAGAAGTTAGACCAGACCCCTTCCTGCCTATGATTCTTCAAGAAGCATTGCATCATCAACAT CAGGCATAAGCATTATAATAAGACCCTAAATAATAACAGAGACGAAACACATCGCAAAGAGAGTTTTCTTTTATCCC CTTTAAATGTAAATACTCCCAGGAGGAATCAGCCAACATCATTAGGGGTAAATGCATATGTAGAATAACTAGGGC) 具有85%至100%的同一性百分比。

[0064] 在该SEQ ID NO:1中,核苷酸1至219[1:219]对应于NPHS2增强子;核苷酸80至98 [80:98]对应于基序Lmx1b-FoxC2(即转录因子所结合的位置,下划线);被称为超级核心最小启动子1(SCP1)的最小启动子从核苷酸220延伸到300[220:300],并且该最小启动子中的TATA盒位于核苷酸225至231[225:231](双下划线)。SCP1在Juven-Gershon等人,“Rational design of super core promoter that enhances gene expression”,Nature Methods-2006,vol.no.3(11),pp.917-922中被广泛定义。

[0065] 在另一个具体实施方式中,足细胞特异性杂合启动子包含:

[0066] (a) 包含SEQ ID NO:13或由SEQ ID NO:13(AAAAAACAGAAGTTAGACCAGACCCCTTCCTGC

CTATGATTCTTCAAGAAGCATTGCATC ATCAACATCAGGCATAAGCATTAATAAAGACCCTAAATAATAACAGAG ACGAAACACATC GCAAAGAGAGTTTTCTTTTATCCCCTTTAAAATGTAAATACTCCCAGGAGGAATCAGCCA ACATCATTAGGGGTTAATGCATATG)组成的足细胞特异性增强子序列;和

[0067] (b) 长度为56个核苷酸的最小核心启动子序列,其与SEQ ID NO:20 (GGCGTTTACTA TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC) 具有85%至100%的同一性百分比,更具体地由SEQ ID NO:20组成。

[0068] 在更具体的实施方式中,足细胞特异性启动子包含SEQ ID NO:4或由SEQ ID NO:4 [在本说明书和附图中也标记为0.2NPH2+minCMV] (AAAAACAGAAGTTAGACCAGACCCCTTCCTGCC TATGATTCTTCAAGAAGCATTGCATC ATCAACATCAGGCATAAGCATTAATAAAGACCCTAAATAATAACAGAGA CGAAACACATCGCAAAGAGAGTTTTCTTTTATCCCCTTTAAAATGTAAATACTCCCAGGAGGAATCAGCCAACATC ATTAGGGGTTAATGCATATGGGCGTTTACTATGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC) 组成。

[0069] 可替代地,第一方面的杂合启动子可以通过组成它的具有已识别功能的子序列来定义(参见上文)。

[0070] 定义第一方面的启动子的序列(例如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4或与其具有至少85%同一性百分比的序列,或前文公开的实施方式中的任何序列)是多核苷酸构建体的启动子序列,该多核苷酸构建体包含与该启动子序列可操作地连接的感兴趣基因或其片段的序列、或感兴趣多核苷酸的序列。因此,如所述的,本发明的第二方面是一种多核苷酸构建体,其包含如第一方面所定义的分开的足细胞特异性杂合启动子,以及与足细胞特异性杂合启动子可操作地连接的感兴趣基因或基因片段的核苷酸序列。

[0071] 蛋白质变体为本领域技术人员所熟知,并且可涉及源自核苷酸修饰的氨基酸序列修饰。例如,氨基酸序列修饰通常属于三种类型中的一种或多种:替换,插入或缺失变体。同样,核苷酸序列变体,无论其既定作用(即基因的启动子、编码基因序列等)如何,也可以涉及核苷酸序列修饰,包括核苷酸的缺失、插入和改变。

[0072] 在本发明中,术语“同一性”是指对序列(无论是氨基酸序列还是核酸序列)进行最佳比对时,两个序列之间相同的残基的百分比。如果在最佳比对中,第一序列中的位置被与第二序列中相应位置处相同的氨基酸或核苷酸残基占据时,则这两个序列相对于该位置表现出同一性。同一性百分比确定了在给定比对中在定义长度内相同残基的数量。因此,两个序列之间的同一性水平(或“序列同一性百分比”)测量为序列所共有的相同位置的数量相对于所比较位置的数量的比率(即,序列同一性百分比=(相同位置的数量/所比较的位置总数)×100)。空位,即比对中残基存在于一个序列而不存在于另一个序列中的位置,被视为具有不相同残基的位置并计为比较位置。

[0073] 许多用于快速获得最佳比对并计算两个或更多个序列之间的同一性的数学算法是已知的,并且被结合到许多可用的软件程序中。出于本发明的目的,两个氨基酸序列或两个核苷酸序列之间的序列同一性优选使用基于全局比对的算法来确定,例如Needleman-Wunsch算法(Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453),优选在EMBOSS包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice等人,2000,Trends Genet.16:276-277)的Needle程序中实现;或BLAST全局比对工具(Altschul等人,“Basic local alignment search tool”,1990,J.Mol.Biol,v.215,pages 403-410),使用

默认设置。当所比较的序列长度基本上相同时,也可以使用局部比对。

[0074] 在本发明第一方面的具体实施方式中,可选地与下文提供的任一实施方式组合,与其中所识别的任何序列(即,增强子、核心启动子)的同一性百分比选自所示序列的至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少88.5%、至少89%、至少89.5%、至少90%、至少90.5%、至少91%、至少91.5%、至少92%、至少92.5%、至少93%、至少93.5%、至少94%、至少94.5%、至少95%、至少95.5%、至少96%、至少96.5%、至少97%、至少97.5%、至少98%、至少98.5%、至少99%或至少99.5%的同一性。

[0075] 在本发明第一方面的具体实施方式中,可选地与下文提供的任一实施方式组合,足细胞特异性杂合启动子由序列SEQ ID NO:1或其功能变体组成,所述变体由与SEQ ID NO:1具有至少85%、86%、87%、88%、88.5%、89%、89.5%、90%、90.5%、91%、91.5%、92%、92.5%、93%、93.5%、94%、94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%或99.5%同一性的序列组成。

[0076] 本文公开了一种足细胞特异性杂合启动子,其由序列SEQ ID NO:4或其功能变体组成,所述功能变体由与SEQ ID NO:4具有至少85%、86%、87%、88%、88.5%、89%、89.5%、90%、90.5%、91%、91.5%、92%、92.5%、93%、93.5%、94%、94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%或99.5%的同一性的序列组成。

[0077] 术语“核酸构建体”或“多核苷酸构建体”是指使用重组DNA技术产生的人造核酸分子。核酸构建体是一种单链或双链的核酸分子,其已被修饰以包含核酸的片段,这些片段以自然界中不存在的方式组合和并置。核酸构建体通常是“载体”,即用于将外源产生的DNA递送到宿主细胞中的核酸分子。当它指的是包含编码感兴趣的蛋白质的序列的多核苷酸序列时,它也可以被称为“基因构建体”或“表达盒”,该多核苷酸序列可操作地连接到表达启动子,所述启动子控制编码该蛋白质的序列的表达。对于“可操作地连接”,应当理解为编码蛋白质的序列位于启动子序列之后(5'-3'方向),或者在包含限制位点或者存在基因构建的其他稳定元件的情况下位于启动子附近。表达盒本身也是一个表达系统,作为载体或质粒进一步用于保护基因构建体,或者在病毒载体的情况下促进进入细胞。对于“多核苷酸序列”,应理解为包含脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的核酸分子(DNA或RNA)。核酸可以是单链或双链的,并且其包括但不限于编码多肽的核苷酸序列。

[0078] 在第二方面的具体实施方式中,该多核苷酸构建体还包含以下中的一种或多种:

[0079] (a) 多腺苷酸化信号核苷酸序列;

[0080] (b) 蛋白质翻译起始位点共有核苷酸序列;

[0081] (c) 转录后调控元件核苷酸序列;和

[0082] (d) 5'和3'反向末端重复核苷酸序列。

[0083] 所有这些元件(a)至(d)都是使得与启动子可操作地连接的基因正确表达的序列。

[0084] 在第二方面的具体实施方式中,多核苷酸构建体包含如第一方面所定义的足细胞特异性杂合启动子,和与足细胞特异性杂合启动子可操作地连接的感兴趣基因或基因片段的核苷酸序列,以及以下中的一种或多种:多腺苷酸化信号核苷酸序列;蛋白质翻译起始位点共有核苷酸序列;和转录后调控元件核苷酸序列。

[0085] 多腺苷酸化信号是一种通过稳定即将被进一步翻译的转录本mRNA来促进转录的序列。多腺苷酸化是在信使RNA上添加多聚(A)尾。多聚(A)尾由多个腺苷酸单磷酸组成;换

句话说,它是仅具有腺嘌呤碱基的RNA段。多聚(A)尾对于mRNA的核输出、翻译和稳定性非常重要。因此,加入多腺苷酸化信号可以增强感兴趣基因的表达。

[0086] 蛋白质翻译起始位点是通过介导核糖体组装和翻译起始来促进翻译起始的核苷酸序列。

[0087] 转录后调控元件是增强病毒(即载体)在包装细胞中的稳定性的序列,使得包装病毒的滴度更高,从而表达转基因(即可操作地连接到启动子的感兴趣基因)。

[0088] 5'和3'反向末端重复(5'-ITR和3'-ITR)是序列中基本相同的区域,位于腺相关病毒基因组的两端,指向相反的方向,作为病毒基因组复制的起点。ITR通常与启动子一起位于所需基因的两侧,并且在单链载体DNA被宿主细胞DNA聚合酶复合物转化为双链DNA后,它们有助于在核中形成多联体。本领域技术人员将了解哪种序列可作为5'-ITR和3'-ITR发挥作用。

[0089] 在第二方面的更具体的实施方式中,多核苷酸构建体在5'到3'的方向上包含:

[0090] (i) 5'反向末端重复核苷酸序列;

[0091] (ii) 如第一方面所定义的分离的多核苷酸杂合启动子(权利要求1);

[0092] (iii) 蛋白质翻译起始位点共有核苷酸序列;

[0093] (iv) 感兴趣基因或基因片段的核苷酸序列;

[0094] (v) 转录后调控元件核苷酸序列;

[0095] (vi) 多腺苷酸化信号核苷酸序列;以及

[0096] (vii) 3'反向末端重复核苷酸序列。

[0097] 在根据第二方面的多核苷酸构建体的更具体的实施方式中,蛋白质翻译起始位点共有核苷酸序列是kozak共有序列。已知kozak序列在翻译过程的起始中起着重要作用,因此可以增强感兴趣基因的表达。Kozak共有序列(Kozak共有或Kozak序列)是在大多数真核生物mRNA转录本中发挥蛋白质翻译起始位点的功能的核酸基序。

[0098] 在多核苷酸构建体的另一具体实施方式中,可选地与该多核苷酸构建体的上文或下文的任意实施方式组合,转录后调控元件核苷酸序列是土拨鼠肝炎转录后调控元件(WPRE)。WPRE是一种转录时产生增强表达的三级结构的DNA序列。当该多核苷酸构建体位于载体中时,加入WPRE元件可增加载体所递送的转基因的表达。在更具体的实施方式中,WPRE是SEQ ID NO:12 (GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGT)的WPRE3。WPRE3比WPRE短。WPRE包含598个碱基对,而WPRE3包含248个碱基对(248bp),但在增加转基因的表达方面同样有效。

[0099] 在多核苷酸构建体的另一具体实施方式中,可选地与该多核苷酸构建体的上文或下文的任意实施方式组合,多腺苷酸化信号核苷酸序列选自:

[0100] (i) 牛生长激素(bGH)多腺苷酸化信号,

[0101] (ii) 早期SV40多腺苷酸化信号,

[0102] (iii) 合成的多腺苷酸化信号(SpA),以及

[0103] (iv) 相对于感兴趣基因或基因片段的核苷酸序列的3'位置非翻译序列(3'-UTR),该3'位置非翻译序列(3'-UTR)包含相距少于50个核苷酸的至少两个细胞质多腺苷酸

化元件 (CPE), 以及与第一细胞质多腺苷酸化元件或第二细胞质多腺苷酸化元件相距少于 100 个核苷酸的细胞质多腺苷酸化信号。

[0104] 在多核苷酸构建体的更具体的实施方式中, 可选地与该多核苷酸构建体的上文或下文的任意实施方式组合, 多腺苷酸化信号核苷酸序列是非翻译序列, 其包含相距少于 50 个核苷酸的至少两个细胞质多腺苷酸化元件, 以及与第一细胞质多腺苷酸化或第二细胞质多腺苷酸化相距少于 100 个核苷酸的细胞质多腺苷酸化信号。

[0105] 如本文所使用的, 术语“细胞质多腺苷酸化元件”或“CPE”是指在信使 RNA 的 3' UTR 中发现的序列。CPE 通常具有序列 5'-UUUUAi₂U-3' (也称为共有序列), 尽管也可能存在其他变体, 例如非共有序列: UUUUACU、UUUCAU 和 UUUUCCU。CPE 与 CPE 结合蛋白 (CPEB) 结合, 促进现有多腺苷酸化尾的延伸, 并总体上促进 mRNA 的翻译。本领域技术人员可以通过 Piqué 等人在 “A Combinatorial Code for CPE-Mediated Translational Control” Cell 2008, 132 (3): 434-48 中描述的方法确定特定序列是否为 CPE。

[0106] 在具体的实施方式中, 当核酸构建体是 RNA 分子时, 第一 CPE 具有共有序列 5'-UUUUAi₂U-3'。当核酸构建体是 DNA 分子时, CPE 包含转录时产生上述序列的序列。

[0107] 在具体的实施方式中, 当核酸构建体是 RNA 分子时, 第二 CPE 具有共有序列 5'-UUUUAi₂U-3'。当核酸构建体是 DNA 分子时, CPE 包含转录时产生上述序列的序列。

[0108] 在具体的实施方式中, 当核酸构建体是 RNA 分子时, 第一 CPE 和第二 CPE 具有共有序列 5'-UUUUAi₂U-3'。当核酸构建体是 DNA 分子时, CPE 包含转录时产生上述序列的序列。

[0109] 在更具体的实施方式中, 第一 CPE 具有共有序列 5'-UUUUUAA-3'。

[0110] 在更具体的实施方式中, 第二 CPE 具有共有序列 5'-UUUUAAU-3'。

[0111] 在更加具体的实施方式中, 当核酸构建体是 RNA 分子时, 第一 CPE 具有共有序列 5'-UUUUUAA-3', 而第二 CPE 具有共有序列 5'-UUUUAAU-3', 或者当核酸构建体是 DNA 分子时, 具有转录时产生上述序列的序列。

[0112] 在具体的实施方式中, 本发明的多核苷酸的 3' UTR 还包含第三 CPE。在更具体的实施方式中, 第三 CPE 具有非共有序列。在更加具体的实施方式中, 当核酸构建体是 RNA 分子时, 第三 CPE 具有非共有序列 5'-UUUUACU-3', 或者当核酸构建体是 DNA 分子时, 第三 CPE 具有转录时产生上述序列的序列。

[0113] 在具体的实施方式中, 第三 CPE 相对于第一 CPE 位于 3' 位置, 但相对于细胞质多腺苷酸化信号位于 5' 位置。在另一个具体的实施方式中, 第三 CPE 相对于第一 CPE 和细胞质多腺苷酸化信号位于 5' 位置。在另一个具体的实施方式中, 第三 CPE 位于第一 CPE 和第二 CPE 之间, 并且相对于细胞质多腺苷酸化信号位于 3' 位置。

[0114] 在具体的实施方式中, 当核酸构建体是 RNA 分子时, 第一 CPE 具有共有序列 5'-UUUUUAA-3', 第二 CPE 具有共有序列 5'-UUUUAAU-3', 并且 3' UTR 还包含第三 CPE, 该第三 CPE 具有非共有序列 5'-UUUUACU-3', 或者当核酸构建体是 DNA 分子时, 具有转录时产生上述序列的序列。

[0115] 当核酸构建体为 RNA 分子时, 所述核酸构建体还包含多聚腺嘌呤尾。

[0116] 第一方面的核酸构建体的 3' UTR 包含与第二 CPE 相距少于 100 个核苷酸的细胞质多腺苷酸化信号。如本文所使用的, 术语“细胞质多腺苷酸化信号”是指存在于 mRNA 的 3' UTR 中并促进 mRNA 细胞质多腺苷酸化的核酸序列。在具体的实施方式中, 细胞质多腺苷酸化信号

是六核苷酸AAUAAA。

[0117] 表述“与第一CPE或第二CPE相距少于100个核苷酸”是指第一CPE或第二CPE的最后一个核苷酸与细胞质多腺苷酸化信号的第一个核苷酸之间的核苷酸数目少于100个核苷酸。在具体的实施方式中,第一CPE或第二CPE与细胞质多腺苷酸化信号之间的核苷酸数目少于90个、少于80个、少于70个、少于60个、少于50个、少于40个、少于30个、少于20个、少于10个、少于5个核苷酸。在更具体的实施方式中,第一CPE或第二CPE与细胞质多腺苷酸化信号之间的距离为25个核苷酸。在具体的实施方式中,第二CPE与细胞质多腺苷酸化信号之间没有核苷酸。在另一个具体的实施方式中,第二CPE与细胞质多腺苷酸化信号部分重叠。

[0118] 在具体的实施方式中,细胞质多腺苷酸化信号位于相对于第一CPE和第二CPE的3'位置。

[0119] 在另一实施方式中,第二细胞质多腺苷酸化元件可以与细胞质多腺苷酸化信号重叠。在具体的实施方式中,第二CPE与细胞质多腺苷酸化信号重叠至少一个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个或至少6个核苷酸。

[0120] 在另一个具体的实施方式中,当3'UTR包含第三CPE时,胞质多腺苷酸化信号位于相对于第三CPE的3'位置。

[0121] 包含CPE元件和细胞质多腺苷酸化信号的这些多腺苷酸化信号的具体实施方式在公开号为W02017153606的国际申请(巴塞罗那生物医学研究基金会(IRB Barcelona)等人)中进行了广泛的评论。该文献提出在构建体中使用这些3'UTR序列来选择性地在癌细胞中表达感兴趣基因。然而,肿瘤细胞的行为不能直接转移到任何其他患病细胞(即肾脏),并且也有结果相互矛盾的文献。

[0122] 如将在实施例中描述的,特别指定的杂合启动子与包含CPE元件的多腺苷酸化信号的组合允许在所有受损足细胞中以更高程度(即刺激)表达所需的基因治疗转基因。当基因治疗表达能够恢复足细胞的健康状态时,基因治疗转基因表达仍将以基础水平表达,因此,转基因在所有足细胞中表达,并且有利地在受损的足细胞中以更高的程度表达。

[0123] 在多核苷酸构建体的另一具体实施方式中,可选地与该多核苷酸构建体上文或下文的任意实施方式组合,与足细胞特异性杂合启动子可操作地连接的感兴趣基因或其片段选自:

[0124] -与一种或多种肾脏疾病相关的基因,和/或

[0125] -长度至多为5kb、更具体地至多为4.5kb、还具体地至多为4.0kb的基因。

[0126] 在更具体的实施方式中,该基因或其片段选自以下的一种或多种:Crumbs细胞极性复合物组分2基因(CRB2)、肾病蛋白基因(NPHS1);足蛋白基因(NPHS2);含aarF域激酶4(ADCK4)基因;壳二糖基二磷酸多醇 β -甘露糖基转移酶基因(ALG1);Rho GTP酶激活蛋白24基因(ARHGAP24);ARGHDIA CD151-CD2AP;辅酶Q2、聚异戊二烯基转移酶基因(COQ2);辅酶Q6、单加氧酶基因(COQ6);二酰甘油激酶 ϵ 基因(DGKE);E2F转录因子3基因(E2F3);上皮膜蛋白2基因(EMP2);KN基序和锚蛋白重复结构域2基因(KANK2);L抗原家族成员3基因(LAGE3);LMNA基因(LMNA);LIM同源盒转录因子1- β 基因(LMX1B);转录因子MafB基因(MAFB);核孔蛋白85基因(NUP85);核孔蛋白93基因(NUP93);核RNA输出因子5基因(NXF5);O-唾液酸糖蛋白内肽酶基因(OSGEP);配对盒基因(PAX);十异戊二烯二磷酸合酶亚基2基因(PDSS2);磷酸甘露糖变位酶2基因(PMM2);足细胞标志蛋白样基因(PODXL);清道夫受体B类成员2基因

(SCARB2);鞘氨醇-1-磷酸裂解酶1基因(SGPL1);SMAD家族成员7基因(Smad7);TP53调节激酶基因(TP53RK);TP53RK结合蛋白基因(TPRKB);维生素D受体基因(VDR);WD重复结构域73基因(WDR73);Wilms肿瘤1基因(WT1);锌金属肽酶基因(ZMPSTE2);载脂蛋白L1基因(APOL1)、IV型胶原蛋白 $\alpha 3$ 链基因(COL4A3);IV型胶原蛋白 $\alpha 4$ 链基因(COL4A4)、IV型胶原蛋白 $\alpha 5$ 链基因(COL4A5)、IV型胶原蛋白 $\alpha 6$ 链基因(COL4A6)、Klotho蛋白基因(Klotho)、成纤维细胞生长因子23基因(FGF23)、骨形态发生蛋白7基因(BMP7)和血管内皮生长因子(VEGF)C基因。在具体的实施方式中,所有这些基因以小基因的形式包含在本发明的构建体中。因此,它们是包含一个或多个外显子和基因以与野生型基因相同的方式表达自身所必需的控制区的基因片段。

[0127] 在具体的实施方式中,多核苷酸构建体选自由以下组成的组:

[0128] SEQ ID NO:6,或与SEQ ID NO:6具有至少85%同一性的功能等效变体;

[0129] SEQ ID NO:18,或与SEQ ID NO:18具有至少85%同一性的功能等效变体(在本说明书中也标记为0.3NPHS2-SCP1_Kco.hCRB2_minSV40pA);

[0130] SEQ ID NO:19,或与SEQ ID NO:19具有至少85%同一性的功能等效变体。

[0131] 在另一个具体的实施方式中,多核苷酸构建体选自由以下组成的组:

[0132] SEQ ID NO:8,或与SEQ ID NO:8具有至少85%同一性的功能等效变体(0.3_Luc_minSV40[2375bp]MiniHybrid NTX,参见实施例2);

[0133] SEQ ID NO:9,或与SEQ ID NO:9具有至少85%同一性的功能等效变体(0.3_Luc_CPE[2309bp],0.3_Luc_CPE[2309bp],参见实施例3);

[0134] SEQ ID NO:10,或与SEQ ID NO:10具有至少85%同一性的功能等效变体(0.3NPHS2-SCP1_KTurboGFP_WPRE3_minSV40pA,参见实施例1);

[0135] SEQ ID NO:11,(0.2NPHS2-minCMV_KTurboGFP_WPRE3_minSV40pA,参见实施例1)。

[0136] 在第三方面,本发明涉及一种载体,其包含如第一方面所定义的是细胞特异性杂合启动子,或如第二方面所定义的多核苷酸构建体。

[0137] 如本文所使用的,术语“载体”是指能够将一种或多种感兴趣的多核苷酸递送到宿主细胞中并且优选额外表达地该一种或多种感兴趣的多核苷酸的构建体。载体的示例包括但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体、包裹在脂质体中的DNA或RNA表达载体、以及某些真核细胞,例如生产细胞。该术语还涉及允许将靶向构建体随机或定点整合到基因组DNA中的靶向构建体。这种靶向构建体优选地包含足够长度的DNA,用于同源重组或异源整合。

[0138] 在载体的一个具体的实施方式中,这是表达载体。

[0139] 术语“表达载体”是指用于在细胞、优选真核细胞、更优选哺乳动物细胞中表达本发明的核酸构建体的复制型DNA构建体。表达载体是生物技术中生产蛋白质的基本工具。表达载体具有任何载体都可具有的特征,例如复制起点、可选标志物和适合插入基因的位点(如多克隆位点)。表达载体还优选包含原核生物的复制起点,这是载体在细菌中繁殖所必需的。此外,表达载体还可以包含细菌的选择基因,例如编码赋予对抗生素的抗性的蛋白质的基因,抗生素例如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素等。表达载体还可包含一个或多个多克隆位点。

[0140] 在本发明的载体的更加具体的实施方式中,它是腺相关病毒载体(AAV),具体地选

自以下一种或多种血清型: AAV1、AAV2、AAV3B、AAV4、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVLK03、AAV-DJ和AAV-DJ/8。具体地,任何其他对肾脏组织有趋向性的AAV,更具体地对足细胞或小管细胞有趋向性的AAV。

[0141] 如本文所使用的,术语“腺相关病毒(AAV)”是指感染处于分裂和静止状态的灵长类动物(和人类)细胞的病毒载体。因为它们似乎没有任何致病作用,并且通常整合在基因组的相同位置(AAVS1位点在19号染色体),所以该病毒载体可以安全地用于在基因治疗应用中将外源DNA转导到人体细胞中。通常,AAV血清型在氨基酸和核酸水平上具有显著同源性的基因组序列,提供相同的遗传功能,产生在物理上和功能上基本等同的病毒体,并且可以被工程改造以表达需要组织特异性调控的转基因。

[0142] 本发明的第四方面是一种细胞,其包含如第一方面所定义的足细胞特异性杂合启动子、或如第二方面所定义的多核苷酸构建体或根据第三方面的载体。该细胞以功能性的方式包含一个或多个这些列出的元件,即这些元件允许表达感兴趣基因或片段。

[0143] 在具体的实施方式中,该细胞是动物细胞,更具体地是哺乳动物细胞,更加具体地是人体细胞。

[0144] 用于合成构建体、载体的方法以及用于细胞转染或转导的所有分子生物学工具的是本领域技术人员所熟知的,并且在分子生物学的实施方案中适当地确定。在实施例中指出具体条件。

[0145] 本发明还涵盖药物组合物,其包含治疗有效量的根据本发明的任何多核苷酸构建体、根据本发明的载体(vector)、或根据本发明的细胞,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂和/或运载体(carrier)。

[0146] 术语“药物”也涵盖“兽用组合物”的概念。因此,它们涉及通过任何所需或适用的途径对任何动物(包括人类)施用时具有治疗效果的一组合物。

[0147] 如本文所使用的,表述“治疗有效量”是指施用时足以预防待解决的疾病进展或者在一定程度上缓解待解决的疾病的一种或多种症状的化合物的量。当然,根据本发明施用的化合物的具体剂量将由围绕病例的具体情况而定,包括施用的化合物、施用途径、所治疗的具体病症以及类似的考虑因素。

[0148] 表述“药学上可接受的赋形剂或运载体”是指药学上可接受的材料、组合物或溶媒。从与药物组合物的其他成分相容的意义上讲,每种组分必须是药学上可接受的。它还必须适合用于与人类和动物的组织或器官接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或合理的收益/风险比相称的其他问题或并发症。合适的可接受的赋形剂的示例为溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体溶媒、分散助剂或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。除非任何常规的赋形剂介质与某种物质或其衍生物不相容,例如通过产生任何不良的生物效应或以有害的方式与药物组合物的任何其他组分相互作用,否则其用途被认为是在本发明的范围内。

[0149] 合适的药学上可接受的赋形剂的示例为溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体溶媒、分散助剂或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。除非任何常规的赋形剂介质与某种物质或其衍生物不相容,例如通过产生任何不良的生物效应或以有害的方式与药物组合物的任何其他组分相互作用,否则其用途被认为是在本发明的范围内。

[0150] 本发明药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂、和/或任何附加成分的相对量将根据所治疗的对象的身份、大小和/或状况而变化,并且还取决于施用该组合物的途径。

[0151] 用于制造药物组合物的药学上可接受的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂、分散剂和/或造粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂、和/或油。根据配方师的判断,组合物中可以存在诸如着色剂、包衣剂、甜味剂和调味剂的赋形剂。

[0152] 含有根据本发明的多核苷酸构建体、根据本发明的载体、或根据本发明的细胞的药物组合物可以以任何剂型存在,例如固体或液体,并且可以通过任何合适的途径施用,例如口服、胃肠外、直肠、局部、鼻内、眼内、腹膜内或舌下途径,为此它们将包括配制所需剂型所必需的药学上可接受的赋形剂,所需剂型例如局部制剂(软膏、乳膏、脂质凝胶、水凝胶等)、滴眼剂、气雾剂、可注射水凝胶、可注射溶液、渗透泵等。

[0153] 示例性稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉及其组合。

[0154] 示例性造粒剂和/或分散剂包括但不限于马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、羧基乙酸淀粉钠、粘土、海藻酸、瓜尔豆胶、柑橘渣、琼脂、膨润土、纤维素和木制品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚乙烯吡咯烷酮(交联聚维酮)、羧甲基淀粉钠(羧基乙酸淀粉钠)、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素(交联甲羧纤维素)钠、甲基纤维素、预糊化淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉、水不溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、铝硅酸镁盐(Veegum)、月桂基硫酸钠、季铵化合物及其组合。

[0155] 示例性粘合剂包括但不限于淀粉(例如、玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如,蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露醇);天然胶和合成胶(例如,阿拉伯树胶、海藻酸钠、爱尔兰苔藓提取物、潘瓦尔胶(panwar gum)、印度树胶(ghatti gum)、伊沙普尔壳的粘液(mucilage of isapol husks)、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、醋酸纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、铝硅酸镁盐(Veegum)、以及落叶松阿拉伯半乳聚糖;海藻酸盐;聚环氧乙烷;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇;及其组合。

[0156] 示例性防腐剂可以包括抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂和其他防腐剂。示例性抗氧化剂包括但不限于 α 生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、抗坏血酸硬脂酸酯、抗坏血酸油酸酯、丁基羟基茴香醚、丁基羟基甲苯、一硫代甘油、焦亚硫酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠和亚硫酸钠。示例性螯合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸一水合物、乙二胺四乙酸二钠、乙二胺四乙酸二钾、乙二胺四乙酸、富马酸、苹果酸、磷酸、乙二胺四乙酸钠、酒石酸和乙二胺四乙酸三钠。

[0157] 示例性缓冲剂包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液、醋酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、D-葡萄糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊酸、二碱式磷酸钙、磷酸、磷酸三钙、磷酸氢钙、醋酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、醋酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨丁三醇、氢

氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏溶液、乙醇及其组合。

[0158] 示例性润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石、麦芽、甘油山嵛酸酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、月桂基硫酸镁、月桂基硫酸钠及其组合。

[0159] 所有这些药物组合物的制备均按照本领域技术人员所知的常规做法。

[0160] 当本发明的杂合启动子、构建体或细胞包含可操作连接到启动子的基因时,所述基因是与疾病相关的基因,例如当发生突变时,本发明的所有前述方面及其相应的实施方式可用作药物,从而允许由可操作地连接到杂合启动子的所述基因表达功能性蛋白。因此,在第五方面,本发明涉及用作药物使用的如第一方面所定义的启动子、如第二方面所定义的多核苷酸构建体、如第三方面所定义的载体或如第四方面所定义的细胞,或包含它们中的一种或多种的药物组合物。

[0161] 在更具体的实施方式中,根据前述方面使用的杂合启动子、多核苷酸构建体、载体、细胞或药物组合物,该药物用于预防和/或治疗肾脏疾病。

[0162] 该实施方式还可以表述为如上所述的杂合启动子、多核苷酸构建体、载体、细胞或药物组合物在制造用于预防和/或治疗肾脏疾病的药物中的用途。本发明还涉及一种用于治疗 and/或预防肾脏疾病的方法,包括向有此需要的对象(包括人类)施用治疗有效量的如上定义的杂合启动子、多核苷酸构建体、载体、细胞或药物组合物,以及药学上可接受的赋形剂或运载体。

[0163] 在更具体的实施方式中,肾脏疾病选自以下肾小球遗传疾病中的一种或多种,包括常染色体隐性类固醇耐药性肾病综合征、常染色体显性类固醇耐药性肾病综合征、德尼-德拉什综合征(Denys-Drash syndrome)、弗雷泽综合征(Frasier's syndrome)、WAGR(维尔姆斯肿瘤、无虹膜、泌尿生殖系统异常、发育迟缓)综合征、皮尔森综合征(Pierson's syndrome)、指甲-髌骨综合征、希姆克免疫骨发育不良症、线粒体疾病伴类固醇耐药性肾病综合征、法布里病(Fabry's disease)、奥尔波特综合征(Alport's syndrome)、良性家族性血尿(薄基底膜肾病)、费希特纳综合征(Fechtner's syndrome)(奥尔波特综合征伴巨大血小板减少症)、奥尔波特综合征伴平滑肌瘤病和家族性淀粉样变性以及其他肾脏疾病,例如IgA肾病、糖尿病肾病、登特病(Dent disease)。

[0164] 根据本发明的杂合启动子、多核苷酸构建体、载体、细胞或药物组合物可用于肠胃外施用,例如静脉内施用或通过输注技术施用。在具体的实施方式中,其中一种或多种以无菌水溶液的形式施用,该溶液包含例如其他物质、盐或葡萄糖,以使该溶液与血液等渗。特别地,水溶液是缓冲溶液(优选地pH为3至9)。可相应地配制药组合物。通过本领域技术人员熟知的标准制药技术容易地在无菌条件下完成合适的肠胃外制剂的制备。根据本发明的杂合启动子、多核苷酸构建体、载体、细胞或药物组合物用于指定用途并且适合于系统性施用,例如通过静脉注射。

[0165] 在另一个具体的实施方式中,根据本发明的杂合启动子、多核苷酸构建体、载体、细胞或药物组合物适合于指定用途并且适合局部施用,例如通过靶向施用至肾脏。适当地,它们用于通过注射到肾动脉或肾静脉,或通过输尿管或囊下注射来施用。在本发明的实施方式中,杂合启动子、多核苷酸构建体、载体、细胞或药物组合物通过注射到肾动脉来施用。在本发明的替代实施方式中,它们将通过逆行施用来施用,例如,使用导尿管经由输尿管施

用。

[0166] 对于具体施用到小鼠肾静脉,发明人提出了一种允许施用小体积(约50微升)的方法。这种低剂量施用避免肾脏中细胞的损伤。

[0167] 具体的施用方法包括夹紧肾门和输尿管。然后将约50 μ l包含本发明的载体、或多核苷酸构建体、或本发明的细胞的组合物,或含有其中一种或多种的任何药物组合物注射到肾静脉。具体而言,它逆向注射到肾静脉。小鼠的具体剂量为5*10E10载体基因组(vg)/小鼠至5*10E11vg/小鼠。这些剂量可以按照等效标准转换到人类。

[0168] 通过这种施用方式,发明人可以使用具有组成型启动子(巨细胞病毒)的多核苷酸构建体作为参考示例来施用感兴趣的报告基因。如所述将通常为约100 μ l的注射体积减少到50 μ l。此外,尽管肾脏组织受到高压损伤,但由于剂量(即体积)低但有效,没有观察到细胞损伤(数据未示出)。发明人检测到,通过这种施用方式和使用组成型启动子,表达也在肝脏中起作用。这证明通过这种施用方式,注射的构建体、载体、细胞等进入了体循环。这是值得注意的,因为如将在下文的实施例所示的,具有本发明的杂合启动子的构建体、载体或细胞对足细胞具有高度选择性,在肝细胞中的表达程度低于现有技术中的其他构建体。因此,在系统施用,所提出的启动子和衍生的多核苷酸构建体、载体或细胞在所需靶标中的组织表达方面是安全的。此外,如果特定的多腺苷酸化信号伴随杂合启动子一起存在于构建体中,病变细胞中的表达被增强。

[0169] 在具体的实施方式中,杂合启动子、多核苷酸构建体、载体、细胞或药物组合物以单剂量施用,换言之,不需要后续剂量。在需要重复剂量的情况下,在具体的实施方式中使用不同的或相同的AAV血清型。

[0170] 可选地,杂合启动子、多核苷酸构建体、载体、细胞或药物组合物与其他治疗方法组合施用,例如特别地暂时性免疫抑制疗法。考虑与杂合启动子、多核苷酸构建体、载体、细胞或药物组合物组合的其他治疗方法可以包括抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS),使用诸如血管紧张素转换酶抑制剂(ACEi)、血管紧张素受体阻断剂(ARB)或醛固酮拮抗剂化合物(例如螺内酯和新药物如非奈利酮(firenenone))的药物,或者甚至在不久的将来可能使用新的有前景的疗法,如斯帕森坦(spasartan)、钠-葡萄糖转运蛋白2(SGLT2)抑制剂或其他已批准的化合物来减少蛋白尿和慢性肾病(CKD)的进展。

[0171] 在整个说明书和权利要求书中,“包括”一词及其变体并不旨在排除其他技术特征、添加剂、组分或步骤。此外,“包括”一词涵盖“由……组成”的情况。本发明的附加目的、优势和特征将在本领域技术人员审查了说明书之后变得显而易见,或者可以通过实施本发明而获悉。下列实施例通过说明的方式提供,但并不旨在限制本发明。此外,本发明涵盖了本文描述的具体和优选实施方式的所有可能的组合。

[0172] 实施例

[0173] 实施例1.通过具有本发明的足细胞特异性杂合启动子的构建体的GFP表达以及与其他足细胞特异性启动子的现有技术中的构建体的比较

[0174] 包括SEQ ID NO:1的足细胞特异性杂合启动子以表达报告绿色荧光蛋白的由SEQ ID NO:10所定义的多核苷酸构建体(在本说明书中也称为0.3NPHS2-SCP1_KGFP_WPRE3_minSV40pA或图1中的杂合-SCP1-GFP)通过插入足细胞(E11细胞系)、HEK293细胞(ATCC# CRL-11268)、HepG2细胞(任何可商购的细胞)、HeLa细胞(#CCL-2)和肾近端小管细胞_RPTEC

细胞(任何可商购的细胞)中的质粒进行表达。用SEQ ID NO:11(在本说明书中也称为0.2NPBS2-minCMV_KTurboGFP_WPRE3_minSV40pA或图1中的杂合-CMV-GFP)进行相同的实验。

[0175] 作为比较例,相同的质粒装载有由SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15所定义的多核苷酸构建体,分别对应于由Harendza等人2009和Moeller等人2003测定的构建体,两者分别包括与由SEQ ID NO:1所定义的启动子不同的启动子。SEQ ID NO:14在本说明书中也称为0.8NPBS2_KGFP_WPRE3_minSV40pA或图1中的Mid-NPBS2-GFP。SEQ ID NO:15在本说明书中也称为2.5NPBS2_KGFP_WPRE3_minSV40pA或图1中的FL-NPBS2-GFP。

[0176] SEQ ID NO:16作为对照,也称为CMV_KGFP_WPRE3_minSV40pA或图1中的CMV-GFP。

[0177] 使用Lipofectamine 3000(Thermo Fisher#L3000008)通过瞬时转染来转染细胞。细胞在37℃,5% CO₂、Ta、RH、培养基等的条件下在补充有10%FBS(Gibco#10270098)、1%丙酮酸钠[100mM](Gibco#11360039)、1%抗生素/抗真菌剂(Gibco#15240-062)和0.2%plasmocin(Invivogen#ant-mpp)的DMEM(Gibco#42430082)中培养,并在转染后48小时测定表达。

[0178] 通过显微镜检测细胞内的荧光,以绿色荧光细胞表示。图2(A)示出了该测定的一个副本的荧光显微镜共聚焦图像。在图2(B)中示出了在所测定的每种细胞类型中每个视野中的细胞的相对荧光(相对GFP细胞/视野)。

[0179] 最后,图3描述了所选细胞系中Lmx1b和Foxc2转录因子的表达。

[0180] 由该实施例的数据可以证实,使用本发明的构建体,在足细胞中发生了更高层次的表达。

[0181] 实施例2.用荧光素酶构建体确认本发明的足细胞特异性杂合启动子的表达

[0182] 在包含作为报告基因的荧光素酶基因的构建体中测试了本发明的SEQ ID NO:1的启动子。SEQ ID NO:8的构建体包括早期SV40多腺苷酸化信号作为多腺苷酸化信号。

[0183] 测定中的对照是包括组成型CMV启动子的SEQ ID NO:17的构建体(CMV_荧光素酶_WPRE3_minSV40pA)。

[0184] 数据如图4所示,其中描绘了启动子和荧光素酶基因的示意图,并且足细胞中的表达表示为每种构建体在足细胞中的相对荧光素酶单位(RLU)。如实施例1用质粒执行测定。

[0185] 实施例3.对病变细胞的选择性

[0186] 发明人出乎意料地发现,当本发明构建体中的多腺苷酸化信号为包含两个CPE和序列AAUAAA的细胞质多腺苷酸化信号(CPE多聚A)的3'-UTR序列时,在维持应激条件(即内质网(ER)应激条件)下表达较高。

[0187] 该测定是用肾细胞系(HEK293,ATCC#CRL-11268)进行的,并且数据表明与被称为SV40多聚A的多腺苷酸化信号相比,CPE多聚A允许荧光素酶基因在应激条件下表达,甚至在长时间应激后表达水平更高。相比之下,含有SV40多聚A的构建体一直维持表达,但表达水平较低。

[0188] 在这些测定中使用的包含SEQ ID NO:1的足细胞特异性启动子的构建体的两种测试版本是SEQ ID NO:8的构建体,其包含早期SV40多腺苷酸化信号(图5中的SV40多聚A)作为多腺苷酸化信号;以及SEQ ID NO:9的构建体(图5中的CPE多聚A),其包含相对于荧光素酶基因位于3'位置并且包含两个细胞质多腺苷酸化元件(CPE)的非翻译序列(3'-UTR)作为

多腺苷酸化信号。

[0189] 图5还显示了构建体中元件整合的方案。该图显示了它们各自在内质网应激条件(ER应激)下的表达。该图包括随ER应激时间蛋白质表达(相对荧光素酶表达)和mRNA水平(相对mRNA表达)的数据。本领域技术人员将了解如何诱导ER应激条件以及如何计算蛋白质和mRNA的相对表达水平。

[0190] 这些数据表明,当本发明的多核苷酸构建体中的某些元件与足细胞特异性杂合启动子结合时,具有协同作用。

[0191] 实施例4.CRB2蛋白在HEK293细胞中的表达

[0192] 将包含SEQ ID NO:1的足细胞特异性杂合启动子和CRB2基因(cohCRB2)的SEQ ID NO:18的构建体用于HEK293细胞的质粒转染。SEQ ID NO:18(图6中的杂合-SCP1-CRB2-SV40pA)包含早期SV40多腺苷酸化信号作为多腺苷酸化信号。

[0193] 作为比较例,还转染了具有组成型巨细胞病毒启动子和CRB2基因的SEQ ID NO:5的构建体。SEQ ID NO:5包含被称为合成多腺苷酸化信号(SpA)的多腺苷酸化信号。使用空载体作为对照。

[0194] 该测定的数据如图6所示,其显示了使用SEQ ID NO:1启动子(或与其具有85%同一性的启动子)的Crb2基因(3.8kb基因)的表达与使用组成型CMV启动子(被称为强启动子)的表达比例一致。

[0195] 引文列表

[0196] 专利文献

[0197] -W02020148548A1(布里斯托大学)

[0198] -W02021181118A1(布里斯托大学等)

[0199] -W02017153606(巴塞罗那生物医学研究基金会(IRB Barcelona)等)

[0200] 非专利文献

[0201] -Piqu et al in“ACombinatorial Code for CPE-Mediated Translational Control”Cell 2008,132(3):434-48.

[0202] --Juven-Gershon et al.,“rational design of super core promoter that enhances gene expression”,Nature Methods-2006,vol.no.3(11),pp.917-922.

[0203] -Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453

[0204] -EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice et al.,2000,Trends Genet.16:276-277

[0205] -Altschul et al.,“Basic local alignment search tool”,1990,J.Mol.Biol, v.215,pages403-410.

[0206] -Harendza et al.2009

[0207] -Moeller et al.2003

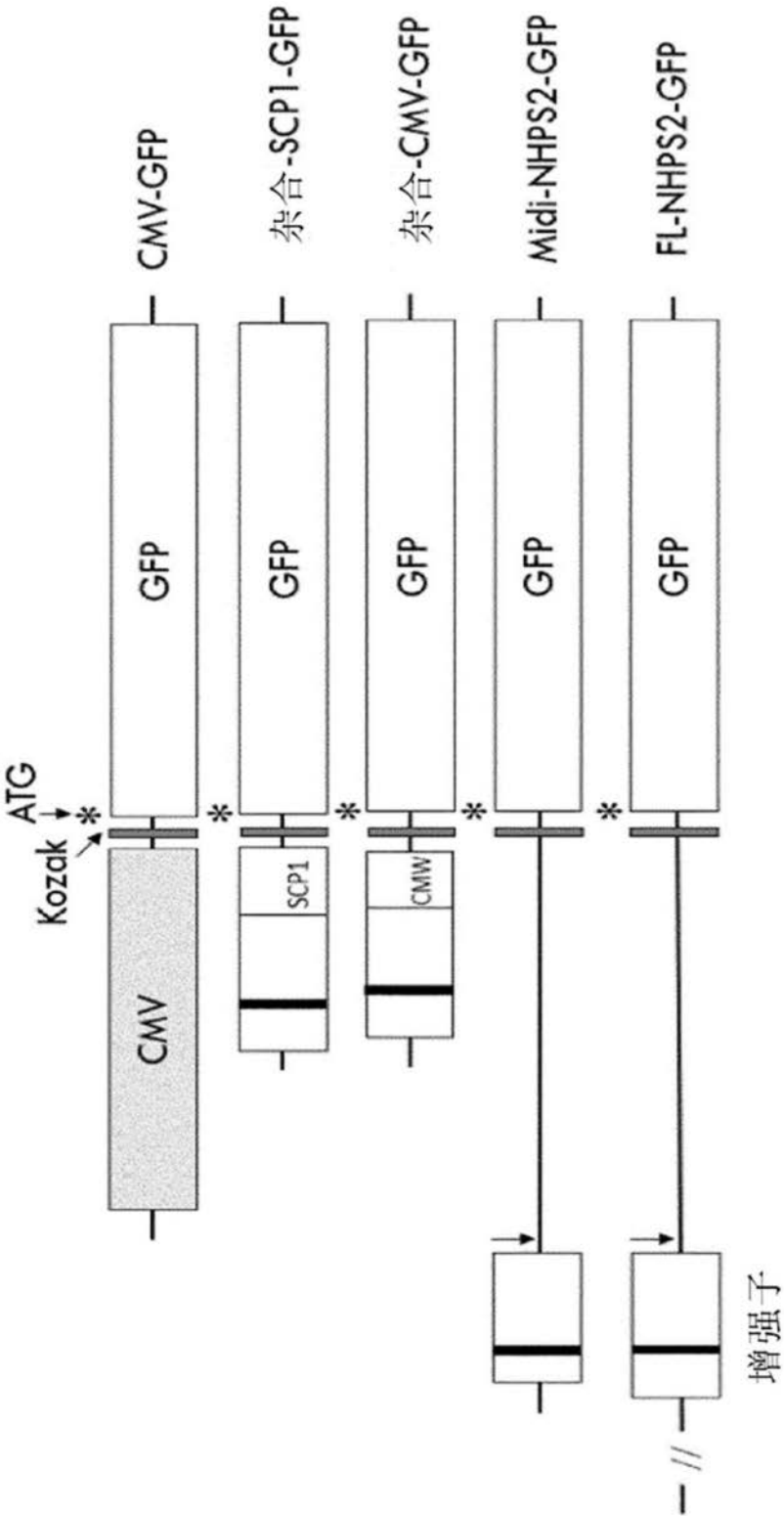


图1

(A)

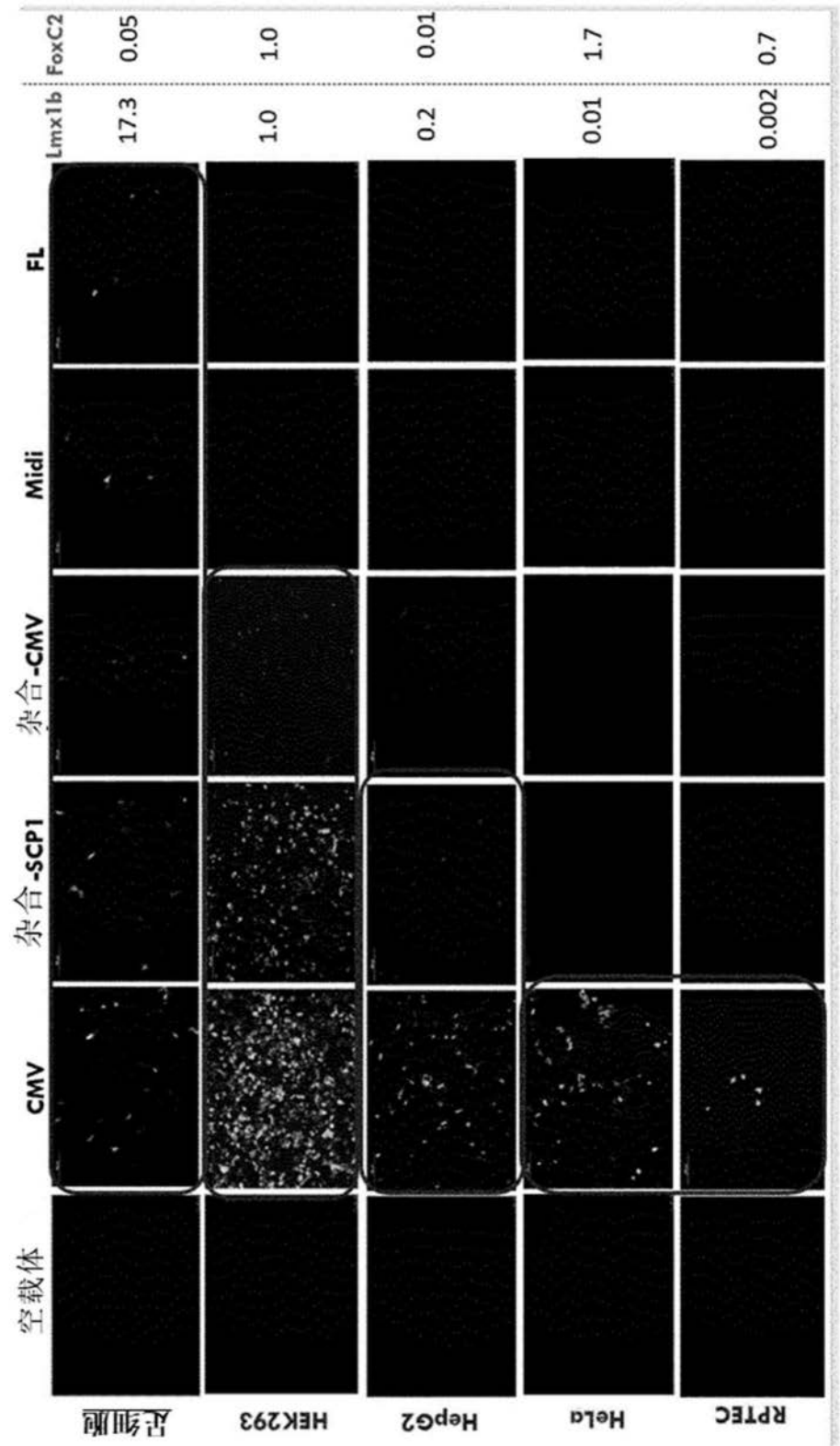


图2A

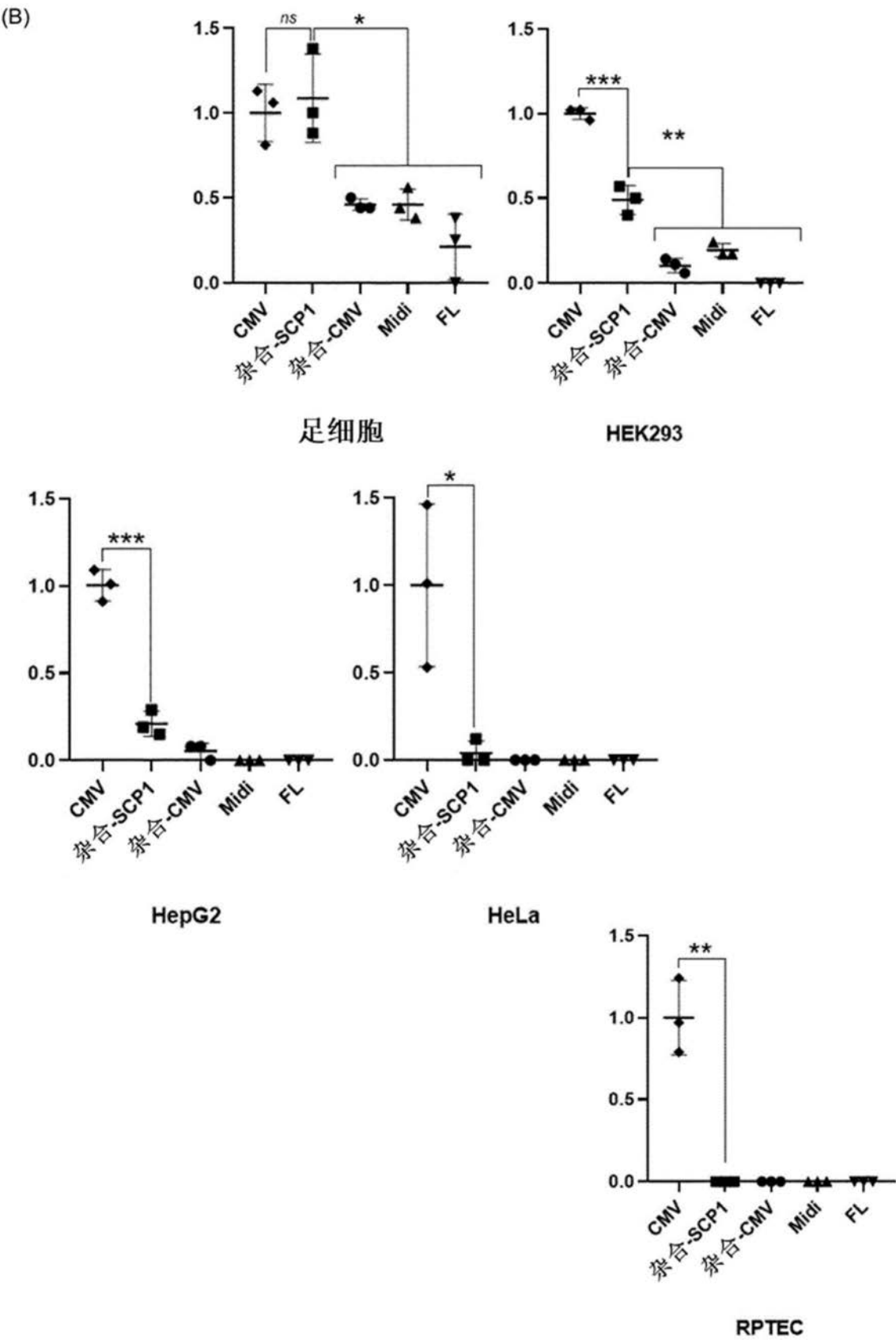


图2B

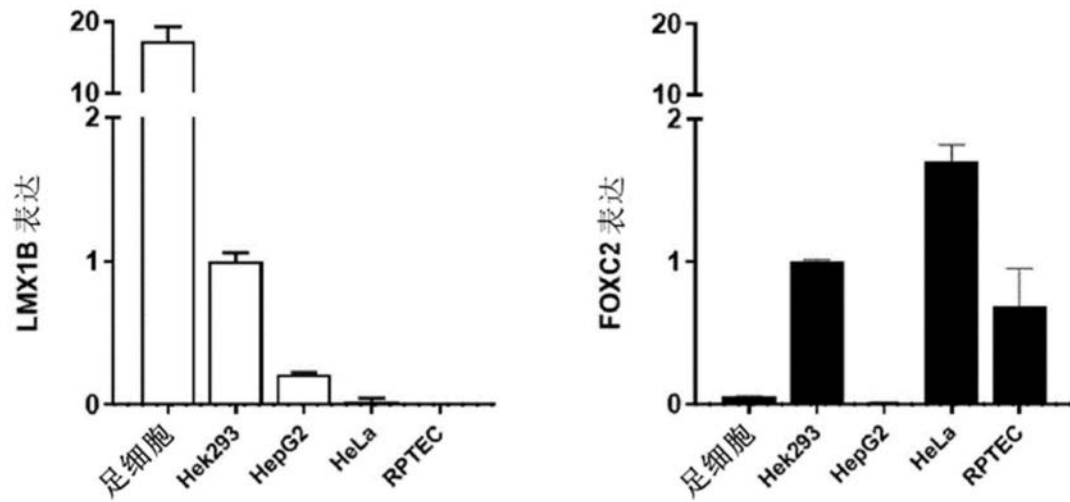


图3

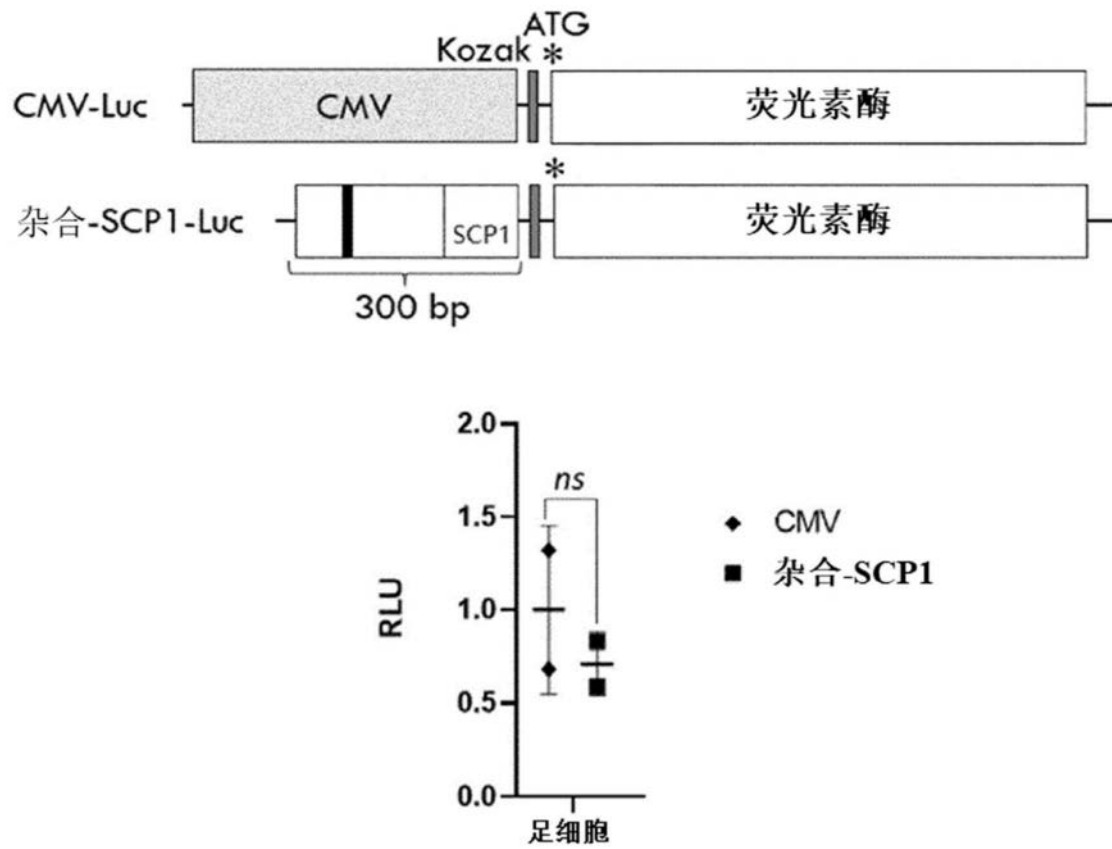


图4

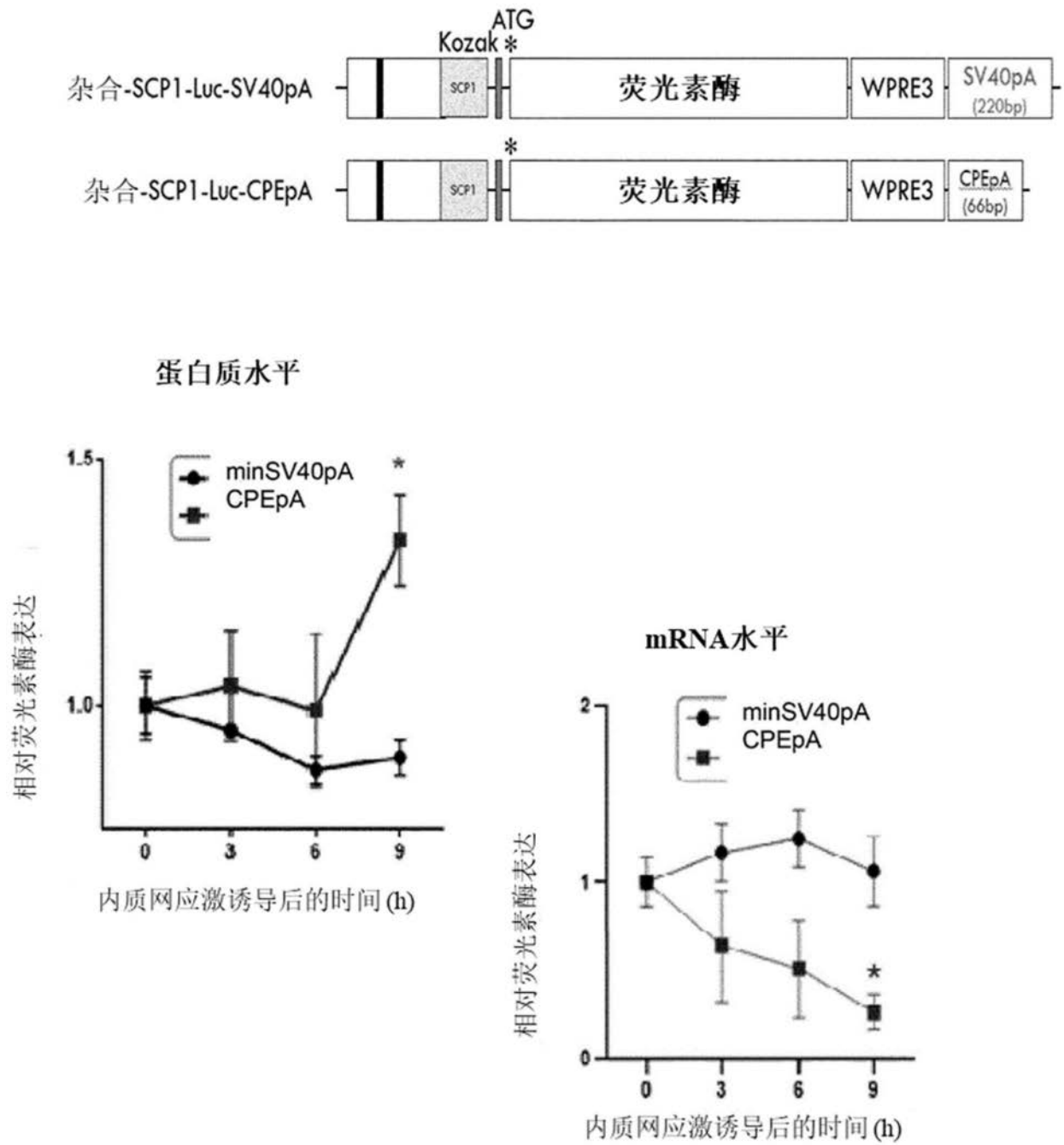


图5

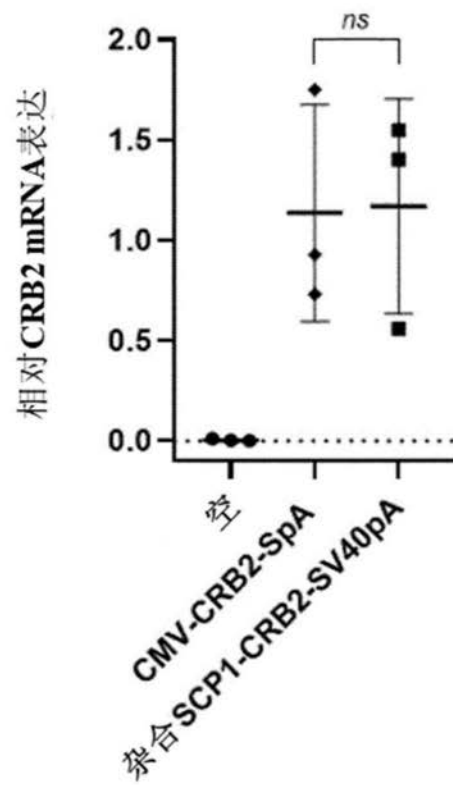


图6