



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 114375205 A

(43) 申请公布日 2022.04.19

(21) 申请号 202080044892.9

(22) 申请日 2020.06.19

(30) 优先权数据

62/864,404 2019.06.20 US

62/867,172 2019.06.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/038643 2020.06.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/257586 EN 2020.12.24

(71) 申请人 武田药品工业株式会社

地址 日本国大阪府大阪市中央区道修町四
丁目1番1号

(72) 发明人 I·比利奇 B·赖佩特

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

代理人 汤国华

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

权利要求书5页 说明书53页 附图39页

(54) 发明名称

用基于病毒的基因疗法进行治疗的方法

(57) 摘要

提供了促进持续转基因表达的用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法。所述方法包括向所述患者施用白介素-6 (IL6) 信号传导路径或 NCOR2/SMRT 组蛋白脱乙酰路径的抑制剂以及基于病毒的基因疗法载体。还提供了用于将基于病毒的基因疗法指定给患者的方法,所述方法包括通过评估所述患者是否具有 SMRT/NCOR2 基因中与降低的 SMRT/NCOR2 蛋白功能相关联的突变或白介素-6 受体 (IL-6R) 基因中与降低的 IL-6R 功能相关联的突变来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型。如果所述患者具有所述 SMRT/NCOR2 基因中与降低的 SMRT/NCOR2 蛋白功能相关联的突变或所述 IL-6R 基因中与降低的 IL-6R 功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体指定给所述患者。

1. 一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法,所述方法包括向所述患者施用:
 - 1) 白介素-6 (IL6) 路径抑制剂;和
 - 2) 基于病毒的基因疗法载体。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述IL6路径抑制剂是白介素-6 (IL6) 的抑制剂或白介素-6受体 (IL6R) 的抑制剂。
3. 如权利要求2所述的方法,其中IL6的所述抑制剂是抗IL6单克隆抗体。
4. 如权利要求3所述的方法,其中所述抗IL6单克隆抗体是司妥昔单抗、奥洛珠单抗、伊斯利莫单抗、克拉扎珠单抗、斯如库单抗、吉瑞利珠单抗、FM101、MEDI5117。
5. 如权利要求2所述的方法,其中IL6R的所述抑制剂是抗IL6R单克隆抗体。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述抗IL6R单克隆抗体是托珠单抗、沙利鲁单抗、乐维利单抗、沃巴利珠单抗或萨特利珠单抗。
7. 如权利要求1所述的方法,其中所述IL6路径抑制剂是JAK/STAT3信号传导路径、Ras/MAPK信号传导路径或PI3K/Akt信号传导路径的抑制剂。
8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中在施用所述基于病毒的基因疗法载体之前至少两天施用所述白介素-6 (IL6) 路径抑制剂。
9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中在施用所述基于病毒的基因疗法载体之后施用所述白介素-6 (IL6) 路径抑制剂至少一次。
10. 一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法,所述方法包括向所述患者施用:
 - 1) NCOR2/SMRT组蛋白脱乙酰路径的抑制剂;和
 - 2) 基于病毒的基因疗法载体。
11. 如权利要求10所述的方法,其中所述NCOR2/SMRT组蛋白脱乙酰路径的所述抑制剂是组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 抑制剂。
12. 如权利要求11所述的方法,其中所述HDAC抑制剂选自由伏立诺他、罗米地辛、贝利司他和帕比司他组成的组。
13. 如权利要求10所述的方法,其中所述NCOR2/SMRT组蛋白脱乙酰路径的所述抑制剂是NCOR2/SMRT基因沉默剂。
14. 如权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述基于病毒的基因疗法载体是工程改造的腺相关病毒 (AAV) 载体。
15. 如权利要求14所述的方法,其中所述AAV载体是血清型8AAV (AAV8) 载体。
16. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述基于病毒的基因疗法载体编码选自由以下组成的组的蛋白质:凝血因子、丝氨酸蛋白酶、细胞因子、细胞因子受体蛋白的可溶性部分、免疫球蛋白、T细胞受体的可溶性部分、主要组织相容性复合体 (MHC) 蛋白的可溶性部分、补体调控蛋白、生长因子、激素受体蛋白的可溶性部分、胆固醇受体蛋白的可溶性部分、转录因子蛋白和代谢酶。
17. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述基于病毒的基因疗法载体编码选自由以下组成的组的凝血因子:因子VII多肽、因子VIII多肽、因子IX多肽和因子X多肽。
18. 如权利要求17所述的方法,其中所述因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII构建体。
19. 如权利要求18所述的方法,其中所述B结构域缺失的因子VIII构建体由包含与选自

由SEQ ID NO:X[FVIII-CS01]、SEQ ID NO:4[FVIII-CS04]和SEQ ID NO:X[FVIII-CS23]组成的组的核酸序列的至少95%序列同一性的核酸序列编码。

20. 如权利要求17所述的方法,其中所述因子IX多肽具有R338L氨基酸取代。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述因子IX多肽由选自SEQ ID NO:X[FXI-CS02]、SEQ ID NO:X[FXI-CS03]、SEQ ID NO:X[FXI-CS04]、SEQ ID NO:X[FXI-CS05]和SEQ ID NO:X[FXI-CS06]的核酸序列编码。

22. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述基于病毒的基因疗法载体编码选自由以下组成的组的蛋白质:粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、类视黄醇异构水解酶(RPE65)、运动神经元存活蛋白1(SMN1)。

23. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述基于病毒的基因疗法载体选自由talimogene laherparepvec、voretigene neparvovec-rzyl和onasemnogene abeparvovec-xioi组成的组。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的方法,所述方法还包括将皮质类固醇的疗程施用至所述患者。

25. 如权利要求24所述的方法,其中在将所述基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者之后施用所述皮质类固醇的所述疗程。

26. 如权利要求25所述的方法,其中所述皮质类固醇的所述疗程是逐渐缩减剂量的所述皮质类固醇。

27. 如权利要求24至26中任一项所述的方法,其中所述皮质类固醇是泼尼松龙或泼尼松。

28. 如权利要求27所述的方法,其中施用泼尼松龙或泼尼松的疗程包括:

紧接在将所述基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者之后,在第一周期间将每天40至80mg的泼尼松龙或泼尼松施用至所述患者;

紧接在将所述基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者之后,在第二周期间将每天20至60mg的泼尼松龙或泼尼松施用至所述患者;以及

紧接在将所述基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者之后,在第三周期间将每天10至50mg的泼尼松龙或泼尼松施用至所述患者。

29. 如权利要求24至28中任一项所述的方法,其中以低剂量施用所述皮质类固醇类固醇。

30. 如权利要求29所述的方法,其中以每天至多20mg的剂量将所述皮质类固醇施用至所述患者。

31. 如权利要求29所述的方法,其中以每天至多10mg的剂量将所述皮质类固醇施用至所述患者。

32. 如权利要求29所述的方法,其中以每天至多5mg的剂量将所述皮质类固醇施用至所述患者。

33. 一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法,所述方法包括向所述患者施用:

1) 白介素-6 (IL6) 路径抑制剂;

2) 基于病毒的基因疗法载体;和

3) 每天至多20mg的剂量的皮质类固醇。

34. 如权利要求33所述的方法,其中以每天至多10mg的剂量施用所述皮质类固醇。

35. 如权利要求33所述的方法,其中以每天至多5mg的剂量施用所述皮质类固醇。

36. 一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法,所述方法包括:

通过以下中的一者或两者来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,以及

评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变;并且

如果所述患者具有所述SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或所述IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者。

37. 一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法,所述方法包括:

通过以下方式来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变;并且

如果所述患者在所述IL-6R基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者。

38. 一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法,所述方法包括:

通过以下方式来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变;并且

如果所述患者在所述SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者。

39. 一种用于治疗患者中与酶活性的水平不足相关的疾病的方法,所述方法包括:

通过以下中的一者或两者来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,以及

评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变;并且

如果所述患者具有所述SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或所述IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者,以及

如果所述患者不具有所述SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或所述IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将具有所述酶活性的蛋白质治疗剂施用至所述患者。

40. 一种用于治疗患者中与酶活性的水平不足相关的疾病的方法,所述方法包括:

通过以下方式来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变;并且

如果所述患者在所述SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者,以及

如果所述患者在所述SMRT/NCOR2基因中不具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将具有所述酶活性的蛋白质治疗剂施用至所述患者。

41. 一种用于将基于病毒的基因疗法指定给患者的方法,所述方法包括:

通过以下方式来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变;并且

如果所述患者在所述IL-6R基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体指定给所述患者。

42. 一种用于治疗患者中与酶活性的水平不足相关的疾病的方法,所述方法包括:

通过以下方式来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变;并且

如果所述患者在所述IL-6R基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者;以及

如果所述患者在所述IL-6R基因中不具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将具有所述酶活性的蛋白质治疗剂施用至所述患者。

43. 一种用于将基于病毒的基因疗法指定给患者的方法,所述方法包括:

通过以下中的一者或两者来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,以及

评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变;并且

如果所述患者具有所述SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或所述IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体指定给所述患者。

44. 一种用于将基于病毒的基因疗法指定给患者的方法,所述方法包括:

通过以下方式来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的

突变;并且

如果所述患者在所述SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体指定给所述患者。

45.一种用于将针对与酶活性的水平不足相关的疾病的治疗指定给患者的方法,所述方法包括:

通过以下中的一者或两者来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,以及

评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变;并且

如果所述患者具有所述SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或所述IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体指定给所述患者;以及

如果所述患者不具有所述SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或所述IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将具有所述酶活性的多肽指定给所述患者。

46.一种用于将针对与酶活性的水平不足相关的疾病的治疗指定给患者的方法,所述方法包括:

通过以下方式来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变;并且

如果所述患者在所述IL-6R基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体指定给所述患者;以及

如果所述患者在所述IL-6R基因中不具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将具有所述酶活性的多肽指定给所述患者。

47.一种用于将针对与酶活性的水平不足相关的疾病的治疗指定给患者的方法,所述方法包括:

通过以下方式来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:

评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变;并且

如果所述患者在所述SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体指定给所述患者;以及

如果所述患者在所述SMRT/NCOR2基因中不具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将具有所述酶活性的多肽指定给所述患者。

用基于病毒的基因疗法进行治疗的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年6月20日提交的美国临时专利申请第62/864,404号和2019年6月26日提交的美国临时专利申请第62/867,172号的优先权,所述美国临时专利申请的内容据此出于所有目的通过引用以它们的整体并入本文。

[0003] 资助声明

[0004] 本发明部分地根据由国立卫生研究院授予的拨款号NIH NHLBI RC3 HL103396-01在政府资助下完成。政府可享有本发明中的某些权利。

背景技术

[0005] 若干临床研究已证明源于非致病性腺相关病毒(AAV)的DNA病毒载体用于将转基因成功递送至需要基因疗法的患者中的用途,所述患者诸如是罹患血友病B的那些患者。AAV载体构建体通过用由启动子、目标转基因和多腺苷酸尾组成的治疗盒替换病毒基因来产生。尽管已在患者中实现功能性转基因表达,但已假定转基因源性蛋白质或酶的有效血浆水平的维持受限于针对AAV载体的免疫应答(IR),从而导致成功转导的肝细胞的消除。参见Nathwani AC等人,The New England Journal of Medicine,371:1994-2004(2014)以及Nathwani AC等人,The New England Journal of Medicine,365:2357-65(2011)。

[0006] 在一些情况下,用皮质类固醇成功治疗了在AAV载体输注后6-10周在一些患者中观察到的无症状性丙氨酸转氨酶(ALT)水平增加,此使得能够维持转基因源性蛋白质或酶在血液中的活性水平。参见Nathwani AC等人,Hum.Gene Ther.,28:1004-12(2017),Nathwani AC等人,(2014)(上文),以及Nathwani AC等人,(2011)(上文)。发现转氨酶升高和转基因表达的不稳定性与识别AAV衣壳的循环细胞毒性T细胞(CTL)的载体剂量依赖性产生相关联,从而得出结论:适应性CTL IR可能导致经转导肝细胞的清除和转基因表达的丧失。Nathwani AC等人,(2017)(上文),Nathwani AC等人,(2014)(上文),以及Nathwani AC等人,(2011)(上文)。

[0007] 可经受基因疗法治病的疾患中的一者是血友病B。血友病B是一种由凝血因子IX(FIX)的活性缺乏引起的出血病症,所述活性缺乏由X染色体上的F9基因中的突变所致。在患者中所见的出血倾向具有与循环FIX水平相关的可变严重性:<1%正常活性(重度疾病)与自发性出血相关联,通常是关节和肌肉内出血,而>5%至40%活性(轻度)与罕见自发性出血和更好的关节功能保留相关联。凝血因子水平相对适度增加至15-20%被认为足以针对这些患者中的关节出血和它的相关致衰弱性影响进行保护。

[0008] 用于血友病B的当前标准疗法涉及静脉内输注替代FIX凝血因子浓缩物作为预防或用以治疗出血发作。这具有若干缺点,包括频繁预防性输注(多达每周3次)的成本和不便,需要围绕凝血因子水平的峰值和谷值来计划身体活动,以及有突破性出血的可能。尽管以替代疗法进行管理,但血友病B仍旧对患病者的日常生活具有可观的负性影响。

[0009] 基因疗法正作为一种用以通过将功能性人FIX基因递送至肝细胞中来维持这些患者中的有效循环FIX水平的潜在治愈性方法被研究。同样,导致持续基因表达的用基于病毒

的基因疗法治疗患者的方法正被研究。

发明内容

[0010] 因此,本领域中需要改善常规基因疗法的方法。具体来说,需要改善非整合型病毒载体诸如腺病毒中短暂转基因表达的时长的方法。本公开解决本领域中的这些和其他问题,例如通过提供有助于在基于AAV病毒的基因疗法后的持续转基因表达的方法,例如通过相伴阻抑IL6信号传导路径和/或NCoR2/SMRT脱乙酰路径。

[0011] 在一些实施方案中,本公开提供了一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法,所述方法包括向所述患者施用白介素-6 (IL6) 路径抑制剂和基于病毒的基因疗法载体。在一些实施方案中,IL6路径抑制剂是IL6的抑制剂或白介素-6受体 (IL6R) 的抑制剂。在一些实施方案中,IL6路径抑制剂是抗IL6或抗IL6R单克隆抗体。

[0012] 本公开还提供了用于鉴定可能更有利地对基因疗法例如基于腺病毒的基因疗法起响应的患者的方法。在一些实施方案中,这些方法包括确定患者是否具有使所述患者对持续的基于病毒的基因疗法敏感的基因型。在一些实施方案中,方法评估受试者是否具有阻抑IL6信号传导路径和/或NCoR2/SMRT脱乙酰路径的突变。

[0013] 在一些实施方案中,此种方法包括确定患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型,以及响应于所述患者具有所述基因型的确定,将基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者。

[0014] 在一些实施方案中,确定患者是否具有所述基因型包括评估以下中的一者或两者:患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,以及患者是否在白介素-6受体 (IL-6R) 基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变。

[0015] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包含患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中导致IL-6R单倍体缺陷的突变。在一些实施方案中,患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中的突变是IL-6R基因中的错义突变。

[0016] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包含患者的SMRT/NCOR2基因的两个拷贝中使编码的SMRT/NCOR2蛋白的蛋白功能相对于野生型SMRT/NCOR2蛋白功能降低至少75%的突变。

[0017] 在一些实施方案中,患者是需要治疗与酶活性的水平不足相关的疾病的受试者。

[0018] 在另一方面,本公开提供了一种用于治疗与酶活性的水平不足相关的疾病的方法。方法包括确定患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型,以及响应于所述患者具有所述基因型的确定,将基于病毒的基因疗法载体施用至所述患者。

[0019] 在一些实施方案中,在确定患者不具有所述基因型后,方法包括将具有酶活性的蛋白质治疗剂施用至患者。

[0020] 在一些实施方案中,确定患者是否具有所述基因型包括评估以下中的一者或两者:患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,以及患者是否在白介素-6受体 (IL-6R) 基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变。

[0021] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包含患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中导致IL-6R单倍体缺陷的突变。在一些实施

方案中,患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中的突变是IL-6R基因中的错义突变。

[0022] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包含患者的SMRT/NCOR2基因的两个拷贝中使编码的SMRT/NCOR2蛋白的蛋白功能相对于野生型SMRT/NCOR2蛋白功能降低至少75%的突变。

[0023] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。

[0024] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包含具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包含至少10个CG二核苷酸。

[0025] 在一些实施方案中,其中患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一些实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一些实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。

[0026] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包含编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,所述因子VIII多核苷酸包含SEQ ID NO:X的核酸序列。[CS04]。

[0027] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包含编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,所述因子VIII多核苷酸包含SEQ ID NO:X的核酸序列[CS04+NG5+X5]。

[0028] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包含编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,所述因子IX多核苷酸包含SEQ ID NO:X的核酸序列[CS06]。

[0029] 本发明的其他目标、优势和实施方案将根据以下具体实施方式而显而易见。

附图说明

[0030] 图1显示实施例1中所述的研究的基线患者特征。

[0031] 图2显示如实施例1中所述,通过全外显子组测序对患者5中潜在影响FIX转基因表达的变体的鉴定。

[0032] 图3说明一实例因子IX基因疗法构建体。FIX基因疗法构建体含有自身互补性腺相关病毒(scAAV)基因组,所基因组由截短的320个碱基对(bp)的鼠转甲状腺素蛋白(transthyretin,TTR)启动子/增强子,继之以来自小鼠细小病毒(MVM)的77个bp的内含子片段、密码子优化的FIX Padua (R338L) cDNA转基因和牛生长激素(BGH)多腺苷酸化序列组成。这个表达盒由一个野生型145nt AAV2反向末端重复序列(ITR)和在AAV DNA解离位点和D序列中具有工程改造缺失的另一ITR(经修饰反向末端重复序列[Δ ITR])侧接,以便引导自身互补性AAV DNA序列而非非常规单链AAV DNA序列的优先复制和包装。

[0033] 图4A、图4B、图4C、图4D、图4E、图4F、图4G、图4H、图4I、图4J、图4K、图4L、图4M和图4N共同说明如实施例1中所述,每个剂量群组中的患者的FIX活性、肝脏酶和AAV8 IFN- γ ELISPOT数据。根据患者和剂量群组的FIX基因疗法构建体输注后因子IX活性相对于出血发作、FIX替代疗法的施用和泼尼松龙(prednisolone)给药(患者6、7和8)以及肝细胞毒性的肝脏酶ALT和AST标志物来绘图。患者6和7接受泼尼松龙作为响应于FIX表达的突然丧失的挽救治疗。患者8接受用泼尼松龙进行的预防性治疗。泼尼松治疗的持续期显示于蓝色条形图中,其中斜坡指示剂量逐渐缩减。每个患者的来自IFN- γ ELISPOT测定的结果显示于下部图版中;患者的PBMC对AAV8衣壳肽的反应被绘制为相对于对照(红线),每100万个PBMC的斑点形成单位的数目。患者8用中等剂量的FIX基因疗法构建体和预防性皮质类固醇的伴随治疗方案治疗。在不存在升高的肝转氨酶或T细胞活化的情况下持续研究的前6个月实现2-3%的

FIX活性水平,这与群组2中的其他患者一致。所述患者在第7个月期间显现了需要治疗的扁桃体鳞状细胞癌,并且返回至定期预防性FIX输注。AAV8,腺相关病毒血清型8;ALT,丙氨酸转氨酶;AST,天冬氨酸转氨酶;FIX,因子IX;IFN γ ELISPOT,干扰素- γ 酶联免疫吸附斑点;PBMC,外周血液单个核细胞。

[0034] 图5说明在实施例1中所述的研究中,根据患者和剂量群组的峰值FIX:C。在接受3个升高剂量群组中的1者的单次输注FIX基因疗法构建体之后测量的每个患者中的峰值FIX:C活性。

[0035] 图6说明如实施例1中所述,相对于CpG消减的载体构建体,用FIX基因疗法构建体处理的小鼠中的抗AAV8 NAb应答。作为通过TLR9进行的免疫活化的替代标志的抗AAV8 NAb应答指示由CpG消减的载体达成的免疫原性较低。C56B1/6小鼠(8-10周龄,n=6-8/组)用相同剂量(4×10^{12} vg/kg)的scAAV8载体静脉内处理,所述scAAV8载体各自携带含有不同数目的CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODN)的FIX Padua编码序列:FIX基因疗法构建体(FIX Padua编码序列中有99个CpG ODN)。4周后收集血液,并且抗AAV8中和抗体(NAb)的所得滴度的量值被作为对CpG ODN的适应性免疫应答的标志来测定。

[0036] 图7说明在实施例1中所述的研究中,对于在FIX基因疗法构建体输注之前和之后12个月时期,根据患者的FIX消耗。

[0037] 图8说明在实施例1中所述的研究中,对于紧靠在FIX基因疗法构建体输注之前以及在所述输注之后的时期,来自患者6的实验室测试结果。

[0038] 图9说明在实施例1中所述的研究中,患者5中的全外显子组测序变体分析。在患者5中独特地鉴定的潜在影响性杂合性和复合杂合性变体。

[0039] 图10A和图10B共同显示根据一些实施方案的编码因子VIII变体的CS04密码子改变的核苷酸序列(SEQ ID NO:XX) (“CS04-FL-NA”代表全长编码序列)。

[0040] 图11A和图11B显示根据一些实施方案的编码具有m2突变体(I105V/A127S/G151K/M166T/L171P(SPI))氨基酸取代的因子VIII变体的CS04m2密码子改变的核苷酸序列(SEQ ID NO:XX) (“CS01-FL-NA-m2”)。

[0041] 图12A和图12B显示根据一些实施方案的编码具有m3氨基酸取代的因子VIII变体的CS04m3密码子改变的核苷酸序列(SEQ ID NO:XX) (“CS04-FL-NA-m3”)。

[0042] 图13A和图13B显示根据一些实施方案的编码具有m2突变组(I105V/A127S/G151K/M166T/L171P(SPI))和m3氨基酸取代的因子VIII变体的CS04m23密码子改变的核苷酸序列(SEQ ID NO:XX) (“CS04-FL-NA-m23”)。

[0043] 图14A和图14B显示根据一些实施方案的编码具有m1(F328S)氨基酸取代的因子VIII变体的CS04m1密码子改变的核苷酸序列(SEQ ID NO:XX) (“CS04-FL-NA-m1”)。

[0044] 图15A和图15B显示根据一些实施方案的编码具有m1和m3氨基酸取代的因子VIII变体的CS04m13密码子改变的核苷酸序列(SEQ ID NO:XX) (“CS04-FL-NA-m13”)。

[0045] 图16显示根据一些实现方式的编码具有R384L氨基酸取代的因子IX变体的CS06密码子改变的核苷酸序列(SEQ ID NO:XX) (CS06-FL-NA)。

[0046] 图17显示AAV8-huFIX-null载体显示较高转导功效和较高FIX表达。左侧图版:每个细胞的基因疗法构建体的载体拷贝数。右侧图版:用AAV8-FIXR338L [6×10^{12} vg/kg]或AAV8-FIXR338L CpG-less [6×10^{12} vg/kg]处理的生物反应器培养物中FIXR338L拷贝数/ μ g

RNA。每个细胞的载体拷贝基于1 μ g DNA等效于150,000个细胞来计算。

[0047] 图18显示两个代表性供体的所选细胞因子的归一化时间过程：对照生物反应器（黑色圆圈）和用AAV8-huFIX-cpg（红色方块）或AAV8-huFIX-null（蓝色三角）处理的生物反应器。细胞因子表达总体上是微弱的，然而，在第2-3天，AAV8-huFIX-cpg诱导了升高的IP-10和Mip-1 α 水平。

[0048] 图19显示在细胞接种之后的AST和ALT时间过程：对照不进行感染（圆圈），以及用AAV8-huFIX-cpg（方块）或AAV8-huFIX-null（三角）感染。施加病毒粒子24小时（第0天-第1天）。

[0049] 图20显示相比于AAV8-huFIX-null载体，AAV8-huFIX-cpg载体诱导更高抗AAV8 BAB（左侧图版）和NAB（右侧图版）应答，从而表明由CpG对TLR9路径的更强烈活化。

具体实施方式

[0050] 使用病毒载体进行的体内转基因递送会诱导靶标器官中例如肝中的应激应答。IL-6信号传导是针对病毒病原体的基本应激应答路径，其可降低基于病毒的基因疗法流程诸如腺病毒相关病毒（AAV）介导的基因疗法的功效。本公开基于来自在8名用AAV8-FIX基因疗法治疗的血友病B患者中进行的临床研究的遗传研究结果。在八名患者的群组内，仅一名患者显示超过5年的持续转基因表达。在所有其他患者中，表达在8-12周内下降至治疗阈值以下。在具有持续转基因表达的这名患者中，鉴定了IL-6受体 α 基因中的杂合性错义变体。因此假定这个突变减弱了患者的肝中IL-6介导的应激应答。因此，在其他方面，本公开提供了用于基因治疗的改善方法，所述改善方法包括相伴阻抑接受基于病毒载体的基因疗法的受试者中IL6介导的应激应答。

[0051] 有利的是，本文所述的改善方法提供了用于改善基于病毒载体的基因疗法的更安全和更有效手段。用以减弱接受基于病毒载体的基因疗法的患者中的免疫应答的先前尝试由按需或预防性使用非选择性皮质类固醇诸如泼尼松（prednisone）组成。皮质类固醇通常在临床中用于处理潜在炎症性应答，包括肝中的毒性。然而，高剂量皮质类固醇的使用与严重副作用以及在体内AAV介导的基因递送后在挽救转基因表达方面仅有零星功效相关联。相比之下，抗IL-6/抗IL-6R疗法已在临床中被证明是安全的，特别是当历经有限时期使用时。因此，抗IL6/抗IL6R疗法的使用提供了对炎症的更特异性的、集中的和更安全的阻抑，从而有助于在基于病毒载体的基因疗法例如AAV介导的基因疗法后的持续治疗性转基因表达。

[0052] 然而，在一些情况下，由于皮质类固醇的有益消炎性质，所以在基因疗法期间的皮质类固醇共疗法仍然是合乎需要的。发现作为一种抗IL6单克隆抗体的托珠单抗（tocilizumab）的施用有助于皮质类固醇节约，例如能够降低皮质类固醇剂量而不降低皮质类固醇治疗的功效。Fortunet C.等人，*Rheumatology*, 54 (4) :672-77 (2015)，其内容出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。有利的是，如本文所述，在基因疗法期间共同施用抗IL6/IL6R路径抑制剂和低剂量皮质类固醇提供了皮质类固醇疗法的有益消炎作用，伴有降低的不利影响，诸如肝损害、液体滞留、骨损害、血糖升高以及情绪、记忆和躁狂问题。

[0053] 定义

[0054] 除非上下文另外明确规定，否则如本文中以及随附权利要求中所用，单数形式“一

个(种)(a/an)”和“这个(种)(the)”包括复数个(种)指示物。因此,举例来说,提及“一个(种)抗体”包括复数个(种)此类抗体,并且提及“一个(种)宿主细胞”包括提及一个(种)或多个(种)宿主细胞及其为本领域技术人员所知的等效物,以此类推。还应注意权利要求可被起草来排除任何任选要素。因此,这个陈述意图充当与叙述权利要求要素关联使用诸如“只有”、“仅有”等的排他性术语或使用“否定性”限制的前提基础。

[0055] 在进一步描述本发明之前,应了解本发明不限于所述特定实施方案,因此,当然可变化。还应了解本文所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且不意图具有限制性,因为本发明的范围将仅受限于随附权利要求。

[0056] 如本文所用,“rFIX”是指重组FIX。

[0057] 术语“重组”在例如关于细胞或核酸、蛋白质或载体使用时指示所述细胞、核酸、蛋白质或载体已通过引入异源性核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质来修饰,或所述细胞源于如此修饰的细胞。因此,举例来说,重组细胞表达不见于细胞的天然(非重组)形式内的基因,或表达否则异常表达,欠表达或完全不表达的天然基因。

[0058] 如本文所用,“重组FIX”包括通过重组DNA技术获得的FIX。本发明中的FIX可包括所有潜在形式,包括单体和多聚形式。还应了解本发明涵盖待组合使用的不同形式的FIX。举例来说,本发明的FIX可包括不同多聚体、不同衍生物、以及生物活性衍生物与非生物活性衍生物两者。

[0059] 在本发明的情形下,重组FIX包括来自例如哺乳动物诸如灵长类动物、人、猴、兔、猪、啮齿动物、小鼠、大鼠、仓鼠、沙鼠、犬科动物、猫科动物的任何FIX家族成员及其生物活性衍生物。还包括具有活性的突变和变异FIX蛋白,也包括VWF蛋白的功能性片段和融合蛋白。此外,本发明的FIX还可包含有助于纯化、检测或两者的标签。本文所述的FIX可进一步经治疗性部分或适于体外或体内成像的部分修饰。

[0060] 术语“经分离”、“经纯化”或“生物纯”是指材料大致上或基本上不含如在它的天然状态下所见的通常伴随它的组分。通常使用分析化学技术诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法测定纯度和同质性。作为存在于制剂中的主要种类的VWF是大致上纯化的。在一些实施方案中,术语“经纯化”表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中产生基本上一个条带。在其他实施方案中,这意指核酸或蛋白质是至少50%纯的,更优选是至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%纯的。在其他实施方案中,“纯化(Purify/purification)”意指从待纯化的组合物移除至少一种污染物。在这个意义上,纯化不要求经纯化化合物是同质的,例如100%纯的。

[0061] 如本文所用,“施用(administering)”(和所有语法等效形式)包括向受试者静脉内施用、肌肉内施用、皮下施用、口服施用、以栓剂形式施用、表面接触、腹膜内施用、病变内施用或鼻内施用、或植入缓慢释放装置例如小型渗透泵。施用通过包括胃肠外和经粘膜(例如口服、经鼻、经阴道、经直肠或经皮)的任何途径来进行。胃肠外施用包括例如静脉内、肌肉内、微动脉内、真皮内、皮下、腹膜内、室内和颅内。其他递送模式包括但不限于使用脂质体制剂、静脉内输注、经皮贴片等。

[0062] 术语“治疗有效量或剂量”或“治疗足够量或剂量”或“有效或足够量或剂量”是指产生它被施用来达成的治疗作用的剂量。举例来说,可用于治疗血友病的药物的治疗有效量可为能够预防或缓解一种或多种与血友病相关的症状的量。精确剂量将取决于治疗目

的,并且将可由本领域技术人员使用已知技术确定(参见例如Lieberman,Pharmaceutical Dosage Forms(第1-3卷,1992);Lloyd,The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(1999);Pickar,Dosage Calculations(1999);以及Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2003,Gennaro编,Lippincott,Williams&Wilkins)。

[0063] 如本文所用,术语“患者”和“受试者”可互换使用,并且是指患有疾病或有可能感染疾病的哺乳动物(优选是人)。所述术语不表示特定年龄。因此,成年个体与新生个体两者均受到关注。

[0064] 如本文所用,术语“约”表示从指定值加上或减去10%的近似范围。举例来说,措辞“约20%”涵盖18-22%的范围。

[0065] 如本文所用,术语“半衰期”是指物质的量经受衰退(或从样品或从患者清除)直至降低一半所花费的时期。

[0066] 就“生物样品”来说,其意指从受试者分离的组织或液体的样品,包括但不限于例如血液、血浆、血清、粪便物、尿、骨髓、胆汁、脊髓液、淋巴液、皮肤样品,皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外分泌物,眼泪、唾液、乳汁、血细胞、器官、活检体以及体外细胞培养成分的样品,包括但不限于由细胞和组织在培养基中的生长产生的条件培养基,例如重组细胞和细胞组分。

[0067] 就“治疗有效剂量或量”来说,其意指当如本文所述施用,导致所需治疗响应诸如像减少出血或缩短凝血时间的量。

[0068] 传统抗体结构单元通常包含四聚体。每个四聚体通常由相同的两对多肽链构成,每对具有一个“轻”链(通常具有约25kDa的分子量)和一个“重”链(通常具有约50-70kDa的分子量)。人轻链被分类为 κ 和 λ 轻链。治疗性抗体通常基于IgG类别,所述IgG类别具有若干子类,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。一般来说,相比于IgG3,更频繁使用IgG1、IgG2和IgG4。

[0069] 每个链的氨基末端部分包括约100至110或更多个氨基酸的可变区,主要负责抗原识别,通常在本领域中以及在本文中被称作“Fv结构域”或“Fv区”。在可变区中,重链和轻链的V结构域中的每一者的三个环聚集以形成抗原结合位点。环中的每一者被称为互补决定区(在下文中被称为“CDR”),在所述互补决定区中,氨基酸序列的变化是最显著的。“可变”是指以下事实:在抗体之间,可变区的某些区段在序列方面广泛不同。可变区内的可变性不是均匀分布的。作为替代,V区由15-30个氨基酸的称为框架区(FR)的相对不变链段组成,所述链段由各自是9-15个氨基酸长或更长的称为“高变区”的具有极大可变性的较短区域分隔。

[0070] 每个VH和VL由三个高变区(“互补决定区”,“CDR”)和四个FR组成,从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0071] 高变区通常涵盖在轻链可变区中约氨基酸残基24-34(LCDR1;“L”表示轻链)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3),以及在重链可变区中大致约31-35B(HCDR1;“H”表示重链)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)的氨基酸残基;Kabat等人,SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991),和/或形成高变环的那些残基(例如轻链可变区中的残基26-

32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2) 和91-96 (LCDR3), 以及重链可变区中的残基26-32 (HCDR1)、53-55 (HCDR2) 和96-101 (HCDR3); Chothia和Lesk (1987) J.Mol.Biol.196:901-917)。以下描述本发明的特定CDR。

[0072] 如将由本领域中的人士所了解, 在不同编号系统之中, CDR的精确编号和放置可为不同的。然而, 应了解对可变重序列和/或可变轻序列的公开包括对相关(固有)CDR的公开。因此, 对每个可变重区域的公开是对vhCDR (例如vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3) 的公开, 并且对每个可变轻区域的公开是对vlCDR (例如vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3) 的公开。

[0073] CDR编号的有用比较如下, 参见Lafranc等人, Dev.Comp.Immunol.27 (1):55-77 (2003):

[0074] 表1

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	接触	Xencor
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35	27-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58	54-61
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101	103-116
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36	27-38
vlCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55	56-62
vlCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96	97-105

[0076] 本发明提供了许多不同CDR组。在这个情况下, “完整CDR组” 包含三个可变轻CDR和三个可变重CDR, 例如vlCDR1、vlCDR2、vlCDR3、vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3。这些可分别是较大可变轻结构域或可变重结构域的一部分。此外, 如本文更充分概述, 可变重结构域和可变轻结构域在使用重链和轻链时可在单独多肽链上, 或在scFv序列的情况下可在单一多肽链上。

[0077] CDR促进形成抗体的抗原结合位点, 或更具体来说, 表位结合位点。“表位” 是指与抗体分子的可变区中的被称为互补位的特定抗原结合位点相互作用的决定簇。表位是分子诸如氨基酸或糖侧链的集团, 并且通常具有特定结构特征以及特定电荷特征。单一抗原可具有超过一个表位。

[0078] 每个链的羧基末端部分界定主要负责效应子功能的恒定区。Kabat等人收集了重链和轻链的可变区的众多一级序列。基于序列的保守程度, 他们将单个一级序列分类成CDR和框架, 并且制作了它们的清单 (参见SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 第5版, NIH出版物编号91-3242, E.A.Kabat等人, 其通过引用整体并入本文)。

[0079] 在免疫球蛋白的IgG子类中, 在重链中存在若干免疫球蛋白结构域。就本文中的“免疫球蛋白 (Ig) 结构域” 来说, 其意指免疫球蛋白的具有独特三级结构的区域。在本发明中受到关注的是重链结构域, 包括恒定重 (CH) 结构域和铰链结构域。在IgG抗体的情形下, IgG同种型各自具有三个CH区。因此, 在IgG的情形下的“CH” 结构域如下: “CH1” 是指根据如Kabat中的EU索引的位置118-220。“CH2” 是指根据如Kabat中的EU索引的位置237-340, 并且“CH3” 是指根据如Kabat中的EU索引的位置341-447。如本文所示以及以下所述, pI变体可在CH区中的一者或多者以及以下讨论的铰链区中。

[0080] 重链的Ig结构域的另一类型是铰链区。就本文中的“铰链” 或“铰链区” 或“抗体铰链区” 或“免疫球蛋白铰链区” 来说, 其意指包含在抗体的第一恒定结构域与第二恒定结构

域之间的氨基酸的柔性多肽。在结构上,IgG CH1结构域终止于EU位置220处,并且IgG CH2结构域开始于残基EU位置237处。因此,对于IgG,抗体铰链在本文中定义为包括位置221(在IgG1中是D221)至236(在IgG1中是G236),其中编号根据如Kabat中的EU索引。在一些实施方案中,例如在Fc区的情形下,包括下铰链,其中“下铰链”通常涉及位置226或230。如本文所指示,也可在铰链区中产生pI变体。

[0081] 如将由本领域中的人士所了解,在不同编号系统之中,重恒定区结构域的精确编号和放置可为不同的。根据EU和Kabat的重恒定区编号的有用比较如下,参见Edelman等人,1969,Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85以及Kabat等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,United States Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,其通过引用整体并入本文。

[0082] 表2

[0083]

	EU编号	Kabat编号
CH1	118-215	114-223
铰链	216-230	226-243
CH2	231-340	244-360
CH3	341-447	361-478

[0084] 轻链通常包含两个结构域,即可变轻结构域(含有轻链CDR,并且连同可变重结构域一起形成Fv区)和恒定轻链区(经常被称为CL或Cκ)。

[0085] “特异性结合特定抗原或表位例如IL6或IL6R”或“与特定抗原或表位例如IL6或IL6R特异性结合”或“对特定抗原或表位例如IL6或IL6R具有特异性”意指结合在可测量程度上不同于非特异性相互作用。可例如通过相较于对照分子的结合,测定分子的结合来测量特异性结合,所述对照分子通常是不具有结合活性的具有类似结构的分子。举例来说,可通过与类似于靶标的对照分子的竞争来测定特异性结合。

[0086] 对特定抗原或表位例如IL6或IL6R的特异性结合可例如通过抗体对于抗原或表位具有至少约 10^{-4} M、至少约 10^{-5} M、至少约 10^{-6} M、至少约 10^{-7} M、至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、或者至少约 10^{-10} M、至少约 10^{-11} M、至少约 10^{-12} M或更大的KD来展现,其中KD是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。通常,相对于抗原或表位,特异性结合所述抗原的抗体对于对照分子将具有是20、50、100、500、1000、5,000、10,000倍或更多倍大的KD。

[0087] 此外,对特定抗原或表位例如IL6或IL6R的特异性结合可例如通过相对于对照,抗体对于抗原或表位具有是至少20、50、100、500、1000、5,000、10,000倍或更多倍大的KA或Ka来展现,其中KA或Ka是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率。通常使用BIACORE®测定测量结合亲和力。

[0088] 如本文所用,术语“组蛋白脱乙酰基酶”或“HDAC”是指在基因表达的表观遗传调控方面具有各种功能的一类酶。由一些HDAC展现的一种这样的功能是从组蛋白上的ε-N-乙酰基赖氨酸氨基酸移除乙酰基。HDAC酶还脱去其他靶标的乙酰基。然而,组蛋白的脱乙酰化与持续靶标基因表达直接相关联。HDAC蛋白可基于功能和DNA序列类似性分成四个类别。前两个类别被视为“经典”HDAC,其活性由曲古抑菌素A(trichostatin A,TSA)抑制,而第三类别是不受TSA影响,并且在系统发生方面不与其他三个类别相关的NAD⁺依赖性蛋白的家族。第四类别基于与其他类别的DNA序列类似性被视为非典型种类。II类进一步再分成两个子类:

类别IIA和类别IIB,其中后者包含两个独立HDAC结构域。

[0089] 就“出血病症”来说,其意指与大量出血相关的任何病症,诸如先天性凝血病症、获得性凝血病症、抗凝剂的施用、或创伤诱发的出血性疾患。如下所讨论,出血病症可包括但不限于血友病A、血友病B、冯维勒布兰德病(von Willebrand disease)、特发性血小板减少症、一种或多种接触因子诸如因子XI、因子XII、前激肽释放酶(prekallikrein)和高分子量激肽原(HMWK)的缺乏症、一种或多种与临床重大出血的相关的因子诸如因子V、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子XIII、因子II(低凝血酶原血症)和冯维勒布兰德因子的缺乏症、维生素K缺乏症、纤维蛋白原病症,包括无纤维蛋白原血症、低纤维蛋白原血症和异常纤维蛋白原血症, α 2-抗纤溶酶缺乏症以及诸如由肝病、肾病、血小板减少症、血小板功能异常、血肿、内出血、关节积血、手术、创伤、体温过低、月经和妊娠引起的大量出血。

[0090] 如本文所用,术语“血友病”是指广泛地通过血液凝固或凝血降低来表征的一组疾病状态。血友病可指A型、B型或C型血友病,或指所有三种疾病类型的复合。A型血友病(血友病A)由因子VIII(FVIII)活性的降低或丧失引起,并且是最主要的血友病亚型。B型血友病(血友病B)由因子IX(FIX)凝固功能的丧失或降低所致。C型血友病(血友病C)是因子XI(FXI)凝固活性的丧失或降低的结果。血友病A和B是X连锁疾病,而血友病C是常染色体性的。用于血友病的常规治疗包括预防性施用和按需施用凝血因子,诸如FVIII、包括Bebulin®-VH的FIX和FXI,以及FEIBA-VH、去氨加压素(desmopressin)和血浆输注。

[0091] 就“同源性”来说,其意指两个多肽部分之间的同一性百分比。如本文所提及,当两个多肽序列展现约50%或更大序列同一性,诸如60%或更大序列同一性,诸如75%或更大序列同一性,诸如85%或更大序列同一性,诸如90%或更大序列同一性,诸如95%或更大序列同一性,包括99%或更大序列同一性时,所述序列是彼此“大致上同源的”。在一些实施方案中,大致上同源的多肽包括与指定序列具有完全同一性的序列。

[0092] 就“同一性”来说,其意指两个聚合序列的精确亚单位与亚单位对应性。举例来说,相同多肽是与另一多肽具有精确氨基酸与氨基酸对应性的多肽,或相同多核苷酸是与另一多核苷酸具有精确核苷酸与核苷酸对应性的多核苷酸。可通过以下方式来确定同一性百分比:通过将序列对准,对两个对准序列之间的精确匹配数目计数,除以参考序列的长度,并且将结果乘以100来在两个分子(参考序列和与参考序列具有未知同一性百分比的序列)之间直接比较序列信息。任何适宜方案都可用于确定两个聚合序列之间的同一性百分比,诸如像ALIGN,Dayhoff,M.O.,Atlas of Protein Sequence and Structure M.O.Dayhoff编,5增刊3:353-358,National biomedical Research Foundation,Washington,D.C.,其修改Smith和Waterman Advances in Appl.Math.2:482-489,1981的局部同源性算法以用于肽分析。

[0093] 术语“变体”、“类似物”和“突变蛋白”是指参考分子的保留所需活性诸如在治疗出血病症中的凝固活性的生物活性衍生物。关于多肽(例如凝血因子)的术语“变体”和“类似物”是指具有天然多肽序列和结构,相对于天然分子具有一个或多个氨基酸添加、取代(通常在性质上是保守的)和/或缺失,只要修饰不破坏生物活性,并且如下所定义与参考分子是“大致上同源”的化合物。当比对两个序列时,此类类似物的氨基酸序列将与参考序列具有高度序列同源性,例如50%或更大,诸如60%或更大,诸如70%或更大,诸如80%或更大,诸如90%或更大,诸如95%或更大,包括99%或更大的氨基酸序列同源性。在一些情况下,

类似物将包括相同氨基酸数目,但将包括取代。术语“突变蛋白”还包括具有一个或多个氨基酸样分子的多肽,包括但不限于仅含有氨基和/或亚氨基分子的化合物、含有氨基酸的一个或多个类似物(包括例如合成的非天然存在氨基酸等)的多肽、具有取代键联以及本领域中已知的天然存在的和非天然存在的(例如合成的)其他修饰的多肽、环化分子、分支分子等。所述术语还包括包含一个或多个N取代的甘氨酸残基(“类肽”)和其他合成氨基酸或肽的分子。(对于类肽的描述,参见例如美国专利第5,831,005;5,877,278;和5,977,301号;Nguyen等人,Chem.Biol.(2000) 7:463-473;以及Simon等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1992) 89:9367-9371)。在本发明的实施方案中,类似物和突变蛋白具有与天然分子至少相同的凝固活性。

[0094] 如本文讨论的分子量可表示为数量平均分子量或重量平均分子量。除非另外指示,否则在本文中对分子量的所有提及都是指重量平均分子量。可使用例如凝胶渗透色谱法或其他液相色谱法技术测量数量平均分子量测定与重量平均分子量测定两者。

[0095] 如本文所用,术语“因子VIII”和“FVIII”可互换使用,并且是指例如如使用欧洲药典9.0的第2.7.4章中所述的两步显色因子X活化测定所测量,在特定条件下,具有因子VIII活性的任何蛋白质(例如经常被称为FVIIIa的活性FVIII)或具有因子IXa辅因子活性的蛋白质的蛋白质前体(例如蛋白原或前蛋白原)。在一示例性实施方案中,因子VIII多肽是指具有与野生型因子VIII多肽的重链和轻链具有高序列同一性(例如至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更大)的序列的多肽。在一些实施方案中,因子VIII多肽的B结构域被缺失、截短或被接头多肽替换以降低编码因子VIII多肽的多核苷酸的大小。

[0096] 野生型因子VIII多肽的非限制性实例包括人前因子VIII原(例如GenBank登录号AAA52485、CAA25619、AAA58466、AAA52484、AAA52420、AAV85964、BAF82636、BAG36452、CAI41660、CAI41666、CAI41672、CAI43241、CA003404、EAW72645、AAH22513、AAH64380、AAH98389、AAI11968、AAI11970或AAB61261)、相应的因子VIII原、以及它们的天然变体;猪前因子VIII原(例如UniProt登录号F1RZ36或K7GSZ5)、相应的因子VIII原、以及它们的天然变体;小鼠前因子VIII原(例如GenBank登录号AAA37385、CAM15581、CAM26492或EDL29229)、相应的因子VIII原、以及它们的天然变体;大鼠前因子VIII原(例如GenBank登录号AAQ21580)、相应的因子VIII原、以及它们的天然变体;大鼠前因子VIII原;以及其他哺乳动物因子VIII同源物(例如猴、猿、仓鼠、豚鼠等)。

[0097] 通常,编码因子VIII的多核苷酸编码非活性单链多肽(例如前蛋白原),所述非活性单链多肽经受翻译后加工以形成活性因子VIII蛋白(例如FVIIIa)。举例来说,参考图15,野生型人因子VIII前蛋白原首先被裂解以释放编码的信号肽(未显示),从而形成第一单链蛋白原(显示为“人野生型FVIII”)。蛋白原接着在B结构域与A3结构域之间被裂解以形成包括因子VIII重链(例如A1和A2结构域)和B结构域的第一多肽,和包括因子VIII轻链(例如包括A3、C1和C3结构域)的第二多肽。第一多肽进一步被裂解以移除B结构域,并且还分开A1结构域和A2结构域,所述A1结构域和所述A2结构域在成熟因子VIIIa蛋白中保持与因子VIII轻链联合。对于因子VIII成熟过程的综述,参见Graw等人,Nat Rev Genet.,6(6):488-501(2005),其内容出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。

[0098] 如本文所用,术语“因子VIII多肽”和“FVIII多肽”是指在特定条件下具有因子VIII丝氨酸蛋白酶活性的多肽。因子VIII多肽包括当通过上述翻译后加工来活化时变为具

有因子VIII丝氨酸蛋白酶活性的活性因子VIII蛋白的单链前体多肽(包括因子VIII前多肽原、因子VIII肽原和成熟单链因子VIII多肽),以及活性因子VIII蛋白自身。在一示例性实施方案中,人因子VIII多肽是指包括与野生型人因子VIII多肽的包括轻链和重链的部分具有高序列同一性(例如至少85%、90%、95%、99%或更大)的氨基酸序列的多肽。

[0099] 如本文所用,因子VIII多肽包括具有因子IX辅因子活性的天然变体和人工构建体。如本公开中所用,因子VIII涵盖保留一定基本因子IX辅因子活性(例如相应野生型活性的至少5%、10%、25%、50%、75%或更大)的任何天然变体、替代性序列、同工型或突变蛋白质。具体包括在“因子VIII”的定义内的是因子VIII变体,有时也被称为“变异FVIII”。相较于人野生型FVIII,变异FVIII蛋白具有至少一个氨基酸修饰。见于人类群体中的因子VIII氨基酸变异(相对于FVIII-FL-AA (SEQ ID NO:19))的实例包括但不限于S19R、R22T、Y24C、Y25C、L26P/R、E30V、W33G、Y35C/H、G41C、R48C/K、K67E/N、L69P、E72K、D75E/V/Y、P83R、G89D/V、G92A/V、A97P、E98K、V99D、D101G/H/V、V104D、K108T、M110V、A111T/V、H113R/Y、L117F/R、G121S、E129V、G130R、E132D、Y133C、D135G/Y、T137A/I、S138R、E141K、D145H、V147D、Y155H、V159A、N163K、G164D/V、P165S、C172W、S176P、S179P、V181E/M、K185T、D186G/N/Y、S189L、L191F、G193R、L195P、C198G、S202N/R、F214V、L217H、A219D/T、V220G、D222V、E223K、G224W、T252I、V253F、N254I、G255V、L261P、P262L、G263S、G266F、C267Y、W274C、H275L、G278R、G280D、E284K、V285G、E291G/K、T294I、F295L、V297A、N299I、R301C/H/L、A303E/P、I307S、S308L、F312S、T314A/I、A315V、G323E、L326P、L327P/V、C329F、I331V、M339T、E340K、V345A/L、C348R/S/Y、Y365C、R391C/H/P、S392L/P、A394S、W401G、I405F/S、E409G、W412G/R、K427I、L431F/S、R437P/W、I438F、G439D/S/V、Y442C、K444R、Y450D/N、T454I、F455C、G466E、P470L/R/T、G474E/R/V、E475K、G477V、D478N、T479R、F484C、A488G、R490G、Y492C/H、Y492H、I494T、P496R、G498R、R503H、G513S/V、I522Y、K529E、W532G、P540T、T541S、D544N、R546W、R550C/G/H、S553P、S554C/G、V556D、R560T、D561G/H/Y、I567T、P569R、S577F、V578A、D579A/H、N583S、Q584H/K/R、I585R/T、M586V、D588G/Y、L594Q、S596P、N601D/K、R602G、S603I/R、W604C、Y605H/S、N609I、R612C、N631K/S、M633I、S635N、N637D/I/S、Y639C、L644V、L650F、V653A/M、L659P、A663V、Q664P、F677L、M681I、V682F、Y683C/N、T686R、F698L、M699T/V、M701I、G705V、G710W、N713I、R717L/W、G720D/S、M721I/L、A723T、L725Q、V727F、E739K、Y742C、R795G、P947R、V1012L、E1057K、H1066Y、D1260E、K1289Q、Q1336K、N1460K、L1481P、A1610S、I1698T、Y1699C/F、E1701K、Q1705H、R1708C/H、T1714S、R1715G、A1720V、E1723K、D1727V、Y1728C、R1740G、K1751Q、F1762L、R1768H、G1769R、L1771P、L1775F/V、L1777P、G1779E/R、P1780L、I1782R、D1788H、M1791T、A1798P、S1799H、R1800C/G/H、P1801A、Y1802C、S1803Y、F1804S、L1808F、M1842I、P1844S、T1845P、E1848G、A1853T/V、S1858C、K1864E、D1865N/Y、H1867P/R、G1869D/V、G1872E、P1873R、L1875P、V1876L、C1877R/Y、L1882P、R1888I、E1894G、I1901F、E1904D/K、S1907C/R、W1908L、Y1909C、A1939T/V、N1941D/S、G1942A、M1945V、L1951F、R1960L/Q、L1963P、S1965I、M1966I/V、G1967D、S1968R、N1971T、H1973L、G1979V、H1980P/Y、F1982I、R1985Q、L1994P、Y1998C、G2000A、T2004R、M2007I、G2013R、W2015C、R2016P/W、E2018G、G2022D、G2028R、S2030N、V2035A、Y2036C、N2038S、2040Y、G2045E/V、I2051S、I2056N、A2058P、W2065R、P2067L、A2070V、S2082N、S2088F、D2093G/Y、H2101D、T2105N、Q2106E/P/R、G2107S、R2109C、I2117F/S、Q2119R、

F2120C/L、Y2124C、R2135P、S2138Y、T2141N、M2143V、F2145C、N2148S、N2157D、P2162L、R2169C/H、P2172L/Q/R、T2173A/I、H2174D、R2178C/H/L、R2182C/H/P、M2183R/V、L2185S/W、S2192I、C2193G、P2196R、G2198V、E2200D、I2204T、I2209N、A2211P、A2220P、P2224L、R2228G/L/P/Q、L2229F、V2242M、W2248C/S、V2251A/E、M2257V、T2264A、Q2265R、F2279C/I、I2281T、D2286G、W2290L、G2304V、D2307A、P2319L/S、R2323C/G/H/L、R2326G/L/P/Q、Q2330P、W2332R、I2336F、R2339T、G2344C/D/S和C2345S/Y。因子VIII蛋白还包括含有翻译后修饰的多肽。

[0100] 如本文所用,术语“因子VIII多核苷酸”和“FVIII多核苷酸”是指编码例如如使用欧洲药典9.0的第2.7.4章中所述的两步显色因子X活化测定所测量,在特定条件下,具有因子IXa辅因子活性的FVIII多肽(例如活性FVIII,经常被称为FVIIIa)或具有因子IXa辅因子活性的蛋白质的蛋白质前体(例如蛋白原或前蛋白原)的多核苷酸。

[0101] 就本文中的“因子VIII活性”或“因子IX丝氨酸辅因子活性”来说,其意指在因子IXa存在下裂解因子X多肽的能力,例如通过水解野生型因子IX中的Arg194-Ile195肽键,由此使因子X活化成因子Xa。可使用本领域中已知的任何因子VIII活性测定来测量活性水平。一种用于测定因子VIII活性的实例测定是欧洲药典9.0的第2.7.4章中所述的两步显色因子X活化测定。

[0102] 如本文所用,术语“FVIII疗法”包括对患者提供因子VIII以缓解、减弱与血友病A相关的一种或多种症状(即临床因素)或预防所述一种或多种症状的复发的任何治疗方法。所述术语涵盖施用可用于维持或改善患有血友病的个体的健康状况的包含因子VIII(包括因子VIII的任何经修饰形式)的任何化合物、药物、程序或方案,并且包括本文所述的任何治疗剂。本领域技术人员将了解可例如基于根据本公开获得的结果来改变FVIII疗法的过程或FVIII疗法的剂量。

[0103] 如本文所用,术语“绕道疗法”包括对患者提供非因子VIII止血剂、化合物或凝血因子以缓解、减弱与血友病相关的一种或多种症状(即临床因素)或预防所述一种或多种症状的复发的任何治疗方法。可提供的非FVIII化合物和凝血因子包括但不限于因子VIII抑制剂绕道活性物(FEIBA)、重组的活化的因子VII(FVIIa)、凝血酶原复合物浓缩物和活化的凝血酶原复合物浓缩物。这些非FVIII化合物和凝血因子可为重组的或血浆源性的。本领域技术人员将了解可例如基于根据本发明获得的结果来改变绕道疗法的过程或绕道疗法的剂量。绕道疗法中施用的非FVIII化合物在本文中被称作“FVIII绕道复合物”或“因子VIII绕道复合物”。

[0104] 如本文所用,术语“因子IX”和“FIX”(其中“IX”是指用以意指“九”的罗马数字)可互换使用,并且是指例如如使用欧洲药典9.0的第2.7.11章中所述的一步因子IX凝固测定所测量,在因子VIII存在下,具有因子IX活性的任何蛋白质(例如活性FIX,经常被称为“FIXa”)或具有因子IX活性特别是因子X裂解活性的蛋白质的蛋白质前体(例如蛋白原或前蛋白原,经常被称为pFIX和ppFIX),所述章节的内容据此通过引用并入本文。

[0105] 野生型因子IX多肽的非限制性实例包括人前因子IX原(例如GenBank登录号NP_000124.1)和NP_001300842.1(FIX2-FL-AA)、相应的缺乏信号肽(前蛋白原的氨基酸1-28)和/或前导肽(前蛋白原的氨基酸29-46)的单链因子IX、以及它们的天然变体;猪前因子IX原(例如UniProt登录号P00741)、相应的缺乏信号肽的单链因子IX、以及它们的天然变体;鼠前因子IX原(例如UniProt登录号P16294)、相应的缺乏信号肽的单链因子IX、以及它们的

天然变体;大鼠前因子IX原(例如UniProt登录号P16296)、相应的缺乏信号肽的单链因子IX、以及它们的天然变体;以及其他哺乳动物因子VIII同源物(例如黑猩猩、猿、仓鼠、豚鼠等)。

[0106] 因子IX被翻译成包括信号肽、前导肽、轻链、活化肽和重链的非活性单链多肽,经常被称为因子IX前多肽原。因子IX前肽原经受翻译后加工以形成活性因子IX蛋白(例如FIXa)。这个加工包括移除(例如通过裂解)信号肽,随后移除(例如通过裂解)前导肽,以形成仍然是非活性的含有因子IX轻链和因子IX重链的单链成熟因子IX多肽。成熟因子IX多肽进一步被裂解以切除因子IX轻链与因子IX重链之间的活化肽,从而形成活性因子IX蛋白(例如FIXa)。因子IX轻链和因子IX轻链通过二硫键保持联合。对于关于因子IX的结构、功能和活化的额外信息,参见例如Brandstetter H.等人P.N.A.S.USA,92(21):9796-800(1995),Hopfner K P等人,Structure,7(8):989-96(1999),Gailani D.等人,Thromb Res.,133增刊1:S48-51(2014)以及美国专利申请公布第2018/0339026号,其内容出于所有目的通过引用以它们的整体并入本文。

[0107] 如本文所用,术语“因子IX多肽”和“FIX多肽”是指例如如使用欧洲药典9.0的第2.7.11章中所述的一步因子IX凝固测定所测量,在特定条件下,具有因子IX丝氨酸蛋白酶活性的多肽。因子IX多肽包括当通过上述翻译后加工来活化时变为具有因子IX丝氨酸蛋白酶活性的活性因子IX蛋白的单链前体多肽(包括因子IX前多肽原、因子IX肽原和成熟单链因子IX多肽),以及活性因子IX蛋白自身。具体包括在因子IX多肽的定义中包括R338L变体的因子IX多肽。在一示例性实施方案中,人因子IX多肽是指包括与野生型人因子IX多肽的包括轻链和重链的部分FIX-MP-AA(SEQ ID NO:XX,显示于图XX中),或与Padua人因子IX多肽的包括轻链和重链的部分FIXp-MP-AA(SEQ ID NO:XX)具有高序列同一性(例如至少85%、90%、95%、99%或更大)的氨基酸序列的多肽。

[0108] 如本文所用,因子IX多肽包括在因子VIII存在下具有因子IX裂解活性的天然变体和人工构建体。如本公开中所用,因子IX涵盖如根据欧洲药典9.0的第2.7.11章的一步凝固测定中所测定,保留一定基本因子IX裂解活性(例如相应野生型活性的至少5%、10%、25%、50%、75%或更大)的任何天然变体、替代性序列、同工型或突变蛋白质,所述欧洲药典的在第2.7.11章中的人凝血因子IX的测定的教导内容具体地通过引用并入本文。见于人类群体中的因子IX氨基酸变异(相对于FIX-FL-AA(SEQ ID NO:XX))的实例包括但不限于I17N、L20S、C28R、C28Y、V30I、R43L、R43Q、R43W、K45N、R46S、R46T、N48I、S49P、L52S、E53A、E54D、E54G、F55C、G58A、G58E、G58R、E66V、E67K、F71S、E73K、E73V、R75Q、E79D、T84R、Y91C、D93G、Q96P、C97S、P101R、C102R、C102R、G106D、G106S、C108S、D110N、I112S、N113K、Y115C、C119F、C119R、E124K、G125E、G125R、G125V、C134Y、I136T、N138H、G139D、G139S、C155F、G160E、Q167H、S169C、C170F、C178R、C178W、R191C、R191H、R226G、R226Q、R226W、V227D、V227F、V228F、V228L、Q241H、Q241K、C252S、C252Y、G253E、G253R、A265T、C268W、A279T、N283D、E291V、R294G、R294Q、V296M、H302R、N306S、I316F、L318R、L321Q、N328K、N328Y、P333H、P333T、T342K、T342M、I344L、G351D、W356C、G357E、G357R、K362E、G363W、A366D、R379G、R379Q、C382Y、L392F、L383I、R384L、K387E、I390F、M394K、F395I、F395L、C396F、C396S、A397P、R404T、C407R、C407S、D410H、S411G、S411I、G412E、G413R、P414T、V419E、F424V、T426P、S430T、W431G、W431R、G432S、E433A、G433K、C435Y、A436V、G442E、G442R、

I443T、R449Q、R449W、Y450C、W453R和I454T。如以下更充分讨论,这个编号相对于野生型人FIX。在人类群体中鉴定的其他氨基酸变异是已知的,并且可例如使用国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的(“NCBI”)变异浏览器,登录号GCF_000001405.25来得到。因子VIII蛋白还包括含有翻译后修饰的多肽。

[0109] 特别用于本公开中的是包括所谓“Padua”突变的FIX蛋白,即在成熟单链因子IX蛋白的位置338处精氨酸变为亮氨酸(R338L),在因子IX前多肽原的位置384处精氨酸变为亮氨酸(R384L)。这个突变对FIX蛋白赋予高功能活性。举例来说,显示在体内,“Padua”蛋白(例如含有R338L突变的因子IX)的活性是野生型因子IX的5倍至10倍大。美国专利第6,531,298号;Simioni P.等人,N Engl J Med.361(17):1671-75(2009),据此通过引用以它的整体并入本文。因此,本公开提供了编码有时在本文中被称为“FIXp”或“pFIX”的Padua-FIX蛋白的氨基酸和核酸构建体。

[0110] 如本文所用,术语“因子IX多核苷酸”和“FIX多核苷酸”是指编码例如如使用欧洲药典9.0的第2.7.11章中所述的一步因子IX凝固测定所测量,在特定条件下,具有因子IX丝氨酸蛋白酶活性的因子IX多肽的多核苷酸。具体包括在因子IX多核苷酸的定义中的是编码包括R338L变体的因子IX多肽的多核苷酸。

[0111] 就本文中的“因子IX活性”或“因子IX丝氨酸蛋白酶活性”来说,其意指在因子VIIIa辅因子存在下裂解因子X多肽的能力,例如通过水解野生型因子IX中的Arg194-Ile195肽键,由此使因子X活化成因子Xa。可使用本领域中已知的任何因子IX活性测定来测量活性水平。用于测定因子IX活性的一实例测定是欧洲药典9.0的第2.7.11章中所述的一步因子IX凝固测定。

[0112] 如本文所用,术语“FIX疗法”包括对患者提供因子IX以缓解、减弱与血友病B相关的一种或多种症状(即临床因素)或预防所述一种或多种症状的复发的任何治疗方法。所述术语涵盖施用可用于维持或改善患有血友病的个体的健康状况的包含因子IX(包括因子IX的任何经修饰形式)的任何化合物、药物、程序或方案,并且包括本文所述的任何治疗剂。本领域技术人员将了解可例如基于根据本公开获得的结果来改变FIX疗法的过程或FIX疗法的剂量。

[0113] 如本文所用,术语“载体”是指用于将编码治疗性蛋白质的核酸转移至宿主细胞中的任何核酸构建体。在一些实施方案中,载体包括起复制核酸构建体的作用的复制子。可用于基因疗法的载体的非限制性实例包括在体内充当自主复制单位的质粒、噬菌体、粘粒、人工染色体和病毒。在一些实施方案中,载体是用于将编码治疗性蛋白质的核酸引入至宿主细胞中的病毒载体。可用于基因疗法的许多经修饰真核病毒在本领域中是已知的。举例来说,腺相关病毒(AAV)特别充分适合于在人基因疗法中使用,因为人是病毒的天然宿主,尚不清楚天然病毒会促成任何疾病,并且病毒引发轻度免疫应答。

[0114] 如本文所用,术语“病毒粒子”是指包封编码治疗性蛋白质的多核苷酸的病毒粒子,其在引入至适合动物宿主(例如人)中时对于所述治疗性蛋白质的表达是特异性的。具体包括在病毒粒子的定义内的是包封其中已插入编码治疗性蛋白质的密码子改变的多核苷酸的基因组的重组病毒粒子。

[0115] 如本文所用,术语“错义突变”是指蛋白质中一个氨基酸的由单一核苷酸的点突变引起的变化,并且是DNA序列中的一种非同义取代类型。

[0116] 如本文所用,术语“单倍体缺陷”描述二倍体基因组中的基因组状态,其中特定基因包括致使由所述基因编码的基因产物的一个拷贝无功能或接近无功能的突变,或其中所述基因的一个拷贝部分地或完全地不存在于所述二倍体基因组中。因此,术语“单倍剂量不足”是指其中基因产物(例如特定蛋白质)的总水平和/或活性是正常水平和/或活性的约一半,并且降低的活性不足以达成正常细胞功能的状态。在一些实施方案中,单倍剂量不足代表其中基因产物的正常水平和/或活性是不具有单倍剂量不足的生物体中的野生型水平和/或活性的约25%至约75%、或约30%至约70%、或约35%至约65%、或约40%至约60%、或约45%至约55%的状态。这是确实的,因为在一些情况下,细胞将通过从基因的另一拷贝产生更多基因产物来弥补特定基因的一个功能性拷贝的损失。类似地,在一些情况下,当基因的另一拷贝被缺失或致使无功能时,细胞将从所述基因的功能性拷贝产生较少基因产物,例如在其中正反馈环路用于至少部分地调控所述基因的表达的情况下。

[0117] 就本文中的“AAV”或“腺相关病毒”来说,其可指已向其中插入源于编码治疗性蛋白质的多核苷酸的天然存在的“野生型”AAV基因组的病毒、源于使用由天然存在的AAV cap基因编码的衣壳蛋白包装至衣壳中的编码治疗性蛋白质的重组多核苷酸的重组病毒、或源于使用由非天然衣壳cap基因编码的衣壳蛋白包装至衣壳中的编码治疗性蛋白质的重组多核苷酸的重组病毒。包括在AAV的定义内的是包封编码治疗性蛋白质的多核苷酸的血清型AAV 1型(AAV1)、AAV 2型(AAV2)、AAV 3型(AAV3)、AAV 4型(AAV4)、AAV 5型(AAV5)、AAV6型(AAV6)、AAV 7型(AAV7)、AAV 8型(AAV8)和AAV 9型(AAV9)病毒,以及由一种或多种包封编码治疗性蛋白质的多核苷酸的变异AAV衣壳蛋白形成的病毒。

[0118] 如本文所用,术语“基因疗法”包括对患者提供编码治疗性蛋白质的核酸以缓解、减弱与病症相关的一种或多种症状(例如临床因素)或预防所述一种或多种症状的复发的任何治疗方法。所述术语涵盖施用包含编码治疗性蛋白质(包括所述治疗性蛋白质的任何经修饰形式)的核酸的任何化合物、药物、程序或方案,以维持或改善患有病症例如内源性治疗性蛋白质的活性的缺乏的个体的健康状况。本领域技术人员将了解可例如基于根据本公开获得的结果来改变基因疗法的过程或基因疗法治疗剂的剂量。

[0119] 如本文所用,术语“基因”是指DNA分子的编码多肽链的区段(例如编码区)。在一些实施方案中,基因安置有在产生多肽链中涉及的紧靠在编码区之前,之后,以及/或者插入编码区的区域(例如调控元件诸如启动子、增强子、多腺苷酸化序列、5'非翻译区、3'非翻译区或内含子)。

[0120] 如本文所用,术语“调控元件”是指提供编码序列在细胞中的表达的核苷酸序列,诸如启动子、增强子、终止子、多腺苷酸化序列、内含子等。

[0121] 如本文所用,术语“启动子元件”是指辅助控制编码序列的表达的核苷酸序列。通常,启动子元件位于基因的翻译起始位点的5'。然而,在某些实施方案中,启动子元件可位于内含子序列内,或编码序列的3'。在一些实施方案中,可用于基因疗法载体的启动子源于靶标蛋白质的天然基因。在一些实施方案中,可用于基因疗法载体的启动子对于在靶标生物体的特定细胞或组织中表达是特异性的(例如肝特异性启动子)。在其他实施方案中,多种充分表征的启动子元件中的一者用于本文所述的基因疗法载体中。充分表征的启动子元件的非限制性实例包括CMV早期启动子、 β -肌动蛋白启动子和甲基CpG结合蛋白2(MeCP2)启动子。在一些实施方案中,启动子是驱动靶标蛋白质的大致上恒定表达的组成型启动子。在

其他实施方案中,启动子是诱导型启动子,其响应于特定刺激(例如暴露于特定处理或剂)驱动靶标蛋白质的表达。对于设计用于AAV介导的基因疗法的启动子的综述,参见Gray等人(Human Gene Therapy 22:1143-53(2011)),其内容出于所有目的通过引用以它们的整体明确并入本文。

[0122] 如本文所用,术语“CpG”是指沿DNA的单链的胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸,其中“p”代表两者之间的磷酸酯键联。

[0123] 如本文所用,术语“CpG岛”是指多核苷酸内具有统计升高的CpG二核苷酸密度的区域。如本文所用,如果满足以下条件,那么多核苷酸(例如编码治疗性蛋白质的多核苷酸)的区域是CpG岛:历经200碱基对窗口:(i)所述区域具有大于50%的GC含量,并且(ii)如由以下关系所确定,观察到的CpG二核苷酸/预期的CpG二核苷酸的比率是至少0.6:

$$[0124] \quad \frac{N[CpG] \times N[\text{窗口长度}]}{N[C] \times N[G]} \geq 0.6$$

[0125] 对于关于用于鉴定CpG岛的方法的额外信息,参见Gardiner-Garden M.等人,J Mol Biol.,196(2):261-82(1987),其内容出于所有目的通过引用以它的整体明确并入本文。

[0126] 如本文所用,术语“核酸”是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸以及它们的聚合物,以及它们的互补序列。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或经修饰主链残基或键联的核酸,其是合成的,天然存在的,以及非天然存在的,与参考核酸具有类似结合性质,并且以与参考核苷酸类似的方式被代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。然而,用于患者中的基因疗法中的本文特别有用的实施方案使用磷酸二酯键。

[0127] 术语“氨基酸”是指天然存在的和非天然的氨基酸,包括以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸包括由遗传密码编码的那些,以及稍后被修饰的那些氨基酸,例如羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。天然存在的氨基酸可包括例如D-氨基酸和L-氨基酸。关于氨基酸序列,本领域普通技术人员将认识到对核酸或肽序列进行的改变、添加或缺失所编码序列中单一氨基酸或小百分比的氨基酸的单个取代、缺失或添加是“经保守修饰变体”,其中改变导致氨基酸被化学类似氨基酸取代。提供在功能上类似的氨基酸的保守性取代表在本领域中是熟知的。此类经保守修饰变体外加于并且不排除本公开的多态性变体、物种间同源物和等位基因。

[0128] 如本文所用,术语“肝特异性表达”是指相较于在其他组织中,特定基因在肝组织中的优先或占优势体内表达。在一些实施方案中,肝特异性表达意指特定基因的所有表达的至少50%发生在受试者的肝组织内。在其他实施方案中,肝特异性表达意指特定基因的所有表达的至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%发生在受试者的肝组织内。因此,肝特异性调控元件是在肝组织中驱动基因的肝特异性表达的调控元件。

[0129] 如本文所述,编码治疗性蛋白质的多核苷酸可包括调控元件,诸如启动子、增强子、终止子、多腺苷酸化序列和内含子,以及病毒包装元件,诸如反向末端重复序列(“ITR”),和/或支持多核苷酸在非病毒宿主细胞中的复制的其他元件,例如支持多核苷酸例如在细菌、酵母或哺乳动物宿主细胞中的繁殖的复制子。

[0130] 特别用于本公开中的是编码治疗性蛋白质的密码子改变的多核苷酸。如本文所述,相较于由天然编码的构建体(例如使用野生型人密码子编码相同治疗性氨基酸序列的多核苷酸)提供的治疗性蛋白质表达水平,密码子改变的多核苷酸提供增加的体内转基因治疗性蛋白质表达。如本文所用,术语“增加的表达”是指相较于被施用天然编码的构建体的动物的血液中的转基因治疗性蛋白质水平,被施用密码子改变的多核苷酸的动物的血液中的转基因治疗性蛋白质水平增加。蛋白质的表达增加导致蛋白质的活性增加;因此,增加的表达导致增加的活性。

[0131] 在一些实施方案中,增加的表达是指相较于被施用天然编码的多核苷酸的动物的血液中的转基因治疗性多肽水平,被施用密码子改变的多核苷酸的动物的血液中的转基因治疗性多肽大至少25%。出于本公开的目的,增加的表达是指通过改变密码子序列产生的影响,而非由潜在氨基酸取代例如因子IX中的“Padua”突变引起的高活性。也就是说,从编码“Padua”因子IX多核苷酸的密码子优化序列获得的表达水平相对于从天然编码的“Padua”蛋白获得的表达水平进行比较。在一些实施方案中,增加的表达是指相较于被施用天然编码的多核苷酸的动物的血液中的转基因治疗性多肽水平,被施用密码子改变的多核苷酸的动物的血液中的转基因治疗性多肽大至少50%,大至少75%,大至少100%,是至少3倍大、至少4倍大、至少5倍大、至少6倍大、至少7倍大、至少8倍大、至少9倍大、至少10倍大、至少15倍大、至少20倍大、至少25倍大、至少30倍大、至少40倍大、至少50倍大、至少60倍大、至少70倍大、至少80倍大、至少90倍大、至少100倍大、至少125倍大、至少150倍大、至少175倍大、至少200倍大、至少225倍大或至少250倍大。可例如使用对于治疗性多肽是特异性的ELISA测定来测量动物的血液中的治疗性多肽水平。

[0132] IL-6是一种也被称为B细胞刺激因子-2(BSF2)或干扰素 β 2的细胞因子。IL-6作为B淋巴细胞谱系细胞的活化中涉及的分化因子被发现(Hirano,T.等人,Nature,324:73-76,1986),并且在那之后,已证明IL-6是影响各种细胞的功能的多功能性细胞因子(Akira,S.等人,Adv.in Immunology,54:1-78,1993)。已报道IL-6诱导T淋巴细胞谱系细胞的成熟(Lotz,M.等人,J.Exp.Med.,167:1253-1258,1988)。

[0133] IL-6通过细胞上两种类型的蛋白质来传输它的生物活性。一种是IL-6受体(在本文中也称为IL-6R),其是IL-6所结合的具有约80kD的分子量的配体结合蛋白(Taga,T.等人,J.Exp.Med.,166:967-981,1987;Yamasaki,K.等人,Science,241:825-828,1987)。除穿透细胞膜,并且在细胞膜上表达的膜结合类型之外,IL-6受体还以主要由它的细胞外区域组成的可溶性IL-6受体的形式存在。

[0134] 如本文所提及,“类视黄醇或甲状腺激素受体-2的沉默介体/核受体辅阻遏物2基因”或“SMRT/NCOR-2基因”是指编码类视黄醇或甲状腺激素受体-2的沉默介体/核受体辅阻遏物2(形成通过募集一般性染色质修饰酶诸如组蛋白脱乙酰基酶和甲基转移酶来介导靶基因的转录沉默的核受体辅阻遏物复合物所需的核受体辅阻遏物)的基因。SMRT复合物直接与HNF4 α 相互作用,由此潜在地直接影响HNF4 α 介导的TTR启动子表达。

[0135] 如本文所用,术语“基因型”是指个体的遗传组成。术语“基因分型”或“基因型测定”是指用生物测定来确定个体的基因型的过程。用于基因分型的生物测定包括诸如像聚合酶链式反应(PCR)、DNA片段分析、等位基因特异性寡核苷酸(ASO)探针、DNA测序、DNA微阵列等的技术,或所述技术的组合。常用基因分型技术包括但不限于限制片段长度多态性

(RFLP)、末端限制片段长度多态性 (t-RFLP)、扩增片段长度多态性 (AFLP)、多重连接依赖性探针扩增 (MLPA) 以及全外显子组测序和变异分析。

[0136] 在一实施方案中,基因分型测定包括全外显子组测序和变异分析。举例来说,在一实施方案中,从用EDTA处理的全血样品提取患者的基因组DNA。接着使用可商购获得的试剂盒进行外显子组富集。构建样品的片段化DNA文库,并且进行高通量测序。使用例如Burrows-Wheeler Aligner来比对序列读段。使用组合注释依赖性消减 (CADD) 评估患者的全外显子组中的变异(当相较于其他类似个体的全基因组时)来对人基因组中单核苷酸变体和插入/缺失的可能有害性评分以确定患者是否在目标基因中具有突变(例如与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的那些)。

[0137] 引言

[0138] 在关于用基于AAV的FIX基因疗法治疗患有血友病B的患者的临床试验中,发现转氨酶升高和FIX表达的不稳定性与识别AAV衣壳的循环细胞毒性T细胞 (CTL) 的载体剂量依赖性产生相关联,从而导致假设适应性CTL IR可能导致经转导肝细胞的清除和FIX表达的丧失。

[0139] 这个效应先前尚未在用AAV FIX基因疗法进行的临床前动物研究中观察到,并且CTL介导的转基因丧失的所提出模型留下了若干未回答的问题。首先,证据表明AAV衣壳抗原递呈在AAV施用之后即刻是最高效的,接着下降,从而暗示衣壳特异性CTL应在较早时间点消除了大多数经AAV转导的肝细胞。解释在CTL介导的对经转导肝细胞的移除之后,泼尼松龙可如何恢复FIX活性还存在困难。单链载体与自身互补性 (scAAV) 载体两者均被证明在载体输注之后早期通过Toll样受体9 (TLR9;病原体相关分子模式 [PAMPS] 的识别中涉及的关键病毒传感物中的一者)来上调先天性免疫信号传导,并且还已提出先天性免疫系统在协调稍后的对长期AAV转导的应答方面具有作用。

[0140] 用于较早AAV FIX基因疗法试验中的载体储备物含有过多的AAV空衣壳(仅有估计约15%含有载体基因组),以使其余大部分衣壳潜在地具有免疫原性,但未携带FIX基因。如果AAV衣壳剂量依赖性T细胞应答是潜伏于观察到的转氨酶升高之下的唯一机制,那么极大降低AAV空衣壳载量可潜在地避免转氨酶升高的并发症和相关FIX活性丧失。

[0141] 用以降低初始用于FIX基因疗法的AAV载体的免疫原性的后续尝试已集中于使FIX表达最大化,同时降低对病毒载体的暴露。从单链DNA转换成scAAV载体(在临床前研究中被证明更强力)以及FIX序列的密码子优化已有助于使用较低载体剂量。此外,由于在人中具有较低的中和抗体 (NAbs) 报道血清阳性率,所以AAV血清型8 (AAV8;恒河猴 (rhesus macaque) 血清型) 优先于AAV2加以使用。AAV8还与改善的对肝细胞的嗜性相关联,从而有助于降低载体剂量,同时容许递送至外周静脉中。

[0142] 还已重新设计scAAV8 FIX表达策略以并入高活性FIX变体 (FIX Padua)。这个天然存在的单氨基酸变体含有相对于野生型FIX蛋白,导致比活性增加到5至10倍的功能获得突变(亮氨酸取代位置338中的精氨酸)。

[0143] 基于AAV8的FIX Padua基因疗法FIX基因疗法构建体的开发并入了高活性FIX Padua变体以使FIX表达最大化,并且包括纯化步骤以使AAV空衣壳的量降低至约30%来使免疫系统活化潜力最小化。临床前测试中的令人鼓舞的结果导致进一步开发作为用于血友病B的潜在治疗剂的FIX基因疗法构建体,所述构建体被设计来使FIX活性改善至预期会提

供有效保护以免遭关节出血的水平。

[0144] 然而,转基因的持续表达仍然是问题。有利的是,本公开提供了用于通过改善的持续转基因表达来达成的改善的基因治疗的方法。具体来说,在一些实施方案中,通过相伴阻抑IL6信号传导路径和/或NCoR2/SMRT脱乙酰路径来实现改善的持续表达。

[0145] 本公开还提供了一种用于鉴定用于不仅针对血友病,而且针对可潜在地用基因疗法治疗的任何其他疾病的基于病毒的基因疗法的患者的方法;以及一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法,所述方法促进在施用之后基因疗法载体的持续表达。

[0146] 用于改善的基于病毒载体的基因治疗的方法

[0147] 如实施例1中所述,在被施用基于AAV的因子IX基因疗法载体的八名血友病B患者之中,仅单一患者(患者5)维持转基因因子IX从基因疗法载体的表达超过四年。对患者5的基因组分析揭示所述患者在他们的白介素-6(IL6)和NCoR2/SMRT基因中具有突变。因此,在一个方面,本公开提供了用于改善的基因治疗的方法,所述方法通过相伴施用白介素-6(IL6)信号传导路径或NCoR2/SMRT组蛋白脱乙酰路径的抑制剂和基于病毒的基因疗法载体来模拟在这个患者中观察到的IL6和/或NCoR2/SMRT功能阻抑。

[0148] IL6路径抑制剂的共同施用

[0149] 因此,在一些实施方案中,本文所述的方法包括施用白介素-6(IL6)信号传导路径的抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是IL6抑制剂。举例来说,在一些实施方案中,IL6抑制剂是单克隆抗体或其衍生物,例如基于抗IL6单克隆抗体的CDR序列来工程改造的IL6特异性结合分子。若干抗IL6单克隆抗体被核准用于治疗使用,或处于临床前/临床试验中。这些抗体包括司妥昔单抗(siltuximab)、奥洛珠单抗(olokizumab)、伊斯利莫单抗(elsilimomab)、克拉扎珠单抗(clazakizumab)、斯如库单抗(sirukumab)、吉利珠单抗(gerilimzumab)、FM101和MEDI5117。抗IL6单克隆抗体、其变体、及其衍生物的非限制性实例例如描述于美国专利第7,291,721、7,560,112、7,612,182、7,820,155、7,919,095、7,955,597、8,062,866、8,632,774、9,234,034号、美国专利申请公布第2014/0127209、2011/0059080号以及PCT公布第W0 2019/109947号中,所述专利的内容据此出于所有目的通过引用以它们整体并入本文。

[0150] 因此,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和司妥昔单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和司妥昔单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和司妥昔单抗的衍生物,例如抗体的含有司妥昔单抗的CDR区中的一者或多者的衍生物。对于关于以商品名SYLVANT®销售的司妥昔单抗的更多信息,参见美国专利第7,612,182和7,291,721号,其内容据此出于所有目的通过引用以它们整体并入本文。

[0151] 类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和奥洛珠单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和奥洛珠单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个

氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和奥洛珠单抗的衍生物,例如抗体的含有奥洛珠单抗的CDR区中的一者或多者的衍生物。

[0152] 类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和伊斯利莫单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和伊斯利莫单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和伊斯利莫单抗的衍生物,例如抗体的含有伊斯利莫单抗的CDR区中的一者或多者的衍生物。

[0153] 类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和克拉扎珠单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和克拉扎珠单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和克拉扎珠单抗的衍生物,例如抗体的含有克拉扎珠单抗的CDR区中的一者或多者的衍生物。

[0154] 类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和斯如库单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和斯如库单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和斯如库单抗的衍生物,例如抗体的含有斯如库单抗的CDR区中的一者或多者的衍生物。对于关于斯如库单抗的更多信息,参见美国专利第7,560,112号,其内容据此出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。

[0155] 类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和吉瑞利珠单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和吉瑞利珠单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和吉瑞利珠单抗的衍生物,例如抗体的含有吉瑞利珠单抗的CDR区中的一者或多者的衍生物。

[0156] 类似地,在一些实施方案中,本文所述的方法包括施用白介素-6受体(IL6R)的抑制剂。在一些实施方案中,IL6R抑制剂是单克隆抗体或其衍生物,例如基于抗IL6R单克隆抗体的CDR序列来工程改造的IL6R特异性结合分子。若干抗IL6单克隆抗体被核准用于治疗使用,或处于临床前/临床试验中。这些抗体包括托珠单抗、沙利鲁单抗(sarilumab)、乐维利单抗(levilimab)、沃巴利珠单抗(vobarilizumab)或萨特利珠单抗(satralizumab)。抗IL6单克隆抗体、其变体、及其衍生物的非限制性实例例如描述于美国专利第5,795,965、7,582,298、8,337,849、8,562,991、9,017,678、9,173,880、9,828,430和10,618,964号、美国

专利申请公布第2017/0166646号以及PCT公布第W02018/029182、W0 2018/112237和W0 2019/052457号中,所述专利的内容据此出于所有目的通过引用以它们的整体并入本文。

[0157] 因此,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和托珠单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和托珠单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和托珠单抗的衍生物,例如抗体的含有托珠单抗的CDR区中的一者或多者的衍生物。对于关于以商品名**ACTEMRA®**销售的司妥昔单抗的更多信息,参见美国专利第5,795,965号,其内容据此出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。

[0158] 类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和沙利鲁单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和沙利鲁单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和沙利鲁单抗的衍生物,例如抗体的含有沙利鲁单抗的CDR区中的一者或多者的衍生物。对于关于以商品名**KEVZARA®**销售的沙利鲁单抗的更多信息,参见美国专利第7,582,298号,其内容据此出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。

[0159] 类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和乐维利单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和乐维利单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和乐维利单抗的衍生物,例如抗体的含有乐维利单抗的CDR区中的一者或多者的衍生物。

[0160] 类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和沃巴利珠单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和沃巴利珠单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和沃巴利珠单抗的衍生物,例如抗体的含有沃巴利珠单抗的CDR区中的一者或多者的衍生物。

[0161] 类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和萨特利珠单抗。在相关实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和萨特利珠单抗的变体,例如具有在抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代、在抗体的可变区中的一个或多个氨基酸取代、和/或在抗体的CDR中的一个或多个氨基酸取代的单克隆抗体。类似地,在一些实施方案中,方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和萨特利珠单抗的衍生物,例如抗体的含有萨特利珠单抗

的CDR区中的一者或多者的衍生物。对于关于萨特利珠单抗的更多信息,参见美国专利第8,562,991号,其内容据此出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。

[0162] 白介素6 (IL-6) 是一种充当促炎性细胞因子与消炎性肌肉因子两者的白介素。IL-6的过度产生牵涉于包括若干慢性炎症性疾病和癌症的多种疾病的发病机理中。已知的是IL6在JAK/STAT信号传导路径、Ras/MAK信号传导路径、SHP-2/ERK MAPK信号传导路径和PI3K/Akt信号传导路径内起作用。在肝中,IL6/IL6R信号转导系统起活化两种细胞间信号传导路径即SHP-2/ERK MAPK路径和JAK/STAT路径的作用。参见Mihara M.等人,Clin Sci (Lond),122(4):143-59(2012),其内容据此出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。因此,在一些实施方案中,本文所述的方法包括施用这些路径中的一者中例如除IL6或IL6R以外的因子的抑制剂。

[0163] 在一些实施方案中,本文所述的方法包括与基于病毒的基因疗法载体共同施用JAK/STAT信号传导路径中因子的抑制剂。举例来说,在一些实施方案中,方法包括施用JAK抑制剂。JAK抑制剂通过抑制Janus激酶家族酶(JAK1、JAK2、JAK3、TYK2)中的一者或多者的活性,由此干扰JAK-STAT信号传导路径来起作用。JAK抑制剂的非限制性实例包括鲁索利替尼(ruxolitinib)、托法替尼(tofacitinib)、奥拉替尼(ocelotinib)、巴瑞替尼(baricitinib)、培非替尼(peficitinib)、菲卓替尼(fedratinib)、乌帕替尼(upadacitinib)、非戈替尼(filgotinib)、赛度替尼(cerdulatinib)、甘多替尼(gandotinib)、来他替尼(lestaurtinib)、莫洛替尼(momelotinib)、帕克替尼(pacritinib)、阿布昔替尼(abrocitinib)、葫芦素I(cucurbitacin I)和CHZ868。类似地,在一些实施方案中,本文所述的方法包括施用STAT抑制剂。STAT抑制剂通过抑制信号转导及转录激活因子(STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B、STAT6)中的一者或多者的活性来起作用。STAT抑制剂的非限制性实例包括匹格列酮(pioglitazone)、甲氨蝶呤(methotrexate)、西罗莫司(sirolimus)、他克莫司(tacrolimus)、西罗莫司、AT9283、隐丹参酮(cryptotanshinone)、辣椒素(capsaicin)、姜黄素(curcumin)、葫芦素1(cucurbitacin 1)、南蛇藤醇(celastrol)、阿替莫德(atiprimod)和萝卜硫素(sulforaphane)。对于关于处于临床试验中的JAK和STAT抑制剂的更多信息,参见Chin-Yap L.等人,Front.Oncol.,9(48)(2019),其内容出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。

[0164] 类似地,在一些实施方案中,本文所述的方法包括与基于病毒的基因疗法载体共同施用SHP-2/ERK MAPK信号传导路径中因子的抑制剂。MAPK信号传导路径的抑制剂的非限制性实例包括生长抑素(somatostatin)类似物(例如SOM230和奥曲肽(octreotide))、多巴胺(dopamine)及其激动剂(例如多巴胺、溴麦角环肽(bromocriptine)和卡麦角林(cabergoline))、TGF- β 、18- β -甘草次酸(18-beta-glycyrrhetic acid)、BIM-23A760、熊果酸(usolic acid)和氟维司群(fulvestrant)。对于关于MAPK信号传导路径的抑制剂的更多信息,参见Lu M等人,Frontiers in Endocrinology,10(330)(2019)。

[0165] 组蛋白脱乙酰基酶抑制剂的共同施用

[0166] 在一些实施方案中,本文所述的方法包括施用NCOR2/SMRT组蛋白脱乙酰基酶的抑制剂。NCOR2/SMRT基因编码介导某些靶标基因的转录沉默的核受体辅阻遏物。所编码蛋白质是甲状腺激素和视黄酸受体相关辅阻遏物家族的成员。这个蛋白质充当多亚单位复合物的一部分,所述复合物包括组蛋白脱乙酰基酶以修饰染色质结构,从而阻止靶标基因的基

基础转录活性。这个基因的异常表达与某些癌症相关联。选择性剪接导致编码不同同工型的多种转录物变体。

[0167] 因此,在一些实施方案中,本文所述的方法提供了用于基因治疗的改善方法,所述改善方法包括向患者施用治疗有效剂量的基于病毒的基因疗法载体和组蛋白脱乙酰基酶抑制剂。

[0168] 已鉴定通常通过与HDAC的含锌催化结构域的结合来作用于I、IIa和IIb类HDAC的若干组蛋白脱乙酰基酶抑制剂。这些抑制剂属于若干群组,包括异羟肟酸(例如曲古抑菌素A(tricostatin A)、环状四肽(例如曲帕辛B(trapoxin B))以及酯肽、苯甲酰胺、亲电子酮和脂族酸化合物(例如苯基丁酸盐和丙戊酸)。源于这些群组的第二代抑制剂包括异羟肟酸伏立诺他(vorinostat, SAHA)、贝利司他(belinostat, PXD101)、LAQ824、帕比司他(panobinostat, LBH-589)、吉维司他(givinostat, ITF2357)以及苯甲酰胺类的胺恩替司他(entinostat, MS275)、CL-994和莫西司他(mocetinostat, MGCD0103)。通常,苯甲酰胺抑制I类而非II类HDAC,并且异羟肟酸是对I和IIb类HDAC比对IIa类HDAC更强烈的抑制剂,但某一类别内的同工型选择性是显著较低的。

[0169] 治疗性蛋白质

[0170] 通常,本文所述的方法适于与编码任何治疗性蛋白质的基于病毒的基因疗法载体例如腺相关基因疗法载体一起使用,因为提出的作用机制不依赖于从载体表达的蛋白质。充分适合于在本文所述的方法中使用的治疗性蛋白质的类型的实例包括凝血因子、丝氨酸蛋白酶、细胞因子、细胞因子受体蛋白的可溶性部分、免疫球蛋白、T细胞受体的可溶性部分、主要组织相容性复合体(MHC)蛋白的可溶性部分、补体调控蛋白、生长因子、激素受体蛋白的可溶性部分、胆固醇受体蛋白的可溶性部分、转录因子蛋白和代谢酶。

[0171] 实际上,存在已被授予监管核准的若干基因疗法。举例来说,talimogene laherparepvec(编码粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF))、voretigene neparvovec-rzyl(编码类视黄醇异构水解酶(RPE65))和onasemnogene abeparvovec-xioi(编码运动神经元存活蛋白1(SMN1))。因此,在一些实施方案中,本文所述的方法包括施用IL6/IL6R抑制剂和编码粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)多肽、类视黄醇异构水解酶(RPE65)多肽或运动神经元存活蛋白1(SMN1)多肽的基于病毒的基因疗法载体。在具体实施方案中,本文所述的方法包括施用IL6/IL6R抑制剂以及talimogene laherparepvec、voretigene neparvovec-rzyl和onasemnogene abeparvovec-xioi中的一者。

[0172] 在一些实施方案中,基因疗法载体编码血液因子,例如凝血因子,例如因子II、因子V、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子XI或因子XII。因此,在一些实施方案中,本文所述的方法包括施用IL6/IL6R抑制剂和编码因子II、因子V、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子XI或因子XII的基于病毒的基因疗法载体。

[0173] 因子VIII

[0174] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一些实施方案中,本公开提供了编码因子VIII变体的密码子改变的多核苷酸。当于基于AAV的基因疗法构建体中施用时,这些密码子改变的多核苷酸提供显著改善的因子VIII生物效能(例如活性)。相较于以常规方式加以密码子优化的构建体,密码子改变的多核苷酸还显示

改善的AAV病毒粒子包装。

[0175] 野生型因子VIII编码有19个氨基酸的信号肽,其在因子VIII的活化之前从所编码多肽裂解。如由本领域中的人士所了解,因子VIII信号肽可被突变,用来自其他基因或来自其他生物体的因子VIII基因的信号肽替换,或被完全移除,而不影响在通过细胞加工移除信号肽之后留下的成熟多肽的序列。

[0176] 因此,在一些实施方案中,本文提供的密码子改变的多核苷酸(例如核酸组合物)具有与以下部分具有高序列同一性的核苷酸序列:所述部分编码因子VIII重链和轻链,以及取代B结构域的具有14个氨基酸的短接头(例如含有弗林蛋白酶(furin)裂解位点以有助于在体内活性FVIIIa蛋白的成熟的“SQ”接头),还包括相对于全长人野生型因子VIII序列的五个“X5突变”中的一者或多者(例如I105V/A127S/G151K/M166T/L171P(SPI编号;(SPE编号分别是I86V/A108S/G132K/M147T/L152P))突变中的一者、两者、三者、四者或全部五者),以及/或者插入至取代B结构域的接头(例如SQ接头)中的短糖基化肽。

[0177] 具体来说,X5突变组基于以下事实:在B结构域缺失的基因疗法构建体中用猪氨基酸82-176取代相应人氨基酸增加了在HEK293细胞中表达时的因子VIII活性(W.Xiao,沟通)。将单一猪氨基酸回复突变至人BDD-FVIII构建体中鉴定了A1结构域内促成这个现象的五个氨基酸:I105V、A127S、G151K、M166T和L171P(SPI)。将这些突变的组合引入至人构建体中再现了较大猪取代的改善活性。因此,在一些实施方案中,编码的因子VIII多肽包括一个或多个选自I105V、A127S、G151K、M166T和L171P的氨基酸取代,其中5个氨基酸的整组在许多实施方案中特别有用。

[0178] 在一些实施方案中,因子VIII多肽包括在A1结构域中11个氨基酸的疏水性β片层内的突变,所述β片层与BiP相互作用,增加因子VIII的分泌。举例来说,口袋内的F328S(SPI,F309S SPE)氨基酸取代使因子VIII分泌增加至3倍。变体的编号可在包括信号肽,“信号肽被包括(Signal Peptide Inclusive)”或“SPI”的情况下,或从经加工最终蛋白质序列开始,在“信号肽被排除(Signal Peptide Exclusive)”或“SPE”的情况下来进行。因此,使用SPI编号,突变F328S与F309 SPE突变体相同。通常,本说明书使用SPI编号,但如将由本领域中的人士所了解,任一编号系统都产生相同的一个或多个突变。

[0179] 已知的是其他因子VIII变体会提供有利性质。举例来说,位于A1结构域与C2结构域之间的界面处的残基A108、R121和L2302(SPE)的突变会增加因子VIII的稳定性。举例来说,A108I氨基酸取代引入更好地填充结构域间间隙,从而稳定相互作用的疏水性残基。同样,R121C/L2302C(SPE)双氨基酸取代引入跨越A1-C2结构域的二硫键,从而进一步稳定相互作用。总之,所有三个氨基酸取代都使因子VIII的热稳定性增加到3至4倍。对于综述,参见Wakabayashi等人,J Biol Chem.286(29):25748-55(2011)以及Wakabayashi等人,Thromb Haemost.10(3):492-95(2012)。

[0180] 类似地,位于因子VIII的钙结合结构域内的E113(SPE)的突变会增加FVIII凝固比活性。举例来说,E113A似乎通过FVIII对因子IXa的亲和力增加来增加FXase形成。具体来说,E113A氨基酸取代使FVIII凝固比活性增加至两倍,并且使对因子IXa的亲和力增加至四倍(Biochemistry,41:8485(2002);J.Biol.Chem.,279:12677(2004);以及Biochemistry,44:10298(2005))。

[0181] 取代围绕因子VIII APC裂解位点的一个或多个氨基酸残基(残基331-341(SPE))

会降低由活化的蛋白C达成的因子VIIIa失活,而不影响FVIII活性。举例来说,PQL333-335VDQ (SPE) 氨基酸取代使因子VIII失活降低至1/16。同样,MKN336-339GNQ氨基酸取代使因子VIII失活降低至1/9。当组合时,两个三氨基酸取代(例如PQLRMKN333-339VDQQRGNQ)(分别是SEQ ID NO 34和35)使因子VIII失活降低至1/100(J.Biol.Chem.,282:20264(2007))。因此,在一些实施方案中,编码的因子VIII多肽包括PQL333-335VDQ和/或MKN337-339GNQ (SPE) 氨基酸取代。

[0182] A2结构域界面内的突变也增加因子VIII稳定性。具体来说,使A1-A2和A2-A3结构域界面中的带电荷残基突变会增加因子VIIIa中A2亚单位的稳定性和保留。举例来说,使D519、E665和E1984突变成V或A会产生因子VIII的稳定性增加至多达2倍,并且因子VIIIa的稳定性增加至多达5倍。具体来说,D519A/E665V氨基酸取代提供稳定性增加至3倍;D519V/E665V氨基酸取代提供稳定性增加至2倍,A2解离降低至1/8,并且凝血酶产生潜力增加至2-4倍;D519V/E1984A氨基酸取代提供稳定性增加至2倍;并且D519V/E665V/E1984A氨基酸取代提供稳定性增加至2倍(Blood112:2761-69(2008);J.Thromb.Haemost.,7:438-44(2009))。

[0183] 穿过HC-B结构域界面用七个氨基酸取代六个氨基酸引入了靠近界面引入的另一糖基化位点。因此,在一些实施方案中,m3是相对于FVIII-FL-AA (SEQ ID NO:19),缺失氨基酸AIEPRSF755-761,并且在N754之后插入氨基酸TTYVNRSL (SEQ ID NO:33)(例如AIEPRSF755-761TTYVNRSL) (“TTYVNRSL”以SEQ ID NO:33公开)。相对于野生型因子VIII序列,残基AIEPR755-759落在重链的末端内,而残基S760和F761落在B结构域内。在其中FVIII B结构域被缺失、截短或替换的一些实施方案中,残基S760和F761可不存在于所突变的潜在氨基酸序列中。

[0184] 在额外实施方案中,本公开的多肽和多核苷酸包括m4突变。消除因子VIII中的C1899-C1903二硫键也增加分泌。此外,对于F328S (SPI,F309S SPE) 和C1918G/C1922G氨基酸取代的组合,因子VIII分泌增加是累加的(Miao等人,Blood,103:3412-19(2004);Selvaraj等人,J.Thromb.Haemost.,10:107-15(2012))。

[0185] 在一些实施方案中,进一步改变FVIII重链与轻链之间的连接(例如野生型因子VIII中的B结构域)。由于AAV包装容量的大小限制,B结构域被缺失、截短和/或接头取代的变体应会改善FVIII基因疗法构建体的功效。最惯常使用的取代B结构域的接头是SQ FVIII的接头,其仅保留B结构域的14个氨基酸作为接头序列。另一猪VIII变体(“OBI-1”,描述于美国专利第6,458,563号中)在CHO细胞中良好表达,并且具有24个氨基酸的略微更长接头。在一些实施方案中,由本文所述的密码子改变的多核苷酸编码的因子VIII构建体包括SQ型B结构域接头序列。在其他实施方案中,由本文所述的密码子改变的多核苷酸编码的因子VIII构建体包括OBI-1型B结构域接头序列。

[0186] 在一些实施方案中,本文所述的编码的因子VIII多肽包括SQ型B结构域接头,包括野生型人因子VIII B结构域的氨基酸760-762/1657-1667(Sandberg等人Thromb.Haemost.85:93(2001))。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,SQ型B结构域接头具有一个氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,SQ型B结构域接头具有两个氨基酸取代。在一些实施方案中,糖基化肽插入至SQ型B结构域接头中。

[0187] 在一些实施方案中,本文所述的编码的因子VIII多肽包括Greengene型B结构域接

头,包括野生型人因子VIII B结构域的氨基酸760/1582-1667(Oh等人,Biotechnol.Prog., 17:1999(2001))。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,Greengene型B结构域接头具有一个氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,Greengene型B结构域接头具有两个氨基酸取代。在一些实施方案中,糖基化肽插入至Greengene型B结构域接头中。

[0188] 在一些实施方案中,本文所述的编码的因子VIII多肽包括延长的SQ型B结构域接头(SFSQNPPVLKRHR),包括野生型人因子VIII B结构域的氨基酸760-769/1657-1667(Thim等人,Haemophilia,16:349(2010))。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,延长的SQ型B结构域接头具有一个氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,延长的SQ型B结构域接头具有两个氨基酸取代。在一些实施方案中,糖基化肽插入至延长的SQ型B结构域接头中。

[0189] 在一些实施方案中,本文所述的编码的因子VIII多肽包括猪OBI-1型B结构域接头,包括来自野生型猪因子VIII B结构域的氨基酸SFAQNSRPPSASAPKPPVLRHRHQR(SEQ ID NO:31)(Toschi等人,Curr.Opin.Mol.Ther.12:517(2010))。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,猪OBI-1型B结构域接头具有一个氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,猪OBI-1型B结构域接头具有两个氨基酸取代。在一些实施方案中,糖基化肽插入至猪OBI-1型B结构域接头中。在一些实施方案中,糖基化肽选自图13中所示的那些(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73和75)。

[0190] 在一些实施方案中,本文所述的编码的因子VIII多肽包括人OBI-1型B结构域接头,包括野生型人因子VIII B结构域的氨基酸760-772/1655-1667(FVIII-FL-AA;SEQ ID NO:19)。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,人OBI-1型B结构域接头具有一个氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,人OBI-1型B结构域接头具有两个氨基酸取代。在一些实施方案中,糖基化肽插入至人OBI-1型B结构域接头中。在一些实施方案中,糖基化肽选自图13中所示的那些(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73和75)。

[0191] 在一些实施方案中,本文所述的编码的因子VIII多肽包括O8型B结构域接头,包括来自野生型猪因子VIII B结构域的氨基酸SFSQNSRHQAYRYRRG(SEQ ID NO:32)(Toschi等人,Curr.Opin.Mol.Ther.12:517(2010))。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,猪OBI-1型B结构域接头具有一个氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于相应野生型序列,猪OBI-1型B结构域接头具有两个氨基酸取代。在一些实施方案中,糖基化肽插入至猪OBI-1型B结构域接头中。在一些实施方案中,糖基化肽选自图13中所示的那些(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73和75)。

[0192] 从因子VIII构建体移除B结构域似乎不影响活化的酶(例如FVIIIa)的活性,推测是因为B结构域在活化期间被移除。然而,因子VIII的B结构域含有例如通过N连接的或O连接的糖基化来翻译后修饰的若干残基。对野生型因子VIII B结构域的电子分析(Prediction of N-glycosylation sites in human proteins,R.Gupta,E.Jung和S.Brunak,准备中(2004))预测这些位点中的至少四者在体内被糖基化(图14)。认为B结构域内的这些修饰促进体内因子VIII的翻译后调控和/或半衰期。

[0193] 尽管因子VIII B结构域不存在于成熟因子VIIIa蛋白中,但前体因子VIII分子的B结构域内的糖基化可增加在活化之前蛋白质的循环半衰期。因此,在一些实施方案中,本文

所述的编码的因子VIII构建体的多肽接头包括一个或多个糖基化序列,以允许达成体内糖基化。在一些实施方案中,多肽接头包括至少一个共有糖基化序列(例如N连接的或O连接的糖基化共有序列)。在一些实施方案中,多肽接头包括至少两个共有糖基化序列。在一些实施方案中,多肽接头包括至少三个共有糖基化序列。在一些实施方案中,多肽接头包括至少四个共有糖基化序列。在一些实施方案中,多肽接头包括至少五个共有糖基化序列。在一些实施方案中,多肽接头包括至少6、7、8、9、10个或更多个共有糖基化序列。

[0194] 在一些实施方案中,多肽接头含有至少一个N连接的糖基化序列N-X-S/T,其中X是除P、S或T以外的任何氨基酸。在一些实施方案中,多肽接头含有至少两个N连接的糖基化序列N-X-S/T,其中X是除P、S或T以外的任何氨基酸。在一些实施方案中,多肽接头含有至少三个N连接的糖基化序列N-X-S/T,其中X是除P、S或T以外的任何氨基酸。在一些实施方案中,多肽接头含有至少四个N连接的糖基化序列N-X-S/T,其中X是除P、S或T以外的任何氨基酸。在一些实施方案中,多肽接头含有至少五个N连接的糖基化序列N-X-S/T,其中X是除P、S或T以外的任何氨基酸。在一些实施方案中,多肽接头含有至少6、7、8、9、10个或更多个N连接的糖基化序列N-X-S/T,其中X是除P、S或T以外的任何氨基酸。

[0195] 因子VIII

[0196] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIX多肽。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一些实施方案中,本公开提供了编码因子IX变体的密码子改变的多核苷酸。当于基于AAV的基因疗法构建体中施用,这些密码子改变的多核苷酸提供显著改善的因子IX生物效能(例如活性)。相较于以常规方式加以密码子优化的构建体,密码子改变的多核苷酸还显示改善的AAV病毒粒子包装。

[0197] 皮质类固醇的共同施用

[0198] 在一些实施方案中,用于改善的基因治疗的上述方法还包括与IL6/IL6R信号传导路径和/或NCoR2/SMRT脱乙酰路径的抑制剂共同向人患者施用皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的疗程,例如以例如通过降低受试者的细胞因子和/或趋化因子产生来降低炎症性应答的水平。用于与基因疗法共同施用泼尼松龙或泼尼松的实例方法例如描述于国际专利申请公布第W0 2008/069942号中,所述国际专利申请公布的内容出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。

[0199] 在一些实施方案中,在施用基于病毒的基因疗法载体(例如腺相关病毒(AAV)粒子)之前将皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至人患者。举例来说,在一些实施方案中,在将基于病毒的基因疗法载体(例如AAV粒子)施用至患者之前约一周或约一或两天施用皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,在施用基于病毒的基因疗法载体(例如AAV粒子)之前约一周或约一或两天开始施用皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的疗程,并且在施用基于病毒的基因疗法载体(例如AAV粒子)之后继续。

[0200] 在一些实施方案中,当施用基于病毒的基因疗法载体(例如腺相关病毒(AAV)粒子)时将皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)共同施用至人受试者。举例来说,在一些实施方案中,在同一天施用皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松),例如紧邻在基于病毒的基因疗法载体(例如AAV粒子)的施用之前或之后。在一些实施方案中,在施用基于病毒的基因疗法载体(例如AAV粒子)的同一天施用皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的疗程,并且在

施用基于病毒的基因疗法载体(例如AAV粒子)之后继续。

[0201] 在一些实施方案中,在施用基于病毒的基因疗法载体(例如腺相关病毒(AAV)粒子)之后将皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者。举例来说,在一些实施方案中,在将基于病毒的基因疗法载体(例如AAV粒子)施用至患者之后约一或两天开始施用皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。

[0202] 应注意皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)是口服施用的小分子药物(尽管它还可静脉内施用),因此,在这个情形下的“共同施用”不要求单一溶液含有两种药物。

[0203] 在一些实施方案中,历经至少两周的时期,例如每日或每两天,将皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的疗程施用至患者。在一些实施方案中,历经至少三周的时期施用皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的疗程。在一些实施方案中,在疗程期间,皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的剂量降低。举例来说,在一个实施方案中,疗程以施用每天约60mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)开始,并且随着疗程进展而降低。

[0204] 在一个实施方案中,疗程包括紧接在AAV粒子的输注之后,在疗程的第一周期间将每天约60mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者,在疗程的第二周期间将每天约40mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者,以及在第三周期间将每天约30mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者。

[0205] 在一些实施方案中,疗程包括在第三周之后进一步逐渐缩减皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的施用,例如施用逐渐缩减剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一个实施方案中,皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的逐渐缩减剂量包括相继施用以下剂量(例如在每种浓度下一次或多次剂量):每天约20mg皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)、每天约15mg皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)、每天约10mg皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)和每天约5mg皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。

[0206] 在一个实施方案中,皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的逐渐缩减剂量包括(例如紧接)在完成皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的初始疗程之后,连续5天将每天约20mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者,(例如紧接)在向患者施用20mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的5天之后,连续3天将每天约15mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者,(例如紧接)在向患者施用15mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的3天之后,连续3天将每天约10mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者,以及(例如紧接)在向患者施用10mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的3天之后,连续3天将每天约5mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者。

[0207] 在一个实施方案中,皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的逐渐缩减剂量包括紧接在完成皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的初始疗程之后,连续7天将每天约30mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者,紧接向患者施用30mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的在7天之后,连续7天将每天约20mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者,紧接在向人受试者施用20mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的7天之后,连续5天将每天约15mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者,紧接在向患者施用15mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的5天之后,连续5天将每天约10mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)施用至患者,以及紧接在向患者施用10mg的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的5天之后,连续5天将每天约5mg的皮质类固醇(例如泼

尼松龙或泼尼松)施用至患者。

[0208] 在一些实施方案中,基于在皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的初始疗程结束时,患者是否仍然展现肝脏炎症的体征来确定施用至患者的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)的逐渐缩减剂量的时长,所述体征例如如由转基因的表达降低、表达的治疗性蛋白质的活性表达降低、或肝脏酶增加所指示。

[0209] 在一些实施方案中,患者中肝脏酶的水平增加指示受试者中的肝脏炎症。举例来说,在一些实施方案中,在施用基于病毒的基因疗法载体(例如AAV粒子)之后监测患者中肝脏酶的水平,并且如果检测到肝脏酶的水平增加(例如肝脏酶的量增加超过阈值,例如相较于在施用载体之前或在施用载体之后不久患者中肝脏酶的基线水平),那么向患者施用泼尼松龙或泼尼松的疗程。对于关于用于与基于病毒的基因疗法载体共同施用皮质类固醇的各种方案的更多细节,参见2019年7月19日提交的PCT申请PCT/US19/41802,其内容出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。

[0210] 鉴于由托珠单抗达成的皮质类固醇节约的临床证据,在一些实施方案中,本文所述的方法包括施用抗IL6/IL6R路径抑制剂和低剂量皮质类固醇方案。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天至多30mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天至多25mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天至多20mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天至多15mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天至多10mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天至多7.5mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天至多5mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天至多2.5mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天1mg至每天30mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天1mg至每天20mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。

[0211] 在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天1mg至每天15mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天1mg至每天10mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天1mg至每天7.5mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天1mg至每天5mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天1mg至每天30mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。在一些实施方案中,低剂量皮质类固醇疗法包括每天约1mg、2.5mg、5mg、7.5mg、10mg、12.5mg、15mg、20mg、25mg或30mg的剂量的皮质类固醇(例如泼尼松龙或泼尼松)。

[0212] 与以上描述类似,在一些实施方案中,本文所述的方法包括当与IL6/IL6R路径抑制剂一起施用时低剂量皮质类固醇的初始疗程,随后降低剂量和/或逐渐缩减剂量。在一些实施方案中,持续延长时期施用进一步降低的剂量。然而,在一些实施方案中,不是每日而

是每隔一天、每三天、每周两次、每周、每两周、每月、每季度、每半年、每年以及以此类推来施用进一步降低的剂量。在一些实施方案中,以按需方式施用低剂量皮质类固醇。

[0213] 用于鉴定适合患者的方法

[0214] 在一个方面,本公开涉及一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法,所述方法促进或确保在施用之后基因疗法载体的持续表达。方法包括通过以下中的一者或两者来确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:(i) 评估患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,以及(ii) 评估患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变。如果患者具有SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体指定给患者。

[0215] 在一实施方案中,确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在SMRT/NCOR2或IL-6R基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在SMRT/NCOR2或IL-6R基因中具有突变。

[0216] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的SMRT/NCOR2基因的两个拷贝中使编码的SMRT/NCOR2蛋白的蛋白功能相对于野生型SMRT/NCOR2蛋白功能降低至少75%的突变。

[0217] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中导致IL-6R单倍体缺陷的突变。在一实施方案中,患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中的突变是IL-6R基因中的错义突变。

[0218] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0219] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0220] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0221] 在本公开的另一方面,一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法包括通过评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变

来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型。如果患者在IL-6R基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至患者。

[0222] 在一些实施方案中,确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在IL-6R基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在IL-6R基因中具有突变。

[0223] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中导致IL-6R单倍体缺陷的突变。在一实施方案中,患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中的突变是IL-6R基因中的错义突变。

[0224] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0225] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0226] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0227] 在本公开的另一方面,一种用于用基于病毒的基因疗法治疗患者的方法包括通过评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型。如果患者在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至患者。

[0228] 在一些实施方案中,确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有突变。

[0229] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的SMRT/NCOR2基因的两个拷贝中使编码的SMRT/NCOR2蛋白的蛋白功能相对于野生型SMRT/NCOR2蛋白功能降低至少75%的突变。

[0230] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0231] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII绕道复合物。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0232] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子IX。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0233] 在本公开的另一方面,一种用于治疗患者中与酶活性的水平不足相关的疾病的方法包括通过以下中的一者或两者来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:(i)评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,以及(ii)评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变。如果患者具有SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至患者。如果患者不具有SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变中的任一者或两者,那么将具有酶活性的蛋白质治疗剂施用至患者。

[0234] 在一实施方案中,确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在SMRT/NCOR2或IL-6R基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在SMRT/NCOR2或IL-6R基因中具有突变。

[0235] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的SMRT/NCOR2基因的两个拷贝中使编码的SMRT/NCOR2蛋白的蛋白功能相对于野生型SMRT/NCOR2蛋白功能降低至少75%的突变。

[0236] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中导致IL-6R单倍体缺陷的突变。在一实施方案中,患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中的突变是IL-6R基因中的错义突变。

[0237] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体

包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0238] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII绕道复合物。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0239] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子IX。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0240] 在本公开的另一方面,一种用于治疗患者中与酶活性的水平不足相关的疾病的方法包括通过评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型。如果患者在IL-6R基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至患者。如果患者在IL-6R基因中不具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将具有酶活性的蛋白质治疗剂施用至患者。

[0241] 在一实施方案中,确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在IL-6R基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在IL-6R基因中具有突变。

[0242] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中导致IL-6R单倍体缺陷的突变。在一实施方案中,患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中的突变是IL-6R基因中的错义突变。

[0243] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0244] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII绕道复合物。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基

因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0245] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子IX。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0246] 在本公开的另一方面,一种用于治疗患者中与酶活性的水平不足相关的疾病的方法包括通过评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型。如果患者在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法载体施用至患者。如果患者在SMRT/NCOR2基因中不具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将具有酶活性的蛋白质治疗剂施用至患者。

[0247] 在一实施方案中,确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有突变。

[0248] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的SMRT/NCOR2基因的两个拷贝中使编码的SMRT/NCOR2蛋白的蛋白功能相对于野生型SMRT/NCOR2蛋白功能降低至少75%的突变。

[0249] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0250] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII绕道复合物。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0251] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子IX。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0252] 在本公开的另一方面,一种将基于病毒的基因疗法指定给患者的方法包括通过以

下中的一者或两者来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型：(i) 评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变，以及(ii) 评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变。如果患者具有SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变，那么将基于病毒的基因疗法指定给患者。

[0253] 在一实施方案中，确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在SMRT/NCOR2或IL-6R基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变：从患者获得生物样品，以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在SMRT/NCOR2或IL-6R基因中具有突变。

[0254] 在一些实施方案中，使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的SMRT/NCOR2基因的两个拷贝中使编码的SMRT/NCOR2蛋白的蛋白功能相对于野生型SMRT/NCOR2蛋白功能降低至少75%的突变。

[0255] 在一些实施方案中，使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中导致IL-6R单倍体缺陷的突变。在一实施方案中，患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中的突变是IL-6R基因中的错义突变。

[0256] 在一些实施方案中，基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中，AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中，基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸，其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中，编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0257] 在一些实施方案中，患者患有血友病A，并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中，编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中，基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸，并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中，基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸，并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0258] 在一些实施方案中，患者患有血友病B，并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中，相对于野生型因子IX序列，编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中，基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸，并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0259] 在本公开的另一方面，一种将基于病毒的基因疗法指定给患者的方法包括通过评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型。如果患者在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变，那么将基于病毒的基因疗法指定给患者。

[0260] 在一些实施方案中，确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成

的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有突变。

[0261] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的SMRT/NCOR2基因的两个拷贝中使编码的SMRT/NCOR2蛋白的蛋白功能相对于野生型SMRT/NCOR2蛋白功能降低至少75%的突变。

[0262] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0263] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0264] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0265] 在本公开的另一方面,一种将基于病毒的基因疗法指定给患者的方法包括通过评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型。如果患者在IL-6R基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法指定给患者。

[0266] 在一些实施方案中,确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在IL-6R基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在IL-6R基因中具有突变。

[0267] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中导致IL-6R单倍体缺陷的突变。在一实施方案中,患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中的突变是IL-6R基因中的错义突变。

[0268] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括

至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0269] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0270] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0271] 在本公开的另一方面,一种用于为患者中与酶活性的水平不足相关的疾病指定治疗的方法包括通过以下中的一者或两者来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型:(i) 评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,以及(ii) 评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变。如果患者具有SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法指定给患者。如果患者不具有SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变或IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变中的任一者或两者,那么将通过施用具有酶活性的多肽进行治疗指定给患者。

[0272] 在一实施方案中,确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在SMRT/NCOR2或IL-6R基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在SMRT/NCOR2或IL-6R基因中具有突变。

[0273] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的SMRT/NCOR2基因的两个拷贝中使编码的SMRT/NCOR2蛋白的蛋白功能相对于野生型SMRT/NCOR2蛋白功能降低至少75%的突变。

[0274] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中导致IL-6R单倍体缺陷的突变。在一实施方案中,患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中的突变是IL-6R基因中的错义突变。

[0275] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0276] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子

VIII多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII绕道复合物。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0277] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子IX。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0278] 在本公开的另一方面,一种用于为患者中与酶活性的水平不足相关的疾病指定治疗的方法包括通过评估所述患者是否在白介素-6受体(IL-6R)基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型。如果患者在IL-6R基因中具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法指定给患者。如果患者在IL-6R基因中不具有与降低的IL-6R功能相关联的突变,那么将通过施用具有酶活性的多肽进行的治疗指定给患者。

[0279] 在一实施方案中,确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在IL-6R基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在IL-6R基因中具有突变。

[0280] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中导致IL-6R单倍体缺陷的突变。在一实施方案中,患者的IL-6R基因的至少一个拷贝中的突变是IL-6R基因中的错义突变。

[0281] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0282] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII绕道复合物。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0283] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子IX。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载

体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0284] 在本公开的另一方面,一种用于为患者中与酶活性的水平不足相关的疾病指定治疗的方法包括通过评估所述患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变来确定所述患者是否具有使所述患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型。如果患者在SMRT/NCOR2基因中具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将基于病毒的基因疗法指定给患者。如果患者在SMRT/NCOR2基因中不具有与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变,那么将通过施用具有酶活性的多肽进行治疗指定给患者。

[0285] 在一实施方案中,确定患者是否具有使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括通过例如以下方式来确定患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有与增加的对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染的敏感性相关联的突变:从患者获得生物样品,以及对所述生物样品进行基因分型测定以确定患者是否在SMRT/NCOR2基因中具有突变。

[0286] 在一些实施方案中,使患者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型包括患者的SMRT/NCOR2基因的两个拷贝中使编码的SMRT/NCOR2蛋白的蛋白功能相对于野生型SMRT/NCOR2蛋白功能降低至少75%的突变。

[0287] 在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一实施方案中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)载体。在一些实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括具有编码治疗性蛋白质的核酸序列的多核苷酸,其中编码所述治疗性蛋白质的所述核酸序列包括至少10个CG二核苷酸。在一些实施方案中,编码治疗性蛋白质的核酸序列包括至少25个CG二核苷酸、至少30个CG二核苷酸、至少35个CG二核苷酸、至少40个CG二核苷酸、至少50个CG二核苷酸、或在这些数目中的任何两者之间的任何其他数目的CG二核苷酸。

[0288] 在一些实施方案中,患者患有血友病A,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子VIII多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子VIII绕道复合物。在一实施方案中,编码的因子VIII多肽是B结构域缺失的因子VIII多肽。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子VIII多肽的因子VIII多核苷酸,并且所述因子VIII多核苷酸包括核酸序列CS04+NG5+X5。

[0289] 在一些实施方案中,患者患有血友病B,并且基于病毒的基因疗法载体编码因子IX多肽。在一实施方案中,蛋白质治疗剂包括因子IX。在一实施方案中,相对于野生型因子IX序列,编码的因子IX多肽具有R338L氨基酸变化。在一实施方案中,基于病毒的基因疗法载体包括编码因子IX多肽的因子IX多核苷酸,并且所述因子IX多核苷酸包括核酸序列CS06。

[0290] 实施例

[0291] 实施例1-对用腺相关病毒血清型8-因子IX(AAV8-FIX)基因疗法治疗的患者的全外显子组测序揭示持续转基因表达的潜在决定因素

[0292] 在I/II期临床试验中研究FIX基因疗法在患有血友病B的患者中的安全性和动力学以评估治疗对FIX活性水平和出血率的影响,并且监测患者。

[0293] 首次人体I/II期前瞻性多中心开放标签研究(NCT01687608)采用了非随机化(未

混合单臂研究) 单次升高剂量设计以评估FIX基因疗法构建体FIX Padua基因疗法在患有血友病B的成人中的安全性和动力学。研究根据良好临床规范 (Good Clinical Practice) 的标准和赫尔辛基宣言 (Declaration of Helsinki) 的原则进行。从所有临床场所的机构审查委员会获得了伦理核准。研究方案由美国国立卫生研究院重组DNA咨询委员会 (US National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee)、美国食品与药物管理局 (US Food and Drug Administration) 和美国国立心脏、肺和血液研究所 (US National Heart, Lung and Blood Institute) 审查。所有患者都提供了关于研究参与以及关于全外显子组测序的书面知情同意书。

[0294] 研究包括患有血友病B (FIX≤2% ; 第一群组是<1%) , >150天暴露于外源性FIX浓缩物, 并且每年有≥3次需要FIX替代的出血或定期使用FIX预防来防止出血的男性患者 (年龄是18至75岁)。如果患者具有肝病、活动性肝炎病毒感染、或HIV控制不良、或针对AAV8的中和抗体 (抗体滴度<1:5) 的迹象 (对于合格性准则的完整清单, 参见表3) , 那么将他们排除。合格患者从2013年1月至2016年7月入组, 并且经受筛选 (对于实验室筛选评估的完整清单 [表S2] , 参见补充材料, 所述完整清单包括关于血清细胞因子、AAV8和AAV2 NAb以及抗原特异性IFN- γ 酶联免疫斑点 [ELISPOT] 测定的方法细节) 。

[0295] 表3. 研究纳入和排除准则

[0296]	纳入准则	排除准则
	1. 年龄 18-75 岁的男性, 包括 18 和 75 岁	1. 除血友病 B 以外的一种或多种出血病症
	2. 确定的血友病 B, 每年有≥3	2. 针对 FIX 蛋白的抑制剂的家

[0297]

次需要用外源性 FIX 治疗的出血;或由于频繁出血发作史而使用 FIX 预防	族史,或在任何时间的具有产生的针对 FIX 蛋白的抑制剂(在任何单一测试时 ≥ 0.6 毕提斯达单位(Bethesda Unit))的个人实验室证据
3. 血浆 FIX 活性 $\leq 2\%$ (第一群组是 $< 1\%$; 于是符合方案)	3. 有文件记载的先前对任何 FIX 产品的过敏反应
4. > 150 天暴露于外源施用的 FIX 的历史	4. AAV8 中和抗体滴度高于 1:X
5. 正常凝血酶原时间(PT)	5. ELISPOT 阳性
6. 活动性丙型肝炎病毒(HCV)阴性,定义为丙型肝炎病毒抗体阴性和关于血浆丙型肝炎病毒核糖核酸(RNA)的聚合酶链式反应(PCR)测试阴性(不可检测),或如果丙型肝炎病毒抗体阳性,那么相隔至少 3 个月的 ≥ 2 次的关于血浆 HCV RNA 的连续 PCR 测试必须是阴性(不可检测),并且在筛选时是阴性	6. 指示可能的自身免疫介导的肝炎的血清标志: • 抗核抗体(ANA)滴度$> 1:180$ • 抗平滑肌抗体测定结果≥ 40 (Inova QUANTA Lite™ 肌动蛋白免疫球蛋白[IgG]酶联免疫吸附测定[ELISA]); 31-39 的值将被标记为可能异常,并且 PI 和医学监查员将评估受试者的合格性 • 抗肝肾微粒体 1 型抗体(LKM1)滴度升高 • 总 IgG $> 2 \times \text{ULN}$ (除非受人免疫缺陷病毒[HIV]共感染)
7. 能够成为孩子的父亲的男子必须同意使用屏障避孕(避孕套和杀精子剂的组合)或限制与绝经后、手术绝育、或实施避孕的伴侣的性交,持续在施用 AskBio009 之后的至少 6 个月或直至 AskBio009 基因组不再于精液中检测到,以较早者为准	7. 在第 0 研究日之前 72 小时内接受了全身性免疫抑制疗法
8. 签署知情同意书	8. 乙型肝炎表面抗原阳性
9. 愿意并且能够维持关于出血发作的日记以及居家/门诊 FIX 蛋白使用的个人记录	9. HIV 感染和: • CD4 细胞计数< 350 个细胞/mm³ (如果未收集 CD4, 那么必须具有在筛选的 30 天内

[0298]

	HIV 感染呈阴性的文件记载), 或 • 在第 0 研究日之前 6 个月内存在抗逆转录病毒疗法方案的变化, 或 • ALT 或 AST >1.5 x ULN
10. 愿意并且能够遵守方案的其他要求, 包括提供精液样品	10. 除 HIV 以外的已知免疫病症 (包括骨髓瘤或淋巴瘤)
	11. 如由以下中的一者或多者证实的肝性炎症或外显性或隐匿性肝硬化标志: • 血小板计数 <175,000/μL • 白蛋白 $\leq$3.5 g/dL • 总胆红素 >1.5 x ULN 以及直接胆红素 $\geq$0.5 mg/dL • 碱性磷酸酶 >2.0 x ULN • ALT 或 AST >2.0 x ULN (受 HIV 感染的受试者除外, 根据排除 8) • 过去的肝活检指示中度或重度纤维化 (Metavir 分期是 2 或更高) • 腹水、静脉曲张、静脉曲张出血或肝性脑病史
	12. 绝对嗜中性粒细胞计数 (ANC) <1000 个细胞/mm ³
	13. 血清肌酸酐 >1.5 mg/dL
	14. 尿蛋白 >1+
	15. 肌酸激酶 (CK) >2.5 x ULN
	16. 身体质量指数 >35
	17. 先前接受了腺相关病毒 (AAV) 载体
	18. 在第 0 研究日之前 12 个月内接受了任何其他基因转移剂
	19. 在入组之前 30 天内或在研究性药物在血液中的 5 个半衰期内接受了研究性干预或参与了另一临床试验, 以较长久

[0299]		者为准
		20. 在第 0 研究日之前 30 天内接受了全身性抗病毒和/或干扰素疗法(除针对 HIV 的治疗之外)
		21. 在第 0 研究日之前 12 个月内接受了用于治疗赘生疾病或其他病症的化学疗法或生物疗法
		22. 如由研究者所确定, 在第 0 研究日之前 30 天内的临床重大感染
		23. 在第 0 研究日之前 3 个月内进行了, 或在第 0 研究日之后 6 个月内计划有大手术或矫形手术程序
		24. 如由研究者所确定, 将不利地影响受试者安全性或可阻碍受试者进行如由方案所需的皮质类固醇治疗的预防性施用、或顺应性或研究结果解释的急性或慢性疾病
		25. 如由研究者所确定, 可能损害受试者遵守方案要求的程序的能力的精神病或认知功能异常(包括药物或酒精滥用)的新近史

[0300] FIX基因疗法表达盒由侧接有AAV2源性反向末端重复序列(ITR)的自身互补性转基因、肝特异性转甲状腺素蛋白(TTR)启动子/增强子和高活性FIX(R338L)Padua变体组成(图1)。使用在WAVE生物反应器系统(GE Healthcare,Piscataway,NJ,USA)中生长的悬浮HEK293细胞的三质粒转染方案,在北卡罗来纳大学教堂山分校医学院(UNC)载体核心研究室制造良好制造规范FIX基因疗法构建体。通过Q-PCR和斑点印迹测定来测定载体滴度。

[0301] 指定入组患者接受3个升高剂量群组中的1者的单次i.v.输注FIX基因疗法构建体:1) 2.0×10^{11} 个载体基因组(vg)/kg;2) 1.0×10^{12} vg/kg;3) 3.0×10^{12} vg/kg。容许患者在研究期间根据需要接受护理标准血友病B治疗(包括用于按需治疗出血发作以及/或者预防的外源性FIX蛋白)。

[0302] 主要结局指标是根据剂量群组对不利事件的评估以及从基线开始的实验室评估变化。次要结局指标包括在输注后指定时间点,对体液(血液、唾液、尿、粪便和精液)中载体脱落的监测,以及对针对FIX Padua(R338L)转基因产品和针对AAV8衣壳蛋白的全身性IR

(体液性和细胞性)的评估。还测定了针对wt FIX和FIX Padua的结合Ig抗体。此外,测量了在FIX基因疗法构建体输注之前以及之后24小时血液中的循环肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和白介素-6 (IL-6) 水平(更多细节在补充材料中)。

[0303] 次要功效结局包括从输注前基线开始的FIX活性和FIX蛋白水平变化。在标准一步FIX活性测定中测量FIX活性,使用Siemens BCS-XP自动化分析仪和作为aPTT活化剂的鞣花酸(ellagic acid),在中心实验室(Esoterix, Inc. Englewood, Colorado)进行。这个测定还形成用于考查含有wt FIX的血浆中以及含有FIX Padua的血浆中的凝固抑制的毕提斯达抑制剂测定的基础。先前已描述用以定量来自患者血浆的样品的FIX Padua蛋白的转基因产物特异性ELISA的开发。还将研究期间的出血发作频率和严重性以及外源性FIX产品的使用与对于12个月的研究前时期收集的数据进行比较。

[0304] 人Luminex试剂盒由Millipore® (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) 定制设计。所述试剂盒提供作为测定的标准物的相应分析物的即用型混合物。根据制造商方案进行测定。简要来说,将标准物用250 μ l去离子水复原以获得所有细胞因子的10000pg/ml浓度。将小瓶倒置多次以进行混合,并且保持在冰上直至使用。质量控制物(低和高)是试剂盒的组成部分,并且相应质量控制范围由制造商提供。将两种质量控制物(低和高)用250 μ l去离子水(低和高)复原。在悬浮阵列多路系统(Bio-Plex® 200系统, BioRad®)上测量样品。分析了以下参数:细胞因子(干扰素[IFN] α 2、IFN γ 、白介素[IL]-10、IL-12p70、IL-13、IL-17A、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1[MCP-1]、巨噬细胞炎症性蛋白-1 α [MIP-1 α]、肿瘤坏死因子 α [TNF α]、转化生长因子- β 1[TGF- β 1]、可溶性CD40配体[sCD40L]和干扰素 γ 诱导蛋白10[IP-10];肝参数(γ -谷氨酰基转移酶[GGT]、碱性磷酸酶、铁、铁蛋白、总蛋白、白蛋白、 α -1-球蛋白、 α -2-球蛋白、 β -球蛋白、 β -1-球蛋白、 β -2-球蛋白、 γ -球蛋白、 α -1-胎蛋白和C-反应蛋白[CRP])。

[0305] 使用 4×10^{12} vg/kg,将C57BL6小鼠(Charles River Laboratories)用FIX基因疗法构建体载体以及用下一代CpG消减的载体来免疫。在激发之后四周,使用针对小鼠加以改变的以上描述的中和抗体测定来评估抗AAV8中和抗体(NAb)。

[0306] 研究一些患者中转基因表达的丧失的根源分析包括比较用富含CpG的AAV8载体注射的小鼠中相对于用CpG消减的AAV8载体注射的小鼠中的AAV8中和抗体滴度(Nab)。

[0307] 用于AAV8和AAV2的中和Ab的测定(体外转导抑制测定)

[0308] 在筛选期间以及在FIX基因疗法构建体输注之后定期测定血清中针对AAV8衣壳的中和抗体(NAb)的存在。在每个时间点,还测定针对AAV2的NAb;人是AAV2的天然宿主,并且预期约半数的所筛选成人将具有预先存在的抗AAV2 Nab。体外转导抑制测定如先前所述用于测定来自研究受试者的血清抑制通过AAV在细胞培养中进行的荧光素酶标记基因转移的潜力。将受试者血清的连续两倍稀释液与AAV. 荧光素酶1:1混合,并且在37°C下孵育2小时,接着用于在组织培养中感染Huh7细胞(其容许由AAV2与AAV8两者达成的感染)。在24小时感染之后,将虫荧光素作为表达的荧光素酶的底物添加至细胞中,并且通过光度计定量荧光素酶活性。将受试者的血清的导致抑制 $\geq 50\%$ 的荧光素酶活性(相较于无血清对照)的最高稀释度记录为NAb滴度。

[0309] 使用外周血液单个核细胞(外周血液T淋巴细胞, PBMC)的IFN γ 释放酶联免疫斑点测定,在基线时以及在FIX基因疗法构建体输注之后连续评估对针对AAV8衣壳和FIX Padua

的T细胞应答的评估。产生 (Mimotopes) 在序列方面重叠10个氨基酸的15聚体肽的文库以跨越整个AAV8衣壳VP1蛋白,并且分成3个池 (AAV8抗原池1-3)。此外、产生 (Mimotopes) 在序列方面重叠10个氨基酸的15聚体肽的文库以跨越整个FIX R338L蛋白蛋白,并且分成2个池 (FIX R338L抗原池1和2)。作为细胞活力的阳性对照,在1 μ g/ml的最终浓度下测试白细胞凝集素PHA-L。作为多克隆活化的阳性对照,在5ng/ml PMA和2mM离子霉素最终浓度下测试PMA-离子霉素。对于每个板,还针对包含由CMV、EBV和流感病毒获得的表位池的CEF (Cellular Technology Limited) 运行参考对照。将完全淋巴细胞培养基 (具有10%FBS的RPMI) 作为阴性反应性对照加以测试。在预期的细胞培养之前一天,将多孔板用处于无菌PBS中的人IFN γ 包被抗体 (Mabtech) 包被过夜。在细胞培养的当天,将板用PBS洗涤,并且用完全培养基封闭。将来自研究受试者的新鲜PBMC在淋巴细胞培养基中调整至 2×10^6 个细胞/毫升的浓度,并且将100 μ l的细胞悬液添加至含有等体积的抗原 (或对照) 的孔中。在37 $^{\circ}$ C下刺激 (孵育) 18-24小时之后,洗涤细胞培养板,并且与人IFN γ HRP检测抗体 (Mabtech) 一起孵育,继之以与亲和素-HRP一起孵育,并且随后与AEC显色试剂一起孵育。在孵育五分钟之后终止显色,将板干燥,并且使用AID Elispot读取器ELR03定量人IFN γ 活化计数。

[0310] 定量实时聚合酶链式反应 (qPCR) 用于在治疗后第1研究日以及在每周间隔下检测全血、唾液、精液、尿和粪便中的FIX基因疗法构建载体基因组,直至连续2个样品低于检测限。

[0311] 在有书面知情同意书的情况下,提取来自接受FIX基因疗法构建体的8名患者的基因组DNA以用于全外显子组测序。在研究期间以及持续>4年的随访具有持续高水平FIX表达的患者 (患者5) 用作索引受试者。进行变异分析以将来自在FIX基因疗法构建体输注之后未能维持FIX转基因表达的7名患者的外显子组序列与来自索引患者5的外显子组序列进行比较。使用QIAamp DSP DNA血液小型试剂盒 (Qiagen) 从EDTA处理的全血样品提取基因组DNA。根据制造商说明书,使用TruSeq快速捕获外显子组文库试剂盒 (Illumina) 对每个样品进行外显子组富集。构建每个样品的片段化DNA文库,并且使用Illumina HiSeq2000测序平台以100bp双端模式进行高通量测序。每个碱基125-180个读段的平均测序深度满足对于确信变体鉴定推荐的测序深度。使用Burrows-Wheeler Aligner将测序的读段与GRCh37比对。用Picard工具 (<http://picard.sourceforge.net>) 标记重复读段,同时利用GATK进行插入/缺失重比对和碱基质量评分重校正。使用GATK程序包内的Snpeff工具进行变体识别。使用Ingenuity变异分析工具 (Qiagen) 进行变体优先性排序。使用作为一种用以对人基因组中单核苷酸变体和插入/缺失的可能有害性评分的方法的组合注释依赖性消减 (CADD) 来评估患者5的全外显子组序列与其他受试者的全外显子组序列之间的变化。CADD通过将在自然选择中存活的变体与模拟的突变相对比来提供将多个变体注释工具整合成单一量度的框架。被观察到的可能性较小 (未在自然选择中存活) 的变体得到较高评分,所述评分与变体是有害的可能性的程度相关联。

[0312] 为评估FIX基因疗法构建载体中的CpG寡脱氧核苷酸序列充当推定的能够加强适应性抗AAV免疫应答的先天性免疫信号的潜力,产生了表达密码子优化的FIX cDNA的额外基因疗法载体。这些载体全都是包装由相同AAV2 ITR序列侧接的FIX Padua编码序列的scAAV8载体,其中表达由相同TTR启动子/增强子和转录调控元件驱动。载体仅在FIX Padua表达盒中CpG元件的数目方面不同,如下所详述:FIX基因疗法构建体中有99个CpG;载体

ODN0中有零个CpG (Blue02) ;载体ODN3中有3个CpG。另外,使用由Nathwani等人 (Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. Blood 2006;107:2653-61.) 报道的密码子优化的FIX基因序列合成了Gray01基因序列。

[0313] 所有动物实验都由机构动物护理和使用委员会核准。所有动物实验都在止血正常的雄性C56Bl/6小鼠中进行。在8-10周龄时,小鼠接受单次尾部静脉注射 4×10^{12} vg/kg的FIX基因疗法构建体,或CpG降低的scAAV8 FIX表达载体中的一者 (n=6-8只小鼠/处理组/实验)。考查了三个单独临床生产批次的FIX基因疗法构建体。在载体输注之后,在第26天时将小鼠处死。收集血液以考查抗AAV8中和抗体 (NAb) 的形成,作为适应性免疫性 (抗体产生) 是否由于基因疗法载体中TLR9配体CpG的富集而加强的标志。

[0314] 结果

[0315] 年龄是20-69岁 (平均[SD]年龄30.5[15.98]岁;6/8年龄<30岁) 的八名男性在筛选时有资格纳入研究,并且入组至3个剂量群组中的1者中 (图1)。七名患者是白种人,并且1名是黑种人/非裔美国人;3名患者就FIX抗原交叉反应性物质 (CRM) 来说呈阳性。没有患者具有活动性HIV或HCV的血清学证据 (2名患者具有抗HCV抗体,但根据PCR就活动性HCV RNA来说全都呈阴性)。所有患者的AAV8 NAb水平都是不可检测,但在2名患者中检测到针对AAV2的NAb (滴度:分别是1:10和1:5) (图1)。在筛选时在患者7中检测到对AAV8的循环外周血液单个核细胞 (PBMC) 应答。

[0316] 在全身性FIX基因疗法构建体输注期间或在输注后8小时时期中没有生命体征或血清/血液学参数异常被报告。最低剂量群组中的一名患者具有1级过敏反应,此在30分钟内消退。没有患者中断他的输注。报告了最高剂量群组中1名患者在输注后4小时与8小时之间血清IL-6无症状升高,在输注后24小时返回至基线 (图8)。

[0317] 报告了3名患者中的四起SAE:横纹肌溶解、扁桃体的细菌性感染、扁桃体出血和扁桃体的鳞状细胞癌 (关于这最后一事件的叙述性信息提供在补充信息中);其全都被视为与FIX基因疗法构建体无关。十起AE (在4名患者中) 被视为可能与研究治疗相关。在这些AE之中,7起在严重性方面是轻度的 (疲劳、感觉潮红、头痛、流感样症状、踝部肿胀、肝脏酶升高和高血压),并且3起是中度的 (肝脏酶升高、脓肿和疲劳)。

[0318] 测量了尿、精液、唾液、粪便和全血中的载体基因组,其中峰值浓度和脱落持续期在3个群组中广泛地显示剂量依赖性 (表4)。除全血之外,没有患者在第4周 (精液、粪便) 至第5周 (唾液、尿) 之后显示体液中的脱落。来自血液的载体信号在群组1和2中丢失,但在最高剂量群组中在12个月访视时仍然高于检测限。

[0319] 表4. 体液中wt FIX载体基因组的脱落

样品	持续期(天)		
	群组 1 (2.0×10^{11} vg/kg)	群组 2 (1.0×10^{12} vg/kg)	群组 3 (3.0×10^{12} vg/kg)
[0320] 血液	155.0	330.0	NR
唾液	11.5	23.8	35.5
精液	8.5	22.3	26.0
粪便	18.5	21.7	28.5

[0321] NR, 未达到

[0322] 根据给药群组的在体液中检测到WT FIX基因组的平均天数。对于取自最高给药群组中的患者的全血样品, 在12个月访视时, WT FIX基因组仍然高于检测水平。

[0323] 除群组1中治疗的第一名患者之外, 所有患者都显示载体源性hFIX表达, 此在较高剂量群组中截至FIX基因疗法构建体输注之后第1-2周是明显的(图2), 并且在无血栓形成性或对FIX Padua的细胞性和体液性IR的证据的情况下发生。FIX基因疗法构建体源性FIX表达是剂量依赖性的(图2和图3)。平均(范围)峰值FIX活性是群组1中的3.5% (3-4%), 群组2中的13% (3-25%), 以及群组3中的45% (32-58%)。在峰值表达时, 在基线时是FIX CRM阴性的患者中的FIX比活性证明了源于功能获得FIX Padua(而非野生型FIX)的循环凝血活性(图2)。采用FIX Padua特异性ELISA确证了所有(CRM+和CRM-)患者的转基因特异性表达, 因为FIX Padua抗原水平与测量的FIX活性, 而非与用标准FIX ELISA测定测量的FIX抗原水平相关联(图2)。

[0324] 在群组1中, 患者2截至第4周实现2-3%FIX活性, 并且暂时停止预防。群组2中的所有4名患者都经历了显著水平的FIX活性, 但具有可观的患者间变异性。患者3显示了FIX活性, 其中在第11周时具有16.9%的峰值, 但在第12周时经历了FIX表达的急性丧失, 并且随后重新开始预防性治疗。患者4具有约7%的初始峰值FIX活性水平, 所述水平随后在第6周与第7周之间下降; 他也重新开始替代疗法。患者8接受预防性皮质类固醇; 前6个月实现2-3%的FIX活性。患者5在第7周时实现约20%的FIX活性, 并且是持续>4年的随访具有在不存在出血或FIX蛋白输注下实现的持续活性的唯一患者(图2)。尽管患者3与患者4两者均急性地丧失了峰值表达的>80% (历经约2周), 但两名患者都不显示增加的肝转氨酶、应答于载体或转基因的T细胞活化(抗原特异性IFN- γ ELISPOT)、针对FIX或针对FIX Padua的抑制剂或非中和抗体的产生、与这个丧失一致的其他症状/实验室扰动。

[0325] 在最高剂量群组中, 患者6截至第6周实现58.5%的峰值FIX活性, 这与AAV衣壳引导的T细胞活化的增加一致。在第7周时发生FIX活性的急剧下降, 伴有肝转氨酶的增加和进一步T细胞活化。根据方案, 在72小时内启动用泼尼松治疗, 从而导致肝脏酶和ELISPOT结果的快速正常化。FIX活性未恢复, 并且患者重新开始预防性FIX输注。患者7截至第5周超过30%FIX活性。他在经历在第6周时肝脏酶的略微升高以及FIX活性突然丧失之后开始采用泼尼松; 然而, FIX活性继续下降(图2)。

[0326] 在FIX基因疗法构建体输注之后的包括峰值因子表达的时期的12个月随访时期期间, 相较于前一年, 外源性FIX消耗似乎降低(6/8患者中年度FIX使用降低, 并且7/8患者中

每个月FIX输注的次数降低)。因子消耗的最大降低似乎发生在来自最高剂量群组的患者中(图5)。

[0327] 针对载体的AAV8特异性T细胞应答

[0328] AAV8特异性细胞毒性T细胞应答被认为会杀灭经转导肝细胞。然而,仅有在最高剂量群组中的两名患者具有关于AAV8衣壳反应性T细胞的强烈ELISPOT信号,并且这些研究结果不伴有AE(图2)。在患者6中皮质类固醇疗法的启动伴有IFN- γ ELISPOT的立刻正常化,但在患者7中在启动泼尼松之后,这个信号持续数周保持升高。

[0329] 在患者6和7中响应于ALT升高,并且在患者8中作为预防来启动的全身性皮质类固醇施用不起维持这些患者中的FIX活性水平的作用(图2)。

[0330] 在给药之后多达5-8个月测定患者的血浆样品的18种细胞因子和15种肝参数未揭示关于为何仅有1名患者5选择性地显示稳定FIX Padua表达超过4年(数据未显示)的任何结论性提示。

[0331] 具有CpG簇的载体化表达盒可能通过tol样受体9 (TLR9) 活化先天性免疫系统,从而对转基因表达具有潜在负性影响。因为FIX基因疗法构建体中的FIX Padua转基因含有99个CpG基序,从而产生具有升高的CpG二核苷酸密度的CpG岛。在动物模型中测试了这个假设,其中通过测量针对AAV8的NAbs的滴度来间接分析先天性免疫系统的载体依赖性活化。当用FIX基因疗法构建体或携带CpG消减的FIX Padua转基因的FIX基因疗法构建体样构建体激发动动物时,用FIX基因疗法构建体处理的动物中针对AAV8的NAbs滴度增加(图4)。这些数据表明CpG基序的数目增加确实可驱动能够加强靶向载体的适应性免疫性的先天性免疫信号传导。

[0332] 为了解载体的潜在免疫原性可如何转换为患者5的稳定表达,假设遗传变异可能已促进了患者5未能发动抗AAV8免疫应答,从而有助于显示的长期转基因表达。因此,研究了通过全外显子组测序确定的在所有患者中在基因组的编码区内的潜在遗传变异。

[0333] 基于鉴定的基因、突变内的已知变体的表型表现的先前知识,以及根据SIFT、PolyPhen-2和组合注释依赖性消减(CADD)算法值来评估鉴定的变体。所有三种方法都预测人基因组中单核苷酸变体和插入/缺失的有害性。尽管不存在为患者5的基因组所特有的纯合基因变体,但发现了若干独特杂合性和复合杂合性变体(图9)。基于当前知识,此处描述的鉴定的变体中的两者可潜在地以较高概率影响转基因表达(图2)。

[0334] 一个是复合杂合性基因变体,其涉及SMRT/NCOR2(“类视黄醇或甲状腺激素受体-2的沉默介体/核受体辅阻遏物2”)基因的两个等位基因中的重复,具体来说是p.Q508-509dup和p.Q507-509dup。鉴定的变体的CADD评分指示中度有害性风险(图2和图9)。SMRT/NCOR2为核受体辅阻遏物复合物形成所需,所述复合物通过与位点特异性转录因子的相互作用被募集至一组靶标基因以通过募集一般性染色质修饰酶来介导转录沉默。

[0335] 通过外显子组测序鉴定的另一变体是编码白介素-6的受体的IL-6R基因中的杂合性错义突变变体c.344A>C, p.A115E。IL-6结合结构域内的这个丙氨酸被谷氨酸取代产生了26.1的CADD评分,所述CADD评分是对IL-6受体功能的有害性的概率极高的特征(图2和图9)。此外,先前已有文件记载人和小鼠中IL-6R的单倍剂量不足,从而表明在患者5中鉴定的遗传变体可能降低对由高载量的AAV8衣壳引起的IL-6介导的炎症性应激的敏感性,并且保护靶向的肝细胞免遭应激诱导的死亡。

[0336] 在8名成年男性血友病B患者的这个I/II期临床剂量逐步升高研究中,基于AAV8的FIX Padua FIX基因疗法构建体基因疗法在所有患者中都良好耐受。在1年研究或后续随访期间,不存在显著的输注相关或后续安全性异常,没有血栓形成,并且没有抑制剂或其他FIX Padua引导的免疫性的证据。用被设计来降低免疫原性空AAV衣壳污染物的FIX基因疗法构建体载体构建体治疗导致在8名患者中的7名中成功转导密码子优化的FIX Padua转基因以及升高FIX表达。FIX基因疗法构建体施用与明确地由转基因产物的表达引起的峰值FIX:C活性的剂量依赖性增加相关联,如通过FIX Padua特异性ELISA所证明。在FIX基因疗法构建体基因疗法之后在患者中的功能性FIX Padua表达导致因子消耗降低,这与在动物研究中以及在接受不同的基于AAV8的FIX Padua载体的患有血友病B的患者中的这个成果一致。

[0337] 一名患者在无出血或不使用FIX替代疗法>4年的情况下实现持续FIX表达,治疗性FIX活性是约20%。然而,在具有可测量FIX Padua表达的其他患者中,FIX活性未维持超过5-11周。

[0338] 在输注之后前几个月内转基因表达水平的急性丧失,经常伴有肝脏酶升高(来自患者6的结果例示),也已在其他AAV载体血友病基因疗法试验中报道。这个临床无症状的肝细胞毒性(类似于自身免疫肝炎),与基因表达的急性丧失一致,已归因于载体剂量依赖性衣壳引导的细胞IR。实际上,最强烈的ELISPOT和转氨酶信号是在这个研究的最高剂量群组中测量到的,并且支持与载体剂量的关系,这根据先前试验是明显的。

[0339] 不同于其中限制FIX表达的衣壳引导的适应性IR可通过免疫抑制来管理的其他AAV FIX基因疗法研究,在这个研究中,FIX活性不可通过皮质类固醇预防或挽救来维持。在费城儿童医院(Children's Hospital of Philadelphia)进行的AAV8 FIX基因疗法研究类似地报道了3名具有不可通过免疫抑制来挽救的载体衣壳IR的患者,并且尚未证明在接受针对血友病的AAV基因疗法的所有患者中ALT正常化、类固醇免疫抑制和因子表达的稳定化之间的明确关系。

[0340] 被进行来考查对采用FIX基因疗法构建体的FIX表达的免疫原性丧失的替代性解释的分析已提供来自在小鼠中刺激的NAb滴度的以下证据:FIX基因疗法构建体中FIX cDNA编码序列的较高CpG寡脱氧核苷酸(ODN)含量(在密码子优化期间引入)可促进增加载体的免疫原性,因为相对于FIX基因疗法构建体,应答于CpG降低的载体构建体产生了较低NAb滴度。肝定向AAV基因疗法的动物模型不预测或再现在临床上观察到的针对AAV的CTL IR,此使得难以对这些应答建模。因此,这些模型用于评估类似FIX表达性载体的比较免疫原性的有效性是不明确的。

[0341] 有确定证据证明CpG作为PAMP通过TLR9进行信号传导以刺激先天性IR的免疫原性,所述先天性IR接着有助于产生强烈适应性IR。这个知识已应用于开发转基因DNA疫苗,其中CpG ODN基序被故意地工程改造至序列中以提供佐剂效应。此外,已证明AAV载体会上调通过TLR9-MyD88路径进行的先天性免疫信号传导,并且引发适应性IR。尽管先天性免疫系统活化和AAV抗原递呈被认为在AAV载体施用之后即刻发生,但在原代人肝细胞和人嵌合小鼠模型中的新近研究已证明长期AAV转导触发通过IFN- β 达成的稍后先天性IR所采用的机制,可使所述机制失活以加强AAV转导。总之,这个证据表明富含CpG的FIX基因疗法构建体载体可驱动能够加强靶向载体的适应性免疫性,并且导致观察到的急性FIX表达丧失的

先天性免疫信号传导。可预期CpG ODN刺激的通过TLR9进行的先天性免疫信号传导以相较于具有较低CpG-ODN含量的其他AAV FIX Padua载体更加强健的方式引发和维持针对AAV的适应性免疫性。

[0342] 这个研究中的转氨酶升高或抗AAV CTL活化证据(如通过PBMC的IFN- γ ELISPOT所测量)并不始终预示FIX活性的丧失,尤其是在较低剂量群组中,尽管定位在肝中的相对微弱的对载体的IR在外周血液的测定中可能不始终可检测。接受最高FIX基因疗法构建体剂量的患者6中在第6周时58.5%活性的FIX表达峰值的突然丧失与肝脏酶和对AAV8具有反应性的PBMC的增加同时发生。

[0343] 在两个不同研究中描述了作为先天性免疫系统活化的标志的IL-6的短暂升高,所述两个不同研究描绘在将scAAV载体输注至小鼠肝中之后NF- κ B的TLR9依赖性活化和短暂促炎性细胞因子诱导。尽管未获得FIX基因疗法构建体在人中触发先天性免疫应答的直接实验证据,但患者5的IL-6R基因中的通过序列分析鉴定的变体暗示这个患者对由IL-6驱动的先先天性免疫信号传导的易感性较小。尚未研究在患者5中鉴定的特定p.A115E变体,但存在非同义IL-6R SNP与功能性降低相关联的先例。次要等位基因变体IL-6R 358Ala的表达与降低的细胞表面IL-6R表达、降低的对IL-6信号传导的敏感性、以及免于显现具有确定的炎症性组分的许多疾患(包括类风湿性关节炎、1型糖尿病和冠心病)的保护作用特异性相关联。这个特定IL-6R(基因)变体的实例支持以下见解:患者5可能在体内平衡条件下不显示临床表型,但当呈现以强烈免疫佐剂时,免疫应答可为不完全的。此外,包括IL-6的炎症性细胞因子还可影响转录因子HNF4 α 与转甲状腺素蛋白(TTR)启动子的相互作用的程度,并且由此调节基因表达。

[0344] 迄今为止,不存在关于编码核受体辅阻遏物的SMRT/NCOR2基因的所鉴定复合杂合子变体的临床影响的信息。SMRT/NCOR2为形成通过募集一般性染色质修饰酶诸如组蛋白脱乙酰基酶和甲基转移酶来介导靶标基因的转录沉默的核受体辅阻遏物复合物所需。SMRT复合物直接与HNF4 α 相互作用,由此潜在地直接影响HNF4 α 介导的TTR启动子表达。考虑到染色质化游离型AAV载体基因组可通过组蛋白修饰来调控,似乎合理的是开放染色质状态的维持促进持续转基因表达。

[0345] 总之,IL-6R变体提供对在不存在AAV引导的IR的证据下在这个患者中独特地观察到的持续FIX表达的可信潜在解释。这个患者还强调患者间变异性对基于AAV的基因疗法的成功的影响,所述影响值得进一步研究。

[0346] 先前临床试验经验已暗示针对衣壳的适应性IR是从AAV载体持续表达的主要限制因素。这是第一次潜在地由FIX基因疗法构建体的CpG脱氧核糖核苷酸含量驱动的先先天性免疫刺激已牵涉于从AAV载体进行的基因表达的丧失中。这些研究结果已导致开发用于基因疗法的CpG降低的载体,并且对于未来临床研究具有重要影响。不仅要增加在载体设计期间引入的免疫刺激性组分的警觉性,而且还要增加对先天免疫性的早期控制,此可能帮助降低载体免疫原性和改善AAV转导效率。推定与功能失调性IL-6受体信号传导相关联的患者5中持续治疗性FIX表达>4年还强调需要了解哪些患者相关变量可能预测采用当前基因递送技术会取得成功。

[0347] 患者5中基因疗法载体的持续表达指示IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变或SMRT/NCOR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变中的任一者或两者

指示增加的患者对由基于病毒的转基因载体达成的持续感染的敏感性,并且相比于不具有这些突变的受试者,具有这些突变中的一者或两者的受试者可对基因疗法起更大响应。

[0348] 因此,在决定用于需要治疗与酶活性的水平不足相关的疾病的受试者的治疗计划之前,可有帮助的是通过评估所述受试者是否具有IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变或SMRT/NOCR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变中的一者或两者来确定所述受试者是否具有使所述受试者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型。

[0349] 如果确定受试者具有IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变或SMRT/NOCR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变中的一者或两者,那么所述受试者可具有使所述受试者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型,因此,可具有更大概率来采用基于病毒的基因疗法取得成功。因此,被确定具有IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变或SMRT/NOCR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变中的一者或两者的受试者可被指定使用基于病毒的基因疗法载体进行的基因疗法。

[0350] 在另一方面,如果受试者被确定不具有IL-6R基因中与降低的IL-6R功能相关联的突变或SMRT/NOCR2基因中与降低的SMRT/NCOR2蛋白功能相关联的突变中的任一者,那么所述受试者可不具有使所述受试者对由基于病毒的基因疗法载体达成的持续感染敏感的基因型,因此,采用基于病毒的基因疗法取得成功的概率可为相对较低的。因此,受试者可不被指定基于病毒的基因疗法,并且作为替代,可被指定替代性疗法,诸如像通过施用具有在受试者中缺乏的酶活性的蛋白质治疗剂进行的酶替代疗法。

[0351] 实施例2-含有CpG的腺相关病毒血清型8(AAV8)构建体的增加的免疫原性可能促进转基因表达的下降

[0352] AAV8基因疗法已在临床试验中显示功效。然而,已观察到在一些患者中转基因表达的早期自发性下降。假设抗AAV8特异性T细胞应答杀灭了经转导肝细胞,从而导致转基因表达的下降以及ALT和AST水平的上升。迄今为止,动物模型尚未显示转基因表达的自发性下降,从而致使难以关于转基因活性的下降来分析载体免疫原性。因此,开发了鼠模型和使用原代人肝细胞的3D生物反应器模型以评估AAV8载体的免疫原性。作为模型的第一用途,评估了人FIX(huFIX) AAV8载体(AAV8-huFIX)中免疫活化性CpG岛对载体的免疫原性的影响。

[0353] 3D生物反应器系统是用以培养原代人肝细胞的最优系统。因此,它在医院中用于体外肝支持。简要说,从人部分肝切除术中分离原代人肝细胞,并且在生物反应器中培养,在第-3天开始,如Schmelzer等人,Biotechnol Bioeng.,103(4):817-27(2009)以及Hoffmann SA等人,Biotechnol Bioeng.,109(12):3172-81(2012)中所述,所述文献的内容通过引用并入本文。三天后,即在第0天时,用含有99CpG岛的AAV8-huFIX-cpg构建体和不具有CpG的AAV8-huFIX-null构建体处理原代肝细胞,例如包括库普弗细胞(Kupffer cell)。十天后,即在第10天时,终止培养,并且接着评估细胞因子产生、肝特异性酶水平和FIX基因表达。

[0354] 如图17中所示,AAV8-huFIX-null载体显示较高转导功效(左侧图版)和较高FIX表达(右侧图版)。在两个图中,来自供体A的结果显示在棒条对的左侧,并且来自供体B的结果

显示在棒条对的右侧。

[0355] 此外,如图18中所示的Th1样细胞因子IP-10和Mip-1a的诱导增加表明AAV8-huFIX null载体的免疫原性较低。图18显示两个代表性供体的所选细胞因子的归一化时间过程:对照生物反应器(圆圈)和用AAV8-huFIX-cpg(方块)或AAV8-huFIX-null(三角)处理的生物反应器。细胞因子表达总体上是微弱的,然而,在第2-3天,AAV8-huFIX-cpg诱导了升高的IP-10和Mip-1a水平。

[0356] 然而,如图19中所示,在载体施加之后,在生物反应器培养期间,肝细胞的天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)参数不改变。图19显示在细胞接种之后的AST和ALT时间过程:对照不进行感染(圆圈),以及用AAV8-huFIX-cpg(方块)或AAV8-huFIX-null(三角)感染。施加病毒粒子24小时(第0天-第1天)。

[0357] 为进一步在体内研究这个现象,在小鼠中进行AAV8-huFIX-cpg和AAV8-huFIX-null载体的比较免疫原性评估。通过先天性免疫活化诱导抗AAV8结合抗体(BAB)和中和抗体(NAB)的能力用作读数。发现相比于AAV8-huFIX-cpg载体,AAV8-huFIX-null载体具有较低免疫原性。具体来说,图20显示相比于AAV8-huFIX-null载体,AAV8-huFIX-cpg载体诱导更高抗AAV8 BAB(左侧图版)和NAB(右侧图版)应答,从而表明由CpG对TLR9路径的更强烈活化。

[0358] 总之,这些结果表明富含CpG的AAV8-FIX构建体更倾向于活化免疫系统,并且可能促进在用AAV8载体治疗的一些患者中观察到的转基因表达下降。

[0359] 以上阐述的实施例被提供来对本领域普通技术人员给与对如何制备和使用本发明的组合物、系统和方法的实施方案的完全公开和描述,并且不意图限制本发明者视为他们的发明的发明的范围。用于执行本发明的上述模式的为本领域技术人员显而易见的修改意图在以下权利要求的范围内。说明书中提及的所有专利和出版物都指示本发明所属领域技术人员的技能水平。本公开中引用的所有参考文献都通过引用并入本文,所述引用的程度就好像已单独地将每个参考文献通过引用以它的整体并入本文一样。

[0360] 所有标题和章节名称都仅出于明晰和参考目的而使用,并且不应被视为以任何方式进行限制。举例来说,本领域技术人员将了解根据本文所述的本发明的精神和范围酌情组合来自不同标题和章节的各个方面的有用性。

[0361] 本文引用的所有参考文献都据此通过引用以它们的整体以及出于所有目的并入本文,所述引用的程度就好像已具体地和单独地指出将每个单独的出版物或专利或专利申请出于所有目的通过引用以它的整体并入本文。

[0362] 如将为本领域技术人员显而易见,可在不脱离本申请的精神和范围的情况下对本申请进行许多修改和变化。本文所述的具体实施方案和实例仅通过举例方式提供,并且本申请仅受随附权利要求的条款以及所述权利要求有权享有的等效物的全部范围限制。

基线患者特征

变量	剂量群组									
	最低剂量 (2×10^{11} vg/kg)		中等剂量 (1.0×10^{12} vg/kg)				最高剂量 (3.0×10^{12} vg/kg)			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
患者	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
基线 FIX活性	<1	<1	<1	<1	<1	1.7	1.1	1.1	1.1	1.1
年龄	29	+	Y	12	60					
年龄	25	29	25	21	24	31	20	69		
基线 CRM状况	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
接受预防	否	是	是	否	是	是	是	是	是	是
ABR	12	12	7.2	12	24	3	0	0	3	0
每年输注率	24	60	48	12	36	48	96	72	48	96
HIV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HCV	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
抗AAV8 NAb	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5
抗AAV2 NAb	<1.5	<1.5	1.10	1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5

图1

表2. 通过全外显子组测序对患者5中潜在影响FIX转基因表达的变体的鉴定

基因符号	染色体位置	蛋白质变体	类型	功能影响 (SIFT/PolyPhen-2)	CADD	表型
杂合性变体						
<i>IL6R</i>	Chr1: 154402968	p.E115A	错义	-/很可能有害	26.1	免疫应答、炎症
复合杂合性变体						
<i>NCOR2</i>	Chr12: 124887061	p.Q508_Q509dup, p.Q507-Q509dup	框内	-/-	11.51	基因表达调控
<i>ATN1</i>	Chr12: 7045904	p.Q500_Q502del	框内	-/-	0.05	神经表现
<i>ATN1</i>	Chr12: 7045904	p.Q501_Q502dup	框内	-/-	0.05	神经表现

图2

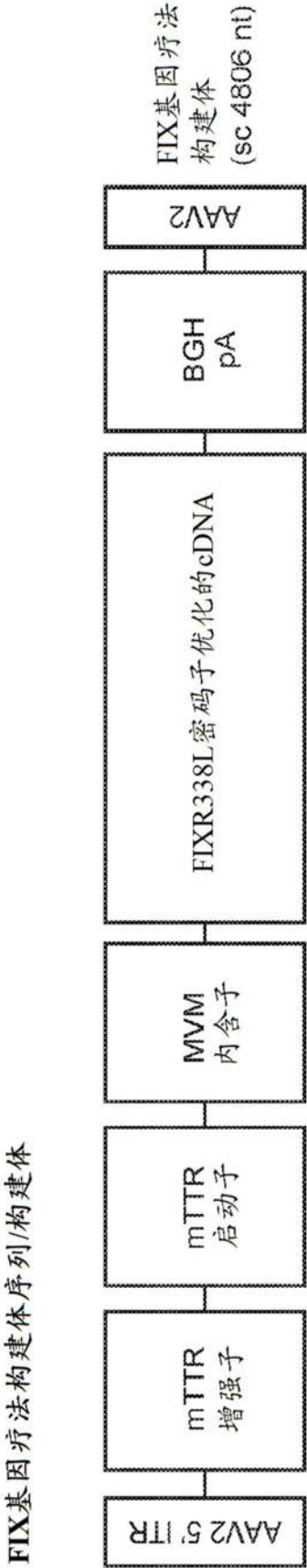


图3

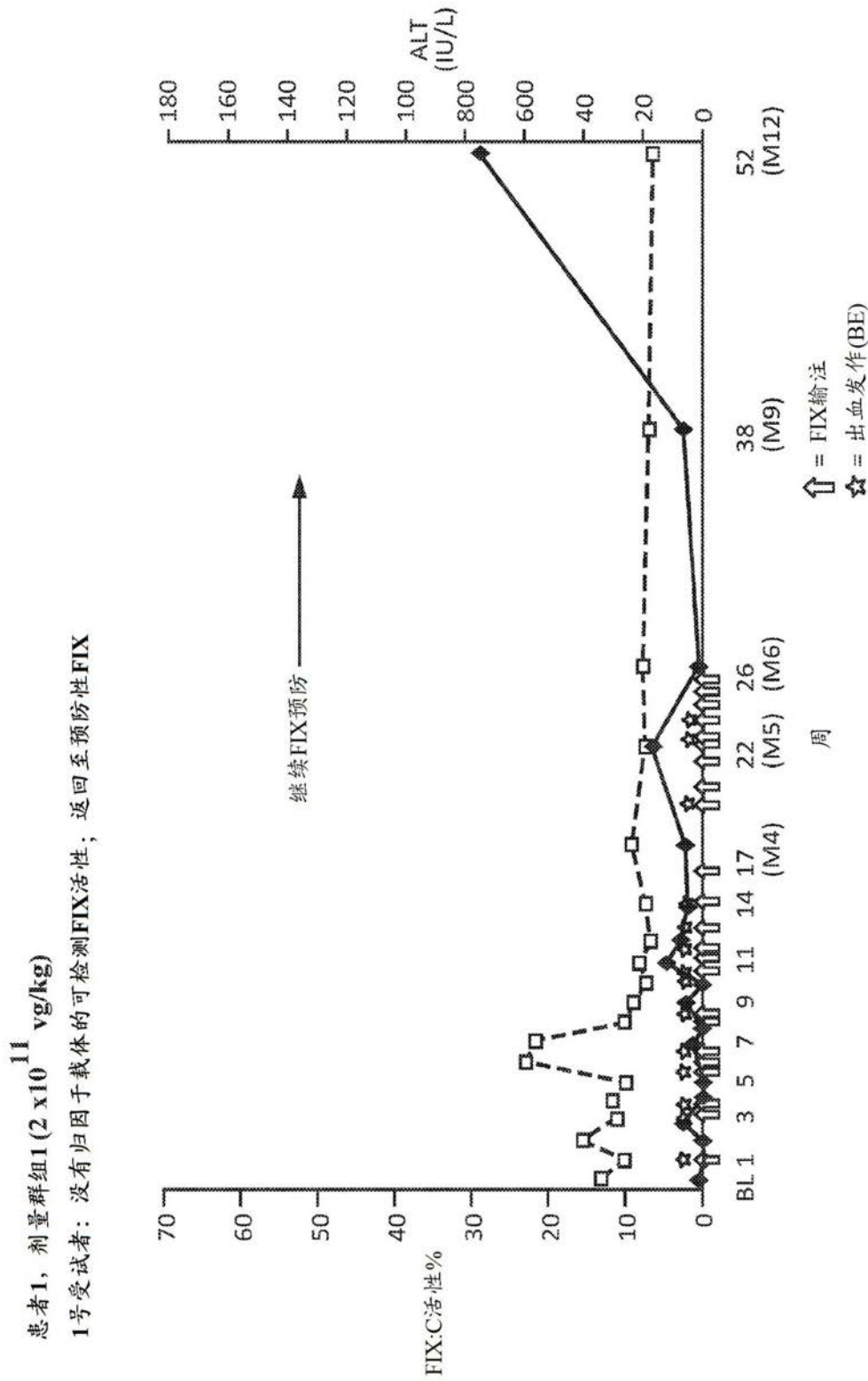


图4A

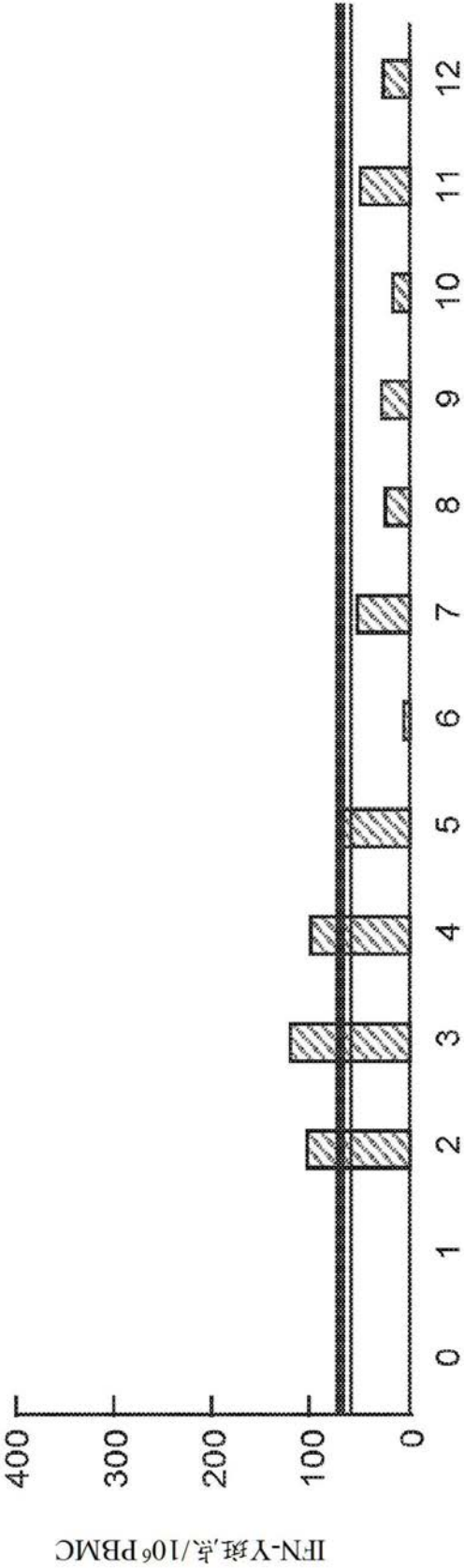


图4B

患者2, 剂量群组1 (2×10^{11} vg/kg)
2号受试者: 2-3%的长期FIX基因表达, 在长期随访中重新开始因子替代

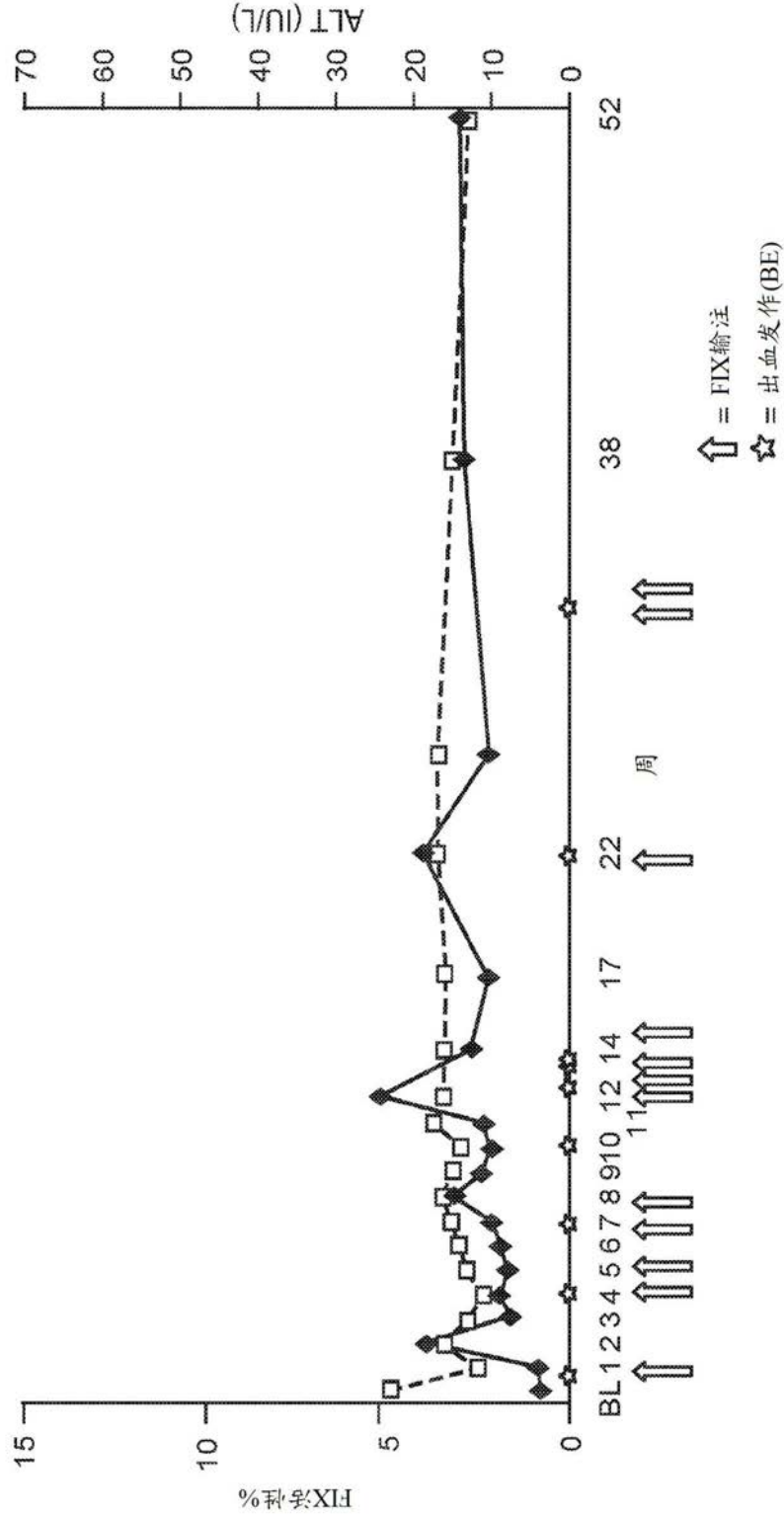


图4C

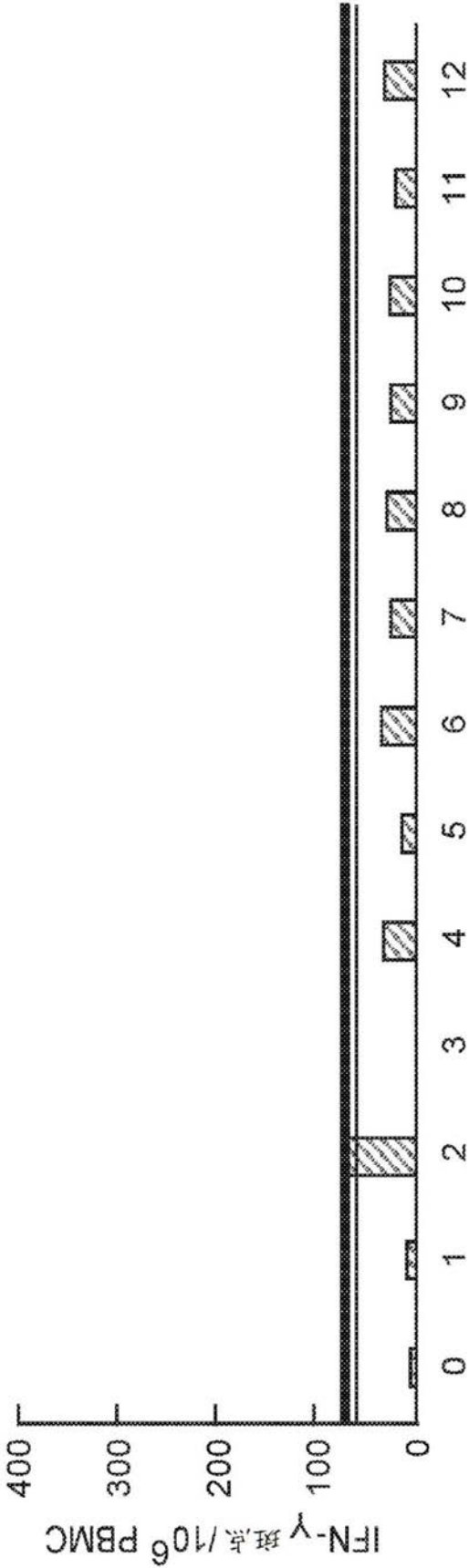


图4D

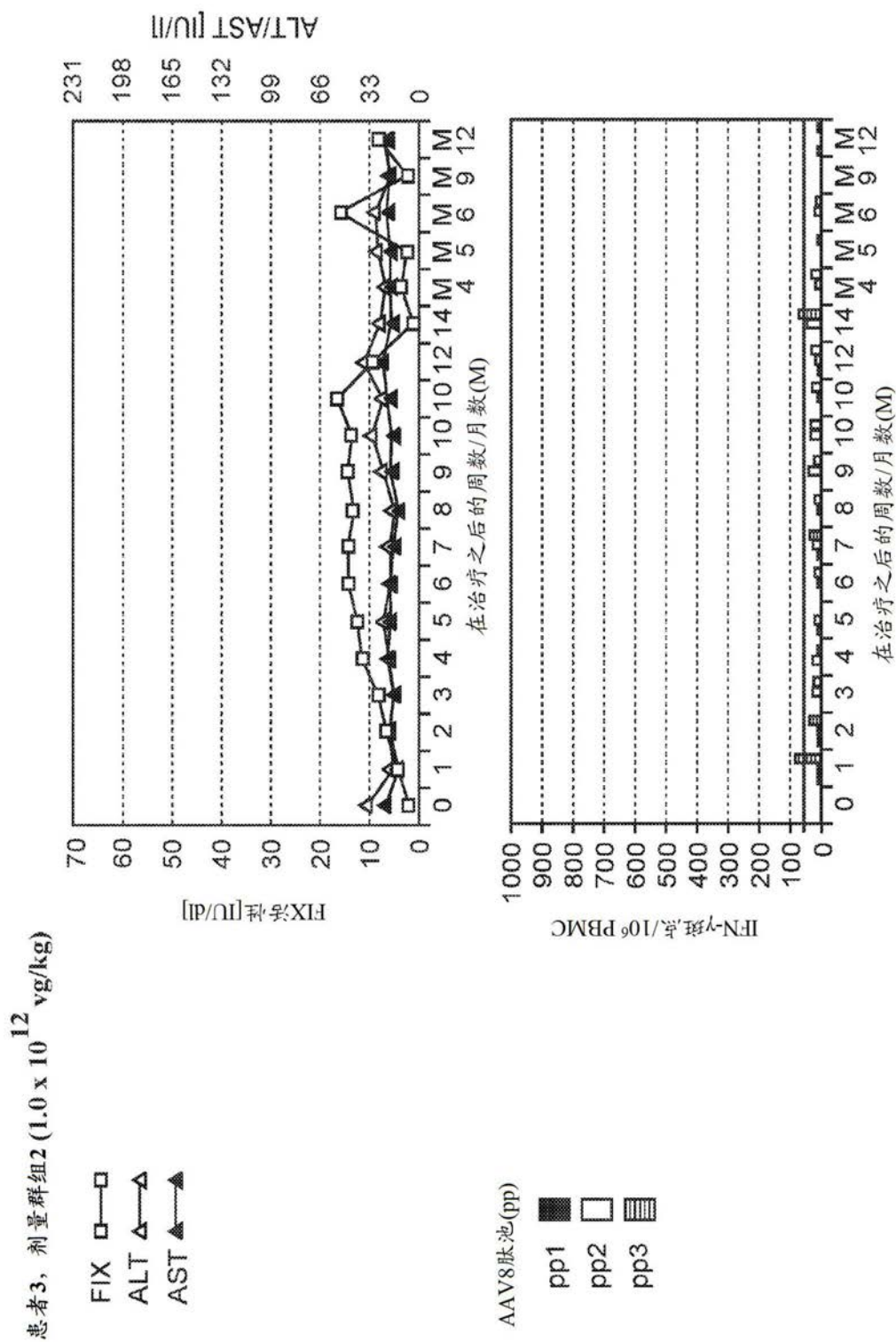


图4E

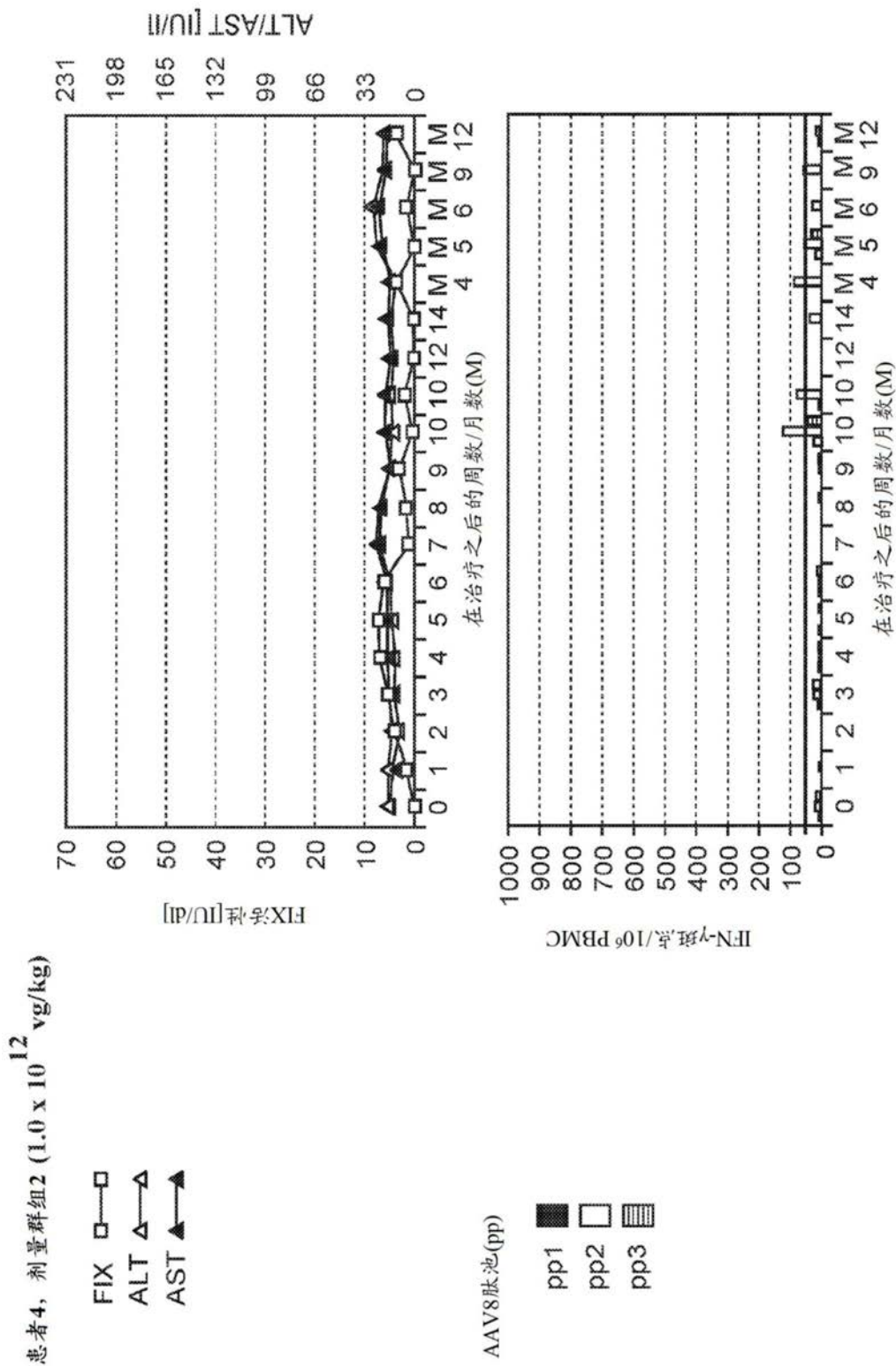


图4F

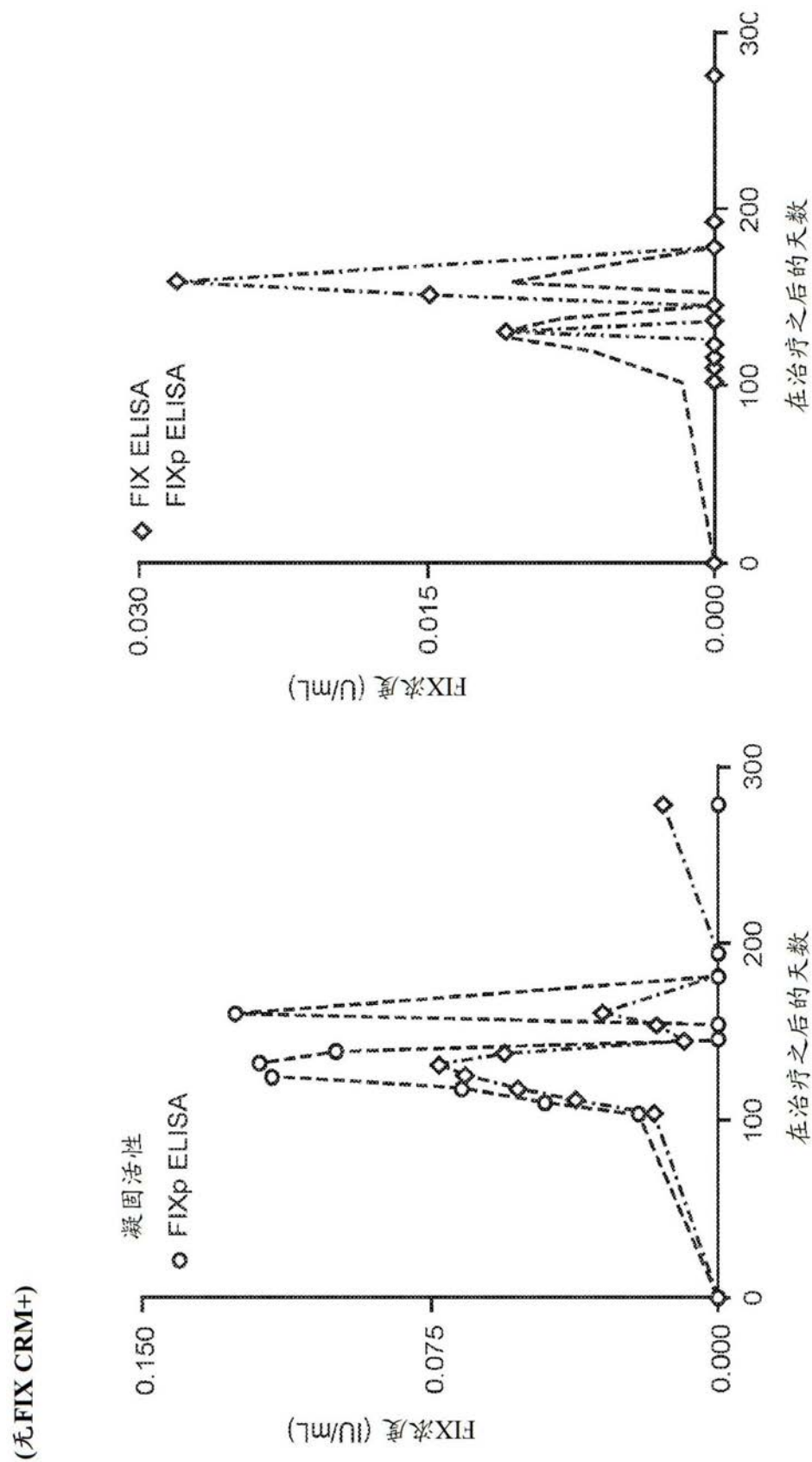


图4G

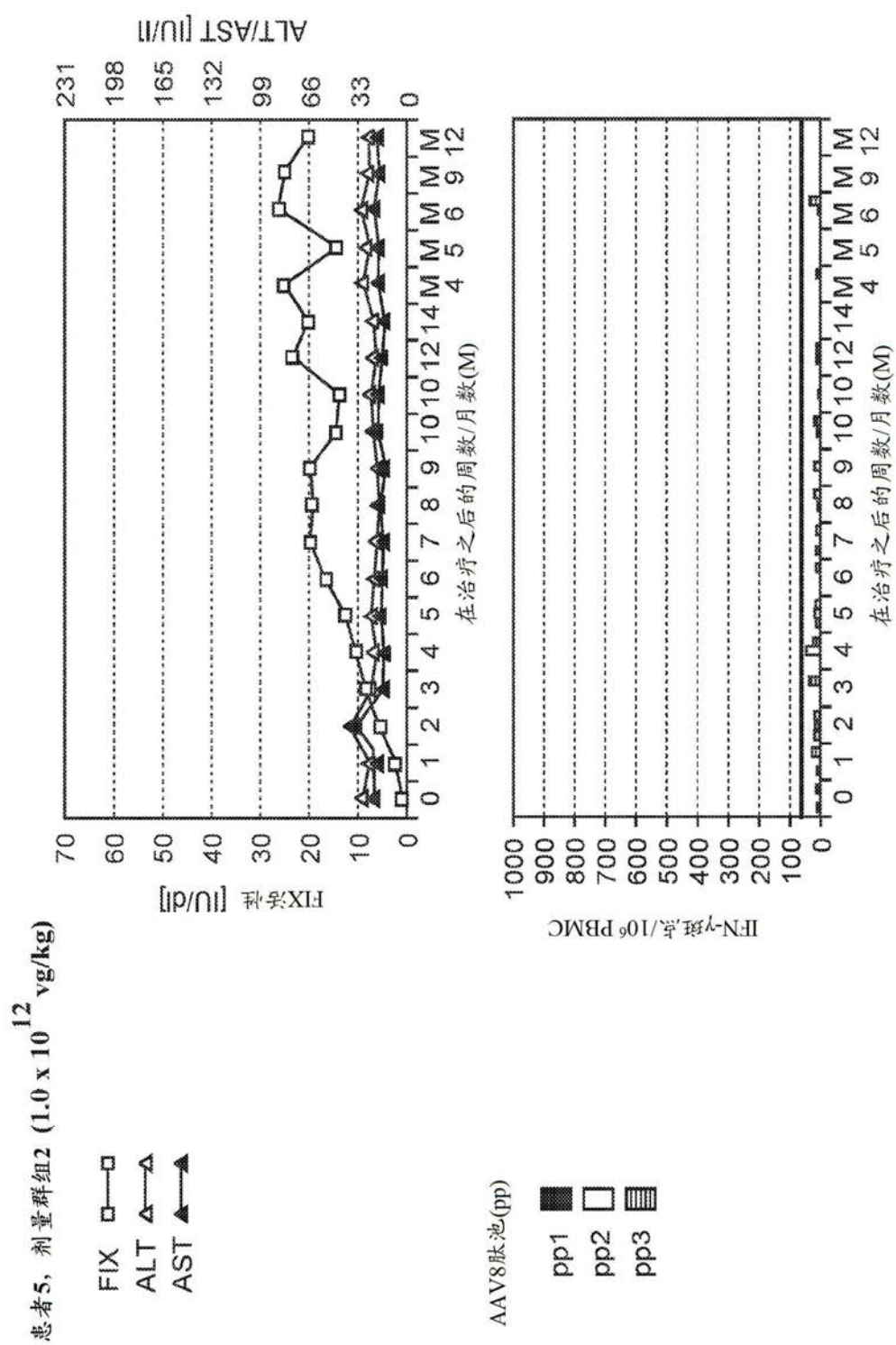


图4H

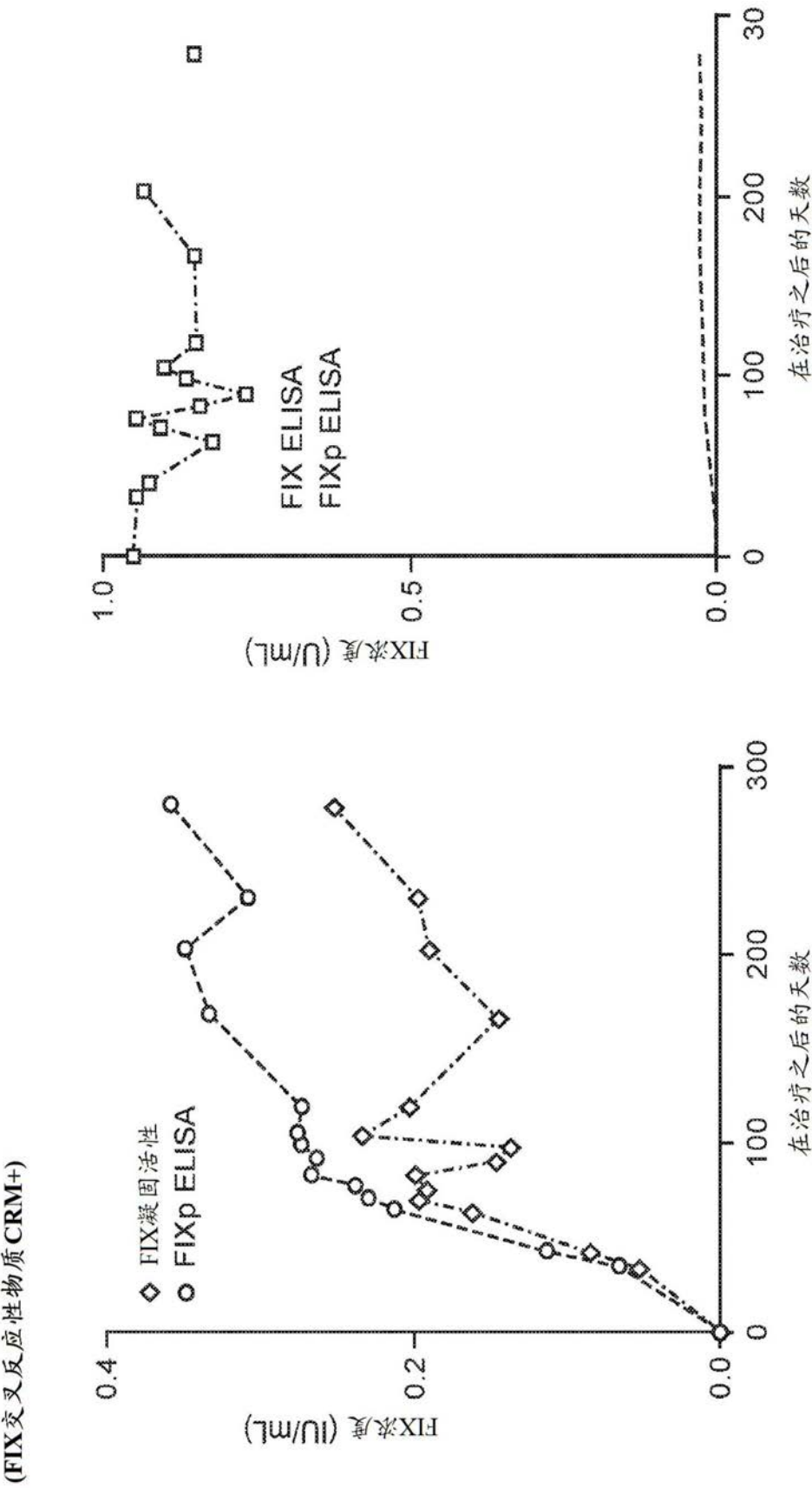


图4I

患者8, 群组2 (1.0×10^{12} vg/kg)
第2剂量: 1×10^{12} vg/kg BAX 335

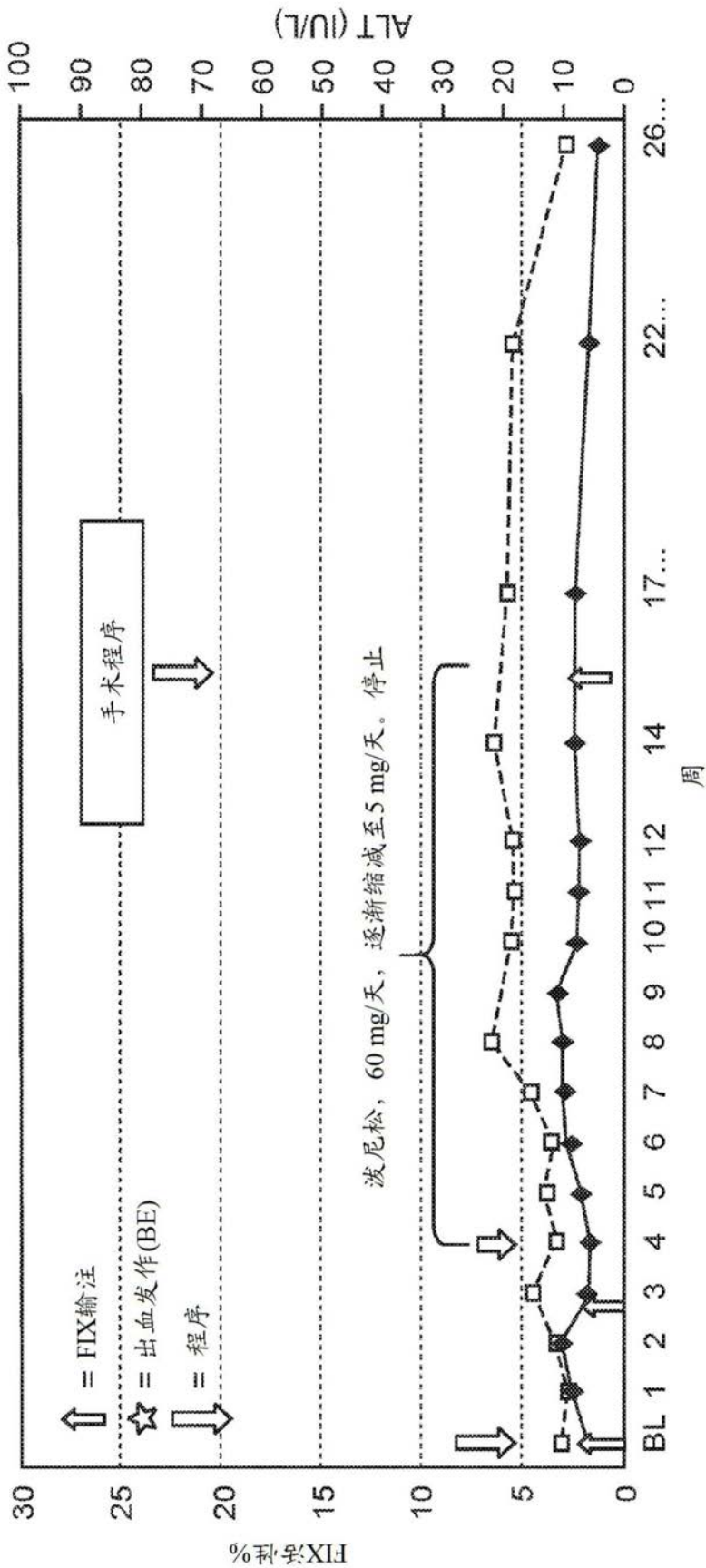


图4J

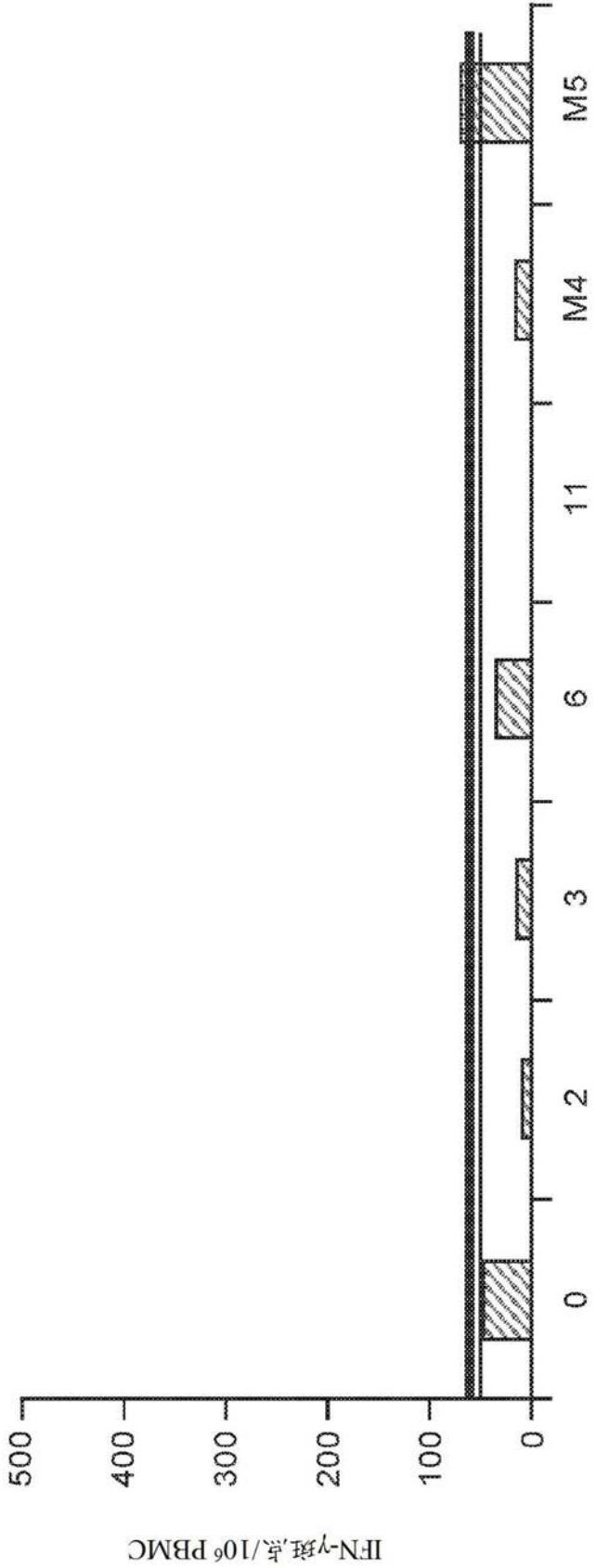


图4K

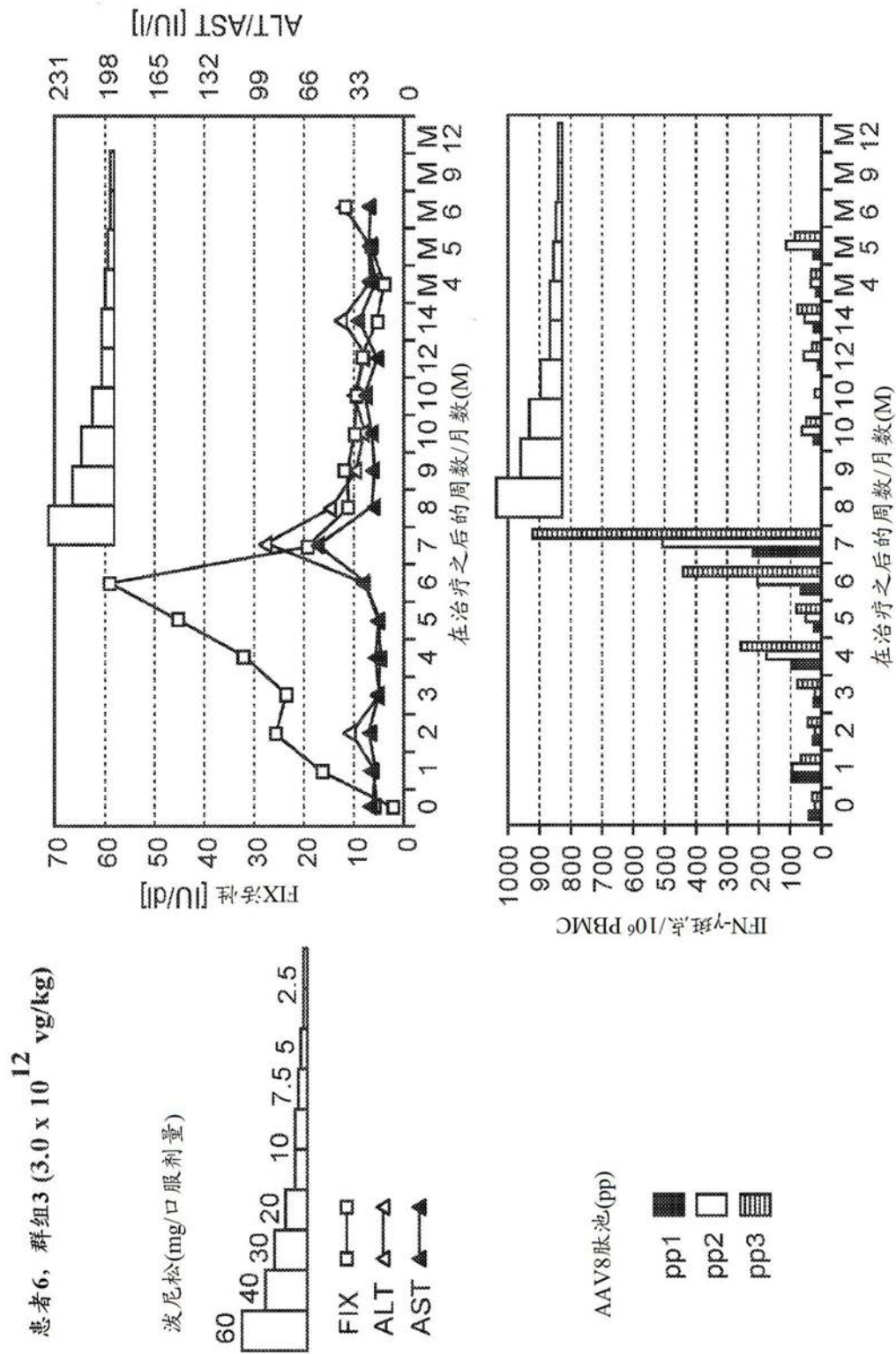


图4L

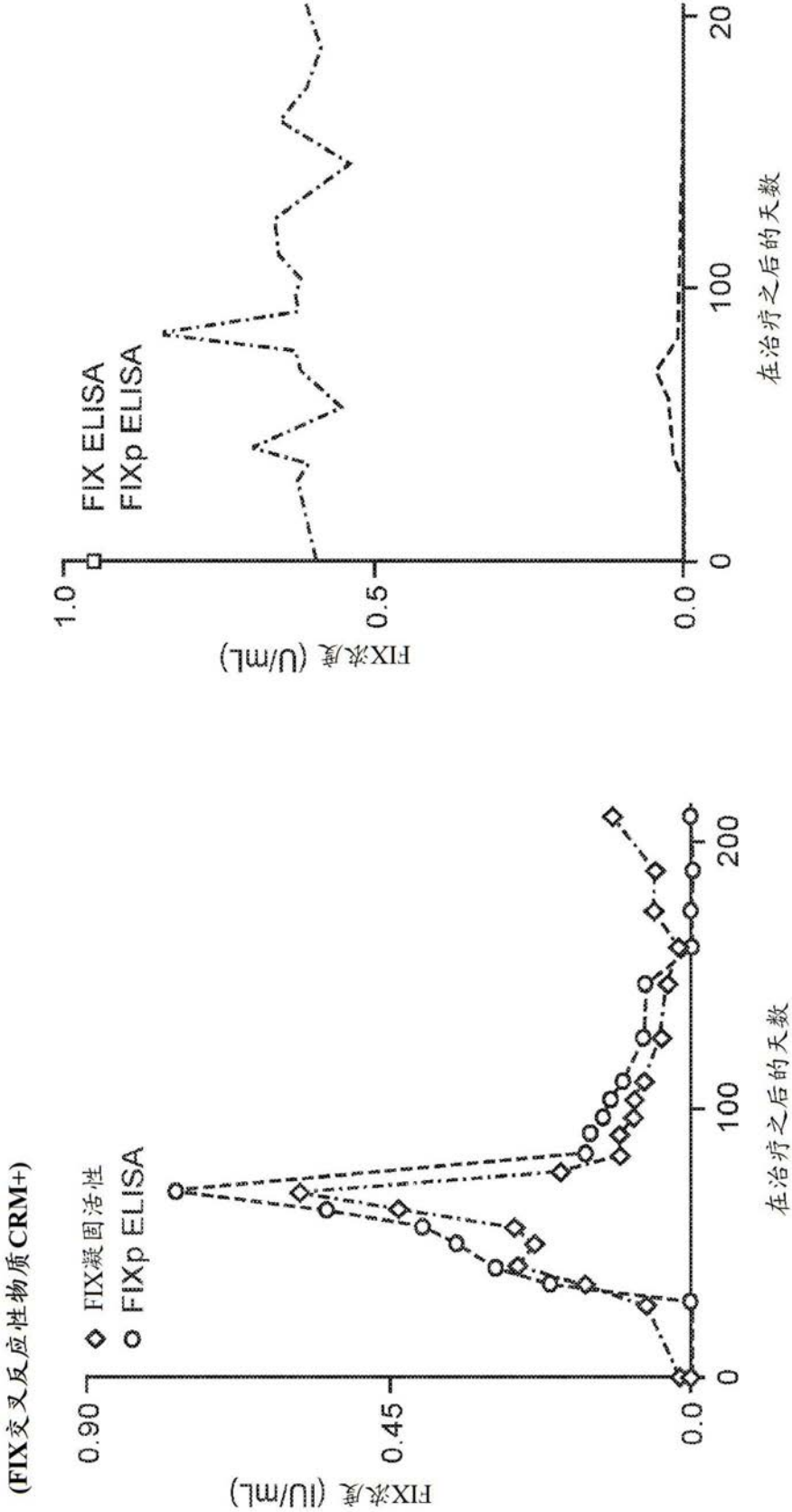


图4M

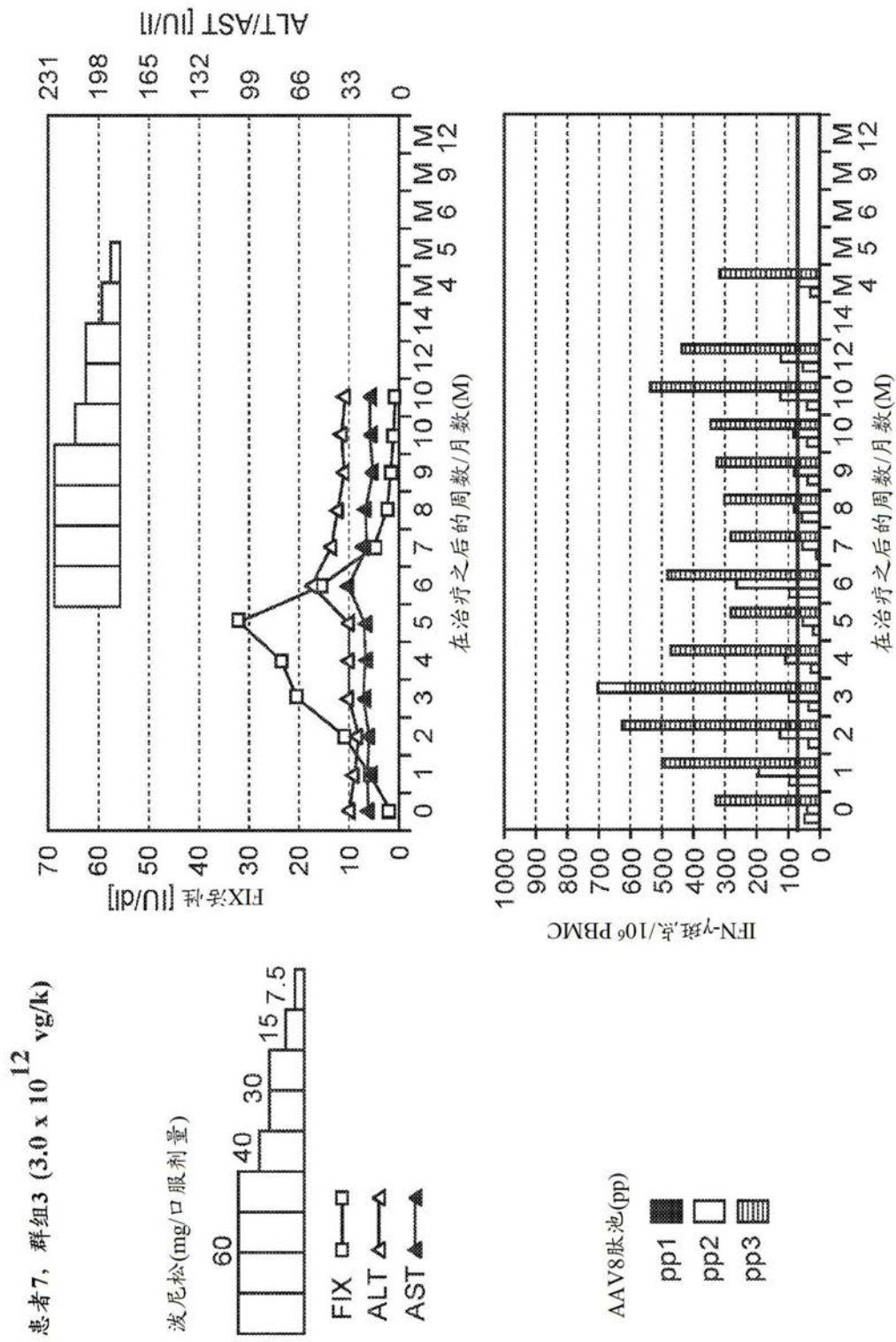


图4N

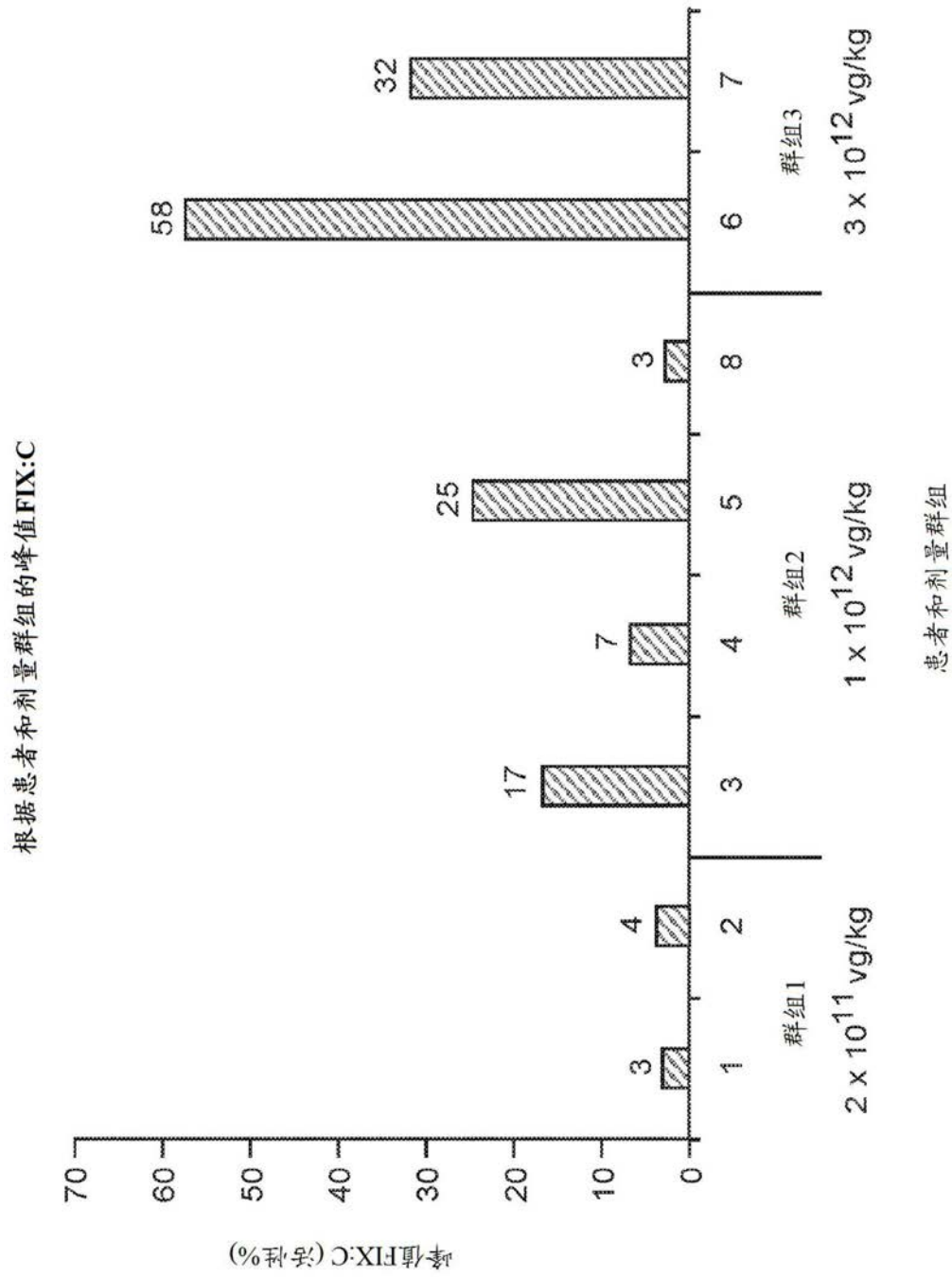


图5

相对于CpG消减的载体构建体，用FIX基因疗法构建体处理的小鼠中的抗AAV8 NAb应答

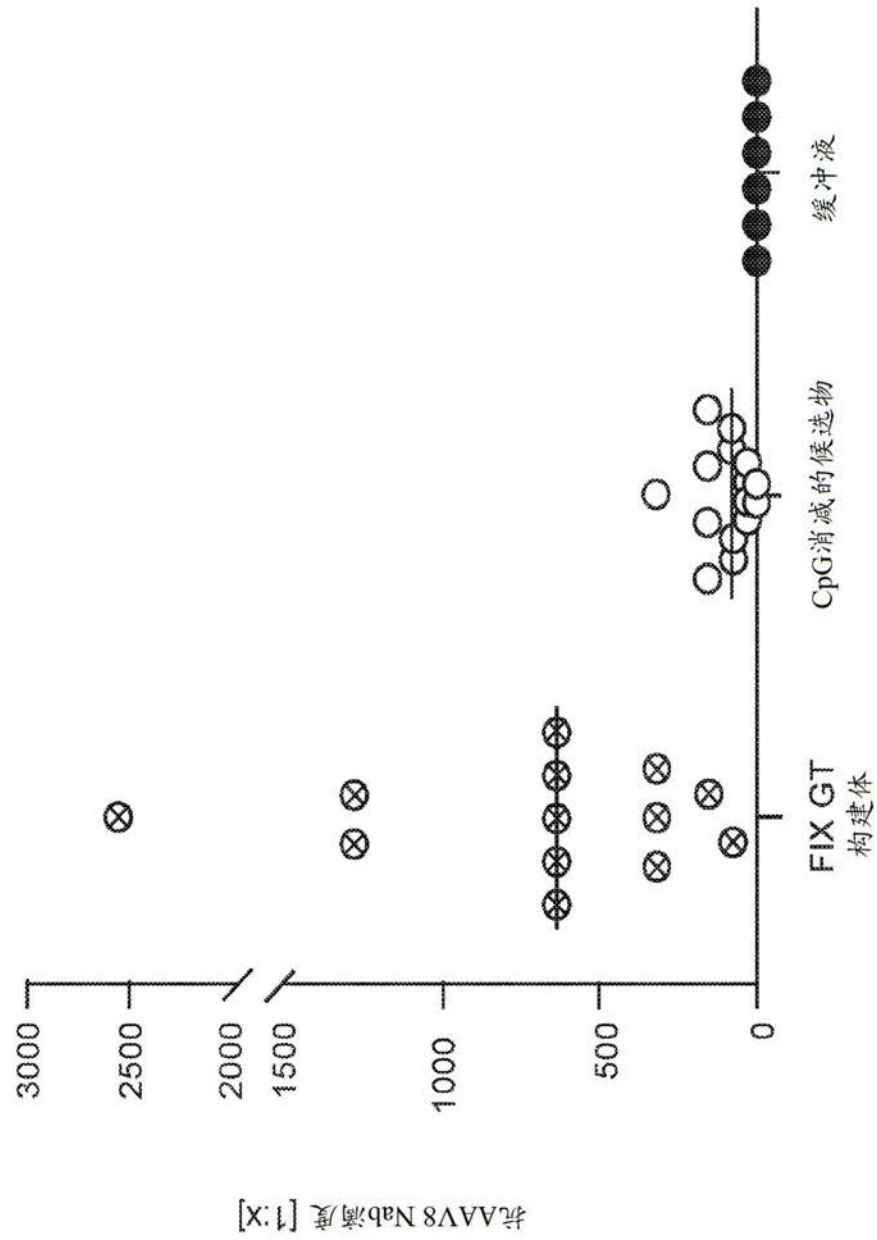


图6

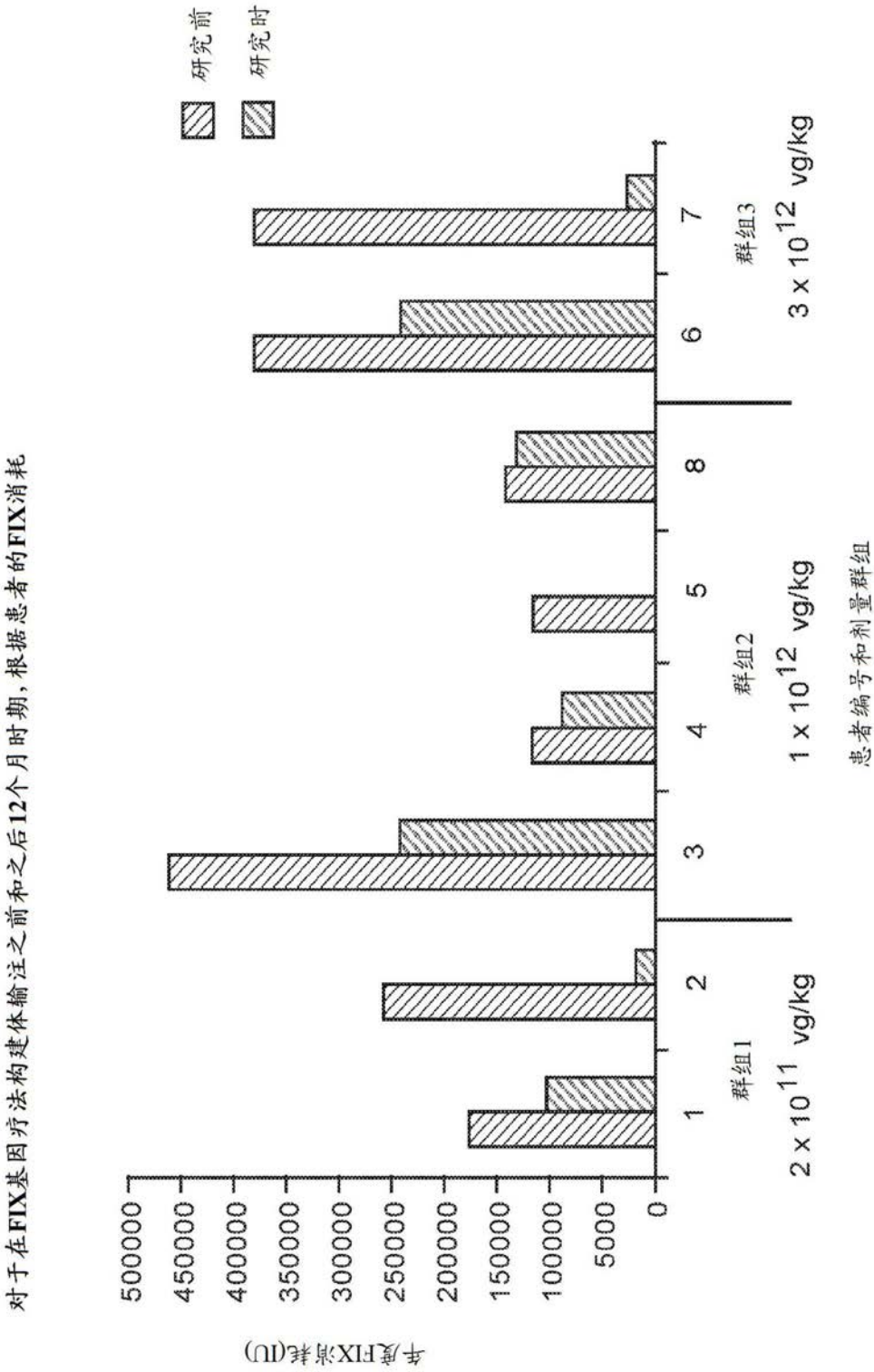
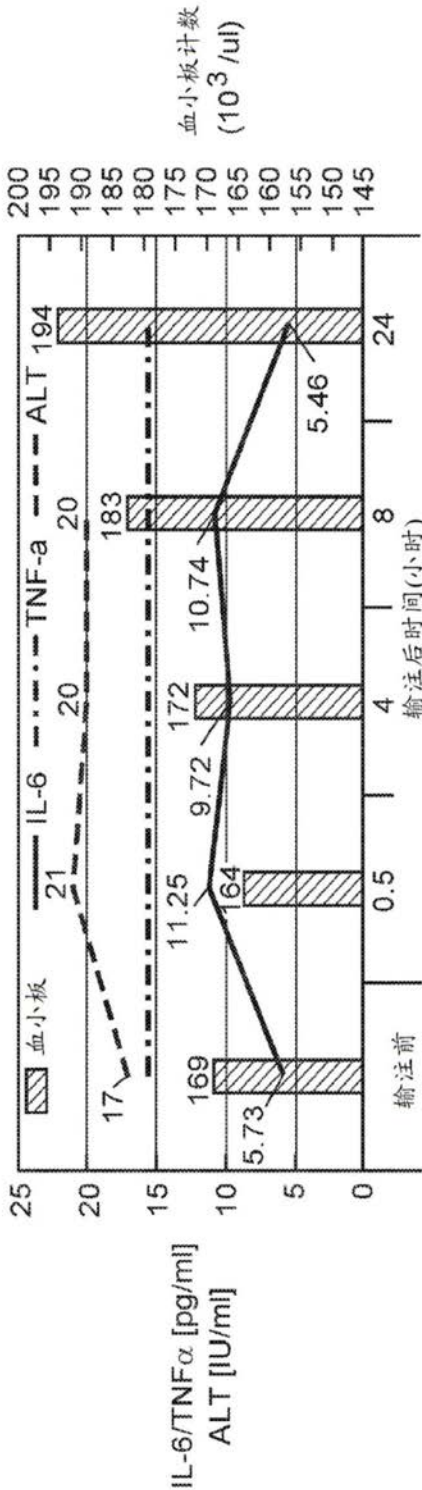


图7

表S4

对于紧靠在FIX基因疗法构建体输注之前以及在所述输注之后的时期，来自患者6的实验室测试结果



正常范围：IL-6: <3.12-8.70 (pg/ml); TNFα: <15.6 (pg/ml); ALT: 0-55 (IU/ml);
血小板：140-415 (10³ /ul)。在所有时间点，TNFα的值都<15.6。
ALT，丙氨酸转氨酶；IL-6，白介素-6；TNFα，肿瘤坏死因子-α。

患者6						
	正常范围(单位)	输注前	输注后时间(小时)			
			0.5	4	8	24
IL-6	<3.12-8.70 (pg/ml)	5.73	11.25	9.72	10.74	5.46
TNF α	<15.6 (pg/ml)	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6
ALT	0-55 (IU/ml)	17	21	20	20	ND
血小板	140-415 (10 ³ /ul)	169	164	172	183	194

ALT，丙氨酸转氨酶；IL-6，白介素-6；ND，未检测出；TNFα，肿瘤坏死因子-α。

图8

表S7 患者5中的全外显子组测序变体分析									
在患者5中独特地鉴定的潜在影响性杂合性和复合杂合性变体。									
基因符号	染色体位置	基因区域	蛋白质 变体	dbSNP 标识符	类型	功能影响 (SIFT/PolyPhen-2)	CADD	表型	单倍剂量 不足
杂合性变体									
IL6R	Chr1: 154402968	外显子	p.E115A	-	错义	-/很可能有害	26.1	免疫应答、炎症	是40-42
SIM1	Chr6: 100841633	外显子	p.C434S	-	错义	耐受/可能有害	23.2	葡萄糖控制; HET: 血液中葡萄糖水平 增加、肥胖	是57-58 (小鼠)
HSPA1A/1B	Chr6: 31795860	外显子	p.T45A	-	错义	-/-	14.82	ATP代谢; HET: 肥胖、葡萄糖血液水平、 运动行为(震颤、紧握、...)	是 (小鼠)
SLC24A1	Chr15: 65931951	外显子	p.R637*,p.R655*rs201452975	终止密码子获得	-/-	-/-	42.0	Ca2+摄取	否
RYR2	Chr1: 237711862	外显子	p.R1013Q	rs149514924	错义	-/可能有害	26.8	Ca2+释放	否
CAV3	Chr3: 8787330	外显子	p.T78M	rs72546668	错义	耐受/可能有害	23.7	Ca2+释放、胆固醇和 D-葡萄糖体内平衡	否
CTNND2	Chr5: 11385131	外显子	p.G184C	rs61749844	错义	有害/良性	23.5	自闭症相关	否
PPP1R12A	Chr12: 80169699	3' UTR	-	-	-	-	1.65	血管平滑肌控制、血压	否
MAZ	Chr16: 29821426, 3' UTR, 外显子, -	-	-	-, rs75194070	-	-	0.85	转录调控物	否
PLOD3	Chr16: 29821435 ncRNA Chr7: 100855221	外显子	p.R380W	-	错义	有害/可能有害	33.0	赖氨酸羧基化	否
GUCY2C	Chr12: 14794040	外显子	p.T682A	-	错义	耐受/可能有害	23.6	调控结肠损伤和炎症	否
PINK1	Chr1: 20964599	外显子	p.I218L	-	错义	耐受/可能有害	4.39	多巴胺分泌	否
PON1	Chr7: 94928381	外显子	p.P315T	-	错义	有害/可能有害	23.7	无明显表型	否
AQP1	Chr7: 30961242	外显子、内含子	p.Y7C	rs192763050	错义	-	4.16	无明显表型	否

图9

CS04-FL-NA

atgcagattgagctgagcacctgcttcttctgtgctgctgaggttctgcttctctgccaccagga
gatactacctgggggctgtggagctttcttgggaactacatgcagtctgacctgggggagctgacctgt
ggatgccagggttcccacccagagtgcccaaatccttcccattcaacacctctgtggtctacaagaag
acctctttgtggagttcactgaccacctgttcaacattgccaaacccaggccacctggatgggac
tcttgggacccaccattcaggctgaggtgtatgacactgtggtcatcacctcaagaacatggcctc
ccacctgtgagcctgcatgctgtgggggtcagctactggaaggcctctgaggggctgagtatgat
gaccagacctcccagaggggagaaggaggtgacaaaagtgttccctgggggcagccacacctatgtgt
ggcaggtcctcaaggagaatggcccatggcctctgaccactctgacctgacctactcctaccttct
tcatgtggacctggtcaaggacctcaactctggactgattggggcctgctggtgtgcaggaggggc
tccctggccaaagagaagaccagacctgcacaagttcattctcctgtttgctgtctttgatgagg
gcaagagctggcactctgaaaccaagaactccctgatgcaggacaggatgctgacctctgccagggc
ctggcccaagatgcacactgtgaatggctatgtgaacaggagcctgacctgactcattggctgccac
aggaaatctgtctactggcatgtgattggcatggggacaacccctgaggtgcactccatttctctgg
agggccacaccttccctggtcaggaaccacagacaggccagcctggagatcagccccatcaccttct
cactgccacagacctgctgatggacctcggacagttcctgctgttctgccacatcagctcccaccag
catgatggcatggaggcctatgtcaagggtggacagctgacctgaggagccacagctcaggatgaaga
acaatgaggaggctgaggactatgatgatgacctgactgactctgagatggatgtggtccgcttga
tgatgacaacagcccatccttcattcagatcaggtctgtggccaagaaacaccccaagacctgggtg
cactacattgctgctgaggaggaggactgggactatgccccactggctcctggccccctgatgacagga
gctacaagagccagtagctcaacaatggccacagaggattggacgcaagtacaagaaagttaggtt
catggcctacactgatgaaaccttcaagaccaggaggccattcagcatgagtctggcatcctgggc
ccactcctgtatggggagggtgggggacacctgctcatcttcaagaaccaggcctccaggccct
acaacatctacccacatggcatcactgatgtcaggccctgtacagccgcaggctgccaagggggt
gaaacacctcaaggacttccccattctgcctggggagatcttcaagtacaagtggactgtcactgtg
gaggatggaccaaccaaatctgacccaggtgcctcaccagatactactccagctttgtgaacatgg
agagggacctggcctctggcctgattggccactgctcatctgctacaaggagtctgtggaccagag
gggaaaccagatcatgtctgacaagaggaatgtgattctgttctctgtctttgatgagaacaggagc
tggtaacctgactgagaacattcagcgcttctgcccacccctgctggggtgcagctggaggacctg
agttccaggccagcaacatcatgcactccatcaatggctatgtgttgacagcctccagcttctgt
ctgacctgcatgaggtggcctactggtacattcttctattggggccagactgacttcttctgtc
ttcttctctggctacaccttcaaacacaagatggtgtatgaggacacctgacctcttccattct
ctggggagactgtgttcatgagcatggagaacctggcctgtggattctgggatgccacaactctga
cttccgcaacaggggcatgactgccctgctcaaggtctcctcctgtgacaagaactggggactac
tatgaggacagctatgaggacatctctgcctacctgctcagcaagaacaatgccattgagcccagga
gcttcagccagaatccacctgtcctgaaacgccaccagaggagatcaccaggaccacctccagtc
tgaccaggaggagattgactatgatgacaccatttctgtggagatgaagaaaggagactttgacatc
tatgacgaggacgagaaccagagcccaggagcttcagaagaagaccaggcactacttcatgtctg
ctgtggagcgctgtgggactatggcatgagctccagcccccatgtcctcaggaacaggggccagtc
tggctctgtgccacagttcaagaaagtggcttcccaagagttcactgatggcagcttcacccagccc
ctgtacagaggggagctgaatgagcacctgggactcctggggcccatacatcagggtgaggtggagg
acaacatcatggtgaccttccgcaaccaggcctccaggccctacagcttctacagctccctcatcag
ctatgagGaggaccagaggcagggggctgagccacgcaagaactttgtgaaaccaatgaaaccaag
acctacttctggaaagtccagcaccacatggccccacccaaggatgagtttgactgcaaggcctggg

(接续)

图10A

cctactttctctgatgtggacctggagaaggatgtgcactctggcctgattggcccactcctggctctg
ccacaccaacacctgaacctgcccattggaaggcaagtgactgtgcaggagtttgccctcttcttc
accatctttgatgaaaccaagagctggtaacttcaactgagaacatggagcgcaactgcaggggcccat
gcaacattcagatggaggacccaccttcaaagagaactaccgcttccatgccatcaatggctacat
catggacacctgacctgggcttgtcatggcccaggaccagaggatcaggtgggtacctgcttctctatg
ggctccaatgagaacattcaactccatccacttctctgggcatgtcttcaactgtgcgcaagaaggagg
agtacaagatggccctgtacaacctctaccctggggctctttgagactgtggagatgctgcctccaa
agctggcatctggagggtggagtgccatctgggggagcacctgcagctggcatgagcacctgttc
ctggctacagcaacaagtggcagacccccctgggaatggcctctggccacatcagggacttccaga
tcaactgcctctggccagtatggccagtgggcccccaagctggccaggctccactactctggatccat
caatgcctggagcaccaaggagccattcagctggatcaaagtggacctgctggcccccatgatcatc
catggcatcaagacccagggggccaggcagaagttctccagcctgtacatcagccagttcatcatca
tgtacagcctggatggcaagaaatggcagacctacagaggcaactccactggaacactcatggtctt
ctttggcaatgtggacagctctggcatcaagcacaacatcttcaaccccccaatcatcgccagatac
atcaggctgcacccccccactacagcatccgcagcacctcaggatggagctgatgggctgtgacc
tgaactcctgcagcatgcccctgggcatggagagcaaggccatttctgatgccagatcactgcctc
cagctacttcaccaacatgtttgccacctggagcccaagcaaggccaggctgcacctccagggaagg
agcaatgcctggaggccccagggtcaacaacccaaaggagtggctgcagggtggacttcagaagacca
tgaaggctcactggggtgaccacccaggggtcaagagcctgctcaccagcatgtatgtgaaggagtt
cctgatcagctccagccaggatggccaccagtggacctcttcttccagaatggcaagggtcaagggtg
ttccagggcaaccaggacagcttcacCctgtggtgaacagcctggacccccccctcctgaccagat
acctgaggatcaccacccagagctgggtccaccagattgccctgaggatggagggtcctgggatgtga
ggcccaggacctgtactga (SEQ ID NO:1)

图10B

CS04m2-FL-NA

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGG
AGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTTTCTTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCT
GTGGAIGCCAGGTTCCCACCCAGAGTGCCCAATCCTTCCCATTCAACACCTCTGTGGTCTACAAG
AAGACCTCTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAACCCAGGCCACCTGGATG
GGAATCCTGGGACCCACCATTGAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCGTCACCTCAAGAACATG
GCCTCCACCCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGTACTGGAAGTCTCTGAGGGGGCTGAG
TATGATGACCAGACCTCCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAAGTGTCCCTGGGAAGAGCCACACC
TATGTGTGGCAGGTCCTCAAGGAGAATGGCCCCACTGCCTCTGACCCACCTGCCTGACCTACTCC
TACCTTTCTCATGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGC
AGGGAGGGCTCCCTGGCCAAAGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATTCTCTGTGTTGCTGTC
TTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACTCCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCC
TCTGCCAGGGCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGACTC
ATTGGCTGCCACAGGAAATCTGTCTACTGGCATGTGATTGGCATGGGGACAACCCCTGAGGTGCAC
TCCATTTTCTCTGGAGGGCCACACCTTCTGGTCAGGAACACAGACAGGCCAGCCTGGAGATCAGC
CCCATCACCTTCTCACTGCCCAGACCCTGCTGATGGACCTCGGACAGTTCCTGCTGTTCTGCCAC
ATCAGCTCCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTCAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCA
CAGCTCAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATG
GATGTGGTCCGCTTTGATGATGACAACAGCCATCCTTCATTGAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAA
CACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCACTGGTC
CTGGCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTCAACAATGGCCACAGAGGATTGGACGC
AAGTACAAGAAAGTCAGTTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATTGAG
CATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCACTCCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTCATCATCTTC
AAGAACCAGGCCTCCAGGCCCTACAACATCTACCCACATGGCATCACTGATGTCAGGCCCCCTGTAC
AGCCGCAGGCTGCCAAAGGGGGTGAACACCTCAAGGACTTCCCCATTCTGCCTGGGGAGATCTTC
AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACCAAATCTGACCCAGGTGCCTCACCAGA
TACTACTCCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCACTGCTCATC
TGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGAAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATTCTG
TTCTCTGTCTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATTGAGCGCTTCTGCCCAAC
CCTGCTGGGGTGCACTGGAGGACCCTGAGTTCAGGCCAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGC
TATGTGTTTGACAGCCTCCAGCTTTCTGTCTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATTCTTTCT
ATTGGGGGCCAGACTGACTTCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAACACAAGATGGTG
TATGAGGACACCCTGACCCTCTTCCCATTCTCTGGGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGGAGAACCCT
GGCCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACCTCTGACTTCCGCAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTCAAA
GTCTCCTCCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTAC
CTGCTCAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCCACCTGTCTGAAACGC
CACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCCTCCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACC
ATTTCTGTGGAGATGAAGAAAGAGGACTTTGACATCTATGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAAGG
AGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCAATTGCTGCTGTGGAGCGCCTGTGGGACTATGGCATG
AGCTCCAGCCCCCATGTCCTCAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCACAGTTCAAGAAAGTG

(接续)

图11A

GTCTTCCAAGAGTTCACGTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCAC
CTGGGACTCCTGGGCCCATACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCCGCAAC
CAGGCCTCCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCTCCCTCATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGG
GCTGAGCCACGCAAGAAGTTTGTGAAACCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTCCAGCAC
CACATGGCCCCCACCAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTG
GAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACCAACACCCTGAACCTT
GCCCATGGAAGGCAAGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTCTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAG
AGCTGGTACTTCACCTGAGAACATGGAGCGCAACTGCAGGGCCCCATGCAACATTGAGATGGAGGAC
CCCACCTTCAAAGAGAACTACCGCTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGCCTGGG
CTTGTCTATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTTTCTATGGGCTCCAATGAGAACATT
CACTCCATCCACTTCTCTGGGCATGTCTTCACTGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTG
TACAACCTCTACCCTGGGGTCTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCTCCAAAGCTGGCATCTGGAGG
GTGGAGTGCCCTCATTTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCTGTTCTTGGTCTACAGCAAC
AAGTGCCAGACCCCCCTGGGAATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGC
CAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTCCACTACTCTGGATCCATCAATGCCTGGAGC
ACCAAGGAGCCATTGAGCTGGATCAAAGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATCAAG
ACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCTCCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTG
GATGGCAAGAAATGGCAGACCTACAGAGGCAACTCCACTGGAACACTCATGGTCTTCTTTGGCAAT
GTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCAATCATCGCCAGATACATCAGGCTG
CACCCACCCACTACAGCATCCGCAGCACCCCTCAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACTCC
TGCAGCATGCCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATTTCTGATGCCAGATCACTGCCTCCAGCTAC
TTCACCAACATGTTTGGCACCTGGAGCCCAAGCAAGGCCAGGCTGCACCTCCAGGGGAAGGAGCAAT
GCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCAAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAG
GTCAGTGGGGTGACCACCCAGGGGGTCAAGAGCCTGCTCACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCTTG
ATCAGCTCCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCCTCTTCTTCCAGAATGGCAAGGTCAAGGTGTTT
CAGGGCAACCAGGACAGCTTCACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCTCCTGACCAGATAC
CTGAGGATTACCCCCAGAGCTGGGTCCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTCTTGGGATGTGAG
GCCCAGGACCTGTACTGA (SEQ ID NO:2)

图11B

CS04m3-FL-NA

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGG
AGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTTTCTTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCCT
GTGGATGCCAGGTTCCCACCCAGAGTGCCCAATCCTTCCCATTCAACACCTCTGTGGTCTACAAAG
AAGACCCTCTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAACCCAGGCCACCCTGGATG
GGACTCCTGGGACCCACCATTGAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCATCACCTCAAGAACATG
GCCTCCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGTACTGGAAGGCTCTGAGGGGGCTGAG
TATGATGACCAGACCTCCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAAGTGTCCCTGGGGGCAGCCACACC
TATGTGTGGCAGGTCTCAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCACTCTGCCTGACCTACTCC
TACCTTTCTCATGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGC
AGGGAGGGCTCCCTGGCCAAAGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATTCTCTGTGTGCTGTC
TTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACTCCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCC
TCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGACTC
ATTGGCTGCCACAGGAAATCTGTCTACTGGCATGTGATTGGCATGGGGACAACCCCTGAGGTGCAC
TCCATTTTCTGGAGGGCCACACCTTCTGGTCAGGAACACAGACAGGCCAGCCTGGAGATCAGC
CCCATCACCTTCTCACTGCCCAGACCCTGCTGATGGACCTCGGACAGTTCCTGCTGTTCTGCCAC
ATCAGCTCCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTCAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCA
CAGCTCAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATG
GATGTGGTCCGCTTTGATGATGACAACAGCCCATCCTTCATTGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAA
CACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCACTGGTC
CTGGCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTCAACAATGGCCACAGAGGATTGGACGC
AAGTACAAGAAAGTCAGGTTTATGGCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATTGAG
CATGAGTCTGGCATCCTGGGCCACTCCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTCATCATCTTC
AAGAACCAGGCCTCCAGGCCCTACAACATCTACCCACATGGCATCACTGATGTCAGGCCCCCTGTAC
AGCCGCAGGCTGCCAAAGGGGGTGAACACCTCAAGGACTTCCCCATTCTGCCTGGGGAGATCTTC
AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACCAATCTGACCCAGGTGCCTCACCAGA
TACTACTCCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCACTGCTCATC
TGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGAAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATTCTG
TTCTCTGTCTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATTGAGCGCTTCTGCCCAAC
CCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCAGGCCAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGC
TATGTGTTTGACAGCCTCCAGCTTTCTGTCTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATTCTTTCT
ATTGGGGCCCAGACTGACTTCCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAACACAAGATGGTG
TATGAGGACACCCTGACCCTCTTCCATTCTCTGGGGAGACTGTGTTGATGAGCATGGAGAACCCT
GGCCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACCTCTGACTTCCGCAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTCAAA
GTCTCCTCCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTAC
CTGCTCAGCAAGAACAATACCACCTACGTGAACCGCTCCCTGAGCCAGAATCCACCTGTCTGAAA
CGCCACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCCTCCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGAC
ACCATTTCTGTGGAGATGAAGAAAGAGGACTTTGACATCTATGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCA
AGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGCGCCTGTGGGACTATGGC
ATGAGCTCCAGCCCCCAIGTCCTCAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCACAGTTCAAGAAA

(接续)

图12A

GTGGTCTTCCAAGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCGTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAG
CACCTGGGACTCCTGGGCCCATACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCCGC
AACCAGGCCTCCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCTCCCTCATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAG
GGGGCTGAGCCACGCAAGAACTTTGTGAAACCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTCCAG
CACCACATGGCCCCACCAAGGATGAGTTTGAAGGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGAC
CTGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACCAACACCCTGAAC
CCTGCCCATGGAAGGCAAGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTCTTCTTCACCATCTTTGATGAAACC
AAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGCGCAACTGCAGGGCCCCATGCAACATTCAGATGGAG
GACCCACCTTCAAAGAGAACTACCGCTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGCCT
GGGCTTGTCTATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTTTCTATGGGCTCCAATGAGAAC
ATTCACTCCATCCACTTCTCTGGGCATGTCTTCACTGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCC
CTGTACAACCTCTACCTTGGGGTCTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCTCCAAAGCTGGCATCTGG
AGGGTGGAGTGCCTCATTTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCTGTTCCTGGTCTACAGC
AACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGAATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCT
GGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCAAGCTGGCCAGGCTCCACTACTCTGGATCCATCAATGCCTGG
AGCACCAAGGAGCCATTCACTGGATCAAAGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATC
AAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCTCCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCAATCATCATGTACAGC
CTGGATGGCAAGAAATGGCAGACCTACAGAGGCAACTCCACTGGAACACTCATGGTCTTCTTTGGC
AATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCAATCATCGCCAGATACATCAGG
CTGCACCCACCCACTACAGCATCCGCAGCACCTCAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAAC
TCCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATTTCTGATGCCCAGATCACTGCCTCCAGC
TACTTCACCAACATGTTTGGCACCTGGAGCCCAAGCAAGGCCAGGCTGCACCTCCAGGGAAGGAGC
AATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCAAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATG
AAGGTCACTGGGGTGACCACCCAGGGGGTCAAGAGCCTGCTCACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTC
CTGATCAGCTCCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTCTTCTTCCAGAATGGCAAGGTCAAGGTG
TTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCAACCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCTCCTGACCAGA
TACCTGAGGATTCAACCCAGAGCTGGGTCCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTCTGGGATGT
GAGGCCAGGACCTGTACTGA (SEQ ID NO:3)

图12B

CS04m23-FL-NA

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGG
AGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTTTCTTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCCT
GTGGATGCCAGGTTCCCACCCAGAGTGCCCAAATCCTTCCCATTCAACACCTCTGTGGTCTACAAG
AAGACCCTCTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAACCCAGGCCACCCTGGATG
GGACTCCTGGGACCCACCATTGAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCGTCACCCCTCAAGAACATG
GCCTCCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGTCCTCTGAGGGGGCTGAG
TATGATGACCAGACCTCCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAAGTGTTCCCTGGGAAGAGCCACACC
TATGTGTGGCAGGTCTCAAGGAGAATGGCCCCACTGCCTCTGACCCACCCTGCCTGACCTACTCC
TACCTTTCTCATGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGC
AGGGAGGGCTCCCTGGCCAAAGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATTCTCCTGTTTGCTGTC
TTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACTCCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCC
TCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGACTC
ATTGGCTGCCACAGGAAATCTGTCTACTGGCATGTGATTGGCATGGGGACAACCCCTGAGGTGCAC
TCCATTTTCTGGAGGGCCACACCTTCCCTGGTCAGGAACACAGACAGGCCAGCCTGGAGATCAGC
CCCATCACCTTCTCACTGCCCAGACCTGCTGATGGACCTCGGACAGTTCCTGCTGTTCTGCCAC
ATCAGCTCCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTCAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCA
CAGCTCAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATG
GATGTGGTCCGCTTTGATGATGACAACAGCCCATCCTTCATTGATCAGGTCGTGTGCCAAGAAA
CACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCACTGGTC
CTGGCCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTCAACAATGGCCACAGAGGATTGGACGC
AAGTACAAGAAAGTCAGGTTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATTGAG
CATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCACTCCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTCATCATCTTC
AAGAACCAGGCCTCCAGGCCCTACAACATCTACCCACATGGCATCACTGATGTCAGGCCCCCTGTAC
AGCCGCAGGCTGCCAAAGGGGGTGAAACACCTCAAGGACTTCCCCATTCTGCCTGGGGAGATCTTC
AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACCAAATCTGACCCAGGTGCCTCACCAGA
TACTACTCCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCACTGCTCATC
TGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGAAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATTCTG
TTCTCTGTCTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATTGAGCGCTTCTGCCCAAC
CCTGCTGGGGTGAGCTGGAGGACCCTGAGTTCAGGCCAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGC
TATGTGTTTGACAGCCTCCAGCTTTCTGTCTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATTCTTTCT
ATTGGGGCCCAGACTGACTTCCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAACACAAGATGGTG
TATGAGGACACCCTGACCCTCTTCCCATCTCTGGGGAGACTGTGTTGATGAGCATGGAGAACCCT
GGCCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACCTCTGACTTCCGCAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTCAAA
GTCTCCTCCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTAC
CTGCTCAGCAAGAACAATACCACCTACGTGAACCGCTCCCTGAGCCAGAATCCACCTGTCTGAAA
CGCCACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCCTCCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGAC
ACCATTTCTGTGGAGATGAAGAAAGAGGACTTTGACATCTATGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCA
AGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGCGCCTGTGGGACTATGGC
ATGAGCTCCAGCCCCCATGTCCTCAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCACAGTTCAGAAA

(接续)

图13A

GTGGTCTTCCAAGAGTTCACTGATGGCAGCTTACCCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAG
CACCTGGGACTCCTGGGCCCATACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCCGC
AACCAGGCCCTCCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCTCCCTCATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAG
GGGGCTGAGCCACGCAAGAACTTTGTGAAACCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTCCAG
CACCACATGGCCCCCACCAGGATGAGTTTGAAGGCTGGGCTACTTCTCTGATGTGGAC
CTGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACCAACACCTGAAC
CCTGCCCATGGAAGGCAAGTGAAGTGTGAGGAGTTTGGCCCTCTTCTTACCATCTTTGATGAAACC
AAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGCGCAACTGCAGGGCCCCATGCAACATTGAGATGGAG
GACCCACCTTCAAAGAGAACTACCGCTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCTGCCT
GGGCTTGTGATGGCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTTTCTATGGGCTCCAATGAGAAC
ATTCACCTCCATCCACTTCTCTGGGCATGTCTTCACTGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCC
CTGTACAACCTCTACCTGGGGTCTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCTCCAAAGCTGGCATCTGG
AGGGTGGAGTGCCTCATTTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCTGTTCTCTGGTCTACAGC
AACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGAATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCT
GGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCAAGCTGGCCAGGCTCCACTACTCTGGATCCATCAATGCCTGG
AGCACCAAGGAGCCATTGAGCTGGATCAAAGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATC
AAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAACTTCTCCAGCCTGTACATCAGCCAGTTTCATCATCATGTACAGC
CTGGATGGCAAGAAATGGCAGACCTACAGAGGCAACTCCACTGGAACACTCATGGTCTTCTTTGGC
AATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACTCTTCAACCCCCCAATCATCGCCAGATACATCAGG
CTGCACCCCACTACAGCATCCGCAGCACCTCAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAAC
TCCTGCAGCATGCCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATTTCTGATGCCAGATCACTGCCTCCAGC
TACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCAAGCAAGGCCAGGCTGCACCTCCAGGGAAGGAGC
AATGCCTGGAGGGCCAGGTCAACAACCCAAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATG
AAGGTCACCTGGGGTGACACCCAGGGGGTCAAGAGCCTGCTCACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTC
CTGATCAGCTCCAGCCAGGATGGCCACCAAGTGGACCTCTTCTTCCAGAATGGCAAGGTCAAGGTG
TTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCTCCTGACCAGA
TACCTGAGGATTACCCCAAGAGCTGGGTCCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTCTGGGATGT
GAGGCCAGGACCTGTACTGA (SEQ ID NO:4)

图13B

CS04m1-FL-NA

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCTGTGCCTGCTGAGGTTCCTGCTTCTCTGCCACCAGG
AGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTTTCTTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCT
GTGGATGCCAGGTTCCCACCCAGAGTGCCCAATCCTTCCCATTCAACACCTCTGTGGTCTACAAG
AAGACCTCTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAACCCAGGCCACCTGGATG
GGA CTCTGGGACCCACCATTTCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCATCACCTCAAGAACATG
GCCTCCACCCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGTTCAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAG
TATGATGACCAGACCTCCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAAGTGTTCCTGGGGGCAGCCACACC
TATGTGTGGCAGGTCTCAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCACTCTGCCTGACCTACTCC
TACCTTTCTCATGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGC
AGGGAGGGCTCCCTGGCCAAAGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATTCTCCTGTTTGTGTCT
TTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACTCCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCC
TCTGCCAGGGCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGACTC
ATTGGCTGCCACAGGAAATCTGTCTACTGGCATGTGATTGGCATGGGGACAACCCCTGAGGTGCAC
TCCATTTTCTGGAGGGCCACACCTTCTGGTTCAGGAACACAGACAGGCCAGCCTGGAGATCAGC
CCCATCACCTTCTCACTGCCCAGACCCTGCTGATGGACCTCGGACAGTTCCTGCTGTCTGCCAC
ATCAGCTCCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTCAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCA
CAGCTCAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATG
GATGTGGTCCGCTTTGATGATGACAACAGCCATCCTTCATTTCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAA
CACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCACTGGTC
CTGGCCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTCAACAATGGCCACAGAGGATTGGACGC
AAGTACAAGAAAGTCAGGTTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATTTCAG
CATGAGTCTGGCATCCTGGGCCACTCCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCCTGCTCATCATCTTC
AAGAACCAGGCCCTCCAGGCCCTACAACATCTACCCACATGGCATCACTGATGTCAGGCCCTGTAC
AGCCGCAGGCTGCCAAAGGGGGTGAACACCTCAAGGACTTCCCCATTCTGCCTGGGGAGATCTTC
AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACCAAATCTGACCCAGGTGCCTCACCAGA
TACTACTCCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCACTGCTCATC
TGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGAACAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATTCTG
TTCTCTGTCTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATTTCAGCGCTTCTGCCCAAC
CCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGC
TATGTGTTTGACAGCCTCCAGCTTTCTGTCTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATTCCTTCT
ATTGGGGCCCAGACTGACTTCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAACACAAGATGGTG
TATGAGGACACCCCTGACCCTCTTCCCATCTCTGAGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGGAGAACCCT
GGCCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACCTGACTTCCGCAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTCAAA
GTCTCCTCCTGTGACAAGAACAACCTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTAC
CTGCTCAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCCACCTGTCTGAAACGC
CACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCTCCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACC
ATTTCTGTGGAGATGAAGAAAGAGGACTTTGACATCTATGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCAAGG
AGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCCTACTTCAITGCTGTGTGGAGCGCCTGTGGGACTATGGCATG
AGCTCCAGCCCCATGTCTCAGGAACAGGGCCAGTCTGGCTCTGTGCCACAGTTCAAGAAAGTG

(接续)

图14A

GTCTTCCAAGAGTTCACCTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCAC
CTGGGACTCCTGGGCCCATACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCCGCAAC
CAGGCCTCCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCTCCCTCATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGG
GCTGAGCCACGCAAGAAGCTTTGTGAAACCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTCCAGCAC
CACATGGCCCCCACCAGGATGAGTTTGAAGTGAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTG
GAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACCAACACCCTGAACCCT
GCCCATGGAAGGCAAGTGACTGTGCAGGAGTTTGGCCTCTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAG
AGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGCGCAACTGCAGGGCCCCATGCAACATTGAGATGGAGGAC
CCCACCTTCAAAGAGAACTACCGCTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGCCTGGG
CTTGTTCATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTTTCTATGGGCTCCAATGAGAACATT
CACTCCATCCACTTCTCTGGGCATGTCTTCACTGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTG
TACAACCTCTACCCCTGGGGTCTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCTCCAAAGCTGGCATCTGGAGG
GTGGAGTGCCCTCATTTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCTGTTCCTGGTCTACAGCAAC
AAGTGCCAGACCCCCCTGGGAATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGC
CAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTCCACTACTCTGGATCCATCAATGCCTGGAGC
ACCAAGGAGCCATTGAGCTGGATCAAAGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATCAAG
ACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCTCCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTG
GATGGCAAGAAATGGCAGACCTACAGAGGCAACTCCACTGGAACACTCATGGTCTTCTTTGGCAAT
GTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCAATCATCGCCAGATACATCAGGCTG
CACCCACCCACTACAGCATCCGCAGCACCCCTCAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACTCC
TGCAGCATGCCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATTTCTGATGCCAGATCACTGCCTCCAGCTAC
TTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCAAGCAAGGCCAGGCTGCACCTCCAGGGAAGGAGCAAT
GCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCAAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAG
GTCAGTGGGGTGACCACCCAGGGGTCAAGAGCCTGCTCACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTG
ATCAGCTCCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTCTTCTTCCAGAATGGCAAGGTCAAGGTGTTT
CAGGGCAACCAGGACAGCTTACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCTCCTGACCAGATAC
CTGAGGATTACCCCCAGAGCTGGGTCCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTCTGGGATGTGAG
GCCCAGGACCTGTACTGA (SEQ ID NO:5)

图14B

CS04m13-FL-NA

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGG
AGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTTTCTTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCT
GTGGAIGCCAGGTTCCCAACCAGAGTGCCCAATCCTTCCATTCAACACCTCTGTGGTCTACAAG
AAGACCCTCTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAACCCAGGCCACCCTGGATG
GGACTCCTGGGACCCACCATTGAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCATCACCTCAAGAACATG
GCCTCCCAACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAG
TATGATGACCAGACCTCCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAAGTGTTCCTGGGGGCAGCCACACC
TATGTGTGGCAGGTCCTCAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCACTCTGCCTGACCTACTCC
TACCTTTCTCATGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGC
AGGGAGGGCTCCCTGGCCAAAGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATTCTCTGTGTTGCTGTC
TTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACTCCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCC
TCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGACTC
ATTGGCTGCCACAGGAAATCTGTCTACTGGCATGTGATTGGCATGGGGACAACCCCTGAGGTGCAC
TCCATTTTCTGGAGGGCCACACCTTCCCTGGTCAGGAACACAGACAGGCCAGCCTGGAGATCAGC
CCCATCACCTTCCCTCACTGCCCAGACCCTGCTGATGGACCTCGGACAGTTCCTGCTGTCTGCCAC
ATCAGCTCCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTCAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCA
CAGCTCAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATG
GATGTGGTCCGCTTTGATGATGACAACAGCCCATCCTTCATTGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAA
CACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCACTGGTC
CTGGCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTCAACAATGGCCACAGAGGATTGGACGC
AAGTACAAGAAAGTCAGGTTCAATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATTGAG
CATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCTCCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTCATCATCTTC
AAGAACCAGGCCTCCAGGCCCTACAACATCTACCCACATGGCATCACTGATGTCAGGCCCCCTGTAC
AGCCGAGGCTGCCAAAGGGGGTGAACACCTCAAGGACTTCCCCATTCTGCCTGGGGAGATCTTC
AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACCAATCTGACCCAGGTGCCTCACCAGA
TACTACTCCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCACTGCTCATC
TGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGAAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATTCTG
TTCTCTGTCTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATTCAGCGCTTCCTGCCCAAC
CCTGCTGGGGTGACGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGC
TATGTGTTGACAGCCTCCAGCTTTCTGTCTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATTCTTTCT
ATTGGGGCCCAGACTGACTTCCCTTCTGTCTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAACACAAGATGGTG
TATGAGGACACCCTGACCCTCTTCCATTCTCTGGGGAGACTGTGTTGATGAGCATGGAGAACCCT
GGCCTGTGATTCTGGGATGCCACAACCTCTGACTTCCGCAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTCAAA
GTCTCCTCCTGTGACAAGAACAATACCACCTACGTGAACCGCTCCCTGAGCCAGAATCCACCTGTCTGAAA
CGCCACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCCTCCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGAC
ACCATTTCTGTGGAGATGAAGAAAGAGGACTTTGACATCTATGACCAGGACGAGAACCAGAGCCCA
AGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGCGCCTGTGGGACTATGGC
ATGAGCTCCAGCCCCCATGTCTCAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCACAGTTCAAGAAA

(接续)

图15A

GTGGTCTTCCAAGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCGTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAG
CACCTGGGACTCCTGGGCCCATACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCCGC
AACCAGGCCTCCAGGCCCCTACAGCTTCTACAGCTCCCTCATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAG
GGGGCTGAGCCACGCAAGAACTTTGTGAAACCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTCCAG
CACCACATGGCCCCCACCAGGATGAGTTTGAAGGCTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGAC
CTGGAGAAGGATGTGCACCTCTGGCCTGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACCAACACCCTGAAC
CCTGCCCATGGAAGGCAAGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTCTTCTTACCATCTTTGATGAAACC
AAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGCGCAACTGCAGGGCCCCATGCAACATTCAGATGGAG
GACCCACCTTCAAAGAGAACTACCGCTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGCCT
GGGCTTGTCTATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTTTCTATGGGCTCCAATGAGAAC
ATTCACTCCATCCACTTCTCTGGGCATGTCTTCACTGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCC
CTGTACAACCTCTACCCTGGGGTCTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCTCCAAAGCTGGCATCTGG
AGGGTGGAGTGCCTCATTTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCTGTTCCTGGTCTACAGC
AACAAAGTGCCAGACCCCCCTGGGAATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCT
GGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCAAGCTGGCCAGGCTCCACTACTCTGGATCCATCAATGCCTGG
AGCACCAAGGAGCCATTCAGCTGGATCAAAGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATC
AAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCTCCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGC
CTGGATGGCAAGAAATGGCAGACCTACAGAGGCAACTCCACTGGAACACTCATGGTCTTCTTTGGC
AATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAAACATCTTCAACCCCCCAATCATCGCCAGATACATCAGG
CTGCACCCCACTTACAGCATCCGCAGCACCTCAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAAC
TCCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATTTCTGATGCCAGATCACTGCCTCCAGC
TACTTCACCAACATGTTTGGCACCTGGAGCCCAAGCAAGGCCAGGCTGCACCTCCAGGGAAGGAGC
AATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCAAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATG
AAGGTCACTGGGGTGACCACCCAGGGGGTCAAGAGCCTGCTCACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTC
CTGATCAGCTCCAGCCAGGATGGCCACAGTGGACCCTCTTCTTCCAGAATGGCAAGGTCAAGGTG
TTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCAACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCTCCTGACCAGA
TACCTGAGGATTACCCCCAGAGCTGGGTCCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTCTGGGATGT
GAGGCCAGGACCTGTACTGA (SEQ ID NO:XX)

图15B

CS06-FL-NA

atgcagaggggtcaacatgatcatggctgagtcacctggcctcatcaccatctgcctgctgggtac
ctgctgtctgctgagtgcaactgtcttcctggaccatgagaatgccacaagatcctcaacaggccc
aagagatacaactctggcaactggaggagtttgtccagggcaacctggagagggagtgcatggag
gagaagtgtcctttgaggaggccaggagggtctttgagaacactgagcgcaccactgagttctgg
aaacagtatgtggatggggaccagtgtgagtcacaacctgcctgaatgggggcagctgcaaggat
gacatcaacagctatgagtgctggtgccccctttggctttgagggcaagaactgtgagctggatgtg
acctgcaacatcaagaatggcagatgtgagcagttctgcaagaactctgctgacaacaagggtggtg
tgctcctgcactgagggctaccgctggctgagaaccagaagagctgtgagcctgctgtgccattc
ccatgtggcagagtctctgtgagccagaccagcaagctcaccagggtgagactgtgttcctgat
gtggactatgtgaacagcactgaggctgaaacctcctggacaacatcaccagagcaccagagc
ttcaatgacttcaccagagtgggtgggaggagaggatgccaaagcctggccagttccctggcaagtg
gtgctcaatggcaagggtggatgccttctgtgggggtccattgtgaatgagaagtggattgtcact
gctgccactgtgtggagactgggtcaagatcactgtggtggctggggagcacaacattgaggag
actgagcacactgagcagaagcgcaatgtgatcaggatcatccccaccacaactacaatgctgcc
atcaacaagtacaacctgacattgcctgctggagctggatgagccctgggtcctcaacagctat
gtgacccccatctgcattgctgacaaggagtacaccaacatcttctcaagtttggctctggctat
gtctctggctggggcagagtgttccacaaaggcaggtctgcctgggtgctccagtaacctgagagtg
ccctgggtggacagggccacctgcctcttgagcaccaagttcaccatctacaacaacatgttctgt
gctggcttccatgagggaggaagagacagctgccagggggactctggaggaccccatgtcactgag
gtggagggcacctccttcctcactggcatcatctcctggggagaggagtgtgccatgaaaggcaaa
tatggcatctacaccaaagtctccagatatgtcaactggatcaaggagaagaccaagctgacctga
(SEQ ID NO:XX)

图16

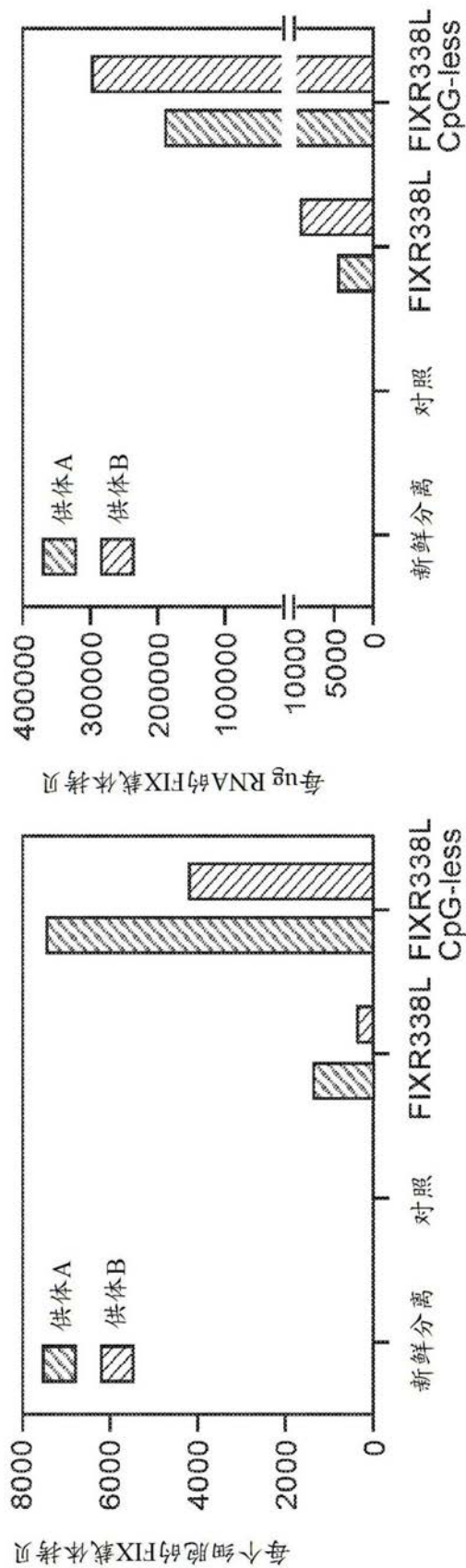


图17

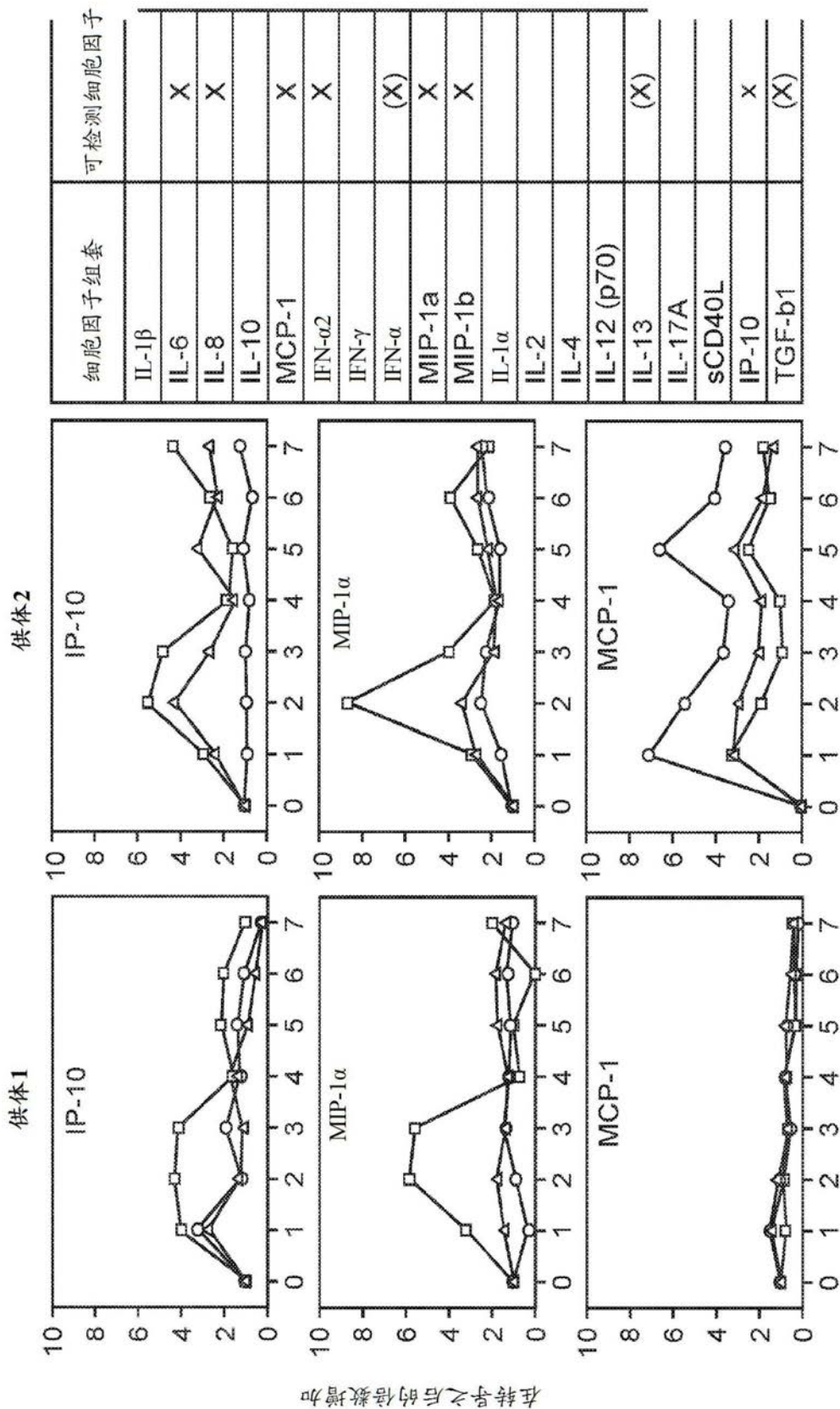


图18

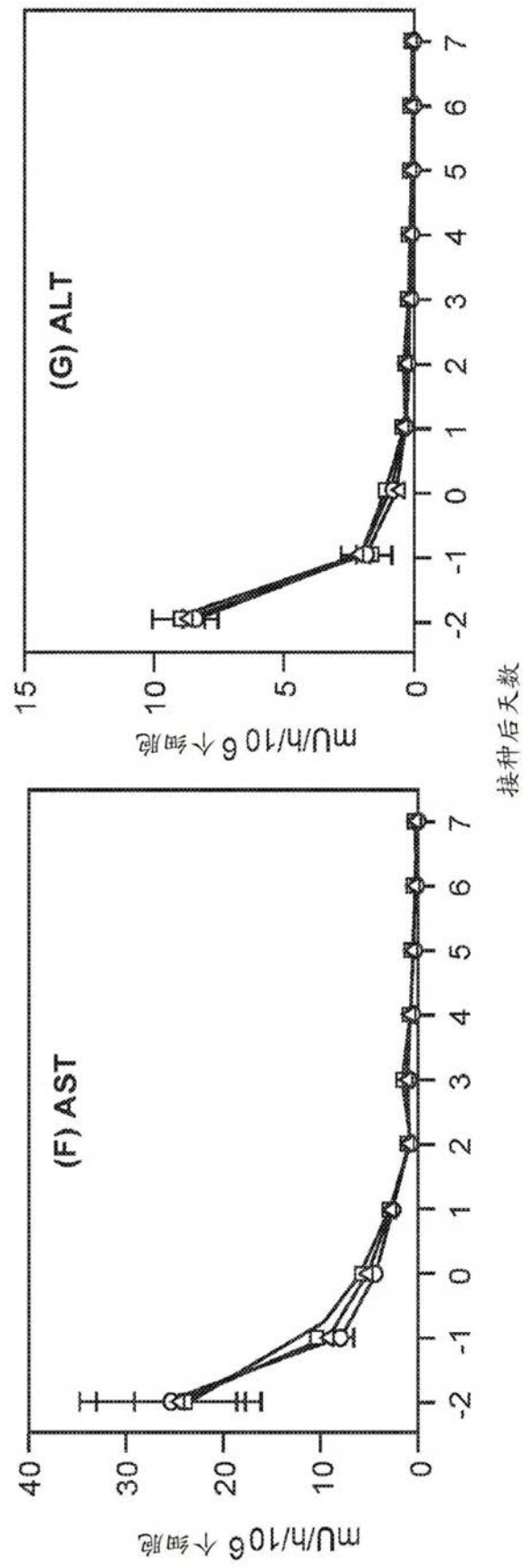


图19

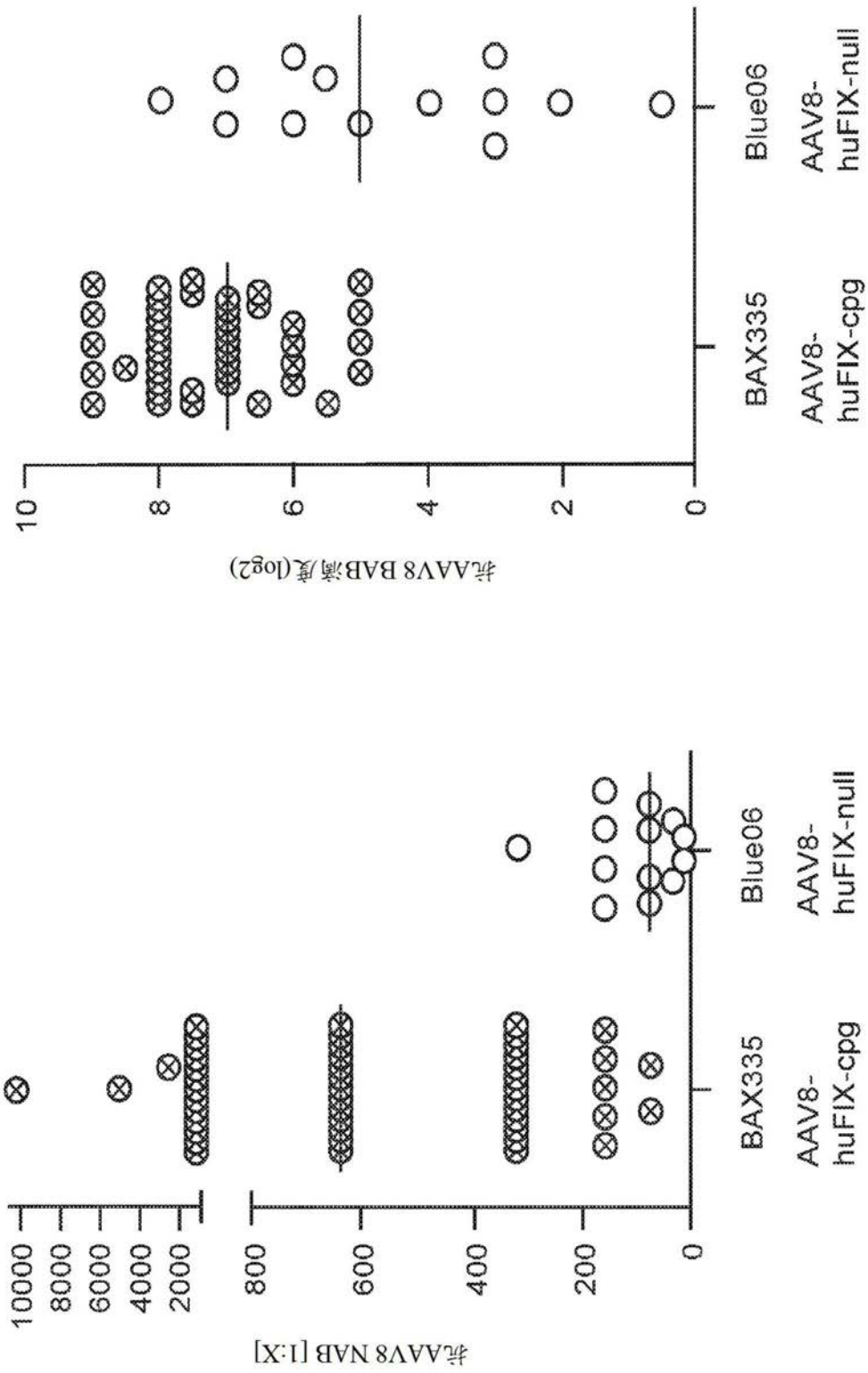


图20