



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109843306 A

(43)申请公布日 2019.06.04

(21)申请号 201780061659.X

(74)专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理

(22)申请日 2017.08.18

有限公司 11280

(30)优先权数据

代理人 郭广迅 李渤

62/377297 2016.08.19 US

(51)Int.Cl.

A61K 35/32(2015.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/20(2006.01)

2019.04.03

A61K 35/761(2015.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 48/00(2006.01)

PCT/US2017/047589 2017.08.18

A61P 19/02(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

A61P 29/00(2006.01)

W02018/035451 EN 2018.02.22

(71)申请人 卡琳缪恩股份有限公司

权利要求书5页 说明书14页

地址 美国亚利桑那州

序列表7页 附图1页

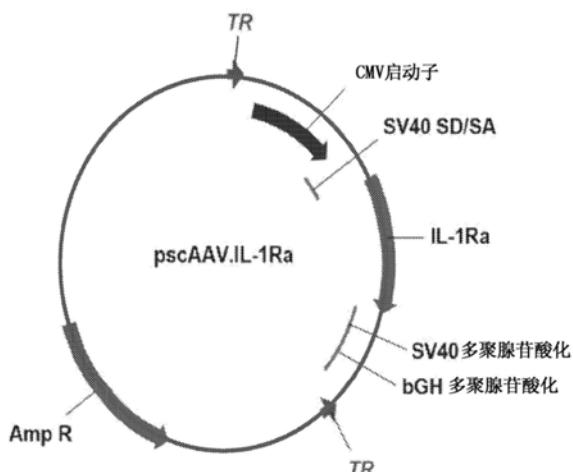
(72)发明人 J·S·巴特利特

(54)发明名称

使用自身互补型重组腺相关病毒治疗病症的方法和组合物

(57)摘要

用于治疗病症的症状的方法和组合物，所述病症例如但不限于骨关节炎和类风湿性关节炎。该方法的特征在于关节内直接注射自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)和适于表达修饰的IL-1Ra肽的载体。本发明的方法可以表达治疗有效量的经修饰的IL-1Ra肽，以改善与所治疗病症相关的症状。



1. 一种向有此需要的人提供治疗有效量的白介素1受体激动剂(IL-1Ra)肽的方法,所述方法包括:将包含自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物引入目标位置,其中所述sc-rAAV包含:

a. 工程化AAV衣壳;和

b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含可操作地连接到启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因与SEQ ID NO:2至少95%相同;

其中所述sc-rAAV将载体转导到目标位置的细胞中,其中表达所述修饰的IL-1Ra基因以便为人提供治疗有效量的所述IL-1Ra肽。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述人被诊断患有骨关节炎或类风湿性关节炎或有发生骨关节炎或类风湿性关节炎的风险。

3. 权利要求1所述的方法,其中所述目标位置是人的关节、滑膜、滑膜下层、关节囊、腱、韧带、软骨或关节周围肌肉。

4. 权利要求1所述的方法,其中所述组合物通过关节内直接注射被引入目标位置。

5. 权利要求1所述的方法,其中所述细胞是软骨细胞、滑膜细胞或其组合。

6. 权利要求1所述的方法,其中所述方法在第一次进行所述方法的时间之后的时间点第二次进行。

7. 权利要求1所述的方法,其中所述时间点是至少3个月。

8. 权利要求1所述的方法,其中所述方法进一步包括将第二治疗与所述组合物联合共同引入目标位置。

9. 权利要求8所述的方法,其中所述第二治疗包括糖皮质激素、透明质酸、富血小板血浆、重组人IL-1Ra或其组合。

10. 权利要求1所述的方法,其中所述启动子包括CMV启动子。

11. 权利要求1所述的方法,其中所述工程化衣壳包含至少一部分血清型AAV2和至少一部分血清型AAV6。

12. 权利要求1所述的方法,其中所述工程化衣壳包含至少一部分血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或其组合。

13. 权利要求1所述的方法,其中所述载体进一步包含SV40和牛生长激素(bGH)聚腺苷酸化序列。

14. 权利要求13所述的方法,其中所述载体进一步包含SV40剪接供体(SD)和剪接受体(SA)位点。

15. 权利要求1所述的方法,其中所述载体包含sc-rAAV2.5Hu-IL-1Ra。

16. 一种改善人骨关节炎或类风湿性关节炎的症状的方法,所述方法包括将包含自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物引入目标位置,其中所述sc-rAAV包含:

a. 工程化AAV衣壳;和

b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含可操作地连接到启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因与SEQ ID NO:2至少95%相同;

其中所述sc-rAAV将载体转导到目标位置的细胞中,其中表达所述修饰的IL-1Ra基因以便为人提供有效改善与骨关节炎或类风湿性关节炎相关症状的量的IL-1Ra肽。

17. 权利要求16所述的方法,其中所述目标位置是人的关节、滑膜、滑膜下层、关节囊、

腱、韧带、软骨或关节周围肌肉。

18. 权利要求16所述的方法,其中所述组合物通过关节内直接注射被引入目标位置。

19. 权利要求16所述的方法,其中所述细胞是软骨细胞、滑膜细胞或其组合。

20. 权利要求16所述的方法,其中所述方法在第一次进行所述方法的时间之后的时间点第二次进行。

21. 权利要求16所述的方法,其中所述时间点是至少3个月。

22. 权利要求16所述的方法,其中所述方法进一步包括将第二治疗与所述组合物联合共同引入目标位置。

23. 权利要求22所述的方法,其中所述第二治疗包括糖皮质激素、透明质酸、富血小板血浆、重组人IL-1Ra或其组合。

24. 权利要求16所述的方法,其中所述启动子包括CMV启动子。

25. 权利要求16所述的方法,其中所述工程化衣壳包含至少一部分血清型AAV2和至少一部分血清型AAV6。

26. 权利要求16所述的方法,其中所述工程化衣壳包含至少一部分血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或其组合。

27. 权利要求16所述的方法,其中所述载体进一步包含SV40和牛生长激素(bGH)聚腺苷酸化序列。

28. 权利要求27所述的方法,其中所述载体进一步包含SV40剪接供体(SD)和剪接受体(SA)位点。

29. 权利要求16所述的方法,其中所述载体包含sc-rAAV2.5Hu-IL-1Ra。

30. 一种将IL-1Ra肽递送至软骨细胞或滑膜细胞的方法,所述方法包括将软骨细胞或滑膜细胞与自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)接触,所述自身互补型重组腺相关病毒包含:

a. 工程化腺相关病毒(AAV)衣壳,其包含至少一部分血清型2和至少一部分血清型6;和

b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含可操作地连接到CMV启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因与SEQ ID NO:2至少95%相同;

其中所述sc-rAAV将载体转导到软骨细胞或滑膜细胞中,并且表达所述修饰的IL-1Ra基因以便向软骨细胞或滑膜细胞提供IL-1Ra肽。

31. 权利要求30所述的方法,其中所述载体包含sc-rAAV2.5Hu-IL-1Ra。

32. 权利要求30所述的方法,其中所述载体进一步包含SV40和牛生长激素(bGH)聚腺苷酸化序列。

33. 权利要求30所述的方法,其中所述载体进一步包含SV40剪接供体(SD)和剪接受体(SA)位点。

34. 一种包含自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物,其中所述sc-rAAV包含:

a. 包含至少一部分血清型2和至少一部分血清型6的工程化衣壳;和

b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含编码可操作地连接至CMV启动子的修饰的IL-1Ra肽的核酸序列,编码修饰的IL-1Ra肽的所述核酸序列与SEQ ID NO:2至少90%相同。

35. 权利要求34所述的组合物,其中所述载体进一步包含SV40和牛生长激素(bGH)多聚腺苷酸化序列。

36. 权利要求35所述的组合物,其中所述载体进一步包含SV40剪接供体 (SD) 和剪接受体 (SA) 位点。

37. 权利要求34的组合物,其中所述载体包含sc-rAAV2.5Hu-IL-1Ra。

38. 一种自身互补型重组腺相关病毒 (sc-rAAV) 载体,其包含可操作地连接至CMV启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因与SEQ ID NO:2至少95%相同。

39. 权利要求38所述的载体,其进一步包含SV40和牛生长激素 (bGH) 多聚腺苷酸化序列。

40. 权利要求39所述的载体,其进一步包含SV40剪接供体 (SD) 和剪接受体 (SA) 位点。

41. 权利要求38所述的载体,其包含sc-rAAV2.5Hu-IL-1Ra。

42. 一种修复有此需要的人的软骨的方法,所述方法包括:将包含自身互补型重组腺相关病毒 (sc-rAAV) 的组合物引入软骨位置,其中所述sc-rAAV包含:

a. 工程化AAV衣壳;和

b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含可操作地连接到启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因与SEQ ID NO:2至少95%相同;

其中所述sc-rAAV将载体转导到软骨位置的细胞中,其中表达所述修饰的IL-1Ra基因,以便为人提供有效修复软骨的IL-1Ra肽。

43. 权利要求42所述的方法,其中所述人被诊断患有骨关节炎或类风湿性关节炎或有发生骨关节炎或类风湿性关节炎的风险。

44. 权利要求42所述的方法,其中所述组合物通过关节内直接注射被引入软骨位置。

45. 权利要求42所述的方法,其中所述细胞是软骨细胞、滑膜细胞或其组合。

46. 权利要求42所述的方法,其中所述方法在第一次进行所述方法的时间之后的时间点第二次进行。

47. 权利要求42所述的方法,其中所述时间点是至少3个月。

48. 权利要求42所述的方法,其中所述方法进一步包括将第二治疗与所述组合物联合共同引入软骨位置。

49. 权利要求48所述的方法,其中所述第二治疗包括糖皮质激素、透明质酸、富血小板血浆、重组人IL-1Ra或其组合。

50. 权利要求42所述的方法,其中所述启动子包括CMV启动子。

51. 权利要求42所述的方法,其中所述工程化衣壳包含至少一部分血清型AAV2和至少一部分血清型AAV6。

52. 权利要求42所述的方法,其中所述工程化衣壳包含至少一部分血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或其组合。

53. 权利要求42所述的方法,其中所述载体包含sc-rAAV2.5Hu-IL-1Ra。

54. 一种向炎症区域提供白介素1受体激动剂(IL-1Ra)肽的方法,所述方法包括:将包含自身互补型重组腺相关病毒 (sc-rAAV) 的组合物引入炎症位置,其中所述sc-rAAV包含:

a. 工程化AAV衣壳;和

b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含可操作地连接到启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因与SEQ ID NO:2至少95%相同;

其中所述sc-rAAV将载体转导到炎症位置的细胞中,其中表达所述修饰的IL-1Ra基因

以便为炎症位置的细胞提供治疗有效量的对减轻炎症有效的IL-1Ra肽。

55. 权利要求54所述的方法,其中所述炎症的位置是人的关节、滑膜、滑膜下层、关节囊、腱、韧带、软骨或关节周围肌肉。

56. 权利要求54所述的方法,其中所述组合物通过关节内直接注射被引入炎症位置。

57. 权利要求54所述的方法,其中所述细胞是软骨细胞、滑膜细胞或其组合。

58. 权利要求54所述的方法,其中所述启动子包括CMV启动子。

59. 权利要求54所述的方法,其中所述工程化衣壳包含至少一部分血清型AAV2和至少一部分血清型AAV6。

60. 权利要求54所述的方法,其中所述工程化衣壳包含至少一部分血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或其组合。

61. 权利要求54所述的方法,其中所述载体包含sc-rAAV2.5Hu-IL-1Ra。

62. 一种向有此需要的人提供治疗有效量的白介素1受体激动剂(IL-1Ra)的方法,所述方法包括:将包含自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物引入目标位置,其中所述sc-rAAV包含:

a. 工程化AAV衣壳;和

b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含可操作地连接到启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因根据SEQ ID NO:6编码IL-1Ra;

其中所述sc-rAAV将载体转导到目标位置的细胞中,其中表达IL-1Ra基因以便向人提供治疗有效量的所述IL-1Ra。

63. 一种改善人骨关节炎或类风湿性关节炎的症状的方法,所述方法包括将包含自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物引入目标位置,其中所述sc-rAAV包含:

a. 工程化AAV衣壳;和

b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含可操作地连接到启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因根据SEQ ID NO:6编码IL-1Ra;

其中所述sc-rAAV将载体转导到目标位置的细胞中,其中表达IL-1Ra基因以便向人提供有效改善骨关节炎或类风湿性关节炎相关症状的量的IL-1Ra。

64. 一种将IL-1Ra肽递送至软骨细胞或滑膜细胞的方法,所述方法包括将软骨细胞或滑膜细胞与自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)接触,所述自身互补型重组腺相关病毒包含:

a. 工程化腺相关病毒衣壳(AAV),其包含至少一部分血清型2和至少一部分血清型6;和

b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含可操作地连接至CMV启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因根据SEQ ID NO:6编码IL-1Ra;

其中所述sc-rAAV将载体转导到软骨细胞或滑膜细胞中,并且表达IL-1Ra基因以便向软骨细胞或滑膜细胞提供IL-1Ra。

65. 一种包含自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物,其中所述sc-rAAV包含:

a. 包含至少一部分血清型2和至少一部分血清型6的工程化衣壳;和

b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含编码可操作地连接至CMV启动子的修饰的IL-1Ra肽的核酸序列,所述核酸序列根据SEQ ID NO:6编码IL-1Ra。

66. 一种修复有此需要的人的软骨的方法,所述方法包括:将包含自身互补型重组腺相

关病毒(sc-rAAV)的组合物引入软骨位置,其中所述sc-rAAV包含:

- a. 工程化AAV衣壳;和
- b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含可操作地连接到启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因根据SEQ ID NO:6编码IL-1Ra;

其中所述sc-rAAV将载体转导到软骨位置的细胞中,其中表达IL-1Ra基因以便为人提供有效修复软骨的IL-1Ra。

67. 一种向炎症区域提供白介素1受体激动剂(IL-1Ra)肽的方法,所述方法包括:将包含自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物引入炎症位置,其中所述sc-rAAV包含:

- a. 工程化AAV衣壳;和
- b. 包装在所述衣壳内的载体,所述载体包含可操作地连接到启动子的修饰的IL-1Ra基因,所述修饰的IL-1Ra基因根据SEQ ID NO:6编码IL-1Ra;

其中所述sc-rAAV将载体转导到炎症位置的细胞中,其中表达IL-1Ra基因以便向炎症位置的细胞提供治疗有效量的对减轻炎症有效的IL-1Ra肽。

使用自身互补型重组腺相关病毒治疗病症的方法和组合物

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2016年8月19日提交的美国临时专利申请第62/377,297号的优先权，该申请的说明书(多个说明书)以引用的方式完整地并入本文。

[0003] 对序列表的参考

[0004] 申请人声称，以根据第13条第1(a)项提交的附件C/ST.25文本文件的形式记录的、标题为CALIM_16_02_PCT_Sequence_Listing_ST25.txt的信息与构成提交的国际申请一部分的信息相同。序列表的内容以引用的方式完整地并入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及基因治疗和用于基因治疗的组合物，更具体地涉及自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)和使用sc-rAAV治疗病症或病症的症状的方法。

背景技术

[0006] 骨关节炎(OA)影响了2700多万美国人，是老年人残疾的主要原因。OA患者的死亡风险也很高。我们的医疗保健系统的OA费用估计每年超过1000亿美元。这些统计数据反映出OA是不可治愈的，并且对治疗有显著抗性。

[0007] OA最早和最主要的症状是疼痛。这通常出现在疾病过程的后期，此时受影响的关节通常有相当大的结构改变，包括关节软骨的丧失、软骨下骨的硬化、骨赘的形成和滑膜炎症。膝关节也有半月板损伤。在缺乏阻止或逆转疾病进展的疾病改善性骨关节炎药物(DMOAD)的情况下，目前的治疗是姑息性的。由于目前没有有效的方式来干预疾病过程，许多患者发展到需要全关节置换手术的地步。虽然这是一个成功的手术，但需要大规模、昂贵的手术和广泛的康复训练。在许多情况下，需要进行翻修手术来替换已经功能失调的人工关节。

[0008] 在缺乏DMOAD的情况下，目前的护理标准是姑息性的。正如美国风湿病学会(ACR)于2012年和美国骨科医生学会(AAOS)于2013年发布的最新膝关节(本申请的目标关节)OA治疗指南所反映的，目前的治疗方法分为三个渐进类别。非药物疗法包括一系列策略，如患者教育和自助、锻炼计划和减重。药物治疗包括使用对乙酰氨基酚、非甾体抗炎药(NSAID)、鸦片剂和关节内注射糖皮质激素或透明质酸。NSAID给许多患者带来部分缓解，但其与上消化道出血和肾功能衰竭有关，在目前情况下尤其令人担忧，因为许多OA患者都是老年人。在许多情况下，关节内注射糖皮质激素带来迅速缓解，但效果通常只持续几周。由于担心感染和证据表明持续高剂量的糖皮质激素损伤关节软骨，反复注射糖皮质激素是不切实际的和忌用的。关节内注射透明质酸(黏性补给)的益处存在争议；ACR对此没有提出建议，而AAOS也不再对其提出建议。关节内注射间充质干细胞(MSC)和自体血液制品，如富含血小板的血浆越来越受欢迎，但未获FDA批准用于OA。国际骨关节炎研究协会和欧洲抗风湿病联盟对膝关节OA治疗的最新建议与ACR和AAOS的建议大同小异。各机构的建议强调了OA的治疗选择缺乏和完全缺乏可靠的药物干预。即使对治疗有一些反应，它也只解决体征和症状，而

不解决疾病进展。当治疗没有控制OA的症状和进展时,可指示进行外科干预。

[0009] 关节镜灌洗和清创术已广泛用于缓解症状,但有证据表明其效果没有比安慰剂好,因此其使用已经减少。有时进行截骨术来重新调整膝关节中的力,使得负载现在由完整的软骨区域承受。这项措施可以缓解几年,直到新的承重关节软骨侵蚀和症状重现。总的来说,截骨术被认为是一种拖延策略,它能为假体膝关节的手术植入争取时间。许多患者发展到需要全关节置换的程度,去年在美国手术植入超过70万个人工膝关节。

[0010] IL-1是软骨细胞软骨溶解和抑制软骨细胞基质合成的强大介质。这两个过程在一起对软骨有很大的破坏性。IL-1也显示出抑制软骨形成,但同时促进成骨分化的某些方面,这可能帮助引起骨赘的形成和软骨下骨的硬化。矛盾的是,IL-1也促进破骨细胞活性。通过刺激成骨作用和骨质溶解,IL-1将增强骨转换,正如在OA期间的软骨下骨中所见。最后,IL-1能够很好地激起OA中见到的炎症变化。它的热原活性是已知的,并且在兔膝关节中极少量的IL-1的表达足以引起明显的滑膜炎。

[0011] 在研究从患有OA的人关节中恢复的软骨时,发现软骨细胞产生的IL-1以自分泌的方式大幅提高和维持。而且,细胞不产生IL-1Ra。这表明在OA期间,在缺乏其主要生理抑制剂的情况下,IL-1增强软骨细胞的自分泌和旁分泌激活。在OA中软骨细胞对IL-1的反应性增强也可通过OA软骨细胞上I型IL-1受体(信号传导受体)的表达增加来指示。软骨细胞对IL-1的局部产生和消耗可能有助于解释为什么滑液中IL-1的浓度趋向于较低,甚至在OA中也是如此。此外,遗传分析已经确定了编码IL-1Ra (IL1RN) 的人类基因中的单核苷酸多态性(SNP) 和与某些类型OA的发病率和严重性相关的调控因素。

[0012] 靶向药物递送是关节内治疗关节疾病的主要问题。各种大小的分子以及颗粒都通过淋巴管、滑膜下层毛细血管或两者从关节中迅速清除。这使得在关节中难以实现持续的治疗剂量的抗OA药物。为了解决这个问题,小分子可以全身递送,但是蛋白质难以以这种方式递送,因为在穿过滑膜毛细血管的穿孔内皮时存在尺寸依赖性限制。而且,全身递送使非靶位点暴露于高剂量的治疗剂,导致不良副作用。蛋白质从关节中快速流出,半衰期通常为几个小时,这使得关节内递送可能无效。例如,重组IL-1R(阿那白滞素(Kineret),Amgen Biologicals)通过每日皮下注射来递送,以尝试治疗RA的症状。然而,每日递送未在两次注射之间维持IL-1Ra的治疗性血清水平(Evans等人,1996,Human Gene Therapy,7:1261-1290;Evans等人,2005,PNAS102 (24):8698-8703)。一些研究使用离体基因转移引入IL-1Ra以治疗OA。然而,这些方法是费力的,并且已经看来没有提供长期的基因表达(Frisbie等人,2002,基因疗法9 (1):12-20)。此外,一些研究描述了靶向IL-1 α 和IL-1 β (例如ABT-981)的双可变结构域免疫球蛋白(DVD-Ig)用于治疗骨关节炎的用途(Kamath等人,2011,Osteoarthritis and Cartilage19S1:S64;Wang等人,2015,Osteoarthritis and Cartilage 23:A398-399;Wang等人,2014,Osteoarthritis and Cartilage 22:S462-S463;Lacy等人,2015,mAbs 7 (3):605-619;Wu等人,2009,mAbs 1 (4):339-347;Wang等人,2014,Scientific Abstracts SAT0448第756页;Goss等人,2014,Scientific Abstracts SAT0447第755-756页;US2015/0050238;Wang等人,2014年ACR/ARHP Annual Meeting Abstract编号2237;Wang等人,2015年ACR/ARHP Annual Meeting Abstract编号318)。然而,由于半衰期相对短,这些肽需要反复全身引入(例如每2周4剂或每4周3剂,例如通过皮下注射或静脉输注)。(Wang等人,2015,Osteoarthritis and Cartilage 23:A398-399;

Wang等人,2014,0steoarthritis and Cartilage 22:S462-S463;Evans等人,2005,PNAS102 (24):8698-8703)。

[0013] 本发明的特征在于以持续的方式将治疗性基因产物(例如,IL-1Ra)递送至目标位置(例如关节)的方法和组合物。本发明的特征还在于用于治疗病症的症状的方法和组合物,所述病症例如但不限于骨关节炎和类风湿性关节炎。本发明的特征还在于用于向个体(例如人)提供治疗有效量的治疗性基因产物(例如IL-1Ra)的方法和组合物。所述方法和组合物可以以自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)为特征,其中sc-rAAV包含工程化衣壳和包装在衣壳内的载体(例如sc-rAAV载体)。所述载体可包含可操作地连接到启动子(例如组成型启动子)的转基因(例如编码目的蛋白质,例如治疗性基因产物,例如IL-1Ra的核苷酸序列或其密码子修饰形式)。治疗基因产物可被递送到目标位置,例如关节。例如,为了治疗骨关节炎,可以通过关节内直接注射将sc-rAAV引入关节中的细胞(例如,软骨细胞,滑膜细胞等)中。本发明不限于上述病症,也不限于目标位置(例如,关节)。

[0014] 注意,Goodrich等人(Molecular Therapy-Nucleic Acids,2013,2:e70)一般性公开了一种使用scAAV递送的IL-1Ra治疗骨关节炎的方法。然而,Goodrich等人未具体鉴定或启用任何特定的IL-1Ra序列,例如根据本发明的IL-1Ra序列。特别地,基因治疗领域是不可预测的领域,其中人们不能假设目的蛋白质的任何特定基因序列都将有效表达。此外,与人相比,基因治疗就动物模型中的有效性而言也是不可预测的,例如,人们不能假设如果特定方法在动物模型中有效,那么它将在人中有效。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明的特征在于一种自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)。在一些实施方案中,sc-rAAV包含工程化AAV衣壳和包装在衣壳内的载体,其中所述载体包含可操作地连接到启动子的修饰的IL-1Ra基因,并且修饰的IL-1Ra基因与SEQ ID NO:2至少95%相同。在一些实施方案中,启动子包含CMV启动子。在一些实施方案中,工程化衣壳包含至少一部分血清型AAV2和至少一部分血清型AAV6。在一些实施方案中,工程化衣壳包含至少一部分血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或其组合。在一些实施方案中,载体进一步包含SV40和牛生长激素(bGH)多聚腺苷酸化序列。在一些实施方案中,载体进一步包含SV40剪接供体(SD)和剪接受体(SA)位点。在一些实施方案中,载体包含sc-rAAV2.5Hu-IL-1Ra。在一些实施方案中,sc-rAAV是组合物的一部分。

[0017] 在一些实施方案中,sc-rAAV包含工程化AAV衣壳和包装在衣壳内的载体,其中所述载体包含可操作地连接到启动子的修饰IL-1Ra基因,并且修饰的IL-1Ra基因根据SEQ ID NO:6编码IL-1Ra蛋白。

[0018] 本发明的特征在于向有此需要的人(例如,被诊断患有骨关节炎或类风湿性关节炎或有骨关节炎或类风湿性关节炎风险的人)提供治疗有效量的白介素1受体激动剂(IL-1Ra)肽的方法。在一些实施方案中,该方法包括将包含根据本发明的自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物引入目标位置(例如,通过关节内注射)。sc-rAAV将载体转导到目标位置的细胞中,其中表达修饰的IL-1Ra基因,以便为人提供治疗有效量的所述IL-1Ra肽。

[0019] 本发明的特征还在于一种改善人骨关节炎或类风湿性关节炎的症状的方法。在一些实施方案中,该方法包括将包含根据本发明的自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的

组合物引入目标位置(例如,通过关节内直接注射)。sc-rAAV将载体转导到目标部署的细胞中,其中表达修饰的IL-1Ra基因,以便为人提供有效改善骨关节炎或类风湿性关节炎相关症状的量的IL-1Ra肽。

[0020] 本发明的特征还在于一种修复有此需要的人(例如,被诊断患有骨关节炎或类风湿性关节炎或有发生骨关节炎或类风湿性关节炎风险的人)的软骨的方法。在一些实施方案中,该方法包括将包含根据本发明的自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物引入软骨位置(例如,通过关节内直接注射)。sc-rAAV将载体转导到软骨位置的细胞中,其中表达修饰的IL-1Ra基因,以便为人提供有效修复软骨的IL-1Ra肽。

[0021] 本发明的特征还在于一种向炎症区域提供白介素1受体激动剂(IL-1Ra)肽的方法。在一些实施方案中,该方法包括将包含根据本发明的自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物引入炎症位置(例如,通过关节内注射)。sc-rAAV将载体转导到炎症位置的细胞中,其中表达修饰的IL-1Ra基因,以便为炎症位置的细胞提供治疗有效量的对减轻炎症有效的IL-1Ra肽。

[0022] 在一些实施方案中,目标位置是人的关节、滑膜、滑膜下层(subsynovium)、关节囊、腱、韧带、软骨或关节周围肌肉。在一些实施方案中,细胞是软骨细胞、滑膜细胞或其组合。

[0023] 在一些实施方案中,该方法在第一次进行该方法的时间之后的时间点第二次进行。在一些实施方案中,时间点是至少3个月。在一些实施方案中,该方法还包括与组合物联合向目标位置共同引入第二治疗(例如糖皮质激素、透明质酸、富血小板血浆、重组人IL-1Ra或其组合)。

[0024] 本发明的特征还在于一种将IL-1Ra肽递送至软骨细胞或滑膜细胞的方法。在一些实施方案中,该方法包括使软骨细胞或滑膜细胞与根据本发明的自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)接触,根据本发明的自身互补型重组腺相关病毒例如包含至少一部分血清型2和至少一部分血清型6的工程化腺相关病毒衣壳(AAV)和包装在衣壳内的载体,其中所述载体包含可操作地连接至CMV启动子的修饰的IL-1Ra基因,并且所述修饰的IL-1Ra基因与SEQ ID NO:2至少95%相同。sc-rAAV将载体转导到软骨细胞或滑膜细胞中,并且表达修饰的IL-1Ra基因以向软骨细胞或滑膜细胞提供IL-1Ra肽。

[0025] 对于上述方法和组合物(例如,向有此需要的人提供治疗有效量的白介素1受体激动剂(IL-1Ra)肽的方法、改善人骨关节炎或类风湿性关节炎的症状的方法、将IL-1Ra肽递送至软骨细胞或滑膜细胞的方法、包含自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)的组合物、包含可操作地连接至CMV启动子的修饰的IL-1Ra基因的自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)载体、修复有需要的犬的软骨的方法、向炎症区域提供白介素1受体激动剂(IL-1Ra)肽的方法等),修饰的IL-1Ra基因可与SEQ ID NO:2至少95%相同并根据SEQ ID NO:6编码IL-1Ra。

[0026] 本文描述的任何特征或特征组合都包括在本发明的范围内,只要包括在任何这样的组合中的特征不相互矛盾,这由上下文、本说明书和本领域普通技术人员的知识是显而易见的。在下面的详细描述和权利要求中,本发明的其他优点和方面是显而易见的。

[0027] 附图简述

[0028] 图1示出质粒sc-rAAV2.5Hu-IL-1Ra,其包含在CMV启动子控制下编码人IL-1Ra蛋

白的修饰的互补DNA。基因插入片段还含有SV40和牛生长激素(bGH)多聚腺苷酸化序列,以及SV40剪接供体(SD)和剪接受体(SA)位点。末端反向重复序列(TR)之间的区域已经通过测序验证。

[0029] 术语

[0030] 除非另有解释,本文使用的所有技术和科学术语具有与所公开的发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。除非上下文另外明确指明,否则单数术语“一(a)”,“一(an)”和“该(the)”包括复数的指示对象。类似地,除非上下文中另外明确指示,“或”一词旨在包括“和”。“包含”是指“包括”。因此,“包含甲或乙”是指“包括甲”或“包含乙”或“包含甲和乙”。

[0031] 下面描述用于实践和/或测试本公开内容的实施方案的合适方法和材料。这样的方法和材料仅仅是说明性的,而不要成为限制性的。可以使用类似于或等同于本文所述的方法和材料的其他方法和材料。例如,本公开内容所属领域中熟知的常规方法在各种一般和更具体的参考文献中有所描述,包括例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989;Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001;Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates,1992(以及至2000年的增补);Ausubel等人,Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,第4版,Wiley and Sons,1999;Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1990;以及Harlow和Lane,Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999,它们的公开内容通过引用完整地并入本文。

[0032] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用完整地并入本文。

[0033] 虽然类似于或等同于本文所述的方法和材料的方法和材料可以用于实践或测试所公开的技术,但是在下文中描述了合适的方法和材料。这些材料、方法和实例仅是说明性的,而不要成为限制性的。

[0034] 为了便于审阅本公开内容的各个实施方案,提供了以下对特定术语的解释:

[0035] 腺相关病毒(AAV)、重组腺相关病毒(rAAV)和自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV):AAV是细小病毒科中的小病毒(20nm)。已知AAV不会引起疾病。由于多种原因,AAV最近被用于基因治疗,包括其已显示具有低免疫原性、能够有效转导非分裂细胞以及能够感染多种细胞和组织类型。重组AAV(rAAV)不含天然病毒编码序列。重组AAV DNA作为长度约为4600个核苷酸的单链分子包装在病毒衣壳中。病毒感染细胞后,细胞的分子机制将单链DNA转化为双链形式。只有双链的DNA形式对将所含基因转录成RNA的细胞蛋白质有用。自互补型AAV(sc-rAAV)是一种能形成分子内双链DNA模板的工程化形式的rAAV。因此,一旦感染,sc-rAAV的两个互补半体将结合形成一个双链的DNA单元,为立即复制和合成做好准备。

[0036] 表达:将核酸序列转化成蛋白质。蛋白质可以在细胞内表达并保持,成为细胞表面膜的组分,或者分泌到细胞外基质或培养基中。

[0037] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列

与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子可操作地连接到编码序列。

[0038] 药学上可接受的媒介物:药学上可接受的载体(媒介物),例如溶液,可以是常规的,但不限于常规媒介物。例如,E.W.Martin,Remington的Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,PA,第15版(1975)和D.B.Troy编辑的Remington: The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams&Wilkins,Baltimore MD 和Philadelphia,PA,第21版(2006)描述了适用于一种或多种治疗化合物或分子的药物递送的组合物和制剂。通常,载体的性质将取决于所采用的特定给药方式。除生物中性载体外,所给予的药物组合物可含有少量无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0039] 预防、治疗、管理或改善病症:“预防”疾病可以指抑制病症的全面发展。“治疗”可以指在疾病或病理病症开始发展后改善其体征或症状的治疗性干预。“管理”可以指不允许疾病或病症的体征或症状恶化的治疗性干预。“改善”可以指疾病或病症的体征或症状的数量或严重性的减低。

[0040] 序列一致性:两个或多个核酸序列之间的一致性(或相似性)通过序列之间的一致性或相似性来表示。序列一致性可以用百分比一致性来衡量;百分比越高,序列越一致。序列相似性可以用相似性百分比来衡量(考虑到保守氨基酸置换);百分比越高,序列越相似。用于比较的序列比对方法是本领域熟知的。各种程序和比对算法在以下有描述:Smith& Waterman,Adv.Appl.Math.2:482,1981;Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.48:443,1970; Pearson&Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444,1988; Higgins&Sharp,Genetics,73:237-44,1988; Higgins&Sharp,CABIOS 5:151-3,1989;Corpet等人,Nuc.Acids Res.16:10881-90,1988;Huang等人,Computer Appl.s.in the Biosciences 8,155-65,1992;以及Pearson等人,Meth.Mol.Bio.24:307-31,1994.Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-10,1990,给出了序列比对方法和同源性计算的详细考虑。NCBI基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool,BLAST)(Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-10,1990)可从几个来源获得,包括国家生物技术中心(NCBI,国家医学图书馆,38A栋,8N805室,Bethesda,MD20894)和在互联网获得,用于与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx关联使用。另外的信息可在NCBI网站上找到。BLASTN可用于比较核酸序列,而BLASTP可用于比较氨基酸序列。如果两个比较的序列共享同源性,则指定的输出文件将那些同源区域呈现为对齐的序列。如果两个比较的序列不共享同源性,则指定的输出文件将不呈现对齐的序列。类BLAST比对工具(BLAT)也可以用来比较核酸序列(Kent,GenomeRes.12:656-664,2002)。BLAT可从几个来源获得,包括Kent Informatics(Santa Cruz,CA)和在互联网(genome.ucsc.edu)获得。一旦比对,通过对两个序列中呈现相同核苷酸或氨基酸残基的位置数计数确定匹配数。通过将匹配数除以所鉴定序列中所示序列的长度或接头长度(例如来自所鉴定序列中所列序列的100个连续核苷酸或氨基酸残基)来确定序列一致性百分比,然后将结果值乘以100。例如,当与具有1554个核苷酸的测试序列比对时,具有1166个匹配的核酸序列与测试序列75.0%相同($1166 \div 1554 \times 100 = 75.0$)。百分比序列一致性值四舍五入到最接近的十分之一。

[0041] 治疗有效量:一定量的特定药剂,足以在用该药剂治疗的受试者中达到预期效果。

这些试剂可包括IL-1Ra。例如,治疗有效量的IL-1Ra可以是足以预防、治疗或改善骨关节炎或类风湿性关节炎的症状的量。用于预防、改善和/或治疗受试者的药剂的治疗有效量将取决于被治疗的受试者、病痛的类型和严重性,以及治疗组合物的给予方式。

[0042] 转导:转导的细胞是通过分子生物学技术已经将核酸分子引入其中的细胞。如本文所用,术语转导包括通过其可以将核酸分子引入这种细胞的所有技术,包括用病毒或病毒载体转染,用质粒载体转化,以及通过电穿孔、脂转染和粒子枪加速引入裸DNA。这种细胞有时被称为转化的细胞。

[0043] 载体:被引入宿主细胞中,从而产生转化的宿主细胞的核酸分子。载体可包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体可能缺乏允许其在宿主细胞中复制的核酸序列。载体还可包括目标基因、一个或多个选择性标记基因、本领域已知的其他基因要素或任何其他合适的插入片段。

[0044] 发明的详述

[0045] 本发明的特征在于用于以持续的方式将治疗性基因产物(例如IL-1Ra)递送至目标位置(例如关节)的方法和组合物。本发明的特征还在于用于治疗病症的症状的方法和组合物,所述病症例如但不限于骨关节炎或类风湿性关节炎。本发明的特征还在于用于向个体(例如人)提供治疗有效量的治疗性基因产物(例如IL-1Ra)的方法和组合物。该方法和组合物的特征可以是自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV),其中sc-rAAV包含工程化衣壳和包装在衣壳内的载体(sc-rAAV载体)。所述载体可包含可操作地连接到启动子(例如组成型启动子)的转基因(例如编码目的蛋白质的核苷酸序列,例如治疗性基因产物,例如IL-1Ra或其修饰形式)。

[0046] 如之前所讨论的,本发明的特征在于包含自身互补型重组腺相关病毒(sc-rAAV)载体的组合物。在下面表1中的SEQ ID N0:1中显示了sc-rAAV载体的非限制性实例。SEQ ID N0:1的sc-rAAV载体包含修饰的IL-1基因。在一些实施方案中,载体包含SV40多聚腺苷酸化序列。在一些实施方案中,载体包含牛生长激素(bGH)多腺苷酸化序列。在一些实施方案中,载体包含SV40剪接供体(SD)和剪接受体(SA)位点。sc-rAAV载体不限于SEQ ID N0:1。

[0047] sc-rAAV载体包含编码目标肽的核酸。在一些实施方案中,核酸与SEQ ID N0:2至少90%相同。在一些实施方案中,核酸与SEQ ID N0:2至少92%相同。在一些实施方案中,核酸与SEQ ID N0:2至少94%相同。在一些实施方案中,核酸与SEQ ID N0:2至少95%相同。在一些实施方案中,核酸与SEQ ID N0:2至少96%相同。在一些实施方案中,核酸与SEQ ID N0:2至少97%相同。在一些实施方案中,核酸与SEQ ID N0:2至少98%相同。在一些实施方案中,核酸与SEQ ID N0:2至少99%相同。在下表1中可以找到这种核酸序列的非限制性实例。例如,SEQ ID N0:3是修饰的人IL-1Ra的序列,其与SEQ ID N0:2约98%相同;SEQ ID N0:4是修饰的人IL-1Ra的序列,其与SEQ ID N0:2约99%相同;并且(注意,表1中的粗体字母是与SEQ ID N0:2相比的核苷酸置换,及密码子加下划线)。

[0048] 表1

[0049]

SEQ ID NO:	描述	序列
1	含有完整病毒序列的 Hu-IL-1Ra 质粒的序列，带有修饰的人 IL1Ra 插入片段（加下划线的）和粗体斜体表示的 SacII/NotI 限制性位点。	CATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCAGTTGC GTATTGGGCGCTTCCGCTTCGCTCACTGACTCGCTGC GCTCGGTCGTCGGCTCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA AAGGCGGTAA <u>TACG</u> TTATCCACAGAATCAGGGATAACGC AGGAAAGAACATGTGAGCAA <u>AAGGCCAG</u> CAA <u>AAGGCCAG</u> GAACCGTAAA <u>AAGGCCG</u> TTGCTGGCGTTTCCATAGGC TCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGT CAGAGGTGGCGAA <u>ACCG</u> ACAGGACTATAAGATA <u>ACCG</u> CGTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC <u>GT</u> CTCC <u>GT</u> TTCCG ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTCG GGAAGCGTGGCGTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCT CAGTCGGTAGGT <u>CGT</u> CCAGCT <u>CA</u> AGCTGGCTGTGC ACGAACCCCCCGTTCAGCCGACC <u>G</u> CTGC <u>C</u> TTATCCGGT AACTATCGTCTGAGT <u>CC</u> AAC <u>CCGG</u> TAAGACACGACTATC GCCACTGGCAGCAG <u>CC</u> ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG AGGTATGAG <u>CCGG</u> TGCTACAGAGTT <u>CTG</u> AA <u>GTGG</u> TGGC TA <u>ACTACGG</u> CTACACTAGAAGGACAGTATTGGTAT <u>CTG</u> CT <u>CTG</u> CTGAAG <u>CCAG</u> TT <u>AC</u> CT <u>CCG</u> AAAA <u>AGAG</u> TTGGTAGC TCT <u>GT</u> AT <u>CCGG</u> CAA <u>AC</u> AA <u>AC</u> CC <u>ACCG</u> CT <u>GT</u> AG <u>CGGT</u> GGTT TT <u>TTG</u> TT <u>GC</u> AA <u>GC</u> AG <u>AT</u> AC <u>GC</u> CG <u>CA</u> AAAA <u>AGGA</u> TCT <u>CA</u> AG <u>AA</u> AG <u>AT</u> <u>CC</u> TT <u>GT</u> AT <u>TTT</u> CT <u>ACGGGG</u> CT <u>GC</u> CAGTGG <u>AA</u> CG <u>AA</u> ACT <u>AC</u> GT <u>TA</u> AG <u>GG</u> AT <u>TTT</u> GG <u>TC</u> GATT <u>AT</u> CA <u>AA</u> AA <u>AGG</u> AT <u>CTT</u> CA <u>CC</u> TA <u>AG</u> AT <u>CTT</u> AA <u>ATT</u> AA AAT <u>GA</u> AG <u>TT</u> AA <u>AT</u> CA <u>AT</u> CT <u>AA</u> AG <u>AT</u> AT <u>AT</u> G <u>AG</u> TA <u>AA</u> CT GG <u>TC</u> TA <u>CG</u> AG <u>TT</u> AC <u>CA</u> AT <u>GC</u> TT <u>AT</u> CA <u>CT</u> AG <u>GT</u> G <u>AGG</u> C <u>AC</u> CT <u>ATC</u> TC <u>AG</u> CG <u>AT</u> CT <u>GT</u> CT <u>AT</u> TC <u>CG</u> TT <u>CA</u> TC <u>CA</u> TA <u>GT</u> TC <u>CT</u> GC <u>ACT</u> CC <u>CG</u> TC <u>GT</u> TA <u>GA</u> TA <u>AC</u> AC <u>GA</u> TC <u>AC</u> GG <u>GA</u> GG <u>GG</u> CT <u>TA</u> CC <u>AT</u> TGG <u>CC</u> CC <u>AG</u> GT <u>CG</u> CA <u>AT</u> GA <u>TA</u> CC <u>CG</u> CG <u>AG</u> AC <u>CC</u> AC <u>CG</u> CT <u>CA</u> CG <u>GC</u> TC <u>CC</u> CA <u>AG</u> TT <u>AT</u> CA <u>GA</u> AA <u>AC</u> AC <u>AG</u> CC <u>AG</u> CC <u>GG</u> AA <u>AG</u> GCC <u>CG</u> AG <u>CG</u> CA <u>GA</u> AG <u>GT</u> GG <u>TC</u> CT <u>GA</u> CA <u>CT</u> AT <u>CCG</u> C <u>CT</u> CC <u>AT</u> CC <u>AG</u> T <u>CT</u> AT <u>TA</u> AT <u>GT</u> GG <u>CC</u> GG <u>GA</u> AG <u>CT</u> AG <u>AG</u> TA <u>AG</u> TA <u>GT</u> CG <u>CC</u> AG <u>TT</u> AA <u>AG</u> TT <u>GT</u> GC <u>CA</u> AC <u>GT</u> TT <u>GC</u> CC <u>AT</u> TG <u>CT</u> A <u>CA</u> GG <u>CA</u> TC <u>GT</u> GG <u>GT</u> TC <u>AC</u> G <u>CT</u> CG <u>CT</u> GG <u>GT</u> AT <u>GG</u> C <u>TT</u> CA <u>TC</u> AG <u>CT</u> CC <u>GG</u> TT <u>CC</u> CA <u>AC</u> GT <u>CA</u> AG <u>GC</u> G <u>AG</u> TT <u>AC</u> AT <u>GT</u> AT <u>CC</u> CA <u>GT</u> TT <u>GT</u> GC <u>AA</u> AA <u>AG</u> CG <u>GT</u> TA <u>GC</u> CT <u>CC</u> GG <u>CT</u> CC <u>GA</u> TC <u>GT</u> TT <u>GT</u> CA <u>GA</u> AG <u>TA</u> AG <u>TT</u> GG <u>CC</u> GC <u>AG</u> TT <u>GT</u> AT <u>CA</u> TC <u>AT</u> GT <u>TT</u> AT <u>GG</u> C <u>AG</u> CA <u>CT</u> GT <u>CA</u> TA <u>AT</u> TC <u>CT</u> ACT <u>GT</u> CA <u>TC</u> GC <u>AT</u> GTA <u>AG</u> AT <u>GT</u> TT <u>CT</u> GT <u>GA</u> CT <u>GT</u> GA <u>GT</u> ACT <u>CA</u> AC <u>CA</u> AG <u>TC</u> AT <u>TC</u> TA <u>GT</u> GA <u>AT</u> AG <u>GT</u> TA <u>GC</u> GG <u>CG</u> AC <u>CG</u> G <u>AG</u> TT <u>GT</u> CT <u>TT</u> GC <u>CC</u> CG <u>CG</u> GT <u>CA</u> AT <u>AC</u> GG <u>GA</u> AA <u>AT</u> AC <u>CG</u> CG <u>CC</u> AC <u>AT</u> AG <u>CA</u> GA <u>AC</u> TT <u>AA</u> AG <u>GT</u> GT <u>CT</u> CA <u>TT</u> GG <u>AA</u> AC <u>GT</u> TT <u>CT</u> CG <u>GG</u> CG <u>AA</u> ACT <u>CT</u> CA <u>AG</u> GA <u>AT</u> CT <u>AC</u> CG <u>CT</u> GT <u>TT</u> GA <u>GT</u> AC <u>CG</u> AT <u>TC</u> GA <u>GT</u> AC <u>CC</u> AC <u>TC</u> GT <u>GC</u> AC <u>CC</u> CA <u>AC</u> GT <u>CA</u> TC <u>TC</u> CA <u>GC</u> AT <u>CT</u> TT <u>AC</u> TT CA <u>CC</u> AC <u>CG</u> TT <u>CT</u> GG <u>GT</u> GA <u>GC</u> AA <u>AC</u> AG <u>GA</u> AG <u>GC</u> AA <u>AT</u> GCC <u>CG</u> AA <u>AA</u> AG <u>GG</u> AA <u>AT</u> AG <u>GG</u> CG <u>AC</u> CG <u>GA</u> AT <u>GT</u> GA <u>AA</u> TA <u>CT</u> CA <u>TA</u> CT <u>CT</u> CC <u>TT</u> CA <u>AT</u> AT <u>TT</u> GA <u>AG</u> CA <u>TT</u> AT <u>TA</u> GG <u>GT</u> TT <u>AT</u> GT <u>CT</u> CA <u>GA</u> CG <u>GG</u> AT <u>AC</u> AT <u>TT</u> GA <u>AT</u> GT <u>AT</u> TT <u>AG</u> AA <u>AA</u> AT <u>AA</u> AC <u>AA</u> AT <u>AG</u> GG <u>GG</u> TT <u>CC</u> CG <u>CG</u> CA <u>AT</u> TT <u>CC</u> CG <u>AA</u> AG <u>GT</u> GC <u>CC</u> AC <u>CT</u> GT <u>AC</u> GT <u>CT</u> TA <u>AG</u> AA <u>AC</u> CA <u>TT</u> AT <u>TA</u> TC <u>AT</u> AC <u>AC</u> CT <u>TA</u> AA <u>AA</u> AT <u>AG</u> GG <u>CG</u> TA <u>TC</u> AC <u>CG</u> AG <u>GG</u> CC <u>TT</u> CG <u>CT</u> CG CG <u>CG</u> TT <u>TC</u> GG <u>GT</u> GA <u>CG</u> GT <u>GA</u> AA <u>AC</u> CT <u>TC</u> GA <u>CA</u> CA <u>AT</u> GC <u>AG</u>

[0050]

	<p>CTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCG GGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGG CGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGA TTGTACTGAGAGTCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCAC AGATCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGAATTCAAACAT CCAATAATCATAACAGGCAAGGAAAGAATTAGCAAATTA AGCAATAAAGCCTCAGAGCATAAAGCTAAATCGGTGTACC AAAAACATTATGACCCGTAAATACTTTGCGGGAGAAGCCT TTATTCAACGCAAGGATAAAAATTAGAACCCCTATATA TTTAAATGCAATGCCTGAGTAATGTGTAGGTAAAGATTCAA ACGGGTGAGAAAGGCCGGAGACAGTCAAATCACCACAT ATGATATTCAACCGTCTAGCTGATAAATTATGCCCCGAGAG GGTAGCTATTGAGAGGTCTCACAAAGGCTATCAGGTCA TTGCTGAGAGTCTGGAGCAAACAAGAGAATCGATGAACG GTAATCGTAAAACAGTCATGTCAATCATATGTACCCCGTTG ATAATCAGAAAAGCCCCAAAACAGGAAGATTGTATAAGC AAATATTAAATTGTAACGTTAATATTGTTAAATTCGCG TAAATTTGTTAAATCAGCTCATTAAACCAATAGGCC GAAATCGGCAAACCTTATAAAATCAAAGAATAGACCGA GATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGAAACAAGAGTCCAC TATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAC CGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCACATCACCCT AATCAAGTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAAT CGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGG GAAAGCCGGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAGAAAG CGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGT CACGCTGCCGTAAACACCACACCGCCCGCTTAATGCGC CGCTACAGGGCGCTACTATGGTGTTGACGAGCACGTA TAACGTGCTTCCTCGTTAGAATCAGAGCGGGAGCTAAACA GGAGGCCGATTAAGGGATTAGACAGGAACGGTACGCC AGAACCTGAGAAGTGTGTTATAATCAGTGAGGCCACCGA GTAAAAGAGTCTGTCATCACGCAAATTAAACCGTTGCGCA ATACTTCTTGATTAGTAATAACATCACTTGCTGAGTAGAA GAACTCAAACATCGGCCCTGCTGGTAATATCCAGAACATA TTACCGCCAGCCATTGCAACAGGAAAACGCTCATGGAAAT ACCTACATTGACGCTCAATCGTCTGGAATTCCATTGCCA TTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG CCTCTCGCTATTACGCCAGCTGGCGCGCTCGCTCGCTCACT GAGGCCGCCGGCAAAGCCGGCGTCGGCGACCTTG GTCGCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGTTCTGTAGTTAATG ATTAACCGCCATGCTACTTACGTAAGCCATGCTCGATC TGAATTGGTACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCGC CTGGCTGACCGCCAAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATA ATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCAT TGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTT GGCAGTACATCAAGTGTATCATGCCAAGTACGCCCTAT TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCCCTGGCATTATGCC AGTACATGACCTTATGGGACTTCCACTGGCAGTACATCT ACGTATTAGTCATCGTATTACCATGGTGTGCGGTTTGGC AGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTTGTACTCACGGGA TTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTT TGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGAACA ACTCCGCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGCCTGTACGG TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGTCA GATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTGACCTCCATA GAAGACACCGGGACCGATCCACGCTCCGGACTCTAGAGGA TCCGGTACTCGAGGAACTGAAAAACAGAAAGTTAACTGG</p>
--	--

[0051]

		TAAGTTAGTCTTTGTCTTTATTCAGGTCCCAGATCGG GTGGTGGTGC AA ATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTG CCTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTA AAAGCTGCGGAATTGTAC <u>CCGC</u> <u>GGGCC</u> ACCATGGAAATCTG CAGAGGCCTGCGGAGCCACCTGATTACCCTGCTGCTGCTGTTCC TGTCCACAGCGAGACAATCTGCCGGCCAGCGGGCGGAA GTCCAGCAAGATGCAGGCCTCCGGATCTGGGACGTGAAC CAGAAAACCTTCTACCTCGGAACAACCAGCTGGTGGCCG GATACCTGCAGGGCCCCAACGTGAACCTGGAAGAGAAGAT CGACGTGGT CCC ATCGAGCCCCACGCCCTGTTCTGGGCA TCCACGGCGCAAGATGTG CT GAGCTGCGTGAAGTCCGG CGACGAGACAAGACTGCAGCTGGAAGCGTGAACATCACC GACCTGAGCGAGAACCGGAAGCAGGACAAGAGATTGCCCT TCATCAGAAGCGACAGCGGGCCACCACCGAGCTTGAGAG CGCCGCCTGGGGCTGGTCTGTACAGCCATGGAAG CCGACCAGCCC G TGTCCCTGACAAACATGCCGACGAGGG CGT G TGATGGTACCAAGTTCTATTTCAGAAGATGAGTAAT <u>AA</u> <u>AGCGGCCG</u> <u>GGG</u> ATCCAGACATGATAAGATACATTGATG AGTTTGACAAACCACAAACTAGAATGCA G TGAA AAA ATG CTTATTGTGAAATTGTGATGCTATTGCTTATTGTAACC ATTATAAGCTGCAATAAAACAAGTTACAACAAACAATTGATT CATTTATGTT C AGGTT C AGGGGGAGGTGTGGGAGGTTT TTAGTCGACTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTG C CTT CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCCT CCTGACCC T GGAAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCCTAAT AAAATGAGGAATTG C ATCGCATTG T TGAGTAGGTGT C AT TCTATTCTGGGGGGTGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGG AGGATTGGGAAGACAATAGCAGGAACCCACTCCCTCT GCGCGCTCGCTCGACTGAGGCCGGGACCAAAGGTC GCCGACGCCGGG C TTGCCGGCGGCC T CAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGCTGCTG
2	修饰的人IL-1Ra插入片段	ATGGAATCTGCAGAGGCC T CGGAGCCACCTGATTACCCT GCTGCTGTTCTGTTCCACAGCGAGACAATCTGCCGGCCCA GCCGCCGGAAAGTCCAGCAAGATGCAGGCC T CCGGATCTG GGACGTGAACCAGAAAACCTTCTACCTGCAGGGCCCCAACGTGAACCTGG AAGAGAAGATCGACGTGGT G CCATCGAGCCCCACGCCCT GTTCTGGG C ATCCACGGCGCAAGATGTG C CTGAGCTGCG TGAAGTCCGGCGACGAGACAAGACTGCAGCTGGAAGCCGT GAACATCACC G ACCTGAGCGAGAACCGGAAGCAGGACAA GAGATTG C C T CATCAGAAGCGACAGCGGGCCCCACCACC AGCTT G AGAGCGCC C CTGCCGGCTGGTCTGT G TAC AGCCATGGAAGCCGACCAGCCCGTGTCCCTGACAAACATG CCCGACGAGGGCGT G ATGGTACCAAGTTCTATTTCAGAAG AGATGAGTAATAA
3	修饰的人IL-1Ra插入片段(与SEQ ID NO:2 98%相同;粗体字母是密码子内的核苷酸置换(密码子加下划线))	ATGGAATCTGCAGAGG <u>ACT</u> CGGAGCCAC <u>CTA</u> ATTACC <u>CT</u> <u>ACT</u> <u>CTT</u> <u>CT</u> <u>CT</u> <u>G</u> T T CCACAGCGAGACAATCTGCCGGCCCA GCCGCCGGAAAGTCCAGCAAGATGCAGGCC <u>T</u> CCGGATCTG GGACGTGAACCAGAAAACCTTCTAC <u>CT</u> <u>CC</u> GGAAACAACCAG CTGGTGG <u>CGGG</u> ATAC <u>CT</u> <u>CC</u> AGGGCCCCAACGTGAAC <u>CTAG</u> AAGAGAAGATCGACGTGGT G CCATCGAGCCCCACGCCCT GTTCTGGG C ATCCACGGCGCAAGATGTG C CTGAGCTGCG TGAAGTCCGGCGACGAGACAAGACTGCAGCTGGAAGCCGT GAACATCACC G ACCTGAGCGAGAACCGGAAGCAGGACAA GAGATTG C C T CATCAGAAGCGACAGCGGGCCCCACCACC AGCTT G AGAGCGCC C CTGCCGGCTGGTCTGT G TAC AGCCATGGAAGCCGACCAGCCCGTGTCCCTGACAAACATG CCCGACGAGGGCGT G ATGGTACCAAGTTCTATTTCAGAAG

[0052]

		AGATGAGTAATAA
4	修饰的人 IL-1Ra 插入片段 (与 SEQ ID NO:2 99% 相同; 粗体字母是密码子内的核苷酸置换 (密码子加下划线))	ATGG <u>G</u> ATCTGCAGAGGCCTGCGGAG <u>CC</u> <u>A</u> CTGATTAC <u>CC</u> <u>A</u> CT <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> GT <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> TAGCGAGACAA <u>T</u> CTGCC <u>G</u> <u>G</u> GCGG <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> AGTCC <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> ATGC <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> GGACGTGAACC <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> AC <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> AC <u>C</u> <u>T</u> GC <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> CTGG <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> AC <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> GC <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> AAGAGAAGATCGAC <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> TC <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> GTTCTGG <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> TC <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> AGATGTGC <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> TGAAGTCC <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> CGAGACAA <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> GAACATC <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> GAGATT <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> TC <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> AGCTT <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> AGCCAT <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> CCC <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> AGATGAGTAATAA
		AGATGAGTAATAA
4	修饰的人 IL-1Ra 插入片段 (与 SEQ ID NO:2 99% 相同; 粗体字母是密码子内的核苷酸置换 (密码子加下划线))	ATGG <u>G</u> ATCTGCAGAGGCCTGCGGAG <u>CC</u> <u>A</u> CTGATTAC <u>CC</u> <u>A</u> CT <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> GT <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> TAGCGAGACAA <u>T</u> CTGCC <u>G</u> <u>G</u> GCGG <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> AGTCC <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> ATGC <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> GGACGTGAACC <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> AC <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> AC <u>C</u> <u>T</u> GC <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> CTGG <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> AC <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> GC <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> AAGAGAAGATCGAC <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> TC <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> GTTCTGG <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> TC <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> AGATGTGC <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> TGAAGTCC <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> CGAGACAA <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> GAACATC <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> GAGATT <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> TC <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> AGCTT <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> AGCCAT <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> CCC <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> AGATGAGTAATAA

[0053] 在一些实施方案中,由IL-1Ra插入片段编码的IL-1Ra肽包含IL-1Ra (参见下面表2中SEQ ID NO:6)。

[0054] 表2

[0055]

SEQ ID NO:	描述	序列
6	IL-1Ra (UNIPROTP18 510)	MEICRGLRSH LITLLFLFH SETICRPSGR KSSKMQAFRI WDVNQKTFYL RNNQLVAGYL QGPVNLEEK IDVVPIEPHA LFLGIHGGKM CLSCVKSGDE TRLQLEAVNI TDLSENRKQD KRFAFIRSDS GPTTSFESAA CPGWFLCTAM EADQPVSLTN MPDEGVMVTK FYFQEDE

[0056] 转基因 (例如,编码目标蛋白质的核苷酸序列) 可操作地连接到启动子。在一些实施方案中,启动子包含巨细胞病毒(CMV)启动子。本发明不限于CMV启动子,并且可以以任何合适的启动子或各种启动子的部分为特征。启动子的实例包括CMV启动子、杂交CMV启动子、CAG启动子、人β-肌动蛋白启动子、杂交β-肌动蛋白启动子、EF1启动子、U1a启动子、U1b启动子、Tet诱导型启动子、VP16-LexA启动子、鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子、人延长因子-1α启动子、猿病毒40(SV40)启动子和单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子。

[0057] 在一些实施方案中,启动子包含杂交启动子。作为一个实例,表3显示IL-1 β /IL-6杂交启动子(另见vandeLoo等人,2004,Gene Therapy 11:581-590)。本发明也不限于表3所示的杂交启动子。

[0058] 表3

[0059]

SEQ ID NO:	描述	序列
7	IL-1 β /IL-6 杂交启动子	atccaagag ggagaagaag cccattggag atgatgccat aaaggaagtg gaagcgat gataaaaaatc atagtgccca ttcccaaata atcccaagaag cagaagggaa aggagagaaa tatccacaaa gacagggtgt ggtacacaca acattttca tactttaaga tcccagaggaa ctcatggaaa tgatacaaga aaatgactca taagaacaaa tattaggaag ccagtgc当地 gaatgagatg ggaaatggg gaaaatgtt gggcagatt gcttagttt gttctaagca agagggtgaa caaggaagga acagctact acaaagaaca gacatcactg catgtacaca caataatata agaactaacc catgattatt ttgcttgct tcttgtcaa aatgattgaa gccaatgag atgagatcaa ccttgataac tggctggctt cggcatgatt agacacaaga tggatcagg gcacttgctg ctgtgataaa tgcgtctc ctgttgttga agaatgaccc gacaggtaa agaggaactt gcagctgaga aaggcttag tgcataaga gctgaaataat tcccaaag ctggagcatc ctggcatttc cagctcccc tctgtcttgc ttccacttcc ttggggctac atcaccatct acatcatcat cactcttca ctcctccct tagtgccaaat tatgttata gcgagatatt ttctgctcat tggggatcgg aaggaagtgc tggctgttgc ggggtctct tggaaagaca ggatctgata catacgttgc acaacctatt tgacataaga ggtttcaactt cctgagatgg atgggatggt agcagattt ggtccaggat acagggccag gatgagatcat ggcagaactg tggagactgt tacgtcagg ggcattggcc catggcttca aaatttccctt cggatc ctctggccc caccctcacc ctccaaacaaa gatttatcaa atgtggatt ttccatgag tctcaatatt agagtctca ccccaataaa atataggact ggagatgtt gaggcttatt ctggccctcga gcccacccggg aacgaaagag aagcttatac tccctccag gagccagct atgaacttct tc

[0060] 在一些实施方案中,sc-rAAV载体包装在衣壳内。在一些实施方案中,衣壳包含至少一部分AAV血清型1(AAV1)、AAV血清型2(AAV2)、AAV血清型3(AAV3)、AAV血清型4(AAV4)、AAV血清型5(AAV5)、AAV血清型6(AAV6)、其衍生物或其组合。例如,在一些实施方案中,衣壳包含至少一部分AAV血清型2和至少一部分AAV血清型6,例如AAV2.5。

[0061] 该组合物,例如包含sc-rAAV的组合物,可以引入到目标位置(例如,人中)的细胞中。例如,在一些实施方案中,当治疗骨关节炎的症状时,可以通过关节内直接注射将组合物引入关节中的细胞(例如软骨细胞、滑膜细胞,例如A型、B型等)中。在一些实施方案中,将该组合物给予人的关节、滑膜、滑膜下层、关节囊、腱、韧带、软骨或关节周围肌肉。本发明不局限于上述病症(例如骨关节炎)、给予方式(例如关节内注射)、目标位置(例如关节)或细胞类型(例如软骨细胞、滑膜细胞)。例如,在一些实施方案中,可以转导的其他细胞类型可包括间充质干细胞。

[0062] sc-rAAV将载体转导到细胞中,并表达修饰的IL-1Ra肽。在一些实施方案中,表达IL-1Ra肽,以便向人提供治疗有效量的所述修饰的IL-1Ra肽,所述修饰的IL-1RA肽有效改善与各种病症如骨关节炎或类风湿性关节炎相关的症状。

[0063] 在一些实施方案中,组合物(例如sc-rAAV)的引入进行一次。在一些实施方案中,

组合物(例如sc-rAAV)的引入进行两次,例如第一次和在第一次之后的第二次。在一些实施方案中,组合物的引入进行两次以上,例如三次、四次、五次等。组合物的第二次引入可以在首次实施该方法的时间后的时间点进行,例如,在3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、1年以上等之后。

[0064] 该组合物可包含任何合适的药物组合物。在一些实施方案中,组合物包含缓冲溶液。在一些实施方案中,缓冲溶液包括磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在一些实施方案中,组合物进一步包含山梨醇,例如5%山梨醇。在一些实施方案中,组合物进一步包含盐,例如氯化钠。盐的浓度可以是任何合适的浓度,例如350mM氯化钠、大于350mM氯化钠、小于350mM氯化钠等。

[0065] 在一些实施方案中,组合物(例如sc-rAAV)与第二治疗共同给予。在一些实施方案中,第二治疗包括用于OA或RA的治疗剂或用于治疗该病症的症状的任何其他合适的治疗。用于OA的第二治疗的非限制性实例包括糖皮质激素、透明质酸(黏性补给)、富含血小板的血浆和重组人IL-1Ra(Anakinra; Kineret®)。例如,在一些实施方案中,sc-rAAV与糖皮质激素或富含血小板的血浆共同给予。

[0066] 以下美国专利的公开内容通过引用完整地并入本文:US2008/0187576、US2009/0104155、KR2012041139、JP2015518816、W02013151672、W02008088895、US8529885、US7037492、US20070128177、US6491907、US8999948、US20150218586、US7892824、US20130295614、JP2002538770、JP2010516252、KR2002027450、KR2003028080、US6482634、US20090105148、US20120232130、US20140234255、US5756283、US6083716、W02002038782、W02007039699、W02012047093、W02014170470、W02015018860、W02015044292、W02015158749、US7452696、US6943153、US6429001、W02015031392、W02004092211。

[0067] 实施例1

[0068] 实施例1描述了本发明的sc-rAAV(编码IL-1Ra)的给予。本发明不限于实施例1的公开内容。五名患者参加了研究本发明sc-rAAV给予的临床试验。患者如下:(1)1名患有右膝骨关节炎的65岁男性;(2)1名患有左膝骨关节炎的59岁男性;(3)1名患有左膝骨关节炎的58岁女性;(4)1名患有右膝骨关节炎的51岁男性;和(5)1名患有右膝骨关节炎的48岁男性。每名患者通过关节内注射以每膝 1×10^{12} 病毒基因给予sc-rAAV。IL-1Ra在软骨细胞和滑膜细胞中表达。患者1描述了在2周内改善OA相关症状。患者2描述了在1周内改善OA相关症状。患者3描述了在5周内改善OA相关症状。患者4描述了在1周内改善OA相关症状。截至6周,患者5描述OA相关症状没有改善。

[0069] 实施例2

[0070] 实施2描述了本发明sc-rAAV(编码IL-1Ra)的第一次给予和一段时间后相同的本发明的sc-rAAV的第二次给予。本发明不限于实施例2的公开内容。一名55岁男性右膝出现骨关节炎。他的医师进行单次关节内注射本发明的sc-rAAV载体(编码IL-1Ra)。患者的症状在两个月内消除了。6个月后,医师进行第二次(单次)关节内注射相同的本发明的sc-rAAV载体(编码IL-1Ra)。第二次注射后6个月,患者的症状仍然没有出现。

[0071] 实施例3

[0072] 实施例3描述了本发明的sc-rAAV(编码IL-1Ra)的第一次给予和一段时间后不同于第一次sc-rAAV的本发明的sc-rAAV(编码IL-1Ra)的第二次给予。本发明不限于实施例3

的公开内容。一名49岁女性右脚踝出现骨关节炎。她的医师进行单次关节内注射本发明的sc-rAAV载体(编码IL-1Ra)。患者的症状在5个月内已经改善,但没有消除。6个月后,医师进行第二次(单次)关节内注射不同的本发明的sc-rAAV载体(编码IL-1Ra)。第二次注射后6个月,患者的症状消失了。

[0073] 实施例4

[0074] 实施例4描述了本发明的sc-rAAV(编码IL-1Ra)和第二治疗的共同给予。本发明不限于实施例4的公开内容。一名68岁男性左膝出现骨关节炎。他的医师进行单次关节内注射本发明的sc-rAAV载体(编码IL-1Ra)和富含血小板的血浆。患者的症状在2个月内消除了。

[0075] 根据前面的描述,除了在此描述的修改之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的。这种修改也要落入所附权利要求的范围。本申请中引用的每篇参考文献均通过引用完整地并入本文。

[0076] 尽管已经显示和描述了本发明的实施方案,但对于本领域技术人员而言,可以对其进行不超出所附权利要求范围的修改将是显而易见的。权利要求中列举的附图标记是示例性的,并且仅仅是为了便于专利局审查,不以任何方式进行限制。在一些实施方案中,本专利申请中呈现的附图按比例绘制,包括角度、尺寸比等。在一些实施方案中,附图仅是代表性的,并且权利要求不受附图尺寸的限制。在一些实施方案中,本文使用短语“包括”描述的发明描述包括可以被描述为“由……组成”的实施方案,并且因此满足了使用短语“由……组成”请求保护本发明的一个或多个实施方案的书面描述要求。

[0077] 在下面的权利要求中列举的任何附图标记仅仅是为了便于审查本专利申请,并且是示例性的,不要以任何方式将权利要求的范围限制到附图中具有相应附图标记的特定特征。

序列表

<110> 卡琳缪恩股份有限公司(CALIMMUNE, INC.)
 <120> 使用自身互补型重组腺相关病毒治疗病症的方法和组合物
 <130> CALIM 16.02 PCT
 <150> 62/377,297
 <151> 2016-08-19
 <160> 7
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 5718
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (5718)
 <223> 含有完整病毒序列的Hu-IL-1Ra质粒的序列,带有修饰的人IL1Ra插入片段和SacII/NotI限制性位点。
 <400> 1

cattaatgaa	tcggccaacg	cgcggggaga	ggcggtttgc	gtattggcg	ctcttccgct	60
tcctcgctca	ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggt	atcagctcac	120
tcaaaggcgg	taatacggtt	atccacagaa	tcagggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	180
gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttccat	240
aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	300
ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	gctccctcg	gcgctctcct	360
gttccgaccc	tgccgcttac	cggataccctg	tccgccttgc	tcccttcggg	aagcgtggcg	420
ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	agttcggtgt	aggtcggtcg	ctccaagctg	480
ggctgtgtgc	acgaacccccc	cgttcagccc	gaccgctgctg	ccttattccgg	taactatcg	540
cttgagtc	acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	600
attagcagag	cgaggtatgt	aggcggtgct	acagagttct	tgaagtggtg	gcctaactac	660
ggctacacta	gaaggacagt	atttggtatac	tgcgctctgc	tgaagccagt	tactttcgga	720
aaaagagttg	gtagctcttgc	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	780
gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	840
tctacgggt	ctgacgctca	gtggAACGAA	aactcacgtt	aagggatttt	ggtcatgaga	900
ttatcaaaaa	gtatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	taaatcaatc	960
taaagtat	atgagtaaac	ttggcttgac	agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	1020
atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcatcc	atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	1080
actacgatac	gggaggggctt	accatctggc	cccagtgcgt	caatgatacc	gcgagaccca	1140
cgctcaccgg	ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag	ccggaaggc	cgagcgcaga	1200

agtggtcctg caacttatac cgccctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga	1260
gtaagtagtt cgccagttaa tagttgcgc aacgttgttgc cattgctac aggcacatcg	1320
gtgtcacgct cgtcgttgg tatggcttca tttagctccg gttcccaacg atcaaggcga	1380
gttacatgtat ccccccattgtt gtgcaaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcg	1440
gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctatggtta tggcagcact gcataattct	1500
cttactgtca tgccatccgt aagatgctt tctgtgactg gtgagtgactc aaccaagtca	1560
ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctttgcc cggcgtcaat acgggataat	1620
accgcgccac atagcagaac tttaaaagtgc ctcatttgc gaaaacgttc ttccgggcga	1680
aaactctcaa ggatcttacc gctgttggaa tccagttcgat tgtaacccac tcgtgcaccc	1740
aactgatctt cagcatctt tactttcacc agcggttctg ggtgagcaaa aacaggaagg	1800
caaaatgccc caaaaaagg aataaggcgc acacggaaat gttgaataact catactttc	1860
cttttcaat attattgaag catttatcag gtttattgtc tcatgagcgg atacatattt	1920
gaatgtattt agaaaaataa acaaataagg gttccgcgc cattttcccg aaaagtgc	1980
cctgacgtct aagaaaccat tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg	2040
aggcccttgc gtctcgccgc ttccgggtat gacgggtaaa acctctgaca catgcagctc	2100
ccggagacgg tcacagcttgc tctgttgcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagg	2160
gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcgggc tggcttaact atgcggcatc agagcagatt	2220
gtactgagag tgcaccat gtcgggtgaa ataccgcaca gatgcgtaa gagaataac	2280
cgcacatcggg attccaaatc ccaataatc atacaggca ggcaaaagaat tagcaaaatt	2340
aagcaataaa gcctcagagc ataaagctaa atcggttgc ccaaaaacat tatgaccctg	2400
taatactttt gcccggagaat cctttatttc aacgcggaa taaaaatttt tagaaccctc	2460
atataattttt aatgcgtatgc ctgttgcgtatg tgttagttaaa gattcaaaacg ggtgagaa	2520
gccggagaca gtcaaatcac catcaatatg atattcaacc gttctagctg ataaaattcat	2580
gccggaggg gtagcttattt ttgagaggc tctacaagg ctatcaggc attgcctg	2640
agtctggagc aaacaagaga atcgatgaa ggtatcgta aaactagcat gtcaatcata	2700
tgtaccccg ttgataatca gaaaagcccc aaaaacagga agattgtata agcaaatatt	2760
taaattgtaa acgttaat tttgttaaaa ttccgtttaa attttgcattt aatcagctca	2820
tttttaacc aataggccga aatcgccaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag	2880
atagggttgc gtgttgcgttcc agtttggaa aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc	2940
aacgtcaag ggcggaaaac cgtctatcag ggcgtggcc cactacgtga accatcaccc	3000
taatcaagtt ttttgggtc gaggtggccgt aaagcactaa atcgaaaccc taaaggagc	3060
ccccgattt aagcttgcg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaaagaaa	3120
gcgaaaggag cggcgctag ggcgtggca agtgttagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc	3180
acacccggccg cgcttaatgc ggcgtacag ggcgtgtact atggttgcatt tgacgagc	3240
gtataacgtt ctggctgtc tagaatcaga gcccggacta aacaggagc cgattaaagg	3300
gattttagac aggaacggta cgccagaatc ctgagaagtg ttttataat cagtggagcc	3360
accgagtaaa agagtctgtc catcagcata attaaccgtt gtcgtatc ttctttgatt	3420
agtaataaca tcacttgcct gagtagaaga actcaaacta tcggccttgc tggtaatatc	3480
cagaacaata ttaccggccag ccattgcac agggaaaacg ctcatggaaa tacctacatt	3540

ttgacgctca atcgctgga attccattcg ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaaggg	3600
cгatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcgc gctcgctcg tcactgaggc	3660
cгcccggca aagcccggc gtcggcgac cttggcgc tgagcgagcg	3720
agcgcgcaga gagggagtgg ccaactccat cactaggggt tcctttagt taatgattaa	3780
cccgccatgc tacttatcta cgtagccatg ctcgatctga attcggtacc cgttacataa	3840
cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata	3900
atgacgtatg ttccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag	3960
tatttacggtaa aactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc	4020
cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgaccctta	4080
tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg	4140
cgttttggc agtacatcaa tggcgtgga tagcggttt actcacgggg atttccaagt	4200
ctccacccca ttgacgtcaa tggagttt tttggcacc aaaatcaacg ggactttcca	4260
aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggcgc gtaggcgtgt acggtgggag	4320
gtctatataa gcagagctcg ttttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc	4380
tgtttgacc tccatagaag acaccggac cgatccagcc tccggactct agaggatccg	4440
gtactcgagg aactgaaaaa ccagaaagtt aactggtaag ttttagtctt ttgtcttttta	4500
tttcaggtcc cggatccggt ggtggcgc aaatggcacc tgccctcag tggatgttgc	4560
ctttacttctt aggccctgtac ggaagtgtta cttctgctct aaaagctgcg gaattgtacc	4620
cgcgggccac catggaaatc tgcagaggcc tgcggagcca cctgattacc ctgctgtgt	4680
tcctgttcca cagcgagaca atctgccgc ccagcggccg gaagtccagc aagatgcagg	4740
ccttccggat ctgggacgtg aaccagaaaa ccttctaccc gcggaacaac cagctggtgg	4800
ccggataacct gcagggccccc aacgtgaacc tggaaagagaa gatgcacgtg gtgcacatcg	4860
agccccacgc cctgtttctg ggcacccacg gcgcaagat gtgcctgagc tgcgtgaagt	4920
ccggcgcacga gacaagactg cagctggaaac ccgtgaacat caccgaccc agcgagaacc	4980
ggaagcagga caagagattc gccttcatca gaagcgacag cggcccccacc accagcttg	5040
agagcgcgc cttccccggc tggccctgt gtacagccat ggaagccgac cagccgtgt	5100
ccctgacaaa catgccgcac gagggcgtga tggcaccaa gttctatttt caagaagatg	5160
agtaataagc ggccgccggg atccagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac	5220
cacaactaga atgcagtgaa aaaaatgctt tatttgtaaa atttgtatg ctattgcttt	5280
atttgttaacc attataagct gcaataaaaca agttaacaac aacaattgca ttcatttat	5340
gtttcaggtt cagggggagg tgtggaggt ttttagtgc actagagctc gctgatcgc	5400
ctcgactgtg cttcttagtt gccagccatc tggcccttgc ccctccccg tgccttcctt	5460
gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcacatcg	5520
ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggggggtg gggcaggaca gcaaggggaa	5580
ggattggaa gacaatagca gaaacccac tccctctcg cgccgtcgct cgctactga	5640
ggccgggcga ccaaaggctcg cccgacgccc gggcttgc cggcggcct cagtgagcga	5700
gcgagcgcgc agctgctg	5718

<210> 2

<211> 537

<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1) .. (537)	
<223>	修饰的人IL-1Ra插入片段	
<400>	2	
	atggaaatct gcagaggcct gcggagccac ctgattaccc tgctgctgtt cctgttccac	60
	agcgagacaa tctgccggcc cagcggccgg aagtccagca agatgcaggc cttccggatc	120
	tgggacgtga accagaaaac cttctacctg cggaacaacc agctggtggc cggataacctg	180
	cagggcccca acgtgaacct ggaagagaag atcgacgtgg tgcccatcga gccccacgcc	240
	ctgtttctgg gcatccacgg cgcaagatg tgcctgagct gcgtgaagtc cggcgacgag	300
	acaagactgc agctggaagc cgtgaacatc accgacactg gcgagaaccg gaagcaggac	360
	aagagattcg cttcatcag aagcgacagc ggccccacca ccagcttga gagcgccgccc	420
	tgcggcgtt ggttcctgtg tacagccatg gaagccgacc agccctgtc cctgacaaac	480
	atgcccacg agggcgtgat ggtcaccaag ttctatttc aagaagatga gtaataa	537
<210>	3	
<211>	537	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1) .. (537)	
<223>	修饰的人IL-1Ra插入片段, 与SEQ ID NO:2 98%相同;	
<400>	3	
	atggaaatct gcagaggact gcggagccac ctaattaccc tactccttt cctgttccac	60
	agcgagacaa tctgccggcc cagcggccgg aagtccagca agatgcaggc tttccggatc	120
	tgggacgtga accagaaaac cttctacctc cggaacaacc agctggtggc gggataacctc	180
	cagggcccca acgtgaacct agaagagaag atcgacgtgg tgcccatcga gccccacgcc	240
	ctgtttctgg gcatccacgg cgcaagatg tgcctgagct gcgtgaagtc cggcgacgag	300
	acaagactgc agctggaagc cgtgaacatc accgacactg gcgagaaccg gaagcaggac	360
	aagagattcg cttcatcag aagcgacagc ggccccacca ccagcttga gagcgccgccc	420
	tgcggcgtt ggttcctgtg tacagccatg gaagccgacc agccctgtc cctgacaaac	480
	atgcccacg agggcgtgat ggtcaccaag ttctatttc aagaagatga gtaataa	537
<210>	4	
<211>	537	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		

<221> misc_feature
 <222> (1)..(537)
 <223> 修饰的人IL-1Ra插入片段,与SEQ ID NO:2 99%相同;
 <400> 4
 atggagatct gcagaggcct gcggagccat ctgattaccc tactgcttt cctgttccat 60
 agcgagacaa tctgccggcc cagcggccgg aagtccagca aaatgcaggc cttccggatc 120
 tgggacgtga accagaaaac cttctacctg cggaacaacc agctggtggc cggtacactg 180
 cagggcccca acgtgaacct ggaagagaag atcgacgtgg tgcccatcga gccccacgcc 240
 ctgtttctgg gcatccacgg cggcaagatg tgccctgagct gcgtgaagtc cggtacgag 300
 acaagactgc agctggaagc cgtgaacatc accgacactg gcgagaaccg gaagcaggac 360
 aagagattcg cttcatcag aagcgacagc ggccccacca ccagcttga gagcgcgcgc 420
 tgccccggct gttcctgtg tacagccatg gaagccgacc agccctgtc cctgacaaac 480
 atgcccacg agggcgtgat ggtcaccaag ttctatttc aagaagatga gtaataa 537
 <210> 5
 <211> 537
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(537)
 <223> 修饰的人IL-1Ra插入片段,与SEQ ID NO:2 95%相同;
 <400> 5
 atggagatct gcagaggact gcggagccac ctaattaccc tactccttt cctgttccat 60
 agcgagacaa tctgccggcc cagcggccgg aagtccagca aaatgcaggc tttccggatc 120
 tgggatgtga accagaagac cttctacctc cggaacaacc agctggtggc gggatacctc 180
 cagggcccca acgtgaacct agaagagaag atcgacgtgg tgcccatcga gccccacgcc 240
 ctgtttctgg gcatccatgg cggcaagatg tgtctgagtt gcgtgaagtc aggcgacgag 300
 acaagactgc agctggaagc cgtgaacatc accgacactg gcgaaaaccg gaagcaggac 360
 aagagattcg cttcatcag aagcgacagc ggccccacca ctagcttga gagcgcagcc 420
 tgccccggct gttcctgtg tacagccatg gaggccgacc agccctgtc cctgacaaac 480
 atgcctgacg aaggcgtgat ggtcaccaag ttctactttc aagaagatga ataataa 537
 <210> 6
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 6
 Met Glu Ile Cys Arg Gly Leu Arg Ser His Leu Ile Thr Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe His Ser Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser

20	25	30
Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe		
35	40	45
Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn		
50	55	60
Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala		
65	70	75
Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys		
85	90	95
Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp		
100	105	110
Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser		
115	120	125
Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp		
130	135	140
Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn		
145	150	155
Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp		
165	170	175
Glu		
<210> 7		
<211> 1165		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (1)..(1165)		
<223> IL-1 β /IL-6杂交启动子		
<400> 7		
atccaagagg gagaagaagc ccattggaga ttagccata aaggaagtgg aagcgatatg		60
ataaaaaatca tagtgcctat tcccaaataa tcccagaagc agaaggaaaa ggagagaaaat		120
atccacaaag acaggtgtgg gtacacacaa cattttcat acttaagat cccagaggac		180
tcatggaaat gatacaagaa aatgactcat aagaacaaat attaggaagc cagtgc当地		240
aatgagatgg gaaattgggg aaaatgttgg gggcagattt ctttagttctg ttctaagcaa		300
gagggtaaac aaggaaggaa cagtcacta caaagaacag acatcactgc atgtacacac		360
aataatataa gaactaaccc atgattattt tgcttgttctt cttgttcaaa atgattgaag		420
accaatgaga tgagatcaac cttgataact ggctggcttc ggcataat gacacaat		480
ggtatcaggg cacttgctgc tttgaataat gtcagtctcc tgtcttggaa gaatgacactg		540
acaggtaaa gaggaacttg cagctgagaa aggctttagt gactcaagag ctgaataatt		600

ccccaaaagc tggagcatcc tggcattcc agctccccat ctctgcttgt tccacttcct	660
tggggctaca tcaccatcta catcatcatc actctccac tccctccctt agtgc当地	720
atgtttatag cgagatattt tctgctcatt ggggatcgga aggaagtgc gtggc当地	780
cggtctcctt ggaaagacag gatctgatac atacgttgca caaccttattt gacataagag	840
gtttcacttc ctgagatgga tgggatggta gcagatttg gtccaggtta cagggccagg	900
atgagacatg gcagaactgt ggagactgtt acgtcagggg gcattgcccc atggctcaa	960
aatttccctc gagcctctgg ccccaccctc accctccaac aaagatttat caaatgtggg	1020
atttcccat gagtctaat attagagtct caaccccaa taaatatagg actggagatg	1080
tctgaggctc attctgccct cgagccacc gggAACGAAA gagaagctct atctccctc	1140
caggagccca gctatgaact cttc	1165

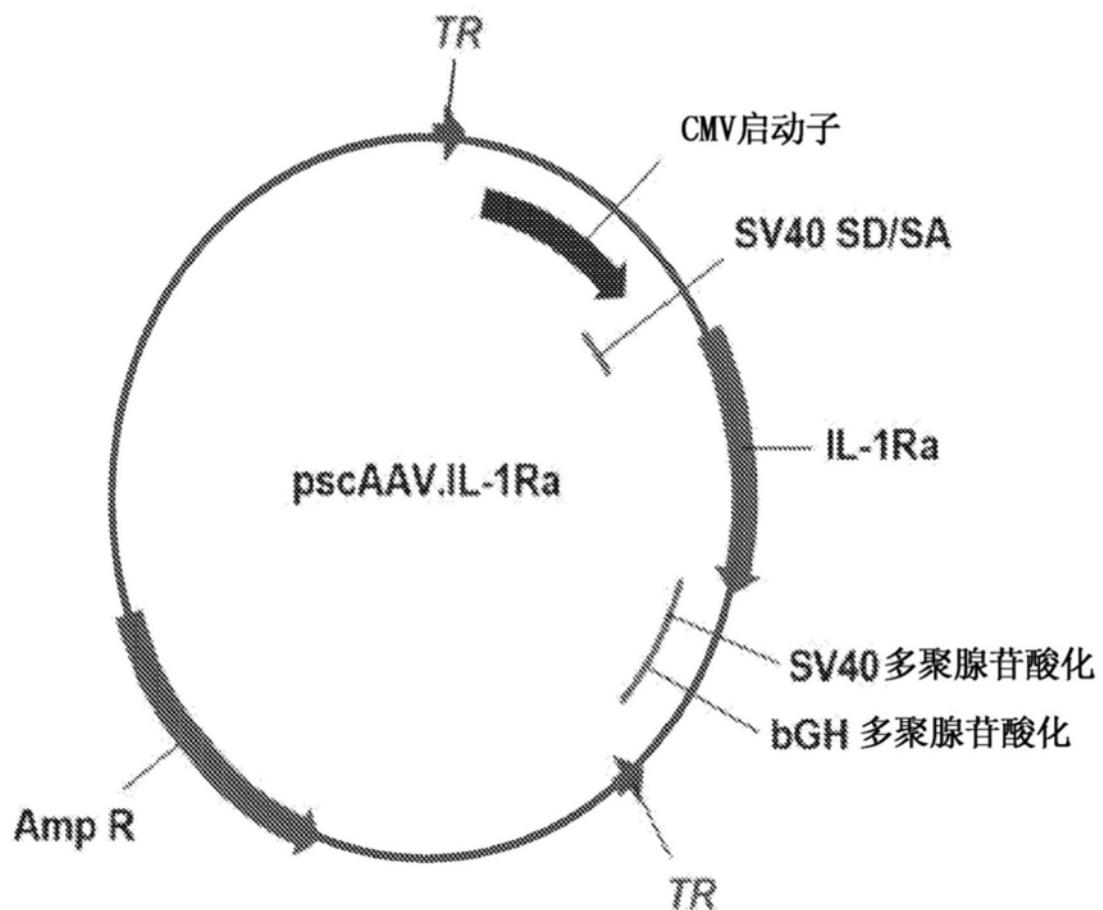


图1