



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105934515 B

(45)授权公告日 2020.08.04

(21)申请号 201480074046.6

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

(22)申请日 2014.11.25

72002

(65)同一申请的已公布的文献号

代理人 左路

申请公布号 CN 105934515 A

(51)Int.Cl.

(43)申请公布日 2016.09.07

C12N 9/16(2006.01)

(续)

(30)优先权数据

(56)对比文件

61/908,861 2013.11.26 US

EP 2412387 A1, 2012.02.01,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

Lee young mok et.al. The upstream
enhancer elements of the G6PC promoter
are critical for optimal G6PC expression
in murine glycogen storage disease type
la. «Molecular genetics and metabolism»
.2013, 275-280.

2016.07.25

Grieger j c et.al. larger genomes on
infectivity and postentry steps.. «Journal
of virology, the American society for
microbiology, us». 2005, p9933-9944, 图1和5.

(86)PCT国际申请的申请数据

(续)

PCT/US2014/067415 2014.11.25

审查员 黄蕊

(87)PCT国际申请的公布数据

权利要求书1页 说明书27页

W02015/081101 EN 2015.06.04

序列表19页 附图20页

(73)专利权人 美国政府(由卫生和人类服务部
的部长所代表)

地址 美国马里兰

专利权人 佛罗里达大学研究基金会有限公
司

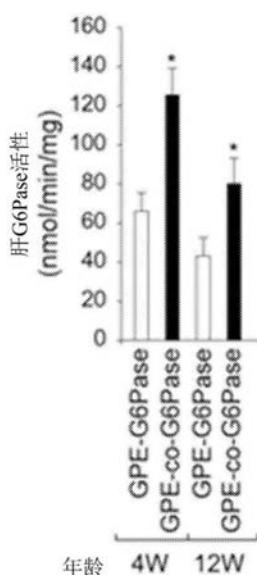
(72)发明人 J·J·周 B·J·伯恩

(54)发明名称

用于治疗糖原贮积病的腺相关病毒载体

(57)摘要

本公开内容描述了用于治疗糖原贮积病,特别是Ia型糖原贮积病的基因疗法应用的改进的腺相关病毒(AAV)载体。描述了重组核酸分子、载体和重组AAV,其包含G6PC启动子/增强子、合成内含子、G6PC编码序列(例如野生型或密码子优化的G6PC编码序列),以及位于G6PC启动子/增强子和内含子之间以及内含子和G6PC编码序列之间的填充核酸序列。本文公开的重组AAV表现出高效的肝转导并且能够纠正GSD-Ia的动物模型中的代谢异常。



[接上页]

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

C12N 15/86(2006.01)

(56)对比文件

Zhijian wu et.al.Optimization of self-complementary AAV verctors for liver-directed expression results in sustained

correction of hemophilia B at low vector dose.《Molecular therapy》.2008,表1,第283页.

Wai han yiu et.al.Complete normalization of hepatic G6PC deficiency in murine glycogen storage disease type la using gene therapy.《Molecular therapy》.2010, p1076-1084.

1. 一种腺相关病毒 (AAV) 载体, 其包含重组核酸分子, 所述重组核酸分子包含 SEQ ID NO: 3 的核苷酸 182-4441 或 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 182-4441。
2. 根据权利要求 1 所述的 AAV 载体, 其中所述重组核酸分子包含 SEQ ID NO: 3 的核苷酸 17-4819 或 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 17-4819。
3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的 AAV 载体, 其由 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列组成。
4. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的 AAV 载体, 其中所述 AAV 载体是 AAV 血清型 8 (AAV8) 载体。
5. 一种分离的宿主细胞, 其包含权利要求 1 至 4 中任一项所述的 AAV 载体。
6. 一种重组 AAV (rAAV), 其包含重组核酸分子, 所述重组核酸分子包含 SEQ ID NO: 3 的核苷酸 182-4441 或 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 182-4441。
7. 根据权利要求 6 所述的 rAAV, 其中所述重组核酸分子包含 SEQ ID NO: 3 的核苷酸 17-4819 或 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 17-4819。
8. 根据权利要求 6 或权利要求 7 所述的 rAAV, 其中所述 rAAV 是 rAAV8。
9. 一种组合物, 其包含在可药用载体中的权利要求 6-8 任一项所述的 rAAV。
10. 根据权利要求 9 所述的组合物, 其被配制用于静脉内给药。
11. 权利要求 6-8 任一项所述的 rAAV 或权利要求 9 或权利要求 10 所述的组合物在制备用于治疗被诊断为患有 Ia 型糖原贮积病 (GSD-Ia) 的受试者的药物中的用途。
12. 根据权利要求 11 所述的用途, 其中静脉内给予所述 rAAV。
13. 根据权利要求 11 或权利要求 12 所述的用途, 其中以 1×10^{11} 至 1×10^{14} 病毒颗粒 (vp) / kg 的剂量给予所述 rAAV。
14. 根据权利要求 13 所述的用途, 其中以 1×10^{12} 至 8×10^{13} vp/kg 的剂量给予所述 rAAV。
15. 根据权利要求 13 所述的用途, 其中以 1×10^{13} 至 6×10^{13} vp/kg 的剂量给予所述 rAAV。
16. 根据权利要求 11 或权利要求 12 所述的用途, 其中所述 rAAV 以单次剂量给予。
17. 根据权利要求 11 或权利要求 12 所述的用途, 其中所述 rAAV 以多次剂量给予。

用于治疗糖原贮积病的腺相关病毒载体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年11月26日提交的美国临时申请No. 61/908,861的优先权,其通过引用的方式全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及用于治疗糖原贮积病,特别是Ia型糖原贮积病的基因疗法载体。

背景技术

[0004] Ia型糖原贮积病(GSD-Ia或冯吉尔克病(von Gierke disease),MIM232200)是由葡萄糖-6-磷酸酶α(G6Pase-α)的缺陷造成的,这是一种主要在肝脏、肾和肠中表达的酶(Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010)。由G6PC基因编码的G6Pase-α是通过九个跨膜螺旋锚定在内质网(ER)中的疏水性蛋白质(Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010)。这种酶在糖原分解和糖异生的最后步骤中催化葡萄糖-6-磷酸(G6P)水解成葡萄糖和磷酸。受GSD-Ia影响的患者不能维持葡萄糖稳态,并且具有空腹低血糖、生长迟缓、肝肿大、肾肥大、高脂血症、高尿酸血症和乳酸血症(lactic academia)(Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010)。

[0005] 当前没有GSD-Ia的治愈法。低血糖症可以使用食疗控制(Greene et al., N Engl J Med 294:423-425, 1976; Chen et al., N Engl J Med 310:171-175, 1984),其能够使患者获得接近正常的生成和青春期发育。但是,较长期的临床并发症及其背后的病理过程依然未被纠正。一种最显著的慢性风险是肝细胞腺癌(HCA),其在70-80%的超过25岁的GSD-I患者中出现(Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010; Labrune et al., J Pediatr Gastroenterol Nutr 24:276-279, 1997; Rake et al., Eur J Pediatr 161 (Suppl1) :S20-S34, 2002)。GSD-Ia患者中的HCA是小的多发性并且无包膜的,并发症包括局部受压(local compression)和瘤内出血。在10%的GSD-Ia患者中,HCA经历恶性转化成肝细胞癌(HCC)(Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010; Rake et al., Eur J Pediatr 161 (增刊1) :S20-S34, 2002; Franco et al., J Inherit Metab Dis 28:153-162, 2005)。

[0006] 已经在GSD-Ia的动物模型中进行了使用携带G6Pase-α的重组腺相关病毒(AAV)的基因疗法研究;这些研究已表现出了效力,并且没毒性(Chou and Mansfield, Expert Opin Biol Ther 11:1011-1024, 2011中的综述)。之前使用GSD-Ia的小鼠模型的研究已经表明,在G6PC 5'侧翼区的核苷酸-298至+128的CBA启动子/CMV增强子(Ghosh et al., Gene Ther 13:321-329, 2006)、犬G6PC启动子(Koeberl et al., Gene Ther 13:1281-1289, 2006)或人G6PC启动子的指导下表达G6Pase-α的重组AAV将G6Pase-α转基因递送到肝脏并且实现了对这种疾病的长期纠正。但是,尽管这些研究很有希望,但是均没有能够完全纠正肝G6Pase-α缺陷的。

发明内容

[0007] 本文提供了可在用于治疗糖原贮积病,尤其是GSD-Ia的基因疗法应用中使用的重组核酸分子、腺相关病毒 (AAV) 载体和重组AAV。

[0008] 在一些实施方案中,重组核酸分子包含G6PC启动子/增强子、合成内含子和G6PC编码区,后者任选地被密码子优化用于在人细胞中表达。重组核酸分子还包含位于G6PC启动子/增强子和内含子之间,以及内含子和G6PC编码序列之间的填充核酸序列。在一些特定的非限制性实例中,重组核酸分子包含SEQ ID N0:1的核苷酸182-4441或SEQ ID N0:3的核苷酸182-4441。

[0009] 在一些实施方案中,重组核酸分子还包含5'和3'反向末端重复 (ITR) 序列。在一些实例中,重组蚂蚁核酸分子包含SEQ ID N0:1的核苷酸17-4819或SEQ ID N0:3的核苷酸17-4819。在其他实施方案中,重组核酸分子包含SEQ ID N0:1或SEQ ID N0:3的完整载体核酸序列。

[0010] 本文还提供了包含本文公开的重组核酸分子的载体。在一些实施方案中,载体是AAV载体,例如AAV8载体。本文还提供了包含本文公开的重组核酸分子或载体的分离的宿主细胞。例如,分离的宿主细胞可以是适合于AAV增殖的细胞。

[0011] 本文还提供了包含本文公开的重组核酸分子的重组AAV (rAAV)。本公开内容还提供了包含rAAV的组合物。

[0012] 本文还提供了治疗被诊断为患有糖原贮积病的受试者的方法,包括选择患有Ia型糖原贮积病 (GSD-Ia) 的受试者并且给予所述受试者治疗有效量的本文公开的rAAV或者包含rAAV的组合物。

[0013] 通过参考附图进行的以下发明详述,本发明上述的和其他的目的、特征和优点将变得更明显。

附图说明

[0014] 图1A-1B是示出了AAV-GPE输注的G6pc^{-/-}小鼠的表型分析结果的图表。(图1A)示出了用 1.2×10^{11} vg/小鼠的AAV-GPE输注的雌性G6pc^{-/-}小鼠及其雌性G6pc^{+/+}/G6pc^{-/-}同窝出生仔 (littermate) 的体重。在图上方示出了输注时的年龄 (2天、2周或4周)。(○), G6pc^{+/+}/G6pc^{-/-}小鼠; (●), AAV-GPE输注的G6pc^{-/-}小鼠。(图1B)示出了输注AAV-GPE的小鼠的血糖、胆固醇、甘油三酯、尿酸和乳酸水平。由于每组中各自代谢物的相似性,示出的数据为6-24周龄的合并数据。在2天龄 (n=36)、2周龄 (n=24) 或4周龄 (n=9) 时向 (+/+&+/-)、G6pc^{+/+}/G6pc^{-/-}, (-/-)、G6pc^{-/-}, 或 (-/-GPE)、G6pc^{-/-}小鼠输注AAV-GPE。数据表示为平均值±SEM。*p < 0.05, **p < 0.005。

[0015] 图2A-2B是示出了在24小时禁食后野生型和AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中肝G6Pase-α活性和mRNA表达的图表。向7只2周、11只4周、1只15周 (*) 和1只30周 (**) 龄的G6pc^{-/-}小鼠输注不同剂量的AAV-GPE;当小鼠为70-90周龄时评估G6Pase-α活性和mRNA表达。(图2A)示出了所指出周龄 (W) 时的肝G6Pase-α活性。基于与野生型活性相比的小鼠G6Pase-α活性,将小鼠分组为低 (AAV-L)、中 (AAV-M) 和高 (AAV-H)。(图2B)AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中肝G6Pase-α mRNA表达及其与G6Pase-α活性的关系。数据表示为平均值±SEM。在图2B中,*p < 0.05, **p < 0.005。

[0016] 图3A-3C是示出了70至90周龄时的经AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠的表型分析结果的图表。(图3A) 血糖、胆固醇、甘油三酯、尿酸和乳酸水平。(图3B) 体重、体长和BMI。F, 雌性; M, 雄性。(图3C) 肝重量。处理指示为: (+/+) , 野生型小鼠; (-/-AAV) , 用不同剂量AAV-GPE输注的G6pc^{-/-}小鼠。AAV-L (n=6) 、AAV-M (n=9) 和AAV-H (n=5) 分别是表达3-9% (低,L) 、22-63% (中,M) 和81-128% (高,H) 的正常肝G6Pase- α 活性的AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠。数据表示为平均值±SEM。*p<0.05, **p<0.005。

[0017] 图4A-4C是示出了空腹血糖和葡萄糖耐量谱的图表。(图4A) 70至90周龄时的野生型和经AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠的空腹血糖谱。(图4B) 6-8周龄时的未经处理的G6pc^{-/-}小鼠的空腹血糖谱。(图4C) 70至90周龄时的野生型和经AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠的葡萄糖耐量谱。将野生型或AAV-GPE输注的G6pc^{-/-}小鼠禁食6小时, 腹膜内注射2mg/g右旋糖(dextrose) , 然后每30分钟通过尾静脉采集血样。数据表示为平均值±SEM。(+/+) , 野生型小鼠; (-/-) , 未处理的G6pc^{-/-}小鼠。AAV-L (n=6) 、AAV-M (n=9) 和AAV-H (n=5) 分别是表达3-9%、22-63%和81-129%的正常肝G6Pase- α 活性的AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠。

[0018] 图5A-5C是示出了禁食24小时后70至90周龄的野生型和经AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠的胰岛素以及SREBP-1c和葡萄糖激酶的肝脏mRNA水平的图表。(图5A) 空腹胰岛素水平及其与动物体重的关系。(图5B) 通过实时RT-PCR的SREBP-1c mRNA的定量。(图5C) 葡萄糖激酶mRNA的定量以及空腹胰岛素与肝葡萄糖激酶mRNA水平的关系。(+/+, ○) , 野生型小鼠 (n=20) ; (-/-AAV, ●) AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠 (n=20) 。数据表示为平均值±SEM。**P<0.005。

[0019] 图6A-6D是示出了12周龄的野生型、rAAV-GPE处理的和rAAV-miGPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中的生化分析结果的图表。rAAV-GPE和rAAV-miGPE分别是在2864bp的人G6PC启动子/增强子(GPE) 和382bp的最小人G6PC启动子/增强子(miGPE) 的指导下表达人G6Pase的rAAV载体。(图6A) 肝微粒体G6Pase- α 活性及其与载体基因组拷贝数的关系。(图6B) 生长曲线。(图6C) BMI值。(图6D) 血糖水平。GPE-高, 高剂量rAAV-GPE处理的(○) ; miGPE-高, 高剂量rAAV-miGPE处理的(●) ; GPE-低, 低剂量rAAV-GPE处理的(□) ; miGPE-低, 低剂量rAAV-miGPE处理的(■) G6pc^{-/-}小鼠; (+/+) , 野生型(▼) 小鼠。数据表示为平均值±SEM。*P<0.05。

[0020] 图7A-7C是示出了12周龄野生型、rAAV-GPE处理的和rAAV-miGPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中的表型分析结果的图表。(图7A) 肝重量。(图7B) 肝糖原含量。(图7C) 肝甘油三酯含量。GPE-高 (n=6) , 高剂量rAAV-GPE处理的; miGPE-高 (n=6) , 高剂量rAAV-miGPE处理的; GPE-低 (n=6) , 低剂量rAAV-GPE处理的; miGPE-低 (n=6) , 低剂量rAAV-miGPE处理的G6pc^{-/-}小鼠; (+/+) , 野生型小鼠。数据表示为平均值±SEM。*P<0.05。

[0021] 图8A-8C是示出了12周龄的野生型、rAAV-GPE处理的和rAAV-miGPE处理的G6pc^{-/-}小鼠的空腹血糖和葡萄糖耐量谱的图表。(图8A) 空腹血糖谱。(图8B) 24禁食小时之后的血糖水平。(图8C) 葡萄糖耐量谱。GPE-高 (n=6) , 高剂量rAAV-GPE处理的(○) ; miGPE-高 (n=6) , 高剂量rAAV-miGPE处理的(●) ; GPE-低 (n=6) , 低剂量rAAV-GPE处理的(□) ; miGPE-低 (n=6) , 低剂量rAAV-miGPE处理的(■) G6pc^{-/-}小鼠; (+/+) , 野生型(▼) 小鼠。数据表示为平均值±SEM。*P<0.05, **P<0.005。

[0022] 图9是犬 (SEQ ID NO:10) 和人 (SEQ ID NO:4) G6Pase蛋白序列的比对。

- [0023] 图10是示出了人、小鼠、大鼠和犬G6Pase-的氨基酸序列差异的表。
- [0024] 图11是示出了用rAAV转导的GSD-Ia小鼠中的肝G6Pase活性的图表。用rAAV8载体(10^{13} vg/kg)转导GSD-Ia小鼠,所述载体在GPE启动子/增强子的指导下表达天然或密码子优化(codon-optimized,co)的人G6Pase。12周龄小鼠中的肝G6Pase活性为 165.4 ± 18.2 nmol/min/mg。
- [0025] 图12是示出了12周龄野生型(+/+)和rAAV处理的GSD-Ia小鼠中的肝重量的图表。
- [0026] 图13A和13B分别是示出了野生型(○)和rAAV8-GPE-co-G6Pase处理的GSD-Ia(●)小鼠中的葡糖耐量和空腹血糖谱的图表。
- [0027] 序列表
- [0028] 使用37C.F.R.1.822中定义的核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码示出了所附序列表中列出的核酸和氨基酸序列。仅示出了每个核酸序列的一条链,但是应理解通过参考示出的链而包含了互补链。序列表以2014年11月112日创建的39.6KB的ASCII文本文件提交,其通过引用的方式纳入本文。在所附序列表中:
- [0029] SEQ ID NO:1是UF11-GPE-G6PC质粒的核苷酸序列,所述质粒包含以下特征:
- [0030] ITR-核苷酸17-163
- [0031] G6PC启动子/增强子-核苷酸182-3045
- [0032] 填充序列-核苷酸3051-3184
- [0033] 内含子-核苷酸3185-3321
- [0034] 填充序列-核苷酸3322-3367
- [0035] G6PC编码序列-核苷酸3368-4441
- [0036] ITR-核苷酸4674-4819
- [0037] SEQ ID NO:2是UF11-K29-G6PC质粒的核苷酸序列,所述质粒包含以下特征:
- [0038] ITR-核苷酸17-163
- [0039] 6PC启动子/增强子-核苷酸182-3045
- [0040] 内含子-核苷酸3052-3188
- [0041] G6PC编码序列-核苷酸3202-4275
- [0042] ITR-核苷酸4508-4653
- [0043] SEQ ID NO:3是UF11-GPE-co-G6PC质粒的核苷酸序列,所述质粒包含以下特征:
- [0044] ITR-核苷酸17-163
- [0045] 6PC启动子/增强子-核苷酸182-3045
- [0046] 填充序列-核苷酸3051-3184
- [0047] 内含子-核苷酸3185-3321
- [0048] 填充序列-核苷酸3322-3367
- [0049] G6PC编码序列-核苷酸3368-4441
- [0050] ITR-核苷酸4674-4819
- [0051] SEQ ID NO:4是人G6PC蛋白的氨基酸序列。
- [0052] SEQ ID NO:5-8是引物序列。
- [0053] SEQ ID NO:9是犬G6PC的核苷酸序列。
- [0054] SEQ ID NO:10是犬G6PC的氨基酸序列。

具体实施方式

[0055] I. 缩写

- [0056] AAV 腺相关病毒
- [0057] BMI 体重指数
- [0058] CBA 鸡 β -激动蛋白
- [0059] CMV 巨细胞病毒
- [0060] ELISA 酶联免疫吸附测定
- [0061] G6P 葡萄糖-6-磷酸
- [0062] G6PC 葡萄糖-6-磷酸酶,催化亚基
- [0063] G6PT 葡萄糖-6-磷酸转运蛋白
- [0064] GPE G6PC启动子/增强子
- [0065] GSD 糖原贮积病
- [0066] H&E 苏木精和曙红
- [0067] HCA 肝细胞腺瘤
- [0068] HCC 肝细胞癌
- [0069] ITR 反向末端重复
- [0070] ORF 开放阅读框
- [0071] rAAV 重组AAV
- [0072] vg 病毒基因组
- [0073] vp 病毒颗粒

[0074] II. 术语和方法

[0075] 除非另有说明,否则技术术语是根据常规用法使用。分子生物学中常见术语的定义可以在以下中找到:Benjamin Lewin, Genes V, Oxford University Press出版,1994 (ISBN 0-19-854287-9);Kendrew et al. (编辑), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd. 出版,1994 (ISBN0-632-02182-9);以及Robert A. Meyers (编辑), Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers Inc. 出版,1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

[0076] 为了便于理解本公开内容的各个实施方案,提供了特定术语的以下解释:

[0077] 腺相关病毒 (AAV):感染人和其他一些灵长类物种的小的复制缺陷性无包膜病毒。已知AAV不造成疾病并且引起非常轻微的免疫应答。使用AAV的基因疗法载体可以感染分裂细胞和静止期细胞,并且可以保持染色体外状态而不整合到宿主细胞的基因组中。这些特征使得AAV成为用于基因疗法的有吸引力的病毒载体。目前有11种确认的AAV血清型 (AAV1-11)。

[0078] 给药/给予:通过有效的途径向受试者提供或给予药剂,例如治疗剂(例如,重组AAV)。示例性给药途径包括但不限于注射(例如,皮下、肌内、真皮内、腹膜内和静脉内)、口服、导管内、舌下、直肠、经皮、鼻内、阴道和吸入途径。

[0079] 密码子优化的:“密码子优化的”核酸是指已经被改变以使得密码子最适于特定系统(例如,特定物种或物种的组)中的表达的核酸序列。例如,核酸序列可以优化用于在哺乳动物细胞或特定哺乳动物物种(例如人细胞)中表达。密码子优化不改变所编码蛋白质的氨

基酸序列。

[0080] 增强子:通过提高启动子的活性来提高转录速率的核酸序列。

[0081] G6PC:位于人染色体17q21中的编码葡萄糖-6-磷酸酶α (G6Pase-α) 的基因。G6Pase-α是357个氨基酸的疏水蛋白质,具有将其锚定在内质网中的9个螺旋 (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010)。G6Pase-α蛋白质在糖异生和糖原分解的最终步骤催化葡萄糖-6-磷酸水解成葡萄糖和磷酸,是葡萄糖稳态中的重要酶。G6PC基因中的突变造成Ia型糖原贮积病 (GSD-Ia),这是一种与肝脏和肾中的糖原和脂肪积累相关的以严重空腹低血糖为特征的代谢障碍。

[0082] 糖原贮积病 (GSD):肌肉、肝脏以及其他组织中糖原合成或分解过程中的缺陷造成的一类疾病。GSD可以是遗传性的或获得性的。遗传性GSD是由参与这些过程的新陈代谢的任何先天缺陷造成。目前有11种确认的糖原贮积病 (GSD I、II、III、IV、V、VI、VII、IX、XI、XII和XIII型)。GSD-I由两种常染色体隐形疾病GSD-Ia和GSD-Ib组成 (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010)。GSD-Ia由葡萄糖-6-磷酸酶α的缺陷造成。葡萄糖-6-磷酸转运蛋白 (G6PT) 的缺陷是GSD-Ib的原因。

[0083] Ia型糖原贮积病 (GSD-Ia):也称为冯吉尔克病,GSD-Ia是最常见的糖原贮积病,活产儿中发病率为约1/100,000。GSD-Ia是由酶葡萄糖-6-磷酸酶α (G6Pase-α) 的缺陷造成的遗传病。G6Pase-α的缺陷损害肝脏由糖原和由糖异生产生游离葡萄糖的能力。患有GSD-Ia的患者不能维持葡萄糖稳态并且具有空腹低血糖、生长迟缓、肝肿大、肾肥大、高脂血症、高尿酸血症和乳酸血症 (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010)。目前没有用于GSD-Ia的治愈方法。

[0084] 内含子:基因中不包含蛋白质的编码信息的一段DNA。内含子在信使RNA翻译之前被移除。

[0085] 反向末端重复 (ITR):有效复制所需的腺相关病毒基因组中的对称核酸序列。ITR序列位于AAV DNA基因组的每一端。ITR充当病毒DNA合成的复制起点,并且是产生AAV整合型载体的必要的顺式元件。

[0086] 分离的:“分离的”生物组分 (例如,核酸分子、蛋白质、病毒或细胞) 已经被从其中所述组分天然存在的生物体的细胞或组织中或者生物体本身中的其他生物组分 (例如其他染色体和染色体外DNA和RNA、蛋白质和细胞) 中基本上分离或纯化。已经“分离”的核酸分子和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的那些。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸分子和蛋白质,以及化学合成的核酸分子和蛋白质。

[0087] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列被放置为具有功能关系时,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,则启动子与编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且当有必要连接两个蛋白质编码区时,其在相同阅读框中。

[0088] 可药用载体:本公开内容中可以使用的可药用载体 (溶剂 (vehicle)) 是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W.Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975) 描述了适合一种或更多种治疗性化合物、分子或试剂的药物递送的组合物和制剂。

[0089] 通常,载体的性质取决于所使用的特定给药方式。例如,胃肠外制剂通常包含可注

射流体,其包括药学和生理学上可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、水性右旋糖、甘油等作为溶剂。对于固体组合物(例如,粉末剂、丸剂、片剂或胶囊剂形式),可以包含常规无毒固体载体,例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物学中性载体外,待给予的药物组合物还可以包含少量无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如醋酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0090] 预防、治疗或改善疾病:“预防”疾病(例如GSD-Ia)是指抑制疾病的全面发生。“治疗”是指在疾病开始发生后改善疾病或病理病症的体征或症状的治疗性介入。“改善”是指降低疾病的体征或症状的数目或严重性。

[0091] 启动子:指导/引起核酸(例如,基因)的转录的DNA区域。启动子包括转录起始位点附近的必要核酸序列。通常,启动子位于其转录的基因附近。启动子还任选地包括远端增强子或阻遏物元件,其可以位于距转录起始位点数千个碱基对远。

[0092] 纯化的:术语“纯化的”并不需要绝对纯度;相反地,其旨在作为相对术语。因此,例如,纯化的多肽、蛋白质、病毒或其他活性化合物是全部或部分地从天然相关的蛋白质和其他污染物中分离得那些。在某些实施方案中,术语“基本上纯化的”是指已从细胞、细胞培养基或其他粗制品中分离并且经过分级分离以除去初始制品的多种组分(如蛋白质、细胞碎片以及其他组分)的肽、蛋白质、病毒或其他活性化合物。

[0093] 重组:重组核酸分子是指这样的核酸分子,其具有非天然存在的序列,或者具有通过两个序列片段的人为组合(否则地话,其将是分开的)制备的序列。这种人为组合可以通过化学合成或者通过分离的核酸分子片段的人为操作(如通过基因工程技术)实现。

[0094] 同样地,重组病毒是包含非天然存在的序列或通过至少两个不同来源的序列的人为组合制备的序列的病毒。术语“重组”还包括仅通过天然核酸分子、蛋白质或病毒的一部分的添加、置换或缺失改变的核酸、蛋白质和病毒。本文使用的“重组AAV”是指其中包装有重组核酸分子(例如,编码G6Pase-α的重组核酸分子)的AAV颗粒。

[0095] 序列同一性:两个或更多个核酸序列之间或者两个或更多个氨基酸序列之间的同一性或相似性是根据序列之间的同一性或相似性表示。序列同一性可以根据百分比同一性测量;百分比越高,序列越相同。序列相似性可以根据百分比相似性测量(考虑保守性氨基酸置换);百分比越高,序列越相似。当使用标准方法比对时,核酸或氨基酸序列的同源物或直系同源物具有相对高的序列同一性/相似性程度。与来自相关性更远的物种(例如,人和线虫(*C.elegans*)序列)相比,当直系同源蛋白质或cDNA来自更紧密相关的物种(例如,人和小鼠序列)时,这种同源性更显著。

[0096] 用于比较的序列比对方法是本领域中公知的。以下描述了多种程序和比对算法: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 118:285-319,1988;Higgins&Sharp,CABIOS 5:151-3,1989;Corpet et al.,Nuc.Acids Res.16:10881-90,1988;Huang et al.Computer Appl.s in the Biosciences 8,155-65,1992;以及Pearson et al.,Meth.Mol.Bio.24:307-31,1994.Altschul et al.,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。

[0097] NCBI基本局部比对检索工具(BLAST)(Altschul et al.,J.Mol.Biol.215:403-10,1990)可以从多个来源获得,包括国家生物信息中心(NCBI)和网上,其用于结合序列分

析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx使用。额外的信息可以在NCBI网址上找到。

[0098] 血清型:通过抗原的特征组区分的一类密切相关的微生物(例如,病毒)。

[0099] 填充序列:较大核酸分子(例如,载体)中包含的核苷酸序列,其通常用于在两个核酸特征之间(例如启动子和编码序列之间)产生所需的间隔,或者延长核酸分子以使其具有所需长度。填充序列不包含蛋白质编码信息,可以是未知的/合成来源并且/或者与较大核酸分子内的其他核酸序列不相关。

[0100] 受试者:活的多细胞脊椎动物生物体,包括人和非人哺乳动物的类别。

[0101] 合成:通过人工手段在实验室产生,例如合成核酸可以在实验室化学合成。

[0102] 治疗有效量:足以在用试剂治疗的受试者或者细胞中取得所需效果的特定药物或治疗试剂(例如重组AAV)的量。试剂的有效量取决于多种因素,包括但不限于被治疗的受试者或细胞,以及治疗性组合物的给药方式。

[0103] 载体:载体是允许插入外源核酸而不破坏载体在宿主细胞中复制和/或整合的能力的核酸分子。载体可以包含允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可以包含一种或更多种选择性标记基因和其他遗传元件。表达载体是包含必要的调控序列以允许插入的基因转录和翻译的载体。在本文的一些实施方案中,载体是AAV载体。

[0104] 除非另有说明,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有本公开内容所属领域的普通技术人员所通常理解的含义相同的含义。除非上下文另外明确说明,单数术语“一”、“一个”和“所述”包括复数指示物。“包含A或B”意指包含A、或者B,或者A和B。还应理解的是,对于核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小,以及所有分子重量或分子质量值是近似的,并且被提供用于描述。尽管在本公开内容的实践或测试中可以使用与本文所述的那些方法和材料相似或相同的方法和材料,但是以下描述了合适的方法和材料。本文提到的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用的方式全文纳入本文。在矛盾的情况下,以本说明书(包括术语的解释)为准。此外,材料、方法和实例仅为示例性的,而不是旨在限制。

[0105] III.多个实施方案的概述

[0106] 本文提供了可在用于治疗糖原贮积病(尤其是GSD-Ia)的基因疗法应用中使用的重组核酸分子、AAV载体和重组AAV。

[0107] 所述重组核酸分子包含G6PC启动子/增强子(GPE)、合成内含子和G6PC编码区。所述G6PC编码区任选地被密码子优化用于在人细胞中表达。所述重组核酸分子还包含位于G6PC启动子/增强子和内含子之间,以及内含子和G6PC编码序列之间的填充核酸序列。当被包含在AAV载体中时,所述重组核酸分子还可以包含5'和3'反向末端重复(ITR)序列。

[0108] 本文公开了,具有G6PC启动子/增强子的表达G6Pase- α 的重组AAV(AAV-GPE)在指导体内肝转基因的表达方面比具有替代启动子/增强子(即,鸡 β 激动蛋白启动子/CMV增强子)的另外的表达G6Pase- α 的重组AAV显著更有效。经过24小时的研究期,用AAV-GPE处理的G6PC缺陷小鼠(GSD-Ia的模型)表现出肝G6PC缺陷的完全正常化,如通过正常的血糖、血代谢物、肝糖原和肝脂肪水平证明的(参见实施例1和Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010)。另外,对AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠的长期研究表明,AAV-GPE介导的基因疗法在小鼠中有效至少70-90周,表达了大于3%的肝G6Pase- α 。特别地,AAV-GPE处理的小鼠表现出

正常的肝脂肪贮积、正常的血代谢物和葡糖耐量谱,降低的空腹血糖岛素水平,并且没有肝异常(如肝细胞肿瘤)的迹象(参见实施例2和Lee et al., Hepatology 56:1719-1729, 2012)。

[0109] 本公开内容还发现,G6PC启动子的上游增强子元件对于GSD-Ia动物模型中的最佳G6PC表达是关键的。特别地,证明与仅包含383bp的最小G6PC启动子/增强子的表达G6Pase- α 的重组AAV相比,利用在核苷酸-2684至-1(相对于G6PC起始位点)包含G6PC启动子/增强子的AAV-GPE的治疗在GSD-Ia小鼠模型中产生了显著更高的肝G6Pase- α 表达水平,实现了更大的肝糖原积累的降低,并且导致了更好的空腹耐量(参见实施例3和Lee et al., Mol Genet Metab. 110 (3): 275-280, 2013)。

[0110] 本公开内容还发现,存在于G6PC启动子/增强子和内含子之间以及内含子和G6PC编码序列之间的填充核苷酸序列对于G6Pase- α 的肝转导和表达很重要。特别地,由缺少填充序列的质粒UF11-K29-G6PC (SEQ ID NO:2)产生的重组AAV表现出7.3nmol/min/mg的G6Pase活性。相比之下,由质粒UF11-GPE-G6PC (SEQ ID NO:1)产生的重组AAV表现出33.0nmol/min/mg的G6Pase活性(参见实施例4)。本公开内容提供了存在于本文中由SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3给出的AAV载体中的填充序列的第一次描述。

[0111] 另外,本文公开的数据证明,G6PC编码序列的密码子优化使翻译效率提高约1.5至2.5倍,导致与编码野生型G6PC的AAV-GPE的给药相比,在AAV-co-GPE(包含密码子优化的G6PC核酸序列)给药后肝脏中显著更高的G6Pase- α 表达(参见实施例5)。

[0112] 总之,这些结果表明,包含位于核苷酸-2684至-1的G6PC启动子/增强子、合成内含子、内含子侧翼的填充序列和G6PC编码区(野生型或密码子优化)的重组AAV是有效的肝转基因表达和体内GSD-Ia治疗的关键特征。

[0113] 本文提供了重组核酸分子,其包含与SEQ ID NO:1的核苷酸182-4441核苷酸或SEQ ID NO:3的核苷酸182-4441具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列。例如,核酸分子可以在G6PC编码区中包含核苷酸置换,例如用于密码子优化。又例如,G6PC编码区可以是来自不同物种的G6PC,例如犬G6PC或犬G6PC的密码子优化(用于在人中表达)形式。在一些实例中,由SEQ ID NO:1的核苷酸182-3045或者SEQ ID NO:3的核苷酸182-3045给出的G6PC编码区被置换成犬G6PC编码序列(SEQ ID NO:9)。或者,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的人G6PC编码区可以包含核苷酸置换,所述核苷酸置换导致在犬和人G6PC蛋白序列之间不同的残基处的编码变化。例如,可以引入核苷酸置换,导致人G6PC蛋白(SEQ ID NO:4)的残基3、54、139、196、199、242、247、292、298、301、318、324、332、347、349、350和/或353处的编码变化。图9示出了人和犬G6Pase- α 蛋白序列的比对,图10提供了示出人、小鼠、大鼠和犬G6Pase- α 之间的氨基酸差异的表。本公开内容考虑了在图10中所列的任何残基处改变氨基酸序列的核苷酸置换。

[0114] 在其他情况下,核苷酸置换可以存在于填充序列或者合成内含子序列中。核苷酸置换还可能会被包含在载体序列中,例如3'ITR下游(即3'),或者5'ITR和GPE之间,或者G6PC编码区和3'ITR之间的载体序列。在一些实施方案中,重组核酸分子包含SEQ ID NO:1的核苷酸182-4441或SEQ ID NO:3的核苷酸182-4441。这些重组核酸分子包含核苷酸-2684至-1处的G6PC启动子/增强子序列、合成内含子、内含子侧翼的填充序列和G6PC编码序列。SEQ ID NO:1包含野生型G6PC编码区,而SEQ ID NO:3包含密码子优化的G6PC编码序列。

[0115] 在一些实施方案中,重组核酸分子还包含3'和5'ITR序列。因此,本文提供了重组核酸分子,其包含与SEQ ID N0:1的核苷酸17-4819或者SEQ ID N0:3的核苷酸17-4819具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,重组核酸分子包含SEQ ID N0:1的核苷酸17-4819或者SEQ ID N0:3的核苷酸17-4819。在一些特定的非限制性实例中,重组核酸分子包含SEQ ID N0:1的完整序列(用于产生AAV-GPE的UF11-GPE-G6PC质粒)或者SEQ ID N0:3的完整序列(用于产生密码子优化的AAV-co-GPE的UF11-GPE-co-G6PC质粒)。在其他实例中,重组核酸分子包含与SEQ ID N0:1或SEQ ID N0:3具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列。

[0116] 在其他实施方案中,本文提供了重组核酸分子,其包含与SEQ ID N0:2的核苷酸182-4275具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列。在一些实例中,重组核酸分子包含SEQ ID N0:2的核苷酸182-4275。在一些实例中,重组核酸分子包含与SEQ ID N0:2的核苷酸17-4653具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列。在一些实例中,重组核酸分子包含SEQ ID N0:2的核苷酸17-4653。在一些特定的非限制性实例中,重组核酸分子包含SEQ ID N0:2的完整序列(缺少填充序列的UF11-K29-G6PC质粒)。在其他实例中,重组核酸分子包含与SEQ ID N0:2具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列。

[0117] 本文还提供了包含本文公开的重组核酸分子的载体。在一些实施方案中,载体是AAV载体。AAV血清型可以是任何适合于向受试者递送转基因的血清型。在一些实例中,AAV载体是血清型8AAV(AAV8)。在其他实例中,AAV载体是血清型1、2、3、4、5、6、7、9、10、11或12载体(即,AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV9、AAV10、AAV11或AAV12)。在其他实例中,AAV载体是两种或更多种AAV血清型的杂种(例如,但不限于AAV2/1、AAV2/7、AAV2/8或AAV2/9)。AAV血清型的选择部分取决于基因疗法所靶向的细胞类型。对于GSD-Ia的治疗,肝和肾是相关的靶器官。

[0118] 本文还提供了包含本文公开的重组核酸分子或载体的分离的宿主细胞。例如,分离的宿主细胞可以是适合于产生重组AAV(rAAV)的细胞(或细胞系)。在一些实例中,宿主细胞是哺乳动物细胞,例如HEK-293、BHK、Vero、RD、HT-1080、A549、Cos-7、ARPE-19或MRC-5细胞。

[0119] 本文还提供了包含本文公开的重组核酸分子的rAAV。在一些实施方案中,rAAV是rAAV8和/或rAAV2。但是,AAV血清型可以是任何其他合适的AAV血清型,例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV9、AAV10、AAV11或AAV12,或者两种或更多种AAV血清型的杂种(例如,但不限于AAV2/1、AAV2/7、AAV2/8或AAV2/9)。本公开内容还提供了包含本文公开的rAAV和可药用载体的组合物。在一些实施方案中,组合物被配制为用于静脉内或肌给药。用于rAAV给药的合适的药物制剂可以在例如美国专利申请No.2012/0219528中找到。

[0120] 本文还提供了治疗被诊断为患有糖原贮积病的受试者的方法,包括选择患有GSD-Ia的受试者,以及给予所述受试者治疗有效量的本文公开的rAAV(或者包含rAAV的组合物)。在一些实施方案中,rAAV通过静脉内给予。

[0121] 在一些实施方案中,以约 1×10^{11} 至约 1×10^{14} 病毒颗粒(vp)/kg的剂量给予rAAV。在一些实例中,以约 1×10^{12} 至约 8×10^{13} vp/kg的剂量给予rAAV。在其他实例中,以约 1×10^{13} 至约 6×10^{13} vp/kg的剂量给予rAAV。在一些特定的非限制性实例中,以至少约 1×10^{11} 、至少约 5×10^{11} 、至少约 1×10^{12} 、至少约 5×10^{12} 、至少约 1×10^{13} 、至少约 5×10^{13} 或至少约 1×10^{14} vp/kg的剂量给予rAAV。在其他非限制性实例中,以不大于约 5×10^{11} 、不大于约 1×10^{12} 、不大于约 5×10^{12} 、不大于约 1×10^{13} 、不大于约 5×10^{13} 或不大于约 1×10^{14} vp/kg的剂量给予rAAV。在一个非限制性实例中,以约 1×10^{12} vp/kg的剂量给予rAAV。根据所需治疗结果的需要,可以以单剂量或多剂量(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个剂量)给予rAAV。

[0122] IV. 用于基因疗法应用的重组AAV

[0123] AAV属于细小病毒(Parvoviridae)科和依赖病毒(Dependovirus)属。AAV是小的无包膜病毒,其包装有线性单链DNA基因。AAV DNA的正义链和反义链以相等的频率被包装在AAV衣壳中。

[0124] AAV基因组以两个开放阅读框(ORF)侧翼的两个反向末端重复(ITR)为特征。在AAV2基因中,例如,ITR的前125个核苷酸是回文结构,其自折叠以使碱基配对最大化并且形成T型发夹结构。ITR的另外20个碱基(称为D序列)保持未配对。ITR是对于AAV DNA复制很重要的顺式作用序列;ITR是复制起点并且充当了通过DNA聚合酶的第二链合成的引物。该合成过程中形成的双链DNA(也成为复制形成单体)被用于第二轮的自引物复制并且形成复制形成二聚体。通过链置换机制加工这些双链中间产物,得到用于包装的单链DNA和用于转录的双链DNA。位于ITR内的是Rep结合元件和末端解离位点(terminal resolution site, TRS)。这些特征在AAV复制期间被病毒复制调节蛋白Rep利用来加工双链中间产物。除了其在AAV复制中的作用外,ITR还是AAV基因组包装、转录、非许可条件下的负调控和位点特异性整合所必需的(Daya and Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008)。

[0125] AAV左侧的ORF包含Rep基因,其编码四种蛋白质:Rep78、Rep 68、Rep52和Rep40。右侧的ORF包含Cap基因,其产生三种病毒衣壳蛋白(VP1、VP2和VP3)。AAV衣壳蛋白包含排列成二十面体对称的60个病毒衣壳蛋白。VP1、VP2和VP3以1:1:10摩尔比存在(Daya and Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008)。

[0126] AAV是目前基因疗法中最常用的病毒之一。尽管AAV感染人和一些其他灵长类物种,已知其不导致疾病并引起非常轻微的免疫应答。利用AAV的基因疗法载体可以感染分裂细胞和静止期细胞二者,并且保持为染色体外状态而不整合到宿主细胞的基因组中。由于AAV的有利特征,本公开内容考虑了将AAV用于本文公开的重组核酸分子和方法。

[0127] AAV具有用于基因疗法载体的多种所需特征,包括结合并且进入靶细胞、进入细胞核的能力、在细胞核中表达较长时间的能力以及低毒性。但是AAV基因组的小尺寸限制了可以整合的异源DNA的大小。为了使这个问题尽可能小,已经构建了不编码Rep和整合效率元件(IEE)的AAV载体。保留了ITR,因为它们是包装所需的顺式信号(Daya and Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008)。

[0128] 产生适合于基因疗法的rAAV的方法是本领域中已知的(参见,例如美国专利申请No.2012/0100606;2012/0135515;2011/0229971;和2013/0072548;以及Ghosh et al., Gene Ther 13(4):321-329, 2006),并且可以与本文公开的重组核酸分子和方法一起使用。

[0129] 本文提供了以下实施例以说明某些特征和/或实施方案。这些实施例不应解释为

将本公开内容限制于所述的特定特征或实施方案。

[0130] 实施例

[0131] 实施例1: 使用基因疗法使Ia型糖原贮积病的肝G6PC缺陷完全正常化

[0132] 本实施例描述了由两种不同启动子驱动的两种表达G6Pase- α 的AAV载体在G6PC缺陷小鼠中的肝基因递送效率和G6Pase- α 表达的比较。结果证明,具有G6PC启动子/增强子的AAV载体(AAV-GPE)在指导持久的体内肝转基因表达方面比具有鸡 β -激动蛋白启动子/CMV增强子的AAV载体(AAV-CBA)更有效。另外,用AAV-GPE处理的G6PC缺陷小鼠表现出正常的血糖、血代谢物、肝糖原和肝脂肪水平。

[0133] 材料和方法

[0134] pUF11-GPE-G6PC的构建和AAV载体的制备

[0135] 通过如下方式对pUF11-mG6Pase- α -CBA (Ghosh et al., Gene Ther 13:321-329, 2006) (其中, 小鼠G6Pase- α 是由CBA启动子/CMV增强子驱动 (Xu et al., Hum Gene Ther 12:563-573, 2001)) 进行改变来构建包含处于人G6PC启动子/增强子控制之下的人G6Pase- α 的UF11-GPE-G6PC质粒: 通过XhoI/SphI消化切割来自pUF11-mG6Pase- α -CBA的Tkp-neo片段, 然后将剩余载体进行凝胶纯化, 用T4DNA聚合酶补平, 然后自连接以产生pUF11-mG6Pase- α -CBA-[Tkp-neo]^{-/-}。然后在5'-SbfI和3'-NotI位点将pUF11-mG6Pase- α -CBA-[Tkp-neo]^{-/-}中的mG6Pase- α 和CBA启动子/CMV增强子替换成人G6Pase- α cDNA, 产生pUF11-G6PC。然后用PCR克隆包含人G6PC启动子/增强子的G6PC 5'侧翼区的核苷酸-2864至-1。PCR模板是包含人G6PC基因的细菌人工染色体 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), 引物对是1S (5'-CCTTGAGAATCCACGGTGT-3'; SEQ ID NO:5) 和2AS (5'-CCTCATTCCCTGGCACCTC-3'; SEQ ID NO:6), 其分别在5'和3'端包含额外的KpnI和XbaI位点。然后将包含G6PC启动子/增强子的KpnI-XbaI片段连接到KpnI-XbaI线性化的pUF11-G6PC中, 产生pUF11-G6PC-GPE-1。接下来, 使用分别在5'和3'端包含额外的SpeI和SbfI位点的引物对3S (5'-AGGTAAAGTATCAAGGTTACA-3'; SEQ ID NO:7) 和4AS (5'-ACCTGTGGAGAGAAAGGCAA-3'; SEQ ID NO:8) 来用PCR克隆来自pCI载体的 (Promega, Madison, WI) 的嵌合内含子。然后将这种嵌合内含子作为SpeI-SbfI片段连接到SpeI-SbfI线性化的大pUF11-G6PC-GPE-1片段中, 产生pUF11-GPE-G6PC (SEQ ID NO:1)。通过DNA测序确认所有构建体。

[0136] 分别使用pUF11-GPE-G6PC和pUF11-mG6Pase- α -CBA产生AAV-GPE和AAV-CBA, 并且如之前所述产生、纯化和滴定 (Ghosh et al., Gene Ther 13:321-329, 2006)。使用实时PCR利用针对G6PC或CBA启动子的引物和探针进行载体基因组定量。

[0137] 向G6pc^{-/-}小鼠输注AAV载体

[0138] 如之前所述对G6pc^{-/-}小鼠给予葡萄糖疗法, 其由每12小时腹膜内注射25-100 μ l 15%葡萄糖组成 (Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996)。使断奶存活的小鼠不受限地食用小鼠饲料 (Zeigler Bros., Inc., Gardners, PA)。

[0139] 通过颞静脉向2天龄的G6pc^{-/-}小鼠输注, 以及通过眶后静脉窦向2或4周龄的G6pc^{-/-}小鼠输注AAV载体。使用年龄匹配的G6pc^{+/+}/G6pc⁺⁻和4至6周龄的G6pc^{-/-}小鼠作为对照。对于病毒输注的小鼠, 在输注后立即停止葡萄糖疗法。

[0140] 12或14周龄的AAV-GPE输注的G6pc^{-/-}小鼠的葡萄糖耐量测试由采血前禁食6小时, 然

后皮下注射0.25ml 10%右旋糖，并且每30分钟通过尾静脉重复采血(持续额外2小时)组成。

[0141] 磷酸水解酶测定

[0142] 基本上如之前的描述进行微粒体分离和磷酸水解酶测定(Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996)。将包含50mM pH 6.5的二甲砷酸盐缓冲液、10mM G6P和适量的微粒体制品的反应混合物(100μl)在37°C下孵育10分钟。通过将完整膜在0.2%脱氧胆酸盐中于0°C下孵育20分钟来制备破坏的微粒体膜。通过将pH 5的破坏的微粒体制品在37°C下预孵育10分钟使酸性不稳定的G6Pase-α失活来评估非特异性磷酸酶活性。

[0143] 通过将10μm厚的肝脏组织切片于室温下在包含40mM pH 6.5的Tris-马来酸盐、10mM G6P、300mM蔗糖和3.6mM硝酸铅的溶液中孵育10分钟来进行G6Pase-α的酶组织化学分析(Teutsch, Prog Histochem Cytochem 14:1-92, 1981)。捕获的磷酸铅在转化成褐色硫化铅后可视化(Teutsch, Prog Histochem Cytochem 14:1-92, 1981)。

[0144] 表型分析

[0145] 从尾静脉采集血样。使用获自Thermo Electron (Louisville, CO) 的试剂盒分析血糖、总胆固醇和尿酸。使用获自Sigma Diagnostics (St Louis, MO) 的试剂盒测量甘油三酯，通过来自Trinity Biotech (St. Louis, MO) 的试剂盒测量乳酸。

[0146] 对于苏木精和曙红(H&E)以及油红O染色，将肝脏切片保存在10%中性缓冲的福尔马林中，并且切成4-10微米厚度。使用Axioskop2plus显微镜和AxioVision 4.5软件(Carl Zeiss, Thornwood, NY)使染色的切片可视化。对于脂质积累的定量组织学测量，使用Adobe Photoshop CS3 (Adobe System Incorporated, San Jose, CA) 将油红O染色转变成像素密度单位。

[0147] 为了确定肝糖原含量，用HCl使组织均质化(煮沸10分钟)，并且用醋酸钠中和到4.5的最终pH(Teutsch, Prog Histochem Cytochem 14:1-92, 1981)。然后将水解的组织用淀粉-α-1,4-α-1,6-葡萄糖苷酶消化，并且使用获自Sigma Diagnostics的试剂盒测量释放的葡萄糖。糖原含量报道为nmol糖基单元/mg肝蛋白。

[0148] 抗体测定

[0149] 通过蛋白质印迹分析测定针对人和小鼠G6Pase-α的抗体。通过12%聚丙烯酰胺SDS凝胶的电泳并且将印迹转移到聚偏二氟乙烯膜(Millipore, Bedford, MA)上来解析来自Ad-human G6Pase-α或Ad-mouse G6Pase-α感染的COS-1细胞(Ghosh et al., J Biol Chem 277:32837-32842, 2002)的微粒体蛋白。将所述膜放在包含多通道的Multiscreen Apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 中。用1:3000稀释的兔抗人G6Pase-α血清(Ghosh et al., J Biol Chem 277:32837-32842, 2002)或者1:200稀释的来自AAV-GPE输注的或AAV-CBA输注的动物的血清样品孵育每个通道下的膜带(membrane strip)。使用来自未处理的G6pc^{-/-}和G6pc^{+/+}/G6pc⁺⁻同窝出生仔的血清样品作为对照。在过夜孵育后，然后用辣根过氧化物酶缀合的山羊抗兔IgG或山羊抗小鼠IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) 孵育膜带。通过使用来自Pierce (Rockford, IL) 的SuperSignal™ West Pico化学发光底物的化学发光系统使免疫复合物可视化。

[0150] CD8+淋巴细胞免疫检测

[0151] 将小鼠肝脏骤冷，包埋在O.C.T. (Sakura Finetek, Terrance, CA) 中，并且切成8微

米厚度的切片。将切片在丙酮中于-20℃下固定10分钟,干燥,用PBS洗涤,用含有2%BSA的PBS封闭30分钟,并且用溶于补充有1%BSA的PBS中的针对CD8的兔多克隆抗体(Abcam Inc., Cambridge, MA)在4℃孵育过夜。用PBS洗涤后,将切片用与Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) 染料缀合的山羊抗大鼠IgG抗体在黑暗中于25℃下孵育1小时。用PBS洗涤后,用含有DAPI的抗褪色水基封固剂(Vector Laboratories, Burlingame, CA)固定标记的细胞,并且使用Axioskop2plus荧光显微镜(Carl Zeiss, Thornwood, NY)可视化。对200倍放大率下的十个随机选择的视野中的CD8+细胞计数,并且报道为平均值。

[0152] 统计学分析

[0153] 使用GraphPad Prism®程序版本4 (GraphPad Software, San Diego, CA) 进行未配对的t检验。p<0.05时认为值是统计学上显著的。

[0154] 结果

[0155] AAV-GPE输注指导长期肝G6Pase- α 表达

[0156] 为了检验之前研究的人G6PC启动子元件(Koeberl et al., Mol Ther 16:665-672, 2008)的核苷酸-298上游的序列的体内影响,构建了在人G6PC5'侧翼区的核苷酸-2864至-1的控制下表达人G6Pase- α 的AAV8载体AAV-GPE。由于没有在小鼠中开始AAV介导的基因疗法的标准年龄(Ghosh et al., Gene Ther 13:321-329, 2006; Koeberl et al., Gene Ther 13:1281-1289, 2006; Koeberl et al., Mol Ther 16:665-672, 2008),并且有证据表明基因转移的效率和持久性的丧失受与肝脏生长有关的肝细胞增殖速率增加的影响(Cunningham et al., Mol Ther 16:1081-1088, 2008),在2天龄、2周龄或4周龄的三个不同年龄输注G6pc^{-/-}小鼠,并且在24周龄时检查肝G6Pase- α 表达。尽管年龄具有差异,但是每组小鼠用相同剂量的AAV-GPE(1.2×10^{11} 病毒基因组(vg)/小鼠)输注。在24周研究期间监测输注小鼠的代谢谱,并且将所有测量值与其G6pc^{+/+}/G6pc^{-/-}同窝出生仔和4至6周龄的未处理G6pc^{-/-}小鼠的结果相比较。GSD-Ia是常染色体隐性疾病,之前的研究表明G6pc^{+/+}和G6pc^{-/-}同窝出生仔的表型与野生型不能区分(Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996)。

[0157] 无论输注时年龄如何,在24周研究期间中,输注的G6pc^{-/-}动物中没有过早死亡。在2天龄时输注AAV-GPE(1.2×10^{11} vg/小鼠,相当于 6×10^{13} vg/kg)的G6pc^{-/-}小鼠中,2周龄时的肝G6Pase- α 活性为对照活性的77.6%,在4周龄时降低至对照活性的16.2%,在6周龄时降低至对照活性的6.5%(表1)。但是,在6周以后,肝G6Pase- α 活性水平稳定,直至24周(表1)。因此,在整个24周的研究中,表达降低了11.9倍,最大降低发生在前6周内。

[0158] 相比之下,在2周龄时输注AAV-GPE(1.2×10^{11} vg/小鼠,相当于 1.5×10^{13} vg/kg)的G6pc^{-/-}小鼠中,输注后2周时(4周龄时)的肝G6Pase- α 活性为其G6pc^{+/+}/G6pc^{-/-}同窝出生仔中的活性的2.4倍(表1),达到 433.4 ± 11.1 nmol/mg/min。尽管4至6周龄之间肝G6Pase- α 活性随后确实经历2.6倍的降低(174.0 ± 22.4 nmol/mg/min),但是其获得在24周研究期间从6周龄开始持续的接近正常的肝G6Pase- α 活性(174.0 ± 22.4 nmol/mg/min)(表1)。同样地,在4周龄时输注相同剂量(1.2×10^{11} vg/小鼠,相当于 1×10^{13} vg/kg)的AAV-GPE的G6pc^{-/-}小鼠中,肝G6Pase- α 活性在24周龄时为 335.6 ± 40.2 nmol/min/mg,是对照同窝出生仔中活性的1.9倍(表1)。这些发现与之前提出的观点(Cunningham et al., Mol Ther 16:1081-1088, 2008)一致:基因转移的效率和持久性的丧失受与肝脏生长有关的肝细胞增殖速率增加的影响。在肝脏生长速率降低的发育晚期阶段注射导致较少的基因表达丧失。

[0159] 研究了肝脏中G6Pase- α 转基因表达的分布。如预期的,未处理的G6pc^{-/-}小鼠的肝脏切片中没有可染色的G6Pase- α 活性。在G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}小鼠中,酶组织学分析表明,G6Pase- α 分布在整个肝脏中,但是在接近血管的地方具有显著更高的水平。

[0160] 在2天龄时输注AAV-GPE的G6pc^{-/-}小鼠中,在2周龄时肝G6Pase- α 活性分布在整个肝脏中。不同于野生型小鼠,表达是不均匀的,具有比对照肝脏中染色更强的焦点(foci)。染色的G6Pase- α 活性从2周龄至4周龄显著降低,与磷酸水解酶活性4.8倍的降低一致(表1)。再一次,染色的G6Pase活性降低并且在6周龄和更大时稳定。

[0161] 在2或4周龄时输注AAV-GPE的G6pc^{-/-}小鼠中,酶组织化学分析再次表明,G6Pase- α 转基因分布在整个肝脏中,具有含显著更高酶活性水平的焦点。再一次,通过组织化学分析评估的G6Pase- α 活性与定量磷酸水解酶测定一致(表1)。在2周龄时输注AAV-GPE的G6pc^{-/-}小鼠中,肝脏中具有比野生型肝脏中的细胞染色更浅的细胞。因此,尽管表现出野生型G6Pase- α 活性,但是AAV-GPE输注的小鼠中并没有恢复正常肝G6Pase- α 表达模式。

[0162] 表1.输注 1.2×10^{11} vg/小鼠的AAV-GPE的G6pc^{-/-}小鼠中的肝G6Pase活性

| 小鼠 | 年龄 周 | 磷酸水解酶活性 nmol/mg/min | 相对活性 | % (+/+ or +/-) 活性 |
|---------------------|---------|------------------------|------|-------------------|
| | | | % | |
| +/- 或 +/- (n = 16) | 2-24 | 178.1 ± 10.0 | | 100 |
| 2 天龄时输注 | | | | |
| -/-/AAV-GPE (n = 2) | 2 | 138.3 ± 22.6 | 100 | 77.6 |
| -/-/AAV-GPE (n = 4) | 4 | 28.8 ± 9.9 | 20.8 | 16.2 |
| -/-/AAV-GPE (n = 7) | 6-24 | 11.6 ± 5.0 | 8.4 | 6.5 |
| 2 周龄时输注 | | | | |
| -/-/AAV-GPE (n = 2) | 4 | 433.4 ± 11.1 | 100 | 243.3 |
| -/-/AAV-GPE (n = 2) | 6 | 156.1 ± 7.0 | 36.0 | 87.6 |
| -/-/AAV-GPE (n = 3) | 24 | 174.0 ± 22.4 | 40.1 | 97.7 |
| 4 周龄时输注 | | | | |
| -/-/AAV-GPE (n = 3) | 24 | 335.6 ± 40.2 | | 188.4 |

[0165] 如材料和方法部分中所述,在2天龄、2周龄或4周龄时向G6pc^{-/-}(-/-)小鼠输注 1.2×10^{11} vg/小鼠的AAV-GPE。使用年龄匹配的G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}(+/-&+/-)小鼠作为阳性对照,使用4至6周龄的G6pc^{-/-}(-/-)小鼠作为阴性对照。已经通过从各结果中减去未处理的G6pc^{-/-}小鼠肝微粒体中的G6Pase- α 活性(1.8 ± 0.2 nmol/min/mg)对表中的值进行了背景校正。数据表示为平均值±SEM。

[0166] AAV-CBA输注指导较低水平的肝G6Pase- α 表达

[0167] CBA启动子/CMV增强子已经被广泛用于指导高水平的肝转基因表达 (Xu et al., Hum Gene Ther 12:563-573, 2001)。但是,已知CMV增强子被广泛的CpG和非CpG甲基化沉默 (Brooks et al., J Gene Med 6:395-404, 2004; Mehta et al., Gene 428:20-24, 2009)。之前使用在杂种CBA启动子/CMV增强子的控制下表达鼠G6Pase- α 的AAV8载体AAV-CBA的体内实验表现出了差的表达 (Ghosh et al., Gene Ther 13:321-329, 2006), 这可能与CMV启动子的甲基化有关。为了比较AAV-CBA和AAV-GPE之间的体内肝脏基因转移效率, 以与AAV-GPE实验中类似的方式向G6pc^{-/-}小鼠输注 4.8×10^{11} vg/小鼠的增加剂量的AAV-CBA (在2天龄和2周龄时), 并且追踪至24周龄。

[0168] 对于在2天龄时输注的G6pc^{-/-}小鼠, AAV-CBA输注的小鼠中2周龄时肝G6Pase- α 活性为AAV-GPE输注小鼠中的2.8倍 (表1和2), 反映了4倍高的AAV-CBA输注剂量。但是, 新生AAV-CBA输注的动物中的肝G6Pase- α 活性在4周龄时迅速降低到 20.6 ± 1.1 nmol/mg/min (表2), 2周中降低18.6倍, 相比之下AAV-GPE输注的新生G6pc^{-/-}小鼠中降低4.8倍 (表1)。由于CBA和GPE具有相同的载体背景, 该发现表明CBA启动子/CMV增强子在指导持续的体内肝转基因表达方面的效率低于G6PC启动子/增强子。

[0169] 在2周龄时输注 4.8×10^{11} vg/小鼠的AAV-CBA的G6pc^{-/-}小鼠中, 肝G6Pase- α 活性在4周龄时为 236.9 ± 64.7 (表2), 其比在2周龄时输注 1.2×10^{11} vg/小鼠的AAV-GPE的4周龄G6pc^{-/-}小鼠 (表1) 低1.83倍。另外, 使用CBA载体的肝G6Pase- α 活性从6周龄时的 55.7 ± 2.7 nmol/mg/min持续降低到24周龄时的 38.1 ± 1.7 nmol/mg/min (表2)。这与使用GPE载体表达的水平形成对比, 后者在该时期内稳定在接近野生型的水平 (表1)。

[0170] AAV-CBA输注的动物的酶组织化学分析表明活性染色与GPE载体的那些类似, 具有多个比对照肝脏中染色更强的焦点的不均匀分布。但是与定量磷酸水解酶测定 (表2) 一致, 总染色强度随着输注小鼠年龄的增加显著降低。

[0171] 表2. 输注 4.8×10^{11} vg/小鼠的AAV-CBA的G6pc^{-/-}小鼠中的肝G6Pase活性

| 小鼠 | 年龄 周 | 磷酸水解酶活性 nmol/mg/min | 相对活性 % | % (+/+ or +/-) 活性 |
|---------------------|---------------------|------------------------|--------------|-------------------|
| +/- or +/- (n = 16) | 2-24 | 178.1 ± 10.0 | | |
| 2 天龄时输注 | | | | |
| [0172] | -/-/AAV-CBA (n = 2) | 2 | 382.3 ± 4.2 | 100 |
| | -/-/AAV-CBA (n = 3) | 4 | 20.6 ± 1.1 | 5.4 |
| 2 周龄时输注 | | | | |
| [0172] | -/-/AAV-CBA (n = 2) | 4 | 236.9 ± 64.7 | 100 |
| | -/-/AAV-CBA (n = 2) | 6 | 55.7 ± 2.7 | 23.5 |
| | -/-/AAV-CBA (n = 3) | 24 | 38.1 ± 1.7 | 16.1 |

[0173] 如在材料和方法部分中所述,在2天龄和2周龄时向G6pc^{-/-}(-/-)小鼠输注4.8×10¹¹vg/小鼠的AAV-CBA。使用年龄匹配的G6pc^{+/+}/G6pc^{-/-}(+/-&+/-)小鼠作为阳性对照,使用4至6周龄的G6pc^{-/-}(-/-)小鼠作为阴性对照。已经通过从各结果中减去未处理的G6pc^{-/-}小鼠肝微粒体中的G6Pase- α 活性(1.8±0.2nmol/min/mg)对表中的值进行了背景校正。数据表示为平均值±SEM。

[0174] AAV-GPE输注纠正了GSD-Ia的病理性临床表现

[0175] 接受葡萄糖疗法的G6pc^{-/-}小鼠生长迟缓,并且在2周龄时平均体重为其G6pc^{+/+}/G6pc^{-/-}同窝出生仔的约60% (Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996)。输注AAV-GPE的新生G6pc^{-/-}小鼠具有显著提高的生长速率,并且输注动物的体重与对照小鼠相当(图1)。在2或4周龄时输注AAV-GPE的G6pc^{-/-}小鼠表现出与其G6pc^{+/+}/G6pc^{-/-}同窝出生仔平行但是更低值的生长曲线,与开始基因疗法之前G6pc^{-/-}小鼠更低的初始体重一致(图1A)。

[0176] 在葡萄糖疗法下,G6pc^{-/-}小鼠持续表现出低血糖、高胆固醇血症、高甘油三脂血症、高尿酸血症和乳酸血症(Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996; Kim et al., J Hepatol 48:479-485, 2008)。相比之下,AAV-GPE输注的G6pc^{-/-}小鼠具有正常血糖谱(图1B),输注的动物中没有出现未处理的G6pc^{-/-}小鼠(Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996)和人GSD-Ia患者(Chou et al., Curr Mol Med 2:121-143, 2002)中常见的频繁的低血糖癫痫(hypoglycemic seizure)。新生输注的G6pc^{-/-}小鼠的血糖水平比其对照同窝出生仔显著更低(图1B),表明肝G6Pase- α 活性恢复到对照水平的6.5%不足以维持正常血糖谱。相比之下,在2或4周龄时输注AAV-GPE的G6pc^{-/-}小鼠中的血糖水平与其对照同窝出生仔中的血糖水平没有差别(图1B)。AAV-GPE输注还使血清胆固醇、甘油三酯、尿酸和乳酸水平正常化,但是新生输注的G6pc^{-/-}小鼠具有稍高的血胆固醇和乳酸水平(图1B)。

[0177] 肝肿大是GSD-Ia的另一个临床表现,并且主要由过量的糖原和脂质沉积造成(Chou et al., Curr Mol Med 2:121-143, 2002)。在24周龄的未受影响的和AAV-GPE转导的小鼠的肝脏组织切片中没有观察到组织学异常。24周龄G6pc^{+/+}/G6pc⁺⁻小鼠的肝脏中糖原含量平均为 1.89 ± 0.17 nmol糖基单元/mg蛋白质。在新生AAV-GPE输注的动物中,24周龄时的糖原含量显著更高,为 4.65 ± 0.19 nmol糖基单元/mg蛋白质,表明在GSD-Ia小鼠中观察到了糖原贮积缺陷。相比之下,在2或4周龄接受输注的小鼠在24周龄时表现出野生型的糖原水平,即分别为 1.61 ± 0.39 和 1.65 ± 0.19 nmol糖基单元/mg蛋白质,表明在该发育阶段没有GSD-Ia疾病的典型组织学结构。

[0178] 油红0染色表明,在24周龄时,AAV-GPE输注的动物中的脂质含量与G6pc^{+/+}/G6pc⁺⁻同窝出生仔中的脂质含量类似。对于定量组织化学测量,使用Adobe Photoshop将利用油红0染色成像的脂质转化成像素密度单位。AAV-GPE处理的G6pc⁺⁻小鼠的肝脏中的密度单位低于对照小鼠中的那些密度单位(约150像素密度单位/m²对比300像素密度单位/m²),但是差异不是统计学上显著的。总之,这些结果表明,AAV-GPE输注的G6pc⁺⁻小鼠没有表现出组织学异常并且在肝脏中具有正常糖原和脂肪含量。

[0179] AAV-GPE输注的G6pc⁺⁻小鼠表现出正常空腹葡萄糖和葡糖耐量谱

[0180] 分别检查在2周龄和4周龄时输注AAV-GPE的12和14周龄G6pc⁺⁻小鼠中的空腹葡萄糖水平。在6小时禁食后,G6pc^{+/+}/G6pc⁺⁻小鼠中的血糖水平无变化。重要的是,在2或4周龄时输注AAV-GPE的G6pc⁺⁻小鼠中的血糖水平在禁食6小时后也没有变化,证明输注的G6pc⁺⁻小鼠不再患有空腹低血糖,这是GSD-Ia的特征(Chou et al., Curr Mol Med 2:121-143, 2002)。使用未处理的G6pc⁺⁻小鼠进行的类似禁食实验获得仅短时间禁食后的迅速低血糖,然后是低血糖癫痫。

[0181] 研究表明,肝G6Pase- α 的过表达可能诱导糖尿病(Liu et al., Biochem Biophys Res Commun 205:680-686, 1994; Antinozzi et al., Annu Rev Nutr 19:511-544, 1999; Clore et al., Diabetes 49:969-974, 2000)。由于在4周龄时输注AAV-GPE的24周龄G6pc⁺⁻小鼠的肝G6Pase- α 活性为其G6pc^{+/+}/G6pc⁺⁻同窝出生仔中活性的近2倍,本发明人在4周龄时输注AAV-GPE的14周龄G6pc⁺⁻小鼠中进行葡糖耐量测试。作为对照,还在2周龄时输注AAV-GPE的12周龄G6pc⁺⁻小鼠中进行葡糖耐量测试。这些动物表现出野生型的肝G6Pase- α 活性水平。输注的G6pc⁺⁻小鼠中的葡糖耐量谱与对照同窝出生仔无差别。

[0182] 不存在针对人G6Pase- α 的免疫应答

[0183] 为了确定输注的G6pc⁺⁻小鼠中是否产生针对人G6Pase- α 的体液应答,使用来自用AAV-GPE或AAV-CBA输注的小鼠的血清进行蛋白质印迹分析。使用同样识别鼠G6Pase- α 的兔抗人G6Pase- α 血清作为阳性对照。在任何存活至24周龄的AAV-GPE输注的或AAV-CBA输注的G6pc⁺⁻小鼠中均没有检出针对G6Pase- α 的抗体。此外,在G6pc^{+/+}/G6pc⁺⁻同窝出生仔或未处理的G6pc⁺⁻小鼠的血清中不存在针对G6Pase- α 的内源抗体。

[0184] AAV-CBA输注引起增加的肝CD8+淋巴细胞浸润

[0185] AAV-CBA输注的G6pc⁺⁻小鼠的肝脏中没有可检测的针对G6Pase- α 的抗体,表明细胞介导的对于G6Pase- α 转基因的免疫应答不是这种载体指导的转基因表达迅速降低的原因。另一种可能性是AAV-CBA载体引起的炎性免疫应答。因此,在向G6pc⁺⁻小鼠输注AAV-CBA或AAV-GPE后2周检查肝CD8+淋巴细胞浸润。在2或4周龄的野生型或G6pc⁺⁻小鼠中,肝CD8+

淋巴细胞计数很低。在2天龄时输注AAV-CBA或AAV-GPE的G6pc^{-/-}小鼠中,每种载体类型的2周龄时的肝CD8+淋巴细胞计数类似,并且与未处理的2周龄野生型或G6pc^{-/-}动物中的计数相当。在2周龄时输注AAV-GPE的G6pc^{-/-}小鼠中,肝CD8+淋巴细胞计数在4周龄时依然很低。相比之下,在2周龄时输注AAV-CBA的G6pc^{-/-}小鼠中,肝CD8+淋巴细胞计数在4周龄时显著增加。结果表明,AAV-CBA引起的炎性应答可以至少部分地解释了CBA启动子/CMV增强子指导的肝G6Pase- α 表达的迅速降低和低效率。

[0186] 实施例2:使用基因疗法预防肝细胞肿瘤以及纠正IA型糖原贮积病中的代谢异常

[0187] 本实施例描述了在长期研究中评估AAV-GPE载体的效力的研究。G6pc^{-/-}小鼠中AAV-GPE载体介导的基因疗法在小鼠中有效至少70-90周,表达大于3%的野生型肝G6Pase- α 。结果证明AAV-GPE处理的小鼠表现出正常的肝脂肪贮积,正常血代谢物和葡萄糖耐量谱,降低的空腹胰岛素水平,并且没有肝异常的迹象。

[0188] 材料和方法

[0189] 向G6pc^{-/-}小鼠输注AAV-GPE

[0190] 通过眶后静脉窦将AAV-GPE载体(如实施例1中所述,Yiu et al.,Mol Ther 18:1076-1084,2010)输注到G6pc^{-/-}小鼠中(Lei et al.,Nat Genet 13:203-209,1996)。使用年龄匹配的G6pc^{+/+}/G6pc^{-/-}和6至10周龄的G6pc^{-/-}小鼠作为对照。对于病毒输注的小鼠,在输注后立即停止葡萄糖治疗(Lei et al.,Nat Genet 13:203-209,1996)。

[0191] 小鼠的葡萄糖耐量测试由采血前禁食6小时,然后腹膜内注射2mg/g体重的葡萄糖溶液,并且重复通过尾静脉采血2小时组成。

[0192] 磷酸水解酶和微粒体G6P摄取测定

[0193] 如之前的描述进行微粒体分离、磷酸水解酶测定、G6Pase- α 的酶组织化学测定和微粒体G6P摄取测定(Yiu et al.,Mol Ther 18:1076-1084,2010;Lei et al.,Nat Genet 13:203-209,1996)。

[0194] 表型分析

[0195] 首先通过使用Veo 2100系统(VisualSonics,Ontario,Canada)的超声波检查小鼠的肝结节(hepatic nodule)并且从尾静脉采集血样。使用获自Thermo Electron(Louisville,CO)的试剂盒分析血糖、总胆固醇和尿酸;通过来自Sigma Diagnostics(St Louis,MO)的试剂盒分析甘油三酯;通过来自Trinity Biotech(St.Louis,MO)的试剂盒分析乳酸;以及通过来自Crystal Chem(Downers Grove,IL)的超灵敏小鼠胰岛素ELISA试剂盒分析胰岛素。如之前所述测量肝糖原含量(Yiu et al.,Mol Ther 18:1076-1084,2010)。为了确定肝甘油三酯、葡萄糖和G6P含量,将肝脏组织在RIPA缓冲液(50mM pH 8.0的Tris HCl、150mM NaCl、1% Triton X-100、0.5% 脱氧胆酸钠和0.1% SDS)(Thermo Scientific, Rockford, IL)中均质化,并且使用来自Sigma Diagnostics的试剂盒测量甘油三酯,通过来自Thermo Electron的试剂盒测量葡萄糖,以及通过来自BioVision(Mountain View,CA)的试剂盒测量G6P。

[0196] 对于苏木精和曙红(H&E)以及油红O染色(Yiu et al.,Mol Ther 18:1076-1084,2010),将肝脏切片保存在10%中性缓冲的福尔马林中并且切成4-10微米厚度。使用Axioskop2plus显微镜以及AxioVision 4.5软件(Carl Zeiss,Thornwood,NY)使染色切片可视化。

[0197] 定量实时RT-PCR和抗体分析

[0198] 使用TRIzolTM试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)从肝脏组织中分离总RNA。在使用Applied Biosystems TaqMan探针的Applied Biosystems 7300实时PCR系统(Foster City, CA)中通过实时RT-PCR对mRNA表达进行定量。使用Applied Biosystems SDS v1.3软件分析数据并且归一化到β激动蛋白RNA。如之前所述通过蛋白质印迹分析检测针对人G6Pase-α的抗体(Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010)

[0199] 统计学分析

[0200] 使用GraphPad Prism[®]程序版本4(San Diego, CA)进行未配对t检验。P<0.05时认为值是统计学显著的。

[0201] 结果

[0202] AAV-GPE输注指导长期肝G6Pase-α表达

[0203] 向2或4周龄的G6pc^{-/-}小鼠(n=18)输注不同剂量的AAV-GPE(5×10¹²至3×10¹³病毒颗粒(vp)/kg),所述剂量预期恢复并且维持3%至100%的野生型肝G6Pase-α活性。还输注了一只15周龄(5×10¹²vp/kg)和一只30周龄(1×10¹³vp/kg)G6pc^{-/-}小鼠。接受葡萄糖疗法的GSD-Ia小鼠的低存活率严重限制了可用于研究的成年小鼠的数目(Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996)。监测20只输注动物的代谢和组织学谱70至90周,并且将所有测量结果与其G6pc^{+/+}和G6pc^{-/-}同窝出生仔相比较。G6pc^{+/+}和G6pc^{-/-}小鼠的表型与野生型无差别(Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996)。

[0204] 没有过早死亡的AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠。在24小时禁食后处死的小鼠中评估肝G6Pase-α活性和糖原含量。70至90周龄的野生型小鼠(n=20)的平均空腹肝G6Pase-α活性为185.8±12.7nmol/mg/min(图2A)。如计划的,经处理的小鼠中恢复了一定范围的肝G6Pase-α活性。在20只AAV-GPE处理的在70至90周龄处死的G6pc^{-/-}小鼠中,6只小鼠具有低水平(野生型活性的3%至9%)的肝G6Pase-α活性并且称为AAV-L,9只小鼠具有中等水平(野生型活性的22%至63%)的肝G6Pase-α活性并且称为AAV-M,5只小鼠具有高水平(野生型活性的81%至128%)的肝G6Pase-α活性并且称为AAV-H(图2A)。实时RT-PCR分析表示出了肝G6Pase-αmRNA表达和G6Pase-α活性之间的线性关系(图2B)。

[0205] 酶组织化学分析表明,野生型小鼠中的G6Pase-α分布在整个肝脏中,在接近血管的地方具有显著更高的水平。在未处理的小鼠G6pc^{-/-}的肝脏切片中,没有可染色的G6Pase-α活性。在AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中,G6Pase-α也分布在整个肝脏中,但是具有含显著更高水平酶活性的焦点,并且与血管无关。AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中肝G6Pase-α的不均匀分布表明相当大比例的肝细胞具有低的或者几乎没有G6Pase-α,包括表达野生型G6Pase-α活性的81-128%的AAV-H肝脏。不均匀的肝G6Pase-α表达不是GSD-Ia表型营救所需的。

[0206] AAV-GPE输注纠正GSD-Ia中的代谢异常

[0207] GSD-Ia以低血糖、高胆固醇血症、高甘油三脂血症、高尿酸血症和乳酸血症为特征(Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996; Kim et al., J Hepatol 48:479-485, 2008)。表达野生型肝G6Pase-α活性的AAV-H小鼠中的血糖水平与对照同窝出生仔中的那些血糖水平无差别(图3A)。分别表达22-63%和3-9%的正常肝G6Pase-α活性的AAV-M和AAV-L的也保持了血糖正常(~100mg/dl)状态(Yoshizawa et al., J Clin Invest 119:2807-2817, 2009),但是其血糖水平始终低于对照同窝出生仔(图3A)。所有AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠

表现出正常的胆固醇和甘油三酯的血清谱,而经处理的G6pc^{-/-}小鼠中的尿酸和乳酸血清水平低于对照同窝出生仔中的那些尿酸和乳酸血清水平(图3A)。

[0208] 70至90周龄的雌性和雄性AAV-GPE处理小鼠的平均体重分别为其年龄和性别匹配的对照小鼠中的70%和62% (图3B)。但是经处理的G6pc^{-/-}小鼠的平均体长为对照的90% (图3B)。因此,AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠的体重指数(BMI)值(Bahary et al., Proc Natl Acad Sci USA 87:8642-8646, 1990)显著低于对照同窝出生仔中的那些BMI值(图3B)。尽管两组小鼠的BMI值表明为正常生长(Bahary et al., Proc Natl Acad Sci USA 87:8642-8646, 1990),但是AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠相当瘦。野生型小鼠的肝重量相对恒定(图3C)。在AAV-GPE输注的小鼠中,肝重量与恢复的肝G6Pase- α 活性逆相关(图3C)。当肝重量表示为体重的百分比时,AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠具有显著更高的值,因为其体重较低。但是,当直接比较绝对肝重量时,AAV-M、AAV-H和对照同窝出生仔之间没有显著差异(图3C)。但是,AAV-L小鼠持续表现出肝肿大。AAV-GPE向肾递送很少或不递送转基因(Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010)。但是,表达更高G6Pase- α 活性的输注小鼠具有更低肾重量,表明好的肝代谢控制使肾肥大正常化。

[0209] AAV-GPE输注的G6pc^{-/-}的肝脏中不存在组织异常、脂肪变性或HCA

[0210] 为了确定AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中HCA结节的存在,每个肝脏使用5个或更多个独立切片进行超声分析,然后进行广泛的肝脏检查和肝活检样品的组织学分析。在存活至70-90周龄的野生型(n=20)和AAV-GPE转导的G6pc^{-/-}(n=20)小鼠中超声和形态学分析没有检出肝结节。在2或4周龄输注的AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠(n=18)除了增加的糖原贮积外没有表现出组织学异常。在15周龄输注的84周龄小鼠(表达正常肝G6Pase- α 活性的6%)表现出提高的糖原贮积并且在一个肝脏切片中具有一些坏死性病灶(foci)。尽管大部分在30周龄输注的90周龄小鼠的肝脏组织切片(表达正常肝G6Pase- α 活性的38%)其未表现出组织学异常,但是一个肝脏切片确实具有许多坏死性病灶。因为坏死性病灶是6周龄或更大的未处理的GSD-Ia小鼠中见到的典型肝病状(Kim et al., J Hepatol 48:479-485, 2008),非常可能的是在15或30周龄的基因疗法开始之前坏死性病灶已经形成。

[0211] 已经报道了肝特异性G6pc无效(null)小鼠的肝脏形成了具有显著脂肪变性的HCA(Mutel et al., J Hepatol 54:529-537, 2011)。尽管一些野生型小鼠具有提高的肝脂肪贮积,但是在AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠的肝脏中几乎没有或没有脂肪贮积。此外,AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠(n=20)中的肝甘油三酯含量与野生型小鼠中的肝甘油三酯含量没有统计学差异。油红O染色确认了AAV-GPE处理动物(n=20)中脂质含量与对照动物中的脂质含量类似。

[0212] 已经充分确认,环氧合酶-2(COX-2)是在许多恶变前和恶性癌症中(包括HCC)中过表达的标志物(Wu, Cancer Treat Rev 32:28-44, 2006)。定量RT-PCR分析表明,AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}和对照同窝出生仔中表达类似的肝COX-2信使水平。

[0213] AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠表现正常空腹葡萄糖和葡萄糖耐量谱

[0214] 开始禁食前野生型小鼠(n=20)的平均血糖水平为165.0±3.0mg/dl(零时间),其在禁食24小时后降低到113.3±6.5mg/dl(图4A)。AAV-L和AAV-M小鼠的空腹血糖谱与对照小鼠的空腹血糖谱平行,但是血糖水平始终较低(图4A),而AAV-H小鼠的空腹葡萄糖谱与对照小鼠的空腹葡萄糖谱无区别。鲜明对比的是,未处理的G6pc^{-/-}小鼠在禁食60至75分钟内

表现出显著的低血糖(图4B),这是GSD-Ia的标志(Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6: 676-688, 2010)。总之,AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠不再患有GSD-Ia的空腹低血糖特征(Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688,2010)。

[0215] AAV-M和AAV-H小鼠中的血糖耐量谱与野生型同窝出生仔的那些血糖耐量谱无区别(图4C)。在AAV-L小鼠中,腹膜内葡萄糖注射后,血糖水平以比野生型对照更快的速率降低。

[0216] AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中降低的空腹血胰岛素水平

[0217] 胰岛素信号转导调节肝葡萄糖和脂质代谢(Leavens and Birnbaum, Crit Rev Biochem Mol Biol 46:200-215, 2011)。禁食24小时后,70-90周龄的野生型(n=20)和AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠(n=20)中的血胰岛素水平分别为1.84±0.29和0.56±0.09ng/ml(图5A)。二者均在正常范围内(de Luca et al., J Clin Invest 115:3484-3493, 2005),但是AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中的空腹血胰岛素水平更接近正常平均值(de Luca et al., J Clin Invest 115:3484-3493, 2005)。尽管AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中的空腹血胰岛素水平与恢复的肝G6Pase- α 不相关,但是野生型和经处理的G6pc^{-/-}小鼠中的胰岛素水平与其体重表现出线性关系(图5A)。

[0218] 胰岛素的转录效果是由固醇调节元件结合蛋白1c(SREBP-1c)介导(Leavens and Birnbaum, Crit Rev Biochem Mol Biol 46:200-215, 2011)。定量RT-PCR分析表明,禁食24小时的AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠和对照小鼠表达了类似水平的肝SREBP-1c转录物(图5B)。葡萄糖激酶是葡萄糖感受器(Massa et al., IUBMB Life 63:1-6, 2011)。当血胰岛素水平低时,如在禁食时,肝葡萄糖激酶活性降低(Massa et al., IUBMB Life 63:1-6, 2011)。如利用血胰岛素所看到的,在禁食24小时后,AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中的肝葡萄糖激酶转录物显著低于对照同窝出生仔中的肝葡萄糖激酶转录物(图5C)。值得注意的是,肝葡萄糖激酶mRNA的水平和空腹血胰岛素的水平在野生型和AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中均表现出线性关系(图5C)。

[0219] AAV-GPE输注的G6pc^{-/-}小鼠的肝脏中的葡萄糖稳态

[0220] 禁食期间,通过在糖异生和糖原分解的最终步骤中由G6PT/G6Pase- α 复合物使G6P水解来在肝脏中产生内源葡萄糖来维持血糖稳态(Chou et al. Nat Rev Endocrinol 6: 676-688, 2010)。缺少功能性G6Pase- α 的G6pc^{-/-}小鼠不能肝脏、肾或肠中产生内源葡萄糖。禁食24小时后,野生型小鼠(n=20)中的肝游离葡萄糖水平为389±17nmol/mg蛋白质,AAV-L(n=6)、AAV-M(n=9)和AAV-H(n=5)小鼠中的肝游离葡萄糖水平分别为野生型小鼠中的61%、68%和90%。禁食AAV-L和AAV-M肝脏中的细胞内G6P水平分别为野生型肝脏中细胞内G6P水平的2.9倍和1.6倍,但是禁食AAV-H肝脏中的细胞内G6P水平与野生型肝脏中的细胞内G6P水平在统计学上类似。

[0221] 肝G6P参与多种代谢途径,包括细胞质中的糖原合成、糖酵解、戊糖磷酸途径以及ER腔中的内源葡萄糖产生。禁食24小时后,在小鼠中检查参与上述途径的多种关键酶的肝表达。这些包括催化肝糖异生中的第一个关键步骤的胞质磷酸烯醇式丙酮酸激酶(PEPCK-C)(Hanson and Reshef, Biochimie 85:1199-1205, 2003);将果糖-1,6-二磷酸转化成果糖-6磷酸的果糖-1,6-二磷酸酶(FBPase-1)(Hers, J Inherit Metab Dis 13:395-410, 1990);在糖原分解和糖原合成中催化葡萄糖-6-P和葡萄糖-1-P的可逆转化的葡萄糖磷酸

变位酶 (PGMase) (Hers, J Inherit Metab Dis 13:395-410, 1990) ; 通过将果糖-6-P转化成果糖-1,6-二磷酸来催化糖酵解中的不可逆限速步骤的磷酸果糖激酶1 (PFK-1) (Hers, J Inherit Metab Dis 13:395-410, 1990) ; 通过将G6P转化成6-磷酸葡萄糖酸内酯来催化戊糖磷酸途径中的第一个反应的G6P脱氢酶 (G6PDH) (Wamelink et al., J Inherit Metab Dis 31: 703-717, 2008) ; 以及将胞质G6P转运到ER腔中的G6PT (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010) 。

[0222] 定量实时RT-PCR分析表明,在禁食肝脏中,与对照相比,AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中PEPCK-C和PGMase转录物无变化,而FBPase-1转录物增加。AAL-L肝脏中的PFK-1转录物和G6PDH转录物二者均增加,但是在AAV-M和AAV-H肝脏中其依然与野生型肝脏中在统计学上类似。不论所恢复的肝G6Pase- α 活性水平如何,AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中的肝G6PT mRNA水平为野生型对照中的2.2倍。G6PT介导的肝微粒体G6P摄取活性是内源葡萄糖产生中的速度限制 (Arion et al., J Biol Chem 251:6784-690, 1976) ,但是共同依赖于G6Pase- α 活性 (Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996) 。与野生型肝微粒体相比,由G6pc^{-/-}小鼠制备的肝微粒体 (具有完整的G6PT) 表现出显著更低的G6P摄取活性 (Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996) ,如果通过基因转移使G6Pase- α 活性恢复,其可以逆转 (Zingone et al., J Biol Chem 275:828-832, 2000) 。在AAV-L、AAV-M和AAV-H肝脏中,微粒体G6P摄取活性分别为野生型活性的43%、50%和72%,反映了与肝游离葡萄糖水平平行的肝G6Pase- α 活性的增加 (图2A) 。

[0223] 不存在针对人G6Pase- α 的免疫应答

[0224] 为了确定在输注的小鼠中是否产生针对人G6Pase- α 的体液应答,使用从70-90周岁的对照和AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠获得的血清进行蛋白质印迹分析。使用也识别鼠G6Pase- α 的针对人G6Pase- α 的单克隆抗体 (Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010) 作为阳性对照。在任何存活到70至90周岁的AAV-GPE输注的G6pc^{-/-}小鼠或野生型对照小鼠中均未检出针对G6Pase- α 的抗体。

[0225] 实施例3:G6PC启动子的上游增强子元件对于Ia型糖原贮积病中的最佳

[0226] G6PC表达是关键的

[0227] 本实施例描述的研究进一步评估了AAV-GPE载体的效力。AAV-GPE是包含2684bp的G6PC启动子/增强子的单链载体,将其与包含382bp的最小G6PC启动子/增强子的双链载体AAV-miGPE相比较。本实施例中所述的结果表明与AAV-miGPE载体相比,AAV-GPE载体在GSD-Ia小鼠中指导了显著更高水平的肝G6Pase- α 表达,取得了肝糖原积累的更大的降低,并且获得更好的空腹耐受性。

[0228] 材料和方法

[0229] 向G6pc^{-/-}小鼠输注rAAV载体

[0230] 所有G6pc^{-/-}小鼠利用葡萄糖疗法保持存活 (Lei et al., Nat. Genet. 13:203-209, 1996) 。通过眶后静脉窦将rAAV载体输注到2周龄G6pc^{-/-}小鼠中。使用年龄匹配的G6pc^{+/+}/G6pc^{-/-}小鼠作为对照。对于rAAV载体输注的小鼠,在输注后立即终止葡萄糖疗法。在2周龄G6pc^{-/-}小鼠中进行所有病毒转导并且在12周龄时评估效力。

[0231] 磷酸水解酶测定

[0232] 基本上如之前所述,确定微粒体分离和磷酸水解酶测定 (Lei et al.,

Nat. Genet. 13:203-209, 1996)。对于磷酸水解酶测定,将包含50mM pH 6.5的二甲砷酸盐缓冲液、10mM G6P和适量微粒体制品的反应混合物(100μl)在30℃下孵育10分钟。通过将完整膜在0.2%脱氧胆酸盐中于0℃下孵育20分钟来制备破坏的微粒体膜。通过将pH 5的破坏的微粒体制品在37℃下预孵育10分钟使酸性不稳定的G6Pase-α失活来评估非特异性磷酸酶活性。

[0233] 载体DNA和mRNA的定量

[0234] 使用GenEluteTM Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 分离来自小鼠组织的总DNA, 使用TRIzolTM Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) 从小鼠组织分离总RNA。分别在使用Applied Biosystems TaqMan探针的Applied Biosystems 7300实时PCR系统中(Applied Biosystems, Foster City, CA) 通过PCR和实时RT-PCR对载体基因组数目和mRNA表达进行定量。使用TaqMan探针组Hs00609178_m1 (对于G6PC) 和Mm00607939_s1 (对于β-激动蛋白) 将人G6PC基因的数目归一化至小鼠β-激动蛋白。标准曲线中使用对应于0.01至100拷贝的人G6PC基因的质粒DNA。为了确定载体基因组拷贝数, 将样品的Ct值与标准曲线比较。使用TaqMan[®]探针组Hs00609178_m1 (对于G6PC) 和Mm02601633_g1 (对于Rp119) 将G6PC mRNA表达归一化至Rp119RNA。

[0235] 表型分析

[0236] 使用获自Thermo Electron (Louisville, CO) 的试剂盒分析血糖。如之前所述, 测量肝糖原和磷酸三酯含量(参见实施例1和2, 以及Yiu et al., Mol. Ther. 18:1076-1084, 2010; Lee et al., Hepatology 56:1719-1729, 2012)。为了确定肝甘油三酯, 将肝脏组织在RIPA缓冲液(50mM pH 8.0的Tris HC1、150mM NaCl、1% Triton X-100、0.5%脱氧胆酸钠和0.1% SDS) (Thermo Scientific, Rockford, IL) 中均质化, 并且使用来自Sigma Diagnostics (St Louis, MO) 的试剂盒测量甘油三酯。

[0237] 小鼠的葡萄糖耐量测试由采血前禁食6小时, 然后腹膜内注射2mg/g体重的葡萄糖溶液, 并且重复通过尾静脉采血2小时组成。

[0238] 统计学分析

[0239] 使用GraphPad Prism[®]程序版本4 (GraphPad Software, San Diego, CA) 进行未配对的t检验。p<0.05时认为值是统计学上显著的。

[0240] 结果

[0241] rAAV-GPE处理的或rAAV-miGPE处理的G6pc-/-小鼠中的肝G6Pase-α表达

[0242] 在处理的G6pc-/-小鼠中进行12周的研究以检查rAAV-GPE(参见实施例1和Yiu et al., Mol. Ther. 18:1076-1084, 2010) 和rAAV-miGPE (Koeberl et al., Mol. Ther. 16:665-672, 2008) 载体的效力。每种载体在两个不同研究中心使用两个剂量, 1×10^{13} 病毒颗粒(vp)/kg (高剂量) 和 2×10^{12} vp/kg (低剂量), 每组6只小鼠。两个中心获得了类似结果。尽管转导的G6pc-/-小鼠中的肝G6Pase-α活性代表了两个中心的组合数据, 但是其他报道的数据来自单个研究。研究表明, rAAV介导的肝基因转移的效率和持久性在早期发育中较低, 这是因为与肝脏生长有关的快速肝细胞增殖速率, 其稀释了rAAV有效转染的细胞的数目(Yiu et al., Mol. Ther. 18:1076-1084, 2010; Cunningham, Mol. Ther. 16:1081-1088, 2008)。在本研究中, 当肝细胞增殖保持为高时, 向2周龄G6pc-/-小鼠给予rAAV载体。结果, 在12周龄时检查的肝G6Pase-α表达显著低于用相同载体剂量输注的成年小鼠中看到的肝G6Pase-α表

达。依然需要确定人疾病中的最佳介入时间。

[0243] 所有处理的G6pc^{-/-}小鼠存活至12周龄,两个中心均没有过早死亡。在12周龄野生型小鼠的肝脏中,微粒体G6Pase- α 活性为 203.5 ± 10.3 nmol/min/mg (n=24)。在两个中心独立确定的组合数据(每次处理n=12)表明,在12周龄时,高剂量rAAV-GPE疗法重建了约18%的野生型肝G6Pase- α 活性,其为rAAV-miGPE活性的3.5倍以上,而低剂量rAAV-GPE疗法产生的活性为rAAV-miGPE的3.6倍以上(图6A)。肝G6Pase- α 活性与肝载体基因组拷贝数呈线性关系增加,AAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠(n=6)中的拷贝数显著高于rAAV-miGPE处理的小鼠(n=6)(图6A)。

[0244] rAAV-GPE或rAAV-miGPE处理的G6pc^{-/-}小鼠的代谢谱

[0245] 所有rAAV-GPE和rAAV-miGPE处理的G6pc^{-/-}小鼠表现出与其野生型同窝出生仔平行的生长曲线,但是具有更低体重(图6B)。不论载体或剂量水平如何,经处理小鼠的体重指数(BMI)值与野生型小鼠无区别(图6C)。所有经处理的G6pc^{-/-}小鼠的血糖水平始终低于野生型对照,但是依然高于正常范围的下限(图6D),输注的动物均不具有GSD-Ia的典型的频繁低血糖癫痫(Chou et al., Curr. Mol. Med. 2:121-143, 2002; Chou et al. Nat. Rev. Endocrinol. 6:676-688, 2010; Lee et al., Hepatology 56:1719-1729, 2012)。

[0246] 肝脏相对于体重的相对重量是对肝糖原和/或中性脂肪积累的一种量度(Chou et al., Curr. Mol. Med. 2:121-143, 2002; Chou et al., Nat. Rev. Endocrinol. 6:676-688, 2010),其在所有4个经处理的G6pc^{-/-}小鼠组中均高于野生型小鼠,但是高剂量rAAV-GPE处理的小鼠比其他组显著更接近于正常(图7A)。与此一致的是,rAAV-GPE和rAAV-miGPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中的糖原含量显著低于其野生型对照(图7B),较高载体剂量比较低载体剂量更好地减少糖原,证明恢复更高的肝G6Pase- α 表达改善了肝肿大。但是,仅比较高剂量疗法时,rAAV-miGPE处理的小鼠具有的糖原比rAAV-GPE处理的小鼠多43%。尽管肝糖原持续升高,但是在任何12周龄的rAAV处理的G6pc^{-/-}小鼠的肝脏组织切片中均没有观察到组织学异常。除了低剂量的rAAV-miGPE处理的小鼠以外,野生型和其他3组rAAV处理的G6pc^{-/-}小鼠之间的肝甘油三酯含量没有统计学差异(图7C)。

[0247] rAAV-GPE处理的和rAAV-miGPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中的空腹葡萄糖和葡糖耐量谱

[0248] 对于野生型小鼠(n=24),禁食前的平均血糖水平为 172.2 ± 2.6 mg/dl(零时间),其在禁食8小时后降低到 134.6 ± 3.8 mg/dl(图8A)。高剂量疗法的小鼠(每种处理n=6)的空腹血糖谱显著好于低剂量疗法的小鼠(每种处理n=6),但是即使在高剂量下,rAAV-GPE处理的小鼠保持显著更高的葡萄糖水平,其在禁食6小时内稳定至野生型水平,而rAAV-miGPE处理的小鼠的稳定期(plateau)更低,为野生型水平的60%(图8A)。高剂量rAAV-GPE和rAAV-miGPE处理的小鼠还可以维持24小时禁食,但是rAAV-GPE处理的小鼠中的空腹血糖水平比rAAV-miGPE处理的小鼠中的空腹血糖水平显著更高(图8B)。总之,相比于rAAV-miGPE处理的G6pc^{-/-}小鼠,rAAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠更接近于野生型并且更加能够耐受禁食。

[0249] 在腹膜内葡萄糖注射后监测经处理的G6pc^{-/-}小鼠(每种处理n=6)的血糖耐量谱。总的来说,所述谱平行于野生型小鼠(图8C),高剂量处理的小鼠的应答比低剂量处理的小鼠更好。

[0250] 通过定量PCR分析12周龄的高剂量rAAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中人G6PC转基因在肝脏、肾、肠、脑、睾丸和卵巢中的生物学分布(表1)。在转导的肝脏中,载体基因组拷贝数/μg DNA为94,440±7,624(或者0.51±0.04载体拷贝/二倍体基因组)。在转导的肾和肠中,数目急剧降低,平均分别仅为肝拷贝数的2.57%和0.64%,表明rAAV8病毒不能有效转导肾和肠。脑和睾丸中的基因组拷贝数/μg DNA甚至更低,分别为肝拷贝数的0.12%和0.02%。在卵巢中仅检出了背景水平的人G6PC基因组。

[0251] 包含组织特异性启动子/增强子元件的rAAV-GPE载体主要在肝脏、肾近端小管和肠中表达(Chou et al., Curr. Mol. Med. 2:121-143, 2002; Chou et al., Nat. Rev. Endocrinol. 6:676-688, 2010)。人G6PC转录物的定量实时RT-PCR分析示出了基因组拷贝数和基因表达之间的相关性(表3)。在肝脏中,与RpI19转录物相比的人G6PC mRNA的水平为0.62740±0.04445。如从基因拷贝数分析所预期的,肾仅表达肝人G6PC mRNA的0.03%,在肠、脑、睾丸和卵巢中仅检出了背景水平的人G6PC mRNA。

[0252] 表3.12周龄高剂量rAAV-GPE处理的G6pc^{-/-}小鼠中人G6PC基因组分布和mRNA表达

| 组织 | 人 G6PC 拷贝数/μg 基因组 | 与 RpI19 mRNA 相比的人 |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| | DNA | G6PC mRNA × 10 ⁵ |
| 野生型组织, 无转基因(n = 6) | 8 ± 2 | 8 ± 1 |
| 肝, -/-/rAAV-GPE (n = 6) | 94,440 ± 7,624 (100) | 62740 ± 4445 (100) |
| [0253] 肾, -/-/rAAV-GPE (n = 6) | 2,429 ± 626 (2.57) | 22 ± 5 (0.033) |
| 肠 e, -/-/rAAV-GPE (n = 6) | 601 ± 124 (0.64) | 9 ± 1 |
| 脑, -/-/rAAV-GPE (n = 6) | 121 ± 23 (0.12) | 8 ± 1 |
| 睾丸, -/-/rAAV-GPE (n = 6) | 25 ± 8 (0.02) | 9 ± 1 |
| 卵巢, -/-/rAAV-GPE (n = 6) | 7 ± 2 | 9 ± 1 |

[0254] 数据为平均值±SEM。不包含转基因的野生型组织的值为肝脏、肾、肠、脑、睾丸和卵巢的平均值±SEM。括号中的数值为肝脏值的%。

[0255] 实施例4:具有和不具有填充序列的AAV载体的比较

[0256] 本实施例描述了以下发现:表达G6Pase-α的AAV载体中内含子侧翼的填充核苷酸序列对于有效肝转导很重要。

[0257] 为了评估填充序列对G6Pase-α的转基因递送和肝表达的贡献,构建了质粒UF11-K29-G6PC。UF11-K29-G6PC (SEQ ID N0:2) 与UF11-GPE-G6PC (SEQ ID N0:1) 的区别在于缺少内含子周围的填充序列。每种质粒中的G6PC启动子/增强子 (GPE) 和G6PC编码序列相同。

[0258] 向G6pc^{-/-}小鼠给予1×10¹³vp/kg的重组AAV-K29-G6PC或重组AAV-GPE-G6PC。结果表明与AAV-GPE-G6PC相比,AAV-K29-G6PC在GSD-Ia小鼠中表现出显著降低的肝转导效率。AAV-K29-G6PC转导的肝脏和AAV-GPE-G6PC转导的肝脏中的G6Pase活性分别为7.3和33.0nmol/min/mg。这些结果证明,内含子侧翼的填充序列对于有效肝转导很重要。

[0259] 实施例5:编码密码子优化的G6PC的AAV载体的产生

[0260] 本实施例描述了含密码子优化的G6PC的AAV载体的构建和表征。

[0261] UF11-GPE-co-G6PC质粒(包含密码子优化的G6PC; SEQ ID N0:3) 来源于UF11-GPE-

G6PC质粒 (SEQ ID N0:1) ,但是将AAV-GPE-G6PC中的野生型G6Pase编码序列替换了合成的密码子优化的G6Pase (SEQ ID N0:3的核苷酸3368-4441) 。

[0262] 转录物体内表达测定表明,co-G6Pase表现出的酶活性为野生型人G6Pase的1.9倍。另外,在GSD-Ia小鼠中评估了两个批次的重组AAV-GPE-co-G6PC的体内活性并且与重组AAV-GPE-G6PC的活性相比较。第一批次的AAV-GPE-co-G6PC在转导肝脏方面的效率比AAV-GPE-G6PC高50%。第二批次的AAV-GPE-co-G6PC在转导肝脏方面的效率比重组AAV-GPE-G6PC高2.5倍。

[0263] 这些结果证明,G6PC的密码子优化提高了表达G6Pase- α 的重组AAV的肝脏转导能力。

[0264] 实施例6:表达密码子优化的人G6Pase的重组AAV载体的效力的评估

[0265] 本实施例描述了在GSD-Ia小鼠中比较rAAV8-GPE-G6Pase和rAAV8-GPE-co-G6Pase介导的基因递送的效力的研究。

[0266] 使用2-3个独立批次的两种AAV载体比较GSD-Ia小鼠中的基因递送的效力:1) rAAV8-GPE-G6Pase (在~3kb的人G6PC启动子/增强子 (GPE) 指导下表达人G6Pase- α 的rAAV8载体;以及2) rAAV8-GPE-co-G6Pase (在GPE的指导下表达密码子优化的 (co) 人G6Pase- α 的rAAV8载体)。图11中的结果表明,4周龄和12周龄的rAAV8-GPE-co-hG6Pase处理的GSD-Ia小鼠中肝G6Pase活性为通过rAAV8-GPE-G6Pase载体恢复的各活性的1.9倍。

[0267] 所有处理的GSD-Ia小鼠表现出正常的胆固醇、甘油三酯、尿酸和乳酸的血清谱以及正常的肝脂肪水平。在rAAV输注的小鼠中,肝重量与所恢复的肝G6Pase活性逆相关。与rAAV-GPE-co-G6Pase处理的小鼠相比,rAAV-GPE-G6Pase处理的小鼠表现出显著更严重的肝肿大(图12)。

[0268] 在功能上,12周龄时,rAAV8-GPE-co-G6Pase处理的GSD-Ia小鼠表现出正常的葡萄糖耐量谱(图13A)并且在24小时禁食中保持血糖正常(图13B)。

[0269] 实施例7:使用基于AAV的基因疗法治疗人GSD-Ia

[0270] 本实施例描述了临幊上使用编码的G6PC的AAV载体治疗GSD-Ia的示例性方法。

[0271] 选择诊断为患有GSD-Ia的患者进行治疗。通常,患者为至少18岁,并且可能或不可能已经预暴露于免疫调节。向所述患者给予治疗有效量的表达G6PC的重组AAV载体,例如本文公开的AAV-GPE-G6PC或AAV-GPE-co-G6PC。重组AAV可以静脉内给予。可以由医生选择合适的治疗剂量。在一些情况下,治疗有效剂量为 1×10^{11} 至约 1×10^{14} 病毒颗粒 (vp) /kg,例如约 1×10^{12} vp/kg。在大部分情况下,向所述患者给予单剂量。在不存在免疫调节的情况下,所述患者可能仅耐受单次rAAV输注。如果所述患者已经预暴露于免疫调节,可以给予两个或更多个剂量。可以随时间监测受试者的健康以确定治疗的有效性。

[0272] 考虑到可以应用所公开的发明的原理的许多可能实施方案,应认识到所举例说明的实施方案仅是本发明的优选实例,并且不应解释为限制本发明的范围。相反地,本发明范围由所附权利要求限定。因此,本发明人要求保护这些权利要求的范围和精神内的所有发明。

序列表

<110> THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE
 SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
 <120> 用于治疗糖原贮积病的腺相关病毒载体
 <130> 4239-91776-02
 <150> US 61/908, 861
 <151> 2013-11-26
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 7671
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体 (质粒UF11-GPE-G6PC)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(163)
 <223> 反向末端重复

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (182)..(3045)
 [0001] <223> G6PC 启动子/增强子

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3051)..(3184)
 <223> 填充序列 (Stuffer sequence)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3185)..(3321)
 <223> 内含子

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3322)..(3367)
 <223> 填充序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3368)..(4441)
 <223> G6PC编码序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4674)..(4819)
 <223> 反向末端重复

 <400> 1
 gggggggggg ggggggggtt ggccactccc tctctgcgct ctcgctcgct cactgaggcc 60
 gggcgaccaa aggtcgcccg acgccccggc tttgccccggg cggcctcagt gagcgagcga 120
 gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actagggtt cctagatctg aattcggtag 180

| | |
|--|------|
| ccctttgaga atccacggtg tctcgatgca gtcagcttc taacaagctg gggcctcacc | 240 |
| tgttttccca cggtataaaaa cgtgctggag gaagcagaaaa ggggctggca ggtggaaaga | 300 |
| tgaggaccag ctcatcgct catgactatg aggttgcct gatccagagg gtccccctgc | 360 |
| ctgggtggccc accgccagga agactccac tgtccctgga tgccagagt gggatgtcaa | 420 |
| ctccatcaact tatcaactcc ttatccatag gggtattctt cctgaggcgt ctcagaaaac | 480 |
| agggccctcc ccatatgctg accacataat agaaccctc ccaactcaga gaccctggct | 540 |
| gctagctgcc ctggcatgac ccagacagtgc gcctttgtat atgttttag actcaccttgc | 600 |
| actcacctct gaccatagaa actctcatcc cagaggtcact tgcaatagtt actccacaac | 660 |
| agaggcttat ctgggttagag ggaggctccc tacctatggc ccagcagccc tgacagtgc | 720 |
| gatcacatata accccacgcc ccagcactgc ctgccacgca tgggcttact ttacacccac | 780 |
| ccacagtcaac caacacatta cctgctctcc aaggtaggc gtggcaggag aagttgttt | 840 |
| ggaccagcag aaaccatgca gtcaaggaca actggagtca gcatggctg ggtgcgagcc | 900 |
| cttgggtgggg tggggaggag actccaggc atacctcctg gaggatgtt taatcatttc | 960 |
| cagcatggaa tgctgtcaac ttttgcaca gattcattag ctctgagttt ctttttctg | 1020 |
| tccccagcta ccccttacat gtcaatatgg acttaatgat gggaaattca ggcaagttt | 1080 |
| taaacatttt atccccctg gctcttatcc tcaaaaaatg catgaattt gaggcagtgg | 1140 |
| [0002] ctcatgcctg taatccaaat gctttgctag gttgaggcgg gaggatcact tgaagccagg | 1200 |
| aatttgagac cagcctggc cgcatagtga gaccccgttt ctacaaaaat aaataaataa | 1260 |
| ataataaata atagtgatata gaagcatgat taaatagccc tatttttaa aatgcatgag | 1320 |
| ttcggttacct gattcattcc ctgggtcctt tcacagtctt ccgtgaccca agtgttaggg | 1380 |
| ttttggctc tctactattt gtaggctgat atatagtata cacacacaca cacacacaca | 1440 |
| tatacacaca cacagtgtat cttgagcttt ctttgtata tctacacaca tatgtataag | 1500 |
| aaagctcaag atatagaagc ctttttcaa aaataactga aagttcaaa ctcttaagt | 1560 |
| ctccagttac catttgctg gtattctt tggaaaccat acattcatca tattgtgc | 1620 |
| cagtaagact atacattcat tatttgctt aaacgtatga gttaaaacac ttggccaggc | 1680 |
| atgggtggtc acacctgtaa tcccagagct ttgggaagcc aagactggca gatctttga | 1740 |
| gctcaggaat tcaagaccag cctggcaac atggaaaaac cccatctcta caaaagatag | 1800 |
| aaaaatttgc caggcatggt ggcgtgtgcc tgtggccca gctactcagg aggctgaggt | 1860 |
| gggaggatca cattagccca ggaggtttag gctgcagtga gccgtgatta tgccactgca | 1920 |
| ctccagctg ggagacagag tgagaccctg tttcaaaaaa aagagagaga aaatttaaaa | 1980 |
| aagaaaaacaa caccaaggc tgtaactta aggtcattaa atgaattaa cactgcattc | 2040 |
| aaaaacgatt actttctggc cctaagagac atgaggccaa taccaggaag ggggttgatc | 2100 |
| tcccaaaccac gaggcagacc ctagactcta atacagttaa gaaaaagacca gcaagatgtat | 2160 |

| | | |
|--------|---|------|
| | tgccagcctc ctcagaacc tggcacgct cttggcctg gggctggctc tcaactccag | 4200 |
| | catgtacagg gagagctgca aggggaaact cagcaagtgg ctcccatcc gcctcagtc | 4260 |
| | tattgtagcc tccctcgctc tcctgcacgt cttgactcc ttgaaacccc catcccaagt | 4320 |
| | cgagctggtc ttctacgtct tgccttctg caagagtgcg gtagtgcccc tggcatccgt | 4380 |
| | cagtgtcatc ccctactgcc tcgcccaggc cctgggccag ccgcacaaga agtcgttgt | 4440 |
| | agcggccgca gggatccaga catgataaga tacattgatg agtttgaca aaccacaact | 4500 |
| | agaatgcagt gaaaaaaatg ctttatttgc gaaatttgcg atgctattgc ttatgttgc | 4560 |
| | accattataa gctgcaataa acaagttAAC aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag | 4620 |
| | gttcaggggg aggtgtggg ggttttttag tcgaccatgc tggggagaga tctaggaacc | 4680 |
| | cctagtgtatg gagttggca ctccctctc ggcgcgtcgc tcgctcactg aggccccc | 4740 |
| | ggcaaaagccc gggcgctggg cgacctttgg tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcg | 4800 |
| | cagagaggga gtggccaaacc ccccccccccc ccccccgtca gccctgcatt aatgaatcg | 4860 |
| | ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tggcgctct tccgcttcct cgctcactga | 4920 |
| | ctcgctgcgc tcggcgttcc ggctgcggcg agcggtatca gctactcaa aggcgtaat | 4980 |
| | acggttatcc acagaatcag gggataacgc agggaaagaaac atgtgagcaa aaggccagca | 5040 |
| | aaaggccagg aaccgtaaaaa aggccgcgtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc | 5100 |
| [0004] | tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtgg cgaaacccga caggactata | 5160 |
| | aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc | 5220 |
| | gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttccggaaagc gtggcgcttt ctcaatgctc | 5280 |
| | acgctgttagg tatctcagtt cggtaggt cgttcgttcc aagctggct gtgtgcacga | 5340 |
| | ccccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtctt agtccaaccc | 5400 |
| | ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactgg aacaggatta gcagagcgag | 5460 |
| | gtatgttagc ggtgctacag agttcttgc gttggcgctt aactacggct acactagaag | 5520 |
| | gacagtattt ggtatctcgc ctctgctgaa gccagttacc ttccggaaaaa gagttggtag | 5580 |
| | ctcttgcattcc ggcaaaacaaa ccaccgctgg tagcggtgg tttttgttt gcaagcagca | 5640 |
| | gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atctttctta cggggctgt | 5700 |
| | cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gatttggc atgagattat caaaaggat | 5760 |
| | cttcaccttag atcctttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga | 5820 |
| | gtaaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgcg gcacctatct cagcgatctg | 5880 |
| | tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgt tagataacta cgatacggga | 5940 |
| | gggcttacca tctggccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct caccggctcc | 6000 |
| | agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggccgag cgcagaagtgc gtcctgcac | 6060 |
| | tttatccgcc tccatccagt ctattaatttgc ttccggaa gcttagagtaa gtagttcgcc | 6120 |

| | |
|--|------|
| agttaatagt ttgcgcacg ttgttgcatt tgctacagge atcgtgggtg caccgctcg | 6180 |
| gtttggatg gcttcattca gctccgggtt ccaacgatca aggccaggta catgatcccc | 6240 |
| catgttgc aaaaaagcgg ttagctcatt cggccctccg atcgttgta gaagtaagtt | 6300 |
| ggccgcaggta ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc | 6360 |
| atccgttaaga tgctttctg tgactggta gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg | 6420 |
| tatgcggcga ccgagttgtcttggccgtcaatacgg gataataccg cgccacatag | 6480 |
| cagaactta aaagtgcctca tcattggaaa acgttctcg gggcgaaaaac tctcaaggat | 6540 |
| cttaccgctg tttagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaaact gatctcagc | 6600 |
| atctttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaaca ggaaggcaaa atgcccggaaa | 6660 |
| aaagggaata agggcgacac ggaaatgtt aatactcata ctcttcctt ttcaatatttt | 6720 |
| ttgaaggcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa | 6780 |
| aaataaaacaa ataggggttc cgccacatt tccccggaaa gtgccaccctg acgtctaaga | 6840 |
| aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgagge ccttcgtct | 6900 |
| cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctccgg agacggcac | 6960 |
| agcttgcgtg taagcggatg cggggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt | 7020 |
| tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcacatcag cagattgtac tgagagtgc | 7080 |
| [0005] ccatatgcgg tgtgaaatac cgacacatg cgttaaggaga aaataccgca tcaggaaatt | 7140 |
| gttaacgtta atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcattttt | 7200 |
| aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg | 7260 |
| ttgagtgttgc ttccagtttgc gaacaagagt ccactattaa agaacgttgc ctccaaacgtc | 7320 |
| aaaggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat gcccactac gtgaaccatc accctaatac | 7380 |
| agtttttgg ggtcgagggtg cgttaaagca ctaaatcgga accctaaagg gagccccgg | 7440 |
| tttagagctt gacggggaaa gcccgcgaac gtggcgagaa aggaaggaa gaaagcgaaa | 7500 |
| ggagcggcgc ctagggcgct ggcaagtgtc ggggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc | 7560 |
| gccgcgccta atgcgcgc acaggcgcg tcgcgcatt cggcattcag gctacgcaac | 7620 |
| tgttgggaag ggcatcggt gcccgcctt tcgctattac gccaggctgc a | 7671 |

<210> 2

<211> 7505

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体 (质粒UF11-K29-G6PC)

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(163)

<223> 反向末端重复

<220>

<221> misc_feature

<222> (182)..(3045)

<223> G6PC 启动子/增强子

<220>

<221> misc_feature

<222> (3052)..(3188)

<223> 内含子

<220>

<221> misc_feature

<222> (3202)..(4275)

<223> G6PC编码序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (4508)..(4653)

<223> 反向末端重复

<400> 2

gggggggggg ggggggggtt ggccactccc tctctgcgct ctcgctcgct cactgaggcc 60

gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga 120

ggcgcgacag agggagtggc caactccatc actaggggtt cctagatctg aattcggtag 180

ccctttgaga atccacggtg tctcgatgca gtcagtttc taacaagctg gggcctcacc 240

tgttttccca cgataaaaaa cgtgctggag gaagcagaaa ggggctggca ggtggaaaga 300

[0006] tgaggaccag ctcatcgctc catgactatg aggttgcctt gatccagagg gtcggccctgc 360

ctgggtggccc accgcccagga agactccac tggccctgga tgcccagagt gggatgtcaa 420

ctccatcaact tatcaactcc ttatccatag gggatttttt cctgaggcgt ctcagaaaac 480

agggccctcc ccatatgctg accacataat agaacccttc ccaactcaga gaccctggct 540

gctagctgcc ctggcatgac ccagacagtgc gcctttgtat atgttttag actcacctt 600

actcacctt gaccatagaa actctcatcc cagaggtcac tgcaatagtt actccacaac 660

agaggcttat ctgggttagag ggaggctccc tacctatggc ccagcagccc tgacagtgc 720

gatcacatcat accccacgcc ccagcaactgc ctggcacgca tgggcttact ttacaccac 780

ccacagtcaac caacacattt cctgtctcc aaggttaggc gtggcaggag aagtttgc 840

ggaccagcag aaaccatgca gtcaaggaca actggagtca gcatggcgt ggtgcgagcc 900

cttgggtgggg tggggaggag actccaggc atacctctg gaggatgttt taatcatttc 960

cagcatggaa tgctgtcaac ttttgcaca gattcattag ctctgagttt ctttttctg 1020

tccccagcta ccccttacat gtcaatatgg acttaatgat gggaaattca ggcaagttt 1080

taaacatttt atccccctg gctttatcc taaaaaatg catgaattt gaggcagtgg 1140

ctcatgcctg taatcccaat gctttcttag gttgaggcgg gaggatcact tgaagccagg 1200

aatttgagac cagcctggc cgcatagtga gacccgttt ctacaaaaat aaataaataa 1260

ataataaata atagtgatata gaagcatgat taaaatggccc tatttttaa aatgcatgag 1320

| | |
|---|------|
| ttcggttacct gattcattcc ctgggttcctt tcacagtctt ccgtgaccac agtgttaggg | 1380 |
| ttttggtctc tctactattt gtaggctgat atatagtata cacacacacaca cacacacaca | 1440 |
| tatacacaca cacagtgtat cttgagcttt cttttgtata tctacacaca tatgtataag | 1500 |
| aaagctcaag atatagaagc ccttttcaa aaataactga aagttcaaa ctcttaagt | 1560 |
| ctccagttac cattttgctg gtattttat ttggaaccat acattcatca tattttgca | 1620 |
| cagtaagact atacattcat tattttgctt aaacgtatga gttaaaacac ttggccaggc | 1680 |
| atgggtggtc acacctgtaa tcccagagct ttgggaagcc aagactggca gatctttga | 1740 |
| gctcaggaat tcaagaccag cctggcaac atggaaaaac cccatctcta caaaagatag | 1800 |
| aaaaatttagc caggcatggt ggcgtgtgcc tgtggtccc gctactcagg aggctgaggt | 1860 |
| gggaggatca cattagccca ggaggtttag gctgcagtga gccgtgatta tgccactgca | 1920 |
| ctccagcctg ggagacagag tgagaccctg tttcaaaaaa aagagagaga aaatttaaaa | 1980 |
| aagaaaacaa caccaaggc tgtaactta agtcatcattaa atgaattaa cactgcattc | 2040 |
| aaaaacgatt actttctggc cctaagagac atgaggccaa taccaggaag ggggttgatc | 2100 |
| tcccaaacc aggcagacc ctagactcta atacagttaa ggaaagacca gcaagatgat | 2160 |
| agtccccat acaatagaag ttactatatt ttatttttg tttttttt gttttttt | 2220 |
| gtttttttt gttttttt agagactggg gtcttgctcg attgcccagg ctgttagtgca | 2280 |
| [0007] gcggtggac aatagctcac tgcagactcc aactcctggg ctcaagcaat ctcctgcct | 2340 |
| cagcctcctg aatagctggg actacaaggg tacaccatca cacacaccaa aacaattttt | 2400 |
| taaattttt ttagaaacg agggcttgc ttgtttgcc aggctggct ccaactcctg | 2460 |
| gcttcaaggg atcctccac ctcagcctcc caaattgctg ggattacagg tgtgagccac | 2520 |
| cacaaccagc cagaacttta ctaattttaa aattaagaac ttaaaaacttg aatagctaga | 2580 |
| gcaccaagat ttttcttgc cccaaataa gtgcagttgc aggcatagaa aatctgacat | 2640 |
| ctttgcaaga atcatcgtagt atgttagactc tgcctgtgt ctctggcctg gtttgggga | 2700 |
| ccaggaggc agacccttgc actgccaaga agcatgccaa agttaatcat tggccctgct | 2760 |
| gagtcacatgg ccgatcaggc ttgtttgtg tgcctgttt tctattttac gtaaatcacc | 2820 |
| ctgaacatgt ttgcatcaac ctactggta tgcaccttg atcaatacat tttagacaaa | 2880 |
| cgtggttttt gagtccaaag atcaggctg gttgacactg aatactggat acagggcata | 2940 |
| taaaacaggg gcaaggcaca gactcatagc agagcaatca ccaccaagcc tggaataact | 3000 |
| gcaaggcctc tgctgacatc ttccctgaggc gccaaggaaa tgaggcttag taggtaaagta | 3060 |
| tcaagggtac aagacagggt taaggagacc aatagaaaact gggcttgctg agacagagaa | 3120 |
| gactcttgcg tttctgatag gcaccttattt gtcttactga catccacttt gccttctct | 3180 |
| ccacaggcctc tgcaggccac catggaggaa ggaatgaatg ttctccatga ctttggatc | 3240 |
| cagtcaacac attacccatca ggtgaattac caagactccc aggactggg catcttgggt | 3300 |

| | | |
|--------|---|------|
| | tccgtgatcg cagacctcag gaatgccttc tacgtcctct tccccatctg gttccatctt | 3360 |
| | caggaagctg tgggcattaa actcccttgg gttagctgtga ttggagactg gctcaacctc | 3420 |
| | gtcttaagt ggattctctt tggacagcgt ccatactggt gggtttgga tactgactac | 3480 |
| | tacagcaaca cttccgtgcc cctgataaaag cagttccctg taacctgtga gactggacca | 3540 |
| | gggagccct ctggccatgc catggcaca gcaggtgtat actacgtgat ggtcacatct | 3600 |
| | actcttcca tcttcaggg aaagataaaag ccgacactaca gatttcggtg cttgaatgtc | 3660 |
| | attttgtgt tgggattctg ggctgtgcag ctgaatgtct gtctgtcacg aatctacatt | 3720 |
| | gctgctcatt ttcctcatca agttgttgct ggagtccctgt caggcattgc tttgcagaa | 3780 |
| | actttcagcc acatccacag catctataat gccagcctca agaaatattt tctcattacc | 3840 |
| | ttcttcctgt tcaagttcgc catcgattt tatctgtgc tcaaggact gggtagac | 3900 |
| | ctcctgtgga ctctggagaa agcccagagg tggtgcgagc agccagaatg ggtccacatt | 3960 |
| | gacaccacac ccttgcacag ctcctcaag aacctggca cgctttgg cctggggctg | 4020 |
| | gctctcaact ccagcatgta cagggagagc tgcaagggga aactcagcaa gtggctccca | 4080 |
| | ttccgcctca gctctattgt agcctccctc gtcctctgc acgtcttga ctcttgaaa | 4140 |
| | cccccatccc aagtcgagct ggtcttctac gtcttgctt tctgcaagag tgcggtagtg | 4200 |
| | cccttggcat ccgtcagtgt catccctac tgcctcgccc aggtcctggg ccagccgcac | 4260 |
| [0008] | aagaagtctg tgtaagcggc cgccgggatc cagacatgat aagatacatt gatgagttt | 4320 |
| | gacaaaccac aactagaatg cagtaaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta | 4380 |
| | ttgcttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgattc | 4440 |
| | atttatgtt tcaggttcag gggaggtgt gggaggttt ttagtcgacc atgctggga | 4500 |
| | gagatctagg aacccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc | 4560 |
| | actgaggccg cccgggcaaa gcccggcgt cggcgcacct ttggcgccc ggcctcagtg | 4620 |
| | agcgagcggc cgccgcagaga gggagtgccc aacccccc cccccccccc tgcagccctg | 4680 |
| | cattaatgaa tggccaacg cgccgggaga ggcggttgc gtattggcg ctcttcgct | 4740 |
| | tcctcgctca ctgactcgct ggcctcggtc gttcgctgc ggcgagcgtt atcagctcac | 4800 |
| | tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcagggata acgcaggaaa gaacatgtga | 4860 |
| | gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cttgtgtgc gttttccat | 4920 |
| | aggctccgccc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac | 4980 |
| | ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gtcctctgt ggcctctct | 5040 |
| | gttccgaccc tggcgcttac cggataacctg tccgccttcc tccctcggg aagcgtggcg | 5100 |
| | ctttctcaat gtcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcggtcg ctccaaagctg | 5160 |
| | ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgacg cttatccgg taactatcg | 5220 |
| | cttgagtcca acccggtaaag acacgactta tcgcccactgg cagcagccac tggtaacagg | 5280 |

| | |
|--|------|
| attagcagag cgaggtatgt aggccgtgct acagagttt tgaagtggg gcctaactac | 5340 |
| ggctacacta gaaggacagt atttggtatac tgcgtctgc tgaagccagt taccttcgga | 5400 |
| aaaagagttg gtagctttt atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggtttttt | 5460 |
| gtttgcaaggc agcagattac ggcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt | 5520 |
| tctacgggt ctgacgctca gtggAACAA aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga | 5580 |
| ttatcaaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc | 5640 |
| taaagtatat atgagtaaac ttggctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct | 5700 |
| atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgttagata | 5760 |
| actacgatac gggagggcctt accatctggc cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca | 5820 |
| cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaaaggc cgagcgcaga | 5880 |
| agtggcctg caactttatc cgcctccatc cagtctttaa attgttgccg ggaagctaga | 5940 |
| gtaagtagtt cgccagttaa tagttgcgc aacgttggcc ccattgctac aggcatcgtg | 6000 |
| gtgtcacgct cgtcggtttg tatggcttca ttcaagctccg gttcccaacg atcaaggcga | 6060 |
| gttacatgat ccccatgtt gtgaaaaaaaaa gcggttagct cttcgggtcc tccgatcgaa | 6120 |
| gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct | 6180 |
| cttactgtca tgccatccgt aagatgctt tctgtgactg gtgagtaactc aaccaagtca | 6240 |
| [0009] ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctttgcc cggcgtaat acggataat | 6300 |
| accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattt gaaaacgttc ttggggcga | 6360 |
| aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tggtaacccac tcgtgcaccc | 6420 |
| aactgatctt cagcatctt tactttcacc agcgttctg ggtgagcaaa aacaggaagg | 6480 |
| caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaataact catactttc | 6540 |
| cttttcaat attattgaag catttatcag gtttattgtc tcatgagcgg atacatattt | 6600 |
| gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca cattttcccg aaaagtgcga | 6660 |
| cctgacgtct aagaaaccat tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcagc | 6720 |
| aggcccttc gtctcgcg tttcggtgat gacggtaaaa acctctgaca catcgacgtc | 6780 |
| ccggagacgg tcacagcttgc tctgttaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcaggc | 6840 |
| ggtcagcgg gtgtggcg gtgtcggttact atgcggcatc agagcagatt | 6900 |
| gtactgagag tgcaccat gtcgggtgaa ataccgcaca gatgcgttaag gagaaaaatac | 6960 |
| cgcattcaggaa aattgtaaac gttaatattt tggtaaaattt cgcgttaat tttgttaaa | 7020 |
| tcagctcatt tttaaccaa taggcccggaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaaagaat | 7080 |
| agaccgagat agggtttgagt gttgtccag tttggaaacaa gagtccacta taaaagaacg | 7140 |
| tggactccaa cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggccca ctacgtgaac | 7200 |
| catcacccta atcaagttt ttggggcgtca ggtgcgttaa agcactaaat cggaacccta | 7260 |

| | |
|--|------|
| aagggagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag | 7320 |
| ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgcgttaggg cgctggcaag tgttagcggtc acgctgcgcg | 7380 |
| taaccaccac accccggcgcttaatgcgc cgctacaggg cgctgcgcgcattgcgcatt | 7440 |
| tcaggctacg caactgttgg gaagggcgat cggtgcggc ctcttcgcta ttacgccagg | 7500 |
| ctgca | 7505 |
| | |
| <210> 3 | |
| <211> 7671 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| | |
| <220> | |
| <223> 合成构建体 (质粒UF11-GPE-co-G6PC) | |
| | |
| <220> | |
| <221> misc_feature | |
| <222> (17)..(163) | |
| <223> 反向末端重复 | |
| | |
| <220> | |
| <221> misc_feature | |
| <222> (182)..(3045) | |
| <223> G6PC 启动子/增强子 | |
| | |
| <220> | |
| <221> misc_feature | |
| <222> (3051)..(3184) | |
| <223> 填充序列 | |
| | |
| <220> | |
| <221> misc_feature | |
| <222> (3185)..(3321) | |
| <223> 内含子 | |
| | |
| <220> | |
| <221> misc_feature | |
| <222> (3322)..(3367) | |
| <223> 填充序列 | |
| | |
| <220> | |
| <221> misc_feature | |
| <222> (3368)..(4441) | |
| <223> 密码子优化的G6PC编码序列 | |
| | |
| <220> | |
| <221> misc_feature | |
| <222> (4674)..(4819) | |
| <223> 反向末端重复 | |
| | |
| <400> 3 | |
| gggggggggg ggggggggtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc | 60 |
| ggcgaccaa aggtcgcccg acgcccggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgcagcga | 120 |
| gcgcgcagag agggagtgcc caactccatc actaggggtt cctagatctg aattcggtac | 180 |
| ccctttgaga atccacggtg tctcgatgca gtcagcttgc taacaagctg gggcctcacc | 240 |
| tgttttccca cggataaaaaa cgtgctggag gaagcagaaa gggcgtggca ggtggaaaga | 300 |

| | | |
|--------|--|------|
| | tgaggaccag ctcatcgct catgactatg aggttgcct gatccagagg gtccccctgc | 360 |
| | ctgggtggcc accgccagga agactccac tgtccctgga tgcccagagt gggatgtcaa | 420 |
| | ctccatcaact tatcaactcc ttatccatag ggttattttt cctgaggcgt ctcagaaaac | 480 |
| | agggccctcc ccatatgctg accacataat agaaccctc ccaactcaga gaccctggct | 540 |
| | gctagctgcc ctggcatgac ccagacagtgc gcctttgtat atgttttag actcaccttgc | 600 |
| | actcacctt gaccatagaa actctcatcc cagaggtcac tgcaatagtt actccacaac | 660 |
| | agaggcttat ctgggttagag ggaggctccc tacctatggc ccagcagccc tgacagtgc | 720 |
| | gatcacatat accccacgccc ccagcactgc ctgccacgca tggcattact ttacacccac | 780 |
| | ccacagtac caacacatta cctgctctcc aaggtaggc gtggcaggag aagtttgctt | 840 |
| | ggaccagcag aaaccatgca gtcaaggaca actggagtca gcatggcgtg ggtgcgagcc | 900 |
| | cttgggtgggg tggggaggag actccaggc atacccctg gaggatgtt taatcatttc | 960 |
| | cagcatggaa tgctgtcaac ttttgcaca gattcatttag ctctgagttt ctttttctg | 1020 |
| | tcccccagcta ccccttacat gtcaatatgg acttaatgat gggaaattca ggcaagttt | 1080 |
| | taaacatttt attccccctg gctcttatcc tcaaaaaatg catgaattt gaggcagtgg | 1140 |
| | ctcatgcctg taatcccaat gctttgctag gttgaggcgg gaggatcact tgaagccagg | 1200 |
| | aatttgagac cagcctggc cgcatagtga gaccccggtt ctacaaaaat aaataaataa | 1260 |
| [0011] | ataataaaata atagtgatata gaagcatgat taaatagccc tatttttaa aatgcatgag | 1320 |
| | ttcggttaccc gattcattcc ctgggttcctt tcacagtctt ccgtgaccctt agtggtaggg | 1380 |
| | ttttggctc tctactattt gtaggctgat atatagtata cacacacaca cacacacaca | 1440 |
| | tatacacaca cacagtgtat cttgagcttt ctttgtata tctacacaca tatgtataag | 1500 |
| | aaagctcaag atatagaagc cttttcaaa aaataactga aagttcaaa ctcttaagt | 1560 |
| | ctccagttac cattttgctg gtatttttattt ttggaaccat acattcatca tatttttgca | 1620 |
| | cagtaagact atacattcat tattttgctt aaacgtatga gttaaaacac ttggccaggc | 1680 |
| | atgggtggc acacctgtaa tcccagagct ttgggaagcc aagactggca gatctttga | 1740 |
| | gctcaggaat tcaagaccag cctggcaac atggaaaaac cccatctcta caaaagatag | 1800 |
| | aaaaatttgc caggcatggt ggcgtgtgcc tgtggccca gctactcagg aggctgaggt | 1860 |
| | gggaggatca cattagccca ggaggtttag gctgcagtga gccgtgatta tgccactgca | 1920 |
| | ctccagcctg ggagacagag tgagaccctg tttcaaaaaa aagagagaga aaatttaaaa | 1980 |
| | aagaaaaacaa caccaaggc tgtaacttta aggtcattaa atgaattt cactgcattc | 2040 |
| | aaaaacgatt actttctggc cctaagagac atgaggccaa taccaggaag ggggttgatc | 2100 |
| | tcccaaaccg gaggcagacc ctagactcta atacagttaa gaaaagacca gcaagatgat | 2160 |
| | agtcccccaat acaatagaag ttactatatt ttattttttt gttttttttt gttttttttt | 2220 |
| | gtttttttt gttttttt agagactggg gtcttgctcg attggccagg ctgttagtgca | 2280 |

| | |
|---|------|
| gccccggac aatagctcac tgcagactcc aactcctggg ctcaagcaat cctcctgcct | 2340 |
| cagcctcctg aatagctggg actacaaggg tacaccatca cacacaccaa aacaattttt | 2400 |
| taaatttttgc ttagaaacg agggcttgc ttgttgccc aggctggct ccaactcctg | 2460 |
| gcttcaaggg atcctccac ctcagccctcc caaatttgc ggattacagg tgtgagccac | 2520 |
| cacaaccaggc cagaacttta ctaattttaa aattaagaac taaaacttg aatagctaga | 2580 |
| gcaccaagat tttctttgt ccccaataa gtgcagttgc aggcatagaa aatctgacat | 2640 |
| ctttgcaaga atcatcggtt atgttagactc tgtcctgtgt ctctggcctg gtttgggga | 2700 |
| ccaggaggc agacccttgc actgccaaga agcatgcca agttaatcat tggccctgct | 2760 |
| gagttacatgg ccgatcaggc tggtttgtg tgcctgttt tctattttac gttaatcacc | 2820 |
| ctgaacatgt ttgcacatcaac ctactggta tgcaccttg atcaatacat tttagacaaa | 2880 |
| cgtgggtttt gagtccaaag atcaggcgt ggttgcactg aataactggat acagggcata | 2940 |
| taaaacaggg gcaaggcaca gactcatagc agagcaatca ccaccaagcc tggaataact | 3000 |
| gcaaggcgtc tgctgacatc ttcttgaggt gccaaggaaa tgaggcttag agaagctta | 3060 |
| ttgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagttag tgcttctgac acaacagtct | 3120 |
| cgaacttaag ctgcagttagc tctcttaagg tagccttgca gaagttggc gtgaggcact | 3180 |
| ggcaggtaa gtagtcaaggt tacaagacag gttttaggag accaatagaa actggcctt | 3240 |
| [0012] tcgagacaga gaagacttttgcgttctga taggcaccta ttggcttac tgacatccac | 3300 |
| tttgccttcc tctccacagg tgtccactcc cagttcaattt acagcttta aggcctgca | 3360 |
| ggccaccatg gaagaggcga tgaacgtgct gcacgacttc ggcacccaga gcacccacta | 3420 |
| tctgcaggc aactaccagg acagccagga ctggttcattt ctgggttccg tgatgccga | 3480 |
| cctgcggAAC gccttctacg tgctttccc catctggttt catctgcaag aagccgtcg | 3540 |
| catcaagctg ctgtgggtgg ccgtgatcgg cgattggctt aacctgggtt tcaagtggat | 3600 |
| cctgttccgc cagcggccctt attgggtggt gctggacacc gactactaca gcaacaccag | 3660 |
| cgtccccctg atcaagcagt tccccgtgac ctgcgagaca ggccctggctt ctccttctgg | 3720 |
| ccacgcccattt ggaacagccg gcgtgtacta cgtgatggc accagcaccc tgagcattt | 3780 |
| ccaggcgaag atcaagccca cctaccgtt ccgggtgcctt aacgtgatcc tgggtggg | 3840 |
| cttctggcc gtcagctga acgtgtgcctt gagccggatc tacctggccg cccacttccc | 3900 |
| acatcaagtg gtggccggcg tgctgagcgg aatcgccgtt ggcacccat tcagccacat | 3960 |
| ccacagcattt tacaacgcca gcctgaagaa gtacttctgtt atcacatttt ttctgttcc | 4020 |
| cttcggccatc ggcttctacc tgctgctgaa gggcctgggc gtggacctgc tgggtggcc | 4080 |
| ggaaaaggcc cagcgggtgtt ggcacccat ccggcggcc cgagtgggtt cacatcgaca | 4140 |
| cgccagccctg ctgaagaacc tggcaccctt gttggactt ggcctggccc tgaacagcag | 4200 |
| catgtacaga gagagctgca agggcaagctt gagcaagttt ctggcccttcc ggctgagcag | 4260 |

| | | |
|--------|---|------|
| | catcggtggcc agcctggtgc tgctgcacgt gttcgacage ctgaagcccc ccagccaggt | 4320 |
| | ggaactggtg ttttacgtgc tgagcttctg caagagcgcc gtggccccc tggcctccgt | 4380 |
| | gtctgtgatc ccctactgcc tggctcaggt gctggccag ccccacaaga agtccctctg | 4440 |
| | agcggccgca gggatccaga catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact | 4500 |
| | agaatgcagt gaaaaaaatg ctttatttgc gaaatttgc atgctattgc tttatttgc | 4560 |
| | accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag | 4620 |
| | gttcaggggg aggtgtggga ggttttttag tcgaccatgc tggggagaga tctaggaacc | 4680 |
| | cctagtatgc gagttggcca ctccctctc ggcgcctc tcgctcactg aggcccccgg | 4740 |
| | ggcaaagccc gggcgctggg cgacctttgg tcgccccggcc tcagtgagcg agcgagcg | 4800 |
| | cagagaggga gtggccaaacc ccccccccccc ccccccgtca gccctgcatt aatgaatcgg | 4860 |
| | ccaacgcgca gggagaggcg gtttgcgtat tggcgctct tcgcctcactgatcgc | 4920 |
| | ctcgctgcgc tcggcgttgc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggccgtat | 4980 |
| | acggttatcc acagaatcag gggataacgc agggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca | 5040 |
| | aaaggccagg aaccgtaaaaa aggccgcgtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc | 5100 |
| | tgacgagcat cacaatcagc gacgctcaag tcagagggtgg cgaaacccga caggactata | 5160 |
| | aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcgttgc cgaccctgc | 5220 |
| [0013] | gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttccggaaagc gtggcgctt ctcaatgc | 5280 |
| | acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgttcgtcc aagctggct gtgtcacga | 5340 |
| | ccccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgcttg agtccaaccc | 5400 |
| | ggtaaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcg | 5460 |
| | gtatgttagc ggtgctacag agttttgaa gtgggtggct aactacggct acactagaag | 5520 |
| | gacagtattt ggtatctgcg ctctgtgaa gccagttacc ttccggaaaaa gagttggtag | 5580 |
| | ctcttgcgttcc ggcaaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca | 5640 |
| | gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atctttctta cggggctgt | 5700 |
| | cgcctcgtgg aacgaaaact cacgttaagg gatttggc atgagattat caaaaaggat | 5760 |
| | cttcacctag atcctttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga | 5820 |
| | gtaaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gcacctatct cagcgtatc | 5880 |
| | tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgt tagataacta cgatacgg | 5940 |
| | gggcttacca tctggccca gtgctgcaat gataccgca gacccacgct caccggctcc | 6000 |
| | agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggccgag cgcagaagt gtcctgcaac | 6060 |
| | tttatccgcc tccatccagt ctattaatttgc ttggccggaa gctagagtaa gtagttcgcc | 6120 |
| | agttaatagt ttgcgcacg ttgttgcgtat tgctacagtc atcgtgggtgt cacgctgc | 6180 |
| | gtttggtagt gcttcattca gctccgggttc ccaacgatca aggcgagttt catgatcccc | 6240 |

| | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|---------------|------------|-------------|-------------|------|
| catgttgtgc | aaaaaaagcggttagctcctt | cggcctccg | atcggtgtca | gaagtaagtt | 6300 | |
| ggccgcagtgttacactca | ttatcactca | tggttatggc | agcactgcat | aattctctta | ctgtcatgcc | 6360 |
| atccgttaaga | tgctttctgtgactggta | gtactcaacc | aagtcattct | gagaatagtgt | 6420 | |
| tatgcggcga | ccgagttgtcttgccggc | gtcaatacgg | gataataccg | cggccacatag | 6480 | |
| cagaacttaaaagtgtca | tcattggaaa | acgttctcg | ggcgaaaaac | tctcaaggat | 6540 | |
| cttaccgctgtttagagatcca | ttcgatgtatgc | acccactcgt | gcacccaact | gatcttcagc | 6600 | |
| atctttactttcaccagcg | tttctgggtg | agcaaaaaca | ggaaggcaaa | atgccgcaaa | 6660 | |
| aaaggaaataaggcgacac | ggaaatgttg | aatactcata | ctttcctt | ttcaatattat | 6720 | |
| ttgaaggcatttatcagggtt | attgtctcat | gagcggatac | atatttgaat | gtatttagaa | 6780 | |
| aaataaaacaaataggggttc | cgcgcacatt | tccccgaaaa | gtgccacctg | acgtctaaga | 6840 | |
| aaccattattatcatgacat | taacctataa | aaataggcgt | atcacgaggc | ccttcgtct | 6900 | |
| cgcgcgtttc | ggtgtatgacg | gtgaaaacct | ctgacacatg | cagctccgg | agacggtcac | 6960 |
| agcttgcgt | taagcggatg | ccgggagcag | acaagcccgt | cagggcgcgt | cagcgggtgt | 7020 |
| tggcgggtgt | cgggctggc | ttaactatgc | ggcatcagag | cagattgtac | tgagagtgc | 7080 |
| ccatatcggtgtaaatac | cgcacagatg | cgttaaggaga | aaataccgca | tcagggaaatt | 7140 | |
| gttaaacgttaatatttgtt | aaaattcgcg | ttaaattttt | gttaaatcag | ctcattttt | 7200 | |
| [0014]aaccataggccgaaatcgg | caaaatccct | tataaatcaa | aagaatagac | cgagataggg | 7260 | |
| tttagtgcgttgc | ttccagtttgc | gaacaagagt | ccactattaa | agaacgtgga | ctccaaacgtc | 7320 |
| aaagggcgaaaaaccgtcta | tcagggcgat | ggcccactac | gtgaaccatc | accctaatca | 7380 | |
| agtttttgg | ggtcgaggtgc | ccgttaagca | ctaaatcgga | accctaaagg | gagcccccga | 7440 |
| tttagagctt | gacggggaaa | gccggcgaac | gtggcgagaa | aggaaggaa | gaaagcgaaa | 7500 |
| ggagcggcgc | ctagggcgct | ggcaagtgtatgc | gccccacgc | tgcgcgttaac | caccacaccc | 7560 |
| gccgcgtta | atgcgcgc | acagggcg | tcgcgcatt | cgccattcag | gctacgcaac | 7620 |
| tgttgggaag | ggcgatcggt | gcggccctct | tcgctattac | gccaggctgc | a | 7671 |

<210> 4

<211> 357

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Gly | Met | Asn | Val | Leu | His | Asp | Phe | Gly | Ile | Gln | Ser | Thr |
| 1 | | | | | 5 | | | 10 | | | 15 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Tyr | Leu | Gln | Val | Asn | Tyr | Gln | Asp | Ser | Gln | Asp | Trp | Phe | Ile | Leu |
| | | | | | 20 | | | 25 | | | 30 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Ser | Val | Ile | Ala | Asp | Leu | Arg | Asn | Ala | Phe | Tyr | Val | Leu | Phe | Pro |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

35

40

45

Ile Trp Phe His Leu Gln Glu Ala Val Gly Ile Lys Leu Leu Trp Val
 50 55 60

Ala Val Ile Gly Asp Trp Leu Asn Leu Val Phe Lys Trp Ile Leu Phe
 65 70 75 80

Gly Gln Arg Pro Tyr Trp Trp Val Leu Asp Thr Asp Tyr Tyr Ser Asn
 85 90 95

Thr Ser Val Pro Leu Ile Lys Gln Phe Pro Val Thr Cys Glu Thr Gly
 100 105 110

Pro Gly Ser Pro Ser Gly His Ala Met Gly Thr Ala Gly Val Tyr Tyr
 115 120 125

Val Met Val Thr Ser Thr Leu Ser Ile Phe Gln Gly Lys Ile Lys Pro
 130 135 140

Thr Tyr Arg Phe Arg Cys Leu Asn Val Ile Leu Trp Leu Gly Phe Trp
 145 150 155 160

Ala Val Gln Leu Asn Val Cys Leu Ser Arg Ile Tyr Leu Ala Ala His
 [0015] 165 170 175

Phe Pro His Gln Val Val Ala Gly Val Leu Ser Gly Ile Ala Val Ala
 180 185 190

Glu Thr Phe Ser His Ile His Ser Ile Tyr Asn Ala Ser Leu Lys Lys
 195 200 205

Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Phe Leu Phe Ser Phe Ala Ile Gly Phe Tyr
 210 215 220

Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Val Asp Leu Leu Trp Thr Leu Glu Lys
 225 230 235 240

Ala Gln Arg Trp Cys Glu Gln Pro Glu Trp Val His Ile Asp Thr Thr
 245 250 255

Pro Phe Ala Ser Leu Leu Lys Asn Leu Gly Thr Leu Phe Gly Leu Gly
 260 265 270

Leu Ala Leu Asn Ser Ser Met Tyr Arg Glu Ser Cys Lys Gly Lys Leu
 275 280 285

Ser Lys Trp Leu Pro Phe Arg Leu Ser Ser Ile Val Ala Ser Leu Val
 290 295 300

Leu Leu His Val Phe Asp Ser Leu Lys Pro Pro Ser Gln Val Glu Leu
 305 310 315 320

Val Phe Tyr Val Leu Ser Phe Cys Lys Ser Ala Val Val Pro Leu Ala
 325 330 335

Ser Val Ser Val Ile Pro Tyr Cys Leu Ala Gln Val Leu Gly Gln Pro
 340 345 350

His Lys Lys Ser Leu
 355

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多核苷酸

<400> 5
 cctttgagaa tccacggtgt

20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0016]

<220>
 <223> 合成多核苷酸

<400> 6
 cctcatttcc ttggcacctc

20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多核苷酸

<400> 7
 aggttaagttt caaggttaca

20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多核苷酸

<400> 8
 acctgtggag agaaaggcaa

20

<210> 9

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| <211> | 1074 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <212> | DNA | | | | | | | | | | | | | | | |
| <213> | 家犬科 (Canis familiaris familiaris) | | | | | | | | | | | | | | | |
| <400> | 9 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | atggagaaaag gaatggatgt gctccatgac tttggaatcc agtcaacgca ctacccatccag | 60 | | | | | | | | | | | | | | |
| | gtgaattacc aggactctca ggattgggttc atcttgggtgt ccgtgattgc agacccatcagg | 120 | | | | | | | | | | | | | | |
| | aatgccttct atgtcctctt tcccatctgg ttccatctgc gtgaagctgt gggcatcaaa | 180 | | | | | | | | | | | | | | |
| | cttctctggg tagctgtgat tggagactgg ctcaacctcg tctttaaatg gattctgttt | 240 | | | | | | | | | | | | | | |
| | ggacagcgctc catactggtg ggtcatggac accgactact atagcaacac ctctgtgcc | 300 | | | | | | | | | | | | | | |
| | ctgataaaagc aatttccagt tacctgtgaa actggaccag ggagtccctc tggcatgcc | 360 | | | | | | | | | | | | | | |
| | atgggtacag caggtgtata ctacgtgatg gtcacatcta cccttctat ctttcggggg | 420 | | | | | | | | | | | | | | |
| | agaaaaaagc caacctacag attcgggtgc ttgaatatcc ttctgtggtt gggattctgg | 480 | | | | | | | | | | | | | | |
| | gctgtgcagc tgaacgtctg tctgtcccgaa atctaccttg ctgctcatt cccccatcag | 540 | | | | | | | | | | | | | | |
| | gttggcgtgagcaggcattgtgttgc gttgtgaaa ctttccgcca catccagagc | 600 | | | | | | | | | | | | | | |
| | atctacaatg ccagcctcaa gaaatatttt ctcattactt tcttcctgtt cagtttgcc | 660 | | | | | | | | | | | | | | |
| | attggatttt acctgctgct caaggggctg ggtgtggacc tcctgtggac actggaaaaaa | 720 | | | | | | | | | | | | | | |
| | gccaggagat ggtgtgagcg gccggaaatgg gttcacattg acaccacacc ctggccagc | 780 | | | | | | | | | | | | | | |
| | cttctcaaga acgtggggac cctctttggc ctgggggtga ctctcaactc cagcatgtac | 840 | | | | | | | | | | | | | | |
| [0017] | aggaaagct gcaagggcaa gcttagcaag tggcccattccgcctcag ctgcattgtg | 900 | | | | | | | | | | | | | | |
| | gtgtctctca tcctcctgca cctctttgac tcttggaaac ccccatccca aactgagctg | 960 | | | | | | | | | | | | | | |
| | atcttctaca cttgtcctt ctgcaagagt gcagcagtgc ccctggcatc tgtcagcctc | 1020 | | | | | | | | | | | | | | |
| | atcccctact gccttgcctgg ggtcttcgac cagccagaca agaagtctt gtaa | 1074 | | | | | | | | | | | | | | |
| <210> | 10 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <211> | 357 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| <213> | 狼科 (Canis lupus familiaris) | | | | | | | | | | | | | | | |
| <400> | 10 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | Glu | Lys | Gly | Met | Asp | Val | Leu | His | Asp | Phe | Gly | Ile | Gln | Ser | Thr | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | 15 | | | | |
| His | Tyr | Leu | Gln | Val | Asn | Tyr | Gln | Asp | Ser | Gln | Asp | Trp | Phe | Ile | Leu | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | |
| Val | Ser | Val | Ile | Ala | Asp | Leu | Arg | Asn | Ala | Phe | Tyr | Val | Ile | Phe | Pro | |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | 45 | | | |
| Ile | Trp | Phe | His | Leu | Arg | Glu | Ala | Val | Gly | Ile | Lys | Leu | Leu | Trp | Val | |
| | | | | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | |
| Ala | Val | Ile | Gly | Asp | Trp | Leu | Asn | Leu | Val | Phe | Lys | Trp | Ile | Leu | Phe | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Gly Gln Arg Pro Tyr Trp Trp Val Met Asp Thr Asp Tyr Tyr Ser Asn | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Thr Ser Val Pro Leu Ile Lys Gln Phe Pro Val Thr Cys Glu Thr Gly | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Pro Gly Ser Pro Ser Gly His Ala Met Gly Thr Ala Gly Val Tyr Tyr | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Val Met Val Thr Ser Thr Leu Ser Ile Phe Arg Gly Arg Lys Arg Pro | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Thr Tyr Arg Phe Arg Cys Leu Asn Ile Leu Leu Trp Leu Gly Phe Trp | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ala Val Gln Leu Asn Val Cys Leu Ser Arg Ile Tyr Leu Ala Ala His | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Phe Pro His Gln Val Val Ala Gly Val Leu Ser Gly Ile Ala Val Ala | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Glu Thr Phe Arg His Ile Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Ser Leu Lys Lys | | | |
| [0018] | 195 | 200 | 205 |
| Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Phe Leu Phe Ser Phe Ala Ile Gly Phe Tyr | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Val Asp Leu Leu Trp Thr Leu Glu Lys | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Ala Arg Arg Trp Cys Glu Arg Pro Glu Trp Val His Ile Asp Thr Thr | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Pro Phe Ala Ser Leu Leu Lys Asn Val Gly Thr Leu Phe Gly Leu Gly | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Val Thr Leu Asn Ser Ser Met Tyr Arg Glu Ser Cys Lys Gly Lys Leu | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Ser Lys Trp Phe Pro Phe Arg Leu Ser Cys Ile Val Val Ser Leu Ile | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Leu Leu His Leu Phe Asp Ser Leu Lys Pro Pro Ser Gln Thr Glu Leu | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Ile Phe Tyr Thr Leu Ser Phe Cys Lys Ser Ala Ala Val Pro Leu Ala | | | |
| 325 | 330 | 335 | |

Ser Val Ser Leu Ile Pro Tyr Cys Leu Ala Arg Val Phe Asp Gln Pro
340 345 350

[0019]

Asp Lys Lys Ser Leu
355

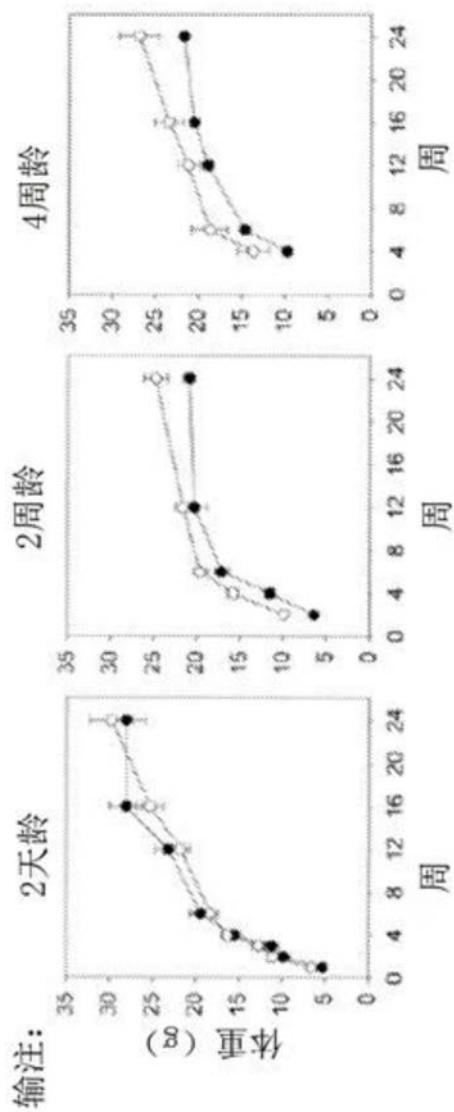


图1A

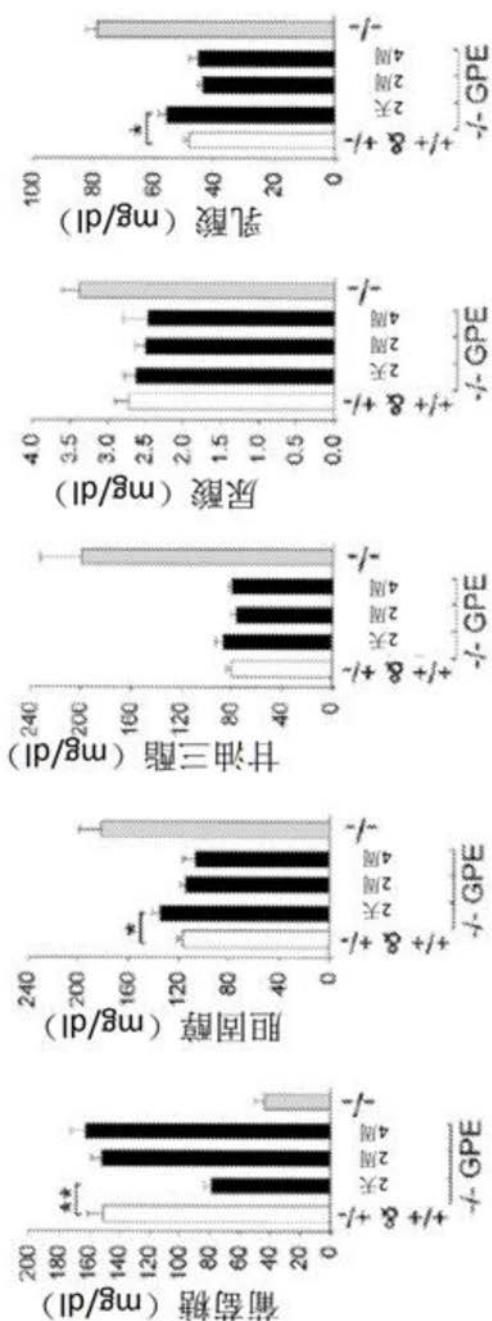


图1B

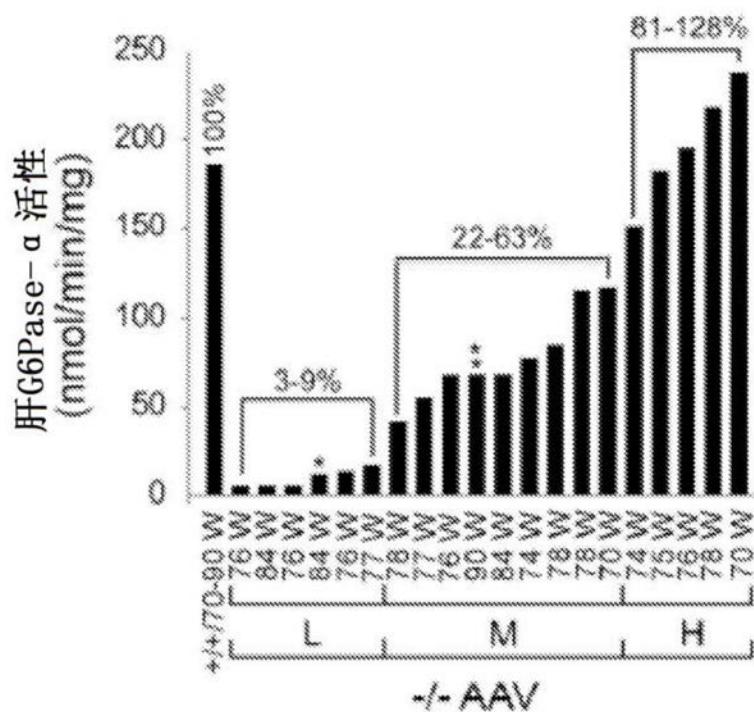


图2A

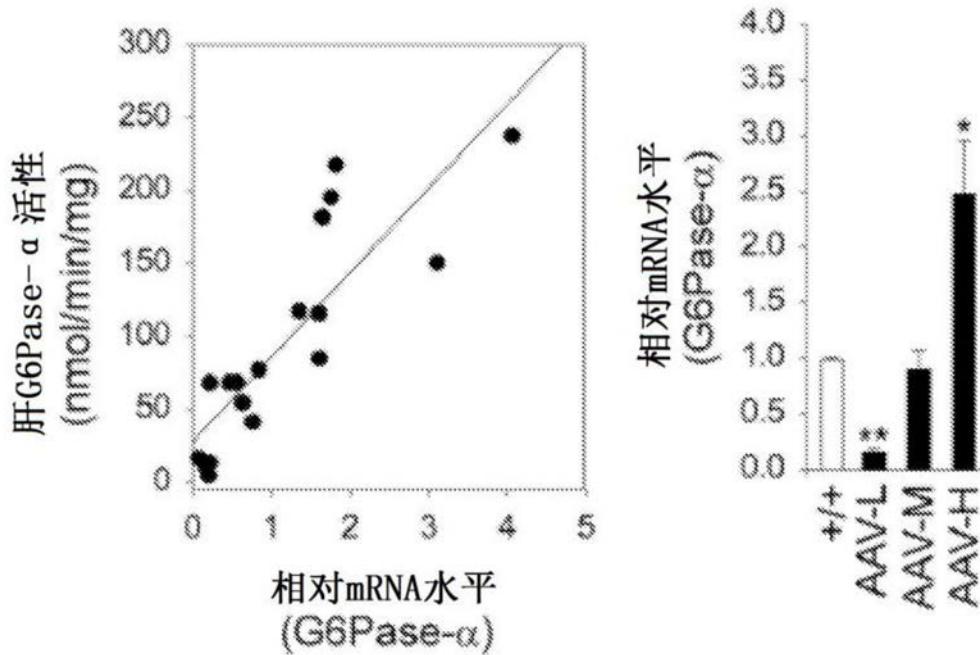


图2B

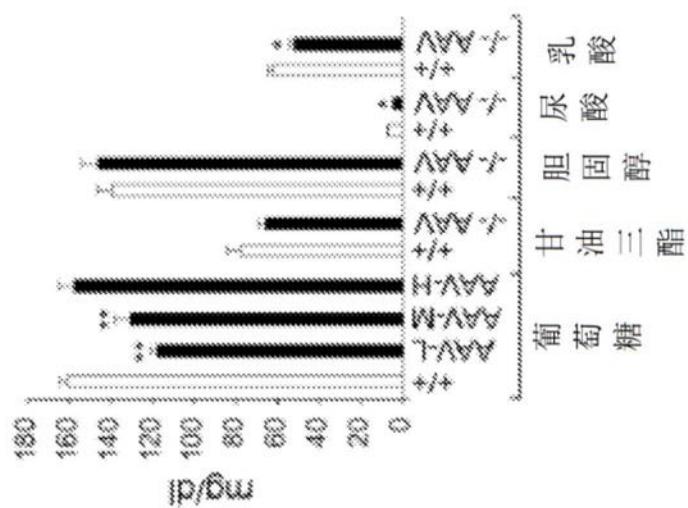


图3A

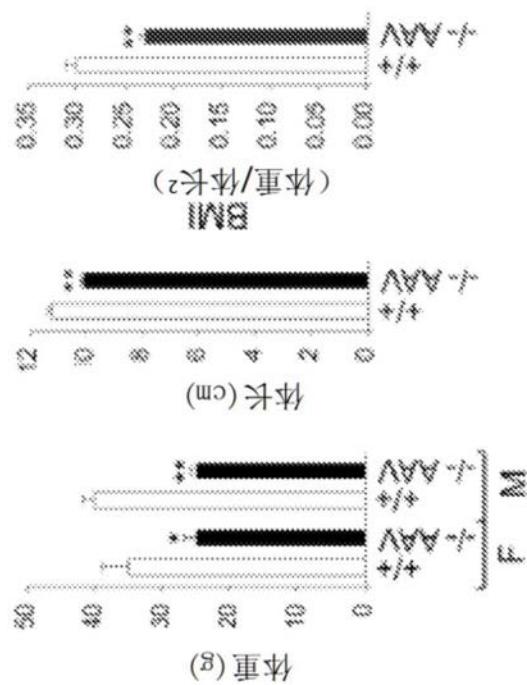


图3B

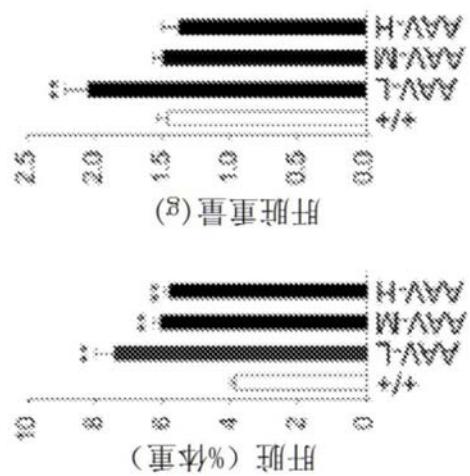


图3C

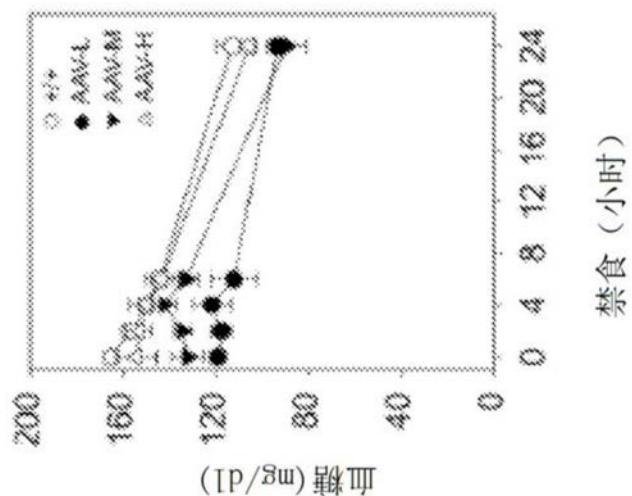


图4A

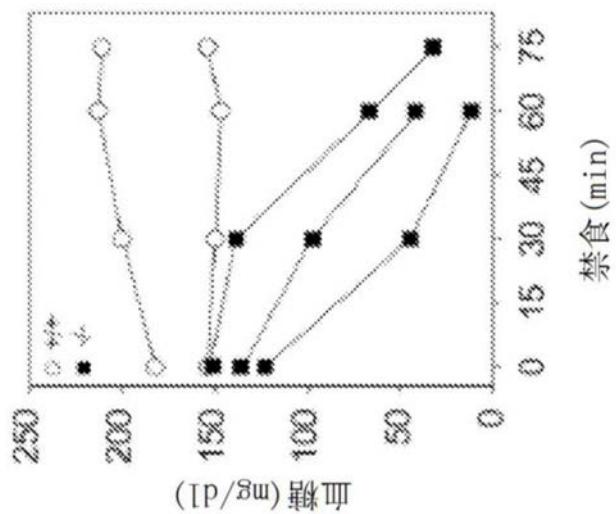


图4B

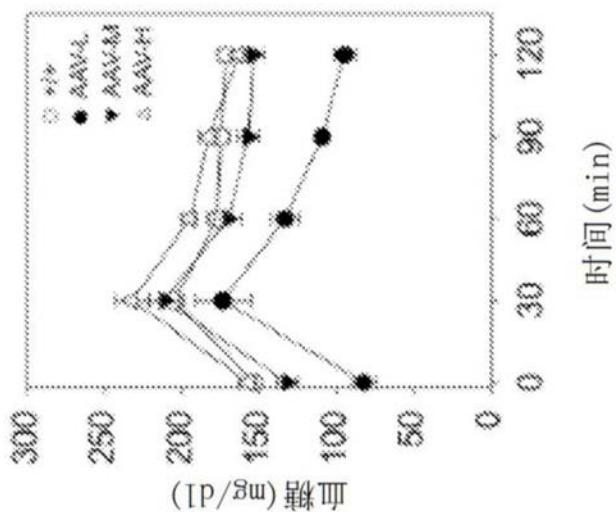


图4C

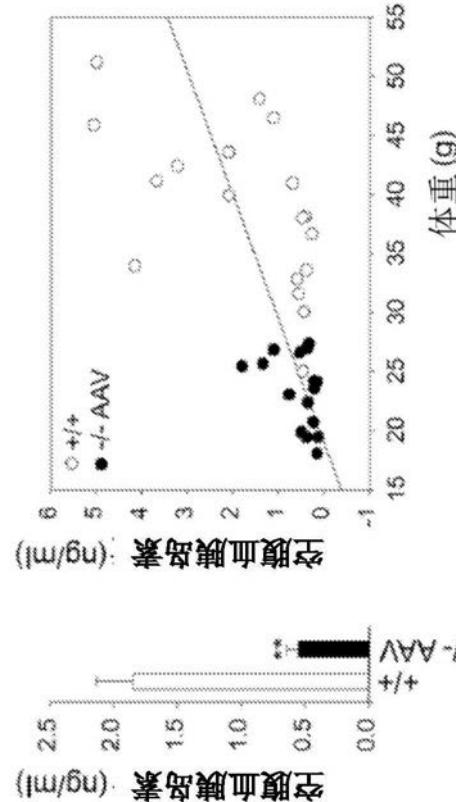


图5A



图5B

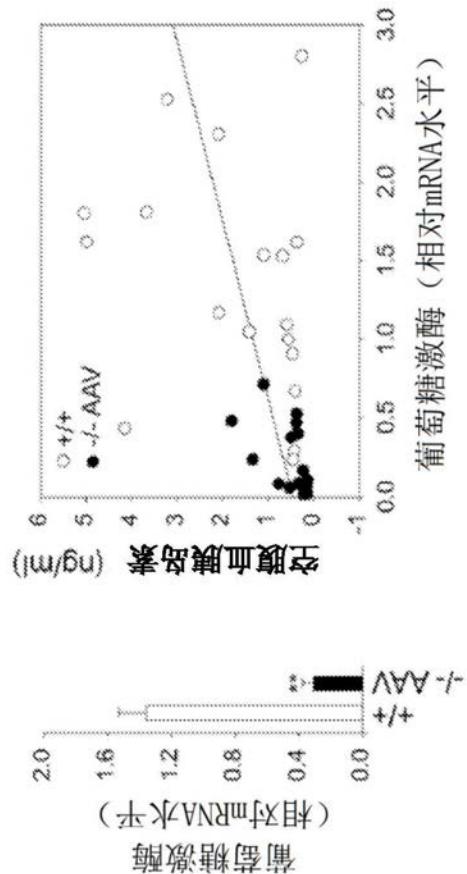


图5C

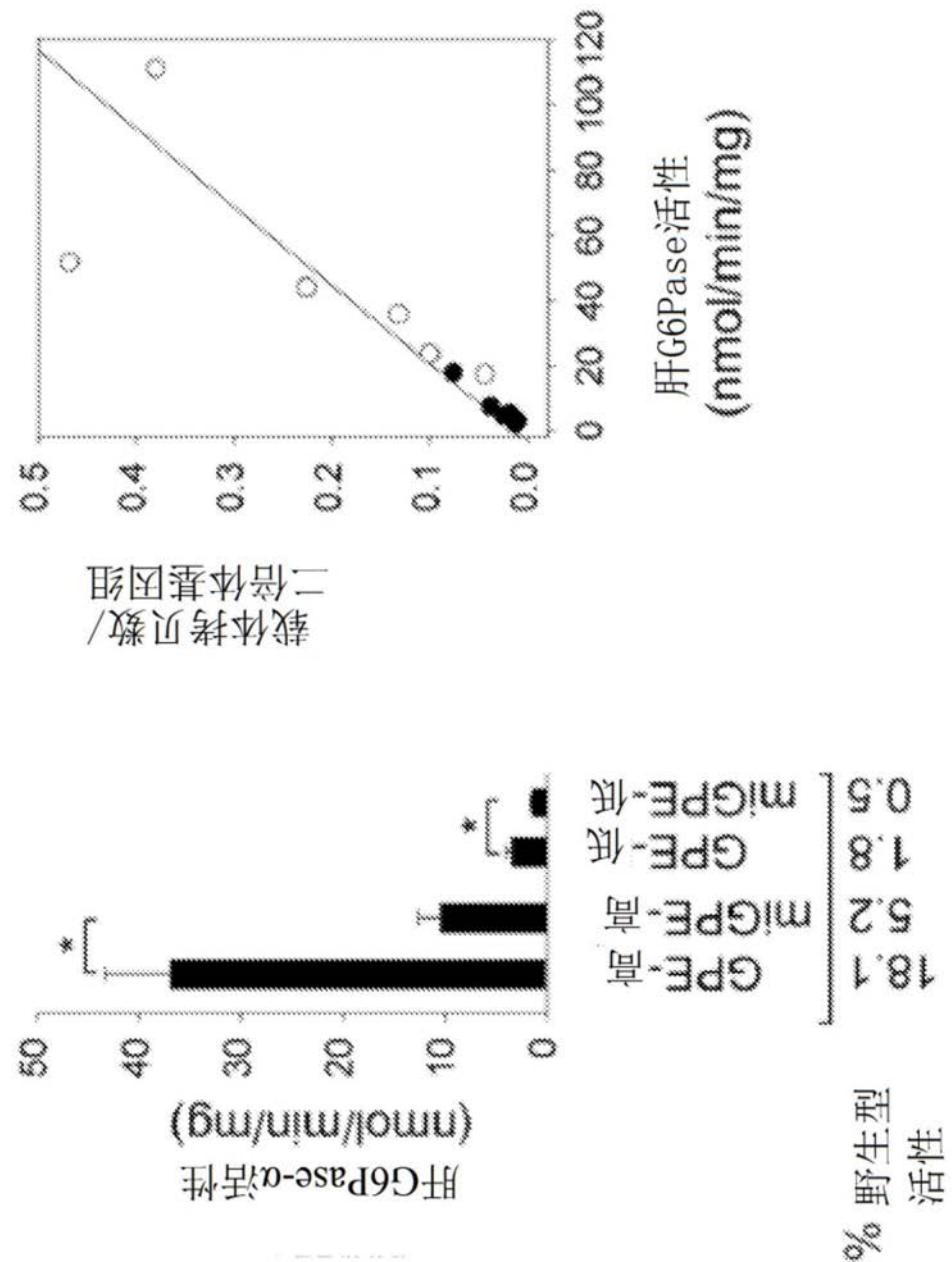


图6A

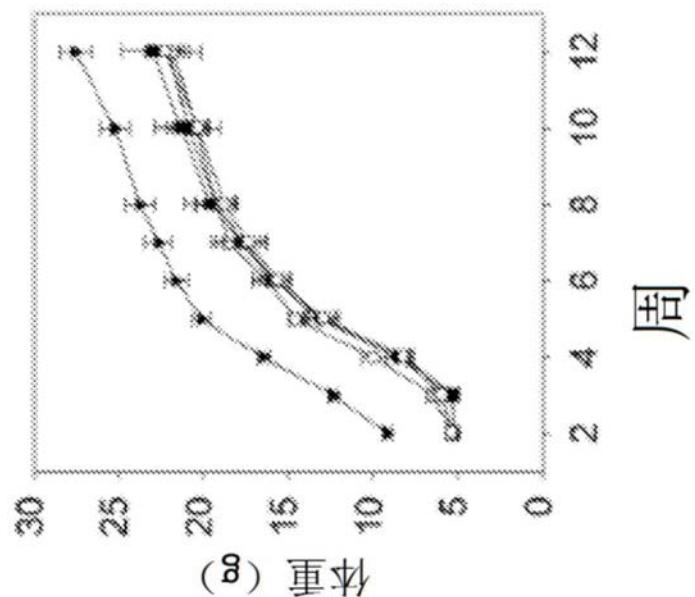


图6B

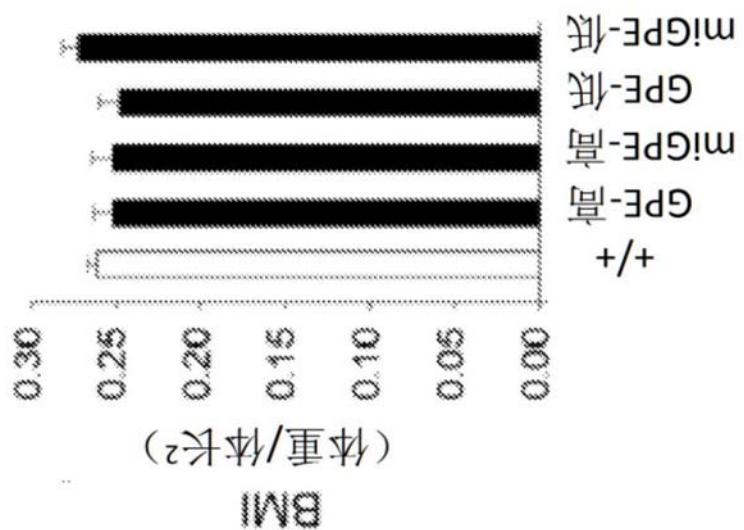


图6C

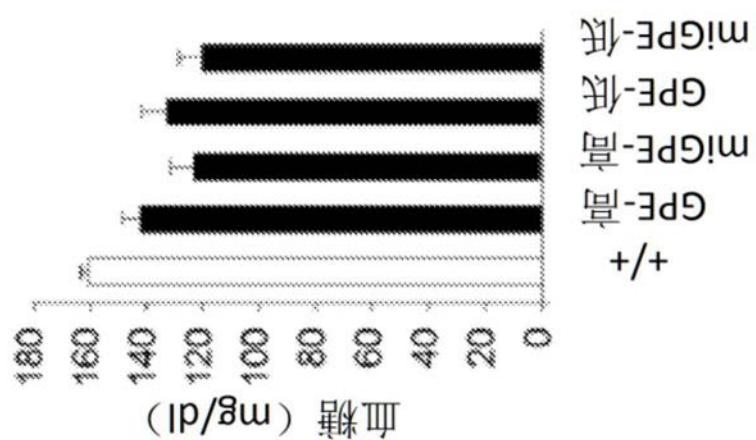


图6D

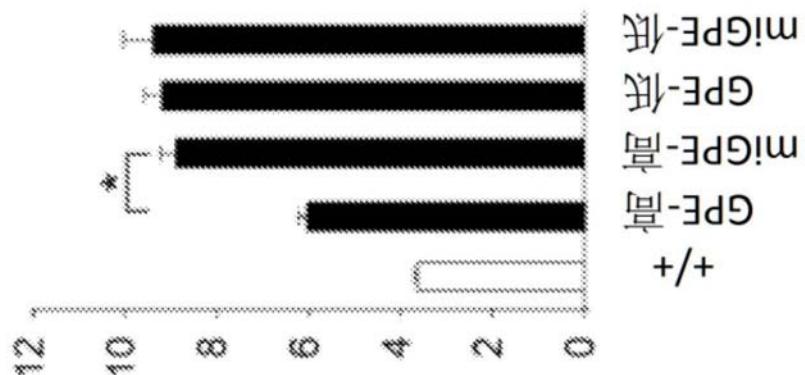


图7A

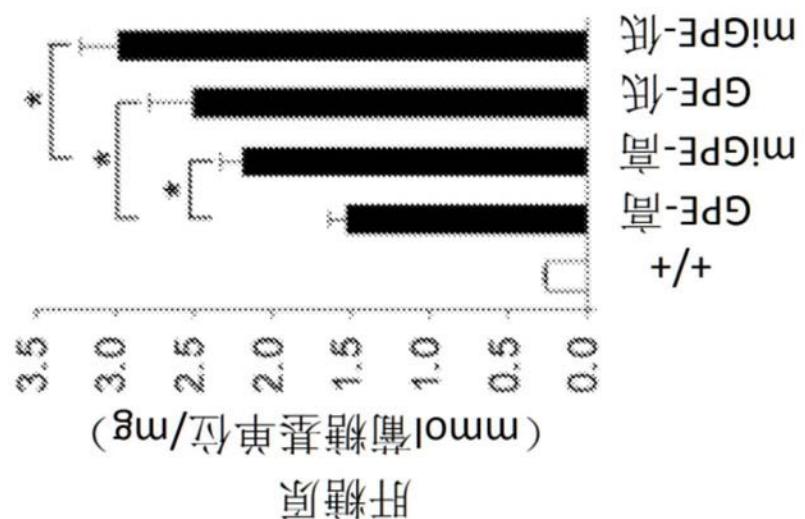
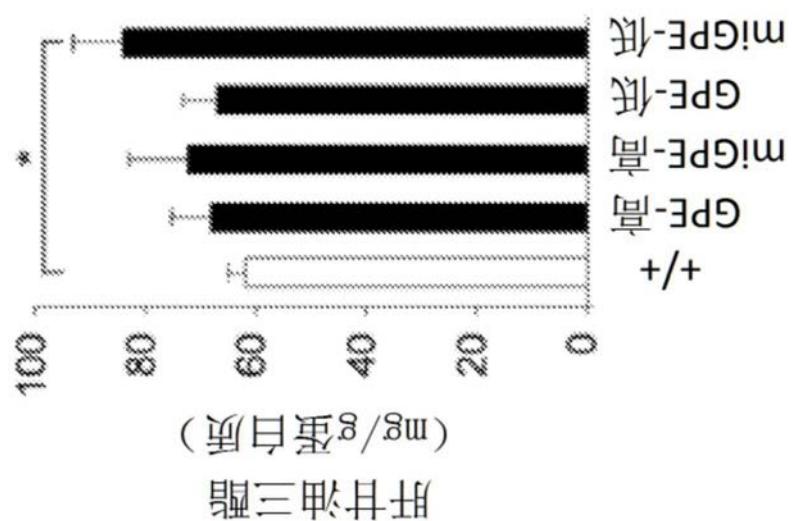


图7B



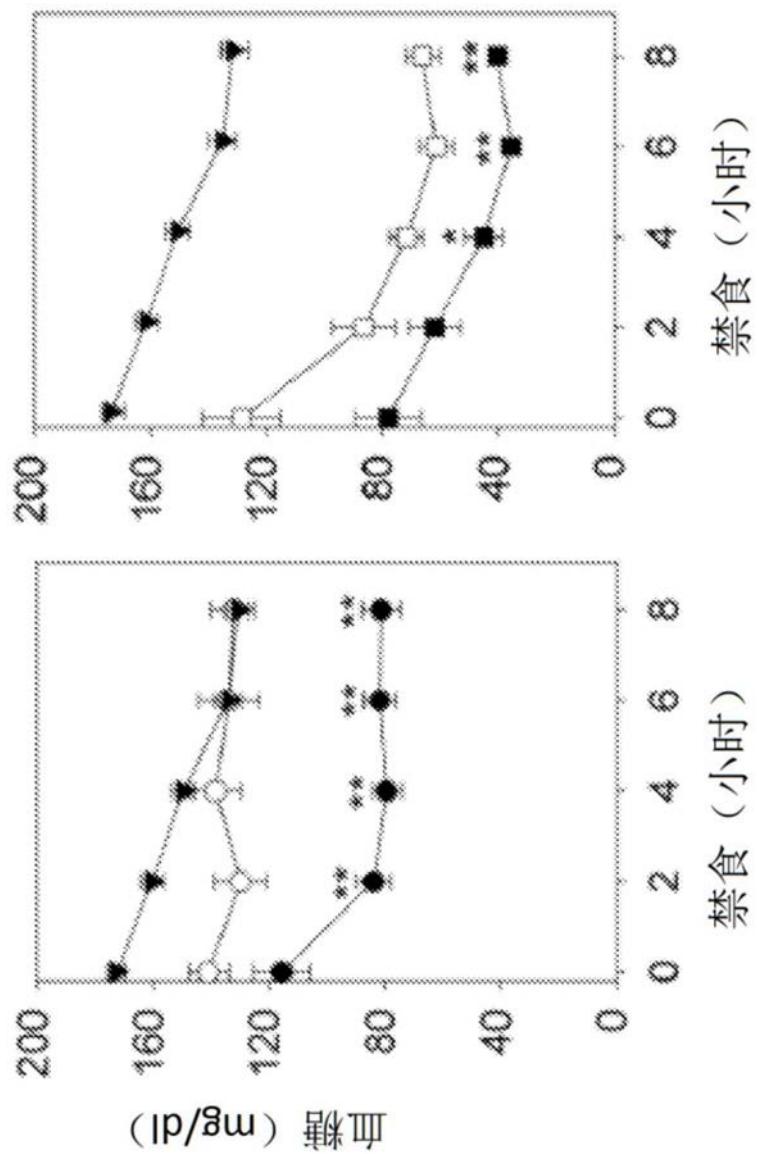


图8A

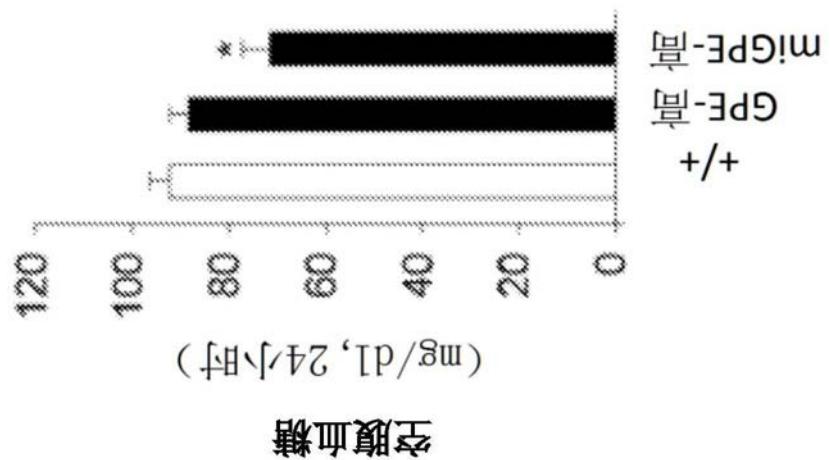


图8B

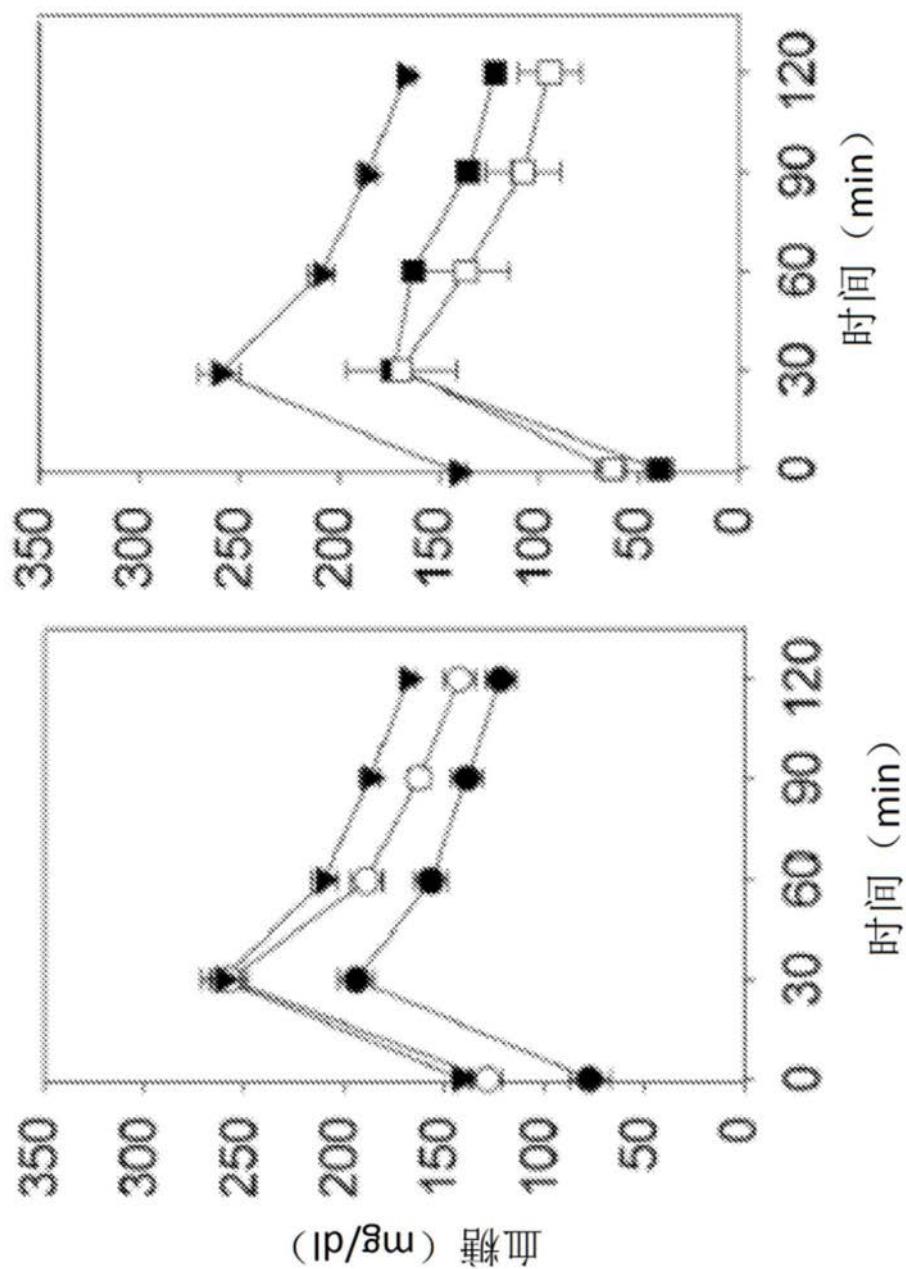


图8C

| | | |
|----|--|-----|
| 翻译 | MEKCMDVLDHDFGIQSTHYLQVNQYQDSQDWFLIVSVTADLRNAFYVLEPIFMFHLREAVGIRLLEVAVIGDMLNLFV | 75 |
| 翻译 | MESENVLHDFGIQSTHYLQVNQYQDSQDWFLIVSVTADLRNAFYVLEPIFMFHLREAVGIRLLEVAVIGDMLNLFV | 75 |
| 翻译 | KWILPGQRPYWWVMDTDYVNTSVPLIKQEPVTCTGPGSPSGCHAMGTAGVYVWVTSPLSISIPEGRKRPYRRC | 150 |
| 翻译 | KWILPGQRPYWWVMDTDYVNTSVPLIKQEPVTCTGPGSPSGCHAMGTAGVYVWVTSPLSISIPEGRKRPYRRC | 150 |
| 翻译 | LNILMLLGFWAVQLNVCLSRIVLAAHEPHQVVAAGVLSGGIAVAETFHICSYNALSKKYELITPEFLPSPAIGYYL | 225 |
| 翻译 | LNVILMLLGFWAVQLNVCLSRIVLAAHEPHQVVAAGVLSGGIAVAETFHICSYNALSKKYELITPEFLPSPAIGYYL | 225 |
| 翻译 | LNKGGLGVDDLLMTLEKAARCEEEWVHIDTTPEASLLKKNVGTLLGVALNSWVRESCKGKLSKMLPPRLSSIV | 300 |
| 翻译 | LNKGGLGVDDLLMTLEKAARCEEEWVHIDTTPEASLLKKNVGTLLGVALNSWVRESCKGKLSKMLPPRLSSIV | 300 |
| 翻译 | VSLILHLEDSLKPPPSQHLLIPYVLSPECKSAAVPLASVSLIPIYCLARVEDQPPKKSL- | 357 |
| 翻译 | ASLYMLHVEDSLKPPPSQHLLIPYVLSPECKSAAVPLASVSLIPIYCLARVEDQPPKKSL- | 357 |

第一行：犬 G6Pase- α
第二行：人 G6Pase- α

图9

人、小鼠、大鼠和犬G6Pase- α 之间的氨基酸差异：

| | 氨基酸 |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 人 | E3 (N) | Q54 (C1) | Q139 (C2) | S196 (H5) | H199 (C3) | Q242 (L3) | Q247 (L3) |
| 小鼠 | E3 | K54 | R139 | S196 | H199 | K242 | R247 |
| 大鼠 | E3 | Q54 | R139 | S196 | H199 | K242 | R247 |
| 狗 | K3 | R54 | R139 | R196 | Q199 | R242 | R247 |
| | | | | | | | |
| 人 | S298 (H8) | A301 (H8) | V318 (L4) | V324 (H9) | V332 (H9) | Q347 (C) | L349 (C) |
| 小鼠 | C298 | A301 | V318 | I324 | T332 | R347 | L349 |
| 大鼠 | C298 | A301 | I318 | I324 | T332 | R347 | L349 |
| 狗 | C298 | V301 | T318 | T324 | A332 | R347 | F349 |
| | | | | | | | |
| 人 | H353 | | | | | | |
| 小鼠 | H353 | | | | | | |
| 大鼠 | H353 | | | | | | |
| 狗 | D353 | | | | | | |

H: 螺旋结构域 (H1至H9)
 N- N端结构域
 C: 羧基端结构域
 L-环: 腔环 (C1至C4)
 C-环: 胞质环 (C1至C4)

图 10

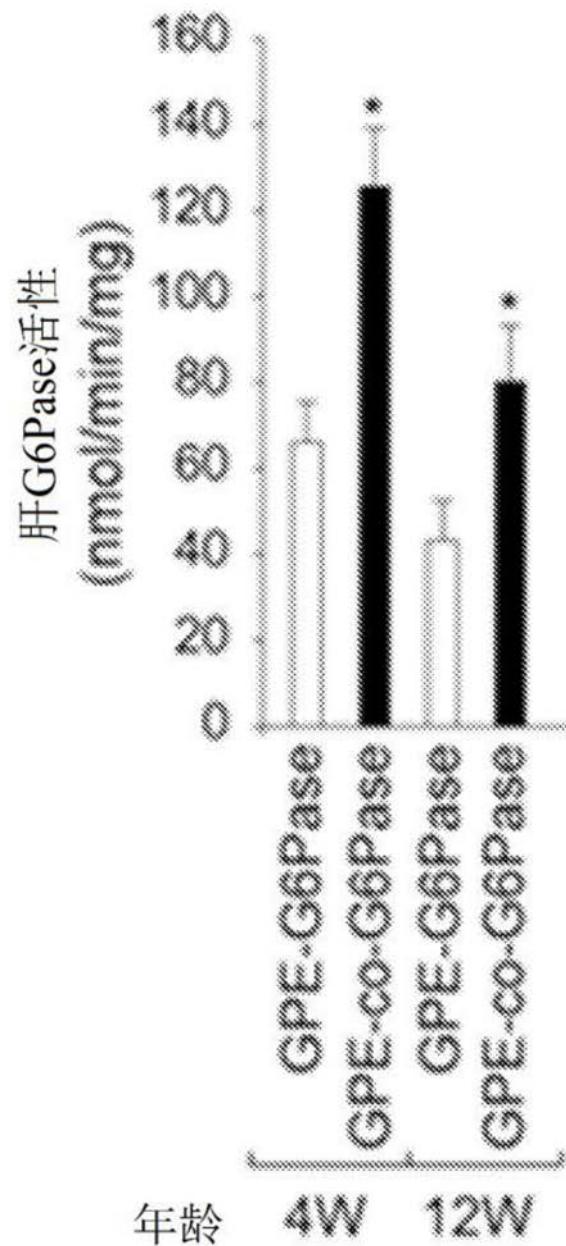


图11

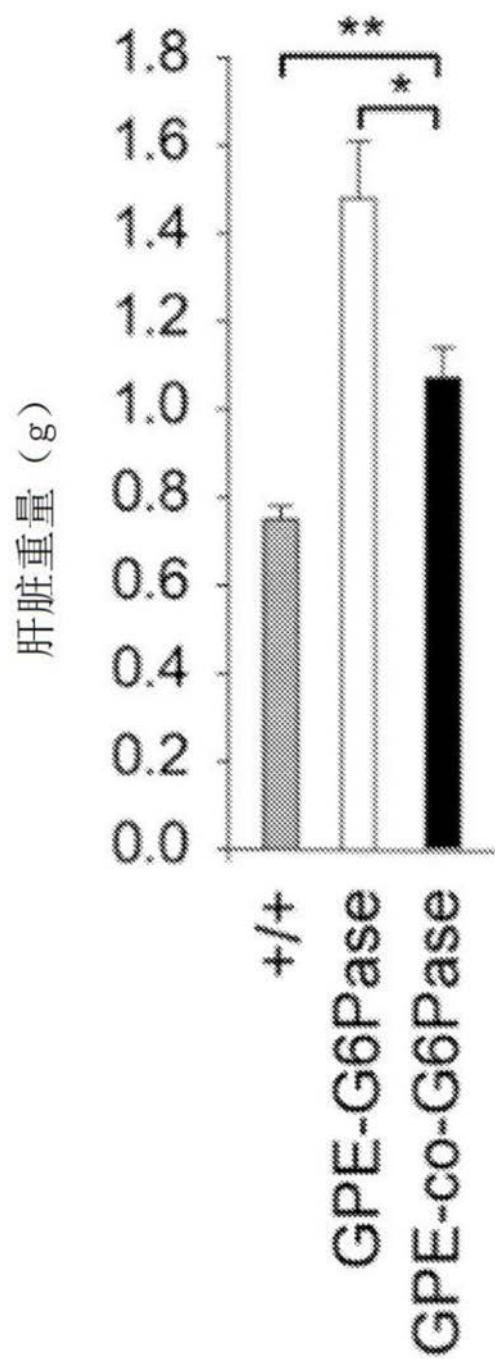


图12

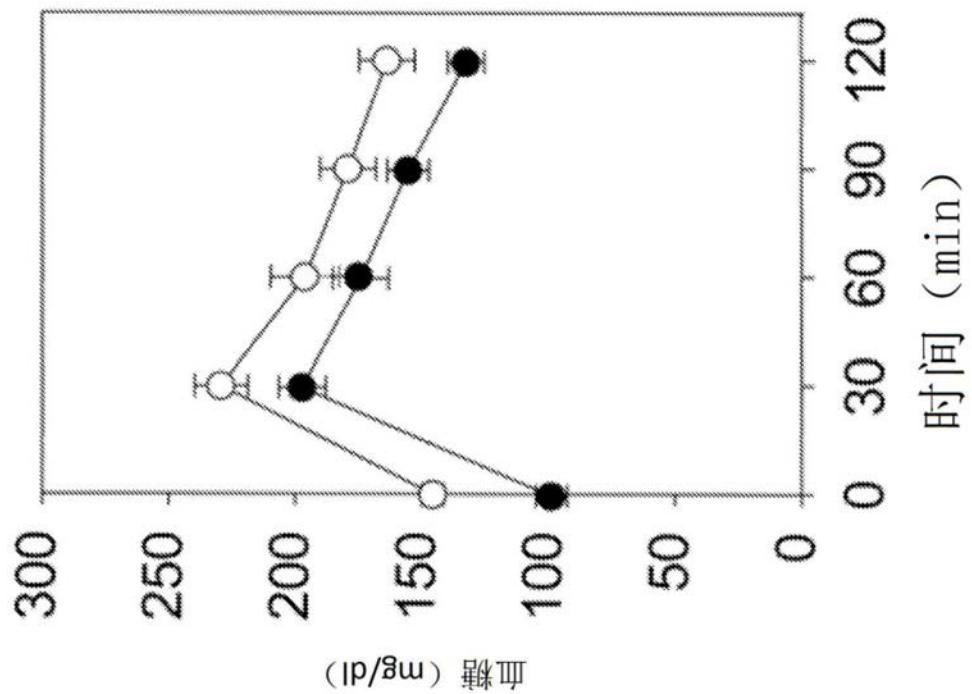


图13A

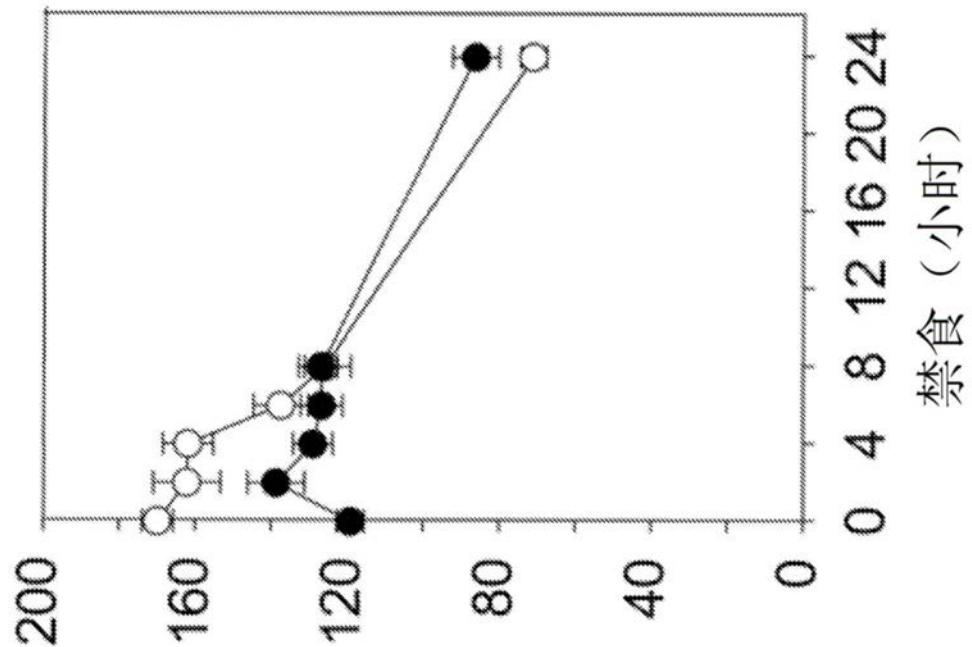


图13B