



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119234040 A

(43) 申请公布日 2024.12.31

(21) 申请号 202380041468.2

(22) 申请日 2023.04.05

(30) 优先权数据

63/328,241 2022.04.06 US

63/483,075 2023.02.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/065388 2023.04.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/196862 EN 2023.10.12

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S·程 S·M·雅克布 T·森口

C·奥里奥丹 G·阮

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

权利要求书8页 说明书60页

序列表(电子公布) 附图24页

(54) 发明名称

DM-1肌强直性营养不良的靶向基因疗法

(57) 摘要

本文提供了用于治疗肌强直性营养不良1型(DM1)的RNAi分子。本文还提供了含有该RNAi的表达盒、载体(例如,rAAV)、病毒颗粒和药物组合物。本文还进一步提供了与使用该RNAi例如治疗DM1有关的方法和试剂盒。

1. 一种包含第一链和第二链的RNAi, 其中
 - a) 该第一链和该第二链形成双链体;
 - b) 该第一链包含指导区, 其中该指导区包含具有序列5' -AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3' (SEQ ID NO:1) 或具有与SEQ ID NO:1的序列具有约90%同一性的序列的核酸; 并且
 - c) 该第二链包含非指导区。
2. 如权利要求1所述的RNAi, 其中该非指导区包含具有序列5' -ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3' (SEQ ID NO:2) 或具有与SEQ ID NO:2的序列具有约90%同一性的序列的核酸。
3. 如权利要求1或2所述的RNAi, 其中该第一链包含具有SEQ ID NO:1的序列的核酸, 并且该非指导区包含具有SEQ ID NO:2的序列的核酸。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的RNAi, 其中该第一链和该第二链借助于能够形成环结构的RNA接头连接。
5. 如权利要求4所述的RNAi, 其中该RNA接头包含约4至约50个核苷酸。
6. 如权利要求4或5所述的RNAi, 其中该环结构包含约4至约20个核苷酸。
7. 如权利要求4-6中任一项所述的RNAi, 其中该环结构包含具有SEQ ID NO:3的序列或具有与SEQ ID NO:3的序列具有约90%同一性的序列的核酸序列。
8. 如权利要求4-7中任一项所述的RNAi, 其中该RNAi从5' 至3' 包含该第二链、该RNA接头和该第一链。
9. 如权利要求4-7中任一项所述的RNAi, 其中该RNAi从5' 至3' 包含该第一链、该RNA接头和该第二链。
10. 如权利要求1-8中任一项所述的RNAi, 其中该RNAi包含具有SEQ ID NO:7的序列或具有与SEQ ID NO:7的序列具有约90%同一性的序列的核酸。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的RNAi, 其中该RNAi是小抑制性RNA (siRNA)、微RNA (miRNA) 或小发夹RNA (shRNA)。
12. 如权利要求1-11中任一项所述的RNAi, 其中该RNAi进一步包含支架。
13. 如权利要求12所述的RNAi, 其中该支架包含SEQ ID No:11的核酸的全部或一部分。
14. 如权利要求13所述的RNAi, 其中该miRNA嵌入该支架内。
15. 如权利要求14所述的RNAi, 其中该支架具有5' 臂和3' 臂, 其中该5' 臂位于编码该RNAi的核酸的5', 其中该3' 臂位于编码该RNAi的核酸的3'。
16. 如权利要求12-15中任一项所述的RNAi, 其中该支架是miR-155支架。
17. 如权利要求12-16中任一项所述的RNAi, 其中该miR-155支架包含位于该RNAi的5' 的具有SEQ ID NO:9的序列或与SEQ ID NO:9的序列具有约90%同一性的序列的核酸。
18. 如权利要求12-17中任一项所述的RNAi, 其中该miR-155支架包含位于该RNAi的3' 的具有SEQ ID NO:10的序列或与SEQ ID NO:10的序列具有约90%同一性的序列的核酸。
19. 如权利要求1-18中任一项所述的RNAi, 其中该RNAi靶向编码与肌强直性营养不良1型 (DM1) 相关的多肽的RNA。
20. 如权利要求19所述的RNAi, 其中该多肽是营养不良性肌强直蛋白激酶 (DMPK)。
21. 如权利要求20所述的RNAi, 其中该DMPK包含与DM-1相关的突变。
22. 如权利要求20或21所述的RNAi, 其中编码DMPK的基因包含5个或更多个CTG三核苷酸重复序列。

23. 一种表达盒,该表达盒包含编码如权利要求1-22中任一项所述的RNAi的核酸。
24. 如权利要求23所述的表达盒,其中编码该RNAi的核酸与启动子可操作地连接。
25. 如权利要求24所述的表达盒,其中该启动子是肌肉特异性启动子。
26. 如权利要求24或25所述的表达盒,其中该启动子是结蛋白启动子或其变体。
27. 如权利要求26所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含一个或多个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。
28. 如权利要求26或27所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含两个增强子元件、和该人结蛋白基因的启动子。
29. 如权利要求26-28中任一项所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。
30. 如权利要求26-29中任一项所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含:包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件,和/或包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件。
31. 如权利要求26-30中任一项所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列或与SEQ ID NO:12的核苷酸序列具有约90%同一性的序列。
32. 如权利要求23-31中任一项所述的表达盒,其中该表达盒进一步包含内含子。
33. 如权利要求32所述的表达盒,其中该内含子是兔 β -珠蛋白内含子。
34. 如权利要求32或33所述的表达盒,其中该内含子包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列或与SEQ ID NO:13的序列具有约90%同一性的序列。
35. 如权利要求32-34中任一项所述的表达盒,其中编码该RNAi的核酸嵌入该内含子中。
36. 如权利要求35所述的表达盒,其中该内含子包含5' 臂和3' 臂,其中该5' 臂位于编码该RNAi的核酸的5' 并且该3' 臂位于编码该RNAi的核酸的3' 。
37. 如权利要求36所述的表达盒,其中该内含子的5' 臂包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列或与SEQ ID NO:14的序列具有约90%同一性的序列。
38. 如权利要求36或37所述的表达盒,其中该内含子的3' 臂包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列或与SEQ ID NO:15的序列具有约90%同一性的序列。
39. 如权利要求23-38中任一项所述的表达盒,其中该表达盒进一步包含聚腺苷酸化信号。
40. 如权利要求39所述的表达盒,其中该聚腺苷酸化信号是牛生长激素聚腺苷酸化信号、SV40聚腺苷酸化信号或HSV TK pA。
41. 如权利要求40所述的表达盒,其中该聚腺苷酸化信号是最小牛生长激素聚腺苷酸化信号。
42. 如权利要求39-41中任一项所述的表达盒,其中该牛生长激素聚腺苷酸化信号包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列或与SEQ ID NO:16的序列具有约90%同一性的序列。
43. 如权利要求23-42中任一项所述的表达盒,其中该表达盒包含SEQ ID NO:17的核苷酸序列或与SEQ ID NO:17的序列具有约90%同一性的序列。
44. 一种表达盒,其中该表达盒包含经修饰的结蛋白启动子,其中该经修饰的结蛋白启

动子包含一个或多个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。

45. 如权利要求44所述的表达盒,其中该经修饰的结蛋白启动子包含两个增强子元件、和该人结蛋白基因的启动子。

46. 如权利要求44或45所述的表达盒,其中该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。

47. 如权利要求44-46中任一项所述的表达盒,其中该经修饰的结蛋白启动子包含:包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件,和/或包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件。

48. 如权利要求44-47中任一项所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列或与SEQ ID NO:12的核苷酸序列具有约90%同一性的序列。

49. 如权利要求44-48中任一项所述的表达盒,其中该表达盒进一步包含内含子。

50. 如权利要求49所述的表达盒,其中该内含子是兔 β -珠蛋白内含子。

51. 如权利要求49或50所述的表达盒,其中该内含子包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列或与SEQ ID NO:13的序列具有约90%同一性的序列。

52. 如权利要求44-51中任一项所述的表达盒,其中编码转基因的核酸嵌入该内含子中。

53. 如权利要求52所述的表达盒,其中该内含子包含5'臂和3'臂,其中该5'臂位于该编码转基因的核酸的5'并且该3'臂位于该编码转基因的核酸的3'。

54. 如权利要求53所述的表达盒,其中该内含子的5'臂包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列或与SEQ ID NO:14的序列具有约90%同一性的序列。

55. 如权利要求53或54所述的表达盒,其中该内含子的3'臂包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列或与SEQ ID NO:15的序列具有约90%同一性的序列。

56. 如权利要求44-55中任一项所述的表达盒,其中该表达盒进一步包含聚腺苷酸化信号。

57. 如权利要求56所述的表达盒,其中该聚腺苷酸化信号是牛生长激素聚腺苷酸化信号、SV40聚腺苷酸化信号或HSV TK pA。

58. 如权利要求57所述的表达盒,其中该聚腺苷酸化信号是最小牛生长激素聚腺苷酸化信号。

59. 如权利要求56-58中任一项所述的表达盒,其中该牛生长激素聚腺苷酸化信号包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列或与SEQ ID NO:16的序列具有约90%同一性的序列。

60. 如权利要求44-59中任一项所述的表达盒,其中该转基因编码多肽或核酸。

61. 如权利要求44-60中任一项所述的表达盒,其中该转基因编码RNAi。

62. 一种载体,该载体包含如权利要求23-61中任一项所述的表达盒。

63. 如权利要求62所述的载体,其中该表达盒的侧翼是一个或多个填充核酸序列。

64. 如权利要求63所述的载体,其中该一个或多个填充核酸序列源自人Serpina1基因。

65. 如权利要求63或64所述的载体,其中位于该表达盒5'的填充核酸序列源自该人Serpina1基因。

66. 如权利要求63-65中任一项所述的载体,其中位于该表达盒5'的填充序列包含SEQ

ID NO:18的核苷酸序列或与SEQ ID NO:18的序列具有约90%同一性的序列。

67. 如权利要求63-66中任一项所述的载体,其中位于该表达盒3'的填充核酸序列源自该人Serpina1基因。

68. 如权利要求63-67中任一项所述的载体,其中位于该表达盒3'的填充序列包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列或与SEQ ID NO:19的序列具有约90%同一性的序列。

69. 如权利要求62-68中任一项所述的载体,其中该载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。

70. 如权利要求69所述的rAAV载体,其中该表达盒的侧翼是一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。

71. 如权利要求70所述的rAAV载体,其中该表达盒的侧翼是两个AAV ITR。

72. 如权利要求70或71所述的rAAV载体,其中这些AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。

73. 如权利要求70-72中任一项所述的rAAV载体,其中这些AAV ITR是AAV2 ITR。

74. 如权利要求69-73中任一项所述的rAAV载体,其中该rAAV载体包含SEQ ID NO:20的核苷酸序列或与SEQ ID NO:20的序列具有约90%同一性的序列。

75. 如权利要求69-74中任一项所述的rAAV载体,其中该载体是自身互补的rAAV载体。

76. 一种细胞,该细胞包含如权利要求23-61中任一项所述的表达盒、如权利要求62-68中任一项所述的载体、或如权利要求69-75中任一项所述的rAAV载体。

77. 一种病毒颗粒,该病毒颗粒包含如权利要求62-68中任一项所述的载体。

78. 一种重组AAV颗粒,该重组AAV颗粒包含如权利要求69-75中任一项所述的rAAV载体。

79. 如权利要求78所述的rAAV颗粒,其中该AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74N502I、AAVrh74 W505R、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、AAV2-HBKO、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合型、牛AAV、或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

80. 如权利要求78或79所述的rAAV颗粒,其中该ITR和该rAAV病毒颗粒的衣壳源自相同的AAV血清型。

81. 如权利要求78或79所述的rAAV颗粒,其中该ITR和该rAAV病毒颗粒的衣壳源自不同的AAV血清型。

82. 如权利要求78、79或81所述的rAAV颗粒,其中该AAV病毒颗粒包含AAVrh74 N502I血清型衣壳。

83. 如权利要求82所述的rAAV颗粒,其中该ITR是AAV2 ITR并且该rAAV颗粒的衣壳是AAVrh74 N502I血清型衣壳。

84. 如权利要求78、79或81所述的rAAV颗粒,其中该AAV病毒颗粒包含AAVrh74 W505R血清型衣壳。

85. 如权利要求83a所述的rAAV颗粒,其中该ITR是AAV2 ITR并且该rAAV颗粒的衣壳是AAVrh74 W505R血清型衣壳。

86. 一种包含rAAV载体和衣壳的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:
AAV2 ITR,
编码来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,
Byrne结蛋白增强子元件,
Paulin结蛋白增强子元件,
结蛋白启动子,
兔 β -珠蛋白内含子的5'臂,
5' miR155支架序列,
DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列,
miR155末端环序列,
DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列,
3' miR155支架序列,
兔 β -珠蛋白内含子的3'臂,
最小牛生长激素聚腺苷酸化序列,
编码来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,和
AAV2 ITR;
并且其中该衣壳是AAVrh74 N502I衣壳。

87. 一种包含rAAV载体的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:
包含SEQ ID NO:43的多核苷酸序列的AAV2 ITR,
编码包含SEQ ID NO:18的多核苷酸序列的来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核
酸,
包含SEQ ID NO:21的多核苷酸序列的Byrne结蛋白增强子元件,
包含SEQ ID NO:22的多核苷酸序列的Paulin结蛋白增强子元件,
包含SEQ ID NO:23的多核苷酸序列的结蛋白启动子,
包含SEQ ID NO:14的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的5'臂,
包含SEQ ID NO:40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列,
包含SEQ ID NO:4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列,
包含SEQ ID NO:6的多核苷酸序列的miR155末端环序列,
包含SEQ ID NO:5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列,
包含SEQ ID NO:41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列,
包含SEQ ID NO:15的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的3'臂,
包含SEQ ID NO:16的多核苷酸序列的最小牛生长激素聚腺苷酸化序列,
编码包含SEQ ID NO:19的多核苷酸序列的来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的
核酸,和
包含SEQ ID NO:49的多核苷酸序列的AAV2 ITR;
并且其中衣壳是AAVrh74 N502I衣壳。

88. 如权利要求86或87所述的rAAV颗粒,其中该AAVrh74 N502I衣壳包含含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的衣壳蛋白。

89. 一种包含rAAV载体和衣壳的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:

AAV2 ITR, 编码来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸, Byrne结蛋白增强子元件, Paulin结蛋白增强子元件, 结蛋白启动子, 兔 β -珠蛋白内含子的5' 臂, 5' miR155支架序列, DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列, miR155末端环序列, DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列, 3' miR155支架序列, 兔 β -珠蛋白内含子的3' 臂, 最小牛生长激素聚腺苷酸化序列, 编码来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸, 和AAV2 ITR; 并且其中该衣壳是AAVrh74 W505R衣壳。

90. 一种包含rAAV载体的rAAV颗粒, 其中该rAAV载体从5' 至3' 包含以下核酸: 包含SEQ ID NO:43的多核苷酸序列的AAV2 ITR, 编码包含SEQ ID NO:18的多核苷酸序列的来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸, 包含SEQ ID NO:21的多核苷酸序列的Byrne结蛋白增强子元件, 包含SEQ ID NO:22的多核苷酸序列的Paulin结蛋白增强子元件, 包含SEQ ID NO:23的多核苷酸序列的结蛋白启动子, 包含SEQ ID NO:14的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的5' 臂, 包含SEQ ID NO:40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列, 包含SEQ ID NO:4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列, 包含SEQ ID NO:6的多核苷酸序列的miR155末端环序列, 包含SEQ ID NO:5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列, 包含SEQ ID NO:41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列, 包含SEQ ID NO:15的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的3' 臂, 包含SEQ ID NO:16的多核苷酸序列的最小牛生长激素聚腺苷酸化序列, 编码包含SEQ ID NO:19的多核苷酸序列的来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸, 和包含SEQ ID NO:49的多核苷酸序列的AAV2 ITR; 并且其中衣壳是AAVrh74 W505R衣壳。

91. 如权利要求86a或86b所述的rAAV颗粒, 其中该AAVrh74 W505R衣壳包含含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的衣壳蛋白。

92. 一种组合物, 该组合物包含如权利要求77所述的病毒颗粒或如权利要求78-86中任一项所述的rAAV颗粒。

93. 一种药物组合物, 该药物组合物包含如权利要求77所述的病毒颗粒或如权利要求78-86中任一项所述的rAAV颗粒。

94. 如权利要求87或88所述的组合物, 其中该组合物进一步包含药学上可接受的载剂。

95. 一种经修饰的结蛋白启动子, 其中该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。

96. 如权利要求90所述的经修饰的结蛋白启动子, 其中该经修饰的结蛋白启动子包含两个增强子元件、和该人结蛋白基因的启动子。

97. 如权利要求90或91所述的经修饰的结蛋白启动子, 其中该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。

98. 如权利要求90-92中任一项所述的经修饰的结蛋白启动子, 其中该经修饰的结蛋白启动子包含: 包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有约90%同一性的序列的一个或多个增强子元件, 和/或包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22的序列具有约90%同一性的序列的一个或多个增强子元件。

99. 如权利要求90-93中任一项所述的经修饰的结蛋白启动子, 其中该经修饰的结蛋白启动子包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列或与SEQ ID NO:12的序列具有约90%同一性的序列。

100. 一种试剂盒, 该试剂盒包含如权利要求1-22中任一项所述的RNAi。

101. 一种试剂盒, 该试剂盒包含如权利要求77所述的病毒颗粒或如权利要求78-86中

任一项所述的AAV颗粒。

102. 一种试剂盒,该试剂盒包含如权利要求87-89中任一项所述的组合物。

103. 如权利要求95-97中任一项所述的试剂盒,该试剂盒进一步包含使用说明书。

104. 一种用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如权利要求1-22中任一项所述的RNAi。

105. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中的营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)表达的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如权利要求1-22中任一项所述的RNAi。

106. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如权利要求1-22中任一项所述的RNAi。

107. 一种用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如权利要求77所述的病毒颗粒或如权利要求78-86中任一项所述的rAAV颗粒。

108. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中的营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)表达的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如权利要求77所述的病毒颗粒或有效量的如权利要求78-86中任一项所述的rAAV颗粒。

109. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如权利要求77所述的病毒颗粒或有效量的如权利要求78-86中任一项所述的rAAV颗粒。

110. 如权利要求102-104中任一项所述的方法,其中该病毒颗粒或rAAV颗粒的有效量是约 1×10^8 至约 2×10^{13} 个基因组拷贝/mL的剂量。

111. 如权利要求105所述的方法,其中该剂量为约 5×10^{12} 个基因组拷贝/mL。

112. 如权利要求105所述的方法,其中该剂量为约 1×10^{13} 个基因组拷贝/mL。

113. 如权利要求105所述的方法,其中该剂量为约 2×10^{13} 个基因组拷贝/mL。

114. 如权利要求102-104中任一项所述的方法,其中该病毒颗粒或rAAV颗粒的有效量是约 1×10^8 至约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重的剂量。

115. 如权利要求109所述的方法,其中该剂量为约 5×10^{13} 个基因组拷贝/kg体重。

116. 如权利要求109所述的方法,其中该剂量为约 1×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重。

117. 如权利要求109所述的方法,其中该剂量为约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重。

118. 一种用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如权利要求87-89中任一项所述的组合物。

119. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中的营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)表达的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如权利要求87-89中任一项所述的组合物。

120. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如权利要求87-89中任一项所述的组合物。

121. 如权利要求99-101中任一项所述的方法,其中该RNAi与免疫抑制剂组合施用,其中该免疫抑制剂在该RNAi施用之前、同时和/或之后施用。

122. 如权利要求102-104中任一项所述的方法,其中该病毒颗粒或该rAAV颗粒与免疫

抑制剂组合施用,其中该免疫抑制剂在该病毒颗粒或该rAAV颗粒施用之前、同时和/或之后施用。

123. 如权利要求113-115中任一项所述的方法,其中该组合物与免疫抑制剂组合施用,其中该免疫抑制剂在该组合物施用之前、同时和/或之后施用。

DM-1肌强直性营养不良的靶向基因疗法

相关申请的交叉引用

本申请根据35U.S.C. §119(e) 要求2022年4月6日提交的美国临时申请序列号63/328,241和2023年2月3日提交的美国临时申请序列号63/483,075的优先权,这些文献的内容通过援引并入本文。

序列表的提交

[0001] 以下以XML文件提交的内容通过援引以其全文并入本文:计算机可读形式(CRF)的序列表(文件名:737870_SA9-363PC_ST26.xml,创建日期:2023年4月3日,大小:82,900字节)。

技术领域

[0002] 本发明涉及变体RNAi分子。在一些方面,本发明涉及用于治疗肌营养不良的变体RNAi分子。

背景技术

[0003] 在对基因功能的基础研究中,已经证实RNA干扰(RNAi)是基因沉默的有用工具,并且RNAi显示出作为治疗剂阻抑与许多疾病的发展相关的基因的巨大前景。在自然界中,由RNAi进行的基因调控通过称为微RNA(miRNA)的小RNA进行(Ambros, (2004) Nature[自然] 431:350-355;Krol等人, (2010) Nat. Rev. Genet. [自然综述:遗传学] 11:597-610)。微RNA已经成为多种细胞过程的有力调控剂,并且当由病毒载体递送时,人工miRNA被连续表达,从而导致靶基因的稳健且持续的阻抑。对miRNA加工中涉及的机制的阐明已经允许科学家利用内源性细胞RNAi机制并使用人工miRNA来指导靶基因产物的降解(参见,例如US PG Pub. [授权前公开]2014/0163214和Davidson等人, (2012) Cell[细胞] 150:873-875)。

[0004] 肌强直性营养不良1型(DM1)是由DMPK基因座中CTG重复序列(>50)的扩增引起的单基因、常染色体显性的进行性疾病。具有重复序列的DMPK转录成mRNA,该mRNA形成发夹并结合RNA结合蛋白,从而使这些结合蛋白无法发挥其正常功能。这导致核灶的出现、mRNA的错误剪接并且最终导致肌强直。DM1主要影响骨骼肌、心肌和平滑肌,从而引起显著的身体、认知和行为损害和残疾。目前尚无批准用于DM1的疗法。因此,对于治疗DM1的疗法存在高度未满足的医学需求。

[0005] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请和出版物,均通过援引以其全文并入。

发明内容

[0006] 在一些方面,本发明提供了包含第一链和第二链的RNAi,其中a)该第一链和该第二链形成双链体;b)该第一链包含指导区,其中该指导区包含具有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)或具有与SEQ ID NO:1的序列具有约90%同一性的序列的核酸;并且c)第二链包含非指导区。在一些实施例中,该非指导区包含具有序列5' ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)或具有与SEQ ID NO:2的序列具有约90%同一

性的序列的核酸。在一些实施例中,该第一链包含具有SEQ ID NO:1的序列的核酸,并且该非指导区包含具有SEQ ID NO:2的序列的核酸。在一些实施例中,该第一链和该第二链借助于能够形成环结构的RNA接头连接。在一些实施例中,该RNA接头包含约4至约50个核苷酸。在一些实施例中,该环结构包含约4至约20个核苷酸。在一些实施例中,该环结构包含具有SEQ ID NO:3的序列或具有与SEQ ID NO:3的序列具有约90%同一性的序列的核酸序列。在一些实施例中,该RNAi从5'至3'包含该第二链、该RNA接头和该第一链。在一些实施例中,该RNAi从5'至3'包含该第一链、该RNA接头和该第二链。在一些实施例中,该RNAi包含具有SEQ ID NO:7的序列或具有与SEQ ID NO:7的序列具有约90%同一性的序列的核酸。在一些实施例中,该RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)或小发夹RNA(shRNA)。

[0007] 在本发明的一些实施例中,该RNAi进一步包含支架。在一些实施例中,该支架包含SEQ ID No:11的核酸的全部或一部分。在一些实施例中,该miRNA嵌入该支架内。在一些实施例中,该支架具有5'臂和3'臂,其中该5'臂位于编码该RNAi的核酸的5',其中该3'臂位于编码该RNAi的核酸的3'。在一些实施例中,该支架是miR-155支架。在一些实施例中,该miR-155支架包含位于该RNAi的5'的具有SEQ ID NO:9的序列或与SEQ ID NO:9的序列具有约90%同一性的序列的核酸。在一些实施例中,该miR-155支架包含位于该RNAi的3'的具有SEQ ID NO:10的序列或与SEQ ID NO:10的序列具有约90%同一性的序列的核酸。

[0008] 在本发明的一些实施例中,该RNAi靶向编码与肌强直性营养不良1型(DM1)相关的多肽的RNA。在一些实施例中,该多肽是营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)。在一些实施例中,该DMPK包含与DM1相关的突变。在一些实施例中,编码DMPK的基因包含5个或更多个CTG三核苷酸重复序列。

[0009] 在一些方面,本发明提供了一种表达盒,该表达盒包含编码本文所述的任何RNAi的核酸。在一些实施例中,编码该RNAi的核酸与启动子可操作地连接。在一些实施例中,该启动子是肌肉特异性启动子。在一些实施例中,该启动子是结蛋白启动子或其变体。在一些实施例中,该结蛋白启动子包含一个或多个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。在一些实施例中,该结蛋白启动子包含两个增强子元件、和该人结蛋白基因的启动子。在一些实施例中,该结蛋白启动子包含一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。在一些实施例中,该结蛋白启动子包含:包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件,和/或包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件。在一些实施例中,该结蛋白启动子包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列或与SEQ ID NO:12的核苷酸序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,该表达盒进一步包含内含子。在一些实施例中,该内含子是兔 β -珠蛋白内含子。在一些实施例中,该内含子包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列或与SEQ ID NO:13的序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,编码该RNAi的核酸嵌入该内含子中。在一些实施例中,该内含子包含5'臂和3'臂,其中该5'臂位于编码该RNAi的核酸的5'并且该3'臂位于编码该RNAi的核酸的3'。在一些实施例中,该内含子的5'臂包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列或与SEQ ID NO:14的序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,该内含子的3'臂包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列或与SEQ ID NO:15的序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,该表达盒进一步包含聚腺苷酸化信号。在一些实施例中,该聚腺苷酸化信号是牛生长激素聚腺苷酸化信号、SV40聚

腺苷酸化信号或HSV TK pA。在一些实施例中,该聚腺苷酸化信号是最小牛生长激素聚腺苷酸化信号。在一些实施例中,该牛生长激素聚腺苷酸化信号包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列或与SEQ ID NO:16的序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,该表达盒包含SEQ ID NO:17的核苷酸序列或与SEQ ID NO:17的序列具有约90%同一性的序列。

[0010] 在一些方面,本发明提供了一种表达盒,其中该表达盒包含经修饰的结蛋白启动子,其中该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。在一些实施例中,该经修饰的结蛋白启动子包含两个增强子元件、和该人结蛋白基因的启动子。在一些实施例中,该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。在一些实施例中,该经修饰的结蛋白启动子包含:包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件,和/或包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件。在一些实施例中,该结蛋白启动子包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列或与SEQ ID NO:12的核苷酸序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,该表达盒进一步包含内含子。在一些实施例中,该内含子是兔 β -珠蛋白内含子。在一些实施例中,该内含子包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列或与SEQ ID NO:13的序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,编码转基因的核酸嵌入该内含子中。在一些实施例中,该内含子包含5'臂和3'臂,其中该5'臂位于该编码转基因的核酸的5'并且该3'臂位于该编码转基因的核酸的3'。在一些实施例中,该内含子的5'臂包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列或与SEQ ID NO:14的序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,该内含子的3'臂包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列或与SEQ ID NO:15的序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,该表达盒进一步包含聚腺苷酸化信号。在一些实施例中,该聚腺苷酸化信号是牛生长激素聚腺苷酸化信号、SV40聚腺苷酸化信号或HSV TK pA。在一些实施例中,该聚腺苷酸化信号是最小牛生长激素聚腺苷酸化信号。在一些实施例中,该牛生长激素聚腺苷酸化信号包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列或与SEQ ID NO:16的序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,该转基因编码多肽或核酸。在一些实施例中,该转基因编码RNAi。

[0011] 在一些方面,本发明提供了包含本文所述的任何表达盒的载体。在一些实施例中,该表达盒的侧翼是一个或多个填充(stuffer)核酸序列。在一些实施例中,该一个或多个填充核酸序列源自人Serpina1基因。在一些实施例中,位于该表达盒5'的填充核酸序列源自该人Serpina1基因。在一些实施例中,位于该表达盒5'的填充序列包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列或与SEQ ID NO:18的序列具有约90%同一性的序列。在一些实施例中,位于该表达盒3'的填充核酸序列源自该人Serpina1基因。在一些实施例中,位于该表达盒3'的填充序列包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列或与SEQ ID NO:19的序列具有约90%同一性的序列。

[0012] 在本发明的一些实施例中,该载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。在一些实施例中,该表达盒的侧翼是一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。在一些实施例中,该表达盒的侧翼是两个AAV ITR。在一些实施例中,这些AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。在一些实施例中,这些AAV ITR是AAV2 ITR。在一些实施例中,该rAAV载体包含SEQ ID NO:20的核苷酸序列或与SEQ ID NO:20的序列具有约

90%同一性的序列。在一些实施例中,该载体是自身互补的rAAV载体。

[0013] 在一些实施例中,本发明提供了包含本文所述的任何表达盒、本文所述的任何载体或本文所述的任何rAAV载体的细胞。

[0014] 在一些方面,本发明提供了包含本文所述的任何载体的病毒颗粒。在一些方面,本发明提供了包含本文所述的任何rAAV载体的重组AAV颗粒。在一些实施例中,该AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74 N502I、AAVrh74 W505R、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2N708A、AAV V708K、AAV2-HBKO、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合型、牛AAV、或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施例中,ITR和该rAAV病毒颗粒的衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施例中,ITR和该rAAV病毒颗粒的衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施例中,该AAV病毒颗粒包含AAVrh74 N502I血清型衣壳。在一些实施例中,该ITR是AAV2 ITR并且该rAAV颗粒的衣壳是AAVrh74 N502I血清型衣壳。在一些实施例中,该AAV病毒颗粒包含AAVrh74 W505R血清型衣壳。在一些实施例中,该ITR是AAV2 ITR并且该rAAV颗粒的衣壳是AAVrh74W505R血清型衣壳。在一些实施例中,本发明提供了一种包含rAAV载体和衣壳的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:AAV2 ITR,编码来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,Byrne结蛋白增强子元件,Paulin结蛋白增强子元件,结蛋白启动子,兔 β -珠蛋白内含子的5'臂,5'miR155支架序列,DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列,miR155末端环序列,DMPK²⁰⁴miRNA乘客序列,3'miR155支架序列,兔 β -珠蛋白内含子的3'臂,最小牛生长激素聚腺苷酸化序列,编码来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,和AAV2 ITR;并且其中衣壳是AAVrh74 N502I衣壳。在一些实施例中,本发明提供了一种包含rAAV载体的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:包含SEQ ID NO:43的多核苷酸序列的AAV2 ITR,编码包含SEQ ID NO:18的多核苷酸序列的来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,包含SEQ ID NO:21的多核苷酸序列的Byrne结蛋白增强子元件,包含SEQ ID NO:22的多核苷酸序列的Paulin结蛋白增强子元件,包含SEQ ID NO:23的多核苷酸序列的结蛋白启动子,包含SEQ ID NO:14的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的5'臂,包含SEQ ID NO:40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列,包含SEQ ID NO:4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列,包含SEQ ID NO:6的多核苷酸序列的miR155末端环序列,包含SEQ ID NO:5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列,包含SEQ ID NO:41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列,包含SEQ ID NO:15的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的3'臂,包含SEQ ID NO:16的多核苷酸序列的最小牛生长激素聚腺苷酸化序列,编码包含SEQ ID NO:19的多核苷酸序列的来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,和包含SEQ ID NO:49的多核苷酸序列的AAV2 ITR;并且其中衣壳是AAVrh74 N502I衣壳。在一些实施例中,该AAVrh74 N502I衣壳包含含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的衣壳蛋白。

[0015] 在一些实施例中,本发明提供了一种包含rAAV载体和衣壳的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:AAV2 ITR,编码来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,Byrne结蛋白增强子元件,Paulin结蛋白增强子元件,结蛋白启动子,兔 β -珠蛋白内含子的5'臂,5'miR155支架序列,DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列,miR155末端环序列,DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列,3'miR155支架序列,兔 β -珠蛋白内含子的3'臂,最小牛生长激素聚腺苷酸化序

列,编码来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,和AAV2 ITR;并且其中衣壳是AAVrh74 W505R衣壳。在一些实施例中,本发明提供了一种包含rAAV载体的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:包含SEQ ID NO:43的多核苷酸序列的AAV2 ITR,编码包含SEQ ID NO:18的多核苷酸序列的来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,包含SEQ ID NO:21的多核苷酸序列的Byrne结蛋白增强子元件,包含SEQ ID NO:22的多核苷酸序列的Paulin结蛋白增强子元件,包含SEQ ID NO:23的多核苷酸序列的结蛋白启动子,包含SEQ ID NO:14的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的5'臂,包含SEQ ID NO:40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列,包含SEQ ID NO:4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列,包含SEQ ID NO:6的多核苷酸序列的miR155末端环序列,包含SEQ ID NO:5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列,包含SEQ ID NO:41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列,包含SEQ ID NO:15的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的3'臂,包含SEQ ID NO:16的多核苷酸序列的最小牛生长激素聚腺苷酸化序列,编码包含SEQ ID NO:19的多核苷酸序列的来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,和包含SEQ ID NO:49的多核苷酸序列的AAV2 ITR;并且其中衣壳是AAVrh74 W505R衣壳。在一些实施例中,该AAVrh74 W505R衣壳包含含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的衣壳蛋白。

[0016] 在一些方面,本发明提供了包含本文所述的任何病毒颗粒或rAAV颗粒的组合物。在一些实施例中,本发明提供了包含本文所述的任何病毒颗粒或rAAV颗粒的药物组合物。在一些实施例中,该组合物进一步包含药学上可接受的载剂。

[0017] 在一些方面,本发明提供了一种经修饰的结蛋白启动子(例如,用于在肌细胞中表达转基因),其中该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。在一些实施例中,该经修饰的结蛋白启动子包含两个增强子元件、和该人结蛋白基因的启动子。在一些实施例中,该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。在一些实施例中,该经修饰的结蛋白启动子包含:包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有约90%同一性的序列的一个或多个增强子元件,和/或包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22的序列具有约90%同一性的序列的一个或多个增强子元件。在一些实施例中,该经修饰的结蛋白启动子包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列或与SEQ ID NO:12的序列具有约90%同一性的序列。

[0018] 在一些方面,本发明提供了试剂盒,这些试剂盒包含如本文所述的RNAi、如本文所述的病毒颗粒、如本文所述的AAV颗粒或如本文所述的组合物中的一种或多种。在一些实施例中,该试剂盒进一步包含使用说明书。

[0019] 在一些方面,本发明提供了用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的方法,这些方法包括向该哺乳动物施用有效量的本文所述的任何RNAi。在一些方面,本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中的营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)表达的方法,这些方法包括向该哺乳动物施用有效量的本文所述的任何RNAi。在一些方面,本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的方法,这些方法包括向该哺乳动物施用有效量的本文所述的任何RNAi。

[0020] 在一些方面,本发明提供了用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的方法,这些方法包括向该哺乳动物施用有效量的如本文所述的任何病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)。在一些方面,本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中的营

养不良性肌强直蛋白激酶 (DMPK) 表达的方法, 这些方法包括向该哺乳动物施用有效量的如本文所述的任何病毒颗粒 (例如, rAAV颗粒)。在一些方面, 本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的方法, 这些方法包括向该哺乳动物施用有效量的如本文所述的任何病毒颗粒 (例如, rAAV颗粒)。

[0021] 在本发明的一些实施例中, 病毒颗粒 (例如, rAAV颗粒) 的有效量是约 1×10^8 至约 2×10^{13} 个基因组拷贝/mL的剂量。在本发明的一些实施例中, 该剂量为约 5×10^{12} 个基因组拷贝/mL。在本发明的一些实施例中, 该剂量为约 1×10^{13} 个基因组拷贝/mL。在本发明的一些实施例中, 该剂量为约 2×10^{13} 个基因组拷贝/mL。

[0022] 在本发明的一些实施例中, 病毒颗粒 (例如, rAAV颗粒) 的有效量是约 1×10^8 至约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重的剂量。在本发明的一些实施例中, 该剂量为约 5×10^{13} 个基因组拷贝/kg体重。在本发明的一些实施例中, 该剂量为约 1×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重。在本发明的一些实施例中, 该剂量为约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重。

[0023] 在一些方面, 本发明提供了用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型 (DM1) 的方法, 这些方法包括向该哺乳动物施用有效量的如本文所述的任何组合物。在一些方面, 本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中的营养不良性肌强直蛋白激酶 (DMPK) 表达的方法, 这些方法包括向该哺乳动物施用有效量的如本文所述的任何组合物。在一些方面, 本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的方法, 这些方法包括向该哺乳动物施用有效量的如本文所述的任何组合物。

[0024] 在本发明的一些实施例中, 该RNAi与免疫抑制剂组合施用, 其中该免疫抑制剂在该RNAi施用之前、同时和/或之后施用。在一些实施例中, 该病毒颗粒或该rAAV颗粒与免疫抑制剂组合施用, 其中该免疫抑制剂在该病毒颗粒或该rAAV颗粒施用之前、同时和/或之后施用。在一些实施例中, 该组合物与免疫抑制剂组合施用, 其中该免疫抑制剂在该组合物施用之前、同时和/或之后施用。

附图说明

[0025] 通过结合附图参考以下描述可以理解本申请。

[0026] 图1A描绘了nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴基因盒的序列示意图。杂合肌肉启动子位于miR155-amiR-DMPK²⁰⁴序列的上游。miRNA的下游是牛生长激素聚腺苷酸化序列 (minBGHpA)。来自A1AT内含子的填充序列侧接该盒的任一侧。所有这些的侧翼是两个AAV2 ITR, 从而产生3739bp的组合载体基因组大小。

[0027] 图1B描绘了用于克隆nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴基因盒的ITR质粒。ITR质粒含有侧翼是AAV2 5'和3' ITR的A1AT填充序列。A1AT填充序列包含用于克隆的NcoI和SphI限制性位点。

[0028] 图1C描绘了在HEK 293细胞中进行小规模包装测定以确认DC969-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴质粒的包装的结果。使用AAV rep/cap质粒进行小规模生产。y轴示出与标准EGFP质粒基因盒 (CD627-CBA-GFP) 相比, 每个HEK 293细胞产生的载体的量。DRP: DNA酶抗性颗粒。

[0029] 图2A-图2C描绘了尾静脉注射后对DMSXL小鼠中由AAV即nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴ (amiR155-204) 表达盒对DMPK敲低的评价。图2A示出了通过定量不同器官中的转基

因拷贝数评价的AAV的转导效率和生物分布。qPCR结果表示为AAV拷贝数/细胞核的平均比率。图2B示出了经转导组织中amiR-DMPK²⁰⁴的水平。将微RNA输入水平针对U6小核RNA归一化,并相对于经过BSS(平衡盐溶液)处理的细胞设置。图2C示出了经转导组织中DMPK的沉默。通过qRT-PCR测定总DMPK。将mRNA输入针对tata盒结合蛋白(TBP)归一化并相对于经过BSS处理的细胞设置。虚线指示相对于TBP表达的50% DMPK表达。对于图2A-图2C,使用配对学生T检验评价数据:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,且****p<0.0001。n=13(BSS),n=12(amiR155-204)。

[0030] 图3A-图3B描绘了AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴对人DMPK的阻抑。将DMSXL小鼠以剂量依赖性方式全身注射AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴。8周后对小鼠实施安乐死,收获器官,并测量amiR-DMPK²⁰⁴和DMPK转录物水平。图3A描绘了各种组织中针对U6归一化的amiR-DMPK²⁰⁴的丰度。图3B描绘了各种组织中针对mTBP归一化的hDMPK转录物的丰度。使用ANOVA,多重比较检验对数据进行评价:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,且****p<0.0001。(n=wt-10,BSS-7,低剂量5,中剂量13和高剂量7)。

[0031] 图4描绘了用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴全身处理后DMSXL小鼠中剪接异常的校正。处理8周后,使用RT-PCR评估腓肠肌中LDB3中选择性外显子11的剪接。使用ANOVA,多重比较检验对数据进行评价:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,且****p<0.0001。(n=wt-10,BSS-7,低剂量5,中剂量13和高剂量7)。

[0032] 图5A和图5B示出了用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴以剂量依赖性方式处理的雌性DMSXL小鼠的存活率和体重增加。图5A示出了Kaplan-Meier存活曲线,显示与低剂量或BSS处理的动物相比,用中剂量处理8周后的存活率提高。图5B示出了与BSS处理的或低剂量处理的动物相比,在用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴处理的DMSXL动物中观察到的体重提高。

[0033] 图6描绘了用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴以剂量依赖性方式全身处理DMSXL DM1小鼠模型后DM1疾病的电生理特征的逆转。使用ANOVA,多重比较检验对数据进行评价:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,且****p<0.0001。(n=wt-10,BSS-7,低剂量5,中剂量13和高剂量7)。

[0034] 图7A示出了实验方案的示意图。在第-1天收集血液(●)以再次确认中和抗体。在第0天以1e13 vg/kg的剂量向NHP施用编码GFP报告因子的AAV,并在D21进行尸检并收集多个组织以评价生物分布。图7B-图7E示出了来自注射AAV9、AAV rh74和AAV rh74 N502I(rh74M)的动物的各种组织的GFP表达的定量。条形图表示胫骨前肌(TA;图7B)、股二头肌(图7C)、四头肌(图7D)、心脏(图7E)和肝脏(图7F)中通过ELISA测量的GFP量。使用ANOVA,多重比较检验对数据进行评价:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,且****p<0.0001。

[0035] 图8A和图8B描绘了AAV rh74 N502InDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴对人DMPK的阻抑。将DMSXL小鼠以剂量依赖性方式全身注射AAV rh74 N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴。8周后对小鼠实施安乐死,收获器官,并测量amiR-DMPK²⁰⁴和DMPK转录物水平。图8A描绘了各种组织中针对U6归一化的amiR-DMPK²⁰⁴的丰度。图8B描绘了各种组织中针对mTBP归一化的hDMPK转录物的丰度。使用ANOVA,多重比较检验对数据进行评价:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,且****p<0.0001。

[0036] 图9示出了AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴对内源性DMPK的沉默。通过

qRT-PCR对从iPSC分化的人DM1心肌细胞提取的RNA测定总DMPK水平。这些心肌细胞用AAVrh74N502InDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴转导。将mRNA输入水平针对TBP mRNA归一化。miRCTL3用作阴性对照并设为1。配对学生T检验:**p<0.01。

[0037] 图10是显示amiR-DMPK²⁰⁴处理的HEK293细胞中全基因组基因表达变化的火山图(Benjamini Hochberg FDR<1%)。表格示出了前4个差异性表达(DE)基因,其中3'UTR种子互补,FDR<1%和FDR<5%。

[0038] 图11示出了多个序列中amiRDMPK²⁰⁴靶序列的保守性。人靶标是SEQ ID NO:28,猕猴靶标是SEQ ID NO:29,小鼠靶标是SEQ ID NO:30,大鼠靶标是SEQ ID NO:31,并且狗靶标是SEQ ID NO:32。

[0039] 图12说明在所示处理组中病毒基因组拷贝数/细胞在多种组织中的生物分布。

[0040] 图13示出了在所示处理组中在不同肌肉组织中的剂量依赖性amiR-DMPK表达。

[0041] 图14示出了每个所示处理组的不同肌肉中在处理后的DMPK表达水平。

具体实施方式

[0042] 在一些方面,本发明提供了包含第一链和第二链的RNAi,其中a)该第一链和该第二链形成双链体;b)该第一链包含指导区,其中该指导区包含具有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)或具有与SEQ ID NO:1的序列具有约90%同一性的序列的核酸;并且c)该第二链包含非指导区,其中该非指导区包含具有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)或具有与SEQ ID NO:2的序列具有约90%同一性的序列的核酸。在一些实施例中,本发明提供了用于表达编码RNAi的核酸的表达盒;例如,用于在哺乳动物的肌肉中表达RNAi。在一些实施例中,该表达盒在rAAV载体中。

[0043] 在一些方面,本发明提供了通过向哺乳动物施用本发明的RNAi来治疗该哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM-1)的方法。在一些实施例中,施用的RNAi抑制哺乳动物中营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)的表达;从而改善哺乳动物的DM-1。

一般技术

[0044] 本文描述或参考的技术和程序通常被本领域技术人员充分理解并且通常使用常规方法加以采用,例如以下文献中描述的广泛利用的方法:Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册](Sambrook等人,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],Cold Spring Harbor,N.Y.[纽约冷泉港],2012);Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学实验操作手册](F.M.Ausubel等人编辑,2003);Methods in Enzymology[酶学方法]系列(Academic Press,Inc.[学术出版社公司]);PCR 2:A Practical Approach[PCR 2:实用方法](M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编辑,1995);Antibodies[抗体],ALaboratory Manual[实验室手册](Harlow和Lane编辑,1988);Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique and Specialized Applications[动物细胞培养:基本技术和专门应用手册](R.I.Freshney,第6版,J.Wiley and Sons[约翰·威利父子出版公司],2010);Oligonucleotide Synthesis[寡核苷酸合成](M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology[分子生物学方法],Humana Press[胡马纳出版社];Cell Biology:A Laboratory Notebook[细胞生物学:实验室笔记本](J.E.Cellis编辑,Academic Press[学

术出版社],1998);Introduction to Cell and Tissue Culture[细胞和组织培养的介绍](J.P.Mather和P.E.Roberts,Plenum Press[普伦姆出版社],1998);Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures[细胞和组织培养:实验室程序](A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑,J.Wiley and Sons[约翰·威利父子出版公司],1993-8);Handbook of Experimental Immunology[实验免疫学手册](D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑,1996);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells[用于哺乳动物细胞的基因转移载体](J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction[PCR:聚合酶链式反应](Mullis等人编辑,1994);Current Protocols in Immunology[免疫学实验室指南](J.E.Coligan等人编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology[精编分子生物学实验指南](Ausubel等人编辑,J.Wiley and Sons[约翰·威利父子出版公司],2002);Immunobiology[免疫生物学](C.A.Janeway等人,2004);Antibodies[抗体](P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach[抗体:实用方法](D.Catty编辑,IRL Press[IRL出版社],1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach[单克隆抗体:实用方法](P.Shepherd和C.Dean编辑,Oxford University Press[牛津大学出版社],2000);Using Antibodies:ALaboratory Manual[使用抗体:实验室手册](E.Harlow和D.Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],1999);The Antibodies[抗体](M.Zanetti和J.D.Capra编辑,Harwood Academic Publishers[哈伍德学术出版社],1995);和Cancer:Principles and Practice of Oncology[癌症:肿瘤学原理和实践](V.T.DeVita等人编辑,J.B.Lippincott Company[利宾考特公司],2011)。

定义

[0045] 如本文所用的“载体”是指包含要在体外或体内递送到宿主细胞中的核酸的重组质粒或病毒。

[0046] 如本文所用的术语“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合形式。因此,该术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂种,或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、经化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。多核苷酸的主链可以包含糖和磷酸基团(如通常可以在RNA或DNA中发现的),或经修饰的或经取代的糖或磷酸基团。替代性地,多核苷酸的主链可以包含合成亚基如氨基磷酸酯的聚合物,因此可以是寡脱氧核苷氨基磷酸酯(P-NH₂)或混合的氨基磷酸酯-磷酸二酯寡聚物。另外,双链多核苷酸可以通过以下方式从化学合成的单链多核苷酸产物获得:通过合成互补链并在适当条件下使链退火,或通过使用DNA聚合酶用适当引物从头合成互补链。

[0047] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物,并且不限于最小长度。此类氨基酸残基的聚合物可以含有天然或非天然氨基酸残基,并且包括但不限于氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。全长蛋白质及其片段都涵盖在该定义中。这些术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等。此外,为了本发明的目的,“多肽”是指包括对天然序列的修饰,诸如缺失、添加和取代(通常在性质上是保守的)的蛋白质,只要该蛋白质维持所期望的活性。这些修饰可以是有意的,如通过定点诱变,或者可以是偶然的,诸如通过产生蛋白质的宿主的突变或由于PCR扩增的错误产生。

[0048] “重组病毒载体”是指包含一个或多个异源序列(即,非病毒来源的核酸序列)的重组多核苷酸载体。在重组AAV载体的情况下,重组核酸的侧翼是至少一个,并且在一些实施例中是两个反向末端重复序列(ITR)。

[0049] “重组AAV载体(rAAV载体)”是指包含一个或多个异源序列(即,非AAV来源的核酸序列)的多核苷酸载体,这些异源序列的侧翼是至少一个,并且在一些实施例中是两个AAV反向末端重复序列(ITR)。当存在于已被合适的辅助病毒感染(或正在表达合适的辅助功能)并且正在表达AAV rep和cap基因产物(即,AAV Rep和Cap蛋白)的宿主细胞中时,此类rAAV载体可以复制并包装到感染性病毒颗粒中。当rAAV载体掺入较大的多核苷酸中(例如,染色体中或另一种载体诸如用于克隆或转染的质粒中)时,则rAAV载体可称为“前载体”,其可以在AAV包装功能和合适的辅助功能的存在下通过复制和衣壳化得以“挽救”。rAAV载体可以是多种形式中的任一种,包括但不限于质粒、线性人工染色体、与脂质复合、包封在脂质体中以及衣壳化在病毒颗粒,特别是AAV颗粒中。rAAV载体可以包装到AAV病毒衣壳中以产生“重组腺相关病毒颗粒(rAAV颗粒)”。

[0050] “异源”意指源自与它进行比较或将它引入或掺入其中的实体的其余部分基因型上不同的实体。例如,通过基因工程技术引入不同细胞类型中的多核苷酸是异源多核苷酸(并且当表达时,可以编码异源多肽)。类似地,并入病毒载体中的细胞序列(例如,基因或其部分)相对于载体是异源核苷酸序列。

[0051] 术语“转基因”是指引入细胞中并且能够转录成RNA并任选地在适当的条件下翻译和/或表达的多核苷酸。在一些方面,它赋予其被引入的细胞期望的性质,或以其他方式产生期望的治疗或诊断结果。在另一个方面,它可以转录成介导RNA干扰的分子,诸如miRNA、siRNA或shRNA。

[0052] 如关于病毒滴度使用的术语“基因组颗粒(gp)”、“基因组当量”或“基因组拷贝(gc)”是指含有重组AAV DNA基因组的病毒体的数目,而与感染性或功能性无关。特定载体制剂中基因组颗粒的数目可以通过诸如本文实例中或例如Clark等人(1999) Hum. Gene Ther. [人类基因疗法], 10:1031-1039; Veldwijk等人(2002) Mol. Ther. [分子疗法], 6:272-278中描述的程序测量。

[0053] 如本文所用的术语“载体基因组(vg)”可以指包含载体(例如,病毒载体)的一组多核苷酸序列的一种或多种多核苷酸。载体基因组可以衣壳化在病毒颗粒中。根据特定病毒载体,载体基因组可以包含单链DNA、双链DNA或单链RNA或双链RNA。载体基因组可以包括与特定病毒载体相关的内源序列和/或通过重组技术插入特定病毒载体中的任何异源序列。例如,重组AAV载体基因组可以包括在启动子、填充序列、目标序列(例如,RNAi)和聚腺苷酸化序列侧翼的至少一个ITR序列。完整的载体基因组可以包括载体的一组多核苷酸序列。在一些实施例中,病毒载体的核酸滴度可以按照vg/mL测量。适于测量这种滴度的方法是本领域已知的(例如,定量PCR)。

[0054] 如本文所用,术语“抑制”可以指阻断、减少、消除或以其他方式拮抗特定靶标的存在或活性的作用。抑制可以指部分抑制或完全抑制。例如,抑制基因的表达可以指会导致该基因表达的阻滞、减少、消除或任何其他拮抗的任何作用,包括mRNA丰度的降低(例如,使mRNA转录沉默)、mRNA的降解、mRNA翻译的抑制等。在一些实施例中,抑制DMPK的表达可以指DMPK表达的阻滞、减少、消除或任何其他拮抗,包括DMPK mRNA丰度的降低(例如,使DMPK

mRNA转录沉默)、DMPK mRNA的降解、DMPK mRNA翻译的抑制等。例如,抑制细胞中蛋白质的积聚可以指会导致该蛋白质表达的阻滞、减少、消除或其他拮抗的任何作用,包括mRNA丰度的降低(例如,使mRNA转录沉默)、mRNA的降解、mRNA翻译的抑制、蛋白质的降解等。在一些实施例中,抑制细胞中DMPK蛋白质的积聚是指细胞中DMPK蛋白质表达的阻滞、减少、消除或其他拮抗,包括DMPK mRNA丰度的降低(例如,使DMPK mRNA转录沉默)、DMPK mRNA的降解、DMPK mRNA翻译的抑制、DMPK蛋白质的降解等。

[0055] 如关于病毒滴度使用的术语“感染单位(iu)”、“感染性颗粒”或“复制单位”是指通过感染中心测定(也称为复制中心测定),如例如McLaughlin等人(1988)J.Virol.[病毒学杂志],62:1963-1973中所述测量的感染性和可复制重组AAV载体颗粒的数目。

[0056] 如关于病毒滴度使用的术语“转导单位(tu)”是指引起功能性转基因产物产生的感染性重组AAV载体颗粒的数目,如诸如本文实例中或例如Xiao等人(1997)Exp.Neurobiol.[实验神经生物学],144:113-124;或Fisher等人(1996)J.Virol.[病毒学杂志],70:520-532中描述的功能性测定中所测量的。

[0057] “反向末端重复”或“ITR”序列是本领域众所周知的术语,是指在病毒基因组末端发现的处于相反取向的相对短的序列。

[0058] “AAV反向末端重复(ITR)”序列是本领域众所周知的术语,是存在于天然单链AAV基因组的两个末端的大约145个核苷酸的序列。ITR最外面的125个核苷酸可以以两个选择性取向中的任一取向存在,导致不同AAV基因组之间和单个AAV基因组的两个末端之间的异质性。最外面的125个核苷酸还含有几个较短的自身互补区(命名为A区、A'区、B区、B'区、C区、C'区和D区),允许在ITR的该部分内发生链内碱基配对。

[0059] “末端解析序列”或“trs”是AAV ITR的D区中在病毒DNA复制期间被AAV rep蛋白切割的序列。突变体末端解析序列是耐AAV rep蛋白切割的。

[0060] “AAV辅助功能”是指允许AAV被宿主细胞复制和包装的功能。AAV辅助功能可以按多种形式中的任一种提供,包括但不限于协助AAV复制和包装的辅助病毒或辅助病毒基因。其他AAV辅助功能是本领域已知的,例如基因毒性剂。

[0061] AAV的“辅助病毒”是指允许AAV(其是缺陷型细小病毒)被宿主细胞复制和包装的病毒。辅助病毒提供允许AAV复制的“辅助功能”。已经鉴定了许多此类辅助病毒,包括腺病毒、疱疹病毒和痘病毒诸如牛痘和杆状病毒。腺病毒涵盖许多不同的亚群,但是C亚群的5型腺病毒(Ad5)是最常用的。人、非人哺乳动物和禽类来源的许多腺病毒是已知的并且可从诸如ATCC等保藏机构获得。也可从诸如ATCC等保藏机构获得的疱疹家族的病毒包括例如单纯疱疹病毒(HSV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)和假狂犬病病毒(PRV)。用于AAV复制的腺病毒辅助功能的实例包括E1A功能、E1B功能、E2A功能、VA功能和E4orf6功能。可从保藏机构获得的杆状病毒包括苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)。

[0062] 如果感染性AAV颗粒与感染性辅助病毒颗粒的比率为至少约102:1、至少约104:1、至少约106:1或至少约108:1或更大,则称rAAV制剂“基本上不含”辅助病毒。在一些实施例中,制剂也不含等量的辅助病毒蛋白(即,如果上述辅助病毒颗粒杂质以被破坏的形式存在,则由于此类水平的辅助病毒而存在的蛋白)。病毒和/或细胞蛋白质污染通常可以在SDS凝胶上作为考马斯染色条带的存在(例如,除了对应于AAV衣壳蛋白VP1、VP2和VP3的那些以

外的条带的出现)而被观察到。

[0063] 关于参考多肽或核酸序列的“百分比(%)序列同一性”被定义为在比对序列并引入空位(如果必要)以获得最大百分比的序列同一性之后,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分时,候选序列中的氨基酸残基或核苷酸与参考多肽或核酸序列中的氨基酸残基或核苷酸相同的百分比。用于测定氨基酸或核酸序列百分比同一性目的的比对可以本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用公开可用的计算机软件程序,例如,在 *Current Protocols in Molecular Biology* [分子生物学实验操作手册] (Ausubel等人编辑,1987),增刊30,部分7.7.18,表7.7.1中描述的那些,并且包括BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。优选的比对程序是ALIGN Plus (科学教育软件公司 (Scientific and Educational Software),宾夕法尼亚州 (Pennsylvania))。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。出于本文的目的,给定氨基酸序列A与、和或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(可以替代性地表述为给定氨基酸序列A与、和或针对给定氨基酸序列B具有或包含一定的%氨基酸序列同一性)计算如下:100乘以分数X/Y,其中X是通过序列比对程序在程序对A和B的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等时,A与B的%氨基酸序列同一性将与B与A的%氨基酸序列同一性不相等。出于本文的目的,给定核酸序列C与、和或针对给定核酸序列D的%核酸序列同一性(可以替代性地表述为给定核酸序列C与、和或针对给定核酸序列D具有或包含一定的%核酸序列同一性)计算如下:100乘以分数W/Z,其中W是通过序列比对程序在该程序对C和D的比对中评分为相同匹配的核苷酸的数目,并且其中Z是D中核苷酸的总数。应当理解,在核酸序列C的长度与核酸序列D的长度不相等时,C与D的%核酸序列同一性将与D与C的%核酸序列同一性不相等。

[0064] “分离的”分子(例如,核酸或蛋白质)或细胞意指它已经从其天然环境的组分中鉴定并且分离和/或回收。

[0065] “有效量”是足以实现有益的或期望的结果,包括临床结果(例如,症状的改善、临床终点的实现等)的量。有效量能以一次或多次施用来施用。就疾病状态而言,有效量是足以改善、稳定或延迟疾病发展的量。

[0066] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如,奶牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类(例如,人和非人灵长类,诸如猴)、兔以及啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施例中,个体或受试者是人。

[0067] 如本文所用,“治疗”是用于获得有益或期望的临床结果的方法。出于本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病程度的减小、疾病状态的稳定(例如,不恶化)、防止疾病的传播(例如,转移)、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和,以及可检测或不可检测的缓解(部分或完全)。“治疗”还可以表示与未接受治疗的预期存活率相比延长存活率。

[0068] 如本文所用,术语“预防性治疗”是指这样的治疗,其中个体已知或怀疑患有病症或处于患有病症的风险中,但尚未展示出病症的症状或展示出病症的最小症状。进行预防性治疗的个体可以在症状发作之前进行治疗。

[0069] 如本文所用,术语“肌强直性营养不良1型”或“DM1”是指影响骨骼肌和平滑肌以及

眼、心脏、内分泌系统和中枢神经系统的多系统病症。有三种重叠类别的DM-1 (Bird, TD, Myotonic Dystrophy Type 1. [肌强直性营养不良1型]1999年9月17日[2021年3月25日更新]。见于:Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA等人编辑. *GeneReviews*® [互联网]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle [西雅图华盛顿大学]; 1993-2022)。轻度DM1的特征在于白内障和轻度肌强直, 经典DM1的特征在于肌无力和消瘦、肌强直、白内障、并且常常特征在于心脏传导异常。先天性DM1的特征在于出生时张力减退和严重全身无力, 常常伴有呼吸功能不全和早期死亡; 智力障碍是常见的。

[0070] 如本文所用, 术语“营养不良性肌强直蛋白激酶”、“DMPK”、“肌强直蛋白-蛋白激酶”、“MT-PK”、“肌强直性营养不良蛋白激酶”或“MDPK”可以指与大多数DM1病例相关的基因或其多肽产物。DMPK基因的3'非翻译区含有CTG三核苷酸重复序列的5-37个拷贝。这种不稳定基序扩展到50-1,000个拷贝导致肌强直性营养不良I型, 其严重程度随着重复元件拷贝数的增加而增加。

[0071] 如本文所用, “RNAi”可以指在细胞中诱导RNA干扰的任何RNA分子。RNAi的实例包括但不限于小抑制性RNA (siRNA)、微RNA (miRNA) 和小发夹RNA (shRNA)。

[0072] “miRNA”可以指含有以下的多核苷酸: (i) 靶向目标基因以通过RNAi敲低的双链序列和(ii) 形成类似于内源miRNA的茎-环结构的附加序列。在一些实施例中, miRNA包括位于茎-环结构侧翼的核酸。这些侧翼序列称为“miRNA支架”。靶向RNAi的目标基因的序列(例如, ~20-nt的短序列)可以连接至产生miRNA样茎-环的序列以及当将多核苷酸组装成miRNA样二级结构时与目标序列碱基配对以形成双链体的序列。如本文所述, 该双链体可以不完全杂交, 例如它可以含有一个或多个未配对的或错配的碱基。当通过Dicer切割该多核苷酸时, 含有靶向目标基因的序列的该双链体可以展开并掺入RISC复合物中。miRNA支架可以指miRNA本身或指编码miRNA的DNA多核苷酸。miRNA支架的实例包括miR-155序列 (Lagos-Quintana, M. 等人 (2002) *Curr. Biol.* [当代生物学] 12: 735-9) 和mirGE支架 (WO 2014016817 A2)。用于将序列克隆到miRNA支架中的市售试剂盒是本领域已知的(例如, 来自生命科技公司 (Life Technologies)、赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific) 的 Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi 表达载体试剂盒; 麻萨诸塞州沃尔瑟姆 (Waltham, MA))。

[0073] 如本文所用, 术语“有义”核酸是包含编码转基因的全部或一部分的序列的核酸。在一些实例中, 转基因的mRNA是有义核酸。

[0074] 如本文所用, “反义”核酸是与“有义”核酸互补的核酸序列。例如, 反义核酸可以与编码转基因的mRNA互补。

[0075] 如本文所用, RNAi的“指导区”是通常基于互补性结合靶mRNA的RNAi链。互补区可以涵盖指导区的全部或一部分。通常, 互补区至少包括种子区。在许多情况下, RNAi的反义区是指导区。

[0076] 如本文所用, 在本文中可互换使用的RNAi的“乘客区”或“非指导区”是RNAi的与指导区互补的区域。在许多情况下, RNAi的有义区是乘客区。

[0077] 如本文所用, RNAi (例如, miRNA) 的“种子区”是微RNA的长度为约1-8个核苷酸的区域。在一些实例中, 种子区及其靶mRNA的3'-UTR可以是RNAi识别中的关键决定簇。

[0078] 如本文所用, “脱靶基因沉默”是指RNAi的种子区与非预期mRNA的3'-UTR中的序列

配对并且指导那些转录物的翻译阻遏和去稳定(例如,减少非预期mRNA的表达)。

[0079] 本文中提及的“约”值或参数包括(并且描述)涉及该值或参数本身的实施例。例如,提及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0080] 如本文所用,除非另有指示,否则冠词的单数形式“一”、“一个(一种)”和“该”包括复数引用物。

[0081] 应理解,本文所述的本发明的方面和实施例包括“包含方面和实施例”、“由方面和实施例组成”和/或“基本上由方面和实施例组成”。

RNAi

[0082] 在一些方面,本发明提供了用于治疗肌强直性营养不良1型(DM1)的靶向DMPK RNA的改良RNAi。在一些实施例中,该RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)或小发夹RNA(shRNA)。本领域已知小抑制性或干扰性RNA(siRNA)是长度为大约19-25(例如19-23)个碱基对的双链RNA分子,其在细胞中诱导RNAi。miRNA典型地小于siRNA,可以具有多个靶标,并且起到阻遏翻译、降解mRNA并且在一些情况下核酸内切切割mRNA的作用。小发夹RNA(shRNA)在本领域中已知为包含通过短环(例如,约4-11个核苷酸)连接的双链RNA的大约19-25(例如,19-23)个碱基对的RNA分子,其在细胞中诱导RNAi。在一些实施例中,RNAi包含第一链和第二链,其中a)该第一链和该第二链形成双链体;b)该第一链包含指导区,其中该指导区包含核酸序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1);并且c)第二链包含非指导区。在一些实施例中,指导区包含核酸序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1),且非指导区包含序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)。

[0083] 在一些实施例中,第一链包含指导区,其中该指导区包含与5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)具有大于约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列。在一些实施例中,第一链包含指导区,其中该指导区包含与5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)具有大于约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列,但保持至少一个CpG基序。在一些实施例中,第二链包含非指导区,其中该非指导区包含与5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)具有大于约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列。在一些实施例中,第二链包含非指导区,其中该非指导区包含与5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)具有大于约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列,但保持至少一个CpG基序。

[0084] 在一些实施例中,RNAi包含SEQ ID NO:7的核酸序列。在一些实施例中,RNAi包含与SEQ ID NO:7具有大于约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列。在一些实施例中,RNAi包含与SEQ ID NO:7具有超过约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列,但保持至少一个序列(例如,在种子序列中)。

[0085] 在一些实施例中,本发明提供了编码RNAi的核酸,该RNAi包含第一链和第二链,其中a)第一链和第二链形成双链体;b)第一链包含指导区,并且c)第二链包含非指导区。在一些实施例中,编码RNAi的核酸包含SEQ ID NO:4的核酸序列和/或SEQ ID NO:5的核酸。在一些实施例中,编码RNAi的核酸包含与SEQ ID NO:4具有大于约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列和/或与SEQ ID NO:5具有大于约75%、80%、

85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列。在一些实施例中, RNAi由SEQ ID NO:8的核酸序列编码。在一些实施例中, RNAi由与SEQ ID NO:8具有大于约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列编码。

[0086] 微RNA (miRNA) 在本领域中已知为在细胞中诱导RNAi的RNA分子, 其包含通过环连接的双链RNA的短 (例如, 19-25个碱基对) 序列并且含有包含一个或多个凸起 (例如, 配对错误或未配对的碱基对) 的双链RNA的一个或多个另外的序列。如本文所用, 术语“miRNA”涵盖内源miRNA以及外源或异源miRNA。在一些实施例中, “miRNA”可以指pri-miRNA或pre-miRNA。在miRNA加工期间, 产生pri-miRNA转录物。由Drosha-DGCR8通过以下方式加工pri-miRNA以产生pre-miRNA: 切除一个或多个序列留下具有5'侧翼区、指导链、环区、非指导链和3'侧翼区; 或5'侧翼区、非指导链、环区、指导链和3'侧翼区的pre-miRNA。然后将pre-miRNA输出至细胞质并由Dicer加工以产生具有指导链和非指导 (或乘客) 链的siRNA。然后RISC复合物使用指导链来催化基因沉默, 例如通过识别与指导链互补的靶RNA序列。miRNA的进一步描述可以例如在WO 2008/150897中找到。miRNA对靶序列的识别主要通过靶标与miRNA种子序列 (例如指导链的核苷酸1-8 (5'至3')) 之间的配对来确定 (参见例如Boudreau, R.L. 等人 (2013) *Nucleic Acids Res.* [核酸研究] 41:e9)。

[0087] 在pri/pre-miRNA结构中, 双链体中指导链:非指导链界面部分地通过互补碱基配对 (例如, 沃森-克里克碱基配对) 形成。然而, 在一些实施例中, 该互补碱基配对不延伸通过整个双链体。在一些实施例中, 界面中的凸起可存在于一个或多个核苷酸位置。如本文所用, 术语“凸起”可以指与双链体中与其相对的核酸非互补的核酸区域。在一些实施例中, 当互补核酸的区域彼此结合, 而中心非互补区域的区域不结合时形成凸起。在一些实施例中, 当位于两个互补区之间的两条核酸链具有不同长度时形成凸起。如下所述, 凸起可以包含1个或多个核苷酸。

[0088] 在miRNA加工期间, miRNA在邻近指导链:非指导链界面的切割位点被切割, 从而释放指导链和非指导链的siRNA双链体。在一些实施例中, miRNA在邻近切割位点的有义链或反义链中包含凸起。换言之, 在一些实施例中, miRNA在邻近种子序列的指导链或非指导链中包含凸起。

[0089] 在一些实施例中, miRNA在与成熟非指导链的5'切割位点相对的指导链中包含凸起。在一些实施例中, miRNA包含与非指导链的5'核苷酸相对的凸起。在一些实施例中, miRNA在与成熟指导链的3'切割位点相对的有义链中包含凸起。在一些实施例中, miRNA包含与指导链的3'核苷酸相对的凸起。

[0090] 基于RNAi的疗法的安全性可受到小抑制性RNA (siRNA) 与非预期mRNA结合并减少其表达的能力 (称为脱靶基因沉默的效应) 的阻碍。脱靶主要发生在种子区 (小RNA的核苷酸2-8) 与非预期mRNA的3'-UTR中的序列配对并指导那些转录物的翻译阻遏和去稳定时。减少的脱靶RNAi可以通过以下方式设计: 取代指导序列和非指导序列内的碱基; 例如, 通过产生CpG基序。可以使用SiSPOTR算法来评价可产生显著较低的脱靶评分的潜在取代, SiSPOTR算法是鉴定具有最低脱靶潜力和有效沉默能力的候选序列的特异性聚焦的siRNA设计算法 (Boudreau等人, *Nucleic Acids Res.* [核酸研究] 2013年1月; 41 (1) e9)。降低的SiSPOTR评分预测与亲本RNAi分子相比具有较低数目的潜在人类脱靶的序列。在本发明的一些实施例中, 改进RNAi以减少脱靶基因沉默。

[0091] 在一些实施例中,第一链和第二链借助于能够形成环结构的RNA(例如, RNA接头)连接。如本领域通常已知的,当RNA分子包含两个RNA序列时,形成RNA环结构(例如,茎-环或发夹),这两个RNA序列碱基配对在一起,被未碱基配对在一起的RNA序列隔开。例如,如果序列A和序列C互补或部分互补使得它们碱基配对在一起,但序列B中的碱基不碱基配对在一起,则可以在RNA分子A-B-C中形成环结构。

[0092] 在一些实施例中,能够形成环结构的RNA包含4至50个核苷酸。在某些实施例中,能够形成环结构的RNA包含13个核苷酸。在一些实施例中,能够形成环的RNA中的核苷酸数目为4至50个核苷酸或其间的任何整数。在一些实施例中,环的0-50%可以与环的另一部分互补。如本文所用,术语“环结构”是连接核酸的两条互补链的序列。在一些实施例中,环结构的1-3个核苷酸与核酸的互补链相邻,并且可以与环结构的远端部分的1-3个核苷酸互补。例如,环结构的5'端的三个核苷酸可以与环结构的3'端的三个核苷酸互补。

[0093] 在一些实施例中,编码本披露的RNAi的核酸包含异源miRNA支架。在一些实施例中,使用异源miRNA支架来调节miRNA表达;例如,增加miRNA表达或降低miRNA表达。可以使用本领域已知的任何miRNA支架。在一些实施例中,miRNA支架源自miR-155支架(参见,例如,Lagos-Quintana, M.等人(2002) *Curr. Biol.* [当代生物学] 12:735-9和来自生命科技公司、赛默飞世尔科技公司的Invitrogen™BLOCK-iT™Pol II miR RNAi表达载体试剂盒;麻萨诸塞州沃尔瑟姆)或mirGE支架(WO 2014/016817)。

治疗肌强直性营养不良1型(DM-1)的方法

[0094] 肌强直性营养不良1型(DM1)是由DMPK基因座(营养不良性肌强直蛋白激酶)中CTG重复序列(>50)的扩展引起的单基因、常染色体显性、进行性疾病。具有重复序列的DMPK转录成mRNA,该mRNA形成发夹并结合RNA结合蛋白,隔绝它们的正常功能。这导致出现核灶、错误剪接并且最终导致肌强直。DM1主要影响骨骼肌、心肌和平滑肌,从而引起显著的身体、认知和行为损害和残疾。

[0095] 在一些方面,本发明提供了用于治疗哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的方法和组合物,这些方法包括向该哺乳动物施用本披露的药物组合物(例如,包含本披露的rAAV颗粒的药物组合物)。在一些方面,本发明提供了用于抑制患有DM-1的哺乳动物中DMPK的表达的方法和组合物,这些方法包括向该哺乳动物施用本披露的药物组合物(例如,包含本披露的rAAV颗粒的药物组合物)。在一些方面,本发明提供了用于抑制患有DM1的哺乳动物的细胞中DMPK的积聚的方法和组合物,这些方法包括向该哺乳动物施用本披露的药物组合物(例如,包含本披露的rAAV颗粒的药物组合物)。在一些方面,本发明提供了用于改善DM1症状的方法和组合物,这些方法包括向哺乳动物的肌脑施用有效量的包含编码本披露的RNAi的载体的rAAV颗粒。

[0096] 在一些方面,本发明提供了用于靶向患有DM1的哺乳动物中的DMPK mRNA的RNAi。在一些实施例中, RNAi包含第一链和第二链,第一链包含含有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)的第一核酸,第二链包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)的第二核酸。本文所述的RNAi(例如,作为rAAV载体的一部分)尤其可用于治疗DM1。

[0097] 在一些实施例中,该RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)或小发夹RNA(shRNA)。本领域已知小抑制性或干扰性RNA(siRNA)是长度为大约19-25(例如19-23)个碱

基对的双链RNA分子,其在细胞中诱导RNAi.miRNA典型地小于siRNA,可以具有多个靶标,并且起到阻遏翻译、降解mRNA并且在一些情况下核酸内切切割mRNA的作用。小发夹RNA(shRNA)在本领域中已知为包含通过短环(例如,约4-11个核苷酸)连接的双链RNA的大约19-25(例如,19-23)个碱基对的RNA分子,其在细胞中诱导RNAi。

[0098] 在一些实施例中,miRNA包含与SEQ ID NO:1约90%相同的指导序列。在一些实施例中,miRNA包含与SEQ ID NO:1约90%相同、91%相同、92%相同、93%相同、94%相同、95%相同、96%相同、97%相同、98%相同、99%相同或100%相同中的任一情况的指导序列。

[0099] 在一些实施例中,miRNA包含与SEQ ID NO:2有约90%相同的非指导序列(乘客链)。在一些实施例中,miRNA包含与SEQ ID NO:2约90%相同、91%相同、92%相同、93%相同、94%相同、95%相同、96%相同、97%相同、98%相同、99%相同或100%相同中的任一情况的非指导序列。

[0100] 在一些实施例中,该第一链和该第二链借助于能够形成环结构的RNA连接。如本领域通常已知的,当RNA分子包含两个RNA序列时,形成RNA环结构(例如,茎-环或发夹),这两个RNA序列碱基配对在一起,被未碱基配对在一起的RNA序列隔开。例如,如果序列A和序列C互补或部分互补使得它们碱基配对在一起,但序列B中的碱基不碱基配对在一起,则可以在RNA分子A-B-C中形成环结构。

[0101] 在一些实施例中,能够形成环结构的RNA包含4至50个核苷酸。在某些实施例中,能够形成环结构的RNA包含13个核苷酸。在某些实施例中,能够形成环结构的RNA包含核苷酸序列GUUUUGGCCACUGACUGAC(SEQ ID NO:3)。在一些实施例中,载体基因组包含与SEQ ID NO:3的序列至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同中的任一情况的核苷酸序列。

[0102] 在一些方面,本发明提供了包括向哺乳动物(例如,患有DM1的哺乳动物)施用包含第一链和第二链的RNAi的方法,该第一链包含含有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)的第一核酸,该第二链包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)的第二核酸。在一些实施例中,重组病毒颗粒包含RNAi。在一些实施例中,重组病毒颗粒是将rAAV载体衣壳化的AAV颗粒,其中该rAAV载体编码RNAi。

[0103] 在一些实施例中,rAAV颗粒的递送是通过向哺乳动物全身注射rAAV颗粒。在一些实施例中,全身注射是静脉内注射、动脉内注射、肌内注射、腹膜内注射、皮内注射或皮下注射、CSF内和鞘内施用(IT)。

[0104] 在一些方面,本发明提供了用于治疗哺乳动物的DM1的方法,这些方法包括向哺乳动物施用本披露的药物组合物。在一些方面,本发明提供了用于抑制患有DM1的哺乳动物的细胞中DMPK的积聚的方法,这些方法包括向哺乳动物施用本披露的药物组合物。在一些方面,本发明提供了用于抑制患有DM1的哺乳动物中DMPK的表达的方法,这些方法包括向哺乳动物施用本披露的药物组合物。在一些实施例中,DMPK是突变体DMPK(例如,包含大于37个或大于50个CTG重复序列的DMPK)。

[0105] 在一些实施例中,本发明提供了通过施用有效量的包含编码本披露的RNAi的rAAV载体的药物组合物以阻抑突变体DMPK的活性来治疗患有DM1的人的方法。在一些实施例中,药物组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0106] 在一些实施例中,这些方法包括施用有效量的包含编码本披露的RNAi的rAAV载体的药物组合物以阻抑突变体DMPK的活性。在一些实施例中,这些rAAV颗粒的病毒滴度为至少约 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 10×10^{12} 、 11×10^{12} 、 15×10^{12} 、 20×10^{12} 、 25×10^{12} 、 30×10^{12} 或 50×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,这些rAAV颗粒的病毒滴度为约 5×10^{12} 至 6×10^{12} 、 6×10^{12} 至 7×10^{12} 、 7×10^{12} 至 8×10^{12} 、 8×10^{12} 至 9×10^{12} 、 9×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 11×10^{12} 、 11×10^{12} 至 15×10^{12} 、 15×10^{12} 至 20×10^{12} 、 20×10^{12} 至 25×10^{12} 、 25×10^{12} 至 30×10^{12} 、 30×10^{12} 至 50×10^{12} 或 50×10^{12} 至 100×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,这些rAAV颗粒的病毒滴度为约 5×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 25×10^{12} 或 25×10^{12} 至 50×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,这些rAAV颗粒的病毒滴度为至少约 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 10×10^9 、 11×10^9 、 15×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 或 50×10^9 个转导单位/mL中的任一种。在一些实施例中,这些rAAV颗粒的病毒滴度为约 5×10^9 至 6×10^9 、 6×10^9 至 7×10^9 、 7×10^9 至 8×10^9 、 8×10^9 至 9×10^9 、 9×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 11×10^9 、 11×10^9 至 15×10^9 、 15×10^9 至 20×10^9 、 20×10^9 至 25×10^9 、 25×10^9 至 30×10^9 、 30×10^9 至 50×10^9 或 50×10^9 至 100×10^9 个转导单位/mL中的任一种。在一些实施例中,这些rAAV颗粒的病毒滴度为约 5×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 15×10^9 、 15×10^9 至 25×10^9 或 25×10^9 至 50×10^9 个转导单位/mL中的任一种。在一些实施例中,这些rAAV颗粒的病毒滴度至少为约 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 10×10^{10} 、 11×10^{10} 、 15×10^{10} 、 20×10^{10} 、 25×10^{10} 、 30×10^{10} 、 40×10^{10} 或 50×10^{10} 个感染单位/mL中的任一种。在一些实施例中,这些rAAV颗粒的病毒滴度至少为约 5×10^{10} 至 6×10^{10} 、 6×10^{10} 至 7×10^{10} 、 7×10^{10} 至 8×10^{10} 、 8×10^{10} 至 9×10^{10} 、 9×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 11×10^{10} 、 11×10^{10} 至 15×10^{10} 、 15×10^{10} 至 20×10^{10} 、 20×10^{10} 至 25×10^{10} 、 25×10^{10} 至 30×10^{10} 、 30×10^{10} 至 40×10^{10} 、 40×10^{10} 至 50×10^{10} 或 50×10^{10} 至 100×10^{10} 个感染单位/mL中的任一种。在一些实施例中,这些rAAV颗粒的病毒滴度至少为约 5×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 15×10^{10} 、 15×10^{10} 至 25×10^{10} 或 25×10^{10} 至 50×10^{10} 个感染单位/mL中的任一种。

[0107] 在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 1×10^8 至约 2×10^{13} 个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 1×10^8 至约 5×10^8 、约 5×10^8 至约 10×10^8 、约 10×10^8 至约 20×10^8 、约 20×10^8 至约 30×10^8 、约 30×10^8 至约 40×10^8 、约 40×10^8 至约 50×10^8 或约 50×10^8 至约 100×10^8 个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 1×10^9 至约 5×10^9 、约 5×10^9 至约 10×10^9 、约 10×10^9 至约 20×10^9 、约 20×10^9 至约 30×10^9 、约 30×10^9 至约 40×10^9 、约 40×10^9 至约 50×10^9 或约 50×10^9 至约 100×10^9 个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 1×10^{10} 至约 5×10^{10} 、约 5×10^{10} 至约 10×10^{10} 、约 10×10^{10} 至约 20×10^{10} 、约 20×10^{10} 至约 30×10^{10} 、约 30×10^{10} 至约 40×10^{10} 、约 40×10^{10} 至约 50×10^{10} 或约 50×10^{10} 至约 100×10^{10} 个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 1×10^{11} 至约 5×10^{11} 、约 5×10^{11} 至约 10×10^{11} 、约 10×10^{11} 至约 20×10^{11} 、约 20×10^{11} 至约 30×10^{11} 、约 30×10^{11} 至约 40×10^{11} 、约 40×10^{11} 至约 50×10^{11} 或约 50×10^{11} 至约 100×10^{11} 个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 1×10^{12} 至约 5×10^{12} 、约 5×10^{12} 至约 10×10^{12} 、约 10×10^{12} 至约 20×10^{12} 、约 20×10^{12} 至约 30×10^{12} 、约 30×10^{12} 至约 40×10^{12} 、约 40×10^{12} 至约 50×10^{12} 或

约 50×10^{12} 至约 100×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 1×10^{13} 至约 2×10^{13} 个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 1×10^8 、约 5×10^8 、约 1×10^9 、约 5×10^9 、约 1×10^{10} 、约 5×10^{10} 、约 1×10^{11} 、约 5×10^{11} 、约 1×10^{12} 、约 5×10^{12} 、约 1×10^{13} 或约 2×10^{13} 个基因组拷贝/mL。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 5×10^{12} 个基因组拷贝/mL。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 1×10^{13} 个基因组拷贝/mL。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量浓度为约 2×10^{13} 个基因组拷贝/mL。

[0108] 在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量为至少约 1×10^8 至约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重中的任一种。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量介于约 1×10^8 至约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重中的任一者之间。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量介于约 1×10^8 至约 1×10^{14} 、 5×10^8 至约 1×10^{14} 、 1×10^9 至约 1×10^{14} 、 5×10^9 至约 1×10^{14} 、 1×10^{10} 至约 1×10^{14} 、 5×10^{10} 至约 1×10^{14} 、 1×10^{11} 至约 1×10^{14} 、 5×10^{11} 至约 1×10^{14} 、 1×10^{12} 至约 1×10^{14} 、 5×10^{12} 至约 1×10^{14} 、 1×10^{13} 至约 1×10^{14} 、 5×10^{13} 至约 1×10^{14} 、 1×10^8 至约 5×10^{13} 、 5×10^8 至约 5×10^{13} 、 1×10^9 至约 5×10^{13} 、 5×10^9 至约 5×10^{13} 、 1×10^{10} 至约 5×10^{13} 、 5×10^{10} 至约 5×10^{13} 、 1×10^{11} 至约 5×10^{13} 、 5×10^{11} 至约 5×10^{13} 、 1×10^{12} 至约 5×10^{13} 、 5×10^{12} 至约 5×10^{13} 、 1×10^{13} 至约 5×10^{13} 、 1×10^8 至约 1×10^{13} 、 5×10^8 至约 1×10^{13} 、 1×10^9 至约 1×10^{13} 、 5×10^9 至约 1×10^{13} 、 1×10^{10} 至约 1×10^{13} 、 5×10^{10} 至约 1×10^{13} 、 1×10^{11} 至约 1×10^{13} 、 5×10^{11} 至约 1×10^{13} 、 1×10^{12} 至约 1×10^{13} 、 5×10^{12} 至约 1×10^{13} 、 1×10^8 至约 5×10^{12} 、 5×10^8 至约 5×10^{12} 、 1×10^9 至约 5×10^{12} 、 5×10^9 至约 5×10^{12} 、 1×10^{10} 至约 5×10^{12} 、 5×10^{10} 至约 5×10^{12} 、 1×10^{11} 至约 5×10^{12} 、 5×10^{11} 至约 5×10^{12} 、 1×10^{12} 至约 5×10^{12} 、 1×10^8 至约 1×10^{12} 、 5×10^8 至约 1×10^{12} 、 1×10^9 至约 1×10^{12} 、 5×10^9 至约 1×10^{12} 、 1×10^{10} 至约 1×10^{12} 、 5×10^{10} 至约 1×10^{12} 、 1×10^{11} 至约 1×10^{12} 、 5×10^{11} 至约 1×10^{12} 、 1×10^8 至约 5×10^{11} 、 5×10^8 至约 5×10^{11} 、 1×10^9 至约 5×10^{11} 、 5×10^9 至约 5×10^{11} 、 1×10^{10} 至约 5×10^{11} 、 5×10^{10} 至约 5×10^{11} 、 1×10^{11} 至约 5×10^{11} 、 1×10^8 至约 1×10^{11} 、 5×10^8 至约 1×10^{11} 、 1×10^9 至约 1×10^{11} 、 5×10^9 至约 1×10^{11} 、 1×10^{10} 至约 1×10^{11} 、 5×10^{10} 至约 1×10^{11} 、 1×10^8 至约 5×10^{10} 、 5×10^8 至约 5×10^{10} 、 1×10^9 至约 5×10^{10} 、 5×10^9 至约 5×10^{10} 、 1×10^{10} 至约 5×10^{10} 、 1×10^8 至约 1×10^{10} 、 5×10^8 至约 1×10^{10} 、 1×10^9 至约 1×10^{10} 、 5×10^9 至约 1×10^{10} 、 1×10^8 至约 5×10^9 、 5×10^8 至约 5×10^9 、 1×10^9 至约 5×10^9 、 5×10^9 至约 1×10^9 或 1×10^8 至约 5×10^8 gc/kg体重中的任一者之间。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量为约 1×10^9 、约 5×10^9 、约 1×10^{10} 、约 5×10^{10} 、约 1×10^{11} 、约 5×10^{11} 、约 1×10^{12} 、约 5×10^{12} 、约 1×10^{13} 、约 5×10^{13} 、约 1×10^{14} 或约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量为约 5×10^{13} 个基因组拷贝/kg体重。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量为约 1×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的剂量为约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重。

[0109] 在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的总量为至少约 1×10^9 至约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重中的任一种。在一些实施例中,施用给个体的rAAV颗粒的总量为约 1×10^9 至约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重中的任一种。在本发明的一些实施例中,注射至纹状体的组合物的体积大于约 $10\mu\text{l}$ 、 $25\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ 、 $75\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、 $300\mu\text{l}$ 、 $400\mu\text{l}$ 、 $500\mu\text{l}$ 、 $600\mu\text{l}$ 、 $700\mu\text{l}$ 、 $800\mu\text{l}$ 、 $900\mu\text{l}$ 、 1mL 、 5mL 、 10mL 、 25mL 、 50mL 、 75mL 或 100mL 中的任一种或其间的任何量。

[0110] 本发明的组合物(例如,包含编码本披露的RNAi的载体的rAAV颗粒)可以单独使用或与一种或多种用于治疗DM1的另外的治疗剂组合使用。依次施用之间的间隔可以是至少(或替代性地,少于)几分钟、几小时或几天。

[0111] 在一些实施例中,用于治疗DM1的RNAi与免疫抑制剂组合施用;例如,以阻抑对RNAi的免疫应答。在一些实施例中,在施用RNAi之前施用免疫抑制剂。在一些实施例中,在施用RNAi的同时施用免疫抑制剂。在一些实施例中,在施用RNAi之后施用免疫抑制剂。在一些实施例中,免疫抑制剂以在施用RNAi之前、期间或之后的任何组合施用。

[0112] 在一些实施例中,用于治疗DM1的rAAV颗粒与免疫抑制剂组合施用;例如,以阻抑对rAAV颗粒和/或rAAV颗粒的转基因产物的免疫应答。在一些实施例中,在施用rAAV颗粒之前施用免疫抑制剂。在一些实施例中,在施用rAAV颗粒的同时施用免疫抑制剂。在一些实施例中,在施用rAAV颗粒之后施用免疫抑制剂。在一些实施例中,免疫抑制剂以在施用rAAV颗粒之前、期间或之后的任何组合施用。

[0113] 在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的RNAi在制造用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的药物中的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的RNAi在制造用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)的表达的药物中的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的RNAi在制造用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的药物中的用途。

[0114] 在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的RNAi治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的RNAi用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)的表达的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的RNAi用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的用途。

[0115] 在一些实施例中,本发明提供了用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的本文所述的RNAi。在一些实施例中,本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)的表达的任何本文所述的RNAi。在一些实施例中,本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的任何本文所述的RNAi。

[0116] 在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的病毒颗粒(例如,AAV颗粒)在制造用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的药物中的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的病毒颗粒(例如,AAV颗粒)在制造用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)的表达的药物中的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的病毒颗粒(例如,AAV颗粒)在制造用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的药物中的用途。

[0117] 在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的病毒颗粒(例如,AAV颗粒)用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的病毒颗粒(例如,AAV颗粒)用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)的表达的用途。在一些实施例中,本发明

提供了有效量的任何本文所述的病毒颗粒(例如,AAV颗粒)用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的用途。

[0118] 在一些实施例中,本发明提供了用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的本文所述的病毒颗粒(例如,AAV颗粒)。在一些实施例中,本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)的表达的任何本文所述的病毒颗粒(例如,AAV颗粒)。在一些实施例中,本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的任何本文所述的病毒颗粒(例如,AAV颗粒)。

[0119] 在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的组合物在制造用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的药物中的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的组合物在制造用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)的表达的药物中的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的组合物在制造用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的药物中的用途。

[0120] 在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的组合物用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的组合物用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)的表达的用途。在一些实施例中,本发明提供了有效量的任何本文所述的组合物用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的用途。

[0121] 在一些实施例中,本发明提供了用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的本文所述的组合物。在一些实施例中,本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)的表达的任何本文所述的组合物。在一些实施例中,本发明提供了用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的任何本文所述的组合物。

RNAi表达构建体和载体

[0122] 本发明提供了用于表达本文所述的RNAi的表达构建体、载体和rAAV颗粒。

[0123] 在一些实施例中,编码本披露的RNAi的核酸包含异源miRNA支架。在一些实施例中,使用异源miRNA支架来调节miRNA表达;例如,增加miRNA表达或降低miRNA表达。可以使用本领域已知的任何miRNA支架。在一些实施例中,miRNA支架源自miR-155支架(参见,例如,Lagos-Quintana,M.等人(2002)Curr.Biol.[当代生物学]12:735-9和来自生命科技公司、赛默飞世尔科技公司的Invitrogen™BLOCK-iT™Pol II miR RNAi表达载体试剂盒;麻萨诸塞州沃尔瑟姆)或mirGE支架(WO 2014/016817)。在一些实施例中,编码本披露的RNAi的核酸包含miRNA支架。在一些实施例中,miRNA支架由SEQ ID NO:11提供。在一些实施例中,miRNA支架包含与SEQ ID NO:11的核酸序列具有大于80%、85%、90%、95%或99%同一性的核酸。

[0124] 在一些实施例中,RNAi靶向编码与DM1相关的多肽(例如,突变体DMPK)的RNA。不希望受理论束缚,认为RNAi可以用于减少或消除其功能获得已经与DM1相关的多肽(例如,突变体DMPK)的表达和/或活性。

[0125] 在一些实施例中,转基因(例如,编码本披露的RNAi)与启动子可操作地连接。示例性的启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘

油酸激酶-1 (PGK) 启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子和CK6启动子、转甲状腺素蛋白启动子 (TTR)、TK启动子、四环素反应性启动子 (TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子 (LSP)、E2F启动子、端粒酶 (hTERT) 启动子;巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子 (CAG启动子;Niwa等人, Gene [基因], 1991, 108 (2) : 193-9) 和延伸因子1- α 启动子 (EF1- α) 启动子 (Kim等人, Gene [基因], 1990, 91 (2) : 217-23和Guo等人, Gene Ther. [基因疗法], 1996, 3 (9) : 802-10)。在一些实施例中, 启动子包括人 β -葡萄糖醛酸酶启动子或与鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子连接的巨细胞病毒增强子。启动子可以是组成型启动子、诱导型启动子或阻遏型启动子。

[0126] 诱导型启动子允许调控基因表达并且可以受外源供给的化合物、环境因素 (诸如温度) 或特定生理状态的存在调控, 特定生理状态例如急性期、细胞的特定分化状态, 或仅在复制细胞中。受外源供给启动子调控的诱导型启动子的实例包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白 (MT) 启动子、地塞米松 (Dex) 诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 启动子、T7聚合酶启动子系统 (WO 98/10088); 蜕皮激素昆虫启动子 (No等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊], 93 : 3346 - 3351 (1996))、四环素阻遏型系统 (Gossen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊], 89:5547-5551 (1992))、四环素诱导型系统 (Gossen等人, Science [科学], 268:1766-1769 (1995)), 还参见Harvey等人, Curr. Opin. Chem. Biol. [化学生物学的当前观点], 2:512-518 (1998))、RU486诱导型系统 (Wang等人, Nat. Biotech. [自然生物技术], 15:239-243 (1997) 和Wang等人, Gene Ther. [基因疗法], 4:432-441 (1997)) 和雷帕霉素诱导型系统 (Magari等人, J. Clin. Invest. [临床研究杂志], 100:2865-2872 (1997))。在该上下文中可用的其他类型的诱导型启动子是受特定生理状态调控的启动子, 特定生理状态例如温度、急性期、细胞的特定分化状态, 或仅在复制细胞中。

[0127] 在一些实施例中, 调控序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况下, 组织特异性调控序列结合以组织特异性方式诱导转录的组织特异性转录因子。此类组织特异性调控序列 (例如, 启动子、增强子等) 是本领域众所周知的。在一些实施例中, 该启动子是肌肉特异性启动子。在一些实施例中, 该启动子是结蛋白启动子。在一些实施例中, 该启动子是人结蛋白启动子 (例如, 人结蛋白基因的-228至+75; 例如, SEQ ID NO:23)。在一些实施例中, 该启动子是经修饰的结蛋白启动子。在一些实施例中, 结蛋白启动子包含对于肌细胞中的高水平表达很重要的结蛋白启动子元件 (Li和Paulin等人1991. Journal of Biol Chem. [生物化学杂志])。在一些实施例中, 结蛋白启动子包含至少一个拷贝的Byrne结蛋白增强子 (例如, SEQ ID NO:21)。在一些实施例中, 结蛋白启动子包含至少一个拷贝的Paulin结蛋白增强子 (-973至-693) (例如, SEQ ID NO:22)。在一些实施例中, 结蛋白启动子包含一个拷贝的Byrne结蛋白增强子和一个拷贝的Paulin结蛋白增强子 (-973至-693)。在一些实施例中, 结蛋白启动子包含一个拷贝的Byrne结蛋白增强子和一个拷贝的Paulin结蛋白增强子 (-973至-693) 以及人结蛋白基因的启动子 (-228至+75)。

[0128] 在一些方面, 本发明提供了表达盒 (例如, 和用于在肌细胞中表达转基因 (例如, 治疗性转基因) 的表达盒), 其中该表达盒包含经修饰的结蛋白启动子, 其中该结蛋白启动子包含一个或多个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。在一些实施例中, 该结蛋白启动子包含两个增强子元件、和该人结蛋白基因的启动子。在一些实施例中, 该结蛋白启动子包含

一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列的增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的增强子元件和一个或多个包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列的增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含与SEQ ID NO:21的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的核苷酸序列的增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含与SEQ ID NO:22的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的核苷酸序列的增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含与SEQ ID NO:21的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的核苷酸序列的增强子元件,和一个或多个包含与SEQ ID NO:22的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的核苷酸序列的增强子元件。

[0129] 在一些实施例中,包含经修饰的结蛋白启动子的表达盒进一步包含内含子。在一些实施例中,该内含子是兔 β -珠蛋白内含子。在一些实施例中,该内含子包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列。在一些实施例中,该内含子包含与SEQ ID NO:13的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的核苷酸序列。在一些实施例中,编码转基因(例如,治疗性转基因)的核酸嵌入该内含子中。在一些实施例中,该内含子包含5'臂和3'臂,其中该5'臂位于该编码转基因的核酸的5'并且该3'臂位于该编码转基因的核酸的3'。在一些实施例中,该内含子的5'臂包含具有SEQ ID NO:14的序列的核酸。在一些实施例中,该内含子的5'臂包含具有与SEQ ID NO:14的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的序列的核酸。在一些实施例中,该内含子的3'臂包含具有SEQ ID NO:15的序列的核酸。在一些实施例中,该内含子的3'臂包含具有与SEQ ID NO:15的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的序列的核酸。在一些实施例中,该内含子的5'臂包含具有SEQ ID NO:14的序列的核酸,并且该内含子的3'臂包含具有SEQ ID NO:15的序列的核酸。在一些实施例中,该内含子的5'臂包含具有与SEQ ID NO:14的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的序列的核酸,并且该内含子的3'臂包含具有与SEQ ID NO:15的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的序列的核酸。

[0130] 在一些实施例中,包含经修饰的结蛋白启动子的表达盒进一步包含聚腺苷酸化信号。在一些实施例中,该聚腺苷酸化信号是牛生长激素聚腺苷酸化信号、SV40聚腺苷酸化信号或HSV TK pA。在一些实施例中,该聚腺苷酸化信号是最小牛生长激素聚腺苷酸化信号。在一些实施例中,该牛生长激素聚腺苷酸化信号包含具有SEQ ID NO:16的序列的核酸。在一些实施例中,该牛生长激素聚腺苷酸化信号包含具有与SEQ ID NO:16的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的序列的核酸。

[0131] 在一些实施例中,本发明提供了包含经修饰的结蛋白启动子用于在肌细胞中表达转基因(例如,治疗性转基因)的表达盒。在一些实施例中,该转基因编码多肽(例如,治疗性多肽)。在一些实施例中,该转基因编码核酸(例如,治疗性核酸)。在一些实施例中,该转基因编码RNAi。在一些实施例中,该转基因编码siRNA、shRNA或miRNA。

[0132] 在一些方面,本发明提供了经修饰的结蛋白启动子,其中该结蛋白启动子包含一

个或多个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。在一些实施例中,该结蛋白启动子包含两个增强子元件、和该人结蛋白基因的启动子。在一些实施例中,该结蛋白启动子包含一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列的增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的增强子元件和一个或多个包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列的增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含与SEQ ID NO:21的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的核苷酸序列的增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含与SEQ ID NO:22的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的核苷酸序列的增强子元件。在一些实施例中,结蛋白启动子包含一个或多个包含与SEQ ID NO:21的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的核苷酸序列的增强子元件,和一个或多个包含与SEQ ID NO:22的核苷酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%同一性中的任一种的核苷酸序列的增强子元件。

[0133] 在一些方面,本发明提供了包含重组自身互补基因组(例如,自身互补rAAV载体)的rAAV颗粒。具有自身互补载体基因组的AAV病毒颗粒和使用自身互补AAV基因组的方法描述于美国专利第6,596,535号、第7,125,717号、第7,465,583号、第7,785,888号、第7,790,154号、第7,846,729号、第8,093,054号和第8,361,457号;以及Wang Z.等人,(2003)Gene Ther[基因疗法]10:2105-2111,每个参考文献通过援引以其全文并入本文。包含自身互补基因组的rAAV依靠其部分互补序列(例如,异源核酸的互补编码链和非编码链)将快速形成双链DNA分子。在一些实施例中,载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码该核酸的互补序列的第二核酸序列,其中第一核酸序列可沿其大部分或全部长度与第二核酸序列形成链内碱基对。

[0134] 在一些实施例中,编码RNAi的第一异源核酸序列和编码RNAi的互补序列的第二异源核酸序列通过突变的ITR(例如,右侧ITR)连接。在一些实施例中,ITR包含多核苷酸序列5'-CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCGGGCGACC AAAGGTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGAGAGGGA-3(SEQ ID NO:27)。突变的ITR包含含有末端解析序列的D区的缺失。因此,在复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR处切割病毒基因组,并且因此,按5'至3'顺序包含以下项的重组病毒基因组将包装在病毒衣壳中:AAV ITR,包含调控序列的第一异源多核苷酸序列,突变的AAV ITR,与第一异源多核苷酸处于相反取向的第二异源多核苷酸,和第三AAV ITR。

rAAV颗粒和产生rAAV颗粒的方法

[0135] 本发明提供了包含如本文披露的RNAi的rAAV颗粒。在一些实施例中,本发明提供了使用重组病毒颗粒递送RNAi以治疗DM1的方法。在一些实施例中,rAAV颗粒包含编码本披露的RNAi的序列,该序列的侧翼是一个或两个ITR。将核酸衣壳化在AAV颗粒中。AAV颗粒还包含衣壳蛋白。在一些实施例中,核酸包含在转录方向上操作性连接的组分的目标编码序列(例如,编码本披露的RNAi的核酸)、控制序列(包括转录起始序列和终止序列),由此形成表达盒。该表达盒在5'端和3'端侧翼是至少一个功能性AAV ITR序列。“功能性AAV ITR序列”意指ITR序列的功能如同预期用于AAV病毒体的挽救、复制和包装。参见Davidson等人,

PNAS[美国国家科学院院刊],2000,97(7)3428-32;Passini等人,J.Virol.[病毒学杂志],2003,77(12):7034-40;和Pechan等人,Gene Ther.[基因疗法],2009,16:10-16,这些文献全部通过援引以其全文并入本文。为了实践本发明的一些方面,重组载体至少包含衣壳化所必需的所有AAV序列和供rAAV感染的物理结构。用于本发明载体的AAV ITR不需要具有野生型核苷酸序列(例如,如Kotin,Hum.Gene Ther.[人类基因疗法],1994,5:793-801中所述),并且可以通过核苷酸的插入、缺失或取代而改变,或者AAV ITR可以源自几种AAV血清型中的任一种。当前已知超过40种血清型的AAV,并且继续鉴定新的血清型和现有血清型的变体。参见Gao等人,PNAS[美国国家科学院院刊],2002,99(18):11854-6;Gao等人,PNAS[美国国家科学院院刊],2003,100(10):6081-6;及Bossis等人,J.Virol.[病毒学杂志],2003,77(12):6799-810。任何AAV血清型的使用都被认为在本发明的范围内。在一些实施例中,rAAV载体是源自AAV血清型的载体,包括但不限于AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVrh74、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR等。在一些实施例中,AAV中的核酸包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV的ITR或小鼠AAV衣壳血清型ITR等。在一些实施例中,AAV中的核酸进一步编码如本文所述的RNAi。例如,AAV中的核酸可以包含本文考虑的任何AAV血清型的至少一个ITR,并且可以进一步编码包含一条包含指导区的链和另一条包含非指导区的链的RNAi。在一个实施例中,AAV中的核酸可以包含任何AAV血清型的至少一个ITR并且可以进一步编码包含第一链和第二链的RNAi,该第一链包含含有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)或与SEQ ID NO:1具有80%、85%、90%或95%同一性的序列的第一核酸,该第二链包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)或与SEQ ID NO:2具有80%、85%、90%或95%同一性的序列的第二核酸。

[0136] 在一些实施例中,AAV中的核酸从5'至3'包含编码以下的核酸:ITR(例如,AAV2 ITR)、启动子、编码如本文披露的RNAi的核酸、聚腺苷酸化信号和AAV ITR(例如,AAV2 ITR)。在一些实施例中,AAV中的核酸从5'至3'包含编码以下的核酸:ITR(例如,AAV2 ITR)、启动子、编码RNAi的核酸、聚腺苷酸化信号和AAV ITR(例如,AAV2 ITR),该RNAi包含第一链和第二链,该第一链包含含有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)或与SEQ ID NO:1具有80%、85%、90%或95%同一性的序列的第一核酸,该第二链包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)或与SEQ ID NO:2具有80%、85%、90%或95%同一性的序列的第二核酸。在一些实施例中,AAV中的核酸从5'至3'包含编码以下的核酸:ITR(例如,AAV2 ITR)、结蛋白启动子、编码如本文披露的RNAi的核酸、聚腺苷酸化信号(例如,牛生长激素polyA)和AAV ITR(例如,AAV2 ITR)。在一些实施例中,AAV中的核酸从5'至3'包含编码以下的核酸:ITR(例如,AAV2 ITR)的全部或功能部分、结蛋白启动子、内含子(例如,嵌合内含子)、编码RNAi的核酸、聚腺苷酸化信号(例如,牛生长激素polyA)和AAV ITR(例如,AAV2 ITR),该RNAi包含第一链和第二链,该第一链包含含有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)或与SEQ ID NO:1具有80%、85%、90%或95%同一性的序列的第一核酸,该第二链包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)或与SEQ ID NO:2具有80%、85%、90%或95%同一性的序列的第二核酸。在一些实施例中,第一链和第二链形成双链体。在一些实施例中,第一链通过接头与第二链连接。在一

些实施例中,接头包含SEQ ID NO:3的核酸序列或与SEQ ID NO:3具有80%、85%、90%或95%同一性的序列。

[0137] 在一些实施例中,AAV中的核酸从5'至3'包含编码以下的核酸:ITR(例如,AAV2 ITR)的全部或功能部分、填充序列(例如,人 α 1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列的全部或一部分)、结蛋白启动子、内含子(例如,兔 β -珠蛋白内含子)的5'臂、编码RNAi的核酸、内含子(例如,兔 β -珠蛋白内含子)的3'臂、聚腺苷酸化信号(例如,牛生长激素polyA)、填充序列(例如,人 α 1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列的全部或一部分)和AAV ITR(例如,AAV2 ITR),该RNAi包含第一链和第二链,该第一链包含含有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)或与SEQ ID NO:1具有80%、85%、90%或95%同一性的序列的第一核酸,该第二链包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)或与SEQ ID NO:2具有80%、85%、90%或95%同一性的序列的第二核酸。

[0138] 在一些实施例中,AAV中的核酸从5'至3'包含编码以下的核酸:ITR(例如,AAV2 ITR)、结蛋白启动子、编码RNAi的核酸、聚腺苷酸化信号(例如,牛生长激素polyA)和AAV ITR(例如,AAV2 ITR),该RNAi包含第一链和第二链,该第一链包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)或与SEQ ID NO:2具有80%、85%、90%或95%同一性的序列的第一核酸,该第二链包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:1)或与SEQ ID NO:1具有80%、85%、90%或95%同一性的序列的第二核酸。在一些实施例中,第一链和第二链形成双链体。在一些实施例中,第一链通过接头与第二链连接。在一些实施例中,接头包含SEQ ID NO:6的核酸序列。

[0139] 在一些实施例中,AAV中的核酸从5'至3'包含编码以下的核酸:ITR(例如,AAV2 ITR)的全部或功能部分、填充序列(例如,人 α 1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列的全部或一部分)、结蛋白启动子、内含子(例如,兔 β -珠蛋白内含子)的5'臂、编码RNAi的核酸、内含子(例如,兔 β -珠蛋白内含子)的3'臂、聚腺苷酸化信号(例如,牛生长激素polyA)、填充序列(例如,人 α 1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列的全部或一部分)和AAV ITR(例如,AAV2 ITR),该RNAi包含第一链和第二链,该第一链包含含有序列5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)的第一核酸,该第二链包含含有序列5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)的第二核酸。

[0140] 在一些实施例中,载体可包括(一种或多种)填充核酸。在一些实施例中,该填充核酸可以包含编码报告多肽的序列。如本领域技术人员将理解的,填充核酸可以位于载体内的多个区域中,并且可以由载体内的连续序列(例如,单个位置中的单个填充核酸)或多个序列(例如,多于一个位置(例如,2个位置、3个位置等)中的多于一个填充核酸)组成。在一些实施例中,填充核酸可以位于RNAi序列的下游。在实施例中,填充核酸可以位于RNAi序列的上游(例如,在启动子和编码RNAi的核酸之间)。本领域技术人员还将理解,多种核酸可以用作填充核酸。在一些实施例中,填充核酸包含人 α 1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列或C16 P1染色体16P1克隆(人C16)填充序列的全部或一部分。在一些实施例中,填充序列包含基因的全部或一部分。例如,填充序列包含人AAT序列的一部分。本领域技术人员将认识到,基因的不同部分(例如,人AAT序列)可以用作填充片段。例如,填充片段可以来自基因的5'端、基因的3'端、基因的中间、基因的非编码部分(例如,内含子)、基因的编码区(例如,外显子),或基因的非编码部分和编码部分的混合。本领域技术人员还将认识到填充序列的全部或一部

分可以用作填充序列。在一些实施例中,载体包含含有SEQ ID NO:18的核苷酸序列或与SEQ ID NO:18的核苷酸序列具有大于约80%、85%、90%、95%或99%同一性的核苷酸序列的5'填充序列。在一些实施例中,载体包含含有SEQ ID NO:19的核苷酸序列或与SEQ ID NO:19的核苷酸序列具有大于约80%、85%、90%、95%或99%同一性的核苷酸序列的3'填充序列。在一些实施例中,载体包含含有SEQ ID NO:18的核苷酸序列或与SEQ ID NO:18的核苷酸序列具有大于约80%、85%、90%、95%或99%同一性的核苷酸序列的5'填充序列并且包含含有SEQ ID NO:19的核苷酸序列或与SEQ ID NO:19的核苷酸序列具有大于约80%、85%、90%、95%或99%同一性的核苷酸序列的3'填充序列。

[0141] 在另外的实施例中,rAAV颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh8R、AAVrh.10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74 N502I、AAVrh74 W505R的衣壳蛋白或这些衣壳蛋白的突变体。在一些实施例中,突变衣壳蛋白保持形成AAV衣壳的能力。在一些实施例中,rAAV颗粒包含AAV5酪氨酸突变衣壳(Zhong L.等人,(2008) Proc Natl Acad Sci U S A [美国国家科学院院刊] 105(22):7827-7832)。在另外的实施例中,rAAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白(Gao,等人,J.Virol.[病毒学杂志] 2004,78(12):6381)。

[0142] 不同的AAV血清型用于优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如,患病组织)内的特定细胞类型。rAAV颗粒可包含相同血清型或混合血清型的病毒蛋白和病毒核酸。例如,在一些实施例中,rAAV颗粒可以包含AAV1衣壳蛋白和至少一种AAV2 ITR,或者它可以包含AAV2衣壳蛋白和至少一种AAV1 ITR。本文提供了用于产生rAAV颗粒的AAV血清型的任何组合,如同本文明确陈述了每种组合。在一些实施例中,本发明提供了rAAV颗粒,其包含AAV1衣壳和本披露的rAAV载体(例如,包含编码本披露的RNAi的核酸的表达盒),侧翼为至少一个AAV2 ITR。在一些实施例中,本发明提供了包含AAV2衣壳的rAAV颗粒。

[0143] 在一些方面,本发明提供了包含重组自身互补基因组的病毒颗粒。具有自身互补基因组的rAAV颗粒和使用自身互补AAV基因组的方法描述于美国专利第6,596,535号、第7,125,717号、第7,465,583号、第7,785,888号、第7,790,154号、第7,846,729号、第8,093,054号和第8,361,457号;以及Wang Z.等人,(2003) Gene Ther [基因疗法] 10:2105-2111,每个参考文献通过援引以其全文并入本文。包含自身互补基因组的rAAV依靠其部分互补序列(例如,转基因的互补编码链和非编码链)将快速形成双链DNA分子。在一些实施例中,本发明提供了包含AAV基因组的rAAV颗粒,其中该rAAV基因组包含第一异源多核苷酸序列(例如,本披露的RNAi)和第二异源多核苷酸序列(例如,本披露的RNAi的反义链),其中该第一异源多核苷酸序列可沿其大部分或全部长度与该第二多核苷酸序列形成链内碱基对。在一些实施例中,第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列通过促进链内碱基配对的序列(例如,发夹DNA结构)连接。发夹结构是本领域已知的,例如在miRNA或siRNA分子中。在一些实施例中,第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列通过突变的ITR(例如,右侧ITR)连接。在一些实施例中,ITR包含多核苷酸序列5'-CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC AAAGGTCGCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGA-3 (SEQ ID NO:27)。突变的ITR包含含有末端解析序列的D区的缺失。因此,在复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR处切割病毒基因组,并且因此,按5'至3'顺序包含以下项的重组病毒基因组将包装在病毒衣壳中:AAV ITR,包含调控

序列的第一异源多核苷酸序列,突变的AAV ITR,与第一异源多核苷酸处于相反取向的第二异源多核苷酸,和第三AAV ITR。在一些实施例中,本发明提供了包含重组病毒基因组的AAV病毒颗粒,该重组病毒基因组包含:功能性AAV2ITR,编码本披露的RNAi的第一多核苷酸序列,包含D区缺失而缺乏功能性末端解析序列的突变型AAV2 ITR,包含第一多核苷酸序列的编码本披露的RNAi的序列的互补序列的第二多核苷酸序列和功能性AAV2 ITR。

[0144] 可以使用本领域已知的方法产生rAAV颗粒。参见例如,美国专利第6,566,118号;第6,989,264号;和第6,995,006号。在实践本发明时,用于产生rAAV颗粒的宿主细胞包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、微生物和酵母。宿主细胞也可以是其中AAV rep和cap基因在宿主细胞中稳定维持的包装细胞或其中AAV载体基因组稳定维持的生产细胞。示例性的包装细胞和生产细胞源自293细胞、A549细胞或HeLa细胞。使用本领域已知的标准技术纯化和配制AAV载体。

[0145] 本领域已知的用于产生rAAV载体的方法包括但不限于转染、稳定细胞系生产和感染性杂合病毒生产系统,这些系统包括腺病毒-AAV杂合物、疱疹病毒-AAV杂合物(Conway, JE等人,(1997) J.Virology[病毒学杂志]71(11):8780-8789)和杆状病毒-AAV杂合物。用于产生rAAV病毒颗粒的rAAV生产培养全部需要;1)在杆状病毒生产系统的情况下,合适的宿主细胞,包括例如人来源的细胞系诸如HeLa细胞、A549细胞或293细胞,或昆虫来源的细胞系诸如SF-9;2)由野生型或突变体腺病毒(诸如温度敏感型腺病毒)、疱疹病毒、杆状病毒或提供辅助功能的质粒构建体提供的合适的辅助病毒功能;3)AAV rep和cap基因和基因产物;4)侧翼是至少一个AAV ITR序列的核酸(诸如治疗性核酸);和5)支持rAAV产生的合适的培养基和培养基组分。在一些实施例中,AAV rep和cap基因产物可以来自任何AAV血清型。一般而言,但不是必须的,AAV rep基因产物与rAAV载体基因组的ITR具有相同的血清型,只要rep基因产物可以起到复制和包装rAAV基因组的作用即可。本领域已知的合适培养基可用于产生rAAV载体。这些培养基包括但不限于由海克隆实验室(Hyclone Laboratories)和JRH生产的培养基,包括改良的伊格尔培养基(MEM)、杜尔贝科改良的伊格尔培养基(DMEM),定制配制品诸如美国专利第6,566,118号中描述的那些定制配制品,和如美国专利第6,723,551号中描述 Sf-900 II SFM培养基,其各自通过援引以其全文并入本文,特别是关于用于产生重组AAV载体的定制培养基配制品。在一些实施例中,AAV辅助功能由腺病毒或HSV提供。在一些实施例中,AAV辅助功能由杆状病毒提供,并且宿主细胞是昆虫细胞(例如,草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (Sf9)细胞)。

[0146] 在一些实施例中,rAAV颗粒可以通过三重转染方法,诸如下文提供的示例性三重转染方法产生。简言之,可以将含有rep基因和衣壳基因的质粒与辅助腺病毒质粒一起转染(例如,使用磷酸钙方法)到细胞系(例如,HEK-293细胞)中,并且可以收集和任选地纯化病毒。因此,在一些实施例中,通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染到宿主细胞中来产生rAAV颗粒,其中将核酸转染到宿主细胞中产生能够产生rAAV颗粒的宿主细胞。

[0147] 在一些实施例中,rAAV颗粒可通过生产细胞系方法,诸如下文提供的示例性生产细胞系方法产生(还参见Martin等人,(2013) Human Gene Therapy Methods[人类基因治疗方法]24:253-269中的参考文献)。简言之,可以用含有rep基因、衣壳基因和启动子异源核酸序列的质粒稳定转染细胞系(例如,HeLa细胞系)。可以筛选细胞系以选择用于rAAV产生

的前导克隆物,然后将前导克隆物扩增到生产生物反应器中并用腺病毒(例如,野生型腺病毒)作为辅助物感染以启动rAAV产生。随后可以收获病毒,可以灭活(例如,通过加热)和/或去除腺病毒,并且可以纯化rAAV颗粒。因此,在一些实施例中,rAAV颗粒由包含以下中的一种或多种的生产细胞系产生:编码rAAV载体的核酸,编码AAV rep和cap的核酸,和编码AAV辅助病毒功能的核酸。

[0148] 在一些方面,提供了用于产生如本文披露的任何rAAV颗粒的方法,该方法包括(a)在产生rAAV颗粒的条件下培养宿主细胞,其中该宿主细胞包含(i)一个或多个AAV包装基因,其中每个所述AAV包装基因均编码AAV复制和/或衣壳化蛋白;(ii)rAAV原载体,其包含编码如本文所述的本披露的RNAi的核酸,该核酸的侧翼是至少一个AAV ITR,和(iii)AAV辅助功能;以及(b)回收由该宿主细胞产生的rAAV颗粒。在一些实施例中,RNAi包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列。在一些实施例中,所述至少一个AAV ITR选自由以下AAV ITR组成的组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74 N502I、AAVrh74 W505R、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR等。在一些实施例中,所述衣壳化蛋白选自由以下组成的组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6(例如,野生型AAV6衣壳或变体AAV6衣壳如ShH10,如美国授权前公开2012/0164106中所述)、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9(例如,野生型AAV9衣壳或经修饰的AAV9衣壳,如美国授权前公开2013/0323226中所述)、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74(例如,野生型AAVrh74衣壳或变体AAVrh74衣壳,例如如WO 2019178412中所述的AAVrh74 N502I或AAVrh74 W505R,通过援引以其全文并入)、酪氨酸衣壳突变体、肝素结合衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVA2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳(例如,AAV-DJ/8衣壳、AAV-DJ/9衣壳、或美国授权前公开2012/0066783中描述的任何其他衣壳)、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1衣壳、或美国专利号8,283,151或国际公开号WO/2003/042397中描述的AAV衣壳。在一些实施例中,突变衣壳蛋白保持形成AAV衣壳的能力。在一些实施例中,衣壳化蛋白是AAV5酪氨酸突变衣壳蛋白。在另外的实施例中,rAAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白。在一些实施例中,rAAV颗粒包含AAVrh74 N502I衣壳及包含AAV2 ITR和编码本披露的RNAi的核酸的重组基因组。在一些实施例中,rAAV颗粒包含AAVrh74 W505R衣壳及包含AAV2 ITR和编码本披露的RNAi的核酸的重组基因组。在另一个实施例中,纯化rAAV颗粒。如本文所用的术语“纯化”包括不含至少一些其他组分的rAAV颗粒的制剂,这些其他组分也可存在于rAAV颗粒天然存在或最初制备的地方。因此,例如,分离的rAAV颗粒可以使用纯化技术使其从来源混合物诸如培养裂解物或生产培养上清液中富集来制备。富集可以以多种方式测量,例如通过溶液中存在的DNA酶抗性颗粒(DRP)或基因组拷贝(gc)的比例,或通过感染性,或者可以相对于来源混合物中存在的第二种潜在干扰物质对富集进行测量,该第二种潜在干扰物质诸如为污染物,包括生产培养物污染物或过程中污染物,包括辅助病毒、培养基组分等。

[0149] 本文还提供了包含rAAV颗粒和药学上可接受的载剂的药物组合物,该rAAV颗粒包含编码本披露的RNAi的转基因。这些药物组合物可适合本文所述的任何施用模式。包含编码本披露的RNAi的核酸的rAAV颗粒的药物组合物可以全身引入。例如,可以静脉内、动脉内、皮下或腹膜内施用包含编码本披露的RNAi的核酸的重组病毒颗粒。

[0150] 在一些实施例中,包含重组病毒颗粒和药学上可接受的载剂的药物组合物适合施用于人,该重组病毒颗粒包含编码本文所述的本披露的RNAi的转基因。此类载剂是本领域众所周知的(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明顿制药科学],第15版,第1035-1038和1570-1580页)。在一些实施例中,包含本文所述的rAAV和药学上可接受的载剂的药物组合物适于全身注射到哺乳动物中。

[0151] 此类药学上可接受的载剂可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油等。盐水溶液及右旋糖、聚乙二醇(PEG)和甘油水溶液也可以用作液体载剂,特别是对于注射液而言。药物组合物可以进一步包含另外的成分,例如防腐剂、缓冲液、张力剂、抗氧化剂和稳定剂、非离子润湿剂或澄清剂、增粘剂等。本文所述的药物组合物可以单一单位剂量或以多剂量形式包装。这些组合物通常配制为无菌和基本上等渗的溶液。

制品和试剂盒

[0152] 还提供了在本文所述的方法中使用的试剂盒或制品。在各方面中,试剂盒在合适的包装中包含本文所述的组合物(例如,包含编码本披露的RNAi的核酸的本披露的rAAV颗粒)。本文所述的组合物的合适包装是本领域已知的,并且包括例如小瓶(诸如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶、罐、柔性包装(例如,密封的Mylar或塑料袋)等。这些制品可以进一步灭菌和/或密封。

[0153] 本发明还提供了包含本文所述的组合物的试剂盒,并且可以进一步包含关于使用该组合物的方法,诸如本文所述的用途的说明书。本文所述的试剂盒可以进一步包含从商业和使用者角度来看合乎需要的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器以及含进行本文所述的任何方法的说明书的包装插页。例如,在一些实施例中,该试剂盒包含:包含编码本披露的RNAi的转基因以将有效量的rAAV颗粒递送至哺乳动物的重组病毒颗粒、适于注射到哺乳动物中的药学上可接受的载剂的组合物和以下的一种或多种:缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器以及含进行向哺乳动物的注射的说明书的包装插页。在一些实施例中,该试剂盒包含用本文所述的rAAV颗粒治疗DM-1的说明书。在一些实施例中,该试剂盒包含根据本文所述方法中的任一种使用本文所述rAAV颗粒的说明书。

示例性实施例

[0154] 本发明包括以下列举的示例性实施例。

[0155] 1. 一种RNAi,其包含第一链和第二链,其中a) 该第一链和该第二链形成双链体;b) 该第一链包含指导区,其中该指导区包含具有序列5' -AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3' (SEQ ID NO:1) 或具有与SEQ ID NO:1的序列具有约90%同一性的序列的核酸;并且c) 第二链包含非指导区。

[0156] 2. 如实施例1所述的RNAi,其中该非指导区包含具有序列5' -ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3' (SEQ ID NO:2) 或具有与SEQ ID NO:2的序列具有约90%同一性的序列的核酸。

[0157] 3. 如实施例1或2所述的RNAi,其中该第一链包含具有SEQ ID NO:1的序列的核酸,并且该非指导区包含具有SEQ ID NO:2的序列的核酸。

[0158] 4. 如实施例1-3中任一项所述的RNAi,其中该第一链和该第二链借助于能够形成环结构的RNA接头连接。

- [0159] 5. 如实施例4所述的RNAi,其中该RNA接头包含约4至约50个核苷酸。
- [0160] 6. 如实施例4或5所述的RNAi,其中该环结构包含约4至约20个核苷酸。
- [0161] 7. 如实施例4-6中任一项所述的RNAi,其中该环结构包含具有SEQ ID NO:3的序列或具有与SEQ ID NO:3的序列具有约90%同一性的序列的核酸序列。
- [0162] 8. 如实施例4-7中任一项所述的RNAi,其中该RNAi从5'至3'包含该第二链、该RNA接头和该第一链。
- [0163] 9. 如实施例4-7中任一项所述的RNAi,其中该RNAi从5'至3'包含该第一链、该RNA接头和该第二链。
- [0164] 10. 如实施例1-8中任一项所述的RNAi,其中该RNAi包含具有SEQ ID NO:7的序列或具有与SEQ ID NO:7的序列具有约90%同一性的序列的核酸。
- [0165] 11. 如实施例1-10中任一项所述的RNAi,其中该RNAi是小抑制性RNA (siRNA)、微RNA(miRNA)或小发夹RNA(shRNA)。
- [0166] 12. 如实施例1-11中任一项所述的RNAi,其中该RNAi进一步包含支架。
- [0167] 13. 如实施例12所述的RNAi,其中该支架包含SEQ ID No:11的核酸的全部或一部分。
- [0168] 14. 如实施例13所述的RNAi,其中该miRNA嵌入该支架内。
- [0169] 15. 如实施例14所述的RNAi,其中该支架具有5'臂和3'臂,其中该5'臂位于编码该RNAi的核酸的5',其中该3'臂位于编码该RNAi的核酸的3'。
- [0170] 16. 如实施例12-15中任一项所述的RNAi,其中该支架是miR-155支架。
- [0171] 17. 如实施例12-16中任一项所述的RNAi,其中该miR-155支架包含位于该RNAi的5'的具有SEQ ID NO:9的序列或与SEQ ID NO:9的序列具有约90%同一性的序列的核酸。
- [0172] 18. 如实施例12-17中任一项所述的RNAi,其中该miR-155支架包含位于该RNAi的3'的具有SEQ ID NO:10的序列或与SEQ ID NO:10的序列具有约90%同一性的序列的核酸。
- [0173] 19. 如实施例1-18中任一项所述的RNAi,其中该RNAi靶向编码与肌强直性营养不良1型(DM1)相关的多肽的RNA。
- [0174] 20. 如实施例19所述的RNAi,其中该多肽是营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)。
- [0175] 21. 如实施例20所述的RNAi,其中该DMPK包含与DM 1相关的突变。
- [0176] 22. 如实施例20或21所述的RNAi,其中编码DMPK的基因包含5个或更多个CTG三核苷酸重复序列。
- [0177] 23. 一种表达盒,该表达盒包含编码如实施例1-22中任一项所述的RNAi的核酸。
- [0178] 24. 如实施例23所述的表达盒,其中编码该RNAi的核酸与启动子可操作地连接。
- [0179] 25. 如实施例24所述的表达盒,其中该启动子是肌肉特异性启动子。
- [0180] 26. 如实施例24或25所述的表达盒,其中该启动子是结蛋白启动子或其变体。
- [0181] 27. 如实施例26所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含一个或多个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。
- [0182] 28. 如实施例26或27所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含两个增强子元件、和该人结蛋白基因的启动子。
- [0183] 29. 如实施例26-28中任一项所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。

- [0184] 30. 如实施例26-29中任一项所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含:包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件,和/或包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件。
- [0185] 31. 如实施例26-30中任一项所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列或与SEQ ID NO:12的核苷酸序列具有约90%同一性的序列。
- [0186] 32. 如实施例23-31中任一项所述的表达盒,其中该表达盒进一步包含内含子。
- [0187] 33. 如实施例32所述的表达盒,其中该内含子是兔 β -珠蛋白内含子。
- [0188] 34. 如实施例32或33所述的表达盒,其中该内含子包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列或与SEQ ID NO:13的序列具有约90%同一性的序列。
- [0189] 35. 如实施例32-34中任一项所述的表达盒,其中编码该RNAi的核酸嵌入该内含子中。
- [0190] 36. 如实施例35所述的表达盒,其中该内含子包含5'臂和3'臂,其中该5'臂位于编码该RNAi的核酸的5'并且该3'臂位于编码该RNAi的核酸的3'。
- [0191] 37. 如实施例36所述的表达盒,其中该内含子的5'臂包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列或与SEQ ID NO:14的序列具有约90%同一性的序列。
- [0192] 38. 如实施例36或37所述的表达盒,其中该内含子的3'臂包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列或与SEQ ID NO:15的序列具有约90%同一性的序列。
- [0193] 39. 如实施例23-38中任一项所述的表达盒,其中该表达盒进一步包含聚腺苷酸化信号。
- [0194] 40. 如实施例39所述的表达盒,其中该聚腺苷酸化信号是牛生长激素聚腺苷酸化信号、SV40聚腺苷酸化信号或HSV TK pA。
- [0195] 41. 如实施例40所述的表达盒,其中该聚腺苷酸化信号是最小牛生长激素聚腺苷酸化信号。
- [0196] 42. 如实施例39-41中任一项所述的表达盒,其中该牛生长激素聚腺苷酸化信号包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列或与SEQ ID NO:16的序列具有约90%同一性的序列。
- [0197] 43. 如实施例23-42中任一项所述的表达盒,其中该表达盒包含SEQ ID NO:17的核苷酸序列或与SEQ ID NO:17的序列具有约90%同一性的序列。
- [0198] 44. 一种表达盒,其中该表达盒包含经修饰的结蛋白启动子,其中该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。
- [0199] 45. 如实施例44所述的表达盒,其中该经修饰的结蛋白启动子包含两个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。
- [0200] 46. 如实施例44或45所述的表达盒,其中该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。
- [0201] 47. 如实施例44-46中任一项所述的表达盒,其中该经修饰的结蛋白启动子包含:包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件,和/或包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22的序列具有约90%同一性的核苷酸序列的一个或多个增强子元件。
- [0202] 48. 如实施例44-47中任一项所述的表达盒,其中该结蛋白启动子包含SEQ ID NO:

12的核苷酸序列或与SEQ ID NO:12的核苷酸序列具有约90%同一性的序列。

[0203] 49.如实施例44-48中任一项所述的表达盒,其中该表达盒进一步包含内含子。

[0204] 50.如实施例49所述的表达盒,其中该内含子是兔 β -珠蛋白内含子。

[0205] 51.如实施例49或50所述的表达盒,其中该内含子包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列或与SEQ ID NO:13的序列具有约90%同一性的序列。

[0206] 52.如实施例44-51中任一项所述的表达盒,其中该编码转基因的核酸嵌入该内含子中。

[0207] 53.如实施例52所述的表达盒,其中该内含子包含5'臂和3'臂,其中该5'臂位于该编码转基因的核酸的5'并且该3'臂位于该编码转基因的核酸的3'。

[0208] 54.如实施例53所述的表达盒,其中该内含子的5'臂包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列或与SEQ ID NO:14的序列具有约90%同一性的序列。

[0209] 55.如实施例53或54所述的表达盒,其中该内含子的3'臂包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列或与SEQ ID NO:15的序列具有约90%同一性的序列。

[0210] 56.如实施例44-55中任一项所述的表达盒,其中该表达盒进一步包含聚腺苷酸化信号。

[0211] 57.如实施例56所述的表达盒,其中该聚腺苷酸化信号是牛生长激素聚腺苷酸化信号、SV40聚腺苷酸化信号或HSV TK pA。

[0212] 58.如实施例57所述的表达盒,其中该聚腺苷酸化信号是最小牛生长激素聚腺苷酸化信号。

[0213] 59.如实施例56-58中任一项所述的表达盒,其中该牛生长激素聚腺苷酸化信号包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列或与SEQ ID NO:16的序列具有约90%同一性的序列。

[0214] 60.如实施例44-59中任一项所述的表达盒,其中该转基因编码多肽或核酸。

[0215] 61.如实施例44-60中任一项所述的表达盒,其中该转基因编码RNAi。

[0216] 62.一种载体,该载体包含如实施例23-61中任一项所述的表达盒。

[0217] 63.如实施例62所述的载体,其中该表达盒的侧翼是一个或多个填充核酸序列。

[0218] 64.如实施例63所述的载体,其中该一个或多个填充核酸序列源自人Serpina1基因。

[0219] 65.如实施例63或64所述的载体,其中位于该表达盒5'的填充核酸序列源自该人Serpina1基因。

[0220] 66.如实施例63-65中任一项所述的载体,其中位于该表达盒5'的填充序列包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列或与SEQ ID NO:18的序列具有约90%同一性的序列。

[0221] 67.如实施例63-66中任一项所述的载体,其中位于该表达盒3'的填充核酸序列源自该人Serpina1基因。

[0222] 68.如实施例63-67中任一项所述的载体,其中位于该表达盒3'的填充序列包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列或与SEQ ID NO:19的序列具有约90%同一性的序列。

[0223] 69.如实施例62-68中任一项所述的载体,其中该载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。

[0224] 70.如实施例69所述的rAAV载体,其中该表达盒的侧翼是一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。

- [0225] 71. 如实施例70所述的rAAV载体,其中该表达盒的侧翼是两个AAV ITR。
- [0226] 72. 如实施例70或71所述的rAAV载体,其中这些AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。
- [0227] 73. 如实施例70-72中任一项所述的rAAV载体,其中这些AAV ITR是AAV2 ITR。
- [0228] 74. 如实施例69-73中任一项所述的rAAV载体,其中该rAAV载体包含SEQ ID NO:20的核苷酸序列或与SEQ ID NO:20的序列具有约90%同一性的序列。
- [0229] 75. 如实施例69-74中任一项所述的rAAV载体,其中该载体是自身互补的rAAV载体。
- [0230] 76. 一种细胞,该细胞包含如实施例23-61中任一项所述的表达盒、如实施例62-68中任一项所述的载体、或如实施例69-75中任一项所述的rAAV载体。
- [0231] 77. 一种病毒颗粒,该病毒颗粒包含如实施例62-68中任一项所述的载体。
- [0232] 78. 一种重组AAV颗粒,该重组AAV颗粒包含如实施例69-75中任一项所述的rAAV载体。
- [0233] 79. 如实施例78所述的rAAV颗粒,其中该AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAVrh74、AAVrh74N502I、AAVrh74 W505R、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、AAV2-HBKO、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合型、牛AAV、或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。
- [0234] 80. 如实施例78或79所述的rAAV颗粒,其中该ITR和该rAAV病毒颗粒的衣壳源自相同的AAV血清型。
- [0235] 81. 如实施例78或79所述的rAAV颗粒,其中该ITR和该rAAV病毒颗粒的衣壳源自不同的AAV血清型。
- [0236] 82. 如实施例78、79或81所述的rAAV颗粒,其中该AAV病毒颗粒包含AAVrh74 N502I血清型衣壳。
- [0237] 83. 如实施例82所述的rAAV颗粒,其中该ITR是AAV2 ITR并且该rAAV颗粒的衣壳是AAVrh74 N502I血清型衣壳。
- [0238] 84. 如实施例78、79或81所述的rAAV颗粒,其中该AAV病毒颗粒包含AAVrh74 W505R血清型衣壳。
- [0239] 85. 如实施例84所述的rAAV颗粒,其中该ITR是AAV2 ITR并且该rAAV颗粒的衣壳是AAVrh74 W505R血清型衣壳。
- [0240] 86. 一种包含rAAV载体和衣壳的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:AAV2 ITR,编码来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,Byrne结蛋白增强子元件,Paulin结蛋白增强子元件,结蛋白启动子,兔 β -珠蛋白内含子的5'臂,5' miR155支架序列,DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列,miR155末端环序列,DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列,3' miR155支架序列,兔 β -珠蛋白内含子的3'臂,最小牛生长激素聚腺苷酸化序列,编码来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,和AAV2 ITR;并且其中该衣壳是AAVrh74 N502I衣壳。87. 一种包含rAAV载体的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:包含SEQ ID NO:43的多核苷酸序列的AAV2 ITR,编码包含SEQ ID NO:18的多核苷酸序列的来自人serpinA1基因的填

充核酸序列的核酸,包含SEQ ID NO:21的多核苷酸序列的Byrne结蛋白增强子元件,包含SEQ ID NO:22的多核苷酸序列的Paulin结蛋白增强子元件,包含SEQ ID NO:23的多核苷酸序列的结蛋白启动子,包含SEQ ID NO:14的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的5'臂,包含SEQ ID NO:40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列,包含SEQ ID NO:4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列,包含SEQ ID NO:6的多核苷酸序列的miR155末端环序列,包含SEQ ID NO:5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列,包含SEQ ID NO:41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列,包含SEQ ID NO:15的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的3'臂,包含SEQ ID NO:16的多核苷酸序列的最小牛生长激素聚腺苷酸化序列,编码包含SEQ ID NO:19的多核苷酸序列的来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,和包含SEQ ID NO:49的多核苷酸序列的AAV2 ITR;并且其中衣壳是AAVrh74 N502I衣壳。

[0241] 88.如实施例86或87所述的rAAV颗粒,其中该AAVrh74N502I衣壳包含含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的衣壳蛋白。

[0242] 89.一种包含rAAV载体和衣壳的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:AAV2 ITR,编码来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,Byrne结蛋白增强子元件,Paulin结蛋白增强子元件,结蛋白启动子,兔 β -珠蛋白内含子的5'臂,5' miR155支架序列,DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列,miR155末端环序列,DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列,3' miR155支架序列,兔 β -珠蛋白内含子的3'臂,最小牛生长激素聚腺苷酸化序列,编码来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,和AAV2 ITR;并且其中衣壳是AAVrh74 W505R衣壳。

[0243] 90.一种包含rAAV载体的rAAV颗粒,其中该rAAV载体从5'至3'包含以下核酸:包含SEQ ID NO:43的多核苷酸序列的AAV2 ITR,编码包含SEQ ID NO:18的多核苷酸序列的来自人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,包含SEQ ID NO:21的多核苷酸序列的Byrne结蛋白增强子元件,包含SEQ ID NO:22的多核苷酸序列的Paulin结蛋白增强子元件,包含SEQ ID NO:23的多核苷酸序列的结蛋白启动子,包含SEQ ID NO:14的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的5'臂,包含SEQ ID NO:40的多核苷酸序列的5' miR155支架序列,包含SEQ ID NO:4的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA指导序列,包含SEQ ID NO:6的多核苷酸序列的miR155末端环序列,包含SEQ ID NO:5的多核苷酸序列的DMPK²⁰⁴ miRNA乘客序列,包含SEQ ID NO:41的多核苷酸序列的3' miR155支架序列,包含SEQ ID NO:15的多核苷酸序列的兔 β -珠蛋白内含子的3'臂,包含SEQ ID NO:16的多核苷酸序列的最小牛生长激素聚腺苷酸化序列,编码包含SEQ ID NO:19的多核苷酸序列的来自该人serpinA1基因的填充核酸序列的核酸,和包含SEQ ID NO:49的多核苷酸序列的AAV2 ITR;并且其中衣壳是AAVrh74 W505R衣壳。

[0244] 91.如实施例89或90所述的rAAV颗粒,其中该AAVrh74W505R衣壳包含含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的衣壳蛋白。

[0245] 92.一种组合物,该组合物包含如实施例77所述的病毒颗粒或如实施例78-91中任一项所述的rAAV颗粒。

[0246] 93.一种药物组合物,该药物组合物包含如实施例77所述的病毒颗粒或如实施例78-91中任一项所述的rAAV颗粒。

[0247] 94.如实施例92或93所述的组合物,其中该组合物进一步包含药学上可接受的载剂。

[0248] 95.一种经修饰的结蛋白启动子,其中该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个

增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。

[0249] 96. 如实施例95所述的经修饰的结蛋白启动子,其中该经修饰的结蛋白启动子包含两个增强子元件、和人结蛋白基因的启动子。

[0250] 97. 如实施例95或96所述的经修饰的结蛋白启动子,其中该经修饰的结蛋白启动子包含一个或多个Byrne增强子元件和/或一个或多个Paulin增强子元件。

[0251] 98. 如实施例95-97中任一项所述的经修饰的结蛋白启动子,其中该经修饰的结蛋白启动子包含:包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有约90%同一性的序列的一个或多个增强子元件,和/或包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22的序列具有约90%同一性的序列的一个或多个增强子元件。

[0252] 99. 如实施例95-98中任一项所述的经修饰的结蛋白启动子,其中该经修饰的结蛋白启动子包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列或与SEQ ID NO:12的序列具有约90%同一性的序列。

[0253] 100. 一种试剂盒,该试剂盒包含如实施例1-22中任一项所述的RNAi。

[0254] 101. 一种试剂盒,该试剂盒包含如实施例77所述的病毒颗粒或如实施例78-91中任一项所述的AAV颗粒。

[0255] 102. 一种试剂盒,该试剂盒包含如实施例92-94中任一项所述的组合物。

[0256] 103. 如实施例100-102中任一项所述的试剂盒,该试剂盒进一步包含使用说明书。

[0257] 104. 一种用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如实施例1-22中任一项所述的RNAi。

[0258] 105. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中的营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)表达的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如实施例1-22中任一项所述的RNAi。

[0259] 106. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如实施例1-22中任一项所述的RNAi。

[0260] 107. 一种用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如实施例77所述的病毒颗粒或如实施例78-91中任一项所述的rAAV颗粒。

[0261] 108. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中的营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)表达的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如实施例77所述的病毒颗粒或有效量的如实施例78-91中任一项所述的rAAV颗粒。

[0262] 109. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如实施例77所述的病毒颗粒或有效量的如实施例78-91中任一项所述的rAAV颗粒。

[0263] 110. 如实施例102-104中任一项所述的方法,其中该病毒颗粒或rAAV颗粒的有效量是约 1×10^8 至约 2×10^{13} 个基因组拷贝/mL的剂量。

[0264] 111. 如实施例110所述的方法,其中该剂量为约 5×10^{12} 个基因组拷贝/mL。

[0265] 112. 如实施例110所述的方法,其中该剂量为约 1×10^{13} 个基因组拷贝/mL。

[0266] 113. 如实施例110所述的方法,其中该剂量为约 2×10^{13} 个基因组拷贝/mL。

[0267] 114. 如实施例107-109中任一项所述的方法,其中该病毒颗粒或rAAV颗粒的有效

量是约 1×10^8 至约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重的剂量。

[0268] 115. 如实施例114所述的方法,其中该剂量为约 5×10^{13} 个基因组拷贝/kg体重。

[0269] 116. 如实施例114所述的方法,其中该剂量为约 1×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重。

[0270] 117. 如实施例114所述的方法,其中该剂量为约 2×10^{14} 个基因组拷贝/kg体重。

[0271] 118. 一种用于治疗有需要的哺乳动物的肌强直性营养不良1型(DM1)的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如实施例92-94中任一项所述的组合物。

[0272] 119. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物中的营养不良性肌强直蛋白激酶(DMPK)表达的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如实施例92-94中任一项所述的组合物。

[0273] 120. 一种用于抑制有需要的患有DM-1的哺乳动物的细胞中DMPK RNA的积聚的方法,该方法包括向该哺乳动物施用有效量的如实施例92-94中任一项所述的组合物。

[0274] 121. 如实施例104-106中任一项所述的方法,其中该RNAi与免疫抑制剂组合施用,其中该免疫抑制剂在该RNAi施用之前、同时和/或之后施用。

[0275] 122. 如实施例107-109中任一项所述的方法,其中该病毒颗粒或该rAAV颗粒与免疫抑制剂组合施用,其中该免疫抑制剂在该病毒颗粒或该rAAV颗粒施用之前、同时和/或之后施用。

[0276] 123. 如实施例118-120中任一项所述的方法,其中该组合物与免疫抑制剂组合施用,其中该免疫抑制剂在该组合物施用之前、同时和/或之后施用。

实例

[0277] 通过参考以下实例将更好地理解当前披露的主题,这些实例是作为本发明的示例提供的,而不是以限制的方式提供的。

实例1:amiR-DMPK²⁰⁴表达盒的产生

[0278] 产生了编码设计用于靶向DMPK基因的微RNA(amiR-DMPK²⁰⁴)的单链AAV病毒载体(图1A)。构建体被设计成使得amiR-DMPK²⁰⁴微RNA嵌入优化的微RNA骨架miR155(BLOCK-iT; 赛默飞世尔目录号K4935-00、K4936-00、K4937-00、K4938-00)中且下文称为“miR155 amiR-DMPK²⁰⁴”或“amiR155-DMPK²⁰⁴”。miR155 amiR-DMPK²⁰⁴的侧翼是兔 β -珠蛋白内含子序列并且置于杂合肌肉启动子(nDes)的调控下。

[0279] 通过常规寡核苷酸合成(美国金斯瑞(Genscript, USA))合成包含Byrne结蛋白增强子、一个拷贝的Paulin结蛋白增强子(-973至-693)、和人结蛋白基因的启动子(-228至+75)的nDesmin启动子。

[0280] 将牛生长激素聚腺苷酸化序列置于侧接内含子的amiR-DMPK²⁰⁴微RNA(minBGHpA)的3'。包括填补序列(“填充序列”)。整个基因盒的侧翼是野生型AAV血清型2反向末端重复(ITR)序列,用于DNA挽救和复制,以及包装到AAV衣壳中。将序列工程改造到ITR质粒中,将该质粒用于产生进行体内功效研究的载体。

5'和3' ITR序列

[0281] ITR序列是145bp的AAV2野生型序列。3' ITR(表达盒的下游)处于Flip取向(GenBank:LQ493091.1)。5' ITR(表达盒的上游)处于Flop取向(145bp)(Miller等人,2004, Nature Genetics[自然遗传学]36.7(2004):767-773)。通过Sanger测序确认序列的准确性。

nDes启动子

[0282] 使用文献中示出的结蛋白启动子元件构建nDes启动子(Li和Paulin等人,1991,J Biol Chem.[生物化学杂志]266.10:6562-6570)。nDes启动子包含一个拷贝的Byrne结蛋白增强子、一个拷贝的Paulin结蛋白增强子(-973至-693)、和人结蛋白基因的启动子(-228至+75)。

兔 β -珠蛋白内含子的5'臂和3'臂

[0283] 该内含子用于侧接amiR-DMPK²⁰⁴盒,因为已知miRNA的内含子表达会增强靶敲低。

具有miR155支架的amiR-DMPK²⁰⁴(miR155-amiRDMPK²⁰⁴)

[0284] 内源miRNA是在许多初级RNA转录物(pri-miRNA)中发现的发夹样二级结构。在核中,微处理器Drosha/DGCR8复合物结合并切割pri-miRNA的基底茎以释放茎-环前体miRNA(pre-miRNA)。然后将pre-miRNA从核中输出,在核中环被Dicer/TRBP切割以形成成熟的RNA双链体。指导链,也称为靶向链,与乘客链分开并负载到RNA诱导的沉默复合物(RISC)中的argonaute蛋白上,然后靶向互补mRNA转录物进行降解或翻译阻遏。

[0285] 将amiR-DMPK²⁰⁴序列鉴定为DM1治疗的靶标。amiR-DMPK²⁰⁴的靶序列位于DMPK核苷酸序列的3'UTR内的“CUG”重复序列的上游。因此,amiR-DMPK²⁰⁴可抑制野生型和突变体DMPK转录物两者。

[0286] 另外,amiR-DMPK²⁰⁴靶区在非人灵长类(NHP-食蟹猴)和人类中是保守的,从而允许在NHP中进行DMPK敲低的临床前评估(图11)。评价amiR-DMPK²⁰⁴微RNA,并且显示miR155支架具有有效的指导链加工和最小限度的乘客链加工,降低了脱靶效应的可能性(参见以下实例2)。

[0287] 选择用于开发的最终构建体是具有miR155支架的amiR-DMPK²⁰⁴(amiR155-DMPK²⁰⁴),其中当经过加工时,指导链靶向DMPK mRNA进行降解。经工程改造的pre-miRNA序列结构基于鼠miR-155序列(Lagos-Quintana等人,2002,Current Biology[当代生物学],12:9,735-739)。将源自miR-155转录物的5'和3'侧翼区插入载体中以尽可能地保留miR-155结构。优化茎-环结构,并且2个核苷酸的内环导致比在天然miR-155分子中发现的5个核苷酸/3个核苷酸的内环更高的敲低率(来源:BLOCK-iTTMPol II miR RNAi表达载体,英杰公司(Invitrogen))。经证实载体nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴,在AAV衣壳的背景下,在DM1的DMSXL小鼠模型中具有有效的体内活性(参见以下实例3)。

minBGH polyA

[0288] 将186bp的最小BGH polyA位点插入amiR-DMPK²⁰⁴序列的下游以允许mRNA的转录终止和聚腺苷酸化。

来自A1AT内含子的填充序列

[0289] 使用来自 α -1抗胰蛋白酶基因内含子序列4的填充序列使基因盒达到rAAV载体的包装限度。

具有nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴盒的ITR质粒(nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴)的克隆

[0290] 设计表达构建体nDes-miR155-amiR-DMPK204-minBGHpolyA盒的1938bp ITR-ITR序列。将nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴-minBGHpolyA盒克隆到ITR质粒中。合成的nDes-miR155-amiR-DMPK204-minBGHpolyA包括用于克隆到ITR质粒中的5'NcoI位点和3'SphI位点(图1B)。简言之,用NcoI和SphI消化含有合成的nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴-minBGHpolyA

序列的质粒,并凝胶纯化1.9kB片段。将ITR质粒用NcoI和SphI消化,使用牛小肠碱性磷酸酶去磷酸化(新英格兰生物实验室(New England Biolabs);目录号M0290)并凝胶纯化8.2kB载体骨架片段。连接含有表达盒的经过消化的1.9kB片段和经过消化的ITR质粒以产生质粒ITR-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴。

小规模rAAV载体生产

[0291] 在HEK 293细胞中进行小规模包装测定,以确认ITR-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴质粒的包装。使用AAV rep/cap质粒进行小规模生产。图1C示出与标准EGFP质粒基因盒相比,每个HEK 293细胞产生的载体的量。

[0292] 为了确定amiR-DMPK²⁰⁴校正DM1表型的潜力,测试了在来自DM1患者的骨骼肌成肌细胞培养物中使人DMPK转录物沉默和校正剪接缺陷的能力。由于DMPK基因的3'UTR中的CTG扩增,DMPK mRNA发夹结构聚集为不溶性核糖核灶并隔绝几种RNA结合蛋白。所引起的必需剪接因子诸如盲肌样蛋白1(MBNL1)的再分布导致负责肌肉组织分化的下游效应物的错误剪接。用amiR-DMPK²⁰⁴处理DM1患者细胞导致超过50%的DMPK mRNA沉默和剪接校正,如通过MBNL1外显子7包含所测量的。

实例2:miR155 amiR-DMPK²⁰⁴的加工

[0293] 将amiR-DMPK²⁰⁴包装到AAV衣壳中,并在体内分析DMPK敲低功效、乘客链活性和加工模式。将带有nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴的构建体包装到AAV中。将载体静脉注射到表达具有>1,000个CTG重复序列的人DMPK的DMSXL成体人源化DM1小鼠模型中。八周后,对动物实施安乐死,收集多个组织以测量DMPK敲低功效,并且选择心脏组织测量乘客链活性和加工模式。

[0294] RT-PCR分析显示amiR-DMPK²⁰⁴在多种肌肉组织中稳健表达,在心脏中具有较高表达(图2B)。伴随amiR-DMPK²⁰⁴表达,RT PCR分析确认心脏中稳健的DMPK阻抑,在不同骨骼肌中具有平均>70%和约30%的DMPK阻抑(图2C)。在心脏组织中,相对于TBP(TATA结合蛋白)表达,DMPK表达低于50%。值得注意的是,相对于TBP表达低水平DMPK(约50%,由图2C中的虚线指示)的DMSXL小鼠没有明显的DM1表型。有趣的是,即使在肝脏中观察到较高的转导(图2A),但nDesmin启动子在心脏组织中显示出强活性并且在骨骼肌中显示出相似的水平(图2B)。这表明表达主要限于受DM1病理影响的心肌和骨骼肌。

[0295] 为了评估amiR-DMPK²⁰⁴的加工,通过用于小转录组分析的NGS分析心脏组织的成熟amiR-DMPK²⁰⁴长度及指导链和乘客链的序列组成。

amiR-DMPK²⁰⁴的加工不产生乘客链。在小鼠心肌细胞中amiR-DMPK²⁰⁴专门加工成指导链(>99%),但常常产生比从miRBase数据库预测的更长的链(表1)。miR155加工最常产生22至26个核苷酸长的成熟长度,但在5'端精确加工(表1)。映射到miR155 amiR-DMPK²⁰⁴的不同指导链长度(nt)的序列分布以百分比(%读段)计算。预期的amiR-DMPK²⁰⁴指导链加下划线,并且种子序列为粗体。星号指示对应于amiR-DMPK²⁰⁴指导链的预测长度的读段。

表1.映射到miR155 amiR-DMPK²⁰⁴的不同指导链长度(nt)的序列分布以百分比(%读段)计算。预期的amiR-DMPK²⁰⁴指导链加下划线。星号指示对应于amiR-DMPK²⁰⁴指导链的预测长度的读段。

miR-155读段序列	长度	%序列	SEQ ID NO
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGT	23	52	33

AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTT	24	24	34
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTTT	25	11	35
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGT*	22	6	36
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTTTT	26	3	37
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTG	22	4	38

[0296] 总之,用具有miR155的amiR-DMPK²⁰⁴没有检测到乘客链(%指导链>99%)。因此,选择miR155作为临床前研究的先导物,因为miR155miRNA支架对于RNAi是充分验证的。

实例3:通过在转基因小鼠中全身注射编码miR155-amiRDMPK²⁰⁴的AAV对人DMPK的剂量依赖性阻抑

[0297] 为了确定最有效的剂量,研究了三种单独剂量的亲肌AAV (WO/2019/207132) 衣壳的递送。在剂量递增研究中评价编码具有miR155支架的amiR-DMPK²⁰⁴的表达盒(amiR155-DMPK²⁰⁴)的AAV。8周龄DMSXL小鼠静脉内注射 5.0×10^{11} 个载体基因组(vg)/kg、 5×10^{12} vg/kg和 1.0×10^{13} vg/kg(对应于低、中和高剂量)。在AAV输注后8周分析小鼠的临床症状,诸如体重、存活率、肌强直和心脏功能。基因转移后8周对小鼠实施安乐死,并测量DMPK阻抑和剪接校正。通过小RNA TaqMan测量miR155-amiRDMPK²⁰⁴表达水平,并将mRNA输入水平针对u6小核RNA进行归一化。

[0298] 以剂量依赖性方式观察到amiR155-DMPK²⁰⁴的表达(图3A),并引起多种组织中总DMPK表达的剂量依赖性降低(图3B)。总之,观察到约10个amiR155-DMPK²⁰⁴拷贝/U6足以使心脏和膈肌中的DMPK降低 $\geq 50\%$,该量足以治疗DM1患者。

[0299] 接下来,研究DMPK阻抑对特征性DM1表型诸如剪接异常的后果。引起Ldb3转录物中包含外显子11的LIM结构域结合蛋白3(Ldb3)的异常剪接已被证明是由CUG重复RNA隔绝RNA剪接机制引起的DM1-特异性表型(Yamashita等人2014.Neurobiol Dis.[疾病神经生物学] 69:200-5)。在用中剂量或高剂量的AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴处理的小鼠中观察到腓肠肌中包含外显子11的Ldb3转录物的显著减少,确认在用amiR155-DMPK²⁰⁴处理的肌肉中剪接缺陷得到有效校正(图4)。

[0300] 除了这些分子校正外,然后还根据疾病的生理和功能表现测量了AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴的功效。

[0301] 为了确定处理是否可以改善存活和减轻体重损失,用三种不同剂量的AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴处理DMSXL小鼠,并监测存活和体重。在用中剂量和高剂量处理8周后观察到体重和存活率的改善。另一方面,用低剂量或平衡盐溶液(BSS)对照没有观察到改善(图5A和图5B)。

[0302] 接下来,根据疾病的功能表现诸如预防肌强直和心脏异常来测量AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴的功效。肌电图测量揭示用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴处理的小鼠的肌强直显著降低(表2)。具体地,处理后,仅7.6%的用中剂量处理的动物具有肌强直。相比之下,对照(用BSS处理的)或低剂量组中>50%的小鼠具有持久性肌强直(评分1)。

表2.用AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴处理后具有肌强直的DMSXL DM1小鼠的数目。

分组	具有肌强直(腓肠肌)的动物 数目
WT	0/10
DMSXL-对照(未处理的)	4/7
DMSXL-5E11 VG/Kg(低 剂量)	3/5
DMSXL-5E12 VG/Kg(中 剂量)	1/13
DMSXL-5E13 VG/Kg(高 剂量)	1/7

P<0.05

肌强直放电按4分量表分级:0,无肌强直;1,在少于50%的针插入中偶见肌强直放电;2,在大于50%的针插入中有肌强直放电;3:几乎每个插入都有肌强直放电。

[0303] DMSXL小鼠的心脏功能也在处理后8周使用表面超声心动图连同骨骼肌功能一起监测。与BSS处理的对照相比,AAV nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴改善心输出量。在处理8周后,在中剂量组(5e12vg/kg)中注意到心输出量的显著改善(图6)。

实例4:AAVrh74N502I衣壳改善了肌肉转导并降低了肝脏转导

[0304] 进行实验以测试含有AAVrh74N502I VP1衣壳蛋白(WO 2019178412;SEQ ID NO:50)的AAV衣壳在非人灵长类动物的各种组织中的转导效率。图7A中示出了实验的概要。用 1×10^{13} vg/kg各自含有eGFP表达盒的AAV9、AAVrh74或AAVrh74N502I衣壳静脉内处理非人灵长类动物。处理后21天,处死动物,并测量胫骨前肌(TA)、股二头肌、四头肌、心脏和肝脏中的eGFP表达水平。

[0305] 与比较衣壳相比,含有AAVrh74N502I衣壳蛋白的衣壳在非人灵长类动物中具有改善的肌肉转导(图7B-图7E)和降低的肝脏转导(图7F)。(表3)。

表3.用AAVrh74N502I衣壳处理的非人灵长类动物的组织中的eGFP水平相对于用AAV9和AAVrh74衣壳处理的非人灵长类动物增加。

组织	AAV9	AAVrh74
胫骨前肌	+13x	+178x
股二头肌	+303x	+56x
四头肌	NS*	+32x
心脏	NS	+13x
肝脏	-15x	-2x

*NS=不显著

实例5:对DMSXL小鼠模型中AAVrh74N502InDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴靶接合的评

价

[0306] 为了确定最有效的剂量,研究了两种单独剂量的AAVrh74N502I衣壳的递送。在剂量递增研究中评价编码具有miR155支架的amiR-DMPK²⁰⁴的表达盒(miR155-amiR-DMPK²⁰⁴)的AAV。8周龄DMSXL小鼠静脉内注射 9×10^{13} 个载体基因组(vg)/kg和 1.8×10^{14} vg/kg(对应于低高剂量和高剂量)。基因转移后8周对小鼠实施安乐死,并通过小RNA TaqMan测量DMPK抑制和amiR-DMPK²⁰⁴表达水平,并将mRNA输入水平针对u6小核RNA进行归一化。

[0307] 以剂量依赖性方式观察到amiR-DMPK²⁰⁴的表达(图8A),并引起多种组织中总DMPK表达的剂量依赖性降低(图8B)。总之,观察到~10个amiR-DMPK²⁰⁴拷贝/U6足以使心脏和膈肌中的DMPK降低 $\geq 50\%$,该量足以治疗DM1患者。

[0308] 最后,经证实前导载体nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴,在亲肌衣壳AAVrh74N502I(SEQ ID NO:50)的背景下,在心肌细胞来源的DM1 iPSC中具有有效的体外活性(图9)。

实例6:转录组上AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴的评价

[0309] 为了确定amiR-DMPK²⁰⁴处理对转录组是否具有任何重大影响,进行全基因组RNA测序(RNA-seq),通过将CBA miR155-amiR-DMPK²⁰⁴质粒转染到HEK293细胞系中来比较amiR-DMPK²⁰⁴处理与CTL3(加扰miRNA)。为了评价观察到的非DMPK基因表达变化是否是由于amiR-DMPK²⁰⁴的脱靶效应引起的,评价了显著下调的靶标中种子互补性的富集。使用5%的错误发现率(FDR)显著性阈值,存在4个差异性表达的基因OPN4(12.5倍)、DMPK(1.7倍)、KRTAP21-2(1.7倍)、C8ORF44-SGK3(1.7倍),它们的3'UTR含有TTTCGAC种子互补序列(表4)。对于1% FDR,仅有OPN4(12.5倍)、DMPK(1.7倍)显示出差异表达(图10)。正如所预期的,DMPK是受影响最显著的mRNA水平之一(44%沉默)。总之,amiR-DMPK²⁰⁴在HEK293细胞中过表达后观察到最小的脱靶效应。

表4

基因名称	log2 倍数 204 对比 CTL3	倍数 204 对 比 CTL3	P 值	FDR_BH < 0.05	FDR_BH < 0.01
OPN4	-3.64	12.5	2.7746E-17	5E-13	是
DMPK	-0.77	1.7	3.4308E-10	2E-06	是
KRTAP21-2	-0.76	1.7	0.0001	0.0103	
C8orf44-SGK3	-0.79	1.7	0.0003	0.0191	

实例7:探索AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴在非人灵长类动物中的生物分布和活性的剂量范围发现研究

为了确定AAVrh74MN502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴的生物分布和活性,向食蟹猴施用单次静脉内输注(IV)剂量。研究持续时间为单次注射后12周。

共有16只食蟹猴(8只雄性,8只雌性;24至48月龄)在研究的第1天经由隐静脉IV给药一次。剂量示于下面表5中。基于以下剂量水平(vg/kg)将动物分组(每组2只雄性和2只雌性)为四个不同的类别:配制缓冲液(第1组); 5×10^{13} vg/kg(第2组); 1×10^{14} vg/kg(第3组);和 2×10^{14} vg/kg(第4组)。12周后,处死动物并收获组织用于分析。

表5

分组	试验品或对照品	剂量水平 (vg/kg)	剂量浓度 (vg/mL)	动物数目	
				雄性	雌性
1	配制缓冲液	0	0	2	2
2	AAVrh74N502I	5×10^{13}	5×10^{12}	2	2
	nDes-miR155-amiR-DMPK ²⁰⁴		vg/ml		
3	AAVrh74N502I	1×10^{14}	1×10^{13}	2	2
	nDes-miR155-amiR-DMPK ²⁰⁴		vg/ml		
4	AAVrh74N502I	2×10^{14}	2×10^{13}	2	2
	nDes-miR155-amiR-DMPK ²⁰⁴		vg/ml		

机械匀化收获的组织进行RNA和DNA提取,并用数字PCR(dPCR)分析样品。

AAVrh74N502I nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴的剂量依赖性生物分布和活性在几种肌肉和非肌肉组织中得以证明。分析几种骨骼肌(胫骨前肌(TA);腓肠肌;四头肌;二头肌;比目鱼肌;趾长伸肌(EDL);膈肌)以及心肌和肝脏组织。在测试的所有组织中都发现病毒基因组拷贝,并且每个组织中拷贝数/细胞是剂量依赖性方式的(图12)。amiR-DMPK表达(图13)和DMPK下调(图14)在各种肌肉组织、心脏组织和肝脏组织中也是剂量依赖性方式的。发现DMPK表达的剂量依赖性减少与对照组相比减少高达90%。发现在动物中测试的所有剂量是安全的并且是动物耐受良好的。

序列

除非另有指示,否则所有多肽序列以N-末端至C-末端呈现。除非另有指示,否则所有核酸序列以5'至3'呈现。

Byrne结蛋白增强子序列

CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTG
CTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGT
GTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGACCCAGGGGGCAGGAGC
CACACAAAGTCTGTGCGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAACCTG

AAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTGAGGCCCCACCCTCGA (SEQ ID NO:21)

来源:Li和Paulin等人1991."High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer[高水平结蛋白表达取决于肌肉特异性增强子]."Journal of Biol Chem. [生物化学杂志]266.10:6562-6570。

Homo sapiens desmin locus control region(DES-LCR)on chromosome 2[2号染色体上的智人结蛋白基因座控制区(DES-LCR)](NCBI参考序列:NG_046330.1)

Byrne增强子序列对应于参考序列中的17767-18125。

Paulin结蛋白增强子序列

CCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGCGTTCTCCTCT
ATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGG

TTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTG
 AGTAGGGGATGAATCAGGGAGGGGCGGGGACCCAGGGGCGAGGCCACACAAAGTCTGTGCGGG
 GGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAACTGAA (SEQ ID NO:22) 来源:Li和Paulin等人1991."High
 level desmin expression depends on amuscle-specific enhancer[高水平结蛋白表达
 取决于肌肉特异性增强子]."Journal of Biol Chem.[生物化学杂志]266.10:6562-6570。

Homo sapiens desmin locus control region(DES-LCR)on chromosome 2[2号
 染色体上的智人结蛋白基因座控制区(DES-LCR)](NCBI参考序列:NG_046330.1)

Paulin增强子序列对应于参考序列中的17787-18063

Paulin结蛋白启动子序列(-228至+75)

CTGCAGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAG
 GA

CCCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCC
 CC

CACGGCCACGGGCCGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGACAGCTGTCAGGGG
 AG

GGGAGGCGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCT
 GT

CTCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCG
 CCCGCCAGCCTCGCCCG (SEQ ID NO:23)

与公开的序列有一个碱基对差异(C而不是A,以粗体和下划线显示)。来源:Li和
 Paulin等人1991."High level desmin expression depends on amuscle-specific
 enhancer[高水平结蛋白表达取决于肌肉特异性增强子]."Journal of Biol Chem.[生物
 化学杂志]266.10:6562-6570。

Homo sapiens desmin locus control region(DES-LCR)on chromosome 2[2号
 染色体上的智人结蛋白基因座控制区(DES-LCR)](NCBI参考序列:NG_046330.1)

Paulin启动子序列对应于参考序列中的18535-18844

完整nDes启动子序列

CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTC
 CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTG
 CTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGT
 GTGTGGGCGTGGTGGTGTGAGTAGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGACCCAGG
 GGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAACTG
 AAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCACTGTTTATAAACTTGAGGCCCCACCCTCGAGGTAC
 CCCCTGCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCAGCCATGCG

TTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAG
 ATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTG
 GGTGGTGTGAGTAGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCC

ACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAAACTGAAAGCTTCTGC
 AGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAGGACCCC
 CGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTTCGCGGGGAGCTGGCTCCCCGCCCCACG
 GCCACGGGCCGCCCTTCTCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGCTGTCAGGGGAGGGGA
 GCGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCC
 CCTCGCCGATCCACTCTCCGGCCGGCCGCTGCCCGCCGCTCCTCCGTGCGCCCGCCAGCCTCGCC
 CG (SEQ ID NO:12)

来源:Li和Paulin等人1991."High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer[高水平结蛋白表达取决于肌肉特异性增强子]."Journal of Biol Chem.[生物化学杂志]266.10:6562-6570。

兔 β -珠蛋白内含子

GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTATA
 TGGAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACC
 ATG**CATG**GACCCTCATGATAATTTTGTTCCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATT
 GTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACCTTTTTCGTTAAACTTTAGCTTGCATT
 TGTAACGAATTTTTTAAATTCACCTTTGTTTATTTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGATT
 CCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTA
 AATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATCTGGCTGGCGTGGAAATATTCTTATT
 GGTAGAAACAACACTACA**T**CCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATA
 TACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAACC
 ATGTTTCATGCCTTCTTCT**T**TTTCCTACAG (SEQ ID NO: 13)

兔 β -珠蛋白内含子的5'臂

GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTA
 TA
 TGGAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCA
 CC
 ATG**CATG**GACCCTCATGATAATTTTGTTCCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCA
 TT
 GTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACCTTTTTCGTTAAACTTTAGCTTGC
 ATT
 TGTAACGAATTTTTTAAATTCACCTTTGTTTATTTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGA
 TTC (SEQ ID NO:14)

来源:穴兔(*Oryctolagus cuniculus*)血红蛋白, β (HBB2)基因ID 100009084本发
 明的序列具有另外的CATG(以粗体和下划线显示),其不存在于基因ID 100009084中。

兔 β -珠蛋白内含子的3'臂

CAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAAT
 TA
 AATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGAAATATTCTTA
 TT
 GGTAGAAACAACACTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGA
 TA
 TACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCTCTGCTAA
 CCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAG (SEQ ID NO:15)

来源:穴兔血红蛋白, β (HBB2) 基因ID 100009084

本发明的序列具有两个T残基(以粗体和下划线显示),而不是基因ID 100009084中的两个C残基。

miR155-DMPK²⁰⁴序列:

5' miR155侧翼序列

RNA序列

CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCU (SEQ ID NO:9)

DNA序列

CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCT (SEQ ID NO:40)

来源:BLOCK-iTTMPol II miR RNAi表达载体试剂盒目录号#K493500经工程改造的pre-miRNA序列结构基于鼠miR-155序列(Lagos-Quintana等人,2002,Current Biology[当代生物学],12:9,735-739)。

amiR-DMPK²⁰⁴指导-DNA

AGTCGAAGACAGTTCTAGGGT (SEQ ID NO:4)

miR155末端环-DNA

GTTTTGGCCACTGACTGAC (SEQ ID NO:6)

来源:BLOCK-iTTMPol II miR RNAi表达载体试剂盒目录号#K493500经工程改造的pre-miRNA序列结构基于鼠miR-155序列(Lagos-Quintana等人,2002,Current Biology[当代生物学],12:9,735-739)。

amiR-DMPK²⁰⁴乘客-DNA

ACCCTAGATGTCTTCGATT (SEQ ID NO:5)

amiR-DMPK²⁰⁴指导-RNA-miR155末端环-amiR-DMPK²⁰⁴乘客-RNA

AGUCGAAGACAGUUCUAGGGUUGUUUUGCCACUGACUGACACCCUAGAUGUCUUCGAUU (SEQ ID NO:7)

amiR-DMPK²⁰⁴指导-DNA-miR155末端环-amiR-DMPK²⁰⁴乘客-DNA

AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATT (SEQ ID NO:8)

3' miR155侧翼序列

RNA序列

GACACAAGGCCUGUUACUAGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC (SEQ ID NO:10)DNA序列

GACACAAGGCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCC (SEQ ID NO:41) 来源:BLOCK-iT™Po1 II miR RNAi表达载体试剂盒目录号#K493500

经工程改造的pre-miRNA序列结构基于鼠miR-155序列(Lagos-Quintana等人, 2002,Current Biology[当代生物学],12:9,735-739)。

miR155

RNA

CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGACACAAGGCCUGUUACUAGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC

(SEQ ID NO:11)

DNA

CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCC

(SEQ ID NO:42)

全miR155-DMPK²⁰⁴双链体序列-RNA

CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGAGUCGAAGACAGUUCUAGGGUGUUUUGGCCACUGACUGAC
ACCCUAGAUGUCUUCGAUUCAGGACACAAGGCCUGUUACUAGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC (SEQ ID NO:
24)

全miR155-DMPK²⁰⁴双链体序列-DNA

CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTGTTTGGCCACTGACTGAC
ACCCTAGATGTCTTCGATTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCC (SEQ ID NO:
25)

最小BGHpA序列

TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCC
CACTGTCCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG
GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC (SEQ ID NO:16)

来源:家牛(Bos taurus)生长激素1(GH1)mRNA NCBI参考序列NM_180996.1

1138 bp A1AT内含子填充序列(表达盒的上游)

TACGTACAATTGGGATCCTTCGAACCTTGAGAGAAAACATCCCAGGGATTTACAGATCAC
ATGCAGGCAGGGACCAGCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGGAGGGGGCCAGGGAT
GGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGCAGTTATTTTTGGGTGGGATTCACCACTTTTC
CCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATTAAGAAGACAAAGGGTTTGTG
AACTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGC
TTCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTGGAGGGGAGAGA
AGCAGAGACACGTTGTAAGGCTGATCCCAGGCCTCGAGCAAGGCTCACGTGGACACCTC
CCAGGAAGCGCTCACTCCCCCTGGACGGCCCTGGCCCTGCACATCCTCTCCCTCCCTGT
CACATAGGCCTTGCTCCTCCTCAAGGCTTTGGCTGATGGGGCTGGCTCCCTCTGTCCA
TCTTCCTGACAAGCGCCTCTCCCCCTGCTCAGGTGCACCCACAACCTCAGAACAGGGAAG
AGCATCGTCACTCCACTAGTCTGCCTCCAGGGCTCTCTCCTTTCTAGTACACGGCTTGA
AGCTCCTTGAGGACACGGACCCTGGCAGTGACCTTCACAGTGGCCAGACCCCAAGATAA
TGCAGCCATTCATGGAACCTGCAGGTTGTTCAATTGGTGCCTTTAGTTTTCCAAAATAAG
TGTCACCTTAGCTGAAATCATTCAATTAATTCAGACACCAAATCTCACAGATCGAAGGAG

TCAGAAATTCCTTTGAAACAACCTTAGCCCAAACCTTTCTGTGTCAGTATGGATAAATCA
AGGCCCAATGTCTAGAAGGTCTTGGGCAAAGTTGAAATTCAGGGTCAGTGACACAACCT
CAAGGGAGGCCCGAAAGTGCCAGCTGCACAGCAGCCCCTGCCTGGCTTTGCTGTTTGC
CCACCGTCCCGTGTGTCAGTGAATCACGGGCATCTTCAGGAGCTCAGCCTGGGTCTTCATT
TGTTTTCCCTCGGCCCTTCCTCAGCCTCAGGACAGTGCTAGCAGCCCCACACATTCTCCCTACAGA
TACCATGG (SEQ ID NO:18)

来源:质粒DC 969 (Serp1A1=A1AT) 染色体14NG_008290.1

398bpA1AT内含子填充序列(表达盒的下游)

GCATGCAGAGTGGACAGGGCCTCAGGGACCCCTGATCCAGCTTTCTCATTGGACAGA
AGGAGGAGACTGGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCCCACTAAGGCCACAGCAGAGCCAG
GACTTTAGCTGTGCTGACTGCAGCCTGGCTTGCTCCACTGCCCTCCTTTGCCTCAAGA
GCAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCCCTGGCCTTGCTCCCACCTCCCCTCCC
CTATGCTGTTTTCTGGGACAGTGGGAGCTGGCTTAGAATGCCCTGGGGCCCCCAGGAC
CCTGGCATTTTAACCCCTCAGGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATACAGAAGAGTCCATCA CCTGCTGT
ATGCCACACACCATCCCCACAGTCGACATTTAAATT (SEQ ID NO:19)

来源:质粒DC 969 (Serp1A1=A1AT) 染色体14NG_008290.1

ITR-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴-BGHpA-填充序列-ITR(3739bp)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC

GAC

CTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATCACTAGGG

GTT

CCTTACGTACAATTGGGATCCTTCGAACTTGAGAGAAAACATCCCAGGGATTTACAGATCACATGCAG

GCA

GGGACCAGCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGG

AGC

GAGAGGCAGTTATTTTTGGGTGGGATTACCACCTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTTGTT
CAA
TCATTAAGAAGACAAAGGGTTTGTGAACTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAA
AAC
ATGGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTGGAGGGG
AGA
GAAGCAGAGACACGTTGTAAGGCTGATCCCAGGCCTCGAGCAAGGCTCACGTGGACACCTCCCAGGAA
GCG
CTCACTCCCCCTGGACGGCCCTGGCCCTGCACATCCTCTCCCTCCCTGTCACATAGGCCTTGCTCCTC
CTC
AAGGCTTTGGCTGATGGGGCTGGCTCCCCTCTGTCCATCTTCTGACAAGCGCCTCTCCCCCTGCTCA
GGT
GCACCCACAACCTCAGAACAGGGAAGAGCATCGTCACTCCACTAGTCTGCCTCCAGGGCTCTCTCCTTT
CTA
GTACACGGCTTGAAGCTCCTTGAGGACACGGACCCTGGCAGTGACCTTCACAGTGCCAGACCCCAAG
ATA
ATGCAGCCATTCATGGAACGCAGGTTGTTTATTGGTCGCCTTTAGTTTTCCAAAATAAGTGTCACTT
TAG
CTGAAATCATTCATTAATTCAGACACCAAATCTCACAGATCGAAGGAGTCAGAAATTCCTTTGAAACA
ACT
TAGCCCAAACCTTTCTGTGTCAGTATGGATAAATCAAGGCCCAATGTCTAGAAGGTCTTGGGCAAAGT
TGA
AATTCAGGGTCAGTGACACAACCTCAAGGGAGGCCCCGAAAGTGCCAGCTGCACAGCAGCCCCTGCCT
GGC
TTTGCTGTTTGCCACCGTCCCCTGTCAGTGAATCACGGGCATCTTCAGGAGCTCAGCCTGGGTCTTC
ATT
TGTTTTCCCTCGGCCCTTCCTCAGCCTCAGGACAGTGCTAGCAGCCCCACACATTCTCCCTACAGA
TAC
CATGGCACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTTCCAG
CCA
TGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGT

TGG
GTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGG
GAT
GAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGC
ACA
TAGCAATTGGAAACTGAAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTGAGG
CCC
CACCCCTCGAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCAGCCATGCGTTCTC
CTC
TATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATG
CGG
CTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGG
AGG
GGGCGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTG
GAA
ACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCCTCACAG
GAC
CCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCACGGCCACG
GGC
CGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGACAGCTGTCAGGGGAGGGGAGGCGGGGGCTGATGTCAG
GAG
GGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGC
CTG
CCCCGCCCTCCTCCGTGCGCCCGCCAGCCTCGCCCGGAGCTCTGAGTAGACGAAGCTAAGGCGCGCC
TGA
GAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTAT
ATG
GAGGGGGCAAAGTTTTAGGGTGTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGATCACCATGCATGGACC
CTC
ATGATAATTTGTTTCTTTCACCTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTCTTTTCAT
TTT

CTGTAACTTTTTTCGTAAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTAAATTCACCTTTGTTTATTTG
 TCA
 GATTGTAAGATCCCATCGATTCCGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAGACAG
 TTC
 TAGGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGC
 ACT
 CACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTIONCAGCACAGTTTTAGAGAA
 CAA
 TTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGAAATATTCTT
 ATT
 GGTAGAAACAACACTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACACTGTT
 TGA
 GATGAGGATAAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTT
 TCC
 TACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGC
 CTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCCTAATAAAAATGAGGAAATGCATCGCAT
 TGTCTG
 AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAA
 TAGCGCATGCAGAGTGGACAGGGGCTCAGGGACCCCTGATCCCAGCTTTCTCATTTGGACAGAAGGAG
 GAGACTGGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCCCACTAAGGCCACAGCAGAGCCAGGACTTTAGCTGTGC
 TGACTIONCAG
 CCTGGCTTGCCCTCCACTGCCCTCCTTTGCCTCAAGAGCAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCC
 CTG
 GCCTTGCCCTCCACCTCCCCTCCCCTATGCTGTTTTCTGGGACAGTGGGAGCTGGCTTAGAATGCC
 TGG
 GGCCCCCAGGACCCTGGCATTTTAACCCTCAGGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATACAGAAGAGTCCA
 TCA
 CCTGCTGTATGCCACACACCATCCCACAGTCGACATTTAAATT**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGG**
CCA
CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTT
GGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

(SEQ ID NO:20)

表5. 从5' ITR至3' ITR的ITR-nDes-miR155-amiR-DMPK²⁰⁴序列注释 (3739bp)

序列 编号	SEQ ID NO	注释
1-145	43	5' ITR
146-1283	44	A1AT 填充序列
1284-2238	12	nDes 启动子 (详情如下)
1284-1642	21	Byrne 增强子
1643-1648	n/a	Kpn1 限制性位点
1647-1923	22	Paulin 增强子
1923-1928	n/a	HindIII 限制性位点
1929-1934	n/a	PstI 限制性位点
1929-2238	23	Paulin 启动子
2268-2578	45	兔 β -珠蛋白内含子的 5'臂
2579-2584	n/a	BamH1 限制性位点
2585-2611	46	5'miR155 侧翼序列
2612	n/a	来自 Invitrogen Block-IT 试剂盒的附加碱基
2613-2633	4	DMPK ²⁰⁴ miRNA 指导序列
2634-2652	6	miR155 末端环
2653-2671	5	DMPK ²⁰⁴ miRNA 乘客序列
2672-2674		来自 Invitrogen Block-IT 试剂盒的附加碱基
2675-2716	41	3'miR155 侧翼序列
2717-2722	n/a	Xho1 限制性位点
2723-3005	47	兔 β -珠蛋白内含子的 3'臂
3011-3196	16	minBGH polyA
3197-3594	48	A1AT 填充序列
3595-3739	49	3'ITR

合成的nDes-miR155-204片段的序列:

AGATCTCCATGGCACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGT

TC

CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGA

GA

TGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAG

TA

GGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGTGG

GA
GCGCACATAGCAATTGGAAACTGAAAGCTTATCAGACCCTTTCTGAAATCAGCCCCTGTTTATAAAC
TT
GAGGCCCCACCCTCGAGGTACCCCTGCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGC
GT
TCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGTT
GA
CATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGATGAA
TC
AGGGAGGGGGCGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGTGGGAGCGCACATAG
CA
ATTGAAACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCG
TC
ACAGGACCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTGCGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCACG
GC
CACGGCCGCCCTTTCTGGCAGGACAGCGGGATCTGCAGCTGTCAGGGAGGGGAGGCGGGGGCTGA
TG
TCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCC
GG
CCGCTGCCCGCCCTCCTCCGTGCGCCGCCAGCCTCGCCCGAGCTCTGAGTAGACGAAGCTAAGG
CG
CGCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAAATTCA
TG
TTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTAGGGTGTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGCA
TG
GACCCTCATGATAATTTTGTTCCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTTCT
TT
TCATTTTCTGTAACCTTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTAAATTCACCTTTTGTT
TA
TTTGTGAGATTGTAAGATCCCATCGATTCCGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGA
AG
ACAGTTCTAGGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTACAGGACACAAGGCCTGTT
AC
TAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTT
AG
AGAACAATTGTTATAATTAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCGGCTGGCGTGGAAT
AT
TCTTATTGGTAGAAACAACACTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATAC
AC

TGTTTGAGATGAGGATAAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCT
 TC
 TTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCC
 CC
 GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCG
 CA
 TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
 AAGACAATAGCGCATGCGTCGACT (SEQ ID NO:26)

nDes-miR155-204启动子至polyA

CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGC
 GTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATG
 CGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGATGAATCAGGGAGGGGG
 CGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGAAACTGAAAGC
 TTATCAGACCCTTTCTGAAATCAGCCCACTGTTATAAACTTGAGGCCCCACCCTCGAGGTACCCCTGCCCCCA
 CAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGCGTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCA
 GCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTG
 GGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGG
 GGTGGGAGCGCACATAGCAATTGAAACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGC
 AGGCTTGCCCGTCACAGGACCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTGCGGGGAGCTGGCCTCCCCGCC
 CCACGGCCACGGGCCGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTGCAGCTGTCAGGGGAGGGGAGGCGGGGGCTGAT
 GTCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCC
 TGCCCGCCGCTCCTCCGTGCGCCCGCCAGCCTCGCCCGGAGCTCTGAGTAGACGAAGCTAAGGCGCGCTGAGAAC
 TTCAGGGTGAGTTGGGGACCCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAATAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAA
 AGTTTTTCAGGGTGTGTTTGTAGAAATGGAAGATGTCCTTGTATCACCATGCATGGACCCTCATGATAATTTTGTTC
 TTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACCTTTTTCGTTAAACTT
 TAGCTTGCAATTTGTAACGAATTTTAAATTCACTTTTGTATTGTTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGATTTCGGATCC
 CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTGTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGAT
 GTCTTCGATTGAGGACACAAGGCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTA
 TATTGTAATTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTC
 TGGCTGGCGTGAAATATTCTTATTGGTAGAAAACACTACATCCTGGTCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTAC
 AATGATATACTGTTTGAGATGAGGATAAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCC
 TTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCC
 GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCT
 GAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC

(SEQ ID NO:17)

AAVrh74变体的氨基酸序列 (WO 2019178412)

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65		70		75		80									
Gln	Gln	Leu	Gln	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala
			85						90					95	
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly
			100					105						110	
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro
			115					120						125	
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Ser	Pro	Val	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
			130					135						140	
Pro	Val	Glu	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile
			145					150						155	
Gly	Lys	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln
				165						170					175
Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro
				180						185					190
Pro	Ala	Gly	Pro	Ser	Gly	Leu	Gly	Ser	Gly	Thr	Met	Ala	Ala	Gly	Gly
				195						200					205
Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser
						210								215	
Ser	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val
														225	
Ile	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His
														240	
														245	
														250	
														255	
Leu	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Asp
														260	
														265	
														270	
Asn	Thr	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn
														275	
														280	
														285	
Arg	Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn
														290	
														295	
														300	
Asn	Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn
														305	
														310	
														315	
														320	
Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Gln	Asn	Glu	Gly	Thr	Lys	Thr	Ile	Ala
														325	
														330	
														335	
Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln
														340	
														345	
														350	
Leu	Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe

645	650	655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe		
660	665	670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu		
675	680	685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr		
690	695	700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu		
705	710	715
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg		
725	730	735

Asn Leu (**SEQ ID NO:39**)

AAVrh74N502I的氨基酸序列

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFAQKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQPIGEPAPGSPGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRTITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSFRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFESYNFEDVFPFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLRSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSIFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMTFGKQAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:50)

编码AAVrh74 N502I衣壳的核苷酸序列

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTGCGAGTGGTG
GGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAAGCAGGACAACGGCCGGGTCTGGTGCTTCT
GGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACGACTCGACAAGGGGAGCCCCGTAACGCGGGACGCAGCGCCCTCG
AGCAGACAAGCCTACGACCAGCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAATCACGCCGACCCGA
GTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACCTCGGGCGCGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGCGG
GTTCTCGAACCTCTGGGCCTGGTTGAATCGCCGGTTAAGACGGCTCCTGGAAAAGAGACCGGTAGAGCCATCAC
CCCAGCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAAAAGAGACTCAATTTTGG
GCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTCAACCAATCGGAGAACCACCAGCAGGCCCTCTGGTCTGGGA
TCTGGTACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCCT
CAGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGCACCTGGGCCCTGCC
CACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGGACCTCGGGAGGAAGCACCACGACAACACCTACTTC
GGCTACAGCACCCCTGGGGTATTTTACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTACCACGTGACTGGCAGCGAC
TCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCAC
GCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGATTAGGTCTTTACGGACTCGGAATACCAG

CTCCCGTACGTGCTCGGCTCGGCGCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCCCTCAGT
 ACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCTGTGGGCCGGTCTCCTTCTACTGCCTGGAGTACTTTCCCTTC
 TCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAATTCAGCTACAACCTTCGAGGACGTGCCCTTCCACAGCAGCTACGCG
 CACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGAACCCTCTCATCGACCAGTACTTGTACTACCTGTCCCGGACTCAAAGCA
 CGGGCGGTACTGCAGGAACCTCAGCAGTTGCTATTTTTCTCAGGCCGGCCTAACAAACATGTGGCTCAGGCCAAGAA
 CTGGCTACCCGGTCCCTGCTACCGGCAGCAACGCGTCTCCACGACACTGTGCGAGAACAACAACAGCATCTTTGCC
 TGGACGGGTGCCACCAAGTATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATGGCTACCCACA
 AGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATCCAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAGGGAGCTGGAAAAGACAACGT
 GGACTATAGCAGCGTGATGCTAACCAGCGAGGAAGAAATAAAGACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGC
 GTGGTGGCCGATAACCTGCAACAGCAAAACGCCGCTCCTATTGTAGGGGCCGTCAATAGTCAAGGAGCCTTACCTG
 GCATGGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGGCCAAGATTCCTCATAACGGACGGCAACTT
 TCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTGAAGCATCCGCCTCCTCAGATCCTGATTAATAAACACACCTGTT
 CCCGCGGATCCTCCGACCACCTTCAATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTCATCACGCAGTACAGTACCGCCAGGTCA
 GCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAAACGCTGGAACCCAGAGATTCAGTACACTTCCAATA
 CTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAATACTGAGGGTACTTATTCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGT
 TACCTCACCCGTAATCTGTAA (SEQ ID NO:51)

AAVrh74W505R的氨基酸序列

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNA
 DAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFAQKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKR
 PVEPSPQRSPDSSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGAD
 VVGSSSNWHCDSTWLGDRIITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS
 RDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADV
 FMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFESYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPIDQYLYL
 SRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFARTGATKYHLNGRDSLVPNGV
 AMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS
 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQY
 STGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:52)

编码AAVrh74W505R的核苷酸序列

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTCCGCGAGTGGTG
 GGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACAACGGCCGGGTCTGGTGTCTCCT
 GGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCG
 AGCAGACAAGGCTACGACCAGCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAATCACGCCGACGCCGA
 GTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACCTCGGGCGCGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGCGG
 GTTCTCGAACCTCTGGGCCTGGTTGAATCGCCGGTTAAGACGGCTCCTGGAAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCAC
 CCCAGCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAAAAAGAGACTCAATTTTGG
 GCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTCAACCAATCGGAGAACCACCAGCAGGCCCTCTGGTCTGGGA
 TCTGGTACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCT
 CAGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGCACCTGGGCCCTGCC
 CACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGGACCTCGGGAGGAAGACCAACGACAACACCTACTTC

GGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGAC
TCATCAACAACAACCTGGGGATCCGGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCAC
GCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGATTACAGGTCTTTACGGACTCGGAATACCAG
CTCCCGTACGTGCTCGGCTCGGGCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCCCTCAGT
ACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCTGTGGGCCGGTTCCTTCTACTGCCTGGAGTACTTTCCCTTC
TCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAATTCAGCTACAACCTTCGAGGACGTGCCCTTCCACAGCAGCTACGCG
CACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGAACCCTCTCATCGACCAGTACTTGTACTACCTGTCCCGGACTCAAAGCA
CGGGCGGTACTGCAGGAACTCAGCAGTTGCTATTTTCTCAGGCCGGCCTAACAACATGTCCGGCTCAGGCCAAGAA
CTGGCTACCCGGTCCCTGCTACCGGCAGCAACGCTCTCCACGACACTGTCGCAGAACAACAACAGCAACTTTGCC
AGGACGGGTGCCACCAAGTATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATGGCTACCCACA
AGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATCCAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAGGGAGCTGGAAAAGACAACGT
GGACTATAGCAGCGTGATGCTAACCAGCGAGGAAGAAATAAAGACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGC
GTGGTGGCCGATAACCTGCAACAGCAAAACGCCGCTCCTATTGTAGGGCCGTCAATAGTCAAGGAGCCTTACCTG
GCATGGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGGCCAAGATTCCTCATAACGGACGGCAACTT
TCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTGAAGCATCCGCCTCCTCAGATCCTGATTAACAAAACACACCTGTT
CCCGCGGATCCTCCGACCACCTTCAATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTTCATCACGCAGTACAGTACCGGCCAGGTCA
GCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAACGCTGGAACCCAGAGATTACAGTACTTCCAACATA
CTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAATACTGAGGGTACTTATTCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGT
TACCTCACCCGTAATCTGTAA (SEQ ID NO:53)

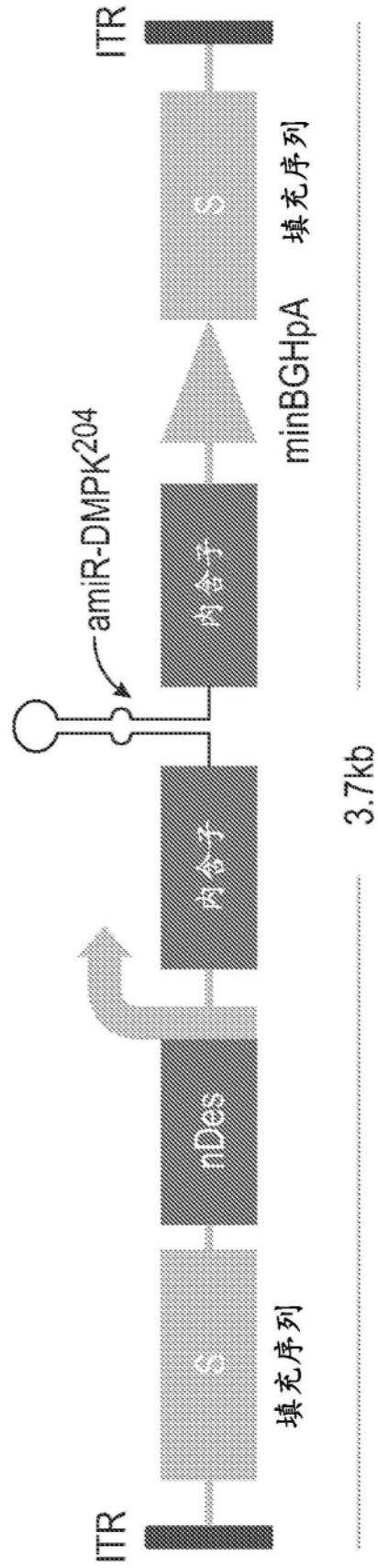


图1A

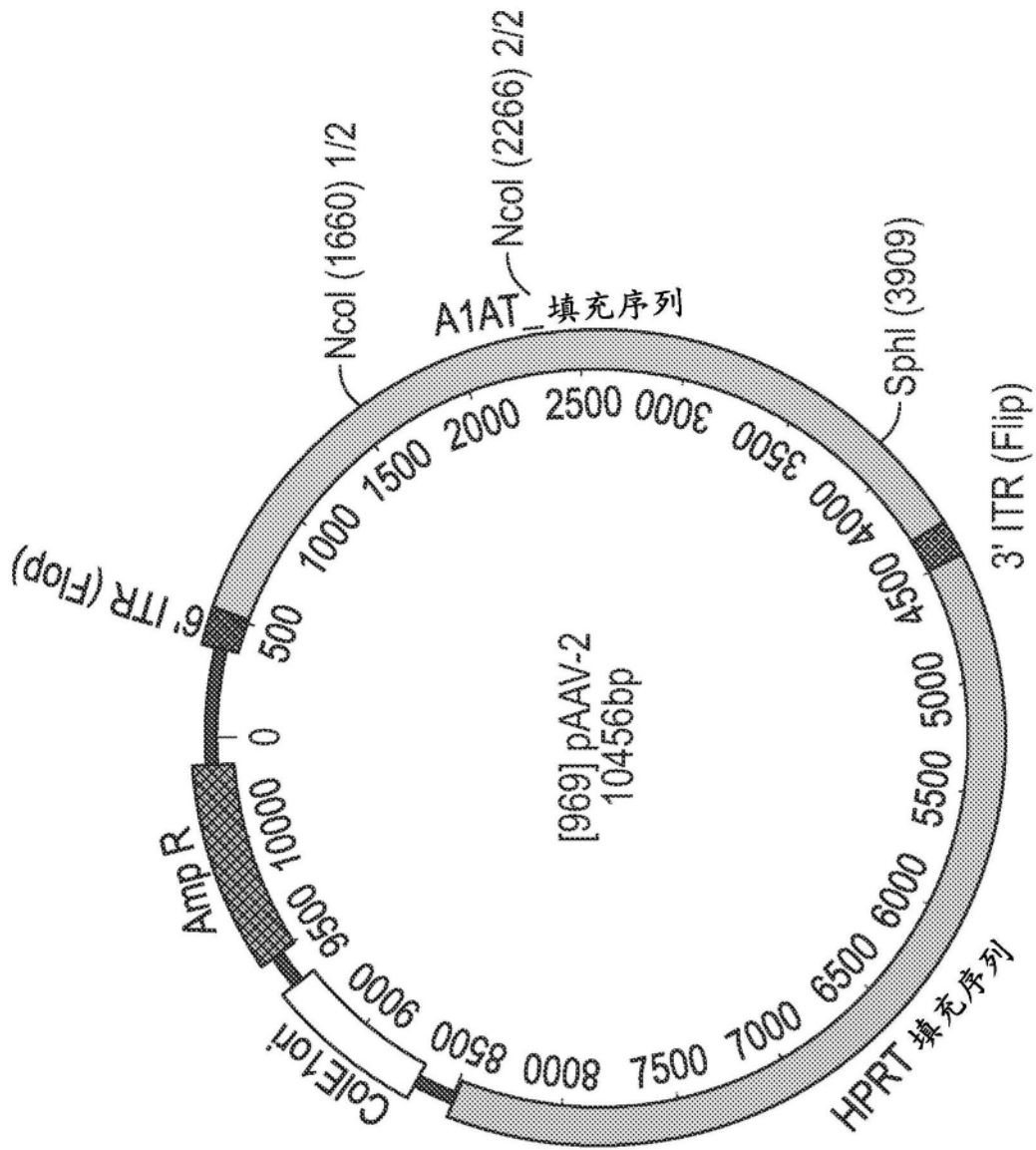


图1B

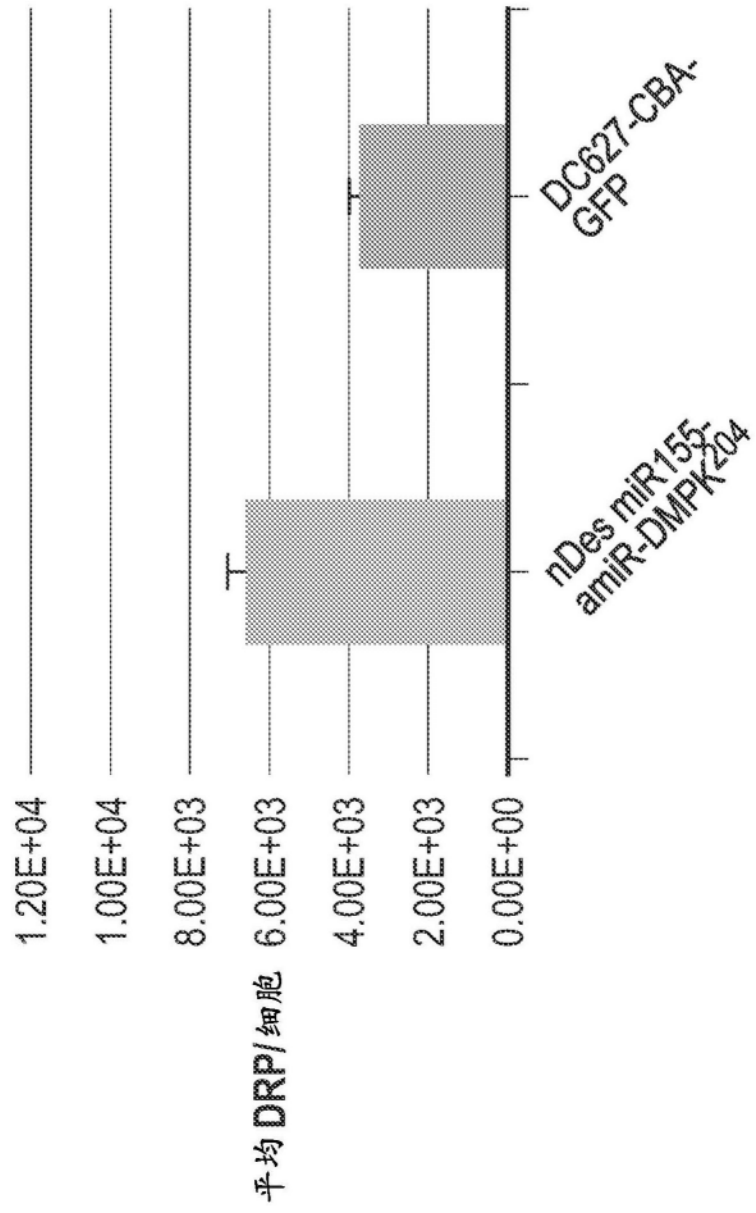


图1C

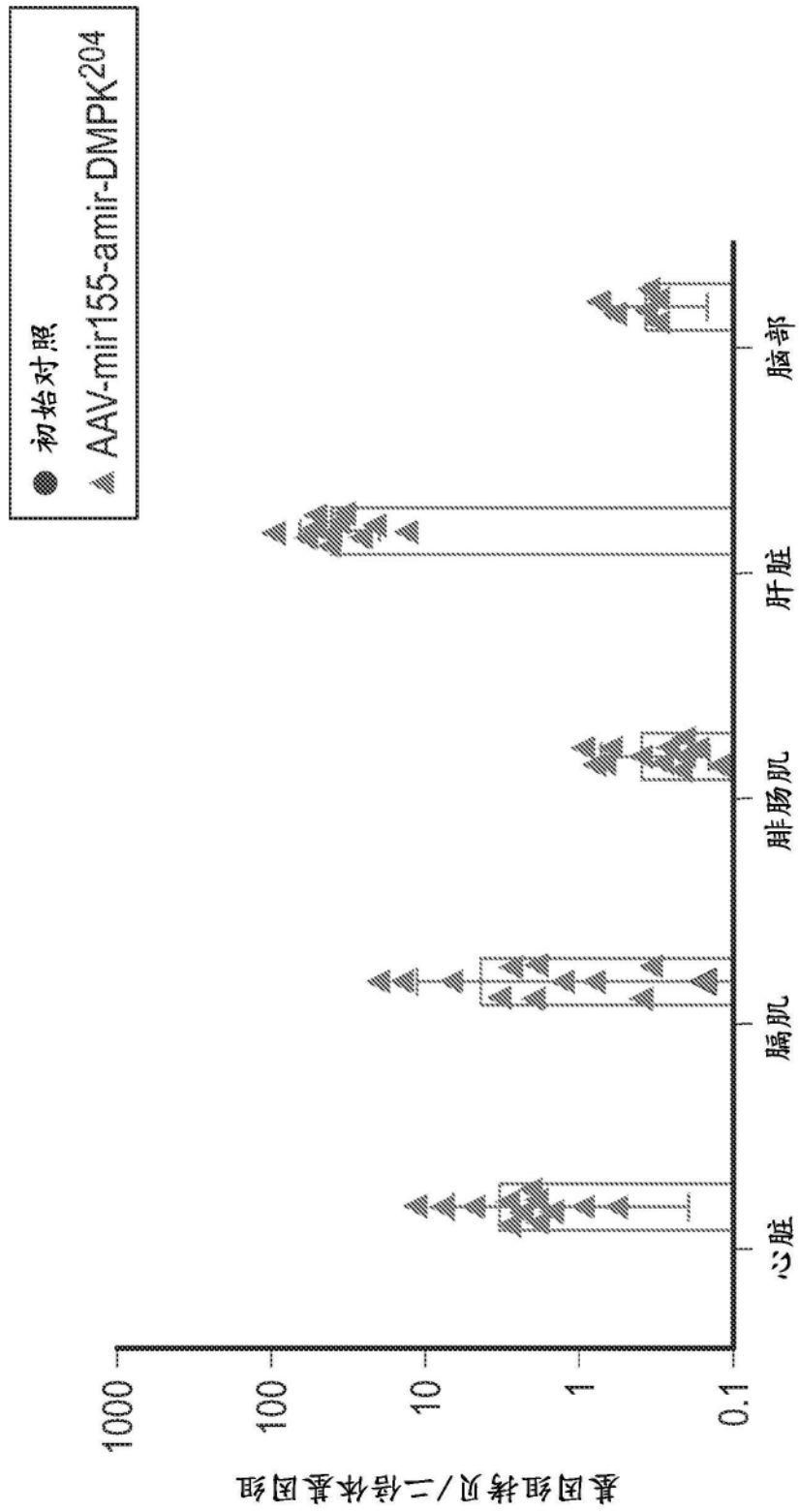


图2A

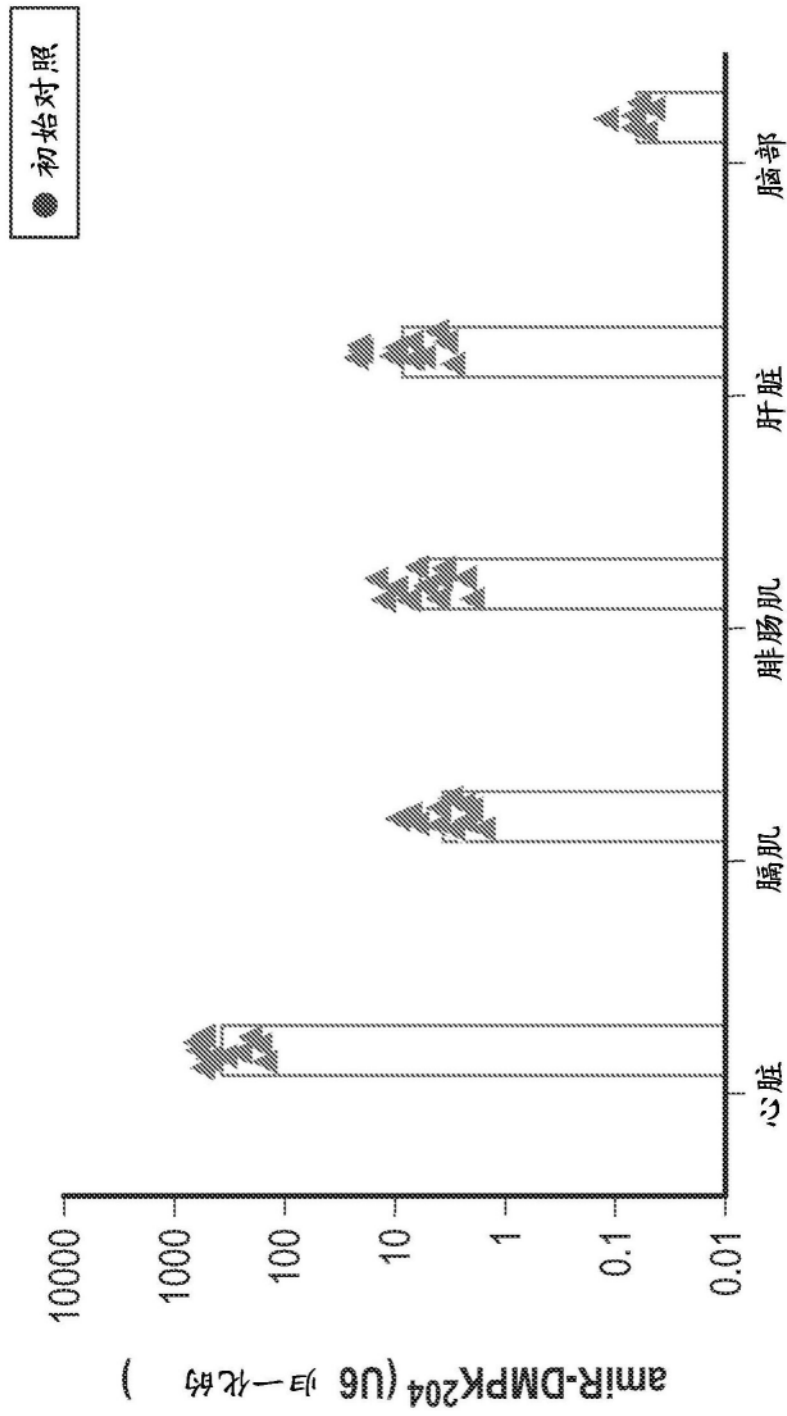


图2B

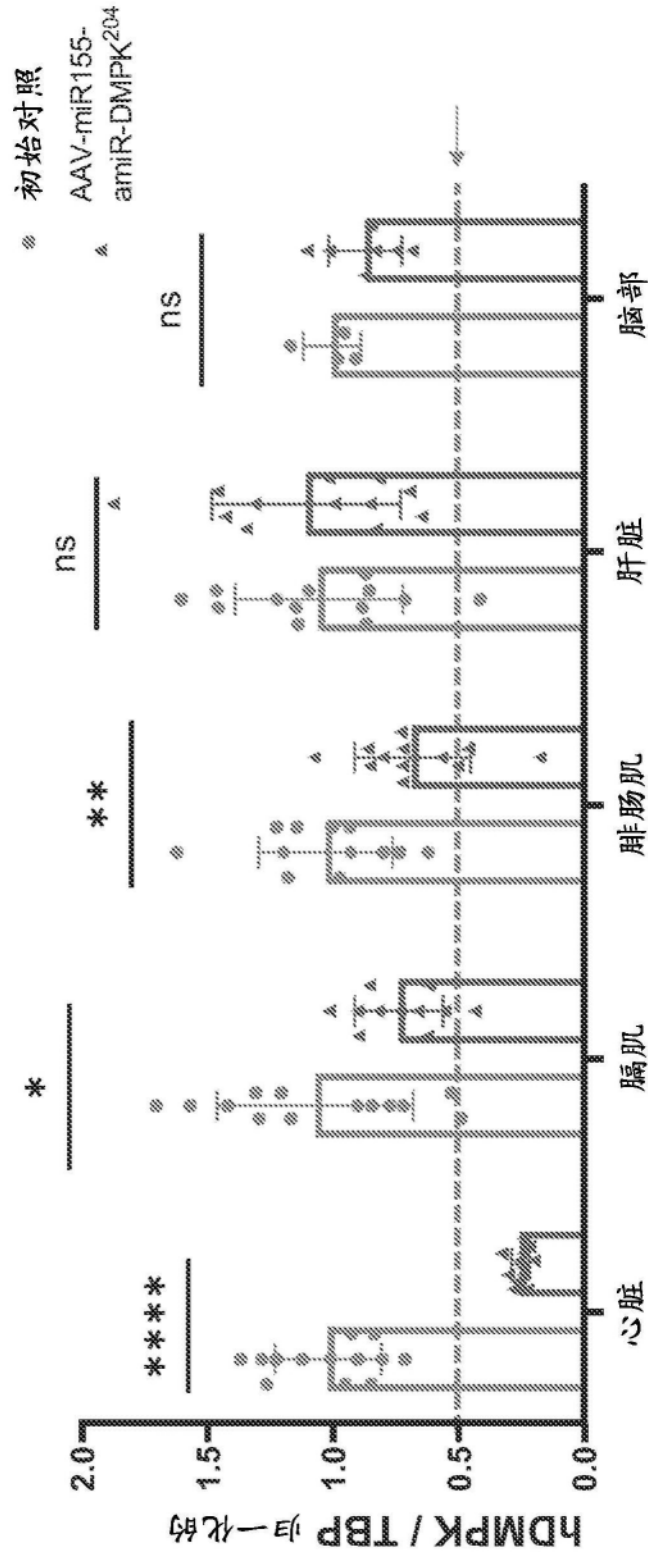


图2C

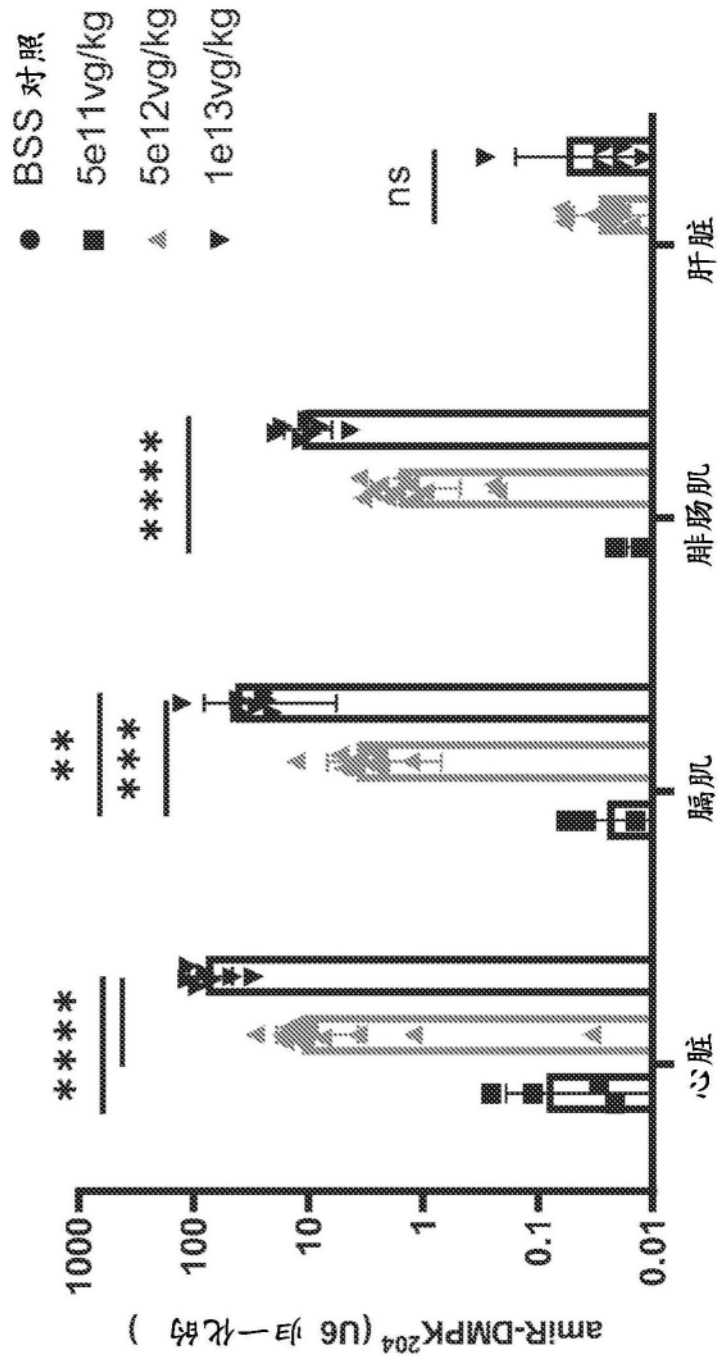


图3A

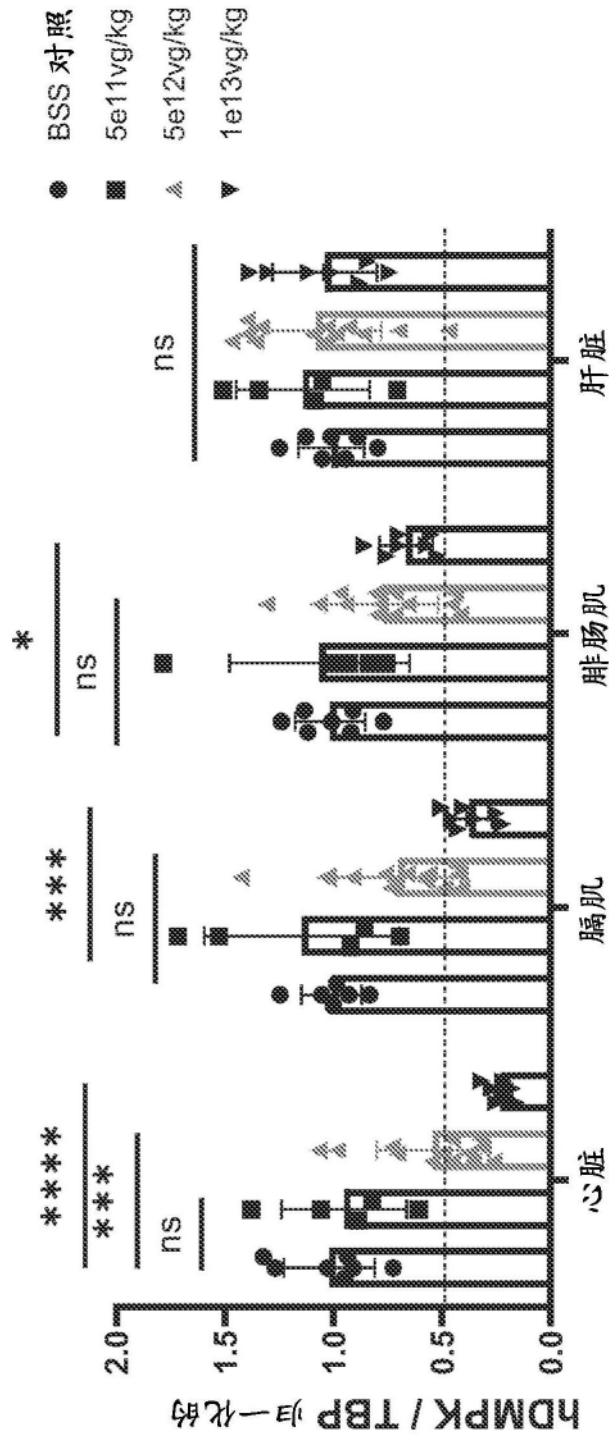


图3B

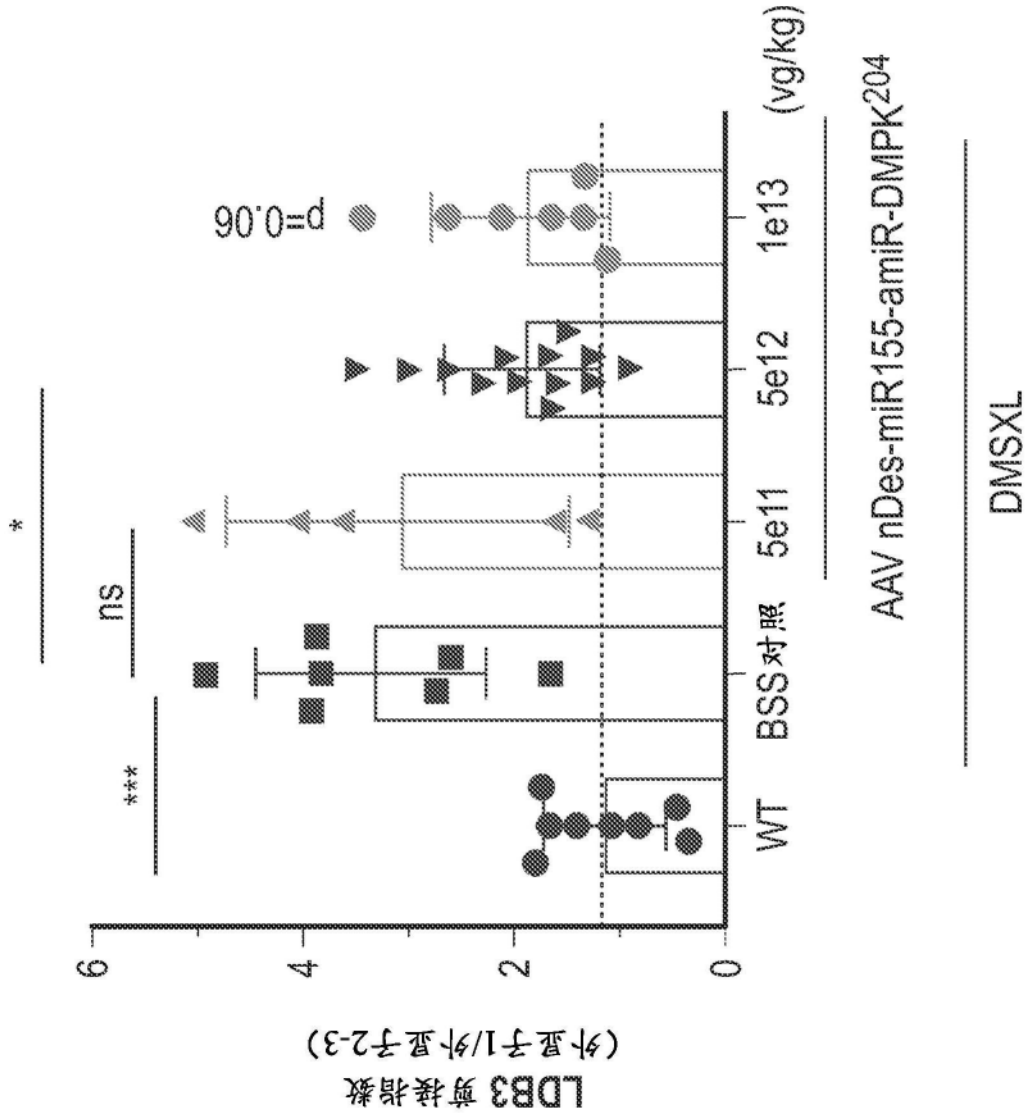


图4

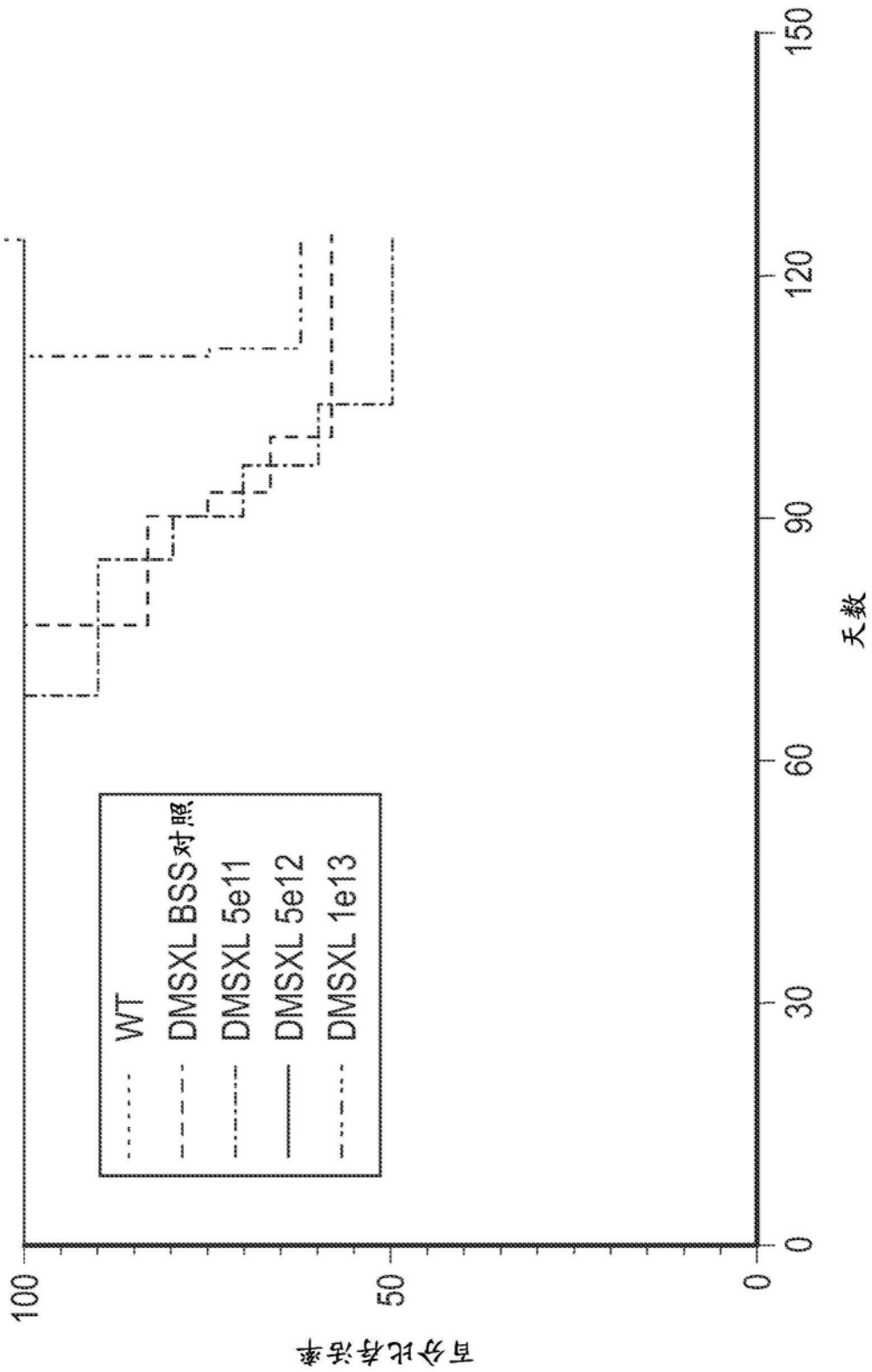


图5A

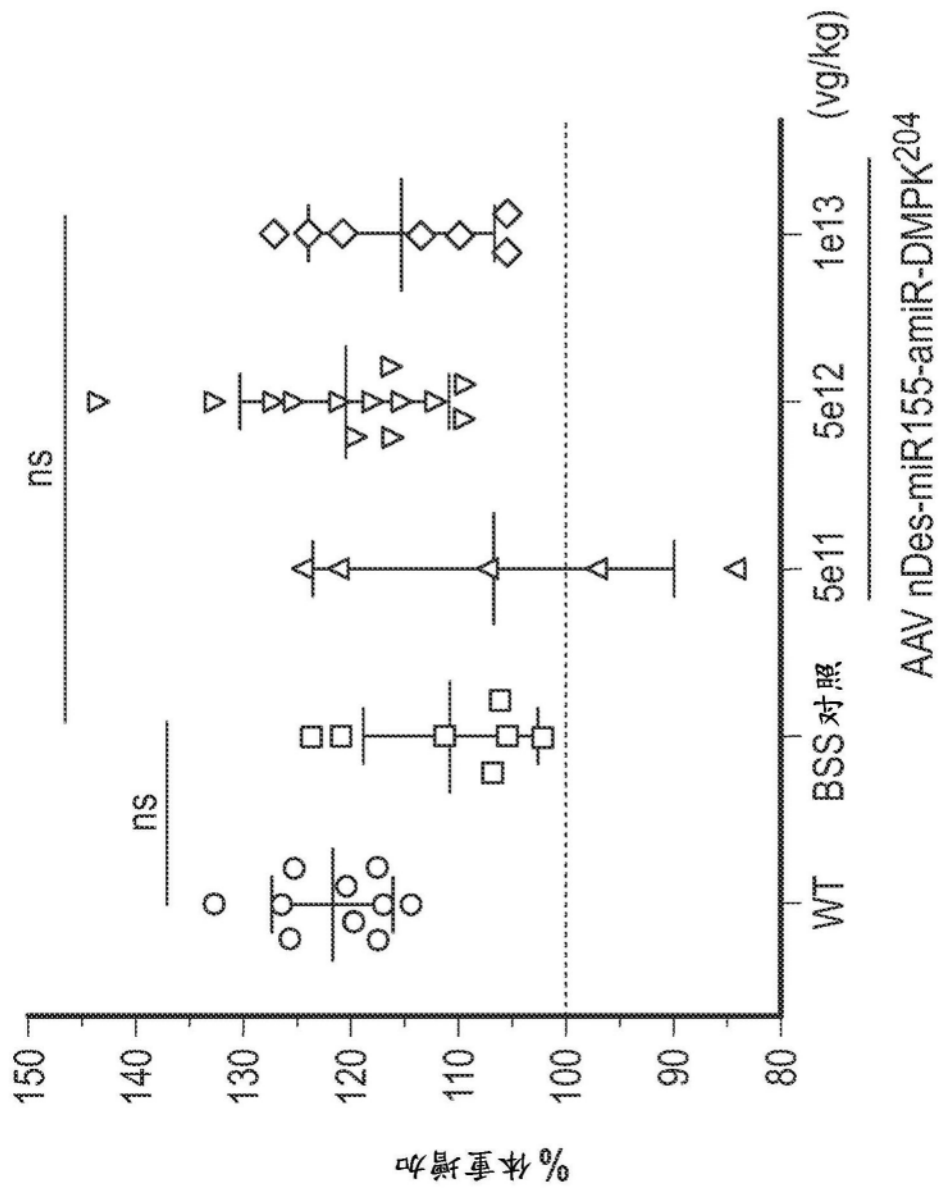


图5B

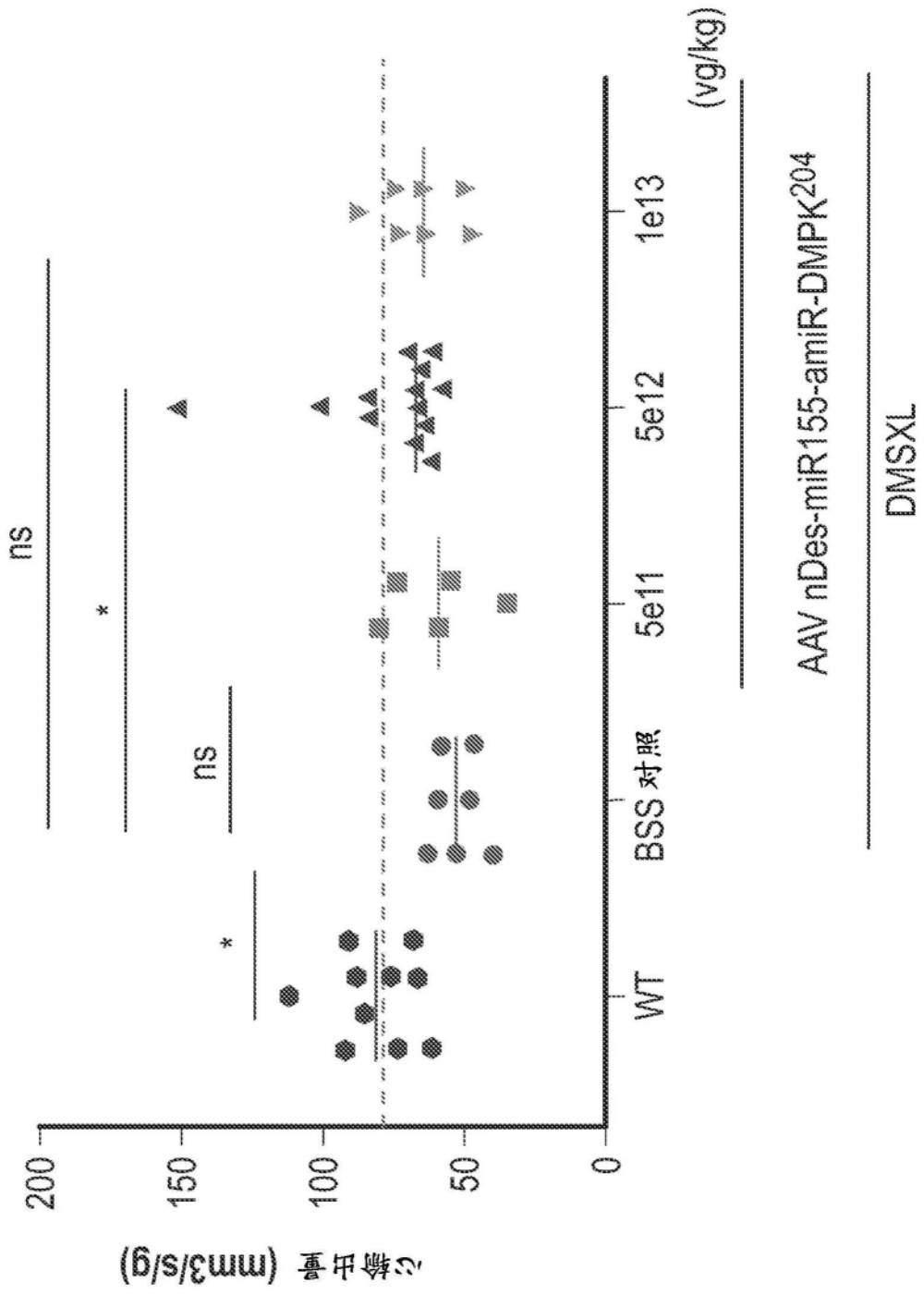


图6

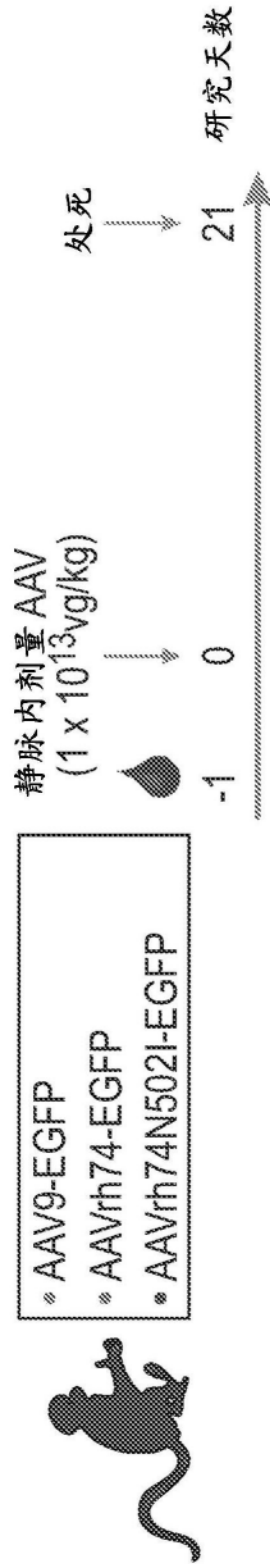


图7A

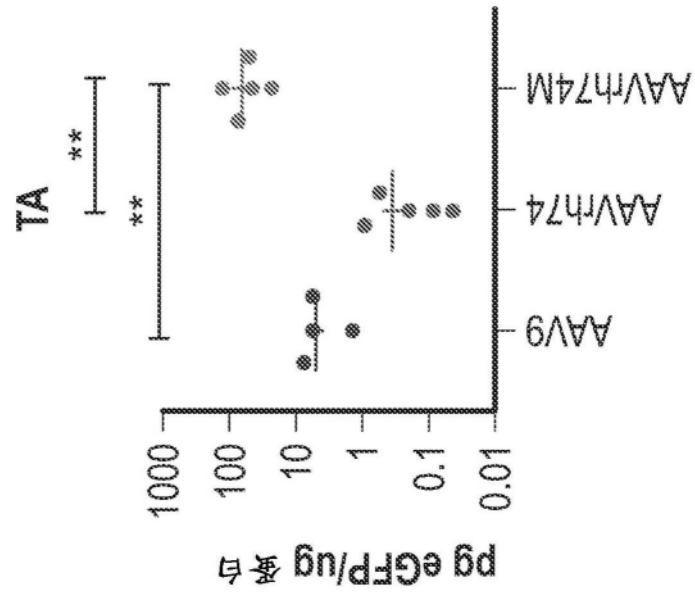


图7B

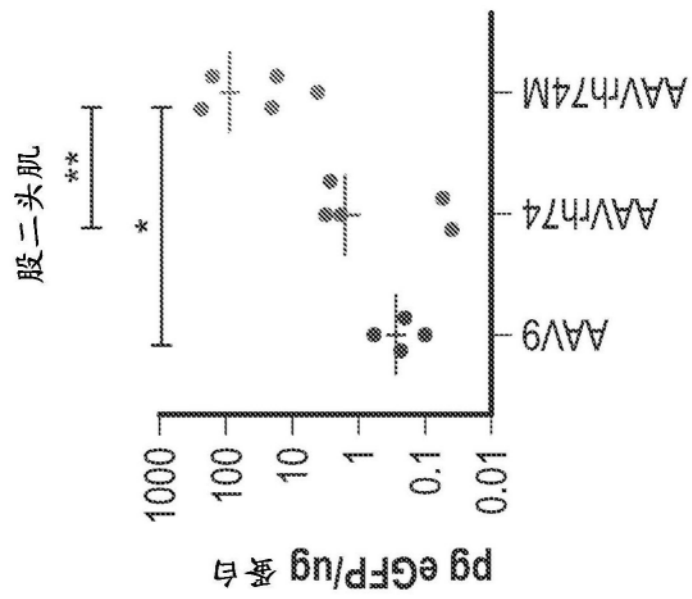


图7C

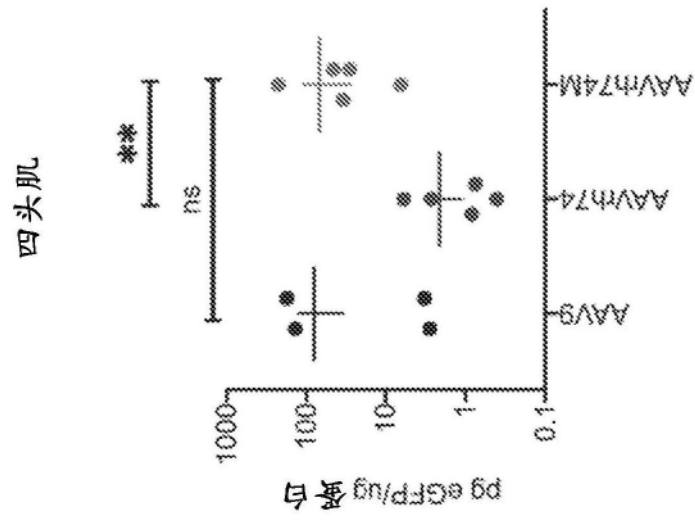


图7D

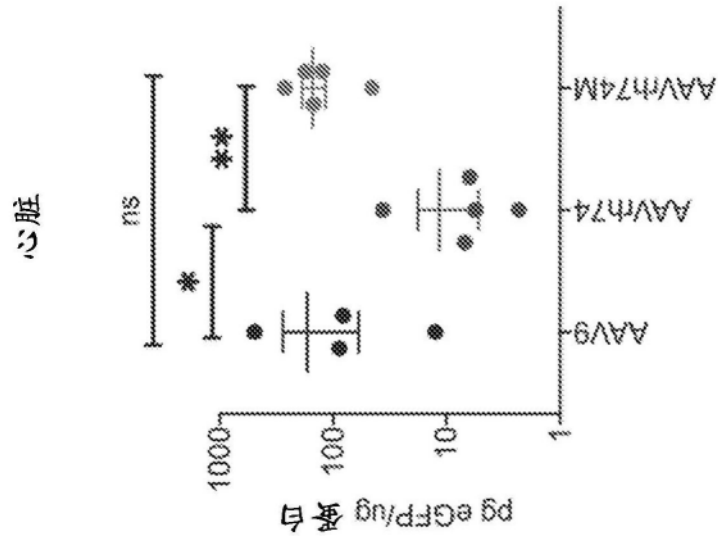


图7E

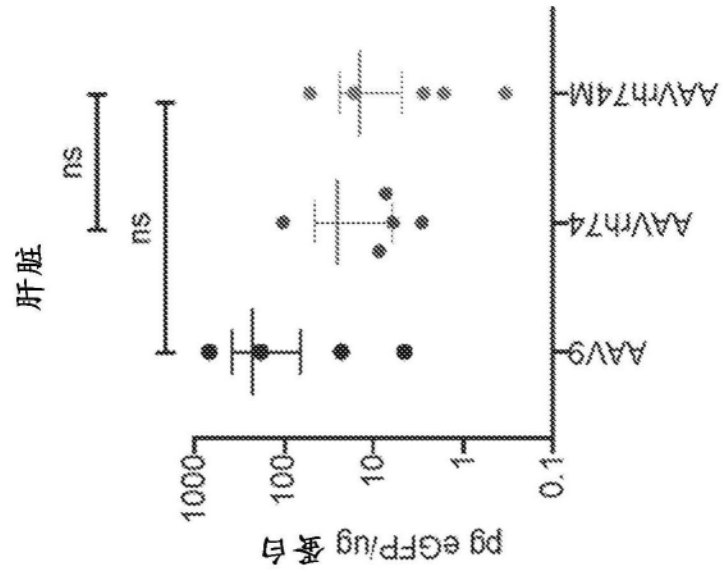


图7F

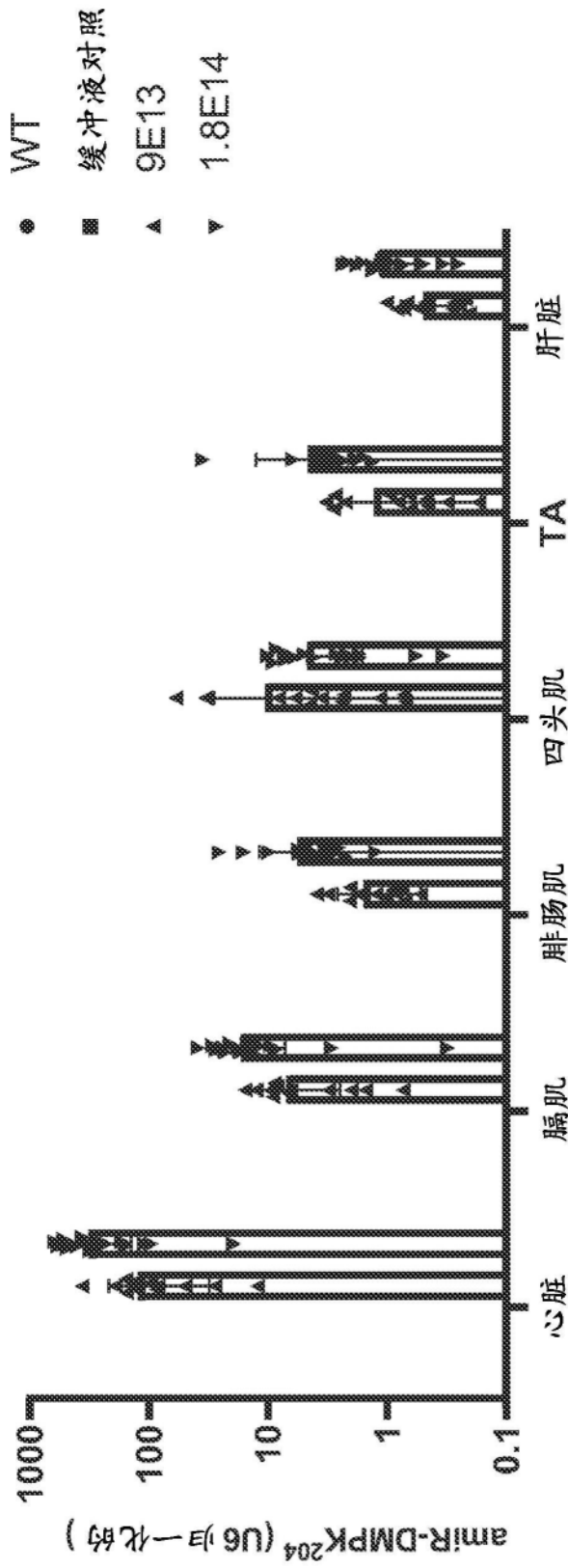


图8A

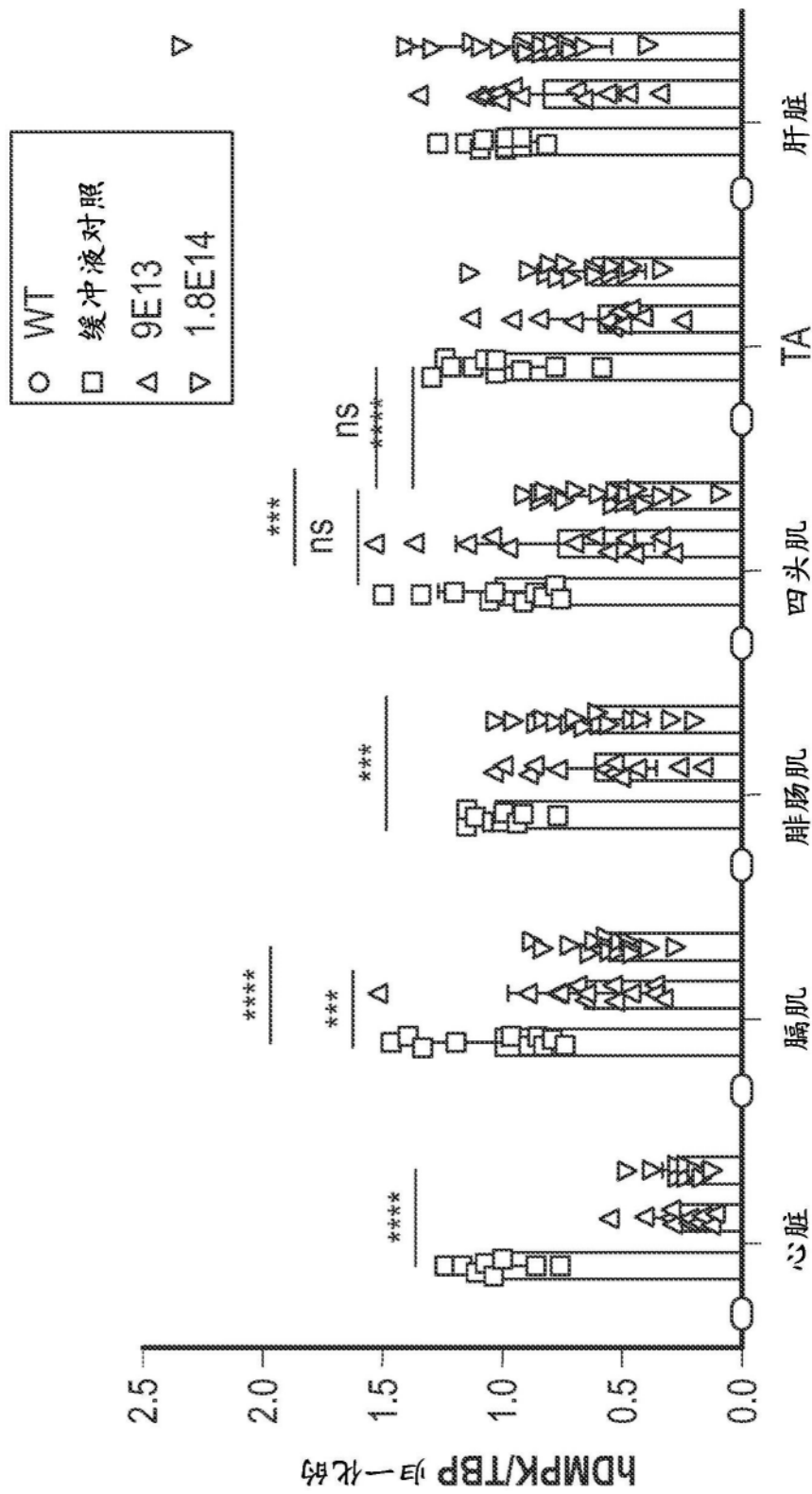


图8B

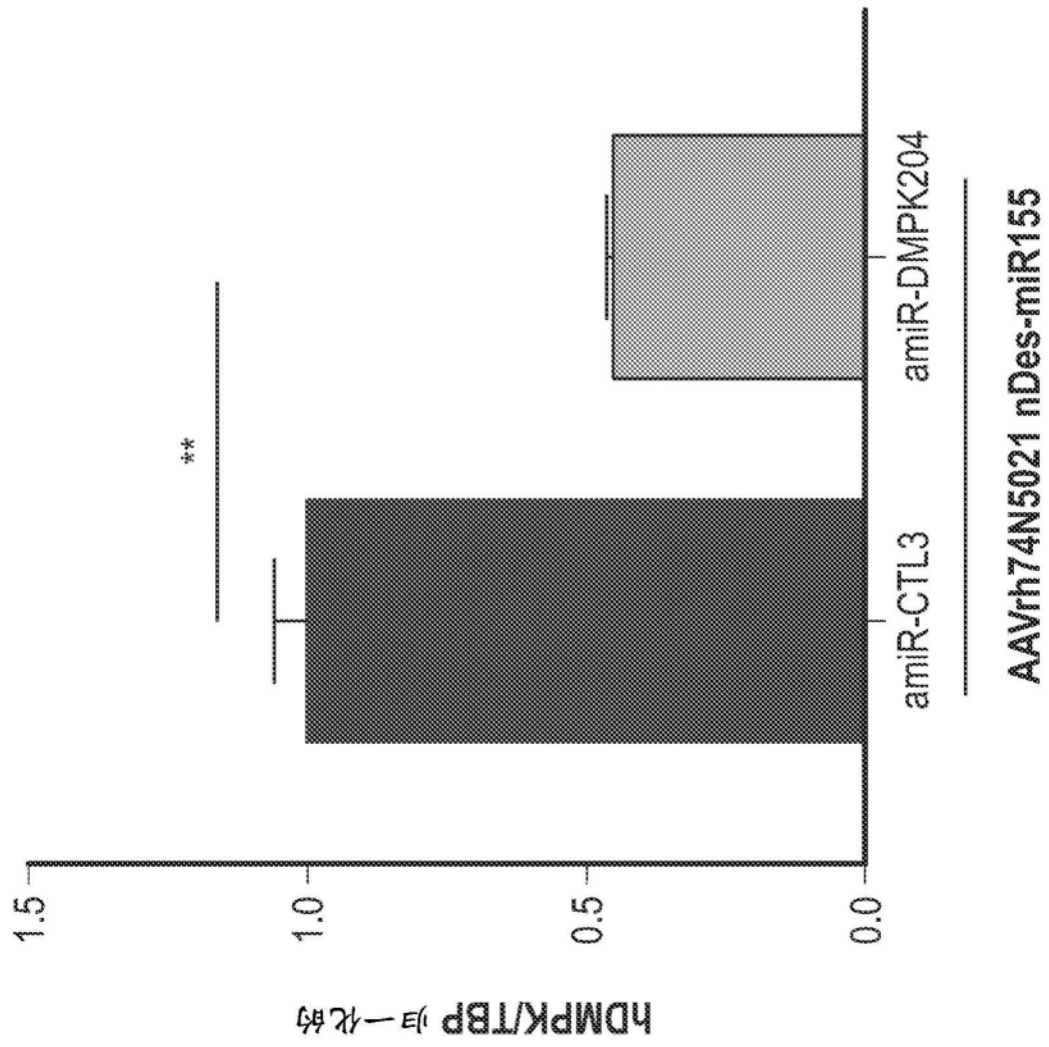


图9

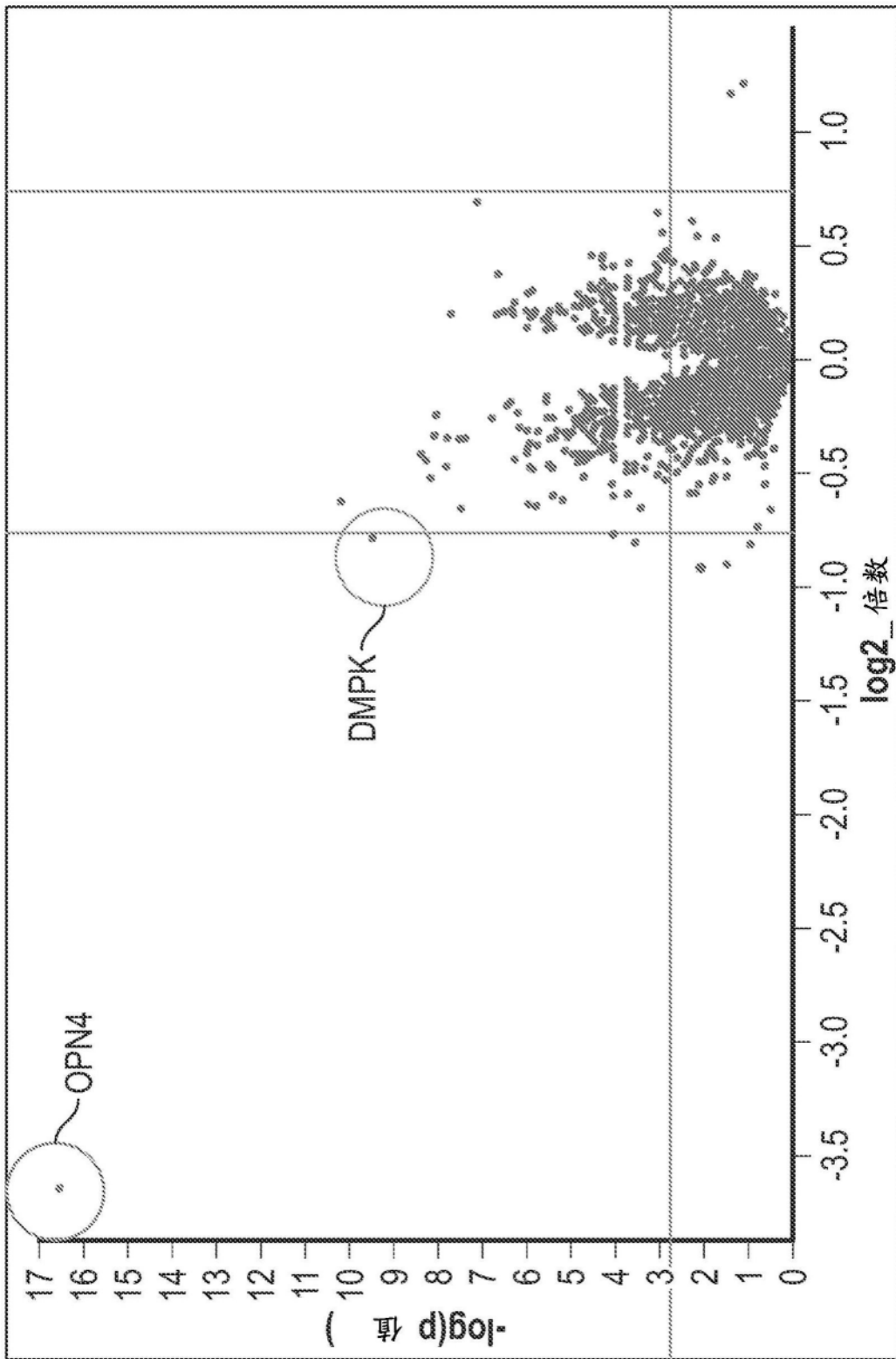


图10

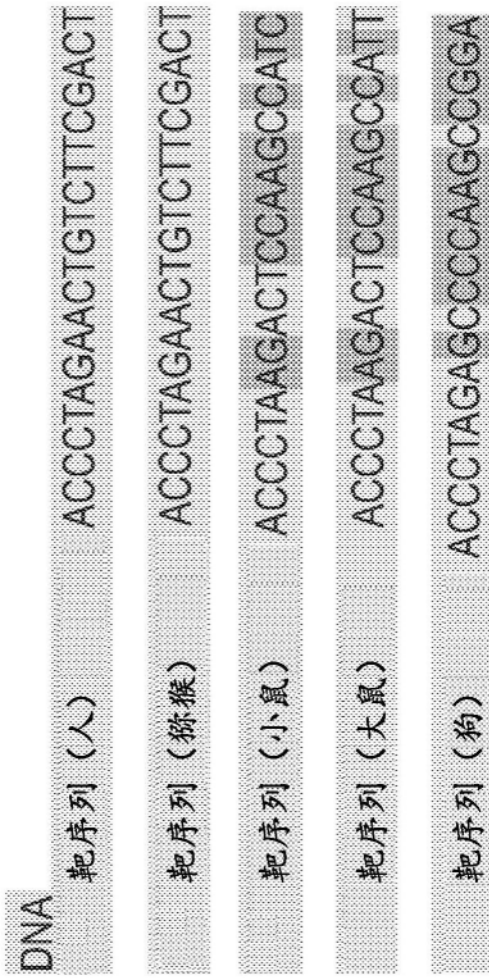


图11

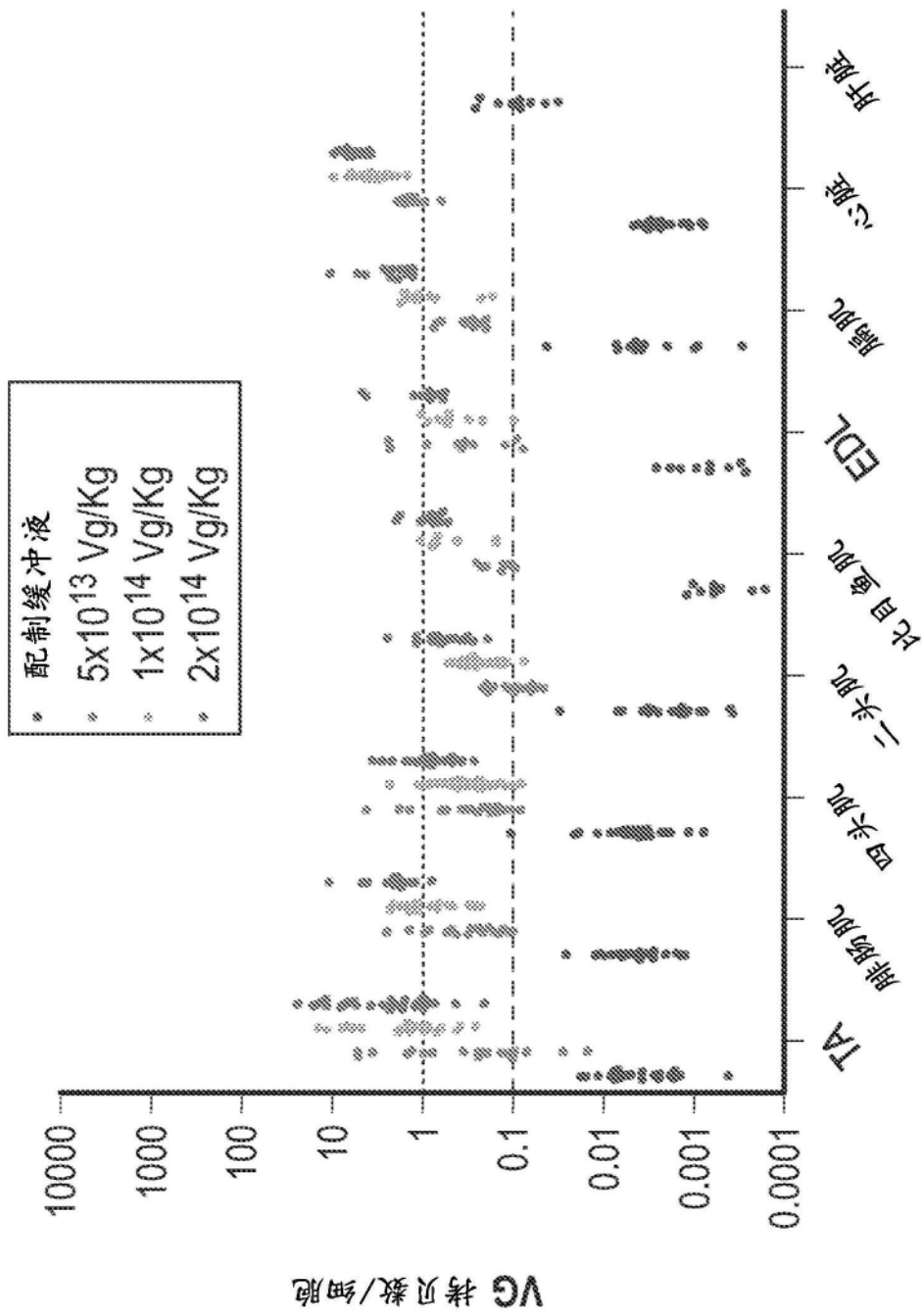


图12

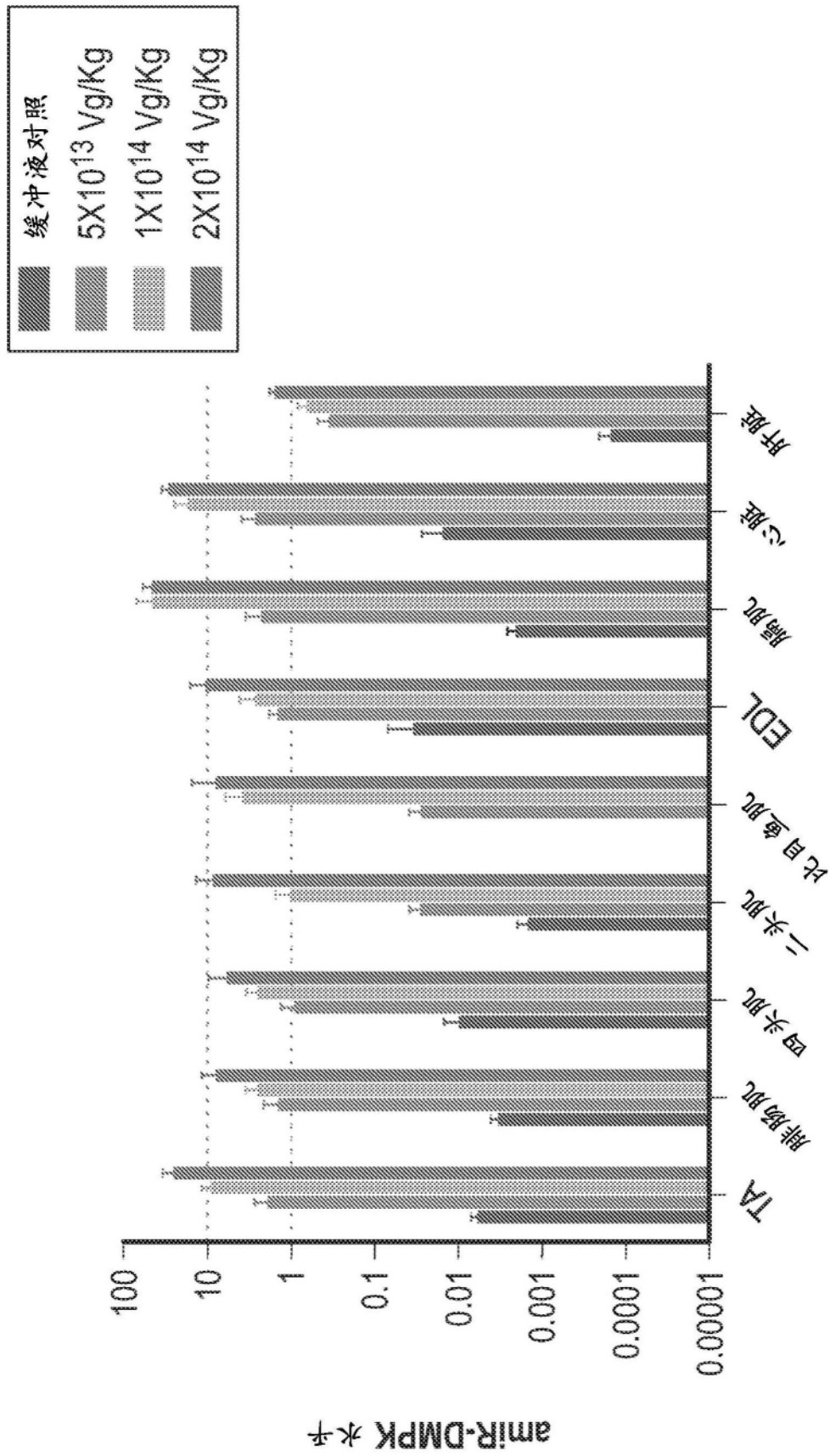


图13

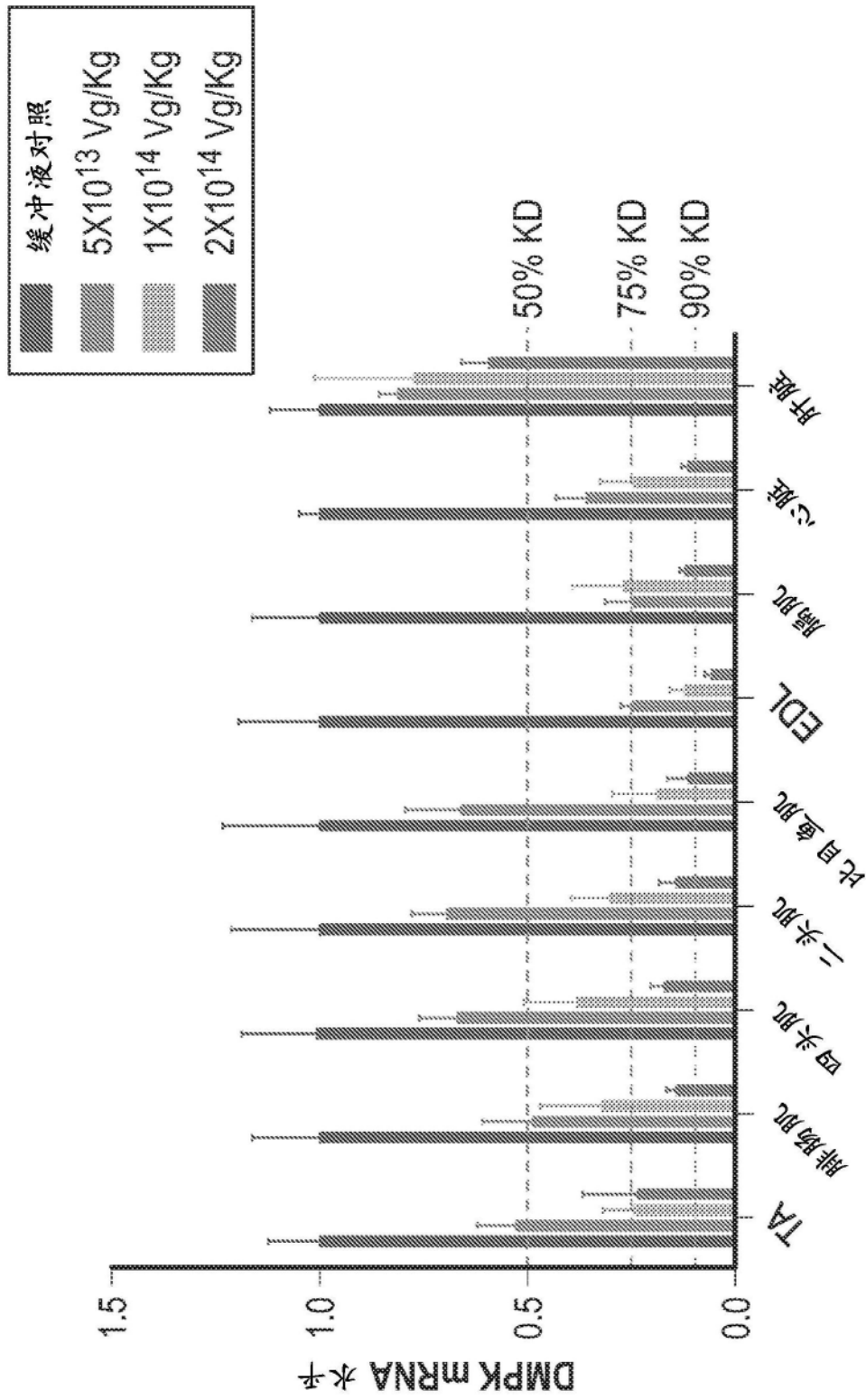


图14