



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107980063 B

(45) 授权公告日 2021.12.10

(21) 申请号 201680027116.1

CN 1230220 A, 1999.09.29

(22) 申请日 2016.05.10

Robin J Ziegler 等. Correction of the

(65) 同一申请的已公布的文献号

Biochemical and Functional Deficits in
Fabry Mice Following AAV8-mediated
Hepatic Expression of α -galactosidase A.
《Molecular Therapy》.2007, 第15卷(第3期),

申请公布号 CN 107980063 A

Robin J. Ziegler 等. AAV2 Vector

(43) 申请公布日 2018.05.01

Harboring a Liver-Restricted Promoter
Facilitates Sustained Expression of
Therapeutic Levels of α -Galactosidase A
and the Induction of Immune Tolerance in
Fabry Mice.《MOLECULAR THERAPY》.2004, 第9卷
(第2期),

(30) 优先权数据

1508025.2 2015.05.11 GB

Jin-Ok Choi 等. Characterization of

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.10

Fabry Mice Treated With Recombinant
Adeno-Associated Virus 2/8-mediated Gene
Transfer.《J Biomed Sci.》.2010, 第17卷(第1
期),

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2016/051328 2016.05.10

刘晓霞等. Fabry病一家系临床调查及 α -半
乳糖苷酶 A 基因突变研究.《四川大学学报(医学
版)》.2012, 第43卷(第6期),

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/181122 EN 2016.11.17

让文亮. 人 α -半乳糖苷酶 A 突变体的构
建、人 α -半乳糖苷酶 A 突变体的构建、人 α -
半乳糖苷酶 A 突变体的构建、表达及生化性
质的初步研究.《中国优秀硕士学位论文全文数
据库》.2012, (第07期),

(73) 专利权人 UCL商业有限责任公司

审查员 白鸽

地址 英国伦敦

(72) 发明人 A · 纳斯瓦尼 D · 拉贾

权利要求书1页 说明书12页

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

序列表3页 附图9页

代理人 张小勇

(51) Int.Cl.

C12N 15/56 (2006.01)

物。此外,描述了在治疗法布里病的方法中使用
核酸分子。

C12N 15/864 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103974619 A, 2014.08.06

B

CN 107980063 B
描述了包含编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋
白的核苷酸序列的核酸分子,其中所述核苷酸序
列与SEQ ID N0.1的序列具有至少85%的同
一性。还描述了包含核酸分子的载体、宿主细胞或
转基因动物;和包含核酸分子或载体的药物组合

(54) 发明名称

法布里病基因治疗

(57) 摘要

1. 核酸分子, 其由编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列组成, 其中所述核苷酸序列由SEQ ID NO:1的序列组成。
2. 用于表达 α -半乳糖苷酶A蛋白的载体, 所述载体包含权利要求1的核酸分子。
3. 权利要求2的载体, 其还包含肝脏特异性启动子。
4. 权利要求2的载体, 其中所述载体是AAV载体。
5. 权利要求2的载体, 其中所述载体是单链载体。
6. 权利要求2的载体, 其中所述载体包含由SEQ ID NO:3的序列组成的核苷酸序列。
7. 宿主细胞, 其包含权利要求1的核酸分子或权利要求2-6中任一项的载体。
8. 药物组合物, 其包含权利要求1的核酸分子或权利要求2-6中任一项的载体和一种或多种药学上可接受的赋形剂。
9. 权利要求1的核酸分子或权利要求2-6中任一项的载体, 其用于治疗。
10. 权利要求1的核酸分子或权利要求2-6中任一项的载体, 其用于治疗法布里病。
11. 权利要求1的核酸分子或权利要求2-6中任一项的载体在制备用于治疗法布里病的药物中的用途。
12. 权利要求1的核酸分子或权利要求2-6中任一项的载体在制备药物中的用途, 所述药物用于将编码 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列递送到受试者的方法, 所述方法包括向所述受试者施用权利要求1的核酸分子或权利要求2-6中任一项的载体。
13. 用于表达 α -半乳糖苷酶A蛋白的载体在制备治疗法布里病的药物中的用途, 所述载体包含权利要求1的核酸分子。
14. 权利要求13的载体的用途, 所述载体还包含肝脏特异性启动子。
15. 权利要求13的载体的用途, 其中所述载体是AAV载体。
16. 权利要求13的载体的用途, 其中所述载体是单链载体。
17. 权利要求13的载体的用途, 其中所述载体包含由SEQ ID NO:3的序列组成的核苷酸序列。
18. 构建体, 其中所述构建体包含权利要求1的核酸分子。

法布里病基因治疗

发明领域

[0001] 本发明涉及用于治疗法布里病的新基因治疗方法。

发明背景

[0003] 法布里病是一种罕见的X连锁遗传多系统溶酶体储存障碍,估计患病率约为1:40,000。这是由于 α -半乳糖苷酶A酶的缺乏导致中性糖鞘脂在各种器官包括血管的内皮细胞和平滑肌细胞的溶酶体中的积累。这种积累导致器官功能受损,导致终末期肾病,心脏并发症和中风,与约58年的缩短预期寿命有关。

[0004] 造血干细胞移植已经证明了在法布里病中的临床益处,但与高发病率和死亡率有关。2002年,欧洲药品管理局批准了两种重组酶: α 半乳糖苷酶 α (agalsidase alfa) (Shire HGT, Boston MA, USA) 和 α 半乳糖苷酶 β (agalsidase beta) (Genzyme Inc, Boston MA, USA),它们代表了法布里病唯一目前可用的特异性治疗方法。酶替代疗法(ERT)是治疗法布里病的合理且有前途的方法,但并不代表治愈,需要患者终生每周静脉内施用,估计NHS费用约为每年20万英镑。另外,相当一部分患者(55-88%)对 α -半乳糖苷酶A产生中和抗体,从而使ERT无效。

[0005] 相比之下,针对法布里病的基因治疗通过在将正常拷贝的 α -半乳糖苷酶A基因转移到受影响的患者后,通过持续的内源性产生 α -半乳糖苷酶A来提供治疗的潜力。

[0006] 本发明人已经开发了使用腺相关病毒载体 (AAV) 介导 α -半乳糖苷酶A基因的转移和表达的基因治疗方法。由于法布里病由单一基因的缺陷引起,相对较低的酶校正水平将降低糖鞘脂的储存。此外,由于代谢交叉校正机制,少量细胞的校正也会潜在校正远端细胞,其中经校正的细胞分泌可以校正旁观者细胞的 α -半乳糖苷酶A。最后,本发明人的方法需要在体内AAV介导的肝细胞基因转移后肝介导的 α -半乳糖苷酶A的表达,这导致对转基因蛋白质的耐受性,从而降低了产生 α -半乳糖苷酶A的中和抗体的风险。

发明概述

[0008] 在本发明的第一方面,提供了包含编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列的核酸分子,其中所述核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少85%的同一性。

[0009] 本发明人已经出乎意料地发现,与含有野生型 α -半乳糖苷酶A cDNA的相同构建体相比,SEQ ID NO:1的新密码子优化序列导致在肝脏特异性启动子控制下用AAV载体转导的肝细胞中的 α -半乳糖苷酶A蛋白的表达增加。

[0010] 核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少85%的同一性。在一些实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少86%的同一性。在其它实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少87%的同一性。在具体实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少88%的同一性。在另外的实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少89%的同一性。在一些实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少90%的同一性。在其它实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少91%的同一性。在具体实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少92%的同一性。在另外的实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少93%的同一性。在一些实施方案

中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少94%的同一性。在其它实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少95%的同一性。在具体实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少96%的同一性。在其它实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少97%的同一性。在一些实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少98%的同一性。在其它实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少99%的同一性。在具体实施方案中,核苷酸序列具有SEQ ID NO:1的序列。

[0011] 核苷酸序列编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白。功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白从糖脂和糖蛋白水解末端 α -半乳糖基部分。用于测定 α -半乳糖苷酶A活性的合适方法是本领域技术人员众所周知的。优选地,核苷酸序列编码具有野生型氨基酸序列的 α -半乳糖苷酶A蛋白。序列是本领域技术人员众所周知的。例如,信息可以在GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 上找到,登录号为CAA29232.1 (GI: 757912)。关于蛋白质的更多信息可在NCBI参考序列:NP_000160.1 (GI: 4504009) 下找到。野生型蛋白质序列具有429个氨基酸。

[0012] 在本发明的第二方面,提供了用于表达 α -半乳糖苷酶A蛋白的载体。

[0013] 载体包含上述核酸分子。这意味着载体含有编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列,使得当表达序列时,功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白由其中包含载体的细胞产生。

[0014] SEQ ID NO:1的序列是密码子优化的 α -半乳糖苷酶A核苷酸序列。序列没有以正常方式进行密码子优化。相反,密码子已经基于用于在肝脏中高水平表达的蛋白质的密码子来选择。其原因是载体通常在肝脏中表达。已经发现这种特殊的密码子优化方法产生出乎意料地高表达的核苷酸序列。

[0015] 编码 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列的长度优选为1265至1315个核苷酸。在一些实施方案中,编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列长度为1270至1310个核苷酸。在其它实施方案中,编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列长度为1275至1305个核苷酸。在具体实施方案中,编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列长度为1280至1300个核苷酸。

[0016] 优选地,载体还包含启动子。启动子引起编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列的表达。可以使用任何适当的启动子,例如HLP,LP1,HCR-hAAT,ApoE-hAAT和LSP。这些启动子在以下参考文献中更详细地描述:HLP:McIntosh J. et al., Blood 2013 Apr 25, 121 (17):3335-44;LP1:Nathwani et al., Blood. 2006 April 1, 107 (7):2653-2661;HCR-hAAT:Miao et al., Mol Ther. 2000;1:522-532;ApoE-hAAT:Okuyama et al., Human Gene Therapy, 7, 637-645 (1996);和LSP:Wang et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 March 30, 96 (7):3906-3910。优选的启动子也描述于WO 2011/005968中。另一个优选的启动子具有SEQ ID NO:2的序列,称为HLP2。具有SEQ ID NO:2的启动子是肝脏特异性启动子,已被发现在肝脏中表达特别好。表达良好的同时启动子也相对较小,这允许更有效地包装载体。优选地,启动子是肝脏特异性启动子。

[0017] SEQ ID NO:3是载体构建体的核苷酸序列,其包含启动子和编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列。因此,本发明的核酸分子可以包含与SEQ ID NO:3的序列具有至少90%同一性的核苷酸序列。在其它实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:3的序列具有至少91%的同一性。在具体实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:3的序列具有至少92%的同

一性。在另外的实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:3的序列具有至少93%的同一性。在一些实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:3的序列具有至少94%的同一性。在其它实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:3的序列具有至少95%的同一性。在具体实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:3的序列具有至少96%的同一性。在另外的实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:3的序列具有至少97%的同一性。在一些实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:3的序列具有至少98%的同一性。在其它实施方案中,核苷酸序列与SEQ ID NO:3的序列具有至少99%的同一性。在具体实施方案中,核苷酸序列具有SEQ ID NO:3的序列。

[0018] 载体可以是用于表达 α -半乳糖苷酶A蛋白的任何合适的载体,包括病毒和非病毒载体。病毒载体包括细小病毒,腺病毒,逆转录病毒,慢病毒或单纯疱疹病毒。细小病毒可以是腺病毒相关病毒 (AAV)。载体优选是重组腺相关病毒 (rAAV) 载体或慢病毒载体。更优选地,载体是rAAV载体。

[0019] 根据本发明的载体可以是基因递送载体。这样的基因递送载体可以是病毒基因递送载体或非病毒基因递送载体。

[0020] 因此,本发明提供了基于动物细小病毒的基因递送载体,特别是诸如感染性人或猿猴AAV的依赖病毒 (dependovirus) 及其组分 (例如,动物细小病毒基因组),用作用于在哺乳动物细胞中引入和/或表达 α -半乳糖苷酶A蛋白的载体。因此,本文所用的术语“细小病毒”包括诸如任何类型的AAV的依赖病毒。

[0021] 细小病毒科的病毒是小型DNA动物病毒。细小病毒科可以分为两个亚科:感染脊椎动物的细小病毒亚科 (Parvovirinae) 和感染昆虫的浓核病毒亚科 (Densovirinae)。细小病毒亚科的成员在本文中被称为细小病毒,包括依赖病毒属 (Dependovirus)。从其属的名字可以推断,依赖病毒属的成员是独特的,因为它们通常需要与辅助病毒如腺病毒或疱疹病毒共感染用于细胞培养中的生产性感染。依赖病毒属包括AAV,其通常感染人 (例如,血清型1、2、3A、3B、4、5和6) 或灵长类动物 (例如血清型1和4) 以及感染其他温血动物的相关病毒 (例如,牛、犬、马和羊腺相关病毒)。关于细小病毒和细小病毒科其他成员的进一步信息,见 Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Chapter 69于 Fields Virology (3d Ed. 1996)。为方便起见,本文通过参考AAV进一步举例说明和描述本发明。然而,应当理解,本发明不限于AAV,而是可以同样适用于其他细小病毒。

[0022] 所有已知AAV血清型的基因组组成非常相似。AAV的基因组是长度小于约5,000个核苷酸 (nt) 的线性单链DNA分子。末端反向重复序列 (ITR) 侧接编码非结构复制 (Rep) 蛋白和结构 (VP) 蛋白的独特核苷酸序列。VP蛋白 (VP1、VP2和VP3) 形成衣壳。末端145nt是自身互补的并且被组织成以便可以形成形成T形发夹的能量稳定的分子内的双链体。这些发夹结构作为病毒DNA复制的起点,用作细胞DNA聚合酶复合物的引物。在哺乳动物细胞中野生型 (wt) AAV感染后,Rep基因 (即编码Rep78和Rep52蛋白) 分别由P5启动子和P19启动子表达,并且两个Rep蛋白在病毒基因组的复制中具有功能。Rep ORF中的剪接事件导致实际上四种Rep蛋白的表达 (即Rep78、Rep68、Rep52和Rep40)。然而,已经显示在哺乳动物细胞中编码Rep78和Rep52蛋白的未剪接的mRNA足以产生AAV载体。在昆虫细胞中,Rep78和Rep52蛋白也足以产生AAV载体。

[0023] 在适合用作基因治疗载体的AAV中,载体基因组通常包含待包装的用于递送至靶细胞的核酸。根据该特定实施方案,异源核苷酸序列位于载体基因组任一端的病毒ITR之

间。在进一步优选的实施方案中,细小病毒(例如AAV)cap基因和细小病毒(例如AAV)rep基因从模板基因组(并且因此从其产生的病毒颗粒DNA)中缺失。该构造使得能够由细小病毒衣壳携带的核酸序列的大小最大化。

[0024] 根据特定实施方案,核酸位于底物任一端的病毒ITR之间。细小病毒基因组可能仅使用一个ITR发挥功能。因此,在基于细小病毒的本发明的基因治疗载体中,载体基因组侧接至少一个ITR,但更典型地侧接两个AAV ITR(通常具有载体基因组的任一侧,即5'末端一个和3'末端一个)。载体基因组中的核酸与ITR中的一个或多个之间可能存在插入序列。

[0025] 优选地,编码功能性α-半乳糖苷酶A蛋白(用于在哺乳动物细胞中表达)的核苷酸序列将被并入位于两个常规ITR之间或位于用两个D区工程改造的ITR的任一侧上的细小病毒基因组中。

[0026] 可以在本发明中用于生产AAV基因治疗载体的AAV序列可以从任何AAV血清型的基因组衍生。通常,AAV血清型具有在氨基酸和核酸水平上具有显著同源性的基因组序列,提供相同的一组遗传功能,产生基本上物理和功能等同的病毒颗粒,并通过实际相同的机制复制和组装。对于各种AAV血清型的基因组序列和基因组相似性的概述,参见例如GenBank登录号U89790;GenBank登录号J01901;GenBank登录号AF043303;GenBank登录号AF085716;Chiorini et al,1997;Srivastava et al,1983;Chiorini et al,1999;Rutledge et al,1998;和Wu et al,2000。AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8或9可用于本发明。然而,AAV血清型1、5或8是用于本发明上下文的AAV序列的优选来源。当用于生产基因治疗载体时,来自AAV血清型的序列可以被突变或工程改造。

[0027] 优选地,用于本发明上下文中的AAV ITR序列衍生自AAV1、AAV2、AAV4和/或AAV6。同样,Rep(Rep78和Rep52)编码序列优选衍生自AAV1、AAV2、AAV4和/或AAV6。然而,编码用于本发明上下文中的VP1、VP2和VP3衣壳蛋白的序列可以取自任何已知的42种血清型,更优选来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9或通过例如衣壳shuffling技术和AAV衣壳文库新开发的AAV样颗粒。

[0028] 大多数血清型中AAV Rep和ITR序列特别保守。各种AAV血清型的Rep78蛋白是例如大于89%的相同,并且在AAV2、AAV3A、AAV3B和AAV6之间的基因组水平上的总核苷酸序列同一性约为82% (Bantel-Schaal et al,1999)。此外,已知许多AAV血清型的Rep序列和ITR可以在哺乳动物细胞中AAV颗粒的生产中有效地交叉互补(即功能上替代)来自其它血清型的相应序列。US 2003148506报道,AAV Rep和ITR序列还有效地与昆虫细胞中的其他AAV Rep和ITR序列交叉互补。

[0029] 已知AAV VP蛋白质确定AAV病毒颗粒的细胞向性(tropicity)。VP蛋白编码序列比不同AAV血清型中的Rep蛋白和基因显著更不保守。Rep和ITR序列交叉互补其他血清型的相应序列的能力允许产生包含一种血清型(例如AAV1、5或8)的衣壳蛋白和另一AAV血清型(如AAV2)的Rep和/或ITR序列的假型AAV颗粒。这种假型rAAV颗粒是本发明的一部分。

[0030] 经修饰的“AAV”序列也可以在本发明的上下文中使用,例如,用于生产AAV基因治疗载体。这样的经修饰的序列例如包括与AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8或AAV9ITR、Rep或VP具有至少约70%,至少约75%,至少约80%,至少约85%,至少约90%,至少约95%或更多核苷酸和/或氨基酸序列同一性的序列(例如,具有约75-99%核苷酸序列同一性的序列)可用于替换野生型AAV ITR、Rep或VP序列。

[0031] 尽管与其他AAV血清型在许多方面相似,AAV5比其他已知的人和猿猴AAV血清型不同于其他人和猿血清型的不同之处更多。鉴于此,rAAV5的产生可能与昆虫细胞中其他血清型的产生不同。在本发明的方法用于产生rAAV5的情况下,优选一种或多种构建体,在多于一种构建体的情况下,总体上包含AAV5ITR的核苷酸序列,核苷酸序列包含AAV5Rep编码序列(即核苷酸序列包含AAV5Rep78)。可以根据需要修饰这样的ITR和Rep序列以获得AAV5或假型AAV5载体的有效生产。例如,可以修饰Rep序列的起始密码子,可以修饰或消除VP剪接位点,和/或可修饰VP1起始密码子和附近的核苷酸以改善AAV5载体的产生。

[0032] 因此,本发明中使用的病毒衣壳可以来自任何细小病毒,如上所述的自主细小病毒或依赖病毒。优选地,病毒衣壳是AAV衣壳(例如,AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5或AAV6衣壳)。通常,优选AAV1衣壳或AAV6衣壳。细小病毒衣壳的选择可以基于本领域已知的许多考虑,例如,靶细胞类型,所需表达水平,待表达的异源核苷酸序列的性质,与病毒生产有关的问题,等等。例如,AAV1和AAV6衣壳可以有利地用于骨骼肌;AAV1,AAV5和AAV8用于肝脏和中枢神经系统(例如脑)细胞;AAV5用于气道和肺或脑中的细胞;AAV3用于骨髓细胞;和AAV4用于脑中特定细胞(例如可附加 appendable 细胞)。

[0033] 选择最合适的病毒、病毒亚型或病毒血清型在本领域技术人员的技术技能之内。对于某种类型的组织,某些亚型或血清型可能比其他亚型或血清型更合适。

[0034] 例如,本发明的核酸的肝脏特异性表达可以有利地由AAV介导的肝细胞转导诱导。肝脏适合于AAV介导的转导,可以使用不同的血清型(例如,AAV1、AAV5或AAV8)。肌肉的转导可以通过经由血流施用AAV编码核酸来实现。因此,静脉内或动脉内施用是适用的。

[0035] 根据本发明制备的细小病毒基因治疗载体可以是其中病毒TR和病毒衣壳来自不同细小病毒的“杂合”颗粒。优选地,病毒TR和衣壳来自不同血清型的AAV。同样,细小病毒可以具有“嵌合”衣壳(例如,含有来自不同细小病毒,优选不同AAV血清型的序列)或“靶向”衣壳(例如定向性)。

[0036] 在本发明的上下文中,“至少一个细小病毒ITR核苷酸序列”被理解为是指包含大部分互补的、对称排列的序列也称为“A”、“B”和“C”区的回文序列。ITR起复制起点的作用,复制起点是在复制中具有“顺式”作用的位点,即作为反式作用复制蛋白例如Rep 78(或Rep68)的识别位点,其识别回文和回文内的特定序列。ITR序列的对称性的一个例外是ITR的“D”区。它是独特的(在一个ITR内没有互补序列)。单链DNA的切口发生在A区和D区之间的交界处。这是新DNA合成开始的区域。D区通常位于回文的一侧,并为核酸复制步骤提供方向性。在哺乳动物细胞中复制的细小病毒通常具有两个ITR序列。然而,可以工程改造ITR,使得结合站点对称地位于A区和D区的两条链上,在回文的每一侧上有一个。在双链环状DNA模板(例如质粒)上,Rep78-或Rep68-辅助的核酸复制然后在两个方向上进行,单个ITR足以用于环状载体的细小病毒复制。因此,在本发明的上下文中可以使用一个ITR核苷酸序列。然而,优选地,使用两个或另一偶数个常规ITR。最优选地,使用两个ITR序列。优选的细小病毒ITR是AAV ITR。为了安全起见,可能需要构建在初始引入细胞后不能进一步繁殖的细小病毒(AAV)载体。用于限制接收者中不希望的载体繁殖的这种安全机制可以通过使用具有US 2003148506中所述的嵌合ITR的AAV来提供。

[0037] 本领域技术人员将理解,可以考虑病毒ITR的来源来选择用于产生本发明的AAV载体的病毒Rep蛋白。例如,尽管ITR的血清型和Rep蛋白不是必须匹配的,AAV5ITR通常与

AAV5Rep蛋白更有效地相互作用。

[0038] 本发明中使用的ITR通常是功能性的,即它们可以是完全可分解的(resolvable),并且是AAV序列,优选血清型1、2、3、4、5或6的AAV序列。根据本发明的可分解的AAV ITR不需要具有野生型ITR序列(例如,可以通过插入、缺失、截短或错义突变改变的野生型序列),只要ITR介导期望的功能,例如,病毒包装、整合和/或原病毒拯救等。

[0039] 有利地,通过与以前的方法相比,使用基因治疗载体,蛋白质合成(即 α -半乳糖苷酶A合成)的恢复是转导细胞永久获得或持续一段时间的特征,因此避免了需要连续施用来达到治疗效果。

[0040] 因此,本发明的载体因此代表了通过工程改造有效转导合适的细胞类型例如肝细胞的基因治疗载体内的核酸用于体内递送 α -半乳糖苷酶A核苷酸序列的开发策略的工具。

[0041] 载体可以是单链载体或自身互补载体。在一些实施方案中,载体是单链载体。在其它实施方案中,载体是自身互补载体。

[0042] 载体还可以包含多聚A尾。优选地,其位于编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列的下游。优选地,多聚A尾是牛生长激素多聚A尾。优选地,其长度为250至270个核苷酸。

[0043] 载体可以包含允许表达功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的其它元件。这些元件是本领域技术人员众所周知的。

[0044] 优选分离上述核酸。

[0045] 本领域技术人员生产上述核酸分子的能力将是很好的。这可以例如使用给定序列的化学合成来完成。

[0046] 此外,本领域技术人员将容易地能够确定核酸是否表达功能性蛋白质。合适的方法对于本领域技术人员是显而易见的。例如,一种合适的体外方法包括将核酸插入载体(例如慢病毒或AAV载体)中,用载体转导宿主细胞例如293T或HeLa细胞,并测定 α -半乳糖苷酶A活性。或者,合适的体内方法包括将含有核酸的载体转导到患有法布里病的小鼠中,并测定小鼠血浆中的功能性 α -半乳糖苷酶A。下面更详细地描述合适的方法。

[0047] 核酸可以是由核苷酸组成的任何类型的核酸。应能够表达核酸以便产生蛋白质。优选地,核酸是DNA或RNA。

[0048] 本发明还提供了包含上述核酸分子或载体中的任一种的宿主细胞。优选地,载体能够在宿主中表达 α -半乳糖苷酶A核苷酸序列。宿主可能是任何合适的宿主。

[0049] 如本文所用,术语“宿主”是指含有本发明的蛋白质或载体的生物体和/或细胞,以及适用于表达重组基因或蛋白质的生物体和/或细胞。本发明不限于任何特定类型的细胞或生物体。实际上,考虑了将在本发明中用作宿主的任何合适的生物体和/或细胞。宿主细胞可以是单细胞、相似或不同细胞的群体的形式,例如以培养物(例如液体培养物或固体基质上的培养物)、生物体或其一部分的形式。

[0050] 根据本发明的宿主细胞可以允许表达本发明的核酸分子。因此,宿主细胞可以是例如细菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞。

[0051] 此外,本发明提供了包含含有编码上述功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核酸分子或上述载体的细胞的转基因动物。优选地,动物是非人哺乳动物,特别是灵长类动物。或者,动物可以是啮齿动物,特别是小鼠;或者可以是犬,猫,羊或猪。

[0052] 在一方面,本发明提供了包含本发明的核酸分子或载体和一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。一种或多种赋形剂包括载体、稀释剂和/或其它药用剂、药物制剂或佐剂等。

[0053] 本发明还提供了治疗法布里病的方法,其包括向患有法布里病的患者施用治疗有效量的如上所述的载体。优选地,患者是人。

[0054] 当法布里病在上述方法中“得到治疗”时,这意味着法布里病的一种或多种症状得到改善。这并不意味着法布里病的症状得到完全补救,使得它们不再存在于患者体内,尽管在某些方法中可能是这种情况。治疗方法导致法布里病的一种或多种症状的比治疗前更不严重。

[0055] “治疗有效量”是指在剂量上和必要的时间段内有效实现所期望的治疗结果例如提高受试者中功能性 α -半乳糖苷酶A的水平(以便导致功能性 α -半乳糖苷酶A产生至足以改善法布里病症状的水平)的量。

[0056] 将本发明的核酸或载体体内递送至宿主细胞可导致宿主中功能性 α -半乳糖苷酶A的增加,例如达到改善法布里病的一种或多种症状的水平。

[0057] 患有法布里病的受试者中天然存在的 α -半乳糖苷酶A的水平根据法布里病的严重程度而变化。患有严重疾病形式的患者具有正常健康受试者(本文称为“正常水平”)中发现的水平的小于约1%的 α -半乳糖苷酶A水平。已经发现,当使用本发明的治疗方法时,可以使功能性 α -半乳糖苷酶A的水平升高至正常水平的至少约1%。在一些实施方案中,本发明的治疗方法导致功能性 α -半乳糖苷酶A的水平升高至正常水平的至少约2%,至少约3%,至少约4%,至少约10%,约15%,至少约20%或至少约25%。在具体实施方案中,本发明的治疗方法导致功能性 α -半乳糖苷酶A的水平升高至正常水平的至少约30%。

[0058] 在一个实施方案中,本发明的治疗方法导致功能性 α -半乳糖苷酶A的水平升高至至多为正常水平。

[0059] 可以相对容易地测量功能性 α -半乳糖苷酶A的活性,测定 α -半乳糖苷酶A活性的方法是本领域技术人员众所周知的。使用如Clin.Biochem.45(15):1233-8(2012)中所述的血液斑点法,可以方便地在血液中测量 α -半乳糖苷酶的活性。该方法的原理是在酸性pH值下, α -半乳糖苷酶将底物4-甲基伞形酮基- α -D-吡喃半乳糖苷水解成4-甲基伞形酮和半乳糖。添加碱性缓冲液可终止酶反应,并使4-甲基伞形酮在与未水解的底物不同的波长下发荧光,从而允许其在大量过量的未水解底物存在下进行测量。在白细胞中,通常超过95%的 α -半乳糖苷酶活性是 α -半乳糖苷酶A,而在血浆和培养细胞中,同工酶, α -半乳糖苷酶B可显著有助于总 α -半乳糖苷酶活性。 α -半乳糖苷酶A可以在 α -半乳糖苷酶B的存在下通过利用A同工酶的增加的热负荷来测量,并且在血浆中 α -半乳糖苷酶B的加入可以通过加入a-NAc半乳糖胺来抑制。这种方法的一个关键优点是只需要在滤纸上有5ul的全血干斑点。这提供了在载体施用后随着在法布里Ko小鼠进行实验实时测量 α -半乳糖苷酶水平的优点。

[0060] 或者,血浆中的 α -半乳糖苷酶A活性可以在基因转移后的小鼠终点出血中进行评估。该方法基于以下事实:如上所述,在酸性pH下, α -半乳糖苷酶将底物4-甲基伞形酮基- α -D-吡喃半乳糖苷水解成4-甲基伞形酮和半乳糖。此外,还可以使用显示抗原水平的标准的蛋白质印迹分析法或标准(ELISA)型免疫测定来测量 α -半乳糖苷酶。

[0061] 此外,本发明提供了用于治疗例如用于治疗法布里病的编码如上所述的功能性 α -

半乳糖苷酶A蛋白的核酸分子,或如上所述的载体。

[0062] 此外,本发明提供编码如上所述的功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核酸分子或如上所述的载体在制备用于治疗法布里病的药物中的用途。

[0063] 本发明还提供了将编码功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核苷酸序列递送到受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用编码如上所述的功能性 α -半乳糖苷酶A蛋白的核酸分子或如上所述的载体。

[0064] 在以上说明书中,术语“同一性”用于指两个序列的相似性。为了本发明的目的,这里定义为了确定两个核苷酸序列的同一性百分比,为了最佳比较的目的对齐序列(例如,可以在第一核酸的序列中引入缺口以获得与第二氨基或核酸序列的最佳对比)。然后比较核苷酸位置的核苷酸残基。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置的相同的氨基酸或核苷酸残基占据时,则该位置处的分子是相同的。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数目的函数(即,同一性百分比=相同位置的数量/位置总数(即重叠位置) $\times 100$)。优选地,两个序列的长度相同。

[0065] 可以在被比较的两个序列的整个长度上进行序列比较,或者在两个序列的片段上进行序列比较。通常,比较将在被比较的两个序列的全长上进行。然而,序列同一性可以在例如约二十,约五十,约一百,约二百,约五百,约1000或约2000或更多个连续核酸残基的区域上进行。

[0066] 本领域技术人员将意识到几个不同的计算机程序可用于确定两个序列之间的同源性或同一性的事实。在优选实施方案中,使用软件包Clone Manager Professional版本9(优选版本9.4)分析两个序列之间的同一性。该分析工具由Sci-Ed Software (Scientific & Educational Software, 11010 Lake Grove Blvd, Ste 100, PMB 122, Morrisville, NC 27560, USA-<http://www.scied.com/index.htm>)生成。用于比较序列的设置优选如下:比对:全局DNA比对;参数:两条链;评分矩阵:线性(不匹配2,OpenGap 4,ExtGap 1)。或者,也可以使用相同的软件和本地设置使用以下方法如Fast Scan-MaxScore和Fast Scan MaxQual。

[0067] 其他方法也可用于确定序列同一性。例如,可以使用已经并入到Accelrys GCG软件包中的GAP程序中的Needleman和Wunsch(1970)算法(可从<http://www.accelrys.com/products/gcg/>获得),使用Blosum 62矩阵或PAM250矩阵,缺口权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6来确定两个氨基酸或核酸序列之间的同一性百分比。

[0068] 本发明文件中引用的所有专利和文献通过引用整体并入本文。

[0069] 本领域技术人员将理解,本发明的所有方面,无论它们是否涉及例如核酸、载体、宿主细胞或用途,均可同样适用于本发明的所有其它方面。特别地,治疗方法,例如核酸或载体的施用的方面可以比本发明的一些其它方面更详细地描述,例如涉及核酸或载体用于治疗法布里病的用途。然而,本领域技术人员将会理解,对于本发明的特定方面给出了更详细的信息,该信息通常同样适用于本发明的其它方面。此外,本领域技术人员还将理解,与治疗方法有关的描述同样适用于核酸或载体在治疗法布里病中的用途。

[0070] 发明详述

[0071] 现在将仅通过参考附图的方式详细描述本发明,其中:

[0072] 图1显示了碱性凝胶分析,其表明表达野生型(wt) α -半乳糖苷酶A(梯状条带旁边

的左泳道)和密码子优化(codop) α -半乳糖苷酶A(右泳道)的scAAV8载体都被完全包装,没有可检测的部分基因组。这些载体用血清型8衣壳变成假型载体,其中wt或密码子优化 α -半乳糖苷酶A基因在肝脏特异性HLP启动子的控制下。

[0073] 图2示出了当以 1×10^7 vg/细胞的感染复数(MOI)转导入HUH7肝癌细胞时,包含密码子优化的 α -半乳糖苷酶A的scAAV载体(scAAV-GLA-codop)不影响 α -半乳糖苷酶A转录物的内源水平(左上图),但表达高水平的密码子优化的 α -半乳糖苷酶A mRNA(右上图)。在递增的MOI下,将scAAV-GLA-codop转导入HUH7细胞,导致 α -半乳糖苷酶A转录物的递增和剂量特异性表达(下图)。

[0074] 图3说明使用表达野生型(WT-GLA)和密码子优化(codop-GLA) α -半乳糖苷酶A(α -gal A)的scAAV载体一式两份转导HUH7细胞。显示GLA-codop载体介导GLA蛋白的更高表达。

[0075] 图4显示了在单次推注尾静脉注射 4×10^{10} vg/小鼠($\sim 2 \times 10^{12}$ vg/kg)或 4×10^{11} vg/小鼠($\sim 2 \times 10^{13}$ vg/kg)的AAV8假型scAAV-GLA-codop后,成年法布里小鼠(3月龄)或1周龄、2周龄或3周龄的新生小鼠中的 α -半乳糖苷酶A活性。基因转移后3个月测定转基因表达预计达到峰值时的活性。在终点出血时收集数据(血浆水平)。

[0076] 图5显示了在单次推注尾静脉注射 4×10^{10} vg/小鼠($\sim 2 \times 10^{12}$ vg/kg)或 4×10^{11} vg/小鼠($\sim 2 \times 10^{13}$ vg/kg)的AAV8假型scAAV-GLA-codop后,成年法布里小鼠(3月龄)或1周龄、2周龄或1月龄的新生小鼠中的 α -半乳糖苷酶A活性。基因转移后3个月测定转基因表达预计达到峰值时的活性。使用血液斑点法“实时”收集数据。

[0077] 图6显示来自转导动物肝脏的蛋白质印迹分析。以 4×10^{11} vg/小鼠的剂量转导后 α -葡萄糖苷酶A高水平表达,但以 4×10^{10} vg/小鼠的剂量转导后没有高水平表达。

[0078] 图7显示转导动物的肾脏、白细胞(WBC)和心脏中 α -半乳糖苷酶A表达的蛋白质印迹分析。

[0079] 图8显示了早期阶段i.p.注射载体后 α -GLA敲除小鼠肾脏中鞘糖脂沉积物的电子显微照片。A)未处理的,B)AAV处理的一周龄小鼠,低剂量(2×10^{12} vg/kg)和C)高剂量(2×10^{13} vg/kg)。经处理的小鼠在i.p.注射后5个月被处死(culled)(放大倍率:x5000和x2000)。

[0080] 图9显示了中期阶段i.p.注射载体后 α -GLA敲除小鼠肾脏中鞘糖脂沉积物的电子显微照片。A)未处理的,B)AAV处理的3周龄小鼠,低剂量(2×10^{12} vg/kg)和C)高剂量(2×10^{13} vg/kg)。经处理的小鼠在i.p.注射后一个月被处死(放大倍率:x5000和x2000)。

[0081] 图10显示了中期阶段i.v.注射载体后 α -GLA敲除小鼠肾脏中鞘糖脂沉积物的电子显微照片。A)未处理的,B)AAV处理的一月龄小鼠,低剂量(2×10^{12} vg/kg)和C)高剂量(2×10^{13} vg/kg)。经处理的小鼠在i.v.注射后10个月被处死(放大倍数:x5000、x2000和x200)。

[0082] 图11显示了晚期阶段i.v.注射载体后 α -GLA敲除小鼠肾脏中鞘糖脂沉积物的电子显微照片。A)未处理的,B)AAV处理的3月龄小鼠,低剂量(2×10^{12} vg/kg)和C)高剂量(2×10^{13} vg/kg)。经处理的小鼠在i.v.注射后13个月被处死(放大倍数:x5000、x2000和x200)。

[0083] 概述

[0084] 本发明人的研究计划的首要目标是建立一种安全有效和广泛可用的治愈法布里病的方法。在实现这一目标的过程中,本发明人已经开发了具有独特的密码子优化的 α -半乳糖苷酶A序列的肝脏导向AAV基因转移方法。

[0085] 本发明的优点在于:

[0086] 1. 编码 α -半乳糖苷酶A的AAV的单次外周静脉输注可导致患有法布里病的患者中 α -半乳糖苷酶A的长期表达。AAV介导的基因转移后 α -半乳糖苷酶A的稳定长期表达, 将:

[0087] a. 比可能使用酶替代疗法(ERT)发挥更大的临床益处, 从而改善预防末梢器官损伤的前景, 并改善患有法布里病的患者的预期寿命;

[0088] b. 消除了常规终生输注 α -半乳糖苷酶A的需要, 从而提高了生活质量; 和

[0089] c. 由于减少/消除了对昂贵ERT的需求而导致有可能节省NHS

[0090] 2. 来自密码子优化的表达盒的更加强有力的表达导致使用较低剂量的AAV载体的治疗益处

[0091] 3. 在AAV介导的基因转移后, 连续较高的血浆水平的 α -半乳糖苷酶A, 并且就其本身而言改善了在中枢神经系统内校正病理学的前景, 和

[0092] 4. 来自肝脏的 α -半乳糖苷酶A的表达将降低在ERT后55-88%患者发生中和抗体的风险。

[0093] 本发明人已经观察到, 成年(3月龄)和新生(2日龄)法布里模型小鼠中的scAAV8介导的基因转移导致 α -gal A水平大幅高于与主要器官中摄入该酶相关的生理水平, 从而提高了减轻患有法布里病的患者疾病表型的可能性。在肝脏介导的转基因表达之后, 没有观察到对蛋白质的免疫学反应, 包括在早期阶段接受载体并因此具有低水平的 α -gal A表达的动物中, 最有可能反映出随着肝脏继续生长到成体大小以附加体形式保持的AAV载体基因组的损失。

[0094] 材料与方法

[0095] 将表达野生型(WT-GLA)和密码子优化(codop-GLA) α -半乳糖苷酶A的scAAV8载体转导入HUH7细胞(肝癌细胞系)以评估效力。简言之, 将在6孔培养板中以 5×10^4 个细胞/孔铺板并用10%FBS的DMEM培养的HUH7细胞用OPTIMEM培养基(Life Technologies)洗涤两次, 然后用AAV载体转导。72小时后, 收获细胞以提取DNA、RNA或蛋白质。使用DNEasy血液和组织试剂盒(Qiagen)进行DNA提取, 并使用QPCR方法和转基因特异性引物以及细胞管家基因(小鼠或人GAPDH或 β -肌动蛋白)计算基因组拷贝数。在QPCR期间建立了标准曲线, 其允许计算AAV载体的基因组拷贝数。通过测定提取后基因组DNA的浓度, 并假设每个孔的DNA含量为6.6pg来计算宿主基因组拷贝数。通过将这两个值相除, 计算每个宿主细胞的载体基因组拷贝。使用制造商的说明书使用Trizol(Life Technologies)进行RNA提取并实施, 并使用Superscript II(Life Technologies)生成cDNA。使用特异性针对内源或密码子优化形式的 α -半乳糖苷酶A的引物进行QRT-PCR。对于蛋白质印迹, 在RIPA缓冲液中用加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Sigma-Aldrich)提取细胞。

[0096] 电子显微镜分析

[0097] 在密码子优化 α -半乳糖苷酶A的基因转移后的各个时间点, 通过高分辨率电子显微镜评估小鼠肾实质的超微结构。以低剂量(2e12vg/kg)或高剂量(2e13vg/kg)施用载体。

鼠龄	早期阶段: i.p.注射	中间阶段: i.p.注射	中间阶段: i.v.注射	晚期阶段: i.v.注射
[0098] α -GLA A KO 小鼠接受高剂量和低剂量的scAAV-LP1-GLAcod, 鼠龄为:	1至2周 它们在i.p.注射后5个月被处死。 每组 N=6	3周 它们在i.p.注射后1个月被处死。 每组 N=3	1个月 它们在i.v.注射后10个月被处死。 每组 N=3	3个月 它们在i.v.注射后13个月被处死。 每组 N=3

[0099] 在基因转移后的各个时间点处死小鼠。将肾脏取出并固定在10%中性缓冲福尔马林,甲基Carnoy溶液中,并且小块用2.5%戊二醛和2%多聚甲醛固定,随后在1%四氧化锇中后固定,并用标准程序包埋于Epon。用金刚石刀以80nm切割Epon包埋块。然后将超薄切片用乙酸双氧铀和柠檬酸铅进行双染色用于电子显微镜。用蓝宝石刀替代金刚石刀以1 μ m切割相同的块面。在H-7650电子显微镜下检查切片。

[0100] 结果

[0101] 初步评估已经表明,在肝脏特异性启动子控制下用编码密码子优化的 α -半乳糖苷酶A的AAV载体转导肝细胞导致转基因 α -半乳糖苷酶A的表达水平是用含有野生型 α -半乳糖苷酶A cDNA的相同构建体观察到的4倍,这基于现有技术是意想不到的(图2和3)。

[0102] 从Kulkarni (T.Ohshima et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 94 (1997), pp.2540-2544) 获得的C57BL/6半合子雄性小鼠 (0/-) 和纯合子雌性小鼠 (-/-) 繁殖法布里模型小鼠。基于经验证的q-PCR测定和基于凝胶的定量测定,成年法布里小鼠(3月龄)接受单次推注尾静脉注射4e10vg/小鼠(=~2 \times 10¹²vg/kg)或4e11vg/小鼠(=~2 \times 10¹³vg/kg)的AAV8假型scAAV-GLA-codop。腹膜内注射给予1周龄、2周龄或3周龄的新生小鼠相同剂量的载体。其后,每隔2周从尾静脉收集血样。当转基因表达预期达到峰值时,通过在基因转移后3个月进行的终点出血(血浆水平)时如上所述的功能测定法测定 α -半乳糖苷酶A活性(图4)。还使用血液斑点法(图5)以“实时”评估 α -半乳糖苷酶A活性水平,因为这需要较小的样品体积(通常为20 μ l血液)。

[0103] 在小鼠的所有组群(N=4只动物/组)中都观察到高水平的功能性 α -半乳糖苷酶A活性,不管载体被施用于成年小鼠(3个月=3M)还是被施用于出生后早期1-3周(单次推注1W、2W、3W)。在3个月时接受2 \times 10¹²vg/kg载体的动物的活性水平较高,平均值 \pm SD=544nmol/hr/ml。用相同剂量的载体注射但在出生后1周注射的动物中的水平低至七分之一,为80nmol/hr/ml。这是人体的正常水平(范围为4.0-21.9nmol/hr/ml)的4倍。在纯合子法布里小鼠中观察到0-0.9nmol/hr/ml的活性水平,而杂合子动物的水平接近**—7.4nmol/hr/ml**。因此,基因转移后,观察到 α -半乳糖苷酶A活性4-26倍的增加。用血液斑点测定观察到的水平稍低,但是该分析证实,对于低和高剂量组群,成年小鼠的 α -半乳糖苷酶A活性分别为118 \pm 6和176 \pm 4nmol/hr/ml,呈剂量依赖性增加。在1月龄时接受载体的组群中观察到类似的水平。出生后2周转移的动物的低和高剂量组群的 α -半乳糖苷酶A活性分别为10 \pm 2和117 \pm 7nmol/hr/ml。相比之下,腹腔内分别给予2 \times 10¹²或2 \times 10¹³vg/kg剂量水平后,在1周龄时接受载体的动物的 α -半乳糖苷酶A活性最低,为2 \pm 0.4和8 \pm 3nmol/hr/ml。

[0104] 本发明人接下来评估了主要器官中的 α -半乳糖苷酶A水平。用4e11vg/小鼠转染后的动物的肝脏的蛋白质印迹分析显示高水平的内源性人 α -半乳糖苷酶A表达(图6),但在用4e10vg/小鼠转导的动物中则没有。在4e11vg/小鼠(=2e13vg/kg)转导的动物中,白细胞(WBC)显示存在人 α -半乳糖苷酶A,表明从血浆中摄取。事实上,这是与其他组织包括肾脏和心脏的一致发现(图7)。基因转移后, α -半乳糖苷酶A的水平与野生型C57B16小鼠中的水平相当,表明在接近100%生理水平的水平。基于我们在酶替代治疗方面的经验,这是意想不到的发现。因此这建议在AAV介导的基因转移之后连续长期表达 α -半乳糖苷酶A促进在法布里病中受影响的关键器官中 α -半乳糖苷酶A的摄取。这些关键器官的失败是患有法布里病的患者预期寿命降低的原因,并对酶替代疗法疗效提出了质疑。

[0105] 肾脏受累是由中性糖鞘脂(主要是神经酰胺三己糖昔) (Gb3)的积累引起的法布里病的突出特征。因此,通过高分辨率电子显微镜评估了小鼠肾实质的超微结构。在未处理的法布里小鼠中,足细胞形成足突融合,并且存在Gb3积累的储存过程,而滤过裂孔(filtration slit)形成多泡体并降解,并且裂孔隔膜(slit diaphragm)形成复合物。当发生这种现象时,可能发展蛋白尿和肾小球硬化。在围产期期间,在出生后1个月或出生后3个月(当未经处理的动物建立肾脏病理学)时,施用AAV8假型scAAV-GLA-codop后,观察到从整个肾实质剂量依赖性但大量去除脂质积聚,导致正常的肾脏结构(图8-11)。因此,如所有处理组小鼠的肾组织中较少、较小或较不致密的溶酶体的超微结构发现所示,2×10¹¹和2×10¹²vg/kg剂量水平可以既消耗积累的Gb3又防止其在小鼠中的再积聚。这些研究结果表明,在肾脏中α-Gal A容易内吞到内吞体,用于随后在含有底物的溶酶体中进行加工。

[0106] 序列

[0107] SEQ ID NO:1:密码子优化的α-半乳糖昔酶A的核苷酸序列

[0108] SEQ ID NO:2:启动子HLP2的核苷酸序列。

[0109] SEQ ID NO:3:包含启动子和密码子优化的α-半乳糖昔酶A序列(scAAV8-LP1-GLACo)的载体构建体的核苷酸序列。该序列包含LP1启动子。密码子优化的α-半乳糖昔酶A序列位于碱基722-2011。

- [0001] 序列表
[0002] <110> UCL商业有限公司
[0003] <120> Fabry Disease Gene Therapy
[0004] <130> P530226PCT
[0005] <150> GB1508025.2
[0006] <151> 2015-05-11
[0007] <160> 3
[0008] <170> PatentIn version 3.5
[0009] <210> 1
[0010] <211> 1290
[0011] <212> DNA
[0012] <213> 人工序列
[0013] <220>
[0014] <223> 密码子优化α-半乳糖苷酶A的核苷酸序列
[0015] <400> 1
[0016] atgcagctgc ggaaccccgaa actgcacctg gatatgcgc tggcactgag atttctggca 60
[0017] ctggctctttt gggatattcc tggagcaagg gcccctggaca acggactggc tcgaacccccc 120
[0018] acaatgggct ggctgcactg ggagaggttc atgtcaatc tggactgtca ggaggaacct 180
[0019] gatagctgca tctccgaaaaa gctgttatg gagatggccg aactgtatggt gtctgagggc 240
[0020] tggaaagatg ctgggtacga atatctgtgc attgacgatt gttggatggc accacagcga 300
[0021] gacagtgagg gccggctgca ggcagatcca cagagattcc ctcacggat caggcagctg 360
[0022] gccaactacg tgcatagcaa gggctgaaa ctggaatct acgcagacgt gggcaataag 420
[0023] acatgtcccg gcttcccggt gtcctttgga tactatgaca tcgatgcaca gactttcgcc 480
[0024] gactggggcg tggatctgtc gaagtttgcg ggatgtact gtgatagtct ggagaacctg 540
[0025] gctgatggat ataaacacat gtcactggca ctgaatagga ccggccgcag catgtctac 600
[0026] tcctgcgagt ggccctgtta tatgtggcca ttccagaagc ccaactacac agaaatccgc 660
[0027] cagtattgtt accattggcg aaattttgtc gacattgacg attcttgaa gagtatcaaa 720
[0028] tcaattctgg actggactag cttcaaccag gaacgaatcg tggatgtcgc aggacctggc 780
[0029] gggtaatg acccagat gctggtcattt ggcaacttcg ggctgagctg gaatcagcag 840
[0030] gtcacccaga tggccctgtg ggctatcatg gcccgtccac tggatgtc aaatgacactg 900
[0031] agacacatta gcccccaggc aaaggccctg ctgcaggaca aagatgtgat cgccattaaac 960
[0032] caggaccctc tggaaagca gggctaccag ctgcacagg gggataattt tgaagtgtgg 1020
[0033] gaacgcctc tgcggact ggcttggca gtcgcatttca tcaaccggca ggagattgga 1080
[0034] gcccccaagat cttacacaaat cgctgtggca tctctggga aaggagtcgc ttgcaatccc 1140
[0035] gcatgtttca ttactcagct gctgcctgtg aagcgcaaac tggctttta tgaatggacc 1200
[0036] tctcggctga gaagtcatat caacccaaact ggcactgtcc tgctgcagct ggagaacact 1260
[0037] atgcagatga gcctgaaaga cctgctgtaa 1290
[0038] <210> 2
[0039] <211> 335
[0040] <212> DNA
[0041] <213> 人工序列

- [0042] <220>
- [0043] <223> 启动子HLP2的核苷酸序列
- [0044] <400> 2
- [0045] ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60
- [0046] tgaccttggc gctggggcag aggtcagaca cctctctggg cccatgccac ctccaaactgg 120
- [0047] acacaggacg ctgtggttc tgagccaggg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag 180
- [0048] cccctgtttg ctccctccat aactgggtg accttggta atattcacca gcagcctccc 240
- [0049] ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaat acggacgagg acagggccct gtctcctcag 300
- [0050] cttcaggcac caccactgac ctggacagt gaatc 335
- [0051] <210> 3
- [0052] <211> 2330
- [0053] <212> DNA
- [0054] <213> 人工序列
- [0055] <220>
- [0056] <223> 包括启动子和密码子优化α-半乳糖苷酶A序列的载体构建体的核苷酸序列
- [0057] <400> 3
- [0058] gggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc 60
- [0059] gacgcccggg ctttgcggc gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcaga gagggagtgg 120
- [0060] ccaactccat cactaggggt tcctggaggg gtggagtcgt gacccttaaa atggcaaac 180
- [0061] attgcaagca gcaaacacgca aacacacagc cctccctgcc tgctgacctt ggagctgggg 240
- [0062] cagaggtcag agacctctc gggccatgc cacctccaaac atccactcga ccccttggaa 300
- [0063] ttcgggtgga gaggagcaga ggtgtcctg gcgtggttt ggttagtgta gaggggaatg 360
- [0064] actccttcg gtaagtgcag tggaaagctgt acactgccc gc当地ggc当地gtggc当地 420
- [0065] taggcggc当地 actcagatcc cagccagtg当地 acttagcccc tgttgctcc tccgataact 480
- [0066] ggggtgaccc tggtaatat tcaccagcag cctccccc当地 tgccctctg gatccactgc 540
- [0067] ttaaatacgg acgaggacag ggc当地ctgtct cctcagctc aggccaccacc actgacctgg 600
- [0068] gacagtgaat cc当地gactcta agttaataaaataaaatggtataat gtgttaaact 660
- [0069] actgattcta attgttctc tcttttagat tccaaccctt ggaactgaat tc当地ggccgc当地 720
- [0070] catgcagctg cggaaaccccg aactgcaccc gggatgc当地 ctggcactga gatttctggc 780
- [0071] actggctctc tggatattc ctggagcaag ggc当地ctggac aacggactgg ctc当地gaaaccc 840
- [0072] cacaatggc当地 tggctgcact gggagagggtt catgtcaat ctggactgtc aggaggaacc 900
- [0073] ttagtgc当地 atctccaaa agctgtttat ggagatggcc gaactgtatgg tgtctgagg 960
- [0074] ctggaaagat gctgggtacg aatatctgtc cattgacat tggatgg caccacagcg 1020
- [0075] agacagttag ggc当地ggctgc aggccatcc acagagatcc cctcacggc当地 tc当地ggc当地 1080
- [0076] gccaactac gtgc当地tagca agggc当地tggaa actggaaatc tacgc当地agacg tggcaataa 1140
- [0077] gacatgtgcc当地 ggcttcccg ggtc当地tttgg atactatgac atcgatgc当地 acactttc当地 1200
- [0078] cgactggggc当地 gtggatctgc tgaatggc当地 cggatgc当地 tacgtatgtc tggagaacc 1260
- [0079] ggctgatggc当地 tataaacaca tgtcactggc当地 actgaatagg accggccgca当地 gcatcgtcta 1320
- [0080] ctccctgc当地 gagccccc当地tgt atatgtggc当地 attccagaag cccaaactaca cagaaatccg 1380
- [0081] ccaggatgtt aaccattggc当地 gaaatggc当地 tgacattgac当地 gatttggc当地 agagtatcaa 1440
- [0082] atcaattctg gactggacta gctcaacca ggaacgaatc gtggatgtc当地 caggacctgg 1500
- [0083] cgggtggaaat gaccaggata tgctggc当地 catccggc当地acttc当地 gggctgagct ggaatc当地 1560

[0084] ggtcacccag atggccctgt gggctatcat ggccgctcca ctgttatgt caaatgacct 1620
[0085] gagacacatt agcccccagg caaaggccct gctgcaggac aaagatgtga tcgccattaa 1680
[0086] ccaggaccct ctggaaagc aggctacca gctgcgacag gggataatt ttgaagtgt 1740
[0087] ggaacgcctt ctgtccggac tggcttggc agtcgccatg atcaaccggc aggagattgg 1800
[0088] aggcccaaga tcctacacaa tcgctgtggc atctctgggg aaaggagtcg cttgcaatcc 1860
[0089] cgcattttc attactcagc tgctgcctgt gaagcgaaaa ctggctttt atgaatggac 1920
[0090] ctctcgctg agaagtata tcaacccaaac tggcaactgac ctgctgcagc tggagaacac 1980
[0091] tatgcagatg agcctgaaag acctgctgta agatatctga tcatgactcg atgctttatt 2040
[0092] tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt 2100
[0093] aacaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggtttt 2160
[0094] taaactagtc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg 2220
[0095] tcgcccgacg cccgggctt gcccggcgg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg 2280
[0096] gacagatccg ggcccgcatg cgtcgacaat tcactggccg tcgtttaca 2330

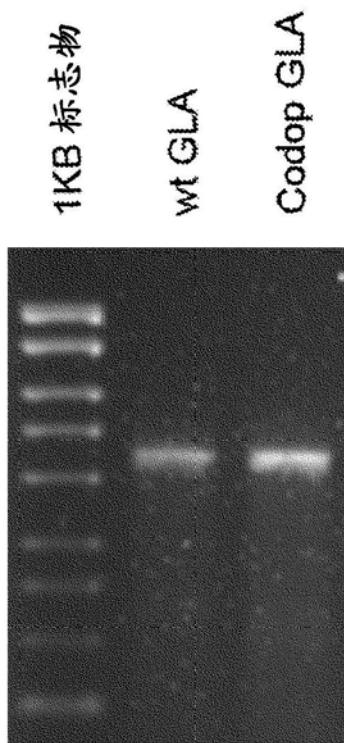


图1

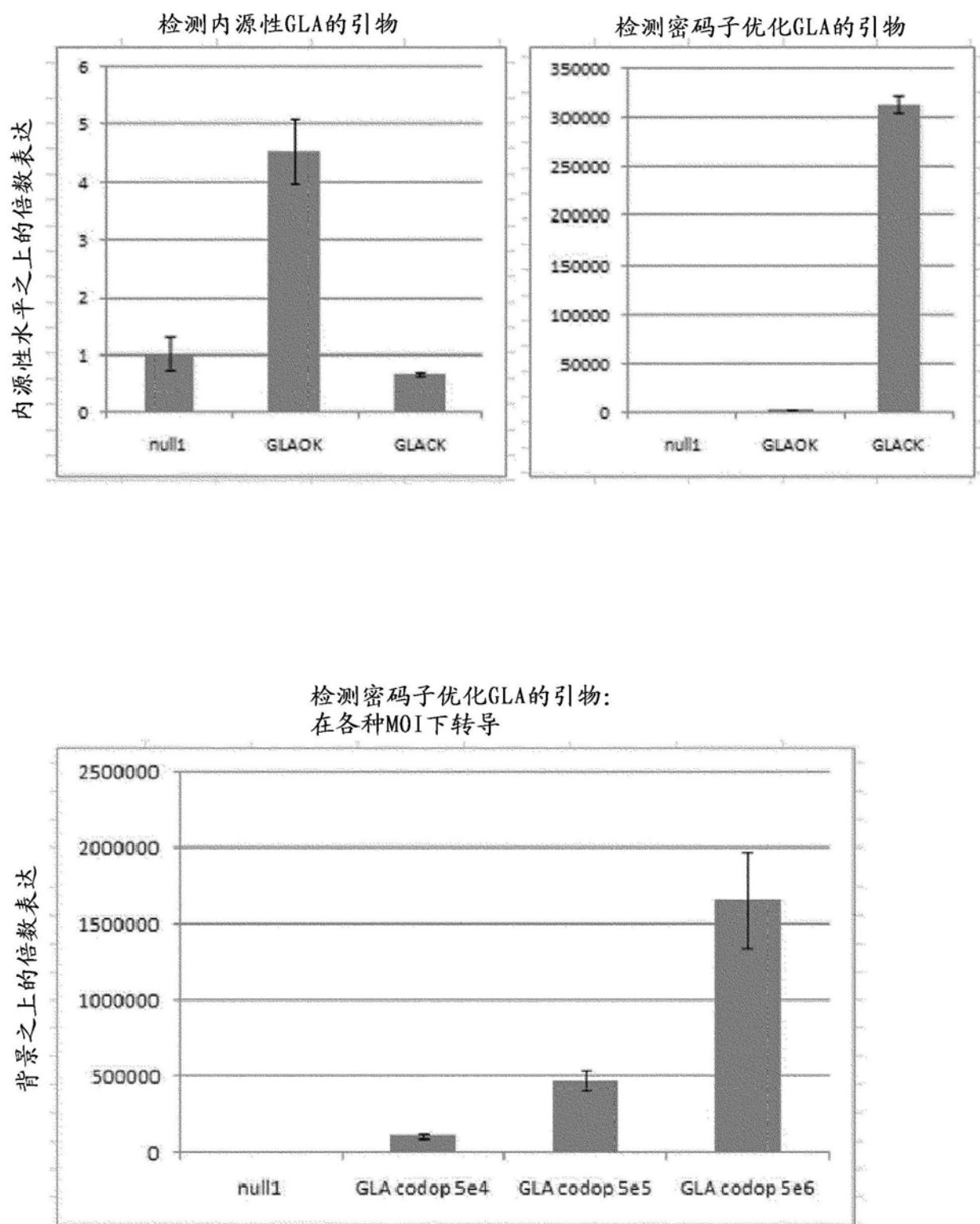


图2

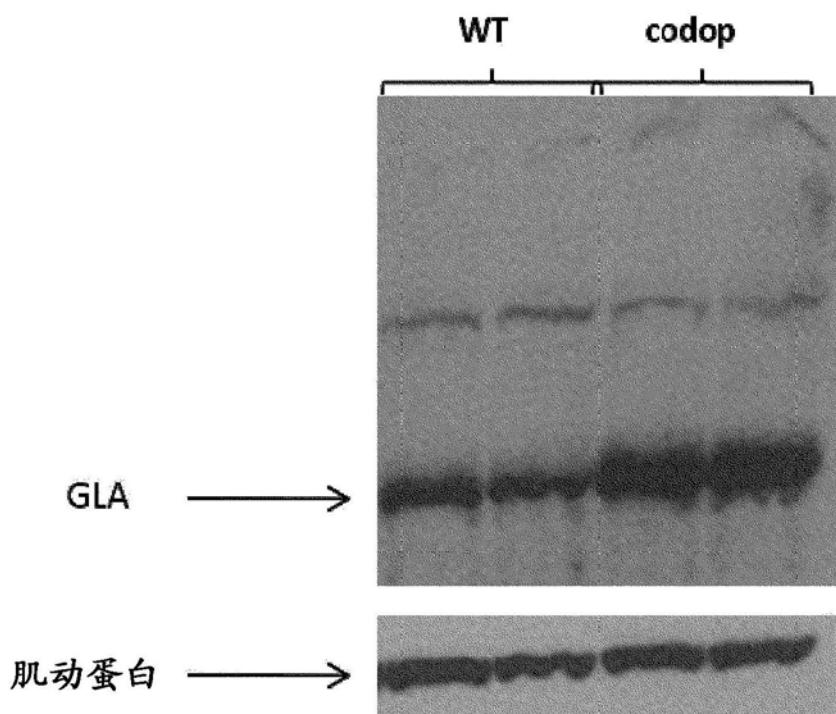


图3

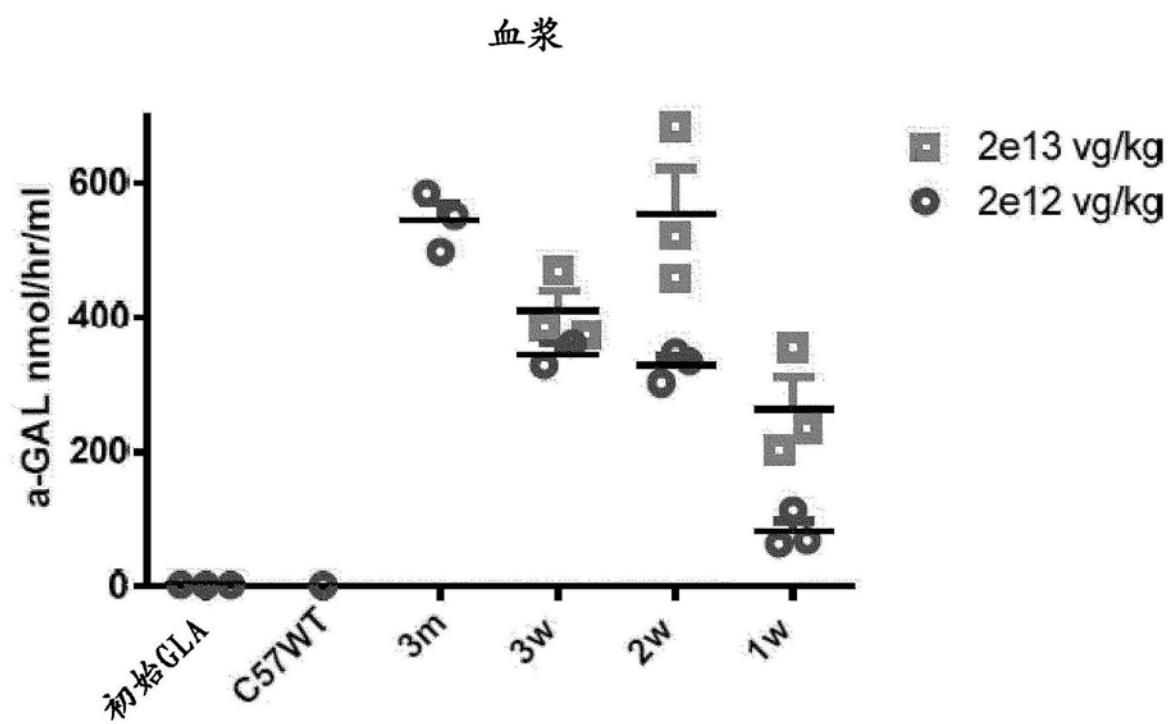


图4

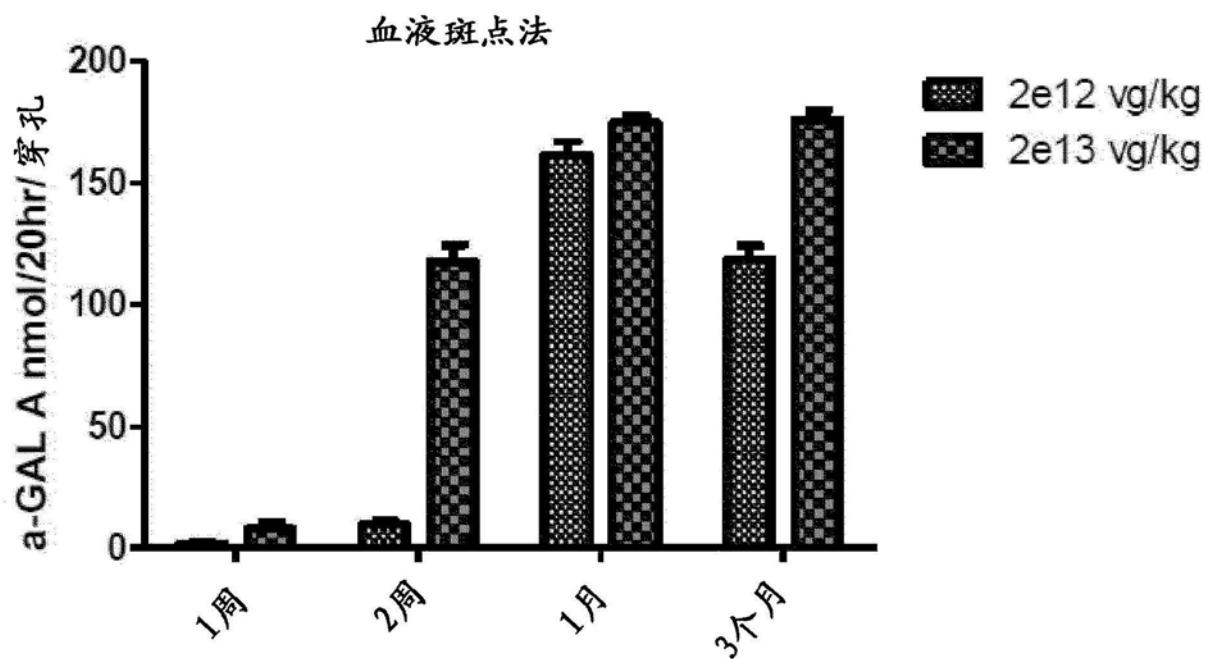


图5

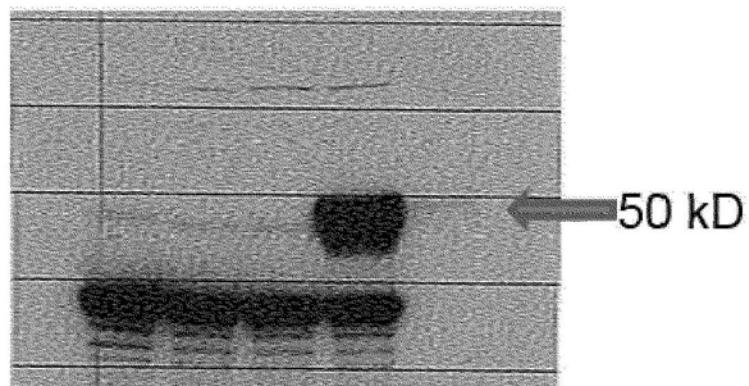


图6

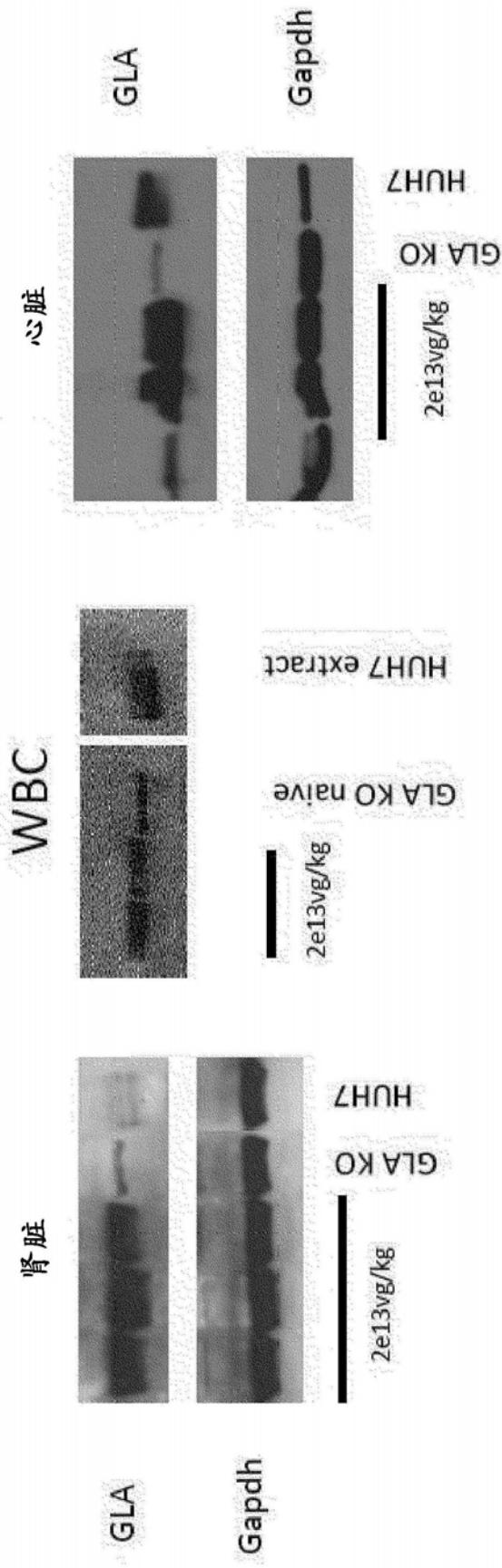


图7

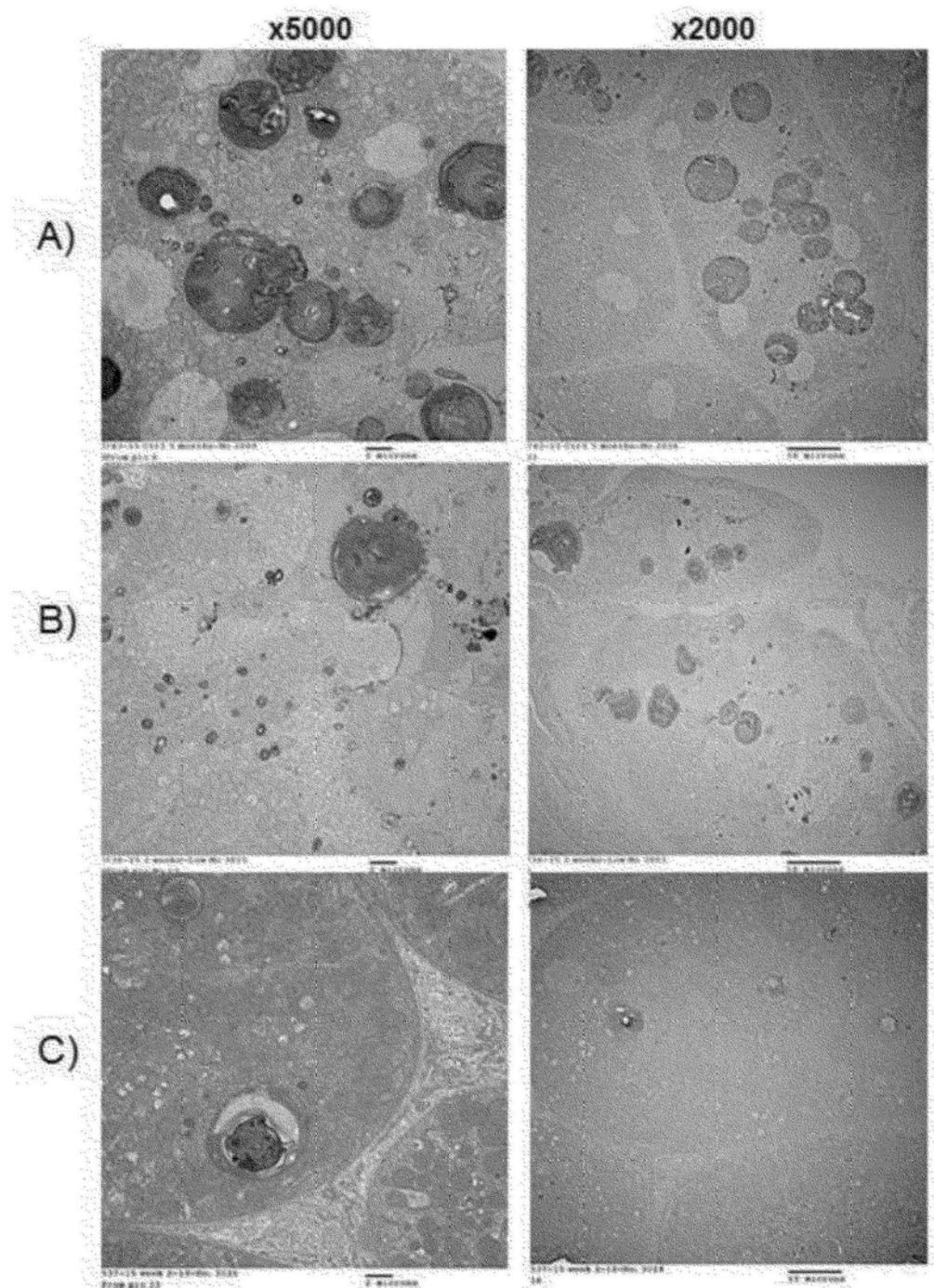


图8

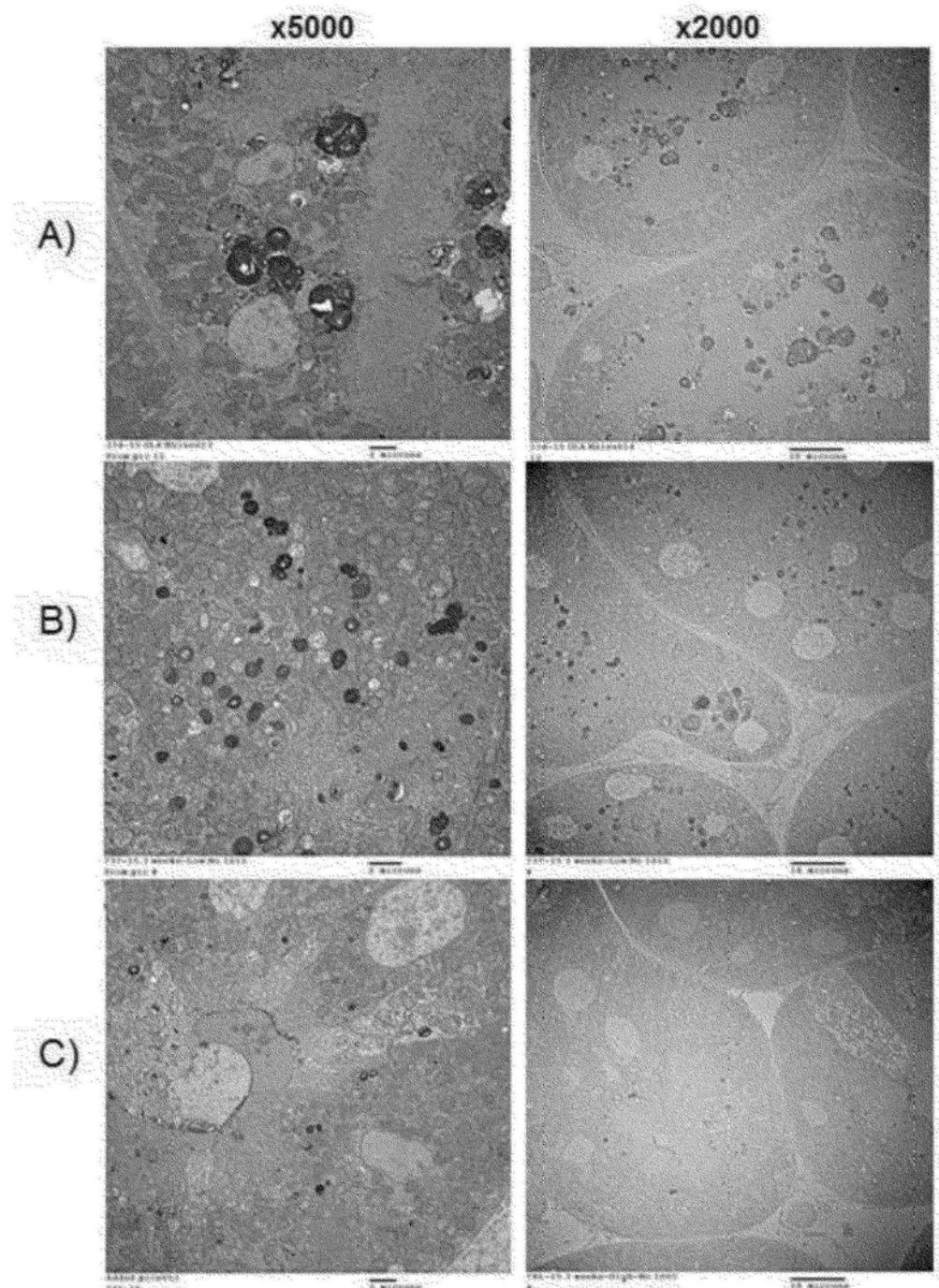


图9

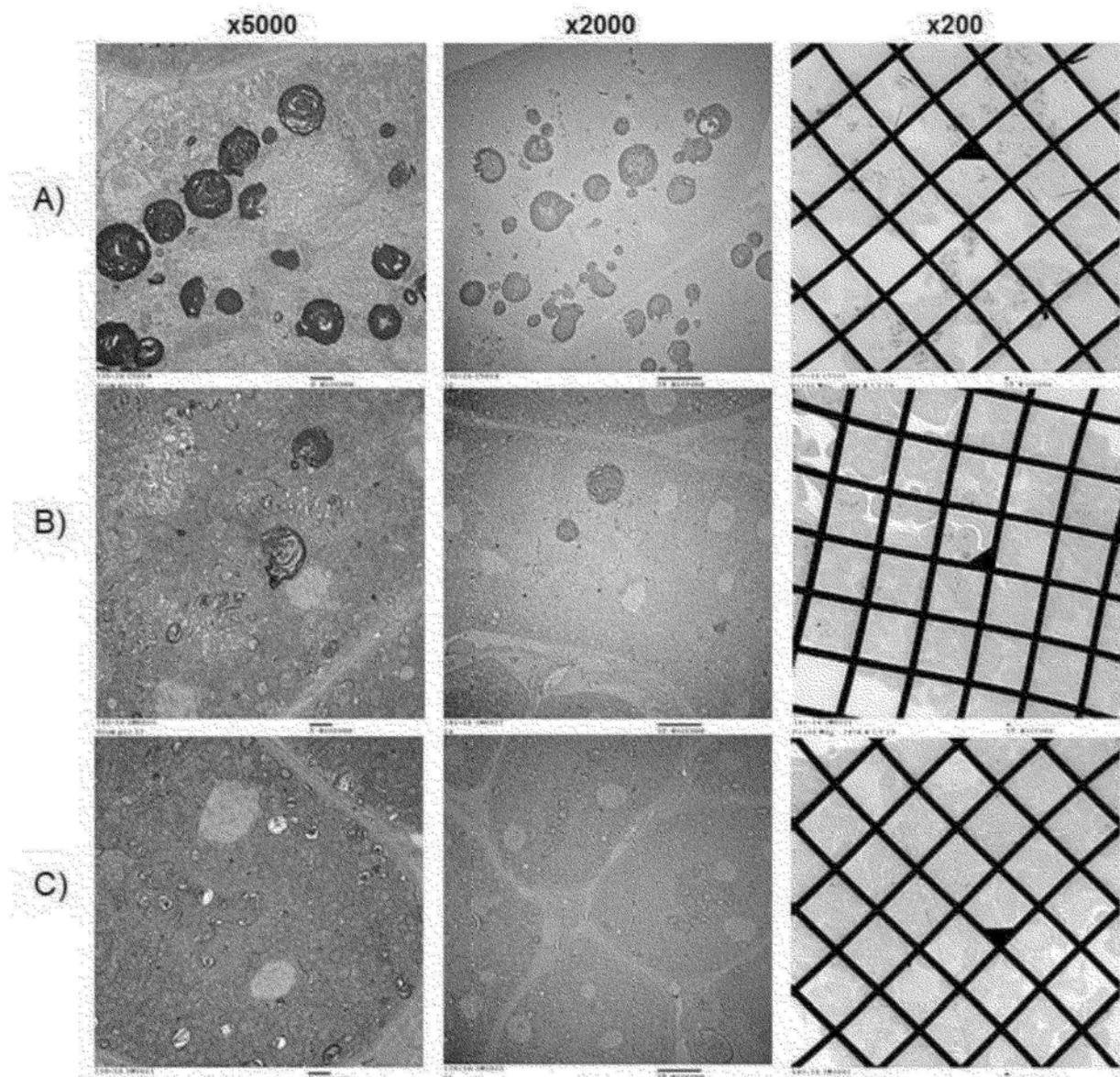


图10

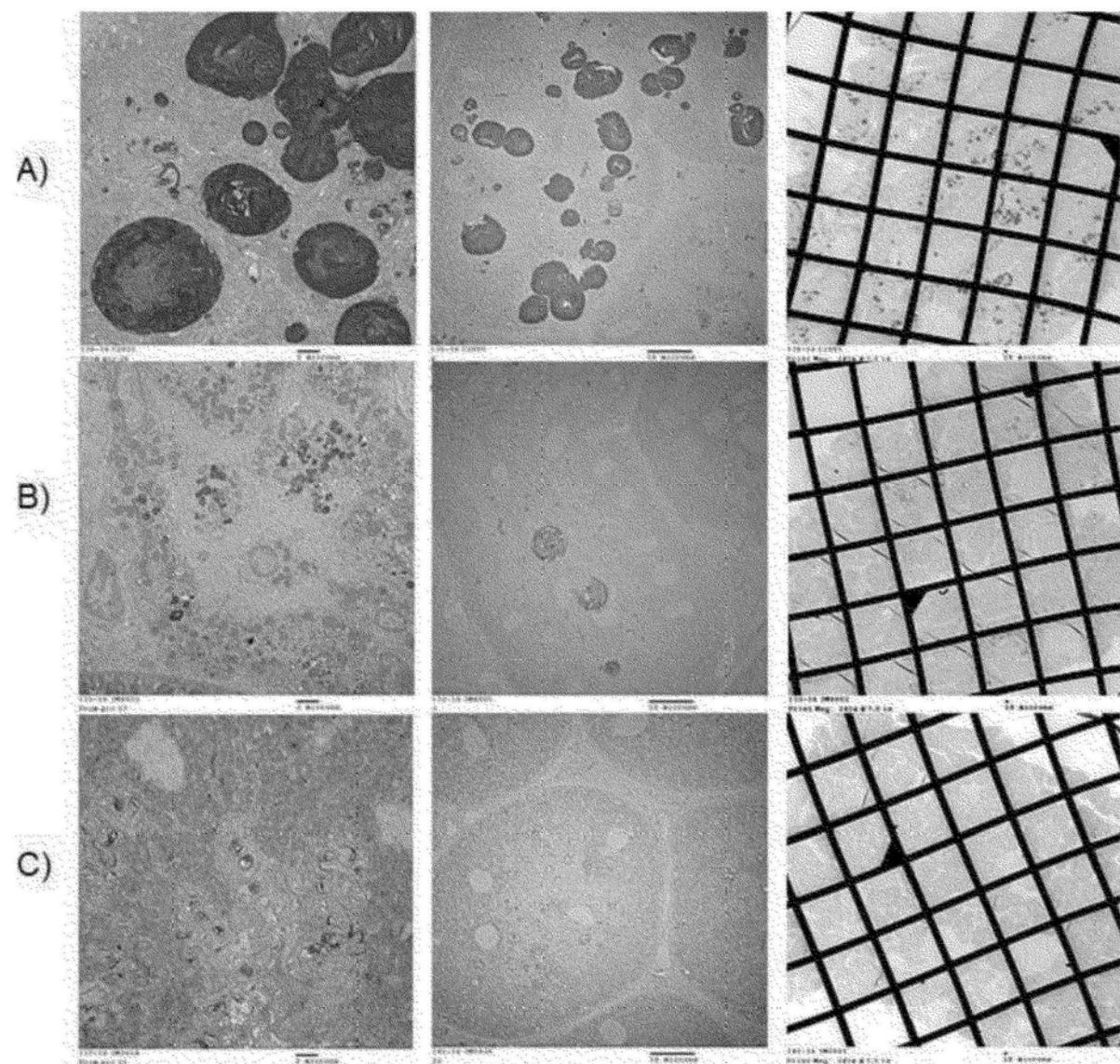


图11