(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117384890 A
(43)申请公布日 2024.01.12

(21)申请号 202311396633.4
(22)申请日 2017.09.12
(30)优先权数据
16306150.0 2016.09.12 EP
16306187.2 2016.09.16 EP
(62)分案原申请数据
201780055024.9 2017.09.12
(71)申请人 吉尼松公司
地址 法国埃维里
申请人 法国国家卫生及研究医学协会
埃夫里-瓦尔德艾松大学
(72)发明人 费德里克·敏果兹
基斯配·罗兹提
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
专利代理师 辛怡 杨青
(51)Int.Cl.
C12N 9/24(2006.01)
A61K 38/47(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书37页
序列表（电子公布） 附图8页

(54)发明名称

酸性α-葡萄糖苷酶变体及其用途

(57)摘要

本发明涉及酸性α-葡萄糖苷酶变体及其用途。

CN 117384890 A

1.一种截短的酸性α-葡萄糖苷酶多肽,所述截短的GAA多肽包含与亲本GAA多肽相比从其N-端末端1至75个连续氨基酸的缺失,

其中所述亲本GAA多肽对应于不含信号肽的GAA多肽的前体形式,并且

其中所述截短的GAA多肽还包含融合到其N-端末端的信号肽。

2.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽,其中所述截短的GAA多肽包含与所述亲本GAA多肽相比从其N-端末端8至43个连续氨基酸的缺失。

3.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽,其中所述截短的GAA多肽与所述亲本GAA多肽相比在其N-端末端处缺失了8、9、10、40、41、42或43个连续氨基酸。

4.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽,其中所述截短的GAA多肽与所述亲本GAA多肽相比在其N-端末端处截短了8、42或43个连续氨基酸。

5.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽,其中所述截短的GAA多肽与所述亲本GAA多肽相比在其N-端末端处截短了8个连续氨基酸。

6.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽,其中所述亲本GAA多肽是人类GAA。

7.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽,其中所述亲本GAA多肽是由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成的人类GAA。

8.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽,其中所述亲本GAA多肽是由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的人类GAA。

9.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽,其中所述截短的GAA多肽由SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成。

10.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽,其中所述融合的信号肽由选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成。

11.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽,其中所述融合的信号肽由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成。

12.一种药物组合物,其在可药用载体中包含根据权利要求1所述的截短的GAA多肽。

13.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽或根据权利要求12所述的药物组合物用于制备药物的用途,所述药物用于治疗GAA缺乏或糖原贮积病。

14.根据权利要求13所述的用途,其中所述糖原贮积病选自GSDI、GSDII、GSDIII、GSDIV、GSDV、GSDVI、GSDVII、GSDVIII和心脏的致死性先天性糖原贮积病。

15.根据权利要求13所述的用途,其中所述糖原贮积病是GSDII或GSDIII。

16.根据权利要求13所述的用途,其中所述糖原贮积病是GSDIII。

17.根据权利要求1所述的截短的GAA多肽或根据权利要求12所述的药物组合物用于制备药物的用途,所述药物用于治疗糖原贮积病并同时降低所述截短的GAA多肽的免疫原性。

酸性α-葡萄糖苷酶变体及其用途

[0001] 本申请为国际申请日2017年9月12日、国际申请号PCT/EP2017/072944于2019年3月7日进入中国国家阶段、申请号201780055024.9、发明名称“酸性α-葡萄糖苷酶变体及其用途”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及酸性α-葡萄糖苷酶(GAA)的变体及其用途。

背景技术

[0003] 庞贝氏病(Pompe disease),也被称为II型糖原贮积病(GSD)和酸性麦芽糖酶缺乏症,是一种由溶酶体酶酸性α-葡萄糖苷酶(GAA)的缺乏引起的常染色体隐性代谢性肌病。GAA是一种外切-1,4和1,6-α-葡萄糖苷酶,其在溶酶体中将糖原水解成葡萄糖。GAA的缺乏导致溶酶体中糖原积累,并引起呼吸肌、心肌和骨骼肌的渐进性损伤。所述疾病的范围从通常在1-2岁之前致死的快速发展的婴儿期过程,到在儿童和成年人中引起显著发病和早期死亡的发展更慢的非均相过程。Hirschhorn RR,遗传病的代谢和分子基础(The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease),3:3389-3420(2001,McGraw-Hill);Van der Ploeg和Reuser,Lancet 372:1342-1351(2008)。

[0004] 当前用于治疗庞贝氏病的人类疗法包括给药重组人类GAA,也被称为酶替代疗法(ERT)。已证实ERT对严重的婴儿期GSD II有效。然而,酶疗法的益处受到需要频繁输注和产生针对重组hGAA的抑制性抗体的限制(Amalfitano,A.等,(2001)Genet.In Med.3:132-138)。此外,ERT不能高效地校正整个身体,可能是由于所述蛋白质在外周静脉递送后的不良生物分配、几种组织摄入的不足和高免疫原性的组合。

[0005] 作为ERT的可替选或附属方案,研究了基因治疗方法治疗GSD-II的可行性。(Amalfitano,A.等,(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:8861-8866;Ding,E.等,(2002)Mol.Ther.5:436-446;Fraites,T.J.等,(2002)Mol.Ther.5:571-578;Tsujino,S.等,(1998)Hum.Gene Ther.9:1609-1616)。然而,用于校正遗传缺陷的肌肉定向基因转移必须面对疾病的系统性本质和转入基因的肌肉表达与其他组织相比倾向于免疫原性更高这一事实的限制。

[0006] Doerfler等,2016描述了编码人类密码子优化的GAA的两种构建物的组合给药,一种构建物在肝特异性启动子的控制之下,另一种在肌肉特异性启动子的控制之下。肝特异性启动子驱动的GAA表达被用于在$Gaa^{-/-}$小鼠模型中促进对GAA的免疫耐受性,而肌肉特异性启动子驱动的GAA表达在疗法所靶向的一部分组织中提供治疗性蛋白的表达。然而,这种策略不完全令人满意,因为它需要使用多个构建物,并且它不产生GAA的全身性表达。

[0007] 过去已提出使用修饰的GAA蛋白来改进溶酶体贮积病治疗。具体来说,申请WO2004064750和Sun等,2006,公开了一种包含可操作连接到GAA的信号肽的嵌合GAA多肽,作为提高所述蛋白质向分泌途径的靶向的一种方式。

[0008] 然而,患者可用的疗法并不完全令人满意,并且在本领域中仍需要改进的GAA多肽

和GAA生产。具体来说,对使用GAA的治疗的长期功效、高水平的GAA生产、对产生的GAA多肽的提高的免疫耐受性和GAA被需要它的细胞和组织的增加的摄取,仍存在着需求。此外,在WO2004064750和Sun等,2006中,其中公开的嵌合GAA多肽的组织分布不完全令人满意。因此,对允许在如果不是全部也是大多数目标组织中校正糖原积累的全面治疗性GAA多肽,仍存在需求。

发明内容

[0009] 本发明涉及GAA变体,其与野生型GAA蛋白相比以更高的水平表达和分泌,引发对全身范围的糖原病理性积累的改进的校正,并引起对GAA的免疫耐受性的诱导。

[0010] 根据一个方面,本发明涉及一种截短的GAA多肽,其包含从亲本GAA多肽的N-端末端缺失至少一个氨基酸,其中所述亲本多肽对应于不含信号肽的GAA多肽的前体形式。在特定实施方式中,所述截短的GAA多肽与所述亲本GAA多肽相比在其N-端末端处缺失了至少2个,特别是至少2个、特别是至少3个、特别是至少4个、特别是至少5个、特别是至少6个、特别是至少7个、特别是至少8个连续氨基酸。在另一个实施方式中,所述截短的GAA多肽与所述亲本GAA多肽相比在其N-端末端处缺失了至多75个,特别是至多70个、特别是至多60个、特别是至多55个、特别是至多50个、特别是至多47个、特别是至多46个、特别是至多45个、特别是至多44个、特别是至多43个连续氨基酸。在其他特定实施方式中,所述截短的GAA多肽与所述亲本GAA多肽相比在其N-端末端处缺失了至多47个,特别是至多46个、特别是至多45个、特别是至多44个、特别是至多43个连续氨基酸。在另一个特定实施方式中,所述截短的GAA多肽与所述亲本GAA多肽相比在其N-端末端处缺失了1至75个,特别是1至47个、特别是1至46个、特别是1至45个、特别是1至44个、特别是1至43个连续氨基酸。在另一个实施方式中,所述截短的GAA多肽与所述亲本GAA多肽相比在其N-端末端处缺失了2至43个,特别是3至43个、特别是4至43个、特别是5至43个、特别是6至43个、特别是7至43个、特别是8至43个连续氨基酸。在更特定实施方式中,所述截短的GAA多肽与亲本GAA多肽相比在其N-端末端处缺失了6、7、8、9、10、27、28、29、30、31、40、41、42、43、44、45、46或47个连续氨基酸,特别是与亲本GAA多肽相比在其N-端末端处截短了7、8、9、28、29、30、41、42、43或44个、更特别地8、29、42或43个连续氨基酸。在其他特定实施方式中,所述亲本多肽是人类GAA(hGAA),特别是具有在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的氨基酸序列的hGAA。

[0011] 在特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽具有在SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35中示出的序列。

[0012] 此外,本发明的截短的GAA多肽还可以包含融合到其N-端末端的信号肽,特别是选自SEQ ID NO:3至7的信号肽,特别是SEQ ID NO:3的信号肽。

[0013] 另一方面,本发明涉及一种核酸分子,其编码如上所述的截短的GAA多肽,所述截短的GAA多肽任选地通过其N-端末端融合到信号肽。在某些实施方式中,所述核酸分子具有被优化以在体内、特别是在人类对象中提高所述截短的GAA多肽的表达和/或提高对所述截短的GAA多肽的免疫耐受性的核苷酸序列。

[0014] 另一方面,本发明涉及一种核酸构建物,其包含可操作连接到一种或多种调控序列例如启动子、内含子、多腺苷化信号和/或增强子(例如顺式调控模块或CRM)的本发明的核酸分子。在特定实施方式中,所述启动子是优选地选自α-1抗胰蛋白酶启动子(hAAT)、甲

状腺素运载蛋白启动子、白蛋白启动子和甲状腺素结合性球蛋白(TBG)启动子的肝特异性启动子。在另一个特定实施方式中,所述启动子是肌肉特异性启动子例如Spc5-12、MCK和肌间线蛋白启动子。在另一个实施方式中,所述启动子是遍在启动子例如CMV、CAG和PGK启动子。所述核酸构建物还可以任选地包含内含子,特别是选自人类β球蛋白b2(或HBB2)内含子、FIX内含子、鸡β-球蛋白内含子和SV40内含子的内含子,其中所述内含子任选地是修饰的内含子例如SEQ ID NO:17的修饰的HBB2内含子、SEQ ID NO:19的修饰的FIX内含子或SEQ ID NO:21的修饰的鸡β-球蛋白内含子。在本发明的核酸构建物的特定实施方式中,所述核酸构建物优选地以下述顺序包含:增强子;内含子;启动子,特别是肝特异性启动子;编码所述GAA蛋白的核酸序列;和多腺苷化信号,所述构建物优选地以下述顺序包含:ApoE控制区;HBB2内含子,特别是修饰的HBB2内含子;hAAT启动子;编码所述截短的GAA多肽的核酸序列;和牛生长激素多腺苷化信号。在特定实施方式中,所述核酸构建物更特别地包含SEQ ID NO:22至26任一者的核苷酸序列。

[0015] 另一方面,本发明涉及一种载体,其包含本文中公开的核酸分子或核酸构建物。本发明的载体可以特别是病毒载体,优选为反转录病毒载体例如慢病毒载体,或AAV载体。优选地,所述载体是单链或双链自身互补的AAV载体,优选为具有AAV来源的衣壳例如AAV1、AAV2、变体AAV2、AAV3、变体AAV3、AAV3B、变体AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、变体AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10例如AAVcy10和AAVrh10、AAVrh74、AAVdj、AAV-Anc80、AAV-LK03、AAV2i8和猪AAV例如AAVpo4和AAVpo6衣壳或具有嵌合衣壳的AAV载体。在特定实施方式中,所述载体是具有AAV8、AAV9、AAVrh74或AAV2i8衣壳,特别是AAV8、AAV9或AAVrh74衣壳,更特别是AAV8衣壳的AAV载体。

[0016] 另一方面,本发明提供了一种细胞,其用本发明的核酸分子、核酸构建物或载体转化。更特别地,所述细胞是肝细胞或肌细胞。

[0017] 在特定情况下,本发明提供了一种药物组合物,其在可药用载体中包含本发明的截短的GAA多肽、核酸分子、核酸构建物、载体或细胞。

[0018] 本发明还涉及本发明的截短的GAA多肽、核酸分子、核酸构建物、载体或细胞,其用作药物。

[0019] 本发明还提供了本发明的截短的GAA多肽、核酸分子、核酸构建物、载体或细胞,其用于治疗糖原贮积病的方法中。在特定实施方式中,所述糖原贮积病是GSDI、GSDII、GSDIII、GSDIV、GSDV、GSDVI、GSDVII、GSDVIII或心脏的致死性先天性糖原贮积病。在更特定实施方式中,所述糖原贮积病选自GSDI、GSDII和GSDIII,更特别地选自GSDII和GSDIII。在甚至更特别的实施方式中,所述糖原贮积病是GSDII。

附图说明

[0020] 图1.hGAA的部分的缺失提高了它在体外的分泌。图A.使用Lipofectamine™,将人类肝细胞瘤细胞(Huh7)用表达绿色荧光蛋白(GFP)的对照质粒或表达野生型hGAA(hGAA)或按照两种不同算法进行序列优化的hGAA(分别为hGAAco1和co2)的质粒转染。不同的hGAA构建物含有野生型或人类α-1-抗胰蛋白酶信号肽(sp2)。截短的hGAA通过在信号肽后缺失8个氨基酸来获得(Δ8)。在转染后48小时,通过产荧光酶测定法测量培养基中的hGAA活性,并针对在“材料和方法”中指明的反应产物的标准曲线评估GAA活性。柱状图显示了源自于三

个不同实验的分泌的hGAA水平的平均值±SE。统计分析通过配对t-检验来进行,在柱状图中报告了获得的p-值(*=正如所指示的p<0.05)。图B.使用Lipofectamine,将人类肝细胞瘤细胞(Huh7)用表达GFP的对照质粒或表达具有野生型或胰凝乳蛋白酶原B1信号肽(sp7)的hGAAco1的质粒转染。hGAA蛋白已通过在信号肽后移除8或42个氨基酸来截短(分别为Δ8和Δ42)。转染后48小时,通过如上所指示的产荧光测定法测量培养基中的hGAA活性。柱状图显示了源自于三个不同实验的分泌的hGAA水平的平均值±SE。统计分析通过ANOVA来进行(*=正如所指示的p<0.05)。

[0021] 图2.在庞贝氏病小鼠模型中hGAA的部分的缺失提高了它在血流中的分泌。将3月龄$GAA^{-/-}$小鼠(n=4-5只小鼠/组)用PBS或2E12vg/kg的AAV8载体静脉内注射,所述载体在肝特异性启动子的转录控制之下表达序列优化的hGAA(hGAAco1)。hGAA的野生型信号肽已用胰凝乳蛋白酶原信号肽(sp7)替换,并且hGAA的序列作为全长本源序列使用或通过在信号肽后移除8或42的氨基酸来截短(分别为Δ8和Δ42)。在注射后一个月,将小鼠放血,并使用产荧光测定法测量血清中的hGAA活性。统计分析通过ANOVA来进行(*=正如所指示的p<0.05)。

[0022] 图3.信号肽提高hGAA的分泌。通过Lipofectamine™,将人类肝细胞瘤细胞(Huh7)用对照质粒(GFP)、表达野生型hGAA(被称为sp1)的质粒或表达与信号肽6-8(sp6-8)融合的序列优化的Δ8hGAA(hGAAco)的质粒转染。在转染后48小时,通过产荧光酶测定法测量培养基中的hGAA活性,并针对4-甲基伞形酮的标准曲线评估GAA活性。柱状图显示了源自于三个不同实验的分泌的hGAA水平的平均值±SE。统计分析通过ANOVA来进行(*=相对于模拟转染的细胞p<0.05)。

[0023] 图4.截短的Δ8hGAA在庞贝氏病的小鼠模型中高效校正糖原积累。将4月龄野生型(WT)和$GAA^{-/-}$小鼠(n=4-5只小鼠/组)用PBS或6E11 vg/kg的AAV8载体静脉内注射,所述载体在人类α-1-抗胰蛋白酶启动子的转录控制之下表达与信号肽1、2、7和8(sp1、2、7、8)融合的序列优化的Δ8hGAA(hGAAco)。图A.柱状图示出了在载体注射后3个月通过产荧光测定法在血液中测量到的hGAA活性。统计分析通过ANOVA来进行,在所述柱状图中报道了相对于PBS处理的GAA-/-动物获得的p-值(*=p<0.05)。图B-D.心脏、隔膜和股四头肌中糖原含量的生物化学校正。将4月龄$GAA^{-/-}$小鼠如上所述进行处理。在注射后三个月,将小鼠处死并评估糖原含量。柱状图示出了在心脏(图B)、隔膜(图C)和股四头肌(图D)中测量到的糖原含量,其被表示为在糖原的酶消化后释放的葡萄糖。统计分析通过ANOVA来进行(*=相对于PBS注射的GAA-/-小鼠p<0.05)。

[0024] 图5.在庞贝氏病小鼠模型中高度分泌的hGAA降低了体液应答。将4月龄GAA-/-小鼠用PBS或两种不同剂量(5E11或2E12 vg/kg)的AAV8载体静脉内注射,所述载体包含在人类α-1-抗胰蛋白酶启动子的转录控制之下编码融合到信号肽1(co)、信号肽2(sp2-Δ8-co)、信号肽7(sp7-Δ8-co)或信号肽8(sp8-Δ8-co)的Δ8hGAA的优化序列。在注射后1个月,通过ELISA分析血清中抗hGAA抗体的存在。使用纯化的小鼠IgG作为标准品进行定量。统计分析通过ANOVA和Dunnett's事后检验来进行(*=p<0.01)。

[0025] 图6.在NHP中AAV8-hAAT-sp7-Δ8-hGAAco1注射引起hGAA在血液中的高效分泌和在肌肉中的摄取。在第0天用2E12 vg/kg的AAV8-hAAT-sp7-Δ8-hGAAco1注射两只食蟹猴(Macaca Fascicularis)。图A对在载体给药之前12天和之后30天从两只猴获得的血清进行

的hGAA蛋白质印迹。在左侧指示了与样品平行运行的分子量标志物的条带位置。图B在载体注入后3个月,将猴处死并收获组织,用于hGAA摄取的生物化学评估。对从二头肌和隔膜获得的组织提取物进行hGAA蛋白质印迹。使用抗微管蛋白抗体作为载样对照。在左侧指示了与样品平行运行的分子量标志物的条带位置。

[0026] 图7.用hGAA表达载体注射的GDE-/-动物的肝脏中糖原含量的生物化学校正。将3月龄野生型(WT)或GDE-/-小鼠用PBS或表达在人类α-1-抗胰蛋白酶启动子的转录控制之下并与信号肽7融合的密码子优化的hGAA的AAV8载体(AAV8-hAAT-sp7--Δ8-hGAAco1)以1E11或1E12 vg/小鼠的剂量静脉内注射。柱状图示出了在肝脏中测量到的糖原含量,其被表示为在糖原的酶消化后释放的葡萄糖。统计分析通过ANOVA来进行(*=相对于PBS注射的GDE-/-小鼠$p<0.05$,§=相对于PBS注射的WT动物$p<0.05$)。

[0027] 图8.在用编码不同GAA变体的质粒转染的细胞的培养基中的GAA活性。在质粒转染后24小时(图A)和48小时(图B)测量HuH7细胞的培养基中的GAA活性,所述质粒包含编码与本源GAA sp1信号肽组合的本源GAA(co)或编码包括与异源sp7信号肽组合的本源GAA的工程化GAA(sp7-co)的优化序列。评估了在sp7信号肽之后的GAA编码序列中的不同缺失的影响(sp7-Δ8-co,sp7-Δ29-co,sp7-Δ42-co,sp7-Δ43-co,sp7-Δ47-co,sp7-Δ62-co)。使用编码eGFP的质粒作为阴性对照。统计分析通过单向ANOVA和Tukey事后检验来进行。条中的散列标志(#)示出了相对于co的统计学显著差异;tau符号(τ)示出了相对于sp7-Δ8-co、sp7-Δ29-co、sp7-Δ42-co、sp7-Δ43-co的统计学显著差异。数据是两个独立实验的平均值±SD。除了使用不同符号的情况之外,*$p<0.05$,**$p<0.01$,***$p<0.001$,****$p<0.0001$。

[0028] 图9.不同GAA变体的细胞内GAA活性。在质粒转染后48小时测量HuH7细胞的裂解液中的GAA活性,所述质粒包含编码与本源GAA sp1信号肽组合的本源GAA(co)或编码包括与异源sp7信号肽组合的本源GAA的工程化GAA(sp7-co)的优化序列。评估了在所述信号肽之后的GAA编码序列中的不同缺失的影响(sp7-Δ8-co,sp7-Δ29-co,sp7-Δ42-co,sp7-Δ43-co,sp7-Δ47-co,sp7-Δ62-co)。使用编码eGFP的质粒作为阴性对照。统计分析通过单向ANOVA和Tukey事后检验来进行。Tau符号(τ)示出了相对于sp7-co、sp7-Δ8-co、sp7-Δ29-co、sp7-Δ42-co、sp7-Δ43-co的统计学显著差异。数据是两个独立实验的平均值±SD。除了使用不同符号的情况之外,*$p<0.05$,**$p<0.01$,***$p<0.001$,****$p<0.0001$。

[0029] 图10.使用与sp6或sp8信号肽组合的Δ8缺失,在细胞培养基中提高的GAA活性。在质粒转染后48小时测量了HuH7细胞的培养基(图A)和裂解液(图B)中的GAA活性,所述质粒包含编码与本源GAA sp1信号肽组合的本源GAA(co)或编码包括与异源sp6或sp8信号肽组合的本源GAA的工程化GAA(sp6-co或sp8-co)的优化序列。评估了在信号肽之后的GAA编码序列中的8个氨基酸的缺失的影响(sp6-Δ8-co、sp8-Δ8-co)。使用编码eGFP的质粒作为阴性对照。统计分析通过单向ANOVA和Tukey事后检验来进行。条中的星号示出了相对于co的统计学显著差异。数据是两个独立实验的平均值±SD。除了使用不同符号的情况之外,*$p<0.05$,**$p<0.01$,***$p<0.001$,****$p<0.0001$。

具体实施方式

[0030] 本发明涉及一种截短的GAA多肽,编码这种截短的GAA多肽的核酸分子,包含所述核酸的核酸构建物,包含所述核酸构建物的载体,包含所述核酸分子或构建物或载体的细

胞,以及包含本发明的多肽、核酸分子、核酸构建物、载体或细胞的药物组合物。发明人已令人吃惊地显示,本发明的GAA的截短形式极大提高GAA分泌并同时降低它的免疫原性。

[0031] 溶酶体酸性α-葡萄糖苷酶或"GAA"(E.C.3.2.1.20)(1,4-α-D-葡聚糖葡萄糖水解酶)是一种外切-1,4-α-D-葡萄糖苷酶,其水解寡糖的α-1,4和α-1,6键两者,以释放葡萄糖。GAA的缺乏引起II型糖原贮积病(GSDII),也被称为庞贝氏病(尽管这个术语以前是指这种疾病的婴儿期发作形式)。它催化糖原的完全降解,并在分支点处减慢。在17号染色体上28kb的人类酸性α-葡萄糖苷酶基因编码3.6kb mRNA,其产生952个氨基酸的多肽(Hoefsloot等,(1988)EMBO J.7:1697;Martiniuk等,(1990)DNA and Cell Biology 9:85)。所述酶在内质网中接受与翻译同时的N-连接糖基化。它被合成为110-kDa的前体形式,其经过大量的糖基化修饰、磷酸化并经过蛋白水解加工,通过大约90-kDa的内体中间体,成熟为最终的溶酶体76和67kDa形式(Hoefsloot,(1988)EMBO J.7:1697;Hoefsloot等,(1990)Biochem.J.272:485;Wisselaar等,(1993)J.Biol.Chem.268:2223;Hermans等,(1993)Biochem.J.289:681)。

[0032] 在患有GSD II的患者中,酸性α-葡萄糖苷酶的缺乏引起糖原在溶酶体中大量积累,破坏细胞功能(Hirschhorn,R.和Reuser,A.J.,(2001),在《遗传病的代谢和分子基础》(The Metabolic and Molecular Basis for Inherited Disease),Scriver,C.R.等主编,第3389-3419页(McGraw-Hill,New York)中)。在最常见的婴儿期形式中,患者表现出渐进性肌肉变性和心肌病,并在2岁之前死亡。在青少年和成年人发作形式中,存在严重衰弱。

[0033] 此外,患有其他GSD的患者也可能从优化形式的GAA的给药获益。例如,已显示(Sun等,(2013)Mol Genet Metab 108(2):145;WO2010/005565)GAA的给药在来自于III型糖原贮积病(GSD III)患者的原代成肌细胞中降低糖原。

[0034] 特别地,在本发明的情形中,"GAA的前体形式"是GAA多肽的包含其天然信号肽的形式。例如,SEQ ID NO:2的序列是人类GAA(hGAA)的前体形式。在SEQ ID NO:2中,1-27位氨基酸残基对应于所述hGAA多肽的信号肽。这个hGAA的信号肽的序列也显示在SEQ ID NO:4中。

[0035] 在本发明的情形中,本发明的截短的GAA多肽源自于亲本GAA多肽。根据本发明,"亲本GAA多肽"可以是如上所定义的功能性前体GAA序列,但不含其信号肽。例如,参考典型的野生型人类GAA多肽,完整的野生型GAA多肽(即GAA的前体形式)显示在SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:30中并具有信号肽(对应于SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:30的1-27位氨基酸),而充当这些野生型人类GAA多肽的截短的GAA形式的基础的亲本GAA多肽分别显示在SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:33中,并且没有信号肽。在这个实例中,对应于SEQ ID NO:2的28-952位氨基酸和SEQ ID NO:30的28-952位氨基酸的后者,被称为亲本GAA多肽。

[0036] 根据本发明,本发明的截短的GAA多肽是功能性GAA多肽,即它具有野生型GAA多肽的功能。正如上文所定义的,野生型GAA的功能是水解寡糖和多糖、更特别是糖原的α-1,4和α-1,6链两者,以释放出葡萄糖。由本发明的核酸编码的功能性GAA蛋白与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33的野生型GAA多肽相比,可以具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或至少100%的对糖原的水解活性。由本发明的核酸编码的GAA蛋白的活性甚至可能为SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33的野生型GAA蛋白的活性的超过100%,例如超过110%、120%、130%、140%或甚至超过150%。

[0037] 所述亲本GAA多肽的氨基酸序列或其编码序列可以源自于任何来源,包括鸟类和哺乳动物物种。当在本文中使用时,术语“鸟类”包括但不限于鸡、鸭、鹅、鹌鹑、火鸡和野鸡。当在本文中使用时,术语“哺乳动物”包括但不限于人类、猿猴和其他非人类灵长动物、牛科动物、绵羊、山羊、马、猫科动物、犬科动物、兔形目动物等。在本发明的实施方式中,所述亲本GAA多肽是人类、小鼠或鹌鹑,特别是人类的GAA多肽。

[0038] 此外,所述亲本GAA多肽可以是GAA多肽的功能性变体,其与GAA多肽相比包含一个或多个氨基酸修饰例如氨基酸插入、缺失和/或替换。例如,所述亲本多肽可以是人类GAA多肽例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1的多肽的功能性衍生物,与该人类GAA多肽具有至少80、85、90、95、96、97、98或至少99%的序列同一性。例如,除了上文中定义的截短之外,GAA多肽的功能性变体与所述亲本多肽例如在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本GAA多肽相比可以具有0至50个之间、0至30个之间、0至20个之间、0至15个之间、0至10个之间或0至5个之间的氨基酸变化。特别地,所述亲本GAA多肽可以由具有在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的氨基酸序列的人类GAA多肽构成。

[0039] 术语“同一性”及其偏差当指称多肽时,意味着当两个被比较的多肽序列中的一个位置被同一氨基酸占据时(例如如果两个多肽的每一者中的一个位置被亮氨酸占据),则所述多肽在该位置处具有同一性。两个多肽之间的同一性百分数是所述两个序列共有的匹配位置的数目除以被比较的位置的数目X 100的函数。例如,如果在两个多肽中10个位置中的6个匹配,则所述两个序列是60%一致的。通常,在将两个序列对齐以给出最大同一性时做出比较。本领域技术人员已知的各种不同的生物信息学工具可用于比对核酸序列,例如BLAST或FASTA。

[0040] 所述亲本GAA多肽也可以是GAA变体,例如由Kunita等,(1997)Biochemica et Biophysica Acta 1362:269所描述的GAA II;由Hirschhorn,R.和Reuser,A.J.(2001)在《遗传病的代谢和分子基础》(The Metabolic and Molecular Basis for Inherited Disease)(Scriver,C.R.、Beaudet,A.L.、Sly,W.S.和Valle,D.主编),第3389-3419页,McGraw-Hill,New York中所描述的GAA多态性和SNP,参见第3403-3405页。可以使用本领域中已知的任何变体GAA多肽作为定义亲本GAA多肽的基础。示例性的变体GAA多肽包括SEQ ID NO:2(NCBI参考序列NP_000143.2);SEQ ID NO:29(GenBank AAA52506.1);SEQ ID NO:30(GenBank CAA68763.1);SEQ ID NO:31(GenBank:EAW89583.1)和SEQ ID NO:32(GenBank ABI53718.1)。其他有用的变体包括在Hoefsloot等,(1988)EMBO J.7:1697和Van Hove等,(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:65(人类)以及GenBank登记号NM_008064(小鼠)中所描述的。其他变体GAA多肽包括在WO2012/145644、WO00/34451和US6,858,425中所描述的那些。在特定实施方式中,所述亲本GAA多肽源自于在SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:30中示出的氨基酸序列。

[0041] 本发明的GAA的截短形式是亲本GAA多肽的N-端截短形式,其中从所述亲本GAA多肽的N-端末端缺失至少一个氨基酸。

[0042] “截短形式”意味着包含从亲本GAA多肽的N-端部分缺失一个或几个连续氨基酸的GAA多肽。例如,所述GAA组成部分与所述亲本GAA蛋白相比,可以从其N-端末端截短1至75个连续氨基酸或超过75个连续氨基酸。具体来说,所述截短的GAA多肽与所述亲本GAA蛋白相

比,可以从其N-端末端截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75个连续氨基酸(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。使用可替选的命名法,由所述亲本GAA多肽中1个氨基酸的截短产生的GAA多肽被称为Δ1GAA截短形式,由从N-端末端截短2个连续氨基酸产生的GAA多肽被称为Δ2GAA截短形式,由所述亲本GAA多肽中3个连续氨基酸的截短产生的GAA多肽被称为Δ3GAA截短形式,等等。在特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43、Δ44、Δ45、Δ46、Δ47、Δ48、Δ49、Δ50、Δ51、Δ52、Δ53、Δ54、Δ55、Δ56、Δ57、Δ58、Δ59、Δ60、Δ61、Δ62、Δ63、Δ64、Δ65、Δ66、Δ67、Δ68、Δ69、Δ70、Δ71、Δ72、Δ73、Δ74或Δ75GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0043] 在另一个特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43、Δ44、Δ45、Δ46或Δ47GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0044] 在另一个特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43、Δ44、Δ45或Δ46GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0045] 在另一个特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43、Δ44或Δ45GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0046] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43或Δ44GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0047] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0048] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41或Δ42GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0049] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0050] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0051] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0052] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0053] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0054] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本hGAA蛋白的截短形式)。

[0055] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的亲本

hGAA蛋白的截短形式)。

[0056] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ6、Δ7、Δ8、Δ9或Δ10截短形式,特别是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ7、Δ8或Δ9截短形式,更特别是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ8截短形式。

[0057] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ27、Δ28、Δ29、Δ30或Δ31截短形式,特别是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ28、Δ29或Δ30截短形式,更特别是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ29截短形式。

[0058] 在另一个特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ40、Δ41、Δ42、Δ43或Δ44截短形式,特别是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ41、Δ42或Δ43截短形式,更特别是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ42截短形式。

[0059] 在其他特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是GAA(特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ41、Δ42、Δ43、Δ44或Δ45截短形式,特别是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ42、Δ43或Δ44截短形式,更特别是GAA(特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ43截短形式。

[0060] 在另一个实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43、Δ44、Δ45、Δ46或Δ47截短形式。

[0061] 在另一个实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ7、Δ8、Δ9、Δ28、Δ29、Δ30、Δ41、Δ42、Δ43或Δ44截短形式。

[0062] 在另一个实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43或Δ44截短形式。

[0063] 在另一个实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ8、Δ29、Δ42、Δ43或Δ47截短形式。

[0064] 在另一个实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ8、Δ29、Δ42或Δ43截短形式。

[0065] 在另一个实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是GAA(特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA蛋白)的Δ8或Δ42截短形式。

[0066] 在本发明的特定实施方式中,本发明的截短的GAA多肽是功能性人类GAA多肽的截短形式。在其他特定实施方式中,所述亲本hGAA多肽是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽。在这个实施方式的变化形式中,本发明的截短的GAA

多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43、Δ44、Δ45、Δ46、Δ47、Δ48、Δ49、Δ50、Δ51、Δ52、Δ53、Δ54、Δ55、Δ56、Δ57、Δ58、Δ59、Δ60、Δ61、Δ62、Δ63、Δ64、Δ65、Δ66、Δ67、Δ68、Δ69、Δ70、Δ71、Δ72、Δ73、Δ74或Δ75GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0067] 在这个实施方式的变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43、Δ44、Δ45、Δ46或Δ47GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0068] 在这个实施方式的变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43、Δ44、Δ45或Δ46GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0069] 在这个实施方式的变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43、Δ44或Δ45GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0070] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43或Δ44GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序

列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％的同一性。

[0071] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％的同一性。

[0072] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ1、Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41或Δ42GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％的同一性。

[0073] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41或Δ42GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％的同一性。

[0074] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41或Δ42GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％的同一性。

[0075] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41或Δ42GAA截短形式,所述功能性变

体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0076] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41或Δ42GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0077] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41或Δ42GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0078] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41或Δ42GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0079] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41或Δ42GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0080] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ2、Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ

31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0081] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ3、Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0082] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ4、Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0083] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ5、Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0084] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0085] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、

Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0086] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、甚至更特别是在SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ8、Δ9、Δ10、Δ11、Δ12、Δ13、Δ14、Δ15、Δ16、Δ17、Δ18、Δ19、Δ20、Δ21、Δ22、Δ23、Δ24、Δ25、Δ26、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ32、Δ33、Δ34、Δ35、Δ36、Δ37、Δ38、Δ39、Δ40、Δ41、Δ42或Δ43GAA截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的同一性。

[0087] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ6、Δ7、Δ8、Δ9或Δ10、特别是Δ7、Δ8或Δ9、更特别是Δ8截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性。

[0088] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ27、Δ28、Δ29、Δ30或Δ31、特别是Δ28、Δ29或Δ30、更特别是Δ29截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性。

[0089] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ40、Δ41、Δ42、Δ43或Δ44、特别是Δ41、Δ42或Δ43、更特别是Δ42截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性。

[0090] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ41、Δ42、Δ43、Δ44或Δ45、特别是Δ42、Δ43或Δ44、更特别是Δ43截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性。

[0091] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性

变体的Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ27、Δ28、Δ29、Δ30、Δ31、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43、Δ44或Δ45、特别是Δ7、Δ8、Δ9、Δ28、Δ29、Δ30、Δ41、Δ42、Δ43或Δ44、特别是Δ8、Δ29、Δ42或Δ43截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性。

[0092] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ6、Δ7、Δ8、Δ9、Δ10、Δ40、Δ41、Δ42、Δ43或Δ44、特别是Δ8或Δ42截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性。

[0093] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ8、Δ29、Δ42、Δ43或Δ47截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性。

[0094] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ8、Δ29、Δ42或Δ43截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性。

[0095] 在这个实施方式的另一种变化形式中,本发明的截短的GAA多肽是hGAA多肽、更特别是在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33中、特别是SEQ ID NO:1中示出的hGAA多肽或其功能性变体的Δ8或Δ42截短形式,所述功能性变体在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1所示的序列中包含氨基酸替换,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1具有至少80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性。

[0096] 在特定实施方式中,本发明的截短的hGAA多肽具有由SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36中示出的序列或其功能性变体构成的氨基酸序列,所述功能性变体与SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36中示出的序列相比包含1至5个,特别是1至4个、特别是1至3个、更特别是1至2个、特别是1个氨基酸替换。在另一个特定实施方式中,本发明的截短的hGAA多肽具有由SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35中示出的序列或其功能性变体构成的氨基酸序列,所述功能性变体与SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35中示出的序列相比包含1至5个氨基酸替换。在特定实施方式中,本发明的截短的hGAA多肽具有由SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28中示出的序列或其功能性变体构成的氨基酸序列,所述功能性变体与SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28中示出的序列相比包含1至5个,特别是1至4个、特别是1至3个、更特别是1至2个、特别是1个氨基酸替换。

[0097] 本发明的截短的GAA多肽还可以包含信号肽,例如GAA的天然信号肽或源自于另一种分泌蛋白的可替选信号肽。这些信号肽的非限制性实例包括在SEQ ID NO:3至7中示出的

那些。发明人已令人吃惊地显示,将本发明的截短的GAA多肽融合到可替选信号肽甚至进一步提高了它的分泌。因此,本发明提供了一种嵌合GAA多肽,其包含信号组成部分和截短的GAA多肽组成部分,所述截短的GAA多肽组成部分是如上所定义的截短的GAA多肽。在特定实施方式中,所述信号肽是GAA的天然信号肽,例如SEQ ID NO:4中示出的hGAA的信号肽。在另一个实施方式中,所述信号肽是源自于不同于GAA的蛋白质的外源(或可替选)信号肽。在特定实施方式中,所述可替选信号肽选自SEQ ID NO:3、5、6和7或其如下文所定义的功能性衍生物。

[0098] 发明人已显示,融合到所述GAA蛋白的剩余部分的外源信号肽与包含其天然信号肽的相应GAA多肽相比,提高了得到的嵌合GAA多肽的分泌。此外,所述截短的GAA多肽组成部分与包含融合到所述亲本GAA多肽的同一信号肽的嵌合GAA多肽相比,也提高了所述嵌合GAA多肽(包括信号肽和截短的GAA多肽两者)的分泌。

[0099] 可以在本发明中工作的特定信号肽包括来自于胰凝乳蛋白酶原B2的1-20位氨基酸(SEQ ID NO:3)、人类α-1-抗胰蛋白酶的信号肽(SEQ ID NO:5)、来自于艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶的1-25位氨基酸(SEQ ID NO:6)和来自于蛋白酶C1抑制剂的1-23位氨基酸(SEQ ID NO:7)。当与包含天然信号肽的GAA相比时,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:7的信号肽允许所述嵌合GAA蛋白在体外和体内两者更高地分泌。在特定实施方式中,所述信号肽具有SEQ ID NO:3至7中示出的序列,或者是其功能性衍生物,即与SEQ ID NO:3至7中示出的序列相比包含1至5个,特别是1至5个、特别是1至3个、更特别是1至2个、特别是1个氨基酸缺失、插入或替换的序列,只要所得到的序列对应于功能性信号肽,即允许GAA蛋白分泌的信号肽即可。在特定实施方式中,所述信号肽组成部分序列由选自SEQ ID NO:3至7的序列构成。

[0100] 在特定实施方式中,本发明的GAA多肽选自:

[0101] -SEQ ID NO:3与GAA的Δ8截短形式,例如SEQ ID NO:27中显示的hGAA的Δ8截短形式的组合;

[0102] -SEQ ID NO:4与GAA的Δ8截短形式,例如SEQ ID NO:27中显示的hGAA的Δ8截短形式的组合;

[0103] -SEQ ID NO:5与GAA的Δ8截短形式,例如SEQ ID NO:27中显示的hGAA的Δ8截短形式的组合;

[0104] -SEQ ID NO:6与GAA的Δ8截短形式,例如SEQ ID NO:27中显示的hGAA的Δ8截短形式的组合;

[0105] -SEQ ID NO:7与GAA的Δ8截短形式,例如SEQ ID NO:27中显示的hGAA的Δ8截短形式的组合;

[0106] -SEQ ID NO:3与GAA的Δ29截短形式,例如SEQ ID NO:34中显示的hGAA的Δ29截短形式的组合;

[0107] -SEQ ID NO:4与GAA的Δ29截短形式,例如SEQ ID NO:34中显示的hGAA的Δ29截短形式的组合;

[0108] -SEQ ID NO:5与GAA的Δ29截短形式,例如SEQ ID NO:34中显示的hGAA的Δ29截短形式的组合;

[0109] -SEQ ID NO:6与GAA的Δ29截短形式,例如SEQ ID NO:34中显示的hGAA的Δ29截

短形式的组合;

[0110] -SEQ ID NO:7与GAA的Δ29截短形式,例如SEQ ID NO:34中显示的hGAA的Δ29截短形式的组合;

[0111] -SEQ ID NO:3与GAA的Δ42截短形式,例如SEQ ID NO:28中显示的hGAA的Δ42截短形式的组合;

[0112] -SEQ ID NO:4与GAA的Δ42截短形式,例如SEQ ID NO:28中显示的hGAA的Δ42截短形式的组合;

[0113] -SEQ ID NO:5与GAA的Δ42截短形式,例如SEQ ID NO:28中显示的hGAA的Δ42截短形式的组合;

[0114] -SEQ ID NO:6与GAA的Δ42截短形式,例如SEQ ID NO:28中显示的hGAA的Δ42截短形式的组合;

[0115] -SEQ ID NO:7与GAA的Δ42截短形式,例如SEQ ID NO:28中显示的hGAA的Δ42截短形式的组合;

[0116] -SEQ ID NO:3与GAA的Δ43截短形式,例如SEQ ID NO:35中显示的hGAA的Δ43截短形式的组合;

[0117] -SEQ ID NO:4与GAA的Δ43截短形式,例如SEQ ID NO:35中显示的hGAA的Δ43截短形式的组合;

[0118] -SEQ ID NO:5与GAA的Δ43截短形式,例如SEQ ID NO:35中显示的hGAA的Δ43截短形式的组合;

[0119] -SEQ ID NO:6与GAA的Δ43截短形式,例如SEQ ID NO:35中显示的hGAA的Δ43截短形式的组合;和

[0120] -SEQ ID NO:7与GAA的Δ43截短形式,例如SEQ ID NO:35中显示的hGAA的Δ43截短形式的组合;

[0121] -SEQ ID NO:3与GAA的Δ47截短形式,例如SEQ ID NO:36中显示的hGAA的Δ47截短形式的组合;

[0122] -SEQ ID NO:4与GAA的Δ47截短形式,例如SEQ ID NO:36中显示的hGAA的Δ47截短形式的组合;

[0123] -SEQ ID NO:5与GAA的Δ47截短形式,例如SEQ ID NO:36中显示的hGAA的Δ47截短形式的组合;

[0124] -SEQ ID NO:6与GAA的Δ47截短形式,例如SEQ ID NO:36中显示的hGAA的Δ47截短形式的组合;和

[0125] -SEQ ID NO:7与GAA的Δ47截短形式,例如SEQ ID NO:36中显示的hGAA的Δ47截短形式的组合;

[0126] 或者是其功能性衍生物,所述功能性衍生物与所得到的序列组合具有至少90%的同一性,特别是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性。在这些实施方式中,正如上面提到的,所述信号肽组成部分可以是与SEQ ID NO:3至7中示出的序列相比包含1至5个,特别是1至4个、特别是1至3个、更特别是1至2个、特别是1个氨基酸缺失、插入或替换的序列,只要所得到的序列对应于功能性信号肽,即允许得到的嵌合的截短的GAA蛋白分泌的信号肽即可。

[0127] 从细胞分泌的新合成的GAA的相对比例可以通过本领域中已知的和实施例中所描述的方法常规地确定。分泌的蛋白质可以通过在细胞培养基、血清、奶等中直接测量所述蛋白质本身(例如通过蛋白质印迹)或通过蛋白质活性测定法(例如酶测定法)来检测。

[0128] 本领域技术人员还应该理解,所述截短的GAA多肽或嵌合GAA多肽可以含有另外的氨基酸,例如作为核酸构建物的操作例如添加限制性位点的结果,只要这些另外的氨基酸不使所述信号肽或GAA多肽不具有功能即可。所述另外的氨基酸可以被切除或者可以被成熟多肽保留,只要保留不产生无功能的多肽即可。

[0129] 另一方面,本发明涉及一种核酸分子,其编码本发明的截短的GAA多肽或本发明的嵌合GAA多肽。

[0130] 编码截短的GAA的本发明的核酸分子的序列针对在体内表达所述GAA多肽被优化。序列优化可以包括核酸序列的大量改变,包括密码子优化,提高GC含量,减少CpG岛的数目,减少可选开放阅读框(ARF)的数目和减少拼接供体和拼接受体位点的数目。由于遗传密码的简并性,不同核酸分子可能编码相同蛋白质。也已公知,不同生物体中的遗传密码通常偏向于使用编码同一氨基酸的几个密码子中的一者超过其他密码子。通过密码子优化,将改变引入到核苷酸序列中,其利用给定细胞背景中存在的密码子偏好,以使得到的密码子优化的核苷酸序列与未经密码子优化的序列相比更可能以相对高的水平在这种给定的细胞背景中表达。在本发明的优选实施方式中,这种编码截短的GAA的序列优化过的核苷酸序列被密码子优化,以与编码同一截短的GAA蛋白的未经密码子优化的核苷酸序列相比提高它在人类细胞中的表达,例如通过利用人类特异性密码子使用偏好。

[0131] 在特定实施方式中,所述优化过的GAA编码序列是密码子优化的,和/或与SEQ ID NO:8的野生型hGAA编码序列的82-2859位核苷酸相比具有提高的GC含量和/或具有减少的可选开放阅读框数目和/或具有减少的拼接供体和/或拼接受体位点数目。例如,本发明的核酸序列引起所述GAA序列中与野生型GAA序列的序列相比GC含量提高至少2、3、4、5或10%。在特定实施方式中,本发明的核酸序列引起所述GAA序列中与野生型GAA核苷酸序列的序列相比GC含量提高2、3、4或更特别地5%或10%(特别是5%)。在特定实施方式中,编码功能性GAA多肽的本发明的核酸序列与SEQ ID NO:8中示出的序列的82-2859位核苷酸“基本上相同”,即具有约70%同一性、更优选地约80%同一性、甚至更优选地约90%同一性、甚至更优选地约95%同一性、甚至更优选地约97%、98%或甚至99%同一性。正如上文提到的,除了GC含量和/或ARF数目之外,序列优化还可以包括所述序列中CpG岛数目的减少和/或拼接供体和受体位点数目的减少。当然,正如本领域技术人员公知的,序列优化是所有这些参数之间的平衡,意味着如果上述参数中的至少一者改善而一种或多种其他参数没有改善,则序列可以被认为是优化的,只要所述优化的序列引起所述转入基因的改进例如表达提高和/或在体内对所述转入基因的免疫应答降低即可。

[0132] 此外,编码功能性GAA的核苷酸序列对人类细胞的密码子使用的适应性可以被表示为密码子适应指数(CAI)。密码子适应指数在本文中被定义为基因的密码子使用对高表达的人类基因的密码子使用的相对适应性的度量。每个密码子的相对适应性(w)是每个密码子的使用与同一氨基酸的最丰富的密码子的使用的比率。所述CAI被定义为这些相对适应性值的几何平均值。排除非同义密码子和终止密码子(取决于遗传密码)。CAI值的范围为0至1,更高的值指示最丰富密码子的更高比例(参见Sharp和Li,1987,Nucleic Acids

Research 15:1281-1295;也参见:Kim等,Gene.1997,199:293-301;zurMegede等,Journal of Virology,2000,74:2628-2635)。优选地,编码GAA的核酸分子具有至少0.75(特别是0.77)、0.8、0.85、0.90、0.92或0.94的CAI。

[0133] 术语“核酸序列”(或核酸分子)是指采取单链或双链形式的DNA或RNA分子,特别是编码本发明的GAA蛋白的DNA。

[0134] 发明人已发现,上文描述的截短的GAA多肽当从编码它的核酸分子表达时,与野生型GAA cDNA相比,令人吃惊地引起功能性GAA蛋白在体外和体内两者的高水平表达。此外,也正如本发明人所示,从表达本发明的核酸分子的肝和肌细胞产生的截短的GAA蛋白不诱导免疫应答。这意味着该核酸分子可用于生产高水平的GAA多肽并提供治疗益处,例如避免求助于免疫抑制性治疗,允许低剂量的免疫抑制性治疗,和允许向需要的对象重复给药本发明的核酸分子。因此,本发明的截短的GAA多肽和本发明的核酸分子在缺乏GAA表达和/或活性或GAA的高水平表达可以改善疾病例如糖原贮积病的情形中是特别令人感兴趣的。具体来说,所述糖原贮积病可以是GSDI(冯·吉尔克氏病(von Gierke's disease))、GSDII(庞贝氏病)、GSDIII(科里氏病(Cori disease))、GSDIV、GSDV、GSDVI、GSDVII、GSDVIII或心脏的致死性先天性糖原贮积病。更具体来说,所述糖原贮积病选自GSDI、GSDII和GSDIII,甚至更特别地选自GSDII和GSDIII。在甚至更特定的实施方式中,所述糖原贮积病是GSDII。具体来说,本发明的核酸分子可用于基因疗法中,以治疗缺乏GAA的病症或与糖原的积累相关的其他病症,例如GSDI(冯·吉尔克氏病)、GSDII(庞贝氏病)、GSDIII(科里氏病)、GSDIV、GSDV、GSDVI、GSDVII、GSDVIII和心脏的致死性先天性糖原贮积病,更特别是GSDI、GSDII或GSDIII,甚至更特别是GSDII和GSDIII。在甚至更特定的实施方式中,本发明的核酸分子可用于基因疗法中,以治疗GSDII。

[0135] 在本发明的另一个实施方式中,本发明的核酸分子的编码所述截短的GAA多肽组成部分的部分与编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:33、特别是SEQ ID NO:1的核苷酸序列的相应部分具有至少75%(例如77,7%)或至少80%或至少82%(例如83.1%)的同一性,后者是不含信号肽的野生型hGAA多肽的序列。

[0136] 本发明的核酸分子的截短的GAA组成部分与作为序列优化过的序列的SEQ ID NO:10或11的核苷酸序列优选地具有至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少92%同一性、特别是至少95%的同一性,例如至少98、99或100%的同一性。

[0137] 术语“同一性”及其偏差是指两个核酸分子之间的序列同一性。当两个被比较序列中的一个位置被同一碱基占据时(例如如果两个DNA分子中的每一者中的一个位置被腺嘌呤占据),则所述分子在该位置处是一致的。两个序列之间的同一性百分数是所述两个序列共有的匹配位置的数目除以被比较的位置的数目X 100的函数。例如,如果在两个序列中10个位置中的6个匹配,则所述两个序列是60%一致的。通常,在将两个序列对齐以给出最大同一性时做出比较。本领域技术人员已知的各种不同的生物信息学工具可用于比对核酸序列,例如BLAST或FASTA。

[0138] 此外,本发明的核酸分子编码功能性GAA蛋白,即它编码人类GAA蛋白,所述蛋白在被表达时具有野生型GAA蛋白的功能。正如上文所定义的,野生型GAA的功能是水解寡糖和多糖、更特别是糖原的α-1,4和α-1,6连接两者,以释放出葡萄糖。由本发明的核酸编码的功能性GAA蛋白与SEQ ID NO:1、2、30或33的野生型GAA蛋白相比,可以具有至少50%、60%、

70％、80％、90％、95％、99％或至少100％的对糖原的水解活性。由本发明的核酸编码的GAA蛋白的活性甚至可以为SEQ ID NO:1、2、30或33的野生型GAA蛋白的活性的超过100％,例如超过110％、120％、130％、140％或甚至超过150％。

[0139] 专业技术人员能够容易地确定本发明的核酸是否表达功能性GAA蛋白。适合的方法对于本领域技术人员来说是显而易见的。例如,一种适合的体外方法包括将所述核酸插入到载体例如质粒或病毒载体中,用所述载体转染或转导宿主细胞例如293T或HeLa细胞或其他细胞例如Huh7,并测定GAA活性。可替选地,适合的体内方法包括将含有所述核酸的载体转导到庞贝氏病或另一种糖原贮积病的小鼠模型中,并测定小鼠血浆中的功能性GAA和组织中GAA的存在。适合的方法更详细描述在下面的实验部分中。

[0140] 在特定实施方式中,本发明的核酸分子包含在SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13中示出的序列,其编码具有SEQ ID NO:27中示出的氨基酸序列的多肽;在SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49中示出的序列,其编码具有SEQ ID NO:28中示出的氨基酸序列的多肽;在SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51中示出的序列,其编码具有SEQ ID NO:35中示出的氨基酸序列的多肽;或在SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:53中示出的序列,其编码具有SEQ ID NO:36中示出的氨基酸序列的多肽。在进一步的实施方式中,本发明的核酸分子包含在SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13中示出的序列,其编码具有SEQ ID NO:27中示出的氨基酸序列的多肽;在SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49中示出的序列,其编码具有SEQ ID NO:28中示出的氨基酸序列的多肽;或在SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51中示出的序列,其编码具有SEQ ID NO:35中示出的氨基酸序列的多肽。在特定实施方式中,本发明的核酸分子包含在SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13中示出的序列,其编码具有SEQ ID NO:27中示出的氨基酸序列的多肽。

[0141] 本发明还涉及包含本发明的核酸分子的核酸构建物。所述核酸构建物可以对应于表达盒,其包含可操作连接到一个或多个表达控制序列和/或提高转入基因的表达的其他序列和/或增强被编码蛋白质的分泌的序列和/或增强被编码蛋白质的摄入的序列的本发明的核酸序列。当在本文中使用时,术语“可操作连接”是指多核苷酸元件以功能性关系相连。当核酸被放置成与另一个核酸序列处于功能性关系时,它被“可操作连接”。例如,启动子或另一个转录调控序列,如果它影响编码序列的转录,则被可操作连接到所述编码序列。这些表达控制序列在本领域中是已知的,例如启动子、增强子(例如顺式调控模块(CRM))、内含子、polyA信号等。

[0142] 具体来说,所述表达盒可以包含启动子。所述启动子可以是遍在或组织特异性启动子,特别是能够在需要GAA表达的细胞或组织中,例如在缺乏GAA的患者中的需要GAA表达的细胞或组织中促进表达的启动子。在特定实施方式中,所述启动子是肝特异性启动子例如α-1抗胰蛋白酶启动子(hAAT)(SEQ ID NO:14)、甲状腺素运载蛋白启动子、白蛋白启动子、甲状腺素结合性球蛋白(TBG)启动子、LSP启动子(包含甲状腺素结合性球蛋白启动子序列、两个拷贝的α1-微球蛋白/双库尼茨抑制剂(bikunin)增强子序列和前导序列-34。Ill,C.R.等,(1997),用于甲型血友病的基因疗法的人类因子VIII互补DNA表达质粒的优化(Optimization of the human factor VIII complementary DNA expression plasmid for gene therapy of hemophilia A),Blood Coag.Fibrinol.8:S23-S30)等。其他有用的肝特异性启动子在本领域中是已知的,例如在冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory)编纂的肝特异性基因启动子数据库(http://rulai.cshl.edu/LSPD/)中列出

的启动子。在本发明的情形中,优选的启动子是hAAT启动子。在另一个实施方式中,所述启动子是在一种目标组织或细胞中(例如在肌细胞中)和在肝细胞中指导表达的启动子。例如,在一定程度上,对肌细胞特异的启动子例如肌间线蛋白、Spc5-12和MCK启动子可能在肝细胞中存在一定的表达泄漏,这对于诱导对象对从本发明的核酸表达的GAA多肽的免疫耐受性来说可以是有利的。

[0143] 其他组织特异性或非组织特异性启动子在本发明的实践中也可以是有用的。例如,所述表达盒可以包含组织特异性启动子,其是不同于肝特异性启动子的启动子。例如,所述启动子可以是肌肉特异性的,例如肌间线蛋白启动子(和肌间线蛋白启动子变体例如包含天然或人工增强子的肌间线蛋白启动子)、SPc5-12或MCK启动子。在另一个实施方式中,所述启动子是对其他细胞谱系特异的启动子例如红细胞生成素启动子,用于从红细胞谱系的细胞表达所述GAA多肽。

[0144] 在另一个实施方式中,所述启动子是遍在启动子。代表性的遍在启动子包括巨细胞病毒增强子/鸡β肌动蛋白(CAG)启动子、巨细胞病毒增强子/启动子(CMV)、PGK启动子、SV40早期启动子等。

[0145] 此外,所述启动子也可以是内源启动子,例如白蛋白启动子或GAA启动子。

[0146] 在特定实施方式中,所述启动子被结合到增强子序列例如顺式调控模块(CRM)或人工增强子序列。例如,所述启动子可以被结合到增强子序列例如人类ApoE控制区(或人类载脂蛋白E/C-I基因座,肝控制区HCR-1——Genbank登记号U32510,示出在SEQ ID NO:15中)。在特定实施方式中,增强子序列例如ApoE序列被结合到肝特异性启动子例如上面列出的那些启动子,特别是例如hAAT启动子。在本发明的实践中有用的其他CRM包括在Rincon等,MolTher.2015Jan;23(1):43-52;Chuah等,MolTher.2014Sep;22(9):1605-13或Nair等,Blood.2014May 15;123(20):3195-9中所描述的CRM。

[0147] 在另一个特定实施方式中,所述核酸构建物包含内含子,特别是置于所述启动子与GAA编码序列之间的内含子。内含子可以被引入以提高mRNA的稳定性和蛋白质的生产。在其他实施方式中,所述核酸构建物包含人类β球蛋白b2(或HBB2)内含子、凝血因子IX(FIX)内含子、SV40内含子或鸡β-球蛋白内含子。在另一个其他实施方式中,本发明的核酸构建物含有修饰的内含子(特别是修饰的HBB2或FIX内含子),其被设计用于减少在所述内含子中存在的可选开放阅读框(ARF)的数目或甚至完全除去ARF。优选地,除去长度跨度超过50bp并具有与起始密码子同框的终止密码子的ARF。ARF可以通过修改所述内含子的序列来去除。例如,可以利用核苷酸替换、插入或缺失,优选地通过核苷酸替换进行修饰。作为实例,可以替换在目标内含子序列中存在的ATG或GTG起始密码子中的一个或多个核苷酸,特别是一个核苷酸,产生非起始密码子。例如,可以将目标内含子序列内的ATG或GTG用不是起始密码子的CTG代替。

[0148] 在核酸构建物中使用的经典HBB2内含子示出在SEQ ID NO:16中。例如,该HBB2内含子可以通过消除所述内含子中的起始密码子(ATG和GTG密码子)进行修饰。在特定实施方式中,包含在所述构建物中的修饰的HBB2内含子具有在SEQ ID NO:17中示出的序列。在核酸构建物中使用的经典FIX内含子源自于人类FIX的第一内含子,并示出在SEQ ID NO:18中。FIX内含子可以通过消除所述内含子中的起始密码子(ATG和GTG密码子)进行修饰。在特定实施方式中,包含在本发明的构建物中的修饰的FIX内含子具有在SEQ ID NO:19中示出

的序列。在核酸构建物中使用的经典鸡β-球蛋白内含子示出在SEQ ID NO:20中。鸡β-球蛋白内含子可以通过消除所述内含子中的起始密码子(ATG和GTG密码子)进行修饰。在特定实施方式中,包含在本发明的构建物中的修饰的鸡β-球蛋白内含子具有在SEQ ID NO:21中示出的序列。

[0149] 发明人以前已在WO2015/162302中显示,这种修饰的内含子特别是修饰的HBB2或FIX内含子具有有利的性质,并且可以显著提高转入基因的表达。

[0150] 在特定实施方式中,本发明的核酸构建物是一种表达盒,其以5'至3'的方向包含任选地在前面带有增强子的启动子、本发明的编码序列(即本发明的优化的截短的GAA编码序列、本发明的嵌合GAA编码序列或本发明的嵌合且序列优化过的GAA编码序列)和多腺苷化信号(例如牛生长激素多腺苷化信号、SV40多腺苷化信号或另一种天然存在的或人工多腺苷化信号)。在特定实施方式中,本发明的核酸构建物是一种表达盒,其以5'至3'的方向包含任选地在前面带有增强子(例如ApoE控制区)的启动子、内含子(特别是如上所定义的内含子)、本发明的编码序列和多腺苷化信号。在另一个特定实施方式中,本发明的核酸构建物是一种表达盒,其以5'至3'的方向包含增强子例如ApoE控制区、启动子、内含子(特别是如上所定义的内含子)、本发明的编码序列和多腺苷化信号。在本发明的其他特定实施方式中,所述表达盒以5'至3'的方向包含ApoE控制区、hAAT-肝特异性启动子、HBB2内含子(特别是如上所定义的修饰的HBB2内含子)、本发明的编码序列和牛生长激素多腺苷化信号,例如在下述序列中示出的构建物:

[0151] -SEQ ID NO:22,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ8截短形式并编码SEQ ID NO:5的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0152] -SEQ ID NO:23,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ8截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:5的信号肽的优化的序列;

[0153] -SEQ ID NO:24,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ8截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:5的信号肽的另一个优化的序列;

[0154] -SEQ ID NO:25,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ8截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的优化的序列;

[0155] -SEQ ID NO:26,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ42截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的优化的序列;

[0156] -SEQ ID NO:37,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ29截短形式(源自于SEQ ID NO:9的未优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的未优化的序列;

[0157] -SEQ ID NO:38,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ29截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的优化的序列;

[0158] -SEQ ID NO:39,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ29截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的另一个优化

的序列;

[0159] -SEQ ID NO:40,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ42截短形式(源自于SEQ ID NO:9的未优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的未优化的序列;

[0160] -SEQ ID NO:41,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ42截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的另一个优化的序列;

[0161] -SEQ ID NO:42,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ43截短形式(源自于SEQ ID NO:9的未优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的未优化的序列;

[0162] -SEQ ID NO:43,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ43截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的优化的序列;和

[0163] -SEQ ID NO:44,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ43截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的另一个优化的序列;

[0164] -SEQ ID NO:45,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ47截短形式(源自于SEQ ID NO:9的未优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的未优化的序列;

[0165] -SEQ ID NO:46,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ47截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的优化的序列;和

[0166] -SEQ ID NO:47,其包括编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ47截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)和SEQ ID NO:3的信号肽的另一个优化的序列。

[0167] 本发明的其他表达盒可以包括下述核酸序列:

[0168] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ8截短形式并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0169] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ29截短形式并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0170] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ42截短形式并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0171] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ43截短形式并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0172] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ47截短形式并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0173] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ8截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0174] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ8截短形式(源自于SEQ ID NO:13

的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0175] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ29截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0176] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ29截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0177] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ42截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0178] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ42截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0179] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ43截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0180] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ43截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0181] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ47截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0182] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ47截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列。

[0183] .

[0184] 在这些特定构建物的可替选实施方式中,编码SEQ ID NO:1的序列被编码SEQ ID NO:33的序列代替。

[0185] 在特定实施方式中,所述表达盒包含ApoE控制区、hAAT-肝特异性启动子、密码子优化的HBB2内含子、本发明的编码序列和牛生长激素多腺苷化信号。

[0186] 在设计本发明的核酸构建物时,本领域技术人员应该注意用于将所述构建物递送到细胞和器官的载体的尺寸限制。具体来说,本领域技术人员知道AAV载体的主要限制是它的运载容量,其可能随着AAV血清型而变,但据认为被限制在母体病毒基因组的尺寸左右。例如,5kb通常被认为是包装在AAV8衣壳中的最大尺寸(Wu Z.等,MolTher.,2010,18(1):80-86;Lai Y.等,Mol Ther.,2010,18(1):75-79;Wang Y.等,Hum Gene Ther Methods,2012,23(4):225-33)。因此,本领域技术人员在本发明的实践中应该注意选择本发明的核酸构建物的组分,以使得到的核酸序列,包括编码AAV 5'-至3'-ITR的序列,优选地不超过所使用的AAV载体的运载容量的110%,具体来说优选地不超过5.5kb。

[0187] 本发明还涉及包含本文中公开的核酸分子或构建物的载体。具体来说,本发明的载体是适合于蛋白质表达,优选地用于基因疗法的载体。在一个实施方式中,所述载体是质粒载体。在另一个实施方式中,所述载体是含有本发明的核酸分子、特别是编码本发明的GAA多肽的信使RNA的纳米粒子。在另一个实施方式中,所述载体是基于转座子的系统,允许将本发明的核酸分子或构建物整合到靶细胞的基因组中,例如极度活跃的睡美人(Sleeping Beauty)(SB100X)转座子系统(Mates等,2009)。在另一个实施方式中,所述载体是适用于基因疗法的病毒载体,靶向任何目标细胞例如肝组织或细胞、肌细胞、CNS细胞(例如脑细胞)或造血干细胞例如红细胞谱系的细胞(例如红细胞)。在这种情况下,本发明的核酸构建物还含有本领域中公知的适合于生产高效病毒载体的序列。在特定实施方式中,所

述病毒载体源自于整合病毒。具体来说,所述病毒载体可以源自于反转录病毒或慢病毒。在另一个特定实施方式中,所述病毒载体是AAV载体,例如适用于转导肝组织或细胞的AAV载体,更特别是AAV-1、AAV-2和AAV-2变体(例如包含具有Y44+500+730F+T491V改变的工程化衣壳的四重突变的衣壳优化的AAV-2,其公开在Ling等,2016Jul 18,Hum Gene Ther Methods.[Epub ahead of print]中)、AAV-3和AAV-3变体(例如包含具有两个氨基酸变化S663V+T492V的工程化AAV3衣壳的AAV3-ST变体,其公开在Vercauteren等,2016,Mol.Ther.Vol.24(6),p.1042中)、AAV-3B和AAV-3B变体、AAV-4、AAV-5、AAV-6和AAV-6变体(例如包含三重突变的AAV6衣壳Y731F/Y705F/T492V形式的AAV6变体,其公开在Rosario等,2016,Mol Ther Methods Clin Dev.3,p.16026中)、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10例如AAV-cy10和AAV-rh10、AAV-rh74、AAV-dj、Anc80、LK03、AAV2i8、猪AAV血清型例如AAVpo4和AAVpo6等载体,或反转录病毒载体例如慢病毒载体和α-反转录病毒。正如在本领域中已知的,取决于考虑使用的具体病毒载体,将其他适合的序列引入到本发明的核酸构建物中,用于获得功能性病毒载体。适合的序列包括用于AAV载体的AAV ITR或用于慢病毒载体的LTR。因此,本发明还涉及如上所述的表达盒,其在每一侧带有ITR或LTR。

[0188] 病毒载体的优点在本公开下面的部分中讨论。病毒载体对于递送本发明的核酸分子或构建物来说是优选的,例如反转录病毒载体如慢病毒载体,或非致病性细小病毒,更优选为AAV载体。人类细小病毒腺相关病毒(AAV)是一种天然复制有缺陷的依赖病毒,其能够整合到被感染细胞的基因组中以建立潜伏感染。最后一种性质在哺乳动物病毒中似乎是独特的,因为所述整合发生在人类基因组中被称为AAVS1的特异性位点处,其位于19号染色体上(19q13.3-qter)。

[0189] 因此,AAV载体作为用于人类基因疗法的潜在载体引起了相当大的兴趣。所述病毒的有利性质包括它与任何人类疾病缺乏相关性,它感染分裂细胞和非分裂细胞两者的能力,以及可以被感染的源自于不同组织的广范围的细胞系。

[0190] 在从人类或非人类灵长动物(NHP)分离并被充分表征的AAV的血清型中,人类血清型2是被开发作为基因转移载体的第一种AAV,其他目前使用的AAV血清型包括AAV-1、AAV-2变体(例如包含具有Y44+500+730F+T491V改变的工程化衣壳的四重突变的衣壳优化的AAV-2,其公开在Ling等,2016Jul 18,Hum Gene Ther Methods.[Epub ahead of print]中)、AAV-3和AAV-3变体(例如包含具有两个氨基酸变化S663V+T492V的工程化AAV3衣壳的AAV3-ST变体,其公开在Vercauteren等,2016,Mol.Ther.Vol.24(6),p.1042中)、AAV-3B和AAV-3B变体、AAV-4、AAV-5、AAV-6和AAV-6变体(例如包含三重突变的AAV6衣壳Y731F/Y705F/T492V形式的AAV6变体,其公开在Rosario等,2016,Mol Ther Methods Clin Dev.3,p.16026中)、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10例如AAV-cy10和AAV-rh10、AAV-rh74、AAV-dj、Anc80、LK03、AAV2i8、猪AAV血清型例如AAVpo4和AAVpo6,以及AAV血清型的酪氨酸、赖氨酸和丝氨酸衣壳突变体等。此外,其他非天然的工程化变体和嵌合AAV也可以是有用的。

[0191] AAV病毒可以使用常规的分子生物学技术进行工程化改造,使得可以优化这些粒子用于核酸序列的细胞特异性递送,用于最小化免疫原性,用于调节稳定性和粒子寿命,用于高效降解,用于精确递送到核。

[0192] 用于组装成载体的理想的AAV片段包括cap蛋白,包括vp1、vp2、vp3和高变区,rep蛋白,包括rep 78、rep 68、rep 52和rep 40,以及编码这些蛋白质的序列。这些片段可以被

容易地使用在各种不同的载体系统和宿主细胞中。

[0193] 缺少Rep蛋白的基于AAV的重组载体以低效能整合到宿主的基因组中,并主要作为可以在靶细胞中存留数年的稳定的环状游离体存在。

[0194] 除了使用AAV天然血清型之外,在本发明的情形中也可以使用人工AAV血清型,包括但不限于具有非天然存在的衣壳蛋白的AAV。这种人工衣壳可以通过任何适合的技术,使用所选的AAV序列(例如vp1衣壳蛋白的片段)与可以从不同的所选AAV血清型、同一AAV血清型的非毗连部分、非AAV病毒来源或非病毒来源获得的异源序列相组合来产生。人工AAV血清型可以是但不限于嵌合AAV衣壳、重组AAV衣壳或“人源化”AAV衣壳。

[0195] 因此,本发明涉及包含本发明的核酸分子或构建物的AAV载体。在本发明的情形中,所述AAV载体包含能够转导目标靶细胞、特别是肝细胞的AAV衣壳。根据特定实施方式,所述AAV载体具有AAV-1、AAV-2、AAV-2变体(例如包含具有Y44+500+730F+T491V改变的工程化衣壳的四重突变的衣壳优化的AAV-2,其公开在Ling等,2016Jul18,Hum Gene Ther Methods.[Epub ahead of print]中)、AAV-3和AAV-3变体(例如包含具有两个氨基酸变化S663V+T492V的工程化AAV3衣壳的AAV3-ST变体,其公开在Vercauteren等,2016,Mol.Ther.Vol.24(6),p.1042中)、AAV-3B和AAV-3B变体、AAV-4、AAV-5、AAV-6和AAV-6变体(例如包含三重突变的AAV6衣壳Y731F/Y705F/T492V形式的AAV6变体,其公开在Rosario等,2016,Mol Ther Methods Clin Dev.3,p.16026中)、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10例如AAV-cy10和AAV-rh10、AAV-rh74、AAV-dj、Anc80、LK03、AAV2i8、猪AAV例如AAVpo4和AAVpo6,以及AAV血清型的酪氨酸、赖氨酸和丝氨酸衣壳突变体等的血清型。在特定实施方式中,所述AAV载体具有AAV8、AAV9、AAVrh74或AAV2i8血清型(即所述AAV载体具有AAV8、AAV9、AAVrh74或AAV2i8血清型的衣壳)。在另一个特定实施方式中,所述AAV载体是假型载体,即它的基因组和衣壳源自于不同血清型的AAV。例如,所述假型AAV载体可以是其基因组源自于上文提到的血清型之一,并且衣壳源自于另一种血清型的载体。例如,所述假型载体的基因组可以具有源自于AAV8、AAV9、AAVrh74或AAV2i8血清型的衣壳,并且它的基因组可以源自于不同的血清型。在特定实施方式中,所述AAV载体具有AAV8、AAV9或AAVrh74血清型,特别是AAV8或AAV9血清型,更特别是AAV8血清型的衣壳。

[0196] 在特定实施方式中,在所述载体被用于将转入基因递送到肌细胞的情形中,所述AAV载体可以选自AAV8、AAV9和AAVrh74等。

[0197] 在另一个特定实施方式中,在所述载体被用于将转入基因递送到肝细胞的情形中,所述AAV载体可以选自AAV5、AAV8、AAV9、AAV-LK03、AAV-Anc80和AAV3B等。

[0198] 在另一个实施方式中,所述衣壳是修饰的衣壳。在本发明的情形中,“修饰的衣壳”可以是嵌合衣壳或包含源自于一种或多种野生型AAV VP衣壳蛋白的一种或多种变体VP衣壳蛋白的衣壳。

[0199] 在特定实施方式中,所述AAV载体是嵌合载体,即它的衣壳包含源自于至少两种不同AAV血清型的VP衣壳蛋白,或包含至少一种将源自于至少两种AAV血清型的VP蛋白区域或结构域组合的嵌合VP蛋白。可用于转导肝细胞的这种嵌合AAV载体的实例描述在Shen等,Molecular Therapy,2007和Tenney等,Virology,2014中。例如,嵌合AAV载体可以源自于AAV8衣壳序列与不同于AAV8血清型的AAV血清型例如上文具体提到的任一种AAV血清型的序列的组合。在另一个实施方式中,所述AAV载体的衣壳包含一种或多种变体VP衣壳蛋白,

例如在WO2015013313中所公开的,特别是表现出高的肝趋向性的RHM4-1、RHM15-1、RHM15-2、RHM15-3/RHM15-5、RHM15-4和RHM15-6衣壳变体。

[0200] 在另一个实施方式中,所述修饰的衣壳也可源自于通过易错PCR和/或肽插入(例如在Bartel等,2011中所述)插入的衣壳修饰。此外,衣壳变体可以包括单氨基酸变化例如酪氨酸突变体(例如在Zhong等,2008中所述)。

[0201] 此外,所述AAV载体的基因组可以是单链或自身互补的双链基因组(McCarty等,Gene Therapy,2003)。自身互补的双链AAV载体通过从AAV末端重复序列之一中缺失掉末端解链位点(trs)来产生。这些其复制的基因组是野生型AAV基因组长度的一半的修饰的载体,具有包装DNA二聚体的倾向性。在优选实施方式中,在本发明的实践中使用的AAV载体具有单链基因组,并且更优选地包含AAV8、AAV9、AAVrh74或AAV2i8衣壳,特别是AAV8、AAV9或AAVrh74衣壳例如AAV8或AAV9衣壳,更特别是AAV8衣壳。

[0202] 在特别优选的实施方式中,本发明涉及一种AAV载体,其在单链或双链的自身互补的基因组(例如单链基因组)中包含本发明的核酸构建物。在一个实施方式中,所述AAV载体包含AAV8、AAV9、AAVrh74或AAV2i8衣壳,特别是AAV8、AAV9或AAVrh74衣壳例如AAV8或AAV9衣壳,更特别是AAV8衣壳。在另一个特定实施方式中,所述核酸被可操作连接到启动子,特别是遍在或肝特异性启动子。根据特定变体的实施方式,所述启动子是遍在启动子,例如巨细胞病毒增强子/鸡β-肌动蛋白(CAG)启动子、巨细胞病毒增强子/启动子(CMV)、PGK启动子和SV40早期启动子。在特定变体中,所述遍在启动子是CAG启动子。根据另一种变体,所述启动子是肝特异性启动子,例如α-1抗胰蛋白酶启动子(hAAT)、甲状腺素运载蛋白启动子、白蛋白启动子和甲状腺素结合性球蛋白(TBG)启动子。在特定变体中,所述肝特异性启动子是SEQ ID NO:14的hAAT肝特异性启动子。在另一个特定实施方式中,包含在本发明的AAV载体的基因组中的核酸构建物还包含如上所述的内含子,例如置于所述启动子与编码GAA编码序列(即本发明的优化的GAA编码序列、本发明的嵌合GAA编码序列或本发明的嵌合且优化的GAA编码序列)的核酸序列之间的内含子。可以包含在引入到所述AAV载体中的核酸构建物内的代表性内含子包括但不限于人类β球蛋白b2(或HBB2)内含子、FIX内含子和鸡β-球蛋白内含子。所述AAV载体的基因组中的所述内含子可以是经典(或未修饰的)内含子或被设计以减少所述内含子中的可选开放阅读框(ARF)的数目或甚至完全除去ARF的修饰的内含子。可以在这种将本发明的核酸引入到AAV载体内的实施方式的实践中使用的修饰和未修饰的内含子,已在上文充分描述。在特定实施方式中,本发明的AAV载体,特别是包含AAV8、AAV9、AAVrh74或AAV2i8衣壳,特别是AAV8、AAV9或AAVrh74衣壳例如AAV8或AAV9衣壳,更特别是AAV8衣壳的AAV载体,在其基因组内包括修饰(或优化的)内含子,例如SEQ ID NO:17的修饰的HBB2内含子、SEQ ID NO:19的修饰的FIX内含子和SEQ ID NO:21的修饰的鸡β-球蛋白内含子。在另一个特定实施方式中,本发明的载体是包含AAV8、AAV9、AAVrh74或AAV2i8衣壳、特别是AAV8、AAV9或AAVrh74衣壳例如AAV8或AAV9衣壳,更特别是AAV8衣壳的AAV载体,其包含的基因组以5'至3'方向含有:AAV 5'-ITR(例如AAV2 5'-ITR),ApoE控制区,hAAT-肝特异性启动子,HBB2内含子(特别是如上所定义的修饰的HBB2内含子),本发明的GAA编码序列,牛生长激素多腺苷化信号和AAV 3'-ITR(例如AAV2 3'-ITR),例如所述基因组包含在SEQ ID NO:22至26和SEQ ID NO:37至47中示出的核酸构建物,并在侧翼带有AAV 5'-ITR(例如AAV2 5'-ITR)和AAV 3'-ITR(例如AAV2 3'-ITR)。在本发明的实践中有用的其他核酸

构建物包括上文描述的那些,包括:

[0203] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ8截短形式并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0204] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ29截短形式并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0205] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ42截短形式并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0206] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ43截短形式并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0207] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ47截短形式并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的未优化的核苷酸序列;

[0208] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ8截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0209] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ8截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0210] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ29截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0211] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ29截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0212] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ42截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4或6的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0213] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ42截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0214] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ43截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0215] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ43截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0216] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ47截短形式(源自于SEQ ID NO:12的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列;

[0217] -编码源自于SEQ ID NO:1的亲本hGAA的GAA的Δ47截短形式(源自于SEQ ID NO:13的优化序列的核苷酸序列)并编码SEQ ID NO:4、6或7的信号肽的优化的核苷酸序列。

[0218] 在这些特定构建物的可替选实施方式中,编码SEQ ID NO:1的序列被编码SEQ ID NO:33的序列代替。

[0219] 在本发明的特定实施方式中,本发明的核酸构建物包含如上所定义的肝特异性启动子,并且所述载体是如上所述的能够转导肝组织或细胞的病毒载体。发明人在下文展示的数据显示,得益于这个实施方式开发了高效且优化的载体以在肝细胞中表达高度可分泌形式的GAA并诱导对所述蛋白质的免疫耐受,肝的促耐受原和代谢性质被有利地实现。

[0220] 此外,在另一个特定实施方式中,本发明提供了两种载体例如两种病毒载体、特别是两种AAV载体的组合,用于在目标细胞中改进基因递送和治疗功效。例如,所述两种载体

可以携带编码本发明的GAA蛋白的本发明的核酸分子,并且其在这两种载体的每一种中,在一个不同的启动子控制之下。在特定实施方式中,一种载体包含作为肝特异性启动子(如上文描述的之一)的启动子,另一种载体包含对用于治疗糖原贮积病的另一种目标组织具有特异性的启动子例如肌肉特异性启动子,例如肌间线蛋白启动子。在这个实施方式的特定变化形式中,这种载体组合对应于如WO2015196179中所述产生的多种共包装AAV载体。

[0221] 本发明还涉及用本发明的核酸分子或构建物转化的细胞例如肝细胞,这与用于离体基因疗法的情况相同。本发明的细胞可以通过任何适合的给药途径递送到需要它们的对象例如缺乏GAA的患者,例如通过注射到所述对象的肝脏中或血流中。在特定实施方式中,本发明包括将本发明的核酸分子、核酸构建物或载体、特别是慢病毒载体引入到肝细胞中,特别是待治疗对象的肝细胞中,并将其中引入有所述核酸的转化的肝细胞给药到所述对象。有利的是,这个实施方式对从所述细胞分泌GAA有用。在特定实施方式中,所述肝细胞是来自于待治疗患者的肝细胞,或者是肝干细胞,其被进一步转化并在体外分化成肝细胞,用于随后给药到所述患者。

[0222] 本发明还涉及一种转基因非人类动物,在其基因组中包含编码本发明的GAA多肽的核酸分子或构建物。在特定实施方式中,所述动物是小鼠。

[0223] 除了在下文实施例中呈现的特定递送系统之外,各种不同的递送系统是已知的,并且可用于给药本发明的核酸分子或构建物,例如包封在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达本发明的编码序列的重组细胞中,受体介导的胞吞作用,构建治疗性核酸作为反转录病毒或其他载体的一部分等。

[0224] 根据一个实施方式,可能希望将本发明的GAA多肽、核酸分子、核酸构建物或细胞通过任何适合的途径引入到所述对象的肝脏中。除了裸露的DNA之外,可以将例如微环和转座子用于慢病毒载体的递送。此外,基因编辑技术例如锌指核酸酶、巨核酸酶(meganuclease)、TALEN和CRISPR,也可用于递送本发明的编码序列。

[0225] 本发明还提供了包含本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞的药物组合物。这些组合物包含治疗有效量的所述治疗剂(本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞)和可药用载体。在特定实施方式中,术语“可药用的”意味着由联邦或州政府的监管机构批准或列于美国或欧洲药典或其他公认的药典中,用于在动物和人类中使用的。术语“载体”是指稀释剂、佐剂、赋形剂或介质,所述治疗剂与它们一起给药。这些药用载体可以是无菌液体例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当所述药物组合物被静脉内给药时,水是优选的载体。盐水溶液和右旋糖和甘油水溶液也可用作液体载体,特别是对于可注射溶液。适合的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0226] 如果需要,所述组合物还可以含有少量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采取溶液、悬液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释剂等的形式。口服配方可以包含标准的载体例如制药级甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。适合的药物载体的实例描述在E.W.Martin的《Remington制药学》(Remington’s Pharmaceutical Sciences)中。这些组合物应该含有治疗有效量的所述治疗剂、优选是采取纯化形式的治疗剂,以及适合量的载体以便提供适合于给药到所述对象的形式。在特定实施方式中,本发明

的核酸、载体或细胞被配制在包含磷酸盐缓冲盐水并增补有0.25％人血清白蛋白的组合物中。在另一个特定实施方式中,本发明的核酸、载体或细胞被配制在包含林格乳酸盐溶液和以总组合物的重量计终浓度为0.01-0.0001％、例如浓度为0.001％的非离子型表面活性剂例如pluronic F68的组合物中。所述组合物还可以包含血清白蛋白,特别是人血清白蛋白,例如0.25％的人血清白蛋白。其他适用于储存或给药的配方在本领域中是已知的,特别是从WO 2005/118792或Allay等,2011。

[0227] 在优选实施方式中,所述组合物按照常规程序配制成适合于静脉内给药到人类的药物组合物。通常,用于静脉内给药的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。在必要时,所述组合物还可以包含增溶剂和局部麻醉剂例如利诺卡因,以缓解注射位点处的疼痛。

[0228] 在一个实施方式中,本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞可以在囊泡、特别是脂质体中递送。在另一个实施方式中,本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞可以在受控释放系统中递送。

[0229] 本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞的给药方法包括但不限于真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。在特定实施方式中,所述给药通过静脉内或肌肉内途径。本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞,不论是否被载体化,都可以通过任何方便的途径给药,例如通过输注或快速浓注,通过经上皮或粘膜衬(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)的吸收,并且可以与其他生物活性药剂一起给药。给药可以是系统性或局部的。

[0230] 在特定实施方式中,可能希望将本发明的药物组合物局部给药到需要治疗的区域,例如肝脏。这可以例如利用植入物来实现,所述植入物是多孔、无孔或胶状材料,包括膜例如硅橡胶膜或纤维。

[0231] 在糖原贮积病的治疗中有效的本发明的治疗剂(即本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞)的量可以通过标准的临床技术来确定。此外,可以任选地使用体内和/或体外测定法来帮助预测最适剂量范围。在所述制剂中使用的精确剂量也取决于给药途径和疾病的严重性,并且应该根据执业医师的判断和每位患者的情况来决定。本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞的给药到需要它们的对象的剂量将随着几种因素而变,包括但不限于给药途径、治疗的具体疾病、对象的年龄或实现治疗效果所必需的表达水平。本领域技术人员可以在本领域知识的基础上,容易地根据这些因素和其他因素确定所需的剂量范围。在治疗包括向对象给药病毒载体例如AAV载体的情况下,所述载体的典型剂量为至少$1x10^{8}$个载体基因组每千克体重(vg/kg),例如至少$1x10^{9}$vg/kg、至少$1x10^{10}$vg/kg、至少$1x10^{11}$vg/kg、至少$1x10^{12}$vg/kg、至少$1x10^{13}$vg/kg或至少$1x10^{14}$vg/kg。

[0232] 本发明还涉及一种用于治疗糖原贮积病的方法,所述方法包括向需要的对象递送治疗有效量的本发明的核酸、载体、GAA多肽、药物组合物或细胞的步骤。

[0233] 本发明还涉及一种用于治疗糖原贮积病的方法,所述方法不诱导针对所述转入基因(即针对本发明的GAA多肽)的免疫应答,或诱导针对所述转入基因的降低的免疫应答,所述方法包括向需要的对象递送治疗有效量的本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、药物组合物或细胞的步骤。本发明还涉及一种用于治疗糖原贮积病的方法,所述方法包括向需要的对象重复给药治疗有效量的本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、药物组合物或细胞。在这种情况下,本发明的核酸分子或核酸构建物包含在肝细胞中有功能的启动子,从而允

许从其产生针对所表达的GAA多肽的免疫耐受性。同样地,在这种情况下,在这种情形中使用的药物组合物包含的核酸分子或核酸构建物包含在肝细胞中有功能的启动子。在递送肝细胞的情况下,所述细胞可以是以前从所述需要治疗的对象收集并通过在其中引入本发明的核酸分子或核酸构建物进行工程化改造从而使它们能够生产本发明的GAA多肽的细胞。根据一个实施方式,在包含重复给药的情况下,所述给药可以重复至少一次或更多次,并且甚至可以被认为按照定期时间表进行,例如每周、每月或每年一次。所述定期时间表也可以包括每2、3、4、5、6、7、8、9或10年或超过10年给药一次。在另一个特定实施方式中,本发明的病毒载体的每次给药,对于每次连续的给药来说使用不同的病毒来进行,从而避免由于针对以前给药的病毒载体的可能免疫应答而造成的效能降低。例如,第一次给药可以使用包含AAV8衣壳的病毒载体,然后给药包含AAV9衣壳的载体或甚至给药与AAV无关的病毒例如反转录病毒或慢病毒载体。

[0234] 根据本发明,治疗可以包括治愈、缓解或预防作用。因此,治疗性和预防性治疗包括特定糖原贮积病的症状的改善或阻止或以其他方式降低发生特定糖原贮积病的风险。术语“预防性”可以被认为是降低特定病症的严重性或发生率。“预防性”还包括在以前被诊断为患有特定病症的患者中阻止所述病症的复发。“治疗性”也可以降低现有病症的严重性。术语“治疗”在本文中用于指称可以有益于动物、特别是哺乳动物、更特别是人类对象的任何方案。

[0235] 本发明还涉及一种用于治疗糖原贮积病的离体基因治疗方法,所述方法包括将本发明的核酸分子或核酸构建物引入到需要治疗的患者的分离的细胞例如分离的造血干细胞中,并将所述细胞引入到所述需要治疗的患者中。在这种情况的特定实施方式中,将所述核酸分子或构建物用如上所定义的载体引入到所述细胞中。在特定实施方式中,所述载体是整合型病毒载体。在另一个特定实施方式中,所述病毒载体是反转录病毒载体例如慢病毒载体。例如,在van Til等,2010,Blood,115(26),p.5329中所公开的慢病毒载体可用于本发明的方法的实践中。

[0236] 本发明还涉及本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞,其用作药物。

[0237] 本发明还涉及本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞,其用于治疗由GAA基因中的突变引起的疾病的方法中,特别是用于治疗庞贝氏病的方法中。本发明还涉及本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞,其用于治疗糖原贮积病的方法中,所述糖原贮积病例如为GSDI(冯·吉尔克氏病)、GSDII(庞贝氏病)、GSDIII(科里氏病)、GSDIV、GSDV、GSDVI、GSDVII、GSDVIII和心脏的致死性先天性糖原贮积病,更特别是GSDI、GSDII或GSDIII,甚至更特别是GSDII和GSDIII,最特别是GSDII。本发明的截短的GAA多肽可以被给药到需要的患者,用于酶替代疗法(ERT)中,例如用于糖原贮积病的酶替代疗法中,所述糖原贮积病例如GSDI(冯·吉尔克氏病)、GSDII(庞贝氏病)、GSDIII(科里氏病)、GSDIV、GSDV、GSDVI、GSDVII、GSDVIII和心脏的致死性先天性糖原贮积病,更特别是GSDI、GSDII或GSDIII,甚至更特别是GSDII和GSDIII,最特别是GSDII。

[0238] 本发明还涉及本发明的核酸分子、核酸构建物、载体、GAA多肽或细胞在制造药物中的用途,所述药物可用于治疗糖原贮积病例如GSDI(冯·吉尔克氏病)、GSDII(庞贝氏病)、GSDIII(科里氏病)、GSDIV、GSDV、GSDVI、GSDVII、GSDVIII和心脏的致死性先天性糖原

贮积病,更特别是GSDI、GSDII或GSDIII,甚至更特别是GSDII和GSDIII,最特别是GSDII。

[0239] 实施例

[0240] 通过参考下面的实验实施例和附图,对本发明进行更详细地描述。提供这些实施例仅仅是出于说明的目的,并且不打算是限制性的。

[0241] 材料和方法

[0242] GAA活性

[0243] 在将冷冻的组织样品在蒸馏水中匀浆后测量GAA活性。称出50-100mg组织并匀浆,然后以10000x g离心20分钟。在96孔板中,使用10μl上清液和20μl底物4MUα-D-葡萄糖苷设置反应。将所述反应混合物在37℃温浴1小时,然后通过添加150μl pH 10.5的碳酸钠缓冲液终止反应。使用EnSpireα读板器(Perkin-Elmer)在449nm(发射)和360nm(激发)下,使用标准曲线(0-2500pmol/μl的4MU)来测量从各个反应混合物释放的荧光4MU。所述澄清的上清液的蛋白质浓度通过BCA(Thermo Fisher Scientific)来定量。为了计算GAA活性,用释放的4MU浓度除以样品的蛋白质浓度,并将活性以nmol/小时/mg蛋白为单位报告。

[0244] 小鼠研究

[0245] Gaa-/-小鼠通过定向破坏外显子6来产生,并维持在C57BL/6J/129X1/SvJ背景上(Raben N.等,1998)。以0.2ml的体积通过尾静脉递送载体。每月收集血清样品以监测分泌的hGAA的水平。使用PBS注射的患病动物和野生型同窝仔畜作为对照。

[0246] NHP研究

[0247] 将雄性食蟹猴饲养在不锈钢笼子中并维持在12小时光/暗周期下。在开始研究之前,所有食蟹猴具有<1:5的中和抗体滴度。通过隐静脉输注一剂2E12 vg/kg的AAV8-hAAT-sp7-Δ8-hGAAco1。在所述注射之前12天和之后30天通过股静脉获取血液样品。将全血收集在含有EDTA的管中并离心以分离血清。在载体给药后三个月,将所有食蟹猴安乐死。首先将动物用氯胺酮/右旋美托咪啶的混合物麻醉,然后使用IV注射的戊巴比妥钠进行安乐死。立即收集组织并在液氮中冷冻。

[0248] 蛋白质印迹分析

[0249] 从冷冻的肌肉获得总匀浆物。通过Pierce BCA蛋白质测定法(Thermo Fisher Scientific),按照制造商的说明书确定提取物中的蛋白质浓度。蛋白质印迹使用抗hGAA抗体(Abcam)来进行。使用抗微管蛋白抗体(Sigma Aldrich)作为载样对照。

[0250] 结果

[0251] 怀着设计具有提高的分泌和降低的免疫原性的GAA的新形式的目的,我们决定产生GAA的截短形式,并任选地将它们与可替选信号肽组合。

[0252] SEQ ID NO:2中示出的人类GAA充当设计这些新形式的基础。SEQ ID NO:1对应于SEQ ID NO:2的序列,但不含GAA的相应的天然信号肽(SEQ ID NO:2的1-27位氨基酸)。设计了核酸构建物以编码源自于SEQ ID NO:1的、在N-端末端处截短的GAA多肽。我们从在野生型hGAA编码序列(SEQ ID NO:9,其对应于作为包括信号肽编码序列的野生型hGAA编码序列的SEQ ID NO:8的82-2859位核苷酸)的基础上设计缺失了对应于SEQ ID NO:1的前8个氨基酸的密码子的核酸序列(Δ8)开始。除了野生型hGAA编码序列之外,我们还设计了编码所述Δ8截短的hGAA多肽的优化的核酸序列(SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11分别对应于hGAAco1和hGAAco2优化的编码序列),以排除可能的序列特异性影响。

[0253]

序列	WT	co1	co2
CAI[a]	0.84	0.94	0.77
GC 含量[b]	64.7	61.9	54.4
aORF 5'→3'[c]	2	3	0
aORF 3'→5'[d]	5	4	0
SA[e]	3	0	1
SD[f]	3	0	0
相对于 wt 的同一性%[g]		83.1	77.7
相对于 co1 的同一性%[h]			80.8
CpG 岛[i]	4	5	1

[0254]

[0255] 表1.优化的序列的描述。此表说明了两种hGAA优化序列与野生型的特征的比较。a)密码子适应指数和b)GC含量使用稀有密码子分析工具来计算(http://www.genscript.com)。c)和d)分别是在5'至3'(aORF 5'→3')和3'至5'(aORF 3'→5')链上计算的可选开放阅读框。e)和f)分别是使用拼接位点在线预测工具计算的受体(SA)和供体(SD)拼接位点(http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)。g)和h)分别是针对野生型(wt)和优化的co1序列计算的百分同一性。i)CpG岛使用MethDB在线工具计算(http://www.methdb.de/links.html)。CpG岛是长度超过100bp、GC含量>60%并且观察/预期比率>0.6的序列。

[0256] 将hGAA序列的1-27位氨基酸(对应于hGAA的天然信号肽,在这里被定义为sp1;其序列示出在SEQ ID NO:4中)用在这里被定义为sp2的人类α-1-抗胰蛋白酶(NP_000286.3)的序列的1-24位氨基酸(序列示出在SEQ ID NO:5中)代替。我们将编码截短的hGAA的构建物与它们的全尺寸版本平行地转染到人类肝细胞瘤细胞(Huh-7)中,并在48小时后测量释放在培养基中的hGAA的量(图1A)。对于野生型(hGAA)和密码子优化的(hGAAco2)序列两者来说,hGAA序列的Δ8缺失引起分泌水平显著的、50%的提高。在不同的密码子优化的序列(hGAAco1)上进行的相同的截短也以相同的程度提高了hGAA的分泌。

[0257] 为了证实信号肽之后的序列的变化可以提高hGAA的分泌,我们进一步截短了所述hGAA多肽。我们从hGAAco1构建物消除了对应于hGAA的前42个氨基酸的密码子(Δ42),并将它们用源自于胰凝乳蛋白酶原B1的信号肽(sp7;序列示出在SEQ ID NO:3中)代替。然后,我们将使用这种新的缺失的构建物获得的分泌的功效与使用与sp7信号肽融合的Δ8版本和带有sp1或sp7的全尺寸hGAAco1进行了比较。我们将这些构建物转染到Huh-7细胞中,并在转染后48小时测量培养基中的hGAA活性。正如预期的,我们可以在全尺寸hGAAco1转染后测量到hGAA活性(相对于GFP $p=0.055$),并且通过用sp7替换野生型信号肽,它的分泌提高2倍(相对于hGAAco1,$p=0.006$)。令人吃惊的是,与全尺寸序列相比,与sp7信号肽融合的Δ8和Δ42hGAA序列两者都显示出分泌的hGAA的2倍的提高(相对于sp7-hGAAco1分别为$p=0.0002$和0.0003,图1B)。

[0258] 合在一起,这些数据证实了hGAA序列的截短与高效信号肽相结合,能够在体外提

高所述蛋白质的分泌。此外,所述截短与本源序列的突变相比具有一个重要优势,因为它不产生大量的新抗原,这在治疗性产品的工程化改造中是一个优点。

[0259] 然后,我们在体内,在庞贝氏病小鼠模型中验证了这些发现。我们用AAV8载体注射GAA-/-小鼠(Raben等,J.Bio.Chem.1998),所述AAV8载体在源自于载脂蛋白B增强子和人类α-1-抗胰蛋白酶启动子的融合体的高强度肝特异性启动子(hAAT)的转录控制之下表达与sp7信号肽融合的全尺寸、Δ8或Δ42hGAAco1。在注射2E12 vg/kg的如上所述的载体后一个月,将小鼠放血并测量血清中的hGAA活性。用表达与sp7融合的全长hGAAco1的载体处理的小鼠,在血流中显示出hGAA水平的提高(相对于PBS,p=0.115)。令人吃惊的是,截短的hGAAΔ8和Δ42两者都引起血清中hGAA水平的显著提高(分别为p=0.014和0.013)。

[0260] 这些数据表明,hGAA的前端氨基酸的缺失引起血流中分泌的hGAA的水平显著提高。

[0261] 此外,将对应于艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶的1-25位氨基酸(sp6;SEQ ID NO:6)的另一个信号肽融合到hGAA的Δ8截短形式。与表达与sp1、sp2、sp6、sp7或sp8融合的优化的hGAA(hGAAco1)的质粒平行地,我们用表达GFP或野生型hGAA(hGAA;对应于SEQ ID NO:30的28-952位氨基酸残基的亲本多肽)的质粒转染肝细胞瘤细胞(Huh-7)。在转染后48小时,分析生长培养基中hGAA的存在。值得注意的是,这些构建物引起hGAA分泌水平显著高于在GFP转染的细胞所代表的阴性对照中观察到的分泌水平(图3)。

[0262] 然后,我们评估了如上所述用Δ8-hGAA处理的GAA-/-小鼠的心脏、隔膜和股四头肌中的糖原含量。值得注意的是,在用Δ8-hGAAco表达载体处理后,我们在组织中观察到高水平的hGAA(数据未示出),其与所有考虑的组织中糖原含量的显著降低相关(图4B-D)。具体来说,在心脏中(图4B),在用带有高效信号肽sp7和8的载体处理后测量到的糖原水平与在未患病的动物中观察到的水平不可区分(相对于WT分别为p=0.983和0.996)。重要的是,与PBS注射或用与sp1信号肽融合的hGAAco表达载体处理的GAA-/-动物相比,在用sp7和sp8载体两者处理后观察到的水平显著降低。

[0263] 我们还试验了使用我们的载体的肝转导是否诱导针对所述转入基因的体液应答。将小鼠用在肝特异性启动子的转录控制之下表达带有本源sp1信号肽的hGAAco1(co)或与sp2、sp7或sp8融合的Δ8-hGAAco1的AAV8载体静脉内注射。结果呈现在图5中。用在组成性启动子的转录控制之下表达Δ8-hGAAco1的AAV肌肉内注射的Gaa-/-显示出非常高水平的总IgG(~150μg/mL),而在肝中表达同一蛋白的载体总的来说显示出更低的体液应答水平。有趣的是,用表达sp1 hGAAco1(co)的载体注射的小鼠在两种剂量下显示出可检测的抗体水平,而用工程化的高分泌载体注射的小鼠具有不可检测的IgG水平。这些数据表明,转入基因在肝中的表达对于外周耐受的诱导来说是基础性的,它们还提供了下述指示,即通过与高效信号肽融合获得的高的循环hGAA水平,诱导针对所述蛋白质本身的体液应答的降低。

[0264] 将在小鼠研究中选出的性能最好的载体注射到两只非人类灵长动物(NHP,食蟹猴)中,以验证我们的载体的分泌效能和在肌肉中的摄取。我们用2E12 vg/kg的AAV8-hAAT-sp7-Δ8-hGAAco1注射两只猴。在注射后一个月,我们使用特异性抗hGAA抗体,通过蛋白质印迹测量了两只动物的血清中的hGAA水平。我们在两只猴中观察到大小与hGAA相符的清晰条带。这个条带在载体注射前12天获得的血清样品中不存在,从而证实了我们的检测方法

的特异性(图6A)。我们在注射后三个月处死动物并获取组织,以确认从肝脏分泌到血流中的hGAA是否被肌肉高效摄取。我们使用特异性针对hGAA的抗体对从两只猴的二头肌和隔膜获得的总裂解液进行蛋白质印迹。有趣的是,我们能够在2号动物中观察到清晰的条带,所述动物也在血流中显示出最高水平的hGAA(图6B)。在1号动物中,我们也能在两种被分析的肌肉中观察到分子量与hGAA相一致的较弱的条带。这些数据表明,在NHP中AAV8-hAAT-sp7-Δ8-hGAAco1载体高效转导肝。它们也证实了分泌在血流中的蛋白被高效摄取到肌肉中,并且这种摄取与在血液中测量到的hGAA水平相关。

[0265] 我们还确定了在小鼠研究中选出的最佳性能载体(AAV8-hAAT-sp7-Δ8-hGAAco1)在GSDIII小鼠模型中的效果。我们开发了糖原脱支酶(GDE)的敲除小鼠模型。这种模型重现了在患有III型糖原贮积病(GSDIII)的人类中观察到的疾病表型。具体来说,完全缺乏GDE活性的GDE-/-小鼠具有肌肉强度受损并在不同组织中积累糖原。有趣的是,它们也在肝脏中积累糖原,这在人类中也被观察到。在这里,我们试验了肝脏中sp7-Δ8-hGAA的过表达是否挽救在GDE-/-小鼠中观察到的糖原积累。我们用1E11或1E12 vg/小鼠的AAV8-hAAT-sp7-Δ8-hGAAco1注射GDE-/-小鼠。作为对照,我们用PBS平行地注射野生型(WT)和GDE-/-小鼠。在载体给药后三个月,将小鼠处死,并对肝脏中的糖原水平进行定量。结果报告在图7中。正如已经报道的(Pagliarani等和我们的模型),GDE-/-小鼠显示出肝脏中糖原积累的显著增加(p=1.3E-7),当与野生型动物相比时具有多5倍的糖原。令人吃惊的是,使用1E11和1E12 vg/小鼠的AAV8-hAAT-sp7-Δ8-hGAAco1载体的处理引起糖原含量的统计学显著的降低(分别为p=4.5E-5和1.4E-6)。重要的是,在用AAV8-hAAT-sp7-Δ8-hGAAco1载体注射的小鼠的肝脏中测量到的糖原水平与在野生型动物中测量到的水平不可区分,特别是在最高剂量下(对于1E11剂量组群来说p=0.053,对于1E12剂量组群来说为0.244)。

[0266] 我们在用不同版本的GAA(全都密码子优化过)转染的HuH7细胞的培养基和裂解物中进行了GAA活性的分析:1.包括本源sp1 GAA信号肽的本源GAA(co),2.含有异源sp7信号肽的工程化的GAA(sp7-co),和3.含有异源sp7信号肽然后缺失了不同数目的氨基酸的工程化的GAA(sp7-Δ8-co、sp7-Δ29-co、sp7-Δ42-co、sp7-Δ43-co、sp7-Δ47-co和sp7-Δ62-co,其中分别缺失了SEQ ID NO:1的前8、29、42、47和62个N-端氨基酸)。所述分析显示(图8),与工程化的未缺失的GAA(sp7-co)和本源GAA(co)两者相比,在用Δ8、Δ29、Δ42和Δ43GAA版本转染的细胞的培养基中GAA活性明显更高。相反,与其他工程化的GAA版本[缺失的(sp7-Δ8-co、sp7-Δ29-co、sp7-Δ42-co、sp7-Δ43-co)和未缺失的(sp7-co)]相比,在用Δ47和Δ62GAA版本转染的细胞的培养基中观察到明显更低的GAA活性。有趣的是,(图9)在生产性缺失(sp7-Δ8-co、sp7-Δ29-co、sp7-Δ42-co、sp7-Δ43-co)和未缺失的版本(sp7-co)之间细胞内GAA活性没有差异,表明它们都在细胞内高效地生产和加工。相反,对于sp7-Δ47-co和sp7-Δ62-co版本来说,细胞内GAA活性非常低,并且与所有其他工程化的版本[缺失的(sp7-Δ8-co、sp7-Δ29-co、sp7-Δ42-co、sp7-Δ43-co)和未缺失的(sp7-co)]相比明显更低。

[0267] 我们还在用不同版本的GAA(全都密码子优化过)转染的HuH7细胞的培养基和裂解物中进行了GAA活性的分析:1.包括本源sp1GAA信号肽的本源GAA(co),2.含有异源sp6或sp8信号肽的工程化的GAA(sp6-co、sp8-co),和3.含有异源sp6或sp8信号肽然后缺失了8个氨基酸的工程化的GAA(sp6-Δ8-co、sp8-Δ8-co)。所述分析显示(图10),与i.它们相应的

工程化的未缺失的GAA版本(sp6-co或sp8-co)和ii.本源GAA(co)相比,在用Δ8版本转染的细胞的培养基中GAA活性明显更高。有趣的是,在所有工程化的GAA版本(缺失和未缺失的两者)之间,细胞内GAA活性没有差异,表明它们都在细胞内高效地生产和加工(细胞裂解液图)。相反,与工程化的版本相比,使用本源GAA(co)时细胞内GAA活性明显更高,表明本源GAA主要保留在细胞内。

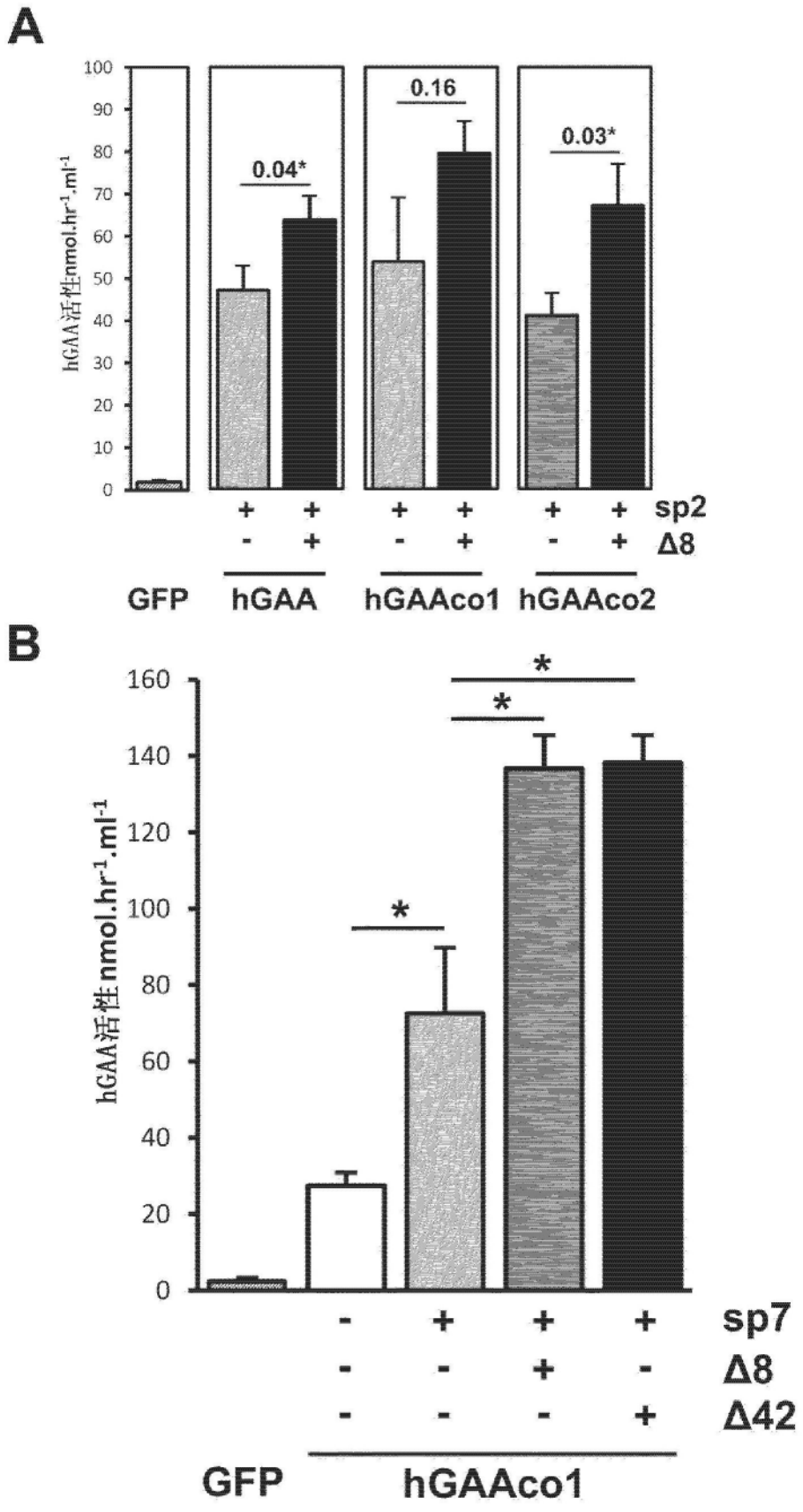

A
hGAA活性nmol.hr-1.ml-1
0.04*
0.16
0.03*
sp2
Δ8
GFP
hGAA
hGAAco1
hGAAco2
B
hGAA活性nmol.hr-1.ml-1
*
*
*
sp7
Δ8
Δ42
GFP
hGAAco1

图1

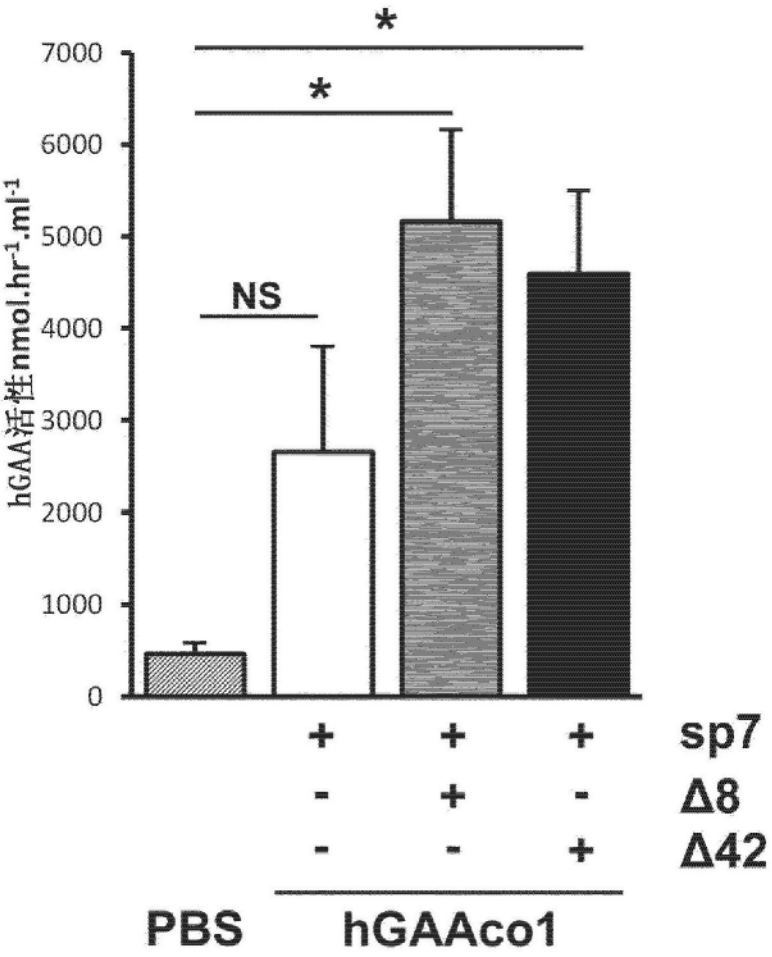

*
*
NS
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
hGAA活性nmol.hr-1.ml-1
+ + + sp7
- + - Δ8
- - + Δ42
PBS
hGAAco1

图2

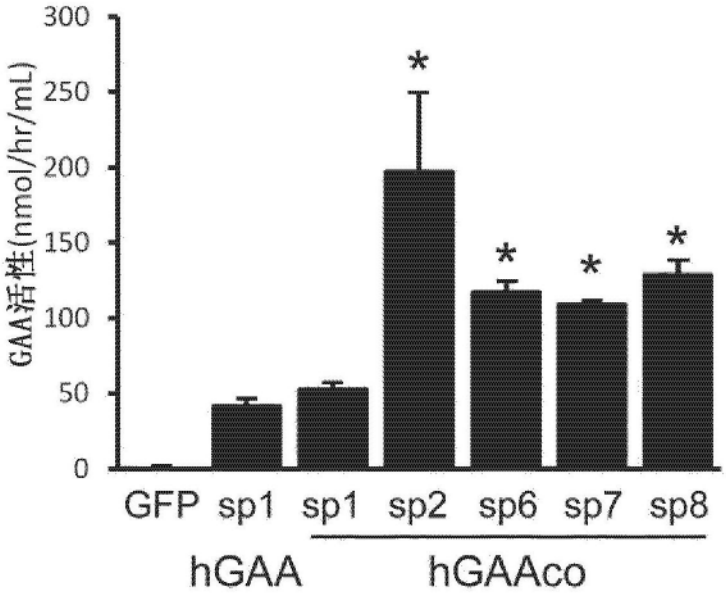

300
250
200
150
100
50
0
GAA活性(nmol/hr/mL)
*
*
*
*
GFP sp1 sp1 sp2 sp6 sp7 sp8
hGAA
hGAAco

图3

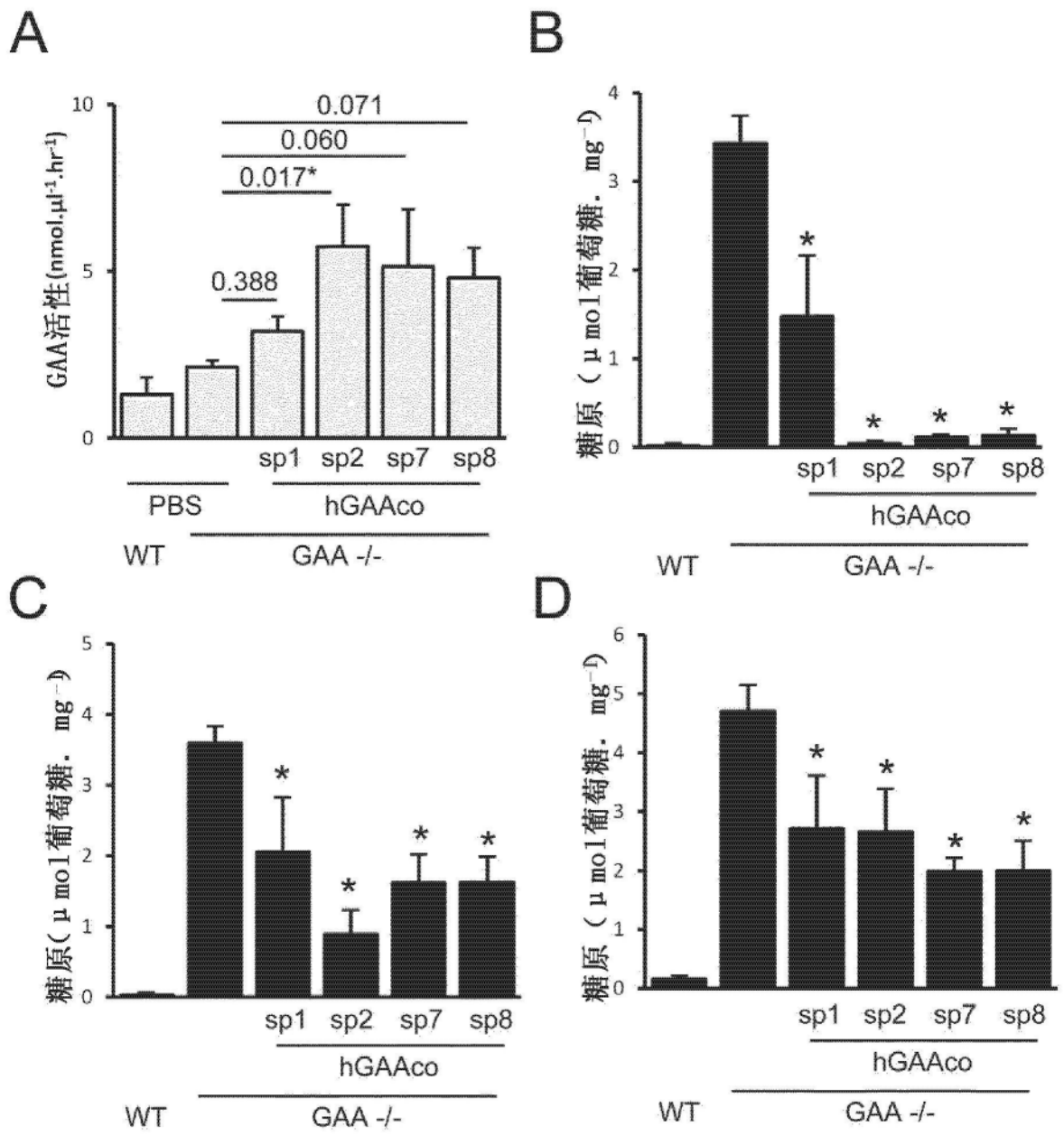

A
B
C
D
GAA活性(nmol.μl-1.hr-1)
糖原（μmol葡萄糖．mg-1）
0.071
0.060
0.017*
0.388
sp1
sp2
sp7
sp8
PBS
hGAAco
WT
GAA -/-

图4

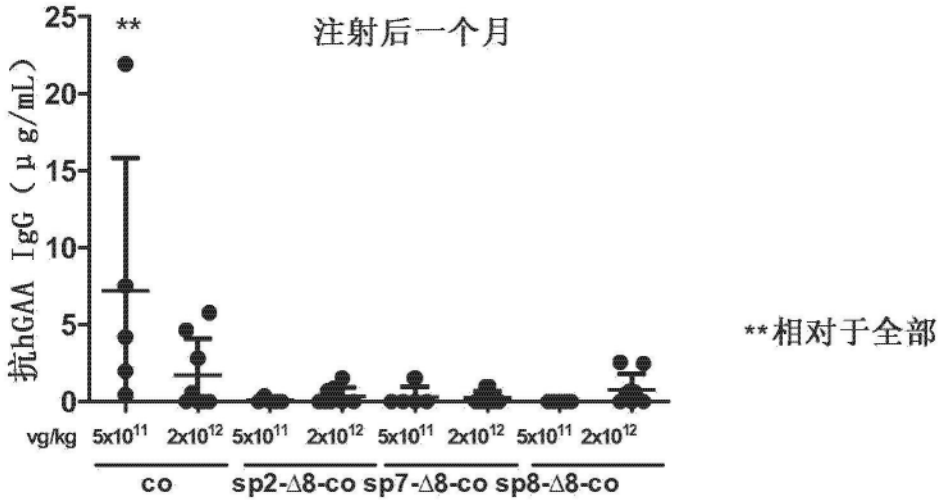

注射后一个月
**
抗hGAA IgG（μg/mL）
25
20
15
10
5
0
vg/kg
5x10^11
2x10^12
5x10^11
2x10^12
5x10^11
2x10^12
5x10^11
2x10^12
co
sp2-Δ8-co
sp7-Δ8-co
sp8-Δ8-co
**相对于全部

图5

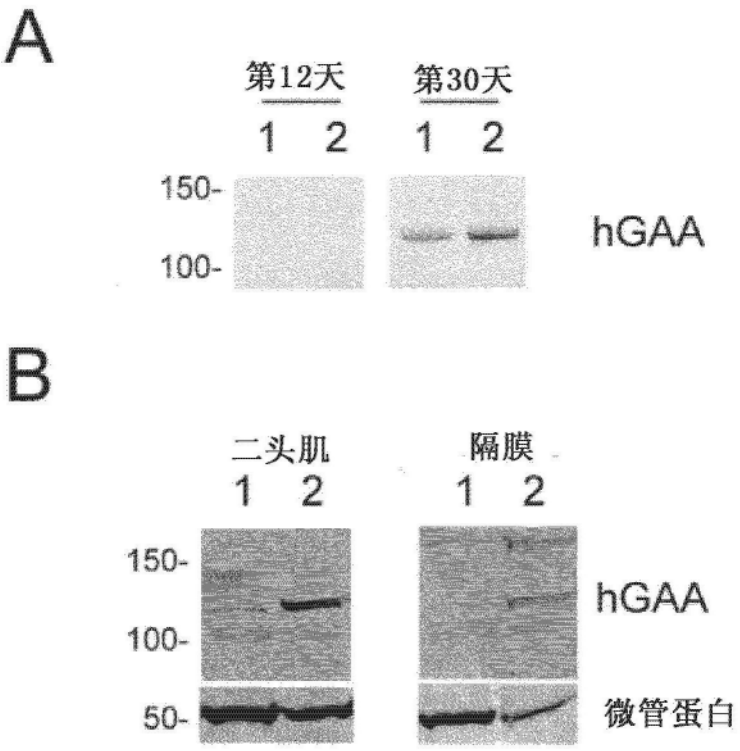

A
第12天
第30天
1 2 1 2
150-
100-
hGAA
B
二头肌
隔膜
1 2 1 2
150-
100-
50-
hGAA
微管蛋白

图6

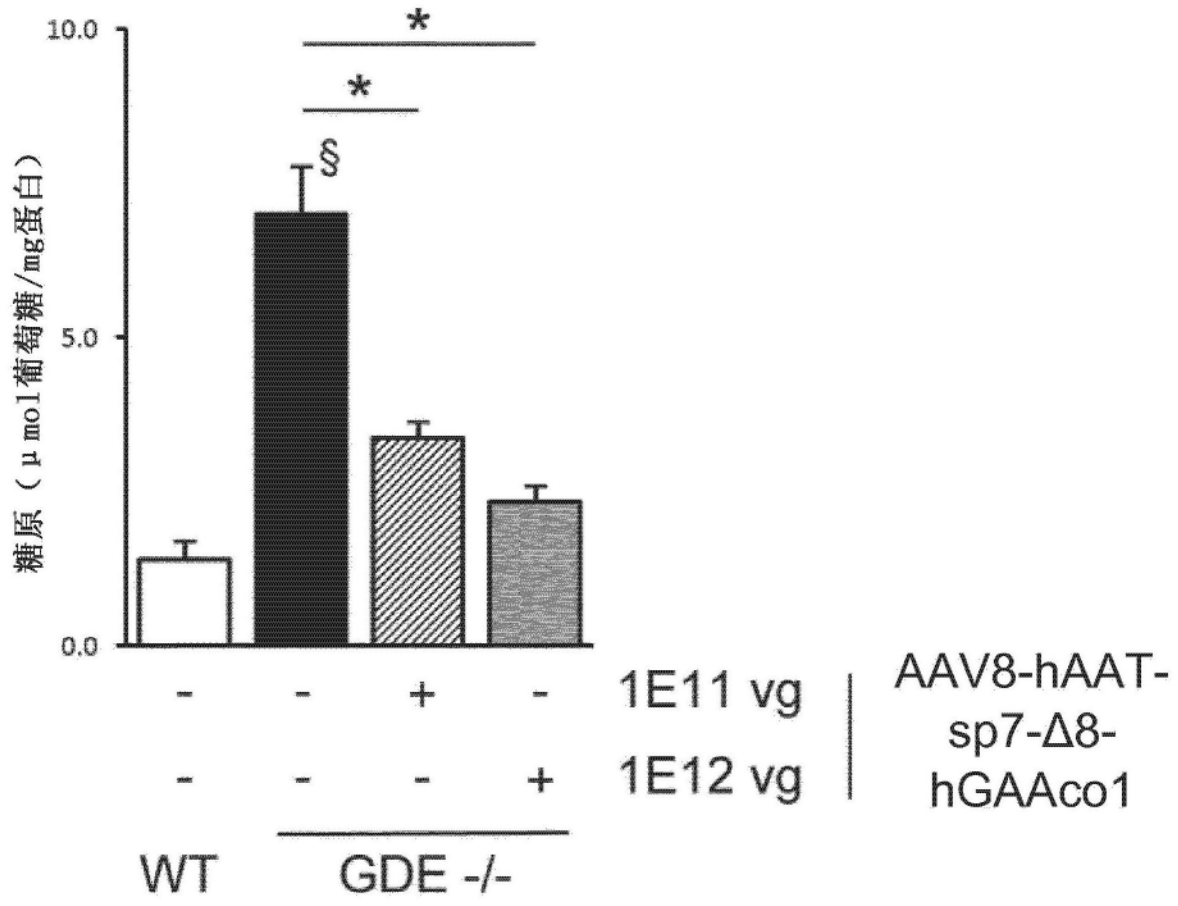
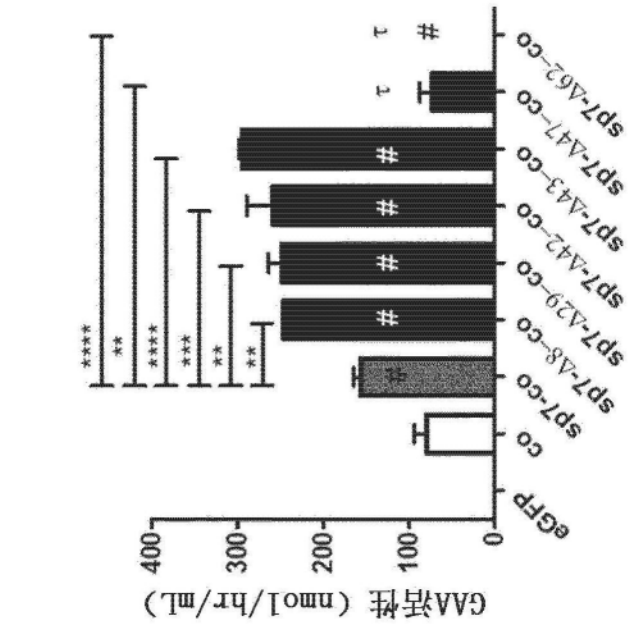

10.0
5.0
0.0
糖原（μmol葡萄糖/mg蛋白）
*
*
§
- - + - 1E11 vg
- - - + 1E12 vg
AAV8-hAAT-sp7-Δ8-hGAAco1
WT
GDE -/-

图7


B
GAA活性 (nmol/hr/mL)
0
100
200
300
400
eGFP
co
SPT-co
SPT-A8-co
SPT-A29-co
SPT-A42-co
SPT-A43-co
SPT-A47-co
SPT-A62-co
#
****
**
****
***
**
**

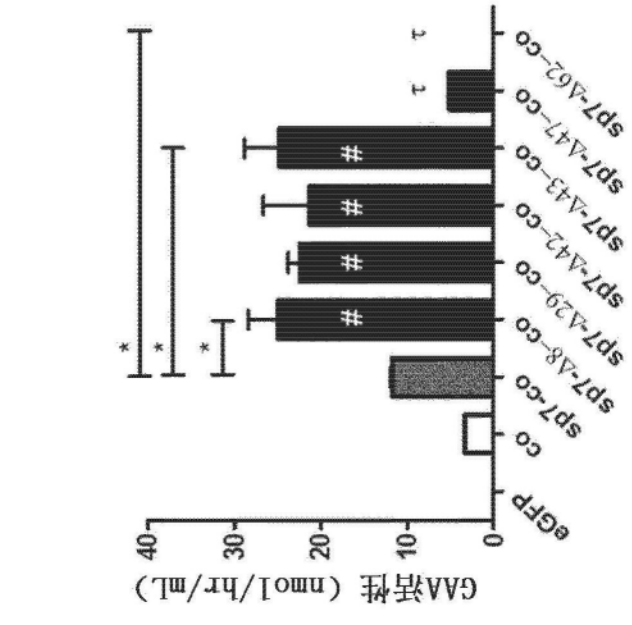

A
GAA活性 (nmol/hr/mL)
0
10
20
30
40
eGFP
co
SPT-co
SPT-A8-co
SPT-A29-co
SPT-A42-co
SPT-A43-co
SPT-A47-co
SPT-A62-co
#
*
*
*

图8

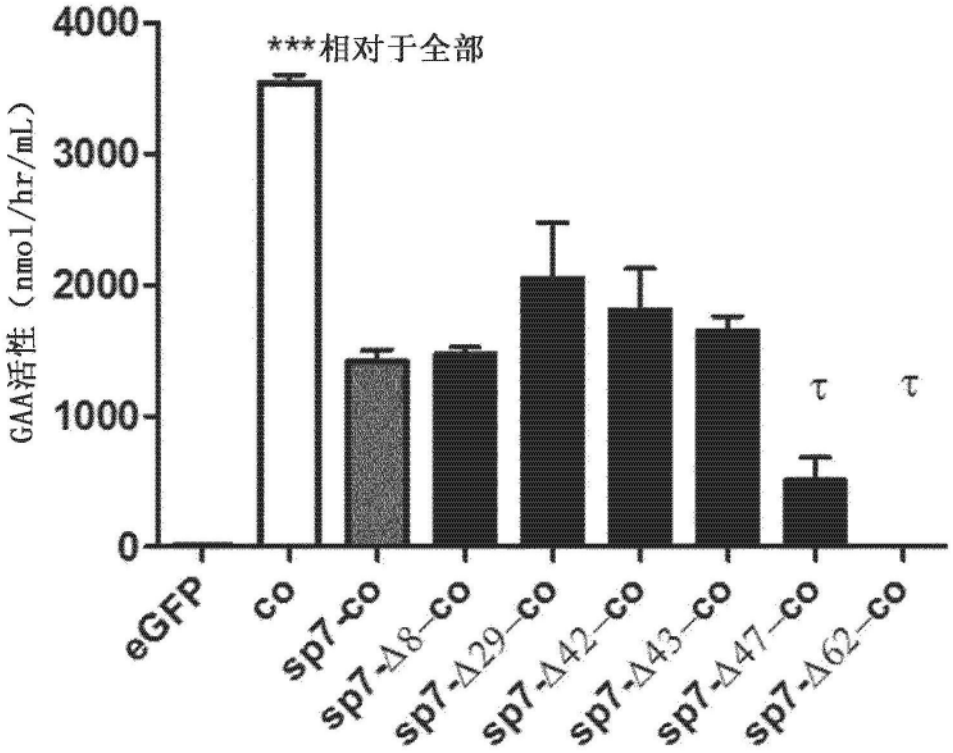

4000
3000
2000
1000
0
GAA活性（nmol/hr/mL）
***相对于全部
τ
τ
eGFP
co
sp7-co
sp7-Δ8-co
sp7-Δ29-co
sp7-Δ42-co
sp7-Δ43-co
sp7-Δ47-co
sp7-Δ62-co

图9

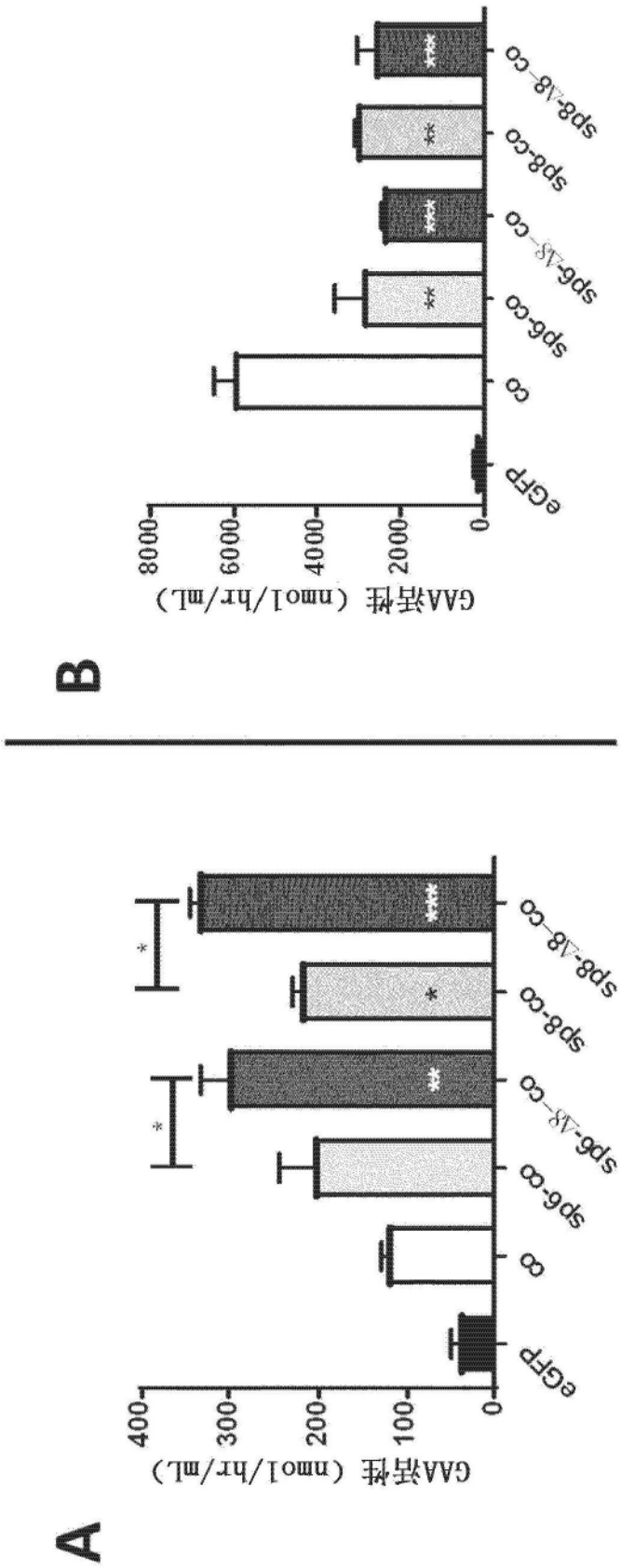

B
GAA活性 (nmol/hr/mL)
0
2000
4000
6000
8000
eGFP
co
spb-co
spb-Δx-co
spb-co
spb-Δ8-co
A
GAA活性 (nmol/hr/mL)
0
100
200
300
400
eGFP
co
spb-co
spb-Δx-co
spb-co
spb-Δ8-co

图10