



(21) 申请号 201780023705.7

C07K 14/47 (2006.01)

(22) 申请日 2017.04.14

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109121395 A

(43) 申请公布日 2019.01.01

(30) 优先权数据

62/323333 2016.04.15 US

62/433548 2016.12.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/027583 2017.04.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/180976 EN 2017.10.19

(73) 专利权人 全国儿童医院研究所

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 L. 罗迪诺-克拉帕 J.R. 门德尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

专利代理师 任晓华 周齐宏

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101896186 A, 2010.11.24

Eric R. Pozsgai等.Pre-Clinical

Efficacy Study of Beta-Sarcoglycan Gene Transfer.《Molecular Therapy》.2013,第21卷第S68页.

Eric R. Pozsgai等.Pre-Clinical

Efficacy Study of Beta-Sarcoglycan Gene Transfer.《Molecular Therapy》.2013,第21卷第S68页.

Baodong Sun等.Correction of multiple striated muscles in murine Pompe disease through adeno-associated virus-mediated gene therapy.《Mol Ther》.2008,第16卷(第8期),第1366-1371.

Simona Zanotti等.Opposing roles of miR-21 and miR-29 in the progression of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy.《Biochim Biophys Acta》.2015,第1852卷(第7期),第1451-1464页.

审查员 贺巧巧

权利要求书2页 说明书29页

序列表12页

(54) 发明名称

腺相关病毒载体递送 β -肌聚糖和微RNA-29以及肌营养不良症的治疗

(57) 摘要

本文描述了重组AAV载体,其包含包括 β -肌聚糖的多核苷酸序列,以及使用重组载体在患有肌营养不良症的哺乳动物受试者中减少或预防纤维化的方法。本文还描述了联合治疗,其包含给患有肌营养不良症的哺乳动物受试者施用表达 β -肌聚糖和miR-29c的AAV载体。

1. 一种重组AAV载体,其包含由SEQ ID NO:1组成的核苷酸序列。
2. 根据权利要求1所述的重组AAV载体,其中所述核苷酸序列编码SEQ ID NO:2中所列的多肽序列。
3. 根据权利要求1或2所述的重组AAV载体,其中所述载体属于血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13或AAV rh.74。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的重组AAV载体,其中所述载体属于血清型AAV rh.74。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的重组AAV载体,其中所述核苷酸序列可操作地与肌肉特异性控制元件连接。
6. 根据权利要求5所述的重组AAV载体,其中所述肌肉特异性控制元件为人类骨骼肌动蛋白基因元件、心肌肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子mef、肌肉肌酸激酶(MCK)、截短的MCK (tMCK)、肌球蛋白重链(MHC)、MHCK7、C5-12、鼠类肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白c基因元件、慢缩心肌肌钙蛋白c基因元件、慢缩肌钙蛋白I基因元件、缺氧诱导核因子、类固醇诱导元件或糖皮质激素响应元件(gre)。
7. 根据权利要求6所述的重组AAV载体,其中所述肌肉特异性控制元件为截短的MCK (tMCK)。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的重组AAV载体,其进一步包含由SEQ ID NO:6组成的核苷酸序列。
9. 根据权利要求6所述的重组AAV载体,其中所述肌肉特异性控制元件为MHCK7。
10. 根据权利要求1-9所述的重组AAV载体,其进一步包含由SEQ ID NO:4组成的核苷酸序列。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的重组AAV载体,其包含SEQ ID NO:3中所列的核苷酸序列。
12. 根据权利要求1-10中任一项所述的重组AAV载体,其包含SEQ ID NO:5中所列的核苷酸序列。
13. 一种组合物,包含根据权利要求1-12中任一项所述的重组AAV载体。
14. 根据权利要求1-12中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求13所述的组合物在制备用于治疗受试者的肌营养不良症的药物中的用途。
15. 根据权利要求1-12中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求13所述的组合物在制备用于增加患有肌营养不良症的受试者的肌肉力量和/或肌肉质量的药物中的用途。
16. 根据权利要求1-12中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求13所述的组合物在制备用于减少患有肌营养不良症的受试者中的纤维化的药物中的用途。
17. 根据权利要求1-12中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求13所述的组合物在制备用于减少患有肌营养不良症的受试者中的收缩诱导的损伤的药物中的用途。
18. 根据权利要求1-12中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求13所述的组合物在制备用于治疗受试者的 β -肌聚糖病的药物中的用途。
19. 根据权利要求14-18中任一项所述的用途,其中所述受试者患有肢带型肌营养不良症。
20. 根据权利要求14-19中任一项所述的用途,其中所述重组AAV载体或所述组合物经

配置用于通过肌肉内注射或静脉内注射施用。

21. 根据权利要求14-19中任一项所述的用途, 其中所述重组AAV载体或所述组合物经配置用于全身施用。

22. 根据权利要求21所述的用途, 其中所述重组AAV载体或所述组合物经配置用于通过注射、输注或灌輸的胃肠外施用。

23. 根据权利要求14-22中任一项所述的用途, 其中所述药物进一步包含第二种重组AAV载体, 所述第二种重组AAV载体包含miR-29核苷酸序列。

24. 一种根据权利要求1-12中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求13所述的组合物的用途, 所述重组AAV载体或所述组合物与包含包括miR29C的多聚核苷酸序列的第二种重组AAV载体组合地用于制备用于在需要减少纤维化的哺乳动物受试者中减少纤维化的药物。

25. 根据权利要求23或24所述的用途, 其中所述第二种重组载体包含SEQ ID NO:9中所列的核苷酸序列或SEQ ID NO:8中所列的核苷酸序列。

26. 一种根据权利要求1-12中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求13所述的组合物的用途, 所述重组AAV载体或所述组合物与包含包括miR-29c的多聚核苷酸序列的第二种重组AAV载体组合地用于制备用于在需要增加肌肉力量的哺乳动物受试者中增加肌肉力量的药物。

27. 根据权利要求26所述的用途, 其中所述第二种重组载体包含SEQ ID NO:9中所列的核苷酸序列或SEQ ID NO:8中所列的核苷酸序列。

28. 根据权利要求23-27中任一项所述的用途, 其中所述受试者患有肌营养不良症。

29. 一种根据权利要求1-12中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求13所述的组合物的用途, 所述重组AAV载体或所述组合物与包含包括miR-29c的多聚核苷酸序列的第二种重组AAV载体组合地用于制备用于在哺乳动物受试者中治疗肌营养不良症的药物。

30. 根据权利要求29所述的用途, 其中所述第二种重组载体包含SEQ ID NO:9中所列的核苷酸序列或SEQ ID NO:8中所列的核苷酸序列。

31. 根据权利要求29或30所述的用途, 其中所述肌营养不良症为肢带型肌营养不良症。

腺相关病毒载体递送 β -肌聚糖和微RNA-29以及肌营养不良症的治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年4月15日提交的美国临时申请第62/323,333号和于2016年12月13日提交的美国临时申请第62/433,548号的优先权权益,两者均通过引用整体并入本文。

[0003] 通过引用并入电子递交的材料

[0004] 本申请含有计算机可读形式的序列表作为本公开的单独部分,其通过引用整体并入本文并确认如下:文件名称:50622A_Seqlisting.txt;大小:21,466字节,产生于:2017年4月13日。

技术领域

[0005] 本文描述了像表达 β -肌聚糖的AAV载体这样的治疗载体和使用这些载体在患有肌营养不良症的受试者中减少和预防纤维化的方法。本发明还提供组合基因治疗方法,其包含施用表达 β -肌聚糖的第一种AAV载体和表达miR-29的第二种AAV载体,以便在患有肌营养不良症的患者中减少和预防纤维化。

背景技术

[0006] 2E型肢带型肌营养不良症(LGMD)(LGMD2E)是一种常染色体隐性疾病,由于对 β -肌聚糖进行编码的基因(SGCB)突变引起功能蛋白损失而导致。1LGMD2E在美国代表相对常见和严重形式的LGMD,在全世界的发病率为1/200,000至1/350,000。(2) β -肌聚糖的缺失引起具有慢性肌肉纤维损失的进行性营养障碍、发炎、脂肪替代以及纤维化,全部都会导致肌肉力量和功能的恶化。(3,4)作为一个复合物,大小在35kD与50kD之间的肌聚糖(α -、 β -、 γ -、 δ -)(5)全都是跨膜蛋白,其为肌膜提供稳定性,从而在肌肉活动过程中提供对机械应力的保护。(3)LGMD2E中损失 β -肌聚糖通常会导致其它肌聚糖蛋白不同程度的伴随损失,引起肌肉膜的脆性,导致肌纤维损失。1尽管LGMD2E的一系列临床表型有所不同,但是通常在10岁之前诊断到,并且步行移动的损失发生在青少年中后期。1,6,7患者具有升高的血清肌酸激酶(CK)、远端肌肉衰弱、由于步行移动的底部损失和进行性损失而引起的难度。在多至百分之五十的情况下涉及心脏。

[0007] 腺相关病毒(AAV)是一种复制缺陷型细小病毒,其单链DNA基因组长度为约4.7kb,包括两个145个核苷酸的末端反向重复(ITR)。AAV具有多种血清型。各AAV血清型的基因组的核苷酸序列是已知的。例如,Genbank登录号NC_002077中提供了AAV-1的完全基因组;Genbank登录号NC_001401和Srivastava等人,《病毒学杂志(J.Virol.)》,45:555-564{1983}中提供了AAV-2的完全基因组;Genbank登录号NC_1829中提供了AAV-3的完全基因组;Genbank登录号NC_001829中提供了AAV-4的完全基因组;Genbank登录号AF085716中提供了AAV-5基因组;Genbank登录号NC_001862中提供了AAV-6的完全基因组;Genbank登录号AX753246和AX753249中分别提供了至少部分AAV-7和AAV-8基因组;Gao等人,《病毒学杂志

(J.Virol.)》,78:6381-6388 (2004) 中提供了AAV-9基因组;《分子治疗 (Mol. Ther.)》,13 (1):67-76 (2006) 中提供了AAV-10基因组;《病毒学 (Virology)》,330 (2):375-383 (2004) 中提供了AAV-11基因组。参见美国专利9,434,928中提供了AAVrh.74基因组的序列,其通过引用并入本文。AAV的ITR内包含引导病毒DNA复制(rep)、衣壳化/包裹以及宿主细胞染色体整合的顺式作用序列。三个AAV启动子(针对其相对图谱位置称作p5、p19、以及p40)驱动对rep基因和cap基因进行编码的两个AAV内部开放阅读框的表达。两个rep启动子(p5和p19)与单独AAV内含子(在核苷酸2107和2227处)的差异剪接结合导致由rep基因产生四种rep蛋白(rep78、rep68、rep52、以及rep40)。Rep蛋白具有多种酶的特性,其最终会引起病毒基因组的复制。cap基因由p40启动子表达,并且它对三种衣壳蛋白VP1、VP2、以及VP3进行编码。可替代的剪接和非共有序列翻译起始位点引起三种相关衣壳蛋白的产生。一个单独共有序列的聚腺苷酸化位点位于AAV基因组的图谱位置95。在Muzyczka,《当今微生物学和免疫学主题 (Current Topics in Microbiology and Immunology)》,158:97-129 (1992) 中对AAV的生活周期和遗传学进行了综述。

[0008] AAV具有独特的特征,使得其成为在(例如)基因治疗中将外源DNA递送至细胞的有吸引力的载体。培养物中细胞的AAV感染是非细胞致病性的,人类和其它动物的自然感染是隐性的和无症状的。此外,AAV感染许多哺乳动物细胞,可能会靶向许多不同的体内组织。此外,AAV缓慢转导分裂细胞和非分裂细胞,并且可基本上在那些细胞的生存期内作为转录活性的核附加体(染色体外元件)存在。AAV原病毒的基因组作为克隆DNA插入质粒中,其使得重组基因组的构建成为可能。另外,由于引导AAV复制和基因组衣壳化的信号包含在AAV基因组的ITR中,因此可将内部大约4.3kb的基因组(对复制和结构衣壳蛋白进行编码,rep-cap)的一部分或全部替代为外源DNA。为了产生AAV载体,可以反式形式提供rep蛋白和cap蛋白。AAV的另一个重要特征是它是非常稳定且猛烈的病毒。它容易承受用于将腺病毒失活的条件(56℃至65℃,进行数小时),使得低温储存AAV不那么重要。甚至可将AAV冻干。最后,经AAV感染的细胞对于二次感染不具有抗性。

[0009] 多个研究已经显示在肌肉中存在长期(>1.5年)重组AAV介导的蛋白表达。参见Clark等人,《人类基因治疗 (Hum Gene Ther)》,8:659-669 (1997);Kessler等人,《美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA)》,93:14082-14087 (1996);以及Xiao等人,《病毒学杂志 (J Virol)》,70:8098-8108 (1996)。还参见Chao等人,《分子治疗 (Mol Ther)》,2:619-623 (2000)和Chao等人,《分子治疗 (Mol Ther)》,4:217-222 (2001)。此外,由于肌肉是高度血管化的,因此重组AAV转导如Herzog等人,《美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA)》,94:5804-5809 (1997)和Murphy等人,《美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA)》,94:13921-13926 (1997)所述在肌肉内注射之后在体循环中引起转基因产物的出现。此外,Lewis等人,《病毒学杂志 (J Virol)》,76:8769-8775 (2002)证明,骨骼肌纤维具有对于正确的抗体的糖基化、折叠、以及分泌必要的细胞因子,表明肌肉能够进行所分泌的蛋白治疗剂的稳定表达。

[0010] 针对LGMD2E的疗法的一种新兴的形式是病毒介导的基因递送,使得受伤肌肉恢复野生型蛋白,从而引起肌肉功能的恢复。考虑到一部分患者可能会产生心肌病,(8,9,10,13)在这些患者的长期护理中必须考虑这一点。在之前的报道中,对缺失Sgcb的小鼠进行了充分表征。Araishi等人³开发了β-肌聚糖缺陷型小鼠,其具有所有肌聚糖以及肌长蛋白的

伴随损失,至少保留少量分区蛋白、肌营养不良蛋白聚糖以及肌营养不良蛋白,从而再现LGMD2E中观察到的临床图像。该动物模型中的组织学变化也是临床对应部分的一种原型,包括骨骼肌纤维化突出物。(14) Dressman等人(25)用rAAV2.CMV.SGCB注射腹部横肌。表达持续21个月,并保护肌肉纤维免于坏死复发。还描述了使用自补AAV来增强转基因表达、16使用肌肉特异性启动子来更好地靶向骨骼肌(20,26)以及人类 β -肌聚糖基因(hSGCB)的优化。

[0011] 患有LGMD和其它肌营养不良症的患者中的功能改进需要基因的恢复和纤维化的减少。需要可以与基因恢复方法结合以更有效地治疗LGMD和其它肌营养不良症的减少纤维化的方法。

发明内容

[0012] 本文描述了表达 β -肌聚糖基因的基因治疗载体(例如AAV),以及将 β -肌聚糖递送至肌肉以便在患有肌营养不良症的哺乳动物受试者中减少和/或预防纤维化、并且/或者增加肌肉力量、并且/或者治疗 β -肌聚糖病的方法。

[0013] 此外,本发明提供使用基因治疗载体递送 β -肌聚糖以解决LGMD2E中观察到的基因缺陷、并使用基因治疗载体递送miR-29以进一步抑制纤维化的联合治疗和方法。

[0014] 在一个方面,本文描述了一种重组AAV载体,其包含对 β -肌聚糖进行编码的多聚核苷酸序列。在一些实施例中,对 β -肌聚糖进行编码的多聚核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1中所列核苷酸序列具有(例如)至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、或89%、更典型90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的序列,并对保留 β -肌聚糖活性的蛋白进行编码。在一些实施例中,对 β -肌聚糖进行编码的多聚核苷酸序列包含SEQ ID NO:1中所列核苷酸序列。在一些实施例中,对 β -肌聚糖进行编码的多聚核苷酸序列由SEQ ID NO:1中所列核苷酸序列组成。

[0015] 在另一个方面,本文所述的重组AAV载体包含对与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、或89%、更典型至少90%、91%、92%、93%、或94%以及更典型至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的 β -肌聚糖进行编码的多聚核苷酸序列,并且所述蛋白会保留 β -肌聚糖的活性。

[0016] 在另一个方面,本文描述了一种重组AAV载体,其包含对功能性 β -肌聚糖进行编码的多聚核苷酸序列,其包含在严格条件下与SEQ ID NO:1核酸序列或其互补序列杂交的核苷酸序列。

[0017] 术语“严格”用于指本领域通常所理解严格的条件。杂交的严格性主要由温度、离子强度、以及像甲酰胺这样的变性剂的浓度确定。用于进行杂交和洗涤的严格条件的实例是65至68℃下0.015M的氯化钠、0.0015M的柠檬酸钠,或者42℃下0.015M的氯化钠、0.0015M的柠檬酸钠、以及50%的甲酰胺。参见Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(分子Cloning:A Laboratory Manual)》,第2版,冷泉港实验室,(纽约冷泉港,1989)。还可使用更严格的条件(例如更高的温度、更低的离子强度、更高的甲酰胺、或其它变性剂),但是杂交速率会受到影响。在其中涉及脱氧寡核苷酸杂交的情况下,另外的示例性严格杂交条件包

括在37℃ (对于14碱基寡核苷酸)、48℃ (对于17碱基寡核苷酸)、55℃ (对于20碱基寡核苷酸)、以及60℃ (对于23碱基寡核苷酸)下在6x SSC 0.05%焦磷酸钠中洗涤。

[0018] 为了减少非特异性杂交和/或背景杂交的目的,杂交和洗涤缓冲液中可包括其它试剂。0.1%牛血清白蛋白、0.1%聚乙烯吡咯烷酮、0.1%焦磷酸钠、0.1%十二烷基硫酸钠、NaDodSO₄、(SDS)、聚蔗糖、邓哈特溶液、超声处理的鲑鱼精子DNA (或者其它非互补DNA)、以及硫酸葡聚糖是一些实例,尽管还可使用其它合适的试剂。可对这些添加剂的浓度和类型进行改变而不会显著影响杂交条件的严格性。杂交试验通常在pH 6.8至7.4下进行,但是,在典型的离子强度条件下,杂交速率几乎不受pH的影响。参见Anderson等人,《核酸杂交:实际方法 (Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach)》,第4章,IRLPRESS Limited (英国牛津)。本领域技术人员可对杂交条件进行调节,以便适应这些变量,并容许不同序列相互关系的DNA形成杂交体。

[0019] 在另一个方面,本文所述的重组AAV载体可以可操作地与肌肉特异性控制元件连接。例如,肌肉特异性控制元件是人类骨骼肌动蛋白基因元件、心肌肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子MEF、肌肉肌酸激酶 (MCK)、tMCK (截短MCK)、肌球蛋白重链 (MHC)、MHCK7 (杂交形式的MHC和MCK)、C5-12 (合成启动子)、鼠类肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白C基因元件、慢缩心肌肌钙蛋白C基因元件、慢缩肌钙蛋白I基因元件、缺氧诱导核因子、类固醇诱导元件或糖皮质激素响应元件 (GRE)。

[0020] 在一些实施例中,肌肉特异性启动子为MHCK7 (SEQ ID NO:4)。本文所述的一种示例性rAAV是pAAV.MHCK7.hSCGB,其包含SEQ ID NO:3核苷酸序列;其中MCHK7启动子跨越核苷酸130-921,SV40嵌合内含子跨越核苷酸931-1078,β-肌聚糖序列跨越核苷酸1091-2047,并且聚A跨越核苷酸2054-2106。

[0021] 在一些实施例中,肌肉特异性启动子为tMCK (SEQ ID NO:6)。本文所述的一种示例性rAAV是pAAV.tMCK.hSCGB,其包含SEQ ID NO:5核苷酸序列;其中tMCK启动子跨越核苷酸141-854,SV40嵌合内含子跨越核苷酸886-1018,β-肌聚糖序列跨越核苷酸1058-2014,并且聚A跨越核苷酸2021-2073。

[0022] 所述AAV可以是任何血清型,例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13以及AAVrh.74。在 (例如) WO 01/83692中公开了假型rAAV的产生。还考虑其它类型的rAAV变体,例如衣壳突变的rAAV。参见 (例如) Marsic等人,《分子治疗 (Molecular Therapy)》,22 (11):1900-1909 (2014)。

[0023] 还考虑包含本文所述的任何rAAV载体的组合物。

[0024] 还提供了产生重组AAV载体颗粒的方法,其包含培养经本文所述的任何重组AAV载体转染的细胞,并从转染细胞的上清液回收重组AAV颗粒。还考虑包含本文所述的任何重组AAV载体的病毒颗粒。

[0025] 还提供了在有必要需要的哺乳动物受试者中减少纤维化的方法。在这方面,所述方法包含给哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文所述的AAV载体 (或者包含本文所述的AAV载体的组合物)。在一些实施例中,哺乳动物受试者患有肌营养不良症。在一些实施例中,施用本文所述的AAV载体 (或者包含本文所述的AAV载体的组合物) 减少受试者的骨骼肌中或心肌中的纤维化。这些方法可进一步包含施用第二重组AAV载体的步骤,所述第二重组AAV载体包含多聚核苷酸序列,其包含miR29C。

[0026] 如本文所使用的术语“肌营养不良症”是指一种其中力量和肌肉体积缓慢衰减的疾病。肌营养不良症疾病的非限制性实例可包括贝克肌营养不良症、胫骨肌营养不良症、杜氏肌营养不良症、Emery-Dreifuss肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、肌聚糖病、先天性肌营养不良症(例如由于部分LAMA2缺陷而导致的先天性肌营养不良症)、分区蛋白缺陷型先天性肌营养不良症、1D型先天性肌营养不良症、Fukuyama先天性肌营养不良症、1A型肢带型肌营养不良症、2A型肢带型肌营养不良症、2B型肢带型肌营养不良症、2C型肢带型肌营养不良症、2D型肢带型肌营养不良症、2E型肢带型肌营养不良症、2F型肢带型肌营养不良症、2G型肢带型肌营养不良症、2H型肢带型肌营养不良症、2I型肢带型肌营养不良症、2J型肢带型肌营养不良症、2K型肢带型肌营养不良症、IC型肢带型肌营养不良症、具有单纯性大疱性表皮松解的强直脊柱性肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症、Ullrich先天性肌营养不良症、以及Ullrich scleroatonic肌营养不良症。在一些实施例中,所述受试者患有肢带型肌营养不良症。在一些实施例中,所述受试者患有2E型肢带型肌营养不良症(LGMD2E)。

[0027] 如本文所使用的术语“纤维化”是指胞外基质(ECM)组分的过度沉积或失控沉积和受伤组织(包括骨骼肌、心肌、肝脏、肺、肾脏以及胰腺)中的异常修复过程。所沉积的ECM组分包括胶原蛋白(例如胶原蛋白1、胶原蛋白2或胶原蛋白3)和纤连蛋白。

[0028] 在另一个方面,本文描述了在哺乳动物受试者中增加肌肉力量和/或肌肉质量的方法,所述方法包含给哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文所述的AAV载体(或者包含本文所述的AAV载体的组合物)。

[0029] 在本发明的任一个方法中,所述受试者可患有肌营养不良症,例如肢带型肌营养不良症或者任何其它肌营养不良蛋白相关的肌营养不良症。

[0030] 还提供了在哺乳动物受试者中治疗肌营养不良症的方法,其包含给哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文所述的AAV载体(或者包含本文所述的AAV载体的组合物)。在一些实施例中,所述肌营养不良症为肢带型肌营养不良症。本文所述的任何方法可进一步包含施用包含包括miR29C的多聚核苷酸序列的第二种重组AAV载体的步骤。

[0031] 还考虑联合治疗。在这方面,此处所述的以上任何方法可进一步包含施用包含包括miR29C的多聚核苷酸序列的第二种重组AAV载体。在一些实施例中,包含miR29C的多聚核苷酸可操作地与肌肉特异性控制元件连接。例如,肌肉特异性控制元件是人类骨骼肌动蛋白基因元件、心肌肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子MEF、肌肉肌酸激酶(MCK)、tMCK(截短的MCK)、肌球蛋白重链(MHC)、MHCK7(杂交形式的MHC和MCK)、C5-12(合成启动子)、鼠类肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白C基因元件、慢缩心肌肌钙蛋白C基因元件、慢缩肌钙蛋白I基因元件、缺氧诱导核因子、类固醇诱导元件或糖皮质激素响应元件(GRE)。在一些实施例中,第二种重组载体如美国临时申请第62/323,163号(其公开内容通过引用整体并入本文)所述包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:8中所列的多聚核苷酸序列。

[0032] 在其中给哺乳动物受试者施用表达 β -肌聚糖的rAAV载体和表达miR29c的rAAV载体的本文所述的联合治疗方法中,rAAV载体可同时施用,或者连续施用,在施用表达miR29c的rAAV之前或之后立即施用表达 β -肌聚糖的rAAV载体。可替代地,在施用表达miR-29的rAAV之后约1至24小时(例如1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小

时、21小时、22小时、23小时或24小时)内施用表达 β -肌聚糖的AAV载体,或者进行本发明的方法,其中在施用表达miR-29的rAAV之前约1至24小时(例如1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时或24小时)内施用表达 β -肌聚糖的AAV载体。在一些实施例中,在施用表达miR-29的rAAV之后约1至5小时(例如1小时、2小时、3小时、4小时或5小时)内施用表达 β -肌聚糖的AAV载体,或者进行本发明的方法,其中在施用表达miR-29c的rAAV之前约1至5小时(例如1小时、2小时、3小时、4小时或5小时)内施用表达 β -肌聚糖的AAV载体。

[0033] 在本发明的任一种方法中,通过肌肉内注射或静脉内注射施用rAAV。此外,在本发明的任一种方法中,rAAV被系统性施用,例如通过注射、输注或灌輸进行肠道外施用。

[0034] 本发明的组合物被配制为用于肌肉内注射或静脉内注射。此外,本发明的组合物被配制为用于系统性施用,例如通过注射、输注或灌輸进行肠道外施用。

[0035] 此外,任一个组合物均被配制为用于给患有肌营养不良症(例如肢带型肌营养不良症或任何其它肌营养不良蛋白相关的肌营养不良症)的受试者施用。在一些实施例中,所述组合物可进一步包含第二种重组AAV载体,其包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:8中所列的多聚核苷酸序列。

[0036] 在本发明的任一种用途中,药物被配制为用于肌肉内注射或静脉内注射。此外,在本发明的任一种用途中,药物被配制为用于系统性施用,例如通过注射、输注或灌輸进行肠道外施用。此外,任一种药物可被制备为用于给患有肌营养不良症(例如肢带型肌营养不良症或任何其它肌营养不良蛋白相关的肌营养不良症)的受试者施用。在一些实施例中,药物可进一步包含第二种重组AAV载体,其包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:8中所列的多聚核苷酸序列。

[0037] 以上段落并非旨在对本发明的每个方面进行界定,在其它部分(例如具体实施方式)中描述了更多的方面。整个文件旨在关联为统一的公开物,并应理解,本文所述特征的所有组合均被考虑,即使各特征的组合在本文件的同一句子、段落、或部分中未一起出现。作为一个附加方面,本发明包括以任何方式比以上特定段落所定义的变型的范围更窄的本发明的所有实施例。例如,在本发明的某些方面作为一类描述时,应理解该类的每个成员单独地是本发明的一个方面。

具体实施方式

[0038] 本公开基于施用表达 β -肌聚糖的包含多聚核苷酸的AAV载体会在肢带型肌营养不良症动物模型中引起肌肉纤维化的减少或完全反转这一发现。如各实例所示,施用本文所述的AAV载体引起营养不良特性的反转,包括更少的退化纤维、减少的炎症以及通过增加力的产生防止偏心收缩从而改进功能恢复。

[0039] 如本文所使用,术语“AAV”是腺相关病毒的标准缩写。腺相关病毒是一种单链DNA细小病毒,其仅在其中某些功能由共感染(co-infecting)辅助病毒提供的细胞中生长。目前有13种AAV血清型已经得到表征。AAV的基本信息和综述可在(例如)Carter,1989,《细小病毒手册(Handbook of Parvoviruses)》,第1卷,第169-228页,和Berns,1990,《病毒学(Virology)》,第1743-1764页,Raven出版社,(纽约)中找到。然而,完全可以预期这些相同

的原理可应用于其它AAV血清型,这是由于众所周知各种血清型在结构和功能上均紧密相关,甚至在基因水平下亦是如此。(参见例如,Blacklowe,《细小病毒和人类疾病(Parvoviruses and Human Disease)》,1988,第165-174页,J.R.Pattison编辑;和Rose,《综合病毒学(Comprehensive Virology)》3:1-61(1974))。例如,所有AAV血清型均明显地展现出非常类似的由同源rep基因介导的复制特性;并且全部具有三种相关的衣壳蛋白,例如在AAV2中表达的那些。相关性程度还进一步由异源双链体分析所表明,异源双链体分析显示各血清型之间沿基因组长度具有广泛的交叉杂交;并且在末端处存在相似的自结合(self-annealing)片段,其对应于“末端反向重复序列”(ITR)。类似的感染性模式还表明每种血清型的复制功能处于类似的调控下。

[0040] 如本文所使用的“AAV载体”是指包含一种或多种目标多聚核苷酸(或者转基因)的载体,所述目标多聚核苷酸(或者转基因)位于AAV末端重复序列(ITR)的侧翼。当在已经被对rep和cap基因产物进行编码和表达的载体转染的宿主细胞中存在时,这种AAV载体可被复制并包装到传染性的病毒颗粒中。

[0041] “AAV病毒粒子”或“AAV病毒颗粒”或“AAV载体颗粒”是指由至少一种AAV衣壳蛋白和衣壳化的多聚核苷酸AAV载体构成的病毒颗粒。如果所述颗粒包含异源多聚核苷酸(即野生型AAV基因组之外的多聚核苷酸,例如给哺乳动物细胞递送的转基因),那么它通常称作“AAV载体颗粒”或简单称作“AAV载体”。因此,AAV载体颗粒的产生必然包括产生AAV载体,照此在AAV载体颗粒中包含载体。

[0042] AAV

[0043] 本发明的重组AAV基因组包含本发明的核酸分子和核酸分子侧翼的一种或多种AAV ITR。rAAV基因组中的AAV DNA可来自可产生重组病毒的任何AAV血清型,包括(但不限于)AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13以及AAVrh.74。在(例如)WO 01/83692中公开了假型rAAV的产生。还考虑其它类型的rAAV变体,例如具有衣壳突变的rAAV。参见(例如)Marsic等人,《分子治疗(Molecular Therapy)》,22(11):1900-1909(2014)。如以上背景技术部分所述,各种AAV血清型的基因组的核苷酸序列在本领域中是已知的。为了促进骨骼肌特异性的表达,可使用AAV1、AAV5、AAV6、AAV8或AAV9。

[0044] 本发明的DNA质粒包含rAAV基因组。DNA质粒被转移至可被AAV辅助病毒(例如腺病毒、缺失E1的腺病毒或疱疹病毒)感染的细胞,从而将rAAV基因组组装到传染性的病毒颗粒中。其中向细胞提供待包装的AAV基因组、rep和cap基因、以及辅助病毒功能体的产生rAAV颗粒的技术是本领域中的标准。rAAV的产生需要单独细胞(本文中称作包装细胞)中存在以下组分:rAAV基因组、从rAAV基因组(即不是在rAAV基因组中)分离的AAV rep和cap基因、以及辅助病毒功能体。AAV rep和cap基因可来自可产生重组病毒的任何AAV血清型,并且可来自与rAAV基因组ITR不同的AAV血清型,包括(但不限于)AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13以及AAVrh.74。在(例如)WO 01/83692中公开了假型rAAV的产生,其通过引用整体并入本文。

[0045] 一种产生包装细胞的方法是产生会稳定表达对于AAV颗粒的产生必要的所有组分的细胞系。例如,包含缺乏AAV rep和cap基因的rAAV基因组、从所述rAAV基因组分离的AAV rep和cap基因、以及可选择标记(例如新霉素抗性基因)的一种质粒(或者多种质粒)被整合

到细胞的基因组中。已经通过程序将AAV基因组引入细菌质粒中,例如GC加尾(Samulski等人,1982,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,79:2077-2081)、添加含有限制性内切核酸酶切割位点的合成接头(Laughlin等人,1983,《基因(Gene)》,23:65-73)或通过直接平末端连接(Senapathy&Carter,1984,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》,259:4661-4666)。然后将包装细胞系用像腺病毒这样的辅助病毒感染。该方法的优点是细胞是可选择的并且适合rAAV的大规模生产。合适的方法的其它实例采用腺病毒或杆状病毒而不是质粒将rAAV基因组和/或rep和cap基因引入包装细胞中。

[0046] 在(例如)Carter,1992,《生物技术最新观点(Current Opinions in Biotechnology)》,1533-539以及Muzyczka,1992,《微生物学与免疫学的当前课题(Curr.Topics in Microbial.and Immunol.)》,158:97-129中对产生rAAV的一般原则进行了综述。在Ratschin等人,《分子细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》4:2072(1984);Hermonat等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,81:6466(1984);Tratschin等人,《分子细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》5:3251(1985);McLaughlin等人,《病毒学杂志(J.Virol.)》,62:1963(1988);以及Lebkowski等人,1988《分子细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》,7:349(1988)中描述了各种方法。Samulski等人(1989,《病毒学杂志(J.Virol.)》,63:3822-3828);美国专利第5,173,414号;WO 95/13365和相应的美国专利第5,658,776号;WO 95/13392;WO 96/17947;PCT/US98/18600;WO 97/09441(PCT/US96/14423);WO 97/08298(PCT/US96/13872);WO 97/21825(PCT/US96/20777);WO 97/06243(PCT/FR96/01064);WO 99/11764;Perrin等人(1995)《疫苗(Vaccine)》13:1244-1250;Paul等人(1993)《人类基因治疗(Human Gene Therapy)》4:609-615;Clark等人(1996)《基因治疗(Gene Therapy)》3:1124-1132;美国专利第5,786,211号;美国专利第5,871,982号;以及美国专利第6,258,595号。以上文件通过引用整体并入本文,与rAAV的产生相关的那些文件部分特别重要。

[0047] 因此本发明提供产生传染性rAAV的包装细胞。在一个实施例中,包装细胞可以是稳定转化的癌细胞,例如HeLa细胞、293细胞以及PerC.6细胞(一种同源293系)。在另一个实施例中,包装细胞是其为非转化癌细胞的细胞,例如低传代293细胞(腺病毒的E1转化的人类胎儿肾细胞)、MRC-5细胞(人类胎儿成纤维细胞)、WI-38细胞(人类胎儿成纤维细胞)、Vero细胞(猴肾细胞)以及FRhL-2细胞(恒河猴胎儿肺细胞)。

[0048] 本发明的重组AAV(即传染性的衣壳化rAAV颗粒)包含rAAV基因组。实施例包括(但不限于)称作pAAV.MHCK7.hSCGB的rAAV,其包含SEQ ID NO:3中所列的多聚核苷酸序列;和称作pAAV.tMCK.hSCGB的rAAV,其包含SEQ ID NO:5中所列的多聚核苷酸序列。

[0049] 所述rAAV可通过本领域的标准方法纯化,例如通过柱色谱或氯化铯梯度纯化。用于从辅助病毒纯化rAAV载体的方法在本领域中是已知的,并且包括在(例如)Clark等人,《人类基因治疗(Hum.Gene Ther.)》,10(6):1031-1039(1999);Schenpp和Clark,《分子医学方法(Methods Mol.Med.)》,69427-443(2002);美国专利第6,566,118和WO 98/09657中公开的方法。

[0050] 在另一个实施例中,本发明考虑包含本发明的rAAV的组合物。本文所述的组合物包含药学上可接受的载体中的rAAV。所述组合物还可包含其它成分,例如稀释剂和佐剂。可接受的载体、稀释剂以及佐剂对于接受者是非毒性的,优选在所采用的剂量和浓度下是惰

性的,并且包括缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐、或其它有机酸;抗氧化剂,例如抗坏血酸;低分子量多肽;蛋白,例如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天门冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖、以及其它糖类,包括葡萄糖、甘露糖、或环糊精;螯合剂,例如EDTA;糖醇,例如甘露糖醇或山梨糖醇;盐形成反离子,例如钠;以及/或者非离子表面活性剂,例如吐温、普朗罗尼或聚乙二醇(PEG)。

[0051] 本发明的方法中施用的rAAV的滴度将取决于(例如)特定的rAAV、施用模式、治疗目标、个体、以及目标细胞类型而有所变化,并且可通过本领域的方法标准确定。rAAV的滴度可从约 1×10^6 ,约 1×10^7 ,约 1×10^8 ,约 1×10^9 ,约 1×10^{10} ,约 1×10^{11} ,约 1×10^{12} ,约 1×10^{13} 至约 1×10^{14} 或更多的脱氧核糖核酸酶抗性颗粒(DRP)每毫升。剂量还可以以病毒基因组(vg)为单位表示。

[0052] 本发明考虑用rAAV体内或体外转导目标细胞的方法。体内方法包含给有此需要的动物(包括人类)施用一剂有效剂量或者多剂有效剂量的包含本发明的rAAV的组合物的步骤。如果所述剂量在产生疾患/疾病之前施用,那么这种施用就是预防性的。如果所述剂量在产生疾患/疾病之后施用,那么这种施用就是治疗性的。在本发明的实施例中,有效剂量是缓解(消除或减弱)与所治疗的疾患/疾病状态相关的至少一种症状、减慢或预防进展为疾患/疾病状态、减慢或预防疾患/疾病状态的进展、减弱疾病程度、引起疾病的(部分或完全)缓解、以及/或者延长存活的剂量。考虑使用本发明的方法预防或治疗的疾病的一个实例是肌营养不良症,例如肢带型肌营养不良症。

[0053] 本发明还考虑组合治疗。如本文所使用的组合包括同时治疗或顺序治疗。特别考虑本发明方法与标准医学治疗(例如皮质类固醇)的组合,如与新的疗法的组合一样。

[0054] rAAV载体的治疗有效量是约 1×10^{13} vg/kg至约 5×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 2×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 3×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 4×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 5×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 6×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 7×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 8×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 9×10^{13} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 1×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{13} vg/kg至约 2×10^{14} vg/kg、或 1×10^{13} vg/kg至约 3×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{13} 至约 4×10^{14} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 4×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 5×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 6×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 7×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 8×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 9×10^{13} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 1×10^{14} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 2×10^{14} vg/kg、或 3×10^{13} vg/kg至约 3×10^{14} vg/kg、或约 3×10^{13} 至约 4×10^{14} vg/kg、或约 3×10^{13} vg/kg至约 5×10^{14} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 6×10^{13} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 7×10^{13} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 8×10^{13} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 9×10^{13} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 1×10^{14} vg/kg、或约 5×10^{13} vg/kg至约 2×10^{14} vg/kg、或 5×10^{13} vg/kg至约 3×10^{14} vg/kg、或约 5×10^{13} 至约 4×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{14} vg/kg至约 2×10^{14} vg/kg、或 1×10^{14} vg/kg至约 3×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{14} 至约 4×10^{14} vg/kg、或约 1×10^{14} vg/kg至约 5×10^{14} vg/kg的rAAV剂量。本发明还包含包括这些范围的rAAV载体的组合物。

[0055] 例如,rAAV载体的治疗有效量是 1×10^{13} vg/kg、约 2×10^{13} vg/kg、约 3×10^{13} vg/kg、约 4×10^{13} vg/kg、约 5×10^{13} vg/kg、约 6×10^{13} vg/kg、约 7×10^{13} vg/kg、约 8×10^{13} vg/kg、约 9×10^{13} vg/kg、约 1×10^{14} vg/kg、约 2×10^{14} vg/kg、约 3×10^{14} vg/kg、约 4×10^{14} vg/kg以及 5×10^{14} vg/kg的剂量。本发

明还包含组合物,其包含这些剂量的rAAV载体。

[0056] 施用有效剂量的组合物可通过本领域中的标准途径进行,包括(但不限于)肌肉内、肠道外、静脉内、口服、含服、鼻腔、经肺、颅内、骨内、眼内、直肠、或阴道。本发明的rAAV(特别是AAV ITR和衣壳蛋白)的AAV组分的施用途径和血清型可由本领域技术人员在考虑被治疗的感染和/或疾病的状态以及表达 β -肌聚糖的目标细胞/组织的情况下进行选择或匹配。

[0057] 本发明提供局部施用和全身施用有效剂量的本发明的rAAV和组合物。例如,全身施用是施用到循环系统中,以便整个身体受到影响。全身施用包括肠内施用,例如通过胃肠道施用和肠道外施用吸收,所述胃肠道施用和肠道外施用通过注射、输注或灌输进行。

[0058] 特别地,本发明的rAAV的实际施用可使用会将rAAV重组载体输运至动物的目标组织的任何物理方法实现。根据本发明的施用包括(但不限于)注射到肌肉内、血流内以及/或直接注射到肝脏内。简单地将rAAV再悬于磷酸盐缓冲盐水中已经证明足以提供可用于肌肉组织表达的载体,并且对于可与rAAV一起施用的载体或其它组分没有已知的限制(尽管会将DNA降解的组成应以rAAV的常规方式避免)。可对rAAV的衣壳蛋白进行修饰,以便rAAV靶向有兴趣的特定目标组织,例如肌肉。参见(例如)WO 02/053703,其公开内容通过引用并入本文。药物组合物可制备为可注射的制剂或者制备为局部用制剂,以便通过经皮输送递送至肌肉。以前已经开发了多种用于肌肉内注射和经皮输送的制剂,并且可在本发明的实践中使用。为了便于施用和操控,rAAV可与任何药学上可接受的载体一起使用。

[0059] 为了肌肉内注射的目的,可采用佐剂(例如芝麻油或花生油)中或水性丙二醇中的溶液,以及无菌水溶液。如果需要的话,这种水溶液可被缓冲,并且首先用盐水或葡萄糖使该液体稀释剂等渗。作为游离酸(DNA含有酸性磷酸基团)或者药学上可接受的盐的rAAV的溶液可在水中制备,合适地与像羟丙基纤维素这样的表面活性剂混合。还可在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和在油中制备rAAV的分散体。在储存和使用的常规条件下,这些制备物含有防腐剂,以防止微生物的生长。就此而言,所采用的无菌水性介质全都可容易地通过本领域技术人员熟知的标准技术获得。

[0060] 适合可注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体,以及用于临时制备可注射的无菌溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,所述形式必须是无菌的,并且必须是易于注射程度的流体。它在制备条件和储存条件下必须是稳定的,并且必须在防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用的情况下储存。载体可以是溶剂或分散体介质,其含有(例如)水、乙醇、聚醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、其合适的混合物,以及植物油。可(例如)通过使用像蛋黄素这样的包衣、通过维持需要的颗粒大小(在分散体的情况下)以及通过使用表面活性剂保持合适的流动性。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂预防微生物作用,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、噻汞撒等。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过使用延迟吸收的药剂实现,例如单硬脂酸铝和明胶。

[0061] 可注射的无菌溶液根据需要通过将适当溶剂中所需量的rAAV与以上所列各种其它成分结合接着通过过滤灭菌来制备。一般而言,分散体通过将无菌活性成分结合到无菌载体中来制备,所述载体含有基础分散介质和来自以上所列的那些的所需其它成分。在用于制备可注射的无菌溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技

术,其会产生活性成分粉末以及来自之前其无菌过滤溶液的任何另外的目标成分。

[0062] 用rAAV进行转导还可在体外进行。在一个实施例中,期望的目标肌肉细胞被从受试者移除,用rAAV转导,并再引入受试者中。可替代地,在同种同基因或异种异基因肌肉细胞不会在受试者中产生不适当的免疫响应时可使用那些细胞。

[0063] 转导和将转导细胞再引入受试者中的合适方法在本领域中是已知的。在一个实施例中,细胞可通过以下方式进行体外转导:在(例如)合适的介质中将rAAV与肌肉细胞结合,并使用常规技术(例如Southern印迹和/或PCR)或使用可选择标记筛选含有目标DNA的那些细胞。然后可将转导细胞配制为药物组合物,并使用(例如)导管通过各种技术(例如通过肌肉内注射、静脉内注射、皮下注射和腹膜内注射,或通过注射到平滑肌和心肌中)将所述组合物引入受试者中。

[0064] 使用本发明的rAAV转导细胞会引起 β -肌聚糖的持续表达。因此本发明提供给哺乳动物受试者、优选人类施用/递送表达 β -肌聚糖的rAAV的方法。这些方法包括使用一种或多种本发明的rAAV转导组织,包括(但不限于)像肌肉这样的组织、像肝脏和大脑这样的器官、以及像唾液腺这样的腺体。转导可使用包含组织特异性控制元件的基因盒进行。例如,本发明的一个实施例提供在肌肉特异性控制元件引导下转导肌肉细胞和肌肉组织的方法,所述肌肉特异性控制元件包括(但不限于)衍生自肌动蛋白和肌球蛋白基因家族的那些(例如衍生自myoD基因家族的那些)[参见Weintraub等人,《科学(Science)》,251:761-766(1991)]、肌细胞特异性增强子结合因子MEF-2[Cserjesi和Olson,《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》11:4854-4862(1991)]、衍生自人类骨骼肌动蛋白基因的控制元件[Muscat等人,《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》,7:4089-4099(1987)]、心肌肌动蛋白基因、肌肉肌酸激酶序列元件[参见Johnson等人,《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》,9:3393-3399(1989)]以及鼠类肌酸激酶增强子(mCK)元件、衍生自骨骼快缩肌钙蛋白C基因、慢缩心肌肌钙蛋白C基因以及慢缩肌钙蛋白I基因的控制元件:缺氧诱导核因子(Semenza等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》,88:5680-5684(1991))、类固醇诱导元件和启动子(包括糖皮质激素响应元件(GRE))(参见Mader和White,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》90:5603-5607(1993))、以及其它控制元件。

[0065] 肌肉组织是用于体内递送DNA的一个有吸引力的靶标,这是由于它不是生命器官并且易于接近。本发明考虑转导肌纤维的miRNA的持续表达。

[0066] 通过“肌肉细胞”或“肌肉组织”意思是衍生自任何类型肌肉(例如骨骼肌和平滑肌,例如来自消化道、膀胱、血管或心脏组织的平滑肌)的细胞或细胞群组。这种肌肉细胞可以是分化的或未分化的,例如成肌细胞、肌细胞、肌小管、心肌细胞以及成心肌细胞。

[0067] 术语“转导”用于指通过所述的复制缺陷型rAAV将目标多聚核苷酸(例如对 β -肌聚糖进行编码的多聚核苷酸序列)体内或体外施用/递送至接受者的细胞,导致接受者细胞对 β -肌聚糖的表达。

[0068] 因此,本文还描述了给有此需要的哺乳动物受试者施用有效剂量(或者基本上同时施用的多个剂量,或者在多个时间间隔施用的多个剂量)的对 β -肌聚糖进行编码的rAAV的方法。

[0069] 本文提到的所有公开物和专利均通过引用整体并入本文,就如同每个单独的公开物或专利被明确地和单独地表明通过引用并入本文一样。在有冲突时,以本申请(包括本文

中的任何定义) 为准。

[0070] 在以下实例中进一步对本发明进行说明, 以下实例并不限制权利要求书中所述的本发明的范围。

[0071] 实例

[0072] 材料和方法

[0073] 动物模型——所有程序均由全国儿童医院研究所动物护理和使用委员会批准(方案AR12-00040)。B6.129-Sgcb^{tm1Kcam/1J}杂合小鼠从Jackson Laboratory(美国缅因州巴港; 株系号:006832) 购买。Sgcb^{-/-}小鼠通过繁殖杂合小鼠产生。K0小鼠作为纯合动物在标准化条件下在全国儿童医院研究所动物来源中心饲养和维持。小鼠以12小时:12小时的白天:夜晚循环用Teklad Global Rodent Diet(3.8z5纤维,18.8%的蛋白,5%的脂肪食物)维持。使用PCR通过基因型分析对SGCB^{-/-}小鼠进行确认。所有动物均在标准小鼠笼中圈养,并自由进食进水。

[0074] β -肌聚糖基因的构建。全长人类 β -肌聚糖cDNA(Genbank登录号NM_0034994.3)由美国新泽西州皮斯卡塔韦的GenScript Inc进行密码子优化和合成。通过GenScript的密码子优化使用考虑包括转录、mRNA的加工和稳定性、翻译以及蛋白折叠的参数的算法,以便设计在肌肉组织中引起最大表达的cDNA序列(www.genscript.com)。

[0075] 对于pAAV.tMCK.hSGCB的构建,然后将cDNA克隆到含有AAV2 ITR的质粒中,并且所述盒包括Kozak共有序列(CCACC)、SV40嵌合内含子以及合成聚腺苷酸化位点(53bp)。重组tMCK启动子是来自Xiao Xiao博士(北卡罗来纳大学)的赠品。它是以上所述的CK6启动子27的修饰,并且包括含有转录因子结合位点的启动子区上游的增强子的修饰。所述增强子由两个E-箱(E-box)(左侧和右侧)构成。tMCK启动子修饰包括将左侧E-箱转化为右侧E-箱的突变(2R修饰)和6-bp插入(S5修饰)。通过将来自pUC57-BSG(Genscript Inc.)的1040bp的KpnI/XbaI片段结合到pAAV.tMCK.hSGCA.26的KpnI/XbaI位点构建pAAV.tMCK.hSGCB载体。

[0076] 通过除去tMCK启动子和具有NotI/KpnI位点的SV40嵌合内含子并插入含有MHCK7启动子和相同的具有NotI/KpnI位点的SV40嵌合内含子的PCR扩增片段构建pAAV.MHCK7.hSGCB载体。MHCK7是基于MCK的启动子,其利用来自具有近端启动子(enh358MCK,584-bp)的内源肌肉肌酸激酶基因内约1.2kb转录起始位点的5'的206-bp的增强子^{3,12}。MHCK7启动子本身含有该修饰的MCK基因家族的CK7盒(其与CK部分的188-bp α -MyHC(α -肌球蛋白重链)增强子5'连接),以增强心脏表达¹²。所述启动子的肌酸激酶部分(CK)在tMCK与MHCK7之间具有96%的同一性。最后,通过将pAAV.MHCK7.DYSF5'DV44中960bp的NotI/KpnI MHCK7+内含子片段结合到pAAV.tMCK.hSGCB的NotI/KpnI位点构建pAAV.MHCK7.hSGCB载体(Pozgai等人,《基因治疗(Gene Ther.)》23:57-66,2016)

[0077] rAAV的产生。以前由Rodino-Klapac等人报道的一种修改的交叉包装方法(《转化医学杂志(J.Trans.Med.)》5:45,2007)用于产生rAAV载体。在此,CaPO₄在HEK293细胞中沉淀的三重转染方法容许将AAV2 ITR包装到不同的AAV衣壳血清型中。(28,29)产生质粒是(i) pAAV.tMCK.hSGCB或pAAV.MHCK7.hSGCB, (ii) 对cap血清型8类分离物rh.74进行编码的rep2-caprh.74修饰的AAV辅助质粒,以及(iii) 表达腺病毒E2A、E4 ORF6以及VAI/II RNA基因的5型腺病毒辅助质粒(pAdhelper)。对载体进行纯化,并如上所述确定衣壳化的vg滴度(利用Prism 7500Taqman检测器系统;PE Applied Biosystems,美国加利福尼亚州卡尔斯

巴德)。30引物和荧光探针靶向tMCK启动子,并且如下:tMCK正向引物,5'-ACCCGAGATGCCTGGTTATAATT-3'(SEQ ID NO:10);tMCK反向引物,5'-TCCATGGTGTACAGAGCCTAAGAC-3'(SEQ ID NO:11);以及tMCK探针,5'-FAM-CTGCTGCCTGAGCCTGAGCGGTTAC-TAMRA-3'(SEQ ID NO:12)。引物和荧光探针靶向MHCK7启动子,并且如下:MHCK7正向引物,5'-CCAACACCTGCTGCCTCTAAA-3'(SEQ ID NO:16);MHCK7反向引物,5'-GTCCCCACAGCCTTGTTTC-3'(SEQ ID NO:17);以及MHCK7探针,5'-FAM-TGGATCCCC-Zen-TGCATGCGAAGATC-3IABKFQ-3'(SEQ ID NO:18)。

[0078] 肌肉内的基因递送。对于肌肉内注射,将小鼠麻醉并在1至4%的异氟烷(在O₂中)下维持。4周至6周龄的SGCB^{-/-}小鼠的左下肢前腔用95%的EtOH清洗,然后使用30号超细胰岛素注射器向横腹(TA)肌注射稀释于盐水中3×10¹¹vg的scAAVrh.74.tMCK.hSGCB,体积为30μl。不对侧肌肉进行处理,充当对照。在注射6周(n=9,4只雄性,5只雌性)或12周(n=6,4只雄性,2只雌性)之后将两肢的TA肌除去,以评估基因转移效率。在涉及6月龄小鼠(n=5,5只雄性)的试验中,处理包括向左TA中肌肉内注射3×10¹¹vg的scAAVrh.74.tMCK.hSGCB。对于分离肢体灌注试验,sgcb^{-/-}小鼠在4周龄(n=5,5只雄性)和5周龄(n=4,2只雄性,2只雌性)时通过如上所述注射到股动脉中用5×10¹¹vg的scAAVrh.74.tMCK.hSCBB灌注。19将动物安乐死,并在基因转移8周之后对肌肉进行分析。

[0079] 系统性基因递送:系统性递送通过将载体注射到sgcb^{-/-}小鼠的尾静脉中实现。使用30号超细胰岛素注射器向小鼠注射稀释于盐水中1×10¹²vg的scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB,体积为212μL。将小鼠限制在保持管中,通过尾部狭槽将尾部放在后部,使其变暖,以便扩张血管,从而易于注射。在将动脉定位于尾部中心线之后,在沿尾动脉的一条紫色/蓝色外侧静脉进行注射。所有经处理的小鼠均在4至5周龄时注射,并在注射6个月之后将其安乐死。

[0080] EDL力的产生和偏心收缩的预防。对通过分离灌注(ILP)处理的小鼠的EDL肌肉进行生理学分析。经处理的小鼠的两只下后肢的EDL肌肉在肌腱处切开,并进行以前我们的实验室和其它实验室所述的(19,31)(带有一些调整)评估功能的生理学方案。在偏心收缩方案中,在500ms与700ms之间进行5%的拉伸-重新伸长程序(100ms内进行5%的拉伸,接着在100ms内恢复至最佳长度)。在强直和偏心收缩方案之后,将肌肉除去,称量湿重,并使用龙胶固定到卡盘上,然后在液氮中冷却的甲基丁烷中冷冻。

[0081] TA力的产生和偏心收缩的预防。在从通过IM注射处理的小鼠提取的肌肉上进行评估TA肌中的功能输出的方案。在几个之前的研究中给出了该TA程序。(32,33)在偏心收缩之后,然后将小鼠安乐死,切下TA肌,称量并冷冻用于分析。以盲方式但不是随机方式进行数据分析。

[0082] 免疫荧光。冷冻切片(12μm)在室温下在湿室中用封闭缓冲液(1×TBS,10%的山羊血清,0.1%的吐温)中稀释度为1:50的单克隆人类β-肌聚糖一抗(Leica Biosystems,英国纽卡斯尔;目录号:NCL-L-b-SARC)孵育1小时。然后将切片用TBS洗涤3次,每次20分钟,重新封闭30分钟。与AlexaFluor 594缀合的山羊抗小鼠第二IgG1抗体(Life Technologies,美国纽约格兰德岛;目录号:A21125)以1:250的稀释度应用45分钟。将切片在TBS中洗涤3次,进行20分钟,并用Vectashield封固剂(Vector Laboratories,美国加利福尼亚州伯林盖姆)固定。使用Zeiss AxioCam MRC5相机摄取覆盖肌肉切片四个不同象限的四个随机的×20倍图像。对于每个图像确定β-肌聚糖染色(450%的肌肉膜染色强度)阳性的纤维的百分

比,并对每块肌肉取平均值。

[0083] 蛋白质印迹分析。将经处理的左侧TA肌和右侧对侧TA肌(20至20微米厚)的组织切片收集到微量离心机中,并在1片蛋白酶抑制剂混合物片(Roche,美国印第安纳州印第安纳波利斯)的存在下使用100 μ l均化缓冲液(125mM的Tris-HCl,4%的SDS,4M的尿)均化。均化之后,在4℃下将样品在10,000rpm下离心10分钟。在NanoDrop(Thermo Scientific,美国马萨诸塞州沃尔瑟姆)上对蛋白进行定量。蛋白样品(20 μ g)在3至8%的聚丙烯酰胺Tris-醋酸盐凝胶(NuPage,Invitrogen,美国加利福尼亚州卡尔斯巴德)上在150V下电泳1小时5分钟,然后在35V下转移到PVDF膜(Amersham Biosciences,美国新泽西州皮斯卡塔韦)上,进行1小时15分钟。将所述膜在TBST中5%的脱脂奶粉中封闭1小时,然后用兔多克隆人类 β -肌聚糖抗体(Novus Biologicals,美国科罗拉多州利托顿;目录号:NBP-1-90300,1:100或1:250的稀释度)和1:5000的单克隆小鼠 γ -微管蛋白抗体(Sigma-Aldrich,美国密苏里州圣路易斯;目录号:T6557)或1:5000稀释度的小鼠单克隆小鼠 α -辅肌动蛋白抗体(Sigma-Aldrich,美国密苏里州圣路易斯;目录号:A7811)孵育。使用了1:500稀释度的兔多克隆小鼠心肌肌钙蛋白I抗体(Abcam,马萨诸塞州剑桥;目录号:ab47003)和1:1000稀释度的兔单克隆小鼠粘着斑蛋白抗体(Invitrogen,马里兰州弗雷德里克;目录号:70062)。使用抗小鼠(Millipore,美国马萨诸塞州比尔里卡;目录号:AP308P)和抗兔(Life Technologies;目录号:656120)第二-HRP抗体进行ECL免疫检测。

[0084] EBD化验。通过肌肉内注射将一剂 3×10^{10} vg的scAAVrh.74.tMCK.hSGCB递送至4周龄sgcb^{-/-}小鼠的左侧TA。注射4周之后,小鼠在右侧以5 μ l/g体重腹腔内注射1x磷酸盐缓冲溶液中过滤灭菌的10mg/ml EBD。然后在注射24小时之后将小鼠杀死,并对组织进行收集和切割。将切片在冷的丙酮中固定10分钟,然后使用免疫荧光方案对人类 β -肌聚糖进行染色。

[0085] 形态学分析。肌肉纤维直径以及细胞核位于中央的肌纤维的百分比由经苏木精和曙红(H&E)染色的TA肌和GAS肌确定。每只动物每个切片使用Zeiss AxioCamMRC5相机摄取4个随机的 $\times 20$ 倍图像。使用NIH ImageJ软件(美国马里兰州贝塞斯达)对中央成核纤维进行定量。纤维直径使用Zeiss Axiovision LE4软件(Carl Zeiss Microscopy,德国慕尼黑)测量为通过肌肉纤维的最短直径。

[0086] 生物分布的qPCR分析。进行Taqman定量PCR,以便如上所述对目标肌肉和非目标的对侧肌肉以及非目标器官中存在的载体基因组拷贝数进行定量。(18,30)使用载体特异性的引物探针组来扩增位于scAAVrh.74.tMCK.hSGCB转基因盒内的独特的紧靠tMCK启动子下游的内含子区的序列。该研究中使用了以下引物和探针:tMCK和MHCK7内含子正向引物5'-GTGAGGCACTGGGCAGGTAA-3'(SEQ ID NO:13);tMCK和MHCK7内含子反向引物5'-ACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAG-3'(SEQ ID NO:14);以及tMCK和MHCK7内含子探针5'-6FAM-ATCAAGGTTACAAGACAG-GTTTAAGGAGACCAATAGAAA-tamra-3'(IDT)(SEQ ID NO:15)。拷贝数记录为载体基因组数每微克基因组DNA。用于免疫细胞染色的免疫组织化学。使用免疫组织化学来确认免疫细胞。Fisherbrand Superfrost带电荷的显微镜载玻片上的冷冻组织切片使用抗大鼠Ig HRP Detection试剂盒(BD Pharmagen,美国加利福尼亚州圣荷赛;目录号:551013)、CD3(目录号:555273)、CD4(目录号:550280)、CD8(目录号:550281)以及用于巨噬细胞的Mac-3(目录号:550292)用大鼠抗小鼠单克隆抗体孵育。所有一抗均以1:20用磷酸盐

缓冲盐水稀释。使用具有Streptavidin-HRP过氧化物酶ectastain ABC Peroxidase的DAB缓冲液中稀释的DAB生色团观察阳性免疫染色。每块肌肉和每种相应的染色摄取10个随机的 $\times 40$ 倍图像。对单核细胞的数量计数,并表示为每平方毫米的总数量。

[0087] 天狼星红染色和胶原蛋白定量。置于Fisherbrand Superfrost带电荷的显微镜载玻片上的冷冻切片在10%的Neutral Buffered Formalin中固定5分钟,然后用蒸馏水润洗。然后将各载玻片在Picrosirius Red Stain Kit (Polysciences Inc.,美国宾夕法尼亚州沃灵顿;目录号:24901)的溶液(磷钼酸)中孵育2分钟。在蒸馏水中充分润洗之后,将各载玻片在Solution B(Direct Red 80/2,4,6-三硝基苯酚)中放置15分钟,接着再次在蒸馏水中润洗,然后在Solution C(0.1N的盐酸)中孵育2分钟。使用去离子水中1:10的稀释用Poly Scientific(目录号:S2114)的1%的冰醋酸中1%的Fast Green将各载玻片反染色2.5分钟。最后,各载玻片再次在蒸馏水中润洗,用分级乙醇脱水,在二甲苯中清洁,并使用Thermo-Scientific的Cytoseal 60培养基(美国马萨诸塞州沃尔瑟姆;目录号:8310)与盖玻片一起固定。使用AxioVision 4.9.1软件(Carl Zeiss Microscopy)摄取图像。对于天狼星红染色的分析和胶原蛋白%的定量,红色与绿色之间的对比使用Adobe Photoshop增强。选择ImageJ软件程序中的颜色反卷积插件,并使用RGB颜色反卷积选择。红色图像包括天狼星红染色的所有结缔组织。绿色图像包括Fast Green反染色的所有肌肉。仅使用红色图像和原始图像。然后给图像施加一个阈值,以获得黑白图像,胶原蛋白阳性区域为黑色,胶原蛋白阴性区域为白色。使用测量功能计算胶原蛋白的面积。然后将原始图像转化为‘8-比特’并将阈值调节为254(其会比将图像完全饱和低一个单位)确定总的组织面积。然后如以上所进行测量总的组织面积并记录总面积。然后将胶原蛋白面积除以总的组织面积计算胶原蛋白的百分比。然后计算每个个体的平均百分比。

[0088] 用于功能评估的隔膜强直性收缩:将小鼠安乐死,切割隔膜,保持肋连接和中心腱完整,并如之前Beastrom等人(《美国病理学杂志(Am.J.Pathol.)》179:2464-74,2011)、Rafael-Forney等人(《循环(Circulation)》124:582-8,2011)以及Moorwood等人(《视频实验期刊(J.Visualized Experiments)》71:e50036,[年?])所述置于K-H缓冲液中。将一个2至4mm宽的隔膜切片分离。隔膜条带用编织的手术丝线(6/0;Surgical Specialties,宾夕法尼亚州雷丁)在中心腱处紧紧绑住,并缝合到附着在该条带远端的一部分肋骨。将每块肌肉转移至保持在37℃的充满充氧K-H溶液的水浴。将肌肉水平排列,并直接绑在固定销与双模式力变换器-伺服电动机(305C;Aurora Scientific,加拿大安大略省奥罗拉)之间。将两个铂板电极置于器官浴中,以便在肌肉长度的侧翼。将肌肉拉伸至用于测量颤搐收缩的最佳长度,然后在开始强直性方案之前让其松弛10分钟。一旦肌肉被稳定,将肌肉调为1g的最佳长度,并进行准备运动,其包括每30秒3次1Hz的颤搐,接着是每分钟3次150Hz的颤搐。在3分钟的松弛阶段之后,以20Hz、50Hz、80Hz、120Hz、150Hz、180Hz对隔膜进行刺激,在每次刺激之间容许2分钟的松弛时间,每次刺激持续时间为250ms,以便确定最大强直性张力。测量肌肉的长度和重量。针对肌肉重量和长度将力正常化。

[0089] 心脏磁共振成像:使用9.4T水平开孔的磁共振成像(MRI)系统和小鼠体线圈(BrukerBioSpin,美国马萨诸塞州比尔里卡)对心脏功能进行分析。在置于成像床上之前用2.5%的异氟烷与卡波金的混合物(1L/min)将小鼠麻醉3分钟。将小鼠置于成像设备中并开始成像之后,在该研究的剩余部分将异氟烷/卡波金混合物降至1.5%。使用MRI相容系统

(1025型, Small Animal Instruments, 美国纽约州石溪) 对EKG和呼吸进行监控。在小鼠的整个左心室 (LV) 获得门控 (gated) 心脏短轴FLASH Cine T1加权的图像 (TR=8ms; TE=2.8ms;

[0090] =180; 矩阵=256×256; FOV=3.0×3.0cm; 切片厚度=1mm, n切片=7, 高达20帧每个心脏循环)。对于图像分析, 对每个短轴图像的舒张末期和收缩末期时间点进行确定, 并手动跟踪心内膜和心外膜心脏边界。乳头肌从LV的心内膜边界排除。从这些测量的面积计算舒张末期体积 (EDV)、收缩末期体积 (ESV)、每搏输出量 (SV)、心输出量 (CO)、射血分数 (EF)、以及平均LV质量。

[0091] 免疫荧光: 胫骨前肌 (TA)、腓肠肌 (GAS)、股四头肌 (QUAD)、腰大肌 (PSOAS)、臀大肌 (GLUT)、肱三头肌 (TRI) 和隔膜肌以及心脏的冷冻切片 (12μm) 通过如Pozgai等人, 《基因治疗 (Gene Therap.)》23:57-66, 2016中所述的我们之前使用的方案进行hSGCB转基因的免疫荧光染色。切片用小鼠单克隆人类β-肌聚糖一抗 (Leica Biosystems, 英国纽卡斯尔; 目录号: NCL-L-b-SARC) 以1:100的稀释度孵育。覆盖肌肉切片四个不同象限的4个随机的20X倍图像使用Zeiss AxioCam MRC5相机摄取。确定每个图像的β-肌聚糖染色 (>50%的肌肉膜染色) 阳性的纤维的百分比, 并对每块肌肉取平均值。

[0092] 形态学分析: 在7月龄的C57BL6 WT小鼠 (n=5)、sgcb^{-/-}小鼠 (n=5)、以及经rAAV.MHCK7.hSGCB处理6个月的sgcb^{-/-}小鼠 (n=5) 的12μm厚的肌肉冷冻切片上进行苏木精和曙红 (H&E) 染色, 以便进行分析。在TA、GAS、QUAD、PSOAS、GLUT、TRI、以及隔膜肌中确定具有中央核的肌纤维的百分比。另外, 在GAS、PSOAS、以及TRI肌肉中测量肌肉纤维直径。每只动物每块肌肉使用Zeiss AxioCam MRC5相机摄取4个随机的20X倍图像。使用NIH ImageJ软件对中央成核纤维进行定量, 并使用ZeissAxiovision LE4软件测量纤维直径。

[0093] X射线图像: 在麻醉的7月龄的C57BL6 WT小鼠 (n=6)、未经处理的sgcb^{-/-}小鼠 (n=6)、以及经rAAV.MHCK7.hSGCB处理6个月的sgcb^{-/-}小鼠 (n=6) 上使用Faxitron MX-20数字X射线系统在26kV下全身X射线辐射3秒 (Faxitron X-Ray Corp, 美国林肯夏 (Lincolnshire))。

[0094] 空场笼活动的激光监控: 空场活动室被用于确定试验小鼠的总体活动。按照之前所述的方案 (具有几处修改) 对7月龄的C57BL6 WT (n=6) 群组 and 未经处理的sgcb^{-/-} (n=6) 对照群组的小鼠以及经rAAV.MHCK7.hSGCB处理6个月的sgcb^{-/-}小鼠 (n=6) 进行分析 (Kobayashi等人, 《自然 (Nature)》456:511-5, 2008, Beastro等人, 《美国病理学杂志 (Am.J.Pathol.)》179:2464-74, 2011)。所有小鼠均在每天清早临近夜晚结束的循环中的同一时间小鼠活动最多时进行测试。所有小鼠均在隔离室中在弱光下每次由同一操作员进行测试。为了减轻焦虑并将行为变化保持最小 (其可能会影响小鼠的正常活动从而影响化验结果), 所测试的小鼠并不单独圈养 (Voikar等人, 《基因大脑行为 (Genes Brain Behav.)》4:240-52, 2005)。使用Photobeam Activity System (San Diego Instruments, 加利福尼亚州圣地亚哥) 监控小鼠的活动。该系统使用从前到后和从左到右穿过动物室的不可见红外光束格栅来监控小鼠在X-Y-Z平面内的位置和移动。活动以5分钟的间隔记录1小时的循环。在开始获取数据几天之前使小鼠在最开始的1小时时段内适应活动测试房间的环境。小鼠在单独的室中以4只每组进行测试。在每次使用之间对测试设备进行清洗, 以减少小鼠的反应行为变化, 其可能会改变我们的结果。将所收集的数据转化为Microsoft Excel表, 并且

所有计算均在Excel程序中进行。X和Y平面中的移动的单独的激光束中断对每只小鼠进行累计,以代表总的步行移动,并对Z平面内的激光束中断进行累计,以便获得1小时时间间隔内的垂直活动。

[0095] 实例1

[0096] scAAVrh.74.tMCK.hSGCB的构建和载体效力

[0097] 构建了含有密码子优化的全长人SCGB cDNA的转基因盒。所述盒包括Kozak共有序列(CCACC)、SV40嵌合内含子、合成聚腺苷酸化位点、以及用于驱动所述盒的表达的肌肉特异性的tMCK启动子(20)。所述盒被包装到自补(sc)AAVrh.74载体中,所述AAVrh.74载体与AAV8具有93%的同源性。AAVrh.74已经在小鼠和非人类灵长类动物中显示出安全性和有效性,特别是当通过循环递送至肌肉穿过血管屏障时尤其如此。(17,18,21)载体的效力通过肌肉内注射到Sgcb缺失型小鼠左侧TA肌中确定。在基因转移3周之后,递送 3×10^{10} vg转导 $70.5 \pm 2.5\%$ 的肌肉纤维,并且递送 1×10^{11} vg转导 $89.0 \pm 4.0\%$ 的肌肉纤维。

[0098] 实例2

[0099] 肌肉内递送scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

[0100] 按照载体效力,研究延伸至分析基因转移6周和12周后的治疗效力。由于3周短期效力研究之后高水平表达的原因,选择 3×10^{10} vg的总剂量进行随后使用最低有效剂量的研究。5周龄的sgcb^{-/-}小鼠用 3×10^{10} vg的scAAVrh.74.tMCK.hSGCB在左横腹(TA)进行肌肉内处理,使用免疫荧光在注射6周之后在 $88.4 \pm 4.2\%$ 的肌肉纤维中显示β-肌聚糖的表达(n=9),在注射12周之后在 $76.5 \pm 5.8\%$ 的肌肉纤维中显示β-肌聚糖的表达(n=6),并通过蛋白质印迹确定表达。β-肌聚糖表达伴随着肌营养不良蛋白相关的蛋白复合物的组分(α-肌聚糖和肌营养不良蛋白)的恢复。使用伊文思蓝染料(EBD)作为膜渗透性的标记(22,23),我们发现表达外源β-肌聚糖的所有纤维均被保护免于泄露和包括EBD.sgcb^{-/-}小鼠的肌肉展现出具有中央成核纤维的严重肌营养不良症、频繁的肌肉纤维坏死、纤维化组织、以及显著的纤维大小的变化,其表现为萎缩性和肥大性纤维。(3,4)苏木精和曙红染色显示患病肌肉的营养不良表型的总体改进,包括中央核的减少(未经处理的sgcb^{-/-}— $76.8 \pm 2.3\%$ 相对于经AAV.hSGCB处理— $38.86 \pm 3.5\%$; $P < 0.0001$)。在处理之后还观察到纤维大小分布的正常化和平均纤维直径的增加(未经处理的sgcb^{-/-}— $32.6 \pm 0.31 \mu\text{m}$ 相对于经AAV.hSGCB处理— $35.56 \pm 0.22 \mu\text{m}$; $P < 0.0001$)。

[0101] scgb^{-/-}小鼠的组织病理学指标是特征为肌肉组织主要广泛替代为胶原蛋白以及其它胞外基质组分(例如纤连蛋白、弹性蛋白、层粘蛋白以及饰胶蛋白)的纤维化。(14)肌肉组织被结缔组织替代的这一替代对基因替代的潜在价值提出挑战,并且可能会限制改进的程度。(24)为了测试这一点,对处理12周的小鼠的纤维化减少进行化验。由于TA肌固有的纤维化程度在KO模型中被确定并且由于TA肌代表血管ILP基因递送之后的潜在靶标,因此特别对TA肌进行评估。TA肌的I型和III型胶原蛋白的天狼星红染色显示经scAAVrh.74.tMCK.hSGCB处理的肌肉内存在的胶原蛋白的量与未经处理的sgcb^{-/-}小鼠肌肉相比显著降低(52.74%) (经AAV.hSGCB处理和未经处理的sgcb^{-/-}分别为 $20.7 \pm 0.57\%$ 和 $43.8 \pm 2.3\%$; $P < 0.0001$)。未经处理的5周龄的小鼠的sgcb^{-/-}肌肉在注射年龄时具有 $24.05 \pm 1.5\%$ 的胶原蛋白沉积,表明胶原蛋白的量在处理12周之后略微(14.0%)降低。

[0102] 实例3

[0103] scAAVrh.74.tMCK.hSGCB基因转移之后骨骼肌的功能校正

[0104] 为了确定hSGCB基因转移是否可改进肌肉功能,我们对经scAAVrh.74.tMCK.hSGCB处理的sgcb^{-/-}小鼠的TA肌的功能特性进行评估。在向4周龄的sgcb^{-/-}小鼠的TA肌肉内递送 3×10^{10} vg的scAAVrh.74.tMCK.hSGCB之后,在处理6周之后对TA肌进行原位力测量(n=4)。将经处理的肌肉与未经处理的对侧肌肉和C57BL/6WT小鼠的肌肉对比。经scAAVrh.74.tMCK.hSGCB处理的肌肉显示绝对强直性张力和归一化比力显著改进。与未经处理的sgcb^{-/-}对照的 770.9 ± 118.3 mN相比,经处理的肌肉具有 1436.9 ± 199.5 mN的平均绝对力(P<0.01)。类似地,经处理的TA肌产生 254.01 ± 6.9 mN/mm²的平均比力,并且未经处理的肌肉产生 124.2 ± 13.9 mN/mm²的力(P<0.01)。最后,经scAAVrh.74.tMCK.hSGCB处理的肌肉与未经处理的对照肌肉相比显示出更大的对收缩诱导的损伤的抗性。经处理的TA肌从首次收缩之后产生的力损失 $34.0 \pm 5.1\%$ 的力,而未经处理的患病肌肉则在偏心收缩方案之后损失 $54.1 \pm 3.8\%$ 的力(P<0.01)。这些数据显示,hSGCB基因转移确实会为β-肌聚糖缺陷型患病肌肉提供功能益处。

[0105] 实例4

[0106] 用scAAVrh.74.tMCK.hSGCB处理老龄肌肉

[0107] 对LGMD2E的这一小鼠模型中的疾病进展的研究显示,尽管最严格的肌肉中的组织重建在6周与20周之间发生,但是肌肉的组织病理学会继续随着年龄恶化,与患者中的疾病进展类似。(3,4,14)因此,为了模拟在更大的年龄在更严重的肌肉恶化和肌内膜纤维化的情况下进行处理的临床条件,我们用 3×10^{10} vg的scAAVrh.74.tMCK.hSGCB对6月龄的sgcb^{-/-}小鼠(n=5)的TA进行肌肉内处理。处理12周之后,在9月龄时, $80.1 \pm 4.8\%$ 的肌肉纤维被转导。I型和III型胶原蛋白的天狼星红染色显示与未经处理的sgcb^{-/-}小鼠肌肉相比经处理的小鼠中存在的胶原蛋白的量降低42.2%(经AAV.hSGCB处理— $20.0 \pm 0.80\%$ 相对于未经处理的sgcb^{-/-}— $34.6 \pm 1.4\%$,P<0.0001)。在处理年龄时,6月龄的sgcb^{-/-}小鼠具有 $30.8 \pm 2.0\%$ 的胶原蛋白沉积(n=4,4只雄性);因此,这些结果表明,用scAAVrh.74.tMCK.hSGCB处理不仅会预防纤维化,而且还具有将存在的纤维化反转的潜力。

[0108] 实例5

[0109] sgcb^{-/-}小鼠中scAAVrh.74.tMCK.hSGCB的ILP

[0110] 靶向一个肢体中的多种肌肉的能力对于转化至LGMD2E患者容许更多临床相关的递送方法。在4周至6周龄的sgcb^{-/-}小鼠中通过ILP递送 5×10^{11} vg的scAAVrh.74.tMCK.hSGCB(n=9,7只雄性,2只雌性)在基因转移2个月之后进行分析。β-肌聚糖表达达到腓肠肌(GAS)中的纤维的 $91.8 \pm 4.7\%$ 和TA中的纤维的 $90.6 \pm 2.8\%$ 。ILP递送scAAVrh.74.tMCK.hSGCB与未经处理的对侧的肌肉相比显著防止离心收缩诱导的损伤(P<0.05),其与WT并无不同。血管递送也恢复肌肉组织病理学参数。中央核在TA(未经处理的sgcb^{-/-}— $76.9 \pm 2.8\%$ 相对于经AAV.hSGCB处理— $23.2 \pm 5.7\%$,P<0.001)和GAS(未经处理的sgcb^{-/-}— $78.2 \pm 2.4\%$ 相对于经AAV.hSGCB处理— $16.8 \pm 6.6\%$,P<0.001)中被降低。基因转移还在TA(未经处理的sgcb^{-/-}— $30.53 \pm 0.52\mu\text{m}$ 相对于经AAV.hSGCB处理— $41.9 \pm 0.46\mu\text{m}$;P<0.0001)和GAS(未经处理的sgcb^{-/-}— $38.9 \pm 0.37\mu\text{m}$ 相对于经AAV.hSGCB处理— $33.3 \pm 0.44\mu\text{m}$;P<0.0001)中导致平均纤维大小的增加,并且纤维直径分布恢复正常。观察到CD3细胞、CD4细胞以及巨噬细胞的数量显著降低(约60%)(表1)。

表 1. 经 scAAVrh.74.tMCK.hSGCB ILP 处理的小鼠中的免疫响应

细胞类型	经处理的左侧 TA 细胞/mm ²	未经处理的右侧 TA 细胞/mm ²	未注射的 SGCB-/- TA 细胞/mm ²
CD3	15.6 ± 3.2	37.85 ± 6.2	29.8 ± 1.7
CD4	20.9 ± 4.7	58.1 ± 2.9	49.0 ± 0.8
CD8	8.2 ± 1.8	12.7 ± 2.4	15.5 ± 5.8
巨噬细胞	28.2 ± 5.0	75.2 ± 5.6	100.2 ± 5.9

缩写: ANOVA, 方差分析; ILP, 分离肢体灌注; SGCB, β -肌聚糖; TA, 胫骨前肌。未注射的 SGCB-/-小鼠以及经 scAAVrh.74.tMCK.hSGCB 处理的肌肉和未经处理的肌肉中存在的免疫细胞的定量。所示数据是 ILP 递送病毒之后的数据, 代表细胞平均数量/mm² ± s.e.m, n = 8 每组。使用单向 ANOVA 对三个不同组的值进行对比。免疫细胞的水平被降低, 对于 CD8 除外的所有株系, 经处理的左侧 TA 与未经处理的右侧 TA 之间并且/或者经处理的左侧 TA 与未注射的 TA 之间具有统计上显著的差异 (P < 0.01)。

[0112] TA和GAS肌的天狼星红染色与未经处理的sgcb^{-/-}肌肉相比在血管递送之后也显示胶原蛋白的量显著降低。在终端年龄时,TA中的胶原蛋白水平在经处理的肌肉中降至21.6 ± 1.3%, 相较而言在未经处理的sgcb^{-/-}小鼠中降至40.2 ± 1.5% (P<0.0001)。如上所示,注射年龄的sgcb^{-/-}小鼠在TA肌中呈现24.1 ± 1.5%的胶原蛋白,再一次表明胶原蛋白的沉积在处理8周之后略微减少(10.0%)。类似地,在终点时,GAS肌的染色显示经处理的小鼠具有22.9 ± 0.99%的胶原蛋白,相较而言未经处理的sgcb^{-/-}小鼠具有37.9 ± 1.3%的胶原蛋白 (P<0.0001)。进行定性PCR以检测肌肉中的胶原蛋白转录水平,其与天狼星红染色的结果相关联。总之,这些数据显示,AAV介导的人类 β -肌聚糖的递送会减少sgcb^{-/-}患病肌肉的肌肉纤维化,改进肌肉功能,并反转营养不良病理学。

[0113] 实例6

[0114] rAAVrh.74.tMCK.hSGCB的安全性和生物分布

[0115] 最初,将 3×10^{10} vg的scAAVrh.74.tMCK.hSGCB肌肉内注射到TA中的一般WT小鼠通过苏木精和曙红染色未显示毒性信号,表明没有因病毒而引起的不良反应。如在之前的切片中,所述ILP血管递送 5×10^{11} vg总剂量的scAAVrh.74.tMCK.hSGCB之后,在一小组小鼠中对该组的安全性进行评估 (n=4)。首先,对具有显著基因表达的目标肌肉进行组织学结构上地分析,还对非目标器官进行组织学结构上地分析,包括心脏、肺、肝脏、肾脏、脾、生殖腺、以及隔膜。由兽医病理学家对石蜡切片进行外形检查,在所示任何器官中均没有毒性证据 (数据未显示)。还分别使用蛋白质印迹和qPCR在以上所有组织和器官中对蛋白表达和载体生物分布进行评估。在测试的所有器官中均检测到载体基因组拷贝;但是,在经处理的肌肉之外的任何样品中则均未检测到蛋白表达。最后,当对任一组的平均重量进行对比时,对经处理的和未经处理的肌肉的湿重的分析未显示显著的差别或趋势 (数据未显示)。这些数据提供证据,证明肌肉特异性的tMCK启动子限制向骨骼肌的表达,并且载体是非毒性的。

[0116] 实例7

[0117] SGCB-/-小鼠的心脏和隔膜中的组织学缺陷和功能缺陷

[0118] 未经处理的WT和7月龄的SGCB-/-小鼠 (每个株系n=6) 通过心脏MRI和隔膜生理学进行分析,以便寻找缺陷。根据这些分析,将动物处死,并评估组织病理学。三色染色在隔膜和心脏中均显示广泛的纤维化 (红色染色)。这还伴随着隔膜中比力的功能缺陷 (116.24mN/mm²SGCB-/-相对于236.67mN/mm²WT), 以及通过MRI测量的射血分数的显著缺陷 (WT, 78%相对于SGCB-/-65%)。

[0119] 实例8

[0120] scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB的构建和载体效力

[0121] 含有密码子优化的全长人类SCGB cDNA的转基因盒被构建。所示盒包括Kozak共有序列(CCACC)、SV40嵌合内含子、合成聚腺苷酸化位点、以及用于驱动所述盒的表达的肌肉特异性的MHCK7。这是基于MCK的启动子,其利用从具有近端启动子(enh358MCK,584-bp)的内源肌肉肌酸激酶基因内转录起始位点的约1.2kb 5'得到的206-bp的增强子^{3,12}。所述盒被包装到自补(sc)AAVrh.74载体中,所述AAVrh.74载体与AAV8具有93%的同源性。AAVrh.74在小鼠和非人类灵长类动物中显示出安全性和有效性,特别是当通过循环递送至肌肉穿过血管屏障时。(17,18,21)通过肌肉内注射到缺失Sgcb的小鼠的左TA肌中确定载体的效力。递送 3×10^{10} vg在基因转移4周之后转导>90%的肌肉纤维。

[0122] 实例9

[0123] 系统性递送scAAV.MHCK7.hSGCB

[0124] 我们通过尾静脉注射以 1×10^{12} vg总剂量(5×10^{13} vg/kg)的剂量将载体递送至14只SGCB^{-/-}小鼠,以评估我们的载体当在6个月的长期时间点系统性递送时的转基因表达和效力。小鼠在4周龄时注射,在注射6个月之后进行完全尸检(1只小鼠在1个月杀死,2只小鼠在4个月杀死,以便立即对表达进行评估)。对以上所讨论的所有骨骼肌以及隔膜和心脏进行提取以便进行分析。器官也被移除,以便进行毒理学和生物分布分析。人类β-肌聚糖的免疫荧光染色被用于确定系统性注射hSGCB载体的6只KO小鼠的5块肢体肌肉(左侧和右侧)以及隔膜和心脏中hSGCB转基因的表达。这些肌肉包括TA、腓肠肌(GAS)、股四头肌(QUAD)、臀大肌(GLUT)(未显示)、腰大肌(PSOAS)、以及肱三头肌(TRI)。心脏组织的定性分析也被用于评估递送后心肌中转基因表达的相对水平。

[0125] 每块肌肉摄取4个20X倍图像,并对每个图像确定hSGCB阳性纤维的百分比,从而得到每只小鼠每块肌肉的平均转导百分比。结果在所分析的所有肌肉(包括隔膜和心脏)中均显示≥98%的转导。当通过免疫荧光进行分析时β-肌聚糖缺陷型小鼠完全缺乏蛋白。 1×10^{12} vg总剂量的治疗剂量在所有骨骼肌(包括隔膜)中均得到平均值为 $97.96 \pm 0.36\%$ (±SEM)的载体转导,在心肌中得到大约95%或更大的载体转导(数据未显示)。

[0126] 实例10

[0127] 在SGCB^{-/-}小鼠中长期系统性递送scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB

[0128] 为了以实例9中所述的1个月的效力化验的结果为基础,对于给sgcb^{-/-}小鼠长期(6个月的持续时间)系统性递送β-肌聚糖转基因盒进行研究。4至5周龄的sgcb^{-/-}小鼠用 1×10^{12} vg总剂量的scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB在尾静脉中进行静脉内处理(n=5)。在注射6个月之后对小鼠进行尸检,在所有经处理的小鼠的6块骨骼肌(左侧和右侧)以及隔膜和心脏中使用免疫荧光显示hSGCB转基因的表达。所分析的骨骼肌包括TA、GAS、QUAD、臀大肌(GLUT)、PSOAS、以及TRI。由于系统性递送,经处理的小鼠中的平均hSGCB表达在所有骨骼肌(包括隔膜)中均为 $98.13 \pm 0.31\%$ (±SEM),心脏中的表达超过>95%。显示代表性的图像。所有经处理的小鼠的每块单独的肌肉类型中的表达水平的平均值在表2中示出。蛋白质印迹确定所有肌肉中的转基因表达。表2将各种肌肉的表达值提供为系统性注射小鼠的左侧和右侧肌肉的平均值(n=5)。各值表示为平均值±SEM。此外,通过蛋白质印迹和密度测定法对经处理的小鼠的心脏中hSGCB转基因表达的定量表明,hSGCB的过表达高达超过BL6 WT表达水平

72.0%，与骨骼肌中定量的高水平相关联。

[0129] 表2.β-肌聚糖免疫荧光表达

[0130]

肌肉	递送途径	剂量 (vg 总剂量)	终点 (月)	%表达 SGCB 的纤维
TA	IV	1e12	6	98.88 ± 0.55
GAS	IV	1e12	6	98.24 ± 0.82
QD	IV	1e12	6	99.32 ± 0.19
GLUT	IV	1e12	6	97.50 ± 0.39
PSOAS	IV	1e12	6	98.75 ± 0.23
TRI	IV	1e12	6	97.21 ± 1.35
隔膜	IV	1e12	6	97.00 ± 1.26
心脏	IV	1e12	6	≥95%

[0131] GAS和隔膜的苏木精和曙红染色所示的之前的报道 (Araishi等人,《人类分子遗传学 (Hum.Mol.Genet) 》8:1589-98,1999,Durbeej等人,《分子细胞 (Mol.Cell.) 》5:141-51,2000) 中所述的sgcb^{-/-}肌肉的一个重要特征是严重的营养不良病理,包括中央成核、坏死、炎性浸润、以及纤维化。基因转移显著改进这一病理,从而缓解许多这些营养不良特性。组织学参数的定量显示由于基因转移所分析的各种骨骼肌中的中央成核显著减少。鉴于如此处所示BL6 WT小鼠所有肌肉具有预期的低中央成核水平平均为1.89±0.39%,考虑到所分析的所有肌肉,未经处理的sgcb^{-/-}小鼠的中央核平均为66.85±1.86%,相较而言经AAV.MHCK7.hSGCB处理的sgcb^{-/-}肌肉为36.30±5.16% (p<0.0001)。以下表3将为BL6 WT、sgcb^{-/-}、以及系统性注射的小鼠的各种肌肉给出的中央核计数和纤维直径提供为左侧肌肉和右侧肌肉的平均值 (±SEM) (n=5每组)。需要注意的是,处于中央的核表明,最显著的退化/再生循环在sgcb^{-/-}肌肉中发生在第3周。在这一损割之后对动物进行处理,因此预期中央核不会完全反转。更深入的肌肉组织病理学分析显示,与未经处理的sgcb^{-/-}小鼠相比,经载体处理的患病小鼠中所检查的所有3块肌肉的纤维大小分布变得正常,并且平均纤维直径增加 (GAS:未经处理的sgcb^{-/-}-28.37±0.23μm相较于经AAV.hSGCB处理-36.04±0.17 μm;p<0.0001) (PSOAS:未经处理的sgcb^{-/-}-24.75±0.23μm相较于经AAV.hSGCB处理-38.43 ±0.28μm;p<0.0001) (TRI:未经处理的sgcb^{-/-}-28±0.31μm相较于经AAV.hSGCB处理-35.56 ±0.22μm;p<0.0001) (表3)。

[0132] 表3.中央成核百分比的分析

[0133]

动物群组	剂量 (vg 总剂量)	肌肉	中央核% (平均值 ± SEM)	合并平均 中央核% (± SEM)	纤维直径 μm (平均值 ± SEM)
C57BL6 WT	无	TA	1.78 ± 0.86	1.89 ± 0.39	无
		GAS	0.83 ± 0.41		39.69 ± 0.18
		QD	0.98 ± 0.31		无
		GLUT	2.50 ± 0.68		无
		PSOAS	1.26 ± 0.28		40.96 ± 0.22
		TRI	2.13 ± 0.36		41.53 ± 0.24
		DIA	3.75 ± 1.30		无
Sgcb ^{-/-}	无	TA	70.45 ± 3.04	66.85 ± 1.86	无
		GAS	67.26 ± 1.81		28.37 ± 0.23
		QD	63.57 ± 2.09		无

动物群组	剂量 (vg 总剂量)	肌肉	中央核% (平均值 $\pm$ SEM)	合并平均 中央核% ($\pm$ SEM)	纤维直径 μm (平均值 $\pm$ SEM)
[0134]		GLUT	61.34 $\pm$ 2.05		无
		PSOAS	62.73 $\pm$ 5.20		24.75 $\pm$ 0.22
		TRI	67.11 $\pm$ 2.83		28.74 $\pm$ 0.22
		DIA	75.47 $\pm$ 3.79		无
	经 AAV.MHCK7.hSGCB 处理	TA	43.85 $\pm$ 3.89	36.30 $\pm$ 5.16	无
		GAS	38.71 $\pm$ 3.50		36.04 $\pm$ 0.18
		QD	46.10 $\pm$ 6.26		无
		GLUT	42.11 $\pm$ 5.48		无
		PSOAS	21.00 $\pm$ 4.69		38.43 $\pm$ 0.28
		TRI	48.39 $\pm$ 6.20		39.92 $\pm$ 0.27
		DIA	11.59 $\pm$ 2.08		无

[0135] 由于纤维化在LGMD2E的发病机理和治疗的有效性中的重要作用,在纤维化的减少中显示相同的效力很重要。现在在系统性递送scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB之后在局部 β -肌聚糖基因转移中看到这一点。使用I型和III型胶原蛋白的天狼星红染色,我们对注射6个月之后的7月龄的BL6WT小鼠 ($n=4$)、未经处理的sgcb^{-/-}小鼠 ($n=4$)、以及经处理的sgcb^{-/-}小鼠 ($n=5$) 的腓肠肌和隔膜肌中的胶原蛋白水平进行了分析。经处理的肌肉与未经处理的sgcb^{-/-}肌肉相比显示出显著更少的胶原蛋白沉积。载体转导的GAS肌含有17.55 $\pm$ 0.59%的胶原蛋白,相较而言在未经处理的sgcb^{-/-}-GAS肌中含有43.55 $\pm$ 3.33%的胶原蛋白 ($p < 0.0001$)。另外,经处理的隔膜肌展现出21.67 $\pm$ 1.09%的胶原蛋白,相较而言未经处理的sgcb^{-/-}-肌肉中为44.05 $\pm$ 2.39% ($p < 0.0001$),从而证明hSGCB基因转移减少LGMD2E表型的纤维化组分的能力。

[0136] 实例11

[0137] 系统性递送之后隔膜功能的恢复

[0138] 为了确定hSGCB基因转移是否可改进肌肉功能,我们对经scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB处理(参见Griffin等人的方法)的SGCB^{-/-}小鼠的隔膜肌的功能特性进行了评估。首先确定SGCB^{-/-}小鼠隔膜的功能缺陷。KO隔膜显示在进行严格的疲劳方案之后与BL6 WT小鼠相比比力输出降低50.9% (116.24mN/mm²) (116.24mN/mm²相对于236.67mN/mm²),力的损失更大(SGCB^{-/-}中的损失为23%;BL6 WT中的损失为7%)。通过尾静脉递送scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB在隔膜中引起几乎100%的hSGCB表达,从而引起隔膜功能的恢复,比力输出改进为226.07mN/mm²,耐疲劳性更高,力的损失只有12% ($n=5$)。

[0139] 实例12

[0140] 递送scAAVrh.74.CMV.mir29C会减少SGCB^{-/-}小鼠中的纤维化

[0141] 我们在骨骼肌以及心脏和隔膜中确认的广泛纤维化表明需要治疗LGMD2E中的胶原蛋白沉积(纤维化)。我们之前发现,在杜氏肌营养不良症中(Mir29A、B、以及C中)Mir29C减少地最严重。他假定Mir-29C在 β -肌聚糖缺陷小鼠(LGMD2E的小鼠模型)中也会被减少。我们证明确实如此。Mir29C水平被降低,纤维化(胶原蛋白)水平被增加,并且3种纤维化组分(Co1A、Co13A、以及Fbn)在RNA水平下被增加。为了测试我们是否可以防止Mir29C纤维化,基因治疗载体scrAAVrh.74.CMV.mir29c (3x10¹¹ vgs)被注射到4周龄SGCB^{-/-}小鼠的胫前肌肉

中 (n=5)。scrAAVrh.74.CMV.miR29c示出,并在美国临时申请第62/323,163号中进行了描述,其公开内容通过引用整体并入本文。用AAVrh.74.CMV.miR29C处理2个月之后,从经处理的和对照SGCB^{-/-}小鼠以及WT小鼠收集TA肌,并分析纤维化(胶原蛋白水平) (n=5每组)。使用天狼星红染色并进行定量,胶原蛋白水平在处理之后被降低。Col1A、Col3A、以及Fbn的转录水平被正常化,肌肉纤维大小被增加。显示经天狼星红染色的未处理的和经AAVrh.74.CMV.miR29C处理的胫前肌肉的扫描完全切片的代表性图像,所述天狼星红将胶原蛋白1和3染色。这显示scAAVrh.74.CMV.miR29C会减少SGCB^{-/-}小鼠中的纤维化并且可与scAAVrh.74.tMCK.hSGCB或scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB的基因替换一起组合使用的原则的证据。

[0142] 实例13

[0143] 静脉内基因转移至SGCB^{-/-}小鼠降低胸椎的脊柱后侧凸

[0144] 由于患有LGMD2E的患者中组织病理学的恶化而导致的躯干肌肉的退化可归因于脊柱后凸。由于支持脊柱的肌肉的衰弱而导致的胸椎的脊柱后侧凸可导致隔膜被往前推动,从而进一步损害肺容量和隔膜功能。由于总体解剖学外观脊柱后侧凸的sgcb^{-/-}小鼠的表型的严重性的原因,全身X射线摄影术被用于确定7月龄的BL6 WT小鼠 (n=6)、sgcb^{-/-}小鼠 (n=6)、以及经处理的sgcb^{-/-}小鼠在注射6个月之后的脊柱后凸程度 (n=6)。后凸指数 (KI) 计分确定脊柱后侧凸水平的量化值 (Laws等人《应用生理学杂志 (J. Appl. Physiol.)》97:1970-7, 2004)。WT区块所示, KI计分是前肢距后肢的长度与从脊柱弯曲中间到顶点的长度的比例。sgcb^{-/-}小鼠具有严重弯曲的脊柱和较低的KI计分 3.64 ± 0.16 (n=6), 而BL6 WT小鼠则具有显著更直的脊柱, 从而得到更高的KI计分 6.01 ± 0.41 (n=6) (p<0.01)。经处理的sgcb^{-/-}小鼠在脊柱中展现出脊柱后凸程度的显著降低, KI计分增加至 5.39 ± 0.58 (n=6) (p<0.05)。这些数据表明, 静脉内递送scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB对于脊柱的总体完整性具有益处, 并且可缓解疾病中存在的脊柱后凸和关节挛缩。该数据显示sgcb^{-/-}小鼠在系统性递送本发明的rAAV载体之后脊柱后凸缓解并且物理活动增加。该数据是本发明的基因治疗会改进LGMD2E患者的生活质量的生活质量的另外的证明。

[0145] 实例14

[0146] 心肌病的评估

[0147] 如苏木精和曙红和天狼星红染色所示, 在7月龄的sgcb^{-/-}小鼠 (特别是存在心肌坏死和纤维化的sgcb^{-/-}小鼠) 的心肌中还检测到肢体和隔膜肌的组织学破坏。心脏功能的损害经常以心输出量降低和射血分数更低的扩张型心肌病的形式表现 (Semplicini等人, 《神经学 (Neurology)》84:1772-81, 2015, Fanin等人, 《神经肌肉失调 (Neuromuscul Disorder)》13:303-9, 2003)。使用心脏磁共振成像 (MRI) 来评估心脏的几个功能参数, 确定sgcb^{-/-}小鼠的心肌相较于BL6 WT小鼠的功能缺陷, 以便用作功能结构的度量。7月龄的对照小鼠的成像显示每搏输出量从sgcb^{-/-}心脏的 0.041 ± 0.0019 mL降低29.4%至BL6 WT心脏的 0.029 ± 0.0024 mL (p<0.01), 心输出量从sgcb^{-/-}心脏的 14.70 ± 0.74 mL/min降低31.7%至BL6 WT心脏的 12.72 ± 0.97 mL/min, 最后, sgcb^{-/-}心脏的射血分数的 $66.21 \pm 3.83\%$ 与BL6 WT心脏的 $76.90 \pm 1.67\%$ 相比低14.3% (p<0.05)。这表明该年龄总体心脏功能中度降低, 并且倾向于产生心脏病。通过系统性递送恢复KO小鼠心脏的hSGCB表达部分校正这些缺陷, 将每搏输出量改进为 0.032 ± 0.0027 mL, 心输出量改进为 14.66 ± 0.75 mL/min, 射血分数改进

为 $68.16 \pm 2.31\%$ 。作为本文报道的心脏组织的组织破坏和功能破坏的关联,心肌肌钙蛋白I (cTrpI) (一种心脏功能的重要调节器和心脏损害的指示(生物标记))表达的蛋白质印迹在患病sgcb^{-/-}心脏中降低至BL6 WT小鼠中看到的水平的60.38%。经处理之后cTrpI水平恢复至WT心脏中看到的表达的35.80%的水平。

[0148] 实例15

[0149] 隔膜肌的功能恢复以及物理活动的增加

[0150] LGMD2E中显著涉及隔膜功能失调和呼吸衰竭要求临床系统性治疗必须获得对隔膜的功能益处。在隔膜肌条带上使用离体试验方案评估恢复 β -肌聚糖是否会对该严重损害的肌肉提供功能益处。根据7月龄患病小鼠隔膜中确认的显著组织病理学,sgcb^{-/-}隔膜(n=4)展现出功能缺陷,与BL6 WT小鼠(n=5)相比比力输出显著(51%)降低(分别为 $116.24 \pm 10.49 \text{ mN/mm}^2$ 相对于 $236.67 \pm 15.87 \text{ mN/mm}^2$, $p < 0.001$),并且按照严格的疲劳方案从首次收缩之后产生的力损失更多的力(sgcb^{-/-}中的损失为 $23 \pm 1.0\%$;BL6 WT中的损失为 $7.0 \pm 3.0\%$, $p < 0.05$)。通过尾静脉递送scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB 6个月之后,观察到比力输出的显著改进。比力输出增加至 $226.07 \pm 27.12 \text{ mN/mm}^2$ (n=5) (与sgcb^{-/-}相比 $p < 0.05$),并且观察到更好地保护肌肉免于重复疲劳,力的损失仅仅为 $12.0 \pm 4.0\%$ (与sgcb^{-/-}相比 $p < 0.05$)。总之,这些数据支持之前我们在TA肌中的发现,并且显示恢复 β -肌聚糖会提供隔膜肌的功能恢复。

[0151] 在许多神经肌肉疾病中经常报道疲劳增加和总体活动降低的症状,这要部分归因于发生脊柱后凸。作为结果,并且考虑LGMD2E的表型,可以假设KO小鼠与健康WT小鼠相比自然会活动更少,此外,给sgcb^{-/-}小鼠系统性递送rAAV.MHCK7.hSGCB会导致小鼠更多的物理活性。为了验证这一假设和基因转移其它潜在的功能益处,在所有小鼠群组上进行与Kobayashi等人,《自然(Nature)》456:511-5,2008和Beastrom等人,《美国病理学杂志(Am.J.Pathol.)》179:2464-74,2011中所述类似的空场笼活动方案的激光监控。显示KO小鼠总的步行移动(x和y平面的水平移动)和后肢垂直站立与WT相比显著降低(55.5%)。1小时的时段内水平移动激光束中断的平均数量在WT小鼠中为 7355 ± 400.8 (n=6),相较而言在KO小鼠中为 3271 ± 483.8 (n=6) ($p < 0.0001$)。另外,WT小鼠中记录的垂直站立激光束中断的平均数量为 626.7 ± 53.76 ,相较而言KO小鼠中为 264.5 ± 63.36 ($p < 0.01$)。根据最初的假设,对活动的定量显示经rAAV.MHCK7.hSGCB处理的小鼠与KO相比明显活动更多,其中在经处理的小鼠中总的步行移动增加22%至 5143 ± 293.2 次激光束中断 ($p < 0.05$),后肢垂直站立显著增加77%至 615.3 ± 95.93 次激光束中断 ($p < 0.05$) (n=6)。

[0152] 实例16

[0153] rAAVrh.74.MHCK7.hSGCB的安全性和生物分布分析

[0154] 6月龄的sgcb^{-/-}小鼠在以 $1.0 \times 10^{12} \text{ vg}$ 的总剂量($5 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$)系统性递送scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB之后对hSGCB基因治疗潜在的毒性或安全性顾虑进行评估。在施用载体的sgcb^{-/-}动物的组织样品(TA、TRI、隔膜、心脏、生殖腺、肺、肾脏、肝脏、以及脾)上分别使用qPCR和蛋白质印迹分析载体生物分布和非目标转基因表达。使用载体特异性的引物探针组在所有收集的组织中均以不同水平探测到MHCK7.hSGCB载体基因组。正如所预期,在肝脏以及骨骼肌和心脏中观察到最高水平,表明测试制品被有效递送到施用载体的小鼠的所有目标肌肉中。另外,检测hSGCB蛋白表达的蛋白质印迹确认肌肉特异性的MHCK7启动子

的功能和限制于心脏和骨骼肌的转基因的表达。在所有骨骼肌样品以及心脏样品中均观察到β-肌聚糖蛋白不同程度的表达,并且重要的是,在任何非肌肉组织中均未检测到,这被β-肌聚糖已知是肌肉特异性的蛋白这一事实所支持。最后,在从5只sgcb^{-/-}小鼠以及以该研究中使用的治疗剂量用我们的载体系统性处理的5只C57BL/6 WT小鼠收集的肌肉组织和所有离体器官的冷冻切片上进行苏木精和曙红染色。然后由兽医病理学家对这些切片的毒性进行外形检查,并且在任何小鼠的任何样品中均未检测到不良作用。总之,这些数据表明测试动物很好地耐受该测试制品。

[0155] 使用较低剂量(1×10^{12} vg的总剂量; 5×10^{13} vg/kg)在整个身体的所有肌肉中均获得这种高水平的转导而没有不良作用这一事实对于转化到LGMD2E患者会提供很大前景。从临床观点上来看,本文所述的试验中使用的剂量比给患有SMA的婴儿采用系统性递送而递送表达AAV疗法的SMN1使用的剂量低得多,其目前正在进行临床试验(Mendell等人,《分子治疗(Mol. Ther.)》24:S190,2016)。在可临床应用的剂量水平下使用MHCK7启动子高效恢复β-肌聚糖的表达连同功能益处非常令人鼓舞,并且鉴于LGMD2E患者的β-肌聚糖缺陷很可能涉及心脏,系统性递送会为这些患者提供很大的益处。

[0156] 参考:

[0157] 1 Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E等人《β-肌聚糖(A3b)突变会引起肌聚糖复合物损失的常染色体隐性肌营养不良症(Beta-sarcoglycan(A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex)》。《天然遗传学(Nat Genet)》1995;11:266-273。

[0158] 2 Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C等人《美国的肢带型肌营养不良症(Limb-girdle muscular dystrophy in the United States)》。《神经病理学与实验神经学杂志(J Neuropathol Exp Neurol)》2006;65:995-1003。

[0159] 3 Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E等人《肌聚糖复合物和肌长蛋白的损失会在β-肌聚糖缺陷型小鼠中引起肌营养不良症(Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice)》。《人类分子遗传学(Hum Mol Genet)》1999;8:1589-1598。

[0160] 4 Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL等人《β-肌聚糖基因的破坏显示2E型肢带型肌营养不良症的发病机理的复杂性(Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E)》。《分子细胞(Mol Cell)》2000;5:141-151。

[0161] 5 Bonnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sa Moreira E, Marie SK等人《β-肌聚糖基因突变的基因组筛选:误义突变可能会引起严重的2E型肢带型肌营养不良症(LGMD 2E) (Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E))》。《人类分子遗传学(Hum Mol Genet)》1996;5:1953-1961。

[0162] 6 Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP.《肌聚糖病的临床范围(The clinical spectrum of sarcoglycanopathies)》。《神经学(Neurology)》1999;52:176-179。

[0163] 7 Sandona D, Betto R.《肌聚糖病:分子发病机理和治疗前途

(Sarcoglycanopathies:molecular pathogenesis and therapeutic prospects)》。《分子医学的专家综述(Exp Rev Mol Med)》2009;11:e28.

[0164] 8 Fanin M,Melacini P,Boito C,Pegoraro E,Angelini C.《LGMD2E患者面临产生扩张型心肌病的风险(LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy)》。《神经肌肉性疾病(Neuromusc Disord)》2003;13:303-309.

[0165] 9 Sveen ML,Thune JJ,Kober L,Vissing J.《患有2型肢带型肌营养不良症和贝克肌营养不良症的患者涉及心脏(Cardiac involvement in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2 and Becker muscular dystrophy)》。《神经学档案(Arch Neurol)》2008;65:1196-1201.

[0166] 10 Melacini P,Fanin M,Duggan DJ,Freda MP,Berardinelli A,Danieli GA等人《由于肌聚糖基因突变引起的肌营养不良症涉及心脏(Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations)》。《肌肉与神经(Muscle Nerve)》1999;22:473-479.

[0167] 11 Narayanaswami P,Weiss M,Selcen D,David W,Raynor E,Carter G等人《循证指南概述:肢带型营养不良和远端营养不良的诊断和治疗:美国神经病学学会指南发展小组委员会和美国神经肌肉&电生理诊断医学协会的实际问题综述小组的报告(Evidence-based guideline summary:diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies:report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice issues review panel of the American Association of Neuromuscular&Electrodiagnostic Medicine)》。《神经学(Neurology)》2014;83:1453-1463.

[0168] 12 Wong-Kisiel LC,Kuntz NL.《患有2E型肢带型肌营养不良症的一对兄弟姐妹对地夫可特的响应(Two siblings with limb-girdle muscular dystrophy type 2E responsive to deflazacort)》。《神经肌肉性疾病(Neuromusc Disord)》2010;20:122-124.

[0169] 13 Barresi R,Di Blasi C,Negri T,Brugnoni R,Vitali A,Felisari G等人《由 β 肌聚糖突变引起的心脏肌聚糖复合物的破坏和严重心肌病(Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations)》。《医学遗传学杂志(J Med Genet)》2000;37:102-107.

[0170] 14 Gibertini S,Zanotti S,Savadori P,Curcio M,Saredi S,Salerno F等人《缺失 β -肌聚糖的小鼠的肌肉中的纤维化和炎症比mdx小鼠更严重(Fibrosis and inflammation are greater in muscles of beta-sarcoglycan-null mouse than mdx mouse)》。《细胞组织研究(Cell Tissue Res)》2014;356:427-443.

[0171] 15 McCarty DM,Fu H,Monahan PE,Toulson CE,Naik P,Samulski RJ.《腺相关病毒末端重复(TR)突变体会产生自补载体以克服体内转导的限速步(Adeno-associated virus terminal repeat(TR)mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo)》。《基因治疗(Gene Ther)》2003;10:2112-2118.

[0172] 16 McCartyDM,Monahan PE,Samulski RJ.《自补重组腺相关病毒(scAAV)载体

促进独立于DNA合成的有效转导 (Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNAsynthesis)》。《基因治疗 (Gene Ther)》2001;8:1248-1254.

[0173] 17 Chicoine LG,Rodino-Klapac LR,Shao G,Xu R,BremerWG,Camboni M等人《通过血管给恒河猴的腓肠肌施用rAAVrh74.MCK.GALGT2会刺激肌营养不良蛋白和层粘蛋白 α 2替代品的表达 (Vascular delivery of rAAVrh74.MCK.GALGT2 to the gastrocnemius muscle of the rhesus macaque stimulates the expression of dystrophin and laminin alpha2 surrogates)》。《分子治疗 (Mol Ther)》2014;22:713-724.

[0174] 18 Rodino-Klapac LR,Montgomery CL,Bremer WG,Shontz KM,Malik V,Davis N等人《在肌肉内和血管递送之后非人类灵长类动物中FLAG标记的微肌营养不良蛋白的持续表达 (Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery)》。《分子治疗 (Mol Ther)》2010;18:109-117.

[0175] 19 Rodino-Klapac LR,Janssen PM,Montgomery CL,Coley BD,Chicoine LG,Clark KR等人《在无高体积或高压的情况下通过肢血管递送微肌营养不良蛋白基因以便治疗杜氏肌营养不良症的转化方法 (A translational approach for limb vascular Delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy)》。《转化医学杂志 (J Transl Med)》2007;5:45.

[0176] 20 Wang B,Li J,Fu FH,Chen C,Zhu X,Zhou L等人《用于AAV载体的紧凑的肌肉特异性启动子的构建和分析 (Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors)》。《基因治疗 (Gene Ther)》2008;15:1489-1499.

[0177] 21 Chicoine LG,Montgomery CL,Bremer WG,Shontz KM,Griffin DA,Heller KN等人《血浆置换术会消除血管递送之后AAV抗体对微肌营养不良蛋白基因表达的负面影响 (Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on micro-dystrophin gene expression following vascular delivery)》。《分子治疗 (Mol Ther)》2014;22:338-347.

[0178] 22 Matsuda R,Nishikawa A,Tanaka H.《通过用伊文思蓝进行活体染色观察mdx小鼠中的营养不良肌肉纤维:肌营养不良蛋白缺陷型肌肉中的细胞凋亡证据 (Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue:evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle)》。《生物化学杂志 (J Biochem)》1995;118:959-964.

[0179] 23 Straub V,Rafael JA,Chamberlain JS,Campbell KP.《肌营养不良症的动物模型显示不同模式的肌膜破坏 (Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption)》。《细胞生物学杂志 (J Cell Biol)》1997;139:375-385.

[0180] 24 Mendell JR,Sahenk Z,Malik V,Gomez AM,Flanigan KM,Lowes LP等人《贝克肌营养不良症的1/2a期卵泡抑制素基因治疗试验 (A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy)》。《分子治疗 (Mol Ther)》2015;23:

192-201。

[0181] 25 Dressman D, Araishi K, Imamura M, Sasaoka T, Liu LA, Engvall E 等人《通过重组腺相关病毒递送 α -肌聚糖和 β -肌聚糖:肌肉的有效修复,但毒性不同 (Delivery of alpha-and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity)》。《人类基因治疗 (Hum Gene Ther)》2002;13:1631-1646。

[0182] 26 Rodino-Klapac LR, Lee JS, Mulligan RC, Clark KR, Mendell JR.《 α -肌聚糖过表达缺乏毒性支持LGMD2D的临床基因转移试验 (Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D)》。《神经学 (Neurology)》2008;71:240-247。

[0183] 27 Shield MA, Haugen HS, Clegg CH, Hauschka SD.《肌肉肌酸激酶基因的E-箱位点和近端调控区域不同地调节转基因小鼠的不同骨骼肌和心肌的表达 (E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expression in diverse skeletal muscles and cardiac muscle of transgenic mice)》。《分子细胞生物学 (Mol Cell Biol)》1996;16:5058-5068。

[0184] 28 Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X 等人《将2型单独腺相关病毒 (AAV) 载体基因组交叉包装到多种AAV血清型中使得能够进行宽特异性的转导 (Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity)》。《病毒学杂志 (J Virol)》2002;76:791-801。

[0185] 29 Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ.《腺相关病毒载体的产生和表征 (Production and characterization of adeno-associated viral vectors)》。《自然实验手册 (Nat Protoc)》2006;1:1412-1428。

[0186] 30 Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR.《高度纯化的重组腺相关病毒载体具有生物活性并且不含可检测的辅助病毒和野生型病毒 (Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses)》。《人类基因治疗 (Hum Gene Ther)》1999;10:1031-1039。

[0187] 31 Liu M, Yue Y, Harper SQ, Grange RW, Chamberlain JS, Duan D.《腺相关病毒介导的微肌营养不良蛋白表达会保护不成熟mdx肌肉免受收缩诱导的损伤 (Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury)》。《分子治疗 (Mol Ther)》2005;11:245-256。

[0188] 32 Hakim CH, Grange RW, Duan D.《趾长伸肌的被动力学特性在2月龄至20月龄的mdx小鼠中受到损害 (The passive mechanical properties of the extensor digitorum longus muscle are compromised in 2-to 20-mo-old mdx mice)》。《应用生理学杂志 (J Appl Physiol)》2011;110:1656-1663。

[0189] 33 Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szegedy CA, Maiti B, Findlay 等人《DMD外显子5IRES的转化会产生功能肌营养不良蛋白同种型,其会缓解人类和小鼠中的肌营养不良蛋白病 (Translation from a DMD exon 5IRES results in a functional dystrophin

isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice)》。《自然医学 (NatMed) 》2014;20:992-1000。

序列表

- <110> 美国全国儿童医院研究所
 <120> 腺相关病毒载体递送B-肌聚糖和微RNA-29以及肌营养不良症的治疗
 <130> 28335/50622A
 <150> US 62/433,548
 <151> 2016-12-13
 <150> US 62/323,333
 <151> 2016-04-15
 <160> 18
 <170> 专利版本3.5
 <210> 1
 <211> 957
 <212> DNA
 <213> 智人
 <220>
 <221> 各种特征
 <223> β -肌聚糖

[0001]

```

<400> 1
atggcagcag cagccgccgc agccgccgag cagcagtcaa gcaatggacc agtgaaaaaa    60
tcaatgagag aaaaagccgt cgagaggaga tcagtgaata aggagcaca cagcaatttc    120
aaagccggct acatccctat tgacgaagat cgcctgcata agacaggcct gagggggcgc    180
aaaggaaacc tggcaatctg cgtcatcatt ctgtgttita tcctggccgt gattaatctg    240
atcattactc tgggtatttg ggctgtcadc cgcattggcc caaacgggtg tgactctatg    300
gagttccacg aaagtggcct gctgcgattt aagcagggtgt ccgatatggg ggtcatccat    360
ccactgtaca aatctactgt cggcggggcg agaaacgaga atcttggtgat caccgggaac    420
aatcagccca ttgtgttcca gcagggaacc acaaagctgt ctgtggaaaa caataaaaca    480
tcaatcacta gcgacatttg catgcagttc tttgatcccc ggaccagaa tatectgttc    540
agtaccgact atgagacaca cgaatttcat ctgccttccg ggggtgaagtc tctgaacgtc    600
cagaaagcca gcactgagag aatcaccagt aacgtacat cagacctgaa tatcaagggtg    660
gatggacgag ctattgtccg gggaaatgag ggcgtgttca tcatgggcaa gacaattgaa    720
tttcacatgg gaggcaacat ggagctgaaa gcagaaaaca gcatcattct gaatgggagc    780
gtgatgggtc ccactaccag actgccagc tcctctagtg gagaccagct ggggtccgga    840
gattgggtca ggtataagct gtgcatgtgt gccgatggca ccctgtttaa agtgcaggtc    900
accagccaga atatgggatg tcagattagc gataaccctt gtgggaatac tcattaa    957

```

- <210> 2
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 各种特征
 <223> β -肌聚糖

<400> 2

Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Gln Gln Ser Ser Asn Gly
 1 5 10 15

Pro Val Lys Lys Ser Met Arg Glu Lys Ala Val Glu Arg Arg Ser Val
 20 25 30

Asn Lys Glu His Asn Ser Asn Phe Lys Ala Gly Tyr Ile Pro Ile Asp
 35 40 45

Glu Asp Arg Leu His Lys Thr Gly Leu Arg Gly Arg Lys Gly Asn Leu
 50 55 60

Ala Ile Cys Val Ile Ile Leu Leu Phe Ile Leu Ala Val Ile Asn Leu
 65 70 75 80

Ile Ile Thr Leu Val Ile Trp Ala Val Ile Arg Ile Gly Pro Asn Gly
 85 90 95

[0002]

Cys Asp Ser Met Glu Phe His Glu Ser Gly Leu Leu Arg Phe Lys Gln
 100 105 110

Val Ser Asp Met Gly Val Ile His Pro Leu Tyr Lys Ser Thr Val Gly
 115 120 125

Gly Arg Arg Asn Glu Asn Leu Val Ile Thr Gly Asn Asn Gln Pro Ile
 130 135 140

Val Phe Gln Gln Gly Thr Thr Lys Leu Ser Val Glu Asn Asn Lys Thr
 145 150 155 160

Ser Ile Thr Ser Asp Ile Gly Met Gln Phe Phe Asp Pro Arg Thr Gln
 165 170 175

Asn Ile Leu Phe Ser Thr Asp Tyr Glu Thr His Glu Phe His Leu Pro
 180 185 190

Ser Gly Val Lys Ser Leu Asn Val Gln Lys Ala Ser Thr Glu Arg Ile
 195 200 205

Thr Ser Asn Ala Thr Ser Asp Leu Asn Ile Lys Val Asp Gly Arg Ala
 210 215 220

Ile Val Arg Gly Asn Glu Gly Val Phe Ile Met Gly Lys Thr Ile Glu
 225 230 235 240

Phe His Met Gly Gly Asn Met Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ser Ile Ile
245 250 255

Leu Asn Gly Ser Val Met Val Ser Thr Thr Arg Leu Pro Ser Ser Ser
260 265 270

Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Gly Asp Trp Val Arg Tyr Lys Leu Cys
275 280 285

Met Cys Ala Asp Gly Thr Leu Phe Lys Val Gln Val Thr Ser Gln Asn
290 295 300

Met Gly Cys Gln Ile Ser Asp Asn Pro Cys Gly Asn Thr His
305 310 315

<210> 3
<211> 2306
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

[0003] <220>
<221> 各种特征
<223> pAAV.MHCK7.hSCGB

<400> 3
ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagggggtt aaccaattgg 120
cgcgcccgca agcttgcattg tctaagctag acccttcaga ttaaaaaataa ctgaggttaag 180
ggcctgggta ggggaggttg tgtgagacgc tctgtctctt cctctatctg cccatcggcc 240
ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaaggc catggagcca gaggggcgag 300
ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg ggccctgctg tctagcatgc ccactacgg 360
gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 420
taaccagac atgtggtgc ccccccccc ccaacacctg ctgcctctaa aaataacctt 480
gtccctggtg gatccctgc atgcgaagat ctgcgaacaa ggctgtgggg gactgagggc 540
aggctgtaac aggcttgggg gccagggtt atacgtgcct gggactccca aagtattact 600
gttccatgtt cccggcgaag ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt 660
aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg cagccatac aaggccatgg ggctgggcaa 720
gtgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg 780
ctctcagggg cccctccctg gggacagccc ctcttggtta gtcacacctt gtaggtctct 840
ctatataacc caggggcaca ggggtgccc tcattctacc accacctcca cagcacagac 900

	agacactcag gagcagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt	960
	caggccccgg atccggtggt ggtgcaaate aaagaactgc tcctcagtgg atgttgccct	1020
	tactttctagg cctgtacgga agtggttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtaccggg	1080
	taccgccacc atggcagcag cagccgccgc agccgccgag cagcagtcga gcaatggacc	1140
	agtgaaaaaa tcaatgagag aaaaagccgt cgagaggaga tcagtgaata aggagcacia	1200
	cagcaatttc aaagccggt acatccctat tgacgaagat cgcctgcata agacaggcct	1260
	gagggggcgc aaaggaaacc tggcaatctg cgtcatcatt ctgctgttta tcctggccgt	1320
	gattaatctg atcattactc tgggtgattg ggctgtcatc cgcattggcc caaacgggtg	1380
	tgactctatg gagttccacg aaagtggcct gctgcgattt aagcaggtgt ccgatatggg	1440
	ggtcatccat ccactgtaca aatctactgt cggcggggcg agaaacgaga atctgggtgat	1500
	caccgggaac aatcagccca ttgtgttcca gcagggaacc acaaagctgt ctgtggaaaa	1560
	caataaaaca tcaatcacta gcgacattgg catgcagttc ttgatcccc ggaccagaa	1620
	tatcctgttc agtaccgact atgagacaca cgaatttcct ctgccttcg gggatgaagtc	1680
	tctgaacgtc cagaaagcca gcactgagag aatcaccagt aacgtacat cagacctgaa	1740
	tatcaagggtg gatggacgag ctattgtccg gggaaatgag ggcgtgttca tcatgggcaa	1800
	gacaattgaa ttccacatgg gaggaacat ggagctgaaa gcagaaaaca gcatcattct	1860
[0004]	gaatggggagc gtgatggtct ccactaccag actgcccagc tcctctagtg gagaccagct	1920
	gggggtccgga gattgggtca ggtataagct gtgcatgtgt gccgatggca cctgttttaa	1980
	agtgacaggtc accagccaga atatgggatg tcagattagc gataaccctt gtgggaatac	2040
	tcattaaaag ctgtggccga ataaaagatc tttattttca ttagatctgt gtgttggttt	2100
	tttgtgtgtc ctgcaggggc gcgcctctag agcatggcta cgtagataag tagcatggcg	2160
	ggttaatcat taactacaag gaacccttag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg	2220
	ctcgtctgct cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc ttgcccggg	2280
	cggcctcagt gagcgagcga gcgcgc	2306
	<210> 4	
	<211> 792	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<220>	
	<221> 各种特征	
	<223> MHCK7启动子	
	<400> 4	
	aagcttgcac gtctaagcta gacccttcag attaaaaata actgaggtaa gggcctgggt	60
	aggggaggtg gtgtgagacg ctctgtctc tcctctatct gccatcggc cctttgggga	120

```

ggaggaatgt gcccaaggac taaaaaaagg ccatggagcc agaggggcga gggcaacaga      180
cctttcatgg gcaaaccctt gggccctgct gtctagcatg cccactacg ggtctaggct      240
gcccattgtaa ggaggcaagg cctggggaca cccgagatgc ctggttataa ttaaccacaga      300
catgtggctg ccccccccc cccaacacct gctgcctcta aaaataacct tgtccctggt      360
ggatccccctg catgcgaaga tcttcgaaca aggctgtggg ggactgaggg caggctgtaa      420
caggcttggg ggccagggt tatacgtgcc tgggactccc aaagtattac tgttccatgt      480
tcccggcgaa gggccagctg tcccccgcca gctagactca gcacttagtt taggaaccag      540
tgagcaagtc agcccttggg gcagcccata caaggccatg gggctgggca agctgcacgc      600
ctgggtccgg ggtgggcacg gtgcccgggc aacgagctga aagctcatct gctctcaggg      660
gcccctccct ggggacagcc cctcctggct agtcacaccc ttaggctcc tctatataac      720
ccaggggcac aggggctgcc ctcatctac caccacctcc acagcacaga cagacactca      780
ggagcagcca gc                                         792

```

<210> 5
 <211> 2244
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0005]

<220>
 <223> 引物

<220>
 <221> 各种特征
 <223> pAAV, tMCK, hSGCB

```

<400> 5
ctgcgcctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt      60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagggggtt aaccaattgg      120
cggccgcaaa cttgcatgcc ccactacggg tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc      180
tggggacacc cgagatgcct ggttataatt aacccaaca cctgctgcc ccccccccc      240
aacacctgct gcctgagcct gagcggttac cccaccccg tgccctgggtc ttaggctctg      300
tacaccatgg aggagaagct cgctctaaaa ataaccctgt ccctgggtga tccactacgg      360
gtctatgctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat      420
taacccaac acctgctgcc ccccccccc caacacctgc tgccctgagcc tgagcgggta      480
ccccaccccg gtgcctgggt cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc tcgctctaaa      540
aataaccctg tccctggtgg accactacgg gtctaggtg cccatgtaag gaggcaaggc      600
ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taacccaac acctgctgcc ccccccccc      660
aacacctgct gcctgagcct gagcggttac cccaccccg tgccctgggtc ttaggctctg      720
tacaccatgg aggagaagct cgctctaaaa ataaccctgt ccctgggtc cctggggac      780

```

	agcccccctcct ggctagtcac accctgtagg ctctcttata taaccagggt gcacaggggc	840
	tgcccccggtg tcacctgcag aagttggtcg tgaggcactg ggcaggttag tatcaaggtt	900
	acaagacagg tttaaggaga ccaatagaaa ctgggcttgt cgagacagag aagactcttg	960
	cgtttctgat aggcacctat tggctttact gacatccact ttgcctttct ctccacaggt	1020
	gtccactccc agttcaatta cagcgcgtgg taccaccatg gcagcagcag ccgccgcagc	1080
	cgccgagcag cagtcaagca atggaccagt gaaaaaatca atgagagaaa aagccgtcga	1140
	gaggagatca gtgaataagg agcacaacag caatttcaaa gccggctaca tccctattga	1200
	cgaagatcgc ctgcataaga caggcctgag ggggcgcaaa ggaaacctgg caatctgcgt	1260
	catcattctg ctgtttatcc tggccgtgat taatctgac attactctgg tgatttgggc	1320
	tgtcatccgc attggcccaa acgggtgtga ctctatggag ttccacgaaa gtggcctgct	1380
	gcgatttaag caggtgtccg atatgggggt catccatcca ctgtacaaat ctactgtcgg	1440
	cgggcggaga aacgagaatc tggtgatcac cgggaacaat cagcccatg tgttccagca	1500
	gggaaccaca aagctgtctg tggaaaacaa taaaacatca atcactagcg acattggcat	1560
	gcagttcttt gatccccgga ccagaatat cctgttcagt accgactatg agacacacga	1620
	atttcatctg ccttccgggg tgaagtctct gaacgtccag aaagccagca ctgagagaat	1680
	caccagtaac gctacatcag acctgaatat caaggtggat ggacgagcta ttgtccgggg	1740
[0006]	aatgagggc gtgttcatca tgggcaagac aattgaattt cacatgggag gcaacatgga	1800
	gctgaaagca gaaaacagca tcattctgaa tgggagcgtg atggtctcca ctaccagact	1860
	gccagctcc tctagtggag accagctggg gtccggagat tgggtcaggt ataagctgtg	1920
	catgtgtgcc gatggcacc tgtttaaagt gcaggtcacc agccagaata tgggatgtca	1980
	gattagcgat aacccttgtg ggaatactca ttaaaagctt ggccgcaata aaagatcttt	2040
	attttcatta gatctgtgtg ttggtttttt gtgtgtcctg caggggcgcg cctctagagc	2100
	atggctacgt agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa cccctagtga	2160
	tggagtggc cactccctct ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccggg cgaccaaagg	2220
	tcgcccagcg cccgggcttt gccc	2244
	<210> 6	
	<211> 714	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<220>	
	<221> 各种特征	
	<223> tMCK启动子	
	<400> 6	
	ccactacggg tctaggtctg ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct	60

```

ggttataatt aacccaaca cctgctgcc cccccccc aacacctgct gcctgagcct 120
gagcggttac cccaccccg tgcctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct 180
cgctctaaaa ataaccctgt ccctgggtga tccactacgg gtctatgctg cccatgtaag 240
gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taacccaac acctgctgcc 300
ccccccccc caacacctgc tgcctgagcc tgagcgggta cccaccccg gtgcctgggt 360
cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc tcgctctaaa aataaccctg tccctgggtg 420
accactacgg gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc 480
tggttataat taacccaac acctgctgcc cccccccc aacacctgct gcctgagcct 540
gagcggttac cccaccccg tgcctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct 600
cgctctaaaa ataaccctgt ccctgggtc cctggggac agccctcct ggctagtcac 660
acctgtagg ctctctata taaccaggg gcacaggggc tgcccccggt tcac 714

```

<210> 7
 <211> 296
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物

[0007]

<220>
 <221> 各种特征
 <223> mir29c

```

<400> 7
ggccggcctg ttggaatgag gcttcagtac ttacagaat cgttgccctgc acatcttga 60
aacacttgct gggattactt cttcagggtta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg 120
ctgttgacag tgagcgcaac cgatttcaaa tgggtgctaga gtgaagccac agatgtctag 180
caccatttga aatcggttat gcctactgcc tcggaattca aggggctact ttaggagcaa 240
ttatcttggt tactaaaact gaataccttg ctatctcttt gatacattgg ccggcc 296

```

<210> 8
 <211> 3384
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<220>
 <221> 各种特征
 <223> pAAV. CMV. Mir29C

```

<400> 8
cagcagctgc gcgtcgtc gctcactgag gccgccggg caaagcccg gcgtcgggcg 60
accttggtc gcccgccctc agtgagcgag cgagcgcgca gagaggagt ggggttaaac 120

```

	tcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat	180
	tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc	240
	aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc	300
	caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcttggcat tatgcccagt	360
	acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta	420
	ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg	480
	gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac	540
	gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaattggc ggtaggcgtg	600
	tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc gcctggagac	660
	gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga ccgatccagc ctccggactc	720
	tagaggatcc ggtactcgag gaactgaaaa accagaaagt taactggtaa gtttagtctt	780
	tttgtctttt atttcaggtc ccggatccgg tgggtgtgca aatcaaagaa ctgctcctca	840
	gtggatgttg cctttacttc taggcctgta cggaagtgtt acttctgctc taaaagctgc	900
	ggaattgtac ccggggccga tccaccggtc tttttcgcaa cggttttgcc gccagaacac	960
	aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgaca	1020
	tgttcggcga ggccggggcct gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa	1080
[0008]	gctggccggc ctgtttgaat gaggttcag tactttacag aatcgttgcc tgcacatctt	1140
	ggaaacactt gctgggatta cttcttcagg ttaacccaac agaaggctcg agaaggtata	1200
	ttgctgttga cagtgagcgc aaccgatttc aaatgggtgt agagtgaagc cacagatgtc	1260
	tagcaccatt tgaaatcggg tatgcctact gcctcggaat tcaaggggct actttaggag	1320
	caattatctt gtttactaaa actgaatacc ttgctatctc ttgatacat tggccggcct	1380
	gctctgggtg ctggcctcgc gccgccgtgt atcgccccgc cctgggcggc aaggctggcc	1440
	cggtcggcac cagttgcgtg agcggaaaga tggccgctc ccggccctgc tgcagggagc	1500
	tcaaaatgga ggacgcggcg ctcgggagag cgggcgggtg agtcacccac acaaaggaaa	1560
	agggcctttc cgtcctcagc cgtcgcttca tgtactcca cggagtaccg ggcgccgtcc	1620
	aggcacctcg attagttctc gagcttttgg agtacgtcgt ctttaggttg gggggagggg	1680
	ttttatgca tggagtttcc ccacactgag tgggtggaga ctgaagttag gccagcttgg	1740
	cacttgatgt aattctcctt ggaatttgcc ctttttgagt ttggatcttg gttcattctc	1800
	aagcctcaga cagtggttca aagttttttt cttccatttc aggtgtcgtg aaaagctagc	1860
	gctaccggac tcagatctcg agtcaagct gcggggatcc agacatgata agatacattg	1920
	atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt	1980
	gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca	2040
	attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt tcactagtag	2100

	catggctacg tagataagta gcatggcggg ttaatcatta actacaagga acccctagtg	2160
	atggagttgg ccactccctc tctgcgcgt cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag	2220
	gtcggccgac gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgccagctg	2280
	gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg	2340
	cgaatggaat tccagacgat tgagcgtcaa aatgtaggta tttccatgag cgtttttcct	2400
	gttgcaatgg ctggcggtaa tattgttctg gatattacca gcaaggccga tagtttgagt	2460
	tcttctactc aggcaagtga tgttattact aatcaaagaa gtattgcgac aacggttaat	2520
	ttgcgtgatg gacagactct ttactcggg ggctcactg attataaaaa cactttctcag	2580
	gattctggcg taccgttcct gtctaaaatc ccttaatcg gcctcctgtt tagctccgc	2640
	tctgattcta acgaggaaag cacgttatac gtgctcgta aagcaaccat agtacgcgc	2700
	ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtgggttac gcgagcgtga ccgctacact	2760
	tgccagcgcc ctagegccc ctcctttcgc tttcttcct tcctttctcg ccacgttcgc	2820
	cggtttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctccctta gggttcgat ttagtgcctt	2880
	acggcacctc gacccccaaa aacttgatta gggatgatgt tcacgtagt ggccatcgcc	2940
	ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtcacg ttctttaata gtggactctt	3000
	gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat	3060
[0009]	tttgccgatt tcggcctatt ggtaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa	3120
	ttttaacaaa atattaacgt ttacaattta aatatttgct tatacaatct tcctgtttt	3180
	ggggcttttc tgattatcaa ccggggtaca tatgattgac atgctagttt tacgattacc	3240
	gttcacgat tctcttggtt gctccagact ctcaggcaat gacctgatag cctttgtaga	3300
	gacctctcaa aaatagctac cctctccggc atgaatttat cagctagaac gggtgaatat	3360
	catattgatg gtgatttgac tgtc	3384
	<210> 9	
	<211> 296	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<220>	
	<221> 各种特征	
	<223> miR29c	
	<400> 9	
	ggccggcctg tttgaatgag gcttcagtac ttacagaat cgttcgctgc acatcttgga	60
	aacacttgct gggattactt cttcaggta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg	120
	ctgttgacag tgagcgcaac cgatttcaaa tgggtgctaga gtgaagccac agatgtctag	180

	caccatttga aatcggttat gcctactgcc tcggaattca aggggctact ttaggagcaa	240
	ttatcttggt tactaaaact gaataccttg ctatctcttt gatacattgg ccggcc	296
	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<220>	
	<221> 各种特征	
	<223> tMCK正向引物	
	<400> 10	
	acccgagatg cctggttata att	23
	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
[0010]	<220>	
	<221> 各种特征	
	<223> tMCK反向引物	
	<400> 11	
	tcctatggtgt acagagccta agac	24
	<210> 12	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<220>	
	<221> 各种特征	
	<223> tMCK探针	
	<220>	
	<221> 各种特征	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 5' FAM	
	<220>	
	<221> 各种特征	
	<222> (25)..(25)	
	<223> 3' TAMRA	
	<400> 12	
	ctgctgcctg agcctgagcg gttac	25

[0011]	<210>	13	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<220>		
	<221>	各种特征	
	<223>	tMCK内含子正向引物	
	<400>	13	
		gtgaggcact gggcaggttaa	20
	<210>	14	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<220>		
	<221>	各种特征	
	<223>	tMCK内含子反向引物	
	<400>	14	
		acctgtggag agaaaggcaa ag	22
	<210>	15	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<220>		
	<221>	各种特征	
	<223>	tMCK内含子探针	
	<220>		
	<221>	各种特征	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	5' 6FAM	
	<220>		
	<221>	各种特征	
	<222>	(39)..(39)	
	<223>	3' TAMRA	
	<400>	15	
		atcaagggtta caagacaggt ttaaggagac caatagaaa	39
	<210>	16	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

[0012]	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	16	
		ccaacacctg ctgcctctaa a	21
	<210>	17	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<220>		
	<221>	各种特征	
	<223>	MHCK7反向引物	
	<400>	17	
		gtcccccaca gccttggtc	19
	<210>	18	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<220>		
	<221>	各种特征	
	<223>	MHCK7探针	
	<220>		
	<221>	各种特征	
	<222>	(1).. (1)	
	<223>	5' FAM	
	<220>		
	<221>	各种特征	
	<222>	(9).. (9)	
	<223>	Zen	
	<220>		
	<221>	各种特征	
	<222>	(23).. (23)	
	<223>	3IABKFQ	
	<400>	18	
		tggatcccct gcatgcgaag atc	23