



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115461465 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 09

(21) 申请号 202180027085.0

(22) 申请日 2021.04.07

(30) 优先权数据

63/006,148 2020.04.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/026262 2021.04.07

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/207415 EN 2021.10.14

(71) 申请人 密苏里大学管理机构

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 段东升 潘秀芳 岳永平

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 赵晓琳

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书23页

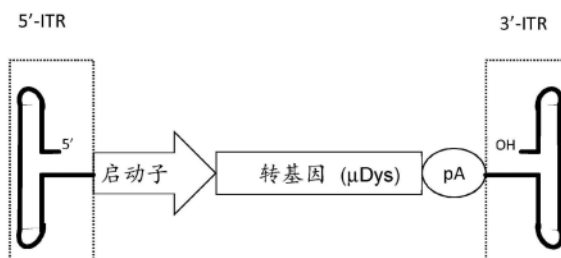
序列表5页 附图22页

(54) 发明名称

用于AAV基因治疗的无CpG的ITR

(57) 摘要

本发明公开了重组腺相关病毒(rAAV)核酸载体,包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)。本发明还公开了包含rAAV载体的rAAV颗粒,以及用于递送核酸和/或用于基因治疗的组合物和方法。本发明还公开了使用所述rAAV载体通过AAV基因疗法治疗疾病的组合物和方法。



1. 不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3' (CpG) 基序的末端反向重复序列 (ITR)。
2. 根据权利要求1所述的ITR,与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中的至少一个具有约70%至约90%的序列同一性。
3. 根据权利要求1所述的ITR,包含约100至约200个核酸。
4. 根据权利要求1所述的ITR,包含小于70%的GC含量。
5. 根据权利要求1所述的ITR,包含含有转换突变的Rep结合元件 (RBE)。
6. 根据权利要求1所述的ITR,其中所述ITR是5'端ITR或3'端ITR。
7. 根据权利要求1所述的ITR,其中所述ITR是5'端ITR,所述5'端ITR包括在所述5'端ITR的A段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至胸腺嘧啶取代。
8. 根据权利要求7所述的ITR,其中所述ITR是5'端ITR,所述5'端ITR包括A段中3个剩余CpG基序中的鸟嘌呤至腺嘌呤取代。
9. 根据权利要求8所述的ITR,其中5'-端ITR的A'、B'和C'段中的相应碱基被互补碱基取代。
10. 根据权利要求1所述的ITR,其中所述ITR是3'端ITR,所述3'-端ITR包括在所述3'-端ITR的A段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至胸腺嘧啶取代。
11. 根据权利要求10所述的ITR,其中所述ITR是3'端ITR,所述3'-端ITR包括在所述3'-端ITR的A段中的3个剩余CpG基序中的鸟嘌呤至腺嘌呤取代。
12. 根据权利要求11所述的ITR,其中3'端ITR的A'、B'和C'段中的相应碱基被互补碱基取代。
13. 根据权利要求1所述的ITR,与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中的至少一个具有约80%的序列同一性。
14. 根据权利要求11所述的ITR,选自SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中的至少一个。
15. 一种重组腺相关病毒 (rAAV) 核酸载体,包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3' (CpG) 基序的末端反向重复序列 (ITR)。
16. 一种重组腺相关病毒 (rAAV) 颗粒,包含病毒衣壳和rAAV核酸载体,所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3' (CpG) 基序的末端反向重复序列 (ITR)。
17. 一种药物组合物,包含药学上可接受的载体和权利要求16所述的重组腺相关病毒 (rAAV) 颗粒。
18. 一种将核酸递送至细胞中的方法,所述方法包括向所述细胞施用权利要求15所述的rAAV载体。
19. 一种预防或治疗有需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效治疗量的权利要求15所述的rAAV载体。
20. 根据权利要求19所述的预防或治疗疾病的方法,其中所述疾病选自神经肌肉疾病、视网膜疾病、听觉疾病、肝病、肾病、肺病、心脏病、血液疾病、中枢神经系统疾病和其他疾病。

用于AAV基因治疗的无CpG的ITR

[0001] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0002] 本发明是在政府支持下,由美国国立卫生研究院授予的编号为NS090634和AR070517的支持下以及陆军医学研究和物资司令部授予的编号为W81XWH-14-1-0302的支持下完成的。政府对这项发明享有一定的权利。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求序列号为63/006,148、申请日为2020年4月7日的美国临时申请的权利要求,其全部内容通过引用并入本文

[0005] 序列表的引入

[0006] 本文提供了序列表的纸质副本和计算机可读形式的序列表,其中计算机可读形式的序列表包含名为“20UMC037_ST25.txt”的文件,大小为5,645字节(在MICROSOFT WINDOWS®EXPLORER中显示),并通过引用将其并入本文。该序列表由SEQ ID NO:1-19组成。

背景技术

[0007] 本公开总体上涉及重组腺相关病毒(rAAV)核酸载体,其包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)(即,ITR不包括任何CpG基序)。更具体地,本公开涉及包含rAAV载体的rAAV颗粒,涉及用于递送核酸的组合物和方法,以及涉及用于基因治疗的组合物和方法。本公开还涉及使用rAAV载体通过AAV基因疗法治疗疾病的组合物和方法。

[0008] 腺相关病毒(AAV)是一种辅助依赖性细小病毒,最早在腺病毒制剂中作为污染颗粒被发现。AAV含有一个约4.7kb的单链DNA基因组。AAV是在80年代末和90年代初开发的一种基因传递/基因治疗载体。监管机构已批准三种AAV载体用于治疗遗传性疾病。其中包括用于治疗脂蛋白脂酶缺乏症的Glybera、用于治疗莱伯氏先天性黑蒙症的Luxturna(Voretigene neparvovec-rzyl)和用于治疗脊髓性肌萎缩症的Zengensma(Onasemnogene abeparvovec-xioi)。AAV基因疗法在许多其他遗传性疾病中也取得了显著的临床成功,如血友病A、血友病B、X连锁肌管型肌病和巨轴索神经病。

[0009] rAAV载体是通过用转基因表达盒替换野生型AAV复制(Rep)和结构/衣壳(Cap)开放阅读框而产生的。两个反向末端重复序列(ITR)是rAAV载体中唯一的野生型病毒序列(图1A)。每个ITR由核苷酸组成,这些核苷酸以翻转(flip)或反转(flop)构型形成T形发夹结构。

[0010] ITR对于野生型AAV和rAAV基因组复制、子代基因组生成和封装进衣壳以及单链载体基因组转化为具有转录能力的潜活形式的持续转基因表达都是必不可少的。AAV载体的生产依赖于载体基因组从双链前病毒质粒(顺式质粒,cis-plasmid)中的成功拯救,随后通过自引发机制对载体基因组进行复制,并且将单链基因组置换和封装到预组装的衣壳中。ITR对所有这些进程都至关重要。具体来说,大Rep蛋白结合RBE和RBE'元件。这些相互作用使大的Rep蛋白在末端分离位点(trs)形成序列特异性和链特异性切口。通过该切割产生的

游离3'OH基团用作合成次级ITR的复制引物。进一步复制导致新互补链的产生和原始互补链的置换。移位的链(载体基因组)通过5倍通道被小Rep蛋白沿3'至5'方向泵入预先形成的空衣壳中。除了在载体生产中发挥关键作用外,ITR对AAV转导也很重要。载体基因组的ITR引发的单链到双链转化是转基因转录的先决条件。持续性AAV转导(持续性转基因表达)也依赖于ITR间重组和随后形成的游离型环状AAV基因组。

[0011] 尽管在将AAV基因治疗从实验室转移到病床方面取得了重大进展,但仍存在重大障碍。其中包括免疫应答。AAV最初被认为是一种免疫原性弱的载体。然而,最新的动物研究结果和临床试验数据表明,AAV载体可以通过先天性和适应性免疫机制诱导显著的免疫应答。

[0012] 这些缺点强调了开发新的、增强的AAV基因治疗技术的必要性。因此,亟需开发具有改进的免疫原性特性的AAV基因治疗载体。

[0013] ITR的基因修饰可能代表一种降低AAV载体免疫原性的方法。不幸的是,众所周知,ITR诱变与功能缺陷有关。

[0014] 通过诱变,ITR的结构-功能关系已被广泛质疑。大多数ITR突变是有害的。它们对AAV复制和/或封装进衣壳产生负面影响(Ryan等人,1996;Wang等人,1998;Brister和Muzyczka,1999;2000;McCarty等人,2003;Zhong等人,2008;Zhou等人,2008;Ling等人,2015;Zhou等人,2017)。RBE的二核苷酸颠换突变使Rep结合减少2至10倍(Ryan等人,1996)。RBE核心序列的单核苷酸颠换突变导致Rep结合减少多达5倍(Ryan等人,1996)。trs的单核苷酸颠换突变几乎消除了大Rep蛋白的ITR切口(Brister和Muzyczka,1999)。B臂和C臂的截断导致AAV复制减少8倍(Zhou等人,2017)。在一个ITR中trs的缺失完全阻止了来自突变的ITR的AAV基因组复制(McCarty等人,2003;McCarty,2008)。D-序列的缺失和/或取代使得AAV仅包装正链或负链基因组,而不是两者(Zhong等人,2008;Zhou等人,2008;Ling等人,2015年)。有缺陷的ITR也与非载体序列的包装有关(Wang等人,1996;Wang等人,1998;Savy等人,2017;Tai等人,2018)。总之,这些研究揭示了在AAV基因治疗中保持完整ITR的重要性。

发明内容

[0015] 本公开总体上涉及不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)(即,ITR不包括任何CpG基序)。更具体地,本公开涉及重组腺相关病毒(rAAV)核酸载体,包括无CpG基序的ITR(即,ITR不包括任何CpG基序)。本公开还涉及包含所述rAAV载体的rAAV颗粒和药物组合物。本公开还涉及递送核酸的方法和AAV基因治疗的方法。本公开还涉及使用rAAV载体用AAV基因疗法治疗疾病的组合物和方法,其中rAAV载体的ITR不含CpG基序(即ITR不包括任何CpG基序)。

[0016] 在一个方面,本公开涉及不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)(即,ITR不包括任何CpG基序)。

[0017] 一方面,本公开涉及重组腺相关病毒(rAAV)核酸载体,包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)(即,ITR不包括任何CpG基序)。

[0018] 另一方面,本公开涉及包含病毒衣壳和rAAV核酸载体的rAAV颗粒,所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的ITR(即,ITR不包含任何CpG基序)。

[0019] 另一方面,本发明涉及一种药物组合物,包含药学上可接受的载体和rAAV核酸载体,所述rAAV核酸载体包含不含(CpG)基序的ITR。优选地,ITR是无CpG的ITR(即,ITR不包括任何CpG基序)。

[0020] 在另一个方面,本公开涉及将核酸递送到细胞中的方法,所述方法包括向细胞施用包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的ITR的rAAV载体。

[0021] 在另一个方面,本公开涉及治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的rAAV载体,所述rAAV载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的ITR。优选地,ITR是不含CpG的ITR(即,ITR不包括任何CpG基序)。

附图说明

[0022] 通过下文对本公开的详细描述,将更好地理解本公开,并且除了上述之外的特征、方面和优点将变得显而易见。该详细描述参考以下附图,其中:

[0023] 图1A示出了AAV载体的示意图。

[0024] 图1B示出了来自AAV1(SEQ ID NO:1)、2(SEQ ID NO:2)、3(SEQ ID NO:3)、4(SEQ ID NO:4)、6(SEQ ID NO:5)、7(SEQ ID NO:6)的3'-ITR与无CpG的AAV(AAV不含CpG-1;SEQ ID NO:7)的变体-1的比对。

[0025] 图1C示出了野生型ITR(SEQ ID NO:8)和在无CpG的ITR变体-1(SEQ ID NO:9)中产生的突变的二维图,以消除反转构型中载体基因组5'-末端(5'-ITR)的CpG基序。

[0026] 图1D示出了3'-ITR在反转构型中的二维图,该二维图示出了野生型3'-ITR(130个核苷酸)序列(SEQ ID NO:10)和碱基变化导致无CpG的3'-ITR(SEQ ID NO:7)。

[0027] 图1E示出了来自AAV1(SEQ ID NO:1)、2(SEQ ID NO:2)、3(SEQ ID NO:3)、4(SEQ ID NO:4)、6(SEQ ID NO:5)、7(SEQ ID NO:6)的3'-ITR与无CpG的AAV(AAV不含CpG-2;SEQ ID NO:11)变体-2的比对。

[0028] 图2A示出了每种载体三轮独立生产的载体产量的定量。

[0029] 图2B示出了野生型ITR载体和无CpG的ITR载体的代表性透射电子显微镜图像。

[0030] 图2C示出了空颗粒的定量。

[0031] 图3A示出了来自肌营养不良mdx小鼠(抗肌萎缩蛋白缺陷型(dystrophin-null)mdx小鼠)的胫骨前肌的代表性抗肌萎缩蛋白免疫荧光染色和HE染色显微照片,所述抗肌萎缩蛋白缺陷型mdx小鼠未接受AAV微抗肌萎缩蛋白(micro-dystrophin)注射(未注射,右图)、注射有无CpG的AAV微抗肌萎缩蛋白载体(无CpG的ITR,左图)、和野生型AAV微抗肌萎缩蛋白载体(野生型ITR,中图)。

[0032] 图3B示出了接受无CpG的AAV微抗肌萎缩蛋白载体(无CpG的ITR)或野生型AAV微抗肌萎缩蛋白载体(野生型ITR)的抗肌萎缩蛋白缺陷型mdx小鼠的胫骨前肌中抗肌萎缩蛋白阳性肌纤维的定量。

[0033] 图3C示出了未接受AAV微抗肌萎缩蛋白载体注射(未注射)、注射了无CpG的AAV微抗肌萎缩蛋白载体(无CpG的ITR)和野生型AAV微抗肌萎缩蛋白载体(野生型ITR)的抗肌萎缩蛋白缺陷型mdx小鼠的胫骨前肌中微抗肌萎缩蛋白表达的蛋白免疫印记评估。

[0034] 图3D示出了通过蛋白免疫印记在接受无CpG的AAV微抗肌萎缩蛋白载体(无CpG的ITR)或野生型AAV微抗肌萎缩蛋白载体(野生型ITR)的抗肌萎缩蛋白缺陷型mdx小鼠的胫骨

前肌中抗肌萎缩蛋白表达水平的定量。

[0035] 图3E示出了通过定量PCR在接受无CpG的AAV微抗肌萎缩蛋白载体(无CpG的ITR)或野生型AAV微抗肌萎缩蛋白载体(野生型ITR)的抗肌萎缩蛋白缺陷型mdx小鼠的胫骨前肌中对AAV载体基因组拷贝数的定量。

[0036] 图4A-4F示出了胫骨前肌的代表性全视野抗肌萎缩蛋白免疫染色和苏木精-伊红(H&E)染色显微照片。

[0037] 图5A和5B示出了中心成核和肌纤维大小分布的评估。

[0038] 图6A-6H示出了肌肉收缩性的定量评估。

[0039] 虽然本公开易于进行各种修改和替代形式,但是其特定实施方案已经在附图中以示例的方式示出,并且在下文中详细描述。然而,应当理解,特定实施方案的描述并不旨在将本公开限制为涵盖落入由所附权利要求限定的本公开的精神和范围内的所有修改、等同物和替代方案。

具体实施方式

[0040] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管与本文所述的方法和材料类似的或等同的任何方法和材料均可用于本公开的实践或测试中,但优选的方法和材料描述如下。

[0041] 本公开的方法是产生相对于野生型ITR缺失一个或多个CpG基序的ITR。优选地,ITR是无CpG的ITR。在某些方面,ITR用于rAAV载体。令人惊讶的是,尽管发生了突变,ITR仍保留了基因递送的功能。这种方法的一个重要优点是rAAV载体不包含任何CpG基序(即缺失任何CpG基序;本文也称为“无CpG”)。

[0042] 一方面,本公开涉及缺失至少一个5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)。优选地,ITR不包括任何CpG基序(即“无CpG”)。优选地,ITR是SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中的一个。

[0043] 一方面,本公开涉及包含缺失一个或多个5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)的重组腺相关病毒(rAAV)核酸载体。优选地,ITR不包括任何CpG基序(即“无CpG”)。优选地,ITR是SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中的一个。

[0044] 如本文所用,5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序是指在单链线性序列中被一个磷酸基团隔开的胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)。CpG表示法用于将此单链线性序列与双链序列的胞嘧啶和鸟嘌呤的CG碱基配对区分开来。不受特定理论的束缚,据信减少ITR的CpG基序数量会减弱T细胞应答并延长转基因表达。据信,未甲基化的CpG基序被摄取后,会被浆细胞样树突状细胞内体中的Toll样受体9(TLR9)会感应到(Zhu等人,2009;Martino等人,2011;Toth等人,2019),并且这导致I型干扰素的产生和细胞毒性T淋巴细胞的激活(Zhu等人,2009;Rogers等人,2015;Rogers等人,2017;Ashley等人,2019)。

[0045] 如本文所用,重组腺相关病毒核酸载体或rAAV载体是指单链脱氧核糖核酸(ssDNA)链,其在基因组的5'末端携带有5'-ITR,在基因组的3'末端携带有3'-ITR。5'-ITR和3'-ITR之间的DNA可以是表达盒,其可以用于将遗传物质携带到外源细胞中。术语rAAV载体可以指核酸链中的碱基序列(一级结构)或三维折叠ssDNA分子(三级结构)。

[0046] 在一些实施方案中,重组腺相关病毒核酸载体或rAAV载体也可以指自互补载体,所述自互补载体在基因组的中间具有末端分离位点突变的ITR和在基因组的5'末端和3'末端具有两个末端开放的常规ITR。基因组5'的一半和基因组3'的一半的折叠形成互补的双链脱氧核糖核酸(dsDNA),用于携带遗传物质到外源细胞中。

[0047] 如本文所用,“野生型AAV ITR”是指5'-ITR和3'-ITR中的一种或两种,它们是天然存在的腺相关病毒和重组AAV载体中的末端ssDNA片段。天然存在的腺相关病毒的实例包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13。在制备本公开的无CpG的ITR中用作参考点的特别合适的野生型AAV ITR来自腺相关病毒血清型2(AAV2)。术语野生型AAV ITR可指核酸链中的碱基序列(一级结构)或三维折叠的ssDNA AAV载体分子中的ITR片段(三级结构)。典型的rAAV载体缺失除ITR序列之外的所有天然病毒序列。因此,基因治疗或其他rAAV应用中使用的多种载体都使用了包括野生型AAV ITR在内的载体。因此,应当理解,本文所用术语野生型AAV ITR包括许多rAAV载体中使用的野生型AAV ITR。示例性的野生型AAV ITR序列包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0048] 野生型AAV ITR包含约145个核酸。本公开的ITR可包括约100、约110、约120、约130、约140、约150、约160、约170、约180、约190、约200、约100至约150、约110至约150、约110至约140、约120至约140、约120至约150、约130至约150或约130至140个核酸。观察到缺失野生型ITR末端的15-17个核苷酸(即5'-ITR的5'末端的15-17个核苷酸和/或3'-ITR的3'末端的15-17个核苷酸)不会改变ITR功能(Samulski等人,1987;Savy等人,2017),因此特别适用于本公开的ITR包含约130个核酸。

[0049] 在一些实施方案中,ITR与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中的一个或多个具有约70%至约99%、约70%至约95%、约70%至约90%、约70%至约80%、约80%至约99%、约80%至约95%、或约80%至约90%的序列同一性。在一些实施方案中,ITR与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中的一个或多个具有约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的序列同一性。

[0050] 在一些实施方案中,ITR缺失野生型AAV ITR中包含的一个或多个CpG基序。野生型AAV载体中的两个野生型AAV ITR总共包含32个CpG基序(每个16个基序)。在一些实施方案中,ITR缺失野生型AAV ITR中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个CpG基序。在一些实施方案中,ITR缺失野生型AAV ITR中的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或32个CpG基序。在一些实施方案中,ITR与一种或多种野生型AAV ITR具有至少70%、至少80%、至少85%、至少95%或99%的序列同一性,而ITR缺失野生型AAV ITR中的16个CpG基序中的一个或多个。特别合适的ITR与血清型-2的一种或多种野生型AAV ITR(AAV2 ITR)具有至少70%、至少80%、至少85%、至少95%或99%的序列同一性,并且ITR缺失野生型AAV 2 ITR中的16个CpG基序中的一个或多个。在优选的实施方案中,序列同一性的计算不考虑野生型ITR的末端15个核苷酸(即5'-ITR的5'末端的15个核苷酸和/或3'-ITR的3'末端的15个核苷酸)。

[0051] 优选地,ITR不含CpG基序(即ITR是无CpG的ITR,不含任何CpG基序)。如本文所用,“无CpG的ITR”指ITR不包含任何CpG基序。野生型AAV载体中的两个ITR总共包含32个CpG基

序(每个16个)。在一些实施方案中,ITR缺失野生型AAV ITR中的16个CpG基序。在一些实施方案中,ITR缺少野生型AAV ITR中的32个CpG基序。在一些实施方案中,ITR与一种或多种野生型AAV ITR具有至少70%、至少80%或至少85%的序列同一性,ITR缺失野生型AAV ITR中的16个CpG基序。特别合适的ITR与血清型-2的野生型AAV ITR(AAV2 ITR)的一种或多种具有至少70%、至少80%或至少85%的序列同一性,并且ITR缺失野生型AAV2 ITR中的16个CpG基序和/或ITR缺失野生型AAV2 ITR中的32个CpG基序。在优选的实施方案中,序列同一性的计算不考虑野生型ITR的末端15个核苷酸(即5'-ITR的5'末端的15个核苷酸和/或3'-ITR的3'末端的15个核苷酸)。

[0052] 通过比对序列以进行最佳比较,可以确定两个序列的同一性百分比。例如,可在第一核酸序列的序列中引入空位,以与第二核酸序列最佳比对。然后比较相应位置的核苷酸。当第一序列中的一个位置被与第二序列中相应位置相同的核苷酸占据时,核酸在该位置是相同的。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同核苷酸数量的函数。因此,同一性百分比=[相同核苷酸的数量/重叠位置的总数]×100。序列同一性的百分比可以根据该公式计算,通过比较两个被比较序列的最佳比对,确定相同核酸在两个序列中出现的位置的数量以产生匹配位置的数量(上述公式中的“相同位置的数量”),将匹配位置的数量除以被比较位置的总数(上述公式中的“重叠位置的总数”),并将结果乘以100以产生序列同一性百分比。在这种比较中,序列可以是相同的长度,也可以是不同的长度。用于确定比较窗的序列的最佳比对可以通过Smith和Waterman(1981)的局部同源性算法(Smith和Waterman, 1981)、通过Needleman和Wunsh(1972)的同源性比对算法(Needleman和Wunsch,1970)、通过Pearson和Lipman(1988)的方法搜索相似性(Pearson和Lipman,1988)、通过这些算法的计算机化实施(威斯康星州麦迪逊市,Science Drive 575号遗传计算机组,Wisconsin Genetics软件包7.0版中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或通过检查来进行。

[0053] 优选地,由于CpG基序中C或G残基的点突变,ITR缺失野生型AAV ITR中的16个CpG基序中的一个或多个。在特定的实施方案中,CpG基序中C或G残基的一些或所有点突变是转换突变。例如,本公开的ITR可与野生型ITR具有约85%的序列同一性(在序列同一性计算中不考虑野生型ITR的缺失的末端15个核苷酸),并且可缺失野生型ITR中的所有16个CpG基序,其中ITR突变全部是用腺嘌呤[A]、胸腺嘧啶[T]、鸟嘌呤[G]、或胞嘧啶[C]取代野生型ITR中胞嘧啶[C]和/或鸟嘌呤[G]的点突变。

[0054] “转换突变”按照本领域普通技术人员所理解的一般含义使用,并且当嘧啶碱基(即胸腺嘧啶[T]或胞嘧啶[C])取代另一嘧啶碱基时或当嘌呤碱基(即腺嘌呤[A]或鸟嘌呤[G])取代另一嘌呤碱基时发生。

[0055] 野生型ITR可分为七个片段,包括A、A'、B、B'、C、C'和D序列,如AAV2的示例性5'-ITR(图1C,SEQ ID NO:8)。序列A、B和C分别与序列A'、B'和C'反向互补。序列B/B'和C/C'的配对形成了ITR T形发夹结构的两个臂。序列A和A'的配对形成了T形ITR的茎。20个核苷酸长的D序列在AAV载体中作为单链DNA保留(图1C和1D)。

[0056] 野生型ITR包含三个功能必需的序列元件。其中包括Rep结合元件(RBE)、第二Rep结合元件(RBE')和末端分离位点(trs)。RBE位于A/A'茎,由22-bp序列组成(图1C和1D)。在RBE中,有一个10-bp的核心序列(图1C和1D)。核心序列中的二核苷酸颠换突变将Rep结合亲和性降低了至少10倍(Ryan等人,1996)。三个四核苷酸重复序列GAGY(互补链中的RCTC)被

认为是RBE的共有Rep-结合基序(Amiss等人,2003;Wilmott等人,2019)。Y是指C或T,R是指A或G。这种共有的Rep结合基序及其外周序列对于Rep结合很重要(Wilmott等人,2019)。在一些实施方案中,四个四核苷酸重复序列GMGY(互补链中的RCKC)及其侧翼序列被认为对Rep结合很重要。M指A或C,K指G或T。在AAV2 ITR中,Rep结合需要四个四核苷酸重复序列GMGC(互补链中的GCKC)及其侧翼序列(5'端为CAGT,3'端为AG)(Ryan等人,1996)。RBE'位于B臂或C臂的尖端。它由5-核苷酸序列组成(图1C和1D)(Brister和Muzyczka,2000)。trs是位于A/A'茎和D-序列连接处的7-核苷酸序列(Brister和Muzyczka,1999年)。

[0057] 野生型ITR有16个CpG基序(图1B和1C)。已知这些区域中的突变影响ITR功能(Ryan等人,1996;Brister和Muzyczka,1999;2000;Zhou等,2017)。这些CpG基序位于A/A'茎(序列A中4个,序列A'中4个)、B/B'臂(序列B中2个,序列B'中2个)和C/C'臂(序列C中2个,序列C'中2个)。在三个ITR必需元件中,只有RBE包含CpG基序(6个在核心序列中,总共8个)。RBE'和trs中没有CpG基序。

[0058] 在一些实施方案中,本公开的ITR包括含有转换突变的Rep结合元件(RBE)。优选地,RBE中的所有突变都是转换突变。在一些实施方案中,ITR突变可以包括转换突变、颠换突变及其组合。

[0059] AAV载体(野生型和工程化的)在载体的任一端包含两个ITR,5'端ITR和3'端ITR(图1A)。因此,本公开的rAAV载体还包含两个ITR,5'端ITR和3'端ITR,并且至少一种但优选两种ITR都缺失一个或多个CpG基序。更优选地,至少一种但优选两种ITR无CpG。在各种实施方案中,rAAV载体包含无CpG的5'-端ITR、无CpG的3'-端ITR及其组合。

[0060] 在一些实施方案中,5'-端ITR包含5'-端ITR的A段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至胸腺嘧啶取代。在一些实施方案中,5'-端ITR包含A段中3个剩余的CpG基序中的鸟嘌呤至腺嘌呤取代。

[0061] 在一些实施方案中,5'-端ITR包括5'-端ITR的C段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至腺嘌呤取代和C段中紧邻下游的胞嘧啶中的胞嘧啶至鸟嘌呤取代。在一些实施方案中,5'-端ITR包括在5'-端ITR的C段的第二CpG基序中的鸟嘌呤至胞嘧啶取代和在C段的紧邻下游的鸟嘌呤中的鸟嘌呤至胸腺嘧啶取代。

[0062] 在一些实施方案中,5'-末端ITR包括5'-端ITR的C段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至胸腺嘧啶取代和C段中紧邻下游的胞嘧啶中的胞嘧啶至鸟嘌呤取代。在一些实施方案中,5'-端ITR包括在5'-端ITR的C段的第二CpG基序中的胞嘧啶至腺嘌呤取代和在紧接C段的第二CpG基序下游的鸟嘌呤中的鸟嘌呤至腺嘌呤取代。

[0063] 在一些实施方案中,5'-端ITR包含5'-端ITR的B段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至腺嘌呤取代。在一些实施方案中,5'-端ITR包含5'-端ITR的B段中的第二CpG基序中的鸟嘌呤至胞嘧啶取代。

[0064] 在一些实施方案中,5'-端ITR包含5'-端ITR的B段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至胸腺嘧啶取代。在一些实施方案中,5'-端ITR包含5'-端ITR的B段中的第二CpG基序中的胞嘧啶至鸟嘌呤取代。

[0065] 在一些实施方案中,5'-端ITR的A'、B'和C'段中的相应碱基被互补碱基取代。

[0066] 在一些实施方案中,3'-端ITR包含3'-端ITR的A段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至胸腺嘧啶取代。在一些实施方案中,3'-端ITR包含在3'-端ITR的A段中的3个剩余CpG基序中

的鸟嘌呤至腺嘌呤取代。

[0067] 在一些实施方案中,3'-端ITR包含3'-端ITR的B段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至腺嘌呤取代。在一些实施方案中,3'-端ITR包括3'-端ITR的B段的第二CpG基序中的胞嘧啶至鸟嘌呤取代和鸟嘌呤至胞嘧啶取代。

[0068] 在一些实施方案中,3'-端ITR包含3'-端ITR的B段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至胸腺嘧啶取代。在一些实施方案中,3'-端ITR包含3'-端ITR的B段的第二CpG基序中的胞嘧啶至鸟嘌呤取代。

[0069] 在一些实施方案中,3'-端ITR序列包含3'-末端ITR的C段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至腺嘌呤取代和C段中紧邻下游的胞嘧啶中的胞嘧啶至鸟嘌呤取代。在一些实施方案中,3'-端ITR序列包含3'-端ITR的C段中的第二CpG基序中的鸟嘌呤至胞嘧啶取代和C段中紧邻下游的鸟嘌呤至胸腺嘧啶取代。

[0070] 在一些实施方案中,3'-端ITR序列包含3'-端ITR的C段中的第一CpG基序中的鸟嘌呤至胸腺嘧啶取代和C段中紧邻下游的胞嘧啶中的胞嘧啶至鸟嘌呤取代。在一些实施方案中,3'-端ITR序列包含3'-端ITR的C段中第二CpG基序中的胞嘧啶至腺嘌呤取代和C段中第二CpG基序紧邻下游的鸟嘌呤至腺嘌呤取代。

[0071] 在一些实施方案中,3'-端ITR的A'、B'和C'段中的相应碱基被互补碱基取代。

[0072] GC含量是设计无CpG的ITR的另一个重要考虑因素。野生型AAV1、2、3、4、6、7的3'-ITR的GC含量分别为68.53%、69.66%、65.07%、64.38%、67.13%和68.97%。人类基因组的GC含量平均为40.9%。特别合适的无CpG的ITR的GC含量小于70%、小于65%、小于60%、约70%、约65%、约60%、约40%至约70%、约40%至约65%或约40%至约60%。例如,在一些实施方案中,ITR包含约60%的GC含量。在一些实施方案中,ITR的GC含量为60.16% (变体-1无CpG的ITR的5'-ITR)、60.00% (变体-1无CpG的ITR的3'-ITR)、58.59% (变体-2无CpG的ITR的5'-ITR)和58.02% (变体-2无CpG的ITR的3'-ITR)。

[0073] GC含量采用在线GC含量计算器计算。具体而言,GC含量百分比采用以下公式计算: 总数(G+C)/总数(A+T+G+C) × 100%。

[0074] 表1中给出了特别合适的ITR的序列。在一些实施方案中,ITR与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中的一个或多个具有约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%的序列同一性。优选地,ITR包括选自SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列及其组合。例如,在一个实施方案中,5'-端ITR包括SEQ ID NO:9,3'-端ITR包括SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,5'-端ITR包括SEQ ID NO:9,3'-端ITR包括SEQ ID NO:11。在另一个实施方案中,5'-端ITR包括SEQ ID NO:12,3'-端ITR包括SEQ ID NO:11。在另一个实施方案中,5'-端ITR包括SEQ ID NO:12,3'-端ITR包括SEQ ID NO:7。

[0075] 表1:序列编号(SEQ ID NO)

SEQ ID NO	名称	序列
9	无 CpG 的 5'-ITR (变体-1)	5'-GCTCACTCACTCACTCACTGAGGCCAGCCCTGCAAA GCAGGGCTGTCAGGCCACCTTTGGTGGCCTGGCCTCA GTGAGTGAGTGAGTGAGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTTCCT-3'
7	无 CpG 的 3'-ITR (变体-1)	5'-AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC TGCTCACTCACTCACTCACTGAGGCCAGGGCACCAAA GGTGCCCTGACAGCCCTGCTTTGCAGGGCTGGCCTCA GTGAGTGAGTGAGTGAGCAG-3'
12	无 CpG 的 5'-ITR (变体-2)	5'-GCTCACTCACTCACTCACTGAGGCCTGCAGAGCAAA GCTCTGCAGTCTGGGGACCTTTGGTCCCCAGGCCTCAG TGAGTGAGTGAGTGAGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTC CATCACTAGGGGTTTCCT-3'
11	无 CpG 的 3'-ITR (变体-2)	5'-AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC TGCTCACTCACTCACTCACTGAGGCCTGGGGACCAAA GGTCCCCAGACTGCAGAGCTTTGCTCTGCAGGCCTCA GTGAGTGAGTGAGTGAGCAGA-3'

[0076] 本公开的rAAV载体还包含表达盒。表达盒编码通过AAV基因治疗技术递送的目的核酸序列。在各种实施方案中,表达盒编码一种或多种诊断剂、治疗剂和/或预防剂。例如,在一个实施方案中,表达盒编码微抗肌萎缩蛋白。

[0077] 表达盒还可以编码真核启动子。特别合适的真核启动子包括组织特异性启动子。在一些实施方案中,表达盒进一步编码组织特异性启动子。

[0078] 表达盒还可以编码诱导型启动子。合适的诱导型启动子包括例如四环素 (Tet) 诱导型启动子、多西环素 (Dox) 诱导型启动子和他莫昔芬 (tam) 诱导型启动子。包括的诱导型启动子允许通过施用诱导化合物对基因表达进行时间控制。例如, Tet- (和Dox-) 诱导系统的两个组成部分是Tet阻遏物 (Tet) 和Tet操纵子 (tet0)。Tet及其类似物多西环素 (Dox) 均与TetR相互作用,并且耐受性良好,广泛用于哺乳动物系统。Tet-ON方法可用于调节基因表达。在反向Tet控制的反式激活剂 (rtTA) 或Tet-OFF系统中, Tet或Dox与Tet反应启动子结合并诱导该启动子。

[0079] 递送系统

[0081] 合适的rAAV载体递送方法是递送裸DNA。

[0082] 优选地，rAAV载体包含在合适的DNA递送系统中。合适的DNA递送系统包括非病毒递送系统。特别合适的非病毒递送系统包括例如脂质体载体、阳离子聚合物、纳米颗粒和DNA结合聚合物。在施用多于一种类型的rAAV载体的实施方案中，rAAV载体可以任选地包括在不同的递送系统中。或者，在一些实施方案中，多个rAAV载体可包含在单个递送系统中。

[0083] 另一种特别合适的DNA递送系统包括病毒衣壳。特别合适的病毒载体包括，例如，腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒、高地J病毒(HJV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)和单纯疱疹病毒(HSV)。在施用多于一种类型的rAAV载体的实施方案中，rAAV载体可以任选地包含在不同的病毒衣壳中。或者，在一些实施方案中，多个rAAV载体可以包含在单个病毒衣壳中。

[0084] 本公开的一个方面涉及重组腺相关病毒(rAAV)颗粒，所述rAAV颗粒包含病毒衣壳和rAAV核酸载体，所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)。

[0085] 特别合适的病毒衣壳是AAV病毒衣壳或rAAV病毒衣壳。病毒衣壳的一些示例是AAV1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、rh10、rh74和AAV-Anc80、AAV-B1、AAV-DJ、AAV-KP1、AAV-LK03、AAV-Myo、AAV-NP22、AAV-NP40、AAV-NP66、AAV-PHP.A、AAV-PHP.B、AAV酪氨酸突变体或其他天然存在的病毒衣壳或实验室产生的衣壳。

[0086] AAV病毒衣壳是指由野生型AAV基因组编码的野生型病毒衣壳。野生型AAV基因组包括含有衣壳蛋白VP1、VP2和VP3的重叠核苷酸序列的衣壳开放阅读框，它们相互作用形成具有二十面体对称性的衣壳。这些蛋白的分子量分别为87、72和62千道尔顿。野生型AAV衣壳由VP1、VP2和VP3的混合物组成，总计60种单体，以1:1:10的比例呈二十面体对称排列，估计大小为3.9兆道尔顿。rAAV核酸载体可以封装在野生型AAV衣壳中。在一些实施方案中，病毒衣壳可以是野生型AAV衣壳的修饰形式。例如，rAAV核酸载体可以封装在突变AAV衣壳或重组AAV(rAAV)衣壳中。

[0087] 可以通过已知方法将rAAV载体封装在预先组装的病衣壳中。

[0088] 药物组合物

[0089] 本公开的其他方面涉及药物组合物，包括本文所述的rAAV载体或rAAV颗粒。

[0090] 本公开的一个方面涉及一种药物组合物，包含药学上可接受的载体和rAAV核酸载体，所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)。

[0091] 本公开的另一方面涉及一种药物组合物，包含药学上可接受的载体和重组腺相关病毒(rAAV)颗粒，所述颗粒包含病毒衣壳和rAAV核酸载体，所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)。

[0092] 本文所述的化合物可以使用一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂通过任何常规方式配制成药物组合物，所述载体或赋形剂如在Remington's Pharmaceutical Sciences(A.R.Gennaro编)，第21版，ISBN:0781746736(2005)中所记载，在此全文引入作为参考。这样的组合物可以含有有效治疗量(例如，有效量)的一种或多种本文所述的化合物，其可以是纯化的形式，以及合适量的载体，以便向受试者提供适于施用的形式。

[0093] 术语“组合物”指的是将药物制备成适于施用于受试者如人的形式。因此，“组合

物”可以包括药学上可接受的赋形剂,包括稀释剂或载体。

[0094] 本文使用的术语“药学上可接受的”可以描述不会引起不可接受的药理学活性损失或不可接受的不良反应的物质或组分。药学上可接受的成分的实例可以是在美国药典(USP 29)和国家处方集(NF 24),美国药典委员会,马里兰州罗克维尔,2005(“USP/NF”)或更新版本中药品各论中的成分,以及在FDA持续更新的非活性成分搜索在线数据库中列出的成分。USP/NF等中未描述的其他可用成分也可以使用。

[0095] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指任何类型的无毒的惰性固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或制剂助剂。这种介质和试剂在药物活性物质中的应用是本领域公知的(一般参见Remington's Pharmaceutical Sciences(A.R.Gennaro编),第21版(2005))。例如,用于口服给药的药物组合物可以使用本领域已知的药学上可接受的载体以适于口服给药的剂量配制。这样的载体使得药物组合物能够被配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体制剂、凝胶剂、糖浆剂、膏剂、悬浮液等,以供受试者使用。

[0096] 药学上可接受的载体,包含有助于将活性化合物加工成药用制剂的赋形剂和助剂。可作为药学上可接受载体的材料的一些实例是糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙纤维素;粉状黄耆胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂如可可脂和栓剂蜡;油类如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类如丙二醇;酯如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;去污剂,如吐温80;缓冲剂如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原的水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;人工脑脊液(CSF)和磷酸盐缓冲液,以及其它无毒的相容润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,并且,着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于组合物中,根据处方者基于所需给药途径的判断。

[0097] 药学上可接受的载体还包括聚合物。特别合适的聚合物是泊洛沙姆。

[0098] 所述药物组合物还可以包含蛋白酶。特别合适的蛋白酶可以是胰蛋白酶、胶原酶及其组合。

[0099] 所述药物组合物还可以包含小分子。

[0100] 除了与化合物不相容之外的任何常规介质或试剂,均可用在药物组合物的应用中。额外的活性成分也可以掺入到组合物中。

[0101] “稳定的”制剂或组合物可以指具有足够稳定性的组合物,以允许在适宜的温度下储存,例如在约0℃和约60℃之间,在商业上合理的时间内,例如至少约一天、至少约一周、至少约一个月、至少约三个月、至少约六个月、至少约一年或至少约两年储存。

[0102] 组合物应适于给药。用于本公开的化合物可以通过已知的方法配制以用于多种途径施用于受试者,所述途径包括但不限于肠胃外、口服、局部、皮内、鼻内、肌内、腹膜内、静脉内、动脉内、皮下、硬膜外、经皮、口腔和直肠。所述化合物也可以与一种或多种另外的药剂联合给药,或者与其它生物活性或生物惰性药剂共同施用。此类生物活性试剂或惰性试剂可与试剂流体或机械连接,或通过离子、共价、范德华力、疏水力、亲水力或其他物理力与试剂连接。

[0103] 可配制控释(或缓释)组合物以延长化合物的活性并降低给药频次。控释组合物还可用于影响起效时间或其他特征,如化合物的血药浓度,从而影响副作用的发生。控释组合物可设计成最初释放产生所需治疗效果的一定量的化合物,并逐渐和持续释放其它量的化

合物以在延长的时间内维持治疗效果水平。为了维持化合物在体内接近恒定的水平,化合物可从剂型中以一定的速率释放,该速率将取代体内代谢或排泄的化合物的量。化合物的控释可由以通过各种诱导剂刺激,如酸碱度变化、温度变化、酶、水或其他生理条件或分子。

[0104] 本文所述的组合物、rAAV载体或rAAV颗粒也可与其他治疗方式联合使用。因此,除了本文所述的治疗法之外,还可以向受试者提供已知对疾病、失调或病症的治疗有效其它疗法。

[0105] 方法

[0106] 本公开的其他方面涉及将本文所述的rAAV载体、rAAV颗粒和药物组合物递送到细胞中的方法。

[0107] 一个特定方面涉及将核酸递送到细胞中的方法,所述方法包括向所述细胞施用重组腺相关病毒(rAAV)核酸载体,所述载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)。

[0108] 另一特定方面涉及将核酸递送到细胞中的方法,所述方法包括向所述细胞施用重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含病毒衣壳和rAAV核酸载体,所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)。

[0109] 另一特定方面涉及将核酸递送到细胞中的方法,所述方法包括向所述细胞施用药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的载体和重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,所述重组腺相关病毒(rAAV)颗粒包含病毒衣壳和rAAV核酸载体,所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)。

[0110] 待施用的病毒构建体的剂量基于载体基因组(vg)拷贝数,这是AAV病毒领域中公认的测量单位。合适的剂量范围为约 1×10^2 vg/注射部位至约 1×10^{15} vg/kg(体积范围为约1微升至约50毫升)。可使用更高或更低剂量,具体取决于例如给药途径、疾病类型和严重程度,或个体的年龄、性别、体重和病情。在文献中提供了关于特定剂量和递送方法的指导,并且本领域的从业人员通常可以获得。一般来说,当采用肠胃外途径时,可以施用较低剂量。因此,例如,对于静脉内给药,可以使用例如约 1×10^9 vg/kg至 1×10^{15} vg/kg范围内的剂量。

[0111] 特别合适的细胞是哺乳动物细胞,包括来自实验动物如啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)、猪、灵长类动物、兔、牛、马、狗等的细胞。细胞也可以是活体动物的细胞,例如实验动物、家畜或宠物。

[0112] 特别合适的细胞是人细胞。细胞可以是来自人类的实验性细胞,包括患病或健康细胞。细胞也可以是活的人类患者的细胞。细胞也可以是胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

[0113] 本公开的其他方面涉及基因治疗的方法或治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效治疗量的本文所述的rAAV载体、rAAV颗粒或药物组合物。

[0114] 一个特定方面涉及对有需要的受试者进行基因治疗的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效治疗量的包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序列(ITR)的重组腺相关病毒(rAAV)核酸载体。

[0115] 另一方面涉及对有此需要的受试者进行基因治疗的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效治疗量的重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含病毒衣壳和rAAV核酸载体,所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'(CpG)基序的末端反向重复序

列 (ITR)。

[0116] 另一方面涉及对有此需要的受试者进行基因治疗的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效治疗量的药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的载体和重组腺相关病毒 (rAAV) 颗粒,所述颗粒包含病毒衣壳和rAAV核酸载体,所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3' (CpG) 基序的末端反向重复序列 (ITR)。

[0117] 一个特定方面涉及治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效治疗量的重组腺相关病毒 (rAAV) 核酸载体,所述载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3' (CpG) 基序的末端反向重复序列 (ITR)。

[0118] 另一方面涉及治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效治疗量的重组腺相关病毒 (rAAV) 颗粒,所述颗粒包含病毒衣壳和rAAV核酸载体,所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3' (CpG) 基序的末端反向重复序列 (ITR)。

[0119] 另一方面涉及治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效治疗量的药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的载体和重组腺相关病毒 (rAAV) 颗粒,所述颗粒包含病毒衣壳和rAAV核酸载体,所述rAAV核酸载体包含不含5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3' (CpG) 基序的末端反向重复序列 (ITR)。

[0120] 所述药物组合物可以通过途径施用,包括但不限于口服、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、经皮、皮下、腹膜内、鼻内、肠胃外、局部、舌下或直肠方式。例如,施用途径可选自口服、鼻内、腹膜内、静脉内、皮下、肌肉内、瘤内、直肠、局部和透皮。

[0121] 本文所述的任何一种或多种化合物的有效治疗剂量的确定在本领域技术人员的能力范围内。有效治疗剂量是指得到所需结果的活性成分 (化合物) 的量。精确剂量将由执业医师根据治疗需要的受试者相关的因素来确定。调整剂量和给药以提供足够水平的活性成分或维持所需效果。可考虑的因素包括疾病状态的严重程度、受试者的一般健康状况、受试者的年龄、体重和性别、饮食、给药时间和频率、药物联用、反应敏感性以及对治疗的耐受性/应答。长效药物组合物可以每3-4天、每周或每两周给药一次,这取决于特定制剂的半衰期和清除率。

[0122] 本文所述的每一种症候、疾病、失调和病症以及其它情况均可受益于本文所述的组合物和方法。一般而言,治疗症候、疾病、失调或病症包括预防或延迟可能患有或易患有所述症候、疾病、失调或病症但尚未经历或表现出其临床或亚临床症状的哺乳动物的临床症状的出现。治疗还可以包括抑制症候、疾病、失调或病症,例如,阻止或减少疾病或其至少一种临床或亚临床症状的发展。此外,治疗可包括缓解疾病,例如,引起症候、疾病、失调或病症或其临床或亚临床症状中的至少一种的消退。对要治疗的受试者的益处可以是具有统计学意义的,或者至少是受试者或医生可感知的。

[0123] 如本文所用,“有需要的个体”和“有需要的受试者”是指易患有特定疾病、失调或病症的个体,或具有患特定疾病、失调或病症的风险的个体,或已经患有特定疾病、失调或病症的个体。由于家族史、年龄、环境和/或生活方式,个体可能易患这些疾病、失调或病症,或处于较高的患病风险中。有需要的个体可以是成人、儿童和幼儿。特别合适的个体可以是人类。其它特别合适的个体可以是实验动物,例如啮齿动物 (例如,小鼠和大鼠)、猪、灵长类动物、兔、牛、马、狗等。

[0124] 在一些实施方案中,有需要的个体选自成人、儿童和幼儿。

[0125] 在一些实施方案中,所述疾病可以指肝病、心脏病、肺病、肾病、血液疾病、中枢神经系统疾病、神经肌肉疾病。

[0126] 特别合适的给药方式是原位施用于组织或器官。例如,疾病可以是神经肌肉疾病,表达盒可以编码微抗肌萎缩蛋白,并且施用可能是肌肉组织内注射或静脉内注射。

[0127] 另一种特别合适的给药方式可以是原位施用于眼睛或眼睛附近。例如,疾病可能是视网膜疾病,可以对眼睛用药或在眼睛附近给药。

[0128] 另一种特别合适的给药方式可以是原位施用于耳朵或在耳朵中。例如,疾病可能是听力障碍或听力丧失,可以对耳朵用药或在耳朵里给药。

[0129] 实施例

[0130] 实施例1-4旨在设计和产生具有无CpG的ITR的示例性rAAV载体。实施例5-9涉及使用示例性rAAV载体的体内小鼠模型试验。

[0131] 实施例1

[0132] 本实施例介绍了针对示例rAAV载体的示例性无CpG的ITR的设计。

[0133] 为了确定CpG消耗是否影响rAAV的产生,制作了两种携带相同表达盒但ITR不同的rAAV微抗肌萎缩蛋白载体。一种具有野生型ITR,另一种具有无CpG的ITR。

[0134] 无CpG的ITR的制备。在一个示例中,基于AAV2的野生型ITR设计了无CpG的ITR。通过用胸腺嘧啶替换ITR A序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤,用腺嘌呤替换ITR A序列中剩余3个CpG基序中的鸟嘌呤,用腺嘌呤和鸟嘌呤替换ITR C序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤及其紧邻下游的胞嘧啶,用胞嘧啶和胸腺嘧啶替换ITR C序列中的第二CpG基序中的鸟嘌呤及其紧邻的下游鸟嘌呤,用腺嘌呤替换ITR B序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤,用胞嘧啶替换ITR B序列中第二CpG基序中的鸟嘌呤。用互补碱基修饰5'-端ITR的A'、B'和C'序列中的相应碱基(图1C)。

[0135] 在另一个示例中,通过用胸腺嘧啶替换ITR A序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤,用腺嘌呤替换ITR A序列中剩余3个CpG基序中的鸟嘌呤,用胸腺嘧啶和鸟嘌呤替换ITR C序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤及其紧邻下游的胞嘧啶,用腺嘌呤和腺嘌呤替换ITR C序列中第二CpG基序中的胞嘧啶和紧邻第二CpG基序下游的鸟嘌呤,用胸腺嘧啶替换ITR B序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤,用鸟嘌呤替换ITR B序列中第二CpG基序中的胞嘧啶,设计了5'-端无CpG的ITR。用互补碱基修饰5'-端ITR的A'、B'和C'序列中的相应碱基。

[0136] 在一个示例中,通过用胸腺嘧啶替换ITR A序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤,用腺嘌呤替换ITR A序列中其余3个CpG基序中的鸟嘌呤,用腺嘌呤替换ITR B序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤,分别用鸟嘌呤和胞嘧啶替换B臂第二CpG基序中的胞嘧啶和鸟嘌呤,用腺嘌呤和鸟嘌呤替换ITR C序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤及其紧邻下游胞嘧啶,用胞嘧啶和胸腺嘧啶替换ITR C序列中第二CpG基序中的鸟嘌呤及其紧邻下游鸟嘌呤,设计了3'-末端无CpG的ITR。用互补碱基修饰5'-端ITR的A'、B'和C'序列中的相应碱基(图1D)。

[0137] 在另一个示例中,通过用胸腺嘧啶替换ITR A序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤,用腺嘌呤替换ITR A序列中剩余3个CpG基序中的鸟嘌呤,用胸腺嘧啶替换ITR B序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤,用鸟嘌呤替换B臂第二CpG基序中的胞嘧啶,用胸腺嘧啶和鸟嘌呤替换ITR C序列中第一CpG基序中的鸟嘌呤及其紧邻下游的胞嘧啶,用腺嘌呤和腺嘌呤替换ITR

C序列中第二CpG基序中的胞嘧啶及其紧邻下游的鸟嘌呤,设计了3'-末端无CpG的ITR。用互补碱基修饰5'-端ITR的A'、B'和C'序列中的相应碱基。

[0138] 设计的无CpG的ITR由GenScript (Piscataway, NJ) 合成。设计的无CpG的ITR也可由提供DNA合成服务的任何其他商业资源合成。

[0139] 图1. 无CpG的ITR的工程化。图1A, AAV载体的示意图。表达盒由启动子、转基因和多腺苷酸化 (pA) 信号以及其他未描述的调控元件 (如内含子、增强子、microRNA结合靶点等) 组成。在本研究的上下文中, 转基因是微抗肌萎缩蛋白基因 (μ Dys)。在AAV载体中, 表达盒两侧有两个ITR。5'和3' ITR用虚线框突出显示。图1B, 来自变体-1无CpG载体的3'-ITR与AAV1、2、3、4、6和7的比对。AAV ITR分为D、A、B、B'、C、C'和A'部分。粗体黑色字母表示AAV2 ITR中的核苷酸, 与变体1无CpG的ITR中的核苷酸不同。D部分和A部分之间带下划线的斜体核苷酸GTTGGCC是AAV2末端分离位点 (trs)。C部分和C'部分之间带下划线的斜体核苷酸CTTTG是AAV2第二个Rep-结合元件 (RBE')。A部分和A'部分中带下划线的核苷酸是AAV 2 Rep-结合元件 (RBE)。方框标记了Rep-结合元件中的GAGY (互补链中的RCTC) 四核苷酸重复基序。星号表示在所有ITR中保守的核苷酸。黑点表示在AAV1、2、3、4、6和7的ITR中保守的核苷酸, 但在变体-1无CpG的ITR中不保守。破折号表示变体-1无CpG的ITR中缺失的核苷酸。图1C, 反转构型中5'-ITR的二维图。AAV ITR被分成四个区域, 包括A/A'茎 (序列A及其互补序列A'), B/B'臂 (序列B、其互补序列B'和序列B与B'之间的3个插入的腺嘌呤核苷酸), C/C'臂 (序列C、其互补序列C'和序列C与C'之间的3个插入的胸腺嘧啶核苷酸) 和D-序列 (下划线)。此外, 在B/B'和C/C'臂之间有一条未配对的胸腺嘧啶。灰色字母: AAV载体中缺失的核苷酸。RBE: Rep结合元件, 一个22bp的序列。核心RBE序列 (方框) 由10-bp序列组成。RBE': 第二Rep结合元件, 一个5碱基的序列。箭头: 末端分离位点 (trs)。插入内容为对术语的解释。无CpG的ITR中修饰的核苷酸被标记。图1D, 3'-ITR在反转构型中的二维图。3'-ITR分为四个区域, 包括A/A'茎 (序列A及其互补序列A'), B/B'臂 (序列B、其互补序列B'和序列B与B'之间的3个插入的腺嘌呤核苷酸), C/C'臂 (序列C、其互补序列C'和序列C与C'之间的3个插入的胸腺嘧啶核苷酸) 和D-序列 (带下划线)。此外, 在B/B'和C/C'臂之间还有一个未配对的腺嘌呤。灰色字母: AAV载体中缺失的核苷酸。RBE: Rep结合元件, 一个22bp的序列。核心RBE序列 (方框) 由10bp序列组成。RBE': 第二Rep结合元件, 一个5碱基的序列。箭头: 末端分离位点 (trs)。插入内容为对术语的解释。无CpG的ITR中修饰的核苷酸被标记。图1E, 来自变体-2无CpG载体的3'-ITR与AAV1、2、3、4、6和7的比对。AAV ITR分为D、A、B、B'、C、C'和A'部分。粗体黑色字母表示AAV2 ITR中的核苷酸, 其与变体-2无CpG的ITR中的核苷酸不同。阴影字母表示无CpG的ITR的变体-1和变体-2之间不同的核苷酸。D部分和A部分之间带下划线的斜体核苷酸GTTGGCC是末端分离位点 (trs)。C部分和C'部分之间带下划线的斜体核苷酸CTTTG是第二Rep-结合元件 (RBE')。A部分和A'部分中带下划线的核苷酸是AAV 2 Rep-结合元件 (RBE)。方框标记了Rep-结合元件中的GAGY (互补链中的RCTC) 四核苷酸重复基序。星号表示在所有ITR中保守的核苷酸。黑点表示在AAV1、2、3、4、6和7的ITR中保守的核苷酸, 但在变体-1无CpG的ITR中不保守。破折号表示变体-2无CpG ITR中缺失的核苷酸。

[0140] 实施例2

[0141] 本实施例介绍了用无CpG的ITR制备示例性rAAV载体, 并提供了编码微抗肌萎缩蛋白的示例性表达盒。

[0142] 微抗肌萎缩蛋白表达盒。密码子优化的人微抗肌萎缩蛋白基因包含N-末端结构域、铰链1、红细胞膜内蛋白样重复1、16、17和24、铰链4、富含半胱氨酸的结构域和人抗肌萎缩蛋白的合成抗肌萎缩蛋白/抗肌萎缩结合位点。微抗肌萎缩蛋白的表达受人延伸因子1- α (E1F- α) 启动子和来自pCpGfree (Invivogen, 美国加利福尼亚州圣地亚哥) 的小鼠巨细胞病毒增强子以及来自pGL3-Basic (Promega, 美国威斯康星州麦迪逊市) 的合成多腺苷酸位点的调控。

[0143] 重组AAV的制备、纯化和滴定。两个顺式质粒用于rAAV储备液制备。它们携带与上述完全相同的微抗肌萎缩蛋白的表达盒。一个顺式质粒含有变体-1无CpG的ITR。另一个顺式质粒含有野生型ITR。将rAAV载体包装在Y731F酪氨酸突变体AAV-9中, 并根据已公布的方案使用瞬时转染法生产载体贮备 (Shin等人, 2012; Shin等人, 2013)。rAAV载体通过两轮等密度氯化铯超速离心纯化, 然后在4°C下三次更换HEPES缓冲液48小时。使用ABI 7900 HT qPCR机中的快速SYBR Green Master Mix试剂盒 (Applied Biosystems, 加利福尼亚州福斯特城) 通过定量PCR测定病毒滴度。该对引物是为小鼠巨细胞病毒增强子区域设计的。正向引物为5'-ACATAAGGTCAATGGGAGGTAAGC (SEQ ID NO:13), 反向引物为5'-CAATGGGACTTTCCTGTTGATTC (SEQ ID NO:14)。

[0144] ITR测序。由于二级结构复杂且GC含量高, 因此首先使用GE healthcare illustra TempliPhiSequence Resolver试剂盒 (GE healthcare life sciences, 货号#28-9035-29) 扩增DNA。然后使用引物5'-GATGTGCTGCAAGCGATTA (SEQ ID NO:15) 对5'-端ITR进行桑格测序, 使用引物5'-TTATGCTTCCGGCTCGTATG (SEQ ID NO:16) 对3'-端ITR进行Sanger测序。

[0145] AAV病毒ITR测序。如Tran等人 (Tran等人, 2020) 所述, 通过苯酚:氯仿:异戊醇 (Invitrogen) 提取和EtOH沉淀分离载体基因组。简言之, 使用Express Template Prep试剂盒2.0 (末端修复/A加尾) (PN 100-938-900), 用标签化的SMRTBell接头构建了SMRT测序文库。文库在Sequel II上运行, 采集15小时。使用召回接头 (recall adapter) 处理生成的子读长, 并以--min-snr=2.00和--min-passes=0.5的最小阈值运行ccs。然后对读长进行拆分, 映射到参考载体基因组, 并在IGV上显示, 如Robinson等人所述 (Robinson等人, 2011)。AAV病毒ITR测序证实, 在纯化的AAV载体中CpG基序被完全消除。

[0146] 实施例3

[0147] 本实施例介绍了对包含无CpG的ITR的示例性rAAV载体的产量的研究。

[0148] 瞬时转染是rAAV制备中最常用的方法, 用于制备野生型和无CpG的载体。使用等密度氯化铯超速离心法并排纯化粗裂解物。使用相同的设置, 通过定量PCR测定载体滴度。

[0149] 为了研究载体的生产效率, 每种载体制备三个批次。野生型和无CpG载体的产量分别为 $1.18 \pm 0.08 \times 10^5$ vg/细胞和 $3.03 \pm 0.32 \times 10^4$ vg/细胞 (图2A)。

[0150] 图2A-2C. rAAV产量的定量评估。图2A, 每种载体三个独立生产轮次的载体产量定量。**, $p < 0.01$ 。图2B, 野生型ITR载体和无CpG的ITR载体的代表性透射电子显微镜图像。箭头: 完整包装的AAV颗粒。箭簇: 空的AAV颗粒。图2C, 空颗粒的定量。每个数据点代表一个视野在放大25000倍下的定量结果。对于野生型ITR载体, 共对48个场进行了定量。对于无CpG的ITR载体, 共对25个视野进行了定量。

[0151] 实施例4

[0152] 本实施例介绍了对包含无CpG的ITR的示例性rAAV载体的基因组封装进衣壳的研

究。

[0153] 为了研究rAAV基因组的封装,使用透射电子显微镜对空颗粒的百分比进行了定量(图2B和2C)。封装进衣壳的rAAV病毒颗粒显示出均匀的电子密度,而空颗粒具有暗中心(图2B)。平均而言,野生型和无CpG载体中分别有 $11.9 \pm 1.2\%$ 和 $11.8 \pm 1.5\%$ 的空颗粒。由于在野生型和无CpG的载体中检测到相似量的空颗粒($\sim 12\%$),从ITR消除CpG基序似乎不影响单链基因组封装到预组装衣壳中(图2B和2C)。

[0154] 电子显微镜。通过透射电子显微镜检查rAAV颗粒。具体而言,用超纯水将纯化和透析的AAV病毒稀释至 $1-3 \times 10^9$ vg/ μ l,然后置于200目辉光放电碳涂覆铜网格上5分钟。在超纯水中温和洗涤4至5次后,用2%NANO-WTM(Nanoprobes,美国纽约亚普汉克)对病毒染色5分钟。使用JEOL JEM-1400透射电子显微镜观察病毒颗粒。

[0155] 实施例5-9涉及使用包含无CpG的ITR的示例性rAAV载体的体内小鼠模型试验。

[0156] 实施例5

[0157] 本实施例介绍了在Duchenne肌营养不良症(DMD)小鼠模型中施用无CpG的ITR的示例性rAAV载体。

[0158] 为了确定CpG消耗是否影响rAAV载体的体内转导,在DMD的mdx模型中进行配对研究。具体而言,将野生型和无CpG载体注射到同一mdx小鼠的胫骨前肌(TA)的两侧。rAAV注射后4个月,对微抗肌萎缩蛋白表达、TA肌肉中的AAV载体基因组拷贝数以及微抗肌萎缩蛋白对肌肉疾病的组织学和生理学改善进行了定量(图3至图6)。

[0159] 实验小鼠。所有动物实验均经密苏里州大学动物护理和使用委员会批准,且符合NIH指南。所有的动物实验都是在密苏里州大学进行的。抗肌萎缩蛋白缺陷型mdx小鼠(货号001801)最初购自Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)。使用Jackson Laboratory的创建者在密苏里州大学的一个无特定病原体的屏障设施内的空间构建实验小鼠。使用已发表的方案确认小鼠的基因型(Shin等人,2011)。将所有小鼠置于无特定病原体的动物护理设施中,12小时光照(25勒克斯):12小时黑暗,可随意使用PicoLab啮齿动物饮食20#5053和高压灭菌的市政自来水。室温和相对湿度分别维持在 $68 \pm 2^\circ$ F和 $50 \pm 20\%$ 。每天观察所有动物的一般状况和健康状况。所有小鼠都有一个在断奶时随机分配的唯一标识号(耳标)。

[0160] rAAV给药。使用Hamilton注射器将 2.8×10^{10} vg颗粒/肌肉(在50 μ l的HEPES缓冲液中)的rAAV载体注射到6只10月龄雌性mdx小鼠的TA肌肉中。TA肌的一侧接受野生型载体,同一只小鼠的对侧接受无CpG载体。

[0161] 形态学分析。rAAV注射后4个月,进行末端TA肌肉功能测定。功能测定后,根据密苏里州大学动物护理和使用委员会批准的方案对小鼠实施安乐死。仔细解剖TA肌,将其切成两段。一段在液氮中速冻。另一段包埋在液氮冷却的异戊烷中的最佳切削温度化合物(Sakura Finetek Inc,托伦斯,加利福尼亚州)中。使用10微米冷冻切片进行染色。苏木精和伊红(H&E)染色显示一般肌肉组织病理。使用Dys-3(1:20, Vector Laboratories,彼得伯勒,英国)免疫荧光染色评估抗肌萎缩蛋白表达,这是一种物种特异性抗肌萎缩蛋白单克隆抗体,可识别人抗肌萎缩蛋白的铰链1区,但不会与小鼠抗肌萎缩蛋白发生交叉反应。使用Nikon E800荧光显微镜在相同的曝光设置下观察载玻片。图像使用QImage Retiga 1300相机拍摄。使用Fiji成像软件,从数字化H&E染色图像中确定中心有核肌纤维(Schindelin等人,2012)。使用Fiji成像软件从数字化抗肌萎缩蛋白免疫染色图像中定量分析抗肌萎缩蛋

白阳性细胞的百分比。

[0162] 蛋白质免疫印迹。胫骨前肌在含有10% SDS、5mM 乙二胺四乙酸、62.5mM Tris-HCl (pH 6.8) 和2% 蛋白酶抑制剂 (Roche, 印第安纳波利斯, 印第安纳州, 美国) 的匀浆缓冲液中, 使用组织匀浆器 (Bullet Blender Storm 24, Next Advance, 纽约) 在机器中以设定的12的速度在4°C 下匀浆10min。匀浆在Eppendorf 离心机 (型号5417C, Brinkmann Instruments Inc., Westbury, 纽约) 中以14000RPM 离心3min。Brinkmann Instruments Inc., Westbury, 纽约)。使用DC分析试剂盒 (BioRad, Hercules, 加利福尼亚州) 测定上清液中的总蛋白浓度。将50 μ g 蛋白质在95°C 变性5min, 在冰上冷却2min, 然后在3% 堆积/6% 分离 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上在100V 下分离。将蛋白质在含有10% 甲醇的 Towbin 缓冲液中以60V 在4°C 下转移到0.45 μ m PVDF膜10小时。用蒸馏水洗涤膜5min, 然后浸入10ml 1X iBind Flex 溶液至少2min (将500 μ l 100X 添加剂和10ml iBind Flex 5X 缓冲液混合在39.5ml 蒸馏水中)。然后将膜切成两片, 分别含有微抗肌萎缩蛋白和 α -微管蛋白。然后将膜放置在 iBind Flex Western 系统 (目录号: SLF 2000, Invitrogen) 上预润湿的 iBind Flex Card 上, 蛋白面朝下放在混合溶液的顶部。按以下顺序将样品加入孔插入物的行中: 第1行, 一抗小鼠抗人抗肌萎缩蛋白重复序列16 (1:200 溶于1X iBind Flex 溶液, MANDYS102 克隆7 D2 G2a 型, ex43, 2047-2105) (Morris 等人, 2011) 或小鼠抗 α -微管蛋白 (1:1000 溶于1X iBind Flex 溶液, T5168, Sigma); 第2行: 1X iBind Flex FD 溶液; 第3行, 二抗体山羊抗小鼠 IgG (1:1000 溶于1X iBind Flex 溶液, Santa Cruz, Dallas, TX); 第4行, 1X iBind Flex FD 溶液。关闭孔盖, 将样品培养3小时。使用 Clarity Western ECL 底物 (BioRad, Hercules, 加利福尼亚州) 检测信号, 并使用 Li-COR Odyssey 成像系统进行可视化。使用 Li-COR Image Studio 5.0.21 版软件对条带强度进行光密度定量。在同一印迹中, 将微抗肌萎缩蛋白条带的相对强度归一化为相应的 α -微管蛋白条带 (上样对照)。

[0163] TA 肌肉中载体基因组拷贝数的定量。从 OCT 包埋的冷冻组织样本中提取基因组 DNA。使用 NanoDrop OneC 分光光度计 (ThermoFisher Scientific, 沃尔瑟姆, 马萨诸塞州, 美国) 测量 DNA 浓度。使用 PrimeTime 基因表达 Master Mix (Integrated DNA technologies IDT, 爱荷华州) 在 ABI 7900 HT qPCR 机 (Applied Biosystems, 福斯特市, 加利福尼亚州) 中进行定量 TaqMan PCR 分析。qPCR 引物和探针均从人 EF-1 α 启动子区设计。正向引物为 5'-GGCTTGGGTAACTGGGAAA-3' (SEQ ID NO:17), 反向引物为 5'-GTTACAGAGACTACTGCACTTAT-3-3' (SEQ ID NO:18), 探针为 5'-ATGTGGTGTACTGGCTCCACCTTT-3' (SEQ ID NO:19)。在以下条件下进行 qPCR 反应: 95°C 下 10 分钟, 然后进行 40 个循环: 95°C 下 15 秒和 60°C 下 1 分钟。通过对照已知量的含有变体-1 无 CpG 的 ITR 的顺式-质粒的拷贝数标准曲线进行测量, 将每个反应的阈值循环 (Ct) 值转换为载体基因组拷贝数。数据以每二倍体基因组的载体基因组拷贝数报告。

[0164] 骨骼肌功能测定。根据已发表的研究方案对 TA 肌肉的功能进行了原位评估 (Hakim 等人, 2011; Hakim 等人, 2013)。具体而言, 测量了颤搐力、强直力和离心收缩曲线。通过腹膜内注射含有 25mg/ml 氯胺酮、2.5mg/ml 赛拉嗪和 0.5mg/ml 乙酰丙嗪的混合物 (以 2.5 μ l/g 体重) 麻醉实验小鼠。小心暴露 TA 肌和坐骨神经。然后将小鼠转移到定制设计的温控踏板平台上 (Hakim 等人, 2013)。随后, 使用 305C-LR 双模伺服电机传感器 (Aurora Scientific, Inc., 奥罗拉, 安大略省, 加拿大) 根据已公布的协议在原位测量力 (Hakim 等人, 2011; Hakim 等人,

2013)。测定绝对颤搐力、最佳最大等长强直力以及通过10个重复的离心收缩循环的力的下降。使用动态肌肉控制和分析软件(Aurora Scientific Inc.)进行数据采集和分析。用绝对肌力除以肌肉横截面积(CSA)计算比肌力。根据以下公式计算肌肉CSA, $CSA = (\text{肌肉质量, 单位为g}) / [(\text{肌肉密度, 单位为g/cm}^3) \times (\text{长度比}) \times (\text{最佳肌肉长度, 单位为cm})]$ 。肌肉密度采用 1.06g/cm^3 (Mendez和Keys, 1960)。长度比是指最佳纤维长度与最佳肌肉长度的比值。TA肌的长度比为0.6 (Burkholder等人, 1994)。

[0165] 统计分析。数据以平均值±平均值的标准误差(SEM)表示。使用GraphPad PRISM软件7.0版(GraphPad软件, 加利福尼亚州拉霍亚)的学生t检验确定统计显著性。当 $p < 0.05$ 时, 认为差异有统计学意义。

[0166] 实施例6

[0167] 本实施例提供了所研究的小鼠肌肉组织的免疫荧光染色结果。

[0168] 在免疫荧光染色中, 在野生型和无CpG载体注射的TA肌肉中均观察到遍及整个肌肉的健壮肌膜微抗肌萎缩蛋白表达(图3A, 图6)。微抗肌萎缩蛋白阳性肌纤维的百分比无统计学差异(图3B)。

[0169] 图3A和3B. 免疫荧光染色评价微抗肌萎缩蛋白的表达。图3A, 来自注射了无CpG载体(左图)和野生型载体(中图)的抗肌萎缩蛋白缺陷型mdx小鼠的胫骨前肌的代表性抗肌萎缩蛋白免疫荧光染色和HE染色显微照片。纳入了一只年龄和性别匹配的未注射的mdx小鼠的TA肌肉作为对照(右图)。比例尺适用于所有图像。图3B, 抗肌萎缩蛋白阳性肌纤维的定量。

[0170] 图3C和3D. 蛋白质免疫印迹评估微抗肌萎缩蛋白的表达。图3C, 来自抗肌萎缩蛋白缺陷型mdx小鼠的胫骨前肌的代表性抗肌萎缩蛋白蛋白质印迹, 这些小鼠未接受AAV微抗肌萎缩蛋白载体注射(未注射)、注射了无CpG的AAV微抗肌萎缩蛋白载体(无CpG的ITR)和野生型AAV微抗肌萎缩蛋白载体(野生型ITR)。图3D, 使用Li-COR Image Studio 5.0.21版软件对条带强度进行光密度测定。在同一印迹中, 将微抗肌萎缩蛋白条带的相对强度归一化为相应的 α -微管蛋白条带(上样对照)。

[0171] 图3E. 通过定量PCR评估TA肌肉中的AAV载体基因组拷贝数。对接受无CpG的AAV微抗肌萎缩蛋白载体注射(无CpG的ITR)或野生型AAV微抗肌萎缩蛋白载体注射(野生型ITR)的抗肌萎缩蛋白缺陷型mdx小鼠中TA肌肉的AAV载体基因组拷贝数进行了定量。

[0172] 图4A-4F. 胫骨前肌代表性全视图抗肌萎缩蛋白免疫染色和HE染色显微照片。图4A, 注射有无CpG载体的肌肉的抗肌萎缩蛋白染色。图4B, 注射有无CpG载体的肌肉的HE染色。图4C, 注射有野生型ITR载体的肌肉的抗肌萎缩蛋白染色。图4D, 注射有野生型ITR载体的肌肉的HE染色。图4E, 未注射的肌肉的抗肌萎缩蛋白染色。图4F未注射的肌肉HE染色。

[0173] 实施例7

[0174] 本实施例介绍了对所研究的小鼠肌肉组织组织学改善的研究结果。

[0175] 为了确定组织学改善效果, 对中心核化和肌纤维大小分布进行了量化(图5)。前者显示变性/再生, 后者显示肌肉肥大/萎缩。注射有野生型载体的肌肉含有 $54.3 \pm 2.1\%$ 的中心具核肌纤维。注射有无CpG载体的肌肉含有 $59.1 \pm 3.1\%$ 的中心具核肌纤维(图5A)。通过最小费雷特直径测量肌纤维大小(图5B)。在整个范围内(从10到 $56\mu\text{m}$), 注射有野生型和无CpG载体的肌肉之间没有差异。

[0176] 图5A和5B.中心核化和肌纤维大小分布的评估。图5A,用无CpG载体和野生型载体处理的mdx肌肉中含有中心定位核的肌纤维百分比。图5B,来自无CpG载体处理的肌肉(n=6块肌肉,每块肌肉80至131条肌纤维)的616条肌纤维和来自野生型载体处理的肌肉(n=6块肌肉,每块肌肉87至135条肌纤维)的712条肌纤维中不同最小费雷特直径的肌纤维百分比的分布。

[0177] 实施例8

[0178] 本实施例介绍了对小鼠肌肉组织进行生理改善的研究结果。

[0179] 为了确定生理改善效果,量化了肌肉重量、横截面积、绝对和特定颤搐力、绝对和特定强直力、力-频率关系以及离心收缩激发后的力降低(图6)。在所检查的所有参数中,没有具有统计学意义的差异。

[0180] 图6A-6H.肌肉收缩力的定量评价。图6A,胫骨前肌(TA)的重量。图6B,肌肉横截面积(CSA)。图6C,绝对颤搐力(Pt)。图6D,比颤搐力(sPt)。图6E,绝对强直力(Po)。图6F,比强直力(sPo)。图6G,力-频率关系。图6H,离心收缩曲线。

[0181] 实施例9

[0182] 本实施例介绍了小鼠研究中转导效率的研究结果。

[0183] 考虑到ITR在单链至双链转化(类似于复制的过程)中的作用,以及观察到无CpG载体的产量显著降低,最初认为无CpG载体可能表现出降低的转导效率。为了检验这一点,在同一只动物中进行了配对研究。将野生型载体注射到肌肉的一侧,将无CpG载体注射到对侧。令人惊讶的是,没有检测到转基因表达的差异(图3)。重要的是,两种载体在减轻患病小鼠的组织学和生理缺陷方面是具有同等效力(图5和6)。

[0184] 总之,不含CpG的ITR可用于产生rAAV载体。重要的是,在无CpG的ITR的rAAV载体的生物学效力与携带野生型ITR的载体相当。

[0185] 当介绍本公开或其优选实施方案的要素时,冠词“一”、“一个”、“该”和“所述”旨在表示存在一个或多个要素。术语“包含”、“包括”和“具有”旨在具有包含性,并且表示除了所列出的元素之外,还可以有其他元素。

[0186] 鉴于以上所述,可以看到,本发明实现了本公开的几个目的,并且获得了其他有利的结果。

[0187] 由于在不脱离本公开的范围的情况下,可以对上述方法、工艺和组合物进行各种改变,因此,包含在上述描述中并在附图中示出的所有内容应被解释为说明性的,而不是限制性的。

[0188] 参考文献

[0189] Amiss, T. J., McCarty, D. M., Skulimowski, A., and Samulski, R. J. (2003). Identification and characterization of an adeno-associated virus integration site in CV-1 cells from the African green monkey. *J Virol* 77, 1904-1915.

[0190] Ashley, S. N., Somanathan, S., Giles, A. R., and Wilson, J. M. (2019). TLR9 signaling mediates adaptive immunity following systemic AAV gene therapy. *Cell Immunol* 346, 103997.

[0191] Brister, J. R., and Muzyczka, N. (1999). Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase

activity and transesterification. *J Virol* 73,9325-9336.

[0192] Brister, J.R., and Muzyczka, N. (2000). Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J Virol* 74,7762-7771.

[0193] Burkholder, T.J., Fingado, B., Baron, S., and Lieber, R.L. (1994). Relationship between muscle fiber types and sizes and muscle architectural properties in the mouse hindlimb. *J Morphol* 221,177-190.

[0194] Hakim, C.H., Li, D., and Duan, D. (2011). Monitoring murine skeletal muscle function for muscle gene therapy. *Methods Mol Biol* 709,75-89.

[0195] Hakim, C.H., Wasala, N.B., and Duan, D. (2013). Evaluation of muscle function of the extensor digitorum longus muscle ex vivo and tibialis anterior muscle in situ in mice. *J Vis Exp*, e50183.

[0196] King, J.A., Dubielzig, R., Grimm, D., and Kleinschmidt, J.A. (2001). DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J* 20,3282-3291.

[0197] Ling, C., Wang, Y., Lu, Y., Wang, L.N., Jayandharan, G.R., Aslanidi, G.V., Li, B.Z., Cheng, B.B., Ma, W.Q., Lentz, T., Ling, C.Q., Xiao, X., Samulski, J., Muzyczka, N., and Srivastava, A. (2015). Enhanced Transgene Expression from Recombinant Single-Stranded D-Sequence-Substituted Adeno-Associated Virus Vectors in Human Cell Lines In Vitro and in Murine Hepatocytes In Vivo. *Journal of Virology* 89,952-961.

[0198] Martino, A.T., Suzuki, M., Markusic, D.M., Zolotukhin, I., Ryals, R.C., Moghimi, B., Ertl, H.C., Muruve, D.A., Lee, B., and Herzog, R.W. (2011). The genome of self-complementary adeno-associated viral vectors increases Toll-like receptor 9-dependent innate immune responses in the liver. *Blood* 117,6459-6468.

[0199] Mccarty, D.M. (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 16,1648-1656.

[0200] Mccarty, D.M., Fu, H., Monahan, P.E., Toulson, C.E., Naik, P., and Samulski, R.J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 10,2112-2118.

[0201] Mendez, J., and Keys, A. (1960). Density and composition of mammalian muscle. *Metabolism* 9,184-188.

[0202] Morris, G.E., Man, N.T., and Sewry, C.A. (2011). Monitoring Duchenne muscular dystrophy gene therapy with epitope-specific monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol* 709,39-61.

[0203] Needleman, S.B., and Wunsch, C.D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* 48,443-453.

[0204] Pearson, W.R., and Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological

sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85,2444-2448.

[0205] Robinson, J.T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 29,24-26.

[0206] Rogers, G.L., Shirley, J.L., Zolotukhin, I., Kumar, S.R.P., Sherman, A., Perrin, G.Q., Hoffman, B.E., Srivastava, A., Basner-Tschakarjan, E., Wallet, M.A., Terhorst, C., Biswas, M., and Herzog, R.W. (2017). Plasmacytoid and conventional dendritic cells cooperate in crosspriming AAV capsid-specific CD8(+) T cells. *Blood* 129,3184-3195.

[0207] Rogers, G.L., Suzuki, M., Zolotukhin, I., Markusic, D.M., Morel, L.M., Lee, B., Ertl, H.C., and Herzog, R.W. (2015). Unique Roles of TLR9- and MyD88-Dependent and -Independent Pathways in Adaptive Immune Responses to AAV-Mediated Gene Transfer. *J Innate Immun* 7,302-314.

[0208] Ryan, J.H., Zolotukhin, S., and Muzyczka, N. (1996). Sequence requirements for binding of Rep68 to the adeno-associated virus terminal repeats. *J Virol* 70,1542-1553.

[0209] Samulski, R.J., Chang, L.S., and Shenk, T. (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* 61,3096-3101.

[0210] Savy, A., Dickx, Y., Nauwynck, L., Bonnin, D., Merten, O.W., and Galibert, L. (2017). Impact of Inverted Terminal Repeat Integrity on rAAV8 Production Using the Baculovirus/Sf9 Cells System. *Hum Gene Ther Methods* 28,277-289.

[0211] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9,676-682.

[0212] Shin, J.-H., Hakim, C., Zhang, K., and Duan, D. (2011). Genotyping mdx, mdx3cv and mdx4cv mice by primer competition PCR. *Muscle Nerve* 43,283-286.

[0213] Shin, J.-H., Pan, X., Hakim, C.H., Yang, H.T., Yue, Y., Zhang, K., Terjung, R.L., and Duan, D. (2013). Microdystrophin ameliorates muscular dystrophy in the canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 21,750-757.

[0214] Shin, J.-H., Yue, Y., and Duan, D. (2012). Recombinant adeno-associated viral vector production and purification. *Methods Mol Biol* 798,267-284.

[0215] Smith, T.F., and Waterman, M.S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 147,195-197.

[0216] Tai, P.W.L., Xie, J., Fong, K., Seetin, M., Heiner, C., Su, Q., Weiland, M., Wilmot, D., Zapp, M.L., and Gao, G. (2018). Adeno-associated Virus Genome Population Sequencing Achieves Full Vector Genome Resolution and Reveals Human-Vector Chimeras. *Mol Ther Methods Clin Dev* 9,130-141.

- [0217] Toth,R.,Meszaros,I.,Huser,D.,Forro,B.,Marton,S.,Olasz,F.,Banyai,K.,Heilbronn,R.,and Zadori,Z.(2019).Methylation Status of the Adeno-Associated Virus Type 2(AAV2).Viruses 11.
- [0218] Tran,N.T.,Heiner,C.,Weber,K.,Weiand,M.,Wilmot,D.,Xie,J.,Wang,D.,Brown,A.,Manokaran,S.,Su,Q.,Zapp,M.L.,Gao,G.P.,and Tai,P.W.L.(2020).AAV-Genome Population Sequencing of Vectors Packaging CRISPR Components Reveals Design-Influenced Heterogeneity.Molecular Therapy-Methods&Clinical Development 18,639-651.
- [0219] Wang,X.S.,Khuntirat,B.,Qing,K.,Ponnazhagan,S.,Kube,D.M.,Zhou,S.,Dwarki,V.J.,and Srivastava,A.(1998).Characterization of wild-type adeno-associated virus type 2-like particles generated during recombinant viral vector production and strategies for their elimination.J Virol 72,5472-5480.
- [0220] Wang,X.S.,Ponnazhagan,S.,and Srivastava,A.(1996).Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats:selective encapsidation of viral genomes in progeny virions.J Virol 70,1668-1677.
- [0221] Wilmott,P.,Lisowski,L.,Alexander,I.E.,andLogan,G.J.(2019).A User's Guide to the Inverted Terminal Repeats of Adeno-Associated Virus.Hum Gene Ther Methods 30,206-213.
- [0222] Zhong,L.,Zhou,X.,Li,Y.,Qing,K.,Xiao,X.,Samulski,R.J.,and Srivastava,A.(2008).Single-polarity Recombinant Adeno-associated Virus 2 Vector-mediated Transgene Expression In Vitro and In Vivo:Mechanism of Transduction.Mol Ther 16,290-295.
- [0223] Zhou,Q.Z.,Tian,W.H.,Liu,C.G.,Lian,Z.H.,Dong,X.Y.,and Wu,X.B.(2017).Deletion of the B-B' and C-C' regions of inverted terminal repeats reduces rAAV productivity but increases transgene expression.Scientific Reports 7.
- [0224] Zhou,X.,Zeng,X.,Fan,Z.,Li,C.,Mccown,T.,Samulski,R.J.,and Xiao,X.(2008).Adeno-associated virus of a single-polarity DNA genome is capable of transduction in vivo.Mol Ther 16,494-499.
- [0225] Zhu,J.,Huang,X.,and Yang,Y.(2009).The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice.J Clin Invest 119,238-2398.

序列表

<110> 密苏里大学管理机构

段东升

潘秀芳

岳永平

<120> 用于AAV基因治疗的无CpG的ITR

<130> 20UMC037

<150> US 63/006,148

<151> 2020-04-07

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 143

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

```
ttaccctag tgatggagtt gccactccc tctctgcgcg ctcgctcgcg cggtagggcc 60
tgcggaccaa aggtccgcag acggcagagc tctgctctgc cggccccacc gagcgagcga 120
gcgcgcagag agggagtggg caa 143
```

<210> 2

<211> 145

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

```
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgcctc ctcactgagg 60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgaccccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120
gagcgcgcag agagggagtg gcca 145
```

<210> 3

<211> 146

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

gccatacctc tagtgatgga gttggcact ccctctatgc gcactcgctc gctcggtggg 60
gcctggcgac caaaggtcgc cagacggacg tgctttgcac gtccggcccc accgagcgag 120
cgagtgcgca tagagggagt ggccaa 146

<210> 4

<211> 146

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 4

gggcaaacct agatgatgga gttggcact ccctctatgc gcgctcgctc actcactcgg 60
ccctggagac caaaggtctc cagaactgcc gcctctggcc ggcagggccg agtgagtgag 120
cgagcgcgca tagagggagt ggccaa 146

<210> 5

<211> 143

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 5

ataccctag tgatggagtt gccactccc tctatgcgcg ctcgctcgct cggtggggcc 60
tgccgaccaa aggtccgcag acggcagagg tctcctctgc cggccccacc gagcgagcga 120
gcgcgcatag agggagtggg caa 143

<210> 6

<211> 145

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 6

cggtaccctc agtgaggag ttggcactc cctctatgcg cgctcgctcg ctcggtgggg 60
cctgcggacc aaaggtccgc agacggcaga gctctgctct gccggcccc cagagcgagc 120
gagcgcgcat agagggagtg gccaa 145

<210> 7

<211> 130

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgct cactcactca ctactgagg 60
ccagggcacc aaaggtgccc tgacagccct gctttgcagg gctggcctca gtgagtgagt 120
gagtgagcag 130

<210> 8

<211> 128

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 8

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccc ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60
tcgccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagagga gtggccaact ccatcactag 120
gggttcct 128

<210> 9

<211> 128

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

gctcactcac tcactcactg aggccagccc tgcaaagcag ggctgtcagg ccacctttgg 60
tggcctggcc tcagtgagtg agtgagtgag cagagagga gtggccaact ccatcactag 120
gggttcct 128

<210> 10

<211> 130

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 10

aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgct cgctcctcgc ctactgagg 60
ccggcgacc aaaggtcgcg cgacgccccg gctttgccc ggcgccctca gtgagcgagc 120
gagcgcgcag 130

<210> 11

<211> 131

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

aggaaccctt agtgatggag ttggccactc cctctctgct cactcactca ctactgagg 60
cctggggacc aaaggtcccc agactgcaga gctttgctct gcaggcctca gtgagtgagt 120
gagtgagcag a 131

<210> 12

<211> 128

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

gctcactcac tcaactcactg aggctgcag agcaaagctc tgcagtctgg ggacctttgg 60
tccccaggcc tcagtgagtg agtgagtgag cagagagga gtggccaact ccatcactag 120
gggttcct 128

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

acataaggctc aatgggaggt aagc 24

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

caatgggact ttctgttga ttc 23

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

gatgtgctgc aaggcgatta 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 16
ttatgcttcc ggctcgtatg 20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 17
ggcttgggta aactgggaaa 20
<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 18
gttcacagag actactgcac ttat 24
<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 19
atgtggtgta ctggetccac cttt 24

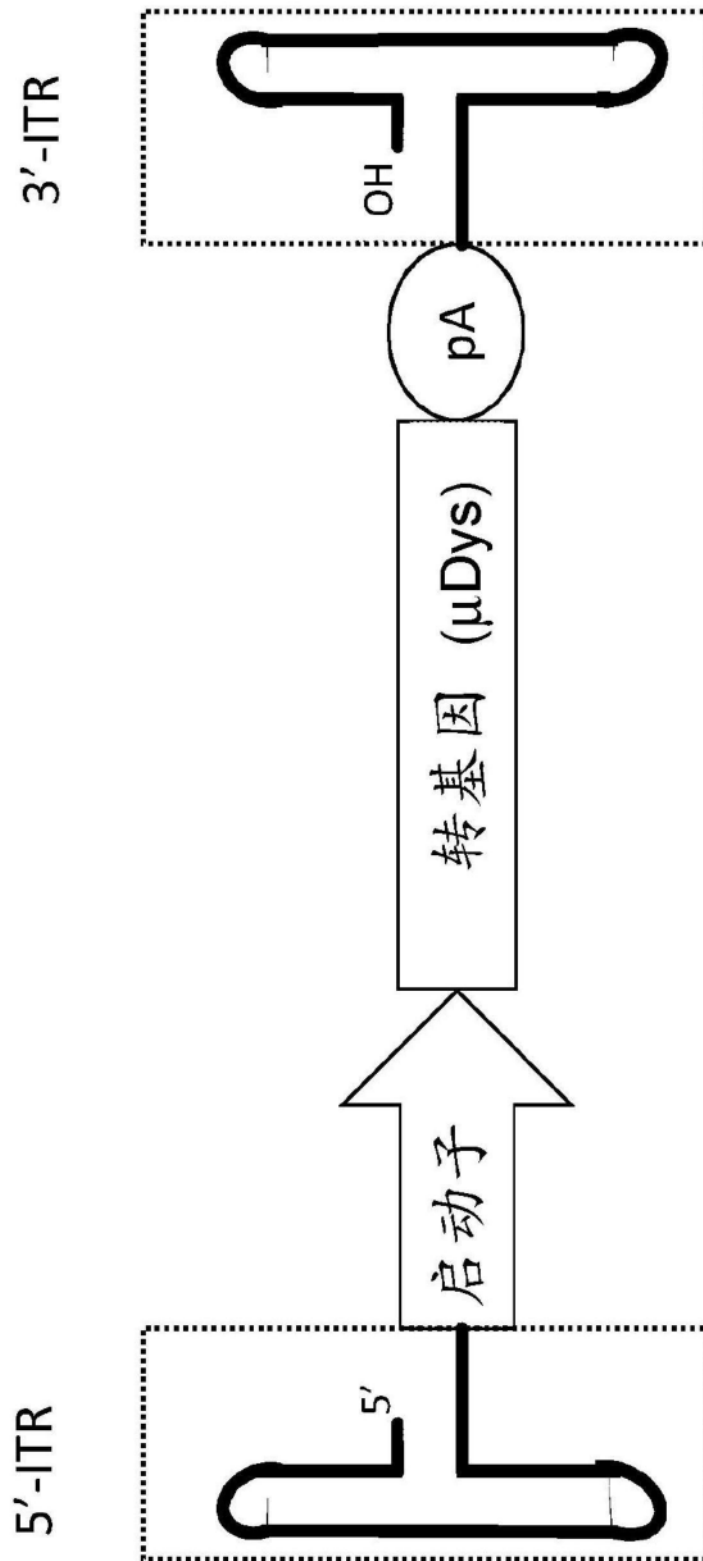


图1A

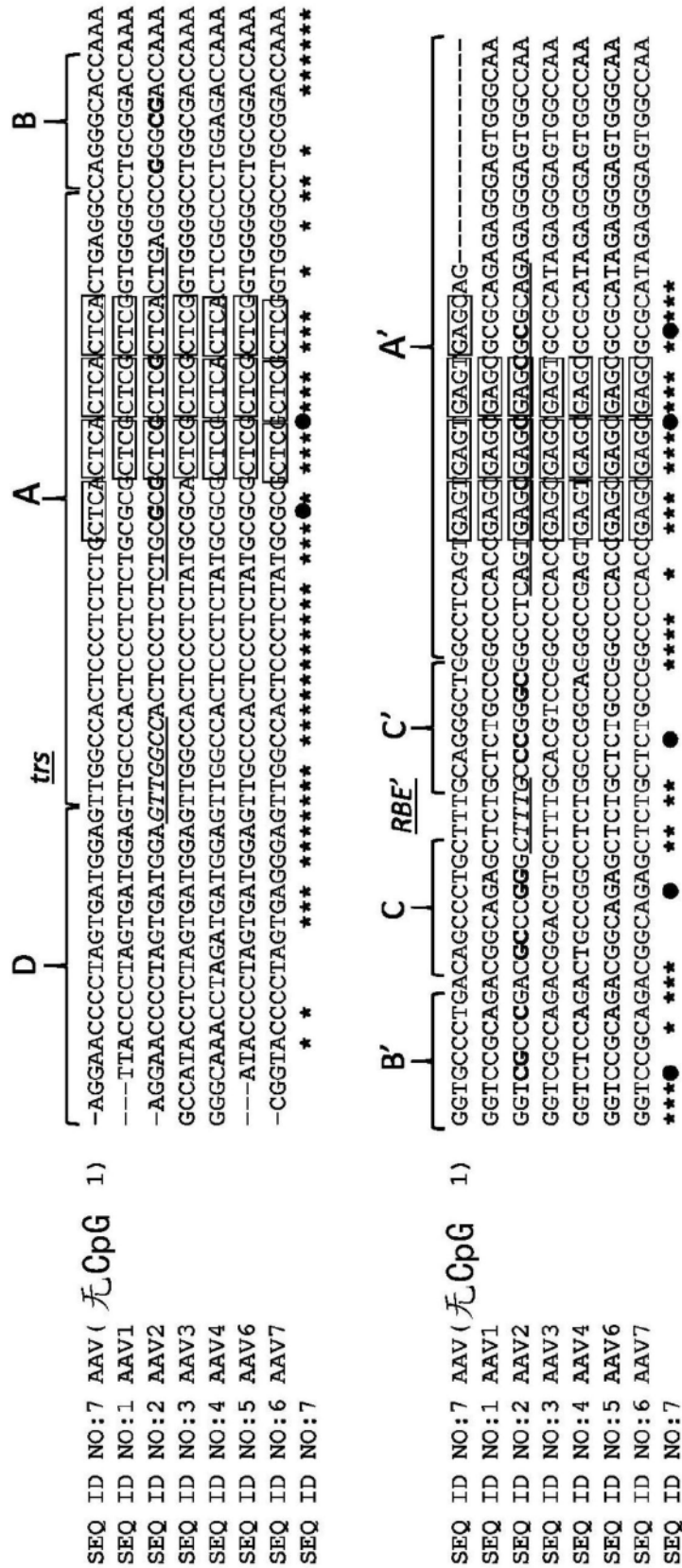


图1B

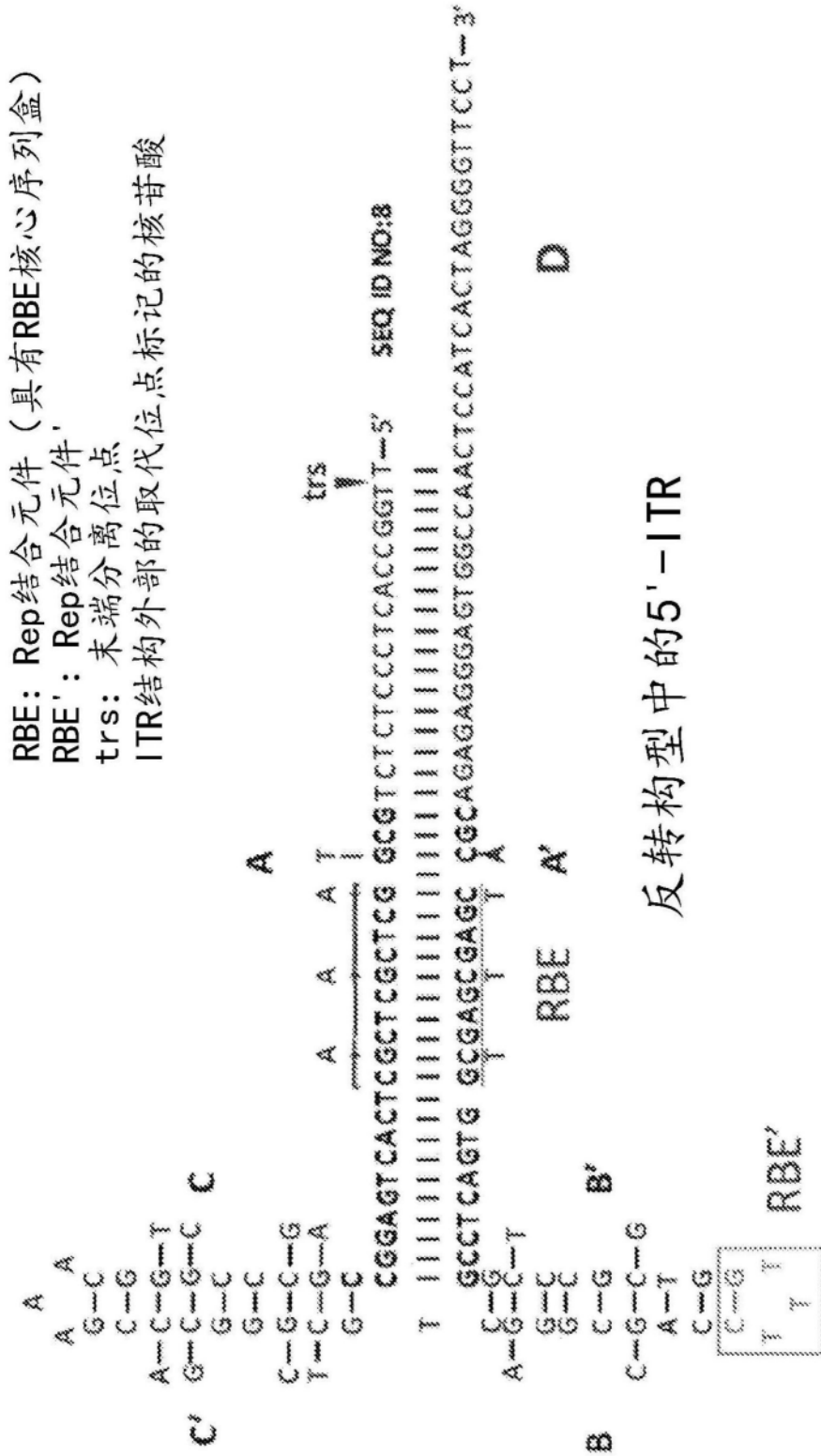


图1C

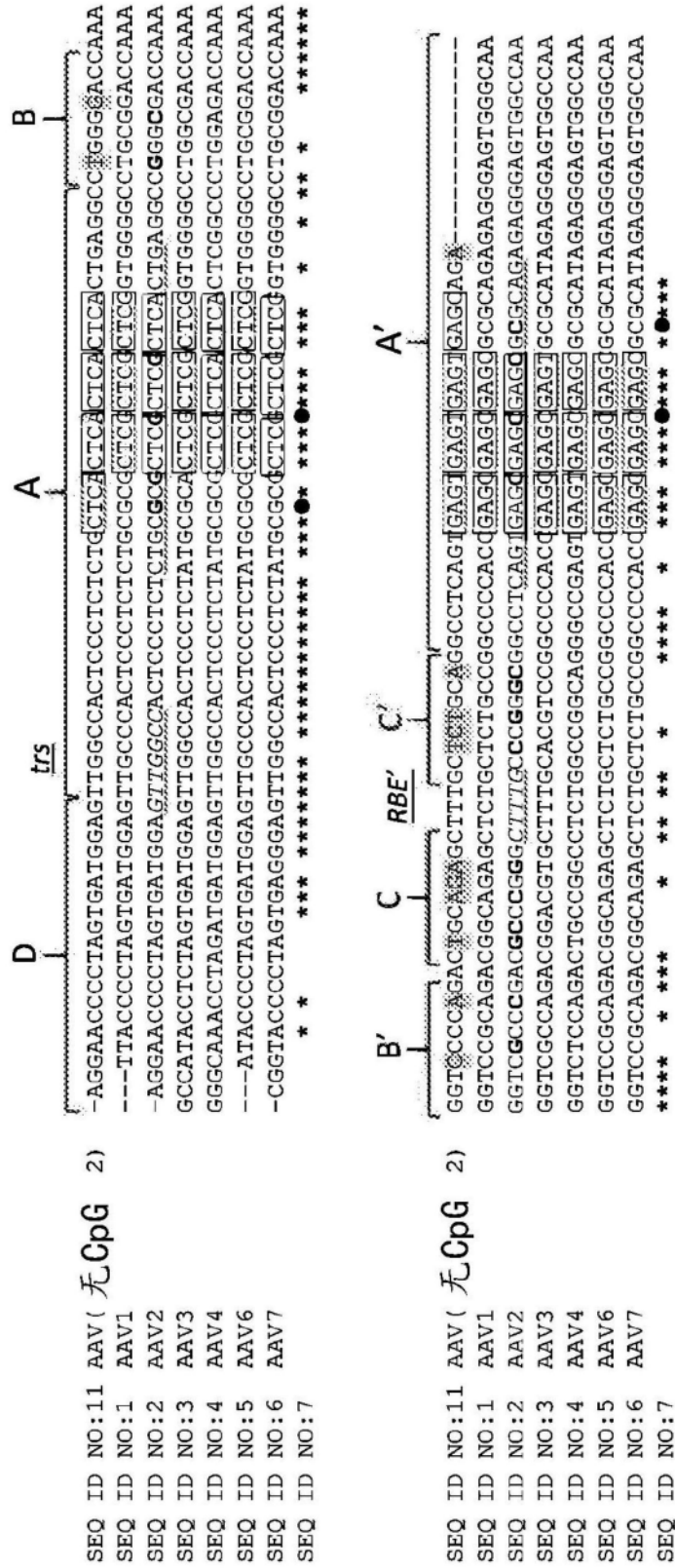


图1E

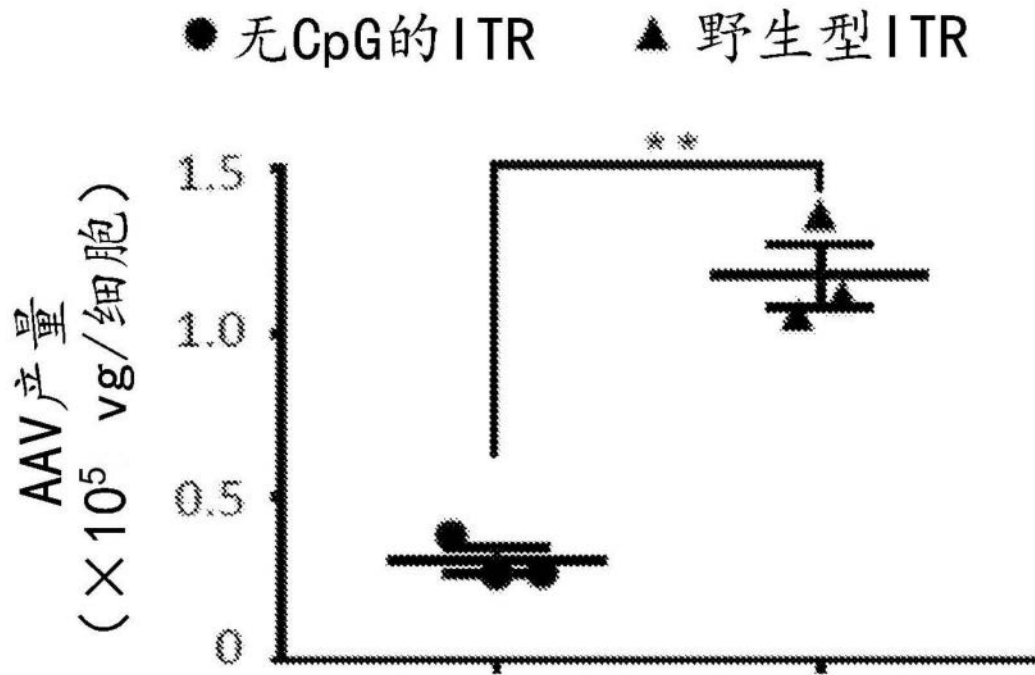


图2A

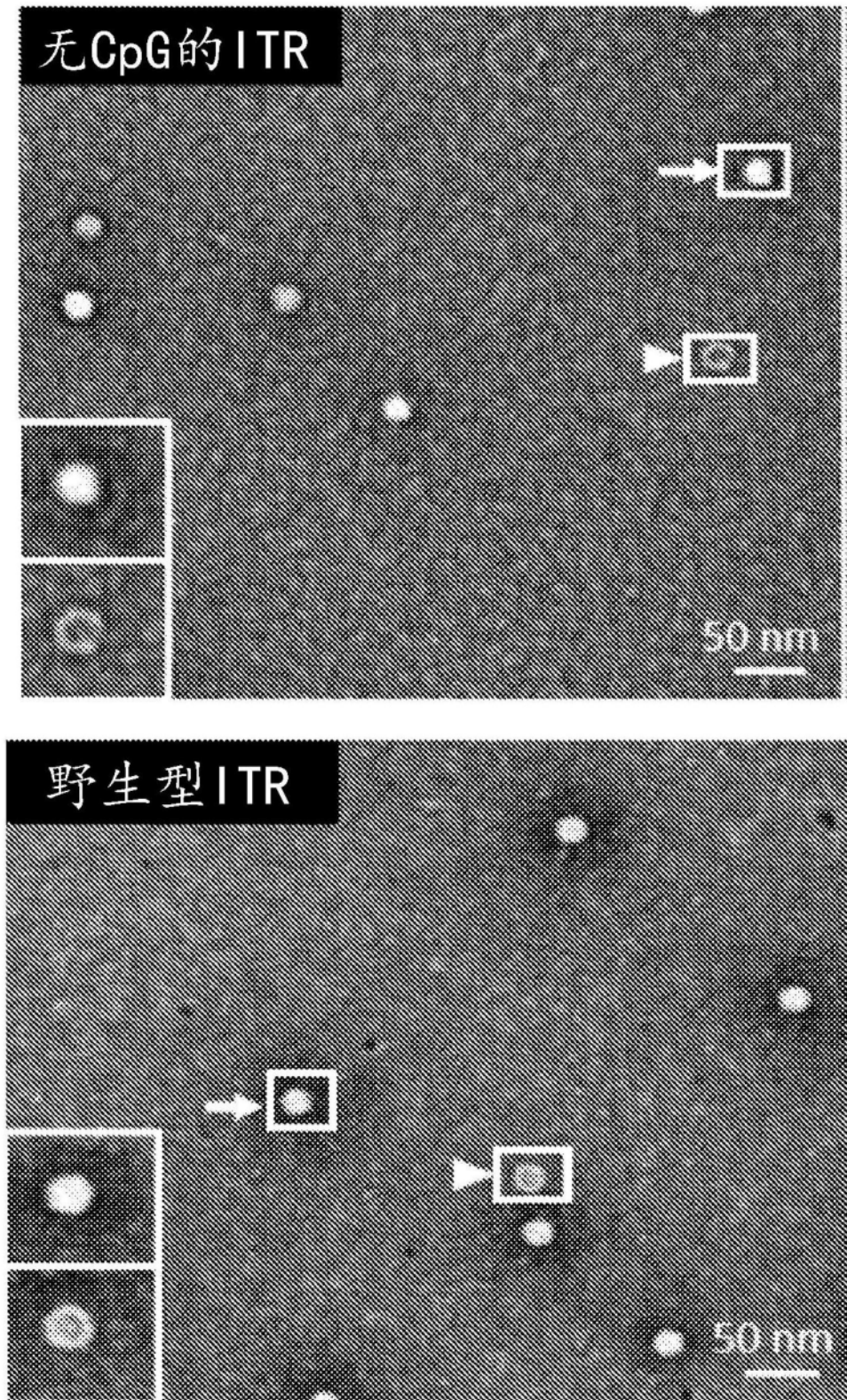


图2B

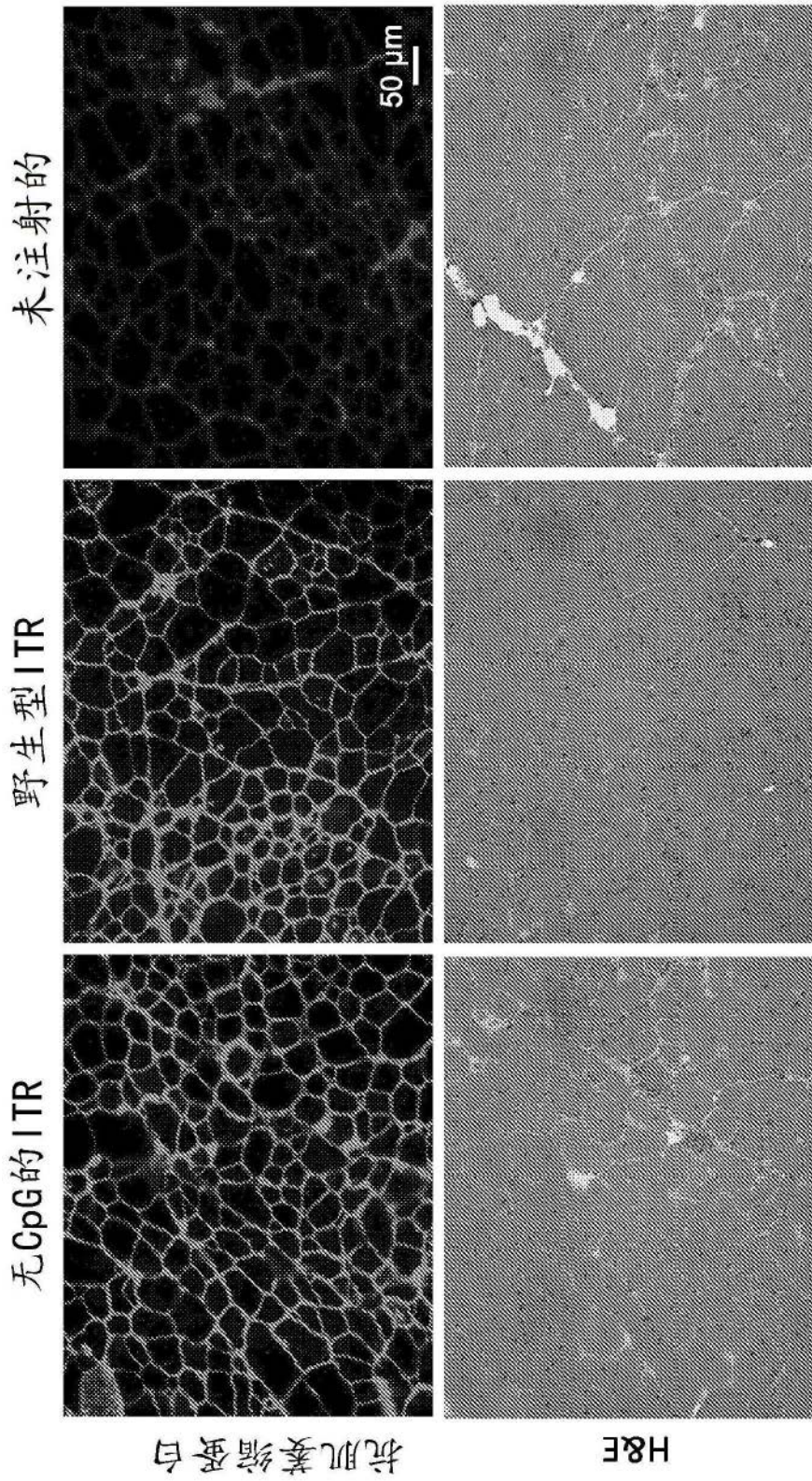


图3A

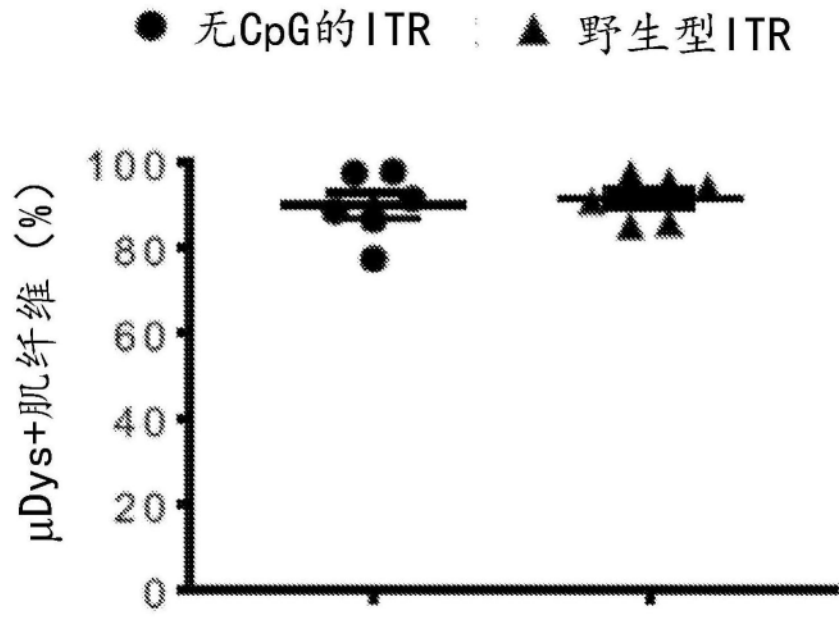


图3B

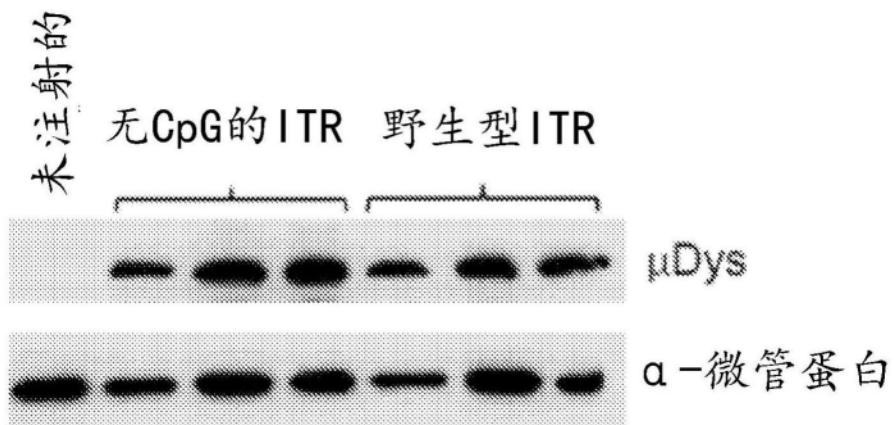


图3C

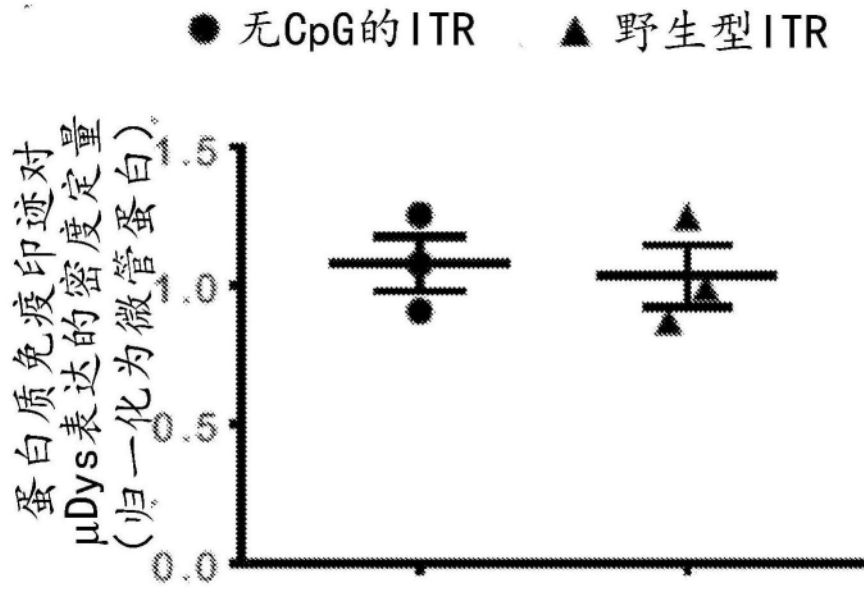


图3D

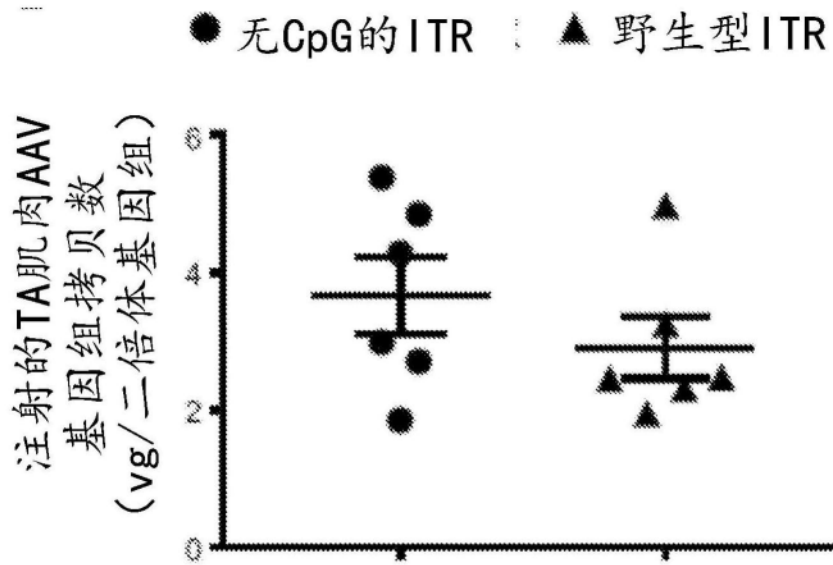


图3E

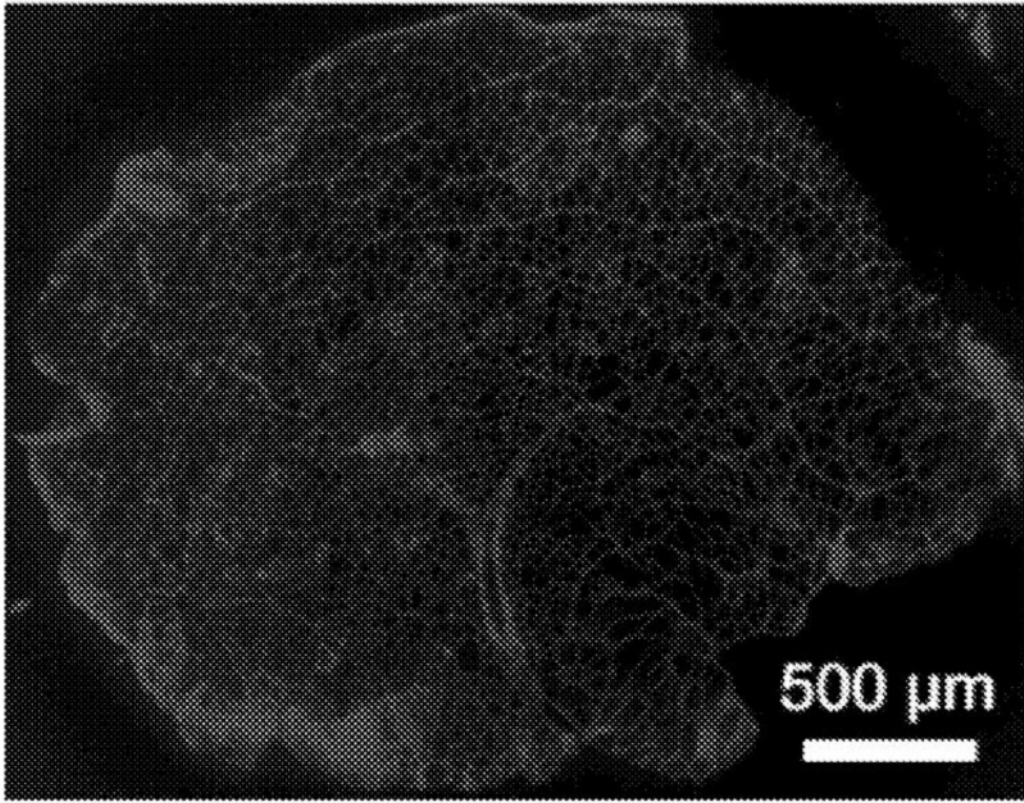


图4A

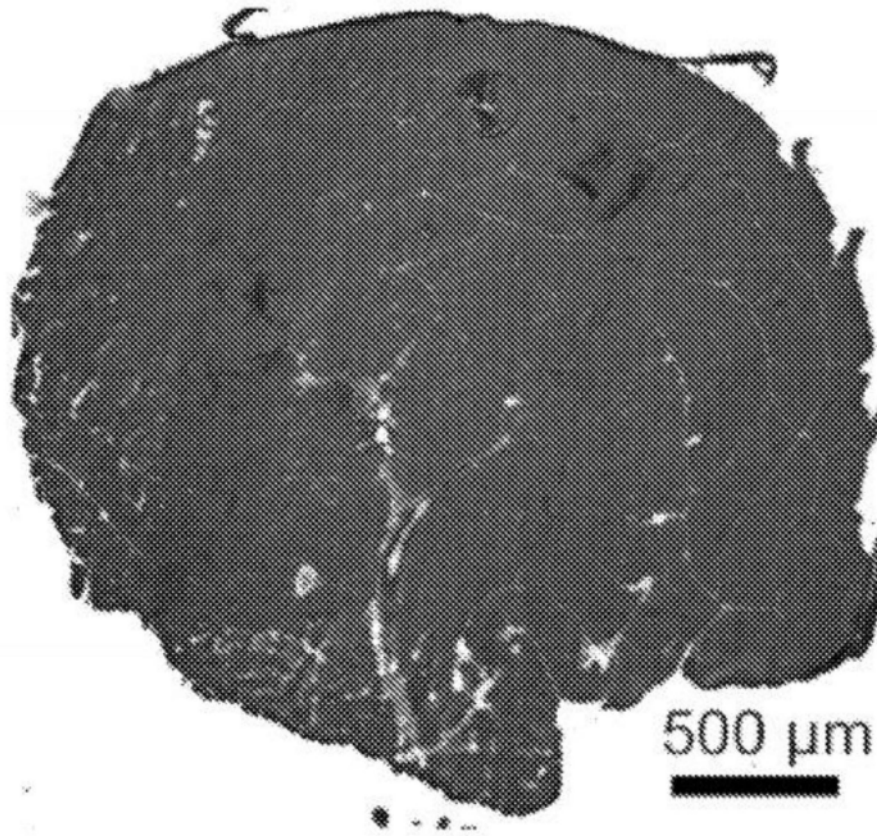


图4B

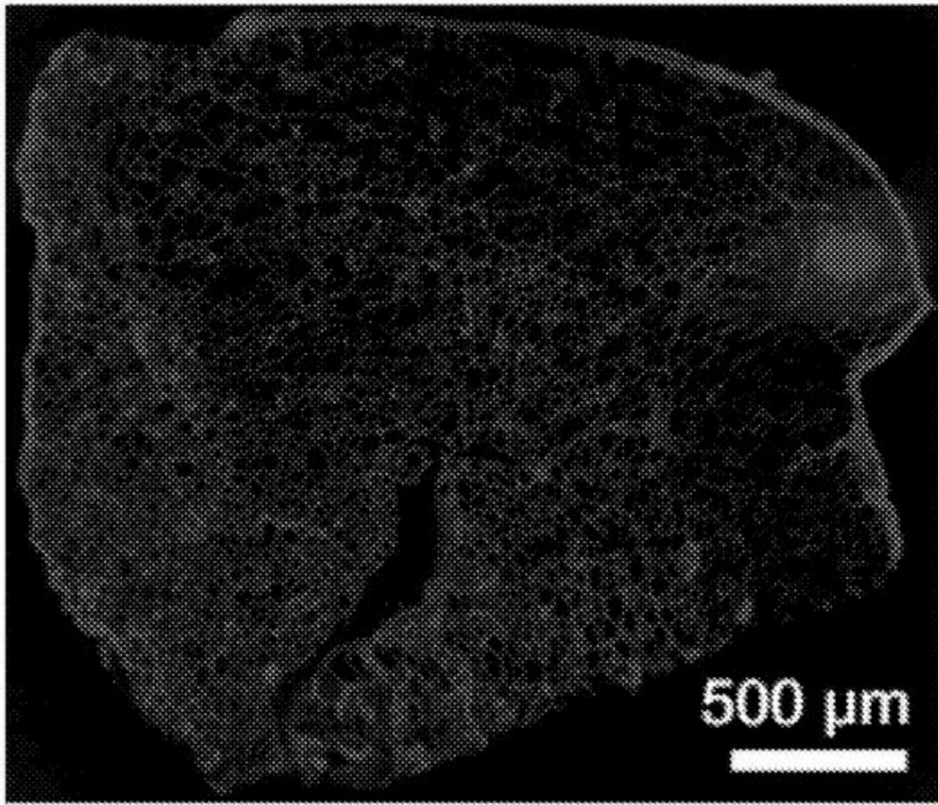


图4C

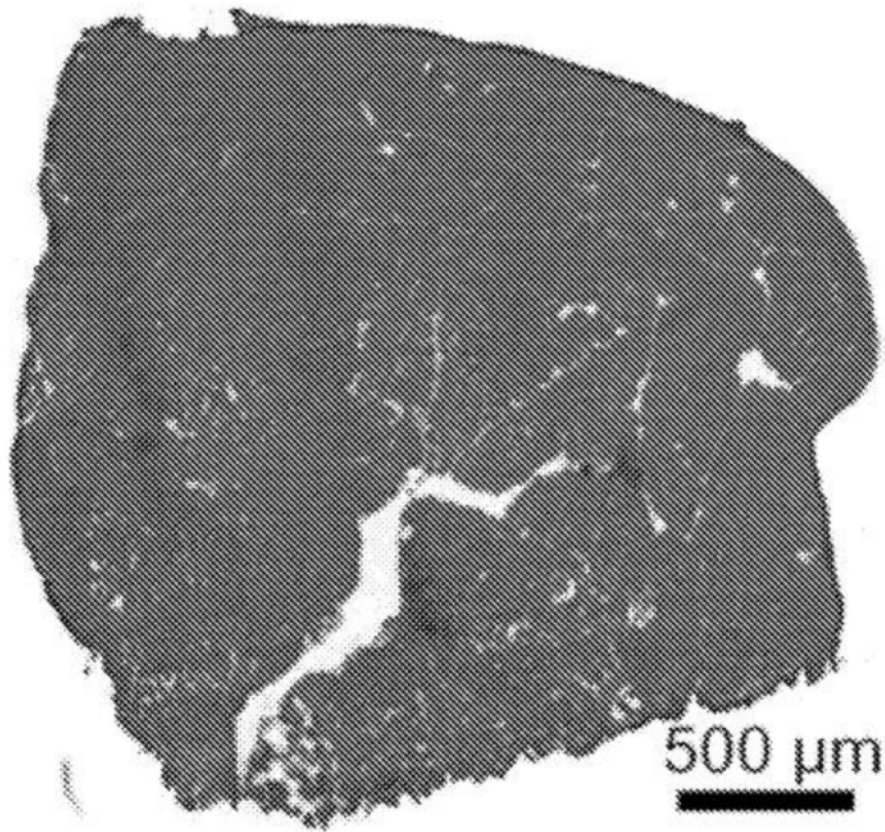


图4D

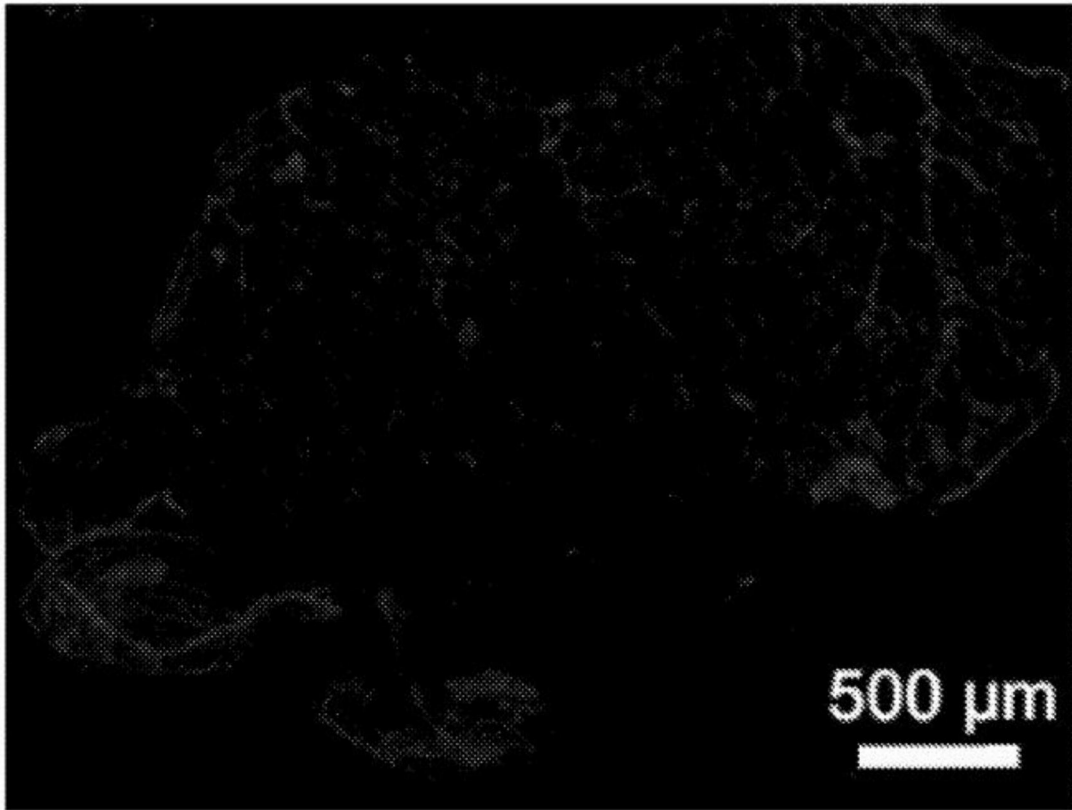


图4E

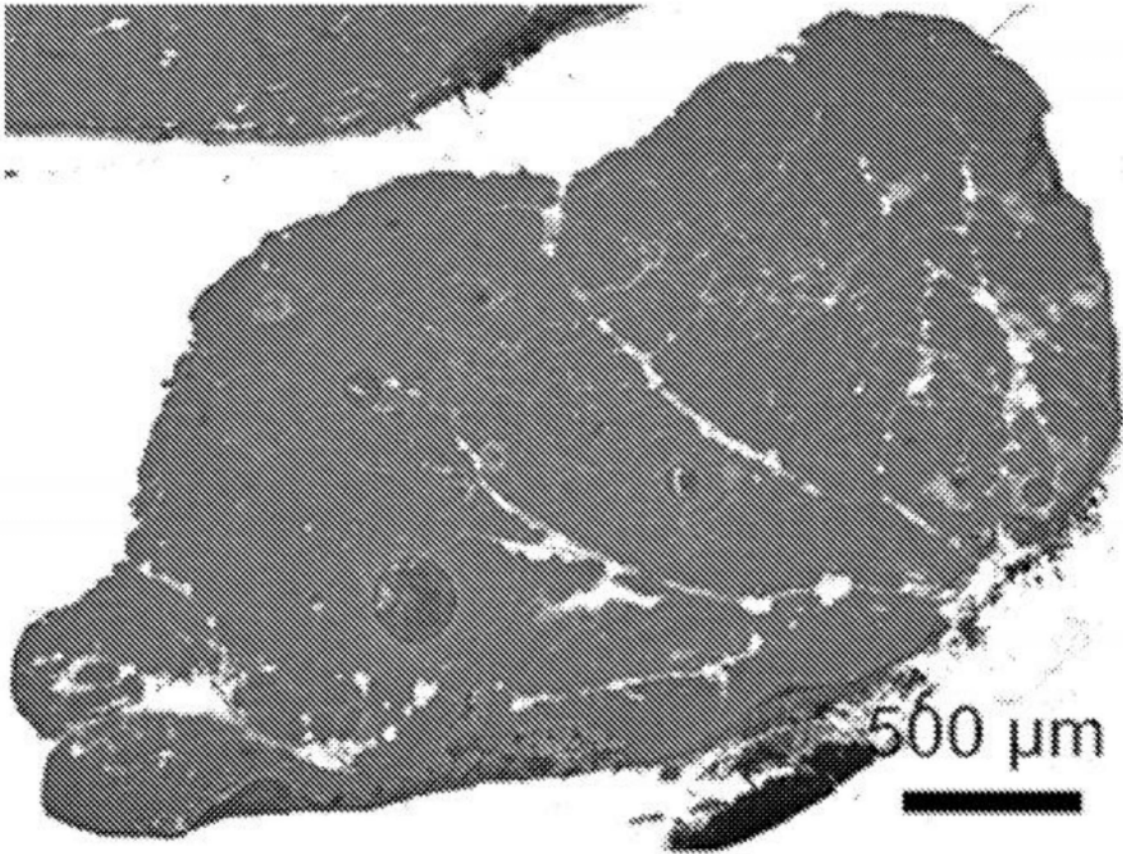


图4F

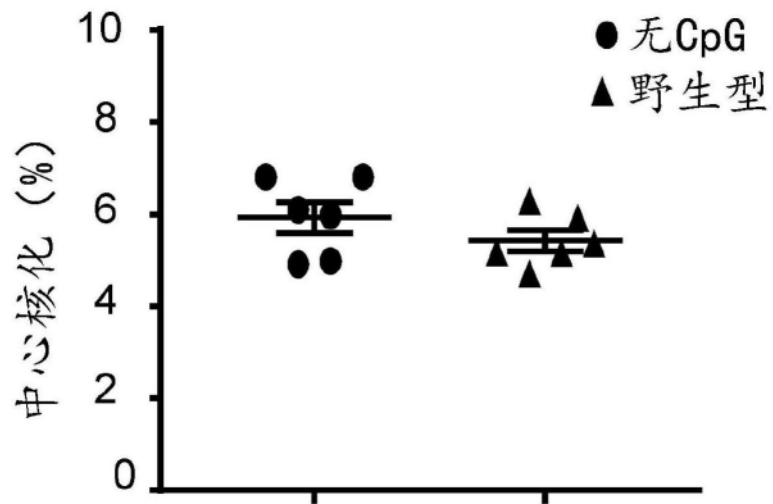


图5A

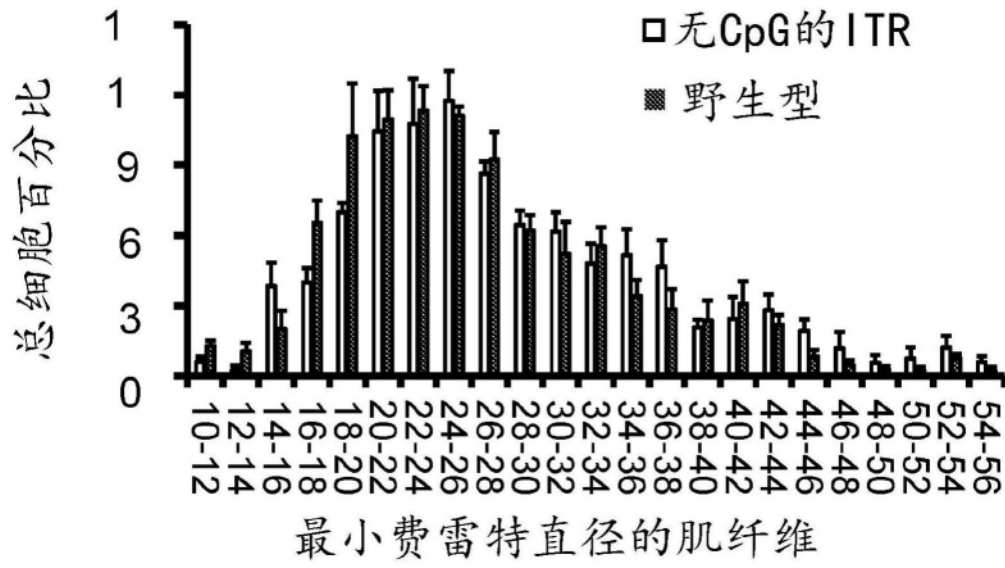


图5B

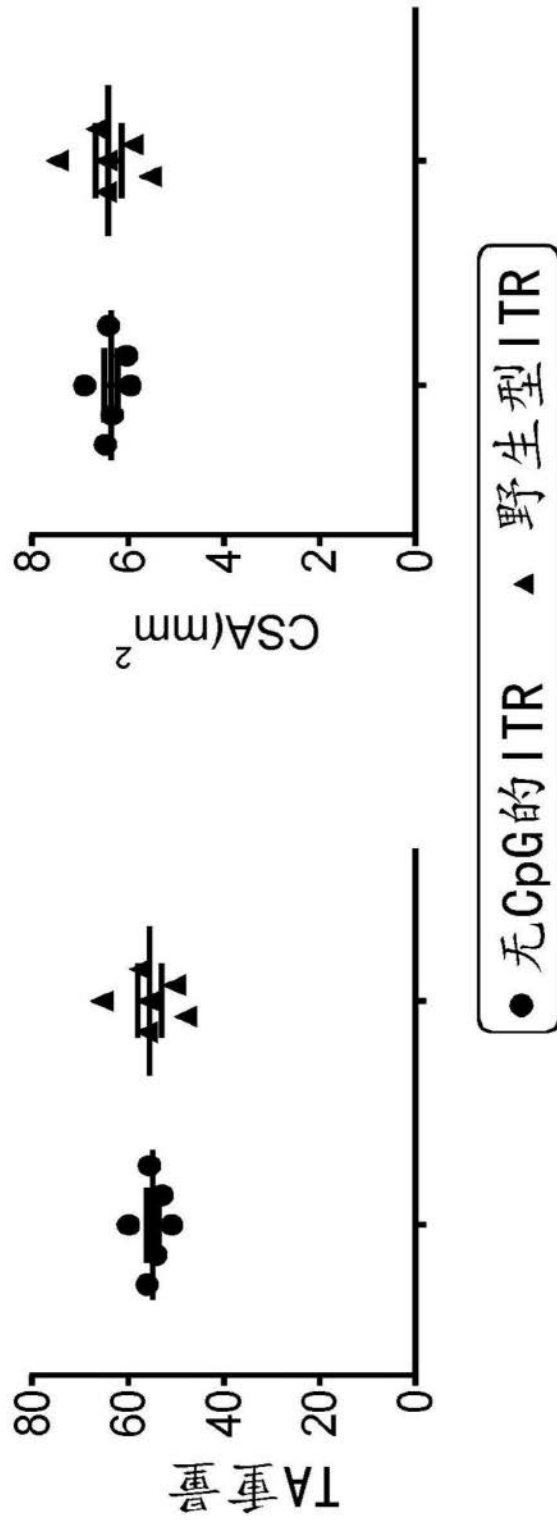


图6A

图6B

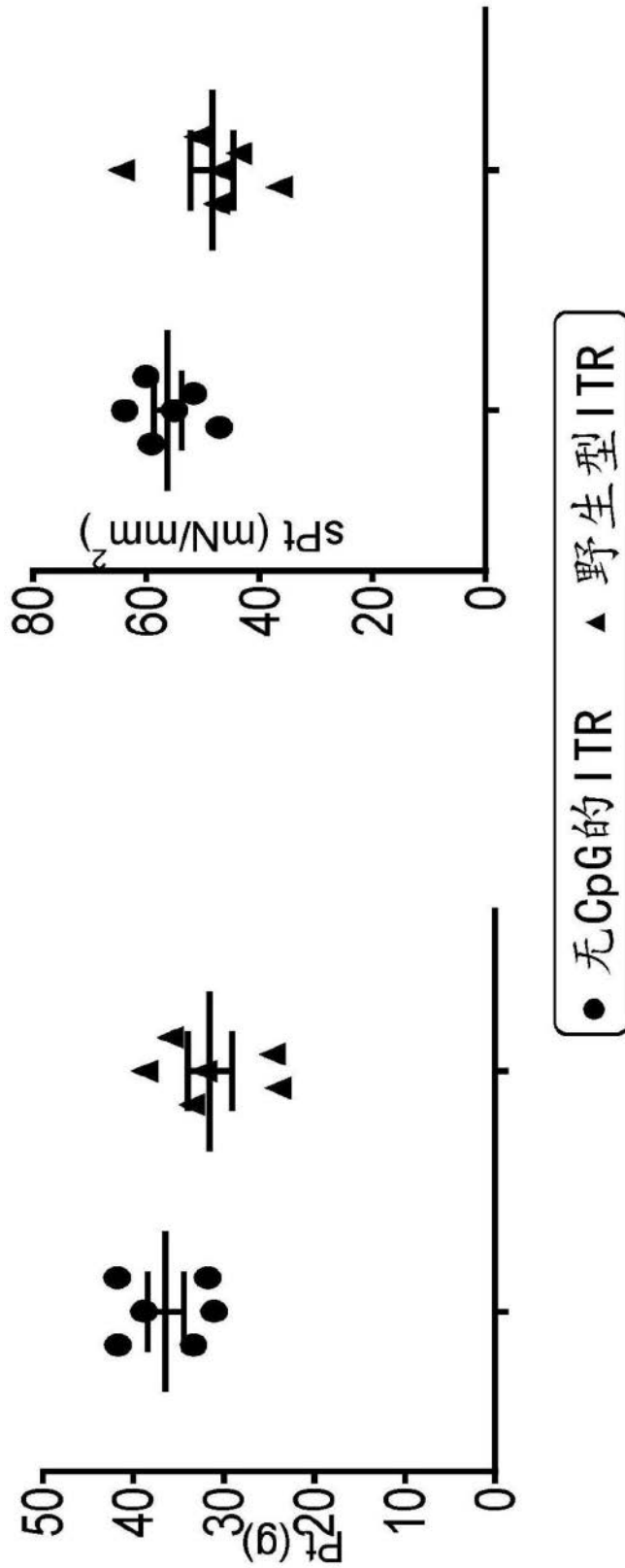


图6C

图6D

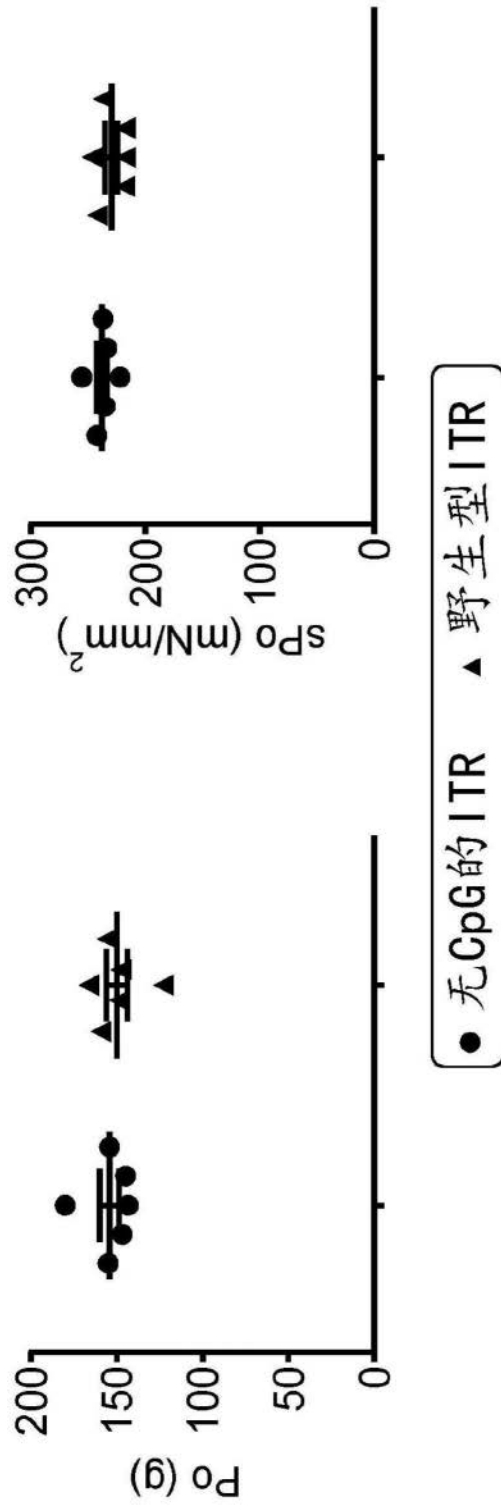


图6E

图6F

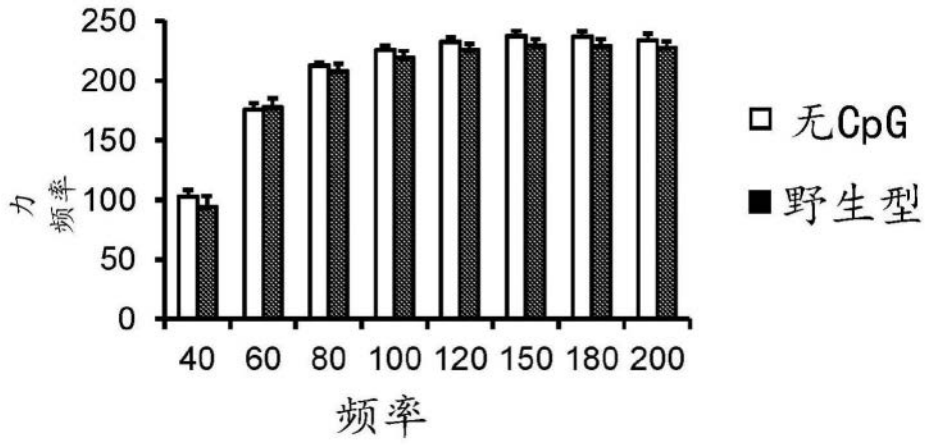


图6G

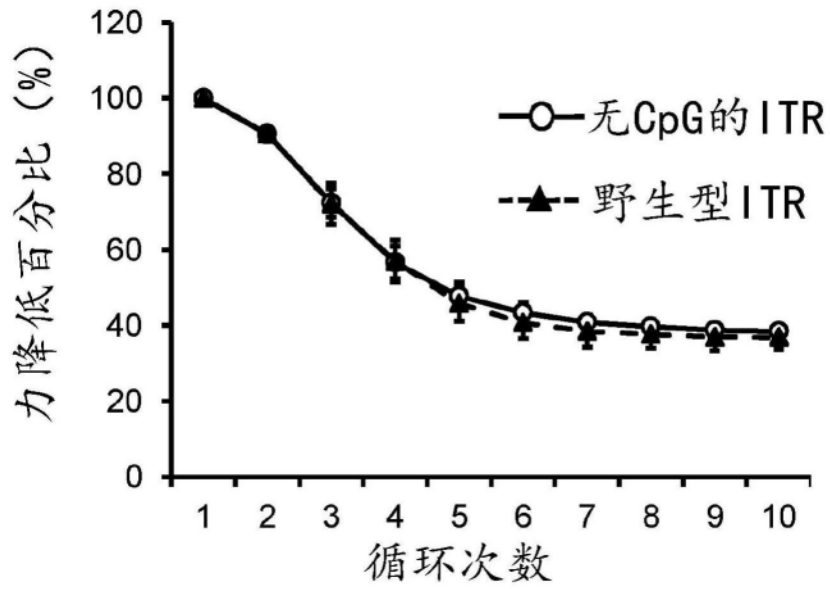


图6H