(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109121421 B
(45)授权公告日 2022.11.01

(21)申请号 201680081580.9
(22)申请日 2016.12.09
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109121421 A
(43)申请公布日 2019.01.01
(30)优先权数据
62/266383 2015.12.11 US
62/269440 2015.12.18 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.08.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/065984 2016.12.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/100682 EN 2017.06.15

(73)专利权人 宾夕法尼亚州大学信托人
地址 美国宾夕法尼亚州
(72)发明人 J.M.威尔逊 D.J.拉德
(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 梁谋 罗文锋

(51)Int.Cl.
C12N 15/86(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)

审查员 马晓霞

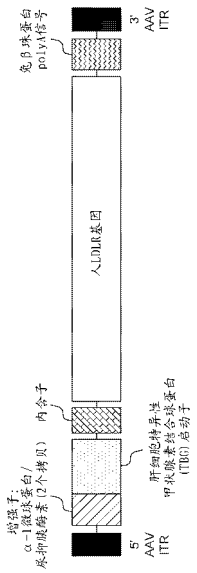
权利要求书2页 说明书33页
序列表33页 附图22页

(54)发明名称

用于治疗家族性高胆固醇血症的基因疗法

(57)摘要

提供了组合物和方案,其可用于降低以下中的一种或多种:受试者中的LDL-胆固醇、总胆固醇和/或空腹甘油三酯,和/或将LDL载脂蛋白B(apoB)的分级分解率(FCR)从基线改变至rAAV施用后的所选时间点。所述方法涉及经外周静脉通过输注向人受试者施用复制缺陷型重组腺相关病毒(rAAV)的悬浮液。



CN 109121421 B

1.适合于人受试者中外周静脉输注的药物组合物,其包含复制缺陷型重组腺相关病毒(rAAV)在配制缓冲液中的悬浮液,其中:

(a)所述rAAV是包含AAV8衣壳和载体基因组的*AAV8.TBG.hLDLR*,其中所述载体基因组包含AAV-5' 反向末端重复序列(ITR)、表达盒和AAV-3' ITR,其中所述表达盒包含编码人LDL受体(hLDLR)的核酸序列,所述核酸序列与指导其表达的表达控制序列可操作地连接,其中所述表达控制序列包含为甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子的肝脏特异性启动子、两个α mic/bik增强子序列、嵌合内含子序列和兔β珠蛋白多腺苷酸化(polyA)序列,其中hLDLR编码序列是SEQ ID NO: 4的核酸序列,并且其中所述载体基因组包装在所述AAV8衣壳中;和

(b)所述配制缓冲液包含磷酸缓冲盐水和泊洛沙姆的水溶液。

2.权利要求1的药物组合物,其中所述rAAV基因组拷贝(GC)效价是至少1 x 10^{13} GC/ml。

3.权利要求1的药物组合物,其中所述rAAV包含具有SEQ ID NO: 5的编码氨基酸序列的AAV8衣壳。

4.权利要求1的药物组合物,其中所述*AAV8.TBG.hLDLR*具有包含SEQ ID NO: 6的核苷酸1-3947的载体基因组。

5.权利要求1-4中任一项的药物组合物,其中所述配制缓冲液为180mM NaCl、10mM磷酸钠、0.001%泊洛沙姆188, pH 7.3。

6.权利要求1-5中任一项的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物适合用于通过以下方式治疗家族性高胆固醇血症(FH):

在诊断患有家族性高胆固醇血症(FH)的人受试者中减少以下的一种或多种:LDL-胆固醇、总胆固醇和/或空腹甘油三酯,和/或

在诊断患有家族性高胆固醇血症(FH)的人受试者中将LDL载脂蛋白B(apoB)的分级分解率(FCR)从基线改变至rAAV施用后选定的时间点。

7.权利要求1-5中任一项的药物组合物在制备药物中的用途,其中所述药物可以经外周静脉通过输注施用于人受试者,且包含通过优化的qPCR (oqPCR)或数字液滴PCR (ddPCR)测定的剂量为(i)至少约5 x 10^{11}基因组拷贝/kg或(ii) 2.5 x 10^{12} 基因组拷贝(GC)/kg至7.5 x 10^{12}基因组拷贝(GC)/kg人受试者体重的复制缺陷型重组腺相关病毒(rAAV)的悬浮液。

8.权利要求6或7的用途,其中所述配制缓冲液为180mM NaCl、10mM磷酸钠、0.001%泊洛沙姆188, pH 7.3。

9.权利要求6-8中任一项的用途,其中所述受试者已诊断患有纯合FH (HoFH)。

10.权利要求6-8中任一项的用途,其中所述受试者已诊断患有杂合FH (HeFH)。

11.权利要求6-10中任一项的用途,其中所述人受试者用PCSK9抑制剂、抑制素、烟酸、依泽替米贝或胆汁酸螯合剂中的一种或多种进行共治疗。

12.药物组合物在制备药物中的用途,所述药物治疗诊断患有家族性高胆固醇血症(FH)的人受试者,其中所述药物可以经外周静脉通过输注施用于人受试者,且所述组合物包含通过优化的qPCR (oqPCR)或数字液滴PCR (ddPCR)测定的剂量为(i)至少约5 x 10^{11}基因组拷贝/kg或(ii) 2.5 x 10^{12} 基因组拷贝(GC)/kg至7.5 x 10^{12}基因组拷贝(GC)/kg人

受试者体重的复制缺陷型重组腺相关病毒(rAAV)的悬浮液,其中:

(a)所述rAAV包含AAV8衣壳和载体基因组,其中所述载体基因组包含AAV-5' 反向末端重复序列(ITR)和表达盒、AAV-3' ITR,其中所述表达盒包含编码野生型人LDL受体(hLDLR)的核酸序列,所述核酸序列与指导其表达的表达控制序列可操作地连接,其中所述表达控制序列包含为甲状腺素结合球蛋白启动子的肝脏特异性启动子、两个α mic/bik增强子序列、嵌合内含子序列和兔β珠蛋白多腺苷酸化(polyA)信号序列,其中编码hLDLR的核酸序列是SEQ ID NO: 4,并且其中所述载体基因组包装在AAV8衣壳中;和

(b)所述rAAV悬浮液具有这样的效力,使得施用于HoFH的双敲除LDLR-/-Apobec-/-小鼠模型的5×10^{11} GC/kg的剂量将所述小鼠模型中的基线胆固醇水平降低25%至75%,其中在载体施用之前和之后评估基线胆固醇水平。

13.权利要求12的用途,其中所述rAAV是包含AAV8衣壳和包装在所述AAV8衣壳中的包含SEQ ID NO: 6的核苷酸1-3947的载体基因组的*AAV8.TBG.hLDLR*。

14.权利要求12的用途,其中配制缓冲液为180mM NaCl、10mM磷酸钠、0.001%泊洛沙姆188, pH 7.3。

15.权利要求12-14中任一项的用途,其中所述受试者已诊断患有纯合FH (HoFH)。

16.权利要求12-14中任一项的用途,其中所述受试者已诊断患有杂合FH (HeFH)。

17.药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于降低以下中的一种或多种:人受试者中的LDL-胆固醇、总胆固醇和/或空腹甘油三酯,和/或将LDL载脂蛋白B(apoB)的分级分解率(FCR)从基线改变至rAAV施用后的所选时间点,其中所述药物可以经外周静脉通过输注施用于人受试者,且所述组合物包含通过oqPCR或ddPCR测定的剂量为(a)至少约5×10^{11}基因组拷贝/kg或(b) 2.5×10^{12} 基因组拷贝(GC)/kg至7.5×10^{12}基因组拷贝(GC)/kg人受试者体重的复制缺陷型重组腺相关病毒(rAAV)的悬浮液,并且其中所述rAAV包含AAV8衣壳和载体基因组,其中所述载体基因组包含AAV-5' 反向末端重复序列(ITR)、表达盒和AAV-3' ITR,其中所述表达盒包含编码人LDL受体(hLDLR)的核酸序列,所述核酸序列与指导其表达的表达控制序列可操作地连接,其中所述表达控制序列包含为甲状腺素结合球蛋白启动子的肝脏特异性启动子、两个α mic/bik增强子序列、嵌合内含子序列和兔β珠蛋白多腺苷酸化(polyA)序列,其中编码hLDLR的核酸序列是SEQ ID NO: 4,并且其中所述载体基因组包装在所述AAV8衣壳中。

18.权利要求17的用途,其中所述人受试者用PCSK9抑制剂、抑制素、烟酸、依泽替米贝或胆汁酸螯合剂中的一种或多种进行共治疗。

用于治疗家族性高胆固醇血症的基因疗法

[0001] 1. 前言

[0002] 本发明涉及用于治疗家族性高胆固醇血症(FH)且具体是纯合FH (HoFH)的基因疗法。

[0003] 电子形式提交的材料通过引用并入

[0004] 申请人在此将以电子形式提交的序列表材料通过引用并入本文。该文件标注为“UPN-16-7717PCT_ST25.txt”。

[0005] 2. 发明背景

[0006] 家族性高胆固醇血症(FH)是由影响LDL受体(LDLR)功能的基因中的突变引起的危及生命的病症(Goldstein等人Familial hypercholesterolemia, in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, C.R.Scriver, 等人, 编辑.2001, McGraw-Hill Information Services Company:New York. 第2863-2913页 (2001))。据估计,>90%的患有分子证实的FH的患者携带编码LDLR的基因中的突变(LDLR,MIM 606945)。其余患者携带另外三个基因上的突变:编码载脂蛋白(apo) B的APOB (MIM 107730)、编码前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型(PCSK9)的PCSK9 (MIM 607786)和编码LDLR衔接蛋白1的LDLRAP1 (MIM 695747)。后者是与隐性性状相关的唯一基因突变。通常通过同一基因的2个等位基因中存在突变来赋予纯合性;然而,已报道具有双重杂合性的患者的病例(两个杂合突变,两个不同基因中各一个)。基于杂合FH在1/500和1/200之间的患病率(Nordestgaard等人Eur Heart J, 2013.34(45): 第3478-90a页 (2013), Sjouke 等人 Eur Heart J, (2014)),据估计世界上7,000-43,000人患有纯合FH (HoFH)。

[0007] 突变体LDLR等位基因的表征已揭示了多种突变,包括缺失、插入、错义突变和无义突变(Goldstein 等人2001)。已报道超过1700个LDLR突变。这种基因型异质性导致受体的生物化学功能的可变后果,其分类为四个一般组。1类突变与无可检测的蛋白质相关,并且通常由基因缺失引起。2类突变导致蛋白质的细胞内加工异常。3类突变特异性地影响结合配体LDL,且4类突变编码不在有被小窝中聚簇的受体蛋白质。基于使用患者培养的成纤维细胞评估的残余LDLR活性,突变也被分类为受体阴性(LDLR的<2%残余活性)或受体缺陷(2-25%残余活性)。受体缺陷的患者平均具有较低的LDL-C水平和较低的恶性心血管病程。

[0008] 由于LDL受体功能受损,患有HoFH的患者中未经治疗的总血浆胆固醇水平通常高于500 mg/dl,导致过早和侵袭性动脉粥样硬化,通常导致在20岁前的心血管疾病(CVD)和30岁前死亡 (Cuchel 等人Eur Heart J, 2014.35(32): 第2146-2157页 (2014), Goldstein 等人2001)。早期起始对这些患者的积极治疗因此是必需的(Kolansky 等人2008)。可用的选项是有限的。抑制素类被认为是一线的药物治疗。即使在最大剂量,在大部分患者中观察到LDL-C血浆水平中仅10-25%的降低(Marais 等人Atherosclerosis, 2008.197(1): 第400-6页 (2008); Raal 等人Atherosclerosis, 2000.150(2): 第421-8页 (2000))。向抑制素疗法中添加胆固醇吸收抑制剂依泽替米贝可以导致LDL-C水平进一步10-20%的降低(Gagne 等人Circulation, 2002.105(21): 第2469-2475页 (2002))。使用其他降胆固醇药物,包括胆汁酸螯合剂、烟酸、贝特类和普罗布考已成功用于前抑制素时

期,且可被认为实现HoFH中进一步的LDL-C降低;然而,它们的使用受到耐受性和药物可用性的限制。已经显示这种方法减少CVD和全因死亡率(Raal 等人Circulation, 2011.124(20): 第2202-7页)。尽管实施了积极的多药物治疗方法,但HoFH患者的LDL-C水平仍然升高,且其平均预期寿命保持在约32年(Raal 等人2011)。多年来还已测试了几种非药物选项。手术干预诸如分流术(Bilheimer Arteriosclerosis, 1989.9(1 Suppl): 第I158-I163页 (1989); Forman 等人Atherosclerosis, 1982.41(2-3): 第349-361页 (1982))和回肠旁路术(Deckelbaum 等人N. Engl. J. Med.1977;296:465-470 1977.296(9): 第465-470页 (1977))已经仅导致部分且短暂的LDL-C降低,并且目前被认为是不可行的方法。已证实原位肝移植显著降低HoFH患者的LDL-C水平(Ibrahim 等人J Cardiovasc Transl Res, 2012.5(3): 第351-8页 (2012); Kucukkartallar 等人2 Pediatr Transplant, 2011.15(3): 第281-4页 (2011)),但是缺点和风险限制了这种方法的使用,其包括移植后手术并发症和死亡率的高风险、捐赠者短缺以及需要免疫抑制疗法的终身治疗(Malatack Pediatr Transplant, 2011.15(2): 第123-5页 (2011); Starzl 等人Lancet, 1984.1(8391): 第1382-1383页 (1984))。目前HoFH的护理标准包括脂蛋白单采术,其为一种清除血浆LDL-C的物理方法,可以瞬间降低LDL-C 50%以上(Thompson Atherosclerosis, 2003.167(1): 第1-13页 (2003); Vella 等人Mayo Clin Proc, 2001.76(10): 第1039-46页 (2001))。治疗期后血浆中LDL-C的快速重新积累(Eder and Rader Today's Therapeutic Trends, 1996.14: 第165-179页 (1996))使每周或每两周单采术成为必需。尽管该程序可以延迟动脉粥样硬化的发病(Thompson 等人Lancet, 1995.345: 第811-816页; Vella 等人Mayo Clin Proc, 2001.76(10): 第1039-46页(2001)),但其是费力的、昂贵的且不易获得的。此外,虽然它是一种通常耐受良好的程序,但是对于许多HoFH患者而言,需要频繁重复和静脉内进入的事实可能是具有挑战性的。

[0009] 最近,FDA已批准三种新药作为专门用于HoFH的附加(add-on)疗法。其中两种,洛美他派 (lomitapide)和米泊美生(mipomersen),抑制含apoB的脂蛋白的组装和分泌,尽管它们通过不同的分子机制完成这一点(Cuchel 等人N Engl J Med, 2007.356(2): 第148-156页 (2007); Raal 等人Lancet, 2010.375(9719): 第998-1006页 (2010))。该方法导致LDL-C的显著降低,所述降低用洛美他派达到平均~50%(Cuchel 等人2013)和用米泊美生达到平均~25%(Rall 等人2010)。然而,它们的使用与一系列可能影响耐受性和长期依从性并包括肝脏脂肪积累的不良事件相关,其长期后果尚未完全阐明。

[0010] 第三种是一类新型降脂药物的部分,即针对前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9(PCSK9)的单克隆抗体,其已显示可有效降低LDL-C水平,且对杂合FH患者有明显有利的安全性(Raal 等人Circulation, 2012.126(20): 第2408-17页 (2012), Raal 等人The Lancet, 2015.385(9965): 第341-350页 (2015); Stein 等人Circulation, 2013.128(19): 第2113-20页 (2012))。每4周用PCSK9抑制剂evolocumab 420 mg治疗HoFH 12周已显示与安慰剂相比提供LDL-C减少约30%(Raal 等人2015)。然而,PCSK9抑制剂的功效取决于残留的LDLR活性,对没有残留LDLR活性的患者没有作用(Raal 等人2015, Stein 等人Circulation, 2013.128(19): 第2113-20页 (2013))。尽管添加PCSK9抑制剂可能成为FH的护理标准,并且可以在HoFH患者子集中提供进一步降低以降低高胆固醇血症,但它们不会显着影响该病况的临床管理。

[0011] 因此,对于HoFH的新医学疗法仍存在未满足的医疗需求。

[0012] 3. 发明概述

[0013] 本发明涉及复制缺陷型腺相关病毒(AAV)用于将人低密度脂蛋白受体(hLDLR)基因递送至诊断患有HoFH的患者(人受试者)的肝细胞的用途。用于递送LDLR基因的重组AAV载体(rAAV)("rAAV.hLDLR")应该具有肝脏的趋向性(例如,携带AAV8衣壳的rAAV),并且hLDLR转基因应该通过肝脏特异性表达控制元件来控制。这种rAAV.hLDLR载体可以在20至30分钟时期内通过静脉内(IV)输注施用,以达到肝脏中LDLR表达的治疗水平。rAAV.hLDLR的治疗有效剂量范围为2.5 x 10^{12}至7.5 x 10^{12} 基因组拷贝(GC)/kg患者体重。在一个优选的实施方案中,rAAV悬浮液具有这样的效力,使得施用于HoFH的双敲除LDLR-/-Apobec-/- 小鼠模型(DKO小鼠)的5 x 10^{11} GC/kg的剂量在DKO小鼠中降低基线胆固醇水平25%-75%。

[0014] 治疗的目标是通过基于rAAV的肝脏定向基因疗法在功能上替代患者的缺陷性LDLR作为治疗该疾病的可行方法并改善对当前降脂治疗的反应。本发明部分基于开发允许安全递送有效剂量的治疗组合物和方法;和改进的制备方法,以满足人受试者中有效给药的纯化生产要求。

[0015] 在治疗后,例如给药后,使用血浆LDL-C水平作为患者中人LDLR转基因表达的替代生物标志物,可以评估疗法的功效。例如,基因疗法治疗后患者血浆LDL-C水平的降低将表明功能性LDLR的成功转导。另外或可替代地,可以监测的其他参数包括但不限于测量总胆固醇(TC)、非高密度脂蛋白胆固醇(非HDL-C)、HDL-C、空腹甘油三酯(TG)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)、脂蛋白(a)(Lp(a))、载脂蛋白B(apoB)和载脂蛋白A-I(apoA-I)与基线相比的变化,以及载体施用之前和之后的LDL动力学研究(代谢机制评估),或其组合。

[0016] 作为治疗候选者的患者优选成人(年龄≥18岁的男性或女性),所述成人被诊断患有携带*LDLR*基因中的两个突变的HoFH;即,在与HoFH一致的临床表现的情况下,在两个等位基因上具有分子上确定的LDLR突变的患者,所述临床表现可包括未治疗的LDL-C水平,例如,LDL-C水平>300mg/dl,治疗的LDL-C水平,例如,LDL-C水平<300mg/dl和/或总血浆胆固醇水平大于500mg/dl和过早和侵袭性动脉粥样硬化。治疗候选者包括正在接受降脂药物例如抑制素类、依泽替米贝、胆汁酸螯合剂、PCSK9抑制剂以及LDL和/或血浆单采术治疗的HoFH患者。

[0017] 在治疗之前,应评估HoFH患者对用于递送hLDLR基因的AAV血清型的中和抗体(NAb)。此类NAb可干扰转导效率并降低治疗功效。具有基线血清NAb效价≤1:5的HoFH患者是用rAAV.hLDLR基因疗法方案治疗的良好候选者。治疗具有血清NAb效价>1:5的HoFH患者可能需要联合疗法,例如在用rAAV.hLDLR载体递送治疗之前和/或期间用免疫抑制剂瞬时共治疗。另外或可替代地,监测患者的肝酶升高,其可以用瞬时免疫抑制剂疗法治疗(例如,如果观察到天冬氨酸转氨酶(AST)或丙氨酸转氨酶(ALT)的至少约2x基线水平)。用于这种共疗法的免疫抑制剂包括但不限于类固醇、抗代谢物、T细胞抑制剂和烷化剂。

[0018] 通过以下来说明本发明:描述人受试者的AAV8.LDLR治疗方案的实施例(第6节,实施例1); 证明治疗在疾病动物模型中的功效的临床前动物数据(第7节,实施例2); 制备和配制治疗性AAV.hLDLR组合物(第8.1至8.3节,实施例3); 和表征AAV载体的方法(第8.4节,实施例3)。

[0019] 3.1. 定义

[0020] 如本文所用,“AAV8衣壳”是指具有GenBank登录号:YP_077180的编码氨基酸序列的AAV8衣壳,其通过引用并入本文,并在SEQ ID NO:5中再现。本发明包括来自该编码序列的一些变化,其可包括与GenBank登录号:YP_077180; 美国专利7,282,199、7,790,449;8,319,480; 8,962,330; US 8,962,332中的参考氨基酸序列具有约99%同一性的序列(即,与参考序列小于约1%的变化)。在另一个实施方案中,AAV8衣壳可具有WO2014/124282中描述的AAV8变体的VP1序列,其通过引用并入本文。已经描述了产生衣壳的方法、因此的编码序列以及产生rAAV病毒载体的方法。参见,例如Gao, 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.100 (10), 6081-6086 (2003), US 2013/0045186A1和WO 2014/124282。

[0021] 如本文所用,术语“NAb效价”指中和其靶向表位(例如AAV)的生理效应的中和抗体(例如抗AAV NAb)产生多少的量度。抗AAV NAb效价可以如以下中所述来测量:例如Calcedo, R., 等人, Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses.Journal of Infectious Diseases, 2009.199(3): 第381-390页,其通过引用并入本文。

[0022] 在氨基酸序列的上下文中,术语“百分比(%)同一性”、“序列同一性”、“百分比序列同一性”或“百分比相同”是指两个序列中当根据一致性比对时相同的残基。可以容易地确定氨基酸序列相对于蛋白质、多肽、约32个氨基酸、约330个氨基酸或其肽片段或相应的核酸序列编码序列的全长的同一性百分比。合适的氨基酸片段长度可以是至少约8个氨基酸,并且可以是高至约700个氨基酸。通常,当提及两个不同序列之间的“同一性”、“同源性”或“相似性”时,参考“比对的”序列确定“同一性”、“同源性”或“相似性”。“比对的”序列或“比对”是指多个核酸序列或蛋白质(氨基酸)序列,与参考序列相比时通常含有针对缺失或额外碱基或氨基酸的校正。使用多种公开或商业上可获得的多序列比对程序中的任一种进行比对。序列比对程序可用于氨基酸序列,例如“Clustal X”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“BLOCKMAKER”、“MEME”和“Match-Box”程序。通常,这些程序中的任何程序都在默认设置下使用,但是本领域技术人员可以根据需要改变这些设置。可选地,本领域技术人员可以利用另一种算法或计算机程序,该算法或计算机程序提供至少如由参考算法和程序提供的同一性或比对水平。参见例如J. D. Thomson 等人, Nucl.Acids.Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27(13):2682-2690 (1999)。

[0023] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指与目的基因邻接的表达控制序列和反式或远距离起作用以控制目的基因的表达控制序列。

[0024] “复制缺陷型病毒”或“病毒载体”是指合成或人工病毒颗粒,其中含有目的基因的表达盒包装在病毒衣壳或包膜中,其中也包装在病毒衣壳或包膜内的任何病毒基因组序列是复制缺陷的;即,它们不能产生子代病毒体,但保留感染靶细胞的能力。在一个实施方案中,病毒载体的基因组不包括编码复制所需的酶的基因(基因组可以被工程化为“无病毒基因的(gutless)” - 仅含有侧接扩增和包装人工基因组所需的信号的目的转基因),但这些基因可能在生产过程中提供。因此,由于子代病毒粒子的复制和感染无法发生(例外是存在复制所需的病毒酶),所以认为使用基因疗法是安全的。

[0025] 应注意,术语“一个/种(a或an)”指一个/种或多个/种。因此,术语“一个/种”、“一

个/种或多个/种”和“至少一个/种”在本文可互换使用。

[0026] 词语“包含(comprise, comprises和comprising)”以开放式而非封闭式解释。词语“由……组成(consist, consisting)”及其变体以封闭式而非开放式解释。虽然说明书中的各种实施方案是使用“包含”语言呈现的,但在其他情况下,相关实施方案也旨在使用“由……组成”或“基本上由……组成”语言来解释和描述。

[0027] 除非另有说明,否则本文所用的术语“约”是指与给定参考值相差10%。

[0028] 除非在本说明书中另有定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义,并且参考公开的文本,其为本领域技术人员提供了本申请中使用的许多术语的一般指导。

[0029] 4. 附图简述

[0030] 图1A-1H.预先存在的AAV8 NAb对恒河猴肝脏中EGFP表达水平的影响。通过外周静脉用$3x10^{12}$ GC/kg AAV8.TBG.EGFP注射不同类型和年龄的恒河猴,并在7天后处死并以几种方式分析肝细胞转导。图1A-1E是显微照片,其显示来自动物的肝脏的代表性切片,其具有各种水平的预先存在的针对AAV8的中和抗体(分别<1:5、1:5、1:10和1:20)。图1F显示了基于肝细胞百分比转导的转导效率的定量形态测定分析。图1G显示了基于相对EGFP强度的转导效率的定量形态测定分析。图1H显示通过ELISA定量肝脏裂解物中EGFP蛋白质。成年食蟹猴(n = 8,闭合圆),成年恒河猴(n = 8,空心三角),幼年恒河猴(n = 5,空心方块)。

[0031] 图2.DKO小鼠中mLDLR的长期表达。用10^{11} GC/小鼠($5x10^{12}$ GC/kg)的AAV8.TBG.mLDLR (n = 10) 或AAV8.TBG.nLacZ (n = 10)对DKO小鼠给药。定期监测血清中的胆固醇水平。早至第7天就实现了两组间的统计学显着差异(p<0.001),并且保持在整个实验持续期间。在载体施用后第180天处死小鼠。

[0032] 图3A - 3F.AAV8.TBG.mLDLR后DKO小鼠中动脉粥样硬化的消退。图3A是一组具有En face Sudan IV染色的三个小图。将小鼠主动脉压住并用Sudan IV染色,其染色中性脂质。显示了在载体施用后第60天(高脂肪饮食第120天)用10^{11} GC/小鼠的AAV8.nLacZ ($5x10^{12}$ GC/kg) (中)、10^{11} GC/小鼠的AV8.TBG.mLDLR ($5x10^{12}$ GC/kg) (右)处理的动物或在基线(高脂肪饮食第60天)的动物的代表性主动脉。图3B是显示定量沿着主动脉的整个长度用油红O染色的主动脉的百分比的形态测定分析的结果的柱形图。图3C-3K显示来自这些小鼠的主动脉根被油红O染色。图3L是柱形图,其显示测定基线(n = 10)、AAV.TBG.nLacZ(n = 9)和AAV8.TBG.mLDLR(n = 10)中总主动脉表面的Sudan IV染色百分比。对油红O病变进行定量。将动脉粥样硬化病变区域数据进行单向ANOVA。通过使用Dunnett检验将实验组与基线组进行比较。将重复测量ANOVA用于比较基因转移后随时间不同组小鼠之间的胆固醇水平。所有比较的统计显著性指定为P,0.05。图表代表平均值SD值。*p <0.05, **p <0.01, ‡ p <0.001。

[0033] 图4测试或对照物注射的DKO小鼠中的胆固醇水平。将DKO小鼠用$7.5x10^{11}$ GC/kg、$7.5x10^{12}$ GC/kg或$6.0x10^{13}$ GC/kg的AAV8.TBG.mLDLR或$6.0x10^{13}$ GC/kg的AAV8.TBG.hLDLR或媒介物对照(100 μl PBS)IV注射。胆固醇水平表示为平均值±SEM。每组显示来自相同的尸检时间点的血清胆固醇相对于PBS对照的统计学显着降低。

[0034] 图5A - 5B.测试物注射的DKO小鼠中的胆固醇水平。图5A显示如在第0天、第7天和第30天测量的用不同剂量的载体处理的小鼠中的胆固醇水平(mg/mL)。值表示为平均值±

SEM。$P<0.05$。

[0035] 图6A – 6C.载体注射的恒河猴中的外周T细胞应答。所呈现的数据显示了恒河猴19498(图6A)、090-0287(图6B)和090-0263(图6C)的T细胞应答和AST水平的时间过程。对于每个研究日,在每个图中从左到右绘制了测量为斑点形成单位(SFU)/百万个PBMC的对无刺激、AAV8和hLDLR的T细胞应答。恒河猴19498和090-0287产生了对和/或hLDLR转基因的阳性外周T细胞应答,而090-0263没有。*表示显著高于背景的阳性衣壳应答。

[0036] 图7.AAV8.TBG.hLDLR载体的示意图。

[0037] 图8A – 8B.AAV顺式质粒构建体。A)亲本顺式克隆质粒pENN.AAV.TBG.PI的线性表示,其含有肝脏特异性TBG启动子和侧接AAV2 ITR元件的嵌合内含子。B)人LDLR顺式质粒pENN.AAV.TBG.PI.hLDLR.RBG.KanR的线性表示,其中人LDLR cDNA被克隆到pENN.AAV.TBG.PI中的内含子和poly A信号之间且氨苄青霉素抗性基因被卡那霉素抗性基因取代。

[0038] 图9A – 9B.AAV反式质粒。FIG 9A是AAV8反式包装质粒p5E18-VD2/8的线性表示,其具有氨苄青霉素抗性基因。FIG 9B是AAV8反式包装质粒pAAV2/8的线性表示,其具有卡那霉素抗性基因。

[0039] 图 10A – 10B.腺病毒辅助质粒。图10A图示ad复制质粒pAdΔF6经中间体pAdΔF1和pAdΔF5从亲本质粒pBHG10的起源。图10B是pAdΔF6中的氨苄青霉素抗性基因被卡那霉素抗性基因取代以产生pAdΔF6(Kan)的线性表示。

[0040] 图11A – 11B.显示AAV8.TBG.hLDLR载体制备过程的流程图。

[0041] 5. 发明详述

[0042] 将复制缺陷型rAAV用于递送hLDLR基因至诊断有HoFH的患者(人受试者)的肝细胞中。rAAV.hLDLR载体应该具有肝脏的趋向性(例如,携带AAV8衣壳的rAAV),并且hLDLR转基因应该通过肝脏特异性表达控制元件来控制。

[0043] 这种rAAV.hLDLR载体可以在约20至约30分钟时期内通过静脉内(IV)输注施用,以达到肝脏中LDLR表达的治疗水平。在其他实施方案中,可以选择更短(例如,10至20分钟)或更长(例如,超过30分钟至60分钟的间隔时间,例如约45分钟或更长)。rAAV.hLDLR的治疗有效剂量范围为至少约2.5×10^{12}至7.5×10^{12}基因组拷贝(GC)/kg患者的体重。在一个优选的实施方案中,rAAV悬浮液具有这样的效力,使得施用于HoFH的双敲除LDLR-/-Apobec-/-小鼠模型(DKO小鼠)的5×10^{11} GC/kg的剂量将DKO小鼠中的基线胆固醇水平降低25%至75%。可以使用低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平作为转基因表达的替代物来评估治疗的功效。主要功效评估包括治疗后1至3个月(例如,第12周)的LDL-C水平,且随后作用持续有效至少约1年(约52周)。长期安全性和转基因表达的持续可以治疗后测量。

[0044] 作为治疗候选者的患者优选成人(年龄≥18岁的男性或女性),所述成人被诊断患有携带*LDLR*基因中的两个突变的HoFH;即,在与HoFH一致的临床表现的情况下,在两个等位基因上具有分子上确定的LDLR突变的患者,所述临床表现可包括未治疗的LDL-C水平,例如,LDL-C水平>300mg/dl,治疗的LDL-C水平,例如,LDL-C水平<300mg/dl和/或总血浆胆固醇水平大于500mg/dl和过早和侵袭性动脉粥样硬化。治疗候选者包括正在接受降脂药物例如抑制素类、依泽替米贝、胆汁酸螯合剂、PCSK9抑制剂以及LDL和/或血浆单采术治疗的HoFH患者。

[0045] 在治疗之前，应评估HoFH患者对用于递送hLDLR基因的AAV血清型的中和抗体(NAb)。此类NAb可干扰转导效率并降低治疗功效。具有基线血清NAb效价≤1:5的HoFH患者是用rAAV.hLDLR基因疗法方案治疗的良好候选者。具有血清NAb效价>1:5的HoFH患者的治疗可能需要联合疗法，例如在用rAAV.hLDLR治疗之前/期间与免疫抑制剂短暂共同治疗，另外或可选地，监测患者肝酶升高，其可以用瞬时免疫抑制剂疗法治疗(例如，如果观察到天冬氨酸转氨酶(AST)或丙氨酸转氨酶(ALT)的至少约2x基线水平)。

[0046] 5.1 基因疗法载体

[0047] rAAV.hLDLR载体应该具有肝脏的趋向性(例如，携带AAV8衣壳的rAAV)，并且hLDLR转基因应该通过肝脏特异性表达控制元件来控制。将载体配制在适合于在人受试者中输注的缓冲液/载体中。缓冲液/载体应包括防止rAAV粘住输注管但不会干扰rAAV体内结合活性的组分。

[0048] 5.1.1.rAAV.hLDLR载体

[0049] 具有肝向性的多种rAAV中的任一种均可使用。可选择作为rAAV的衣壳来源的AAV的实例包括例如rh10、AAVrh64R1、AAVrh64R2、rh8［参见例如，美国公开专利申请号2007-0036760-A1；美国公开专利申请号2009-0197338-A1；EP 1310571］。还参见WO 2003/042397 (AAV7和其他后AAV)、美国专利7790449和美国专利7282199 (AAV8)、WO 2005/033321和US 7,906,111 (AAV9)、WO 2006/110689和WO 2003/042397 (rh10)、AAV3B；US 2010/0047174 (AAV-DJ)。

[0050] hLDLR转基因可包括但不限于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:4提供的一种或多种序列，其在所附序列表中提供，其通过引入并入本文。参考SEQ ID NO:1，这些序列包括位于约碱基对188至约碱基对250的信号序列，且变体1的成熟蛋白跨过约基碱基对251至约碱基对2770。SEQ ID NO:1还鉴定外显子，其中至少一个外显子在hLDLR的已知可变剪接变体中不存在。另外或任选地，可以选择编码一种或多种其他hLDLR同种型的序列。参见例如同种型2、3、4、5和6，其序列例如可得自http://www.uniprot.org/uniprot/P01130。例如，普通变体缺少SEQ ID NO: 1的外显子4 (bp (255)..(377)或外显子12 (bp (1546)..(1773))。任选地，转移可以包括具有异源信号序列的成熟蛋白的编码序列。SEQ ID NO:2提供人LDLR的cDNA和翻译的蛋白(SEQID NO:3)。SEQ ID NO:4提供人LDLR的工程化的cDNA。可选地或另外，基于网络或可商购的计算机程序以及基于公司的服务可用于将氨基酸序列反向翻译为核酸编码序列，包括RNA和/或cDNA两者。参见例如EMBOSS的backtranseq, http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/ ; Gene Infinity (http://www.geneinfinity.org/sms-/sms_backtranslation.html);ExPasy (http://www.expasy.org/tools/)。

[0051] 在下文实施例中描述的具体实施方案中，基因疗法载体是在肝特异性启动子(甲状腺素结合球蛋白，TBG)控制下表达hLDLR转基因的AAV8载体，称为rAAV8.TBG.hLDLR(参见图6)。外部AAV载体组分是血清型8，$T = 1$二十面体衣壳，由3个AAV病毒蛋白VP1、VP2和VP3的60个拷贝组成，比例为1:1:18。衣壳含有单链DNA rAAV载体基因组。

[0052] rAAV8.TBG.hLDLR基因组含有侧接两个AAV反向末端重复序列(ITR)的hLDLR转基因。hLDLR转基因包括增强子、启动子、内含子、hLDLR编码序列和多腺苷酸化(polyA)信号。ITR是在载体生产过程中负责基因组复制和包装的遗传元件，并且是产生rAAV所需的唯一

病毒顺式元件。hLDLR编码序列的表达由肝细胞特异性TBG启动子驱动。两个拷贝的α1微球蛋白/尿抑胰酶素增强子元件在TBG启动子之前，以刺激启动子活性。存在嵌合内含子以进一步增强表达，并且包括兔β珠蛋白多腺苷酸化(polyA)信号以介导hLDLR mRNA转录物的终止。

[0053] 本文描述的示例性质粒和载体使用肝特异性启动子甲状腺素结合球蛋白(TBG)。可选地，可以使用其他肝特异性启动子[参见例如, The Liver Specific Gene Promoter Database, Cold Spring Harbor, http://rulai.schl.edu/LSPD, α1抗胰蛋白酶(A1AT); 人白蛋白Miyatake 等人, J. Virol., 71:5124 32 (1997), humAlb; 和乙型肝炎病毒核心启动子Sandig 等人, Gene Ther., 3:1002 9 (1996)]。TTR最小增强子/启动子、α抗胰蛋白酶启动子、LSP (845 nt)25(需要无内含子scAAV)。尽管不太理想，但可以使用其他启动子，例如病毒启动子、组成型启动子、可调节的启动子[参见例如WO 2011/126808和WO 2013/04943]或对生理信号有响应的启动子用于本文所述的载体中。

[0054] 除启动子外，表达盒和/或载体可以包含其他合适的转录起始、终止、增强子序列、有效的RNA处理信号诸如剪接和多腺苷酸 (polyA)信号；稳定胞质mRNA的序列；增强翻译效率的序列(例如Kozak共有序列)；增强蛋白稳定性的序列；和当需要时，增强编码产物分泌的序列。合适的polyA序列的实例包括例如SV40、牛生长激素(bGH)和TK polyA。合适的增强子的实例包括，例如，甲胎蛋白增强子、TTR最小启动子/增强子、LSP(TH-结合球蛋白启动子/α1-微球蛋白/尿抑胰酶素增强子)等。

[0055] 这些控制序列与hLDLR基因序列“可操作地连接”。可以将表达盒工程化到质粒上，该质粒用于产生病毒载体。将表达盒包装入AAV病毒颗粒所需的最小序列是AAV 5’和3’ITR，其可以与衣壳具有相同的AAV来源，或者其是不同AAV来源(产生AAV假型)。在一个实施方案中，来自AAV2的ITR序列或其缺失形式(ΔITR)用于方便和加速监管批准。但是，可以选择来自其他AAV源的ITR。当ITR的来源来自AAV2并且AAV衣壳来自另一个AAV来源时，所得到的载体可以称为假型。通常，AAV载体的表达盒包含AAV 5’ITR、hLDLR编码序列和任何调节序列以及AAV 3’ITR。然而，这些元件的其他配置可能是合适的。已经描述了缩短版本的5’ITR，称为ΔITR，其中缺失了D序列和末端解离位点(trs)。在其他实施方案中，使用全长AAV 5’和3’ITR。

[0056] 缩写“sc”指自身互补。“自身互补AAV”是指具有表达盒的质粒或载体，在所述表达盒中已经设计了由重组AAV核酸序列携带的编码区以形成分子内双链DNA模板。在感染时，scAAV的两个互补的一半部分将缔合而不是等待第二链的细胞介导的合成，以形成一个准备立即复制和转录的双链DNA(dsDNA)单元。参见，例如，D M McCarty 等人, “Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis”, Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16，第1248-1254页。自身互补的AAV描述于例如美国专利号6,596,535; 7,125,717和7,456,683，其各自通过引用整体并入本文。

[0057] 5.1.2. rAAV.hLDLR制剂

[0058] rAAV.hLDLR制剂是含有有效量的悬浮在水溶液中的rAAV.hLDLR载体的悬浮液，所述水溶液含有缓冲盐水、表面活性剂和调节至离子强度等同于约100 mM氯化钠(NaCl)至约250 mM氯化钠的生理学上相容的盐或盐的混合物、或调节至等同离子浓度的生理学上相容

的盐。在一个实施方案中，如通过优化的qPCR(oqPCR)或数字液滴PCR(ddPCR)测量的，制剂可含有例如约1.5 x 10^{11} GC/kg至约6 x 10^{13} GC/kg或约1 x 10^{12}至约1.25 x 10^{13} GC/kg，如描述于例如M. Lock 等人, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods.2014 Apr;25(2):115-25. doi:10.1089/hgtb.2013.131.Epub 2014年2月14日，其通过引用并入本文。例如，如本文提供的悬浮液可以含有NaCl和KCl。pH范围可以为6.5-8或7-7.5。合适的表面活性剂或表面活性剂的组合可选自泊洛沙姆，即由聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))的中心疏水链侧接两个聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))的亲水链组成的非离子三嵌段共聚物、SOLUTOL HS 15 (Macrogol-15 羟基硬脂酸 酯)、LABRASOL(聚氧基辛酸甘油酯)、聚氧基10油烯基醚、TWEEN(聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯)、乙醇和聚乙二醇。在一个实施方案中，制剂含有泊洛沙姆。这些共聚物通常用字母“P”(对于泊洛沙姆)后面跟三个数字命名:前两个数字×100给出聚氧丙烯芯的近似分子量，最后一个数字×10给出聚氧乙烯含量百分比。在一个实施方案中，选择泊洛沙姆188。表面活性剂可以以至高达悬浮液的约0.0005％至约0.001％的含量存在。在一个实施方案中，如通过oqPCR或数字液滴PCR (ddPCR)所测量，rAAV.hLDLR制剂是含有至少1x10^{13}个基因组拷贝(GC)/mL或更多的悬浮液，如描述于例如M. Lock 等人, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods.2014 Apr;25(2):115-25. doi:10.1089/hgtb.2013.131.Epub 2014年2月14日，其通过引用并入本文。在一个实施方案中，将载体悬浮在含有180mM氯化钠、10mM磷酸钠、0.001％泊洛沙姆188，pH7.3的水溶液中。该制剂适用于人受试者并且静脉内施用。在一个实施方案中，通过输注经20分钟(±5分钟)经由外周静脉递送制剂。但是，可以根据需要或期望调整该时间。

[0059] 为了确保从施用于患者的AAV. hLDLR剂量中除去空衣壳，将空衣壳在载体纯化过程中与载体颗粒分离，例如，使用氯化铯梯度超速离心，如本文8.3.2.5节中详细讨论的。在一个实施方案中，使用2016年4月13日提交的美国专利申请号62/322,093和2015年12月11日提交的美国专利申请号62/266,341且标题为“AAV8的可扩展纯化方法”(其通过引用结合到本文中)中描述的方法，从空衣壳中纯化含有包装的基因组的载体颗粒。简而言之，描述了两步纯化方案，其从rAAV生产细胞培养物的澄清的浓缩上清液中选择性地捕获并分离含有基因组的rAAV载体颗粒。该方法利用在高盐浓度下进行的亲和捕获方法，然后在高pH下进行阴离子交换树脂方法，以提供基本上不含rAAV中间体的rAAV载体颗粒。

[0060] 在某些实施方案中，该方法将含有包含药理学活性基因组序列的DNA的重组AAV8病毒颗粒与基因组缺陷型(空)AAV8衣壳中间体分离。该方法涉及:(a)形成装载悬浮液，其包含:重组AAV8病毒颗粒和空AAV8衣壳中间体，其已被纯化以从产生颗粒和中间体的AAV生产者细胞培养物中除去非AAV材料; 和包含20mM Bis-Tris丙烷(BTP)且pH为约10.2的缓冲液A; (b)将(a)的悬浮液加载到强阴离子交换树脂上，所述树脂在容器中，所述容器具有用于悬浮液和/或溶液流动的入口和允许洗脱液从容器中流出的出口; (c)用缓冲液1％B洗涤装载的阴离子交换树脂，该缓冲液含有10mM NaCl和20mM BTP，且pH为约10.2; (d)对经装载和洗涤的阴离子交换树脂施加渐增的盐浓度梯度，其中所述盐梯度范围为10mM至约190mM NaCl，包括端点或等同物; 和(e)从洗脱液中收集rAAV颗粒，所述rAAV颗粒从中间体中纯化出来。

[0061] 在一个实施方案中，使用的pH为10至10.4(约10.2)且rAAV颗粒为自AAV8中间体纯化的至少约50％至约90％，或者pH为10.2且rAAV颗粒为自AAV8中间体纯化的约90％至约

99％。在一个实施方案中，这由基因组拷贝确定。当储液中的rAAV8颗粒为储液中rAAV8的至少约75％至约100％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、或至少99％且“空衣壳”小于储液或制剂中rAAV8的约1％、小于约5％、小于约10％、小于约15％时，rAAV8颗粒(包装的基因组)的储液或制剂“基本上不含”AAV空衣壳(和其他中间体)。

[0062] 在一个实施方案中，制剂的特征在于rAAV储液的“空”与“满”的比率为1或更小，优选小于0.75，更优选为0.5，优选小于0.3。

[0063] 在进一步的实施方案中，rAAV颗粒的平均产率为至少约70％。这可以通过测定装载到柱上的混合物中的效价(基因组拷贝)和最终洗脱中存在的量来计算。此外，这些可以基于q-PCR分析和/或SDS-PAGE技术确定，例如本文所述的那些技术或本领域已经描述的技术。

[0064] 例如，为了计算空的和满的颗粒含量，将所选样品(例如，碘克沙醇梯度纯化的制剂，其中GC的# = 颗粒的#)的VP3带体积相对于装载的GC颗粒作图。得到的线性方程(y = mx + c)用于计算测试物峰的带体积中的颗粒数。然后将装载的每20μL的颗粒数(pt)乘以50，以得到颗粒(pt)/ mL。Pt/mL除以GC/mL得到颗粒与基因组拷贝的比率(pt/GC)。Pt/mL-GC/mL得到空的pt/mL。空的pt/mL除以pt/mL且x 100得到空颗粒的百分比。

[0065] 通常，用于测定空衣壳和具有包装的基因组的AAV载体颗粒的方法是本领域已知的。参见例如，Grimm 等人，*Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer 等人，*Molec.Ther*.(2003) 7:122-128。为了测试变性衣壳，该方法包括使经处理的AAV储液经受SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，其由能够分离三种衣壳蛋白的任何凝胶组成，例如，在缓冲液中含有3-8％Tris-乙酸盐的梯度凝胶，然后运行凝胶直至样品材料分离，并将凝胶印迹到尼龙或硝酸纤维素膜上，优选尼龙膜。然后将抗AAV衣壳抗体用作与变性衣壳蛋白结合的一级抗体，优选抗AAV衣壳单克隆抗体，最优选B1抗AAV-2单克隆抗体(Wobus 等人，J.*Virol*.(2000) 74:9281-9293)。然后使用二级抗体，所述二级抗体结合一级抗体并含有检测与一级抗体结合的手段，更优选包含与其共价结合的检测分子的抗IgG抗体，最优选与辣根过氧化物酶共价连接的绵羊抗小鼠IgG抗体。检测结合的方法用于半定量测定一级抗体和二级抗体之间的结合，优选能够检测放射性同位素发射、电磁辐射或比色变化的检测方法，最优选化学发光检测试剂盒。例如，对于SDS-PAGE，可以取出来自柱级分的样品并在含有还原剂(例如DTT)的SDS-PAGE上样缓冲液中加热，并且在预制的梯度聚丙烯酰胺凝胶(例如Novex)上分辨衣壳蛋白。可以使用SilverXpress(Invitrogen，CA)根据制造商的说明进行银染。在一个实施方案中，可以通过定量实时PCR(Q-PCR)测量柱级分中AAV载体基因组的浓度(vg)。将样品稀释并用DNase I(或另一种合适的核酸酶)消化以除去外源DNA。灭活核酸酶后，将样品进一步稀释并使用引物和对引物间的DNA序列特异性的TaqMan荧光探针扩增。在Applied Biosystems Prism 7700序列检测系统上测量每个样品达到定义的荧光水平所需的循环数(阈值循环，Ct)。含有与AAV载体中所含序列相同序列的质粒DNA用于在Q-PCR反应中产生标准曲线。通过将从样品获得的循环阈值(Ct)值对质粒标准曲线的Ct值归一化来将其用于测定载体基因组效价。也可以使用基于数字PCR的终点测定。

[0066] 在一个方面，本文提供了优化的q-PCR方法，其利用广谱丝氨酸蛋白酶，例如蛋白酶K(例如可从Qiagen商购获得)。更具体地，优化的qPCR基因组效价测定与标准测定相似，除了在DNA酶I消化后，用蛋白酶K缓冲液稀释样品并用蛋白酶K处理，然后加热灭活。适当

地，用等于样品大小的量的蛋白酶K缓冲液稀释样品。蛋白酶K缓冲液可以浓缩至2倍或更高。通常，蛋白酶K处理为约0.2mg/mL，但可以在0.1mg/mL至约1mg/mL之间变化。处理步骤通常在约55℃下进行约15分钟，但可以在较低温度(例如，约37℃至约50℃)下进行较长时间段(例如，约20分钟至约30分钟)，或在较高温度(例如，至高达约60℃)下进行较短的时间段(例如，约5至10分钟)。类似地，热灭活通常在约95℃下持续约15分钟，但温度可降低(例如，约70至约90℃)并延长时间(例如，约20分钟至约30分钟)。然后将样品稀释(例如，1000倍)并如标准测定中所述进行TaqMan分析。

[0067] 另外或可选地，可以使用液滴数字PCR(ddPCR)。例如，已描述通过ddPCR测定单链和自身互补AAV载体基因组效价的方法。参见例如，M. Lock 等人，Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods.2014 Apr;25(2):115-25. doi:10.1089/hgtb.2013.131.Epub 2014年2月14日。

[0068] 5.1.3 制造

[0069] rAAV.hLDLR载体可以如图11所示的流程图所示制造。简而言之，将细胞(例如HEK293细胞)在合适的细胞培养系统中繁殖并转染用于载体生成。然后可以收获、浓缩和纯化rAAV.hLDLR载体以制备大量载体(bulk vector)，然后将其填充并在下游过程中完成。

[0070] 制造本文所述基因疗法载体的方法包括本领域熟知的方法，例如生成用于产生基因疗法载体的质粒DNA、生成载体和纯化载体。在一些实施方案中，基因疗法载体是AAV载体，并且生成的质粒是编码AAV基因组和目的基因的AAV顺式质粒、含有AAV rep和cap基因的AAV反式质粒以及腺病毒辅助质粒。载体生成过程可包括方法步骤，例如细胞培养的开始，细胞的传代，细胞的接种，用质粒DNA转染细胞，转染后培养基更换为无血清培养基，以及收获含有载体的细胞和培养基。在本文中将所收获的含有载体的细胞和培养基称为粗细胞收获物。

[0071] 此后，粗细胞收获可以经受方法步骤，例如载体收获物的浓缩，载体收获物的渗滤，载体收获物的微流化，载体收获物的核酸酶消化，微流化中间体的过滤，色谱纯化，超速离心纯化，通过切向流过滤的缓冲液交换，以及配制和过滤以制备大量载体。

[0072] 在某些实施方案中，类似于图11的那些的方法可以与其他AAV生产细胞结合使用。本领域已知许多用于生产rAAV载体的方法，包括转染，稳定细胞系生产和感染性杂合病毒生产系统，其包括腺病毒-AAV杂合体、疱疹病毒-AAV杂合体和杆状病毒-AAV杂合体。参见例如，G Ye, 等人，Hu Gene Ther Clin Dev, 25:212-217 (Dec 2014); RM Kotin, Hu Mol Genet, 2011, Vol. 20, Rev Issue 1, R2-R6; M. Mietzsch, 等人，Hum Gene Therapy, 25:212-222 (Mar 2014); T Virag 等人，Hu Gene Therapy, 20:807-817 (August 2009); N. Clement 等人，Hum Gene Therapy, 20:796-806 (Aug 2009); DL Thomas 等人，Hum Gene Ther, 20:861-870 (Aug 2009)。用于生产rAAV病毒颗粒的rAAV生产培养物都需要：1)合适的宿主细胞，包括例如人来源细胞系如HeLa、A549或293细胞，或昆虫来源细胞系如SF-9(在杆状病毒生产系统的情况下)；2)合适的辅助病毒功能，由野生型或突变体腺病毒(如温度敏感性腺病毒)、疱疹病毒、杆状病毒或提供反式或顺式辅助功能的核酸构建体提供；3)功能性AAV rep基因、功能性cap基因和基因产物；4)侧接AAV ITR序列的转基因(例如治疗性转基因)；和5)支持rAAV生产的合适的培养基和培养基组分。

[0073] 已经描述了多种合适的细胞和细胞系用于生产AAV。细胞本身可选自任何生物有机体，包括原核(例如细菌)细胞和真核细胞(包括昆虫细胞、酵母细胞和哺乳动物细胞)。特别理想的宿主细胞选自任何哺乳动物物种，包括但不限于细胞诸如A549、WEHI、3T3,10T1/2、BHK、MDCK、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10、VERO、WI38、HeLa、HEK 293细胞(其表达功能性腺病毒E1)、Saos、C2C12、L细胞、HT1080、HepG2和来源自哺乳动物包括人、猴、小鼠、大鼠、兔和仓鼠的原代成纤维细胞、肝细胞和成肌细胞。在某些实施方案中，细胞是悬浮适应细胞。提供细胞的哺乳动物物种以及哺乳动物细胞的类型(即成纤维细胞、肝细胞、肿瘤细胞等)的选择均不是对本发明的限制。

[0074] 在一个具体实施方案中，用于制备基因疗法载体的方法描述于下文第8节的实施例3中。

[0075] 5.2 患者群体

[0076] 作为治疗候选者的患者优选成人(年龄≥18岁的男性或女性)，所述成人被诊断患有携带*LDLR*基因中的两个突变的HoFH;即，在与HoFH一致的临床表现的情况下，在两个等位基因上具有分子上确定的LDLR突变的患者，所述临床表现可包括未治疗的LDL-C水平，例如，LDL-C水平>300mg/dl，治疗的LDL-C水平，例如，LDL-C水平<300mg/dl和/或总血浆胆固醇水平大于500mg/dl和过早和侵袭性动脉粥样硬化。在一些实施方案中，可以治疗年龄<18岁的患者。在一些实施方案中，被治疗的患者为年龄≥18岁的男性。在一些实施方案中，被治疗的患者为年龄≥18岁的女性。治疗候选者包括正在接受降脂药物例如抑制素类、依泽替米贝、胆汁酸螯合剂、PCSK9抑制剂以及LDL和/或血浆单采术治疗的HoFH患者。

[0077] 在治疗之前，应评估HoFH患者对用于递送hLDLR基因的AAV血清型的NAb。此类NAb可干扰转导效率并降低治疗功效。具有基线血清NAb效价≤1:5的HoFH患者是用rAAV.hLDLR基因疗法方案治疗的良好候选者。治疗具有血清NAb效价>1:5的HoFH患者可能需要联合疗法，例如与免疫抑制剂的瞬时共同治疗。用于这种共同疗法的免疫抑制剂包括但不限于类固醇、抗代谢物、T细胞抑制剂和烷基化剂。例如，这种瞬时治疗可包括以递减剂量的每天一次给药的类固醇(例如强的松)持续7天，其量开始于约60mg，并且以10mg/天减少(第7天无剂量)。可以选择其他剂量和药物。

[0078] 可以允许受试者在其护理医师的判断下在基因疗法治疗之前和同时继续其标准护理治疗(例如，LDL单采术和/或血浆交换以及其他降脂治疗)。在替代方案中，医生可能更喜欢在施用基因疗法治疗之前停止标准护理疗法，并且任选地，在施用基因疗法后作为共同疗法恢复标准护理治疗。基因疗法方案的理想终点是低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)减少和LDL载脂蛋白B(apoB)距基线的分级分解率(FCR)直至施用基因疗法治疗后12周的变化。其他期望的终点包括，例如，降低以下一种或多种:总胆固醇(TC)、非高密度脂蛋白胆固醇(非HDL-C)、空腹甘油三酯(TG)的降低和HDL-C(例如，期望增加的水平)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)、脂蛋白(a) (Lp(a))、载脂蛋白B(apoB)和/或载脂蛋白AI(apoA-I)的变化。

[0079] 在一个实施方案中，患者在用AAV8.hLDLR单独和/或与使用辅助治疗组合治疗后随研究的持续时间实现期望的LDL-C阈值(例如，LDL-C <200、<130或<100, mg/dl)。

[0080] 尽管如此，具有以下一种或多种特征的患者可能会在其护理医师的判断下被排除在治疗之外：

[0081] · 心力衰竭，其由NYHA分类定义为功能III级(在基线访视的12周内有住院史)或

功能性IV级。

[0082] · 以下的基线访视的12周内的历史:心肌梗死(MI),导致住院治疗的不稳定型心绞痛,冠状动脉旁路移植手术(CABG),经皮冠状动脉介入治疗(PCI),不受控的心律失常,颈动脉手术或支架植入,中风,短暂性缺血发作,颈内血管重建术,血管内手术或外科手术。

[0083] · 不受控的高血压,其定义为:收缩压> 180 mmHg,舒张压> 95 mmHg。

[0084] · 基于记录的组织学评估或非侵入性成像或测试的肝硬化或慢性肝病的历史。

[0085] · 任何以下肝脏疾病的记录诊断:非酒精性脂肪性肝炎(活组织检查证实); 酒精性肝病; 自身免疫性肝炎; 肝癌; 原发性胆汁性肝硬化; 原发性硬化性胆管炎; 威尔逊病;血色素沉着症; α_1 抗胰蛋白酶缺乏症。

[0086] · 筛查时异常LFT(AST或ALT> 2x正常值上限(ULN)和/或＞1.5x ULN的总胆红素,除非患者因吉尔伯特综合征而患有非结合性高胆红素血症)。

[0087] · 乙型肝炎,如由HepB SAg或Hep B核心Ab和/或病毒DNA阳性所确定;或慢性活动性丙型肝炎,如由HCV Ab和病毒RNA阳性所确定。

[0088] · 52周内的酗酒史。

[0089] · 某些已知具有潜在肝毒性的禁用药物,特别是那些可引起微泡或大泡性脂肪变性的药物。这些包括但不限于:异维甲酸、胺碘酮、HAART药物、大量使用对乙酰氨基酚(2g/天> 3×q周)、异烟肼、甲氨蝶呤、四环素、他莫昔芬、丙戊酸盐。

[0090] · 目前使用全身性皮质类固醇,或活动性结核、全身性真菌病或其他慢性感染。

[0091] · 免疫缺陷病史,包括HIV阳性检测结果。

[0092] · 慢性肾功能不全,其被定义为估计的GRF <30 mL/min。

[0093] · 过去5年内的癌症史,除了充分治疗的基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌或原位宫颈癌以外。

[0094] · 以前的器官移植。

[0095] · 在确定基线和/或治疗之前不到3个月发生的任何主要外科手术。

[0096] 基线血清AAV8 NAb效价>1:5。在其他实施方案中,护理医师可确定这些身体特征(病史)中的一种或多种的存在不应排除本文提供的治疗。

[0097] 5.3. 给药和施用途径

[0098] 患者接受通过输注经外周静脉施用的单一剂量的rAAV.hLDLR;例如,经约20至约30分钟。施用于患者的rAAV.hLDLR的剂量为至少2.5 x 10^{12} GC/kg或7.5 x 10^{12} GC/kg、或至少5 x 10^{11} GC/kg至至少7.5 x 10^{12} GC/kg (如通过oqPCR或ddPCR测量的)。然而,可以选择其他剂量。在一个优选的实施方案中,rAAV悬浮液具有这样的效力,使得施用于HoFH的双敲除LDLR-/-Apobec-/-小鼠模型(DKO小鼠)的5×10^{11} GC/kg的剂量将DKO小鼠中的基线胆固醇水平降低25%至75%。

[0099] 在一些实施方案中,施用于患者的rAAV.hLDLR的剂量范围为2.5 x 10^{12} GC/kg至7.5 x 10^{12} GC/kg。优选地,rAAV悬浮液具有这样的效力,使得施用于HoFH的双敲除LDLR-/-Apobec-/-小鼠模型(DKO小鼠)的5×10^{11} GC/kg的剂量将DKO小鼠中的基线胆固醇降低水平25%至75%。在一个具体的实施方案中,施用于患者的rAAV.hLDLR的剂量为至少5 x 10^{11} GC/kg、2.5 x 10^{12} GC/kg、3.0 x 10^{12} GC/kg、3.5 x 10^{12} GC/kg、4.0 x 10^{12} GC/kg、4.5 x 10^{12} GC/kg、5.0 x 10^{12} GC/kg、5.5 x 10^{12} GC/kg、6.0 x 10^{12} GC/kg、6.5 x 10^{12} GC/kg、

7.0 x 10^{12} GC/kg或7.5 x 10^{12} GC/kg。

[0100] 在一些实施方案中，rAAV.hLDLR与一种或多种治疗HoFH的疗法组合施用。在一些实施方案中，rAAV.hLDLR与用于治疗HoFH的标准降脂疗法组合施用，所述标准降脂疗法包括但不限于抑制素、依泽替米贝、ezedia、胆汁酸螯合剂、LDL单采术、血浆单采术、血浆置换、洛美他派、米泊美生和/或PCSK9抑制剂。在一些实施方案中，rAAV.hLDLR与烟酸组合施用。在一些实施方案中，rAAV.hLDLR与贝特类组合施用。

[0101] 5.4.测量临床目标

[0102] 施用后基因疗法载体的安全性可以通过在载体施用后直至约52周的多个时间点评估的不良事件的数量、身体检查中记录的变化和/或临床实验室参数来评估。尽管可以更早地观察到生理效应，例如，在约1天至一周内，但在一个实施方案中，稳态水平表达水平在约12周达到。

[0103] 与基线相比，用rAAV.hLDLR施用实现的LDL-C降低可以评估为在约12周或在其他所需时间点LDL-C的确定的百分比变化。

[0104] 与基线值相比，其他脂质参数特别是总胆固醇(TC)、非高密度脂蛋白胆固醇(非HDL-C)、HDL-C、空腹甘油三酯(TG)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)、脂蛋白(a) (Lp(a))、载脂蛋白B(apoB)和载脂蛋白A-I(apoA-I)中的百分比变化，也可在约12周或在其他所需时间点进行评估。LDL-C降低的代谢机制可以通过在rAAV.hLDLR施用之前以及在施用后12周再次进行LDL动力学研究进行评估。要评估的主要参数是LDL apoB的分级分解率(FCR)。

[0105] 如本文所用，当患者表达足够水平的LDLR以实现这些临床终点中的至少一种时，本文的rAAV.hLDLR载体“功能性替代”或“功能性补充”具有活性LDLR的患者缺陷型LDLR。在非FH患者中实现低至正常野生型临床终点水平的约10％至低于100％的hLDLR的表达水平可提供功能性替代。

[0106] 在一个实施方案中，可以在早至给药后约8小时至约24小时观察到表达。可以在给药后数天至数周内观察到上述一种或多种期望的临床效果。

[0107] 在rAAV.hLDLR施用后，可以评估长期(长达260周)的安全性和功效。

[0108] 下文第6.4.1至6.7节中描述的标准临床实验室评估和其他临床测定可用于监测不良事件，评估脂质参数变化百分比的功效终点，药效动力学评估，脂蛋白动力学，ApoB-100浓度，以及对rAAV.hLDLR载体的免疫应答。

[0109] 以下实施例仅是说明性的，并不意图限制本发明。

实施例

[0110] 6. 实施例1:治疗人受试者的方案

[0111] 该实施例涉及由于低密度脂蛋白受体(LDLR)基因中的突变而患有遗传上确认的纯合家族性高胆固醇血症(HoFH)患者的基因疗法治疗。在该实施例中，将基因疗法载体AAV8.TBG.hLDLR(表达hLDLR的复制缺陷型腺相关病毒载体8(AAV8))施用给患有HoFH的患者。可以使用低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平作为转基因表达的替代物来评估治疗的功效。主要功效评估包括治疗后约12周的LDL-C水平，且随后作用持续有效至少52周。长期安全性和转基因表达的持续可以在肝活检样品中治疗后测量。

[0112] 6.1. 基因疗法载体

[0113] 基因疗法载体是在肝特异性启动子(甲状腺素结合球蛋白,TBG)的控制下表达转基因人低密度脂蛋白受体(hLDLR)的AAV8载体且在本实施例中称为AAV8.TBG.hLDLR(参见图7)。AAV8.TBG.hLDLR载体由AAV载体活性组分和配制缓冲液组成。外部AAV载体组分是血清型8,*T* = 1二十面体衣壳,由3个AAV病毒蛋白VP1、VP2和VP3的60个拷贝组成,比例为1:1:18。衣壳含有单链DNA重组AAV(rAAV)载体基因组。基因组含有侧接两个AAV反向末端重复序列(ITR)的hLDLR转基因。增强子、启动子、hLDLR编码序列和多腺苷酸化(polyA)信号包含在hLDLR转基因中。ITR是在载体生产过程中负责基因组复制和包装的遗传元件,并且是产生rAAV所需的唯一病毒顺式元件。hLDLR编码序列的表达由肝细胞特异性TBG启动子驱动。两个拷贝的α1微球蛋白/尿抑胰酶素增强子元件在TBG启动子之前,以刺激启动子活性。存在嵌合内含子以进一步增强表达,并且包括兔β珠蛋白多腺苷酸化(polyA)信号以介导hLDLR mRNA转录物的终止。用于产生该载体的pAAV.TBG.PI.hLDLRco.RGB的序列提供于SEQ ID NO:6中。

[0114] 研究剂的制剂为在含有180 mM氯化钠、10 mM磷酸钠、0.001% 泊洛沙姆188, pH 7.31的水溶液中的至少$1x10^{13}$个基因组拷贝 (GC)/mL,并且通过输注经外周静脉在20分钟(±5分钟)内施用。

[0115] 6.2. 患者群体

[0116] 接受治疗的患者是患有在LDLR基因中携带两个突变的纯合家族性高胆固醇血症(HoFH)的成人。患者可以是18岁或18岁以上的男性或女性。在与HoFH一致的临床表现的环境中,患者在两个等位基因上具有分子定义的LDLR突变,其可包括未处理的LDL-C水平,例如,LDL-C水平>300 mg/dl,经治疗的LDL-C水平,例如, LDL-C水平<300 mg/dl和/或总血浆胆固醇水平大于500 mg/dl和过早和侵袭性动脉粥样硬化。接受治疗的患者可以同时接受降脂药物例如抑制素类、依泽替米贝、胆汁酸螯合剂、PCSK9抑制剂以及LDL和/或血浆单采术的治疗。

[0117] 接受治疗的患者可以具有基线血清AAV8中和抗体(NAb)效价≤1:5。如果患者不具有基线血清AAV8中和抗体(NAb)效价≤1:5,则可以在转导期间用免疫抑制剂瞬时共治疗患者。用于共疗法的免疫抑制剂包括但不限于类固醇、抗代谢物、T细胞抑制剂和烷化剂。

[0118] 可以允许受试者在其护理医师的判断下在基因疗法治疗之前和同时继续其标准护理治疗(例如,LDL单采术和/或血浆交换以及其他降脂治疗)。在替代方案中,医生可能更喜欢在施用基因疗法治疗之前停止标准护理疗法,并且任选地,在施用基因疗法后作为共同疗法恢复标准护理治疗。基因疗法方案的理想终点是低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)减少和LDL载脂蛋白B(apoB)距基线的分级分解率(FCR)直至施用基因疗法治疗后约12周的变化。

[0119] 6.3. 给药和施用途径

[0120] 患者接受通过输注经外周静脉施用的单一剂量的AAV8.TBG.hLDLR。施用于患者的AAV8.TBG.hLDLR的剂量为约$2.5x10^{12}$ GC/kg或$7.5x10^{12}$ GC/kg。为了确保从施用于患者的AAV8.TBG.hLDLR剂量中去除空衣壳,在载体纯化过程中通过氯化铯梯度超速离心或通过离子交换色谱法将空衣壳与载体颗粒分离,如第8.3.2.5节中所讨论。

[0121] 6.4. 测量临床目标

[0122] · 用AAV8.TBG.hLDLR施用实现的LDL-C降低可以评估为在约12周与基线相比LDL-

C的确定的百分比变化。

[0123] · 其他脂质参数特别是总胆固醇(TC)、非高密度脂蛋白胆固醇(非HDL-C)、HDL-C、空腹甘油三酯(TG)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)、脂蛋白(a) (Lp(a))、载脂蛋白B(apoB)和载脂蛋白A-I(apoA-I)中的百分比变化,可在约12周与基线值相比进行评估。

[0124] · LDL-C降低的代谢机制可以通过在载体施用之前以及在施用后约12周再次进行LDL动力学研究进行评估。要评估的主要参数是LDL apoB的分级分解率(FCR)。

[0125] · 在AAV8.TBG.hLDLR施用后,可以评估长期(长达52周或长达260周)的安全性和功效。

[0126] 6.4.1. 可以进行的标准临床实验室评估:

[0127] 可以在治疗前和治疗后测试以下临床概况:

[0128] · 生化概况:钠、钾、氯、二氧化碳、葡萄糖、血尿素氮、乳酸脱氢酶(LDH)肌酸酐、肌酸酐磷酸激酶、钙、总蛋白、白蛋白、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶 、总胆红素、GGT。

[0129] · CBC:白细胞(WBC)计数、血红蛋白、血细胞比容、血小板计数、红细胞分布宽度、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白和平均红细胞血红蛋白浓度。

[0130] · 凝结:PT、INR、PTT (在筛选和基线,根据需要。

[0131] ·尿液分析:尿液颜色、浊度、pH、葡萄糖、胆红素、酮、血液、蛋白质、WBC。

[0132] 6.4.2. 目标不良事件

[0133] 以下临床测定可用于监测毒性:

[0134] ·肝损伤

[0135] o 胆红素或肝酶(AST、ALT、AlkPhos)的CTCAE v4.0 3级或更高级别的实验室结果。

[0136] o 胆红素和AlkPhos CTCAE v4.0 2级(胆红素>1.5xULN; AlkPhos> 2.5xULN)。

[0137] ·肝毒性(即符合"Hy法"的标准)

[0138] o AST或ALT≥3×ULN(正常上限),和

[0139] o >2×ULN血清总胆红素且无升高的碱性磷酸酶,和

[0140] o 没有发现其他原因可以解释转氨酶水平升高以及总胆红素升高。

[0141] 6.5. 功效终点

[0142] 评估AAV8.TBG.hLDLR施用后约12周时脂质参数的百分比变化可以进行评估并与基线进行比较。这包括:

[0143] · 直接测量LDL-C的百分比变化(主要功效终点)。

[0144] · 总胆固醇、VLDL-C、HDL-C、计算的非HDL-胆固醇中的百分比变化,甘油三酯、apoA-I、apoB和Lp(a)中的变化。

[0145] 基线LDL-C值可以计算为在施用AAV8.TBG.hLDLR之前在禁食条件下在2个单独场合中获得的LDL-C水平的平均值,以控制实验室和生物学变异性并确保可靠的功效评估。

[0146] 6.5.1. 药效动力学/功效评估

[0147] 可以在禁食条件下评估以下功效实验室测试:

[0148] ·直接测量的LDL-C

[0149] ·脂质组:总胆固醇、LDL-C、非HDL-C、HDL-C、TG、Lp(a)

[0150] ·载脂蛋白:apoB和apoA-I。

[0151] 另外,可在治疗前和治疗后12周测定任选的LDL apoB动力学。降脂功效可以评估为在载体施用后约12、24和52周时相对于基线的百分比变化。基线LDL-C值通过平均在施用前在禁食条件下在2个不同场合中获得的LDL-C水平来计算。载体施用后12周LDL-C从基线的百分比变化是基因转移功效的主要量度。

[0152] 6.6. 脂蛋白动力学

[0153] 脂蛋白动力学研究可以在载体施用之前进行,并且再次在之后12周进行,以评估LDL-C降低的代谢机制。要评估的主要参数是LDL-apoB的分级分解率(FCR)。通过静脉内输注氘化亮氨酸来实现apoB的内源标记,然后在48小时内进行血液取样。

[0154] 6.6.1. ApoB-100分离

[0155] 通过顺序超速离心D3-亮氨酸输注后抽取的定时样品分离VLDL、IDL和LDL。使用Tris-甘氨酸缓冲系统,通过制备性十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS PAGE)从这些脂蛋白中分离Apo B-100。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测定各个apoB种类内的ApoB浓度。使用自动免疫比浊测定法测定总apoB浓度。

[0156] 6.6.2. 同位素富集测定

[0157] 从聚丙烯酰胺凝胶中切下ApoB-100条带。将切下的条带在12N HCl中在100℃下水解24小时。在使用气相色谱仪/质谱仪分析之前,将氨基酸转化为N-异丁基酯和N-七氟丁酰胺衍生物。从观察到的离子电流比计算同位素富集(百分比)。这种格式的数据类似于放射性示踪剂实验中的比放射性。假设在该程序期间每个受试者在apoB-100代谢方面保持稳定状态。

[0158] 6.7. 对AAV8评估的药代动力学和免疫反应

[0159] 以下测试可用于评估对AAV载体免疫前的药代动力学和对AAV载体的免疫反应:

[0160] ·免疫反应监测:AAV8 NAb效价;对AAV8载体的T细胞反应; 对hLDLR的T细胞反应。

[0161] ·载体浓度:血浆中的AAV8浓度,通过PCR测量为载体基因组。

[0162] ·人白细胞抗原分型(HLA型):通过高分辨率评估HLA-A、HLA-B、HLA-C(对于I类)和HLA DRB1/DRB345、DQB1和DPB1(对于II类),评估来自外周血单核细胞(PBMC)的脱氧核糖核酸(DNA)中的HLA类型。该信息允许将针对AAV8衣壳或LDLR转基因的可能的T细胞免疫反应与特定HLA等位基因关联,有助于解释T细胞反应的强度和时机中的个体差异。

[0163] 6.8 黄色瘤评估

[0164] 体检包括任何黄瘤的鉴定、检查和描述。确定黄色瘤位置和类型的记录,即皮肤、眼睑(眼睛)、结节和/或腱的。可能时,将公制尺或卡尺用于记录体检期间黄色瘤的大小(最大和最小程度)。如果可能的话,最广泛且易于识别的黄色瘤的数字照片是在病变旁边放置卷尺(公制,毫米)来拍摄。

[0165] 7. 实施例2:临床前数据

[0166] 进行非临床研究以研究AAV8.TBG.hLDLR对HoHF动物模型和预先存在的体液免疫的影响。在测量胆固醇降低的小型和大型动物模型中进行多个单剂量药理学研究。此外,在双敲除LDLR-/- Apobec1-/-小鼠模型(DKO)中测量动脉粥样硬化的消退,所述小鼠模型缺乏LDLR和Apobec1,由于含有apoB-100的LDL升高而发生严重的高胆固醇血症(即使是普通饮食),并发生广泛的动脉粥样硬化。这些数据用于确定最低有效剂量并充分证明人体研究

的剂量选择。为了进一步表征人类研究的适当剂量并鉴定潜在的安全性信号，在非人灵长类动物(NHP)和HoFH的小鼠模型中进行毒理学研究。

[0167] 7.1 预先存在的体液免疫:AAV介导的基因转移对肝脏的影响

[0168] 本研究的目的是在恒河猴和食蟹猴中使用AAV8衣壳化载体评估先前存在的针对AAV的体液免疫对肝脏定向基因转移的影响。从较大的动物群体中选择21只恒河猴和食蟹猴，所述动物预先筛选针对AAV8的预先存在的免疫水平。动物代表了广泛的年龄分布且都是雄性。这些研究集中在具有低至不可检测水平的中和抗体(NAbs)的动物，同时包括更有限的数量，且AAV8 NAb效价至高达1:160。通过外周静脉输注向动物输注表达来自肝特异性酪胺酸结合球蛋白(TBG)启动子的增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的3×10^{12} GC/kg AAV8载体。7天后对动物进行尸检，并评估组织的EGFP表达和AAV8载体基因组的肝靶向(图1)。使用体外转导抑制测定法以及在被动转移实验的背景下评估NHP血清中针对AAV8的预先存在的NAb，其中来自NHP的血清在载体施用之前和施用时被注入小鼠中以评估预先存在的AAV8 NAbs对体内肝脏定向基因转移的影响 (Wang 等人, 2010 Molecular Therapy 18(1): 126-134)。

[0169] 如通过荧光显微镜(图1)和ELISA的EGFP检测以及肝脏中的载体DNA定量证明，具有检测不到的至低水平的针对AAV8的预先存在的NAbs的动物显示出肝脏中的高水平转导。就HoFH中的功效而言，转导最有用的量度是转导的肝细胞的百分比，其在不存在预先存在的NAb的情况下为17％(范围为4.4％至40％)。这与在相同剂量的载体下在小鼠中观察到的功效非常接近。显着影响肝细胞转导的预先存在的NAb的T阈值效价≤1:5(即1:10或更高的效价显着降低转导)。抗体介导的肝转导抑制直接与肝脏中减少的AAV基因组相关。筛选人血清中预先存在的针对AAV8的NAb的证据，结果表明约15％的成年人具有超过≤1:5的针对AAV8的NAb。此外，显示较高水平的NAb与载体的生物分布的变化相关，使得NAb减少肝脏基因转移，同时增加载体基因组沉积到脾脏中，而不增加脾脏转导。

[0170] 7.2 AAV8.TBG.mLDLR对HoFH小鼠模型中血清胆固醇的影响

[0171] 将DKO小鼠(6至12周龄雄性)IV注射AAV8.TBG.mLDLR，然后进行代谢校正和逆转预先存在的动脉粥样硬化病变。还评估动物的总体临床毒性和血清转氨酶的异常。使用小鼠形式的LDLR用于向DKO小鼠中施用。

[0172] 接受10^{11} GC/小鼠(5×10^{12} GC/kg)的小鼠显示高胆固醇血症几乎完全正常化，其稳定180天(图2)。在啮齿动物的最高剂量下，在载体注射后长达6个月未观察到ALT水平升高或肝脏生化异常(Kassim等人，2010, PLoS One 5(10): e13424)。

[0173] 7.3 AAV8.TBG.mLDLR对高脂饮食的HoFH小鼠模型中动脉粥样硬化病变的影响

[0174] 鉴于AAV8介导的LDLR递送诱导总胆固醇显著降低，在概念验证研究中检查了AAV8介导的mLDLR表达，以确定其是否对动脉粥样硬化病变有影响(Kassim等人, 2010, PLoS One 5(10): e13424)。三组雄性DKO小鼠喂食高脂饮食以加速动脉粥样硬化的进展。两个月后，一组小鼠接受单次IV注射$5x10^{12}$ GC/kg对照AAV8.TBG.nLacZ载体，一组接受单次IV注射$5x10^{12}$ GC/kg AAV8.TBG.mLDLR载体，而第三非干预组进行尸检，用于动脉粥样硬化病变的定量。将接受载体的小鼠在高脂饮食中维持另外60天，此时对它们进行尸检。

[0175] 接受AAV8.TBG.mLDLR载体的动物实现总胆固醇从基线处1555 ± 343 mg/dl快速下降至第7天时的266 ± 78 mg/dl，并且在处理后第60天达到67 ± 13 mg/dl。相比之下，

AAV8.TBG.nLacZ处理的小鼠的血浆胆固醇水平实际上保持不变，从基线处1566 ± 276 mg/dl到载体后60天测量的1527 ± 67 mg/dl。在高脂饮食两个月后，所有动物发展出血清转氨酶的轻微增加，在用AAV8.TBG.nLacZ载体处理后仍然升高，但在用AAV8.TBG.mLDLR载体处理后减少三倍至正常水平。

[0176] 通过两种独立的方法评估先前存在的动脉粥样硬化病变的演变。在第一种方法中，主动脉从弓形开口到髂骨分叉处并用油红O染色(图3A)；形态测定分析量化了沿着主动脉的整个长度用油红O染色的主动脉的百分比(图3B)。油红O是溶解色素(脂溶性染料)重氮染料，用于在冷冻切片上染色中性甘油三酯和脂质。用这种染料染色主动脉允许显色载有脂质的斑块。如图3所示，两个月的高脂饮食导致广泛的动脉粥样硬化，覆盖20％的主动脉，反映了载体时的基线疾病；在用AAV8.TBG.nLacZ载体处理后，在另外两个月的时间内，这增加至33％，代表动脉粥样硬化进一步进展65％。相比之下，用AAV8.TBG.mLDLR载体处理导致动脉粥样硬化在两个月内消退87％，从基线时动脉粥样硬化覆盖20％的主动脉到载体施用后60天动脉粥样硬化覆盖仅2.6％的主动脉。

[0177] 在第二种方法中，在主动脉根中量化总病变面积(图3C-F)。该分析揭示了相同的总体趋势，AAV8.TBG.nLacZ注射的小鼠与基线小鼠相比在2个月内显示出44％的进展，而AAV8.TBG.mLDLR注射的小鼠显示与基线小鼠相比病变消退64％。总之，通过注射AAV8.TBG.mLDLR表达LDLR诱导胆固醇的显着降低和两个月内动脉粥样硬化的显著消退，如通过主动脉内两个不同部位的两种独立定量方法所评估的。

[0178] 7.4 HoFH小鼠模型中最小有效剂量的评估

[0179] 对HoFH群体中表型和基因型之间相关性的广泛研究已表明，LDL和总胆固醇中的差异仅25-30％转化为临床结果的显著差异(Bertolini 等人2013, Atherosclerosis 227(2):342-348; Kolansky 等人2008, Am J Cardiol 102(11):1438-1443; Moorjani 等人1993, The Lancet 341(8856):1303-1306)。此外，与LDL-C降低相关的降脂治疗低于30％转化为延迟心血管事件和HoFH患者的延长生存期 (Raal 等人2011, Circulation 124(20):2202-2207)。最近，FDA批准了用于治疗HoFH的药物米泊美生，其中主要终点是LDL-C从基线降低20％至25％(Raal 等人2010, Lancet 375(9719):998-1006)。

[0180] 针对此背景，下文讨论的基因疗法小鼠研究中的最小有效剂量(MED)被定义为导致血清中总胆固醇的统计学显著且稳定降低(其比基线低至少30％)的载体的最低剂量。已经在许多不同的研究中评估了MED，并且下面提供了每个实验的简要描述。

[0181] 7.4.1. AAV8.TBG.mLDLR在DKO小鼠中的POC剂量范围研究

[0182] 在DKO小鼠中进行AAV8.TBG.mLDLR和AAV8.TBG.hLDLR的概念验证剂量范围研究以鉴定用于进一步研究的合适剂量。在这些研究中，DKO雄性小鼠静脉注射不同剂量的AAV8.TBG.mLDLR，范围为$1.5\text{-}500\times10^{11}$ GC/kg，随后血浆胆固醇降低(Kassim等，2010，PLoS One 5(10):e13424)。在这些研究实验中使用的GC剂量($1.5\text{-}500\times10^{11}$)基于定量PCR(qPCR)效价。在第21天，在剂量为1.5×10^{11} GC/kg的AAV8.TBG.mLDLR下观察到血浆胆固醇的统计学显著降低至高达30％，与较大剂量的载体成比例地实现了更大的降低(Kassim等人, 2010, PLoS One 5(10): e13424)。对代谢校正后收获的肝组织的分析显示小鼠LDLR转基因和蛋白质的水平与载体剂量成比例。因此，观察到剂量-反应相关性。

[0183] 7.4.2. DKO和LAHB小鼠中AAV8.TBG.hLDLR的剂量范围研究

[0184] 用含有人LDL受体(hLDLR)基因而不是小鼠LDLR基因的载体进行DKO小鼠中类似的概念验证研究。用hLDLR载体的结果与用mLDLR观察到的结果非常相似,因为载体的剂量与转基因的表达和载体基因组在肝脏中的沉积成比例(Kassim等人2013, Hum Gene Ther 24(1):19-26)。主要区别在于其功效 - 人LDLR载体在该模型中的效力较低。在$5x10^{12}$ GC/kg和$5x10^{11}$ GC/kg(基于qPCR效价的剂量)下实现了接近至少30%的胆固醇降低,尽管仅在较高剂量下才获得统计学显著性。

[0185] 观察到的降低的功效归因于人LDLR对小鼠ApoB的亲和力降低。为了绕过这个问题,使用表达人ApoB100且因此更真实地对与人类研究相关的人apoB100与人LDLR的相互作用建模的LAHB小鼠模型重复研究。两种品系(DKO vs. LAHB)的雄性小鼠接受尾静脉注射AAV8.TBG.hLDLR的三种载体剂量之一(基于qPCR的效价,$0.5x10^{11}$ GC/kg、$1.5x10^{11}$ GC/kg和$5.0x10^{11}$ GC/kg)。在第0天(载体施用前)、第7天和第21天对来自每个群组的动物放血,并进行血清胆固醇水平的评估。与DKO小鼠中的mLDLR相比,人LDLR在LAHB小鼠中有效的多:在$1.5x10^{11}$ GC/kg的剂量下实现血清胆固醇降低30%,这与小鼠LDLR构建体在DKO动物中的之前研究获得的功效相同(Kassim等人2013, Hum Gene Ther 24(1):19-26)。

[0186] 7.4.3. HoFH小鼠模型中AAV8.TBG.mLDLR和AAV8.TBG.hLDLR的非临床药理学/毒理学研究

[0187] 6-22周龄的雄性和雌性DKO小鼠(n = 280,140只雄性和140只雌性)接受尾静脉注射AAV8.TBG.mLDLR的三种载体剂量之一($7.5x10^{11}$ GC/kg、$7.5x10^{12}$ GC/kg、$6.0x10^{13}$ GC/kg)或一剂量的预期的基因疗法载体AAV8.TBG.hLDLR($6.0x10^{13}$ GC/kg)。使用oqPCR滴定法,基于每千克体重的基因组拷贝(GC)给动物给药,所述滴定法在本文的8.4.1节中描述。另外一组动物接受PBS作为媒介物对照。在第3天、第14天、第90天和第180天处死来自每个群组的动物并收集血液用于评估血清胆固醇水平(图4)。

[0188] 观察到所有治疗小鼠组在所有尸检时间点胆固醇的快速和显著降低。在早期时间点在低剂量载体时雌性中似乎比雄性中这种降低低更少,但这种差异随着时间而降低,且最终不同性别之间没有可检测到的差异。每组显示在相同的尸检时间点的血清胆固醇相对于PBS对照至少30%的统计学显著降低。因此,基于该研究的MED的测定≤7.5×10^{11} GC/kg。

[0189] 7.4.4. AAV8.TBG.hLDLR在纯合家族性高胆固醇血症小鼠模型中的功效研究

[0190] 12-16周龄的雄性DKO小鼠(n = 40)IV施用AAV8.TBG.hLDLR的四种剂量之一($1.5x10^{11}$ GC/kg、$5.0x10^{11}$ GC/kg、$1.5x10^{12}$ GC/kg、$5.0x10^{12}$ GC/kg)(基于oqPCR滴定法的剂量)。在第0天(载体施用前)、第7天和第30天对动物采血并评估血清胆固醇(图5)。在用≥5.0×10^{11} GC/kg治疗的小鼠组中,在第7天和第30天观察到胆固醇的快速且显著降低。基于该研究的MED的测定为$1.5x10^{11}$ GC/kg和$5.0x10^{11}$ GC/kg。

[0191] 7.5.AAV8.TBG.rhLDLR在高脂饮食的LDLR +/-恒河猴中的影响

[0192] 进行设计用于评估FH恒河猴中AAV8-LDLR基因转移的研究。将10^{13} GC/kg AAV8.TBG.rhAFP(对照载体;基于qPCR滴定法的剂量)施用到脂肪饲喂或普通饮食饲喂的野生型恒河猴后,没有观察到天冬氨酸氨基转移酶(AST)或丙氨酸氨基转移酶(ALT)值的升高。这表明AAV8衣壳本身不会引发炎症或有害肝脏过程。

[0193] 7.6. AAV8.TBG.hLDLR在HoFH小鼠模型中的试验性生物分布研究

[0194] 为了评估HoFH基因疗法的安全性和药效动力学特性,在DKO小鼠中进行了试验性

生物分布(BD)研究。这些研究检测了通过以下两种途径之一全身施用5×10^{12} GC/kg(基于qPCR滴定法的剂量)AAV8.TBG.hLDLR载体的5只雌性DKO小鼠中的载体分布和持久性:1)IV注射入尾静脉或2)门静脉内注射。在两个不同的时间点(第3天和第28天),收获一组组织并从收获的组织中提取总细胞DNA。在这些试验性研究中,IV和门静脉内途径都产生了可比较的BD概况,支持通过外周静脉向患者和动物输注基因疗法载体的基本原理。

[0195] 7.7.毒理学

[0196] 为了评估HoFH基因疗法的潜在毒性,在DKO小鼠(HoFH的小鼠模型)和野生型和LDLR +/-恒河猴中进行药理学/毒理学研究。这些研究包括检测在普通饮食饲喂的野生型和LDLR +/-恒河猴中与毒性相关的载体中LDLR转基因表达的作用,AAV8.TBG.mLDLR和AAV8.TBG.hLDLR在HoFH小鼠模型中的药理学/毒理学研究和检测AAV8.TGB.hLDLR在HoFH小鼠模型中的非临床生物分布。这些研究在下面详细描述。

[0197] 7.8. 检测在普通饮食饲喂的野生型和LDLR +/-恒河猴中与毒性相关的载体中LDLR转基因表达的作用的非临床研究

[0198] 用1.25×10^{13} GC/kg AAV8.TBG.hLDLR(基于oqPCR滴定法的剂量)IV施用4只野生型和4只LDLR +/-恒河猴,在载体施用后监测非人灵长类动物(NHP)长达一年。在载体施用后第28天对四只动物(两只野生型和两只LDLR +/-)进行尸检以评估急性载体相关毒性和载体分布,并且在载体施用后第364/365天对四只动物(两只野生型和两只LDLR +/-)进行尸检以评估长期载体相关病理学和载体分布。每个野生型和LDLR +/-恒河猴群组都有两只雄性和两只雌性。

[0199] 动物很好地耐受载体的输注而没有长期或短期的临床后遗症。生物分布研究表明肝脏的高水平和稳定靶向及低得多(但仍可检测到)的肝外分布,其随时间而下降。这些数据表明,功效的靶器官肝脏也是潜在毒性的最可能来源。在载体施用后28和364/365天进行的尸检时收集的组织的详细综述显示肝脏中有一些极小至轻微的发现,并且LDLR +/-恒河猴中有一些动脉粥样硬化的证据。肝脏病理学的性质和在两只未治疗的野生型动物之一中观察到类似病理学的事实向病理学家表明它们与测试物无关。

[0200] 在载体施用之前,一只动物的丙氨酸转氨酶(ALT)持续升高,其在载体施用后持续升高,且水平的范围为58-169 U/L。剩余的动物表现出转氨酶没有升高或仅天冬氨酸转氨酶(AST)和ALT的瞬时和低水平增加,从未超过103U/L。在载体注射后发现最一致的异常,表明它们与测试物有关。评估T细胞对人LDLR或AAV8衣壳的活化与AST/ALT增加的相关性。图6呈现证明相关发现的三种选定动物中的AAV衣壳ELISPOT数据和血清AST水平。只有一只动物显示出相关性,其中AST增加至103U/L对应于针对衣壳的T细胞的出现(图6,动物090-0263); 当AST立即恢复到正常范围时,衣壳T细胞反应持续存在。

[0201] 对于存在衣壳和转基因特异性T细胞的组织来源的T细胞的分析显示,肝脏来源的T细胞在晚期时间点对来自两种基因型(野生型和LDLR +/-)的衣壳起反应,而针对人LDLR的T细胞在这个晚期时间点在LDLR +/-动物中检测到。这表明PBMC不反映靶组织中的T细胞区室。通过RT-PCR分析在第28和364/365天收获的肝组织的转基因表达,并且其的确似乎受到临床病理学异常或T细胞出现的影响。

[0202] 野生型或LDLR +/-动物都没有在普通饮食中产生高胆固醇血症。在1.25×10^{13} GC/kg(基于oqPCR)的剂量下未观察到剂量限制毒性(DLT),这意味着最大耐受剂量(MTD)将

等于或大于该剂量。观察到转氨酶中测试物相关的升高，其是低且瞬时的但仍然存在。因此，未观察到的不良反应水平(NOAEL)小于本文实施例1中评价的单一高剂量。

[0203] 7.9.HoFH小鼠模型中AAV8.TBG.mLDLR和AAV8.TBG.hLDLR的非临床药理学/毒理学研究

[0204] 该研究在DKO小鼠中进行，因为使用该品系将允许1)与毒性平行地评价概念验证功效，以及2)在与LDLR缺陷相关的任何病理学背景中评估载体相关毒性及其相关的血脂异常及其后遗症如脂肪变性。

[0205] 设计该研究以最高剂量测试AAV8.TBG.hLDLR，其是施用于具有HoFH的人受试者的最高剂量的8倍，如实施例1中所述。在该高剂量以及两个较低剂量下测试表达鼠LDLR的载体的形式，以提供评估剂量对毒性参数以及胆固醇降低的影响。用表达鼠LDLR的载体进行剂量反应实验，以更能反映使用人LDLR载体在人体中观察到的毒性和功效。

[0206] 在该研究中，对6-22周龄的雄性和雌性DKO小鼠施用AAV8.TBG.mLDLR的剂量之一($7.5x10^{11}$ GC/kg、$7.5x10^{12}$ GC/kg和$6.0x10^{13}$ GC/kg)或$6.0x10^{13}$ GC/kg的载体(AAV8.TBG.hLDLR) (基于oqPCR滴定法的剂量)。在载体施用后第3天、第14天、第90天和第180天对动物进行尸检; 选择这些时间以捕获测试物的载体表达概况以及急性和慢性毒性。通过测量血清胆固醇水平监测转基因表达的功效。评估动物的综合临床病理学，对载体的免疫反应(细胞因子、针对AAV8衣壳的NAb和针对衣壳和转基因的T细胞应答)，并且在尸体剖检时收获组织用于全面的组织病理学检查。

[0207] *本研究的主要毒理学发现如下：*

[0208] ·治疗组未观察到临床后遗症

[0209] ·临床病理学：

[0210] o 转氨酶：异常局限于肝功能测试AST和ALT的升高(其范围为1-4x ULN)，并且主要在所有剂量的鼠LDLR载体的第90天发现。在施用高剂量人LDLR载体的组中没有转氨酶升高，除了少数雄性动物中<2x ULN的ALT。与小鼠载体相关的异常是轻微的并且不是剂量依赖性的，因此不认为与载体有关。基本上没有与高剂量人载体相关的发现。基于这些发现，没有证据表明治疗相关的毒性，这意味着基于这些标准的无不良反应水平(NOAEL)为$6.0x10^{13}$ GC/kg。

[0211] · 病理学:没有重大的病理学发现。组织病理学限于肝脏中的微小或轻度发现，如下：

[0212] o根据评估的所有标准，施用PBS的动物具有最小和/或轻度异常的证据。在评估治疗相关病理学时，我们关注任何分类为轻度的发现，其高于PBS注射动物中观察到的发现。

[0213] o在施用小鼠和人LDLR载体的高剂量雌性小鼠中观察到轻度胆管增生和窦状细胞增生。这可以代表仅在高剂量下观察到的载体相关效应。

[0214] o小叶中心肥大是轻度的，仅在雄性中且不是在高剂量的载体时，认为它与载体无关。

[0215] o在高剂量人LDLR载体中，在第180天，在1/7雄性和3/7雌性中发现最小的坏死。

[0216] o基于高剂量载体时的轻度胆管和窦状腺增生的发现，以及高剂量人LDLR载体中的几个最小坏死的实例，基于这些标准的NOAEL为$7.5x10^{12}$ GC/kg至$6.0x10^{13}$ GC/kg。

[0217] · *其他发现*:在施用高剂量的人LDLR载体后，动物发展出针对AAV8的NAb增加至并

且基于IFN-γELISPOT证实施用高剂量的人LDLR载体后针对衣壳和LDLR的T细胞应答非常低。基于对载体后3天和14天的血清分析，几乎没有证据表明存在急性炎症反应；尽管IL6没有增加，但少数细胞因子确实显示适度和短暂的升高。

[0218] 一个值得注意的发现是用小鼠LDLR载体处理的DKO小鼠的毒性并不比用人LDLR载体处理的更差，如果人LDLR在T细胞方面比小鼠转基因更具免疫原性则可能是这种情况。ELISPOT研究确实显示了在施用表达人转基因的高剂量载体的小鼠中LDLR特异性T细胞的一些激活，尽管它们很低并且在有限数量的动物中支持毒性数据，这表明这种宿主应答机制不太可能导致安全性问题。

[0219] 总之，不存在剂量限制的毒性，这意味着最大耐受剂量高于测试的最高剂量$6.0x10^{13}$ GC/kg。基于最高剂量的肝脏病理学中的轻度和可逆发现，NOAEL大约在$6.0x10^{13}$ GC/kg(其中观察到肝脏轻度可逆病理)至低至$7.5x10^{12}$ GC/kg(其中没有明确指示载体相关发现)。

[0220] 7.10.AAV8.TGB.hLDLR在HoFH小鼠模型中的分临床生物分布

[0221] 6-22周龄的雄性和雌性DKO小鼠IV施用7.5×10^{12} GC/kg(通过oqPCR滴定法测量的剂量)的AAV8.TBG.hLDLR，其是实施例1f中治疗人受试者的最高剂量。在载体施用后第3天、第14天、第90天和第180天对动物进行尸体用于生物分布评估。除了血液，还收获了20种器官。通过对收获的总基因组DNA的定量、灵敏的PCR分析来评估器官中载体基因组的分布。每个组织的一个样品包括对照DNA的峰值，包括已知量的载体序列，以评估PCR测定反应的充分性。

[0222] 肝脏中的载体GC数量在肝脏中显著高于其他器官/组织，这与AAV8衣壳的高嗜肝性质一致。例如，肝脏中的载体基因组拷贝是第90天在任何其他组织中发现的载体基因组拷贝的至少100倍。在前三个时间点，雄性或雌性小鼠之间没有显著差异。随时间GC数目在肝脏中降低，直至第90天，其随后稳定。在所有组织中观察到类似的下降趋势，但是在具有更高细胞更新率的组织中载体拷贝数的下降更快。在两种性别的性腺和大脑中存在低但可检测水平的载体基因组拷贝。

[0223] AAV8.TBG.hLDLR在DKO小鼠中的生物分布与用AAV8的公布结果一致。肝脏是IV输注后基因转移的靶主要目标，且肝脏中的基因组拷贝不会随着时间而显著下降。其他器官被靶向用于载体递送，尽管这些非肝组织中的基因转移水平显著较低并且随时间下降。因此，这里提供的数据表明，待评估的主要器官系统是肝脏。

[0224] 7.11. 非临床安全性研究的结论

[0225] 恒河猴和DKO小鼠研究证实，高剂量载体与低水平、短暂和无症状的肝脏病理学相关，这通过NHP中转氨酶的瞬时升高和小鼠中短暂出现的轻度胆管和窦状腺肥大所证实。没有观察到认为是由于载体而引起的其他毒性。

[0226] 在恒河猴中至高达$1.25x10^{13}$ GC/kg和DKO小鼠中至高达$6x10^{13}$ GC/kg的剂量时没有观察到DLT。NOAEL的测定主要集中于肝毒性，如在恒河猴中转氨酶的升高和DKO小鼠的组织病理学中所反映的。这转化为在恒河猴中NOAEL小于$1.25x10^{13}$ GC/kg且在DKO小鼠中小于$6x10^{13}$ GC/kg但大于$7.5x10^{12}$ GC/kg。剂量基于oqPCR滴定法。

[0227] 7.12.支持人类治疗的非临床数据的总体评估

[0228] 已经为临床研究的剂量选择和设计提供依据的从药理学和毒理学研究中得出的

关键发现如下：

[0229] ·最小有效剂量(MED)：在非临床研究中将MED定义为GC/kg剂量，其导致血清胆固醇降低30％。两项实现IND的非临床研究确定MED为$1.5\text{-}5.0\text{x}10^{11}$ GC/kg。小鼠药理学/毒理学研究表明，相对于PBS对照，血清胆固醇的统计学显着降低至少30％，允许估计MED≤$7.5\text{x}10^{11}$GC/kg。观察到的剂量 - 反应关系允许如通过oqPCR测定的MED为$1.5\text{-}5.0\times10^{11}$ GC/kg。

[0230] ·最大耐受剂量(MTD)：在非临床研究中将MTD定义为不导致剂量限制性毒性(DLT)的GC/kg剂量。在所测试的最高剂量的毒理学研究中未观察到DLT，其在DKO小鼠中为$6.0\text{x}10^{13}$ GC/kg，在恒河猴中为$1.25\text{x}10^{13}$ GC/kg，如通过oqPCR测定的。我们的结果表明实际MTD高于这些剂量。

[0231] ·没有观察到的不良事件水平(NOAEL)：这在DKO小鼠中确定为7.5×10^{12} GC/kg。这是基于最小至轻度组织病理学发现，其主要在肝脏(胆管和窦状腺增生，最小坏死)，在较高剂量的人LDLR(hLDLR)转基因下观察到。在恒河猴中只测试了一个剂量; 然而，在$1.25\text{x}10^{13}$ GC/kg的毒性是轻微的，包括AST和ALT的瞬时和低水平增加，表明在低于测试剂量的剂量下将实现真正的NOAEL。

[0232] 基于这些数据，我们得到两个剂量：单剂量$2.5\text{x}10^{12}$ GC/kg或单剂量$7.5\text{x}10^{12}$ GC/kg(基于oqPCR滴定法的剂量)。建议在临床中测试的最高剂量低于在恒河猴毒理学研究中测试的最高剂量，并且是在DKO小鼠中测试的最高剂量的1/8 - 这两者都不被认为是MTD。提出为MED至少5倍的剂量，表明参与低剂量群组的患者可能潜在地获得一些益处。较低剂量也是DKO小鼠中的NOAEL剂量的约1/3，且是恒河猴中测试的剂量的1/5。

[0233] 8. 实施例3：AAV8.TBG.hLDLR的制备

[0234] AAV8.TBG.hLDLR载体由AAV载体活性组分和配制缓冲液组成。外部AAV载体组分是血清型8，$T = 1$二十面体衣壳，由3个AAV病毒蛋白VP1、VP2和VP3的60个拷贝组成，比例为1:1:18。衣壳含有单链DNA重组AAV(rAAV)载体基因组(图7)。基因组含有侧接两个AAV反向末端重复序列(ITR)的人低密度脂蛋白受体(LDLR)转基因。增强子、启动子、内含子、人LDLR编码序列和多腺苷酸化(polyA)信号包含在人LDLR转基因中。ITR是在载体生产过程中负责基因组复制和包装的遗传元件，并且是产生rAAV所需的唯一病毒顺式元件。人LDLR编码序列的表达由肝细胞特异性甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子驱动。两个拷贝的α1微球蛋白/尿抑胰酶素增强子元件在TBG启动子之前，以刺激启动子活性。存在嵌合内含子以进一步增强表达，并且包括兔β珠蛋白polyA信号以介导人LDLR mRNA转录物的终止。载体作为AAV8.TBG.hLDLR载体在配制缓冲液中的悬浮液提供。配制缓冲液是180mM NaCl、10mM磷酸钠、0.001％泊洛沙姆188，pH 7.3。

[0235] 载体制造和载体表征的细节在下面的部分中描述。

[0236] 8.1. 用于产生AAV8.TBG.hLDLR的质粒

[0237] 用于产生AAV8.TBG.hLDLR的质粒如下：

[0238] 8.1.1 顺式质粒(载体基因组表达构建体)：含有人LDLR表达盒的pENN.AAV.TBG.hLDLR.RBG.KanR(图8)。该质粒编码rAAV载体基因组。表达盒的polyA信号来自兔β珠蛋白基因。两个拷贝的α1微球蛋白/尿抑胰酶素增强子元件在TBG启动子之前。

[0239] 为了生成用于产生AAV8.TBG.hLDLR的顺式质粒，将人LDLR cDNA克隆到含有AAV2

ITR的构建体pENN.AAV.TBG.PI中以产生pENN.AAV.TBG.hLDLR.RBG。pENN.AAV.TBG.PI中的质粒骨架最初来自pZac2.1,一种基于pKSS的质粒。切除pENN.AAV.TBG.hLDLR.RBG中的氨苄青霉素抗性基因并用卡那霉素基因替换以产生pENN.AAV.TBG.hLDLR.RBG.KanR。从具有嵌合内含子的TBG启动子(Promega Corporation,Madison,Wisconsin)驱动人LDLR cDNA的表达。表达盒的polyA信号来自兔β珠蛋白基因。两个拷贝的α1微球蛋白/尿抑胰酶素增强子元件在TBG启动子之前。

[0240] 序列元件的描述

[0241] 1. 反向末端重复(ITR):AAV ITR(GenBank＃NC001401)是两端相同但方向相反的序列。当AAV和腺病毒(ad)辅助功能以反式提供时,AAV2 ITR序列既作为载体DNA复制的起点又作为载体基因组的包装信号行使功能。因此,ITR序列代表载体基因组复制和包装所需的唯一顺式作用序列。

[0242] 2. 人α1微球蛋白/尿抑胰酶素增强子(2拷贝; 0.1Kb); Genbank＃X67082)。这种肝脏特异性增强子元件用于提供肝脏特异性并增强TBG启动子的表达。

[0243] 3. 人甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子(0.46Kb; Gen bank＃L13470)。该肝细胞特异性启动子驱动人LDLR编码序列的表达

[0244] 4. 人LDLR cDNA(2.58Kb; Genbank＃NM000527,完整CDS)。人LDLR cDNA编码860个氨基酸的低密度脂蛋白受体,且预测分子量为95kD,通过SDS-PAGE的表观分子量为130kD。

[0245] 5. 嵌合内含子(0.13Kb; Genbank＃U47121; Promega Corporation,Madison,Wisconsin)。嵌合内含子由来自人β-珠蛋白基因的第一个内含子的5'-供体位点和来自位于免疫球蛋白基因重链可变区的前导和主体之间的内含子的分支和3'-受体位点组成。已经显示在表达盒中存在内含子有助于mRNA从细胞核转运至细胞质,从而增强稳定水平的mRNA的积累用于翻译。这是基因载体中旨在介导增加的基因表达水平的常见特征。

[0246] 6. 兔β-珠蛋白多腺苷酸化信号:(0.13Kb; GenBank＃V00882.1)兔β-珠蛋白多腺苷酸化信号提供顺式序列,用于抗体mRNA的有效多腺苷酸化。该元件作为转录终止的信号起作用,转录终止是在新生转录物的3'末端的特异性切割事件随后加入长聚腺嘌呤尾。

[0247] 8.1.2 反式质粒(包装构建体):pAAV2/8(Kan),含有AAV2 rep基因和AAV8 cap基因(图9)。

[0248] AAV8反式质粒pAAV2/8(Kan)表达AAV2复制酶(*rep*)基因和编码病毒体蛋白、VP1、VP2和VP3的AAV8衣壳(*cap*)基因。AAV8衣壳基因序列最初分离自恒河猴的心脏DNA(GenBank登录号 AF513852)。为了产生嵌合包装构建体,用XbaI和XhoI消化含有AAV2 rep和cap基因的质粒p5E18以除去AAV2 cap基因。然后用AAV8 cap基因的2.27Kb SpeI/XhoI PCR片段替换AAV2 cap基因以产生质粒p5E18VD2/8(图9a)。通常驱动rep表达的AAV p5启动子在该构建体中从rep基因的5'末端重新定位到cap基因的3'末端。该排列用于下调rep的表达以增加载体产量。p5E18中的质粒骨架来自pBluescript KS。作为最后一步,将氨苄青霉素抗性基因替换为卡那霉素抗性基因以产生pAAV2/8(Kan)(图9B)。通过直接测序验证了整个pAAV2/8(Kan)反式质粒。

[0249] 8.1.3 腺病毒辅助质粒: pAdΔF6(Kan)

[0250] 质粒pAdΔF6(Kan)的大小为15.7Kb,且含有对AAV复制很重要的腺病毒基因组区

域,即E2A、E4和VA RNA。pAd ΔF6(Kan)不编码任何额外的腺病毒复制或结构基因,并且不含有复制所必需的顺式元件,例如腺病毒ITR,因此预期不会产生感染性腺病毒。腺病毒E1必需基因功能由HEK293细胞提供,其中产生rAAV载体。pAd ΔF6(Kan)衍生自Ad5的E1、E3缺失的分子克隆(pBHG10,基于pBR322的质粒)。在Ad5 DNA中引入缺失以去除不必要的腺病毒编码区并在所得ad辅助质粒中将腺病毒DNA的量从32Kb减少至12Kb。最后,氨苄青霉素抗性基因被卡那霉素抗性基因取代以产生pAd ΔF6(Kan)(图10)。DNA质粒测序由Qiagen Sequencing Services, Germany进行,并显示pAdDeltaF6(Kan)的参考序列与下列腺病毒元件之间有100%的同源性:p1707FH-Q:E4 ORF6 3.69-2.81Kb; E2A DNA结合蛋白11.8-10.2Kb; VA RNA区域12.4-13.4Kb。

[0251] 上述顺式、反式和ad-辅助质粒中的每一种都含有卡那霉素抗性盒,因此,β-内酰胺抗生素不用于它们的生产中。

[0252] 8.1.4 质粒制造

[0253] 用于生产载体的所有质粒均由Puresyn Inc. (Malvern, PA)生产。该过程中使用的所有生长培养基都是无动物的。该过程中使用的所有组分,包括发酵瓶、容器、膜、树脂、柱、管和与质粒接触的任何组分,都专用于单一质粒,并且认证为无BSE。没有共用组分,并在适当时使用一次性用品。

[0254] 8.2.细胞库

[0255] AAV8.TBG.hLDLR载体由HEK293工作细胞库产生,所述工作细胞库来源自完全表征的主细胞库。两个细胞库的制造和测试细节如下所示。

[0256] 8.2.1 HEK293主细胞库

[0257] HEK293主细胞库(MCB)是原代人胚胎肾细胞(HEK)293的衍生物。HEK293细胞系是由剪切的人腺病毒5型(Ad5)DNA (Graham 等人, 1977, Journal of General Virology 36(1): 59-72)转化的永久系。HEK293 MCB已经对微生物和病毒污染进行广泛测试。HEK293 MCB目前储存在液氮中。对HEK293 MCB进行了额外的测试,以证明不存在人、猿、牛和猪来源的特定病原体。通过同工酶分析证明了HEK293 MCB的人类起源。

[0258] 还通过评估皮下注射细胞悬浮液后裸(nu/nu)无胸腺小鼠中的肿瘤形成,对HEK293 MCB进行致瘤性测试。在该研究中,在10只阳性对照小鼠中的10只在注射部位诊断出纤维肉瘤,并且在10只测试物小鼠中的10只在注射部位诊断出癌。在任何阴性对照小鼠中都没有诊断出肿瘤。还测试了HEK293 MCB L/N 3006-105679是否存在1型和2型猪圆环病毒(PCV)。发现MCB对1型和2型PCV呈阴性。

[0259] 8.2.2 HEK293工作细胞库

[0260] HEK293工作细胞库(WCB)使用根据欧洲药典专著进行合格性认证的新西兰来源的胎牛血清FBS(Hyclone PN SH30406.02)制备。使用一个小瓶(1mL)的MCB作为种子材料建立HEK293 WCB。进行表征测试,且测试结果列于 Table 4.1。

[0261] 表4.1HEK293 WCB的表征。

[0262]

测试	方法	研究编号		结果
测试琼脂可培养的和非琼脂可培养的支原体USP、EP、1993 PTC的存在	体内	BioReliance	AD61FS.102063GMP.BSV	未检测到支原体
琼脂可培养的和非琼脂可培养的支原体USP、EP、1993 PTC/JP测试的定量	体内	BioReliance	AD61FS.102062GMP.BSV	未观察到支原体郁积
隔离物无菌性测试, USP <71>, 21 CFR 610.12	直接接种	BioReliance	AD61FS.510120GMP.BSV	无细菌或真菌生长
测试不明显病毒的存在	体内	BioReliance	AD61FS.005002GMP.BSV	阴性
病毒污染物存在的28天测定	体外	BioReliance	AD61FS.003800.BSV	阴性

细胞培养物鉴定和表征	同工酶分析	BioReliance	AD61FS.380801.BSV	人

[0263] 8.3.载体制备

[0264] 下面给出了质粒制造过程的一般描述，并且其也反映在图11中的流程图中。

[0265] 8.3.1 质粒生成过程(上游过程)

[0266] 8.3.1.1 将HEK293 WCB细胞培养物引入T-烧瓶(75cm^2)

[0267] 将来自含有10^7个细胞/1mL的WCB的一小瓶HEK293细胞在37℃下解冻，并接种在含有补充有10％胎牛血清(DMEM HG/10％FBS)的DMEM高葡萄糖的75cm^2组织培养瓶中。然后将细胞置于37℃/5％CO2培养箱中，并生长至约70％汇合且每日直接目视和显微镜检查以评估细胞生长。将这些细胞命名为第1代，并传代以产生用于载体生物合成的细胞种子序列，持续长达约10周，如下所述。在每一代记录传代数，并且在第20代后停止细胞。如果载体生物合成需要额外的细胞，则从另一个HEK293 WCB小瓶开始新的HEK293细胞种子序列。

[0268] 8.3.1.2 细胞传代入~2个T型烧瓶(225 cm^2)

[0269] 当在T75烧瓶中生长的HEK293细胞为～约70％汇合时，使用重组胰蛋白酶(TrypLE)将细胞从烧瓶表面分离，并接种在含有DMEM HG/10％FBS的两个T225烧瓶中。将细胞置于培养箱中并生长至～约70％汇合。通过目视检查和使用显微镜监测细胞的细胞生长、无污染和稠度。

[0270] 8.3.1.3 细胞传代入～10个T型烧瓶(225 cm^2)

[0271] 当在两个T225烧瓶中生长的HEK293细胞为～70％汇合时，使用重组胰蛋白酶(TrypLE)分离细胞，并在含有DMEM HG/10％FBS的10个225cm2 T-烧瓶中以每瓶约3×10^6个细胞的密度接种。将细胞置于37℃/5％CO_2培养箱中并生长至～70％汇合。通过直接目视检查和使用显微镜监测细胞的细胞生长、无污染和稠度。通过在T225烧瓶中连续传代维持细胞以维持细胞种子序列并提供用于扩增的细胞以支持后续载体批次的制备。

[0272] 8.3.1.4 细胞传代入～10个滚瓶

[0273] 当在10个T225烧瓶中生长的HEK293细胞为～70％融合时，使用重组胰蛋白酶(TrypLE)分离细胞，计数并接种在含有DMEM HG/10％FBS的850cm^2滚瓶(RB)中。然后将RB置于RB培养箱中并使细胞生长至～70％汇合。通过直接目视检查和使用显微镜监测RB的细胞生长、无污染和稠度。

[0274] 8.3.1.5 细胞传代入～100个滚瓶

[0275] 当在如之前的加工步骤中所述制备的RB中生长的HEK293细胞为～70％汇合时，使用重组胰蛋白酶(TrypLE)将它们分离，计数并接种在含有DMEM/10％FBS的100个RB中。然后将RB置于RB培养箱(37℃，5％CO_2)中并生长至～70％汇合。通过直接目视检查和使用显微镜监测细胞的细胞生长、无污染和稠度。

[0276] 8.3.1.6 用质粒DNA转染细胞

[0277] 当在100个RB中生长的HEK293细胞为～70％汇合时，用三种质粒中的每一种转染细胞：AAV血清型特异性包装(反式)质粒、ad辅助质粒和含有人LDLR基因侧接AAV反向末端重复序列(ITR)的表达盒的载体顺式质粒。使用磷酸钙法进行转染(质粒详情见第4.1.1节)。将RB置于RB培养箱(37℃，5％CO_2)中过夜。

[0278] 8.3.1.7.培养基交换为无血清培养基

[0279] 在转染后过夜孵育100个RB后，通过抽吸从每个RB中除去含有转染试剂的DMEM/

10％FBS培养基，并用DMEM-HG（不含FBS）代替。将RB放回RB培养箱并在37℃、5％CO_2下孵育直至收获。

[0280] 8.3.1.8.载体收获

[0281] 从培养箱中取出RB并检查转染的证据（细胞形态中转染诱导的变化，细胞单层分离）和任何污染的证据。通过搅拌每个RB将细胞从RB表面分离，然后通过倾析到与BioProcess容器（BPC）连接的无菌一次性漏斗中收获细胞。BPC中的合并的收获材料标记为“产物中间体：粗细胞收获物”和获取样品用于（1）过程中生物负载测试和（2）生物负载、支原体和外源因子产物释放测试。标记为粗细胞收获物（CH）的产物中间体批次储存在2-8℃直至进一步处理。

[0282] 8.3.2 载体纯化方法（下游方法）

[0283] 虽然常见的“平台”纯化方法用于所有AAV血清型（即并入相同的步骤系列和次序），但每种血清型都需要独特的色谱步骤条件，这是影响用于制备应用于色谱树脂的澄清的细胞裂解物的步骤的某些细节（缓冲液组成和pH）的要求。

[0284] 8.3.2.1 通过TFF的AAV8载体收获浓缩和渗滤

[0285] 含有粗制CH的BPC连接到用磷酸盐缓冲盐水平衡的中空纤维（100k MW截止）TFF装置的消毒储库的入口。使用蠕动泵将粗制CH应用于TFF装置并浓缩至1-2L。保留载体（保留物），同时小分子量部分和缓冲液通过TFF过滤器孔并被丢弃。然后使用AAV8渗滤缓冲液对收获物进行渗滤。渗滤后，将浓缩的载体回收到5L BPC中。该材料标有“产物中间体：收获后TFF”，并获取样品用于过程中生物负载测试。浓缩的收获物立即进一步处理或在2-8℃下储存直至进一步处理。

[0286] 8.3.2.2 收获物的微流化和核酸酶消化

[0287] 将浓缩和渗滤的收获物进行剪切，其使用微流化器破坏完整的HEK293细胞。每次使用后，将微流化器用1N NaOH消毒最少1小时，储存在20％乙醇中直至下一次运行，并在每次使用前用WFI冲洗。将包含在BPC中的粗载体连接到微流化器的消毒过的入口端口，并将无菌空BPC连接到出口端口。利用微流化器产生的空气压力，含有载体的细胞通过微流化器相互作用室（一个直径300μm的回旋通路）以裂解细胞并释放载体。重复微流化过程以确保细胞完全裂解和载体的高回收率。在产物中间体重复通过微流化器之后，用～500mL的AAV8 Benzonase缓冲液冲洗流路。含有经微流化的载体的5L BPC与微流化器的出口端口分离。该材料标有“产物中间体：最终微流化的’，和获取样品用于过程中生物负载测试。经微流化的产物中间体立即进一步处理或在2-8℃下储存直至进一步处理。通过额外的100U/mL Benzonase®从AAV8颗粒中除去核酸杂质。将BPC的内容物混合并在室温下温育至少1小时。进一步处理核酸酶消化的产物中间体。

[0288] 8.3.2.3 经微流化的中间体的过滤

[0289] 将含有微流化和消化产物中间体的BPC连接到筒式过滤器，其具有从3μm开始下降至至0.45μm的梯度孔径。过滤器用AAV Benzonase缓冲液调节。使用蠕动泵，将微流化的产物中间体通过筒式过滤器并收集在连接到过滤器出口端口的BPC中。将无菌AAV8 Benzonase缓冲液泵送通过滤筒以冲洗过滤器。然后将过滤的产物中间体连接到用AAV8 Benzonase缓冲液调节的0.2μm最终孔径的胶囊过滤器。使用蠕动泵，将过滤的中间体通过筒式过滤器并收集在连接到过滤器出口端口的BPC中。将一定体积的无菌AAV8 Benzonase

缓冲液泵送通过滤筒以冲洗过滤器。该材料标有“产物中间体:MF后0.2μm过滤的”,并获取样品用于过程中生物负载测试。将该材料在2-8℃下储存过夜直至进一步处理。在将澄清的细胞裂解物应用于色谱柱之前,可以在色谱分析当天进行另外的过滤步骤。

[0290] 8.3.2.4 通过阴离子交换色谱纯化

[0291] 通过添加稀释缓冲液AAV8调节0.2μm过滤的产物中间体的NaCl浓度。随后使用离子交换树脂通过离子交换色谱法纯化含有载体的细胞裂解物。GE Healthcare AKTA Pilot色谱系统配有一个含有约1L树脂床体积的BPG柱。使用连续流动条件填充色谱柱,并满足确立的不对称规格。系统按照确立程序进行消毒,并储存在20%乙醇中直至下一次运行。在即将使用之前,用无菌AAV8洗涤缓冲液平衡系统。使用无菌技术和无菌材料和组分,将含有澄清的细胞裂解物的BPC连接到消毒过的样品入口端口,并将下面列出的含有生物加工缓冲液的BPC连接到AKTA Pilot上的消毒的进口端口。色谱分析程序过程中的所有连接均无菌进行。将澄清的细胞裂解物施加于柱,并使用AAV8洗涤缓冲液冲洗。在这些条件下,载体与柱结合,并从树脂中冲洗去杂质。通过施加AAV8洗脱缓冲液从柱上洗脱AAV8颗粒并收集到无菌塑料瓶中。该材料标记为“产物中间体”,并且获取样品用于过程中生物负载测试。将材料立即进一步处理。

[0292] 8.3.2.5 通过CsCl梯度超速离心纯化

[0293] 如上所述通过阴离子交换柱色谱法纯化的AAV8颗粒含有空衣壳和其他产物相关杂质。通过氯化铯梯度超速离心将空衣壳与载体颗粒分离。使用无菌技术,将氯化铯加入载体‘产物中间体’中并轻柔混合至对应于1.35g/mL的密度的终浓度。将溶液通过0.2μm过滤器过滤,分配到超速离心管中,并在Ti50转子中在15℃下进行超速离心约24小时。离心后,将管从转子中取出,用Septihol擦拭,并加入BSC中。将每个管夹在支架中并进行聚焦照射以帮助条带显色。通常观察到两个主要条带,上部条带对应于空衣壳,且下部条带对应于载体颗粒。用连接到无菌注射器的无菌针头从每个管中回收下部条带。将从每个管回收的载体合并,并获取样品用于过程中生物负载、内毒素和载体效价。将合并的材料分配到标记为“产物中间体:CsCl梯度后”的无菌50mL聚丙烯锥形管中,并立即储存在-80°C直至下一个加工步骤。

[0294] 8.3.2.6 通过切向流过滤的缓冲液交换

[0295] 在测试和释放用于合并物后,将通过CsCl条带加工步骤纯化的载体批次合并,并通过TFF进行渗滤以产生原料载体(Bulk Vector)。基于从各批次获得的样品的滴定,使用经计算体积的无菌渗滤缓冲液调节合并载体的体积。取决于可用的体积,将合并的、浓度调节的载体的等分试样用单次使用TFF装置进行TFF。将装置在使用前消毒,然后在渗滤缓冲液中平衡。一旦渗滤过程完成,就在无菌瓶中从TFF装置中回收载体。将该材料标记为“0.2μm过滤前批次”。将材料立即进一步处理。

[0296] 8.3.2.7 配制和0.2μm过滤以制备原料载体

[0297] 将由各个TFF单元制备的批次合并在一起并通过在500mL无菌瓶中轻柔涡旋混合。然后将合并的材料通过0.22μm过滤器以制备原料载体。将合并的材料取样用于原料载体和保留的QC测试,并然后等分到无菌的50mL聚丙烯管中,标记为“原料载体”,并储存在-80℃直至下一步骤。

[0298] 8.4.载体的测试

[0299] 进行表征测定，包括血清型鉴定、空粒子含量和转基因产物鉴定。所有测定的描述如下所示。

[0300] 8.4.1 基因组拷贝(GC) 效价

[0301] 将优化定量PCR(oqPCR)测定用于通过与同源质粒标准品比较来确定基因组拷贝效价。oqPCR测定利用DNA酶I和蛋白酶K的连续消化，然后进行qPCR分析以测量衣壳化的载体基因组拷贝。使用靶向RBG polyA区的序列特异性引物和与该相同区域杂交的荧光标记探针的组合完成DNA检测。与质粒DNA标准曲线的比较允许效价测定而无需任何PCR后样品操作。已经将许多标准品、验证样品和对照(用于背景和DNA污染)引入测定中。该测定已通过建立和定义测定参数来鉴定，所述测定参数包括灵敏度、检测限、鉴定范围以及测定内和测定间精确度。建立了内部AAV8参考批次并用于进行资格研究。

[0302] 8.4.2 效力测定

[0303] 设计体内效力测定以检测HoFH的双敲除(DKO) LDLR-/- Apobec-/-小鼠模型的血清中人LDLR载体介导的总胆固醇水平的降低。开发体内效力测定的基础在第4.3.5.11节中描述。为了测定AAV8.TBG.hLDLR载体的效力，将6-20周龄的DKO小鼠IV(通过尾静脉)注射每只小鼠$5x10^{11}$GC/kg PBS中稀释的载体。通过眶后出血对动物进行放血，并且通过Antech GLP在载体施用(第14天和第30天)之前和之后评估血清总胆固醇水平。基于以此剂量的载体施用的先前经验，预期载体施用的动物中的总胆固醇水平在第14天下降基线的25％-75％。基于总胆固醇降低的预期范围，选择$5x10^{11}$GC/kg每小鼠剂量用于临床测定，这将允许评估在稳定性测试过程中载体效力的变化。

[0304] 8.4.3 载体衣壳身份:VP3的AAV衣壳质谱

[0305] 通过基于通过质谱(MS)分析VP3衣壳蛋白的肽的测定来实现载体的AAV2/8血清型的确认。该方法涉及从SDS-PAGE凝胶中切除的VP3蛋白条带的多酶消化(胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和胞内蛋白酶Glu-C)，然后在Q-Exactive Orbitrap质谱仪上的UPLC-MS/MS上进行表征以对衣壳蛋白进行测序。开发了串联质谱(MS)方法，其允许鉴定某些污染蛋白并从质谱中获得肽序列。

[0306] 8.4.4 空比满颗粒比

[0307] 使用如分析超速离心机中测量的分析超速离心(AUC)沉降速度的载体颗粒概况在是获得关于大分子结构异质性、确认差异和缔合或聚集状态的信息的极好方法。将样品加载到细胞中并在Beckman Coulter Proteomelab XL-I分析型超速离心机中以12000 RPM沉降。每两分钟记录折射率扫描持续3.3小时。通过c(s)模型(Sedfit程序)和相对于标准化c(s)值绘制的计算沉降系数来分析数据。应观察到代表单体载体的主峰。迁移慢于主要单体峰的峰的出现表明空的/错误组装的颗粒。使用空的AAV8颗粒制剂建立空颗粒峰的沉降系数。主要单体峰和先前峰的直接定量允许测定空比满颗粒比。

[0308] 8.4.5 感染效价

[0309] 感染单位(IU)测定用于确定RC32细胞(表达rep2的HeLa细胞)中载体的生产摄取和复制。简而言之，96孔板中的RC32细胞通过连续稀释的载体和均匀稀释的Ad5共同感染，且在每个rAAV稀释下12个重复。感染后72小时，裂解细胞，并进行qPCR以检测相对于输入的rAAV载体扩增。进行终点稀释TCID 50计算(Spearman-Karber)以确定以IU/ml表示的复制效价。由于“感染性”值取决于与细胞接触的颗粒、受体结合、内化、向细胞核的转运和基因

组复制,所以它们受到测定几何结构和在所用细胞系中存在合适的受体和结合后途径的影响。对AAV载体导入至关重要的受体和结合后途径通常在无限增殖化细胞系中维持,因此感染性测定效价不是存在的“感染性”颗粒数量的绝对量度。然而,衣壳化的GC与“感染单位”的比率(描述为GC/IU比率)可用作批次之间产品一致性的量度。该体外生物测定的可变性很高(30-60%CV),这可能是由于体外AAV8载体的低感染性。

[0310] 8.4.6 转基因表达测定

[0311] 在从接受1×10^{10} GC(5×10^{11} GC/kg)的AAV8.TBG.hLDLR载体的LDLR-/-Apobec-/-小鼠收获的肝脏中评估转基因表达。将30天前用载体给药的动物安乐死,收获肝脏并在RIPA缓冲液中匀浆。将25-100μg总肝匀浆在4-12%变性SDS-PAGE凝胶上电泳,并使用针对人LDLR的抗体进行探测以确定转基因表达。将未接受载体或接受无关载体的动物用作测定的对照。由于翻译后修饰,预期用载体处理的动物显示出从90-160kDa中任何位置迁移的条带。通过量化条带的积分强度来确定相对表达水平。

[0312] (序列表自由文本)

[0313] 提供的以下信息为含数字标识符<223>的自由文本的序列。

[0314]

SEQ ID NO: （含自由文本）	<223>下的自由文本
1	<221> misc_feature <222> (188)..(2770) <223> 由全长 CDS 编码的 LDLR 同工型 1, 188-2770; 由 缺少外显子的可选的剪接变体编码的其他变体; 缺少第四外显子或第十二外显子的最常见变体 <220> <221> misc_信号 <222> (188)..(250) <220> <221> misc_feature <222> (251)..(2767) <223> 同工型 1 的成熟蛋白
4	<223> 人工 hLDLR <220> <221> misc_feature <222> (1)..(2583) <223> 人工 hLDLR 编码序列
5	<223> 腺相关病毒 8 vp1 衣壳蛋白
6	<223> pAAV.TBG.PI.hLDLRco.RGB <220> <221> 重复区 <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> 增强子 <222> (221)..(320) <223> α mic/bik <220> <221> 增强子 <222> (327)..(426) <223> α mic/bik <220> <221> 启动子 <222> (442)..(901) <223> TBG <220> <221> TATA_信号

[0315]

SEQ ID NO: （含自由文本）	<223>下的自由文本
	<222> (885)..(888) <223> TATA <220> <221> CDS <222> (969)..(3551) <223> 密码子优化的 hLDLR <220> <221> polyA_信号 <222> (3603)..(3729) <223> 兔珠蛋白 poly A <220> <221> 重复区 <222> (3818)..(3947) <223> 3' ITR <220> <221> 复制起点 <222> (4124)..(4579) <223> f1 ori <220> <221> misc_feature <222> (4710)..(5567) <223> AP(R) <220> <221> 复制起点 <222> (5741)..(6329) <223> 复制起点
7	<223> 合成构建体

[0316] 本说明书中引用的所有出版物均以其整体通过引用并入本文，如为2015年12月18日提交的美国临时专利申请号62/269,440和2015年12月11日提交的美国临时专利申请号62/266,383。类似地，本文提及且在所附序列表中出现的SEQ ID NO通过引用并入。尽管本发明已经参考具体实施方案进行描述，但应理解可进行修改而不背离本发明的精神。此类修改旨在落入所附权利要求的范围之内。

序列表

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> 用于治疗家族性高胆固醇血症的基因疗法

<130> UPN-16-7717PCT

<150> US 62/269,440
<151> 2015-12-18

<150> US 62/266,383
<151> 2015-12-11

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5292
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> 外显子
<222> (1)..(254)

[0001]

<220>
<221> misc_feature
<222> (188)..(2770)
<223> 由全长CDS编码的LDLR同工型1, 188-2770;
由缺少外显子的可选的剪接变体编码的其他变体;
缺少第四外显子或第十二外显子的最常见变体

<220>
<221> misc_信号
<222> (188)..(250)

<220>
<221> misc_feature
<222> (251)..(2767)
<223> 同工型1的成熟蛋白

<220>
<221> 外显子
<222> (255)..(377)

<220>
<221> 外显子
<222> (378)..(500)

<220>
<221> 外显子
<222> (501)..(881)

<220>
<221> 外显子
<222> (882)..(1004)

<220>
<221> 外显子
<222> (1005)..(1127)

<220>
<221> 外显子
<222> (1128)..(1247)

<220>
<221> 外显子
<222> (1248)..(1373)

<220>
<221> 外显子
<222> (1374)..(1545)

<220>
<221> 外显子
<222> (1546)..(1773)

<220>
<221> 外显子
<222> (1774)..(1892)

[0002]

<220>
<221> 外显子
<222> (1893)..(2032)

<220>
<221> 外显子
<222> (2033)..(2174)

<220>
<221> 外显子
<222> (2175)..(2327)

<220>
<221> 外显子
<222> (2328)..(2498)

<220>
<221> polyA_信号
<222> (5252)..(5257)

<220>
<221> polyA_位点
<222> (5284)..(5284)

<400> 1

```
ctc ttg cag tga ggt gaa gac att tga aaa tca ccc cac tgc aaa ctc          48
Leu Leu Gln     Gly Glu Asp Ile     Lys Ser Pro His Cys Lys Leu
1                   5                       10
```

```
ctc ccc ctg cta gaa acc tca cat tga aat gct gta aat gac gtg ggc          96
Leu Pro Leu Leu Glu Thr Ser His     Asn Ala Val Asn Asp Val Gly
15                  20                  25

ccc gag tgc aat cgc ggg aag cca ggg ttt cca gct agg aca cag cag         144
Pro Glu Cys Asn Arg Gly Lys Pro Gly Phe Pro Ala Arg Thr Gln Gln
30                  35                  40                  45

gtc gtg atc cgg gtc ggg aca ctg cct ggc aga ggc tgc gag cat ggg         192
Val Val Ile Arg Val Gly Thr Leu Pro Gly Arg Gly Cys Glu His Gly
                50                  55                  60

gcc ctg ggg ctg gaa att gcg ctg gac cgt cgc ctt gct cct cgc cgc         240
Ala Leu Gly Leu Glu Ile Ala Leu Asp Arg Arg Leu Ala Pro Arg Arg
            65                  70                  75

ggc ggg gac tgc ag  t ggg cga cag atg cga aag aaa cga gtt cca gtg       288
Gly Gly Asp Cys Ser   Gly Arg Gln Met Arg Lys Lys Arg Val Pro Val
        80                  85                  90

cca aga cgg gaa atg cat ctc cta caa gtg ggt ctg cga tgg cag cgc         336
Pro Arg Arg Glu Met His Leu Leu Gln Val Gly Leu Arg Trp Gln Arg
    95                  100                 105

tga gtg cca gga tgg ctc tga tga gtc cca gga gac gtg ct  t gtc tgt       384
    Val Pro Gly Trp Leu         Val Pro Gly Asp Val Leu   Val Cys
    110                 115                 120
```

[0003]

```
cac ctg caa atc cgg gga ctt cag ctg tgg ggg ccg tgt caa ccg ctg         432
His Leu Gln Ile Arg Gly Leu Gln Leu Trp Gly Pro Cys Gln Pro Leu
        125                 130                 135

cat tcc tca gtt ctg gag gtg cga tgg cca agt gga ctg cga caa cgg         480
His Ser Ser Val Leu Glu Val Arg Trp Pro Ser Gly Leu Arg Gln Arg
    140                 145                 150

ctc aga cga gca agg ctg tc  c ccc caa gac gtg ctc cca gga cga gtt       528
Leu Arg Arg Ala Arg Leu Ser   Pro Gln Asp Val Leu Pro Gly Arg Val
155                 160                 165                 170

tcg ctg cca cga tgg gaa gtg cat ctc tcg gca gtt cgt ctg tga ctc         576
Ser Leu Pro Arg Trp Glu Val His Leu Ser Ala Val Arg Leu     Leu
                175                 180                 185

aga ccg gga ctg ctt gga cgg ctc aga cga ggc ctc ctg ccc ggt gct         624
Arg Pro Gly Leu Leu Gly Arg Leu Arg Arg Gly Leu Leu Pro Gly Ala
            190                 195                 200

cac ctg tgg tcc cgc cag ctt cca gtg caa cag ctc cac ctg cat ccc         672
His Leu Trp Ser Arg Gln Leu Pro Val Gln Gln Leu His Leu His Pro
        205                 210                 215

cca gct gtg ggc ctg cga caa cga ccc cga ctg cga aga tgg ctc gga         720
Pro Ala Val Gly Leu Arg Gln Arg Pro Arg Leu Arg Arg Trp Leu Gly
    220                 225                 230
```

```
tga gtg gcc gca gcg ctg tag ggg tct tta cgt gtt cca agg gga cag      768
    Val Ala Ala Ala Leu     Gly Ser Leu Arg Val Pro Arg Gly Gln
        235                 240                 245

tag ccc ctg ctc ggc ctt cga gtt cca ctg cct aag tgg cga gtg cat      816
    Pro Leu Leu Gly Leu Arg Val Pro Leu Pro Lys Trp Arg Val His
            250                 255                 260

cca ctc cag ctg gcg ctg tga tgg tgg ccc cga ctg caa gga caa atc      864
Pro Leu Gln Leu Ala Leu     Trp Trp Pro Arg Leu Gln Gly Gln Ile
        265                 270                 275

tga cga gga aaa ctg cg  c tgt ggc cac ctg tcg ccc tga cga att cca      912
    Arg Gly Lys Leu Arg   Cys Gly His Leu Ser Pro     Arg Ile Pro
            280                 285                     290

gtg ctc tga tgg aaa ctg cat cca tgg cag ccg gca gtg tga ccg gga      960
Val Leu     Trp Lys Leu His Pro Trp Gln Pro Ala Val     Pro Gly
                295                 300                     305

ata tga ctg caa gga cat gag cga tga agt tgg ctg cgt taa tg  t gac     1008
Ile     Leu Gln Gly His Glu Arg     Ser Trp Leu Arg     Cys   Asp
                    310                 315

act ctg cga ggg acc caa caa gtt caa gtg tca cag cgg cga atg cat     1056
Thr Leu Arg Gly Thr Gln Gln Val Gln Val Ser Gln Arg Arg Met His
    320                 325                 330
```

[0004]

```
cac cct gga caa agt ctg caa cat ggc tag aga ctg ccg gga ctg gtc     1104
His Pro Gly Gln Ser Leu Gln His Gly     Arg Leu Pro Gly Leu Val
335                 340                 345

aga tga acc cat caa aga gtg cg  g gac caa cga atg ctt gga caa caa     1152
Arg     Thr His Gln Arg Val Arg   Asp Gln Arg Met Leu Gly Gln Gln
350                 355                 360

cgg cgg ctg ttc cca cgt ctg caa tga cct taa gat cgg cta cga gtg     1200
Arg Arg Leu Phe Pro Arg Leu Gln     Pro     Asp Arg Leu Arg Val
365                 370                 375

cct gtg ccc cga cgg ctt cca gct ggt ggc cca gcg aag atg cga ag  a     1248
Pro Val Pro Arg Arg Leu Pro Ala Gly Gly Pro Ala Lys Met Arg Arg
    380                 385                 390

tat cga tga gtg tca gga tcc cga cac ctg cag cca gct ctg cgt gaa     1296
Tyr Arg     Val Ser Gly Ser Arg His Leu Gln Pro Ala Leu Arg Glu
395                 400                 405

cct gga ggg tgg cta caa gtg cca gtg tga gga agg ctt cca gct gga     1344
Pro Gly Gly Trp Leu Gln Val Pro Val     Gly Arg Leu Pro Ala Gly
410                 415                 420

ccc cca cac gaa ggc ctg caa ggc tgt gg  g ctc cat cgc cta cct ctt     1392
Pro Pro His Glu Gly Leu Gln Gly Cys Gly   Leu His Arg Leu Pro Leu
425                 430                 435                 440
```

```
ctt cac caa ccg gca cga ggt cag gaa gat gac gct gga ccg gag cga      1440
Leu His Gln Pro Ala Arg Gly Gln Glu Asp Asp Ala Gly Pro Glu Arg
                445                 450                 455

gta cac cag cct cat ccc caa cct gag gaa cgt ggt cgc tct gga cac      1488
Val His Gln Pro His Pro Gln Pro Glu Glu Arg Gly Arg Ser Gly His
            460                 465                 470

gga ggt ggc cag caa tag aat cta ctg gtc tga cct gtc cca gag aat      1536
Gly Gly Gly Gln Gln     Asn Leu Leu Val     Pro Val Pro Glu Asn
        475                 480                 485

gat ctg cag cac cca gct tga cag agc cca cgg cgt ctc ttc cta tga      1584
Asp Leu Gln His Pro Ala     Gln Ser Pro Arg Arg Leu Phe Leu
            490                 495                 500

cac cgt cat cag cag aga cat cca ggc ccc cga cgg gct ggc tgt gga      1632
His Arg His Gln Gln Arg His Pro Gly Pro Arg Arg Ala Gly Cys Gly
                505                 510                 515

ctg gat cca cag caa cat cta ctg gac cga ctc tgt cct ggg cac tgt      1680
Leu Asp Pro Gln Gln His Leu Leu Asp Arg Leu Cys Pro Gly His Cys
            520                 525                 530

ctc tgt tgc gga tac caa ggg cgt gaa gag gaa aac gtt att cag gga      1728
Leu Cys Cys Gly Tyr Gln Gly Arg Glu Glu Glu Asn Val Ile Gln Gly
        535                 540                 545
```

[0005]

```
gaa cgg ctc caa gcc aag ggc cat cgt ggt gga tcc tgt tca tgg ctt      1776
Glu Arg Leu Gln Ala Lys Gly His Arg Gly Gly Ser Cys Ser Trp Leu
    550                 555                 560

cat gta ctg gac tga ctg ggg aac tcc cgc caa gat caa gaa agg ggg      1824
His Val Leu Asp     Leu Gly Asn Ser Arg Gln Asp Gln Glu Arg Gly
565                     570                 575

cct gaa tgg tgt gga cat cta ctc gct ggt gac tga aaa cat tca gtg      1872
Pro Glu Trp Cys Gly His Leu Leu Ala Gly Asp     Lys His Ser Val
580                 585                 590

gcc caa tgg cat cac cct ag  a tct cct cag tgg ccg cct cta ctg ggt     1920
Ala Gln Trp His His Pro Arg   Ser Pro Gln Trp Pro Pro Leu Leu Gly
595                 600                     605                 610

tga ctc caa act tca ctc cat ctc aag cat cga tgt caa cgg ggg caa      1968
    Leu Gln Thr Ser Leu His Leu Lys His Arg Cys Gln Arg Gly Gln
                    615                 620                 625

ccg gaa gac cat ctt gga gga tga aaa gag gct ggc cca ccc ctt ctc      2016
Pro Glu Asp His Leu Gly Gly     Lys Glu Ala Gly Pro Pro Leu Leu
                630                 635                 640

ctt ggc cgt ctt tga g ga  caa agt att ttg gac aga tat cat caa cga     2064
Leu Gly Arg Leu       Gly Gln Ser Ile Leu Asp Arg Tyr His Gln Arg
                      645                 650                 655
```

```
agc cat ttt cag tgc caa ccg cct cac agg ttc cga tgt caa ctt gtt      2112
Ser His Phe Gln Cys Gln Pro Pro His Arg Phe Arg Cys Gln Leu Val
                660                 665                 670

ggc tga aaa cct act gtc ccc aga gga tat ggt tct ctt cca caa cct      2160
Gly     Lys Pro Thr Val Pro Arg Gly Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Pro
                675                 680                 685

cac cca gcc aag ag  g agt gaa ctg gtg tga gag gac cac cct gag caa    2208
His Pro Ala Lys Arg   Ser Glu Leu Val     Glu Asp His Pro Glu Gln
            690                 695                     700

tgg cgg ctg cca gta tct gtg cct ccc tgc ccc gca gat caa ccc cca      2256
Trp Arg Leu Pro Val Ser Val Pro Pro Cys Pro Ala Asp Gln Pro Pro
            705                 710                 715

ctc gcc caa gtt tac ctg cgc ctg ccc gga cgg cat gct gct ggc cag      2304
Leu Ala Gln Val Tyr Leu Arg Leu Pro Gly Arg His Ala Ala Gly Gln
        720                 725                 730

gga cat gag gag ctg cct cac ag  a ggc tga ggc tgc agt ggc cac cca    2352
Gly His Glu Glu Leu Pro His Arg   Gly     Gly Cys Ser Gly His Pro
    735                 740                     745

gga gac atc cac cgt cag gct aaa ggt cag ctc cac agc cgt aag gac      2400
Gly Asp Ile His Arg Gln Ala Lys Gly Gln Leu His Ser Arg Lys Asp
    750                 755                 760
```

[0006]

```
aca gca cac aac cac ccg acc tgt tcc cga cac ctc ccg gct gcc tgg      2448
Thr Ala His Asn His Pro Thr Cys Ser Arg His Leu Pro Ala Ala Trp
765                 770                 775                 780

ggc cac ccc tgg gct cac cac ggt gga gat agt gac aat gtc tca cca      2496
Gly His Pro Trp Ala His His Gly Gly Asp Ser Asp Asn Val Ser Pro
                785                 790                 795

ag ctctgggcga cgttgctggc agaggaaatg agaagaagcc cagtagcgtg           2548

agggctctgt ccattgtcct ccccatcgtg ctcctcgtct tcctttgcct gggggtcttc    2608

cttctatgga agaactggcg gcttaagaac atcaacagca tcaactttga caaccccgtc    2668

tatcagaaga ccacagagga tgaggtccac atttgccaca accaggacgg ctacagctac    2728

ccctcgagac agatggtcag tctggaggat gacgtggcgt gaacatctgc ctggagtccc    2788

gtccctgccc agaacccttc ctgagacctc gccggccttg ttttattcaa agacagagaa    2848

gaccaaagca ttgcctgcca gagctttgtt ttatatattt attcatctgg gaggcagaac    2908

aggcttcgga cagtgcccat gcaatggctt gggttgggat tttggtttct tcctttcctc    2968

gtgaaggata agagaaacag gcccgggggg accaggatga cacctccatt tctctccagg    3028

aagttttgag tttctctcca ccgtgacaca atcctcaaac atggaagatg aaaggggagg    3088
```

[0007]

ggatgtcagg cccagagaag caagtggctt tcaacacaca acagcagatg gcaccaacgg 3148

gacccccctgg ccctgcctca tccaccaatc tctaagccaa acccctaaac tcaggagtca 3208

acgtgtttac ctcttctatg caagccttgc tagacagcca ggttagcctt tgccctgtca 3268

cccccgaatc atgacccacc cagtgtcttt cgaggtgggt ttgtaccttc cttaagccag 3328

gaaagggatt catggcgtcg gaaatgatct ggctgaatcc gtggtggcac cgagaccaaa 3388

ctcattcacc aaatgatgcc acttcccaga ggcagagcct gagtcactgg tcacccttaa 3448

tatttattaa gtgcctgaga cacccggtta ccttggccgt gaggacacgt ggcctgcacc 3508

caggtgtggc tgtcaggaca ccagcctggt gcccatcctc ccgaccccta cccacttcca 3568

ttcccgtggt ctccttgcac tttctcagtt cagagttgta cactgtgtac atttggcatt 3628

tgtgttatta ttttgcactg ttttctgtcg tgtgtgttgg gatgggatcc caggccaggg 3688

aaagcccgtg tcaatgaatg ccggggacag agaggggcag gttgaccggg acttcaaagc 3748

cgtgatcgtg aatatcgaga actgccattg tcgtctttat gtccgcccac ctagtgcttc 3808

cacttctatg caaatgcctc caagccattc acttccccaa tcttgtcgtt gatgggtatg 3868

tgtttaaaac atgcacggtg aggccgggcg cagtggctca cgcctgtaat cccagcactt 3928

tgggaggccg aggcgggtgg atcatgaggt caggagatcg agaccatcct ggctaacacg 3988

tgaaaccccg tctctactaa aaatacaaaa aattagccgg gcgtggtggc gggcacctgt 4048

agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatggtgt gaacccggga agcggagctt 4108

gcagtgagcc gagattgcgc cactgcagtc cgcagtctgg cctgggcgac agagcgagac 4168

tccgtctcaa aaaaaaaaaa caaaaaaaaa ccatgcatgg tgcatcagca gcccatggcc 4228

tctggccagg catggcgagg ctgaggtggg aggatggttt gagctcaggc atttgaggct 4288

gtcgtgagct atgattatgc cactgctttc cagcctgggc aacatagtaa gaccccatct 4348

cttaaaaaat gaatttggcc agacacaggt gcctcacgcc tgtaatccca gcactttggg 4408

aggctgagct ggatcacttg agttcaggag ttggagacca ggcctgagca acaaagcgag 4468

atcccatctc tacaaaaacc aaaaagttaa aaatcagctg ggtacggtgg cacgtgcctg 4528

tgatcccagc tacttgggag gctgaggcag gaggatcgcc tgagcccagg aggtggaggt 4588

tgcagtgagc catgatcgag ccactgcact ccagcctggg caacagatga agaccctatt 4648

tcagaaatac aactataaaa aaataaataa atcctccagt ctggatcgtt tgacgggact 4708

tcaggttctt tctgaaatcg ccgtgttact gttgcactga tgtccggaga gacagtgaca 4768

gcctccgtca gactcccgcg tgaagatgtc acaagggatt ggcaattgtc cccagggaca 4828

aaacactgtg tccccccccag tgcagggaac cgtgataagc ctttctggtt tcggagcacg 4888

taaatgcgtc cctgtacaga tagtggggat tttttgttat gtttgcactt tgtatattgg 4948

ttgaaactgt tatcacttat atatatatat atacacacat atatataaaa tctatttatt 5008

tttgcaaacc ctggttgctg tatttgttca gtgactattc tcggggccct gtgtaggggg 5068

ttattgcctc tgaaatgcct cttctttatg tacaaagatt atttgcacga actggactgt 5128

gtgcaacgct ttttgggaga atgatgtccc cgttgtatgt atgagtggct tctgggagat 5188

gggtgtcact ttttaaacca ctgtatagaa ggtttttgta gcctgaatgt cttactgtga 5248

tcaattaaat ttcttaaatg aaccaatttg tctaaaaaaa aaaa 5292

<210> 2
<211> 2583
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
[0008] <222> (1)..(2583)

<400> 2

```
atg ggg ccc tgg ggc tgg aaa ttg cgc tgg acc gtc gcc ttg ctc ctc        48
Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
1               5                   10                  15

gcc gcg gcg ggg act gca gtg ggc gac aga tgt gaa aga aac gag ttc        96
Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
            20                  25                  30

cag tgc caa gac ggg aaa tgc atc tcc tac aag tgg gtc tgc gat ggc       144
Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
        35                  40                  45

agc gct gag tgc cag gat ggc tct gat gag tcc cag gag acg tgc ttg       192
Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu
    50                  55                  60

tct gtc acc tgc aaa tcc ggg gac ttc agc tgt ggg ggc cgt gtc aac       240
Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn
65                  70                  75                  80

cgc tgc att cct cag ttc tgg agg tgc gat ggc caa gtg gac tgc gac       288
Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp
                85                  90                  95

aac ggc tca gac gag caa ggc tgt ccc ccc aag acg tgc tcc cag gac       336
```

```
Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp
                100                 105                 110

gag ttt cgc tgc cac gat ggg aag tgc atc tct cgg cag ttc gtc tgt      384
Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys
        115                 120                 125

gac tca gac cgg gac tgc ttg gac ggc tca gac gag gcc tcc tgc ccg      432
Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
    130                 135                 140

gtg ctc acc tgt ggt ccc gcc agc ttc cag tgc aac agc tcc acc tgc      480
Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys
145                 150                 155                 160

atc ccc cag ctg tgg gcc tgc gac aac gac ccc gac tgc gaa gat ggc      528
Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly
                165                 170                 175

tcg gat gag tgg ccg cag cgc tgt agg ggt ctt tac gtg ttc caa ggg      576
Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly
            180                 185                 190

gac agt agc ccc tgc tcg gcc ttc gag ttc cac tgc cta agt ggc gag      624
Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu
        195                 200                 205

[0009]
tgc atc cac tcc agc tgg cgc tgt gat ggt ggc ccc gac tgc aag gac      672
Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp
    210                 215                 220

aaa tct gac gag gaa aac tgc gct gtg gcc acc tgt cgc cct gac gaa      720
Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu
225                 230                 235                 240

ttc cag tgc tct gat gga aac tgc atc cat ggc agc cgg cag tgt gac      768
Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp
                245                 250                 255

cgg gaa tat gac tgc aag gac atg agc gat gaa gtt ggc tgc gtt aat      816
Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn
            260                 265                 270

gtg aca ctc tgc gag gga ccc aac aag ttc aag tgt cac agc ggc gaa      864
Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu
        275                 280                 285

tgc atc acc ctg gac aaa gtc tgc aac atg gct aga gac tgc cgg gac      912
Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp
    290                 295                 300

tgg tca gat gaa ccc atc aaa gag tgc ggg acc aac gaa tgc ttg gac      960
Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp
305                 310                 315                 320

aac aac ggc ggc tgt tcc cac gtc tgc aat gac ctt aag atc ggc tac     1008
```

```
Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr
                325                 330                 335

gag tgc ctg tgc ccc gac ggc ttc cag ctg gtg gcc cag cga aga tgc  1056
Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys
            340                 345                 350

gaa gat atc gat gag tgt cag gat ccc gac acc tgc agc cag ctc tgc  1104
Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys
        355                 360                 365

gtg aac ctg gag ggt ggc tac aag tgc cag tgt gag gaa ggc ttc cag  1152
Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln
    370                 375                 380

ctg gac ccc cac acg aag gcc tgc aag gct gtg ggc tcc atc gcc tac  1200
Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr
385                 390                 395                 400

ctc ttc ttc acc aac cgg cac gag gtc agg aag atg acg ctg gac cgg  1248
Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg
                405                 410                 415

agc gag tac acc agc ctc atc ccc aac ctg agg aac gtg gtc gct ctg  1296
Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu
            420                 425                 430

gac acg gag gtg gcc agc aat aga atc tac tgg tct gac ctg tcc cag  1344
Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln
        435                 440                 445

aga atg atc tgc agc acc cag ctt gac aga gcc cac ggc gtc tct tcc  1392
Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser
    450                 455                 460

tat gac acc gtc atc agc agg gac atc cag gcc ccc gac ggg ctg gct  1440
Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala
465                 470                 475                 480

gtg gac tgg atc cac agc aac atc tac tgg acc gac tct gtc ctg ggc  1488
Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly
                485                 490                 495

act gtc tct gtt gcg gat acc aag ggc gtg aag agg aaa acg tta ttc  1536
Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe
            500                 505                 510

agg gag aac ggc tcc aag cca agg gcc atc gtg gtg gat cct gtt cat  1584
Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
        515                 520                 525

ggc ttc atg tac tgg act gac tgg gga act ccc gcc aag atc aag aaa  1632
Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
    530                 535                 540

ggg ggc ctg aat ggt gtg gac atc tac tcg ctg gtg act gaa aac att  1680
```

[0010]

```
Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile
545                 550                 555                 560

cag tgg ccc aat ggc atc acc cta gat ctc ctc agt ggc cgc ctc tac  1728
Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
                565                 570                 575

tgg gtt gac tcc aaa ctt cac tcc atc tca agc atc gat gtc aat ggg  1776
Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
            580                 585                 590

ggc aac cgg aag acc atc ttg gag gat gaa aag agg ctg gcc cac ccc  1824
Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro
        595                 600                 605

ttc tcc ttg gcc gtc ttt gag gac aaa gta ttt tgg aca gat atc atc  1872
Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile
    610                 615                 620

aac gaa gcc att ttc agt gcc aac cgc ctc aca ggt tcc gat gtc aac  1920
Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn
625                 630                 635                 640

ttg ttg gct gaa aac cta ctg tcc cca gag gat atg gtc ctc ttc cac  1968
Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His
                645                 650                 655

aac ctc acc cag cca aga gga gtg aac tgg tgt gag agg acc acc ctg  2016
Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
            660                 665                 670

agc aat ggc ggc tgc cag tat ctg tgc ctc cct gcc ccg cag atc aac  2064
Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
        675                 680                 685

ccc cac tcg ccc aag ttt acc tgc gcc tgc ccg gac ggc atg ctg ctg  2112
Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
    690                 695                 700

gcc agg gac atg agg agc tgc ctc aca gag gct gag gct gca gtg gcc  2160
Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
705                 710                 715                 720

acc cag gag aca tcc acc gtc agg cta aag gtc agc tcc aca gcc gta  2208
Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
                725                 730                 735

agg aca cag cac aca acc acc cgg cct gtt ccc gac acc tcc cgg ctg  2256
Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
            740                 745                 750

cct ggg gcc acc cct ggg ctc acc acg gtg gag ata gtg aca atg tct  2304
Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
        755                 760                 765

cac caa gct ctg ggc gac gtt gct ggc aga gga aat gag aag aag ccc  2352
```

[0011]

```
His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro
    770                 775                 780

agt agc gtg agg gct ctg tcc att gtc ctc ccc atc gtg ctc ctc gtc      2400
Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val
785                 790                 795                 800

ttc ctt tgc ctg ggg gtc ttc ctt cta tgg aag aac tgg cgg ctt aag      2448
Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
                805                 810                 815

aac atc aac agc atc aac ttt gac aac ccc gtc tat cag aag acc aca      2496
Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
            820                 825                 830

gag gat gag gtc cac att tgc cac aac cag gac ggc tac agc tac ccc      2544
Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro
        835                 840                 845

tcg aga cag atg gtc agt ctg gag gat gac gtg gcg tag                  2583
Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
    850                 855                 860
```

[0012]

```
<210>  3
<211>  860
<212>  PRT
<213>  智人

<400>  3

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
1               5                   10                  15

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
            20                  25                  30

Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
        35                  40                  45

Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu
    50                  55                  60

Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn
65                  70                  75                  80

Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp
                85                  90                  95

Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp
```

100 105 110

Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys
115 120 125

Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
130 135 140

Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys
145 150 155 160

Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly
165 170 175

Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly
180 185 190

Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu
195 200 205

[0013] Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp
210 215 220

Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu
225 230 235 240

Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp
245 250 255

Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn
260 265 270

Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu
275 280 285

Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp
290 295 300

Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp
305 310 315 320

Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr

325 330 335

Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys
340 345 350

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys
355 360 365

Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln
370 375 380

Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr
385 390 395 400

Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg
405 410 415

Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu
420 425 430

[0014] Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln
435 440 445

Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser
450 455 460

Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala
465 470 475 480

Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly
485 490 495

Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe
500 505 510

Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
515 520 525

Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
530 535 540

Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile

545 550 555 560

Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
565 570 575

Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
580 585 590

Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro
595 600 605

Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile
610 615 620

Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn
625 630 635 640

Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His
645 650 655

[0015] Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
660 665 670

Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
675 680 685

Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
690 695 700

Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
705 710 715 720

Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
725 730 735

Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
740 745 750

Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
755 760 765

His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro

770 775 780

Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val
785 790 795 800

Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
805 810 815

Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
820 825 830

Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro
835 840 845

Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
850 855 860

<210> 4
<211> 2583
<212> DNA
<213> 人工序列

[0016]

<220>
<223> 人工hLDLR

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2583)
<223> 人工hLDLR编码序列

<400> 4
atgggacctt ggggttggaa actccgctgg acagtggctc tgctcctggc agcagcagga 60

acagccgtgg gagatcgctg cgaaaggaac gagttccagt gccaggacgg caagtgcatc 120

agctacaagt gggtctgcga cggtagcgca gagtgtcagg acggaagcga cgaaagccag 180

gagacttgcc tgagcgtgac ttgcaagtcc ggcgacttct cttgcggagg cagagtgaac 240

cgctgcatcc ctcagttttg gcggtgcgac ggccaggtgg attgcgataa cggaagcgac 300

gagcagggtt gccctcctaa gacttgcagc caggacgaat tccgctgtca cgacggcaag 360

tgcatcagca ggcagttcgt ctgcgacagc gacagggatt gtctggacgg aagcgacgag 420

gcctcttgtc ctgtgctgac ttgtggccca gccagcttcc agtgcaactc cagcacttgc 480

atcccacagc tctgggcttg cgacaacgac ccagattgcg aggacggatc agacgagtgg 540

[0017]

```
ccacagcgct gcagaggcct gtacgtgttt cagggcgatt ccagcccttg cagcgctttt   600
gagttccact gcctgagcgg cgagtgcatt cactcttctt ggaggtgcga cggtggccca   660
gattgcaagg acaagagcga cgaggagaat tgcgccgtgg ctacttgcag accagacgaa   720
ttccagtgca gcgacggcaa ttgcatccac ggctctaggc agtgcgacag ggagtacgat   780
tgcaaggaca tgagcgacga agtcggttgc gtgaacgtca ccctctgcga gggtcccaat   840
aagttcaagt gccacagcgg cgagtgcatt accctggaca aggtctgcaa catggccagg   900
gattgccggg attggagcga cgagcctatc aaggagtgcg gcaccaacga gtgcctggat   960
aacaacggcg gctgcagcca cgtgtgcaat gacctgaaga tcggctacga gtgcctctgc  1020
ccagacggat tccagctggt ggctcagaga cgctgcgaag acatcgacga gtgccaggat  1080
cccgacactt gcagccagct gtgcgtgaat ctggagggag gctacaagtg ccagtgcgaa  1140
gagggattcc agctggaccc tcacaccaag gcttgtaaag ccgtgggcag catcgcctac  1200
ctgttcttca ccaacagaca cgaagtgcgg aagatgaccc tggatcggag cgagtacacc  1260
agcctgatcc ctaacctgcg gaacgtggtg gccctggata cagaagtggc cagcaacagg  1320
atctattgga gcgacctgag ccagcggatg atttgcagca cccagctgga cagagcccac  1380
ggagtgtcca gctacgacac cgtgatcagc agagacatcc aggctccaga cggactggca  1440
gtggattgga tccacagcaa catctactgg accgactcag tgctgggaac agtgtccgtg  1500
gccgatacaa agggcgtgaa gcggaagacc ctgttcagag agaacggcag caagcccagg  1560
gctattgtgg tggatcccgt gcacggcttc atgtattgga ccgattgggg caccccccgct  1620
aagatcaaga agggcggcct gaacggcgtg gacatctaca gcctggtgac cgagaacatc  1680
cagtggccca acggaattac cctggacctg ctgagcggca gactgtattg ggtggacagc  1740
aagctgcaca gcatcagcag catcgacgtg aacggcggaa accggaagac catcctggag  1800
gacgagaaga gactggccca ccctttcagc ctggccgtgt tcgaggacaa ggtcttctgg  1860
accgacatca tcaacgaggc catcttcagc gccaacaggc tgacaggaag cgacgtgaac  1920
ctgctggcag agaatctgct gtctcccgag gacatggtgc tgttccacaa cctgacccag  1980
cccagaggcg tcaattggtg cgagagaacc accctgagca acggaggttg ccagtacctg  2040
tgcctgccag ccctcagat taaccctcac agccccaagt tcacttgcgc ttgcccagac  2100
ggcatgctgc tggccagaga tatgcggtct tgtctgacag aagccgaagc cgctgtggct  2160
acacaggaga caagcaccgt gcggctgaag gtgtctagca cagccgtgag aacccagcac  2220
```

acaaccacca gacccgtgcc agataccagc agactgccag gagctacacc aggactgacc 2280

accgtggaga tcgtgaccat gagccaccag gctctgggag acgtggcagg aagaggaaac 2340

gagaagaagc ctagcagcgt gagagccctg tctatcgtgc tgcccatcgt gctgctggtg 2400

ttcctctgtc tgggcgtgtt cctcctctgg aagaattggc ggctgaagaa catcaacagc 2460

atcaacttcg acaaccccgt gtaccagaag accaccgagg acgaggtgca catttgccac 2520

aaccaggacg gctacagcta ccctagcagg cagatggtgt ccctggaaga cgacgtggct 2580

tga 2583

<210> 5
<211> 738
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 腺相关病毒8 vp1衣壳蛋白

<400> 5

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

[0018]

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

```
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145                 150                 155                 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
                165                 170                 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro
            180                 185                 190

Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
        195                 200                 205

Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
    210                 215                 220

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225                 230                 235                 240
```

[0019]

```
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
                245                 250                 255

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp
            260                 265                 270

Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
        275                 280                 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
    290                 295                 300

Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
305                 310                 315                 320

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
                325                 330                 335

Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
            340                 345                 350
```

```
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
        355                 360                 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
    370                 375                 380

Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
385                 390                 395                 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr
                405                 410                 415

Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
            420                 425                 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
        435                 440                 445

Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly
    450                 455                 460
```

[0020]

```
Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp
465                 470                 475                 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly
                485                 490                 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His
            500                 505                 510

Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr
        515                 520                 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile
    530                 535                 540

Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val
545                 550                 555                 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
                565                 570                 575
```

Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala
580 585 590

Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
595 600 605

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
610 615 620

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625 630 635 640

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe
660 665 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
675 680 685

[0021]

Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
705 710 715 720

Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
725 730 735

Asn Leu

<210> 6
<211> 6768
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAV.TBG.PI.hLDLRco.RGB

<220>
<221> 重复区

<222> (1)..(130)
<223> 5’ ITR

<220>
<221> 增强子
<222> (221)..(320)
<223> Alpha mic/bik

<220>
<221> 增强子
<222> (327)..(426)
<223> α mic/bik

<220>
<221> 启动子
<222> (442)..(901)
<223> TBG

<220>
<221> TATA_信号
<222> (885)..(888)
<223> TATA

<220>
<221> CDS
<222> (969)..(3551)
<223> 密码子优化的hLDLR

[0022]

<220>
<221> polyA_信号
<222> (3603)..(3729)
<223> 兔珠蛋白poly A

<220>
<221> 重复区
<222> (3818)..(3947)
<223> 3’ ITR

<220>
<221> 复制起点
<222> (4124)..(4579)
<223> f1 ori

<220>
<221> misc_feature
<222> (4710)..(5567)
<223> AP(R)

<220>
<221> 复制起点
<222> (5741)..(6329)
<223> 复制起点

<400> 6
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg 180

atcctctaga actatagcta gaattcgccc ttaagctagc aggttaattt ttaaaaagca 240

gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggttaataat 300

ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa aaagcagtca aaagtccaag 360

tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt aataatctca ggagcacaaa 420

cattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctacctttg acatcatttc ctctgcgaat 480

gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc ttttgtacaa 540

ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc caatagtgag aacttttcc 600

tgctgcctct tggtgctttt gcctatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactcttgcc 660

agcatggact taaacccctc cagctctgac aatcctcttt ctcttttgtt ttacatgaag 720

ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta tcatttttg ctttgttcct 780

cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc ccagggttaa tgctggggtt 840

aatttataac taagagtgct ctagttttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaaga 900

[0023] tgttgctttc tgagagacag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaat tgctaacgca 960

gacgttgc atg gga cct tgg ggt tgg aaa ctc cgc tgg aca gtg gct ctg 1010
Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu
1 5 10

ctc ctg gca gca gca gga aca gcc gtg gga gat cgc tgc gaa agg aac 1058
Leu Leu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn
15 20 25 30

gag ttc cag tgc cag gac ggc aag tgc atc agc tac aag tgg gtc tgc 1106
Glu Phe Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys
35 40 45

gac ggt agc gca gag tgt cag gac gga agc gac gaa agc cag gag act 1154
Asp Gly Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr
50 55 60

tgc ctg agc gtg act tgc aag tcc ggc gac ttc tct tgc gga ggc aga 1202
Cys Leu Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg
65 70 75

gtg aac cgc tgc atc cct cag ttt tgg cgg tgc gac ggc cag gtg gat 1250
Val Asn Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp
80 85 90

tgc gat aac gga agc gac gag cag ggt tgc cct cct aag act tgc agc 1298
Cys Asp Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser

95 100 105 110

cag gac gaa ttc cgc tgt cac gac ggc aag tgc atc agc agg cag ttc 1346
Gln Asp Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe
115 120 125

gtc tgc gac agc gac agg gat tgt ctg gac gga agc gac gag gcc tct 1394
Val Cys Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser
130 135 140

tgt cct gtg ctg act tgt ggc cca gcc agc ttc cag tgc aac tcc agc 1442
Cys Pro Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser
145 150 155

act tgc atc cca cag ctc tgg gct tgc gac aac gac cca gat tgc gag 1490
Thr Cys Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu
160 165 170

gac gga tca gac gag tgg cca cag cgc tgc aga ggc ctg tac gtg ttt 1538
Asp Gly Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe
175 180 185 190

cag ggc gat tcc agc cct tgc agc gct ttt gag ttc cac tgc ctg agc 1586
Gln Gly Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser
195 200 205

[0024]

ggc gag tgc att cac tct tct tgg agg tgc gac ggt ggc cca gat tgc 1634
Gly Glu Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys
210 215 220

aag gac aag agc gac gag gag aat tgc gcc gtg gct act tgc aga cca 1682
Lys Asp Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro
225 230 235

gac gaa ttc cag tgc agc gac ggc aat tgc atc cac ggc tct agg cag 1730
Asp Glu Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln
240 245 250

tgc gac agg gag tac gat tgc aag gac atg agc gac gaa gtc ggt tgc 1778
Cys Asp Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys
255 260 265 270

gtg aac gtc acc ctc tgc gag ggt ccc aat aag ttc aag tgc cac agc 1826
Val Asn Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser
275 280 285

ggc gag tgc att acc ctg gac aag gtc tgc aac atg gcc agg gat tgc 1874
Gly Glu Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys
290 295 300

cgg gat tgg agc gac gag cct atc aag gag tgc ggc acc aac gag tgc 1922
Arg Asp Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys
305 310 315

ctg gat aac aac ggc ggc tgc agc cac gtg tgc aat gac ctg aag atc 1970
Leu Asp Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile

320 325 330

ggc tac gag tgc ctc tgc cca gac gga ttc cag ctg gtg gct cag aga 2018
Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg
335 340 345 350

cgc tgc gaa gac atc gac gag tgc cag gat ccc gac act tgc agc cag 2066
Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln
355 360 365

ctg tgc gtg aat ctg gag gga ggc tac aag tgc cag tgc gaa gag gga 2114
Leu Cys Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly
370 375 380

ttc cag ctg gac cct cac acc aag gct tgt aaa gcc gtg ggc agc atc 2162
Phe Gln Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile
385 390 395

gcc tac ctg ttc ttc acc aac aga cac gaa gtg cgg aag atg acc ctg 2210
Ala Tyr Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu
400 405 410

gat cgg agc gag tac acc agc ctg atc cct aac ctg cgg aac gtg gtg 2258
Asp Arg Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val
415 420 425 430

gcc ctg gat aca gaa gtg gcc agc aac agg atc tat tgg agc gac ctg 2306
Ala Leu Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu
435 440 445

[0025]

agc cag cgg atg att tgc agc acc cag ctg gac aga gcc cac gga gtg 2354
Ser Gln Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val
450 455 460

tcc agc tac gac acc gtg atc agc aga gac atc cag gct cca gac gga 2402
Ser Ser Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly
465 470 475

ctg gca gtg gat tgg atc cac agc aac atc tac tgg acc gac tca gtg 2450
Leu Ala Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val
480 485 490

ctg gga aca gtg tcc gtg gcc gat aca aag ggc gtg aag cgg aag acc 2498
Leu Gly Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr
495 500 505 510

ctg ttc aga gag aac ggc agc aag ccc agg gct att gtg gtg gat ccc 2546
Leu Phe Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro
515 520 525

gtg cac ggc ttc atg tat tgg acc gat tgg ggc acc ccc gct aag atc 2594
Val His Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile
530 535 540

aag aag ggc ggc ctg aac ggc gtg gac atc tac agc ctg gtg acc gag 2642
Lys Lys Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu

```
          545                 550                 555

aac atc cag tgg ccc aac gga att acc ctg gac ctg ctg agc ggc aga      2690
Asn Ile Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg
    560                 565                 570

ctg tat tgg gtg gac agc aag ctg cac agc atc agc agc atc gac gtg      2738
Leu Tyr Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val
575                 580                 585                 590

aac ggc gga aac cgg aag acc atc ctg gag gac gag aag aga ctg gcc      2786
Asn Gly Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala
                595                 600                 605

cac cct ttc agc ctg gcc gtg ttc gag gac aag gtc ttc tgg acc gac      2834
His Pro Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp
            610                 615                 620

atc atc aac gag gcc atc ttc agc gcc aac agg ctg aca gga agc gac      2882
Ile Ile Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp
        625                 630                 635

gtg aac ctg ctg gca gag aat ctg ctg tct ccc gag gac atg gtg ctg      2930
Val Asn Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu
    640                 645                 650

ttc cac aac ctg acc cag ccc aga ggc gtc aat tgg tgc gag aga acc      2978
Phe His Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr
655                 660                 665                 670

acc ctg agc aac gga ggt tgc cag tac ctg tgc ctg cca gcc cct cag      3026
Thr Leu Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln
                675                 680                 685

att aac cct cac agc ccc aag ttc act tgc gct tgc cca gac ggc atg      3074
Ile Asn Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met
            690                 695                 700

ctg ctg gcc aga gat atg cgg tct tgt ctg aca gaa gcc gaa gcc gct      3122
Leu Leu Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala
        705                 710                 715

gtg gct aca cag gag aca agc acc gtg cgg ctg aag gtg tct agc aca      3170
Val Ala Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr
    720                 725                 730

gcc gtg aga acc cag cac aca acc acc aga ccc gtg cca gat acc agc      3218
Ala Val Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser
735                 740                 745                 750

aga ctg cca gga gct aca cca gga ctg acc acc gtg gag atc gtg acc      3266
Arg Leu Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr
                755                 760                 765

atg agc cac cag gct ctg gga gac gtg gca gga aga gga aac gag aag      3314
Met Ser His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys
```

[0026]

```
                770                 775                 780

aag cct agc agc gtg aga gcc ctg tct atc gtg ctg ccc atc gtg ctg      3362
Lys Pro Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu
        785                 790                 795

ctg gtg ttc ctc tgt ctg ggc gtg ttc ctc ctc tgg aag aat tgg cgg      3410
Leu Val Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg
    800                 805                 810

ctg aag aac atc aac agc atc aac ttc gac aac ccc gtg tac cag aag      3458
Leu Lys Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys
815                 820                 825                 830

acc acc gag gac gag gtg cac att tgc cac aac cag gac ggc tac agc      3506
Thr Thr Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser
                835                 840                 845

tac cct agc agg cag atg gtg tcc ctg gaa gac gac gtg gct tga          3551
Tyr Pro Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
            850                 855                 860

taagtcgacc cgggcggcct cgaggacggg gtgaactacg cctgaggatc cgatcttttt     3611

ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagcccctg agcatctgac ttctggctaa     3671

taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt ttttgtgtct ctcactcgga     3731

agcaattcgt tgatctgaat ttcgaccacc cataataccc attaccctgg tagataagta     3791

gcatggcggg ttaatcatta actacaagga acccctagtg atggagttgg ccactccctc     3851

tctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgac gcccgggctt     3911

tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagcctt aattaaccta attcactggc     3971

cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc     4031

agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc     4091

ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg ggacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc     4151

ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc tagcgcccgc     4211

tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct     4271

aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa     4331

acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc     4391

tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact     4451

caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt cggcctattg     4511

gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgct     4571
```

[0027]

[0028]

tacaatttag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc 4631

taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 4691

tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 4751

gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 4811

gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc 4871

cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 4931

tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 4991

tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 5051

atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 5111

ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg ctttttttgca caacatgggg 5171

gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 5231

gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc 5291

gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 5351

gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga 5411

gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 5471

cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 5531

atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 5591

tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 5651

ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca 5711

gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc 5771

tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta 5831

ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgttctt 5891

ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc 5951

gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg 6011

ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt cgggctgaac gggggttcg 6071

tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 6131

ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc 6191

agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 6251

agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg 6311

gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc 6371

tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt 6431

accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca 6491

gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg 6551

attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac 6611

gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg 6671

gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac 6731

catgattacg ccagatttaa ttaaggcctt aattagg 6768

<210> 7
<211> 860
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

[0029] <400> 7

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
35 40 45

Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu
50 55 60

Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn
65 70 75 80

Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp
85 90 95

Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp
100 105 110

Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys
115 120 125

Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
130 135 140

Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys
145 150 155 160

Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly
165 170 175

Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly
180 185 190

Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu
195 200 205

Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp
210 215 220

[0030]

Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu
225 230 235 240

Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp
245 250 255

Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn
260 265 270

Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu
275 280 285

Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp
290 295 300

Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp
305 310 315 320

Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr
325 330 335

Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys
340 345 350

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys
355 360 365

Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln
370 375 380

Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr
385 390 395 400

Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg
405 410 415

Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu
420 425 430

Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln
435 440 445

[0031]

Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser
450 455 460

Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala
465 470 475 480

Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly
485 490 495

Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe
500 505 510

Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
515 520 525

Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
530 535 540

Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile
545 550 555 560

Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
565 570 575

Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
580 585 590

Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro
595 600 605

Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile
610 615 620

Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn
625 630 635 640

Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His
645 650 655

Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
660 665 670

[0032]

Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
675 680 685

Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
690 695 700

Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
705 710 715 720

Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
725 730 735

Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
740 745 750

Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
755 760 765

His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro
770 775 780

Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val
785 790 795 800

Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
805 810 815

[0033]

Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
820 825 830

Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro
835 840 845

Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
850 855 860

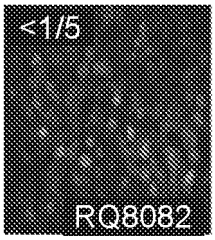


图 1A

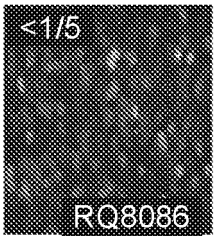


图 1B

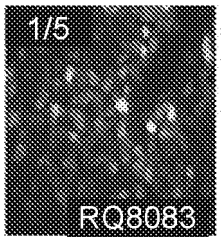


图 1C

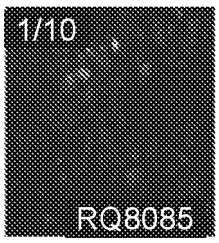


图 1D

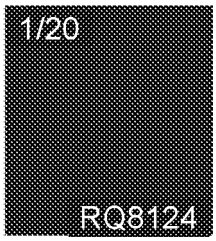

1/20
RQ8124

图 1E

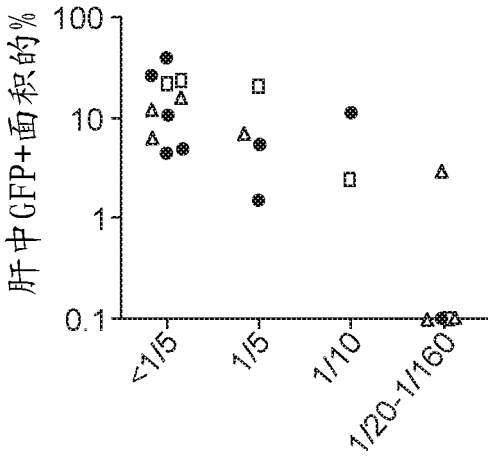

肝中GFP+面积的%
100
10
1
0.1
<1/5
1/5
1/10
1/20-1/160

图 1F

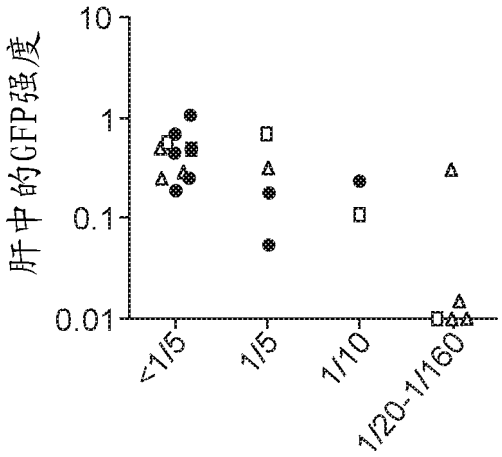

肝中的GFP强度
10
1
0.1
0.01
<1/5
1/5
1/10
1/20-1/160

图 1G

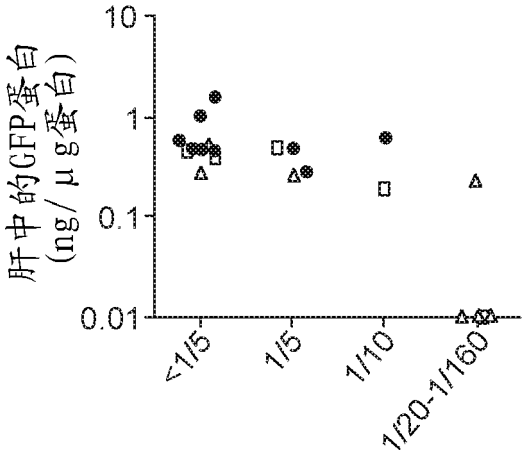

肝中的GFP蛋白
(ng/μg蛋白)
10
1
0.1
0.01
<1/5
1/5
1/10
1/20-1/160

图 1H

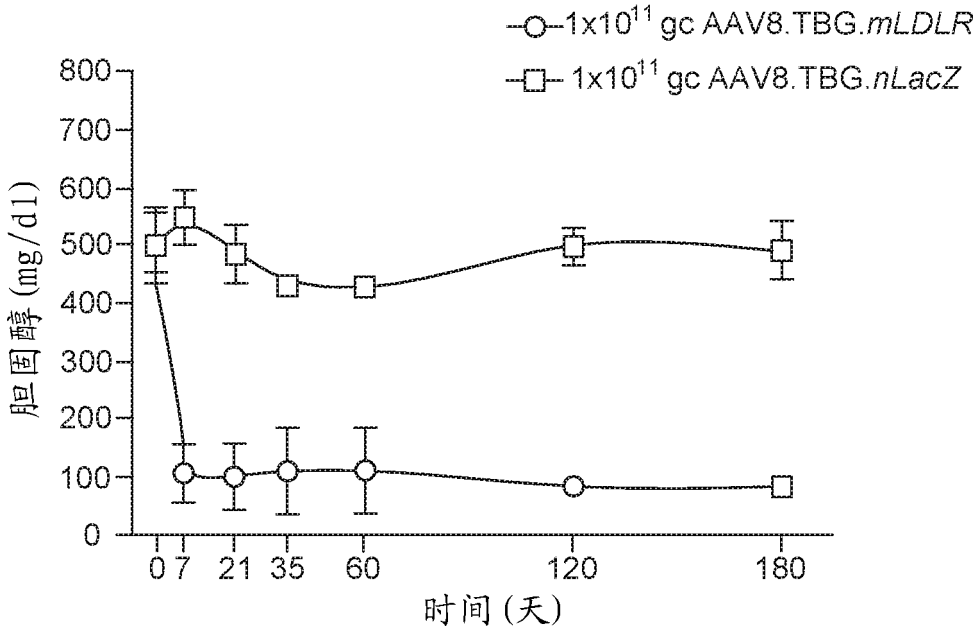

1x10^11 gc AAV8.TBG.mLDLR
1x10^11 gc AAV8.TBG.nLacZ
胆固醇(mg/dl)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 7 21 35 60 120 180
时间(天)

图 2

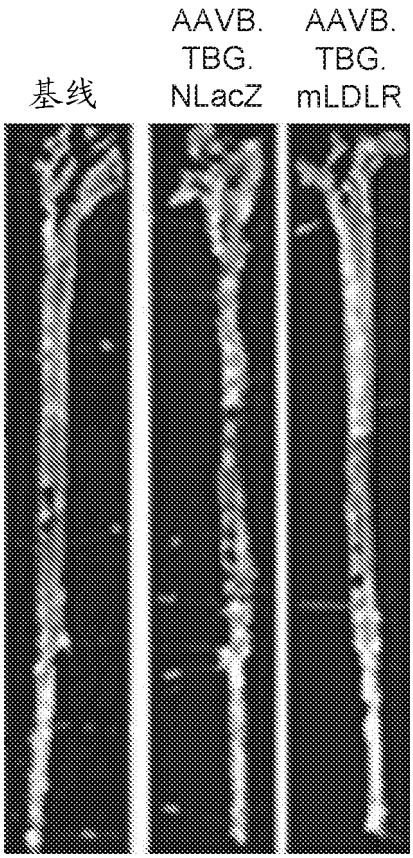

基线
AAVB.
TBG.
NLacZ
AAVB.
TBG.
mLDLR

图 3A

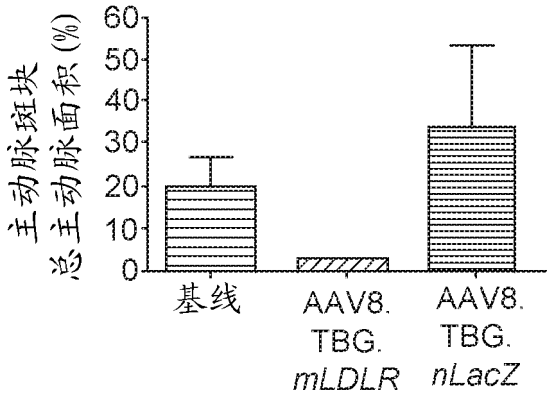

主动脉斑块
总主动脉面积 (%)
60
50
40
30
20
10
0
基线
AAV8.
TBG.
mLDLR
AAV8.
TBG.
nLacZ

图 3B

基线



图 3C

nLacZ



图 3D

mLDLR



图 3E

基线



图 3F

nLacZ



图 3G

mLDLR



图 3H

基线

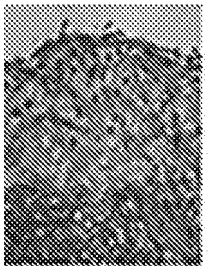


图 3I

nLacZ



图 3J

mLDLR



图 3K

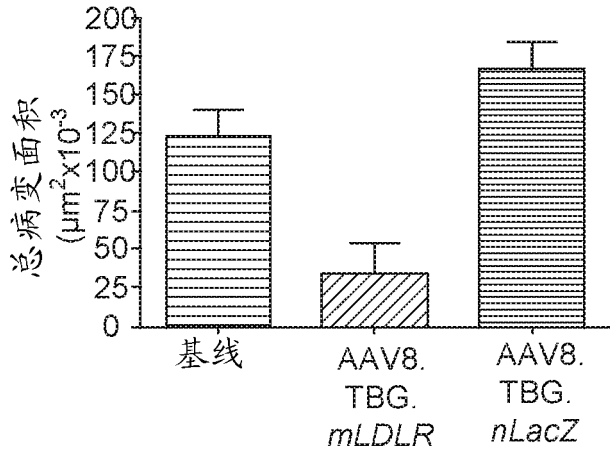

总病变面积
(μm²x10⁻³
200
175
150
125
100
75
50
25
0
基线
AAV8.
TBG.
mLDLR
AAV8.
TBG.
nLacZ

图 3L

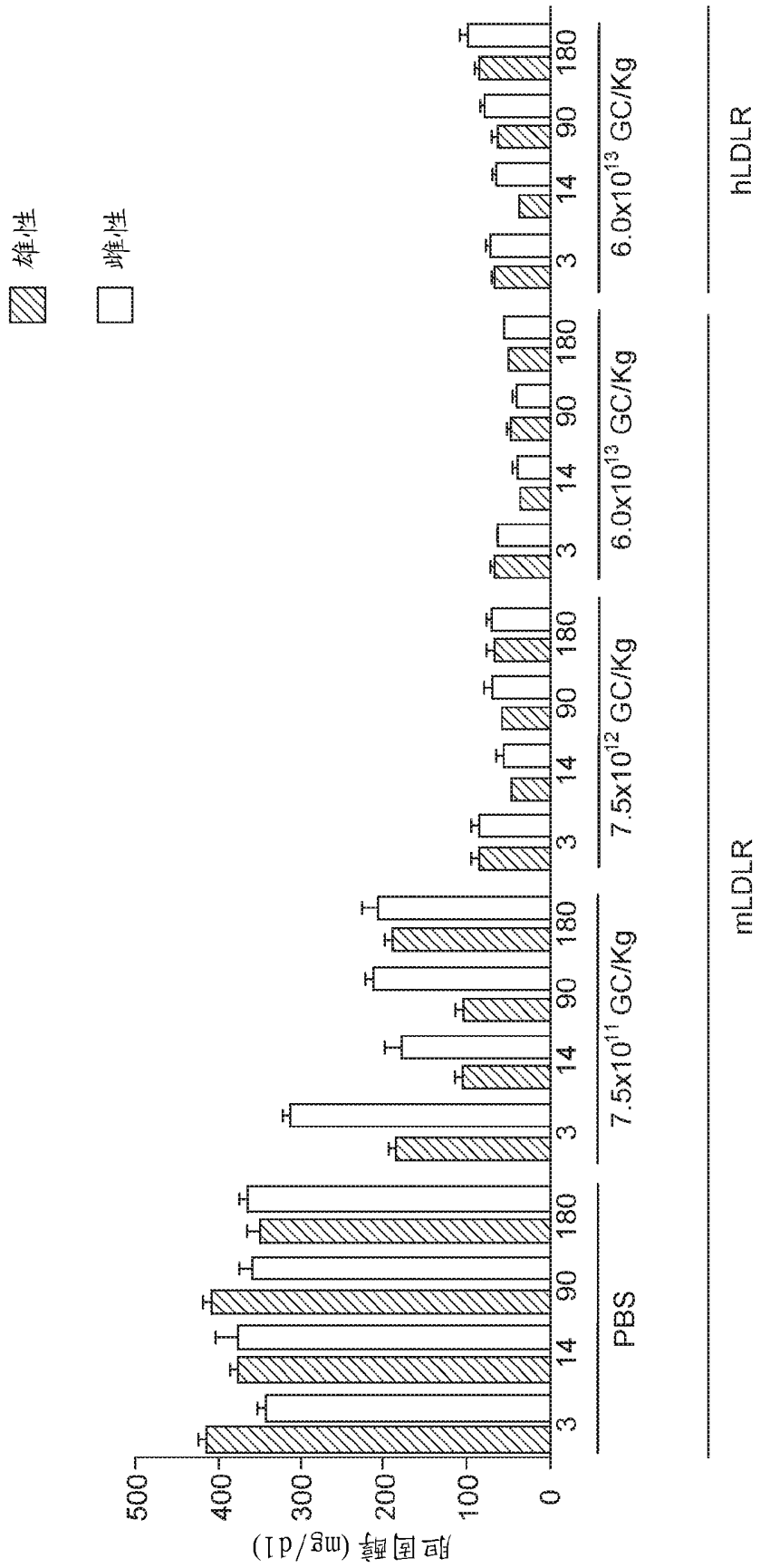

雄性
雌性
胆固醇 (mg/dl)
500
400
300
200
100
0
3
14
90
180
PBS
7.5x10^11 GC/Kg
7.5x10^12 GC/Kg
6.0x10^13 GC/Kg
mLDLR
hLDLR

图 4

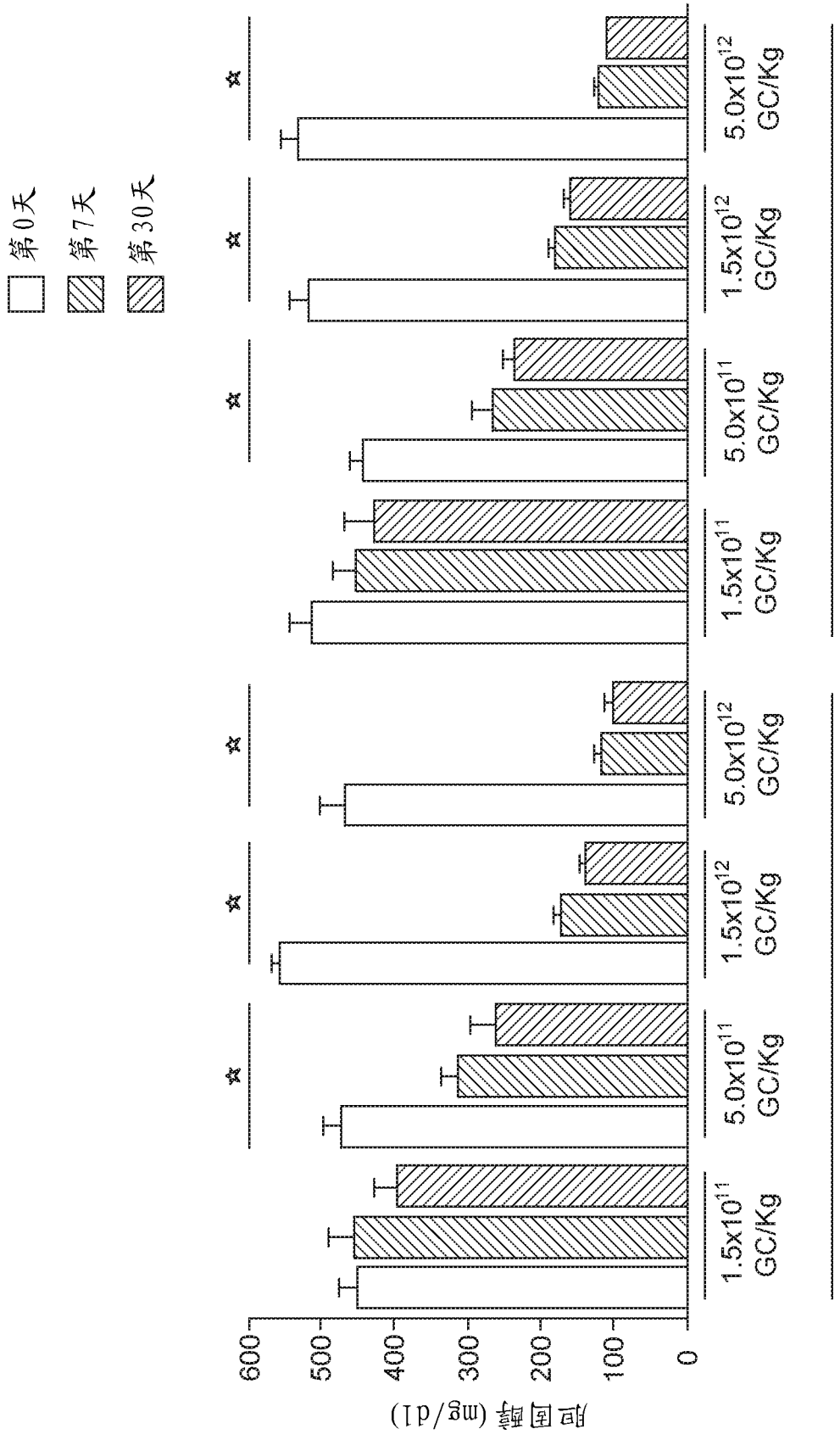

第0天
第7天
第30天
胆固醇 (mg/dl)
600
500
400
300
200
100
0
1.5x10^11 GC/Kg
5.0x10^11 GC/Kg
1.5x10^12 GC/Kg
5.0x10^12 GC/Kg
1.5x10^11 GC/Kg
5.0x10^11 GC/Kg
1.5x10^12 GC/Kg
5.0x10^12 GC/Kg

图 5

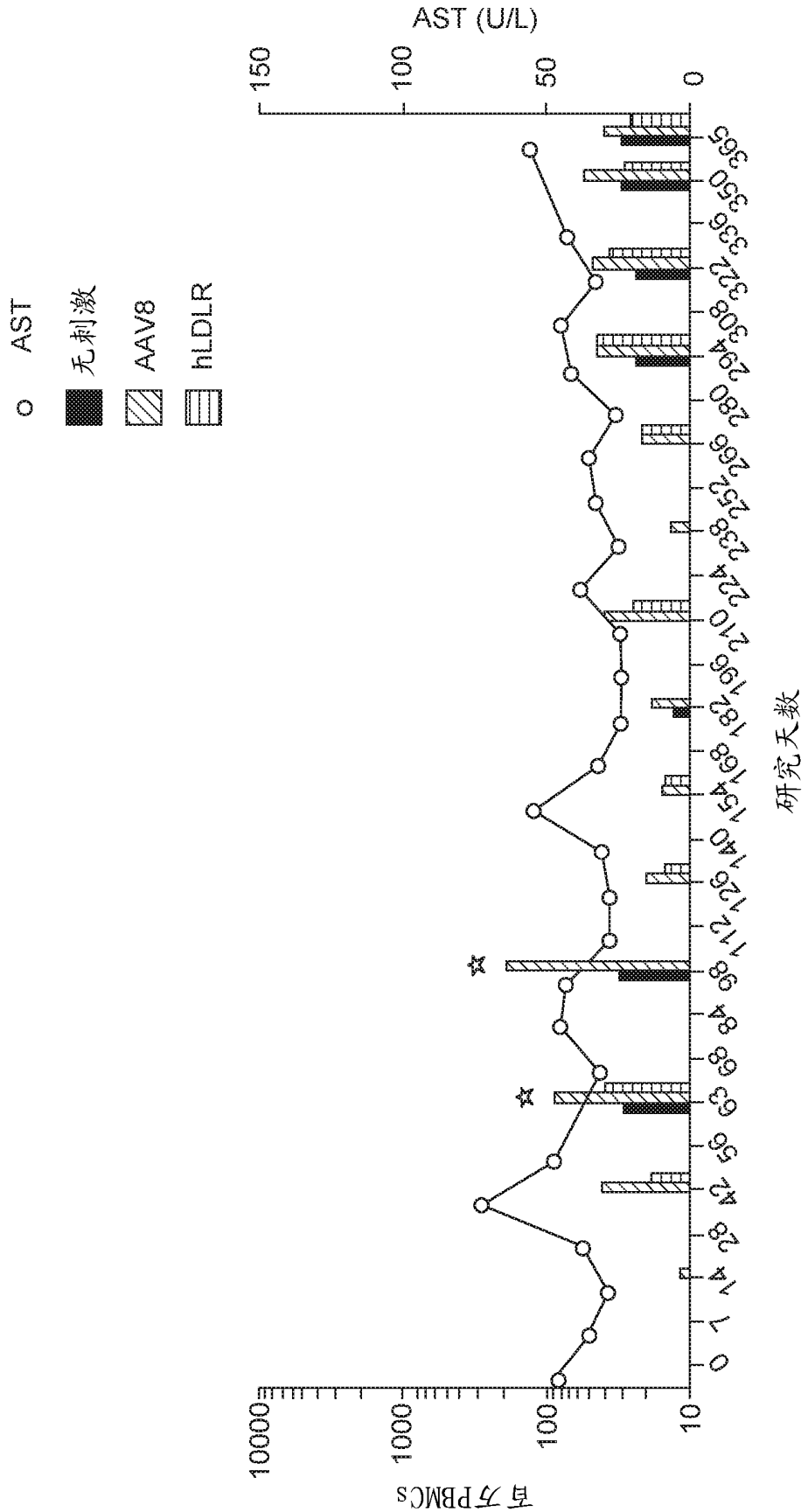

AST (U/L)
150
100
50
0
AST
无刺激
AAV8
hLDLR
10000
1000
100
10
百万PBMCs
0
7
14
28
42
56
63
70
84
98
112
126
140
154
168
182
196
210
224
238
252
266
280
294
308
322
336
350
365
研究天数

图 6A

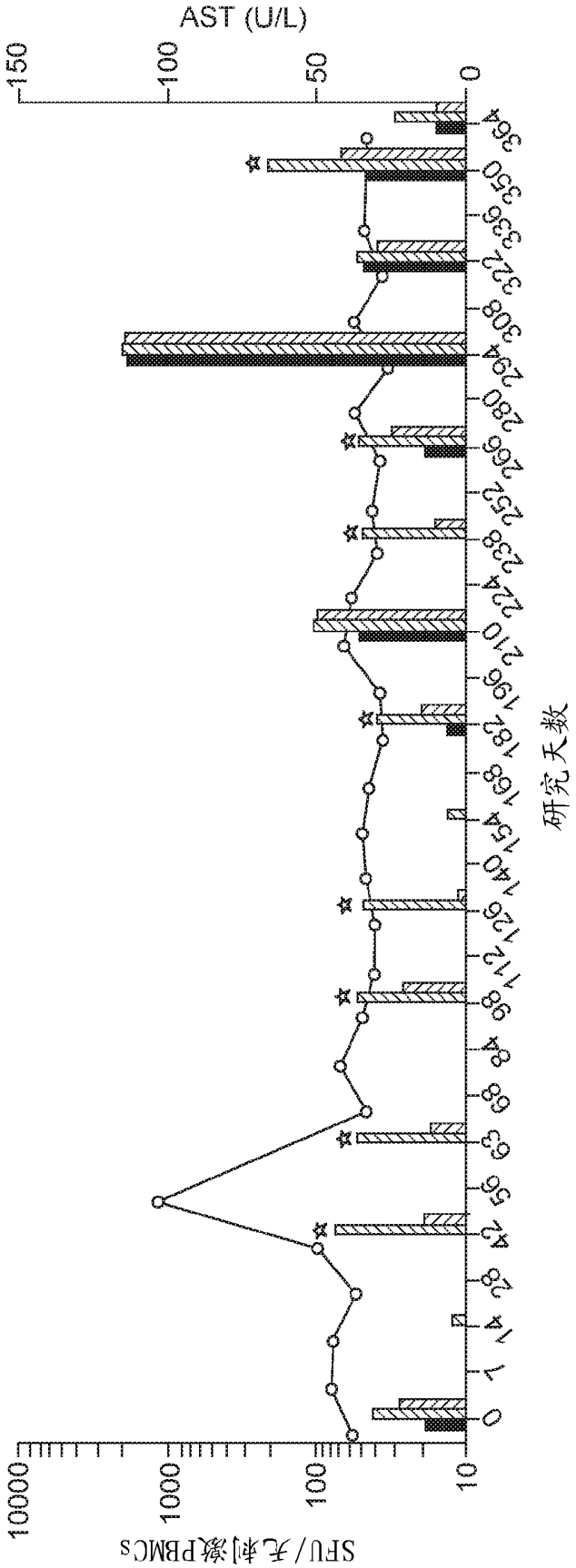

AST (U/L)
150
100
50
0
0
7
14
28
42
56
63
68
84
98
112
126
140
154
168
182
196
210
224
238
252
266
280
294
308
322
336
350
364
研究天数
10000
1000
100
10
SFU/无刺激PBMCs

图 6B

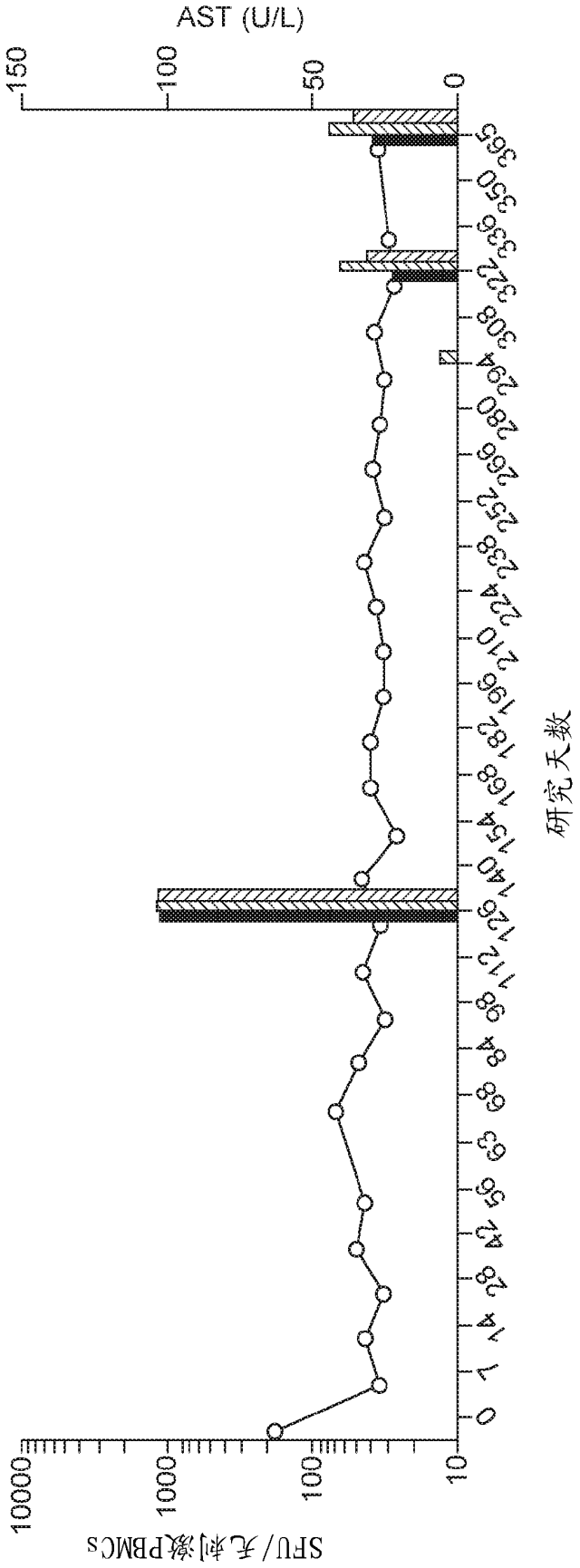

AST (U/L)
150
100
50
0
0
1
14
28
42
56
63
68
84
98
112
126
140
154
168
182
196
210
224
238
252
266
280
294
308
322
336
350
365
研究天数
10000
1000
100
10
SFU/无刺激PBMCs

图 6C

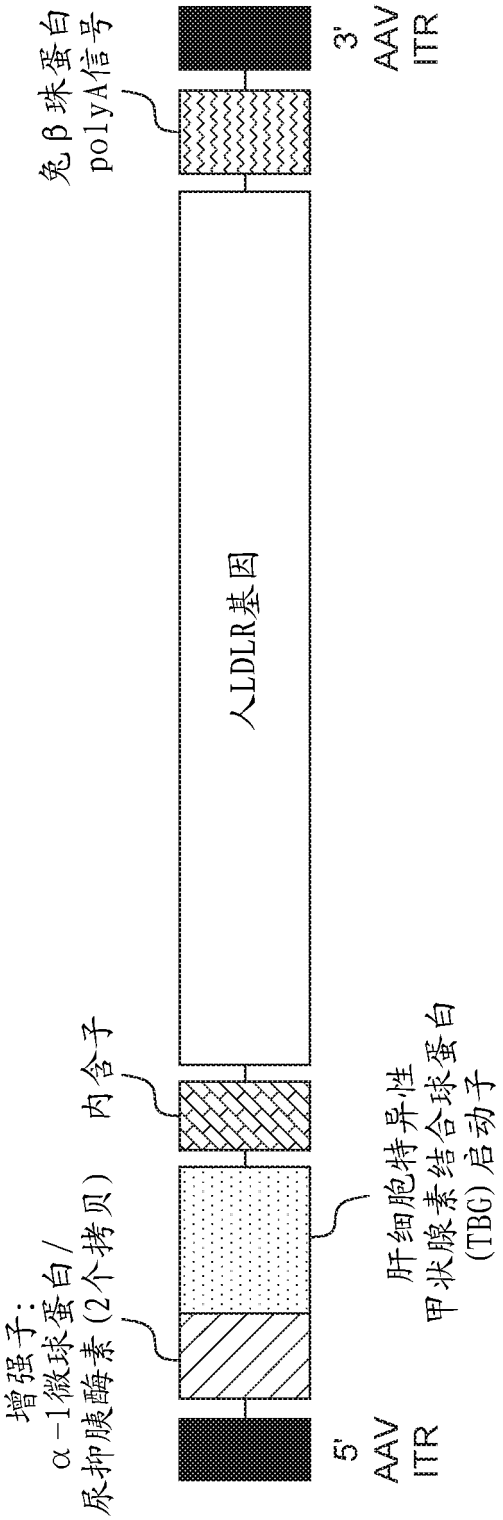

增强子:
α-1微球蛋白/
尿抑胰酶素(2个拷贝)
内含子
肝细胞特异性
甲状腺素结合球蛋白
(TBG)启动子
人LDLR基因
兔β珠蛋白
polyA信号
5'
AAV
ITR
3'
AAV
ITR

图 7

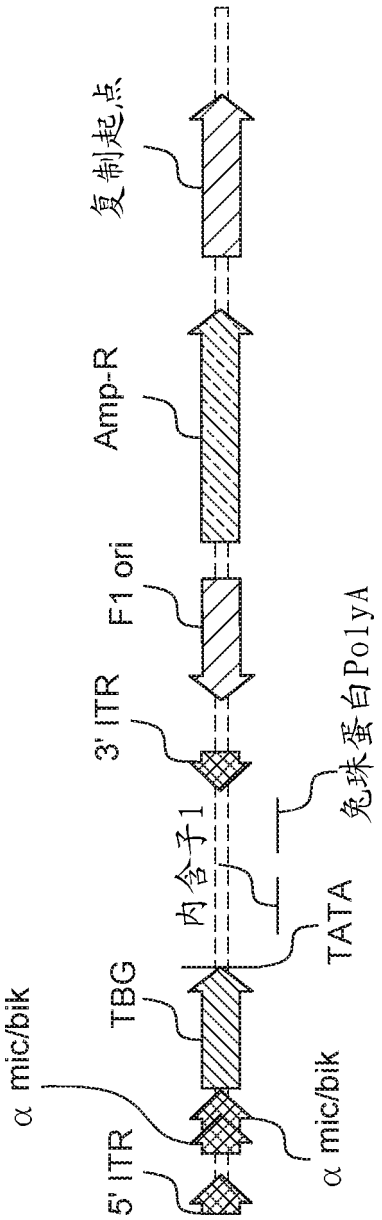

复制起点
Amp-R
F1 ori
3' ITR
兔珠蛋白PolyA
内含子1
TATA
TBG
α mic/bik
5' ITR
α mic/bik

图 8A

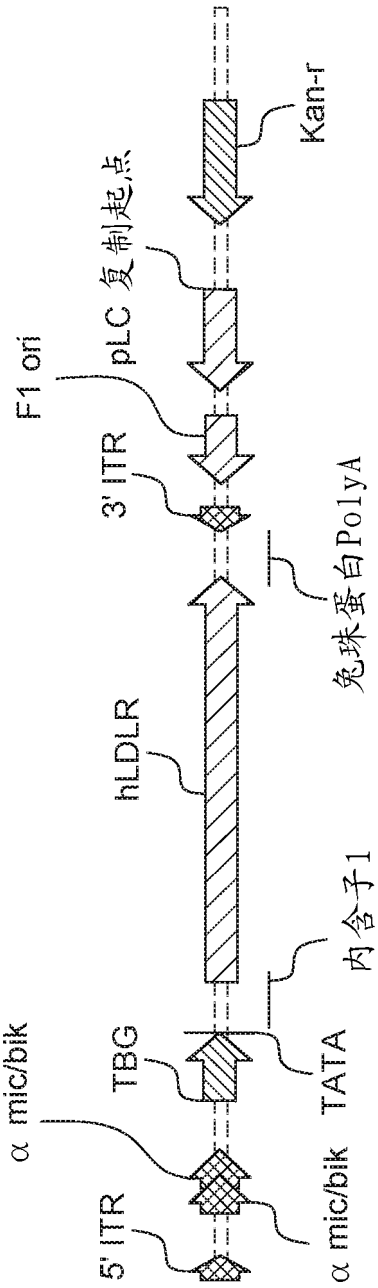

Kan-r
pLC 复制起点
F1 ori
3' ITR
兔珠蛋白PolyA
hLDLR
内含子1
TATA
TBG
α mic/bik
α mic/bik
5' ITR

图 8B

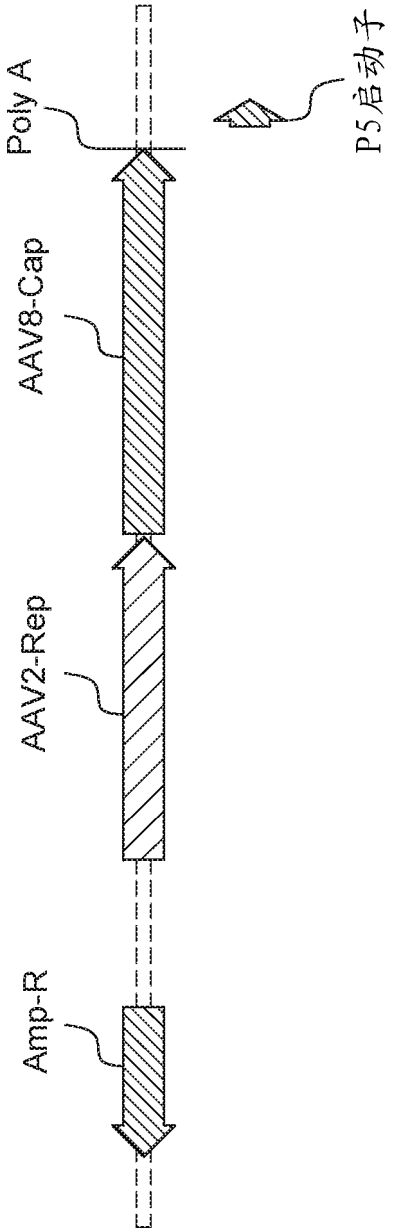


图 9A

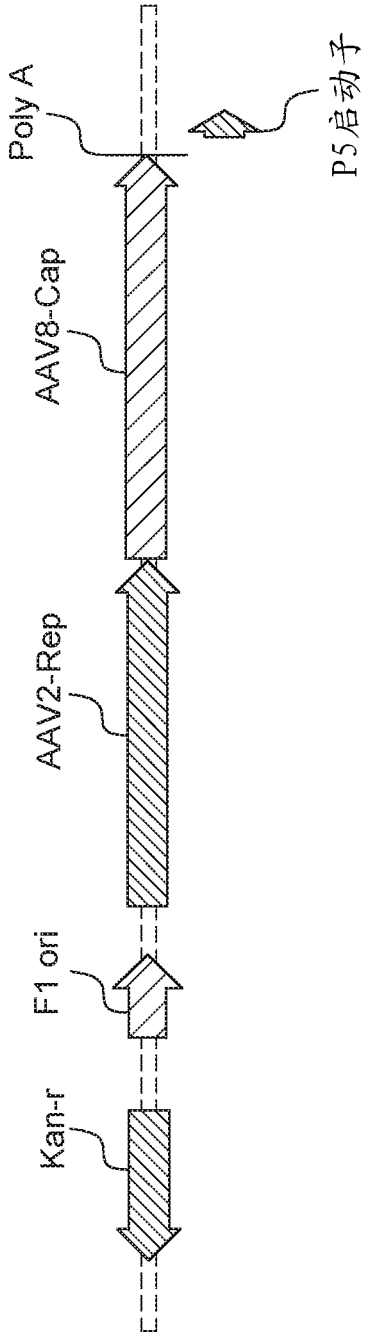


图 9B

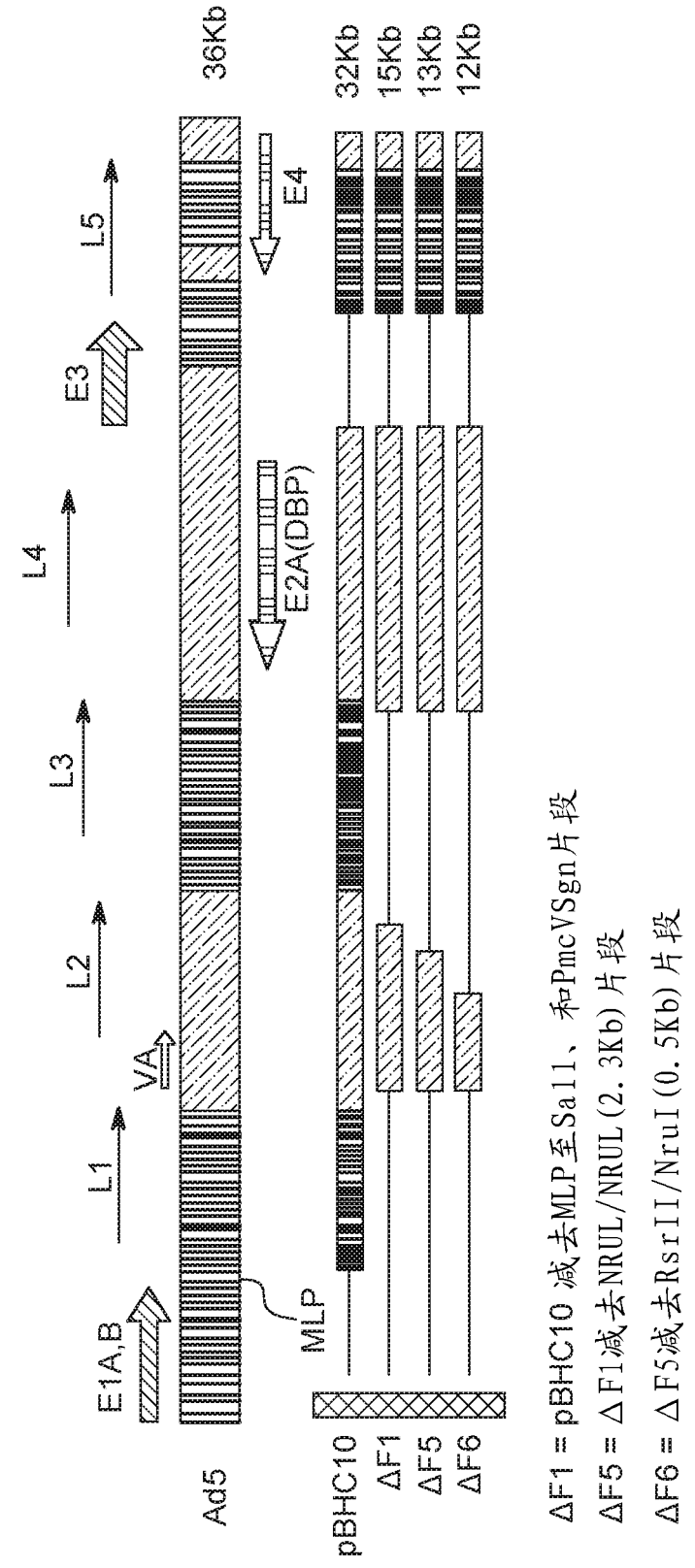

36Kb
32Kb
15Kb
13Kb
12Kb
E4
L5
E3
L4
E2A(DBP)
L3
L2
VA
L1
E1A,B
MLP
Ad5
pBHC10
ΔF1
ΔF5
ΔF6
ΔF1 = pBHC10 减去MLP至Sal1、和PmcVSgn片段
ΔF5 = ΔF1减去NRUL/NRUL(2.3Kb)片段
ΔF6 = ΔF5减去RsrII/NruI(0.5Kb)片段

图 10A

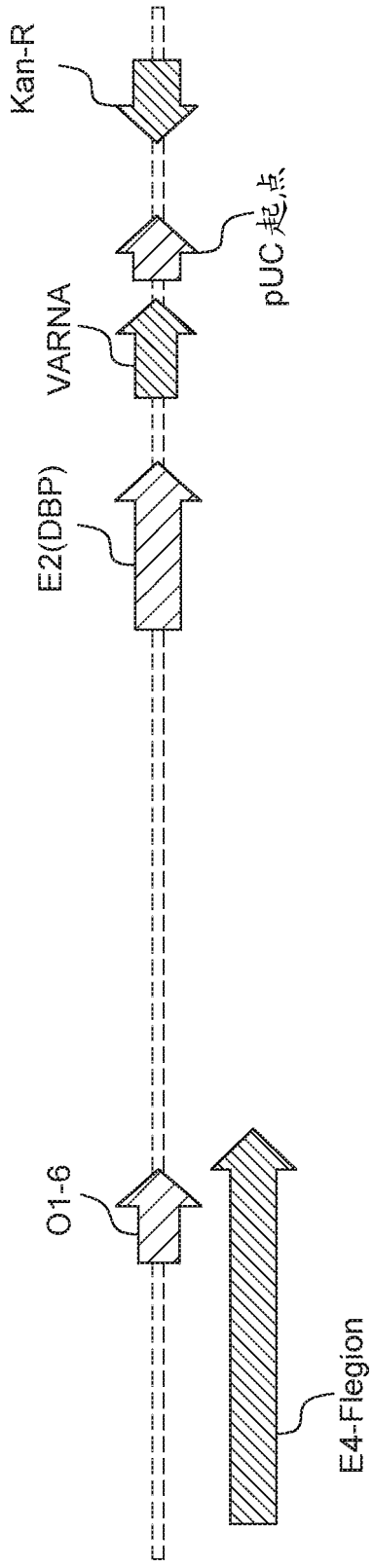


图 10B

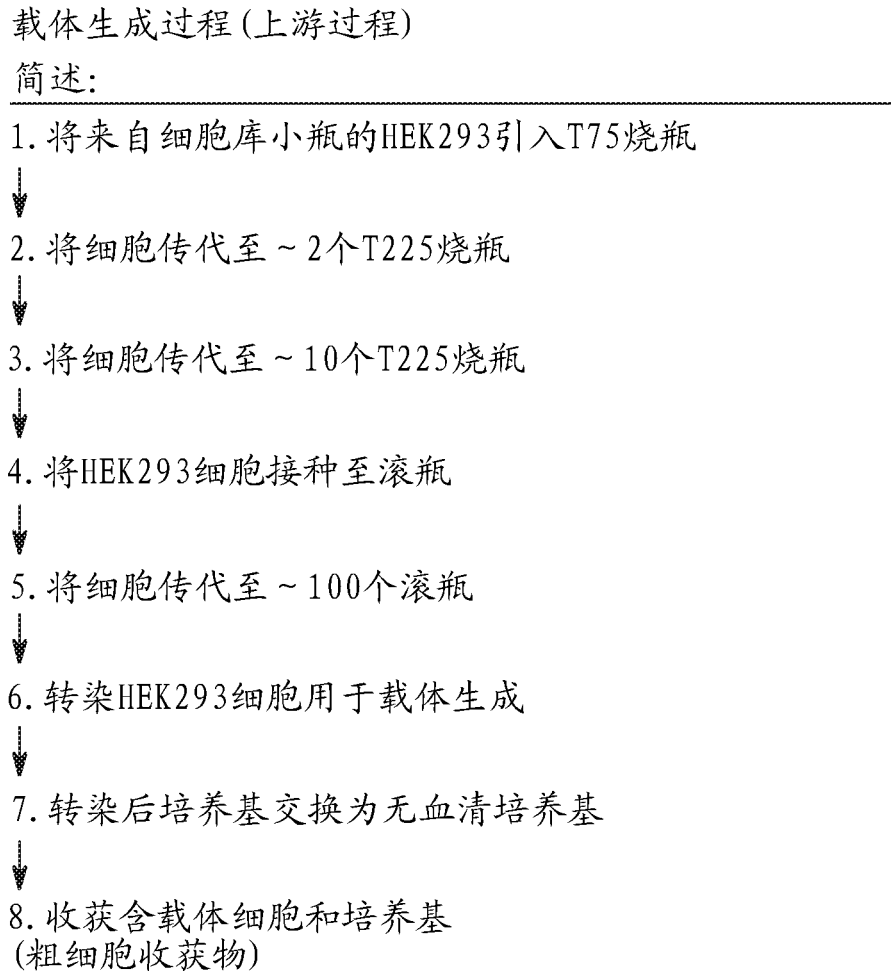

载体生成过程(上游过程)
简述:
1.将来自细胞库小瓶的HEK293引入T75烧瓶
2.将细胞传代至~2个T225烧瓶
3.将细胞传代至~10个T225烧瓶
4.将HEK293细胞接种至滚瓶
5.将细胞传代至~100个滚瓶
6.转染HEK293细胞用于载体生成
7.转染后培养基交换为无血清培养基
8.收获含载体细胞和培养基
(粗细胞收获物)

图 11A

载体生成过程(下游过程)

简述:

9.AAV8载体收获物浓缩和通过TFF渗滤

↓

10.收获物的微流化和核酸酶消化

↓

11.经微流化的中间体的过滤(最终0.2m)

↓

12.通过离子交换色谱的AAV8载体纯化

↓

13.通过梯度超速离心的AAV8载体纯化

↓

14.通过切向流的缓冲液交换以制备原料载体

↓

15.配制和0.2 m过滤以制备原料载体

载体纯化过程(下游过程)

简述:

16.最终载体产物填充和完成

图 11B