



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108220246 B

(45) 授权公告日 2022.07.12

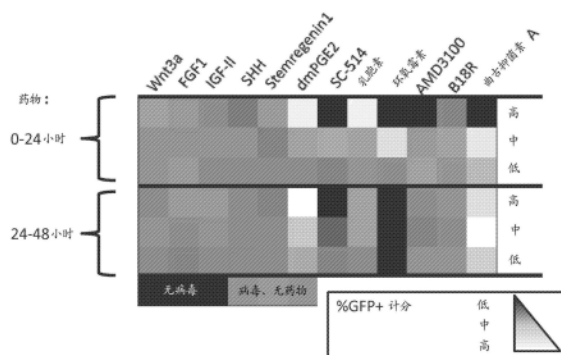
(21) 申请号 201810168851.5	CN 107630001 A, 2018.01.26
(22) 申请日 2012.09.28	CN 108379292 A, 2018.08.10
(65) 同一申请的已公布的文献号	CN 102245758 A, 2011.11.16
申请公布号 CN 108220246 A	CN 108713059 A, 2018.10.26
(43) 申请公布日 2018.06.29	CN 108883136 A, 2018.11.23
(30) 优先权数据	CN 106062201 A, 2016.10.26
61/541,736 2011.09.30 US	CN 110769860 A, 2020.02.07
(62) 分案原申请数据	CN 105358679 A, 2016.02.24
201280056851.7 2012.09.28	CN 103958667 A, 2014.07.30
(73) 专利权人 蓝鸟生物公司	CN 103937743 A, 2014.07.23
地址 美国马萨诸塞州剑桥宾尼街60号	CN 108135935 A, 2018.06.08
(72) 发明人 加勒特·科林斯·赫夫纳	CN 107523587 A, 2017.12.29
亚伯拉罕·艾萨克·巴桑	WO 2010054271 A1, 2010.05.14
(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理	CN 110769860 A, 2020.02.07
有限责任公司 11204	FR 3074189 A1, 2019.05.31
专利代理师 王达佐 洪欣	WO 2016210292 A1, 2016.12.29
(51) Int. Cl.	WO 2017139576 A1, 2017.08.17
C12N 5/10 (2006.01)	WO 2014026110 A3, 2014.04.10
C12N 15/867 (2006.01)	WO 2014015318 A1, 2014.01.23
A61K 35/28 (2015.01)	WO 2018193118 A1, 2018.10.25
A61P 7/06 (2006.01)	(续)
A61P 7/00 (2006.01)	审查员 李非儿
A61P 5/38 (2006.01)	
(56) 对比文件	
WO 2011060381 A1, 2011.05.19	权利要求书2页 说明书46页
AU 2009313290 A1, 2010.05.14	序列表13页 附图1页

(54) 发明名称

用于改善病毒转导的化合物

(57) 摘要

本发明提供了提高细胞的病毒转导效力的方法和组合物。更具体地,本发明提供了可用于安全且可靠地提高使用病毒和/或病毒载体转导细胞如造血干细胞(HSC)的方法的效率的方法和材料。所述组合物和方法可用于响应于造血干细胞基因疗法治疗的治疗适应证。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Gustavo Mostoslavsky等.Efficiency of transduction of highly purified murine hematopoietic stem cells by lentiviral and oncoretroviral vectors under conditions of minimal in vitro manipulation.《Molecular therapy》.2005,第11卷(第6期),第932-40页.

Pavan Reddy等.Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia

effect.《Proc Natl Acad Sci U S A.》.2004,第101卷(第11期),

包新华.X-连锁肾上腺脑白质营养不良.《中国实用儿科杂志》.2009,第24卷(第7期),

赖淑萍.“前列腺素E2体外可促进人CD34+细胞增殖”.《中山大学学报(医学科学版)》.2013,第34卷(第1期),

Garrett C Heffner等.“Prostaglandin E2 Increases Lentiviral Vector Transduction Efficiency of Adult Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells”.《Molecular therapy》.2018,第26卷(第1期),

1. 增加与慢病毒一起培养的CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞的转导效率的方法,其包括:在包含前列腺素E2 (PGE₂) 或16,16-二甲基PGE₂的培养基中用所述慢病毒转导所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞,其中所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞不是人胚胎干细胞;

其中在前列腺素E2 (PGE₂) 或16,16-二甲基PGE₂和促进所述造血干细胞或祖细胞扩增的一个或多个生长因子的存在下用所述慢病毒转导所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞为CD34⁺造血干细胞。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞为CD34⁺造血祖细胞。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞为CD34⁺造血干细胞和造血祖细胞。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中至少50%的所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞被转导。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中至少75%的所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞被转导。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中至少90%的所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞被转导。

8. 根据权利要求1所述的方法,还包括将所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞和慢病毒在组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂的存在下培养。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述HDAC抑制剂选自:曲古抑菌素A (TSA)、丙戊酸(VPA)、丁酸钠、辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)、苯基丁酸钠、缩酚酸肽、trapoxin (TPX)、含有环异羟肟酸的肽1 (CHAP1)、MS-275、LBH589和PXD-101。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述慢病毒为人类免疫缺陷病毒(HIV)。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述慢病毒被水疱性口炎病毒G-蛋白(VSV-G)包膜蛋白假型化。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一个或多个生长因子包括干细胞因子(SCF)、促血小板生成素(TPO)和胎肝酪氨酸激酶3(FLT3)配体。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞在前列腺素E2 (PGE₂) 或16,16-二甲基PGE₂的存在下用所述慢病毒转导至少24小时。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中在转导的前24小时期间,将所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞在前列腺素E2 (PGE₂) 或16,16-二甲基PGE₂的存在下用所述慢病毒转导。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中在转导的前24小时至前48小时期间,将所述CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞在前列腺素E2 (PGE₂) 或16,16-二甲基PGE₂的存在下用所述慢病毒转导。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述慢病毒包含载体,所述载体含有:

a) 左端(5')慢病毒LTR;

b) 可操作地连接至目标基因的表达调控序列;以及

c) 右端(3')慢病毒LTR。

17. 根据权利要求1所述的方法,其中所述慢病毒包含载体,所述载体含有:

- a) 左端 (5') HIV-1 LTR;
- b) Psi 包装序列 (Ψ);
- c) HIV-1 中心聚嘌呤区/DNA 侧翼序列 (cPPT/FLAP);
- d) rev 应答元件 (RRE);
- e) 可操作地连接至目标基因的 β -球蛋白启动子和 β -球蛋白基因座控制区 (LCR); 以及
- f) 右端 (3') 慢病毒 LTR, 其包含:
 - i) 一个或多个绝缘子元件, 或
 - ii) 兔 β -球蛋白聚腺苷酸序列 (r β gpA)。

18. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述慢病毒包含载体, 所述载体含有:

- (a) 左端 (5') HIV-1 LTR;
- (b) Psi (Ψ) 包装信号;
- (c) cPPT/FLAP;
- (d) rev 应答元件 (RRE);
- (e) MND 启动子, 其可操作地连接至编码人 ABCD1 多肽的多核苷酸;
- (f) 右端 (3') HIV-1 LTR; 以及
- (g) 兔 β -球蛋白聚腺苷酸序列。

19. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述慢病毒为复制缺陷型。

20. 根据权利要求 5-17 中任一项所述的方法转导的 CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞的群体在制备用于治疗患有血红蛋白病的患者的药物中的用途。

21. 根据权利要求 20 所述的用途, 其中所述血红蛋白病为 β -地中海贫血或镰状细胞疾病。

22. 根据权利要求 5-16 或 18 中任一项所述的方法转导的 CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞的群体在制备治疗患有肾上腺脑白质营养不良或肾上腺脊髓神经病的患者的药物中的用途。

用于改善病毒转导的化合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是201280056851.7号中国专利申请的分案申请。本申请按照35 U.S.C. § 119 (e) 要求于2011年9月30日递交的美国临时申请第61/541,736号的权益,其通过引用整体并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 以文本格式代替纸件副本提供了与本申请相关的序列表,其通过引用并入本说明书中。含有该序列表的文本文件的名称为BLBD_006_01WO_ST25.txt。该文本文件为30KB,创建于2012年9月27日,其通过EFS-Web电子递交。

[0005] 发明背景

技术领域

[0006] 本发明总体上涉及提高细胞的病毒转导方法的效率。更具体地,本发明提供了用于提高使用可用于治疗适应证的病毒和/或病毒载体转导细胞如人造血干细胞 (HSC) 的效率的方法和材料。

[0007] 相关技术描述

[0008] 美国食品和药物管理局 (FDA) 还没有批准任何人类基因治疗产品出售。当前基因治疗是实验性的,在临床试验中还未证明是很成功的。自1990年开始第一次基因治疗临床试验以来,几乎没有取得进展。1999年,18岁的Jesse Gelsinger的死亡使基因治疗遭受了重大挫折。Jesse在参加鸟氨酸羧基转移酶缺陷症 (OTCD) 的基因治疗试验。开始该治疗4天后,他死于多器官衰竭。人们认为对腺病毒载体的严重免疫反应引起了他的死亡。

[0009] 另一个主要打击来自2003年1月,当时FDA对于在血液干细胞中使用逆转录病毒载体的所有基因治疗试验发布了临时停止命令。FDA在得知在法国基因治疗试验中接受治疗的第二个孩子已经患上了白血病样病症时采取了这一行动。2002年8月,这个孩子和另一个患有类似病症的孩子已经通过基因疗法成功地治疗了X-连锁的严重联合免疫缺陷病 (X-SCID),也称“泡泡儿综合征”。2003年2月末,FDA的生物效应调节物咨询委员会 (BRMAC) 开会讨论可能的措施,以允许很多用于治疗危及生命的疾病的逆转录病毒基因治疗试验,从而推进合适的安全保护。2003年4月,FDA解除了在血液干细胞中使用逆转录病毒载体进行基因治疗试验的禁令。

[0010] 然而,最近有几个小组在对抗几种疾病上取得了基因治疗试验的中等程度成功。2008年,来自伦敦大学学院眼科和Moorfield眼科医院NIHR生物医药研究中心的英国研究人员宣布,基因治疗临床试验成功治疗了莱伯氏先天性黑内障,一种遗传性失明。该结果表明了实验性治疗是安全的并能够提高视力 (Maguire et al., N Engl J Med. 358 (21) :2240 (2008))。

[0011] 2011年Neurologix公司宣布在晚期帕金森氏病 (PD) 的研究性基因治疗 (NLX-P101) 的2期试验中获得了阳性结果。相比接受假手术的对照个体,在停药后的运动评分上,接受NLX-P101的研究参与者经历了统计意义上显著的和具有临床意义的改善。在该试验

中,在一个月时观察到这个益处,并在整个6个月的盲法研究(blinded study)期间中继续保持基本上不变。该结果也表明了NLX-P101的正面安全特性,还没有报道过与该基因治疗或手术过程有关的严重不良事件。参与该试验的患者患有中期至晚期的PD,且对当前治疗没有充分响应。

[0012] 2009年,法国科学家小组报道,使用造血干细胞介导的基因治疗成功地治疗了X-连锁的肾上腺脑白质营养不良(ALD)。从患者中取出自体干细胞,进行离体的遗传矫正,然后在患者接受了清髓处理后再输入至患者。经过24-30个月时段的跟进,检测到多克隆重建,9-14%的表达ALD蛋白的粒细胞、单核细胞以及T和B淋巴细胞。这些结果有力地表明,造血干细胞被成功地转导至患者。输入遗传矫正的细胞14-16个月后,2位患者中进行性大脑脱髓鞘停止了。

[0013] 基因治疗领域的最近进展提高了患有血红蛋白病如 β -地中海贫血和镰状细胞贫血的患者将从新治疗方法中获益的希望。移植用携带 β -球蛋白基因的慢病毒载体修饰的造血细胞(HC),已经导致了几种血红蛋白失调小鼠模型中的长期矫正,参见Imren et al., Proc Natl Acad Sci U S A.2002;99(22):14380-14385;Malik et al., Ann NY Acad Sci.2005;1054:238-249;May et al., Nature.2000;406(6791):82-86;Pawliuk et al., Science.2001;294(5550):2368-2371,但相反,仅在1例 β -地中海贫血患者中导致无需输血(Cavazzana-Calvo et al., Nature.2010;467(7313):318-322)。

[0014] 尽管输入遗传修饰的自体细胞的主要益处是避免GVHD的风险和免疫抑制性预移植调理以及解决缺乏兼容性供体,当前的治疗面临至少3个重要注意事项:需要毒性的骨髓清除(Dunbar et al., Hum Gene Ther.1998;9(17):2629-2640);当前的基因转移方法不能转导超过一部分的造血干细胞(HSC)(Santoni de Sio and Naldini, Methods Mol Biol.2009;506:59-70);现有各种体内挑选策略受制于次优的效率和安全性(Beard et al., J Clin Invest.2010;120(7):2345-2354;Cornetta et al., Cancer Gene Ther.2006;13(9):886-895;Milsom et al., Cancer Res.2008;68(15):6171-6180)。例如,响应于造血干细胞治疗的疾病中,例如镰状细胞疾病、 β -地中海贫血、肾上腺脑白质营养不良和肾上腺脊髓神经病,其局限包括但不限于,低效率的造血干细胞或造血祖细胞转导,需要毒性的骨髓移植性或骨髓清除治疗,以及缺乏体内挑选转导的细胞的最佳方法。

[0015] 因此,本领域需要改善的基因治疗方法,特别是用于治疗或预防造血功能障碍的基因治疗方法。本发明提供了困扰本领域的这些和其他问题的技术方案。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明总体上提供了用于提高病毒转导效率的方法和组合物,所述组合物包含增加前列腺素EP受体信号转导的化合物。本发明的组合物和方法还提供了使用病毒和/或病毒载体转导细胞如人造造血干细胞(HSC)的更安全和更可靠的方法。所述组合物和方法可用于响应于造血干细胞基因疗法治疗的治疗适应证。

[0018] 在不同的实施方案中,本发明部分地,包括用于增加与逆转录病毒一起培养的细胞的转导效率的方法,其包括将所述细胞和逆转录病毒培养于包含一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物的培养基中。在一实施方案中,所述化合物为小分子。

[0019] 在一实施方案中,所述细胞为干细胞或祖细胞。

[0020] 在一个具体实施方案中,所述干细胞或祖细胞为诱导的多能(pluripotent)干细

胞。

[0021] 在又一实施方案中,所述干细胞或祖细胞选自:间充质干细胞、造血干细胞、神经干细胞、视网膜干细胞、心肌干细胞、骨骼肌干细胞、脂肪组织来源的干细胞、软骨细胞干细胞、肝脏干细胞、肾脏干细胞和胰腺干细胞。

[0022] 在某一实施方案中,所述干细胞或祖细胞为造血干细胞或造血祖细胞。

[0023] 在又一实施方案中,所述细胞选自:成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、神经细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、施旺 (Schwann) 细胞、视网膜细胞、角膜细胞、皮肤细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞、树突状细胞、T-淋巴细胞、B-淋巴细胞、NK-细胞、胃细胞、肠细胞、平滑肌细胞、血管细胞、膀胱细胞、胰腺 α -细胞、胰腺 β -细胞、胰腺 δ -细胞、肝细胞、肾细胞、肾上腺细胞和肺细胞。

[0024] 在又一具体的实施方案中,所述细胞为造血干细胞或造血祖细胞。

[0025] 在一实施方案中,至少约50%的所述造血干细胞或造血祖细胞被转导。

[0026] 在另一实施方案中,至少约75%的所述造血干细胞或造血祖细胞被转导。

[0027] 在又一实施方案中,至少约90%的所述造血干细胞或造血祖细胞被转导。

[0028] 在具体的实施方案中,本文公开的任何组合物或方法,包含一种或多种选自以下的增加前列腺素EP受体信号转导的化合物:PGA₂;PGB₂;PGD₂;PGE₁;PGE₂;PGF₂;PGI₂;PGH₂;PGJ₂;及其前体、代谢物、衍生物和类似物。

[0029] 在某些实施方案中,本文公开的任何组合物或方法,包含一种或多种选自以下的增加前列腺素EP受体信号转导的化合物:15d-PGJ₂;8-12-PGJ₂;2-羟基十七碳三烯酸 (HHT);血栓素A₂;血栓素B₂;伊洛前列素;曲前列环素;曲伏前列素;卡前列素-氨丁三醇;他氟前列素;拉坦前列素;比马前列素;异丙基乌诺前列酮;氯前列烯醇;Oestrophan;Superphan;米索前列醇;布他前列素;亚油酸;13 (s) -HODE;LY171883;蜂蜜酸;二十碳三烯酸;环氧二十碳三烯酸;ONO-259;Cay1039;PGE₂受体激动剂;16,16-二甲基PGE₂;19 (R) -羟基PGE₂;16,16-二甲基PGE₂p- (p-乙酰胺基苯甲酰胺基) 苯酯;11-脱氧-16,16-二甲基PGE₂;9-脱氧-9-亚甲基-16,16-二甲基PGE₂;9-脱氧-9-亚甲基PGE₂;硫前列酮;PGE₂丝氨酸酰胺;PGE₂甲酯;16-苯基四去甲PGE₂;15 (S) -15-甲基PGE₂;15 (R) -15-甲基PGE₂;科里醇 (Corey alcohol) -A;科里醇-B;科里二醇;BIO-8-溴-cAMP;毛喉素;Bapta-AM;芬地林;尼卡地平;硝苯地平;哌咪清;毒毛旋花甙元;毛花洋地黄甙;L-Arg;硝普化钠;钒酸钠;缓激肽;甲苯凡林;氟氢缩松;阿替洛尔;吲哚洛尔;加波沙朵;犬尿喹啉酸;胍苯哒嗪;噻苯咪唑;比枯枯灵碱 (Bicuculline);拉特罗毒素 (Vesamicol);黄夹次苷;丙咪嗪;氯磺丙脲;1,5-亚戊基四唑;4-氨基吡啶;二氮嗪;苯磷硫胺;12-甲氧基十二碳烯酸;N-甲酰-Met-Leu-Phe;加拉碘铵;IAA 94和氯烯雌醚。

[0030] 在一些实施方案中,本文公开的任何组合物或方法包含一种或多种选自以下的增加前列腺素EP受体信号转导的化合物:前列腺素E₂ (PGE₂) 或16,16-二甲基PGE₂。

[0031] 在另外的实施方案中,本文公开的任何方法还包括在组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂存在下培养所述细胞和逆转录病毒。

[0032] 在一实施方案中,所述HDAC抑制剂选自:曲古抑菌素 (Trichostatin) A (TSA)、丙戊酸 (VPA)、丁酸钠、辛二酰苯胺异羟肟酸 (SAHA)、苯基丁酸钠、缩酚酸肽、trapoxin (TPX)、含有环异羟肟酸的肽1 (CHAP1)、MS-275、LBH589和PXD-101。

[0033] 在不同的实施方案中,本文公开的任何组合物或方法包括逆转录病毒,其为慢病毒。

[0034] 在具体的实施方案中,本文公开的任何组合物或方法包括逆转录病毒,其为人类免疫缺陷病毒(HIV)。

[0035] 在某些实施方案中,本文公开的任何组合物或方法包括具有水疱性口炎病毒G-蛋白(VSV-G)包膜蛋白的逆转录病毒假病毒。

[0036] 在另外的实施方案中,本文公开的任何方法包括在转导前将所述细胞在增加前列腺素EP受体信号转导的化合物存在下培养。

[0037] 在具体的实施方案中,将所述细胞与增加前列腺素EP受体信号转导的化合物一起培养至少约2小时。

[0038] 在进一步的实施方案中,将所述细胞与增加前列腺素EP受体信号转导的化合物一起培养至少约4小时。

[0039] 在某些实施方案中,在转导期间将所述细胞在增加前列腺素EP受体信号转导的化合物存在下培养。

[0040] 在进一步的实施方案中,将所述细胞在增加前列腺素EP受体信号转导的化合物存在下培养至少约24小时。

[0041] 在另外的实施方案中,在转导的前24小时期间,将所述细胞在增加前列腺素EP受体信号转导的化合物存在下培养。

[0042] 在一些实施方案中,在转导的前48小时期间,将所述细胞在增加前列腺素EP受体信号转导的化合物存在下培养。

[0043] 在具体的实施方案中,本文公开的任何组合物或方法包括包含载体的逆转录病毒,所述载体含有:左端(5')逆转录病毒LTR;可操作地连接至目标基因的表达调控序列;以及右端(3')逆转录病毒LTR。

[0044] 在某些实施方案中,本文公开的任何组合物或方法包括包含载体的逆转录病毒,所述载体含有:左端(5')HIV-1LTR;Psi包装序列(Ψ);HIV-1中心聚嘌呤区/DNA侧翼序列(cPPT/FLAP);rev应答元件(RRE);可操作地连接至目标基因的 β -球蛋白启动子和 β -球蛋白基因座控制区(LCR);以及右端(3')逆转录病毒LTR,所述右端(3')逆转录病毒LTR包含:一个或多个绝缘子元件或兔 β -球蛋白聚腺苷酸序列(rBgpA)。在不同的实施方案中,将所述造血干细胞或造血祖细胞给予至患有血红蛋白病的患者。

[0045] 在不同的具体实施方案中,所述血红蛋白病为 β -地中海贫血或镰状细胞疾病。

[0046] 在某些实施方案中,本文公开的任何组合物或方法包括载体,所述载体包含:左端(5')HIV-1LTR;Psi(Ψ)包装信号;cPPT/FLAP;RRE;MND启动子,其可操作地连接至编码人ABCD1多肽的多核苷酸;右端(3')HIV-1LTR;以及兔 β -球蛋白聚腺苷酸化序列。在某些不同的实施方案中,将所述造血干细胞或造血祖细胞给予至患有肾上腺脑白质营养不良或肾上腺脊髓神经病的患者。

[0047] 在不同的实施方案中,所述逆转录病毒为复制缺陷型。

附图说明

[0048] 图1所示为促进CD34+细胞的病毒转导的化合物的筛选结果。将CD34+细胞解冻并

用SCF、TP0、FltL和IL3预刺激,然后用GFP+慢病毒转导。在预刺激期间(0-24小时)或转导期间(24-48小时),将细胞额外暴露于高、中或低浓度可溶因子(参见表1)。培养约一周后,然后洗涤细胞并通过流式细胞术分析细胞。确定是GFP+的细胞的百分比并表示为热图(heatmap)。灰色表示约45%转导的细胞,且动态范围为0%(黑)至~92%(白)。

[0049] 序列表标识说明

[0050] SEQ ID N0:1所示为人 α -球蛋白cDNA的多核苷酸序列。

[0051] SEQ ID N0:2所示为人 α -球蛋白多肽的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID N0:3所示为小鼠 α -球蛋白多肽的氨基酸序列。

[0053] SEQ ID N0:4所示为大鼠 α -球蛋白多肽的氨基酸序列。

[0054] SEQ ID N0:5所示为人 β -球蛋白cDNA的多核苷酸序列。

[0055] SEQ ID N0:6所示为人 β -球蛋白多肽的氨基酸序列。

[0056] SEQ ID N0:7所示为突变的人 β -球蛋白多肽氨基酸序列。

[0057] SEQ ID N0:8所示为小鼠 β -球蛋白多肽的氨基酸序列。

[0058] SEQ ID N0:9所示为大鼠 β -球蛋白多肽的氨基酸序列。

[0059] SEQ ID N0:10所示为人 γ -球蛋白cDNA的多核苷酸序列。

[0060] SEQ ID N0:11所示为人 γ -球蛋白多肽的氨基酸序列。

[0061] SEQ ID N0:12所示为小鼠 γ -球蛋白多肽的氨基酸序列。

[0062] SEQ ID N0:13所示为大鼠 γ -球蛋白多肽的氨基酸序列。

[0063] SEQ ID N0:14所示为人 δ -球蛋白cDNA的多核苷酸序列。

[0064] SEQ ID N0:15所示为人 δ -球蛋白多肽的氨基酸序列。

[0065] SEQ ID N0:16所示为编码ACBD1多核苷酸的cDNA序列。

[0066] SEQ ID N0:17所示为编码ACBD1多核苷酸的cDNA序列。

[0067] SEQ ID N0:18所示为ACBD1多肽的氨基酸序列。

[0068] 发明详述

[0069] A. 综述

[0070] 本发明总体上涉及改良的基因治疗组合物和使用其治疗、预防或缓解遗传疾病的方法。基因治疗的一个巨大挑战是提高细胞的转导效率,所述细胞包含要被递送至个体中的治疗基因,其中相比非转导的细胞,矫正的细胞不具有固有的选择优势。

[0071] 本发明部分地,基于出人意料的发现,即本发明新的细胞转导方法可用于在体外、离体或体内扩增或增加治疗性细胞即矫正的细胞的数目,从而进一步增加基因治疗的效力。撇开任何具体理论的束缚,本发明部分地,包括通过提高细胞的转导效率而每个转导产生更多矫正的细胞,因此,本发明的基因治疗方法要求给予较少细胞以向正在接受基因治疗的个体提供治疗性、预防性或改善性终点。而且,由于更高数目的转导的细胞被递送至患者中,未必需要骨髓抑制性或骨髓抑制的治疗以达到治疗性、预防性或改善性终点。

[0072] 因此,本发明解决了用于提高在治疗遗传疾病中的基因治疗效率的未予满足的临床需求,从而转导的细胞群体中更大数目的治疗细胞可被给予至个体中,以提供治疗性、预防性或改善性效果。本发明尤其涉及出人意料地有效的细胞转导方法、载体和遗传改造的细胞,从而促进了用于基因治疗所需的临床结果。

[0073] 除非具体说明相反,本发明的实施可使用本领域的常规分子生物学方法和重组

DNA技术,为了说明的目的,其中大多数会在以下进行描述。这些技术在文献中得以充分地解释,参见例如,Sambrook,et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual (2nd Edition,1989);Maniatis et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual (1982);DNA Cloning:A Practical Approach,vol.I&II (D.Glover,ed.);Oligonucleotide Synthesis (N.Gait,ed.,1984);Nucleic Acid Hybridization (B.Hames&S.Higgins,eds.,1985);Transcription and Translation (B.Hames&S.Higgins,eds.,1984);Animal Cell Culture (R.Freshney,ed.,1986);A Practical Guide to Molecular Cloning (B.Perbal,ed.,1984)。

[0074] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请均通过引用整体并入本文。

[0075] B. 定义

[0076] 除非另有说明,本文所用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域普通技术人员通常所理解的相同含义。为本发明的目的,定义如下术语。

[0077] 如本文所用,术语“逆转录病毒”是指将其基因组RNA逆转录为线性双链DNA拷贝并随后将其基因组DNA共价地整合至宿主基因组的RNA病毒。逆转录病毒是基因递送的常用工具(Miller,2000,Nature.357:455-460)。一旦该病毒被整合至宿主基因组,其被称为“前病毒”。该前病毒用作RNA聚合酶II的模板,并指导编码产生新病毒粒子所需的结构蛋白和酶的RNA分子的表达。

[0078] 示例性逆转录病毒包括但不限于:莫罗尼鼠白血病毒(M-MuLV)、莫罗尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病毒(GaLV)、猫白血病毒(FLV)、泡沫病毒、弗里德(Friend)鼠白血病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯(Rous)肉瘤病毒(RSV)以及慢病毒。

[0079] 如本文所用,术语“慢病毒”是指一组(或属)复合逆转录病毒。示例性慢病毒包括但不限于:HIV(人免疫缺陷病毒;包括1型HIV和2型HIV);维斯那-梅迪病毒(VMV)病毒;山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病毒(EIAV);猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);以及猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一实施方案中,优选基于HIV的载体骨架(即HIV顺式作用元件)。

[0080] 逆转录病毒载体,更具体地慢病毒载体可用于实施本发明。因此,如本文所用,术语“逆转录病毒”或“逆转录病毒载体”意在分别包括“慢病毒”和“慢病毒载体”。

[0081] 本文所用术语“载体”是指能够转移或转运另一种核酸分子的核酸分子。被转运的核酸通常连接至,例如,插入至载体核酸分子。载体可包括在细胞中直接自主复制的序列,或可包括足以允许整合至宿主细胞DNA的序列。有用的载体包括,例如,质粒(例如,DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌人工染色体和病毒载体。有用的病毒载体包括例如,复制缺陷型逆转录病毒和慢病毒。

[0082] 对于本领域技术人员来说,显然术语“病毒载体”广泛用于指包含病毒来源的核酸元件的核酸分子(例如,转移质粒),所述核酸元件通常促进核酸分子转移或整合至细胞基因组;或者指介导核酸转移的病毒粒子。病毒粒子通常包括各种病毒组分,且有时还包括除核酸以外的宿主细胞组分。

[0083] 术语病毒载体可指能够将核酸转移至细胞中的病毒或病毒粒子,或者指被转移的核酸本身。病毒载体和转移质粒包含主要源自病毒的结构性和/或功能性遗传元件。术语

“逆转录病毒载体”是指包含结构性和/或功能性遗传元件或其部分的病毒载体或质粒,其主要源自逆转录病毒。术语“慢病毒载体”是指包含结构性和/或功能性遗传元件或其部分的病毒载体或质粒,其包括主要源自慢病毒的LTR。术语“杂合体”是指包含两种逆转录病毒序列例如慢病毒序列和非慢病毒病毒序列的载体、LTR或其他核酸。在一实施方案中,杂合体载体是指包含用于逆转录、复制、整合和/或包装的逆转录病毒序列例如慢病毒序列的载体或转移质粒。

[0084] 在具体的实施方案中,术语“慢病毒载体”、“慢病毒表达载体”可用于指慢病毒转移质粒和/或传染性慢病毒粒子。当本文提及元件如克隆位点、启动子、调控元件、异源核酸等时,应理解这些元件的序列以RNA形式存在于本发明的慢病毒粒子中,且以DNA形式存在于本发明的DNA质粒中。

[0085] 前病毒的每个末端均有称为“长末端重复”或“LTR”的结构。术语“长末端重复(LTR)”是指位于逆转录病毒DNA末端的碱基对结构域,在其天然的序列背景中是正向重复且含有U3、R和U5区。LTR通常提供对于逆转录病毒基因表达(例如,基因转录的促进、开始和聚腺苷酸化)和病毒复制很重要的功能。LTR包含许多调控信号,包括转录控制元件、聚腺苷酸化信号和病毒基因组复制和整合所需的序列。病毒LTR分为3个区,即U3、R和U5。U3区包含增强子和启动子元件。U5区是引物结合位点和R区之间的序列,且包含聚腺苷酸化序列。R(重复)与U3和U5区侧翼连接。LTR由U3、R和U5区组成,且在病毒基因组5'和3'端均出现。邻近5'LTR是基因组逆转录(tRNA引物结合位点)和将病毒RNA有效包装至粒子中(Psi位点)所必需的序列。

[0086] 如本文所用,术语“包装信号”或“包装序列”是指位于逆转录病毒基因组中的序列,其为将病毒RNA插入至病毒衣壳或粒子中所必需的,参见例如,Clever et al., 1995.J.of Virology, Vol.69, No.4; pp.2101-2109。几个逆转录病毒载体使用对病毒基因组进行包装所需的最小的包装信号(也称为psi[Ψ]或[Ψ⁺]序列)。因此,如本文所用,术语“包装序列”、“包装信号”、“psi”和符号“Ψ”是指在病毒粒子形成期间用于包装逆转录病毒RNA链所需的非编码序列。

[0087] 在不同的实施方案中,载体包含修饰的5'LTR和/或3'LTR。通常对3'LTR进行修饰,通过使病毒成为复制缺陷型从而提高慢病毒或逆转录病毒系统的安全性。如本文所用,术语“复制缺陷型”是指不能完整有效地进行复制的病毒,从而无法产生传染性病毒粒子(例如,复制缺陷型慢病毒后代)。术语“能够复制的”是指能够复制的野生型病毒或突变病毒,从而病毒的病毒复制能够产生传染性病毒粒子(例如,具有复制能力的慢病毒)。

[0088] “自失活”(SIN)载体是指复制缺陷型载体,例如,逆转录病毒或慢病毒载体,其中的右端(3')LTR增强子-启动子区(也称U3区)已经被修饰(例如,通过缺失和/或替换),从而防止除第一轮病毒复制之外的病毒转录。这是因为病毒复制期间右端(3')LTR U3区被用作左端(5')LTR U3区的模板,因此,没有U3增强子-启动子就无法产生病毒转录本。在本发明又一实施方案中,对3'LTR进行修饰从而U5区被替换,例如,用异源的或合成的聚腺苷酸序列、一个或多个绝缘子元件和/或诱导型启动子。应注意,对LTR的修饰,如对3'LTR、5'LTR或3'和5'LTR二者的修饰,也都包括在本发明中。

[0089] 通过用异源启动子替换5'LTR的U3区以在病毒粒子产生期间指导病毒基因组转录,提供了另外的安全性改善。可使用的异源启动子的实例包括,例如,病毒性猿猴病毒40

(SV40) (例如, 早期或晚期)、巨细胞病毒 (CMV) (例如, 极早期)、莫罗尼鼠白血病毒 (MoMLV)、劳氏肉瘤病毒 (RSV) 和单纯疱疹病毒 (HSV) (胸苷激酶) 启动子。典型的启动子能够以 Tat-非依赖性方式指导高水平的转录。该替换降低了重组以产生能够复制的病毒的可能性, 因为在病毒产生系统中没有完整的 U3 序列。在某些实施方案中, 所述异源启动子可为可诱导的, 从而仅在一个或多个诱导因子存在时, 才会发生病毒基因组的全部或部分转录。诱导因子包括但不限于, 宿主细胞被培养于其中的一种或多种化合物或生理条件, 例如, 温度或 pH。

[0090] 在一些实施方案中, 病毒载体包含 TAR 元件。术语“TAR”是指位于慢病毒 (例如, HIV) LTR 的 R 区的“反式激活应答”遗传元件。该元件与慢病毒反式激活因子 (tat) 遗传元件相互作用以促进病毒复制。然而, 在其中 5'LTR 的 U3 区被异源启动子替换的实施方案中, 并不需要该元件。

[0091] “R 区”是指逆转录病毒 LTR 内的区, 其在封端基团起始 (即转录起始) 处开始至紧邻聚腺苷酸区起始之前结束。R 区也被定义为与 U3 和 U5 区侧翼连接。R 区在逆转录期间允许将新生 DNA 从基因组一端转移至另一端中起着重要的作用。

[0092] 如本文所用, 术语“FLAP 元件”是指其序列包括逆转录病毒例如 HIV-1 或 HIV-2 的中央聚嘌呤区和中央终止序列 (cPPT 和 CTS) 的核酸。合适的 FLAP 元件描述于美国专利第 6,682,907 号和 Zennou, et al., 2000, Cell, 101:173。HIV-1 逆转录期间, 在中心聚嘌呤区 (cPPT) 正链 DNA 的中心起始和在中心终止序列 (CTS) 的中心终止, 导致三链 DNA 结构的形成: HIV-1 中心侧翼 DNA。尽管不希望被任何理论所束缚, 所述侧翼 DNA 可作为慢病毒基因组核输入的顺式活性决定子和/或可以增加病毒的滴度。在具体的实施方案中, 逆转录病毒或慢病毒载体骨架包含位于载体中异源目标基因上游或下游的一个或多个 FLAP 元件。例如, 在具体的实施方案中, 转移质粒包括 FLAP 元件。在一实施方案中, 本发明的载体包括分离自 HIV-1 的 FLAP 元件。

[0093] 在一实施方案中, 逆转录病毒或慢病毒转移载体包含一个或多个输出元件。术语“输出元件”是指顺式作用转录后调控元件, 其调控 RNA 转录本从细胞核运输至细胞的细胞质。RNA 输出元件的实例包括但不限于, 人类免疫缺陷病毒 (HIV) rev 响应元件 (RRE) (参见例如, Cullen et al., 1991, J. Virol. 65:1053; 和 Cullen et al., 1991, Cell 58:423), 以及乙型肝炎病毒转录后调控元件 (HPRE)。通常, RNA 输出元件位于基因的 3'UTR 中, 且可作为一个或多个拷贝插入。

[0094] 在具体的实施方案中, 通过将转录后调控元件、有效的聚腺苷酸化位点和任选的转录终止信号整合至载体中, 增加了病毒载体中异源序列的表达。多种转录后调控元件可增加异源核酸在蛋白质上的表达, 例如, 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件 (WPRE; Zufferey et al., 1999, J. Virol., 73:2886); 乙型肝炎病毒 (HPRE) 中存在的转录后调控元件 (Huang and Yen, 1995, Mol. Cell. Biol., 5:3864); 等等 (Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766)。在具体的实施方案中, 本发明的载体缺少或不包含转录后调控元件如 WPRE 或 HPRE, 因为在一些情况下这些元件增加了细胞转化的风险和/或不会实质上或明显地增加 mRNA 转录本的量或增加 mRNA 稳定性。因此, 在一些实施方案中, 作为一种附加的安全措施, 本发明的载体缺少或不包含 WPRE 或 HPRE。

[0095] 指导异源核酸转录本有效终止和聚腺苷酸化的元件增加了异源基因表达。转录终

止信号通常发现于聚腺苷酸化信号下游。如本文所用,术语“聚腺苷酸位点”或“聚腺苷酸序列”是指通过RNA聚合酶II指导新生RNA转录本的终止和聚腺苷酸化的DNA序列。重组转录本的有效聚腺苷酸化是可取的,因为缺少聚腺苷酸尾的转录本不稳定且很快会被降解。可用于本发明载体的聚腺苷酸信号的示例性实例包括理想的聚腺苷酸序列(例如,AATAAA、ATTAAA AGTAAA)、牛生长激素聚腺苷酸序列(BGHpA)、兔 β -球蛋白聚腺苷酸序列(r β gpA),或本领域已知的另一合适的异源或内源的聚腺苷酸序列。

[0096] 在某些实施方案中,逆转录病毒或慢病毒载体还包含一个或多个绝缘子元件。绝缘子元件可有利于保护慢病毒-表达的序列例如治疗性多肽免于整合位点效应,整合位点效应可由基因组DNA中存在的顺式作用元件介导,并导致所转移序列的表达失调(即位置效应;参见例如,Burgess-Beusse et al.,2002,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,99:16433;以及Zhan et al.,2001,Hum.Genet.,109:471)。在一些实施方案中,转移载体在3'LTR包含一个或多个绝缘子元件,当把前病毒整合至宿主基因组中时,借助于复制3'LTR,所述前病毒在5'LTR或3'LTR上均包含一个或多个绝缘子。适用于本发明的绝缘子包括但不限于,鸡 β -球蛋白绝缘子(参见Chung et al.,1993.Cell 74:505;Chung et al.,1997.PNAS 94:575;以及Bell et al.,1999.Cell 98:387,通过引用并入本文)。绝缘子元件的实例包括但不限于,来自 β -球蛋白基因座的绝缘子,如鸡HS4。

[0097] 根据本发明的某些特定实施方案,病毒载体骨架序列的大多数或所有均源自慢病毒,例如HIV-1。然而应理解,可使用许多不同来源的慢病毒序列,且所述慢病毒序列中某些序列的很多替换和改变均可被容纳,而不损害转移载体发挥本文所述功能的能力。而且,许多慢病毒载体为本领域已知,参见Naldini et al.,(1996a,1996b和1998);Zufferey et al.,(1997);Dull et al.,1998,美国专利第6,013,516号和第5,994,136号,其中的许多可适用于产生本发明的病毒载体或转移质粒。

[0098] 如本文所用,术语“化合物”包括小有机分子、前列腺素、cAMP增强子、Wnt途径激动剂、cAMP/PI3K/AKT途径激动剂、 Ca^{2+} 第二信使通路激动剂、一氧化氮(NO)/血管紧缩素信号转导激动剂和无机化学品,包括但不限于,其所有类似物和衍生物。

[0099] “小分子”、“小有机分子”或“小分子化合物”是指低分子量化合物,其分子量小于约5kD,小于约4kD,小于约3kD,小于约2kD,小于约1kD或小于约0.5kD。在具体的实施方案中,小分子可包括核酸、肽、模拟肽、类肽、其他小有机化合物或药物等。化学品和/或生物混合物如真菌、细菌或藻类提取物的文库为本领域已知,且可使用本发明的任何试验进行筛选。合成分子文库的方法的实例可参见:(Carell et al.,1994a;Carell et al.,1994b;Cho et al.,1993;DeWitt et al.,1993;Gallop et al.,1994;Zuckermann et al.,1994)。

[0100] 化合物文库可呈现为溶液(Houghten et al.,1992)或小球(Lam et al.,1991)、片状(Fodor et al.,1993)、细菌、孢子(Ladner et al.,U.S.Pat.No.5,223,409,1993)、质粒(Cull et al.,1992)或噬菌体(Cwirla et al.,1990;Devlin et al.,1990;Felici et al.,1991;Ladner et al.,美国专利第5,223,409号,1993;Scott and Smith,1990)。本文公开的本发明包括不同的文库在用于确定在细胞信号转导通路的任何点上增加前列腺素EP受体信号转导的小分子中的应用。用于本发明目的的文库包括但不限于:(1)化学文库,(2)天然产物文库,以及(3)由随机的肽、寡核苷酸和/或有机分子组成的组合文库。

[0101] 化学文库由已知化合物的结构类似物和衍生物或者通过天然产物筛选的确定为“苗头物(hit)”或“先导物(lead)”的化合物组成。天然产物文库源自微生物、动物、植物或海洋生物的集合,其用于制备用于通过以下方法来筛选的混合物:(1)土壤、植物或海洋微生物培养液的发酵和提取,或(2)植物或海洋生物培养液的提取。天然产物文库包括聚酮化合物、非核糖体肽和其变体(非天然存在的)。综述可参见,Cane,D.E.,et al.,(1998) *Science* 282:63-68。组合文库由大量肽、寡核苷酸或有机化合物作为混合物组成。它们相对容易采用常规的自动化合成方法、PCR、克隆或专利合成方法来制备。尤其值得关注的是肽和寡核苷酸的组合文库。

[0102] 更具体地,组合化学文库是通过组合许多化学“结构单元”如试剂,通过化学合成或生物合成产生的不同化合物的集合。例如,线性组合化学文库如多肽文库是以针对给定化合物长度(即多肽化合物中氨基酸的长度)的各种可能方式来组合一系列化学结构单元(氨基酸)而形成。通过这种化学结构单元的组合混合可合成数百万种化合物。

[0103] 组合的化学品及由其建立的文库的综述可参见,Huc,I.and Nguyen,R.(2001) *Comb.Chem.High Throughput Screen* 4:53-74;Lepre,C A.(2001) *Drug Discov.Today* 6:133-140;Peng,S.X.(2000) *Biomed.Chromatogr.*14:430-441;Bohm,H.J.and Stahl,M.(2000) *Curr.Opin.Chem.Biol.*4:283-286;Barnes,C and Balasubramanian,S.(2000) *Curr.Opin.Chem.Biol.*4:346-350;Lepre,Enjalbal,C,et al.,(2000) *Mass Spectrom Rev.*19:139-161;Hall,D.G.,(2000) *Nat.Biotechnol.*18:262-262;Lazo,J.S.,and Wipf,P.(2000) *J.Pharmacol.Exp.Ther.*293:705-709;Houghten,R.A.,(2000) *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.*40:273-282;Kobayashi,S.(2000) *Curr.Opin.Chem.Biol.*(2000)4:338-345;Kopylov,A.M.and Spiridonova,V.A.(2000) *Mol.Biol.(Mosk)*34:1097-1113;Weber,L.(2000) *Curr.Opin.Chem.Biol.*4:295-302;Dolle,R.E.(2000) *J.Comb.Chem.*2:383-433;Floyd,C D.,et al.,(1999) *Prog.Med.Chem.*36:91-168;Kundu,B.,et al.,(1999) *Prog.Drug Res.*53:89-156;Cabilly,S.(1999) *Mol.Biotechnol.*12:143-148;Lowe,G.(1999) *Nat.Prod.Rep.*16:641-651;Dolle,R.E.and Nelson,K.H.(1999) *J.Comb.Chem.*1:235-282;Czarnick,A.W.and Keene,J.D.(1998) *Curr.Biol.*8:R705-R707;Dolle,R.E.(1998) *Mol.Divers.*4:233-256;Myers,P.L.,(1997) *Curr.Opin.Biotechnol.*8:701-707;以及Pluckthun,A.and Cortese,R.(1997) *Biol.Chem.*378:443。

[0104] 制备组合文库的设备为商业可获得的(参见例如,357MPS,390MPS,Advanced Chem Tech,Louisville Ky.,Symphony,Rainin,Woburn,Mass.,433A Applied Biosystems,Foster City,Calif.,9050Plus,Millipore,Bedford,Mass.)。此外,很多组合文库本身就是商业可获得的(参见例如,ComGenex,Princeton,N.J.,Asinex,Moscow,Ru,Tripos,Inc.,St.Louis,Mo.,ChemStar,Ltd.,Moscow,RU,3D Pharmaceuticals,Exton,Pa.,Martek Biosciences,Columbia,Md.,etc.)。

[0105] 如本文所用,术语“代谢前体”是指代谢成所需化合物的化合物形式。

[0106] 如本文所用,术语“代谢物”是指经过代谢后所得到的化合物形式。

[0107] 提及化学品如有机化学品,“类似物”或“衍生物”是指在结构和功能上类似于另一种化学物质的化学分子,通常在结构上有单个元件或基团不同,但如果其保留了和母体化合物相同的功能,则可能通过修饰多于一个基团(例如,2、3或4个基团)而产生差异。这类修

饰对本领域技术人员来说是常规技术,其包括例如,增加或取代化学部分(moiety),如酸的酯或酰胺,保护基如醇或硫醇的苄基和胺的叔-丁氧基羰基。还包括修饰烷基侧链如烷基取代(例如,甲基、二甲基、乙基等),修饰侧链的饱和或不饱和水平,添加修饰的基团如取代的苯基和苯氧基。衍生物还可包括缀合物如生物素或亲和素部分、酶如辣根过氧化物酶等,且包括放射性标记的、生物发光的、化学发光的或荧光部分。同样,可将所述部分(moieties)添加至本文所述的试剂以改变其药代动力学特性,如增加在体内或离体的半衰期,或增加其细胞渗透特性以及其他所需的特性。也包括前药,其已知可促进许多所需的药物品质(例如,可溶性、生物利用度、生产等)(参见例如,W0/2006/047476的示例性EP激动剂前药,因其公开了这类激动剂而通过引用并入本文)。

[0108] 如本文所用,术语“多核苷酸”或“核酸”是指信使RNA(mRNA)、RNA、基因组RNA(gRNA)、正链RNA(RNA(+))负链RNA(RNA(-))、基因组DNA(gDNA)、互补DNA(cDNA)或DNA。多核苷酸包括单链和双链的多核苷酸。优选地,本发明的多核苷酸包括与本文描述的任何参考序列(参见例如,序列列表)具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸或变体,通常其中所述变体保留所述参考序列的至少一种生物活性。在不同的示例性实施方案中,本发明部分地包括,病毒载体和转移质粒多核苷酸序列和包含其的组合物。在具体的实施方案中,本发明提供了编码一种或多种治疗性多肽和/或其他目标基因的多核苷酸。在具体的实施方案中,本发明提供了编码如本文其他地方所讨论的球蛋白多肽或ATP-结合盒亚家族D(ALD)成员1(ABCD1)多肽的多核苷酸。

[0109] 如本文所用,术语“多核苷酸变体”和“变体”等是指展现出与参考多核苷酸序列基本上序列同一的多核苷酸,或者在下文定义的严格条件下与参考序列杂交的多核苷酸。这些术语包括多核苷酸,其中相比参考多核苷酸,一个或多个核苷酸被增加或缺失,或者用不同的核苷酸取代。就这点而言,本领域充分理解,可对参考多核苷酸进行包括突变、添加、缺失和替换的某些改变,由此所述改变的多核苷酸保留参考多核苷酸的生物功能或活性。

[0110] 如本文所用,术语“分离的”是指材料,例如多核苷酸、多肽、细胞,其基本上或实质上脱离了在天然状态下通常与其相伴的组分。在具体的实施方案中,术语“获得的”或“来自”与分离的同义使用。例如,如本文所用,“分离的多核苷酸”是指多核苷酸,其已经从天然存在状态下与其侧翼连接的序列中纯化出来,例如已经从通常与所述片段邻接的序列中移除的DNA片段。

[0111] 描述多核苷酸方向的术语包括:5' (通常为具有游离磷酸基的多核苷酸末端)和3' (通常为具有游离羟基(OH)的多核苷酸末端)。多核苷酸序列可按照5'至3'方向或3'至5'方向解释。

[0112] 术语“互补的”和“互补性”是指通过碱基配对原则关联的多核苷酸(即核苷酸序列)。例如,DNA序列5'AGTCATG3'的互补链为3'TCAGTAC5'。后者的序列通常写成5'端在左边且3'端在右侧的反义互补形式,5'CATGACT3'。与其反义互补序列相同的序列被称为回文序列。互补性可为“部分的”,其中仅一些核苷酸的碱基按照碱基配对原则匹配。或者,在核酸之间可具有“完全的”或“总体的”互补性。

[0113] 如本文所用,术语“核酸盒”是指载体中的遗传序列,其能表达RNA继而表达多肽。在一实施方案中,所述核酸盒含有目标基因,例如目标多核苷酸。在另一实施方案中,所述

核酸盒含有一个或多个表达调控序列以及目标基因,例如目标多核苷酸。载体可包含1、2、3、4、5个或更多个核酸盒。所述核酸盒在载体内在位置上和顺序上设定,以便盒中的所述核酸能被转录为RNA,且在需要时翻译为蛋白或多肽,在转化的细胞中经历其活性所要求的合适的翻译后修饰,通过靶向合适的胞内区室而转移至生物活性的合适区室或分泌至胞外区室。优选地,所述盒使其3'和5'端适于快速插入至载体,例如,其在每端均有限制性内切核酸酶位点。在本发明的优选实施方案中,所述核酸盒包含用于治疗、预防或改善遗传疾病如造血功能障碍的治疗基因序列。所述盒可作为单个单元被移除并插入至质粒或病毒载体。

[0114] 多核苷酸包括目标多核苷酸。如本文所用,术语“目标多核苷酸”是指插入至期望被表达的表达载体中的一个或多个多核苷酸,例如,编码多肽(即目标多肽)多核苷酸。在优选的实施方案中,本发明的载体和/或质粒包含一个或多个目标多核苷酸,例如球蛋白基因或ABCD1基因。在某些实施方案中,目标多核苷酸编码提供治疗、预防或改善造血器官疾病或造血功能障碍的治疗效果的多肽,其可称为“治疗性多肽”,例如球蛋白基因。参见,例如美国专利第6,051,402号和第7,901,671号,其全部公开和权利要求特别地通过引用并入本文。参见例如,SEQ ID NO:1、5、10和14。

[0115] 在某些其他实施方案中,目标多核苷酸编码提供治疗、预防或改善肾上腺脑白质营养不良或肾上腺脊髓神经病的治疗效果的多肽,其可称为“治疗性多肽”,例如ABCD1基因。参见例如,SEQ ID NO:16-17。参见,例如美国专利第5,869,039号和第6,013,769号,其全部公开和权利要求特别地通过引用并入本文。

[0116] 如本文所用,术语“球蛋白”是指能够共价地或非共价地结合亚铁血红素部分并因而能运输或存储氧气的蛋白或蛋白亚基。术语“球蛋白”包括脊椎动物和无脊椎动物血红蛋白亚基、脊椎动物和无脊椎动物肌红蛋白或其变体。球蛋白的实例包括, α -球蛋白或其变体、 β -球蛋白或其变体、 γ -球蛋白或其变体,以及 δ -球蛋白或其变体。

[0117] 在一实施方案中,所述目标多核苷酸是编码提供治疗血红蛋白病的治疗功能的多肽的基因,例如 α -球蛋白、 β -球蛋白或 β -球蛋白A-T87Q。目标多核苷酸及其编码的多肽,包括编码野生型多肽的多核苷酸及其功能变体和片段。在具体的实施方案中,功能变体与相应的野生型参考多核苷酸或多肽序列具有至少80%、至少90%、至少95%或至少99%同一性。在某些实施方案中,功能变体或片段具有相应野生型多肽的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%或至少110%或更多的生物活性。适用于本发明的代表性多核苷酸序列包括但不限于,编码 α -球蛋白、 β -球蛋白或 β -球蛋白A-T87Q的多核苷酸。

[0118] 本发明的多核苷酸,无论编码序列本身的长度,均可与其他DNA序列组合,如本文其他地方公开的和本领域已知的启动子和/或增强子、非翻译区(UTR)、Kozak序列、聚腺苷酸化信号、其他限制性内切酶位点、多克隆位点、内部核糖体进入位点(IRES)、重组酶识别位点(例如,LoxP、FRT和Att位点)、终止密码子、转录终止信号和编码自我切割多肽的多核苷酸、表位标记,从而其总长度可发生较大变化。因此考虑到可使用几乎任何长度的多核苷酸片段,其总长度优选限于在预期的重组DNA方案中易于制备和使用。

[0119] 术语“表达调控序列”是指包含一个或多个启动子、增强子或其他转录控制元件或其组合的多核苷酸序列,其能够指导、增加、调控或控制可操作地连接的多核苷酸的转录或表达。在具体的实施方案中,本发明的载体包含一个或多个表达调控序列,其对特定细胞、细胞类型或细胞谱系如靶细胞具有特异性;即,可操作地连接至对特定细胞、细胞类型或细

胞谱系具有特异性的表达调控序列的多核苷酸表达是表达于靶细胞,而不是其他非靶细胞。载体中具有细胞特异性的一个或多个表达调控序列,根据所需治疗各自可在相同或不同的细胞类型中表达。在优选的实施方案中,载体包含对造血细胞例如造血干细胞或造血祖细胞具有特异性的一个或多个表达调控序列。在其他优选的实施方案中,载体包含对红系细胞具有特异性的一个或多个表达调控序列。

[0120] 如本文所用,术语“启动子”是指RNA聚合酶要结合的多核苷酸(DNA或RNA)的识别位点。术语“增强子”是指DNA片段,其包含能够提供增强的转录的序列,且在一些情况下能独立于其相对于另一控制序列的方向发挥作用。增强子可与启动子和/或其他增强子元件协同地或加成地发挥作用。术语“启动子/增强子”是指包含能够提供启动子和增强子功能的序列的DNA片段。

[0121] 在具体的实施方案中,本发明的载体包含外源的、内源的或异源的控制序列如启动子和/或增强子。“内源的”控制序列是天然地连接至基因组内给定基因的序列。“外源的”控制序列是通过遗传操作手段(即分子生物学技术)而与基因毗邻放置的序列,从而该基因的转录由所连接的增强子/启动子指导。“异源的”控制序列是外源的序列,其相对于接受遗传操作的细胞源自不同物种。“合成的”控制序列可包含一个或多个内源和/或外源序列、和/或在体外或用生物信息学方法确定的为特定基因治疗提供最佳启动子和/或增强子活性的序列的元件。

[0122] 术语“可操作地连接的”是指毗邻放置,其中所描述的组分之间的关系使其能够以预期的方式发挥作用。在一实施方案中,该术语是指核酸表达调控序列(如启动子和/或增强子或其他表达调控序列)和第二多核苷酸序列例如目标多核苷酸之间的功能性连接,其中所述表达调控序列指导相应于第二序列的核酸的转录。

[0123] 如本文所用,术语“组成型表达调控序列”是指启动子、增强子或启动子/增强子,其连续地或不断地允许可操作地连接的序列的转录。组成型表达调控序列可为“普遍存在的”启动子、增强子或启动子/增强子,其允许在各种各样的细胞和组织类型中表达;或者可为“细胞特异性”、“细胞类型特异性”、“细胞谱系特异性”或“组织特异性”启动子、增强子或启动子/增强子,其允许分别在种类受限的细胞和组织类型中表达。示例性的普遍存在的表达调控序列包括但不限于巨细胞病毒(CMV)极早期启动子,病毒性猿猴病毒40(SV40)(例如,早期或晚期)、莫罗尼鼠白血病毒(MoMLV)LTR启动子,劳氏肉瘤病毒(RSV)LTR、单纯疱疹病毒(HSV)(胸苷激酶)启动子,牛痘病毒的H5、P7.5和P11启动子,延长因子1- α (EF1a)启动子,早期生长应答1(EGR1)、铁蛋白H(FerH)、铁蛋白L(FerL)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、真核生物翻译起始因子4A1(EIF4A1)、热休克70kDa蛋白5(HSPA5)、热休克蛋白90kDa- β 成员1(HSP90B1)、热休克蛋白70kDa(HSP70)、 β -驱动蛋白(β -KIN)、人ROSA 26基因座(Irions et al., (2007) Nature Biotechnology 25,1477-1482)、泛激素C启动子(UBC),磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子,巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白(CAG)启动子,以及 β -肌动蛋白启动子。

[0124] 在具体实施方案中,可取的是使用细胞、细胞类型、细胞谱系或组织特异性表达控制序列,以实现所需多核苷酸序列的细胞类型特异性、细胞谱系特异性或组织特异性表达(例如,仅在细胞类型、细胞谱系或组织的子群中或在特定发育阶段表达编码多肽的核酸)。

[0125] 组织特异性启动子的示例性实例包括但不限于:B29启动子(B细胞表达)、runt转

录因子 (CBFa2) 启动子 (干细胞特异性表达)、CD14启动子 (单核细胞表达)、CD43启动子 (白细胞和血小板表达)、CD45启动子 (造血细胞表达)、CD68启动子 (巨噬细胞表达)、CYP450 3A4启动子 (肝细胞表达)、肌间线蛋白启动子 (肌肉细胞表达)、弹性蛋白酶1启动子 (胰腺泡细胞表达)、内皮糖蛋白启动子 (内皮细胞表达)、成纤维细胞特异性蛋白1启动子 (FSP1) 启动子 (成纤维细胞表达)、纤连蛋白启动子 (成纤维细胞表达)、fms-相关的酪氨酸激酶1 (FLT1) 启动子 (内皮细胞表达)、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 启动子 (星形胶质细胞表达)、胰岛素启动子 (胰腺 β -细胞表达)、整合蛋白- α -2b (ITGA2B) 启动子 (巨核细胞)、胞内粘着分子2 (ICAM-2) 启动子 (内皮细胞)、干扰素- β (IFN- β) 启动子 (造血细胞)、角蛋白5启动子 (角化细胞表达)、肌红蛋白 (MB) 启动子 (肌肉细胞表达)、成肌分化1 (MYOD1) 启动子 (肌肉细胞表达)、肾病蛋白启动子 (足细胞表达)、骨 γ -羧基谷氨酸蛋白2 (OG-2) 启动子 (成骨细胞表达)、3-酮酸CoA转移酶2B (Oxct2B) 启动子 (单倍体精细胞表达)、表面活化蛋白B (SP-B) 启动子 (肺细胞表达)、突触蛋白启动子 (神经细胞表达)、Wiskott-Aldrich综合征蛋白 (WASP) 启动子 (造血细胞表达)。

[0126] 在一实施方案中,本发明的载体包含可操作地连接至编码球蛋白多肽的多核苷酸的一种或多种造血细胞或组织特异性启动子和/或增强子,其选自:人 β -球蛋白启动子、人 β -球蛋白LCR、人 α -球蛋白HS40增强子和锚蛋白-1启动子。

[0127] 在另一实施方案中,本发明的载体包含在小神经胶质细胞中具有活性的启动子,其可操作地连接至编码ATP-结合盒亚家族D成员1 (ABCD1) 多肽的多核苷酸。在某些实施方案中,所述启动子包含骨髓及外骨髓增殖的肉瘤病毒增强子、负控制区缺失的d1587rev引物-结合位点取代的 (MND) 启动子或其转录活性片段。

[0128] 如本文所用,“条件表达”可指任何类型的条件表达,包括但不限于,可诱导表达;可抑制表达;在具有特定生理学、生物学或疾病状态等的细胞或组织中表达。该定义并不意图排除细胞类型或组织特异性的表达。本发明的某些实施方案提供目标多核苷酸的条件表达,例如,通过使细胞、组织、生物体等接受治疗或条件而控制表达,所述治疗或条件导致多核苷酸被表达或者导致由目标多核苷酸编码的多核苷酸表达增加或降低。

[0129] 可诱导的启动子/系统的示例性实例,包括但不限于,类固醇-可诱导启动子如编码糖皮质激素或雌激素受体的基因的启动子 (用相应的激素处理可诱导)、金属硫蛋白启动子 (用各种重金属处理可诱导)、MX-1启动子 (用干扰素可诱导)、“GeneSwitch”米非司酮-可调控系统 (Sirin et al., (2003) *Gene*, 323:67)、Cumate可诱导基因开关 (WO 2002/088346)、四环素依赖性调控系统等。

[0130] 条件表达也可通过使用位点特异性DNA重组酶来实现。根据本发明的某些实施方案,所述载体包含由位点特异性重组酶介导的至少一个 (通常两个) 重组位点。如本文所用,术语“重组酶”或“位点特异性重组酶”包括参与涉及一个或多个重组位点 (例如,2、3、4、5、6、7、10、12、15、20、30、50个等) 的重组反应的分割或整合的蛋白、酶、辅因子或相关蛋白,其可为野生型蛋白 (see Landy, (1993) *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707) 或其突变体、衍生物 (例如,含有重组蛋白序列或其片段的融合蛋白)、片段和变体。适用于本发明具体实施方案中的重组酶的示例性实例,包括但不限于:Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、 Φ C31、Cin、Tn3解离酶、TndX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCE1和ParA。

[0131] 所述载体可包含用于各种各样的位点特异性重组酶中任意一个的一个或多个重

组位点。应理解,位点特异性重组酶的靶位点为除了载体例如逆转录病毒载体或慢病毒载体整合所需的任何位点以外。如本文所用,术语“重组序列”、“重组位点”或“位点特异性重组位点”是指重组酶将识别和结合的特定核酸序列。

[0132] 例如,Cre重组酶的一个重组位点是loxP,其为34个碱基对的序列,包括侧翼连接于8个碱基对核心序列的两条13个碱基对的反向重复序列(作为重组酶结合位点)(参见,Sauer,B.,(1994)Current Opinion in Biotechnology 5:521-527中的图1)。其他loxP位点的示例性实例包括但不限于:lox511(Hoess et al.,1996;Bethke and Sauer,1997)、lox5171(Lee and Saito,1998)、lox2272(Lee and Saito,1998)、m2(Langer et al.,2002)、lox71(Albert et al.,1995)和lox66(Albert et al.,1995)。

[0133] FLP重组酶的合适的识别位点,包括但不限于:FRT(McLeod,et al.,1996),F1、F2、F3(Schlake and Bode,1994),F4、F5(Schlake and Bode,1994),FRT(LE)(Senecoff et al.,1988),FRT(RE)(Senecoff et al.,1988)。

[0134] 识别序列的其他实施例为attB、attP、attL和attR序列,其由重组酶 λ 整合酶例如phi-c31来识别。 ϕ C31 SSR仅介导异型位点attB(长度34bp)和attP(长度39bp)之间的重组(Groth et al.,2000)。attB和attP分别因细菌和噬菌体基因组上噬菌体整合酶的结合位点而得名,二者均含有很可能由 ϕ C31同型二聚体结合的不完整反向重复序列(Groth et al.,2000)。产物位点attL和attR有效地对进一步的 ϕ C31-介导的重组迟钝(Belteki et al.,2003),使得所述反应不可逆。对于催化插入,已经发现,带有attB的DNA插入至基因组attP位点,比attP位点插入至基因组attB位点更容易(Thyagarajan et al.,2001;Belteki et al.,2003)。因此,典型的策略性位置为通过将带有attP的“停泊位点”同源重组至确定的基因座,然后其与带有attB的输入序列一起用于插入。

[0135] 如本文所用,“内部核糖体进入位点”或“IRES”是指促进内部核糖体直接进入顺反子(蛋白编码区)的起始密码子如ATG,从而导致所述基因的不依赖帽结构的翻译的元件。参见例如,Jackson et al.,(1990)Trends Biochem Sci 15(12):477-83)和Jackson and Kaminski.(1995)RNA 1(10):985-1000。在具体的实施方案中,本发明包括的所述载体包含编码一种或多种多肽的一个或多个目标多核苷酸。在具体的实施方案中,为了实现多个多肽各自的有效翻译,所述多核苷酸序列可被一个或多个IRES序列或编码自我切割多肽的多核苷酸序列所分开。

[0136] 如本文所用,术语“Kozak序列”是指显著促进mRNA与核糖体小亚基的起始结合并提高翻译的短核苷酸序列。共有的Kozak序列为(GCC)RCCATGG,其中R是嘌呤(A或G)(Kozak,(1986)Cell.44(2):283-92,以及Kozak,(1987)Nucleic Acids Res.15(20):8125-48)。在具体的实施方案中,本发明包括的所述载体包含具有共有的Kozak序列且编码所需的多肽的多核苷酸。

[0137] 在某些实施方案中,载体包含选择基因,也称为可选择的标记。通常选择基因编码的蛋白:(a)赋予对抗生素或其他毒素的抗性,例如,氨苄青霉素、新霉素、潮霉素、甲氨蝶呤、博莱霉素(Zeocin)、杀稻瘟菌素或四环素,(b)补足营养缺陷型缺陷,或(c)提供复合培养基中没有的关键营养素,例如,编码芽孢杆菌的D-丙氨酸消旋酶的基因。任何数目的选择系统均可用于恢复转化的细胞系。这些包括但不限于,单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler et

al., (1977) Cell 11:223-232) 和腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Lowy et al., (1990) Cell 22: 817-823) 基因, 其分别可用于tk-或aprt-细胞。

[0138] 在不同的实施方案中, 本发明的载体用于增加、建立和/或维持一个或多个多肽例如球蛋白的表达。术语“多肽”和“蛋白”在本文中互换使用以指氨基酸残基的聚合物及其变体和合成的类似物。因此, 这些术语应用于其中一个或多个氨基酸残基为合成的非天然存在的氨基酸, 例如相应天然存在的氨基酸的化学类似物, 的氨基酸聚合物和天然存在的氨基酸聚合物。适用于本发明具体实施方案的组合物和方法的球蛋白多肽的示例性实例, 例如, SEQ ID NO: 2-4, 6-9, 11-13 和 15。还参见例如, 美国专利第 6,051,402 号和第 7,901,671 号, 其全部公开和权利要求特别地通过引用并入本文。

[0139] 适用于本发明具体实施方案的组合物和方法的 ABCD1 多肽的示例性实例, 例如 SEQ ID NO: 18。还参见例如, 美国专利第 5,869,039 号和第 6,013,769 号, 其全部公开和权利要求特别地通过引用并入本文。

[0140] 本发明的具体实施方案还包括多肽“变体”。提及多肽“变体”是指通过添加、缺失、截短和/或替换至少一个氨基酸残基而不同于参考多肽且保留了生物活性的多肽。在某些实施方案中, 多肽变体通过一个或多个替换而不同于参考多肽, 如本领域所知, 所述替换可为保守的或非保守的。

[0141] 在某些实施方案中, 变体多肽包括与参考多肽的相应序列具有至少约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性或相似性的氨基酸序列。在某些实施方案中, 氨基酸添加或缺失发生在所述参考多肽的 C-末端和/或 N-末端。

[0142] 如上面提到的, 本发明的多肽可用各种方式改变, 包括氨基酸替换、缺失、截短和插入。这类操作的方法通常为本领域已知。例如, 参考多肽的氨基酸序列变体可通过 DNA 中的突变来制备。诱变和核苷酸序列改变的方法为本领域公知。参见, 例如 Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:488-492, Kunkel et al., (1987) Methods in Enzymol, 154: 367-382, 美国专利第 4,873,192 号, Watson, J.D. et al., (1987) Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 以及本文引用的文献。关于不影响目标蛋白的生物活性的合适氨基酸替换的指导, 可参见 Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) 中的模型。

[0143] “宿主细胞”包括在体内、离体或体外用本发明的重组载体或多核苷酸转染、感染或转导的细胞。宿主细胞可包括包装细胞、生产细胞和用病毒载体感染的细胞。在具体的实施方案中, 将用本发明的病毒载体感染的宿主细胞给予至需要治疗的个体。在某些实施方案中, 术语“靶细胞”与宿主细胞互换使用以指所需细胞类型的转染、感染或转导的细胞。在优选的实施方案中, 所述靶细胞为干细胞或祖细胞。在某些优选的实施方案中, 所述靶细胞为体细胞, 例如, 成体干细胞、祖细胞或分化的细胞。在具体的优选实施方案中, 所述靶细胞为造血细胞, 例如造血干细胞或造血祖细胞。其他治疗性靶细胞在下文讨论。

[0144] 术语“干细胞”是指未分化的细胞, 其能够: (1) 长期自我更新, 或产生至少一个原始细胞的相同拷贝的能力, (2) 在单个细胞水平分化为多个细胞, 且在一些情况下为仅一种特化的细胞类型, 以及 (3) 在体内的组织功能性再生。根据其发展潜力, 将干细胞再分为全

能(totipotent)、多能(pluripotent)、专能(multipotent)和寡能/单能(oligo/unipotent)。“自我更新”是指细胞具有产生未改变的子细胞,并产生特化的细胞类型(潜力)的独特能力。自我更新可以两种方式实现。不对称的细胞分裂产生一个与母细胞相同的子细胞和一个不同于母细胞的子细胞,其为祖细胞或分化的细胞。不对称的细胞分裂不增加细胞的数目。对称的细胞分裂产生两个相同的子细胞。细胞的“增殖”或“扩增”是指对称地分裂细胞。

[0145] 如本文所用,术语“全能”是指细胞形成生物体的所有细胞谱系的能力。例如,在哺乳动物中仅受精卵和首次卵裂期分裂球为全能。如本文所用,术语“多能”是指细胞形成身体或躯体(即胚体)的所有细胞谱系的能力。如本文所用,术语“专能”是指成体干细胞形成一种细胞谱系的多种细胞类型的能力。例如,造血干细胞能够形成血细胞谱系的所有细胞,例如,淋巴细胞和骨髓细胞。如本文所用,术语“寡能”是指成体干细胞仅分化为几种不同的细胞类型的能力。例如,淋巴和骨髓干细胞能够分别形成淋巴细胞谱系或骨髓细胞谱系。如本文所用,术语“单能”是指细胞形成单一细胞类型的能力。例如,精子发生干细胞仅能形成精子细胞。

[0146] 如本文所用,术语“祖细胞(progenitor)”或“祖细胞(progenitor cell)”是指能够自我更新并分化为多种成熟细胞的细胞。许多祖细胞沿着单一细胞谱系分化,但可具有非常广泛的增殖能力。

[0147] 造血干细胞(HSC)产生定向造血祖细胞(HPC),其能够在生物体的一生中产生所有类型的成熟血细胞。术语“造血干细胞”或“HSC”是指产生生物体所有血细胞类型的专能干细胞,所述血细胞类型包括髓样(例如,单核细胞和巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞/血小板、树突状细胞)细胞谱系和淋巴样细胞谱系(例如,T-细胞、B-细胞、NK-细胞)以及本领域已知的其他细胞(参见Fei,R.,et al.,美国专利第5,635,387号;McGlave,et al.,美国专利第5,460,964号;Simmons,P.,et al.,美国专利第5,677,136号;Tsukamoto,et al.,美国专利第5,750,397号;Schwartz,et al.,美国专利第5,759,793号;DiGuisto,et al.,美国专利第5,681,599号;Tsukamoto,et al.,美国专利第5,716,827号)。当移植到受到致命辐射的动物或人时,造血干细胞和造血祖细胞能够重新繁殖红系细胞、中性粒细胞-巨噬细胞、巨核细胞和淋巴样细胞造血细胞库。

[0148] 通常需要产生大量病毒粒子以达到合理的病毒滴度。通过将转移载体转染至包装细胞系来产生病毒粒子,所述包装细胞系包含病毒结构基因和/或附属基因,例如gag、pol、env、tat、rev、vif、vpr、vpu、vpx或nef基因,或者其他逆转录病毒基因。

[0149] 如本文所用,术语“包装载体”是指缺少包装信号的表达载体或病毒载体,且其包含编码1、2、3、4个或更多个病毒结构基因和/或附属基因的多核苷酸。通常,包装载体包含于包装细胞中,其通过转染、转导或感染而被引入至细胞。转染、转导或感染的方法为本领域技术人员所熟知。本发明的逆转录病毒/慢病毒转移载体可通过转染、转导或感染被引入至包装细胞系,从而产生生产细胞或细胞系。本发明的包装载体可通过标准方法被引入至人细胞或细胞系,包括例如,磷酸钙转染、脂质转染或电穿孔。在一些实施方案中,将所述包装载体和显性可选择标记一起引入至细胞,如新霉素、潮霉素、嘌呤霉素、杀稻瘟菌素(blastocidin)、博来霉素(zeocin)、胸苷激酶、DHFR、Gln合成酶或ADA,然后在合适药物的存在下选择并分离克隆。可选择标记基因可物理连接至由包装载体编码的基因,例如通过

IRES或自我切割病毒肽。

[0150] 病毒包膜蛋白 (env) 决定了可用所述细胞系产生的重组逆转录病毒进行感染和转化的宿主细胞范围。在慢病毒如HIV-1、HIV-2、SIV、FIV和EIV的情况下,env蛋白包括gp41和gp120。优选地,由本发明的包装细胞表达的病毒env蛋白是由来自病毒gag和pol基因的单独载体所编码的,如此前所述。

[0151] 可用于本发明逆转录病毒-来源的env基因的示例性实例,包括但不限于:MLV包膜、10A1包膜、BAEV、FeLV-B、RD114、SSAV、埃博拉病毒 (Ebola)、仙台病毒、FPV (鸡瘟病毒) 和流感病毒包膜。类似地,可使用编码来自RNA病毒 (例如,下述RNA病毒科:小RNA病毒科、杯状病毒科、星状病毒科、披膜病毒科、黄病毒科、冠状病毒科、副粘液病毒科、弹状病毒科、丝状病毒科、正粘液病毒科、布尼亚病毒科、沙粒病毒科、呼肠孤病毒科、双RNA病毒科、逆转录病毒科) 和来自DNA病毒 (嗜肝病毒科、环状病毒科、细小病毒科、乳多空病毒科、腺病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科和虹彩病毒科) 的包膜的基因。示例性实例包括,FeLV、VEE、HFVW、WDSV、SFV、狂犬病毒 (Rabies)、ALV、BIV、BLV、EBV、CAEV、SNV、ChTLV、STLV、MPMV、SMRV、RAV、FuSV、MH2、AEV、AMV、CT10和EIAV。

[0152] 在其他实施方案中,用于将本发明的病毒假型化的包膜蛋白包括但不限于以下任何病毒:甲型流感如H1N1、H1N2、H3N2和H5N1 (禽流感)、乙型流感、丙型流感病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、轮状病毒、诺瓦克病毒组的任何病毒、肠腺病毒、细小病毒、登革热病毒、猴痘、单股反链病毒、丽沙病毒如狂犬病毒、拉各斯蝙蝠病毒、莫科拉病毒、杜文海格病毒、欧洲蝙蝠病毒1&2和澳大利亚蝙蝠病毒、暂时病毒、水疱病毒、水疱性口炎病毒 (VSV)、疱疹病毒如单纯疱疹病毒1型和2型、水痘带状疱疹、巨细胞病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒 (EBV)、人类疱疹病毒 (HHV)、人类疱疹病毒6型和8型、人类免疫缺陷病毒 (HIV)、乳突病毒、鼠 γ -疱疹病毒、沙粒病毒如阿根廷出血热病毒、玻利维亚出血热病毒、萨比亚相关的出血热病毒、委内瑞拉出血热病毒、拉沙热病毒、马秋博病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、布尼亚病毒如克里米亚-刚果出血热病毒、汉坦病毒、导致肾综合征的出血热病毒、里夫特裂谷热病毒、丝状病毒科 (丝状病毒) 包括埃博拉出血热和马尔堡出血热、黄病毒科包括科萨努尔森林病病毒、鄂木斯克出血热病毒、蜱传脑炎病毒以及副粘液可病毒如亨德拉病毒和尼帕病毒、大天花和小天花 (痘疮)、甲病毒属如委内瑞拉马脑炎病毒、东方马脑炎病毒、西方马脑炎病毒、SARS-相关的冠状病毒 (SARS-CoV)、西尼罗河病毒、任何引起脑炎的病毒。

[0153] 在一实施方案中,本发明提供了产生重组逆转录病毒的包装细胞,例如,用VSV-G糖蛋白假型化的慢病毒。

[0154] 如本文所用,术语“假型”或“假型化”是指其病毒包膜蛋白已经被具有优选特性的另一种病毒的病毒包膜蛋白替换的病毒。例如,HIV可使用水疱性口炎病毒G-蛋白 (VSV-G) 包膜蛋白进行假型化,其允许HIV感染更宽范围的细胞,因为HIV包膜蛋白 (由env基因编码) 通常使病毒靶向CD4⁺呈现细胞。在本发明的优选实施方案中,用VSV-G将慢病毒包膜蛋白假型化。在一实施方案中,本发明提供了产生重组逆转录病毒的包装细胞,例如,用VSV-G包膜糖蛋白假型化的慢病毒。

[0155] 如本文所用,术语“包装细胞系”是指这样的细胞系,其不包含包装信号,但能够稳定地或瞬时地表达正确包装病毒粒子所需的病毒结构蛋白和复制酶 (例如,gag、pol和

env)。任何合适的细胞系均可用于制备本发明的包装细胞。通常,所述细胞为哺乳动物细胞。在具体实施方案中,用于制备包装细胞系的所述细胞为人细胞。可使用的合适细胞系包括,例如,CHO细胞、BHK细胞、MDCK细胞、C3H 10T1/2细胞、FLY细胞、Psi-2细胞、BOSC 23细胞、PA317细胞、WEHI细胞、COS细胞、BSC 1细胞、BSC 40细胞、BMT 10细胞、VERO细胞、W138细胞、MRC5细胞、A549细胞、HT1080细胞、293细胞、293T细胞、B-50细胞、3T3细胞、NIH3T3细胞、HepG2细胞、Saos-2细胞、Huh7细胞、HeLa细胞、W163细胞、211细胞和211A细胞。在优选的实施方案中,所述包装细胞为293细胞、293T细胞或A549细胞。在另一个优选的实施方案中,所述细胞为A549细胞。

[0156] 如本文所用,术语“生产细胞系”是指能够产生重组逆转录病毒粒子的细胞系,其包括包装细胞系和包含包装信号的转移载体构建物。可使用常规技术制备传染性病毒粒子和病毒储备液。制备病毒储备液的方法为本领域已知,且描述于例如,Y.Soneoka et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633,以及N.R.Landau et al. (1992) J. Virol. 66:5110-5113。可使用常规技术从包装细胞中采集传染性病毒粒子。例如,如本领域所知,可通过细胞裂解收集传染性粒子,或通过收集细胞培养物上清液。任选地,如需要可对收集的病毒粒子进行纯化。合适的纯化技术为本领域技术人员熟知。

[0157] “增强”、“促进”、“增加”或“扩增”通常是指相比用媒介物或对照分子/组合物转导的细胞数目,本发明组合物和/或方法引起、导致或产生更高数目的转导的细胞的能力。在一实施方案中,相比现有用于转导的组合物和方法,本发明的组合物和方法转导的造血干细胞包含转导的细胞数目增加。细胞转导的增加可使用本领域已知的方法来确定,如报告子检测、RT-PCR和细胞表面蛋白表达等等。“增加的”或“提高的”数量的转导通常是指“统计学上显著的”数量,且可包括增加为由媒介物、对照组合物或其他转导方法所转导的细胞数目的1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包括其间的和大于1的所有整数和小数,例如,1.5、1.6、1.7、1.8等)。

[0158] “减少”、“降低”、“减小”、“减低或“削减”通常是指,相比用本发明组合物和/或方法转导的细胞,导致相对较少转导的细胞的组合物和/或方法。“降低的”或“减少的”转导的细胞数量通常是指“统计学上显著的”数量,且可包括减少为本发明组合物和/或方法所产生的转导的细胞数目(参考响应)的1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包括其间的和大于1的所有整数和小数,例如,1.5、1.6、1.7、1.8等)。

[0159] “维持”、“保持”、“维护”、“不改变”、“基本上不改变”或“基本上不降低”通常是指与媒介物、对照分子/组合物引起的相应或特定细胞谱系中的响应相当的生理响应。相当的响应是指其与参考响应没有显著差异或可测量的差异。

[0160] 本文所用冠词“a”、“an”、“the”是指一个或一个以上(即至少一个)该冠词的语法对象。以举例的方式,“元件(an element)”是指一个或一个以上的元件。

[0161] 使用可选择的(例如,“或”)应理解为是指选择项的一个、两个或其任何组合。如本文所用,所用术语“包括”和“包含”为同义的。

[0162] 如本文所用,术语“约(about/approximately)”是指相对于参考的数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度,数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度变化达15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。在一实

施方案中,术语“约 (about/approximately)”表示对于参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度,±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%或±1%范围的数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。

[0163] 在整个本申请文件中,除非另有要求,词语“包括/包含/含有 (comprise/comprises/comprising)”应理解为意指包括所述步骤、元件、步骤或元件的组,但不排除任何其他步骤、元件、步骤或元件的组。“由…组成”是指包括且限于术语“由…组成”所列举的任何事物。因此,“由…组成”表示所列举的元件为必须的和强制性的,且不存在其他元件。“基本上由…组成”是指包括任何该词语所列举的元件,且限于其他不干扰或有助于本公开中列举的元件所指定的活性或作用的元件。因此,词语“基本上由…组成”表示所列举的元件为必须的和强制性的,但其他元件不是任选的,其根据是否影响所列举的元件的活性或作用可能存在或不存在。

[0164] 遍及本说明书中提及“一实施方案”或“实施方案”是指与该实施方案相关而描述的具体特征、结构或特性包含在本发明的至少一实施方案中。因此,遍及本说明书中多个地方出现词语“在一实施方案中”或“实施方案”不一定均指相同的实施方案。而且,所述具体特征、结构或特性可按任何合适的方式组合至一个或多个实施方案中。

[0165] 在以下描述中,陈述了某些具体细节以便提供本发明不同实施方案的充分理解。然而,本领域技术人员应理解,本发明可在没有这些细节下实施。此外应理解,源自本文公开的结构和替代物的各种组合的单独载体或载体的组,在本申请中公开的程度等同于每个载体或载体的组被单独地陈述。因此,具体载体结构或具体替代物的选择处于本发明公开的范围之内。

[0166] C. 病毒载体

[0167] 已经测试和发现了逆转录病毒和慢病毒载体是用于稳定地将目标基因,例如编码治疗性多肽的基因,引入至各种靶细胞的基因组中的合适递送载体。本发明部分地包括,基因治疗载体至细胞群的改善的递送,所述细胞群被给予至个体以提供基因治疗。

[0168] 本发明还提供转移载体,其可用于实施本发明的方法。尽管本领域技术人员应理解,这类转移载体可使用各种不同的病毒载体来制备,在具体的实施方案中,所述转移载体为逆转录病毒载体或慢病毒载体,部分地由于慢病毒载体能够在体外和体内提供转基因至非分裂细胞中的有效递送、整合和长期表达。各种慢病毒载体为本领域已知,参见Naldini et al., (1996a, 1996b, and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, 美国专利第6,013,516号和第5,994,136号,其各自均可适用于制备本发明的转移载体。

[0169] 通常,这些载体是基于质粒的或基于病毒的,且被构建为带有必要的序列以用于将编码治疗性多肽的核酸转移至宿主细胞。

[0170] 在示例性的实施方案中,所述逆转录病毒载体为慢病毒载体。因此,所述载体可源自人免疫缺陷-1 (HIV-1)、人免疫缺陷-2 (HIV-2)、猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猫免疫缺陷病毒 (FIV)、牛免疫缺陷病毒 (BIV)、Jembrana病毒 (JDV)、马传染性贫血病毒 (EIAV)、山羊关节炎脑炎病毒 (CAEV) 等。涉及本发明的大多数方面时,基于HIV的载体骨架 (即HIV顺式作用序列元件和HIV gag、pol和rev基因) 通常为优选的,由于基于HIV的构建物在人细胞转导时为最有效的。

[0171] 尽管具体的示例性实施方案包括用于矫正造血功能障碍例如血红蛋白病的载体、组合物和方法的更详细描述,本发明不应理解为限于本公开。本领域技术人员容易理解,本文描述的原理可应用于其他系统中的基因治疗,例如神经系统,包括眼睛、中枢神经系统和周围神经系统;循环系统;肌肉系统;骨骼系统;器官,包括皮肤、心、肺、胰腺、肝、肾、肠等。

[0172] 在一实施方案中,本发明提供了包含在具体细胞类型或细胞谱系中指导目标多核苷酸例如球蛋白基因表达的表达调控序列的载体,例如慢病毒载体。使用细胞类型或细胞谱系表达调控序列提供了在单一细胞谱系中将多核苷酸表达限制在期望的细胞分化阶段的安全优势;因此,本发明的载体减轻了对于在不期望的细胞类型中的多肽异位表达的担忧。

[0173] 在一个非限制性实例中,所述表达调控序列可为如本文其他地方所公开的普遍存在的表达调控序列。

[0174] 在另一个非限制性实例中,所述表达调控序列可为干细胞特异性表达调控序列,其指导目标多核苷酸在神经干细胞、间充质干细胞、肝脏干细胞、胰腺干细胞、心脏干细胞、肾脏干细胞或造血干细胞中的干细胞特异性表达。

[0175] 在又一非限制性实例中,所述表达调控序列可为细胞类型或细胞谱系特异性表达调控序列,其指导目标多核苷酸在造血干细胞、造血祖细胞、髓样细胞、淋巴样细胞、血栓形成细胞谱系、肥大细胞、红细胞生成细胞谱系细胞、粒细胞生成细胞谱系细胞和单核细胞生成细胞谱系细胞中的表达。

[0176] 在具体的实施方案中,本发明的载体可用于在一种或多种或所有造血细胞中表达多核苷酸例如目标基因,所述造血细胞包括但不限于:造血干细胞、造血祖细胞、髓样祖细胞、淋巴样祖细胞、血小板形成祖细胞、红系祖细胞、粒细胞生成祖细胞、单核细胞生成祖细胞、成巨核细胞、前巨核细胞、巨核细胞、凝血细胞/血小板、前成红细胞、嗜碱性成红细胞、多染成红细胞、正色成红细胞、多染红细胞、红细胞(RBC)、嗜碱性前髓细胞、嗜碱性髓细胞、嗜碱性后髓细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性前髓细胞、嗜中性髓细胞、嗜中性后髓细胞、中性粒细胞、嗜酸性前髓细胞、嗜酸性髓细胞、巨噬细胞、树突状细胞、成淋巴细胞、成前淋巴细胞、自然杀伤(NK)-细胞、小淋巴细胞、T-淋巴细胞、B-淋巴细胞、浆细胞和淋巴样树突状细胞。

[0177] 在优选的实施方案中,本发明的载体可用于在一种或多种红系细胞中表达多核苷酸例如目标基因,所述红系细胞例如,前成红细胞、嗜碱性成红细胞、多染成红细胞、正色成红细胞、多染红细胞、红细胞(RBC)。

[0178] 在一实施方案中,所述载体包含造血细胞启动子、增强子或启动子/增强子,其可操作地连接至目标基因,例如球蛋白。

[0179] 合适的细胞类型或细胞谱系特异性表达调控序列包括但不限于,造血细胞表达控制序列,例如造血干细胞启动子和造血祖细胞启动子。在实施方案中,如果期望在一个或多个红系细胞中表达目标基因,合适的造血细胞表达控制序列可包括但不限于,红系细胞特异性启动子和任选地红系细胞特异性增强子、人 β -球蛋白启动子、人 β -球蛋白LCR或人 α -球蛋白HS40增强子和锚蛋白-1启动子。

[0180] 在一实施方案中,合适的细胞类型或细胞谱系特异性表达调控序列包括但不限于,在小神经胶质细胞中具有活性的启动子。在某些实施方案中,所述启动子包括MND启动子或其具有转录活性的片段,其可操作地连接至目标基因,例如ABCD1。

[0181] 使用细胞类型或细胞谱系表达调控序列提供了将多核苷酸表达限制于在单一谱系中细胞分化的所需阶段的安全优势;因此,本发明的载体减小了处理在不期望的细胞类型中多肽异位表达的担忧。在一实施方案中,本发明提供了载体,其包含一个或多个LTR和可操作地连接至目标基因的表达调控序列。在相关的实施方案中,所述表达调控序列为红系细胞特异性表达调控序列,其选自:人 β -球蛋白启动子;人 β -球蛋白LCR;以及人 α -球蛋白HS40增强子和锚蛋白-1启动子。

[0182] 在不同的实施方案中,载体设计应符合治疗、预防或改善特定造血器官疾病、造血功能障碍或造血功能病症的目的。例如,本发明包括用于血红蛋白病基因治疗的载体,其包含的目标基因选自:人 α -球蛋白、人 β -球蛋白、人 δ -球蛋白和人 γ -球蛋白,或者生物学活性变体或其片段。在一实施方案中,所述球蛋白基因选自:野生型人 β -球蛋白基因、包含一个或多个内含子序列缺失的缺失人 β -球蛋白基因,以及编码至少一个抗镰状化的氨基酸残基的突变人 β -球蛋白基因。

[0183] 在具体实施方案中,其中接受治疗的病症为镰状细胞血红蛋白病,所述目标基因可为抗镰状化蛋白。如本文所用,“抗镰状化蛋白”是指预防或逆转导致镰状细胞病症中红细胞镰状化的病理事件的多肽。在本发明一实施方案中,本发明的转导的细胞被用于将抗镰状化蛋白递送至患有血红蛋白病症的个体。抗镰状化蛋白也包括包含抗镰状化的氨基酸残基的突变 β -球蛋白基因。

[0184] 在优选实施方案中,一个该球蛋白变体为人 β A-球蛋白基因,其在密码子87(β A-T87Q)编码苏氨酸至谷氨酰胺的突变;或者人 β A-球蛋白基因(该球蛋白多肽的成熟形式已通过切割N-端蛋氨酸进行了处理,该成熟球蛋白多肽的密码子87为苏氨酸;全长非切割的球蛋白多肽的密码子88为苏氨酸)。其他抗镰状化的氨基酸残基为本领域所知并可用于本发明中。例如,参见美国专利第6,051,402号、美国专利第5,861,488号、美国专利第6,670,323号、美国专利第5,864,029号、美国专利第5,877,288号和Levasseur et al., Blood 102:4312-4319 (2003), 其通过引用并入本文。

[0185] 在某些实施方案中,将包含红系细胞特异性表达调控序列的载体用于治疗、预防或改善显著超过血红蛋白病的大量疾病。红血细胞前体细胞为有用的细胞群,在其中表达可分泌至循环系统从而递送至全身的多肽。这类体内蛋白递送的实例为人凝血因子IX,其为血友病B患者中缺失的凝血因子,参见例如,A.H.Chang, et al., Molecular Therapy (2008), 其通过引用并入本文。

[0186] 在一实施方案中,用本发明的载体转导的细胞可用作体外、离体或体内蛋白分泌的“工厂”。例如,包含红系细胞特异性表达调控序列的载体可用于由分化自HSC的红系细胞在体外大规模生产蛋白。

[0187] 可以这种方式表达的目标多核苷酸,包括但不限于:腺苷脱氨酶、溶酶体储积病中受影响的酶、载脂蛋白E、源自脑的神经营养因子(BDNF)、骨形态生成蛋白2(BMP-2)、骨形态生成蛋白6(BMP-6)、骨形态生成蛋白7(BMP-7)、心肌营养蛋白1(CT-1)、CD22、CD40、睫状神经营养因子(CNTF)、CCL1-CCL28、CXCL1-CXCL17、CXCL1、CXCL2、CX3CL1、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、多巴胺、红细胞生成素、凝血因子IX、凝血因子VIII、表皮生长因子(EGF)、雌性激素、FAS-配体、成纤维细胞生长因子1(FGF-1)、成纤维细胞生长因子2(FGF-2)、成纤维细胞生长因子4(FGF-4)、成纤维细胞生长因子5(FGF-5)、成纤维细胞生长因子6(FGF-6)、成纤

维细胞生长因子1 (FGF-7)、成纤维细胞生长因子1 (FGF-10)、Flt-3、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞刺激因子 (GM-CSF)、生长素、肝细胞生长因子 (HGF)、干扰素- α (IFN- α)、干扰素- β (IFN- β)、干扰素- γ (IFN γ)、胰岛素、胰高血糖素、胰岛素样生长因子1 (IGF-1)、胰岛素样生长因子2 (IGF-2)、白介素1 (IL-1)、白介素2 (IL-2)、白介素3 (IL-3)、白介素4 (IL-4)、白介素5 (IL-5)、白介素6 (IL-6)、白介素7 (IL-7)、白介素8 (IL-8)、白介素9 (IL-9)、白介素10 (IL-10)、白介素11 (IL-11)、白介素12 (IL-12)、白介素13 (IL-13)、白介素15 (IL-15)、白介素17 (IL-17)、白介素19 (IL-19)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、巨噬细胞炎症蛋白3a (MIP-3a)、巨噬细胞炎症蛋白3b (MIP-3b)、神经生长因子 (NGF)、神经营养蛋白3 (NT-3)、神经营养蛋白4 (NT-4)、甲状旁腺素、源自血小板的生长因子AA (PDGF-AA)、源自血小板的生长因子AB (PDGF-AB)、源自血小板的生长因子BB (PDGF-BB)、源自血小板的生长因子CC (PDGF-CC)、源自血小板的生长因子DD (PDGF-DD)、RANTES、干细胞因子 (SCF)、源自基质细胞的因子1 (SDF-1)、睾酮、转化生长因子- α (TGF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、Wnt1、Wnt2、Wnt2b/13、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt7c、Wnt8、Wnt8a、Wnt8b、Wnt8c、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt14、Wnt15或Wnt16、音猬因子、沙漠刺猬因子和印度刺猬因子。

[0188] 在一实施方案中,本发明的载体包括至少一个修饰的或未修饰的逆转录病毒LTR,例如慢病毒LTR、 β -球蛋白启动子和 β -球蛋白基因座控制区 (LCR),其可操作地连接至例如编码球蛋白多肽的目标多核苷酸。LTR的合适的修饰包括但不限于:将5'LTR替换为异源启动子例如,巨细胞病毒 (CMV) 启动子、劳氏肉瘤病毒 (RSV) 启动子、胸苷激酶启动子或猿猴病毒40 (SV40) 启动子;以及3'LTR的一个或多个修饰、添加和/或缺失,如本文其他地方所讨论。

[0189] 在具体实施方案中,使用人 β -球蛋白启动子、源自人 β -球蛋白LCR的包含一个或多个DNA酶I超敏感位点2、3和4的 β -球蛋白LCR,和/或人 β -球蛋白3'增强子元件,以实现多核苷酸的红系细胞特异性表达。

[0190] 在不同的实施方案中,本发明的载体包含一个或多个选自以下的元件:Psi包装序列 (Ψ^+)、中心聚嘌呤区/侧翼DNA (cPPT/FLAP)、逆转录病毒输出元件、转录后调控元件、一个或多个绝缘子元件、聚腺苷酸化序列、可选择标记和细胞自杀基因,如本文其他地方所讨论。

[0191] 在不同的实施方案中,本发明的载体包含可操作地于造血细胞中的启动子,其可操作地连接至编码用于治疗血红蛋白病的多肽的基因。所述载体可具有一个或多个LTR,其中每个LTR包含一个或多个修饰,如一个或多个核苷酸替换、添加或缺失。所述载体可进一步包含多个附加元件中的一个以便增加转导效率 (例如cPPT/FLAP)、病毒包装 (例如, Psi (Ψ) 包装信号, RRE), 和/或增加治疗基因表达的其他元件 (例如, 聚腺苷酸化序列)。

[0192] 在一实施方案中,载体包含左端 (5') 逆转录病毒LTR、Psi包装序列 (Ψ^+)、中心聚嘌呤区/侧翼DNA (cPPT/FLAP)、逆转录病毒输出元件、 β -球蛋白启动子、 β -球蛋白基因座控制区 (LCR), 和任选地3' β -球蛋白增强子,其可操作地连接至目标多核苷酸,以及包含一个或多个绝缘子元件或聚腺苷酸化序列的右端 (3') 逆转录病毒LTR。

[0193] 在具体的实施方案中,本发明的载体为慢病毒载体,其包含左端 (5') HIV-1LTR、Psi包装序列 (Ψ^+)、HIV-1中心聚嘌呤区/DNA侧翼序列 (cPPT/FLAP)、rev应答元件 (RRE)、 β -

球蛋白启动子、 β -球蛋白基因座控制区(LCR),和任选地3' β -球蛋白增强子,其可操作地连接至目标多核苷酸,以及包含一个或多个绝缘子元件和兔 β -球蛋白聚腺苷酸序列(r β gpa)的右端(3')逆转录病毒LTR。

[0194] 在不同的实施方案中,本发明的载体包含可操作地在小神经胶质细胞中的启动子,其可操作地连接至编码用于治疗肾上腺脑白质营养不良和/或肾上腺髓质神经病变的多肽的基因。载体可具有一个或多个LTR,其中任一个LTR包含一个或多个修饰,如一个或多个核苷酸替换、添加或缺失。所述载体可进一步包含多个附加元件中的一个以提高转导效率(例如,cPPT/FLAP)、病毒包装(例如,Psi(Ψ)包装信号、RRE),和/或提高治疗性基因表达的其他元件(例如,聚腺苷酸序列)。

[0195] 在一个具体实施方案中,本发明的转移载体包含左端(5')逆转录病毒LTR;中心聚嘌呤区/侧翼DNA(cPPT/FLAP);逆转录病毒输出元件;在小神经胶质细胞中具有活性的启动子,其可操作地连接至编码ATP-结合盒亚家族D成员-1(ABCD1)多肽的多核苷酸;以及右端(3')逆转录病毒LTR。

[0196] 在某一实施方案中,本发明提供了慢病毒载体,其包括:左端(5')HIV-1LTR;Psi(Ψ)包装信号;cPPT/FLAP;RRE;MND启动子,其可操作地连接至编码人ABCD1多肽的多核苷酸;右端(3')自失活的(SIN)HIV-1LTR;以及兔 β -球蛋白聚腺苷酸化序列。

[0197] 本领域技术人员应理解,从本发明已有的实施方案可形成许多其他不同的实施方案,以便治疗性转基因或目标基因在除造血细胞谱系外的靶细胞类型或细胞谱系中表达,例如,神经细胞谱系。

[0198] D. 转导方法

[0199] 本发明部分地,包括显著增加靶细胞转导效率的方法和组合物。不希望受限于任何特定的理论,本发明的组合物和方法包括可使用明显更少的病毒来转导明显更多的细胞,从而使得在治疗细胞基因组中的基因组改变和/或原癌基因的插入激活作用风险最小化。使得在治疗细胞基因组中原癌基因的插入激活作用和其他基因组改变风险最小化,是设计合适的基因治疗方案中的重要考虑,因为这使得包含癌症样特征的转导的细胞在体内克隆扩增并产生癌症、肿瘤或其他涉及异常细胞增殖的疾病的可能性最小化。而且,本领域已经注意到,使用大量病毒进行转导通常对转导的细胞具有细胞毒性。因此,本发明的组合物和方法进一步提高了转导的细胞的存活力。因此,本发明提供了更安全且更有效的基因治疗。

[0200] 使用逆转录病毒或慢病毒载体通过病毒感染而非通过转染来递送基因或其他多核苷酸序列被称为“转导”。在一实施方案中,通过感染和前病毒整合将逆转录病毒载体转导至细胞。在某些实施方案中,如果细胞例如靶细胞包含通过使用病毒或逆转录病毒载体感染而递送该细胞的基因或其他多核苷酸序列,则所述细胞被“转导”。在具体的实施方案中,转导的细胞包含通过逆转录病毒或慢病毒载体递送至其细胞基因组的一个或多个基因或其他多核苷酸序列。

[0201] 在具体的实施方案中,用本发明的病毒载体转导的宿主细胞或靶细胞表达治疗性多肽并被给予至个体以治疗和/或预防疾病、失调或病症。

[0202] 可使用常规技术制备传染性病毒粒子和病毒储备液。制备病毒储备液的方法为本领域已知,且描述于例如,Y.Soneoka et al.(1995)Nucl.Acids Res.23:628-633,以及

N.R.Landau et al. (1992) J.Virol.66:5110-5113。

[0203] 在具体的实施方案中,基于HIV 1型(HIV-1)的病毒粒子可通过在生产细胞中共表达病毒粒子包装元件和转移载体来产生。可用很多质粒瞬时转染这些细胞。一般使用3-4个质粒,但根据慢病毒元件分解为分立单元的程度,质粒数目可更大。例如,一个质粒可编码源自HIV-1的病毒粒子的核心和酶组分。该质粒被称为包装质粒。另一个质粒通常编码包膜蛋白,最常见为水疱性口炎病毒(VSV G)的G蛋白,因为其高度稳定性和广泛的向性。该质粒可称为包膜表达质粒。又一质粒编码待转移至靶细胞的基因组,即所述载体本身,其被称为转移载体。可通过已知技术将所述包装质粒转导至人细胞系,包括磷酸钙转染、脂质转染或电穿孔。通过该技术及其变体可产生滴度为每毫升几百万转导单位(TU/ml)的重组病毒。超速离心后可获得约 10^8 TU/ml、 10^9 TU/ml、 10^{10} TU/ml、 10^{11} TU/ml、 10^{12} TU/ml或约 10^{13} TU/ml的浓缩储备液。

[0204] 可使用常规技术从包装细胞收集传染性病毒粒子。例如,如本领所知,可通过细胞溶解收集传染性病毒粒子或通过收集细胞培养物上清液。任选地,如需要可纯化所收集的病毒粒子。合适的纯化技术为本领域技术人员所熟知。

[0205] 可采用本领域熟知的技术在体内、离体或体外使用病毒感染细胞。例如,当在离体转导细胞例如CD34⁺细胞、树突状细胞、周边血细胞或干细胞时,通常使用约为1-50的感染复数(MOI)也相当于每 10^5 细胞为 1×10^5 至 50×10^5 病毒载体转导单位的剂量,将所述载体粒子和细胞一起孵育。当然,这包括相当于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45和50MOI的载体量。

[0206] 也可通过直接将病毒注射至需要治疗的细胞、组织或器官来递送至体内的个体。直接注射需要约1-50的感染复数(MOI),也相当于每 10^5 细胞为 1×10^5 至 50×10^5 病毒载体转导单位。

[0207] 可根据病毒滴度(TU/mL)来递送病毒,所述病毒滴度可使用市购的p24滴度测定来测量,其为针对p24病毒外壳蛋白的ELISA。下列公式可用于计算p24的pg/mL:每个慢病毒的物理粒子(PP)有约2000个分子的p24: $(2 \times 10^3) \times (24 \times 10^3 \text{Da的p24/PP})$, 48×10^6 /阿伏伽德罗常数 = $(48 \times 10^6) / (6 \times 10^{23}) = 8 \times 10^{-17}$ g的p24/PP,约1PP每 1×10^{-16} g的p24, 1×10^4 PP每pg的p24。合理地包装的VSV-G假型化慢病毒载体可具有的感染指数范围为1TU/1000个物理粒子(PP)至1TU/100PP(或更少)。因此,该范围约为10-100TU/pg p24。正是通过该转换来获得TU/mL。

[0208] 基于过去的经验,直接注射的慢病毒量由总TU确定,并且可基于能够可行地注射至该位点的体积和待注射的组织类型而变化。例如,脑部注射位点仅可允许少量体积的注射病毒,因而优选高滴度的制剂,每次注射可使用的TU为约 1×10^6 至 1×10^7 ,约 1×10^6 至 1×10^8 , 1×10^6 至 1×10^9 ,约 1×10^7 至 1×10^{10} , 1×10^8 至 1×10^{11} ,约 1×10^8 至 1×10^{12} ,或约 1×10^{10} 至 1×10^{12} 或更多。然而,全身性的递送可容纳大得多的TU,可递送的加载量为 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 或 1×10^{15} 。

[0209] 本发明包括组合物和方法,其提供使用比上述公布的更低的病毒滴度在体外、离体和体内高效转导细胞,以获得与没有本发明的组合物和方法情况下相当的转导效率。

[0210] 本发明的某些方面源于该出人意料的发现,即通过在体外、离体或体内将细胞与逆转录病毒和一种或多种刺激前列腺素EP受体信号转导通路的化合物接触显著提高了转

导效率,例如小分子或者那些公开于W02007/112084和W02010/108028的化合物,其各自通过引用整体并入本文。如本文所用,术语“刺激前列腺素EP受体信号转导”、“激活前列腺素EP受体信号转导”或“增加前列腺素EP受体信号转导”通常是指化合物在与一种或多种化合物接触过的细胞中增加前列腺素EP受体下游的细胞信号转导活性的能力,所述增加是相对于没有所述一种或多种化合物情况下前列腺素EP受体下游的细胞信号转导活性。可用于测量前列腺素EP受体信号转导通路激活或刺激的检测方法为本领域所知,且描述于例如,W02010/108028,其通过引用整体并入本文。

[0211] 刺激前列腺素EP受体信号转导通路的化合物的示例性实例包括但不限于,小分子例如,小有机分子、前列腺素、Wnt途径激动剂、cAMP/PI3K/AKT途径激动剂、Ca²⁺第二信使通路激动剂、一氧化氮(NO)/血管紧缩素信号转导激动剂和已知刺激前列腺素信号转导通路的其他化合物,其选自:甲苯凡林、氟氢缩松、阿替洛尔、吡洛洛尔、加波沙朵、犬尿喹啉酸、胍苯哒嗪、噻苯咪唑、比枯枯灵碱、拉特罗毒素、黄夹次苷、丙咪嗪、氯磺丙脲、1,5-亚戊基四唑、4-氨基吡啶、二氮嗪、苯磷硫胺、12-甲氧基十二碳烯酸、N-甲酰-Met-Leu-Phe、加拉碘铵、IAA 94、氯烯雌醚和这些化合物的衍生物。

[0212] 在一个优选实施方案中,所述刺激前列腺素途径的化合物为天然存在的或合成的化学分子或多肽,其结合EP受体和/或与EP受体相互作用,通常激活或促进与前列腺素EP受体有关的一个或多个下游信号转导通路,如本文所述和本领域所知。

[0213] 在一实施方案中,所述刺激前列腺素途径的化合物选自:PGA₂;PGB₂;PGD₂;PGE₁(前列地尔(CaverjectTM;EdexTM;MuseTM;Prostin VRTM);PGE₂;PGF₂;PGI₂(依前列醇(FlolanTM;ProstacyclinTM));PGH₂;PGJ₂;及其前体、代谢物、衍生物和类似物。

[0214] 其他刺激前列腺素途径的示例性化合物,包括但不限于:15d-PGJ₂;δ-12-PGJ₂;2-羟基十七碳三烯酸(HHT);血栓素(TXA2和TXB2);PGI₂类似物,例如伊洛前列素(VentavisTM)和曲前列环素(RemodulinTM);PGF₂类似物,例如曲伏前列素(TravatanTM)、卡前列素-氨丁三醇(HemabateTM)、他氟前列素(ZioptanTM)、拉坦前列素(XalatanTM)、比马前列素(LumiganTM;LatisseTM)、异丙基乌诺前列酮(ResculaTM)、氯前列烯醇(CiosinTM,CyclixTM, EstrumateTM,LutaprostTM,OnsettTM,PlanateTM)、Oestrophon和Superphan;PGE₁类似物,例如米索前列醇(CytotecTM)和布他前列素;和科里醇-A[[3α,4α,5β,6α]-(-)-[六氢-4-(羟甲基)-2-氧-2H-环戊并[b]呋喃-5-基][1,1'-联苯]-4-羧酸盐];科里醇-B[2H-环戊并[b]呋喃-2-酮,5-(苯甲酰氧基)六氢

[0215] -4-(羟甲基)[3αR-(3α,4α,5β,6α)];和科里二醇((3αR,4S,5R,6aS)-六氢-5-羟基-4-(羟甲基)-2H-环戊并[b]呋喃-2-酮)。

[0216] 在一实施方案中,所述化合物为前列腺素EP受体配体,包括但不限于:前列腺素E2(PGE₂)及其“类似物”或“衍生物”。前列腺素通常涉及激素样分子,其源自包含20个碳原子包括5-碳环的脂肪酸,如本文所述和本领域所知。

[0217] PGE₂的“类似物”或“衍生物”的示例性实例,包括但不限于:16,16-二甲基PGE₂;16-16-二甲基PGE₂p-(p-乙酰胺基苯甲酰胺基)苯酯、11-脱氧-16,16-二甲基PGE₂;9-脱氧-9-亚甲基-16,16-二甲基PGE₂;9-脱氧-9-亚甲基PGE₂;9-酮-氟前列醇、5-反式-PGE₂;17-苯基-ω-三去甲PGE₂;PGE₂丝氨酸酰胺、PGE₂甲酯、16-苯基四去甲PGE₂;15(S)-15-甲基PGE₂;15(R)-15-甲基PGE₂;8-异-15-酮-PGE₂;8-异PGE₂异丙基酯、20-羟基PGE₂;11-脱氧PGE₂i、诺氯

前列素、硫前列酮、布他前列素、15-酮-PGE₂和19(R)羟基PGE₂。

[0218] 还包括具有与PGE₂结构类似的前列腺素类似物或衍生物,其在9-位用卤素进行了取代(参见例如,WO 2001/12596,其通过引用整体并入本文),以及2-脱羧-2-磷酸亚基前列腺素衍生物,如描述于美国申请公开号第2006/0247214号,其通过引用整体并入本文)。

[0219] 在一些实施方案中,所述化合物为非基于PGE₂的配体。在某些实施方案中,所述非基于PGE₂的配体选自:EP1激动剂、EP2激动剂、EP3激动剂和EP4激动剂。

[0220] 在具体的实施方案中,所述前列腺素EP受体选自EP1、EP2、EP3和EP4。

[0221] 非基于PGE₂的EP1激动剂的示例性实例,包括但不限于,ONO-DI-004和ONO-8713。非基于PGE₂的EP2激动剂的示例性实例,包括但不限于,CAY10399、ONO_8815Ly、ONO-AE1-259和CP-533,536。非基于PGE₂的EP2激动剂其他实例包括咔唑和茚,公开于WO 2007/071456中;由于其公开了这类制剂而通过引用整体并入本文中。非基于PGE₂的EP3激动剂的示例性实例包括但不限于,AE5-599MB28767、GR 63799X、ONO-NT012和ONO-AE-248。非基于PGE₂的EP4激动剂的示例性实例包括但不限于,ONO-4819、APS-999Na、AH23848和ONO-AE 1-329。非基于PGE₂的EP4激动剂的其他实例可参见WO/2000/038663;美国专利第6,747,037号和美国专利第6,610,719号,由于其各自公开了这类激动剂而通过引用整体并入本文中。

[0222] 在一实施方案中,所述刺激前列腺素EP受体信号转导通路的化合物为Wnt激动剂。Wnt激动剂的示例性实例包括但不限于,Wnt多肽和糖原合酶激酶3(GSK3)抑制剂。适于用作刺激前列腺素EP受体信号转导通路的化合物的wnt多肽示例性实例包括但不限于,Wnt1、Wnt2、Wnt2b/13、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt7c、Wnt8、Wnt8a、Wnt8b、Wnt8c、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt14、Wnt15,或Wnt15及其生物活性片段。

[0223] GSK3抑制剂适于用作刺激前列腺素EP受体信号转导通路的化合物,其结合并降低GSK3 α 或GSK3 β 的活性。GSK3抑制剂的示例性实例包括但不限于,BIO(6-溴靛玉红-3'-脞)、LiCl或其他GSK-3抑制剂,其示例于美国专利第6,057,117号和第6,608,063;美国专利申请第2004/0092535号和第2004/0209878号;ATP-竞争性、选择性GSK-3抑制剂CHIR-911和CHIR-837(也分别称为CT-99021和CT-98023)。Chiron公司(Emeryville,CA)。

[0224] 在另一实施方案中,所述刺激前列腺素EP受体信号转导通路的化合物通过cAMP/P13K/AKT第二信使通路增加信号转导,其选自:联丁酰基cAMP(DBcAMP)、佛波酯、毛喉素、sclareline、8-溴-cAMP、霍乱毒素(CTX)、氨茶碱、2,4二硝基酚(DNP)、去甲肾上腺素、肾上腺素、异丙肾上腺素、异丁基甲基黄嘌呤(IBMX)、咖啡因、茶碱(二甲基黄嘌呤)、多巴胺、咯利普兰、伊洛前列素、脑垂体腺苷酸环化酶活化多肽(PACAP)和肠血管活性多肽(VIP),以及这些试剂的衍生物。

[0225] 在又一实施方案中,所述刺激前列腺素EP受体信号转导通路的化合物通过Ca²⁺第二信使通路增加信号转导,并选自:Bapta-AM、芬地林、尼卡地平和这些化合物的衍生物。

[0226] 在另一实施方案中,所述刺激前列腺素EP受体信号转导通路的化合物通过NO/血管紧张素信号转导通路增加信号转导,并选自:L-Arg、硝普化钠、钒酸钠、缓激肽及其衍生物。

[0227] 在一实施方案中,本发明提供了提供转导效率的方法,其包括将细胞群与逆转录病毒和增加前列腺素EP受体信号转导的一种或多种化合物一起培养,所述化合物选自:前列腺素、PGE₂;PGD₂;PGI₂;亚油酸;13(s)-HODE;LY171883;蜂蜜酸;二十碳三烯酸;环氧二十

碳三烯酸;ONO-259;Cay1039;PGE₂受体激动剂;16,16-二甲基PGE₂;19(R)-羟基PGE₂;16,16-二甲基PGE₂p-(p-乙酰胺基苯甲酰胺基)苯酯;11-脱氧-16,16-二甲基PGE₂;9-脱氧-9-亚甲基-16,16-二甲基PGE₂;9-脱氧-9-亚甲基PGE₂;布他前列素;硫前列酮;PGE₂丝氨酸酰胺;PGE₂甲酯;16-苯基四去甲PGE₂;15(S)-15-甲基PGE₂;15(R)-15-甲基PGE₂;BIO;8-溴-cAMP;毛喉素;Bapta-AM;芬地林;尼卡地平;硝苯地平;哌咪清;毒毛旋花甙元;毛花洋地黄甙;L-Arg;硝普化钠;钒酸钠;缓激肽;甲苯凡林;氟氢缩松;阿替洛尔;吡洛洛尔;加波沙朵;犬尿喹啉酸;胍苯吡嗪;噻苯咪唑;比枯枯灵碱;拉特罗毒素;黄夹次苷;丙咪嗪;氯磺丙脲;1,5-亚戊基四唑;4-氨基吡啶;二氮嗪;苯磷硫胺;12-甲氧基十二碳烯酸;N-甲酰-Met-Leu-Phe;加拉碘铵;IAA 94和氯烯雌醚。

[0228] 在一个具体实施方案中,本发明提供了提供转导效率的方法,其包括将细胞群与逆转录病毒和作为前列腺素EP受体配体的一种或多种化合物一起培养,所述化合物选自:16,16-二甲基PGE₂;16,16-二甲基PGE₂p-(p-乙酰胺基苯甲酰胺基)苯酯;11-脱氧-16,16-二甲基PGE₂;9-脱氧-9-亚甲基-16,16-二甲基PGE₂;9-脱氧-9-亚甲基PGE₂;9-酮-氟前列醇;5-反式-PGE₂;17-苯基- ω -三去甲PGE₂;PGE₂丝氨酸酰胺;PGE₂甲酯;16-苯基四去甲PGE₂;15(S)-15-甲基PGE₂;15(S)-15-甲基PGE₂;15(R)-15-甲基PGE₂;8-异-15-酮-PGE₂;8-异PGE₂异丙基酯;20-羟基PGE₂;11-脱氧PGE_i;诺氯前列素、硫前列酮、布他前列素、15-酮-PGE₂和19(R)羟基PGE₂。

[0229] 本发明还包括可通过在逆转录病毒、刺激前列腺素EP受体途径的化合物例如PGE₂和一个或多个组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂的存在下培养细胞来提高细胞的转导效率。

[0230] 适用于本发明的组合物和方法中的HDAC抑制剂的示例性实例,包括但不限于:HDAC抑制剂包括但不限于,TSA(曲古抑菌素A)(参见例如,Adcock,(2007)British Journal of Pharmacology 150:829-831)、VPA(丙戊酸)(参见例如,Munster,et al,(2007)Journal of Clinical Oncology 25:18S:1065)、丁酸钠(NaBu)(参见例如,Han,et al.,(2007)Immunology Letters 108:143-150)、SAHA(辛二酰苯胺异羟肟酸或伏立诺他)(参见例如,Kelly,et al.,(2005)Nature Clinical Practice Oncology 2:150-157)、苯基丁酸钠(参见例如,Gore,et al.,(2006)Cancer Research 66:6361-6369)、缩酚酸肽(FR901228,FK228)(参见例如,Zhu,et al.,(2003)Current Medicinal Chemistry 3(3):187-199)、trapoxin(TPX)(参见例如,Furumai,et al.,(2001)PNAS 98(1):87-92)、含有环异羟肟酸的肽1(CHAP1)(参见,Furumai同上)、MS-275(参见例如,Carninci,et al.,W02008/126932,其通过引入并入本文)、LBH589(参见例如,Goh,et al.,W02008/108741,其通过引入并入本文)和PXD-101(参见,Goh,同上)。

[0231] 本发明包括在逆转录病毒存在下培养细胞,所述逆转录病毒可暴露于(与其接触)刺激前列腺素EP受体信号转导通路的化合物和/或HDAC抑制剂为期约10min至约72hr、约30min至约72hr、约30min至约48hr、约30min至约24hr、约30min至约12hr、约30min至约8hr、约30min至约6hr、约30min至约4hr、约30min至约2hr、约1hr至约2hr的时长,或任何介于中间的时长。

[0232] 在一实施方案中,就所述与逆转录病毒一起培养的细胞暴露于(与其接触)刺激前列腺素EP受体信号转导通路的化合物和/或HDAC抑制剂为期约30min、约1hr、约2hr、约4hr、约5hr、约6hr、约7hr、约8hr、约9hr、约10hr、约11hr、约12hr、约13hr、约14hr、约15hr、约

16hr、约17hr、约18hr、约19hr、约20hr、约21hr、约22hr、约23hr、约24hr、约48hr或约72hr的时长,或任何介于中间的时长。

[0233] 本发明包括在细胞与逆转录病毒一起培养之前、期间或之后或其组合,将细胞与刺激前列腺素EP受体信号转导通路的一种或多种化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂一起培养任何本文公开的上述时长。

[0234] 本发明包括在细胞与一个或多个HDAC抑制剂一起培养之前、期间或之后或其任何组合,将细胞与刺激前列腺素EP受体信号转导通路的一种或多种化合物和逆转录病毒一起培养任何本文公开的上述时长。

[0235] 本发明包括在细胞与刺激前列腺素EP受体信号转导通路的一种或多种化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂一起培养之前、期间或之后或其任何组合,将细胞与逆转录病毒一起培养任何本文公开的上述时长。

[0236] 而且,本领域技术人员应理解,本发明用于促进转导的方法包括,在起初的6hr转导期间、起初的12hr转导期间、起初的24hr转导期间、起初的48hr转导期间、或起初的72hr转导期间或在转导的任何介于中间的时长内,将细胞与逆转录病毒、刺激前列腺素EP受体信号转导通路的一种或多种化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂一起培养。

[0237] 此外,本发明包括在逆转录病毒和刺激前列腺素EP受体信号转导通路的一种或多种化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂存在下,将细胞转导1、2、3次或更多次。在另一实施方案中,本发明包括在逆转录病毒存在下将细胞转导1、2、3次或更多次,并暴露于(与其接触)刺激前列腺素EP受体信号转导通路的一种或多种化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂仅一次或两次。

[0238] 在具体实施方案中,本发明包括可将细胞与逆转录病毒、刺激前列腺素EP受体信号转导通路的一种或多种化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂一起培养,其中所述细胞暴露于或接触上述物质中与本文中其他地方公开的相同或不同的时长。

[0239] 本发明还包括本发明的组合物和方法,其能够将几乎任何细胞类型的转导提高至少约30%,至少约40%,至少约50%,至少约60%,至少约65%,至少约70%,至少约75%,至少约80%,至少约85%,至少约90%,至少约91%,至少约92%,至少约93%,至少约94%,至少约95%,至少约96%,至少约97%,至少约98%,至少约99%或至少约100%。

[0240] 在具体的实施方案中,转导效率的增加表示相比仅用载体转导的细胞,至少2-倍,至少5-倍,至少10-倍,至少25-倍,至少50-倍,或至少100-倍,或更多倍富集的转导的细胞。

[0241] 转导之前、期间和/或之后,可将所述细胞培养于适于细胞维持、生长或增殖的培养基中。合适的培养基和培养条件为本领域熟知。这类培养基包括但不限于,达尔伯克氏改良伊格尔培养基®(DMEM)、DMEM F12培养基®、伊格尔极限必需培养基®、F-12K培养基®、伊思科夫改良达尔伯克氏培养基®,RPMI-1640培养基®和无血清培养基培养和扩增造血细胞SFEM®。许多培养基也被提供为低葡萄糖配方,含有或没有丙酮酸钠。

[0242] 也可有利地使用其他补充剂为细胞提供必需的微量元素用于最佳生长和扩增。这类补充剂包括胰岛素、转铁蛋白、硒酸钠及其组合。这些组分可包含于盐溶液中,如包括但不限于,汉克斯平衡盐溶液®(HBSS)、厄尔盐溶液®、抗氧化剂补充剂、MCDB-201®补充剂、磷酸缓冲盐(PBS)、抗坏血酸和抗坏血酸-2-磷酸盐以及其他氨基酸。许多细胞培养基已

经含有氨基酸,然而,一些培养基要求在培养细胞之前添加。这类氨基酸包括但不限于,L-丙氨酸、L-精氨酸、L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-半胱氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和L-缬氨酸。确定合适浓度的这些补充剂为本领域技术人员熟知。

[0243] 也可将激素有利地用于本发明的细胞培养物中,其包括但不限于,D-醛固酮、己烯雌酚(DES)、地塞米松、 β -雌二醇、氢化可的松、胰岛素、催乳素、孕酮、生长抑素/人生长激素(HGH)、促甲状腺素、甲状腺素和L-甲状腺原氨酸。

[0244] 也可将脂质和脂质载体用于添加至细胞培养基,取决于细胞类型和分化的细胞的类型。这类脂质和载体可包括但不限于,环糊精(α 、 β 、 γ)、胆固醇、缀合至白蛋白的亚油酸、亚油酸和缀合至白蛋白的油酸、未缀合的亚油酸、缀合至白蛋白的亚油酸-油酸-花生四烯酸,以及未缀合的油酸和缀合至白蛋白的油酸等。

[0245] 也可将细胞培养于低血清或无血清的培养基。用于培养细胞的无血清培养基,描述于例如,美国专利第7,015,037号。许多细胞已经在低血清或无血清的培养基中生长。

[0246] 转导之后,可将转导的细胞在适合其维持、生长或增殖的条件下培养。在具体的实施方案中,将所述转导的细胞培养约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天,然后进行移植。

[0247] 在转导之前、期间和/或之后,可将所述细胞在促进干细胞或祖细胞扩增的条件下培养。可使用本领域已知的任何方法。在某些实施方案中,在转导之前、期间和/或之后,可将所述细胞在促进干细胞或祖细胞扩增的一个或多个生长因子存在下培养。促进干细胞或祖细胞扩增的生长因子实例,包括但不限于,胎肝酪氨酸激酶(Flt3)配体、干细胞因子以及白介素6和11,其已经被证明促进鼠造血干细胞自我更新。其他的包括音猬因子,其通过激活骨形态生成蛋白4诱导原始造血祖细胞增殖;Wnt3a,其刺激HSC的自我更新;脑源性神经营养因子(BDNF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、睫状神经营养因子(CNF)、转化生长因子- β (TGF- β)、成纤维细胞生长因子(FGF例如,碱性FGF、酸性FGF、FGF-17、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-8b、FGF-8c、FGF-9)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、源自血小板的生长因子(PDGF例如,PDGFAA、PDGFAB、PDGFBB)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干细胞因子(SCF)、基质细胞衍生因子(SCDF)、胰岛素样生长因子(IGF)、促血小板生成素(TPO)或白介素-3(IL-3)。在具体的实施方案中,在转导之前、期间和/或之后,可将所述细胞在促进干细胞或祖细胞扩增的一个或多个生长因子存在下培养。

[0248] 尽管本文提供的描述和实施例主要关注专能干细胞尤其包括造血干细胞的转导和选择,本发明的方法和组合物也可用于转导和选择其他细胞类型,包括此前不能用来选择治疗用途的转导细胞的其他类型的多能干细胞或专能干细胞和脆性细胞。

[0249] 根据本发明方法而使用的细胞可获自任何动物,优选哺乳动物,例如非人灵长类或人,更优选人,且它们可被植入至任何动物,优选哺乳动物,更优选人。

[0250] 在本发明基因治疗方法中,适用于转导和给予的细胞,包括但不限于干细胞、祖细胞和分化的细胞。

[0251] 适用于使用本发明组合物和方法进行转导的干细胞的示例性实例,包括但不限于诱导的多能干细胞、中胚层干细胞、内胚层干细胞和外胚层干细胞。

[0252] 在具体的实施方案中,使用本文包括的组合物和方法转导的细胞群或细胞来源,包括间充质干细胞和/或祖细胞、中胚层干细胞和/或祖细胞、内胚层干细胞和/或祖细胞或外胚层干细胞和/或祖细胞。在某些实施方案中,在本文包括的组合物和方法中使用的细胞群或细胞来源,包括骨髓干细胞、脐带血干细胞和/或祖细胞、骨骼干细胞和/或祖细胞、肌肉干细胞和/或祖细胞、造血干细胞和/或造血祖细胞、脂肪干细胞和/或祖细胞、软骨干细胞和/或祖细胞、神经干细胞和/或祖细胞、皮肤干细胞和/或祖细胞、肝脏干细胞和/或祖细胞、胰干细胞和/或祖细胞、肾干细胞和/或祖细胞、胃干细胞和/或祖细胞以及肠干细胞和/或祖细胞。

[0253] 在某些实施方案中,使用本发明的组合物和方法转导的细胞群或细胞来源,包括但不限于成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、神经细胞、神经胶质细胞(星形胶质细胞、少突胶质细胞、施旺细胞)、视网膜细胞(棒状细胞、锥形细胞)、角膜细胞、皮肤细胞、单核细胞和巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞/血小板、树突状细胞、T-细胞、B-细胞、NK-细胞、胃细胞、肠细胞、平滑肌细胞、血管细胞、膀胱细胞、胰岛细胞(胰腺 α -细胞、胰腺 β -细胞、胰腺 δ -细胞)、肝细胞、肾细胞、肾上腺细胞和肺细胞。

[0254] 在不同的实施方案中,优选使用干细胞,因为当被给予至体内具体生物生态位时,其能够分化为合适的细胞类型。

[0255] 在优选的实施方案中,将本发明的组合物和方法用于促进造血干细胞或造血祖细胞的转导。

[0256] 本发明还包括细胞群的分离和转导。如本文所用,术语“细胞群”是指可由任何数目和/或同源或异源的细胞类型组合构成的多个细胞,如本文其他地方所描述。例如,对于造血干细胞或造血祖细胞的转导,细胞群可分离自或源自脐带血、胎盘血、骨髓或周边血。细胞群可包括约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约100%的所述待转导的靶细胞类型。在某些实施方案中,造血干细胞或造血祖细胞可使用本领域已知的方法分离自或纯化自异质的细胞群。在具体的实施方案中,造血干细胞或造血祖细胞在细胞群转导后进行纯化,而在其他实施方案中,造血干细胞或造血祖细胞在转导之前进行分离。

[0257] 也可在进行转导前或转导后,使用本领域已知的方法将本发明的细胞冷藏保存。一旦细胞在培养物中被建立,细胞可在新鲜或冷冻下使用并作为冷冻储备液储藏,采用例如包含40%FCS和10%DMSO的DMEM。其他制备培养的细胞的冷冻储备液的方法也是本领域技术人员可获得的。

[0258] 在具体的实施方案中,将包含干细胞或祖细胞的细胞群与逆转录病毒,例如慢病毒,以及增加前列腺素信号转导的一种或多种化合物接触,所述化合物例如前列腺素EP受体配体如PGE2或其类似物或衍生物。在某些实施方案中,进一步将所述细胞群与一种或多种HDAC抑制剂接触。在不同的实施方案中,所述细胞群在离体或体内进行接触。

[0259] 在某些优选的实施方案中,所述干细胞或祖细胞为造血干细胞或造血祖细胞。

[0260] E. 细胞培养组合物

[0261] 本发明还包括包含在培养基中的细胞培养物的基于细胞的组合物,所述培养基包含逆转录病毒和增加前列腺素信号转导的一种或多种化合物。如本文全文中所讨论的,在

具体的实施方案中,本发明的组合物和方法可用于离体的和体内的基于细胞的基因治疗。在一些实施方案中,所述细胞培养基为药学上可接受的细胞培养基。

[0262] 可将包含本发明基于细胞的组合物的治疗性培养物、细胞培养物、培养系统或细胞培养物组合物通过肠内或肠胃外给药方法单独给予或与其他合适化合物联用以达到所需的治疗目的,例如,一种或多种生长因子。

[0263] 在一个示例性实施方案中,包含本发明转导的细胞的治疗性培养物、细胞培养物、培养系统或细胞培养物组合物通过直接注射到组织进行全身给予。

[0264] F. 组合物和制剂

[0265] 本发明的制剂和组合物可包括任何数目的转导的或非转导的细胞的组合或者它们的组合、病毒载体、多肽、多核苷酸和一种或多种化合物,例如刺激前列腺素信号转导的化合物和/或HDAC抑制剂,如本文所述,配制于药学上可接受的或生理上可接受的溶液(例如,培养基)中,以单独地或与一种或多种其他治疗形式组合给予至细胞、组织、器官或动物。

[0266] 本发明具体的离体和体外制剂和组合物可包括转导的或非转导的细胞的组合或者它们的组合、病毒载体和一种或多种化合物,例如刺激前列腺素信号转导的化合物和/或HDAC抑制剂,如本文所述,配制于药学上可接受的或生理上可接受的溶液(例如,培养基)中,以单独地或与一种或多种其他治疗形式组合给予至细胞、组织、器官或动物。

[0267] 本发明具体的体内制剂和组合物可包括病毒载体和一种或多种化合物,例如刺激前列腺素信号转导的化合物和/或HDAC抑制剂的组合,如本文所述,配制于药学上可接受的或生理上可接受的溶液(例如,培养基)中,以单独地或与一种或多种其他治疗形式组合给予并转导动物中的细胞或组织。

[0268] 在某些实施方案中,本发明提供了包含治疗有效量转导的细胞的组合物,如本文所述,与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂(例如,药学上可接受的细胞培养基)一起配制。

[0269] 在某些其他实施方案中,本发明提供了包含逆转录病毒载体和一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物的组合物,如本文所述,与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂(例如,药学上可接受的细胞培养基)一起配制。

[0270] 在具体的实施方案中,本发明提供了包括包含干细胞或祖细胞的细胞群、逆转录病毒载体和一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物的组合物,如本文所述,与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂(例如,药学上可接受的细胞培养基)一起配制。在一个相关的实施方案中,所述细胞群包含造血干细胞和造血祖细胞。

[0271] 本发明还包括包含根据本文描述的方法制备的转导的细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。在其他实施方案中,本发明提供了包含逆转录病毒载体和一种或多种化合物,例如刺激前列腺素信号转导的化合物和/或HDAC抑制剂,的药物组合物,如本文所述。

[0272] 词语“药学上可接受的”是指当给予至人时,不产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。包含蛋白作为活性成分的含水组合物制剂为本领域所熟知。通常,这类组合物被制备为作为液体溶液或悬浮液可注射的形式;也可制备为适于在注射前溶解或悬浮于液体中的固体形式。该制剂也可被乳化。

[0273] 如本文所用,“载体”包括任何和所有溶剂、分散媒介、赋形剂、包衣料、稀释剂、抗

菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶质等。将这类媒介和试剂用作药物活性物质为本领域熟知。除了与所述活性成分不兼容的任何常规媒介和试剂，考虑了将其用于所述治疗性组合物。也可将补充性活性成分掺入至所述组合物。

[0274] 如本文所用，“药学上可接受的载体”包括生理上兼容的任何和所有溶剂、分散媒介、包衣料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等，包括药学上可接受的细胞培养基。在一实施方案中，组合物包含适于肠胃外给药的载体，例如，血管内（静脉内或动脉内）、腹膜内或肌肉内给药。药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液以及用于即时制备可注射无菌溶液或分散液的无菌粉末。将这类媒介和试剂用作药学活性物质为本领域熟知。除了与所述转导的细胞不兼容的任何常规媒介和试剂，考虑了将其用于本发明的药物组合物。

[0275] 本发明的组合物可包含一种或多种多肽、多核苷酸、含有其的载体、增加前列腺素EP受体信号转导的化合物、HDAC抑制剂和转导的细胞等，如本文所述，在药学上可接受的或生理学上可接受的溶液中配制，以单独地或与一种或多种其他治疗形式组合给予至细胞或动物。还应理解，如需要，还可将本发明的组合物与其他试剂，例如细胞因子、生长因子、生长激素、小分子或各种药物活性剂联用。只要所添加的试剂不对递送所述组合物用于期望的基因治疗的能力产生不良影响，对于可包括在所述组合物中的其他组分基本没有限制。

[0276] 在本发明的药物组合物中，配制药学上可接受的赋形剂和载体溶液为本领域技术人员熟知，其发展出将本文描述的特定组合物用于各种治疗方案中的合适剂量和治疗方案，包括例如，经口、肠胃外、静脉内、鼻内和肌肉内给药和制剂。

[0277] 在某些情况下，可取的是将本文公开的组合物经肠胃外、静脉内、肌肉内或甚至腹膜内给药，其描述于例如，美国专利第5,543,158号、美国专利第5,641,515号和美国专利第5,399,363号（其各自特别地通过引用整体并入本文）。作为游离碱或药学上可接受盐的活性化合物的溶液，可在水中与表面活性剂如羟丙基纤维素恰当地混合制备。也可在甘油、液态聚乙二醇及其混合物中和在油中制备分散液。在常规储存和使用条件下，这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0278] 适用于注射的药物剂型包括，无菌水溶液或分散液和用于即时制备注射用无菌溶液或分散液的无菌粉末（美国专利第5,466,468，其特别地通过引入整体并入本文）。在所有情况下所述剂型应为无菌的，且应为其存在达到易于注射的程度的流体。其在生产和储存条件下应为稳定的，其保存时应抗微生物如细菌和真菌活动的污染。所述载体可为溶剂或分散剂媒介，其含有例如，水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等）、其合适的混合物和/或植物油。应维持合适的流动性，例如，通过使用包衣料如卵磷脂，通过在分散液的情况下维持所需的粒径和通过使用表面活性剂。通过各种抗菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫汞撒等，可有助于防止微生物活动。在许多情况下，优选包括等渗剂，例如糖或氯化钠。通过在所述组合物中使用吸收延迟剂，例如单硬脂酸铝和明胶，可产生延迟吸收的可注射组合物。

[0279] 对于在水溶液中进行肠胃外给药，例如，如需要该溶液应适当地缓冲，且首先用足够的盐水或葡萄糖使得所述液体稀释剂为等渗的。这些特定的水溶液尤其适用于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内给药。就这一点，鉴于本发明的公开，可使用的无菌水媒介应为本领域技术人员已知。例如，可将一个剂量溶解于1ml等渗的NaCl溶液中，或者加入至1000ml的

皮下输液流体中或在推荐的输注位点注射(参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th Edition.Baltimore,MD:Lippincott Williams&Wilkins,2005)。根据接受治疗的个体的状态,将需要进行一些剂量改变。负责给药的人无论如何应该为个别个体确定合适的剂量。而且,针对人给药,制剂应符合无菌、致热原性和一般安全性,以及FDA生物标准办公室所要求的纯度水平。

[0280] 无菌的可注射溶液可按如下制备:以所需的量将活性化合物掺入至含有上述所列各种其他成分的合适溶剂中,如需要,然后过滤除菌。通常,通过将各种无菌活性成分掺入至含有基本分散媒介和所需的上述所列其他成分的无菌溶剂中。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生了活性成分和源自此前其进行过滤除菌溶液中的任何所需成分的粉末。

[0281] 本文公开的组合物可配制为中性的或盐形式。药学上可接受的盐,包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成的),其与无机酸例如盐酸或磷酸一起形成,或与有机酸如醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等一起形成。与游离羧基一起形成的盐也可源自无机碱,例如,氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。配制时,溶液应以与所述剂型兼容的形式且以治疗有效量给药。该制剂易于以各种剂型如可注射溶液、药物释放胶囊等给药。

[0282] 在某些实施方案中,所述组合物可通过鼻内喷剂、吸入剂和/或其他气溶胶递送载体进行递送。通过经鼻气溶胶喷剂将基因、多核苷酸和肽组合物直接递送至肺的方法,已经描述于例如,美国专利第5,756,353号和美国专利第5,804,212号(其各自特别地通过引用整体并入本文)。同样,使用鼻内微粒树脂(Takenaga et al.,1998)和溶血磷脂酰甘油化合物(美国专利第5,725,871号,其特别地通过引入整体并入本文)递送药物为药物领域所熟知。同样,以聚四氟乙烯支持基质的形式递送转化粘液质药物,描述于美国专利第5,780,045号(特别地通过引入整体并入本文)。

[0283] 在某些实施方案中,所述递送可通过使用脂质体、纳米胶囊、微粒、微球、脂质微粒、囊泡,任选地与CPP多肽混合等来进行,以将本发明的组合物引入至合适的宿主细胞。具体地,本发明的组合物可配制为包封于脂质微粒、脂质体、囊泡、纳米球、纳米微粒等中进行递送。可使用已知的常规技术来配制和应用这类递送载体。本发明的制剂和组合物可包含一种或多种由任何数目的多肽、多核苷酸和小分子组合构成的抑制剂和/或激活剂,如本文所述,其被配制于药学上可接受的或生理学上可接受的溶液(例如,培养基)中,以单独地或组合一种或多种其他治疗形式给予至细胞或动物。还应理解,如需要,本发明的组合物还可与其他试剂,例如细胞、其他蛋白或多肽或各种药物活性剂联用进行给药。

[0284] 在某些实施方案中,本发明提供了适于递送病毒载体系统(即病毒介导的转导),包括但不限于逆转录病毒(例如慢病毒)载体的制剂或组合物。

[0285] 用于离体递送的示例性制剂还可包括应用本领域已知的各种转染剂,如磷酸钙、电穿孔、热休克和各种脂质体制剂(即脂质介导的转染)。如下文更加详细描述,脂质体为脂双层包封一部分含水流体。DNA自发结合至阳离子脂质体的外表面(由于其电荷),且这些脂质体会与细胞膜相互作用。

[0286] 在某些方面,本发明提供了药学上可接受的组合物,其包括治疗有效量的一种或多种多核苷酸或多肽,如本文所述,将其与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或

稀释剂(例如,药学上可接受的细胞培养基)一起配制。

[0287] 本发明的具体实施方案可包括其他制剂,如药学领域中熟知的那些,且其描述于,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th Edition.Baltimore,MD:Lippincott Williams&Wilkins,2005。

[0288] 在某些实施方案中,本发明的组合物包括有效量的组合物且任选地包含一种或多种辅助治疗。在本发明的某些实施方案中,包含基于细胞的组合物且任选地包含一种或多种辅助治疗的组合物还可包括无菌盐水、林格氏溶液、汉克斯平衡盐溶液(HBSS)、或Isolyte S(pH 7.4)无血清细胞培养基,或别的药学上可接受的培养基(例如,细胞培养基),如本文其他地方所讨论。

[0289] 在具体的实施方案中,组合物包含使用下述物质进行处理的细胞群(例如,与其接触):一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂,其各自独立地具有终浓度约1 μ M至约100 μ M。在某些实施方案中,使用下述物质对细胞群进行处理:一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂,其各自独立地具有终浓度约1 $\times 10^{-14}$ M至约1 $\times 10^{-3}$ M,约1 $\times 10^{-13}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-12}$ M至约1 $\times 10^{-5}$ M,约1 $\times 10^{-11}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-11}$ M至约1 $\times 10^{-5}$ M,约1 $\times 10^{-10}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-10}$ M至约1 $\times 10^{-5}$ M,约1 $\times 10^{-9}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-9}$ M至约1 $\times 10^{-5}$ M,约1 $\times 10^{-8}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-7}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-6}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,或任何介于中间范围的终浓度。

[0290] 在另一实施方案中,将细胞群与下述物质接触:一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂,其各自独立地具有终浓度约1 $\times 10^{-14}$ M,约1 $\times 10^{-13}$ M,约1 $\times 10^{-12}$ M,约1 $\times 10^{-10}$ M,约1 $\times 10^{-9}$ M,约1 $\times 10^{-8}$ M,约1 $\times 10^{-7}$ M至约1 $\times 10^{-6}$ M,约1 $\times 10^{-5}$ M,约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-3}$ M,或任何介于中间范围的终浓度。在包含一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂的组合物中,所述化合物可彼此浓度不同或处于相同的浓度。

[0291] 本领域技术人员应能够使用常规方法,以确定用于本发明方法的有效量组合物的合适给药途径和正确剂量,所述组合物包含转导的细胞和/或一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂。本领域技术人员还应理解,在某些治疗中需要将本发明药物组合物多次给药以产生治疗效果。

[0292] 例如,组合物可在1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、1年、2年、5年、10年或更长时期内给药1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次或更多次。

[0293] 而且,相同或不同的本发明组合物的多次给药可在延长的时期内多次给药,如以上所述。

[0294] 而且,可通过相同的或不同的途径给予所述转导的细胞和/或一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂,如本文其他地方所讨论。也可在不同的位点采用相同的或不同的给药途径给予所述转导的细胞和/或一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂。而且,可在相同的位点采用相同的给药途径在相同或不同的时间给予所述转导的细胞和/或一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂。

[0295] G. 基因治疗方法

[0296] 所述转导的细胞和相应的逆转录病毒载体提供了改善的基因治疗方法。如本文所用,术语“基因治疗”是指将基因引入至细胞的基因组。在不同的实施方案中,本发明的病毒载体包含表达编码多肽的治疗性转基因的造血细胞表达调控序列,所述多肽为诊断患有或怀疑患有单基因疾病、失调或病症或者响应于造血干细胞治疗的疾病、失调或病症的个体提供治愈性、预防性或改善性益处。

[0297] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了具有发展为脑小神经胶质细胞潜力的转导的细胞。在具体的实施方案中,将造血干细胞与本发明的载体一起转导,并给予至需要治疗肾上腺脑白质营养不良或肾上腺脊髓神经病的个体。造血干细胞是脑小神经胶质细胞的起源,因此是优选的。

[0298] 在具体的实施方案中,转导的造血干细胞或造血祖细胞包含病毒载体,该病毒载体含有表达编码多肽的治疗性转基因的造血细胞表达调控序列,所述多肽为诊断患有或怀疑患有单基因疾病、失调或病症或者造血系统疾病、失调或病症的个体提供治愈性、预防性或改善性益处。

[0299] 相比仅用载体转导细胞,包含病毒例如慢病毒和/或一种或多种增加前列腺素EP受体信号转导的化合物和/或一种或多种HDAC抑制剂的组合物,可在体内、离体或体外以提高的效率感染和转导细胞。在离体的和体外的实施方案中,可将所述转导的细胞给予至需要治疗的个体。本发明考虑了,本发明的载体、病毒粒子和转导的细胞被用于治疗、预防和/或改善个体的单基因疾病、失调或病症或者造血系统疾病、失调或病症,例如血红蛋白病。

[0300] 如本文所用,“造血作用”是指从祖细胞形成和发展血细胞,以及从干细胞形成祖细胞。血细胞包括但不限于红细胞或红血细胞(RBC)、网织红细胞、单核细胞、中性粒细胞、巨核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、B-细胞、巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞、凝血细胞和白血细胞。

[0301] 如本文所用,术语“血红蛋白病”或“血红蛋白病症”包括涉及在血液中存在异常血红蛋白分子的失调。血红蛋白病的实例,包括但不限于,血红蛋白C疾病、血红蛋白镰状细胞疾病(SCD)、镰状细胞贫血和地中海贫血。还包括血液中存在组合的异常血红蛋白的血红蛋白病(例如镰状细胞/Hb-C疾病)。

[0302] 术语“镰状细胞贫血病”或“镰状细胞疾病”本文定义为包括任何有症状的贫血病症,其源于红血细胞的镰状化。镰状细胞疾病的临床表现包括:贫血;疼痛;和/或器官功能障碍,如肾衰竭、视网膜病、急性胸痛综合征、局部贫血、阴茎异常勃起和中风。如本文所用,术语“镰状细胞疾病”是指伴随镰状细胞贫血的各种临床问题,尤其是对于在HbS中的镰状细胞替换为纯合体的个体。通过使用术语镰状细胞疾病,在本文提及的原发性临床表现为生长和发育延迟、发展为严重感染的倾向增加,特别是由于肺炎球菌、明显的脾脏功能损伤、阻止有效清除循环中的细菌、具有复发性并逐渐损害脾脏组织。术语“镰状细胞疾病”还包括肌肉骨骼病的急性发作,其主要影响腰椎、腹部和股骨干,且其病理机制和严重程度类似于减压病。在成人中,这类疾病发作通常表现为每几周或几个月短期的轻度或中度发作里间隔有平均约每年一次长达5-7天的极度痛苦发作。已知的引发这类危险的事件有酸中毒、组织缺氧和脱水,所有这些均加强了细胞内HbS的聚集(J.H.Jandl, Blood: Textbook of Hematology, 2nd Ed., Little, Brown and Company, Boston, 1996, pages

[0304] 544-545)。如本文所用,术语“地中海贫血”包括由于变异影响到血红蛋白合成而

发生的遗传性贫血。因此,术语包括任何有症状的贫血,其源于地中海贫血病症如严重的或 β -地中海贫血、重度地中海贫血、中度地中海贫血、 α -地中海贫血如血红蛋白H病。

[0305] 如本文所用,“地中海贫血”是指特征为缺陷性产生血红蛋白的遗传性失调。地中海贫血的实例包括 α 和 β 地中海贫血。 β -地中海贫血由 β -球蛋白链中的突变引起,并可以重度或轻度形式发生。在重度形式的 β -地中海贫血中,孩子在出生时为正常的,但在生命的第一年期间发展为贫血。轻度形式的 β -地中海贫血产生小的红血细胞。如果你仅从一个父母亲中获得缺陷性基因,就发生轻度地中海贫血。患有该型失调的人为该疾病的携带者且通常没有症状。

[0306] α -地中海贫血通常源于涉及HBA1和HBA2基因的缺失。这两个基因编码 α -球蛋白,其为血红蛋白的组件(亚基)。在每个细胞的基因组中有两个拷贝的HBA1基因和两个拷贝的HBA2基因。结果有4个产生 α -球蛋白的等位基因。不同类型的 α -地中海贫血源于失去了一些或所有这些等位基因。Hb Bart综合征,最严重形式的 α -地中海贫血,源于失去了所有4个 α -球蛋白等位基因。HbH疾病源于失去了4个 α -球蛋白等位基因中的3个。在这两种病症中,缺少 α -球蛋白阻止了细胞产生正常的血红蛋白。反之,细胞产生异常形式的血红蛋白,称为血红蛋白Bart (Hb Bart) 或血红蛋白H (HbH)。这些异常血红蛋白分子不能有效地把氧气运送至身体组织。Hb Bart或HbH替换了正常血红蛋白导致贫血和其他与 α -地中海贫血有关的严重健康问题。

[0307] 在优选实施方案中,本发明的基因治疗方法用于治疗、预防或改善血红蛋白病,其选自:血红蛋白C疾病、血红蛋白镰状细胞疾病(SCD)、镰状细胞贫血、遗传性贫血、地中海贫血、 β -地中海贫血、重度地中海贫血、中度地中海贫血、 α -地中海贫血和血红蛋白H病。

[0308] 在不同的实施方案中,通过直接注射将所述逆转录病毒载体给予至需要体内基因治疗的个体的细胞、组织或器官。在不同的其他实施方案中,用本发明的载体体外或离体转导细胞,且任选地扩展的离体。然后将所述转导的细胞给予至需要基因治疗的个体。

[0309] 适于在本发明的基因治疗方法中转导和给予的细胞,包括但不限于干细胞、祖细胞和分化的细胞,如本文其他地方所描述。在某些实施方案中,所述转导的细胞为诱导的多能干细胞、骨髓干细胞、脐带血干细胞、胎盘干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、肝脏干细胞、胰腺干细胞、心脏干细胞、肾脏干细胞、造血干细胞,如本文其他地方所描述。

[0310] 在优选的实施方案中,所述转导的细胞为分离自骨髓、脐带血或外周循环的造血干细胞和/或造血祖细胞。在具体的优选实施方案中,所述转导的细胞为分离自骨髓、脐带血或外周循环的造血干细胞。

[0311] 可根据某些表型或基因型标记来确认HSC。例如,可通过以下确认HSC:其小的尺寸、缺少谱系(lin)标记、用活体染料如若丹明123(若丹明DULL,也称rhodamine)或Hoechst 33342染色浅(侧群细胞),以及其在表面存在各种抗原标记,其中许多属于分化群系列(例如,CD34、CD38、CD90、CD133、CD105、CD45、Ter119和干细胞因子受体c-kit)。HSC对于通常用于检测细胞系定型的标记主要为阴性的,因此,通常称为Lin(-)细胞。

[0312] 在一实施方案中,人HSC可表征为CD34+、CD59+、Thy1/CD90+、CD38lo/-、C-kit/CD117+和Lin(-)。然而,并非所有干细胞均被这些组合所覆盖,因为某些HSC是CD34-/CD38-。也有一些研究表明,最早的干细胞可能在细胞表面缺少c-kit。对于人HSC,CD133可能代表早期标记,因为CD34+和CD34-HSC均显示为CD133+。本领域已知CD34+和Lin(-)细胞

也包括造血祖细胞。

[0313] 在另一实施方案中,所述造血层级(等级)通过SLAM码来确定。SLAM(信号转导淋巴细胞激活分子)家族是>10个的分子的一组,其基因主要衔接着位于染色体1(小鼠)的单个基因座上,均属于免疫球蛋白基因超家族的亚基,且最初被认为参与T-细胞激发。该家族包括CD48、CD150、CD244等,CD150为基础成员,因此也称为slamF1,即SLAM家族成员1。针对造血层级的标记的SLAM码为:造血干细胞(HSC)-CD150+CD48-CD244-;专能干细胞祖细胞(MPP)-CD150-CD48-CD244+;谱系限制的祖细胞(LRP)-CD150-CD48+CD244+;普通髓样祖细胞(CMP)-lin-SCA-1-c-kit+CD34+CD16/32mid;粒细胞-巨噬细胞祖细胞(GMP)-lin-SCA-1-c-kit+CD34+CD16/32hi;以及巨核细胞-红系祖细胞(MEP)-lin-SCA-1-c-kit+CD34-CD16/32low。

[0314] 在小鼠中,斯坦福大学的Irving Weissman小组于1988年首先分离出小鼠造血干细胞,也首先找出了区分小鼠造血层级的标记。这些造血层级的标记为:长期造血干细胞(LT-HSC)-CD34-、SCA-1+、Thy1.1+/lo、C-kit+、lin-、CD135-、Slamf1/CD150+;短期造血干细胞(ST-HSC)-CD34+、SCA-1+、Thy1.1+/lo、C-kit+、lin-、CD135-、Slamf1/CD150+、Mac-1(CD11b)lo;早期专能祖细胞-(早期MPP)-CD34+、SCA-1+、Thy1.1-、C-kit+、lin-、CD135+、Slamf1/CD150-、Mac-1(CD11b)lo、CD41lo;以及晚期专能祖细胞(晚期MPP)-CD34+、SCA-1+、Thy1.1-、C-kit+、lin-、CD135high、Slamf1/CD150-、Mac-1(CD11b)lo、CD41lo。

[0315] 在一实施方案中,所述造血细胞为CD105+Sca1+细胞。

[0316] 本发明的细胞可为自体同源的/自体的(“自己的”)或非自体同源的(“非自己的”,例如同种异体的、同基因的或异基因的)。如本文所用,“自体同源的”是指细胞来自相同的个体。如本文所用,“同种异体的”是指细胞相比较基因不同且属于相同物种。如本文所用,“同基因的”是指细胞相比较基因相同且来自不同个体。如本文所用,“异基因的”是指细胞相比较来自不同物种。在优选的实施方案中,本发明的细胞为同种异体的。

[0317] 如本文所用,“个体”包括表现出可用本文其他地方公开的基因治疗载体、基于细胞的治疗和方法进行治疗的单基因疾病、失调或病症症状的任何动物。在优选的实施方案中,个体包括表现出造血系统的单基因疾病、失调或病症症状的任何动物,例如可用本文其他地方公开的基因治疗载体、基于细胞的治疗和方法进行治疗的血红蛋白病。合适的个体(例如患者)包括实验动物(如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、农场动物和家养动物或宠物(如猫或狗)。包括非人灵长类,优选人患者。典型的个体包括表现出可通过基因治疗来调控的异常量(比“正常”或“健康”个体更低或更高)一种或多种生理活性的动物。

[0318] 如本文所用,“治疗”或“进行治疗”包括疾病或病理状态的症状和病理上任何有益的或可取的效果,甚至可包括接受治疗的疾病或病症一个或多个可测量标记的最小降低。治疗可包括任选地疾病或病症症状的减少或改善,或疾病或病症发展的延迟。“治疗”不一定表示完全根除或治愈所述疾病或病症或其相关症状。

[0319] 如本文所用,“预防”和类似词语如“被阻止”、“防止”等表示用于预防、抑制或减少疾病或病症发生或复发可能性的方法。其也指延迟疾病或病症发作或复发,或者延迟疾病或病症症状的发生或复发。如本文所用,“预防”和类似词语还包括在疾病或病症发作或复发之前减小疾病或病症的强度、影响、症状和/或负担。

[0320] 如本文所用,术语“量”是指“有效的量”或“有效量”的病毒或转导的治疗性细胞,

以达到有益的或期望的预防或治疗结果,包括临床结果。

[0321] “预防有效量”是指有效的病毒或转导的治疗性细胞的量,以便达到期望的预防结果。通常但不一定,由于在疾病之前或其早期阶段将预防剂量应用于个体,所述预防有效量小于治疗有效量。

[0322] “治疗有效量”的病毒或转导的治疗性细胞可根据以下因素而变化,如疾病状态、年龄、性别和个体体重,以及所述干细胞和祖细胞在个体中产生所需响应的能力。治疗有效量也是这样的量,其中所述病毒或转导的治疗性细胞的任何毒性或不良作用均被治疗性有益效果超过。术语“治疗有效量”包括有效地“治疗”个体(例如患者)的量。

[0323] 不希望受限于任何特定理论,由本发明的载体、组合物和方法提供的重要益处为高的基因治疗效力,其通过用相比现有方法包含高百分比的转导的细胞的细胞群进行给药来实现。

[0324] 可将所述转导的细胞作为骨髓或脐带血移植物给予至已经接受或没有接受骨髓清除治疗的个体。在一实施方案中,将本发明的转导的细胞在骨髓移植物中给予至已经接受化学清除或放射性清除骨髓治疗的个体。

[0325] 在一实施方案中,将转导的细胞的剂量经静脉注射递送至个体。在优选的实施方案中,将转导的造血干细胞经静脉注射递送至个体。

[0326] 在一个示例性的实施方案中,提供给个体的有效量转导的细胞为小于 1×10^{12} 个细胞/100kg,小于 1×10^{11} 个细胞/100kg,小于 1×10^{10} 个细胞/100kg,小于 1×10^9 个细胞/100kg,小于 1×10^8 个细胞/100kg,小于 1×10^7 个细胞/100kg,小于 5×10^6 个细胞/100kg,小于 4×10^6 个细胞/100kg,小于 3×10^6 个细胞/100kg,小于 2×10^6 个细胞/100kg,小于 1×10^6 个细胞/100kg,小于 5×10^5 个细胞/100kg,小于 4×10^5 个细胞/100kg,小于 3×10^5 个细胞/100kg,小于 2×10^5 个细胞/100kg,小于 1×10^5 个细胞/100kg,小于 5×10^4 个细胞/100kg或小于 1×10^4 个细胞/100kg的个体体重。

[0327] 在另一个示例性的实施方案中,提供给个体的有效量转导的细胞为约 1×10^{12} 个细胞/100kg,约 1×10^{11} 个细胞/100kg,约 1×10^{10} 个细胞/100kg,约 1×10^9 个细胞/100kg,约 1×10^8 个细胞/100kg,约 1×10^7 个细胞/100kg,约 5×10^6 个细胞/100kg,约 4×10^6 个细胞/100kg,约 3×10^6 个细胞/100kg,约 2×10^6 个细胞/100kg,约 1×10^6 个细胞/100kg,约 5×10^5 个细胞/100kg,约 4×10^5 个细胞/100kg,约 3×10^5 个细胞/100kg,约 2×10^5 个细胞/100kg,约 1×10^5 个细胞/100kg,约 5×10^4 个细胞/100kg,或约 1×10^4 个细胞/100kg。

[0328] 在另一个示例性的实施方案中,提供给个体的有效量转导的细胞为,约 1×10^1 个细胞/100kg至约 1×10^{12} 个细胞/100kg,约 1×10^2 个细胞/100kg至约 1×10^{11} 个细胞/100kg,约 1×10^3 个细胞/100kg至约 1×10^{10} 个细胞/100kg,约 1×10^4 个细胞/100kg至约 1×10^9 个细胞/100kg,约 1×10^5 个细胞/100kg至约 1×10^8 个细胞/100kg,约 1×10^6 个细胞/100kg至约 1×10^7 个细胞/100kg,或任何介于中间范围的细胞数/100kg。

[0329] 在不同的实施方案中,相比现有方法,本发明的方法提供了更有效和更安全的基因治疗,且包括将包含以下量转导的细胞的细胞群或细胞剂量给予至个体:约5%转导的细胞,约10%转导的细胞,约15%转导的细胞,约20%转导的细胞,约25%转导的细胞,约30%转导的细胞,约35%转导的细胞,约40%转导的细胞,约45%转导的细胞,约50%转导的细胞,约55%转导的细胞,约60%转导的细胞,约65%转导的细胞,约70%转导的细胞,约75%

转导的细胞,约80%转导的细胞,约85%转导的细胞,约90%转导的细胞,约95%转导的细胞,约98%转导的细胞,或约100%转导的细胞。

[0330] 在不同的实施方案中,本发明的载体、组合物和方法提供了使用离体基因治疗和自体同源的移植的改善的基因治疗方法。在一个优选的实施方案中,本发明提供了转导的细胞如干细胞,例如造血干细胞。在具体的实施方案中,用本发明的载体转导造血干细胞,并将其给予至需要血红蛋白病治疗的个体。

[0331] 在具体的实施方案中,用本发明的载体转导造血干细胞,并将其给予至需要肾上腺脑白质营养不良或肾上腺髓神经病治疗的个体。

[0332] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了改善的病毒载体系统,其被优化以便在红系细胞或红系前体细胞中表达高水平的一种或多种治疗性蛋白。本发明的逆转录病毒载体包括慢病毒载体还包含目标多核苷酸,包括例如球蛋白基因或编码抗镰状化蛋白的基因。在一实施方案中,在本发明的逆转录病毒载体中所述球蛋白基因表达 β -球蛋白、 δ -球蛋白或 γ -球蛋白。在另一实施方案中,所述人 β -球蛋白基因为野生型人 β -球蛋白基因或人 β^A -球蛋白基因。在另一实施方案中,所述人 β -球蛋白基因包含内含子序列的一个或多个缺失或者为编码至少一个抗镰状化氨基酸残基的突变的人 β -球蛋白基因。抗镰状化氨基酸可源自人 δ -球蛋白或人 γ -球蛋白。在另一实施方案中,所述突变的人 β -球蛋白基因在密码子87(β^A-T87Q)处编码从苏氨酸至谷氨酰胺的突变。

[0333] 本发明的逆转录病毒载体包括慢病毒载体可用于基因治疗,包括用于治疗血红蛋白病。在具体的实施方案中,本发明提供了使用前述载体在红系细胞中获得稳定的高水平基因表达的方法,例如,为了治疗红系细胞特异性疾病。在具体实施方案中,将所述基因治疗载体用于治疗血红蛋白病,包括例如镰状细胞疾病(SCD)。在另一个优选的实施方案中,将所述基因治疗载体用于治疗地中海贫血,包括但不限于 β -地中海贫血。

[0334] 在另一个优选的实施方案中,用包含ABCD1基因的载体转导造血干细胞,以用于治疗肾上腺脑白质营养不良和/或肾上腺髓质神经病变。

[0335] 现在将通过以下实施例更充分地描述本发明。然而,本发明能以许多不同形式体现,而不应解释为受限于本文所述的实施方案;而是,提供这些实施方案是为了充分和完全地公开本发明,并向本领域技术人员充分表达本发明的范围。

实施例

[0336] 实施例1

[0337] 用于转导的细胞的预刺激

[0338] 将一瓶CD34+细胞(所有细胞)通过于37°C孵育1-2min解冻,并将内含物转移至15-mL锥形管中的10mL干细胞生长培养基(下文称为SCGM)。将细胞在标准的台式离心机中以1500RPM离心5min,重悬于10mL SCGM中,并于血细胞计数器中计数。将对应于合适数目细胞的体积转移至新鲜的15-mL锥形管,再次以1500RPM离心5min。将细胞于SCGM+1 $\times$ 细胞因子(100ng/mL SCF,100ng/mL TPO,100ng/mL FltL和30ng/mL IL-3)中重悬至期望的细胞浓度,并接种至37°C、标准加湿的组织培养箱(5%CO₂)中的无菌非粘附性表面。

[0339] 使用很多类别(表1)中可溶化合物的不同浓度来筛选增加CD34+细胞的病毒转导效率的化合物。筛选结果如图1所示。

[0340] 表1

[0341]	浓度	Wnt3	FGF1	IGF-II	SHH	StemRegenin-1	dmPGE2
	高	100ng/mL	100ng/mL	200ng/mL	100ng/mL	1000nM	100μM
	中	10ng/mL	10ng/mL	20ng/mL	10ng/mL	100nM	10μM
	低	1ng/mL	1ng/mL	2ng/mL	1ng/mL	10nM	1μM

[0342] 表1 (续)

	浓度	SC514	乳胞素 (Omuralide)	环氧霉素	AMD3100	B18R	曲古抑菌素 A
[0343]	高	10 um	1000 nm	10 μM	100 ng/mL	200 ng/mL	3000 nM
	中	1 um	100 nm	1 μM	10 ng/mL	20 ng/mL	300 nM
	低	0.1 um	10 nm	0.1 μM	1 ng/mL	2 ng/mL	30 nM

[0344] 实施例2

[0345] 转导

[0346] 将预刺激的细胞(实施例1)培养18-24hr之后进行计数。收集所述细胞,并以1500RPM离心5min。将 1.2×10^6 个预刺激的CD34⁺细胞重悬于60μL 10×细胞因子(1000ng/mL SCF, 1000ng/mL TPO, 1000ng/mL FltL和300ng/mL IL-3)、7.8μL硫酸鱼精蛋白、111μL病毒上清液和361.2μL SCGM。将90μL细胞/病毒悬浮液(约200,000细胞)加入至标准非粘附性96-孔板的每个孔内。在该病毒转导步骤期间,将终浓度100μM、50μM、25μM、12.5μM、1μM或0μM的dmPGE2加入其中。所述病毒储备液的滴度为 2.7×10^8 TU/mL,且感染复数(MOI)为约25。

[0347] 将细胞在37℃、标准加湿的组织培养箱(5%CO₂)中孵育。

[0348] 实施例3

[0349] 用dmPGE2刺激细胞

[0350] 从1mg以前处理的dmPGE2(Cayman Chemicals)制备等分的10mM dmPGE2的DMSO溶液。简而言之,用移液管将空气移至dmPGE2的小瓶直到乙酸甲酯被蒸发。将263μL DMSO加入至小瓶内剩余的PGE2中,并将25μL的等分加入至1.5mL的微量离心管,并于-80℃储存。通过在SCGM中系列稀释dmPGE2制备10×工作储备液,并根据表2将其以合适的工作浓度加入至细胞。然后将细胞在37℃、标准加湿的组织培养箱(5%CO₂)中孵育。

[0351] 表2: 系列稀释dmPGE2并将dmPGE2添加至细胞

[0352]		储备液A	储备液B	储备液C	储备液D	储备液E
	dmPGE2冷冻储备液	20	0	0	0	0
	SCGM的体积	180	100	100	100	92.5
	储备液A的体积	0	100	0	0	0
	储备液B的体积	0	0	100	0	0
	储备液C的体积	0	0	0	100	0
	储备液D的体积	0	0	0	0	8
	dmPGE2的浓度	1mM	500μM	250μM	125μM	10μM

对于终浓度为:	100μM	50μM	25μM	12.5μM	1μM
加入10μL的:	储备液A	储备液B	储备液C	储备液D	储备液E

[0353] 实施例4

[0354] 确认检测

[0355] 制备用于确认检测的细胞

[0356] 与病毒和dmPGE2一起培养24hr后,洗涤细胞,然后进行功能确认检测。通过将细胞转移至96-孔的U形底孔板进行洗涤,并在标准的台式离心机中以1500RPM离心5min。吸出培养基,将细胞重悬于200μL SCGM。将细胞再次以1500RPM离心5min,并吸出培养基。将细胞再次重悬于200μL SCGM,然后以1500RPM离心5min,并再次吸出培养基。具体的功能确认检测在下文中描述。

[0357] 7-天液体培养

[0358] 将洗涤的细胞重悬于200μL SCGM+1×细胞因子(如实施例1中所述),并转移至含有添加的800μL SCGM+1×细胞因子的标准12-孔非粘附性组织培养板。将细胞在标准加湿的组织培养箱(5%CO₂)中再维持6天,然后接受载体拷贝数分析(实施例5)和FACS分析。对于FACS分析,检测细胞中病毒编码的转基因绿色荧光蛋白(GFP)的存在。培养细胞的库中病毒标记的细胞的频率被定量为该细胞群中GFP+细胞的频率。对标记的细胞的平均荧光强度进行定量。用不同浓度的dmPGE2进行7-天液体培养检测的结果如表3所示。

[0359] 在甲基纤维素中评估集落形成单位活性

[0360] 将洗涤的细胞重悬于200μL SCGM,然后转移至3mL等分添加有细胞因子的甲基纤维素中(例如,Methocult M4434Classic)。使用16号平端针将1.5mL转移至平行35-mm组织培养皿。将培养皿维持在标准加湿的组织培养箱14-16天,并对集落的大小、形态和细胞组合物打分。然后挑选单个集落用于随后的载体拷贝数目分析(实施例5),或者将整个35-mm培养皿的内容物汇合,然后进行载体拷贝数目分析(实施例5)。

[0361] 长期培养起始细胞(LTC-IC)

[0362] 将细胞重悬于200μL SCGM,进行计数,然后以不同的稀释度(2000、1000、500、250、125、62、31、16个细胞/孔,于添加有100U/mL-100μg/mL Pen-Strep的200μL StemSpan SFEM (StemCell Technologies,cat#09650)中)转移至预涂覆的MS-5基质层,且每个稀释度24个重复。以每周间隔将100μL替换为100μL新鲜培养基。在第5周收获培养物。丢弃100μL,用剩下的100μL冲洗细胞,并用50μL新鲜培养基洗涤所述孔,并整个内容物接种于MethocultTM H4434;将150μL细胞悬浮液与600μL Methocult H4434均质化,并接种于12-孔板的一个孔中为期14天。然后进行集落计数。将含有至少一个集落(>40细胞)的孔的数目和针对每个稀释度分析的孔的总数用于使用L-calc软件(Stem Cell Technologies)计算LTC-IC的频率和95%置信区间。从每个处理组挑选100个集落到100个不同的孔中,并针对载体的存在单独打分。将每个处理组的100个集落汇合,提取基因组DNA并通过qPCR评估载体拷贝数目(实施例5)。

[0363] 移植到NOD/SCID-γ (NSG)小鼠

[0364] 为了确定是否以最小的残余毒性促进人长期造血干细胞的病毒转导,将转导的细胞洗涤后重悬于磷酸盐缓冲盐水(PBS),并移植到辐照后的成年NSG小鼠的尾部血管。按照标准的IACUC动物护理指导,将小鼠放在无病原体的环境中。在阶段性时间点,通过标准方

案从小鼠收集人供体来源提供的周边血液。简而言之,用2%葡聚糖使红血细胞球形化,然后用红细胞裂解缓冲液处理进一步澄清事实上清液。用缀合有荧光团的抗体染色单核细胞,其描述于Majeti, et al., Cell Stem Cell 2007,并在LSR-II (Becton Dickinson) 上通过流式细胞术进行分析。

[0365] 整合位点分析

[0366] 为了确定dmPGE2是否改变慢病毒载体的整合位点偏好,将来自用dmPGE2-处理的和模拟物处理的病毒转导的人造血干细胞和造血祖细胞移植小鼠的骨髓样品,进行线性扩增介导的PCR (Cartier, (2009) Science 326 (5954):818-23)。简而言之,以1-1000ng DNA作为模板,使用逆转录病毒LTR-特异性生物素化的引物进行线性PCR。用磁珠分离线性PCR产物。在半固相下完成进一步合成第二链DNA、限制性内切酶消化 (Tsp509I, NlaIII or HpyCH4IV) 和连接子盒的连接,然后是两个额外的指数PCR步骤。通过进行额外的指数PCR步骤将GS Flx特异性扩增和测序引物A和B加至LAM-PCR扩增子的两端,进一步制备产生的LAM-PCR扩增子以用于454焦磷酸测序 (GS Flx; Roche Diagnostics)。按照生产商的建议完成引物设计。将6个碱基的识别序列整合至引物A以便在单次测序运行的同时分析不同样本。使用40ng纯化的LAM-PCR产物。PCR条件如下:开始于95℃变性120s;于95℃ 45s、60℃ 45s和72℃ 60s共12个循环;于72℃最终延长300s。对LAM-PCR扩增子序列进行剪切,并用BLAST比对。

[0367] 实施例5

[0368] 载体拷贝数目分析

[0369] 简而言之,通过标准方案(例如通过Qiagen公司的DNEasy柱)从细胞分离总基因组DNA。使用针对病毒LTR和人β-肌动蛋白的TaqMan探针,使基因组DNA进行实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)。将病毒信号和β-肌动蛋白信号的Ct值归一化为标准的对照,并计算每拷贝β-肌动蛋白的病毒拷贝数目。当使用编码GFP的病毒构建体时,观察到载体拷贝数目和平均荧光强度之间的线性关系(实施例4)。用不同浓度的dmPGE2进行载体拷贝数目 (VCN) 分析的结果如表3A-C所示。

[0370] 表3A-C显示了dmPGE2在3个分别的实验中促进病毒转导CD34+细胞的剂量响应。将CD34+细胞解冻,并用SCF、TPO、FltL和IL3预刺激,然后(A)用GFP+慢病毒以感染复数25转导,(B)用GFP+慢病毒以感染复数5转导,或者(C)用表达ALD (ABCD1) 的慢病毒以感染复数25转导。在病毒转导步骤(培养24-48hr)期间,将细胞暴露于dmPGE2。然后洗涤细胞,并在培养约一周后通过流式细胞术和PCR进行分析。通过FACS染色显示针对GFP (A, B) 或ALD (C) 的细胞阳性百分比,以及平均荧光强度 (MFI) 和载体拷贝数目 (VCN) (A, B)。

[0371] 表3A:GFP MOI 25

[0372]

dmPGE2浓度	%阳性 (GFP)	MFI	VCN
100μM	81.53	1,513,504.00	3.55
50μM	67.62	977,806.75	2.2
25μM	59.99	845,691.00	1.7
12.5μM	54.71	759,442.75	1.5
0μM	30.07	583,079.25	0.535
无病毒	0.02	290,577.50	N.D.

[0373] 表3B:GFP MOI 5

[0374]	dmPGE2 浓度	%阳性(GFP)	MFI	VCN
	100 μ M	42.97	732,716.25	0.83
	50 μ M	36.80	656,703.50	0.715
[0375]	25 μ M	18.69	562,428.00	0.21
	12.5 μ M	17.84	530,218.50	0.18
	0 μ M	9.05	477,691.00	0.025
	无病毒	0.02	290,577.50	N.D.

[0376] 表3C:ABCD1MOI 25

[0377]	dmPGE2浓度	%阳性
	100 μ M	72.26
	50 μ M	56.10
	25 μ M	43.76
	12.5 μ M	45.36
	1 μ M	34.13
	0 μ M	21.44

[0378] 实施例6

[0379] dmPGE2在促进病毒转导CD34+细胞中的时程和剂量响应

[0380] 将MCD-34+细胞解冻,并用SCF、TPO、FltL和IL3预刺激,然后用GFP+慢病毒以感染复数25进行转导。在病毒转导步骤期间(培养24-25hr;培养24-26hr;培养24-28hr;或培养24-48hr)将细胞暴露于dmPGE2,然后在培养约一周后洗涤并用流式细胞术分析。可选择地,在预刺激步骤期间(培养22-24hr;培养23-24hr)将细胞暴露于dmPGE2。针对GFP的细胞阳性百分比如表4所示。

[0381] 表4

	病毒和 PGE2				预刺激 w/PGE2	
[0382]	dmPGE2 浓度	加 1 Hr	加 2 Hr	加 4 Hr	24 Hr	减 2 Hr 减 1 Hr
	100 μ M	2.48	4.02	21.57	76.44	34.85 25.14
	50 μ M	1.85	4.23	27.45	54.63	31.85 22.98
[0383]	25 μ M	1.76	4.76	27.46	50.69	31.90 24.05
	12.5 μ M	1.97	5.32	28.08	47.42	30.64 22.13
	1 μ M	2.94	7.17	21.10	32.03	25.74 22.29
	0 μ M	3.14	7.05	13.61	20.79	20.69 21.31

[0384] 实施例7

[0385] 用慢病毒载体在dmPGE2存在下转导HSC后矫正 β -地中海贫血或镰状细胞疾病

[0386] 在知情同意下根据机构审查委员会 (IRB) 批准的方案,通过清血法从患者采集流动的周边血。采用聚蔗糖梯度去除红细胞,用Miltenyi CliniMACS系统 (Miltenyi Biotec) 进行CD34+挑选后获得了富集CD34-的细胞。用人SCF、FltL、TPO和IL3以约4E6细胞/mL的浓度预刺激细胞18-24小时。然后在SCF、FltL、TPO、IL3、硫酸鱼精蛋白和dmPGE2存在下,用含有人 β -球蛋白A-T87Q基因的Lentiglobin GTP以感染复数25转导细胞18-24hr。

[0387] 转导后,移除部分细胞用于放行检测,剩余部分冷冻保存并于-80℃储藏。作为放行检测的部分,将针对个体的转导的细胞进行7-天培养和VCN分析(实施例1),以证明平均0.5-3拷贝/细胞,以及>50%的转导效率。成功实施放行检测后,患者将接受白消安和环磷酰胺的治疗。

[0388] 以 $>3 \times 10^6$ CD34+细胞/kg的单次静脉内剂量,将自体同源的CD34+细胞的剂量经静脉注射给予至个体。在移植病区每天随访患者的不良事件和实验参数以监测骨髓移植。

[0389] 一旦进行了移植且患者稳定,患者可离开医院,然后每月随访为期6个月,且至少每3个月随访总长24个月。评估包括常规血液学和化学安全实验评估,以及特别的血液检测、骨髓检查、收集不良事件和伴随药物治疗,并评估特别的疾病特异性血液学和临床参数。

[0390] 主要测试指标为:安全性、转导的细胞输入的容忍度和进行自体同源的操作的CD34+细胞移植的时间。其他测试指标包括:在造血细胞和血细胞中存在转导基因和基因产物的生物学和生物化学测量、输注要求、住院治疗的数目和在2年随访期的时程期间于各个时段发生的临床事件。移植后,针对严重不良事件、RCL检测和将血细胞入库保存以用于在发生恶性疾病的事件中进行插入诱变试验,所有患者至少每年随访总长为15年。

[0391] 实施例8

[0392] 用慢病毒载体在dmPGE2存在下转导HSC后矫正肾上腺脑白质营养不良

[0393] 在知情同意下根据机构审查委员会 (IRB) 批准的方案,通过清血法从患者采集流动的周边血。采用聚蔗糖梯度去除红细胞,用Miltenyi CliniMACS系统 (Miltenyi Biotec) 进行CD34+挑选后获得了富集CD34-的细胞。用人SCF、FltL、TPO和IL3以约4E6细胞/mL的浓度预刺激细胞18-24小时。然后在SCF、FltL、TPO、IL3、硫酸鱼精蛋白和dmPGE2存在下,用含有人ABCD1基因的Lenti-D GTP以感染复数25转导细胞18-24hr。

[0394] 转导后,移除部分细胞用于放行检测,剩余部分冷冻保存并于-80℃储藏。作为放行检测的部分,将针对个体的转导的细胞进行7-天培养和VCN分析(实施例1),以证明平均0.5-3拷贝/细胞,以及>50%的转导效率。成功实施放行检测后,患者将接受白消安和环磷酰胺的治疗。

[0395] 以 $>3 \times 10^6$ CD34+细胞/kg的单次静脉内剂量,将自体同源的CD34+细胞的剂量经静脉注射给予至个体。在移植病区每天随访患者的不良事件和实验参数以监测骨髓移植。

[0396] 一旦进行了移植且患者稳定,患者可离开医院,然后每月随访为期6个月,且至少每3个月随访总长24个月。评估包括常规血液学和化学安全实验评估,以及特别的血液检测、骨髓检查、收集不良事件和伴随药物治疗,并评估特别的疾病特异性血液学和临床参数。

[0397] 主要测试指标为：安全性、转导的Lenti-D细胞输入的容忍度和进行自体同源的操作的CD34+细胞移植的时间。其他测试指标包括：在造血细胞和血细胞中存在转导基因和基因产物的生物学和生物化学测量、脑部MRI和认知研究、住院治疗的数目和在2年随访期的时程期间于各个时段发生的临床事件。移植后，针对严重不良事件、RCL检测和将血细胞入库保存以用于在发生恶性疾病的事件中进行插入诱变试验，所有患者至少每年随访总长为15年。

[0398] 本领域技术人员应容易理解，在阅读本公开后，可对基于以上详细描述的方案进行很多修改。通常，在所附权利要求书中，所用术语不应解释为将该权利要求书限制于本说明书和权利要求书中公开的特定实施方案，而应解释为包括所有可能的实施方案以及该权利要求书的等效物的整个范围。因此，所附权利要求书不受限于本公开。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 蓝鸟生物公司 (BLUEBIRD BIO, INC.)
[0003]	加勒夫·科林斯·赫夫纳;
[0004]	亚伯拉罕·艾萨克·巴桑
[0005]	<120> 用于改善病毒转导的化合物
[0006]	<130> BLBD-006/01W0
[0007]	<150> US 61/541,736
[0008]	<151> 2011-09-30
[0009]	<160> 18
[0010]	<170> SIPOSequenceListing 1.0
[0011]	<210> 1
[0012]	<211> 576
[0013]	<212> DNA
[0014]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0015]	<400> 1
[0016]	actcttctgg tccccacaga ctacagagaga acccaccatg gtgctgtctc ctgccgacaa 60
[0017]	gaccaacgtc aaggccgcct ggggtaaggt cggcgcgcac gctggcgagt atggtgcgga 120
[0018]	ggccctggag aggatgttcc tgtccttccc caccaccaag acctacttcc cgcacttcga 180
[0019]	cctgagccac ggctctgccc aggttaaggg ccacggcaag aaggtggccg acgcgctgac 240
[0020]	caacgccgtg gcgcacgtgg acgacatgcc caacgcgctg tccgccctga gcgacctgca 300
[0021]	cgcgcacaag cttegggtgg acccggtcaa cttaagctc ctaagccact gcctgctggt 360
[0022]	gaccctggcc gccacctcc ccgccgagtt caccctgcg gtgcacgcct ccctggacaa 420
[0023]	gttcttggtc tctgtgagca ccgtgctgac ctccaaatac cgtaagctg gaggctcggt 480
[0024]	ggccatgctt cttgccccctt gggcctcccc ccagccccctc ctcccccttc tgcacccgta 540
[0025]	ccccctgggt ctttgaataa agtctgagtg ggcggc 576
[0026]	<210> 2
[0027]	<211> 142
[0028]	<212> PRT
[0029]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0030]	<400> 2
[0031]	Met Val Leu Ser Pro Ala Asp Lys Thr Asn Val Lys Ala Ala Trp Gly
[0032]	1 5 10 15
[0033]	Lys Val Gly Ala His Ala Gly Glu Tyr Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg
[0034]	20 25 30
[0035]	Met Phe Leu Ser Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asp
[0036]	35 40 45
[0037]	Leu Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala
[0038]	50 55 60
[0039]	Asp Ala Leu Thr Asn Ala Val Ala His Val Asp Asp Met Pro Asn Ala
[0040]	65 70 75 80
[0041]	Leu Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro

[0042]	85	90	95
[0043]	Val Asn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ala		
[0044]	100	105	110
[0045]	His Leu Pro Ala Glu Phe Thr Pro Ala Val His Ala Ser Leu Asp Lys		
[0046]	115	120	125
[0047]	Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg		
[0048]	130	135	140
[0049]	<210> 3		
[0050]	<211> 142		
[0051]	<212> PRT		
[0052]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
[0053]	<400> 3		
[0054]	Met Val Leu Ser Gly Glu Asp Lys Ser Asn Ile Lys Ala Ala Trp Gly		
[0055]	1	5	10
[0056]	Lys Ile Gly Gly His Gly Ala Glu Tyr Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg		
[0057]	20	25	30
[0058]	Met Phe Ala Ser Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asp		
[0059]	35	40	45
[0060]	Val Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala		
[0061]	50	55	60
[0062]	Asp Ala Leu Ala Asn Ala Ala Gly His Leu Asp Asp Leu Pro Gly Ala		
[0063]	65	70	75
[0064]	Leu Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro		
[0065]	85	90	95
[0066]	Val Asn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ser		
[0067]	100	105	110
[0068]	His His Pro Ala Asp Phe Thr Pro Ala Val His Ala Ser Leu Asp Lys		
[0069]	115	120	125
[0070]	Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg		
[0071]	130	135	140
[0072]	<210> 4		
[0073]	<211> 142		
[0074]	<212> PRT		
[0075]	<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)		
[0076]	<400> 4		
[0077]	Met Val Leu Ser Ala Asp Asp Lys Thr Asn Ile Lys Asn Cys Trp Gly		
[0078]	1	5	10
[0079]	Lys Ile Gly Gly His Gly Gly Glu Tyr Gly Glu Glu Ala Leu Gln Arg		
[0080]	20	25	30
[0081]	Met Phe Ala Ala Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Ser His Ile Asp		
[0082]	35	40	45
[0083]	Val Ser Pro Gly Ser Ala Gln Val Lys Ala His Gly Lys Lys Val Ala		

[0084]	50	55	60
[0085]	Asp Ala Leu Ala Lys Ala Ala Asp His Val Glu Asp Leu Pro Gly Ala		
[0086]	65	70	75
[0087]	Leu Ser Thr Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro		
[0088]	85	90	95
[0089]	Val Asn Phe Lys Phe Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Cys		
[0090]	100	105	110
[0091]	His His Pro Gly Asp Phe Thr Pro Ala Met His Ala Ser Leu Asp Lys		
[0092]	115	120	125
[0093]	Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg		
[0094]	130	135	140
[0095]	<210> 5		
[0096]	<211> 626		
[0097]	<212> DNA		
[0098]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0099]	<400> 5		
[0100]	acatttgctt ctgacacaac tgtgttcact agcaacctca aacagacacc atggtgcatc	60	
[0101]	tgactcctga ggagaagtct gccgttactg ccctgtgggg caaggtgaac gtggatgaag	120	
[0102]	ttggtgggtga ggccctgggc aggctgctgg tggctaccc ttggaccag aggttctttg	180	
[0103]	agtccitttg ggatctgtcc actcctgatg ctgttatggg caaccctaag gtgaaggctc	240	
[0104]	atggcaagaa agtgctcggg gccttttagtg atggcctggc tcacctggac aacctcaagg	300	
[0105]	gcacctttgc cactctgagt gagctgcact gtgacaagct gcacgtggat cctgagaact	360	
[0106]	tcaggctcct gggcaacgtg ctggctctgtg tgctggccca tcactttggc aaagaattca	420	
[0107]	ccccaccagt gcaggctgcc tatcagaaag tgggtggctgg tgtggctaata gccctggccc	480	
[0108]	acaagtatca ctaagctcgc tttcttctgtg tccaatttct attaaagggt cctttgttcc	540	
[0109]	ctaagtccaa ctactaaact ggggatatt atgaagggcc ttgagcatct ggattctgcc	600	
[0110]	taataaaaaa catttatatt cattgc	626	
[0111]	<210> 6		
[0112]	<211> 147		
[0113]	<212> PRT		
[0114]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0115]	<400> 6		
[0116]	Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp		
[0117]	1	5	10
[0118]	Gly Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu		
[0119]	20	25	30
[0120]	Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp		
[0121]	35	40	45
[0122]	Leu Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His		
[0123]	50	55	60
[0124]	Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp		
[0125]	65	70	75

[0126]	Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
[0127]	85 90 95
[0128]	Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val
[0129]	100 105 110
[0130]	Cys Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln
[0131]	115 120 125
[0132]	Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His
[0133]	130 135 140
[0134]	Lys Tyr His
[0135]	145
[0136]	<210> 7
[0137]	<211> 147
[0138]	<212> PRT
[0139]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0140]	<400> 7
[0141]	Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp
[0142]	1 5 10 15
[0143]	Gly Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu
[0144]	20 25 30
[0145]	Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp
[0146]	35 40 45
[0147]	Leu Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His
[0148]	50 55 60
[0149]	Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp
[0150]	65 70 75 80
[0151]	Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
[0152]	85 90 95
[0153]	Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val
[0154]	100 105 110
[0155]	Cys Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln
[0156]	115 120 125
[0157]	Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His
[0158]	130 135 140
[0159]	Lys Tyr His
[0160]	145
[0161]	<210> 8
[0162]	<211> 147
[0163]	<212> PRT
[0164]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)
[0165]	<400> 8
[0166]	Met Val His Leu Thr Asp Ala Glu Lys Ala Ala Val Ser Gly Leu Trp
[0167]	1 5 10 15

[0168]	Gly Lys Val Asn Ala Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu
[0169]	20 25 30
[0170]	Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Tyr Phe Asp Ser Phe Gly Asp
[0171]	35 40 45
[0172]	Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Ala Lys Val Lys Ala His
[0173]	50 55 60
[0174]	Gly Lys Lys Val Ile Thr Ala Phe Asn Asp Gly Leu Asn His Leu Asp
[0175]	65 70 75 80
[0176]	Ser Leu Lys Gly Thr Phe Ala Ser Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
[0177]	85 90 95
[0178]	Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Met Ile Val
[0179]	100 105 110
[0180]	Ile Val Leu Gly His His Leu Gly Lys Asp Phe Thr Pro Ala Ala Gln
[0181]	115 120 125
[0182]	Ala Ala Phe Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Ala Ala Leu Ala His
[0183]	130 135 140
[0184]	Lys Tyr His
[0185]	145
[0186]	<210> 9
[0187]	<211> 147
[0188]	<212> PRT
[0189]	<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)
[0190]	<400> 9
[0191]	Met Val His Leu Thr Asp Ala Glu Lys Ala Ala Val Asn Gly Leu Trp
[0192]	1 5 10 15
[0193]	Gly Lys Val Asn Pro Asp Asp Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu
[0194]	20 25 30
[0195]	Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Tyr Phe Asp Ser Phe Gly Asp
[0196]	35 40 45
[0197]	Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His
[0198]	50 55 60
[0199]	Gly Lys Lys Val Ile Asn Ala Phe Asn Asp Gly Leu Lys His Leu Asp
[0200]	65 70 75 80
[0201]	Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala His Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
[0202]	85 90 95
[0203]	Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Met Ile Val
[0204]	100 105 110
[0205]	Ile Val Leu Gly His His Leu Gly Lys Glu Phe Thr Pro Cys Ala Gln
[0206]	115 120 125
[0207]	Ala Ala Phe Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Ser Ala Leu Ala His
[0208]	130 135 140
[0209]	Lys Tyr His

[0210]	145
[0211]	<210> 10
[0212]	<211> 583
[0213]	<212> DNA
[0214]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0215]	<400> 10
[0216]	acactcgtt ctggaacgtc tgaggttatc aataagctcc tagtccagac gccatgggtc 60
[0217]	atttcacaga ggaggacaag gctactatca caagcctgtg gggcaaggtg aatgtggaag 120
[0218]	atgctggagg agaaaccctg ggaaggctcc tggttgtcta cccatggacc cagaggttct 180
[0219]	ttgacagctt tggcaacctg tcctctgcct ctgccatcat gggcaacccc aaagtcaagg 240
[0220]	cacatggcaa gaaggtgctg acttccttgg gagatgccat aaagcacctg gatgatctca 300
[0221]	agggcacctt tgcccagctg agtgaactgc actgtgacaa gctgcatgtg gatcctgaga 360
[0222]	acttcaagct cctgggaaat gtgctggtga ccgttttggc aatccatttc ggcaaagaat 420
[0223]	tcaccctga ggtgcaggct tcctggcaga agatggtgac tggagtggcc agtgcctgt 480
[0224]	cctccagata cactgagct cactgcccac gatgcagagc tttcaaggat aggcctttatt 540
[0225]	ctgcaagcaa tcaaataata aatctattct gctaagagat cac 583
[0226]	<210> 11
[0227]	<211> 147
[0228]	<212> PRT
[0229]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0230]	<400> 11
[0231]	Met Gly His Phe Thr Glu Glu Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ser Leu Trp
[0232]	1 5 10 15
[0233]	Gly Lys Val Asn Val Glu Asp Ala Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu
[0234]	20 25 30
[0235]	Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Ser Phe Gly Asn
[0236]	35 40 45
[0237]	Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His
[0238]	50 55 60
[0239]	Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Asp Ala Ile Lys His Leu Asp
[0240]	65 70 75 80
[0241]	Asp Leu Lys Gly Thr Phe Ala Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
[0242]	85 90 95
[0243]	Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Val Leu Val
[0244]	100 105 110
[0245]	Thr Val Leu Ala Ile His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln
[0246]	115 120 125
[0247]	Ala Ser Trp Gln Lys Met Val Thr Gly Val Ala Ser Ala Leu Ser Ser
[0248]	130 135 140
[0249]	Arg Tyr His
[0250]	145
[0251]	<210> 12

[0252]	<211> 147
[0253]	<212> PRT
[0254]	<213> 小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
[0255]	<400> 12
[0256]	Met Val His Phe Thr Ala Glu Glu Lys Ala Ala Ile Thr Ser Ile Trp
[0257]	1 5 10 15
[0258]	Asp Lys Val Asp Leu Glu Lys Val Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu
[0259]	20 25 30
[0260]	Leu Ile Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Lys Phe Gly Asn
[0261]	35 40 45
[0262]	Leu Ser Ser Ala Leu Ala Ile Met Gly Asn Pro Arg Ile Arg Ala His
[0263]	50 55 60
[0264]	Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Leu Gly Val Lys Asn Met Asp
[0265]	65 70 75 80
[0266]	Asn Leu Lys Glu Thr Phe Ala His Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
[0267]	85 90 95
[0268]	Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Met Leu Val
[0269]	100 105 110
[0270]	Ile Val Leu Ser Thr His Phe Ala Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln
[0271]	115 120 125
[0272]	Ala Ala Trp Gln Lys Leu Val Ile Gly Val Ala Asn Ala Leu Ser His
[0273]	130 135 140
[0274]	Lys Tyr His
[0275]	145
[0276]	<210> 13
[0277]	<211> 147
[0278]	<212> PRT
[0279]	<213> 褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
[0280]	<400> 13
[0281]	Met Val His Phe Thr Ala Glu Glu Lys Ala Ala Ile Ile Ser Ile Trp
[0282]	1 5 10 15
[0283]	Glu Lys Val Asp Leu Glu Lys Ile Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu
[0284]	20 25 30
[0285]	Leu Ile Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Lys Phe Gly Asn
[0286]	35 40 45
[0287]	Leu Ser Ser Ala Leu Ala Ile Met Gly Asn Pro Arg Ile Arg Ala His
[0288]	50 55 60
[0289]	Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Ser Ala Val Glu Asn Met Asp
[0290]	65 70 75 80
[0291]	Asn Leu Lys Glu Thr Phe Ala His Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
[0292]	85 90 95
[0293]	Leu His Val Asp Pro Gln Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Met Leu Val

[0294]	100	105	110
[0295]	Ile Val Leu Ser Thr His Phe Ala Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln		
[0296]	115	120	125
[0297]	Ala Ala Trp Gln Lys Leu Val Met Gly Val Ala Asn Ala Leu Ser His		
[0298]	130	135	140
[0299]	Lys Tyr His		
[0300]	145		
[0301]	<210> 14		
[0302]	<211> 774		
[0303]	<212> DNA		
[0304]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0305]	<400> 14		
[0306]	agggcaagtt aagggaatag tggaatgaag gttcattttt cattctcaca aactaatgaa	60	
[0307]	accctgctta tcttaaacca acctgctcac tggagcaggg aggacaggac cagcataaaa	120	
[0308]	ggcagggcag agtcgactgt tgcttacact ttctttctgac ataacagtgt tcactagcaa	180	
[0309]	cctcaaacag acaccatggt gcatctgact cctgaggaga agactgctgt caatgccctg	240	
[0310]	tggggcaaag tgaacgtgga tgcagttggt ggtgaggccc tgggcagatt actggtggtc	300	
[0311]	tacccttgga cccagagggt ctttgagtcc tttggggatc tgtcctctcc tgatgctgtt	360	
[0312]	atgggcaacc ctaaggtgaa ggctcatggc aagaagggtc taggtgcctt tagtgatggc	420	
[0313]	ctggtcacc tggacaacct caagggcact ttttctcagc tgagtgaact gcaactgtgac	480	
[0314]	aagctgcacg tggatcctga gaacttcagg ctcttgggca atgtgctggt gtgtgtgctg	540	
[0315]	gcccgaact ttggcaagga attcacccca caaatgcagg ctgcctatca gaaggtgggtg	600	
[0316]	gctggtgtgg ctaatgccct ggctcacaag taccattgag atcctggact gtttctgat	660	
[0317]	aaccataaga agacctatt tccctagatt ctattttctg aacttgggaa cacaatgcct	720	
[0318]	acttcaaggg tatggcttct gcctaataaa gaatgttcag ctcaacttcc tgat	774	
[0319]	<210> 15		
[0320]	<211> 147		
[0321]	<212> PRT		
[0322]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0323]	<400> 15		
[0324]	Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Thr Ala Val Asn Ala Leu Trp		
[0325]	1 5 10 15		
[0326]	Gly Lys Val Asn Val Asp Ala Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu		
[0327]	20 25 30		
[0328]	Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp		
[0329]	35 40 45		
[0330]	Leu Ser Ser Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His		
[0331]	50 55 60		
[0332]	Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp		
[0333]	65 70 75 80		
[0334]	Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ser Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys		
[0335]	85 90 95		

[0336]	Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val	
[0337]	100	105 110
[0338]	Cys Val Leu Ala Arg Asn Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Gln Met Gln	
[0339]	115	120 125
[0340]	Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His	
[0341]	130	135 140
[0342]	Lys Tyr His	
[0343]	145	
[0344]	<210> 16	
[0345]	<211> 2297	
[0346]	<212> DNA	
[0347]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0348]	<400> 16	
[0349]	ccagccccag tccctacgcg gcagccagcc caggtgacat gccggtgctc tccaggcccc	60
[0350]	ggccctggcg ggggaacacg ctgaagcgca cggccgtgct cctggccctc gcggcctatg	120
[0351]	gagcccacaa agtctacccc ttggtgcgcc agtgccctggc cccggccagg ggtcttcagg	180
[0352]	cgcccgccgg ggagcccacg caggaggcct ccggggtcgc ggcgggccaaa gctggcatga	240
[0353]	accgggtatt cctgcagcgg ctctgtggc tcttgcggct gctgttcccc cgggtcctgt	300
[0354]	gccgggagac ggggctgctg gccctgcaact cggccgcctt ggtgagccgc accttctgt	360
[0355]	cgggtgatgt ggcccgcctg gacggaaggc tggcccgtg catcgctccgc aaggaccgc	420
[0356]	gggttttgg ctggcagctg ctgcagtggc tctcatcgc cctccctgct accttcgtca	480
[0357]	acagtgccat ccgttacctg gagggccaac tggccctgtc gttccgcagc cgtctggtgg	540
[0358]	cccacgccta ccgcctctac ttctcccagc agacctacta ccgggtcagc aacatggacg	600
[0359]	ggcggttcg caacctgac cagtctctga cggaggacgt ggtggccttt gcggcctctg	660
[0360]	tggccacct ctactccaac ctgaccaagc cactcctgga cgtggctgtg acttcttaca	720
[0361]	ccctgcttcg ggcgggccgc tcccgtagg cggcacagc ctggccctcg gccatcgccg	780
[0362]	gcctcgtggt gttcctcacg gccaacgtgc tgcgggcctt ctgcccag ttcggggagc	840
[0363]	tgggtgcaga ggaggcgcgg cggaaggggg agctgcgcta catgcactcg cgtgtggtgg	900
[0364]	ccaactcgga ggagatcgcc ttctatgggg gccatgaggt ggagctggcc ctgctacagc	960
[0365]	gctcctacca ggacctggcc tcgcagatca acctatcct tctggaacgc ctgtggtatg	1020
[0366]	ttatgctgga gcagttctc atgaagtatg tgtggagcgc ctcgggcctg ctcatggtgg	1080
[0367]	ctgtcccat catcactgcc actggctact cagagtcaga tgcagaggcc gtgaagaagg	1140
[0368]	cagccttga aaagaaggag gaggagctgg tgagcgagcg cacagaagcc ttactattg	1200
[0369]	cccgaacct cctgacagcg gctgcagatg ccattgagcg gatcatgtcg tcgtacaagg	1260
[0370]	aggtgacgga gctggctggc tacacagccc gggtagcaga gatgttcag gtatttgaag	1320
[0371]	atgttcagcg ctgtcacttc aagaggccca gggagctaga ggacgctcag gcggggtctg	1380
[0372]	ggaccatagg ccggtctggt gtccgtgtgg agggccccct gaagatccga ggccaggtgg	1440
[0373]	tggatgtgga acaggggatc atctgcgaga acatcccat cgtcacgccc tcaggagagg	1500
[0374]	tgggtgtggc cagcctcaac atcagggtgg aggaaggcat gcattgtctc atcacaggcc	1560
[0375]	ccaatggctg cggcaagagc tccctgttcc ggatcctggg tgggctctgg ccacgtacg	1620
[0376]	gtggtgtgct ctacaagccc ccacccagc gcatgttcta catcccgag aggccttaca	1680
[0377]	tgtctgtggg ctccctgcgt gaccaggtga tctaccgga ctcagtggag gacatgcaaa	1740

[0378]	ggaagggcta ctcggagcag gacctggaag ccatcctgga cgtcgtgcac ctgcaccaca	1800
[0379]	tcctgcagcg ggaggaggt tgggaggtcta tgtgtgactg gaaggacgtc ctgtcgggtg	1860
[0380]	gcgagaagca gagaatcggc atggcccgcga tgttctacca caggcccaag tacgccctcc	1920
[0381]	tggatgaatg caccagcgcc gtgagcatcg acgtggaagg caagatcttc caggcggcca	1980
[0382]	aggacgcggg cattgccctg ctctccatca cccaccggcc ctccctgtgg aaataccaca	2040
[0383]	cacacttgct acagttcgat ggggagggcg gctggaagtt cgagaagctg gactcagctg	2100
[0384]	cccgcctgag cctgacggag gagaagcagc ggctggagca gcagctggcg ggcattccca	2160
[0385]	agatgcagcg gcgcctccag gagctctgcc agatcctggg cgaggccgtg gccccagcgc	2220
[0386]	atgtgccggc acctagcccc caaggccctg gtggcctcca gggcgcctcc acctgactcg	2280
[0387]	agggggggcc cgggtacc	2297
[0388]	<210>	17
[0389]	<211>	2238
[0390]	<212>	DNA
[0391]	<213>	智人 (Homo sapiens)
[0392]	<400>	17
[0393]	atgccggtgc tctccaggcc cgggccctgg cgggggaaca cgtgaagcg cacggccgtg	60
[0394]	ctcctggccc tcgcggccta tggagccac aaagtctacc ccttggtgcg ccagtgcctg	120
[0395]	gccccggcca ggggtcttca ggcccccgc ggggagccca cgcaggagcg ctccggggtc	180
[0396]	gcggcggcca aagctggcat gaaccgggta ttcctgcagc ggctcctgtg gctcctgcgg	240
[0397]	ctgtgttcc cccgggtcct gtgccgggag acggggctgc tggccctgca ctccggccgc	300
[0398]	ttggtgagcc gcaccttct gtccgtgtat gtggcccgcc tggacggaag gctggcccg	360
[0399]	tgcatcgctc gcaaggaccc gcgggctttt ggctggcagc tgctgcagtg gctcctcatc	420
[0400]	gcccctccctg ctaccttct caacagtgc atccgttacc tggagggcca actggccctg	480
[0401]	tcgttccgca gccgtctggt ggcccacgcc taccgcctct acttctccca gcagacctac	540
[0402]	taccgggtca gcaacatgga cgggcggctt cgcaacctg accagtctct gacggaggac	600
[0403]	gtggtggcct ttgcggcctc tgtggccac ctctactcca acctgaccaa gccactcctg	660
[0404]	gacgtggctg tgacttccta caccctgctt cgggcggccc gctcccgtgg agccggcaca	720
[0405]	gcctggccct cggccatcgc cggcctcgtg gtgttctca cggccaacgt gctgcgggcc	780
[0406]	ttctcgccca agttcgggga gctggtggca gaggaggcgc ggcggaagg ggagctgcgc	840
[0407]	tacatgcact cgcgtgtggt ggccaactcg gaggagatcg ctttctatgg gggccatgag	900
[0408]	gtggagctgg ccctgtaca gcgtcctac caggacctgg cctcgcagat caacctcatc	960
[0409]	cttctggaac gcctgtggt tgttatgctg gagcagttcc tcatgaagta tgtgtggagc	1020
[0410]	gcctcgggcc tgctcatggt ggctgtcccc atcatcactg cactggcta ctcagagtca	1080
[0411]	gatgcagagg ccgtgaagaa ggcagccttg gaaaagaagg aggaggagct ggtgagcgag	1140
[0412]	cgcacagaag cttcactat tgcccgaac ctctgacag cggctgcaga tgccattgag	1200
[0413]	cggatcatgt cgtcgtacaa ggaggtgacg gagctggctg gctacacagc ccgggtgcac	1260
[0414]	gagatgttcc aggtatttga agatgttcag cgctgtcact tcaagaggcc caggagcta	1320
[0415]	gaggacgtc aggcggggtc tgggaccata ggccggtctg gtgtccgtgt ggaggcccc	1380
[0416]	ctgaagatcc gaggccaggt ggtggatgtg gaacagggga tcatctgcga gaacatcccc	1440
[0417]	atgtcacgc cctcaggaga ggtggtggtg gccagcctca acatcagggt ggaggaaggc	1500
[0418]	atgcatctgc tcatcacagg cccaatggc tgcggcaaga gctccctgtt ccgatcctg	1560
[0419]	ggtgggctct ggcccacgta cgggtggtgt ctctacaagc cccacccca gcgcatttc	1620

[0420] tacatcccgc agaggcccta catgtctgtg ggctccctgc gtgaccaggt gatctaccgc 1680
 [0421] gactcagtgg aggacatgca aaggaagggc tactcggagc aggacctgga agccatcctg 1740
 [0422] gacgtcgtgc acctgcacca catcctgcag cgggaggag gttgggagc tatgtgtgac 1800
 [0423] tggaaggacg tcctgtcggg tggcgagaag cagagaatcg gcatggcccg catgtttctac 1860
 [0424] cacaggccca agtacgccct cctggatgaa tgcaccagcg ccgtgagcat cgacgtggaa 1920
 [0425] ggcaagatct tccaggcggc caaggacgcg ggcattgccc tgctctccat caccaccgg 1980
 [0426] ccctccctgt ggaaatacca cacacacttg ctacagttcg atggggaggg cggctggaag 2040
 [0427] ttcgagaagc tggactcagc tgcccgcctg agcctgacgg aggagaagca gcggctggag 2100
 [0428] cagcagctgg cgggcattcc caagatgcag cggcgcctcc aggagctctg ccagatcctg 2160
 [0429] ggcgaggccg tggccccagc gcatgtgccg gcacctagcc cgcaaggccc tgggtggcctc 2220
 [0430] cagggtgcct ccacctga 2238
 [0431] <210> 18
 [0432] <211> 745
 [0433] <212> PRT
 [0434] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0435] <400> 18
 [0436] Met Pro Val Leu Ser Arg Pro Arg Pro Trp Arg Gly Asn Thr Leu Lys
 [0437] 1 5 10 15
 [0438] Arg Thr Ala Val Leu Leu Ala Leu Ala Ala Tyr Gly Ala His Lys Val
 [0439] 20 25 30
 [0440] Tyr Pro Leu Val Arg Gln Cys Leu Ala Pro Ala Arg Gly Leu Gln Ala
 [0441] 35 40 45
 [0442] Pro Ala Gly Glu Pro Thr Gln Glu Ala Ser Gly Val Ala Ala Ala Lys
 [0443] 50 55 60
 [0444] Ala Gly Met Asn Arg Val Phe Leu Gln Arg Leu Leu Trp Leu Leu Arg
 [0445] 65 70 75 80
 [0446] Leu Leu Phe Pro Arg Val Leu Cys Arg Glu Thr Gly Leu Leu Ala Leu
 [0447] 85 90 95
 [0448] His Ser Ala Ala Leu Val Ser Arg Thr Phe Leu Ser Val Tyr Val Ala
 [0449] 100 105 110
 [0450] Arg Leu Asp Gly Arg Leu Ala Arg Cys Ile Val Arg Lys Asp Pro Arg
 [0451] 115 120 125
 [0452] Ala Phe Gly Trp Gln Leu Leu Gln Trp Leu Leu Ile Ala Leu Pro Ala
 [0453] 130 135 140
 [0454] Thr Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Tyr Leu Glu Gly Gln Leu Ala Leu
 [0455] 145 150 155 160
 [0456] Ser Phe Arg Ser Arg Leu Val Ala His Ala Tyr Arg Leu Tyr Phe Ser
 [0457] 165 170 175
 [0458] Gln Gln Thr Tyr Tyr Arg Val Ser Asn Met Asp Gly Arg Leu Arg Asn
 [0459] 180 185 190
 [0460] Pro Asp Gln Ser Leu Thr Glu Asp Val Val Ala Phe Ala Ala Ser Val
 [0461] 195 200 205

[0462]	Ala His Leu Tyr Ser Asn Leu Thr Lys Pro Leu Leu Asp Val Ala Val
[0463]	210 215 220
[0464]	Thr Ser Tyr Thr Leu Leu Arg Ala Ala Arg Ser Arg Gly Ala Gly Thr
[0465]	225 230 235 240
[0466]	Ala Trp Pro Ser Ala Ile Ala Gly Leu Val Val Phe Leu Thr Ala Asn
[0467]	245 250 255
[0468]	Val Leu Arg Ala Phe Ser Pro Lys Phe Gly Glu Leu Val Ala Glu Glu
[0469]	260 265 270
[0470]	Ala Arg Arg Lys Gly Glu Leu Arg Tyr Met His Ser Arg Val Val Ala
[0471]	275 280 285
[0472]	Asn Ser Glu Glu Ile Ala Phe Tyr Gly Gly His Glu Val Glu Leu Ala
[0473]	290 295 300
[0474]	Leu Leu Gln Arg Ser Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Gln Ile Asn Leu Ile
[0475]	305 310 315 320
[0476]	Leu Leu Glu Arg Leu Trp Tyr Val Met Leu Glu Gln Phe Leu Met Lys
[0477]	325 330 335
[0478]	Tyr Val Trp Ser Ala Ser Gly Leu Leu Met Val Ala Val Pro Ile Ile
[0479]	340 345 350
[0480]	Thr Ala Thr Gly Tyr Ser Glu Ser Asp Ala Glu Ala Val Lys Lys Ala
[0481]	355 360 365
[0482]	Ala Leu Glu Lys Lys Glu Glu Glu Leu Val Ser Glu Arg Thr Glu Ala
[0483]	370 375 380
[0484]	Phe Thr Ile Ala Arg Asn Leu Leu Thr Ala Ala Ala Asp Ala Ile Glu
[0485]	385 390 395 400
[0486]	Arg Ile Met Ser Ser Tyr Lys Glu Val Thr Glu Leu Ala Gly Tyr Thr
[0487]	405 410 415
[0488]	Ala Arg Val His Glu Met Phe Gln Val Phe Glu Asp Val Gln Arg Cys
[0489]	420 425 430
[0490]	His Phe Lys Arg Pro Arg Glu Leu Glu Asp Ala Gln Ala Gly Ser Gly
[0491]	435 440 445
[0492]	Thr Ile Gly Arg Ser Gly Val Arg Val Glu Gly Pro Leu Lys Ile Arg
[0493]	450 455 460
[0494]	Gly Gln Val Val Asp Val Glu Gln Gly Ile Ile Cys Glu Asn Ile Pro
[0495]	465 470 475 480
[0496]	Ile Val Thr Pro Ser Gly Glu Val Val Val Ala Ser Leu Asn Ile Arg
[0497]	485 490 495
[0498]	Val Glu Glu Gly Met His Leu Leu Ile Thr Gly Pro Asn Gly Cys Gly
[0499]	500 505 510
[0500]	Lys Ser Ser Leu Phe Arg Ile Leu Gly Gly Leu Trp Pro Thr Tyr Gly
[0501]	515 520 525
[0502]	Gly Val Leu Tyr Lys Pro Pro Pro Gln Arg Met Phe Tyr Ile Pro Gln
[0503]	530 535 540

[0504]	Arg	Pro	Tyr	Met	Ser	Val	Gly	Ser	Leu	Arg	Asp	Gln	Val	Ile	Tyr	Pro
[0505]	545						550				555					560
[0506]	Asp	Ser	Val	Glu	Asp	Met	Gln	Arg	Lys	Gly	Tyr	Ser	Glu	Gln	Asp	Leu
[0507]						565				570						575
[0508]	Glu	Ala	Ile	Leu	Asp	Val	Val	His	Leu	His	His	Ile	Leu	Gln	Arg	Glu
[0509]						580				585						590
[0510]	Gly	Gly	Trp	Glu	Ala	Met	Cys	Asp	Trp	Lys	Asp	Val	Leu	Ser	Gly	Gly
[0511]						595				600						605
[0512]	Glu	Lys	Gln	Arg	Ile	Gly	Met	Ala	Arg	Met	Phe	Tyr	His	Arg	Pro	Lys
[0513]			610							615					620	
[0514]	Tyr	Ala	Leu	Leu	Asp	Glu	Cys	Thr	Ser	Ala	Val	Ser	Ile	Asp	Val	Glu
[0515]			625							630					635	
[0516]	Gly	Lys	Ile	Phe	Gln	Ala	Ala	Lys	Asp	Ala	Gly	Ile	Ala	Leu	Leu	Ser
[0517]						645					650					655
[0518]	Ile	Thr	His	Arg	Pro	Ser	Leu	Trp	Lys	Tyr	His	Thr	His	Leu	Leu	Gln
[0519]						660					665					670
[0520]	Phe	Asp	Gly	Glu	Gly	Gly	Trp	Lys	Phe	Glu	Lys	Leu	Asp	Ser	Ala	Ala
[0521]						675									680	
[0522]	Arg	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	Gln	Arg	Leu	Glu	Gln	Gln	Leu	Ala
[0523]						690									695	
[0524]	Gly	Ile	Pro	Lys	Met	Gln	Arg	Arg	Leu	Gln	Glu	Leu	Cys	Gln	Ile	Leu
[0525]						705									710	
[0526]	Gly	Glu	Ala	Val	Ala	Pro	Ala	His	Val	Pro	Ala	Pro	Ser	Pro	Gln	Gly
[0527]										725					730	
[0528]	Pro	Gly	Gly	Leu	Gln	Gly	Ala	Ser	Thr							
[0529]															740	
																745

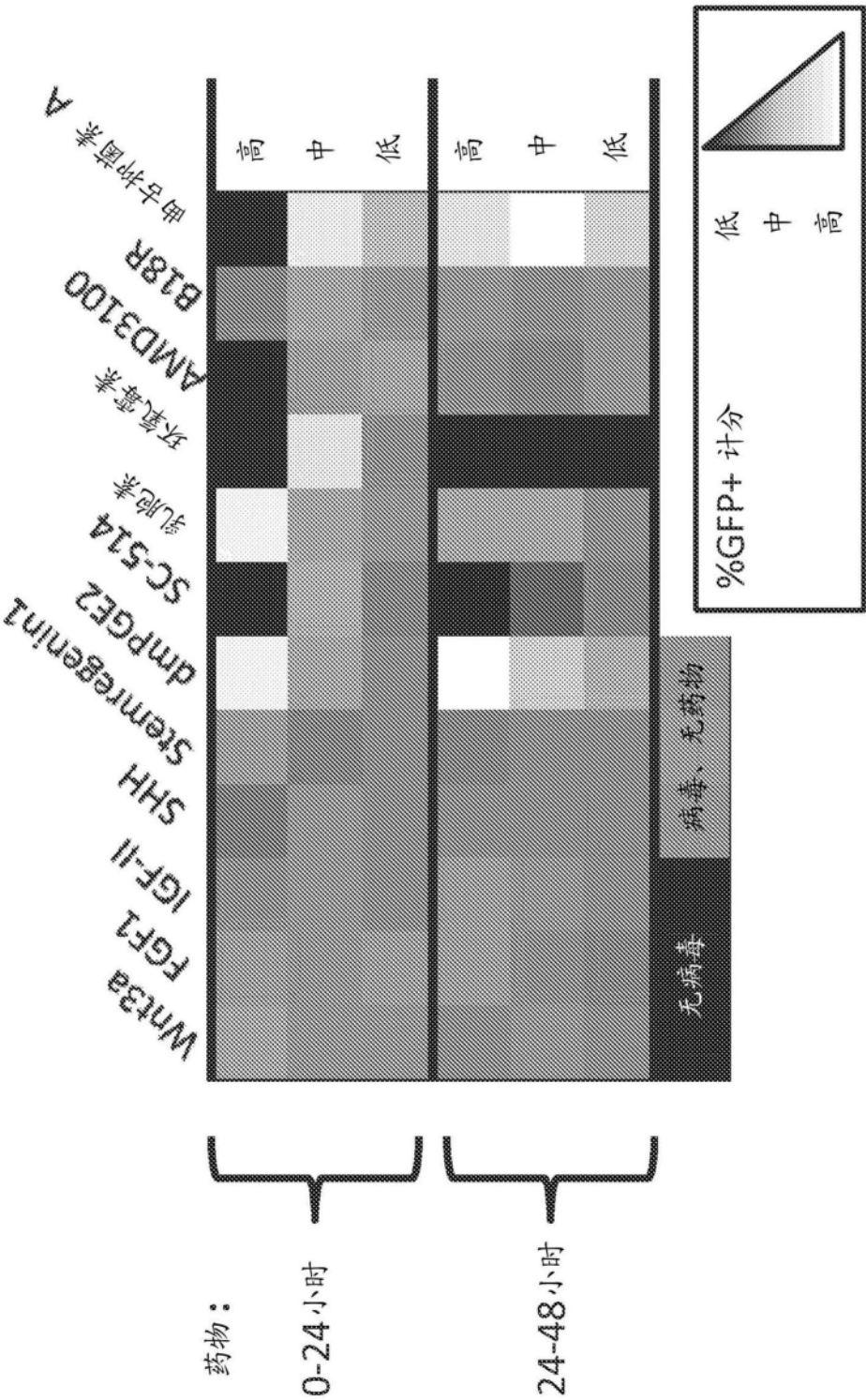


图1