



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110139933 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201780076917.1

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

(22)申请日 2017.11.08

代理人 杨昀 陶家蓉

(30)优先权数据

62/419,621 2016.11.09 US

(51)Int.Cl.

C12N 15/86(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 48/00(2006.01)

2019.06.12

C07K 14/47(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/060680 2017.11.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/089527 EN 2018.05.17

(71)申请人 英特瑞克斯顿股份有限公司

地址 美国弗吉尼亚州

(72)发明人 S·肖尔 D·托马斯 G·鲁滨逊

M·皮科特 R·索恩

K·格鲁伊斯

权利要求书3页 说明书55页

序列表17页 附图33页

(54)发明名称

共济蛋白表达构建体

(57)摘要

本发明提供了表达共济蛋白的多核苷酸、载体和病毒以及治疗弗里德赖希氏共济失调的方法。



1. 一种包含编码人共济蛋白多肽的核酸分子的多核苷酸, 所述人共济蛋白多肽具有与5'UTR可操作地连接的SEQ ID NO:1至少80%相同的氨基酸序列, 其中所述5'UTR是5U2、FTH1、GAPDH或RPL6-5'剪接。

2. 根据权利要求1所述的多核苷酸, 其中所述核酸编码具有与SEQ ID NO:1至少85%相同的氨基酸序列的蛋白质。

3. 根据权利要求1所述的多核苷酸, 其中所述核酸编码具有与SEQ ID NO:1至少90%相同的氨基酸序列的蛋白质。

4. 根据权利要求1所述的多核苷酸, 其中所述核酸编码具有与SEQ ID NO:1至少90%相同的氨基酸序列的蛋白质。

5. 根据权利要求1所述的多核苷酸, 其中所述核酸编码具有与SEQ ID NO:1至少95%相同的氨基酸序列的蛋白质。

6. 根据权利要求1所述的多核苷酸, 其中所述核酸编码具有与SEQ ID NO:1至少98%相同的氨基酸序列的蛋白质。

7. 根据权利要求1所述的多核苷酸, 其中所述核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的多核苷酸, 其中编码人共济蛋白多肽的所述核酸分子与至少一种控制元件可操作地连接, 其中所述控制元件是启动子、3'调节元件或其组合。

9. 根据权利要求8所述的多核苷酸, 其中所述启动子是诱导型启动子。

10. 根据权利要求9所述的多核苷酸, 其还包含调节来自所述诱导型启动子的表达的基因开关。

11. 根据权利要求10所述的多核苷酸, 其中所述基因开关是基于蜕皮激素受体(EcR)的基因开关。

12. 根据权利要求11所述的多核苷酸, 其中所述基于蜕皮激素受体(EcR)的基因开关是RHEOSWITCH THERAPEUTIC SYSTEM® (RTS®)基因开关。

13. 根据权利要求8所述的多核苷酸, 其中所述启动子是CMV启动子、UBC启动子、EF1α启动子、PGK1启动子或最小共济蛋白启动子。

14. 根据权利要求8所述的多核苷酸, 其中所述3'调节元件是SV40早期序列、SV40晚期序列、具有SEQ ID NO:7的核酸序列的合成3'调节元件、或人生长激素多腺苷酸化序列。

15. 根据权利要求8所述的多核苷酸, 其中所述核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质, 并且所述控制元件包含UBC启动子、5U2序列和人生长激素多腺苷酸化序列。

16. 根据权利要求8所述的多核苷酸, 其中所述核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质, 并且所述控制元件包含UBC启动子、5U2序列和具有SEQ ID NO:7的核酸序列的合成3'调节元件。

17. 一种病毒载体, 其包含根据权利要求1至16中任一项所述的多核苷酸。

18. 根据权利要求17所述的病毒载体, 其中所述载体是腺相关病毒载体。

19. 根据权利要求18所述的病毒载体, 其中所述腺相关病毒载体是AAV5。

20. 一种重组病毒粒子, 其包含病毒载体, 其中所述载体包含编码人共济蛋白的核酸分

子,所述核酸分子与5'UTR和控制元件可操作地连接,其中所述5'UTR是5U2、FTH1、GAPDH或RPL6-5'剪接,所述控制元件指导转录和翻译。

21. 根据权利要求20所述的病毒粒子,其中所述载体是腺相关病毒载体。

22. 根据权利要求21所述的病毒粒子,其中所述腺相关病毒载体是AAV5。

23. 根据权利要求20至22中任一项所述的病毒粒子,其中所述核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质。

24. 根据权利要求20至23中任一项所述的病毒粒子,其中所述控制元件是启动子、3'调节元件或其组合。

25. 根据权利要求24所述的病毒粒子,其中所述启动子是诱导型启动子。

26. 根据权利要求25所述的病毒粒子,其还包含调节来自所述诱导型启动子的表达的基因开关。

27. 根据权利要求26所述的病毒粒子,其中所述基因开关是基于蜕皮激素受体(EcR)的基因开关。

28. 根据权利要求27所述的病毒粒子,其中所述基于蜕皮激素受体(EcR)的基因开关是RHEOSWITCH THERAPEUTIC SYSTEM®(RTS®)基因开关。

29. 根据权利要求24所述的病毒粒子,其中所述启动子是CMV启动子、UBC启动子、EF1α启动子、PGK1启动子或最小共济蛋白启动子。

30. 根据权利要求24至29中任一项所述的病毒粒子,其中所述3'调节元件是SV40早期序列、SV40晚期序列、具有SEQ ID NO:7的核酸序列的合成3'调节元件、或人生长激素多腺苷酸化序列。

31. 根据权利要求24所述的病毒粒子,其中所述核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,所述启动子是UBC启动子,并且所述调节元件是5U2序列和人生长激素多腺苷酸化序列。

32. 根据权利要求24所述的病毒粒子,其中所述核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,所述启动子是UBC启动子,并且所述调节元件是5U2序列和具有SEQ ID NO:7的核酸序列的合成3'调节元件。

33. 一种组合物,其包含:

(a) 病毒载体,其中所述载体包含编码人共济蛋白的核酸分子,所述核酸分子与5'UTR和控制元件可操作地连接,所述5'UTR选自5U2、FTH1、GAPDH和RPL6-5'剪接,所述控制元件指导转录和翻译;和

(b) 药学可接受的赋形剂。

34. 根据权利要求33所述的组合物,其中所述载体是腺相关病毒载体。

35. 根据权利要求34所述的组合物,其中所述腺相关病毒载体是AAV5。

36. 根据权利要求33至35中任一项所述的组合物,其中所述核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质。

37. 根据权利要求33至36中任一项所述的组合物,其中所述控制元件是启动子、3'调节元件或其组合。

38. 根据权利要求37所述的组合物,其中所述启动子是诱导型启动子。

39. 根据权利要求38所述的组合物,其还包含调节来自所述诱导型启动子的表达的基

因开关。

40. 根据权利要求39所述的组合物,其中所述基因开关是基于蜕皮激素受体 (EcR) 的基因开关。

41. 根据权利要求40所述的组合物,其中所述基于蜕皮激素受体 (EcR) 的基因开关是 RHEOSWITCH THERAPEUTIC SYSTEM® (RTS®) 基因开关。

42. 根据权利要求37所述的组合物,其中所述启动子是CMV启动子、UBC启动子、EF1 α 启动子、PGK1启动子或最小共济蛋白启动子。

43. 根据权利要求33至38中任一项所述的组合物,其中所述3'调节元件是SV40早期序列、SV40晚期序列、具有SEQ ID NO:7的核酸序列的合成3'调节元件、或人生长激素多腺苷酸化序列。

44. 根据权利要求37所述的组合物,其中所述核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,所述启动子是UBC启动子,并且所述调节元件是5U2序列和人生长激素多腺苷酸化序列。

45. 根据权利要求37所述的组合物,其中所述核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,所述启动子是UBC启动子,并且所述调节元件是5U2序列和具有SEQ ID NO:7的核酸序列的合成3'调节元件。

46. 一种治疗有此需要的受试者中的弗里德赖希氏共济失调的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求33所述的组合物,其中所述核酸分子由所述受试者的细胞以足以改善所述受试者中的弗里德赖希氏共济失调的至少一种症状的水平表达。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述弗里德赖希氏共济失调的至少一种症状是臂和/或腿中的协调性丧失;疲劳、视力障碍、听力丧失、言语不清、侵袭性脊柱侧凸、糖尿病、肥厚性心肌病或心律失常。

48. 根据权利要求46或47所述的方法,其中所述共济蛋白在线粒体中表达。

49. 根据权利要求46或47所述的方法,其中所述共济蛋白在小脑中表达。

50. 根据权利要求46或47所述的方法,其中所述共济蛋白在海马中表达。

51. 根据权利要求46或47所述的方法,其中所述共济蛋白在前皮质中表达。

52. 根据权利要求46或47所述的方法,其中所述共济蛋白在背根神经节中表达。

53. 根据权利要求46所述的方法,其中所述共济蛋白在所述受试者中以大于25%的正常水平的共济蛋白的水平表达。

54. 根据权利要求46所述的方法,其中所述共济蛋白在所述受试者中以大于30%的正常水平的共济蛋白的水平表达。

55. 根据权利要求46所述的方法,其中所述共济蛋白在所述受试者中以大于40%的正常水平的共济蛋白的水平表达。

56. 根据权利要求46所述的方法,其中所述共济蛋白在所述受试者中以大于50%的正常水平的共济蛋白的水平表达。

共济蛋白表达构建体

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请以引用的方式并入“序列表”(下文鉴定),所述序列表经由美国专利局的电子提交系统(EFS)以文本文件格式同时随同提交。随同提交的序列表的文本文件副本标记为“INX00317PCT_ST25”,是大小为40.298字节的文件,并且于2017年10月4日创建。该序列表以引用的方式整体并入本文。

背景技术

[0003] 弗里德赖希氏共济失调(Friedreich's Ataxia,FA)是最常见形式的可遗传的共济失调,并且影响美国50,000人中的约1人。弗里德赖希氏共济失调由存在于染色体9上的编码共济蛋白基因(FXN)的基因中的突变引起。FA的潜在分子病理学是由于FXN的第一个内含子中三核苷酸GAA重复扩增(70-1700)的存在(Campuzano等人(1996)Hum.Mol.Genet.6:1771-1780)。该基因突变的效果是不足数量的线粒体蛋白质共济蛋白的产生,所述线粒体蛋白质共济蛋白看起来在铁稳态中起重要作用(Pandolfo(2008)Archives of Neurology 65:1296-1303;Campuzano等人(1996)Hum.Mol.Genet.6:1771-1780)。共济蛋白蛋白质的水平减少与线粒体功能障碍有关,并且导致细胞毒性和细胞死亡(Pandolfo(2009)J.Neurol.256Suppl.1:3-8)。缺陷基因的杂合子携带者表达大约50%的正常共济蛋白蛋白质水平,并且是无症状的;纯合子患者表达5-25%的正常共济蛋白水平,并且是有症状的。因此,可能的是,FA患者的CNS中的细胞中共济蛋白蛋白质水平的适度增加会导致显著的神经学改善。此外,增加内源性FXN水平或FXN蛋白替换方法的分子在临床和临床前研究中已显示出前景。因此,经由基因疗法的蛋白质替换是治疗开发的引人注目的替代选项。本领域迫切需要弗里德赖希氏共济失调的治疗和预防。

发明内容

[0004] 本发明提供了包含编码人共济蛋白的核酸分子的多核苷酸,所述核酸分子与指导其转录和翻译的控制元件可操作地连接。在本发明的一些实施例中,核酸编码其氨基酸序列与SEQ ID NO:1至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的共济蛋白蛋白质。在本发明的一些实施例中,核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的共济蛋白蛋白质。在一些实施例中,控制元件选自启动子、5'调节元件、3'调节元件及其组合。

[0005] 在一些实施例中,启动子选自CMV启动子、UBC启动子、EF1 α 启动子、PGK1启动子和最小共济蛋白启动子。在一些实施例中,5'调节元件选自GAPDH序列、FTH1-5'UTR、RPL6-5'剪接序列和5U2序列。在一些实施例中,3'调节元件选自SV40早期序列、SV40晚期序列、合成的3'调节元件和人生长激素多腺苷酸化序列。

[0006] 在本发明的一个特定实施例中,核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,并且控制元件包含UBC启动子(例如,SEQ ID NO:3)、5U2序列(例如,SEQ ID NO:4)和人生长激素多腺苷酸化序列(例如,SEQ ID NO:5)。

[0007] 在本发明的另一个特定实施例中,核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋

白质,并且控制元件包含UBC启动子(例如,SEQ ID NO:3)、5U2序列(例如,SEQ ID NO:4)和合成的3'调节元件序列(SEQ ID NO:7)。

[0008] 本发明还提供了包含本发明的多核苷酸的病毒载体。在一些实施例中,病毒载体是腺相关病毒载体。在一个具体实施例中,病毒载体是AAV5。

[0009] 本发明还提供了包含病毒载体的重组病毒粒子,并且其中所述病毒载体包含编码人共济蛋白的核酸分子,所述核酸分子与指导其转录和翻译的控制元件可操作地连接。在一些实施例中,病毒粒子含有腺相关病毒载体。在某些具体实施例中,腺相关病毒载体是AAV5。在一些实施例中,病毒粒子包含编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质的核酸分子。

[0010] 在一些实施例中,控制元件选自启动子、5'调节元件、3'调节元件及其组合。在一些实施例中,启动子选自CMV启动子(例如,SEQ ID NO:13)、UBC启动子(例如,SEQ ID NO:3)和EF1 α 启动子(例如,SEQ ID NO:18)、PGK1启动子(例如,SEQ ID NO:17)和最小共济蛋白启动子。在一些实施例中,5'调节元件选自GAPDH(例如,SEQ ID NO:15)序列、FTH1-5'UTR(例如,SEQ ID NO:14)、RPL6-5'剪接序列(例如,SEQ ID NO:16)和5U2序列(SEQ ID NO:4)。在一些实施例中,3'调节元件选自SV40早期序列(例如,SEQ ID NO:8)、SV40晚期序列(例如,SEQ ID NO:9)、合成的3'调节元件序列(SEQ ID NO:7)和人生长激素多腺苷酸化序列(例如,SEQ ID NO:5)。在某些具体实施例中,核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,所述启动子是UBC启动子(SEQ ID NO:3),并且所述调节元件是5U2序列(SEQ ID NO:4)和人生长激素多腺苷酸化序列(SEQ ID NO:5)。在其它具体实施例中,核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,启动子是UBC启动子(SEQ ID NO:3),并且所述调节元件是5U2序列(SEQ ID NO:4)和合成的3'调节元件序列(SEQ ID NO:7)。

[0011] 本发明还提供了包含以下的组合物:(a)病毒载体,其中所述病毒载体包含编码人共济蛋白的核酸分子,所述核酸分子与指导其转录和翻译的控制元件可操作地连接;以及(b)药学可接受的赋形剂。

[0012] 在一些实施例中,载体是腺相关病毒载体。在某些具体实施例中,腺相关病毒载体是AAV5。

[0013] 在一些实施例中,核酸编码其氨基酸序列与SEQ ID NO:1至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的共济蛋白蛋白质。

[0014] 在一些实施例中,控制元件选自启动子、5'调节元件、3'调节元件及其组合。在一些实施例中,启动子选自CMV启动子(例如,SEQ ID NO:13)、UBC启动子(例如,SEQ ID NO:3)和EF1 α 启动子(例如,SEQ ID NO:18)、PGK1启动子(例如,SEQ ID NO:17)和最小共济蛋白启动子。在一些实施例中,5'调节元件选自GAPDH(例如,SEQ ID NO:15)、FTH1-5'UTR(例如,SEQ ID NO:14)、RPL6-5'剪接序列(例如,SEQ ID NO:16)和5U2序列(SEQ ID NO:4)。在一些实施例中,3'调节元件选自SV40早期序列(例如,SEQ ID NO:8)、SV40晚期序列(例如,SEQ ID NO:9)、合成的3'调节元件序列(SEQ ID NO:7)和人生长激素多腺苷酸化序列(例如,SEQ ID NO:5)。在某些具体实施例中,核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,所述启动子是UBC启动子(SEQ ID NO:3),并且所述调节元件是5U2序列(SEQ ID NO:4)和人生长激素多腺苷酸化序列(SEQ ID NO:5)。在某些其它具体实施例中,核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,所述启动子是UBC启动子(SEQ ID NO:3),并且所述调节元件是

5U2序列 (SEQ ID NO:4) 和合成的3'调节元件序列 (SEQ ID NO:7)。

[0015] 本发明还提供了组合物,其包含(a)重组病毒粒子和(b)药学可接受的赋形剂,其中所述重组病毒粒子包含病毒载体,并且其中所述病毒载体包含编码人共济蛋白蛋白质的核酸分子,其氨基酸序列与SEQ ID NO:1至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同,所述核酸分子与指导其转录和翻译的控制元件可操作地连接。在一些实施例中,病毒粒子含有腺相关病毒载体。在某些具体实施例中,腺相关病毒载体是AAV5。在一些实施例中,病毒粒子包含编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质的核酸分子。

[0016] 在一些实施例中,控制元件选自启动子、5'调节元件、3'调节元件及其组合。在一些实施例中,启动子选自CMV启动子、UBC启动子、EF1 α 启动子、PGK1启动子和最小共济蛋白启动子。在一些实施例中,5'调节元件选自GAPDH(例如,SEQ ID NO:15)、FTH1-5'UTR(例如,SEQ ID NO:14)、RPL6-5'剪接序列(例如,SEQ ID NO:16)和5U2序列(SEQ ID NO:4)。在一些实施例中,3'调节元件选自SV40早期序列(SEQ ID NO:8)、SV40晚期序列(SEQ ID NO:9)、合成3'调节元件序列(SEQ ID NO:7)和人生长激素多腺苷酸化序列(SEQ ID NO:5)。在某些具体实施例中,核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,所述启动子是UBC启动子(SEQ ID NO:3),并且所述调节元件是5U2序列(SEQ ID NO:4)和人生长激素多腺苷酸化序列(SEQ ID NO:5)。在其它具体实施例中,核酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质,启动子是UBC启动子(SEQ ID NO:3),并且所述调节元件是5U2序列(SEQ ID NO:4)和合成的3'调节元件序列(SEQ ID NO:7)。

[0017] 在一些实施例中,药学可接受的赋形剂是1X PBS(例如,0.154M NaCl、0.056M Na₂HPO₄和0.0106M KH₂PO₄)或DPBS(例如,0.337M NaCl、0.027M KCl、0.015M Na₂HPO₄和0.0015M KH₂PO₄)。

[0018] 在一些实施例中,病毒载体以 2.5×10^{11} vg/mL、 7.5×10^{11} vg/mL或 2.5×10^{12} vg/mL的浓度存在。

[0019] 在一些实施例中,组合物的pH为6.5至7.5;7.0至7.5;6.8至7.2。在一些实施例中,组合物的pH为7.0或7.4。

[0020] 组合物还可以包含以至多95%cp/cp,优选50%cp/cp或更低百分比的空衣壳。

[0021] 本发明还提供了治疗弗里德赖希氏共济失调的方法,其包括对受试者的CNS中的至少一个靶位点提供包含病毒载体(例如,优选AAV载体,例如但不限于AAV5载体)的药物制剂,其中所述载体包含编码人共济蛋白蛋白质的多核苷酸和药学可接受的赋形剂,其剂量为至少约 1×10^9 vg、 1×10^{10} vg、 1×10^{11} vg或 1×10^{12} vg或更多。在一些实施例中,剂量为至少约 1×10^{13} vg、 5×10^{13} vg、 1.5×10^{14} vg或 5×10^{14} vg。

[0022] 在一些实施例中,靶位点是CSF空间;蛛网膜下腔(例如,小脑延髓池);脑(例如,脑室空间、小脑、大脑、海马、内皮质、背根神经节或尾状核);或脊柱(例如,腰椎、胸椎、颈椎)。在一些实施例中,活性成分(例如,表达共济蛋白的载体、病毒粒子、病毒、rAAV等)在两次注射中递送:一次在右小脑中且比较一次在左小脑中。在一些实施例中,这些是两次相等的注射。在一些实施例中,活性成分(例如,表达共济蛋白的载体、病毒粒子、病毒、rAAV等)通过注射小脑并且还全身地提供它来施用。

[0023] 在该方法的实施例中,药物制剂可以实质内、鞘内、脑室内、全身或这些的组合施用。在一些实施例中,药物制剂通过以相等份鞘内施用于小脑延髓池和腰椎。

[0024] 在该方法的一些实施例中,剂量是基于脑重量至少 3.7×10^{10} vg/g、 1.11×10^{11} vg/g或 3.7×10^{11} vg/g的量。在一些实施例中,药物制剂包含至少 2×10^{12} vg/mL、 7×10^{12} vg/mL或 2×10^{13} vg/mL的载体浓度。

[0025] 在该方法的一些实施例中,药物制剂作为0.1mL至5mL(例如,3mL或2mL)的单次推注射进行施用。在其它实施例中,药物制剂作为输注以0.001mL/分钟至1mL/分钟(例如,0.01mL/分钟)的速率递送。

[0026] 本发明还提供了在有此需要的受试者中治疗弗里德赖希氏共济失调的方法。在一些实施例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明病毒的药物组合物,其包含在药物载体中表达共济蛋白的病毒粒子。重组病毒粒子在受试者中转导细胞,并且核酸分子通过转导的细胞以足以改善受试者中的弗里德赖希氏共济失调的至少一种症状的水平表达。

[0027] 弗里德赖希氏共济失调的症状可以是选自以下的一种或多种:臂和/或腿中的协调性丧失;疲劳、视力障碍、听力丧失、言语不清、侵袭性脊柱侧凸、糖尿病、肥厚性心肌病和心律失常。

[0028] 在一些实施例中,共济蛋白在线粒体中表达。在一些实施例中,共济蛋白在小脑中表达。在一些实施例中,共济蛋白在海马中表达。在一些实施例中,共济蛋白在前皮质中表达。在一些实施例中,共济蛋白在背根神经节中表达。

[0029] 在本发明方法的一些实施例中,共济蛋白在所述受试者中以大于25%的正常水平的共济蛋白的水平表达。在其他实施例中,共济蛋白在所述受试者中以大于30%的正常水平的共济蛋白的水平表达。在另外其他实施例中,共济蛋白在所述受试者中以大于40%的正常水平的共济蛋白的水平表达。在另外其他实施例中,共济蛋白在所述受试者中以大于50%的正常水平的共济蛋白的水平表达。

[0030] 在某些实施例中,将诱导性调节(以剂量依赖性方式)共济蛋白表达的基因开关掺入多核苷酸内,以表达共济蛋白。基因开关可以是例如RHEOSWITCH THERAPEUTIC SYSTEM® (RTS®)基因开关。

附图说明

[0031] 图1显示了关于在未分化的SY5Y中采用UBC启动子,连同绿色荧光蛋白(GFP)、CMV和模拟对照的所选构建体的第1层结果。小图A显示了每 μ g总蛋白的FXN的pg产率。小图B显示了超过模拟转染细胞的表达水平倍数。关于构建体组成参见表1。

[0032] 图2显示了关于在FA患者成纤维细胞中采用UBC启动子,连同绿色荧光蛋白(GFP)、CMV和模拟对照的所选构建体的第1层结果。小图A显示了每 μ g总蛋白的FXN的pg产率。小图B显示了超过模拟转染细胞的表达水平倍数。关于构建体组成参见表1。

[0033] 图3显示了关于在未分化的SY5Y中采用UBC启动子,连同绿色荧光蛋白(GFP)、CMV和模拟对照的所选构建体的第2层结果。小图A显示了每 μ g总蛋白的FXN的pg产率。小图B显示了超过模拟转染细胞的表达水平倍数。关于构建体组成参见表1。

[0034] 图4显示了关于在FA患者成纤维细胞中采用UBC启动子,连同绿色荧光蛋白(GFP)、CMV和模拟对照的所选构建体的第2层结果。小图A显示了每 μ g总蛋白的FXN的pg产率。小图B显示了超过模拟转染细胞的表达水平倍数。关于构建体组成参见表1。

[0035] 图5显示了关于在未分化的SY5Y中采用UBC启动子,连同绿色荧光蛋白(GFP)、CMV和模拟对照的所选构建体的第3层结果。小图A显示了每 μg 总蛋白的FXN的pg产率。小图B显示了超过模拟转染细胞的表达水平倍数。关于构建体组成参见表1。

[0036] 图6显示了关于在FA患者成纤维细胞中采用UBC启动子,连同绿色荧光蛋白(GFP)、CMV和模拟对照的所选构建体的第3层结果。小图A显示了每 μg 总蛋白的FXN的pg产率。小图B显示了超过模拟转染细胞的表达水平倍数。关于构建体组成参见表1。

[0037] 图7显示了通过用人共济蛋白转染的非洲绿猴成纤维细胞(COS-7)的荧光图像表达且适当地运输到线粒体内的人共济蛋白:(A)用DAPI染色的核,(B)用MitoTracker染色的线粒体,(C)用抗人共济蛋白(Abcam#ab11038)染色的所表达的人共济蛋白,和(D)人共济蛋白与核和线粒体的共定位。

[0038] 图8显示了通过用人共济蛋白转染的鼠成纤维细胞(NC6)的荧光图像表达且适当地运输到线粒体内的人共济蛋白:(A)用DAPI染色的核,(B)用MitoTracker染色的线粒体,(C)用抗人共济蛋白(Abcam#ab11038)染色的所表达的人共济蛋白,和(D)人共济蛋白与核和线粒体的共定位。

[0039] 图9显示了在转导后第5天和第7天(小图A)以及转导后第10天和第14天(小图B)时,以500,000个基因组拷贝/细胞的用AAV5-人共济蛋白(026)转导的FA(3816)第21天神经元的蛋白质印迹。使用标准蛋白质印迹技术,用抗人共济蛋白抗体(Abcam#ab11038)检测人共济蛋白。加载分子量标记以确认成熟共济蛋白蛋白质的大小(14.2kDa)。FA+:转导细胞;FA-:非转导细胞;Ctrl:对照细胞。

[0040] 图10显示了将成纤维细胞重编程以成为多能细胞的策略的卡通图,所述多能细胞可以分化成各种细胞类型,用于建模、治疗测试和移植。

[0041] 图11显示了如通过超过模拟(GFP处理的)细胞的倍数所表达的,来自iPSC衍生的神经元细胞的共济蛋白表达的结果,所述神经元细胞通过关于024和026构建体(参见表1)的共济蛋白表达质粒的电穿孔进行转化。

[0042] 图12显示了如通过超过模拟(GFP处理的)细胞的倍数所表达的,来自iPSC衍生的神经元细胞的共济蛋白表达的结果,所述神经元细胞用关于024和026AAV构建体(参见表1)的共济蛋白表达AAV进行转导。

[0043] 图13显示了实质内施用的AAV5-FXN-026的小鼠小脑中共济蛋白的表达(pg FXN/mg蛋白质)。

[0044] 图14显示了心室内施用AAV5-FXN 026的小鼠小脑(CB)、海马(HPC)和前皮质(ACX)中的共济蛋白表达(pg FXN/mg蛋白质)。

[0045] 图15显示了重组AAV5.hFXN载体图谱。泛素C启动子(UBC启动子)、5'调节元件(5U2)、未修饰的hFXN cDNA(hFXN GOI)、人生长激素多腺苷酸化3'调节元件(hGH-多聚A)和ITR接头。整个序列的侧翼为AAV反向末端重复(ITR)。

[0046] 图16显示了正常人共济蛋白前体推导的氨基酸序列SEQ ID NO:1)。加下划线的序列是共济蛋白蛋白质前体转运至线粒体所必需的肽。必须去除斜体化的肽以活化蛋白质。完全加工的规范共济蛋白蛋白质(以粗体表示)具有130个氨基酸。序列来自UniProt数据库:标识符#:Q16595-1。UniProt联盟包含欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute)(EBI)、瑞士生物信息学研究所(Swiss Institute of

Bioinformatics) (SIB) 和蛋白质信息资源 (Protein Information Resource) (PIR)。

[0047] 图17显示了AAV5.hFXN载体制造过程的示意图。

[0048] 图18显示了pAAV5-hFXN DNA的示意性质粒图谱。

[0049] 图19显示了AAV5-hFXN-载体的核苷酸序列:基因插入物:ITR至ITR-注释的 (SEQ ID NO:19)。

[0050] 图20显示了pAAV5-hFXN质粒的核苷酸序列 (SEQ ID NO:20)。

[0051] 图21显示了表示在Sarsero共济蛋白缺陷小鼠的小脑中rAAV5-hFXN载体诱导的人共济蛋白表达的图表。将rAAV5.hFXN (2 μ L) 以 7×10^9 vg/ μ L的剂量直接注射到FA小鼠的小脑 (IPc, N=7只小鼠) 或脑室内空间 (ICV, N=7) 内。三只FA小鼠在小脑或ICV中用AAV5.GFP (对照, 2 μ L) 以 4×10^9 vg/ μ L的剂量进行注射。在注射后4周, 收获小脑。还收获来自两只未处理的对照小鼠的小脑组织。如上所述分析组织裂解产物的人共济蛋白。显示了关于每种处理的平均表达。

[0052] 图22是显示了使用几个递送位置和装置, 在载体的生物分布后, 来自猪小脑的每 μ g组织的DNA拷贝的图表。

[0053] 图23是显示了使用几个递送位置和装置, 在载体的生物分布后, 来自猪其它组织的每 μ g组织的DNA拷贝的图表。

[0054] 图24:是显示了使用几个递送位置和装置, 在载体的生物分布后, 来自猪脊柱组织的每 μ g组织的DNA拷贝的图表。

[0055] 图25是显示了使用几个递送位置和装置, 在载体的生物分布后, 来自猪全身组织的每 μ g组织的DNA拷贝的图表。

[0056] 图26是显示了单次输注到小脑内之后的rAAV5-FXN-026分布的图表。第28天相对于第60天在雄性Yucatan猪的小脑中的载体基因组拷贝 (vg DNA/ μ g组织DNA)。

[0057] 图27是显示了单次输注到雄性Yucatan猪的小脑内之后的rAAV5-FXN-026分布的图表。第28天相对于第60天在脑中的载体基因组拷贝 (vg DNA/ μ g组织DNA)。

[0058] 图28是显示了单次输注到雄性Yucatan猪的小脑内之后的rAAV5-FXN-026分布的图表。第28天相对于第60天在脊髓和DRG中的载体基因组拷贝 (vg DNA/ μ g组织DNA)。

[0059] 图29是显示了来自雄性Yucatan猪的小脑皮质、齿状核、海马和运动皮质的组织样品中的共济蛋白蛋白质表达的图表。共济蛋白水平经由ELISA。

[0060] 图30是显示了在小脑内施用于食蟹猴后, AAV5人共济蛋白载体AAV5-hFXN (026) 的生物分布的图表。经由ELISA分析来自小脑皮质、齿状核、海马和运动皮质的组织样品的共济蛋白水平。

具体实施方式

[0061] 本发明涉及人共济蛋白在细胞中的表达和在有此需要的患者中的弗里德赖希氏共济失调治疗。

[0062] 对于本文所述的方法, 可以使用的各种方案公开于参考手册中, 例如: Current Protocols in Molecular Biology (编辑Ausubel等人, Wiley, 2004版) 和MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL Sambrook和Russell (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001年, 第三版)。含有免疫试剂的方法, 如蛋白质印迹、ELISA和免疫沉淀如下所述

执行:USING ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL (Harlow和Lane Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999)。这些参考文献各自以其整体并入本文。

[0063] 当在本公开内容中使用术语“一个”、“一”或“一种”时,除非另有说明,否则它们意指“至少一个/种”或“一个或多个/一种或多种”。

[0064] 术语“AAV病毒”应意指完整的病毒颗粒,例如野生型(wt) AAV病毒颗粒。AAV病毒具有包裹线性单链AAV核酸基因组的AAV衣壳蛋白外壳。AAV病毒是不能复制的(即复制缺陷型或辅助依赖型病毒)。AAV病毒任选得自任何腺相关病毒血清型,包括但不限于AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5或AAVX7。AAV病毒可以具有全部或部分缺失的一种或多种AAV野生型基因,优选rep和/或cap基因,但保留功能性侧翼ITR序列。AAV病毒的例子包括但不限于在登录号53222、53223、53224、53225和53226可得自美国典型培养物保藏中心(“ATCC”)的AAV病毒。关于AAV病毒及其用途的描述参见例如,Haj-Ahmad和Graham(1986) J.Virol.57:267-274;Bett等人(1993) J.Virol.67:5911-5921;Mittereder等人(1994) Human Gene Therapy 5:717-729;Seth等人(1994) J.Virol.68:933-940;Barr等人(1994) Gene Therapy 1:51-58;Berkner,K.L.(1988) BioTechniques 6:616-629;以及Rich等人(1993) Human Gene Therapy 4:461-476。

[0065] 如本文使用的,“病毒粒子”是包含病毒核酸主链的多核苷酸,其具有待表达的目的基因(例如,共济蛋白)和控制目的基因表达的至少一种调节元件。

[0066] 术语“重组AAV”、“rAAV”、“重组AAV载体”或“rAAV载体”应意指由AAV蛋白壳(即衣壳)组成的感染性但复制缺陷型病毒,所述AAV蛋白壳包封具有不同于野生型AAV DNA的基因插入物的病毒载体。

[0067] 术语“反向末端重复”或“ITR”应意指在病毒遗传物质的任一末端处的对称核酸序列。不受理论束缚,文献报道显示ITR帮助AAV基因组的有效增殖。文献还报道了ITR形成发夹的能力,其促成允许第二核酸链的引物酶不依赖性合成的自引发。ITR还显示帮助AAV DNA整合到宿主细胞基因组内。ITR无需是野生型核苷酸序列,并且可以例如通过核苷酸的插入、缺失或取代来改变,只要该序列提供功能性援救、复制和包装。AAV ITR区的任选核苷酸序列是已知的。参见例如,Kotin,R.M.(1994) “Human Gene Therapy”5:793-801;Berns,K.I.“Parvoviridae and their Replication”in Fundamental Virology,第2版(B.N.Fields和D.M.Knipe,编辑)

[0068] 术语“基因插入物”应意指核酸分子,包括编码多肽的部分。

[0069] 术语“基因疗法”应意指受试者的治疗,其包括向受试者引入一种或多种缺陷或缺失基因的正常拷贝。

[0070] 术语“FXN基因疗法”或“共济蛋白基因疗法”应意指受试者的治疗,其包括将FXN基因的正常拷贝引入受试者,所述受试者具有缺陷FXN基因,缺少FXN基因,具有FXN基因的不足表达,或产生不足数量的共济蛋白。

[0071] 术语“受试者”、“个体”或“患者”应可互换使用,并且应意指哺乳动物,优选需要治疗的人受试者可以是任何年龄。受试者可以是成人。受试者可以是年龄约18岁至约60岁的成人。受试者可以是儿童。受试者可以是年龄约17岁或更小的未成年儿童。受试者可以是年龄约10岁或更小的未成年儿童。受试者可以是年龄约3岁或更小的未成年儿童。

[0072] 术语“衣壳”应意指病毒的蛋白质外壳或壳。衣壳任选地包括包含蛋白质的一个或

多个寡聚结构亚单位,任选地称为原聚体。衣壳可以任选地被脂质双层和糖蛋白包膜包围。在一个实施例中,衣壳是腺相关病毒(AAV)衣壳。在一个实施例中,衣壳是重组腺相关病毒(rAAV)血清型-5衣壳。

[0073] 术语“空衣壳”应意指不含载体基因组的病毒蛋白外壳。空衣壳可以是病毒样颗粒,因为它与一种或多种抗体反应,所述抗体与完整(例如携带载体基因组)病毒(例如腺相关病毒,AAV)反应。在非限制性例子中,空AAV5衣壳保留与一种或多种抗体反应的能力,所述抗体结合AAV,例如AAV5或另一种AAV血清型。例如,空的AAV2衣壳保留与结合AAV8的一种或多种抗体反应的能力。

[0074] 空衣壳有时可以在AAV载体制剂中天然发现。此类制剂可以根据本发明使用。任选地,可以操纵此类制剂以增加或减少空衣壳的数目。例如,可以将空衣壳的量调节至预期减少抗体抑制效应的量。空衣壳也可以不依赖于载体制剂而产生,并且任选地(i)加入载体制剂中,或(ii)分别施用于受试者。参见F.Mingozzi等人,美国专利申请公开号2014/0336245“Virus vectors for highly efficient transgene delivery”。

[0075] 术语“经修饰的衣壳”应意指经内容物修饰的衣壳,或经修饰使得衣壳不能进入细胞的衣壳。

[0076] 术语“经内容物修饰的衣壳”应意指携带经修饰的基因插入物的衣壳。经修饰的基因插入物的例子包括但不限于非编码核酸。

[0077] 术语“突变型空衣壳”应意指包含破坏病毒受体结合的突变的空衣壳。在一个实施例中,突变型空衣壳是非感染性突变型衣壳。在另一个实施例中,空衣壳可以吸收抗体但不能进入靶细胞。在另一个实施例中,空衣壳可以吸收中和抗体。参见J.Aalbers等人,“Empty Capsids and Macrophage Inhibition/Depletion Increase rAAV Transgene Expression in Joints of Both Healthy and Arthritic Mice,”Human Gene Therapy, 2017Feb;28(2):168-1781;以及Ayuso E等人“High AAV vector purity results in serotype-and tissue independent enhancement of transduction efficiency.”Gene Ther 2010;17:503-510。

[0078] 术语“FXN基因插入物”应意指包含编码FXN的核酸序列的基因插入物。在一个实施例中,基因插入物包含编码人FXN(hFXN)的核酸序列。在一个实施例中,编码hFXN的核酸序列是未经修饰的FXN cDNA。在一个特定的实施例中,编码hFXN的核酸序列是对应于参考序列:NM_000144.4中描述的正常人共济蛋白mRNA序列的cDNA。(参见JJ Carvajal等人,“The Friedreich’s ataxia gene encodes a novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase”Nat.Genet.14(2),157-162(1996)。)

[0079] 术语“载体基因组”或“vg”应广义地理解为涵盖含有基因插入物的载体或病毒粒子。为方便起见,“载体基因组”应包括但不限于含有基因插入物的载体或包封在衣壳内的病毒粒子例如AAV病毒和rAAV载体和基因插入物,其未被衣壳包封。为方便起见,未被衣壳包封的含有基因插入物的载体或病毒粒子包括含有分离的基因插入物的载体或病毒粒子。参见美国专利号9,598,703“Capsid-free AAV vectors,compositions,and methods for vector production and gene delivery”。

[0080] 出于定量目的,“vg”计算为含有基因插入物的载体或病毒粒子的计数。在一个例子中,单个“载体基因组”或单个“vg”是携带含有基因插入物的载体或病毒粒子的单个基因

插入物或单个衣壳。在另一个例子中,一个AAV5.hFXN载体颗粒应意指“1vg”,而约 5×10^{14} vg应意指约 5×10^{14} 个AAV5.hFXN载体。

[0081] 术语“衣壳颗粒”或“cp”应广义地理解为涵盖任何衣壳。为方便起见,衣壳可以是完全的(例如,包封基因插入物)或空的。衣壳颗粒包括但不限于携带载体基因组的衣壳(例如,AAV病毒和rAAV载体)、空衣壳、经修饰的衣壳、经内容物修饰的衣壳和突变型空衣壳。

[0082] 出于定量目的,“cp”计算为携带载体基因组(例如,AAV病毒和rAAV载体、病毒粒子)、空衣壳、经修饰的衣壳、经内容物修饰的衣壳和突变型空衣壳的组合衣壳的总数的计数。在一个例子中,“1cp”壳应意指一个空衣壳,而约 1.76×10^{12} cp壳应意指约 1.76×10^{12} 个空衣壳。在另一个例子中,包含50%cp/cp空衣壳的药物制剂包含每100个总衣壳颗粒(完全和空的)50个空衣壳颗粒。在另一个例子中,包含10%空衣壳的药物制剂可以包含总共约 5.5×10^{14} cp个衣壳颗粒,其中生色团药物制剂包含约 5×10^{14} vg个AAV5.hFXN载体和约 5×10^{13} cp个空衣壳。

[0083] 术语“转导”应意指通过使用病毒颗粒将基因转运至细胞。

[0084] 术语“有效量”或“治疗有效量”是足以实现治疗有益或治疗上所需结果的量。治疗有效量可以以一次或多次施用、应用或剂量施用。

[0085] 术语“靶点”或“靶位点”应意指在其中施用药物制剂的受试者的中枢神经系统(CNS)中的位置。在一个方面,靶位点是脑脊髓液(CSF)空间。在一个实施例中,靶位点是蛛网膜下腔。在另一个实施例中,靶位点是脑室空间。在一个实施例中,靶位点是脑。在另一个实施例中,靶位点是脊柱。在另一个实施例中,靶位点是马尾。靶位点可以任选地是大脑、小脑、海马、内皮质、背根神经节、齿状核、尾状核或小脑延髓池。靶位点可以任选地是骶骨、腰椎、胸椎或颈椎。药物制剂可以施用于一个或多个靶位点。

[0086] 术语“质粒构建体”应意指与至少一种其它质粒组合使用的环状核酸分子,以在体外转染细胞系以产生衣壳颗粒。在一个实施例中,质粒构建体包含:编码hFXN的核酸序列(例如,人FXN cDNA);人泛素C(UBC)启动子;5U2,其为源自犬肌质/内质网钙ATP酶基因的第二个内含子和牛酪蛋白基因的5'非翻译区的合成的5'调节元件(美国专利号8,835,621);人生长激素多聚A(hGH-多聚A);侧面为AAV2基因元件的两个AAV2反向末端重复(ITR);以及抗生素抗性基因。

[0087] 如本文使用的,“核酸”、“核酸分子”、“核酸序列”、“寡核苷酸”、“寡核苷酸序列”、“核苷酸序列”、“多核苷酸”和“多核苷酸序列”可互换使用,并且指磷酸酯聚合物形式的核糖核苷(腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷;“RNA分子”)或脱氧核糖核苷(脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷或脱氧胞苷;“DNA分子”),或其任何磷酸酯类似物,如硫代磷酸酯和硫酯,以单链形式或双链螺旋。双链DNA-DNA、DNA-RNA和RNA-RNA螺旋是可能的。术语核酸分子,且特别是DNA或RNA分子,仅指分子的一级结构和二级结构,并不限于任何特定的三级形式。因此,该术语包括尤其是在线性或环状DNA分子(例如限制性片段)、质粒、超螺旋DNA和染色体中发现的双链DNA。在讨论特定双链DNA分子的结构时,在本文中可以根据仅沿着DNA的非转录链(即,具有与mRNA同源的序列的链)以5'至3'方向给出序列的常规惯例来描述序列。

[0088] 如本文使用的,“重组DNA分子”是已经历分子生物学操作的DNA分子。DNA包括但不限于cDNA、基因组DNA、质粒DNA、合成DNA和半合成DNA。

[0089] 如本文使用的,与多核苷酸序列结合使用的术语“片段”(例如“多核苷酸片段”)指

相对于参考核酸长度减少的核苷酸序列,并且在共同部分上包含与参考核酸相同的核苷酸序列。适当时,根据本发明的此类核酸片段可以包括在其为组成成分的较大多核苷酸中。此类片段包含多核苷酸或可替代地由多核苷酸组成,所述多核苷酸在长度中范围为根据本发明的核酸的至少6、8、9、10、12、15、18、20、21、22、23、24、25、30、39、40、42、45、48、50、51、54、57、60、63、66、70、75、78、80、90、100、105、120、135、150、200、300、500、720、900、1000或1500个连续核苷酸。

[0090] 如本文使用的,术语“嵌合的”意指由在其天然状态下不连续的片段组成。例如,嵌合多核苷酸意指包含在其天然状态下不连续的片段的多核苷酸。

[0091] 如本文使用的,与多核苷酸序列结合使用的术语“合成的”是与野生型多核苷酸序列不同的非天然多核苷酸(或多核苷酸的一部分)。例如,合成基因(或基因的一部分)可以含有本质上不连续的一个或多个核酸序列(嵌合序列),和/或可以涵盖取代、插入和缺失及其组合。

[0092] 如本文使用的,“基因”指包含核苷酸的多核苷酸,其编码功能分子(例如多肽或RNA),并且包括cDNA或基因组DNA核酸。通常理解的是,编码多肽或RNA的基因组DNA包括从成熟mRNA剪接的非编码区(即内含子),并且因此不存在于编码相同多肽或RNA的cDNA中。“基因”可以包含表达特定RNA、蛋白质或多肽的核酸片段。“基因”还可以包含在编码序列之前(5'非编码序列)和之后(3'非编码序列)的调节序列。“基因”还可以包含形成三链体的寡核苷酸(TFO)。“天然基因”指如在自然界中与其自身调节序列一起发现的基因。“嵌合基因”或“重组基因”指并非天然基因的任何基因,包括在自然界中未一起发现的调节和/或编码序列。相应地,嵌合基因可以包含源自不同来源的调节序列和编码序列,或源自相同来源但以不同于自然界中发现的方式排列的调节序列和编码序列。嵌合基因可以包含源自不同来源的编码序列和/或源自不同来源的调节序列。“内源基因”指在生物基因组中的其天然位置中的天然基因。

[0093] “外来”基因或“外源”基因或“异源”基因或“转基因”指通常在宿主细胞或生物中未发现,但通过基因转移引入宿主细胞或生物内的基因。转基因可以包含插入非天然生物内的天然基因,或者嵌合或合成基因。转基因也可以是内源基因的cDNA形式。转基因基因也可以是内源突变基因的未突变形式或内源未突变基因的突变形式。转基因基因也可以是治疗基因或实验基因,例如报道基因。转基因可以直接引入宿主生物的靶细胞内,或通过转化细胞例如自体细胞的转移间接引入宿主生物内。

[0094] 如本文使用的,基因的“5'非翻译区”或“5'UTR”应理解为基因的部分,其转录成初级RNA转录物(前mRNA)并且所述部分位于编码序列的上游。初级转录物是初始RNA产物,含有内含子和外显子,通过DNA的转录产生。许多初级转录物必须经历RNA加工,以形成生理活性RNA种类。加工为成熟mRNA可以包括修剪末端,去除内含子,加帽和/或从其前体RNA中切割出各个rRNA分子。mRNA的5'UTR因此是mRNA的部分,其不翻译成蛋白质并且位于编码序列的上游。在基因组序列中,5'UTR通常定义为转录起始位点和起始密码子之间的区域。脊椎动物mRNA的5'非翻译区(5'UTR)可以是长度几十个碱基至几百个碱基(Crowe等人,2006BMC Genomics 7:16)。“合成的5'UTR”是不同于野生型5'UTR多核苷酸序列的非天然5'UTR。合成的5'UTR可以含有本质上不连续的一个或多个核酸序列(嵌合序列),和/或可以涵盖取代、插入和缺失及其组合。

[0095] 如本文使用的,“剪接点”、“内含子-外显子剪接点”或“剪接位点”是由细胞剪接仪器识别的真核前mRNA中的内含子边界处的区域,在其中两个相邻的外显子被连接且内含子被删除。剪接位点由5'和3'内含子/外显子边界处的保守序列表示。对于绝大多数内含子,最保守的序列是位于内含子5'末端侧翼的GU和位于3'末端侧翼的AG。然而,这些共有序列的例外也是已知的,例如具有AU-AC剪接位点的内含子。在内含子-外显子边界处的5'剪接位点称为“剪接供体”位点。在内含子-外显子边界处的3'剪接位点称为“剪接受体”位点。“剪接体”是大的核糖核蛋白复合物,其充当细胞的剪接仪器。剪接体由组装在前mRNA底物上的小核核糖核蛋白(snRNP)亚基组成。snRNP本身由小核RNA(snRNA)和几种蛋白质亚基组成。在剪接反应期间,通过与snRNA的碱基配对执行前mRNA内剪接位点的识别。

[0096] 如本文使用的,“异源”DNA指并非天然位于细胞中或细胞的染色体位点中的DNA。因此,异源DNA包括对于细胞外来的基因。“异源”DNA还可以包括天然存在于细胞中但位于非天然位置中的基因。此外,“异源”DNA分子可以是含有非宿主DNA区段的DNA分子,其可操作地连接宿主DNA区段,例如转录启动子。相反,异源DNA分子可以包含与外源启动子可操作地连接的内源基因。此外,“异源”可以指DNA分子或片段,其源自与参考DNA分子或片段不共享共同进化起源的基因。

[0097] 如本文使用的,术语“基因组”包括染色体以及线粒体、叶绿体和病毒DNA或RNA。

[0098] 如本文使用的,术语“探针”指单链核酸分子,其可以与互补的单链靶核酸碱基配对以形成双链分子。

[0099] 如本文使用的,DNA“编码序列”指双链DNA序列,其编码多肽,并且当置于适当的调节序列的控制下之时,可以在体外或体内细胞中或细胞外例如在管中转录且翻译成的多肽。“合适的调节序列”指位于编码序列的上游(5'非编码序列)、内部或下游(3'非编码序列)的核苷酸序列,并且其影响转录、RNA加工或稳定性,或者相关编码序列的翻译。调节序列可以包括启动子、翻译前导序列、内含子、多腺苷酸化识别序列、RNA加工位点、效应子结合位点和茎-环结构。编码序列的边界由在5'(氨基)末端处的起始密码子和在3'(羧基)末端处的翻译终止密码子决定。编码序列可以包括但不限于原核、真核或嵌合序列,来自mRNA的cDNA,基因组DNA序列且甚至合成的DNA序列。

[0100] 如本文使用的,“开放读码框”缩写为ORF,并且指核酸序列DNA、cDNA或RNA的长度,其包含翻译起始信号或起始密码子例如ATG或AUG以及终止密码子,并且可以潜在地翻译成多肽序列。

[0101] 如本文使用的,术语“下游”指位于参考核苷酸序列3'的核苷酸序列。特别地,下游核苷酸序列一般涉及在转录起始点之后的序列。例如,基因的翻译起始密码子位于转录起始位点的下游。术语“上游”指位于参考核苷酸序列5'的核苷酸序列。特别地,上游核苷酸序列一般涉及位于编码序列或转录起始点的5'侧上的序列。例如,大多数启动子位于转录起始位点的上游。

[0102] 如本文使用的,与DNA序列有关的术语“化学合成的”意指组分核苷酸在体外组装。DNA的手工化学合成可以使用充分确定的程序完成,或者可以使用许多商购可得机器之一执行自动化学合成。相应地,可以基于核苷酸序列的优化来定制基因用于最佳基因表达,以反映宿主细胞的密码子偏好。技术人员应了解如果密码子使用偏向于宿主喜欢的那些密码子的成功基因表达的可能性。优选密码子的确定可以基于源自其中序列信息可获得的宿主

细胞的基因的调查。

[0103] 如本文使用的,术语“限制性内切核酸酶”和“限制酶”可互换使用,并且指在双链DNA内的特定核苷酸序列内结合且切割的酶。

[0104] 如本文使用的,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,并且指由共价连接的氨基酸残基组成的聚合化合物。

[0105] 如本文使用的,“聚合酶链反应”缩写为PCR,并且指用于酶促扩增特定核酸序列的体外方法。PCR涉及重复系列的温度循环,其中每个循环包括三个阶段:模板核酸的变性以分离靶分子的链,使单链PCR寡核苷酸引物退火为模板核酸,以及退火的引物通过DNA聚合酶的延伸。

[0106] 如本文使用的,术语“同源性”指两个多核苷酸或两个多肽部分之间的同一性百分比。序列从一个部分到另一个部分之间的对应可以通过本领域已知的技术确定。例如,可以通过比对序列信息且使用可容易获得的计算机程序,直接比较两个多肽分子之间的序列信息来确定同源性。可替代地,可以通过在同源区域之间形成稳定双链体的条件下的多核苷酸杂交,随后为用单链特异性核酸酶的消化和消化片段的大小确定来确定同源性。如本文使用的,以其所有语法形式和拼写变化的术语“同源的”指具有“共同进化起源”的蛋白质之间的关系,所述蛋白质包括来自超家族的蛋白质(例如,免疫球蛋白超家族)和来自不同物种的同源蛋白质(例如,肌球蛋白轻链等)(Reeck等人,(1987) Cell 50:667)。此类蛋白质(及其编码基因)具有序列同源性,如通过其高度的序列相似性所反映的。然而,在通常的用法和本专利申请中,当用副词如“高度”修饰时,术语“同源的”可以指序列相似性而不是共同的进化起源。

[0107] 相应地,以其所有语法形式的术语“序列相似性”指蛋白质的核酸或氨基酸序列之间的同一性或对应程度,所述蛋白质可以共享或不共享共同的进化起源(参见Reeck等人,(1987) Cell 50:667)。在一个实施例中,当至少约21%(优选至少约50%、最优选至少约75%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)的核苷酸在DNA序列的确定长度上匹配时,两个DNA序列是“基本上同源的”或“基本上相似的”。可以通过使用序列数据库中可获得的标准软件比较序列,或者在例如如对于该特定系统限定的严格条件下的DNA杂交实验中鉴定基本上同源的序列。确定适当的杂交条件在本领域的技术范围内(参见例如Sambrook等人,1989,下文)。

[0108] 如本文使用的,“基本上相似的”指核酸片段,其中一个或多个核苷酸碱基中的变化导致一个或多个氨基酸的取代,但不影响由DNA序列编码的蛋白质的功能特性。“基本上相似的”也指核酸片段,其中一个或多个核苷酸碱基中的变化不影响核酸片段通过反义或共抑制技术介导基因表达改变的能力。“基本上相似的”也指本发明的核酸片段的修饰,例如一个或多个核苷酸碱基的缺失或插入,其基本上不影响所得到的转录物的功能特性。因此,应理解,本发明涵盖超出特定的示例性序列。所提出的修饰各自完全在本领域的常规技术范围内,如编码产物的生物活性的保留确定一样。

[0109] 此外,技术人员认识到由本发明所涵盖的基本上相似的序列也由它们在严格条件下杂交的能力来限定。当核酸分子的单链形式在温度和溶液离子强度的适当条件下对另一核酸分子退火时,该核酸分子可与另一种核酸分子例如cDNA、基因组DNA或RNA“杂交”(参见Sambrook等人,1989,下文)。杂交和洗涤条件是众所周知的,并且在Sambrook, J., Fritsch,

E.F.和Maniatis,T.MOLECULAR CLONING.A LABORATORY MANUAL,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor(1989),特别是其中的第11章和表11.1中举例说明。温度和离子强度的条件确定杂交的“严格性”。

[0110] 可以调节严格条件以筛选中度相似的片段,例如来自遥远相关生物的同源序列至高度相似的片段,例如复制来自密切相关生物的功能性酶的基因。对于同源核酸的初步筛选,可以使用对应于55℃的 T_m 的低严格性杂交条件,例如5XSSC、0.1%SDS、0.25%乳和无甲酰胺;或30%甲酰胺、5XSSC、0.5%SDS。中等严格性杂交条件对应于较高的 T_m ,例如40%甲酰胺,伴随5X或6XSSC。高严格性杂交条件对应于最高等价 T_m ,例如50%甲酰胺、5X或6XSSC。

[0111] 杂交需要两个核酸含有互补序列,尽管取决于杂交的严格性,碱基之间的错配是可能的。术语“互补的”用于描述能够彼此杂交的核苷酸碱基之间的关系。例如,就DNA而言,腺苷与胸腺嘧啶互补,且胞嘧啶与鸟嘌呤互补。相应地,本发明还包括与如本文公开或使用的完整序列互补的分离的核酸片段以及那些基本上相似的核酸序列。

[0112] 在一个实施例中,通过采用杂交条件检测多核苷酸,所述杂交条件包括在55℃的 T_m 下的杂交步骤,并且利用如上所述的条件。在另一个实施例中, T_m 为60℃;在某些实施例中, T_m 为63℃或65℃。

[0113] 杂交后洗涤也确定严格性条件。一组优选条件使用一系列洗涤,从在室温下15分钟(min)的6XSSC、0.5%SDS开始,然后用在45℃下30分钟的2XSSC、0.5%SDS重复,然后用在50℃下30分钟的0.2XSSC、0.5%SDS重复两次。严格条件的另一个例子使用较高温度,其中洗涤与上述那些相同,除了在0.2XSSC、0.5%SDS中的最后两次30分钟洗涤的温度增加至60℃之外。高严格条件的另外一个例子使用在0.1XSSC、0.1%SDS中在65℃下的两次最终洗涤。杂交需要两个核酸包含互补序列,尽管取决于杂交的严格性,碱基之间的错配是可能的。

[0114] 用于使核酸杂交的适当严格性取决于核酸的长度和互补程度,本领域众所周知的变量。两个核苷酸序列之间的相似性或同源性程度越大,具有那些序列的核酸杂交物的 T_m 值越大。核酸杂交的相对稳定性(对应于较高的 T_m)按以下次序降低:RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。对于长度大于100个核苷酸的杂交物,已推导出用于计算 T_m 的方程(参见Sambrook等人,同上,9.50-0.51)。对于与较短核酸即寡核苷酸的杂交,错配的位置变得更重要,并且寡核苷酸的长度确定其特异性(参见Sambrook等人,同上,11.7-11.8)。

[0115] 在一个实施例中,通过采用杂交条件检测多核苷酸,所述杂交条件包括在小于500mM盐中以及在至少37℃下的杂交步骤,以及在2XSSPE中在至少63℃的温度下的洗涤步骤。在另一个实施例中,杂交条件包括对于杂交步骤小于200mM的盐和至少37℃。在某些实施例中,杂交条件包括对于杂交和洗涤步骤两者2XSSPE和63℃。

[0116] 可杂交核酸的长度是例如至少约10个核苷酸。可杂交核酸的最小长度可以是至少约15个核苷酸;至少约20个核苷酸;或至少30个核苷酸。此外,技术人员将认识到,可以根据因素如探针的长度在需要时调节温度和洗涤溶液盐浓度。

[0117] 本发明的基本上相似的核酸片段是其DNA序列与本文报道的核酸片段的DNA序列至少70%相同的那些核酸片段。本发明的核酸片段包括其DNA序列与本文报道的核酸片段的DNA序列至少80%、90%、95%、96%、97%、98%和99%相同的那些核酸片段。

[0118] 如本文使用的,术语“对应于”在本文中用于指相似或同源序列,无论精确位置是否与测量相似性或同源性的分子相同或不同。核酸或氨基酸序列比对可以包括空缺。因此,术语“对应于”指序列相似性,而不是氨基酸残基或核苷酸碱基的编号。

[0119] 如本文使用的,氨基酸或核苷酸序列的“基本部分”包含足够的多肽的氨基酸序列或基因的核苷酸序列,以通过经由本领域技术人员人工评估序列、或通过使用算法如BLAST (Basic Local Alignment Search Tool;Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410 (1993); BLAST可在万维网上公开获得)的计算机自动序列比较和鉴定来推定鉴定该多肽或基因。一般而言,需要十个或更多个连续氨基酸或者三十个或更多个核苷酸的序列,以便推定鉴定与已知蛋白质或基因同源的多肽或核酸序列。此外,关于核苷酸序列,包含20至30个连续核苷酸的基因特异性寡核苷酸探针可以用于基因鉴定(例如,DNA杂交)和分离(例如,细菌菌落或细菌噬菌体噬菌斑的原位杂交)的序列依赖性方法中。另外,12至15个碱基的短寡核苷酸可以用作PCR中的扩增引物,以获得包含引物的特定核酸片段。相应地,核苷酸序列的“基本部分”包含足够的序列,以特异性地鉴定和/或分离包含该序列的核酸片段。

[0120] 如本文使用的,如本领域已知的,术语“相似性百分比”是两个或更多个多肽序列或者两个或更多个多核苷酸序列之间的关系,如通过比较序列所确定的。在本领域中,“同一性”还意指多肽或多核苷酸序列之间的序列相关程度,视情况而定,如通过此类序列的串之间的匹配所确定的。“同一性”和“相似性”可以通过已知方法容易地计算,所述方法包括但不限于以下中所述的那些:Computational Molecular Biology (Lesk,A.M.,编辑) Oxford University Press,New York (1988);BIOCOMPUTING:INFORMATICS AND GENOME PROJECTS (Smith,D.W.,编辑) Academic Press,New York (1993);COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA,PART I (Griffin,A.M.和Griffin,H.G.,编辑) Humana Press,New Jersey (1994);SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY (von Heinje,G.,编辑) Academic Press (1987);以及SEQUENCE ANALYSIS PRIMER (Gribskov,M.和Devereux,J.,编辑) Stockton Press,New York (1991)。设计确定同一性的方法,以给出测试序列之间的最佳匹配。确定同一性和相似性的方法在可公开获得的计算机程序中汇编。可以使用LASERGENE生物信息学计算套件(DNASTAR Inc., Madison,WI)的Megalign程序执行序列比对和同一性百分比计算。可以使用Clustal比对方法(Higgins等人,CABIOS.5:151-153 (1989))与缺省参数(GAP PENALTY=10,GAP LENGTH PENALTY=10)执行序列的多重比对。可以选择使用Clustal方法用于配对比对的缺省参数:KTUPLE 1,GAP PENALTY=3,WINDOW=5和DIAGONALS SAVED=5。

[0121] 如本文使用的,术语“序列分析软件”指可用于分析核苷酸或氨基酸序列的任何计算机算法或软件程序。“序列分析软件”可以是商业可得的或独立开发的。通常的序列分析软件包括但不限于GCG程序套件(Wisconsin Package版本9.0,Genetics Computer Group (GCG),Madison,WI)、BLASTP、BLASTN、BLASTX (Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410 (1990)) 和DNASTAR (DNASTAR,Inc.1228S.Park St.,Madison,WI 53715USA)。在本专利申请的上下文中,应理解,在序列分析软件用于分析的情况下,除非另有说明,否则分析结果将基于所参考程序的“缺省值”。如本文使用的,“缺省值”意指在首次初始化时最初用软件下载的值或参数的任何集合。

[0122] 如本文使用的,术语“表达”或“基因表达”指通过基因的“转录”(即,经由RNA聚合酶的酶促作用),将基因中编码的遗传信息转换成RNA(例如,mRNA、rRNA、tRNA或snRNA)的过

程,并且对于蛋白质编码基因,通过mRNA的“翻译”转化成蛋白质的过程。基因表达可以在该过程的许多阶段进行调节。“上调”或“活化”指增加基因表达产物(即,RNA或蛋白质)生产的调节,而“下调”或“抑制”指降低生产的调节。涉及上调或下调的因子(例如转录因子)通常分别称为“激活因子”和“抑制因子”。出于本发明的目的,靶基因可以通过与下调RNA分子的特异性相互作用而“转录后”(即在RNA转录物的水平下)下调。

[0123] 如本文使用的,术语“转录和翻译控制序列”指DNA调节序列,例如启动子、增强子、终止子等等,其提供编码序列在宿主细胞中的表达。

[0124] 关于基因开关,术语“基于蜕皮激素受体的”指这样的基因开关,其至少包含天然存在的或合成的蜕皮激素受体配体结合结构域的功能部分,并且响应与蜕皮激素受体配体结合结构域结合的配体调节基因表达。蜕皮激素响应系统的例子描述于美国专利号7,091,038和6,258,603中。在一个实施例中,该系统是RHEOSWITCH THERAPEUTIC SYSTEM® (RTS®),其含有在组成型启动子下表达的两种融合蛋白,与Gal4 DNA结合结构域融合的诱变处理的蜕皮激素受体(EcR)的DEF结构域以及与VP16转录激活结构域融合的嵌合RXR的EF结构域。

[0125] 如本文使用的,术语“可操作地连接”指核酸序列在单个核酸片段上的结合,使得一者的功能受另一者的影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达(即,编码序列在启动子的转录控制下)时,它与该编码序列可操作地连接。编码序列可以在有义或反义方向上与调节序列可操作地连接。

[0126] 如本文使用的,“载体”指用于将核酸克隆和/或转移到宿主细胞内的任何媒介物。载体可以是另一个DNA片段可以与之附着,以便达到附着片段的复制的复制子。“复制子”指任何遗传元件(例如,质粒、噬菌体、粘粒、染色体、病毒),其在体内作为DNA复制的自主单元起作用,即能够在其自身控制下复制。术语“载体”包括用于在体外、离体或体内将核酸引入宿主细胞内的病毒和非病毒媒介物两者。术语“载体”还可以包括小环DNA。例如,载体可以是不含细菌DNA序列的质粒。富含CpG区域的细菌DNA序列的去除已显示降低转基因表达沉默,并且导致来自质粒DNA载体的更持久表达(参见例如Ehrhardt,A.等人(2003) Hum. Gene Ther. 10:215-25; Yet,N.S. (2002) Mol. Ther. 5:731-38; Chen,Z.Y.等人(2004) Gene Ther. 11:856-64)。术语“载体”还可以包括转座子例如Sleeping Beauty(Izsvak等人(2000) J. Mol. Biol. 302:93-102)或人工染色体。

[0127] 本领域已知的大量载体可以用于操纵核酸,将应答元件和启动子掺入基因等内,或将核酸转移到宿主细胞内。可能的载体包括例如质粒或经修饰的病毒,包括例如细菌噬菌体如 λ 衍生物,或者质粒例如pBR322或pUC质粒衍生物,或Bluescript载体。较大的载体例如人工染色体(细菌(BAC)、酵母(YAC)或人(HAC))可以用于容纳较大的插入物。例如,通过将适当的DNA片段连接到具有互补粘性末端的选择载体内,可以将对应于应答元件或启动子的DNA片段插入合适的载体内。可替代地,可以通过酶促修饰DNA分子的末端,或者可以通过将核苷酸序列(接头)连接到DNA末端内产生任何位点。可以将此类载体改造为含有可选择标记物基因,其提供用载体转染或转化的细胞的选择。包含根据本发明的多核苷酸的重组载体可以包括其中寻找其扩增或其表达的用于在细胞宿主中复制的一个或多个起点、标记物或可选择标记物。

[0128] 如本文使用的,术语“可选择标记物”指鉴定因子,通常为抗生素或化学抗性基因,

其能够基于标记物基因的效应,即对抗生素的抗性、对除草剂的抗性、比色标记物、酶、荧光标记物等等加以选择,其中所述效应用于追踪目的核酸的遗传和/或鉴定或选择已遗传目的核酸的细胞或生物。本领域已知且使用的可选择标记物基因的例子包括:提供对氨苄青霉素、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、潮霉素、双丙氨膦除草剂、磺酰胺等等的抗性的基因;以及用作表型标记物的基因,即花色素苷调节基因、异戊基转移酶基因等等。

[0129] 如本文使用的,术语“报道基因”指编码能够基于报道基因的效应进行鉴定的鉴定因子的核酸,其中所述效应用于追踪目标核酸的遗传,以鉴定已遗传目的核酸的细胞或生物,和/或测量基因表达诱导或转录。本领域已知且使用的报道基因的例子包括:荧光素酶(Luc)、荧光蛋白如绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、 β -葡萄糖醛酸酶(Gus)等等。可选择标记物基因也可以被视为报道基因。

[0130] 如本文使用的,术语“质粒”指经常携带并非细胞中心代谢的部分的基因的染色体外元件,并且通常为环状双链DNA分子的形式。此类元件可以是源自任何来源的自主复制序列,基因组整合序列,噬菌体或核苷酸序列,线性、环状或超螺旋的单链或双链DNA或RNA,其中许多核苷酸序列已连接或重组成独特的构建体,其能够将用于选择的基因产物的启动子片段和DNA序列连同适当的3'非翻译序列引入细胞内。

[0131] 如本文使用的,“克隆载体”指“复制子”,其是核酸例如DNA的单位长度,其序贯复制并且包含复制起点,例如质粒、噬菌体或粘粒,另一个核酸区段可以与之附着,以便达到附着区段的复制。克隆载体可能能够在一种细胞类型中复制且在另一种中表达(“穿梭载体”)。术语“表达载体”指设计为在转化到宿主细胞之后能够表达插入的核酸序列的载体、质粒或媒介物。克隆的基因,即插入的核酸序列,通常置于控制元件的控制下,所述控制元件例如启动子、最小启动子、增强子等等。可用于驱动核酸在宿主细胞中的表达的初始控制区或启动子是众多的和本领域技术人员熟悉的。

[0132] 真核载体的例子包括但不限于可从Stratagene获得的pW-LNE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG;可从Amersham Pharmacia Biotech获得的pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL;以及可从Clontech获得的pCMVDsRed2-express、pIRES2-DsRed2、pDsRed2-Mito、pCMV-EGFP。许多其它载体是众所周知且商购可得的。

[0133] 例如,在美国公开专利申请号2004/0185556、美国专利申请号11/233,246以及国际公开申请号WO 2005/040336和WO 2005/116231中描述了包含用于快速插入和去除基因程序的元件的分子插入枢轴的有用载体。

[0134] 如本文使用的,术语“启动子”和“启动子序列”可互换使用,并且指能够控制编码序列或功能性RNA的表达的DNA序列。一般而言,编码序列位于启动子序列的3'。启动子可以整体源自天然基因,或者由源自自然界中发现的不同启动子的不同元件组成,或甚至包含合成的DNA区段。本领域技术人员应理解,不同的启动子可以指导基因在不同组织或细胞类型中、或在不同的发育阶段、或响应不同的环境或生理条件的表达。

[0135] 促使基因在大多数细胞类型中在大多数时间下表达的启动子通常被称为“组成型启动子”。促使基因在特定细胞类型中表达的启动子通常被称为“条件启动子”。“条件启动子的非限制性例子是“细胞特异性启动子”或“组织特异性启动子”。促使基因在发育或细胞分化的特定阶段表达的启动子通常被称为“发育特异性启动子”或“细胞分化特异性启动子”。在细胞暴露于诱导启动子的试剂、生物分子、化学、配体、光等等或用其处理后诱导且

促使基因表达的启动子通常被称为“可诱导的启动子”或“可调节的启动子”。诱导型启动子的非限制性例子是TetO诱导型启动子、热休克蛋白启动子、金属硫蛋白启动子、生长激素启动子和MMTV-LTR启动子。还认识到,由于在大多数情况下调节序列的确切边界尚未完全确定,因此不同长度的DNA片段可以具有相同的启动子活性。

[0136] 启动子序列通常在其3'末端处被转录起始位点结合,并且向上游(5'方向)延伸以包括在高于背景的可检测水平下起始转录所必需的最少数目的碱基或元件。在启动子序列内将发现转录起始位点(例如通过用核酸酶S1作图方便地限定),以及负责RNA聚合酶结合的蛋白质结合结构域(共有序列)。

[0137] 当RNA聚合酶将编码序列转录成mRNA时,编码序列在细胞中的转录和翻译控制序列的“控制下”,所述mRNA然后进行反式RNA剪接(如果编码序列含有内含子)并且翻译成由编码序列编码的蛋白质。

[0138] 终止控制区,即终止子或多腺苷酸化序列,也可以源自对优选宿主天然的各种基因。任选地,终止位点可能是不必要的,但是,它可以包括在内。在本发明的一个实施例中,终止控制区可以包含或源自合成序列、合成多腺苷酸化信号、SV40晚期多腺苷酸化信号、SV40多腺苷酸化信号、牛生长激素(BGH)多腺苷酸化信号、病毒终止子序列等等。

[0139] 如本文使用的,术语“转染”指外源或异源RNA或DNA通过细胞的摄取。当此类RNA或DNA已引入细胞内时,细胞已被外源或异源RNA或DNA“转染”。转染的RNA或DNA可以整合(共价连接)到构成宿主细胞基因组的染色体DNA内。“转化”指核酸片段转移到宿主生物的基因组内,导致遗传上稳定的遗传。

[0140] 如本文使用的,术语“调节(modulate)”和“调节(modulates)”意指诱导、减少或抑制核酸或基因表达,导致蛋白质或多肽生产的分别诱导、减少或抑制。

[0141] 如本文使用的,“RNA转录物”指由RNA聚合酶催化的DNA序列转录产生的产物。当RNA转录物是DNA序列的完美互补拷贝时,它被称为初级转录物,或者它可以是源自初级转录物的转录后加工的RNA序列,并且被称为成熟RNA。“信使RNA(mRNA)”指不含内含子并且可以被细胞翻译成蛋白质的RNA。“cDNA”指与mRNA互补且源自mRNA的双链DNA。“有义”RNA指包括mRNA且因此可以被细胞翻译成蛋白质的RNA转录物。

[0142] 包含范围为1001至3000bp的非编码多核苷酸,以确保用于AAV的最佳基因组包装大小的“填充序列”,可以掺入本发明的病毒载体内。

[0143] 本发明提供了包含编码共济蛋白蛋白质的核酸序列的多核苷酸。如本文使用的,“共济蛋白蛋白质”指具有共济蛋白的生物活性,并且具有与SEQ ID NO:1中所示的人共济蛋白序列至少80%相同的氨基酸序列的多肽。在一些实施例中,多肽具有与SEQ ID NO:1至少85%相同的氨基酸序列。在其它实施例中,多肽具有与SEQ ID NO:1至少90%相同的氨基酸序列。在其它实施例中,多肽具有与SEQ ID NO:1至少95%相同的氨基酸序列。在其它实施例中,多肽具有与SEQ ID NO:1至少96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。编码共济蛋白蛋白质的核酸可以是SEQ ID NO:2中所示的那些或编码SEQ ID NO:1的任何序列,其由于遗传密码的简并性而与SEQ ID NO:2不同。编码共济蛋白蛋白质变体的核酸可以是编码多肽的核酸,所述多肽具有与SEQ ID NO:1至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0144] 核酸分子

[0145] 共济蛋白

[0146] 弗里德赖希氏共济失调 (FRDA) 与共济蛋白 (FXN) 的缺乏有关,所述共济蛋白是涉及铁-硫簇合成的线粒体蛋白质。可用于本发明中的共济蛋白蛋白质是全长共济蛋白蛋白质、功能性截短、功能性变体和功能性类似物。“功能性”意指本发明中使用的共济蛋白保留足以缓解弗里德赖希氏共济失调的至少一种症状的共济蛋白活性。共济蛋白蛋白质序列优选含有在N末端处的一部分,其指导蛋白质易位进入线粒体内。线粒体定位序列(也称为“转运肽”)是本领域已知的。共济蛋白定位序列是SEQ ID NO:1的氨基酸1-41。该序列可以被其序列是本领域已知的其它线粒体转运器取代。SEQ ID NO:1显示了共济蛋白前原蛋白,其氨基酸1-41构成转运肽,氨基酸42-210构成原蛋白,且氨基酸56-2010构成成熟蛋白质。

[0147] 在共济蛋白蛋白质的详细研究中, Faraj等人调查了C末端区域 (CTR) 或共济蛋白的结构-功能关系以及改变对共济蛋白蛋白质稳定性的作用 (Faraj, S.E. 等人 (2014) FEBS J. 281 (15) :3397-3419) (以引用的方式整体并入本文)。Faraj等人发现具有L198R突变或81-193的完全截短的某种突变体足以引起弗里德赖希氏共济失调。其它突变体如L203C突变增加了蛋白质的稳定性。在她的Texas A&M University硕士论文 (2013) 的另一项研究中, Melissa Thorstad发现FXN β 4和 β 5片层残基Q153、W155和R165对于SDU结合至关重要,并且残基N146、Q148、Q153和W155看起来对于SDU激活是重要的。因此,用于本发明中的功能性共济蛋白蛋白质包括维持共济蛋白CTR的结构和稳定性的那些,一个例子是L203C变体。一般而言,可用于本发明中的共济蛋白蛋白质具有与SEQ ID NO:1的那种至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,条件是包括某些残基,包括转运肽和前序列 (SEQ ID NO:1的氨基酸42-55) 以及Q153、W155、R165、N146、Q148、Q153和W155。此类共济蛋白蛋白质可以由本领域技术人员使用Faraj等人的方法,并且评价CTR的稳定性和结构,并且如Faraj和Thorstad所述维持关键残基进行确定。

[0148] 启动子

[0149] 可用于驱动核酸在所需宿主细胞中的表达的启动子是众多的且本领域技术人员众所周知的。事实上,能够驱动编码共济蛋白的多核苷酸表达的任何启动子都可以用于表达载体中,包括但不限于病毒启动子、细菌启动子、动物细胞启动子、哺乳动物细胞启动子、合成启动子、组成型启动子、组织特异性启动子、发病机制或疾病相关启动子、发育特异性启动子、诱导型启动子和光调节启动子。本领域已知的动物和哺乳动物启动子包括但不限于SV40早期 (SV40e) 启动子区域、劳斯肉瘤病毒 (RSV) 的3'长末端重复 (LTR) 中包含的启动子、腺病毒 (Ad) 的E1A或主要晚期启动子 (MLP) 基因的启动子、巨细胞病毒 (CMV) 早期启动子、单纯疱疹病毒 (HSV) 胸苷激酶 (TK) 启动子、杆状病毒IE1启动子、延伸因子1 α (EF1) 启动子、磷酸甘油酸激酶 (PGK1) 启动子、泛素 (UBC) 启动子、白蛋白启动子、小鼠金属硫蛋白-L启动子的调节序列和转录控制区、遍在启动子 (HPRT、波形蛋白、(x-肌动蛋白、微管蛋白等等)、中间丝 (结蛋白、神经丝、角蛋白、GFAP等等) 的启动子、治疗基因 (MDR、CFTR或因子VIII型等等) 的启动子、发病机制或疾病相关启动子和显示出特异性并且已用于转基因动物中的启动子,如在脑中的少突胶质细胞中活跃的髓鞘碱性蛋白基因控制区、在骨骼肌中活跃的肌球蛋白轻链-2基因控制区。另外,可以通过添加增强子或调节序列等等来修饰这些表

达序列。在本发明的多核苷酸中,共济蛋白基因与启动子可操作地连接,以驱动共济蛋白基因的转录。启动子可以是任何已知的启动子,其具有驱动共济蛋白基因转录的效应。在此类启动子的某些具体例子中包括但不限于CMV启动子、UBC启动子、EF1 α 启动子、PGK1启动子和最小共济蛋白启动子。在具体实施例中,编码共济蛋白的多核苷酸与UBC启动子可操作地连接,例如SEQ ID NO:3中所示的那种。

[0150] 5' 调节元件

[0151] 在包含共济蛋白基因的多核苷酸中,多核苷酸优选包含与共济蛋白基因可操作地连接的5'非翻译区(5'UTR)的至少一部分,其中所述5'UTR可以来自任何哺乳动物物种。可以使用的非限制性5'UTR包括来自人共济蛋白基因、牛共济蛋白基因、小鼠共济蛋白基因、大鼠共济蛋白基因、绵羊共济蛋白基因、猴共济蛋白基因、山羊共济蛋白基因、马共济蛋白基因、猪共济蛋白基因、骆驼共济蛋白基因、猫共济蛋白基因或犬共济蛋白基因的5'UTR。

[0152] 在某些实施例中,使用非共济蛋白5'UTR的至少一部分。非共济蛋白5'UTR的例子包括但不限于甘油醛3-磷酸脱氢酶5'调节元件(GAPDH)(例如,SEQ ID NO:15)、合成的5'调节元件(例如在美国专利号8,835,621中所述的那些,所述美国专利以引用的方式整体并入本文,包括5U2(SEQ ID NO:4))、60S核糖体蛋白L5 5'调节元件(RPL6-5'剪接)(例如,SEQ ID NO:16)和铁蛋白重链5'调节元件(FTH1-5'UTR)(例如,SEQ ID NO:14)。

[0153] 在一些实施例中,5'UTR可以是长度至少约25个核苷酸。在其它实施例中,5'UTR可以是长度至少约30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、185、190、195、200个或更多个核苷酸。在另一个实施例中,包含共济蛋白基因5'UTR的多核苷酸片段可以代表至少约50%的天然5'UTR序列。在其它实施例中,包含共济蛋白基因5'UTR的多核苷酸片段可以代表至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或更多得出天然5'UTR序列。在另一个实施例中,包含共济蛋白基因5'UTR的多核苷酸片段可以代表完整的天然5'UTR序列。

[0154] 3' 调节元件

[0155] 在包含共济蛋白基因的多核苷酸中,多核苷酸优选包含与共济蛋白基因可操作地连接的3'调节区,其中所述3'调节区可以来自任何哺乳动物物种。在某些实施例中,包含共济蛋白基因的多核苷酸另外包含3'调节元件,例如人生长激素多腺苷酸化信号(hGHPA)(例如,SEQ ID NO:5)、猿猴病毒40早期多腺苷酸化区域(SV40早期)(例如,SEQ ID NO:8)、猿猴病毒40晚期多腺苷酸化区域(SV40晚期)(例如,SEQ ID NO:9)和合成的3'调节元件(例如SEQ ID NO:7)。

[0156] 载体

[0157] 本领域已知的几种方法可以用于繁殖根据本发明的多核苷酸。一旦建立了合适的宿主系统和生长条件,就可以大量繁殖且制备重组表达载体。如本文所述,可以使用的表达载体包括但不限于下述载体或其衍生物:人或动物病毒,例如牛痘病毒或腺病毒;昆虫病毒,例如杆状病毒;酵母载体;细菌噬菌体载体(例如 λ)以及质粒和粘粒DNA载体等等。

[0158] 本领域已知的大量载体可以用于操纵核酸,将应答元件和启动子掺入基因等内。可能的载体包括例如质粒或经修饰的病毒,包括例如细菌噬菌体如 λ 衍生物,或者质粒例如pBR322或pUC质粒衍生物,或Bluescript载体。可用于本发明中的载体的另一个例子是如WO 2007/038276中所述的ULTRAVECTOR[®] Production System(Intrexon Corp.,

Blacksburg, Va.)。例如,通过将适当的DNA片段连接到具有互补粘性末端的选择载体内,可以将对应于响应元件和启动子的DNA片段插入合适的载体内。可替代地,可以通过酶促修饰DNA分子的末端,或者可以通过将核苷酸序列(接头)连接到DNA末端内产生任何位点。可以将此类载体改造为含有可选择标记物基因,其提供已将标记物掺入细胞基因组内的细胞的选择。此类标记物允许鉴定和/或选择掺入且表达由标记物编码的蛋白质的宿主细胞。

[0159] 病毒载体且特别是逆转录病毒载体已用于细胞和动物两者内。可以使用的病毒载体包括但不限于逆转录病毒、腺相关病毒、痘、杆状病毒、牛痘、单纯疱疹、EB、腺病毒、双生病毒和花椰菜病毒载体。非病毒载体包括质粒、脂质体、带电脂质(细胞转染素)、DNA-蛋白质复合物和生物聚合物。除核酸之外,载体还可以包含一个或多个调节区,和/或可用于选择、测量和监测核酸转移结果(转移到哪些组织、表达持续时间等)的可选择标记物。

[0160] 可以通过本领域已知的方法将载体引入所需的宿主细胞内,例如转染、电穿孔、显微注射、转导、细胞融合、DEAE葡聚糖、磷酸钙沉淀、脂质转染(溶酶体融合)、基因枪的使用或DNA载体转运蛋白(参见例如,Wu等人,(1992) J. Biol. Chem. 267:963; Wu等人,(1988) J. Biol. Chem. 263:14621;以及Hartmut等人,加拿大专利申请号2,012,311)。

[0161] 还可以通过脂质转染在体内引入根据本发明的多核苷酸。(Feigner等人,(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413; Mackey等人,(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027;以及Ulmer等人(1993) Science 259:1745; Feigner等人(1989) Science 337:387)。用于转移核酸的各种脂质化合物和其它组合物是本领域已知的,包括但不限于PCT公开号W0 95/18863、W0 96/17823、美国专利号5,459,127、W0 95/21931、W0 96/25508和W0 95/21931。

[0162] 还能够将载体作为裸DNA质粒在体内引入,如美国专利号5,693,622、5,589,466和5,580,859中所述。

[0163] 在某些实施例中,可以将本发明的多核苷酸掺入病毒载体内用于递送给受试者。病毒载体的非限制性例子包括腺病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、疱疹病毒载体和腺相关病毒(AAV)载体。

[0164] 在特定实施例中,本发明的多核苷酸在腺相关病毒(AAV)载体中提供。腺相关病毒载体可以是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10或可以感染人的任何其它AAV血清型。在某些具体实施例中,腺相关病毒载体是AAV5。

[0165] AAV载体是源自腺相关病毒血清型的载体。AAV载体可以具有全部或部分缺失的一种或多种AAV野生型基因,优选rep和/或cap基因,但保留功能性侧翼ITR序列。AAV载体至少包括病毒的顺式复制和包装所需的那些序列(例如,功能性ITR)。AAV ITR区的核苷酸序列是已知的(Kotin, RM (1994) Hum. Gene Ther. 5 (7):793-801; Berns, KI "Parvoviridae and their Replication" in VIROLOGY, 第2版, (Fields, BN和Knipe, DM, 编辑) New York: Raven Press; 1990b:1743-1763)。ITR可以源自不同的血清型,只要它们是功能性的。本发明的AAV表达载体可以通过本领域已知的任何方法构建,以在转录方向上可操作地连接组分(即,包括启动子、5'UTR、共济蛋白基因和3'调节元件(如作为转录终止区域)的控制元件)。

[0166] 在一个特定方面,本发明涉及包含AAV血清型5(AAV5)和FXN基因插入物的载体。在一个实施例中,载体是AAV5-hFXN载体,其包含rAAV5衣壳和编码hFXN的互补DNA(cDNA)序列。

[0167] 具有基因插入物的AAV5.hFXN载体的例子显示于图15中。

[0168] //-ITR-UBC-5U2-hFXN GOI-hGH-多聚A-ITR接头-ITR-//

[0169] ITR=AAV2反向末端重复，

[0170] UBC=人泛素C(UBC) 启动子

[0171] 5U2=合成的5'调节元件

[0172] hFXN GOI=人FXN cDNA

[0173] hGH-多聚A=人生长激素多聚A

[0174] 包含共济蛋白构建体的重组病毒可以通过本领域已知的任何技术产生，包括但不限于转染包装细胞(例如，PA317细胞、PsiCRIP细胞、GPenv+细胞、293细胞)或者用辅助质粒或病毒瞬时转染。用于制备复制缺陷型重组病毒的描述和方案可以在例如WO 94/19478、WO 95/14785、WO 96/22378、美国专利号5,882,877、6,013,516、4,861,719和5,278,056中找到。

[0175] 在本发明的具体实施例中，多核苷酸包含编码共济蛋白蛋白质的核酸，所述共济蛋白蛋白质具有与UBC启动子(SEQ ID NO:3)和5U2 5'UTR(SEQ ID NO:4)和合成的3'调节元件(SEQ ID NO:7)可操作地连接的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在本发明的另一个具体实施例中，多核苷酸包含编码共济蛋白蛋白质的核酸，所述共济蛋白蛋白质具有与UBC启动子(SEQ ID NO:3)和5U2 5'UTR(SEQ ID NO:4)和hGHpA 3'调节元件(SEQ ID NO:5)可操作地连接的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在本发明的某些实施例中，将这两种多核苷酸各自掺入AAV5载体内，从而制备两种类型的AAV5载体以表达共济蛋白。在其它特定实施例中，将表达共济蛋白的这些类型的AAV5载体各自包装到病毒粒子内，制备两种类型的rAAV5用于表达共济蛋白，其各自可以任选地配制成本发明的组合物。

[0176] 药物制剂

[0177] 任选地，在磷酸盐缓冲盐水(PBS)、1X PBS、2X PBS、10X PBS、Dulbecco's PBS(DPBS)或者不含镁或钙的DPBS中配制AAV5.hFXN载体。

[0178] 在一个实施例中，药物制剂包含AAV5.hFXN载体和1X PBS。在另一个实施例中，药物制剂包含AAV5.hFXN载体、1X DPBS和约200mM NaCl。

[0179] 在一个方面，药物制剂具有与人脑脊髓液的pH基本上相似的pH。在一个实施例中，药物制剂具有约6.5至约7.5的pH。在另一个实施例中，药物制剂具有约6.8至约7.2的pH。在另一个实施例中，药物制剂具有约7.0至约7.5的pH。在另一个实施例中，药物制剂具有约7的pH。在另一个实施例中，药物制剂具有约7.1的pH。在另一个实施例中，药物制剂具有约7.2的pH。在另一个实施例中，药物制剂具有约7.2的pH。在另一个实施例中，药物制剂具有约7.4的pH。

[0180] 在一个特定实施例中，药物制剂包含AAV5.hFXN载体、0.154M NaCl、0.056M Na₂HPO₄和0.0106M KH₂PO₄。在另一个特定实施例中，药物制剂包含AAV5.hFXN载体、0.337M NaCl、0.027M KCl、0.015M Na₂HPO₄和0.0015M KH₂PO₄。

[0181] 药物制剂的例子包括但不限于表2中所示的药物制剂。

[0182] 表2. 示例性AAV5.hFXN制剂

	组分	制剂 1	制剂 2
[0183]	AAV5-hFXN	2.5×10^{11} vg/mL	2.5×10^{12} vg/mL
	赋形剂	PBS	Dulbecco's PBS (无 Mg, 无 Ca) + 200mM NaCl
	pH	7.4	7.0

[0184] 在一个方面,药物制剂包含以至多约25%至约95%cp/cp的百分比的空衣壳。在一些实施例中,药物制剂包含以至多约50%cp/cp至约75%cp/cp的百分比的空衣壳。在其它实施例中,药物制剂包含以至多约25%cp/cp至约50%cp/cp的百分比的空衣壳。在一些实施例中,药物制剂包含以至多约95%cp/cp的百分比的空衣壳。在一些实施例中,药物制剂包含以0%到至多约25%cp/cp的百分比的空衣壳。本文的范围包括所述数字之间的所有整数(例如,25%至50%包括25%、26%、27%、28%等,直至且包括50%)。在一些实施例中,药物制剂基本上不含空衣壳。如本文使用的,“基本上不含”意指具有很少量或不含有该组分量的制剂。“基本上不含空衣壳”指具有1%至0%空衣壳的制剂。

[0185] 施用途径;药物制剂的递送:

[0186] 在一个方面,药物制剂通过鞘内(IT)递送进行施用。在另一个方面,药物制剂通过脑室内(ICV)递送进行施用。在另一个方面,药物制剂通过实质内递送进行施用。

[0187] 在一个实施例中,药物制剂通过实质内递送至脑进行施用。在一个实施例中,药物制剂通过实质内递送至小脑进行施用。在另一个实施例中,药物制剂通过实质内递送至大脑进行施用。在另一个实施例中,药物制剂通过实质内递送到齿状核内进行施用。在另一个实施例中,药物制剂通过实质内递送到背根神经节内进行施用。

[0188] 药物制剂可以使用任何合适的递送装置进行施用,包括但不限于针、导管或相关装置。药物制剂可以使用本领域已知的任何合适的技术进行施用,包括但不限于立体定向注射(参见Davidson等人,“Recombinant adeno-associated virus type 2,4,and 5vectors:Transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system”PNAS 97:3428-3432,2000;以及Alisky等人,“Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases”Hum.Gene Ther.11:2315-2329,2000)。

[0189] 在一个实施例中,使用单次推注注射施用药物制剂。在另一个实施例中,使用连续输注施用药物制剂。在另一个实施例中,使用多次注射施用药物制剂。在另一个实施例中,使用一次注射、两次注射、三次注射或四次注射施用药物制剂。

[0190] 在一个实施例中,药物制剂双侧施用。在另一个实施例中,药物制剂双侧施用。在一个特定实施例中,药物制剂作为双侧注射施用于小脑。

[0191] 药物制剂可以通过手动注射、输液泵或渗透泵递送。非手动注射包括但不限于对流增强递送(CED)。参考L.Samaranch等人,“MR-guided parenchymal Delivery of Adeno-Associated Viral Vector Serotype 5in Non-Human Primate Brain”Gene Therapy (2017) 24,253-261;以及美国专利号9,701,984“CNS targeting AAV Vectors and Methods of use Thereof”。渗透泵和输液泵两者均从各种供应商商购可得,例如Alzet Corporation,Hamilton Corporation,Alza,Inc.,Palo Alto,CA。注射泵的一个非限制性

例子是Pump11Elite Series,Harvard Pump,Harvard Apparatus Holliston,MA。注射泵的一个非限制性例子是Legato™ Syringe Pump,KD Scientific Inc.Holliston,MA。

[0192] 可以使用任何合适的套管或针。可以使用任何合适的尖端样式。套管或针可任选地包括一个或多个锥形区域。在各种实施例中,套管或针可以是斜面的。

[0193] 示例性脊髓穿刺针包括但不限于Pencil-Point (**Pencan®**-Braun;**Reganesth®**-Sarstedt AG;Whitacre;Sprotte) 和Quincke (**Spinocan®**-Braun) 型斜角针。

[0194] 可以使用任何合适尺寸的套管或针。尺寸可以取决于植入的部位。例如,硬膜外腔的宽度对于胸部区域仅为约3-5mm,并且对于腰椎区域为约5-7mm。套管或针的长度的例子可以包括但不限于长度约15至150mm,例如,对于硬膜外儿科使用约65mm、对于标准成人约85mm以及对于肥胖的成人患者约110mm。套管或针的示例性厚度包括但不限于约0.05mm至约2mm。

[0195] 可以使用任何合适规格的套管或针。例子包括但不限于约14G至约22G。在一些实施例中,针或插管的规格是约18G至约22G。

[0196] ICV接入装置的例子包括但不限于Ommaya和Rickham储库。参考J.L.Cohen-Pfeffer等人,“Intracerebroventricular Delivery as a Safe,Long-Term Route of Drug Administration”Pediatric Neurology,第67卷,2017年2月,第23-35页;“Safety of Ommaya reservoirs in children with brain tumors:a 20-year experience with 5472intraventricular drug administrations in 98patients”J Neurooncol.,120 (2014),第139-145页;A.Desi等人,“Gibaldi’s Drug Delivery Systems In Pharmaceutical Care,”American Society of Health-System Pharmacists,2007;以及Cook AM等人,Intracerebroventricular administration of drugs.Pharmacotherapy.2009Jul;29 (7) :832-45。

[0197] 在另一个实施例中,使用Medtronic ASCENDA™ Intrathecal Catheter递送系统,经由腰椎穿刺通过鞘内递送施用到CSF内来施用药物制剂。在一个特定的实施例中,通过将导管插入蛛网膜下腔且将1/2剂量的药物制剂施用于腰椎和1/2剂量的药物制剂施用于小脑延髓池来施用药物制剂。

[0198] 在一个实施例中,ASCENDA™ 8781 Intrathecal Catheter递送系统试剂盒包括但不限于:带有插入导丝的脊柱区段,带有附着的无缝线泵连接器的泵区段,带有2个附着夹头的导管连接器,16T-规格引入针(11.4cm) • 带有锚分配器的锚。长度:总导管139.7cm,脊柱区段66.0cm,泵区段73.7cm。脊柱区段:外径1.2mm(4French),内径0.5mm,间隔标记物1cm,封闭有6个侧孔的导管尖端。泵区段:外径(仅导管)1.2mm(4French),内径0.5mm(仅导管),间隔标记物1cm间隔。导管体积:0.0022mL/cm。导管连接器:内径0.3mm,夹头外径4.3mm,引导线:外径0.5mm,引入针16T规格,11.4cm。可调区段:脊柱和泵区段的导管连接器端部。泵区段至脊柱区段分离力>10.0N。无缝线泵连接器至泵分离力:>10.0N。

[0199] 任选地通过导管和输液泵递送药物制剂。任选地使用适合于CNS输注的任何导管和泵组合。导管和泵组合的一个非限制性例子是Medtronic ASCENDA™ Intrathecal Catheter递送系统。有用泵的例子包括但不限于Medtronic SynchroMed®EL 18mL、SynchroMed® II 20mL和SynchroMed®II 40mL泵。

[0200] 在另一个实施例中,药物制剂任选地通过Alcyone MEMS Cannula (AMC™,Alcyone Lifesciences,Inc.,Lowel,MA.)、双腔、MR相容性注射和抽吸神经-心室套管进行递送。在另一个实施例中,药物制剂任选地通过Alcyone Pulsar鞘内导管进行递送。

[0201] 容器:

[0202] 在一个实施例中,药物制剂包含在具有含氟聚合物衬里的塑料封闭物的药物级硼硅酸盐玻璃容器中。含氟聚合物的例子包括但不限于聚四氟乙烯 (PTFE) (Teflon®)、聚乙烯四氟乙烯 (ETFE) (Fluorotec®)、以及乙烯和四氟乙烯的共聚物(Tefzel®)。在一个实施例中,封闭物衬有聚四氟乙烯 (PTFE) (Teflon®)。

[0203] 剂量:

[0204] 载体的剂量取决于包括但不限于施用模式、各个受试者的状况和递送的特定载体的因素。

[0205] 在本发明的一个实施例中,每个受试者的剂量范围为约 1×10^{10} vg至约 1×10^{15} vg。在另一个实施例中,剂量为至少约 1×10^{11} vg、至少约 1×10^{12} vg、至少约 1×10^{13} vg、至少约 1×10^{14} vg或至少约 1×10^{15} vg。

[0206] 在另一个实施例中,剂量为至少约 5×10^{13} vg、至少约 1.5×10^{14} vg或至少约 5×10^{14} vg。

[0207] 在另一个实施例中,剂量为约 5×10^{13} vg、约 1.5×10^{14} vg或约 5×10^{14} vg。

[0208] 在另一个实施例中,剂量是基于脑重量的约 3.7×10^{10} vg/g、基于脑重量约 1.11×10^{11} vg/g、或基于脑重量约 3.7×10^{11} vg/g的量。

[0209] 剂量是在每次施用中每个受试者的所有靶部位上的总剂量。

[0210] 对于一个非限制性例子,每个受试者约 5×10^{13} vg的总剂量包括约 2.5×10^{13} vg的两次注射(即,在小脑右半部中的一次 2.5×10^{13} vg注射和在小脑左半部中的一次 2.5×10^{13} vg注射)。对于另一个非限制性例子,每个受试者约 1.5×10^{14} vg的总剂量包括约 7.5×10^{13} vg的两次注射(即,在小脑右半部中的一次 7.5×10^{13} vg注射和在小脑左半部中的一次 7.5×10^{13} vg注射)。对于另一个非限制性例子,每个受试者约 5×10^{14} vg的总剂量包括约 2.5×10^{14} vg的两次注射(即,在小脑右半部中的一次 2.5×10^{14} vg注射和在小脑左半部中的一次 2.5×10^{14} vg注射)。

[0211] 对于另一个非限制性例子,每个受试者约 5×10^{13} vg的总剂量包括约 2.5×10^{13} vg的两次注射(即,在腰椎处的一次 2.5×10^{13} vg注射和在小脑延髓池处的一次 2.5×10^{13} vg注射)。对于另一个非限制性例子,每个受试者约 1.5×10^{14} vg的总剂量包括约 7.5×10^{13} vg的两次注射(即,在腰椎处的一次 7.5×10^{13} vg注射和在小脑延髓池处的一次 7.5×10^{13} vg注射)。对于另一个非限制性例子,每个受试者约 5×10^{14} vg的总剂量包括约 2.5×10^{14} vg的两次注射(即,在腰椎处的一次 2.5×10^{14} vg注射和在小脑延髓池处的一次 2.5×10^{14} vg注射)。

[0212] 参考D.J.Schuster,“Supraspinal gene transfer by intrathecal adeno-associated virus serotype 5.”Front.Neuroanat.(2014b),8:66;S.J.Gray.“Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates.”Gene Ther.2013;20(4):450-459.;T.Federici等人,“Robust spinal motor neuron transduction following

intrathecal delivery of AAV9 in pigs,”Gene Ther,19(8):852,2012;以及B.Snyder等人,“Comparison of adeno-associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery,”Hum.Gene Ther,22(9):1129,2011。

[0213] 剂量体积:

[0214] 在一个实施例中,药物制剂以每个靶位点范围为约0.1mL至约10mL的剂量体积递送。在另一个实施例中,药物制剂以每个靶位点范围为约1mL至约5mL的剂量体积递送。在另一个实施例中,药物制剂以每个靶位点范围为约1mL至约3mL的剂量体积递送。在另一个实施例中,药物制剂以每个靶位点范围为约1.5mL至约2.5mL的剂量体积递送。在另一个实施例中,药物制剂以每个靶位点范围为约1mL至约2mL的剂量体积递送。在一个特定实施例中,药物制剂以每个靶位点约1mL的剂量体积递送。在另一个特定实施例中,药物制剂以每个靶位点约2mL的剂量体积递送。在另一个特定实施例中,药物制剂以每个靶位点约3mL的剂量体积递送。

[0215] 剂量浓度:

[0216] 在一个实施例中,药物制剂包含约 1×10^9 至约 2×10^{13} vg/mL的AAV5.hFXN载体浓度。在一些实施例中,AAV5.hFXN载体浓度为约 1×10^{10} 至约 2×10^{13} 。在其它实施例中,AAV5.hFXN载体浓度为约 1×10^{11} 至约 2×10^{13} 。在其它实施例中,AAV5.hFXN载体浓度为约 1×10^{12} 至约 2×10^{13} vg/mL。在另一个实施例中,AAV5.hFXN载体浓度为约 2.5×10^{12} 至约 2×10^{13} vg/mL。在其它实施例中,AAV5.hFXN载体浓度为约 5×10^{12} 至约 2×10^{13} vg/mL。在再进一步的实施例中,AAV5.hFXN载体浓度为约 7×10^{12} 至约 2×10^{13} vg/mL。

[0217] 在某些实施例中,AAV5.hFXN载体浓度为至少约 1×10^9 、至少约 1×10^{11} 、至少约 2.5×10^{11} 、至少约 5×10^{11} 、至少约 1×10^{12} 、至少约 2×10^{12} 、至少约 2.5×10^{12} 、至少约 5×10^{12} 、至少约 7×10^{12} 、至少约 1×10^{13} 、或至少约 2×10^{13} vg/mL。

[0218] 在一个实施例中,药物制剂包含浓度约 1×10^9 vg/mL、约 1×10^{10} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL、约 1×10^{12} vg/mL、约 1×10^{13} vg/mL、约 2.5×10^{11} vg/mL、约 5×10^{11} vg/mL、约 2×10^{12} vg/mL、约 2.5×10^{12} vg/mL、约 5×10^{12} vg/mL、约 7×10^{12} vg/mL、约 1×10^{13} vg/mL、或约 2×10^{13} vg/mL的AAV5.hFXN载体浓度。

[0219] 施用速率:

[0220] 在一个实施例中,药物制剂经过约一分钟至约10分钟作为单次推注注射进行递送。在一个实施例中,药物制剂经过约1分钟至约5分钟作为单次推注注射进行递送。

[0221] 在一个实施例中,药物制剂以范围为约0.001mL/分钟至约10mL/分钟的速率递送。在另一个实施例中,药物制剂以范围为约0.01mL/分钟至约1mL/分钟的速率递送。在另一个实施例中,药物制剂以范围为约0.01mL/分钟至约0.1mL/分钟的速率递送。在另一个实施例中,药物制剂以范围为约1mL/分钟至约10mL/分钟的速率递送。在另一个实施例中,药物制剂以范围为约1mL/分钟至约2mL/分钟的速率递送。

[0222] 在一个实施例中,药物制剂以约0.1mL/分钟、约0.2mL/分钟、约0.3mL/分钟、约0.4mL/分钟、约0.5mL/分钟、约0.6mL/分钟、约0.7mL/分钟、约0.8mL/分钟、约0.9mL/分钟或约1.0mL/分钟的速率递送。

[0223] 在一个实施例中,药物制剂以约0.01mL/分钟、约0.02mL/分钟、约0.03mL/分钟、约0.04mL/分钟、约0.05mL/分钟、约0.06mL/分钟、约0.07mL/分钟、约0.08mL/分钟、约0.09mL/

分钟或约0.1mL/分钟的速率递送。

[0224] 在一个实施例中,包含 1×10^{12} vg/mL的AAV5.hFXN载体浓度的药物制剂以约0.001mL/分钟的速率递送至每个靶位点约1mL的剂量体积。

[0225] 本领域普通技术人员能够将剂量调整得更高或更低,并且根据因素如施用途径(例如,全身剂量可以增加多达2-3对数)、剂量时机、症状改善(即,功效)、或特定患者的个体需求来确定适当的剂量/剂量方案。

[0226] 结果测量:

[0227] 参考M.Patel等人,“Progression of Friedreich ataxia:quantitative characterization over 5years,”Annals of Clinical and Translational Neurology, 2016;3 (9):684-69;D.Lynch等人“Friedreich ataxia:effects of genetic understanding on clinical evaluation and therapy”Arch.Neurol,2002,59:743-747;C.Wilson等人,“Quality of life in Friedreich ataxia:what clinical,social and demographic factors are important?”Eur.J Neurol.200714 (9):1040-1047;G.Rance等人,“Speech perception ability in individuals with Friedreich ataxia.”Brain.2008131:2002-2012;A.Koeppen,“Friedreich’s ataxia:Pathology,pathogenesis,and molecular genetics.”J.Neurol.Sci.2011,303(1-2):1-12;以及S.R.Regner等人,“Friedreich ataxia clinical outcome measures:natural history evaluation in 410participants”J.Child Neurol.2012,27 (9):1152-8。

[0228] 在研究药物施用后1、3、6和12个月收集功效数据。使用弥散张量成像和各种功能结果(包括但不限于FARS总体和FARS Neuro;25英尺步行测试评估;关于GAITRite Walkway System的评估;使用Biodex Balance System SD的评估;使用9孔插棒测试的评估)评估受试者中的疗效。扩散张量成像可以例如通过齿状核和DRG的T2弛豫测量和/或通过磁共振成像(MRS)的NAA水平和铁水平来测量。

[0229] 用于体内使用的药物赋形剂,本文所述的活性成分(例如,表达共济蛋白的载体、病毒粒子、病毒、rAAV等)可以在药学可接受的载体中摄取,例如溶液、悬浮液、片剂、胶囊、软膏、酞剂和可注射组合物。药物组合物可以含有按重量计0.01%至99%的活性成分。组合物可以是单剂量或多剂量形式。任何特定药物组合物中配体的量将取决于有效剂量,即引发所需基因表达或抑制所需的剂量。

[0230] 施用药物制剂的合适途径包括经口、直肠、局部(包括皮肤、颊和舌下)、阴道、肠胃外(包括皮下、实质内、肌肉内、静脉内、瘤内、皮内、鞘内、脑室内和硬膜外)、玻璃体内以及通过鼻胃管。在某些实施例中、施用途径是对CSF空间;蛛网膜下腔(例如,小脑延髓池);脑(例如,脑室空间、小脑、大脑、海马、内皮质、背根神经节或尾状核);或脊柱(例如,腰椎、胸椎、颈椎)。在一些实施例中,活性成分(例如,表达共济蛋白的载体、病毒粒子、病毒、rAAV等)在两次注射中递送:一次在右小脑中且比较一次在左小脑中。在一些实施例中,这些是两次相等的注射。在一些实施例中,活性成分(例如,表达共济蛋白的载体、病毒粒子、病毒、rAAV等)通过注射小脑并且还全身地提供它来施用。本领域技术人员将理解,施用途径取决于待治疗的状况,并且可以随着因素如接受者的状况而变化。

[0231] 用于表达共济蛋白(例如,病毒、AAV、载体、病毒等)的本发明的多核苷酸可以用于治疗弗里德赖希氏共济失调。将本发明的多核苷酸、病毒粒子和/或组合物施用于有此需要

的受试者改善弗里德赖希氏共济失调的至少一种症状。可以改善的弗里德赖希氏共济失调的症状包括但不限于臂和/或腿中的协调性丧失;疲劳,视力障碍,听力丧失,言语不清,侵袭性脊柱侧凸,糖尿病,肥厚性心肌病和心律失常。

[0232] 使用本发明的构建体和组合物治疗弗里德赖希氏共济失调允许共济蛋白在受试者中以共济蛋白的正常表达的至少25%或更高直到正常水平(包括超过正常水平的水平,条件是它不造成不利效应)表达。在一些实施例中,水平将为正常的至少30%。在其它实施例中,水平将为共济蛋白的正常水平的至少或大于35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。在其它实施例中,达到了共济蛋白的正常水平。

[0233] 使用本发明的组合物和方法,在线粒体中表达共济蛋白。优选地,在选自小脑、海马、前皮质和背根神经节的至少一种组织的线粒体中表达共济蛋白。

[0234] 基因开关系统

[0235] 基因开关可以通过添加或去除特定配体来调节基因表达的任何基因开关。在一个实施例中,基因开关是其中基因表达的水平取决于存在的配体水平的基因开关。可以用于本发明的基因开关中的配体依赖性转录因子复合物的例子包括但不限于由其各自的配体(例如,糖皮质激素、雌激素、孕激素、类视黄醇、蜕皮激素及其类似物和模拟物)和由四环素激活的rTTA激活的核受体超家族的成员。在本发明的一个方面,基因开关是基于EcR的基因开关。此类系统的例子包括但不限于美国专利号6,258,603、7,045,315,美国公开专利申请号2006/0014711、2007/0161086和国际公开申请号W0 01/70816中描述的系统。嵌合蜕皮激素受体系统的例子描述于美国专利号7,091,038,美国公开专利申请号2002/0110861、2004/0033600、2004/0096942、2005/0266457和2006/0100416,以及国际公开申请号W0 01/70816、W0 02/066612、W0 02/066613、W0 02/066614、W0 02/066615、W0 02/29075和W0 2005/108617中,所述专利各自以引用的方式整体并入。非类固醇蜕皮激素激动剂调节系统的例子是RheoSwitch[®] Mammalian Inducible Expression System(New England Biolabs,Ipswich,MA)。在本发明的另一个方面,基因开关基于FK506结合蛋白(FKBP)与FKBP雷帕霉素相关蛋白(FRAP)的异二聚化,并且通过雷帕霉素或其非免疫抑制性类似物调节。此类系统的例子包括但不限于ARGENT[™] Transcriptional Technology(ARIAD Pharmaceuticals,Cambridge,MA),以及美国专利号6,015,709、6,117,680、6,479,653、6,187,757和6,649,595中描述的系统。

[0236] 在一个实施例中,基因开关包含在治疗性开关启动子的控制下,编码配体依赖性转录因子复合物的单个转录因子序列。转录因子序列可以编码配体依赖性转录因子复合物,其是天然存在的或人工配体依赖性转录因子复合物。人工转录因子是其中转录因子的天然序列已被改变的因子,例如通过序列的突变或通过来自不同转录因子的结构域组合。在一个实施例中,转录因子包含组H核受体配体结合结构域。在一个实施例中,组H核受体配体结合结构域来自蜕皮激素受体、遍在受体(UR)、孤儿受体1(OR-1)、类固醇激素核受体1(NER-1)、类视黄醇X受体相互作用蛋白-15(RIP-15)、肝X受体 β (LXR β)、类固醇激素受体样蛋白(RLD-1)、肝X受体(LXR)、肝X受体 α (LXR α)、类法尼醇X受体(FXR)、受体相互作用蛋白14(RIP-14)或法尼醇受体(HRR-1)。在另一个实施例中,组H核受体LBD来自蜕皮激素受体。

[0237] A. 基于蜕皮激素的基因开关

[0238] EcR和其它组H核受体是核受体超家族的成员,其中所有成员一般特征在于氨基末端反式激活结构域(AD,也可互换地称为“TA”或“TD”)的存在,任选地与异二聚化配偶体(HP)融合以形成共激活蛋白(CAP)、DNA结合结构域(DBD)和经由铰链区与DBD融合的LBD以形成配体依赖性转录因子(LTF)。如本文使用的,术语“DNA结合结构域”包含DNA结合蛋白的最小多肽序列,直至DNA结合蛋白的整个长度,只要DNA结合结构域作用于与特定应答元件结合。核受体超家族的成员的特征还在于四个或五个结构域的存在:A/B、C、D、E,并且在一些成员中F(参见US 4,981,784和Evans,Science240:889(1988))。“A/B”结构域对应于反式激活结构域,“C”对应于DNA结合结构域,“D”对应于铰链结构域,且“E”对应于配体结合结构域。该家族的一些成员还可以在LBD的羧基末端侧上具有对应于“F”的另一个反式激活结构域。

[0239] 下述多肽序列作为蜕皮激素受体(蜕皮类固醇受体)(20-羟基-蜕皮激素受体)(20E受体)(EcRH)(核受体亚家族1组H成员1)的多肽序列报道,并且在Genbank中具有登录号P34021。

[0240] 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)蜕皮激素受体的蛋白质序列(SEQ ID NO: 10)

[0241] 1 MKRRWSNNGG FMRLPEESSS EVTSSSNGLV LPSGVNMSPS SLDSHDYCDQ DLWLCGNESG

[0242] 61 SFGGSNGHGL SQQQQSVITL AMHGCSSTLP AQTTIIPING NANGNGGSTN GQYVPGATNL

[0243] 121 GALANGMLNG GFNGMQQQIQ NGHGLINSTT PSTPTTPLHL QQNLGGAGGG GIGGMGILHH

[0244] 181 ANGTPNGLIG VVGGGGGVGL GVGGGGVGGL GMQHTPRSDS VNSISSGRDD LSPSSSLNGY

[0245] 241 SANESCDAKK SKKGPAPRVQ EELCLVCGDR ASGYHYNALT CEGCKGFFRR SVTKSAVYCC

[0246] 301 KFRACEMDM YMRRKCQECR LKKCLAVGMR PECVVPENQC AMKRREKKAQ KEKDGMTTSP

[0247] 361 SSQHGGNGSL ASGGGQDFVK KEILDLMTC EPPQHATIPLL PDEILAKCQA RNIPSLTYNQ

[0248] 421 LAVIYKLIWY QDGYEQPSEE DLRRIMSQPD ENESQTDVSF RHTEITILT VQLIVEFAKG

[0249] 481 LPAFTKIPQE DQITLLKACS SEVMMLRMAR RYDHSSDSIF FANNRSYTRD SYKMAGMADN

[0250] 541 IEDLLHFCRQ MFSMKVDNVE YALLTAIVIF SDRPGLEKAQ LVEAIQSYII DTLRIYILNR

[0251] 601 HCGDSMSLVF YAKLLSILTE LRTLGNQNAE MCFSLKLKNR KLPKFLEEIW DVHAIPPSVQ

[0252] 661 SHLQITQEEN ERLERAERMR ASVGGAITAG IDCDSASTSA AAAAAQHQPQ PQPQPQPSSL

[0253] 721 TQND SQHQTQ PQLQPQLPPQ LQGQLQPQLQ PQLQTQLQPQ IQPQPQLLPV SAPVPASVTA

[0254] 781 PGSLSAVSTS SEYMGGSAAI GPITPATTSS ITAAVTASST TSAVPMGNGV GVGVGVGNGV

[0255] 841 SMYANAQTAM ALMGVALHSH QEQLIGGVAV KSEHSTTA

[0256] 在一个实施例中,蜕皮激素受体配体结合结构域选自无脊椎动物蜕皮激素受体配体结合结构域、节肢动物蜕皮激素受体配体结合结构域、鳞翅目蜕皮激素受体配体结合结构域、双翅目蜕皮激素受体配体结合结构域、直翅目蜕皮激素受体配体结合结构域、同翅目蜕皮激素受体配体结合结构域、半翅目蜕皮激素受体配体结合结构域、云杉卷叶蛾云杉夜蛾(*Choristoneura fumiferana*)EcR蜕皮激素受体配体结合结构域、甲虫黄粉虫(*Tenebrio molitor*)蜕皮激素受体配体结合结构域、烟草天蛾(*Manduca sexta*)蜕皮激素受体配体结合结构域、烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)蜕皮激素受体配体结合结构域、摇蚊伸展摇蚊(*Chironomus tentans*)蜕皮激素受体配体结合结构域、蚕蛾家蚕(*Bombyx mori*)蜕皮激素受体配体结合结构域、偏瞳蔽眼蝶(*Bicyclus anynana*)蜕皮激素受体配体结合结构域、七

叶树常见七叶树 (*Junonia coenia*) 蜕皮激素受体配体结合结构域、果蝇黑腹果蝇蜕皮激素受体配体结合结构域、蚊子埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 蜕皮激素受体配体结合结构域、绿蝇 *Lucilia capitata* 蜕皮激素受体配体结合结构域、绿蝇铜绿蝇 (*Lucilia cuprina*) 蜕皮激素受体配体结合结构域、绿蝇红头丽蝇 (*Calliphora vicina*) 蜕皮激素受体配体结合结构域、地中海果蝇地中海实蝇 (*Ceratitis capitata*) 蜕皮激素受体配体结合结构域、蝗虫飞蝗 (*Locusta migratoria*) 蜕皮激素受体配体结合结构域、蚜虫桃蚜 (*Myzus persicae*) 蜕皮激素受体配体结合结构域、招潮蟹 (*Celca pugilator*) 蜕皮激素受体配体结合结构域、硬蜱美洲钝眼蜱 (*Amblyomma americanum*) 蜕皮激素受体配体结合结构域、粉虱银叶粉虱 (*Bemisia argentifolii*) 蜕皮激素受体配体结合结构域和叶蝉黑尾叶蝉 (*Nephotetix cincticeps*) 蜕皮激素受体配体结合结构域。

[0257] 在另一个实施例中,蜕皮激素受体配体结合结构域是云杉卷叶蛾蜕皮激素受体配体结合结构域,其氨基酸序列显示于SEQ ID NO:11中。

[0258] 在另一个实施例中,蜕皮激素受体配体结合结构域是云杉卷叶蛾蜕皮激素受体配体结合结构域的类似物,其保留云杉卷叶蛾蜕皮激素受体配体结合结构域的体外云杉卷叶蛾蜕皮激素受体配体结合活性的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。体外蜕皮激素受体配体结合测定是本领域普通技术人员众所周知的。例如,参见WO 02/066612。

[0259] 在另一个实施例中,蜕皮激素受体配体结合结构域类似物是WO 02/066612、US 2006/0100416、WO 05/108617和2005/0266457中公开的蜕皮激素受体配体结合结构域。在另一个实施例中,蜕皮激素受体配体结合结构域类似物是云杉卷叶蛾蜕皮激素受体的V107I/Y127E取代突变体,其显示于SEQ ID NO:12中。

[0260] DBD的特征在于两个半胱氨酸锌指的存在,其间是两个氨基酸基序,P-盒和D-盒,其赋予对于应答元件的特异性。这些结构域可以是天然的、经修饰的或异源受体蛋白的不同结构域的嵌合体。与核受体家族的子集一样,EcR也具有较少的充分限定的负责异二聚化特性的区域。因为核受体的结构域本质上是模块,所以LBD、DBD和AD可以互换。

[0261] 在另一个实施例中,转录因子包含AD、识别与其表达待调节的治疗性蛋白质或治疗性多核苷酸相关的应答元件的DBD;以及组H核受体LBD。在某些实施例中,组H核受体LBD包含取代突变。

[0262] DNA结合结构域可以是具有已知应答元件的任何DNA结合结构域(DBD),包括合成和嵌合DNA结合结构域、或其类似物、组合或修饰。在一个实施例中,DNA结合结构域选自GAL4DBD、LexA DBD、转录因子DBD、组H核受体成员DBD、类固醇/甲状腺激素核受体超家族成员DBD、细菌LacZ DBD、EcR DBD、GAL4DBD和LexA DBD。

[0263] 反式激活结构域(缩写为“AD”或“TA”)可以是任何组H核受体成员AD、类固醇/甲状腺激素核受体AD、合成或嵌合AD、聚谷氨酰胺AD、碱性或酸性氨基酸AD、VP16AD、GAL4AD、NF- κ B AD、BP64AD、B42酸性激活结构域(B42AD)、p65反式激活结构域(p65AD)或其类似物、组合或修饰。

[0264] 在另一个实施例中,基因开关包含在第一治疗开关启动子(TSP-1)的控制下的第一转录因子序列例如CAP、以及在第二治疗开关启动子(TSP-2)的控制下的第二转录因子序列例如LTF,其中由所述第一转录因子序列和所述第二转录因子序列编码的蛋白质相互作用

用,以形成蛋白质复合物(LDTFC),即“双开关”-或基于“二杂交物”的基因开关。第一TSP和第二TSP可以相同或不同。在该实施例中,治疗分子表达所需的基因开关中两种不同TSP的存在增强了治疗方法的特异性(参见W02011/119773的图2)。W02011/119773的图2还证实了简单地通过插入适当的TSP来修饰治疗基因开关以治疗任何疾病、病症或状况的能力。

[0265] 在进一步的实施例中,第一转录因子序列和第二转录因子序列(例如CAP或LTF)均在单个治疗开关启动子(例如W0 2011/119773的图1中的TSP-1)的控制下。该启动子的激活将生成具有单个开放读码框的CAP和LTF两者。这可以通过使用转录接头如IRES(内部核糖体进入位点)来实现。在该实施例中,配体依赖性转录因子复合物的两个部分在TSP-1活化后合成。TSP-1可以是组成型启动子或仅在与疾病、病症或状况相关的条件下活化。

[0266] 在进一步的实施例中,一种转录因子序列例如LTF,在仅在与疾病、病症或状况相关的条件下激活的治疗开关启动子(例如,W0 2011/119773中的图4中的TSP-2或TSP-3)的控制下,并且其它转录因子序列例如CAP,在组成型治疗开关启动子的控制下(例如,W0 2011/119773中的图4中的TSP-1)。在该实施例中,配体依赖性转录因子复合物的一部分组成型存在,而第二部分仅在与疾病、病症或状况相关的条件下合成。

[0267] 在另一个实施例中,一种转录因子序列例如CAP,在第一TSP(例如,W0 2011/119773中的图3中的TSP-1)的控制下,并且两种或更多种不同的第二转录因子序列例如LTF-1和LTF-2在不同TSP(例如,W0 2011/119773中的图3中的TSP-2和TSP-3)的控制下。在该实施例中,每个LTF可以具有识别不同因子调节的启动子序列的不同DBD(例如,DBD-A结合与因子调节的启动子-1(FRP-1)相关的应答元件,并且DBD-B结合与因子调节的启动子-2(FRP-2)相关的应答元件。调节的启动子各自可以与不同的治疗基因可操作地连接。以这种方式,可以同时提供多重治疗。

[0268] 在一个实施例中,第一转录因子序列编码包含以下的多肽:AD、识别与其表达待调节的治疗产物序列相关的应答元件的DBD;以及组H核受体LBD,并且第二转录因子序列编码包含选自脊椎动物类视黄醇X受体(RXR)、无脊椎动物RXR、超螺旋蛋白(USP)或嵌合核受体的转录因子,所述嵌合核受体包含选自脊椎动物RXR、无脊椎动物RXR和USP的至少两种不同的核受体配体结合域多肽片段(参见W0 01/70816 A2和US 2004/0096942 A1)。“配偶体”核受体配体结合结构域还可以包含截短突变、缺失突变、取代突变或另一种修饰。

[0269] 在另一个实施例中,基因开关包含编码第一多肽的第一转录因子序列以及编码第二多肽的第二转录因子序列,所述第一多肽包含核受体LBD和识别与其表达待调节的治疗产物序列相关的应答元件的DBD,所述第二多肽包含AD和核受体LBD,其中核受体LBD之一是组H核受体LBD。在一个实施例中,第一多肽基本上不含AD,且第二多肽基本上不含DBD。出于本发明的目的,“基本上不含”意指所讨论的蛋白质不含所讨论的结构域的足够序列,以提供活化或结合活性。

[0270] 在本发明的另一个方面,第一转录因子序列编码包含异二聚化配偶体和AD(“CAP”)的蛋白质,并且第二转录因子序列编码包含DBD和LBD(“LTF”)的蛋白质。

[0271] 当仅一个核受体LBD是组H LBD时,另一个核受体LBD可以来自与组H LBD形成二聚体的任何其它核受体。例如,当组H核受体LBD是EcR LBD时,另一个核受体LBD“配偶体”可以来自EcR、脊椎动物RXR、无脊椎动物RXR、超螺旋蛋白(USP)或嵌合核受体,所述嵌合核受体包含选自脊椎动物RXR、无脊椎动物RXR或USP的至少两种不同的核受体LBD片段(参见W0

01/70816A2、国际专利申请号PCT/US02/05235、US 2004/0096942A1和美国专利号7,531,326,所述专利以引用的方式整体并入本文。“配偶体”核受体配体结合结构域还可以包含截短突变、缺失突变、取代突变或另一种修饰。

[0272] 在一个实施例中,脊椎动物RXR LBD来自人智人(*Homo sapiens*)、小鼠小家鼠(*Mus musculus*)、大鼠褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、鸡原鸡(*Gallus gallus*)、猪家猪(*Sus scrofa domestica*)、青蛙非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、被囊动物(*Polyandrocarpa misakiensis*)或水母箱形水母(*Tripedalia cysophora*) RXR。

[0273] 在一个实施例中,无脊椎动物RXR配体结合结构域来自蝗虫飞蝗超螺旋多肽(“LmUSP”)、硬蜱美洲钝眼蜱RXR同源物1(“AmaRXR1”)、硬蜱美洲钝眼蜱RXR同系物2(“AmaRXR2”)、招潮蟹RXR同系物(“CpRXR”)、甲虫黄粉虫RXR同源物(“TmRXR”)、蜜蜂(*Apis mellifera*) RXR同源物(“AmRXR”)、蚜虫烟蚜(*Myzus persicae*) RXR同系物(“MpRXR”)、或非双翅目/非鳞翅目RXR同源物。

[0274] 在一个实施例中,嵌合RXR LBD包含选自脊椎动物物种RXR多肽片段、无脊椎动物物种RXR多肽片段或非双翅目/非鳞翅目无脊椎动物物种RXR同源多肽片段的至少两个多肽片段。用于本发明中的嵌合RXR配体结合结构域可以包含至少两个不同物种的RXR多肽片段,或当物种相同时,两个或更多个多肽片段可以来自物种RXR多肽片段的两个或更多个不同同种型。例如,此类嵌合RXR LBD公开于WO 2002/066614中。

[0275] 在一个实施例中,嵌合RXR配体结合结构域包含至少一个脊椎动物物种RXR多肽片段和一个无脊椎动物物种RXR多肽片段。

[0276] 在另一个实施例中,嵌合RXR配体结合结构域包含至少一个脊椎动物物种RXR多肽片段和一个非双翅目/非鳞翅目无脊椎动物物种RXR同源物多肽片段。

[0277] 当与核受体的LBD组合时,所述LBD依次又与治疗产物序列相关的FRP的应答元件结合,配体提供治疗产物序列表达的外部时序调节。结合机制或其中本发明的各种组分彼此结合的次序,即例如配体与LBD、DBD与应答元件、AD与启动子等,并不重要。

[0278] 在一个具体例子中,配体与组H核受体的LBD及其核受体LBD配偶体的结合使得治疗产物序列能够表达。该机制不排除配体与组H核受体(GHNR)或其配偶体结合的可能性,以及所得到的活性同二聚体复合物(例如GHNR+GHNR或配偶体+配偶体)的形成。优选地,改变一个或多个受体结构域,产生杂合基因开关。通常,三个结构域DBD、LBD和AD中的一个或多个,可以选自与其它结构域的来源不同的来源,使得杂合基因和所得到的杂合蛋白质在所选择的宿主细胞或生物中进行优化用于反式激活活性、配体的互补结合和特定应答元件的识别。另外,应答元件本身可以用其它DNA结合蛋白质结构域的应答元件进行修饰或取代,例如来自酵母的GAL-4蛋白(参见Sadowski等人,Nature 335:563(1988))或来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的LexA蛋白(参见Brent等人,Cell 43:729(1985)),或者对于与此类特异性相互作用设计、修饰且选择的蛋白质靶向相互作用特异性的合成应答元件(参见例如,Kim等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:3616(1997)),以适应杂合受体。双杂交系统的另一个优点在于它们允许选择用于根据所需最终结果驱动基因表达的启动子。此类双重控制在基因治疗领域可能是特别重要的,尤其是当产生细胞毒性蛋白时,因为可以控制表达的时机以及表达在其中发生的细胞两者。当将与合适启动子可操作连接的基因引入受试者的细胞内之时,通过本发明系统的存在来控制外源基因的表达。启动子可以是组成型或诱

导型调节的,或者可以是组织特异性的(即,仅在特定类型的细胞中表达)或对生物的某些发育阶段特异性的。

[0279] 在配体的存在或不存在下,第一杂合蛋白的DNA结合结构域与应答元件的DNA序列结合,以在该应答元件的调节下起始或抑制下游基因的转录。

[0280] 功能性LDTFC,例如EcR复合物,还可以包括另外的蛋白质,例如亲免素。称为转录因子(例如DHR38或BFTZ-1)的核受体蛋白家族的另外成员也可以是配体依赖性的或关于EcR、USP和/或RXR的独立配偶体。另外,可能需要其它辅因子,例如一般称为共激活因子(也称为衔接子或介质)的蛋白质。这些蛋白质不与DNA序列特异性结合,且不涉及基础转录。它们可以通过各种机制发挥其对转录激活的作用,包括激活物的DNA结合的刺激,通过影响染色质结构、或通过介导激活物起始复合物相互作用。此类共激活因子的例子包括RIP140、TIF1、RAP46/Bag-1、ARA70、SRC-1/NCoA-1、TIF2/GRIP/NCoA-2、ACTR/AIB1/RAC3/pCIP以及混杂的共激活因子C应答元件B结合蛋白、CBP/p300(关于综述,参见Glass等人, Curr Opin Cell Biol.9:222(1997))。另外,可能需要一般称为辅阻遏物(也称为阻遏物、沉默子或沉默介质)的蛋白质辅因子,以在不存在配体的情况下有效抑制转录激活。这些辅阻遏物可以与无配体的EcR相互作用,以沉默在应答元件处的活性。目前的证据提示配体的结合改变了受体的构象,这导致辅阻遏物的释放和上述共激活因子的募集,从而取消了其沉默活性。辅阻遏物的例子包括N-CoR和SMRT(关于综述,参见Horwitz等人, Mol Endocrinol.10:1167(1996))。这些辅因子可以在细胞或生物内是内源的,或者可以作为转基因外源添加以受调节的或不受调节的方式表达。

[0281] B. 基于雷帕霉素的基因开关

[0282] 本发明还提供了基因开关系统,其利用FK506结合蛋白作为配体依赖性转录因子复合物和雷帕霉素作为配体。在一个实施例中,编码基因开关的构建体包含:

[0283] (a) 编码第一嵌合蛋白的第一多核苷酸,所述第一嵌合蛋白与雷帕霉素或其类似物结合,并且包含至少一个FK506结合蛋白(FKBP)结构域和与其异源的至少一个蛋白质结构域,其中所述FKBP结构域包含选自以下的肽序列:

[0284] (1) 天然存在的FKBP

[0285] (2) 天然存在的FKBP的变体,其中至多10个氨基酸残基已缺失、插入或用取代氨基酸替换,和

[0286] (3) 由DNA序列编码的FKBP,所述DNA序列与编码(1)或(2)的FKBP的DNA序列选择性杂交;

[0287] (b) 编码第二嵌合蛋白的第二多核苷酸,所述第二嵌合蛋白与(a)雷帕霉素或雷帕霉素类似物和(b)第一嵌合蛋白两者形成复合物,并且包含至少一个FKBP:雷帕霉素结合(FRB)结构域和与其异源的至少一个蛋白质结构域,其中所述FRB结构域包含选自以下的肽序列:

[0288] (4) 天然存在的FRB结构域,

[0289] (5) 天然存在的FRB结构域的变体,其中至多10个氨基酸残基已缺失、插入或用取代氨基酸替换,和

[0290] (6) 由DNA序列编码的FRB结构域,所述DNA序列与编码(4)或(5)的FRB的DNA序列选择性杂交。

[0291] 在该基因开关系统中,第一多核苷酸和第二多核苷酸各自处于如本文其它地方所述的一种或多种治疗开关启动子的控制下。此外,在某些实施例中,对于第一嵌合蛋白和第二嵌合蛋白中的FKBP和/或FRB结构域异源的至少一个蛋白质结构域可以是一个或多个“作用”或“效应子”结构域。效应子结构域可以选自广泛多样的蛋白质结构域,包括DNA结合结构域、转录激活结构域、细胞定位结构域和信号传导结构域(即,能够聚集或多聚化、触发细胞生长、增殖、分化、凋亡、基因转录等的结构域)。

[0292] 在某些实施例中,一种融合蛋白含有至少一个DNA结合结构域(例如,GAL4或ZFHD1DNA结合结构域),且另一种融合蛋白含有至少一个转录激活结构域(例如,VP16或p65转录激活结构域)。融合蛋白的配体介导的结合表示转录因子复合物的形成,并且导致与DNA序列连接的靶基因的转录起始,所述DNA序列被融合蛋白之一上的DNA结合域识别(即,能够与之结合)。关于基因表达系统以及配体的信息公开于美国专利号6,187,757;6,649,595;6,509,152;6,479,653;和6,117,680中。

[0293] 在其它实施例中,本发明提供了基因开关系统,其包含编码两种融合蛋白的多核苷酸,所述融合蛋白在不存在配体的情况下自聚集,其中(a)第一融合蛋白包含与所选择的配体和转录激活结构域结合的条件聚集结构域,并且(b)第二融合蛋白包含与所选择的配体和DNA结合结构域结合的条件聚集结构域,和(c)在不存在配体的情况下,细胞表达与调节DNA可操作地连接的基因,所述DNA结合结构域与所述调节DNA结合。包含基因开关系统的经修饰的细胞在配体的存在下以足以阻遏基因的量扩增。配体去除诱导编码蛋白质的表达,所述蛋白质导致细胞死亡。编码两种融合蛋白的核酸处于至少一种条件启动子的控制下。利用条件聚集结构域的基因表达系统公开于美国公开号2002/0048792中。

[0294] C.基于原核阻遏物/操纵子的基因开关系统

[0295] 在一个实施例中,本发明提供了基因开关系统,其包含(a)编码反式激活因子融合蛋白的第一多核苷酸,所述融合蛋白包含原核四环素(“tet”)阻遏物和真核转录激活蛋白结构域;以及(b)编码共济蛋白多肽的第二多核苷酸,其中所述第二多核苷酸与最小启动子和至少一个tet操纵子序列可操作地连接。编码反式激活因子融合蛋白的第一多核苷酸可以包含如本文其它地方所述的治疗性开关启动子。

[0296] 在另一个实施例中,基因开关系统包含来自细菌大肠杆菌的乳糖(“Lac”)阻遏物-操纵子系统。本发明的基因开关系统还可以包含(a)编码反式激活因子融合蛋白的第一多核苷酸,所述融合蛋白包含原核lac I阻遏物和真核转录激活因子蛋白质结构域;以及(b)编码共济蛋白多肽的第二多核苷酸,其中所述第二多核苷酸与基因开关启动子可操作地连接。在Lac系统中,lac操纵子在不存在乳糖或合成类似物如异丙基-b-D-硫代半乳糖苷的情况下失活。

[0297] 另外的基因开关系统包括下述中描述的那些:US7,091,038;W02004078924;EP1266015;US20010044151;US20020110861;US20020119521;US20040033600;US20040197861;US20040235097;US20060020146;US20040049437;US20040096942;US20050228016;US20050266457;US20060100416;W02001/70816;W02002/29075;W02002/066612;W02002/066613;W02002/066614;W02002/066615;W02005/108617;US6,258,603;US20050209283;US20050228016;US20060020146;EP0965644;US 7,304,162;US7,304,161;MX234742;KR10-0563143;AU765306;AU2002-248500;和AU2002-306550。

[0298] D. 基因开关系统的组合

[0299] 本发明提供了包含两种或更多种基因开关系统的核酸组合物、经修饰的细胞和生物反应器,所述基因开关系统包含由有效量的一种或多种配体激活的不同配体依赖性转录因子复合物,其中所述两种或更多种基因开关系统包含第一基因开关和第二基因开关,这两者在与一种或多种配体结合后,选择性诱导一种或多种白介素多肽的表达。在本发明的范围内是基因开关系统的任何数目和/或组合。

[0300] 在一个实施例中,本发明提供了包含基因开关系统的核酸组合物,所述基因开关系统包含:

[0301] i. 包含多核苷酸的第一基因表达盒,所述多核苷酸编码第一

[0302] 杂合多肽,其包含:

[0303] 1. 反式激活结构域,其激活与编码共济蛋白多肽的多核苷酸可操作地结合的启动子;和

[0304] 2. 异二聚体配偶体结构域,

[0305] ii. 包含多核苷酸的第二基因表达盒,所述多核苷酸编码第二杂合多肽,其包含:

[0306] 1. DNA结合结构域,其识别与编码共济蛋白多肽的多核苷酸可操作地结合的因子调节的启动子;和

[0307] 2. 配体结合域;和

[0308] iii. 包含编码共济蛋白多肽的多核苷酸的第三基因表达盒,所述第三基因表达盒包含:

[0309] 1. 诱导型启动子,其被第二杂合多肽的反式激活结构域激活;和,

[0310] 2. 编码所述共济蛋白多肽的多核苷酸。

[0311] 在某些实施例中,两种或更多种基因开关系统的组合可以是(1)基于双开关蜕皮激素受体的基因表达系统和(2)基于单开关蜕皮激素受体的基因开关。在其它实施例中,组合可以是(1)基于单开关或双开关蜕皮激素受体的基因开关和(2)基于雷帕霉素的基因开关。可替代地,基因开关系统的组合可以是上文公开的两种相同的基于雷帕霉素的基因开关系统。基因开关系统的任何可能组合都在本发明的范围内。双开关蜕皮激素系统的例子可以在例如WO 2002/29075和US 2002/0110861中找到。

[0312] E. 其它基因开关

[0313] 在本发明的另一个方面,本发明的基因表达盒掺入cumate开关系统,其通过CymR阻遏物起作用,所述CymR阻遏物以高亲和力结合cumate操纵子序列。(SparQ™ Cumate Switch, System Biosciences, Inc.)。通过添加cumate(与CymR结合的无毒小分子)来缓和阻遏。该系统具有动态可诱导性,可以精细调节并且是可逆的和可诱导的。

[0314] 在本发明的另一个方面,本发明的基因表达盒掺入核糖开关,其是结合效应子的信使RNA分子的调节区段,导致由mRNA编码的蛋白质生产中的变化。含有核糖开关的mRNA直接涉及响应其效应分子的浓度而调节其自身活性。效应子可以是源自嘌呤/嘧啶、氨基酸、维生素或其它小分子辅因子的代谢产物。这些效应子充当核糖开关传感器的配体或适体。Breaker, RR. Mol Cell. (2011) 43 (6) :867-79.

[0315] 在本发明的另一个方面,本发明的基因表达盒掺入基于生物素的基因开关系统,其中所述细菌阻遏蛋白TetR与链霉抗生物素蛋白融合,所述链霉抗生物素蛋白与合成生物

素化信号AVITAG相互作用,所述AVITAG与VP16融合以激活基因表达。AVITAG肽的生物素化受细菌生物素连接酶BirA调节,因此使配体反应性成为可能。Weber等人(2007) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 104,2643-2648;Weber等人(2009) *Metabolic Engineering*,11(2):117-124。

[0316] 可以用作本发明的部分的另外基因开关系统是本领域众所周知的,包括但不限于以引用的方式并入本文的Auslander和Fussenegger, *Trends in Biotechnology* (2012),31(3):155-168中描述的那些。

[0317] 基因开关配体

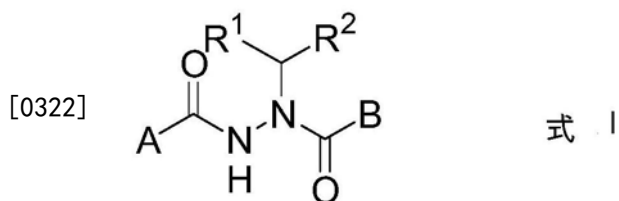
[0318] 如本文使用的,如应用于基因开关(例如,基于EcR的基因开关)的术语“配体”,描述了具有激活基因开关以刺激其中编码的多肽表达的能力的小分子和可溶性分子。本发明的配体依赖性转录因子复合物的配体结合蛋白质复合物,所述蛋白质复合物包含配体结合结构域、异二聚体配偶体结构域、DNA结合结构域和反式激活结构域中的一种或多种。激活配体依赖性转录因子复合物的配体的选择取决于所利用的基因开关的类型。

[0319] 配体的例子包括但不限于蜕皮类固醇,例如蜕皮激素、20-羟基蜕皮激素、松甾酮A、米乐甾酮A等等,9-顺式-视黄酸,视黄酸的合成类似物,N,N'-二酰基肼,例如美国专利号6,013,836;5,117,057;5,530,028;和5,378,726以及美国公开申请号2005/0209283和2006/0020146中公开的那些;如美国公开申请号2004/0171651中所述的噁二唑啉;二苯甲酰基烷基氨基肼,例如欧洲申请号461,809中公开的那些;N-烷基-N,N'-二芳酰基肼,例如美国专利号5,225,443中公开的那些;N-酰基-N-烷基羰基肼,例如欧洲申请号234,994中公开的那些;N-芳酰基-N-烷基-N'-芳酰基肼,例如美国专利号4,985,461中所述的那些;氨基酮,例如美国公开申请号2004/0049037中所述的那些;所述专利各自以引用的方式并入本文,并且其它类似的材料包括3,5-二叔丁基-4-羟基-N-异丁基-苯甲酰胺、8-O-乙酰哈巴昔、氧固醇、22(R)羟基胆固醇、24(S)羟基胆固醇、25-环氧胆固醇、T0901317、5- α -6- α -环氧胆固醇-3-硫酸酯(ECHS)、7-酮胆固醇-3-硫酸酯、法呢醇、胆汁酸、1,1-二磷酸酯、保幼激素III等等。可用于本发明中的二酰基肼配体的例子包括RG-115819(3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-乙基-2,2-二甲基-丙基)-N'-(2-甲基-3-甲氧基-苯甲酰基)-酰肼)、RG-115932((R)-3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-叔丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲酰基)-酰肼)和RG-115830(3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-叔丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲酰基)-酰肼)。参见例如,作为US 2009/0163592公开的美国专利申请序列号12/155,111和PCT申请号PCT/US2008/006757,这两者均以引用的方式整体并入本文。

[0320] 例如,基于蜕皮激素受体的基因开关的配体可以选自任何合适的配体。天然存在的蜕皮激素或蜕皮激素类似物(例如,20-羟基蜕皮激素、米乐甾酮A、松甾酮A、松甾酮B、松甾酮C、26-碘代松甾酮A、牛膝甾酮或26-mesylinokosterone)和非类固醇诱导剂均可以用作本发明的基因开关的配体。美国专利号6,379,945B1描述了从烟芽夜蛾中分离出的昆虫类固醇受体("HEcR"),其能够充当响应类固醇和某些非类固醇诱导剂两者的基因开关。在这个系统以及响应类固醇和某些非类固醇诱导剂两者的许多其它系统中,由于多种原因,非类固醇诱导剂具有优于类固醇的明显优点,所述原因包括例如:较低的制造成本,代谢稳定性,昆虫、植物或哺乳动物中不存在,以及环境可接受性。美国专利号6,379,945B1描述了两种二苯甲酰肼、1,2-二苯甲酰基-1-叔丁基-肼和虫酰肼(N-(4-乙基苯甲酰基)-N'-(3,5-

二甲基苯甲酰基)-N'-叔丁基-胍)作为基于蜕皮激素的基因开关的配体的用途。本发明还包括作为配体的是其它二苯甲酰胍,例如美国专利号5,117,057B1中公开的那些。在美国专利号6,147,282中还公开了虫酰胍作为来自黑腹果蝇的蜕皮激素受体的化学配体的用途。蜕皮激素配体的另外的非限制性例子是3,5-二叔丁基-4-羟基-N-异丁基-苯甲酰胺、8-O-乙酰哈巴苷、1,2-二酰基胍、N'-取代-N,N'-二取代胍、二苯甲酰基烷基氨基胍、N-取代-N-烷基-N,N-二芳酰基胍、N-取代-N-酰基-N-烷基、羰基胍或N-芳酰基-N'-烷基-N'-芳酰基胍。(参见美国专利号6,723,531)。

[0321] 在一个实施例中,基于蜕皮激素的基因开关系统的配体是二酰基胍配体或手性二酰基胍配体。基因开关系统中使用的配体可以是式I的化合物



[0323] 其中

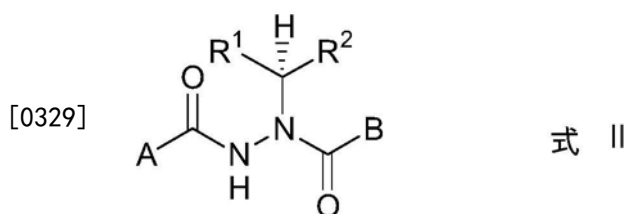
[0324] A是烷氧基、芳基烷氧基或芳氧基;

[0325] B是任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;和

[0326] R¹和R²是独立地任选取代的烷基、芳烷基、羟烷基、卤代烷基、任选取代的环烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;

[0327] 或其药学可接受的盐、水合物、结晶形式或无定形形式。

[0328] 在另一个实施例中,配体可以是富含对映体的式II化合物



[0330] 其中

[0331] A是烷氧基、芳基烷氧基、芳氧基、芳烷基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;

[0332] B是任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;和

[0333] R¹和R²独立地是任选取代的烷基、芳烷基、羟烷基、

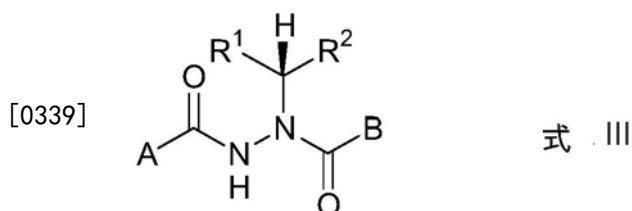
[0334] 卤代烷基、任选取代的环烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;

[0335] 条件是R¹不等于R²;

[0336] 其中在具有R¹和R²的不对称碳原子处的绝对构型占优势地是S;

[0337] 或其药学可接受的盐、水合物、结晶形式或无定形形式。

[0338] 在某些实施例中,配体可以是富含对映体的式III化合物



[0340] 其中

[0341] A是烷氧基、芳基烷氧基、芳氧基、芳烷基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；

[0342] B是任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；和

[0343] R¹和R²是独立地任选取代的烷基、芳烷基、羟烷基、卤代烷基、任选取代的环烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；

[0344] 条件是R¹不等于R²；

[0345] 其中在具有R¹和R²的不对称碳原子处的绝对构型占优势地是R；

[0346] 或其药学可接受的盐、水合物、结晶形式或无定形形式。

[0347] 在一个实施例中，配体可以是具有至少95%对映体过量的(R)-3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-叔丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲酰基)-肼或其药学可接受的盐、水合物、结晶形式或无定形形式。

[0348] 当与基于蜕皮激素的基因开关系统一起使用时，式I的二酰基肼配体和式II或III的手性二酰基肼配体提供了用于调节本发明的共济蛋白多肽的外部时序表达的手段。参见于2008年5月29日提交、作为US 2009/0163592公开的美国申请号12/155,111，其完全以引用的方式并入本文。

[0349] 用于本发明中的配体可以形成盐。如本文使用的，术语“盐”指示与无机和/或有机酸和碱形成的酸性盐和/或碱性盐。另外，当式I、II或III的化合物含有碱性部分和酸性部分两者时，可以形成两性离子（“内盐”）并且包括在如本文使用的术语“盐”内。使用药学可接受的（即，无毒的、生理学可接受的）盐，尽管其它盐也用于例如制备过程中可以采用的分离或纯化步骤中。可以例如通过使化合物与一定量的酸或碱（例如等量）在介质如盐在其中沉淀的介质或水性介质中反应，然后冻干而形成式I、II或III化合物的盐。

[0350] 含有碱性部分的配体可以与各种有机酸和无机酸形成盐。示例性的酸加成盐包括乙酸盐（例如由乙酸或三卤乙酸形成的那些，例如三氟乙酸）、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐（由盐酸形成）、氢溴酸盐（由溴化氢形成）、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐（由马来酸形成）、甲磺酸盐（由甲磺酸形成）、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、草酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐（例如由硫酸形成的那些）、磺酸盐（例如本文提到的那些）、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐（toluenesulfonate）例如甲苯磺酸盐（tosylate）、十一烷酸盐等等。

[0351] 含有酸性部分的配体可以与各种有机碱和无机碱形成盐。示例性碱性盐包括铵盐，碱金属盐如钠盐、锂盐和钾盐，碱土金属盐如钙盐和镁盐，由有机碱（例如有机胺）如苄

星青霉素、二环己胺、羟胺(由N,N-双(脱氢枞基)乙二胺)、N-甲基-D-葡萄糖胺、N-甲基-D-葡萄糖酰胺、叔丁胺形成的盐,以及由氨基酸如精氨酸、赖氨酸等等形成的盐。

[0352] 利用FK506结合结构域的诱导型基因表达系统的配体的非限制性例子是FK506、环孢菌素A或雷帕霉素。FK506、雷帕霉素及其类似物公开于美国专利号6,649,595B2和6,187,757中。还参见美国专利号7,276,498和7,273,874。

[0353] 本文所述的配体可以单独施用或作为包含药学可接受的载体的药物组合物的部分施用。在一个实施例中,药物组合物为溶液、悬浮液、片剂、胶囊、软膏、酞剂或可注射组合物的形式。

[0354] 现在将参考特定实例来描述本发明的某些实施例,所述实例仅提供用于说明本发明,且不应被解释为以任何方式进行限制。

[0355] 实例

[0356] 现在将描述本发明的某些方面,但不应解释为对本发明的限制。

[0357] 实例中使用的材料和方法

[0358] A. 矩阵设计和实验设计

[0359] 初始共济蛋白设计循环以三个阶段进行。首先,基于历史数据和专家考虑以及体内靶细胞类型(DRG)的文献优先选择部分。其次,配制完全析因矩阵。第三,在完全析因上进行D-优化实验设计。这导致揭示最大方差并且最快地导致预测模型开发的矩阵的子集。

[0360] 使用Design of Experiment算法设计且分析~80个构建体的组成型表达矩阵,具有启动子和5'/3'调节元件中的变化,以减少充分测试“高”和“中等”水平(潜在地分别代表超生理和生理水平)的FXN表达所需的构建体数目。如Greene等人(2005)中所述的FXN最小必需1,255bp启动子包括在矩阵中,以提供FXN表达的潜在生理水平。其它组成型启动子包括EF1a、UBC和PGK1。由原始矩阵的80生成五十个构建体。

[0361] 将矩阵减少至50个载体,其具有包括在表达筛选中的另外的阳性、超生理学表达对照:CAG-FXN-hGHpA和CMV-5U2-FXN-hGHpA。已知为非常强的启动子的CMV启动子不包括在矩阵中,因为已知其在体内随着时间过去沉默(McCown等人(1996)Brain Res.713:99-107; Klein等人(1998)Exp.Neurol.150:183-194;Paterna等人(2000)Gene Ther.7,1304-1311; Tenenbaum等人(2004)J.Gene Med.6(Suppl.1),S212-S222)。包括具有CAG(鸡β-肌动蛋白杂合体)启动子(也是强启动子)的CAG-FXN-hGHpA构建体作为比较物。CAG启动子还含有CMV早期增强子以及鸡β-肌动蛋白基因的第一个外显子和第一个内含子,以及兔β-珠蛋白基因的5'剪接受体。该杂合启动子以及它的其它变体照常规用于AAV基因治疗应用中(例如, Flotte等人(2011)Hum.Gene Ther.22:1239-1247;Maclachlan等人(2011)Mol.Ther.19:326-334;Perdomini等人(2014)Nature Med.20:542-547)。

[0362] 使用标准克隆技术构建50种基质载体和对照。将基质载体和对照生成到AAV主链内,其中将表达盒插入两个AAV反向末端重复(ITR)序列之间,这对于将基因组包装到所选择的AAV衣壳血清型内是必需的。构建体还包括范围为1,001bp至2,500bp的非编码“填充”序列,以使基因组大小达到~4.2kb,这对于衣壳包装是最佳的。使用下一代测序技术,包括来自Illumina的Nextera XT DNA制备试剂盒,伴随一些修改,对构建体进行完全序列验证。这些中的子集在本文中呈现并且在表1中列出。

[0363] B. 转染程序、测定和分析

[0364] 在第0天时,将冷冻的SY5Y细胞(European Collection of Cell Cultures,由Public Health England操作的ECACC),Sigma目录#94030304;批号#13C014)接种在原始烧瓶中,并且在37℃、5%CO₂、饱和湿度下温育。分开地,将冷冻的FA成纤维细胞(Coriell;目录#GM03816)接种在原始烧瓶中,并且在37℃、5%CO₂、饱和湿度下温育。

[0365] 在第3天时,当SY5Y和成纤维细胞为75%汇合时,抽吸每个烧瓶的培养基,并且用10mL DPBS(Gibco,不含钙、镁,目录#14190)将细胞冲洗一次,然后将它们重悬浮于3mL胰蛋白酶-EDTA(0.25%,Gibco目录#25200)中,并且将它们在RT下温育3分钟。加入5mL培养基以中和每个烧瓶中的胰蛋白酶。将细胞从每个T75烧瓶收集到15mL Falcon管内,并且在Sorval台式离心机中以1000rpm在RT下离心5分钟。弃去上清液,并且将细胞重悬浮于2mL新鲜培养基中。轻轻搅动细胞以破碎任何团块。然后将细胞以1:2分开,并且将1mL细胞悬浮液各自加入4个T75烧瓶中。

[0366] C. 转染

[0367] 在第0天时,4.0x10⁴个活SY5Y和FA成纤维细胞在0.4mL培养基/孔的四块48孔组织培养处理的板中铺平板。通过抽吸且弃去培养基,用10mL DPBS冲洗每个烧瓶一次,抽吸且弃去DPBS,将细胞重悬浮于3mL胰蛋白酶-EDTA中,并且将它们在RT下温育3分钟,来收集细胞。然后加入5mL培养基,以中和每个烧瓶中的胰蛋白酶,并且将细胞收集到15mL Falcon管内,并且在Sorval台式离心机中以1000rpm在RT下离心5分钟。弃去上清液,并且将细胞重悬浮于2mL新鲜成纤维细胞培养基中,并且合并来自2种细胞类型各自的细胞(成纤维细胞与SY5Y分开)。轻轻搅动细胞以破碎任何团块。

[0368] 通过将10μL细胞悬浮液加入90μL稀释的台盼蓝中来计数细胞,并且在将细胞装载到血球计数器上以计数细胞之前轻轻混合。我们获得了活/死:6.5x 10⁶个细胞/mL的SY5Y和1.8x 10⁶个细胞/mL的FA成纤维细胞,其中存活率:对于SY5Y为83/85=97.6%,并且对于FA成纤维细胞为82/85=96.5%。

[0369] 然后将4.0x10⁴个SY5Y细胞和FA成纤维细胞在含有0.4mL新鲜DMEM/F12培养基(Gibco,目录#11320-033,补充有10%热灭活的胎牛血清(FBS)(Atlanta Bio,目录#S11550H)的48孔板的每个孔中铺平板。将板左右以及前后摇动,以使细胞均匀分布。板在37℃、5%CO₂、饱和湿度下温育过夜。

[0370] 对于FA成纤维细胞,在第1天时,观察细胞的汇合和一般外观。制备用于FA成纤维细胞的DNA:TransfeX(1:1)复合物。标记关于每种质粒的一个管,并且每种质粒有3个管。将TransfeX、质粒DNA和Opti-MEM I Reduced-Serum Medium(Gibco,目录#31985-062,聚有L-谷氨酰胺、w/HEPES、w/2.4g/L NaBicarb)加温至室温,并且轻轻涡旋以混合。将50μL Opti-MEM I Reduced-Serum Medium移液到无菌微量离心管内。每管加入适当体积的质粒DNA(0.75μg DNA),并且通过轻轻移液彻底混合。然后,将0.75μL TransfeX Reagent(ATCC,目录#ACS-4005)加入每个管中的稀释DNA混合物中。通过移液随后轻弹管来彻底混合TransfeX:DNA复合物。将TransfeX:DNA复合物在室温下温育15分钟。将管离心(短旋转)以迫使所有液体到Eppendorf管的底部。为了将转染复合物添加到FA成纤维细胞中,通过将复合物逐滴添加到孔的不同区域(50μL混合物到三个一式三份孔中的每一个),将复合物分配到细胞中。将培养容器轻轻地前后和左右摇动,以使TransfeX:DNA复合物均匀分布并且温育~72小时。

[0371] 对于SY5Y细胞,在第1天时,制备DNA:Fugene 6 (1:3) 复合物。标记关于每种质粒的一个管,并且每种质粒有3个管。将FuGene 6、质粒DNA和Opti-MEM I Reduced-Serum Medium加温至室温,并且轻轻涡旋以混合。将50 μ L Opti-MEM I Reduced-Serum Medium移液到无菌微量离心管内。然后将2.25 μ L Fugene6试剂(Promega,目录#2692)加入每个管中的培养基中,并且温育5分钟。每管加入适当体积的质粒DNA(0.75 μ g DNA),并且通过轻轻移液彻底混合。通过移液随后轻弹管来彻底混合转染试剂/培养基/DNA复合物。将复合物在室温下温育15分钟。将管离心(短旋转)以迫使所有液体到Eppendorf管的底部。为了将转染复合物添加到SY5Y细胞中,通过将复合物逐滴添加到孔的不同区域(50 μ L混合物到三个一式三份孔中的每一个),将复合物分配到细胞中。将培养容器轻轻地前后以及左右摇动,以使转染复合物均匀分布并且温育~72小时。

[0372] 在第4天时,(视觉上)验证GFP荧光信号,并且在细胞裂解缓冲液(对于每10mL细胞裂解缓冲液:200 μ L (50X细胞提取增强剂)+2mL (5X细胞提取缓冲液)+7.8mL (DI水,Gibco,目录#A12873)+1片蛋白酶抑制剂/EDTA (Roche,目录#04693159001)中裂解细胞。简言之,抽吸来自四块48孔板的每个孔的上清液,并且将细胞用冷冻的1X PBS洗涤两次(所有步骤都在冰上执行)。冷冻的裂解缓冲液以150 μ L/孔加入。使用P1000尖端的底部刮取每个孔中的细胞,以确保细胞裂解。具有在裂解缓冲液中的细胞的板在4 $^{\circ}$ C下在振荡器上温育30分钟。通过上下移液而不形成泡沫来收集细胞裂解产物,并且加入微量离心管中。裂解产物在4 $^{\circ}$ C、18,000rpm下离心20分钟。然后将细胞裂解产物转移到新的微量离心管中,并且在-800C下贮存直至准备用于共价蛋白ELISA(参见下文)中。

[0373] 在第5天时,使用Micro BCA Assay Protocol (Pierce,目录#23235;批号#PK 207908),按照制造商的说明书,测定用FXN基质转染的SY5Y和FA成纤维细胞裂解产物的总蛋白浓度。

[0374] 在第6天时,使用FXN ELISA (FRATAXIN Human Simple Step ELISA,Abcam ab176112),根据制造商的推荐,测定FXN基质转染的SY5Y和FA成纤维细胞样品中的FXN含量,除了所有样品和标准都在1X PBS中稀释之外。简言之,根据Abcam Kit的制造商说明书制备试剂、工作标准和样品。在使用前,将所有材料和试剂都平衡至室温。所有标准、对照和样品都一式两份运行。

[0375] 将每种样品或标准的50 μ L等分试样将加入适当的孔中。按照制造商的说明书,基于从微量BCA测定(Pierce,目录#23235;批号#PK 207908)获得的总蛋白浓度数据,1:150稀释SY5Y细胞裂解产物,并且1:50稀释FA成纤维细胞。将Antibody Cocktail (Frataxin ELISA试剂盒中提供的1X Capture Antibody加上1X Detector Antibody,并且按照制造商的说明书制备)的50 μ L等分试样加入每个孔中。将板密封并且在室温下在设定为400rpm的板振荡器上温育1小时。通过从孔中抽吸或倾析,然后将350 μ L 1X Wash Buffer PT分配到每个孔内,用3x 350 μ L 1X Wash Buffer PT (Frataxin ELISA试剂盒中提供的缓冲液,并且按照制造商的说明书制备)来洗涤每个孔。最后一次洗涤后,将板倒置并且用干净的纸巾吸干,以去除多余的液体。向每个孔中加入100 μ L TMB底物,并且在设定为400rpm的板振荡器上在黑暗中温育10分钟。然后向每个孔中加入100 μ L停止溶液。将板在板振荡器上振荡1分钟以混合。记录每个孔在450nm处的OD作为终点读数。

[0376] 质粒:构建体描述于表1中。所有构建体都含有范围为1001至3000bp的填充物,以

确保用于AAV的最佳基因组包装大小。

[0377] 表1. 所选构建体

编号/名称	组合物*		
	启动子	5' Reg	3' Reg
CMV	CMV (SEQ ID NO:13)	5U2 (SEQ ID NO:4)	hGHpA (SEQ ID NO:5)
012	UBC (SEQ ID NO:3)	FTH1-5'UTR (SEQ ID NO:14)	SV40 早期 (SEQ ID NO:8)
017	UBC (SEQ ID NO:3)	FTH1-5'UTR (SEQ ID NO:14)	SV40 晚期 (SEQ ID NO:9)
020	UBC (SEQ ID NO:3)	GAPDH (SEQ ID NO:15)	其它
021	UBC (SEQ ID NO:3)	RPL6-5'剪接 (SEQ ID NO:16)	其它
[0378] 023	UBC (SEQ ID NO:3)	GAPDH (SEQ ID NO:15)	合成的 3'调节元件 (SEQ ID NO:7)
024	UBC (SEQ ID NO:3)	5U2 (SEQ ID NO:4)	合成的 3'调节元件 (SEQ ID NO:7)
025	UBC (SEQ ID NO:3)	RPL6-5'剪接 (SEQ ID NO:16)	合成的 3'调节元件 (SEQ ID NO:7)
026	UBC (SEQ ID NO:3)	5U2 (SEQ ID NO:4)	hGHpA (SEQ ID NO:5)
034	PGK1 (SEQ ID NO:17)	GAPDH (SEQ ID NO:15)	SV40 晚期 (SEQ ID NO:9)
GFP	CMV (SEQ ID NO:13)	n/a	未知
模拟			

[0379] D. AAV5载体制造

[0380] 可以使用分子生物学领域众所周知的方法构建可用于本发明实践中的病毒颗粒，包括但不限于病毒、载体、病毒粒子、基因递送媒介物、rAAV、衣壳和空衣壳。携带转基因的病毒载体可以由编码转基因的多核苷酸、合适的调节元件和产生介导细胞转导的病毒蛋白所必需的元件组装。

[0381] 生物物质AAV5.hFXN是含有WT hFXN cDNA的重组腺相关病毒(rAAV)。基因插入物(例如‘转基因’)编码人共济蛋白蛋白质前体，其表达旨在增加受治疗的受试者中线粒体共济蛋白的量。从头化学合成载体中的hFXN cDNA，以匹配参考序列：NM_000144.4(在万维网

上URL ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000144处)中描述的正常人共济蛋白mRNA的序列。
[0382] 026构建体的描述:重组AAV5单链DNA载体的主要元件显示于图21中。载体元件在表3中更详细地描述。

[0383] 表3:单链DNA载体元件的描述。

[0384]

核苷酸碱基	元件标识符	描述
1-141	ITR	AAV2反向末端重复
142-191	未显示	限制性酶位点
192-762	UBC启动子	人泛素C (UBC) 启动子
763-784	未显示	限制性酶位点
785-964	5U2	合成的5'调节元件
965-970	未显示	限制性酶位点
971-1609	hFXN GOI	人FXN cDNA
1610-1635	未显示	限制性酶位点
1636-2262	hGH-多聚A	人生长激素多聚A
2263-2283	未显示	限制性酶位点
2284-4533	ITR接头	合成接头
4534-4451	未显示	限制性酶位点
4452-4691	ITR	AAV2反向末端重复

[0385] rAAV5.hFXN质粒核苷酸序列 (SEQ ID NO:20) 的代表性例子显示于图20中。本发明的实施例包括但不限于rAAV5.hFXN质粒核苷酸序列 (SEQ ID NO:20) 的功能同源物。

[0386] 含有基因插入物的载体的代表性例子是显示于图19中的核苷酸序列 (SEQ ID NO:19)。该序列代表从左侧ITR开始到右侧ITR结束的pAAV5.hFXN质粒。本发明的实施例包括但不限于核苷酸序列 (SEQ ID NO:19) 的功能同源物。

[0387] 药物制剂

[0388] 生物产物rAAV5.hFXN载体在适合于鞘内注射的无菌缓冲溶液中配制。示例性组合物显示于表4和表5中。

[0389] 表4:AA5.hFXN载体产物的示例性组合物

[0390]

组分	浓度	功能
AAV5.hFXN	5×10^{13}	活性成分

[0391]

	vg/mL	模拟人脑脊髓液的主要化学离子种类、浓度和pH(7.3)的活性载体稀释物
NaCl	7,01 gm/L	
KCl	0,208 gm/L	
CaCl ₂	0.233 gm/L	
MgCl ₂	0.029 gm/L	
Na ₂ HPO ₄	1.10 gm/L	
NaH ₂ PO ₄	0.329 gm/L	
H ₂ O	适量 1.0 L	

[0392] 表5:AA5.hFXN载体产物的示例性组合物

[0393]	组分	浓度	功能
	AAV5.hFXN	2.5 x 10 ¹¹ vg/mL	活性成分
	NaCl	0.154M	pH (7.4)
	Na ₂ HPO ₄	0.056M	
	KH ₂ PO ₄	0.0106 M	

[0394] 表7:AA5.hFXN载体产物的示例性组合物

[0395]	组分	浓度	功能
	AAV5.hFXN	5 x 10 ¹³ vg/mL	活性成分
	NaCl	0.337M	pH (7.0)
	KCl	0.027 M	
	Na ₂ HPO ₄	0.015M	
	KH ₂ PO ₄	0.0015M	

[0396] 实例1

[0397] (A) 第1层筛选

[0398] 转染在48孔板中一式两份发生。对于每种构建体,合并来自两个孔的细胞,测定总蛋白水平(BCA),然后通过ELISA测定FXN水平。FXN水平针对总蛋白含量进行标准化,并且误差条表示ELISA测定重复。图1和图2中分别显示了未分化的SY5Y细胞和FA患者成纤维细胞中的FXN表达水平,其中构建体采用UBC启动子。图1和图2的小图A显示了pg FXN/ng总蛋白。图1和图2的小图B显示了超过模拟的FXN倍数。除了极少的例外,UBC (SEQ ID NO:3) 和EF1a (SEQ ID NO:18) 启动子在SY5Y和FA患者成纤维细胞中提供了更高水平的FXN表达(图2)。

[0399] (B) 第2层筛选

[0400] 转染在48孔板中一式三份进行,其中每孔具有分开的DNA/脂质制备物。图3和图4中显示的是来自第2层筛选的结果。评估来自UBC和EF1a启动子构建体的FXN表达(加上未包

括在第一次筛选中的两个最小FXN启动子构建体),并且将结果按5'调节元件分组。

[0401] (C) 第3层筛选

[0402] 基于来自初级(第1层)和次级(第2层)筛选的组合结果,选择14种FXN构建体用于进一步开发。对于两种细胞类型,来自第三级(第3层)筛选的第二次运行执行的结果显示于下文图5和图6中。

[0403] 实例2

[0404] 为了证实共济蛋白在细胞中的表达位点,在标准培养条件下在玻璃盖玻片上生长非洲绿猴成纤维细胞(COS-7)或鼠成纤维细胞(NC6)。去除培养基,并且细胞用1ml 3.7%福尔马林/磷酸盐缓冲盐水(PBS)在室温下固定10分钟。细胞用2ml PBS洗涤三次,每次10分钟,然后在室温下用封闭溶液(1ml 2%胎牛血清/0.2%Triton X-100/PBS)处理1小时。在40℃下与抗人共济蛋白抗体(在封闭溶液中1:500稀释,Abcam#ab11038)温育过夜后,细胞用PBS-T(0.2%Tween 20/PBS)洗涤三次,每次10分钟。然后将细胞与在封闭缓冲液中以1:500稀释的250ul第二检测抗体(Alexa Fluor 488Gt抗Ms IgG,Thermo Fisher#A-11017)在黑暗中在室温下温育1小时。用PBS-T三次10分钟洗涤后,将含有细胞的盖玻片面朝下置于显微镜载玻片上,所述载玻片具有一滴VectaShield Hard Set与核复染剂DAPI(Vector#H1500),并且通过共聚焦显微镜检查进行分析。在图7,小图A中,用DAPI染色核。在小图B中,用MitoTracker染色线粒体。小图C显示了用抗人共济蛋白的染色。合并的共定位显示于小图D中,并且证实共济蛋白在COS细胞(图7)和NC6细胞(图8)的线粒体中表达。

[0405] 实例3

[0406] 为了证实人共济蛋白在细胞中表达且正确加工,进行了下述实验。源自FA患者的诱导性多能干细胞(iPSC)可以分化成心肌细胞和神经细胞类型,在FA患者中受影响的特定细胞类型,并且维持减少的共济蛋白水平和三联体重复不稳定性(Liu等人(2011)Stem Cell Rev.7(3):703-713;Polak等人(2012)J.Vis.Exp.60:3416;Du等人(2012)J.Biol.Chem.287(35):29861-29872)。神经元细胞被称为FA-iPSC。FA(3816)第21天神经元用AAV5-人共济蛋白(026)以500,000个基因组拷贝/细胞进行转导。在转导后第5、7、10和14天,在具有蛋白酶抑制剂的被动裂解缓冲液(Promega#E1941)中收获神经元。使用超声处理分离来自细胞的总蛋白。使用Bradford方法计算蛋白质浓度。通过SDS-PAGE(Thermo Fisher#NW04120BOX,4-12%NuPage)分离每泳道30ug总蛋白。使用标准蛋白质印迹技术,用抗人共济蛋白抗体(Abcam#ab11038)检测人共济蛋白。加载分子量标记以确认成熟共济蛋白蛋白质的大小(14.2kDa)。图9小图A显示了在转导后第5天和第7天收获的第21天神经元(FA+),连同充当对照细胞(Ctrl)的源自正常患者的非转导细胞(FA)和IPSC。图9小图B显示了在转导后第10天和第14天收获的第21天神经元(FA+),连同充当对照细胞(Ctrl)的源自正常患者的非转导细胞(FA)和IPSC。结果显示人共济蛋白在FA-AAV5转导的细胞中表达且正确加工。

[0407] 图10显示了干细胞疗法的使用的示意图(改编自“Stem Cell Therapy:A Panacea or Perturbed Claim!”(2014年12月30日)(来源:stemcell.uct.ac.za)。

[0408] 实例4

[0409] 使用BioRad Gene Pulser Xcell电穿孔系统,用2μg DNA人共济蛋白DNA构建体,024或026,转染第8天iPSC。使用共济蛋白Protein Quantity Dipstick Assay(AbCam#

ab109881),在4天处理(第12天iPSC)后测定共济蛋白蛋白质表达,并且表示为共济蛋白抗体信号/mg总蛋白。通过将处理细胞中的平均共济蛋白浓度/信号除以模拟对照(GFP处理的)细胞中的共济蛋白浓度/信号,来计算共济蛋白表达中的倍数增加。图11显示了024和026两者均显示出分别大于3倍和3.5倍的平均共济蛋白浓度/信号。

[0410] 实例5

[0411] 以 3.75×10^5 个载体基因组(vg)/细胞的感染复数(MOI),用AAV5-人共济蛋白(AAV5-hFXN)024和026转导第8天iPSC。使用共济蛋白Protein Quantity Dipstick Assay (AbCam#ab109881),在4天处理(第12天iPSC)后测定共济蛋白蛋白质表达,并且表示为共济蛋白抗体信号/mg总蛋白。通过将处理细胞中的平均共济蛋白浓度/信号除以模拟对照(GFP处理的)细胞中的共济蛋白浓度/信号,来计算共济蛋白表达中的倍数增加。图12显示了024和026两者均显示出分别大于2.5倍和3.5倍的平均共济蛋白浓度/信号。

[0412] 实例6

[0413] 将AAV5-人共济蛋白载体以在 $3\mu\text{l}$ 中 7×10^9 vg的剂量直接注射到四只正常野生型(WT)小鼠的小脑(CB)内。在注射后4周,从处理的小鼠以及两只未处理的小鼠收获小脑。使用Human Frataxin Simple Step ELISA (Abcam#176112)分析组织裂解产物的人共济蛋白表达,并且标准化至pg共济蛋白/mg总蛋白。图13显示了对于024和026小脑裂解产物,分别检测到大于30ng和70ng的共济蛋白。在未处理的动物中未检测到人共济蛋白的表达(数据未显示)。

[0414] 实例7

[0415] 将AAV5-人共济蛋白载体以在 $3\mu\text{l}$ 中 7×10^9 vg的剂量通过脑室内注射施用到四只正常野生型(WT)小鼠内。在注射后4周,从处理的小鼠以及两只未处理的小鼠收获小脑(CB)、海马(HPC)和前皮质(ACX)。使用Human Frataxin Simple Step ELISA (Abcam#176112)分析组织裂解产物的人共济蛋白表达,并且标准化至pg共济蛋白/mg总蛋白。在未处理的动物中未检测到人共济蛋白的表达(数据未显示)。图14显示了共济蛋白的累积在024和026两者的海马中最大,然而,026显示在海马中的共济蛋白比024多8倍。

[0416] 实例8

[0417] AAV5.hFXN载体基因疗法的临床研究

[0418] 在含有标准药典赋形剂的无菌溶液中配制AAV5.hFXN载体。通过鞘内(IT)注射施用载体。总剂量为在10mL的最大体积中 5×10^{13} vg至 5×10^{14} vg,所述最大体积为大约200mL的人中平均脑脊髓液(CSF)体积的大约5%(参见D.Agamanolis 2013,Neuropathology:An illustrated interactive course for medical students and residents.第14章:Cerebrospinal Fluid.;Brown等人,“Molecular Mechanisms of Cerebrospinal Fluid Production.Neuroscience.”2004,129(4):957-970.)。

[0419] 阶段1,3+3单次递增剂量研究评估AAV5.hFXN在患有FA的成年患者中的安全性。将单剂量的AAV5.hFXN药物制剂鞘内施用于各3个受试者的连续群组。施用三个递增剂量的AAV5.hFXN,伴随在入选下一个更高剂量水平之前,通过独立DSMB的安全性审查。在剂量后24个月定期执行安全性和神经学评估。执行功能评价。

[0420] 使用可以将肠胃外药物递送到鞘内空间的Medtronic Model 8781 ASCENDA™ Intrathecal Catheter System。导管系统组件包括Medtronic泵和导管系统-在一般麻醉

或区域麻醉下执行的无菌外科手术中植入导管。将导管系统插入腰椎水平,在其中注射待施用的一半剂量,然后使用引导成像将导管旋入到小脑延髓池的水平,在其中注射剩余的一半剂量。

[0421] 研究了三种任选的剂量。在临床试验中测试的低剂量是 5×10^{13} vg。中间剂量是 1.5×10^{14} vg。高剂量是 5×10^{14} vg。非限制性示例性剂量显示于表6中。

[0422] 表6

[0423]

总载体剂量(vg)	总剂量-CSF 体积基础 (vg/mL)	总剂量-脑重量基础(vg/g)
5.0×10^{13}	2.5×10^{11}	3.7×10^{10}
1.5×10^{14}	7.5×10^{11}	1.11×10^{11}
5.0×10^{14}	2.5×10^{12}	3.7×10^{11}

[0424] 在研究药物施用后1、3、6和12个月收集功效数据。使用弥散张量成像和各种功能结果(包括但不限于FARS总体和FARS Neuro;25英尺步行测试评估;关于GAITRite Walkway System的评估;使用Biodex Balance System SD的评估;使用9孔插棒测试的评估)评估受试者中的疗效。扩散张量成像可以例如通过齿状核和DRG的T2弛豫测量和/或通过磁共振成像(MRS)的NAA水平和铁水平来测量。

[0425] 实例9

[0426] 用AAV5.hFXN载体基因疗法小脑内施用治疗弗里德赖希氏共济失调

[0427] 向患有弗里德赖希氏共济失调的30岁患者施用AAV5.hFXN载体药物制剂的 5.0×10^{13} (vg)总载体剂量(具有以pH 7.4的1X PBS的 2.5×10^{13} vg/mL)。该载体将hFXN基因递送到弗里德赖希氏共济失调患者的中枢神经系统内。药物制剂作为单次推注小脑内注射施用。注射速率由Medtronic SynchroMed®EL 18-mL泵控制。 5.0×10^{13} (vg)总载体剂量以0.001mL/分钟的速率和 2.5×10^{13} vg/mL的浓度施用。总体积=2mL。

[0428] 观察到相对于自然疾病进展的改善功能。FARS总得分和FARS Neuro得分从基线开始的增加随着时间过去而改善,并且到手术后6个月达到统计学显著性。患者的FARS总体和FARS Neuro、25英尺步行测试、GAITRite Walkway System、Biodex Balance System SD、9孔插棒测试得分的综合分析证实,早在基因治疗后6个月,总体和精细运动技巧中的统计学显著改善。关于运动技巧可见的显著治疗益处一般随着时间过去而继续。手术后,患者证实在其FARS总体和FARS Neuro、25英尺步行测试、GAITRite Walkway System、Biodex Balance System SD、9孔插棒测试得分中的一般持续增加。在剂量后24个月定期执行安全性和神经学评估。执行功能评价。总之,使用AAV病毒载体转移hFXN基因用于治疗弗里德赖希氏共济失调的本公开内容是实用和有效的。

[0429] 实例10

[0430] 用AAV5.hFXN载体基因疗法小脑内施用治疗弗里德赖希氏共济失调

[0431] 向患有弗里德赖希氏共济失调的30岁患者施用AAV5.hFXN载体药物制剂的 5.0×10^{14} (vg)总载体剂量(具有以pH 7.4的1X PBS的 2.5×10^{14} vg/mL)。该载体将hFXN基因递送到弗里德赖希氏共济失调患者的中枢神经系统内。药物制剂作为单次推注小脑内注射施

用。注射速率由Medtronic SynchroMed®EL 18-mL泵控制。 5.0×10^{14} (vg) 总载体剂量以0.01mL/分钟的速率和 2.5×10^{14} vg/mL的浓度施用。总体积=2mL。

[0432] 观察到相对于自然疾病进展的改善功能。FARS总得分和FARS Neuro得分从基线开始的增加随着时间过去而改善,并且到手术后6个月达到统计学显著性。患者的FARS总体和FARS Neuro、25英尺步行测试、GAITRite Walkway System、Biodex Balance System SD、9孔插棒测试得分的综合分析证实,早在基因治疗后6个月,总体和精细运动技巧中的统计学显著改善。关于运动技巧可见的显著治疗益处一般随着时间过去而继续。手术后,患者证实其在FARS总体和FARS Neuro、25英尺步行测试、GAITRite Walkway System、Biodex Balance System SD、9孔插棒测试得分中的一般持续增加。在剂量后24个月定期执行安全性和神经学评估。执行功能评价。总之,使用AAV病毒载体转移hFXN基因用于治疗弗里德赖希氏共济失调的本公开内容是实用和有效的。

[0433] 实例11

[0434] 用AAV5.hFXN载体基因疗法脑室内施用治疗弗里德赖希氏共济失调

[0435] 向患有弗里德赖希氏共济失调的25岁患者施用AAV5.hFXN载体药物制剂的 3.5×10^{12} vg总载体剂量(具有以pH 7.0的DPBS的 7×10^{12} vg/mL)。该载体将hFXN基因递送到弗里德赖希氏共济失调患者的中枢神经系统内。药物制剂作为单次推注脑室内注射施用于患者的CSF空间。注射速率由Medtronic SynchroMed®EL 18-mL泵控制。 3.5×10^{12} vg总载体剂量以0.001mL/分钟的速率和 7×10^{12} vg/mL的浓度施用。总体积=0.5mL。

[0436] 观察到相对于自然疾病进展的改善功能。FARS总得分和FARS Neuro得分从基线开始的增加随着时间过去而改善,并且到手术后6个月达到统计学显著性。患者的FARS总体和FARS Neuro、25英尺步行测试、GAITRite Walkway System、Biodex Balance System SD、9孔插棒测试得分的综合分析证实,早在基因治疗后6个月,总体和精细运动技巧中的统计学显著改善。关于运动技巧可见的显著治疗益处一般随着时间过去而继续。手术后,患者证实其在FARS总体和FARS Neuro、25英尺步行测试、GAITRite Walkway System、Biodex Balance System SD、9孔插棒测试得分中的一般持续增加。在剂量后24个月定期执行安全性和神经学评估。执行功能评价。总之,使用AAV病毒载体转移hFXN基因用于治疗弗里德赖希氏共济失调的本公开内容是实用和有效的。

[0437] 实例12

[0438] 用AAV5.hFXN载体基因疗法鞘内施用治疗弗里德赖希氏共济失调

[0439] 向患有弗里德赖希氏共济失调的30岁患者施用AAV5.hFXN载体药物制剂的 5.0×10^{14} (vg) 总载体剂量(具有以pH 7.4的1X PBS的 2.5×10^{14} vg/mL)。该载体将hFXN基因递送到弗里德赖希氏共济失调患者的中枢神经系统内。药物制剂作为单次推注小脑内注射施用于患者的CSF空间。将一半剂量施用于患者的腰椎,并且将一半剂量施用于患者的小脑延髓池。在一般麻醉或区域麻醉下执行的无菌外科手术中植入具有66cm脊柱区段的Medtronic Model 8781 ASCENDA™ Intrathecal Catheter System。将导管系统插入腰椎水平,在其中注射待施用的一半剂量,然后使用引导成像将导管旋入到小脑延髓池的水平,在其中注射剩余的一半剂量。注射速率由Medtronic SynchroMed®EL 18-mL泵控制。 5.0×10^{14} (vg) 总载体剂量以0.01mL/分钟的速率和 2.5×10^{14} vg/mL的浓度施用。总体积=2mL (1mL腰椎+1mL

小脑延髓池)。

[0440] 观察到相对于自然疾病进展的改善功能。FARS总得分和FARS Neuro得分从基线开始的增加随着时间过去而改善,并且到手术后6个月达到统计学显著性。患者的FARS总体和FARS Neuro、25英尺步行测试、GAITRite Walkway System、Biodex Balance System SD、9孔插棒测试得分的综合分析证实,早在基因治疗后6个月,总体和精细运动技巧中的统计学显著改善。关于运动技巧可见的显著治疗益处一般随着时间过去而继续。手术后,患者证实在其FARS总体和FARS Neuro、25英尺步行测试、GAITRite Walkway System、Biodex Balance System SD、9孔插棒测试得分中的一般持续增加。在剂量后24个月定期执行安全性和神经学评估。执行功能评价。总之,使用AAV病毒载体转移hFXN基因用于治疗弗里德赖希氏共济失调的本公开内容是实用和有效的。

[0441] 实例13

[0442] Sarsero共济蛋白缺陷小鼠模型

[0443] 参考JP Sarsero等人,“Human BAC-mediated rescue of the Friedreich ataxia knockout mutation in transgenic mice,”Mamm.Genome,2004May;15(5):370-82.FVB;B6.Tg(FXN);FXN-小鼠模型(#018299,The Jackson Laboratories)对于人FXN*500GAA转基因是半合子的,并且对于共济蛋白敲除等位基因是纯合的。因此,该小鼠对于鼠共济蛋白是空的,并且含有插入染色体5中的人共济蛋白基因(在第一个内含子中具有500个GAA重复)。该模型表达低水平的人共济蛋白(~10%),其援救小鼠中的致命性且类似于人中的共济蛋白减少,但不生成FA特征性的任何疾病表型。

[0444] A.方法

[0445] 小鼠用异氟烷进行麻醉,并且置于立体定位仪器(51725D Digital Just for Mice Stereotaxic Instrument,Stoelting,Wood Dale,IL)中。在颅骨中间做出切口,并且将周围的皮肤推回以扩大开口。在立体定向引导下,使用Dremel钻和牙用钻头在颅骨上钻出钻孔。小鼠接受2 μ L浓度为 7×10^{12} 载体基因组/mL的AAV5-FXN-026(N=7)或浓度为 4×10^{12} 载体基因组/mL的AAV5-GFP(对照)(N=3)的双侧小脑内注射,使用10 μ L Hamilton注射器与27规格钝头针/玻璃毛细管。使用常规增强的递送方法以2.5 μ L/分钟注射病毒。用尼龙(Ethilon®)缝合线关闭手术切口。可替代地,小鼠接受2 μ L浓度为 7×10^{12} vg/mL的AAV5-FXN-026(N=7)或浓度为 4×10^{12} vg/mL的AAV5-GFP(对照)(N=3)的双侧脑室内注射,使用10 μ L Hamilton注射器。在注射后4周,收获小脑。还收获来自两只未处理的对照小鼠的小脑组织。使用Human Frataxin Simple Step ELISA(Abcam#176112),特异性检测人共济蛋白的测定,分析组织裂解产物的人共济蛋白表达。

[0446] B.结果

[0447] 按照AAV5-FXN-026载体的不同施用途径,如图21中所示评估特定组织中的共济蛋白蛋白质表达。小脑中内源性共济蛋白蛋白质的可检测水平是来自掺入的人共济蛋白转基因表达的结果,所述转基因援救无效的鼠共济蛋白表型。在对小脑的实质内(IPc)施用后,观察到小脑中超过对照水平的大约7倍增加的共济蛋白蛋白质表达。在脑室内(ICV)施用后,存在小脑中超过对照水平的超过4倍增加的共济蛋白蛋白质表达。

[0448] C.结论

[0449] AAV5-FXN-026经由ICV施用使共济蛋白缺陷小鼠的小脑中的共济蛋白表达增加大

约4倍,并且在IPc注射后增加大约7倍。在FA的小鼠模型中,来自AAV5FXN-026的人共济蛋白质超过对照水平的表达增加提供了以下证据:AAV5-FXN-026中的DNA构建体中的启动子/调节元件在复杂的体内环境中是有功能的。假设在该小鼠模型中10%水平的正常共济蛋白表达,转导后达到的外源性共济蛋白水平将是正常的40-70%,并且在人中无症状的范围内。

[0450] 实例14

[0451] 在猪中的施用途径比较研究

[0452] 使用几个递送位置和装置在猪中研究测试制品AAV5-FXN-026的生物分布。三只雄性Yucatan猪的五个处理组经历外科手术,在其中接近给药部位(腰椎、腰椎和小脑延髓池、或齿状核)。在第0天时,经由腰椎中的脊髓穿刺针(组2)、腰椎和小脑延髓池中的Medtronic ASCENDA™导管(组3)、腰椎和小脑延髓池中的Alcyone Pulsar导管(组4)、齿状核中的脊髓穿刺针(组5)、或齿状核(组6)中的Alcyone MEMS套管(AMC™)施用测试制品。分别以 3×10^{13} (组2至4组)或 3×10^{12} (组5和组6)病毒基因组(vg)的剂量水平,以及2.2至2.3或0.12至0.146mL的剂量体积施用测试制品。一只动物充当对照,并且未经历外科手术或治疗(组1)。将动物维持 28 ± 1 天的恢复期。

[0453] 对于所有动物,每天两次进行关于发病率、死亡率、损伤以及食物和水的可用性的观察。在第-1天至第7天时每天一次以及其后每周一次,对于所有动物进行临床观察。在第-1周期间开始,每周对于所有动物测量且记录体重。对于测试前的所有动物进行体格检查。在研究终止时,执行尸检检查,并且通过qPCR分析来分析所选组织的测试制品浓度。

[0454] 生物分布结果在每组内和每组之间是可变的。在小脑的齿状核区域中的AAV5-FXN-026水平在接受直接输注到小脑内的那些动物中最高(组5和组6)。

[0455] A. 外科手术

[0456] 在第0天时,经由腰椎中的脊髓穿刺针(组2,以 3×10^{13} vg的2.2mL)、腰椎和小脑延髓池中的Medtronic ASCENDA™导管(组3,以 3×10^{13} vg的2.2mL)、腰椎和小脑延髓池中的Alcyone Pulsar导管(组4,以 3×10^{13} 至 3.14×10^{13} vg的2.2至2.3mL)、齿状核中的脊髓穿刺针(组5,以 3×10^{13} vg的0.12mL)、或齿状核(组6,以 2.71×10^{12} 至 3.04×10^{12} vg的0.13至0.146mL)中的Alcyone MEMS套管(AMC™)施用测试制品。一只动物充当对照,并且未经历外科手术或治疗(组1)。将动物维持 28 ± 1 天的恢复期。

[0457] (a). 组2-腰椎注射(脊髓穿刺针)

[0458] 将每只动物置于腹侧卧位。在紧靠L2-L3尾部的皮肤中做出切口。将14G脊髓穿刺针推进到L2-L3处的鞘内空间内。通过荧光成像和/或悬滴技术以及脑脊髓液(CSF)的回流来验证放置。获取针位置的荧光图像,并且用Omnipaque-300的造影剂注射验证导管放置。用1.5mL盐水冲洗针。将测试制品(2.2mL)抽吸入3cc注射器内,并且在48至72秒内给药。在注射完成后,允许至少1分钟的停留时间。取出针,并且使用可吸收缝合线、皮肤缝合器或皮肤胶的任何组合,以标准方式关闭切口。

[0459] (b). 组3-腰椎和小脑延髓池注射(Medtronic ASCENDA™, 8780型号导管)

[0460] 将每只动物置于腹侧卧位。在紧靠L3-L4尾部的皮肤中做出切口。将16G引入针推进到L3-L4处的鞘内空间内。

[0461] 通过荧光成像和/或悬滴技术以及CSF的回流来验证放置。获取针位置的荧光图

像,并且用Omnipaque-300的造影剂注射验证导管放置。Medtronic ASCENDA™导管在荧光引导下推进,其靶为小脑延髓池区域。将引入针从鞘内空间抽取出,并且用1.5mL盐水冲洗导管。将测试制品(2.2mL)抽吸入3cc注射器内。将测试制品的总体积的一半(1.1mL)在30秒内给药到小脑延髓池内,并且用1mL盐水冲洗。在荧光引导下,将导管重新定位在上腰椎区域(L1)中,并且在30至45秒内给药测试制品的总体积的另一半(1.1mL),并且用1mL盐水冲洗。然后取出导管,并且使用可吸收缝合线、皮肤缝合器或皮肤胶的任何组合,以标准方式关闭切口。

[0462] (c).组4-腰椎和小脑延髓池注射(Alcyone Pulsar Catheter)

[0463] 将每只动物置于腹侧卧位。在紧靠L3-L4尾部的皮肤中做出切口。将16G引入针推进到L2-L3或L3-L4处的鞘内空间内。通过荧光成像和/或悬滴技术以及CSF的回流来验证放置。获取针位置的荧光图像,并且用Omnipaque-300的造影剂注射验证导管放置。Alcyone Pulsar导管在荧光引导下推进到小脑延髓池区域。将引入针从鞘内空间抽取出,并且用1.5mL盐水冲洗导管。将测试制品(2.2mL)抽吸入3cc注射器内。将测试制品的总体积的一部分(1.1至1.4mL)在20至29秒内给药到小脑延髓池内,并且用1mL盐水冲洗。在荧光引导下,将导管重新定位至L1,并且在19至71秒内给药测试制品的总体积的另一半(0.9至1.1mL),并且用1mL盐水冲洗。然后取出导管,并且使用可吸收缝合线、皮肤缝合器或皮肤胶的任何组合,以标准方式关闭切口。

[0464] (d).组5-齿状核注射(22Ga脊髓穿刺针)

[0465] 将每只动物置于腹侧卧位。在延伸至颈部区域的颅骨背面上做出中线背切口。使颅骨底部暴露,并且将磁共振成像(MRI)基准置于左枕骨中,并且用骨蜡在适当的位置密封。用缝合线暂时关闭皮肤切口,并且将动物运送到MRI扫描仪用于小脑的冠状和矢状位成像。一旦收集MRI,就将其上传至Osirix MD用于靶向目的。将动物置于头部固定器框架中,并且重新打开切口。用钻孔器执行在颅骨右侧上的开颅术。基于来自Osirix的立体定位坐标,将22G 3.50英寸脊髓穿刺针(具有Quincke点的BD Spinal Needle)插入右小脑内的齿状核区域中。获取针位置的荧光图像,并且用Omnipaque-300的造影剂注射验证针放置。将测试制品(0.15mL)加载到微孔延伸装置内,并且放置30μL空气分离泡。微孔延伸的剩余部分填充有无菌盐水。在约12分钟内以10μL/分钟的速率输注测试制品(0.12mL)。在剂量完成后允许至少1分钟的停留时间。将骨蜡置于钻孔内。使用可吸收缝合线、皮肤缝合器或皮肤胶的任何组合,以标准方式关闭切口。

[0466] (e).组6-齿状核注射(Alcyone MEMS Cannula (AMC™))

[0467] 将每只动物置于腹侧卧位。在延伸至颈部区域的颅骨背面上做出中线背切口。使颅骨底部暴露,并且在颅骨的左侧上放置MRI基准。用缝合线暂时关闭皮肤切口,并且将动物运送到MRI扫描仪用于小脑的冠状和矢状位成像。一旦收集MRI,就将其上传至Osirix MD用于靶向目的。将动物置于头部固定器框架中,并且重新打开切口。用钻孔器执行在颅骨右侧上的开颅术。基于来自Osirix的立体定位坐标,将Alcyone MEMS Cannula插入右小脑内的齿状核区域中。获取导管尖端放置的荧光图像。在13至14分40秒内,以10μL/分钟的速率输注测试制品(0.13至0.146mL)。将骨蜡置于钻孔内。将骨蜡置于钻孔内。使用可吸收缝合线、皮肤缝合器或皮肤胶的任何组合,以标准方式关闭切口。

[0468] B.生物分布评估(qPCR)

[0469] 从所有存活动物的脑、背根神经节 (DRG) (颈椎、腰椎和胸椎)、肾 (左)、脊髓 (颈椎、腰椎和胸椎)、脾和肝 (左侧叶) 收集组织样品 (每器官100至200mg), 用于分析测试制品浓度。对于脑组织, 使用8mm圆形打洞器, 从维持侧向性的右半球和左半球两者取样; 样品取自小脑皮质区域 (以包括浦肯野细胞层)、齿状核、海马和运动皮质。用8mm圆形打洞器从腹角区域中的4至6mm轴向区段收集脊髓组织, 以包括白质和灰质两者。DRG作为由与收集的脊髓区段相关联的左和右神经节组成的对被收集。收集来自指定的每个脊柱区域的足够数目的DRG对, 以获得100至200mg组织。

[0470] 图22显示了来自小脑的每 μg 组织的DNA拷贝。图23显示了来自其它脑区域的每 μg 组织的DNA拷贝。图24显示了来自脊柱组织的每 μg 组织的DNA拷贝。图25显示了来自全身组织的每 μg 组织的DNA拷贝。在称重51.0至55.2kg的雄性Yucatan猪中, AAV5-FXN-026的鞘内和颅内施用是良好耐受的。生物分布结果在每组内和每组之间是可变的。在小脑的齿状核区域中的AAV5-FXN-026水平在接受直接输注到小脑内的那些动物中最高 (组5和组6)。一般而言, 用22Ga脊髓穿刺针的注射导致高小脑AAV5-FXN-026水平。鞘内递送, 无论是通过单次腰椎推注 (组2)、用Medtronic ASCENDA导管在中/下部和腰椎区域处的给药 (组3)、或用Alcyone Pulsar导管在高颈椎/小脑延髓池和腰椎区域两者处的给药, 导致可检测水平的AAV5-FXN-026。Alcyone Pulsar能够被推进到C1或小脑延髓池水平。

[0471] 实例15

[0472] 在猪中的小脑内耐受性和生物分布研究

[0473] 对猪的齿状核的直接注射评价了AAV5-FXN-026的生物分布。每组三只或六只雄性Yucatan猪的两个处理组经历外科手术, 其中在颅骨的开颅术后, 将单次输注的测试制品施用到小脑的齿状核内。在第0天时, 将测试制品以 1×10^{12} 病毒基因组 (vg) (56 μL) (低剂量) 或 3×10^{12} vg (167 μL) (高剂量) 的剂量水平施用于处理的动物。另一组一只雄性动物充当对照, 并且未接受测试制品, 也未经历外科手术; 在第0天时, 对该动物实施安乐死以提供对照组织。将动物维持 28 ± 1 天或 60 ± 4 天的恢复期。

[0474] 对于所有动物, 每天两次进行关于发病率、死亡率、损伤以及食物和水的可用性的观察。在第1天至第7天时每天一次然后其后每周一次, 进行临床观察。在第1周开始和在研究期间每周一次测量且记录体重。测试前进行体格检查。从测试前的所有动物中收集血液样品用于临床病理学评估。在测试前和每次尸检检查之前, 从所有动物中收集血液样品, 用于AAV5抗体的全血浓度的可能未来测定。对于组2和组3在测试前, 并且对于所有动物在每次尸检检查时, 收集脑脊髓液 (CSF) 的样品, 用于AAV5抗体的CSF浓度的可能测定。在研究终止时, 对每只动物实施安乐死并且进行尸检检查。对于所有动物收集血液和所选择的组织, 用于qPCR和共价蛋白蛋白质分析。另外, 对组1动物和组3动物之一进行蛋白质印迹分析。

[0475] 该研究的结果发现在单次输注到小脑内之后, AAV5-FXN-026在脑和脊髓各处的广泛和持久分布。在小脑中第28天相对于第60天的载体基因组拷贝 (vg DNA/ μg 组织DNA) 显示于图26中。在脑中第28天相对于第60天的载体基因组拷贝 (vg DNA/ μg 组织DNA) 显示于图27中。在脊髓和DRG中第28天相对于第60天的载体基因组拷贝 (vg DNA/ μg 组织DNA) 显示于图28中。在第28天, 在小脑、运动皮质和背根神经节中发现最高水平的载体基因组。到60天, AAV5-FXN-026仍存在于这些组织中, 尽管水平相对于28天降低。这些结果证实AAV5衣壳对CNS中的运动神经元束的亲和力。血液中的AAV5-FXN-026水平从在第28天时在大多数动物

中无法检测变成在第60天时在所有动物中可检测,与载体从CNS中清除一致。

[0476] 分析共济蛋白蛋白质的表达,收集来自小脑皮质、齿状核、海马和运动皮质的组织样品。经由ELISA的共济蛋白水平显示于图29中。低剂量动物显示超过共济蛋白的背景对照水平的可变增加。在剂量后第28天,共济蛋白水平在低剂量组织对照组织中增加1.5(小脑皮质)至6.4(海马)倍数。在剂量后28和60天,高剂量动物显示超过未处理的对照组织中注意到的水平增加大约2(运动皮质)和9(齿状核)倍的共济蛋白水平。这些结果证实用高剂量的AAV5-FXN-026处理后60天,共济蛋白蛋白质产生的持续增加。

[0477] 总的来说,该研究证实在将测试制品以 1×10^{12} 和 3×10^{12} vg的剂量直接输注到小脑后,导致对于运动神经元束具有亲和力的AAV5衣壳的广泛和持久的生物分布。

[0478] 实例16

[0479] 在灵长类动物中的28天的小脑内先导性耐受性和生物分布研究

[0480] 本研究评价了在食蟹猴(食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*))中的小脑内施用后,AAV5人共济蛋白载体AAV5-hFXN(026)的耐受性和生物分布。

[0481] 该研究基于目前的国际协调理事会(International Council on Harmonization)(ICH)三方协调指导原则(Harmonized Tripartite Guidelines)和普遍公认的药物化合物测试程序,并且根据美国农业部(United States Department of Agriculture)(USDA)的动物福利法(Animal Welfare Act)(9CFR Parts 1,2和3)和Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,Institute of Laboratory Animal Resources,National Academy Press,Washington,D.C.,2011。(参见“Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals,”ICH M3(R2),2009年6月11日,以及“Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals,”ICH S6(R1),1997年7月16日,(日期为2011年6月12日的附录))。

[0482] 每组三只雄性食蟹猴的两个处理组经历外科手术,其中在颅骨的开颅术后,将单侧或双侧输注的测试制品施用到小脑的齿状核内。在第1天时,将制品以每只动物 1.2×10^{12} (30 μ L)或 2.4×10^{12} (30 μ L/半球)病毒基因组(vg)的剂量水平施用于处理的动物。两只雄性动物的另外一组充当对照,并且接受对照制品,磷酸盐缓冲盐水(PBS),pH 7.4的双侧输注。将维持动物直至第29天 $\pm$ 1天尸检。

[0483] 对于所有动物,每天两次进行关于发病率、死亡率、损伤以及食物和水的可用性的观察。在第1天时开始每天一次进行临床观察。在给药前(第1天),剂量后24和48小时,以及剂量后7、14和28天,进行功能性观察组合(FOB)评价和神经学检查。在第1天时开始每周一次测量且记录体重。在测试前和尸检之前,从所有动物中收集血液样品用于临床病理学评估。在研究终止时,执行尸检检查,并且用显微镜检查组织。收集血液和所选择的组织,用于qPCR和共济蛋白蛋白质酶联免疫吸附测定(ELISA)分析。

[0484] 结果证实AAV5衣壳对于CNS中的运动神经元束的亲和力。通过ELISA分析用于脑组织的共济蛋白蛋白质表达后,在剂量后28天,共济蛋白水平在测试制品处理的动物中增加超过对照动物组织中注意到的水平大约2(小脑皮质)至14(齿状核)倍。测试制品的施用与脑膜内的脑膜单核细胞浸润相关,伴随在小脑膜血管周(血管周)的偶尔成簇。另外,在脑实质内也注意到最小的血管周单核浸润。单核细胞浸润是对病毒衣壳的预期的非不利组织应

答。

[0485] 总之，该研究的结果证实在测试制品AAV5-hFXN (026) 以 1.2×10^{12} vg和 2.4×10^{12} vg的剂量直接输注到小脑后，观察到对于运动神经元束具有亲和力的AAV5衣壳的广泛和持久的生物分布。共济蛋白表达在小脑的齿状核和皮质区域中是明显的，其中观察到组织共济蛋白水平相对于对照组织的一致增加。在第28天，在齿状核和小脑皮质中发现了最高水平的载体基因组。这些结果证实AAV5衣壳对于CNS中的运动神经元束的亲和力。这些结果还证实测试制品以至多 2.4×10^{12} vg剂量的小脑内注射是良好耐受的，并且在CNS各处良好分布。

[0486] 测试制品和对照制剂

[0487] 测试制品AAV5-hFXN (026) 以 4×10^{13} GC/mL的浓度进行配制，并且在给药前加温至室温和体温之间。对照制品是PBS，pH 7.4。

[0488] 动物获取

[0489] 总共九只雄性食蟹猴(食蟹猕猴)(在转移时大约3年10个月至4年5个月)

[0490] 随机化、分配至研究和维持

[0491] 使用按重量计的标准随机化程序，将八只雄性动物(在随机化时称重3.4kg至4.9kg)分配至如表8中鉴定的研究。将维持动物直至第29天±1天尸检。

[0492]

表 8 组分配				
组 编号	施用途径	处理	剂量 (vg)	雄性动物的数目
1	双侧小脑内注射	PBS, pH 7.4	0	2
2	单侧小脑内注射	AAV5-hFXN (026)	1.2×10^{12}	3
3	双侧小脑内注射	AAV5-hFXN (026)	2.4×10^{12}	3

[0493] 外科手术

[0494] 对照和测试制品经由单侧(组2)或双侧(组1和组3)小脑内输注将施用到齿状核的区域内。在第1天时，以每只动物 1.2×10^{12} (30μL) 或 2.4×10^{12} (30μL/半球) 病毒基因组(vg)的剂量水平，将制品施用于处理组(组2和组3)。对照组(组1)接受对照制品，磷酸盐缓冲盐水(PBS)，pH 7.4的双侧输注。将维持动物直至第29天±1天尸检。

[0495] 在麻醉诱导后，剃光头皮，并且将动物固定在磁共振成像(MRI)相容性立体定位框架(Kopf)中。进行基线MRI以确定靶，然后将动物运送到手术室。做出切口且反射皮肤。在适当的注射部位用K线和管状钻执行开颅术。基于立体定位坐标，将钝针(22号；3.5英寸；B&D；参考编号405181)插入右侧(和左侧，对于双侧施用)小脑中的齿状核区域内。经由荧光和造影剂注射确认针的放置。在附接给药管线之前，用无菌盐水冲洗针套。将对照或测试制品(每次输注30μL)加载到具有30μL空气分离泡的微孔延伸装置内。微孔延伸的剩余部分填充有无菌盐水。对照或测试制品以10μL/分钟输注9分钟，以解决针中的死空间。在输注完成后，将针留在原位至少2分钟。在取出针后，将骨蜡置于钻孔内，并且使用可吸收缝合线、皮

肤缝合器或皮肤胶的任何组合,以标准方式关闭切口。

[0496] 详细临床观察

[0497] 在研究期间每天一次执行每只动物的详细临床检查。有时,临时观察以不定期的间隔记录。观察包括但不限于评估皮肤、毛皮、眼、耳、鼻、口腔、胸部、腹部、外生殖器、四肢、呼吸和循环效应、自主效应如流涎和神经紧张系统效应(包括震颤、抽搐、对处理的反应性和异常行为)。

[0498] 生物分布评估(组织、血液和制剂)

[0499] 从脑(每只动物八个样品)、骨髓、心脏、肝、颈淋巴结和肾中收集血液和组织样品(每个样品大约100至200mg。对于脑组织,从维持侧向性的右半球和左半球两者取样。样品取自小脑皮质区域(且包括浦肯野细胞层),齿状核、海马和运动皮质的小脑区域。使用8mm打洞器活组织检查收集每个组织的切片,并且置于标记的2mL微量离心管中,在液氮中快速冷冻,然后置于干冰上直至在qPCR分析之前,冷冻贮存于-60至-90℃下。

[0500] 在手术的每一天时,通过针注射测试制品的一个样品(大约100μL),并且收集样品,置于干冰上,并且在用于测试制品浓度(vg/mL)的qPCR分析之前,贮存于-60至-90℃下。

[0501] 用于共济蛋白蛋白质分析的组织收集

[0502] 收集用于qPCR分析的来自脑区域的样品(至少50mg)被收集用于共济蛋白蛋白质ELISA分析。使用5mm圆形打洞器,从维持侧向性的右半球和左半球两者取样。

[0503] 关于线粒体中的共济蛋白定位的蛋白质印迹分析

[0504] 从一只组1(动物编号701)和所有组3动物中获取另外两个小脑皮质样品(大约100至300mg),用于可能的蛋白质印迹分析。

[0505] 在第1、2、3、7、14和28天时,由兽医工作人员执行神经学检查。评价颅神经应答、外周感觉和姿势/行为应答。在检查时,所有颅神经应答/反射和对浅表疼痛的应答都视为在正常限度内。在第1天时以 1.2×10^{12} vg或 2.4×10^{12} vg的剂量经由小脑内注射施用AAV5hFXN(026)的食蟹猴中,在第27天时的临床病理学终点中并未观察到测试物相关效应。

[0506] 在任一剂量水平下,不存在对血液学终点的测试制品相关作用。由于其可忽略不计的量级、剂量应答模式的缺乏和/或与生物学和程序相关变异的预期值的关系,血液学终点中的所有明显差异都不视为测试制品相关的。

[0507] 在任一剂量水平下,不存在对凝血时间(即APTT和凝血酶原时间)或纤维蛋白原浓度的测试制品相关作用。由于其可忽略不计的量级、剂量应答模式的缺乏和/或与生物学和程序相关变异的预期值的关系,凝固终点中的所有明显差异都不视为测试制品相关的。

[0508] 在任一剂量水平下,不存在对临床化学终点的测试制品相关作用。由于其可忽略不计的量级、剂量应答模式的缺乏和/或与生物学和程序相关变异的预期值的关系,临床化学终点中的所有明显差异都不视为测试制品相关的。

[0509] 不存在测试制品相关的宏观发现;所有动物的所有组织都视为在正常限度内。

[0510] AAV5-hFXN(026)相关的显微镜检查结果限制于接受 2.4×10^{12} vg(双侧注射)和 1.2×10^{12} vg(单侧注射,右侧)的动物中少量单核细胞浸润的存在。在同期对照动物中未观察到单核浸润。

[0511] 在大多数动物中,脑膜单核细胞的特征在于少量单核细胞在脑膜内的局部广泛累积,伴随在小脑膜血管周(血管周)的偶尔成簇。另外,在少量动物的脑实质内也注意到最小

的血管周单核浸润(在以 1.2×10^{12} vg的一只动物的右小脑皮质和右运动皮质切片中,以及在接受 2.4×10^{12} vg的单只动物的右小脑皮质或左运动皮质中)。单核细胞浸润与增加的IBA-1染色/免疫反应性相关和/或显示出增加的IBA-1染色/免疫反应性。单核细胞浸润是预期的发现,并且视为对病毒衣壳的非不利组织应答。

[0512] 结果和讨论

[0513] 共济蛋白蛋白质分析

[0514] 收集来自小脑皮质、齿状核、海马和运动皮质的组织样品,并且提交用于经由ELISA的共济蛋白水平的分析(图30)。该分析的结果发现媒介物对照动物中的共济蛋白的背景水平。共济蛋白水平作为超过对照动物中注意到的背景水平的相对增加进行讨论。组2中的动物接受在右小脑皮质中的单次注射,并且组3中的动物接受双侧注射。在剂量后第28天,注意到共济蛋白水平增加超过对照组织中注意到的水平的1.2至6.6(小脑皮质)和2.7至14.5(齿状核)倍。在剂量后28天,共济蛋白水平在海马和运动皮质中大致相等。这些结果虽然可变,但证实了在用作为小脑齿状核和小脑皮质中的单次注射或双侧注射的测试制品处理后,共济蛋白蛋白质产生超过28天的持续增加。

序列表

<110> 英特瑞克斯顿股份有限公司(Intrexon Corporation)

G • 鲁滨逊(Robinson, Gregory)

S • 肖尔(Schauer, Stephen Ezra)

D • 托马斯(Thomas, Darby Lorraine)

<120> 共济蛋白表达构建体

<130> INX00317PCT

<150> 62/419621

<151> 2016-11-09

<160> 20

<170> 专利版本3.5

<210> 1

<211> 210

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

Met Trp Thr Leu Gly Arg Arg Ala Val Ala Gly Leu Leu Ala Ser Pro
1           5           10           15
Ser Pro Ala Gln Ala Gln Thr Leu Thr Arg Val Pro Arg Pro Ala Glu
           20           25           30
Leu Ala Pro Leu Cys Gly Arg Arg Gly Leu Arg Thr Asp Ile Asp Ala
           35           40           45
Thr Cys Thr Pro Arg Arg Ala Ser Ser Asn Gln Arg Gly Leu Asn Gln
           50           55           60
Ile Trp Asn Val Lys Lys Gln Ser Val Tyr Leu Met Asn Leu Arg Lys
65           70           75           80
Ser Gly Thr Leu Gly His Pro Gly Ser Leu Asp Glu Thr Thr Tyr Glu
           85           90           95
Arg Leu Ala Glu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Ala Glu Phe Phe Glu Asp
           100          105          110
Leu Ala Asp Lys Pro Tyr Thr Phe Glu Asp Tyr Asp Val Ser Phe Gly
           115          120          125
Ser Gly Val Leu Thr Val Lys Leu Gly Gly Asp Leu Gly Thr Tyr Val
           130          135          140
Ile Asn Lys Gln Thr Pro Asn Lys Gln Ile Trp Leu Ser Ser Pro Ser
145          150          155          160
Ser Gly Pro Lys Arg Tyr Asp Trp Thr Gly Lys Asn Trp Val Tyr Ser
           165          170          175

```

His Asp Gly Val Ser Leu His Glu Leu Leu Ala Ala Glu Leu Thr Lys
 180 185 190
 Ala Leu Lys Thr Lys Leu Asp Leu Ser Ser Leu Ala Tyr Ser Gly Lys
 195 200 205

Asp Ala

210

<210> 2

<211> 633

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

atgtggactc tcgggcgccc cgtagtagcc ggctctctgg cgtcaccag cccagcccag 60
 gccagacccc tcacccgggt cccgcggccc gcagagttgg cccactctg cggccgcccgt 120
 ggcttgcgca ccgacatcga tgcgacctgc acgccccgcc gcgcaagttc gaaccaacgt 180
 ggctcaacc agatttggaa tgtcaaaaag cagagtgtct atttgatgaa tttagaggaa 240
 tctggaactt tgggccaccc aggctctcta gatgagacca cctatgaaag actagcagag 300
 gaaacgctgg actctttagc agagtttttt gaagacctg cagacaagcc atacacgttt 360
 gaggactatg atgtctcctt tgggagtggg gtcttaactg tcaaactggg tggagatcta 420
 ggaacctatg tgatcaacaa gcagacgcca aacaagcaaa tctggctatc ttctccatcc 480
 agtggacctc agcgttatga ctggactggg aaaaactggg tgtactccca cgacggcgtg 540
 tccctccatg agctgctggc cgtagagctc actaaagcct taaaaaccaa actggacttg 600
 tcttccttgg cctattccgg aaaagatgct tga 633

<210> 3

<211> 571

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

ggcctccgcg ccgggttttg ggcctcccc cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgctg 60
 ccacgtcaga cgaaggcgcg agcagagctc ctgaccttc cggccggacg ctcaggacag 120
 cggcccgctg ctcataagac tcggccttag aacccagta tcagcagaag gacatttttag 180
 gacgggactt gggtagctct agggcactgg ttttctttcc agagagcgga acaggcgagg 240
 aaaagtagtc ctttctcggc gattctgcgg agggatctcc gtggggcggt gaacgccgat 300
 gattatataa ggacgcgccc ggtgtggcac agctagtctc gtcgcagccg ggatttgggt 360
 cgcggttctt gtttgtggat cgtgtgatc gtcacttggg gagtagcggg ctgctgggct 420
 gggtagctgc gctcgggggt ggcgagtgtg ttttgtgaag ttttttaggc accttttgaa 480
 atgtaatcat ttgggtcaat atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa 540
 ttctggccgt ttttggcttt tttgttagac g 571

<210> 4

<211> 179

<212> DNA

<213> 智人

<400> 4

cgaagaaggt gagtaatctt aacatgctct tttttttttt ttttgctaata cccttttgtg 60
 tgctgatgtt aggatgacat ttacaacaaa tgtttgttcc tgacaggaaa aaccttgctg 120
 ggtaccttcg ttgccggaca cttcttgtcc tctactttgg aaaaaaggaa ttgagagcc 179

<210> 5

<211> 627

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

tgatgggtgg catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac 60
 tccagtgtccc accagccttg tcctaataaaa attaatgtgc atcattttgt ctgactaggt 120
 gtccttctat aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc aagttgggaa 180
 gacaacctgt agggcctgcg gggctctattg ggaaccaagc tggagtgcag tggcacaatc 240
 ttggctcact gcaatctccg cctcctgggt tcaagcgatt ctctgcctc agcctcccgga 300
 gttgttggga ttccaggcat gcatgaccag gctcagctaa tttttgtttt tttggtagag 360
 acgggggtttc accatatgtg ccaggctgggt ctccaactcc taatctcagg tgatctaccc 420
 accttggcct cccaaattgc tgggattaca ggcgtgaacc actgtctcct tccctgtcct 480
 tctgatttta aaataactat accagcagga ggacgtccag acacagcata ggctacctgg 540
 ccatgcccga cgggtgggac atttgagttg cttgcttggc actgtcctct catgcgttgg 600
 gtccactcag tagatgcctg ttgaatt 627

<210> 6

<211> 1711

<212> DNA

<213> 原鸡

<400> 6

attgattatt gactagtatt taatagtaat caattacggg gtcattagtt catagcccat 60
 atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccacg 120
 acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca atagggactt 180
 tccattgacg tcaatgggtg gactattttac ggtaaactgc ccacttggca gtacatcaag 240
 tgtatcatat gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc 300
 attatgcccga gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc tacgtattag 360
 tcacgcctat taccatgggt cgaggtgagc cccacgttct gcttcaactc ccccatctcc 420
 cccccctccc ccccccaat tttgtattta tttatttttt aattattttg tgcagcgatg 480
 ggggcggggg gggggggggc gcgcgccagg cggggcgagg cggggcgagg ggcggggcgg 540
 ggcgaggcgg agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttctttt 600
 tatggcgagg cggcggcggc ggcgcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgggagt 660
 cgctgcgttg ccttcgcccc gtgccccgct ccgcgccgcc tcgcgccgcc cgccccggct 720

ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag cgggcgggac ggcccttctc ctccgggctg 780
 taattagcgc ttggtttaat gacggctcgt ttcttttctg tggctgcgtg aaagccttaa 840
 agggctccgg gagggccctt tgtgcggggg ggagcggctc ggggggtgcg tgcgtgtgtg 900
 tgtgcgtggg gagcgcgcg tgcggcccg gctgcccggc ggctgtgagc gctgcgggcg 960
 cggcgcgggg ctttgtgcgc tccgcgtgtg cgcgagggga gcgcggccgg gggcgggtgc 1020
 ccgcgggtgcg ggggggctgc gaggggaaca aaggctgcgt gcgggggtgtg tgcgtggggg 1080
 ggtgagcagg ggggtgtggc gcggcggctc ggctgtaacc cccccctgca cccccctccc 1140
 cgagttgctg agcacggccc ggcttcgggt gcggggctcc gtgcggggcg tggcgcgggg 1200
 ctgcgcgtgc cgggcggggg gtggcggcag gtgggggtgc cgggcggggc ggggccgcct 1260
 cgggccgggg agggctcggg ggaggggcgc ggcgccccc gagcgcggc ggctgtcgag 1320
 gcgcggcgag ccgcagccat tgccttttat ggtaatcgtg cgagaggcg cagggacttc 1380
 ctttgtccca aatctggcgg agccgaaatc tgggaggcgc cgccgcacc cctctagcgg 1440
 gcgcgggcga agcgggtgcg cgccggcagg aaggaaatgg gcggggaggg ccttcgtgcg 1500
 tcgccgcgcc gccgtcccct tctccatctc cagcctcggg gctgccgcag ggggacggct 1560
 gccttcgggg gggacggggc agggcggggg tcggcttctg gcgtgtgacc ggcggtctta 1620
 gagcctctgc taaccatgtt catgccttct tcttttctt acagctcctg ggcaacgtgc 1680
 tggttgttgt gctgtctcat cattttggca a 1711

<210> 7

<211> 370

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成DNA

<400> 7

tacgtcctc tactctttga gacatcactg gcctataata aatgggttaa tttatgtaac 60
 aaaattgcct tggcttgta actttattag acattctgat gtttgattg tgtaaatact 120
 gttgtattgg aaaagcgtgc caagatggat tattgtaatt cagtgtcttt tttagtaggc 180
 atagtgttac catcaaccac cttaacttca ttttcttat tcaataccta ggtaggtaga 240
 tgctagattc tggaaaataa atatgagtct caagtgtcc ttgtcctctc tcccagtcaa 300
 attctgaatc tagttggcaa gattctgaaa tcaaggcata taatcagtaa taagtgatga 360
 tagaagggta 370

<210> 8

<211> 132

<212> DNA

<213> 猿猴病毒40

<400> 8

aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 60
 aataaagcat ttttttctact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 120
 tatcatgtct gg 132

<210> 9

<211> 221

<212> DNA

<213> 猿猴病毒40

<400> 9

agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaaccaca acaagaatgc agtgaaaaaa 60
 atgcttttatt tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa 120
 taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggagatgtg 180
 ggagggttttt taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt a 221

<210> 10

<211> 878

<212> PRT

<213> 黑腹果蝇

<400> 10

Met	Lys	Arg	Arg	Trp	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Phe	Met	Arg	Leu	Pro	Glu
1				5				10					15		
Glu	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Asn	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
				20				25				30			
Ser	Gly	Val	Asn	Met	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Asp	Ser	His	Asp	Tyr	Cys
			35					40				45			
Asp	Gln	Asp	Leu	Trp	Leu	Cys	Gly	Asn	Glu	Ser	Gly	Ser	Phe	Gly	Gly
			50					55				60			
Ser	Asn	Gly	His	Gly	Leu	Ser	Gln	Gln	Gln	Gln	Ser	Val	Ile	Thr	Leu
65					70					75					80
Ala	Met	His	Gly	Cys	Ser	Ser	Thr	Leu	Pro	Ala	Gln	Thr	Thr	Ile	Ile
				85					90					95	
Pro	Ile	Asn	Gly	Asn	Ala	Asn	Gly	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Gly	Gln
			100					105					110		
Tyr	Val	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Asn	Gly	Met	Leu
			115					120					125		
Asn	Gly	Gly	Phe	Asn	Gly	Met	Gln	Gln	Gln	Ile	Gln	Asn	Gly	His	Gly
			130					135					140		
Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro	Leu	His	Leu
145					150					155				160	
Gln	Gln	Asn	Leu	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Gly	Gly	Met	Gly
				165						170				175	
Ile	Leu	His	His	Ala	Asn	Gly	Thr	Pro	Asn	Gly	Leu	Ile	Gly	Val	Val
				180						185				190	
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Leu	Gly	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Gly

195	200	205
Gly Leu Gly Met Gln His Thr Pro Arg Ser Asp Ser Val Asn Ser Ile		
210	215	220
Ser Ser Gly Arg Asp Asp Leu Ser Pro Ser Ser Ser Leu Asn Gly Tyr		
225	230	235
Ser Ala Asn Glu Ser Cys Asp Ala Lys Lys Ser Lys Lys Gly Pro Ala		
245	250	255
Pro Arg Val Gln Glu Glu Leu Cys Leu Val Cys Gly Asp Arg Ala Ser		
260	265	270
Gly Tyr His Tyr Asn Ala Leu Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe		
275	280	285
Arg Arg Ser Val Thr Lys Ser Ala Val Tyr Cys Cys Lys Phe Gly Arg		
290	295	300
Ala Cys Glu Met Asp Met Tyr Met Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg		
305	310	315
Leu Lys Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Arg Pro Glu Cys Val Val Pro		
325	330	335
Glu Asn Gln Cys Ala Met Lys Arg Arg Glu Lys Lys Ala Gln Lys Glu		
340	345	350
Lys Asp Lys Met Thr Thr Ser Pro Ser Ser Gln His Gly Gly Asn Gly		
355	360	365
Ser Leu Ala Ser Gly Gly Gly Gln Asp Phe Val Lys Lys Glu Ile Leu		
370	375	380
Asp Leu Met Thr Cys Glu Pro Pro Gln His Ala Thr Ile Pro Leu Leu		
385	390	395
Pro Asp Glu Ile Leu Ala Lys Cys Gln Ala Arg Asn Ile Pro Ser Leu		
405	410	415
Thr Tyr Asn Gln Leu Ala Val Ile Tyr Lys Leu Ile Trp Tyr Gln Asp		
420	425	430
Gly Tyr Glu Gln Pro Ser Glu Glu Asp Leu Arg Arg Ile Met Ser Gln		
435	440	445
Pro Asp Glu Asn Glu Ser Gln Thr Asp Val Ser Phe Arg His Ile Thr		
450	455	460
Glu Ile Thr Ile Leu Thr Val Gln Leu Ile Val Glu Phe Ala Lys Gly		
465	470	475
Leu Pro Ala Phe Thr Lys Ile Pro Gln Glu Asp Gln Ile Thr Leu Leu		
485	490	495
Lys Ala Cys Ser Ser Glu Val Met Met Leu Arg Met Ala Arg Arg Tyr		
500	505	510

Asp His Ser Ser Asp Ser Ile Phe Phe Ala Asn Asn Arg Ser Tyr Thr		
515	520	525
Arg Asp Ser Tyr Lys Met Ala Gly Met Ala Asp Asn Ile Glu Asp Leu		
530	535	540
Leu His Phe Cys Arg Gln Met Phe Ser Met Lys Val Asp Asn Val Glu		
545	550	555
Tyr Ala Leu Leu Thr Ala Ile Val Ile Phe Ser Asp Arg Pro Gly Leu		
	565	570
		575
Glu Lys Ala Gln Leu Val Glu Ala Ile Gln Ser Tyr Tyr Ile Asp Thr		
	580	585
		590
Leu Arg Ile Tyr Ile Leu Asn Arg His Cys Gly Asp Ser Met Ser Leu		
	595	600
		605
Val Phe Tyr Ala Lys Leu Leu Ser Ile Leu Thr Glu Leu Arg Thr Leu		
	610	615
		620
Gly Asn Gln Asn Ala Glu Met Cys Phe Ser Leu Lys Leu Lys Asn Arg		
625	630	635
		640
Lys Leu Pro Lys Phe Leu Glu Glu Ile Trp Asp Val His Ala Ile Pro		
	645	650
		655
Pro Ser Val Gln Ser His Leu Gln Ile Thr Gln Glu Glu Asn Glu Arg		
	660	665
		670
Leu Glu Arg Ala Glu Arg Met Arg Ala Ser Val Gly Gly Ala Ile Thr		
	675	680
		685
Ala Gly Ile Asp Cys Asp Ser Ala Ser Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala		
	690	695
		700
Ala Gln His Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Ser Ser Leu		
705	710	715
		720
Thr Gln Asn Asp Ser Gln His Gln Thr Gln Pro Gln Leu Gln Pro Gln		
	725	730
		735
Leu Pro Pro Gln Leu Gln Gly Gln Leu Gln Pro Gln Leu Gln Pro Gln		
	740	745
		750
Leu Gln Thr Gln Leu Gln Pro Gln Ile Gln Pro Gln Pro Gln Leu Leu		
	755	760
		765
Pro Val Ser Ala Pro Val Pro Ala Ser Val Thr Ala Pro Gly Ser Leu		
	770	775
		780
Ser Ala Val Ser Thr Ser Ser Glu Tyr Met Gly Gly Ser Ala Ala Ile		
785	790	795
		800
Gly Pro Ile Thr Pro Ala Thr Thr Ser Ser Ile Thr Ala Ala Val Thr		
	805	810
		815
Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ala Val Pro Met Gly Asn Gly Val Gly Val		

			820						825					830			
Gly	Val	Gly	Val	Gly	Gly	Asn	Val	Ser	Met	Tyr	Ala	Asn	Ala	Gln	Thr		
			835						840					845			
Ala	Met	Ala	Leu	Met	Gly	Val	Ala	Leu	His	Ser	His	Gln	Glu	Gln	Leu		
			850						855					860			
Ile	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Lys	Ser	Glu	His	Ser	Thr	Thr	Ala				
865							870							875			
<210>	11																
<211>	240																
<212>	PRT																
<213>	云杉夜蛾																
<400>	11																
Leu	Thr	Ala	Asn	Gln	Gln	Phe	Leu	Ile	Ala	Arg	Leu	Ile	Trp	Tyr	Gln		
1				5					10					15			
Asp	Gly	Tyr	Glu	Gln	Pro	Ser	Asp	Glu	Asp	Leu	Lys	Arg	Ile	Thr	Gln		
			20						25					30			
Thr	Trp	Gln	Gln	Ala	Asp	Asp	Glu	Asn	Glu	Glu	Ser	Asp	Thr	Pro	Phe		
			35						40					45			
Arg	Gln	Ile	Thr	Glu	Met	Thr	Ile	Leu	Thr	Val	Gln	Leu	Ile	Val	Glu		
			50						55					60			
Phe	Ala	Lys	Gly	Leu	Pro	Gly	Phe	Ala	Lys	Ile	Ser	Gln	Pro	Asp	Gln		
65						70					75				80		
Ile	Thr	Leu	Leu	Lys	Ala	Cys	Ser	Ser	Glu	Val	Met	Met	Leu	Arg	Val		
				85						90					95		
Ala	Arg	Arg	Tyr	Asp	Ala	Ala	Ser	Asp	Ser	Val	Leu	Phe	Ala	Asn	Asn		
			100						105					110			
Gln	Ala	Tyr	Thr	Arg	Asp	Asn	Tyr	Arg	Lys	Ala	Gly	Met	Ala	Tyr	Val		
			115						120					125			
Ile	Glu	Asp	Leu	Leu	His	Phe	Cys	Arg	Cys	Met	Tyr	Ser	Met	Ala	Leu		
			130				135							140			
Asp	Asn	Ile	His	Tyr	Ala	Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Val	Ile	Phe	Ser	Asp		
145					150					155					160		
Arg	Pro	Gly	Leu	Glu	Gln	Pro	Gln	Leu	Val	Glu	Glu	Ile	Gln	Arg	Tyr		
					165					170					175		
Tyr	Leu	Asn	Thr	Leu	Arg	Ile	Tyr	Ile	Leu	Asn	Gln	Leu	Ser	Gly	Ser		
			180						185					190			
Ala	Arg	Ser	Ser	Val	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Ser	Glu		
			195						200					205			
Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Met	Gln	Asn	Ser	Asn	Met	Cys	Ile	Ser	Leu	Lys		

210	215	220
Leu Lys Asn Arg Lys Leu Pro Pro Phe Leu Glu Glu Ile Trp Asp Val		
225	230	235
240		
<210> 12		
<211> 240		
<212> PRT		
<213> 云杉夜蛾		
<400> 12		
Leu Thr Ala Asn Gln Gln Phe Leu Ile Ala Arg Leu Ile Trp Tyr Gln		
1	5	10
Asp Gly Tyr Glu Gln Pro Ser Asp Glu Asp Leu Lys Arg Ile Thr Gln		
20	25	30
Thr Trp Gln Gln Ala Asp Asp Glu Asn Glu Glu Ser Asp Thr Pro Phe		
35	40	45
Arg Gln Ile Thr Glu Met Thr Ile Leu Thr Val Gln Leu Ile Val Glu		
50	55	60
Phe Ala Lys Gly Leu Pro Gly Phe Ala Lys Ile Ser Gln Pro Asp Gln		
65	70	75
Ile Thr Leu Leu Lys Ala Cys Ser Ser Glu Val Met Met Leu Arg Val		
85	90	95
Ala Arg Arg Tyr Asp Ala Ala Ser Asp Ser Ile Leu Phe Ala Asn Asn		
100	105	110
Gln Ala Tyr Thr Arg Asp Asn Tyr Arg Lys Ala Gly Met Ala Glu Val		
115	120	125
Ile Glu Asp Leu Leu His Phe Cys Arg Cys Met Tyr Ser Met Ala Leu		
130	135	140
Asp Asn Ile His Tyr Ala Leu Leu Thr Ala Val Val Ile Phe Ser Asp		
145	150	155
160		
Arg Pro Gly Leu Glu Gln Pro Gln Leu Val Glu Glu Ile Gln Arg Tyr		
165	170	175
Tyr Leu Asn Thr Leu Arg Ile Tyr Ile Leu Asn Gln Leu Ser Gly Ser		
180	185	190
Ala Arg Ser Ser Val Ile Tyr Gly Lys Ile Leu Ser Ile Leu Ser Glu		
195	200	205
Leu Arg Thr Leu Gly Met Gln Asn Ser Asn Met Cys Ile Ser Leu Lys		
210	215	220
Leu Lys Asn Arg Lys Leu Pro Pro Phe Leu Glu Glu Ile Trp Asp Val		
225	230	235
240		
<210> 13		

<211> 598

<212> DNA

<213> 人巨细胞病毒

<400> 13

```
gcattagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt 60
tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgcctggttg accgccaac gacccccgcc 120
cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac 180
gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggt agtacatcaa gtgtatcata 240
cgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg tattatgccc 300
agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat ctgcgtatta gtcacgcta 360
ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac 420
ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc 480
aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaag ggcggtaggc 540
gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctggtttagt gaaccgtcag atccgcta 598
```

<210> 14

<211> 226

<212> DNA

<213> 智人

<400> 14

```
ataagagacc acaagcgacc cgcagggccca gacgttcttc gccgagagtc gtcggggttt 60
cctgcttcaa cagtgccttg acggaacccg gcgctcgctt cccacccccg ccagccgccc 120
atagccagcc ctccgtcacc tcttcaccgc accctcggac tgccccaagg cccccgccgc 180
cgctccagcg ccgcgcagcc accgcccgcg ccgcgcctc tcctta 226
```

<210> 15

<211> 102

<212> DNA

<213> 智人

<400> 15

```
aaattgagcc cgcagcctcc cgcttcgctc tetgetcctc ctgttcgaca gtcagccgca 60
tcttcttttg cgtcgccage cgagccacat cgctcagaca cc 102
```

<210> 16

<211> 107

<212> DNA

<213> 智人

<400> 16

```
cagccgctaa atccaaggta agggaagagg accacggacc attatgtctt aaccttaatt 60
ggcattctct tactgttgat gcatttgtgt cctttagagt tgaaaag 107
```

<210> 17

<211> 1400

<212> DNA

<213> 智人

<400> 17

```

ttgcagaccc tgcattctca tgcagcagag gacaccaccc agactgataa tctggctcaa 60
ctagctccac gatcccaccc aggaagaact cgcaagaact cacttcgacc ccgtgattta 120
atcttcatcc cgaccaacta gcactcccca ctttcgaac ccattcctgc caaattatcc 180
ttaaaaaactc tgattccaga atgctcaggg agactgattt gagtgataat gaaactctgg 240
tctcccgcac agcgctcagc gtgaattatt ctttcgccat tgcaattccc gtcttcataa 300
atcagctctg tctaggcagc ggacaagggtg aaccattgg gcggttacac tttcgttttc 360
aatacatctc tgcttttatt gcttcattct tcttttgctt tgtgcatttc gtccagttct 420
tagttcaaga cgctaagaac ttggacaccc tccacgggtg acaggactac aggtgcccgc 480
caccacgtct agctaatttt ttgtattttt agtagagatg gggttttgct atgttgctca 540
ggctggctct gaaccactgg gctcaagcaa tctgccgggc ttggcctccc aaagtgccgg 600
gattaaaggc gtgagccacc gcgcctggcc cactaaactt ctctgtgcat cagttatttc 660
atttgccata tgaggataac agtagtcact actgcgtttt gtgagcgttg gttaatatat 720
gaaaaatgcc acgtgtttgc cattagcatc aatcatgcca taaccagaaa aattacattg 780
cattttttat tttaaaaaag gtgggggcca gagtggacct gggcctcttc caacttctga 840
gaggtctcta ttactaagta agccttaaca agcacaattc catgaaggga gctaggaaac 900
caggattttc caaaaggagg tggcatttgc attgatcctg gtagggcagc ctccaattcg 960
acgggggttg ggttgcgcct tttccaaggc agccctgggt ttgcgcaggg acgcggctgc 1020
tctgggcgtg gttccgggaa acgcagcggc gccgacctg ggtctcgac attcttcacg 1080
tccgttcgca gcgtcacccg gatcttcgcc gctacccttg tgggcccccc ggcgacgctt 1140
cctgctccgc ccctaagtcg ggaagggttc ttgcggttcg cggcgtgccg gacgtgacaa 1200
acggaagccg cacgtctgac tagaacctc gcagacggac agcgccaggg agcaatggca 1260
gcgcgccgac cgcatgggc tgtggccaat agcggctgct cagcaggccg cgccgagagc 1320
agcggccggg aaggggcggt gcgggaggcg ggggtgtggg cggtagtgtg ggccctgttc 1380
ctgcccgcgc ggtgttccgc 1400

```

<210> 18

<211> 244

<212> DNA

<213> 智人

<400> 18

```

gagcgtgcgt gaggtccgg tgcgcgtcag tgggcagagc gcacatcgcc cacagtcccc 60
gagaagttgg ggggaggggg tcggcgattg aaccggtgcc tagagaaggt ggcgcggggt 120
aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt cccgagggtg ggggagaacc 180
gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg ccgccagaac 240
acag 244

```

<210> 19

<211> 4691

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 表达载体

<400> 19

```

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgetca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca 120
actccatcac taggggttcc ttaactataa cggtcctaag gtagcgagcg atcgcttaat 180
taaggccggc cggcctccgc gccgggtttt ggcgccctcc gcgggcgccc ccctcctcac 240
ggcgagcgct gccacgtcag acgaagggcg cagcgagcgt cctgatacct ccgcccggac 300
gctcaggaca gcggcccgtc gctcataaga ctcgccctta gaaccccgat atcagcagaa 360
ggacatttta ggacgggact tgggtgactc tagggcactg gttttctttc cagagagcgg 420
aacaggcgag gaaaagtagt cccttctcgg cgattctgcg gagggatctc cgtggggcgg 480
tgaacgccga tgattatata aggacgcgcc ggggtgtggc cagctagttc cgtcgcagcc 540
gggatttggg tcgcggttct tgtttgtgga tcgctgtgat cgtcacttgg tgagtagcgg 600
gctgctgggc tgggtacgtg cgctcggggt tggcgagtgt gttttgtgaa gttttttagg 660
caccttttga aatgtaata tttgggtcaa tatgtaattt tcagtgttag actagtaaat 720
tgtccgctaa attctggccg tttttggctt ttttgttaga cgcctgcagg ggcgcgccac 780
gcgtcgaaga aggtgagtaa tcttaacatg ctcttttttt ttttttttgc taatcccttt 840
tgtgtgctga tgtaggatg acatttaca caaatgtttg ttcctgacag gaaaaacctt 900
gctgggtacc ttcgttgccg gacacttctt gtctctact ttggaaaaaa ggaattgaga 960
gccgctagcg ccacatgtg gactctcggg cgccgcgcag tagccggcct cctggcgtca 1020
cccagcccag cccaggccca gacctcacc cgggtcccg gcgggcgaga gttggcccca 1080
ctctgcggcc gccgtggcct gcgcaccgac atcgatgcga cctgcacgcc ccgccgcga 1140
agttcgaacc aacgtggcct caaccagatt tggaatgtca aaaagcagag tgtctatttg 1200
atgaatttga ggaaatctgg aactttgggc caccaggct ctctagatga gaccacctat 1260
gaaagactag cagaggaaac gctggactct ttagcagagt tttttgaaga ccttgacagc 1320
aagccataca cgtttgagga ctatgatgtc tcctttggga gtggtgtctt aactgtcaaa 1380
ctgggtggag atctaggaac ctatgtgatc aacaagcaga cgccaaacaa gcaaatctgg 1440
ctatcttctc catccagtgg acctaagcgt tatgactgga ctgggaaaaa ctgggtgtac 1500
tcccacgacg gcgtgtccct ccatgagctg ctggccgcag agctcactaa agccttaaaa 1560
accaaactgg acttgtcttc cttggcctat tccgaaaaag atgcttgaat cgattacgta 1620
gcggccgcgt cgactgatgg gtggcatccc tgtgacctt cccagtgcc tctcctggcc 1680
ctggaagtgt cactccagt gccaccagc cttgtcctaa taaaattaag ttgcatcatt 1740
ttgtctgact aggtgtcctt ctataatatt atggggtgga ggggggtggt atggagcaag 1800
gggcaagtgt ggaagacaac ctgtagggcc tgcggggtct attgggaacc aagctggagt 1860
gcagtggcac aatcttggt cactgcaatc tccgcctcct gggttcaagc gattctcctg 1920
cctcagcctc ccgagttgtt gggattccag gcatgcatga ccaggctcag ctaatttttg 1980
tttttttggg agagacgggg tttcaccata ttggccaggc tggctctcaa ctctaatct 2040

```

caggatgatct acccaccttg gcctcccaaa ttgctgggat tacaggcgtg aaccactgct 2100
 cccttccctg tccttctgat tttaaaataa ctataccagc aggaggacgt ccagacacag 2160
 cataggctac ctggccatgc ccaaccgggtg ggacatttga gttgcttgct tggcactgtc 2220
 ctctcatgcg ttgggtccac tcagtagatg cctgttgaat tatttaaadc ggtccgcgta 2280
 cgttatggct atagaatgcc ccatcttaga ttgtaggatg cttgagaggt ctaagtcctt 2340
 ctataggata tccttctagg taggtataat actagtctag gttaaactag gctagggagt 2400
 cagagagcat tcgcaaagtt tacctagtct acaagtctct cccactatcc ttgagcctac 2460
 cctaggctag atcctaggaa tcatcccatg tcgtcattct agctcatagc actctcacta 2520
 tcctactagc taggccatct tcctaggaaa agtataagat cctagtttga tatagcatca 2580
 atgtagctag tgggaaggat acggatgacc tcatagcttg cagctttata aacttctccc 2640
 tcccatacca cctacctagg tgctatgagg tgactttaga atcacctct aggaggtaga 2700
 ctatgatagt ccttcttct agtatcaaga tatcatctag ctacaagtta tcgaaggttg 2760
 acctaacctt atagcaatat ttgacctac ctgagagctt tagagcccta gtttgagagt 2820
 ctatgtccat ctagggccta cctaccttac ctactacatg atgtagctct atcctagagc 2880
 cctctcatgg ttatgagttg cctgcaaggc tagaatctag gaagatcctt ccatcatatc 2940
 cttgtagcta ttttctacaa tcgagaagag gtctctctac ttctaacttt tgccattgcc 3000
 ccatctagct acaaggttat gagagagagt ataagtcatg ccataatacc taggtagaaa 3060
 ttctcaccta tcctatttct ttctagcttg cagtgtact agcatgggt gagatcttga 3120
 gtctagcctt ttgtcctagg gactttttag gcctaagact ctagagtgcc ccgatctaata 3180
 atccttctat aacttctac cagtctctta tagcctttga ccctatttct accacctact 3240
 tcgcatggtc tttctttacc ttaccataag actgccttag actacctagg gagagactta 3300
 aggccatgct ataagctata ggtctaggct atatcctttc accatatagc atgatcatag 3360
 gcgcaaagta gaaaggactc taggatagag actctataga tgagcttgat actgactttg 3420
 tcgttacttt gaccctagta gctcacta tcatgatggt gactcttgag ccagtatgat 3480
 ctttgtccta agtcccaccc catctttgcc acgctataga tctgtcttaa gctatagacc 3540
 atccttgacc taccttagag tataggtaa actctagact agactttgta ggagggtat 3600
 agcctttgcc ccatctcacc tcactctcta atatttctat gagcttttag gtaaagtatc 3660
 ttctaaagct atcctagggt ctttttactt cagcaagtgc aaggagtcaa atctcttact 3720
 ttaggcctag caatcttagg tcgcaagacc ctctatagct ctcttctagc tcatagcatg 3780
 ggataacctt cagtcaaaag tgctagactt gctagagatg ctctagatag ttgacctaa 3840
 ggtaggttag aaagtcactt tcgtcctttt gtagtaggtc actgagactt agaatggtct 3900
 atccttgctc ctagcttag ggtgggatct tttaggcctt tgagcctagc aaggactcta 3960
 gtctagggtc catcccatct cctgcaagaa tctctcaagg aaaggttgta gaaggaatga 4020
 gagtagcaat ctatagcaag gatgatggtt gtagaatgag catgtaggta aggcattaga 4080
 tacttttacc tcgtaccttg taggcctata agactttgac ttataaaagt ctgtcctccc 4140
 tagcctatat ggccatagaa ataggacctt gaaagaatgc tatagttagc ttatggccta 4200
 catcctagag aatctaggta aaagatatta tgacttaggt actagagtag cagcaagcta 4260
 gagcctatag ccccatccta cttcaaactt tagagtatag tacttcaaag atcatatact 4320
 ctgacttttag accatggcct tagaagaggt tagagttagg gtctccctt gcgaggtagg 4380

agagcatcctt gagcttttag gagcatccta gcagctaggt ctagagaggg caagttagag 4440
aagtttgagt catgctagag ggcaaagtct cagcctcctt gtcctacaag agtcatctag 4500
gtatagctac atcaaactat catagaagtt tgattaccct gttatcccta aggaaccctt 4560
agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc 4620
aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag 4680
ctgcctgcag g 4691

<210> 20

<211> 7043

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 表达载体

<400> 20

taactataac ggtcctaagg tagcgagcga tcgcttaatt aaggccggcc ggcctccgcg 60
ccgggttttg gcgcctcccc cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgctg ccacgtcaga 120
cgaagggcgc agcgagcgtc ctgatccttc cgcccgacg ctcaggacag cggcccgctg 180
ctcataagac tcggccttag aaccccagta tcagcagaag gacatttttag gacgggactt 240
gggtgactct agggcactgg ttttctttcc agagagcgga acaggcgagg aaaagtagtc 300
ccttctcggc gattctgcgg agggatctcc gtggggcggt gaacccgat gattatataa 360
ggacgcgccg ggtgtggcac agctagttcc gtcgcagccg ggatttggt cgcggttctt 420
gtttgtggat cgctgtgatc gtcacttggt gagtagcggg ctgctgggct gggtacgtgc 480
gctcgggggt ggcgagtgtg ttttgtgaag ttttttaggc accttttgaa atgtaatcat 540
ttgggtcaat atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa ttctggccgt 600
ttttggcttt tttgttagac gcctgcaggg gcgcgccacg cgtcgaagaa ggtgagtaat 660
cttaacatgc tctttttttt ttttttgct aatccctttt gtgtgctgat gttagatga 720
catttacaac aaatgtttgt tcctgacagg aaaaacctg ctgggtacct tcgttgccgg 780
acacttcttg tcctctactt tggaaaaaag gaattgagag ccgctagcgc caccatgtgg 840
actctcgggc gccgcgcagt agccggcctc ctggcgctac ccagcccagc ccaggcccag 900
accctcacc ccgggtcccg gcgggcagag ttggccccac tctgcggccg ccgtggcctg 960
cgcaccgaca tcgatgcgac ctgcacgccc cgccgcgcaa gttcgaacca acgtggcctc 1020
aaccagattt ggaatgtcaa aaagcagagt gtctatttga tgaatttgag gaaatctgga 1080
actttgggcc acccaggctc tctagatgag accacctatg aaagactagc agaggaaacg 1140
ctggactctt tagcagagtt ttttgaagac cttgcagaca agccatacac gtttgaggac 1200
tatgatgtct cctttgggag tgggtgtctta actgtcaaac tgggtggaga tctaggaacc 1260
tatgtgatca acaagcagac gccaaacaag caaatctggc tatcttctcc atccagtgga 1320
cctaagcgtt atgactggac tgggaaaaac tgggtgtact ccacgacgg cgtgtccctc 1380
catgagctgc tggccgcaga gtcactaaa gccttaaaaa ccaaactgga cttgtcttcc 1440
ttggcctatt ccgaaaaaga tgcttgaatc gattacgtag cggccgcgtc gactgatggg 1500
tggcatccct gtgaccctc cccagtgcct ctctggccc tggaagttgc cactccagtg 1560

```

cccaccagcc ttgtcctaataaaaattaagt tgcatacattt tgtctgacta ggtgtccttc 1620
tataatatta tgggggtggag ggggggtggta tggagcaagg ggcaagttgg gaagacaacc 1680
tgtagggcct gcgggggtcta ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggctc 1740
actgcaatct cgcctcctg ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc cgagttgttg 1800
ggattccagg catgcatgac caggctcagc taatttttgt ttttttggta gagacgggg 1860
ttcaccatat tggccaggct ggtctccaac tcctaatactc aggtgatcta cccaccttgg 1920
cctcccaaat tgctgggatt acaggcgtga accactgctc cttccctgt cttctgatt 1980
ttaaaataac tataccagca ggaggacgtc cagacacagc ataggctacc tggccatgcc 2040
caaccggtgg gacatttgag ttgcttgctt ggcaactgtc tctcatgcgt tgggtccact 2100
cagtagatgc ctgttgaatt atttaaatcg gtccgcgtac gttatggcta tagaatgccc 2160
catcttagat tgtagtgac ttgagaggtc taagtcttc tataggatat cttcttaggt 2220
aggtataata ctagtctagg ttaaactagg ctagggagtc agagagcatt cgcaaagttt 2280
acctagtcta caagtctctc ccactatcct tgagcctacc ctaggctaga tcctaggaat 2340
catcccatgt cgtcattcta gctcatagca ctctcactat cctactagct aggccatctt 2400
cctaggaaaa gtataagatc ctagtttgat atagcatcaa tgtagctagt gggaaggata 2460
cggatgacct catagcttgc agctttataa acttctccct cccataccac ctacctaggt 2520
gctatgaggt gacttttagaa tcaccctcta ggaggtagac tatgatagtc cttccttcta 2580
gtatcaagat atcatctagc tacaagtat cgaaggttga cctaacctta tagcaatatt 2640
ttgacctacc tgagagcttt agagccctag tttgagagtc tatgtccatc tagggcctac 2700
ctaccttacc tactacatga tgtagctcta tcctagagcc ctctcatggt tatgagttgc 2760
ctgcaaggct agaatctagg aagatcctc catcatatcc ttgtagctat tttctacaat 2820
cgagaagagg tcctcctact tctaactttt gccattgccc catctagcta caaggttatg 2880
agagagagta taagtcatgc cataatacct aggtagaaat tctcacctat cctatttctt 2940
tctagcttgc agtgctacta gcatgggggtg agatcttgag tctagccttt tgtcctaggg 3000
acttttagag cctaagactc tagagtgtccc cgatctaata tccttctata acttcctacc 3060
agtctcttat agcctttgac cctatttcta ccacctactt cgcattggtt tcttttacct 3120
taccataaga ctgccttaga ctacctaggg agagacttaa ggccatgcta taagctatag 3180
gtctaggcta tatcctttca ccatatagca tgatcatagg cgcaaagtag aaaggactct 3240
aggatagaga ctctatagat gagcttgata ctgactttgt cgttactttg accctagtag 3300
ctcatactat catgatggtg actcttgagc cagtatgac tttgtcctaa gtcccccccc 3360
atctttgcca cgctatagat ctgctctaag ctatagacca tccttgacct accttagagt 3420
ataggtaaaa ctctagacta gactttgtag gagggctata gcctttgccc catctcacct 3480
cactctctaa tatttctatg agcttttagg taaagtatct tctaaagcta tcctagggtc 3540
cttttacttc agcaagtga aggagtcaaa tctcttactt taggcctagc aatcttaggt 3600
cgcaagaccc tctatagctc tcttctagct catagcatgg gataaccttc agtcaaaagt 3660
gctagacttg ctagagatgc tctagatagt ttgacctaa gtaggttaga aagtcacttt 3720
cgtccttttg tagtaggtca ctgagactta gaatggtcta tccttgctcc ctagcttagg 3780
gtgggatctt ttaggccttt gagcctagca aggactctag tctagggtcc atcccatctc 3840
ctgcaagaat ctctcaagga aaggttgtag aaggaatgag agtagcaatc tatagcaagg 3900

```

atgatggttg tagaatgagc atgtaggtaa ggcatgagat acttttacct cgtaccttgt 3960
 aggccataaa gactttgact tataaaaagtc tgcctccctt agcctatatg gcctagaaaa 4020
 taggaccttg aaagaatgct atagttagct tatggcctac atcctagaga atctaggtaa 4080
 aagatattat gacttaggta ctagagtacc agcaagctag agcctatagc cccatcctac 4140
 ttcaaactct agagtatagt acttcaaaga tcatatactc tgactttaga ccatggcctt 4200
 agaagagggt agagttaggg tcctcccttg cgaggtagga gagcatcttg agcttttagg 4260
 agcatcctag cagctaggtc tagagagggc aagttagaga agtttgagtc atgctagagg 4320
 gcaaagtctc agcctccttg tcctacaaga gtcacttagg tatagctaca tcaaactatc 4380
 atagaagttt gattaccctg ttatccctaa ggaaccctta gtgatggagt tggccactcc 4440
 ctctctgcgc gctcgtcgc tcactgaggc cgggcgacca aaggctcgcc gagccccggg 4500
 ctttgcccg ggcgcctcag tgagcgagcg agcgcgagc tgcttcgagg atctatgtcg 4560
 ggtgcggaga aagaggtaat gaaatggcaa gtacttccgg aactataaat tgcgttgccg 4620
 tctgccccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcataaatg aatcgccaa 4680
 cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgcgcttccg ctctctcgct cactgactcg 4740
 ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg 4800
 ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag 4860
 gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac 4920
 gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga 4980
 taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt 5040
 accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc 5100
 tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct 5160
 cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta 5220
 agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat 5280
 gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca 5340
 gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct 5400
 tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt 5460
 acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat ctttgatct tttctacggg gtctgacgct 5520
 cagtggaacg aaaactcacg ttaagggtt ttggatcatg gattatcaaa aaggatcttc 5580
 acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa 5640
 acttggtctg acatgcgcag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc 5700
 tgtctatttc gttcatccat agttgctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg 5760
 gagggcttac catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct 5820
 ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagcgccg agcgcagaag tggctcctgca 5880
 actttatccg cctccatcca gtctattaac tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg 5940
 ccagttaata gtttgccgag cgttggtgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg 6000
 tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 6060
 cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc cgatggttgt cagaagtaag 6120
 ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 6180
 ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtattcaa ccaagtcatt ctgagaatag 6240

tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccc gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat 6300
agcagaactt taaaagtgct catcattggg aagcgttctt cggggcgaaa actctcaagg 6360
atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccacac gagcaccaa ctgatcttca 6420
gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca 6480
aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat 6540
tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag 6600
aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgaggtctaa 6660
gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttctt 6720
ctcgcgcgtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggatacggtc 6780
acagcttgtc tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt 6840
gttggcgggt gtcggggctg gcttaagctg agctaactat gactctctta aggtagccaa 6900
atcctgcagg cagctgcgcg ctgcctcgt cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg 6960
tcgggcgacc tttggtcgcc cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc 7020
caactccatc actaggggtt cct 7043

第一层表达分析

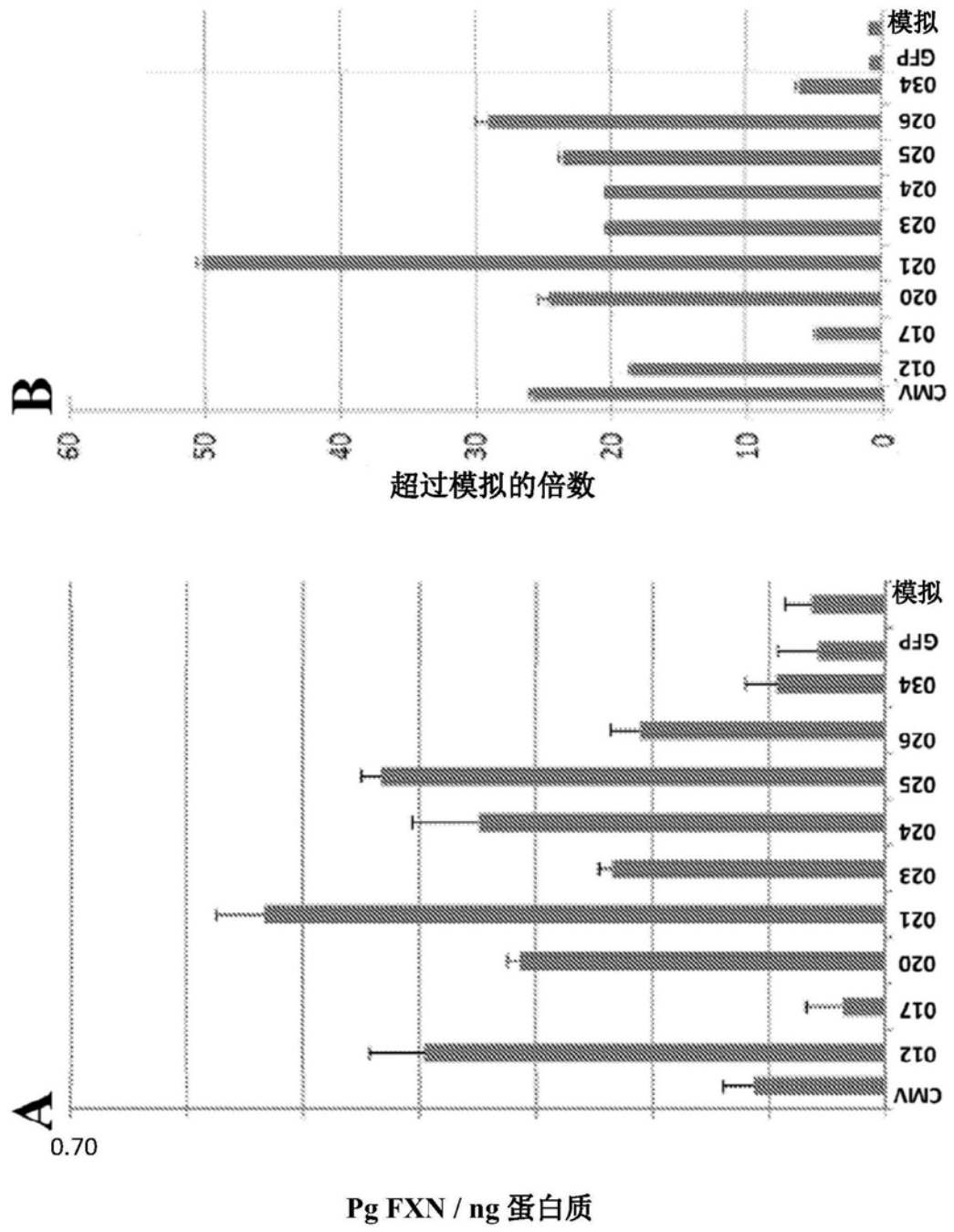


图1

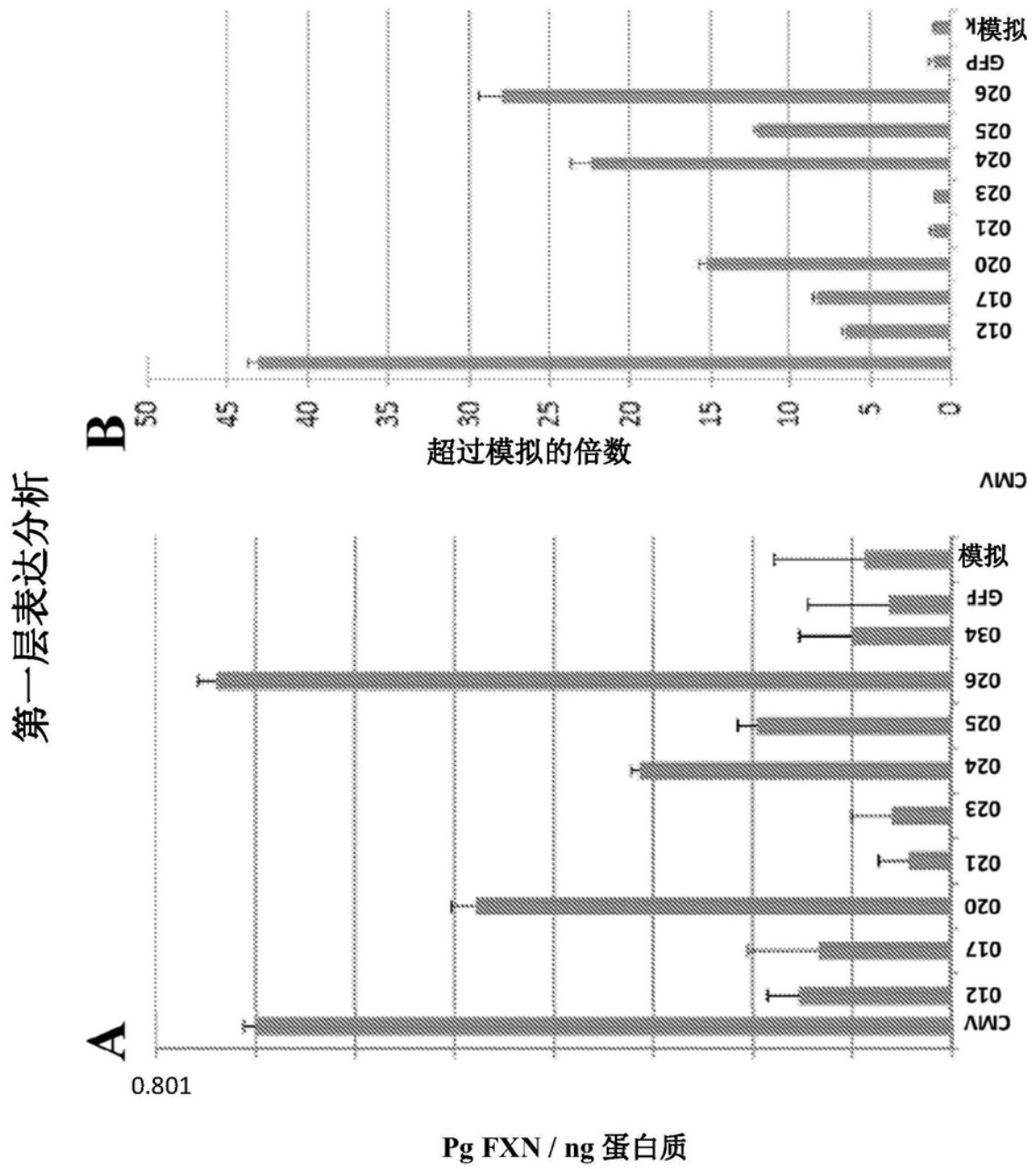


图2

第二层表达分析

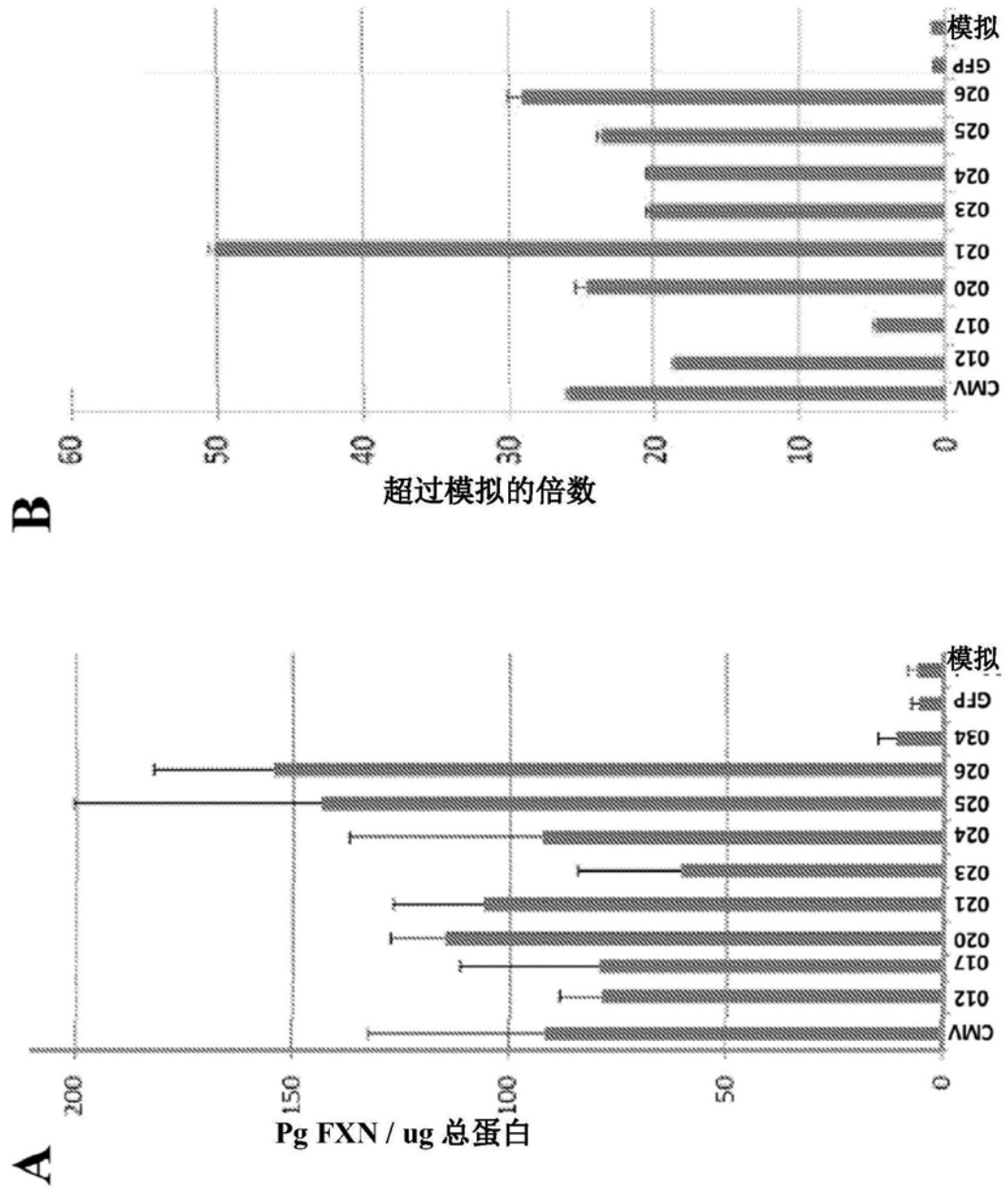


图3

第二层表达分析

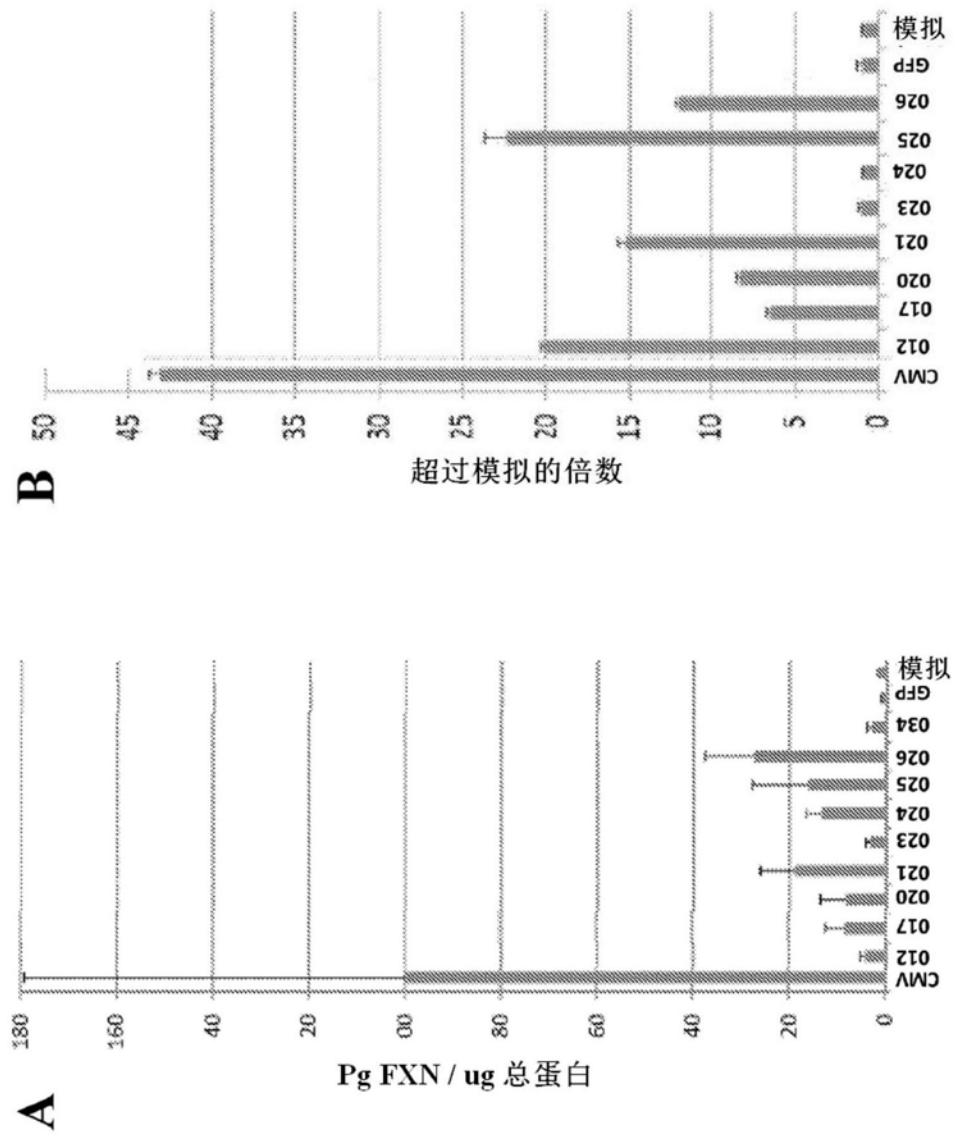


图4

第三层表达分析

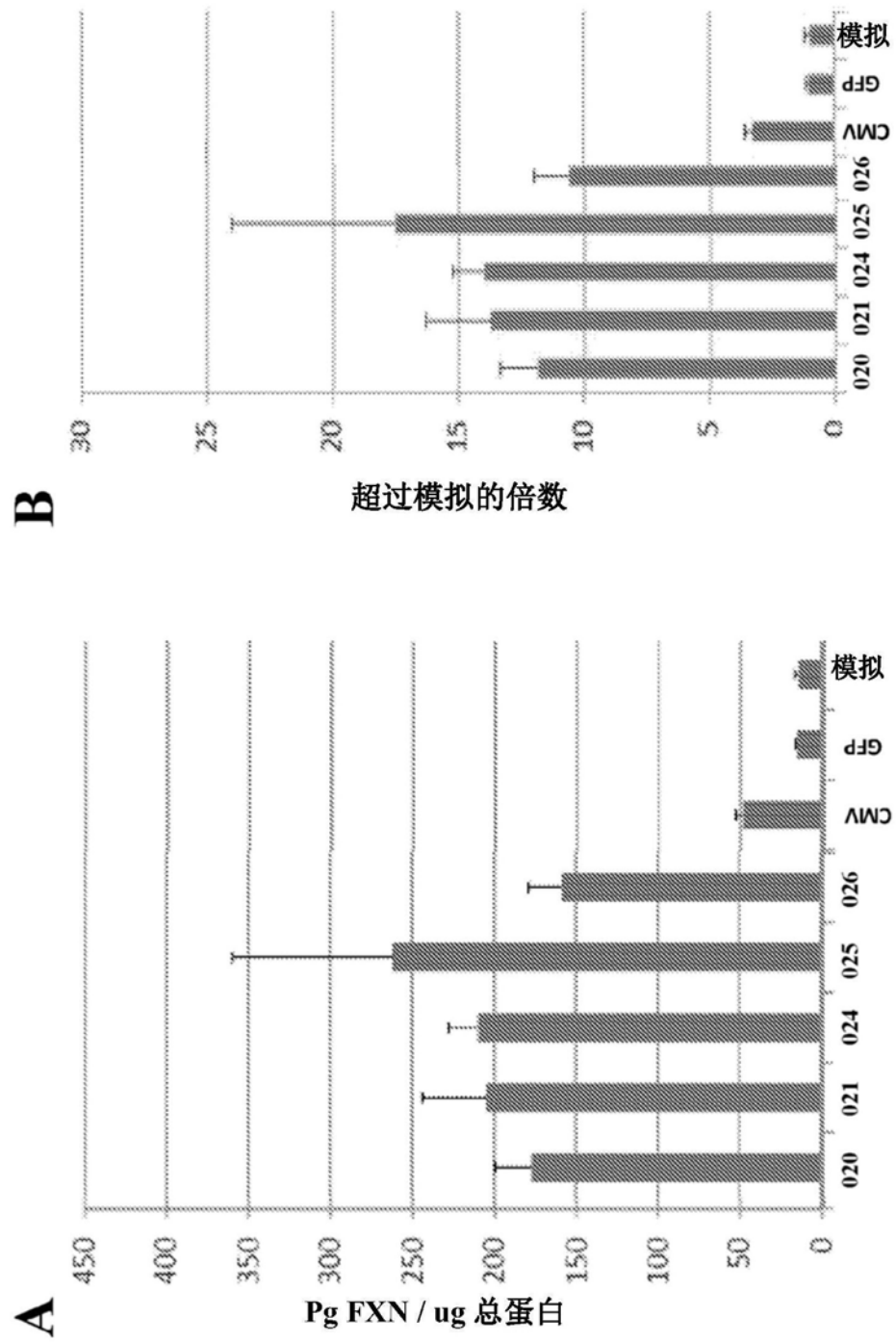


图5

第三层表达分析

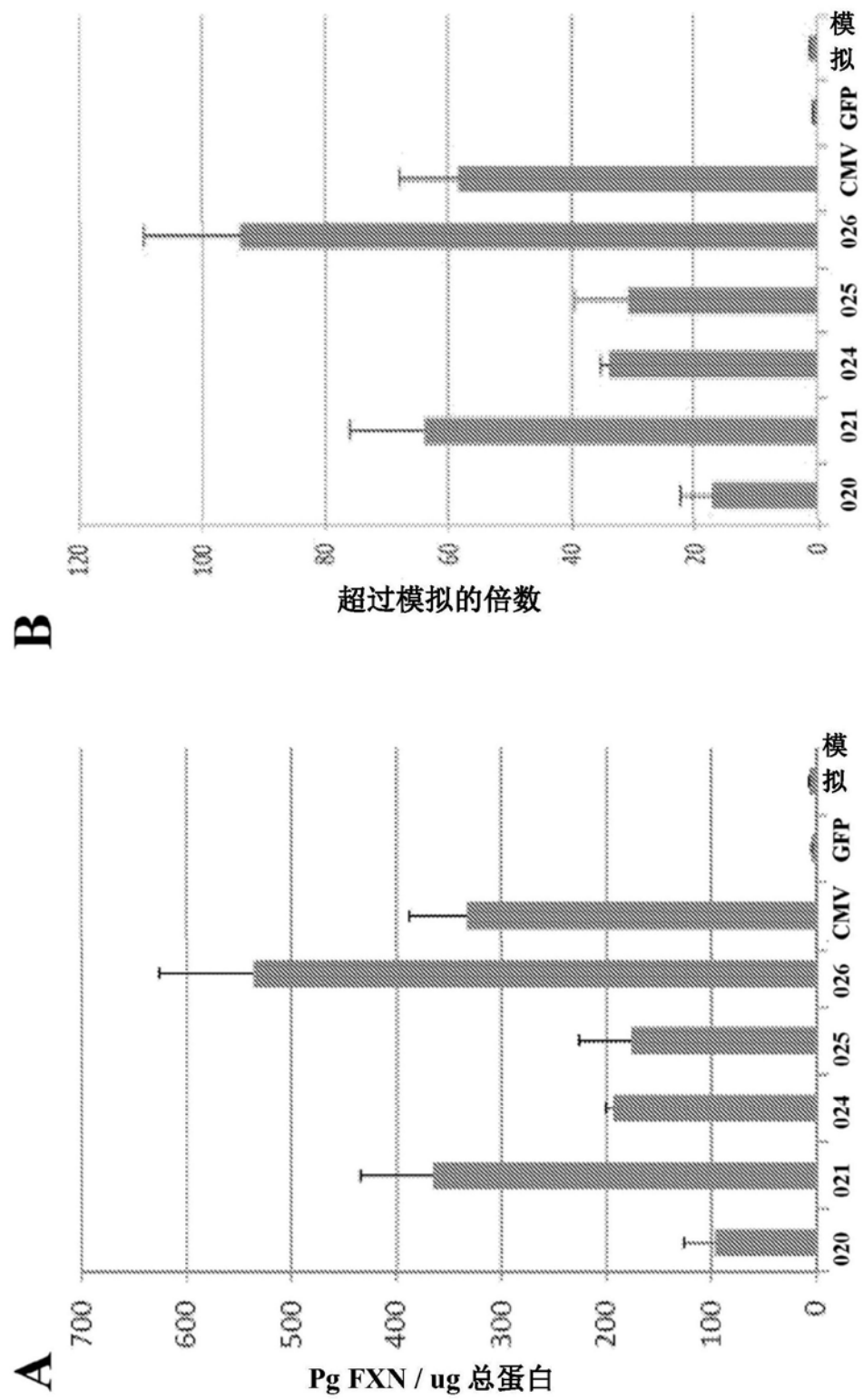


图6

人共济蛋白被转运至线粒体适当的细胞内运输

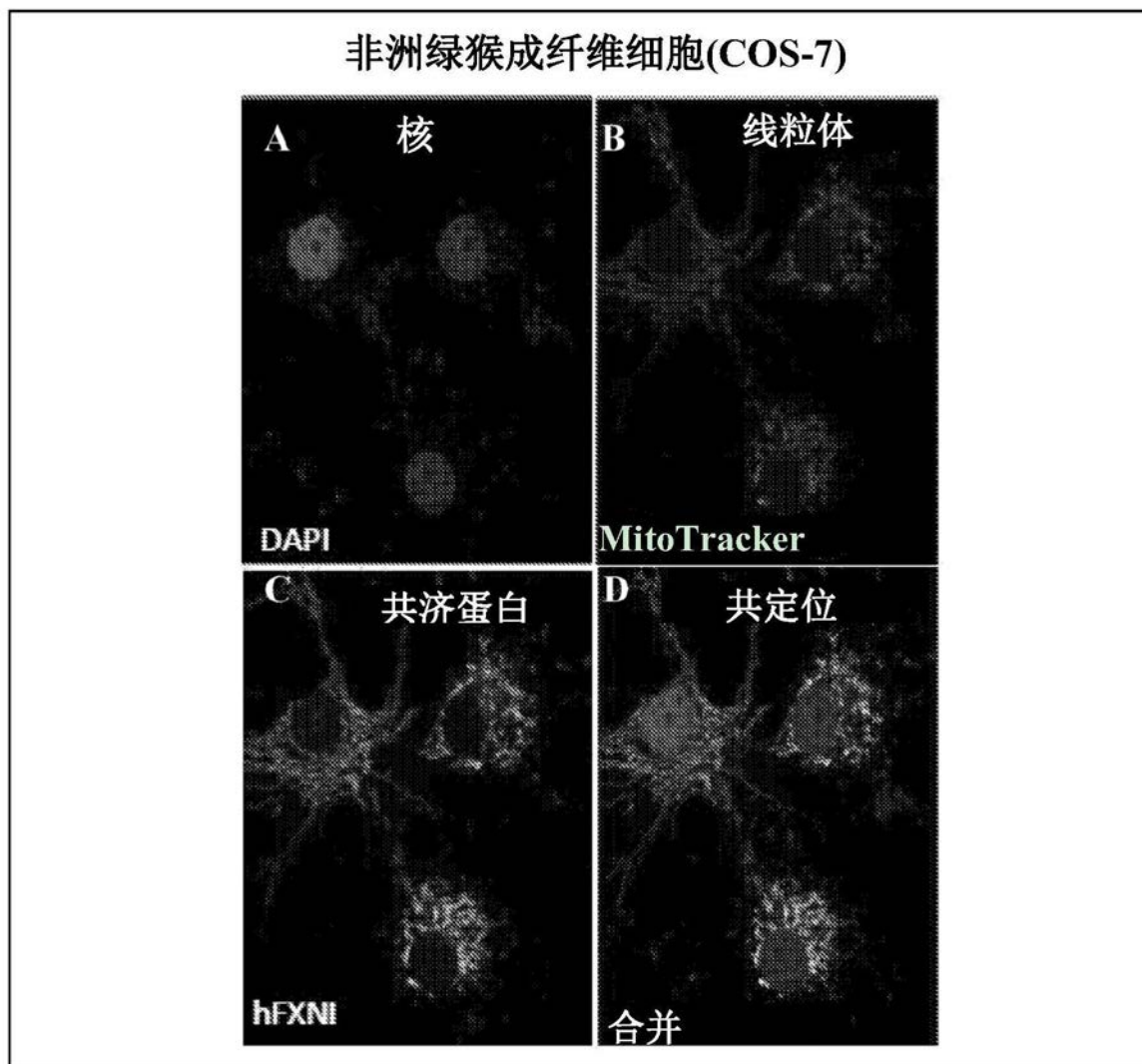


图7

人共济蛋白被转运至线粒体适当的细胞内运输

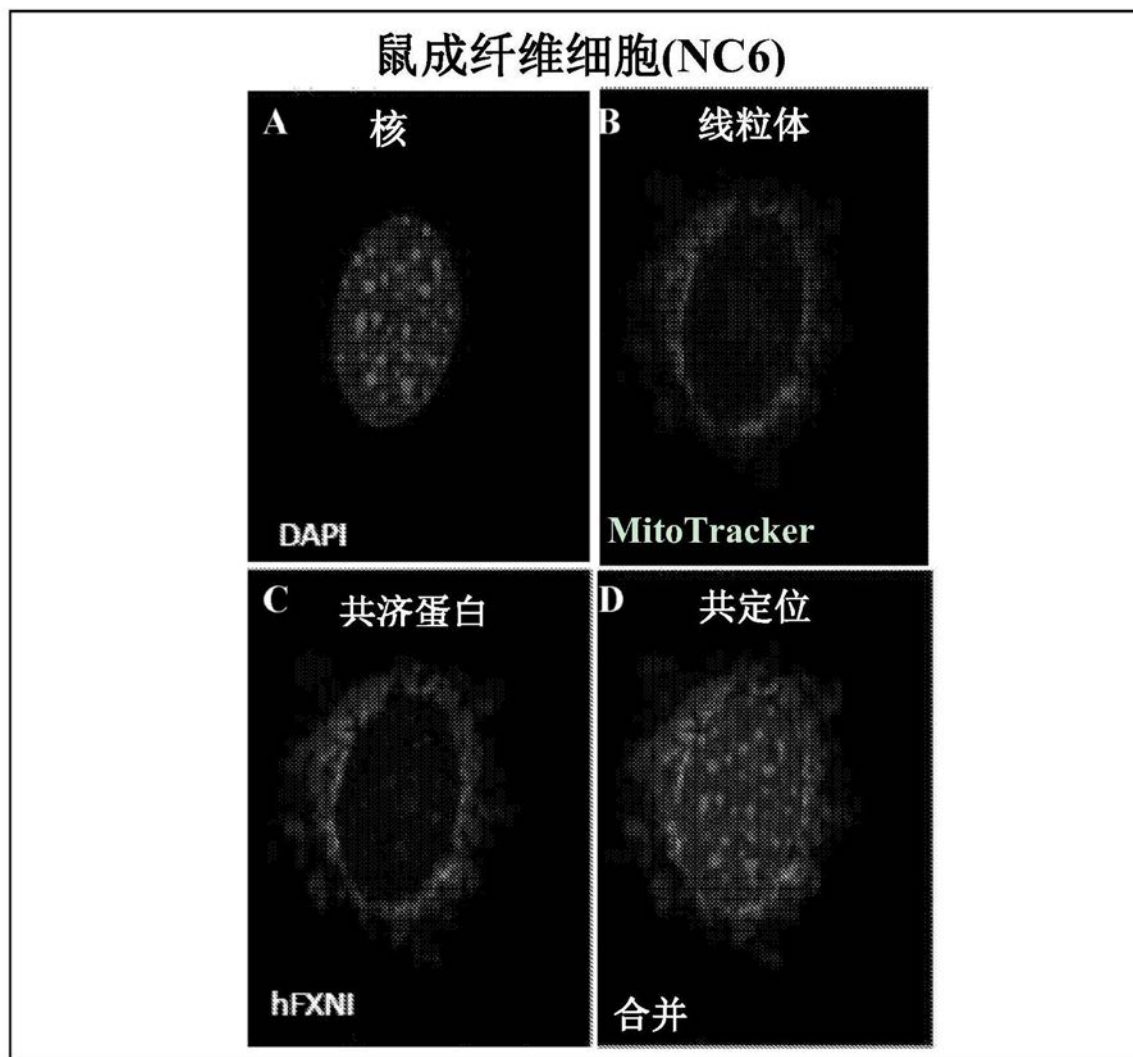


图8

人类共济蛋白被表达且正确加工

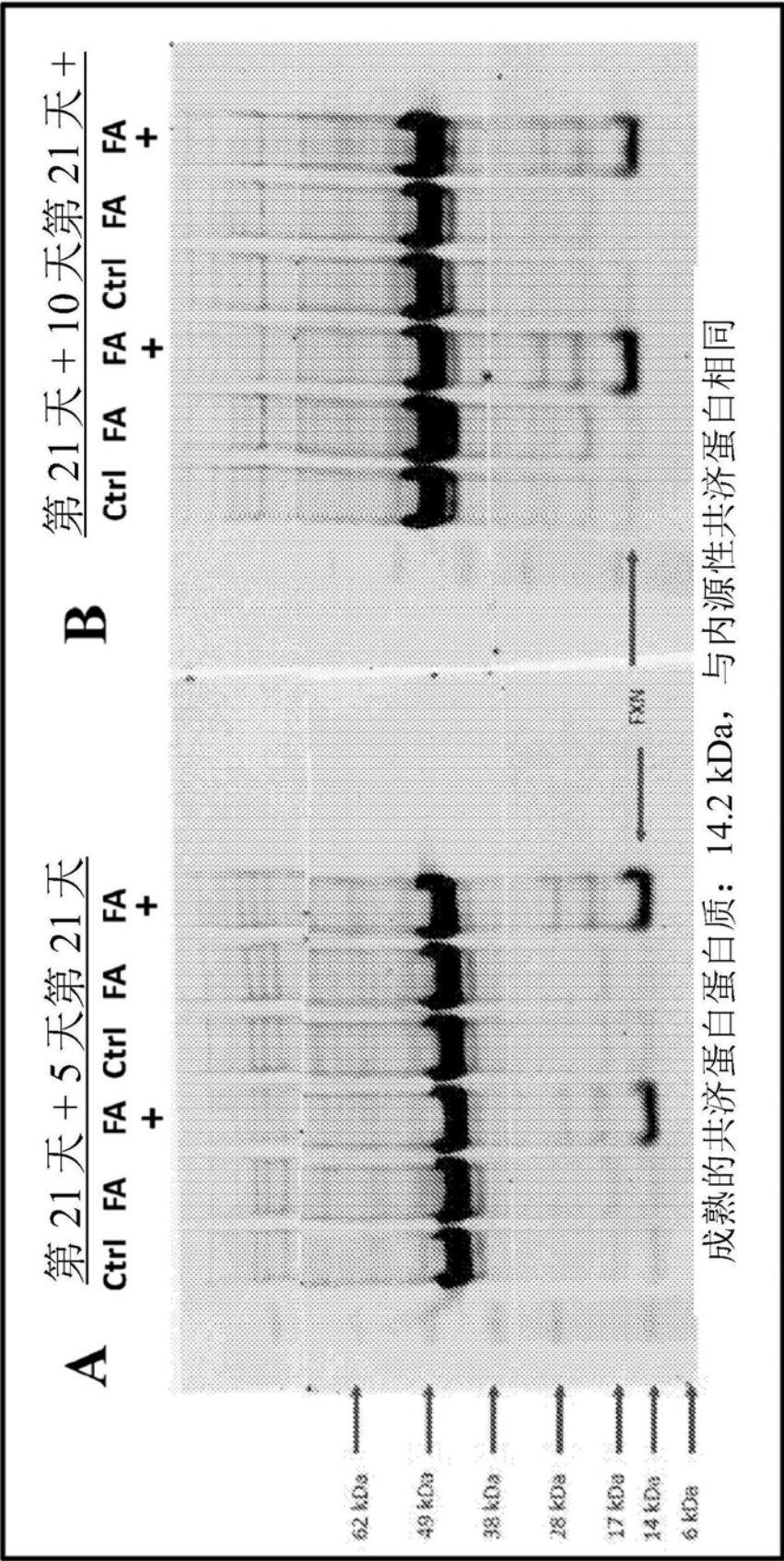


图9

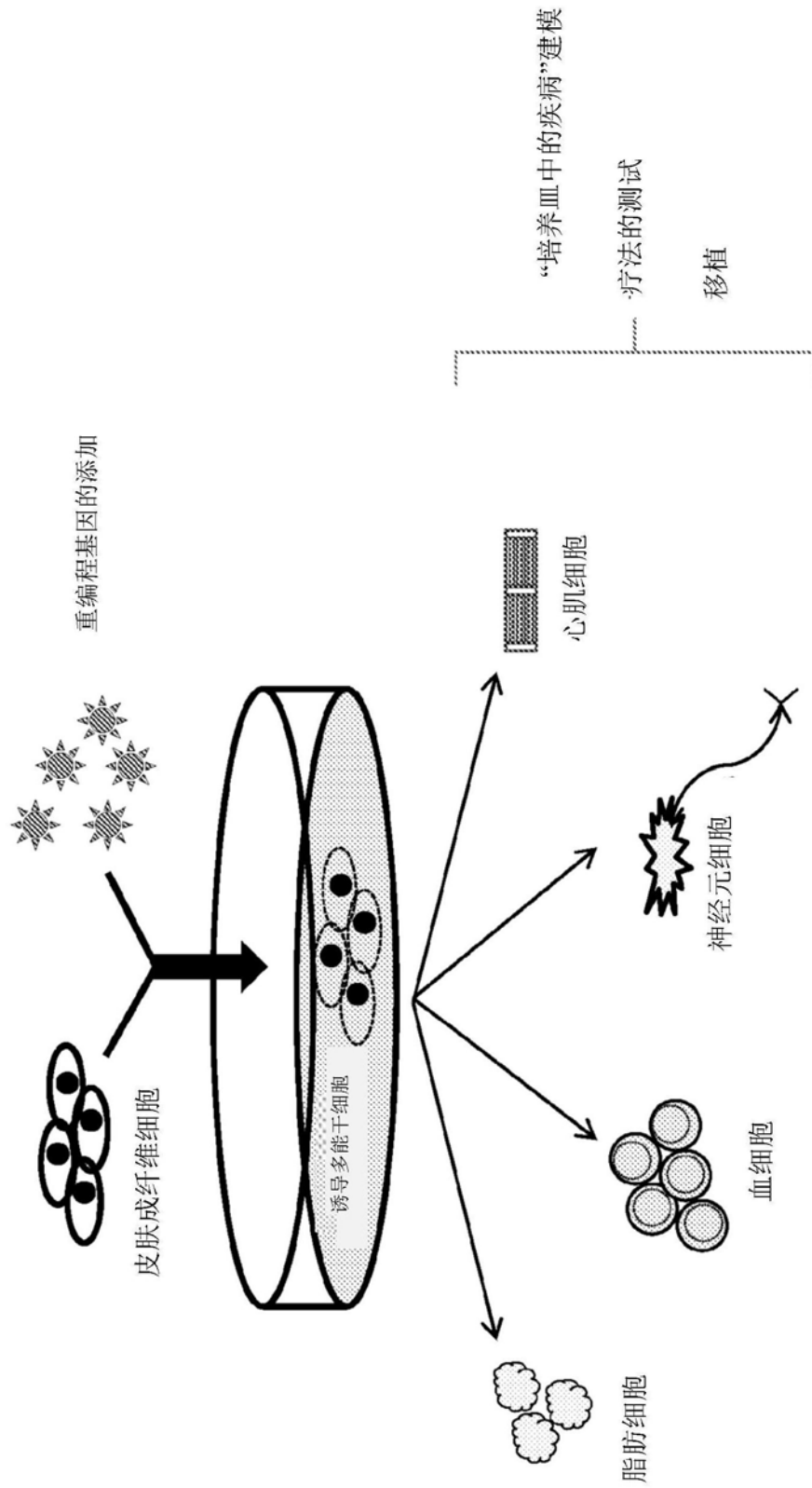


图10

质粒转染 - 电穿孔

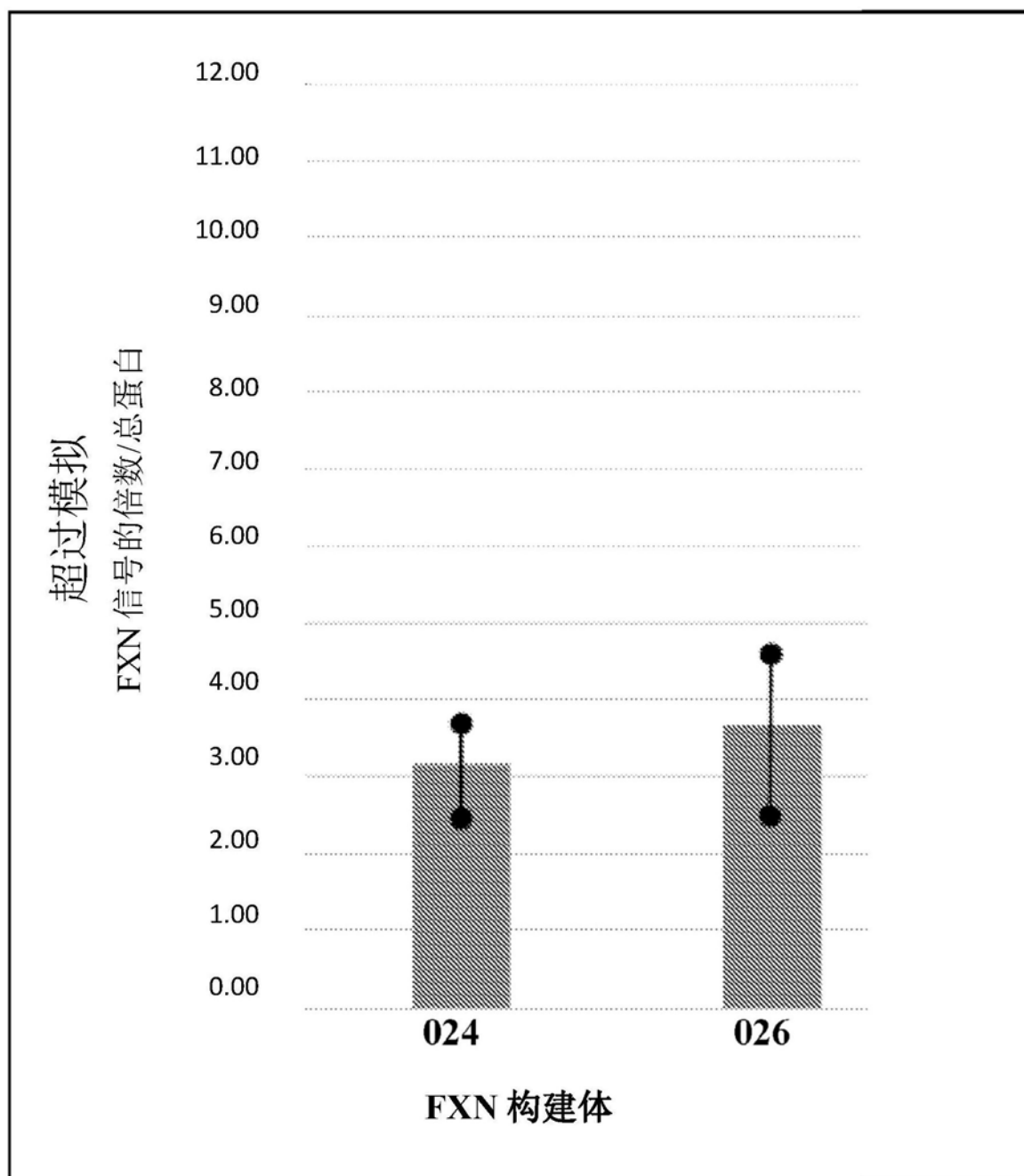


图11

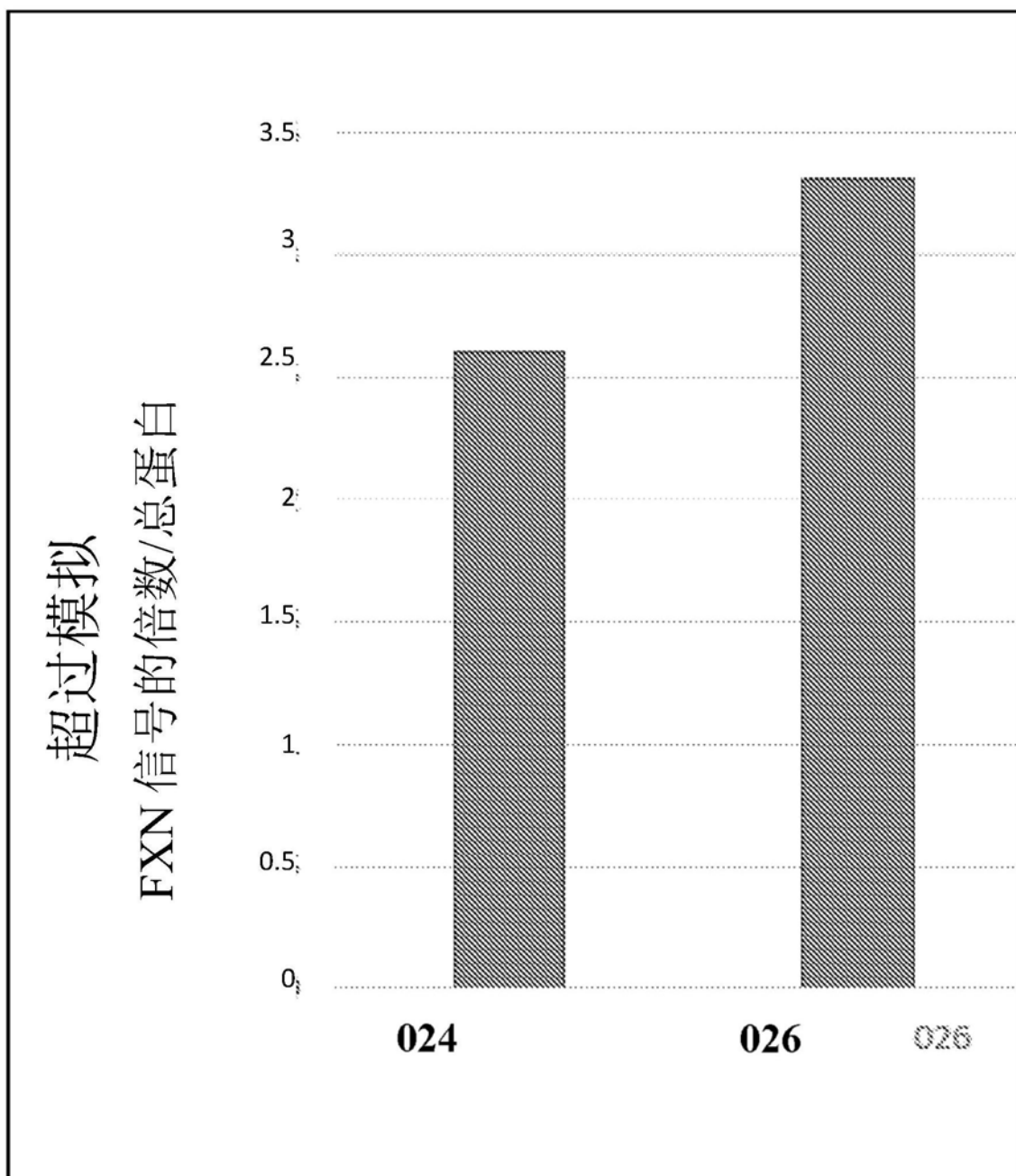
AAV-hFXN - 转导

图12

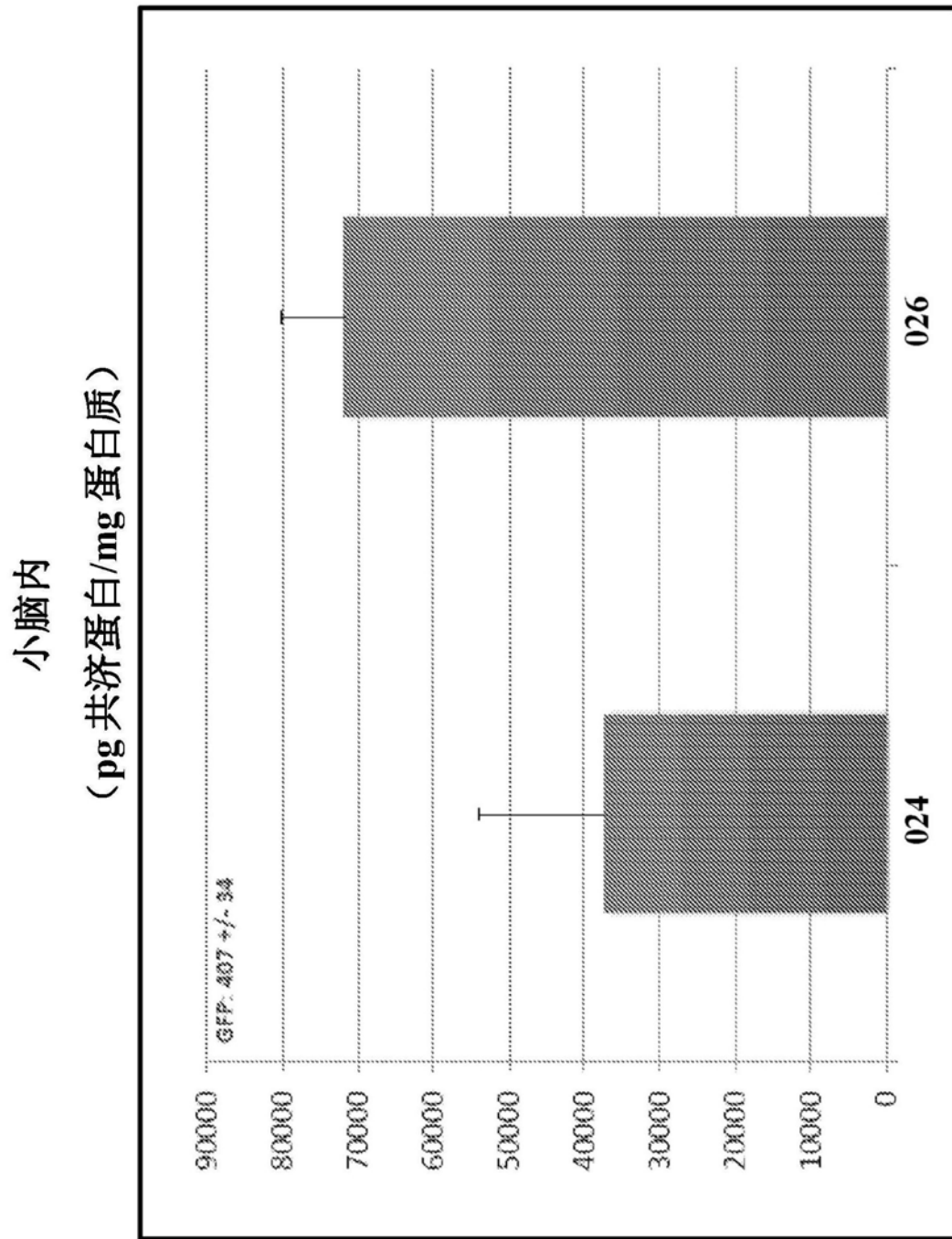


图13

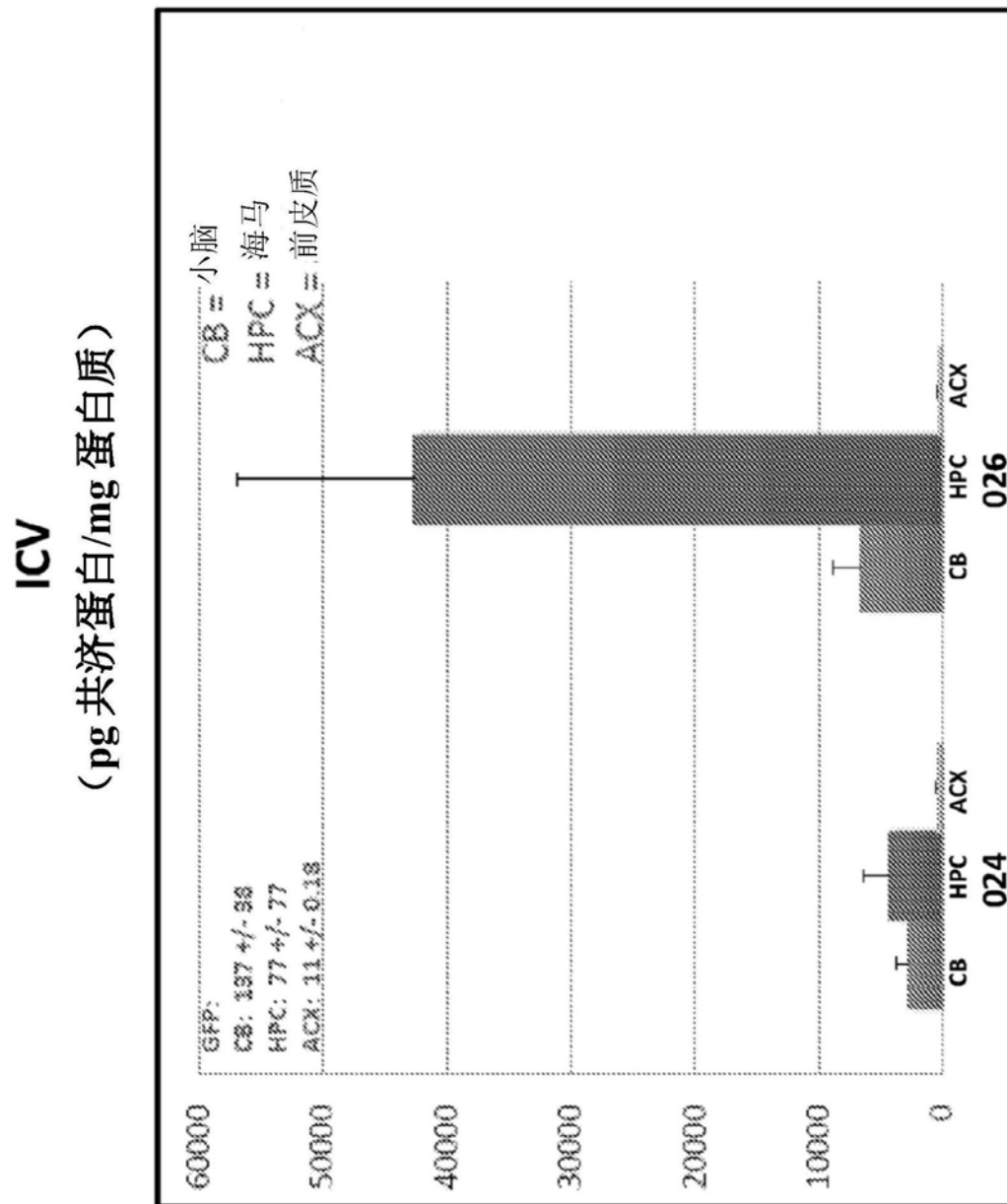


图14



图15

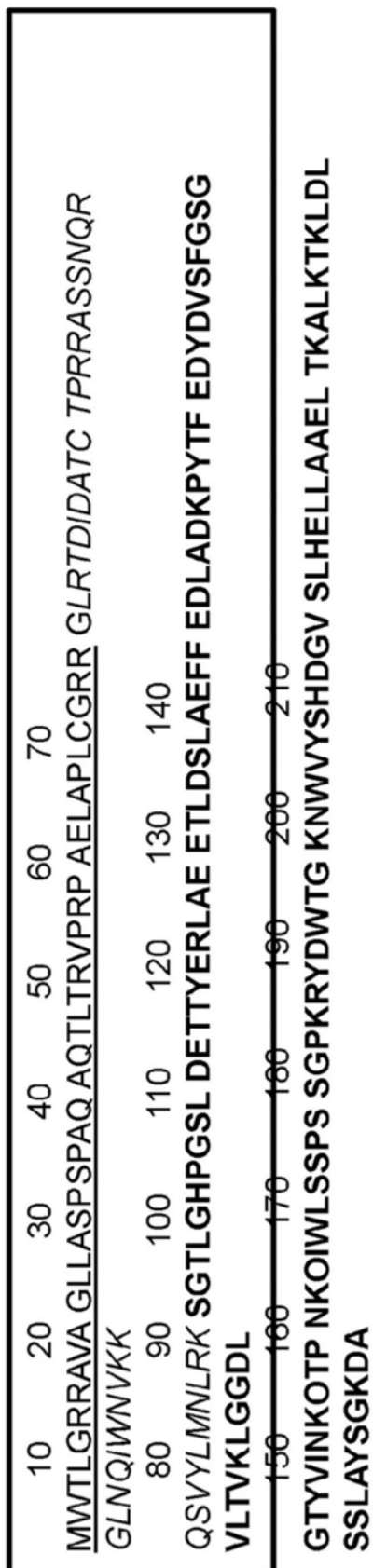


图16

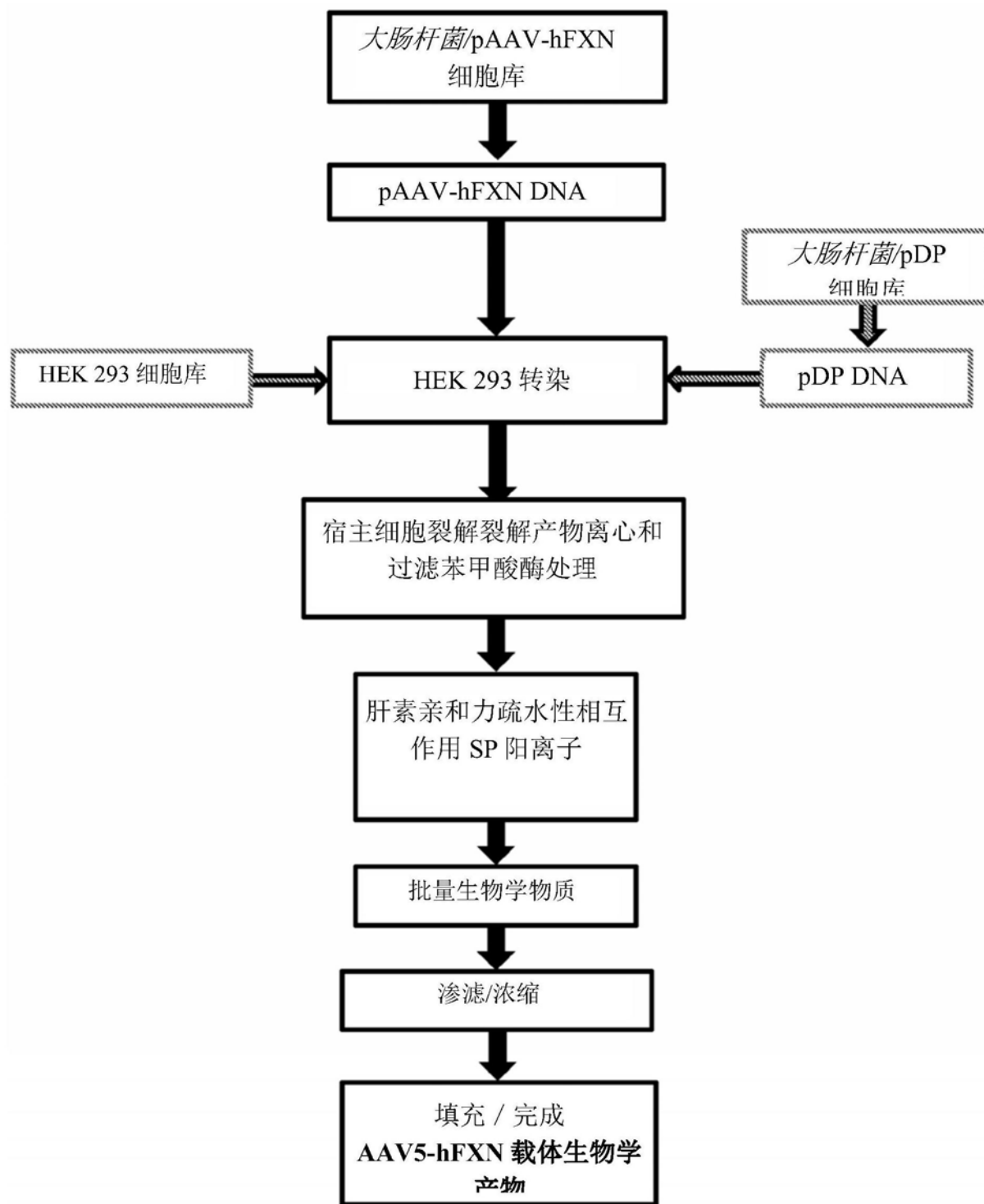


图17

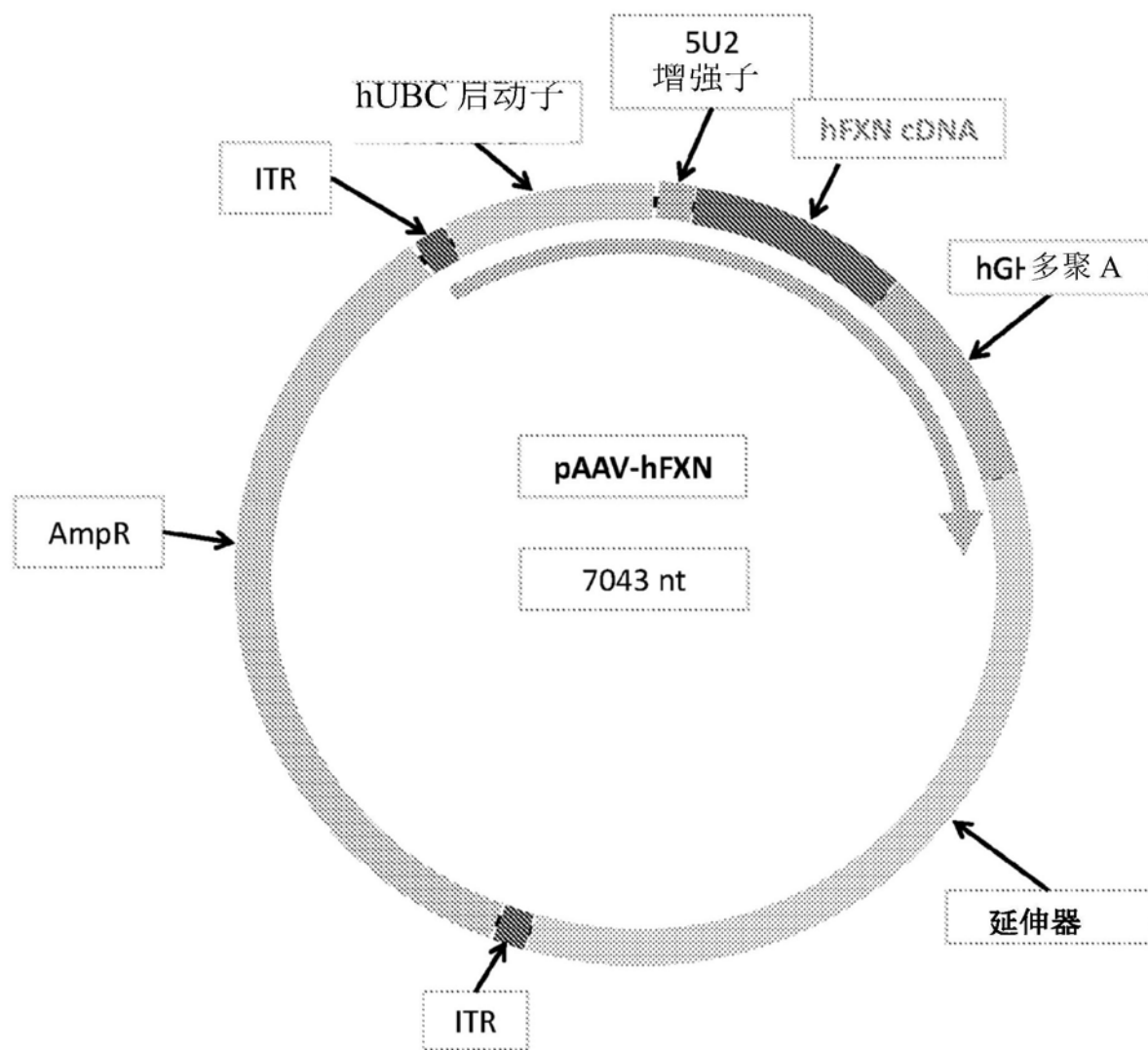


图18

```

AAV2 ITR
cct gca ggc agc tgc gcg ctc gct cgc tca ctg agg ccg ccc ggg caa agc ccg ggc gtc
ggg cga cct ttg gtc gcc cgg cct cag tga gcg agc gag cgc gca gag agg gag ttg cca
I-CeuI RE 位点
act cca tca cta ggg gtt cct taa cta taa cgg tcc taa ggt agc ga
AsiSI PacI FseI 人 U B C 启动子
gcg atc gct taa tta agg ccg gcc ggc ctc cgc gcc ggg ttt tgg cgc ctc ccg cgg gcg
ccc ccc tcc tca cgg cga gcg ctg cca cgt cag acg aag ggc gca gcg agc gtc ctg atc
ctt ccg ccc gga cgc tca gga cag cgg ccc gct gct cat aag act cgg cct tag aac ccc
agt atc agc aga agg aca ttt tag gac ggg act tgg gtg act cta ggg cac tgg ttt tct
ttc cag aga gcg gaa cag gcg agg aaa agt agt ccc ttc tcg gcg att ctg cgg agg gat
ctc cgt ggg gcg gtg aac gcc gat gat tat ata agg acg cgc cgg gtg tgg cac agc tag
ttc cgt cgc agc cgg gat ttg ggt cgc ggt tct tgt ttg tgg atc gct gtg atc gtc act
tgg tga gta gcg gcc tgc tgg gct ggg tac gtg cgc tcg ggg ttg gcg agt gtg ttt tgt
gaa gtt ttt tag gca cct ttt gaa atg taa tca ttt ggg tca ata tgt aat ttt cag tgt
SBfI
tag act agt aaa ttg tcc gct aaa ttc tgg ccg ttt ttg gct ttt ttg tta gac gcc tgc
AscI MluI 502
agg ggc gcg cca cgc gtc gaa gaa ggt gag taa tct taa cat gct ctt ttt ttt ttt
tgc taa tcc ctt ttg tgt gct gat gtt agg atg aca ttt aca aca aat gtt tgt tcc tga
cag gaa aaa cct tgc tgg gta cct tcg ttg ccg gac act tct tgt cct cta ctt tgg aaa
NheI FXN(+ Kozak)
aaa gga att gag agc cgc tag cgc cac cat gtg gac tct ccg gcg ccg cgc agt agc ccg
cct cct ggc gtc acc cag ccc agc cca gcc cca gac cct cac ccg ggt ccc gcg gcc ggc
aga gtt ggc ccc act ctg cgg ccg ccg tgg cct gcg cac cga cat cga tgc gac ctg cac
gcc ccg ccg cgc aag ttc gaa cca acg tgg cct caa cca gat ttg gaa tgt caa aaa gca
gag tgt cta ttt gat gaa ttt gag gaa atc tgg aac ttt ggg cca ccc agg ctc tct aga
tga gac cac cta tga aag act agc aga gga aac gct gga ctc ttt agc aga gtt ttt tga
aga cct tgc aga caa gcc ata cac gtt tga gga cta tga tgt ctc ctt tgg gag tgg tgt
ctt aac tgt caa act ggg tgg aga tct agg aac cta tgt gat caa caa gca gac gcc aaa
caa gca aat ctg gct atc ttc tcc atc cag tgg acc taa gcg tta tga ctg gac tgg gaa
aaa ctg ggt gta ctc cca cga cgg cgt gtc cct cca tga gct gct ggc cgc aga gct cac
taa agc ctt aaa aac caa act gga ctt gtc ttc ctt ggc cta ttc ccg aaa aga tgc ttg
ClaI SnaBI NotI SalI hGI多聚 A
aat cga tta cgt agc ggc cgc gtc gac tga tgg gtg gca tcc ctg tga ccc ctc ccc agt

```

图19A

hGl多聚y A (续)

```

gcc tct cct ggc cct gga agt tgc cac tcc agt gcc cac cag cct tgt cct aat aaa att
aag ttg cat cat ttt gtc tga cta ggt gtc ctt cta taa tat tat ggg gtg gag ggg ggt
ggt atg gag caa ggg gca agt tgg gaa gac aac ctg tag ggc ctg cgg ggt cta ttg gga
acc aag ctg gag tgc agt ggc aca atc ttg gct cac tgc aat ctc cgc ctc ctg ggt tca
agc gat tct cct gcc tca gcc tcc cga gtt gtt ggg att cca ggc atg cat gac cag gct
cag cta att ttt gtt ttt ttg gta gag acg ggg ttt cac cat att ggc cag gct ggt ctc
caa ctc cta atc tca ggt gat cta ccc acc ttg gcc tcc caa att gct ggg att aca ggc
gtg aac cac tgc tcc ctt ccc tgt cct tct gat ttt aaa ata act ata cca gca gga gga
cgt cca gac aca gca tag gct acc tgg cca tgc cca acc ggt ggg aca ttt gag ttg ctt
gct tgg cac tgt cct ctc atg cgt tgg gtc cac tca gta gat gcc tgt tga att att taa
_RsrII_ _BsiWI_ 2250 bp合成哺乳动物中性填料器r
atc ggt ccg cgt acg tta tgg cta tag aat gcc cca tct tag att gta ggt gac ttg aga
ggt cta agt cct tct ata gga tat cct tct agg tag gta taa tac tag tct agg tta aac
tag gct agg gag tca gag agc att cgc aaa gtt tac cta gtc tac aag tct ctc cca cta
tcc ttg agc cta ccc tag gct aga tcc tag gaa tca tcc cat gtc gtc att cta gct cat
agc act ctc act atc cta cta gct agg cca tct tcc tag gaa aag tat aag atc cta gtt
tga tat agc atc aat gta gct agt ggg aag gat acg gat gac ctc ata gct tgc agc ttt
ata aac ttc tcc ctc cca tac cac cta cct agg tgc tat gag gtg act tta gaa tca ccc
tct agg agg tag act atg ata gtc ctt cct tct agt atc aag ata tca tct agc tac aag
tta tgc aag gtt gac cta acc tta tag caa tat ttt gac cta cct gag agc ttt aga gcc
cta gtt tga gag tct atg tcc atc tag ggc cta cct acc tta cct act aca tga tgt agc
tct atc cta gag ccc tct cat ggt tat gag ttg cct gca agg cta gaa tct agg aag atc
ctt cca tca tat cct tgt agc tat ttt cta caa tgc aga aga ggt cct cct act tct aac
ttt tgc cat tgc ccc atc tag cta caa ggt tat gag aga gag tat aag tca tgc cat aat
acc tag gta gaa att ctc acc tat cct att tct ttc tag ctt gca gtg cta cta gca tgg
ggt gag atc ttg agt cta gcc ttt tgt cct agg gac ttt tag agc cta aga ctc tag agt
gcc ccg atc taa tat cct tct ata act tcc tac cag tct ctt ata gcc ttt gac cct att
tct acc acc tac ttc gca tgg tct ttc ttt acc tta cca taa gac tgc ctt aga cta cct
agg gag aga ctt aag gcc atg cta taa gct ata ggt cta ggc tat atc ctt tca cca tat
agc atg atc ata ggc gca aag tag aaa gga ctc tag gat aga gac tct ata gat gag ctt

```

图19B

```

gat act gac ttt gtc gtt act ttg acc cta gta gct cat act atc atg atg gtg act ctt
gag cca gta tga tct ttg tcc taa gtc cca ccc cat ctt tgc cac gct ata gat ctg ctc
taa gct ata gac cat cct tga cct acc tta gag tat agg tca aac tct aga cta gac ttt
gta gga ggg cta tag cct ttg ccc cat ctc acc tca ctc tct aat att tct atg agc ttt
tag gta aag tat ctt cta aag cta tcc tag ggt cct ttt act tca gca agt gca agg agt
caa atc tct tac ttt agg cct agc aat ctt agg tgc caa gac cct cta tag ctc tct tct
agc tca tag cat ggg ata acc ttc agt caa aag tgc tag act tgc tag aga tgc tct aga
tag ttt gac cta agg tag gtt aga aag tca ctt tgc tcc ttt tgt agt agg tca ctg aga
ctt aga atg gtc tat cct tgc tcc cta gct tag ggt ggg atc ttt tag gcc ttt gag cct
agc aag gac tct agt cta ggg tcc atc cca tct cct gca aga atc tct caa gga aag gtt
gta gaa gga atg aga gta gca atc tat agc aag gat gat ggt tgt aga atg agc atg tag
gta agg cat gag ata ctt tta cct cgt acc ttg tag gcc tat aag act ttg act tat aaa
agt ctg tcc tcc cta gcc tat atg gcc tag aaa ata gga cct tga aag aat gct ata gtg
agc tta tgg cct aca tcc tag aga atc tag gta aaa gat att atg act tag gta cta gag
tac cag caa gct aga gcc tat agc ccc atc cta ctt caa atc tta gag tat agt act tca
aag atc ata tac tct gac ttt aga cca tgg cct tag aag agg tta gag tga ggg tcc tcc
ctt gcg agg tag gag agc atc ttg agc ttt tag gag cat cct agc agc tag gtc tag aga
ggg caa gtt aga gaa gtt tga gtc atg cta gag ggc aaa gtc tca gcc tcc ttg tcc tac
aag agt cat cta ggt ata gct aca tca aac tat cat aga agt ttg att acc ctg tta tcc
cta agg aac ccc tag tga tgg agt tgg cca ctc cct ctc tgc gcg ctc gct cgc tca ctg
agg ccg ggc gac caa agg tgc ccc gac gcc cgg gct ttg ccc ggg cgg cct cag tga gcg
agc gag cgc gca gct gcc tgc agg

```

图19C

0001	taactataaac	ggcctaagg	tagcgagcga	tcgcttaatt	aaggccggcc	ggcctccgcg
0061	ccgggttttg	gcgcctcccg	cgggcgcccc	cctcctcacg	gcgagcgctg	ccacgtcaga
0121	cgaagggcgc	agcgagcgtc	ctgatccttc	cgcccggacg	ctcaggacag	cggcccgctg
0181	ctcataagac	tcggccttag	aaccccagta	tcagcagaag	gacatttttag	gacgggactt
0241	gggtgactct	agggcactgg	ttttctttcc	agagagcgga	acaggcgagg	aaaagtagtc
0301	ccttctcggc	gattctgcgg	agggatctcc	gtggggcggt	gaacgcgat	gattatataa
0361	ggacgcgccg	ggtgtggcac	agctagtctc	gtcgagccg	ggatttgggt	cgcggttctt
0421	gtttgtggat	cgctgtgatc	gtcacttgg	gagtagcggg	ctgctgggt	gggtacgtgc
0481	gctcggggtt	ggcgagtgtg	ttttgtgaag	ttttttaggc	accttttgaa	atgtaatcat
0541	ttgggtcaat	atgtaatttt	cagtgttaga	ctagtaaatt	gtccgctaaa	ttctggccgt
0601	ttttggcttt	tttgtagac	gcctgcagg	gcgcgccacg	cgtcgaagaa	ggtgagtaat
0661	cttaacatgc	tctttttttt	tttttttgc	aatccctttt	gtgtgctgat	gttaggatga
0721	catttacaac	aaatgtttgt	tcttgacagg	aaaaaccttg	ctgggtacct	tcgttgccgg
0781	acacttcttg	tctctactt	tggaaaaaac	gaattgagag	ccgctagcgc	caccatgtgg
0841	actctcggg	gccgcgcagt	agccggcctc	ctggcgctac	ccagccagc	ccaggccag
0901	accctcaccc	gggtcccgcg	gccgcgagag	ttggccccac	tctgcccgcg	ccgtggcctg
0961	cgcaccgaca	tcgatgcgac	ctgcacgccc	cgccgcgcaa	gttcgaacca	acgtggcctc
1021	aaccagattt	ggaatgtcaa	aaagcagagt	gtctatttga	tgaatttgag	gaaatctgga
1081	actttgggccc	accaggtctc	tctagatgag	accacctatg	aaagactagc	agaggaaacg
1141	ctggactctt	tagcagagtt	ttttgaagac	cttgacagaca	agccatacac	gtttgaggac
1201	tatgatgtct	cctttgggag	tgggtgtcta	actgtcaaac	tgggtggaga	cttaggaacc
1261	tatgtgatca	acaagcagac	gccaaacaag	caaactctgg	tatcttctcc	atccagtggg
1321	cctaagcgtt	atgactggac	tgggaaaaac	tgggtgtact	cccaacgacg	cgtgtccctc
1381	catgagctgc	tggccgcaga	gctcactaaa	gccttaaaaa	ccaaactgga	cttgtcttcc
1441	ttggcctatt	ccgaaaaaga	tgcttgaatc	gattacgtag	cgcccgcgctc	gactgatggg
1501	tggcatccct	gtgacccctc	cccagtgcc	ctcctggccc	tggaggttgc	cactccagt
1561	cccaccagcc	ttgtccta	aaaattaagt	tgcatcat	tgtctgacta	ggtgtccctc
1621	tataatatta	tgggttggag	gggggtggt	tggagcaagg	ggcaagttgg	gaagacaacc
1681	tgtaggccct	gcgggtctca	tgggaaacca	agctggaagt	cagtggcaca	atcttggtc
1741	actgcaatct	ccgcctcctg	ggttcaagcg	attctcctgc	ctcagcctcc	cgagttgttg
1801	ggattccagg	catgcatgac	caggctcagc	taatttttgt	tttttttggt	gagacgggg
1861	ttcaccatat	tggccaggct	ggtctccaac	tctaatctc	aggtgatcta	cccaccttgg
1921	cctcccaaat	tgctgggatt	acaggcgtga	accactgctc	ccttccctgt	cctctcgatt
1981	ttaaaataac	tataccagca	ggaggacgtc	cagacacagc	ataggctacc	tggccatgcc
2041	caaccggtgg	gacatttgag	ttgcttgctt	ggcactgtcc	tctcatgctg	tgggtccact
2101	cagttagatgc	ctgttgaatt	attttaaact	gtccgcgtac	gttatggcta	tagaatgccc
2161	catcttagat	tgtagggtgac	ttgagaggtc	taagtccctc	tataggatat	ccttctagg
2221	aggtataata	ctagtctagg	ttaactagg	ctaggagtc	agagagcatt	cgcaaagttt
2281	acctagtcta	caagtctctc	ccactatcct	tgagcctacc	ctaggctaga	tcctaggaat
2341	catcccatgt	cgctattcta	gctcatagca	ctctcactat	cctactagct	aggccatctt
2401	cctaggaaaa	gtataagatc	ctagtttgat	atagcatcaa	tgtagctagt	gggaaggata
2461	cggatgacct	catagcttgc	agctttataa	acttctccct	cccataccac	ctacctagg
2521	gctatgaggt	gacttttagaa	tcacctcta	ggaggtagac	tatgatagtc	cttcttcta
2581	gtatcaagat	atcatctagc	tacaagttat	cgaagggtga	cctaacctta	tagcaatatt
2641	ttgacctacc	tgagagcttt	agagccctag	tttgagagtc	tatgtccatc	tagggcctac
2701	ctaccttacc	tactacatga	tgtagctcta	tcctagagcc	ctctcatggt	tatgagttgc
2761	ctgcaaggct	agaatctagg	aagatccttc	catcatatcc	ttgtagctat	ttctacaa
2821	cgagaagagg	tcctcctact	tctaactttt	gccattgccc	catctagcta	caaggttatg
2881	agagagagta	taagtcatgc	cataatacct	aggtagaaat	tctcacctat	cctatttctt
2941	tctagcttgc	agtgtacta	gcctggggtg	agatcttgag	tctagccttt	tgtcctagg
3001	acttttagag	cctaagactc	tagagtgc	cgatctaata	tccttctata	acttccatcc
3061	agtctcttat	agcctttgac	cctatttcta	ccacctactt	cgcatggtct	ttctttacct
3121	taccataaga	ctgccttaga	ctacctagg	agagacttaa	ggccatgcta	taagctatag
3181	gtctaggcta	tatcctttca	ccatatagca	tgatcatagg	cgcaaagtag	aaaggactct
3241	aggatagaga	ctctatagat	gagcttgata	ctgactttgt	cgtaactttg	accctagtag
3301	ctcatactat	catgatggtg	actcttgagc	cagtatgata	tttgtcctaa	gtcccccccc
3361	atctttgcca	cgctatagat	ctgctctaag	ctatagacca	tccttgacct	accttagagt
3421	atagggtcaaa	ctctagacta	gactttgtag	gagggtcata	gcctttgccc	catctcacct

图20A

3481	cactctcttaa	tattttctatg	agctttttagg	ttaaagtatct	tctaaagcta	tcctagggtc
3541	cttttacttc	agcaagtga	aggagtcaaa	tctcttactt	taggcctagc	aatcttaggt
3601	cgcaagaccc	tctatagctc	tcttctagct	catagcatgg	gataaccttc	agtcaaaagt
3661	gctagacttg	ctagagatgc	tctagatagt	ttgacctaa	gtagggttaga	aagtcacttt
3721	cgtctttttg	tagtaggtca	ctgagactta	gaatggtcta	tccttgctcc	ctagcttagg
3781	gtgggatctt	ttaggccttt	gagcctagca	aggactctag	tctagggtcc	atcccatctc
3841	ctgcaagaat	ctctcaagga	aagggtgtag	aaggaatgag	agtagcaatc	tatagcaagg
3901	atgatggttg	tagaatgagc	atgtaggtaa	ggcatgagat	acttttacct	cgtaccttgt
3961	aggcctataa	gactttgact	tataaaagtc	tgtcctccct	agcctatatg	gcctagaaaa
4021	taggaccttg	aaagaatgct	atagttagct	tatggcctac	atcctagaga	atctaggtaa
4081	aagatattat	gacttaggta	ctagagtacc	agcaagctag	agcctatagc	cccatcctac
4141	ttcaaactct	agagtatagt	acttcaaaga	tcatatactc	tgacttttaga	ccatggcctt
4201	agaagaggtt	agagttaggg	tcctcccttg	cgaggttagga	gagcatcttg	agcttttagg
4261	agcctcctag	cagctaggtc	tagagagggc	aagtttagaga	agtttgagtc	atgctagagg
4321	gcaaagtctc	agcctccttg	tcctacaaga	gtcatctagg	tatagctaca	tcaaaactatc
4381	atagaagttt	gattaccctg	ttatccctaa	ggaaccccta	gtgatggagt	tggccactcc
4441	ctctctgcgc	gctcgtcgc	tcacttaggc	cgggcgacca	aaggctgcgc	gacgccggg
4501	ctttgcccgg	gcggcctcag	tgagcgagcg	agcgcgcagc	tgctgcagg	atctatgtcg
4561	ggtgcggaga	aagaggtaat	gaaatggcaa	gtacttccgg	aactataaat	tgcgttgcgc
4621	tcactgccc	ctttccagtc	gggaaacctg	tcgtgccagc	tgcatataatg	aatcgcccaa
4681	cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg	cgcgcttcgg	cttctcgcct	cactgactcg
4741	ctgcgctcgg	tcgttcggct	gcggcgagcg	gtatcagctc	actcaaaggc	ggtaatacgg
4801	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	aagaacatgt	gagcaaaagg	ccagcaaaag
4861	gccaggaaac	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac
4921	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag	aggtggcgaa	accgcacagg	actataaaga
4981	taccaggcgt	ttccccctgg	aaagtccttc	gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgcgcctt
5041	accggatacc	tgctcgcctt	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgtcttctca	tagctcacgc
5101	tgtaggtatc	tcagttcggt	gtaggtcggt	cgtccaaagc	tggtctgtgt	gcacgaacct
5161	cccgctcagc	ccgaccgctg	cgccttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccggta
5221	agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	agcgaggtat
5281	gtaggcgggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	tagaagaaca
5341	gtattttgta	tctgcgctct	cttgaagtcg	gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct
5401	tgatccggca	aacaaaccac	cgtcgttagc	ggtggttttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt
5461	acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct
5521	cagtggaaacg	aaaactcacg	ttaagggtatt	ttgggtcatga	gattatcaaa	aaggatcttc
5581	acctagatcc	ttttaaatta	aaaaatgaagt	tttaaataca	tctaaagtat	atatgagtaa
5641	acttgggtctg	acatgcgcag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc
5701	tgtctatttc	gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	tgtagataac	tacgatacgg
5761	gagggcttac	catctggccc	cagtgtctga	atgataccgc	gagacccacg	ctcaccggct
5821	ccagatttat	cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagcgcgg	agcgcagcag	tggtcctgca
5881	actttatccg	cctccatcca	gtctattaac	tggtgcgggg	aagctagagt	aagtagttcg
5941	ccagttaata	gtttgcggag	cgttggttgc	attgctacag	gcacgtgtgt	gtcacgctcg
6001	tcgttttggt	tggtttcatt	cagctccggg	tcccaacgat	caaggcgagt	tacatgatcc
6061	cccatgttgt	gcaaaaaagc	ggttagctcc	ttcggctcct	cgatggttgt	cagaagtaag
6121	ttggccgcag	tggtatcact	catggttatg	gcagcactgc	ataattctct	tactgtcatg
6181	ccatccgtaa	gatgcttttc	tgtagctggg	gagtattcaa	ccaagtcatc	ctgagaaatg
6241	tgtatgcggc	gaccgagttg	ctctgcccc	gcgtcaatac	gggataatac	cgcgccacat
6301	agcagaactt	taaaagtgtc	catcattggg	aagcgttctt	cggggcgaaa	actctcaagg
6361	atcttaccgc	tggttagatc	cagttcgatg	taaccacac	gagcaaccaa	ctgatcttca
6421	gcattcttta	ctttcaccag	cgtttctggg	tgagcaaaaa	caggaaggca	aaatgccgca
6481	aaaaagggaa	taagggcgac	acggaaatgt	tgaatactca	tactcttctc	ttttcaatat
6541	tattgaagca	tttatcaggg	ttattgtctc	atgagcggat	acatatttga	atgtatttag
6601	aaaaataaac	aaataggggt	tcgcgcacac	tttccccgaa	aagtgcaccc	tgagggtctaa
6661	gaaaccatta	ttatcatgac	attaacctat	aaaaataggc	gtatcacgag	gccccttctt
6721	ctcgcgcgtt	tcgggtgatga	cggtgaaaa	ctctgacaca	tgacgctccc	ggatacggtc
6781	acagcttgct	tgtaagcgga	tgccgggagc	agacaagccc	gtcagggcgc	gtcagcgggt
6841	gttgccgggt	gtcggggctg	gcttaagctg	agctaactat	gactctctta	aggtagccaa
6901	atcctgcagg	cagctgcgcg	ctcgcctcgt	cactgaggcc	gccccgggca	agccccggcg
6961	tcgggcgacc	tttggtcgcc	cggcctcagt	gagcgcgcga	gcgcgcagag	agggagtggc
7021	caactccatc	actaggggtt	cct			

图20B

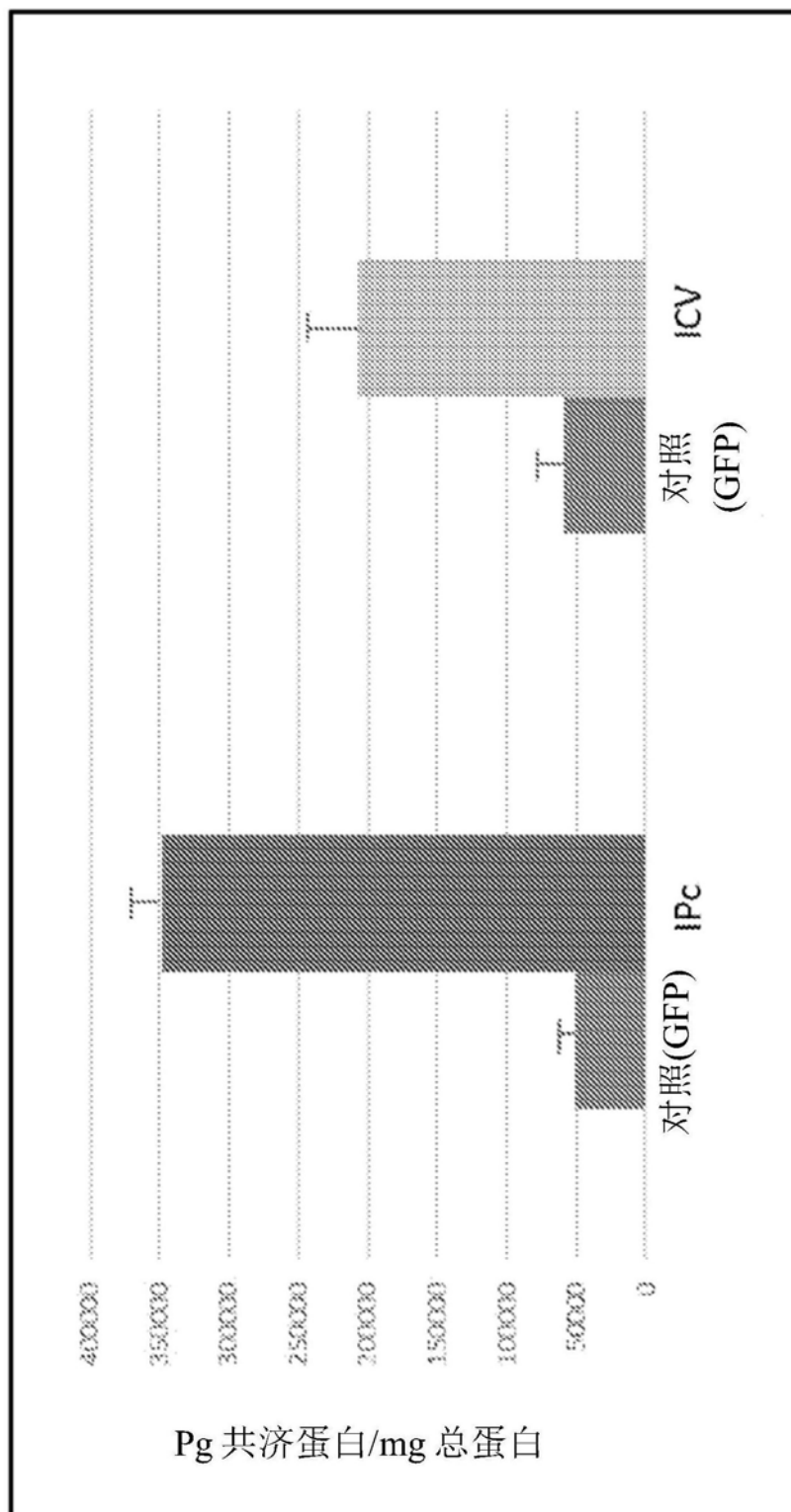


图21

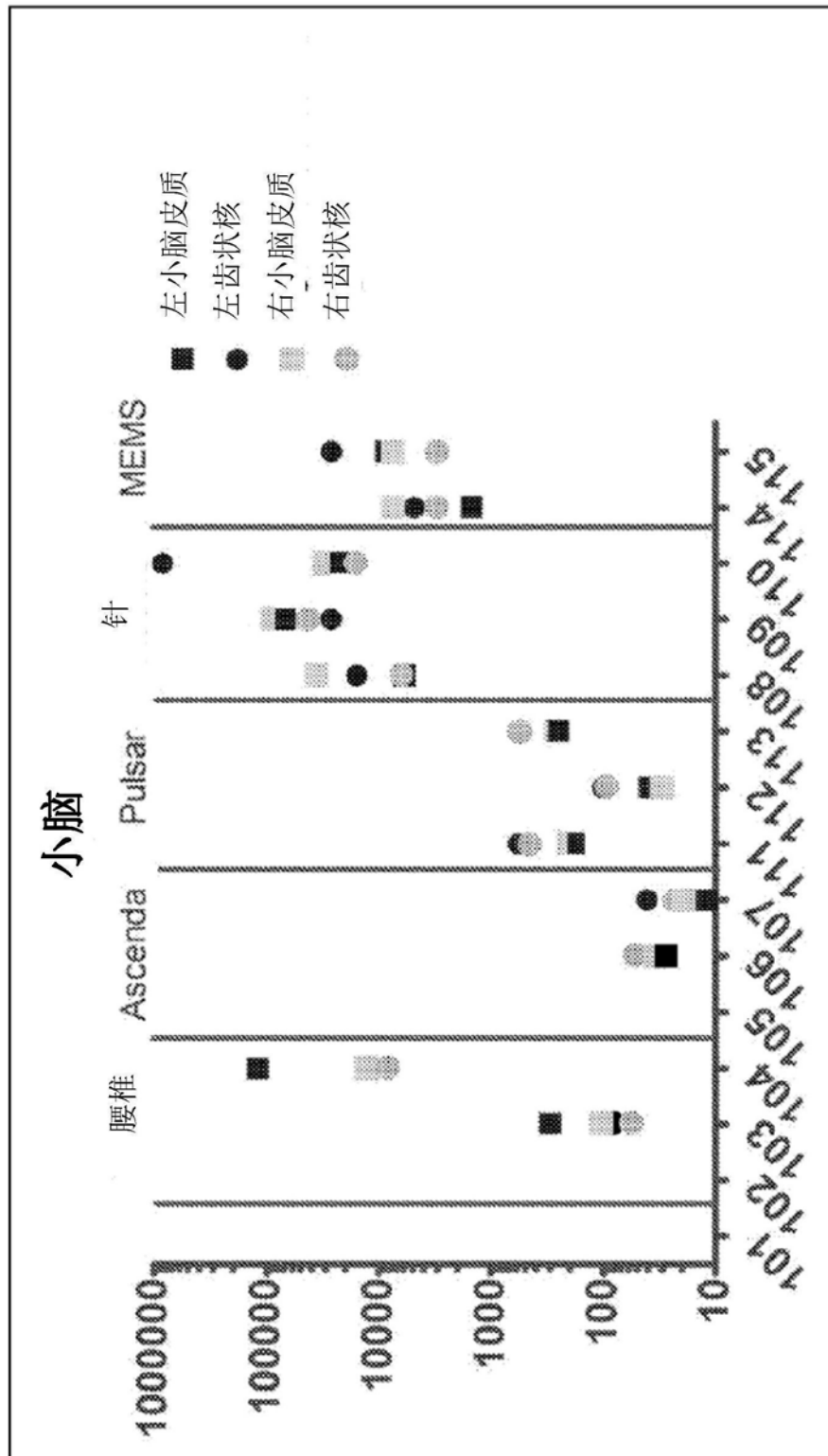


图22

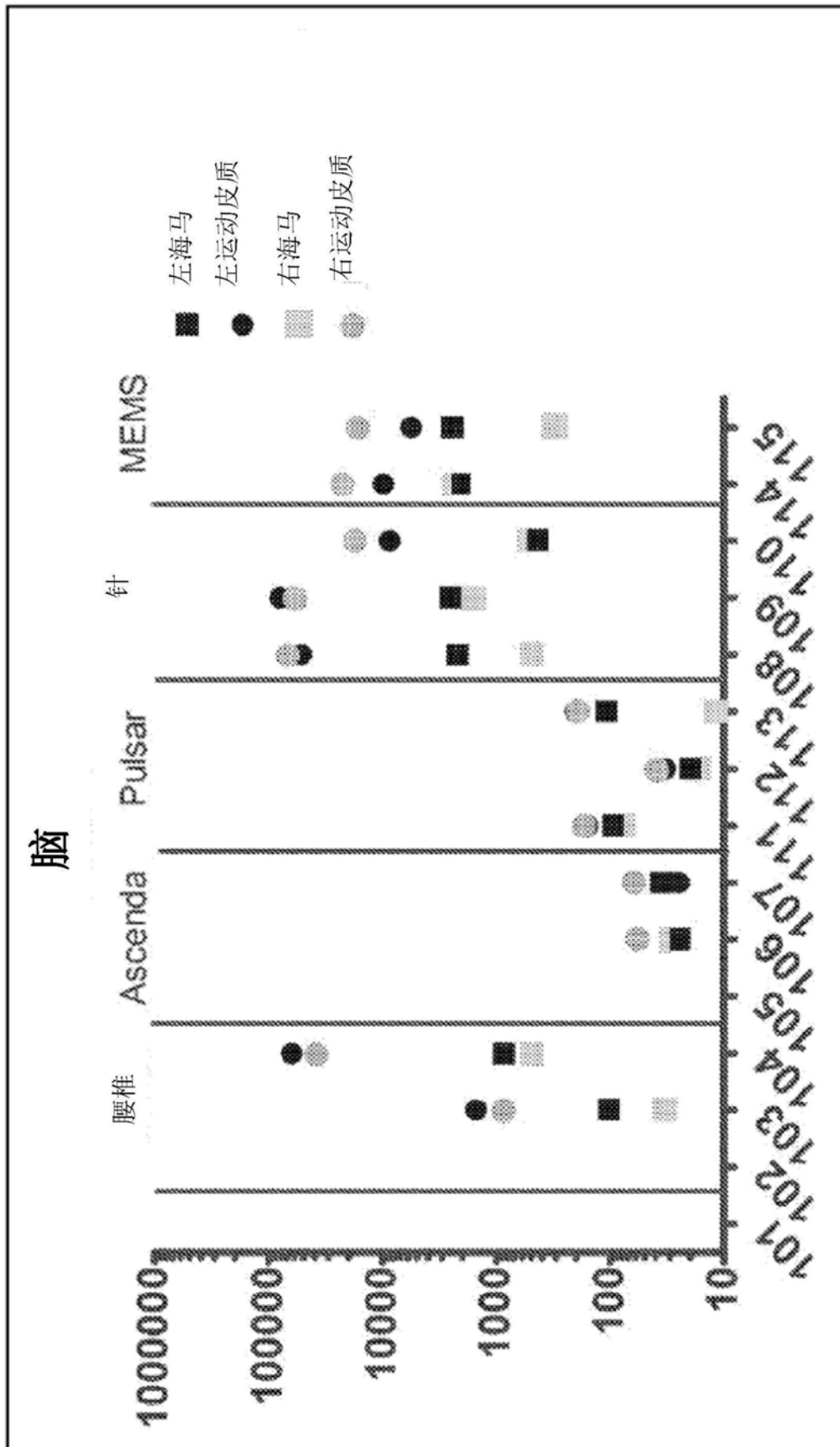


图23

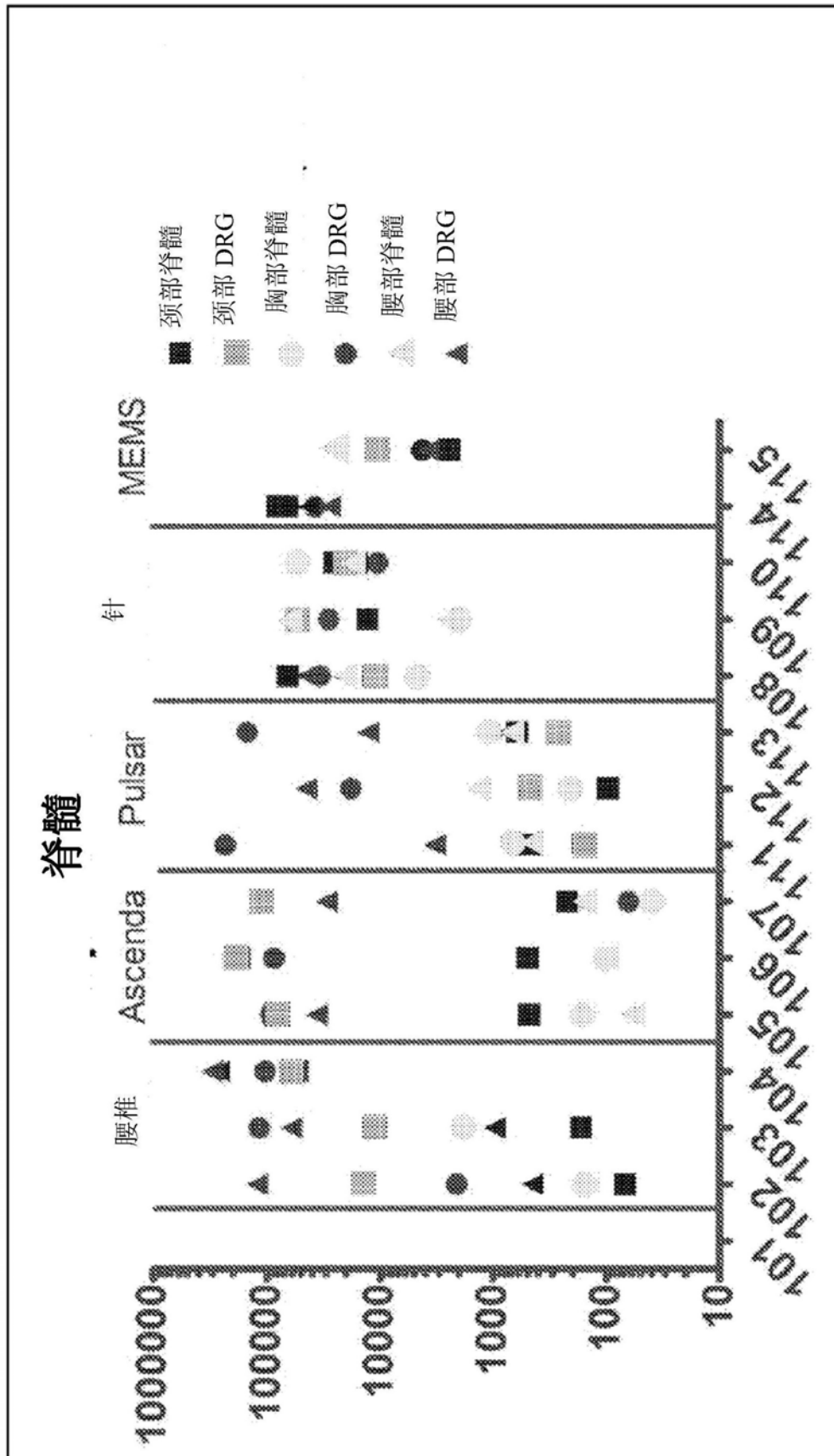


图24

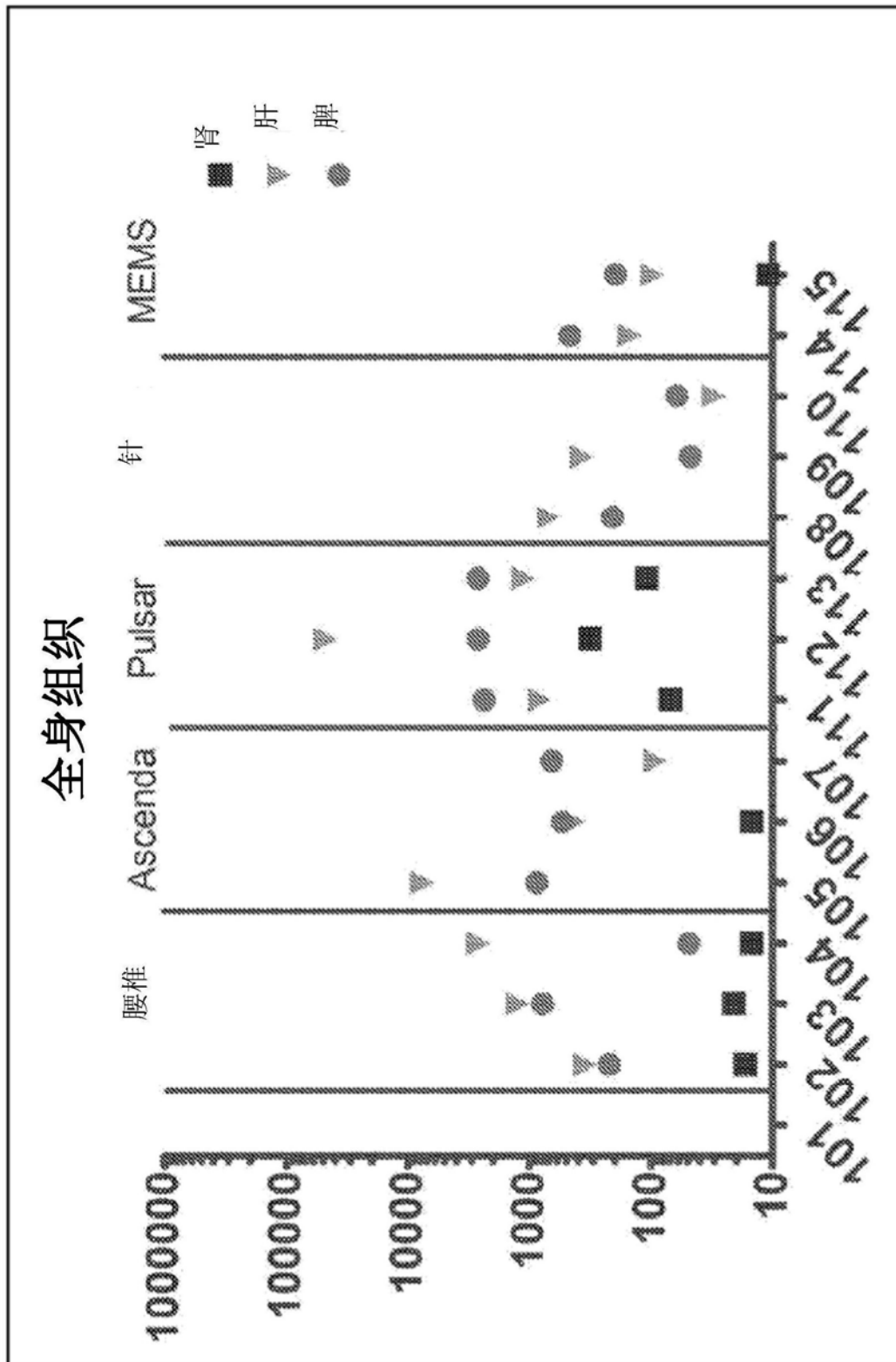


图25

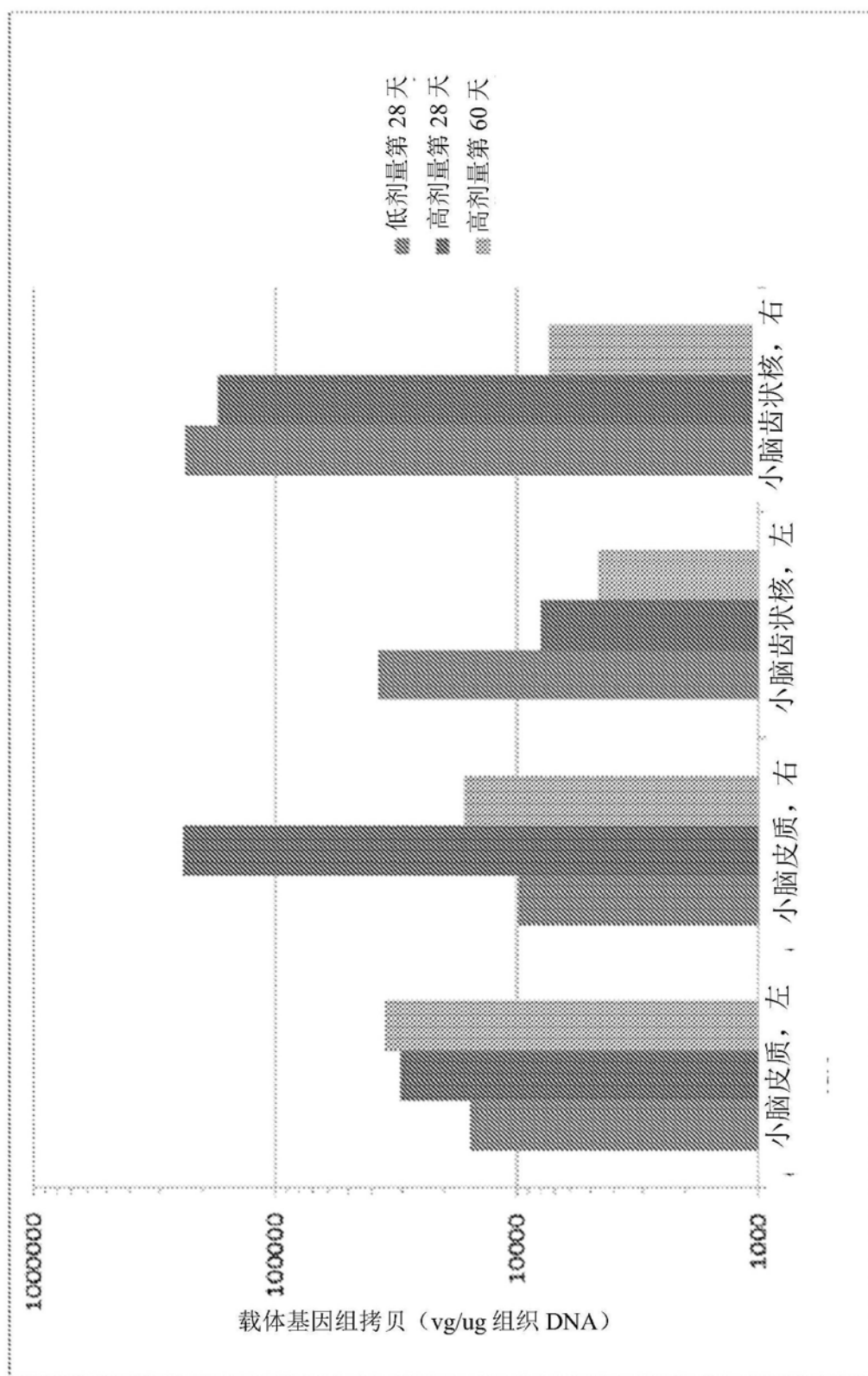


图26

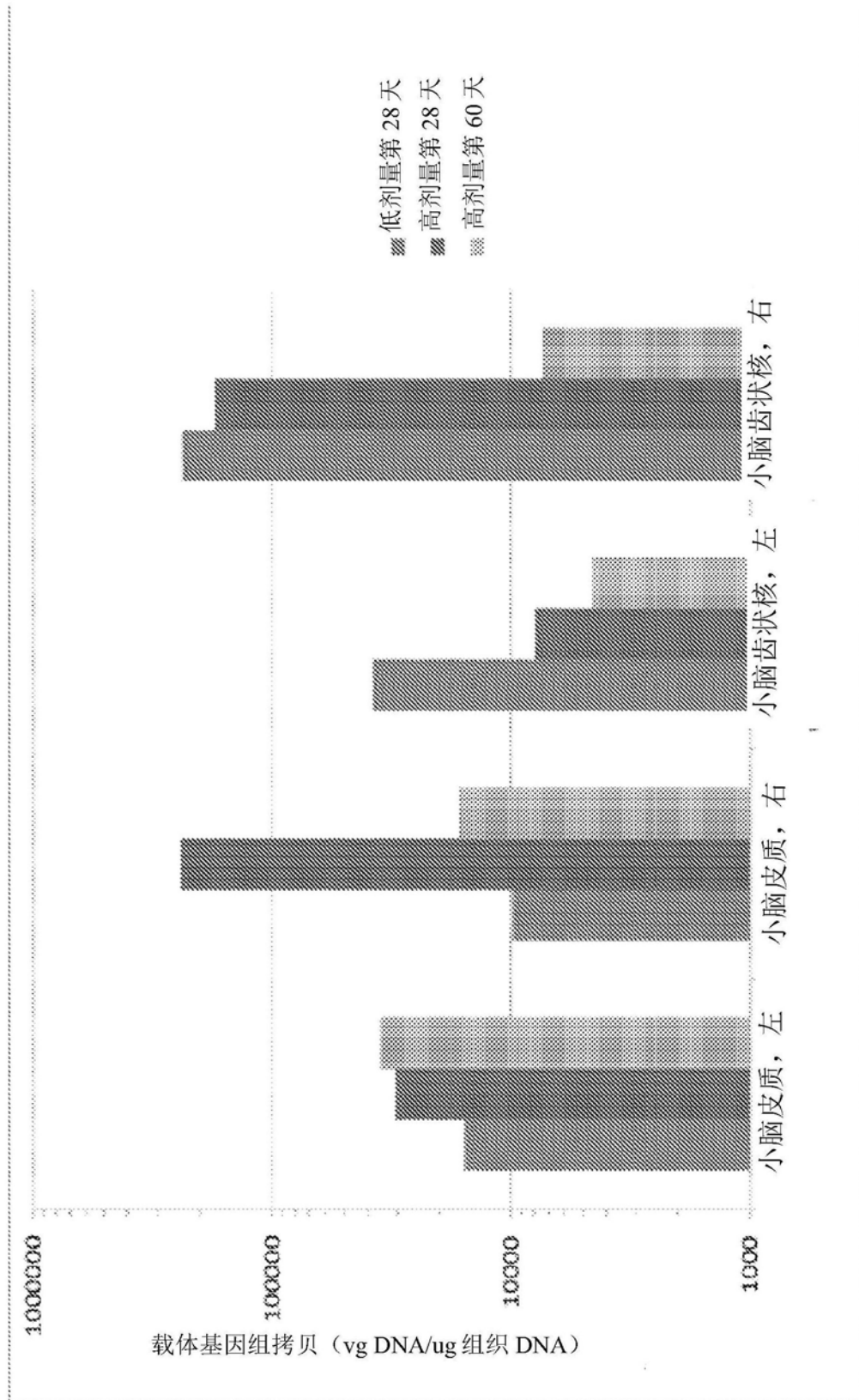


图27

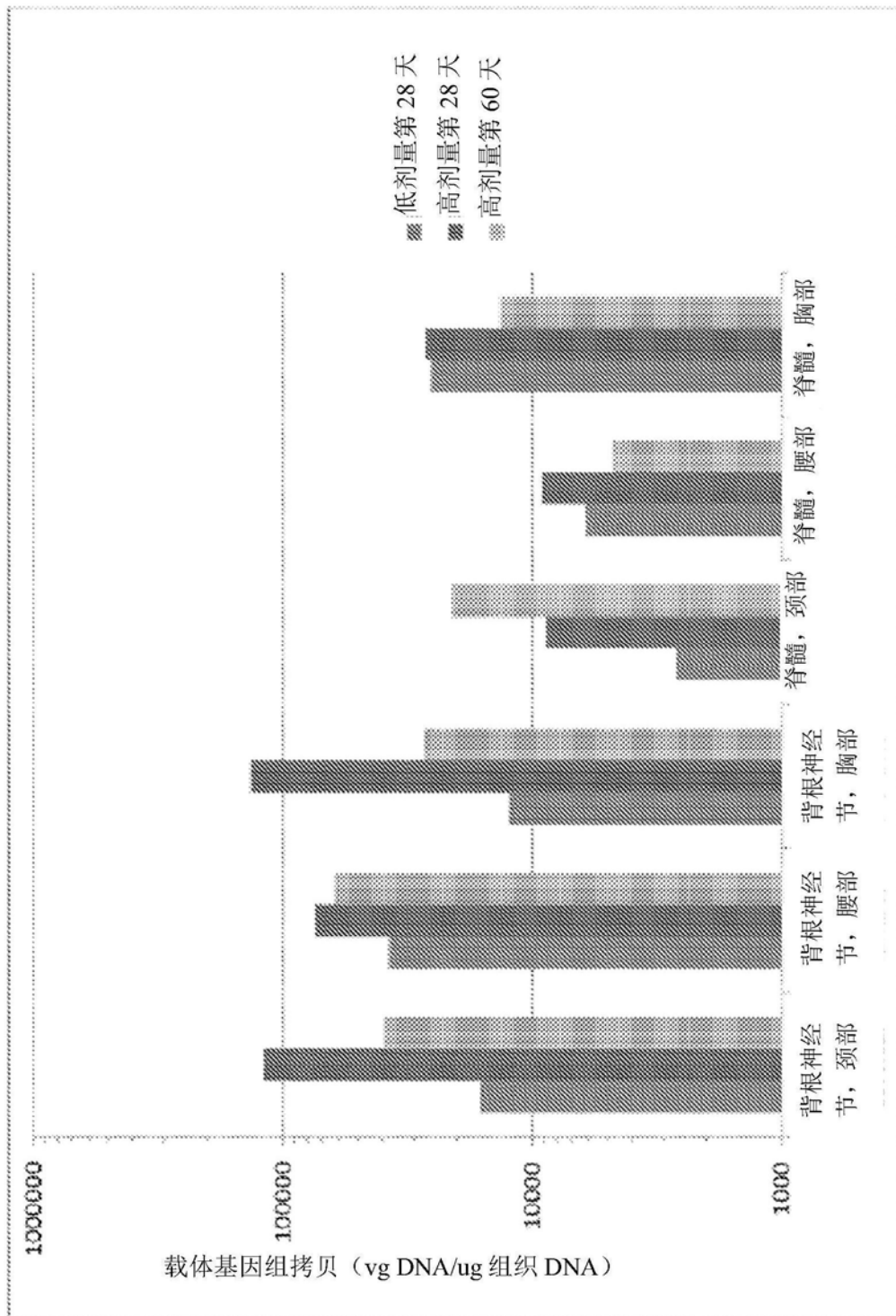


图28

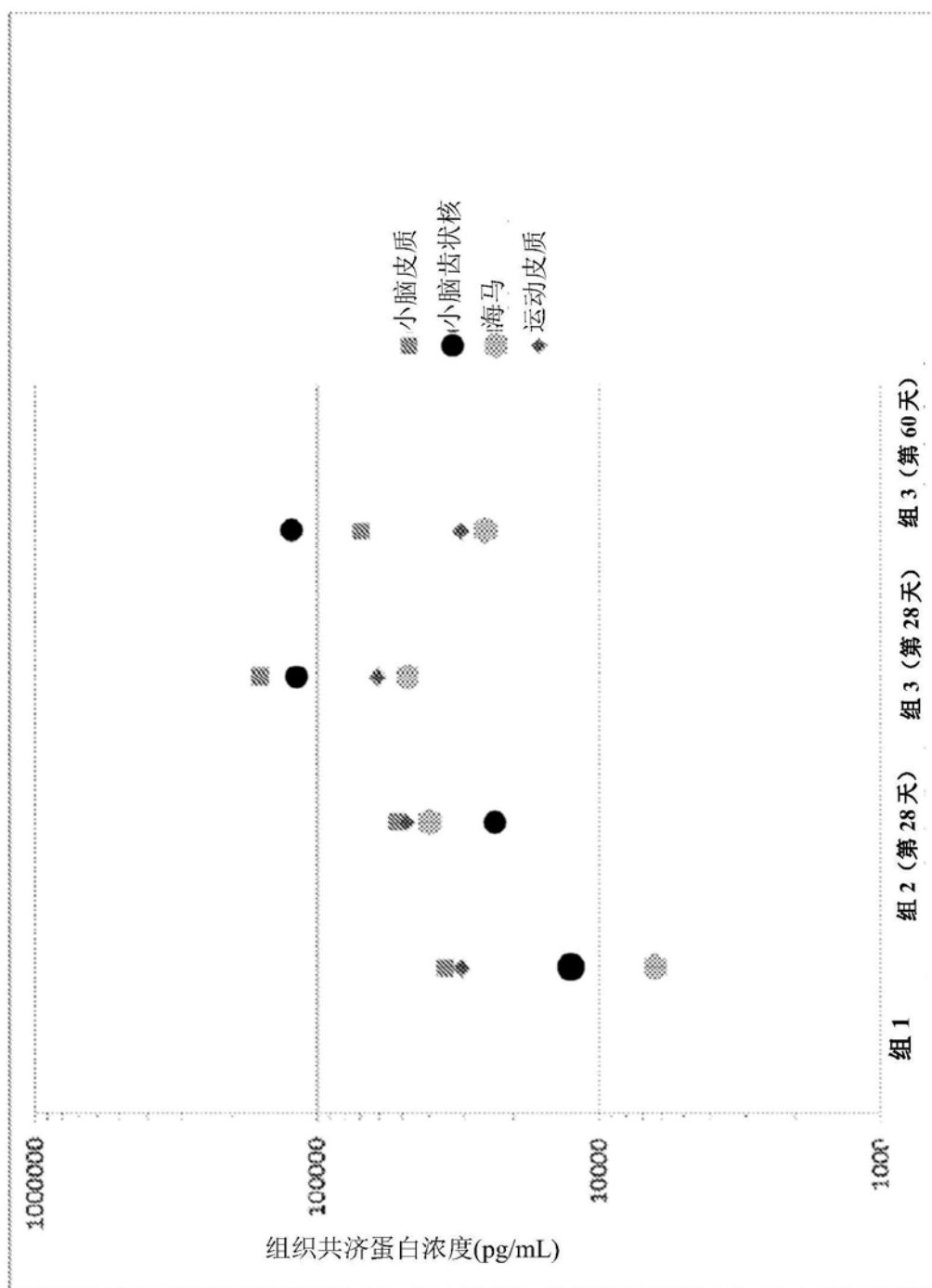


图29

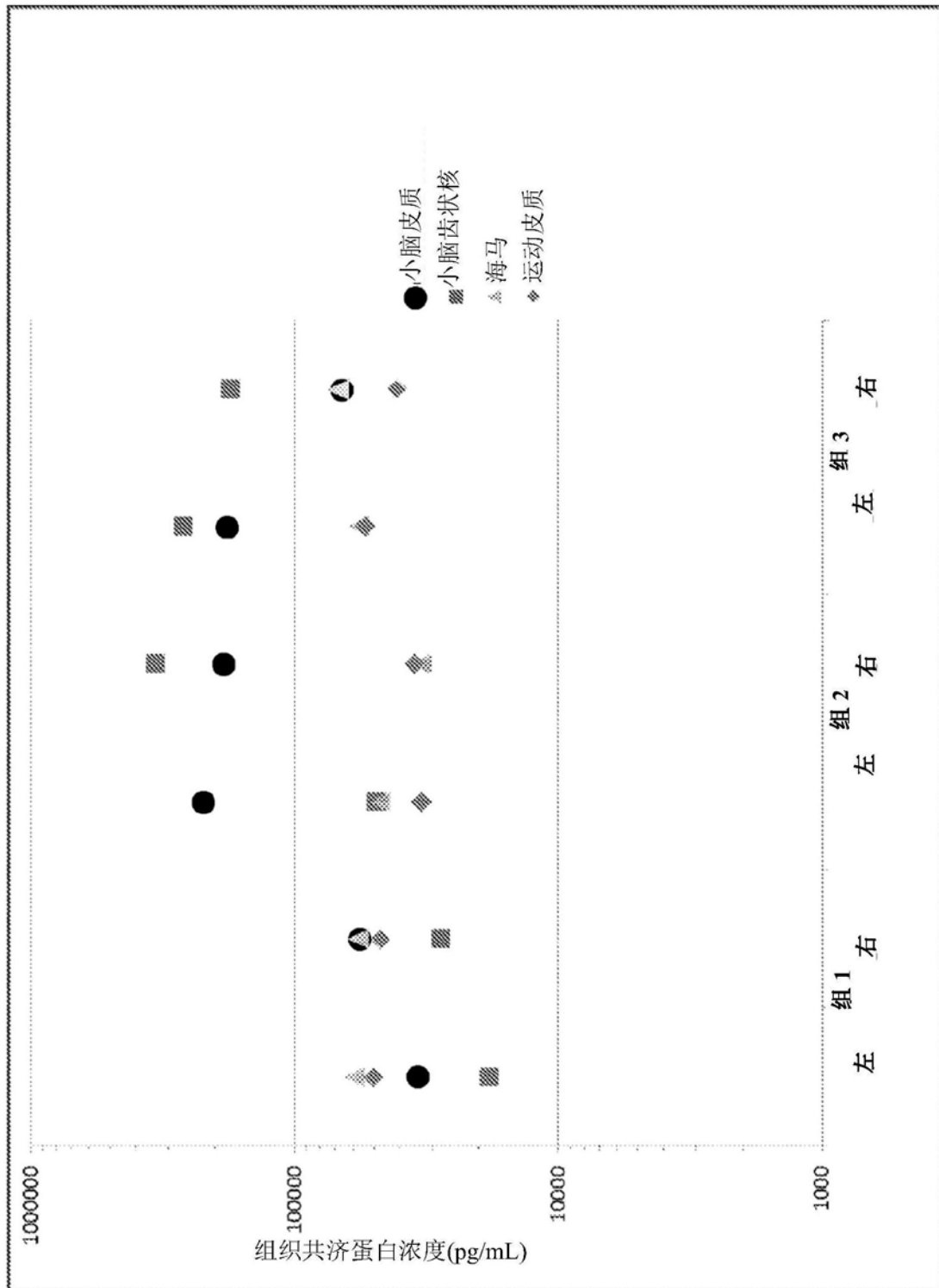


图30