



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112805375 A

(43) 申请公布日 2021.05.14

(21) 申请号 201980065721.1

(22) 申请日 2019.08.07

(30) 优先权数据

62/715,690 2018.08.07 US

62/725,803 2018.08.31 US

62/726,745 2018.09.04 US

62/727,465 2018.09.05 US

62/802,104 2019.02.06 US

62/802,558 2019.02.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/045474 2019.08.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/033525 EN 2020.02.13

(71) 申请人 桑格摩生物治疗股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·安藤 C·W·P·福

S·A·维迪亚 S·Q·王

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

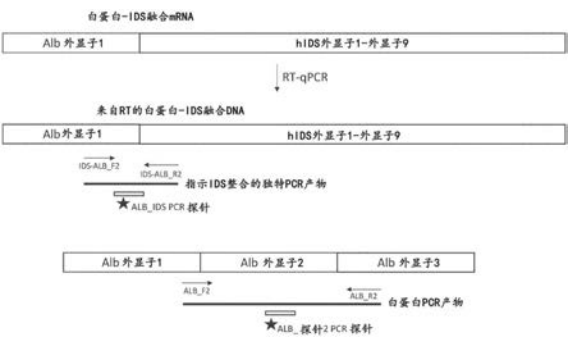
权利要求书6页 说明书88页 附图13页

(54) 发明名称

用于治疗II型黏多糖贮积症的方法

(57) 摘要

本文描述了用于治疗MPSII (亨特) 病的方法和组合物。



1. 一种在患有MPS II的受试者中减少、延迟和/或消除对额外治疗程序的需要、症状的发作、进展和/或严重程度的方法,所述方法包括通过施用包含第一AAV载体、第二AAV载体和第三AAV载体的组合物来治疗所述受试者,所述第一AAV载体包含编码指定为71557或47171的左ZFN的序列,所述第二AAV载体包含编码指定为71728或47898的右ZFN的序列,并且所述第三AAV载体包含编码艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶 (IDS) 的序列。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者中的GAG水平得以降低、稳定和/或GAG得以从所述受试者的尿液中消除。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中血浆和/或白细胞中的IDS水平得以稳定和/或增加,任选地其中IDS水平保持相同或低于检测水平。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中将第一AAV载体、第二AAV载体和第三AAV载体以1:1:8的固定比率施用。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述得以减少、延迟和/或消除的额外治疗程序包括酶替代疗法 (ERT); 骨髓移植; 和/或一种或多种用于骨科、心脏和/或上气道阻塞的支持性手术程序 (例如腺样体扁桃体切除术、疝修补、脑室腹膜分流术、心脏瓣膜置换术、腕管松解术、脊柱减压)。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中发作、进展或严重程度得以减少、延迟或消除的与MPS II相关的所述症状包括功能性能力衰退、神经病学恶化、关节僵硬、变为轮椅依赖性的、残疾进展、强迫空气正压通气需求 (呼吸机需求) 和/或寿命缩短。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一AAV载体和/或所述第二AAV载体包含以下序列中的一种或多种: 编码小肽 (包括但不限于肽标签如FLAG或His标签序列) 的序列; WPRE序列; 核定位信号 (NLS) 编码序列; 聚A信号; 锌指核酸酶的一种或多种锌指蛋白中的一个或多个突变; 锌指核酸酶的FokI核酸酶裂解结构域或裂解半结构域中的一个或多个突变; 驱动所述ZFN表达的启动子序列 (例如, 肝脏特异性启动子如人 α 1-抗胰蛋白酶 (hAAT) 启动子); 一个或多个内含子序列 (例如, HGG-IGG嵌合内含子, 所述嵌合内含子包含来自人 β -珠蛋白基因的第一内含子的5' 供体位点和来自免疫球蛋白基因重链可变区的内含子的分支和3' 受体位点); 和/或一个或多个增强子序列 (例如, 人ApoE增强子序列)。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中:

所述左ZFN包含71557并且所述右ZFN包含71728; 或者

所述左ZFN包含SB-A6P-ZFL2并且所述右ZFN包含SB-A6P-ZR2; 或者

所述左ZFN包含47171并且所述右ZFN包含47898; 或者

所述左ZFN包含SB-A6P-ZLEFT并且所述右ZFN包含SB-A6P-ZRIGHT。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述IDS供体包含任选地如SEQ ID NO:15中所示的人IDS编码序列; 和/或AAV载体, 所述AAV载体含有: (i) 如表3中所示的序列或(ii) 如SEQ ID NO:17中所示的序列。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 所述方法进一步包括在治疗之前和之后测量所述受试者中血浆、肝脏、CSF中或白细胞中的IDS活性和/或水平, 其中如果在治疗之后IDS活性增加 (例如, 增加至正常范围), 则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 所述方法进一步包括在治疗之前和之后测量所述受试者的尿液中的总GAG水平、包含硫酸皮肤素的GAG (DS GAG) 和/或包含硫酸乙

酰肝素的GAG (HS GAG) 水平,其中如果在治疗之后降低GAG、DS GAG和/或HS GAG水平,则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

12.根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法进一步包括在治疗之前和之后测量用力肺活量,其中如果在治疗之后肺功能增加,则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法进一步包括在治疗之前和之后测量步行距离,其中如果在治疗之后步行距离增加,则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

14.根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法进一步包括在治疗之前和之后测量关节活动度(JROM),其中如果在治疗之后JROM增加,则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

15.根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法进一步包括在治疗之后,在脾脏和/或肝脏体积增加之前和之后测量脾脏和/或肝脏体积。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法进一步包括在治疗之前和之后测量一种或多种神经认知能力,其中如果在治疗之后一种或多种所述神经认知能力增加,则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

17.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在治疗之后,所述受试者中的残疾进展、器官肿大、活动过度、攻击性、神经病学恶化、关节僵硬、骨骼畸形、心脏瓣膜增厚、听力损失、角膜浑浊和视力损害、疝气和/或上呼吸道感染得以抑制、减少、延迟或消除。

18.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在治疗之后,所述受试者中对使用医疗呼吸机设备的需要得以稳定、延迟、减少或避免。

19.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在治疗之后,所述受试者变为轮椅依赖性的发作得以延迟、减少或预防。

20.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在治疗之后,所述受试者的期望寿命得以增加。

21.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述额外治疗程序是ERT,任选地其中ERT在治疗之后减少或撤出,任选地其中ERT在治疗之后数小时、数周、数月或数年减少或撤出。

22.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述额外治疗程序是骨髓移植。

23.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者接受 1×10^{12} 与 1×10^{16} vg/kg之间的总AAV剂量,任选地其中所述总AAV剂量包含:(i) 5×10^{12} vg/kg,任选地包含 5×10^{11} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 4×10^{12} vg/kg的所述第三AAV载体;(ii) 1×10^{13} vg/kg,任选地包含 1×10^{12} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 8×10^{12} vg/kg的第三AAV载体;(iii) 5×10^{13} vg/kg,任选地包含 5×10^{12} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 4×10^{13} 的第三AAV载体;(iv) 1×10^{14} vg/kg,任选地包含 1×10^{13} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 8×10^{13} vg/kg的所述第三AAV载体;(v) 5×10^{14} vg/kg,任选地包含 5×10^{13} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 4×10^{14} vg/kg的所述第三AAV载体;或(vi) 1×10^{15} vg/kg,任选地包含 1×10^{14} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 8×10^{14} vg/kg的所述第三AAV载体。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中将所述组合物任选地通过输注泵以10至200mL/小时之间的任何值、任选地100mL/小时的速率静脉施用。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 在用本发明的组合物治疗之前和/或之后, 任选地用皮质类固醇、任选地泼尼松对所述受试者进行前驱用药, 任选地在治疗之前的一周或更长时间内每日地; 治疗当天; 在治疗之后的第7天; 在治疗之后每周地; 和/或在治疗之后长达20周每隔一周地, 任选地如表A中所示进行前驱用药。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述受试者是患有亨特综合征的成年人或儿童, 所述亨特综合征包括早期发作型MPS II、减毒型MPS II或早期发作与减毒型之间的MPS II。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述组合物包含制品, 所述制品包含配制品, 所述配制品包括含有所述第一AAV载体、所述第二AAV载体和所述第三AAV载体的三种药物组合物。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中每种药物组合物用不同的颜色标记。

29. 根据权利要求27或权利要求28所述的方法, 其中将所述药物组合物在施用前组合, 任选地组合在静脉输注袋中。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中用于所述受试者的总剂量如下确定: 确定所述受试者在治疗之前的体重; 用所述受试者的体重除以vg/mL浓度以确定待使用的剂量, 任选地其中所述方法包括(i) 例如如下通过将群组剂量乘以治疗之前的患者体重且然后除以VG浓度来计算所述三个产品组分体积: (a) 从研究协调员获得群组和基线处的患者体重, (b) 从临床分析证明书获得所述VG浓度; (ii) 通过将所述三个产品组分体积和NS/PBS体积相加在一起来计算总体积; (iii) 计算实现0.25%HSA最终浓度所需的HSA静脉溶液的体积, 以及(iv) 计算经调整的NS/PBS体积。

31. 包含第一AAV载体、第二AAV载体和第三AAV载体的组合物用于在患有MPS II的受试者中减少、延迟和/或消除对额外治疗程序的需要、症状的发作、进展和/或严重程度的用途, 所述第一AAV载体包含编码指定为71557或47171的左ZFN的序列, 所述第二AAV载体包含编码指定为71728或47898的右ZFN的序列, 并且所述第三AAV载体包含编码IDS的序列。

32. 根据权利要求31所述的用途, 其中所述受试者中的GAG水平得以在所述受试者的尿液中降低、稳定和/或消除。

33. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 其中血浆和/或白细胞中的IDS水平得以稳定和/或增加, 任选地其中IDS水平保持相同或低于检测水平。

34. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 其中将第一AAV载体、第二AAV载体和第三AAV载体以1:1:8的固定比率施用。

35. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 其中所述得以减少、延迟和/或消除的额外治疗程序包括酶替代疗法(ERT); 骨髓移植; 和/或一种或多种用于骨科、心脏和/或上气道阻塞的支持性手术程序, 任选地其中心脏和/或上气道阻塞包括腺样体扁桃体切除术、疝修补、脑室腹膜分流术、心脏瓣膜置换术、腕管松解术、脊柱减压)。

36. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 其中发作、进展或严重程度得以减少、延迟或消除的与MPS II相关的所述症状包括功能性能力衰退、神经病学恶化、关节僵硬、变为轮椅依赖的、残疾进展、强迫空气正压通气需求和/或寿命缩短。

37. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 其中所述第一AAV载体和/或所述第二AAV载体包含以下序列中的一种或多种: 编码小肽任选地肽标签如FLAG或His标签序列的序列; WPRE序列; 核定位信号 (NLS) 编码序列; 聚A信号; 锌指核酸酶的一种或多种锌指蛋白中的一个或多个突变; 锌指核酸酶的FokI核酸酶裂解结构域或裂解半结构域中的一个或多个突变; 驱动所述ZFN表达的启动子序列, 任选地肝脏特异性启动子如人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 (hAAT) 启动子; 一个或多个内含子序列, 任选地HGG-IGG嵌合内含子, 所述嵌合内含子包含来自人 β -珠蛋白基因的第一内含子的5'供体位点和来自免疫球蛋白基因重链可变区的内含子的分支和3'受体位点; 和/或一个或多个增强子序列, 任选地人ApoE增强子序列。

38. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 其中

所述左ZFN包含71557并且所述右ZFN包含71728; 或者

所述左ZFN包含SB-A6P-ZL2并且所述右ZFN包含SB-A6P-ZR2; 或者

所述左ZFN包含47171并且所述右ZFN包含47898; 或者

所述左ZFN包含SB-A6P-ZLEFT并且所述右ZFN包含SB-A6P-ZRIGHT。

39. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 其中所述IDS供体包含人IDS编码序列, 任选地含有如SEQ ID NO:15中所示的序列的供体; 和/或AAV载体, 所述AAV载体含有: (i) 如表3中所示的序列或(ii) 如SEQ ID NO:17中所示的序列。

40. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 所述用途进一步包括在治疗之前和之后测量所述受试者中血浆、肝脏、CSF中或白细胞中的IDS活性和/或水平, 其中如果在治疗之后IDS活性增加, 任选地增加至正常范围, 则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

41. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 所述用途进一步包括在治疗之前和之后测量所述受试者的尿液中的总GAG水平、包含硫酸皮肤素的GAG (DS GAG) 和/或包含硫酸乙酰肝素的GAG (HS GAG) 水平, 其中如果在治疗之后降低GAG、DS GAG和/或HS GAG水平, 则额外治疗程序得以延迟、减少或消除, 任选地其中GAG、DS GAG和或HS GAG水平表示为与肌酐的比率。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 所述用途进一步包括在治疗之前和之后测量用力肺活量, 其中如果在治疗之后肺功能增加, 则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 所述用途进一步包括在治疗之前和之后测量步行距离, 其中如果在治疗之后步行距离增加, 则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 所述用途进一步包括在治疗之前和之后测量关节活动度 (JROM), 其中如果在治疗之后JROM增加, 则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

45. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 所述用途进一步包括在治疗之后, 在脾脏和/或肝脏体积增加之前和之后测量脾脏和/或肝脏体积。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 所述用途进一步包括在治疗之前和之后测量一种或多种神经认知能力, 其中如果在治疗之后一种或多种所述神经认知能力增加, 则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

47. 根据前述权利要求中任一项所述的用途, 其中在治疗之后, 所述受试者中的残疾进

展、器官肿大、活动过度、攻击性、神经病学恶化、关节僵硬、骨骼畸形、心脏瓣膜增厚、听力损失、角膜浑浊和视力损害、疝气和/或上呼吸道感染得以抑制、减少、延迟或消除。

48. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中在治疗之后,所述受试者中对使用医疗呼吸机设备的需要得以稳定、延迟、减少或避免。

49. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中在治疗之后,所述受试者变为轮椅依赖性的发作得以延迟、减少或预防。

50. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中在治疗之后,所述受试者的期望寿命得以增加。

51. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述额外治疗程序是ERT,任选地其中ERT在治疗之后数小时、数天、数周、数月或数年减少或撤出。

52. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述额外治疗程序是骨髓移植。

53. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述受试者接受 1×10^{12} 与 1×10^{16} vg/kg之间的总AAV剂量,任选地其中所述总AAV剂量包含:(i) 5×10^{12} vg/kg,任选地包含 5×10^{11} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 4×10^{12} vg/kg的所述第三AAV载体;(ii) 1×10^{13} vg/kg,任选地包含 1×10^{12} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 8×10^{12} vg/kg的第三AAV载体;(iii) 5×10^{13} vg/kg,任选地包含 5×10^{12} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 4×10^{13} 的第三AAV载体;(iv) 1×10^{14} vg/kg,任选地包含 1×10^{13} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 8×10^{13} vg/kg的所述第三AAV载体;(v) 5×10^{14} vg/kg,任选地包含 5×10^{13} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 4×10^{14} vg/kg的所述第三AAV载体;或(vi) 1×10^{15} vg/kg,任选地包含 1×10^{14} vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 8×10^{14} vg/kg的所述第三AAV载体。

54. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中将所述组合物任选地通过输注泵以10至200mL/小时之间的任何值的速率、任选地以100mL/小时)的速率静脉施用。

55. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,在用本发明的组合物治疗之前和/或之后,任选地用皮质类固醇、任选地泼尼松对所述受试者进行前驱用药,任选地在治疗之前的一周或更长时间内每日地;治疗当天;在治疗之后的第7天;在治疗之后每周地;和/或在治疗之后长达20周每隔一周地,任选地根据如表A中所示的时间表进行前驱用药。

56. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述受试者是患有亨特综合征的成年人或儿童,所述亨特综合征包括早期发作型MPS II、减毒型MPS II或早期发作与减毒型之间的MPS II。

57. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述组合物包含制品,所述制品包含配制品,所述配制品包括含有所述第一AAV载体、所述第二AAV载体和所述第三AAV载体的三种药物组合物。

58. 根据权利要求57所述的用途,其中每种药物组合物用不同的颜色标记。

59. 根据权利要求57或权利要求58所述的用途,其中将所述药物组合物在施用前组合,任选地组合在静脉输注袋中。

60. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中用于所述受试者的总剂量如下确定:确定所述受试者在治疗之前的体重,所述体重任选地四舍五入成小数点后两位;用所述受试者的体重除以vg/mL浓度以确定待使用的剂量,任选地其中所述方法包括(i)例如如下通

过将群组剂量乘以治疗之前的患者体重且然后除以VG浓度来计算所述三个产品组分体积：
(a) 从研究协调员获得群组和基线处的患者体重，(b) 从临床分析证明书获得所述VG浓度；
(ii) 通过将所述三个产品组分体积和NS/PBS体积相加在一起来计算总体积；(iii) 计算实现0.25%HSA最终浓度所需的HSA静脉溶液的体积，以及(iv) 计算经调整的NS/PBS体积。

用于治疗II型黏多糖贮积症的方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求以下专利申请的权益：2018年8月7日提交的美国临时申请号62/715,690；2018年8月31日提交的美国临时申请号62/725,803；2018年9月4日提交的美国临时申请号62/726,745；2018年9月5日提交的美国临时申请号62/727,465；2019年2月6日提交的美国临时申请号62/802,104；和2019年2月7日提交的美国临时申请号62/802,558，将所述文献的公开内容通过引用以其整体特此并入。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于治疗II型黏多糖贮积症(MPS II) (也称为亨特(Hunter)综合征)的方法、和基因疗法。

背景技术

[0003] 溶酶体贮积病(LSD)是一组罕见的代谢性单基因疾病,其特征在于缺乏通常参与细胞废产物的分解的功能性单独溶酶体蛋白质,所述细胞废产物包括脂质、黏多糖如糖胺聚糖或GAG。黏多糖贮积症II(MPS II) (也称为亨特综合征)是主要发现于男性中的X连锁隐性溶酶体贮积症(Burton和Giugliani (2012) Eur J Pediatr. (2012) 4月;171(4):631-9)。所述疾病的特征在于GAG在尿液、血浆和组织中的积累,并引起多系统性进行性疾病(Muenzer (2014) Mol Gen Metabol 111:63-72)。未经治疗的患有重度亨特综合征的受试者的期望寿命是进入到青少年中期,由于神经病学恶化和/或心肺衰竭而死亡(Sato等人 (2013) Pediatr Cardiol. 34(8):2077-2079)。

[0004] 目前唯一批准用于MPS II的疗法是酶替代疗法(ERT)。使用重组艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)蛋白(艾杜硫酶; **Elaprase[®]**, Shire)的静脉(IV) ERT自2006年以来经美国FDA批准以0.5mg/kg体重的剂量进行每周一次的施用并且已显示改善5岁及以上的MPS II受试者的步行能力。ERT的局限性包括终身治疗的需要、中和抗体的开发、酶不能穿越血脑屏障以及每周静脉输注的不便。总之,这些局限性凸显了为MPS II开发更广泛的一系列治疗性疗法的迫切需要。

发明内容

[0005] 本文公开了用于治疗和/或预防受试者的亨特综合征(MPS II)的组合物和方法。本公开文本提供了用于基因组编辑和/或基因转移的方法和组合物。本公开文本提供了治疗患有MPS II的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用一种或多种多核苷酸,其中所述受试者被治疗。本文提供的治疗方法包括减少、延迟和/或消除额外治疗程序和/或与MPS II相关的一种或多种症状的发作、进展或严重程度。在一些实施方案中,本文提供的治疗方法包括降低、稳定或消除经治疗受试者的尿液中的GAG的方法。在一些实施方案中,所述方法降低、稳定或消除受试者中的尿GAG水平,包括在额外治疗程序之前、期间和之后。在一些实施方案中,本文提供的治疗方法增加或稳定血浆中IDS的浓度。在一些实施方案

中,本文提供的治疗方法导致尿GAG水平的降低、稳定或消除,同时增加或稳定血浆中IDS的浓度。在一些实施方案中,本文提供的治疗方法导致尿GAG水平的降低、稳定或消除,其中血浆中IDS的浓度低于检测水平。在一些实施方案中,总AAV剂量以1:1:8的固定比率包括两个包含ZFN编码序列的载体,和1个包含IDS供体序列的载体。

[0006] 在一些实施方案中,减少、延迟和/或消除的额外治疗程序包括用于骨科、心脏和/或上气道阻塞的酶替代疗法(ERT)和/或骨髓移植和/或支持性手术程序。在一些实施方案中,发作、进展或严重程度得以减少、延迟或消除的与MPS II相关的症状包括功能性能力衰退、神经病学恶化、关节僵硬、变为轮椅依赖性的、残疾进展、强迫空气正压通气需求(呼吸机需求)和寿命缩短。

[0007] 本文提供的组合物和方法的目的和基本原理是使用例如体内基因组编辑来废除或减少对酶替代疗法的需要。本文提供的治疗方法采用有效剂量的工程化锌指核酸酶(ZFN),包括以在体内将酶人艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(hIDS)转基因的校正拷贝以位点特异性方式整合至受试者自身肝细胞的基因组中。在一些实施方案中,hIDS转基因的整合靶向白蛋白基因座的内含子1,导致在血液中可测量的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶的稳定肝特异性表达和分泌。在一些实施方案中,将hIDS转基因置于高度表达的内源白蛋白基因座的控制下提供了患有MPS II的受试者的永久性肝特异性表达。

[0008] 本文公开了用于治疗患有MPS II的受试者的组合物和方法,所述组合物和方法包含三种多核苷酸:编码锌指核酸酶的伴侣半体(也称为“成对的ZFN”或“左和右ZFN”)的两种多核苷酸和包含编码功能性艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)的序列的第三多核苷酸。在一些实施方案中,锌指核酸酶结合并裂解人白蛋白基因。任选地,编码核酸酶的多核苷酸进一步包含编码小肽(包括但不限于肽标签和核定位序列)的序列,和/或包含在一个或多个DNA结合结构域区域(例如,锌指蛋白或TALE的骨架)中的突变和/或在FokI核酸酶裂解结构域或裂解半结构域中的一个或多个突变。当这些多核苷酸组分单独或以任何组合(例如,呈任何组合的肽序列,如FLAG、NLS、WPRE和/或聚A信号)使用时,本发明的方法和组合物提供了令人惊讶且出乎意料的人工核酸酶表达的增加,并具有增加的效率(例如,与没有本文所述的序列/修饰的核酸酶相比的2、3、4、5、6、10、20或更多倍裂解)和/或靶向特异性。在另外的实施方案中,编码锌指核酸酶的多核苷酸可以包含如本文公开的SB-47171(SB-A6P-ZLEFT)或SB-47898(SB-A6P-ZRIGHT)。在另外的实施方案中,编码锌指核酸酶的多核苷酸可以包含SB-71557(SB-A6P-ZL2)或SB-71728(SB-A6P-ZR2)。所述组合物可以进一步包含含有编码艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)的任何供体核苷酸的多核苷酸。在一些实施方案中,供体核苷酸可以包含如本文公开的SB-IDS(SB-A6P-HNT)。在一些实施方案中,将三种多核苷酸递送至缺乏IDS基因的患有MPS II的受试者,由此使得功能性IDS蛋白在受试者中表达。在一些实施方案中,将外源IDS基因与白蛋白特异性ZFN伴侣半体一起递送至受试者中的细胞,由此使得将IDS基因整合(插入)至白蛋白基因中。在另外的实施方案中,IDS基因表达IDS蛋白,由此使得患有MPS II的受试者被治疗。在一些实施方案中,在根据本文提供的方法施用组合物和/或治疗后,受试者中的尿液中GAG的浓度(例如,尿GAG水平)得以降低、稳定或消除。在本文所述的任何方法中,将IDS水平增加至治疗受试者中MPS II疾病(例如症状)的水平(例如IDS水平的正常范围)。受试者中(包括任何组织或器官如肝脏、血浆、尿液、白细胞、CNS等)的IDS水平(其例如通过降低总GAG、降低硫酸皮肤素水平、降低硫酸乙酰肝素水平

而提供治疗益处,其中降低是在组织和/或尿液等中)在施用本文所述的组合物后可以维持数天、数周、数月、数年或更长时间,包括但不限于1至365天(或其之间的任何值,如10、30、50、90、100、150、200等)。

[0009] 在一些实施方案中,所述组合物包含有效剂量的工程化锌指核酸酶(ZFN),以在体内将人酶艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(hIDS)转基因的校正拷贝以位点特异性方式整合至受试者自身肝细胞的白蛋白基因座中。在一些实施方案中,组合物的多核苷酸被携带在一个或多个AAV颗粒上(经由一个或多个AAV颗粒递送)。在其他实施方案中,AAV颗粒是AAV2/6颗粒。三个AAV2/6组分(包括IDS供体AAV、左ZFN AAV和右ZFN AAV)的组合共同地是本发明的组合物。用于治疗患有MPS II的受试者的组合物和方法有效提供hIDS,所述hIDS在受试者中是活性(功能性)的并且能够降解体内黏多糖糖胺聚糖或GAG,由此使得尿液中GAG的浓度(例如尿GAG水平)在治疗后得以降低、稳定或消除;和/或有效提供血浆中活性IDS量的可测量增加。本文提供了用于将转基因序列插入至白蛋白基因座中的方法,其中转基因编码表达的(例如在体液和组织中可检测的)hIDS蛋白(例如,功能性全长或截短的IDS蛋白),IDS蛋白从包含转基因的肝细胞表达和分泌或释放,由此使得表达的IDS蛋白能够影响不具有转基因的其他细胞或被不具有转基因的其他细胞摄取(也称为旁观者效应或交叉校正),和/或IDS是活性的,由此使得尿液GAG(例如总GAG、DS-GAG和/或HS-GAG)相对于基线稳定或减少。

[0010] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用如本文公开的方法和组合物治疗过的受试者相比减少、延迟和/或消除额外治疗程序的治疗方法,例如其中将有效量的hIDS转基因锌指核酸酶(ZFN)施用至受试者,其中受试者在治疗之后对额外治疗程序具有减少、延迟和/或消除的需要。在一些实施方案中,额外治疗程序可以包括用于与MPS II相关的心脏、气道或骨科病症的支持性治疗的骨髓移植、酶替代疗法和/或手术程序。

[0011] 在一些实施方案中,可用于本文所述的组合物和方法中的hIDS转基因(例如SEQ ID NO:15)通过AAV2/6递送来递送(例如递送至肝细胞),并且hIDS递送载体进一步包含侧接hIDS转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂例如对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于通过同源定向修复来帮助促进hIDS转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,例如以防止其中插入IDS转基因的内源白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDS转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDS供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA(SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),例如以允许将hIDS转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体包含指定为SB-IDS AAV的序列(例如表3;SEQ ID NO:17)。

[0012] 在一些实施方案中,可用于本文公开的组合物和方法中的ZFN(例如,其中ZFN对(左和右)ZFN的成员在两个单独的载体上递送的ZFN)包括分别如表1和表2以及这些表之后的序列中所示的指定为SB-47171AAV和SB-47898AAV的AAV载体。在另外的实施方案中,编码锌指核酸酶的多核苷酸可以包含SB-71557(SB-A6P-ZL2)或SB-71728(SB-A6P-ZR2)。在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来递送(例如递送至肝细胞),例如,其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171;SEQ ID NO:9),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898;SEQ ID NO:12)。在另外的实施方案中,编码锌指核酸酶的多核苷酸可以包含SB-71557(SB-A6P-ZL2,SEQ ID NO:30)或SB-71728(SB-A6P-ZR2,SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN表达在肝脏特异性增强子和启动子的控制下,例如由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000)Mol. Ther. 1 (6):522-532(200))。在一些实施方案中,肝脏特异性启动子包含一个或多个ApoE增强子序列(例如,1、2、3和/或4;参见Okuyama等人(1996)Hum Gen Ther 7 (5):637-45)。在一些实施方案中,启动子连接至内含子。在一些实施方案中,内含子是HGG-IGG嵌合内含子,其包含来自人 β -珠蛋白基因的第一内含子的5'供体位点和来自免疫球蛋白基因重链可变区的内含子的分支和3'受体位点。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,使用甲状腺素转运蛋白最小启动子(参见美国专利公开号2017/0119906)。在一些实施方案中,组合物包含SB-47171AAV(表1及表1之后的序列);SB-47898(表2及表2之后的序列);和SB-IDS AAV(表3及表3之后的序列)。在另外的实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(表4及之后的序列(例如SEQ ID NO:30));SB-71728AAV(表5及之后的序列(例如SEQ ID NO:31));和SB-IDS AAV(表3及表3之后的序列(例如SEQ ID NO:17))。

[0013] 任选地,编码核酸酶的多核苷酸进一步包含编码小肽(包括但不限于肽标签和核定位序列)的序列,和/或包含在一个或多个DNA结合结构域区域(例如,锌指蛋白或TALE的骨架)中的突变和/或在FokI核酸酶裂解结构域或裂解半结构域中的一个或多个突变。当这些多核苷酸组分单独或以任何组合(例如,呈任何组合的肽序列,如FLAG、NLS、WPRE和/或聚A信号)使用时,本发明的方法和组合物提供了令人惊讶且出乎意料的人工核酸酶表达的增加,并具有增加的效率(例如,与没有本文所述的序列/修饰的核酸酶相比的2、3、4、5、6、10、20或更多倍裂解)和/或靶向特异性。在一些实施方案中,核酸酶由mRNA编码,并且mRNA任选地包含用于增加转录和翻译效率的元件。在一些实施方案中,元件包含未翻译序列,如天然或人工的5'和/或3'UTR序列。在一些方面,在表达盒中包括5'UTR序列,而在其他方面,使用3'UTR序列。在一些实施方案中,编码人工核酸酶的mRNA包含5'UTR和3'UTR两者。在一个实施方案中,5'UTR是爪蟾属(Xenopus) β -珠蛋白UTR(参见Krieg和Melton(1994)Nuc Acid Res 12 (18):7057)。在一些实施方案中,编码爪蟾属 β -珠蛋白UTR的DNA序列是5'TGCTTGTTCTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCAGA T(SEQ ID NO:18)。在一些实施方案中,编码核酸酶的mRNA包含3'WPRE序列(参见美国专利公开号2016/0326548)。在一些实施方案中,WPRE元件在“X”区域中突变,以防止蛋白质X的表达(参见美国专利号7,419,829)。在一些实施方案中,突变的WPRE元件包含在Zanta-Boussif等人(2009)Gene Ther 16 (5):605-619中描述的突变。在一些实施方案中,WPRE是WPRE3变体(Choi等人(2014)Mol Brain 7:

17)。在一些实施方案中,3'UTR包含聚A信号序列。当这些元件组合使用时,聚A信号可以是WPRE序列的3'或5'。在一些实施方案中,聚A信号序列是牛生长激素信号序列(参见Woychik等人(1984)Proc Natl Acad Sci 81(13):3944-8)。

[0014] 本发明的方法和组合物还可以包括在DNA结合结构域内、在识别靶序列的核苷酸的残基之外的一个或多个氨基酸的突变(例如,“ZFP骨架”(在DNA识别螺旋区之外)的一个或多个突变),所述一个或多个氨基酸可以与DNA骨架上的磷酸非特异性地相互作用。因此,在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物包括ZFP骨架中阳离子氨基酸残基的突变,所述突变对于核苷酸靶标特异性不是必需的。在一些实施方案中,ZFP骨架中的这些突变包含使阳离子型氨基酸残基突变为中性或阴离子型氨基酸残基。在一些实施方案中,ZFP骨架中的这些突变包含使极性氨基酸残基突变至中性或非极性氨基酸残基。在一些实施方案中,突变是在相对于DNA结合螺旋的位置(-5)、(-9)和/或位置(-14)进行。在一些实施方案中,锌指可包含在(-5)、(-9)和/或(-14)的一个或多个突变。在一些实施方案中,多指锌指蛋白中的一个或多个锌指可包含(-5)、(-9)和/或(-14)中的突变。在一些实施方案中,在(-5)、(-9)和/或(-14)的氨基酸(例如精氨酸(R)或赖氨酸(K))突变为丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、Ser(S)、Asp(N)、Glu(E)、Tyr(Y)和/或谷氨酰胺(Q)。参见例如美国公开号20180087072。

[0015] 在一些方面,本发明的方法和组合物包括使用与真核转基因序列融合的编码外源肽序列的序列。在一些实施方案中,将外源肽翻译后融合至蛋白质序列,并且在其他实施方案中,将编码外源肽的序列框内(3'和/或5')连接至编码人工核酸酶的序列(例如,融合蛋白)。外源肽可以编码可用于纯化或标记(例如亲和纯化或免疫组织化学)的序列。此类肽的例子是聚组氨酸标签(“His标签”,Hochuli等人(1988)Bio/Technol 6(11):1321-5)或阳离子肽标签,如Flag标签(Hopp等人(1988)Bio/Technol 6(10):1204-10)。这些肽标签序列中的一个或多个(1、2、3、4、5或更多个)可以以任何组合使用。在一些实施方案中,将编码包含序列N末端DYKDDDK(SEQ ID NO:19)的外源Flag肽的序列框内融合在编码人工核酸酶的序列的C末端或N末端。在优选的实施方案中,使用编码3个FLAG序列(3x FLAG肽)的序列(参见美国专利号6,379,903),其中氨基酸序列是N末端DYKDHDG-DYKDHDG-DYKDDDDK(SEQ ID NO:20)。包含此类肽序列中的一种或多种(例如,3x FLAG)与没有所述肽序列的核酸酶相比可以使核酸酶(裂解)活性增加2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或更多倍)。

[0016] 在一些方面,编码人工核酸酶的mRNA包含核定位肽序列(NLS)。在一些实施方案中,NLS包含来自SV40病毒大T基因的序列PKKKRK V(SEQ ID NO:21)(参见Kalderon等人(1984)Nature 311(5981):33-8),而在其他情况下,NLS包含来自c-myc蛋白的序列PAAKRVKLD(SEQ ID NO:22)(参见Dang和Lee(1988)Mol Cell Biol 8(10):4048-54)。在一些实施方案中,NLS包含来自丁型肝炎病毒的序列EGAPPAKRAR(SEQ ID NO:23)(参见Alves等人(2008)Virology 370:12-21)或来自多瘤病毒T蛋白的VSRK RPRP(SEQ ID NO:24)(Richardson等人(1986)Cell 44(1):77-85)。在其他实施方案中,NLS包含衍生自核质蛋白羧基尾的序列KRPAATKKAGQAKK KKLD(SEQ ID NO:25)(参见Dingwall(1988)J Cell Biol 107:841-849和Robbins等人(1991)Cell 64(3):615-23),而在一些实施方案中,NLS包含最初由Siomi和Dreyfuss(Siomi和Dreyfus(1995)J Cell Biol 129(3):551-560)描述的序列NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY(SEQ ID NO:26)。在另外的实施方案中,NLS包含来自HTLV-1中的Rex蛋白的序列PKTRRRPRRSQRKRPT(SEQ ID NO:27)(Siomi等人(1988)

Cell 55 (2) :197-209)。包含如本文所述的NLS序列中的一种或多种与没有所述肽序列的核酸酶相比可以使核酸酶(裂解)活性增加2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或更多倍。

[0017] 在一些实施方案中,在治疗之后在受试者中延迟、减少或消除了对受试者中额外治疗程序如骨髓移植、ERT疗法和/或支持性手术程序的需要。在一些实施方案中,通过血浆和/或白细胞和/或组织(包括例如血液、肝脏组织和CSF)中IDS活性和/或水平的变化来衡量延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,血浆和/或白细胞和/或血液、肝脏组织和CSF中IDS的活性和/或水平在治疗后增加、保持相同或低于检测水平。检测血浆和/或受试者白细胞中的IDS的方法是本领域已知的。参见例如Chuan等人(2018) Orphanet J Rare Dis.13:84。在一些实施方案中,例如通过在经治疗的受试者的尿液中测量的总GAG、DS GAG(包含硫酸皮肤素的GAG)和HS GAG(包含硫酸乙酰肝素的GAG)水平(例如,表示为与肌酐的比率)的变化来衡量受试者中延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化来衡量延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,通过例如如由受试者的6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化来衡量延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,例如通过关节活动度(JROM)相对于基线的变化来衡量受试者中延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,例如通过例如如由MRI测量的脾脏和/或肝脏体积相对于基线的变化(治疗之前和之后)来衡量受试者中延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化来衡量延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要,所述神经认知能力如例如由以下量表所测量:WASI-II(韦氏简明智力量表(Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence)第二版(Shapiro等人(2015) Mol Genet Metab 116(1-2):61-68)、WPPSI-IV(韦氏学前和初小儿童智力量表(Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence))或BSID-III(贝莉婴儿发育量表(Bayley Scales of Infant Development))和VABS-II(文兰适应行为量表(Vineland Adaptive Behavior Scales))。在一些实施方案中,例如通过例如在血液、肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平相对于基线的变化来衡量延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。

[0018] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0019] 在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物包括例如通过外周静脉导管给予本发明的组合物。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂可以进一步包含例如人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如5e12vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e11vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6(例如,SB-47171AAV和SB-47898AAV或SB-71557AAV和SB-71728AAV)、和4e12vg/kg的hIDS供体AAV(例如,SB-IDS AAV)。在一些实施方案中,受试者接受例如1e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e12vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e12vg/kg的hIDS供体AAV。在另外的实施方案中,受试者接受例如5e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e12vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和4e13的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e13vg/kg的hIDS供体AAV。在一

些实施方案中,受试者接受例如5e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e15vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e14vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e14vg/kg的hIDS供体AAV。可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDS供体),例如包含SB-47171AAV(表1)、SB-47898AAV(表2)和SB-IDS AAV(表3)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(表4,SEQ ID NO:30)、SB-71728AAV(表5,SEQ ID NO:31)和SB-IDS AAV(表3,SEQ ID NO:17)。

[0020] 在一些实施方案中,受试者在接受5e12vg/kg组合物、1e13vg/kg组合物、5e13vg/kg组合物、1e14vg/kg组合物、5e14vg/kg组合物和/或1e15vg/kg组合物的总剂量之后具有延迟、减少或消除的例如对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,受试者在接受5e12vg/kg至1e15vg/kg之间(例如,5e12vg/kg与5e13vg/kg之间、5e12vg/kg与1e14vg/kg之间、5e12vg/kg与5e14vg/kg之间和/或5e12vg/kg与1e15vg/kg之间)的总剂量之后具有延迟、减少或消除的例如对额外治疗程序的需要。

[0021] 在另一方面,本文公开了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS II的受试者中减少、延迟或消除的症状的方法,所述方法包括例如向受试者施用有效量的hIDS转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者在治疗之后具有减少、延迟或消除的症状。在一些实施方案中,通过本文公开的组合物和方法减少、延迟或消除了器官肿大、活动过度、攻击性、神经病学恶化、关节僵硬、骨骼畸形、心脏瓣膜增厚、听力损失、疝气和/或上呼吸道感染。在一些实施方案中,hIDS转基因(例如,SEQ ID NO:15)通过AAV2/6递送来递送(例如,递送至肝细胞),并且hIDS递送载体(例如,如SB-IDS AAV,表3中所示,例如SEQ ID NO:17)进一步包含侧接hIDS转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接例如白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在可用于本文公开的方法和组合物中的ZFN的裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于帮助促进例如hIDS转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处(例如通过同源定向修复)。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免例如白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,例如以防止其中插入IDS转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDS转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDS供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA(SEQ ID NO:15)。存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDS转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(NHEJ或HDR)的情况下是有效的。

[0022] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(SBS-47171;SEQ ID NO:9),并且另一个包含右ZFN(SBS-47898;SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(SBS-71557;SEQ ID NO:30),并且另一个包含右ZFN

(SBS-71728;SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN包含两种单独的多核苷酸(被携带在AAV载体上):SB-47171AAV(例如表1,SEQ ID NO:9)和SB-47898(例如表2,SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,ZFN包含两种单独的多核苷酸(被携带在AAV载体上):SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30)和SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN表达在肝脏特异性增强子和启动子的控制下,由例如人ApoE增强子和人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532 (2000))。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织(在一些实施方案中)肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,组合物包含SB-47171AAV(例如表1,SEQ ID NO:9);SB-47898(例如表2,SEQ ID NO:12);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0023] 在一些实施方案中,通过比较治疗之前和之后的活性或水平所得的血浆中IDS活性或水平的变化来衡量治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS II症状。在一些实施方案中,血浆中IDS的活性和/或水平增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,例如通过在经治疗的受试者的尿液中测量的总GAG、DS GAG(例如包含硫酸皮肤素的GAG)和HS GAG(例如包含硫酸乙酰肝素的GAG)水平(表示为与肌酐的比率)的变化来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS II症状。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化或所述用力肺活量的稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS II症状。在一些实施方案中,例如通过步行距离相对于基线的变化或稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS II症状,所述步行距离如由受试者在治疗之前和之后进行6分钟步行测试以确定由于治疗引起的相对于基线的变化所测量。在一些实施方案中,例如通过关节活动度(JROM)相对于基线的变化或关节活动度的稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS II症状。在一些实施方案中,例如通过如由MRI测量的脾脏和/或肝脏体积相对于基线的变化或所述脾脏和/或肝脏体积的稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS II症状。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化或神经认知能力的稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS II症状,所述神经认知能力如由以下量表所测量:WASI-II(韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,出处同前))、WPPSI-IV(韦氏学前和初小儿童智力量表)或BSID-III(贝莉婴儿发育量表)和VABS-II(文兰适应行为量表)。在一些实施方案中,例如通过在肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平相对于基线的变化或所述水平的稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS II症状。

[0024] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0025] 在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物包括例如通过外周静脉导管给予组合物。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂可以进一步包含例如人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如

5e12vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e11vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e12vg/kg的hIDS供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如1e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e12vg/kg的hIDS供体AAV。在另外的实施方案中,受试者接受例如5e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和4e13的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e13vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e15vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e14vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e14vg/kg的hIDS供体AAV。可以将本文公开的方法和组合物分开施用,或者优选包含所有组分(例如相同或不同载体上的成对ZFN和IDS供体),例如包含SB-47171AAV(例如表1)、SB-47898AAV(例如表2)和SB-IDS AAV(例如表3)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0026] 在一些实施方案中,当受试者接受例如5e12vg/kg、1e13vg/kg、5e13vg/kg、1e14vg/kg、5e14vg/kg和/或1e15vg/kg的总剂量时,观察到在使用本文公开的方法和组合物与本发明的组合物之后在受试者中展现出的减少、延迟或消除的MPS II症状。在一些实施方案中,受试者在接受5e12vg/kg至1e15vg/kg之间(例如,5e12vg/kg与5e13vg/kg之间、5e12vg/kg与1e14vg/kg之间、5e12vg/kg与5e14vg/kg之间和/或5e12vg/kg与1e15vg/kg之间)的总剂量之后具有减少、延迟或消除的MPS II症状。

[0027] 在一些实施方案中,与没有用如本文公开的本发明方法和组合物治疗过的受试者相比,如本文公开的方法和组合物延迟患有MPS II的受试者中对ERT启动的需要,所述方法包括向受试者施用例如有效量的可用于本发明中的hIDS转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中在治疗之后受试者中对ERT的需要被延迟。hIDS转基因(例如SEQ ID NO:15)通过AAV2/6递送来递送(例如递送至肝细胞),并且hIDS递送载体进一步包含例如侧接hIDS转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂例如对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。左同源性臂(LA)含有例如在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的例如约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂例如用于通过同源定向修复来帮助促进hIDS转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小例如以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体在3'端进一步包含例如终止密码子,以防止其中插入IDS转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDS转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDS供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA(例如SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,存在例如衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDS转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情

况下是有效的。

[0028] 在一些实施方案中,可用于本文公开的组合物和方法的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送(例如,递送至肝细胞)。在一些实施方案中,ZFN是例如白蛋白特异性的,并且白蛋白特异性ZFN的半体(左组分和右组分)由单独的AAV载体携带。在一些实施方案中,一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171;SEQ ID NO:9),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898;SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,一个AAV包含左ZFN(例如,SB-71557,表4,SEQ ID NO:30);并且另一个包含右ZFN(例如SB-71728表5,SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,可用于本文公开的方法和组合物中的ZFN的表达在肝脏特异性增强子和启动子的控制下,例如由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000)Mol. Ther.1(6):522-532(200))。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)是特异性且高度活性的(例如在肝细胞和/或预期靶组织中),但是在非肝细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,AAV载体包含SB-47171AAV(例如表1)和SB-47898(例如表2)。在一些实施方案中,所施用的组合物包含SB-47171AAV(例如表1,SEQ ID NO:9);SB-47898(例如表2,SEQ ID NO:12);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0029] 在一些实施方案中,例如在治疗之后在受试者中衡量延迟或减少的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过血浆中IDS活性或水平的变化来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,血浆、CSF、肝脏和/或白细胞中IDS的活性和/或水平增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,例如通过在经治疗的受试者的尿液中测量的总GAG、DS GAG(例如包含硫酸皮肤素的GAG)和HS GAG(例如包含硫酸乙酰肝素的GAG)水平(例如尿液GAG水平)(例如,表示为与肌酐的比率)的变化或稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化或所述用力肺活量的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过如由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化或所述步行距离的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过关节活动度(JROM)相对于基线的变化或关节活动度的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过如由MRI测量的脾脏和/或肝脏体积相对于基线的变化或所述脾脏和/或肝脏体积的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化或神经认知能力的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要,所述神经认知能力如由以下量表所测量:WASI-II(韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,出处同前))、WPPSI-IV(韦氏学前和初小儿童智力量表)或BSID-III(贝莉婴儿发育量表)和VABS-II(文兰适应行为量表)。在一些实施方案中,例如通过肝脏组织和CSF中的总GAG、DS GAG和HS GAG水平相对于基线的变化或所述水平的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。

[0030] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0031] 在一些实施方案中,所述治疗包括例如通过外周静脉导管给予组合物。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN

或右ZFN的每个ZFN AAV2/6 (例如, SB-47171AAV和SB-47898AAV)、和4e12vg/kg的hIDS供体AAV (例如, SB-IDS AAV)。在一些实施方案中, 受试者接受例如1e13vg/kg的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含1e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6 (例如, SB-47171AAV或SB-71557AAV和SB-47898AAV或SB-71728AAV)、和8e12vg/kg的hIDS供体AAV (例如, SB-IDS AAV)。在一些实施方案中, 受试者接受例如5e13vg/kg的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含5e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV (例如, SB-47171AAV或SB-71557和SB-47898AAV或SB-71728AAV)、和4e13vg/kg的hIDS供体AAV (例如, SB-IDS AAV)。在一些实施方案中, 受试者接受例如1e14vg/kg的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含1e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e13vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中, 受试者接受例如5e14vg/kg的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含5e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中, 受试者接受例如1e15vg/kg的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含1e14vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中, 可以将组分分开施用, 或者优选作为包含所有组分 (例如相同或不同载体上的成对ZFN和IDS供体), 例如包含SB-47171AAV或SB-71557 (例如表1或表4)、SB-47898AAV或SB-71728 (例如表2或表5) 和SB-IDS AAV (例如表3) 的组合物施用。

[0032] 在一些实施方案中, 例如在用组合物以5e12vg/kg、1e13vg/kg、5e13vg/kg、1e14vg/kg、5e14vg/kg和/或1e15vg/kg的总剂量治疗之后, 衡量受试者中延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中, 在接受5e12vg/kg至1e15vg/kg之间 (例如, 5e12vg/kg与5e13vg/kg之间、5e12vg/kg与1e14vg/kg之间、5e12vg/kg与5e14vg/kg之间和/或5e12vg/kg与1e15vg/kg之间) 的总剂量之后, 衡量延迟的对ERT的需要。

[0033] 在另一方面, 本文公开了用于在患有MPS II的受试者中去除 (撤出) ERT的方法, 所述方法包括例如 (a) 向接受ERT的受试者施用有效量的如本文所述的hIDS转基因和锌指核酸酶 (ZFN); 和 (b) 在步骤 (a) 之后从受试者撤出ERT。可以在施用之后的任何时间处 (包括在施用转基因和一种或多种ZFN之后数小时 (0-48)、数天 (1-7天)、数周 (1-4周)、数月 (1-12) 或数年 (1-10年)) 撤出ERT。在某些实施方案中, 完全撤出ERT, 而在其他实施方案中, 可以将ERT撤出持续任何时间段, 包括例如与未施用转基因和一种或多种ZFN的受试者相比更长的时间段。在一些实施方案中, 所述方法可以进一步包括通过以下方式评估受试者中撤出ERT的能力: 在施用转基因和一种或多种ZFN后在受试者中例如测量与MPS II相关的一种或多种症状, 例如通过评估器官肿大、活动过度、攻击性、神经病学恶化、关节僵硬、骨骼畸形、心脏瓣膜增厚、听力损失、疝气和/或上呼吸道感染的变化, 其中如果测量证明这些 (MPS II) 症状中的一种或多种通过本文公开的组合物和方法减少、延迟或消除, 则使得不再需要ERT。在一些实施方案中, 所述方法包括通过AAV2/6递送来递送 (例如, 递送至肝细胞) 的hIDS转基因 (例如, SEQ ID NO:15), 并且hIDS递送载体 (例如, 如SB-IDS AAV, 表3中所示, 例如SEQ ID NO:17) 进一步包含侧接hIDS转基因的同源性臂 (例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16), 所述同源性臂侧接例如白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。左同源性臂 (LA) 含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸 (例如SEQ ID NO:13), 并且右同源性臂 (RA) 含有在可用于本文公开的方法和组合物中的ZFN的裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸 (例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中, 同源性臂用于

帮助促进例如hIDS转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处(例如通过同源定向修复)。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免例如白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,例如以防止其中插入IDS转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDS转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDS供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA(SEQ ID NO:15)。存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDS转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(NHEJ或HDR)的情况下是有效的。

[0034] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:30),并且另一个包含右ZFN(SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN包含两种单独的多核苷酸(被携带在AAV载体上):SB-47171AAV或SB-71557(例如表1或表4,分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:30)和SB-47898或SB-71728(例如表2或表5,分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN表达在肝脏特异性增强子和启动子的控制下,由例如人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532(2000))。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织(在一些实施方案中)肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,组合物包含SB-47171AAV(例如表1,SEQ ID NO:9);SB-47898(例如表2,SEQ ID NO:12);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0035] 在一些实施方案中,用本文公开的方法和组合物治疗之后,在患有MPS II的受试者中ERT的撤出通过治疗之前和之后的以下项中的一项或多项来评估:测量如在治疗之前与之后之间血浆、CSF、肝脏中或白细胞中IDS活性或水平的变化或稳定性,其中在治疗之后增加的IDS活性表明可以延迟或撤出ERT;测量如在治疗之前与之后之间经治疗的受试者的尿液中总GAG、DS GAG(例如包含硫酸皮肤素的GAG)和/或HS GAG(例如包含硫酸乙酰肝素的GAG)水平(表示为与肌酐的比率),其中在治疗之后总GAG、DS GAG和/或HS GAG水平的降低或稳定表明可以撤出或延迟ERT;测量如在治疗之前与之后之间由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化或所述用力肺活量的稳定性,其中在治疗之后用力肺活量的增加或稳定表明可以撤出或延迟ERT;测量步行距离相对于基线的变化或步行距离的稳定性,所述步行距离如由受试者在治疗之前和之后进行6分钟步行测试以确定由于治疗引起的相对于基线的变化所测量,其中在治疗之后受试者的步行距离的增加或稳定表明可以撤出或延迟ERT;测量如在治疗之前与之后之间关节活动度(JROM)相对于基线的变化或关节活动度的稳定性,其中在治疗之后活动度的增加或稳定表明可以撤出ERT;测量如在治疗之前与之后之间如由MRI测量的脾脏和/或肝脏体积相对于基线的变化或所述脾脏和/或肝脏体积的稳定性,其中在治疗之后脾脏和/或肝脏体积的减少或稳定表明可以撤出或延迟ERT;测量神经认知能力相对于基线(治疗之前)的变化或神经认知能力的稳定性,所述神经认知能力

如由以下量表所测量: WASI-II (韦氏简明智力量表第二版 (Shapiro等人, 出处同前))、WPPSI-IV (韦氏学前和初小儿童智力量表) 或BSID-III (贝莉婴儿发育量表) 和VABS-II (文兰适应行为量表), 其中如在基线 (治疗之前) 与治疗之后之间神经认知能力的改善或稳定表明可以撤出或延迟ERT; 和/或测量在治疗之前和之后在肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和/或HS GAG水平相对于基线的变化, 其中在治疗之后总GAG、DS GAG和/或HS GAG水平的降低或稳定表明可以撤出或延迟ERT。因此, 在治疗之后 (与治疗之前相比 (基线)), 在这些评估中的一项或多项中观察到正性变化或稳定的情况下, 可以撤出或延迟ERT。在一些实施方案中, 受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT。

[0036] 在一些实施方案中, 本文公开的方法和组合物包括例如通过外周静脉导管给予组合物。在一些实施方案中, 将组合物添加至生理盐水 (NS) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 稀释剂中, 其中稀释剂可以进一步包含例如人血清白蛋白。在一些实施方案中, 受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg 的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg 的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg 的hIDS供体AAV。在其他实施方案中, 受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg 的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg 的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg 的hIDS供体AAV。在另外的实施方案中, 受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg 的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg 的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的hIDS供体AAV。在一些实施方案中, 受试者接受例如 1×10^{14} vg/kg 的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg 的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg 的hIDS供体AAV。在一些实施方案中, 受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg 的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg 的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg 的hIDS供体AAV。在一些实施方案中, 受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg 的总AAV剂量, 所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg 的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14} vg/kg 的hIDS供体AAV。可以将本文公开的方法和组合物分开施用, 或者优选包含所有组分 (例如相同或不同载体上的成对ZFN和IDS供体), 例如包含SB-47171AAV (例如表1)、SB-47898AAV (例如表2) 和SB-IDS AAV (例如表3)。在一些实施方案中, 组合物包含SB-71557AAV (例如表4, SEQ ID NO:30); SB-71728 (例如表5, SEQ ID NO:31); 和SB-IDS AAV (例如表3, SEQ ID NO:17)。

[0037] 在一些实施方案中, 当受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg 和/或 1×10^{15} vg/kg 的总剂量时, 观察到在使用本文公开的方法和组合物与本发明的组合物之后受试者中撤出ERT的能力。在一些实施方案中, 在接受 5×10^{12} vg/kg 至 1×10^{15} vg/kg 之间 (例如, 5×10^{12} vg/kg 与 5×10^{13} vg/kg 之间、 5×10^{12} vg/kg 与 1×10^{14} vg/kg 之间、 5×10^{12} vg/kg 与 5×10^{14} vg/kg 之间和/或 5×10^{12} vg/kg 与 1×10^{15} vg/kg 之间) 的总剂量之后, 观察到使用本文公开的方法和组合物之后在受试者中撤出ERT的能力。

[0038] 在一些实施方案中, 本文提供了与没有用如本文公开的本发明方法和组合物治疗过的受试者相比, 在患有MPS II的受试者中延迟、减少或避免对骨髓移植的需要的需要的方法, 所述方法包括向受试者施用有效量的hIDS转基因和锌指核酸酶 (ZFN), 其中受试者在用本文公开的方法和组合物治疗之后例如对骨髓移植具有延迟、减少或避免的需要。在一些实施方案中, hIDS转基因 (例如SEQ ID NO:15) 通过AAV2/6递送来递送 (例如递送至肝细胞), 并且hIDS递送载体进一步包含侧接hIDS转基因的同源性臂 (例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16), 所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。左同源性臂

(LA) 含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂例如用于帮助促进hIDS转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处(通过同源定向修复)。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小例如以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体在3'端进一步包含例如终止密码子,以防止其中插入IDS转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDS转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDS供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA(例如SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14)例如衍生自hF9外显子2,以允许将hIDS转录物例如高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体是指定为SB-IDS AAV的供体(例如表3;SEQ ID NO:17)。

[0039] 在一些实施方案中,可用于递送至受试者的本文公开的方法和组合物中的ZFN是通过AAV2/6递送的白蛋白特异性对(例如递送至肝细胞),其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SBS-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:30),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SBS-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN表达在例如肝脏特异性增强子和启动子的控制下,由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000)Mol.Ther.1(6):522-532(2000))。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)是特异性且高度活性的(例如在预期靶组织肝细胞中),但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,可用于本文公开的方法和组合物中的ZFN对使用两种单独的AAV载体,即SB-47171AAV或SB-71557(例如分别为表1,SEQ ID NO:9或表4,SEQ ID NO:30)和SB-47898AAV或SB-71728(例如分别为表2,SEQ ID NO:12或表5,SEQ ID NO:31)递送。在一些实施方案中,本文所述的任何方法和组合物可使用三组分AAV系统(针对成对ZFN中的每个组分的2个AAV和携带供体的1个AAV),例如包含SB-47171AAV(例如表1)、SB-47898AAV(例如表2)和SB-IDS AAV(例如表3)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0040] 在一些实施方案中,在使用本文公开的方法和组合物治疗之后,在受试者中衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,通过血浆中IDS活性或水平的变化来衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,血浆、CSF、肝脏或白细胞中IDS的活性和/或水平增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,通过受试者的白细胞中IDS活性或水平的变化来衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,通过在经治疗的受试者的尿液中测量的总GAG、DS GAG(例如包含硫酸皮肤素的GAG)和HS GAG(例如包含硫酸乙酰肝素的GAG)水平(例如尿液GAG水平)(例如,表示为与肌酐的比率)的变化或稳定性来衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要。在一些实施

方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化或所述用力肺活量的稳定性来衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,例如通过如由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化或所述步行距离的稳定性来衡量延迟或减少的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,例如通过关节活动度(JROM)相对于基线的变化或关节活动度的稳定性来衡量延迟或减少的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,例如通过如例如由MRI测量的脾脏和/或肝脏体积相对于基线的变化或所述脾脏和/或肝脏体积的稳定性来减少对骨髓移植需要。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化或神经认知能力的稳定性来衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要,所述神经认知能力如由以下量表所测量:WASI-II(韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,出处同前))、WPPSI-IV(韦氏学前和初小儿童智力量表)或BSID-III(贝莉婴儿发育量表)和VABS-II(文兰适应行为量表)。在一些实施方案中,例如通过在肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平相对于基线的变化或所述水平的稳定性来衡量减少或延迟的对ERT的需要。

[0041] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0042] 在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物包括给予组合物(例如通过外周静脉导管)。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂进一步包含例如人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14} vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDS供体),例如包含SB-47171AAV(例如表1)、SB-47898AAV(例如表2)和SB-IDS AAV(例如表3)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0043] 在一些实施方案中,在用本文公开的方法和组合物治疗之后,衡量受试者中减少、延迟或避免的对骨髓移植的需要,所述方法和组合物包括例如 5×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg和/或 1×10^{15} vg/kg的总剂量。在一些实施方案中,在接受 5×10^{12} vg/kg至 1×10^{15} vg/kg之间(例如, 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{13} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{14} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{14} vg/kg之间和/或 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{15} vg/kg之间)的总剂量之后,衡量受试者中减少、延迟或避免的对骨髓移植的需要。

[0044] 在一些实施方案中,本文提供了与未经治疗的受试者相比通过用本文公开的方法和组合物治疗来降低、稳定或消除尿液GAG (例如尿液GAG水平) 的方法,所述方法包括例如向受试者施用有效量的如本文所述的一种或多种核酸酶和一种或多种供体 (例如,包含hIDS转基因和锌指核酸酶 (ZFN) 的三组分组合), 其中受试者在治疗之后具有降低、稳定或消除的尿液GAG (例如尿液GAG水平)。在一些实施方案中,血浆中IDS的活性或水平低于检测水平。在一些实施方案中,hIDS转基因 (例如SEQ ID NO:15) 通过AAV2/6递送来递送 (例如递送至肝细胞), 并且hIDS递送载体进一步包含例如侧接hIDS转基因的同源性臂 (例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16), 所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂 (LA) 含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸 (例如SEQ ID NO:13), 并且右同源性臂 (RA) 含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸 (例如SEQ ID NO:16)。

在一些实施方案中,同源性臂用于通过同源定向修复来帮助促进例如hIDS转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小例如以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体在3'端进一步包含例如终止密码子,以防止其中插入IDS转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,包含人IDS转基因的rAAV2/6供体载体 (例如SB-IDS供体) 是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA (例如SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,存在例如衍生自hF9外显子2的剪接受体位点 (例如SA, SEQ ID NO:14), 以允许将hIDS转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制 (例如NHEJ或HDR) 的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体是指定为SB-IDS AAV的供体 (例如表3; SEQ ID NO:17)。

[0045] 在一些实施方案中,与治疗之前的受试者中总尿液GAG的量相比或与尚未经治疗的受试者中总尿液GAG相比,通过本文公开的方法和组合物使受试者中总尿液GAG的量稳定或减少。在一些实施方案中,总尿液GAG降低了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%、或两者之间的任何值。在一些实施方案中,与治疗之前的受试者中尿液硫酸皮肤素GAG的量相比或与尚未经治疗的受试者中尿液硫酸皮肤素GAG相比,通过本文公开的方法和组合物使受试者中尿液硫酸皮肤素GAG的量稳定或减少。在一些实施方案中,尿液硫酸皮肤素GAG降低了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%、或两者之间的任何值。在一些实施方案中,与治疗之前的受试者中尿液硫酸乙酰肝素GAG的量相比或与尚未经治疗的受试者中尿液硫酸乙酰肝素GAG相比,通过本文公开的方法和组合物使受试者中尿液硫酸乙酰肝素GAG的量稳定或减少。在一些实施方案中,尿液硫酸乙酰肝素GAG降低了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%、或两者之间的任何值。在一些实施方案中,一旦患者在用本文公开的组合物治疗后从ERT中撤出,将GAG水平用于评估治疗效果的生化标记物。当与患者的其他临床参数评估结合使用时,GAG测量是最有用的。

[0046] 在一些实施方案中,呈白蛋白特异性对的可用于递送至受试者的本文公开的方法

和组合物中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送(例如递送至肝细胞),其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:30),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN表达在例如肝脏特异性增强子和启动子的控制下,由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532 (2000))。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签(例如N末端肽)、核定位序列(NLS)、WPRES序列、另选的聚A序列、5'UTR和/或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)是特异性且高度活性的(例如在预期靶组织肝细胞中),但是在非肝细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签、核定位序列(NLS)、WPRES序列、另选的聚A序列、5'UTR和/或3'UTR。在一些实施方案中,ZFN和IDS供体例如使用包含所有三个组分:针对成对ZFN中的每个组分的两个AAV载体和携带供体的1个AAV的组合物(例如,包含SB-47171AAV或SB-71557AAV(例如表1或表4)、SB-47898AAV或SB-71728AAV(例如表2或表5)和SB-IDS AAV(例如表3)的组合物)来递送。

[0047] 在一些实施方案中,在用本文公开的方法和组合物治疗之后,在受试者的尿液中测量降低、稳定或消除的尿液GAG(例如尿液GAG水平)。在一些实施方案中,通过本领域已知的任何方法测量尿液中降低、稳定或消除的GAG(例如尿液GAG水平、硫酸乙酰肝素GAG和/或硫酸皮肤素GAG)。测量尿液GAG的示例性方法包括二甲基亚甲基蓝(DMB)测定(参见例如de Jong等人(1989) Clin Chem 35/7:1472-1479);依赖于丝氨酸蛋白酶和针对丝氨酸蛋白酶的标记底物、丝氨酸蛋白酶的抑制剂以及怀疑包含一种或多种糖胺聚糖的尿液样品的方法(参见例如美国专利公开号2013/0189718);基于酶消化尿液中发现的硫酸乙酰肝素(HS)、硫酸皮肤素(DS)和硫酸角质素(KS),然后通过LC-MS/MS进行定量的多重测定(Langereis等人(2015) PLoS One 10(9):e0138622);以及可用于确定特定类型GAG浓度的测定,所述测定利用RapidFire(RF, Agilent)高通量质谱系统(参见Tomatsu等人(2014) J Anal Bioanal Tech. 3月1日;2014(增刊2):006)。

[0048] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0049] 在一些实施方案中,对受试者使用如本文公开的方法和组合物的治疗包括例如通过外周静脉导管给予本发明的组合物。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂进一步包含例如人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的

每个ZFN AAV2/6、和8e13vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e15vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e14vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDS供体),例如包含SB-47171AAV(例如表1)、SB-47898AAV(例如,表2)和SB-IDS AAV(例如表3)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0050] 在一些实施方案中,例如在用本发明的组合物以5e12vg/kg、1e13vg/kg、5e13vg/kg、1e14vg/kg、5e14vg/kg和/或1e15vg/kg的总剂量治疗之后,测量受试者中降低、稳定或消除的尿液GAG。在一些实施方案中,在接受5e12vg/kg至1e15vg/kg之间(例如,5e12vg/kg与5e13vg/kg之间、5e12vg/kg与1e14vg/kg之间、5e12vg/kg与5e14vg/kg之间和/或5e12vg/kg与1e15vg/kg之间)的总剂量之后,测量受试者中降低、稳定或消除的尿液GAG。

[0051] 在一些实施方案中,本文提供了与未经治疗的受试者相比,在患有MPS II的受试者中通过用例如ERT的标准给药方案与用如本文公开的本发明组合物的治疗的组合治疗受试者来改善功能性能力、延迟功能性能力衰退或维持功能性能力的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的hIDS转基因和锌指核酸酶(ZFN)并以标准ERT剂量施用,其中受试者在治疗之后具有例如功能性能力的改善、功能性能力的衰退延迟或维持。在一些实施方案中,hIDS转基因(例如SEQ ID NO:15)通过AAV2/6递送来递送至肝细胞,并且hIDS递送载体进一步包含侧接hIDS转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂例如用于通过同源定向修复来帮助促进hIDS转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小例如以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体例如在3'端进一步包含终止密码子,以防止其中插入IDS转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDS转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDS供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体例如包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA(例如SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,存在例如衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDS转基因高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体是指定为SB-IDS AAV的供体(例如表3;SEQ ID NO:17)。

[0052] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送(例如递送至肝细胞),其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:30),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN表达在例如肝脏特异性增强子和启动子的控

制下,由人ApoE增强子和人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532(2000))。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)是特异性且高度活性的(例如在预期靶组织肝细胞中),但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。

[0053] 在一些实施方案中,在治疗之后在受试者中衡量用本文公开的方法和组合物治疗之后功能性能力的改善、衰退延迟或维持。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化来衡量功能性能力的改善、衰退延迟或维持。在一些实施方案中,例如通过如由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化来衡量功能性能力的改善、衰退延迟或维持。在一些实施方案中,例如通过关节活动度相对于基线的变化来衡量功能性能力的改善、衰退延迟或维持。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化来衡量功能性能力的改善、衰退延迟或维持,所述神经认知能力如由以下量表所测量:WASI-II(韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,出处同前))、WPPSI-IV(韦氏学前和初小儿童智力量表)或BSID-III(贝莉婴儿发育量表)和VABS-II(文兰适应行为量表)。

[0054] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0055] 在一些实施方案中,所述治疗包括给予本发明的组合物(例如通过外周静脉导管)。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂进一步包含人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如5e12vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e11vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e12vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如1e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e12vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和4e13的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e13vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e15vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e14vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDS供体),例如包含SB-47171AAV(例如表1)、SB-47898AAV(例如表2)和SB-IDS AAV(例如表3)。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0056] 在一些实施方案中,例如在用本发明的组合物以5e12vg/kg、1e13vg/kg、5e13vg/kg、1e14vg/kg、5e14vg/kg和/或1e15vg/kg的总剂量治疗之后,衡量受试者的功能性能力的改善、衰退延迟或维持。在一些实施方案中,在接受5e12vg/kg至1e15vg/kg之间(例如,

5e12vg/kg与5e13vg/kg之间、5e12vg/kg与1e14vg/kg之间、5e12vg/kg与5e14vg/kg之间和/或5e12vg/kg与1e15vg/kg之间)的总剂量之后,衡量受试者的功能性能力的改善、衰退延迟或维持。

[0057] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS II的人类受试者中抑制或延迟残疾进展的方法,所述方法包括向该受试者施用有效的量的hIDS转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者在用如本文公开的方法和组合物治疗之后具有残疾进展的稳定、抑制或延迟。在一些实施方案中,hIDS转基因(例如SEQ ID NO:15)通过AAV2/6递送来递送(例如递送至肝细胞),并且hIDS递送载体进一步包含侧接hIDS转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。

在一些实施方案中,同源性臂例如用于通过同源定向修复来帮助促进hIDS转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小例如以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体在3'端进一步包含例如终止密码子,以防止其中插入IDS转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDS转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDS供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含例如含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA(例如SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,存在例如衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDS转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体是指定为SB-IDS AAV的供体(例如表3;SEQ ID NO:17)。

[0058] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送(例如递送至肝细胞),其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:30),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN表达由肝脏特异性增强子和启动子控制,例如由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532(200))。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如,SEQ ID NO:2)在预期靶组织肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。

[0059] 在一些实施方案中,在用如本文公开的方法和组合物治疗之后,在受试者中衡量残疾进展的稳定、抑制或延迟。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化或所述用力肺活量的稳定性来衡量残疾进展的稳定、抑制或延迟。在一些实施方案中,例如通过由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化或所述步行距离的稳定性来衡量残疾进展的稳定、抑制或延迟。在一些实施方案中,例如通过关节活动度(JROM)相对于基线的变化或关节活动度的稳定性来衡量残疾进展的稳定、抑制或延

迟。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化或神经认知能力的稳定性来衡量残疾进展的稳定、抑制或延迟,所述神经认知能力如由以下量表所测量:WASI-II(韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,出处同前))、WPPSI-IV(韦氏学前和初小儿童智力量表)或BSID-III(贝莉婴儿发育量表)和VABS-II(文兰适应行为量表)。

[0060] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0061] 在一些实施方案中,所述治疗包括给予本发明的组合物(例如通过外周静脉导管)。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中。在一些实施方案中,受试者接受例如5e12vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e11vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e12vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e12vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和4e13的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e13vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e15vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e14vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDS供体),例如包含SB-47171AAV(例如表1)、SB-47898AAV(例如表2)和SB-IDS AAV(例如表3)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0062] 在一些实施方案中,在用本发明的组合物通过5e12vg/kg、1e13vg/kg、5e13vg/kg、1e14vg/kg、5e14vg/kg和/或1e15vg/kg的总剂量治疗之后,衡量受试者中延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,在接受5e12vg/kg至1e15vg/kg之间(例如,5e12vg/kg与5e13vg/kg之间、5e12vg/kg与1e14vg/kg之间、5e12vg/kg与5e14vg/kg之间和/或5e12vg/kg与1e15vg/kg之间)的总剂量之后,衡量受试者中延迟的对ERT的需要。

[0063] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用如本文公开的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS II的受试者中稳定、延迟、减少或避免对使用医疗呼吸机设备的需要的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的hIDS转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者对使用医疗呼吸机设备具有延迟、减少或避免的需要。在一些实施方案中,hIDS转基因(例如SEQ ID NO:15)通过AAV2/6递送来递送(例如,递送至肝细胞),并且hIDS递送载体进一步包含侧接hIDS转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于通过同源定向修复来帮助促进hIDS转基因靶向整合

于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,以防止其中插入IDS转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDS转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDS供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA(例如SEQ ID NO:15)。存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDS转基因高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体是指定为SB-IDS AAV的供体(例如表3;SEQ ID NO:17)。

[0064] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:30),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN表达由肝脏特异性增强子和启动子控制,由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532 (200))。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签、核定位序列(NLS)、WPRES序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,在治疗之后在受试者中衡量稳定、延迟、减少或避免的对使用呼吸机的需要。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化来衡量稳定、延迟、减少或避免的对使用呼吸机的需要。在一些实施方案中,例如通过由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化来衡量稳定、延迟、减少或避免的对使用呼吸机的需要。

[0065] 在一些实施方案中,使用如本文公开的方法和组合物的治疗包括给予本发明的组合物(例如通过外周静脉导管)。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂进一步包含人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如5e12vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e11vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e12vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如1e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e12vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和4e13的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e13vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e15vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e14vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或

不同载体上的成对ZFN和IDS供体),例如包含SB-47171AAV(例如,表1)、SB-47898AAV(例如,表2)和SB-IDS AAV(例如,表3)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0066] 在一些实施方案中,在用本发明的组合物以5e12vg/kg、1e13vg/kg、5e13vg/kg、1e14vg/kg、5e14vg/kg和/或1e15vg/kg的总剂量治疗之后,衡量受试者中减少或延迟的对使用呼吸机的需要。在一些实施方案中,在接受5e12vg/kg至1e15vg/kg之间(例如,5e12vg/kg与5e13vg/kg之间、5e12vg/kg与1e14vg/kg之间、5e12vg/kg与5e14vg/kg之间和/或5e12vg/kg与1e15vg/kg之间)的总剂量之后,衡量受试者中减少或延迟的对使用呼吸机的需要。

[0067] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用如本文公开的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS II的人类受试者中稳定、延迟、减少或预防受试者成为轮椅依赖性的发作的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的hIDS转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者在治疗之后具有稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中hIDS转基因(例如,SEQ ID NO:15)通过AAV2/6递送来递送至肝细胞,并且hIDS递送载体进一步包含侧接hIDS转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于通过同源定向修复来帮助促进hIDS转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,以防止其中插入IDS转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDS转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDS供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA(例如SEQ ID NO:15)。存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDS转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在某些实施方案中,供体是指定为SB-IDS AAV的供体(例如表3;SEQ ID NO:17)。

[0068] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:30),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN表达由肝脏特异性增强子和启动子控制,由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532 (2000))。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活

性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。

[0069] 在一些实施方案中,在治疗之后在受试者中衡量稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化来衡量稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,通过由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化或所述步行距离的稳定性来衡量稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,通过关节活动度相对于基线的变化或关节活动度的稳定性来衡量稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,通过以下量表来衡量成为轮椅依赖性的发作的稳定、延迟、减少或预防: WASI-II (韦氏简明智力量表第二版 (Shapiro等人, 出处同前))、WPPSI-IV (韦氏学前和初小儿童智力量表) 或BSID-III (贝莉婴儿发育量表) 和VABS-II (文兰适应行为量表)。在一些实施方案中,通过在肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平相对于基线的变化或所述水平的稳定性来衡量稳定或延迟经确认的残疾进展的发作或降低经确认的残疾进展的风险。

[0070] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0071] 在一些实施方案中,所述治疗包括通过外周静脉导管用本发明的组合物进行给药。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂进一步包含人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受5e12vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e11vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e12vg/kg的hIDS供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如1e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e12vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和4e13的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e13vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e13vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e15vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e14vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e14vg/kg的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(例如相同或不同载体上的成对ZFN和IDS供体),例如包含SB-47171AAV(例如表1)、SB-47898AAV(例如表2)和SB-IDS AAV(例如表3)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0072] 在一些实施方案中,在5e12vg/kg、1e13vg/kg、5e13vg/kg、1e14vg/kg、5e14vg/kg和/或1e15vg/kg本文所述的组合物的总剂量之后,衡量受试者中稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,在接受5e12vg/kg至1e15vg/kg之间(例如,5e12vg/kg与5e13vg/kg之间、5e12vg/kg与1e14vg/kg之间、5e12vg/kg与5e14vg/kg之间和/或5e12vg/kg与1e15vg/kg之间)的总剂量之后,衡量受试者中稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。

[0073] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用如本文公开的方法和组合物治疗过的受试者相比延长患有MPS II的受试者的期望寿命的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的hIDS转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者具有延长的期望寿命。在一些实施方案中,hIDS转基因(例如SEQ ID NO:15)通过AAV2/6递送来递送至肝细胞,并且hIDS递送载体进一步包含侧接hIDS转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于通过同源定向修复来帮助促进hIDS转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDS转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,以防止其中插入IDS转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDS转基因的rAAV2/6供体载体(SB-IDS供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDS cDNA(SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDS转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在某些实施方案中,供体是指定为SB-IDS AAV的供体(例如表3及表3之后的序列)。

[0074] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:30),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,ZFN表达由肝脏特异性增强子和启动子控制,由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532)。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,在治疗之后在受试者中衡量期望寿命的延长。

[0075] 在一些实施方案中,所述治疗包括通过外周静脉导管给予如本文公开的组合物。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂进一步包含人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如5e12vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e11vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和4e12vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含1e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和8e12vg/kg的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如5e13vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含5e12vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和4e13的如本文公开的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如1e14vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂

量包含 $1\text{e}13\text{vg/kg}$ 的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 $8\text{e}13\text{vg/kg}$ 的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 $5\text{e}14\text{vg/kg}$ 的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 $5\text{e}13\text{vg/kg}$ 的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 $4\text{e}14\text{vg/kg}$ 的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 $1\text{e}15\text{vg/kg}$ 的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 $1\text{e}14\text{vg/kg}$ 的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 $8\text{e}14\text{vg/kg}$ 的hIDS供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDS供体),例如包含SB-47171AAV(例如表1)、SB-47898AAV(例如表2)和SB-IDS AAV(例如表3)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表4,SEQ ID NO:30);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:31);和SB-IDS AAV(例如表3,SEQ ID NO:17)。

[0076] 在一些实施方案中,在用本发明的组合物以 $5\text{e}12\text{vg/kg}$ 、 $1\text{e}13\text{vg/kg}$ 、 $5\text{e}13\text{vg/kg}$ 、 $1\text{e}14\text{vg/kg}$ 、 $5\text{e}14\text{vg/kg}$ 和/或 $1\text{e}15\text{vg/kg}$ 的总剂量治疗之后,衡量受试者的延长期望寿命。在一些实施方案中,在接受 $5\text{e}12\text{vg/kg}$ 至 $1\text{e}15\text{vg/kg}$ 之间(例如, $5\text{e}12\text{vg/kg}$ 与 $5\text{e}13\text{vg/kg}$ 之间、 $5\text{e}12\text{vg/kg}$ 与 $1\text{e}14\text{vg/kg}$ 之间、 $5\text{e}12\text{vg/kg}$ 与 $5\text{e}14\text{vg/kg}$ 之间和/或 $5\text{e}12\text{vg/kg}$ 与 $1\text{e}15\text{vg/kg}$ 之间)的总剂量之后,衡量受试者的延长期望寿命。

[0077] 在某些实施方案中,a)患有MPS II的受试者中对额外治疗程序的需要得以减少或稳定;b)患有MPS II的受试者中的症状得以减少或稳定;c)患有MPS II的受试者的尿液中GAG的量得以降低、稳定或消除;d)患有MPS II的受试者中的功能性能力得以改善或稳定;e)患有MPS II的患者中对ERT的需要得以减少或稳定;f)患有MPS II的受试者中对ERT的需要得以延迟或稳定;g)ERT治疗的剂量和/或频率在也用如本文公开的组合物治疗的患有MPS II的受试者中稳定或降低,和/或与用单独ERT治疗的MPS-II受试者相比,受试者具有稳定或增加的功能性能力;h)患有MPS II的受试者中残疾进展的风险得以稳定或降低;i)在用本发明的组合物治疗过的受试者中,经确认的残疾进展的发作得以稳定或延迟;j)在变为轮椅依赖性的方面存在延长或消除了对轮椅的需要;k)对使用机械呼吸机的需要得以稳定、减少、延迟或避免;l)与没有用本发明的组合物治疗过的受试者相比,用所述组合物治疗过的受试者的期望寿命得以延长。

[0078] 在一些实施方案中,在用本发明的组合物输注之前对受试者进行前驱用药。在一些实施方案中,在用组合物输注的前一天,用泼尼松或等效皮质类固醇对受试者进行前驱用药。在一些实施方案中,在用组合物输注的前一天和再次在输注的当天用泼尼松或等效皮质类固醇对受试者进行前驱用药。在一些实施方案中,在用组合物输注的前一天、再次在输注的当天、和/或再次在第7天、和/或在第2周和/或第4周和/或第6周和/或第8周直至第20周的持续时间,用泼尼松或等效皮质类固醇对受试者进行前驱用药。

[0079] 在上文和本文所述的方法的一些实施方案中,MPS II是早期发作的重型疾病,伴有躯体和认知受累,而在其他实施方案中,MPS II是特征在于躯体疾病的较晚发作和很少或没有中枢神经系统疾病的减毒MPS II。在另外的实施方案中,MPS II疾病在两者之间的连续体上。在一些实施方案中,受试者是成年人,而在一些实施方案中,受试者来自儿科群体。

[0080] 在根据(或如应用于)以上任何实施方案的某些实施方案中,基于患有早期发作的重型MPS II来选择受试者用于治疗,而在其他实施方案中,受试者具有特征在于躯体疾病的较晚发作伴有很少或不伴有中枢神经系统疾病的减毒MPS II,而在一些实施方案中,基

于患有在两者之间的连续体上的MPS II疾病来选择受试者用于治疗。

[0081] 在上文和本文所述的方法的一些实施方案中,将本发明的组合物以5e12vg/kg、1e13vg/kg、5e13vg/kg、1e14vg/kg、5e14vg/kg和/或1e15vg/kg的总剂量施用。在上文和本文所述的方法的一些实施方案中,将本发明的组合物以5e12vg/kg至1e15vg/kg之间(例如,5e12vg/kg与5e13vg/kg之间、5e12vg/kg与1e14vg/kg之间、5e12vg/kg与5e14vg/kg之间和/或5e12vg/kg与1e15vg/kg之间)的总剂量施用。在上文和本文所述的方法的一些实施方案中,将组合物静脉施用。

[0082] 在上文或本文的任何方法的某些实施方案中,可以将施用本发明的组合物之后的稳定、降低或减少或改善与基线水平、一名或多名未经治疗的受试者中的水平和/或一名或多名接受不同治疗(如ERT)的受试者中的水平进行比较。在一些实施方案中,可以将施用组合物之后的降低或减少或改善与一名或多名接受Elaprase®的受试者中的水平进行比较。

[0083] 在另一方面,本文提供了制品,所述制品包含一种或多种本文所述的组合物。在某些实施方案中,制品包含配制品,所述配制品包含如本文所述的三种药物组合物(例如,在不同的容器如小瓶中):包含ZFN对中的一个成员(例如,左ZFN)的第一药物组合物;包含ZFN对中的第二成员(例如,右ZFN)的第二药物组合物;和包含IDS供体(例如,AAV IDS供体)的第三药物组合物。可以使用组分的任何浓度,包括但不限于表6中所示的浓度。此外,可以使用三种药物组合物的任何比率,例如1:1:8(左ZFN:右ZFN:IDS供体)。不同的组分可以以任何方式标记,例如用针对每种组合物的不同颜色标记。在某些实施方案中,制品包含:含有以下的一组药物产品小瓶:i) ZFN1载体药物产品(SB-A6P-ZLEFT),其任选地在包含具有第一颜色(例如白色)的铝翻盖密封件的容器(例如,小瓶)中;ii) ZFN 2载体药物产品(SB-A6P-ZRIGHT),其任选地在包含具有不同于第一颜色的第二颜色(例如蓝色)的铝翻盖密封件的容器(例如小瓶)中;和iii) 编码对无启动子IDS转基因进行编码的DNA修复模板的第三载体SB-A6P-HRL药物产品,其任选地在包含不同于第一和第二颜色的第三颜色(例如橙色)铝翻盖密封件的容器(例如,小瓶)中。在另外的实施方案中,提供了一组药物产品,所述一组药物产品包含编码SB-71557(SB-A6P-ZL2)或SB-71728(SB-A6P-ZR2)的AAV载体和SB-A6P-HRL载体。在本文所述的任何组合物中,可以将纯化的大量重组载体配制在含有CaCl₂、MgCl₂、NaCl、蔗糖和泊洛沙姆188的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,以5mL体积填充到玻璃药物产品小瓶中,b)具有用于根据上文和本文所述的任何一种方法治疗受试者中的MPS II的说明书的包装插页。在一些实施方案中,组合物包含磷酸盐缓冲盐水(PBS),所述磷酸盐缓冲盐水包含约1.15mg/mL磷酸钠、0.2mg/mL磷酸钾、8.0mg/mL氯化钠、0.2mg/mL氯化钾、0.13mg/mL氯化钙和0.1mg/mL氯化镁。将PBS用2.05mg/mL氯化钠、10-12mg/mL蔗糖和0.5至0mg/mL Kolliphor®(泊洛沙姆或P188)进一步改性。将制品(药物产品)以适合于受试者的任何浓度(例如,如本文所述基于重量确定的)施用(例如,静脉)至有需要的受试者,由此使得IDS在受试者中表达,包括以用于治疗MPS II的治疗水平表达。可以将施用进行一次或以任何频率进行多次。另外,所述组的药物产品可以分开施用,或者可以在施用之前组合,例如组合在静脉输注袋中。

在另一方面,提供了针对所选择的受试者确定如本文所述的组合物的剂量(例如,

以形成制品/一组药物产品)的方法,所述方法包括:确定治疗之前(基线)的受试者的体重(四舍五入成小数点后两位);用受试者的体重除以vg/mL浓度以确定待使用的剂量。例如,对于在群组1待治疗的50kg受试者,使用0.5e14vg的ZFN1(例如47171或71557)、0.5e14vg的ZFN2(例如47898或71729)和4e14SB-IDS。此外,进行以下这些步骤:(i)例如如下通过将群组剂量乘以基线处的患者体重且然后除以VG浓度来计算三个产品组分体积:(a).从研究协调员获得群组和基线处的患者体重,(b).从临床分析证明书获得VG浓度。(ii)通过将三个产品组分体积和NS/PBS体积相加在一起来计算总体积。(iii)计算实现0.25%HSA最终浓度所需的HSA静脉溶液的体积,以及(iv)计算经调整的NS/PBS体积。所述方法可以进一步包括通过确定总体积来提供具有针对受试者体重的正确剂量的配制品(例如,包括包含如本文所述的三种药物产品的制品);和计算所需的人血清白蛋白(HSA)静脉溶液的体积,从而实现针对所选择的受试者的恰当组分浓度。

[0084] 在一些实施方案中,剂量通过受试者的肝脏体积来确定。受试者的体重并不总是与肝脏体积直接相关,特别是在较重的患者中。在小于2个月大的儿科患者中,可以基于肝脏体积确定不同疗法的最佳剂量,以避免肝毒性(参见Bartelink等人(2006) Clin Pharm 45 (11):1077-1097)。因此,对于某些受试者,剂量可以通过近似的肝脏体积来确定。在这些情况下,可以通过本领域已知的方法来估计肝脏体积,例如通过使用基于参数的组合的公式来估计,所述参数如年龄、性别、体重、身高、体重指数和体表面积(Yuan等人(2008) Transplant Proc 40 (10):3536-40)。本领域已知的用于估计或确定肝脏体积的其他方法包括CT或MRI扫描以及腹部几何形状的估计(Yang等人(2018) Yonsei Med J 59 (4):546-553;Huynh等人(2014) AJR Am J Roentgenol 202 (1):152-59)。

[0085] 在另一方面,本文提供了施用如本文所述的组合物的方法,所述方法包括提供如本文所述的制品(例如,如本文所述单独或一起包含三种(AAV)药物组合物(左ZFN、右ZFN、AAV供体)的药物产品),以所选择的剂量为受试者配制一种或多种静脉溶液(例如,使用本文所述的方法),以及向有需要的受试者静脉施用静脉溶液。在某些实施方案中,将制品的三个组分(ZFN1、ZFN2和IDS供体)分别添加至大约200mL IV输注袋,例如在NS或PBS中含有0.25%HSA的IV输注袋。总输注量是根据受试者的群组分配和体重(kg)计算的,并且预计总输注量在约240-800mL之间,这取决于受试者的群组分配和体重(kg)。在受试者在医院或急救设施中时,将使用恒速输注泵以100mL/小时通过静脉输注施用所制备的输注产品。本文所述的任何方法均可以使用输注泵以任何速率,例如10至200mL/小时(或其间的任何值)进行递送。在某些实施方案中,将静脉溶液以100mL/小时的速率递送。受试者可以正在接受ERT或在过去接受过ERT。在某些实施方案中,在静脉溶液输注的一周期间内不给予ERT。

[0086] 还提供了增加受试者的白细胞中IDS水平(活性)的方法,所述方法包括施用如本文所述的静脉溶液(例如,包含三种药物组合物的系统)。在某些实施方案中,IDS水平从低于正常水平(在MPS II受试者中)增加至正常范围内的水平(非MPS II受试者中的水平)。可以通过直接测量IDS水平/活性和/或测量GAG水平来确定增加的IDS水平/活性。使用本文所述的方法和组合物,也可以增加血浆和尿液中的IDS水平(活性)。

[0087] 在本文所述的任何方法中,受试者可以在静脉输注前例如1、2、3、4、5、6、7或更多天,输注日和/或在输注后长达20周或更多周接受皮质类固醇(例如泼尼松),其中剂量是基于受试者的体重确定的。通过受试者的体重确定的随时间逐渐减少剂量的口服泼尼松的示

例性时间表在下表A中示出：

表A：逐渐减少的类固醇剂量

受试者体重	口服泼尼松(mg/天)					
	第-2至第1天	第1周	第2周	第3-16周	第17-19周	第20周
≥ 60	60	60	30	15	5	停止
55	60	60	30	15	5	停止
50	50	50	25	15	5	停止
45	45	45	25	15	5	停止
40	40	40	20	10	5	停止
35	35	35	20	10	5	停止
30	30	30	15	10	5	停止

[0088] 在一些实施方案中，可以使用除表A中举例说明的那些剂量以外的皮质类固醇或其他免疫抑制剂的其他剂量(包括更高或更低)(例如2.0、1.5mg/kg/天泼尼松龙或更多，或7.5-15.5mg/周的甲氨蝶呤)。在一些实施方案中，与表A中举例说明的相比，逐渐减少的起始发生较晚(例如，在4、5、6、7或8周或更多周)。

[0089] 从整体而言鉴于本公开文本，这些和其他方面对于熟练技术人员来说都是易于清楚的。

附图说明

[0090] 图1是示出设计PK/PD模型以估计缓解受试者中MPS II症状所需的最小有效剂量所采取的步骤的示意图。

[0091] 图2是示出在设计模型中要考虑的因素以及用于将Elaprase®人PK数据与所观察到的SB-913小鼠数据联系起来的数学计算的示意图。

[0092] 图3示出了来自小鼠研究的预测药代动力学(PK, IDS血浆活性)和预测药效学(PD, 尿液GAG浓度)数据的比对, 其中小鼠已经用本发明的多核苷酸治疗。预测值示出为黑色实线, 而观察值示出为空心圆圈。数据证明, 预测值和观察值一致。

[0093] 图4示出了对于三个不同剂量组的人中的预测PK和PD值。模型预测, 即使5e+12的最低剂量也将在降低尿液GAG方面具有功效。

[0094] 图5A和图5B是描绘糖胺聚糖(GAG)的分解的图。图5A示出了硫酸皮肤素的分解代谢分解。图5B示出了硫酸乙酰肝素的分解代谢分解。MPS II疾病导致无法起始分解硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素两者的过程, 从而导致这些GAG在患有MPS II的受试者的几乎所有器官和身体组织以及尿液中积累。GAG在细胞溶酶体内的长期积累导致MPS II患者中的细胞充血、器官肿大、组织破坏和器官系统功能障碍。

[0095] 图6A至图6C是描绘在治疗后16周时尿液GAG、尿液硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素水平的百分比变化的曲线图。图6A示出了群组1(左图)和群组2(右图)中尿液总GAG相对于基线的变化百分比, 在左图中三角形示出了受试者#1的数据点并且圆圈示出了受试者#2的数据点, 在右图中菱形示出了受试者#3的数据点并且正方形示出了受试者#4的数据点。通过经验证的1,9-二亚甲基蓝(DMB)比色测定来测量总尿液GAG。图6B示出了群组1(左图)和群组2(右图)中尿液硫酸皮肤素相对于基线的变化百分比, 在左图中三角形示出了受试者#1

的数据点并且圆圈示出了受试者#2的数据点,在右图中菱形示出了受试者#3的数据点并且正方形示出了受试者#4的数据点。图6C描绘了群组1(左图)和群组2(右图)中尿液硫酸乙酰肝素相对于基线的变化百分比,在左图中三角形示出了受试者#1的数据点并且圆圈示出了受试者#2的数据点,在右图中菱形示出了受试者#3的数据点并且正方形示出了受试者#4的数据点。通过经验证的MS/MS测定来测量尿硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素。图6中的数据显示,群组2中的受试者尿具有降低的总尿液GAG、硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素。

[0096] 图7是说明用于检测IDS转基因整合入肝脏中白蛋白基因座的测定的示意图。所述测定是基于PCR的测定,其依赖于使用将检测肝脏中表达的mRNA中独特的白蛋白外显子1-IDS融合物的引物组。在存在插入的转基因的情况下,PCR产物由对应于白蛋白基因的一种引物 and 对应于IDS转基因的一种引物驱动。PCR产物取决于IDS转基因的整合。在不存在IDS转基因整合的情况下,第二PCR测定仅检测到对应于白蛋白mRNA的mRNA表达。

[0097] 图8是描绘在用研究药物治疗之前以及在治疗之后前六名受试者中随时间的血浆IDS的水平的一组曲线图。在所有受试者中均可检测到血浆IDS。

[0098] 图9是描绘在用研究药物治疗之前以及在治疗之后随时间在前六名受试者的尿液中测量的针对肌酐归一化的GAG(硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素和总糖胺聚糖)的水平。

[0099] 图10是受试者6的血浆IDS水平的详细视图,所述受试者发展出在血液中测量的升高的丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平。虚线描绘了血浆中的IDS水平,而实线描绘了血液中的ALT水平。箭头指示用泼尼松进行的给药。

具体实施方式

[0100] 本文公开了用于治疗 and/或预防人类受试者中的亨特(MPS II)综合征的方法和组合物,所述方法和组合物包括在靶细胞中插入合适的转基因序列。所述治疗采用工程化锌指核酸酶(ZFN),以在体内将酶艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(hIDS)转基因的校正拷贝以位点特异性方式整合至受试者自身肝细胞的白蛋白基因座中。一旦从整合的转基因表达,hIDS就是活性的并能够降解黏多糖糖胺聚糖(GAG)。本发明描述了针对MPS II受试者进行预防或治疗的方法。

[0101] 通常,IDS酶是在细胞内产生的,并且由于细胞的不完全内部转运系统,可能少量的IDS酶泄漏到循环中。稳定状态建立为细胞外酶,并被细胞表面的受体摄取回。因此,通常在体内产生的大多数酶发现于组织中,并且在循环中发现的酶浓度通常非常小。相比之下,ERT是将大剂量酶直接输注到血液中,所述酶被设计以在循环中产生高浓度以允许摄取至IDS缺乏组织中。然而,ERT仅产生短暂的高水平IDS酶,随后由于酶的半衰期短以及因为大量被肝脏摄取而在约数分钟至数小时内而迅速从循环中清除。这限制了ERT的有效性,因为它仅提供了酶暴露于组织的短窗口,而且我们知道细胞摄取酶是一种缓慢的受体介导的过程。相反,用于MPS II的理想疗法将通过在循环中产生并保持连续稳定的酶水平而允许使IDS酶长时间且持续地暴露于组织。甚至连续分泌到循环中的少量IDS也足以降低组织GAG,并潜在地为本文公开的组合物提供功效。

[0102] 已显示ERT增加治疗后患者白细胞中的溶酶体酶活性的量,这大概是因为细胞从血浆中摄取了酶(白细胞是富含溶酶体的细胞)。例如,在一项对接受重组IDUA的MPS I患者的研究中,据报道(参见Kakkis等人(2001) NEJM 344 (3))白细胞中IDUA的平均活性在治疗

前为0.04U/mg,并且在治疗后,其在输注后七天(即紧接在下一治疗之前)测量为4.98U/mg。类似地,对MPS II患者的循环白细胞中IDS的测量可用于确定到达组织的酶的存在。

[0103] 溶酶体贮积病(LSD)是一组罕见的代谢性单基因疾病,其特征在于缺乏通常参与废物脂质、黏多糖(即糖胺聚糖(GAG))的分解的功能性单独溶酶体蛋白质。这些疾病的特征在于这些化合物在细胞中的积聚,因为由于分解途径中特定酶的功能失常而无法加工它们以进行再循环。LSD的病理生理学最初被认为与GAG的简单沉积有关,但是当前的研究已产生对这些疾病的复杂性的认识。GAG贮积显现导致细胞、组织和器官稳态的扰动,并且还细胞因子和炎性调节剂的分泌增加有联系,从而导致炎性反应的激活(Muenzer (2014) *Mol Gen Metabol* 111:63-72)。

[0104] 黏多糖贮积症II(MPS II)(也称为亨特综合征)是主要发现于男性中的X连锁隐性溶酶体贮积症。据报道,MPS II的发病率为0.3至0.71名/100,000名活产(Burton和Giugliani (2012) *Eur J Pediatr.* (2012) 4月;171(4):631-9)。将对于减毒形式的疾病的21.7岁的更保守中位期望寿命(对于重型疾病的期望寿命为11.8岁,(Burrow等人(2008) *Biologics*.6月;2(2):311-20;Young和Harper(1982) *Med Genet.*12月;19(6):408-11)应用于每年发病率产生现居美国的约629名患MPS II个体的估计患病率。MPS II是由艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)基因中的突变引起的,所述基因编码参与黏多糖糖胺聚糖(GAG)的溶酶体降解的酶。这导致GAG在尿液、血浆和组织中积累,并引起多系统性、进行性疾病。GAG是MPS II的最重要的生化量度。GAG、特别是硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素在细胞和组织中的积累是MPS II的潜在病理和临床表现的原因;GAG是由FDA和EMA用于评估最常用于治疗MPS II的静脉酶替代疗法的药效学的生化标记物。亨特综合征代表了跨越早期发作、重度疾病(占受试者的三分之二)伴有躯体和认知受累至特征在于躯体疾病的较晚发作和很少或没有中枢神经系统(CNS)疾病的减毒MPS II的疾病谱。IDS突变的特定类型(已鉴定出>150种基因突变)和所得的残留IDS酶的水平最可能决定疾病的严重程度。减毒形式中的残留IDS活性已被测量为野生型IDS活性的0.2%-2.4%,并且具有重度表型的IDS没有活性(Sukegawa-Hayasaka等人(2006) *J Inherit Metab Dis* 29(6):755-61)。IDS基因被映射到Xq28,并含有遍布于24kb上的九个外显子。较大的缺失和重排总是与疾病的重型相关联。

[0105] 重度MPS II受试者典型地在18个月至3岁之间开始有语言迟缓和发育迟缓。所述疾病的特征在于重度MPS II受试者的症状,如器官肿大、活动过度和攻击性、神经系统恶化、关节僵硬和骨骼畸形(包括异常的脊椎骨)、面部特征粗大伴有舌头增大、心脏瓣膜增厚、听力损失和疝气。关节僵硬导致行走和手工灵巧度问题。在儿童早期,受试者可能在身体活动期间无法跟上同伴,而在生命的后期,行走甚至短距离的能力可能丧失,并且许多受试者最终变为轮椅依赖性的(Raluy-Callado等人(2013) *Orphanet J Rare Dis* 8:101)。受试者患有频繁的上呼吸道感染,所述感染最初可通过手术程序如腺样体扁桃体切除术进行治疗,但最终可能需要气管造口术和/或正压通气(J.Ed.Wraith(2013) in Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics,第102.3章,Rimoin,Pyeritz和Korf编辑Elsevier Ltd;Sasaki等人(1987) *Laryngoscope* 97:280-285)。主要的死亡因素是中枢神经系统受累、心脏受累和上呼吸道阻塞(Sato等人(2013) *Pediatr Cardiol.*34(8):2077-2079)。未经治疗的患有重度亨特综合征的患者的期望寿命是进入到青少年中期,由于神经病学恶化和/或心肺衰竭而死亡。患有减毒形式的受试者典型地晚于重度受试

者诊断出。所述疾病的症状与重度受试者相似,但总体疾病严重程度处于较轻度,通常具有缓慢的疾病进展,不伴有或仅伴有轻度认知损害。未经治疗的减毒形式的死亡通常在20-30岁的年龄之间,死于心脏病和呼吸道疾病。

[0106] 目前唯一批准用于MPS II的疗法是酶替代疗法(ERT)。使用重组IDS蛋白(艾杜硫酶; **Elaprase**[®], Shire)的静脉(IV)ERT自2006年以来经美国FDA批准以0.5mg/kg体重的剂量进行每周一次的施用并且已显示改善5岁及以上的MPS II受试者的步行能力。ERT的局限性包括终身治疗的需要、中和抗体的开发、酶不能穿越血脑屏障以及每周静脉输注的不便。另外, **Elaprase**[®]在治疗后在血浆中的半衰期非常短。当以批准的剂量(以3小时输注每周施用的0.5mg/kg)时,蛋白质的近似半衰期为44分钟(用于静脉输注的**Elaprase**[®]溶液处方信息, Shire Human Genetics Therapies, 剑桥MA 2007年10月)。因为艾杜硫酶不能穿过进入CNS中,所以ERT对认知功能具有很小或没有影响(Parini等人(2015) *Mol Gen Metabol Rep* 3:65-74)。还已经表明其对于治疗与MPS II相关的心脏瓣膜疾病具有有限的功效(Sato等人,同上)。与胡勒尔综合征(MPS I的重型)相比,造血干细胞移植(HSCT)由于缺乏治疗认知损害的功效而在历史上不被建议用于重型的MPS II(Guffon等人(2009) *J. Pediatric* 154(5):733)。

[0107] 在初步分析中,通过体内(在身体内)编辑人类基因组已经发现了分子和酶证据。本文公开的组合物意图治疗受试者的肝脏,由此使得在受试者的生命持续时间内产生功能性IDS酶的持续供应。体内基因组编辑的初步证据表明,基因组编辑的肝细胞可以能够在患有MPS II的患者中产生IDS酶,然而还需要更多数据来了解IDS酶增加是否会改善临床结局。中期结果表明,肝脏中已发生体内编辑,并且生化数据(例如,活性IDS酶向血液中的产生和分泌)表明,基因组编辑的肝细胞能够在患有MPS II的患者中产生IDS酶。迄今为止,已经对三名合格受试者分析了肝脏活检-一名来自低剂量群组并且两名来自中等剂量群组。在来自两个中剂量群组受试者的肝脏组织样品中,使用基因整合测定检测到成功基因组编辑的分子信号。该测试使用逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)方法来鉴定白蛋白-IDS嵌合mRNA转录物。在来自中剂量群组中的两名受试者的活检样品中检测到白蛋白-IDS mRNA融合转录物表明ZFN介导的IDS基因整合发生在内源白蛋白基因内的预期位点处。使用MiSeq DNA测序进行的单独的肝脏组织分析(一种灵敏性较低的测定)(定量下限为0.1%)未检测到来自低剂量和中剂量群组受试者的样品中的编辑。设计第二代、可能更有效的ZFN构建体(例如SB-71557和SB-71728)以增加编辑效率以及用于其他改善。临床前数据展示了三种潜在的ZFN 2.0优势:(1)由于结构变化,效率和效能的5至30倍改善;(2)在白蛋白基因中的靶基因座中具有单核苷酸多态性(SNP)的患者(大约20%的群体)中具有同样作用良好的能力;以及(3)改善的特异性(参见美国申请号16/271,250)。也将测试这些ZFN组合物。

[0108] 使用新开发的灵敏定量测定(定量下限为0.78nmol/小时/mL)来测量血浆IDS活性。在接受中剂量的两名受试者和接受高剂量的一名受试者中记录了IDS酶活性与基线相比的较小增加,但是在24周时,这些测量值仍处于基线值的预期范围内(小于10nmol/小时/mL,而相比而言估计的正常范围大于82nmol/小时/mL)。

[0109] 在高剂量组中的第二名患者中测量到血浆IDS活性显著增加,到施用如本文所述的组合物后第6周,水平升高至大约50nmol/小时/mL。血浆IDS活性水平随后随着轻度转氨

酶升高(transaminitis)的发展而同时降低,所述轻度转氨酶升高是由于怀疑的免疫应答而导致的基于AAV疗法的已知风险。在第62、111和128天测量到肝功能测试的1级升高。患者在第121天因与研究药物无关的箝闭脐疝而入院。截至最近的观察,患者的血浆IDS活性测量为14nmol/小时/mL,其高于基线值但低于正常范围。

[0110] 所有六名患者的基线尿液GAG测量值均在视为正常的范围内或略高于正常值,除了硫酸乙酰肝素在所有受试者中在基线处升高。在考虑了基线变异性之后,总体结果未显示GAG的与本文公开的组合物剂量的显著增加或减少。

[0111] 将在施用本文公开的组合物之后观察到的生化变化的临床相关性作为临床数据,并且在从ERT撤出试验后分析患者结局。迄今为止,两名中剂量患者和一名高剂量患者已启动ERT撤出。一名启动程序的中剂量患者大约3个月后由于疲劳和GAG增加而重新开始ERT。将来的其他数据读出将包括来自高剂量群组扩展受试者的生化数据、肝脏活检分析以及ERT撤出后的结局。

概述

[0112] 除非另有指示,否则方法的实践以及本文所公开的组合物制备和使用采用分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、计算化学、细胞培养、重组DNA和相关领域的常规技术,这些技术是本领域所熟知的。这些技术在文献中有充分解释。参见例如Sambrook等人MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989和第三版,2001;Ausubel等人,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley&Sons,纽约,1987和定期更新;丛书METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,圣地亚哥;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,第三版,Academic Press,圣地亚哥,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,第304卷,“Chromatin”(P.M.Wassarman和A.P.Wolffe编辑),Academic Press,圣地亚哥,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,第119卷,“Chromatin Protocols”(P.B.Becker编辑)Humana Press,托托瓦,1999。

定义

[0113] 术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用,并且是指呈线性或环状构象并且呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物。出于本公开文本的目的,不应将这些术语视为在聚合物的长度方面加以限制。这些术语可以涵盖天然核苷酸的已知类似物,以及在碱基、糖和/或磷酸部分(例如,硫代磷酸酯骨架)中被修饰的核苷酸。通常,特定核苷酸的类似物具有相同的碱基配对特异性;即,A的类似物将与T进行碱基配对。

[0114] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。所述术语还适用于如下氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸是相应天然存在的氨基酸的化学类似物或经修饰衍生物。

[0115] “结合”是指高分子之间(例如,蛋白质与核酸之间)的序列特异性非共价相互作用。并非结合相互作用的所有组分都需要是序列特异性的(例如,与DNA骨架中的磷酸残基接触),只要所述相互作用作为整体是序列特异性的即可。此类相互作用的特征通常是解离常数(K_d)为 $10^{-6}M^{-1}$ 或更低。“亲和力”是指结合强度:增强的结合亲和力与较低的 K_d 相关。

[0116] “结合蛋白”是能够非共价结合至另一分子的蛋白质。结合蛋白可以结合至例如DNA分子(DNA结合蛋白)、RNA分子(RNA结合蛋白)和/或蛋白质分子(蛋白质结合蛋白)。在蛋白质结合蛋白的情形中,其可以结合至自身(以形成同二聚体、同三聚体等),和/或其可以

结合至一种或多种不同蛋白质的一个或多个分子。结合蛋白可以具有多于一种类型的结合活性。例如, 锌指蛋白具有DNA结合、RNA结合和蛋白质结合活性。

[0117] “锌指DNA结合蛋白”(或结合结构域)是蛋白质或较大蛋白质内的结构域, 其以序列特异性方式通过一个或多个锌指结合DNA, 所述锌指是结合结构域内的氨基酸序列区域, 所述结合结构域的结构通过锌离子的配位而稳定。术语锌指DNA结合蛋白通常缩写为锌指蛋白或ZFP。术语“锌指核酸酶”包括一种ZFN以及二聚化以裂解靶基因的一对ZFN(所述对中的成员被称为“左和右”或“第一和第二”或“对”)。

[0118] “TALE DNA结合结构域”或“TALE”是包含一个或多个TALE重复结构域/单元的多肽。重复结构域参与TALE与其同源靶DNA序列的结合。单一的“重复单元”(也称为“重复序列”)的长度典型地是33-35个氨基酸, 并展现与天然存在的TALE蛋白内的其他TALE重复序列的至少一定序列同源性。参见例如美国专利号8,586,526和9,458,205。术语“TALEN”包括一种TALEN以及二聚化以裂解靶基因的一对TALEN(所述对中的成员被称为“左和右”或“第一和第二”或“对”)。锌指和TALE结合结构域可以“被工程化”以与预先确定的核苷酸序列结合, 例如通过工程化(改变一个或多个氨基酸)天然存在的锌指或TALE蛋白的识别螺旋区。因此, 工程化DNA结合蛋白(锌指或TALE)是非天然存在的蛋白质。用于工程化DNA结合蛋白的方法的非限制性例子是设计和选择。设计的DNA结合蛋白是在自然界中不存在的蛋白质, 其设计/组成主要源自合理标准。设计的合理标准包括应用替换规则和计算机化算法, 以用于处理存储现有ZFP和/或TALE设计和结合数据的信息的数据库中的信息。参见例如美国专利号8,568,526; 6,140,081; 6,453,242; 和6,534,261; 还参见国际专利公开号WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536; 和WO 03/016496。

[0119] “所选择的”锌指蛋白或TALE是并非在自然界中发现的蛋白质, 其产生主要源自经验过程, 如噬菌体展示、相互作用陷阱或杂交体选择。参见例如, 美国专利号8,586,526; 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; 以及国际专利公开号WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; 和WO 02/099084。

[0120] “重组”是指两种多核苷酸之间交换遗传信息的过程。出于本公开文本的目的, “同源重组(HR)”是指这种交换的特化形式, 其发生于例如细胞中的双链断裂通过同源定向修复机制修复期间。这个过程需要核苷酸序列同源性, 使用“供体”分子模板修复“靶”分子(即, 经历双链断裂的分子), 并且因为其导致遗传信息从供体转移至靶标, 被不同地称为“非交换型基因转化”或“短束基因转化”。不希望受任何特定理论约束, 这种转移可以涉及在断裂的靶标与供体之间形成的异源双链体DNA的错配修正, 和/或“合成依赖性链退火”(其中使用供体重合成将成为靶标的一部分的遗传信息), 和/或相关过程。这种特化的HR通常导致靶分子的序列改变, 使得供体多核苷酸的部分或全部序列并入靶多核苷酸中。

[0121] 在本公开文本的方法中, 如本文所述的一种或多种靶向核酸酶在预定位点处在靶序列(例如, 细胞染色质)中产生双链断裂, 并且可以将与断裂区域中的核苷酸序列具有同源性的“供体”多核苷酸引入细胞中。已显示双链断裂的存在有利于供体序列的整合。供体序列可以是物理整合的, 或可替代地, 供体多核苷酸用作通过同源重组修复断裂的模板, 导致将供体中的全部或部分核苷酸序列引入细胞染色质中。因此, 可以改变细胞染色质中的第一序列, 并且在某些实施方案中, 可以将所述第一序列转换为供体多核苷酸中存在的序

列。因此,术语“替代”(“replace”或“replacement”)的使用可以理解为代表一个核苷酸序列被另一个核苷酸序列替代(即,在信息意义上的序列替代),并且不一定需要将一个多核苷酸物理地或化学地被另一个多核苷酸替代。

[0122] 在本文所述的任何方法中,另外的锌指或TALEN蛋白对可以用于对细胞内另外的靶位点的另外的双链裂解。

[0123] 在用于细胞染色质的目的区域中的序列的靶向重组和/或替代和/或改变的方法的某些实施方案中,通过与外源“供体”核苷酸序列的同源重组来改变染色体序列。如果存在与断裂区域同源的序列,则通过在细胞染色质中存在双链断裂来刺激这种同源重组。

[0124] 在本文所述的任何方法中,第一核苷酸序列(“供体序列”)可包含与目的区域中的基因组序列同源但不相同的序列,从而刺激同源重组以在目的区域中插入不同序列。因此,在某些实施方案中,与目的区域中的序列同源的供体序列的部分相对于被替代的基因组序列展现出约80%至99%(或其之间的任何整数)的序列同一性。在其他实施方案中,供体与基因组序列之间的同源性高于99%,例如,如果超过100个连续碱基对的供体和基因组序列之间只有1个核苷酸不同。在某些情况下,供体序列的非同源部分可以包含在目的区域中不存在的序列,从而将新序列引入目的区域中。在这些情况下,通常非同源序列的侧翼与目的区域中的序列同源或相同的50-1,000个碱基对(或其间的任何整数值)或大于1,000的任意数量的碱基对的序列。在其他实施方案中,供体序列与第一序列非同源,并通过非同源重组机制插入基因组中。

[0125] 本文所述的任何方法可用于通过靶向整合供体序列(其破坏一个或多个目的基因表达)而使细胞中的一种或多种靶序列部分或完全失活。还提供了具有部分或完全失活的基因的细胞系。

[0126] 此外,本文所述的靶向整合的方法也可用于整合一种或多种外源序列。外源核酸序列可以包含例如一种或多种基因或cDNA分子、或任何类型的编码或非编码序列、以及一种或多种控制元件(例如启动子)。另外,外源核酸序列可产生一种或多种RNA分子(例如,小发夹RNA(shRNA)、抑制性RNA(RNAi)、微小RNA(miRNA)等)。

[0127] “裂解”是指DNA分子的共价骨架的断裂。裂解可以通过多种方法来引发,所述多种方法包括但不限于磷酸二酯键的酶促或化学水解。单链裂解和双链裂解都是可能的,并且作为两个不同的单链裂解事件的结果,可发生双链裂解。DNA裂解可导致产生平头末端或交错末端。在某些实施方案中,融合多肽用于靶向的双链DNA裂解。

[0128] “裂解半结构域”是与第二多肽(相同或不同)形成具有裂解活性(优选双链裂解活性)的复合物的多肽序列。术语“第一和第二裂解半结构域”、“+和-裂解半结构域”和“左和右裂解半结构域”可互换使用,以指二聚化的裂解半结构域对。

[0129] “工程化裂解半结构域”是已经被修饰以便与另一个裂解半结构域(例如,另一个工程化裂解半结构域)形成专性异二聚体的裂解半结构域。参见美国专利号7,888,121;7,914,796;8,034,598和8,823,618,将所述文献通过引用以其全文并入本文。

[0130] 术语“序列”是指任何长度的核苷酸序列,其可以是DNA或RNA;可以是线性、环状或分支的,并且可以是单链或双链的。术语“供体序列”是指被插入基因组中的核苷酸序列。供体序列可以具有任何长度,例如长度介于2与10,000个核苷酸之间(或其之间或高于其的任何整数值),优选地长度介于约100与1,000个核苷酸之间(或其之间的任何整数),更优选地

长度介于约200与500个核苷酸之间。

[0131] “疾病相关基因”是在单基因疾病中以某种方式缺陷的基因。单基因疾病的非限制性例子包括重度联合免疫缺陷、囊性纤维化、溶酶体贮积病(例如高雪(Gaucher')病、胡勒尔病、亨特病、法布里(Fabry's)病、尼曼-匹克二氏(Neimann-Pick)病、戴萨克斯病(Tay-Sach's)等)、镰状细胞性贫血和地中海贫血。

[0132] “血脑屏障”是高度选择性的通透性屏障,其可将循环血液与中枢神经系统中的脑分离。血脑屏障由脑内皮细胞形成,所述脑内皮细胞通过CNS血管中的紧密连接而连接,从而限制了血液溶质的通过。长期以来,人们一直认为血脑屏障阻止大分子治疗剂的摄取并且阻止大多数小分子治疗剂的摄取(Pardridge (2005) NeuroRx 2 (1) :3-14)。

[0133] “染色质”是包含细胞基因组的核蛋白结构。细胞染色质包含核酸(主要是DNA)和蛋白质(包含组蛋白和非组蛋白染色体蛋白)。大多数的真核细胞染色质以核小体的形式存在,其中核小体核心包含约150个碱基对的DNA,所述DNA与八聚体相缔合,所述八聚体包含组蛋白H2A、H2B、H3和H4各两个,并且接头DNA(长度可变,取决于生物体)在核小体核心之间延伸。组蛋白H1分子通常与接头DNA相缔合。出于本公开文本的目的,术语“染色质”意为涵盖原核和真核的所有类型的细胞核蛋白。细胞染色质包含染色体和游离型染色质。

[0134] “染色体”是包含细胞基因组的全部或一部分的染色质复合物。细胞的基因组通常以其核型为特征,所述核型是包含所述细胞基因组的所有染色体的集合。细胞的基因组可以包含一条或多条染色体。

[0135] “附加体”是复制型核酸,核蛋白复合物或包含不属于细胞染色体核型的一部分的核酸的其他结构。附加体的例子包括质粒和某些病毒基因组。

[0136] “靶位点”或“靶序列”是定义核酸的一部分的核酸序列,结合分子将结合至所述部分,前提是存在用于结合的充分条件。

[0137] “外源”分子是正常地在细胞中不存在,但可以通过一种或多种遗传、生物化学或其他方法引入细胞中的分子。“在细胞中正常存在”是关于细胞的特定发育阶段和环境条件来确定。因此,例如,仅在肌肉的胚胎发育期间存在的分子是关于成体肌肉细胞的外源分子。类似地,通过热休克引入的分子是关于非热休克细胞的外源分子。外源分子可以包含例如功能失常的内源分子的功能形式或功能正常的内源分子的功能失常形式。

[0138] 外源分子尤其可以是小分子,如通过组合化学工艺产生的小分子,或高分子,如蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、糖蛋白、脂蛋白、多糖、上述分子的任何经修饰衍生物、或者包含一种或多种上述分子的任何复合物。核酸包括DNA和RNA,可以是单链或双链的;可以是线性、分支或环状的;并且可以是任何长度。核酸包括能够形成双螺旋的那些,以及形成三螺旋的核酸。参见,例如,美国专利号5,176,996和5,422,251。蛋白质包括但不限于DNA结合蛋白、转录因子、染色质重构因子、甲基化的DNA结合蛋白、聚合酶、甲基化酶、脱甲基酶、乙酰基酯酶、脱乙酰酶、激酶、磷酸酶、整合酶、重组酶、连接酶、拓扑异构酶、促旋酶和解螺旋酶。

[0139] 外源分子可以是与内源分子类型相同的分子,例如,外源蛋白质或核酸。例如,外源核酸可以包含引入细胞中的感染性病毒基因组、质粒或附加体,或正常地在细胞中不存在的染色体。将外源分子引入细胞中的方法是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于脂质介导的转移(即,脂质体,包括中性和阳离子型脂质)、电穿孔、直接注射、细胞融合、粒

子轰击、磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转移和病毒载体介导的转移。外源分子还可以是与内源分子类型相同,但衍生自与细胞来源不同物种的分子。例如,可将人类核酸序列引入最初衍生自小鼠或仓鼠的细胞系中。

[0140] 相比之下,“内源”分子是在特定发育阶段在特定环境条件下在特定细胞中正常存在的分子。例如,内源核酸可以包含染色体、线粒体、叶绿体或其他细胞器的基因组、或天然存在的游离型核酸。其他内源分子可以包括蛋白质,例如转录因子和酶。

[0141] “融合”分子是其中两个或更多个亚基分子被连接(优选地共价连接)的分子。亚基分子可以是相同化学类型的分子,或者可以是不同化学类型的分子。融合分子的例子包括但不限于融合蛋白(例如,蛋白质DNA结合结构域与裂解结构域之间的融合)、与裂解结构域可操作地缔合的多核苷酸DNA结合结构域(例如,sgRNA)之间的融合和融合核酸(例如,编码融合蛋白的核酸)。

[0142] 细胞中融合蛋白的表达可以源自将融合蛋白递送至细胞或通过将编码融合蛋白的多核苷酸递送至细胞来获得,其中多核苷酸发生转录,并且转录物发生翻译,以产生融合蛋白。反式剪接、多肽裂解和多肽连接也可以参与蛋白质在细胞中的表达。将多核苷酸和多肽递送至细胞的方法呈现于本公开文本中的其他地方。

[0143] 出于本公开文本的目的,“基因”包括编码基因产物(参见下文)的DNA区域以及调控基因产物产生的所有DNA区域,无论此类调控序列是否与编码序列相邻和/或与转录序列相邻。因此,基因包括但不必限于启动子序列、终止子、翻译调节序列(如核糖体结合位点和内部核糖体进入位点)、增强子、沉默子、绝缘子、边界元件、复制起点、基质附着位点和基因座控制区域。

[0144] “基因表达”是指将基因中所含的信息转化为基因产物。基因产物可以是基因的直接转录产物(例如,mRNA、tRNA、rRNA、反义RNA、核酶、结构RNA或任何其他类型的RNA)或通过mRNA翻译产生的蛋白质。基因产物还包括通过如加帽、聚腺苷酸化、甲基化和编辑等方法修饰的RNA,以及通过例如甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、ADP核糖基化、肉豆蔻酸化(myristylation)和糖基化修饰的蛋白质。

[0145] 对基因表达的“调节”是指基因活性的变化。对表达的调节可以包括但不限于基因激活和基因阻遏。基因组编辑(例如,裂解、改变、失活、随机突变)可以用于调节表达。基因失活是指如与不包括如本文所述的ZFP或TALEN的细胞相比,基因表达的任何减少。因此,基因失活可以是部分失活或完全失活。

[0146] “目的区域”是细胞染色质的任何区域,例如基因或者基因内或与基因相邻的非编码序列,其中可期望所述区域结合外源分子。结合可以用于靶向DNA裂解和/或靶向重组的目的。例如,目的区域可以存在于染色体、附加体、细胞器基因组(例如,线粒体、叶绿体)或感染性病毒基因组中。目的区域可以位于基因的编码区内,位于经转录非编码区内(例如前导序列、尾随序列或内含子),或位于在编码区上游或下游的非转录区内。目的区域的长度可以小至单一核苷酸对或多达2,000个核苷酸对,或任何整数值的核苷酸对。

[0147] “真核”细胞包括但不限于真菌细胞(如酵母)、植物细胞、动物细胞、哺乳动物细胞和人类细胞(例如,T细胞)。

[0148] “红血细胞”(RBC)或红细胞是衍生自造血干细胞的终末分化细胞。他们缺乏核酸酶和大多数细胞器。RBC含有血红蛋白以将氧气从肺部运送至周围组织。实际上,单个RBC中

有33%是血红蛋白。它们还将新陈代谢期间由细胞产生的CO₂携带出组织,并返回到肺部以在呼气期间释放。在骨髓中响应于血液性缺氧产生RBC,其通过由肾脏释放促红细胞生成素(EPO)来介导。EPO造成原成红细胞数目的增加并缩短完全RBC成熟所需的时间。在大约120天之后,由于RBC不含有细胞核或任何其他再生能力,因此通过肝脏、脾脏和淋巴结中巨噬细胞的吞噬活性(约90%)或通过血浆中的溶血(约10%)从循环中去除细胞。在巨噬细胞吞没后,由于溶酶体酶的作用,RBC的化学组分在巨噬细胞的液泡内分解。

[0149] “分泌组织”是动物中从个体细胞中分泌产物进入典型地衍生自上皮的一些类型的内腔中的那些组织。定位于胃肠道的分泌组织的例子包括肠、胰腺和胆囊的内衬细胞。其他分泌组织包括肝脏、与眼睛和粘膜相关的组织如唾液腺、乳腺、前列腺、垂体腺和内分泌系统的其他成员。另外,分泌组织包括能够分泌的组织类型的个体细胞。

[0150] 关于两个或更多个组分(如序列元件)的并列,术语“操作性连接”和“操作性地连接”(或“可操作连接”)可互换使用,其中所述组分经排列使得两个组分正常发挥功能并允许以下可能性:至少一个所述组分可以介导对至少一个其他组分发挥的功能。通过说明,如果转录调节序列响应一种或多种转录调节因子的存在或不存在控制编码序列的转录水平,那么转录调节序列(如启动子)与编码序列操作性连接。转录调节序列通常与编码序列顺式操作性连接,但无需与其直接相邻。例如,增强子是与编码序列操作性连接的转录调节序列,即使其不邻接。

[0151] 关于功能多肽,术语“操作性连接”可以指以下事实:每个组分在与另一组分连接时发挥的功能与其没有如此连接时发挥的功能相同。例如,关于其中ZFP或TALE DNA结合结构域与激活结构域融合的融合多肽,如果在功能多肽中,ZFP或TALE DNA结合结构域部分能结合其靶位点和/或其结合位点,同时激活结构域能上调基因表达,那么ZFP或TALE DNA结合结构域和激活结构域呈操作性连接。在融合多肽中的ZFP或TALE DNA结合结构域与裂解结构域融合时,如果在融合多肽中,ZFP或TALE DNA结合结构域部分能够结合其靶位点和/或其结合位点,而裂解结构域能够裂解靶位点附近的DNA,那么ZFP或TALE DNA结合结构域和裂解结构域呈操作性连接。

[0152] “功能性”蛋白质、多肽或核酸包括提供与野生型蛋白质、多肽或核酸相同功能的任何蛋白质、多肽或核酸。蛋白质、多肽或核酸的“功能性片段”是蛋白质、多肽或核酸,其序列与全长蛋白质、多肽或核酸不同,但保留与全长蛋白质、多肽或核酸相同的功能。功能性片段可以具有与相应的天然分子相比较多、较少或相同的残基数,和/或可以含有一个或多个氨基酸或核苷酸取代。确定核酸功能(例如,编码功能、与另一核酸杂交的能力)的方法是本领域所熟知的。类似地,确定蛋白质功能的方法是熟知的。例如,多肽的DNA结合功能可以例如通过滤膜结合、电泳迁移率变动或免疫沉淀测定来确定。DNA裂解可以通过凝胶电泳来测定。参见Ausubel等人,同上。蛋白质与另一蛋白质相互作用的能力可以例如通过免疫共沉淀、双杂交测定或互补(遗传和生物化学二者)来确定。参见例如Fields等人(1989) Nature 340:245-246;美国专利号5,585,245和国际专利公开号WO 98/44350。

[0153] “载体”能将基因序列转移至靶细胞。典型地,“载体构建体”、“表达载体”和“基因转移载体”意指能引导目的基因表达并且可以将基因序列转移至靶细胞的任何核酸构建体。因此,所述术语包括克隆和表达媒介物,以及整合载体。

[0154] “报告基因”或“报告序列”是指产生蛋白质产物的任何序列,所述蛋白质产物在常

规测定中优选地但不一定易于测量。适合报告基因包括但不限于编码介导抗生素抗性(例如,氨苄西林抗性、新霉素抗性、G418抗性、嘌呤霉素抗性)的蛋白质的序列、编码有色或荧光或发光蛋白(例如,绿色荧光蛋白、增强绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、萤光素酶)和介导增强的细胞生长和/或基因扩增的蛋白质(例如,二氢叶酸还原酶)的序列。表位标签包括例如一个或多个拷贝的FLAG、His、myc、Tap、HA或任何可检测的氨基酸序列。“表达标签”包括编码报告物的序列,其可与所需基因序列可操作连接以监测目的基因的表达。“WPRE”序列是衍生自土拨鼠肝炎病毒的土拨鼠肝炎转录后调控元件。WPRE是600bp长的三部分元件,其包含呈给定顺序的 γ 、 α 和 β 元件(Doneillo等人(1992) *J Virol* 72:5085-5092),并有助于转基因在AAV系统中的强表达(Loeb等人(1999) *Hum Gene Ther* 10:2295-2305)。它还增强了缺乏内含子的转基因的表达。呈其天然形式的WPRE含有WHV-X蛋白的部分开放阅读框(ORF)。在其他病毒元件(如WHV(We2)增强子)的情境下完全表达的WHV-X蛋白与土拨鼠和小鼠中肝癌的较高风险相关(Hohne等人(1990) *EMBO J* 9(4):1137-45;Flajolet等人(1998) *J Virol* 72(7):6175-80)。WHV-X蛋白显现不是直接致癌的,但一些研究表明,在某些情况下,它可以充当用于产生与嗜肝DNA病毒(人的乙肝病毒;土拨鼠的土拨鼠肝炎病毒)感染相关的肝癌的弱辅因子。很多时候,提到“野生型”WPRE是指591bp序列(GenBank登录号J02442中的核苷酸1094-1684),所述序列在其3'区域含有WHV X蛋白开放阅读框(ORF)的一部分。在此元件中,WHV-X在位置1502有初始ATG起始密码子并且在位置1488有具有序列GCTGA的启动子区域。在Zanta-Boussif(同上)中,公开了mut6WPRE序列,其中将在位置1488的启动子序列修饰为ATCAT,并将在位置1502的起始密码子修饰为TTG,这有效地阻止了WHV-X的表达。在J04514.1WPRE变体中,ATG WHV X起始位点是位置1504,并且可以在此J04514.1菌株中产生mut6型变体。另一个WPRE变体是仅包含来自野生型WPRE的最少小 γ 和 α 元件的247bp WPRE3变体(Choi等人(2014) *Mol Brain* 7:17),所述变体缺乏WHV X序列。

[0155] 围绕并结合某些类型细胞的细胞外基质由多个组分构成,所述多个组分包括纤维结构蛋白(如各种胶原蛋白)、粘附蛋白(如层粘连蛋白和纤连蛋白)以及蛋白聚糖,所述蛋白聚糖形成嵌入了纤维结构蛋白的凝胶。蛋白聚糖是非常大的大分子,其由核心蛋白组成,许多称为糖胺聚糖的长多糖链与所述核心蛋白共价结合。由于糖胺聚糖的高负电荷,蛋白聚糖是非常高度水合的,这种特性允许蛋白聚糖形成可以膨胀和收缩的凝胶状基质。蛋白聚糖也是有效的润滑剂。“糖胺聚糖”或“GAG”是由重复二糖单元组成的非支链多糖的长的线性聚合物。重复单元(除角质素外)由氨基己糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)以及酸性糖醛糖(葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸)或半乳糖组成。该一般结构的例外是硫酸角质素,其具有替代酸性己糖的半乳糖。糖胺聚糖是高度极性的且吸引水。除透明质酸外,所有GAG与大约30种不同的核心蛋白之一共价连接以形成蛋白聚糖。核心蛋白在粗糙型内质网上合成并且转移至高尔基体,其中通过糖基转移酶将核苷二磷酸活化的酸性糖和氨基糖交替地添加至产生的多糖的非还原端,从而形成对于GAG常见的特征性重复二糖结构。硫酸肝素/硫酸乙酰肝素(HS GAG)和硫酸软骨素/硫酸皮肤素(CS GAG)在高尔基体中合成,其中在粗糙型内质网中制备的蛋白核心通过糖基转移酶用O-连接的糖基化进行翻译后修饰,从而形成蛋白聚糖。硫酸角质素可以通过蛋白聚糖的N-连接的糖基化或O-连接的糖基化来修饰核心蛋白。GAG的第四类透明质酸不是由高尔基体合成的,而是由立即分泌动态拉长的二糖链的整合膜合酶合成的。在细胞外基质正常更新期间蛋白聚糖的降解开始于细胞外基质中蛋白酶

对核心蛋白的蛋白水解裂解,所述核心蛋白然后通过内吞作用进入细胞。内体将其内含物递送至溶酶体,在溶酶体中,蛋白水解酶完成了对核心蛋白的降解,并且一系列糖苷酶和硫酸酯酶将GAG水解为单糖。溶酶体含有将长聚合物水解为较短寡糖的内切糖苷酶和从GAG片段中裂解单独酸性糖或氨基糖的外切糖苷酶。GAG的溶酶体分解代谢从非还原端以逐步方式进行(参见图5)。如果末端糖被硫酸化,则在去除糖之前必须通过特定的硫酸酯酶水解硫酸酯键。当已经去除硫酸酯时,特定的外切糖苷酶随后将寡糖非还原端的末端糖水解,从而使所述寡糖缩短1个糖。以这种逐步方式继续降解,所述降解在通过硫酸酯酶去除硫酸酯与通过外切糖苷酶裂解末端糖之间交替进行。如果去除硫酸酯留下末端的葡糖胺残基,则必须首先将其乙酰化为N-乙酰基葡糖胺,因为溶酶体缺乏去除葡糖胺所需的酶。这是通过使用乙酰-CoA作为乙酰基供体的乙酰转移酶完成的。当葡糖胺残基已被N-乙酰化时,它可以被 α -N-乙酰葡糖胺糖苷酶水解,从而允许继续GAG的逐步降解。在MPS II的情况下,硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的末端糖被硫酸化,并且有缺陷的IDS酶不能去除该硫酸酯基团。通常,末端糖基团上的硫酸酯将通过艾杜糖醛酸硫酸酯酶(IDS)去除,并且然后GAG将被 α 艾杜糖醛酸酶(iduromidase)(IDUA)作用以去除末端糖。

[0156] 术语“受试者”和“患者”可互换使用,并且是指哺乳动物如人类受试者和非人类灵长类动物,以及实验动物如兔子、狗、猫、大鼠、小鼠和其他动物。因此,如本文所用的术语“受试者”或“患者”意指可以施用本发明的改变的细胞和/或由本发明的改变的细胞产生的蛋白质的任何哺乳动物受试者。本发明的受试者包括患有MPS II障碍的受试者。

[0157] 一般来讲,受试者对于MPS II的治疗是合格的。就本文目的而言,此类合格受试者是这样的受试者,所述受试者正在经历、已经历或可能经历MPS II的一种或多种体征、症状或其他适应症;已被诊断患有MPS II(不论是否例如新近诊断)和/或有发展MPS II的风险。患有MPS II或有患有MPS II风险的受试者可以任选地鉴定为已针对组织和/或尿液中GAG的升高水平进行筛选的受试者。

[0158] 如本文所用,“治疗”(“treatment”或“treating”)是用于获得有益或所需结果(包括临床结果)的方法。出于本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于以下中的一种或多种:减少由疾病引起的一种或多种症状、减小疾病的程度、稳定疾病(例如,预防或延迟疾病的恶化)、延迟或减缓疾病的进展、改善疾病状态、减少治疗疾病所需的一种或多种其他药物的剂量和/或提高生活质量。

[0159] 如本文所用,“延迟”或“减缓”MPS II的进展意指预防、延期、阻碍、减缓、延缓、稳定和/或推迟疾病的发展。此延迟可以具有不同的时间长度,这取决于疾病的历史和/或被治疗的个体。

[0160] “有效剂量”或“有效量”是向如本文公开的受试者给予的有效稳定、降低或消除尿液GAG和/或导致血浆中可测量的IDS活性的组合物的剂量和/或量。

[0161] 如本文所用,“在开始治疗时”是指第一次暴露于MPS II治疗性组合物如本发明的组合物时或之前的时间段。在一些实施方案中,“在开始治疗时”是在MPS II药物如SB-913之前约一年、九个月、六个月、三个月、第二个月或一个月中的任一个时间。在一些实施方案中,“在开始治疗时”是紧接在与第一次暴露于MPS II治疗性组合物之前或与第一次暴露于MPS II治疗性组合物同时。

[0162] 术语“轮椅依赖性”意指因受伤或疾病而不能行走并且必须依靠轮椅来走动的受

试者。

[0163] 术语“机械呼吸机”描述了改善受试者的肺与大气之间的空气交换的设备。

[0164] 如本文所用,“基于”包括(1)评估、确定或测量如本文所述的受试者特征(并且优选地选择适合接受治疗的受试者;和(2)施用如本文所述的一种或多种治疗。

[0165] MPS II的“症状”是受试者经历并指示MPS II的任何现象,或结构、功能或感觉相对于正常的偏离。

[0166] 受试者中的“重度MPS II”的特征在于在18个月至3岁之间的语言迟缓和发育迟缓。所述疾病在重度MPS II受试者中的特征在于器官肿大、活动过度和攻击性、神经系统恶化、关节僵硬和骨骼畸形(包括异常的脊椎骨)、面部特征粗大伴有舌头增大、心脏瓣膜增厚、听力损失和疝气。未经治疗的患有重度亨特综合征的患者的期望寿命是进入到青少年中期,由于神经病学恶化和/或心肺衰竭而死亡。

[0167] 受试者中的“减毒形式MPS II”典型地晚于重度受试者诊断出。躯体临床特征与重度受试者相似,但总体疾病严重程度处于较轻度,通常具有缓慢的疾病进展,不伴有或仅伴有轻度认知损害。未经治疗的减毒形式的死亡通常在20-30岁的年龄之间,死于心脏病和呼吸道疾病。

[0168] 术语“支持性手术”是指可以在受试者上进行以缓解可能与疾病相关的症状的手术程序。对于患有MPS II的受试者,此类支持性手术可能包括心脏瓣膜置换手术、扁桃体切除术和腺样体切除术、通气管放置、腹部疝修补、宫颈减压、腕管综合征的治疗、正中神经的手术减压、器械融合术(以稳定和加强脊柱)、关节镜检查、髋关节或膝关节置换以及下肢轴的矫正和气管造口术(参见Wraith等人(2008) Eur J Pediatr.167(3):267-277;和Scarpa等人(2011) Orphanet Journal of Rare Diseases 6:72)。

[0169] 如本文用于辅助疗法的术语“免疫抑制剂”是指起到抑制或掩蔽本文所治疗的哺乳动物的免疫系统作用的物质。所述免疫抑制剂包括抑制细胞因子产生、下调或抑制自身抗原表达或掩蔽MHC抗原的物质。此类药剂的例子包括2-氨基-6-芳基-5-取代嘧啶(参见美国专利4,665,077);非类固醇抗炎药(NSAID);更昔洛韦(ganciclovir)、他克莫司(tacrolimus)、糖皮质激素,如皮质醇或醛固酮,抗炎剂,如环氧合酶抑制剂、5-脂氧合酶抑制剂或白三烯受体拮抗剂;嘌呤拮抗剂,如硫唑嘌呤或吗替麦考酚酯(MMF);烷基化剂,如环磷酰胺;溴隐亭;达那唑;氨苯砒;戊二醛(其掩蔽MHC抗原,如美国专利号4,120,649中所述);MHC抗原和MHC片段的抗独特型抗体;环孢菌素A;类固醇,如皮质类固醇或糖皮质激素类似物,例如泼尼松、甲基泼尼松龙和地塞米松;二氢叶酸还原酶抑制剂,如甲氨蝶呤(口服或皮下);羟氯喹;柳氮磺吡啶;来氟米特;细胞因子或细胞因子受体拮抗剂,包括抗干扰素- α 、- β 或- γ 抗体、抗肿瘤坏死因子- α 抗体(英夫利昔单抗(infliximab)或阿达木单抗(adalimumab))、抗TNF- α 免疫粘附素(依那西普(etanercept))、抗肿瘤坏死因子- β 抗体、抗白介素-2抗体和抗IL-2受体抗体;抗LFA-1抗体,包括抗CD11a和抗CD18抗体;抗L3T4抗体;异源抗淋巴细胞球蛋白;泛T抗体,优选抗CD3或抗CD4/CD4a抗体;含有LFA-3结合结构域的可溶性肽(国际专利公开号W0 90/08187,7/26/90公开的);链激酶;TGF- β ;链道酶;来自宿主的RNA或DNA;FK506;RS-61443;脱氧精胍菌素;雷帕霉素;T细胞受体(Cohen等人,美国专利号5,114,721);T细胞受体片段(Offner等人(1991) Science 251:430-432;国际专利公开号W090/11294;Janeway(1989) Nature 341:482;和国际专利公开号W0 91/

01133);T细胞受体抗体(EP 340,109)如T10B9。

[0170] “皮质类固醇”是指模拟或增大天然存在的皮质类固醇的作用、具有类固醇的一般化学结构的若干种合成或天然存在的物质中的任何一种。合成皮质类固醇的例子包括泼尼松、泼尼松龙(包括甲基泼尼松龙)、地塞米松、糖皮质激素和倍他米松。

[0171] “包装插页”用于指通常包括在治疗性产品的商业包装中的说明书,所述说明书包含关于使用此类治疗性产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症、待与包装产品组合的其他治疗性产品和/或警告等的信息。

[0172] 本文中使用的“标签”是指通常附随着药物配制品的商业包装(包括容器如小瓶和包装插页)以及其他类型的包装所包含的信息。

[0173] 应当理解,可以将本文所述的各个实施方案的一个、一些或所有特性进行组合以形成本发明的其他实施方案。本发明的这些和其他方面对于本领域技术人员将变得清楚。

核酸酶

[0174] 本文所述的方法可以利用一种或多种核酸酶来靶向引入IDS转基因。核酸酶的非限制性例子包括可用于体内裂解携带转基因的供体分子的ZFN、TALEN、归巢核酸内切酶、CRISPR/Cas和/或Ttgo指导RNA,和用于裂解细胞的基因组使得转基因以靶向方式整合至基因组中的核酸酶。在某些实施方案中,一种或多种核酸酶是天然存在的。在其他实施方案中,一种或多种核酸酶是非天然存在的,即在DNA结合分子(也称为DNA结合结构域)和/或裂解结构域中工程化。例如,可以改变天然存在的核酸酶的DNA结合结构域以结合至所选择的靶位点(例如,经工程化以结合至所选择的靶位点的ZFP、TALE和/或CRISPR/Cas的sgRNA)。在其他实施方案中,核酸酶包含异源DNA结合和裂解结构域(例如,锌指核酸酶;TAL效应子结构域DNA结合蛋白;具有异源裂解结构域的大范围核酸酶DNA结合结构域)。在其他实施方案中,核酸酶包含如CRISPR/Cas或Ttgo系统的系统。

A.DNA结合结构域

[0175] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法采用大范围核酸酶(归巢核酸内切酶)DNA结合结构域,以用于结合至供体分子和/或结合至细胞基因组中的目的区域。天然存在的大范围核酸酶识别15-40个碱基对的裂解位点,并且通常分为四个家族:LAGLIDADG家族、GIY-YIG家族、His-Cyst盒家族和HNH家族。示例性归巢核酸内切酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII。上述示例性归巢核酸内切酶的识别序列是已知的。也参见美国专利号5,420,032;美国专利号6,833,252;Belfort等人(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388;Dujon等人(1989)Gene 82:115-118;Perler等人(1994)Nucleic Acids Res.22:1125-1127;Jasin(1996)Trends Genet.12:224-228;Gimble等人(1996)J.Mol.Biol.263:163-180;Argast等人(1998)J.Mol.Biol.280:345-353和New England Biolabs目录。

[0176] 在某些实施方案中,本文所述的方法和组合物利用核酸酶,所述核酸酶包含工程化的(非天然存在的)归巢核酸内切酶(大范围核酸酶)。归巢核酸内切酶和大范围核酸酶如I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII的识别序列是已知的。也参见美国专利号5,420,032;美国专利号6,833,252;Belfort等人(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388;Dujon等人(1989)Gene82:115-118;Perler等人(1994)Nucleic Acids Res.22:1125-1127;Jasin

(1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble 等人 (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180; Argast 等人 (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 和 New England Biolabs 目录。另外, 可以对归巢核酸内切酶和大范围核酸酶的 DNA 结合特异性进行工程化以结合非天然靶位点。参见例如 Chevalier 等人 (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat 等人 (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962; Ashworth 等人 (2006) Nature 441:656-659; Paques 等人 (2007) Current Gene Therapy 7:49-66; 美国专利公开号 2007/0117128。归巢核酸内切酶和大范围核酸酶的 DNA 结合结构域可以在作为整体的核酸酶的情境下改变 (即, 使得核酸酶包括同源裂解结构域) 或可以与异源裂解结构域融合。

[0177] 在其他实施方案中, 用于本文所述的方法和组合物中的一种或多种核酸酶的 DNA 结合结构域包含天然存在或工程化的 (非天然存在的) TAL 效应子 DNA 结合结构域。参见例如美国专利号 8,586,526, 将所述文献通过引用以其整体并入本文。已知黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 的植物病原性细菌会在重要的作物植物中引起许多种疾病。黄单胞菌属的致病性取决于保守的 III 型分泌 (T3S) 系统, 其将超过 25 种不同的效应因子蛋白注入植物细胞中。在所注入的这些蛋白质中有转录激活因子样 (TAL) 效应子, 其模拟植物转录激活因子并操纵植物转录组 (参见 Kay 等人 (2007) Science, 318:648-651)。这些蛋白质含有 DNA 结合结构域和转录激活结构域。最充分表征的 TAL-效应子之一是来自野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*) 的 AvrBs3 (参见 Bonas 等人 (1989) Mol Gen Genet 218:127-136 和国际专利公开号 WO 2010/079430)。TAL-效应子含有串联重复序列的中心化结构域, 每个重复序列含有约 34 个氨基酸, 所述重复序列是这些蛋白质的 DNA 结合特异性的关键。另外, 其含有核定位序列和酸性转录激活结构域 (对于综述, 参见 Schornack S 等人 (2006) J Plant Physiol 163 (3):256-272)。另外, 在植物致病性细菌青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 中, 已经发现在青枯雷尔氏菌生物变型 1 菌株 GMI1000 和生物变型 4 菌株 RS1000 中, 指定为 brg11 和 hpx17 的两种基因与黄单胞菌属的 AvrBs3 家族是同源的 (参见 Heuer 等人 (2007) Appl and Envir Micro 73 (13):4379-4384)。这些基因的核苷酸序列彼此 98.9% 相同, 但不同之处在于 hpx17 的重复结构域中 1,575bp 的缺失。然而, 两种基因产物与黄单胞菌属的 AvrBs3 家族蛋白具有小于 40% 序列同一性。参见例如美国专利号 8,586,526, 将所述文献通过引用以其整体并入本文。

[0178] 这些 TAL 效应因子的特异性取决于在串联重复序列中发现的序列。重复序列包含约 102bp, 并且所述重复序列典型地彼此 91%-100% 同源 (Bonas 等人, 同上)。重复序列的多态性通常位于位置 12 和 13 处, 并且在位置 12 和 13 的高变双残基 (RVD) 的身份与 TAL 效应子的靶序列中连续核苷酸的身份之间显现存在一一对应关系 (参见 Moscou 和 Bogdanove (2009) Science 326:1501, 以及 Boch 等人 (2009) Science, 326:1509-1512)。在实验中, 已经确定这些 TAL 效应子的 DNA 识别天然代码, 使得位置 12 和 13 的 HD 序列导致结合至胞嘧啶 (C), NG 结合至 T, NI 结合至 A、C、G 或 T, NN 结合至 A 或 G, 并且 ING 结合至 T。这些 DNA 结合重复序列已经与新组合和数目的重复序列装配为蛋白质, 以制造能与新序列相互作用的人工转录因子, 并激活非内源报告基因在植物细胞中的表达 (Boch 等人, 同上)。已将工程化 TAL 蛋白与 FokI 裂解半结构域连接以产生 TAL 效应子结构域核酸酶融合物 (TALEN), 从而在酵母报告物测定 (基于质粒的靶标) 中展现出活性。参见例如美国专利号 8,586,526; Christian 等人 (2010) Genetics epub 10.1534/genetics.110.120717)。

[0179] 在某些实施方案中,用于细胞基因组的体内裂解和/或靶向裂解的一种或多种核酸酶的DNA结合结构域包含锌指蛋白。优选地,锌指蛋白是非天然存在的,其被工程化为结合所选的靶位点。参见例如,参见例如Beer li等人(2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo等人(2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan等人(2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal等人(2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo等人(2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416; 美国专利号6,453,242; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,030,215; 6,794,136; 7,067,317; 7,262,054; 7,070,934; 7,361,635; 7,253,273; 和美国专利公开2005/0064474; 2007/0218528; 和2005/0267061,全部通过引用以其整体并入本文。

[0180] 与天然存在的锌指蛋白相比,工程化的锌指结合结构域可以具有新颖的结合特异性。工程化方法包括但不限于合理设计和各种类型的选择。合理设计包括例如使用数据库,所述数据库包含三联体(或四联体)核苷酸序列和个别锌指氨基酸序列,其中每个三联体或四联体核苷酸序列与结合特定三联体或四联体序列的锌指的一个或多个氨基酸序列缔合。参见例如共同拥有的美国专利号6,453,242和6,534,261,将所述文献通过引用以其整体并入本文。

[0181] 示例性选择方法(包括噬菌体展示和双杂交系统)披露于美国专利号5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; 和6,242,568; 以及国际专利公开号WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; 和WO 01/88197中。另外,例如在共同拥有的国际专利公开号WO 02/077227中已经描述了对锌指结合结构域的结合特异性的增强。

[0182] 另外,如这些和其他参考文献中所披露,锌指结构域和/或多指锌指蛋白可使用任何合适的接头序列(包括例如,长度为5个或更多个氨基酸的接头)连接在一起。对于示例性接头序列,还参见美国专利号8,772,453; 6,479,626; 6,903,185; 和7,153,949。本文所述的蛋白质可以包括在蛋白质的单独锌指之间的合适接头的任何组合。

[0183] 靶位点的选择; 用于设计和构建融合蛋白(和编码所述融合蛋白的多核苷酸)的ZFP和方法是本领域技术人员已知的并且详细描述于以下文献中: 美国专利号6,140,081; 5,789,538; 6,453,242; 6,534,261; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 和6,200,759; 和国际专利公开号WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536; 和WO 03/016496。

[0184] 另外,如这些和其他参考文献中所披露,锌指结构域和/或多指锌指蛋白可使用任何合适的接头序列(包括例如,长度为5个或更多个氨基酸的接头)连接在一起。对于长度为6个或更多个氨基酸的示例性接头序列,还参见美国专利号6,479,626; 6,903,185; 和7,153,949。本文所述的蛋白质可以包括在蛋白质的单独锌指之间的合适接头的任何组合。

[0185] 在某些实施方案中,核酸酶的DNA结合结构域是CRISPR/Cas核酸酶系统的一部分,所述部分包括例如单一指导RNA (sgRNA)。参见例如美国专利号8,697,359和美国专利公开号2015/0056705。编码系统的RNA组分的CRISPR(规律间隔成簇短回文重复序列)基因座和编码蛋白质的Cas (CRISPR相关)基因座(Jansen等人(2002) *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575; Makarova等人(2002) *Nucleic Acids Res.* 30:482-496; Makarova等人(2006) *Biol. Direct*

1:7;Haft等人(2005) PLoS Comput. Biol. 1:e60) 组成CRISPR/Cas核酸酶系统的基因序列。微生物宿主中的CRISPR基因座含有CRISPR相关(Cas) 基因以及能将CRISPR介导的核酸裂解的特异性程序化的非编码RNA元件的组合。

[0186] II型CRISPR是最充分表征的系统之一,并在四个连续步骤中进行靶向DNA双链断裂。第一步,从CRISPR基因座转录两个非编码RNA:前体crRNA阵列和tracrRNA。第二步, tracrRNA杂交到前crRNA的重复区上,并且介导将前体crRNA加工成包含单独的间隔子序列的成熟crRNA。第三步,成熟的crRNA:tracrRNA复合物通过crRNA上的间隔子与靶DNA上的原型间隔子之间的Watson-Crick碱基配对将Cas9引导至靶DNA,靶DNA靠近原型间隔子邻近基序(PAM) 是靶标识别的附加要求。最后,Cas9介导靶DNA的裂解以在原型间隔子内产生双链断裂。CRISPR/Cas系统的活性包括三个步骤:(i) 在称为“适应”的过程中将外来DNA序列插入CRISPR阵列中以防止后来的攻击,(ii) 表达相关蛋白质,以及表达并加工所述阵列,之后(iii) RNA介导干扰外来核酸。因此,在细菌细胞中,若干种所谓的“Cas”蛋白与CRISPR/Cas系统的天然功能有关,并在诸如插入外源DNA等功能中发挥作用。

[0187] 在某些实施方案中,Cas蛋白可以是天然存在的Cas蛋白的“功能衍生物”。天然序列多肽的“功能衍生物”是具有与天然序列多肽共同的定性生物特性的化合物。“功能衍生物”包括但不限于天然序列的片段和天然序列多肽和其片段的衍生物,前提是其具有与相应的天然序列多肽共同的生物活性。本文考虑的生物活性是功能衍生物将DNA底物水解成片段的能力。术语“衍生物”涵盖多肽的氨基酸序列变体、共价修饰物和其融合物。Cas多肽或其片段的合适衍生物包括但不限于Cas蛋白或其片段的突变体、融合物、共价修饰物。Cas蛋白包括Cas蛋白或其片段、以及Cas蛋白或其片段的衍生物,所述Cas蛋白可以从细胞获得或以化学方式合成或通过这两种程序的组合获得。细胞可以是天然产生Cas蛋白的细胞,或天然产生Cas蛋白并且经基因工程改造以产生更高表达水平的内源Cas蛋白或从外源引入的核酸(所述核酸编码与内源Cas相同或不同的Cas) 产生Cas蛋白的细胞。在一些情况下,细胞不会天然产生Cas蛋白,而是经基因工程化以产生Cas蛋白。除了和/或代替Cas蛋白可以使用的RNA指导的核酸酶的其他非限制性例子包括2类CRISPR蛋白,如Cpf1。参见例如 Zetsche等人(2015) Cell 163:1-13。

[0188] 在一些实施方案中,DNA结合结构域是TtAgo系统的一部分(参见Swarts等人(2014) Nature 507(7491):258-261;Swarts等人(2012) PLoS One 7(4):e35888;Sheng等人(2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(2):652-657)。在真核生物中,基因沉默是由蛋白质的Argonaute(Ago) 家族介导的。在这个范例中,Ago与小(19-31nt) RNA结合。此蛋白质-RNA沉默复合物通过所述小RNA与靶标之间的Watson-Crick碱基配对来识别靶RNA,并且以核酸内切方式裂解靶RNA(Vogel(2014) Science 344:972-973)。相比之下,原核Ago蛋白结合至小的单链DNA片段结合,并可能用于检测和去除外来(常常为病毒) DNA(Yuan等人(2005) Mol. Cell 19:405;Olovnikov等人(2013) Mol. Cell 51:594;Swarts等人,同上)。示例性的原核Ago蛋白包括来自风产液菌(*Aquifex aeolicus*)、类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、和嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的那些。

[0189] 最充分表征的原核Ago蛋白之一是来自嗜热栖热菌(*T. thermophilus*) 的蛋白(TtAgo;Swarts等人,同上)。TtAgo与具有5'磷酸基团的15nt或13-25nt单链DNA片段缔合。TtAgo结合的这种“指导DNA”用于引导蛋白质-DNA复合物结合第三方DNA分子中的Watson-

Crick互补DNA序列。一旦这些指导DNA中的序列信息允许鉴定靶DNA,TtAgo-指导DNA复合物就会裂解靶DNA。TtAgo-指导DNA复合物与其靶DNA结合时的结构也支持这种机制(G.Sheng等人,同上)。来自类球红细菌(RsAgo)的Ago具有相似的特性(Olovnikov等人,同上)。

[0190] 可以将任意DNA序列的外源指导DNA加载到TtAgo蛋白上(Swartz等人,同上)。由于TtAgo裂解的特异性是由指导DNA引导的,因此,由外源的由研究者指定的指导DNA形成的TtAgo-DNA复合物将TtAgo靶DNA裂解引导至互补的由研究者指定的靶DNA。以此方式,可以在DNA中产生靶向双链断裂。使用TtAgo-指导DNA系统(或来自其他生物的直系同源Ago-指导DNA系统)允许在细胞内靶向裂解基因组DNA。这种裂解可以是单链或双链的。为了裂解哺乳动物基因组DNA,优选使用为在哺乳动物细胞中表达而优化的TtAgo密码子形式。另外,可能优选的是用体外形成的TtAgo-DNA复合物处理细胞,其中TtAgo蛋白与细胞穿透肽融合。另外,可能优选的是使用已经通过诱变改变以在37摄氏度下具有改善活性的TtAgo蛋白形式。使用本领域中利用DNA断裂的标准技术,可以使用TtAgo-RNA介导的DNA裂解来实现一系列结局(包括基因敲除、靶向基因添加、基因校正、靶向基因缺失)。

[0191] 因此,核酸酶包含特异性结合至任何基因中的靶位点的DNA结合结构域,期望将供体(转基因)插入所述靶位点中。

[0192] 在某些实施方案中,DNA结合结构域结合至白蛋白,例如指定为SBS-47171和SBS-47898的ZFP的DNA结合结构域。参见例如美国专利公开号2015/0159172。

B. 裂解结构域

[0193] 可以将任何合适的裂解结构域与DNA结合结构域缔合(例如,可操作地连接)以形成核酸酶。例如,已将ZFP DNA结合结构域与核酸酶结构域融合形成ZFN-功能性实体,所述功能性实体能够通过其工程化(ZFP)DNA结合结构域识别其预期核酸靶标,并导致DNA通过核酸酶活性在ZFP结合位点附近被切割。参见例如Kim等人(1996)Proc Natl Acad Sci USA93(3):1156-1160。最近,已将ZFN用于多种生物体的基因组修饰。参见例如美国专利公开号2003/0232410;2005/0208489;2005/0026157;2005/0064474;2006/0188987;2006/0063231;和国际专利公开号WO 07/014275。同样,已将TALE DNA结合结构域与核酸酶结构域融合以产生TALEN。参见例如美国专利号8,586,526。也已经描述了包含单一指导RNA(sgRNA)的CRISPR/Cas核酸酶系统,所述单一指导RNA结合至DNA并与裂解结构域(例如,Cas结构域)缔合以诱导靶向的裂解。参见例如美国专利号8,697,359和8,932,814以及美国专利公开号2015/0056705。

[0194] 如上所指出,裂解结构域可以与DNA结合结构域是异源的,例如锌指DNA结合结构域和来自核酸酶的裂解结构域或TALEN DNA结合结构域和来自核酸酶的裂解结构域;sgRNA DNA结合结构域和来自核酸酶的裂解结构域(CRISPR/Cas);和/或大范围核酸酶DNA结合结构域和来自不同核酸酶的裂解结构域。异源裂解结构域可以从任何核酸内切酶或核酸外切酶获得。可以衍生裂解结构域的示例性核酸内切酶包括但不限于限制性核酸内切酶和归巢核酸内切酶。参见,例如,2002-2003目录,New England Biolabs,Beverly,MA;和Belfort等人(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388。切割DNA的其他酶是已知的(例如S1核酸酶;绿豆核酸酶;胰腺DNase I;微球菌核酸酶;酵母HO核酸内切酶;还参见Linn等人(编辑)Nucleases,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1993)。这些酶(或其功能片段)中的一种或多种可以用作裂解结构域和裂解半结构域的来源。

[0195] 类似地,裂解半结构域可以衍生自如上所述的需要二聚化以实现裂解活性的任何核酸酶或其部分。通常,如果融合蛋白包含裂解半结构域,那么裂解需要两个融合蛋白。可替代地,可以使用包含两个裂解半结构域的单一蛋白质。两个裂解半结构域可以衍生自相同核酸内切酶(或其功能性片段),或者每个裂解半结构域可以衍生自不同核酸内切酶(或其功能性片段)。另外,两个融合蛋白的靶位点优选地关于彼此来布置,使得两个融合蛋白与其各自的靶位点的结合将裂解半结构域置于针对彼此的空间定向中,此允许裂解半结构域例如通过二聚化形成功能性裂解结构域。因此,在某些实施方案中,靶位点的近边缘被5-8个核苷酸或15-18个核苷酸隔开。然而,任何整数个核苷酸或核苷酸对(例如2至50个核苷酸对或更多)都可以插入两个靶位点之间。通常,裂解位点位于靶位点之间。

[0196] 限制性核酸内切酶(限制酶)存在于许多物种中,并且能够与DNA(在识别位点)进行序列特异性结合,并能够在结合位点或结合位点附近裂解DNA。某些限制酶(例如,IIS型)在远离识别位点的位点处裂解DNA,并且具有可分离的结合结构域和裂解结构域。例如,IIS型FokI酶催化DNA的双链裂解,在一条链上距其识别位点9个核苷酸处,并且在另一条链上距其识别位点13个核苷酸处进行裂解。参见例如美国专利号5,356,802;5,436,150;和5,487,994;以及Li等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4275-4279;Li等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2764-2768;Kim等人(1994a)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:883-887;Kim等人(1994b)J.Biol.Chem.269:31,978-31,982。因此,在一个实施方案中,融合蛋白包含来自至少一种IIS型限制酶的裂解结构域(或裂解半结构域)和一个或多个锌指结合结构域(其可以工程化或可以不经工程化)。

[0197] 其裂解结构域可与结合结构域分离的示例性IIS型限制酶是FokI。这种特定的酶作为二聚体具有活性。Bitinaite等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:10,570-10,575。因此,出于本公开文本的目的,在公开的融合蛋白中使用的FokI酶的部分被认为是裂解半结构域。因此,对于使用锌指-FokI融合物的靶向双链裂解和/或靶向替代细胞序列,可以使用各自包含FokI裂解半结构域的两种融合蛋白来重构有催化活性的裂解结构域。可替代地,也可以使用包含锌指结合结构域和两个FokI裂解半结构域的单一多肽分子。在本公开文本的其他地方提供了使用锌指-FokI融合物进行靶向裂解和靶向序列改变的参数。

[0198] 裂解结构域或裂解半结构域可以是蛋白质的任一部分,其保留裂解活性,或者保留多聚化(例如,二聚化)以形成功能性裂解结构域的能力。

[0199] 示例性IIS型限制酶描述于美国专利7,888,121中,将所述文献以其整体并入本文。另外的限制酶也包含可分离的结合结构域和裂解结构域,并且本公开文本设想了这些。参见例如Roberts等人(2003)Nucleic Acids Res.31:418-420。

[0200] 在某些实施方案中,所述裂解结构域包含最小化或防止同二聚化的一个或多个工程化裂解半结构域(也称为二聚化结构域突变体),例如如在美国专利号8,772,453;8,623,618;8,409,861;8,034,598;7,914,796;和7,888,121中所述,将所有所述文献的披露内容通过引用以其整体并入本文。在FokI的位置446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537和538处的氨基酸残基都是影响FokI裂解半结构域二聚化的靶标。

[0201] 形成专性异二聚体的FokI的示例性工程化裂解半结构域包括一对,其中第一裂解半结构域包括在FokI的位置490和538的氨基酸残基处的突变,而第二裂解半结构域包括氨

氨基酸残基486和499处的突变。

[0202] 因此,在一个实施方案中,第490位的突变用Lys (K) 替代了Glu (E) ;538位的突变用Lys (K) 替代Iso (I) ;486位的突变用Glu (E) 替代Gln (Q) ;以及499位的突变用Lys (K) 替代Iso (I) 。具体地,本文所述的工程化裂解半结构域是通过以下方式制备的:在一个裂解半结构域中突变位置490 (E→K) 和538 (I→K) 以产生指定为“E490K:I538K”的工程化裂解半结构域,并且在另一个裂解半结构域中突变位置486 (Q→E) 和499 (I→L) 以产生指定为“Q486E:I499L”的工程化裂解半结构域。本文所述的工程化裂解半结构域是专性的异二聚体突变体,其中异常裂解被最小化或消除。美国专利号7,914,796和8,034,598,将所述文献的披露内容通过引用以其整体并入本文。在某些实施方案中,工程化裂解半结构域包含在位置486、499和496处(相对于野生型FokI编号)的突变,例如用Glu (E) 残基替代在位置486处的野生型Gln (Q) 残基的突变,用Leu (L) 残基替代在位置499处的野生型Iso (I) 残基的突变,以及用Asp (D) 或Glu (E) 残基替代在位置496处的野生型Asn (N) 残基的突变(也分别称为“ELD”和“ELE”结构域)。在其他实施方案中,工程化裂解半结构域包含在490、538和537位置处(相对于野生型FokI编号)的突变,例如用Lys (K) 残基替代在位置490处的野生型Glu (E) 残基的突变,用Lys (K) 残基替代在位置538处的野生型Iso (I) 残基的突变,以及用Lys (K) 残基或Arg (R) 残基替代在位置537处的野生型His (H) 残基的突变(也分别称为“KKK”和“KKR”结构域)。在其他实施方案中,工程化裂解半结构域包含在位置490和537处(相对于野生型FokI编号)的突变,例如用Lys (K) 残基替代在位置490处的野生型Glu (E) 残基的突变,以及用Lys (K) 残基或Arg (R) 残基替代在位置537处的野生型His (H) 残基的突变(也分别称为“KIK”和“KIR”结构域)。参见例如美国专利号8,772,453。在其他实施方案中,工程化裂解半结构域包含“Sharkey”和/或“Sharkey突变”(参见Guo等人(2010) J.Mol.Biol.400 (1):96-107)。

[0203] 可以使用任何合适的方法来制备本文所述的工程化裂解半结构域,例如,通过对野生型裂解半结构域(FokI)进行定点诱变,如美国专利号7,888,121;7,914,796;8,034,598;和8,623,618中所述的。

[0204] 可替代地,核酸酶可使用所谓的“分裂酶”技术在体内装配于核酸靶位点处(参见例如美国专利公开号2009/0068164)。此类分裂酶的组分可在单独的表达构建体上表达,或者可以连接于一个开放式阅读框中,其中单独组分例如由自裂解的2A肽或IRES序列隔开。组分可以是个别锌指结合结构域或大范围核酸酶核酸结合结构域的结构域。

[0205] 可在使用前例如在基于酵母的染色体系统中针对活性来筛选核酸酶,如美国专利号8,563,314中所述。核酸酶的表达可以在组成型启动子或诱导型启动子的控制下,所述启动子例如半乳糖激酶启动子,其在棉子糖和/或半乳糖的存在下被激活(去阻遏)并在葡萄糖存在下被阻遏。

[0206] Cas9相关CRISPR/Cas系统包含两个RNA非编码组分:tracrRNA和含有通过相同的直接重复序列(DR)间隔的核酸酶指导序列(间隔子)的前体crRNA阵列。为了使用CRISPR/Cas系统完成基因组工程化,这些RNA的两种功能都必须存在(参见Cong等人(2013) Scienceexpress 1/10.1126/science1231143)。在一些实施方案中,tracrRNA和前体crRNA通过单独的表达构建体或作为单独的RNA提供。在其他实施方案中,构建了嵌合RNA,其中将工程化的成熟crRNA(赋予靶标特异性)与tracrRNA(提供与Cas9的相互作用)融合以产生嵌合cr-RNA-tracrRNA杂合体(也称为单一指导RNA)。(参见Jinek等人(2013) Elife 2:

e00471.doi:10.7554/eLife.00471.;Jinek等人(2012) Science337:816-821;和Cong,同上)。

[0207] 如本文所述的一种或多种核酸酶可以在靶位点中进行一个或多个双链和/或单链切割。在某些实施方案中,核酸酶包含催化无活性裂解结构域(例如,FokI和/或Cas蛋白)。参见例如美国专利号9,200,266和8,703,489以及Guillinger等人(2014) Nature Biotech.32(6):577-582。催化无活性裂解结构域在与催化活性结构域组合时可以充当切口酶以进行单链切割。因此,可以组合使用两种切口酶以在特定区域中进行双链切割。在本领域还已知另外的切口酶,例如,McCaffery等人(2016) Nucleic Acids Res.44(2): e11.doi:10.1093/nar/gkv878.Epub 2015年10月19日。

[0208] 因此,可以使用包含DNA结合结构域和裂解结构域的任何核酸酶。在某些实施方案中,核酸酶包含由左和右ZFN组成的ZFN,例如包含第一ZFN和第二ZFN的ZFN,所述第一ZFN包含指定为SBS-47171的ZFP和裂解结构域,所述第二ZFN包含指定为SBS-47898的ZFP和裂解结构域。在某些实施方案中,ZFN的左和右(第一和第二)ZFN被携带在相同载体上,并且在其他实施方案中,ZFN的成对组分被携带在不同的载体,例如两个AAV载体上,所述两个AAV载体一个指定为如表1、SEQ ID NO:9中所示的SB-47171AAV(携带包含指定为SBS-47171的ZFP的ZFN的AAV2/6载体),并且另一个指定为如表2、SEQ ID NO:12中所示的SB-47898AAV(携带包含指定为SBS-47898的ZFP的ZFN的AAV2/6载体)。

靶位点

[0209] 如上详细描述,可以对DNA结构域进行工程化以结合至基因座,例如白蛋白或其他安全港基因中的任何选择序列。与天然存在的DNA结合结构域相比,工程化DNA结合结构域可以具有新颖的结合特异性。工程化方法包括但不限于合理设计和各种类型的选择。合理设计包括例如使用数据库,所述数据库包含三联体(或四联体)核苷酸序列和单独(锌指)氨基酸序列,其中每个三联体或四联体核苷酸序列与结合特定三联体或四联体序列的DNA结合结构域的一个或多个氨基酸序列缔合。参见例如共同拥有的美国专利号6,453,242和6,534,261,将所述文献通过引用以其整体并入本文。还可以进行对TAL-效应子结构域的合理设计。参见例如美国专利公开号2011/0301073。

[0210] 适用于DNA结合结构域的示例性选择方法(包括噬菌体展示和双杂交系统)披露于美国专利号5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,410,248;6,140,466;6,200,759;和6,242,568;以及国际专利公开号W0 98/37186;W0 98/53057;W0 00/27878;和W0 01/88197和GB 2,338,237中。

[0211] 靶位点的选择;核酸酶以及用于设计和构建融合蛋白(和编码所述融合蛋白的多核苷酸)的方法是本领域技术人员已知的,并且详细描述于美国专利公开号2005/0064474和2006/0188987中,将所述文献通过引用以其整体并入本文。

[0212] 另外,如这些和其他参考文献中所披露,DNA结合结构域(例如,多指锌指蛋白)可使用任何合适的接头序列(包括例如,长度为5个或更多个氨基酸的接头)连接在一起。对于长度为6个或更多个氨基酸的示例性接头序列,参见例如美国专利号6,479,626;6,903,185;和7,153,949。本文所述的蛋白质可以包括在蛋白质的单独DNA结合结构域之间的合适接头的任何组合。还参见美国专利号8,586,526。

[0213] 在某些实施方案中,针对一个或多个DNA结合结构域的一个或多个靶位点蛋白

白基因内。参见例如美国专利公开号2015/0159172。

供体

[0214] 如上所指出,提供了对外源序列(也称为“供体序列”或“供体”)的插入,例如以校正突变基因或用于增加编码MPS II疾病中缺乏或缺陷的蛋白质(例如,IDS)的基因的表达。在一些实施方案中,转基因功能可以通过尿液中GAG的稳定、下降或消除和/或通过测量用本文公开的方法和组合物治疗的受试者的血浆中的转基因表达(例如,hIDS)和/或活性来衡量。容易清楚的是,供体序列典型地与其所置于的基因组序列不同。供体序列可以含有非同源序列,所述非同源序列的侧翼为两个同源区域以允许在目的位置处的高效HDR。另外,供体序列可以包含载体分子,所述载体分子包含与细胞染色质中的目的区域不同源的序列。供体分子可以含有若干个不连续的与细胞染色质同源的区域。例如,对于目的区域中通常不存在的序列的靶向插入,所述序列可以存在于供体核酸分子中,并且侧翼为与目的区域中的序列同源的区域。

[0215] 本文描述了靶向插入编码IDS蛋白的转基因以插入选定位置中的方法。用于插入的多核苷酸也可以称为“外源”多核苷酸、“供体”多核苷酸或分子或“转基因”。供体多核苷酸可以是单链和/或双链的DNA或RNA,并且可以以线性或环状形式引入细胞中。参见例如美国专利号8,703,489和9,005,973。一种或多种供体序列也可以包含在DNA MC中,所述DNA MC可以以环状或线性形式引入细胞中。参见例如美国专利公开号2014/0335063。如果以线性形式引入,则可以通过本领域技术人员已知的方法保护供体序列的末端(例如,防止核酸外切降解)。例如,将一个或多个双脱氧核苷酸残基添加至线性分子的3'末端和/或将自身互补的寡核苷酸连接至一个或两个末端。参见例如Chang等人(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:4959-4963;Nehls等人(1996) Science 272:886-889。保护外源多核苷酸免于降解的另外的方法包括但不限于一个或多个末端氨基的添加以及修饰的核苷酸间连接(例如硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、和O-甲基核糖或脱氧核糖残基)的使用。

[0216] 可以将多核苷酸作为载体分子的一部分引入细胞中,所述载体分子具有另外的序列,例如复制起点、启动子和编码抗生素抗性的基因。此外,可以将供体多核苷酸作为裸核酸,作为与如脂质体或泊洛沙姆的试剂复合的核酸引入,或可以通过病毒(例如腺病毒、AAV、疱疹病毒、逆转录病毒、慢病毒和整合酶缺陷型慢病毒(IDLV))递送。

[0217] 通常将供体插入,使得其表达由在整合位点处的内源启动子(即驱动其中插入供体的内源基因(例如,高度表达的白蛋白、AAVS1、HPRT等)的表达的启动子)驱动。然而,清楚的是,供体可以包含启动子和/或增强子,例如组成型启动子或诱导型或组织特异性启动子。在一些实施方案中,供体在表达质粒中维持在细胞中,使得基因在染色体外表达。

[0218] 可以将供体分子插入内源基因中,由此使得所有、一些或没有内源基因被表达。例如,可以将如本文所述的转基因插入白蛋白或其他基因座中,由此使得一些(在编码溶酶体酶的转基因的N末端和/或C末端)或没有任何内源白蛋白序列被表达,例如以与编码一种或多种IDS蛋白的转基因融合的形式。在其他实施方案中,将转基因(例如,具有或不具有如白蛋白的另外的编码序列)整合至任何内源基因座(例如安全港基因座)中。

[0219] 当内源序列(内源或转基因的一部分)与转基因一起表达时,内源序列(例如,白蛋白等)可以是全长序列(野生型或突变型)或部分序列。优选地,内源序列是功能性的。这些全长或部分序列(例如,白蛋白)的功能的非限制性例子包括增加由转基因(例如,治疗性基

因)表达的和/或充当载体的多肽的血清半衰期。

[0220] 此外,尽管对于表达不是必需的,但外源序列也可以包括转录或翻译调控序列,例如启动子、增强子、绝缘子、内部核糖体进入位点、编码2A肽和/或聚腺苷酸化信号的序列。

[0221] 在某些实施方案中,外源序列(供体)包含目的蛋白与作为其融合伴侣的膜蛋白的细胞外结构域的融合物,从而产生定位于细胞表面上的融合蛋白。这使得由转基因编码的蛋白质可能在血清中起作用。在针对MPS II疾病的治疗的情况下,由转基因融合物编码的IDS酶作用于从在细胞(例如,RBC)表面上的位置积累在血清中的代谢产物。另外,如果RBC如正常降解过程那样被脾巨噬细胞吞没,则在更自然地有利于该酶的pH下,当巨噬细胞吞没细胞时形成的溶酶体会使膜结合的融合蛋白暴露于溶酶体中高浓度的代谢产物。

[0222] 在一些情况下,供体可以是已经修饰的内源基因(IDS)。例如,可以在内源基因上进行密码子优化以产生供体。此外,尽管针对酶替代疗法的抗体应答关于所讨论的特定治疗酶和随个体受试者而变化,但是在用使用野生型IDS的酶替代治疗的许多MPS II疾病受试者中已观察到显著的免疫应答。另外,这些抗体与治疗功效的相关性也是可变的(参见Katherine Ponder (2008) J Clin Invest 118(8):2686)。因此,本发明的方法和组合物可以包括与野生型IDS相比具有经修饰序列的供体的产生,包括但不限于在已知作为内源免疫应答的引发表位的位点上产生功能性沉默氨基酸变化的修饰,和/或截短,由此使得由这种供体产生的多肽具有较低的免疫原性。

[0223] 由于脑中缺乏缺失的IDS酶,MPS II疾病受试者常常患有神经病学后遗症。不幸的是,由于血脑屏障的不可渗透性,通常难以通过血液将治疗剂递送至脑。因此,本发明的方法和组合物可以与增加治疗剂向脑中的递送的方法结合使用,所述方法包括但不限于引起脑毛细血管的细胞之间的紧密连接瞬时打开的方法,如通过使用高渗性甘露醇溶液的颈动脉内施用、使用聚焦超声和施用缓激肽类似物进行瞬时渗透性破坏。可替代地,可以设计治疗剂以利用用于特异性转运至脑中的受体或转运机制。可以使用的特异性受体的例子包括运铁蛋白受体、胰岛素受体或低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LRP-1和LRP-2)。已知LRP与一系列分泌型蛋白质(如apoE、tPA、PAI-1等)相互作用,并且因此融合针对LRP的这些蛋白质之一的识别序列可以促进酶在治疗性蛋白质在肝脏中表达后转运至脑中和分泌至血流中(参见Gabathuler (2010) Neurobiol Dis.37(1):48-57)。

[0224] 在某些实施方案中,供体载体是如SB-IDS AAV(表3,SEQ ID NO:17)中所示的载体。

组合物/系统

[0225] 本文所述的本发明利用三个AAV载体来实践所述方法。两个载体用于递送右ZFN和左ZFN,并且第三载体用于提供IDS供体序列(请参见实施例)。在某些实施方案中,所述组合物/系统包含包括SB-47171、SB-47898和SB-IDS AAV的3个载体。

细胞

[0226] 本文还提供了经基因修饰的细胞,例如包含编码IDS蛋白的转基因的肝细胞或干细胞,包括通过本文所述的方法产生的细胞。IDS转基因可以在染色体外表达或者可以使用一种或多种核酸酶以靶向方式整合至细胞基因组中。与随机整合不同,核酸酶介导的靶向整合确保了将转基因整合至特定基因中。可以将转基因整合至靶基因中的任何地方。在某些实施方案中,将转基因整合在核酸酶结合和/或裂解位点处或附近,例如在裂解位点和/

或结合位点的上游或下游的1-300个碱基对(或其间的任何数量的碱基对)内,更优选地在裂解和/或结合位点的任一侧的1-100个碱基对(或其间的任何数量的碱基对)内,甚至更优选地在裂解和/或结合位点的任一侧的1至50个碱基对(或其间的任何数量的碱基对)内。在某些实施方案中,整合序列不包括任何载体序列(例如,病毒载体序列)。

[0227] 可以如本文所述对任何细胞类型进行基因修饰以包含转基因,所述任何细胞类型包括但不限于细胞或细胞系。如本文所述的经基因修饰细胞的其他非限制性例子包括T细胞(例如,CD4⁺、CD3⁺、CD8⁺等);树突状细胞;B细胞;自体的(例如,受试者衍生的)。在某些实施方案中,细胞是肝细胞并且经体内修饰。在某些实施方案中,细胞是干细胞,包括异源多能、全能或多能干细胞(例如,CD34⁺细胞、诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞等)。在某些实施方案中,如本文所述的细胞是衍生自受试者的干细胞。

[0228] 如本文所述的细胞可用于例如通过体内疗法在患有MPS II疾病的受试者中治疗和/或预防所述障碍。还提供了离体疗法,例如可以扩增核酸酶修饰的细胞并然后使用标准技术将其重新引入受试者中的情况。参见例如Tebas等人(2014) *New Eng J Med* 370(10): 901。在干细胞的情况下,在输注至受试者中之后,还发生这些前体体内分化成表达功能性蛋白(来自插入的供体)的细胞。

[0229] 还提供了包含如本文所述的成分(核酸酶、IDS供体、细胞等)中一种或多种的药物组合物(也称为“配制品”或“制品”或“药物产品”或“一组药物产品”)。药物组合物可以以任何浓度包括相同或不同类型的组分组合物。例如,本文提供了包含一组药物产品的制品,所述一组药物产品包括如下的三种单独的药物组合物:第一药物组合物,其包含携带ZFN对的一个成员(例如,左ZFN)的纯化的AAV载体;第二药物组合物,其包含携带ZFN对的另一个成员(例如,右ZFN)的纯化的AAV载体;和第三药物组合物,其包含携带IDS供体的纯化的AAV载体。左ZFN可以包含指定为47171的ZFN(例如,指定为SB-A6P-ZLEF的药物产品)或指定为71557的ZFN(例如,指定为SB-A6P-ZL2的药物产品),并且右ZFN可以包含指定为47898的ZFN(例如,指定为SB-A6P-ZRIGHT的药物产品或指定为71728的ZFN(例如,指定为SB-A6P-ZL2的药物产品)。可以将三种药物组合物中的一种、两种或三种单独配制在包含CaCl₂、MgCl₂、NaCl、蔗糖和泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆P188)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中或生理盐水(NS)配制品中。在一些实施方案中,组合物包含磷酸盐缓冲盐水(PBS),所述磷酸盐缓冲盐水包含约1.15mg/mL磷酸钠、0.2mg/mL磷酸钾、8.0mg/mL氯化钠、0.2mg/mL氯化钾、0.13mg/mL氯化钙和0.1mg/mL氯化镁。将PBS用2.05mg/mL氯化钠、10-12mg/mL蔗糖和0.5至0mg/mL **Kolliphor®** (泊洛沙姆或P188)进一步改性。可以使用ZFN的任何浓度,包括但不限于表6中所示的浓度。此外,制品可以包括任何比率例如1:1:8(左ZFN:右ZFN:IDS供体)的三种药物组合物。

[0230] 将药物组合物(制品/一组药物产品)施用(例如,静脉)至有需要的受试者,由此使得IDS在受试者中表达,包括以用于治疗MPS II的治疗水平(例如,在血浆和/或血白细胞中)表达。所述组合物可以分开施用,或者优选地,将包含一组三种药物产品(ZFN1、ZFN2和IDS供体)的制品在施用之前组合,例如组合在静脉输注袋中。另外,这些配制品可以在施用至受试者之前被冷冻保存。

递送

[0231] 核酸酶、编码这些核酸酶的多核苷酸、供体多核苷酸以及包含本文所述的蛋白质

和/或多核苷酸的组合物可以通过任何合适的手段体内或离体递送。

[0232] 递送如本文所述的核酸酶的方法描述于例如以下文献中：美国专利号6,453,242；6,503,717；6,534,261；6,599,692；6,607,882；6,689,558；6,824,978；6,933,113；6,979,539；7,013,219；和7,163,824，将所有所述文献的披露内容通过引用以其整体并入本文。

[0233] 还可以使用含有编码锌指、TALEN和/或一种或多种Cas蛋白中的一种或多种的序列的载体递送如本文所述的核酸酶和/或供体构建体。可以使用任何载体系统，包括但不限于质粒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体和腺相关病毒载体等。还参见，美国专利号6,534,261；6,607,882；6,824,978；6,933,113；6,979,539；7,013,219和7,163,824，将所述文献通过引用以其整体并入本文。此外，清楚的是，这些载体中的任何一种可包含治疗所需的一种或多种序列。因此，当将一种或多种核酸酶和供体构建体引入细胞中时，可以将核酸酶和/或供体多核苷酸携带于在相同载体上或不同载体上。当使用多个载体时，每个载体可包含编码一种或多种核酸酶和/或供体构建体的序列。

[0234] 可使用常规的基于病毒和非病毒的基因转移方法在细胞（例如哺乳动物细胞）和靶组织中引入编码核酸酶和供体构建体的核酸。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、裸核酸和与递送媒介物（如脂质体或泊洛沙姆（poloxamer））复合的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒，其在递送至细胞后具有游离型或整合的基因组。对于基因疗法程序的综述，参见Anderson (1992) *Science* 256:808-813；Nabel和Felgner (1993) *TIBTECH* 11:211-217；Mitani和Caskey (1993) *TIBTECH* 11:162-166；Dillon (1993) *TIBTECH* 11:167-175；Miller (1992) *Nature* 357:455-460；Van Brunt (1988) *Biotechnology* 6 (10):1149-1154；Vigne (1995) *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36；Kremer和Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51 (1):31-44；Haddada等人 *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler和Böhm (编辑) (1995)；以及Yu等人 (1994) *Gene Therapy* 1:13-26。

[0235] 非病毒递送核酸的方法包括电穿孔、脂转染、显微注射、基因枪、病毒体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质：核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子、和DNA的药剂增强摄取。还可以使用采用例如Sonitron 2000系统 (Rich-Mar) 的声致穿孔 (sonoporation) 来递送核酸。

[0236] 其他示例性核酸递送系统包括由以下各项提供的那些：Amixa Biosystems (Cologne, 德国)、Maxcyte, Inc. (Rockville, 马里兰)、BTX分子递送系统 (Holliston, MA) 和 Copernicus Therapeutics Inc (参见例如美国专利号6,008,336)。脂转染描述于例如美国专利号5,049,386；4,946,787；和4,897,355中)；脂转染试剂是市售的（例如，TransfectamTM和LipofectinTM）。适合于多核苷酸的有效受体识别脂转染的阳离子型和中性脂质包括 Felgner, 国际专利公开号WO 91/17424和WO 91/16024的那些。

[0237] 脂质：核酸复合物（包括靶向脂质体如免疫脂质复合物）的制备是本领域技术人员熟知的（参见例如Crystal (1995) *Science* 270:404-410；Blaese等人 (1995) *Cancer Gene Ther.* 2:291-297；Behr等人 (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:382-389；Remy等人 (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:647-654；Gao等人 (1995) *Gene Therapy* 2:710-722；Ahmad等人 (1992) *Cancer Res.* 52:4817-4820；美国专利号4,186,183；4,217,344；4,235,871；4,261,

975;4,485,054;4,501,728;4,774,085;4,837,028;和4,946,787)。

[0238] 另外的递送方法包括使用将要递送的核酸包装至EnGeneIC递送媒介物(EDV)中。这些EDV被使用双特异性抗体特异性地递送至靶组织中,其中所述抗体的一个臂对所述靶组织具有特异性,并且另一个臂对EDV具有特异性。抗体将EDV携带至靶细胞表面,之后EDV通过内吞作用被引入细胞中。一旦进入细胞,内含物就被释放(参见MacDiarmid等人(2009) *Nature Biotechnology* 27(7):643)。

[0239] 使用基于RNA或DNA病毒的系统递送编码工程化的ZFP的核酸利用高度进化的过程将病毒靶向体内的特定细胞并将病毒有效载荷运输至细胞核。可以将病毒载体直接施用至受试者(体内),或者可以使用它们在体外处理细胞,并且将经修饰细胞施用至受试者(离体)。常规的递送ZFP的基于病毒的系统包括但不限于用于基因转移的逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、痘苗病毒和单纯疱疹病毒载体。使用逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒基因转移方法时,在宿主基因组中整合是可能的,通常导致所插入转基因的长期表达。另外,已经在许多不同细胞类型和靶组织中测量到高转导效率。

[0240] 逆转录病毒的向性可通过并入外来包膜蛋白、扩大靶细胞的潜在靶群体来改变。慢病毒载体是能够转导或感染非分裂细胞并且典型地产生高病毒滴度的逆转录病毒载体。逆转录病毒基因转移系统的选择取决于靶组织。逆转录病毒载体包括顺式作用的长末端重复序列,其具有对多达6-10kb的外来序列的包装能力。最小顺式作用LTR对载体的复制和包装而言是足够的,所述载体随后用于将治疗性基因整合至靶细胞中以提供持久的转基因表达。广泛使用的逆转录病毒载体包括基于鼠类白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、人免疫缺陷病毒(HIV)及其组合的那些载体(参见例如 Buchscher等人(1992) *J. Virol.* 66:2731-2739; Johann等人(1992) *J. Virol.* 66:1635-1640; Sommerfelt等人(1990) *Virol.* 176:58-59; Wilson等人(1989) *J. Virol.* 63:2374-2378; Miller等人(1991) *J. Virol.* 65:2220-2224; 国际专利公开号W0 94/26877。

[0241] 在其中瞬时表达是优选的应用中,可以使用基于腺病毒的系统。基于腺病毒的载体能够在许多细胞类型中具有极高的转导效率,并且不需要细胞分裂。使用此类载体,已经获得高滴度和高表达水平。这种载体可以在相对简单的系统中大量生产。腺相关病毒("AAV")载体也用于转导具有靶核酸的细胞,例如在核酸和肽的体外产生中,以及用于体内和离体基因疗法程序(参见例如, West等人(1987) *Virology* 160:38-47; 美国专利号4,797,368; 国际专利公开号W0 93/24641; Kotin(1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka(1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351。重组AAV载体的构建描述于许多出版物中,包括美国专利号5,173,414; Tratschin等人(1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260; Tratschin等人(1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Hermonat和Muzyczka(1984) *PNAS* 81:6466-6470; 以及 Samulski等人(1989) *J. Virol.* 63:03822-3828(1989)。

[0242] 至少六种病毒载体方法目前可用于临床试验中的基因转移,所述试验利用涉及通过插入辅助细胞系中的基因与缺陷性载体互补以产生转导剂的途径。

[0243] pLASN和MFG-S是已在临床试验中使用的逆转录病毒载体的例子(Dunbar等人(1995) *Blood* 85:3048-305; Kohn等人(1995) *Nat. Med.* 1:1017-102; Malech等人(1997) *PNAS* 94(22):12133-12138)。PA317/pLASN是第一个用于基因治疗试验中的治疗性载体。(Blaese等人(1995) *Science* 270:475-480)。已经测量到MFG-S包装的载体的转导效率为50%或更

高。(Ellem等人(1997) *Immunol Immunother.* 44 (1) :10-20; Dranoff等人(1997) *Hum. Gene Ther.* 1:111-2。

[0244] 重组腺相关病毒载体(rAAV)是有前景的基于缺陷性和非病原性细小病毒腺相关2型病毒的替代性基因递送系统。所有载体都衍生自仅保留侧接转基因表达盒的AAV 145bp反向末端重复序列的质粒。由于整合至经转导细胞基因组中所致的有效基因转移和稳定转基因递送是这种载体系统的关键特征。(Wagner等人(1998) *Lancet* 351 (9117) :1702-3; Kearns等人(1996) *Gene Ther.* 9:748-55)。其他AAV血清型(通过非限制性例子包括AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV 8.2、AAV9和AAV rh10)以及假型化AAV(如AAV2/8、AAV2/5和AAV2/6)也可以根据本发明来使用。

[0245] 复制缺陷型重组腺病毒载体(Ad)可以以高滴度产生,并且易于感染多种不同的细胞类型。对大多数腺病毒载体进行工程化,使得转基因替代Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后使复制缺陷性载体在反式供应所缺失的基因功能的人293细胞中增殖。Ad载体可以在体内转导多种类型的组织,包括非分裂的已分化细胞,如在肝、肾和肌肉中发现的那些。常规Ad载体具有较大运载能力。Ad载体在临床试验中的使用的例子涉及使用肌肉注射的用于抗肿瘤免疫的多核苷酸疗法(Sterman等人(1998) *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9)。在临床试验中使用腺病毒载体进行基因转移的另外例子包括Rosenecker等人(1996) *Infection* 24 (1) :5-10; Sterman等人(1998) *Hum. Gene Ther.* 9 (7) :1083-1089; Welsh等人(1995) *Hum. Gene Ther.* 2:205-18; Alvarez等人(1997) *Hum. Gene Ther.* 5:597-613; Topf等人(1998) *Gene Ther.* 5:507-513; Sterman等人(1998) *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089。

[0246] 包装细胞用于形成能感染宿主细胞的病毒颗粒。此类细胞包括包装腺病毒的293细胞以及包装逆转录病毒的 ψ 2细胞或PA317细胞。用于基因疗法中的病毒载体通常是由将核酸载体包装至病毒颗粒中的生产细胞系产生。载体典型地含有包装和随后整合至宿主中(如果适用)所需的最小病毒序列,其他病毒序列由编码要表达的蛋白质的表达盒替代。失去的病毒功能由包装细胞系反式供应。例如,用于基因疗法中的AAV载体典型地仅具有来自AAV基因组的反向末端重复(ITR)序列,所述序列是包装和整合至宿主基因组中所需的。将病毒DNA包装于细胞系中,所述细胞系含有编码其他AAV基因(即,rep和cap)但缺少ITR序列的辅助质粒。所述细胞系还被作为辅助者的腺病毒感染。辅助病毒促进AAV载体的复制和来自辅助质粒的AAV基因的表达。由于缺少ITR序列,辅助质粒并未被大量包装。腺病毒的污染可通过例如热处理来减少,腺病毒对所述热处理比AAV更敏感。

[0247] 在许多基因疗法应用中,可期望以高度特异性将基因疗法载体递送至特定组织类型。因此,可以修饰病毒载体,以通过将配体表达为与病毒外表面上的病毒外壳蛋白的融合蛋白而具有对给定细胞类型的特异性。配体被选择以具有对已知存在于目的细胞类型上的受体的亲和力。例如Han等人(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9747-9751报道,莫洛尼(Moloney)鼠白血病病毒可以被修饰以表达与gp70融合的人神经生长因子,并且重组病毒感染某些表达人表皮生长因子受体的人乳腺癌细胞。这个原则可以扩展至其他病毒-靶细胞对,其中靶细胞表达受体并且病毒表达包含针对细胞表面受体的配体的融合蛋白。例如,丝状噬菌体可以被工程化以展示对实际上任何所选细胞受体具有特定结合亲和力的抗体片段(例如,FAB或Fv)。虽然上述说明主要适用于病毒载体,但是相同原则可以适用于非病毒载体。此类载体可以被工程化以含有特定摄取序列,所述摄取序列有利于被特定靶细胞

摄取。

[0248] 如下所述,基因治疗载体可以通常通过全身施用(例如,静脉、腹膜内、肌内、皮下或颅内输注)或局部施用在体内施用至个体受试者来递送。可替代地,可以将载体离体递送至细胞中,例如从个体受试者外植的细胞(例如,淋巴细胞、骨髓抽取物、组织活检)或全适供血者造血干细胞,之后将所述细胞再植入受试者体内,通常在选择已经并入所述载体的细胞后再植入。

[0249] 也可以将含有核酸酶和/或供体构建体的载体(例如逆转录病毒、腺病毒、脂质体等)直接施用至生物体以在体内转导细胞。可替代地,可以施用裸DNA。通过通常用于引入分子以与血液或组织细胞最终接触的任何途径施用,所述途径包括但不限于注射、输注、局部施用和电穿孔。施用此类核酸的合适方法是本领域技术人员可获得的并且熟知的,并且尽管可以使用多于一种途径来施用特定组合物,但是特定途径通常可以提供比另一条途径更直接且更有效的反应。

[0250] 适用于引入本文所述的多核苷酸的载体包括非整合型慢病毒载体(IDLV)。参见例如Ory等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:11382-11388;Dull等人(1998)J.Virol.72:8463-8471;Zuffery等人(1998)J.Virol.72:9873-9880;Follenzi等人(2000)Nature Genetics 25:217-222;美国专利公开号2009/054985。

[0251] 药学上可接受的载体部分取决于所施用的特定组合物,以及取决于用于施用所述组合物的特定方法。因此,存在众多种可使用的药物组合物的合适配制品,如下所述(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,1989)。

[0252] 清楚的是,可以使用相同或不同的系统递送核酸酶编码序列和供体构建体。例如,供体多核苷酸可以由质粒携带,而一种或多种核酸酶可以由AAV载体携带。此外,可以通过相同或不同的途径施用(肌内注射、尾静脉注射、其他静脉注射、腹膜内施用和/或肌内注射)不同的载体。可以同时或以任何顺序递送载体。

[0253] 用于离体和体内施用的配制品包括在液体或乳化液体中的悬浮液。通常将活性成分与药学上可接受的并且与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂包括例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。另外,组合物可以含有少量的辅助物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂或增强药物组合物有效性的其他试剂。

应用

[0254] 本发明的方法设想了MPS II疾病(例如溶酶体贮积病)的治疗和/或预防。治疗可以包括将一种或多种校正疾病相关基因(例如,IDS等)插入细胞中的安全港基因座(例如白蛋白)中,以表达所需的一种或多种酶并释放至血流中。一旦进入血液,分泌的酶就可以被组织中的细胞摄取,在所述细胞中酶然后被溶酶体摄取,由此使得GAG分解。转基因可以编码蛋白质,包括密码子优化的转基因(例如,IDS);和/或其中可以去除表位而不在功能上改变蛋白质的转基因。在一些情况下,所述方法包括将表达校正酶编码转基因的附加体插入细胞中以表达所需的酶并释放至血流中。插入分泌型细胞如肝细胞中以将产物释放至血流中是特别有用的。本发明的方法和组合物也可用于需要在造血干细胞中提供编码一种或多种治疗剂的IDS转基因,由此使得衍生自这些细胞的成熟细胞(例如,RBC)含有所述治疗剂的任何情形中。这些干细胞可以在体外或体内分化,并且可以衍生自可用于所有受试者的通用供体类型的细胞。另外,细胞可以含有跨膜蛋白以运输体内的细胞。治疗还可以包括使

用含有治疗性转基因的受试者细胞,其中将所述细胞离体发育且然后被引入回受试者中。例如,可以通过自体骨髓移植将含有合适的IDS编码转基因的HSC插入受试者中。可替代地,也可以将已经使用IDS编码转基因编辑的干细胞如肌肉干细胞或iPSC注射至肌肉组织中。

[0255] 因此,该技术可以用于由于某些问题(例如,表达水平的问题或表达为亚功能或无功能的蛋白的问题)而受试者有某种蛋白质缺陷的情况中。对于本发明特别有用的是在患有MPS II疾病的受试者中表达转基因以校正或恢复功能性。

[0256] 通过非限制性例子的方式,缺陷或缺失蛋白的产生得以完成并用于治疗MPS II疾病。可以将编码蛋白质的核酸供体插入安全港基因座(例如白蛋白或HPRT)中,并使用外源启动子或存在于安全港处的启动子来表达。可替代地,可以使用供体以在原位校正缺陷基因。可以将所期望的IDS编码转基因插入CD34+干细胞中,并在骨髓移植期间返回受试者。最后,可以将核酸供体插入CD34+干细胞中的 β 球蛋白基因座处,由此使得衍生自该细胞的成熟红细胞具有高浓度的由核酸供体编码的生物物质。然后可以通过跨膜蛋白(例如受体或抗体)将含有生物物质的RBC靶向正确的组织。另外,可以通过电敏化离体敏化RBC,以使其在暴露于能量源后更易于破坏(参见国际专利公开号WO 2002/007752)。

[0257] 在一些应用中,可以通过使用本发明的方法和组合物敲除内源基因。这方面的例子包括敲除异常基因调节子或异常疾病相关基因。在一些应用中,异常内源基因可以在功能上或原位被基因的野生型形式替代。也可以改变插入的基因以改善治疗性IDS蛋白的表达和/或功能性或降低其免疫原性。在一些应用中,插入的IDS编码转基因是融合蛋白,以增加其向选定组织(如脑)中的转运。

[0258] 在一些应用中,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS II的人类受试者中改善或维持功能性能力(减缓所述功能性能力的衰退)的方法。在其他应用中,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,减少患有MPS II的受试者中对ERT的需要(剂量水平或频率)的方法。在又另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,延迟患有MPS II的受试者中对ERT启动的需要的的方法。在一方面,本文提供了与未接受过本发明的组合物的受试者相比,延迟、减少或消除患有MPS II的受试者中对支持性手术的需要的的方法,所述方法包括用所述组合物治疗受试者。在另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,延迟、减少或避免患有MPS II的受试者中对骨髓移植的需要的的方法。在又另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS II的受试者中通过将ERT的标准给药方案与用如本文所述的组合物的治疗的组合治疗受试者来改善功能性能力(延迟功能性能力衰退、维持功能性能力)的方法。在另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,抑制患有MPS II的人类受试者中的残疾进展的方法。在又另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,延迟、减少或避免患有MPS II的受试者中对使用医疗呼吸机设备的需要的的方法。在另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS II的人类受试者中延迟经确认的残疾进展的发作或降低经确认的残疾进展的风险的方法。在本发明的一方面,本文提供了降低、稳定或维持患有MPS II的受试者中的尿液GAG的方法,所述方法包括用本发明的组合物治疗受试者。在又另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,延长患有MPS II的受试者的期望寿命的方法。

[0259] 以下实施例涉及本公开文本的示例性实施方案，其中核酸酶包含锌指核酸酶(ZFN)或TALEN。应理解，这只是为了示例目的并且可使用其他核酸酶或核酸酶系统，例如具有工程化DNA结合结构域的归巢核酸内切酶(大范围核酸酶)和/或天然存在的工程化的归巢核酸内切酶(大范围核酸酶) DNA结合结构域和异源裂解结构域和/或包含工程化单一指导RNA的CRISPR/Cas系统的融合物。

实施例

实施例1：

[0260] 多核苷酸和包含多核苷酸的AAV载体的制备如下：编码SB-47171ZFN(左ZFN)的AAV2/6载体包含若干个结构特征：AAV载体的5’和3’ITR、ApoE/hAAT肝控制区和α1-抗胰蛋白酶启动子、人β-球蛋白-IgG嵌合内含子、核定位序列、ZFP 47171ZFN结合结构域、FokI ELD核酸酶结构域和聚腺苷酸化信号。各种元件的位置示出于下表1中。

表1:SB-47171AAV (SEQ ID NO:9)的元件

特征	描述	位置注释	SEQ ID NO
ITR	5'反向末端重复	1-130- [括号中的纯文本]	1
ApoE/hAAT	ApoE肝控制区和α1-抗胰蛋白酶启动子	141-863- <u>加下划线</u>	2
嵌合内含子	人β球蛋白-IgG嵌合内含子	867-999- <i>斜体</i>	3
NLS	NLS	1016-1036- <u>双下划线</u>	4
47171	ZFP 47171 DNA结合结构域	1055-1486- 粗体	5
FokI-ELD	FokI-ELD核酸酶结构域	1493-2092- 小写	6
聚A	聚腺苷酸化信号	2148-2370- <u>虚下划线</u>	7
ITR	3'反向末端重复	2422-2529- <u>波浪下划线</u>	8

[0261] SB-47171AAV2/6载体的完整核苷酸序列示于下文中。表1中所示的特定注释在序列文本中如表1中所示那样指示出：

【CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG
50
GGCGACCTTT GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG
100
GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTCTCT】GCGGCCTAGT AGGCTCAGAG
150
GCACACAGGA GTTTCTGGGC TCACCCTGCC CCCTTCCAAC CCCTCAGTTC
200
CCATCCTCCA GCAGCTGTTT GTGTGCTGCC TCTGAAGTCC AACTGAACA
250
AACTTCAGCC TACTCATGTC CCTAAAATGG GCAAACATTG CAAGCAGCAA
300
ACAGCAAACA CACAGCCCTC CCTGCCTGCT GACCTTGAG CTGGGGCAGA
350
GGTCAGAGAC CTCTCTGGGC CCATGCCACC TCCAACATCC ACTCGACCCC

400
 TTGGAATTTT GGTGGAGAGG AGCAGAGGTT GTCCTGGCGT GGTTTAGGTA
 450
 GTGTGAGAGG GGTACCCGGG GATCTTGCTA CCAGTGGAAC AGCCACTAAG
 500
 GATTCTGCAG TGAGAGCAGA GGGCCAGCTA AGTGGTACTC TCCCAGAGAC
 550
 TGTCTGACTC ACGCCACCCC CTCCACCTTG GACACAGGAC GCTGTGGTTT
 600
 CTGAGCCAGG TACAATGACT CCTTTCGGTA AGTGCAGTGG AAGCTGTACA
 650
 CTGCCCAGGC AAAGCGTCCG GGCAGCGTAG GCGGGCGACT CAGATCCCAG
 700
 CCAGTGGACT TAGCCCCTGT TTGCTCCTCC GATAACTGGG GTGACCTTGG
 750
 TTAATATTCA CCAGCAGCCT CCCCCTTGC CCCTCTGGAT CCACTGCTTA
 800
 AATACGGACG AGGACAGGGC CCTGTCTCCT CAGCTTCAGG CACCACCACT
 850
 GACCTGGGAC AGTCAGGTAA GTATCAAGGT TACAAGACAG GTTTAAGGAG
 900
 ACCAATAGAA ACTGGGCTTG TCGAGACAGA GAAGACTCTT GCGTTTCTGA
 950
 TAGGCACCTA TTGGTCTTAC TGACATCCAC TTTGCCTTTC TCTCCACAGG
 1000
 CAATTGCGCA TGGCCCCCAA GAAGAAGAGG AAGGTGGGCA TCCACGGGGT
 1050
 ACCG**GCCGCA** **ATGGCAGAAC** **GGCCCTTCCA** **GTGCCGCATC** **TGCATGCGCA**
 1100
ACTTCAGCCA **GTCGGGCAAC** **CTGTCCCGCC** **ACATCCGGAC** **TCATACCGGC**
 1150
GAAAAACCAT **TCGCTTGTGA** **CATCTGCGGA** **AGAAAGTTTG** **CGCTGAAGCA**
 1200
GAACCTCTGC **ATGCATACCA** **AGATTCACAC** **CGGAGAGAAG** **CCGTTTCAGT**
 1250
GTCGCATTTG **CATGAGAAAG** **TTGCGCTGGG** **CCGATAACCT** **TCAGAATCAC**
 1300
ACCAAGATCC **ACACCGGGGA** **AAAGCCGTTC** **CAGTGCCGGA** **TCTGCATGAG**
 1350
GAACTTCTCA **ACGTCCGGAA** **ACCTGACCAG** **GCATATCCGG** **ACCCACACTG**
 1400
GGGAGAAGCC **TTTCGCCTGC** **GACATTTGCG** **GTCGGAAGTT** **CGCCCGGCAA**
 1450
TCCCACCTGT **GTCTCCACAC** **TAAGATCCAC** **CTGAGA**GGAT CCcagctggt
 1500
 gaagagcgag ctggaggaga agaagtccga gctgcggcac aagctgaagt

```

1550
acgtgcccc a cgagtacatc gagctgatcg agatcgccag gaacagcacc
1600
caggaccgca tcctggagat gaaggtgatg gagttcttca tgaaggtgta
1650
cggctacagg ggaaagcacc tgggcggaag cagaaagcct gacggcgcca
1700
tctatacagt gggcagcccc atcgattacg gcgtgatcgt ggacacaaag
1750
gcctacagcg gcggctacaa tctgcctatc ggccaggccg acgagatgga
1800
gagatacgtg gaggagaacc agacccgga taagcacctc aacccaacg
1850
agtgggtgga ggtgtaccct agcagcgtga ccgagttcaa gttcctgttc
1900
gtgagcggcc acttcaaggg caactacaag gccagctga ccaggctgaa
1950
ccacatcacc aactgcaatg gcgccgtgct gagcgtggag gagctgctga
2000
tcggcggcga gatgatcaaa gccggcacc tgacactgga ggaggtgcgg
2050
cgcaagttca acaacggcga gatcaacttc agatcttgat aaCTCGAGTC
2100
TAGAGGATCT CGAGCCGAAT TCCTGCAGCC CGGGGGATCA GCCTCGACTG
2150
TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC
2200
TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCACTGTC CTTTCCTAAT AAAATGAGGA
2250
AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG
2300
TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT
2350
GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG
2400
CTCGAGATCC ACTAGGGCCG CAGGAACCCC TAGTGATGGA GTTGGCCACT
2450
CCCTCTCTGC GCGCTCGCTC GCTCACTGAG GCCGCCCGGG CTTTGCCCGG
2500
GCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAG 2529 (SEQ ID NO:9)

```

[0262] 包含SB-47898的AAV2/6载体类似地包含若干个特征,并且这些特征示出在下表2中。

表2:SB-47898AAV (SEQ ID NO:12) 的元件

特征	描述	位置注释	SEQ ID
----	----	------	--------

			NO:
ITR	5'反向末端重复	1-130- [括号中的纯文本]	1
ApoE/hAAT	ApoE肝控制区和 α 1-抗胰蛋白酶启动子	141-863 <u>加下划线</u>	2
嵌合内含子	人 β 珠蛋白-IgG嵌合内含子	867-999 <i>斜体</i>	3
NLS	NLS	1016-1036 <u>双下划线</u>	4
47898	ZFP 47898 DNA结合结构域	1055-1570 粗体	10
FokI-KKR	FokI-KKR核酸酶结构域	1577-2170 小写	11
聚A	聚腺苷酸化信号	2226-2448 <u>虚下划线</u>	7
ITR	3'反向末端重复	2500-2607 <u>波浪下划线</u>	8

[0263] SB-47898AAV2/6载体的完整核苷酸序列示于下文中。表2中所示的特定注释在序列文本中如表2中所示那样指示出。

```

【CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG
50
GGCGACCTTT GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG
100
GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTCTCT】GCGGCCTAGT AGGCTCAGAG
150
GCACACAGGA GTTTCTGGGC TCACCCTGCC CCCTTCCAAC CCCTCAGTTC
200
CCATCCTCCA GCAGCTGTTT GTGTGCTGCC TCTGAAGTCC AACTGAACA
250
AACTTCAGCC TACTCATGTC CCTAAATGG GCAAACATTG CAAGCAGCAA
300
ACAGCAAACA CACAGCCCTC CTGCCTGCT GACCTTGGAG CTGGGGCAGA
350
GGTCAGAGAC CTCTCTGGGC CCATGCCACC TCCAACATCC ACTCGACCCC
400
TTGGAATTC GGTGGAGAGG AGCAGAGGTT GTCCTGGCGT GGTTCAGGTA
450
GTGTGAGAGG GGTACCCGGG GATCTTGCTA CCAGTGGAAC AGCCACTAAG
500

```

GATTCTGCAG TGAGAGCAGA GGGCCAGCTA AGTGGTACTC TCCCAGAGAC
550
TGTCTGACTC ACGCCACCCC CTCCACCTTG GACACAGGAC GCTGTGGTTT
600
CTGAGCCAGG TACAATGACT CCTTTCGGTA AGTGCAGTGG AAGCTGTACA
650
CTGCCCAGGC AAAGCGTCCG GGCAGCGTAG GCGGGCGACT CAGATCCCAG
700
CCAGTGGACT TAGCCCCTGT TTGCTCCTCC GATAACTGGG GTGACCTTGG
750
TTAATATTCA CCAGCAGCCT CCCCCGTTGC CCCTCTGGAT CCACTGCTTA
800
AATACGGACG AGGACAGGGC CCTGTCTCCT CAGCTTCAGG CACCACCACT
850
GACCTGGGAC AGTCAGGTAA GTATCAAGGT TACAAGACAG GTTTAAGGAG
900
ACCAATAGAA ACTGGGCTTG TCGAGACAGA GAAGACTCTT GCGTTTCTGA
950
TAGGCACCTA TTGGTCTTAC TGACATCCAC TTTGCCTTTC TCTCCACAGG
1000
CAATTCGCCA TGGCCCCCAA GAAGAAGAGG AAGGTGGGCA TCCACGGGGT
1050
ACCG**GCCGCA ATGGCAGAGA GGCCCTTTCA GTGCCGGATC TGCATGCGGA**
1100
ACTTCTCCAC CCCACAACCT CTGGACCGAC ATATCCGCAC CCATACCGGG
1150
GAAAAGCCTT TCGCGTGCGA CATTTGCGGA CGGAAATTCG CGTTGAAGCA
1200
CAATCTCCTG ACCCACAATA AGATTCATAC TGGCGAAAAG CCGTTCCAGT
1250
GCCGCATCTG TATGAGGAAC TTCAGCGATC AGTCGAACCT GAACGCCCAC

1300

ATTGCGACTC ATACCGGAGA AAAGCCCTTT GCCTGCGATA TCTGCGGTCTG

1350

CAAGTTCGCT AGGAACTTCT CACTGACCAT GCACACCAAA ATCCACACTG

1400

GAGAGCGGGG ATTCCAGTGT AGAATCTGTA TGCGCAACTT CTCCCTGCGG

1450

CACGACCTGG ACCGCCACAT CAGAACCCAC ACCGGGGAGA AGCCGTTCGC

1500

CTGCGACATC TGCGGCCGGA AGTTCGCCCA CCGGTCCAAC CTGAACAAGC

1550

ACACGAAGAT TCACCTCCGC GGATCCcagc tgggtgaagag cgagctggag

1600

gagaagaagt ccgagctgcg gcacaagctg aagtacgtgc cccacgagta

1650

catcgagctg atcgagatcg ccaggaacag caccacaggac cgcacacctg

1700

agatgaaggt gatggagttc ttcatgaagg tgtacggcta caggggaaag

1750

cacctgggcg gaagcagaaa gcctgacggc gccatctata cagtgggcag

1800

cccatcgat tacggcgtga tcgtggacac aaaggcctac agcggcggct

1850

acaatctgcc tatcggccag gccgacgaga tgcagagata cgtgaaggag

1900

aaccagaccc ggaataagca catcaacccc aacgagtggg ggaagggtgta

1950

ccctagcagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcgtgagc ggccacttca

2000

agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccgcaa aaccaactgc

2050

aatggcgccg tgctgagcgt ggaggagctg ctgatcggcg gcgagatgat
2100
caaagccggc accctgacac tggaggaggt gcggcgcaag ttcaacaacg
2150
gcgagatcaa cttctgataa CTCGAGTCTA GAGGATCTCG AGCCGAATTC
2200
CTGCAGCCCG GGGGATCAGC CTCGACTGTG CCTTCTAGTT GCCAGCCATC
2250
TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC
2300
CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT
2350
AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA
2400
GGATTGGGAA GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGG
2450
CTTCTGAGGC GGAAAGAACC AGCTGGGGCT CGAGATCCAC TAGGGCCGCA
2500
GGAACCCCTA GTGATGGAGT TGGCCACTCC CTCTCTGCGC GCTCGCTCGC
2550
TCACTGAGGC CGCCCGGGCT TTGCCCGGGC GGCCTCAGTG AGCGAGCGAG
2600
CGCGCAG 2607 (SEQ ID NO:12)

[0264] 编码SB-IDS转基因供体的AAV2/6载体包含若干个结构特征: AAV载体的5’和3’ ITR、与侧接白蛋白基因中的靶向裂解位点的区域具有同源性的左和右同源性臂(LA和RA)、用于确保转基因序列与白蛋白启动子的高效接合的衍生自人因子IX外显子2剪接受体的剪接受体、密码子优化的hIDS cDNA序列和聚腺苷酸化信号序列。各种元件的位置示出于下表3中。

表3-SB-IDS AAV (SEQ ID NO:17) 的元件

特征	描述	位置注释	SEQ ID NO
ITR	5’反向末端重复	1-130- [括号中的纯文本]	1

LA	左同源性臂	271-550- <u>加下划线</u>	13
SA	剪接受体	557-584- <i>斜体</i>	14
hIDS	密码子优化的hIDS cDNA	587-2161- 粗体	15
聚A	聚腺苷酸化信号	2174-2398- <u>虚下划线</u>	7
RA	右同源性臂	2405-2504 - <u>波浪下划线</u>	16
ITR	3'反向末端重复	2651-2758- <u>双下划线</u>	8

[0265] SB-IDS AAV2/6载体的完整核苷酸序列如下所示。表3中所示的特定注释在序列文本中如表3中所示那样指示出。

```

【CTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG
50
GGCGACCTTT GGTCGCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG
100
GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTTCCT】GCGGCCTAAG CTTGAGCGGA
150
GTTCCAATTG TACTGTACAG AACCATGGTC ACATGTTTAA CGCTAGCGTG
200
CCGACCTGGT AAAC TGATCA GTGGGTGCAC TTAGGACTGC GTCTTACGCT
250
AATCACATGC GTGCGGCCGC TTTATTCTAT TTTCCAGTA AAATAAAGTT
300
TTAGTAACT CTGCATCTTT AAAGAATTAT TTTGGCATTT ATTTCTAAAA
350
TGGCATAGTA TTTTGTATTT GTGAAGTCTT ACAAGGTTAT CTTATTAATA
400
AAATTCAAAC ATCCTAGGTA AAAAAAAAAA AAGGTCAGAA TTGTTTAGTG
450
ACTGTAATTT TCTTTTGCGC ACTAAGGAAA GTGCAAAGTA ACTTAGAGTG
500
ACTGAAACTT CACAGAATAG GGTTGAAGAT TGAATTCATA ACTATCCCAA
550
GGTACCACTA AAGAATTATT CTTTTACATT TCAGTTAGCG AAACCCAGGC
600
CAACTCAACT ACAGATGCGC TTAACGTCCT GTCATCATC GTGGACGATT
650
TGCGGCCGTC GCTTGGCTGC TATGGAGATA AGCTCGTCCG CTCGCCGAAC
700
ATCGATCAGT TGGCCTCACA CTCACTGCTT TTCCAAAATG CGTTTGCGCA
750
GCAGGCTGTC TGTGCACCTT CAAGAGTCTC ATTCTTGACC GGGCGACGCC
800
CTGACACAAC GCGGCTGTAC GACTTCAACA GCTACTGGAG AGTCCACGCG
850

```

GGTAACTTTT CAACTATCCC ACAGTACTTT AAAGAGAACG GATACGTGAC
900
AATGAGCGTG GGAAAGGTCT TTCACCCCGG CATCTCCTCG AATCACACCG
950
ACGATTTCGCC CTACTCGTGG TCGTTTCCTC CCTACCATCC TTCGAGCGAG
1000
AAGTATGAGA ACACGAAAAC TTGTGCGGGA CCCGACGGAG AGCTGCACGC
1050
TAATCTGCTG TGTCCGGTGG ATGTCTTGGA CGTGCCCGAG GGAACGCTCC
1100
CCGACAAGCA GTCAACGGAG CAGGCGATTC AGTTGCTGGA GAAGATGAAA
1150
ACAAGCGCGT CGCCTTTCTT CCTCGCCGTG GGGTATCACA AGCCCCATAT
1200
TCCTTTCCGC TACCCGAAGG AGTTCCAGAA ACTTTATCCT TTGGAAAACA
1250
TCACTTTGGC ACCGGACCCG GAAGTCCCCG ACGGTCTGCC ACCCGTGGCC
1300
TACAATCCCT GGATGGATAT CAGGCAGAGG GAAGATGTGC AGGCACTCAA
1350
CATCTCAGTC CCCTACGGGC CTATTCCAGT CGATTTTCAA CGCAAGATTC
1400
GGCAGTCGTA TTTTGCGTCG GTGTCCTACC TCGATACGCA AGTAGGTCGA
1450
CTTCTGAGCG CGCTTGATGA CCTTCAGCTG GCAAATTCCA CAATCATCGC
1500
CTTTACGTCG GACCATGGGT GGGCGTTGGG AGAGCATGGA GAGTGGGCAA
1550
AGTATAGCAA TTTTGATGTA GCAACGCACG TGCCCCTGAT TTTCTACGTG
1600
CCGGGTAGAA CGGCCTCGCT TCCCGAGGCA GGCGAAAAAC TTTTTCCTA
1650
TCTCGATCCA TTCGACTCGG CGAGCCAGCT TATGGAACCG GGCAGACAAT
1700
CCATGGACTT GGTAGAATTG GTGTCCCTTT TTCCGACCCT CGCCGGGTTG
1750
GCGGGCTTGC AAGTACCCCC TAGATGCCCT GTACCGAGCT TCCATGTGGA
1800
ACTCTGCCGC GAAGGGAAAA ACCTCCTCAA ACACTTTCGG TTCAGGGACC
1850
TTGAGGAGGA CCCCTATCTG CCAGGGAATC CGCGAGAGTT GATTGCCTAT
1900
TCCCAGTATC CGCGACCCAG CGATATTCCT CAATGGAACT CCGATAAGCC
1950
CTCCCTCAAA GACATCAAGA TTATGGGGTA CTCGATCAGG ACCATCGACT
2000

ATCGCTACAC AGTGTGGGTA GGGTTCAATC CTGACGAATT CCTCGCGAAC
 2050
TTTTCGGACA TCCACGCTGG TGAGCTGTAT TTCGTAGACT CGGACCCGTT
 2100
GCAAGATCAC AATATGTATA ATGATTCCCA AGGAGGAGAT TTGTTCCAGC
 2150
TGCTCATGCC GTGATAAAGA TCTCTGTGCC TTCTAGTTGC CAGCCATCTG
 2200
 TTGTTTGCCC CTCCCCCGTG CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG TGCCACTCCC
 2250
 ACTGTCCTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG
 2300
 GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG
 2350
 ATTGGGAAGA CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAC
 2400
 CGGTCTATCC ATTGCACTAT GCTTTATTTA AAAACCACAA AACCTGTGCT
 2450
 GTTGATCTCA TAAATAGAAC TTGTATTTAT ATTTATTTTC ATTTTAGTCT
 2500
 GTCTGGATCC ACAAATTAAT CGAACCTGCA GCTGATATCG ACGCTTAAGT
 2550
 AGGGCTTAGC AAACGCGTCT CCAACGTTTC GCCGTTAACA CCCCACATAG
 2600
 TGAGTGGTCT TAGTAGTCCG GGTGTTTAAA CTGAAAGATA ACTCGAGCGC
 2650
 AGGAACCCCT AGTGATGGAG TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG
 2700
 CTCACTGAGG CCGCCCGGGC TTTGCCCGGG CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA
 2750
GCGCGCAG 2758 (SEQ ID NO:17)

[0266] SB-71557AAV2/6载体的完整核苷酸序列示于下文中。表4中所示的特定注释在序列文本中如表4中所示那样指示出。

表4:SB71557AAV (SEQ ID NO:30) 的元素

核苷酸位置 注释	特征/ 描述	SEQ ID NO:	序列
1-130	5' ITR [括号 中的纯文 本]	1	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCG GGCAAAGCCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGTC GCCCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG AGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTT CCT

核苷酸位置 注释	特征/ 描述	SEQ ID NO:	序列
156-476	ApoE (增强子) <u>加下划线</u>	32	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTC ACCCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATC CTCCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAG TCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGT CCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAA ACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGA CCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCT CTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGA CCCCTTGAATTTCGGTGGAGAGGAGCAGAG GTTGTCTTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAG GG
485-877	hAAT (启动子) <u>斜体</u>	33	GATCTTGCTACCAAGTGGAACAGCCACTAAGGA TTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGT GGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCC ACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGG TTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTCGGT AAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGC AAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTC AGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTG CTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAAT ATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTG GATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGG GCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACT GACCTGGGACAGT
886-933	5' UTR <u>粗体</u>	18	CTTGTTCTTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACG CTCAACTTTGGCA GAT
943-1075	人β珠蛋白 /IgG嵌合内 含子 (<u>内含子</u>) <u>双下划线</u>	3	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGG AGACCAATAGAACTGGGCTTGTGCGAGACAG AGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTAT TGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTC CACAG
1086-1154	<u>N末端肽</u>	34	GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAG ATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGAC AAG
1161-1181	核定位信号 <u>粗体斜体</u>	36	CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTC
1200-1631	ZFP 71557 DNA结合 结构域 小写	28	GCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTCG AATCTGCATGCAGAACTTCAGTCAGTCCGGCA ACCTGGCCCGCCACATCCGCACCCACACCGGC GAGAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAG GAAATTTGCCCTGAAGCAGAACCTGTGTATGC ATACCAAGATACACACGGGCGAGAAGCCCTT CCAGTGTCGAATCTGCATGCAGAAGTTTGCCT GGCAGTCCAACCTGCAGAACCATACCAAGAT ACACACGGGCGAGAAGCCCTTCCAGTGTCGA ATCTGCATGCGTAACTTCAGTACCTCCGGCAA CCTGACCCGCCACATCCGCACCCACACCGGCG AGAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGG

核苷酸位置 注释	特征/ 描述	SEQ ID NO:	序列
			AAATTTGCCCCGCGCTCCACCTGACCTCCCA TACCAAGATACACCTGCGG
1638-2237	FokI-ELD 核酸酶结构 域 N542D <u>虚下划线</u>	38	CAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAGA AGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGT GCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCG CCAGGAACAGCACCCAGGACCGCATCCTGGA GATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGT ACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAG CAGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATACAGTGG GCAGCCCCATCGATTACGGCGTGATCGTGGAC ACAAAGGCCTACAGCGGCGGCTACAATCTGCC TATCGGCCAGGCCGACGAGATGGAGAGATAC GTGGAGGAGAACCAGACCCGGGATAAGCACC TCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCT AGCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTCGT GAGCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCC CAGCTGACC AGGCTGAACACATCACCAACTGCGACGGCG CCGTGCTGAGCGTGAGAGGAGCTGCTGATCGGC GGCGAGATGATCAAAGCCGGCACCCCTGACAC TGGAGGAGGTGCGGCGCAAGTTCAACAACGG CGAGATCAACTTCAGATCTTGATAA
2250-2841	WPREmut6 3'UTR <u>加点下划线</u>	37	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAG ATTGACTGATATTCTTAAGTATGTTGCTCCTTT TACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCT GTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGT TTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTC TCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTC AACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGAC GCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCAC CTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCC CCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCG CCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGG TTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTGTC GGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCG CCTGTGTTGCCAACTGGATCCTGCGCGGG ACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCTCTCAAT CCAGCGGACCTCCCTTCCCGAGGCCTTCTGCC GGTTCTGCGGCCTCTCCCGCGTCTTCGCTTTCG GCCTCCGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCG CCTCCCCGCTG
2848-3070	<u>聚腺苷酸化 信号</u>	7	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTT GCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCTGGAA GGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAA TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGT GTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAG GACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
3088-3195	3' ITR [括号 中的粗体文	8	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC

核苷酸位置 注释	特征/ 描述	SEQ ID NO:	序列
	本]		CCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAG

71557AAV的完整序列:

```
[CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG 50
GGCGACCTTT GGTCGCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG 100
GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTTCCT] GCGGCCTAAG CTTGAGCTCT 150
TCGAAAGGCT CAGAGGCACA CAGGAGTTTC TGGGCTCACC CTGCCCCCTT 200
CCAACCCCTC AGTTCCCATC CTCCAGCAGC TGTTTGTGTG CTGCCTCTGA 250
AGTCCACACT GAACAAACTT CAGCCTACTC ATGTCCCTAA AATGGGCAAA 300
CATTGCAAGC AGCAAACAGC AAACACACAG CCCTCCCTGC CTGCTGACCT 350
TGGAGCTGGG GCAGAGGTCA GAGACCTCTC TGGGCCCATG CCACCTCCAA 400
CATCCACTCG ACCCCTTGGA ATTTGCGGTG AGAGGAGCAG AGGTTGTCCT 450
GGCGTGGTTT AGGTAGTGTG AGAGGGGTCC CGGGGATCTT GCTACCAGTG 500
GAACAGCCAC TAAGGATTCT GCAGTGAGAG CAGAGGGCCA GCTAAGTGGT 550
ACTCTCCCAG AGACTGTCTG ACTCACGCCA CCCCCTCCAC CTTGGACACA 600
GGACGCTGTG GTTTCTGAGC CAGGTACAAT GACTCCTTTC GGTAAGTGCA 650
GTGGAAGCTG TACACTGCCC AGGCAAAGCG TCCGGGCAGC GTAGGCGGGC 700
GACTCAGATC CCAGCCAGTG GACTTAGCCC CTGTTTGCTC CTCCGATAAC 750
TGGGGTGACC TTGGTTAATA TTCACCAGCA GCCTCCCCCG TTGCCCTCT 800
GGATCCACTG CTTAAATACG GACGAGGACA GGGCCCTGTC TCCTCAGCTT 850
CAGGCACCAC CACTGACCTG GGACAGTCCT AGGTGCTTGT TCTTTTTGCA 900
GAAGCTCAGA ATAAACGCTC AACTTTGGCA GATACTAGTC AGGTAAGTAT 950
CAAGGTTACA AGACAGGTTT AAGGAGACCA ATAGAAACTG GGCTTGTCGA 1000
GACAGAGAAG ACTCTTGCGT TTCTGATAGG CACCTATTGG TCTTACTGAC 1050
ATCCACTTTG CTTTCTCTC CACAGGACCG GTGCCATGGA CTACAAAGAC 1100
CATGACGGTG ATTATAAAGA TCATGACATC GATTACAAGG ATGACGATGA 1150
CAAGATGGCC CCCAAGAAGA AGAGGAAGGT CGGCATTCAT GGGGTACCCg 1200
ccgctatggc tgagaggccc ttccagtgtc gaatctgcat gcagaacttc 1250
agtcagtccg gcaacctggc ccgccacatc cgcacccaca ccggcgagaa 1300
gccttttgcc tgtgacatth gtgggaggaa atttgccctg aagcagaacc 1350
tgtgtatgca taccaagata cacacgggcg agaagccctt ccagtgtcga 1400
```

atctgcatgc agaagtttgc ctggcagtc aacctgcaga accataccaa 1450
gatacacacg ggcgagaagc ccttccagtgc tcgaatctgc atgcgtaact 1500
tcagtacctc cggcaacctg acccgccaca tccgcaccca caccggcgag 1550
aagccttttg cctgtgacat ttgtgggagg aaatttgccc gccgctccca 1600
cctgacctcc cataccaaga tacacctgcg gGGATCCCAG CTGGTGAAGA 1650
GCGAGCTGGA GGAGAAGAAG TCCGAGCTGC GGCACAAGCT GAAGTACGTG 1700
CCCCACGAGT ACATCGAGCT GATCGAGATC GCCAGGAACA GCACCCAGGA 1750
CCGCATCCTG GAGATGAAGG TGATGGAGTT CTTCATGAAG GTGTACGGCT 1800
ACAGGGGAAA GCACCTGGGC GGAAGCAGAA AGCCTGACGG CGCCATCTAT 1850
ACAGTGGGCA GCCCCATCGA TTACGGCGTG ATCGTGGACA CAAAGGCCTA 1900
CAGCGGCGGC TACAATCTGC CTATCGGCCA GGCCGACGAG ATGGAGAGAT 1950
ACGTGGAGGA GAACCAGACC CGGGATAAGC ACCTCAACCC CAACGAGTGG 2000
TGGAAGGTGT ACCCTAGCAG CGTGACCGAG TTCAAGTTCC TGTTCGTGAG 2050
CGGCCACTTC AAGGGCAACT ACAAGGCCCA GCTGACCAGG CTGAACCACA 2100
TCACCAACTG CGACGGCGCC GTGCTGAGCG TGGAGGAGCT GCTGATCGGC 2150
GGCGAGATGA TCAAAGCCGG CACCCTGACA CTGGAGGAGG TCGGGCGCAA 2200
GTTCAACAAC GCGGAGATCA ACTTCAGATC TTGATAACTC GAGTCTAGAA 2250
ATCAACCTCT GGATTACAAA ATTTGTGAAA GATTGACTGA TATTCTTAAC 2300
TATGTTGCTC CTTTTACGCT GTGTGGATAT GCTGCTTTAA TGCCTCTGTA 2350
TCATGCTATT GCTTCCCGTA CGGCTTTCGT TTTCTCCTCC TTGTATAAAT 2400
CCTGGTTGCT GTCTCTTTAT GAGGAGTTGT GGCCCGTTGT CCGTCAACGT 2450
GGCGTGGTGT GCTCTGTGTT TGCTGACGCA ACCCCCACTG GCTGGGGCAT 2500
TGCCACCACC TGTCAACTCC TTTCTGGGAC TTTCGCTTTC CCCCTCCCGA 2550
TCGCCACGGC AGAACTCATC GCCGCCTGCC TTGCCCGCTG CTGGACAGGG 2600
GCTAGGTTGC TGGGCACTGA TAATTCCGTG GTGTTGTCGG GGAAATCATC 2650
GTCCTTTCCT TGGCTGCTCG CCTGTGTTGC CAACTGGATC CTGCGCGGGA 2700
CGTCCTTCTG CTACGTCCCT TCGGCTCTCA ATCCAGCGGA CCTCCCTTCC 2750
CGAGGCCTTC TGCCGGTTCT GCGGCCTCTC CCGCGTCTTC GCTTTCGGCC 2800
TCCGACGAGT CGGATCTCCC TTTGGGCCGC CTCCCCGCCT GGCTAGCCTG 2850
TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC 2900
TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCACTGTC CTTTCCTAAT AAAATGAGGA 2950

AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG 3000
TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT 3050
GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GCGGCCGCGT CGAGCGC [**AGG AACCCCTAGT** 3100
GATGGAGTTG GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG 3150
CCCGGGCTTT GCCCGGGCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAG 3195

(SEQ ID NO:30)

[0267] SB-71728AAV2/6载体的完整核苷酸序列示于下文中。表5中所示的特定注释在序列文本中如表5中所示那样指示出。

表5:SB71728AAV (SEQ ID NO:31) 的元素

核苷酸位置 注释	特征/ 描述	SEQ ID NO:	序列
1-130	5' ITR [括 号中的纯 文本]	1	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCC GGGCAAAGCCCGGGCGTCG GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTCT
156-476	ApoE (增 强子) 加下 划线	32	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCT CACCTGCCCCCTTCCAAC CCCTCAGTTCCCATCTCCAGCAGCTGTTTGT GTGCTGCCTCTGAAGTCC ACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCC CTAAAATGGGCAAACATTG CAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTC CCTGCCTGCTGACCTTGGAG CTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCC CATGCCACCTCCAACATCC ACTCGACCCCTTGGAATTCGGTGGAGAGGA GCAGAGGTTGTCCTGGCGT GGTTTAGGTAGTGTGAGAGGG
485-877	hAAT (启 动子) 斜体	33	GATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGG ATTCTGCAGTGAGAGCAGA GGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACT GTCTGACTCACGCCACCCC CTCCACCTTGACACAGGACGCTGTGGTTTC TGAGCCAGGTACAATGACT CCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACAC TGCCAGGCAAAGCGTCCG GGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAG CCAGTGGACTTAGCCCCGT TTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGT TAATATTCACCAGCAGCCT CCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAA ATACGGACGAGGACAGGGC CCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTG ACCTGGGACAGT
886-933	5' UTR 粗	18	CTTGTTCTTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAAC

核苷酸位置 注释	特征/ 描述	SEQ ID NO:	序列
	体		GCTCAACTTTGGCAGAT
943-1075	人β珠蛋白 /IgG嵌合 内含子(内 含子)双下 划线	3	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAG GAGACCAATAGAACTGGG CTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTC TGATAGGCACCTATTGGTC TTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACA G
1086-1154	N末端肽	34	GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAA GATCATGACATCGATTACAA GGATGACGATGACAAG
1161-1181	核定位信 号 粗体斜体	36	CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTC
1200-1715	ZFP 71728 DNA结合 结构域 小写	29	GCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTC GAATCTGCATGCGTAACTT CAGTCAGTCCTCCGACCTGTCCCGCCACATC CGCACCCACACCGGCGGAGA AGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAA ATTTGCCCTGAAGCACAAC CTGCTGACCCATACCAAGATACACACGGGCG AGAAGCCCTTCCAGTGTCG AATCTGCATGCAGAACTTCAGTGACCAGTCC AACCTGCGCGCCACATCC GCACCCACACCGGCGGAGAAGCCTTTTGCCTG TGACATTTGTGGGAGGAAA TTTGCCCGCAACTTCTCCCTGACCATGCATAC CAAGATACACACCGGAGA GCGCGGCTTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGT AACTTCAGTCTGCGCCACG ACCTGGAGCGCCACATCCGCACCCACACCGG CGAGAAGCCTTTTGCCTGT GACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCACCGCT CCAACCTGAACAAGCATAC CAAGATACACCTGCGG
1722-2315	FokI-KKR 核酸酶结 构域 P478S 虚下划线	39	CAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAG AAGTCCGAGCTGCGGCACAA GCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAG CTGATCGAGATCGCCAGGA ACAGCACCCAGGACCGCATCCTGGAGATGA AGGTGATGGAGTTCTTCATG AAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTG GGCGGAAGCAGAAAGCCTGA CGGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATC GATTACGGCGTGATCGTGG ACACAAAGGCCTACAGCGGCGGCTACAATCT GAGCATCGGCCAGGCCGAC GAGATGCAGAGATACGTGAAGGAGAACCAG ACCCGGAATAAGCACATCAA

核苷酸位置 注释	特征/ 描述	SEQ ID NO:	序列
			CCCCCACGAGTGGTGGGAAGGTGTACCCTAGC AGCGTGACCGAGTTCAAGT TCCTGTTCTGTGAGCGGCCACTTCAAGGGCAA CTACAAGGCCCAGCTGACC AGGCTGAACCGCAAAACCAACTGCAATGGC GCCGTGCTGAGCGTGGAGGA GCTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAAGCC GGCACCCTGACACTGGAGG AGGTGCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAGA TCAACTTCTGATAA
2328-2919	WPREmut 6 3'UTR <u>加点下划 线</u>	37	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAA GATTGACTGATATTCTTAA CTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATG CTGCTTTAATGCCTCTGT ATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTT TTCTCCTCCTTGTATAAA TCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTG GCCCGTTGTCCGTCAACG TGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCA ACCCCCCTGGCTGGGGCA TTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACT TTCGCTTTCCCCCTCCCG ATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCC TTGCCCCGCTGCTGGACAGG GGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTG GTGTTGTCGGGGAAATCAT CGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCC AACTGGATCCTGCGCGGG ACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCTCTCAA TCCAGCGGACCTCCCTTC CCGAGGCCTTCTGCCGGTTCTGCGGCCTCTC CCGCGTCTTCGCTTTCGGC CTCCGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGC CTCCCCGCCTG
2926-3148	<u>聚腺苷酸 化信号</u>	7	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT TGCCCCCTCCCCCGTGCCT TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTG TCCTTTCCTAATAAAATGA GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGT CATTCTATTCTGGGGGGTG GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATT GGGAAGACAATAGCAGGCAT GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
3166-3273	3' ITR [括 号中的粗 体文本]	8	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC CTCTCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGCGGGCTTTGCCCCGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAG

71728AAV的完整序列:

[CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG	50
GGCGACCTTT GGTGCCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG	100
GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTTCCT] GCGGCCTAAG CTTGAGCTCT	150
TCGAAAGGCT <u>CAGAGGCACA CAGGAGTTTC TGGGCTCACC CTGCCCCCTT</u>	200
<u>CCAACCCCTC AGTTCCCATC CTCCAGCAGC TGTTTGTGTG CTGCCTCTGA</u>	250
<u>AGTCCACACT GAACAACTT CAGCCTACTC ATGTCCCTAA AATGGGCAAA</u>	300
<u>CATTGCAAGC AGCAAACAGC AAACACACAG CCCTCCCTGC CTGCTGACCT</u>	350
<u>TGGAGCTGGG GCAGAGGTCA GAGACCTCTC TGGGCCCATG CCACCTCCAA</u>	400
<u>CATCCACTCG ACCCCTTGGA ATTTGCGTGG AGAGGAGCAG AGGTTGTCTT</u>	450
<u>GGCGTGGTTT AGGTAGTGTG <u>AGAGGGGTCC CGGGGATCTT GCTACCAGTG</u></u>	500
<u>GAACAGCCAC TAAGGATTCT GCAGTGAGAG CAGAGGGCCA GCTAAGTGGT</u>	550
<u>ACTCTCCCAG AGACTGTCTG ACTCACGCCA CCCCTCCAC CTTGGACACA</u>	600
<u>GGACGCTGTG GTTTCTGAGC CAGGTACAAT GACTCCTTTC GGTAAGTGCA</u>	650
<u>GTGGAAGCTG TACACTGCCC AGGCAAAGCG TCCGGGCAGC GTAGGCGGGC</u>	700
<u>GACTCAGATC CCAGCCAGTG GACTTAGCCC CTGTTTGCTC CTCCGATAAC</u>	750
<u>TGGGGTGACC TTGGTTAATA TTCACCAGCA GCCTCCCCCG TTGCCCCTCT</u>	800
<u>GGATCCACTG CTTAAATACG GACGAGGACA GGGCCCTGTC TCCTCAGCTT</u>	850
<u>CAGGCACCAC CACTGACCTG GGACAGTCCT AGGTGCCTGT TCTTTTTCGA</u>	900
GAAGCTCAGA ATAAACGCTC AACTTTGGCA GATACTAGTC <u>AGGTAAGTAT</u>	950
<u>CAAGGTTACA AGACAGGTTT AAGGAGACCA ATAGAACTG GGCTTGTCGA</u>	1000
<u>GACAGAGAAG ACTCTTGCGT TTCTGATAGG CACCTATTGG TCTTACTGAC</u>	1050
<u>ATCCACTTTG CTTTTCTCTC <u>CACAGGACCG GTGCCATGGA CTACAAAGAC</u></u>	1100
<u>CATGACGGTG ATTATAAAGA TCATGACATC GATTACAAGG ATGACGATGA</u>	1150
<u>CAAGATGGCC CCCAAGAAGA AGAGGAAGGT CGGCATTTCAT GGGGTACCCg</u>	1200
ccgctatggc tgagaggccc ttccagtgtc gaatctgcat gcgtaacttc	1250
agtcagtcct ccgacctgtc ccgccacatc cgcaccacaca ccggcgagaa	1300
gcctttttgcc tgtgacattt gtgggaggaa atttgccttg aagcacaacc	1350
tgctgaccca taccaagata cacacgggagc agaagccctt ccagtgtcga	1400
atctgcatgc agaacttcag tgaccagtcc aacctgcgcg cccacatccg	1450
cacccacacc ggcgagaagc cttttgcctg tgacatttgt gggaggaaat	1500
ttgcccgcga cttctccctg accatgcata ccaagatata caccggagag	1550

cgcggtctcc agtgtcgaat ctgcatgcgt aacttcagtc tgcgccacga 1600
cctggagcgc cacatccgca cccacaccgg cgagaagcct tttgcctgtg 1650
acatttgtgg gaggaaattht gccacaccgt ccaacctgaa caagcatacc 1700
aagatacacc tgcggGGATC CCAGCTGGTG AAGAGCGAGC TGGAGGAGAA 1750
GAAGTCCGAG CTGCGGCACA AGCTGAAGTA CGTGCCCCAC GAGTACATCG 1800
AGCTGATCGA GATCGCCAGG AACAGCACCC AGGACCGCAT CCTGGAGATG 1850
AAGGTGATGG AGTTCTTCAT GAAGGTGTAC GGCTACAGGG GAAAGCACCT 1900
GGGCGGAAGC AGAAAGCCTG ACGGCGCCAT CTATACAGTG GGCAGCCCCA 1950
TCGATTACGG CGTGATCGTG GACACAAAGG CCTACAGCGG CGGCTACAAT 2000
CTGAGCATCG GCCAGGCCGA CGAGATGCAG AGATACGTGA AGGAGAACCA 2050
GACCCGGAAT AAGCACATCA ACCCCAACGA GTGGTGAAG GTGTACCCTA 2100
GCAGCGTGAC CGAGTTCAAG TTCCTGTTTG TGAGCGGCCA CTTCAAGGGC 2150
AACTACAAGG CCCAGCTGAC CAGGCTGAAC CGCAAAACCA ACTGCAATGG 2200
CGCCGTGCTG AGCGTGGAGG AGCTGCTGAT CGGCGGCGAG ATGATCAAAG 2250
CCGGCACCTT GACACTGGAG GAGGTGCGGC GCAAGTTCAA CAACGGCGAG 2300
ATCAACTTCT GATAACTCGA GTCTAGAAAT CAACCTCTGG ATTACAAAAT 2350
TTGTGAAAGA TTGACTGATA TTCTTAACTA TGTTGCTCCT TTTACGCTGT 2400
GTGGATATGC TGCTTTAATG CCTCTGTATC ATGCTATTGC TTCCCGTACG 2450
GCTTTCTGTT TCTCCTCCTT GTATAAATCC TGGTTGCTGT CTCTTTATGA 2500
GGAGTTGTGG CCCGTTGTCC GTCAACGTGG CGTGGTGTGC TCTGTGTTTG 2550
CTGACGCAAC CCCACTGGC TGGGGCATTG CCACCACCTG TCAACTCCTT 2600
TCTGGGACTT TCGCTTTCCC CCTCCCAGT GCCACGGCAG AACTCATCGC 2650
CGCCTGCCTT GCCCGTGCT GGACAGGGGC TAGGTTGCTG GGCAGTATA 2700
ATTCCGTGGT GTTGTGCGGG AAATCATCGT CCTTTCCTTG GCTGCTCGCC 2750
TGTGTTGCCA ACTGGATCCT GCGCGGGACG TCCTTCTGCT ACGTCCCTTC 2800
GGCTCTCAAT CCAGCGGACC TCCCTTCCCG AGGCCTTCTG CCGGTTCTGC 2850
GGCCTCTCCC GCGTCTTCGC TTTCGGCCTC CGACGAGTCG GATCTCCCTT 2900
TGGGCCGCTT CCCCCTGCTG CTAGCCTGTG CTTTCTAGTT GCCAGCCATC 2950
TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCTTCTCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC 3000
CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT 3050
AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA 3100

GGATTGGGAA GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGC	3150
GGCCGCGTCG AGCGC[AGGAA CCCCTAGTGA TGGAGTTGGC CACTCCCTCT	3200
CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCTTTGC CCGGGCGGCC	3250
TCAGTGAGCG AGCGAGCGCG CAG] (SEQ ID NO:31)	3273

实施例2:

[0268] 如下制备包含如实施例1中所述的多核苷酸和AAV的组合物:在三个加盖的小瓶中提供组分:所述组分以三个加盖小瓶提供:一个小瓶用于ZFN1 (SB-47171,加白色盖并标记为SB-A6P-ZLEFT);一个小瓶用于ZFN2 (SB47898,加蓝色盖并标记为SB-A6P-ZRIGHT);并且一个小瓶用于hIDS供体 (hIDS,加橙色盖并标记为SB-A6P-HNT)。产品组分全部是单独配制在含有CaCl₂、MgCl₂、NaCl、蔗糖和Kolliphor[®] (泊洛沙姆) P188的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中或标准生理盐水 (NS) 配制品中的纯化的AAV。剂量计算使用受试者的体重进行并四舍五入成小数点后两位。计算是通过将群组剂量乘以基线处的受试者体重,且然后除以vg/mL浓度进行的。将三个产品组分体积加在一起,并且确定总体积。另外,计算要添加的人血清白蛋白 (HSA) 静脉溶液的体积,以实现最终浓度为0.25% HSA,并且最后将PBS或NS添加所需的量,以实现恰当的组分浓度。

[0269] 然后将产品组分添加至在NS或PBS中含有0.25% HSA的IV输注袋中。分别添加每种产品组分,并且然后将袋子轻轻混合并转移给负责输注的人员。然后使用输注泵 (Sigma Spectrum) 以100mL/h的速率将产品输注至受试者体内。

实施例3:

研究合格性和排除标准

[0270] 受试者的关键合格性标准包括:≥5岁 (成年人群组1至3:≥18岁;儿科群组4和6:12至17岁;儿科群组5和7:5至11岁);基于以下的证据对MPS II的临床诊断:肝脾肿大、根据X射线的多发性成骨异常、瓣膜性心脏病和/或阻塞性气道疾病伴有经基因测序确认的IDS缺乏症;肝脏肿块阴性的磁共振成像 (MRI)。

[0271] 受试者的主要排除标准包括:已知对酶替代疗法无反应;血清中有针对AAV6的中和抗体;接受针对乙型或丙型肝炎、或活动性乙型肝炎或丙型肝炎或人类免疫缺陷病毒 (HIV) 1/2的抗逆转录病毒疗法;缺乏对艾杜硫酸酶治疗 (Elaprase[®]) 的耐受性;白蛋白基因座中ZFN靶向区域多态性;肝纤维化得分在0至4分量表上为3或4 (Desmet等人 (1994) Hepatology19 (6):1513-20)、肝功能障碍的标记物;怀孕或母乳喂养的女性;禁忌使用皮质类固醇;目前使用全身免疫调节剂或类固醇治疗;先前使用基因疗法产品治疗;以及甲胎蛋白升高或异常。

研究设计

[0272] 本研究是针对患有MPS II疾病的受试者进行的。研究了若干个群组:i) 年龄≥18岁 (成年人群组1至3);ii) 年龄12-17岁 (儿科群组4和6);和iii) 年龄5-11岁 (儿科群组5和7)。这些群组中使用的剂量如下表6中所示。群组1被认为是低剂量,群组2是中剂量,并且群组3是高剂量。对于所有群组,总AAV剂量包括固定比率为1:1:8的2个ZFN载体和1个供体载体。

表6:评价剂量

群组	ZFN 1(SB-41717) vg/kg	ZFN 2(SB-47898) vg/kg	hIDS供体 (SB-IDS) vg/kg	总rAAV vg/kg	
1	5.00 e+11	5.00 e+11	4.00 e+12	5.00 e+12	起始剂量
2, 4, 5	1.00 e+12	1.00 e+12	8.00 e+12	1.00 e+13	2X起始剂量
3, 6, 7	5.00 e+12	5.00 e+12	4.00 e+13	5.00 e+13	10x起始剂量

临床终点

[0273] 主要终点:本研究的主要终点是如通过不良事件和显著不良事件的发生率评估的组合物的安全性和耐受性。另外的安全性评价包括:常规血液学、化学和肝功能实验室测试、生命体征、身体检查、ECG、ECHO和伴随用药;颅神经检查和肌肉强度测试;用于评价肝脏肿块的系列甲胎蛋白测试和肝脏MRI。对所有受试者进行安全性评估。使用监管活动医学词典(Medical Dictionary for Regulatory Activities) (MedDRA) AE词典将所有报告的不良事件编码为一组标准术语。通过严重程度和与研究药物的相关性来汇总每个事件的频率。

[0274] 关键的次要终点包括:以下项相对于基线的变化:血浆中测量的IDS活性;尿液中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平(表示为与肌酐的比率);通过PCR由血浆、唾液、尿液、粪便和精液中载体基因组测量的AAV2/6清除率。尿液GAG水平是MPS II疾病病理生理学的关键生物标记物。另外的次要终点包括每月监测频率和IDS(或等效ERT)的剂量。

[0275] 关键的探索性终点包括以下项相对于基线的变化:在活检处获得的肝脏组织中白蛋白基因座处的基因修饰的百分比和持久性;由PFT测量的用力肺活量;由6MWT测量的步行距离;JROM;用于评价肝脏和脾脏体积的肝脏MRI;用于评价临床软组织和/或骨的脑和颈椎MRI;由WASI-II, WPPSI-IV或BSID-III和由VABS-II测量的神经认知能力;肝脏组织的组织病理学检查;在肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平以及在血清中测量的对AAV 2/6和ZFN的免疫应答。这些端点的分析本质上是描述性和探索性的。通过针对所有招募的受试者的均值、标准差、中位数和范围来汇总连续变量。用针对所有招募的受试者的每种类别的计数和百分比来汇总类别变量。对于所选择的临床和实验室参数,可以计算相对于前一年的变化。对于所选择的实验室参数,可以构建移位表(相对于正常范围的相对于基线的变化)。

统计分析和数据分析

[0276] 这是一项探索性I期研究,并且因此评价功效和相关生物学终点的统计能力有限。因此,分析本质上主要是描述性和探索性的。本研究将招募多达23名受试者(7个群组中的每个群组中2名受试者,有可能在3个年龄群组中的每个群组的最大耐受剂量下招募3名另外的受试者)。由于这是评价安全性和耐受性的I期安全性研究,因此2名受试者/群组的选择不是基于统计计算。所有表、列表和数据汇总均在SAS 9.2或更新版本中进行。

患者

[0277] 患者人口统计学示出在下表7中,其展示所有患者患有减毒型MPS II疾病。表8列出了在试验起始后32周每名受试者具有的治疗暴露。

表7:患者人口统计学

受试者特征	总体(N=8)
年龄(岁)	
患者数量	8
Min-Max	19 - 61
均值(SD)	35.58 (15.59)
性别, n(%)	
男性	8 (100%)
人种, n(%)	
亚洲人	1 (12.5%)
白种人	7 (87.5%)

表8:治疗暴露(近似)

受试者	剂量群组	随访(周)
1	1	57
2	1	49
3	2	39
4	2	34
5	3	25
6	3	19
7	3	2
8	3	1

观察到的不良事件

[0278] 所有受试者均报告了治疗中出现的不良事件 (TEAE), 这与进行中的MPS II疾病一致。大多数为轻度 (1级) 并且无需治疗即可消退。在三名受试者中报告了三种严重不良事件 (SAE), 并且所述严重不良事件被现场研究者认为与研究药物无关。这些严重不良事件是A) 3级支气管炎, 其被认为是继发于受试者因其MPS II引起的慢性肺部疾病的病史, 其中支气管炎在医学治疗之后得以消退; B) 2级心房颤动。这被认为是继发于受试者因其MPS II疾病引起的心脏瓣膜疾病的病史, 并且所述事件在医学治疗之后得以消退; C) 阻塞性脐疝, 其被认为是继发于受试者的潜在MPS II疾病、疝气病史和病态肥胖症。这些事件汇总在下表9A中:

表9A:严重不良事件

事件	组	研究 天数	等级	结局	相关	注释
支气管炎	1 (5e12 vg/kg)	20	3	消退	不相关	继发于受试者 因MPS II引起 的慢性肺部疾 病的病史
心房颤动	2 (1e13 vg/kg)	52	2	消退	不相关	继发于受试者 因MPS II引起 的心脏瓣膜疾 病的病史
阻塞性肺 病	3 (5e13 vg/kg)	121	3	消退	不相关	继发于受试者 的潜在MPS II 疾病、肺气病 史和病态肥胖 症

[0279] 除两种研究药物相关不良事件 (AE) 外,其余是轻度 (1级) 的,并且所有均无需干预即可消退并且不是剂量依赖性的。AE示出在下表10中。

表10:研究药物相关不良事件

首选术语	群组1 (N=2) n [T]	群组2 (N=2) n [T]	群组3 (N=4) n [T]	总体 (N=8) n [T]
任何事件	2 [5]	1 [5]	2 [7]	5 [17]
1- 轻度	2 [5]	1 [5]	2 [5]	5 [15]
2- 中度	无	无	1 [2]	1 [2]
ALT增加	0 [0]	1 [1]	0 [0]	1 [1]
AST增加	0 [0]	1 [1]	0 [0]	1 [1]
虚弱	1 [1]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
冷汗	1 [1]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
头晕	1 [1]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
红斑	0 [0]	1 [2]	0 [0]	1 [2]
潮红	0 [0]	1 [1]	1 [2]	1 [2]
瘙痒症	1 [2]	0 [0]	1 [1]	2 [3]
味觉障碍	0 [0]	0 [0]	1 [1]	1 [1]
头痛	0 [0]	0 [0]	1 [1]*	1 [1]
发热	0 [0]	0 [0]	1 [1]*	1 [1]
转氨酶升高	0 [0]	0 [0]	1 [2]	1 [2]

[0280] 在表10中,“N”指示每个治疗组中的受试者总数量;“n”指示具有每个首选术语的不良事件的受试者数量;并且“[T]”指示不良事件的总数量。*指示中度严重程度 (2级)。

初步的肝基因组编辑结果

[0281] 使用RT-qPCR测定来检测当将IDS转基因插入白蛋白基因中时在肝脏组织中出现

的独特mRNA (参见实施例4)。在接受1e13vg/kg剂量的两名群组2受试者中,结果均为阳性(+) (参见下表11)。用于检测白蛋白基因中靶位点处的插入/缺失的灵敏性较低的基因组DNA测定在所有测试样品中均是阴性的。

表11:白蛋白-IDS mRNA测定

第24周结果	群组1		群组2		群组3	
受试者	1	2*	3	4	5*	6
整合测定	-	n/a	+	+	n/a	待定

*由于禁忌肝活检程序而无可用结果

初步的血浆IDS测量

[0282] 血浆IDS活性是在谷值处测量的,所述谷值定义为在以下时间段中,所述时间段在可能的情况下紧接ERT给药之前,并且不少于受试者最后一次ERT输注之后的96小时。在本研究中,使用标准经验证的荧光测定测量IDS,所述荧光测定使用4-甲基伞形酮基硫酸盐(4MU)作为底物(对于示例性血浆IDS测定,参见以下实施例4)。在基线谷值处以及对于给药后的前16周,血浆IDS活性低于定量水平(5.2nmol/h/mL)。

[0283] 开发了改进的血浆IDS活性测定(参见实施例4)。如图8中所示,通过使用新的测定,在所有受试者中均可检测到血浆IDS。如上,排除了在ERT给药后少于96小时获得的样品。在该测定中,MPS II基线受试者<10mmol/mL/h IDS活性,正常群体中的基线>79mmol/mL/h。图8示出了在用研究药物治疗之前受试者中的血浆IDS水平(参见在第0天给药前标记为阴性的研究天数数据)。

群组1和2的12周尿液GAG结果

[0284] 在用如实施例1中所述的包含多核苷酸和AAV的组合物给药后十二周,群组2中的所有GAG生化标记物减少。通过经验证的1,9-二亚甲基蓝(DMB)比色测定来测量总尿液GAG水平(参见实施例4),而通过经验证的MS/MS测定(超高效液相色谱随后是串联质谱)来测量尿液硫酸皮肤素和尿液硫酸乙酰肝素GAG水平。示例性的MS/MS测定程序描述于实施例4中。观察到群组2中总GAG以及与MPS II最紧密联系的两种GAG即硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的降低。这些结果示出在下表8A中。

表8A:12周尿液GAG结果:

	12周时的 总GAG 变化% 均值(SD)	12周时的 硫酸皮肤素变 化% 均值(SD)	12周时的 硫酸乙酰肝素 变化% 均值(SD)
群组1(受试者1)	+32.7	+ 16.1	+26.1
群组1(受试者2)	-14.3	+28.2	-7.1
群组1均值(SD)	+ 9.2 (33.2)	+ 22.2 (8.5)	+ 9.5 (23.5)
群组2(受试者3)	-42.7	-28.6	-61.0
群组2(受试者4)	-20.2	-10.9	-46.0
群组2均值(SD)	- 31.4 (15.9)	- 19.7 (12.6)	- 53.5 (10.6)

群组1和2的16周尿液GAG结果

[0285] 在用如实施例1中所述的包含多核苷酸和AAV的组合物给药后十六周,群组2中的所有GAG生化标记物减少。通过经验证的1,9-二亚甲基蓝 (DMB) 比色测定来测量总尿液GAG水平(参见实施例4),而通过经验证的MS/MS测定(超高效液相色谱随后是串联质谱)来测量尿液硫酸皮肤素和尿液硫酸乙酰肝素GAG水平。示例性的MS/MS测定程序描述于实施例4中。将这些结果示出在下表8B中。

表8B:16周尿液分析

	16周时的 总GAG 变化% 均值(SD)	16周时的 硫酸皮肤素 变化% 均值(SD)	16周时的 硫酸乙酰肝素 变化% 均值(SD)
群组1(受试者1)	+13.0	-14.5	-15.6
群组1(受试者2)	+4.8	+22.6	-31.4
群组1均值(SD)	+8.9 (5.8)	+ 4.1 (26.2)	-23.5 (11.2)
群组2(受试者3)	-62.5	-47.4	-69.9
群组2(受试者4)	-39.1	-16.3	-53.0
群组2均值(SD)	-50.8 (16.5)	-31.8 (22.0)	-61.5 (12.0)

16周时的结果汇总

[0286] 完成了对群组1、2和3的招募和给药,但是在该初步报告时仅可得群组1和2的第16周数据。因此,当前数据仅来自低剂量和中剂量。最近,将来自群组3的两名患者以比群组2剂量高5倍的5e13vg/kg剂量治疗。将如实施例1中所述的包含多核苷酸和AAV的组合物以高达5.00e13vg/kg的剂量施用至六名患有减毒型MPS II的受试者,并且在所有受试者中总体上是耐受性良好的。没有报告与组合物相关的SAE,并且没有观察到持续的转氨酶升高。尿液GAG生物标记物显示出总GAG、硫酸皮肤素 (DS GAG) 和硫酸乙酰肝素 (HS GAG) 以剂量依赖性方式的降低。在用本文所述的组合物给药后16周时,以1.00e13vg/kg剂量治疗的两名受试者(群组2)显示出尿液硫酸乙酰肝素的大于60%的平均降低。观察到群组2的尿液硫酸乙酰肝素平均降低量为大约61.5%,包括第一患者的大约53%和第二患者的大约69.9%。对于硫酸皮肤素,观察到群组2的平均降低量为大约31.8,包括第一患者的大约47.4%和第二患者的大约16.3%。观察到群组2的尿液硫酸乙酰肝素平均降低量为大约50.8%,包括第一患者的大约62.5%和第二患者的大约39.1%。对于群组2患者,两名患者的总尿GAG、硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素均下降至低于基线。具体地,在第16周时,在群组2(中等剂量)中总尿GAG下降了51%,硫酸皮肤素下降了32%并且硫酸乙酰肝素下降了62%。

[0287] 此外,如图6A至6C(其描绘了基线处的个体受试者值和每名受试者的每次每月访视)中所示,治疗后MPS II生物标记物的降低随时间持续存在。对于群组2中的两名受试者,在整个十六周中,总GAG、硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素观察结果均保持低于基线,除了在受试者因与研究药物无关的心房颤动SAE住院并且持续若干个小时患低血压后四天获得样品时的一个时间点。在下次测量时,该患者的GAG返回至自第4周以来观察到的先前低范围。

[0288] 与群组2相比,群组1受试者的GAG通常保持在其基线测量值附近。对于群组1中的一名患者,总GAG略微上升,而对于另一名患者,总GAG略微下降。本研究中的患者全部接受

ERT,这意味着他们的GAG与未接受过ERT的MPS II患者相比显著降低。接受ERT治疗、患有减毒型疾病的MPS II患者的GAG水平可能有所变化,但通常在诊断模型将考虑患病的较低端一直到正常的很低端的范围内。群组1和2的患者的基线GAG值处于高正常范围内,所述高正常范围升高至足以仍有可测量的下降空间。在基线处以及对于用组合物给药后的前16周,血浆IDS活性低于定量水平。不存在可检测水平并不指示IDS未正在通过使用本文公开的方法和组合物编辑的肝细胞产生。将细胞连续暴露于低水平的循环IDS可能足以驱动酶摄取进细胞中并降低GAG或维持对GAG的抑制,因为这些组织急需IDS。第六名受试者(群组3)已经被以 5.00×10^{13} vg/kg给药,并且将被随访以观察上述的安全性和探索性终点。针对ERT撤出对患者进行评价。ERT撤出之后尿液GAG水平的稳定将是用于评价本文公开的方法和组合物的治疗潜力的一种重要参数。

群组1至3的24周尿液GAG结果

[0289] 对于三个剂量群组(包括 5×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg和 5×10^{13} vg/kg)测量尿液GAG(包括硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素和总GAG)。已经治疗8名受试者,但是该24周数据组仅包括前6名受试者。数据呈现于图9中。

[0290] 图8展示出在治疗后大约第50天,群组3中的受试者6中血浆IDS的较大增加和转氨酶升高的发展。图10描绘了受试者6的IDS水平的特写和在IDS水平峰值期间观察到的肝脏丙氨酸转氨酶的变化。在研究天数62、111和128天报告肝功能测试的轻度(1级)增加。将泼尼松剂量增加至每日60mg PO且然后逐渐减少。该受试者在研究第121天还具有与研究药物无关的SAE(箝闭脐疝)。

24周时的结果汇总

[0291] 示出了成功编辑人类基因组的初步证据。通过肝脏样品的PCR分析(一种检测基因整合的测定)结果,群组2中的两名患者展示出基因整合。另外,合成融合白蛋白IDS转录物。这些基因组编辑的肝细胞在经治疗的MPS II患者的血浆中产生IDS活性。将在此汇总的患者用本文公开的包含AAV SB-47171、AAV SB47898和AAV hIDS供体的组合物治疗。

[0292] 已经根据方案规定的时间表启动ERT撤出,同时监测安全性、IDS/GAG生化标记物和功能度量度。在ERT撤出之后尿液GAG水平的响应对于确定研究药物的潜在临床相关性是重要的。三名受试者(群组2中的2名和群组3中的1名)已开始ERT撤出,然而,群组2中的1名受试者可能在大约3个月之后由于疲劳和尿液GAG的同时增加而重新开始ERT。

[0293] 将研究药物以高达 5×10^{13} vg/kg的剂量施用至8名患有减毒型MPS II的受试者,并且总体上是耐受性良好的。与研究药物相关的不良事件是轻度或中度的并且全部消退。在这些患者中,对研究药物的施用总体上是耐受性良好的,具有有利的安全性概况。报告了十七种不良事件,其中15种是轻度、1级的,并且所有报告的不良事件均无需治疗即可消退。没有报告与研究药物相关的严重不良事件。肝脏活检结果(来自低剂量群组的一名患者和中剂量群组中的两名患者)指示在以 1×10^{13} vg/kg剂量治疗的两名受试者中肝细胞的基因组编辑的初步证据。使用逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)(一种用于扩增和检测特定分子信号的标准实验室方法)的测定进行分析。所述测定被设计以通过鉴定白蛋白-IDS嵌合mRNA转录物来检测基因整合,所述转录物仅在IDS基因已成功整合在内源白蛋白基因内的预期位点处时才能形成。该测定在两名中剂量群组患者中检测到白蛋白-IDS嵌合mRNA转录物。中等剂量群组患者的基因组编辑显现以较低频率发生,因为使用MiSeq DNA测序进行的单独的肝脏

组织分析(一种灵敏性较低的测定)(定量下限为0.1%)未检测到来自低剂量和中剂量群组患者的样品中的编辑。肝脏组织分析显示出在24周之后在1e13vg/kg剂量下的两名受试者中白蛋白-IDS mRNA转录物的证据,这表明发生了基因组编辑。对群组3受试者的分析是不完全的。在5e13vg/kg剂量下的一名受试者中观察到血浆IDS活性的显著增加,然而,该血浆IDS活性在发展轻度转氨酶升高之后降低。

[0294] 另外,此汇总还包括使用更灵敏的定量IDS测定的血浆IDS活性测量值。IDS酶数据包括与基线相比在治疗后24周时研究的所有三个群组中招募的前六名患者的血浆活性水平。酶测定分析检测到在1e13中剂量中的两名受试者和5e13高剂量下的一名受试者的血浆中IDS活性的较小增加。此外,在以5e13高剂量治疗的第二患者中测量到血浆IDS活性的显著增加,其中血浆IDS水平到SB-913治疗后第50天升高至大约50nmol/小时/mL,这是正常血浆IDS活性的下限的大约60%。在该患者中在第62、111和128天测量到肝功能测试的轻度、1级升高,这与怀疑的转氨酶升高事件一致,从而导致该受试者中血浆IDS活性耗散,在治疗后24周时降至14nmol/小时/mL。

[0295] 在这些最初的6名患者中,还收集了24周时的尿液GAG测量值并将其与基线进行比较。所有招募的受试者具有在被认为正常水平或略微高于正常水平的范围内,并且在第24周时,来自前六名患者的尿液GAG水平未显示出明显趋势或有意义的变化。

[0296] 如本文所述,使用本文公开的包含AAV SB-71557和AAV SB-71728(代替47171和47898)以及AAV hIDS供体的组合物进行另外的研究。在临床前研究中,AAV SB-71557和AAV SB-71728已展示出改善的切割效率(5至30倍)和改善的IDS(如本文所述治疗的MPS II受试者中缺乏的酶)表达(5至20倍)(参见美国申请号16/271,250)。

实施例4:

艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶测定

[0297] 可以利用的示例性实验室程序如下进行。为了检测IDS酶活性,存在许多可以使用的测定。示例性测定如下:艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶是从硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素两者中均都存在的艾杜糖醛酸残基的2'位置去除硫酸酯残基的溶酶体酶。该测定使用了含有末端艾杜糖醛酸的人工4-MU底物。然而,为了释放4-MU的荧光,必须将整个艾杜糖醛酸部分从底物去除。艾杜糖醛酸的去除是由 α -艾杜糖醛酸酶催化的,并且此举只能在艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶去除硫酸酯残基之后才能发生。因此,该测定是两步式反应。在第一步期间,给予内源艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶从4-MU底物末端的艾杜糖醛酸残基裂解2'硫酸酯残基的机会。在第二步期间,将外源溶酶体酶(包括 α -艾杜糖醛酸酶,但不包括艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶)添加至反应。 α -艾杜糖醛酸酶可以从已经通过艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶去除2'硫酸酯残基的任何4-MU底物去除艾杜糖醛酸。从4-MU底物去除末端的艾杜糖醛酸释放了其荧光,所述荧光可以用荧光计观察到。然而,如果患者样品内不存在内源艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶,则无法去除2'硫酸酯残基,这会阻止整个艾杜糖醛酸部分被去除,从而淬灭4-MU底物的荧光(Voznyi等人(2001) *J Inher Metab Dis*24:675-680)。

[0298] 程序:通过离心从全血中分离血浆(肝素化绿头或EDTA保持的紫头)。通过离心从全血中分离血浆。离心后,将顶部的液体层(血浆)小心拉出或倾倒入,并收集在单独的适当收集管中。将该含有血浆的管冷冻并装填干冰中运送。

[0299] 将冷冻的血浆样品从冷冻器中取出并在稀释前在37℃水浴中快速解冻。在单独的

微量离心管中用底物缓冲液(10 μ L血浆+90 μ L底物缓冲液)以1:10稀释血浆样品。在每个患者/对照管中,将10 μ L稀释的血浆+20 μ L Hunter底物在微孔板中组合,并在37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育3小时。向每个样品中添加50 μ L淬灭溶液(具有0.2%BSA和1 μ g/mL重组人 α -L-艾杜糖醛酸酶的2xMcilvaine缓冲液),并且将反应板放回37 $^{\circ}$ C培养箱中24小时。将40 μ L的每种反应液转移至平坦白色不透明板,并且添加100 μ L终止缓冲液。使用(365nm激发,450nm发射)板读取器获取荧光信号。使用以下计算确定总酶活性:

[0300] 血浆:平均校正读数 $\times$ 稀释因子(10)=每3小时水解的nmol底物/mL血浆。正常血浆值是82-200nmol/h/mL(从50个供体确定)。酶活性的定量下限(LL0Q)是0.78nmol/mL/h。酶活性的分析测量范围的上限是167nmol/mL/h。

[0301] 底物缓冲液制备如下:将0.1M乙酸钠与0.01M乙酸铅组合并使用冰醋酸调整至5.0的pH。在使用当天,将0.2%BSA添加至底物缓冲液以进行样品稀释。Hunter底物4MU- α IdoA-2S(2.5mM)是商业购买的。

[0302] 淬灭溶液:以0.4M磷酸氢二钠和pH 4.5 0.2M柠檬酸制备2xMcilvaine缓冲液。在使用当天,将0.2%BSA添加至2xMcilvaine缓冲液。以1 μ g/mL的终浓度通过在含有0.2%BSA的2xMcilvaine缓冲液中稀释重组人 α -L-艾杜糖醛酸酶(R&D系统)来制备淬灭溶液。

[0303] 该测定的定量下限=0.78。未受影响个体的参考范围(nmol/mL/h)是82-200,而MPS II患者的基线(ERT后>96h)估计处于0-10。

用于测量血液中IDS活性的另一个示例性测定如下:使用4-甲基伞形酮基 α -L-ido吡喃艾杜糖醛酸2-硫酸盐(IDS-S)作为IDS的底物。然后通过UPLC-MS/MS直接测量其酶促产物4-甲基伞形酮基 α -L-ido吡喃艾杜糖醛酸(IDS-P)和内标4-甲基伞形酮基 α -L-ido吡喃艾杜糖苷(IDS-IS)(Lee等人(2015)Clin Biochem.48(18):1350-3)。

通过MS/MS进行的总尿液糖胺聚糖(GAG)测定和定量尿液硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素和硫酸软骨素测定。

[0304] 存在多种测定来测量尿液中GAG的水平。一种示例性测定描述如下:使用二甲基亚甲基蓝(DMB)测定分析在研究期间收集的尿液样品的糖胺聚糖水平。简而言之,通过用悬浮于3.3pH值下的甲酸中的1,9-二甲基亚甲基蓝染料处理来针对硫酸乙酰肝素对尿液样品进行染色,并在520nm的波长下测量吸光度。将硫酸乙酰肝素的浓度使用尿液样品中鉴定的肌酐蛋白的总浓度进行归一化。(参见例如de Jong等人(1989)Clin Chem35/7:1472-1479)。

[0305] 用于测量存在于生物样品中的总GAG的另一个示例性测定如下:所述方法涉及(a)在适合于通过丝氨酸蛋白酶裂解标记底物以产生可检测信号的条件和时间下将丝氨酸蛋白酶(例如,凝血级联的)、丝氨酸蛋白酶的标记底物、丝氨酸蛋白酶的抑制剂和怀疑包含一种或多种糖胺聚糖的样品组合,(b)检测可检测信号,和(c)将可检测量信号的量与标准进行比较以确定所述样品中所述一种或多种糖胺聚糖的浓度,其中所述丝氨酸蛋白酶的所述抑制剂选自肝素辅因子II和抗凝血酶III,并且其中所述一种或多种糖胺聚糖选自硫酸皮肤素(DS)和硫酸肝素(HS)。(参见例如美国专利公开号2013/0189718)。

[0306] 另一个示例性测定测量存在的GAG的类型,并称为多重测定(Langereis等人(2015)PLoS One 10(9):e0138622)。该测定是基于尿液中发现的硫酸乙酰肝素(HS)、硫酸皮肤素(DS)和硫酸角质素(KS)的酶消化,然后通过LC-MS/MS进行定量。该测定是非常灵敏的测定,并且可用于测量尿液中GAG的确切类型。

[0307] 可用于确定特定类型的GAG浓度的另一个示例性测定利用RapidFire (RF, Agilent)高通量质谱系统。将样品吸收至基质以进行浓缩和脱盐,并且然后直接洗脱至MS/MS中,而无需色谱分离。每个样品处理少于十秒,从而产生比基于常规LC-MS/MS的方法快得多的通量(参见Tomatsu等人(2014) J Anal Bioanal Tech. 3月1日;2014(增刊2):006.)

血浆、唾液、尿液、粪便和精液中的AAV2/6清除率

[0308] 生物样品中AAV的检测可以通过本领域已知的若干种方法进行。一种示例性脱落测定用于分析人血浆、精液、唾液、尿液和粪便样品中的AAV2/6-供体和AAV2/6-ZFN载体,并用于评价来自五种基质的DNA的回收率。来自人供体的人血浆、精液、唾液、尿液和粪便样品提供了用于qPCR分析的基质DNA的来源。

[0309] 自人血浆的DNA分离:将等分试样(200 μ L)的人血浆样品解冻,在2 μ g鲑精DNA的存在下用蛋白酶K处理,之后使用QIAamp DNA微型试剂盒进行DNA分离。将纯化的血浆DNA溶解在100 μ L洗脱缓冲液AE中。

[0310] 自人精液的DNA分离:将等分试样(多至100 μ L)的人精液样品解冻,用蛋白酶K处理,且然后处理以用于使用QIAamp DNA微型试剂盒进行DNA分离。将纯化的精液DNA溶解在100 μ L洗脱缓冲液AE中,并使用Nanodrop ND-8000仪器通过260nm下的UV吸收测定DNA浓度。

[0311] 自人唾液的DNA分离:将等分试样(多至200 μ L)的人唾液样品解冻,用蛋白酶K处理,且然后处理以用于使用QIAamp DNA微型试剂盒进行DNA分离。将纯化的唾液DNA溶解在100 μ L洗脱缓冲液AE中,并使用Nanodrop ND-8000仪器通过260nm下的UV吸收测定DNA浓度。

[0312] 自人尿液的DNA分离:将等分试样(多至200 μ L)的人唾液样品解冻,用蛋白酶K处理,且然后处理以用于使用QIAamp DNA微型试剂盒进行DNA分离。将纯化的唾液DNA溶解在100 μ L洗脱缓冲液AE中,并使用Nanodrop ND-8000仪器通过260nm下的UV吸收测定DNA浓度。

[0313] 自人粪便的DNA分离:将等分试样(90-110mg)的人粪便样品部分解冻、均化,并用蛋白酶K处理,之后使用QIAamp Fast DNA粪便微型试剂盒进行DNA分离。将纯化的粪便DNA溶解在200 μ L缓冲液ATE中,并使用Nanodrop ND-8000仪器通过260nm下的UV吸收测定DNA浓度。

[0314] 将每个qPCR在7900HT快速实时PCR系统中的标准96孔板上进行。将具有反应混合物的板用光学盖密封,并通过以1500rpm离心15分钟离心所有液滴,然后进行qPCR。

[0315] 将针对供体AAV(SB-IDS、SB-A6P-HNT)的反应扩增并检测到91个核苷酸扩增子。将用于检测ZFN DNA(SB-47171:SB-A6P-ZLEFT和SB-47898:SB-A6P-ZRIGHT)的反应扩增并检测到96个核苷酸扩增子。

[0316] 使用的测定条件:在50 $^{\circ}$ C下保持2分钟。在95 $^{\circ}$ C下保持10分钟。在95 $^{\circ}$ C下进行40个循环持续15秒,并且在60 $^{\circ}$ C下持续1分钟。将结果与先前使用线性化的MPS II或ZFN质粒DNA准备的标准曲线进行比较。

肝脏组织中白蛋白基因座的基因修饰

[0317] 用于通过测序检测基因修饰的示例性测定是用于使用MiSeq下一代测序(NGS)平台确定受试者样品中白蛋白基因处的插入和缺失(indel)水平。使用标准程序从肝脏组织分离gDNA,并将其稀释至20ng/mL。对样品进行衔接子PCR,之后进行条形码PCR,并且加载至MiSeq盒上以进行测序。对于PCR反应使用以下条件:

[0318] PCR反应(衔接子):95 $^{\circ}$ C 3分钟[98 $^{\circ}$ C 20秒,55 $^{\circ}$ C 15秒,72 $^{\circ}$ C 15秒],将括号内的步

骤重复29次。最后在72℃下延伸1分钟。

[0319] PCR反应(条形码):95℃ 3分钟[98℃ 20秒,60℃ 15秒,72℃15秒],将括号内的步骤重复9次。最后在72℃下延伸1分钟。

对肝活检中白蛋白-IDS mRNA转录物的鉴定

[0320] 开发了RT-PCR方法以测定独特的白蛋白-IDS mRNA转录物的存在,所述转录物作为将IDS基因插入白蛋白基因座中的结果而产生。使用该测定来测试来自己用研究药物治疗过的受试者的肝活检组织。简而言之,使用制造商的RNA肝脏设置,使用**FastPrep®**仪器(MP Biomedicals)从冷冻的肝脏组织提取RNA。根据制造商的方案,使用PureLink RNA微型试剂盒(Thermo Fischer)分离RNA。对RNA进行定量并将其用于根据制造商的方案使用SuperScript III第一链合成系统(Invitrogen)的逆转录。逆转录后,使用以下引物组对样品进行PCR:

用于白蛋白-IDS mRNA测定的探针和引物

名称	序列(5'->3')	SEQ ID NO
IDS-ALB_F2	CTCTTTAGCTCGGCTTATTCCA	40
IDS-ALB_R2	CGATGATGAGCAGGACGTTAAG	41
ALB_IDS_ 探 针 2 : 6-FAM/ZEN/IBFQ	TCGAGATGCACTTAGCGAAACCCA	42
ALB_F2	TTCGTCGAGATGCACACAAG	43
ALB_R2	TGCTGAAGATACTGAGCAAAGG	44
ALB_探针2 6-FAM/ZEN/IBFQ	AGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATT TGGGA	45

[0321] 如图7中所描绘使用引物和探针来扩增将IDS整合至白蛋白基因中后的独特PCR产物,或在没有IDS整合的情况下检测单独的白蛋白。

[0322] PCR产物的定量使用LabChipGX Touch HT系统(Perkin Elmer)进行。该测定的检测下限为1,000个基因组中的大约1个。

实施例5

[0323] 可以开发用于确定最小有效剂量的模型以预测用本发明的组合物治疗的受试者中的有效剂量。开发模型以检查组合物的预测药代动力学(PK)和药效学(PD),以预测治疗有效剂量。发布的在人类和非人类灵长类动物中使用**Elaprase®**得出的PK数据(Tomanin等人(2014)Orphanet J Rare Dis.9:129.;Garcia等人(2007)Mol Genet Metab.91(2):183-90;Kim,S等人(2017)Mol Genet Metab.122(1-2):92-99.doi:10.1016/j.ymgme.2017.06.001.;Sohn等人(2013)Orphanet J Rare Dis.8:42.;Kim,C等人(2017)J Hum Genet.62(2):167-174.;Elaprase FDA Pharmacology/Toxicology and Medical Review Documents)和来自对本发明的组合物的小鼠研究的PD和PK数据(Ou,L.等人,manuscript in preparation)是符合的。首先,开发了使用人、猴和IDS敲除小鼠(参考)的针对**Elaprase®**的PK/PD模型。接下来,在IDS基因敲除小鼠中使用本发明的组合物开发了PK/PD模型(Ou等人(2014)Mol Genet Metab.111(2):116-122)。然后,将两个模型联系起来以模拟本发明的组合物在人类中的行为(图1),其中进行了一组计算来以数学方式将两种

治疗剂的行为联系起来(图2)。将模型应用至小鼠中观察到的数据以与预测值比对(图3)。接下来,将所述模型用于预测将导致降低尿液GAG水平的血浆IDS活性所需的有效剂量。如图(4)所示,预测即使 5.0×10^{12} vg/kg的最低剂量也可降低经治疗受试者中的尿液GAG,因为预测其导致高于最低估计有效剂量的IDS血浆活性(参见下文)。

[0324] 文献检索发现,正常人、MPS-II携带者(杂合子)和受影响的受试者中IDS活性的量(如通过GCC测定测量的)如下表中所示:

表9B:IDS活性的参考值

MPS II-IDS	成纤维细胞	白细胞	血浆
正常的	26-208 nmol/4 h/mg(1)	18-57 nmol/4 h/mg(1)	167-475 nmol/4 h/mL(1)
		31-110 nmol/4 h/mg(4)	155-1082 nmol/4 h/mL(2)
		43 +/- 13.9 nmol/h/mg(5)	122-463 nmol/4 h/mL(4)
		30.5-94 nmol/4 h/mg(6)	147-250 nmol/4 h/mL(6)
			316+/-126 nmol/4 h/mL(8)
携带者		9-54 nmol/4 h/mg(4)	44-202 nmol/4 h/mL(4)
		17.5 +/- 5.7 nmol/h/mg(5)	
		18-35 nmol/4 h/mg(6)	98-159 nmol/4 h/mL(6)
受影响的	0-3.5 nmol/4 h/mg(1)	0-0.7 nmol/4 h/mg(1)	0-1.1 nmol/4 h/mL(1)
		0.9 +/- 0.6 nmol/h/mg(5)	0-15 nmol/4 h/mL(2)
		0-4.3nmol/4 h/mg - 非常减毒型(7)	0-7.46 nmol/4 h/mL-重度(3)
			0.31-8.18 nmol/4 h/mL - 减毒型(3)
			4.15-22.1 nmol/4 h/mL - 减毒型(8)

[0325] 上表中示出的数据来源如下:“(1)”是Voznyi等人(2001) J. Inherit Metab Dis 24(6):675-80;“(2)”Greenwood Genetic Center, internal observations;“(3)”是Lee等人(2015) Clin Biochem 48(18):1350-3;“(4)”是de Camargo Pinto等人(2010) Am J Med Genet A.;“(5)”是Lin等人(2006) Clin Chim Acta 369(1):29-34;“(6)”是Schwartz等人(2009) J Inherit Metab Dis 32(6):732-738;“(7)”是Quaio等人(2012) J Inherit Metab Dis 4:125-8;和“(8)”是Chistiakov等人(2014) J. Genet Genomics 41(4):197-203。

[0326] 据估计,全身性IDS的30%将被细胞内化,并且正常IDS的25%足以校正MPS-II表型(Eliahu等人(1981) Am J Hum Genet 33(4):576-83)。在从“携带者”MPS-II表型分离的白细胞中观察到的活性(参见表9B)是9-54nmol/4h/mL。因此,如果血浆中30%的IDS被内化至细胞中,则导致大约6.5nmol/4h/mg-10nmol/4h/mg的内部细胞浓度的20-30nmol/4h/mL的血浆浓度足以缓解与疾病相关的症状。

[0327] 本文提及的所有专利、专利申请和出版物均通过引用以其整体特此并入。

[0328] 虽然已经出于清晰理解的目的通过说明和实施例详细提供了公开文本,但是本领域技术人员将了解,可以在不背离本公开文本的精神或范围的情况下进行各种改变和修改。因此,前述说明和实施例不应视为限制性的。

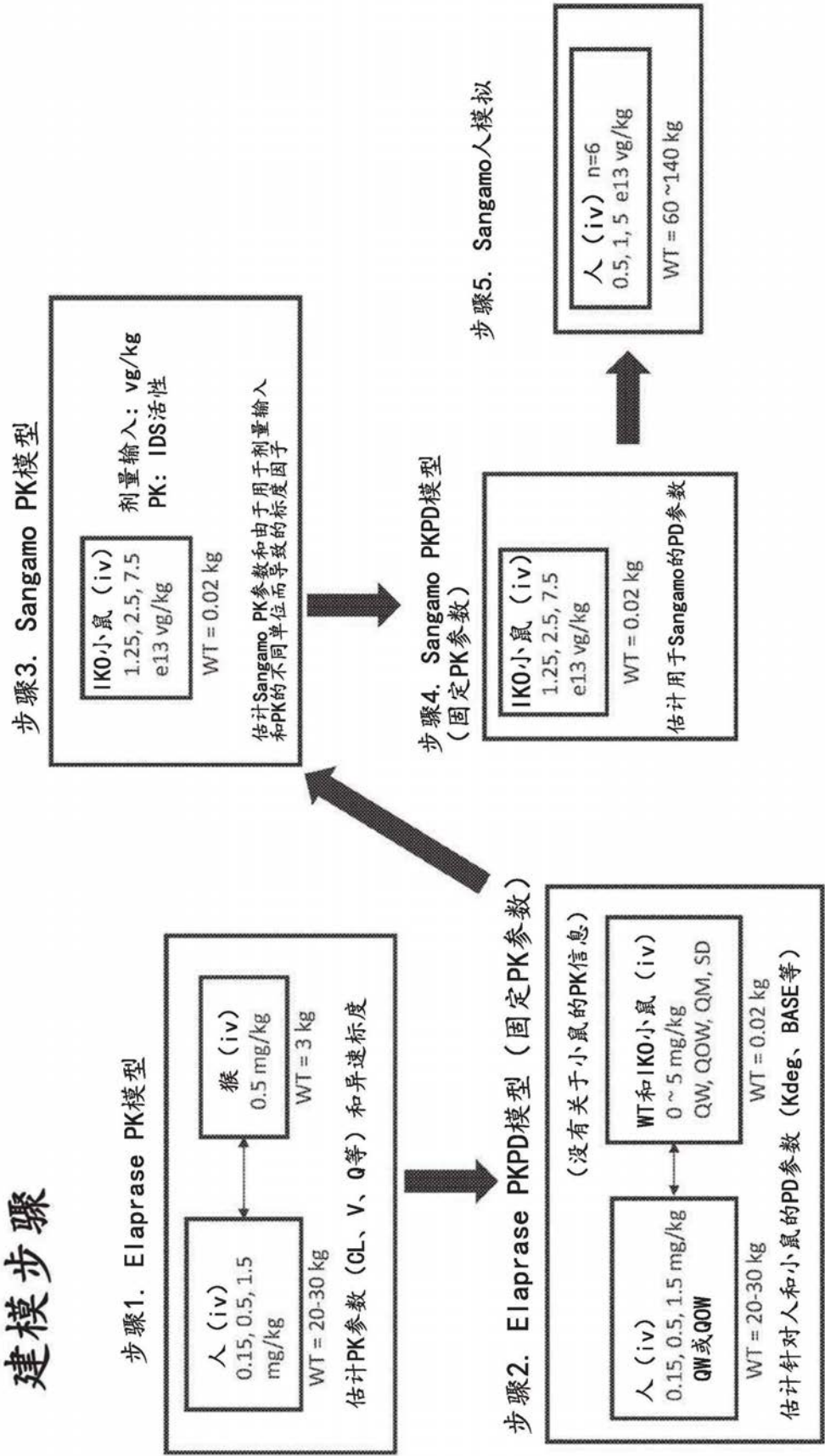


图1

用于将不同物种PK联系起来的异速标度

针对Elaprase PK模型的异速标度
(基于人和猴Elaprase PK数据)

$$CL = CL_{TV} \cdot \left(\frac{WT}{30}\right)^{0.919} \cdot exp(\eta)$$
$$V_1 = V1_{TV} \cdot \left(\frac{WT}{30}\right)^{1.54}$$
$$V_2 = V2_{TV} \cdot \left(\frac{WT}{30}\right)^{1.54}$$

针对Sangamo PK模型的异速标度

由于缺乏物种间PK数据:

1. 使用Elaprase PK估计值 (以上)
2. 使用传统标度 (0.75用于CL, 1用于V)
3. 与Sangamo小鼠PK和PD (GAG) 数据联系起来

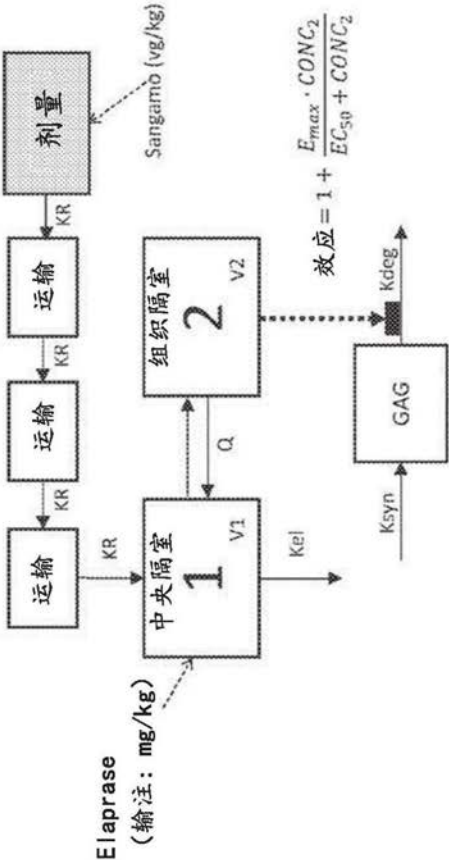


图2

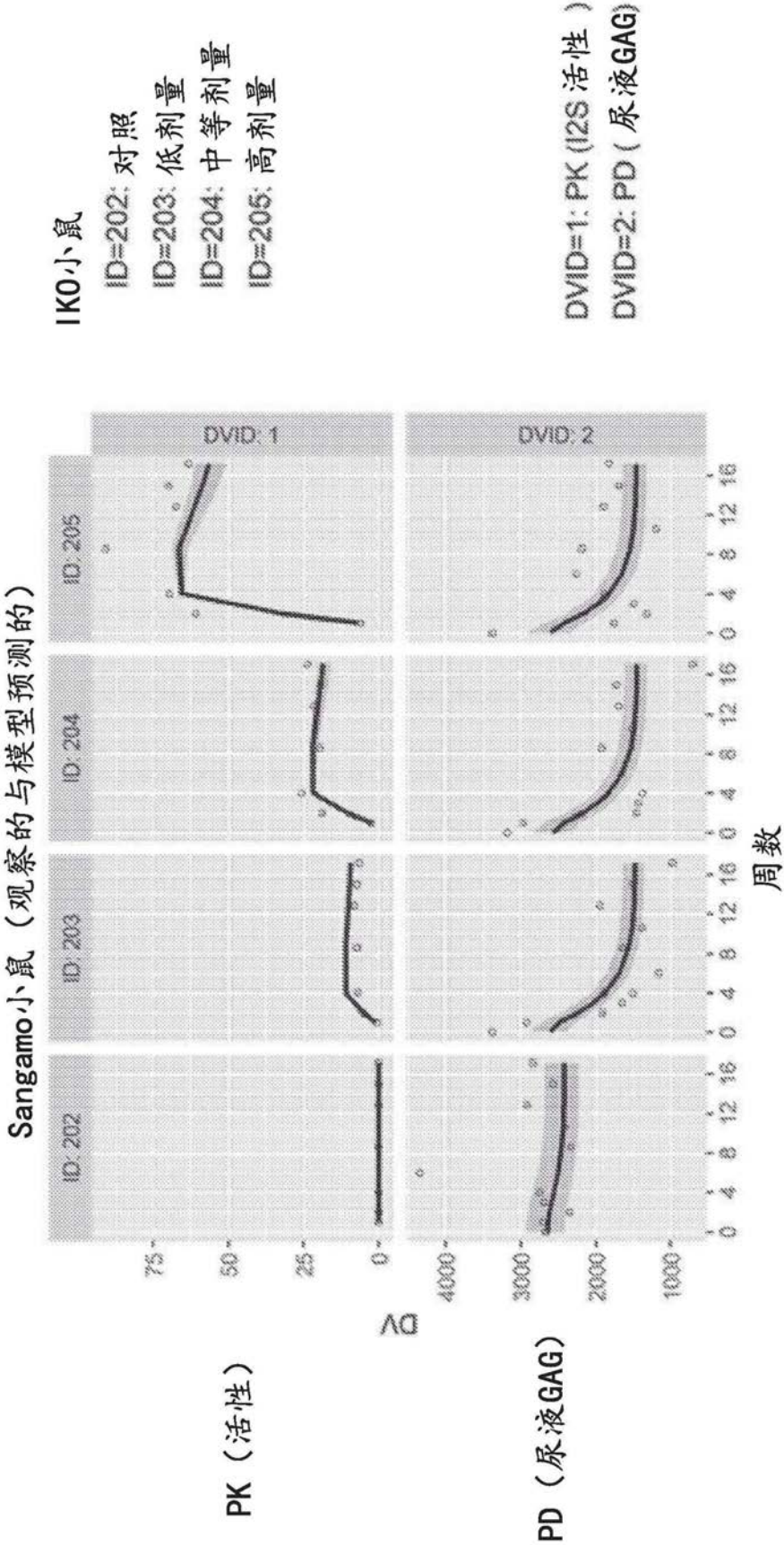


图3

人（基于PK/PD模型）

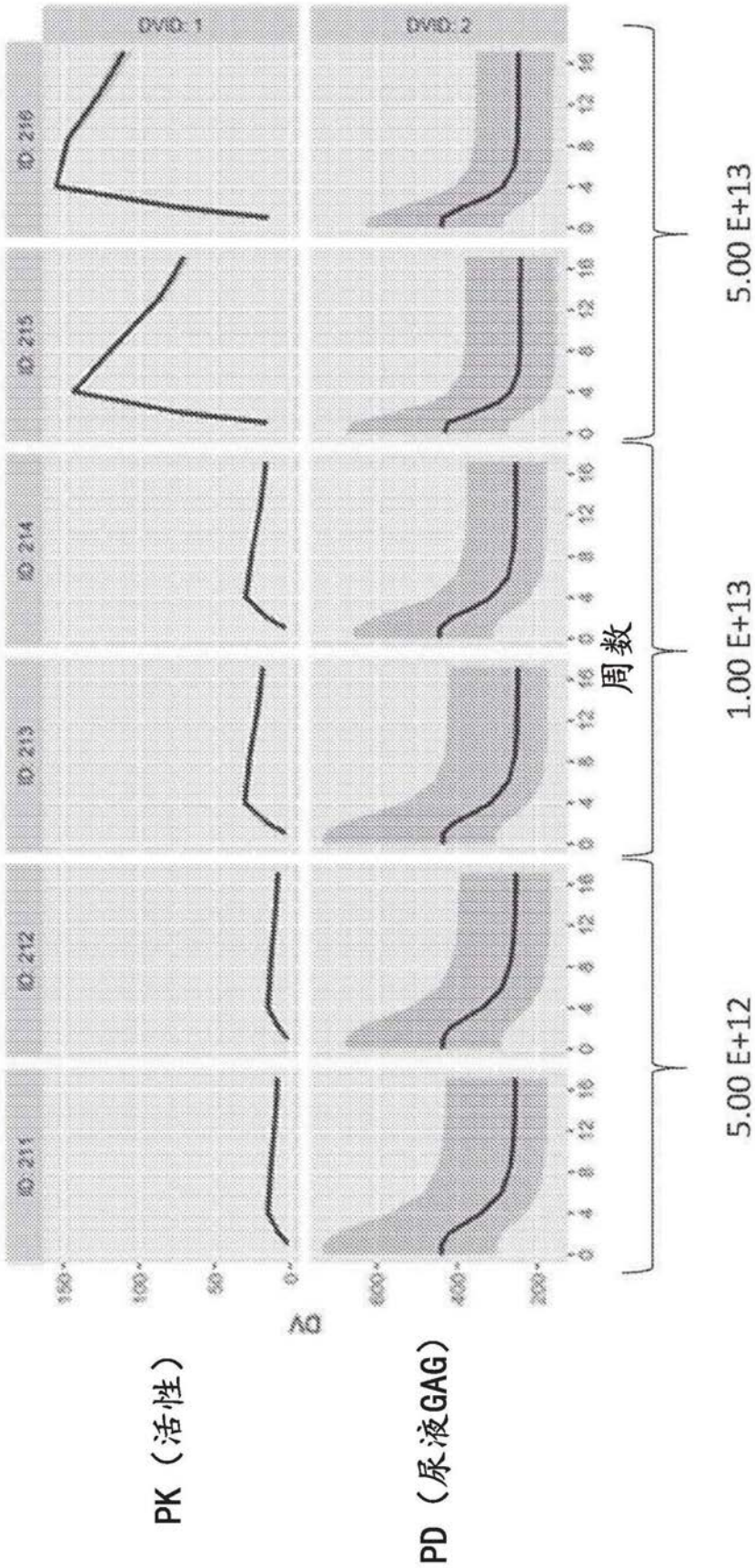


图4

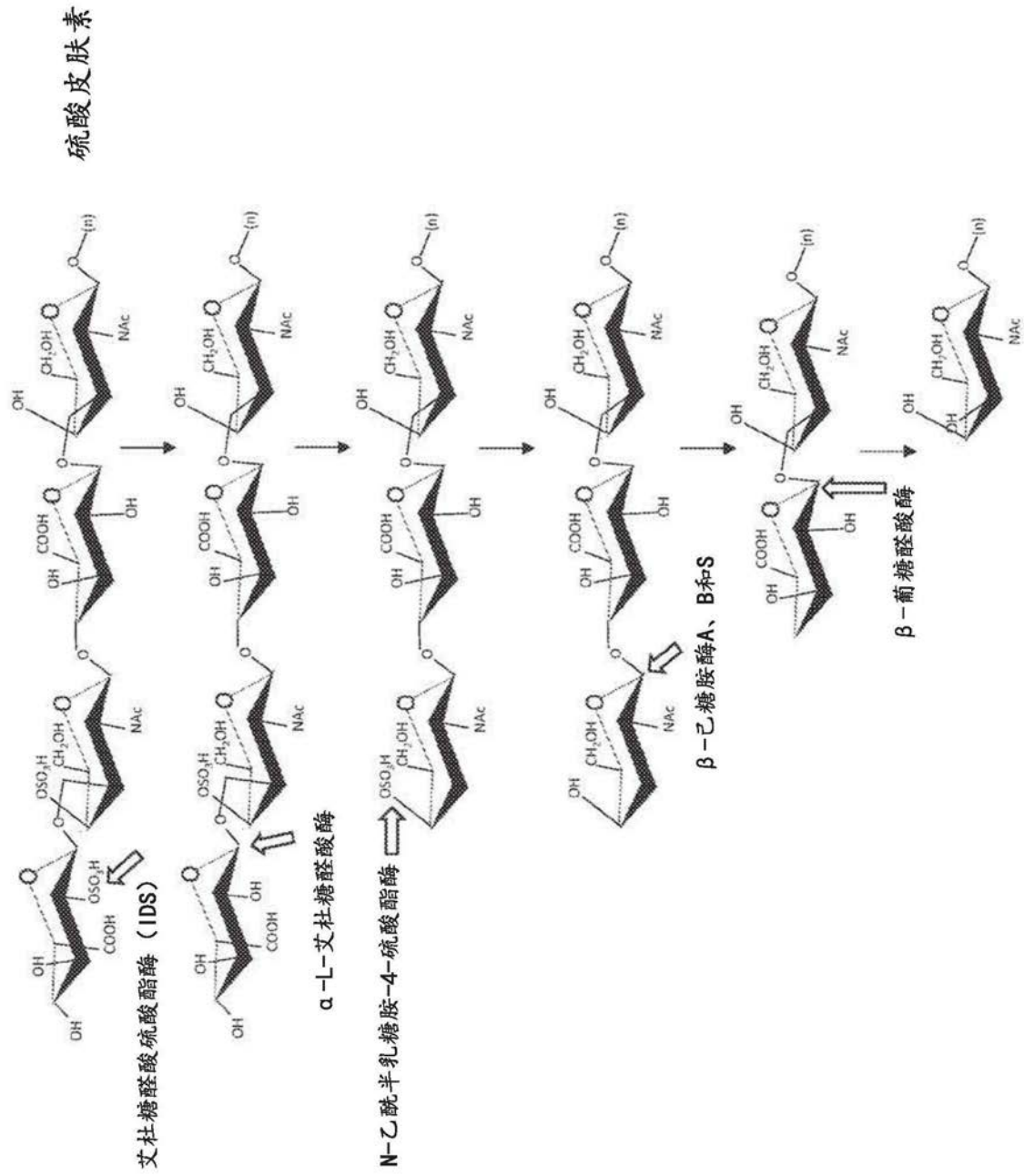


图5A

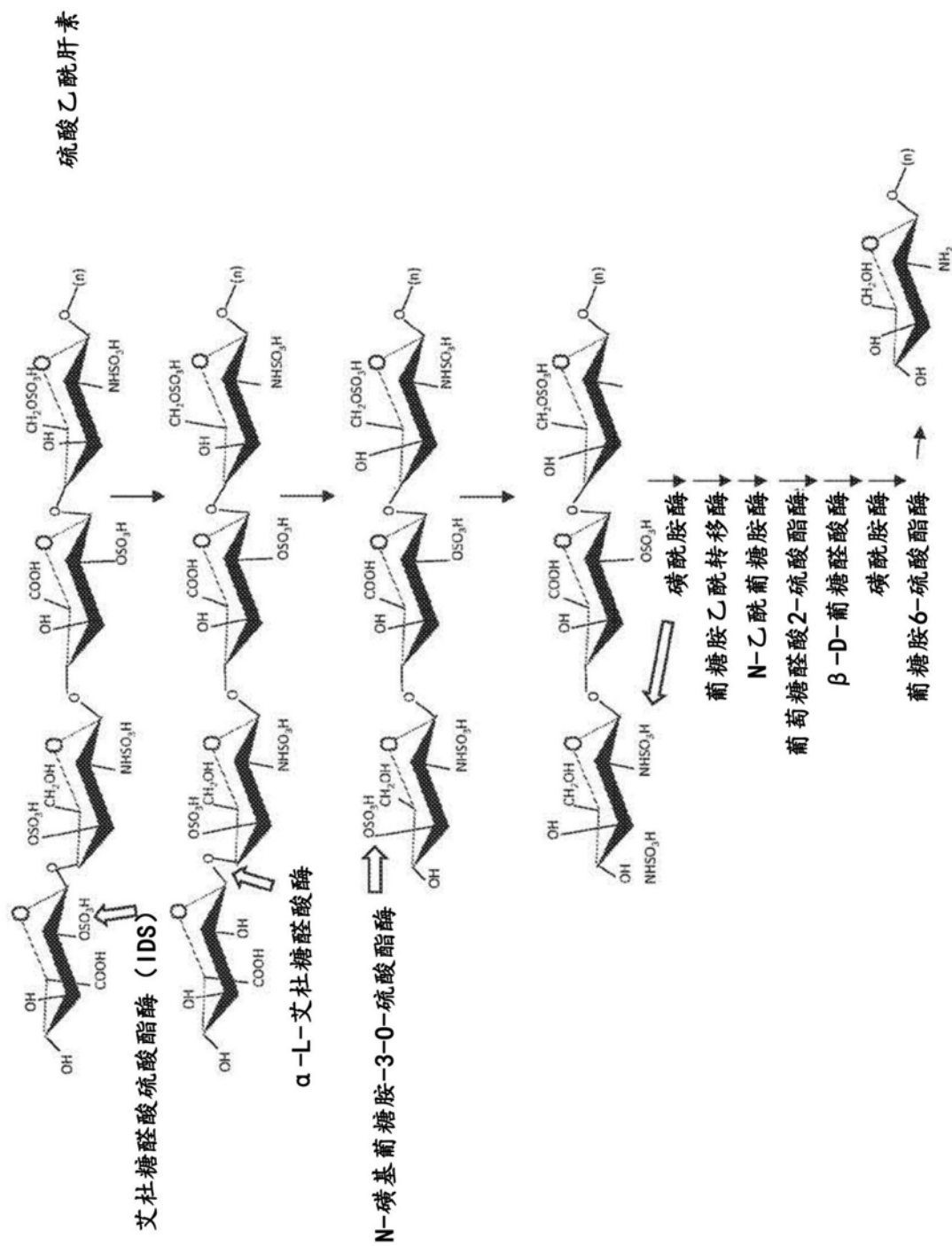
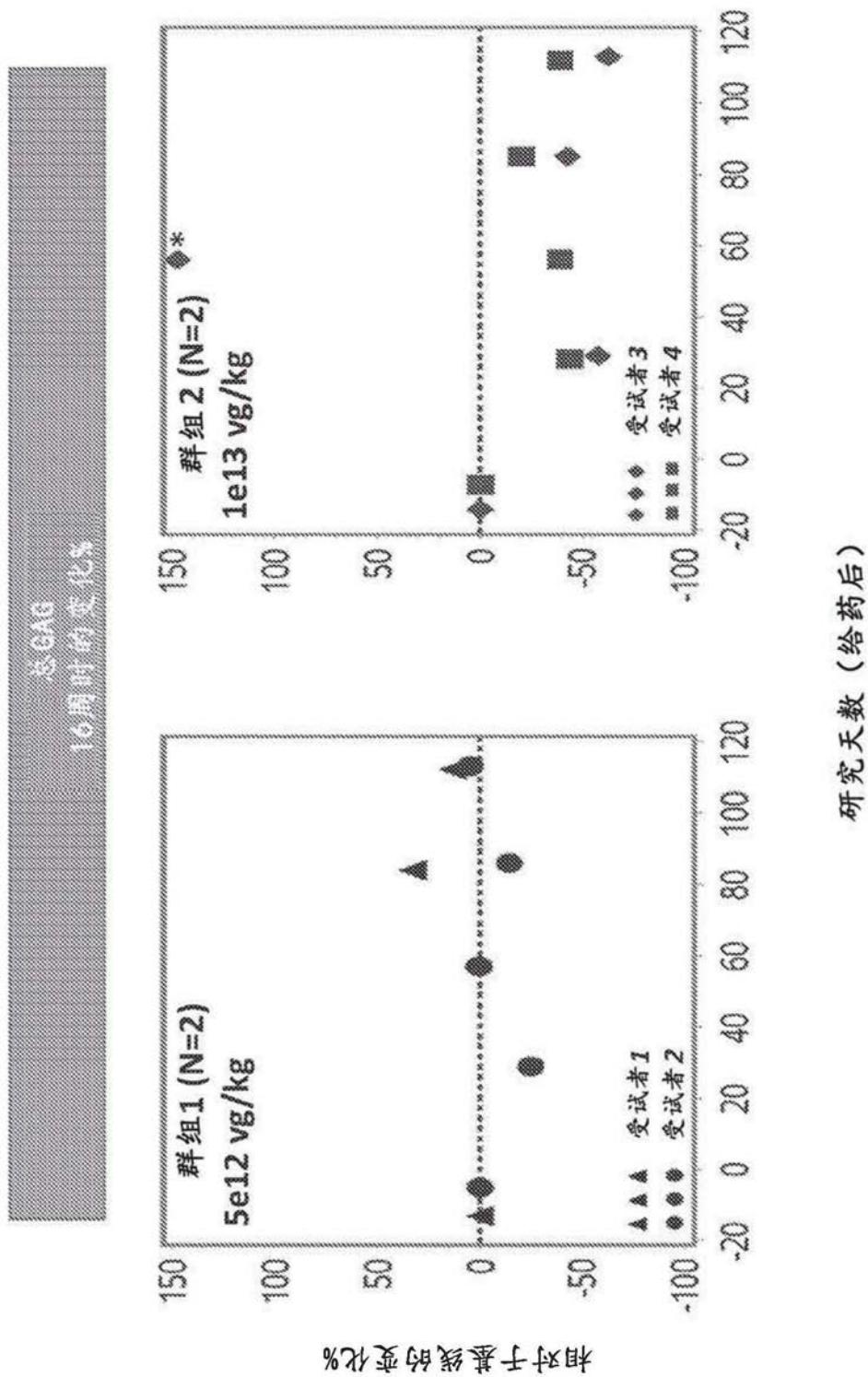
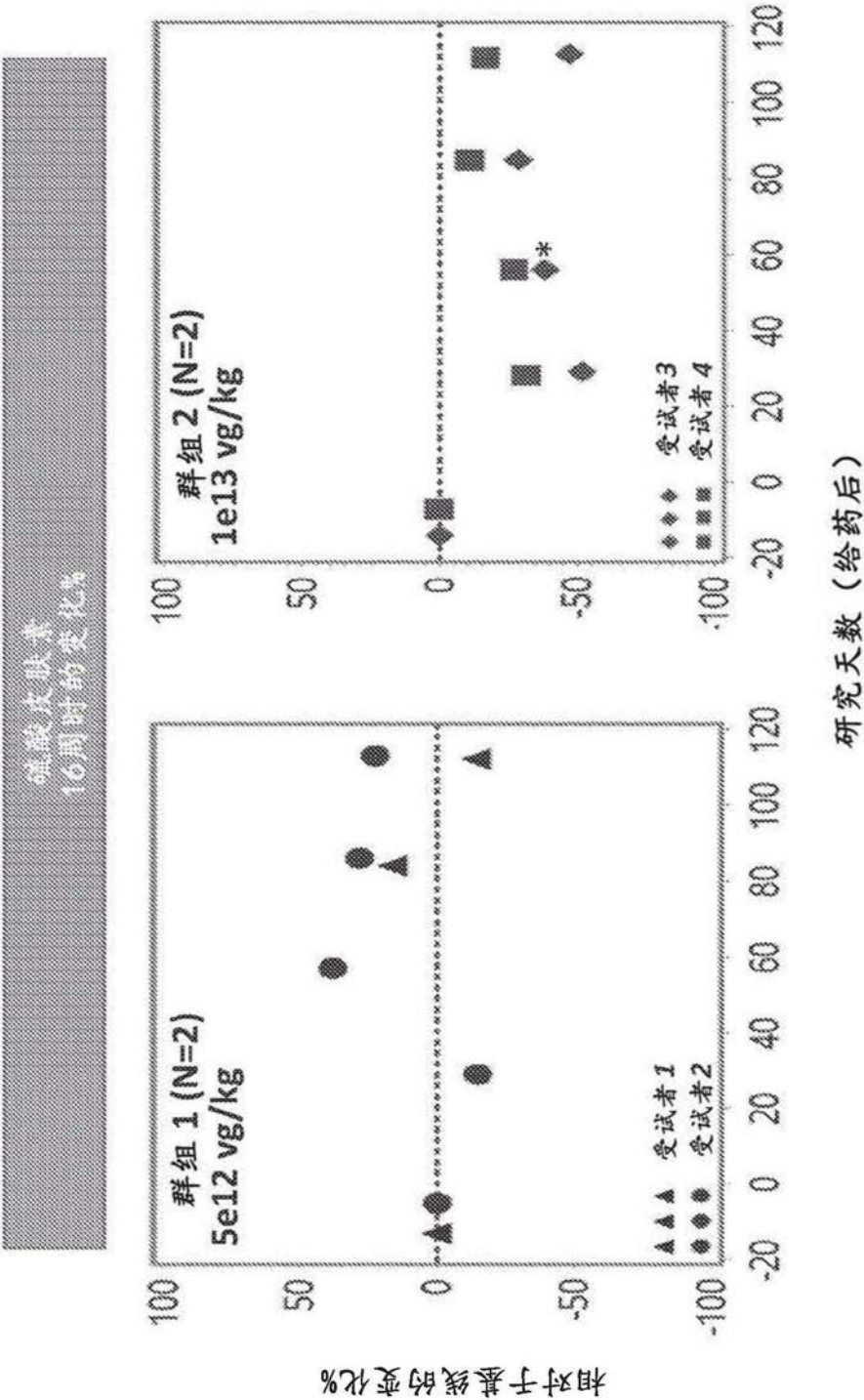


图5B



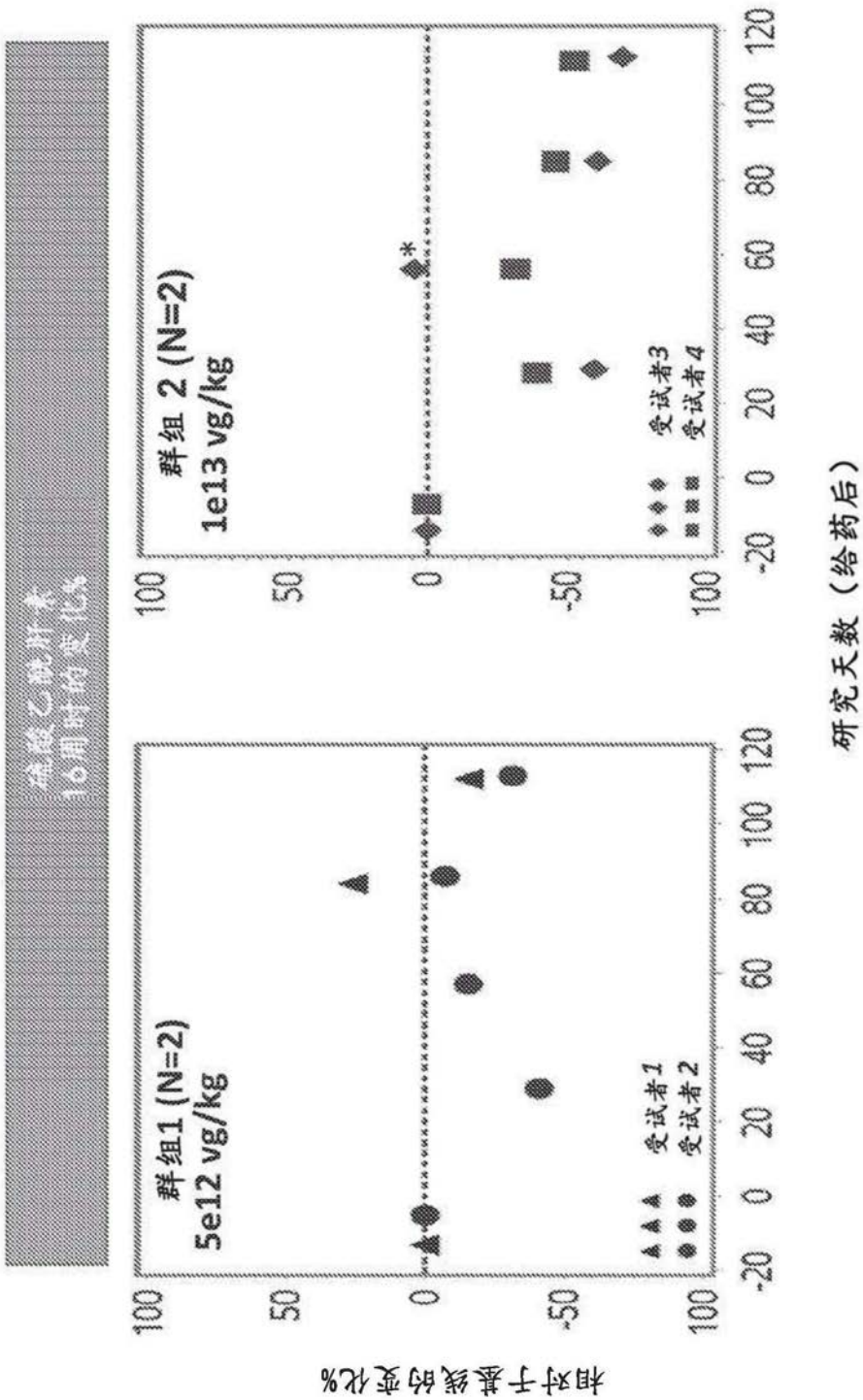
*因心房颤动SAE住院后4天获得的样品，受试者持续若干个小时患低血压

图6A



*因心房颤动SAE住院后4天获得的样品，受试者持续若干个小时患低血压

图6B



* 因心房颤动SAE住院后4天获得的样品，受试者持续若干小时患低血压

图6C

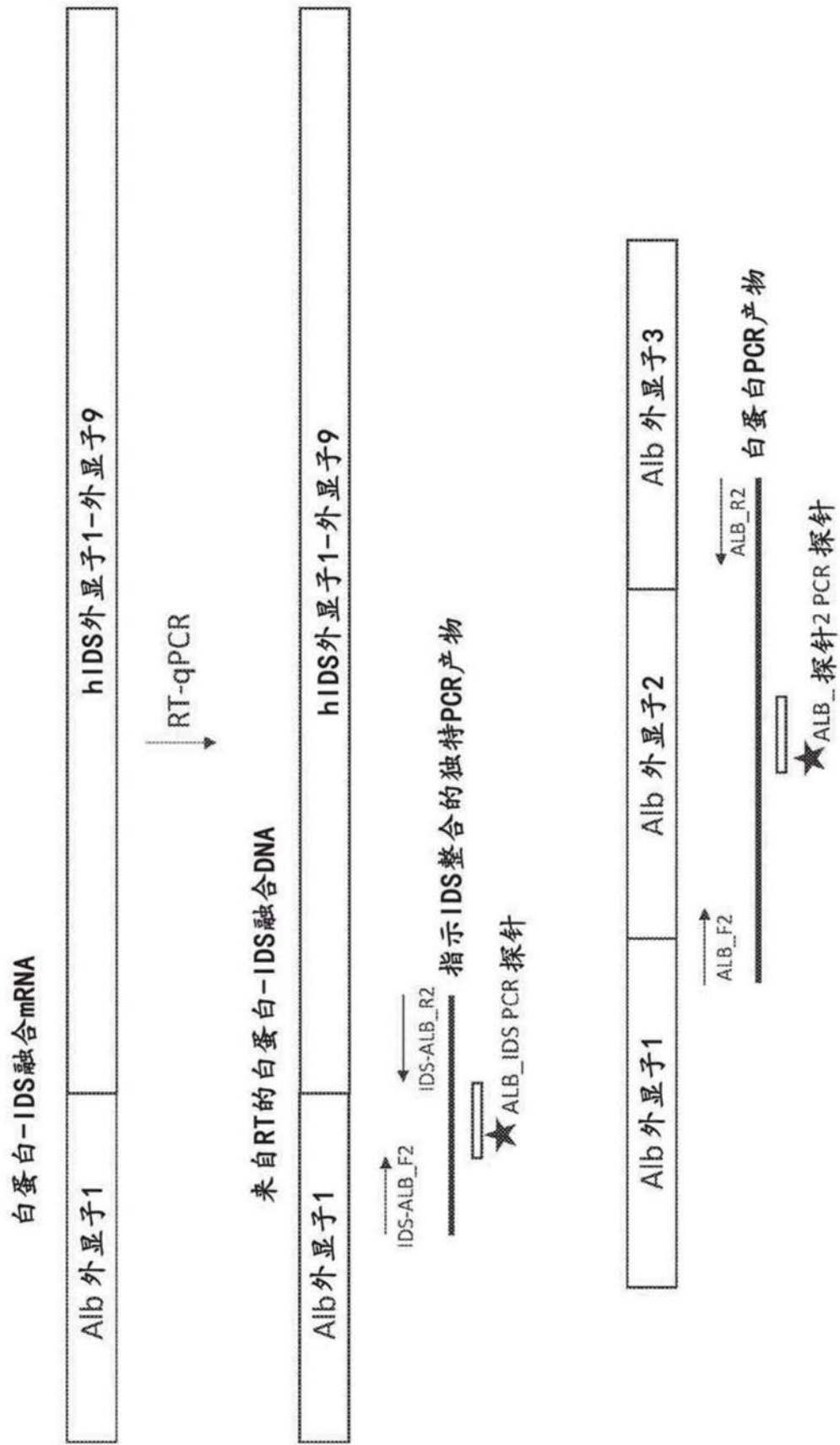


图7

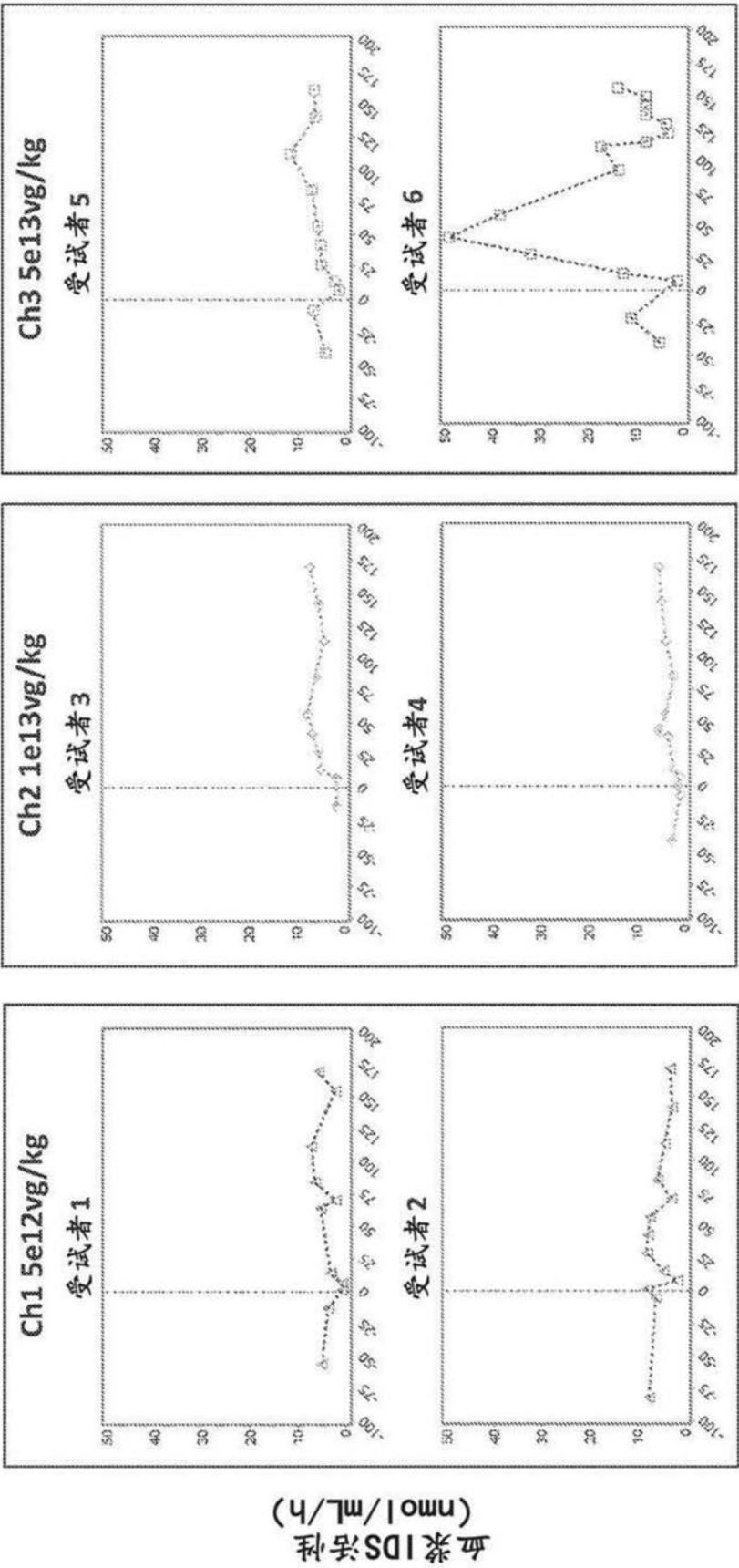


图8

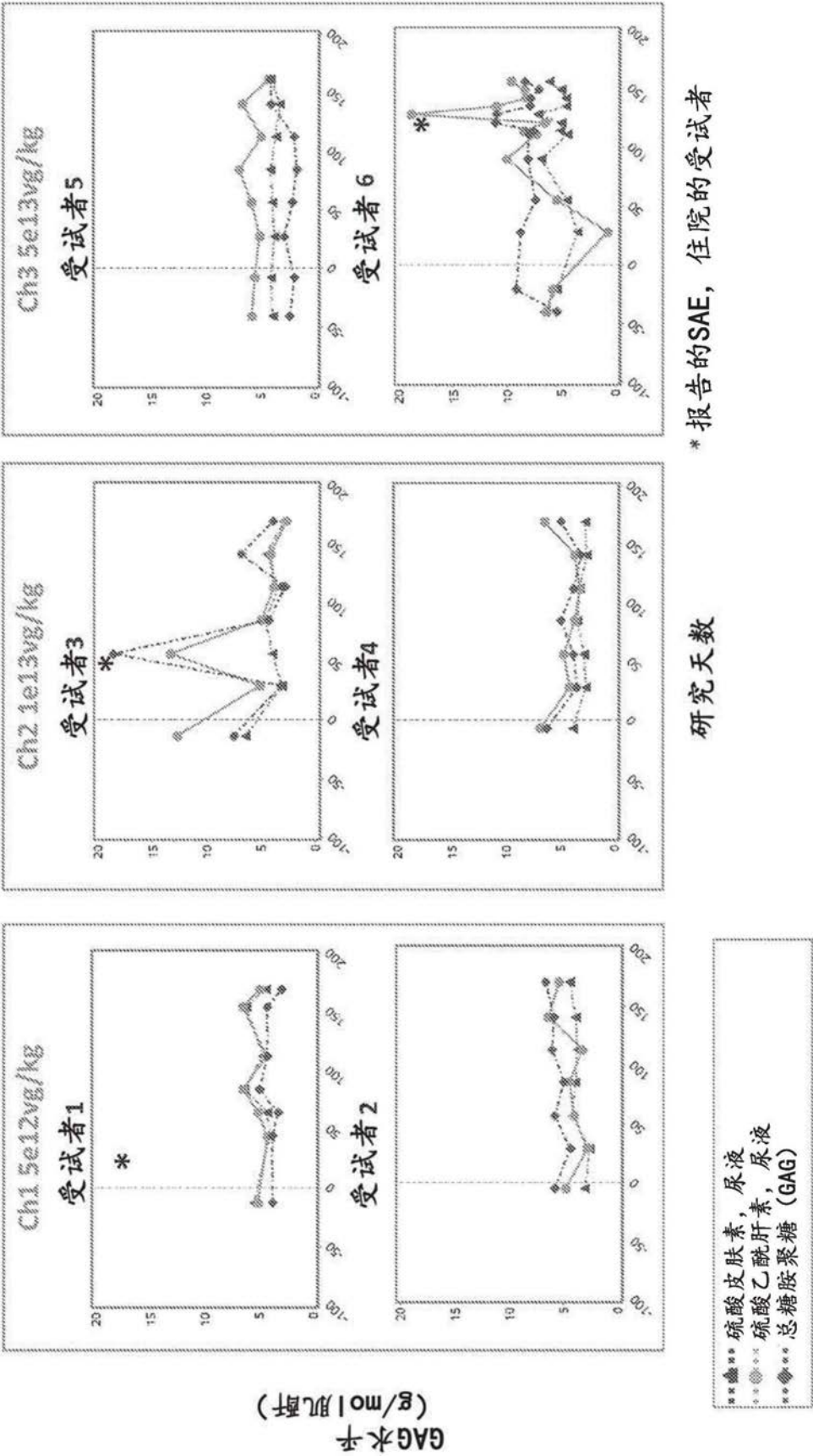


图9

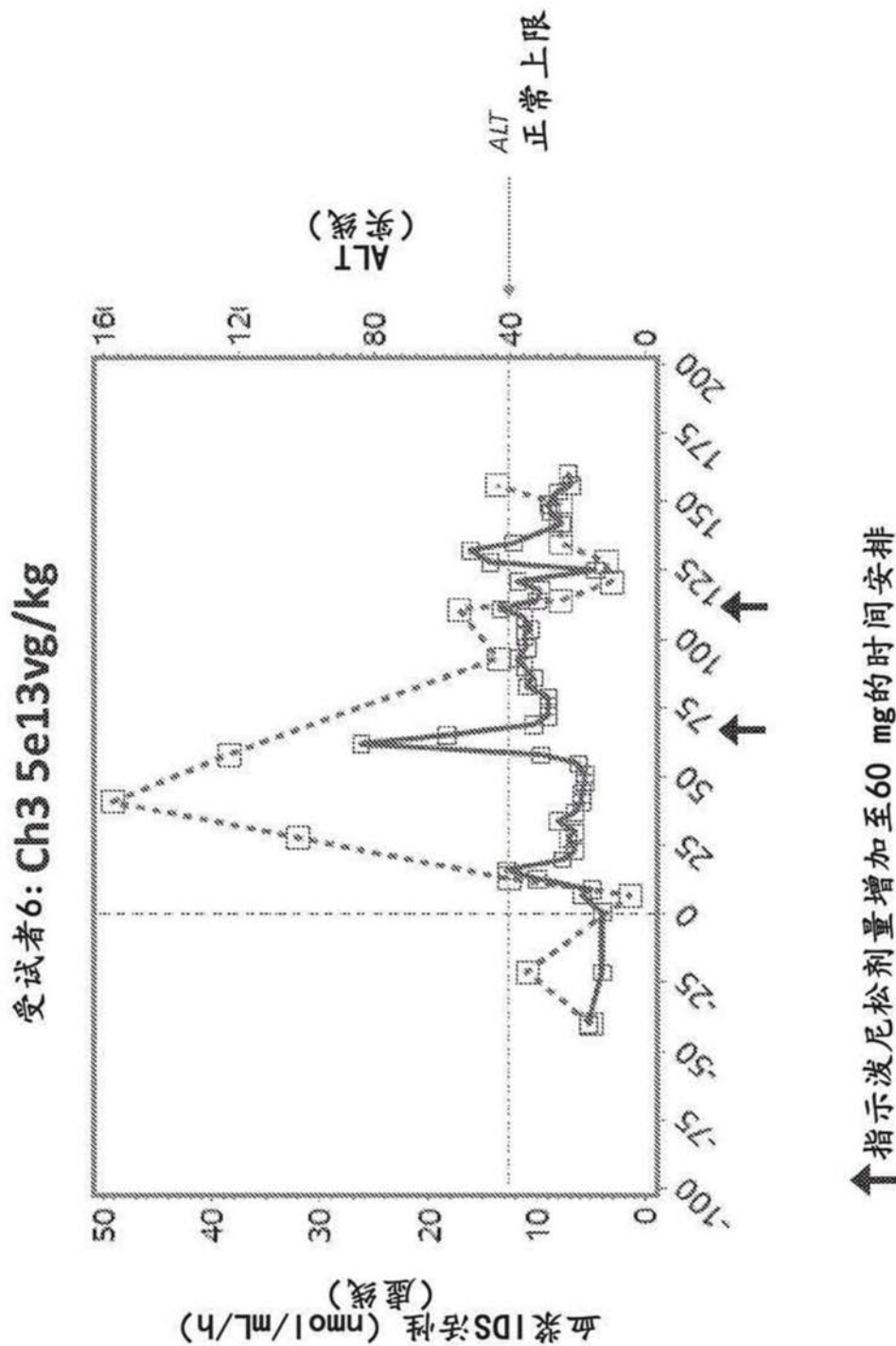


图10