



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115141836 B

(45) 授权公告日 2024.08.27

(21) 申请号 202210744050.5

(22) 申请日 2016.07.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115141836 A

(43) 申请公布日 2022.10.04

(30) 优先权数据
62/247,469 2015.10.28 US
62/307,897 2016.03.14 US
62/315,438 2016.03.30 US
62/326,229 2016.04.22 US
62/355,106 2016.06.27 US

(62) 分案原申请数据
201680067341.8 2016.07.13

(73) 专利权人 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 B·E·赖利 G·K·李

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理师 余颖 陶家蓉

(51) Int.Cl.
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/864 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 115141836 A, 2022.10.04

审查员 李捷

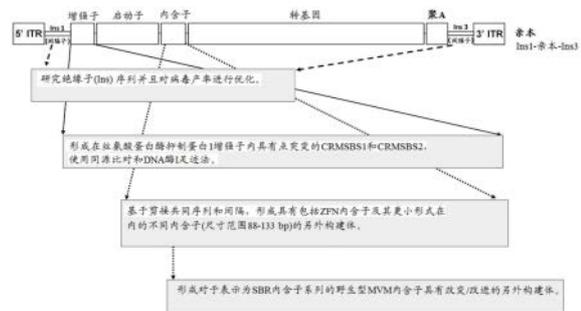
权利要求书1页 说明书43页
序列表13页 附图51页

(54) 发明名称

肝特异性构建体、因子VIII表达盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明是处于基因疗法的领域中,具体地是将编码转基因的构建体靶向递送至肝以用于表达有益的(治疗性)蛋白质。具体地说,本发明涉及血友病诸如甲型血友病的治疗。本发明描述用于在肝细胞中表达转基因的组合物和方法。所述转基因可以在染色体外(以游离基因形式)表达或者可以整合到所述肝细胞的基因组中。在一些实施方案中,所述转基因编码参与凝血级联的蛋白质。在优选的实施方案中,所述转基因编码FVIII多肽。



1. 包含具有序列SEQ ID NO:37的多核苷酸表达构建体的AAV载体在制造用于对有需要的人治疗甲型血友病的药物中的用途。
2. 如权利要求1所述的用途,其中,所述AAV载体具有AAV6衣壳。
3. 如权利要求2所述的用途,其中,所述多核苷酸表达构建体侧接AAV2倒置末端重复序列。
4. 如权利要求1所述的用途,其中,所述AAV载体经由静脉内施用进入人周围静脉。
5. 如权利要求2所述的用途,其中,所述AAV载体经由静脉内施用进入人周围静脉。
6. 如权利要求3所述的用途,其中,所述AAV载体经由静脉内施用进入人周围静脉。

肝特异性构建体、因子VIII表达盒及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年10月28日提交的美国临时专利申请号62/247,469;2016年3月14日提交的美国临时专利申请号62/307,897;2016年4月22日提交的美国临时专利申请号62/326,229;2016年3月30日提交的美国临时专利申请号62/315,438;以及2016年6月27日提交的美国临时专利申请号62/355,106的权益,所述申请特此全部以引用的方式整体并入。

技术领域

[0003] 本公开是处于基因疗法的领域中,具体地是将编码转基因的构建体靶向递送至肝以用于表达有益的(治疗性)蛋白质。具体地说,本公开涉及血友病诸如甲型血友病的治疗。

背景

[0004] 基因疗法可以用于将细胞遗传工程化以具有一个或多个失活基因和/或使得该细胞表达先前该细胞中未产生的产物(例如,经由转基因插入和/或经由校正内源序列)。转基因插入的使用实例包括插入编码一种或多种新型治疗性蛋白质的一种或多种基因、插入编码细胞或个体中缺少的蛋白质的编码序列、在含有突变的基因序列的细胞中插入野生型基因和/或插入编码结构性核酸诸如微小RNA或siRNA的序列。内源基因序列的‘校正’的有用应用的实例包括疾病相关基因突变的改变、编码剪接位点的序列的改变、调控序列的改变和/或编码蛋白质的结构特征的序列的靶向改变。

[0005] 肝基因转移提供将转基因递送至受试者以用于治疗 and/或预防不同病症(包括血友病和溶酶体贮积病)的有效方式。参见,例如,美国专利号9,150,847以及美国公布号20130177983和20140017212。还已描述对肝定向基因疗法具有特异性的载体。参见,例如,WO2014064277;WO 2009130208;EP 2451474B1;Chuah等人,(2014)Molecular Therapy,22,1605-1613;以及Nair等人,(2014)Blood123:3195-3199。这些载体可包括野生型小鼠微小病毒(MVM)内含子序列。参见,例如,Haut和Pintel(1998)J.Virol.72:1834-1843;Haut和Pintel(1998)Virol.258:84-94。

[0006] 在完整哺乳动物中,存在可以调控免疫系统的细胞成员的活化或抑制的复杂机制。例如,树突状细胞(DC)已确立为在免疫活化对比免疫耐受之间的平衡中的重要参与者。它们是免疫系统中最强效的抗原呈递细胞并且将抗原特异性捕获并呈递到原初T细胞。不成熟DC通过特异性受体诸如Toll样受体与潜在抗原相互作用,其中所述抗原通过胞饮现象进入细胞。抗原然后被分解成更小的肽,所述肽通过主要组织相容性复合物呈递至T细胞。另外,成熟DC分泌炎性介质,诸如IL-1 β 、IL-12、IL-6和TNF,所述炎性介质进一步用于活化T细胞。在另一方面,DC也起到使身体对一些抗原耐受以便维持中枢和外周耐受的作用。致耐受性DC(to1DC)在细胞表面上具有少量共刺激信号并且具有减少的以上所述炎性介质的表达。然而,这些to1DC表达大量抗炎性细胞因子像IL-10并且当这些细胞与原初T细胞相互作用时,驱使所述T细胞变成无变应性/调控性T细胞(CD8+Treg)。实际上,已显示此过程

在用这些不成熟/致耐受性DC重复刺激T细胞后有所增强。还已鉴别若干因子,所述因子与to1DC协同作用以诱导不同类型的Treg。例如,原初T细胞与to1DC和HGF、VIP肽、TSLP或维生素D3共同暴露导致对CD4+CD25+Foxp3+Treg的诱导,与TGF- β 或IL-10的共同暴露导致Tr1 Treg并且与糖皮质激素、雷帕霉素、视黄酸共同暴露可以导致CD4+/CD8+Treg (Raker等人(2015)Front Immunol 6:art 569以及Osorio等人(2015)Front Immunol 6:art535)。

[0007] 血友病诸如甲型血友病和乙型血友病是凝血系统的遗传病症,其特征是出血至关节和软组织中以及过量出血至经历创伤或经历手术的任何位点。甲型血友病在临床上与乙型血友病难以分辨,但是因子VIII (FVIII或F8) 在甲型血友病中缺乏或缺少,而因子IX (FIX或F.IX) 在患有乙型血友病的患者中缺乏或缺少。F8基因编码与无活性形式的冯威勒布兰特因子(von Willebrand's factor)相缔合来循环的血浆糖蛋白。在表面损伤后,内在凝血级联启动并且FVIII从复合物中释放并且被活化。活化形式与因子IX一起作用来激活因子X变成活化Xa,最后导致纤维蛋白原改变至纤维蛋白和凝结诱导。参见,Levinson等人(1990)Genomics 7(1):1-11。40%-50%的甲型血友病患者具有涉及F8内含子22的染色体倒位(也称为IVS22)。倒位的原因是F8基因的内含子22中的9.6kb序列与位于F8基因远侧约300kb处的两个密切相关反向序列中的一个之间的染色体内重组事件,导致相对于外显子23至26的外显子1至22倒位。参见,Textbook of Hemophilia, Lee等人(编辑)2005, Blackwell Publishing。其它甲型血友病患者在F8中具有缺陷,包括活性位点突变,和无义和错义突变。

[0008] 在临床上,甲型血友病患者根据患者发生出血发作的频率和那些发作持续的时间长短来评价和分等级。这两种特征直接取决于患者血液中的FVIII蛋白质的量。患有严重血友病的患者通常具有小于1%正常血液水平的FVIII,经历损伤后出血并且常常自发出血到其关节中。中度患者具有1%-5%正常FVIII水平,而轻度患者具有6%或更多正常FVIII并且仅在严重损伤、创伤或手术之后发生出血发作(Kulkarni等人(2009)Haemophilia 15:1281-90)。患有甲型血友病的患者用源自人类血浆或重组产生的替代性FVIII蛋白质治疗,其中治疗的频率取决于出血模式和血友病的严重性。患有严重甲型血友病的患者定期地接受预防性治疗以预防出血发生,而较不严重患者可以仅在损伤后按需要接受治疗。

[0009] 已经描述患有甲型或乙型血友病的患者的基因疗法,其涉及引入编码功能性FVIII或F.IX蛋白质的质粒和其它载体(例如,AAV)。(参见,例如,美国专利号6,936,243;7,238,346和6,200,560;Shi等人(2007)J Thromb Haemost. (2):352-61;Lee等人(2004)Pharm.Res.7:1229-1232;Graham等人(2008)Genet Vaccines Ther.3:6-9;Manno等人(2003)Blood 101(8):2963-72;Manno等人(2006)Nature Medicine 12(3):342-7;Nathwani等人(2011)Mol Ther 19(5):876-85;Nathwani等人(2011);N Engl J Med.365(25):2357-65以及McIntosh等人(2013)Blood121(17):3335-44)。然而,在这些方案中,形成抑制性抗-因子VIII或IX(抗-FVIII或抗-F.IX)抗体和针对递送媒介物的抗体仍然是血友病的基于FVIII和F.IX替换的疗法的主要并发症。参见,例如,Scott&Lozier(2012)Br J Haematol.156(3):295-302。

[0010] 然而,仍然需要驱动一种或多种转基因(包括编码血友病中缺少的一种或多种蛋白质的转基因)在肝细胞中高水平表达的肝特异性多核苷酸(表达盒和转录模块)。

[0011] 概要

[0012] 本发明描述用于在肝细胞中表达转基因的组合物和方法。所述转基因可以在染色体外(以游离基因形式)表达或者可以整合到肝细胞的基因组中(例如,经由核酸酶介导的靶向整合,例如整合到白细胞基因座中)。在一些实施方案中,所述转基因编码参与凝血级联的蛋白质。在优选的实施方案中,所述转基因编码FVIII多肽。本文所述的组合物和方法在体外和体内引起高水平的蛋白质产生,包括在足以在体内显示临床上相关(治疗性)作用的水平下。

[0013] 在一方面,本文描述一种多核苷酸表达构建体,所述构建体包含含有绝缘子序列的至少一个间隔子序列、肝特异性增强子序列(例如,野生型或突变的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子序列)、启动子序列(例如,野生型或突变的甲状腺素运载蛋白(TTR)启动子)以及转基因(例如,核酸酶和/或治疗性蛋白质,诸如血友病或溶酶体贮积病中缺少和/或缺乏的蛋白质)。在某些实施方案中,多核苷酸表达构建体还包含内含子序列(例如,野生型或突变的小鼠微小病毒(MVM)内含子序列)。在某些实施方案中,多核苷酸表达盒包含侧接肝特异性增强子序列、启动子序列、内含子序列和转基因以及任选地多腺苷酸化信号的两个间隔子序列。可以使用任何绝缘子序列,包括但不限于任何野生型或突变的绝缘子序列(例如,任何组合的SEQ ID NO:28、29、30和/或38中的一个或多个)。在某些实施方案中,多核苷酸表达构建体包含表示为CRMSBS1(SEQ ID NO:37)或CRMSBS2(SEQ ID NO:34)的多核苷酸。

[0014] 在另一方面,本文描述一种多核苷酸表达构建体,所述构建体包含肝特异性增强子序列(例如,野生型或突变的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子序列)、启动子序列(例如,野生型或突变的甲状腺素运载蛋白(TTR)启动子)、如SEQ ID NO:15、16或17中任一者所示出的内含子序列以及转基因(例如,核酸酶和/或治疗性蛋白质,诸如血友病或溶酶体贮积病中缺少和/或缺乏的蛋白质)。在某些实施方案中,所述多核苷酸表达盒还包含含有绝缘子序列的至少一个间隔子序列和/或多腺苷酸化信号。

[0015] 在又一方面,本文描述一种多核苷酸表达构建体,所述构建体包含在SEQ ID NO:1-13中任一者的位置1、5、14、32和/或39处具有突变的肝特异性增强子序列(例如,如SEQ ID NO:35或36所示)、启动子序列(例如,野生型或突变的甲状腺素运载蛋白(TTR)启动子)以及转基因(例如,核酸酶和/或治疗性蛋白质,诸如血友病或溶酶体贮积病中缺少和/或缺乏的蛋白质)。在某些实施方案中,多核苷酸表达构建体还包含内含子序列(例如,野生型或突变的小鼠微小病毒(MVM)内含子序列)和/或包含绝缘子序列的至少一个间隔子序列和/或多腺苷酸化信号。

[0016] 换言之,提供一种包含本文所述的多核苷酸表达构建体中的任一种的AAV载体(例如,其中多核苷酸表达构建体是在AAV载体的5'与3'倒置末端重复(ITR)之间)。

[0017] 在其它方面,本文提供药物组合物,所述药物组合物包含一种或多种AAV载体和/或一种或多种如本文所述的多核苷酸表达构建体。

[0018] 还提供用于向有需要的受试者提供蛋白质的方法,所述方法包括向所述受试者、向所述受试者的肝施用如本文所述的多核苷酸表达构建体、AAV载体或药物组合物,其中所述转基因编码所述蛋白质并且所述蛋白质是在所述受试者中产生。在某些实施方案中,转基因被整合到受试者肝细胞的基因组中。任选地,所述方法还包括向所述受试者施用一种或多种核酸酶,其中所述核酸酶裂解内源白蛋白基因并且所述转基因被整合到所述内源白蛋白基因中。还提供遗传修饰细胞以包括转基因(例如,产生蛋白质)的方法,包括将转基因

引入到细胞中(以游离基因形式或整合,包括核酸酶介导的靶向整合)的方法。还提供诱导哺乳动物中对治疗性蛋白质的耐受性的方法,所述方法包括如本文所述地遗传修饰受试者中的细胞(例如,已被修饰以产生如本文所述的蛋白质)以及用一种或多种类固醇和/或B细胞抑制剂治疗,使得哺乳动物变得对治疗性蛋白质耐受。

[0019] 在一方面,本文描述一种多核苷酸表达构建体,所述构建体包含增强子序列(例如,野生型或突变的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子)、启动子序列(例如,甲状腺素运载蛋白最小启动子(TTRm)启动子)和转基因、以及任选地多腺苷酸化序列(例如,合成的多腺苷酸化序列(SPA)和/或信号肽(SP)。在某些实施方案中,表达构建体还包含内含子序列(例如,野生型MVM或突变的MVM序列和/或嵌合内含子)。在某些实施方案中,表达构建体在5'至3'取向中包含增强子序列、启动子序列、内含子序列、转基因(任选地包含信号肽)以及多腺苷酸化信号。

[0020] 表达盒可以被包含在任何病毒或非病毒载体中,所述载体包括但不限于质粒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体以及腺相关载体(AAV)。在一个优选的实施方案中,表达构建体在AAV构建体上携带并且还包含侧接如本文所述的表达构建体的5'和3' ITR。任选地,绝缘子(间隔子)分子被包含在表达构建体的组分中的一种或多种之间,例如在5' ITR与增强子之间和/或在多腺苷酸化信号与3' ITR之间。在一些实施方案中,绝缘子(间隔子)区域包含促进靶向整合的同源臂。在某些实施方案中,构建体是如图1、2、4、6、7、10、19、20或25中任一者所示的构建体。两种示例性构建体示出在SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:37中。清楚的是,个别组分(启动子、绝缘子、增强子、转基因)可以与如本文所述的其它组分的任何组合来组合。

[0021] 在本文所述的任何多核苷酸中,所述增强子可以源自丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子。在某些实施方案中,所述增强子是野生型序列。在其它实施方案中,所述增强子与野生型相比包含一种或多种修饰,例如含有以下各项的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子:如图5所示的一种或多种核苷酸修饰、在SEQ ID NO:1-13中任一者所示的序列的残基1、5、14、32和/或39中的一个或多个处的核苷酸修饰。在某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子包含在SEQ ID NO:1-13中任一者的位置1、5、14和32处的修饰,而在其它实施方案中,丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子包含在SEQ ID NO:1-13中任一者的位置1、14、32和39处的修饰。示例性增强子序列示出在SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36中。在一些实施方案中,本文所述的多核苷酸包含1、2、3、4、5或更多个增强子元件。在一些实施方案中,1、2、3、4、5或更多增强子元件是相同的,在其它实施方案中,使用超过一种类型的增强子元件。

[0022] 本文所述的任何多核苷酸还可任选地包含内含子序列。在某些实施方案中,表达构建体包含嵌合内含子序列,例如,如图6和7的底部图中所示的。T-嵌合内含子是pCI-neo(GenBank U47120)中的嵌合内含子的截短版本。pCI-neo中的嵌合内含子是来自人类 β -球蛋白基因的5'剪接供体位点以及免疫球蛋白基因重链可变区的分支点和3'受体位点。T-嵌合内含子含有5'剪接供体与分支点之间的45bp缺失。在其它实施方案中,表达构建体包含突变的MVM内含子序列(例如,图12、13和14中所示的突变中的一种或多种(SEQ ID NO:15-17)。可替代地,如本文所述的表达构建体可能缺乏内含子序列,例如,如图6、7、19和20的中间图所描绘的构建体中所示出的。

[0023] 本发明的表达构建体还可包含AAV ITR与表达盒之间的优化的绝缘子序列。在某

些实施方案中,表达构建体包含绝缘子(间隔子)区域(例如,Ins1和Ins3,(分别为)SEQ ID NO 15或28和SEQ ID NO:17或30,以及Ins2(SEQ ID NO:16或29)。在某些实施方案中,表达构建体包含Ins4(SEQ ID NO:38)。任何绝缘子序列可以用于5'或3'位置中,并且绝缘子序列的任何组合可以用于表达载体内。在5'位置处的Ins1和在3'位置处的Ins3的组合是特别优选的。

[0024] 如本文所述的表达构建体还包含并表达一种或多种转基因。任何转基因可以使用本文所述的多核苷酸表达,所述多核苷酸包括但不限于编码任何遗传疾病中缺少或缺乏的蛋白质的功能版本的转基因,所述遗传疾病包括但不限于溶酶体贮积病(例如,戈谢氏(Gaucher's)、法布里氏(Fabry's)、亨特氏(Hunter's)、贺勒氏(Hurler's)、奈曼-皮克氏(Neimann-Pick's)、苯丙酮尿症(PKU)等)、代谢病症、和/或血液病症诸如血友病和血红蛋白病等。参见,例如,美国公开号20140017212和20140093913;美国专利号9,255,250和9,175,280。可如本文所述地表达的蛋白质的非限制性实例包括纤维蛋白原、凝血素、组织因子、因子V、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子XI、因子XII(Hageman因子)、因子XIII(血纤蛋白稳定因子)、冯威勒布兰特氏因子、激肽释放酶原、高分子量激肽原(菲茨杰拉德因子(Fitzgerald factor))、纤连蛋白、抗凝血酶III、肝素辅因子II、蛋白质C、蛋白质S、蛋白质Z、蛋白质Z相关蛋白酶抑制剂、血纤维蛋白溶酶原、 α 2-抗纤维蛋白溶酶、组织纤溶酶原激活物、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂-1、纤溶酶原激活物抑制剂-2、葡糖脑苷脂酶(GBA)、 α -半乳糖苷酶A(GLA)、艾杜糖醛酸硫酸酯酶(IDS)、艾杜糖醛酸酶(IDUA)、酸性鞘磷脂酶(SMPD1)、MMAA、MMAB、MMACHC、MMADHC(C2orf25)、MTRR、LMBRD1、MTR、丙酰基-CoA羧化酶(PCC)(PCCA和/或PCCB亚基)、葡萄糖-6-磷酸转运体(G6PT)蛋白质或葡萄糖-6-磷酸酶(G6P酶)、LDL受体(LDLR)、ApoB、LDLRAP-1、PCSK9线粒体蛋白诸如NAGS(N-乙酰谷氨酸合成酶)、CPS1(氨甲酰磷酸合成酶I)、以及OTC(鸟氨酸转氨甲酰酶)、ASS(精氨基琥珀酸合成酶)、ASL(精氨基琥珀酸裂解酶)和/或ARG1(精氨酸酶)、和/或溶质载体家族25(SLC25A13、天冬氨酸/谷氨酸载体)蛋白、UGT1A1或UDP葡萄糖醛酸基转移酶多肽A1、延胡索酰乙酰乙酸酯水解酶(FAH)、丙氨酸-乙醛酸转氨酶(AGXT)蛋白、乙醛酸还原酶/羟基丙酮酸还原酶(GRHPR)蛋白、转甲状腺素蛋白基因(TTR)蛋白、ATP7B蛋白、苯丙氨酸羟化酶(PAH)蛋白、脂蛋白裂解酶(LPL)蛋白、工程化核酸酶、工程化转录因子和/或工程化单链可变片段抗体(双抗体、骆驼抗体等)。在一个优选的实施方案中,所述转基因编码FVIII多肽。在一些实施方案中,FVIII多肽包含B结构域的缺失。

[0025] 在一些实施方案中,一种或多种转基因包含编码工程化核酸酶(例如,ZFN、TALEN、TtAgo和CRISPR/Cas系统)的序列。在其它实施方案中,转基因包含编码工程化转录因子(例如,ZFP-TF、TALE-TF、CRISPR/Cas-TF系统)的序列。转基因也可包含编码对目标靶标具有特异性的单链抗体的序列。另外,转基因可包含编码结构性RNA(例如,RNAi、shRNA、miRNA)的序列。

[0026] 在某些方面,如本文所述的多核苷酸被引入到细胞中,使得它们以游离基因形式维持同时驱动转基因表达。在其它方面,表达构建体被随机整合到它们所引入的细胞的基因组中。在其它方面,驱动转基因表达的表达构建体通过核酸酶介导的靶向整合被整合到基因组中。

[0027] 在其它方面,本文描述用于在肝细胞中表达一种或多种转基因的方法,所述方法

包括将如本文所述的一种或多种表达构建体引入到所述细胞中,使得所述转基因在所述细胞中表达。在某些实施方案中,表达构建体在病毒或非病毒载体,优选地AAV载体(例如AAV2或AAV2/6)上携带。

[0028] 在另一方面,本文提供一种在活动物中表达一种或多种转基因的方法,所述方法包括向所述活动物施用如本文所述的一种或多种表达盒。在某些实施方案中,向活动物的肝施用所述表达盒。在某些实施方案中,表达构建体在病毒或非病毒载体,优选地AAV载体(例如AAV2、AAV2/6或AAV2/8)上携带。

[0029] 在一些实施方案中,本文提供由一种或多种转基因表达治疗相关水平的一种或多种治疗性蛋白质的方法和组合物。在某些实施方案中,编码替代性蛋白质的转基因构建体的表达导致产生正常水平的1%的蛋白质,而在其它实施方案中,产生正常水平的2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、50%、80%、100%、150%、200%、或更多的蛋白质。在一些优选的实施方案中,转基因编码FVIII蛋白质并且产生治疗相关量的所述蛋白质。在一些实施方案中,由于使用本发明的方法和组合物,人类患者在其血液中具有增加量的治疗性蛋白质,这使得临床症状减少。在某些方面,在人类患者中通过本文所述的方法和组合物产生治疗性蛋白质使得与未治疗的患者相比或者与治疗之前的患者相比损伤后的凝血时间降低。在某些方面,用本发明的方法和组合物治疗的人类患者需要比未治疗的患者或与治疗之前的患者相比减少量的替代性疗法。

[0030] 在一些实施方案中,如本文所述的本发明的方法和组合物可以用于诱导哺乳动物中对治疗性蛋白质的耐受性,使得通过转基因编码的治疗性蛋白质的水平在抗治疗性蛋白质抗体短暂升高之后保持在治疗相关性水平下。因此,本文提供一种诱导受试者中对治疗性蛋白质的耐受性的方法,所述方法包括使用如本文所述的方法遗传修饰受试者中的细胞(例如,使得所述细胞产生治疗性蛋白质)、任选地用另外组合物(例如,类固醇和/或B细胞抑制剂)治疗受试者使得所述动物变得对治疗性蛋白质耐受。在某些实施方案中,在用免疫抑制性类固醇或B-细胞抑制剂治疗的同时将治疗性蛋白质插入(整合)到受体细胞中,而在其它情况下,未向动物施用免疫调节性物质。在某些情况下,只要生成抗治疗性蛋白质抗体,就施用免疫调节剂。在某些情况下,在一个时间段之后停用免疫调节剂。

[0031] 在另一方面,提供包含本文所述的细胞、表达构建体和/或任选核酸酶中的一种或多种的药物组合物。

[0032] 在某些方面,本文描述用于靶向整合肝特异性表达盒的方法和系统。所述方法和系统包括向细胞施用如本文所述的一种或多种表达盒和施用对靶基因有特异性的一种或多种核酸酶。在对靶基因进行核酸酶介导的裂解之后,经由同源物依赖性 or 同源物独立性机制将表达盒整合到基因中。在某些实施方案中,靶基因为内源白蛋白基因。

[0033] 为了对本发明的表达构建体进行核酸酶介导的靶向整合,可以使用任何核酸酶,包括但不限于一种或多种锌指核酸酶(ZFN)、TALEN、CRISPR/Cas核酸酶和/或TtAgo核酸酶,使得表达构建体被整合到通过所述核酸酶裂解的区域(基因)中。在某些实施方案中,采用一对或多对核酸酶。所述核酸酶可以mRNA形式引入或者可使用非病毒或病毒载体施用至细胞。在某些方面,核酸酶多核苷酸可通过慢病毒或通过非整合慢病毒递送。在某些方面,表达盒可通过AAV和/或DNA寡聚物递送。

[0034] 在另一方面,本文提供用于提供在哺乳动物或灵长类动物,诸如人灵长类动物,诸

如患有疾病(例如,代谢性疾病、溶酶体贮积病(LSD)、血红蛋白病和/或血友病)的人类患者中缺少或缺乏的一种或多种功能性蛋白质的方法,例如用于通过供应在受试者中缺少或缺乏的蛋白质来治疗疾病的方法。在另一方面,本文提供用于提供治疗性蛋白质以治疗其中缺少、缺乏或异常表达所述蛋白质的病症的方法。在其它实施方案中,所述方法包括施用编码适用于预防或治疗病症的治疗性蛋白质的表达盒。在另一方面,本文描述用于提供治疗性蛋白质以用于治疗病症的方法,其中所述治疗性蛋白质是单链抗体。在某些实施方案中,所述方法包括向有需要的受试者的肝施用如本文所述的表达盒(例如,AAV载体)。在其它实施方案中,所述方法包括将修饰的细胞(由所述表达盒表达在受试者中异常表达的功能形式蛋白质)施用至受试者。因此,分离的细胞可引入受试者中(离体细胞疗法)或细胞可在它是受试者的一部分(在体内)时加以修饰。

[0035] 在所描述的任何组合物和方法中,表达盒和/或核酸酶可在AAV载体上携带,所述载体包括但不限于AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9和AAVrh10或假型AAV诸如AAV2/8、AAV8.2、AAV2/5和AAV2/6等。在某些实施方案中,多核苷酸(表达构建体和/或核酸酶)使用相同AAV载体类型来递送。在其它实施方案中,多核苷酸使用不同AAV载体类型来递送。可使用一种或多种载体来递送多核苷酸。在某些实施方案中,多核苷酸经由静脉内(例如,门静脉内)施用来递送至完整动物的肝。在其它实施方案中,多核苷酸经由在周围静脉内的静脉内施用来递送。

[0036] 在本文描述的任何组合物和方法中,由转基因编码的蛋白质可包括F8蛋白质,例如B-域缺失因子VIII(BDD-F8)。在其它实施方案中,由转基因编码的蛋白质包括因子IX蛋白质。在其它实施方案中,由转基因编码的蛋白质包括因子VII蛋白质。在其它实施方案中,由转基因编码的蛋白质包括因子X蛋白质。在一些实施方案中,由转基因编码的蛋白质包括葡糖脑苷脂酶。在其它实施方案中,由转基因编码的蛋白质包括 α 半乳糖苷酶。在其它实施方案中,由转基因编码的蛋白质包括艾杜糖酸酯-2-硫酸酯酶。在一些实施方案中,由转基因编码的蛋白质包括 α -L艾杜糖苷酸酶。在其它实施方案中,由转基因编码的蛋白质包括鞘磷脂磷酸二酯酶。在一些实施方案中,所述转基因编码单链抗体。在其它实施方案中,所述转基因编码结构性RNA。在本文描述的任何组合物或方法中,转基因还包括转录调控因子,而在其它组合物或方法中,它不包括转录调控因子并且转录通过内源调控因子来调控。在另一方面,本发明方法包括用于治疗性治疗有需要的受试者的组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含工程化干细胞,其包含安全港特异性核酸酶和编码因子VII、F8、F. IX、因子X、GBA、GLA、IDS、IDUA、单链抗体和/或SMPD1蛋白质或其功能片段和/或截断形式的转基因。在其它实施方案中,所述组合物包含工程化干细胞,其已经修饰并且表达编码因子VII、F8、F. IX、因子X、GBA、GLA、IDS、IDUA、单链抗体和/或SMPD1蛋白质或其功能片段和/或截断形式的转基因。

[0037] 本文所述方法可以在体外、离体或体内实施。在某些实施方案中,将组合物引入活的完整哺乳动物中。在递送时,哺乳动物可在任何发育阶段,例如,胚胎、胎儿、新生儿、婴儿、幼年或成年。另外,靶向细胞可为健康或患病细胞。在某些实施方案中,将组合物中的一种或多种静脉内递送(例如,经由门静脉内到达肝,例如尾静脉注射)、动脉内、腹膜内、肌肉内、进入肝实质(例如,经由注射)、进入肝动脉(例如,经由注射),和/或经由胆道系统(例如,经由注射)。

[0038] 为了将组合物靶向至具体类型细胞,例如血小板、成纤维细胞、肝细胞等,施用的组合物中的一种或多种可与特异性结合至细胞表面受体的归巢剂相关联。举例来说,载体可偶联至配体(例如,半乳糖),某些肝系统细胞具有针对所述配体的受体。偶联可为共价的,例如交联剂诸如戊二醛,或为非共价的,例如抗生物素化配体结合至生物素化载体。另一种形式的共价偶联通过将用于制备载体原料的AAV辅助质粒工程化来提供以使得所编码的外壳蛋白中的一种或多种是原生AAV外壳蛋白和肽或蛋白质配体的混合物,从而使配体暴露于病毒颗粒的表面上。

[0039] 还提供一种试剂盒,其包含本文所述的表达构建体、AAV载体、细胞和/或药物组合物中的一种或多种。所述试剂盒还可包含编码核酸酶的核酸(例如,编码ZFN、TALEN或Cas和修饰的Cas蛋白质的RNA分子和指导RNA)、或等分试样的核酸酶蛋白质、细胞、用于执行本发明的方法的说明书等。

[0040] 这些和其它方面鉴于总体公开内容易于为本领域技术人员显而易见。

[0041] 附图描述

[0042] 图1是示出转基因盒元件和鉴别改进的增强子和内含子所采取的步骤的示意图。

[0043] 图2是描绘亲本TTRm启动子和具有绝缘子1-3(“Ins1-3”)的HLP构建体的示意图。SerpE是指来自SERPINA1基因的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白增强子,所述增强子是肝特异性丝氨酸蛋白酶抑制蛋白调控元件。TTRm是指甲状腺素运载蛋白最小启动子。HLP是指杂合肝特异性启动子(McIntosh等人,同上)。hFVIII是指人类因子VIII B-结构域缺失转基因。SP是指信号肽。ITR是指倒置末端重复。SPA是指合成的多腺苷酸化序列。

[0044] 图3是描绘包含不同绝缘子序列或启动子序列的不同AAV构建体的产率的曲线图。在图中看出与在亲本TTRm启动子或HLP构建体背景下的Ins1-Ins2相比改进的来自Ins1-Ins3的产率。在HEK293细胞中产生病毒,产率来自两种细胞工厂(2CF)。SerpE是指来自SERPINA1基因的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白增强子,所述增强子是肝特异性丝氨酸蛋白酶抑制蛋白调控元件。TTRm是指甲状腺素运载蛋白最小启动子。HLP是指杂合肝特异性启动子(McIntosh等人,同上)。hFVIII是指人类因子VIII B-结构域缺失转基因。SP是指信号肽。ITR是指倒置末端重复。SPA是指合成的多腺苷酸化序列。

[0045] 图4是描绘亲本构建体和具有指示为CRMSBS1和CRMSBS2的新增强子的构建体的示意图,所述增强携带人类因子VIII B-构建体缺失的(因子VIII-BDD)转基因。“SerpE”是指来自SERPINA1基因的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白增强子,所述增强子是肝特异性丝氨酸蛋白酶抑制蛋白调控元件。“TTRm”是指甲状腺素运载蛋白最小启动子。“SBS”是指加莫生物科技公司(Sangamo Biosciences)内部数值参考。“hFVIII”是指人类因子VIII BDD转基因。“SP”是指信号肽。“ITR”是指倒置末端重复。“SPA”是指合成的多腺苷酸化序列。“Ins1”和“Ins3”是如以上图2所述的。

[0046] 图5(SEQ ID NO:1至13)示出使用多种物种的SERPINA1基因的ENCODE比对来自不同物种的SERPINA1基因的比对。相同残基未示出(由“.”表示)。指代1至5的加框区域是对序列的修饰位点。中间图中的黑条也示出了HepG2细胞中的DNA酶I敏感性区域。CRMSBS1包含在加框位置1、2、3和4处的改变并且CRMSBS2包含在加框位置1、3、4和5处的改变。“CRM”是指顺式调控性模块。“SBS1/2”是指构建体1和2的加莫生物科技公司内部数值参考。浅灰色加框区域是省略的SERPINA1基因的序列。

[0047] 图6是描绘CRMSBS1、以及源自不具有MVM内含子(CRMSBS1无内含子)或具有截短嵌合内含子(CRMSBS1 T嵌合内含子)的CRMSBS1的2个构建体的示意图,每个构建体包含因子VIII BDD转基因。“CRM”是指顺式调控性元件。“SBS”是指加莫生物科技公司内部数值参考。“hFVIII”是指人类因子VIII BDD。“SP”是指信号肽。“ITR”是指倒置末端重复。“SPA”是指合成的多腺苷酸化序列。“Ins1”和“Ins3”是如以上图2所述的。

[0048] 图7是描绘CRMSBS2、以及源自不具有MVM内含子(CRMSBS2无内含子)或具有截短嵌合内含子(CRMSBS2 T嵌合内含子)的CRMSBS2的2个构建体的示意图,每个构建体包含因子VIII BDD转基因。“CRM”是指顺式调控性元件。“SBS”是指加莫生物科技公司内部数值参考。“hFVIII”是指人类因子VIII BDD。“SP”是指信号肽。“ITR”是指倒置末端重复。“SPA”是指合成的多腺苷酸化序列。“Ins1”和“Ins3”是如以上图2所述的。

[0049] 图8A和8B是示出在向小鼠施用所指示的构建体之后人类分泌因子VIII BDD的体内产生的曲线图。将C57BL/6小鼠用 $6E+12\text{vg/kg}$ AAV2/6hFVIII-BDD构建体转导。图8A示出在施用之后第7天分泌的hFVIII-BDD水平并且图8B示出在28天研究的持续时间内分泌的hFVIII-BDD水平。每张曲线图的左侧y-轴示出 ng/mL 并且右侧y-轴示出正常百分比,其中 $1U = 100\%$ 正常值 $= 200\text{ng/mL}$ 。***表示 $p > .001$, *表示 $p > .05$ 。各组内每个单独的形状表示来自单一动物的结果。

[0050] 图9A和9B描绘在如图7所述地施用载体之后F8-BDD cDNA的肝特异性表达。图9A示出从所指示组织(大脑、心脏、肾脏、肺、肝、脾、睾丸)分析的人类因子VIII-BDD(hFVIII) mRNA水平。正如所示,由亲本F8-BDD cDNA构建体(空心符号)或CRMSBS2无内含子(实心符号),仅检测肝中的hFVIII-BDD mRNA而不检测其它组织中。图9B示出来自图9A中所描绘的相同组织的载体基因组(VG)生物分布。血清型AAV2/6主要转导肝。

[0051] 图10是描绘构建体CRMSBS2和另外构建体(指示为CRMSBS2SBR内含子1、2或3)的示意图。所有构建体均包含人类因子VIII BDD转基因。“CRM”是指顺式调控性元件。“SBS”是指内部加莫生物科技公司内部数值参考。“hFVIII”是指人类因子VIII BDD转基因。“SP”是指信号肽。“ITR”是指倒置末端重复。“SPA”是指合成的多腺苷酸化序列。“MVM”是指MVM内含子序列。

[0052] 图11是描绘小鼠内含子(“WT MVM”)的野生型微小病毒的示意图,所述内含子包含部分序列(SEQ ID NO:14)和供体和受体的位置。“D1”和“D2”分别是指供体1和2。“A1”和“A2”分别是指受体1和2。“IES”是指内含子增强子序列。还参见,Haut和Pintel(1998) J.Virology72:1834-1843以及Haut和Pintel(1998) Virology J.,258:84-94。

[0053] 图12(SEQ ID NO:15)示出对用于本文所述的构建体中的SBR内含子1中的野生型MVM内含子做出的改变的综述。将改变以灰色加框并且包括:对潜在分支点受体1(PBPA1)的微小突变;突变的受体位点1多嘧啶序列,A1PPT(-);突变的受体位点1,A1(-);改进的潜在分支点受体位点2,PBPA2(+);加强的受体位点2多嘧啶序列,A2PPT(+ ,8T),通过添加更多胸苷(T)获得;改进的受体位点2,A2(+)

[0054] 图13(SEQ ID NO:16)示出对用于如本文所述的构建体中的SBR内含子2中的野生型MVM内含子做出的改变的综述。改变以灰色加框并且包括:对潜在分支点受体1(PBPA1)的微小突变;突变的受体位点1多嘧啶序列,A1PPT(-);突变的受体位点1,A1(-);加强的受体位点2多嘧啶序列,A2PPT(+ ,8T),通过添加更多胸苷(T)获得;改进的受体位点2,A2(+)

[0055] 图14(SEQ ID NO:17)示出对用于如本文所述的构建体中的SBR内含子3中的野生型MVM内含子做出的改变的综述。将改变以灰色加框并且包括:G富集内含子增强子序列的突变,IES ko;对潜在分支点受体1(PBPA1)的微小突变;突变的受体位点1多嘧啶序列,A1PPT(-);突变的受体位点1,A1(-);加强的受体位点2多嘧啶序列,A2PPT(+,9T),通过添加更多胸苷(T)获得;改进的受体位点2,A2(+)

[0056] 图15A和15B描绘在具有新型内含子序列的小鼠中缺失的人类分泌的因子VIII B结构域的体内产生。图15具有描绘从小鼠中缺失的所分泌人类因子VIII(hFVIII)B-结构域的水平水平的曲线图,所述水平被表示为ng/mL(左侧-y轴)或正常值百分比(右侧y轴),1U=100%正常值=200ng/mL。将C57BL/6小鼠用如x轴上表示的 $6E+12$ vg/kg AAV2/6hFVIII构建体转导。图15A示出在第7天所分泌的hFVIII水平。图15B示出在28天研究的持续时间内分泌的峰值hFVIII水平。数值表示所述组的平均hFVIII正常值百分比水平。

[0057] 图16A和16B显示FVIII-BDD cDNA的表达是肝特异性的。图16A是示出编码人类因子VIII(hFVIII)的mRNA值的曲线图,所述值在图15表示的研究中从组织(大脑、心脏、肾脏、肺、肝、脾、睾丸)中分析。由亲本F8 cDNA构建体(空心符号)或CRMSBS2 SBR内含子3(实心符号),仅检测肝中的hFVIII mRNA而不检测其它组织中。图16B示出来自图16A中所分析的不同组织的载体基因组(VG)生物分布。血清型AAV2/6主要转导肝,如先前所公布的。

[0058] 图17A和17B描绘在甲型血友病小鼠血浆中酶促活性的人类因子VIII-BDD的超生理水平。图17具有描绘从甲型血友病R593C小鼠中缺失的酶促活性的分泌的人类因子VIII(hFVIII)B-结构域的水平水平的曲线图,所述水平表示为正常值百分比,1U=100%正常值。将甲型血友病敲除小鼠R593C用如x轴上表示的约 $7E+12$ vg/kg AAV2/6hFVIII-BDD构建体转导。图17A示出在第14天所分泌的hFVIII活性水平。图17B示出在第42天所分泌的hFVIII活性水平。数值表示所述组的平均hFVIII正常值百分比水平。

[0059] 图18是示出用F8 CRMSBS2 SBR内含子3cDNA治疗的甲型血友病R593C小鼠中的出血时间的曲线图。结果表明在尾静脉横断之后在血友病小鼠中实现止血的时间量显著减少($p<0.0001$)。

[0060] 图19是描绘CRMSBS1以及不具有MVM内含子或具有嵌合内含子连同因子VIII B-结构域缺失的转基因和Ins1-Ins3的新示例性构建体的示意图。CRM是指顺式调控性元件。SBS是指加莫生物科技公司。hFVIII是指人类因子VIII。SP是指信号肽。ITR是指倒置末端重复。SPA是指合成的多腺苷酸化序列。“Ins1”和“Ins3”是如以上图2所述的。

[0061] 图20是描绘CRMSBS2以及不具有MVM内含子、具有嵌合内含子或具有SBR内含子3连同因子VIII B-结构域缺失的转基因和Ins1-Ins3的新示例性构建体的示意图。CRM是指顺式调控性元件。SBS是指加莫生物科技公司。hFVIII是指人类因子VIII。SP是指信号肽。ITR是指倒置末端重复。SPA是指合成的多腺苷酸化序列。“Ins1”和“Ins3”是如以上图2所述的。

[0062] 图21是描绘在HepG2细胞中通过体外AAV F8 cDNA表达对hFVIII水平和活性进行的评价的曲线图。在24孔皿中将AAV2/6F8cDNA(CRMSBS2 SBR内含子3)以每 $1E+05$ 个细胞 $4.8E+06$ 、 $2.4E+06$ 、 $1.2E+06$ 和 $0.6E+06$ 个病毒基因组的剂量添加到HepG2细胞中(表示为时间t0天)。在添加AAV2/6病毒之后七天(t7)通过ELISA分析上清液的所分泌的hFVIII水平(最左侧条)并且通过APTT凝血测定(最右侧条)和显色活性测定(中间条)分析其活性。结果表明在所分泌的hFVIII水平与活性之间的相关性(在左侧轴上报告为U/mL并且在右侧y轴

上报告为正常值百分比,1U/mL=100%正常值)。示出具有n=6次生物重复的数据。误差条表示平均值的标准偏差。

[0063] 图22是示出在CRMSBS1或CRMSBS2内含子系列的背景下改进的产率率的曲线图。在HEK293细胞中产生病毒,产率来自两种细胞工厂(2CF)。CRM是指顺式调控性元件。SBS是指加莫生物科技公司。hFVIII是指人类因子VIII。SP是指信号肽。ITR是指倒置末端重复。SPA是指合成的多腺苷酸化序列。Ins1和Ins3分别是指绝缘子1和绝缘子3。

[0064] 图23是描绘使用所示多种AAV血清型的野生型小鼠中的hFVIII-BD产生水平的曲线图。向雄性C57BL/6小鼠静脉内注射 $6E+10\text{vg}/\text{小鼠}$ (约 $2E+12\text{vg}/\text{kg}$)的AAV2/5和AAV2/9构建体或 $6E+10\text{vg}/\text{小鼠}$ (约 $2E+12\text{vg}/\text{kg}$)和 $1.8E+11\text{vg}/\text{小鼠}$ (约 $7E+12\text{vg}/\text{kg}$)的AAV2/6和AAV2/8构建体。所述图证实了所有样品在血浆中检测的超生理hFVIII-BDD,除了较低剂量的AAV2/6和AAV 2/5。

[0065] 图24是描绘当经由通过在Sf9细胞(Sf9)中的HEK293产生(HEK)或通过杆状病毒产生来纯化的AAV2/6递送转基因时hFVIII-BDD转基因在野生型小鼠中的相对表达的曲线图。转基因与F8亲本cDNA一起使用(图4)。经由IV注射(尾静脉)以由HEK293细胞或Sf9/rBV(重组杆状病毒)产生的 $1.8E+11\text{vg}/\text{小鼠}$ (约 $7E+12\text{vg}/\text{kg}$)AAV2/6F8亲本cDNA,向雄性C57BL/6小鼠施用亲本F8亲本cDNA。用来自HEK293细胞的F8亲本cDNA进行处理实现正常FVIII血浆水平的 $142.1\% \pm 8.3\% \text{SEM}$ (n=8)(通过hFVIII ELISA测量)的平均峰值。在向小鼠施用F8亲本cDNA(Sf9/rBV)之后实现类似水平 $132.8\% \pm 18.6\% \text{SEM}$ (n=5)(通过hFVIII ELISA测量)。

[0066] 图25A和25B示出CRBSBS2 SBR内含子3(Ins1-Ins3)cDNA转基因供体在小鼠中的表达水平。图25A是供体的示意图,其也示出在图10中。图25B示出血浆中可检测的hFVIII-BDD的量,其表示为ng/mL和正常值百分比(在正常人类血浆中)。用 $1.8E+11\text{vg}/\text{小鼠}$ (约 $7E+12\text{vg}/\text{kg}$)AAV2/6CRMSBS2 SBR内含子3cDNA(n=8)静脉内注射雄性C57BL/6小鼠。示出hFVIII-BDD在C57BL/6小鼠的血浆中的平均峰值水平,如通过hFVIII ELISA所测量的。

[0067] 图26A和26B示出在各种非人灵长类动物(NHP)研究中用人类FVIII-BDD进行的给药方案,所述研究包括通过在第103天去除所有免疫抑制进行的研究。图26A示出利妥昔单抗和甲强龙(Solu-Medrol)给药的综述。利妥昔单抗($10\text{mg}/\text{kg}$; IV)是在测试品之前施用,而甲基强的松龙(甲强龙)($10\text{mg}/\text{kg}$; IM)给药每日进行直到第103天为止。图26B示出用于测试品添加之前和测试品添加之后的实验的给药方案并且还示出利妥昔单抗和甲强龙给药的时间。第1-5组遵循测试品注射之前的免疫抑制方案,而第6-8组遵循测试品注射之后的免疫抑制方案。此研究的持续时间为56天。

[0068] 图27是示出在用AAV2/6hF8 cDNA处理的NHP中在hFVIII活性与水平之间的相关性的曲线图。向食蟹猴施用制剂缓冲液或 $6E+12\text{vg}/\text{kg}$ AAV2/6hF8 cDNA(亲本载体)。图27示出制剂对照组(组1,动物ID 1101-1102)和 $6E+12\text{vg}/\text{kg}$ 剂量组(组3,动物ID 3101-3103)的个别动物。在测试品添加之后第14天,通过ELISA或APTT凝血活性分析hFVIII的循环水平和活性。食蟹猴FVIII的正常水平为约1U/mL(约100%正常值),这反映在制剂对照组的凝血活性数据中,因为凝血活性测定对于人类FVIII而言不具有特异性。相对于食蟹猴FVIII,ELISA对于人类FVIII具有特异性,因此,正如预期的,在制剂对照组中不存在hFVIII水平,如通过ELISA测量的。在组3动物中循环hFVIII存在超生理水平和活性,上至8U/mL(800%正常值)。

[0069] 图28A和28B是示出在用AAV hF8 cDNA处理的NHP中的肝酶曲线的曲线图。向食蟹猴施用制剂缓冲液或6E+12vg/kg AAV2/6hF8 cDNA(亲本载体)。示出制剂对照组(组1,动物ID 1101)和6E+12vg/kg剂量组(组3,动物ID 3102)的动物中作为肝病状指示的代表性肝酶曲线。示出丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)。食蟹猴仍处于正常范围内的可接受上限参考值对于ALT是126U/L并且对于AST是120U/L。对于制剂对照组和6E+12vg/kg AAV hF8 cDNA(亲本载体)组二者,ALT/AST水平在肝活检(肝活检是在第41天)之后有所升高,其由星号表示。另外AAV hF8 cDNA在整个研究中(247天)是良好耐受的。

[0070] 图29A至29D是描绘使用携带因子VIII(F8)B-结构域缺失(FVIII-BDD)蛋白质的AAV供体进行的NHP研究的人类FVIII血浆水平的汇总的曲线图。图29A示出第2组动物(AAV2/6,2E+12vg/kg)的结果;图29B示出组3动物(AAV2/6,6E+12vg/kg)的结果;图29C示出组4动物(AAV2/8,6E+12vg/kg)的结果;并且图29D示出组5动物(AAV2/8,6E+12vg/kg)的结果。1U/mL人类因子VIII被认为是生理正常值,并且等于100%正常生理循环人类因子VIII。

[0071] 图30是描绘在研究中在用所指示的构建体(在AAV6或AAV8载体中)处理非人灵长类动物(NHP)之后峰值人类FVIII抗原水平的曲线图。在2E+12vg/kg剂量水平(n=3)下,实现人类正常hFVIII血浆水平的峰值111.0%、493.9%和840.0%(总体平均值481.6%,如通过hFVIII ELISA测量的)。在表示6E+12vg/kg的较高剂量(n=3)下,实现hFVIII血浆水平的峰值450.0%、625.6%和886.7%[总体平均值654.1%]。AAV8的总体平均值是147.1%。

[0072] 图31A至31C是描绘在给药后168天的时间段内用低剂量(2E+12vg/kg,第2组)AAV2/6-FVIII-BDD cDNA给药的个别食蟹猴(n=3;动物2101、2102和2103)的结果的曲线图。在所有三张曲线图中,以黑色示出血浆中的FVIII-BDD浓度,如通过ELISA所测量的。另外,以灰色示出血浆中的中和抗-FVIII抗体(示出为毕提斯达单位(Bethesda Units))的浓度。水平虚线表示毕提斯达单位截止点,低于此值将不认为对抗-FVIII中和抗体呈阳性。甲强龙在第103天停用,如由垂直虚线所指示的。每张曲线图显示单个猴子的结果:图31A示出动物2101;图31B示出动物2102;并且图31C示出动物2103。

[0073] 图32A至32C是描绘在给药后168天的时间段内用高剂量(6E+12vg/kg,组3)AAV2/6-FVIII-BDD cDNA给药的个别食蟹猴(n=3;动物3101、3102和3103)的结果的曲线图。在所有三张曲线图中,以黑色示出血浆中的FVIII-BDD浓度,如通过ELISA所测量的。另外,以灰色示出血浆中的中和抗-FVIII抗体(示出为毕提斯达单位)的浓度。水平虚线表示毕提斯达单位截止点,低于此值将不认为对抗-FVIII中和抗体呈阳性。甲强龙在第103天停用,由垂直虚线所指示。每张曲线图显示单个猴子的结果:图32A示出动物3101;图32B示出动物3102;并且图32C示出动物3103。

[0074] 图33A至33D是描绘在给药后168天的时间段内用高剂量(6E+12vg/kg,组4)AAV2/8-FVIII-BDD cDNA给药的个别食蟹猴(n=3,动物4101、4102和4103)的结果的曲线图。在曲线图33A-33C中,以黑色示出血浆中的FVIII-BDD浓度,如通过ELISA所测量的。另外,以灰色示出血浆中的中和抗-FVIII抗体(示出为毕提斯达单位)的浓度。图33D是动物4103的曲线图中较低值的‘放大’(注意图33A-33C中的y轴是0-5U/mL的FVIII抗原,而图33D是0-1U/mL的FVIII抗原)。水平虚线表示毕提斯达单位截止点,低于此值将不认为对抗-FVIII中和抗体呈阳性。甲强龙在第103天停用,由垂直虚线所指示。每张曲线图显示单个猴子的结果:图33A示出动物4101;图33B示出动物4102;图33C和33D示出动物4103。

[0075] 图34A至34E是描绘在给药后168天的时间段内用高剂量(6E+12vg/kg,组5)AAV2/8-FVIII-BDD cDNA给药的个别食蟹猴(n=3)的结果的曲线图。在图34A-34C中,以黑色示出血浆中的FVIII-BDD浓度,如通过ELISA所测量的。另外,以灰色示出血浆中的中和抗-FVIII抗体(示出为毕提斯达单位)的浓度。图34D和34E是曲线图中较低值的‘放大’(注意34A-34C中的y轴是0-5U/mL的FVIII抗原,而34D和34E的轴是0-1U/mL的FVIII抗原)。水平虚线表示毕提斯达单位截止点,低于此值将不认为对抗-FVIII中和抗体呈阳性。甲强龙在第103天停用,由垂直虚线所指示。每张曲线图显示单个猴子的结果(动物5101:图34A,5102:图34B,以及5103:图34C)。

[0076] 图35A和35F是描绘在表达转基因hFVIII的动物中使用治疗性hFVIII生物制品的激发的曲线图。用hFVIII生物制品Xyntha®攻击来自组1、组3、组4和组5的食蟹猴(动物ID 1101、3101、3103、4103、5101、5102),所述激发由四次每周的25U/kg Xyntha®的输注组成,这在图35A至35F中指示为倒三角形。Xyntha®激发对应于第198天、第205天、第212天、第219天(在第0天AAV hF8 cDNA测试品添加之后)。由于hFVIII的短半衰期和每周血浆收集,不存在来自hFVIII生物制品Xyntha®的hFVIII水平增加。然而,在对照制剂组1中在Xyntha®激发(通过毕提斯达单位(BU)测量)之后抑制性抗体有所增加(参见动物ID 1101,所述动物接受AAV hF8 cDNA,图35A)。如图35A所示,在Xyntha®激发之后BU达到约0.9BU/mL,这由曲线图中的灰色区域指示。动物ID 3103持续许多周具有上至3U/mL的高BU水平,并且所添加的hFVIII生物制品激发(通过垂直虚线指示)并未诱导另外可检测的抑制性抗体(BU)(图35B)。在接受AAV hF8 cDNA并具有持续的hFVIII水平的所有组中,抑制性抗体(BU)没有增加(图35C至35F,由灰色箭头指示)。图35C示出动物ID3101的hFVIII水平在正常hFVIII的约150%下持续19周,而图35D示出动物ID 4103的hFVIII水平在正常hFVIII的约10%下持续19周。图35E示出动物ID 5101的hFVIII水平在正常hFVIII的约15%下持续19周,而在图35F中动物ID 5102的hFVIII水平在正常hFVIII的约35%下持续19周。水平虚线表示毕提斯达单位截止点,低于此值将不认为对抗-FVIII中和抗体呈阳性。垂直虚线表示在图35B、35E和35F中在测试品给药后第103天去除甲强龙。

[0077] 图36A和36B描绘在HepG2细胞中由内源白蛋白基因座体外表达hVIII-BDD。图36A是示出在向HepG2细胞施用白蛋白靶向的ZFN(SBS#47171/47898,AAV2/6-ZFN)和hFVIII-BDD cDNA AAV2/6-FVIII-BDD(CRMSBS2无内含子)之后HepG2细胞上清液中随时间(t=天数)检测到的hFVIII-BDD的曲线图,AAV2/6-FVIII-BDD以3.0E+04、6.0E+04和1.2E+05连同AAV2/6-ZFN 3.0E+05一起施用。图36B是示出单独的hFVIII cDNA(无ZFN)的曲线图。示出具有n=3次生物重复的数据。误差条表示重复实验平均值的标准偏差。虚线是hFVIII ELISA的检测限。

[0078] 图37是示出在内源白蛋白基因座处的hFVIII-BDD转基因靶向整合的体外检测。靶向整合通过定量PCR检测,所述整合包含白蛋白插入位点。5' PCR引物位于内源人类白蛋白基因座内,PCR探针位于hFVIII-BDD盒的ITR内并且3'引物位于hFVIII-BDD转基因内。所展示的数值被归一化至管家基因GAPDH。

[0079] 图38是示出在根据图26B所示的方案在非人灵长类动物(NHP)中进行处理之后峰值人类FVIII抗原水平的曲线图。第1-5组遵循测试品注射之前的免疫抑制(IS)方案。在6E+

11vg/kg剂量水平(n=3,组3)下,峰值总体平均值是实现的人类正常hFVIII血浆水平的5.7%(通过hFVIII ELISA测量的)。在表示2E+12vg/kg的较高剂量(n=3,组4)下,峰值总体平均值是所实现的hFVIII血浆水平的56.4%并且在6E+12vg/kg(n=3,组5)下,峰值总体平均值是229.0%(通过hFVIII ELISA测量)。灰色阴影表示遵循测试品之后的IS方案的组7和组8。在2E+12vg/kg的剂量水平下(n=3,组7),峰值总体平均值是87.9%,并且对于6E+12vg/kg(n=3,组8)是101.7%。组1和组6是制剂对照组,表示为制剂。

[0080] 图39是示出在使用相同血清型向图38中所示的2E+11vg/kg群组中的受试者再给药产生可检测循环人类FVIII抗原水平之后的结果的曲线图。在研究第56天用9E+11vg/kg(n=3)向表示初始2E+11vg/kg给药(n=3)的第2组再给药(图26B)。示出在再给药后七天循环人类FVIII抗原水平,用半开口圆圈表示(第7天,在9E+11vg/kg的新剂量下)。所有其余数据均与图38中呈现的数据相同(峰值水平与研究第56天相同)。

[0081] 图40A和40B是示出由内源白蛋白基因座体外产生和检测hVIII的曲线图。图40A示出在向HepG2细胞施用白蛋白靶向的ZFN(SBS#42906/43043)和hFVIII cDNA(CRMSBS2 SBR内含子3)之后在HepG2细胞上清液中检测到的hFVIII总水平(在第19天测定)。在此实例中,使用从3.0E+04、6.0E+04和1.2E+05的逐渐增加剂量的hFVIII cDNA连同ZFN 3.0E+05。还示出控制添加到细胞中的总病毒的具有GFP的hFVIII cDNA(无ZFN)以及单独的hFVIII cDNA(无ZFN),后者表明几乎没有可检测的分泌的hFVIII。这是因为游离基因hFVIII在累积大量可检测的分泌的hFVIII之前降解。示出具有n=2次生物重复的数据。误差条表示技术和生物重复实验的平均值的标准偏差。虚线是hFVIII ELISA的检测限。图40B示出使用定量PCR获得的通过NHEJ进行内源白蛋白-hFVIII靶向整合的水平。5'引物位于内源人类白蛋白基因座内,探针位于hFVIII盒的ITR内并且3'引物位于hFVIII内。

[0082] 详述

[0083] 本文描述用于表达转基因(特别是在肝细胞中)的表达盒。构建体可以用于将任何转基因体内或体外递送至肝细胞并且可以用于治疗和/或预防任何疾病或病症,所述疾病或病症可以通过提供一种或多种转基因来减轻。与目前使用的肝靶向构建体不同,本文所述的构建体包括修饰的增强子和/或内含子序列,并且另外表达高水平的转基因,甚至无需使用MVM内含子。这些构建体也较小,从而允许与由小载体系统诸如AAV递送的转基因一起成功使用。

[0084] 本文所述的构建体可以用于在非人灵长类动物的肝中表达hFVIII BDD。根据AAV hF8 cDNA表达盒的初始剂量,hFVIII的循环血浆水平是上至正常循环hFVIII的800%。在这些初始高剂量之后,许多动物定居以持续大于八周表达正常水平的10%-150%。另外,一些动物在用注射的hFVIII蛋白质(Xyntha®)激发之后并未增加抗-hFVIII抗体响应,这表明在实验阶段中在这些动物中产生对hFVIII蛋白质的耐受性。

[0085] 总则

[0086] 除非另外指示,否则这些方法的实施以及本文公开的组合物制备和用途将使用分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、计算化学、细胞培养、重组DNA以及本领域技术内的相关领域中的传统技术。这些技术在文献中得以充分说明。参见,例如,Sambrook等人MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989和2001第三版;Ausubel等人,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,

John Wiley&Sons,New York,1987和定期更新;丛书METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,第三版,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,第304卷,“Chromatin”(P.M.Wassarman和A.P.Wolffe编),Academic Press,San Diego,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,第119卷,“Chromatin Protocols”(P.B.Becker编)Humana Press,Totowa,1999。

[0087] 定义

[0088] 术语“核酸”、“多核苷酸”以及“寡核苷酸”可互换使用,并且是指呈直链或环状构象,以及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。出于本公开的目的,这些术语不应被解释为相对于聚合物的长度为限制性的。所述术语可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,硫代磷酸主链)中被修饰的核苷酸。通常,具体核苷酸的类似物具有相同的碱基成对特异性;即A的类似物将会与T碱基成对。

[0089] 术语“多肽”、“肽”以及“蛋白质”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。所述术语也适用于其中一种或多种氨基酸是对应的天然存在氨基酸的化学类似物或修饰衍生物的氨基酸聚合物。

[0090] “重组”是指两个多核苷酸之间交换遗传信息的过程,包括但不限于通过非同源末端连接(NHEJ)和同源重组的捕获。对本公开内容来说,“同源重组(HR)”是指这种交换的特定形式,所述交换发生在例如经由同源导向修复机理所进行的细胞中双链断裂修复期间。

[0091] 在本公开的某些方法中,如本文所述的一种或多种靶向核酸酶在靶序列(例如,细胞染色质)的预定位点(例如,白蛋白基因)处形成双链断裂(DSB)。DSB介导如本文所述的构建体的整合。任选地,构建体与断裂区域中的核苷酸序列具有同源性。表达构建体可以物理整合,或者可替代地,表达构建体被用作用于经由同源组合来修复断裂的模板,这将导致表达盒中的全部或部分核酸序列引入至细胞染色质中。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,可以转变成存在于表达盒中的序列。因此,使用术语“替换”或“更换”可以理解为表示用另一核苷酸序列来替换一个核苷酸序列,(即,在信息意义上替换序列),并且不必然需要用另一多核苷酸来物理或化学地替换一个多核苷酸。

[0092] 在本文描述的任何方法中,外源性核苷酸序列(“表达构建体”或“表达盒”或“载体”)可以包含与所关注区域中的基因组序列同源但不同的序列,因此将刺激同源重组以在所关注区域插入不相同序列。因此,在某些实施方案中,与所关注区域序列同源的表达盒部分展现了与所替换的基因组序列约80%至99%之间(或任何在其间的整数)的序列同一性。在其它实施方案中,表达盒与基因组序列之间的同源性高于99%,例如如果在具有超过100个邻接碱基对的表达盒与基因组序列的同源区域之间只有1个核苷酸不同。在某些情况下,表达盒的非同源部分可以包含不存在于所关注区域中的序列,这样使得新的序列引入所关注区域中。在这些情况下,非同源序列通常侧接具有50至1,000个碱基对(或在其间的任何整数)或任何大于1,000个碱基对数目的序列,这些序列与所关注区域中的序列同源或相同。

[0093] 术语“序列”是指任何长度的核苷酸序列,所述核苷酸序列可以是DNA或RNA;可以是直链的、环状的或支链的,以及可以是单链或双链的。术语“转基因”是指插入基因组的核苷酸序列。转基因可以具有任何长度,例如2与100,000,000个核苷酸之间的长度(或任何在其间或其上的整数),优选地约100与100,000个核苷酸之间的长度(或任何在其间的整数)

值),更优选地约2000与20,000个核苷酸之间的长度(或任何在其间的值),以及甚至更优选地约5与15kb之间(或任何在其间的值)。

[0094] “染色体”是包括细胞所有或部分基因组的染色质复合物。细胞基因组的特征通常在于它的核型,所述核型是包括细胞基因组的所有染色体集合。细胞的基因组可以包括一种或多种染色体。

[0095] “游离基因”是复制的核酸、核蛋白复合物或其它包含核酸的结构,所述核酸不是细胞染色体核型的一部分。游离基因的实例包括质粒和某些病毒基因组。本文所述的肝特异性构建体可以游离基因形式维持,或者可替代地可稳定整合到细胞中。

[0096] “外源”分子是通常不存在于细胞中,但可以通过一种或多种基因的、生物化学的或其它方法来引入细胞中的分子。“通常存在于细胞中”是相对于细胞的具体发育阶段和环境条件而测定。因此,例如,仅在肌肉的胚胎发育期间存在的分子相对于成年肌肉细胞是外源分子。类似地,通过热激诱导的分子相对于非热激的细胞是外源分子。外源分子可以包括,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。

[0097] 其中,外源分子可以是小分子,如通过组合化学过程而产生的小分子,或大分子如蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、糖蛋白、脂蛋白、多糖、任何上述分子的修饰衍生物或任何包含上述分子的一种或多种的复合物。核酸包括DNA和RNA,可以是单链或双链的;可以是直链、支链或环状的;并且可以是任何长度。核酸包括能够形成双链体以及三链体的那些核酸。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、染色质重塑因子、甲基化的DNA结合蛋白、聚合酶、甲基化酶、脱甲基酶、乙酰基转移酶、脱乙酰酶、激酶、磷酸酶、连接酶、去泛素化酶、整合酶、重组酶、连接酶、拓扑异构酶、促旋酶以及解旋酶。

[0098] 外源分子可以是与内源分子相同类型的分子,例如外源蛋白质或核酸。举例来说,外源核酸可以包括感染的病毒基因组、引入细胞中的质粒或游离基因、或通常不存在于细胞中的染色体。用于将外源分子引入细胞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传递(即,脂质体,包括中性和阳离子脂质)、电穿孔、直接注入、细胞融合、粒子轰击、磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的传递以及病毒载体介导的传递。外源性分子也可为与内源分子相同类型的分子,但是源于与产生细胞的物种不同的物种。举例来说,人类核酸序列可引入最初源于小鼠或仓鼠的细胞系。用于将外源分子引入到植物细胞中的方法是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于原生质体转化、碳化硅(例如,WHISKERS™)、土壤杆菌属介导的转化、脂质介导的传递(即,脂质体,包括中性和阳离子脂质)、电穿孔、直接注入、细胞融合、粒子轰击(例如,使用“基因枪”)、磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的传递以及病毒载体介导的传递。

[0099] 相反,“内源”分子是在具体环境条件下,在具体发育阶段通常存在于具体细胞中的分子。举例来说,内源核酸可以包括染色体、线粒体、叶绿体或其它细胞器的基因组、或天然存在的游离核酸。额外的内源分子可以包括蛋白质,例如转录因子和酶。

[0100] 如本文所用,术语“外源核酸的产物”包括多核苷酸和多肽两种产物,例如转录产物(多核苷酸,诸如RNA)和翻译产物(多肽)。

[0101] “融合”分子是其中两个或更多个亚单位分子得以连接优选地共价连接的分子。亚单位分子可以是相同化学类型的分子,或可以是不同化学类型的分子。融合分子的实例包

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物)、在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)之间的融合物、以及融合核酸(例如,编码融合蛋白的核酸)。

[0102] 细胞中融合蛋白的表达可以由融合蛋白向细胞递送或通过编码融合蛋白的多核苷酸向细胞递送而引起,其中转录多核苷酸,并且翻译转录物以产生融合蛋白。分子间剪接、多肽裂解以及多肽连接反应也可以在细胞中的蛋白质表达中涉及到。用于向细胞递送多核苷酸和多肽的方法在本公开内容别处提出。

[0103] “基因”对本公开内容来说包括编码基因产物(参见下文)的DNA区,以及调控基因产物产生的所有DNA区,无论这些调控序列是否与编码和/或转录序列邻近。因此,基因包括,但不一定限于启动子序列、终止子、翻译调控序列如核糖体结合位点和内核糖体进入位点、增强子、沉默子、绝缘子、边界元件、复制起点、基质结合位点以及基因座控制区。

[0104] “基因表达”是指将包含在基因中的信息转变成基因产物。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或任何其它类型的RNA)或通过mRNA翻译产生的蛋白质。基因产物也包括通过如加帽、多腺苷酸化、甲基化以及编辑的方法来修饰的RNA,以及通过例如甲基化、乙酰化、磷酸化、遍在蛋白化、ADP-核糖基化、肉豆蔻基化以及糖基化来修饰的蛋白质。

[0105] 基因表达“调节”是指基因活性的改变。表达调节可以包括但不限于基因活化和基因阻抑。基因编辑(例如,裂解、变化、失活、随机突变)可以用来调节表达。基因失活是指与不包括如本文所描述的ZFP、TALE或CRISPR/Cas系统的细胞相比,基因表达的任何减少。因此,基因失活可能是部分的或完全的。

[0106] “所关注区”是任何细胞染色质区,如,例如基因或基因内部或基因附近的非编码序列,其中结合外源分子是可取的。结合可以是为了靶向DNA裂解和/或靶向重组的目的。所关注区可以存在于例如染色体、游离基因、细胞器基因组(例如,线粒体、叶绿体)或感染病毒基因组中。所关注区可以在基因编码区内,在转录的非编码区内,如例如前导序列、尾随序列或内含子,或在编码区上游或下游内的非转录区内。所关注区可以小至单个核苷酸对,或高达2,000个核苷酸对长度,或任何整数值的核苷酸对。

[0107] “真核”细胞包括但不限于真菌细胞(诸如酵母)、植物细胞、动物细胞、哺乳动物细胞和人类细胞(例如,T-细胞),包括干细胞(多能(pluripotent)和多潜能(multipotent))。

[0108] 术语“可操作的连接”或“可操作的连接(operatively linked)”(或“可操作连接(operably linked)”)关于并列两种或更多种组分(如序列成分)可互换使用,其中组分经布置,这样既使得组分功能正常又使得组分的至少一种可以介导对于其它组分的至少一种所施加的功能。作为说明,如果响应于一种或多种转录调控因子存在或缺失,转录调控序列控制编码序列转录水平,那么转录调控序列如启动子可操作地连接至编码序列。转录调控序列一般以顺式与编码序列可操作地连接,但无需直接邻近编码序列。举例来说,增强子是可操作地连接至编码序列的转录调控序列,虽然它们不是邻接的。

[0109] 蛋白质、多肽或核酸的“功能片段”是序列不同于全长蛋白质、多肽或核酸,但仍保留与全长蛋白质、多肽或核酸相同功能的蛋白质、多肽或核酸。功能片段可以拥有比对应天然分子更多、更少或相同数量的残基,和/或可以包含一种或多种氨基酸或核酸取代物。用于测定核酸功能(例如,编码功能,可杂交另一核酸的能力)的方法在本领域是众所周知的。

类似地,确定蛋白质功能的方法是熟知的。例如,B结构域缺失的人类因子VIII是全长因子VIII蛋白质的功能片段。

[0110] 多核苷酸“载体”或“构建体”能够将基因序列传递至靶细胞。典型地,“载体构建体”、“表达载体”、“表达构建体”、“表达盒”和“基因转移载体”是指能够引导所关注基因的表达并且可将基因序列转移至靶细胞的任何核酸构建体。因此,此术语包括克隆,和表达媒介物,以及整合载体。

[0111] 术语“受试者”和“患者”可互换使用并且是指哺乳动物如人类患者和非人灵长类动物以及实验动物诸如兔、狗、猫、大鼠、小鼠、以及其它动物。因此,本文所使用的术语“受试者”或“患者”意指可以向其施用本发明的表达盒的任何哺乳动物患者或受试者。本发明的受试者包括患有病症的受试者。

[0112] 肝特异性表达构建体

[0113] 本文描述用于指导转基因在肝细胞内表达的表达盒(构建体),包括在体内向受试者施用表达盒(例如肝递送)之后。表达构建体可以游离基因形式维持并且驱动转基因在染色体外表达,或者可替代地,表达构建体可以整合到肝细胞的基因组中,例如通过核酸酶介导的靶向整合。

[0114] 多核苷酸表达构建体包含增强子序列、启动子序列和一种或多种转基因。任选地包括以下一种或多种:内含子序列、多腺苷酸化序列和/或信号肽。任何增强子序列可以用于本文所述的表达构建体中。在某些实施方案中,增强子是野生型或修饰的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子(Chuah等人,(2014)Molecular Therapy,22,1605-1613;Nair等人,(2014)Blood,123,3195-3199)

[0115] 在优选的实施方案中,所述丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子与野生型相比包含一种或多种突变(例如,点突变),例如含有以下各项的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子:如图5所示的一种或多种核苷酸修饰,即在SEQ ID NO:1-13中任一者所示的序列的残基1、5、14、32和/或39中的一个或多个处的核苷酸修饰。在某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子包含在SEQ ID NO:1-13中任一者的位置1、5、14和32处的修饰(表示为CRMSBS1的构建体),而在其它实施方案中,丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子包含在SEQ ID NO:1-13中任一者的位置1、14、32和39处的修饰(表示为CRMSBS2的构建体)。示例性增强子序列示出如下:

CRMSBS1 (SEQ ID NO:35):

5'GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGATCAGCCCAGTTACCGGA
GGAGCAAACAGGGGCTAAGTTCAC

[0116]

CRMSBS2 (SEQ ID NO:36): 5'

GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGATCACCCCAGTTACCGGAGG
AGCAAACAGGGACTAAGTTCAC

[0117] 类似地,任何启动子序列可以用于本发明的表达盒中。在某些实施方案中,启动子是组成型启动子。在其它实施方案中,启动子是诱导型启动子或组织特异性启动子。在一些实施方案中,启动子是肝特异性启动子。在某些实施方案中,启动子是甲状腺素运载蛋白最小启动子(TTRm)启动子。在其它实施方案中,启动子是 α -1抗胰蛋白酶(hAAT)启动子。

[0118] 本文所述的任何多核苷酸还可任选地包含内含子序列。在某些实施方案中,表达构建体包含截短的嵌合内含子(T-嵌合内含子)序列,例如,如图6、7、19和20的底部图中所示的。T-嵌合内含子是pCI-neo (GenBank U47120)中的嵌合内含子的截短版本。pCI-neo中的嵌合内含子是来自人类 β -球蛋白基因的5'剪接供体位点以及免疫球蛋白基因重链可变区的分支点和3'受体位点。T-嵌合内含子含有5'剪接供体与分支点之间的45bp缺失。在其它实施方案中,表达构建体包含突变的MVM内含子序列(例如,图12、13和14中所示的突变中的一种或多种(SEQ ID NO:15-17))。

[0119] 可替代地,如本文所述的表达构建体可能缺乏内含子序列,例如,如图6、7、19和20的中间图所描绘的构建体中所示出的。在下文中示出具有标注的示例性构建体(包含因子VIII转基因)并且将清楚的是,F8转基因可以用任何转基因替换并且启动子和绝缘子序列可以如本文所述进一步修饰:

[0120] hF8 cDNA,无内含子(全序列,包含启动子模块、聚A(poly A)和Ins,CRMSBS2无内含子)(SEQ ID NO:34):

[0121]

名称: CRMSBS2 无内含子	
模块	残基
Ins 1	14 - 32
<u>CRMSBS2</u>	33 - 104
TTRm	117 - 339
<u>hF8 BDD</u>	345 - 4718
SPA51	4725 - 4775
<u>Ins 3</u>	4776 - 4792

[0122]

```

|         |         |         |         |         |
GCGGCCTAAGCTTGGAAACCATTTGCCACCTTCAGGGGGAGGCTGCTGGTGA - 50
ATATTAACCAAGATCACCCCAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGACTAAGT - 100
TCACACGCGTGGTACCGTCTGCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCGG - 150
ATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCAATATTTGTGTAGGTTACTTATTC - 200
TCCTTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGATTCAGC - 250
TTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCTT - 300
TCACCAGGAGAAGCCGTACACACAGATCCACAAGCTCCTGCTAGTATGCAG - 350
ATCGAGCTCTCCACCTGCTTC'TTCT'GT'GCCTGTTGAGATTCT'GCT'FCAG - 400
CGCCACCAGGAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACA - 450
TGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGA - 500
GTGCCAAGAGCTTCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCTT - 550
GTTTGTGGAGTTCAGTACCACCTGT'TCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCC - 600
CCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACT - 650
GTGGTGATCACCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGC - 700
TGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCC'T'GAGGGGGCTGAGTATGATGACC - 750
AGACCAGCCAGGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGT'TCCCTGGGGGCAGC - 800
CACACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCCTGGA - 850
CCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGG - 900
ACCTGAACCTCTGGCCTGAT'TGGGGCCCT'GCT'GGTGTGCAGGGAGGGCAGC - 950
CTGGCCAAGGAGAAGACCCAGACCT'GCACAAGTTCATCCTGCTGT'TTGC - 1000
TGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGA - 1050
TGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACT - 1100
GTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCT'GCCT'GGCCTGAT'TGGCTGCCACAG - 1150
GAAGTCTGTGACTGGCATGTGAT'TGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGC - 1200
ACAGCATCT'TCCTGGAGGGCCACACCT'TCCTGGTCAGGAACCACAGGCAG - 1250
GCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCT'TCCTGACTGCCAGACCCCTGCT - 1300
GATGGACCTGGGCCAGT'TCCTGCTGT'TCT'GCCACATCAGCAGCCACCAGC - 1350
ATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCC - 1400
CAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCT - 1450
GACTGACTCTGAGATGGATGTGGT'GAGGTTT'GATGATGACAACAGCCCA - 1500
GCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTG - 1550
CACTACAT'GCT'GCT'GAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCTGGT'GCT - 1600
GGCCCT'GAT'GACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCTC - 1650
AGAGGAT'TGGCAGGAAGTACAAGAAGT'GAGGTT'CATGGCC'TACACT'GAT - 1700
GAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGG - 1750
CCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGA - 1800
ACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCATGGCATCACTGATGTG - 1850
AGGCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGA - 1900
CTTCCCATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTG - 1950
TGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCACAGGTGCCTGACCAGATACTAC - 2000
AGCAGCTT'TGTGAACATGGAGAGGGACCT'GGCCTCT'GGCCTGAT'TGGCCC - 2050

1         10         20         30         40         50
|         |         |         |         |
CCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCA - 2100
TGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGT'TCT'CTGTGTTT'GATGAGAACAGG - 2150
AGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCTGCCCAACCCCTGCTGG - 2200
GGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGT'TCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCA - 2250
TCAATGGCTATGTGTTT'GACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCC'TGCATGAG - 2300
GTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCAT'TGGGGCCAGACTGACT'TCCTGTC - 2350

```

[0123] TGTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACA - 2400
CCCTGACCCTGTTCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGGAG - 2450
AACCTTGGCCTGTGGATTC'TGGGCTGCCACAACCTCTGACTTCAGGAACAG - 2500
GGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACACTGGGG - 2550
ACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAG - 2600
AACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCCACCCGTCCTTAA - 2650
GCGCCATCAGCGCGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGG - 2700
AGATTGACTATGATGAGACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTT - 2750
GACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAA - 2800
GACCAGGCACTACTTCAATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCA - 2850
TGAGCAGCAGCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCAGTCTGGCTCTGTG - 2900
CCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTCCAGGAGTTCAGTATGGCAGCTTCAC - 2950
CCAGCCCCGTGACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCCTGCTGGGCC - 3000
CCTACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAAC - 3050
CAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGA - 3100
GGACCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATG - 3150
AAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCACCAAG - 3200
GATGAGTTTGACTGCAAGGCCCTGGGCCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGA - 3250
GAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCA - 3300
ACACCCTGAACCCTGCCATGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGGC - 3350
CTGTCTTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAA - 3400
CATGGAGAGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCCA - 3450
CCTTCAAGGAGAACTACAGGTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGAC - 3500
ACCCTGCCTGGCCTGGTGTGGCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCT - 3550
CTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCC - 3600
ATGTGTTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAAC - 3650
CTGTACCCTGGGGTGT'TTGAGACTGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCTGG - 3700
CATCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGA - 3750
GCACCCTGTTCTTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATG - 3800
GCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGG - 3850
CCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCAATG - 3900
CCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCC - 3950
CCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTTCA - 4000
CAGCCTGTACATCAGCCAGTTTATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGA - 4050
AGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTCTTTT - 4100
GGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCAT - 4150
CATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCAGGAGCA - 4200
CCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCC - 4250
CTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCAGATCACTGCCAGCAG - 4300
CTACTTACCAACATGTTTGGCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGC - 4350
ATCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCCTGGAGGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAG - 4400
GAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGGTGAC - 4450
CACCCAGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCC - 4500
TGATCAGCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCCTGTTCTTCCAGAAT - 4550
GGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCAACCCCTGTGGT - 4600
GAACAGCCTGGACCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCC - 4650
AGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAG - 4700
GCCAGGACCTGTACTGAGGATCC**AATAAAATATCTTTATTTTCATTACA** - 4750

1 10 20 30 40 50
| | | | |
TCTGTGTGTTGGTTTTTTTGTGTGTTTCCCTGTAACGATCGGGCTCGAGCG - 4800

5'

[0124] 在下文中示出具有标注的另一个示例性构建体(包含因子VIII转基因)并且还将清楚的是,F8转基因可以用任何转基因替换并且启动子和绝缘子序列可以如本文所述进一步修饰:

[0125] hF8 cDNA,包含内含子(全序列,包含启动子模块、聚A和Ins,CRMSBS2 SBR内含子3)(SEQ ID NO:37):

[0126]

名称: CRMSBS2 SBR 内含子 3	
模块	残基
Ins 1	14 - 32
<u>CRMSBS2</u>	33 - 104
TTRm	117 - 339
<i>SBR 内含子 3</i>	340 - 432
<u>hF8 BDD</u>	438 - 4811
SPA51	4818 - 4868
<u>Ins 3</u>	4869 - 4885

[0127]

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
GCGGCCTAAGCTTGGAAACCATTTGCCACCTTCAGGGGGAGGCTGCTGGTGA - 50
ATATTAACCAAGATCACCCCAAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGACTAAGT - 100
TCACACGCGTGGTACCSTCTGTCTGCACATTTCCGTAGAGCGAGTGTCCG - 150
ATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTTCATATTTGTTGTTAGGTACTTATTC - 200
TCCTTTTGTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGTTTGGAGTCAGC - 250
TTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAAGCCCC - 300
TCACCAGGAGAGGCCCTCACACAGATCCACAAGCTCCCTGAAGAGGTAAGG - 350
GTTTAAGTTATCGTTAGTTTCGTGCACCATTAATGTTTAAATTACCTGGAGC - 400
ACCTGCCTGAAATCATTTTTTTTTTCAGGTTGGCTAGTATGCAGATCGAGC - 450
TCTCCACCTGCTTCTTCTGTGCCTGTTGAGATTCCTGCTTCAGCGCCACC - 500
AGGAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTC - 550
TGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGAGTGCCCA - 600
AGAGTTTCCCCCTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCCTGTTTGTG - 650
GAGTTCACCTGACCACCTGTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGAT - 700
GGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGA - 750
TCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGG - 800
GTGAGCTACTGGAAGGCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAG - 850
CCAGAGGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACACCT - 900
ATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCTG - 950
TGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAA - 1000
CTCTGGCCTGATTTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCA - 1050
AGGAGAAGACCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGTGTGTTT - 1100
GATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCAGGA - 1150
CAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATG - 1200
GCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTTGGCTGCCACAGGAAGTCT - 1250
GTGTACTGGCATGTGATTTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGCAT - 1300
CTTCTGAGGGGCCACACCTTCTTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCC - 1350
TGGAGATCAGCCCCATCACCTTCTGACTGCCCAGACCCTGCTGATGGAC - 1400
CTGGGCCAGTTCCCTGCTGTCTGTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGG - 1450
CATGGAGGCCATATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGA - 1500
GGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGAC - 1550
TCTGAGATGGATGTGGTGGGTTGATGATGACAACAGCCCCAGCTTCAT - 1600
CCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACA - 1650
TTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCTGGTGTGGCCCT - 1700

```

GATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCAGAGGAT - 1750
TGGCAGGAAGTACAAGAAGGTGAGGTTTCATGGCCTACACTGATGAAACCT - 1800
TCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCTG - 1850
CTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGC - 1900
CAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCC - 1950

1	10	20	30	40	50	

TGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCC - 2000
ATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGA - 2050
TGGCCCCACCAAGTCTGACCCAGGTGCCTGACCAGATACTACAGCAGCT - 2100
TTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATFGCCCCCTGCTG - 2150
ATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGA - 2200
CAAGAGGAATGTGATCCTGTCTCTGTGTTTGTGATGAGAACAGGAGCTGGT - 2250
ACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCTGCCCAACCTGCTGGGGTGCAG - 2300
CTGGAGGACCTTGAGTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGG - 2350
CTATGATGTTTGCAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCATGAGGTGGCCT - 2400
ACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCAGACTGACTTCTGTCTGTGTTT - 2450
TTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACACCCTGAC - 2500
CCTGTTCCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTTTCATGAGCATGGAGAACCCTG - 2550
GCCTGTGGATTCGGGCTGCCACAACCTGACTTCAGGAACAGGGGCATG - 2600
ACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACAAGTGGGGACTACTA - 2650
TGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATG - 2700
CCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCCACCCGTCTTAAGCGCCAT - 2750
CAGCGCGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGA - 2800
CTATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCT - 2850
ACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGG - 2900
CACTACTTTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAG - 2950
CAGCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGT - 3000
TCAAGAAGGTGGTGTCCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCC - 3050
CTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCCTGCTGGGCCCCCTACAT - 3100
CAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGGCCA - 3150
GCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGGACCAG - 3200
AGGCAAGGGGCTGAGCCCAGGAAGAAGTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAA - 3250
GACCTACTTCTGGAAGGTGCAGACACCATGGCCCCACCAAGGATGAGT - 3300
TTGACTGCAAGGCTGGGCCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGAT - 3350
GTGCACTCTGGCCTGATFGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCT - 3400
GAACCCTGCCATGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGGCCTGTTCT - 3450
TCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAG - 3500
AGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCACCTTCAA - 3550
GGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGC - 3600
CTGGCCTGGTGTGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGC - 3650
ATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTGTT - 3700
CACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACC - 3750
CTGGGGTGTGAGACTGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCTGGCATCTGG - 3800
AGGGTGGAGTGCCATGATFGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCCCT - 3850
GTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCTCTG - 3900
GCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGG - 3950
GCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTGGAG - 4000
CACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCATGA - 4050
TCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTTCAAGCAGCCTG - 4100
TACATCAGCCAGTTTCAATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCA - 4150
GACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTCTTTGGCAATG - 4200
TGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCATCATTGCC - 4250
AGATACATCAGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCAGGAGCACCCCTGAG - 4300
GATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCTGGGCA - 4350
TGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCAGATCACTGCCAGCAGCTACTTC - 4400
ACCAACATGTTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCATCTGCA - 4450
GGGCAGGAGCAATGCCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGC - 4500
TGCAGGTGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCACCCAG - 4550
GGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCTGATCAG - 4600

[0128]

```

CAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGG - 4650
1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
[0129] TGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCACCCCTGTGGTGAACAGC - 4700
CTGGACCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCAGAGCTG - 4750
GGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCAGG - 4800
ACCTGTACTGAGGATCCAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGT - 4850
GTTGGTTTTTTGTGTGTTTTTCCTGTAACGATCGGGCTCGAGCGC

```

[0130] 在优选的实施方案中,本文所述的构建体包含如图1、2、4、6、7、10、19、20或25中所示的绝缘子(间隔子)序列。示例性绝缘子序列包含Ins1:5' GGAACCATTGCCACCTTCA (SEQ ID NO:28); Ins2:5' CTATCCATTGCACTATGCT (SEQ ID NO:29); Ins3:5' TTTCTGTACGATCGGG (SEQ ID NO:30)以及Ins4:5' TTGAATTCATAACTATCCCAA (SEQ ID NO:38)。

[0131] 如将清楚的是,任何转基因可以用于本文所述的构建体中。另外,本文所述的构建体的个别组件(启动子、增强子、绝缘子、转基因等)可以任何组合混合并匹配。

[0132] 本文所述的构建体可以包含在任何病毒或非病毒载体中。构建体可以游离基因形式维持或者可以整合到细胞的基因组中(例如,经由核酸酶介导的靶向整合)。

[0133] 非病毒载体包括DNA或RNA质粒、DNA MC、裸核酸以及与递送媒介物诸如脂质体、纳米颗粒或泊洛沙姆复合的核酸。可以用于携带本文所述的表达盒的病毒载体包括但不限于逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒载体、疫苗、以及单纯性疱疹病毒载体。通过逆转录病毒、慢病毒、以及腺相关病毒基因转移方法整合在宿主基因组中是可能的,并且如本文所述的,这可以通过核酸酶介导的整合来促进。

[0134] 在某些优选的实施方案中,构建体被包含在腺相关病毒("AAV")载体或载体系统中,所述构建体可以游离基因形式维持或者整合到肝细胞的基因组中(例如,经由核酸酶介导的靶向整合)。重组AAV载体的结构是在许多出版物中,包括美国专利5,173,414; Tratschin等人,Mol.Cell.Biol.5:3251-3260(1985); Tratschin等人,Mol.Cell.Biol.4:2072-2081(1984); Hermonat&Muzyczka,PNAS 81:6466-6470(1984);以及Samulski等人,J.Virol.63:03822-3828(1989)。

[0135] 因此,在某些实施方案中,表达构建体在AAV构建体上携带并且还包含侧接如本文所述的表达构建体元件(例如,增强子启动子、任选内含子、转基因等)的5'和3' ITR。任选地,间隔子分子被包含在表达构建体的组分中的一种或多种之间,例如在5' ITR与增强子之间和/或在多腺苷酸化信号与3' ITR之间。间隔子可以用作同源臂以有利于重组到安全港基因座(例如白蛋白)中。在某些实施方案中,构建体是如图1、2、4、6、7、10、18、19、20或25中任一者所示的构建体。

[0136] 在某些实施方案中,如本文所述的AAV载体可以源于任何AAV。在某些实施方案中,AAV载体源于缺陷病毒和非致病性杆状病毒腺相关2型病毒。所有此类载体都源于仅保留侧接转基因表达盒的AAV 145bp倒置末端重复序列的质粒。归因于整合至转导的细胞的基因组中的高效基因转移和稳定转基因递送是此载体系统的关键特征。(Wagner等人,Lancet 351:9117-9122(1998), Kearns等人, Gene Ther. 9:748-755(1996))。根据本发明也可以使用其它AAV血清型(包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAVrh.10以及任何新型AAV血清型)。在一些实施方案中,使用嵌合AAV,其中病毒核酸的LTR序列的病毒起源与衣壳序列的病毒起源异源。非限制性实例包括具有源于AAV2的LTR和源于AAV5、

AAV6、AAV8或AAV9的衣壳(即分别为AAV2/5、AAV2/6、AAV2/8和AAV2/9)的嵌合病毒。

[0137] 逆转录病毒载体包括基于以下各项的那些:鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猴免疫缺陷病毒(SIV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、以及其组合(参见,例如,Buchscher等人,J.Virol.66:2731-2739(1992);Johann等人,J.Virol.66:1635-1640(1992);Sommerfelt等人,Virol.176:58-59(1990);Wilson等人,J.Virol.63:2374-2378(1989);Miller等人,J.Virol.65:2220-2224(1991);PCT/US94/05700)。

[0138] 本文所述的构建体也可以并入到腺病毒载体系统中。基于腺病毒的载体能够在许多细胞类型中具有极高转导效率且不需要细胞分裂。用所述载体已获得高效价和表达水平。此载体可在相对简单系统中大量产生。

[0139] pLASN和MFG-S是已被用于临床试验中的逆转录病毒载体的实例(Dunbar等人,Blood 85:3048-305(1995);Kohn等人,Nat.Med.1:1017-102(1995);Malech等人,PNAS 94:22 12133-12138(1997))。PA317/pLASN是用于基因治疗试验中的第一种治疗性载体。(Blaese等人,Science 270:475-480(1995))。已经观察到MFG-S包装载体的50%或更大的转导效率。(Ellem等人,Immunol Immunother.44(1):10-20(1997);Dranoff等人,Hum.Gene Ther.1:111-2(1997))。

[0140] 复制缺陷重组腺病毒载体(Ad)也可以与本文所述的多核苷酸一起使用。大多数腺病毒载体被工程化以使转基因替代Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后使复制缺陷性载体在反式提供缺失的基因功能的人293细胞中增殖。Ad载体可在体内转导多种类型的组织,包括非分裂性分化细胞,如见于肝、肾和肌肉组织中的细胞。常规Ad载体具有大携带能力。在临床试验中使用Ad载体的实例涉及通过肌肉内注射来抗肿瘤免疫接种的多核苷酸疗法(Sterman等人,Hum.Gene Ther.7:1083-9(1998))。在临床试验中使用腺病毒载体进行基因转移的另外实例包括Rosenecker等人,Infection 24:1 5-10(1996);Sterman等人,Hum.Gene Ther.9:7 1083-1089(1998);Welsh等人,Hum.Gene Ther.2:205-18(1995);Alvarez等人,Hum.Gene Ther.5:597-613(1997);Topf等人,Gene Ther.5:507-513(1998);Sterman等人,Hum.Gene Ther.7:1083-1089(1998))。

[0141] 封装细胞用于形成能够感染宿主细胞的病毒颗粒。这类细胞包括可以用于封装AAV的HEK293和Sf9细胞和封装逆转录病毒的 ψ 2细胞或PA317细胞。用于基因疗法的病毒载体通常由生产细胞系产生,所述细胞系将核酸载体封装至病毒颗粒中。载体通常含有封装并随后整合至宿主中所需要的减少病毒序列(如果可适用),其它病毒序列由编码待表达的蛋白质的表达盒替换。缺失的病毒功能由封装细胞系以反式提供。举例来说,用于基因疗法的AAV载体通常只具有来自AAV基因组的反向末端重复(ITR)序列,所述序列为封装并整合至宿主基因组中所需要。病毒DNA封装于细胞系中,其含有编码其它AAV基因,即rep和cap的辅助质粒,但是缺少ITR序列。细胞系还用作为辅助病毒的腺病毒感染。辅助病毒促进复制AAV载体和从辅助质粒表达AAV基因。由于缺少ITR序列,辅助质粒未大量地封装。以腺病毒的污染可通过例如热处理来减少,与AAV相比,腺病毒对于热处理更敏感。在一些实施方案中,使用杆状病毒表达系统来产生AAV。

[0142] 在许多基因治疗应用中,需要基因治疗载体以针对具体组织类型的高度特异性来递送。因此,病毒载体通常被修饰来通过在病毒外表面上以与病毒外壳蛋白的融合蛋白形式表达配体来对给定细胞类型具有特异性。选择配体以对已知存在于目标细胞类型上的受

体具有亲和力。举例来说, Han等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751 (1995), 报告Moloney鼠白血病毒可修饰以表达融合至gp70的人调蛋白, 并且重组病毒感染表达人表皮生长因子受体的某些人乳腺癌细胞。此原理可扩展至其它病毒-靶细胞对, 其中靶细胞表达受体并且病毒表达包含细胞表面受体的配体的融合蛋白。举例来说, 丝状噬菌体可工程化以展示具有实际上任何选定细胞受体的特异性结合亲和力的抗体片段(例如, Fab或Fv)。虽然以上描述主要适用于病毒载体, 但是相同原则可施加于非病毒载体。这类载体可工程化以含有有利于由特异性靶细胞吸收的特异性吸收序列。

[0143] 本文所述的多核苷酸可包含一个或多个非天然碱基和/或主链。具体地说, 如本文所述的表达盒可包含甲基化胞嘧啶以在目标区域中实现转录静止状态。

[0144] 另外, 如本文所述的表达构建体也可以包含另外的转录或翻译调控序列或其它序列, 例如Kozak序列、另外的启动子、增强子、绝缘子、内部核糖体进入位点、编码2A肽的序列、弗林蛋白酶切割位点和/或多腺苷酸化信号。另外, 目标基因的控制元件可以可操作地连接至报告基因以形成嵌合基因(例如, 报告表达盒)。

[0145] 转基因

[0146] 本文所述的构建体可用于肝递送任何转基因。示例性转基因(也称为目标基因和/或外源基因)包括但不限于任何多肽编码序列(例如, cDNA)、启动子序列、增强子序列、表位标签、标记基因、切割酶识别位点以及不同类型的表达构建体。标记基因包括但不限于编码介导抗生素抗性(例如, 氨苄青霉素抗性、新霉素抗性、G418抗体、嘌呤霉素抗性)的蛋白质的序列、编码有色或荧光或冷光蛋白质(例如, 绿色荧光蛋白、增强的绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、荧光素酶)、以及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FLAG、His、myc、Tap、HA或任何可检测的氨基酸序列的一种或多种拷贝。

[0147] 在一个优选的实施方案中, 转基因包含编码其在细胞中的表达为希望的任何多肽的多核苷酸, 所述多肽包括但不限于抗体、抗原、酶、受体(细胞表面或核)、激素、淋巴因子、细胞因子、报告多肽、生长因子、以及任何以上的功能片段。编码序列可以是例如cDNA。

[0148] 在某些实施方案中, 转基因编码任何遗传疾病中缺少或缺乏的蛋白质的功能形式, 所述遗传疾病包括但不限于溶酶体贮积病(例如, 戈谢氏、法布里氏、亨特氏、贺勒氏、奈曼-皮克氏等)、代谢病症、和/或血液病症诸如血友病和血红蛋白病等。参见, 例如, 美国公开号20140017212和20140093913; 美国专利号9,255,250和9,175,280。

[0149] 例如, 转基因可包含编码患有遗传疾病的受试者中缺少或无功能的多肽的序列, 所述遗传疾病包括但不限于以下遗传疾病中的任一种: 软骨发育不全、全色盲、酸性麦芽糖酶缺乏症、腺苷脱氨酶缺乏症(OMIM No. 102700)、肾上腺脑白质营养不良、艾卡尔迪综合征(aicardi syndrome)、 α -1抗胰蛋白酶缺乏症、 α -地中海贫血症、雄激素不敏感综合征、阿佩尔综合征(apert syndrome)、致心律失常性右心室、发育不良、共济失调毛细血管扩张(ataxia telangiectasia)、巴斯综合征(barth syndrome)、 β 地中海贫血症、蓝色橡皮泡痣综合征、卡纳万病(canavan disease)、慢性肉芽肿病(CGD)、猫鸣综合征(cri du chat syndrome)、囊肿性纤维化、德卡姆氏病(dercum's disease)、外胚层发育异常、范可尼贫血(fanconi anemia)、进行性骨化性纤维发育不良(fibrodysplasia ossificans progressive)、脆性X综合征、半乳糖血症、戈谢氏病(Gaucher's disease)、全身性神经节

昔脂沉积症(例如,GM1)、血色素沉着病、在 β -珠蛋白(HbC)的第6密码子中的血红蛋白C突变、血友病、亨廷顿氏病(Huntington's disease)、贺勒综合征(Hurler Syndrome)、低磷酸脂酶症、克兰费尔特综合征(Klinefelter syndrome)、Krabbes病(Krabbes Disease)、Langer-Giedion综合征(Langer-Giedion Syndrome)、白血球粘着缺乏症(LAD, OMIM No.116920)、脑白质营养不良、长QT综合征、Marfan综合征(Marfan syndrome)、Moebius综合征(Moebius syndrome)、黏多糖病(MPS)、指甲髌骨综合征、肾原性尿崩症(nephrogenic diabetes insipidus)、神经纤维瘤病、奈曼-皮克病(Neimann-Pick disease)、成骨不全症(osteogenesis imperfecta)、卟啉病、普瑞德-威利综合征(Prader-Willi syndrome)、早衰、普罗特斯综合征(Proteus syndrome)、成视网膜细胞瘤、雷特综合征(Rett syndrome)、鲁宾斯坦-泰比综合征(Rubinstein-Taybi syndrome)、圣菲利波综合征(Sanfilippo syndrome)、严重联合免疫缺陷病(SCID)、舒瓦克曼综合征(Shwachman syndrome)、镰状细胞病(镰状细胞性贫血)、史密斯-马吉利综合征(Smith-Magenis syndrome)、施蒂克勒综合征(Stickler syndrome)、泰-萨病(Tay-Sachs disease)、血小板减少-桡骨缺失(TAR)综合征、特雷彻柯林斯综合征(Treacher Collins syndrome)、染色体三倍体症、结节性脑硬化、特纳氏综合征(Turner's syndrome)、尿素循环障碍、冯希佩尔-林道病(von Hippel-Landau disease)、瓦登伯格综合征(Waardenburg syndrome)、威廉综合征(Williams syndrome)、威尔逊氏病(Wilson's disease)、维斯科特-奥尔德里奇综合征(Wiskott-Aldrich syndrome)、X-连锁淋巴细胞增殖综合征(XLP, OMIM No.308240)、获得性免疫缺陷、溶酶体贮积病(例如,戈谢氏病、GM1、法布里病和泰-萨病)、黏多糖病(mucopolysaccharidosis)(例如亨特氏病、贺勒氏病)、血红蛋白病(例如,镰状细胞病、HbC、 α -地中海贫血症、 β -地中海贫血症)以及血友病。

[0150] 可如本文所述地表达的蛋白质(包括其功能片段,诸如截短的形式)的非限制性实例包括纤维蛋白原、凝血素、组织因子、因子V、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子XI、因子XII(Hageman因子)、因子XIII(血纤蛋白稳定因子)、冯威勒布兰特氏因子、激肽释放酶原、高分子量激肽原(菲茨杰拉德因子)、纤连蛋白、抗凝血酶III、肝素辅因子II、蛋白质C、蛋白质S、蛋白质Z、蛋白质Z相关蛋白酶抑制剂、血纤维蛋白溶酶原、 α 2-抗纤维蛋白溶酶、组织纤溶酶原激活物、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂-1、纤溶酶原激活物抑制剂-2、葡萄糖脑苷脂酶(GBA)、 α -半乳糖苷酶A(GLA)、艾杜糖醛酸硫酸酯酶(IDS)、艾杜糖醛酸酶(IDUA)、酸性鞘磷脂酶(SMPD1)、MMAA、MMAB、MMACHC、MMADHC(C2orf25)、MTRR、LMBRD1、MTR、丙酰基-CoA羧化酶(PCC)(PCCA和/或PCCB亚基)、葡萄糖-6-磷酸转运体(G6PT)蛋白质或葡萄糖-6-磷酸酶(G6P酶)、LDL受体(LDLR)、ApoB、LDLRAP-1、PCSK9线粒体蛋白诸如NAGS(N-乙酰谷氨酸合成酶)、CPS1(氨甲酰磷酸合成酶I)、以及OTC(鸟氨酸转氨甲酰酶)、ASS(精氨基琥珀酸合成酶)、ASL(精氨基琥珀酸裂解酶)和/或ARG1(精氨酸酶)、和/或溶质载体家族25(SLC25A13、天冬氨酸/谷氨酸载体)蛋白、UGT1A1或UDP葡萄糖醛酸基转移酶多肽A1、延胡索酰乙酰乙酸酯水解酶(FAH)、丙氨酸-乙醛酸转氨酶(AGXT)蛋白、乙醛酸还原酶/羟基丙酮酸还原酶(GRHPR)蛋白、转甲状腺素蛋白基因(TTR)蛋白、ATP7B蛋白、苯丙氨酸羟化酶(PAH)蛋白、脂蛋白裂解酶(LPL)蛋白、工程化核酸酶、工程化转录因子和/或治疗性单链抗体。

[0151] 在某些实施方案中,转基因可包含标记基因(以上所述),从而允许选择已经历靶向整合的细胞;以及编码另外功能的连接序列。标记基因的非限制性实例包括GFP、药物选

择标记等。

[0152] 本文所述的构建体也可以用于递送非编码转基因。编码反义RNA、RNAi、shRNA和微小RNA(miRNA)的序列也可以用于靶向插入。

[0153] 在某些实施方案中,转基因包含长度大于1kb,例如在2与200kb之间、在2与10kb之间(或任何在其间的值)的序列(例如编码序列,也称为转基因)。转基因还可包含一个或多个核酸酶靶位点。

[0154] 当整合(例如,经由核酸酶介导的整合)时,转基因可插入内源基因中以使得所有、一些或没有内源基因得以表达。

[0155] 核酸酶

[0156] 如以上所述,表达盒可以游离基因形式维持或者可以整合到细胞的基因组中。整合可以是随机的。优选地,转基因构建体的整合在通过一种或多种核酸酶(例如,锌指核酸酶(“ZFN”)、TALEN、TtAgo、CRISPR/Cas核酸酶系统、以及归巢内切核酸酶)裂解靶基因之后靶向,并且通过同源导向修复(HDR)或通过非同源末端连接(NHEJ)驱动过程期间的末端捕获来整合构建体。参见,例如,美国专利号9,255,250;9,200,266;9,045,763;9,005,973;9,150,847;8,956,828;8,945,868;8,703,489;8,586,526;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,067,317;7,262,054;7,888,121;7,972,854;7,914,796;7,951,925;8,110,379;8,409,861;美国专利公布20030232410;20050208489;20050026157;20050064474;20060063231;20080159996;201000218264;20120017290;20110265198;20130137104;20130122591;20130177983;20130196373以及20150056705,所述专利的公开内容出于所有目的以引用方式整体并入。

[0157] 任何核酸酶可以用于靶向整合转基因表达构建体。

[0158] 在某些实施方案中,核酸酶包括锌指核酸酶(ZFN),其包含锌指DNA-结合结构域和裂解(核酸酶)结构域。参见,例如,美国专利号9,255,250;9,200,266;9,045,763;9,005,973;9,150,847;8,956,828;8,945,868;8,703,489;8,586,526;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,067,317;7,262,054;7,888,121;7,972,854;7,914,796;7,951,925;8,110,379;8,409,861。

[0159] 在其它实施方案中,核酸酶包括TALEN,其包含TAL-效应物DNA结合结构域和裂解(核酸酶)结构域。参见,例如,美国专利号8,586,526和美国公布号20130196373。

[0160] 在其它实施方案中,核酸酶包括CRISPR/Cas核酸酶系统,其包含用于识别靶位点的单个指导RNA和一个或多个切割结构域。参见,例如,美国专利公开号20150056705。在一些实施方案中,使用CRISPR-Cpf1系统(参见Fagerlund等人,(2015)Genom Bio 16:251)。应理解,术语“CRISPR/Cas”系统是指CRISPR/Cas和CRISPR/Cfp1系统。

[0161] 核酸酶的裂解结构域可以是野生型的或突变的,包括形成专性异二聚体的非天然存在(工程化)裂解结构域。参见,例如,美国专利号8,623,618;7,888,121;7,914,796;以及8,034,598以及美国公开号20110201055。

[0162] 核酸酶可以在靶位点中形成一个或多个双链和/或单链切口。在某些实施方案中,核酸酶包含无催化活性裂解结构域(例如,FokI和/或Cas蛋白质)。参见,例如,美国专利号9,200,266;8,703,489,以及Guillinger等人(2014)Nature Biotech.32(6):577-582。无催化活性裂解结构域可以与有催化活性结构域组合用作切口酶以形成单链切口。因此,两种

切口酶可以组合使用以在特异性区域中形成双链切口。另外的切口酶也是本领域已知的,例如McCaffery等人(2016) *Nucleic Acids Res.* 44 (2) :e11.doi:10.1093/nar/gkv878.2015年10月19日电子出版。

[0163] 在某些实施方案中,核酸酶切割安全港基因(例如,CCR5、Rosa、白蛋白、AAVS1等。参见,例如,美国专利号7,888,121;7,972,854;7,914,796;7,951,925;8,110,379;8,409,861;8,586,526;美国专利公布20030232410;20050208489;20050026157;20060063231;20080159996;201000218264;20120017290;20110265198;20130137104;20130122591;20130177983以及20130177960。在优选的实施方案中,核酸酶切割内源白蛋白基因,使得表达盒整合到肝细胞的内源白蛋白基因座中。白蛋白特异性核酸酶描述于例如美国专利号9,150,847;以及美国公开号20130177983和20150056705中。

[0164] 递送

[0165] 本文所述的构建体(和/或核酸酶)可以通过任何合适的方式体内或离体递送到任何细胞类型中,优选地递送到肝(肝递送)。类似地,当与核酸酶组合使用以用于靶向整合时,核酸酶可以使用非病毒载体、病毒载体以多核苷酸和/或蛋白质形式递送和/或以RNA形式例如mRNA形式递送。

[0166] 核酸的非病毒递送方法包括电穿孔、脂转染、微注射、基因枪、病毒体、脂质体、免疫脂质体、其它纳米颗粒、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒颗粒、以及DNA的试剂增强吸收。使用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)的超声穿孔也可以用于核酸递送。额外示例性的核酸递送系统包括由AmaxaBiosystems(Cologne,Germany)、Maxcyte, Inc.(Rockville,Maryland)、BTX Molecular Delivery Systems(Holliston,MA)和Copernicus Therapeutics Inc(参见例如US6008336)提供的那些。

[0167] 在优选的实施方案中,表达构建体是AAV载体。任选的核酸酶可以mRNA形式或使用一种或多种病毒载体(AAV、Ad等)施用。施用可通过多核苷酸递送至所需靶细胞的任何手段。涵盖体内和离体两种方法。静脉内注射至门静脉是优选施用方法。其它体内施用模式包括例如直接注入肝叶或胆管和/或在肝远端的静脉内注射,包括经由肝动脉,直接注入肝实质,经由肝动脉注射,和/或经由胆道系统的逆行注射。离体施用模式包括切除肝细胞或其它肝细胞的体外转导,随后将转导、切除肝细胞输注回到人患者的门脉管、肝实质或胆道系统,参见例如,Grossman等人,(1994) *Nature Genetics*, 6:335-341。

[0168] 在涉及超过一种多核苷酸的递送的系统(例如,如本文所述的构建体和呈多核苷酸形式的核酸酶)中,使用一种或多种相同和/或不同的载体递送两种或更多种多核苷酸。例如,多核苷酸形式的核酸酶可以mRNA形式递送并且如本文所述的肝特异性构建体可以经由其它形式诸如病毒载体(例如,AAV)、微环DNA、质粒DNA、线性DNA、脂质体、纳米颗粒等来递送。

[0169] 药学上可接受的载体部分地通过所施用的具体组合物以及通过用来施用组合物的具体方法来确定。因此,如下所述,存在可用的药物组合物的广泛多种的适合制剂(例如参见Remington's *Pharmaceutical Sciences*,第17版.,1989)。

[0170] 待施用的表达盒(和任选的核酸酶和/或修饰的细胞)的有效量将随患者不同而变化。因此,有效量最好由施用组合物(例如细胞)的医师确定并且适当剂量可由本领域普通技术人员容易地确定。在,治疗性多肽的血清、血浆或其它组织水平的分析和与施用之前的

初始水平比较可以确定是否施用量太低、在正确范围内或太高。初始和随后施用的合适方案也可变,但是如果有必要,典型地在初始施用之后进行后续施用。随后施用可以可变时间间隔来施用,所述时间间隔在每天一次至每年一次至每隔几年一次范围内。本领域技术人员应认识到可建议适当免疫抑制技术以便通过递送载体的免疫抑制来避免转导的抑制或阻滞,参见例如,Vilquin等人,(1995)Human Gene Ther.,6:1391-1401。

[0171] 离体和体内施用的制剂包括液体或乳化液体中(例如,遗传修饰的细胞、脂质体或纳米颗粒)的悬浮液。活性成分经常与药学上可接受并与活性成分相容的赋形剂混合。合适赋形剂包括例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等和其组合。另外,组合物可含有少量辅助物质,诸如,润湿或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂或增强药物组合物的有效性的其它试剂。

[0172] 应用

[0173] 本文所公开的方法和组合物通过提供表达疾病中缺少或缺乏的蛋白质的转基因来用于提供任何疾病的治疗或者以其它方式治疗或预防所述疾病。细胞可以在体内修饰或者可以离体修饰并且随后施用至受试者。因此,所述方法和组合物提供此类遗传疾病的治疗和/或预防。

[0174] 以下实施例包括本公开的示例性实施方案,其中任选使用的核酸酶包括锌指核酸酶(ZFN)。应认识到此仅用于例证目的并且可使用其它核酸酶,例如TALEN、CRISPR/Cas、具有工程化DNA-结合结构域的归巢内切核酸酶(大范围核酸酶)和/或天然存在或工程化归巢内切核酸酶(大范围核酸酶)DNA-结合结构域和异源裂解结构域的融合和/或大范围核酸酶和TALE蛋白质的融合。另外,将了解的是,如本文所述的表达构建体可以在其它载体(除AAV之外)上携带以在由缺乏蛋白质产生所引起的病症的治疗和/或预防中产生相同的结果。

实施例

[0175] 实施例1:方法

[0176] DNA构建体

[0177] 图1描绘对于携带人类因子VIII cDNA的示例性构建体的开发所遵循的总体结构和方法。构建体包含肝特异性增强子、肝特异性启动子、任选的内含子、绝缘子序列和转基因(例如,密码子优化的人类因子VIII B结构域缺失的转基因)、合成的多腺苷酸化序列、间隔子以及5' /3' 倒置末端重复。使用常规分子生物克隆方法组装所有构建体。

[0178] 如图1所示,在载体开发期间遵循若干个步骤。最初检查构建体组分对在制造期间获得的病毒产率的作用。通过使用如下所示的三种不同的潜在绝缘子序列来探索构建体中绝缘子区域的序列的影响:Ins1:5' GGAACCATTGCCACCTTCA (SEQ ID NO:28), Ins2:5' CTATCCATTGCACTATGCT (SEQ ID NO:29), 以及Ins3:5' TTCCTGTAACGATCGGG (SEQ ID NO:30)。然后将绝缘子区域插入到转基因表达盒中,其中在5' ITR序列与增强子/启动子序列开始部分之间使用的绝缘子一直是Ins1。然而,在构建体的3' 末端,将Ins2或Ins3序列连接至SPA51合成的聚A序列(5' AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGTT, SEQ ID NO:31), 如下:Ins2-SPA51:5' AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGTTCTATCCATTGCACTATGCT, SEQ ID NO:32, 以及Ins3-SPA51:5' AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGTTTTCCTGTAACGATCGGG, SEQ ID NO:33。在一些实施方案中, Ins4连接至SPA51。

[0179] 在表达构建体中也使用Ins序列变体,其中SerpE-TTRm-MVM启动子区域用杂合肝启动子替代(HLP,McIntosh等人,同上)。这些构建体在图2中示出。然后使用HEK293细胞将这些构建体包装到AAV2/6颗粒中,其中产率来自2个细胞工厂(Yuan等人,(2011)HumGene Ther.,22,613-624,2011)。已发现含有修饰的绝缘子序列的构建体的产率(载体基因组)比包含亲本启动子区域的构建体高将近3log,其中表达盒分别在5'和3'端处侧接Ins1和Ins3绝缘子区域(图3)。另外,将这些绝缘子序列插入到以下步骤2所述的修饰的CRMSBS1和CRMSBS2构建体中(图19和20),并且测试其病毒产率(图22)。数据显示与亲本构建体相比新构建体的病毒产率提高8-10倍。

[0180] 在步骤2中,将点突变引入丝氨酸蛋白酶抑制蛋白1增强子中以形成前两种衍生的载体CRMSBS1和CRMSBS2(图4)。这些载体的增强子序列不同,其中点突变如图5所示地引入。所形成的特定改变如下:对于CRMSBS1,表示为如图5所描绘的1、2、3和4,分别进行以下取代:1=G至A,2=C至G,3=T至C并且4=G至A。类似地,对于CRMSBS2,如下修饰位置1、3、4和5:1=G至A,3=T至C,4=G至A并且5=C至T。

[0181] 在步骤3中,制备构建体以研究载体中的内含子序列。如图6和7所示,CRMSBS2和CRMSBS2载体中的内含子序列通过去除MVM内含子来修饰(“CRMSBS1无内含子”,图6,以及“CRMSBS2无内含子”,图7)。在另一个变体中,测试T-嵌合内含子序列(“CRMSBS1 T-嵌合内含子”,图6,以及“CRMSBS2 T-嵌合内含子”,图7)。

[0182] 对于步骤4,通过引入旨在剪接供体和受体位点的突变来对MVM内含子做出改变。图10示出这些载体的图谱,其中改变的内含子被称为SBR内含子1-3。MVM内含子具有两个潜在供体位点和那些供体的两个潜在接受位点(参见图11以进行说明)。在图11中,两个供体位点表示为D1和D2,并且其对应受体位点被示为A1和A2。通过D1-A1和D2-A2的剪接形成的剪接点在基因上方示出为虚线。MVM内含子的部分序列在图11的基因(SEQ ID NO:14)下方示出并且指示内含子增强子序列(IES)的位置(加下划线)以及A1和A2受体的位点(Haut和Pintel,(1998)J Virol,72:1834-1843;Haut和Pintel,(1998)Virol J,258:84-94)。构建三种内含子以用于测试,并且这些内含子示出在图10中,并且表示为SBR内含子1-3(SEQ ID NO:15-17中所示的内含子序列)。还在体外评价由AAV F8 cDNA递送的表达的hFVIII的活性。在24孔皿中将AAV2/6F8 cDNA(CRMSBS2 SBR内含子3)以每1E+05个细胞4.8E+06、2.4E+06、1.2E+06和0.6E+06载体基因组/mL的剂量添加到HepG2细胞中(表示为时间t0天)。在添加AAV2/6病毒之后七天(t7)通过ELISA分析上清液的所分泌的hFVIII水平并且通过APTT凝血测定和显色活性测定分析其活性(对于方法,参见下文)。结果(图21)表明所分泌的hFVIII水平与活性之间的良好相关性。示出具有n=6次生物重复实验的数据。误差条表示重复实验的平均值的标准偏差。

[0183] 然后如下文所述在体内测试这些构建体。

[0184] 定量PCR

[0185] qRT-PCR(对于人类因子VIII mRNA水平):按照制造商说明书使用FastPrep和Lysing Matrix D(MP Biomedicals,Santa Ana CA)裂解小鼠组织。按照制造商说明书使用AllPrep DNA/RNA试剂盒(Qiagen,Carlsbad CA)从小鼠组织分离RNA/DNA。然后使用所提取的RNA,使用Quantitect cDNA合成试剂盒(Qiagen,Carlsbad CA)制备cDNA。然后在Biorad CFX 96上使用SsoAdvanced Universal Probes Supermix(Biorad,Hercules CA)使用来自

IDT (Coralville IA) 的标记的引物/探针测定进行定量PCR。小鼠GAPDH测定是Mm.PT.39a.1。对于人类因子VIII mRNA的特异性检测,引物/探针测定是定制的;正向引物(GGAGATGAAGAAGGAGGACTTTG) (SEQ ID NO:18)、探针(ACATCTACGACGAGGACGAGAACCA) (SEQ ID NO:19)以及反向引物(TCCACAGCAGCAATGAAGTAG) (SEQ ID NO:20)。在对每种样品的GAPDH进行归一化的情况下使用定量qRT-PCR(不是绝对的)并且相对于设定为1.0的一个小鼠样品报告最终数据分析。在所有样品的情况下没有运行模板对照和逆转录酶对照并且没有产生可检测的信号。

[0186] qPCR(对于载体基因组, VG, 分析):按照制造商说明书使用FastPrep和Lysing Matrix D(MP Biomedicals, Santa Ana CA)裂解小鼠组织。按照制造商说明书使用AllPrep DNA/RNA试剂盒(Qiagen, Carlsbad CA)从小鼠组织分离RNA/DNA。使用提取的DNA以用于在AB 7300实时PCR系统(Applied Biosystems, Foster City, CA)上使用TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG(Applied Biosystems, Foster City, CA)进行定量PCR。对于人类因子VIII的特异性检测,引物/探针测定是定制的;正向引物(CCTGGGCCAGTTCCTGCT) (SEQ ID NO:21)、探针(TTCTGCCACATCAGCAGCCACCA) (SEQ ID NO:22)以及反向引物(GGCCTCCATGCCATCATG) (SEQ ID NO:23)。在所有样品的情况下没有运行模板对照并且没有产生可检测的信号。由已知量的纯化的线性人类因子VIII质粒的七个4倍系列稀释液生成qPCR DNA标准曲线。

[0187] qPCR(对于使用HepG2细胞通过NHEJ进行靶向整合)-按照制造商说明书使用QIAamp DNA micro(Qiagen, Carlsbad CA)从人类HepG2细胞中分离DNA。然后在Biorad CFX 96上使用SsoAdvanced Universal Probes Supermix(Biorad, Hercules CA)使用来自IDT (Coralville IA) 的标记的引物/探针测定进行定量PCR。人类GAPDH测定是Hs.PT.39a.22214836。对于在内源人类白蛋白基因座处通过NHEJ进行的靶向整合人类因子VIII的特异性检测,引物/探针测定是定制的;正向引物(AGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACT) (SEQ ID NO:24)、探针(CCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCT) (SEQ ID NO:25)以及反向引物(CCTGAAGGTGGCAATGGT) (SEQ ID NO:26)。出于此研究的目的,在对每种样品的GAPDH进行归一化的情况下使用定量qPCR(不是绝对的),并且最终数据分析相对于设定为1.0的一个样品报告。没有运行模板对照、没有运行转录酶对照和没有运行ZFN对照并且没有产生可检测的信号。

[0188] qPCR(对于从小鼠组织中通过NHEJ和HDR进行靶向整合)-按照制造商说明书使用FastPrep和Lysing Matrix D(MP Biomedicals, Santa Ana CA)裂解小鼠组织。按照制造商说明书使用AllPrep DNA/RNA试剂盒(Qiagen, Carlsbad CA)从小鼠组织分离RNA/DNA。然后在Biorad CFX 96上使用SsoAdvanced Universal Probes Supermix(Biorad, Hercules CA)使用来自IDT(Coralville IA) 的标记的引物/探针测定进行定量PCR。小鼠GAPDH测定是Mm.PT.39a.1。对于在内源小鼠白蛋白基因座处通过NHEJ进行的靶向整合人类因子8cDNA的特异性检测,引物/探针测定是定制的;正向引物(GTGTAGCAGAGAGGAACCATT, SEQ ID NO:39)、探针(CCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCT, SEQ ID NO:40)以及反向引物(GTTAATATTCACCAGCAGCCT, SEQ ID NO:41)。对于在内源小鼠白蛋白基因座处通过NHEJ进行的靶向整合ZFN的特异性检测,引物/探针测定是定制的;正向引物(AGTGTAGCAGAGAGGAACCA, SEQ ID NO:42)、探针(CCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCT, SEQ ID NO:

43)以及反向引物(CAGGGTGAGCCCAGAAAC,SEQ ID NO:44)。对于在内源小鼠白蛋白基因座处通过HDR进行的靶向整合人类因子8的特异性检测,引物/探针测定是定制的;正向引物(AACTTTGAGTGTAGCAGAGAGG,SEQ ID NO:45)、探针(TACCGGAGGAGCAAACAGGGACTA,SEQ ID NO:46)以及反向引物(CTCTACGAAATGTGCAGACAGA,SEQ ID NO:47)。出于此研究的目的,使用定量qPCR(不是绝对的),并且最终数据分析相对于设定为1.0的一个样品报告。没有运行模板对照、没有运行转录酶对照和没有运行ZFN对照并且没有产生可检测的信号。

[0189] 插入缺失(插入和缺失)-按照制造商说明书使用FastPrep和Lysing Matrix D(MP Biomedicals,Santa Ana CA)裂解小鼠组织。按照制造商说明书使用AllPrep DNA/RNA试剂盒(Qiagen,Carlsbad CA)从小鼠组织分离RNA/DNA。将提取的DNA用于PCR并且进行深度测序以测量在小鼠白蛋白基因座处的插入缺失。

[0190] 血浆-对于C57BL/6研究,在第7天、第14天、第21天(未终止)以及第28天或所述更长(终止)时间时从所有小鼠收集血液。对于甲型血友病小鼠研究,在第8天、第14天、第21天、第28天、第35天和第42天(未终止)从所有小鼠收集血液。将所有血液收集到含有柠檬酸钠的管中并且将其处理成血浆。经由下颌下腺静脉或眶后静脉窦收集未终止的血液收集物。经由心脏穿刺或腔静脉收集在处死时的血液收集物。将血浆分离并保存在-60℃至-80℃下,直到在以下所述的ELISA测定或Chromogenix Coamatic活性测定中使用。

[0191] 肝-对于C57BL/6研究,将小鼠在第28天处死并且收集和称量肝、脾、睾丸、大脑、心脏、肺和肾。分离肝左侧叶并将其分成3片并且在液氮中与肝的其余部分分开速冻。将其余肝叶和其它组织(整体)速冻在液氮中。将冷冻样本保存在-60℃至-80℃,直到处理以用于RNA/DNA提取。

[0192] 体外研究,HepG2 AAV F8 cDNA/ZFN。按照制造商指南(ATCC,Manassas VA)维持人类HepG2肝细胞。在实验那天,将HepG2细胞洗涤、胰蛋白酶化并计数。所使用的ZFN是至人类白蛋白内含子基因座,左侧SBS47171和右侧SBS47898。ZFN连同hF8 cDNA(CRMSBS2无内含子)作为AAV2/6递送,表示为零时间。对于每个24孔皿的孔1E+05个细胞,递送3.0E+05的AAV2/6ZFN以及3.0E+04、6.0E+04和1.2E+05的AAV2/6hFVIII cDNA CRMSBS2无内含子。第二天更换培养基。在AAV2/6病毒添加后的时间点t3、t5和t7时使用以下所述的hFVIII ELISA分析上清液中所分泌的hFVIII。

[0193] 体外研究,HepG2 AAV F8 cDNA。按照制造商指南(ATCC,Manassas VA)维持人类HepG2肝细胞。在实验那天,将HepG2细胞洗涤、胰蛋白酶化并计数。按照在24孔皿的各孔中每1E+05个细胞6.0E+06、1.2E+06、2.4E+06和4.8E+06剂量递送AAV2/6hF8 cDNA(CRMSBS2 SBR内含子3)。在时间点t3(t=天)更换培养基。使用来自Affinity Biologics的hFVIII ELISA分析在添加AAV 2/6病毒之后的时间点t5和t7时的上清液的分泌的hFVIII水平,并且通过下文所述的显色测定和凝血测定来分析hFVIII活性。

[0194] 人类因子VIII ELISA。亲和力生物制品hFVIII ELISA(小鼠和HepG2细胞)。根据制造商方案使用Affinity Biologics(Canada)ELISA试剂盒(FVIII-AG)测定所分泌的人类因子VIII水平,除了人类因子VIII标准品之外。用于ELISA测定中的人类因子VIII标准品是来自US Biologicals(Salem,MA)的重组纯化的人类因子VIII(#F0016-06)。简言之,将小鼠血浆添加到板中,在室温下在摇动下孵育一个半小时,接着用试剂盒中提供的洗涤缓冲液洗涤三次。添加试剂盒中提供的检测抗体并且在室温下孵育四十五分钟,接着用试剂盒中

提供的洗涤缓冲液洗涤三次。添加试剂盒中提供的TMB底物并且使其显色十分钟。用终止溶液终止反应并在450nm下使用读板仪读取吸光度。

[0195] 内部hFVIII ELISA(食蟹猴)。使用定制ELISA测定分泌到NHP血浆中的hFVIII的水平。在4℃下用0.2M碳酸盐碳酸氢盐缓冲液pH9.4(Thermo Fisher Scientific,Waltham MA)中的小鼠单克隆抗-hFVIII抗体(Green Mountain,Burlington,VT)将聚苯乙烯微板(Corning,96-孔半面积高结合)涂覆过夜。第二天,将板用1X TBST(Thermo Fisher Scientific,Waltham MA)洗涤四次。然后将96孔板在室温下用3%BSA/TBS封闭缓冲液封闭两小时,接着用1X TBST洗涤四次。将血浆添加到板中,并且在室温下在摇动下孵育两个小时,接着用1XTBST洗涤四次。添加检测抗体即生物素化单克隆小鼠抗-FVIII抗体(Green Mountain,Burlington,VT)并且在室温下孵育一小时,接着用1X TBST洗涤四次。添加链霉亲和素HRP(Jackson ImmunoResearch,West Grove PA)并且将其在室温下孵育一小时,接着用1X TBST洗涤四次。添加TMB Ultra(Thermo Fisher Scientific,Waltham MA)并且使其显色十分钟,用终止溶液终止反应并且在450nm下使用读板仪读取吸光度。本底吸光度读数是可忽略的(通常是0)。

[0196] 显色人类因子VIII活性测定。根据制造商方案使用Diapharma Chromogenic Coamatic Factor VIII测定(West Chester,OH)测定血浆中所分泌的人类因子VIII的活性,除了人类因子VIII标准品之外。用于ELISA测定中的人类因子VIII标准品是来自US Biologicals(Salem,MA)的重组纯化的人类因子VIII(#F0016-06)。

[0197] 凝血活性测定使用活化的部分促凝血酶原激酶时间(aPTT)测定根据制造商方案通过Diagnostica Stago(Boston MA)测定HepG2上清液(或食蟹猴血浆)中所分泌的人类因子VIII的活性,除了人类因子VIII标准品和缺乏人类因子VIII的血浆。人类因子VIII标准品与用于ELISA测定中的人类因子VIII(重组纯化的人类因子VIII,来自US Biologicals,Salem,MA的#F0016-06)相同。凝血测定中所用的缺陷型FVIII试剂是来自Haematologic Technologies,Inc.(Essex Junction,VT)的FVIII-CD<1%FVIII活性(冷冻缺陷型FVIII)。简言之,将标准品或样品添加到含有钢球的比色杯中。添加试剂盒中提供的FVIII-CD<1%FVIII活性和PTT Automate,将其在37℃下孵育一百八十秒。在使钢球在比色杯内运动时,将试剂盒中提供的STA CaCl₂添加到反应物中。通过添加STA CaCl₂来测量凝血时间,直到钢球运动停止。使用Stago Start Hemostasis Analyzer进行该测定的孵育和时间记录。

[0198] 实施例2:体内研究

[0199] 野生型小鼠:将八周至十周龄的C57BL/6小鼠用于体内研究。研究遵守人类护理和使用动物的动物福利法。将测试品(含有构建体的AAV病毒)在室温下在给药前解冻,并且所有动物均接受单次静脉内(IV)200μL注射。以下表1示出用于测试在图8中体内研究的构建体的研究设计(在图4、6和7中定位)。表2示出用于测试图15中列出的构建体的研究设计。剂量为每只小鼠1.8E+11vg,为大约7E+12vg/kg。所有动物均在第0天和第14天接受环磷酸胺的后续200μL腹膜内注射。进行未终止和终止血液收集,如表1和表2所列出的。

[0200] 表1:用于来自图4、6和7的构建体的研究设计(图8中的结果)

组	测试品描述	血清型	免疫补充物	剂量	总体积/小鼠(μL)	N/连续出血的时间点(天数)				
						7	14	21	28	
						7	14	21	28	
1	制剂	NA	50 mg/kg	NA	200	6	6	6	6	6
2	亲本	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6	6
3	CRMSBS1	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6	6
4	CRMSBS1 无内含子	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6	6
5	CRMSBS1 T-嵌合内含子	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6	6
6	CRMSBS2	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6	6
7	CRMSBS2 无内含子	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6	6
8	CRMSBS2 T-嵌合内含子	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6	6
										48

[0202] 表2:来自图15的用于构建体的研究设计

组	测试品描述	血清型	免疫补充物	剂量	总体积/小鼠(μL)	N/连续出血的时间点(天数)				
						7	14	21	28	
						7	14	21	28	
1	制剂	NA	50 mg/kg	NA	200	4	4	4	4	4
2	亲本	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	4	4	4	4	4
3	CRMSBS2	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	4	4	4	4	4
4	CRMSBS2 SBR 内含子 1	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	4	4	4	4	4
5	CRMSBS2 SBR 内含子 2	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	4	4	4	4	4
6	CRMSBS2 SBR 内含子 3	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	4	4	4	4	4
										24

[0204] 在第7天、第14天、第21天(未终止)以及第28天(终止)从所有小鼠收集血液。将所有血液收集到含有柠檬酸钠的管中并且将其处理成血浆。经由下颌下腺静脉或眶后静脉窦收集未终止的血液收集物。经由心脏穿刺或腔静脉收集在处死时的血液收集物。将血浆分离并保存在 -60°C 至 -80°C 下,直到在以下所述的ELISA测定中使用。

[0205] 将所有动物在第28天处死并且收集和称量肝、脾、睾丸、大脑、心脏、肺和肾。分离肝左侧叶并将其分成3片并且在液氮中与肝的其余部分分开速冻。将其余肝叶和其它组织(整体)速冻在液氮中。将冷冻样本保存在 -60°C 至 -80°C ,直到处理以用于RNA/DNA提取。

[0206] 如图8和15所示,所测试的所有构建体在施用之后第7天(图8A和图15A)和第28天(图8B和图15B)在体内引起转基因(人类分泌的因子VIII B结构域缺失)的体内产生。另外,如图9和16所示,转基因仅在肝内表达而不会在其它组织(图9A和16A)中表达,并且AAV载体主要转导肝细胞(载体基因组生物分布分析,如图9B和16B所示)。在这些数据集中,在图1表示的研究中通过如以上实施例1所述的qRT-PCR分析来自组织(大脑、心脏、肝、肺、肾、脾、睾丸)的人类因子VIII-BDD(hFVIII-BDD)mRNA。另外,通过qPCR(参见实施例1)分析这些相同组织中的载体基因组分布并且结果示出在图9B/16B中。这些数据表明AAV2/6载体主要转导肝。

[0207] 也在表2所列出的研究中在体内测试经设计成评价内含子修饰的功绩的构建体,并且第7天和在峰值水平下的数据示出在图15中。还分析hFVIII-BDD mRNA(图16A),连同载体基因组分布(图16B),并且显示hF8 mRNA表达是肝特异性的,并且AAV2/6主要转导肝。

[0208] 因此,本文所述的构建体在肝递送之后提供稳健的转基因表达。

[0209] 进行另外的研究以测试体内观测到的hFVIII-BDD水平是否对所用的AAV的血清型敏感。用AAV2/5、AAV2/6、AAV2/8或AAV2/9F8亲本cDNA的 $6E+10\text{vg}/\text{小鼠}$ (约 $2E+12\text{vg}/\text{kg}$)或 $1.8E+11\text{vg}/\text{小鼠}$ (约 $7E+12\text{vg}/\text{kg}$)静脉内注射雄性C57BL/6小鼠。实现用血清型AAV2/6转导小鼠,已知在转导小鼠肝时在人类正常hFVIII血浆水平的 $91.9\% \pm 15.5\text{SEM}$ ($n=6$)的 $6E+10\text{vg}/\text{小鼠}$ (约 $2E+12\text{vg}/\text{kg}$)平均峰值下是无效的。在表示约 $7E+12\text{vg}/\text{kg}$ 的较高剂量下,实现在六个独立体内小鼠研究的hFVIII血浆平均峰值 $169.2\% \pm 10.1\text{SEM}$ ($n=36$)。AAV2/8在 $2E+12\text{vg}/\text{kg}$ 下的平均峰值水平是320%并且在 $6E+12\text{vg}/\text{kg}$ 下的平均峰值水平是323.6%。对于AAV2/9在 $2E+12\text{vg}/\text{kg}$ 下,平均峰值水平是389.6%(参见图23,也示出使用AAV2/5和AAV2/6的结果)。

[0210] 进行研究以确定用于生成AAV的产生方法对体内实现的hFVIII-BDD表达具有影响。经由IV注射(尾静脉)以由HEK293细胞或Sf9/rBV(重组杆状病毒)产生的 $1.8E+11\text{vg}/\text{小鼠}$ (约 $7E+12\text{vg}/\text{kg}$)的AAV2/6F8亲本cDNA,向雄性C57BL/6小鼠施用亲本F8亲本cDNA。用来自HEK293细胞的F8亲本cDNA进行处理实现正常人类FVIII血浆水平的 $142.1\% \pm 8.3\% \text{SEM}$ ($n=8$)(通过hFVIII ELISA测量)的平均峰值。在向小鼠施用F8亲本cDNA(Sf9/rBV)之后实现类似水平 $132.8\% \pm 18.6\% \text{SEM}$ ($n=5$)(通过hFVIII ELISA测量)(图24)。

[0211] 出于与F8 CRMSBS2 SBR内含子3cDNA相比较的目的重复所述研究(参见图10)。用 $1.8E+11\text{vg}/\text{小鼠}$ (约 $6E+12\text{vg}/\text{kg}$)的AAV2/6CRMSBS2 SBR内含子3cDNA($n=8$)静脉内注射雄性C57BL/6小鼠。示出hFVIII在C57BL/6小鼠血浆中的平均峰值水平,如通过hFVIII ELISA所测量的(图25)。

[0212] 甲型血友病小鼠:还在甲型血友病R593A小鼠模型中测试构建体(Bri1等人(2006)Thromb Haemost 95(2):341-7;Chavez等人,(2012)Hum Gen Ther.,23(4):390)。这些小鼠携带内源鼠F8基因的敲除。另外,它们携带在鼠白蛋白启动子控制下的突变体人类FVIII-R593C转基因,使得它们表达不可检测量的突变体人类蛋白质,但是由于产生痕量的突变体FVIII R593A蛋白质而被认为对人类FVIII表达耐受。初始品种是FVB,但是已在Jackson实验室与C57BL/6小鼠回交至少5代。研究遵守人类护理和使用动物的动物福利法。将测试品在室温下在给药前解冻,并且所有动物均接受单次静脉内(IV)200 μL 注射。剂量为每只小鼠 $1.8E+11\text{vg}$,为大约 $7E+12\text{vg}/\text{kg}$ 。研究设计在以下表3中示出:

[0213] 表3:甲型血友病突变小鼠中的CRMSBS2 SBR内含子3

组	测试品描述	血清型	免疫补充物	剂量	总体积/小鼠(μL)	连续出血的时间点(天数)						
						8	14	21	28	35	42	Sac
[0214] 1	制剂缓冲液	NA	不适用	不适用	200	6	6	6	6	6	6	6
2	CRMSBS2 SBR 内含子3	AAV2/6	不适用	1.80E+11	200	6	6	6	6	6	6	6
12												

[0215] 将研究进行三个月,示出三个月研究的代表性结果,第14天和第42天的结果(图17)显示FVIII-BDD转基因在第14天(图17A)和第42天(图17B)在正常人类血浆中可见的FVIII蛋白质水平的水平 $>300\%$ 下表达。

[0216] 为了测试hFVIII在小鼠甲型血友病模型中的功能和治疗功效,使用尾静脉横断(TVT)模型。简言之,最初用异氟烷麻醉小鼠,并且在研究持续时间期间经由麻醉罩维持麻醉。紧接着在麻醉诱导之后,将小鼠放置在加热垫(设定至 37°C)上,在胃与加热垫之间具有温度传感器,确保头部适当定位在麻醉罩中。使用用于测量的标记块,在“12点钟”用标记笔标记尾部,这对应于精确直径 2.5mm ,此情况是在将尾部浸没在盐水收集管(37°C 盐水)中之后。将尾部浸没在温度盐水中总计10分钟,之后诱导出血。然后在进行切割之前大约十秒将尾部放置在切割块中,其中标记从“13”指向“15点钟”(以有利于左侧尾静脉的横断)。在精确地 $t=0$ 分钟时,切割尾部,其中 1mm 深切口侧放在小鼠左侧上,从而横断侧尾静脉。紧接着在尾部浸没在预先加温的盐水收集管中之后。持续三分钟记录主要出血发作。如果主要出血大于三分钟,则使动物安乐死并替换。在损伤后三分钟,用新预先升温的盐水收集管交换收集管。再持续57分钟记录所有次要出血发作。如果出血在15、30或45分钟时停止,则用盐水润湿的纱布拭子轻轻擦拭两次来激发伤口。紧接着在激发之后,将尾部再浸没到盐水中。在 $t=60$ 分钟时,在仍处于完全麻醉下时将小鼠安乐死。将出血时间报告为主要出血和次要出血时间的总和。将主要和次要出血裂解并且保存以用于随后进行出血损失的血红蛋白测量。(Johansen等人,Haemophilia, (2016) doi:10.1111/hae.12907)。

[0217] 结果表明在尾静脉横断之后在甲型血友病R593C小鼠中实现止血的时间量显著减少($p<0.0001$) (图18),从而证实了在这些小鼠中的治疗性功效。

[0218] 非人灵长类动物:在NHP中使用hFVIII-BDD cDNA构建体进行实验,其中AAV2/6和AAV2/8血清型得到评价。以下表4和图26B示出给药组的身份。在F8转基因表达盒设计的“cDNA 1”(以下表4的组2-4)和“cDNA2”(以下表4的组5)之间的差异在于,“cDNA2”供体具有轻微不同的启动子模块(杂合肝启动子,参见McIntosh等人(2013)Blood 121(17):3335),但是F8-BDD转基因表达盒的其余部分(包括编码区域)是相同的。对于这些实验,使用图26A所列出的给药方案(其中利妥昔单抗在测试品之前施用并且类固醇与测试品同时施用并且之后每天施用)。

[0219] 表4:具有FVIII转基因盒的NHP组

组号	雄性数 ^a	测试品身份	AAV 转基因描述	血清型	组分剂量水平 (vg/kg)	总体 AAV 载体剂量水平 (vg/kg)
1	2	SGMO.01	制剂缓冲液	NA	NA	NA
2	3	SGMO.02	hF8-BDD cDNA 1	AAV2/6	2E+12	2E+12
3	3	SGMO.03	hF8-BDD cDNA 1	AAV2/6	6E+12	6E+12
4	3	SGMO.04	hF8-BDD cDNA 1	AAV2/8	6E+12	6E+12
5	3	SGMO.05	hF8-BDD cDNA 2	AAV2/8	6E+12	6E+12

[0220] 向食蟹猴施用制剂缓冲液或6E+12vg/kg AAV2/6hF8 cDNA(亲本)。在测试品添加之后第14天,通过ELISA或凝血活性分析hFVIII的循环水平和活性(参见图27)。食蟹猴FVIII的正常水平为约1U/mL,这反映在制剂对照组的凝血活性数据中,因为凝血活性测定对于人类FVIII而言不具有特异性。相对于食蟹猴FVIII,ELISA对于人类FVIII具有特异性,因此,正如预期的,如通过ELISA测量的在制剂对照组中不存在hFVIII水平。示出制剂对照组(组1,动物ID 1101-1102)和6E+12vg/kg剂量组(组3,动物ID 3101-3103)的各个动物。在组3动物中,循环hFVIII存在超生理水平和活性,上至8U/mL。

[0222] 在处理之后作为肝病状的指示,测量制剂对照组(组1,动物ID1101)和6E+12vg/kg剂量组(组3,动物ID 3102)的肝酶。测量丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)。食蟹猴的可接受上限参考值对于ALT是126U/L并且对于AST是120U/L。对于制剂对照组和6E+12vg/kg AAV hF8 cDNA(亲本)组二者,ALT/AST水平在肝活检(肝活检是在第41天)之后有所升高,其由星号表示。另外AAV hF8 cDNA在整个研究中(247天)是良好耐受的(参见图28A和28B)。

[0223] 数据呈现在图29中,对于每只猴子设定的数据描绘于图中。数据指示在AAV6血清型本底中较高剂量(比较图29A与图29B)的测试品产生在正常人类血浆中存在的将近10X水平的FVIII-BDD表达。在AAV2/8血清型中的测试品的数据显示FVIII活性的增加,但是其程度与对于AAV2/6所观察到的不相同。

[0224] 在以上所述的初始14天时间段之后,在单剂量的AAV-FVIII-BDD之后多达247天继续实验。类固醇的共给药在第103天停止。使用如下定制ELISA测定猴子血浆中的hFVIII-BDD水平的测定。在4°C下用0.2M碳酸盐碳酸氢盐缓冲液pH 9.4(Thermo Fisher Scientific,Waltham MA)中的小鼠单克隆抗-hFVIII抗体(Green Mountain,Burlington,VT)将96孔半面积HB(高结合)聚苯乙烯微板(Corning)涂覆过夜。第二天,将板用1X TBST(Thermo Fisher Scientific,Waltham MA)洗涤四次。然后将96孔板在室温下用3%BSA/TBS封闭缓冲液封闭两小时,接着用1X TBST洗涤四次。将血浆添加到板中,并且在室温下在摇动下孵育两个小时,接着用1X TBST洗涤四次。添加检测抗体即生物素化单克隆小鼠抗-FVIII抗体(Green Mountain,Burlington,VT)并且在室温下孵育一小时,接着用1X TBST洗涤四次。添加链霉亲和素HRP(Jackson ImmunoResearch,West Grove PA)并且将其在室温下孵育一小时,接着用1X TBST洗涤四次。添加TMB Ultra(Thermo Fisher Scientific,Waltham MA)并且使其显色十分钟,用终止溶液终止反应并且在450nm下使用读板仪读取吸

光度。本底吸光度读数是可忽略的(通常是0)。使用毕提斯达测定确定抑制性抗-FVIII抗体的存在(例如,参见Kasper等人(1975)Thromb Diath Haemorrh 34:869-72)。使用ELISA测定在研究中评价峰值人类FVIII抗原水平。在2E+12vg/kg剂量水平(n=3)下,实现人类正常hFVIII血浆水平的峰值111.0%、493.9%和840.0%(总体平均值481.6%,如通过hFVIII ELISA测量的)。在表示6E+12vg/kg的较高剂量(n=3)下,实现hFVIII血浆水平的峰值450.0%、625.6%和886.7%[总体平均值654.1%](图30)。

[0225] 进行表4所列出的研究并且测量FVIII-BDD和任何抑制性抗-FVIII抗体的水平。对于低剂量动物(n=3),包括以2E+12vg/kg给药的于AAV2/6中的FVIII-BDD cDNA,在检测稳健hFVIII抗原水平(Ag)之后,随着毕提斯达单位(BU)增加,hFVIII-BDD水平降低。BU随时间降低并且hFVIII Ag增加(图31)。结果表明在免疫抑制疗法停止之后,人类FVIII抗原的水平(如通过ELISA测量)下降。

[0226] 对于高剂量单位(n=3),包括以6E+12vg/kg给药的于AAV2/6中的FVIII-BDD cDNA,观察到类似的模式(参见图32)。然而在一只动物3101中,在去除甲强龙之后,未检测到抗-FVIII抗体,尽管存在可检测且持久水平的FVIII抗原(表示正常hFVIII水平的200%),这可以指示动物对人类FVIII抗原的耐受性。

[0227] 当将血清型AAV2/8用于递送高剂量时,观察到类似的结果,除了血浆中可检测的hFVIII抗原的量小于使用AAV2/6载体测量的量(图33)。类似地,当在AAV2/8载体中测试不同FVIII-BDD cDNA启动子模块(组5,以上所述)时,hFVIII-BDD血浆水平类似于组4中可见的那些(图34)。然而,如以上,存在维持可检测量的FVIII-BDD表达的两个个体(5101和5102)和在去除甲强龙之后不具有标记的抗体响应的组4中的个体(4103,图33D),这再次表明在实验前几天可见的稳健响应水平之后对抗原的耐受性。

[0228] 如图34D所示,动物No.5101似乎对hFVIII-BDD耐受,因为在去除甲基强的松龙之后,hFVIII-BDD水平在大约0.1U/mL(表示正常hFVIII水平的10%)下保持稳定持续8周。而且,如图34E所示,动物No.5102似乎对hFVIII-BDD耐受,因为在去除甲基强的松龙之后,hFVIII-BDD水平在大约0.6U/mL(表示正常hFVIII水平的60%)下保持稳定持续8周。值得注意的是,人类血浆中hFVIII的正常水平是大约1U/mL或200ng/mL,并且甚至正常值的1%-5%(>0.001U/mL)的表达可具有治疗性功效(Llung,RC(1999)Thromb Haemost82(2):525-530)。

[0229] 也如以上所述地进行NHP中的实验,除了研究不同免疫抑制方案。对于这些实验,遵循图26B中所示的给药方案,一些组(1-5)接受免疫抑制处理,在测试品给药之前施用,而其它组(6-8)在测试品给药之后接受免疫抑制。

[0230] 如图38所示,在6E+11vg/kg剂量水平(n=3,组3)下,峰值总体平均值是实现的人类正常hFVIII血浆水平的5.7%(通过hFVIII ELISA测量的)。在表示2E+12vg/kg的较高剂量(n=3,组4)下,峰值总体平均值是所实现的hFVIII血浆水平的56.5%并且在6E+12vg/kg(n=3,组5)下,峰值总体平均值是229.0%(通过hFVIII ELISA测量)。在2E+12vg/kg的剂量水平下(n=3,组7),峰值总体平均值是87.9%,并且对于6E+12vg/kg(n=3,组8)是101.7%。组1和组6是制剂对照组,表示为制剂。另外,如图39所示,使用相同血清型再次给药引起可检测的循环人类FVIII抗原水平。这些结果指示用免疫抑制剂预处理动物可有助于最大化的治疗性蛋白质表达。另外,预处理允许在第一剂量期间未产生中和抗体时再次

给药。图39也证实在处理动物中hFVIII表达的响应于不同范围的给药的FVIII-BDD cDNA的剂量响应。由于血浆中甚至1%至5%的FVIII蛋白质的存在被认为在人类中具有显著治疗功效,在E11范围中的临床剂量(在本实验中引起5.7%至12.0%的正常水平)可能提供显著的治疗益处。因此,数据表明本文所述的构建体引起治疗性水平的体内转基因产生。

[0231] 实施例3:核酸酶介导的靶向整合

[0232] 当实施例1和2所述的构建体与白蛋白特异性核酸酶组合用于将表达构建体靶向整合到白蛋白基因座中时,也评价所述构建体的表达。具体地说,向HepG2细胞施用构建体和白蛋白特异性锌指核酸酶。参见,例如,美国专利号9,150,847;9,255,250以及美国专利公布号20130177983;20150159172;20150056705以及20150166618。

[0233] 按照制造商指南(ATCC, Manassas VA)维持人类HepG2肝细胞。在实验那天,将HepG2细胞洗涤、胰蛋白酶化并计数。将ZFN用于人类白蛋白内含子基因座连同人类因子VIII-BDD(hFVIII) cDNA CRMSBS2无内含子,作为AAV2/6递送,表示为时间零。对于24孔皿的每个孔 $1E+05$ 个细胞,递送 $3.0E+05$ 的AAV2/6ZFN以及 $3.0E+04$ 、 $6.0E+04$ 和 $1.2E+05$ 的AAV2/6hFVIII cDNA CRMSBS2无内含子。因此,以从 $3.0E+04$ 、 $6.0E+04$ 和 $1.2E+05$ 的逐渐增加的剂量施用表达构建体连同ZFN $3.0E+05$ 。对照样品包括施用单独的CRMSGS2 SBR内含子3转基因或者与GFP一起、单独的ZFN或单独的GFP。第二天更换培养基。在AAV2/6病毒添加之后19天使用以下所述的hFVIII ELISA分析上清液的所分泌的hFVIII。

[0234] 根据制造商方案使用Affinity Biologicals (Canada) ELISA试剂盒(FVIII-AG)测定所分泌的人类因子VIII-BDD水平,除了人类因子VIII标准品之外。用于ELISA测定中的人类因子VIII标准品是来自US Biologicals (Salem, MA)的重组纯化的人类因子VIII (#F0016-06)。简言之,将HepG2上清液添加到板中,在室温下在摇动下孵育一个半小时,接着用试剂盒中提供的洗涤缓冲液洗涤三次。添加试剂盒中提供的检测抗体并且在室温下孵育四十五分钟,接着用试剂盒中提供的洗涤缓冲液洗涤三次。添加试剂盒中提供的TMB底物并且使其显色十分钟。用终止溶液终止反应并在450nm下使用读板仪读取吸光度。

[0235] 在施用白蛋白靶向的ZFN之后检测HepG2细胞上清液中随时间变化(t =天数)的hFVIII-BDD蛋白质总水平(SBS#47171/47898,参见PCT专利公布WO 2015/089077),并且分析所指示的构建体(图36)。在FVIII BDD表达构建体和ZFN二者的存在下,在以最高剂量的FVIII BDD转基因处理之后三天检测上清液中分泌的FVIII BDD,并且然后在较低剂量下在第五天是可检测的,并且在所有水平下在第七天是可检测的。在ZFN不存在下,上清液中的FVIII BDD在第七天仅超过测定的本底是可检测的。示出具有 $n=3$ 次生物重复实验的数据。误差条表示技术性重复实验的平均值的标准偏差。虚线表示hFVIII ELISA的检测限。在ZFN不存在下仅微弱检测到分泌的hFVIII-BDD,因为游离基因hFVIII-BDD在从该游离基因累积足够量可检测的分泌的hFVIII-BDD之前可能稀释或降解。

[0236] 另外,如通过定量PCR(使用5'引物位于内源人类白蛋白基因座内并且探针位于hFVIII-BDD盒的ITR内并且3'引物位于hFVIII-BDD内)测定的,仅在白蛋白特异性ZFN存在下实现所指示构建体的靶向整合(通过NHEJ)(图37)。因此这些数据表明hFVIII-BDD盒的成功整合和编码的F8蛋白的表达。

[0237] 重复这些实验,测试另一组白蛋白特异性ZFN(SBS#42906/43043,参见PCT专利公布WO 2015/089046)。结果(图40A和40B)示出FVIII蛋白质在这些细胞的上清液中的表达和

转基因的靶向整合。

[0238] 随后将白蛋白特异性ZFN和构建体在体内递送至大致上如实施例1和2所述的动物。将所述构建体整合到内源白蛋白基因座中并且表达转基因。

[0239] 体内研究的实验设计示出在以下表5中。简言之,将F1代雄性C57BL/6幼畜用于体内研究(测试品在表5中指示)。研究中所用的ZFN是SBS#48641和SBS#31523(参见美国专利公布2014-0017212)。研究遵守人类护理和使用动物的动物福利法。将测试品在室温下在给药前解冻,并且所有动物均接受如下所列出的单次皮下100 μ L注射。ZFN剂量是每只小鼠1.5E+11vg并且F8 cDNA剂量是每只小鼠1.5E+11vg。在第7天、第14天、第21天和第28天中的每一个时在麻醉之后从每组两只或三只幼畜收集血液并且将其处理成血浆以用于使用小鼠内部hFVIII ELISA分析血浆中的hFVIII循环水平。从所有小鼠收集组织以用于通过深度测序(插入缺失、插入和缺失)、经由RT-PCR进行的mRNA分析、使用qPCR进行的载体基因组分析以及使用qPCR进行靶向整合分析来分析基因修饰水平。

[0240] 表5:实验设计

组号	测试品描述	测试材料	ZFN 剂量(vg/小鼠)	F8 cDNA 剂量(vg/小鼠)	总 AAV 剂量(vg/小鼠)	总 AAV 剂量 ^a (vg/kg)	雄性幼畜数	剂量体积(μ L) ^b
[0241] 1	制剂缓冲液	SGMO.01	0	0	0	0	9	100
2	ZFN + F8 cDNA	SGMO.02	1.5 x 10 ¹¹ /ZFN	1.5 x 10 ¹¹	4.5 x 10 ¹¹	3.75 x 10 ¹⁴	12	100
3	F8 cDNA	SGMO.03	0	1.5 x 10 ¹¹	1.5 x 10 ¹¹	1.25 x 10 ¹⁴	12	100

[0242] a:使用1.2g体重计算的总AAV剂量

[0243] b:以一个体积100 μ L施用一次。

[0244] 在血浆中检测到的F8水平在以下表6中呈现,FVIII-BDD转基因靶向整合的量也一样。

[0245] 表6:F8表达和转基因整合

天	样品编号	组编号	描述	动物编号	F8 水平 (ELISA)		插入缺失%	靶向整合	
					U/mL	ng/mL		平均值	SE M
7	1	1	制剂	101	0.002	0.4	N.S.	0	
7	2	1	制剂	201	0.006	1.2	N.S.	0	
7	3	2	ZFN/F8 cDNA	401	0	0	7.8	1.48	0.00
7	4	2	ZFN/F8 cDNA	501	0.006	1.2	8.4	4.15	1.13
7	5	2	ZFN/F8 cDNA	601	0.082	16.4	12.5	11.38	3.82
7	6	3	F8 cDNA	901	0.022	4.4	N.S.	0	
7	7	3	F8 cDNA	1001	0.012	2.4	N.S.	0	
7	8	3	F8 cDNA	1101	0.006	1.2	N.S.	0	
14	1	1	制剂	301	0.006	1.2	N.S.	0	
14	2	1	制剂	102	0.006	1.2	N.S.	0	
14	3	2	ZFN/F8 cDNA	701	0.124	24.8	14.4	4.45	1.76
[0246]	14	4	ZFN/F8 cDNA	402	0.037	7.4	16.1	3.02	0.09
14	5	2	ZFN/F8 cDNA	502	0.169	33.8	11.7	2.93	0.71
14	6	3	F8 cDNA	1201	0.002	0.4	N.S.	0	
14	7	3	F8 cDNA	902	0.001	0.2	N.S.	0	
14	8	3	F8 cDNA	1002	0.015	3	N.S.	0	
21	1	1	制剂	202	0	0	N.S.	0	
21	2	1	制剂	302	0.006	1.2	N.S.	0	
21	3	2	ZFN/F8 cDNA	602	0.082	16.4	15.7	21.11	1.11
21	4	2	ZFN/F8 cDNA	702	*	*	18.6	4.76	1.36
21	5	2	ZFN/F8 cDNA	403	*	*	16.7	5.72	2.36
21	6	3	F8 cDNA	1102	0.012	4.4	N.S.	0	
21	7	3	F8 cDNA	903	0.022	2.4	N.S.	0	
28	1	1	制剂	103	0.006	1.2	N.S.	0	
28	4	1	制剂	603	0	0	N.S.	0	
28	2	2	ZFN/F8 cDNA	303	0.004	0.8	9.4	1.00	0.68
28	3	2	ZFN/F8 cDNA	503	0.128	25.6	17.3	5.96	1.26
[0247]	28	5	ZFN/F8 cDNA	703	0.001	0.2	15.0	1.93	0.49
28	6	3	F8 cDNA	1003	0.004	0.8	N.S.	0	
28	7	3	F8 cDNA	1103	0.002	0.4	N.S.	0	

[0248] *:数据不可用

[0249] NS:未显著超过本底

[0250] 因此,在施用白蛋白特异性核酸酶和FVIII-BDD转基因之后,FVIII在小鼠幼畜中是可检测到的。在用ZFN和转基因处理的那些小鼠中转基因的插入也以较高剂量可检测到。

[0251] 因此,本文所述的构建体的核酸酶介导的靶向整合在肝细胞中提供转基因表达。

[0252] 本文提到的所有专利、专利申请以及专利公布特此以引用的方式全部并入。

[0253] 虽然为了清楚理解,比较详细地用说明和实施例的方式提供了公开内容,但本领域技术人员明显可以实施不背离本公开内容精神或范围的各种改变和改进。因此,前面的描述和实施例不应理解为具有限制性。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 桑格摩生物治疗股份有限公司(SANGAMO BIOSCIENCES, INC.)
- [0003] <120> 肝特异性构建体、因子VIII表达盒及其使用方法
- [0004] <130> 8325-0150.40
- [0005] <140> PCT/US2016/042099
- [0006] <141> 2016-07-13
- [0007] <150> 62/355,106
- [0008] <151> 2016-06-27
- [0009] <150> 62/326,229
- [0010] <151> 2016-04-22
- [0011] <150> 62/315,438
- [0012] <151> 2016-03-30
- [0013] <150> 62/307,897
- [0014] <151> 2016-03-14
- [0015] <150> 62/247,469
- [0016] <151> 2015-10-28
- [0017] <160> 47
- [0018] <170> PatentIn 3.5版
- [0019] <210> 1
- [0020] <211> 40
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 智人
- [0023] <400> 1
- [0024] gtcaccccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
- [0025] <210> 2
- [0026] <211> 40
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 黑猩猩
- [0029] <400> 2
- [0030] gtcaccccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
- [0031] <210> 3
- [0032] <211> 40
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 大猩猩属某种
- [0035] <400> 3
- [0036] gtcaccccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
- [0037] <210> 4
- [0038] <211> 40
- [0039] <212> DNA
- [0040] <213> 猩猩属某种
- [0041] <400> 4

- [0042] gtcaccccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
[0043] <210> 5
[0044] <211> 40
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 未知
[0047] <220>
[0048] <223> 未知的描述:来自长臂猿物种的寡核苷酸
[0049] <400> 5
[0050] gtcaccccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
[0051] <210> 6
[0052] <211> 40
[0053] <212> DNA
[0054] <213> 猕猴
[0055] <400> 6
[0056] atcaccccag ttaccggagg agcaaacagg gactaagttc 40
[0057] <210> 7
[0058] <211> 40
[0059] <212> DNA
[0060] <213> 食蟹猴
[0061] <400> 7
[0062] atcaccccag ttaccggagg agcaaacagg gactaagttc 40
[0063] <210> 8
[0064] <211> 40
[0065] <212> DNA
[0066] <213> 狒狒属某种
[0067] <400> 8
[0068] atcaccccag ttaccggagg agcaaacagg gactaagttc 40
[0069] <210> 9
[0070] <211> 40
[0071] <212> DNA
[0072] <213> 绿猴
[0073] <400> 9
[0074] atcaccccag ttaccggagg agcaaacagg gactaagttc 40
[0075] <210> 10
[0076] <211> 40
[0077] <212> DNA
[0078] <213> 未知
[0079] <220>
[0080] <223> 未知的描述:来自狨猴科家族的寡核苷酸
[0081] <400> 10
[0082] gtcagcccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
[0083] <210> 11

- [0084] <211> 39
[0085] <212> DNA
[0086] <213> 松鼠猴属某种
[0087] <400> 11
[0088] gtcagcccag ttaccggagg agcaaacagg gctaagtcc 39
[0089] <210> 12
[0090] <211> 38
[0091] <212> DNA
[0092] <213> 未知
[0093] <220>
[0094] <223> 未知的描述:来自丛猴物种的寡核苷酸
[0095] <400> 12
[0096] gtcaccagt tatcaggag caaacaggag ctaagtcc 38
[0097] <210> 13
[0098] <211> 40
[0099] <212> DNA
[0100] <213> 鼠属某种
[0101] <400> 13
[0102] gtcaccacag ttattggtag agcaaacagg ggctatgtcc 40
[0103] <210> 14
[0104] <211> 88
[0105] <212> DNA
[0106] <213> 小鼠微小病毒
[0107] <400> 14
[0108] aagagtaag ggtttaaggg atggttggtt ggtggggtat taatgtttaa ttacctgttt 60
[0109] tacaggcctg aatcacttg gtttagg 88
[0110] <210> 15
[0111] <211> 92
[0112] <212> DNA
[0113] <213> 人工序列
[0114] <220>
[0115] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0116] <400> 15
[0117] aagagtaag ggtttaaggg atggttggtt ggtgggcat taatgtttaa ttacctgaac 60
[0118] gacgcgccac taatcacttt tttcaggtt gg 92
[0119] <210> 16
[0120] <211> 92
[0121] <212> DNA
[0122] <213> 人工序列
[0123] <220>
[0124] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0125] <400> 16

- [0126] aagaggtaag ggtttaaggg atggttggtt ggtggggcat taatgtttaa ttacgacaac 60
- [0127] gacgcgctg aatcacttt ttttcaggtt gg 92
- [0128] <210> 17
- [0129] <211> 94
- [0130] <212> DNA
- [0131] <213> 人工序列
- [0132] <220>
- [0133] <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸
- [0134] <400> 17
- [0135] aagaggtaag ggtttaagtt atcgtagtt cgtgcacat taatgtttaa ttacctggag 60
- [0136] cacctgctg aatcacttt ttttttcagg ttgg 94
- [0137] <210> 18
- [0138] <211> 23
- [0139] <212> DNA
- [0140] <213> 人工序列
- [0141] <220>
- [0142] <223> 人工序列的描述: 合成的引物
- [0143] <400> 18
- [0144] ggagatgaag aaggaggact ttg 23
- [0145] <210> 19
- [0146] <211> 25
- [0147] <212> DNA
- [0148] <213> 人工序列
- [0149] <220>
- [0150] <223> 人工序列的描述: 合成的探针
- [0151] <400> 19
- [0152] acatctacga cgaggacgag aacca 25
- [0153] <210> 20
- [0154] <211> 21
- [0155] <212> DNA
- [0156] <213> 人工序列
- [0157] <220>
- [0158] <223> 人工序列的描述: 合成的引物
- [0159] <400> 20
- [0160] tccacagcag caatgaagta g 21
- [0161] <210> 21
- [0162] <211> 18
- [0163] <212> DNA
- [0164] <213> 人工序列
- [0165] <220>
- [0166] <223> 人工序列的描述: 合成的引物
- [0167] <400> 21

[0168] cctgggccag ttctgct 18
[0169] <210> 22
[0170] <211> 23
[0171] <212> DNA
[0172] <213> 人工序列
[0173] <220>
[0174] <223> 人工序列的描述:合成的探针
[0175] <400> 22
[0176] ttctgccaca tcagcagcca cca 23
[0177] <210> 23
[0178] <211> 18
[0179] <212> DNA
[0180] <213> 人工序列
[0181] <220>
[0182] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0183] <400> 23
[0184] ggcctccatg ccatcatg 18
[0185] <210> 24
[0186] <211> 24
[0187] <212> DNA
[0188] <213> 人工序列
[0189] <220>
[0190] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0191] <400> 24
[0192] agtgcaaagt aacttagagt gact 24
[0193] <210> 25
[0194] <211> 25
[0195] <212> DNA
[0196] <213> 人工序列
[0197] <220>
[0198] <223> 人工序列的描述:合成的探针
[0199] <400> 25
[0200] ccatactag gggttcctgc ggcct 25
[0201] <210> 26
[0202] <211> 18
[0203] <212> DNA
[0204] <213> 人工序列
[0205] <220>
[0206] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0207] <400> 26
[0208] cctgaaggtg gcaatggt 18
[0209] <210> 27

- [0210] <400> 27
[0211] 000
[0212] <210> 28
[0213] <211> 19
[0214] <212> DNA
[0215] <213> 人工序列
[0216] <220>
[0217] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0218] <400> 28
[0219] ggaaccattg ccaccttca 19
[0220] <210> 29
[0221] <211> 19
[0222] <212> DNA
[0223] <213> 人工序列
[0224] <220>
[0225] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0226] <400> 29
[0227] ctatccattg cactatgct 19
[0228] <210> 30
[0229] <211> 18
[0230] <212> DNA
[0231] <213> 人工序列
[0232] <220>
[0233] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0234] <400> 30
[0235] tttcctgtaa cgatcggg 18
[0236] <210> 31
[0237] <211> 51
[0238] <212> DNA
[0239] <213> 人工序列
[0240] <220>
[0241] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0242] <400> 31
[0243] aataaaatat ctttattttc attacatctg tgtgttggtt ttttgtgtgt t 51
[0244] <210> 32
[0245] <211> 69
[0246] <212> DNA
[0247] <213> 人工序列
[0248] <220>
[0249] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0250] <400> 32
[0251] ataaaaatc tttattttca ttacatctgt gtgttggtt ttttgtgtgt ctatccattg 60

[0252] cactatgct 69
[0253] <210> 33
[0254] <211> 68
[0255] <212> DNA
[0256] <213> 人工序列
[0257] <220>
[0258] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0259] <400> 33
[0260] aataaaatat ctttattttc attacatctg tgtgttggtt ttttgtgtgt tttcctgtaa 60
[0261] cgatcggg 68
[0262] <210> 34
[0263] <211> 4800
[0264] <212> DNA
[0265] <213> 人工序列
[0266] <220>
[0267] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
[0268] <400> 34
[0269] gcggcctaag cttggaacca ttgccacctt cagggggagg ctgctggtga atattaacca 60
[0270] agatcacccc agttaccgga ggagcaaca gggactaagt tcacacgcgt ggtaccgtct 120
[0271] gtctgcacat ttctagagc gagtgttccg atactctaat ctccctaggc aaggttcata 180
[0272] tttgtgtagg ttacttattc tccttttgtt gactaagtca ataatcagaa tcagcaggtt 240
[0273] tggagtccgc ttggcagggg tcagcagcct gggttgggag gagggggtat aaaagcccct 300
[0274] tcaccaggag aagccgtcac acagatccac aagctcctgc tagtatgcag atcgagctct 360
[0275] ccacctgctt ctttctgtgc ctgttgagat tctgcttcag cgccaccagg agatactacc 420
[0276] tgggggctgt ggagctgagc tgggactaca tgcagtctga cctgggggag ctgcctgtgg 480
[0277] atgccagggt cccccccaga gtgcccaga gcttcccctt caacacctct gtggtgtaca 540
[0278] agaagaccct gtttgtggag ttactgacc acctgttcaa cattgccaag cccaggcccc 600
[0279] cctggatggg cctgctgggc cccaccatcc aggctgaggt gtatgacct gtggtgatca 660
[0280] cctgaagaa catggccagc cacctgtga gctgcatgc tgtgggggtg agctactgga 720
[0281] aggctctga gggggctgag tatgatgacc agaccagca gagggagaag gaggatgaca 780
[0282] aggtgtccc tgggggcagc cacacctatg tgtggcaggt gctgaaggag aatggcccca 840
[0283] tggcctctga cccctgtgc ctgacctaca gctacctgag ccatgtggac ctggtgaagg 900
[0284] acctgaactc tggcctgatt ggggccctgc tgggtgtcag ggagggcagc ctggccaagg 960
[0285] agaagacca gaccctgac aagtcatcc tgctgtttgc tgtgtttgat gagggcaaga 1020
[0286] gctggcactc tgaaccaag aacagcctga tgcaggacag ggatgctgcc tctgccaggg 1080
[0287] cctggcccaa gatgcacct gtgaatggct atgtgaacag gacacctgct ggcctgattg 1140
[0288] gctgccacag gaagtctgtg tactggcatg tgattggcat gggcaccacc cctgaggtgc 1200
[0289] acagcatctt cctggagggc cacacctcc tggtcaggaa ccacaggcag gccagcctgg 1260
[0290] agatcagccc catcacctc ctgactgccc agacctgct gatggacctg ggccagttcc 1320
[0291] tgctgttctg ccacatcagc agccaccagc atgatggcat ggaggcctat gtgaaggtgg 1380
[0292] acagctgccc tgaggagccc cagctgagga tgaagaacaa tgaggaggct gaggactatg 1440
[0293] atgatgacct gactgactct gagatggatg tggtagggtt tgatgatgac aacagcccca 1500

[0294]	gcttcatcca gatcaggtct gtggccaaga agcaccceaa gacctgggtg cactacattg 1560
[0295]	ctgtcgagga ggaggactgg gactatgccc ccctgggtct ggcccctgat gacaggagct 1620
[0296]	acaagagcca gtacctgaac aatggcccc agaggattgg caggaagtac aagaaggtca 1680
[0297]	ggttcatggc ctacactgat gaaacctca agaccagga ggccatccag catgagtctg 1740
[0298]	gcatcctggg cccctgctg tatggggagg tgggggacac cctgctgac atcttcaaga 1800
[0299]	accaggccag caggccctac aacatctacc cccatggcat cactgatgtg aggcccctgt 1860
[0300]	acagcaggag gctgcccag ggggtgaagc acctgaagga cttcccctc ctgcctgggg 1920
[0301]	agatcttcaa gtacaagtgg actgtgactg tggaggatgg cccaccaag tctgaccca 1980
[0302]	ggtgcctgac cagatactac agcagcttg tgaacatgga gagggacctg gcctctggcc 2040
[0303]	tgattggccc cctgctgac tgctacaagg agtctgtgga ccagaggggc aaccagatca 2100
[0304]	tgtctgacaa gaggaatgtg atcctgttct ctgtgttga tgagaacagg agctgggtacc 2160
[0305]	tgactgagaa catccagagg ttctgcca accctgctgg ggtgcagctg gaggacctg 2220
[0306]	agttccaggc cagcaacatc atgcacagca tcaatggcta tgtgtttgac agcctgcagc 2280
[0307]	tgtctgtgtg cctgcatgag gtggcctact ggtacatcct gagcattggg gccagactg 2340
[0308]	acttctgtc tgtgttctt tctggctaca cttcaagca caagatggtg tatgaggaca 2400
[0309]	ccctgacct gttcccctt tctggggaga ctgtgttcat gagcatggag aaccctggcc 2460
[0310]	tgtggattct gggctgccac aactctgact tcaggaacag gggcatgact gcctgctga 2520
[0311]	aagtctccag ctgtgacaag aacctgggg actactatga ggacagctat gaggacatct 2580
[0312]	ctgcctacct gctgagcaag aacaatgcca ttgagcccag gagcttcagc cagaatccac 2640
[0313]	ccgtccttaa gcgccatcag cgcgagatca ccaggaccac cctgcagtct gaccaggagg 2700
[0314]	agattgacta tgatgacacc atctctgtgg agatgaagaa ggaggacttt gacatctacg 2760
[0315]	acgaggacga gaaccagagc cccaggagct tccagaagaa gaccaggcac tacttcattg 2820
[0316]	ctgctgtgga gaggctgtgg gactatggca tgagcagcag ccccatgtg ctgaggaaca 2880
[0317]	ggcccagtc tggtctgtg ccccagtca agaaggtggt gttccaggag ttcactgatg 2940
[0318]	gcagcttac ccagcccctg tacagagggg agctgaatga gcacctgggc ctgctgggcc 3000
[0319]	cctacatcag ggctgaggtg gaggacaaca tcatggtgac cttcaggaac caggccagca 3060
[0320]	ggccctacag cttctacagc agcctgatca gctatgagga ggaccagagg cagggggctg 3120
[0321]	agcccaggaa gaactttgtg aagcccaatg aaaccaagac ctacttctgg aaggtgcagc 3180
[0322]	accacatggc cccaccaag gatgagttg actgcaaggc ctgggectac ttctctgatg 3240
[0323]	tggacctgga gaaggatgtg cactctggcc tgattggccc cctgctggtg tgccacacca 3300
[0324]	acacctgaa ccctgcccac ggcaggcagg tgactgtgca ggagtttgcc ctgtttctca 3360
[0325]	ccatctttga tgaaccaag agctggtact tcactgagaa catggagagg aactgcaggg 3420
[0326]	cccctgcaa catccagatg gaggaccca cttcaagga gaactacagg ttccatgcca 3480
[0327]	tcaatggcta catcatggac accctgctg gcctggtgat ggcccaggac cagaggatca 3540
[0328]	ggtggtacct gctgagcatg ggcagcaatg agaacatcca cagcatccac ttctctggcc 3600
[0329]	atgtgttac tgtgaggaag aaggaggagt acaagatggc cctgtacaac ctgtaccctg 3660
[0330]	gggtgttga gactgtggag atgctgcca gcaaggctgg catctggagg gtggagtgcc 3720
[0331]	tgattgggga gcacctgat gctggeatga gcacctgtt cctggtgtac agcaacaagt 3780
[0332]	gccagacccc cctgggcatg gcctctggcc acatcagga cttccagatc actgcctctg 3840
[0333]	gccagtatgg ccagtgggcc cccaagctgg ccaggctgca ctactctggc agcatcaatg 3900
[0334]	cctggagcac caaggagccc ttcagctgga tcaagtgga cctgctggcc cccatgatca 3960
[0335]	tccatggcat caagaccag ggggccaggc agaagttcag cagcctgtac atcagccagt 4020

[0336] tcacatcat gtacagcctg gatggcaaga agtggcagac ctacaggggc aacagcactg 4080
 [0337] gcacctgat ggtgttcttt ggcaatgtgg acagctctgg catcaagcac aacatcttca 4140
 [0338] accccccat cattgccaga tacatcaggc tgcacccac ccaactacagc atcaggagca 4200
 [0339] ccctgaggat ggagctgatg ggctgtgacc tgaacagctg cagcatgccc ctgggcatgg 4260
 [0340] agagcaaggc catctctgat gccagatca ctgccagcag ctacttcacc aacatgtttg 4320
 [0341] ccacctggag cccagcaag gccaggtgc atctgcaggg caggagcaat gcctggaggc 4380
 [0342] cccaggtcaa caacccaag gagggtgc aggtggactt ccagaagacc atgaaggtga 4440
 [0343] ctggggtgac caccagggg gtgaagagcc tgctgaccag catgtatgtg aaggagtcc 4500
 [0344] tgatcagcag cagccaggat ggccaccagt ggacctgtt cttccagaat ggcaaggtga 4560
 [0345] aggtgtcca gggcaaccag gacagctca cccctgtggt gaacagcctg gaccccccc 4620
 [0346] tgctgaccag atacctgagg attcaccacc agagctgggt gcaccagatt gccctgagga 4680
 [0347] tggagtgct gggtgtgag gccaggacc tgtactgagg atccaataaa atatctttat 4740
 [0348] tttcattaca tctgtgtgtt ggtttttgt gtgttttct gtaacgatcg ggctcgagcg 4800
 [0349] <210> 35
 [0350] <211> 72
 [0351] <212> DNA
 [0352] <213> 人工序列
 [0353] <220>
 [0354] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
 [0355] <400> 35
 [0356] gggggaggct gctggtgaat attaaccaag atcagcccag ttaccggagg agcaaacagg 60
 [0357] ggctaagttc ac 72
 [0358] <210> 36
 [0359] <211> 72
 [0360] <212> DNA
 [0361] <213> 人工序列
 [0362] <220>
 [0363] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
 [0364] <400> 36
 [0365] gggggaggct gctggtgaat attaaccaag atcagcccag ttaccggagg agcaaacagg 60
 [0366] gactaagttc ac 72
 [0367] <210> 37
 [0368] <211> 4894
 [0369] <212> DNA
 [0370] <213> 人工序列
 [0371] <220>
 [0372] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
 [0373] <400> 37
 [0374] gcggcctaag cttggaacca ttgccacctt cagggggagg ctgctggtga atattaacca 60
 [0375] agatcaccac agttaccgga ggagcaaca gggactaagt tcacacgcgt ggtaccgtct 120
 [0376] gtctgcacat ttcgtagagc gagggttccg atactctaat ctccctagc aaggttcata 180
 [0377] tttgtgtagg ttacttattc tctttttgt gactaagtca ataacagaa tcagcaggtt 240

[0378]	tggagtcagc ttggcagggg	tcagcagcct gggttggaag	gagggggtat aaaagcccct	300
[0379]	tcaccaggag aagccgtcac	acagatccac aagctcctga	agaggtaagg gtttaagtta	360
[0380]	tcgttagttc gtgcaccatt	aatgtttaat tacctggagc	acctgcctga aatcattttt	420
[0381]	ttttcaggtt ggctagtatg	cagatcgagc tctccacctg	cttctttctg tgctgttga	480
[0382]	gattctgctt cagcgccacc	aggagatact acctgggggc	tgtggagctg agctgggact	540
[0383]	acatgcagtc tgacctgggg	gagctgcctg tggatgccag	gttccccccc agagtgccca	600
[0384]	agagcttccc cttcaacacc	tctgtggtgt acaagaagac	cctgtttgtg gagttcactg	660
[0385]	accacctgtt caacattgcc	aagcccaggc ccccctggat	gggcctgctg ggccccacca	720
[0386]	tccaggctga ggtgtatgac	actgtggtga tcacctgaa	gaacatggcc agccaccctg	780
[0387]	tgagcctgca tgctgtgggg	gtgagctact ggaaggcctc	tgagggggct gagtatgatg	840
[0388]	accagaccag ccagagggag	aaggaggatg acaaggtgtt	ccctgggggc agccacacct	900
[0389]	atgtgtggca ggtgctgaag	gagaatggcc ccatggcctc	tgacccccctg tgctgacct	960
[0390]	acagctacct gagcatgtg	gacctggtga aggacctgaa	ctctggcctg attggggccc	1020
[0391]	tgctggtgtg cagggagggc	agcctggcca aggagaagac	ccagaccctg cacaagttca	1080
[0392]	tctgctgtt tgctgtgttt	gatgagggca agagctggca	ctctgaaacc aagaacagcc	1140
[0393]	tgatgcagga cagggatgct	gcctctgcca gggcctggcc	caagatgcac actgtgaatg	1200
[0394]	gctatgtgaa caggagcctg	cctggcctga ttggctgcca	caggaagtct gtgtactggc	1260
[0395]	atgtgattgg catgggcacc	accctgagg tgcacagcat	cttctggag ggccacacct	1320
[0396]	tctggtcag gaaccacagg	cagggcagcc tggagatcag	ccccatcacc ttctgactg	1380
[0397]	cccagaccct gctgatggac	ctgggccagt tctgctgtt	ctgccacatc agcagccacc	1440
[0398]	agcatgatgg catggaggcc	tatgtgaagg tggacagctg	ccctgaggag ccccagctga	1500
[0399]	ggatgaagaa caatgaggag	gctgaggact atgatgatga	cctgactgac tctgagatgg	1560
[0400]	atgtggtgag gttt gatgat	gacaacagcc ccagcttcat	ccagatcagg tctgtggcca	1620
[0401]	agaagcacc caagacctgg	gtgactaca ttgctgctga	ggaggaggac tgggactatg	1680
[0402]	ccccctggt gctggcccct	gatgacagga gctacaagag	ccagtacctg aacaatggcc	1740
[0403]	cccagaggat tggcaggaag	tacaagaagg tcaggttcat	ggcctacact gatgaaacct	1800
[0404]	tcaagaccag ggaggccatc	cagcatgagt ctggcatcct	gggccccctg ctgtatgggg	1860
[0405]	aggtggggga caccctgctg	atcatcttca agaaccaggc	cagcaggccc tacaacatct	1920
[0406]	acccccatgg catcactgat	gtgaggcccc tgtacagcag	gaggctgccc aagggggtga	1980
[0407]	agcacctgaa ggacttcccc	atctgacctg gggagatctt	caagtacaag tggactgtga	2040
[0408]	ctgtggagga tggccccacc	aagtctgacc ccaggtgcct	gaccagatac tacagcagct	2100
[0409]	ttgtgaacat ggagagggac	ctggcctctg gcctgattgg	ccccctgctg atctgctaca	2160
[0410]	aggagtctgt ggaccagagg	ggcaaccaga tcatgtctga	caagagggaat gtgatcctgt	2220
[0411]	tctctgtgtt tgatgagaac	aggagctggt acctgactga	gaacatccag aggttctctg	2280
[0412]	ccaaccctgc tggggtgcag	ctggaggacc ctgagttcca	ggccagcaac atcatgcaca	2340
[0413]	gcatcaatgg ctatgtgttt	gacagcctgc agctgtctgt	gtgcctgcat gaggtggcct	2400
[0414]	actggtacat cctgagcatt	ggggcccaga ctgacttctc	gtctgtgttc ttctctggct	2460
[0415]	acaccttcaa gcacaagatg	gtgtatgagg acacctgac	cctgttcccc ttctctgggg	2520
[0416]	agactgtgtt catgagcatg	gagaacctcg gcctgtggat	tctgggctgc cacaactctg	2580
[0417]	acttcaggaa caggggcatg	actgccctgc tgaaagtctc	cagctgtgac aagaacactg	2640
[0418]	gggactacta tgaggacagc	tatgaggaca tctctgccta	cctgctgagc aagaacaatg	2700
[0419]	ccattgagcc caggagcttc	agccagaatc cacccgtcct	taagcgcct cagcgcgaga	2760

[0420]	tcaccaggac caccctgcag tctgaccagg aggagattga ctatgatgac accatctctg	2820
[0421]	tggagatgaa gaaggaggac tttgacatct acgacgagga cgagaaccag agccccagga	2880
[0422]	gcttccagaa gaagaccagg cactacttca ttgctgctgt ggagaggetg tgggactatg	2940
[0423]	gcatgagcag cagccccat gtgctgagga acagggccca gtctggctct gtgccccagt	3000
[0424]	tcaagaaggt ggtgttccag gagttcactg atggcagctt caccagccc ctgtacagag	3060
[0425]	gggagctgaa ttagcacctg ggcctgctgg gccctacat cagggtgag gtggaggaca	3120
[0426]	acatcatggt gaccttcagg aaccaggcca gcaggcceta cagcttctac agcagcctga	3180
[0427]	tcagctatga ggaggaccag aggcaggggg ctgagcccag gaagaacttt gtgaagccca	3240
[0428]	atgaaaccaa gacctacttc tggaaggtgc agcaccacat ggccccacc aaggatgagt	3300
[0429]	ttgactgcaa ggcctgggcc tacttctctg atgtggacct ggagaaggat gtgcactctg	3360
[0430]	gcctgattgg cccctgctg gtgtgccaca ccaacacct gaacctgcc catggcaggc	3420
[0431]	aggtgactgt gcaggagttt gccctgttct tcaccatctt tgatgaaacc aagagctggt	3480
[0432]	acttactga gaacatggag aggaactgca gggccccctg caacatccag atggaggacc	3540
[0433]	ccacctcaa ggagaactac aggttccatg ccatcaatgg ctacatcatg gacaccctgc	3600
[0434]	ctggcctggt gatggcccag gaccagagga tcaggtggtta cctgctgagc atgggcagca	3660
[0435]	atgagaacat ccacagcadc cacttctctg gccatgtgtt cactgtgagg aagaaggagg	3720
[0436]	agtacaagat ggccctgtac aacctgtacc ctgggggtgt tgagactgtg gagatgctgc	3780
[0437]	ccagcaaggc tggcatctgg aggggtgagt gcctgattgg ggagcacctg catgctggca	3840
[0438]	ttagcacctt gttcctggtg tacagcaaca agtgccagac cccctgggc atggcctctg	3900
[0439]	gccacatcag ggacttcag atcactgcct ctggccagta tggccagtgg gcccccaagc	3960
[0440]	tggccaggct gcaactactt ggcagcatca atgcctggag caccaaggag ccttccagct	4020
[0441]	ggatcaaggt ggacctgctg gccccatga tcatccatgg catcaagacc cagggggcca	4080
[0442]	ggcagaagtt cagcagcctg tacatcagcc agttcatcat catgtacagc ctggatggca	4140
[0443]	agaagtggca gacctacagg ggcaacagca ctggcacct gatggtgttc tttggcaatg	4200
[0444]	tggacagctc tggcatcaag cacaacatct tcaaccccc catcattgcc agatacatca	4260
[0445]	ggctgcacc caccactac agcatcagga gcacctgag gatggagctg atgggctgtg	4320
[0446]	acctgaacag ctgcagcatg cccctgggca tggagagcaa ggccatctct gatgccaga	4380
[0447]	tactgccag cagctacttc accaacatgt ttgccacctg gagccccagc aaggccaggc	4440
[0448]	tgcactgca gggcaggagc aatgctgga ggccccaggt caacaacccc aaggagtggc	4500
[0449]	tgcaggtgga cttccagaag accatgaagg tgactgggtg gaccaccag ggggtgaaga	4560
[0450]	gcctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tcctgatcag cagcagccag gatggccacc	4620
[0451]	agtggacctt gttcttccag aatggcaagg tgaaggtgtt ccagggaac caggacagct	4680
[0452]	tcaccctgt ggtgaacagc ctggaccccc ccctgctgac cagatactg aggattcacc	4740
[0453]	cccagagctg ggtgcaccag attgcctga ggatggaggt gctgggctgt gaggcccagg	4800
[0454]	acctgtactg aggatccaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt gttggttttt	4860
[0455]	tggtgttttt cctgtaacga tcgggctcga gcgc	4894
[0456]	<210>	38
[0457]	<211>	21
[0458]	<212>	DNA
[0459]	<213>	人工序列
[0460]	<220>	
[0461]	<223>	人工序列的描述:合成的寡核苷酸

- [0462] <400> 38
[0463] ttgaattcat aactatccca a 21
[0464] <210> 39
[0465] <211> 21
[0466] <212> DNA
[0467] <213> 人工序列
[0468] <220>
[0469] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0470] <400> 39
[0471] gtgtagcaga gaggaacat t 21
[0472] <210> 40
[0473] <211> 25
[0474] <212> DNA
[0475] <213> 人工序列
[0476] <220>
[0477] <223> 人工序列的描述:合成的探针
[0478] <400> 40
[0479] ccatcactag gggttcctgc ggcct 25
[0480] <210> 41
[0481] <211> 21
[0482] <212> DNA
[0483] <213> 人工序列
[0484] <220>
[0485] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0486] <400> 41
[0487] gttaatattc accagcagcc t 21
[0488] <210> 42
[0489] <211> 20
[0490] <212> DNA
[0491] <213> 人工序列
[0492] <220>
[0493] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0494] <400> 42
[0495] agttagcag agaggaacca 20
[0496] <210> 43
[0497] <211> 25
[0498] <212> DNA
[0499] <213> 人工序列
[0500] <220>
[0501] <223> 人工序列的描述:合成的探针
[0502] <400> 43
[0503] ccatcactag gggttcctgc ggcct 25

- [0504] <210> 44
[0505] <211> 18
[0506] <212> DNA
[0507] <213> 人工序列
[0508] <220>
[0509] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0510] <400> 44
[0511] caggtgagc ccagaaac 18
[0512] <210> 45
[0513] <211> 22
[0514] <212> DNA
[0515] <213> 人工序列
[0516] <220>
[0517] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0518] <400> 45
[0519] aactttgagt gtagcagaga gg 22
[0520] <210> 46
[0521] <211> 24
[0522] <212> DNA
[0523] <213> 人工序列
[0524] <220>
[0525] <223> 人工序列的描述:合成的探针
[0526] <400> 46
[0527] taccggagga gcaaacaggg acta 24
[0528] <210> 47
[0529] <211> 22
[0530] <212> DNA
[0531] <213> 人工序列
[0532] <220>
[0533] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0534] <400> 47
[0535] ctctacgaaa tgtgcagaca ga 22

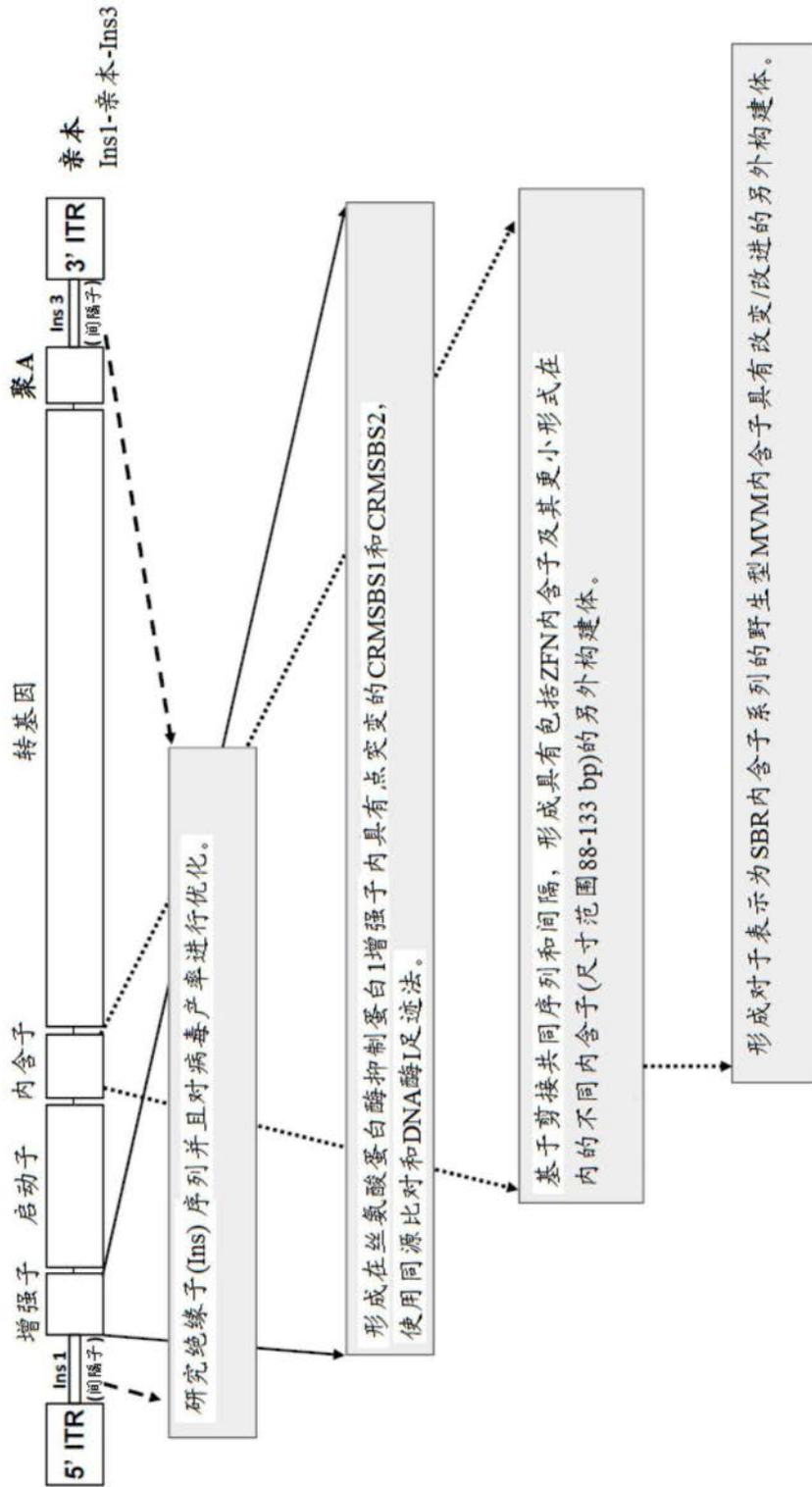


图1

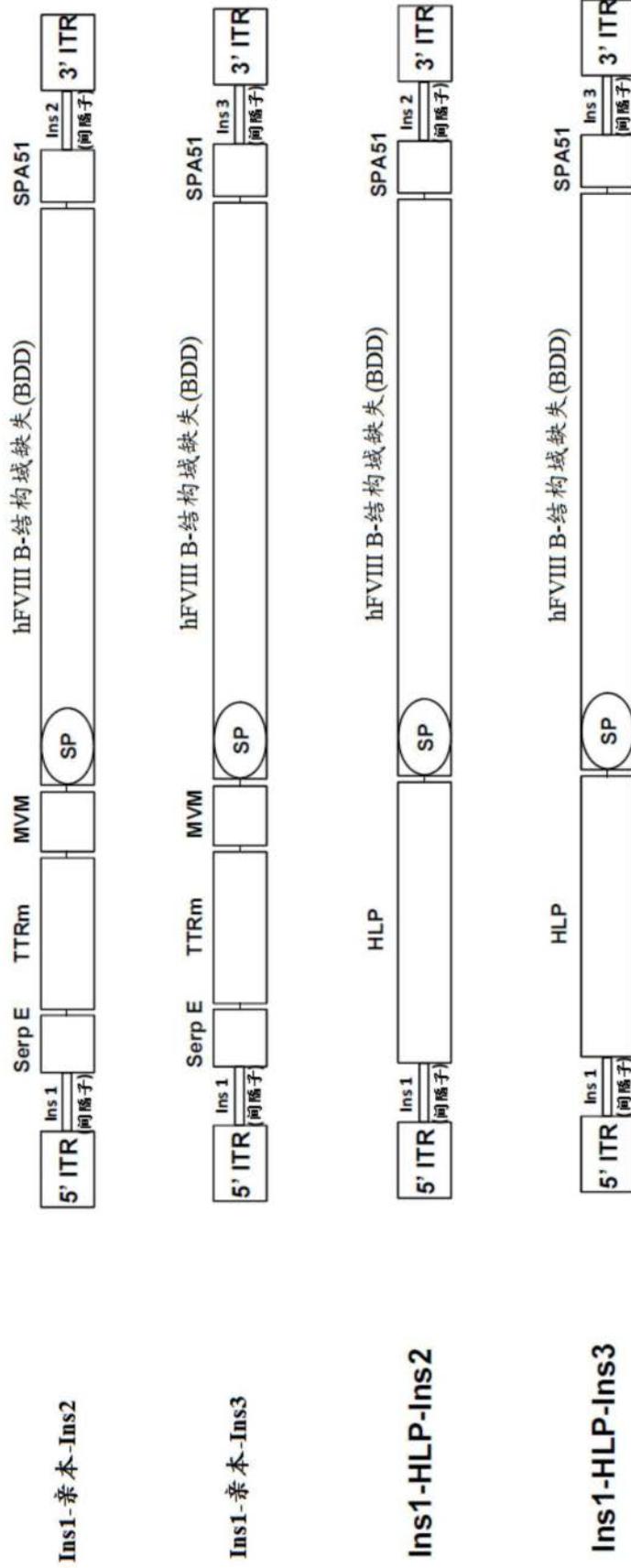


图2

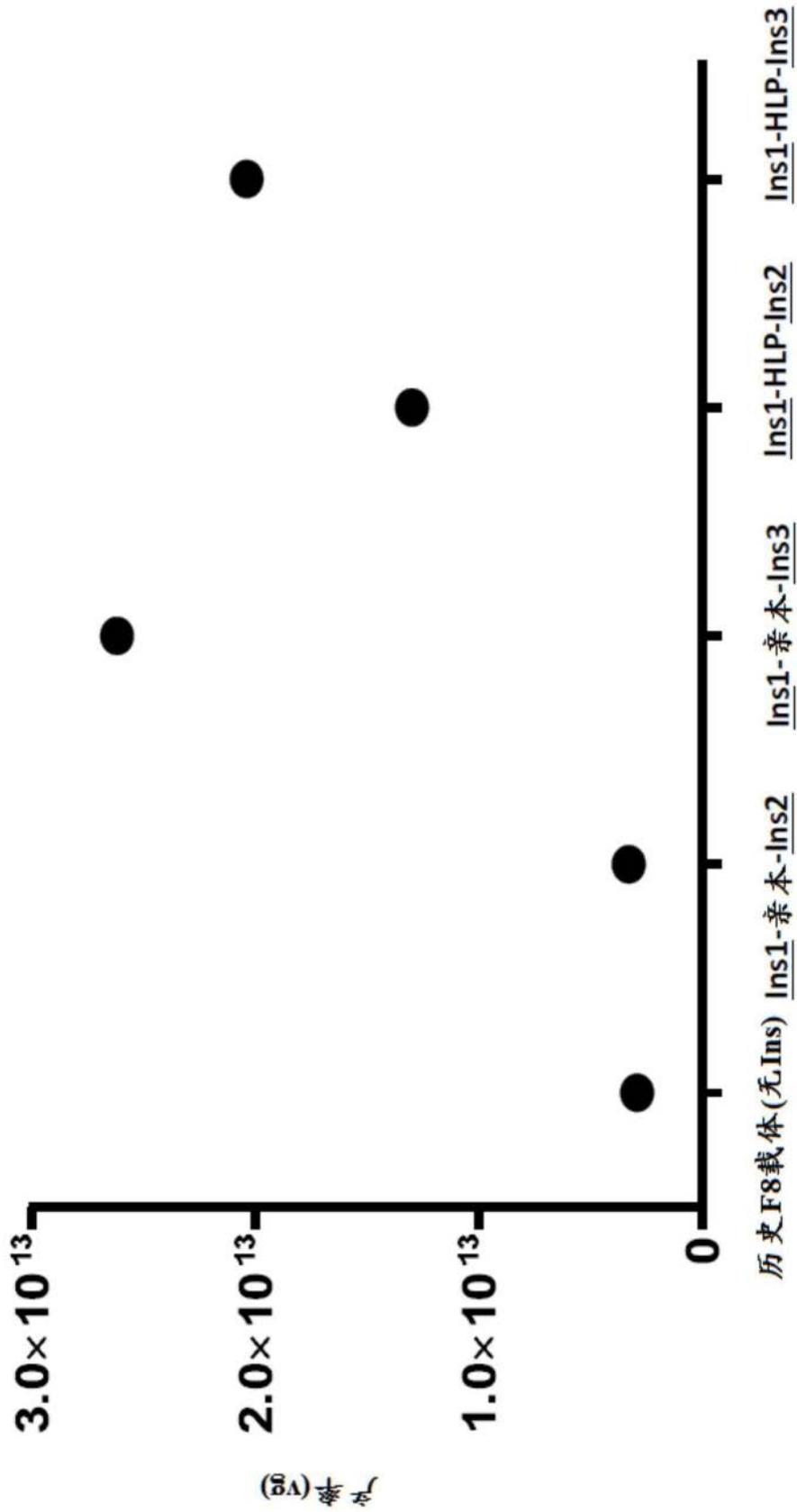


图3

增强子修饰

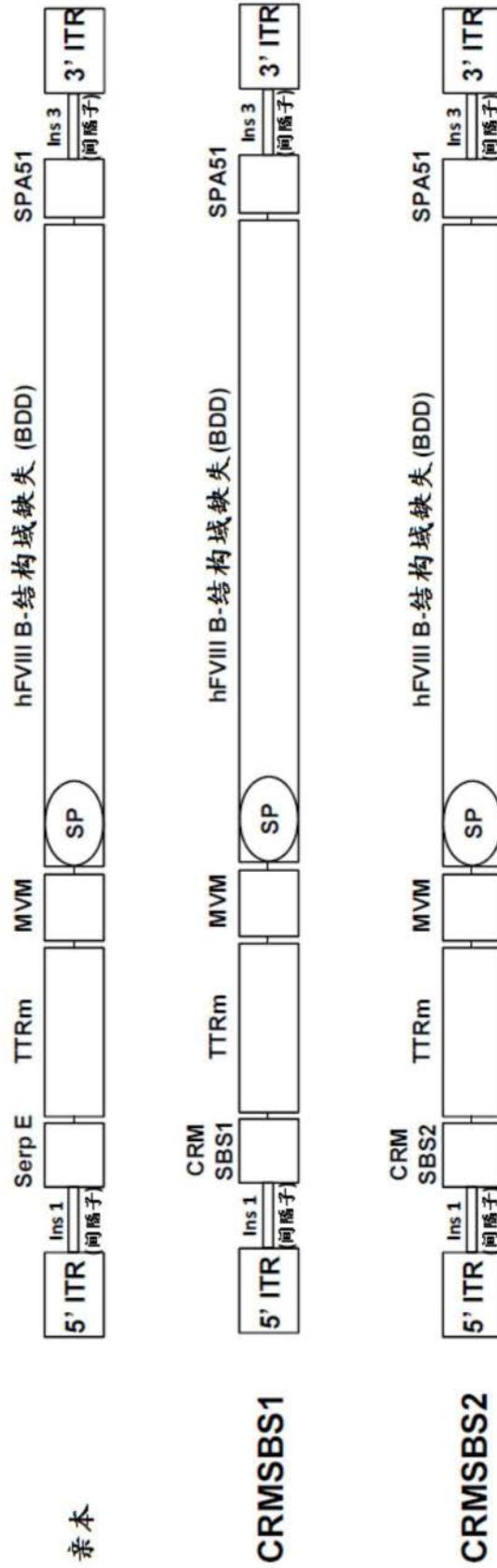
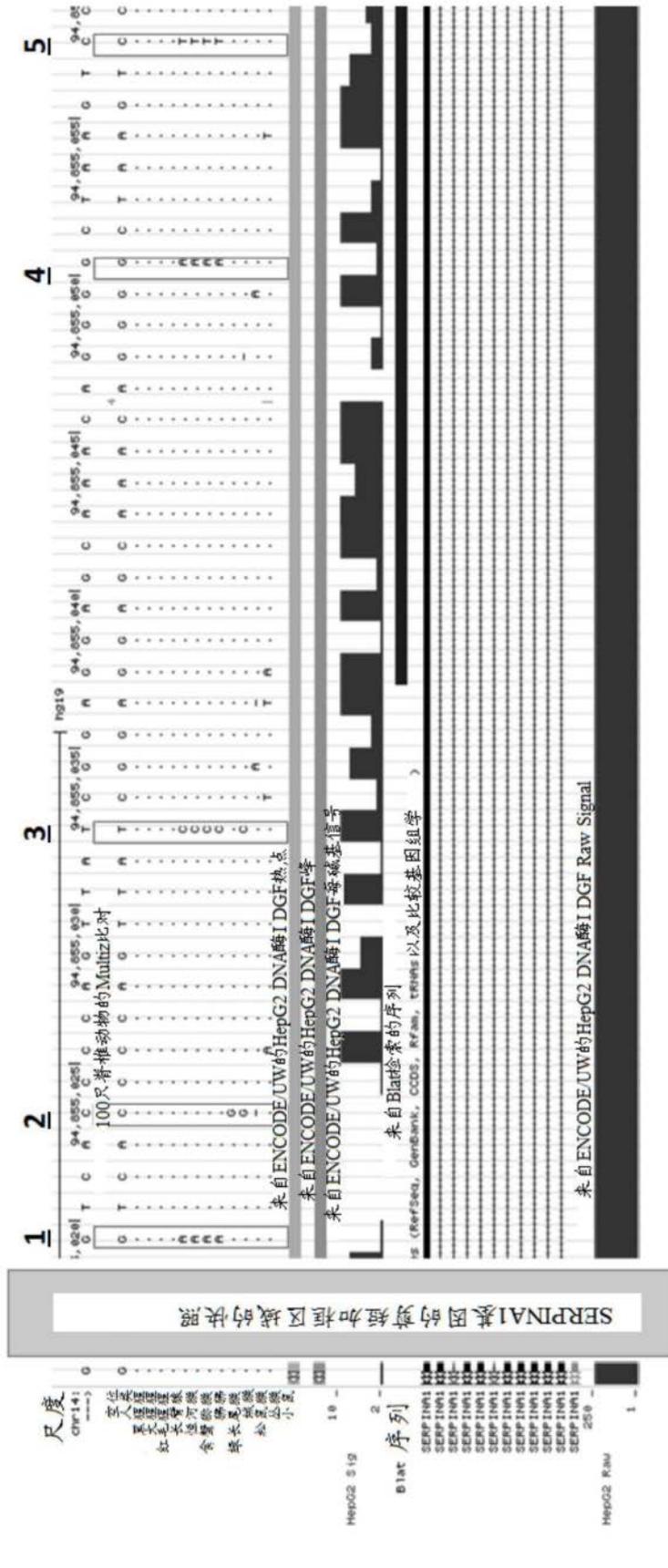


图4



CRMSBS1 = 在1、2、3、4处的改变

CRMSBS2 = 在1、3、4、5处的改变

图5

内含子修饰: CRMSBS1

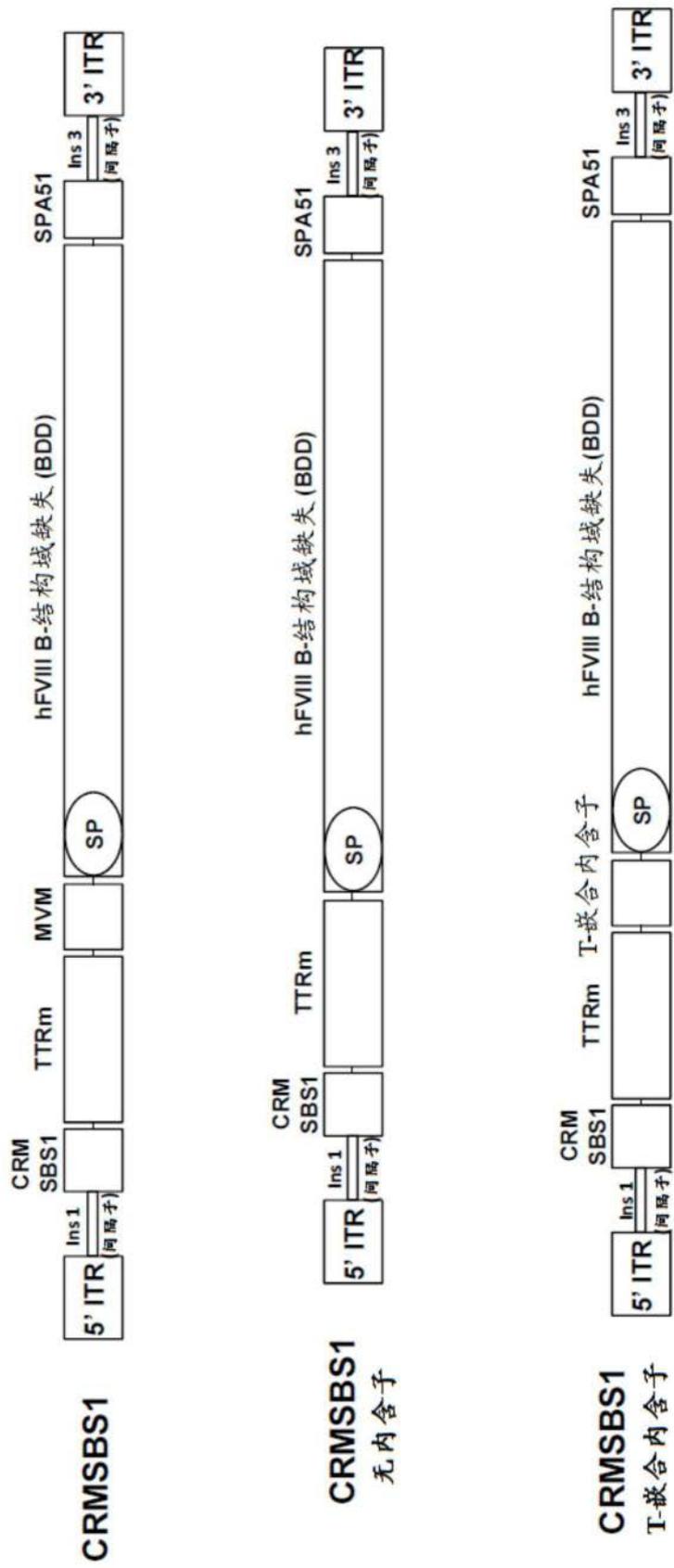
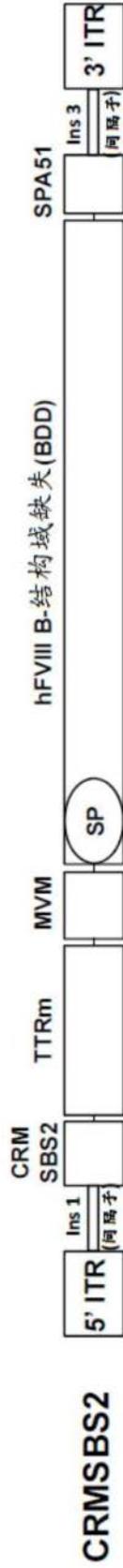


图6

内含子修饰: CRMSBS2



CRMSBS2
无内含子



CRMSBS2
T-嵌合内含子

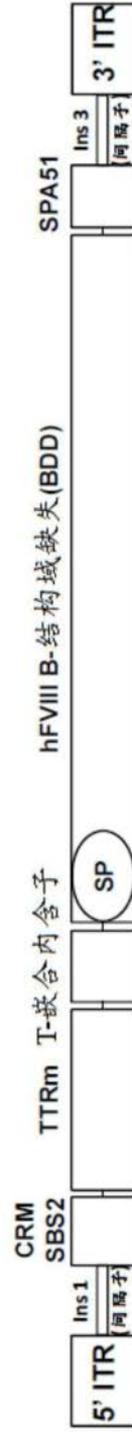


图7

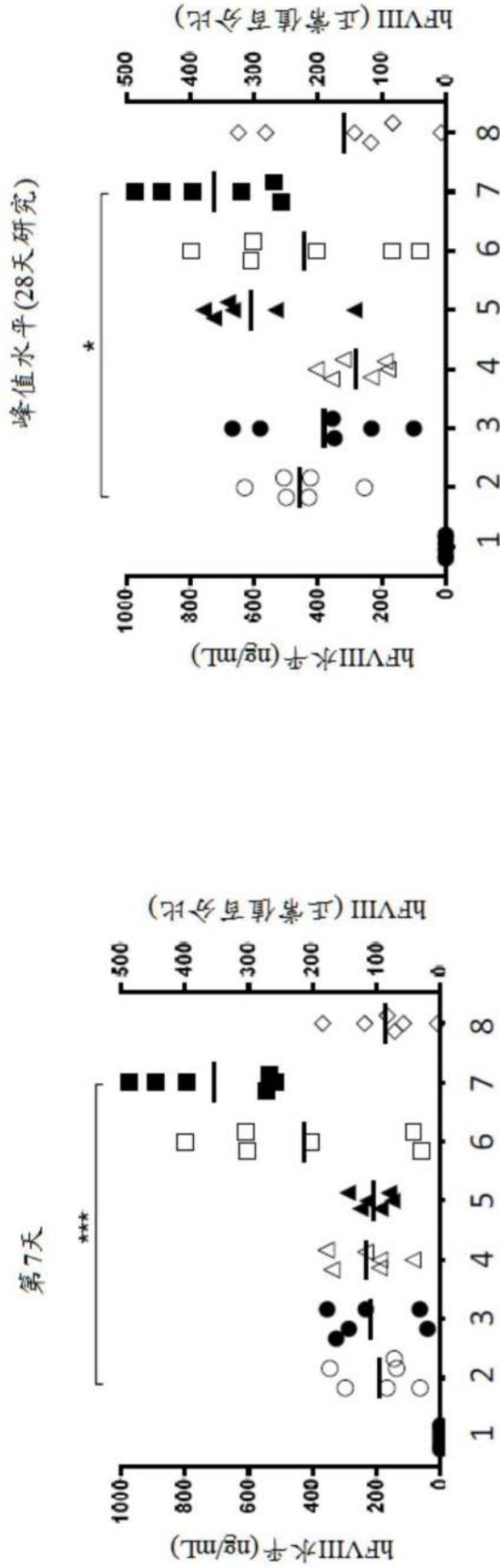


图 8B

编号	名称	具有图谱的图
1	制剂	-
2	亲本	图 4
3	CRMSBS1	图 4
4	CRMSBS1 无内含子	图 6
5	CRMSBS1 T-嵌合内含子	图 6
6	CRMSBS2	图 4
7	CRMSBS2 无内含子	图 7
8	CRMSBS2 T-嵌合内含子	图 7

图 8A

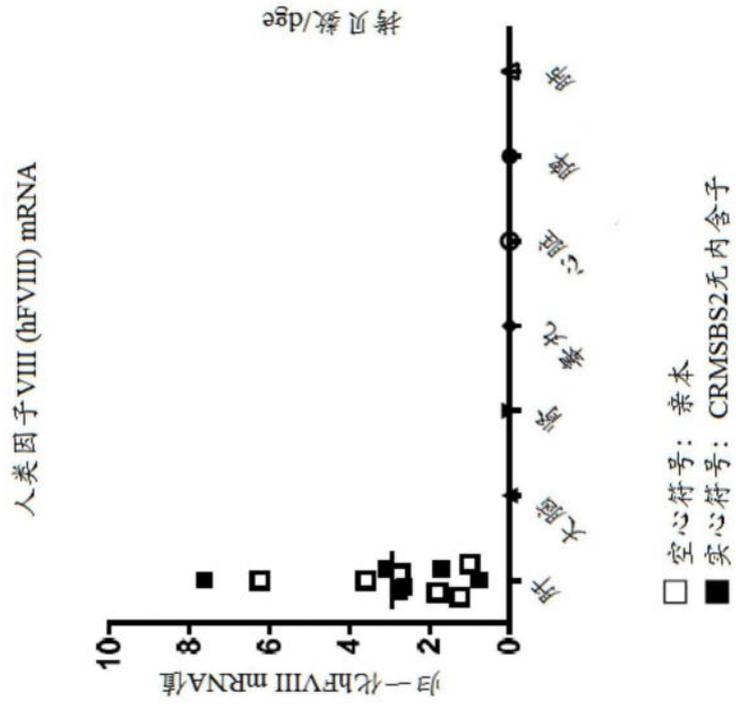


图9A

载体基因组(VG), AAV2/6 生物分布

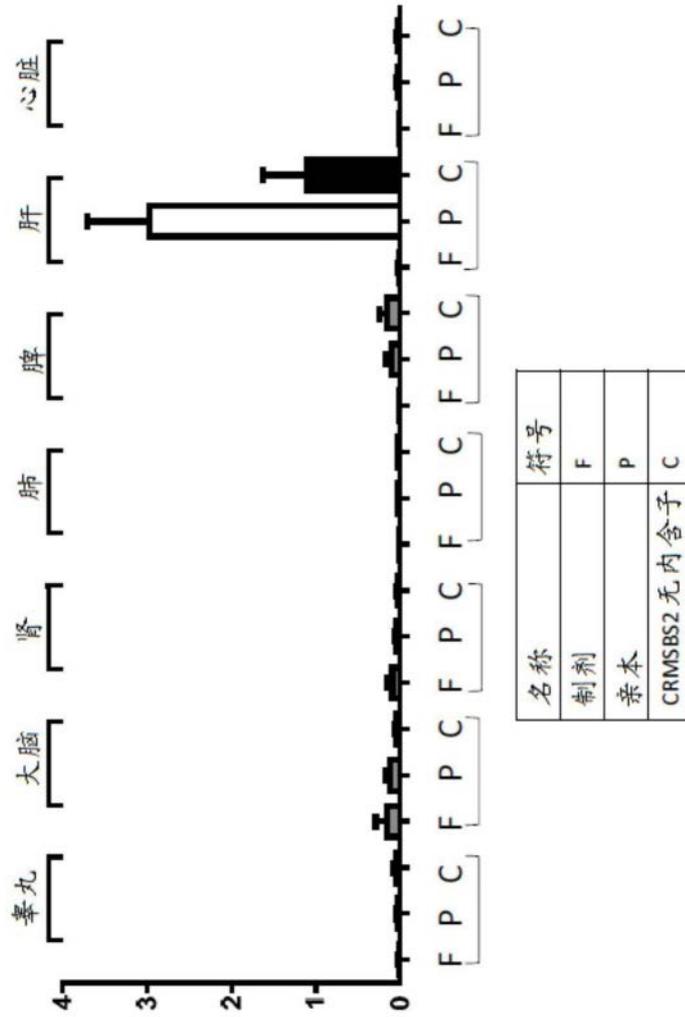


图9B

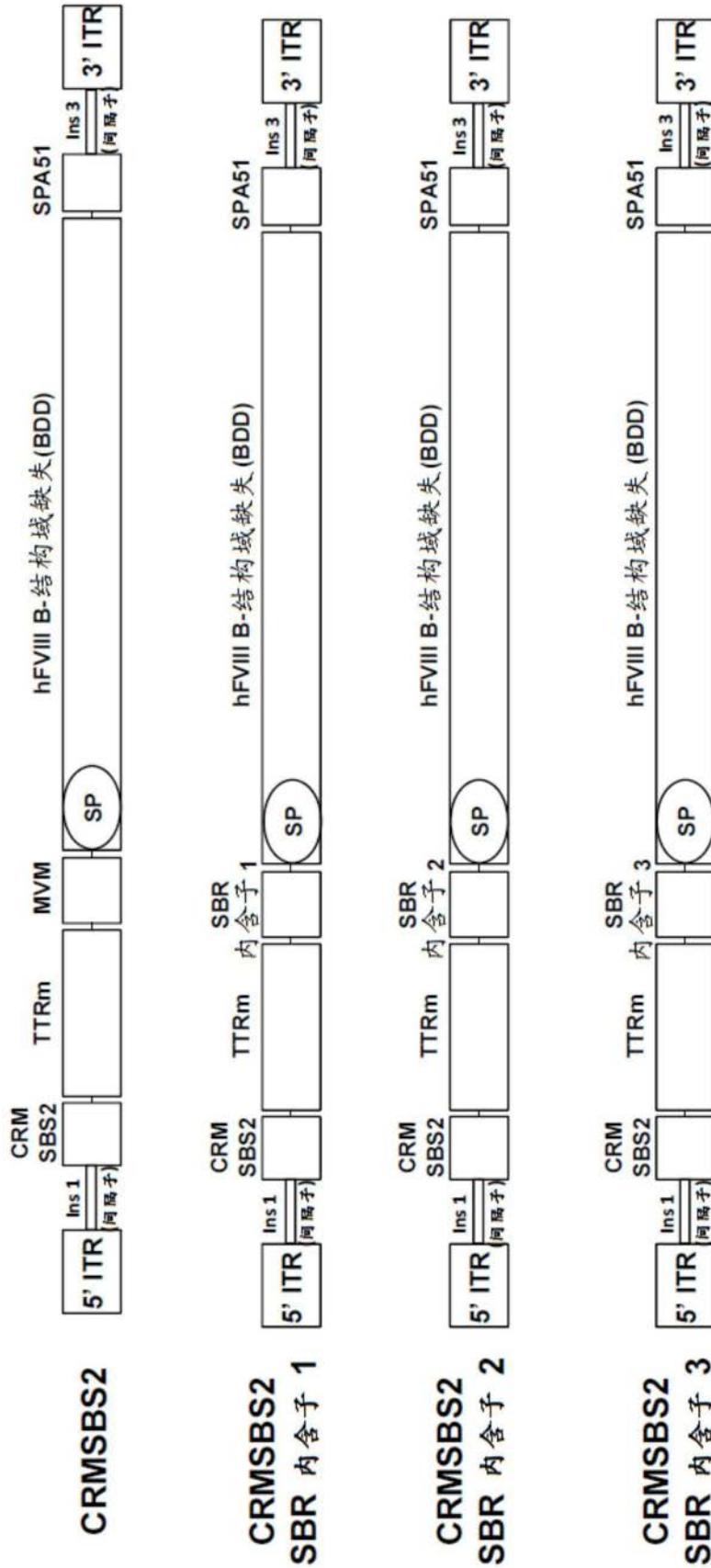


图10

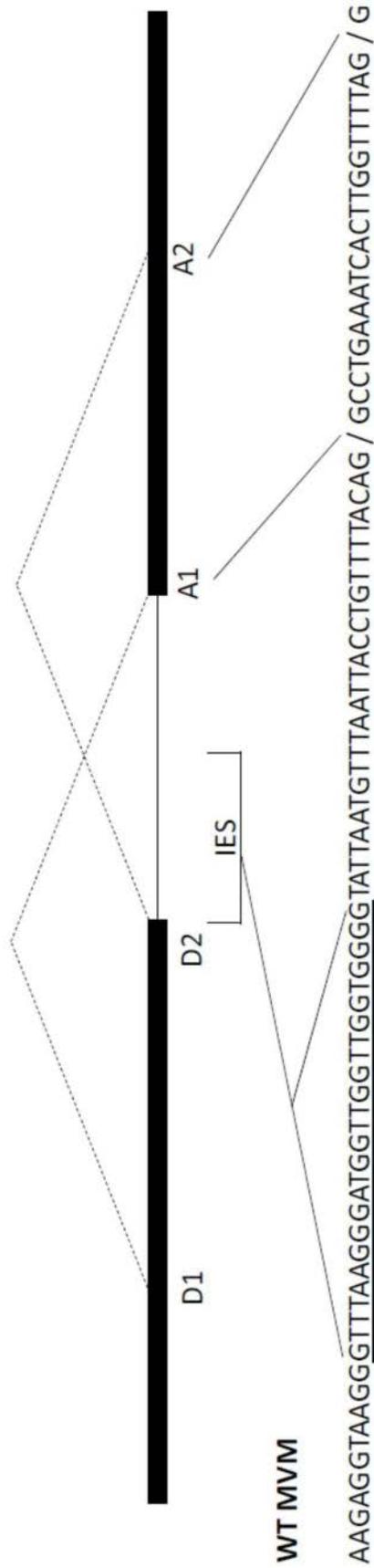


图11

SBR 内含子 1.

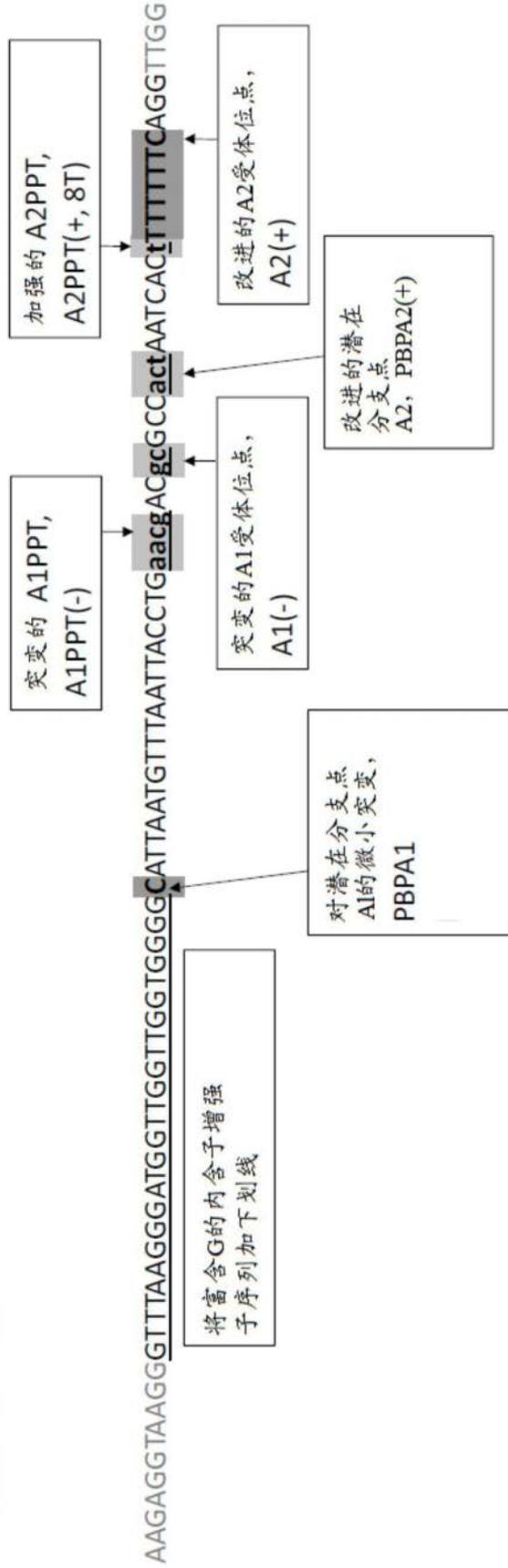


图12

SBR 内含子 2.

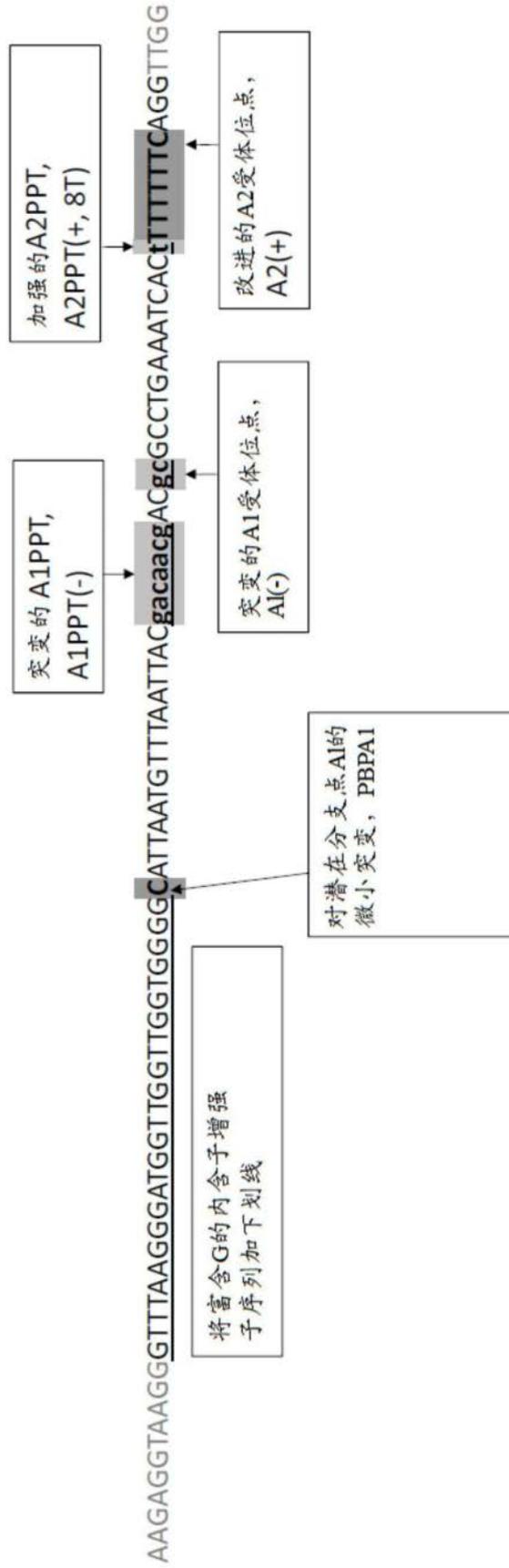


图13

SBR 内含子 3.

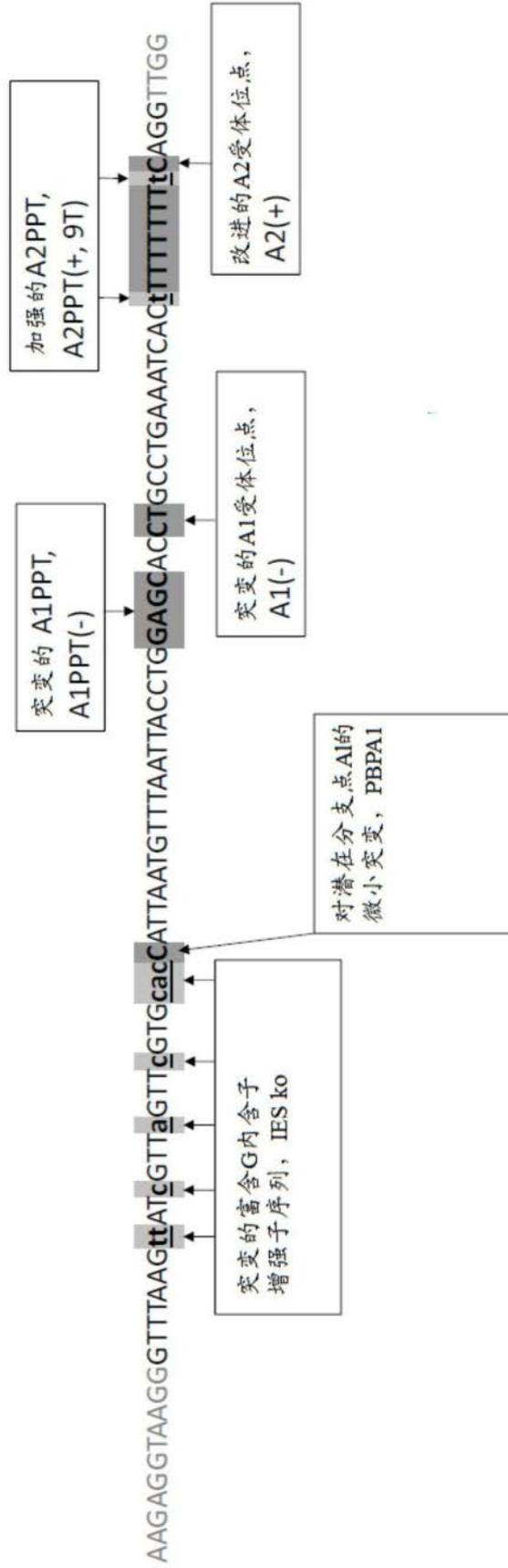


图14

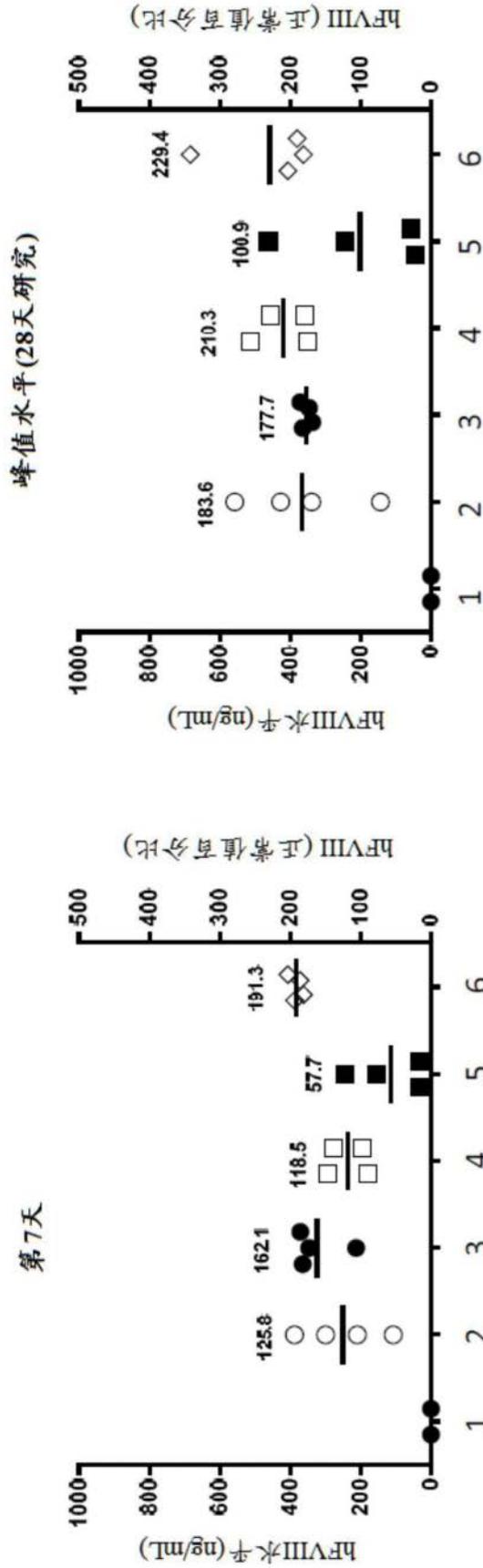


图 15B

编号	名称	具有图谱的图
1	制剂	-
2	亲本	图 4
3	CRMSBS2	图 7
4	CRMSBS2 SBR 内含子 1	图 8
5	CRMSBS2 SBR 内含子 2	图 8
6	CRMSBS2 SBR 内含子 3	图 8

图 15A

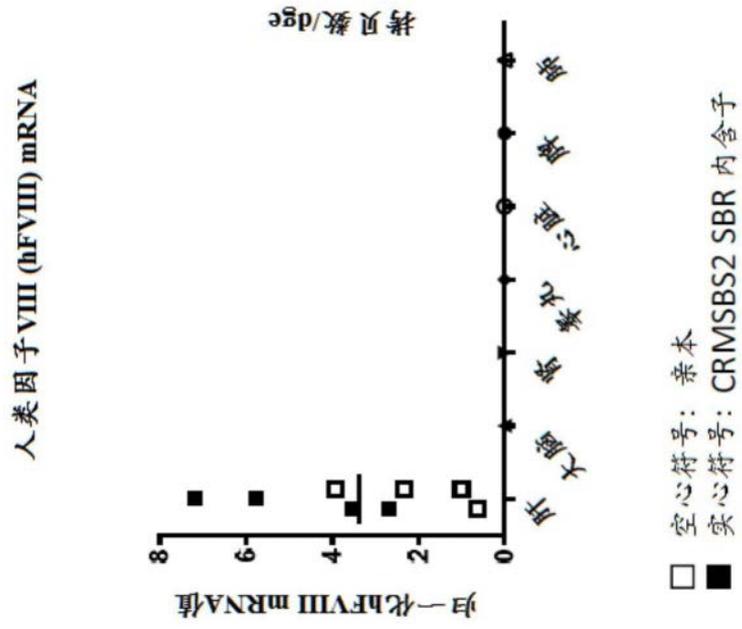


图16A

载体基因组 (VG), AAV2/6 生物分布

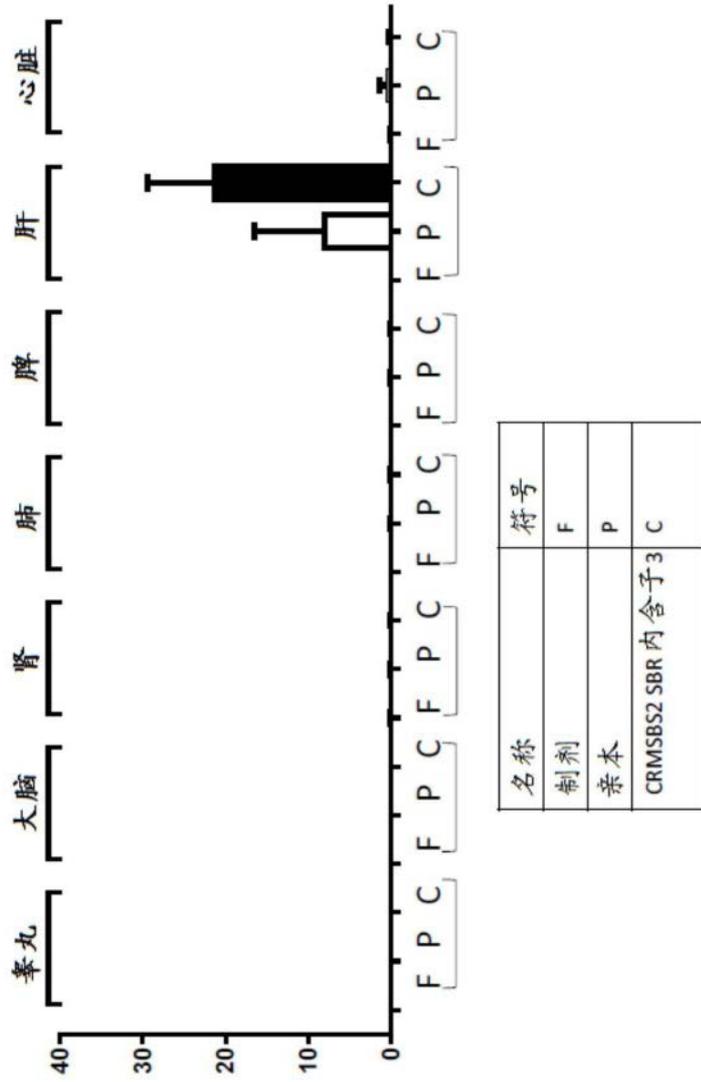
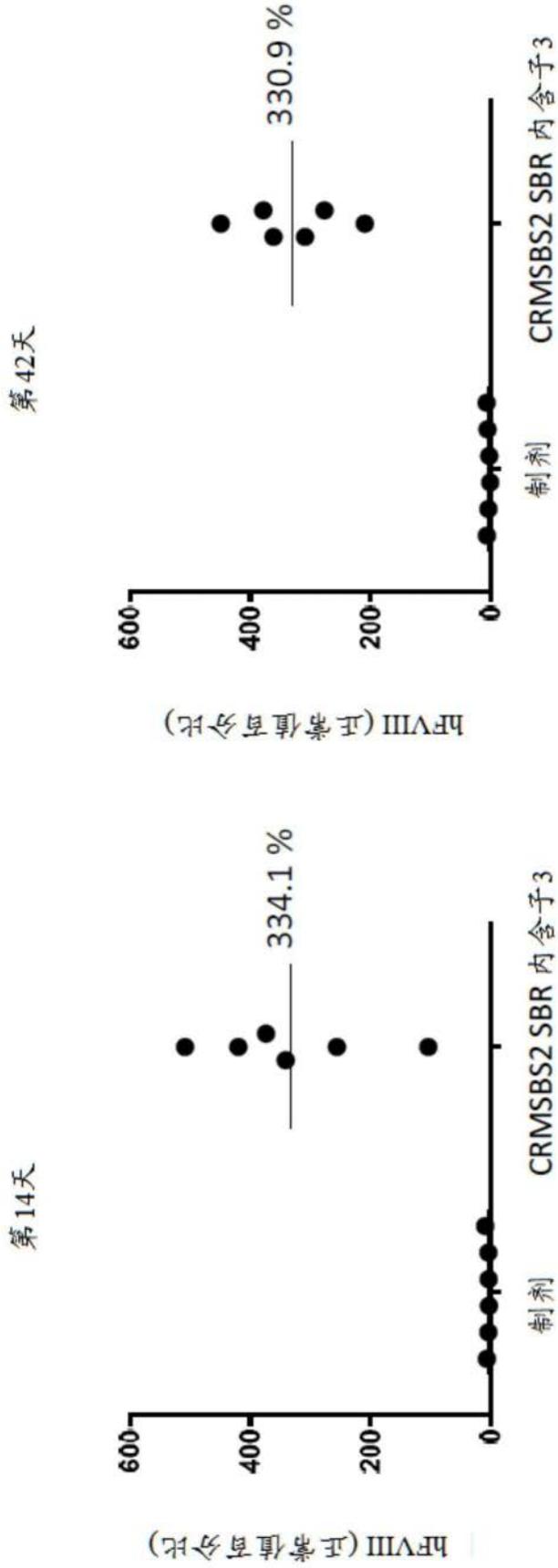


图16B

名称	符号
制剂	F
亲本	P
CRMSBS2 SBR 内含子3	C



R593A小鼠模型

图 17A

图 17B

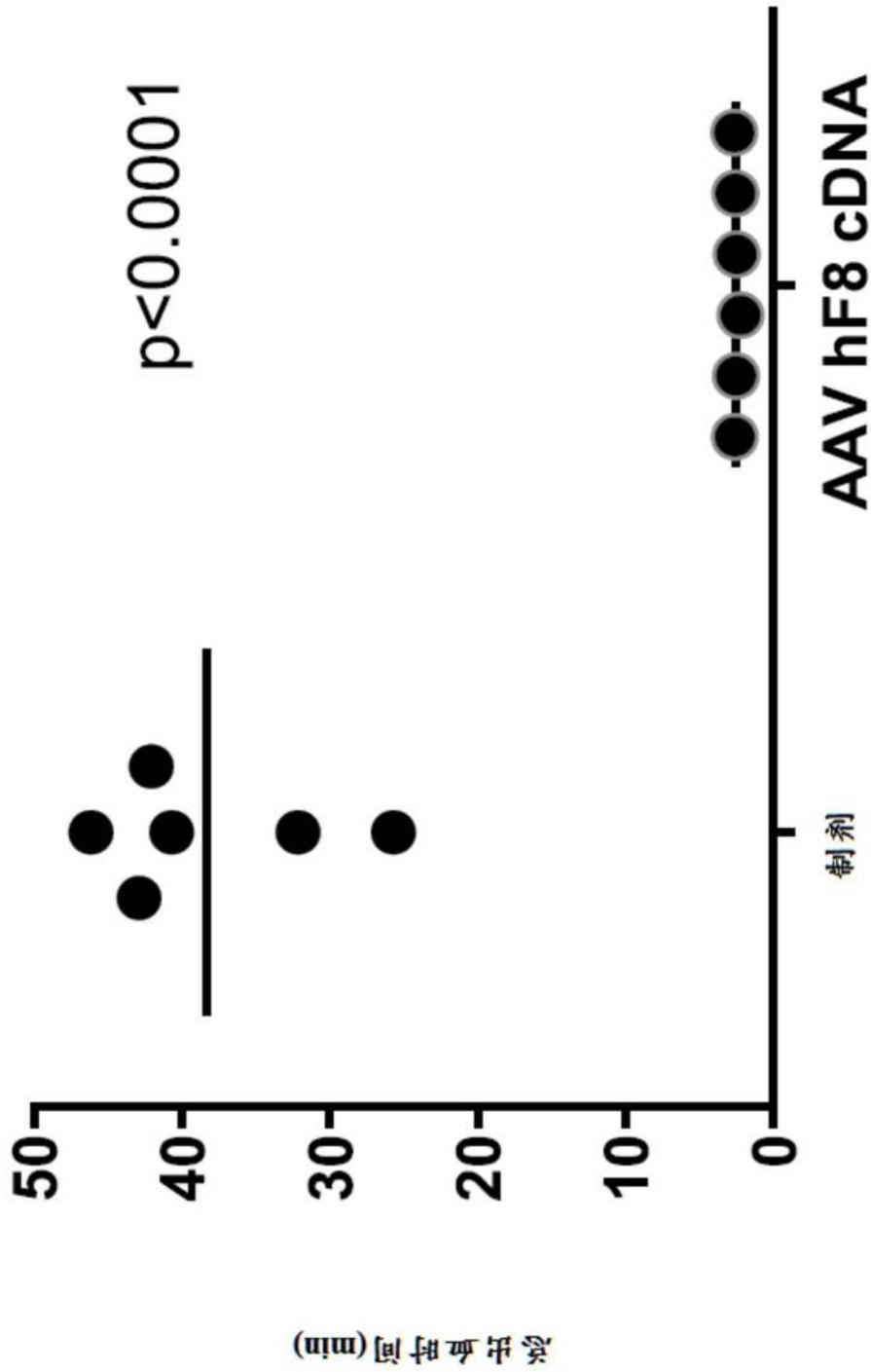


图18

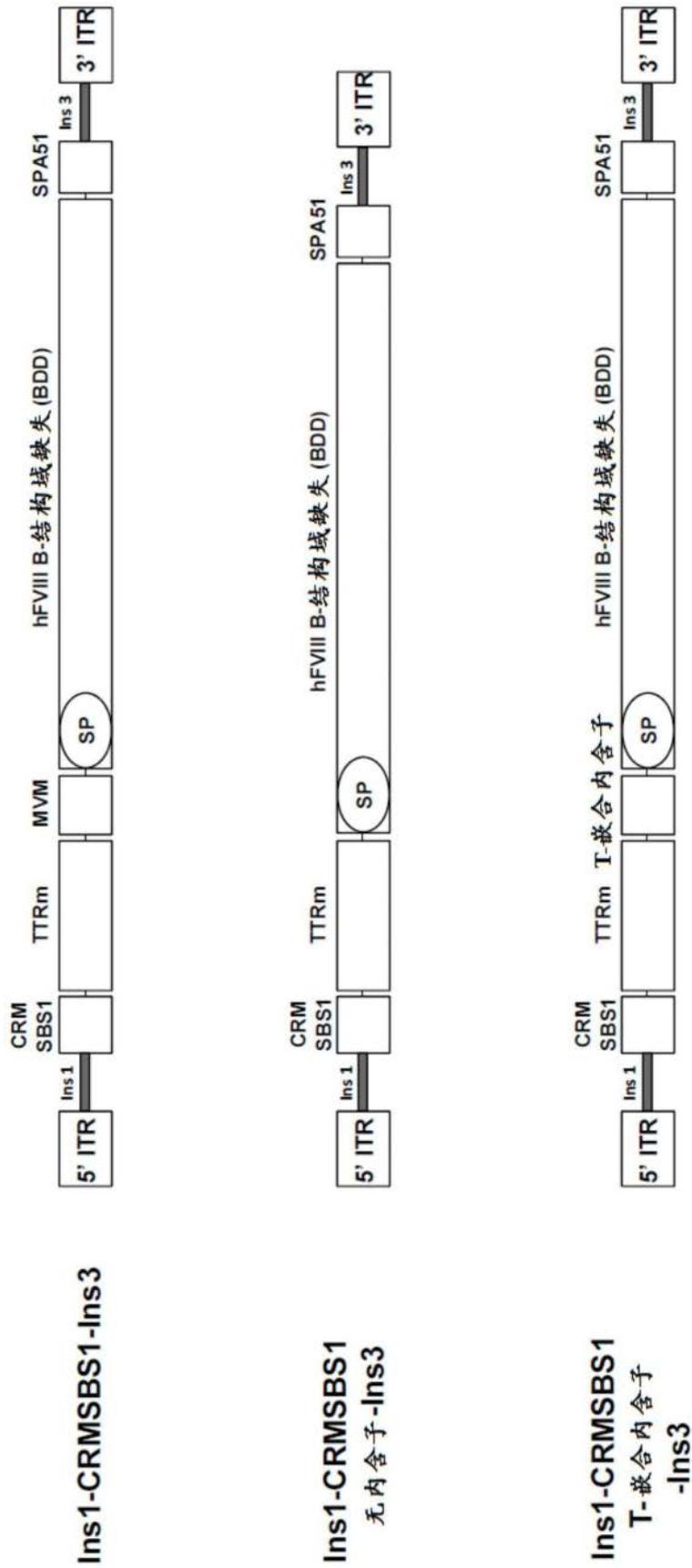


图19

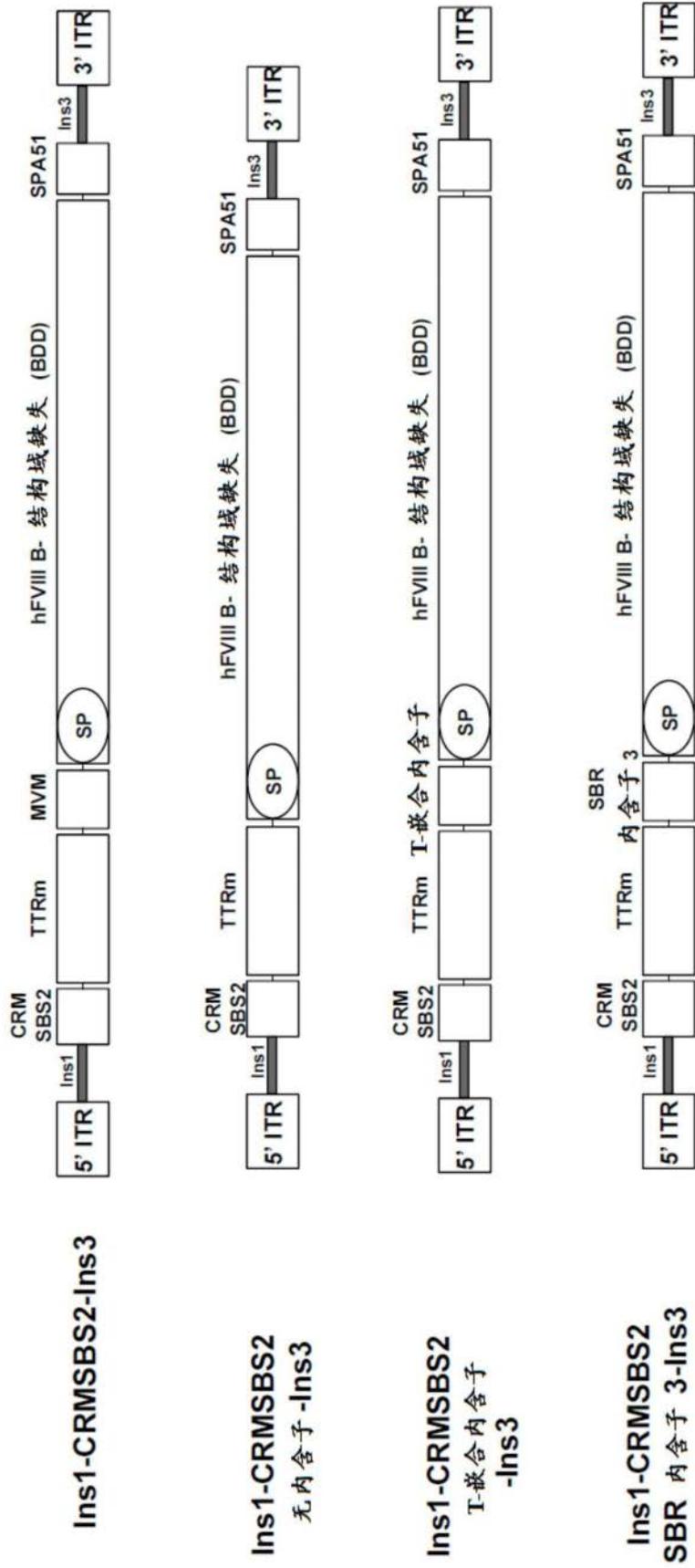


图20

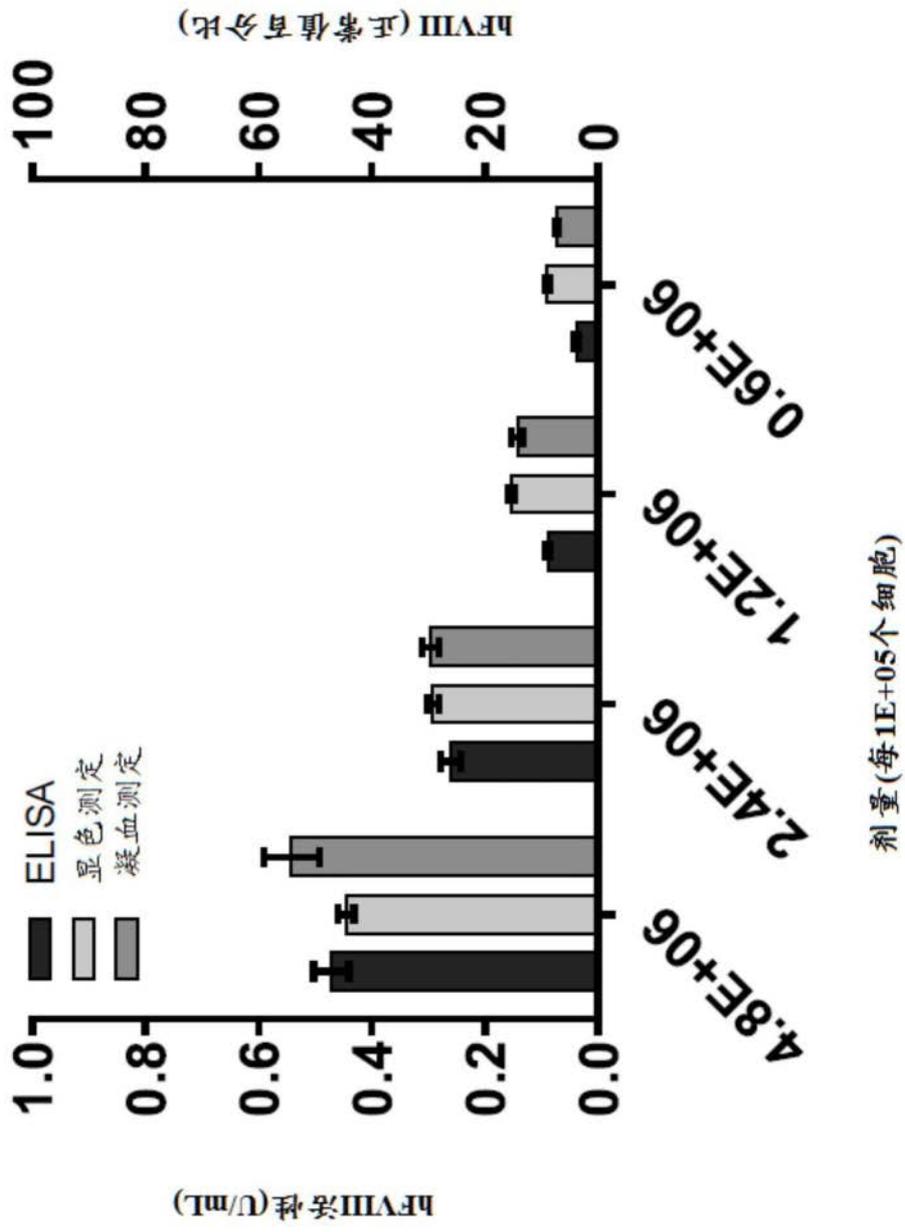
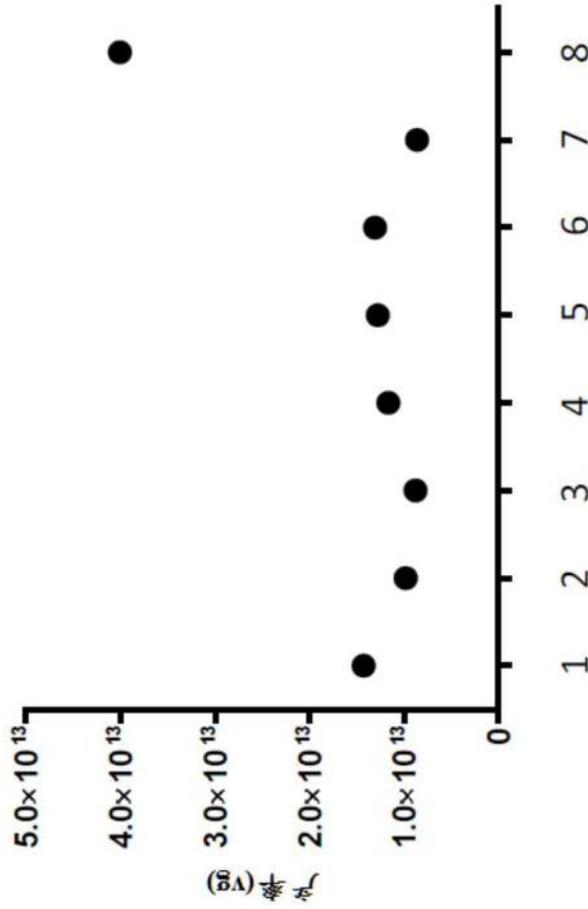


图21



名词	编号
Ins1-亲本-Ins3	1
Ins1-CRMSBS1-Ins3	2
Ins1-CRMSBS1 无内含子-Ins3	3
Ins1-CRMSBS1 T-嵌合内含子-Ins3	4
Ins1-CRMSBS2-Ins3	5
Ins1-CRMSBS2 无内含子-Ins3	6
Ins1-CRMSBS2 T-嵌合内含子-Ins3	7
Ins1-CRMSBS2 SBR 内含子3 -Ins3	8

图22

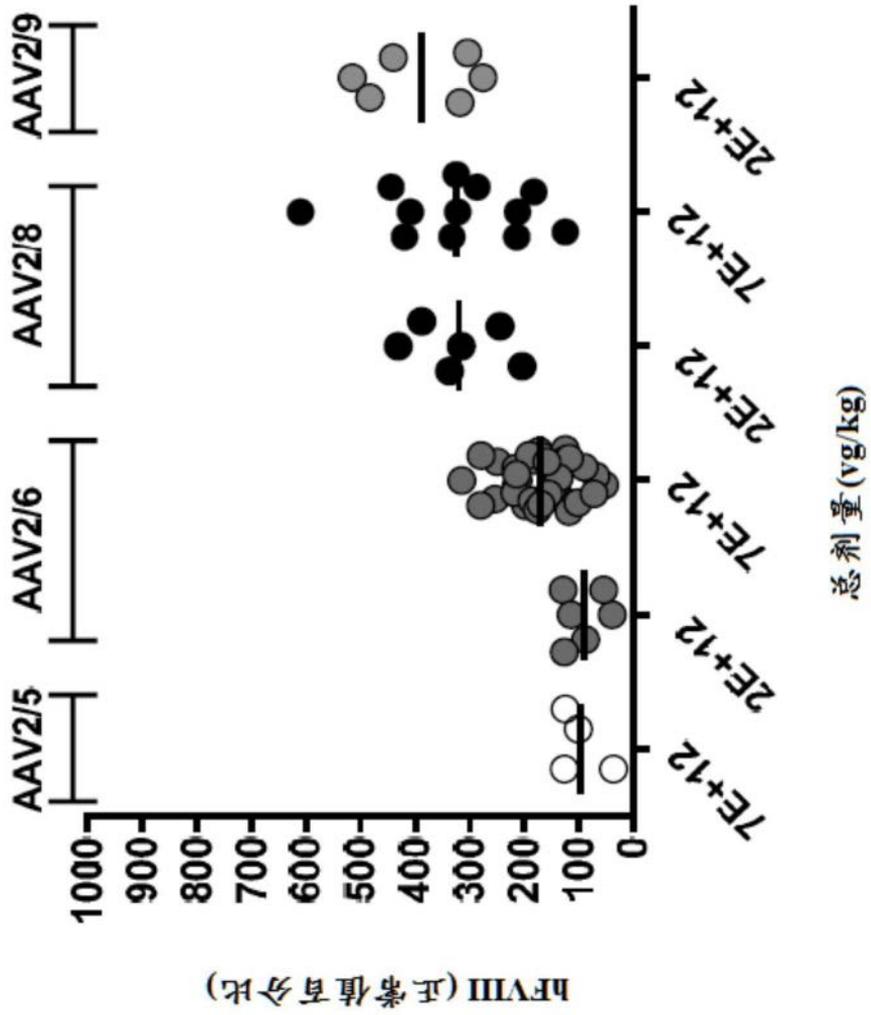


图23

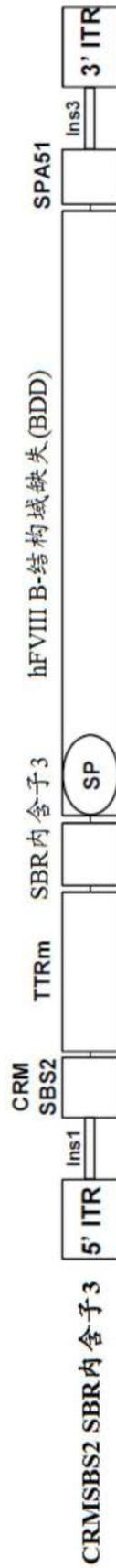


图25A

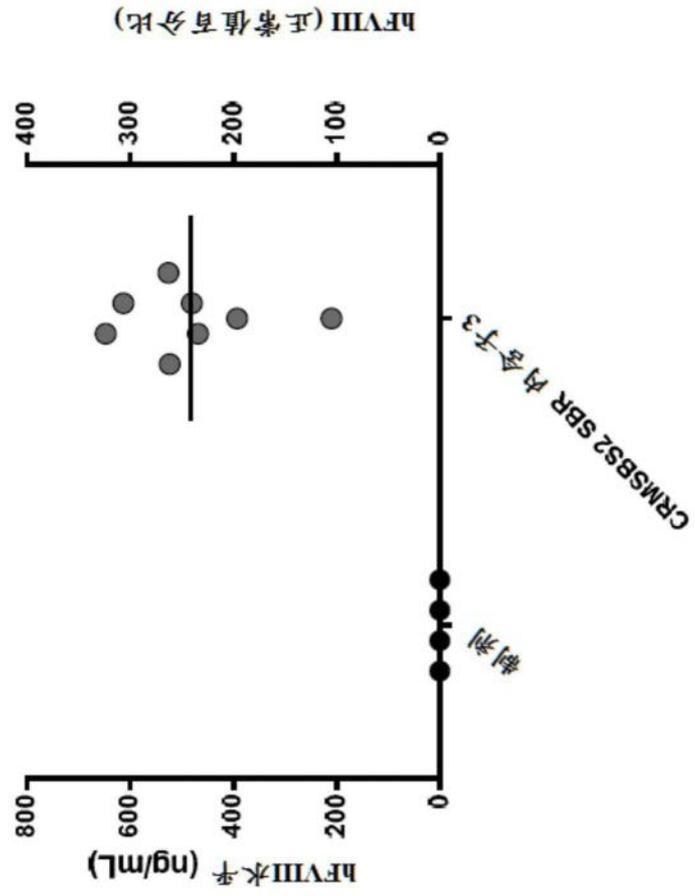


图25B

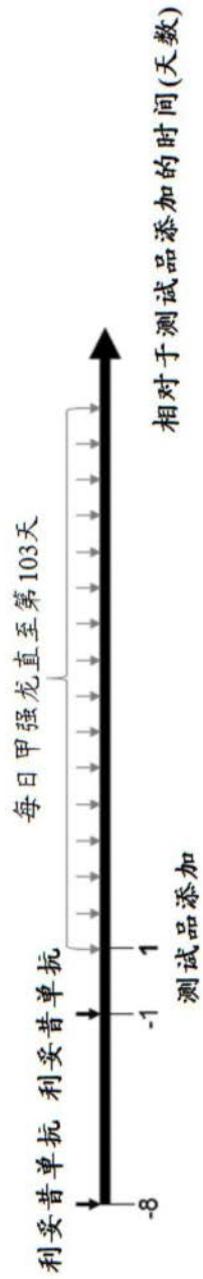


图26A

组	动物编号		测试品身份	AAV转基因描述	血清型	总rAAV剂量 (vg/kg)
	编号	雄性				
免疫抑制方案-在测试品注射之前						
1	1		SGMO.01	制剂缓冲液	NA	0
2	3		SGMO.02	hF8 cDNA I	AAV2/6	2E+11
3	3		SGMO.03	hF8 cDNA I	AAV2/6	6E+11
4	3		SGMO.04	hF8 cDNA I	AAV2/6	2E+12
5	3		SGMO.05	hF8 cDNA I	AAV2/6	6E+12
免疫抑制方案-在测试品注射之后						
6	1		SGMO.06	hF8 cDNA I	NA	0
7	3		SGMO.07	hF8 cDNA I	AAV2/6	2E+12
8	3		SGMO.08	hF8 cDNA I	AAV2/6	6E+12
第2组在第56天再次给药						
2	3		SGMO.A	hF8 cDNA I	AAV2/6	9E+11

Vg-载体基因组

图26B

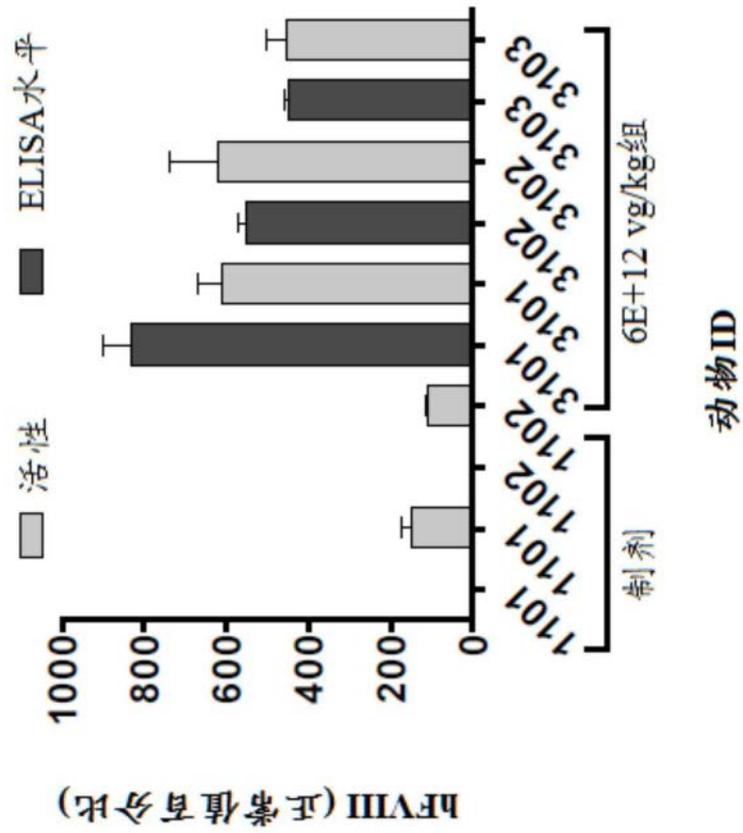
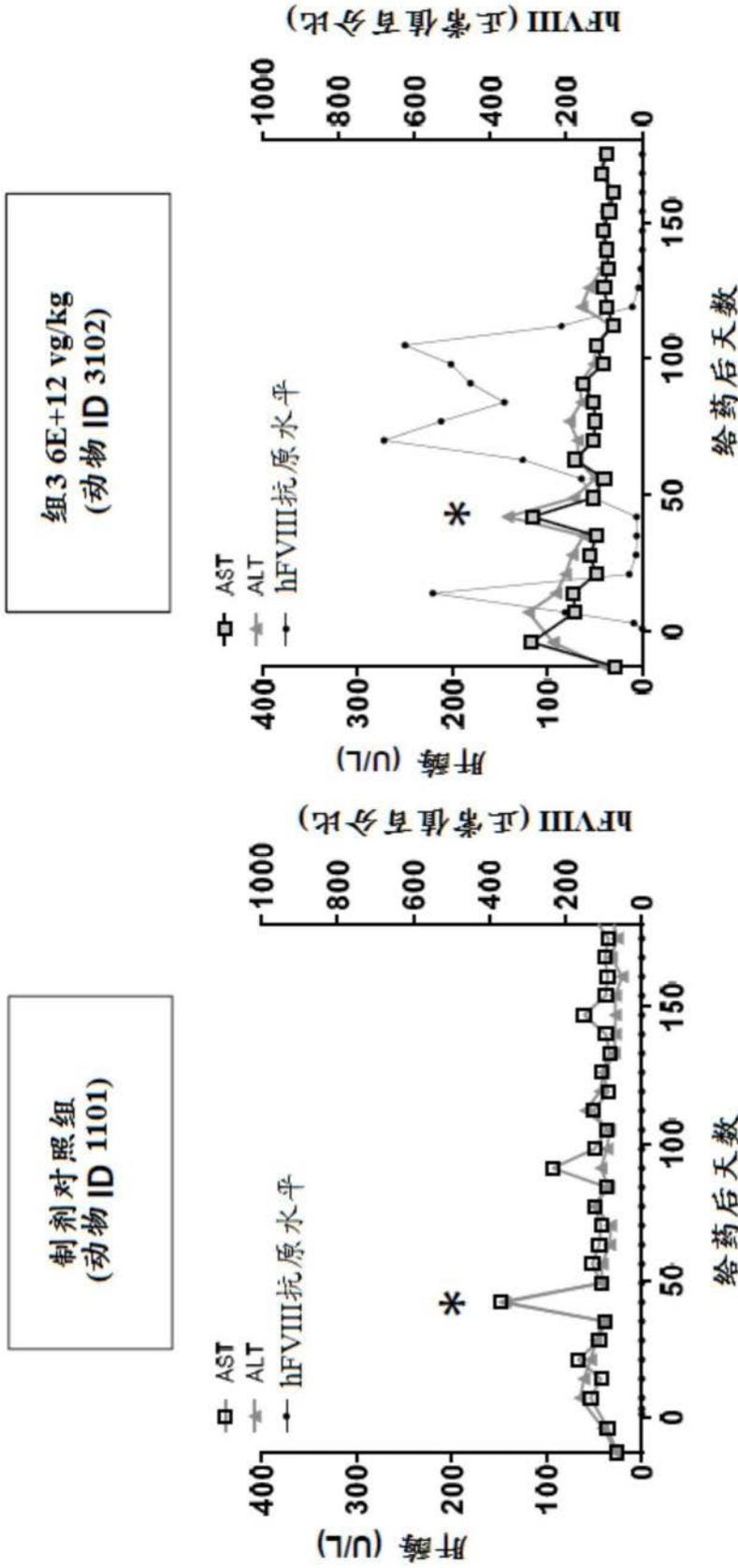


图27



* 在肝活检之后(第41天)观测到的高水平

图 28A

图 28B

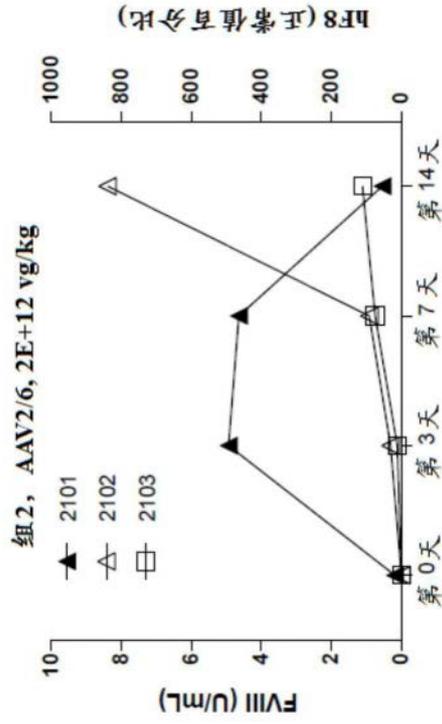


图29A

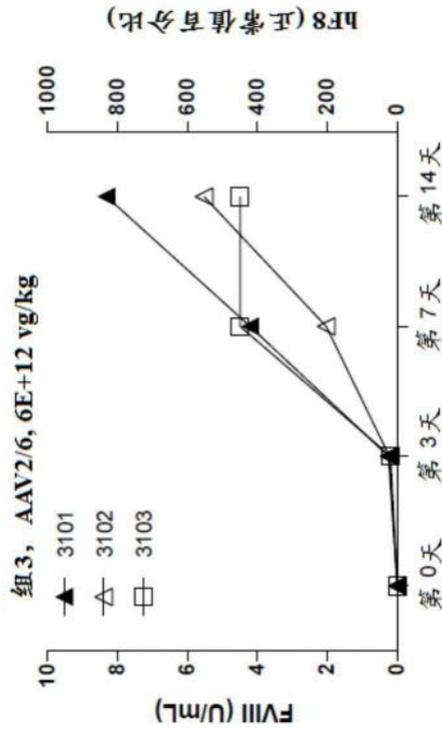


图29B

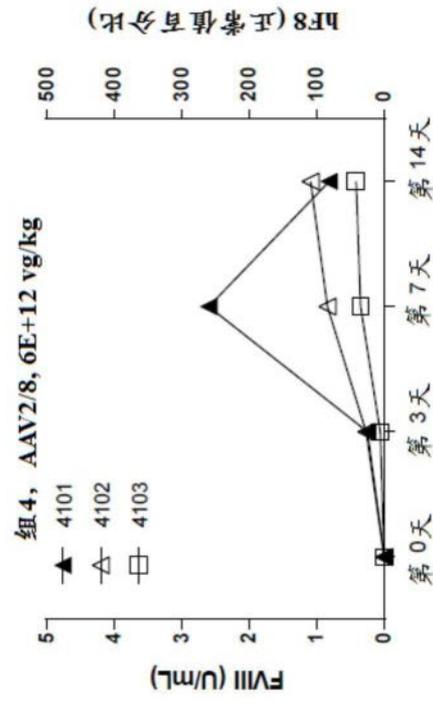


图29C

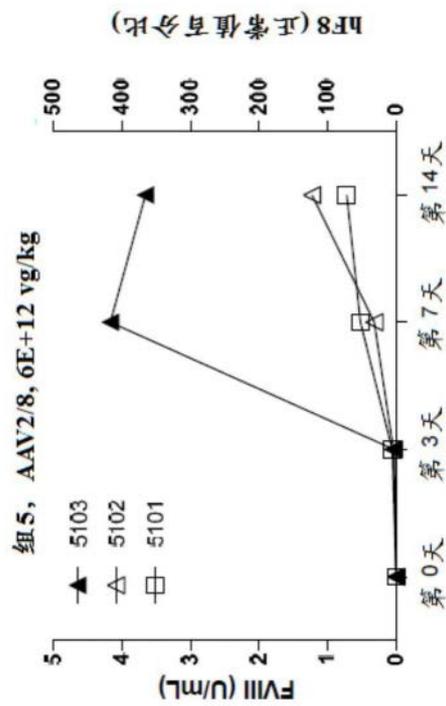


图29D

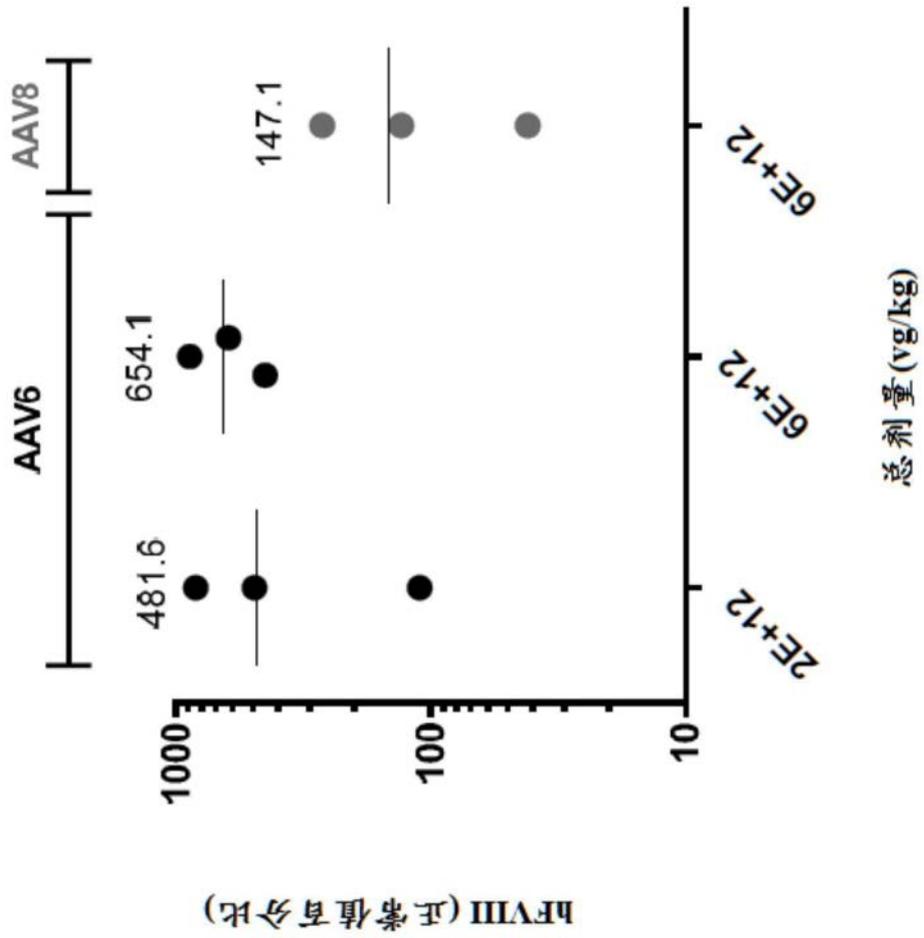
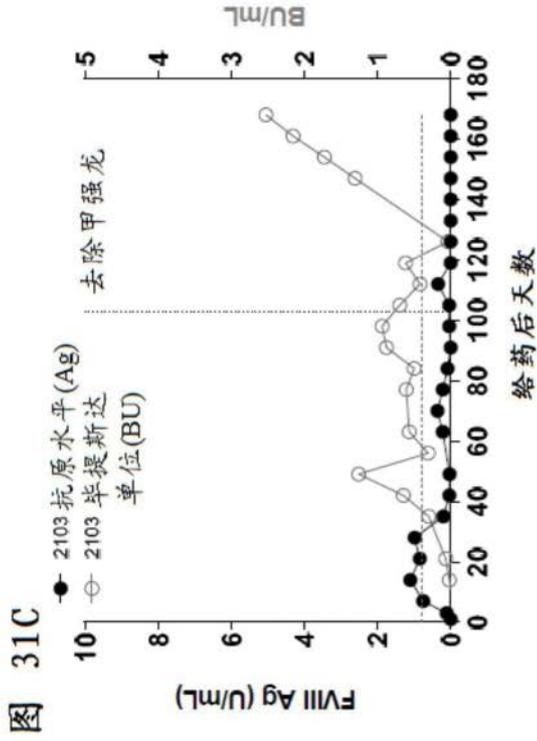
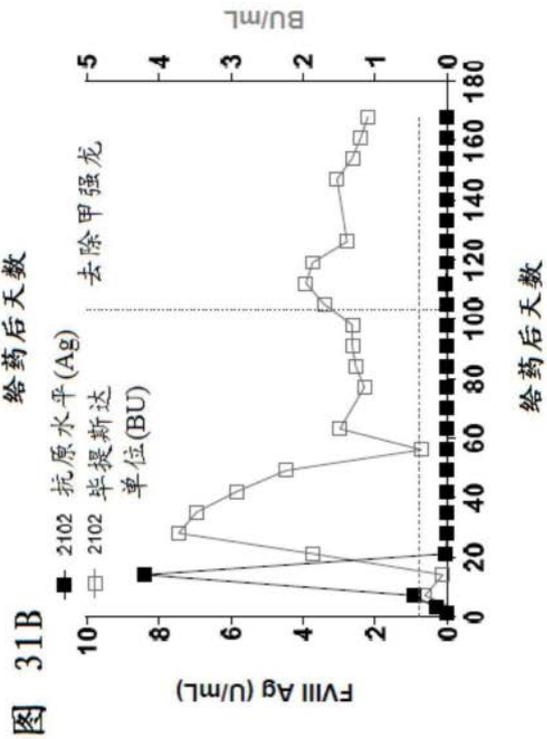
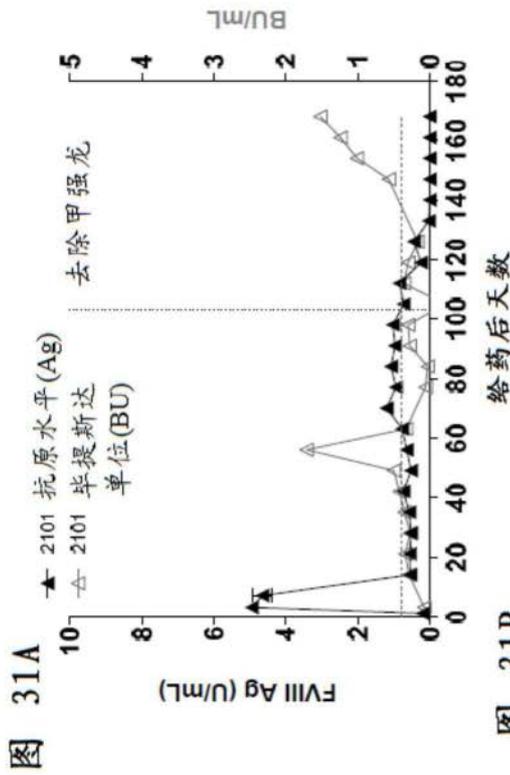
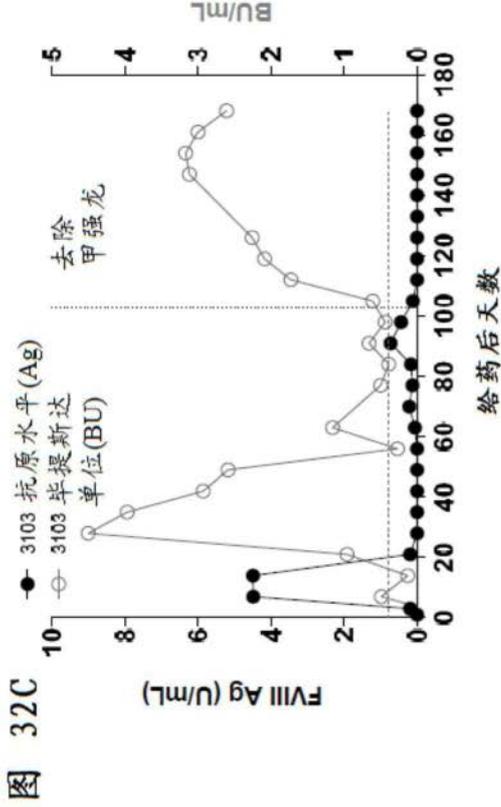


图30



组2, AAV2/6, 2E+12 vg/kg





组3, AAV2/6, 6E+12 vg/kg

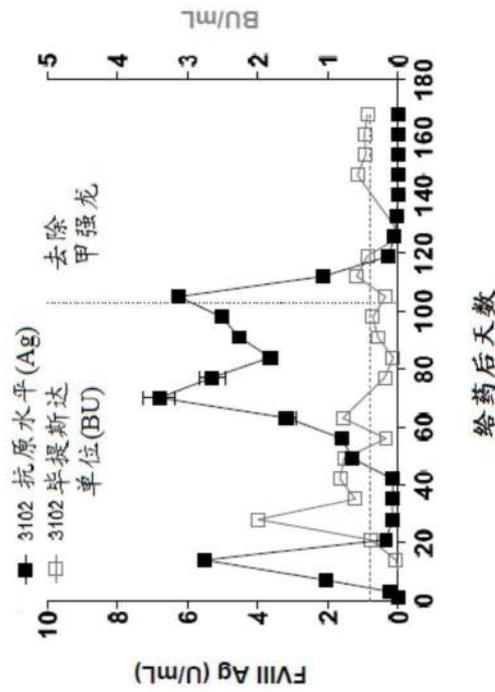
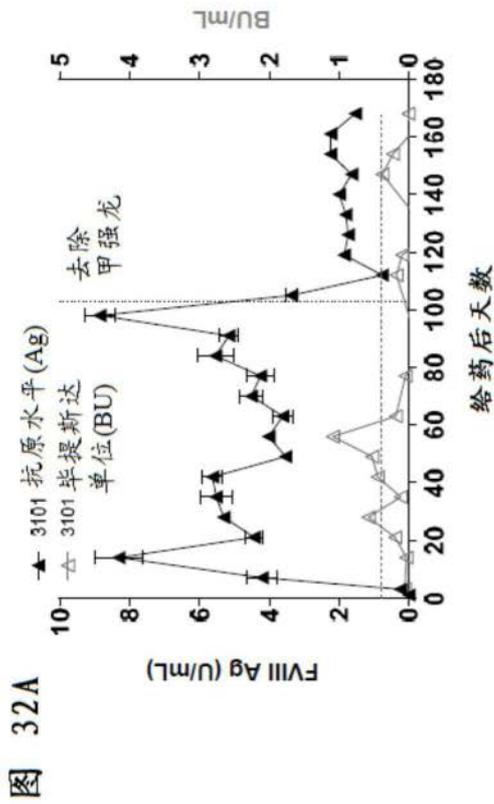


图 32B

组4, AAV2/8, 6E+12 vg/kg

图 33A

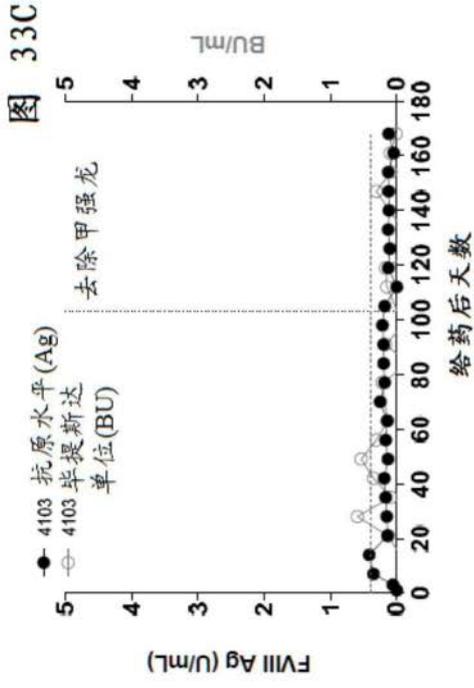
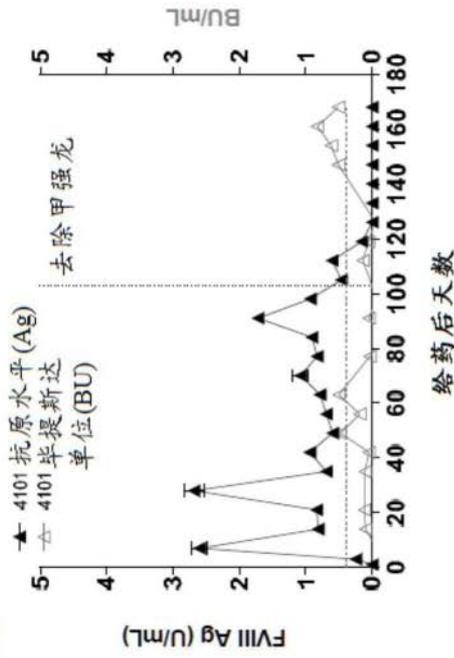


图 33C

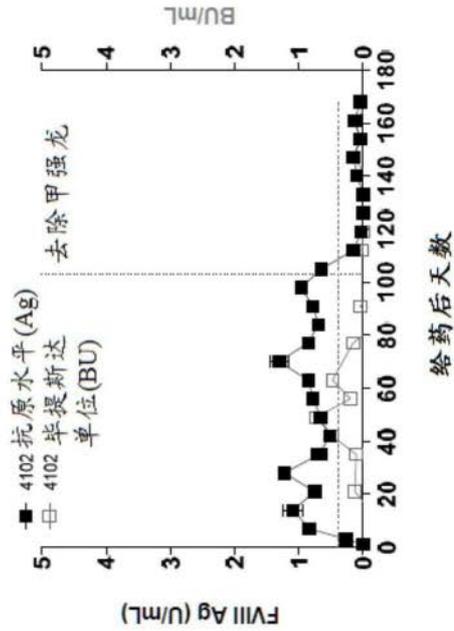


图 33B

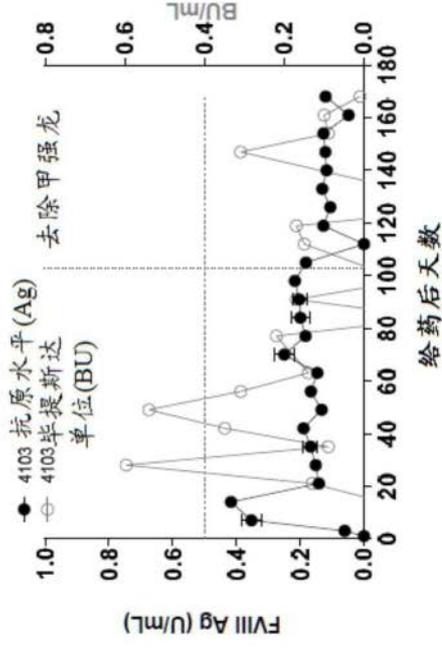
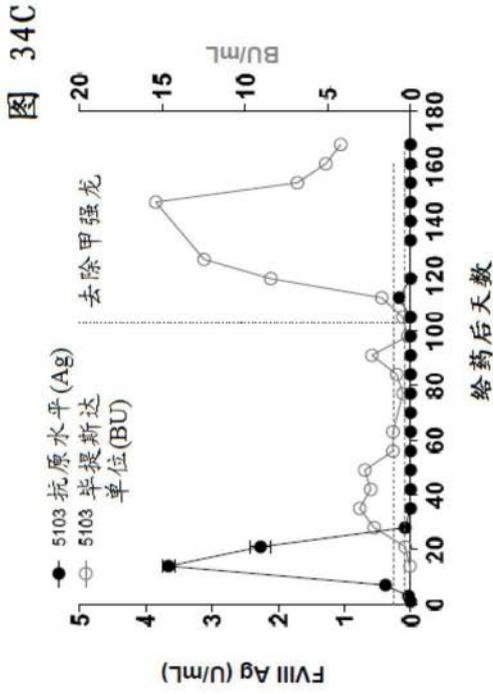


图 33D



组5, AAV2/8, 6E+12 vg/kg

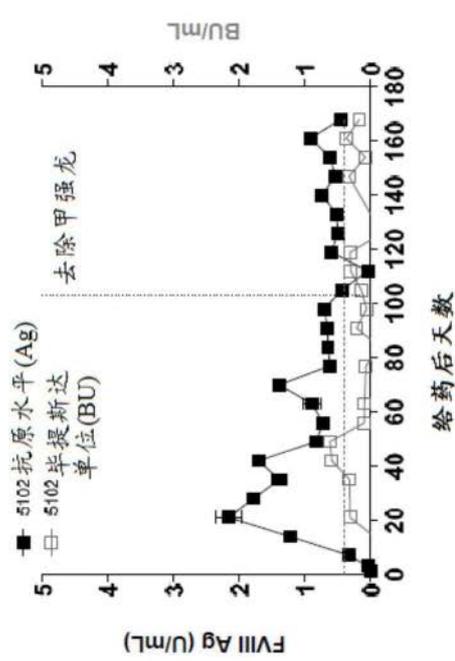
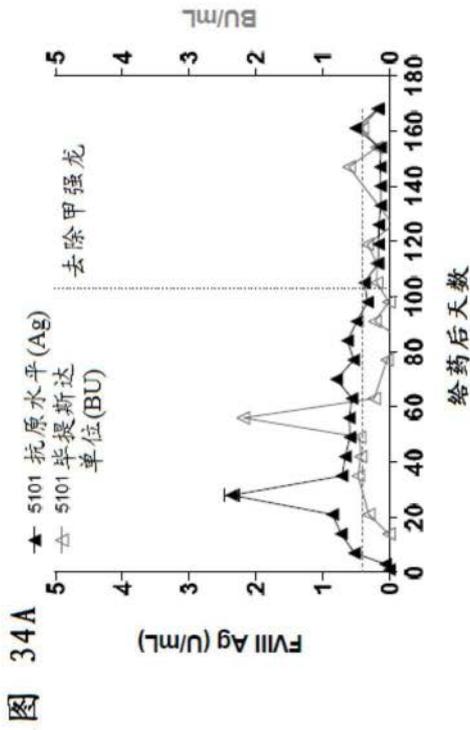
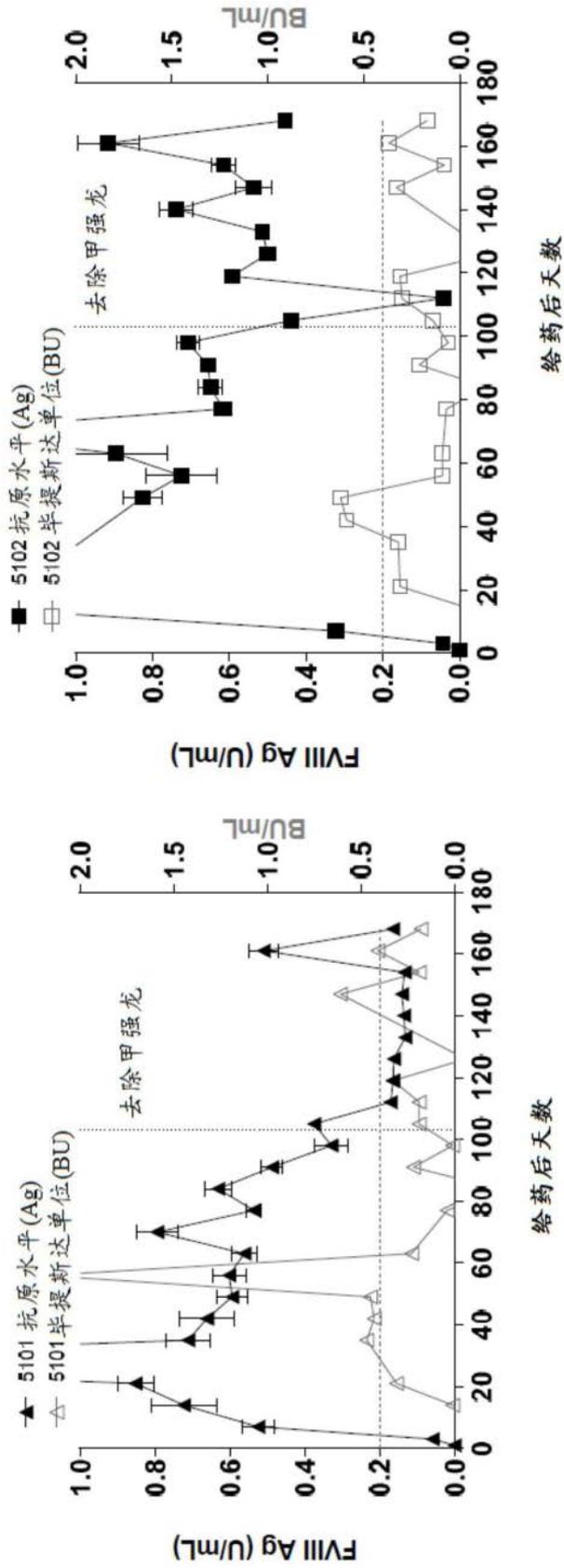


图 34B



组5, AAV2/8, 6E+12 vg/kg

图 34D

图 34E

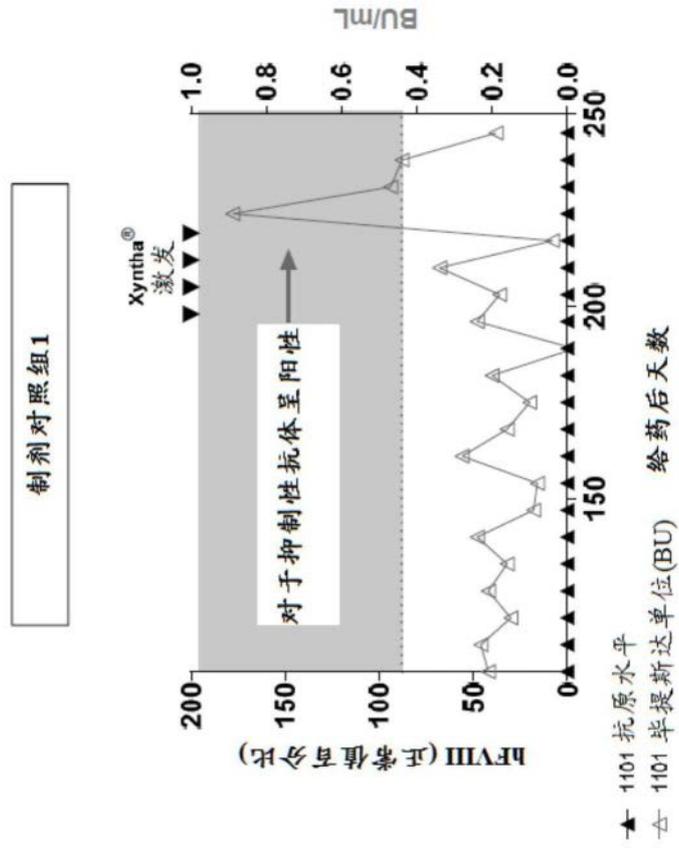


图35A

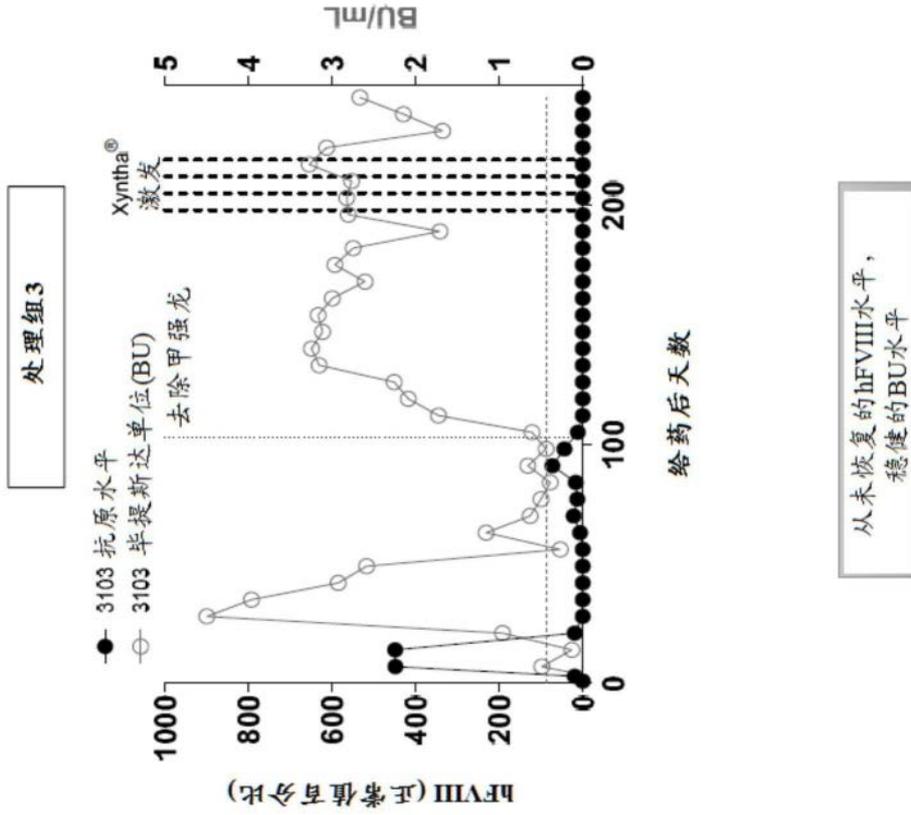


图35B

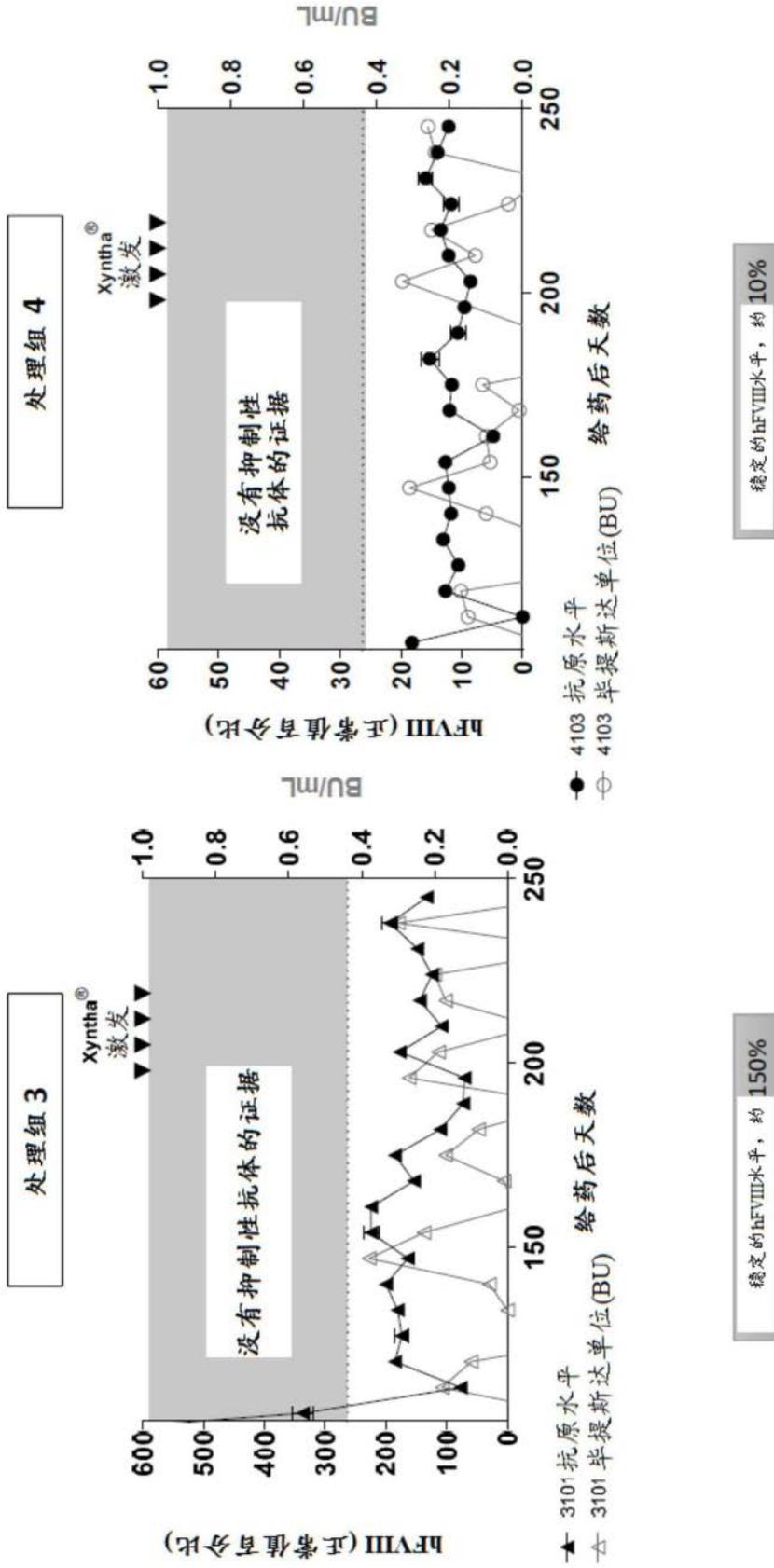


图 35C

图 35D

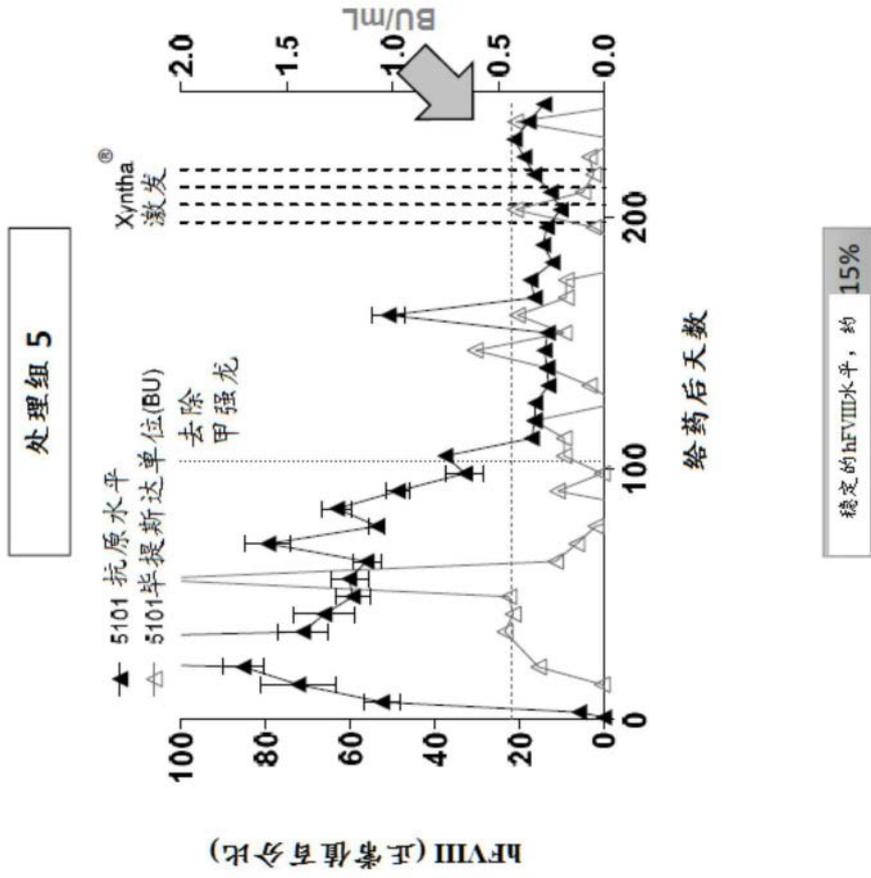


图35E

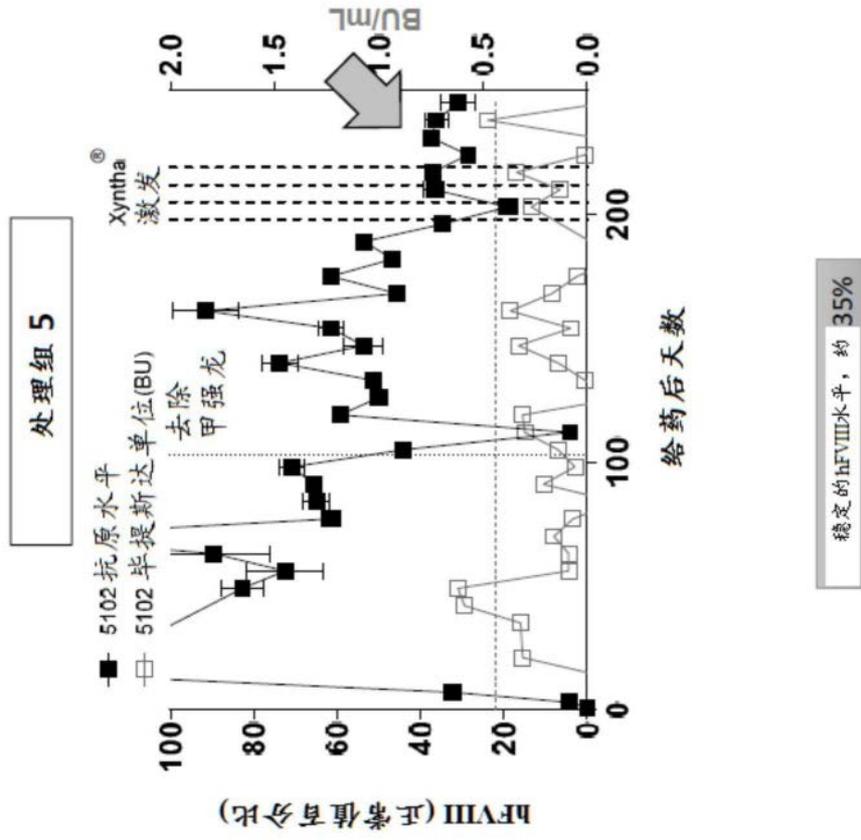


图35F

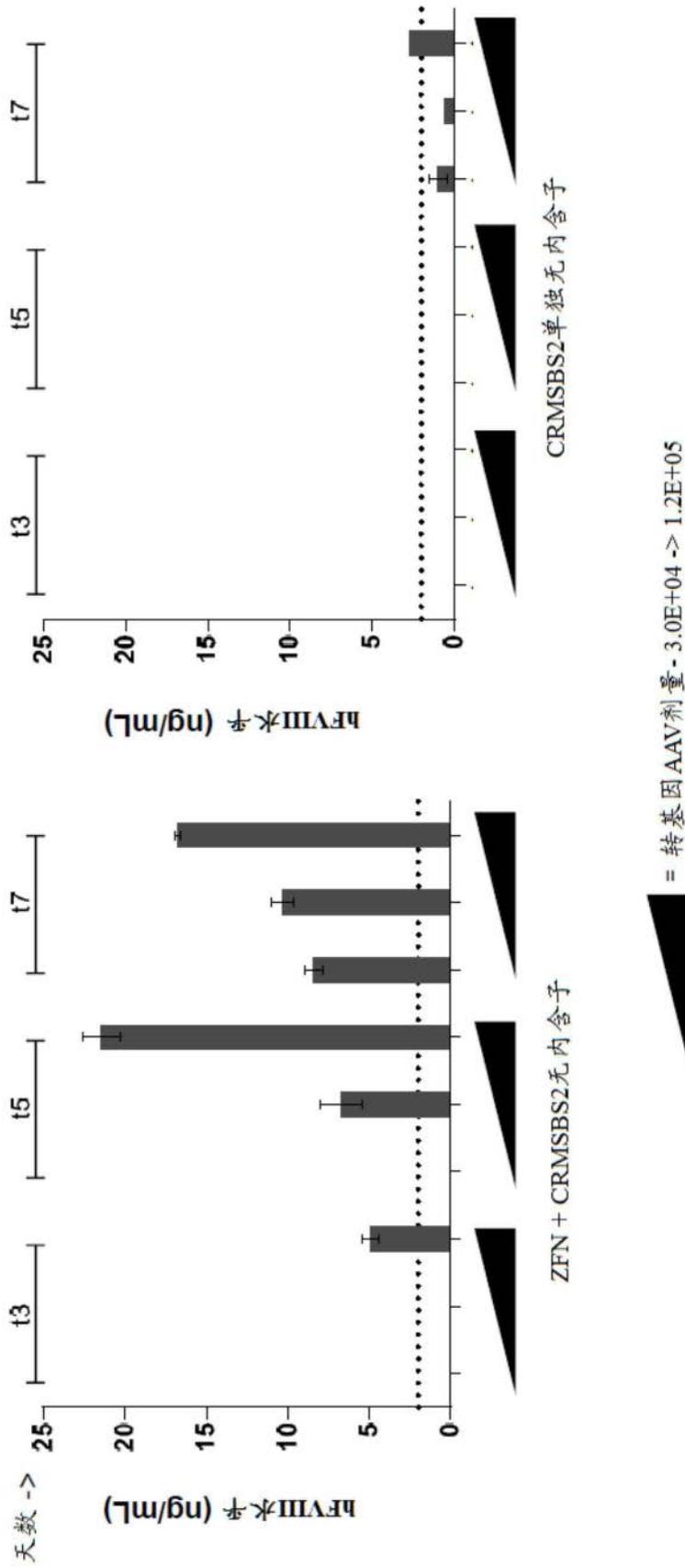


图 36B

图 36A

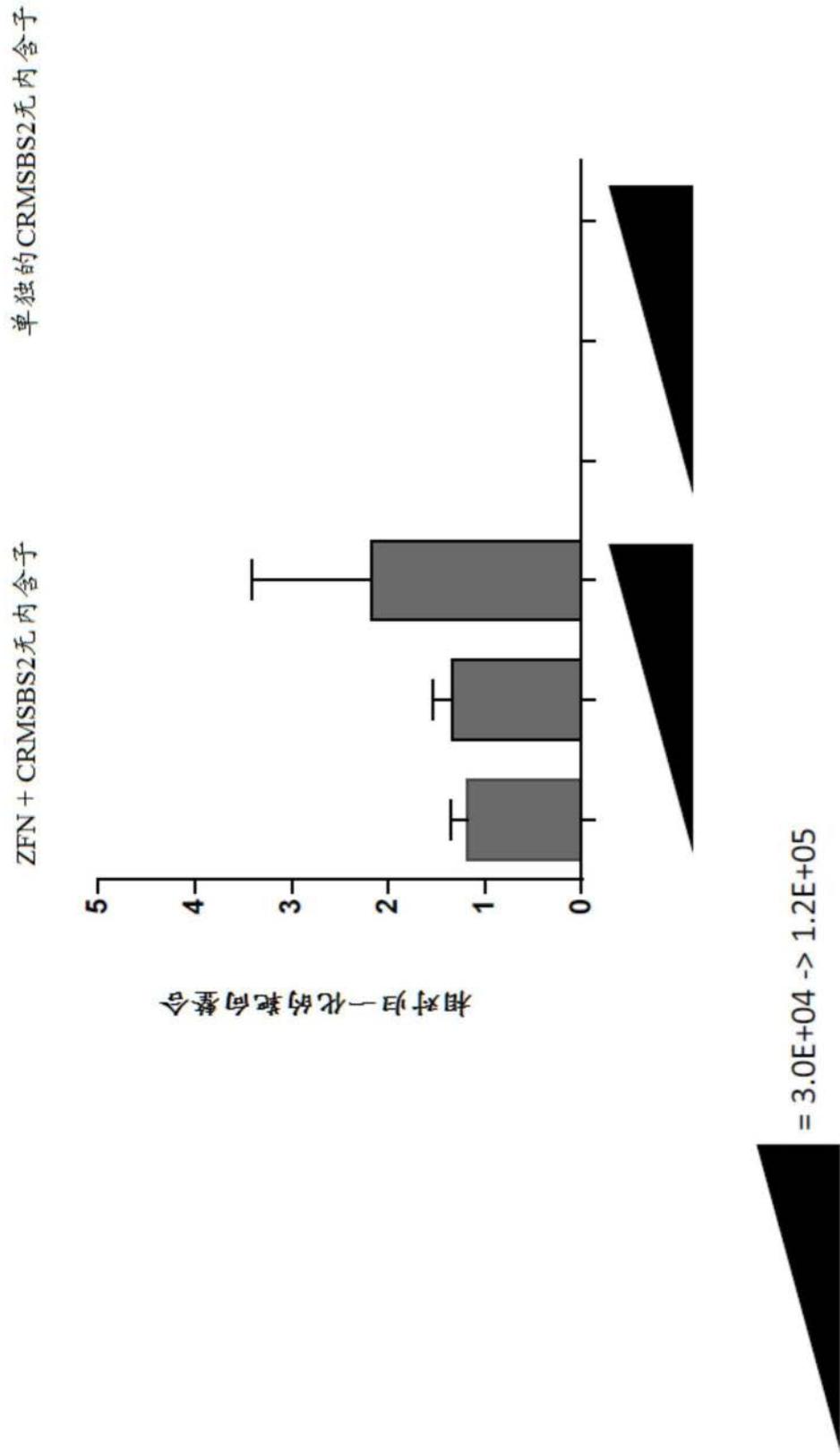


图37

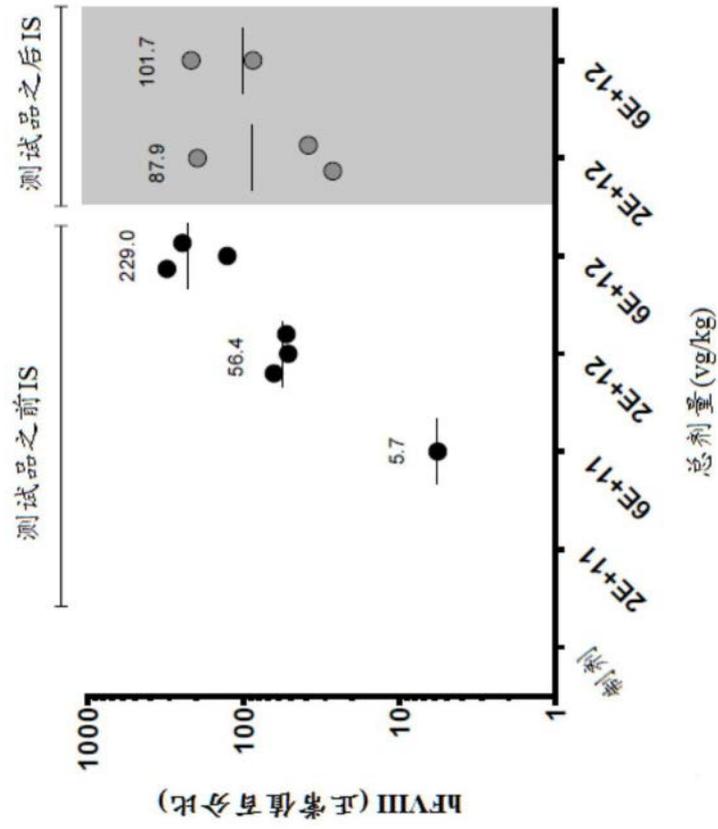


图38

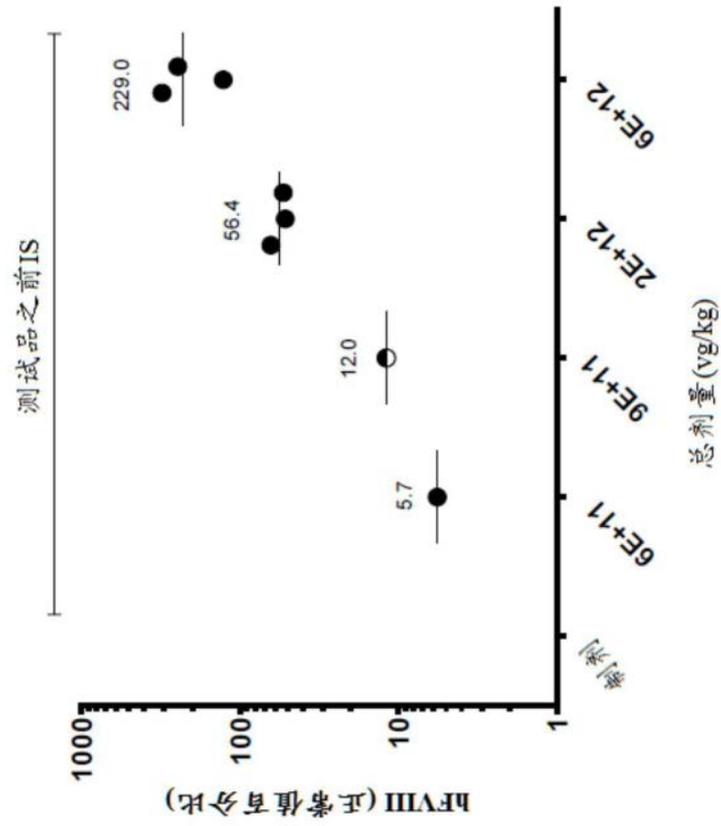


图39

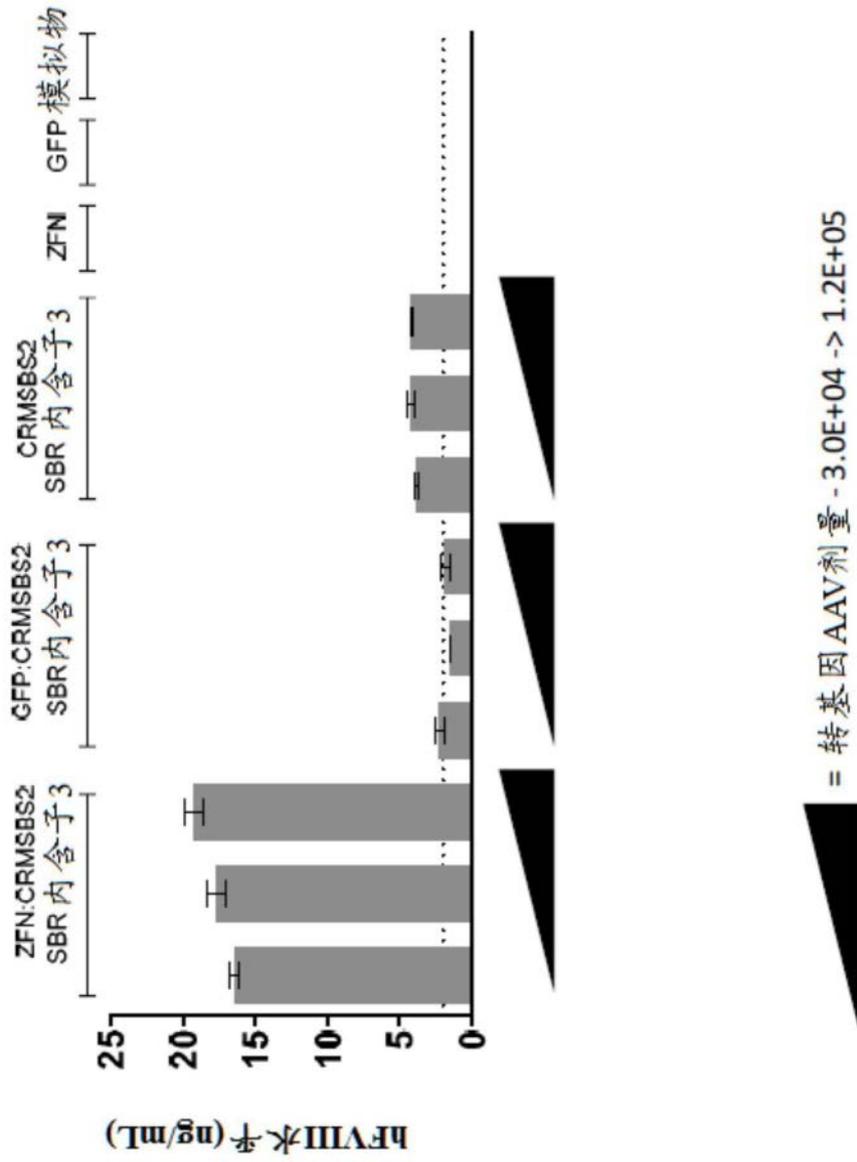


图40A

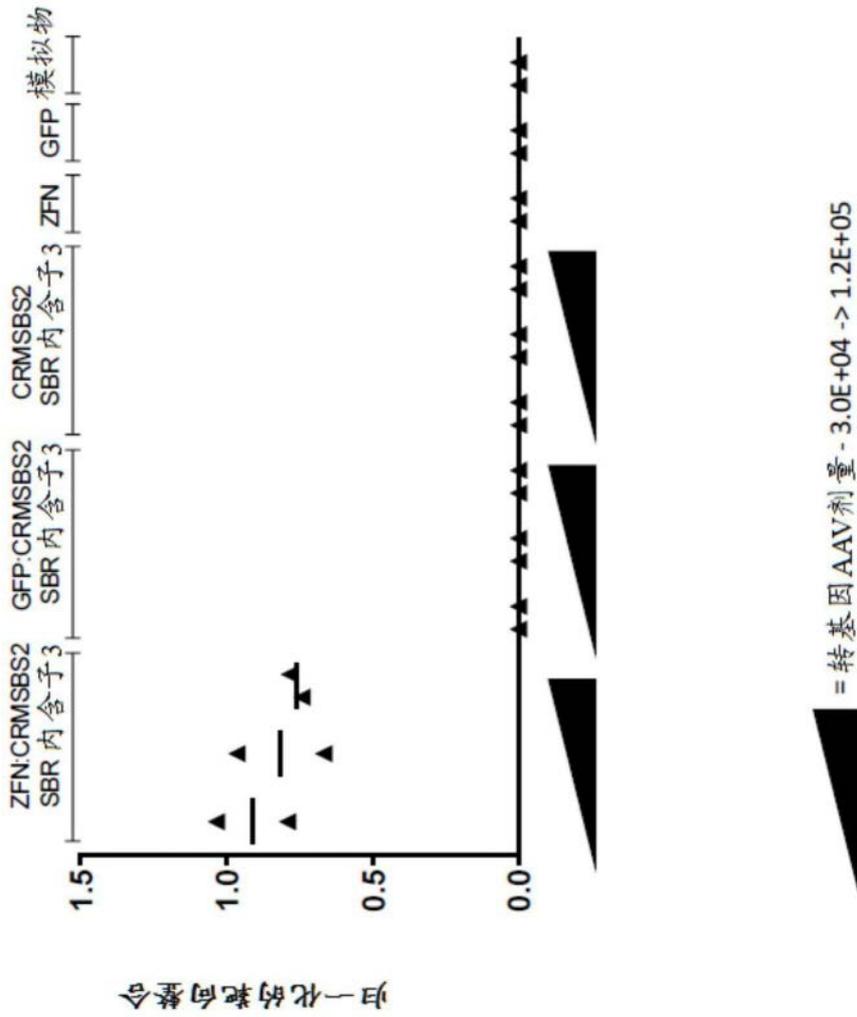


图40B