



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112805026 A

(43) 申请公布日 2021.05.14

(21) 申请号 201980065720.7

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22) 申请日 2019.08.07

代理人 封新琴

(30) 优先权数据

62/802,110 2019.02.06 US

62/802,568 2019.02.07 US

(51) Int.Cl.

A61K 38/47 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/045487 2019.08.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/162978 EN 2020.08.13

(71) 申请人 桑格摩生物治疗股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·安藤 C·W·P·福

S·A·维迪亚 S·Q·王

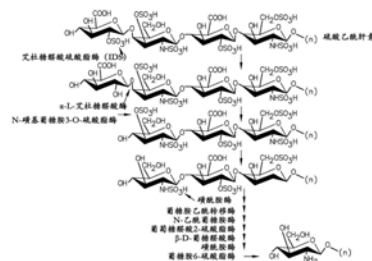
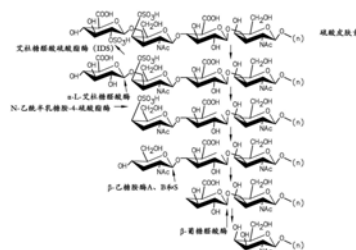
权利要求书6页 说明书87页 附图4页

(54) 发明名称

用于治疗I型黏多糖贮积症的方法

(57) 摘要

本文描述了用于治疗MPS I (胡勒尔) 病的方法和组合物。



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

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者中的GAG水平得以在所述受试者的尿液中降低、稳定和/或消除。

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

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

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

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

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

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中

所述左ZFN包含71557并且所述右ZFN包含71728;或者

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

所述左ZFN包含47171并且所述右ZFN包含47898;或者

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

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述IDUA供体包含任选地如SEQ ID NO:27中所示的人IDUA编码序列;和/或AAV载体,所述AAV载体含有:(i)如表5中所示的序列或(ii)如SEQ ID NO:28中所示的序列。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者接受 $1e12$ 与 $1e16$ vg/kg之间的总AAV剂量,任选地其中所述总AAV剂量包含:(i) $5e12$ vg/kg,任选地包含 $5e11$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $4e12$ vg/kg的所述第三AAV载体;(ii) $1e13$ vg/kg,任选地包含 $1e12$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $8e12$ vg/kg的第三AAV载体;(iii) $5e13$ vg/kg,任选地包含 $5e12$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $4e13$ 的第三AAV载体;(iv) $1e14$ vg/kg,任选地包含 $1e13$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $8e13$ vg/kg的所述第三AAV载体;(v) $5e14$ vg/kg,任选地包含 $5e13$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $4e14$ vg/kg的所述第三AAV载体;或(vi) $1e15$ vg/kg,任选地包含 $1e14$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $8e14$ vg/kg的所述第三AAV载体。

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

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

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述受试者是患有胡勒尔、胡勒尔-沙伊或沙伊综合症的成年人或儿童, 所述胡勒尔、胡勒尔-沙伊或沙伊综合征包括早期发作型MPS I、减毒型MPS I或早期发作与减毒型之间的MPS I。

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

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中每种药物组合物用不同的颜色标记。

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

30. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中用于所述受试者的总剂量如下确定: 确定所述受试者在治疗之前的体重, 所述体重四舍五入成小数点后两位; 用所述受试者的体重除以vg/mL浓度以确定待使用的剂量, 任选地其中所述方法包括(i) 例如如下通过将群组剂量乘以治疗之前的患者体重且然后除以VG浓度来计算所述三个产品组分体积: (a) 从研究协调员获得群组和基线处的患者体重, (b) 从临床分析证明书获得所述VG浓度; (ii) 通过将所述三个产品组分体积和NS/PBS体积相加在一起来计算总体积; (iii) 计算实现0.25% HSA最终浓度所需的HSA静脉溶液的体积, 以及(iv) 计算经调整的NS/PBS体积。

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

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

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

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

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

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

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

38. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中

所述左ZFN包含71557并且所述右ZFN包含71728;或者

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

所述左ZFN包含47171并且所述右ZFN包含47898;或者

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

39. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述IDUA供体包含人IDUA编码序列,任选地含有如SEQ ID NO:27中所示的序列的供体;和/或AAV载体,所述AAV载体含有:(i)如表5中所示的序列或(ii)如SEQ ID NO:28中所示的序列。

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

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

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

43. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,所述用途进一步包括在治疗之前和之后测量在六分钟时段内的步行距离,其中如果在治疗之后步行距离增加,则额外治疗程序得以延迟、减少或消除。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

53. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述受试者接受 $1e12$ 与 $1e16$ vg/kg之间的总AAV剂量,任选地其中所述总AAV剂量包含:(i) $5e12$ vg/kg,任选地包含 $5e11$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $4e12$ vg/kg kg的所述第三AAV载体;(ii) $1e13$ vg/kg,任选地包含 $1e12$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $8e12$ vg/kg的第三AAV载体;(iii) $5e13$ vg/kg,任选地包含 $5e12$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $4e13$ 的第三AAV载体;(iv) $1e14$ vg/kg,任选地包含 $1e13$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $8e13$ vg/kg的所述第三AAV载体;(v) $5e14$ vg/kg,任选地包含 $5e13$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $4e14$ vg/kg的所述第三AAV载体;或(vi) $1e15$ vg/kg,任选地包含 $1e14$ vg/kg的所述第一AAV载体和所述第二AAV载体和 $8e14$ vg/kg的所述第三AAV载体。

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

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

56. 根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述受试者是患有胡勒尔、胡勒尔-沙伊或沙伊综合症的成年人或儿童,所述胡勒尔、胡勒尔-沙伊或沙伊综合征包括早期发作型MPS I、减毒型MPS I或早期发作与减毒型之间的MPS I。

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

58. 根据权利要求57所述的用途,其中每种药物组合物用不同的颜色标记。

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

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

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

用于治疗I型黏多糖贮积症的方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2019年2月6日提交的美国临时申请号62/802,110和2019年2月7日提交的美国临时申请号62/802,568的权益,将这些申请的公开文本通过引用以其全文特此并入。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于治疗I型黏多糖贮积症(MPS I)(也称为胡勒尔(Hurler)综合征)的方法、和基因疗法。

背景技术

[0003] 溶酶体贮积病(LSD)是一组罕见的代谢性单基因疾病,其特征在于缺乏通常参与细胞废产物的分解的功能性单独溶酶体蛋白质,所述细胞废物包括脂质、黏多糖如糖胺聚糖或GAG。I型粘多糖病(MPS I)(也称为胡勒尔/胡勒尔-沙伊(Schei)/沙伊综合征)是一种隐性溶酶体贮积症。根据美国国家神经疾病和中风研究所(National Institute of Neurological Disorders and Stroke)(NINDS)关于MPS I的情况说明,重度MPS I的估计发病率为1/约100,000个出生儿,减毒型MPS I的估计发病率为1/约500,000个出生儿,并且落入重度与减毒型之间的疾病的估计发病率为1/约115,000个出生儿。

[0004] MPS I与编码艾杜糖醛酸酶(IDUA)的基因中的突变相关,所述艾杜糖醛酸酶降解糖胺聚糖(硫酸化碳水化合物聚合物;GAG)。IDUA基因中的突变会减弱或消除IDUA酶活性,这导致毒性GAG在尿液、血浆和身体组织中的积累。

[0005] 根据IDUA突变的具体类型(已描述了多于100种不同的突变)和所产生的残余IDUA酶的水平,患者将发展胡勒尔综合征(MPS I H)或减毒型变体(MPS I H/S和MPS I S)。据估计,所有MPS I患者中的50%-80%表现为重型,这部分归因于诊断的相对容易(Muenzer等人(2009)Pediatrics 123(1):19-29)。MPS I H患者在第一年结束前显示出发育迟缓的症状,并且在2-4岁年龄之间显示出停止生长和进行性智力衰退。其他症状包括器官肿大、角膜浑浊、关节僵硬和骨骼畸形(包括异常的脊椎骨)、面部特征粗大伴有舌头增大、听力损失和疝气。这些MPS I H患者的期望寿命少于10年。患有减毒形式的患者共有这些临床表现中的大部分,但具有不太严重的症状。MPS I的临床严重程度取决于突变改变的性质和残余IDUA酶活性的程度。受影响的个体可能发展智力迟钝;其他中枢神经系统表现(例如,脑积水、颈脊髓压迫伴截瘫/四肢麻痹);器官肿大;角膜浑浊;关节僵硬和挛缩;骨骼畸形(包括异常的脊椎骨);听力损失(耳聋);疝气;慢性限制性和阻塞性肺疾病;以及心脏疾病包括心律失常、瓣膜疾病、冠状动脉狭窄以及很少的心肌病和心力衰竭。

[0006] 这些患者中有许多可以存活到成年,但具有显著的发病率。用于MPS I的当前疗法包括造血干细胞移植(HSCT)和酶替代疗法(ERT)。如果患有重型MPS I(MPS I-H)的患者能够早期(<2.5年)诊断,通过HSCT(骨髓或脐带干细胞)进行的治疗干预可以预防或逆转包括神经认知的大多数临床特征。目前,几乎所有的MPS I H患者都经历HSCT。对于MPS I,HSCT

之后的死亡率是15%，并且在成功植入的情况下的存活率是56%。用中国仓鼠卵巢细胞中产生的多态性重组蛋白Aldurazyme® (laronidase, Sanofi Genzyme) 的ERT自2003年以来一直用于非CNS疗法。已显示这种酶改善肺功能、肝脾肿大和运动能力，并且导致改善的健康相关的生活质量。应尽可能早地建立ERT。酶替代疗法的局限性包括终身治疗的需要，中和抗体的开发，没有穿越血脑屏障的能力，持续的心脏、骨科、眼部并发症以及每周静脉输注的不便。总之，这些局限性凸显了为MPS I开发更广泛的一系列治疗性疗法的迫切需要。

发明内容

[0007] 本文公开了用于治疗 and/或预防受试者中的胡勒尔/胡勒尔-沙伊/沙伊综合征 (MPS I) 的组合物和方法。本公开文本提供了用于基因组编辑和/或基因转移的方法和组合物。本公开文本提供了治疗患有MPS I的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用一种或多种多核苷酸，其中所述受试者被治疗。本文提供的治疗方法包括减少、延迟和/或消除额外治疗程序和/或与MPS I相关的一种或多种症状的发作、进展或严重程度的方法。在一些实施方案中，本文提供的治疗方法包括降低、稳定或消除被治疗受试者的尿液中的GAG的方法。在一些实施方案中，所述方法降低、稳定或消除受试者中的尿GAG水平，包括在额外治疗程序之前、期间和之后。在一些实施方案中，本文提供的治疗方法增加或稳定血浆中活性IDUA的浓度。在一些实施方案中，本文提供的治疗方法增加或稳定血液白细胞中活性IDUA的浓度。在一些实施方案中，本文提供的治疗方法导致尿GAG水平的降低、稳定或消除，同时增加或稳定血浆和/或白细胞中IDUA的浓度。在一些实施方案中，本文提供的治疗方法导致尿GAG水平的降低、稳定或消除，其中血浆和/或白细胞中IDUA的浓度增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中，总AAV剂量以1:1:8的固定比率包括两个包含ZFN编码序列的载体，和1个包含IDUA供体序列的载体。

[0008] 在一些实施方案中，得以减少、延迟和/或消除的额外治疗程序包括酶替代疗法 (ERT) 和/或骨髓移植和/或用于骨科、心脏和/或上气道阻塞的支持性手术程序 (例如腺样体扁桃体切除术、疝修补、脑室腹膜分流术、心脏瓣膜置换术、腕管松解术、脊柱减压，参见D'aca等人 (2012) Eur J Pediatr. 171 (6) :911-919)。在一些实施方案中，发作、进展或严重程度得以减少、延迟或消除的与MPS I相关的症状包括功能性能力衰退、神经病学恶化、关节僵硬、变为轮椅依赖性的、残疾进展、强迫空气正压通气需求 (呼吸机需求) 和寿命缩短。

[0009] 本文提供的组合物和方法的目的和基本原理是使用例如体内基因组编辑来废除或减少对酶替代疗法的需要。本文提供的治疗方法采用有效剂量的工程化锌指核酸酶 (ZFN)，包括以在体内将酶 α -L-艾杜糖醛酸酶 (hIDUA) 转基因的校正拷贝以位点特异性方式整合至受试者自身肝细胞的基因组中。在一些实施方案中，hIDUA转基因的整合靶向白蛋白基因座的内含子1，导致在血液中可测量的 α -L-艾杜糖醛酸酶的稳定肝特异性表达和分泌。在一些实施方案中，将hIDUA转基因置于高度表达的内源白蛋白基因座的控制下提供了患有MPS I的受试者的永久性肝特异性表达。

[0010] 本文公开了用于治疗患有MPS I的受试者的组合物和方法，所述组合物和方法包含三种多核苷酸：编码锌指核酸酶的伴侣半体 (也称为“成对的ZFN”或“左和右ZFN”) 的两种多核苷酸和包含编码功能性 α -L-艾杜糖醛酸酶 (IDUA) 的序列的第三多核苷酸。在一些实施方案中，锌指核酸酶结合并裂解人白蛋白基因。任选地，编码核酸酶的多核苷酸进一步包含

编码小肽(包括但不限于肽标签和核定位序列)的序列,和/或包含在一个或多个DNA结合结构域区域(例如,锌指蛋白或TALE的骨架)中的突变和/或在FokI核酸酶裂解结构域或裂解半结构域中的一个或多个突变。当这些多核苷酸组分单独或以任何组合(例如,呈任何组合的肽序列,如FLAG、NLS、WPRE和/或聚A信号)使用时,本发明的方法和组合物提供了令人惊讶且出乎意料的人工核酸酶表达的增加,并具有增加的效率(例如,与没有本文所述的序列/修饰的核酸酶相比的2、3、4、5、6、10、20或更多倍裂解)和/或靶向特异性。在另外的实施方案中,编码锌指核酸酶的多核苷酸可以包含如本文公开的SB-47171(SB-A6P-ZLEFT)或SB-47898(SB-A6P-ZRIGHT)。在另外的实施方案中,编码锌指核酸酶的多核苷酸可以包含SB-71557(SB-A6P-ZL2)或SB-71728(SB-A6P-ZR2)。所述组合物可以进一步包含含有编码 α -L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)的任何供体核苷酸的多核苷酸。在一些实施方案中,供体核苷酸可以包含如本文公开的SB-IDUA(SB-A6P-HRL)。在一些实施方案中,将三种多核苷酸递送至缺乏功能性IDUA基因的患有MPS I的受试者,由此使得功能性IDUA蛋白在受试者中表达。在一些实施方案中,将外源IDUA基因与白蛋白特异性ZFN伴侣半体一起递送至受试者中的细胞,由此使得将IDUA基因整合(插入)至白蛋白基因中。在另外的实施方案中,IDUA基因表达IDUA蛋白,由此使得患有MPS I的受试者被治疗。在一些实施方案中,在根据本文提供的方法施用组合物和/或治疗后,受试者中的尿液中GAG的浓度(例如,尿GAG水平)得以降低、稳定或消除。

[0011] 在一些实施方案中,所述组合物包含有效剂量的工程化锌指核酸酶(ZFN),以在体内将人酶 α -L-艾杜糖醛酸酶(hIDUA)转基因的校正拷贝以位点特异性方式整合至受试者自身肝细胞的白蛋白基因座中。在一些实施方案中,组合物的多核苷酸被携带在一个或多个AAV颗粒上(经由一个或多个AAV颗粒递送)。在其他实施方案中,AAV颗粒是AAV2/6颗粒。三个AAV2/6组分(包括IDUA供体AAV、左ZFN AAV和右ZFN AAV)的组合共同地是本发明的组合物。用于治疗患有MPS I的受试者的组合物和方法有效提供hIDUA,所述hIDUA在受试者中是活性(功能性)的并且能够降解体内黏多糖糖胺聚糖或GAG,由此使得尿液中GAG的浓度(例如尿GAG水平)在治疗后得以降低、稳定或消除;和/或有效提供从血液分离的血浆中或白细胞中活性IDUA量的可测量增加。本文提供了用于将转基因序列插入至白蛋白基因座中的方法,其中转基因编码表达的(例如在体液和组织中可检测的)hIDUA蛋白(例如,功能性全长或截短的IDUA蛋白),IDUA蛋白从包含转基因的肝细胞表达和分泌或释放,由此使得表达的IDUA蛋白能够影响不具有转基因的其他细胞或被不具有转基因的其他细胞摄取(也称为旁观者效应或交叉校正),和/或IDUA是活性的,由此使得尿液GAG(例如总GAG、DS-GAG和/或HS-GAG)相比于基线(在如本文所述的治疗之前)稳定或减少。

[0012] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用如本文公开的方法和组合物治疗过的受试者相比减少、延迟和/或消除额外治疗程序的治疗方法,例如其中将有效量的hIDUA转基因锌指核酸酶(ZFN)施用至受试者,其中受试者在治疗之后对额外治疗程序具有减少、延迟和/或消除的需要。在一些实施方案中,额外治疗程序可以包括用于与MPS I相关的心脏、气道或骨科病症的支持性治疗的骨髓移植、酶替代疗法和/或手术程序。

[0013] 在一些实施方案中,可用于本文所述的组合物和方法中的hIDUA转基因(例如SEQ ID NO:27)通过AAV2/6递送来递送(例如递送至肝细胞),并且hIDUA递送载体进一步包含侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂例如对侧

接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于通过同源定向修复来帮助促进hIDUA转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,例如以防止其中插入IDUA转基因的内源白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-14的部分的部分IDUA cDNA(SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),例如以允许将hIDUA转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体包含指定为SB-IDUA AAV的序列(例如表5;SEQ ID NO:28)。

[0014] 在一些实施方案中,可用于本文公开的组合物和方法中的ZFN(例如,其中ZFN对(左和右)ZFN的成员在两个单独的载体上递送的ZFN)包括分别如表1和表2以及这些表之后的序列中所示的指定为SB-47171 AAV和SB-47898 AAV的AAV载体。在另外的实施方案中,编码锌指核酸酶的多核苷酸可以包含SB-71557(SB-A6P-ZL2)或SB-71728(SB-A6P-ZR2)。在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来递送(例如递送至肝细胞),例如,其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171;SEQ ID NO:9),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898;SEQ ID NO:12)。在另外的实施方案中,编码锌指核酸酶的多核苷酸可以包含SB-71557(SB-A6P-ZL2,SEQ ID NO:23)或SB-71728(SB-A6P-ZR2,SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN表达在肝脏特异性增强子和启动子的控制下,例如由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000)Mol. Ther. 1(6):522-532(200))。在一些实施方案中,肝脏特异性启动子包含一个或多个ApoE增强子序列(例如,1、2、3和/或4;参见Okuyama等人(1996)Hum Gen Ther 7(5):637-45)。在一些实施方案中,启动子连接至内含子。在一些实施方案中,内含子是HGG-IGG嵌合内含子,其包含来自人 β -珠蛋白基因的第一内含子的5'供体位点和来自免疫球蛋白基因重链可变区的内含子的分支和3'受体位点。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子在预期靶组织肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,使用甲状腺素转运蛋白最小启动子(参见美国专利公开号2017/0119906)。在一些实施方案中,组合物包含SB-47171 AAV(表1及表1之后的序列);SB-47898(表2及表2之后的序列);和SB-IDUA AAV(表5及表5之后的序列)。在另外的实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(表3及之后的序列);SB-71728 AAV(表4及之后的序列);和SB-IDUA AAV(表5及表5之后的序列)。

[0015] 任选地,编码核酸酶的多核苷酸进一步包含编码小肽(包括但不限于肽标签和核定位序列)的序列,和/或包含在一个或多个DNA结合结构域区域(例如,锌指蛋白或TALE的骨架)中的突变和/或在FokI核酸酶裂解结构域或裂解半结构域中的一个或多个突变。当这些多核苷酸组分单独或以任何组合(例如,呈任何组合的肽序列,如FLAG、NLS、WPRE和/或聚

A信号)使用时,本发明的方法和组合物提供了令人惊讶且出乎意料的人工核酸酶表达的增加,并具有增加的效率(例如,与没有本文所述的序列/修饰的核酸酶相比的2、3、4、5、6、10、20或更多倍裂解)和/或靶向特异性。在一些实施方案中,核酸酶由mRNA编码,并且mRNA任选地包含用于增加转录和翻译效率的元件。在一些实施方案中,元件包含未翻译序列,如天然或人工的5'和/或3'UTR序列。在一些方面,在表达盒中包括5'UTR序列,而在其他方面,使用3'UTR序列。在一些实施方案中,编码人工核酸酶的mRNA包含5'UTR和3'UTR两者。在一个实施方案中,5'UTR是爪蟾属(Xenopus)β-珠蛋白UTR(参见Krieg和Melton(1994)Nuc Acid Res 12(18):7057)。在一些实施方案中,编码爪蟾属β-珠蛋白UTR的DNA序列是5' TGCTTGTTCTTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCAGAT (SEQ ID NO:18)。在一些实施方案中,编码核酸酶的mRNA包含3'WPRE序列(参见美国专利公开号2016/0326548)。在一些实施方案中,WPRE元件在“X”区域中突变,以防止蛋白质X的表达(参见美国专利号7,419,829)。在一些实施方案中,3'UTR包含聚A信号序列。当这些元件组合使用时,聚A信号可以是WPRE序列的3'或5'。在一些实施方案中,聚A信号序列是牛生长激素信号序列(参见Woychik等人(1984)Proc Natl Acad Sci 81(13):3944-8)。

[0016] 本发明的方法和组合物还可以包括在DNA结合结构域内、在识别靶序列的核苷酸的残基之外的一个或多个氨基酸的突变(例如,“ZFP骨架”(在DNA识别螺旋区之外)的一个或多个突变),所述一个或多个氨基酸可以与DNA骨架上的磷酸非特异性地相互作用。因此,在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物包括ZFP骨架中阳离子氨基酸残基的突变,所述突变对于核苷酸靶标特异性不是必需的。在一些实施方案中,ZFP骨架中的这些突变包含使阳离子型氨基酸残基突变为中性或阴离子型氨基酸残基。在一些实施方案中,ZFP骨架中的这些突变包含使极性氨基酸残基突变至中性或非极性氨基酸残基。在一些实施方案中,突变是在相对于DNA结合螺旋的位置(-5)、(-9)和/或位置(-14)进行。在一些实施方案中,锌指可包含在(-5)、(-9)和/或(-14)的一个或多个突变。在一些实施方案中,多指锌指蛋白中的一个或多个锌指可包含(-5)、(-9)和/或(-14)中的突变。在一些实施方案中,在(-5)、(-9)和/或(-14)的氨基酸(例如精氨酸(R)或赖氨酸(K))突变为丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、Ser(S)、Asp(N)、Glu(E)、Tyr(Y)和/或谷氨酰胺(Q)。参见例如美国专利公开号2018/0087072。

[0017] 在一些方面,本发明的方法和组合物包括使用与真核转基因序列融合的编码外源肽序列的序列。在一些实施方案中,将外源肽翻译后融合至蛋白质序列,并且在其他实施方案中,将编码外源肽的序列框内(3'和/或5')连接至编码人工核酸酶的序列(例如,融合蛋白)。外源肽可以编码可用于纯化或标记(例如亲和纯化或免疫组织化学)的序列。此类肽的例子是聚组氨酸标签(“His标签”,Hochuli等人(1988)Bio/Technol 6(11):1321-5)或阳离子肽标签,如Flag标签(Hopp等人(1988)Bio/Technol 6(10):1204-10)。这些肽标签序列中的一个或多个(1、2、3、4、5或更多个)可以以任何组合使用。在一些实施方案中,将编码包含序列N末端DYKDDDK (SEQ ID NO:30)的外源Flag肽的序列框内融合在编码人工核酸酶的序列的C末端或N末端。在优选的实施方案中,使用编码3个FLAG序列(3x FLAG肽)的序列(参见美国专利号6,379,903),其中氨基酸序列是N末端DYKDHDG-DYKDHDI-DYKDDDDK (SEQ ID NO:31)。包含此类肽序列中的一种或多种(例如,3x FLAG)与没有所述肽序列的核酸酶相比可以使核酸酶(裂解)活性增加2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或更多倍)。

[0018] 在一些方面,编码人工核酸酶的mRNA包含核定位肽序列(NLS)。在一些实施方案

中,NLS包含来自SV40病毒大T基因的序列PKKKRKV (SEQ ID NO:32) (参见Kalderon等人(1984) *Nature* 311 (5981):33-8),而在其他情况下,NLS包含来自c-myc蛋白的序列 PAAKRVKLD (SEQ ID NO:33) (参见Dang和Lee(1988) *Mol Cell Biol* 8(10):4048-54)。在一些实施方案中,NLS包含来自丁型肝炎病毒的序列EGAPPAKRAR (SEQ ID NO:34) (参见Alves等人(2008) *Virology* 370:12-21)或来自多瘤病毒T蛋白的VSRKRPRP (SEQ ID NO:35) (Richardson等人(1986) *Cell* 44(1):77-85)。在其他实施方案中,NLS包含衍生自核质蛋白羧基尾的序列KRPAATKKAGQAKKKLD (SEQ ID NO:36) (参见Dingwall(1988) *J Cell Biol* 107:841-849和Robbins等人(1991) *Cell* 64(3):615-23),而在一些实施方案中,NLS包含最初由Siomi和Dreyfuss (Siomi和Dreyfus(1995) *J Cell Biol* 129(3):551-560)描述的序列NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (SEQ ID NO:37)。在另外的实施方案中,NLS包含来自HTLV-1中的Rex蛋白的序列PKTRRRPRRSQRKRPT (SEQ ID NO:4) (Siomi等人(1988) *Cell* 55(2):197-209)。包含如本文所述的NLS序列中的一种或多种与没有所述肽序列的核酸酶相比可以使核酸酶(裂解)活性增加2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或更多倍。

[0019] 在一些实施方案中,在治疗之后在受试者中延迟、减少或消除了对受试者中额外治疗程序如骨髓移植、ERT疗法和/或支持性手术程序的需要。在一些实施方案中,通过血浆中或白细胞中IDUA活性和/或水平的变化来衡量延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。检测血浆中和/或受试者白细胞中的IDUA的方法是本领域已知的。关于用于检测干燥血液斑点中的IDUA的方法参见例如Campos等人(2014) *Clinica Chimica Acta* 430:24-27或Gucciardi等人(2014) *Biomed Chromatogr* 28(2):1131-9;关于用于检测组织和白细胞中的IDUA的方法参见例如Ou等人(2014) *Mol Genet Metab* 111(2):113-115;以及参见例如描述了用于检测白细胞IDUA的方法的Mandelli等人(2002) *Archives of Medical Research* 1:20-24。在一些实施方案中,血浆中或白细胞中IDUA的活性和/或水平治疗后增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,例如通过在经治疗的受试者的尿液中测量的总GAG、DS GAG(包含硫酸皮肤素的GAG)和HS GAG(包含硫酸乙酰肝素的GAG)水平(例如,表示为与肌酐的比率)的变化来衡量受试者中延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化来衡量延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,通过例如如由受试者的6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化来衡量延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,例如通过关节活动度(JROM)相对于基线的变化来衡量受试者中延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,例如通过例如如由MRI测量的脾脏和/或肝脏体积相对于基线的变化(治疗之前和之后)来衡量受试者中延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化来衡量延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要,所述神经认知能力如例如由以下量表所测量:WASI-II(韦氏简明智力量表(Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence)第二版(Shapiro等人(2015) *Mol Genet Metab* 116(1-2):61-68)。在一些实施方案中,例如通过例如在肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平相对于基线的变化来衡量延迟、减少或消除的对额外治疗程序的需要。

[0020] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0021] 在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物包括例如通过外周静脉导管给予本发明的组合物。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂可以进一步包含例如人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6(例如,SB-47171 AAV和SB-47898 AAV或SB-71557 AAV和SB-71728AAV)、和 4×10^{12} vg/kg的hIDUA供体AAV(例如,SB-IDUA AAV)。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的hIDUA供体AAV。在另外的实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg的hIDUA供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。可使用 1×10^{12} 至 1×10^{16} 范围内的任何剂量。可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体),例如包含SB-47171 AAV(表1)、SB-47898 AAV(表2)和SB-IDUA AAV(表5)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(表3)、SB-71728 AAV(表4)和SB-IDUA AAV(表5)。

[0022] 在一些实施方案中,受试者在接受约 1×10^{11} 与 1×10^{16} vg/kg之间,包括例如 5×10^{12} vg/kg组合物、 1×10^{13} vg/kg组合物、 5×10^{13} vg/kg组合物、 1×10^{14} vg/kg组合物、 5×10^{14} vg/kg组合物和/或 1×10^{15} vg/kg组合物的总剂量之后具有延迟、减少或消除的例如对额外治疗程序的需要。在一些实施方案中,受试者在接受 5×10^{12} vg/kg至 1×10^{15} vg/kg之间(例如, 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{13} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{14} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{14} vg/kg之间和/或 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{15} vg/kg之间)的总剂量之后具有延迟、减少或消除的例如对额外治疗程序(例如,ERT)的需要。

[0023] 在另一方面,本文公开了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS I的受试者中减少、延迟或消除的症状的方法,所述方法包括例如向受试者施用有效量的hIDUA转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者在治疗之后具有减少、延迟或消除的症状。在一些实施方案中,通过本文公开的组合物和方法减少、延迟或消除了器官肿大、活动过度、攻击性、神经病学恶化、关节僵硬、骨骼畸形、心脏瓣膜增厚、听力损失、角膜浑浊和视力损害、疝气和/或上呼吸道感染。在一些实施方案中,hIDUA转基因(例如,SEQ ID NO: 27)通过AAV2/6递送来递送(例如,递送至肝细胞),并且hIDUA递送载体(例如,如SB-IDUA AAV,表5中所示,例如SEQ ID NO:28)进一步包含侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接例如白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在可用于本文公开的方法和组合物中的ZFN的裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于帮助促进例如hIDUA转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处(例如通

过同源定向修复)。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免例如白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,例如以防止其中插入IDUA转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-14的部分的部分IDUA cDNA (SEQ ID NO:27)。存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDUA转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(NHEJ或HDR)的情况下是有效的。

[0024] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(SBS-47171;SEQ ID NO:9),并且另一个包含右ZFN(SBS-47898;SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(SBS-71557;SEQ ID NO:23),并且另一个包含右ZFN(SBS-71728;SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN包含两种单独的多核苷酸(被携带在AAV载体上):SB-47171 AAV(例如表1,SEQ ID NO:9)和SB-47898(例如表2,SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,ZFN包含两种单独的多核苷酸(被携带在AAV载体上):SB-71557 AAV(例如表3,SEQ ID NO:23)和SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN表达在肝脏特异性增强子和启动子的控制下,由例如人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000)Mol. Ther. 1 (6):522-532(200))。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织(在一些实施方案中)肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,组合物包含SB-47171 AAV(例如表1,SEQ ID NO:9);SB-47898(例如表2,SEQ ID NO:12);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV(例如表3,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0025] 在一些实施方案中,通过比较治疗之前和之后的活性或水平所得的血浆中IDUA活性或水平的变化来衡量治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS I症状。在一些实施方案中,在治疗后,血浆中IDUA的活性和/或水平增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,通过比较治疗之前和之后的活性或水平所得的白细胞中IDUA活性或水平的变化来衡量治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS I症状。在一些实施方案中,白细胞中IDUA的活性和/或水平增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,例如通过在经治疗的受试者的尿液中测量的总GAG、DS GAG(例如包含硫酸皮肤素的GAG)和HS GAG(例如包含硫酸乙酰肝素的GAG)水平(表示为与肌酐的比率)的变化来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS I症状。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化或所述用力肺活量的稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS I症状。在一些实施方案中,例如通过步行距离相对于基线的变化或稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS I症状,所述步行距离如由受试者在治疗之前和之后进行6分钟步行测试以确定由于治疗引起的相对于基线的变化所测量。在一些实施方案中,例如通过关节活动度(JROM)相对于基线的变化或关节活动度的稳定性来衡量在治疗之

后受试者中减少、延迟或消除的MPS I症状。在一些实施方案中,例如通过如由MRI测量的脾脏和/或肝脏体积相对于基线的变化或所述脾脏和/或肝脏体积的稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS I症状。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化或神经认知能力的稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS I症状,所述神经认知能力如由WASI-II(韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,同上)所测量。在一些实施方案中,例如通过在肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平相对于基线的变化或所述水平的稳定性来衡量在治疗之后受试者中减少、延迟或消除的MPS I症状。

[0026] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0027] 在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物包括例如通过外周静脉导管给予组合物。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂可以进一步包含例如人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的hIDUA供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的hIDUA供体AAV。在另外的实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受 1×10^{11} 至 1×10^{16} 的任何总AAV剂量,例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。可以将本文公开的方法和组合物分开施用,或者优选包含所有组分(例如相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体),例如包含SB-47171 AAV(例如表1)、SB-47898 AAV(例如表2)和SB-IDUA AAV(例如表5)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(例如表3,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0028] 在一些实施方案中,当受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg和/或 1×10^{15} vg/kg的总剂量时,观察到在使用本文公开的方法和组合物与本发明的组合物之后在受试者中展现出的减少、延迟或消除的MPS I症状。在一些实施方案中,受试者在接受 5×10^{12} vg/kg至 1×10^{15} vg/kg之间(例如, 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{13} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{14} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{14} vg/kg之间和/或 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{15} vg/kg之间)的总剂量之后具有减少、延迟或消除的MPS I症状。

[0029] 在一些实施方案中,与没有用如本文公开的本发明方法和组合物治疗过的受试者相比,如本文公开的方法和组合物延迟患有MPS I的受试者中对ERT启动的需要,所述方法包括向受试者施用例如有效量的可用于本发明中的hIDUA转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中在治疗之后受试者中对ERT的需要被延迟。hIDUA转基因(例如SEQ ID NO:27)通过AAV2/6递

送来递送(例如递送至肝细胞),并且hIDUA递送载体进一步包含例如侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂例如对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。左同源性臂(LA)含有例如在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的例如约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂例如用于通过同源定向修复来帮助促进hIDUA转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小例如以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体在3'端进一步包含例如终止密码子,以防止其中插入IDUA转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-9的部分的部分IDUA cDNA(例如SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,存在例如衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDUA转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。

[0030] 在一些实施方案中,可用于本文公开的组合物和方法的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送(例如,递送至肝细胞)。在一些实施方案中,ZFN是例如白蛋白特异性的,并且白蛋白特异性ZFN的半体(左组分和右组分)由单独的AAV载体携带。在一些实施方案中,一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171;SEQ ID NO:9),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898;SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,一个AAV包含左ZFN(例如,SB-71557,表3,SEQ ID NO:23);并且另一个包含右ZFN(例如SB-71728表4,SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,可用于本文公开的方法和组合物中的ZFN的表达在肝脏特异性增强子和启动子的控制下,例如由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000)Mol. Ther. 1(6):522-532(200))。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)是特异性且高度活性的(例如在肝细胞和/或预期靶组织中),但是在非肝细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,AAV载体包含SB-47171 AAV(例如表1)和SB-47898(例如表2)。在一些实施方案中,所施用的组合物包含SB-47171 AAV(例如表1,SEQ ID NO:9);SB-47898(例如表2,SEQ ID NO:12);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(例如表3,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0031] 在一些实施方案中,例如在治疗之后在受试者中衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过血浆中或白细胞中IDUA活性或水平的变化来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,血浆和/或白细胞中IDUA的活性和/或水平增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,例如通过在经治疗的受试者的尿液中测量的总GAG、DS GAG(例如包含硫酸皮肤素的GAG)和HS GAG(例如包含硫酸乙酰肝素的GAG)水平(例如尿液GAG水平)(例如,表示为与肌酐的比率)的变化或稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化或所述用力肺活量的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过如由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化或所述步行距离的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。在一

些实施方案中,例如通过关节活动度(JROM)相对于基线的变化或关节活动度的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过如由MRI测量的脾脏和/或肝脏体积相对于基线的变化或所述脾脏和/或肝脏体积的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化或神经认知能力的稳定性来衡量对ERT的延迟需要,所述神经认知能力如由WASI-II(韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,同上))所测量。在一些实施方案中,例如通过肝脏组织和CSF中的总GAG、DS GAG和HS GAG水平相对于基线的变化或所述水平的稳定性来衡量延迟的对ERT的需要。

[0032] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0033] 在一些实施方案中,所述治疗包括例如通过外周静脉导管给予组合物。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6(例如,SB-47171 AAV或SB-71557和SB-47898或SB-71728 AAV)、和 4×10^{12} vg/kg的hIDUA供体AAV(例如,SB-IDUA AAV)。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6(例如,SB-47171或SB-71557 AAV和SB-47898或SB-71728 AAV)、和 8×10^{12} vg/kg的hIDUA供体AAV(例如,SB-IDUA AAV)。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV(例如,SB-47171或SB-71557 AAV和SB-47898或SB-71728 AAV)、和 4×10^{13} 的hIDUA供体AAV(例如,SB-IDUA AAV)。在一些实施方案中,受试者接受 1×10^{11} 至 1×10^{16} vg/kg的总AAV剂量,例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选作为包含所有组分(例如相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体),例如包含SB-47171或SB-71557 AAV(例如表1或表3)、SB-47898或SB-71728 AAV(例如表2或表4)和SB-IDUA AAV(例如表5)的组合物施用。

[0034] 在一些实施方案中,例如在用组合物以 5×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg和/或 1×10^{15} vg/kg的总剂量治疗之后,衡量受试者中延迟的对ERT的需要。在一些实施方案中,在接受 5×10^{12} vg/kg至 1×10^{15} vg/kg之间(例如, 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{13} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{14} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{14} vg/kg之间和/或 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{15} vg/kg之间)的总剂量之后,衡量延迟的对ERT的需要。

[0035] 在另一方面,本文公开了用于在患有MPS I的受试者中去除(撤出)ERT的方法,所述方法包括例如(a)向接受ERT的受试者施用有效量的如本文所述的hIDUA转基因和锌指核酸酶(ZFN);和(b)在步骤(a)之后从受试者撤出ERT。可以在施用之后的任何时间处(包括在施用转基因和一种或多种ZFN之后数小时(0-48)、数天(1-7天)、数周(1-4周)、数月(1-12)或数年(1-10年))撤出ERT。在某些实施方案中,完全撤出ERT,而在其他实施方案中,可以将

ERT撤出持续任何时间段,包括例如与未施用转基因和一种或多种ZFN的受试者相比更长的时间段。在一些实施方案中,所述方法可以进一步包括通过以下方式评估受试者中撤出ERT的能力:在施用转基因和一种或多种ZFN后在受试者中例如测量与MPS I相关的一种或多种症状,例如通过评估器官肿大、角膜浑浊和视力损害、活动过度、攻击性、神经病学恶化、关节僵硬、骨骼畸形、心脏瓣膜增厚、听力损失、疝气和/或上呼吸道感染的变化,其中如果测量证明这些(MPS I)症状中的一种或多种通过本文公开的组合物和方法减少、延迟或消除,则使得不再需要ERT。在一些实施方案中,所述方法包括通过AAV2/6递送来递送(例如,递送至肝细胞)的hIDUA转基因(例如,SEQ ID NO:27),并且hIDUA递送载体(例如,如SB-IDUA AAV,表3中所示,例如SEQ ID NO:28)进一步包含侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接例如白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在可用于本文公开的方法和组合物中的ZFN的裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于帮助促进例如hIDUA转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处(例如通过同源定向修复)。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免例如白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,例如以防止其中插入IDUA转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-14的部分的部分IDUA cDNA(SEQ ID NO:27)。存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDUA转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(NHEJ或HDR)的情况下是有效的。

[0036] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23),并且另一个包含右ZFN(SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN包含两种单独的多核苷酸(被携带在AAV载体上):SB-47171或SB-71557AAV(例如表1,分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23)和SB-47898或SB-71728(例如表2,分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN表达在肝脏特异性增强子和启动子的控制下,由例如人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000)Mol. Ther. 1 (6):522-532(200))。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织(在一些实施方案中)肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,组合物包含SB-47171 AAV(例如表1,SEQ ID NO:9);SB-47898(例如表2,SEQ ID NO:12);和SB-IDUA AAV(例如表3,SEQ ID NO:28)。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(例如表3,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0037] 在一些实施方案中,用本文公开的方法和组合物治疗之后,在患有MPS I的受试者中ERT的撤出通过治疗之前和之后的以下项中的一项或多项来评估:测量如在治疗之前与

之后之间血浆中IDUA活性或水平的变化或稳定性,其中在治疗之后增加的IDUA活性表明可以延迟或撤出ERT;测量如在治疗之前与之后之间受试者的白细胞中IDUA活性或水平的变化或稳定性,其中在治疗之后增加的IDUA活性表明可以延迟或撤出ERT;测量如在治疗之前与之后之间经治疗的受试者的尿液中总GAG、DS GAG (例如包含硫酸皮肤素的GAG) 和/或HS GAG (例如包含硫酸乙酰肝素的GAG) 水平 (表示为与肌酐的比率),其中在治疗之后总GAG、DS GAG和/或HS GAG水平的降低或稳定表明可以撤出或延迟ERT;测量如在治疗之前与之后之间由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化或所述用力肺活量的稳定性,其中在治疗之后用力肺活量的增加或稳定表明可以撤出或延迟ERT;测量步行距离相对于基线的变化或步行距离的稳定性,所述步行距离如由受试者在治疗之前和之后进行6分钟步行测试以确定由于治疗引起的相对于基线的变化所测量,其中在治疗之后受试者的步行距离的增加或稳定表明可以撤出或延迟ERT;测量如在治疗之前与之后之间关节活动度(JROM) 相对于基线的变化或关节活动度的稳定性,其中在治疗之后活动度的增加或稳定表明可以撤出ERT;测量如在治疗之前与之后之间如由MRI测量的脾脏和/或肝脏体积相对于基线的变化或所述脾脏和/或肝脏体积的稳定性,其中在治疗之后脾脏和/或肝脏体积的减少或稳定表明可以撤出或延迟ERT;测量神经认知能力相对于基线(治疗之前)的变化或神经认知能力的稳定性,所述神经认知能力如由WASI-II (韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,同上))所测量,其中如在基线(治疗之前)与治疗之后之间神经认知能力的改善或稳定表明可以撤出或延迟ERT;和/或测量在治疗之前和之后在肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和/或HS GAG水平相对于基线的变化,其中在治疗之后总GAG、DS GAG和/或HS GAG水平的降低或稳定表明可以撤出或延迟ERT。因此,在治疗之后(与治疗之前相比(基线)),在这些评估中的一项或多项中观察到正性变化或稳定的情况下,可以撤出或延迟ERT。在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT。

[0038] 在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物包括例如通过外周静脉导管给予组合物。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂可以进一步包含例如人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的hIDUA供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的hIDUA供体AAV。在另外的实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受 1×10^{11} 至 1×10^{16} vg/kg的总AAV剂量,例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。可以将本文公开的方法和组合物分开施用,或者优选包含所有组分(例如相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体),例如包含SB-47171 AAV(例如表1)、SB-47898 AAV(例如表2)和SB-IDUA AAV(例如表5)。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(例如

表3,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0039] 在一些实施方案中,当受试者接受例如5e12 vg/kg、1e13 vg/kg、5e13 vg/kg、1e14 vg/kg、5e14 vg/kg和/或1e15 vg/kg的总剂量时,观察到在使用本文公开的方法和组合物与本发明的组合物之后受试者中撤出ERT的能力。在一些实施方案中,在接受5e12 vg/kg至1e15 vg/kg之间(例如,5e12 vg/kg与5e13 vg/kg之间、5e12 vg/kg与1e14 vg/kg之间、5e12 vg/kg与5e14 vg/kg之间和/或5e12 vg/kg与1e15 vg/kg之间)的总剂量之后,观察到使用本文公开的方法和组合物之后在受试者中撤出ERT的能力。

[0040] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用如本文公开的本发明方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS I的受试者中延迟、减少或避免对骨髓移植的需要的的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的hIDUA转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者在用本文公开的方法和组合物治疗之后例如对骨髓移植具有延迟、减少或避免的需要。在一些实施方案中,hIDUA转基因(例如SEQ ID NO:27)通过AAV2/6递送来递送(例如递送至肝细胞),并且hIDUA递送载体进一步包含侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂例如用于帮助促进hIDUA转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处(通过同源定向修复)。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小例如以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体在3'端进一步包含例如终止密码子,以防止其中插入IDUA转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-14的部分的部分IDUA cDNA(例如SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14)例如衍生自hF9外显子2,以允许将hIDUA转录物例如高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体是指定为SB-IDUA AAV的供体(例如表5;SEQ ID NO:28)。

[0041] 在一些实施方案中,可用于递送至受试者的本文公开的方法和组合物中的ZFN是通过AAV2/6递送的白蛋白特异性对(例如递送至肝细胞),其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN表达在例如肝脏特异性增强子和启动子的控制下,由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000)Mol. Ther. 1(6):522-532(200))。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签(例如N末端肽)、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)是特异性且高度活性的(例如在预期靶组织肝细胞中),但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,可用于本文公开的方法

和组合物中的ZFN对使用两种单独的AAV载体,即SB-47171或SB-71557 AAV (例如表1,分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23) 和SB-47898或SB-71728 AAV (例如表2,分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26) 递送。在一些实施方案中,本文所述的任何方法和组合物可使用三组分AAV系统(针对成对ZFN中的每个组分的2个AAV和携带供体的1个AAV),例如包含SB-47171 AAV (例如表1)、SB-47898 AAV (例如表2) 和SB-IDUA AAV (例如表5) 的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557AAV (例如表3,SEQ ID NO:23);SB-71728 (例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV (例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0042] 在一些实施方案中,在使用本文公开的方法和组合物治疗之后,在受试者中衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,通过血浆中IDUA活性或水平的变化来衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,血浆中IDUA的活性和/或水平增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,通过受试者的白细胞中IDUA活性或水平的变化来衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,白细胞中IDUA的活性和/或水平增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,通过在经治疗的受试者的尿液中测量的总GAG、DS GAG (例如包含硫酸皮肤素的GAG) 和HS GAG (例如包含硫酸乙酰肝素的GAG) 水平 (例如尿液GAG水平) (例如,表示为与肌酐的比率) 的变化或稳定性来衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化或所述用力肺活量的稳定性来衡量延迟、减少或避免的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,例如通过如由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化或所述步行距离的稳定性来衡量延迟或减少的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,例如通过关节活动度(JROM) 相对于基线的变化或关节活动度的稳定性来衡量延迟或减少的对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,例如通过如例如由MRI测量的脾脏和/或肝脏体积相对于基线的变化或所述脾脏和/或肝脏体积的稳定性来减少对骨髓移植的需要。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化或神经认知能力的稳定性来衡量减少、延迟或避免的对骨髓移植的需要,所述神经认知能力如由WASI-II (韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,同上)) 所测量。在一些实施方案中,例如通过在肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平相对于基线的变化或所述水平的稳定性来衡量减少或延迟的对ERT的需要。

[0043] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0044] 在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物包括给予组合物(例如通过外周静脉导管)。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS) 或磷酸盐缓冲盐水(PBS) 稀释剂中,其中稀释剂进一步包含例如人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、

和 $8e13$ vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 $5e14$ vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 $5e13$ vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 $4e14$ vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 $1e15$ vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 $1e14$ vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 $8e14$ vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体),例如包含SB-47171 AAV(例如表1)、SB-47898 AAV(例如表2)和SB-IDUA AAV(例如表5)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(例如表3,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0045] 在一些实施方案中,在用本文公开的方法和组合物治疗之后,衡量受试者中减少、延迟或避免的对骨髓移植的需要,所述方法和组合物包括例如 $5e12$ vg/kg、 $1e13$ vg/kg、 $5e13$ vg/kg、 $1e14$ vg/kg、 $5e14$ vg/kg和/或 $1e15$ vg/kg的总剂量。在一些实施方案中,在接受 $5e12$ vg/kg至 $1e15$ vg/kg之间(例如, $5e12$ vg/kg与 $5e13$ vg/kg之间、 $5e12$ vg/kg与 $1e14$ vg/kg之间、 $5e12$ vg/kg与 $5e14$ vg/kg之间和/或 $5e12$ vg/kg与 $1e15$ vg/kg之间)的总剂量之后,衡量受试者中减少、延迟或避免的对骨髓移植的需要。

[0046] 在一些实施方案中,本文提供了与未经治疗的受试者相比通过用本文公开的方法和组合物治疗来降低、稳定或消除尿液GAG(例如尿液GAG水平)的方法,所述方法包括例如向受试者施用有效量的如本文所述的一种或多种核酸酶和一种或多种供体(例如,包含hIDUA转基因和锌指核酸酶(ZFN)的三组分组合物),其中受试者在治疗之后具有降低、稳定或消除的尿液GAG(例如尿液GAG水平)。在一些实施方案中,血浆中IDUA的活性或水平增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,受试者的白细胞中IDUA的活性或水平增加、保持相同或低于检测水平。在一些实施方案中,hIDUA转基因(例如SEQ ID NO:27)通过AAV2/6递送来递送(例如递送至肝细胞),并且hIDUA递送载体进一步包含例如侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于通过同源定向修复来帮助促进例如hIDUA转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小例如以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体在3'端进一步包含例如终止密码子,以防止其中插入IDUA转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,包含人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-14的部分的部分IDUA cDNA(例如SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,存在例如衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDUA转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体是指定为SB-IDUA AAV的供体(例如表3;SEQ ID NO:28)。

[0047] 在一些实施方案中,与治疗之前的受试者中总尿液GAG的量相比或与尚未经治疗

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

[0048] 在一些实施方案中,呈白蛋白特异性对的可用于递送至受试者的本文公开的方法和组合物中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送(例如递送至肝细胞),其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN表达在例如肝脏特异性增强子和启动子的控制下,由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532(200))。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)是特异性且高度活性的(例如在预期靶组织肝细胞中),但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签(例如N末端肽)、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ZFN和IDUA供体例如使用包含所有三个组分:针对成对ZFN中的每个组分的两个AAV载体和携带供体的1个AAV的组合物(例如,包含SB-47171或SB-71557 AAV(例如表1)、SB-47898或SB-71728 AAV(例如表2)和SB-IDUA AAV(例如表5)的组合物)来递送。

[0049] 在一些实施方案中,在用本文公开的方法和组合物治疗之后,在受试者的尿液中测量降低、稳定或消除的尿液GAG(例如尿液GAG水平)。在一些实施方案中,通过本领域已知的任何方法测量尿液中降低、稳定或消除的GAG(例如尿液GAG水平、硫酸乙酰肝素GAG和/或硫酸皮肤素GAG)。测量尿液GAG的示例性方法包括二甲基亚甲基蓝(DMB)测定(参见例如de Jong等人(1989) Clin Chem 35/7:1472-1479);依赖于丝氨酸蛋白酶和针对丝氨酸蛋白酶的标记底物、丝氨酸蛋白酶的抑制剂以及怀疑包含一种或多种糖胺聚糖的尿液样品的方法(参见例如美国专利公开号2013/0189718);基于酶消化尿液中发现的硫酸乙酰肝素(HS)、硫酸皮肤素(DS)和硫酸角质素(KS),然后通过LC-MS/MS进行定量的多重测定(Langereis等人(2015) PLoS One 10(9):e0138622);以及可用于确定特定类型GAG浓度的测定,所述测定利用RapidFire(RF, Agilent)高通量质谱系统(参见Tomatsu等人(2014) J Anal Bioanal

Tech.3月1日;2014(增刊2):006)。

[0050] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0051] 在一些实施方案中,对受试者使用如本文公开的方法和组合物的治疗包括例如通过外周静脉导管给予本发明的组合物。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂进一步包含例如人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受 1×10^{11} 至 1×10^{16} vg/kg的总AAV剂量,例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体),例如包含SB-47171 AAV(例如表1)、SB-47898 AAV(例如,表2)和SB-IDUA AAV(例如表3)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(例如表4,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表5,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0052] 在一些实施方案中,例如在用本发明的组合物以 5×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg和/或 1×10^{15} vg/kg的总剂量治疗之后,测量受试者中降低、稳定或消除的尿液GAG。在一些实施方案中,在接受 5×10^{12} vg/kg至 1×10^{15} vg/kg之间(例如, 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{13} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{14} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{14} vg/kg之间和/或 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{15} vg/kg之间)的总剂量之后,测量受试者中降低、稳定或消除的尿液GAG。

[0053] 在一些实施方案中,本文提供了与未经治疗的受试者相比,在患有MPS I的受试者中通过用例如ERT的标准给药方案与用如本文公开的本发明组合物的治疗的组合治疗受试者来改善功能性能力、延迟功能性能力衰退或维持功能性能力的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的hIDUA转基因和锌指核酸酶(ZFN)并以标准ERT剂量施用,其中受试者在治疗之后具有例如功能性能力的改善、功能性能力的衰退延迟或维持。在一些实施方案中,hIDUA转基因(例如SEQ ID NO:27)通过AAV2/6递送来递送至肝细胞,并且hIDUA递送载体进一步包含侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂例如用于通过同源定向修复来帮助促进hIDUA转基因

靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小例如以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体例如在3'端进一步包含终止密码子,以防止其中插入IDUA转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体例如包含含有外显子1加上外显子2-14的部分的部分IDUA cDNA(例如SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,存在例如衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA, SEQ ID NO:14),以允许将hIDUA转基因高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体是指定为SB-IDUA AAV的供体(例如表5;SEQ ID NO:28)。

[0054] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送(例如递送至肝细胞),其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN表达在例如肝脏特异性增强子和启动子的控制下,由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532(200))。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签(例如N末端肽)、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)是特异性且高度活性的(例如在预期靶组织肝细胞中),但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。

[0055] 在一些实施方案中,在治疗之后在受试者中衡量用本文公开的方法和组合物治疗之后功能性能力的改善、衰退延迟或维持。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化来衡量功能性能力的改善、衰退延迟或维持。在一些实施方案中,例如通过如由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化来衡量功能性能力的改善、衰退延迟或维持。在一些实施方案中,例如通过关节活动度相对于基线的变化来衡量功能性能力的改善、衰退延迟或维持。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化来衡量功能性能力的改善、衰退延迟或维持,所述神经认知能力如由WASI-II(韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,同上))所测量。

[0056] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0057] 在一些实施方案中,所述治疗包括给予本发明的组合物(例如通过外周静脉导管)。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂进一步包含人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、

和 $4e13$ 的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受 $1e11$ 至 $1e16$ vg/kg的总AAV剂量,例如 $1e14$ vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 $1e13$ vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 $8e13$ vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 $5e14$ vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 $5e13$ vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 $4e14$ vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 $1e15$ vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 $1e14$ vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 $8e14$ vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体),例如包含SB-47171 AAV(例如表1)、SB-47898 AAV(例如表2)和SB-IDUA AAV(例如表5)。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(例如表3,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0058] 在一些实施方案中,例如在用本发明的组合物以 $5e12$ vg/kg、 $1e13$ vg/kg、 $5e13$ vg/kg、 $1e14$ vg/kg、 $5e14$ vg/kg和/或 $1e15$ vg/kg的总剂量治疗之后,衡量受试者的功能性能力的改善、衰退延迟或维持。在一些实施方案中,在接受 $5e12$ vg/kg至 $1e15$ vg/kg之间(例如, $5e12$ vg/kg与 $5e13$ vg/kg之间、 $5e12$ vg/kg与 $1e14$ vg/kg之间、 $5e12$ vg/kg与 $5e14$ vg/kg之间和/或 $5e12$ vg/kg与 $1e15$ vg/kg之间)的总剂量之后,衡量受试者的功能性能力的改善、衰退延迟或维持。

[0059] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS I的人类受试者中抑制或延迟残疾进展的方法,所述方法包括向该受试者施用有效的量的hIDUA转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者在用如本文公开的方法和组合物治疗之后具有残疾进展的稳定、抑制或延迟。在一些实施方案中,hIDUA转基因(例如SEQ ID NO:27)通过AAV2/6递送来递送(例如递送至肝细胞),并且hIDUA递送载体进一步包含侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂例如用于通过同源定向修复来帮助促进hIDUA转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小例如以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体在3'端进一步包含例如终止密码子,以防止其中插入IDUA转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含例如含有外显子1加上外显子2-14的部分的部分IDUA cDNA(例如SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,存在例如衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDUA转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体是指定为SB-IDUA AAV的供体(例如表5;SEQ ID NO:28)。

[0060] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送(例如递送至肝细胞),其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9

或SEQ ID NO:23),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN表达由肝脏特异性增强子和启动子控制,例如由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532(200))。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签(例如N末端肽)、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如,SEQ ID NO:2)在预期靶组织肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。

[0061] 在一些实施方案中,在用如本文公开的方法和组合物治疗之后,在受试者中衡量残疾进展的稳定、抑制或延迟。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化或所述用力肺活量的稳定性来衡量残疾进展的稳定、抑制或延迟。在一些实施方案中,例如通过由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化或所述步行距离的稳定性来衡量残疾进展的稳定、抑制或延迟。在一些实施方案中,例如通过关节活动度(JROM)相对于基线的变化或关节活动度的稳定性来衡量残疾进展的稳定、抑制或延迟。在一些实施方案中,例如通过神经认知能力相对于基线的变化或神经认知能力的稳定性来衡量残疾进展的稳定、抑制或延迟,所述神经认知能力如由WASI-II(韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,同上))所测量。

[0062] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0063] 在一些实施方案中,所述治疗包括给予本发明的组合物(例如通过外周静脉导管)。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体),例如包含SB-47171 AAV(例如表1)、SB-47898 AAV(例如表2)和SB-IDUA AAV(例如表5)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(例如表3,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0064] 在一些实施方案中,在用本发明的组合物通过 5×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg和/或 1×10^{15} vg/kg的总剂量治疗之后,衡量受试者中延迟的对

ERT的需要。在一些实施方案中,在接受 $5e12$ vg/kg至 $1e15$ vg/kg之间(例如, $5e12$ vg/kg与 $5e13$ vg/kg之间、 $5e12$ vg/kg与 $1e14$ vg/kg之间、 $5e12$ vg/kg与 $5e14$ vg/kg之间和/或 $5e12$ vg/kg与 $1e15$ vg/kg之间)的总剂量之后,衡量受试者中延迟的对ERT的需要。

[0065] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用如本文公开的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS I的受试者中稳定、延迟、减少或避免对使用医疗呼吸机设备的需要的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的hIDUA转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者对使用医疗呼吸机设备具有延迟、减少或避免的需要。在一些实施方案中,hIDUA转基因(SEQ ID NO:27)通过AAV2/6递送来递送(例如,递送至肝细胞),并且hIDUA递送载体进一步包含侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于通过同源定向修复来帮助促进hIDUA转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,以防止其中插入IDUA转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-14的部分的部分IDUA cDNA(例如SEQ ID NO:27)。存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDUA转基因高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在一些实施方案中,供体是指定为SB-IDUA AAV的供体(例如表5;SEQ ID NO:28)。

[0066] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN表达由肝脏特异性增强子和启动子控制,由人ApoE增强子和人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1 (6):522-532 (200))。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签(例如N末端肽)、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中,在治疗之后在受试者中衡量稳定、延迟、减少或避免的对使用呼吸机的需要。在一些实施方案中,例如通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化来衡量稳定、延迟、减少或避免的对使用呼吸机的需要。在一些实施方案中,例如通过由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化来衡量稳定、延迟、减少或避免的对使用呼吸机的需要。

[0067] 在一些实施方案中,使用如本文公开的方法和组合物的治疗包括给予本发明的组合物(例如通过外周静脉导管)。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸

盐缓冲盐水 (PBS) 稀释剂中,其中稀释剂进一步包含人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体),例如包含SB-47171 AAV(例如,表1)、SB-47898 AAV(例如,表2)和SB-IDUA AAV(例如,表5)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(例如表3,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0068] 在一些实施方案中,在用本发明的组合物以 5×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg和/或 1×10^{15} vg/kg的总剂量治疗之后,衡量受试者中减少或延迟的对使用呼吸机的需要。在一些实施方案中,在接受 5×10^{12} vg/kg至 1×10^{15} vg/kg之间(例如, 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{13} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{14} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{14} vg/kg之间和/或 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{15} vg/kg之间)的总剂量之后,衡量受试者中减少或延迟的对使用呼吸机的需要。

[0069] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用如本文公开的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS I的人类受试者中稳定、延迟、减少或预防受试者成为轮椅依赖性的发作的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的hIDUA转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者在治疗之后具有稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,hIDUA转基因(例如SEQ ID NO:27)通过AAV2/6递送来递送至肝细胞,并且hIDUA递送载体进一步包含侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。在一些实施方案中,左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于通过同源定向修复来帮助促进hIDUA转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,以防止其中插入IDUA转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(例如SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-14的部分的部分IDUA cDNA(例如SEQ ID NO:27)。

存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA, SEQ ID NO:14),以允许将hIDUA转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在某些实施方案中,供体是指定为SB-IDUA AAV的供体(例如表5;SEQ ID NO:28)。

[0070] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN表达由肝脏特异性增强子和启动子控制,由人ApoE增强子和人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000) Mol. Ther. 1(6):522-532(200))。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签(例如N末端肽)、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是无活性的;这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。

[0071] 在一些实施方案中,在治疗之后在受试者中衡量稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,通过由肺功能测试测量的用力肺活量相对于基线的变化来衡量稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,通过由6分钟步行测试测量的步行距离相对于基线的变化或所述步行距离的稳定性来衡量稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,通过关节活动度相对于基线的变化或关节活动度的稳定性来衡量稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,通过WASI-II(韦氏简明智力量表第二版(Shapiro等人,同上))来衡量成为轮椅依赖性的发作的稳定、延迟、减少或预防。在一些实施方案中,通过在肝脏组织和CSF中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平相对于基线的变化或所述水平的稳定性来衡量稳定或延迟经确认的残疾进展的发作或降低经确认的残疾进展的风险。

[0072] 在一些实施方案中,受试者在基线处已接受ERT或在过去已接受ERT,而在其他实施方案中,受试者未接受过ERT。

[0073] 在一些实施方案中,所述治疗包括通过外周静脉导管用本发明的组合物进行给药。在一些实施方案中,将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中,其中稀释剂进一步包含人血清白蛋白。在一些实施方案中,受试者接受 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的hIDUA供体AAV。在其他实施方案中,受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受 1×10^{11} 至 1×10^{16} vg/kg的总AAV剂量,例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg的总AAV剂量,所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14}

vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中,可以将组分分开施用,或者优选包含所有组分(例如相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体),例如包含SB-47171 AAV(例如表1)、SB-47898 AAV(例如表2)和SB-IDUA AAV(例如表5)的组合物。在一些实施方案中,组合物包含SB-71557 AAV(例如表3,SEQ ID NO:23);SB-71728(例如表4,SEQ ID NO:26);和SB-IDUA AAV(例如表5,SEQ ID NO:28)。

[0074] 在一些实施方案中,在 5×10^{12} vg/kg SB-913、 1×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg和/或 1×10^{15} vg/kg的总剂量之后,衡量受试者中稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。在一些实施方案中,在接受 5×10^{12} vg/kg至 1×10^{15} vg/kg之间(例如, 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{13} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{14} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{14} vg/kg之间和/或 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{15} vg/kg之间)的总剂量之后,衡量受试者中稳定、延迟、减少或预防的成为轮椅依赖性的发作。

[0075] 在一些实施方案中,本文提供了与没有用如本文公开的方法和组合物治疗过的受试者相比延长患有MPS I的受试者的期望寿命的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的hIDUA转基因和锌指核酸酶(ZFN),其中受试者具有延长的期望寿命。在一些实施方案中,hIDUA转基因(例如SEQ ID NO:27)通过AAV2/6递送来递送至肝细胞,并且hIDUA递送载体进一步包含侧接hIDUA转基因的同源性臂(例如SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16),所述同源性臂对侧接白蛋白基因座中的ZFN切割位点的区域具有特异性。左同源性臂(LA)含有在白蛋白内含子1裂解位点上游的相同序列的约280个核苷酸(例如SEQ ID NO:13),并且右同源性臂(RA)含有在裂解位点下游的相同序列的约100个核苷酸(例如SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,同源性臂用于通过同源定向修复来帮助促进hIDUA转基因靶向整合于白蛋白内含子1基因座处。在一些实施方案中,选择同源性臂的大小以避免白蛋白基因座中的可抑制靶向整合或转基因表达的重复序列和剪接元件。在一些实施方案中,聚A序列衍生自牛生长激素基因。在一些实施方案中,hIDUA转基因供体在3'端进一步包含终止密码子,以防止其中插入IDUA转基因的白蛋白序列的进一步转录。在一些实施方案中,含有人IDUA转基因的rAAV2/6供体载体(SB-IDUA供体)是无启动子构建体,所述无启动子构建体包含含有外显子1加上外显子2-14的部分的部分IDUA cDNA(SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,存在衍生自hF9外显子2的剪接受体位点(例如SA,SEQ ID NO:14),以允许将hIDUA转录物高效剪接至来自白蛋白基因座的成熟mRNA中,并且所述剪接受体位点在两种类型的供体整合机制(例如NHEJ或HDR)的情况下是有效的。在某些实施方案中,供体是指定为SB-IDUA AAV的供体(例如表5及表5之后的序列)。

[0076] 在一些实施方案中,白蛋白特异性对中的ZFN通过AAV2/6递送来类似地递送至肝细胞,其中一个AAV包含左ZFN(例如SBS-47171或SB-71557;分别为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23),并且另一个包含右ZFN(例如SBS-47898或SB-71728;分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,ZFN表达由肝脏特异性增强子和启动子控制,由人ApoE增强子和人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(hAAT)启动子构成(Miao CH等人(2000)Mol. Ther. 1(6):522-532)。在一些实施方案中,ZFN表达是在最小甲状腺素转运蛋白启动子下。在一些实施方案中,包含ZFN的表达盒包含如上所述的一个或多个FLAG标签(例如N末端肽)、核定位序列(NLS)、WPRE序列、另选的聚A序列、5'UTR或3'UTR。在一些实施方案中,ApoE/hAAT启动子(例如SEQ ID NO:2)在预期靶组织肝细胞中是特异性且高度活性的,但是在非肝脏细胞和组织类型中是

无活性的；这防止了在非靶组织中的ZFN表达和活性。在一些实施方案中，在治疗之后在受试者中衡量期望寿命的延长。

[0077] 在一些实施方案中，所述治疗包括通过外周静脉导管给予如本文公开的组合物。在一些实施方案中，将组合物添加至生理盐水(NS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释剂中，其中稀释剂进一步包含人血清白蛋白。在一些实施方案中，受试者接受例如 5×10^{12} vg/kg的总AAV剂量，所述总AAV剂量包含 5×10^{11} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中，受试者接受例如 1×10^{13} vg/kg的总AAV剂量，所述总AAV剂量包含 1×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{12} vg/kg的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中，受试者接受例如 5×10^{13} vg/kg的总AAV剂量，所述总AAV剂量包含 5×10^{12} vg/kg的含有左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV、和 4×10^{13} 的如本文公开的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中，受试者接受例如 1×10^{14} vg/kg的总AAV剂量，所述总AAV剂量包含 1×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{13} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中，受试者接受例如 5×10^{14} vg/kg的总AAV剂量，所述总AAV剂量包含 5×10^{13} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 4×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中，受试者接受例如 1×10^{15} vg/kg的总AAV剂量，所述总AAV剂量包含 1×10^{14} vg/kg的含有例如左ZFN或右ZFN的每个ZFN AAV2/6、和 8×10^{14} vg/kg的hIDUA供体AAV。在一些实施方案中，可以将组分分开施用，或者优选包含所有组分(相同或不同载体上的成对ZFN和IDUA供体)，例如包含SB-47171 AAV(例如表1)、SB-47898 AAV(例如表2)和SB-IDUA AAV(例如表5)的组合物。在一些实施方案中，组合物包含SB-71557 AAV(例如表3, SEQ ID NO:23)；SB-71728(例如表4, SEQ ID NO:26)；和SB-IDUA AAV(例如表5, SEQ ID NO:28)。

[0078] 在一些实施方案中，在用本发明的组合物以 5×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg和/或 1×10^{15} vg/kg的总剂量治疗之后，衡量受试者的延长期望寿命。在一些实施方案中，在接受 5×10^{12} vg/kg至 1×10^{15} vg/kg之间(例如， 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{13} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{14} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{14} vg/kg之间和/或 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{15} vg/kg之间)的总剂量之后，衡量受试者的延长期望寿命。

[0079] 在某些实施方案中，a)患有MPS I的受试者中对额外治疗程序的需要得以减少或稳定；b)患有MPS I的受试者中的症状得以减少或稳定；c)患有MPS I的受试者的尿液中GAG的量得以降低、稳定或消除；d)患有MPS I的受试者中的功能性能力得以改善或稳定；e)患有MPS I的患者中对ERT的需要得以减少或稳定；f)患有MPS I的受试者中对ERT的需要得以延迟或稳定；g)ERT治疗的剂量和/或频率在也用如本文公开的组合物治疗的患有MPS I的受试者中稳定或降低，和/或与用单独ERT治疗的MPS-I受试者相比，受试者具有稳定或增加的功能性能力；h)患有MPS I的受试者中残疾进展的风险得以稳定或降低；i)在用本发明的组合物治疗过的受试者中，经确认的残疾进展的发作得以稳定或延迟；j)在变为轮椅依赖性的方面存在延长或消除了对轮椅的需要；k)对使用机械呼吸机的需要得以稳定、减少、延迟或避免；l)与没有用本发明的组合物治疗过的受试者相比，用所述组合物治疗过的受试者的期望寿命得以延长。

[0080] 在一些实施方案中，在用本发明的组合物输注之前对受试者进行前驱用药。在一些实施方案中，在用组合物输注的前一天，用泼尼松或等效皮质类固醇对受试者进行前驱用药。在一些实施方案中，在用组合物输注的前一天和再次在输注的当天用泼尼松或等效

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

[0081] 在上文和本文所述的方法的一些实施方案中,MPS I是早期发作的重型疾病,伴有躯体和认知受累,而在其他实施方案中,MPS I是特征在于躯体疾病的较晚发作和很少或没有中枢神经系统疾病的减毒MPS I。在另外的实施方案中,MPS I疾病在两者之间的连续体上。在一些实施方案中,受试者是成年人,而在一些实施方案中,受试者来自儿科群体。

[0082] 在根据(或如应用于)以上任何实施方案的某些实施方案中,基于患有早期发作的重型MPS I来选择受试者用于治疗,而在其他实施方案中,受试者具有特征在于躯体疾病的较晚发作伴有很少或不伴有中枢神经系统疾病的减毒MPS I,而在一些实施方案中,基于患有在两者之间的连续体上的MPS I疾病来选择受试者用于治疗。

[0083] 在上文和本文所述的方法的一些实施方案中,将本发明的组合物以 5×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg和/或 1×10^{15} vg/kg的总剂量施用。在上文和本文所述的方法的一些实施方案中,将本发明的组合物以 5×10^{12} vg/kg至 1×10^{15} vg/kg之间(例如, 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{13} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{14} vg/kg之间、 5×10^{12} vg/kg与 5×10^{14} vg/kg之间和/或 5×10^{12} vg/kg与 1×10^{15} vg/kg之间)的总剂量施用。在上文和本文所述的方法的一些实施方案中,将组合物静脉施用。

[0084] 在上文或本文的任何方法中,可以将施用本发明的组合物之后的稳定、降低或减少或改善与基线水平、一名或多名未经治疗的受试者中的水平和/或一名或多名接受不同治疗(如ERT)的受试者中的水平进行比较。在一些实施方案中,可以将施用组合物之后的降低或减少或改善与一名或多名接受Aldurazyme®的受试者中的水平进行比较。

[0085] 在另一方面,本文提供了制品,所述制品包含一种或多种本文所述的组合物。在某些实施方案中,制品包含配制品,所述配制品包含如本文所述的三种药物组合物(例如,在不同的容器如小瓶中):包含ZFN对中的一个成员(例如,左ZFN)的第一药物组合物;包含ZFN对中的第二成员(例如,右ZFN)的第二药物组合物;和包含IDUA供体(例如,AAV IDUA供体)的第三药物组合物。可以使用组分的任何浓度,包括但不限于表6中所示的浓度。此外,可以使用三种药物组合物的任何比率,例如1:1:8(左ZFN:右ZFN:IDUA供体)。不同的组分可以以任何方式标记,例如用针对每种组合物的不同颜色标记。在某些实施方案中,制品包含:含有以下的一组药物产品小瓶:i) ZFN1载体药物产品(SB-A6P-ZLEFT),其任选地在包含具有第一颜色(例如白色)的铝翻盖密封件的容器(例如,小瓶)中;ii) ZFN 2载体药物产品(SB-A6P-ZRIGHT),其任选地在包含具有不同于第一颜色的第二颜色(例如蓝色)的铝翻盖密封件的容器(例如小瓶)中;和iii) 编码对无启动子IDUA转基因进行编码的DNA修复模板的第三载体SB-A6P-HRL药物产品,其任选地在包含不同于第一和第二颜色的第三颜色(例如红色)铝翻盖密封件的容器(例如,小瓶)中。在另外的实施方案中,提供了一组药物产品,所述一组药物产品包含编码SB-71557(SB-A6P-ZL2,SEQ ID NO:23)或SB-71728(SB-A6P-ZR2,SEQ ID NO:26)的AAV载体和SB-A6P-HRL载体。在本文所述的任何组合物中,可以将纯化的大量重组载体配制在含有 CaCl_2 、 MgCl_2 、 NaCl 、蔗糖和泊洛沙姆188的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,以5mL体积填充到玻璃药物产品小瓶中,b)具有用于根据上文和本文所述的任何一种方法治疗受试者中的MPS I的说明书的包装插页。将制品(药物产品)以适合于受试者的任何

浓度(例如,如本文所述基于重量确定的)施用(例如,静脉)至有需要的受试者,由此使得IDUA在受试者中表达,包括以用于治疗MPS I的治疗水平表达。可以将施用进行一次或以任何频率进行多次。另外,所述组的药物产品可以分开施用,或者可以在施用之前组合,例如组合在静脉输注袋中。

[0086] 在另一方面,提供了针对所选择的受试者确定如本文所述的组合物的剂量(例如,以形成制品/一组药物产品)的方法,所述方法包括:确定治疗之前(基线)的受试者的体重(四舍五入成小数点后两位);用受试者的体重除以vg/mL浓度以确定待使用的剂量。例如,对于在群组1待治疗的50kg受试者,使用 0.5×10^{14} vg的ZFN1(例如47171或71557)、 0.5×10^{14} vg的ZFN2(例如47898或71729)和 4×10^{14} SB-IDUA。此外,进行以下这些步骤:

(i) 例如如下通过将群组剂量乘以基线处的患者体重且然后除以VG浓度来计算三个产品组分体积:(a) .从研究协调员获得群组和基线处的患者体重,(b) .从临床分析证明书获得VG浓度。(ii) 通过将三个产品组分体积和NS/PBS体积相加在一起来计算总体积。(iii) 计算实现0.25%HSA最终浓度所需的HSA静脉溶液的体积,以及(iv) 计算经调整的NS/PBS体积。所述方法可以进一步包括通过确定总体积来提供具有针对受试者体重的正确剂量的制品(例如,包括包含如本文所述的三种药物产品的制品);和计算所需的人血清白蛋白(HSA)静脉溶液的体积,从而实现针对所选择的受试者的恰当组分浓度。

[0087] 在一些实施方案中,剂量通过受试者的肝脏体积来确定。受试者的体重并不总是与肝脏体积直接相关,特别是在较重的患者中。在小于2个月大的儿科患者中,可以基于肝脏体积确定不同疗法的最佳剂量,以避免肝毒性(参见Bartelink等人(2006) Clin Pharm 45(11):1077-1097)。因此,对于某些受试者,剂量可以通过近似的肝脏体积来确定。在这些情况下,可以通过本领域已知的方法来估计肝脏体积,例如通过使用基于参数的组合的公式来估计,所述参数如年龄、性别、体重、身高、体重指数和体表面积(Yuan等人(2008) Transplant Proc 40(10):3536-40)。本领域已知的用于估计或确定肝脏体积的其他方法包括CT或MRI扫描以及腹部几何形状的估计(Yang等人(2018) Yonsei Med J 59(4):546-553;Huynh等人(2014) AJR Am J Roentgenol 202(1):152-59)。

[0088] 在另一方面,本文提供了施用如本文所述的组合物的方法,所述方法包括提供如本文所述的制品(例如,如本文所述单独或一起包含三种(AAV)药物组合物(左ZFN、右ZFN、AAV供体)的药物产品),以所选择的剂量为受试者配制一种或多种静脉溶液(例如,使用本文所述的方法),以及向有需要的受试者静脉施用静脉溶液。在某些实施方案中,将制品的三个组分(ZFN1、ZFN2和IDUA供体)分别添加至大约200mL IV输注袋,例如在NS或PBS中含有0.25%HSA的IV输注袋。总输注量是根据受试者的群组分配和体重(kg)计算的,并且预计总输注量在约240-800mL之间,这取决于受试者的群组分配和体重(kg)。在受试者在医院或急救设施中时,将使用恒速输注泵以100mL/小时通过静脉输注施用所制备的输注产品。本文所述的任何方法均可以使用输注泵以任何速率,例如10至200mL/小时(或其间的任何值)进行递送。在某些实施方案中,将静脉溶液以100mL/小时的速率递送。受试者可以正在接受ERT或在过去接受过ERT。在某些实施方案中,在静脉溶液输注的一周期间内不给予ERT。

[0089] 还提供了增加受试者的白细胞中IDUA水平(活性)的方法,所述方法包括施用如本文所述的静脉溶液(例如,包含三种药物组合物的系统)。在某些实施方案中,IDUA水平从低于正常水平(在MPS I受试者中)增加至正常范围内的水平(非MPS I受试者中的水平)。可以

通过直接测量IDUA水平/活性和/或测量GAG水平来确定增加的IDUA水平/活性。使用本文所述的方法和组合物,也可以增加血浆和尿液中的IDUA水平(活性)。

[0090] 在本文所述的任何方法中,受试者可以在静脉输注前例如1、2、3、4、5、6、7或更多天,输注日和/或在输注后长达20周或更多周接受皮质类固醇(例如泼尼松),其中剂量是基于受试者的体重确定的。通过受试者的体重确定的随时间逐渐减少剂量的口服泼尼松的示例性时间表在下表A中示出:

表A:逐渐减少的类固醇剂量

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

[0091] 在一些实施方案中,可以使用除表A中举例说明的那些剂量以外的皮质类固醇或其他免疫抑制剂的其他剂量(包括更高或更低)(例如2.0、1.5mg/kg/天泼尼松或更多,或7.5-15.5mg/周的甲氨蝶呤)。在一些实施方案中,与表A中举例说明的相比,逐渐减少的起始发生较晚(例如,在4、5、6、7或8周或更多周)。

[0092] 从整体而言鉴于本公开文本,这些和其他方面对于熟练技术人员来说都是易于清楚的。

附图说明

[0093] 图1A和图1B是描绘糖胺聚糖(GAG)的分解的图。图1A示出了硫酸皮肤素的分解代谢分解。图1B示出了硫酸乙酰肝素的分解代谢分解。MPS I疾病导致无法参与分解硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素两者的过程,从而导致这些GAG在患有MPS I的受试者的几乎所有器官和身体组织以及尿液中积累。GAG在细胞溶酶体内的长期积累导致MPS I患者中的细胞充血、器官肿大、组织破坏和器官系统功能障碍。

[0094] 图2描绘了受试者白细胞中的IDUA活性。示出了显示来自3名受试者的数据的曲线图,其中受试者1在剂量群组1中,并且受试者2和受试者3在剂量群组2中。研究药物在第0天施用。与给药前的水平(负数研究天数)相比,所有患者显示出白细胞IDUA活性的增加。每个曲线图中的水平虚线描绘正常范围下限。

[0095] 图3描述了每名受试者中的尿液GAG水平。示出了显示来自三名受试者的数据的曲线图,其中受试者1在剂量群组1中,并且受试者2和受试者3在剂量群组2中。研究药物在第0天施用。

具体实施方式

[0096] 本文公开了用于治疗 and/或预防人类受试者中的胡勒尔/胡勒尔-沙伊/沙伊综合征(MPS I)综合征的方法和组合物,所述方法和组合物包括在靶细胞中插入合适的转基因

序列。所述治疗采用工程化锌指核酸酶 (ZFN), 以在体内将酶艾杜糖醛酸酶 (hIDUA) 转基因的校正拷贝以位点特异性方式整合至受试者自身肝细胞的白蛋白基因座中。一旦从整合的转基因表达, hIDUA 就是活性的并能够降解黏多糖糖胺聚糖 (GAG)。本发明描述了针对 MPS I 受试者进行预防或治疗的方法。

[0097] 通常, IDUA 酶是在细胞内产生的, 并且由于细胞的不完全内部转运系统, 可能少量的 IDUA 酶泄漏到循环中。稳定状态建立为被细胞表面的受体摄取回的细胞外酶。因此, 通常在体内产生的大多数酶发现于组织中, 并且在循环中发现的酶浓度通常非常小。相比之下, ERT 是将大剂量酶直接输注到血液中, 所述酶被设计以在循环中产生高浓度以允许摄取至 IDUA 缺乏组织中。然而, ERT 仅产生短暂的高水平 IDUA 酶, 随后由于酶的半衰期短以及因为大量被肝脏摄取而在约数分钟至数小时内而迅速从循环中清除。这限制了 ERT 的有效性, 因为它仅提供了酶暴露于组织的短窗口, 而且我们知道细胞摄取酶是一种缓慢的受体介导的过程。相反, 用于 MPS I 的理想疗法将通过在循环中产生并保持连续稳定的酶水平而允许使 IDUA 酶长时间且持续地暴露于组织。甚至连续分泌到循环中的少量 IDUA 也足以降低组织 GAG, 并潜在地为本文公开的组合物提供功效。

[0098] 已显示 ERT 增加治疗后患者白细胞中的 IDUA 活性的量, 这大概是因为细胞从血浆中摄取了酶 (白细胞是富含溶酶体的细胞)。例如, 在一项对接受重组 IDUA 的患者的研究中, 据报道 (参见 Kakkis 等人 (2001) NEJM 344 (3): 182-8) 白细胞中 IDUA 的平均活性在治疗前为 0.04U/mg, 并且在治疗后, 其在输注后七天 (即紧接在下一次治疗之前) 测量为 4.98U/mg。因此, 循环白细胞中 IDUA 的测量可用于确定血液中酶的存在。

[0099] 溶酶体贮积病 (LSD) 是一组罕见的代谢性单基因疾病, 其特征在于缺乏通常参与废物脂质、黏多糖 (即糖胺聚糖 (GAG)) 的分解的功能性单独溶酶体蛋白质。这些疾病的特征在于这些化合物在细胞中的积聚, 因为由于分解途径中特定酶的功能失常而无法加工它们以进行再循环。LSD 的病理生理学最初被认为与 GAG 的简单沉积有关, 但是当前的研究已产生对这些疾病的复杂性的认识。GAG 贮积显现导致细胞、组织和器官稳态的扰动, 并且还还与细胞因子和炎性调节剂的分泌增加有联系, 从而导致炎性反应的激活 (Muenzer (2014) Mol Gen Metabol 111:63-72)。

[0100] I 型粘多糖病 (MPS I) (也称为胡勒尔/胡勒尔-沙伊 (Schei) /沙伊综合征) 是一种隐性溶酶体贮积症。根据美国国家神经疾病和中风研究所 (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) (NINDS) 关于 MPS I 的情况说明, 重度 MPS I 的估计发病率为 1/约 100,000 个出生儿, 减毒型 MPS I 的估计发病率为 1/约 500,000 个出生儿, 并且落入重度与减毒型之间的疾病的估计发病率为 1/约 115,000 个出生儿。

[0101] MPS I 与编码艾杜糖醛酸酶 (IDUA) 的基因中的突变相关, 所述艾杜糖醛酸酶降解和/或帮助再循环糖胺聚糖 (硫酸化碳水化合物聚合物; GAG)。IDUA 基因中的突变会减弱或消除 IDUA 酶活性, 这导致毒性 GAG 在尿液、血浆和身体组织中的积累, 从而导致广泛的组织和器官损伤。

[0102] 根据 IDUA 突变的具体类型 (已描述了多于 100 种不同的突变) 和所产生的残余 IDUA 酶的水平, 患者将发展胡勒尔综合征 (MPS I H) 或减毒型变体 (MPS I H/S 和 MPS I S)。据估计, 所有 MPS I 患者中的 50% - 80% 表现为重型, 这部分归因于诊断的相对容易 (Muenzer 等人, 同上) MPS I H 患者在第一年结束前显示出发育迟缓的症状, 并且在 2-4 岁年龄之间显示

出停止生长和进行性智力衰退。其他症状包括器官肿大、角膜浑浊、关节僵硬和骨骼畸形(包括异常的脊椎骨)、面部特征粗大伴有舌头增大、听力损失和疝气。这些MPS I H患者的期望寿命少于10年。患有减毒形式的患者共有这些临床表现中的大部分,但具有不太严重的症状。另外,没有CNS累及,且因此他们没有遭受智力迟钝。

[0103] 这些患者中有许多可以存活到成年,但具有显著的发病率。目前MPS I的护理标准包括对重度患者进行造血干细胞移植(HSCT)、和通过频繁静脉输注给予酶替代疗法(ERT)。如果患有重型MPS I (MPS I-H)的患者能够早期(<2.5年)诊断,通过HSCT(骨髓或脐带干细胞)进行的治疗干预可以预防或逆转包括神经认知的大多数临床特征。目前,几乎所有的MPS I H患者都经历HSCT。对于MPS I,HSCT之后的死亡率是15%,并且在成功植入的情况下的存活率是56%。用中国仓鼠卵巢细胞中产生的多态性重组蛋白Aldurazyme[®]的ERT自2003年以来一直在使用。已显示这种酶改善肺功能、肝脾肿大和运动能力,并且导致改善的健康相关的生活质量。应尽可能早地建立ERT。酶替代疗法的局限性包括终身治疗的需要,中和抗体的开发,没有穿越血脑屏障的能力,持续的心脏、骨科、眼部并发症以及每周静脉输注的不便。总之,这些局限性凸显了为MPS I开发更广泛的一系列治疗性疗法的迫切需要。

[0104] 本文公开的方法和组合物的目的和原理是通过体内基因组编辑来消除或减少对酶替代疗法的需要。所提出的治疗采用工程化锌指核酸酶(ZFN),以在体内将艾杜糖醛酸酶(hIDUA)转基因的校正拷贝以位点特异性方式整合至受试者自身肝细胞的基因组中。hIDUA转基因的整合靶向白蛋白基因座的内含子1,导致艾杜糖醛酸酶向血液中的稳定高水平肝特异性表达和分泌。预期将huIDUA转基因置于高度表达的内源白蛋白基因座的控制下可在MPS I患者的寿命内提供艾杜糖醛酸酶的永久性肝特异性表达。

[0105] 将接受每周ERT的轻度MPS I患者招募在研究中。一名患者被给予了 1×10^{13} vg/kg的本文公开的组合物,并且两名患者被给予了 5×10^{13} vg/kg。招募在研究中的三名患者均未接受过骨髓移植。中期数据结果显示出在用本文公开的方法和组合物治疗的所有三名受试者中白细胞IDUA酶活性的剂量依赖性增加。白细胞是IDUA的容易获取的靶组织,且因此为MPS I患者提供了组织酶活性的一个估计。在已接受过骨髓移植的MPS I患者中,增加的白细胞IDUA活性与成功植入和改善的临床结局相关。

[0106] 本文所述的组合物的施用总体上是耐受性良好的。没有报告过治疗相关的严重不良事件(SAE)。在报告的6种总的不良事件中,全部都是轻度或中度的,并且与进行中的MPS I疾病一致,并且没有一个被认为与用本文所述的组合物的治疗相关。在用本文所述的组合物治疗的所有三名患者中观察到白细胞IDUA活性的剂量依赖性增加,其中活性水平上升到高于基线并处于正常范围(正常范围为6.0-71.4nmol/h/mg)内。在所有三名患者中,血浆IDUA活性相对于基线均无变化。三名患者的基线尿液GAG测量值均在视为正常的范围内或略高于正常值。在有限的持续时间内,初步的数据集尿液GAG测量此时没有显示出明显的趋势,没有有意义的变化。需要另外的随访以观察尿液GAG是否出现任何有意义的变化。

[0107] 设计第二代、可能更有效的ZFN构建体(例如SB-71557和SB-71728)以增加编辑效率以及用于其他改善。临床前数据显示了三种潜在的ZFN 2.0优势:(1)由于结构变化,效率和效能的5至30倍改善;(2)在白蛋白基因中的靶基因座中具有单核苷酸多态性(SNP)的患者(大约20%的群体)中具有同样作用良好的能力;以及(3)改善的特异性(参见美国临时专利申请号62/758,786)。也将测试这些ZFN组合物。

概述

[0108] 除非另有指示,否则方法的实践以及本文所公开的组物的制备和使用采用分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、计算化学、细胞培养、重组DNA和相关领域的常规技术,这些技术是本领域所熟知的。这些技术在文献中有充分解释。参见例如Sambrook等人MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989和第三版,2001;Ausubel等人,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley&Sons,纽约,1987和定期更新;丛书METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,圣地亚哥;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,第三版,Academic Press,圣地亚哥,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,第304卷,“Chromatin”(P.M.Wassarman和A.P.Wolffe编辑),Academic Press,圣地亚哥,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,第119卷,“Chromatin Protocols”(P.B.Becker编辑)Humana Press,托托瓦,1999。

定义

[0109] 术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用,并且是指呈线性或环状构象并且呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物。出于本公开文本的目的,不应将这些术语视为在聚合物的长度方面加以限制。这些术语可以涵盖天然核苷酸的已知类似物,以及在碱基、糖和/或磷酸部分(例如,硫代磷酸酯骨架)中被修饰的核苷酸。通常,特定核苷酸的类似物具有相同的碱基配对特异性;即,A的类似物将与T进行碱基配对。

[0110] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。所述术语还适用于如下氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸是相应天然存在的氨基酸的化学类似物或经修饰衍生物。

[0111] “结合”是指高分子之间(例如,蛋白质与核酸之间)的序列特异性非共价相互作用。并非结合相互作用的所有组分都需要是序列特异性的(例如,与DNA骨架中的磷酸残基接触),只要所述相互作用作为整体是序列特异性的即可。此类相互作用的特征通常是解离常数(K_d)为 $10^{-6}M^{-1}$ 或更低。“亲和力”是指结合强度:增强的结合亲和力与较低的 K_d 相关。

[0112] “结合蛋白”是能够非共价结合至另一分子的蛋白质。结合蛋白可以结合至例如DNA分子(DNA结合蛋白)、RNA分子(RNA结合蛋白)和/或蛋白质分子(蛋白质结合蛋白)。在蛋白质结合蛋白的情形中,其可以结合至自身(以形成同二聚体、同三聚体等),和/或其可以结合至一种或多种不同蛋白质的一个或多个分子。结合蛋白可以具有多于一种类型的结合活性。例如,锌指蛋白具有DNA结合、RNA结合和蛋白质结合活性。

[0113] “锌指DNA结合蛋白”(或结合结构域)是蛋白质或较大蛋白质内的结构域,其以序列特异性方式通过一个或多个锌指结合DNA,所述锌指是结合结构域内的氨基酸序列区域,所述结合结构域的结构通过锌离子的配位而稳定。术语锌指DNA结合蛋白通常缩写为锌指蛋白或ZFP。术语“锌指核酸酶”包括一种ZFN以及二聚化以裂解靶基因的一对ZFN(所述对中的成员被称为“左和右”或“第一和第二”或“对”)。

[0114] “TALE DNA结合结构域”或“TALE”是包含一个或多个TALE重复结构域/单元的多肽。重复结构域参与TALE与其同源靶DNA序列的结合。单一的“重复单元”(也称为“重复序列”)的长度典型地是33-35个氨基酸,并展现与天然存在的TALE蛋白内的其他TALE重复序列的至少一定序列同源性。参见例如美国专利号8,586,526和9,458,205。术语“TALEN”包括一种TALEN以及二聚化以裂解靶基因的一对TALEN(所述对中的成员被称为“左和右”或“第

一和第二”或“对”)。锌指和TALE结合结构域可以“被工程化”以与预先确定的核苷酸序列结合,例如通过工程化(改变一个或多个氨基酸)天然存在的锌指或TALE蛋白的识别螺旋区。因此,工程化DNA结合蛋白(锌指或TALE)是非天然存在的蛋白质。用于工程化DNA结合蛋白的方法的非限制性例子是设计和选择。设计的DNA结合蛋白是在自然界中不存在的蛋白质,其设计/组成主要源自合理标准。设计的合理标准包括应用替换规则和计算机化算法,以用于处理存储现有ZFP和/或TALE设计和结合数据的信息的数据库中的信息。参见例如美国专利号8,568,526;6,140,081;6,453,242;和6,534,261;还参见国际专利公开号WO 98/53058;WO 98/53059;WO 98/53060;WO 02/016536;和WO 03/016496。

[0115] “所选择的”锌指蛋白或TALE是并非在自然界中发现的蛋白质,其产生主要源自经验过程,如噬菌体展示、相互作用陷阱或杂交体选择。参见例如,美国专利号8,586,526;5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,200,759;以及国际专利公开号WO 95/19431;WO 96/06166;WO 98/53057;WO 98/54311;WO 00/27878;WO 01/60970;WO 01/88197;和WO 02/099084。

[0116] “重组”是指两种多核苷酸之间交换遗传信息的过程。出于本公开文本的目的,“同源重组(HR)”是指这种交换的特化形式,其发生于例如细胞中的双链断裂通过同源定向修复机制修复期间。这个过程需要核苷酸序列同源性,使用“供体”分子模板修复“靶”分子(即,经历双链断裂的分子),并且因为其导致遗传信息从供体转移至靶标,被不同地称为“非交换型基因转化”或“短束基因转化”。不希望受任何特定理论约束,这种转移可以涉及在断裂的靶标与供体之间形成的异源双链体DNA的错配修正,和/或“合成依赖性链退火”(其中使用供体重合成将成为靶标的一部分的遗传信息),和/或相关过程。这种特化的HR通常导致靶分子的序列改变,使得供体多核苷酸的部分或全部序列并入靶多核苷酸中。

[0117] 在本公开文本的方法中,如本文所述的一种或多种靶向核酸酶在预定位点处在靶序列(例如,细胞染色质)中产生双链断裂,并且可以将与断裂区域中的核苷酸序列具有同源性的“供体”多核苷酸引入细胞中。已显示双链断裂的存在有利于供体序列的整合。供体序列可以是物理整合的,或可替代地,供体多核苷酸用作通过同源重组修复断裂的模板,导致将供体中的全部或部分核苷酸序列引入细胞染色质中。因此,可以改变细胞染色质中的第一序列,并且在某些实施方案中,可以将所述第一序列转换为供体多核苷酸中存在的序列。因此,术语“替代”(“replace”或“replacement”)的使用可以理解为代表一个核苷酸序列被另一个核苷酸序列替代(即,在信息意义上的序列替代),并且不一定需要将一个多核苷酸物理地或化学地被另一个多核苷酸替代。

[0118] 在本文所述的任何方法中,另外的锌指或TALEN蛋白对可以用于对细胞内另外的靶位点的另外的双链裂解。

[0119] 在用于细胞染色质的目的区域中的序列的靶向重组和/或替代和/或改变的方法的某些实施方案中,通过与外源“供体”核苷酸序列的同源重组来改变染色体序列。如果存在与断裂区域同源的序列,则通过在细胞染色质中存在双链断裂来刺激这种同源重组。

[0120] 在本文所述的任何方法中,第一核苷酸序列(“供体序列”)可包含与目的区域中的基因组序列同源但不相同的序列,从而刺激同源重组以在目的区域中插入不同序列。因此,在某些实施方案中,与目的区域中的序列同源的供体序列的部分相对于被替代的基因组序列展现出约80%至99%(或其之间的任何整数)的序列同一性。在其他实施方案中,供体与

基因组序列之间的同源性高于99%，例如，如果超过100个连续碱基对的供体和基因组序列之间只有1个核苷酸不同。在某些情况下，供体序列的非同源部分可以包含在目的区域中不存在的序列，从而将新序列引入目的区域中。在这些情况下，通常非同源序列的侧翼为与目的区域中的序列同源或相同的50-1,000个碱基对(或其间的任何整数值)或大于1,000的任意数量的碱基对的序列。在其他实施方案中，供体序列与第一序列非同源，并通过非同源重组机制插入基因组中。

[0121] 本文所述的任何方法可用于通过靶向整合供体序列(其破坏一个或多个目的基因表达)而使细胞中的一种或多种靶序列部分或完全失活。还提供了具有部分或完全失活的基因的细胞系。

[0122] 此外，本文所述的靶向整合的方法也可用于整合一种或多种外源序列。外源核酸序列可以包含例如一种或多种基因或cDNA分子、或任何类型的编码或非编码序列、以及一种或多种控制元件(例如启动子)。另外，外源核酸序列可产生一种或多种RNA分子(例如，小发夹RNA(shRNA)、抑制性RNA(RNAi)、微小RNA(miRNA)等)。

[0123] “裂解”是指DNA分子的共价骨架的断裂。裂解可以通过多种方法来引发，所述多种方法包括但不限于磷酸二酯键的酶促或化学水解。单链裂解和双链裂解都是可能的，并且作为两个不同的单链裂解事件的结果，可发生双链裂解。DNA裂解可导致产生平头末端或交错末端。在某些实施方案中，融合多肽用于靶向的双链DNA裂解。

[0124] “裂解半结构域”是与第二多肽(相同或不同)形成具有裂解活性(优选双链裂解活性)的复合物的多肽序列。术语“第一和第二裂解半结构域”、“+和-裂解半结构域”和“左和右裂解半结构域”可互换使用，以指二聚化的裂解半结构域对。

[0125] “工程化裂解半结构域”是已经被修饰以便与另一个裂解半结构域(例如，另一个工程化裂解半结构域)形成专性异二聚体的裂解半结构域。参见美国专利号7,888,121;7,914,796;8,034,598;和8,823,618,将所述文献通过引用以其全文并入本文。

[0126] 术语“序列”是指任何长度的核苷酸序列，其可以是DNA或RNA；可以是线性、环状或分支的，并且可以是单链或双链的。术语“供体序列”是指被插入基因组中的核苷酸序列。供体序列可以具有任何长度，例如长度介于2与10,000个核苷酸之间(或其之间或高于其的任何整数值)，优选地长度介于约100与1,000个核苷酸之间(或其之间的任何整数)，更优选地长度介于约200与500个核苷酸之间。

[0127] “疾病相关基因”是在单基因疾病中以某种方式缺陷的基因。单基因疾病的非限制性例子包括重度联合免疫缺陷、囊性纤维化、溶酶体贮积病(例如高雪(Gaucher')病、胡勒尔病、亨特病、法布里(Fabry's)病、尼曼-匹克二氏(Neimann-Pick)病、戴萨克斯病(Tay-Sach's)等)、镰状细胞性贫血和地中海贫血。

[0128] “血脑屏障”是高度选择性的通透性屏障，其可将循环血液与中枢神经系统中的脑分离。血脑屏障由脑内皮细胞形成，所述脑内皮细胞通过CNS血管中的紧密连接而连接，从而限制了血液溶质的通过。长期以来，人们一直认为血脑屏障阻止大分子治疗剂的摄取并且阻止大多数小分子治疗剂的摄取(Pardridge (2005) NeuroRx 2(1):3-14)。

[0129] “染色质”是包含细胞基因组的核蛋白结构。细胞染色质包含核酸(主要是DNA)和蛋白质(包含组蛋白和非组蛋白染色体蛋白)。大多数的真核细胞染色质以核小体的形式存在，其中核小体核心包含约150个碱基对的DNA，所述DNA与八聚体相缔合，所述八聚体包含

组蛋白H2A、H2B、H3和H4各两个,并且接头DNA(长度可变,取决于生物体)在核小体核心之间延伸。组蛋白H1分子通常与接头DNA相缔合。出于本公开文本的目的,术语“染色质”意为涵盖原核和真核的所有类型的细胞核蛋白。细胞染色质包含染色体和游离型染色质。

[0130] “染色体”是包含细胞基因组的全部或一部分的染色质复合物。细胞的基因组通常以其核型为特征,所述核型是包含所述细胞基因组的所有染色体的集合。细胞的基因组可以包含一条或多条染色体。

[0131] “附加体”是复制型核酸,核蛋白复合物或包含不属于细胞染色体核型的一部分的核酸的其他结构。附加体的例子包括质粒和某些病毒基因组。

[0132] “靶位点”或“靶序列”是定义核酸的一部分的核酸序列,结合分子将结合至所述部分,前提是存在用于结合的充分条件。

[0133] “外源”分子是正常地在细胞中不存在,但可以通过一种或多种遗传、生物化学或其他方法引入细胞中的分子。“在细胞中正常存在”是关于细胞的特定发育阶段和环境条件来确定。因此,例如,仅在肌肉的胚胎发育期间存在的分子是关于成体肌肉细胞的外源分子。类似地,通过热休克引入的分子是关于非热休克细胞的外源分子。外源分子可以包含例如功能失常的内源分子的功能形式或功能正常的内源分子的功能失常形式。

[0134] 外源分子尤其可以是小分子,如通过组合化学工艺产生的小分子,或高分子,如蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、糖蛋白、脂蛋白、多糖、上述分子的任何经修饰衍生物、或者包含一种或多种上述分子的任何复合物。核酸包括DNA和RNA,可以是单链或双链的;可以是线性、分支或环状的;并且可以是任何长度。核酸包括能够形成双螺旋的那些,以及形成三螺旋的核酸。参见,例如,美国专利号5,176,996和5,422,251。蛋白质包括但不限于DNA结合蛋白、转录因子、染色质重构因子、甲基化的DNA结合蛋白、聚合酶、甲基化酶、脱甲基酶、乙酰基酯酶、脱乙酰酶、激酶、磷酸酶、整合酶、重组酶、连接酶、拓扑异构酶、促旋酶和解螺旋酶。

[0135] 外源分子可以是与内源分子类型相同的分子,例如,外源蛋白质或核酸。例如,外源核酸可以包含引入细胞中的感染性病毒基因组、质粒或附加体,或正常地在细胞中不存在的染色体。将外源分子引入细胞中的方法是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于脂质介导的转移(即,脂质体,包括中性和阳离子型脂质)、电穿孔、直接注射、细胞融合、粒子轰击、磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转移和病毒载体介导的转移。外源分子还可以是与内源分子类型相同,但衍生自与细胞来源不同物种的分子。例如,可将人类核酸序列引入最初衍生自小鼠或仓鼠的细胞系中。

[0136] 相比之下,“内源”分子是在特定发育阶段在特定环境条件下在特定细胞中正常存在的分子。例如,内源核酸可以包含染色体、线粒体、叶绿体或其他细胞器的基因组、或天然存在的游离型核酸。其他内源分子可以包括蛋白质,例如转录因子和酶。

[0137] “融合”分子是其中两个或更多个亚基分子被连接(优选地共价连接)的分子。亚基分子可以是相同化学类型的分子,或者可以是不同化学类型的分子。融合分子的例子包括但不限于融合蛋白(例如,蛋白质DNA结合结构域与裂解结构域之间的融合)、与裂解结构域可操作地缔合的多核苷酸DNA结合结构域(例如,sgRNA)之间的融合和融合核酸(例如,编码融合蛋白的核酸)。

[0138] 细胞中融合蛋白的表达可以源自将融合蛋白递送至细胞或通过将编码融合蛋白

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

[0139] 出于本公开文本的目的,“基因”包括编码基因产物(参见下文)的DNA区域以及调控基因产物产生的所有DNA区域,无论此类调控序列是否与编码序列相邻和/或与转录序列相邻。因此,基因包括但不必限于启动子序列、终止子、翻译调节序列(如核糖体结合位点和内部核糖体进入位点)、增强子、沉默子、绝缘子、边界元件、复制起点、基质附着位点和基因座控制区域。

[0140] “基因表达”是指将基因中所含的信息转化为基因产物。基因产物可以是基因的直接转录产物(例如,mRNA、tRNA、rRNA、反义RNA、核酶、结构RNA或任何其他类型的RNA)或通过mRNA翻译产生的蛋白质。基因产物还包括通过如加帽、聚腺苷酸化、甲基化和编辑等方法修饰的RNA,以及通过例如甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、ADP核糖基化、肉豆蔻酸化(myristylation)和糖基化修饰的蛋白质。

[0141] 对基因表达的“调节”是指基因活性的变化。对表达的调节可以包括但不限于基因激活和基因阻遏。基因组编辑(例如,裂解、改变、失活、随机突变)可以用于调节表达。基因失活是指如与不包括如本文所述的ZFP或TALEN的细胞相比,基因表达的任何减少。因此,基因失活可以是部分失活或完全失活。

[0142] “目的区域”是细胞染色质的任何区域,例如基因或者基因内或与基因相邻的非编码序列,其中可期望所述区域结合外源分子。结合可以用于靶向DNA裂解和/或靶向重组的目的。例如,目的区域可以存在于染色体、附加体、细胞器基因组(例如,线粒体、叶绿体)或感染性病毒基因组中。目的区域可以位于基因的编码区内,位于经转录非编码区内(例如前导序列、尾随序列或内含子),或位于在编码区上游或下游的非转录区内。目的区域的长度可以小至单一核苷酸对或多达2,000个核苷酸对,或任何整数值的核苷酸对。

[0143] “真核”细胞包括但不限于真菌细胞(如酵母)、植物细胞、动物细胞、哺乳动物细胞和人类细胞(例如,T细胞)。

[0144] “红血细胞”(RBC)或红细胞是衍生自造血干细胞的终末分化细胞。他们缺乏核酸酶和大多数细胞器。RBC含有血红蛋白以将氧气从肺部运送至周围组织。实际上,单个RBC中有33%是血红蛋白。它们还将新陈代谢期间由细胞产生的CO₂携带出组织,并返回到肺部以在呼气期间释放。在骨髓中响应于血液性缺氧产生RBC,其通过由肾脏释放促红细胞生成素(EPO)来介导。EPO造成原成红细胞数目的增加并缩短完全RBC成熟所需的时间。在大约120天之后,由于RBC不含有细胞核或任何其他再生能力,因此通过肝脏、脾脏和淋巴结中巨噬细胞的吞噬活性(约90%)或通过血浆中的溶血(约10%)从循环中去除细胞。在巨噬细胞吞没后,由于溶酶体酶的作用,RBC的化学组分在巨噬细胞的液泡内分解。

[0145] “分泌组织”是动物中从个体细胞中分泌产物进入典型地衍生自上皮的一些类型的内腔中的那些组织。定位于胃肠道的分泌组织的例子包括肠、胰腺和胆囊的内衬细胞。其他分泌组织包括肝脏、与眼睛和粘膜相关的组织如唾液腺、乳腺、前列腺、垂体腺和内分泌系统的其他成员。另外,分泌组织包括能够分泌的组织类型的个体细胞。

[0146] 关于两个或更多个组分(如序列元件)的并列,术语“操作性连接”和“操作性地连接”(或“可操作连接”)可互换使用,其中所述组分经排列使得两个组分正常发挥功能并允

许以下可能性：至少一个所述组分可以介导对至少一个其他组分发挥的功能。通过说明，如果转录调节序列响应一种或多种转录调节因子的存在或不存在控制编码序列的转录水平，那么转录调节序列(如启动子)与编码序列操作性连接。转录调节序列通常与编码序列顺式操作性连接，但无需与其直接相邻。例如，增强子是与编码序列操作性连接的转录调节序列，即使其不邻接。

[0147] 关于功能多肽，术语“操作性连接”可以指以下事实：每个组分在与另一组分连接时发挥的功能与其没有如此连接时发挥的功能相同。例如，关于其中ZFP或TALE DNA结合结构域与激活结构域融合的融合多肽，如果在功能多肽中，ZFP或TALE DNA结合结构域部分能结合其靶位点和/或其结合位点，同时激活结构域能上调基因表达，那么ZFP或TALE DNA结合结构域和激活结构域呈操作性连接。在融合多肽中的ZFP或TALE DNA结合结构域与裂解结构域融合时，如果在融合多肽中，ZFP或TALE DNA结合结构域部分能够结合其靶位点和/或其结合位点，而裂解结构域能够裂解靶位点附近的DNA，那么ZFP或TALE DNA结合结构域和裂解结构域呈操作性连接。

[0148] “功能性”蛋白质、多肽或核酸包括提供与野生型蛋白质、多肽或核酸相同功能的任何蛋白质、多肽或核酸。蛋白质、多肽或核酸的“功能性片段”是蛋白质、多肽或核酸，其序列与全长蛋白质、多肽或核酸不同，但保留与全长蛋白质、多肽或核酸相同的功能。功能性片段可以具有与相应的天然分子相比较多、较少或相同的残基数，和/或可以含有一个或多个氨基酸或核苷酸取代。确定核酸功能(例如，编码功能、与另一核酸杂交的能力)的方法是本领域所熟知的。类似地，确定蛋白质功能的方法是熟知的。例如，多肽的DNA结合功能可以例如通过滤膜结合、电泳迁移率变动或免疫沉淀测定来确定。DNA裂解可以通过凝胶电泳来测定。参见Ausubel等人，同上。蛋白质与另一蛋白质相互作用的能力可以例如通过免疫共沉淀、双杂交测定或互补(遗传和生物化学二者)来确定。参见例如Fields等人(1989) Nature 340:245-246;美国专利号5,585,245和国际专利公开号WO 98/44350。

[0149] “载体”能将基因序列转移至靶细胞。典型地，“载体构建体”、“表达载体”和“基因转移载体”意指能引导目的基因表达并且可以将基因序列转移至靶细胞的任何核酸构建体。因此，所述术语包括克隆和表达媒介物，以及整合载体。

[0150] “报告基因”或“报告序列”是指产生蛋白质产物的任何序列，所述蛋白质产物在常规测定中优选地但不一定易于测量。适合报告基因包括但不限于编码介导抗生素抗性(例如，氨苄西林抗性、新霉素抗性、G418抗性、嘌呤霉素抗性)的蛋白质的序列、编码有色或荧光或发光蛋白(例如，绿色荧光蛋白、增强绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、萤光素酶)和介导增强的细胞生长和/或基因扩增的蛋白质(例如，二氢叶酸还原酶)的序列。表位标签包括例如一个或多个拷贝的FLAG、His、myc、Tap、HA或任何可检测的氨基酸序列。“表达标签”包括编码报告物的序列，其可与所需基因序列可操作连接以监测目的基因的表达。

[0151] 围绕并结合某些类型细胞的细胞外基质由多个组分构成，所述多个组分包括纤维结构蛋白(如各种胶原蛋白)、粘附蛋白(如层粘连蛋白和纤连蛋白)以及蛋白聚糖，所述蛋白聚糖形成嵌入了纤维结构蛋白的凝胶。蛋白聚糖是非常大的大分子，其由核心蛋白组成，许多称为糖胺聚糖的长多糖链与所述核心蛋白共价结合。由于糖胺聚糖的高负电荷，蛋白聚糖是非常高度水合的，这种特性允许蛋白聚糖形成可以膨胀和收缩的凝胶状基质。蛋白聚糖也是有效的润滑剂。“糖胺聚糖”或“GAG”是由重复二糖单元组成的非支链多糖的长的

线性聚合物。重复单元(除角质素外)由氨基己糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)以及酸性糖醛糖(葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸)或半乳糖组成。该一般结构的例外是硫酸角质素,其具有替代酸性己糖的半乳糖。糖胺聚糖是高度极性的且吸引水。除透明质酸外,所有GAG与大约30种不同的核心蛋白之一共价连接以形成蛋白聚糖。核心蛋白在粗糙型内质网上合成并且转移至高尔基体,其中通过糖基转移酶将核苷二磷酸活化的酸性糖和氨基糖交替地添加至产生的多糖的非还原端,从而形成对于GAG常见的特征性重复二糖结构。硫酸肝素/硫酸乙酰肝素(HS GAG)和硫酸软骨素/硫酸皮肤素(CS GAG)在高尔基体中合成,其中在粗糙型内质网中制备的蛋白核心通过糖基转移酶用O-连接的糖基化进行翻译后修饰,从而形成蛋白聚糖。硫酸角质素可以通过蛋白聚糖的N-连接的糖基化或O-连接的糖基化来修饰核心蛋白。GAG的第四类透明质酸不是由高尔基体合成的,而是由立即分泌动态拉长的二糖链的整合膜合酶合成的。在细胞外基质正常更新期间蛋白聚糖的降解开始于细胞外基质中蛋白酶对核心蛋白的蛋白水解裂解,所述核心蛋白然后通过内吞作用进入细胞。内体将其内含物递送至溶酶体,在溶酶体中,蛋白水解酶完成了对核心蛋白的降解,并且一系列糖苷酶和硫酸酯酶将GAG水解为单糖。溶酶体含有将长聚合物水解为较短寡糖的内切糖苷酶和从GAG片段中裂解单独酸性糖或氨基糖的外切糖苷酶。GAG的溶酶体分解代谢从非还原端以逐步方式进行(参见图1)。如果末端糖被硫酸化,则在去除糖之前必须通过特定的硫酸酯酶水解硫酸酯键。当已经去除硫酸酯时,特定的外切糖苷酶随后将寡糖非还原端的末端糖水解,从而使所述寡糖缩短一个糖。以这种逐步方式继续降解,所述降解在通过硫酸酯酶去除硫酸酯与通过外切糖苷酶裂解末端糖之间交替进行。如果去除硫酸酯留下末端的葡萄糖胺残基,则必须首先将其乙酰化为N-乙酰基葡萄糖胺,因为溶酶体缺乏去除葡萄糖胺所需的酶。这是通过使用乙酰-CoA作为乙酰基供体的乙酰转移酶完成的。当葡萄糖胺残基已被N-乙酰化时,它可以被 α -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶水解,从而允许继续GAG的逐步降解。硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的末端糖被硫酸化,从而通过IDS酶(艾杜糖醛酸硫酸酯酶)去除。下一步是去除末端糖,这是由IDUA酶催化的。在患有MPS I的受试者中,缺陷的IDUA酶不能去除末端糖,从而导致乙酰肝素和皮肤素的积聚。

[0152] 术语“受试者”或“患者”可互换使用,并且是指哺乳动物如人类受试者和非人类灵长类动物,以及实验动物如兔子、狗、猫、大鼠、小鼠和其他动物。因此,如本文所用的术语“受试者”或“患者”意指可以施用本发明的改变的细胞和/或由本发明的改变的细胞产生的蛋白质的任何哺乳动物受试者。本发明的受试者包括患有MPS I障碍的受试者。

[0153] 一般来讲,受试者对于MPS I的治疗是合格的。就本文目的而言,此类合格受试者是这样的受试者,所述受试者正在经历、已经历或可能要经历MPS I的一种或多种体征、症状或其他适应症;已被诊断患有MPS I(不论是否例如新近诊断)和/或有发展MPS I的风险。患有MPS I或有患有MPS I风险的受试者可以任选地鉴定为已针对组织和/或尿液中GAG的升高水平进行筛选的受试者。

[0154] 如本文所用,“治疗”(“treatment”或“treating”)是用于获得有益或所需结果(包括临床结果)的方法。出于本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于以下中的一种或多种:减少由疾病引起的一种或多种症状、减小疾病的程度、稳定疾病(例如,预防或延迟疾病的恶化)、延迟或减缓疾病的进展、改善疾病状态、减少治疗疾病所需的一种或多种其他药物的剂量和/或提高生活质量。

[0155] 如本文所用,“延迟”或“减缓”MPS I的进展意指预防、延期、阻碍、减缓、延缓、稳定和/或推迟疾病的发展。此延迟可以具有不同的时间长度,这取决于疾病的历史和/或被治疗的个体。

[0156] 如本文所用,“在开始治疗时”是指第一次暴露于MPS I治疗性组合物如本发明的组合物时或之前的时间段。在一些实施方案中,“在开始治疗时”是在MPS I药物之前约一年、九个月、六个月、三个月、第二个月或一个月中的任一个时间。在一些实施方案中,“在开始治疗时”是紧接在与第一次暴露于MPS I治疗性组合物之前或与第一次暴露于MPS I治疗性组合物同时。

[0157] 术语“轮椅依赖性”意指因受伤或疾病而不能行走并且必须依靠轮椅来走动的受试者。

[0158] 术语“机械呼吸机”描述了改善受试者的肺与大气之间的空气交换的设备。

[0159] 如本文所用,“基于”包括(1)评估、确定或测量如本文所述的受试者特征(并且优选地选择适合接受治疗的受试者;和(2)施用如本文所述的一种或多种治疗。

[0160] MPS I的“症状”是受试者经历并指示MPS I的任何现象,或结构、功能或感觉相对于正常的偏离。

[0161] 受试者中的“重度MPS I”的特征在于在18个月至3岁之间的语言迟缓和发育迟缓。所述疾病在重度MPS I受试者中的特征在于器官肿大、活动过度和攻击性、神经系统恶化、关节僵硬和骨骼畸形(包括异常的脊椎骨)、面部特征粗大伴有舌头增大、心脏瓣膜增厚、听力损失和疝气。

[0162] 受试者中的“减毒形式MPS I”典型地晚于重度受试者诊断出。躯体临床特征与重度受试者相似,但总体疾病严重程度处于较轻度,通常具有缓慢的疾病进展,不伴有或仅伴有轻度认知损害。未经治疗的减毒形式的死亡通常在20-30岁的年龄之间,死于心脏病和呼吸道疾病。

[0163] 术语“支持性手术”是指可以在受试者上进行以缓解可能与疾病相关的症状的手术程序。对于患有MPS I的受试者,此类支持性手术可能包括心脏瓣膜置换手术、扁桃体切除术和腺样体切除术、通气管放置、腹部疝修补、宫颈减压、腕管综合征的治疗、正中神经的手术减压、器械融合术(以稳定和加强脊柱)、关节镜检查、髋关节或膝关节置换以及下肢轴的矫正和气管造口术(参见Wraith等人(2008) Eur J Pediatr.167(3):267-277;和Scarpa等人(2011) Orphanet Journal of Rare Diseases,6:72)。

[0164] 如本文用于辅助疗法的术语“免疫抑制剂”是指起到抑制或掩蔽本文所治疗的哺乳动物的免疫系统作用的物质。所述免疫抑制剂包括抑制细胞因子产生、下调或抑制自身抗原表达或掩蔽MHC抗原的物质。此类药剂的例子包括2-氨基-6-芳基-5-取代嘧啶(参见美国专利4,665,077);非类固醇抗炎药(NSAID);更昔洛韦(ganciclovir)、他克莫司(tacrolimus)、糖皮质激素,如皮质醇或醛固酮,抗炎剂,如环氧合酶抑制剂、5-脂氧合酶抑制剂或白三烯受体拮抗剂;嘌呤拮抗剂,如硫唑嘌呤或吗替麦考酚酯(MMF);烷基化剂,如环磷酰胺;溴隐亭;达那唑;氨苯砜;戊二醛(其掩蔽MHC抗原,如美国专利号4,120,649中所述);MHC抗原和MHC片段的抗独特型抗体;环孢菌素A;类固醇,如皮质类固醇或糖皮质激素类似物,例如泼尼松、甲基泼尼松龙和地塞米松;二氢叶酸还原酶抑制剂,如甲氨蝶呤(口服或皮下);羟氯喹;柳氮磺吡啶;来氟米特;细胞因子或细胞因子受体拮抗

剂,包括抗干扰素- α 、- β 或- γ 抗体、抗肿瘤坏死因子- α 抗体(英夫利昔单抗(infliximab)或阿达木单抗(adalimumab))、抗TNF- α 免疫粘附素(依那西普(etanercept))、抗肿瘤坏死因子- β 抗体、抗白介素-2抗体和抗IL-2受体抗体;抗LFA-1抗体,包括抗CD11a和抗CD18抗体;抗L3T4抗体;异源抗淋巴细胞球蛋白;泛T抗体,优选抗CD3或抗CD4/CD4a抗体;含有LFA-3结合结构域的可溶性肽(国际专利公开号W0 90/08187,7/26/90公开的);链激酶;TGF- β ;链道酶;来自宿主的RNA或DNA;FK506;RS-61443;脱氧精胍菌素;雷帕霉素;T细胞受体(Cohen等人,美国专利号5,114,721);T细胞受体片段(Offner等人(1991)Science 251:430-432;国际专利公开号W0 90/11294;Janeway(1989)Nature 341:482;和国际专利公开号W0 91/01133);T细胞受体抗体(EP 340,109)如T10B9。

[0165] “皮质类固醇”是指模拟或增大天然存在的皮质类固醇的作用、具有类固醇的一般化学结构的若干种合成或天然存在的物质中的任何一种。合成皮质类固醇的例子包括泼尼松、泼尼松龙(包括甲基泼尼松龙)、地塞米松、糖皮质激素和倍他米松。

[0166] “包装插页”用于指通常包括在治疗性产品的商业包装中的说明书,所述说明书包含关于使用此类治疗性产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症、待与包装产品组合的其他治疗性产品和/或警告等的信息。

[0167] 本文中使用的“标签”是指通常附随着药物配制品的商业包装(包括容器如小瓶和包装插页)以及其他类型的包装所包含的信息。标签也可以具有不同的颜色。

[0168] 应当理解,可以将本文所述的各个实施方案的一个、一些或所有特性进行组合以形成本发明的其他实施方案。本发明的这些和其他方面对于本领域技术人员将变得清楚。

核酸酶

[0169] 本文所述的方法可以利用一种或多种核酸酶来靶向引入IDUA转基因。核酸酶的非限制性例子包括可用于体内裂解携带转基因的供体分子的ZFN、TALEN、归巢核酸内切酶、CRISPR/Cas和/或Ttago指导RNA,和用于裂解细胞的基因组使得转基因以靶向方式整合至基因组中的核酸酶。在某些实施方案中,一种或多种核酸酶是天然存在的。在其他实施方案中,一种或多种核酸酶是非天然存在的,即在DNA结合分子(也称为DNA结合结构域)和/或裂解结构域中工程化。例如,可以改变天然存在的核酸酶的DNA结合结构域以结合至所选择的靶位点(例如,经工程化以结合至所选择的靶位点的ZFP、TALE和/或CRISPR/Cas的sgRNA)。在其他实施方案中,核酸酶包含异源DNA结合和裂解结构域(例如,锌指核酸酶;TAL效应子结构域DNA结合蛋白;具有异源裂解结构域的大范围核酸酶DNA结合结构域)。在其他实施方案中,核酸酶包含如CRISPR/Cas或Ttago系统的系统。

A. DNA结合结构域

[0170] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法采用大范围核酸酶(归巢核酸内切酶)DNA结合结构域,以用于结合至供体分子和/或结合至细胞基因组中的目的区域。天然存在的大范围核酸酶识别15-40个碱基对的裂解位点,并且通常分为四个家族:LAGLIDADG家族(“LAGLIDADG”,例如参见下文I-CreI的DNA序列(登录号X01977,x01977.1版)):

1 gatccttgat caggaccctt gacagtttca ggtgggcagt ttatttgggg cgaatgcctc
61 ctaaaaggta acggaggcgt gcaaaggttc cctcagtctg gacggaaatc agacattgag
121 tgtaaaggca aaagggagct tgactgcaag acctacaagt cgagcagggg cgaaagaggg
181 cttagtgatc cgacggtgcc gcgtggaagg gccgtcgcctc aacggataaa agttactccc
241 gggataacag gctgatcttc cccaagagtt cacatcgacg ggaaggtttg gcacctgat
301 gtcggctcat cacatcctcg gtctgtagta ggtccgaagg gttgggctgt tcgcccatta
361 aagtggtagc tgagctgggt tcaaaacgta aataaactg cgtgtgcttg cagtaatgta
421 agcaaagtat cggcttatat cggtgaaacc ttctattgt ttaagtaca aactgtcgca
481 taaaccacat tcgtgggcaa tagatggcaa cgccgagga agaccatttc ttttggttt
541 aataattcaa taaattaaat aaaacatctt atgaatacaa aatataataa agagttctta
601 ctctacttag cagggtttgt agacggtgac ggtagcataa tcgctcaaat taagccta
661 cagtcttata aatttaagca tcagctatca ctgcggttc aagtcacgca aaagacacag
721 agacgttggg ttttagacaa attagtgat gaaattgggg ttggttatgt aagagatagg
781 ggtagcgttt cggattatat tctaagcga atcaagcctt tgcataattt ttaacacaa
841 ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaa caagcaaatt tagttttaa aattatttgg
901 cggcttccgt cagcaaaaga atccccgac aaattcttag aagtttgtac atgggtggat
961 caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct
1021 gtgctagaca gtttaagtga aaaaaagaaa tcgtccccgt agagacttta taaatttagc
1081 caatctctaa aagaatgttt acatacaatt tatttattgt tgctcgattt ataggatatt
1141 ttctcgagag tgggaaagta taatagccg actcctgcca ttaacagtag caggatgaag
1201 acatagtcca tgcctttacg aaagtaaagg ggtagtttt aaagaccgca agttttatc
1261 ggctttaaaa tttcatgctg gagacagttt ggtccatctc cgggtgtaggc gtttagagcat
1321 tgagagtagc ctttcatagt acgagaggac ctgaaaggac atgccaattg tgtaccagtt
1381 ctcaattcaa tgggaaacgc tgggtagcta cgcatggata gataactgct gaaagcatct
1441 aagtaggaag ctaaactcaa gatgagtgct ctctaaggcc gcggctagac aagccgttat
1501 ataggtatca ggtgtacagt cagcaatggc tttagccgag atatactaaa ggccgtttga
1561 ttttgacctt tataatataa ttacataacc cttgcccggg aactatcgtt tatgagctaa
1621 gct

公开为SEQ ID NO:29)、GIY-YIG家族、His-Cyst盒家族和HNH家族。示例性归巢核酸内切酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII。上述示例性归巢核酸内切酶的识别序列是已知的。也参见美国专利号5,420,032;美国专利号6,833,252;Belfort等人(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388;Dujon等人(1989) *Gene* 82:115-118;Perler等人

(1994) *Nucleic Acids Res.* 22:1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble等人 (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast等人 (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 和 *New England Biolabs* 目录。

[0171] 在某些实施方案中,本文所述的方法和组合物利用核酸酶,所述核酸酶包含工程化的(非天然存在的)归巢核酸内切酶(大范围核酸酶)。归巢核酸内切酶和大范围核酸酶如 I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII 和 I-TevIII 的识别序列是已知的。也参见美国专利号 5,420,032; 美国专利号 6,833,252; Belfort 等人 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon 等人 (1989) *Gene* 82:115-118; Perler 等人 (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble 等人 (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast 等人 (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 和 *New England Biolabs* 目录。另外,可以对归巢核酸内切酶和大范围核酸酶的 DNA 结合特异性进行工程化以结合非天然靶位点。参见例如 Chevalier 等人 (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat 等人 (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth 等人 (2006) *Nature* 441:656-659; Paques 等人 (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; 美国专利公开号 2007/0117128。归巢核酸内切酶和大范围核酸酶的 DNA 结合结构域可以在作为整体的核酸酶的情境下改变(即,使得核酸酶包括同源裂解结构域)或可以与异源裂解结构域融合。

[0172] 在其他实施方案中,用于本文所述的方法和组合物中的一种或多种核酸酶的 DNA 结合结构域包含天然存在或工程化的(非天然存在的) TAL 效应子 DNA 结合结构域。参见例如美国专利号 8,586,526,将所述文献通过引用以其整体并入本文。已知黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 的植物病原性细菌会在重要的作物植物中引起许多种疾病。黄单胞菌属的致病性取决于保守的 III 型分泌 (T3S) 系统,其将超过 25 种不同的效应因子蛋白注入植物细胞中。在所注入的这些蛋白质中有转录激活因子样 (TAL) 效应子,其模拟植物转录激活因子并操纵植物转录组(参见 Kay 等人 (2007) *Science*, 318:648-651)。这些蛋白质含有 DNA 结合结构域和转录激活结构域。最充分表征的 TAL-效应子之一是来自野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*) 的 AvrBs3 (参见 Bonas 等人 (1989) *Mol Gen Genet* 218:127-136 和国际专利公开号 W0 2010/079430)。TAL-效应子含有串联重复序列的中心化结构域,每个重复序列含有约 34 个氨基酸,所述重复序列是这些蛋白质的 DNA 结合特异性的关键。另外,其含有核定位序列和酸性转录激活结构域(对于综述,参见 Schornack S 等人 (2006) *J Plant Physiol* 163 (3):256-272)。另外,在植物致病性细菌青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 中,已经发现在青枯雷尔氏菌生物变型 1 菌株 GMI1000 和生物变型 4 菌株 RS1000 中,指定为 brg11 和 hpx17 的两种基因与黄单胞菌属的 AvrBs3 家族是同源的(参见 Heuer 等人 (2007) *Appl and Envir Micro* 73 (13):4379-4384)。这些基因的核苷酸序列彼此 98.9% 相同,但不同之处在于 hpx17 的重复结构域中 1,575bp 的缺失。然而,两种基因产物与黄单胞菌属的 AvrBs3 家族蛋白具有小于 40% 序列同一性。参见例如美国专利号 8,586,526,将所述文献通过引用以其整体并入本文。

[0173] 这些 TAL 效应因子的特异性取决于在串联重复序列中发现的序列。重复序列包含约 102bp,并且所述重复序列典型地彼此 91% - 100% 同源 (Bonas 等人,同上)。重复序列的多态性通常位于位置 12 和 13 处,并且在位置 12 和 13 的高变双残基 (RVD) 的身份与 TAL 效应子的

靶序列中连续核苷酸的身份之间显现存在一一对应关系(参见Moscou和Bogdanove (2009) *Science* 326:1501,以及Boch等人(2009) *Science*,326:1509-1512)。在实验中,已经确定这些TAL效应子的DNA识别天然代码,使得位置12和13的HD序列导致结合至胞嘧啶(C),NG结合至T,NI结合至A、C、G或T,NN结合至A或G,并且ING结合至T。这些DNA结合重复序列已经与新组合和数目的重复序列装配为蛋白质,以制造能与新序列相互作用的人工转录因子,并激活非内源报告基因在植物细胞中的表达(Boch等人,同上)。已将工程化TAL蛋白与FokI裂解半结构域连接以产生TAL效应子结构域核酸酶融合物(TALEN),从而在酵母报告物测定(基于质粒的靶标)中展现出活性。参见例如美国专利号8,586,526;Christian等人(2010) *Genetics* epub 10.1534/genetics.110.120717)。

[0174] 在某些实施方案中,用于细胞基因组的体内裂解和/或靶向裂解的一种或多种核酸酶的DNA结合结构域包含锌指蛋白。优选地,锌指蛋白是非天然存在的,其被工程化为结合所选的靶位点。参见例如,参见例如Beerli等人(2002) *Nature Biotechnol.*20:135-141; Pabo等人(2001) *Ann. Rev. Biochem.*70:313-340; Isalan等人(2001) *Nature Biotechnol.*19:656-660; Segal等人(2001) *Curr. Opin. Biotechnol.*12:632-637; Choo等人(2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.*10:411-416; 美国专利号6,453,242;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,030,215;6,794,136;7,067,317;7,262,054;7,070,934;7,361,635;7,253,273;和美国专利公开2005/0064474;2007/0218528;和2005/0267061,全部通过引用以其整体并入本文。

[0175] 与天然存在的锌指蛋白相比,工程化的锌指结合结构域可以具有新颖的结合特异性。工程化方法包括但不限于合理设计和各种类型的选择。合理设计包括例如使用数据库,所述数据库包含三联体(或四联体)核苷酸序列和个别锌指氨基酸序列,其中每个三联体或四联体核苷酸序列与结合特定三联体或四联体序列的锌指的一个或多个氨基酸序列缔合。参见例如共同拥有的美国专利号6,453,242和6,534,261,将所述文献通过引用以其整体并入本文。

[0176] 示例性选择方法(包括噬菌体展示和双杂交系统)披露于美国专利号5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,410,248;6,140,466;6,200,759;和6,242,568;以及国际专利公开号WO 98/37186;WO 98/53057;WO 00/27878;和WO 01/88197中。另外,例如在共同拥有的国际专利公开号WO 02/077227中已经描述了对锌指结合结构域的结合特异性的增强。

[0177] 另外,如这些和其他参考文献中所披露,锌指结构域和/或多指锌指蛋白可使用任何合适的接头序列(包括例如,长度为5个或更多个氨基酸的接头)连接在一起。对于示例性接头序列,还参见美国专利号8,772,453;6,479,626;6,903,185;和7,153,949。本文所述的蛋白质可以包括在蛋白质的单独锌指之间的合适接头的任何组合。

[0178] 靶位点的选择;用于设计和构建融合蛋白(和编码所述融合蛋白的多核苷酸)的ZFP和方法是本领域技术人员已知的并且详细描述于以下文献中:美国专利号6,140,081;5,789,538;6,453,242;6,534,261;5,925,523;6,007,988;6,013,453;和6,200,759;和国际专利公开号WO 95/19431;WO 96/06166;WO 98/53057;WO 98/54311;WO 00/27878;WO 01/60970;WO 01/88197;WO 02/099084;WO 98/53058;WO 98/53059;WO 98/53060;WO 02/016536;和WO 03/016496。

[0179] 另外,如这些和其他参考文献中所披露,锌指结构域和/或多指锌指蛋白可使用任何合适的接头序列(包括例如,长度为5个或更多个氨基酸的接头)连接在一起。对于长度为6个或更多个氨基酸的示例性接头序列,还参见美国专利号6,479,626;6,903,185;和7,153,949。本文所述的蛋白质可以包括在蛋白质的单独锌指之间的合适接头的任何组合。

[0180] 在某些实施方案中,核酸酶的DNA结合结构域是CRISPR/Cas核酸酶系统的一部分,所述部分包括例如单一指导RNA (sgRNA)。参见例如美国专利号8,697,359和美国专利公开号2015/0056705。编码系统的RNA组分的CRISPR(规律间隔成簇短回文重复序列)基因座和编码蛋白质的Cas(CRISPR相关)基因座(Jansen等人(2002) *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575; Makarova等人(2002) *Nucleic Acids Res.* 30:482-496; Makarova等人(2006) *Biol. Direct* 1:7; Haft等人(2005) *PLoS Comput. Biol.* 1:e60)组成CRISPR/Cas核酸酶系统的基因序列。微生物宿主中的CRISPR基因座含有CRISPR相关(Cas)基因以及能将CRISPR介导的核酸裂解的特异性程序化的非编码RNA元件的组合。

[0181] II型CRISPR是最充分表征的系统之一,并在四个连续步骤中进行靶向DNA双链断裂。第一步,从CRISPR基因座转录两个非编码RNA:前体crRNA阵列和tracrRNA。第二步, tracrRNA杂交到前crRNA的重复区上,并且介导将前体crRNA加工成包含单独的间隔子序列的成熟crRNA。第三步,成熟的crRNA:tracrRNA复合物通过crRNA上的间隔子与靶DNA上的原型间隔子之间的Watson-Crick碱基配对将Cas9引导至靶DNA,靶DNA靠近原型间隔子邻近基序(PAM)是靶标识别的附加要求。最后,Cas9介导靶DNA的裂解以在原型间隔子内产生双链断裂。CRISPR/Cas系统的活性包括三个步骤:(i)在称为“适应”的过程中将外来DNA序列插入CRISPR阵列中以防止后来的攻击,(ii)表达相关蛋白质,以及表达并加工所述阵列,之后(iii)RNA介导干扰外来核酸。因此,在细菌细胞中,若干种所谓的“Cas”蛋白与CRISPR/Cas系统的天然功能有关,并在诸如插入外源DNA等功能中发挥作用。

[0182] 在一些实施方案中,使用CRISPR-Cpf1系统。在弗朗西斯氏菌属物种(*Francisella* spp)中鉴定的CRISPR-Cpf1系统是一种2类CRISPR-Cas系统,可在人细胞中介导稳健的DNA干扰。尽管Cpf1和Cas9在功能上是保守的,但它们在许多方面(包括Cpf1和Cas9的指导RNA和底物特异性)都存在差异(参见Fagerlund,等人(2015) *Genom Bio* 16:251)。Cas9与Cpf1蛋白之间的主要区别是Cpf1不利用tracrRNA,并且因此仅需要crRNA。FnCpf1 crRNA的长度为42-44个核苷酸(19-核苷酸重复序列和23-25-核苷酸间隔子),并且包含单个茎-环,可以耐受保留二级结构的序列变化。此外,Cpf1 crRNA明显短于Cas9所需的约100个核苷酸的工程化sgRNA,并且对于FnCpf1的PAM要求是在置换链上的5'-TTN-3'和5'-CTA-3'。尽管Cas9和Cpf1都在靶DNA中产生双链断裂,但是Cas9使用其RuvC和HNH样结构域以在指导RNA的种子序列内进行平末端切割,而Cpf1使用RuvC样结构域以在种子序列外产生交错切割。由于Cpf1远离关键种子区域进行交错切割,因此NHEJ不会破坏靶位点,因此确保Cpf1可以继续切割同一位点,直到发生所需的HDR重组事件为止。因此,在本文所述的方法和组合中,应理解术语“Cas”包括Cas9和Cfp1蛋白两者。因此,如本文所用,“CRISPR/Cas系统”是指CRISPR/Cas和/或CRISPR/Cfp1系统两者,包括核酸酶、切口酶和/或转录因子系统。

[0183] 在一些实施方案中,可以使用其他Cas蛋白。一些示例性Cas蛋白包括Cas9、Cpf1(也称为Cas12a)、C2c1、C2c2(也称为Cas13a)、C2c3、Cas1、Cas2、Cas4、CasX和CasY;并包括其工程化和天然变体(Burstein等人(2017) *Nature* 542:237-241),例如HF1/spCas9

(Kleinstiver等人(2016) *Nature* 529:490-495; Cebrian-Serrano和Davies(2017) *Mamm Genome* 28(7):247-261); 分割型Cas9系统(Zetsche等人(2015) *Nat Biotechnol* 33(2):139-142); 基于内含肽-外显肽系统的反式剪接Cas9(Troung等人(2015) *Nucl Acid Res* 43(13):6450-8); 微型SaCas9(Ma等人(2018) *ACS Synth Biol* 7(4):978-985)。因此,在本文所述的方法和组合物中,应理解术语“Cas”包括所有天然和工程化的Cas变体蛋白。

[0184] 在某些实施方案中,Cas蛋白可以是天然存在的Cas蛋白的“功能衍生物”。天然序列多肽的“功能衍生物”是具有与天然序列多肽共同的定性生物特性的化合物。“功能衍生物”包括但不限于天然序列的片段和天然序列多肽和其片段的衍生物,前提是其具有与相应的天然序列多肽共同的生物活性。本文考虑的生物活性是功能衍生物将DNA底物水解成片段的能力。术语“衍生物”涵盖多肽的氨基酸序列变体、共价修饰物和其融合物。Cas多肽或其片段的合适衍生物包括但不限于Cas蛋白或其片段的突变体、融合物、共价修饰物。Cas蛋白包括Cas蛋白或其片段、以及Cas蛋白或其片段的衍生物,所述Cas蛋白可以从细胞获得或以化学方式合成或通过这两种程序的组合获得。细胞可以是天然产生Cas蛋白的细胞,或天然产生Cas蛋白并且经基因工程改造以产生更高表达水平的内源Cas蛋白或从外源引入的核酸(所述核酸编码与内源Cas相同或不同的Cas)产生Cas蛋白的细胞。在一些情况下,细胞不会天然产生Cas蛋白,而是经基因工程化以产生Cas蛋白。除了和/或代替Cas蛋白可以使用的RNA指导的核酸酶的其他非限制性例子包括2类CRISPR蛋白,如Cpf1。参见例如Zetsche等人(2015) *Cell* 163:1-13。

[0185] 在一些实施方案中,DNA结合结构域是TtAgo系统的一部分(参见Swartz等人(2014) *Nature* 507(7491):258-261; Swartz等人(2012) *PLoS One* 7(4):e35888; Sheng等人(2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(2):652-657)。在真核生物中,基因沉默是由蛋白质的Argonaute(Ago)家族介导的。在这个范例中,Ago与小(19-31nt)RNA结合。此蛋白质-RNA沉默复合物通过所述小RNA与靶标之间的Watson-Crick碱基配对来识别靶RNA,并且以核酸内切方式裂解靶RNA(Vogel(2014) *Science* 344:972-973)。相比之下,原核Ago蛋白结合至小的单链DNA片段结合,并可能用于检测和去除外来(常常为病毒)DNA(Yuan等人(2005) *Mol. Cell* 19:405; Olovnikov等人(2013) *Mol. Cell* 51:594; Swartz等人,同上)。示例性的原核Ago蛋白包括来自风产液菌(*Aquifex aeolicus*)、类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、和嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的那些。

[0186] 最充分表征的原核Ago蛋白之一是来自嗜热栖热菌(*T. thermophilus*)的蛋白(TtAgo; Swartz等人,同上)。TtAgo与具有5'磷酸基团的15nt或13-25nt单链DNA片段缔合。TtAgo结合的这种“指导DNA”用于引导蛋白质-DNA复合物结合第三方DNA分子中的Watson-Crick互补DNA序列。一旦这些指导DNA中的序列信息允许鉴定靶DNA,TtAgo-指导DNA复合物就会裂解靶DNA。TtAgo-指导DNA复合物与其靶DNA结合时的结构也支持这种机制(G. Sheng等人,同上)。来自类球红细菌(RsAgo)的Ago具有相似的特性(Olovnikov等人,同上)。

[0187] 可以将任意DNA序列的外源指导DNA加载到TtAgo蛋白上(Swartz等人,同上)。由于TtAgo裂解的特异性是由指导DNA引导的,因此,由外源的由研究者指定的指导DNA形成的TtAgo-DNA复合物将TtAgo靶DNA裂解引导至互补的由研究者指定的靶DNA。以此方式,可以在DNA中产生靶向双链断裂。使用TtAgo-指导DNA系统(或来自其他生物的直系同源Ago-指导DNA系统)允许在细胞内靶向裂解基因组DNA。这种裂解可以是单链或双链的。为了裂解哺

乳动物基因组DNA,优选使用为在哺乳动物细胞中表达而优化的TtAgo密码子形式。另外,可能优选的是用体外形成的TtAgo-DNA复合物处理细胞,其中TtAgo蛋白与细胞穿透肽融合。另外,可能优选的是使用已经通过诱变改变以在37摄氏度下具有改善活性的TtAgo蛋白形式。使用本领域中利用DNA断裂的标准技术,可以使用TtAgo-RNA介导的DNA裂解来实现一系列结局(包括基因敲除、靶向基因添加、基因校正、靶向基因缺失)。

[0188] 因此,核酸酶包含特异性结合至任何基因中的靶位点的DNA结合结构域,期望将供体(转基因)插入所述靶位点中。

[0189] 在某些实施方案中,DNA结合结构域结合至白蛋白,例如指定为SBS-47171和SBS-47898的ZFP的DNA结合结构域。参见例如美国专利公开号2015/0159172。

B. 裂解结构域

[0190] 可以将任何合适的裂解结构域与DNA结合结构域缔合(例如,可操作地连接)以形成核酸酶。例如,已将ZFP DNA结合结构域与核酸酶结构域融合形成ZFN-功能性实体,所述功能性实体能够通过其工程化(ZFP)DNA结合结构域识别其预期核酸靶标,并导致DNA通过核酸酶活性在ZFP结合位点附近被切割。参见例如Kim等人(1996)Proc Natl Acad Sci USA 93(3):1156-1160。最近,已将ZFN用于多种生物体的基因组修饰。参见例如美国专利公开号2003/0232410;2005/0208489;2005/0026157;2005/0064474;2006/0188987;2006/0063231;和国际公开WO 07/014275。同样,已将TALE DNA结合结构域与核酸酶结构域融合以产生TALEN。参见例如美国专利号8,586,526。也已经描述了包含单一指导RNA(sgRNA)的CRISPR/Cas核酸酶系统,所述单一指导RNA结合至DNA并与裂解结构域(例如,Cas结构域)缔合以诱导靶向的裂解。参见例如美国专利号8,697,359和8,932,814以及美国专利公开号2015/0056705。

[0191] 如上所指出,裂解结构域可以与DNA结合结构域是异源的,例如锌指DNA结合结构域和来自核酸酶的裂解结构域或TALEN DNA结合结构域和来自核酸酶的裂解结构域;sgRNA DNA结合结构域和来自核酸酶的裂解结构域(CRISPR/Cas);和/或大范围核酸酶DNA结合结构域和来自不同核酸酶的裂解结构域。异源裂解结构域可以从任何核酸内切酶或核酸外切酶获得。可以衍生裂解结构域的示例性核酸内切酶包括但不限于限制性核酸内切酶和归巢核酸内切酶。参见,例如,2002-2003目录,New England Biolabs,Beverly,MA;和Belfort等人(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388。切割DNA的其他酶是已知的(例如S1核酸酶;绿豆核酸酶;胰腺DNase I;微球菌核酸酶;酵母HO核酸内切酶;还参见Linn等人(编辑)Nucleases,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1993)。这些酶(或其功能片段)中的一种或多种可以用作裂解结构域和裂解半结构域的来源。

[0192] 类似地,裂解半结构域可以衍生自如上所述的需要二聚化以实现裂解活性的任何核酸酶或其部分。通常,如果融合蛋白包含裂解半结构域,那么裂解需要两个融合蛋白。可替代地,可以使用包含两个裂解半结构域的单一直蛋白。两个裂解半结构域可以衍生自相同核酸内切酶(或其功能性片段),或者每个裂解半结构域可以衍生自不同核酸内切酶(或其功能性片段)。另外,两个融合蛋白的靶位点优选地关于彼此来布置,使得两个融合蛋白与其各自的靶位点的结合将裂解半结构域置于针对彼此的空间定向中,此允许裂解半结构域例如通过二聚化形成功能性裂解结构域。因此,在某些实施方案中,靶位点的近边缘被5-8个核苷酸或15-18个核苷酸隔开。然而,任何整数个核苷酸或核苷酸对(例如2至50个核苷

酸对或更多)都可以插入两个靶位点之间。通常,裂解位点位于靶位点之间。

[0193] 限制性核酸内切酶(限制酶)存在于许多物种中,并且能够与DNA(在识别位点)进行序列特异性结合,并能够在结合位点或结合位点附近裂解DNA。某些限制酶(例如,IIS型)在远离识别位点的位点处裂解DNA,并且具有可分离的结合结构域和裂解结构域。例如,IIS型FokI酶催化DNA的双链裂解,在一条链上距其识别位点9个核苷酸处,并且在另一条链上距其识别位点13个核苷酸处进行裂解。参见例如美国专利号5,356,802;5,436,150;和5,487,994;以及Li等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4275-4279;Li等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2764-2768;Kim等人(1994a)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:883-887;Kim等人(1994b)J.Biol.Chem.269:31,978-31,982。因此,在一个实施方案中,融合蛋白包含来自至少一种IIS型限制酶的裂解结构域(或裂解半结构域)和一个或多个锌指结合结构域(其可以工程化或可以不经工程化)。

[0194] 其裂解结构域可与结合结构域分离的示例性IIS型限制酶是FokI。这种特定的酶作为二聚体具有活性。Bitinaite等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:10,570-10,575。因此,出于本公开文本的目的,在公开的融合蛋白中使用的FokI酶的部分被认为是裂解半结构域。因此,对于使用锌指-FokI融合物的靶向双链裂解和/或靶向替代细胞序列,可以使用各自包含FokI裂解半结构域的两融合蛋白来重构有催化活性的裂解结构域。可替代地,也可以使用包含锌指结合结构域和两个FokI裂解半结构域的单多肽分子。在本公开文本的其他地方提供了使用锌指-FokI融合物进行靶向裂解和靶向序列改变的参数。

[0195] 裂解结构域或裂解半结构域可以是蛋白质的任一部分,其保留裂解活性,或者保留多聚化(例如,二聚化)以形成功能性裂解结构域的能力。

[0196] 示例性IIS型限制酶描述于美国专利7,888,121中,将所述文献以其整体并入本文。另外的限制酶也包含可分离的结合结构域和裂解结构域,并且本公开文本设想了这些。参见例如Roberts等人(2003)Nucleic Acids Res.31:418-420。

[0197] 在某些实施方案中,所述裂解结构域包含最小化或防止同二聚化的一个或多个工程化裂解半结构域(也称为二聚化结构域突变体),例如如在美国专利号8,772,453;8,623,618;8,409,861;8,034,598;7,914,796;和7,888,121中所述,将所有所述文献的披露内容通过引用以其整体并入本文。在FokI的位置446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537和538处的氨基酸残基都是影响FokI裂解半结构域二聚化的靶标。

[0198] 形成专性异二聚体的FokI的示例性工程化裂解半结构域包括一对,其中第一裂解半结构域包括在FokI的位置490和538的氨基酸残基处的突变,而第二裂解半结构域包括氨基酸残基486和499处的突变。

[0199] 因此,在一个实施方案中,第490位的突变用Lys(K)替代了Glu(E);538位的突变用Lys(K)替代Iso(I);486位的突变用Glu(E)替代Gln(Q);以及499位的突变用Lys(K)替代Iso(I)。具体地,本文所述的工程化裂解半结构域是通过以下方式制备的:在一个裂解半结构域中突变位置490(E→K)和538(I→K)以产生指定为“E490K:I538K”的工程化裂解半结构域,并且在另一个裂解半结构域中突变位置486(Q→E)和499(I→L)以产生指定为“Q486E:I499L”的工程化裂解半结构域。本文所述的工程化裂解半结构域是专性的异二聚体突变体,其中异常裂解被最小化或消除。美国专利号7,914,796和8,034,598,将所述文献的披露

内容通过引用以其整体并入本文。在某些实施方案中,工程化裂解半结构域包含在位置486、499和496处(相对于野生型FokI编号)的突变,例如用Glu(E)残基替代在位置486处的野生型Gln(Q)残基的突变,用Leu(L)残基替代在位置499处的野生型Iso(I)残基的突变,以及用Asp(D)或Glu(E)残基替代在位置496处的野生型Asn(N)残基的突变(也分别称为“ELD”和“ELE”结构域)。在其他实施方案中,工程化裂解半结构域包含在490、538和537位置处(相对于野生型FokI编号)的突变,例如用Lys(K)残基替代在位置490处的野生型Glu(E)残基的突变,用Lys(K)残基替代在位置538处的野生型Iso(I)残基的突变,以及用Lys(K)残基或Arg(R)残基替代在位置537处的野生型His(H)残基的突变(也分别称为“KKK”和“KKR”结构域)。在其他实施方案中,工程化裂解半结构域包含在位置490和537处(相对于野生型FokI编号)的突变,例如用Lys(K)残基替代在位置490处的野生型Glu(E)残基的突变,以及用Lys(K)残基或Arg(R)残基替代在位置537处的野生型His(H)残基的突变(也分别称为“KIK”和“KIR”结构域)。参见例如美国专利号8,772,453。在其他实施方案中,工程化裂解半结构域包含“Sharkey”和/或“Sharkey突变”(参见Guo等人(2010) *J.Mol.Biol.* 400(1):96-107)。

[0200] 可以使用任何合适的方法来制备本文所述的工程化裂解半结构域,例如,通过对野生型裂解半结构域(FokI)进行定点诱变,如美国专利号7,888,121;7,914,796;8,034,598;和8,623,618中所述的。

[0201] 可替代地,核酸酶可使用所谓的“分裂酶”技术在体内装配于核酸靶位点处(参见例如美国专利公开号2009/0068164)。此类分裂酶的组分可在单独的表达构建体上表达,或者可以连接于一个开放式阅读框中,其中单独组分例如由自裂解的2A肽或IRES序列隔开。组分可以是个别锌指结合结构域或大范围核酸酶核酸结合结构域的结构域。

[0202] 可在使用前例如在基于酵母的染色体系统中针对活性来筛选核酸酶,如美国专利号8,563,314中所述。核酸酶的表达可以在组成型启动子或诱导型启动子的控制下,所述启动子例如半乳糖激酶启动子,其在棉子糖和/或半乳糖的存在下被激活(去阻遏)并在葡萄糖存在下被阻遏。

[0203] Cas9相关CRISPR/Cas系统包含两个RNA非编码组分:tracrRNA和含有通过相同的直接重复序列(DR)间隔的核酸酶指导序列(间隔子)的前体crRNA阵列。为了使用CRISPR/Cas系统完成基因组工程化,这些RNA的两种功能都必须存在(参见Cong等人(2013) *Science* 338(6087):1023-1027)。在一些实施方案中,tracrRNA和前体crRNA通过单独的表达构建体或作为单独的RNA提供。在其他实施方案中,构建了嵌合RNA,其中将工程化的成熟crRNA(赋予靶标特异性)与tracrRNA(提供与Cas9的相互作用)融合以产生嵌合cr-RNA-tracrRNA杂合体(也称为单一指导RNA)。(参见Jinek等人(2013) *Elife* 2:e00471.doi:10.7554/eLife.00471.;Jinek等人(2012) *Science* 337:816-821和Cong,同上)。

[0204] 如本文所述的一种或多种核酸酶可以在靶位点中进行一个或多个双链和/或单链切割。在某些实施方案中,核酸酶包含催化无活性裂解结构域(例如,FokI和/或Cas蛋白)。参见例如美国专利号9,200,266;8,703,489以及Guillinger等人(2014) *Nature Biotech.* 32(6):577-582。催化无活性裂解结构域在与催化活性结构域组合时可以充当切口酶以进行单链切割。因此,可以组合使用两种切口酶以在特定区域中进行双链切割。在本领域还已知另外的切口酶,例如,McCaffery等人(2016) *Nucleic Acids Res.* 44(2):

e11.doi:10.1093/nar/gkv878.Epub 2015年10月19日。

[0205] 因此,可以使用包含DNA结合结构域和裂解结构域的任何核酸酶。在某些实施方案中,核酸酶包含由左和右ZFN组成的ZFN,例如包含第一ZFN和第二ZFN的ZFN,所述第一ZFN包含指定为SBS-47171的ZFP和裂解结构域,所述第二ZFN包含指定为SBS-47898的ZFP和裂解结构域。在某些实施方案中,ZFN的左和右(第一和第二)ZFN被携带在相同载体上,并且在其他实施方案中,ZFN的成对组分被携带在不同的载体,例如两个AAV载体上,所述两个AAV载体一个指定为如表1、SEQ ID NO:9中所示的SB-47171AAV(携带包含指定为SBS-47171的ZFP的ZFN的AAV2/6载体),并且另一个指定为如表2、SEQ ID NO:12中所示的SB-47898 AAV(携带包含指定为SBS-47898的ZFP的ZFN的AAV2/6载体)。

靶位点

[0206] 如上详细描述,可以对DNA结构域进行工程化以结合至基因座,例如白蛋白或其他安全港基因中的任何选择序列。与天然存在的DNA结合结构域相比,工程化DNA结合结构域可以具有新颖的结合特异性。工程化方法包括但不限于合理设计和各种类型的选择。合理设计包括例如使用数据库,所述数据库包含三联体(或四联体)核苷酸序列和单独(锌指)氨基酸序列,其中每个三联体或四联体核苷酸序列与结合特定三联体或四联体序列的DNA结合结构域的一个或多个氨基酸序列缔合。参见例如共同拥有的美国专利号6,453,242和6,534,261,将所述文献通过引用以其整体并入本文。还可以进行对TAL-效应子结构域的合理设计。参见例如美国专利公开号2011/0301073。

[0207] 适用于DNA结合结构域的示例性选择方法(包括噬菌体展示和双杂交系统)披露于美国专利号5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,410,248;6,140,466;6,200,759;和6,242,568;以及国际专利公开号WO 98/37186;WO 98/53057;WO 00/27878;和WO 01/88197和GB 2,338,237中。

[0208] 靶位点的选择;核酸酶以及用于设计和构建融合蛋白(和编码所述融合蛋白的多核苷酸)的方法是本领域技术人员已知的,并且详细描述于美国专利公开号2005/0064474和2006/0188987中,将所述文献通过引用以其整体并入本文。

[0209] 另外,如这些和其他参考文献中所披露,DNA结合结构域(例如,多指锌指蛋白)可使用任何合适的接头序列(包括例如,长度为5个或更多个氨基酸的接头)连接在一起。对于长度为6个或更多个氨基酸的示例性接头序列,参见例如美国专利号6,479,626;6,903,185;和7,153,949。本文所述的蛋白质可以包括在蛋白质的单独DNA结合结构域之间的合适接头的任何组合。还参见美国专利号8,586,526。

[0210] 在某些实施方案中,针对一个或多个DNA结合结构域的一个或多个靶位点在白蛋白基因内。参见例如美国专利公开号2015/0159172。

供体

[0211] 如上所指出,提供了对外源序列(也称为“供体序列”或“供体”)的插入,例如以校正突变基因或用于增加编码MPS I疾病中缺乏或缺陷的蛋白质(例如, IDUA)的基因的表达。容易清楚的是,供体序列典型地与其所置于的基因组序列不同。供体序列可以含有非同源序列,所述非同源序列的侧翼为两个同源区域以允许在目的位置处的高效HDR。另外,供体序列可以包含载体分子,所述载体分子包含与细胞染色质中的目的区域不同源的序列。供体分子可以含有若干个不连续的与细胞染色质同源的区域。例如,对于目的区域中通常不

存在的序列的靶向插入,所述序列可以存在于供体核酸分子中,并且侧翼为与目的区域中的序列同源的区域。

[0212] 本文描述了靶向插入编码IDUA蛋白的转基因以插入选定位置中的方法。用于插入的多核苷酸也可以称为“外源”多核苷酸、“供体”多核苷酸或分子或“转基因”。供体多核苷酸可以是单链和/或双链的DNA或RNA,并且可以以线性或环状形式引入细胞中。参见例如美国专利号8,703,489和9,005,973。一种或多种供体序列也可以包含在DNA MC中,所述DNA MC可以以环状或线性形式引入细胞中。参见例如美国专利公开号2014/0335063。如果以线性形式引入,则可以通过本领域技术人员已知的方法保护供体序列的末端(例如,防止核酸外切降解)。例如,将一个或多个双脱氧核苷酸残基添加至线性分子的3'末端和/或将自身互补的寡核苷酸连接至一个或两个末端。参见例如Chang等人(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:4959-4963;Nehls等人(1996) Science 272:886-889。保护外源多核苷酸免于降解的另外的方法包括但不限于一个或多个末端氨基的添加以及修饰的核苷酸间连接(例如硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、和O-甲基核糖或脱氧核糖残基)的使用。

[0213] 可以将多核苷酸作为载体分子的一部分引入细胞中,所述载体分子具有另外的序列,例如复制起点、启动子和编码抗生素抗性的基因。此外,可以将供体多核苷酸作为裸核酸,作为与如脂质体或泊洛沙姆的试剂复合的核酸引入,或可以通过病毒(例如腺病毒、AAV、疱疹病毒、逆转录病毒、慢病毒和整合酶缺陷型慢病毒(IDLV))递送。

[0214] 通常将供体插入,使得其表达由在整合位点处的内源启动子(即驱动其中插入供体的内源基因(例如,高度表达的白蛋白、AAVS1、HPRT等)的表达的启动子)驱动。然而,清楚的是,供体可以包含启动子和/或增强子,例如组成型启动子或诱导型或组织特异性启动子。在一些实施方案中,供体在表达质粒中维持在细胞中,使得基因在染色体外表达。

[0215] 可以将供体分子插入内源基因中,由此使得所有、一些或没有内源基因被表达。例如,可以将如本文所述的转基因插入白蛋白或其他基因座中,由此使得一些(在编码溶酶体酶的转基因的N末端和/或C末端)或没有任何内源白蛋白序列被表达,例如以与编码一种或多种IDUA蛋白的转基因融合的形式。在其他实施方案中,将转基因(例如,具有或不具有如白蛋白的另外的编码序列)整合至任何内源基因座(例如安全港基因座)中。

[0216] 当内源序列(内源或转基因的一部分)与转基因一起表达时,内源序列(例如,白蛋白等)可以是全长序列(野生型或突变型)或部分序列。优选地,内源序列是功能性的。这些全长或部分序列(例如,白蛋白)的功能的非限制性例子包括增加由转基因(例如,治疗性基因)表达的和/或充当载体的多肽的血清半衰期。

[0217] 此外,尽管对于表达不是必需的,但外源序列也可以包括转录或翻译调控序列,例如启动子、增强子、绝缘子、内部核糖体进入位点、编码2A肽和/或聚腺苷酸化信号的序列。

[0218] 在某些实施方案中,外源序列(供体)包含目的蛋白与作为其融合伴侣的膜蛋白的细胞外结构域的融合物,从而产生定位于细胞表面上的融合蛋白。这使得由转基因编码的蛋白质可能在血清中起作用。在针对MPS I疾病的治疗的情况下,由转基因融合物编码的IDUA酶作用于从在细胞(例如,RBC)表面上的位置积累在血清中的代谢产物。另外,如果RBC如正常降解过程那样被脾巨噬细胞吞没,则在更自然地有利于该酶的pH下,当巨噬细胞吞没细胞时形成的溶酶体会使膜结合的融合蛋白暴露于溶酶体中高浓度的代谢产物。

[0219] 在一些情况下,供体可以是已经修饰的内源基因(IDUA)。例如,可以在内源基因上

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

[0220] 由于脑中缺乏缺失的IDUA酶,MPS I疾病受试者常常患有神经病学后遗症。不幸的是,由于血脑屏障的不可渗透性,通常难以通过血液将治疗剂递送至脑。因此,本发明的方法和组合物可以与增加治疗剂向脑中的递送的方法结合使用,所述方法包括但不限于引起脑毛细血管的细胞之间的紧密连接瞬时打开的方法,如通过使用高渗性甘露醇溶液的颈动脉内施用、使用聚焦超声和施用缓激肽类似物进行瞬时渗透性破坏。可替代地,可以设计治疗剂以利用用于特异性转运至脑中的受体或转运机制。可以使用的特异性受体的例子包括运铁蛋白受体、胰岛素受体或低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LRP-1和LRP-2)。已知LRP与一系列分泌型蛋白质(如apoE、tPA、PAI-1等)相互作用,并且因此融合针对LRP的这些蛋白质之一的识别序列可以促进酶在治疗性蛋白质在肝脏中表达后转运至脑中和分泌至血流中(参见Gabathuler (2010) *Neurobiol Dis.* 37 (1):48-57)。

[0221] 在某些实施方案中,供体载体是如SB-IDUA AAV(表5,SEQ ID NO:28)中所示的载体。

本发明的组合物/系统

[0222] 本文所述的本发明利用三个AAV载体来实践所述方法。两个载体用于递送右ZFN和左ZFN,并且第三载体用于提供IDUA供体序列(请参见实施例)。在某些实施方案中,所述组合物/系统包含包括SB-47171或SB-71557、SB-47898或SB-71728和SB-IDUA AAV的3个载体。

细胞

[0223] 本文还提供了经基因修饰的细胞,例如包含编码IDUA蛋白的转基因的肝细胞或干细胞,包括通过本文所述的方法产生的细胞。IDUA转基因可以在染色体外表达或者可以使用一种或多种核酸酶以靶向方式整合至细胞基因组中。与随机整合不同,核酸酶介导的靶向整合确保了将转基因整合至特定基因中。可以将转基因整合至靶基因中的任何地方。在某些实施方案中,将转基因整合在核酸酶结合和/或裂解位点处或附近,例如在裂解位点和/或结合位点的上游或下游的1-300个碱基对(或其间的任何数量的碱基对)内,更优选地在裂解和/或结合位点的任一侧的1-100个碱基对(或其间的任何数量的碱基对)内,甚至更优选地在裂解和/或结合位点的任一侧的1至50个碱基对(或其间的任何数量的碱基对)内。在某些实施方案中,整合序列不包括任何载体序列(例如,病毒载体序列)。

[0224] 可以如本文所述对任何细胞类型进行基因修饰以包含转基因,所述任何细胞类型包括但不限于细胞或细胞系。如本文所述的经基因修饰细胞的其他非限制性例子包括T细胞(例如,CD4⁺、CD3⁺、CD8⁺等);树突状细胞;B细胞;自体的(例如,受试者衍生的)。在某些实施方案中,细胞是肝细胞并且经体内修饰。在某些实施方案中,细胞是干细胞,包括异源多能、全能或多能干干细胞(例如,CD34⁺细胞、诱导性多能干干细胞(iPSC)、胚胎干细胞等)。在某些实施方案中,如本文所述的细胞是衍生自受试者的干细胞。

[0225] 如本文所述的细胞可用于例如通过体内疗法在患有MPS I疾病的受试者中治疗和/或预防所述障碍。还提供了离体疗法,例如可以扩增核酸酶修饰的细胞并然后使用标准技术将其重新引入受试者中的情况。参见例如Tebas等人(2014)New Eng J Med 370(10):901。在干细胞的情况下,在输注至受试者中之后,还发生这些前体体内分化成表达功能性蛋白(来自插入的供体)的细胞。

[0226] 还提供了包含如本文所述的成分(核酸酶、IDUA供体、细胞等)中一种或多种的药物组合物(也称为“配制品”或“制品”或“药物产品”或“一组药物产品”)。药物组合物可以以任何浓度包括相同或不同类型的组分组合物。例如,本文提供了包含一组药物产品的制品,所述一组药物产品包括如下的三种单独的药物组合物:第一药物组合物,其包含携带ZFN对的一个成员(例如,左ZFN)的纯化的AAV载体;第二药物组合物,其包含携带ZFN对的另一个成员(例如,右ZFN)的纯化的AAV载体;和第三药物组合物,其包含携带IDUA供体的纯化的AAV载体。左ZFN可以包含指定为47171的ZFN(例如,指定为SB-A6P-ZLEF的药物产品)或指定为71557的ZFN(例如,指定为SB-A6P-ZL2的药物产品),并且右ZFN可以包含指定为47898的ZFN(例如,指定为SB-A6P-ZRIGHT的药物产品或指定为71728的ZFN(例如,指定为SB-A6P-ZL2的药物产品)。可以将三种药物组合物中的一种、两种或三种单独配制在包含CaCl₂、MgCl₂、NaCl、蔗糖和泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆P188)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中或生理盐水(NS)配制品中。可以使用任何浓度,包括但不限于表6中所示的浓度。此外,制品可以包括任何比率例如1:1:8(左ZFN:右ZFN:IDUA供体)的三种药物组合物。

[0227] 将药物组合物(制品/一组药物产品)施用(例如,静脉)至有需要的受试者,由此使得IDUA在受试者中表达,包括以用于治疗MPS I的治疗水平(例如,在血浆和/或血白细胞中)表达。所述组合物可以分开施用,或者优选地,将包含一组三种药物产品(ZFN1、ZFN2和IDUA供体)的制品在施用之前组合,例如组合在静脉输注袋中。另外,这些配制品可以在施用至受试者之前被冷冻保存。

递送

[0228] 核酸酶、编码这些核酸酶的多核苷酸、供体多核苷酸以及包含本文所述的蛋白质和/或多核苷酸的组合物可以通过任何合适的手段体内或离体递送。

[0229] 递送如本文所述的核酸酶的方法描述于例如以下文献中:美国专利号6,453,242;6,503,717;6,534,261;6,599,692;6,607,882;6,689,558;6,824,978;6,933,113;6,979,539;7,013,219;和7,163,824,将所有所述文献的披露内容通过引用以其整体并入本文。

[0230] 还可以使用含有编码锌指、TALEN和/或一种或多种Cas蛋白中的一种或多种的序列的载体递送如本文所述的核酸酶和/或供体构建体。可以使用任何载体系统,包括但不限于质粒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体和腺相关病毒载体等。还参见,美国专利号6,534,261;6,607,882;6,824,978;6,933,113;6,979,539;7,013,219和7,163,824,将所述文献通过引用以其整体并入本文。此外,清楚的是,这些载体中的任何一种可包含治疗所需的一种或多种序列。因此,当将一种或多种核酸酶和供体构建体引入细胞中时,可以将核酸酶和/或供体多核苷酸携带于在相同载体上或不同载体上。当使用多个载体时,每个载体可包含编码一种或多种核酸酶和/或供体构建体的序列。

[0231] 可使用常规的基于病毒和非病毒的基因转移方法在细胞(例如哺乳动物细胞)和

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

[0232] 非病毒递送核酸的方法包括电穿孔、脂转染、显微注射、基因枪、病毒体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子、和DNA的药剂增强摄取。还可以使用采用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)的声致穿孔(sonoporation)来递送核酸。

[0233] 其他示例性核酸递送系统包括由以下各项提供的那些:Amaya Biosystems(Cologne,德国)、Maxcyte, Inc.(Rockville,马里兰)、BTX分子递送系统(Holliston, MA)和Copernicus Therapeutics Inc(参见例如美国专利号6,008,336)。脂转染描述于例如美国专利号5,049,386; 4,946,787; 和4,897,355中; 脂转染试剂是市售的(例如,TransfectamTM和LipofectinTM)。适合于多核苷酸的有效受体识别脂转染的阳离子型和中性脂质包括Felgner,国际专利公开号WO 91/17424和WO 91/16024的那些。

[0234] 脂质:核酸复合物(包括靶向脂质体如免疫脂质复合物)的制备是本领域技术人员熟知的(参见例如Crystal(1995) *Science* 270:404-410; Blaese等人(1995) *Cancer Gene Ther.* 2:291-297; Behr等人(1994) *Bioconjugate Chem.* 5:382-389; Remy等人(1994) *Bioconjugate Chem.* 5:647-654; Gao等人(1995) *Gene Therapy* 2:710-722; Ahmad等人(1992) *Cancer Res.* 52:4817-4820; 美国专利号4,186,183; 4,217,344; 4,235,871; 4,261,975; 4,485,054; 4,501,728; 4,774,085; 4,837,028; 和4,946,787)。

[0235] 另外的递送方法包括使用将要递送的核酸包装至EnGeneIC递送媒介物(EDV)中。这些EDV被使用双特异性抗体特异性地递送至靶组织中,其中所述抗体的一个臂对所述靶组织具有特异性,并且另一个臂对EDV具有特异性。抗体将EDV携带至靶细胞表面,之后EDV通过内吞作用被引入细胞中。一旦进入细胞,内含物就被释放(参见MacDiarmid等人(2009) *Nature Biotechnology* 27(7):643)。

[0236] 使用基于RNA或DNA病毒的系统递送编码工程化的ZFP的核酸利用高度进化的过程将病毒靶向体内的特定细胞并将病毒有效载荷运输至细胞核。可以将病毒载体直接施用至受试者(体内),或者可以使用它们在体外处理细胞,并且将经修饰细胞施用至受试者(离体)。常规的递送ZFP的基于病毒的系统包括但不限于用于基因转移的逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、痘苗病毒和单纯疱疹病毒载体。使用逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒基因转移方法时,在宿主基因组中整合是可能的,通常导致所插入转基因的长期表达。另外,已经在许多不同细胞类型和靶组织中测量到高转导效率。

[0237] 逆转录病毒的向性可通过并入外来包膜蛋白、扩大靶细胞的潜在靶群体来改变。

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

[0238] 在其中瞬时表达是优选的应用中,可以使用基于腺病毒的系统。基于腺病毒的载体能够在许多细胞类型中具有极高的转导效率,并且不需要细胞分裂。使用此类载体,已经获得高滴度和高表达水平。这种载体可以在相对简单的系统中大量生产。腺相关病毒(“AAV”)载体也用于转导具有靶核酸的细胞,例如在核酸和肽的体外产生中,以及用于体内和离体基因疗法程序(参见例如, West等人(1987) *Virology* 160:38-47; 美国专利号4,797,368; 国际专利公开号W0 93/24641; Kotin(1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka(1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351。重组AAV载体的构建描述于许多出版物中,包括美国专利号5,173,414; Tratschin等人(1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260; Tratschin等人(1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Hermonat和Muzyczka(1984) *PNAS* 81:6466-6470; 以及Samulski等人(1989) *J. Virol.* 63:03822-3828。

[0239] 至少六种病毒载体方法目前可用于临床试验中的基因转移,所述试验利用涉及通过插入辅助细胞系中的基因与缺陷性载体互补以产生转导剂的途径。

[0240] pLASN和MFG-S是已在临床试验中使用的逆转录病毒载体的例子(Dunbar等人(1995) *Blood* 85:3048-305; Kohn等人(1995) *Nat. Med.* 1:1017-102; Malech等人(1997) *PNAS* 94(22):12133-12138)。PA317/pLASN是第一个用于基因治疗试验中的治疗性载体。(Blaese等人(1995) *Science* 270:475-480)。已经测量到MFG-S包装的载体的转导效率为50%或更高。(Ellem等人(1997) *Immunol Immunother.* 44(1):10-20; Dranoff等人(1997) *Hum. Gene Ther.* 1:111-2。

[0241] 重组腺相关病毒载体(rAAV)是有前景的基于缺陷性和非病原性细小病毒腺相关2型病毒的替代性基因递送系统。所有载体都衍生自仅保留侧接转基因表达盒的AAV 145bp反向末端重复序列的质粒。由于整合至经转导细胞基因组中所致的有效基因转移和稳定转基因递送是这种载体系统的关键特征。(Wagner等人(1998) *Lancet* 351(9117):1702-3; Kearns等人(1996) *Gene Ther.* 9:748-55)。其他AAV血清型(通过非限制性例子包括AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV 8.2、AAV9和AAV rh10)以及假型化AAV(如AAV2/8、AAV2/5和AAV2/6)也可以根据本发明来使用。在一些实施方案中,使用了能够穿过血脑屏障的AAV血清型。

[0242] 复制缺陷型重组腺病毒载体(Ad)可以以高滴度产生,并且易于感染多种不同的细胞类型。对大多数腺病毒载体进行工程化,使得转基因替代Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后使复制缺陷性载体在反式供应所缺失的基因功能的人293细胞中增殖。Ad载体可以在体内转导多种类型的组织,包括非分裂的已分化细胞,如在肝、肾和肌肉中发现的那些。常规Ad

载体具有较大运载能力。Ad载体在临床试验中的使用的例子涉及使用肌内注射的用于抗肿瘤免疫的多核苷酸疗法 (Stermann等人 (1998) *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9)。在临床试验中使用腺病毒载体进行基因转移的另外例子包括Rosenecker等人 (1996) *Infection* 24 (1) :5-10; Stermann等人 (1998) *Hum. Gene Ther.* 9 (7) :1083-1089; Welsh等人 (1995) *Hum. Gene Ther.* 2:205-18; Alvarez等人 (1997) *Hum. Gene Ther.* 5:597-613; Topf等人 (1998) *Gene Ther.* 5:507-513; Stermann等人 (1998) *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089。

[0243] 包装细胞用于形成能感染宿主细胞的病毒颗粒。此类细胞包括包装腺病毒的293细胞以及包装逆转录病毒的 ψ 2细胞或PA317细胞。用于基因疗法中的病毒载体通常是由将核酸载体包装至病毒颗粒中的生产细胞系产生。载体典型地含有包装和随后整合至宿主中 (如果适用) 所需的最小病毒序列, 其他病毒序列由编码要表达的蛋白质的表达盒替代。失去的病毒功能由包装细胞系反式供应。例如, 用于基因疗法中的AAV载体典型地仅具有来自AAV基因组的反向末端重复 (ITR) 序列, 所述序列是包装和整合至宿主基因组中所需的。将病毒DNA包装于细胞系中, 所述细胞系含有编码其他AAV基因 (即, rep和cap) 但缺少ITR序列的辅助质粒。所述细胞系还被作为辅助者的腺病毒感染。辅助病毒促进AAV载体的复制和来自辅助质粒的AAV基因的表达。由于缺少ITR序列, 辅助质粒并未被大量包装。腺病毒的污染可通过例如热处理来减少, 腺病毒对所述热处理比AAV更敏感。

[0244] 在许多基因疗法应用中, 可期望以高度特异性将基因疗法载体递送至特定组织类型。因此, 可以修饰病毒载体, 以通过将配体表达为与病毒外表面上的病毒外壳蛋白的融合蛋白而具有对给定细胞类型的特异性。配体被选择以具有对已知存在于目的细胞类型上的受体的亲和力。例如Han等人 (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9747-9751报道, 莫洛尼 (Moloney) 鼠白血病病毒可以被修饰以表达与gp70融合的人神经生长因子, 并且重组病毒感染某些表达人表皮生长因子受体的人乳腺癌细胞。这个原则可以扩展至其他病毒-靶细胞对, 其中靶细胞表达受体并且病毒表达包含针对细胞表面受体的配体的融合蛋白。例如, 丝状噬菌体可以被工程化以展示对实际上任何所选细胞受体具有特定结合亲和力的抗体片段 (例如, Fab或Fv)。虽然上述说明主要适用于病毒载体, 但是相同原则可以适用于非病毒载体。此类载体可以被工程化以含有特定摄取序列, 所述摄取序列有利于被特定靶细胞摄取。

[0245] 如下所述, 基因治疗载体可以通常通过全身施用 (例如, 静脉、腹膜内、肌内、皮下或颅内输注) 或局部施用在体内施用至个体受试者来递送。可替代地, 可以将载体离体递送至细胞中, 例如从个体受试者外植的细胞 (例如, 淋巴细胞、骨髓抽取物、组织活检) 或全供体造血干细胞, 之后将所述细胞再植入受试者体内, 通常在选择已经并入所述载体的细胞后再植入。

[0246] 也可以将含有核酸酶和/或供体构建体的载体 (例如逆转录病毒、腺病毒、脂质体等) 直接施用至生物体以在体内转导细胞。可替代地, 可以施用裸DNA。通过通常用于引入分子以与血液或组织细胞最终接触的任何途径施用, 所述途径包括但不限于注射、输注、局部施用和电穿孔。施用此类核酸的合适方法是本领域技术人员可获得的并且熟知的, 并且尽管可以使用多于一种途径来施用特定组合物, 但是特定途径通常可以提供比另一条途径更直接且更有效的反应。

[0247] 适用于引入本文所述的多核苷酸的载体包括非整合型慢病毒载体 (IDLV)。参见例

如Ory等人(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11382-11388; Dull等人(1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zuffery等人(1998) J. Virol. 72:9873-9880; Follenzi等人(2000) Nature Genetics 25:217-222; 美国专利公开号2009/054985。

[0248] 药学上可接受的载体部分取决于所施用的特定组合物,以及取决于用于施用所述组合物的特定方法。因此,存在众多种可使用的药物组合物的合适配制品,如下所述(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,1989)。

[0249] 清楚的是,可以使用相同或不同的系统递送核酸酶编码序列和供体构建体。例如,供体多核苷酸可以由质粒携带,而一种或多种核酸酶可以由AAV载体携带。此外,可以通过相同或不同的途径施用(肌内注射、尾静脉注射、其他静脉注射、腹膜内施用和/或肌内注射)不同的载体。可以同时或以任何顺序递送载体。

[0250] 用于离体和体内施用的配制品包括在液体或乳化液体中的悬浮液。通常将活性成分与药学上可接受的并且与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂包括例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。另外,组合物可以含有少量的辅助物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂或增强药物组合物有效性的其他试剂。

应用

[0251] 本发明的方法设想了MPS I疾病(例如溶酶体贮积病)的治疗和/或预防。治疗可以包括将一种或多种校正疾病相关基因(例如, IDUA等)插入细胞中的安全港基因座(例如白蛋白)中,以表达所需的一种或多种酶并释放至血流中。一旦进入血液,分泌的酶就可以被组织中的细胞摄取,在所述细胞中酶然后被溶酶体摄取,由此使得GAG分解。转基因可以编码蛋白质,包括密码子优化的转基因(例如, IDUA);和/或其中可以去除表位而不在功能上改变蛋白质的转基因。在一些情况下,所述方法包括将表达校正酶编码转基因的附加体插入细胞中以表达所需的酶并释放至血流中。插入分泌型细胞如肝细胞中以将产物释放至血流中是特别有用的。本发明的方法和组合物也可用于需要在造血干细胞中提供编码一种或多种治疗剂的IDUA转基因,由此使得衍生自这些细胞的成熟细胞(例如,RBC)含有所述治疗剂的任何情形中。这些干细胞可以在体外或体内分化,并且可以衍生自可用于所有受试者的通用供体类型的细胞。另外,细胞可以含有跨膜蛋白以运输体内的细胞。治疗还可以包括使用含有治疗性转基因的受试者细胞,其中将所述细胞离体发育且然后被引入回受试者中。例如,可以通过自体骨髓移植将含有合适的IDUA编码转基因的HSC插入受试者中。可替代地,也可以将已经使用IDUA编码转基因编辑的干细胞如肌肉干细胞或iPSC注射至肌肉组织中。

[0252] 因此,该技术可以用于由于某些问题(例如,表达水平的问题或表达为亚功能或无功能的蛋白的问题)而受试者有某种蛋白质缺陷的情况中。对于本发明特别有用的是在患有MPS I疾病的受试者中表达转基因以校正或恢复功能性。

[0253] 通过非限制性例子的方式,缺陷或缺失蛋白的产生得以完成并用于治疗MPS I疾病。可以将编码蛋白质的核酸供体插入安全港基因座(例如白蛋白或HPRT)中,并使用外源启动子或存在于安全港处的启动子来表达。可替代地,可以使用供体以在原位校正缺陷基因。可以将所期望的IDUA编码转基因插入CD34+干细胞中,并在骨髓移植期间返回受试者。最后,可以将核酸供体插入CD34+干细胞中的 β 球蛋白基因座处,由此使得衍生自该细胞的成熟红细胞具有高浓度的由核酸供体编码的生物物质。然后可以通过跨膜蛋白(例如受体

或抗体)将含有生物物质的RBC靶向正确的组织。另外,可以通过电敏化离体敏化RBC,以使其在暴露于能量源后更易于破坏(参见国际专利公开号WO 2002/007752)。

[0254] 在一些应用中,可以通过使用本发明的方法和组合物敲除内源基因。这方面的例子包括敲除异常基因调节子或异常疾病相关基因。在一些应用中,异常内源基因可以在功能上或原位被基因的野生型形式替代。也可以改变插入的基因以改善治疗性IDUA蛋白的表达和/或功能性或降低其免疫原性。在一些应用中,插入的IDUA编码转基因是融合蛋白,以增加其向选定组织(如脑)中的转运。

[0255] 在一些应用中,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS I的人类受试者中改善或维持功能性能力(减缓所述功能性能力的衰退)的方法。在其他应用中,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,减少患有MPS I的受试者中对ERT的需要(剂量水平或频率)的方法。在又另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,延迟患有MPS I的受试者中对ERT启动的需要的的方法。在一方面,本文提供了与未接受过本发明的组合物的受试者相比,延迟、减少或消除患有MPS I的受试者中对支持性手术的需要的方法,所述方法包括用所述组合物治疗受试者。在另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,延迟、减少或避免患有MPS I的受试者中对骨髓移植的需要的的方法。在又另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS I的受试者中通过将ERT的标准给药方案与用如本文所述的组合物的治疗的组合治疗受试者来改善功能性能力(延迟功能性能力衰退、维持功能性能力)的方法。在另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,抑制患有MPS I的人类受试者中的残疾进展的方法。在又另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,延迟、减少或避免患有MPS I的受试者中对使用医疗呼吸机设备的需要的的方法。在另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,在患有MPS I的人类受试者中延迟经确认的残疾进展的发作或降低经确认的残疾进展的风险的方法。在本发明的一方面,本文提供了降低、稳定或维持患有MPS I的受试者中的尿液GAG的方法,所述方法包括用本发明的组合物治疗受试者。在又另一方面,本文提供了与没有用本发明的方法和组合物治疗过的受试者相比,延长患有MPS I的受试者的期望寿命的方法。

[0256] 以下实施例涉及本公开文本的示例性实施方案,其中核酸酶包含锌指核酸酶(ZFN)或TALEN。应理解,这只是为了示例目的并且可使用其他核酸酶或核酸酶系统,例如具有工程化DNA结合结构域的归巢核酸内切酶(大范围核酸酶)和/或天然存在的工程化的归巢核酸内切酶(大范围核酸酶)DNA结合结构域和异源裂解结构域和/或包含工程化单一指导RNA的CRISPR/Cas系统的融合物。

实施例

实施例1:

[0257] 多核苷酸和包含多核苷酸的AAV载体的制备如下:编码SB-47171 ZFN(左ZFN)的AAV2/6载体包含若干个结构特征:AAV载体的5'和3' ITR、ApoE/hAAT肝控制区和 α 1-抗胰蛋白酶启动子、人 β -球蛋白-IgG嵌合内含子、核定位序列、ZFP 47171 ZFN结合结构域、FokI ELD核酸酶结构域和聚腺苷酸化信号。各种元件的位置示出于下表1中。

表1:SB-47171 AAV (SEQ ID NO:9)的元件

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

[0258] SB-47171 AAV2/6载体的完整核苷酸序列示于下文中。表1中所示的特定注释在序列文本中如表1中所示那样指示出：

```

【CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG
50
GGCGACCTTT GGTCGCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG
100
GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTTCCT】GCGGCCTAGT AGGCTCAGAG
150
GCACACAGGA GTTTCTGGGC TCACCCTGCC CCCTTCCAAC CCCTCAGTTC
200

```

CCATCCTCCA GCAGCTGTTT GTGTGCTGCC TCTGAAGTCC ACACTGAACA
250

AACTTCAGCC TACTCATGTC CCTAAAATGG GCAAACATTG CAAGCAGCAA
300

ACAGCAAACA CACAGCCCTC CCTGCCTGCT GACCTTGGAG CTGGGGCAGA
350

GGTCAGAGAC CTCTCTGGGC CCATGCCACC TCCAACATCC ACTCGACCCC
400

TTGGAATTTT GGTGGAGAGG AGCAGAGGTT GTCCTGGCGT GGTTTAGGTA
450

GTGTGAGAGG GGTACCCGGG GATCTTGCTA CCAGTGGAAC AGCCACTAAG
500

GATTCTGCAG TGAGAGCAGA GGGCCAGCTA AGTGGTACTC TCCCAGAGAC
550

TGTCTGACTC ACGCCACCCC CTCCACCTTG GACACAGGAC GCTGTGGTTT
600

CTGAGCCAGG TACAATGACT CCTTTCGGTA AGTGCAGTGG AAGCTGTACA
650

CTGCCCAGGC AAAGCGTCCG GGCAGCGTAG GCGGGCGACT CAGATCCCAG
700

CCAGTGGACT TAGCCCCTGT TTGCTCCTCC GATAACTGGG GTGACCTTGG
750

TTAATATTCA CCAGCAGCCT CCCCCGTTGC CCCTCTGGAT CCACTGCTTA
800

AATACGGACG AGGACAGGGC CCTGTCTCCT CAGCTTCAGG CACCACCACT
850

GACCTGGGAC AGTCAGGTAA GTATCAAGGT TACAAGACAG GTTTAAGGAG
900

ACCAATAGAA ACTGGGCTTG TCGAGACAGA GAAGACTCTT GCGTTTCTGA
950

TAGGCACCTA TTGGTCTTAC TGACATCCAC TTTGCCTTTC TCTCCACAGG

1000
 CAATTCGCCA TGGCCCCCAA GAAGAAGAGG AAGGTGGGCA TCCACGGGGT
 1050
ACCGGCCGCA ATGGCAGAAC GGCCCTTCCA GTGCCGCATC TGCATGCGCA
 1100
ACTTCAGCCA GTCGGGCAAC CTGTCCCGCC ACATCCGGAC TCATACCGGC
 1150
GAAAACCAT TCGCTTGTGA CATCTGCGGA AGAAAGTTTG CGCTGAAGCA
 1200
GAACCTCTGC ATGCATACCA AGATTCACAC CGGAGAGAAG CCGTTTCAGT
 1250
GTCGCATTTG CATGAGAAAG TTCGCCTGGG CCGATAACCT TCAGAATCAC
 1300
ACCAAGATCC ACACCGGGGA AAAGCCGTTT CAGTGCCGGA TCTGCATGAG
 1350
GAACTTCTCA ACGTCCGGAA ACCTGACCAG GCATATCCGG ACCCACACTG
 1400
GGGAGAAGCC TTTCGCCTGC GACATTTGCG GTCGGAAGTT CGCCCGGCAA
 1450
TCCCACCTGT GTCTCCACAC TAAGATCCAC CTGAGAGGAT Ccagctggt
 1500
 gaagagcgag ctggaggaga agaagtccga gctgcggcac aagctgaagt
 1550
 acgtgcccc a cgagtacatc gagctgatcg agatcgccag gaacagcacc
 1600
 caggaccgca tcctggagat gaaggtgatg gagttcttca tgaaggtgta
 1650
 cggctacagg ggaaagcacc tgggcggaag cagaaagcct gacggcgcca
 1700
 tctatacagt gggcagcccc atcgattacg gcgtgatcgt ggacacaaag
 1750

gcctacagcg gcggtacaa tctgcctatc ggccaggccg acgagatgga
1800

gagatacgtg gaggagaacc agaccocggga taagcacctc aacccaacg
1850

agtgggtggaa ggtgtaccct agcagcgtga ccgagttcaa gttcctgttc
1900

gtgagcggcc acttcaaggg caactacaag gcccagctga ccaggctgaa
1950

ccacatcacc aactgcaatg gcgccgtgct gagcgtggag gagctgctga
2000

tcggcggcga gatgatcaaa gccggcacc tgacactgga ggaggtgcgg
2050

cgcaagttca acaacggcga gatcaacttc agatcttgat aaCTCGAGTC
2100

TAGAGGATCT CGAGCCGAAT TCCTGCAGCC CGGGGGATCA GCCTCGACTG
2150

TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC
2200

TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCACTGTC CTTTCCTAAT AAAATGAGGA
2250

AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG
2300

TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT
2350

GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG
2400

CTCGAGATCC ACTAGGGCCG CAGGAACCCC TAGTGATGGA GTTGGCCACT
2450

CCCTCTCTGC GCGCTCGCTC GCTCACTGAG GCCGCCCGGG CTTTGCCCGG
2500

GCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAG 2529 (SEQ ID NO:9)

[0259] 包含SB-47898的AAV2/6载体类似地包含若干个特征,并且这些特征示出在下表2中。

表2:SB-47898 AAV (SEQ ID NO:12)的元件

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

[0260] SB-47898 AAV2/6载体的完整核苷酸序列示于下文中。表2中所示的特定注释在序列文本中如表2中所示那样指示出。

```

【CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG
50
GGCGACCTTT GGTCGCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG
100
GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTCTCT】GCGGCCTAGT AGGCTCAGAG
150
GCACACAGGA GTTTCTGGGC TCACCCTGCC CCCTTCCAAC CCCTCAGTTC
200
CCATCCTCCA GCAGCTGTTT GTGTGCTGCC TCTGAAGTCC AACTGAACA
250
AACTTCAGCC TACTCATGTC CCTAAAATGG GCAAACATTG CAAGCAGCAA
300
ACAGCAAACA CACAGCCCTC CCTGCCTGCT GACCTTGAG CTGGGGCAGA
350
GGTCAGAGAC CTCTCTGGGC CCATGCCACC TCCAACATCC ACTCGACCCC
400

```

TTGGAATTC GGTGGAGAGG AGCAGAGGTT GTCCTGGCGT GGTTTAGGTA
450

GTGTGAGAGG GGTACCCGGG GATCTTGCTA CCAGTGGAAC AGCCACTAAG
500

GATTCTGCAG TGAGAGCAGA GGGCCAGCTA AGTGGTACTC TCCCAGAGAC
550

TGTCTGACTC ACGCCACCCC CTCCACCTTG GACACAGGAC GCTGTGGTTT
600

CTGAGCCAGG TACAATGACT CCTTTCGGTA AGTGCAGTGG AAGCTGTACA
650

CTGCCCAGGC AAAGCGTCCG GGCAGCGTAG GCGGGCGACT CAGATCCCAG
700

CCAGTGGACT TAGCCCCTGT TTGCTCCTCC GATAACTGGG GTGACCTTGG
750

TTAATATTCA CCAGCAGCCT CCCCCGTTGC CCCTCTGGAT CCACTGCTTA
800

AATACGGACG AGGACAGGGC CCTGTCTCCT CAGCTTCAGG CACCACCACT
850

GACCTGGGAC AGTCAGGTAA GTATCAAGGT TACAAGACAG GTTTAAGGAG
900

ACCAATAGAA ACTGGGCTTG TCGAGACAGA GAAGACTCTT GCGTTTCTGA
950

TAGGCACCTA TTGGTCTTAC TGACATCCAC TTTGCCTTTC TCTCCACAGG
1000

CAATTCGCCA TGGCCCCCAA GAAGAAGAGG AAGGTGGGCA TCCACGGGGT
1050

ACCGGCCGCA ATGGCAGAGA GGCCCTTTCA GTGCCGGATC TGCATGCGGA
1100

ACTTCTCCAC CCCACAACCTT CTGGACCGAC ATATCCGCAC CCATACCGGG
1150

GAAAAGCCTT TCGCGTGCGA CATTTGCGGA CGGAAATTCG CGTTGAAGCA

1200

CAATCTCCTG ACCCACACTA AGATTCATAC TGGCGAAAAG CCGTTCCAGT

1250

GCCGCATCTG TATGAGGAAC TTCAGCGATC AGTCGAACCT GAACGCCCAC

1300

ATTCGGACTC ATACCGGAGA AAAGCCCTTT GCCTGCGATA TCTGCGGTCTG

1350

CAAGTTCGCT AGGAACTTCT CACTGACCAT GCACACCAA ATCCACACTG

1400

GAGAGCGGGG ATTCCAGTGT AGAATCTGTA TGCGCAACTT CTCCCTGCGG

1450

CACGACCTGG ACCGCCACAT CAGAACCCAC ACCGGGGAGA AGCCGTTTCGC

1500

CTGCGACATC TCGGGCCGGA AGTTCGCCCA CCGGTCCAAC CTGAACAAGC

1550

ACACGAAGAT TCACCTCCGC GGATCCcagc tggatgaagag cgagctggag

1600

gagaagaagt ccgagctgcg gcacaagctg aagtacgtgc cccacgagta

1650

catcgagctg atcgagatcg ccaggaacag caccaggac cgcacctctgg

1700

agatgaaggt gatggagttc ttcatgaagg tgtacggcta caggggaaag

1750

cacctgggcg gaagcagaaa gcctgacggc gccatctata cagtgggacag

1800

ccccatcgat tacggcgtga tcgtggacac aaaggcctac agcggcggct

1850

acaatctgcc tatcggccag gccgacgaga tgcagagata cgtgaaggag

1900

aaccagacc ggaataagca catcaacccc aacgagtggg ggaaggtgta

1950

ccctagcagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcgtgagc ggccacttca
 2000
 agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccgcaa aaccaactgc
 2050
 aatggcgccg tgctgagcgt ggaggagctg ctgatcggcg gcgagatgat
 2100
 caaagccggc accctgacac tggaggaggt gcggcgcaag ttcaacaacg
 2150
 gcgagatcaa cttctgataa CTCGAGTCTA GAGGATCTCG AGCCGAATTC
 2200
 CTGCAGCCCG GGGGATCAGC CTCGACTGTG CCTTCTAGTT GCCAGCCATC
 2250
 TGTGTGTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC
 2300
 CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT
 2350
 AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA
 2400
 GGATTGGGAA GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGG
 2450
 CTTCTGAGGC GGAAAGAACC AGCTGGGGCT CGAGATCCAC TAGGGCCGCA
 2500
 GGAACCCCTA GTGATGGAGT TGGCCACTCC CTCTCTGCGC GCTCGCTCGC
 2550
 TCACTGAGGC CGCCCGGGCT TTGCCCGGGC GGCCTCAGTG AGCGAGCGAG
 2600
CGCGCAG 2607 (SEQ ID NO:12)

[0261] 包含SB-71557的AAV2/6载体类似地包含若干个特征,并且这些特征示出在下表3中。

表3:SB-71557 AAV (SEQ ID NO:23)的元件

核苷酸位 置注释	特征/ 描述	SEQ ID NO:	序列
-------------	-----------	---------------	----

核苷酸位置注释	特征/描述	SEQ ID NO:	序列
1-130	5' ITR [括号中的纯文本]	1	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGG GCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGC CCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT
156-476	ApoE(增强子)加下划线	15	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCA CCCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCT CCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCC ACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCT AAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGC AAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGG AGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCC CATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGG AATTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGG CGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGG
485-877	hAAT(启动子)斜体	17	GATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGAT TCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGT ACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCC CCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCT GAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGC AGTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTC CGGGCAGCGTAGGGCGGGCGACTCAGATCCCAG CCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATA ACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAG CCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAA ATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGC TTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGT
886-933	5' UTR 粗体	18	CTTGTTCTTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCT CAACTTTGGCA GAT
943-1075	人β珠蛋白/IgG嵌合内含子(内含子)双下划线	3	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGA GACCAATAGAAACTGGGCTTGTTCGAGACAGAG AAGACTCTTGCCTTCTGATAGGCACCTATTGGT CTTACTGACATCCACTTTGCCTTCTCTCCACAG
1089-1154	N末端肽	19	GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGAT CATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAG CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTC
1161-1181	核定位信号 粗体斜体	4	
1200-1631	ZFP 71557 DNA结合结构域 小写	20	GCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTGCA ATCTGCATGCAGAACTTCAGTCAGTCCGGCAAC CTGGCCCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAG AAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAA TTTGCCCTGAAGCAGAACCTGTGTATGCATACC AAGATACACACGGGCGAGAAGCCCTTCCAGTGT CGAATCTGCATGCAGAAGTTTGCCTGGCAGTCC AACCTGCAGAACCATAACCAAGATACACACGGG CGAGAAGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCG TAACTTCAGTACCTCCGGCAACCTGACCCGCCA CATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGC

核苷酸位置注释	特征/描述	SEQ ID NO:	序列
			CTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCCGCCG CTCCACCTGACCTCCCATACCAAGATACACCT GCGG
1638-2237	FokI-ELD 核酸酶结构 域N542D <u>虚下划线</u>	21	CAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAGAA GTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTGCC CCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAG GAACAGCACCCAGGACCGCATCCTGGAGATGA AGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCT ACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGAAAG CCTGACGGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCC ATCGATTACGGCGTGATCGTGGACACAAAGGCC TACAGCGGCGGCTACAATCTGCCTATCGGCCAG GCCGACGAGATGGAGAGATACGTGGAGGAGAA CCAGACCCGGGATAAGCACCTCAACCCCAACGA GTGGTGAAGGTGTACCCTAGCAGCGTGACCGA GTTCAAGTTCCTGTTCTGAGCGGCCACTTCAA GGGCAACTACAAGGCCAGCTGACC AGGCTGAACCACATCACCAACTGCGACGGCGCC GTGCTGAGCGTGGAGGAGCTGCTGATCGGCGGC GAGATGATCAAAGCCGGCACCTGACACTGGA GGAGGTGCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAGA TCAACTTCAGATCTTGATAA
2250-2841	WPREmut6 3'UTR <u>加点下划线</u>	22	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGA TTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTA CGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTA TCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTT TCCTCCTTGATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTT ATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTC AACGTG GCGTGGTGTGCTCTGTGTTGCTGACGCAACCC CCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAAC TCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCTCCCGAT CGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCTGCCTTGC CCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCAC TGATAATTCGTTGGTGTGTCGGGGAAATCATC GTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCAAC TGGATCCTGCGCGGG ACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCTCTCAATC CAGCGGACCTCCCTTCCCGAGGCCTTCTGCCGG TTCTGCGGCCTCTCCCGCTCTTCGCTTTCGGCC TCCGACGAGTCGGATCTCCCTTGGGCCGCCTC CCCGCCTG
2848-3070	<u>聚腺苷酸化 信号</u>	7	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTG CCCCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCTGGAAGGT GCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAG GAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC AAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
3088-3195	3' ITR [括号 中的 粗体文	8	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT CTCTGCGCGCTCGCTCGCTACTGAGGCCGCC

核苷酸位置注释	特征/描述	SEQ ID NO:	序列
	本]		GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAG

71557 AAV的序列:

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

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

AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG 3000
TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT 3050
GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GCGGCCGCGT CGAGCGC [**AGG AACCCCTAGT**] 3100
GATGGAGTTG GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG 3150
CCCGGGCTTT GCCCGGGCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAG 3195
 (SEQ ID NO:23)

[0262] 包含SB-71728的AAV2/6载体类似地包含若干个特征,并且这些特征示出在下表4中。

表4:SB-71728 AAV (SEQ ID NO:26)的元件

核苷酸位置注释	特征/描述	SEQ ID NO:	序列
1-130	5' ITR [括号中的纯文本]	1	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGC AAAGCCCCGGGCGTCCG GGCGACCTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACT AGGGGTTCTCT
156-476	ApoE(增强子)加下划线	15	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACC CTGCCCCCTTCCAAC CCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCTGTTTGTGTGC TGCCTCTGAAGTCC AACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAA AATGGGCAAACATTG CAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGC CTGCTGACCTTGGAG CTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATG CCACCTCCAACATCC ACTCGACCCCTTGGAAATTCGGTGGAGAGGAGCAG AGGTTGTCCTGGCGT GGTTTAGGTAGTGTGAGAGGG
485-877	hAAT(启动子)斜体	17	GATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTC TGCAGTGAGAGCAGA GGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCT GACTCACGCCACCCC CTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAG CCAGGTACAATGACT CCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCC CAGGCAAAGCGTCCG GGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGT GGACTTAGCCCCTGT TTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATA TTCACCAGCAGCCT CCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACG GACGAGGACAGGGC CCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTG GGACAGT

核苷酸位置注释	特征/描述	SEQ ID NO:	序列
886-933	5' UTR 粗体	18	CTTGTTCTTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCTCA ACTTTGGCAGAT
943-1075	人β珠蛋白/IgG嵌合内含子(内含子)双下划线	3	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGA CCAATAGAAACTGGG CTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGAT AGGCACCTATTGGTC TTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG
1089-1154	<u>N末端肽</u>	19	GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCA TGACATCGATTACAA GGATGACGATGACAAG
1161-1181	核定位信号 粗体斜体	4	CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTC
1200-1715	ZFP 71728 DNA结合结构域 小写	24	GCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTCGAAT CTGCATGCGTAACTT CAGTCAGTCCTCCGACCTGTCCCGCCACATCCGCAC CCACACCGGCGAGA AGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTG CCCTGAAGCACAAC CTGCTGACCCATACCAAGATACACACGGGCGAGAA GCCCTTCCAGTGTCG AATCTGCATGCAGAACTTTCAGTGACCAGTCCAACC TGCGCGCCACATCC GCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGCCTGTGAC ATTTGTGGGAGGAAA TTTGCCCGCAACTTCTCCCTGACCATGCATACCAAG ATACACACCGGAGA GCGCGGCTTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGTAACTT CAGTCTGCGCCACG ACCTGGAGCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAG AAGCCTTTTGCCTGT GACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCACCGCTCCAA CCTGAACAAGCATAAC CAAGATACACCTGCGG
1722-2315	FokI-KKR 核酸酶结构域 虚线下划线 P478S	25	CAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAGAAGT CCGAGCTGCGGCACAA GCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGA TCGAGATCGCCAGGA ACAGCACCCAGGACCGCATCCTGGAGATGAAGGTG ATGGAGTTCTTCATG AAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCG GAAGCAGAAAGCCTGA CGGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCGATT ACGGCGTGATCGTGG ACACAAAGGCCTACAGCGGCGGCTACAATCTGAGC ATCGGCCAGGCCGAC GAGATGCAGAGATACGTGAAGGAGAACCAGACCC GGAATAAGCACATCAA CCCCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCTAGCAGCG

核苷酸 位置注 释	特征/ 描述	SEQ ID NO:	序列
			TGACCGAGTTCAAGT TCCTGTTTCGTGAGCGGCCACTTCAAGGGCAACTAC AAGGCCAGCTGACC AGGCTGAACCGCAAAACCAACTGCAATGGCGCCGT GCTGAGCGTGGAGGA GCTGCTGATCGGCCGCGAGATGATCAAAGCCGGCA CCCTGACACTGGAGG AGGTGCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAGATCAAC TTCTGATAA
2328-29 19	WPREmut 6 3'UTR <u>加点下划 线</u>	22	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATT GACTGATATTCTTAA CTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGC TTAATGCCTCTGT ATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTC CTCCTTGATAAA TCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCC GTTGTCCGTCAACG TGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCC CACTGGCTGGGGCA TTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCG CTTCCCCCTCCCC ATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGC CCGCTGCTGGACAGG GGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTT GTCGGGGAAATCAT CGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCAACT GGATCCTGCGCGGG ACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCTCTCAATCCA GCGGACCTCCCTTC CCGAGGCCTTCTGCCGTTCTGCGGCCTCTCCCGCG TCTTCGCTTTCGGC CTCCGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCC CGCCTG
2926-31 48	<u>聚腺苷酸 化信号</u>	7	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCC CCTCCCCCGTGCT TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTT TCCTAATAAAATGA GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTC TATTCTGGGGGGTG GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGA AGACAATAGCAGGCAT GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
3166-32 73	3' ITR [<u>括 号中的粗 体文本</u>]	8	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCC TCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAG

71728 AAV的完整序列:

[CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG 50
 GGGACCTTT GGTGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG 100
 GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTCCT] GCGGCCTAAG CTTGAGCTCT 150
TCGAAAGGCT CAGAGGCACA CAGGAGTTTC TGGGCTCACC CTGCCCCCTT 200
CCAACCCCTC AGTTCCCATC CTCCAGCAGC TGTTTGTGTG CTGCCTCTGA 250
AGTCCACACT GAACAACTT CAGCCTACTC ATGTCCCTAA AATGGGCAAA 300
CATTGCAAGC AGCAAACAGC AAACACACAG CCCTCCCTGC CTGCTGACCT 350
TGGAGCTGGG GCAGAGGTCA GAGACCTCTC TGGGCCCATG CCACCTCCAA 400
CATCCACTCG ACCCCTTGA ATTTCCGGTGG AGAGGAGCAG AGGTTGTCCT 450
GGCGTGGTTT AGGTAGTGTG AGAGGGGTCC CGGGGATCTT GCTACCAGTG 500
 GAACAGCCAC TAAGGATTCT GCAGTGAGAG CAGAGGGCCA GCTAAGTGGT 550
 ACTCTCCAG AGACTGTCTG ACTCACGCCA CCCCCTCCAC CTTGGACACA 600
 GGACGCTGTG GTTTCTGAGC CAGGTACAAT GACTCCTTTC GGTAAGTGCA 650
 GTGGAAGCTG TACTGCCC AGGCAAAGCG TCCGGGCAGC GTAGGCGGGC 700
 GACTCAGATC CCAGCCAGTG GACTTAGCCC CTGTTTGCTC CTCCGATAAC 750
 TGGGGTGACC TTGGTTAATA TTCACCAGCA GCCTCCCCG TGCCCCCTCT 800
 GGATCCACTG CTTAAATACG GACGAGGACA GGGCCCTGTC TCCTCAGCTT 850
 CAGGCACCAC CACTGACCTG GGACAGTCCT AGGTGCTTGT **TCTTTTGCA** 900
GAAGCTCAGA ATAAACGCTC AACTTTGGCA GATACTAGTC AGGTAAGTAT 950
CAAGGTTACA AGACAGGTTT AAGGAGACCA ATAGAACTG GGCTTGTCGA 1000
GACAGAGAAG ACTCTTGCGT TTCTGATAGG CACCTATTGG TCTTACTGAC 1050
ATCCACTTTG CCTTTCTCTC CACAGGACCG GTGCCATGGA CTACAAAGAC 1100
CATGACGGTG ATTATAAAGA TCATGACATC GATTACAAGG ATGACGATGA 1150
CAAGATGGCC **CCCAAGAAGA AGAGGAAGGT** CGGCATTCAT GGGGTACCCg 1200
 ccgctatggc tgagaggccc ttccagtgtc gaatctgcat gcgtaacttc 1250
 agtcagtcct ccgacctgtc ccgccacatc cgcaccaca ccgycgagaa 1300
 gccttttgcc tgtgacattt gtgggaggaa atttgccctg aagcacaacc 1350
 tgctgacca taccaagata cacacggcg agaagccctt ccagtgtcga 1400
 atctgcatgc agaacttcag tgaccagtcc aacctgcgcg cccacatccg 1450
 caccacacc ggcgagaagc cttttgcctg tgacatttgt gggaggaaat 1500
 ttgcccgcaa cttctccctg accatgcata ccaagataca caccggagag 1550

cgcggttcc agtgtcgaat ctgcatgcgt aacttcagtc tgcgccacga 1600
cctggagcgc cacatccgca cccacaccgg cgagaagcct tttgcctgtg 1650
acatttgtgg gaggaattt gccaccgct ccaacctgaa caagcatacc 1700
aagatacacc tgcggGGATC CCAGCTGGTG AAGAGCGAGC TGGAGGAGAA 1750
GAAGTCCGAG CTGCGGCACA AGCTGAAGTA CGTGCCCCAC GAGTACATCG 1800
AGCTGATCGA GATCGCCAGG AACAGCACCC AGGACCGCAT CCTGGAGATG 1850
AAGGTGATGG AGTTCTTCAT GAAGGTGTAC GGCTACAGGG GAAAGCACCT 1900
GGGCGGAAGC AGAAAGCCTG ACGGCGCCAT CTATACAGTG GGCAGCCCCA 1950
TCGATTACGG CGTGATCGTG GACACAAAGG CCTACAGCGG CGGCTACAAT 2000
CTGAGCATCG GCCAGGCCGA CGAGATGCAG AGATACGTGA AGGAGAACCA 2050
GACCCGGAAT AAGCACATCA ACCCAACGA GTGGTGAAG GTGTACCCTA 2100
GCAGCGTGAC CGAGTTCAAG TTCCTGTTCG TGAGCGGCCA CTTCAAGGGC 2150
AACTACAAGG CCCAGCTGAC CAGGCTGAAC CGCAAAACCA ACTGCAATGG 2200
CGCCGTGCTG AGCGTGAGG AGCTGCTGAT CGGCGGCGAG ATGATCAAAG 2250
CCGGCACCTT GACTGAGG GAGGTGCGGC GCAAGTCAA CAACGGCGAG 2300
ATCAACTTCT GATAACTCGA GTCTAGAAAT CAACCTCTGG ATTACAAAAT 2350
TTGTGAAAGA TTGACTGATA TTCTTAACTA TGTTGCTCCT TTTACGCTGT 2400
GTGGATATGC TGCTTTAATG CCTCTGTATC ATGCTATTGC TTCCGTACG 2450
GCTTTCGTTT TCTCCTCCTT GTATAAATCC TGTTGCTGT CTCTTTATGA 2500
GGAGTTGTGG CCCGTTGTCC GTCAACGTGG CGTGGTGTGC TCTGTGTTG 2550
CTGACGCAAC CCCACTGGC TGGGGCATTG CCACCACCTG TCAACTCCTT 2600
TCTGGGACTT TCGCTTTCCC CCTCCGATC GCCACGGCAG AACTCATCGC 2650
CGCCTGCCTT GCCCGCTGCT GGACAGGGGC TAGGTTGCTG GGCCTGATA 2700
ATTCCGTGGT GTTGTGCGGG AAATCATCGT CCTTTCCTTG GCTGCTCGCC 2750
TGTGTTGCCA ACTGGATCCT GCGCGGGACG TCCTTCTGCT ACGTCCCTC 2800
GGCTCTCAAT CCAGCGGACC TCCCTCCCG AGGCCTTCTG CCGGTTCTGC 2850
GGCCTCTCCC GCGTCTTCGC TTTCGGCCTC CGACGAGTCG GATCTCCCTT 2900
TGGGCCGCCT CCCCGCCTGG CTAGCCTGTG CTTCTAGTT GCCAGCCATC 2950
TGTTGTTTGC CCCTCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC 3000
CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT 3050
AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA 3100

GGATTGGGAA GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGC 3150
 GGCCGCGTCG AGCGC [AGGAA CCCCTAGTGA TGGAGTTGGC CACTCCCTCT 3200
 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCTTTGC CCGGGCGGCC 3250
 TCAGTGAGCG AGCGAGCGCG CAG] (SEQ ID NO:26)

[0263] 编码SB-IDUA转基因供体的AAV2/6载体包含若干个结构特征: AAV载体的5'和3' ITR、与侧接白蛋白基因中的靶向裂解位点的区域具有同源性的左和右源性臂(LA和RA)、用于确保转基因序列与白蛋白启动子的高效接合的衍生自人因子IX外显子2剪接受体的剪接受体、密码子优化的hIDUA cDNA序列和聚腺苷酸化信号序列。各种元件的位置示出于下表5中。

表5: IDUA AAV (SEQ ID NO:28) 的元件

位置	特征描述	SEQ ID NO	序列
1-130	5' ITR [括号中的纯文本]	1	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAA AGCCCGGGCGTCG GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCT
271-550	LA: 左源性臂 <i>斜体</i>	13	TTTATTCTATTTCCAGTAAAATAAAGTTTTAGTAAA CTCTGCATCTTT AAAGAATTATTTTGGCATTATTTCTAAAATGGCATAG TATTTTGTATTT GTGAAGTCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAAATTCA AACATCCTAGGTA AAAAAAAAAAAAAGGTCAGAATTGTTTAGTGACTGTAA TTTTCTTTTGC GC ACTAAGGAAAGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACTGAA ACTTCACAGAATAG GGTTGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAA
557-584	SA: 剪接受体 粗体	14	ACTAAAGAATTATCTTTTACATTTTCAG
587-2458	密码子优化的hIDUA <u>下划线</u>	27	CACTTGGTCCACGTCGACGCTGCCAGAGCCCTGTGGC CGCTTCGAAGATT TTGGAGGTCAACGGGTTTCTGTCCCTCCCCTCCCCACT CGCAAGCAGATC AGTATGTA CTGT CATGGGATCAACAGCTTAACCTCGC CTATGTCGGAGCA GTGCCTCACCGCGGGATCAAGCAAGTAAGGACACATT GGCTCCTTGA ACT CGTCACCACGAGAGGATCGACGGGAAGGGGGCTTTC GTACA ACTTCACTC ATCTCGATGGCTATTTGGATCTCCTCCGCGAGAATCA GTTGTTGCCAGGC

			<p> TTCGAATTGATGGGATCGGCGAGCGGGCACTTTACAG ACTTCGAGGACAA GCAGCAAGTGTTTGAGTGGAAGGACCTCGTGTCGTGCG CTCGCGAGGAGAT ACATTGGTCGCTACGGTTTGGCGCATGTGTCAAAGTG GAACTTCGAAACG TGGAACGAGCCCGATCATCACGATTTTGACAACGTGT CAATGACCATGCA GGGTTTCCTTAACTATTACGACGCCTGTTCCGAGGGAT TGAGGGCAGCAT CACCGGCGCTTCGGCTGGGAGGGCCTGGTGATAGCTT TCATACACCACCT CGATCGCCACTTTCGTGGGGGCTGCTGCGCCATTGTC ACGATGGTACGAA CTTCTTACCGGGGAAGCGGGGTACGGCTTGATTAC ATCAGCCTCCACC GAAAGGGAGCGCGGTCAAGCATCTCGATTCTGGAGCA GGAGAAGGTAGTC GCTCAGCAGATCCGGCAACTCTTCCCAAGTTCGCAG ACACACCTATCTA CAATGATGAGGCAGACCCACTTGTGGGATGGTCCCTT CCGCAGCCATGGC GCGCAGATGTGACTTATGCCGCGATGGTAGTGAAAGT CATCGCCCAGCAC CAGAATCTGCTTCTTGCGAATACGACCAGCGCGTTTC CTTACGCGCTTTT GTCGAACGATAATGCCTTCCTGTCATATCACCCCATC CGTTTGCGCAGA GGACTCTTACGGCGCGATTCCAAGTGAATAACACCAG ACCGCCGCACGTG CAGCTGTTGCGAAAACCCGTGTTGACTGCGATGGGGC TTCTGGCGTTGCT TGATGAGGAACAACCTCTGGGCTGAAGTGTCCCAGGCG GGGACAGTACTTG ATAGCAATCATAACAGTAGGCGTGTTGGCGTCGGCGCA CCGACCGCAGGGA CCCGCGGATGCTTGGAGGGCAGCGGTCCTGATCTACG CCTCGGACGATAC TAGGGCACATCCCAACAGATCGGTCGCTGTCACCCTT CGCCTCAGAGGGG TCCCGCCTGGTCCCGGCTTGGTATACGTCCTAGATAT CTCGACAATGGA CTGTGCAGCCCCGACGGAGAGTGCGGGAGGCTGGGA CGGCCGGTGTTTCC GACAGCCGAGCAGTTTAGACGGATGAGGGCCGCTGA GGACCCCGTGCCAG CGGCACCGAGGCCCTCCCGGCAGGAGGTCGCCTCAC TCTTCGACCGCA CTGCGGCTGCCGTCCCTTCTGCTCGTACACGTCTGCGC GCGACCCGAAAA GCCGCCTGGACAGGTAACCAGGCTCAGGGCGCTCCCC TTGACGCAGGGGC AGTTGGTACTTGTCTGGTCGGACGAACACGTGGGGTC </p>
--	--	--	--

			CAAATGCTTGTGG ACGTATGAAATTCAGTTTTCCCAAGACGGGAAAGCGT ACACTCCGGTGTG GCGCAAACCCTCCACGTTCAACCTCTTCGTCTTTTCCC CAGACACGGGAG CCGTATCAGGGTTCGTACCGAGTCAGAGCCCTCGATTA TTGGGCGAGGCCT GGGCCGTTCTCGGACCCTGTACCATACTTGGAAGTGC CGGTGCCAGGGG ACCGCCCTCGCCTGGTAATCCT
2471-2 695	聚A 小写	7	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCC TCCCCGTGCCT TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTC CTAATAAAATGA GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT ATTCTGGGGGGTG GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG ACAATAGCAGGCAT GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
2702-2 801	RA: 右 同源性 臂 <u>双下划 线</u>	16	CTATCCATTGCACTATGCTTTATTTAAAAACCACAAAA CCTGTGCTGTTG ATCTCATAAATAGAACTTGTATTTATATTTATTTTCAT TTTAGTCTGTCT
2948- 3055	3' ITR [粗体 括号 内]	8	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT GCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC AGTGAGCGAGCGA GCGCGCAG

IDUA AAV的完整序列:

```
[CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG      50
GGCGACCTTT GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG      100
GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTCTT] GCGGCCTAAG CTTGAGCGGA      150
GTTCCAATTG TACTGTACAG AACCATGGTC ACATGTTTAA CGCTAGCGTG      200
CCGACCTGGT AAACCTGATCA GTGGGTGCAC TTAGGACTGC GTCTTACGCT      250
AATCACATGC GTGCGGCCGC TTTATTCTAT TTTCCAGTA AAATAAAGTT      300
TTAGTAAACT CTGCATCTTT AAAGAATTAT TTTGGCATT TTTTCTAAAA      350
TGGCATAGTA TTTTGTATTT GTGAAGTCTT ACAAGGTTAT CTTATTAATA      400
AAATTCAAAC ATCCTAGGTA AAAAAAAAAA AAGGTCAGAA TTGTTTAGTG      450
ACTGTAATTT TCTTTTGCGC ACTAAGGAAA GTGCAAAGTA ACTTAGAGTG      500
ACTGAAACTT CACAGAATAG GGTGAAGAT TGAATTCATA ACTATCCCAA      550
GGTACCACTA AAGAATTATT CTTTTACATT TCAGCGCACT TGGTCCACGT      600
```

<u>CGACGCTGCC AGAGCCCTGT GGCCGCTTCG AAGATTTTGG AGGTCAACGG</u>	650
<u>GTTTCTGTCC TCCCCTTCCC CACTCGCAAG CAGATCAGTA TGTACTGTCA</u>	700
<u>TGGGATCAAC AGCTTAACCT CGCCTATGTC GGAGCAGTGC CTCACCGCGG</u>	750
<u>GATCAAGCAA GTAAGGACAC ATTGGCTCCT TGAACTCGTC ACCACGAGAG</u>	800
<u>GATCGACGGG AAGGGGGCTT TCGTACAAC TCACTCATCT CGATGGCTAT</u>	850
<u>TTGGATCTCC TCCGCGAGAA TCAGTTGTTG CCAGGCTTCG AATTGATGGG</u>	900
<u>ATCGGCGAGC GGGCACTTTA CAGACTTCGA GGACAAGCAG CAAGTGTTTG</u>	950
<u>AGTGGAAGGA CCTCGTGTCG TCGCTCGCGA GGAGATACAT TGGTCGCTAC</u>	1000
<u>GGTTTGGCGC ATGTGTCAAA GTGGAAC TTC GAAACGTGGA ACGAGCCCGA</u>	1050
<u>TCATCACGAT TTTGACAACG TGTC AATGAC CATGCAGGGT TTCCTTAACT</u>	1100
<u>ATTACGACGC CTGTTCCGAG GGATTGAGGG CAGCATCACC GGCGCTTCGG</u>	1150
<u>CTGGGAGGGC CTGGTGATAG CTTTCATACA CCACCTCGAT CGCCACTTTC</u>	1200
<u>GTGGGGGCTG CTGCGCCATT GTCACGATGG TACGAACTTC TTCACCGGGG</u>	1250
<u>AAGCGGGGGT ACGGCTTGAT TACATCAGCC TCCACCGAAA GGGAGCGCGG</u>	1300
<u>TCAAGCATCT CGATTCTGGA GCAGGAGAAG GTAGTCGCTC AGCAGATCCG</u>	1350
<u>GCAACTCTTT CCAAGTTCG CAGACACACC TATCTACAAT GATGAGGCAG</u>	1400
<u>ACCCACTTGT GGGATGGTCC CTTCCGCAGC CATGGCGCGC AGATGTGACT</u>	1450
<u>TATGCCGCGA TGGTAGTGAA AGTCATCGCC CAGCACCAGA ATCTGCTTCT</u>	1500
<u>TGCGAATACG ACCAGCGCGT TTCCTTACGC GCTTTTGTGCG AACGATAATG</u>	1550
<u>CCTTCTGTGTC ATATCACCCC CATCCGTTTG CGCAGAGGAC TCTTACGGCG</u>	1600
<u>CGATTCCAAG TGAATAACAC CAGACCGCCG CACGTGCAGC TGTTGCGAAA</u>	1650
<u>ACCCGTGTTG ACTGCGATGG GGCTTCTGGC GTTGCTTGAT GAGGAACAAC</u>	1700
<u>TCTGGGCTGA AGTGTCCCAG GCGGGGACAG TACTTGATAG CAATCATACA</u>	1750
<u>GTAGGCGTGT TGGCGTCGGC GCACCGACCG CAGGGACCCG CGGATGCTTG</u>	1800
<u>GAGGGCAGCG GTCCTGATCT ACGCCTCGGA CGATACTAGG GCACATCCCA</u>	1850
<u>ACAGATCGGT CGCTGTCACC CTTCGCCTCA GAGGGGTCCC GCCTGGTCCC</u>	1900
<u>GGCTTGGTAT ACGTCACTAG ATATCTCGAC AATGGACTGT GCAGCCCCGA</u>	1950
<u>CGGAGAGTGG CGGAGGCTGG GACGGCCGGT GTTTCCGACA GCCGAGCAGT</u>	2000
<u>TTAGACGGAT GAGGGCCGCT GAGGACCCCG TGGCAGCGGC ACCGAGGCC</u>	2050
<u>CTCCCGGCAG GAGGTGCCT CACTCTTCGA CCGGCACTGC GGCTGCCGTC</u>	2100
<u>CCTTCTGTGTC GTACACGTCT GCGCGCGACC CGAAAAGCCG CCTGGACAGG</u>	2150

TAACCAGGCT CAGGGCGCTC CCCTTGACGC AGGGGCAGTT GGTACTTGTC 2200
TGGTCGGACG AACACGTGGG GTCCAAATGC TTGTGGACGT ATGAAATTCA 2250
GTTTTCCCAA GACGGGAAAG CGTACACTCC GGTGTCGCGC AAACCCTCCA 2300
CGTTCAACCT CTTCGTCTTT TCCCCAGACA CGGGAGCCGT ATCAGGGTCG 2350
TACCGAGTCA GAGCCCTCGA TTATTGGGCG AGGCCTGGGC CGTTCTCGGA 2400
CCCTGTACCA TACTTGGAAG TGCCGGTGCC CAGGGGACCG CCCTCGCCTG 2450
GTAATCCTTG ATAAAGATCT ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg 2500
 tttgcccctc ccccgtgcct tccttgacct tggaggtgc cactcccact 2550
 gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg 2600
 tcattctatt ctggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 2650
 gggagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtgggctc tatggACCGG 2700
TCTATCCATT GCACTATGCT TTATTTAAAA ACCACAAAAC CTGTGCTGTT 2750
GATCTCATAA ATAGAACTTG TATTTATATT TATTTTCATT TTAGTCTGTC 2800
TGGATCCACA AATTAATCGA ACCTGCAGCT GATATCGACG CTTAAGTAGG 2850
 GCTTAGCAAA CGCGTCTCCA ACGTTTCGCC GTTAACACCC CACATAGTGA 2900
 GTGGTCTTAG TAGTCCGGGT GTTTAAACTG AAAGATAACT CGAGCGC [**AGG** 2950
AACCCCTAGT GATGGAGTTG GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC 3000
ACTGAGGCCG CCCGGGCTTT GCCCGGGCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG 3050
CGCAG] (SEQ ID NO:28) 3055

实施例2:

[0264] 如下制备包含如实施例1中所述的多核苷酸和AAV的组合物:在三个加盖的小瓶中提供组分:所述组分以三个加盖小瓶提供:一个小瓶用于ZFN1 (SB-47171,加白色盖并标记为SB-A6P-ZLEFT;或SB-71557,标记为SB-A6P-ZL2);一个小瓶用于ZFN2 (SB47898,加蓝色盖并标记为SB-A6P-ZRIGHT;或SB-71728,标记为SB-A6P-ZR2);并且一个小瓶用于hIDUA供体 (hIDUA,加橙色盖并标记为SB-A6P-HRL)。产品组分全部是单独配制在含有CaCl₂、MgCl₂、NaCl、蔗糖和Kolliphor[®] (泊洛沙姆) P188的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中或标准生理盐水 (NS) 配制品中的纯化的AAV。剂量计算使用受试者的体重进行并四舍五入成小数点后两位。计算是通过将群组剂量乘以基线处的受试者体重,且然后除以vg/mL浓度进行的。将三个产品组分体积加在一起,并且确定总体积。另外,计算要添加的人血清白蛋白 (HSA) 静脉溶液的体积,以实现最终浓度为0.25% HSA,并且最后将PBS或NS添加所需的量,以实现恰当的组分浓度。

[0265] 然后将产品组分添加至在NS或PBS中含有0.25% HSA的IV输注袋中。分别添加每种产品组分,并且然后将袋子轻轻混合并转移给负责输注的人员。然后使用输注泵 (Sigma Spectrum) 以100mL/h的速率将产品输注至受试者体内。

实施例3:

研究合格性和排除标准

[0266] 研究中受试者的关键合格性标准包括： ≥ 18 岁的男性或女性；减毒型MPS I (MPS HIS、MPS IS、MPS IH后HSCT) 的临床诊断；通过基因测序确认的IDUA缺陷；肝脏肿块阴性的磁共振成像(MRI)。

[0267] 研究中受试者的关键排除标准包括：已知对酶替代疗法无反应；血清中有针对抗AAV2/6的中和抗体；严重的并发症或临床上显著的器质性疾病(除非继发于MPS)，如心血管、肝脏、肺部、神经病学或肾疾病。接受针对乙型或丙型肝炎或活动性乙型或丙型肝炎或人类免疫缺陷病毒(HIV) 1/2的抗逆转录病毒疗法；缺乏针对拉罗尼酶(laronidase) 治疗的耐受性并伴有显著的输注相关反应(IAR) 或过敏反应发生；白蛋白基因座中ZFN靶向区多态性；肝纤维化得分在0至4分量表上为3或4(Desmet等人(1994) Hepatology 19(6):1513-20)；如果受试者在筛查2年内进行过肝活检，肝功能障碍的标记物；肌酐 $\geq 1.5\text{mg/dl}$ ；怀孕或母乳喂养的女性；禁忌使用皮质类固醇；目前使用全身(iv或口服) 免疫调节剂或类固醇治疗；在过去5年内有活动性恶性肿瘤病史；在先前3个月内参加过先前研究性药物或医疗设备研究；先前使用基因疗法产品治疗；以及甲胎蛋白升高或异常。

研究设计

[0268] 本研究是针对患有MPS I疾病的受试者进行的。群组中使用的剂量如下表6中所示。群组1被认为是低剂量，群组2是中剂量，并且群组3是高剂量。对于所有群组，总AAV剂量包括固定比率为1:1:8的2个ZFN载体和1个供体载体。

表6:评价剂量

群组	受试者	ZFN 1(SB-41717或 71557) vg/kg	ZFN 2(SB-47898或 71728) vg/kg	hIDUA供体 (SB-IDUA) vg/kg	总 rAAV vg/kg	剂量描述
1	2	1.00 e+12	1.00 e+12	8.00 e+12	1.00 e+13	起始剂量
2	2	5.00 e+12	5.00 e+12	4.00 e+13	5.00 e+13	5x起始剂量
3	5	待确定				最大耐受剂量

[0269] 在招募前接受ERT的受试者在研究期间继续接受ERT，并按照护理标准保持其当前的时间表；然而，在输注的一周内省去ERT以有利于ERT谷值水平下的准确基线测试(例如，尿液GAG水平以及白细胞和血浆IDUA活性的) 并允许输注后一周无ERT。

[0270] 为了最小化对AAV衣壳蛋白、工程化ZFN或内源hIDUA的潜在免疫应答，并保留肝功能，在输注前2天开始预防性地施用泼尼松或等效皮质类固醇，并在大约20周的时段内逐渐减少。

临床终点

[0271] 主要终点：本研究的主要终点是如通过不良事件和显著不良事件的发生率评估的组合物的安全性和耐受性。另外的安全性评价包括：常规血液学、化学和肝功能实验室测试、生命体征、身体检查、ECG、ECHO和伴随用药；颅神经检查和肌肉强度测试；用于评价肝脏肿块的系列甲胎蛋白测试和肝脏MRI。对所有受试者进行安全性评估。使用监管活动医学词典(Medical Dictionary for Regulatory Activities) (MedDRA) AE词典将所有报告的不良事件编码为一组标准术语。通过严重程度和与研究药物物质的相关性来汇总每个事件的

频率。

[0272] 关键的次要终点包括：以下项相对于基线的变化：血浆和白细胞中测量的IDUA活性；尿液中测量的总GAG、DS GAG和HS GAG水平（表示为与肌酐的比率）；通过PCR由血浆、唾液、尿液、粪便和精液中载体基因组测量的AAV2/6清除率。尿液GAG水平是MPS I疾病病理生理学的关键生物标记物。

[0273] 关键的探索性终点包括以下项相对于基线的变化：在活检时获得的肝脏组织中白蛋白基因座处的基因修饰的百分比和持久性；与MPS I相关的成像、功能性和神经认知测试；肝脏和脑脊液(CSF)GAG水平以及对AAV 2/6和/或ZFN的任何免疫应答。

[0274] 从同意的受试者，可以收集另外的样品以用于未来研究目的。此类未来研究目的可以包括分析疾病严重程度的血浆标记物、对疗法的反应（例如，细胞因子、可溶性细胞表面蛋白、可溶性受体）和功能改善（例如，神经功能、肌肉骨骼功能），以及测定AAV病毒抑制、功能、免疫原性或药效学（例如，抗体、可溶性受体、AAV病毒受体抑制剂、细胞因子、共存的交替血清型抗体）。

统计分析和数据分析

[0275] 这是一项探索性I期研究，并且因此评价功效和相关生物学终点的统计能力有限。因此，分析本质上主要是描述性和探索性的。本研究将招募9名受试者（2个群组中的每个群组中2名受试者，有可能在最大耐受剂量下招募5名另外的受试者）。由于这是评价安全性和耐受性的I期安全性研究，因此2名受试者/群组的选择不是基于统计计算。所有表、列表和数据汇总均在SAS 9.2或更新版本中进行。

患者

[0276] 患者人口统计学示出在下表7中。表8列出了在试验起始后32周每名受试者具有的治疗暴露。

表7：患者人口统计学

受试者特征	总体(N=3)
年龄(岁)	
患者数量	3
Min-Max	23.00, 37.00
均值(SD)	29.00 (7.21)
中值	27.00
性别, n(%)	
男性	1 (33.3)
女性	2 (66.7)
人种, n(%)	
亚洲人	2 (66.7)
白种人	1 (33.3)

表8：治疗暴露 (近似)

受试者	剂量群组	随访(周)
1	1	22
2	2	9
3	2	5

观察到的不良事件

[0277] 所有受试者均报告了治疗中出现的不良事件 (TEAE), 这与进行中的MPS I疾病一致。大多数为轻度 (1级) 并且无需治疗即可消退。一般来讲将研究药物以高达5e13 vg/kg的剂量施用至三名患有减毒型MPS I的受试者, 并且总体上是耐受性良好的。

[0278] 研究药物相关不良事件 (AE) 是中度的 (1级), 并且全部与进行中的MPS I疾病一致。未报告SAE, 并且未报告研究药物的AE。没有报告肝功能测试的增加。AE示出在下表9中。

表9: 研究药物相关不良事件

首选术语	群组1 (N=1) n [T]	群组2 (N=2) n [T]	总体 (N=3) n [T]
任何TEAE	1 [2]	2 [4]	3 [6]
1- 轻度			
2- 中度			
头痛	1[1]	无	1[1]
痤疮		2[2]	2[2]
上呼吸道感染	1[1]	无	1[1]
肌肉骨骼僵硬	无	1[1]	1[1]
口咽痛	无	1[1]	1[1]

[0279] 在表9中, “N” 指示每个治疗组中的受试者总数量; “n” 指示具有每个首选术语的不良事件的受试者数量; 并且 “[T]” 指示不良事件的总数量。

[0280] 所有受试者均在逐渐减少服用预防性泼尼松, 而无需增加的给药。所有受试者在治疗后的整个时间段内具有正常的AST和ALT读数。

初步的血浆IDUA测量

[0281] 血浆IDUA活性是在谷值处测量的, 所述谷值定义为在以下时间段中, 所述时间段在可能的情况下紧接ERT给药之前, 并且不少于受试者最后一次ERT输注之后的96小时。通过本领域已知的方法测定 α -L-艾杜糖醛酸酶的活性 (参见实施例4)。在本研究中, 在该初始时间点, 血浆IDUA活性相对于治疗前值没有显著变化。

群组1和2的白细胞IDUA结果

[0282] 使用本领域已知的方法分析受试者的白细胞中的IDUA水平 (参见实施例4)。因为受试者是在不同时间点被招募在研究中, 所以有给药后不同时间段的报告结果, 如表8中所示。结果证明, 经治疗的受试者在其白细胞中的IDUA水平高于正常范围下限。在1e13和5e13两种剂量下, 所有三个经治疗的受试者中均观察到白细胞IDUA活性增加到正常范围中。在给药前 (参见图2, 给药后的研究天数“0” 指示将本文公开的组合物施用至每名受试者的那一天) 发现的IDUA水平的比较证明, 每名受试者具有白细胞IDUA活性的增加。

尿液糖胺聚糖水平结果

[0283] 测定总尿液GAG水平以及硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的水平。使用的方法是本领域已知的方法 (参见实施例4)。

[0284] 尿液GAG分析的结果示出在图4中。这些结果是在此早期时间点时的初步读数。随着受试者在临床研究中的进展, 将针对尿液GAG的降低对进一步的数据点进行分析。

受试者1-3的结果汇总

[0285] 也被称为胡勒尔综合征的MPS I是一种罕见的遗传性代谢疾病,其由IDUA(一种需要分解溶酶体中的GAG的酶)缺乏引起。在没有IDUA的情况下,GAG在细胞中的毒性积聚可导致组织和器官损伤、肌肉骨骼问题和其他症状。目前MPS I的标准护理治疗是酶替代疗法(ERT),其以每周静脉输注给予。对于重度MPS I患者,骨髓移植也是一种常用的治疗。

[0286] 本文所述的研究包含两个剂量群组。将一名患者在第一群组中以 1×10^{13} vg/kg的剂量进行治疗,并且将2名患者在第二群组中以 5×10^{13} 进行治疗。

[0287] 从所有三名患者收集的安全性数据显示,研究药物的施用总体上是耐受性良好的,具有有利的安全性概况。共报告了八种不良事件,全部都是轻度或中度的,与进行中的MPS I疾病一致,并且无需治疗即可消退。报告的不良事件均未被确定为与研究药物治疗相关。没有报告严重不良事件或SAE,并且没有观察到持续的转氨酶升高。

[0288] 在MPS I中,通常将白细胞IDUA活性用于估计骨髓移植患者组织中IDUA酶的水平,因为增加的白细胞IDUA活性与骨髓移植环境中改善的临床结局相关。结果指示了白细胞IDUA活性的剂量依赖性增加,其中活性水平上升至高于基线并处于正常范围(正常范围为6.0-71.4nmol/h/mg)内。在所有三名患者中,血浆IDUA活性相对于基线均无变化。在所有三名患者中,血浆IDUA活性相对于基线均无变化。这可能是由于研究药物和基因组编辑疗法与MPS I疾病生物学的相反PK/PD特性。

[0289] 三名患者的基线尿液GAG测量值均在视为正常的范围内或略高于正常值。在此有限的持续时间内,数据集尿液GAG测量没有显示出明显的趋势或有意义的变化。需要另外的随访以确定尿液GAG是否出现任何有意义的变化。然而,在用如本文所述的组合物治疗的经治疗受试者中观察到的靶组织白细胞IDUA活性增加的早期观察结果是令人鼓舞的。

[0290] 使用本文公开的包含AAV SB-71557和AAV SB-71728(代替47171和47898)以及AAV hIDUA供体的组合物进行另外的研究。在临床前研究中,AAV SB-71557和AAV SB 71728已展示出改善的切割效率(5至30倍)和改善的IDUA(患有MPS I的受试者中缺乏的酶)表达(5至20倍增加)(参见美国临时申请62/728,226)。

实施例4:

IDUA酶测定

[0291] 可以利用的示例性实验室程序如下进行。为了检测IDUA酶活性,存在许多可以使用的测定。

[0292] 一种示例性测定如下:根据所建立的测定条件,使用4-甲基伞形酮基 α -L-艾杜糖醛酸苷(iduronide) (Glycosynth) 作为底物通过荧光测定法测定 α -L-艾杜糖醛酸酶的活性(Whitley等人(1987) Am J Med Genet 28:233-243;Whitley(1986) Birth Defects Orig Artic Ser.22(1):7-24。将4MU-艾杜糖醛酸苷底物用甲酸钠缓冲液(0.4M,pH 3.5)在狭窄的良好建立的最佳pH范围内(Hopwood等人(1979) Clin Chim Acta.92:257-265,Whitley(1986),同上),并在选定的底物浓度下稀释。然后,将25 μ L底物等分试样与25 μ L生物样品(例如血浆、白细胞、组织匀浆)混合。将混合物在37 $^{\circ}$ C孵育30min,并添加200 μ L甘氨酸碳酸盐缓冲液(pH 10.4)以淬灭反应。 α -L-艾杜糖醛酸酶催化非荧光底物(4MU-艾杜糖醛酸苷)裂解为荧光产物(4-MU)。使用4-甲基伞形酮(4-MU,Sigma)制作标准曲线。使用Bio-Tek板读取器测量所产生的荧光,其中在355nm下激发并且在460nm下发射。 α -L-艾杜糖醛酸酶活性以如用Pierce蛋白测定试剂盒(Fisher)测定的单位(每小时转化的产物的nmol)/mg蛋白表

示。将所有反应一式三份地运行。

[0293] 用于测量白细胞中的IDUA活性的另一种示例性荧光测定(使用4-甲基伞形酮基 α -1-艾杜糖醛酸苷(4-MU, Glycosynth, Cheshire, UK或Sigma Aldrich, St. Louis MO)作为底物)(Isman等人(2005) Clin Chem 51(3))如下:

[0294] 在知情同意的情况下从健康成年人供体获得血液。将白细胞如下用Ficoll-Paque分级分离:将血液(10mL)抽入含有肝素钠的真空管(Vacutainer; Becton Dickinson)中,转移到40-mL塑料离心管,用20mL汉克斯(Hanks)平衡盐溶液(HBSS)稀释,并轻轻混合。将经稀释的血液在20 \times 150mm离心管中的15mL Ficoll-Paque上轻轻分层,并且在室温下以360g离心50min;将上清液小心地吸去并丢弃。将在与血浆的界面处的单核细胞移液至塑料离心管中,用HBSS洗涤,并以170g离心10min(进行两次)。然后将单核细胞沉淀物用盐水溶液(9g/L NaCl)冲洗以去除残留的HBSS,并用于实验(在下文称为单核细胞部分)。当通过Wright染色评价时,单核细胞部分含有90%-93%淋巴细胞和3%-5%单核细胞。将存在于初始Ficoll-Paque分离的底部的粒细胞/红细胞部分用等渗盐水洗涤两次,随后通过低渗性裂解去除红细胞,从而得到由94%-98%粒细胞组成的粒细胞部分(在下文称为粒细胞)。将细胞沉淀物储存在-20 $^{\circ}$ C下,并且将所有酶测定在细胞分离后的1-5天内进行。

[0295] 通过Rome等人(1979) Proc Natl Acad Sci U S A 76:2331-2334的方法测定 α -艾杜糖醛酸酶活性(EC 3.2.1.76)。用基于4-甲基伞形酮的底物在365nm激发波长和450nm发射波长下测量该测定和所有其他测定的荧光;将所述结果与用4-甲基伞形酮制备的校准曲线进行比较。将结果报告为匹配样品中酶活性的平均比率(具有95%置信区间)。

[0296] 本领域已知的第二种测定(Aronovich等人(1986) Am. J. Hum. Genet. 58:75-85)如下:通过在右旋糖酐上差速沉淀,然后进行两个低渗性溶血循环来制备白细胞(Lichtman 1990)。对于一些个体,通过用爱泼斯坦-巴尔病毒转化来制备类淋巴母细胞系(LCL)。使用荧光底物4-甲基伞形酮(MU) CC-L-艾杜糖醛酸苷(Calbiochem)测量IDUA的活性,并将其表示为nmol MU/mg蛋白/h、或nmol MU/ml血浆/h,如在别处(Whitley等人(1987) Am J Med Genet 28:233-243)所述的。值得注意的是,最初开发所述测定是用来相对于反应pH(3.3)和底物浓度(2.85mM,高于 K_m 的 >10 倍)优化37 $^{\circ}$ C下的人白细胞IDUA活性。在这些条件下,发现反应关于-3h的反应时间成线性关系,但在本研究中反应为30min或2h。用考马斯蓝(Bio-Rad)测量蛋白质浓度。血浆IDUA酶活性是根据先前公布的方法(Wasteson和Neufeld(1982) Meth Enzymol 83:573-578; Clarke等人(1990) Clin Genet 37:355-362)测定。酶活性的一个单位定义为 3H 底物转化为产物的百分比。比酶活报告为U/mg蛋白/h。

[0297] 用甲酸钠缓冲液(0.4M, pH 3.5)稀释4-MU艾杜糖醛酸苷。然后,将25 μ L底物等分试样(360 μ M)与25 μ L组织匀浆等分试样混合。将混合物在37 $^{\circ}$ C下孵育30min,并添加200 μ L甘氨酸碳酸盐缓冲液(pH 10.4)以淬灭反应。IDUA催化非荧光底物(4-MU艾杜糖醛酸苷)裂解成荧光产物(4-MU)。使用4-甲基伞形酮(Sigma-Aldrich, 圣路易斯, 密苏里州)制作标准曲线。使用微板读取器(BioTek, 威努斯基, 佛蒙特州)测量所产生的荧光,其中在355nm下激发并且在460nm下发射。IDUA酶活性以如用Pierce蛋白测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific, 沃尔瑟姆, 马萨诸塞州)测定的单位(每小时转化的产物的nmol)/mg蛋白表示。将所有反应一式三份地运行(Ou等人(2018) Mol Genet Metab 123(2):105-111)。

[0298] 测量来自组织的IDUA活性的另一个示例性测定如下:在使用氯胺酮/甲苯噻嗪混

合物(10 μ L/g)处死之后,向小鼠经心脏灌注1x PBS。立即收获来自脑、心脏、肾脏、肝脏、脾和肺的样品并快速冷冻以用于IDUA和GAG分析。将收获的小鼠组织置于冰上的Eppendorf管中的1mL PBS中,并使用机动杵匀浆化。然后添加在PBS中的11 μ L 10%曲通X-100,并将匀浆在冰上保持10min。通过Bradford比色法估计澄清上清液中的蛋白质浓度。

[0299] IDUA活性测定如下:简而言之,将50 μ M 4-甲基伞形酮基 α -L-艾杜糖醛酸苷溶液在含有0.2%曲通X-100的0.4M甲酸钠缓冲液(pH 3.5)中制成的25 μ l溶液添加至25 μ l组织匀浆中,并且在37 $^{\circ}$ C下在黑暗中孵育1h。通过添加200 μ l 0.5M NaOH/甘氨酸缓冲液(pH 10.3)使反应淬灭。将管在4 $^{\circ}$ C下以13,000rpm离心1min,将上清液转移到96孔板,并使用Spectra Max Gemini XS荧光测定板读取器(Molecular Devices,森尼维耳,加利福尼亚州)在365nm激发波长和450nm发射波长下读取荧光。注释:甲酸钠、甲酸、4-甲基伞形酮、甘氨酸、NaOH、曲通X-100和叠氮化钠是从Sigma(圣路易,密苏里州)获得的,并且4-甲基伞形酮基 α -L-艾杜糖醛酸苷是从Glycosynth(沃灵顿,柴郡,英国)获得的。组织样品中的IDUA活性如下计算:活性(以ng/h计)=(组织样品的荧光测定读数 \times A)-B,其中A和B是从使用纯终产物(4-甲基伞形酮)生成的标准曲线的曲线拟合方程获得的值。在每个样品中,IDUA的比活性表示为nmol/h/mg蛋白(Garcia-Rivera等人(2007)Brain Res Bull.74(6):429-438)。

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

[0300] 存在多种测定来测量尿液中GAG的水平。一种示例性测定描述如下:使用二甲基亚甲基蓝(DMB)测定分析在研究期间收集的尿液样品的糖胺聚糖水平。简而言之,通过用悬浮于3.3pH值下的甲酸中的1,9-二甲基亚甲基蓝染料处理来针对硫酸乙酰肝素对尿液样品进行染色,并在520nm的波长下测量吸光度。将硫酸乙酰肝素的浓度使用尿液样品中鉴定的肌酐蛋白的总浓度进行归一化。(参见例如de Jong等人(1989)Clin Chem 35(7):1472-1479)。

[0301] 用于测量存在于生物样品中的总GAG的另一个示例性测定如下:所述方法涉及(a)在适合于通过丝氨酸蛋白酶裂解标记底物以产生可检测信号的条件和时间下将丝氨酸蛋白酶(例如,凝血级联的)、丝氨酸蛋白酶的标记底物、丝氨酸蛋白酶的抑制剂和怀疑包含一种或多种糖胺聚糖的样品组合,(b)检测可检测信号,和(c)将可检测量信号的量与标准进行比较以确定所述样品中所述一种或多种糖胺聚糖的浓度,其中所述丝氨酸蛋白酶的所述抑制剂选自肝素辅因子II和抗凝血酶III,并且其中所述一种或多种糖胺聚糖选自硫酸皮肤素(DS)和硫酸肝素(HS)。(参见例如美国专利公开号2013/0189718)。

[0302] 另一个示例性测定测量存在的GAG的类型,并称为多重测定(Langereis等人(2015)PLoS One 10(9):e0138622)。该测定是基于尿液中发现的硫酸乙酰肝素(HS)、硫酸皮肤素(DS)和硫酸角质素(KS)的酶消化,然后通过LC-MS/MS进行定量。该测定是非常灵敏的测定,并且可用于测量尿液中GAG的确切类型。

[0303] 可用于确定特定类型的GAG浓度的另一个示例性测定利用RapidFire(RF, Agilent)高通量质谱系统。将样品吸收至基质以进行浓缩和脱盐,并且然后直接洗脱至MS/MS中,而无需色谱分离。每个样品处理少于十秒,从而产生比基于常规LC-MS/MS的方法快得多的通量(参见Tomatsu等人(2014)J Anal Bioanal Tech.3月1日;2014(增刊2):006.)

血浆、唾液、尿液、粪便和精液中的AAV2/6清除率

[0304] 生物样品中AAV的检测可以通过本领域已知的若干种方法进行。一种示例性脱落测定用于分析人血浆、精液、唾液、尿液和粪便样品中的AAV2/6-供体和AAV2/6-ZFN载体,并用于评价来自五种基质的DNA的回收率。来自人供体的人血浆、精液、唾液、尿液和粪便样品提供了用于qPCR分析的基质DNA的来源。

[0305] 自人血浆的DNA分离:将等分试样(200 μ L)的人血浆样品解冻,在2 μ g鲑精DNA的存在下用蛋白酶K处理,之后使用QIAamp DNA微型试剂盒进行DNA分离。将纯化的血浆DNA溶解在100 μ L洗脱缓冲液AE中。

[0306] 自人精液的DNA分离:将等分试样(多至100 μ L)的人精液样品解冻,用蛋白酶K处理,且然后处理以用于使用QIAamp DNA微型试剂盒进行DNA分离。将纯化的精液DNA溶解在100 μ L洗脱缓冲液AE中,并使用Nanodrop ND-8000仪器通过260nm下的UV吸收测定DNA浓度。

[0307] 自人唾液的DNA分离:将等分试样(多至200 μ L)的人唾液样品解冻,用蛋白酶K处理,且然后处理以用于使用QIAamp DNA微型试剂盒进行DNA分离。将纯化的唾液DNA溶解在100 μ L洗脱缓冲液AE中,并使用Nanodrop ND-8000仪器通过260nm下的UV吸收测定DNA浓度。

[0308] 自人尿液的DNA分离:将等分试样(多至200 μ L)的人唾液样品解冻,用蛋白酶K处理,且然后处理以用于使用QIAamp DNA微型试剂盒进行DNA分离。将纯化的唾液DNA溶解在100 μ L洗脱缓冲液AE中,并使用Nanodrop ND-8000仪器通过260nm下的UV吸收测定DNA浓度。

[0309] 自人粪便的DNA分离:将等分试样(90-110mg)的人粪便样品部分解冻、均化,并用蛋白酶K处理,之后使用QIAamp Fast DNA粪便微型试剂盒进行DNA分离。将纯化的粪便DNA溶解在200 μ L缓冲液ATE中,并使用Nanodrop ND-8000仪器通过260nm下的UV吸收测定DNA浓度。

[0310] 将每个qPCR在7900HT快速实时PCR系统中的标准96孔板上进行。将具有反应混合物的板用光学盖密封,并通过以1500rpm离心15分钟离心所有液滴,然后进行qPCR。

[0311] 将针对供体AAV(SB-IDUA、SB-A6P-HNT)的反应扩增并检测到91个核苷酸扩增子。将用于检测ZFN DNA(SB-47171:SB-A6P-ZLEFT或SB-71557和SB-47898:SB-A6P-ZRIGHT或SB-71728)的反应扩增并检测到96个核苷酸扩增子。

[0312] 使用的测定条件:在50 $^{\circ}$ C下保持2分钟。在95 $^{\circ}$ C下保持10分钟。40个循环:在95 $^{\circ}$ C下持续15秒并且在60 $^{\circ}$ C下持续1分钟。将结果与先前使用线性化的MPS I或ZFN质粒DNA准备的标准曲线进行比较。

肝脏组织中白蛋白基因座的基因修饰

[0313] 通过测序或其他手段检测基因修饰是本领域熟知的。示例性测定是用于使用MiSeq下一代测序(NGS)平台确定受试者样品中白蛋白基因处的插入和缺失(indel)水平。使用标准程序从肝脏组织分离gDNA,并将其稀释至20ng/mL。对样品进行衔接子PCR,之后进行条形码PCR,并且加载至MiSeq盒上以进行测序。对于PCR反应使用以下条件:

[0314] PCR反应(衔接子):95 $^{\circ}$ C 3分钟[98 $^{\circ}$ C 20秒,55 $^{\circ}$ C 15秒,72 $^{\circ}$ C 15秒],将括号内的步骤重复29次。最后在72 $^{\circ}$ C下延伸1分钟。

[0315] PCR反应(条形码):95 $^{\circ}$ C 3分钟[98 $^{\circ}$ C 20秒,60 $^{\circ}$ C 15秒,72 $^{\circ}$ C 15秒],将括号内的步骤重复9次。最后在72 $^{\circ}$ C下延伸1分钟。

[0316] 本文提及的所有专利、专利申请和出版物均通过引用以其整体特此并入。

[0317] 虽然已经出于清晰理解的目的通过说明和实施例详细提供了公开文本,但是本领域

域技术人员将了解,可以在不背离本公开文本的精神或范围的情况下进行各种改变和修改。因此,前述说明和实施例不应视为限制性的。

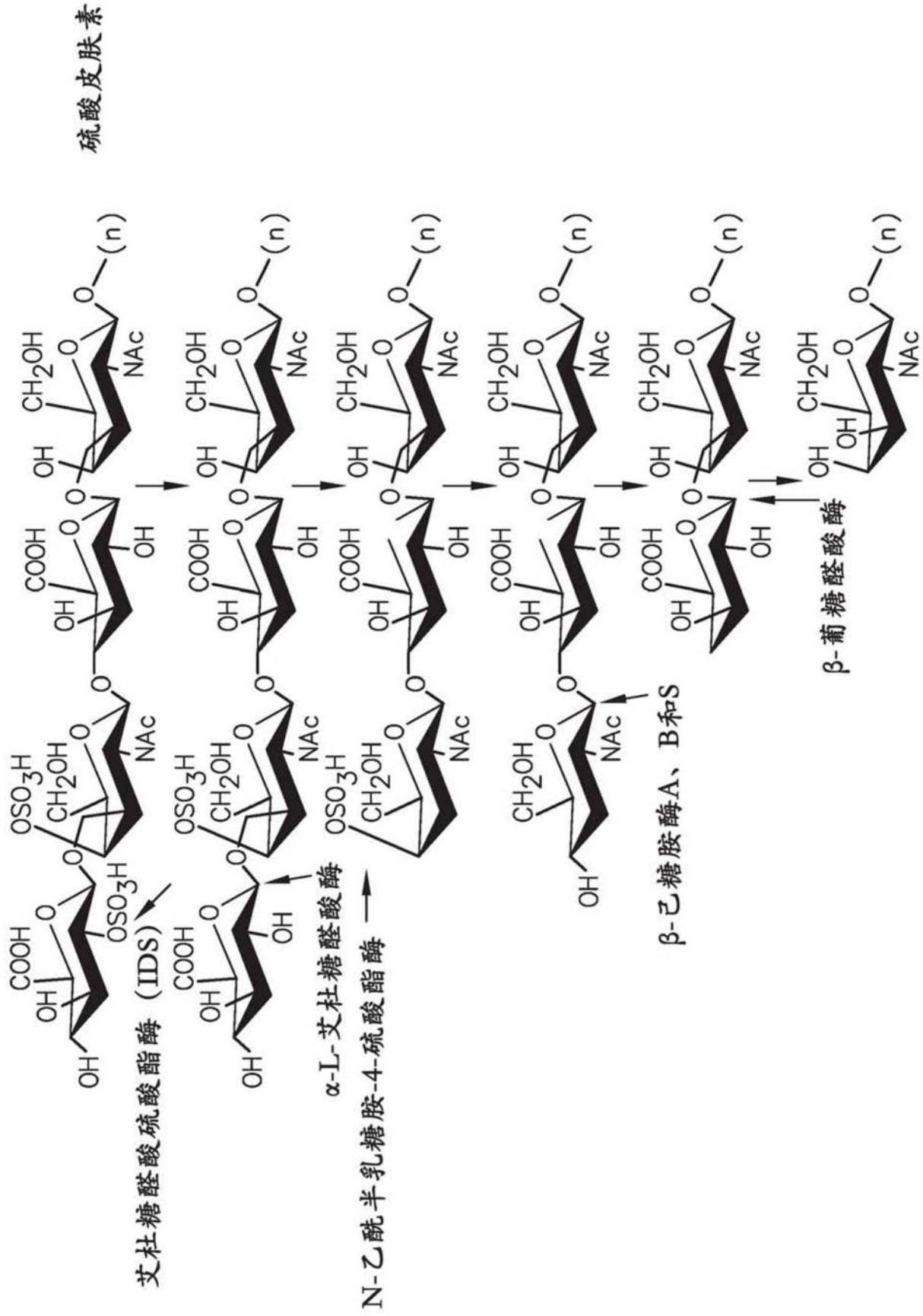


FIG.1A

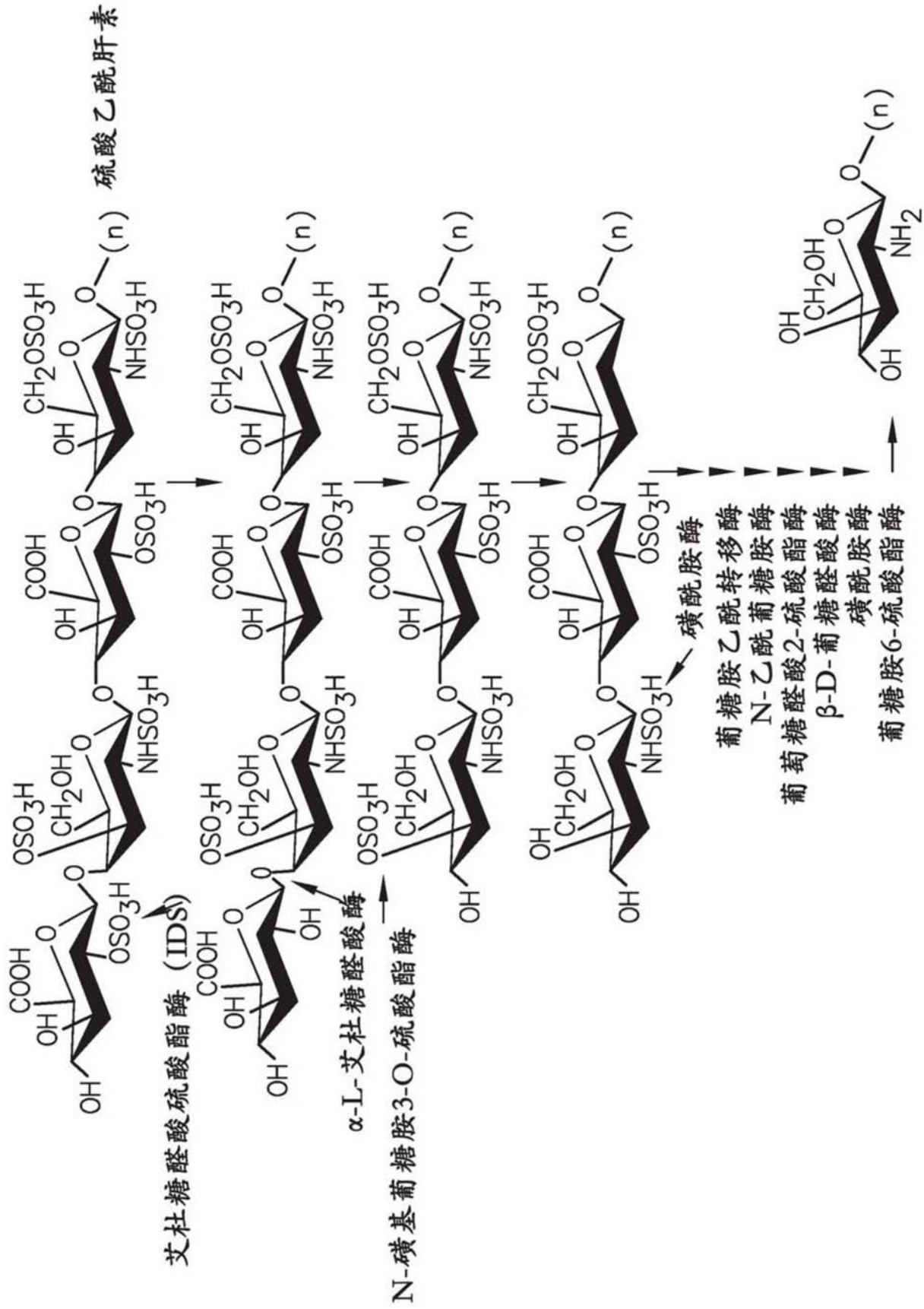


FIG.1B

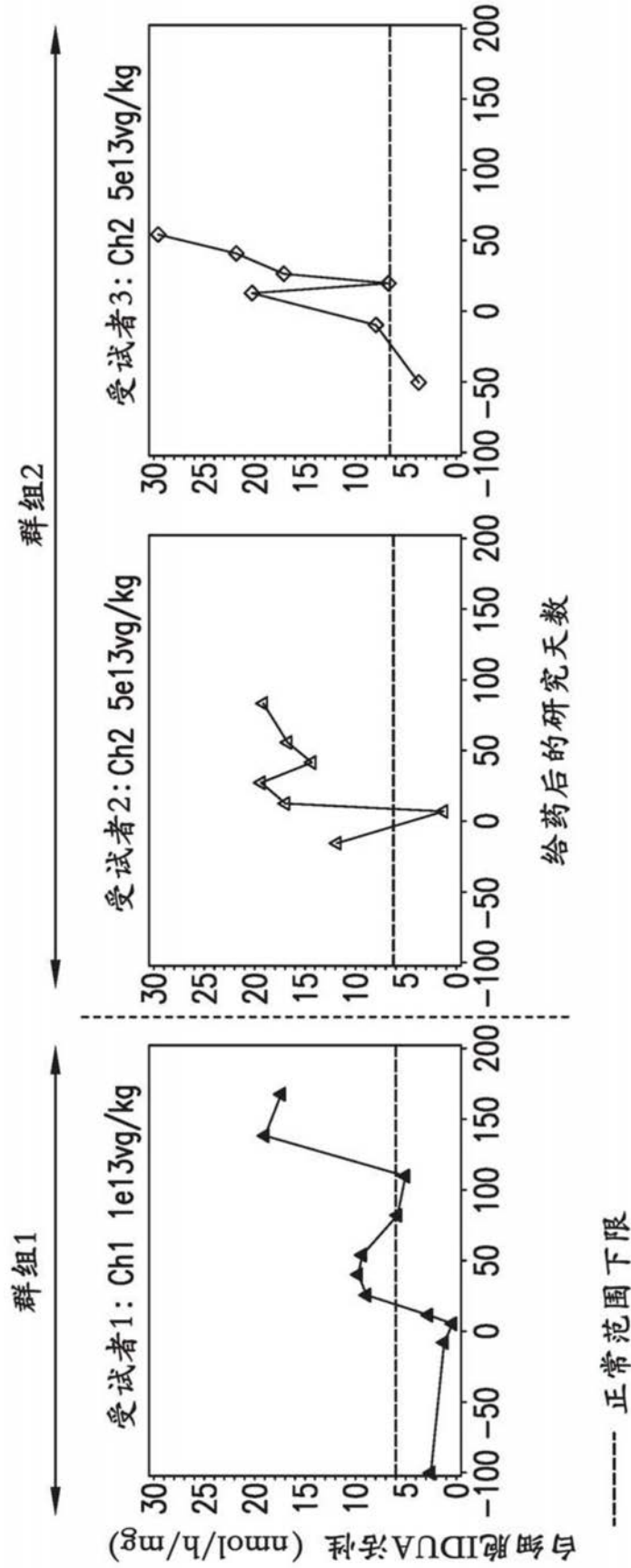


FIG.2

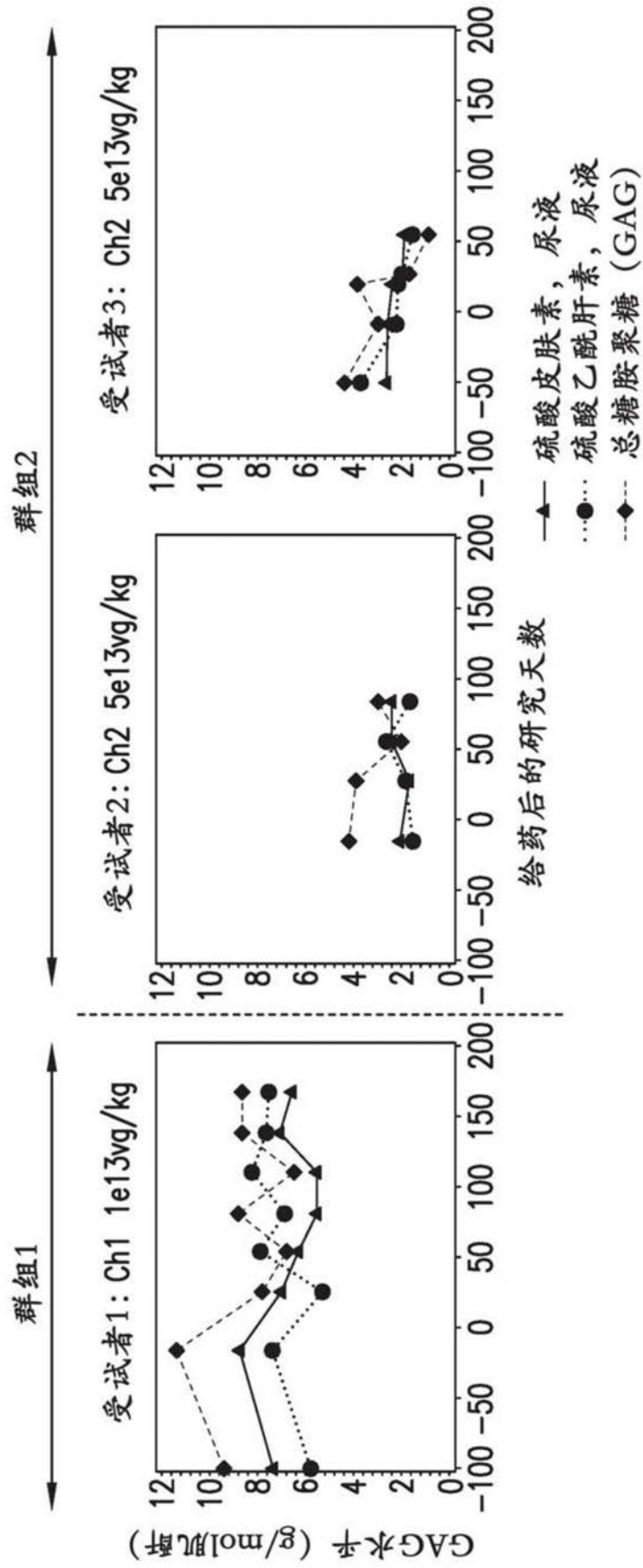


FIG.3