



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108137664 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680049590.4

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2016.08.30

代理人 卢曼 罗文锋

(30)优先权数据

62/212144 2015.08.31 US

62/336211 2016.05.13 US

(51)Int.Cl.

C07K 14/505(2006.01)

C12N 15/10(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

A01K 21/00(2006.01)

A01K 29/00(2006.01)

A61K 9/19(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/049487 2016.08.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/040524 EN 2017.03.09

(71)申请人 宾夕法尼亚州大学信托人

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 C.欣德勒 J.M.威尔逊 M.威尔逊

权利要求书2页 说明书13页

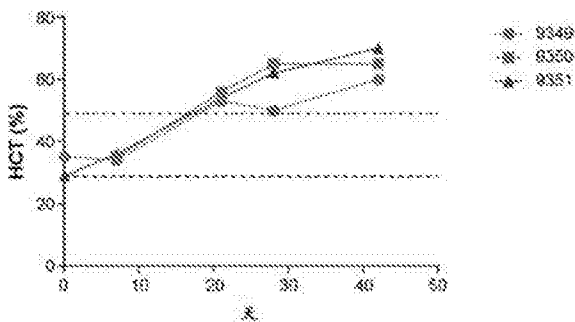
序列表12页 附图2页

(54)发明名称

用于治疗伴侣动物的AAV-EPO

(57)摘要

本公开提供了用于治疗伴侣动物的组合物和方法。提供了腺相关病毒载体,其包括含有编码促红细胞生成素(EPO)的序列的核酸分子。在所需的实施方案中,受试者是猫或狗。



1. 一种重组腺相关病毒 (rAAV), 其包含其中包装有载体基因组的AAV衣壳, 其中所述载体基因组包含编码猫促红细胞生成素 (EPO) 的核酸序列、反向末端重复序列和指导所述EPO在宿主细胞中表达的表达控制序列。

2. 一种重组腺相关病毒 (rAAV), 其包含其中包装有载体基因组的AAV衣壳, 其中所述载体基因组包含编码犬促红细胞生成素 (EPO) 的核酸序列、反向末端重复序列和指导所述EPO在宿主细胞中表达的表达控制序列。

3. 如权利要求1或2所述的rAAV, 其中所述EPO序列编码全长EPO蛋白。

4. 如权利要求1或2所述的rAAV, 其中所述EPO序列与异源前导序列组合编码所述成熟EPO蛋白。

5. 如权利要求1所述的rAAV, 其中所述EPO序列编码SEQ ID NO:4的蛋白质序列。

6. 如权利要求2所述的rAAV, 其中所述EPO序列编码SEQ ID NO:3的蛋白质序列。

7. 如权利要求1所述的rAAV, 其中所述EPO序列包含SEQ ID NO:6的核酸序列或其变体。

8. 如权利要求7所述的rAAV, 其中所述变体是SEQ ID NO:6的密码子优化的变体。

9. 如权利要求8所述的rAAV, 其中密码子优化的变体是SEQ ID NO:8。

10. 如权利要求2所述的rAAV, 其中所述EPO序列包含SEQ ID NO:5的核酸序列或其变体。

11. 如权利要求10所述的rAAV, 其中所述变体是SEQ ID NO:5的密码子优化的变体。

12. 如权利要求11所述的rAAV, 其中密码子优化的变体是SEQ ID NO:7。

13. 如权利要求1或2所述的rAAV, 其中所述表达控制序列包含启动子。

14. 如权利要求13所述的rAAV, 其中所述启动子是CB7启动子。

15. 如权利要求13所述的rAAV, 其中所述启动子是TBG启动子。

16. 如权利要求13所述的rAAV, 其中所述表达控制序列包含组织特异性启动子。

17. 如权利要求16所述的rAAV, 其中所述组织特异性启动子是肾特异性启动子。

18. 如权利要求16所述的rAAV, 其中所述组织特异性启动子是选自Nkcc2启动子、尿调节素启动子、Ksp-钙粘蛋白启动子和THP基因启动子。

19. 如权利要求1或权利要求2所述的rAAV, 其进一步包含内含子、Kozak序列、polyA和转录后调控元件中的一种或多种。

21. 根据权利要求1或权利要求2所述的重组载体, 其中所述AAV衣壳是选自AAV8、rh64R1、AAV9、AAVhu.37或rh10及其变体。

22. 如权利要求1或权利要求2所述的病毒载体, 其中所述衣壳是AAV8衣壳。

23. 如权利要求1或权利要求2所述的病毒载体, 其进一步包含AAV反向末端重复序列。

24. 一种重组腺相关病毒 (rAAV), 其包含其中包装有载体基因组的AAV8衣壳, 其中所述载体基因组包含编码猫促红细胞生成素 (EPO) 的核酸序列、反向末端重复序列和指导EPO在宿主细胞中表达的表达控制序列。

25. 一种药物组合物, 其包含药学上可接受的载剂和根据权利要求1至24中任一项所述的病毒载体。

26. 一种用于治疗慢性肾病的方法, 所述方法包括施用药物组合物, 所述药物组合物包含药学上可接受的载剂和根据权利要求1或权利要求2所述的病毒载体。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述组合物静脉内施用。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中所述受试者是猫或犬。
29. 根据权利要求26所述的方法,其中所述受试者是猫,并且所述EPO是猫序列。
30. 根据权利要求26所述的方法,其中所述组合物与另一种疗法组合施用。
31. 根据权利要求27所述的方法,其中所述组合物以约 3×10^{10} GC/kg的剂量施用。
32. 根据权利要求28所述的方法,其中所述组合物施用不止一次。
33. 一种根据权利要求1至24中任一项所述的重组AAV的用途,其用于治疗慢性肾病。
34. 一种根据权利要求1至24中任一项所述的rAAV,其适用于治疗慢性肾病。

用于治疗伴侣动物的AAV-EPO

[0001] 以电子形式提交的材料引用并入

[0002] 申请人在此通过引用并入以电子形式随同提交的序列列表材料。这个文件被标记为“15-7472PCT_Seq_Listing.txt”。

[0003] 发明背景

[0004] 促红细胞生成素 (EPO) 是一种主要在肾小管周围细胞内形成的激素。它作用于骨髓,刺激红细胞生成。促红细胞生成素还控制成熟红细胞的凋亡(程序性细胞死亡)。肾病减少促红细胞生成素的产生。在人类中,慢性肾病中的贫血控制已经通过重组人类促红细胞生成素(依泊汀)的开发而发生了革命性的变化。已归于慢性肾病的许多症状,如疲劳、昏睡、嗜睡和气短,都会对生活质量造成不利影响,但在纠正贫血后已经得到解决或显著改善。

[0005] 有超过200万只猫和35万只狗患有慢性肾病(CKD)。患有CKD相关肾衰竭的伴侣动物也有类似的症状。它们没有足够的EPO,随后变得非常贫血。过去,兽医给予人类重组EPO直到动物对注入的EPO产生免疫应答。实际上,对于在临床上明确需求的充分了解的生理过程,这没有在市场上留下长期的治疗。

[0006] 因此,需要用于在受试者,特别是伴侣动物中表达EPO的组合物。

发明概要

[0007] 本文提供了新颖的工程化促红细胞生成素(EPO)构建体。这些构建体可以通过许多途径递送给需要其的受试者,并且特别是通过重组载体如重组腺相关病毒(rAAV)载体介导的体内表达。

[0008] 在一些实施方案中,EPO由内源序列编码。也就是说,EPO序列来源于最终打算施用的相同受试者物种。

[0009] 在一些实施方案中,提供了包含药学上可接受的载剂和如本文所述的重组载体的药物组合物。还提供了通过向有需要的受试者施用本文所述的具有表达盒的重组载体来治疗慢性肾病的方法,其中所述表达盒进一步包含指导EPO构建体在受试者中表达的调节控制序列。在一些实施方案中,所治疗的受试者是伴侣动物。在一个实施方案中,受试者是猫。在另一个实施方案中,受试者是犬。如本文所用,术语“患者”和“受试者”可互换使用,并且可以指人类或兽医学受试者。

[0010] 在又一个实施方案中,增加受试者中循环EPO的量的方法包括提供本文所述的具有编码EPO的表达盒的重组载体。

[0011] 上述重组载体可用于治疗慢性肾病和其它以循环红细胞数量减少为特征的病况的方案。

[0012] 根据下面对本发明的详细描述,本发明的其它方面和优点将是显而易见的。

[0013] 图示简单说明

[0014] 图1是显示用表达猫促红细胞生成素的AAV8处理的猫的血细胞比容的图。虚线指示正常范围。

[0015] 图2是显示用表达犬促红细胞生成素的AAV8处理的狗的血细胞比容的图。虚线指示正常范围。

[0016] 图3A显示犬EPO前肽序列,其中前导序列加下划线。图3B显示猫EPO前肽序列,其中前导序列加下划线。

[0017] 图4是显示用表达猫促红细胞生成素的AAV8处理的猫的血细胞比容的图。用 3.0×10^7 GC、 3.0×10^8 GC、 3.0×10^9 GC或 3.0×10^{10} GC AAV8f.EPO处理猫。

具体实施方式

[0018] 携带EPO表达构建体的腺相关病毒载体已经开发用于包括伴侣动物(例如猫和犬)的受试者。尽管可能有效,但重组犬或猫特异性EPO蛋白治疗剂的开发和制造成本远高于将EPO递送至受影响的动物的病毒载体介导的系统。使用病毒载体治疗剂,与频繁注射重组EPO相反,还存在能够一次治疗动物的便利性。EPO的稳定表达将纠正贫血并给动物提高生活质量。本文所述的EPO构建体的特征还在于它们提供对受试者内源的EPO序列,其降低受试者出现对非天然蛋白的免疫应答的风险。

[0019] 还提供了本文所述的构建体的用途。描述了通过许多途径将这些构建体递送给需要其的受试者,并且特别是对于由重组载体如rAAV载体介导的体内表达来说。在一个实施方案中,还提供了在用于治疗有需要的受试者的慢性肾病以及增加受试者中的EPO的方案中使用所述构建体的方法。在一个实施方案中,提供了在用于治疗有需要的受试者的贫血的方案中使用这些构建体的方法。在另一个实施方案中,受试者的贫血与使用其它药物有关。导致贫血的可能药物包括但不限于HIV/AIDS治疗剂(包括AZT)和癌症治疗剂,包括化疗。在另一个实施方案中,受试者的贫血与医学状况有关。导致贫血的可能的医学状况包括但不限于癌症、HIV/AIDS、类风湿性关节炎、克罗恩氏病(Crohn's disease)和其它慢性炎症疾病和功能失调的骨髓(例如再生障碍性贫血、白血病、骨髓增生异常或骨髓纤维化)、多发性骨髓瘤、骨髓增生性疾病和淋巴瘤、溶血性贫血、镰状细胞性贫血和地中海贫血。另外,提供了用于增强受试者中EPO活性的方法。

[0020] EPO在体内表达为前肽,前导序列在物种间共享一些同源性。SEQ ID NO:3显示犬EPO前肽的序列,其中成熟蛋白起始于氨基酸41。前导序列在图3a中加下划线。SEQ ID NO:4显示猫EPO前肽的序列,其中成熟蛋白起始于氨基酸27。前导序列在图3B中加下划线。

[0021] 在一个实施方案中,EPO的功能变体包括与本文所述或本领域已知的EPO核酸或氨基酸序列相比可以包括至多约10%的变异的变体,其保留野生型序列的功能。在一些实施方案中,EPO变体所基于的序列可以包括前肽前导序列(例如,如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中所示)。在另一个实施方案中,本文所述的EPO变体仅指成熟肽(例如,SEQ ID NO:3的氨基酸41-206或SEQ ID NO:4的氨基酸27-192)。如本文所用,“保留功能”意指核酸或氨基酸以与野生型序列相同的方式起作用,但不一定处于相同的表达或活性水平。例如,在一个实施方案中,与野生型序列相比,功能变体具有增加的表达或活性。在另一个实施方案中,与野生型序列相比,功能变体具有降低的表达或活性。在一个实施方案中,与野生型序列相比,功能变体具有10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的表达或活性增加或降低。犬EPO的氨基酸序列在本文中以SEQ ID NO:3提供。猫EPO的氨基酸序列在本文中以SEQ ID NO:4提供。

[0022] 在另一个实施方案中,EPO的功能变体包括与本文所述或本领域已知的EPO核酸或氨基酸序列相比可以包括至多约20%的变异的变体,其保留野生型序列的功能。在一个实施方案中,EPO的功能变体包括与本文所述或本领域已知的EPO核酸或氨基酸序列相比可以包括至多约30%的变异的变体,其保留野生型序列的功能。下面的比对显示了顶部的犬序列,底部的猫序列以及中间的共有序列。

[0023] 犬(查询;SEQ ID NO:3的一部分)对比猫(目标,SEQ ID NO:4的一部分)

```

查询 138  ECPALLLLLSILLLLFLGLFVLSGAPFRLICDSFVLEKPYTLEAREAEKNTWGCAGGCSFSEN 138
          ECPALLLLLSILLLLFLGLFVLSGAPFRLICDSFVLEKPYTLEAREAEKNTWGCAGGCSFSEN
目标 9    ECPALLLLLSILLLLFLGLFVLSGAPFRLICDSFVLEKPYTLEAREAEKNTWGCAGGCSFSEN 64

查询 79   ITVFDKKNVFTYWRERNDVGGQALEXWQGLALLLEAIIKSGALLANASQPSSETQLKVDKA 138
          ITVFDKKNVFTYWRERNDVGGQALEXWQGLALLLEAIIKSGALLANASQPSSETQLKVDKA
目标 65   ITVFDKKNVFTYWRERNDVGGQALEXWQGLALLLEAIIKSGALLANASQPSSETQLKVDKA 134
  
```

[0024]

```

查询 139  VSSLRSLTSLRPAIGAGQREAFSLPEATSAAPLPTTVDTLCKELFRIYDNFLKSLTLYTG 190
          VSSLRSLTSLRPAIGAGQREAFSLPEATSAAPLPTTVDTLCKELFRIYDNFLKSLTLYTG
目标 125  VSSLRSLTSLRPAIGAGQREAFSLPEATSAAPLPTTVDTLCKELFRIYDNFLKSLTLYTG 154

查询 190  EACRNSDR 206
          EACRNSDR
目标 148  EACRNSDR 192
  
```

[0025] 在一个实施方案中,术语EPO是指与野生型序列(SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4,具有或不具有前导肽的序列)相比已经进行了一个或多个氨基酸取代的活性EPO。在一个实施方案中,在如上面的比对中那样跨物种显示变异的残基中进行一个或多个氨基酸取代。在另一个实施方案中,在跨物种显示保守性的残基中进行一个或多个氨基酸取代。尽管EPO在物种间共享高度同一性,但在一个实施方案中,期望基于最终预期施用载体的受试者的物种来选择EPO序列。在一个实施方案中,受试者是哺乳动物。例如,在一个实施方案中,如果受试者是猫,那么EPO序列来源于猫蛋白。在另一个实施方案中,EPO序列来源于犬蛋白。在另一个实施方案中,EPO序列来源于非人类灵长类蛋白。在另一个实施方案中,EPO来源于牛、羊或猪蛋白。在另一个实施方案中,EPO序列是SEQ ID NO:3。在另一个实施方案中,EPO序列是SEQ ID NO:4。

[0026] EPO肽或核酸编码序列可以包括与EPO成熟蛋白质序列结合的异源前导序列。当关于蛋白质或核酸使用时,术语“异源”表示蛋白质或核酸包含两种或更多种序列或子序列,这些序列或子序列在自然界中未以彼此相同的关系发现。例如,通常重组产生表达盒,其具有来自不相关基因的两个或更多个序列,以排列成新的功能性核酸。例如,在一个实施方案中,前导序列可以来自与EPO不同的基因。因此,关于EPO编码序列,前导序列是异源的。在一个实施方案中,前导序列来源于与EPO序列不同的物种。

[0027] 在一个实施方案中,该序列编码融合在EPO成熟多肽上游的IL-2前导肽。在一个实施方案中,前导序列是SEQ ID NO:9:M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S。然而,另一种异源前导序列可以取代IL-2信号/前导肽。前导序列可以是天然存在于细胞因子(例如IL-2、IL12、IL18等)、免疫球蛋白、胰岛素、白蛋白、 β -葡糖醛酸糖苷酶、碱性蛋白酶或纤连蛋白分泌信号肽中的信号序列,或来自组织特异性分泌蛋白的序列等等。在一个实施方案中,前导序列是来自EPO前肽的内源前导序列。

[0028] 如本文所用,术语“来源”或“来源于”意指序列或蛋白质源自特定受试物种或与源自特定受试物种的蛋白质或序列共享相同的序列。例如,“来源于”犬的前肽序列与犬中表达的相同前肽序列共享相同的序列(或其变体,如本文所定义)。然而,指定的核酸或氨基酸实际上不需要源自犬。本领域已知能够产生所需序列的各种技术,包括相似蛋白质(例如同源物)的诱变或人工产生核酸或氨基酸序列。无论衍生序列的实际来源如何,“衍生的”核酸或氨基酸都保留其“衍生”的物种中相同核酸或氨基酸的功能。

[0029] 如本文所用,术语“EPO构建体”、“EPO表达构建体”和同义词包括如本文所述的EPO序列。术语“EPO构建体”、“EPO表达构建体”和同义词可用于指编码EPO(包括具有内源或异源前导序列的EPO成熟蛋白或前肽)的核酸序列或其表达产物。

[0030] 术语“氨基酸取代”及其同义词旨在涵盖通过氨基酸用另一替代氨基酸置换来修饰氨基酸序列。取代可能是保守取代。它也可能是非保守取代。关于两个氨基酸,术语保守意指氨基酸具有本领域技术人员公认的共同特性。例如,具有疏水非酸性侧链的氨基酸,具有疏水酸性侧链的氨基酸,具有亲水非酸性侧链的氨基酸,具有亲水酸性侧链的氨基酸和具有亲水碱性侧链的氨基酸。常见特性还可以是具有疏水性侧链的氨基酸,具有脂肪族疏水性侧链的氨基酸,具有芳香族疏水性侧链的氨基酸,具有极性中性侧链的氨基酸,具有带电侧链的氨基酸,具有带电酸性侧链的氨基酸和具有带碱性侧链的氨基酸。天然存在的和非天然存在的氨基酸都是本领域已知的,并且可以在实施方案中用作替代氨基酸。用于置换氨基酸的方法是本领域技术人员熟知的,并且包括但不限于编码氨基酸序列的核苷酸序列的突变。本文对“一个或多个”的引用旨在涵盖例如1、2、3、4、5、6或更多个别实施方案。

[0031] 还提供了本文所述的组装的EPO蛋白。在一个实施方案中,EPO蛋白由所述AAV构建体产生。在一个实施方案中,EPO蛋白包含与成熟EPO蛋白组合的异源前导序列。在一个实施方案中,异源前导序列来自IL-2。组装的EPO蛋白具有许多用途,包括诊断分析。因此,在一个实施方案中,EPO蛋白被标记。如本文所用,“标记”是用于标记EPO蛋白的化学或生物化学部分。“标记”包括荧光剂、化学发光剂、显色剂、猝灭剂、放射性核苷酸、酶、底物、辅因子、抑制剂、放射性同位素、磁性颗粒和本领域已知的其它部分。“标记”或“报道分子”能够产生可测量的信号,并且可以共价或非共价连接至寡核苷酸或核苷酸(例如非天然核苷酸)或配体。最理想的是,标记可以在视觉上例如以比色法检测到。许多这样的标记在本领域中是已知的并且包括但不限于荧光可检测的荧光染料,例如异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)、别藻蓝蛋白(APC)、柯里膦-0(CPO)或串联染料PE-花青苷-5(PC5)和PE-德克萨斯红(ECD)。常用的荧光染料包括异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)、别藻蓝蛋白(APC),并且还包括串联染料PE-花青苷-5(PC5)、PE-花青苷-7(PC7)、PE-花青苷-5.5、PE-德克萨斯红(ECD)、若丹明、PerCP、异硫氰酸荧光素(FITC)和Alexa染料。取决于分析方法,可以使用这些标记的组合,如德克萨斯红和若丹明、FITC+PE、FITC+PECy5和PE+PECy7等等。其它理想的

标记或标签包括允许在蛋白质底物上物理分离或固定的那些标记或标签。这类标记包括生物素。其它合适的标记或标签描述于例如US 2011-0177967 A1中,其通过引用并入本文。

[0032] 在另一个实施方案中,EPO肽包括与EPO序列相比可以包括至多约10%变异的变体。即,EPO肽与本文提供的和/或本领域已知的EPO序列具有约90%同一性至约99.9%同一性,约95%至约99%同一性或约97%至约98%同一性。

[0033] 除了本文提供的EPO肽之外,还提供了编码这些肽的核酸序列。在一个实施方案中,提供了编码本文所述的EPO肽的核酸序列。在另一个实施方案中,这包括编码SEQ ID NO:3的犬EPO蛋白或与SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的序列的任何核酸序列。在另一个实施方案中,这包括编码SEQ ID NO:4的猫EPO蛋白或与SEQ ID NO:4具有至少90%同一性的序列的任何核酸序列。

[0034] 在一个实施方案中,编码犬EPO的核酸序列是SEQ ID NO:5。在一个实施方案中,编码猫EPO的核酸序列是SEQ ID NO:6。在又一个实施方案中,EPO核酸包括与本文公开的或本领域已知的EPO序列相比可以包括至多约10%变异的变体。在又一个实施方案中,EPO核酸包括与本文公开的或本领域已知的EPO序列相比可以包括至多约20%变异的变体。在又一个实施方案中,EPO核酸包括与本文公开的或本领域已知的EPO序列相比可以包括至多约30%变异的变体。在另一个实施方案中,EPO核酸包括与本文公开的或本领域已知的EPO序列相比可以包括至多约40%变异的变体。

[0035] 在一个实施方案中,编码EPO的核酸序列是编码本文所述的任何EPO肽的密码子优化的序列,包括与所述序列具有至少90%同一性的序列。在一个实施方案中,核酸序列经密码子优化用于在需要施用的受试者中表达。在一个实施方案中,编码犬EPO的核酸序列是SEQ ID NO:7。在一个实施方案中,编码猫EPO的核酸序列是SEQ ID NO:8。

[0036] 当期望EPO肽的变体时,可以使用野生型核酸序列的定点诱变来产生这些肽的编码序列。基于网络或商业可用的计算机程序以及基于服务的公司可用于将氨基酸序列反向翻译成核酸编码序列,包括RNA和/或cDNA。参见例如EMBOSS的backtranseq,http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/;Gene_Infinity(http://www.geneinfinity.org/sms-/sms_backtranslation.html);ExPasy(<http://www.expasy.org/tools/>)。在一个实施方案中,如本文所讨论,将RNA和/或cDNA编码序列设计用于最终打算施用的受试物种中的最佳表达。因此,在一个实施方案中,编码序列被设计用于猫科动物中的最佳表达。在另一个实施方案中,编码序列被设计用于犬科动物中的最佳表达。在又一个实施方案中,编码序列被设计用于灵长类动物中的最佳表达。

[0037] 可以使用密码子优化将编码序列设计用于最佳表达。密码子优化的编码区可以通过各种不同的方法来设计。这种优化可以使用在线提供的方法、公开的方法或提供密码子优化服务的公司进行。例如在国际专利公开号W0 2015/012924中描述了一种密码子优化方法,其通过引用并入本文。简言之,编码产物的核酸序列用同义密码子序列修饰。产物的开放阅读框(ORF)的整个长度适当地被修改。然而,在一些实施方案中,只有ORF的一个片段可以被改变。通过使用这些方法之一,可以将频率应用于任何给定的多肽序列,并产生编码多肽的密码子优化的编码区的核酸片段。

[0038] 在核酸序列的上下文中,术语“百分比(%)同一性”、“序列同一性”、“百分比序列同一性”或“百分比同一性”是指当对应比对时两个序列中的碱基相同。序列同一性比较的

长度可以在基因组全长、基因编码序列的全长或至少约100至150个核苷酸的片段上,或根据需要。然而,较小片段之间的同一性,例如至少约9个核苷酸,通常至少约20至24个核苷酸,至少约28至32个核苷酸,至少约36个或更多个核苷酸,也是期望的。多序列比对程序也可用于核酸序列。这类程序的实例包括可通过因特网上的Web服务器访问的“Clustal W”、“CAP序列组装”、“BLAST”、“MAP”和“MEME”。这类程序的其它来源对于本领域技术人员是已知的。或者,也可以使用Vector NTI实用程序。还有许多本领域中已知可用于测量核苷酸序列同一性的算法,包括上述程序中包含的算法。作为另一个实例,可以使用GCG版本6.1中的程序Fasta™比较聚核苷酸序列。Fasta™提供查询和搜索序列之间最佳重叠区的比对和百分比序列同一性。例如,核酸序列之间的百分比序列同一性可以使用Fasta™以GCG版本6.1中提供的默认参数(字长为6,记分矩阵的NOPAM因子)确定,其通过引用并入本文。

[0039] 在氨基酸序列的上下文中,术语“百分比(%)同一性”、“序列同一性”、“百分比序列同一性”或“百分比同一性”是指当对应比对时两个序列中的残基相同。对于蛋白质、多肽、约70个氨基酸至约100个氨基酸的全长或其肽片段或相应的核酸序列编码序列的氨基酸序列,可容易地确定百分比同一性。合适的氨基酸片段长度可以是至少约8个氨基酸,并且可以是至多约150个氨基酸。一般,当提及两个不同序列之间的“同一性”、“同源性”或“相似性”时,参照“比对”序列确定“同一性”、“同源性”或“相似性”。“比对”序列或“比对”是指多个核酸序列或蛋白质(氨基酸)序列,通常含有与参照序列相比缺失或额外碱基或氨基酸的校正。使用各种公共或商业可用的多序列比对程序中的任何一种来进行比对。序列比对程序可用于氨基酸序列,例如“Clustal X”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“BLOCKMAKER”、“MEME”和“Match-Box”程序。一般,这些程序中的任何一个都以默认设置使用,但本领域的技术人员可以根据需要改变这些设置。或者,本领域技术人员可以利用另外的算法或计算机程序,其提供至少与参考算法和程序提供一样的同一性或比对水平。参见例如J.D.Thomson等人, *Nucl.Acids.Res.*, “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27 (13):2682-2690 (1999)。

[0040] 在一个实施方案中,将编码本文所述的EPO构建体的核酸序列工程化为任何合适的遗传元件,例如裸DNA、噬菌体、转座子、粘粒、RNA分子(例如mRNA)、附加体等,其将上面携带的EPO序列转移至宿主细胞,例如用于产生携带DNA或RNA的纳米颗粒、包装宿主细胞中的病毒载体和/或用于递送至受试者中的宿主细胞。在一个实施方案中,遗传元件是质粒。选择的遗传元件可以通过任何合适的方法递送,包括转染、电穿孔、脂质体递送、膜融合技术、高速DNA包衣小丸、病毒感染和原生质体融合。用于制造这类构建体的方法对于具有核酸操作技能的人员是已知的,并且包括基因工程、重组工程和合成技术。参见例如Green和 Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)。

[0041] 如本文所用,“表达盒”是指包含EPO肽的编码序列、启动子的核酸分子,并且可包含其它调节序列,该盒可被工程化为遗传元件和/或包装于病毒载体(例如病毒颗粒)的衣壳中。典型地,用于产生病毒载体的这样的表达盒含有本文所述的EPO构建体序列,侧翼是病毒基因组的包装信号和其它表达控制序列,如本文所述的那些。可以使用本领域已知的技术针对特定物种优化任何表达控制序列,包括例如本文所述的密码子优化。

[0042] 表达盒通常含有启动子序列作为表达控制序列的一部分。在一个实施方案中,使

用CB7启动子。CB7是具有巨细胞病毒增强子元件的鸡 β -肌动蛋白启动子。或者,可以使用其它肝特异性启动子[参见例如The Liver Specific Gene Promoter Database,Cold Spring Harbor,<http://rulai.schl.edu/LSPD>, α 1抗胰蛋白酶(A1AT);人类白蛋白Miyatake等人,J.Virol.,71:5124-32(1997),humAlb;和乙型肝炎病毒核心启动子,Sandig等人,Gene Ther.,3:1002-9(1996)]。TTR最小增强子/启动子 α -抗胰蛋白酶启动子,LSP(845nt)25(需要无内含子scAAV)。在一个实施方案中,使用肝特异性启动子甲状腺素结合球蛋白(TBG)。其它启动子,如病毒启动子、组成型启动子、可调控启动子[参见例如W0 2011/126808和W0 2013/04943]或响应于生理学提示的启动子可用于本文所述的载体中。

[0043] 除启动子外,表达盒和/或载体可以含有其它适当的转录起始、终止、增强子序列、有效的RNA加工信号如剪接和聚腺苷酸化(polyA)信号;TATA序列;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列);内含子;增强蛋白质稳定性的序列;和当需要时,增加编码产物分泌的序列。表达盒或载体可以不含任何一种或多种本文所述的任何元件。合适的polyA序列的实例包括例如SV40、牛生长激素(bGH)和TK polyA。合适的增强子的实例包括例如CMV增强子、RSV增强子、甲胎蛋白增强子、TTR最小启动子/增强子、LSP(TH-结合球蛋白启动子/ α 1-微球蛋白/bikunin增强子)等等。

[0044] 在一个实施方案中,病毒载体包括核酸表达盒,其包含:5' AAV反向末端重复序列(ITR)、具有任选增强子的启动子、EPO序列、poly A序列和3' AAV ITR,其中所述表达盒在宿主细胞中表达功能性EPO。

[0045] 这些控制序列与EPO构建体序列“可操作地连接”。如本文所用,术语“可操作地连接”是指表达控制序列与所关注基因邻接和表达控制序列以反式或相隔一定距离起作用以控制所关注基因。

[0046] 表达盒可以工程化到用于生产病毒载体的质粒上。将表达盒包装进入AAV病毒颗粒所需的最小序列是AAV 5'和3' ITR,其可以与衣壳具有相同的AAV来源,或具有不同AAV来源(以产生AAV假型)。在一个实施方案中,来自AAV2的ITR序列或其删除版本(Δ ITR)出于便利性使用并用于加速调节认可。然而,可能会选择其它AAV来源的ITR。当ITR的来源来自AAV2并且AAV衣壳来自另一个AAV来源时,所得载体可以被称为假型化。通常,用于AAV载体的表达盒包含AAV 5' ITR、前肽-EPO活性肽编码序列和任何调节序列,以及AAV 3' ITR。然而,这些元件的其它配置可能是合适的。已经描述了称为 Δ ITR的5' ITR的缩短版本,其中删除了D序列和末端决定位点(trs)。在其它实施方案中,使用全长AAV 5'和3' ITR。

[0047] 示例性质粒在序列表中提供。SEQ ID NO:1提供了名为pn1044.CB7.caEPO的编码犬EPO构建体的质粒的序列。在一个实施方案中,将表达盒工程化到SEQ ID NO:1的质粒中。SEQ ID NO:2提供了名为pn1044.CB7.feEPO的编码猫EPO构建体的质粒的序列。在一个实施方案中,将表达盒工程化到SEQ ID NO:2的质粒中。质粒,如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中所示的那些,可以被修饰以包括如本文所述的一种或多种另外的组件,或者根据需要去除或替换组件。在一个实施方案中,质粒具有SEQ ID NO:1的序列或与其具有至少80%同一性的序列。在另一个实施方案中,质粒具有SEQ ID NO:2的序列或与其具有至少80%同一性的序列。

[0048] 缩写“sc”是指自我互补。“自我互补的AAV”是指具有表达盒的质粒或载体,其中由重组AAV核酸序列携带的编码区已被设计为形成分子内双链DNA模板。感染后,不是等待细

胞介导的第二条链的合成,scAAV的两个互补半部将结合形成一个准备立即复制和转录的双链DNA(dsDNA)单位。参见例如D M McCarty等人,“Self-complementary recombinant adeno-associated virus(scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis”,*Gene Therapy*, (2001年8月),第8卷,第16期,第1248-1254页。自我互补的AAV描述于例如美国专利No.6,596,535;7,125,717;和7,456,683,其每一个的全部内容通过引用并入本文。

[0049] 腺相关病毒(AAV)病毒载体是具有AAV蛋白衣壳的AAV DNA酶抗性颗粒,其中包装用于递送至靶细胞的核酸序列。AAV衣壳由60个衣壳(cap)蛋白质亚基VP1、VP2和VP3组成,它们以约1:1:10至1:1:20的二十面体对称排列,取决于所选的AAV。可选择AAV血清型作为AAV病毒载体(DNA酶抗性病毒颗粒)衣壳的来源,包括例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh10、AAVrh64R1、AAVrh64R2、rh8、rh.10、任何已知或提及的AAV或尚未发现的AAV的变体。在一个实施方案中,AAV是AAV8衣壳或其变体。参见例如美国公开专利申请No.2007-0036760-A1;美国公开专利申请No.2009-0197338-A1;EP1310571。也参见WO 2003/042397(AAV7和其它猿猴AAV)、美国专利7790449和美国专利7282199(AAV8)、WO 2005/033321和US 7,906,111(AAV9)、和WO 2006/110689、和WO 2003/042397(rh.10)。或者,基于任何所述AAV的重组AAV可用作AAV衣壳的来源。这些文件还描述了可以选择用于产生AAV的其它AAV并且通过引用并入。在一些实施方案中,用于病毒载体的AAV cap可通过诱变(即,通过插入、缺失或取代)前述AAV Cap或其编码核酸之一而产生。在一些实施方案中,AAV衣壳是嵌合的,包含来自两种或三种或四种或更多种前述AAV衣壳蛋白的结构域。在一些实施方案中,AAV衣壳是来自两种或三种不同AAV或重组AAV的Vp1、Vp2和Vp3单体的嵌合体。在一些实施方案中,rAAV组合物包含多于一种前述的Cap。在另一个实施方案中,AAV衣壳包括与任何所述或已知的AAV衣壳序列相比可以包括至多约10%的变异的变体。即,AAV衣壳与本文提供的和/或本领域已知的AAV衣壳具有约90%同一性至约99.9%同一性、约95%至约99%同一性或约97%至约98%同一性。在一个实施方案中,所述AAV衣壳与AAV衣壳共享至少95%同一性。当确定AAV衣壳的百分比同一性时,可以对任何可变蛋白质(例如,vp1、vp2或vp3)进行比较。在一个实施方案中,AAV衣壳与AAV8vp3共享至少95%同一性。在另一个实施方案中,使用自我互补的AAV。

[0050] 为了将表达盒包装入病毒粒子中,ITR是在与基因相同的构建体中顺式所需的唯一AAV组件。在一个实施方案中,复制(rep)和/或衣壳(cap)的编码序列从AAV基因组中去除并反式或通过包装细胞系供应以产生AAV载体。例如,如上所述,假型AAV可能含有来自不同于AAV衣壳来源的ITR。另外或替代地,可以使用嵌合AAV衣壳。还可以选择其它AAV组件。这类AAV序列的来源在本文中描述,并且也可以从学术、商业或公共来源(例如美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA)分离或获得。或者,AAV序列可通过参考如文献中或数据库(例如GenBank®、PubMed®等)中可获得的公开序列而通过合成或其它合适手段获得。

[0051] 用于产生和分离适合递送至受试者的AAV病毒载体的方法是本领域已知的。参见例如美国专利7790449;美国专利7282199;WO 2003/042397;WO 2005/033321,WO 2006/110689;和US 7588772 B2]。在一个系统中,生产者细胞系用编码侧翼为ITR的转基因的构建体和编码rep和cap的构建体瞬时转染。在第二个系统中,稳定供应rep和cap的包装细胞

系用编码侧翼为ITR的转基因的构建体瞬时转染。在这些系统中的每一个系统中, AAV病毒粒子都是响应于辅助性腺病毒或疱疹病毒感染而产生的, 需要将rAAV从污染性病毒中分离出来。最近, 已经开发了不需要用辅助病毒感染来恢复AAV的系统-所需的辅助功能(即, 腺病毒E1、E2a、VA和E4或疱疹病毒UL5、UL8、UL52和UL29以及疱疹病毒聚合酶)也由系统以反式提供。在这些较新的系统中, 辅助功能可以通过用编码所需辅助功能的构建体瞬时转染细胞来提供, 或者细胞可以被工程化以稳定地含有编码辅助功能的基因, 其表达可以在转录水平或转录后水平加以控制。在另一个系统中, 通过感染基于杆状病毒的载体将侧翼为ITR和rep/cap基因的转基因导入昆虫细胞中。关于这些生产系统的综述, 一般参见例如Zhang等人, 2009, “Adenovirus-Adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant Adeno-associated virus production,” *Human Gene Therapy* 20:922-929, 其中每一个的全部内容通过引用并入本文。在以下美国专利中也描述了制造和使用这些和其它AAV生产系统的方法, 其中每个专利的全部内容通过引用并入本文: 5,139,941; 5,741,683; 6,057,152; 6,204,059; 6,268,213; 6,491,907; 6,660,514; 6,951,753; 7,094,604; 7,172,893; 7,201,898; 7,229,823; 和7,439,065。一般参见例如Grieger和Samulski, 2005, “Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications,” *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99:119-145; Buning等人, 2008, “Recent developments in Adeno-associated virus vector technology,” *J. Gene Med.* 10:717-733; 以及下面引用的参考文献, 每篇文献的全部内容通过引用并入本文。用于构建本发明的任何实施方案的方法是具有核酸操作技术的人员已知的并且包括基因工程、重组工程和合成技术。参见例如Green和Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)。类似地, 产生rAAV病毒粒子的方法是众所周知的, 并且选择合适的方法不是对本发明的限制。参见例如K. Fisher等人, (1993) *J. Virol.*, 70:520-532和美国专利No. 5,478,745。

[0052] 还提供了包含本文所述的病毒载体构建体的组合物。本文所述的药物组合物被设计用于通过任何合适的途径或不同途径的组合递送至有需要的受试者。直接递送至肝脏(任选通过静脉内、通过肝动脉或通过移植)、口服、吸入、鼻内、气管内、动脉内、眼内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内和其它肠胃外施用途径。本文所述的病毒载体可以单一组合物或多种组合物递送。任选地, 可以递送两种或更多种不同的AAV或多种病毒[参见例如W0 2011/126808和W0 2013/049493]。在另一个实施方案中, 多种病毒可以含有不同的复制缺陷型病毒(例如AAV和腺病毒)。

[0053] 复制缺陷型病毒可以与生理上可接受的载剂配制用于基因转移和基因疗法应用。在AAV病毒载体的情况下, 可以使用基因组拷贝(“GC”)的定量作为制剂或悬浮液中所含剂量的量度。本领域已知的任何方法可用于确定本发明的复制缺陷型病毒组合物的基因组拷贝(GC)数量。进行AAV GC数滴定的一种方法如下: 纯化的AAV载体样品首先用DNA酶处理以消除生产过程中未包衣壳的AAV基因组DNA或污染性质粒DNA。然后对DNA酶抗性颗粒进行热处理以从衣壳中释放基因组。然后使用靶向病毒基因组特定区(通常是poly A信号)的引物/探针组通过实时PCR对释放的基因组进行定量。

[0054] 此外, 复制缺陷型病毒组合物可以剂量单位配制以含有一定量的复制缺陷型病

毒,其范围在约 1.0×10^9 GC至约 1.0×10^{15} GC。在另一个实施方案中,该量的病毒基因组可以分开剂量递送。在一个实施方案中,对于约5kg的平均猫或小型犬受试者,剂量为约 1.0×10^{10} GC至约 1.0×10^{12} GC。在一个实施方案中,对于约20kg的平均中型犬受试者,剂量为约 1.0×10^{11} GC至约 1.0×10^{13} GC。犬的平均体重范围介于约5至约50kg。在一个实施方案中,受试者的剂量为约 1.0×10^{11} GC至 1.0×10^{13} GC。在另一个实施方案中,剂量约 3×10^{12} GC。例如,AAV病毒的剂量可以是约 1×10^{11} GC、约 5×10^{11} GC、约 1×10^{12} GC、约 5×10^{12} GC或约 1×10^{13} GC。在一个实施方案中,剂量为约 3×10^{10} GC/kg。在另一个实例中,构建体可以每毫升约0.001mg至约10mg的量递送。在一个实施方案中,对于兽医学受试者,构建体可以1 μ L至约100mL的体积递送。参见例如Diehl等人, *J. Applied Toxicology*, 21:15-23 (2001), 以讨论将物质施用于各种兽医学动物的良好实践。该文件通过引用并入本文。如本文所用,术语“剂量”可以指在治疗过程中递送给受试者的总剂量,或单次(多次)施用递送的数量。

[0055] 根据公开的方法可以将上述重组载体递送至宿主细胞。优选悬浮于生理上相容的载剂、稀释剂、赋形剂和/或佐剂中的rAAV可以施用于期望的受试者,包括但不限于猫、狗或其它非人类哺乳动物受试者。考虑到转移病毒针对的适应症,本领域技术人员可以容易地选择合适的载剂。例如,一种合适的载剂包括盐水,其可以用各种缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)配制。其它示例性的载剂包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。载剂的选择不是本发明的限制。

[0056] 任选地,除了rAAV和/或变体和载剂之外,本发明的组合物可以含有其它常规药物成分,如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性防腐剂包括氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸酯、乙基香兰素、甘油、苯酚和对氯苯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0057] 本文所述的病毒载体和其它构建体可用于制备用于将EPO构建体递送至有需要的受试者和/或用于治疗受试者的慢性肾病的药物。因此,在另一方面,提供了一种治疗慢性肾病的方法。所述方法包括将如本文所述的组合物施用于有需要的受试者。在一个实施方案中,组合物包含含有EPO表达盒的病毒载体,如本文所述。在一个实施方案中,受试者是哺乳动物。在另一个实施方案中,受试者是猫或犬。在另一方面,提供了一种治疗贫血的方法。所述方法包括将如本文所述的组合物施用于有需要的受试者。在一个实施方案中,组合物包含含有EPO表达盒的病毒载体,如本文所述。在一个实施方案中,受试者是哺乳动物。在另一个实施方案中,受试者是猫或犬。

[0058] 在另一个实施方案中,提供了一种治疗猫慢性肾病的方法。所述方法包括施用包含含有编码猫EPO的序列的核酸分子的AAV病毒载体。在另一个实施方案中,提供了一种治疗犬慢性肾病的方法。所述方法包括施用包含含有编码犬EPO的序列的核酸分子的AAV病毒载体。

[0059] 治疗过程可以任选地涉及重复施用相同的病毒载体(例如AAV8载体)或不同的病毒载体(例如AAV8和AAVrh10)。还可以使用本文所述的病毒载体来选择其它组合。任选地,本文所述的组合物可以在涉及其它药物或基于蛋白质的疗法、包括例如重组EPO的方案中组合。任选地,本文所述的组合物可以在涉及包括饮食和锻炼方案的生活方式改变的方案中组合。

[0060] 应注意,术语“一(a/an)”是指一个或多个。因此,术语“一”、“一个或多个”和“至少

一个”在本文中可互换使用。

[0061] 词语“包含 (comprise/comprises/comprising)”应解释为包含性而非排他性的。词语“由.....组成 (consist/consisting)”及其变体应解释为排他性而非包含性的。尽管本说明书中的各种实施方案是使用“包含”语言来呈现的,但是在其它情况下,相关实施方案也旨在使用“由.....组成”或“基本上由.....组成”语言来解释和描述。

[0062] 如本文所用,除非另有说明,否则术语“约”意指与给出的参考值相差10%的变化。

[0063] 如本文所用,术语“调节”或其变体是指组合物抑制生物学途径的一种或多种组分的能力。

[0064] “受试者”是哺乳动物,例如人类、小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猫、马、牛、猪或非人类灵长类动物,如猴、黑猩猩、狒狒或大猩猩。如本文所用,术语“受试者”与“患者”可互换使用。

[0065] 如本文所用,“疾病”、“病症”和“病况”可互换使用,以指示受试者的异常状态。

[0066] 除非在本说明书中另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义并且通过参考公开文本,其向本领域技术人员提供了对本申请中使用的许多术语的一般指导。

[0067] 以下实施例仅是说明性的,并不意图限制本发明。

[0068] 实施例1-EPO载体的构建

[0069] 犬和猫促红细胞生成素的氨基酸序列是从Genbank获得。将氨基酸序列回译并密码子优化,然后加入kozac共有序列、终止密码子和克隆位点。序列由GeneArt产生,并克隆到含有鸡- β 肌动蛋白启动子与CMV增强子 (p1044) 的表达载体中。表达构建体的侧翼是AAV2ITR。通过三重转染和碘克沙醇梯度纯化将犬和猫构建体包装在AAV血清型8衣壳中,并通过Taqman定量PCR进行滴定。

[0070] 实施例2-AAV介导的猫促红细胞生成素在猫中的表达

[0071] 三只猫通过单次肌内注射 3×10^{10} 个基因组拷贝/公斤体重 (GC/kg) 表达猫促红细胞生成素的AAV8进行处理 (图1)。在注射时采集血液样本,然后定期测量血细胞比容。载体注射后第42天开始治疗性静脉切开术。迄今为止,结果显示持续表达EPO超过100天。

[0072] 实施例3-AAV介导的犬促红细胞生成素在狗中的表达

[0073] 三只狗通过单次肌内注射 3×10^{10} GC/kg表达犬促红细胞生成素的AAV8进行处理。在注射时采集血液样本,然后定期测量血细胞比容 (图2)。包括来自未处理的同窝幼畜的血液样本作为对照。载体注射后第60天开始治疗性静脉切开术。

[0074] 实施例4-在猫中AAV介导的猫促红细胞生成素表达的剂量研究

[0075] 猫通过单次肌内注射至多 3×10^7 、 3×10^8 、 3×10^9 或 3×10^{10} 个基因组拷贝/公斤体重 (GC/kg) 表达猫促红细胞生成素的AAV8进行处理。这三组是每个剂量4只猫。所有的猫都是正常/野生型并且随机选择。这项研究的目的是显示长期的安全性和有效性,以突出客户拥有的动物研究可能的临床候选物。图4。

[0076] 实施例5-AAV介导的猫促红细胞生成素在猫中的表达

[0077] 猫通过在左或右四头肌以至多400 μ L的总体积单次肌内注射至多 3×10^9 个基因组拷贝/公斤体重 (GC/kg) 表达猫促红细胞生成素的AAV8进行处理。在注射时采集血液样本,然后定期测量血细胞比容。使用相同的标准,载体可以在初始载体施用后28天或更多时间再次施用。

[0078] 这项研究将包括多达九只患有III期慢性肾病相关贫血的猫。CKD相关性贫血将定义为两次至少间隔一个月血细胞比容低于29%，并且没有其它明显的贫血原因。登记的受试者将接受携带猫促红细胞生成素转基因的腺相关病毒载体(AAV8.fEpo)的单次肌肉注射。受试者将在载体施用时在施用后2、4、6和8周在研究地点进行评估。在每次就诊时，将收集血液用于评估促红细胞生成素浓度、血细胞比容、网织红细胞计数、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白和平均红细胞血红蛋白浓度。在研究药物施用后3个月、6个月和12个月，患者将返回研究地点或跟随主要兽医进行血细胞比容测量。先前已经发现剂量高达3E8个基因组拷贝/kg的研究药物在4只正常猫中是安全的。参加该试验的前三个受试者将接受1E8个基因组拷贝/kg AAV8.fEpo的剂量。在载体施用后前三个受试者达到8周后，将进行安全性和载体活性的初步评估。根据此初始组3只动物的8周分析的结果，使用以下方案进行第二组三只动物的给药：

[0079] 1.如果在初始组中发生任何严重不良事件或者如果任何动物的血细胞比容达到55%，那么剂量将减少三倍，另外三只动物将以该减少剂量登记。(总研究登记6个受试者)

[0080] 2.如果没有不良事件并且所有猫的血细胞比容增加至少5%或达到正常血细胞比容范围，那么另外3只猫将在起始剂量下进行处理。(总研究登记6个受试者)

[0081] 3.如果没有不良事件并且所有猫的血细胞比容未达到至少5%增加或达到正常范围，那么另外3只猫将以3E8个基因组拷贝/kg的3倍更高剂量进行处理。在该组中的所有三只动物已经达到载体施用后6周后，将再次进行安全性和活性的中期评估。如果没有不良事件并且所有猫的血细胞比容增加至少5%或达到正常血细胞比容范围，那么另外3只猫将在此剂量下进行处理。如果没有不良事件并且所有猫的血细胞比容未达到至少5%增加或达到正常范围，那么另外3只猫将以6E8个基因组拷贝/kg的剂量进行处理。(总研究登记9个受试者)因此，根据安全性和血细胞比容变化的中期分析结果，本研究将纳入至少6个和多达9个受试者。主要端点包括载体表达的安全性和评估

[0082] 次要端点包括动物的生活质量和载体的长期持续表达

[0083] 纳入标准：

[0084] 患有III期肾衰竭(血清肌酐 $\geq 2.95\text{mg/dL}$)的猫

[0085] 两次间隔至少一个月，血细胞比容 $\geq 29\%$

[0086] 所有者愿意在研究药物施用后2周、4周、6周和8周返回研究地点进行回访，并在研究药物施用后3个月、6个月和12个月返回研究地点或主要兽医诊所。

[0087] 排除标准：

[0088] 预计寿命少于3个月

[0089] 肾移植

[0090] 过去用重组促红细胞生成素(依泊汀、达贝泊汀)处理

[0091] 主要研究者认为的任何其它情况都会妨碍评估研究药物的安全性和活性

[0092] 预先存在的针对AAV8中和抗体

[0093] 合格的猫在第一次回访期间将被筛选。这将包括完整病史和临床检查、CBC/化学，以及预先存在的针对AAV8的抗体，以及在同意书上完整发布。

[0094] 所有同意研究方案条款的合格的猫都会在接受研究后至少一周内接受单次肌肉注射AAV8.fEPO，剂量可达3E9个基因组拷贝/kg。

[0095] 载体施用后,猫将每隔一周评估一次,持续8周。这些临床检查将包括CBC网格/化学、全临床评估和血清收集。8周后,这些临床评估将从载体施用后第90天开始每3个月进行一次。3个月、6个月、9个月和1年的评估将完成。

[0096] 可能的并发症

[0097] 任何显示65%血细胞比容的红细胞增多症的动物将被给予每3周高达10%血液量的治疗性静脉切开术。

[0098] 本说明书中引用的所有出版物,以及临时专利申请no.62/212,144和62/336,211通过引用并入本文。类似地,本文引用的和出现在所附序列中的SEQ ID NO通过引用并入本文。虽然已经参照特定实施方案描述了本发明,但应理解,可以在不脱离本发明的精神的情况下进行修改。这些修改意图落入所附权利要求的范围内。

SEQUENCE LISTING

- <110> 宾夕法尼亚大学的受托人
- <120> 用于治疗伴侣动物的AAV-EPO
- <130> UPN-15-7472PCT
- <150> US 62/212,144
- <151> 2015-08-31
- <150> US 62/336,211
- <151> 2016-05-13
- <160> 9
- <170> PatentIn 3.5版本
- <210> 1
- <211> 5791
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 构建的序列
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (12) .. (629)
- <223> Epo
- <220>
- <221> polyA信号
- <222> (696) .. (822)
- <223> 兔\球蛋白\poly\A
- <220>
- <221> 重复区
- <222> (911) .. (1040)
- <223> 3' ITR (互补序列)
- <220>
- <221> rep_origin
- <222> (1217) .. (1672)
- <223> f1/ori (互补序列)
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1803) .. (2660)
- <223> AP (R)
- <220>
- <221> rep_origin

<222>	(2834) .. (3422)					
<223>	复制起点					
<220>						
<221>	重复区					
<222>	(3862) .. (3991)					
<223>	5' ITR					
<220>						
<221>	重复区					
<222>	(4059) .. (4440)					
<223>	CMV\IE\启动子					
<220>						
<221>	启动子					
<222>	(4443) .. (4724)					
<223>	CB启动子					
<220>						
<221>	TATA信号					
<222>	(4697) .. (4700)					
<220>						
<221>	内含子					
<222>	(4819) .. (5791)					
<223>	鸡\β-肌动蛋白\内含子					
<400>	1					
aattcgcac	catgtgag	cctgcccc	ctaagcctac	acagtctgcc	tggcacagct	60
tccccgagtg	tctgtcttc	ctgctgctgc	tgagtttgc	gctgctgcct	ctgggcctgc	120
ctgtgctggg	agcacctcct	agactgatct	gcgacagccg	ggtgctggaa	cgttacatcc	180
tggaagcccc	cgaggccgag	aatgtgacca	tgggatgtgc	ccagggtgc	agcttcagcg	240
agaacatcac	cgtgcccgac	accaaagtga	acttctacac	ctggaagaga	atggacgtgg	300
gccagcaggc	cctggaagtg	tggcagggac	tggccctgct	gtctgaggcc	atcctgagag	360
gacaggctct	gctggccaat	gccagccagc	ctagecgagac	acctcagctg	cacgtggaca	420
aggccgtgtc	ctccctgaga	agcctgacca	gctgctgag	agcactggga	gcccagaaag	480
aagccatgag	cctgcctgag	gaagccagcc	ctgcccctct	gagaaccttc	accgtggaca	540
ccctgtgcaa	gctgttccgg	atctacagca	acttctgcg	gggcaagctg	accctgtaca	600
ccggcgaggc	ttgtcggaga	ggcgacagat	gatgaggtag	ctctagagtc	gacctgggcg	660
gcctcgagga	cggggtgaac	tacgctgag	gatecgatct	tttccctct	gccccaaatt	720
atggggacat	catgaagccc	cttgagcctc	tgacttctgg	ctaataaagg	aaattttatt	780
tcattgcaat	agtggtttg	aatTTTTTgt	gtctctcact	cggaagcaat	tcgttgatct	840
gaatttcgac	caccataat	accattacc	ctggtagata	agtagcatgg	cgggttaatc	900
attaactaca	aggaaccct	agtgatggag	ttggccactc	cctctctgcg	cgctcgctcg	960
ctcactgagg	ccgggagacc	aaaggtcgcc	cgacgcccgg	gctttgcccc	ggcggcctca	1020

gtgagcgagc	gagcgcgcag	ccttaattaa	cctaattcac	tggccgctcgt	tttacaacgt	1080
cgtgactggg	aaaaccctgg	cgttacccaa	cttaategcc	ttgcagcaca	tccccctttc	1140
gccagctggc	gtaatagcga	agaggcccgc	accgatcgcc	cttceccaaca	gttgvcgagc	1200
ctgaatggcg	aatgggacgc	gccctgtagc	ggcgcattaa	gvcgvcggcggg	tgtggtggtt	1260
acgcvcgagc	tgaccgctac	acttgccagc	gccctagcgc	ccgctccttt	cgctttcttc	1320
ccttcctttc	tcgccacgtt	cgccggcttt	ccccgtcaag	ctctaaatcg	ggggctccct	1380
ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgacceca	aaaaacttga	ttagggtgat	1440
ggttcacgta	gtgggccatc	gccctgatag	acggtttttc	gccctttgac	gttggagtcc	1500
acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	cactcaacc	tatctcggtc	1560
tattcttttg	atttataaagg	gattttgccc	atttcggcct	attggttaaa	aatgagctg	1620
atttaacaaa	aatttaacgc	gaattttaac	aaaatattaa	cgcttacaat	ttaggtggca	1680
cttttcgggg	aatgtgcgc	ggaaccecta	tttgtttatt	tttctaata	cattcaata	1740
tgtatccgct	catgagacaa	taaccctgat	aatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	1800
gtatgagtat	tcaacatttc	cgtgtcgc	ttatccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	1860
ctgtttttgc	tcaccagaa	acgctggtga	aagtaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	1920
cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	acagvcgtaa	gatccttgag	agttttcgc	1980
ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagttct	gctatgtggc	gvcggtattat	2040
cccgtattga	cgccgggcaa	gagcaactcg	gtcvcgc	acactattct	cagaatgact	2100
tggttgagta	ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	tggcatgaca	gtaagagaat	2160
tatgcagtgc	tgccataacc	atgagtgata	acactvcggc	caacttactt	ctgacaacga	2220
tcggaggacc	gaaggagcta	accgcttttt	tgcaacaat	gggggatcat	gtaactvc	2280
ttgatcgttg	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	2340
tgccctgtagc	aatggcaaca	acgttgvcga	aactattaac	tggvcgaacta	cttactctag	2400
cttcccggca	acaattaata	gactggatgg	aggvcgataa	agttgcagga	ccacttctgc	2460
gctvcggccct	tccggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	tggagccgggt	gagcgtgggt	2520
ctcvcgggtat	cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgtatc	gtagttatct	2580
acacgacggg	gagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	acagatvcgct	gagataggtg	2640
cctcactgat	taagcattgg	taactgtcag	accaagttta	ctcatatata	ctttagattg	2700
atttaaaaact	tcatttttaa	tttaaaaagga	tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	2760
tgaccaaaaat	cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	2820
tcaaaggatc	ttcttgagat	cctttttttc	tgvcgcta	ctgctgcttg	caaacaaaaa	2880
aaccaccgct	accagvcggtg	gtttgtttgc	vcgatacaaga	gctaccaact	cctttttccga	2940
aggtaactgg	cttcagcaga	gvcgagatac	caaatactgt	tcttctagtg	tagccgtagt	3000
taggccacca	cttcaagaac	tctgtagcac	vcgctacata	cctvcgctctg	ctaactctgt	3060
taccagtggc	tgctgccagt	ggvcgataagt	cgtgtcttac	vcgggttgac	tcaagacgat	3120
agttaccgga	taaggvcgag	vcggtvcggct	gaacvcggggg	ttvcgtgcaca	gagcccagct	3180
tggagvcgaac	gacctacacc	gaactgagat	acctacagvc	tgagctatga	gaaagvcgcca	3240
vcgcttcccga	agggagaaaag	gvcggacaggt	atccvcgtaag	vcgvcaggtc	ggaacagggag	3300
agvcgacgag	ggagcttcca	gggggaaacg	cctvcgtatct	ttatagtcct	gtvcgggtttc	3360

gccacctctg	acttgagcgt	cgatTTTTgt	gatgctcgtc	aggggggcgg	agcctatgga	3420
aaaacgccag	caacgcggcc	TTTTtacggt	tcctggcctt	ttgctggcct	tttgcctaca	3480
tgTtctttcc	tcgTtatcc	cctgattctg	tggataaccg	tattaccgcc	tttgagtgag	3540
ctgataccgc	tcgccgcagc	cgaacgaccg	agcgcagcga	gtcagtgagc	gaggaagcgg	3600
aagagcgccc	aatacgcaaa	ccgcctctcc	ccgcgcgttg	gccgattcat	taatgcagct	3660
ggcacgcacag	gtttcccgc	tggaaagcgg	gcagtgagcg	caacgcaatt	aatgtgagtt	3720
agctcactca	ttaggcaccc	cagcctttac	actttatgct	tccggctcgt	atgttggtg	3780
gaattgtgag	cggataacaa	ttcacacag	gaaacagcta	tgacatgat	tacgccagat	3840
ttaattaagg	ccTtaattag	gctgcgcgct	cgctcgcTca	ctgaggccgc	ccgggcaaa	3900
cccgggcgTc	gggcgacctt	tggtcgcTccg	gcctcagTga	gcgagcgagc	gcgcagagag	3960
ggagTggcca	actccatcac	taggggtTcc	ttgtagTtaa	Tgattaacc	gccatgctac	4020
Ttatctacca	gggTaatggg	gatcctctag	aactatagct	agTcgacatt	gattattgac	4080
tagTtatTaa	tagTaatcaa	TtacgggTtc	attagTtcat	agcccatata	TggagTtccg	4140
cgtTacataa	ctTacgTtaa	atggcccgcc	Tggctgaccg	cccaacgacc	cccgcctatt	4200
gacgtcaata	atgacgtatg	Ttcccatagt	aacgccaata	gggactTtcc	attgacgtca	4260
atgggtggac	TattTacggt	aaactgccc	ctTggcagTa	catcaagtgt	atcatatgcc	4320
aagtacgcc	cctattgacg	Tcaatgacgg	Taaatggccc	gcctggcatt	atgccagTa	4380
catgacctTa	TgggactTtc	ctactTggca	gtacatctac	gtattagTca	Tcgctattac	4440
catggtcgag	gtgagcccca	cgtTctgctt	cactctcccc	atctcccc	cctccccacc	4500
cccaattTtg	TattTattTa	TTTTTaaTt	atTttgtgca	gcgatggggg	cggggggggg	4560
ggggggggcg	gcgccagcg	gggcggggcg	gggcgagggg	cggggcgggg	cgaggcggag	4620
aggTgcggcg	gcagccaatc	agagcggcg	gctccgaaag	TtTcTtTtTa	Tggcgaggcg	4680
gcggcggcg	cggccctata	aaaagcgaag	cgcgcgggcg	gcggggagTc	gctgcgacgc	4740
TgcctTcgcc	ccgtgcccc	ctccgccc	gcctcgcgcc	gcccgcTccg	gctctgactg	4800
accgcgtTac	Tcccacaggt	gagcgggcgg	gacggccctt	ctcctccggg	ctgTaatTtag	4860
cgtTtggtTt	aatgacggct	TgtTctTtTt	ctgtggctgc	gtgaaagcct	Tgaggggctc	4920
cgggagggcc	ctTgtgcgg	ggggagcggc	TcggggggTg	cgtgcgtgtg	Tgtgtgcgtg	4980
gggagcgccg	cgtgcggctc	cgcgctgcc	ggcggtgtg	agcgctgcgg	gcgcggcgcg	5040
gggctTtgTg	cgctccgcag	Tgtgcgcgag	gggagcgcgg	ccggggcggg	Tgccccgcgg	5100
Tgcggggggg	gctgcgaggg	gaacaaaggc	Tgcgtgcggg	gtgtgtgcgt	gggggggtga	5160
gcagggggTg	Tgggcgcgtc	ggtcgggctg	caaccccc	Tgcaccccc	TccccgagTt	5220
gctgagcacg	gcccggcttc	gggtgcgggg	ctcctgacgg	ggcgtggcgc	ggggctcgcc	5280
gtgccgggcg	gggggtggcg	gcaggtgggg	gtgccgggcg	gggcggggcc	gcctcggggc	5340
ggggagggct	cgggggaggg	gcgcggcggc	ccccggagcg	ccggcggtg	Tcgaggcgcg	5400
gcgagccgca	gccattgcct	TttatggTaa	Tcgtgcgaga	gggcgcaggg	actTcctTtg	5460
Tcccaaatct	gtgcggagcc	gaaatctggg	aggcgcgcgc	gcaccccc	Tagcgggcgc	5520
ggggcgaagc	ggtgcggcgc	cggcaggaag	gaaatgggcg	gggagggcct	Tcgtgcgtcg	5580
ccgcgccgcc	gtccccTtct	ccctctccag	cctcggggct	gtccgcgggg	ggacggctgc	5640
cttcgggggg	gacggggcag	ggcggggTtc	ggctTctggc	gtgtgaccgg	cggctctaga	5700

gcctctgcta accatgttca tgccttcttc ttttctctac agctcctggg caacgtgctg	5760
gttattgtgc tgtctcatca ttttgcaaa g	5791
<210> 2	
<211> 5749	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 构建的序列	
<220>	
<221> polyA信号	
<222> (56) .. (182)	
<223> 兔\球蛋白\polyA	
<220>	
<221> 重复区	
<222> (271) .. (400)	
<223> 3' ITR (互补序列)	
<220>	
<221> 复制起点	
<222> (577) .. (1032)	
<223> Fl ori	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1163) .. (2020)	
<223> AP (R)	
<220>	
<221> 复制起点	
<222> (2194) .. (2782)	
<223> 复制起点	
<220>	
<221> 重复区	
<222> (3222) .. (3351)	
<223> 5' ITR	
<220>	
<221> 重复区	
<222> (3419) .. (3800)	
<223> CMV\IE\启动子	
<220>	
<221> 启动子	
<222> (3803) .. (4084)	

<223>	CB启动子					
<220>						
<221>	TATA信号					
<222>	(4057) .. (4060)					
<220>						
<221>	内含子					
<222>	(4179) .. (5151)					
<223>	鸡\β-肌动蛋白\内含子					
<220>						
<221>	misc_feature					
<222>	(5163) .. (5738)					
<223>	Epo					
<400>	2					
ctctagagtc	gacccgggcg	gcctcgagga	cgggggtgaac	tacgcctgag	gatccgatct	60
ttttccctct	gccaaaaatt	atggggacat	catgaagccc	cttgagcadc	tgactttctgg	120
ctaataaagg	aaatttattt	tcattgcaat	agtgtgttgg	aattttttgt	gtctctcact	180
cggaagcaat	tcgttgatct	gaatttcgac	caccataat	accattacc	ctggtagata	240
agtagcatgg	cgggttaatc	attaactaca	aggaaccct	agtgatggag	ttggccactc	300
cctctctgcg	cgctcgctcg	ctcactgagg	ccgggcgacc	aaaggtegcc	cgacgcccgg	360
gctttgcccg	ggcggcctca	gtgagcgagc	gagcgcgcag	cettaattaa	cctaattcac	420
tggccgctgt	tttacaacgt	cgtgactggg	aaaaccctgg	cgttacccaa	cttaategcc	480
ttgcagcaca	tcccccttc	gccagctggc	gtaatagcga	agaggcccgc	accgatcgcc	540
cttccaaca	gttgcgcagc	ctgaatggcg	aatgggacgc	gccctgtagc	ggcgcattaa	600
gcgcggcggg	tgtggtggtt	acgcgcagcg	tgaccgctac	acttgccagc	gccctagcgc	660
ccgctccttt	cgctttcttc	ccttcctttc	tcgccacggt	cgccggcttt	ccccgtcaag	720
ctctaaatcg	ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgacceca	780
aaaaacttga	ttaggggat	ggttcacgta	gtgggccatc	gccctgatag	acggtttttc	840
gccctttgac	gttgagtc	acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	900
cactcaacc	tatctcggtc	tattcttttg	atttataagg	gattttgccc	atttcggcct	960
attggttaaa	aatgagctg	atttaacaaa	aatttaacgc	gaattttaac	aaaatattaa	1020
cgcttacaat	ttaggtggca	cttttcgggg	aatgtgcgc	ggaacccta	tttgtttatt	1080
tttctaaata	cattcaaata	tgtatecget	catgagacaa	taaccctgat	aatgcttca	1140
ataatattga	aaaaggaaga	gtatgagtat	tcaacatttc	cgtgtcgccc	ttattccctt	1200
ttttgcggca	ttttgccttc	ctgtttttgc	tcaccagaa	acgtggtga	aagtaaaga	1260
tgctgaagat	cagttgggtg	cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	1320
gatccttgag	agttttcgcc	ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagtctt	1380
gctatgtggc	gcggtattat	cccgtattga	cgccgggcaa	gagcaactcg	gtcggcgcct	1440
acactattct	cagaatgact	tggttgagta	ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	1500
tggcatgaca	gtaagagaat	tatgcagtgc	tgccataacc	atgagtgata	acactgcggc	1560

caacttactt	ctgacaacga	tggaggacc	gaaggagcta	accgcttttt	tgcaacaacat	1620
gggggatcat	gtaactcgcc	ttgatcgtt	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	1680
cgacgagcgt	gacaccacga	tgcctgtagc	aatggcaaca	acgttgcgca	aactattaac	1740
tggcgaacta	cttactctag	cttcccggca	acaattaata	gactggatgg	aggcggataa	1800
agttgcagga	ccacttctgc	gctcggccct	tccggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	1860
tggagccggt	gagcgtgggt	ctcgcggtat	cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	1920
ctcccgtatc	gtagttatct	acacgacggg	gagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	1980
acagatcgct	gagataggtg	cctcactgat	taagcattgg	taactgtcag	accaagttta	2040
ctcatatata	ctttagattg	atttaaaact	tcatttttaa	tttaaaagga	tctaggtgaa	2100
gatccttttt	gataatctca	tgacaaaaat	cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	2160
gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	ttcttgagat	cctttttttc	tgcgcgtaat	2220
ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	accagcggtg	gtttgtttgc	cggatcaaga	2280
gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	cttcagcaga	gcgagatac	caaatactgt	2340
tcttctagtg	tagccgtagt	taggccacca	cttcaagaac	tctgtagcac	cgctacata	2400
cctcgctctg	ctaactctgt	taccagtggc	tgctgccagt	ggcgataagt	cgtgtcttac	2460
cgggttggac	tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgcag	cggtcgggct	gaacgggggg	2520
ttcgtgcaca	cagcccagct	tggagcgaac	gacctacacc	gaactgagat	acctacagcg	2580
tgagctatga	gaaagcgcca	cgcttcccga	agggagaaag	gcgacaggt	atccggtaag	2640
cggcagggtc	ggaacaggag	agcgcacgag	ggagcttcca	gggggaaacg	cctggtatct	2700
ttatagtcct	gtcgggtttc	gccacctctg	acttgagcgt	cgatttttgt	gatgctcgtc	2760
agggggggcgg	agcctatgga	aaaacgccag	caacgcggcc	tttttacggt	tcctggcett	2820
ttgctggcct	tttgctcaca	tgttctttcc	tgcgttatcc	cctgattctg	tggataaccg	2880
tattaccgcc	tttgagtgag	ctgataccgc	tcgccgcagc	cgaacgaccg	agcgcagcga	2940
gtcagtgagc	gaggaagcgg	aagagcgcgc	aatacgcaaa	ccgcctctcc	ccgcgcgttg	3000
gccgattcat	taatgcagct	ggcacgacag	gtttcccgcg	tggaaagcgg	gcagtgagcg	3060
caacgcaatt	aatgtgagtt	agctcactca	ttaggcaccc	caggctttac	actttatgct	3120
tccggctcgt	atgttgtgtg	gaattgtgag	cggataacaa	ttcacacag	gaaacagcta	3180
tgaccatgat	tacgccagat	ttaattaagg	ccttaattag	gctgcgcgct	cgctcgtcga	3240
ctgaggccgc	ccgggcaaaag	cccgggcgtc	gggcgacctt	tggtcgcccc	gcctcagtga	3300
gcgagcgagc	gcgagagag	ggagtggcca	actccateac	taggggttcc	ttgtagttaa	3360
tgattaaccc	gccatgctac	ttatctacca	gggtaatggg	gatcctctag	aactatagct	3420
agtcgacatt	gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	attagttcat	3480
agcccatata	tggagtccg	cgttacataa	cttacggtaa	atggcccgc	tggctgaccg	3540
cccaacgacc	cccgccatt	gacgtcaata	atgacgatg	ttcccatagt	aacgccaata	3600
gggactttcc	attgacgtca	atgggtggac	tatttacggt	aaactgccc	cttggcagta	3660
catcaagtgt	atcatatgcc	aagtacgcc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaattgccc	3720
gcctggcatt	atgccagta	catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	gtacatctac	3780
gtattagtea	tcgctattac	catggtcgag	gtgagcccca	cgttctgctt	cactctcccc	3840
atctcccccc	ctctcccacc	cccaattttg	tatttattta	ttttttaatt	attttgtgca	3900

20	25	30
Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp		
35	40	45
Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Glu Ala Arg Glu Ala Glu Asn		
50	55	60
Val Thr Met Gly Cys Ala Gln Gly Cys Ser Phe Ser Glu Asn Ile Thr		
65	70	75
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Thr Trp Lys Arg Met Asp Val		
85	90	95
Gly Gln Gln Ala Leu Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu		
100	105	110
Ala Ile Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Ala Asn Ala Ser Gln Pro Ser		
115	120	125
Glu Thr Pro Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Ser Leu Arg Ser		
130	135	140
Leu Thr Ser Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Met Ser		
145	150	155
Leu Pro Glu Glu Ala Ser Pro Ala Pro Leu Arg Thr Phe Thr Val Asp		
165	170	175
Thr Leu Cys Lys Leu Phe Arg Ile Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys		
180	185	190
Leu Thr Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Arg Gly Asp Arg		
195	200	205
<210> 4		
<211> 192		
<212> PRT		
<213> 家猫		
<400> 4		
Met Gly Ser Cys Glu Cys Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu		
1	5	10
Leu Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile		
20	25	30
Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Glu Ala Arg Glu Ala		
35	40	45
Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Cys Ser Phe Ser Glu Asn		
50	55	60
Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Thr Trp Lys Arg Met		
65	70	75
Asp Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu		

	85	90	95
Ser Glu Ala Ile Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Ala Asn Ser Ser Gln			
	100	105	110
Pro Ser Glu Thr Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Ser Leu			
	115	120	125
Arg Ser Leu Thr Ser Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala			
	130	135	140
Thr Ser Leu Pro Glu Ala Thr Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Phe Thr			
	145	150	155
Val Asp Thr Leu Cys Lys Leu Phe Arg Ile Tyr Ser Asn Phe Leu Arg			
	165	170	175
Gly Lys Leu Thr Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Arg Gly Asp Arg			
	180	185	190

<210> 5

<211> 576

<212> DNA

<213> 家犬

<400> 5

```

atgggggctg gcgaatgtcc tgcctgttc ctttctgtg ctttctgtc gcttcctctg      60
ggcctcccag tcttgggcgc cccccctcgc ctcatttgtg acagccgggt cctggagaga      120
tacatcctgg aggccagga ggccgaaaat gtcacgatgg gctgtgctca aggctgcagc      180
ttcagtgaga atatcacctg cccagacacc aaggtaatt tctatactg gaagaggatg      240
gatgttgggc agcaggcctt ggaagtctgg caggcctcgg cactgctctc agaagccatc      300
ctgcgggggc aggccctgtt ggccaacgcc tcccagccat ctgagactcc gcagctgcat      360
gtggacaaag ccgtcagcag cctgcgcagc ctcactctc tgcttcgggc gctgggagcc      420
cagaaggagg ccatgtccct tccagaggaa gcctctctg ctccactccg aacattcact      480
gttgatactt tgtgcaaact tttccgaatc tactccaatt tcctccgtgg aaagctgaca      540
ctgtacacag gggaggcctg cagaagagga gacagg                                576

```

<210> 6

<211> 579

<212> DNA

<213> 家猫

<400> 6

```

atggggctgt gcgaatgtcc tgcctgtctg cttctgtat ctttctgtc gcttcccctg      60
ggcctcccag tcttgggcgc cccccctcgc ctcacttgtg acagccgagt cctggagagg      120
tacattctgg gggccagga ggccgaaaat gtcacgatgg gctgtgctga aggctgcagc      180
ttcagtgaga atatcaactg cccagacacc aaggtaact tctatactg gaagaggatg      240
gacgtcgggc agcaggctgt ggaagtctgg caggcctcgg cctgctctc agaagccatc      300
ctgcgggggc aggccctgct ggccaactcc tcccagccat ctgagaccct gcagctgcat      360

```

gtggataaag ccgtcagcag cctgcgcagc ctcacctccc tgcttcgggc actgggagcc	420
cagaaggaag ccacctccct tccagaggca acctctgctg ctccactccg aacattcact	480
gtcgatactt tgtgcaaact tttccgaatc tactccaact tcctgcgggg aaagctgacg	540
ctgtacacag gggaggcctg ccgaagagga gacaggtga	579
<210> 7	
<211> 618	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 密码子优化的序列	
<400> 7	
atgtgcgagc ctgcccccc taagcctaca cagtctgect ggcacagctt ccccgagtgt	60
cctgctctcc tgctgctget gagtttgetg ctgctgecte tgggcctgcc tgtgctggga	120
gcacctccta gactgatctg cgacagccgg gtgctggaac ggtacatcct ggaagcccgc	180
gaggccgaga atgtgaccat gggatgtgcc cagggctgca gcttcagcga gaacatcacc	240
gtgcccgaca ccaaagtga cttctacacc tggaagagaa tggacgtggg ccagcaggcc	300
ctggaagtgt ggcagggact ggccctgctg tctgaggcca tcctgagagg acaggctctg	360
ctggccaatg ccagccagcc tagcgagaca cctcagctgc acgtggacaa ggccgtgtcc	420
tccttgagaa gcctgaccag cctgctgaga gactgggag cccagaaaga agccatgagc	480
ctgcctgagg aagccagccc tgcccctctg agaaccttca ccgtggacac cctgtgcaag	540
ctgttccgga tctacagcaa cttcctgcgg ggcaagctga ccctgtacac cggcgaggct	600
tgtcggagag gcgacaga	618
<210> 8	
<211> 576	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 密码子优化的序列	
<400> 8	
atgggcagct gcgagtgtcc tgctctctctg ctgctgctga gtttgctgct gctgcctctg	60
ggcctgcctg tgctgggagc acctcctaga ctgatctgcg acagccgggt gctggaacgg	120
tacatcctgg aagcccgcga ggccgagaat gtgaccatgg gatgtgccga gggctgcagc	180
ttcagcgaga acatcaccgt gcccacacc aaagtgaact tctacacctg gaagagaatg	240
gacgtgggcc agcaggccgt ggaagtgtgg cagggactgg ccctgctgtc tgaggccatc	300
ctgagaggac aggtcttget ggccaacagc agccagccta gcgaaacct gcagctgcac	360
gtggacaagg ccgtgtcctc cctgagaagc ctgaccagcc tgctgagagc actgggagcc	420
cagaaagagg ccacctctct gcctgaggcc acatctgccg cccctctgag aaccttacc	480
gtggacacc tgtgcaaget gttccgcatc tacagcaact tcctgcgggg caagctgacc	540
ctgtacaccg gcgaggcttg tcggagaggc gacaga	576

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-2前导序列

<400> 9

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1

5

10

15

Val Thr Asn Ser

20

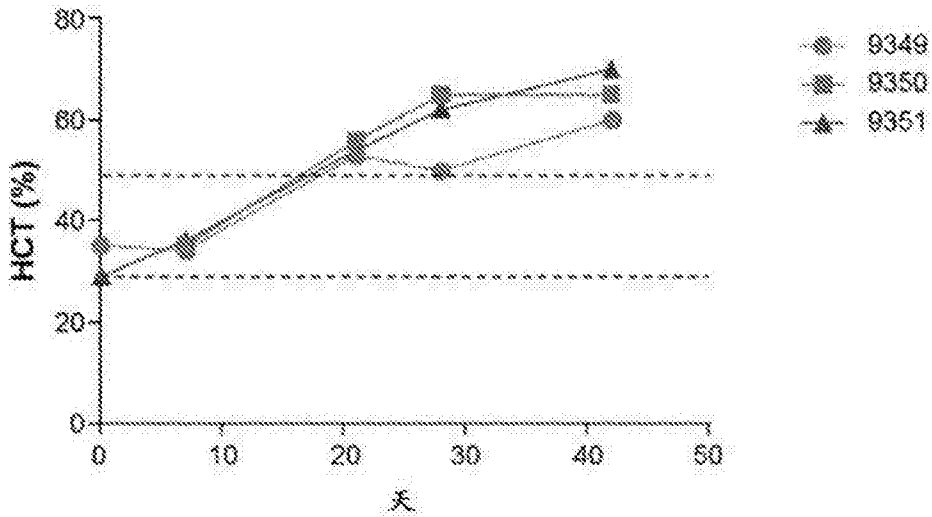


图1

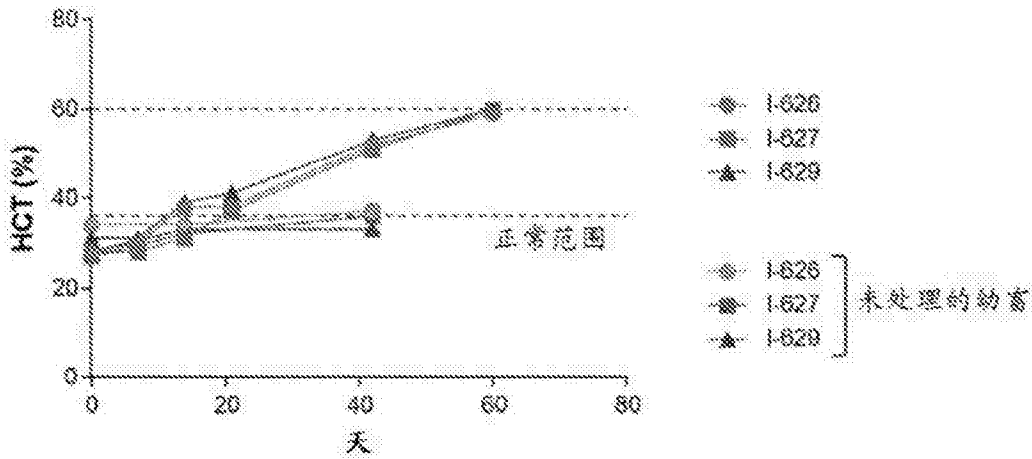


图2

SEQ ID NO: 3 天 EPO

MCEPAPPKPTQSAWHSFPECPAIIIIISLIIILPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYILE
 AREAENVTMGCAQGCFSFSENITVPDTKVNPFYTWKRMDVGGQALEVWQGLALLSE
 AILRGQALLANASQPSETPQLHVDKAVSSLRSLTSLLRALGAQKEAMSLPEEA5PA
 PLRTFTVDTLCKLFRIYSNFLRGKLTLYTGEACRGROR

图3A

SEQ ID NO: 4 氨基酸序列

MGSCECPALLLLLSLLLLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYILEAREAEENVTMGCAE
GC5FSENIIVPDTKVN FYTWKRMDVGGQAVEVWQGLALLSEAILRGQALLANS5Q
PSETLQLHVDKAVSSLRSLTSLLRALGAQKEATSLPEAT5AAPLRTFTVDTLCKLFRI
YSNFLRGKLTLYTGEACRRGDR

图3B

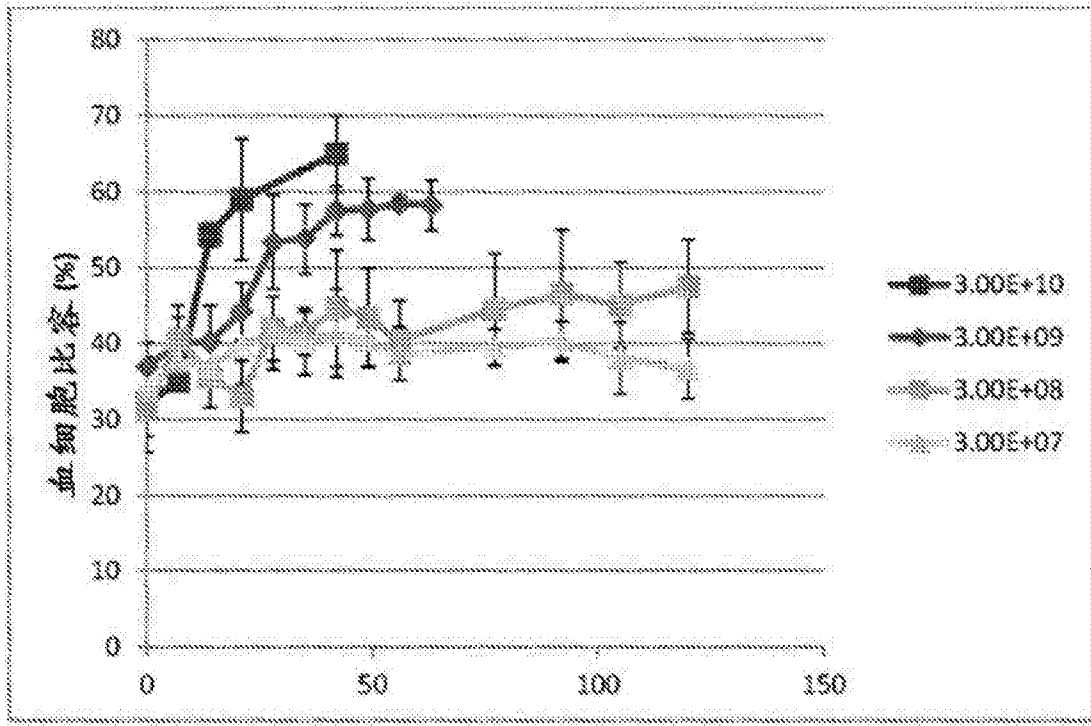


图4