



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115176022 A

(43) 申请公布日 2022. 10. 11

(21) 申请号 202080084617.X

B · 刚加哈兰

(22) 申请日 2020.10.23

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

(30) 优先权数据

11517

62/924,877 2019.10.23 US

专利代理师 吴瑜 张璐

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2022.06.06

C12N 15/861 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 14/47 (2006.01)

PCT/US2020/056984 2020.10.23

C07K 14/81 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/081280 EN 2021.04.29

(71) 申请人 夏尔人类遗传性治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M · 克鲁格曼 F · 霍林

J · 伦格勒 P · 道拉德

F · 舍夫林格 H · 罗滕斯坦纳

权利要求书2页 说明书33页 附图25页

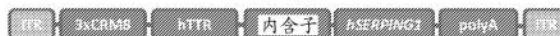
## (54) 发明名称

用于遗传性血管性水肿的基于腺相关病毒载体的基因疗法

## (57) 摘要

本公开尤其提供了一种重组腺相关病毒(rAAV)载体,所述rAAV载体包含AAV8衣壳和编码人C1-酯酶抑制剂的密码子优化的SERPING1序列。本公开还提供了一种治疗患有遗传性血管性水肿(HAE)的受试者的方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用重组腺相关病毒(rAAV)载体,所述rAAV载体包含AAV8衣壳和编码人C1-酯酶抑制剂的密码子优化的SERPING1序列。

表达盒



1. 一种重组腺相关病毒 (rAAV) 载体, 所述rAAV载体包含AAV8衣壳和编码C1抑制剂 (C1-INH) 的密码子优化的SERPING1序列。
2. 如权利要求1所述的rAAV载体, 其中所述编码C1-INH的密码子优化的SERPING1序列包含与SEQ ID NO:2具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性的序列。
3. 如权利要求2所述的rAAV载体, 其中所述编码C1-INH的密码子优化的SERPING1序列包含与SEQ ID NO:2相同的序列。
4. 如权利要求1所述的rAAV载体, 其中所述载体还包含肝脏特异性启动子。
5. 如权利要求4所述的rAAV载体, 其中所述肝脏特异性启动子是甲状腺素运载蛋白启动子 (TTR)。
6. 如前述权利要求中任一项所述的rAAV载体, 其中所述载体还包含遍在启动子。
7. 如前述权利要求中任一项所述的rAAV载体, 其中所述载体还包含以下中的一者或多者: 5' 和3' 反向末端重复序列、所述序列上游的内含子和顺式作用调控模块 (CRM)。
8. 如前述权利要求中任一项所述的rAAV载体, 其中所述载体还包含WPRE序列。
9. 如权利要求8所述的rAAV载体, 其中所述WPRE序列是经修饰的。
10. 如权利要求9所述的rAAV载体, 其中所述WPRE包含mut6delATG修饰。
11. 如权利要求7所述的rAAV载体, 其中所述内含子是小鼠微小病毒 (MVM) 或SV40内含子。
12. 如权利要求7所述的rAAV载体, 其中所述CRM是肝脏特异性CRM。
13. 如权利要求7所述的rAAV载体, 其中所述CRM是CRM8。
14. 如权利要求7所述的rAAV载体, 其中所述载体包含至少三个CRM。
15. 一种包含AAV8衣壳和rAAV载体的重组腺相关病毒 (rAAV), 所述载体包含:
  - a. 5' 反向末端重复序列 (ITR);
  - b. 顺式作用调控模块 (CRM);
  - c. 肝脏特异性启动子;
  - d. 小鼠微小病毒 (MVM);
  - e. 编码C1抑制剂 (C1-INH) 的SERPING1序列;
  - f. 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件 (WPRE); 以及
  - g. 3' ITR。
16. 如权利要求15所述的rAAV, 其中所述SERPING1序列是野生型序列或密码子优化的序列。
17. 如权利要求16所述的rAAV, 其中所述密码子优化的SERPING1序列与SEQ ID NO:2具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性。
18. 一种治疗患有遗传性血管性水肿 (HAE) 的受试者的方法, 所述方法包括向所述有需要的受试者施用前述权利要求中任一项所述的rAAV。
19. 一种治疗患有遗传性血管性水肿 (HAE) 的受试者的方法, 所述方法包括向所述有需要的受试者施用重组腺相关病毒 (rAAV) 载体, 所述rAAV载体包含AAV8衣壳和可操作地连接至编码C1抑制剂 (C1-INH) 的核酸序列的启动子, 并且其中施用使得所述受试者中的C1-INH酶活性增加。
20. 如权利要求19所述的方法, 其中在所述受试者的血浆中检测到所述C1-INH。

21. 如权利要求18-20中任一项所述的方法,其中在所述受试者的肝脏中检测到所述C1-INH。

22. 如权利要求18-21中任一项所述的方法,其中在单次施用后C1-INH维持至少30、60、90、120、150、180天或更长时间。

23. 如权利要求18-22中任一项所述的方法,其中在施用所述rAAV载体后C1-INH活性存在于所述受试者中。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述受试者的C4水平恢复至发作前水平。

25. 如权利要求18-24中任一项所述的方法,其中所述AAV静脉内施用。

26. 如权利要求18-24中任一项所述的方法,其中所述AAV鞘内施用。

27. 如权利要求25或26所述的方法,其中所述AAV以至少约 $5 \times 10^9$ vg的剂量施用。

28. 如权利要求18-27中任一项所述的方法,其中所述rAAV的所述施用不会引发免疫应答。

## 用于遗传性血管性水肿的基于腺相关病毒载体的基因疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年10月23日提交的美国临时申请序列号62/924,877的优先权,所述申请的公开内容特此以引用的方式整体并入。

### 背景技术

[0003] 遗传性血管性水肿 (HAE) 是特征在于面部、喉咙和大多数四肢中肿胀的反复发作的罕见疾患。HAE是潜在危及生命的病症,其特征在于血管扩张的不可预测和反复发作,表现为皮下和粘膜下血管性水肿。在一些情况下,HAE与C1-抑制剂(I型)的低血浆水平相关,而在其他情况下,所述蛋白质以正常或升高的量循环但功能失调(II型)。C1抑制剂是血浆激肽释放酶活性的主要调节剂。HAE发作的症状包括自发发生或由轻度创伤触发的面部、口腔和/或气道肿胀。影响气道的水肿发作可能是致命的。除急性炎症爆发外,过量的血浆激肽释放酶活性还一直与诸如自身免疫性疾病(包括红斑狼疮)的慢性疾患相关。

[0004] 已经考虑和开发了用于治疗C1-INH缺乏或功能障碍的各种策略,包括例如抑制接触系统的成员。例如,拉那芦单抗(lanadelumab)是已被批准用于治疗HAE的血浆激肽释放酶的完全人单克隆抗体抑制剂。

[0005] 使用在体内产生蛋白质的载体对于治疗疾病是合乎需要的,但受到各种因素的限制,包括在递送至受试者后蛋白质产生不良。

[0006] 迄今为止,可用的疗法尚未解决包括疾病复发和需要长期持续施用在内的挑战。因此,需要新颖的且持久的治疗方法来治疗HAE。

### 发明内容

[0007] 本发明提供了重组腺相关病毒(rAAV)载体,所述rAAV载体允许体内有效且稳健的人C1酯酶抑制剂(C1-INH或C1EI)表达。

[0008] 在一个方面,本发明尤其提供了一种重组腺相关病毒(rAAV)载体,所述rAAV载体包含AAV8衣壳和编码C1抑制剂(C1-INH)的密码子优化的SERPING1序列。

[0009] 在一些实施方案中,所述编码C1-INH的密码子优化的SERPING1序列包含与SEQ ID NO:2具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性的序列。

[0010] 在一些实施方案中,所述编码C1-INH的密码子优化的SERPING1序列包含与SEQ ID NO:2相同的序列。

[0011] 在一些实施方案中,所述载体还包含肝脏特异性启动子。

[0012] 在一些实施方案中,所述肝脏特异性启动子是甲状腺素运载蛋白启动子(TTR)。

[0013] 在一些实施方案中,所述载体还包含遍在启动子。

[0014] 在一些实施方案中,所述载体还包含以下中的一者或多者:5'和3'反向末端重复序列、所述序列上游的内含子和顺式作用调控模块(CRM)。

[0015] 在一些实施方案中,所述载体还包含WPRE序列。

[0016] 在一些实施方案中,所述WPRE序列是经修饰的。

- [0017] 在一些实施方案中,所述WPRE含有mut6delATG修饰。
- [0018] 在一些实施方案中,所述内含子是小鼠微小病毒(MVM)或SV40内含子。
- [0019] 在一些实施方案中,所述CRM是肝脏特异性CRM。
- [0020] 在一些实施方案中,所述CRM是CRM8。
- [0021] 在一些实施方案中,所述载体包含至少三个CRM。
- [0022] 在另一个方面,本发明尤其提供了一种包含AAV8衣壳和rAAV载体的重组腺相关病毒(rAAV),并且载体包含:
- [0023] a. 5' 反向末端重复序列(ITR);
- [0024] b. 顺式作用调控模块(CRM);
- [0025] c. 肝脏特异性启动子;
- [0026] d. 小鼠微小病毒(MVM);
- [0027] e. 编码C1抑制剂(C1-INH)的SERPING1序列;
- [0028] f. 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE);以及
- [0029] g. 3' ITR。
- [0030] 在一些实施方案中,所述SERPING1序列是野生型序列或密码子优化的序列。
- [0031] 在一些实施方案中,所述密码子优化的SERPING1序列与SEQ ID NO:2具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性。
- [0032] 在另一个方面,本发明尤其提供了一种治疗患有遗传性血管性水肿(HAE)的受试者的方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用前述实施方案中任一项所述的rAAV。
- [0033] 在另一个方面,本发明尤其提供了一种治疗患有遗传性血管性水肿(HAE)的受试者的方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用重组腺相关病毒(rAAV)载体,所述rAAV载体包含AAV8衣壳和可操作地连接至编码C1抑制剂(C1-INH)的核酸序列的启动子,并且其中施用使得所述受试者中的C1-INH酶活性增加。
- [0034] 在一些实施方案中,在所述受试者的血浆中检测到C1-INH。
- [0035] 在一些实施方案中,在所述受试者的肝脏中检测到C1-INH。
- [0036] 在一些实施方案中,在单次施用后C1-INH维持至少30、60、90、120、150、180天或更长时间。
- [0037] 在一些实施方案中,在施用所述rAAV载体后C1-INH活性存在于所述受试者中。
- [0038] 在一些实施方案中,所述受试者的C4水平恢复至发作前水平。
- [0039] 在一些实施方案中,所述AAV静脉内施用。
- [0040] 在一些实施方案中,所述AAV鞘内施用。
- [0041] 在一些实施方案中,所述AAV以至少约 $5 \times 10^9$ vg的剂量施用。
- [0042] 在一些实施方案中,所述rAAV的施用不会引发免疫应答。
- [0043] 本发明的各个方面在以下章节中详细描述。章节的使用并不意味着限制本发明。每个章节可适用于本发明的任何方面。在本申请中,除非另外指出,否则使用“或”意味着“和/或”。除非上下文另外清楚地指示,否则如本文所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括单数和复数个指示物两者。

## 附图说明

[0044] 图1A是包含野生型人C1-INH (hC1-INH) 表达载体的表达盒的示意性图示。图1B是针对肝脏(肝细胞)中的hC1-INH表达设计的表达盒的示意性图示。ITR:反向末端重复序列;hTTR:人甲状腺素运载蛋白启动子;CRM:顺式作用调控模块;内含子可以是MVM内含子(小鼠微小病毒内含子);并且polyA是上游增强子。

[0045] 图2A是M构建体的总体示意性图示。M构建体是具有HA01 (SERPING1) 序列的对照构建体。HA01是人SERPING1野生型序列,具有1503bp、24个CpG和53,4%GC含量。

[0046] 图2B示出两种M构建体:M01和M01A。M01包含HA01 (SERPING1) 序列和外显子1-内含子1-部分外显子2 (717bp) 内含子,而Mar01A包含HA01 (SERPING1) 序列和MVM (77bp) 内含子。

[0047] 图3A是J构建体的总体示意性图示。J构建体包含四个密码子优化的SERPING1序列。图3B示出四种J构建体-J01、J02、J03和J04的示意性图示。J01包含密码子优化的SERPING1序列HA03。J02包含密码子优化的SERPING1序列HA06。J03包含密码子优化的SERPING1序列HA05。J04包含密码子优化的SERPING1序列HA04。

[0048] 图4A是S构建体的总体示意性图示。所有S构建体包含密码子优化的HA06 (SERPING1) 序列,内含子和WPRE的不同组合。内含子包括MVM内含子或外显子1-内含子1-部分外显子2。图4B示出九种S构建体-S01、S02、S03、S04、S05、S06、S07、S08和S09的示意性图示。

[0049] 图5A是N构建体的总体示意性图示。所有N构建体包含密码子优化的HA06 (SERPING1) 序列和新型启动子元件。图5B示出九种N构建体-N01、N02、N03、N04、N05、N06、N07、N08和N09的示意性图示。

[0050] 图6A是U构建体的总体示意性图示。U构建体包含与WPREmut6delATG组合的不同密码子优化的SERPING1序列。图6B示出十种U构建体-U01、U02、U03、U04、U05、U06、U07、U08、U09和U10的示意性图示。U01包含密码子优化的SERPING1序列HA11。U02包含密码子优化的SERPING1序列HA12。U03包含密码子优化的SERPING1序列HA13。U04包含密码子优化的SERPING1序列HA14。U05包含密码子优化的SERPING1序列HA15。U06包含密码子优化的SERPING1序列HA16。U07包含密码子优化的SERPING1序列HA17。U08包含密码子优化的SERPING1序列HA18。U09包含密码子优化的SERPING1序列HA19。U10包含密码子优化的SERPING1序列HA20。

[0051] 图7A是P构建体的总体示意性图示。所有P构建体包含密码子优化的HA06 (SERPING1) 序列和WPREmut6delATG,与不同的新型启动子元件组合。新型启动子元件包括CRE4、CRE6或CRE4和CRE6。图7B示出六种P构建体-P01、P02、P03、P04、P05和P06的示意性图示。

[0052] 图8A是描绘AAV8.SERPING1载体在HepG2细胞中表达hC1-INH的蛋白质印迹的图像。图8B是说明如通过ELISA测定所测量,AAV8.SERPING1在HepG2细胞中表达功能性C1-INH的实验数据的图。

[0053] 图9A是说明在向野生C57B1/6白化小鼠单次静脉内施用AAV8.SERPING1载体后hC1-INH的剂量依赖性表达的实验数据的图。在注射后第14天测量血浆中的hC1-INH水平。图9B是说明在向野生C57B1/6白化小鼠单次静脉内施用AAV8.SERPING1载体后hSERPING1 DNA或RNA的剂量依赖性表达的实验数据的图。在注射后第28天测量肝脏中的hC1-INH水平。

hSERPING1 DNA的表达水平以拷贝/ $\mu\text{g}$ 以及拷贝/细胞呈现。

[0054] 图10A是说明在向野生-C57B1/6白化小鼠单次静脉内施用不同载体后,包含四种密码子优化的SERPING1构建体(J01、J02、J03和J04)的rAAV8载体在血浆中表达C1-INH方面的体内功效的实验数据的图。在注射后第7天、第14天和第28天测量hC1-INH的表达水平。M01A构建体用作对照。本研究中使用的不同构建体的示意性图示在图10B中示出。

[0055] 图11是说明在向野生-C57B1/6白化小鼠单次静脉内施用载体后,包含密码子优化的SERPING1序列和WPRE的rAAV8载体在血浆中表达C1-INH方面的体内功效的实验数据的图。在注射后第7天、第14天和第28天测量hC1-INH的表达水平。施用单次载体剂量 $4 \times 10^{11}$  vg/kg。

[0056] 图12A是说明在向C57B1/6白化小鼠单次静脉内施用载体后,包含HA06(SERPING1)序列、不同WPRE和内含子的rAAV8载体在血浆中表达C1-INH方面的体内功效的实验数据的图。在注射后第7天、第14天和第28天测量hC1-INH的表达水平。本研究中使用的不同构建体的示意性图示在图12B中示出。

[0057] 图13A是说明在以 $4 \times 10^{11}$  vg/kg的剂量向C57B1/6白化小鼠单次静脉内施用载体后,包含HA06(SERPING1)序列、WPRE和不同启动子元件的rAAV8载体在血浆中表达C1-INH方面的体内功效的实验数据的图。在注射后第7天、第14天和第28天测量hC1-INH的表达水平。本研究中使用的不同构建体的示意性图示在图13B中示出。图13C是说明在以低( $2 \times 10^{12}$  vg/kg)和高( $2 \times 10^{13}$  vg/kg)剂量向C57B1/6白化小鼠静脉内施用S04(一种包含HA06(SERPING1)序列、WPRE mut6delATG和MVM内含子的构建体)后,所述构建体在血浆中表达C1-INH方面的剂量依赖性功效的实验数据的图。在注射后第14天和第28天测量hC1-INH的表达水平。S04的示意性图示在图13C中示出。

[0058] 图14A是说明在以 $2 \times 10^{12}$  vg/kg的剂量向C57B1/6白化小鼠单次静脉内施用载体后,包含密码子优化的SERPING1序列的rAAV8载体在血浆中表达C1-INH方面的体内功效的实验数据的图。在注射后第28天测量hC1-INH的表达水平。将包含密码子优化的SERPING1序列的载体的表达水平与相同剂量的S04构建体的表达水平进行比较。本研究中使用的不同构建体的示意性图示在图14B中示出。

[0059] 图15A是说明在向C57B1/6白化小鼠单次静脉内施用中等剂量的载体后,包含HA06(SERPING1)序列与不同WPRE和新型启动子元件的组别的rAAV8载体在血浆中表达C1-INH方面的体内功效的实验数据的图。在注射后第7天、第14天、第28天、第49天、第70天、第91天、第112天、第133天、第152天和第175天测量hC1-INH的表达水平。本研究中使用的不同构建体的示意性图示在图15B中示出。

[0060] 定义

[0061] 腺相关病毒(AAV):如本文所用,术语“腺相关病毒”或“AAV”或重组AAV(“rAAV”)包括但不限于AAV 1型、AAV 2型、AAV 3型(包括3A型和3B型)、AAV 4型、AAV 5型、AAV 6型、AAV 7型、AAV 8型、AAV 9型、AAV 10型、AAV 11型、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV和绵羊AAV(参见例如,Fields等人,Virology,第2卷,第69章(第4版,Lippincott-Raven Publishers);Gao等人,J.Virology 78:6381-6388(2004);Mori等人,Virology 330:375-383(2004))。通常,AAV可感染分裂细胞和非分裂细胞两者,并且可以染色体外状态存在而不整合到宿主细胞的基因组中。AAV载体通常用于基因疗法中。

[0062] 施用:如本文所用,在通过导致rAAV载体递送的方法或途径将编码治疗剂的rAAV载体递送至受试者的上下文中,术语“施用”或“引入”可互换使用。本领域已知用于施用rAAV载体的各种方法,包括例如静脉内、皮下或透皮。rAAV载体的透皮施用可通过使用“基因枪”或生物射弹颗粒递送系统进行。在一些实施方案中,rAAV载体通过非病毒脂质纳米颗粒施用。

[0063] 动物:如本文所使用,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的人。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的非人动物。在某些实施方案中,非人动物是哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施方案中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼、昆虫和/或蠕虫。在一些实施方案中,动物可以是转基因动物、遗传工程化的动物和/或克隆。

[0064] 大约或约:如本文所用,在应用于一个或多个目标值时,术语“大约”或“约”是指类似于所阐述的参考值的值。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指在所阐述的参考值的任一方向上的(大于或小于)25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的值范围,除非另外说明或以另外的方式从上下文显而易见(除了这样的数值将超过可能值的100%的情况)。

[0065] 功能等效物或衍生物:如本文所用,术语“功能等效物”或“功能衍生物”在氨基酸序列的功能衍生物的背景下表示保留基本上类似于原始序列的生物活性的生物活性(功能或结构)的分子。功能衍生物或等效物可以是天然衍生物或合成制备的。示例性功能衍生物包括具有一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加的氨基酸序列,条件是蛋白质的生物活性是保守的。取代氨基酸期望地具有与所取代的氨基酸的化学-物理性质类似的化学-物理性质。合乎需要的类似化学-物理性质包括电荷、体积、疏水性、亲水性等方面的相似性。

[0066] 体外:如本文所用,术语“体外”是指发生在人工环境中,例如试管或反应容器中、细胞培养物等中、而不是多细胞生物体内的事件。

[0067] 体内:如本文所用,术语“体内”是指在多细胞生物体,如人和非人动物内发生的事件。在基于细胞的系统的背景下,所述术语可用于指在活细胞(与例如体外系统相反)内发生的事件。

[0068] IRES:如本文所用,术语“IRES”是指任何合适的内部核糖体进入位点序列。

[0069] 多肽:如本文所用的术语“多肽”是指经由肽键连接在一起的氨基酸的连续链。所述术语用来指具有任何长度的氨基酸链,但是本领域普通技术人员将理解所述术语不限于冗长的链并且可指包含经由肽键连接在一起的两个氨基酸的最小链。如本领域技术人员所已知,多肽可进行加工和/或修饰。

[0070] 蛋白质:如本文所用的术语“蛋白质”是指充当离散单元的一个或多个多肽。如果单个多肽为离散的功能单元并且不要求与其他多肽永久性或暂时性的物理缔合以便形成离散的功能单元,则术语“多肽”和“蛋白质”可以可互换地使用。如果离散的功能单元包含多于一个彼此物理缔合的多肽,则术语“蛋白质”是指物理偶联并且一起充当离散单元的多个多肽。

[0071] 调控元件:如本文所用,术语“调控元件”是指能够调控和/或控制基因的转录的转录控制元件,特别是非编码顺式作用转录控制元件。调控元件包含至少一个转录因子结合



位点,例如至少一个组织特异性转录因子结合位点。在本文所述的实施方案中,调控元件具有至少一个肝脏特异性转录因子结合位点。通常,与在没有调控元件的情况下从单独启动子转录基因相比,调控元件增加或增强启动子驱动的基因表达。因此,调控元件特别地包含增强子序列,尽管应当理解增强转录的调控元件不限于典型的远上游增强子序列,而是可在它们所调控的基因的任何距离处存在。如本领域所理解的,调控转录的序列可位于体内受调控基因的上游(例如,在启动子区域中)或下游(例如,在3' UTR中),并且可位于所述基因附近或更远。调控元件可包含天然存在的序列、此类调控元件的(部分的)组合或调控元件的若干拷贝,例如非天然存在的序列。因此,调控元件包括天然存在的和优化的或工程化的调控元件以实现所需的表达水平。

[0072] 受试者:如本文所用,术语“受试者”是指人或任何非人动物(例如,小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物)。人包括出生前和出生后形式。在许多实施方案中,受试者是人类。受试者可以是患者,其是指送至医疗服务提供者以诊断或治疗疾病的人。术语“受试者”在本文中可与“个体”或“患者”互换使用。受试者可罹患或易患疾病或病症但是可显示或不显示疾病或病症的症状。

[0073] 基本上:如本文所用,术语“基本上”是指展现总体或接近总体范围或程度的目标特征或特性的定性情况。生物领域的普通技术人员将了解生物和化学现象很少(如果曾发生)达到完全和/或进行至完全或达成或避免绝对结果。因此,本文使用术语“基本上”来获得在许多生物现象和化学现象中固有的潜在完全性缺乏。

[0074] 基本同源性:短语“基本同源性”在本文用于指氨基酸序列或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员将理解,如果两个序列在对应位置含有同源残基,则所述两个序列通常被认为是“基本上同源的”。同源残基可以是相同的残基。或者,同源残基可以是具有适当相似的结构和/或功能特征的不相同的残基。例如,如本领域普通技术人员所熟知的,某些氨基酸通常被分类为“疏水性”或“亲水性”氨基酸,和/或为具有“极性”或“非极性”侧链。用一个氨基酸取代同一类型的另一个氨基酸通常可被认为是“同源”取代。

[0075] 如本领域所熟知的,氨基酸序列或核酸序列可使用各种算法中的任一种进行比较,所述算法包括在商业计算机程序中可用的那些算法,如用于核苷酸序列的BLASTN以及用于氨基酸序列的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST。示例性此类程序描述于Altschul, 等人,basic local alignment search tool,J.Mol.Biol.,215(3):403-410,1990; Altschul, 等人,Methods in Enzymology;Altschul, 等人,“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs”,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997;Baxevanis, 等人,Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley,1998;以及Misener, 等人,(编辑), Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology,第132卷), Humana Press,1999。除了鉴定同源序列之外,上述程序通常提供同源性程度的指示。在一些实施方案中,如果两个序列的对应残基的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在相关段残基上同源,则所述两个序列被认为是基本上同源的。在一些实施方案中,所述相关段是完整序列。在一些实施方案中,所述相关段是至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、

500个或更多个残基。

[0076] 基本同一性:短语“基本同一性”在本文用于指氨基酸序列或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员将理解,如果两个序列在对应位置含有相同残基,则所述两个序列通常被认为是“基本上相同的”。如本领域所熟知的,氨基酸序列或核酸序列可使用各种算法中的任一种进行比较,所述算法包括在商业计算机程序中可用的那些算法,如用于核苷酸序列的BLASTN以及用于氨基酸序列的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST。示例性此类程序描述于Altschul,等人,Basic local alignment search tool,J.Mol.Biol.,215(3):403-410,1990;Altschul,等人,Methods in Enzymology;Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997;Baxevanis等人,Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley,1998;以及Misener,等人,(编辑),Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology,第132卷),Humana Press,1999。除了鉴定相同序列之外,上述程序通常提供同一性程度的指示。在一些实施方案中,如果两个序列的对应残基的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在相关段残基上相同,则所述两个序列被认为是基本上相同的。在一些实施方案中,所述相关段是完整序列。在一些实施方案中,所述相关段是至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500个或更多个残基。

[0077] 患有:“患有”疾病、病症和/或疾患的个体已被诊断具有或展现所述疾病、病症和/或疾患的一种或多种症状。

[0078] 治疗有效量:如本文所用,术语治疗剂的“治疗有效量”是指在施用至患有或易患疾病、病症和/或疾患的受试者时足以治疗、诊断、预防所述疾病、病症和/或疾患的症状和/或延迟其发作的量。本领域普通技术人员将理解治疗有效量通常经由包括至少一个单位剂量的给药方案来施用。

[0079] 治疗:如本文所用,术语“治疗(treat、treatment或treating)”是指用于部分或完全减轻、改善、缓和、抑制、预防特定疾病、病症和/或疾患的一种或多种症状或特征,延迟其发作,降低其严重程度和/或降低其发生率的任何方法。为了降低发展与疾病相关的病理学的风险的目的,可向不显示所述疾病的病征和/或仅显示所述疾病的早期病征的受试者施用治疗。

[0080] 本文中通过端点表述的数值范围包括归入所述范围内的所有数字和分数(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.9、4和5等)。还应理解,所有数字及其分数都假定由术语“约”修饰。

[0081] 本发明的各个方面在以下章节中详细描述。章节的使用并不意味着限制本发明。每个章节可适用于本发明的任何方面。在本申请中,除非另外指出,否则使用“或”意味着“和/或”。除非上下文另外清楚地指示,否则如本文所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括单数和复数个指示物两者。

[0082] 本发明的各个方面在以下章节中详细描述。章节的使用并不意味着限制本发明。每个章节可适用于本发明的任何方面。在本申请中,除非另外指出,否则使用“或”意味着“和/或”。

## 具体实施方式

[0083] 本公开描述了用于体内产生C1-INH以治疗与C1-INH缺乏相关的疾病如HAE的有效且稳健的重组腺相关病毒(rAAV)载体。

[0084] 遗传性血管性水肿(HAE)

[0085] HAE的特征在于C1-INH的水平降低,同时缓激肽上调。它以常染色体显性模式遗传并且影响1:10,000至1:50,000人。HAE(I型和II型)的根本原因归因于映射至染色体11的C1酯酶抑制剂基因(C1EI基因或SERPING1基因)的突变的常染色体显性遗传。SERPING1基因中的常染色体显性突变可能超过300个,但它适合于基因疗法。85%的HAE病例是I型,其中所产生的C1酯酶抑制剂的量不足(参见例如,Gower等人,World Allergy Organ J.,4:S9-S21(2011);Cungo等人,Trends Mol Med,15:69-78(2009);Gooptu等人,Annu Rev Biochem,78:147-176(2009);以及Zuraw等人,J Allergy Clin Immunol Pract,1:458-467(2013))。其余病例的特征在于表达功能失调的C1酯酶抑制剂。

[0086] 与HAE相关的发作的频率、持续时间和严重程度各不相同,其中30%的患者报告大于1次发作/月的频率,40%的患者报告6至11次发作/年,并且剩余30%不经常出现症状。通常,症状在12至36小时内呈短暂进展,并在2至5天内消退;然而,一些发作可能持续长达一周。尽管HAE发作是自限性的,但不可预测的发作发生给患者带来相当大的压力,通常严重影响生活质量,并且可能是致命的。

[0087] 迄今为止,治疗剂适用于长期预防、急性发作的治疗和短期预防(即,牙科手术前),并且包括剂如达那唑(其具有高副作用概况)、C1抑制剂替代蛋白、缓激肽受体拮抗剂、激肽释放酶抑制剂、新鲜冷冻血浆和纯化的C1抑制剂。这些疗法可缓解症状并最大限度地提高生活质量;然而,疾病复发和长期持续施用的需要仍然是治疗的主要障碍(参见例如,Aberer,Ann Med,44:523-529(2012);Charignon等人,Expert Opin Pharmacother,13:2233-2247(2012);Papadopoulou-Alataki,Curr Opin Allergy Clin Immunol,10:20-25(2010);Parikh等人,Curr Allergy Asthma Rep,11:300-308(2011);Tourangeau等人,Curr Allergy Asthma Rep,11:345-351(2011);Bowen等人,Ann Allergy Asthma Immunol,100:S30-S40(2008);Frank,Immunol Allergy Clin North Am,26:653-668(2006);Cicardi等人,J Allergy Clin Immunol,99:194-196(1997);Kreuz等人,Transfusion 49:1987-1995(2009);Bork等人,Ann Allergy Asthma Immunol,100:153-161(2008);和Cicardi等人,J Allergy Clin Immunol,87:768-773(1991))。

[0088] 本发明尤其提供了使用重组腺相关病毒(rAAV)载体治疗HAE的方法和组合物,所述rAAV载体包含编码hC1-INH的密码子优化的SERPING1序列。特别地,本发明提供了一种通过以有效剂量施用包含编码人C1-INH的密码子优化的序列SERPING1的rAAV来治疗HAE的方法,以使得HAE的至少一种症状或特征在强度、严重程度或频率方面降低。本文所述的基因治疗方法在表达治疗水平的hC1-INH方面特别有效。

[0089] rAAV SERPING1载体设计

[0090] 在一些方面,本文提供了编码C1-INH的重组腺相关病毒(rAAV)载体。所述rAAV载体包含衣壳和SERPING1序列。

[0091] 说明本公开的示例性rAAV载体的示意图在图1A和图1B中说明。如图1A所示,在一些实施方案中,本公开的rAAV载体包含肝脏特异性启动子、5'和3'反向末端重复序列

(ITR)、顺式作用调控模块(CRM)和内含子。

[0092] 所述载体的SERPING1序列可以是野生型或密码子优化的变体。因此,在一些实施方案中,rAAV载体包含野生型SERPING1核苷酸序列。在一些实施方案中,rAAV载体包含密码子优化的SERPING1序列。

[0093] 本发明的合适的C1-INH是可取代天然存在的C1-INH的至少部分活性或挽救与C1-INH缺乏相关的一种或多种表型或症状的任何蛋白质或蛋白质的一部分。

[0094] 在一些实施方案中,用于本发明的合适的C1-INH核苷酸序列包含编码人C1-INH蛋白的SERPING1序列。天然存在的人C1-INH核苷酸序列在GenBank:AF435921.1中示出。相应的人C1-INH氨基酸序列在表1中示出:

[0095] 表1.人C1-INH序列

<b>人 C1-INH (氨基酸序列)</b> (GenBank: AAM21515.1)	
[0096]	MASRLTLLTLLLLLLAGDRASSNPATSSSSQDPESLQDRGEGK VATTVISKMLFVEPILEVSSLPTTNSTNSATKITANTTDEPTTQP TTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTTGSFCPGPVTLCSDES STEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQ VLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTSVSQI FHSPDLAIRDTFVNASRTL YSSSPRVL SNNSDANLELINTWVAK NTNNKISRLLDSLPSDTRLVLLNAIYLSAKWKTTDFPKKTRMEP FHFKNSVIKVPMMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGQLQLSHNLSL VILVPQNLKHRLEDMEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLTLP RIKVTTSDMLSIMKLEFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQH QTVLELTETGVEAAAASAVISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQH KFPVFMGRVYDPRA (SEQ ID NO:1)

[0097] 多种启动子可用于本文所述的rAAV载体中。这些包括,例如,遍在启动子、组织特异性启动子和可调控(例如诱导型或阻抑型)启动子。在一些实施方案中,启动子是肝脏特异性启动子。肝脏特异性启动子的实例是本领域已知的,并且包括例如人甲状腺素运载蛋白启动子(TTR)、经修饰的hTTR(hTTR mod.)、 $\alpha$ -抗胰蛋白酶启动子、人因子IX pro/肝脏转录因子反应性寡聚体、LSP、CMV/CBA启动子(1.1kb)、CAG启动子(1.7kb)、mTTR、经修饰的mTTR、mTTR pro、mTTR增强子和碱性白蛋白启动子。肝脏特异性启动子描述于例如,Zhijian Wu等人,Molecular Therapy第16卷,第2期,2008年2月中,其内容以引用的方式并入本文。

[0098] 在一些实施方案中,启动子是遍在启动子。在一些实施方案中,启动子是鸡 $\beta$ 肌动蛋白启动子。

[0099] 在一些实施方案中,rAAV载体含有额外的增强子或调控元件以促进mRNA的转录和/或翻译(例如,增强子序列、Kozak序列、聚腺苷酸化序列、转录终止序列、IRES等)。在一些实施方案中,所述载体包含5'和3'反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方案中,所述载体包含一个或多个增强子元件。在一些实施方案中,所述载体包含polyA尾。

[0100] 在一些实施方案中,rAAV载体包含一个或多个小元件,如内含子。各种内含子是本领域中已知的。本文所述的rAAV载体的合适内含子包括例如MVM内含子、截短的F.IX内含

子、嵌合β珠蛋白SD/免疫球蛋白重链SA内含子、SV40和/或α珠蛋白第1内含子。在一些实施方案中，rAAV载体包含MVM内含子。在一些实施方案中，rAAV载体包含SV40内含子。在一些实施方案中，内含子可以是来自SERPING1基因的外显子1-内含子1-部分外显子2。

[0101] 在一些实施方案中，rAAV载体包含土拨鼠肝炎病毒转录后控制元件(WPRE)，因为WPRE增加病毒载体在许多组织中的转基因表达。WPRE的各种优化或变体形式是本领域中已知的，并且包括例如WPRE野生型、WPRE3和WPREmut6delATG等。WPRE和相关的WPRE变体描述于美国专利号10,179,918；美国专利号7,419,829；美国专利号9,731,033；美国专利号8,748,169；美国专利号7,816,131；美国专利号8,865,881；美国专利号6,287,814；美国专利公布号2016/0199412；美国专利公布号2017/0114363；美国专利公布号2017/0360961；美国专利公布号2019/0032078；美国专利公布号2018/0353621；国际公布号W02017201527；国际公布号W02018152451；国际公布号W02013153361；国际公布号W02014144756；欧洲专利号EP1017785；和欧洲专利公布号3440191中。前述公布各自以引用的方式整体并入本文。

[0102] 在一些实施方案中，rAAV载体包含一个或多个顺式调控元件(CRE)。CRE是构建体的经修饰的主链元件。CRE的各种优化或变体形式是本领域中已知的，并且包括例如CRE4和CRE6等。以下公布描述了CRE的不同变体，并且其各自以引用的方式并入本文：国际公布号W02016146757、W02014064277、W02014063753和W02009130208。

[0103] 在一些实施方案中，rAAV载体包含顺式作用调控模块(CRM)。各种CRM适合用于本文所述的载体中，并且包括例如肝脏特异性CRM、神经元特异性CRM和/或CRM8。在一些实施方案中，所述载体包含多于一个CRM。例如，在一些实施方案中，所述载体包含两个、三个、四个、五个或六个CRM。在一些实施方案中，所述载体包含三个CRM，例如三个CRM8。

[0104] 在一些实施方案中，rAAV载体经序列优化以增加转录物稳定性、用于更有效的翻译和降低免疫原性。在一些实施方案中，rAAV载体经序列优化以增加转录物稳定性、用于更有效的翻译和/或降低免疫原性。在一些实施方案中，SERPING1是序列优化的。

[0105] 在一些实施方案中，rAAV载体是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10或AAV11载体。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 1。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 2。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 3。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 4。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 5。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 6。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 7。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 8。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 9。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 10。在一些实施方案中，rAAV载体是AAV 11。在一些实施方案中，rAAV载体是序列优化的。在一些实施方案中，rAAV衣壳是经修饰的。

[0106] 示例性元件序列在以下表2中示出。在一些实施方案中，rAAV载体包含rAAV载体元件，所述rAAV载体元件包含与表2中所示的载体元件序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中，rAAV载体包含与表2中所示的载体元件核苷酸序列相同的载体元件核苷酸序列。

[0107] 表2：载体的HAE构建体(表达盒)中包含的序列

[0108]

**SERPING1 野生型序列(53% GC 含量, 24 个 CpG)**  
(NCBI 参考序列: NM\_000062.2)

ATGGCCTCCAGGCTGACCCTGCTGACCCTCCTGCTGCTGCTGCTGGCTG  
GGGATAGAGCCTCCTCAAATCCAAATGCTACCAGCTCCAGCTCCCAGG  
ATCCAGAGAGTTTGCAAGACAGAGGCGAAGGGAAGGTCGCAACAACA  
GTTATCTCCAAGATGCTATTCGTTGAACCCATCCTGGAGGTTTCCAGCT  
TGCCGACAACCAACTCAACAACCAATTCAGCCACCAAAATAACAGCTA  
ATACCACTGATGAACCCACCACACAACCCACCACAGAGCCCACCACCC  
AACCCACCATCCAACCCACCCAACCAACTACCCAGCTCCCAACAGATT  
CTCCTACCCAGCCCCTACTGGGTCCTTCTGCCCAGGACCTGTTACTCT  
CTGCTCTGACTTGGAGAGTCATTCAACAGAGGCCGTGTTGGGGGATGC  
TTTGGTAGATTTCTCCCTGAAGCTCTACCACGCCTTCTCAGCAATGAAG  
AAGGTGGAGACCAACATGGCCTTTTCCCCATTTCAGCATCGCCAGCCTCC  
TTACCCAGGTCCTGCTCGGGGCTGGGGAGAACACCAAAACAAACCTGG  
AGAGCATCCTCTTTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTCCACCAGGCCCT  
GAAGGGCTTCACGACCAAGGTGTCACCTCAGTCTCTCAGATCTTCCAC  
AGCCCAGACCTGGCCATAAGGGACACCTTTGTGAATGCCTCTCGGACC  
CTGTACAGCAGCAGCCCCAGAGTCCTAAGCAACAACAGTGACGCCAAC  
TTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACCAACAACAAGATC  
AGCCGGCTGCTAGACAGTCTGCCCTCCGATACCCGCCTTGTCTCCTCA  
ATGCTATCTACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACAACATTTGATCCCAAGA  
AAACCAGAATGGAACCTTTCACCTCAAAAACCTCAGTTATAAAAGTGC

CCATGATGAATAGCAAGAAGTACCCTGTGGCCCATTTTCATTGACCAAA  
 CTTTGAAAGCCAAGGTGGGGCAGCTGCAGCTCTCCACAATCTGAGTTT  
 GGTGATCCTGGTACCCCAGAACCTGAAACATCGTCTTGAAGACATGGA  
 ACAGGCTCTCAGCCCTTCTGTTTTCAAGGCCATCATGGAGAAACTGGAG  
 ATGTCCAAGTTCCAGCCACTCTCCTAACACTACCCCGCATCAAAGTGA  
 CGACCAGCCAGGATATGCTCTCAATCATGGAGAAATTGGAATTCTTCG  
 ATTTTTCTTATGACCTTAACCTGTGTGGGCTGACAGAGGACCCAGATCT  
 TCAGGTTTCTGCGATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAAGTGCAGAGAC  
 TGGGGTGGAGGCGGCTGCAGCCTCCGCCATCTCTGTGGCCCGCACCCT  
 GCTGGTCTTTGAAGTGCAGCAGCCCTTCTCTTCGTGCTCTGGGACCAG  
 CAGCACAAGTCCCTGTCTTCATGGGGCGAGTATATGACCCCAGGGCCT  
 GA

(SEQ ID NO: 2)

**人 SERPING1 野生型序列(与 SEQ ID NO: 2 不同的终止密码子)**

**HA01**

(NCBI 参考序列: NM\_000062.2)

ATGGCCTCCAGGCTGACCCTGCTGACCCTCCTGCTGCTGCTGGCTG  
 GGGATAGAGCCTCCTCAAATCCAAATGCTACCAGCTCCAGCTCCCAGG  
 ATCCAGAGAGTTTGCAAGACAGAGGCGAAGGGAAGGTCGCAACAACA  
 GTTATCTCCAAGATGCTATTCGTTGAACCCATCCTGGAGGTTTCCAGCT  
 TGCCGACAACCAACTCAACAACCAATTCAGCCACCAAAAATAACAGCTA  
 ATACCACTGATGAACCCACCACACAACCCACCACAGAGCCCACCACC  
 AACCCACCATCCAACCCACCCAACCAACTACCCAGCTCCCAACAGATT  
 CTCCTACCCAGCCCCTACTGGGTCCTTCTGCCCAGGACCTGTTACTCT  
 CTGCTCTGACTTGGAGAGTCATTCAACAGAGGCCGTGTTGGGGGATGC  
 TTTGGTAGATTTCTCCCTGAAGCTCTACCACGCCTTCTCAGCAATGAAG  
 AAGGTGGAGACCAACATGGCCTTTTCCCATTTCAGCATCGCCAGCCTCC  
 TTACCCAGGTCTGCTCGGGGCTGGGGAGAACACCAAAAACAAACCTGG  
 AGAGCATCCTCTTTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTCCACCAGGCCCT  
 GAAGGGCTTCACGACCAAGGTGTCACCTCAGTCTCTCAGATCTTCCAC  
 AGCCCAGACCTGGCCATAAGGGACACCTTTGTGAATGCCTCTCGGACC  
 CTGTACAGCAGCAGCCCCAGAGTCCTAAGCAACAACAGTGACGCCAAC  
 TTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACCAACAACAAGATC  
 AGCCGGCTGCTAGACAGTCTGCCCTCCGATACCCGCCTTGTCTCTCTCA  
 ATGCTATCTACCTGAGTGCCAAGTGAAGACAACATTTGATCCCAAGA  
 AAACCAGAATGAACCCCTTCACTTCAAAAACCTCAGTTATAAAAGTGC  
 CCATGATGAATAGCAAGAAGTACCCTGTGGCCCATTTTCATTGACCAAA  
 CTTTGAAAGCCAAGGTGGGGCAGCTGCAGCTCTCCACAATCTGAGTTT  
 GGTGATCCTGGTACCCCAGAACCTGAAACATCGTCTTGAAGACATGGA  
 ACAGGCTCTCAGCCCTTCTGTTTTCAAGGCCATCATGGAGAAACTGGAG  
 ATGTCCAAGTTCCAGCCACTCTCCTAACACTACCCCGCATCAAAGTGA  
 CGACCAGCCAGGATATGCTCTCAATCATGGAGAAATTGGAATTCTTCG  
 ATTTTTCTTATGACCTTAACCTGTGTGGGCTGACAGAGGACCCAGATCT  
 TCAGGTTTCTGCGATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAAGTGCAGAGAC  
 TGGGGTGGAGGCGGCTGCAGCCTCCGCCATCTCTGTGGCCCGCACCCT  
 GCTGGTCTTTGAAGTGCAGCAGCCCTTCTCTTCGTGCTCTGGGACCAG  
 CAGCACAAGTCCCTGTCTTCATGGGGCGAGTATATGACCCCAGGGCCT  
 AG

(SEQ ID NO: 3)

[0109]

密码子优化的 SERPING1 序列

**HA03**

ATGGCCAGCAGGCTGACCCTGCTGACCCTGCTGCTGCTGCTGCTGGCTG  
GAGACAGGGCCAGCAGCAACCCCAATGCCACCAGCAGCAGCAGCCAG  
GACCCTGAGAGCCTGCAGGACAGGGGAGAGGGCAAGGTGGCTACCAC  
AGTGATCAGCAAGATGCTGTTTGTGGAGCCCATCCTGGAGGTGAGCAG  
CCTGCCACCACCAACAGCACCACCAACAGTGCCACCAAGATCACAGC  
CAACACCACAGATGAGCCCACCACCCAGCCCACCACAGAGCCCACCAC  
CCAGCCCACCATCCAGCCCACCAGCCCACCACCCAGCTGCCACAGA  
CAGCCCCACCAGCCCACCACAGGCAGCTTCTGCCCTGGCCCTGTGACC  
CTGTGCAGTGACCTGGAGAGCCACAGCACAGAGGCTGTGCTGGGAGAT  
GCCCTGGTGGACTTCAGCCTGAAGCTGTACCATGCCTTCAGTGCCATGA  
AGAAGGTGGAGACCAACATGGCCTTCAGCCCCTTCAGCATTGCCAGCC  
TGCTGACCCAGGTGCTGCTGGGAGCTGGAGAGAACACCAAGACCAACC  
TGGAGAGCATCCTGAGCTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTGCACCAGG  
CCCTGAAGGGCTTCACCACCAAGGGAGTGACCAGTGTGAGCCAGATCT  
TCCACAGCCCTGACCTGGCCATCAGGGACACCTTTGTGAATGCCAGCA  
GGACCCTGTACAGCAGCAGCCCCAGGGTGCTGAGCAACAACAGTGATG  
CCAACCTGGAGCTGATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACCAACAACA  
AGATCAGCAGGCTGCTGGACAGCCTGCCAGTGACACCAGGCTGGTGC  
TGCTGAATGCCATCTACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACCACCTTTGACCC  
CAAGAAGACCAGGATGGAGCCCTTCCACTTCAAGAACAGTGTGATCAA  
GGTGGCCATGATGAACAGCAAGAAGTACCCTGTGGCCCACTTCATTGA  
CCAGACCCTGAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTTCAGCTTAGCCACAACCT  
GAGCCTGGTGTCTCTGGTGCCCCAGAACCTGAAGCACAGGCTGGAGGA  
CATGGAGCAGGCCCTGAGCCCCAGTGTGTTCAAGGCCATCATGGAGAA  
GCTGGAGATGAGCAAGTTCCAGCCCACCCTGCTGACCCTGCCAGGAT  
CAAGGTGACCACCAGCCAGGACATGCTGAGCATCATGGAGAAGCTGGA  
GTTCTTTGACTTCAGCTATGACCTGAACCTGTGTGGCCTGACAGAGGAC  
CCTGACCTGCAAGTCAGTGCCATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAGCTG  
ACAGAGACAGGAGTGGAGGCTGCTGCTGCCAGTGCCATCAGTGTGGCC  
AGGACCCTGCTGGTGTGTTGAGGTGCAGCAGCCCTTCTGTTTGTGCTGT  
GGGACCAGCAGCACAAGTCCCTGTGTTTCATGGGCAGGGTGTATGACC  
CCAGGGCCTAG

[0110]

(SEQ ID NO: 4)

**HA04**

ATGGCCTCAGGCTGACCCTGCTGACCCTCCTGCTGCTGCTGCTGGCTG  
GGGATAGAGCCTCCTCAAATCCAAATGCTACCAGCTCCAGCTCCCAGG  
ATCCAGAGAGTTTGCAAGACAGAGGAGAAGGCAAGGTGGCAACAACA  
GTTATCTCCAAGATGCTATTTGTTGAACCCATCCTGGAGGTTTCCAGCT  
TGCCTACAACCAACTCAACAACCAATTCAGCCACCAAAATAACAGCTA  
ATACCACTGATGAACCCACCACACAACCCACCACAGAGCCCACCACC  
AACCACCATCCAACCCACCCAACCAACTACCCAGCTCCCAACAGATT  
CTCCTACCCAGCCCCTACTGGCTCCTTCTGCCCAGGACCTGTTACTCT  
CTGCTCTGACTTGGAGAGTCATTCAACAGAGGCTGTGTTGGGAGATGCT  
TTGGTAGATTTCTCCCTGAAGCTCTACCATGCCTTCTCAGCAATGAAGA  
AGGTGGAGACCAACATGGCCTTTTCCCATTTCAGCATTGCCAGCCTCCT  
TACCCAGGTCTGCTGGGGGCTGGAGAGAACACCAAAAACAAACCTGGA  
GAGCATCCTCTCTTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTCCATCAGGCCCTG  
AAGGGCTTCACTACCAAAGGTGTCACCTCAGTCTCTCAGATCTTCCATA



GCCCAGACCTGGCCATAAGGGACACCTTTGTGAATGCCTCTAGGACCC  
 TGTACAGCAGCAGCCCCAGAGTCCTAAGCAACAACAGTGATGCCAACT  
 TGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACAACAACAAGATCA  
 GCAGGCTGCTAGACAGTCTGCCCTCTGATAACCAGGCTTGTCTCCTCAA  
 TGCTATCTACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACAACATTTGATCCCAAGAA  
 AACAGAAATGGAACCCTTTCACTTCAAAAACACTCAGTTATAAAAGTGCC  
 CATGATGAATAGCAAGAAGTACCCTGTGGCCCATTTTCATTGACCAAAC  
 TTTGAAGGCCAAAGTGGGCCAGCTCCAGCTGTCCCACAATCTGAGTTTG  
 GTGATCCTGGTACCCCGAACCCTGAAACATAGACTTGAAGACATGGAA  
 CAGGCTCTCAGCCCTTCTGTTTTCAAGGCCATCATGGAGAAACTGGAGA  
 TGCCAAGTTCAGCCCACTCTCCTAACACTACCCAGGATCAAAGTGAC  
 TACCAGCCAGGATATGCTCTCAATCATGGAGAAATTGGAATTCCTTGAT  
 TTTTCTTATGACCTAACCTGTGTGGCCTGACAGAGGACCCAGATCTTC  
 AGGTTTCTGCTATGCAGCATCAGACAGTGCTGGAACCTGACAGAGACTG  
 GAGTGGAGGCTGCTGCAGCCTCAGCCATCTCTGTGGCCAGGACCCTGC  
 TGGTCTTTGAAGTGCAGCAGCCCTTCTCTTTGTGCTCTGGGACCAGCA  
 GCACAAGTTCCTGTCTTCATGGGCAGAGTATATGACCCCAAGGGCCTA  
 G  
 (SEQ ID NO: 5)

**HA05**

[0111]

ATGGCCTCCAGGCTGACCCTGCTGACCCTCCTGCTGCTGCTGCTGGCTG  
 GGGACAGAGCCTCCTCAAATCCAAATGCTACCAGCTCCAGCTCCCAGG  
 ACCCAGAGAGCCTCCAAGACAGAGGAGAAGGCAAGGTGGCAACAACA  
 GTCATCTCCAAGATGCTCTTTGTGGAACCCATCCTGGAGGTCTCCAGCC  
 TCCCTACAACCAACTCAACAACCAATTCAGCCACCAAGATAACAGCTA  
 ATACCACTGATGAACCCACCACACAACCCACCACAGAGCCCACCACCC  
 AACCCACCATCCAACCCACCCAACCAACTACCCAGCTCCCAACAGACT  
 CTCCTACCCAGCCCACTACTGGCTCCTTCTGCCCAGGACCTGTCACTCT  
 CTGCTCTGACCTGGAGAGCCACTCAACAGAGGCTGTGCTGGGAGATGC  
 TCTGGTGGACTTCTCCCTGAAGCTCTACCATGCCTTCTCAGCAATGAAG  
 AAAGTGGAGACCAACATGGCCTTTTCCCATTTCAGCATTGCCAGCCTCC  
 TGACCCAGGTCTGCTGGGGGCTGGAGAGAACACCAAGACAAACCTGG  
 AGAGCATCCTCTTTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTCCATCAGGCCCT  
 GAAGGGCTTCACTACCAAGGGTGTCACCTCAGTCTCTCAGATCTTCCAC  
 AGCCCAGACCTGGCCATAAGGGACACCTTTGTGAATGCCTCTAGGACC  
 CTGTACAGCAGCAGCCCCAGAGTCCTCAGCAACAACAGTGATGCCAAC  
 CTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACAACAACAAGATC  
 AGCAGGCTGCTGGACAGCCTGCCCTCTGACACCAGGCTGGTCTCTCTCA  
 ATGCTATCTACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACAACATTTGATCCCAAGA  
 AAACCAGAATGGAACCCTTTCACTTCAAGAACTCAGTCATAAAGGTGC  
 CCATGATGAATAGCAAGAAATACCCTGTGGCCCACTTCATTGACCAAA  
 CTCTCAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTCCAGCTGTCCCACAATCTGAGCC  
 TGGTGATCCTGGTGGCCCGAACCCTGAAGCACAGACTGGAAGACATGG  
 AACAGGCTCTCAGCCCTTCTGTCTTCAAGGCCATCATGGAGAAGCTGG  
 AGATGTCCAAGTTCAGCCCACTCTCCTCACACTCCCCAGGATCAAGGT  
 CACTACCAGCCAGGACATGCTCTCAATCATGGAGAAGCTGGAATTCCTT  
 GACTTTTCTTATGACCTGAACCTGTGTGGCCTGACAGAGGACCCAGATC  
 TCCAGGTCTCTGCTATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAACCTGACAGAGA  
 CTGGAGTGGAGGCTGCTGCAGCCTCAGCCATCTCTGTGGCCAGGACC  
 TGCTGGTCTTTGAAGTGCAGCAGCCCTTCTCTTTGTGCTCTGGGACCA

GCAGCACAAGTTCCTGTCTTCATGGGCAGAGTGTATGACCCCAGGGC  
CTAG  
(SEQ ID NO: 6)

**HA06**

ATGGCCTCCAGGCTGACCCTGCTGACCCTCCTGCTGCTGCTGCTGGCTG  
GGGACAGGGCCTCCTCAAACCCCAATGCCACCAGCTCCAGCTCCCAGG  
ACCCAGAGAGCCTCCAGGACAGGGGGGAAGGCAAGGTGGCTACCACA  
GTCATCTCCAAGATGCTCTTTGTGGAGCCATCCTGGAGGTCTCCAGCC  
TCCCCACCACCAACTCAACCACCAACTCAGCCACCAAGATCACAGCCA  
ACACCACTGATGAGCCCACCACACAGCCCACCACAGAGCCCACCACC  
AGCCCACCATCCAGCCCACCAGCCCACCACCAGCTCCCCACAGACT  
CCCCACCCAGCCCACCCTGGCTCCTTCTGCCCAGGCCCTGTCACCCT  
CTGCTCTGACCTGGAGAGCCACTCAACAGAGGCTGTGCTGGGGGATGC  
CCTGGTGGACTTCTCCCTGAAGCTCTACCATGCCTTCTCAGCCATGAAG  
AAGGTGGAGACCAACATGGCCTTCTCCCCCTTCAGCATTGCCAGCCTCC  
TGACCCAGGTCTGCTGGGGGCTGGGGGAGAACACCAAGACCAACCTGG  
AGAGCATCCTCTCCTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTCCATCAGGCCCT  
GAAGGGCTTCACCACCAAGGGAGTCACTCAGTCTCCAGATCTTCCA  
CAGCCCAGACCTGGCCATCAGGGACACCTTTGTGAATGCCTCCAGGAC  
CCTGTACAGCAGCAGCCCCAGGGTCTCAGCAACAACAGTGATGCCAA  
CCTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACAACAACAAGAT  
CAGCAGGCTGCTGGACAGCCTGCCCTCTGACACCAGGCTGGTCCTCCTC  
AATGCCATCTACCTGAGTGCCAAGTGGAAAGACCACCTTTGATCCCAAG  
AAGACCAGGATGGAACCTTCCACTTCAAGAACTCAGTCATCAAGGTG  
CCCATGATGAACAGCAAGAAGTACCCTGTGGCCCACTTCAATTGACCAG  
ACCCTCAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTCCAGCTGTCCACAACCTGAGC  
CTGGTGATCCTGGTGCCCCAGAACCTGAAGCACAGGCTGGAGGACATG  
GAACAGGCCCTCAGCCCCTCTGTCTTCAAGGCCATCATGGAGAAGCTG  
GAGATGTCCAAGTTCCAGCCCACCCTCCTCACCTCCCAGGATCAAGG  
TGACCACCAGCCAGGACATGCTCTCAATCATGGAGAAGCTGGAGTTCT  
TTGACTTCTCCTATGACCTGAACCTGTGTGGCCTGACAGAGGACCCAGA  
TCTCCAGGTCTCTGCCATGCAGCACCAGACAGTGTGGAAGTGCAGACA  
GACTGGAGTGGAGGCTGCTGCAGCCTCAGCCATCTCTGTGGCCAGGAC  
CCTGCTGGTCTTTGAAGTGCAGCAGCCCTTCTCTTTGTGCTCTGGGAC  
CAGCAGCACAAGTTCCTGTCTTCATGGGCAGGGTGTATGACCCCAGG  
GCCTAG  
(SEQ ID NO: 7)

[0112]

**示例性密码子优化的 SERPING1 序列**

**HA11**

ATGGCATCAAGGCTGACCCTTCTCACCTGCTCCTGCTGCTTCTGGCTG  
GGGACAGAGCCTCCAGCAACCCCAATGCCACCTCCAGCAGCTCTCAAG  
ATCCAGAGTCCCTGCAAGACCGGGGAGAAGGCAAGGTGGCTACCACA  
GTCATCTCCAAGATGCTCTTTGTGGAACCCATCCTGGAAGTGTCTCTCC  
TCCCCACCACTAACTCCACCACAACTCTGCCACTAAGATCACAGCCA  
ACACTACAGATGAGCCAACCTACCAGCCTACAACAGAGCCTACCACC  
AACCAACCATCCAGCCAACCCAGCCCACCCTCAGCTGCCACAGACA  
GCCAACACAGCCCACAACCTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTGACCCT  
CTGCAGTGAAGTGGAAAGCCACAGCACCGAGGCTGTGCTGGGAGATGC  
TCTGGTGGACTTTTCTCTCAAGCTGTACCATGCTTTCTCAGCAATGAAG  
AAAGTAGAGACCAACATGGCCTTCAGCCCCTTTCCATTGCCAGCCTCC

TCACTCAAGTGCTCCTGGGGGCTGGAGAGAATACCAAAACCAACCTGG  
 AGAGCATCCTCTCTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCCCT  
 GAAAGGCTTCACAACCAAGGGGGTGACTTCTGTCTCCCAGATCTTCCAC  
 TCTCCAGACCTGGCCATCAGAGACACCTTCGTGAATGCAAGTAGGACC  
 CTCTACAGCTCCTCCCCAAGGGTGCTGTCCAACAATTCTGATGCCAATC  
 TGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACAAACAACAAGATTT  
 CTAGGCTCCTGGACTCCCTGCCTTCTGACACAAGACTGGTTCTGCTGAA  
 TGCTATCTACCTGTCTGCAAAGTGGAAGACCACCTTTGACCCCAAAA  
 GACAAGGATGGAGCCCTTCCATTTTAAGAATTCAGTGATCAAGGTGCC  
 CATGATGAACAGCAAGAAGTACCCTGTTGCCCACTTCATTGACCAAAC  
 ACTGAAGGCCAAAGTGGGCCAGCTCCAGCTTTCCACAACCTCAGCCT  
 GGTGATTCTGGTCCCCCAGAACTTGAAGCACCGGCTGGAGGACATGGA  
 GCAAGCACTGAGCCCCAGTGTCTTCAAGGCAATCATGGAAAACTGGA  
 GATGTCCAAATTCCAGCCCCTCTGTTGACCTTGCCCAGAATCAAAGTC  
 ACCACCAGCCAAGATATGCTGAGTATCATGGAGAAGCTTGAGTTCTTT  
 GATTTCTCCTATGATCTGAACCTGTGTGGCCTGACAGAAGACCCTGACC  
 TCCAAGTCAGTGCCATGCAGCACCAGACAGTGTGGAGCTGACTGAGA  
 CTGGTGTGGAGGCAGCAGCCGCCTCAGCCATCTCTGTGGCCAGAACC  
 TGCTGGTGTGGAGGTGCAGCAGCCTTTCCTGTTTGTCTGTGGGACCA  
 GCAACACAAGTTCCAGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGACCCAAGGGC  
 CTGA

(SEQ ID NO: 8)

**HA12**

[0113]

ATGGCAAGCAGACTGACCTTGCTGACACTGCTCCTTCTCCTGCTGGCTG  
 GAGACCGGGCCAGCAGCAACCCCAATGCCACTTCTTCCCTCCAGTCAAG  
 ACCCAGAGTCCCTGCAAGACAGAGGAGAAGGCAAGGTTGCTACCACTG  
 TGATCTCCAAGATGCTGTTTCGTGGAGCCCATCCTGGAAGTGTCCAGCCT  
 GCCCACCCTAACTCCACCACAAACAGTGCCACCAAAATCACAGCCAA  
 CACTACAGATGAGCCAACCACCAACCAACCACAGAACCACAAACACA  
 GCCTACCATCCAGCCTACTCAGCCCACCACCAGCTTCCCTACAGACTCC  
 CCCACCCAGCCAACAACCTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTGACTCTGT  
 GCTCTGACCTGGAGAGCCACAGCACCGAGGCTGTGCTGGGAGATGCTC  
 TGGTGGACTTCTCCCTGAAACTGTACCACGCCTTTTCAGCCATGAAGAA  
 AGTAGAGACCAACATGGCCTTCAGCCCCTTTAGCATTGCCTCCCTCCTC  
 ACTCAAGTTCTGCTGGGGGCTGGGGAGAACACAAAGACCAACCTGGAA  
 AGCATCCTCTCCTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCACTCA  
 AGGGCTTCACAACCAAGGGGGTGACCAGTGTCTCCCAGATCTTCCATTC  
 CCCAGACCTGGCCATCAGAGACACATTTGTGAATGCATCCAGAACCCT  
 CTACAGCTCCTCTCCAAGGGTGCTGTCCAACAACCTCAGATGCCAATCTT  
 GAGCTGATCAACACCTGGGTGGCCAAAATACCAATAACAAGATCTCA  
 AGGCTGCTGGACAGCCTCCCCAGTGACACCAGACTTGTGCTCCTGAAT  
 GCTATCTACCTGTCTGCAAAGTGGAAGACTACCTTTGATCCCAAAAAG  
 ACAAGGATGGAGCCTTTCCACTTCAAGAACTCTGTCATCAAAGTGCCC  
 ATGATGAACAGCAAGAAGTACCCTGTTGCCCACTTTATTGATCAGACCC  
 TGAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTCCAGCTGTCCCACAACCTTTCTCTGGT  
 GATTTCTGGTCCCCCAGAACCTGAAGCACAGATTGGAAGACATGGAGCA  
 AGCCCTGAGCCCTTCAGTGTTTAAGGCAATCATGGAGAAGCTGGAGAT  
 GTCCAAATTCCAGCCCCTCTCCTCACCCCTGCCTAGGATCAAGGTCACC  
 ACCAGCCAAGATATGCTCTCTATCATGGAAAAGTTGGAGTTCTTTGACT  
 TTTCTATGATCTGAACCTCTGTGGCCTGACTGAGGACCCTGACCTCCA

AGTGTGTCAGCAATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAGCTCACAGAGACTGG  
 GGTGGAAGCCGCAGCAGCCTCTGCCATCTCTGTGGCTAGGACCCTTCTG  
 GTCTTTGAGGTGCAGCAGCCCTTCCTGTTTGTCTGTGGGACCAGCAAC  
 ACAAGTTCCAGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGACCCCAGAGCCTGA  
 (SEQ ID NO: 9)

**HA13**

ATGGCATCTAGGCTGACCTTGCTCACTCTGCTGCTTCTCCTCCTGGCTG  
 GAGACCGGGCCTCCAGCAACCCCAATGCTACCTCCTCCAGTTCCCAAG  
 ATCCAGAGTCCCTGCAAGACAGAGGAGAAGGCAAGGTGGCAACCACT  
 GTCATCAGCAAGATGCTGTTTGTGGAACCCATCCTGGAAGTGTCCAGCC  
 TCCCCACAACCAACTCCACCACAAATTCAGCCACCAAGATCACTGCCA  
 ACACAACCTGATGAGCCCACCACCCAACCAACCAACAGAGCCAACTACC  
 AGCCCACCATCCAGCCCCTCAGCCTACCACCCAGCTTCTACTGACAG  
 CCCAACACAGCCAACCACTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTGACCCTG  
 TGCTCTGACTTGGAAGCCACAGCACTGAAGCTGTGCTGGGAGATGCT  
 CTGGTGGACTTTTCCCTCAAGCTGTACCACGCCTTCTCTGCAATGAAGA  
 AGGTTGAGACCAACATGGCCTTTTCTCCCTTCAGCATTGCCAGCCTGCT  
 GACTCAAGTGCTGCTGGGGGCTGGGGAGAACACCAAAAACAACCTGG  
 AGAGCATCCTCTCCTACCCCAAAGATTTACCTGTGTGCACCAAGCCCT  
 GAAAGGCTTCACAACAAAGGGGGTACCTCTGTCTCCAGATCTTCCAT  
 TCCCCTGACCTGGCCATCAGAGACACCTTCGTGAATGCCAGCAGAACC  
 CTCTACAGCAGCTCCCCAAGGGTGCTCTCCAACAATTCTGATGCCAATC  
 TGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAAACACTAACAACAAGATTT  
 CCAGACTCCTGGACTCCCTGCCAGTGACACAAGGTTGGTCCTCCTGAA  
 TGCAATCTACCTGTCTGCTAAGTGAAGACCACCTTTGATCCCAAGAAA  
 ACCAGAATGGAACCATTCCACTTTAAGAACTCAGTGATCAAGGTCCCC  
 ATGATGAACAGCAAAAAGTACCCTGTTGCCACTTCATTGATCAGACC  
 CTGAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTCCAGCTGTCCCACAACCTCTCTCTG  
 GTCATTCTGGTGCCCCAGAACTTGAAGCACCGGCTGGAAGATATGGAG  
 CAAGCACTGAGCCCCTCTGTGTTCAAGGCAATTATGGAGAAGCTTGAG  
 ATGTCCAAGTTCCAGCCTACACTGCTCACCTGCCTAGGATCAAAGTGA  
 CTACCAGCCAAGACATGCTCTCAATCATGGAGAACTGGAGTTCTTTG  
 ACTTCTCCTATGATCTGAACCTGTGTGGCCTGACTGAGGACCCAGACCT  
 CCAAGTCAGTGCCATGCAGCACCAGACAGTGTTGGAGCTGACAGAAAC  
 TGGGGTGGAGGCAGCAGCCGCCTCTGCCATCAGTGTGGCTAGGACCCT  
 GTTGGTGTGTTGAGGTGCAGCAGCCCTTTCTTTTGTCTGTGGGACCAG  
 CAACACAAGTTTCTGTCTTCATGGGCAGAGTGTATGACCCCAGAGCCT  
 GA  
 (SEQ ID NO: 10)

**HA14**

ATGGCCAGCAGACTCACCTCCTCACTCTGCTCCTGCTTCTGCTGGCTG  
 GGGACCGGGCCTCTAGCAACCCCAATGCCACCAGCTCCTCCAGCCAAG  
 ATCCAGAATCTCTGCAAGACAGAGGAGAAGGCAAGGTTGCCACTACTG  
 TGATCAGCAAGATGCTCTTTGTGGAGCCCATCCTGGAAGTGAGCAGCC  
 TCCCCACTACCAACAGCACCCTAATCAGCTACCAAGATCACAGCCA  
 ATACCACAGATGAACCCACCACACAGCCTACAACAGAACCTACCCTC  
 AACCCACCATCCAGCCTACTCAGCCCACCACCAGCTGCCACAGACT  
 CCCAACCCAGCCAACAACCTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTCACACT  
 CTGCAGTGACTTGGAGAGCCACAGCACTGAGGCTGTGCTGGGAGATGC  
 CCTGGTGGACTTTTCCCTCAAGCTCTACCACGCCTTCTCAGCAATGAAG

[0114]

AAAGTAGAGACCAACATGGCATTCTCTCCTTTCAGCATTGCCTCCCTGC  
 TGACCCAAGTCCTCCTGGGGGCTGGAGAGAACTAAAACCAATCTTG  
 AGTCCATCCTCTCCTACCCAAGGACTTCACCTGTGTCCACCAAGCACT  
 GAAAGGCTTCACAACCAAGGAGTGACCTCTGTGTCCCAGATCTTCCA  
 TTCCCCTGATCTGGCCATCAGAGACACCTTCGTGAATGCTTCCAGAACC  
 TTGTACAGCTCTAGCCCAAGGGTGTGTCCAACAATTCTGATGCTAATC  
 TGGAGCTGATCAACACCTGGGTGGCCAAAAACACAAACAACAAGATTT  
 CTAGGCTCCTGGACAGCCTGCCTTCTGACACAAGGCTGGTTCTGCTGAA  
 TGCAATCTACCTGTCTGCAAAGTGGAAGACCACCTTTGACCCCAAAA  
 GACAAGGATGGAGCCATTCCACTTCAAGAACAGTGTCAAAAGTGCC  
 CATGATGAACTCCAAGAAGTACCCAGTGGCCCATTTCAATTGATCAGAC  
 CCTGAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTCCAGCTTTCCACAACCTCTCACTG  
 GTGATTCTGGTCCCCCAGAACCTGAAGCACCGGCTGGAAGATATGGAG  
 CAAGCCCTCAGCCCCAGTGTGTTAAGGCTATCATGGAGAAGCTGGAG  
 ATGTCCAAATTCCAGCCACTCTCCTGACACTGCCAAGGATCAAGGTCA  
 CCACCTCCAAGACATGCTGTCAATCATGGAAAACTGGAGTTCTTTGA  
 TTTCTCCTATGACCTGAACCTGTGTGGCCTGACTGAGGACCCTGACCTC  
 CAAGTGTCTGCCATGCAGCACCAGACAGTGTGTGGAGCTCACAGAGACT  
 GGGGTGGAAGCCGCTGCTGCCTCAGCCATCTCAGTGGCTAGGACCCTG  
 CTGGTCTTTGAGGTGCAGCAGCCCTTCCTGTTTGTCTGTGGGACCAGC  
 AACACAAGTTCCTGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGATCCCAGAGCCT  
 GA

(SEQ ID NO: 11)

**HA15**

[0115]

ATGGCATCTAGGCTGACACTGCTCACCTTGCTCCTGCTGCTTCTGGCTG  
 GGGACAGAGCTTCCTCCAACCCCAACGCCACCTCCAGCTCTTCCCAAG  
 ACCCTGAGTCTCTGCAAGATAGGGGGGAGGGCAAGGTGGCTACCACAG  
 TCATCAGCAAGATGCTCTTTGTGGAACCCATCCTGGAAGTGAGCAGCCT  
 CCCCCTACCAATAGCACCACCAACAGTGCCACAAAGATCACAGCCAA  
 CACTACAGATGAGCCAACCACTCAGCCACAACAGAGCCTACTACCCA  
 GCCCACCATCCAGCCACACAGCCTACCACCAGCTTCCTACAGACAG  
 CCCCCTCAACCCACCACTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTGACCCTC  
 TGCAGTGACTTGGAGAGCCACAGCACTGAGGCTGTGCTGGGAGATGCT  
 CTGGTGGACTTTTCCCTCAAGCTCTACCACGCCTTCTCTGCAATGAAGA  
 AGGTTGAGACCAACATGGCCTTTAGCCCATTCAGCATTGCCTCCTTGCT  
 GACCCAAGTCTGCTGGGGGCTGGAGAGAACACCAAAACAATCTTGA  
 GTCCATCCTCTCCTACCCCAAGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCACTG  
 AAAGGCTTCACAACCAAGGGGGTACTTCTGTGTCCCAGATCTTCCACT  
 CTCCTGACCTGGCCATCAGAGACACCTTTGTCAATGCCAGCAGAACCCT  
 TTACAGCTCCTCCCCAAGAGTCCTCAGCAACAATTCTGATGCCAATCTG  
 GAGCTGATCAACACCTGGGTGGCAAAAAACACAAACAACAAGATTTCC  
 AGACTCCTGGACTCCCTGCCTTCTGACACAAGGCTGGTTCTGCTGAATG  
 CTATCTACCTGTCTGCCAAGTGGAAGACCACATTTGACCCCAAGAAAA  
 CCAGAATGGAGCCCTTCCATTTCAAGAACTCAGTGATCAAGGTCCCAT  
 GATGAACAGCAAAAAGTACCCTGTTGCCCACTTCATTGATCAGACCCT  
 GAAGGCCAAAGTGGGCCAGCTCCAGCTGTCCCACAACCTGAGCCTGGT  
 CATTCTGGTGCCCCAGAACCTGAAGCACAGACTGGAAGATATGGAGCA  
 AGCCCTGAGCCCTTCAGTCTTTAAGGCAATCATGGAGAAGCTGGAGAT  
 GTCCAAGTTCAGCCAACTCTCCTCACTCTGCCCAGAATCAAAGTCACC  
 ACCAGCCAAGACATGCTGAGTATCATGGAAAACTGGAGTTCTTTGAT

TTCTCCTATGACCTGAACCTCTGTGGCCTGACTGAGGACCCAGACCTCC  
 AAGTGTCTGCCATGCAGCACCAGACAGTGTGGAGCTCACAGAACTG  
 GTGTGGAGGCCGCTGCTGCCTCAGCCATCAGTGTGGCCCGCACCCCTGTT  
 GGTGTTTGGAGGTGCAGCAGCCTTTCCTGTTTCGTGCTGTGGGACCAGCAA  
 CACAAGTTTCCAGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGATCCAAGGGCCTGA  
 (SEQ ID NO: 12)

**HA16**

ATGGCCTCTAGGCTCACCTGCTGACACTGCTGCTCCTCCTGCTGGCTG  
 GAGACCGGGCCAGCAGCAACCCCAATGCTACCAGCTCCTCCAGTCAAG  
 ACCCTGAGTCCCTGCAAGACAGAGGAGAAGGCAAGGTTGCCACTACAG  
 TCATCTCCAAGATGCTGTTTGTAGAGCCCATCCTGGAAGTGTCCAGCCT  
 GCCTACCACCAATAGCACCACCAACAGTGCCACCAAGATCACAGCCAA  
 TACCACAGATGAGCCAACCACCCAGCCTACAACAGAGCCTACCACTCA  
 ACCCACCATCCAGCCAACACAGCCTACTACCCAGCTGCCACAGACAG  
 CCCAACTCAGCCCACCACTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTCACACTC  
 TGCAGTGACCTGGAAAGCCACAGCACTGAGGCTGTGCTGGGAGATGCT  
 CTGGTGGACTTTTCTCTGAAACTGTACCACGCCTTCTCTGCAATGAAGA  
 AAGTGGAGACCAACATGGCATTCTCCCCATTCAGCATTGCCTCCTTGCT  
 GACCCAAGTGCTCCTGGGGGCTGGGGAGAACACAAAAACAAACCTGG  
 AGAGCATCCTCTCCTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCCCT  
 CAAGGGCTTCACAACCAAGGAGTGACCTCTGTGAGCCAGATCTTCCA  
 TTCCCCTGACCTGGCCATTAGGGACACCTTCGTGAATGCAAGCCGGACC  
 CTCTACAGCAGCTCTCCAAGAGTCCTGTCCAACAATTCTGATGCCAAC  
 TAGAGCTGATCAACACCTGGGTGGCAAAGAACAATAACAACAAGATTT  
 CCAGACTCCTGGACTCCCTCCCATCTGACACAAGGCTGGTCTCCTGAA  
 TGCCATCTACCTGTCTGCTAAGTGGAAAGACCACATTTGACCCCAAAA  
 GACAAGGATGGAACCCTTCCACTTCAAAAACCTCAGTGATCAAAGTCCC  
 CATGATGAACAGCAAGAAGTACCCTGTGGCCCATTTTCATTGATCAGAC  
 CCTGAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTCCAGCTTTCACACAACCTCAGCCTT  
 GTGATTCTGGTGCCCCAGAACTTGAAGCACAGACTGGAGGACATGGAG  
 CAAGCCCTGAGCCCCAGTGTCTTCAAGGCAATCATGGAGAACTTGAG  
 ATGTCCAAATTCCAGCCCCTCTGCTCACTCTCCCAGAATCAAGGTCA  
 CCACCTCCCAAGATATGCTCTCAATTATGGAGAAGCTGGAGTTCTTTGA  
 TTTTTCCTATGATCTGAACCTGTGTGGCCTGACTGAAGATCCAGACCTC  
 CAAGTCTCTGCCATGCAGCACCAGACAGTGTGGAGCTCACAGAACT  
 GGGGTGGAAGCCGCTGCTGCCTCAGCCATCAGTGTGGCTAGGACCCTG  
 TTGGTGTGTTGAGGTGCAGCAGCCCTTCTCTTTGTGCTGTGGGACCAGC  
 AACACAAGTTCCAGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGACCCAAGGGCCT  
 GA  
 (SEQ ID NO: 13)

**HA17**

ATGGCATCCCGCCTGACCCTCCTCACCTGCTTCTGCTCCTGCTGGCTG  
 GAGATAGGGCCTCCAGCAACCCCAATGCAACCAGCAGCTCCAGCCAAG  
 ACCCTGAGTCCCTGCAAGACAGAGGAGAAGGCAAGGTTGCCACCACTG  
 TGATTTCCAAGATGCTGTTTGTGGAACCCATCCTGGAAGTGAGCAGCCT  
 CCCAACAAACCAACAGCACCACCAATAGTGCCACAAAAATTACAGCCAA  
 TACCACAGATGAGCCTACCACTCAGCCTACAACAGAACCACCAACCCA  
 GCCTACCATCCAGCCGACCCAGCCAACCACACAGCTCCCCACTGACTC  
 CCCACACAGCCCACCACTGGCTCCTTCTGCCCTGGACCTGTGACTCTG  
 TGCTCTGACCTGGAATCTCACTCCACTGAGGCTGTGCTGGGGGATGCTC

[0116]

TGGTGGATTTTTCCCTCAAGCTCTACCATGCCTTCTCTGCCATGAAGAA  
 GGTGGAGACCAACATGGCCTTTTCTCCCTTTTCCATTGCCAGCCTCCTG  
 ACCCAAGTGCTCCTGGGAGCTGGGGAGAACACCAAGACCAACCTTGAG  
 AGCATTCTGTCTACCCCAAGGACTTTACCTGTGTGCACCAAGCCCTGA  
 AAGGCTTCACCACCAAAGGGGTGACCTCTGTCTCCCAGATCTTCCACAG  
 CCCTGATCTGGCCATTAGGGACACCTTTGTCAATGCTTCCAGAACTCTC  
 TATTCTTCCCTCCCCACGGGTCTCTCCAACAATTCAGATGCCAACCTGG  
 AGCTGATCAACACCTGGGTGGCCAAAAACACAAACAACAAGATCTCAA  
 GGCTCCTGGACAGCCTCCCCAGTGACACACGGCTGGTGCTCCTGAATG  
 CCATCTACCTGTCTGCCAAGTGGAAGACCACTTTTGACCCAAAAAAGA  
 CAAGGATGGAGCCCTTCCATTTCAAGAACAGTGTGATCAAGGTCCCA  
 TGATGAATAGCAAGAAATACCCTGTTGCCCACTTCATTGATCAGACCCT  
 GAAGGCCAAAGTGGGCCAGCTGCAGTTGTCCCAACCTCAGCCTGGT  
 CATACTGGTGCCCCAGAACCTGAAGCATAGGCTGGAAGACATGGAACA  
 AGCACTGAGCCCCTCAGTGTTCAAAGCTATCATGGAGAAGCTGGAGAT  
 GTCCAAATTCAGCCCACCCTGTTGACCCTGCCTAGGATCAAAGTCACC  
 ACCTCCCAAGATATGCTCTCAATAATGGAGAAACTGGAGTTCTTTGATT  
 TCTCCTATGATCTCAATCTGTGTGGCCTGACTGAAGATCCAGACCTCCA  
 AGTCTCAGCAATGCAGCACCAGACAGTCTGGAGCTCACAGAGACTGG  
 TGTGGAGGCGGCAGCAGCCTCAGCCATCTCTGTGGCCAGAACCCTGCT  
 GGTGTTTGAGGTGCAGCAGCCCTCCTGTTTGTCTGTGGGACCAGCAG  
 CATAAGTTTCTGTCTTCATGGGTAGGGTGTATGACCCCAAGAGCCTGA  
 (SEQ ID NO: 14)

**HA18**

[0117]

ATGGCCAGCAGACTCACCTGCTGACCCTGCTCCTCCTGCTCCTGGCTG  
 GGGACAGAGCCTCCTCCAACCCCAATGCAACCTCCTCCAGCTCCCAAG  
 ACCCTGAGTCCCTGCAAGATAGGGGAGAAAGGCAAGGTTGCCACTACTG  
 TCATAAGCAAGATGCTGTTTGTGTAACCCATCTTGGAGGTGTCCAGTCT  
 CCCCACCACAAACAGCACCACCAACTCTGCCACCAAGATCACTGCCAA  
 TACCACAGATGAACCCACCACTCAGCCCACAACCTGAGCCCACCACCCA  
 GCCAACCATACAGCCTACACAGCCAACAACCCAGCTGCCCACTGACTC  
 CCAACCCAGCCTACCACTGGCAGCTTCTGCCCTGGTCTGTACCCCTC  
 TGCAGTGACCTGGAAAGCCATAGCACAGAGGCTGTGCTGGGGGATGCT  
 CTGGTGGACTTCTCCCTCAAACCTCTACCATGCTTTTTCTGCAATGAAGA  
 AGGTGGAAACCAACATGGCCTTCAGCCCCTTCTCCATTGCCAGCCTCTT  
 GACCCAAGTGCTCCTGGGAGCTGGAGAGAACTAAGACTAATCTGGA  
 GAGCATCCTCTCCTACCCCAAAGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCCCTG  
 AAGGGCTTCACCACCAAAGGAGTGACCTCTGTCTCCCAGATCTTCCATT  
 CCCCTGACCTGGCCATAAGGGACACCTTTGTGAATGCCTCTAGGACCCT  
 GTACTCCAGCTCTCCTCGGGTCTCAGCAACAACCTCAGATGCCAACCTG  
 GAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAAAATACCAATAACAAGATTTC  
 CGCCTCCTGGATTCCCTGCCCTCTGACACACGCTGGTGCTCCTGAATG  
 CCATCTACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACCACCTTTGATCCCAAGAAAA  
 CCAGAATGGAGCCTTTCCACTTTAAGAATTCAGTCATTAAGGTGCCAT  
 GATGAATTCCAAGAAGTATCCTGTGGCTCACTTCATTGACCAGACCCTC  
 AAGGCCAAGGTAGGTCAGCTCCAGCTGAGCCACAACCTCAGCCTGGTG  
 ATCCTGGTCCCCCAGAACCTGAAACATAGGCTGGAGGACATGGAACAA  
 GCACTGTCCCATCAGTCTTCAAGGCTATCATGGAGAAGCTGGAGATG  
 AGCAAATTCAGCCCACACTGCTGACCTTGCTAGGATCAAGGTACC  
 ACCAGCCAAGATATGCTCTCAATTATGGAGAACTGGAATTCTTTGACT

TTTCCTATGACCTCAATCTGTGTGGCCTGACAGAAGATCCAGATCTCCA  
 AGTCAGTGCCATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAGCTGACTGAAACTGG  
 GGTGGAGGCAGCGGCAGCCTCAGCCATTTCTGTGGCAAGGACCCTGCT  
 GGTGTTTGAAGTGCAGCAGCCCTTTCTCTTTGTCCTGTGGGATCAGCAG  
 CACAAGTTTCCAGTGTTTCATGGGCCGGGTGTATGATCCAAGGGCCTGA  
 (SEQ ID NO: 15)

**HA19**

ATGGCCTCCCGGCTGACCCTTCTACCCTGCTCCTGCTGCTTCTGGCTG  
 GGGACCGGGCCAGCAGCAACCCCAATGCTACCAGCTCTTCATCACAAG  
 ACCCTGAGAGCCTGCAAGACAGAGGAGAAGGCAAGGTTGCCACTACTG  
 TGATCAGCAAGATGCTCTTCGTGGAGCCCATCCTGGAAGTGTCTTCTCT  
 GCCACAACCAACTCCACCACAAATTCTGCCACCAAAATCACAGCCAA  
 TACCACTGATGAACCCACCACTCAACCCACCACAGAGCCAACAACACA  
 GCCAACCATCCAGCCTACCCAGCCTACCACCCAGCTTCTACAGACAG  
 CCCAACTCAGCCCACAACCTGGCTCCTTCTGCCCTGGGCCTGTCACCCTG  
 TGCTCTGACTTGGAAGCCACAGCACCGAGGCTGTGCTGGGAGATGCT  
 CTGGTGGACTTTTCTTTGAAGCTCTACCACGCCTTCAGTGCCATGAAGA  
 AAGTAGAGACCAACATGGCATTTCAGCCCCTTTTCCATTGCTTCCCTGTT  
 GACCCAAGTGCTCCTTGGAGCTGGAGAGAACAATAAAACCAATCTTGA  
 GTCCATCCTCTCCTACCCCAAAGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCACTG  
 AAAGGCTTCACAACCAAGGGGGTGACCTCAGTGTCCCAGATCTTCCAT  
 TCCCAGACCTGGCCATTAGGGACACATTTGTGAATGCAAGCAGAACT  
 CTGTACAGCTCCAGCCCTAGGGTGCTGTCCAACAATTTCAGATGCCAACT  
 TGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAAACACAAAACAACAAGATCT  
 CCAGACTCCTGGACTCCCTCCCCAGTGACACCAGACTGGTTCTGCTGAA  
 TGCCATCTACCTGTCAGCCAAGTGGAAGACCACCTTTGACCCCAAGAA  
 GACAAGGATGGAACCATTCACCTTTAAGAACAGTGTTCATCAAAGTGCC  
 CATGATGAACAGCAAAAAGTACCCTGTGGCCCACTTCATTGATCAGAC  
 CCTCAAGGCAAAGGTGGGCCAGCTGCAGCTCTCCCACAACCTCAGCCT  
 TGTGATTCTGGTCCCCCAGAACCTGAAGCACAGACTGGAGGACATGGA  
 ACAAGCCCTGTCTCCTTCAGTCTTCAAGGCCATCATGGAGAAGCTGGA  
 GATGTCCAAGTTCAGCCCCTCCTCACACTGCCTAGAATCAAGGTC  
 ACTACCTCTCAAGATATGCTGAGCATCATGGAGAAACTGGAGTTCTTTG  
 ATTTCTCCTATGACCTCAACCTGTGTGGCCTGACAGAAGATCCAGATTT  
 GCAAGTTTCTGCAATGCAGCACCAGACAGTGCTAGAGCTGACTGAGAC  
 TGGTGTGGAAGCTGCTGCAGCCTCTGCTATCTCTGTGGCAAGAACCTTG  
 CTGGTGTGTTGAGGTGCAGCAGCCCTTCTGTTTGTCTGTGGGACCAGC  
 AACACAAGTTTCCAGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGATCCCAGAGCCT  
 GA  
 (SEQ ID NO: 16)

**HA20**

ATGGCATCCAGACTCACACTGCTCACTCTGCTGCTTCTGTTGCTGGCTG  
 GAGACCGGGCCTCCAGCAACCCCAACGCCACTTCTTCCTCCAGTCAAG  
 ATCCTGAGAGTCTCCAAGACAGAGGAGAAGGCAAGGTTGCTACCACTG  
 TGATTTCCAAGATGCTCTTTGTGGAGCCCATCTTGGAAGTGAGCTCCCT  
 GCCTACCACCAATTCCACCACAAATTCAGCCACCAAAATCACCGCCAA  
 CACTACAGATGAGCCAACCACCCAGCCCACGACAGAGCCTACAACCTCA  
 GCCACCATCCAGCCTACTCAACCAACAACACAGCTCCCCACAGACAG  
 CCCACCCAGCCAACCTACTGGCTCCTTCTGCCCTGGGCCCGTGACCCTC  
 TGCAGTGACCTTGAGAGCCACAGCACCGAGGCTGTGCTGGGAGATGCT

[0118]



CTGGTGGACTTTTCTCTGAAGCTGTACCATGCTTTCTCTGCAATGAAGA  
 AAGTAGAGACCAACATGGCCTTCAGTCCCTTTTCCATTGCCAGCCTGCT  
 GACCCAAGTGCTCCTGGGCGCTGGGGAGAACACAAAAACCAACCTGGA  
 GTCCATCCTCTCCTACCCCAAGGATTTACCTGTGTGCACCAAGCCCTG  
 AAGGGCTTCACAACCAAGGGGGTACCTCTGTGTCCCAGATCTTCCATT  
 CCCCAGACCTGGCCATCAGAGACACCTTCGTGAATGCTTCCCGCACCT  
 CTACAGCAGCTCTCCTCGAGTGCTATCCAACAATTCTGATGCCAATCTG  
 GAGCTCATCAACACCTGGGTGGCAAAGAATACAAACAACAAGATCAGC  
 CGGCTGCTGGACTCCCTCCCTTCTGACACAAGGCTGGTCCCTCCTGAATG  
 CCATCTACCTGTCTGCCAAGTGGAAGACCACATTTGATCCCAAAAAGA  
 CAAGAATGGAACCATTCCACTTTAAGAACTCCGTGATCAAAGTCCCA  
 TGATGAACAGCAAGAAGTACCCTGTGGCCCACTTCATTGATCAGACCC  
 TGAAAGCCAAAGTGGGCCAGCTGCAGCTTTCCACAACCTGTCCTTGGT  
 CATCCTGGTGCCCCAGAACCTCAAGCACCCGCTGGAAGATATGGAACA  
 AGCACTCAGCCCATCTGTCTTCAAGGCCATTATGGAGAACTGGAGAT  
 GTCCAAATTCCAGCCCACTCTCCTCACCTGCCAGAATCAAGGTGACT  
 ACCAGCCAAGACATGCTGAGCATCATGGAGAAGCTCGAGTTCTTTGAC  
 TTCTCCTATGACCTCAACTTGTGTGGCCTGACTGAGGACCCTGATCTGC  
 AAGTCAGTGCCATGCAGCACCAGACAGTGTTGGAGCTGACAGAACTG  
 GTGTGGAAGCTGCTGCAGCCTCTGCTATCTCAGTGGCTCGGACCTTGCT  
 TGTGTTTGGAGTGCAGCAACCCTCCTGTTTGTCTGTGGGACCAGCAG  
 CATAAGTTTCCAGTGTTTCATGGGCCGGGTGTATGATCCAAGAGCCTGA  
 (SEQ ID NO: 17)

**3XCRM8**

[0119]

GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGA  
 GGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACCGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATT  
 AACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCA  
 CCGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCG  
 GAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCAC  
 (SEQ ID NO: 18)

**MVM 内含子**

CTAAGGTAAGTTGGCGCCGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATT  
 AATGTTTAATTACCTTTTTTACAGGCCTG  
 (SEQ ID NO: 19)

**SERPING1 外显子 1-内含子 1-部分外显子 2**

CTGATTTACAGGAACTCACACCAGCGATCAATCTTCCTTAATTTGTAAC  
 TGGGCAGTGTCCCGGGCCAGCCAATAGCTAAGACTGCCCCCCCGCAC  
 CCCACCCTCCCTGACCCTGGGGGACTCTCTACTCAGTCTGCACTGGAGC  
 TGCCTGGTGACCAGAAGTTTGGAGTAGGTTTGGTGCTGGGCAGGGGTG  
 GGGAGTAGGGTGGAAAGCATGGAGTGAAGAGGTCTAGGGAGGGGGTC  
 TCCTCACCCCCGCTTCCCTGCCCGCCTTGATCTCGGGGGTCTCTATAGG  
 CTTGCTTCCACCTGGGACTTCTGCCTCCTCCTACCCCAGCCCCTCCCGCC  
 TCAGGCCTGTTGTGCTCAGCCCCCAGGACCTCCCCTCCCCACGCCTC  
 TGGCCTCATTGTTTGGTTAAAGCAGGACCCCCTCCCCCTCCCACCACCT  
 CCCCTCCGACTGAACAGATGGACAGAGACCCGGGCCACGGGGAGAG  
 GAAGGGCCAGCCGGTGCCGGGAAAGGGAAGCGGTTTGGGGAAAACAA  
 AACAGAGGGAGGAGCCAGGGAGAAGGTGGCCCCAGGAGGGAGGAGG  
 AGGGAATTCGCTAAGAGGGACTGGGGCCTGAGACGGAATGGGGGCGG  
 GCCCCGGGCGGGGTGGGGGCCCTGGGCTCCCAGGGTGGGAGCTGGCT  
 CCGAGGCTGGCTGGCTCCGCAGGTCCGCTGACGTCGCCGCCAG

[0120]

(SEQ ID NO: 20)
<b><u>BGHpA</u></b>
CCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT CTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACT CCCACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGA GTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG GGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAA
(SEQ ID NO: 21)
<b><u>WPRE WT</u></b>
AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG TATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAA ATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAA CGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGG GCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTC CCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGA CAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGA AGCTGACGTCCTTTCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGAC CTTCTTCCC GCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCG CCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCCGCT G
(SEQ ID NO: 22)
<b><u>WPRE3</u></b>
AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG TATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAA ATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCC CGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTG TT
(SEQ ID NO: 23)
<b><u>WPREmut6delATG</u></b>
GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTC TTAACTTTGTTGCTCCTTTTACGCTTTGTGGATACGCTGCTTTATTGCCT TTGTATCTTGCTATTGCTTCCCGTTTGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTAT AAATCCTGGTTGCTGTCTTTTTGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGC AACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTG GGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCGGGACTTTCGCTTTCCCC CTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCT GGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGG GAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGAT TCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCG GACCTTCTTCCC GCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTC TTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCC GCATCGGACTAG
(SEQ ID NO: 24)
<b><u>CRE4</u></b>
GAGTTAATGTGTAATGAGACGGGGAGAAAACAGGAGAGCCCAGAATG ACCTGGATGCTGATCACTGAACATACCCTACCCCCAGTAAAACAAATT CAGAAAACAGCTTCCGCCCGTCCCCTCCCAATGGAGGGCTCTGGCAGG



SEREPING1 的密码子优化: 序列同一性				
	HA04	HA03	HA06	HA05
[0124] HA01	97	83	90	93
HA04		84	92	96
HA03			91	87
HA06				95

[0125] 使用编码C1-INH的rAAV载体治疗疾病

[0126] 本文描述了治疗与C1-INH缺乏相关的疾病的方法。因此,在一些实施方案中,本文所述的rAAV载体适用于治疗患有C1-INH缺乏的受试者,如患有HAE的患者。所述治疗方法包括向有需要的受试者施用本文所述的重组腺相关病毒(rAAV)载体。

[0127] 本文所述的rAAV载体可用于治疗与C1-INH缺乏或紊乱相关的任何疾病。

[0128] 在一些实施方案中,rAAV载体在施用于有需要的受试者后保持游离型。在一些实施方案中,rAAV载体在施用于有需要的受试者后不保持游离型。例如,在一些实施方案中,rAAV载体整合到受试者的基因组中。例如,可通过使用各种基因编辑技术来实现这种整合,所述技术例如锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALENS)、ARCUS基因组编辑和/或CRISPR-Cas系统。

[0129] 在一些实施方案中,包含本文所述的rAAV载体的药物组合物用于治疗有需要的受试者。本发明的含有rAAV载体或颗粒的药物组合物含有药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。合适的药物载体的实例是本领域中熟知的,并且包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液如油/水乳液、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。药物组合物可呈冻干形式。此类载体可通过常规方法配制并且以治疗有效量施用于受试者。

[0130] rAAV载体通过合适的途径施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,rAAV载体通过静脉内、腹膜内、皮下或皮内途径施用。在一个实施方案中,rAAV载体是静脉内施用。在实施方案中,皮内施用包括通过使用“基因枪”或生物射弹颗粒递送系统施用。在一些实施方案中,rAAV载体通过非病毒脂质纳米颗粒施用。例如,包含rAAV载体的组合物可包含一种或多种稀释剂、缓冲剂、脂质体、脂质、脂质复合物。在一些实施方案中,rAAV载体包含在微球或纳米颗粒,如脂质纳米颗粒或无机纳米颗粒中。

[0131] 在一些实施方案中,在施用rAAV载体后约1至6周时,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在约1周时在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在约2周时在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在约3周时在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在约4周时在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在约5周时在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在约6周时在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后约1至6周时,在受试者的肝细胞中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后大于7周,在受试者的肝细胞中可检测到功能性C1-INH。

[0132] 在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6

个月、12个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年或10年,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。因此,在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少3个月,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少6个月,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少12个月,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少2年,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少3年,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少4年,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少5年,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少6年,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少7年,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少8年,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少9年,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后至少10年,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后在受试者的余生中,在受试者的血浆中可检测到功能性C1-INH。

[0133] 在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使得活性C1-INH的产生程度与施用静脉内递送的纯化C1-INH蛋白后发现的程度相同。在一些实施方案中,与施用静脉内递送的纯化C1-INH蛋白相比,所施用的包含SERPING1的rAAV使得产生更大量的活性C1-INH。

[0134] 在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使得受试者中的C1-INH增加。在一些实施方案中,在受试者的血浆中检测到C1-INH的增加。在一些实施方案中,在受试者的肝脏组织中检测到C1-INH的增加。在一些实施方案中,可在一种或多种组织/器官中检测到C1-INH的增加,所述组织/器官包括胆囊、脾脏、卵巢、膀胱、脂肪、胎盘、肺、前列腺、心脏、淋巴结和子宫内膜。在一些实施方案中,与施用包含SERPING1的rAAV之前受试者的基线C1-INH水平相比,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%或约10%。因此,在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约95%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约90%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约85%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约80%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约75%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约70%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约65%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约60%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约55%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约50%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约45%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约40%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约35%。在一些实施方案中,所施用的包含

SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约30%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约25%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约20%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约15%。在一些实施方案中,所施用的包含SERPING1的rAAV使受试者中的C1-INH增加约10%。

[0135] 在一些实施方案中,与施用包含SERPING1的rAAV之前受试者中可检测到的功能性C1-INH的量相比,在向受试者施用AAV载体后在循环中可检测到的功能性C1-INH的水平高介于约2与20倍之间。

[0136] 在一些实施方案中,在向受试者施用AAV载体后,可检测到的活性C1-INH的水平达到或超过人治疗水平。在一些实施方案中,在施用rAAV载体后活性C1-INH的水平约为人治疗水平的2与35倍之间。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约2倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约3倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约4倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约5倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约6倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约6倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约7倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约8倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约9倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约10倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约15倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约20倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约25倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约30倍。在一些实施方案中,在施用后活性C1-INH的水平是人治疗水平的约35倍。

[0137] 在一些实施方案中,rAAV.SERPING1载体作为每个受试者的单剂量递送。在一些实施方案中,向受试者递送最小有效剂量(MED)。如本文所用,MED是指实现C1-INH活性、从而使受试者中的C1-INH水平增加所需的rAAV SERPING1载体剂量。

[0138] 载体效价是基于载体制剂的DNA含量确定的。在一些实施方案中,定量PCR或优化的定量PCR用于确定rAAV SERPING1载体制剂的DNA含量。在一个实施方案中,剂量是约 $1 \times 10^{11}$ 个载体基因组(vg)/kg体重至约 $2 \times 10^{13}$  vg/kg,包括端点。

[0139] 在一些实施方案中,剂量是至少 $5 \times 10^9$ vg/kg或更高。

[0140] 在一些实施方案中,可将rAAV SERPING1载体组合物配制成剂量单位以含有在约 $1.0 \times 10^9$ vg至约 $1.0 \times 10^{15}$ vg范围内的量的复制缺陷型病毒。如本文所用,术语“剂量”可指在治疗过程中递送至受试者的总剂量,或在单次(或多次)施用中递送的量。

[0141] 在一些实施方案中,剂量足以使患者中的血浆C1-INH水平增加25%或更多。在一些实施方案中,rAAV SERPING1与用于治疗HAE的一种或多种疗法组合施用。

[0142] 实施例

[0143] 本发明的其他特征、目的和优点在以下实施例中是显而易知的。然而,应了解,所述实施例虽然指示本发明的实施方案,但是仅通过说明给出,而不具有限制性。本发明范围内的各种变化和修改将根据实施例对本领域技术人员变得显而易见。

## [0144] 实施例1.载体设计

[0145] 此实施例中提供了产生包含人C1-酯酶抑制剂 (C1-INH) 的编码序列的rAAV表达构建体 (rAAV载体) 及其变化的示例性方法和设计。在本研究中, hSERPING1用作人C1-INH (hC1-INH) 的编码序列, 并且重组AAV载体 (rAAV8) 用作载体。rAAV载体的基本设计包括侧接反向末端重复序列 (ITR): 5' -ITR和3' -ITR的表达盒。这些ITR通过载体生产细胞中的AAV复制蛋白Rep和相关因子介导载体基因组的复制和包装。通常, 表达盒含有启动子、编码序列、polyA尾和/或标签, 如图1A所示。使用标准分子生物学技术设计并制备了编码人hC1-INH的表达构建体hSERPING1。在启动子hTTR (人甲状腺素运载蛋白启动子) 的下游插入hSERPING1的编码序列。此外, 在所述启动子的上游插入肝脏特异性顺式作用调控模块 (CRM), 并且在所述启动子的下游插入内含子序列。如以下实施例所示, 测试了这种调控和启动子组合的高转导水平。然后将所述表达构建体连接至AAV载体并通过测序进行测试。载体被包装在病毒颗粒中并储存。

[0146] 在另一个实施方案中, 在编码区的下游插入WPRE序列。这种元件产生增加mRNA稳定性的三级结构。本文所述的表达构建体的示意性图示在图1B中示出。

[0147] 可执行上述方案的任何数量的变化。

## [0148] 密码子优化的构建体

[0149] 此外, SERPING1的编码序列基于多个参数如密码子适应指数 (CAI)、CpG位点计数、GC含量和重复碱基序列进行了密码子优化。优选高CAI以利用更频繁使用的密码子并潜在增加来自载体的转基因产物表达水平。减少可引发免疫应答的CpG岛序列。还去除了重复碱基。可执行上述方案的任何数量的变化。例如, 可使用多于一个启动子。此外, 可考虑调控区、启动子、内含子和外显子的不同组合。

[0150] 表4: 具有不同密码子优化的SERPING1编码序列和相关元件的不同表达构建体的实施例。

表达构建体	编码序列	增强子	内含子	启动子元件	其他元件
<b>M 构建体</b> (两个序列)	野生型 SERPING1 编 码序列 (HA01)		SERPING 1 特异性 内含子或 MVM 内 含子	hTTR	
<b>J 构建体</b> (四个不同的序 列)	密码子优化的 SERPING1 (HA03、HA04、 HA05 和 HA06)		MVM 内 含子	hTTR	
<b>S 构建体</b> (六个不同的序 列)	密码子优化的 SERPING1 (HA06)	WPRE、 WPRE3 或 WPREmut6 delATG	MVM 内 含子, 或 外显子 1- 内含子 1- 部分外显 子 2	hTTR	

[0151]

	<b>N 构建体</b> (五个不同的序列)	密码子优化的 SERPING1 (HA06)		MVM 内 含子	hTTR、 hTTR mod.、 mTTR pro、 mTTR 增强 子、CAG 启 动子或 CMV/CBA 启动子	
[0152]	<b>U 构建体</b> (十个不同的序列)	优化的 SERPING1 序 列(HA11、 HA12、 HA13、...HA 20)	WPREmut6 delATG	MVM 内 含子	hTTR	
	<b>P 构建体</b> (六个不同的序列)	密码子优化的 SERPING1 (HA06)	WPREmut6 delATG	MVM 内 含子	hTTR	CRE4, 或 /和 CRE6,

[0153] 为治疗人血管性水肿而设计的不同表达构建体 (HAE 构建体) 列于表 4 中, 并且已在图 2A-7B 中进行了描绘。M 构建体总体上在图 2A 中示出, 并且两种 M 结构-M01 和 M01A 在图 2B 中示出。M01 和 M01A 构建体两者均包含 HA01 序列, 所述序列是人 SERPING1 野生型序列 (对照构建体)。HA01 包含 24 个 CpG 和 53, 4% GC 含量。M01 包含内含子-SERPING1 外显子 1-内含子 1-部分外显子 2 (717bp), 而 M01A 包含 MVM (77bp) 内含子。

[0154] J 构建体总体上在图 3A 中示出, 并且四种 J 构建体-J01、J02、J03 和 J04 在图 3B 中示出。J 构建体是密码子优化的 SERPING1 序列。J01 包含 HA03 SERPING1 序列; J02 包含 HA06 SERPING1 序列; J03 包含 HA05 SERPING1 序列; 并且 J04 包含 HA04 SERPING1 序列。

[0155] S 构建体总体上在图 4A 中示出, 并且九种 S 构建体-S01、S02、S03、S04、S05、S06、S07、S08 和 S09 在图 4B 中示出。S 构建体包含 HA06 SERPING1 序列、内含子 (MVM 内含子或外显子 1-内含子 1-部分外显子 2) 和 WPRE (WPRE3 或 WPREmut6delATG)。

[0156] N 构建体总体上在图 5A 中示出, 并且九种 N 构建体-Napture01、Napture02、Napture03、Napture04、Napture05、Napture06、Napture07、Napture08 和 Napture09 在图 5B 中示出。N 构建体包含 HA06 SERPING1 序列和新型启动子元件如 hTTR、hTTR mod.、mTTR pro、mTTR 增强子、CAG 启动子或 CMV/CBA 启动子。

[0157] U 构建体总体上在图 6A 中示出, 并且十种 U 构建体-U01、U02、U03、U04、U05、U06、U07、U08、U09 和 U10 在图 6B 中示出。U 构建体包含密码子优化的序列和 WPREmut6delATG。

[0158] P 构建体总体上在图 7A 中示出, 并且六种 P 构建体-P01、P02、P03、P04、P05 和 P06 在图 7B 中示出。P 构建体包含 HA06 SERPING1 序列 WPREmut6delATG 和经修饰的主链元件 CRE4 和/或 CRE6。

[0159] 实施例 2. AAV8. SERPING1 载体介导的体外糖基化和功能性 hC1-INH 表达

[0160] 此实施例说明 AAV8. SERPING1 载体在体外 hC1-INH 表达方面的效力。



[0161] 将HepG2细胞(肝细胞)用表达hC1-INH的rAAV载体(AAV8.SERPING1)或对照载体(作为阴性对照)转染,并且在72小时后收集上清液。rAAV载体构建体描绘于图1A中。血浆来源的hC1-INH样品用作阳性对照。使用标准蛋白质印迹分析在免疫印迹上评估细胞上清液中的hC1-INH表达。如图8A所示,在从rAAV载体处理的细胞获得的上清液中检测到hC1-INH。来自此实施例的结果显示来自rAAV载体的hC1-INH的表达。

[0162] 通过使用ELISA测量上清液中存在的hC1-INH的量来确定HepG2细胞中hC1-INH的表达水平。如图8B所示,与对照细胞相比,rAAV转染的细胞表达显著大量的hC1-INH。来自此实施例的结果表明,rAAV转染的细胞表达功能性hC1-INH。

[0163] 实施例3. 剂量依赖性AAV8.hSERPING1载体介导的体内hC1-INH表达

[0164] 此实施例说明rAAV(即AAV8.hSERPING1)载体在体内hC1-INH剂量依赖性表达方面的效力。

[0165] 为了证明体内表达,将编码hC1-INH的AAV8.hSERPING1载体(在图2B中描绘为M01)静脉内注射到小鼠(C57/b1/6)体内。评估了三种不同剂量( $1 \times 10^{11}$  vg/kg、 $4 \times 10^{11}$  vg/kg和 $4 \times 10^{12}$  vg/kg)的载体。每只小鼠接受单剂量。在注射后14天收集血浆样品。

[0166] 通过监测血浆中hC1-INH的水平来确定rAAV的功效。血浆中hC1-INH的水平以正常小鼠中存在的hC1-INH水平的百分比表示。结果描绘于图9A中。施用了rAAV载体的小鼠显示出以剂量依赖性方式表达hC1-INH。接受 $4 \times 10^{12}$  vg/kg剂量的rAAV载体的小鼠组表达的hC1-INH的水平与临床目标水平(即220 $\mu$ g/mL)相当。

[0167] 此外,还通过将载体静脉内注射到小鼠体内来确定rAAV的转导和转录效率。小鼠(C57/b1/6)接受三种剂量( $1 \times 10^{11}$  vg/kg、 $4 \times 10^{11}$  vg/kg和 $4 \times 10^{12}$  vg/kg)中的一者的rAAV,并且第四组小鼠仅接受媒介物。rAAV载体构建体在图2B中描绘为M01。注射后28天,处死动物,并且收获它们的肝脏。将rAAV的转导和转录效率与仅接受媒介物的组进行比较。结果呈现在图9B中,并且表明在所有三个剂量下都存在显著hSERPING1转导和转录。事实上,当hSERPING1 DNA以hSERPING1 DNA拷贝/细胞表示时,观察到剂量依赖性增强的转导。如所预期,仅接受媒介物的小鼠中不存在hSERPING1的转导和转录。

[0168] 来自此实施例的结果表明rAAV.AAV8.hSERPING1载体在体内以剂量依赖性方式表达C1-INH。此结果还揭示野生型小鼠中存在生理性人C1-INH水平。

[0169] 密码子优化的影响和密码子优化的构建体的筛选

[0170] 实施例4. 具有密码子优化的hSERPING1序列的rAAV8载体的体内功效

[0171] 此实施例说明一些密码子优化的rAAV8.C1-INH构建体在血浆中表达C1-INH方面的体内功效。

[0172] 为了测试hSERPING1序列的密码子优化对rAAV8载体的体内功效的影响,制备了四种密码子优化的构建体。密码子优化的构建体是-J01、J02、J03和J04。将小鼠(C57b1/6)注射包含M01A(野生型C1-INH)或密码子优化的C1-INH序列的rAAV载体。所有五种构建体描绘于图10B中。小鼠接受了 $4 \times 10^{11}$ vg/kg或 $2 \times 10^{12}$ vg/kg的载体,并在施用rAAV之前和注射后第7天、第14天和第28天收集血浆样品。仅使用J04评估剂量反应。在这项研究中,仅使用了雄性小鼠。血浆中hC1-INH的水平以正常小鼠中存在的hC1-INH水平的百分比表示。结果描绘于图10A和表5中。

[0173] 施用了对照载体(野生型)以及密码子优化的构建体的小鼠表达hC1-INH。不同的

构建体显示出密码子优化对其表达hC1-INH的能力的适度影响。

[0174] 表5. 与包含野生型SERPING1的载体相比, 包含密码子优化的SERPING1序列的rAAV对hC1-INH的表达

组	条件	处理	载体剂量	在第14天与野生型相比的倍数表达
A	对照载体	M01A	$4 \times 10^{11}$ vg/kg	1
B	测试	J01	$4 \times 10^{11}$ vg/kg	1.1
C	测试	J02	$4 \times 10^{11}$ vg/kg	1.5
D	测试	J03	$4 \times 10^{11}$ vg/kg	1.5
E	测试	J04	$4 \times 10^{11}$ vg/kg	1.2

[0176] 如图10A所示, 密码子优化的构建体J04在整个研究过程中(即在第7天、第14天和第28天)以剂量依赖性方式表达hC1-INH。

[0177] 来自此实施例的结果表明, 相对于野生型(对照载体), 密码子优化适度提高了构建体的功效。密码子优化的构建体还以剂量依赖性方式表达hC1-INH。基于此研究, J02被选择用于后续一生中研究。

[0178] WPRE的影响

[0179] 实施例5. 包含密码子优化的hSERPING1序列和WPRE的rAAV8载体的体内功效

[0180] 此实施例说明包含密码子优化的AAV8.C1-INH-co2序列与三种不同WPRE的组的载体在血浆中表达C1-INH方面的体内功效。

[0181] 将小鼠注射包含不同密码子优化的构建体的rAAV载体: (1) J02(无WPRE元件); (2) S07(含有WPRE3); 和S04(含有WPREmut6delATG)。包含WPRE的rAAV载体描绘于图1B中, 并且不同的密码子优化的构建体和相关元件列于表4中。小鼠接受了 $4 \times 10^{11}$ vg/kg的载体, 并在施用rAAV之前和注射后第7天、第14天和第28天收集血浆样品。血浆中hC1-INH的水平以正常小鼠中存在的hC1-INH水平的百分比表示。结果描绘于图11中。

[0182] 与不含WPRE的密码子优化的构建体相比, 施用了包含WPRE的构建体的小鼠表达高约2.5倍的hC1-INH。

[0183] 来自此实施例的结果表明, WPRE的并入提高了密码子优化的构建体的功效。

[0184] WPRE和内含子的影响

[0185] 实施例6. 包含HA06(hSERPING1)序列、WPRE和内含子的rAAV8载体的体内功效

[0186] 此实施例说明包含HA06(hSERPING1)序列、WPRE和内含子的rAAV8载体对于在血浆中表达hC1-INH的体内功效。

[0187] 为了测试WPRE和内含子对包含HA06序列的rAAV8载体的体内功效的影响, 使用了不同WPRE和内含子的组合。此研究中使用的内含子是MVM内含子或外显子1-内含子1-部分外显子2, 而所使用的WPRE是WPRE3或WPREmut6delATG。此研究中使用的包含WPRE、内含子和密码子优化的hSERPING1序列的不同组合的重组AAV载体描绘于图12B中。小鼠(C57b1/6; 雄性)接受了 $4 \times 10^{11}$ vg/kg或 $2 \times 10^{12}$ vg/kg的载体, 并在施用rAAV之前和注射后第7天、第14天和

第28天收集血浆样品。血浆中hC1-INH的水平以正常小鼠中存在的hC1-INH水平的百分比表示。结果描绘于图12A中。

[0188] 与接受相同剂量的其他构建体的其余动物相比,施用了包含MVM内含子、HA06 (SERPING1) 序列和WPRES (例如,S07) 的构建体的小鼠表达更多的hC1-INH。接受了 $2 \times 10^{12}$ vg/kg的J04的小鼠表现出最高的hC1-INH表达。

[0189] 来自此实施例的结果表明,MVM内含子和WPRES的并入提高了HA06 (SERPING1) 序列的功效。

[0190] WPRES和替代启动子元件在低和高载体剂量下的影响

[0191] 实施例7. 包含HA06 (hSERPING1) 序列、WPRES和替代启动子的rAAV8载体的体内功效。

[0192] 此实施例说明包含HA06 (hSERPING1) 序列、WPRES和新颖启动子的构建体在血浆中的体内功效。

[0193] 为了测试WPRES和其他新颖启动子对rAAV8载体的体内功效的影响,使用了具有不同新颖启动子元件的不同构建体。测试了七种不同的构建体-J02、J04、S04、N01、N02、N03和C22。此测试中包括的C22是对照载体。所有七种构建体描绘于图13B中。小鼠 (C57b1/6; 雄性) 接受了三种剂量 ( $4 \times 10^{11}$ vg/kg、 $1.2 \times 10^{13}$ vg/kg和 $2 \times 10^{12}$ vg/kg) 中的一者的载体,并在施用rAAV之前和注射后第7天、第14天和第28天收集血浆样品。血浆中hC1-INH的水平以正常小鼠中存在的hC1-INH水平的百分比表示。结果描绘于图13A中。

[0194] 与接受相同剂量的其他构建体的其余动物相比,施用了包含HA06 (SERPING1) 序列和WPRESmut6delATG (例如,S04) 的构建体的小鼠表达更多的hC1-INH。接受了 $1.2 \times 10^{13}$ vg/kg的J04的小鼠表现出最高的hC1-INH表达。来自此实施例的结果表明,WPRESmut6delATG的并入提高了HA06 (SERPING1) 序列的功效。

[0195] 在另一个实施例中,小鼠 (C57b1/6; 雄性) 接受了两种剂量 ( $2 \times 10^{12}$ vg/kg和 $2 \times 10^{13}$ vg/kg) 的S04,并在第14天和第28天收集血浆。另一组小鼠接受了缓冲液以充当对照。结果描绘于图13C中。

[0196] 来自此实施例的结果表明S04在两个时间点均以剂量依赖性方式表达hC1-INH。

[0197] 密码子优化的影响

[0198] 实施例8. 包含含有密码子优化的hSERPING1序列的构建体的rAAV8载体的体内功效

[0199] 此实施例说明包含含有密码子优化的hSERPING1序列的构建体的rAAV8载体在血浆中的体内功效。

[0200] 制备了十种不同的密码子优化的构建体-U01、U02、U03、U04、U05、U06、U07、U08、U09和U10。所有十种构建体描绘于图14B中。与S04一起测试了所有密码子优化的构建体的体内功效。构建体S04描绘于图4B中。小鼠 (C57b1/6; 雄性) 接受了 $2 \times 10^{12}$ vg/kg的载体,并在施用rAAV之前和注射后第28天收集血浆样品。血浆中hC1-INH的水平以正常小鼠中存在的hC1-INH水平的百分比表示。结果描绘于图14A中。

[0201] 施用了U06的小鼠表达的hC1-INH与接受相同剂量的S04的组相当。

[0202] 在长期研究中在中等剂量下WPRES和替代启动子元件的影响

[0203] 实施例9. 包含含有HA06 (hSERPING1) 序列、WPRES和替代启动子的构建体的rAAV8载

体的体内功效

[0204] 此实施例说明包含含有HA06 (hSERPING1) 序列、WPRE和新颖启动子元件的构建体的rAAV8载体在血浆中的体内功效。

[0205] 为了测试WPRE和新颖启动子对rAAV8载体的体内功效的影响,使用了有或没有WPRE和新颖启动子元件的不同构建体。测试了七种不同的构建体-J02、S03、S04、S06、S07、N04和N05。所有七种构建体描绘于图15B中。小鼠 (C57b1/6; 雄性) 接受了 $2 \times 10^{12}$  vg/kg的中等剂量,并且在施用rAAV之前和注射后第7天、第14天、第28天、第49天、第70天、第91天、第112天、第133天、第152天和第175天收集血浆样品。血浆中hC1-INH的水平以正常小鼠中存在的hC1-INH水平的百分比表示。结果描绘于图15A中。

[0206] 与接受了没有MVM的构建体 (例如, S06) 的组相比,施用了包含MVM内含子的构建体 (例如, S07) 的小鼠表达更多的hC1-INH。此外,与接受了包含经修饰的WPRE、WPREmut6delATG的构建体 (例如, S03和S04) 的组相比,接受了包含较短WPRE,即WPRE3的构建体 (例如, S06和S07) 的组表达更多的hC1-INH。

[0207] 来自此实施例的结果表明, MVM内含子和WPRE的较短形式WPRE3的并入提高了HA06 (SERPING1) 序列的功效。包含MVM内含子和WPRE3两者的构建体S07表现出在175天内表达hC1-INH的最高功效。

[0208] 等效物和范围

[0209] 本领域的技术人员仅仅使用常规实验将认识到或者能够确定本文所述的发明的具体实施方案的许多等效方案。本发明的范围不旨在限于以上说明书,而是如在以下权利要求书中所阐述的。



图1A

针对肝脏表达的盒设计



图1B

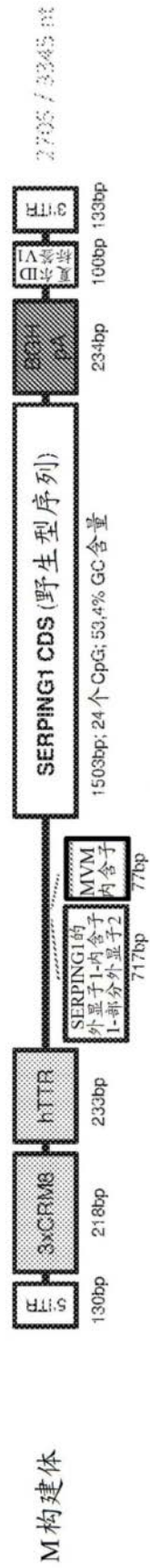


图2A

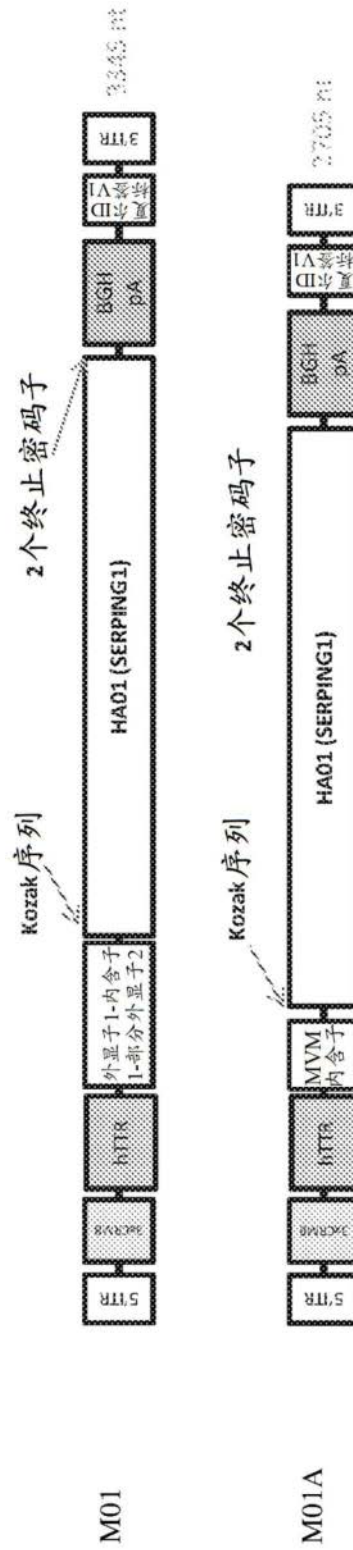
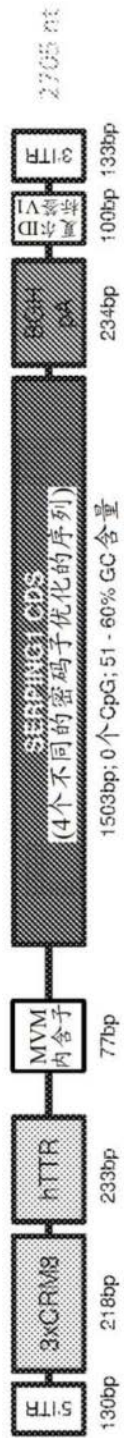


图2B





J 构建体

图3A

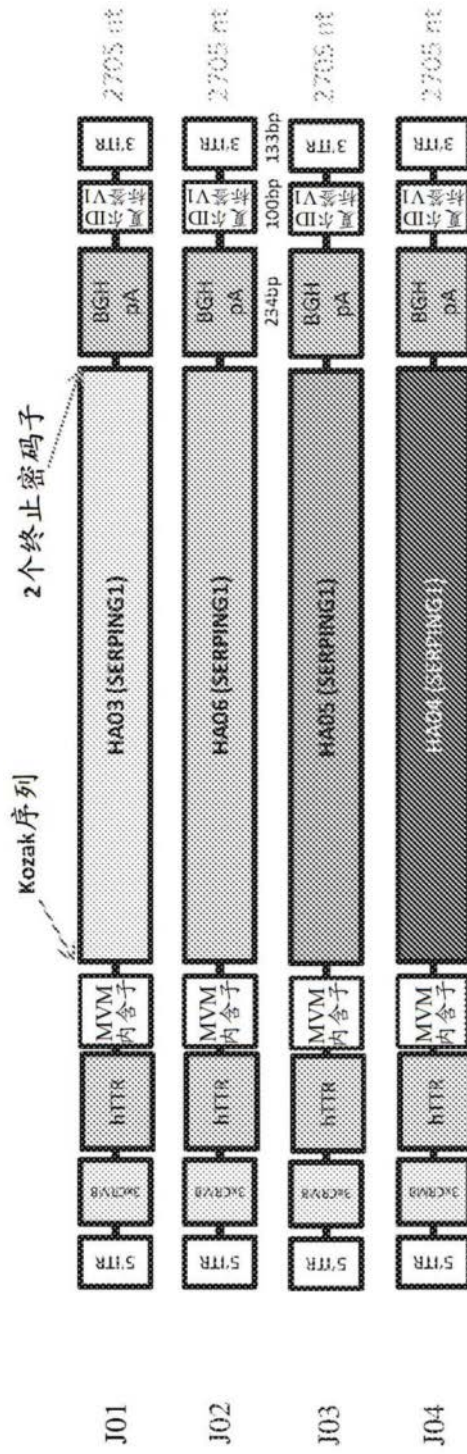
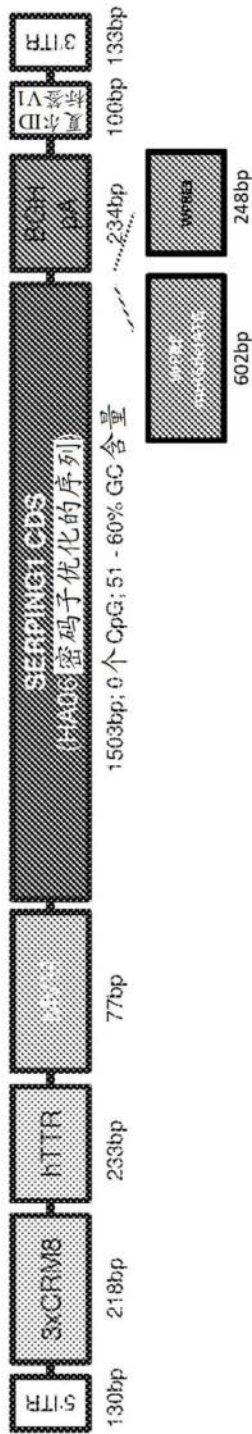


图3B



S 构建体

图4A

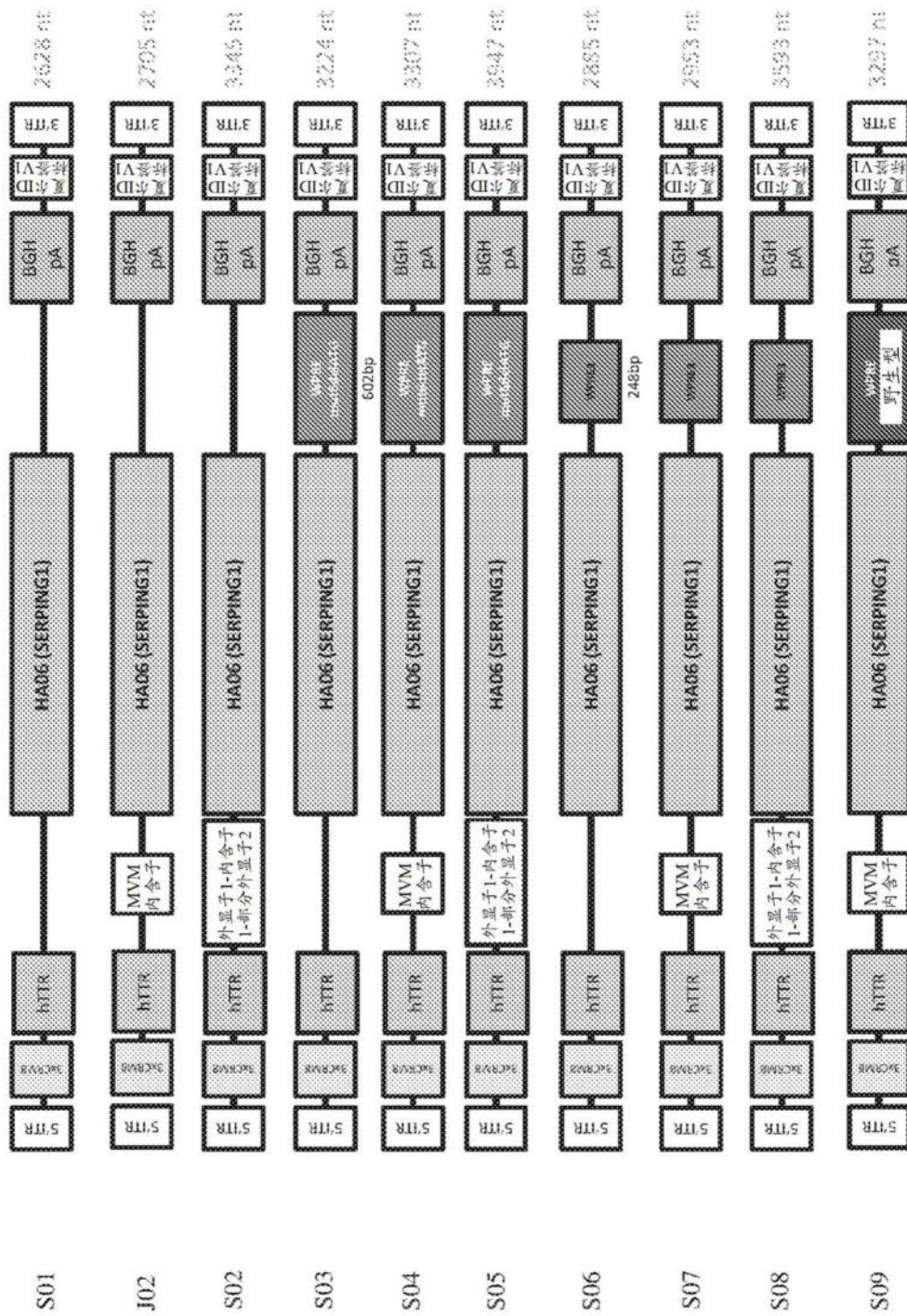


图4B



N 构建体

图5A

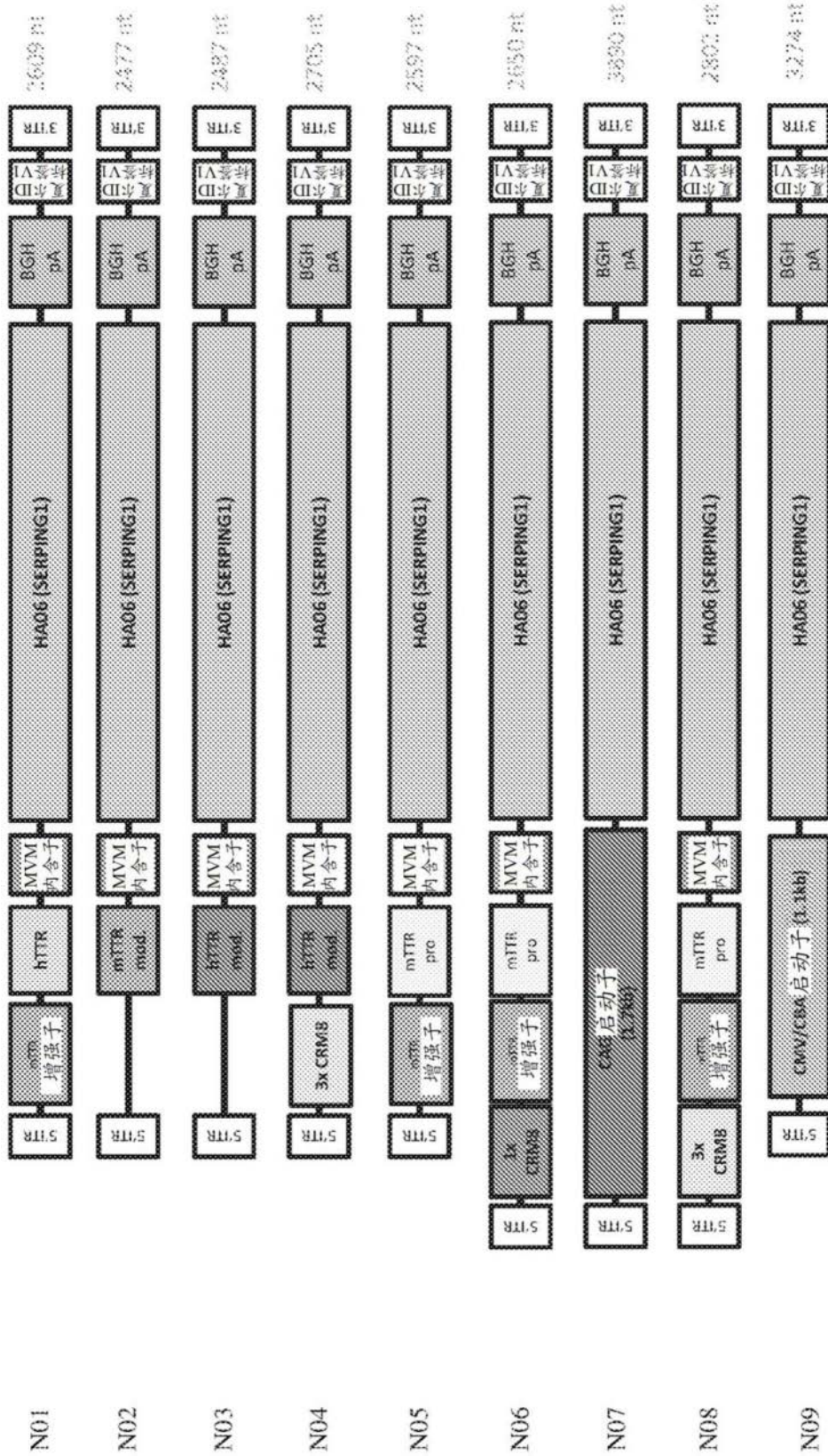


图5B



U 构建体

图6A

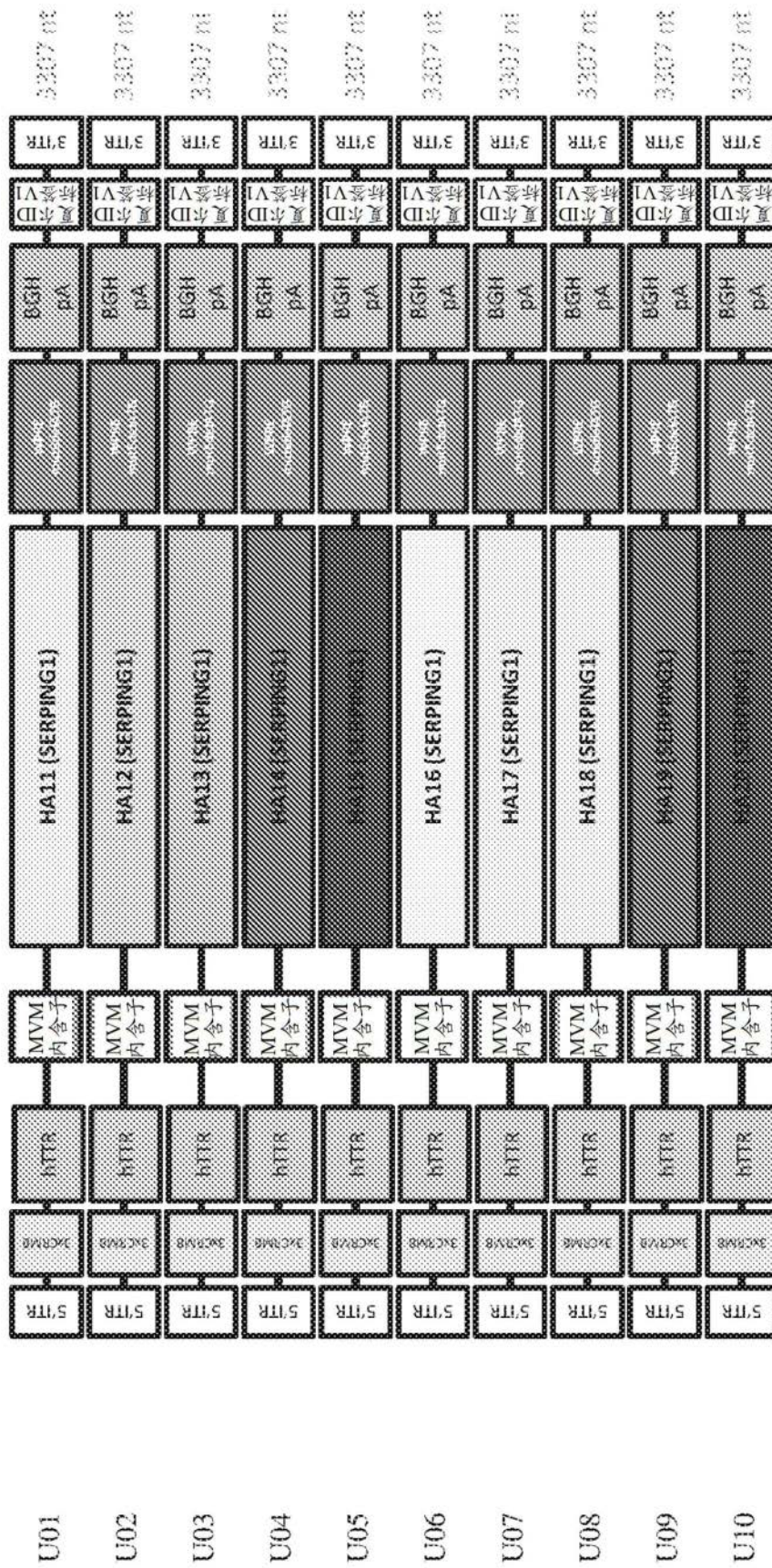


图6B





P 构建体

图7A

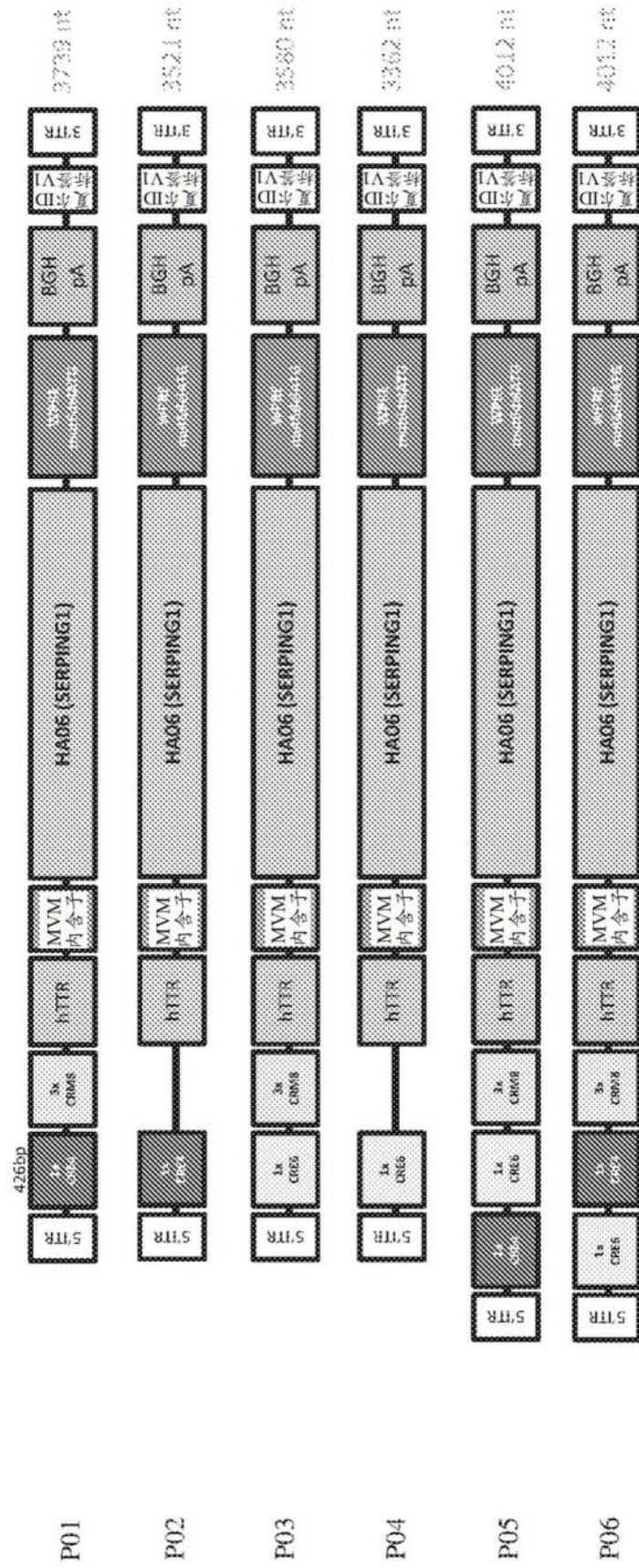


图7B

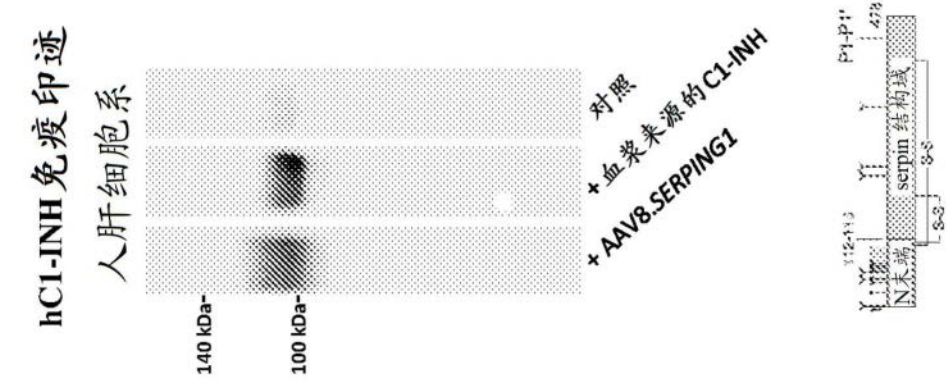


图8A

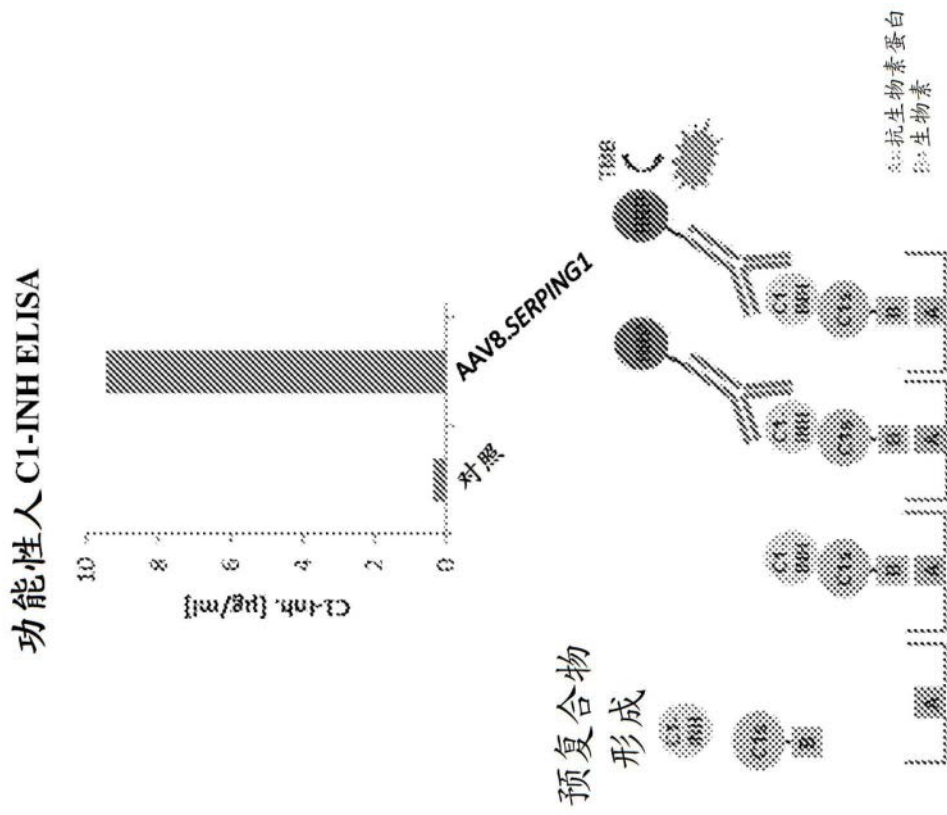


图8B

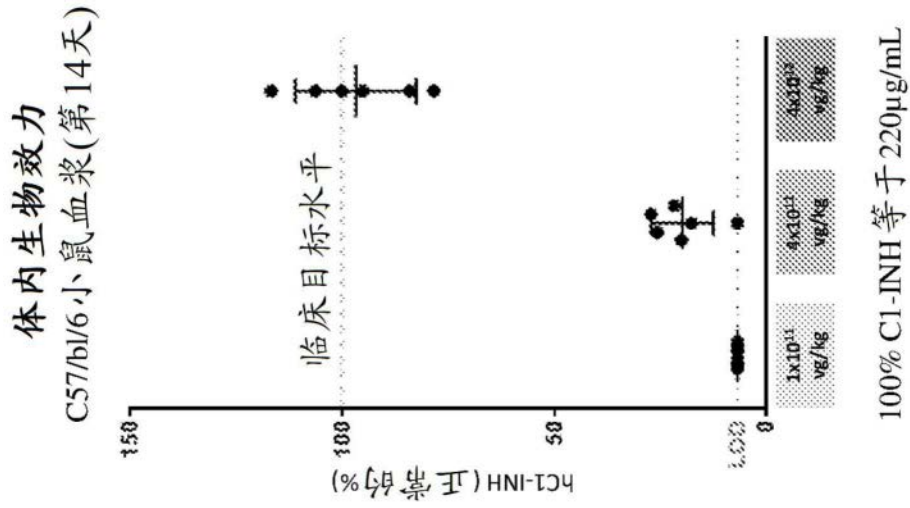


图9A

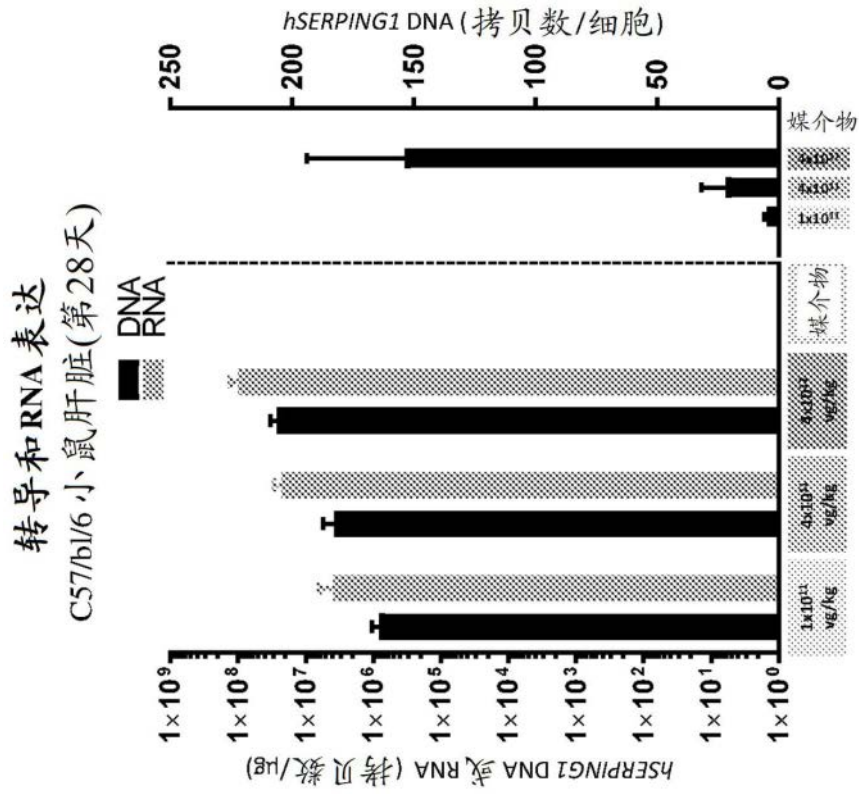


图9B

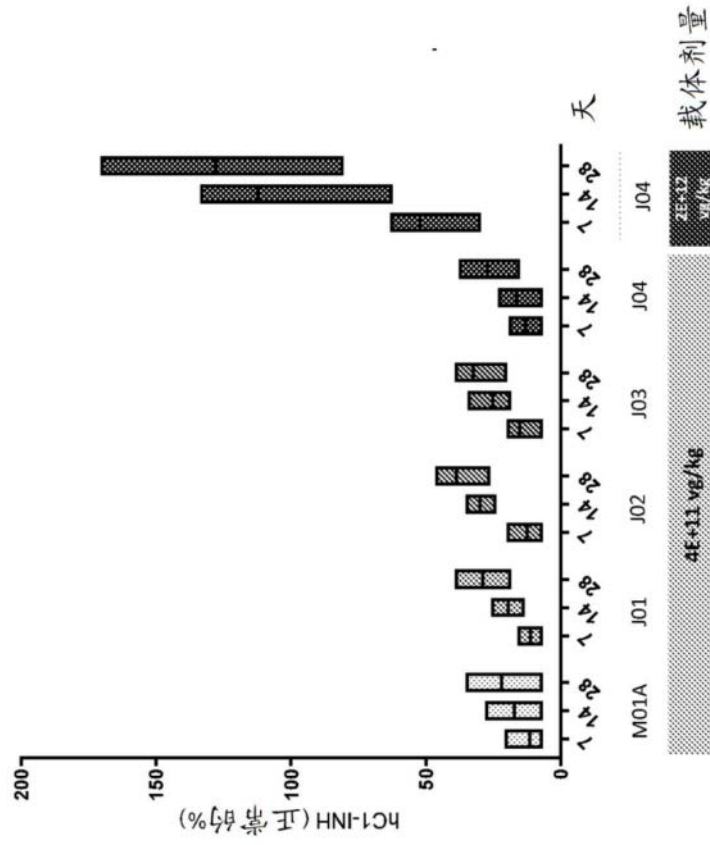


图10A

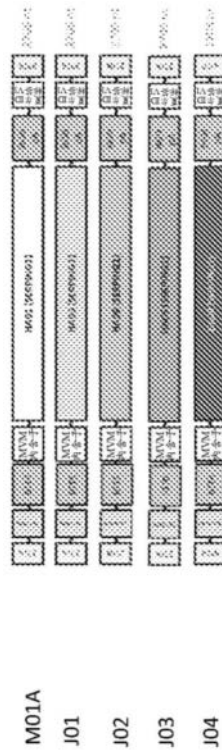


图10B

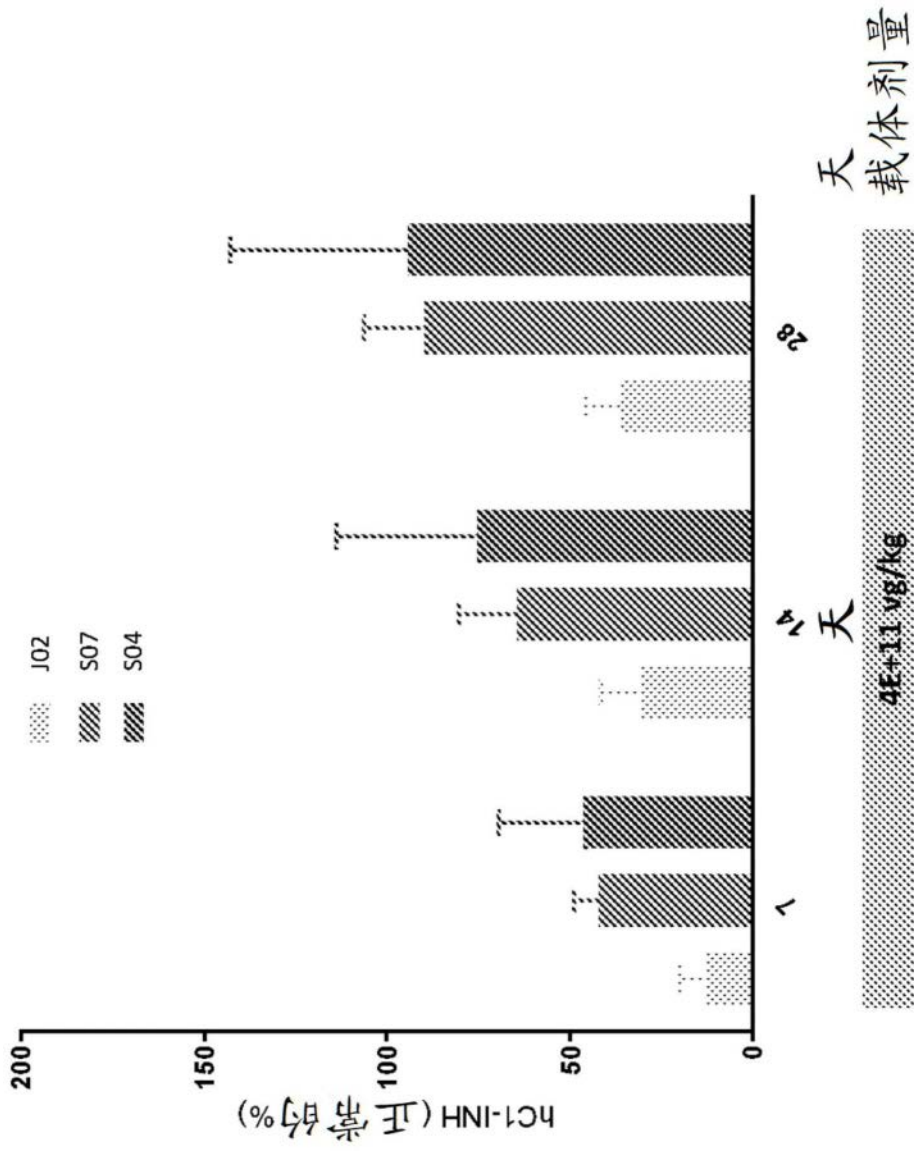


图11

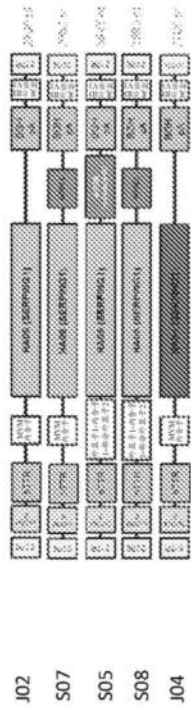


图 12B

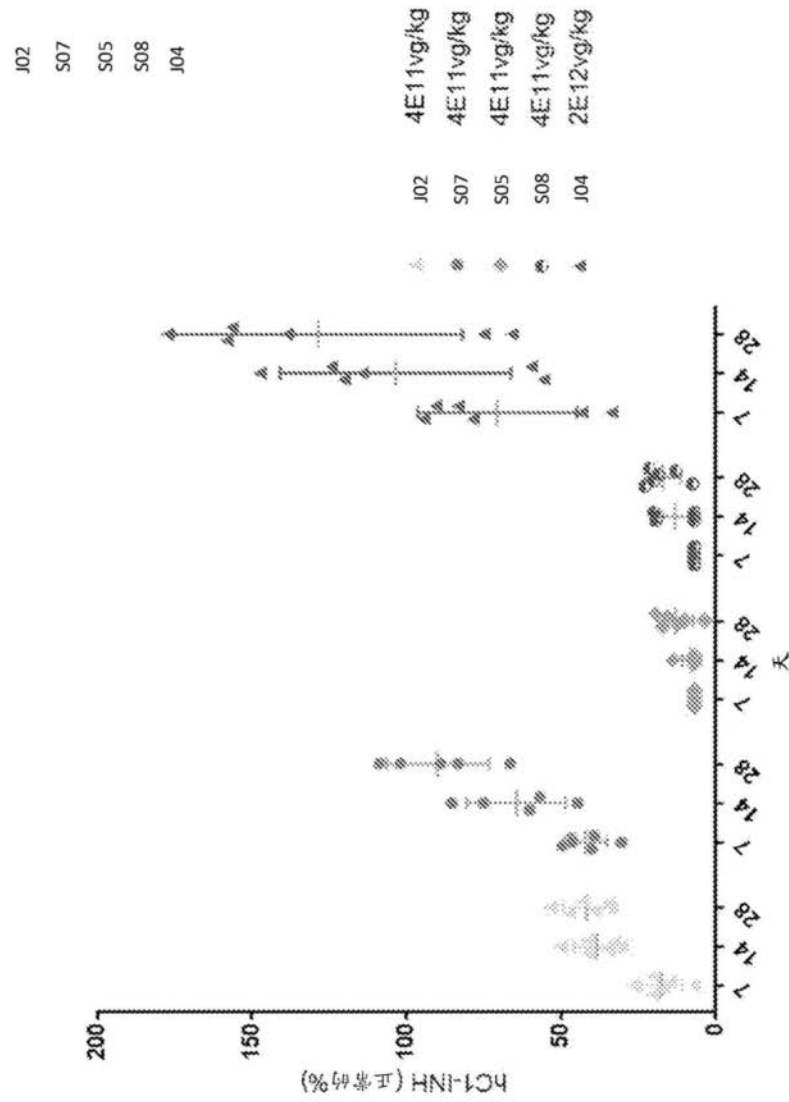


图 12A



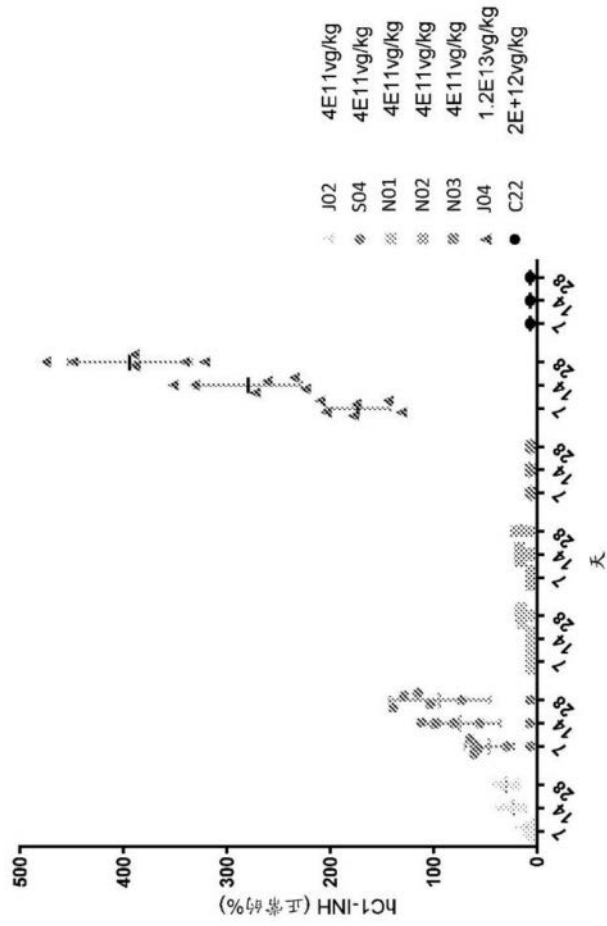


图13A

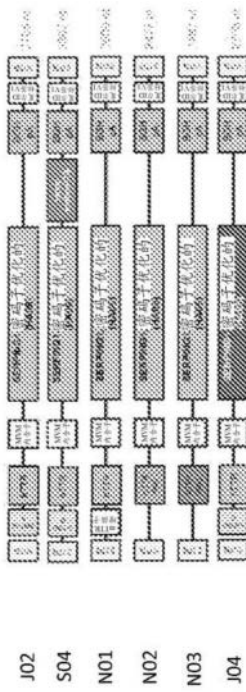


图13B

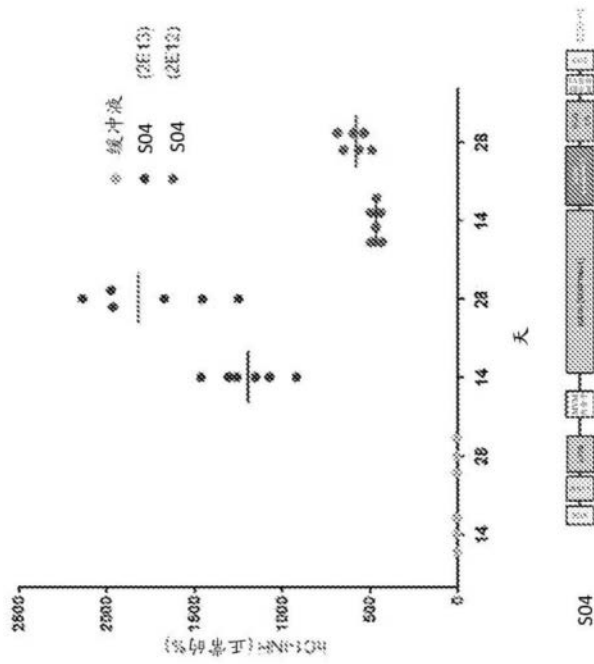


图13C

U01	U02	U03	U04	U05	U06	U07	U08	U09	U10
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
34	34	34	34	34	34	34	34	34	34
35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
39	39	39	39	39	39	39	39	39	39
40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
42	42	42	42	42	42	42	42	42	42
43	43	43	43	43	43	43	43	43	43
44	44	44	44	44	44	44	44	44	44
45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
46	46	46	46	46	46	46	46	46	46
47	47	47	47	47	47	47	47	47	47
48	48	48	48	48	48	48	48	48	48
49	49	49	49	49	49	49	49	49	49
50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
52	52	52	52	52	52	52	52	52	52
53	53	53	53	53	53	53	53	53	53
54	54	54	54	54	54	54	54	54	54
55	55	55	55	55	55	55	55	55	55
56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
58	58	58	58	58	58	58	58	58	58
59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
61	61	61	61	61	61	61	61	61	61
62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
63	63	63	63	63	63	63	63	63	63
64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
66	66	66	66	66	66	66	66	66	66
67	67	67	67	67	67	67	67	67	67
68	68	68	68	68	68	68	68	68	68
69	69	69	69	69	69	69	69	69	69
70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
71	71	71	71	71	71	71	71	71	71
72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
73	73	73	73	73	73	73	73	73	73
74	74	74	74	74	74	74	74	74	74
75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
76	76	76	76	76	76	76	76	76	76
77	77	77	77	77	77	77	77	77	77
78	78	78	78	78	78	78	78	78	78
79	79	79	79	79	79	79	79	79	79
80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
81	81	81	81	81	81	81	81	81	81
82	82	82	82	82	82	82	82	82	82
83	83	83	83	83	83	83	83	83	83
84	84	84	84	84	84	84	84	84	84
85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
86	86	86	86	86	86	86	86	86	86
87	87	87	87	87	87	87	87	87	87
88	88	88	88	88	88	88	88	88	88
89	89	89	89	89	89	89	89	89	89
90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
91	91	91	91	91	91	91	91	91	91
92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
93	93	93	93	93	93	93	93	93	93
94	94	94	94	94	94	94	94	94	94
95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
97	97	97	97	97	97	97	97	97	97
98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

图 14B

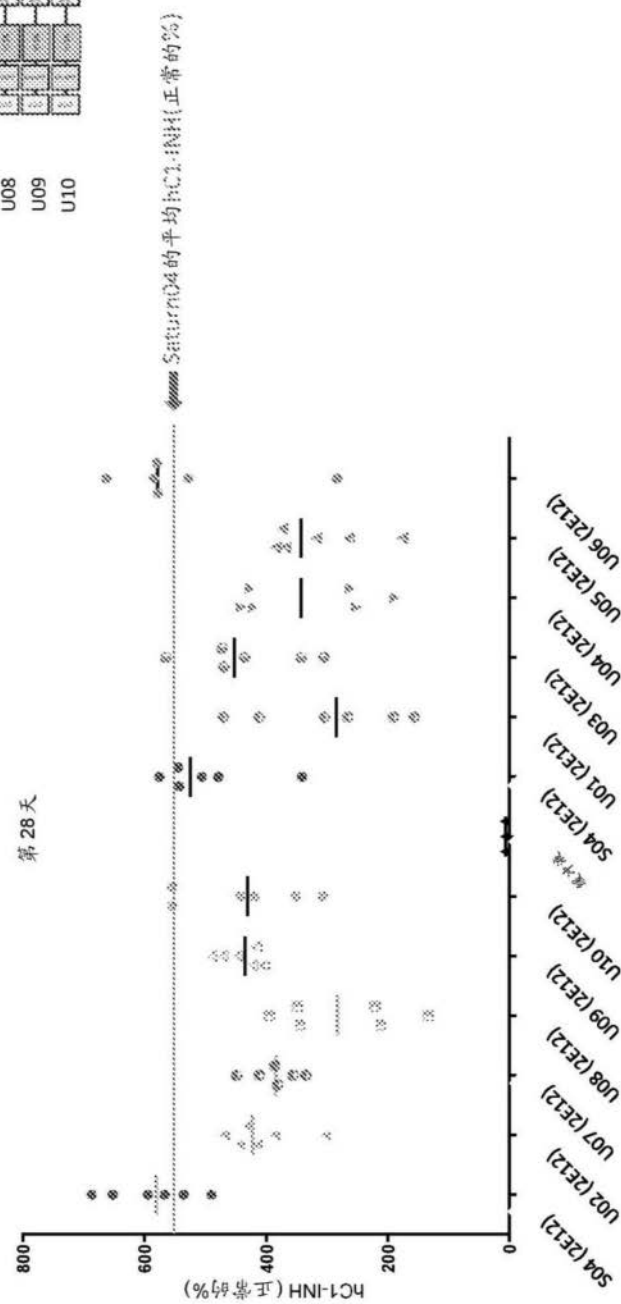


图 14A

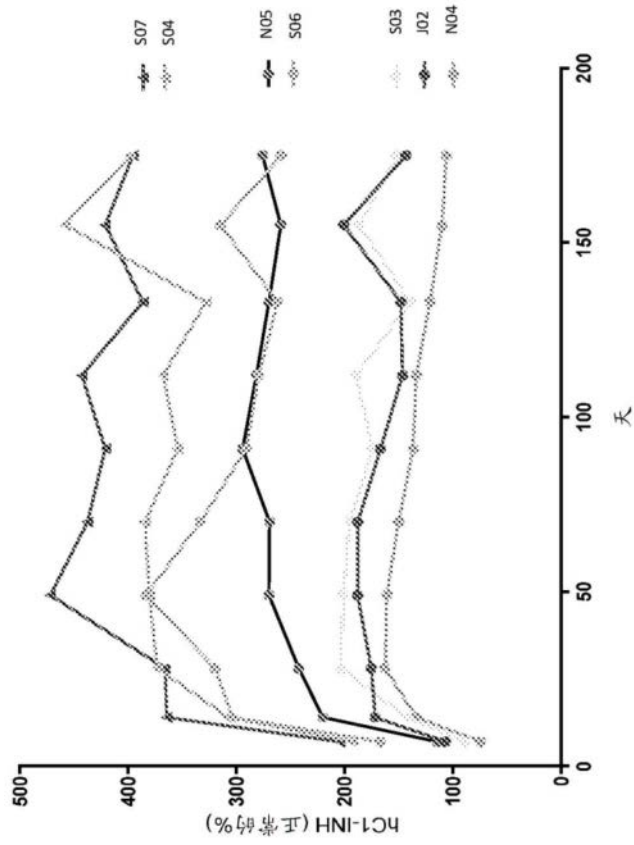


图15A

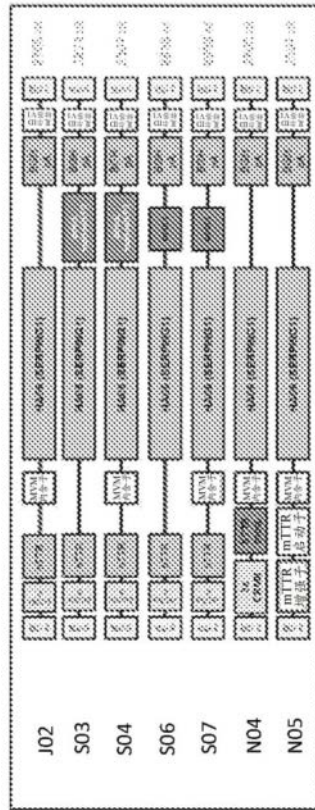


图15B