



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114231532 A

(43) 申请公布日 2022.03.25

(21) 申请号 202210162371.4

A61P 21/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.02.22

(71) 申请人 广州派真生物技术有限公司

地址 510000 广东省广州市广州高新技术产业开发区科学城揽月路3号广州国际企业孵化器G区3楼

(72) 发明人 李华鹏 陈君霖 钟育健 卜晔

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436

代理人 程淼 刘海

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页
序列表3页 附图3页

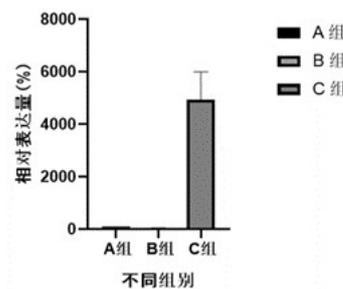
(54) 发明名称

在哺乳动物肌肉中特异性启动基因的启动子序列及其应用

(57) 摘要

本文提供了能够在肌肉组织中特异性表达的嵌合启动子,其包括:肌肉特异性转录因子识别结合位点;肌肉特异性顺式调节模块;以及肌肉特异性启动子。本文还提供了包括该嵌合启动子的表达盒、表达载体、病毒颗粒,以及它们的治疗应用。

qPCR测定不同组肌肉组织luciferase表达效率



1. 肌肉特异性嵌合启动子,包括:

- 1) 第一转录调控元件,所述第一转录调控元件为肌肉特异性转录因子识别结合位点;
- 2) 第二转录调控元件,所述第二转录调控元件为肌肉特异性顺式调节模块;以及
- 3) 第三转录调控元件,所述第三转录调控元件为肌肉特异性启动子。

2. 如权利要求1所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述肌肉特异性嵌合启动子中所述第一转录调控元件的数量为两个或两个以上。

3. 如权利要求2所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中两个或两个以上所述第一转录调控元件串联连接或被所述第二转录调控元件和/或所述第三转录调控元件隔开。

4. 如权利要求2所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述第一转录调控元件的数量为两个,分别位于所述第二转录调控元件或所述第三转录调控元件两侧。

5. 如权利要求1或2所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中还包括第四转录调控元件,所述第四转录调控元件为内含子序列。

6. 如权利要求5所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述第四转录调控元件为SV40内含子序列。

7. 如权利要求1或2所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述肌肉特异性转录因子为Myod蛋白家族的成员。

8. 如权利要求7所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述肌肉特异性转录因子为Myod1转录因子。

9. 如权利要求1或2所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述第一转录调控元件包括SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO: 1有至少90%序列一致性的功能性变体。

10. 如权利要求1或2所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述第二转录调控元件包括SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO: 2有至少90%序列一致性功能性变体。

11. 如权利要求1或2所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述第三转录调控元件包括desmin基因启动子或其功能性片段。

12. 如权利要求11所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述第三转录调控元件包括SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO: 3有至少90%序列一致性其功能性变体。

13. 如权利要求5所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述第四转录调控元件包括SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO: 4有至少90%序列一致性功能性变体。

14. 如权利要求5所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述肌肉特异性嵌合启动子从5'到3'端依次包括所述第一转录调控元件、所述第二转录调控元件、所述第一转录调控元件、所述第三转录调控元件和所述第四转录调控元件。

15. 如权利要求1或2所述的肌肉特异性嵌合启动子,其中所述肌肉特异性嵌合启动子包括SEQ ID NO: 5所述的核苷酸序列或与SEQ ID NO: 5有至少90%序列一致性的功能性变体。

16. 基因表达盒,其包括权利要求1-15任一项所述的肌肉特异性嵌合启动子和与其可操作地连接的目的基因。

17. 表达载体,其包括权利要求1-15任一项所述的肌肉特异性嵌合启动子或权利要求16所述的基因表达盒。

18. 如权利要求17所述的表达载体,其为病毒表达载体。

19. 如权利要求17或18所述的表达载体,其为腺相关病毒(AAV)表达载体。

20. 宿主细胞,包括权利要求1-15任一项所述的肌肉特异性嵌合启动子、权利要求16所述的基因表达盒或权利要求17-19任一项所述的表达载体。

21. 药物组合物,包括:

- 1) 权利要求16所述的基因表达盒;
权利要求17-19任一项所述的表达载体;或
权利要求20所述的宿主细胞;以及
- 2) 药学上可接受的载体。

22. 权利要求16所述的基因表达盒、权利要求17-19任一项所述的表达载体、权利要求20所述的宿主细胞或权利要求21所述的药物组合物在制备治疗肌肉相关病症的药物中的用途。

23. 治疗肌肉相关病症的方法,包括以有效量的权利要求16所述的基因表达盒、权利要求17-19任一项所述的表达载体、权利要求20所述的宿主细胞或权利要求21所述的药物组合物向有需要的受试者给药。

在哺乳动物肌肉中特异性启动基因的启动子序列及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及启动子,尤其是能在哺乳动物肌肉组织中特异性启动基因表达的嵌合启动子。本发明还涉及该嵌合启动子的医疗应用。

背景技术

[0002] 遗传性肌肉疾病往往由于骨骼肌和心脏功能障碍导致较高的发病率和死亡率,目前尚缺乏有效的治疗方法。基因治疗是一种有效的、具有前景的治疗遗传病方法,正处于高速发展阶段,为包括肌肉疾病在内的许多遗传疾病提供了希望。病毒载体,包括慢病毒、腺相关病毒等载体是基因治疗传递基因的常用工具。但实现在肌肉细胞高效递送基因目前仍具有一定的挑战。通过开发肌肉组织特异性启动子增强病毒载体药物特定组织表达,减少递送基因的非特异性表达,达到病毒载体可控释放药物及降低病毒使用量是提高病毒载体在遗传性肌肉疾病基因治疗运用的一种有效的方法。

[0003] 人类Desmin基因编码一种中间丝结构蛋白,在心肌、骨骼肌、平滑肌等肌肉细胞均有合成。Desmin基因在肌肉细胞的特异性表达主要受到启动子区域元件严格的调控。Desmin基因启动子作为肌肉组织特异性启动子已被多篇文章报道,其中包含-973--693及-228-0的截短体具有较高的表达效率^[1]。但其递送效率仍存在不足之处。CRM4顺式增强元件,由Sarcar S等人报道的在小鼠肌肉细胞具有良好的特异性^[2]。Myod1转录因子(Myoblast determination protein 1)作为转录激活剂,促进肌肉特异性靶基因的转录,并在肌肉分化中发挥作用。但目前未见有将它们进行组合而获得活性和特异性更高的启动子的报道。

发明内容

[0004] 本文公开了一种人工优化的能在哺乳动物肌肉中特异性启动基因转录的启动子序列及其应用。该启动子通过添加CRM4顺式增强子元件、Myod1转录因子识别序列以及SV40 intron序列对人类Desmin基因启动子进行优化。通过小鼠体内实验,经优化后的人类Desmin基因启动子其组织特异性及表达能力得到了较大的提高,具有较高的应用价值。

[0005] 一方面,本文提供了肌肉特异性嵌合启动子,其包括:

1) 第一转录调控元件,所述第一转录调控元件为肌肉特异性转录因子识别结合位点;

2) 第二转录调控元件,所述第二转录调控元件为肌肉特异性顺式调节模块;以及

3) 第三转录调控元件,所述第三转录调控元件为肌肉特异性启动子。

[0006] 在一些实施方案中,所述肌肉特异性嵌合启动子中所述第一转录调控元件的数量为两个或两个以上。

[0007] 在一些实施方案中,两个或两个以上所述第一转录调控元件串联连接或被所述第二转录调控元件和/或所述第三转录调控元件隔开。

[0008] 在一些实施方案中,所述第一转录调控元件的数量为两个,分别位于所述第二转

录调控元件或所述第三转录调控元件两侧。

[0009] 在一些实施方案中,所述肌肉特异性嵌合启动子还包括第四转录调控元件,所述第四转录调控元件为内含子序列。

[0010] 在一些实施方案中,所述第四转录调控元件为SV40内含子序列。

[0011] 在一些实施方案中,所述肌肉特异性转录因子为Myod蛋白家族的成员。

[0012] 在一些实施方案中,所述肌肉特异性转录因子为Myod1转录因子。

[0013] 在一些实施方案中,所述第一转录调控元件包括SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO: 1有至少90%序列一致性的功能性变体。

[0014] 在一些实施方案中,所述第二转录调控元件包括SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO: 2有至少90%序列一致性功能性变体。

[0015] 在一些实施方案中,所述第三转录调控元件包括desmin基因启动子或其功能性片段。

[0016] 在一些实施方案中,所述第三转录调控元件包括SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO: 3有至少90%序列一致性其功能性变体。

[0017] 在一些实施方案中,所述第四转录调控元件包括SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO: 4有至少90%序列一致性功能性变体。

[0018] 在一些实施方案中,所述肌肉特异性嵌合启动子从5'到3'端依次包括所述第一转录调控元件、所述第二转录调控元件、所述第一转录调控元件、所述第三转录调控元件和所述第四转录调控元件。

[0019] 在一些实施方案中,所述肌肉特异性嵌合启动子包括SEQ ID NO: 5所述的核苷酸序列或与SEQ ID NO: 5有至少90%序列一致性的功能性变体。

[0020] 在另一方面,本文提供了基因表达盒,其包括上述肌肉特异性嵌合启动子。

[0021] 在另一方面,本文提供了表达载体,其包括上述肌肉特异性嵌合启动子或上述基因表达盒。

[0022] 在一些实施方案中,上述表达载体为病毒表达载体。

[0023] 在一些实施方案中,所述表达载体腺相关病毒(AAV)表达载体。

[0024] 在另一方面,本文提供了宿主细胞,其包括上述肌肉特异性嵌合启动子、基因表达盒或表达载体。

[0025] 在另一方面,本文提供了药物组合物,其包括上述基因表达盒、表达载体或宿主细胞以及药学上可接受的载体。

[0026] 在另一方面,本文提供了上述基因表达盒、表达载体、宿主细胞或药物组合物在制备治疗肌肉相关病症的药物中的用途。

[0027] 在另一方面,本文提供了治疗肌肉相关病症的方法,包括以有效量的上述基因表达盒、表达载体、宿主细胞或药物组合物向有需要的受试者给药。

[0028] 本发明通过CRM4顺式增强元件,Myod1转录因子以及SV40 intron序列对人类Desmin基因启动子截短体进行组合,提高其肌肉组织特异性以及表达能力。

附图说明

[0029] 图1显示了使用不同启动子时的小鼠活体成像荧光图。A组:pAAV-human desmin-

luciferase-p2A-maxGFP; B组:pAAV-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP;C组:pAAV-Myod1-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP。曝光时间100ms。

[0030] 图2显示了qPCR测定的使用不同启动子时不同组织luciferase基因表达量结果。A组:pAAV-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP;B组:pAAV-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP;C组:pAAV-Myod1-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP, 每组肌肉组织以作为定量参照。

[0031] 图3 显示了qPCR测定的使用不同启动子时不同组肌肉组织luciferase表达效率的结果。A组:pAAV-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP;B组:pAAV-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP;C组:pAAV-Myod1-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP。以A组作为参照组。

具体实施方式

[0032] 除非另有说明,本文使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员所通常理解的含义。

[0033] “启动子(promoter)”是RNA 聚合酶识别、结合和开始转录的一段DNA 序列,它含有RNA 聚合酶特异性结合和转录起始所需的保守序列,多数位于结构基因转录起始点的上游,启动子本身不被转录。启动子的实例包括但不限于CMV、EF1A、CAG、CBh、SFFV启动子。

[0034] “嵌合启动子”,也可称为“组合启动子”或“复合启动子”,指其,除启动子序列外,还包括至少一个转录调控元件,并且该转录调控元件与该启动子并非天然存在于同一基因的转录调控序列中。例如,该启动子天然存在于第一基因的转录调控序列中,另一转录调控元件(如转录因子识别结合位点)天然存在于第二基因的转录调控序列中,当这两个转录调控元件因人工操作而处于同一DNA分子中并控制同一基因的转录时,可以认为它们构成了嵌合启动子。

[0035] 提及嵌合启动子或其他转录调控元件时,“肌肉特异性的”指该嵌合启动子或其他转录调控元件偏好性地在肌肉组织或肌细胞中驱动或增强可操作地连接的目的基因的表达。“肌肉特异性的”不排除该嵌合启动子或其他转录调控元件在一定程度上在另一种组织中驱动或增强可操作地连接的目的基因的表达的可能性,只是其表达相对于在肌肉组织中表达低得多。例如,肌肉特异性嵌合启动子可驱动目的基因在肌肉组织和肝组织中表达,但是,目的基因在肌肉组织中的表达水平为肝组织中表达水平的2倍以上,或者5倍以上,或者10倍以上,或者20倍以上,或甚至50倍以上或更高。

[0036] “转录调控元件”指能够驱动(例如启动子)或增强(例如增强子)可操作地连接的目的基因在组织或细胞中的表达的核苷酸片段。“转录调控序列”指控制目的基因表达的转录调控元件的总和,它们可能连续的存在于同一DNA分子中,或者有间隔的存在于同一DNA分子中。

[0037] “可操作地连接”指调控序列与其调控对象的连接方式使得调控序列能够对其调控对象发挥作用。例如,启动子与目的基因“可操作地连接”指启动子可驱动目的基因从准确起始位点的开始转录。

[0038] “转录因子识别结合位点”指DNA分子上的一段核苷酸序列,转录因子可识别并与其结合。转录因子与其结合后,有助于与其他蛋白(如RNA聚合酶)一起形成转录起始复合

物,启动转录过程。

[0039] “顺式调节模块(*cis*-regulatory module,CRM)”指DNA分子上的一段核苷酸序列,为多个转录因子的同时结合提供了识别结合位点。顺式调节模块在下文有更详细的描述。

[0040] “功能性变体”或“功能性片段”指在原始序列(例如天然序列)基础上包括了少许改动(例如氨基酸或核苷酸删除、添加或替换)后获得的蛋白或核酸变体,其仍然保留了原始序列的全部或至少部分功能。例如,功能性变体可保留原始序列某种活性的50%、60%、70%、80%、90%、100%或甚至具有高于原始序列的活性。

[0041] 本文中,术语“核酸分子”、“核酸”和“多核苷酸”可互换使用,指核苷酸聚合物。此类核苷酸聚合物可含有天然和/或非天然核苷酸且包括(但不限于) DNA、RNA和PNA。“核酸序列”指包含于核酸分子或多核苷酸中的核苷酸线性序列。对于DNA分子来说,由于双链互补,在本文提及其中一条链的序列时,本领域技术人员应意识到已同时提及其互补链或包括其互补链的双链DNA分子。

[0042] 术语“载体”指可经工程改造以含有目的多核苷酸(例如目的多肽的编码序列)的核酸分子或可在宿主细胞中复制的核酸分子(例如,核酸、质粒、或病毒等)。载体可包括以下组件中的一个或多个:复制起点、一或多个调控目的多核苷酸的表达的调控序列(诸如启动子和/或增强子)和/或一个或多个可选择标记物基因(诸如抗生素抗性基因和可用于比色分析中的基因,例如 β -半乳糖)。术语“表达载体”指用于在宿主细胞中表达目的基因的载体。

[0043] “宿主细胞”指可为或已为载体或经分离多核苷酸的接受体的细胞。宿主细胞可为原核细胞或真核细胞。示例性真核细胞包括哺乳动物细胞,诸如灵长类动物或非灵长类动物细胞;真菌细胞,诸如酵母;植物细胞;以及昆虫细胞。非限制性示例性哺乳动物细胞包括(但不限于) NS0细胞、293以及CHO细胞,以及其衍生细胞,诸如293-6E、CHO-DG44、CHO-K1、CHO-S和CHO-DS细胞。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,且后代可能由于自然、偶然或故意突变而不一定与原始母细胞完全一致(在形态或基因组DNA互补方面)。宿主细胞也包括在活体内经本文提供的核酸分子或表达载体转染的细胞。

[0044] “目的基因”是指编码RNA或蛋白质产物的多核苷酸序列,所述多核苷酸序列可以根据所需目的引入到细胞或个体中,并且能够在适合条件下表达。目的基因可以编码感兴趣的产物,例如感兴趣的治疗性或诊断性产物。可使用治疗性目的基因,在将其引入细胞、组织或器官中并进行表达以产生所需的治疗结果。治疗可以通过多种方式实现,包括通过将蛋白质在不表达所述蛋白质的细胞中表达,通过将蛋白质在表达所述蛋白质的突变版本的细胞中表达,通过表达对表达它的靶细胞有毒的蛋白质(用于例如杀死不想要的细胞例如癌细胞的策略),通过表达反义RNA以诱导基因阻遏或外显子跳跃,或通过表达目的是抑制蛋白质表达的沉默RNA,例如shRNA。目的基因也可以编码用于靶向基因组的核酸酶,例如CRISPR相关核酸内切酶或转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)。另外,目的基因也可以是与CRISPR/Cas9系统一起使用的向导RNA或一组向导RNA。

[0045] 术语“治疗”包括治愈、缓解或预防效果。因此,治疗性和预防性治疗包括改善障碍的症状或阻止或以其他方式降低发生特定症状的风险。可以提供治疗以延迟、减缓或逆转疾病和/或其一种或多种症状的进展。术语“预防性”可以被认为是降低特定病症的严重性或发作。“预防性”还包括在以前被诊断出患有特定病症的患者中阻止所述病症的复发。“治

疗性”还可以是指降低现有病症的严重性。术语“治疗”在本文中用于指称可以有益于动物、特别是哺乳动物、更特别是人类对象的任何方案。在特定实施方式中，所述哺乳动物可以肌肉相关病症的个体，例如人患者。

[0046] 嵌合启动子

本发明人设计了在本文中称为“嵌合启动子”的转录调控元件，用于驱动或增强目的基因在肌肉组织中的表达。

[0047] 该嵌合启动子包括：一个或多个肌肉特异性转录因子识别结合位点；肌肉特异性顺式调节模块；以及肌肉特异性启动子。

[0048] 在两个或两个以上肌肉特异性转录因子识别结合位点的情况下，这些识别结合位点直接串联连接或接头序列隔开。直接串联连接意味着后一结合识别位点的第一个核苷酸紧跟在上游结合识别位点的最后一个核苷酸之后。在通过连接物连接的情况下，在上游结合识别位点的最后一个核苷酸与随后的下游结合识别位点的第一个核苷酸之间存在其他核苷酸序列。例如，所述接头序列的长度可以在1至50个核苷酸之间，例如1至40个核苷酸，例如1至30个核苷酸，例如1至20个核苷酸，例如1至10个核苷酸。在一些实施方案中，嵌合启动子的设计可以考虑到所准备使用的载体的尺寸限制，因此，此类接头序列如果存在的话，优选短序列。代表性的短接头序列包括由少于15个核苷酸，特别是少于14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3个或少于2个核苷酸构成的核酸序列，例如1个核苷酸的接头序列。

[0049] 在一些实施方案中，所述肌肉特异性转录因子识别结合位点为Myod蛋白家族成员的识别结合位点。Myod蛋白家族成员可例如包括Myod1、Myf5、MyoG和Myf6转录因子。优选地，该肌肉特异性转录因子识别结合位点为转录因子Myod1的识别结合位点。更具体地，该肌肉特异性转录因子识别结合位点包括SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列。另外，可预期，对该核苷酸序列的个别核苷酸进行改动（添加、替换或删除），也有可能仍然具有Myod1结合能力（尽管结合亲和力可能会减弱），这些改动后的功能性变体也应该包括在本发明的范围内。

[0050] 本文提供的嵌合启动子中的肌肉特异性顺式调节模块（CRM）包括成簇的转录因子结合位点，这些转录因子包括E2A、CEBP、LRF、Myod、SREBP及其任意组合，例如CEBP、E2A和LRF；E2A、LRF和Myod；LRF和Myod；或者CEBP、E2A和LRF。优选地，该肌肉特异性顺式调节模块包括E2A、CEBP、LRF、Myod和SREBP识别结合位点。更具体地，该肌肉特异性顺式调节模块包括SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列。另外，可预期，对该核苷酸序列的个别核苷酸（例如不超过50个、20个、10个、5个、4个、3个、2个或1个核苷酸）进行改动（添加、替换或删除），也有可能获得仍然具有部分转录因子结合能力（尽管结合亲和力可能会减弱）的肌肉特异性顺式调节模块，这些改动后的功能性变体也应该包括在本发明的范围内。在一些实施方案中，功能性变体与SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列至少有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至更高的序列一致性。

[0051] 本文提供的嵌合启动子中另一转录调控原件为肌肉特异性启动子，例如天然、截短的或人工合成的肌肉特异性启动子。在一些实施方案中，该肌肉特异性启动子具有2600个核苷酸以下，特别是2000个核苷酸以下的长度，并且在可操作地连接目的基因时具有肌肉组织启动子活性。在特定实施方式中，所述肌肉选择性启动子具有1500个核苷酸以下、1100个核苷酸以下、600个核苷酸以下的长度。肌肉特异性启动子的实例包括desmin基因启

动子、MLC-2v基因启动子、CK6启动子、CK8启动子、Acta1基因启动子、MCK基因启动子等。优选地,所述肌肉特异性启动子为desmin基因启动子或其变体,例如截短的desmin基因启动子。在一些具体实施方案中,该肌肉特异性启动子包括SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列。另外,可预期,对该核苷酸序列的个别核苷酸(例如不超过50个、20个、10个、5个、4个、3个、2个或1个核苷酸)进行改动(添加、替换或删除),也有可能获得仍然具有肌肉特异性启动子活性的功能性变体,这些改动后的功能性变体也应该包括在本发明的范围内。在一些实施方案中,功能性变体与SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列至少有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至更高的序列一致性。

[0052] 本文提供的嵌合启动子还可包括内含子(intron)序列,例如鼠细小病毒(minute virus of mice, MVM)内含子和SV40内含子。在一些实施方案中,本文提供的嵌合启动子可包括SEQ ID NO: 4所示的SV40内含子序列。在另一些实施方案中,本文提供的嵌合启动子可包括SEQ ID NO: 4所示的SV40内含子序列的功能性变体。一般地,这些功能性变体与SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列至少有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至更高的序列一致性。

[0053] 在本文提供的嵌合启动子中包括两个或两个以上肌肉特异性转录因子(例如Myod1)识别结合位点的情况下,这些肌肉特异性转录因子识别结合位点可位于肌肉特异性顺式调节模块的两侧(即其上游和下游),或者位于肌肉特异性启动子的两侧,或者位于相互连接的肌肉特异性顺式调节模块和肌肉特异性启动子的两侧。

[0054] 本文提供的嵌合启动子的各转录调控元件之间可以直接连接或通过接头序列连接。例如,第一调控元件(即肌肉特异性转录因子识别结合位点)可直接与第二调控元件(即CRM)直接连接或通过核苷酸接头连接,即第一调控元件的最后一个核苷酸与第二调控元件的第一个核苷酸之间不存在其他核苷酸或核苷酸序列。在通过核苷酸接头连接的情况下,第一调控元件的最后一个核苷酸与第二调控元件的第一个核苷酸之间,存在其他核苷酸序列(即核苷酸接头)。例如,所述核苷酸接头的长度可以在1至1500个核苷酸之间,例如1至1000个核苷酸(例如101、300、500或1000个核苷酸),例如1至500个核苷酸,例如1至300个核苷酸,例如1至100个核苷酸,例如1至50个核苷酸,例如1至40个核苷酸,例如1至30个核苷酸,例如1至20个核苷酸,例如1至10个核苷酸。考虑到载体分子通常具有尺寸限制,因此,此类核苷酸接头如果存在的话,优选是短的。代表性的短连接物包括由少于15个核苷酸,特别是少于14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3个或少于2个核苷酸构成的核酸序列,例如1个核苷酸的核苷酸接头。

[0055] 在一个特定的实施方案中,本文提供嵌合启动子从5'至3'依次包括:

- 一个或更多个第一调控元件(即肌肉特异性转录因子识别结合位点);
- 第二调控元件(即CRM);
- 第三调控元件(即肌肉特异性启动子或其截短形式);以及任选地
- 第四调控元件(内含子序列)。

[0056] 在一个特定的实施方案中,本文提供嵌合启动子从5'至3'依次包括:

- 第二调控元件(即CRM);
- 一个或更多个第一调控元件(即肌肉特异性转录因子识别结合位点);
- 第三调控元件(即肌肉特异性启动子或其截短形式);以及任选地

- 第四调控元件(内含子序列)。

[0057] 在一个特定的实施方案中,本文提供嵌合启动子从5'至3'依次包括:

- 第二调控元件(即CRM);
- 第三调控元件(即肌肉特异性启动子或其截短形式);
- 一个或更多个第一调控元件(即肌肉特异性转录因子识别结合位点);以及任选地

地

- 第四调控元件(内含子序列)。

[0058] 在一个特定的实施方案中,本文提供嵌合启动子从5'至3'依次包括:

- 一个或更多个第一调控元件(即肌肉特异性转录因子识别结合位点);
- 第二调控元件(即CRM);
- 一个或更多个第一调控元件;
- 第三调控元件(即肌肉特异性启动子或其截短形式);以及任选地
- 第四调控元件(内含子序列)。

[0059] 在一个特定的实施方案中,本文提供嵌合启动子从5'至3'依次包括:

- 第二调控元件(即CRM);
- 一个或更多个第一调控元件(即肌肉特异性转录因子识别结合位点);
- 第三调控元件(即肌肉特异性启动子或其截短形式)
- 一个或更多个第一调控元件;以及任选地
- 第四调控元件(内含子序列)。

[0060] 在一个特定的实施方案中,本文提供嵌合启动子从5'至3'依次包括:

- 一个或更多个第一调控元件(即肌肉特异性转录因子识别结合位点);
- 第二调控元件(即CRM);
- 第三调控元件(即肌肉特异性启动子或其截短形式)
- 一个或更多个第一调控元件;以及任选地
- 第四调控元件(内含子序列)。

[0061] 在本文公开的嵌合启动子的所有实施方式中,都可以包括位于各转录调控元件之间的核苷酸接头。这些核苷酸接头可以位于第一转录调控元件之间或者不同的转录调控元件之间。核苷酸接头的长度如上文描述。通常,优选序列较短的核苷酸接头。

[0062] 在一个具体实例中,本文提供的嵌合启动子包括SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列,或者包括与SEQ ID NO: 5序列一致性至少为80%,例如与SEQ ID NO: 5的序列一致性至少为85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或甚至至少99%并具有肌肉选择性启动子活性的功能性变体序列。

[0063] 表达盒

本文提供的嵌合启动子可以被引入到表达盒中,该表达盒被设计用于提供目的基因在感兴趣的组织(如肌肉组织)中表达。

[0064] 因此,本文提供的表达盒包括上述嵌合启动子和目的基因。

[0065] 在特定得实施方案中,本文提供的表达盒从5'到3'依次包含:

- 本文提供的嵌合启动子;
- 目的基因;以及

- 多腺苷酸化信号。

[0066] 在该实施方案的特定变化形式中,可以将内含子引入到本文提供的嵌合启动子和目的基因之间。或者,所述内含子可以位于目的基因内。在特定的实例中,所述内含子可以为SV40内含子,例如包括SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列。

[0067] 从本文中公开的教导和分子生物学和基因疗法领域中的普通知识,本领域技术人员还可以考虑将其他转录调控元件并入到本文公开的嵌合启动子中,例如引入其他增强子序列(例如MCK增强子或其功能性变体)和内含子序列。

[0068] 可以在表达中引入的目的基因可包括任何感兴趣的基因,尤其是与肌肉病症相关的治疗性基因序列。这些治疗性基因预期可用于如下疾病的治疗:肌营养不良症(例如先天性肌营养不良症)、肌萎缩性脊髓侧索硬化、炎性肌病、肌肉代谢疾病(例如糖原代谢性肌病)、先天性肌强直以及其他神经肌肉障碍。

[0069] 载体、细胞和药物组合物

本文提供的表达盒可以被引入到载体中。因此,本发明还涉及包含上述表达盒的载体。在本发明中使用的载体是适合于RNA/蛋白质表达,特别是适合于基因疗法的载体。

[0070] 在一些实施方式中,所述载体是质粒载体。

[0071] 在另一些实施方式中,所述载体是非病毒载体,例如含有本发明的表达盒的纳米粒子、脂质纳米粒子(LNP)或脂质体。

[0072] 在另一些实施方式中,所述载体是基于转座子的系统,允许将本文提供的表达盒整合到靶细胞的基因组中。

[0073] 在另一实施方式中,所述载体是适用于基因疗法的病毒载体。在这种情况下,正如本领域中公知的,可以向本文提供的表达盒添加适用于产生高效病毒载体的其他序列。在特定实施方式中,所述病毒载体可以源自于腺病毒、反转录病毒或慢病毒(例如整合缺陷型慢病毒)。在所述病毒载体源自于反转录病毒或慢病毒的情况下,所述其他序列可以是在所述表达盒两侧的反转录病毒或慢病毒LTR序列。在另一个特定实施方式中,所述病毒载体是细小病毒载体,例如AAV载体,例如适合于转导肌肉的AAV载体。在这个实施方式中,所述其他序列是在所述表达盒两侧的AAV ITR序列。

[0074] 在优选实施方式中,所述载体是AAV载体。人类腺相关病毒(AAV)是一种天然复制缺陷的依赖病毒,其能够整合到被感染细胞的基因组中以建立潜伏感染。AAV载体作为用于人类基因疗法的载体已有众多应用。该病毒载体的有利特性包括它与任何人类疾病不存在关联,它感染分裂和非分裂细胞两者的能力,并且可以感染源自于不同组织的广范围的细胞系。

[0075] 在从人类或非人类灵长动物(NHP)分离并充分表征的AAV的血清型中,人类血清2型是被开发为基因转移载体的第一种AAV。其他目前使用的AAV血清型还包括AAV-1、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10等。此外,其他非天然的工程化变体和嵌合AAV也可能是有用的。

[0076] AAV病毒可以使用常规的分子生物学技术进行工程化改造,使得可以优化这些粒子以用于核酸序列的细胞特异性递送,用于最小化免疫原性,用于调节稳定性和粒子寿命,用于高效降解,用于向细胞核的精确递送。

[0077] 用于组装成载体的所需AAV片段包括衣壳蛋白,包括vp1、vp2、vp3和高变区,rep蛋

白,包括rep 78、rep 68、rep 52和rep 40,以及编码这些蛋白质的序列。这些片段可以在各种不同的载体系统和宿主细胞中容易地利用。

[0078] 本发明还涉及一种分离的细胞,例如肌细胞,所述细胞用本发明的核酸序列或本发明的表达盒转化。本发明的细胞可以通过注射到需要的对象的感兴趣的组织或血流中,递送到所述对象。在特定实施方式中,本发明涉及将本发明的核酸分子或表达盒引入到待治疗对象的细胞中,并将所述已引入有核酸或表达盒的细胞给回到所述对象。

[0079] 本文还提供了包含上述表达盒、载体或宿主细胞的药物组合物。此类组合物包含治疗有效量的上述表达盒、载体或细胞,以及药学上可接受的载体。

[0080] 提及药物组合物,所使用的术语“药学上可接受的载体”指可以安全地进行施用的固体或液体稀释剂、填充剂、抗氧化剂、稳定剂等物质,这些物质适合于受试者给药而无过度的不良副作用,同时适合于维持位于其中的药物或活性剂的活力。依照给药途径,可以使用本领域众所周知的各种不同的载体,包括,但不限于糖类、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽糖、明胶、滑石、硫酸钙、植物油、合成油、多元醇、藻酸、磷酸缓冲液、乳化剂、等渗盐水、和/或无热原水等。

[0081] 如果需要,药物组合物也可以含有少量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些药物组合物可以采取溶液、悬液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、持续释放制剂等的形式。

[0082] 本文所提供的药物组合物可以制成粉末、注射剂等临床可接受的剂型。可以使用任何适当的途径向受试者施用本发明的药物组合物,例如可通过口服、静脉内输注、肌肉内注射、皮下注射、腹膜下、直肠、舌下,或经吸入、透皮等途径给药。

[0083] 在优选实施方式中,所述药物组合物按照常规程序配制成适合于静脉内或肌肉内给药。通常,用于静脉内或肌内给药的药物组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,所述药物组合物还可以包含增溶剂和局部麻醉剂例如利多卡因,以缓解受试者注射部位处的疼痛。

[0084] 本文所用的“受试者”指动物,例如哺乳动物,包括(但不限于)人类、啮齿动物、猿猴、猫科动物、犬科动物、马科动物、牛科动物、猪科动物、绵羊、山羊、哺乳类实验动物、哺乳类农畜、哺乳类运动动物和哺乳类宠物。受试者可为雄性或雌性且可为任何适龄受试者,包括婴儿、幼年、青年、成人和老年受试者。在一些实例中,受试者指需要治疗疾病或病症的个体。在一些实例中,接受治疗的受试者可为患者,其患有与该治疗有关联的病症,或有风险患上该病症。在特定实例中,受试者为人类,诸如人类患者。该术语通常可与“患者”、“检测对象”、“治疗对象”等互换使用。

[0085] 在一个实施方式中,本发明的表达盒或载体可以在囊泡、特别是脂质体中递送。在又一个实施方式中,本发明的核酸序列、表达盒或载体可以在受控释放系统中递送。

[0086] 治疗应用

本文提供的嵌合启动子、表达盒或载体可用于在肌肉或肌细胞中表达目的基因。因此,在一些实施方案中,本发明涉及上述表达盒、载体、细胞或药物组合物在制备用于治疗肌肉或肌细胞相关疾病的药物中的用途。

[0087] 本文提供的表达盒和载体也可用于基因疗法。因此,在一些实施方案中,本发明涉及治疗肌肉或肌细胞相关疾病的方法,包括以有效量的上述表达盒、载体、细胞或药物组合物向有需要的受试者给药。

[0088] 在一些实施方案中,本文提供了一种在肌细胞中表达目的基因的方法,其包括将本文提供的表达盒或载体引入到所述肌细胞中,并表达所述目的基因。所述方法可以是用于在肌细胞中表达目的基因的体外、离体或体内方法。

[0089] 在一些实施方案中,本本文提供了一种在肌肉组织中表达目的基因的方法,其包括将本文提供的表达盒或表达载体引入到所述肌肉组织中,并表达所述目的基因。优选地,该肌肉组织为骨骼肌。

[0090] 在特定实施方式中,可能希望将本发明的药物组合物等局部给药到需要治疗的区域,例如局部肌肉组织。这可以例如利用植入物来实现,包括多孔、无孔或凝胶状材料。

[0091] 向有需要的受试者给药的剂量随着几种因素而变,包括但不限于给药途径、治疗的具体疾病、对象的年龄或获得治疗效果必需的表达水平。本领域技术人员可以在本领域知识的基础上,根据这些因素和其他因素容易地确定需要的剂量。在以AAV载体给药的情况下,载体的典型剂量是至少每千克体重 1×10^8 份载体基因组(vg/kg),例如至少 1×10^9 vg/kg、至少 1×10^{10} vg/kg、至少 1×10^{11} vg/kg、至少 1×10^{12} vg/kg、至少 1×10^{13} vg/kg、至少 1×10^{14} vg/kg或至少 1×10^{15} vg/kg。当然,医师也可根据受试者的个体情况选择超出该范围的其他剂量。

[0092] 该发明的有益效果在于:通过添加CRM4顺式增强元件、Myod1转录因子识别结合位点及SV40 intron序列,对人类desmin基因启动子截短体进行优化。与未优化的人类desmin基因启动子截短体相比,通过小鼠活体实验验证,优化后的启动子其组织特异性以及组织,心脏组织的表达能力得到了较大的改善。

[0093] 以下通过具体实施例来进一步说明本发明。

[0094] 实施例1

一种人工优化的能在哺乳动物肌肉特异性启动基因的启动子序列,为人类Desmin基因经人工优化所得,具体序列和各转录调控元件序列如下。

Myod1 识别结合位点	GGCAGCTGTTGCT (SEQ ID NO:1)
CRM4 序列	TGGACCCCGTGGTAACCCTATAAGGCCGAGGCAGCTGCTGTCTG AGGCAGGGAGGGGCTGGTGTGGGAGGCTAAGGCCAGCTGCTAA GTTTAGGGTGGCTCCTTCTCTCTTCTTAGAGACAACAGGTGGCT GGGGCCTCAGTGCCCAGAAAAGAAAATGTCTTAGAGGTATCGG CATGGCCTGGAGGAGGGGGACAGGGCAGGGGGAGGCATCTT CCTCAGGACATCGGGTCTAGAGG (SEQ ID NO:2)
人 desmin 启动子 (截短)	CCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTCCAGCCATGCGTCTCT CCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGC TGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAAC ACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGG GATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCC ACACAAAGTCTGTGCGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGA AACTGAAAGCTTATCAGACCCTTCTGGAAATCAGCCACTGTT TATAAACTTGAGGCCCCACCCTCGACAGTACCGGGGAGGAAGA GGGCCTGCACTAGTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCACG GCCACGGGCCGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGC TGTCAGGGGAGGGGAGGGCGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATAACA AATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCTCGCCGCATCC ACTTCCGGCCGGCCGCTGCCCGCCGCTCCTCCGTGCGCCCG

	CCAGCCTCGCCGCGCCGTACCG (SEQ ID NO: 3)
SV40 内含子	AACTGAAAAACCAGAAAAGTAACTGGTAAGTTTGTCTTTTGTCTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTCAAATCAAAGA ACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGA AGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCC (SEQ ID NO: 4)
嵌合启动子 (其中粗体显示 Myod1 识别结合位点; 下划线显示 CRM4 序列; 下划波浪线显示人 desmin 启动子序列; 剩余序列为 SV40 内含子序列)	GGCAGCTGTTGCTTGGACCCCGTGGTAACCCTATAAGCGCAG <u>GCAGCTGCTGTCTGAGGCAGGGAGGGGCTGGTGTGGGAGGCTA</u> <u>AGGGCAGCTGCTAAGTTTAGGGTGGCTCCTTCTCTTCTTAGA</u> <u>GACAACAGGTGGCTGGGGCCTCAGTGCCAGAAAAGAAAATGT</u> <u>CTTAGAGGTATCGGCATGGGCCTGGAGGAGGGGGACAGGGCA</u> <u>GGGGGAGGCATCTTCCTCAGGACATCGGGTCTAGAGGGGCAG</u> CTGTTGCTCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTGTTTCCAGCC <u>ATGCGTTCCTCTATAAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGC</u> <u>AGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCT</u> <u>GACAAAACACAAACCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTG</u> <u>AGTAGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGACCCAGGGGG</u> <u>CAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAG</u> <u>CAATTGGAAACTGAAAGCTTATCAGACCCTTCTGGAAATCAGC</u> <u>CCACTGTTTATAAACTTGAGGCCCCACCCTCGACAGTACCGGGG</u> <u>AGGAAGAGGGCCTGCACTAGTTGCGGGGAGCTGGCCTCCCCG</u> <u>CCCCACGGCCACGGGCCGCCCTTCTGTCAGGACAGCGGGAT</u> <u>CTTGCACTGTACAGGGGAGGGGAGGCGGGGCTGATGTCAGGA</u> <u>GGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCTCG</u> <u>CCGCATCCACTCTCCGGCCGCGCCCTGCCCGCCGCTCCTCCG</u> <u>TGCGCCGCGCAGCCTCGCCGCGCCGTCACCGAACTGAAAAACC</u> <u>AGAAAGTTAACTGGTAAGTTTGTCTTTTGTCTTTTATTTTCAGG</u> <u>TCCCGATCCGGTGGTGGTCAAATCAAAGAAGTGTCTCTCAGT</u> <u>GGATGTTGCCTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTG</u> <u>CTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCC (SEQ ID NO: 5)</u>

[0095] 载体构建如下:

实施例1质粒构建:

(1) 通过在线基因合成网站DNAWorks (v3.2.4) 以及无缝克隆等分子工具构建目标质粒。引物由金唯智生物合成。合成以下质粒:

编号	名称	用途
JL01	pAAV-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP	实验组 1, CRM4-human desmin 启动子
JL02	pAAV-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP	对照质粒, human desmin 启动子
JL03	pAAV-Myod1-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP	实验组 2, Myod1-CRM4-human desmin 启动子

(2) 首先构建pAAV-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP质粒。引物合成CRM4-human desmin启动子,简单步骤如下:将合成的引物稀释为100uM,各吸取0.1μl加入反应体系中,利用高保证酶PrimeSTAR进行扩增。

[0096] 反应体系如下:

成分	体积
引物	各 0.1μl
2 *PrimeSTAR buffer	12.5μl
去离子水	补充至 25μl

扩增体系:

温度	时间	
95°C	预变性	5min
95°C	15s 变性	28 个循环
58°C	15s 退火	
72°C	60s	
72°C	5min	
4°C	保存	

吸取上述PCR产物1 μ l作为第二次扩增反应的模板,加入首尾两端的引物F/R,进行第二次PCR反应。反应体系与条件与上述相同。将第二次PCR反应产物进行胶回收,回收产物命名为片段1。同时利用引物Intron-F/EcoRI-R,以本公司质粒EA0211为模板(质粒EA0211包含两端的ITR序列,luciferase-p2A-maxGFP序列以及由CMV Enhancer、CB Promoter、SV40intron组成的CAG启动子)扩增SV40 intron+luciferase-p2A-maxGFP片段,并进行胶回收,回收产物命名为片段2。利用MluI+EcoRI酶切载体EA0211,并回收3356bp片段,回收产物命名为片段3。

[0097] (3) 利用Exnase Multis连接酶进行无缝克隆,将载体片段与PCR产物进行连接,连接体系如下:

成分	体积	备注
片段1	50ng	CRM4-human desmin 启动子序列
片段2	50ng	SV40 intron+luciferase-p2A-maxGFP 序列
酶切载体片段3	150ng	EA0211 载体酶切回收序列
Exnase Multis 连接酶	1 μ l	
5 \times CE Multis buffer	2 μ l	
去离子水	添加至 10 μ l 体系	

37 $^{\circ}$ C反应30min即可。

[0098] (4) 转染E.coli DH5 α ,涂于氨苄的平板,隔天挑菌检测,阳性克隆送至广州金唯智公司进行测序,将测序结果正确的质粒命名为pAAV-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP。

[0099] (5) 同理利用引物human-desmin-F/human-desmin-R,以pAAV-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP质粒为模板,进行PCR反应扩增human-desmin启动子片段,命名为片段4(human-desmin启动子序列)。以luciferase-F/EcoRI-R为引物,EA0211为模板,扩增luciferase-p2A-maxGFP,命名为片段5(luciferase-p2A-maxGFP序列)。将片段4与片段5及酶切载体片段3(EA0211载体酶切回收序列),进行无缝克隆连接。将测序结果正确的质粒命名为pAAV-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP。

[0100] (6) 利用分别携带有Myod1转录因子识别位点-5' GGCAGCTGTTGCT3' -的CRM4-Myod1-F/CRM4-Myod1-R引物,以pAAV-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP作为模板进行PCR扩增,回收产物命名为片段6(带Myod1转录因子识别位点的CRM4序列)。同时以引物promoter-F/EcoRI-R,pAAV-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP作为模板进行PCR扩增,回收产物命名为片段7(human desmin-luciferase-p2A-maxGFP序列)。将片段6与片段7及酶切载体片段3,进行无缝克隆连接。将测序结果正确的质粒命名为pAAV-Myod1-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP。

[0101] 实施例2 重组腺相关病毒的制备

为了更好的验证优化的人工肌肉特异性启动子的特异性,通过包装腺相关血清型9并转染小鼠测定luciferase蛋白表达效率,以进行验证。

[0102] 重组腺相关病毒包装。以5E+5cell/ml细胞的密度在15cm培养皿中接种,过夜培养16-18小时。每皿加入15 μ g pHelper、10 μ g pRep2Cap9、7 μ g pAAV-CRM4-human-desmin-luciferase-p2A-maxGFP(pAAV-human-desmin-luciferase-p2A-maxGFP或pAAV-Myod1-CRM4-human desmin-luciferase-p2A-maxGFP)。和10 μ g 转染试剂聚乙烯亚胺孵育转染,转染72小时后。收集细胞以及上清液,通过碘克沙醇密度梯度离心。采用SYBRGreenI qPCR测

定病毒滴度,使用前在-80℃冰箱保存。

[0103] 实施例3 小鼠病毒注射活体成像及组织取样

选取12只5-6周龄BALB/c小鼠,随机分成3组,每组4只,3只实验小鼠,1只空白鼠。进行尾静脉注射上述病毒(滴度为 2.5×10^{12} GC/mL,注射体积为200 μ L)。以注射病毒当天为1天,21天后进行小鼠活体成像。结果如图1所示,由图可知,经过优化后的Myod1-CRM4-human desmin启动子,表达效率明显增强,而且主要是在肌肉组织表达。活体成像后第二天,即第22天,进行小鼠组织取样。分别取肝脏,肌肉,心脏,肾,大脑,脊髓6个组织部位。将所取的组织样品放于-80℃冰箱保存。

[0104] 实施例4 小鼠组织样品RNA提取及逆转录定量

按RNA提取试剂盒步骤说明操作。取0.1-0.5g组织样品,转移至含有1ml transzol up的1.5ml EP管中,加入两颗RNA free的钢珠。用震荡匀浆器进行研磨。70HZ,震荡50s,停止10s。重复7次。室温静置5min,进行离心,收集上清。按5:1的比例加入氯仿,剧烈震荡30s,室温静置3min。于4℃进行低温离心。收集上清,加入等体积的无水乙醇,轻微混匀。将所得溶液加入离心柱中,离心,弃废液。加入500 μ l CB9,室温离心,弃废液,重复两次。加入500 μ l WB9,室温离心,弃废液,重复两次。空转20s,室温去除残留乙醇。加入50 μ l的RNA free水进行洗脱。利用NanoDrop测量所提RNA浓度。吸取500ng进行逆转录。利用SYBRGreenI qPCR进行定量,结果如图2、图3所示。其中由图2可知,未经优化的human desmin启动子其肝脏组织 luciferase表达是肌肉组织的40倍。经优化后的human desmin启动子其肝脏组织表达明显下降。由图3可知优化后的human desmin肌肉组织表达效率是未优化的50倍。

[0105] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

[0106] 参考文献:

[1] Li Z , Paulin. High-level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer[J]. Cell Biology International Reports, 1990, 14 (ABSTR. SUPPL):50.

[2] Sarcar S, Tulalamba W, MY Rincón, et al. Next-generation muscle-directed gene therapy by in silico vector design[J]. Nature Communications, 2019, 10(1).

SEQUENCE LISTING

<110> 广州派真生物技术有限公司

<120> 在哺乳动物肌肉中特异性启动基因的启动子序列及其应用

<130> P10975-I

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Myod1识别结合位点

<400> 1

ggcagctggt gct 13

<210> 2

<211> 241

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CRM4序列

<400> 2

tggacccccg tggtaacct ataaggcgag gcagctgctg tctgaggcag ggaggggctg 60
 gtgtgggagg ctaaggcgag ctgctaagtt tagggtggct ctttctctct tcttagagac 120
 aacaggtggc tggggcctca gtgccagaa aagaaaatgt cttagaggta tcggcatggg 180
 cctggaggag gggggacagg gcagggggag gcatcttctt caggacatcg gtccttagag 240
 g 241

<210> 3

<211> 591

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人desmin启动子(截短)

<400> 3

ccccacagct cctctcctgt gcettgtttc ccagccatgc gttctctctct ataaatacc 60
 gctctggat ttggggttg cagctgttgc tgccaggag atggttggt tgacatgcgg 120
 ctctgacaa aacacaaacc cctggtgtgt gtggcgctgg gtggtgtgag taggggatg 180
 aatcaggag ggggcggggg acccagggg caggagccac acaaagtctg tgcgggggtg 240
 ggagcgcaca tagcaattgg aaactgaaag cttatcagac ctttctgga aatcagccca 300

ctgtttataa acttgaggcc ccaccctcga cagtaccggg gaggaagagg gcctgcacta 360
 gttgcggggg agctggcctc cccgccccca cggccacggg ccgccctttc ctggcaggac 420
 agcgggatct tgcagctgtc aggggagggg aggcgggggc tgatgtcagg aggatacaa 480
 atagtgccga cggctggggg ccctgtctcc cctcgccgca tccactctcc ggccggccgc 540
 ctgcccgcgc cctcctccgt gcgcccgcca gcctgccccg cgccgtcacc g 591

<210> 4

<211> 171

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SV40内含子

<400> 4

aactgaaaaa ccagaaagtt aactggtaag ttagtctttt ttgtctttta tttcaggtcc 60
 cggatccggt ggtggtgcaa atcaaagaac tgctcctcag tggatgttgc ctttacttct 120
 aggcctgtac ggaagtgtta cttctgtctt aaaagctgcg gaattgtacc c 171

<210> 5

<211> 1029

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 嵌合启动子

<400> 5

ggcagctggt gcttggacc ccgtggtaac cctataaggc gaggcagctg ctgtctgagg 60
 cagggagggg ctgggtgtgg aggctaaggg cagctgctaa gtttagggtg gctccttctc 120
 tcttcttaga gacaacaggt ggctggggcc tcagtgccca gaaaagaaa tgtcttagag 180
 gtatcggcat gggcctggag gaggggggac agggcagggg gaggcattct cctcaggaca 240
 tcgggtccta gaggggcagc tgttgctccc cacagctcct ctctgtgcc ttgtttccca 300
 gccatgcggt ctctctata aatacccgct ctggtatttg gggttggcag ctgttgctgc 360
 cagggagatg gttgggttga catgcggctc ctgacaaaac acaaaccct ggtgtgtgtg 420
 ggcgtgggtg gtgtgagtag ggggatgaat cagggagggg gcgggggacc cagggggcag 480
 gagccacaca aagtctgtgc gggggtggga gcgcacatag caattgaaa ctgaaagctt 540
 atcagaccct ttctggaaat cagcccactg tttataaact tgaggcccca ccctcgacag 600
 taccggggag gaagagggcc tgcaactagt gcgggggagc tggcctcccc gccccacgg 660
 ccacgggccc ccctttcctg gcaggacagc gggatcttgc agctgtcagg ggaggggagg 720
 cgggggctga tgtcaggagg gatacaaata gtgccgacgg ctgggggccc tgtctccct 780
 cgccgcatcc actctccggc cgcccgctg cccgccgct cctccgtgcg cccgccagcc 840
 tcgcccgcgc cgtcaccgaa ctgaaaaacc agaaagttaa ctggttaagt tagtcttttt 900
 gtcttttatt tcagggtccc gatccggtg tggtgcaaat caaagaactg ctctcagtg 960
 gatgttgctt ttacttctag gcctgtacgg aagtgttact tctgctctaa aagctgcgga 1020

attgtacc 1029

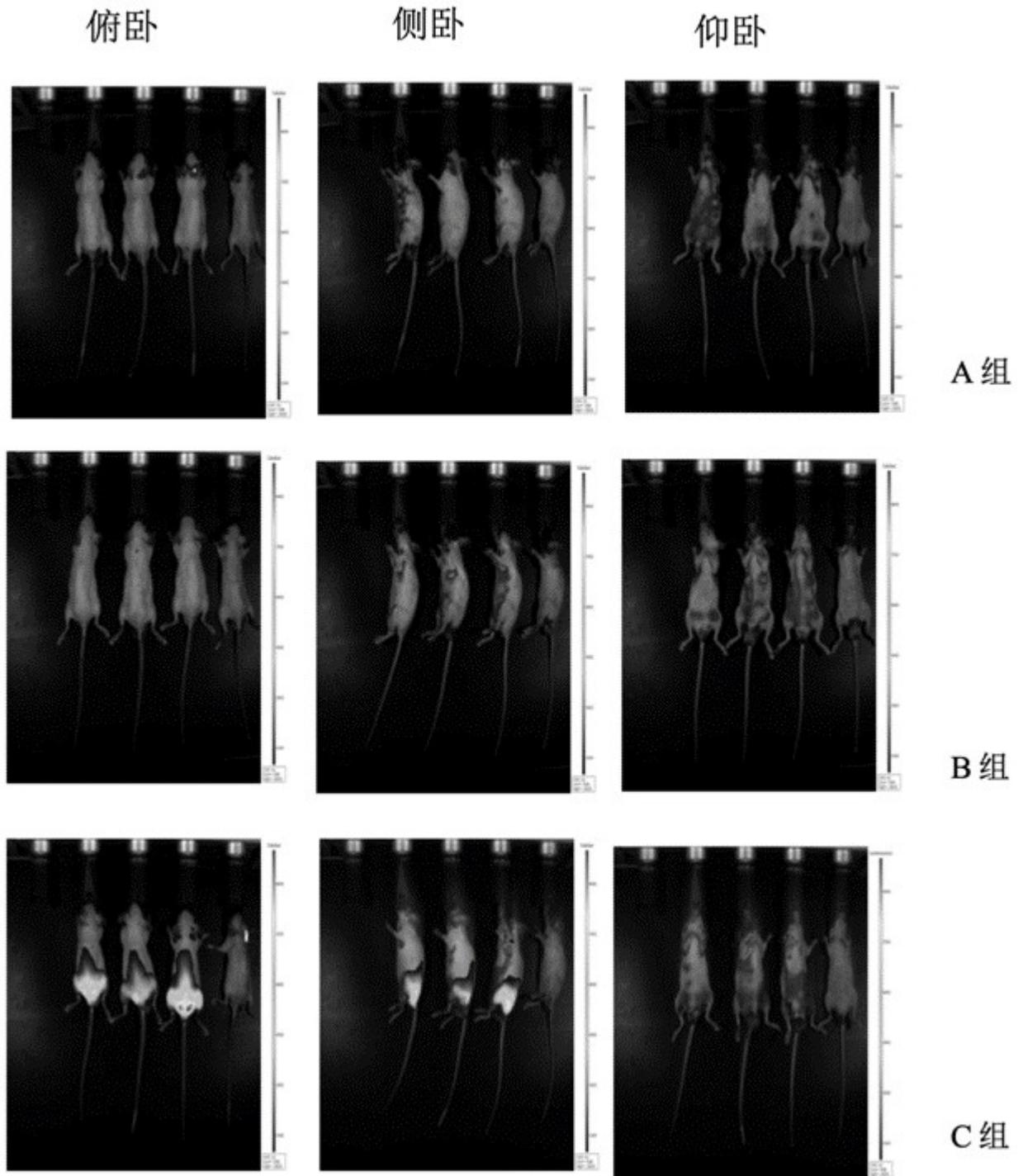
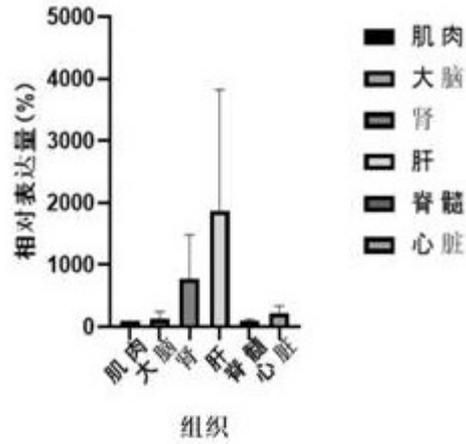
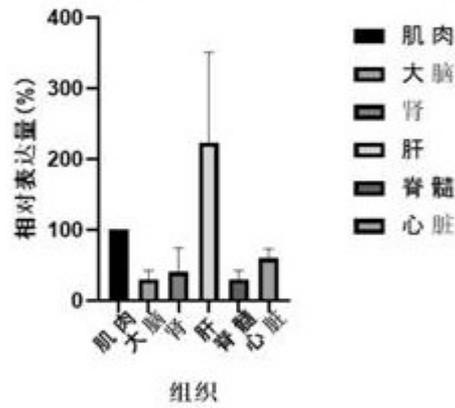


图1

A组qPCR测定肌肉特异性启动子组织特异性



B组qPCR测定肌肉特异性启动子组织特异性



C组qPCR测定肌肉特异性启动子组织特异性

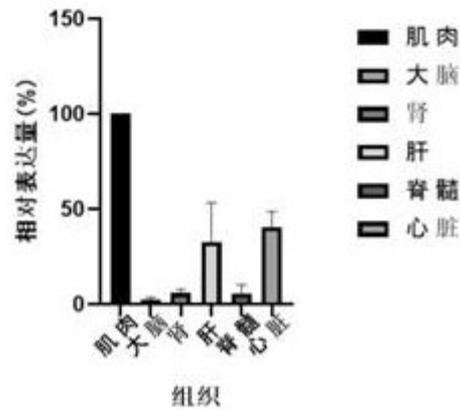


图2

qPCR测定不同组肌肉组织luciferase表达效率

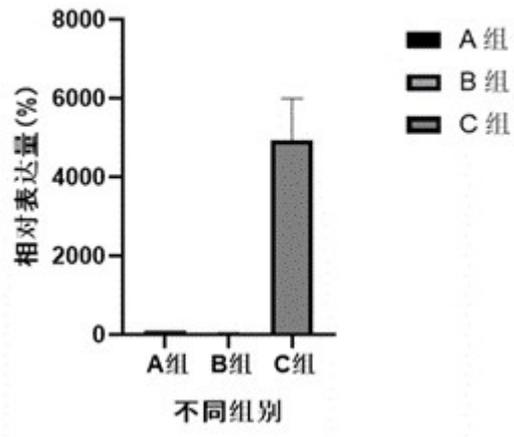


图3