



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118006607 A

(43) 申请公布日 2024.05.10

(21) 申请号 202410170569.6

C12N 15/53 (2006.01)

(22) 申请日 2018.09.21

C12N 15/35 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 5/10 (2006.01)

62/561,932 2017.09.22 US

C12N 7/01 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 48/00 (2006.01)

201880061583.5 2018.09.21

A61K 38/44 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(71) 申请人 马萨诸塞大学

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 C·米勒 R·H·小布朗

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理人 付文川

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

权利要求书2页 说明书31页

C12N 15/864 (2006.01)

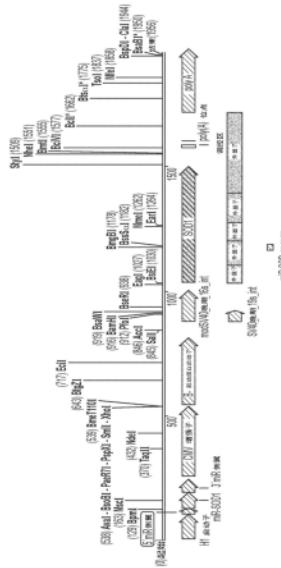
序列表 (电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

SOD1双表达载体及其用途

(57) 摘要

本公开涉及SOD1双表达载体及其用途,具体而言,在一些方面,本公开涉及用于抑制细胞(例如,受试者的细胞)中SOD1表达的组合物和方法。在一些实施方案中,本公开描述了经工程化以表达靶向内源SOD1的抑制性核酸和编码强化的SOD1蛋白的mRNA的分离的核酸。在一些实施方案中,本公开描述的组合物和方法可用于治疗受试者的肌萎缩性侧索硬化(ALS)。



1.一种分离的核酸,其包含:

(a) 编码一种或多种第一miRNA的第一区域,所述第一miRNA包含与受试者的内源mRNA具有足够的序列互补性以与所述内源mRNA杂交并抑制所述内源mRNA的表达的核酸,其中所述内源mRNA编码SOD1蛋白;以及

(b) 编码外源mRNA的第二区域,所述外源mRNA编码野生型SOD1蛋白,

其中所述一种或多种第一miRNA不包含具有充足序列互补性以与所述外源mRNA杂交并抑制所述外源mRNA表达的核酸。

2.根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述外源mRNA缺乏5'非翻译区(5'UTR),缺乏3'非翻译区(3'UTR),或缺乏5'UTR和3'UTR两者。

3.根据权利要求1或2所述的分离的核酸,其中编码SOD1蛋白的外源mRNA相对于内源mRNA具有一个或多个沉默碱基对突变,任选地,其中所述外源mRNA包含与内源mRNA至少95%同一的核酸序列。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的分离的核酸,其中野生型SOD1蛋白由包含SEQ ID NO:7(强化的SOD1)中所示序列的序列编码。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的分离的核酸,其中所述一种或多种第一miRNA靶向编码内源mRNA的核酸的非翻译区(例如5'UTR或3'UTR)。

6.根据权利要求1至4中任一项所述的分离的核酸,其中所述一种或多种第一miRNA靶向编码内源mRNA的核酸的编码序列。

7.根据权利要求6所述的分离的核酸,其中所述一种或多种第一miRNA与包含由SEQ ID NO:2所示序列编码的RNA的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个连续核苷酸的核酸杂交。

8.根据权利要求6或7所述的分离的核酸,其中所述一种或多种第一miRNA由包含SEQ ID NO:3和/或4中所示序列的序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个连续核苷酸编码。

9.根据权利要求8所述的分离的核酸,其中所述一种或多种第一miRNA还包含miR-155或miR-30的侧翼区。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的分离的核酸,其进一步包含第一启动子。

11.根据权利要求10所述的分离的核酸,其中所述第一启动子与所述第一区域有效地连接。

12.根据权利要求10或11所述的分离的核酸,其中所述第一启动子是RNA聚合酶III(poI III)启动子,任选地,其中所述poI III启动子是H1启动子或U6启动子。

13.根据权利要求10或11所述的分离的核酸,其中所述第一启动子是RNA聚合酶II(poI II)启动子,任选地,其中所述poI II启动子是鸡β肌动蛋白(CBA)启动子,或内源SOD1启动子(例如SEQ ID NO:16)。

14.根据权利要求10至13中任一项所述的分离的核酸,其进一步包含第二启动子,其中所述第二启动子有效地连接至所述第二区域。

15.根据权利要求14所述的分离的核酸,其中所述第二启动子是poI II启动子,任选地,其中所述poI II启动子是鸡β肌动蛋白(CBA)启动子,或内源SOD1启动子。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的分离的核酸,其还包含增强子序列,任选地,其

中所述增强子为巨细胞病毒(CMV)增强子。

17. 根据权利要求1至15中任一项所述的分离的核酸,其中所述第一区域定位在所述第二区域的非翻译区(例如,UTR)内。

18. 根据权利要求17所述的分离的核酸,其中所述第一区域位于分离的核酸的内含子内。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的分离的核酸,其中所述第一区域相对于所述第二区域位于5'。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的分离的核酸,其进一步包含至少一个腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)。

21. 根据权利要求20所述的分离的核酸,其包含全长ITR和突变ITR,其中所述ITR位于所述第一和第二区域的侧翼。

22. 一种重组腺相关病毒(rAAV),其包含:

(i) 根据权利要求1至21中任一项所述的分离的核酸;以及

(ii) AAV衣壳蛋白。

23. 根据权利要求22所述的rAAV,其中所述rAAV靶向CNS组织,任选地,其中所述rAAV靶向神经元。

24. 根据权利要求21或23所述的rAAV,其中所述衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白或AAVrh.10衣壳蛋白。

25. 一种组合物,其包含根据权利要求1至21中任一项所述的分离的核酸或根据权利要求22至24中任一项所述的rAAV,和药学上可接受的赋形剂。

26. 一种抑制细胞中SOD1表达的方法,所述方法包括向细胞递送根据权利要求1至21中任一项所述的分离的核酸或根据权利要求22至24中任一项所述的rAAV。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述细胞包含编码突变SOD1蛋白的核酸序列。

28. 一种治疗患有或疑似患有ALS的受试者的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至21中任一项所述的分离的核酸,或有效量的根据权利要求22至24中任一项所述的rAAV。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述受试者包含编码突变SOD1蛋白的核酸序列。

30. 根据权利要求28或29所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物受试者,任选地是人受试者。

SOD1双表达载体及其用途

[0001] 本申请是申请号为2018800615835,申请日为2018年9月21日,发明名称为“SOD1双表达载体及其用途”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求保护在35U.S.C 119(e)下2017年9月22日提交的、名称为“SOD1双表达载体及其用途”的美国临时申请序列号62/561,932的申请日的权益,其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0004] 肌萎缩性侧索硬化 (ALS) 是进行性的且通常致命的运动神经元疾病,有时与额颞痴呆 (FTD) 同时发生。ALS以散发 (SALS) 和家族 (FALS) 两种形式存在。约10%的病例作为常染色体显性性状传播。FDA批准的ALS治疗剂是利鲁唑,这是一种延长存活约10%的化合物。

[0005] 通常,证明SOD1沉默在ALS细胞和转基因动物中有益的研究并没有描述仅沉默突变的等位基因。相反,在大多数研究中,沉默降低了突变的毒性SOD1蛋白以及野生型SOD1蛋白两者的水平。然而,自突变的和野生型等位基因两者的SOD1的过度沉默可能涉及由于野生型SOD1蛋白的活性或功能降低而导致的不希望的生物学后果。

[0006] 发明概述

[0007] 本公开的方面涉及用于调节细胞中胞质Cu/Zn超氧化物歧化酶 (SOD1) 表达的组合物和方法。因此,在一些实施方案中,提供了用于治疗ALS的方法。在一些实施方案中,本公开提供了被工程化以抑制细胞或受试者中内源SOD1表达的合成核酸(例如,合成的 microRNA)。在一些实施方案中,本公开提供了经工程化以在细胞或受试者中表达外源SOD1的核酸。在一些实施方案中,这种外源SOD1对靶向内源SOD1的合成核酸(例如,合成的 microRNA)的靶向具有抗性。因此,在一些实施方案中,本公开提供了用于偶联以下各项的递送的组合物和方法:(1)合成的microRNA以沉默内源胞质Cu/Zn超氧化物歧化酶 (SOD1) 活性的表达,与(2)第二构建体以表达对所述合成的microRNA (miRNA) 有抗性的外源SOD1。

[0008] 本公开部分基于本文所述的组合物和方法,其通过串联包含SOD1的抗SOD1miRNA和cDNA,解决了由于SOD1歧化而失去神经保护活性的问题,其中所述cDNA是从工程化以对抗SOD1 miRNA具有抗性的RNA表达的。在一些实施方案中,本公开所述的构建体允许正常水平的SOD1歧化活性(例如,在已经施用所述构建体的细胞或受试者中),即使使WT和突变的内源SOD1等位基因都完全沉默。

[0009] 因此,在一些方面,本公开提供了分离的核酸,其包含:第一区域,其编码一种或多种第一miRNA,所述第一miRNA包含具有与受试者的内源mRNA足够序列互补以杂交并抑制内源mRNA的表达的核酸,其中所述内源mRNA编码SOD1蛋白;和第二区域,其编码编码野生型 SOD1蛋白的外源mRNA,其中一种或多种第一miRNA不包含具有足以杂交并抑制所述外源 mRNA表达的互补序列的核酸。

[0010] 在一些实施方案中,外源mRNA缺乏5'非翻译区 (5'UTR),缺乏3'非翻译区 (3'UTR),或缺乏5'UTR和3'UTR两者。

[0011] 在一些实施方案中,编码SOD1蛋白的外源mRNA相对于内源mRNA具有一个或多个沉默碱基对突变。在一些实施方案中,外源mRNA包含与内源mRNA至少95%同一的核酸序列。

[0012] 在一些实施方案中,野生型SOD1由SEQ ID NO:7(强化的SOD1序列)所示的核酸序列编码。

[0013] 在一些实施方案中,一种或多种第一miRNA靶向编码内源mRNA的核酸的非翻译区(例如5'UTR或3'UTR)。在一些实施方案中,一种或多种第一miRNA靶向编码内源mRNA的核酸的编码序列。

[0014] 在一些实施方案中,一种或多种第一miRNA与包含由SEQ ID NO:3所示序列编码的RNA的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个连续核苷酸的核酸杂交。在一些实施方案中,一种或多种第一miRNA与包含由SEQ ID NO:2所示序列编码的RNA的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个连续核苷酸的核酸杂交。

[0015] 在一些实施方案中,一种或多种第一miRNA包含SEQ ID NO:4所示序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个连续核苷酸或由其编码。在一些实施方案中,一种或多种第一miRNA包含SEQ ID NO:3所示序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个连续核苷酸或由其编码。在一些实施方案中,miRNA还包含miR-155的侧翼区或miR-30的侧翼区。

[0016] 在一些实施方案中,分离的核酸还包含第一启动子。在一些实施方案中,第一启动子有效地连接至如本公开所述的分离的核酸的第一区域。

[0017] 在一些实施方案中,第一启动子是RNA聚合酶III(pol III)启动子,例如H1启动子或U6启动子。

[0018] 在一些实施方案中,第一启动子是RNA聚合酶II(pol II)启动子,例如鸡β肌动蛋白(CBA)启动子,或内源SOD1启动子(例如SEQ ID NO:16)。

[0019] 在一些实施方案中,分离的核酸还包含第二启动子。在一些实施方案中,第二启动子有效地连接至如本公开所述的分离的核酸的第二区域。

[0020] 在一些实施方案中,第二启动子是pol II启动子,例如鸡β肌动蛋白(CBA)启动子,或内源SOD1启动子。

[0021] 在一些实施方案中,分离的核酸还包含增强子序列,例如巨细胞病毒(CMV)增强子。

[0022] 在一些实施例中,第一区域定位于第二区域的非翻译区(例如,UTR)内。在一些实施方案中,第一区域位于分离的核酸的内含子内。在一些实施方案中,第一区域相对于第二区域位于5'。

[0023] 在一些实施方案中,分离的核酸还包含至少一个腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方案中,分离的核酸包含全长ITR和突变体ITR。在一些实施方案中,ITR位于本公开所述的分离的核酸的第一和第二区域的侧翼。

[0024] 在一些实施方式中,本发明提供了一种重组腺相关病毒(rAAV),其包含本公开所述的分离的核酸和AAV衣壳蛋白。

[0025] 在一些实施方案中,rAAV靶向CNS组织。在一些实施方案中,rAAV靶向神经元。

[0026] 在一些实施方案中,衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白或AAVrh.10衣壳蛋白。

[0027] 在一些方面,本公开提供了包含如本公开所述的分离的核酸或如本公开所述的

rAAV, 和药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0028] 在一些方面, 本公开提供了用于抑制细胞中SOD1表达的方法, 所述方法包括向细胞递送如本公开所述的分离的核酸或如本公开所述的rAAV。

[0029] 在一些实施方案中, 细胞包含编码突变SOD1蛋白的核酸序列。

[0030] 在一些方面, 本公开提供了用于治疗患有或疑似患有ALS的受试者的方法, 所述方法包括向受试者施用有效量的如本公开所述的分离的核酸, 或有效量的如本公开所述的rAAV。

[0031] 在一些实施方案中, 受试者包含编码突变SOD1蛋白的核酸序列。在一些实施方案中, 受试者是哺乳动物受试者, 例如人受试者。

[0032] 附图简要说明

[0033] 图1显示双顺反子双功能载体的构建体设计的示意图。抗Sod1 miRNA通过H1启动子表达, 并且miRNA抗性SOD1 cDNA通过鸡β肌动蛋白启动子和CMV增强子(例如CAG启动子)表达。

[0034] 图2显示了用于单启动子双功能载体的构建体设计的示意图。抗Sod1 miRNA和miRNA抗性SOD1 cDNA都通过鸡β肌动蛋白启动子和CMV增强子(例如CAG启动子)表达。抗Sod1 miR位于内含子中。

[0035] 图3显示双顺反子双功能载体的构建体设计的示意图。抗Sod1 miRNA通过H1启动子表达, 并且miRNA抗性SOD1 cDNA通过鸡β肌动蛋白启动子和CMV增强子(例如CAG启动子)表达。显示了相对于野生型SOD1含有沉默突变的SOD1 cDNA的基因座("miR-SOD抗性靶")。

[0036] 图4显示了单启动子双功能载体的构建体设计的示意图。抗Sod1 miRNA和miRNA抗性SOD1 cDNA都通过鸡β肌动蛋白启动子和CMV增强子(例如CAG启动子)表达。显示了相对于野生型SOD1含有沉默突变的SOD1 cDNA的基因座("miR-SOD抗性靶")。抗Sod1 miR位于内含子中。

[0037] 图5显示双顺反子双功能自互补AAV载体的构建体设计的示意图。抗Sod1 miRNA通过H1启动子表达, 并且miRNA抗性SOD1 cDNA通过鸡β肌动蛋白启动子和CMV增强子(例如CAG启动子)表达。显示了相对于野生型SOD1含有沉默突变的SOD1 cDNA的基因座("miR-SOD抗性靶")。突变AAV反向末端重复序列(UTR)存在于构建体的5'末端, 全长AAV ITR位于3'末端。

[0038] 图6显示双顺反子双功能自互补AAV载体的构建体设计的示意图。抗Sod1 miRNA通过H1启动子表达, 并且miRNA抗性SOD1 cDNA通过鸡β肌动蛋白启动子和CMV增强子(例如CAG启动子)表达。显示了相对于野生型SOD1含有沉默突变的SOD1 cDNA的基因座("miR-SOD抗性靶")。SOD1表达构建体缺少3'UTR。突变AAV反向末端重复序列(UTR)存在于构建体的5'末端, 全长AAV ITR位于3'末端。

[0039] 图7显示了单启动子双功能AAV载体的构建体设计的示意图。抗Sod1 miRNA和miRNA抗性SOD1 cDNA都通过鸡β肌动蛋白启动子和CMV增强子(例如CAG启动子)表达。显示了相对于野生型SOD1含有沉默突变的SOD1 cDNA的基因座("miR-SOD抗性靶")。抗Sod1 miR位于内含子中。AAV ITR位于构建体的5'和3'末端。

[0040] 图8显示了单启动子双功能AAV载体的构建体设计的示意图。抗Sod1 miRNA和miRNA抗性SOD1 cDNA都通过鸡β肌动蛋白启动子和CMV增强子(例如CAG启动子)表达。显示了相对于野生型SOD1含有沉默突变的SOD1 cDNA的基因座("miR-SOD抗性靶")。SOD1表达构

建体缺少3'UTR。抗Sod1 miR位于内含子中。AAV ITR位于构建体的5'和3'末端。

[0041] 图9显示了野生型SOD1编码序列 (SEQ ID NO:1) 与“强化的”SOD1编码序列的一个实例 (SEQ ID NO:7) 的核酸序列比对。

[0042] 发明详述

[0043] 在一些方面,本公开涉及用于调节细胞(例如,受试者的细胞)中与肌萎缩性侧索硬化(ALS)相关的基因的表达和/或活性的组合物和方法。例如,在一些方面,本公开提供了在细胞或受试者中同时表达以下项的组合物(例如,双功能载体):(i)抑制与ALS相关的基因的一种或多种合成的核酸(例如,抑制性RNA,诸如miRNA、siRNA、shRNA等)和(ii)编码对合成的核酸具有抗性的蛋白的与ALS相关的外源基因。与ALS相关的基因的实例包括但不限于C9orf72、SOD1、FUS、TARDBP、SQSTM1、VCP、OPTN、PFN1、UBQLN2、DCTN1、ALS2、CHMP2B、FIG4、HNRNAP1、ATXN2、ANG、SPG11、VAPB、NEFH、CHCHD10、ERBB4、PRPH、MATR3、SETX、SIGMAR1、TBK1、TRPM7、TUBA4A、ANXA11、NEK1、SARM1、UN13A、MOBP、SCFD1 FD、C210rf2,以及例如Renton等人(2014)Nature Neuroscience 17 (1):17-23描述的其它基因。在一些实施方案中,与ALS相关的基因是与ALS相关的负显性基因(例如,编码与ALS相关的负显性基因产物如蛋白的基因)。

[0044] 本公开的方面涉及用于调节细胞中胞质Cu/Zn超氧化物歧化酶(SOD1)表达的组合物和方法。因此,在一些实施方案中,提供了用于治疗ALS的方法。在一些实施方案中,本公开提供了被工程化以抑制细胞或受试者中内源SOD1表达的合成的核酸(例如,合成的microRNA)。在一些实施方案中,本公开提供了经工程化以在细胞或受试者中表达外源SOD1的核酸。在一些实施方案中,这种外源SOD1对靶向内源SOD1的合成的核酸(例如,合成的microRNA)的靶向具有抗性。

[0045] 本公开的方面涉及使用重组腺相关病毒(rAAV)载体治疗ALS的改进的基因治疗组合物和相关方法。特别地,提供了含有核酸的rAAV,所述核酸被工程化以表达沉默与ALS相关的基因如SOD1的抑制性核酸。在一些实施方案中,本公开利用重组AAV(例如rAAV9、rAAV Rh10等)以将microRNA递送至CNS,从而沉默ALS基因,例如SOD1。在一些方面,本公开涉及发现能够在受试者中敲低内源性SOD1表达(例如,野生型SOD1和突变SOD1表达)同时表达野生型SOD1的双功能载体。因此,在一些实施方案中,本公开描述的构建体允许正常水平的SOD1歧化活性(例如,在已经施用所述构建体的细胞或受试者中),即使使WT和突变内源SOD1等位基因完全沉默。

[0046] 在一些方面,本公开提供了分离的核酸,其包含:第一区域,其编码一种或多种第一miRNA,所述第一miRNA包含具有与受试者的内源mRNA足够序列互补以杂交并抑制所述内源mRNA的表达的核酸,其中所述内源mRNA编码SOD1蛋白;和第二区域,其是编码野生型SOD1蛋白的外源mRNA的编码区域,其中所述一种或多种第一miRNA不包含具有足以杂交并抑制所述外源mRNA表达的互补序列的核酸。

[0047] SOD1

[0048] 如本文所用,“SOD1”是指超氧化物歧化酶(SOD1),其是在人体中由SOD1基因编码的酶。通常,SOD1的功能是催化超氧化物歧化为过氧化氢和双氧,并除去体内的自由基。“野生型SOD1”是指由SOD1基因编码的基因产物(例如蛋白),其不会在细胞或受试者中引起毒性功能的获得(例如不会或不会导致ALS的发生)。在一些实施方案中,野生型SOD1基因编码

具有NCBI登录号NM_000454.4中所示序列的mRNA转录物(例如成熟mRNA转录物)。

[0049] “突变SOD1”是指包含一个或多个突变(例如错义突变、无义突变、移码突变、插入、缺失等)的基因产物(例如蛋白),所述突变导致基因产物(例如蛋白)具有改变的功能,例如毒性功能获得。通常,相对于编码野生型SOD1基因产物的核酸,编码突变SOD1基因产物的核酸不包含任何沉默突变。

[0050] 位于21号染色体上编码超氧化物歧化酶(SOD1)的基因中的突变与家族性肌萎缩侧索硬化有关。超氧化物歧化酶(SOD1)是由SOD1基因编码的酶。SOD1结合铜和锌离子,是三种负责破坏体内超氧化物自由基的超氧化物歧化酶之一。编码的同工酶是一种可溶性细胞质和线粒体膜间空间蛋白,作为同型二聚体将天然存在但有害的超氧自由基转化为分子氧和过氧化氢。发生并引起ALS的SOD1频繁突变包括A4V、H46R和G93A。另外的SOD1突变例如由Banci等(2008)PLoS ONE 3(2):e1677描述。

[0051] 本公开部分基于以下发现,即以非等位基因特异性方式同时抑制内源SOD1表达(例如,沉默内源野生型和内源突变SOD1)并且表达外源SOD1蛋白(例如,表达外源野生型SOD1或外源强化的SOD1蛋白)的核酸构建体允许正常水平的SOD1歧化活性,即使在WT和突变内源SOD1等位基因都完全沉默的情况下。如本文所用,“内源”是指由细胞的天然DNA编码的基因(例如,SOD1基因)或基因产物(例如,SOD1蛋白)。“外源”是指源自除细胞天然DNA之外的来源(例如,非天然地导入细胞中的)的基因(例如,编码SOD1蛋白的核酸,如SOD1 cDNA)或基因产物(例如,SOD1蛋白,如强化的SOD1蛋白)。

[0052] 在一些实施方案中,外源SOD1核酸序列编码强化的SOD1蛋白。如本文所用,“强化的SOD1”是指编码SOD1蛋白的核酸序列,所述核酸序列包含一个或多个沉默突变,从而使得其编码与内源野生型SOD1蛋白相同的蛋白,但是具有不同的一级核酸(例如DNA)序列。不希望受任何特定理论的束缚,“强化的SOD1”mRNA转录物不受某些靶向内源SOD1 RNA转录物(例如,野生型SOD1和突变SOD1转录物)的抑制性RNA(例如,miRNA)的抑制。

[0053] 强化的SOD1核酸序列中的沉默突变的数目可以变化。在一些实施方案中,编码强化的SOD1的核酸序列相对于野生型SOD1核酸序列(例如SEQ ID NO:1;SOD1编码序列)包含大约1至大约50个(例如包括端值在内的1至50之间的任何整数)沉默突变。在一些实施方案中,编码强化的SOD1的核酸序列相对于野生型SOD1核酸序列(例如SEQ ID NO:1;SOD1编码序列)包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个或至少15个沉默突变。在一些实施方案中,编码强化的SOD1的核酸序列的一个或多个沉默突变位于被抑制性核酸靶向的种子区域中。在一些实施方案中,种子区域的长度范围为约3至约25个连续核苷酸(例如,3至25之间的任何整数,包括端值)。

[0054] 编码外源(例如强化的)SOD1蛋白与内源野生型SOD1蛋白的核酸之间的核酸(例如DNA)序列同一性可以变化。在一些实施方案中,编码外源SOD1蛋白的核酸序列与内源野生型SOD1核酸序列(例如SEQ ID NO:1;SOD1 DNA编码序列)具有大约99.9%到大约85%的同一性。在一些实施方案中,编码外源SOD1蛋白的核酸序列与内源野生型SOD1核酸序列(例如SEQ ID NO:1;SOD1 DNA编码序列)具有大约99.9%、大约99%、大约98%、大约97%、大约96%、大约95%、大约94%、大约93%、大约92%、大约91%、大约90%、大约89%、大约88%、大约87%、大约86%或大约85%的同一性。在一些实施方案中,核酸序列编码的外源SOD1蛋

与内源野生型SOD1氨基酸序列(例如SEQ ID NO:17)具有大约99.9%至大约90%(例如大约99.9%、大约99%、大约98%、大约97%、大约96%、大约95%、大约94%、大约93%、大约92%、大约91%或大约90%)同一的氨基酸序列。

[0055] 抑制性核酸

[0056] 本公开的方面涉及靶向SOD1(例如,内源SOD1)的抑制性核酸。在一些实施方案中,抑制性核酸是与靶核酸例如RNA、前mRNA、mRNA的至少一部分杂交并抑制其功能或表达的核酸。在一些实施方案中,抑制性核酸是单链或双链的。在一些实施方案中,抑制性核酸包含如SEQ ID NO:4:CTGCATGGATTCCATGTTCAT所示的序列或由其编码(miR-SOD-127)。在一些实施方案中,抑制性核酸包含如SEQ ID NO:3:CTGCATGGATTCCATGTTCAT所示的序列或由其编码(miR-SOD-127)。在一些实施方案中,抑制性核酸是包含SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的成熟miRNA。在一些实施方案中,SEQ ID NO:3是成熟miRNA的引导链,并且SEQ ID NO:4是成熟miRNA的过客链(例如,miRNA*)。

[0057] 在一些实施方案中,抑制性核酸的长度为5至30个碱基(例如,10-30、15-25、19-22)。抑制性核酸还可以是10-50或5-50个碱基长度。例如,抑制性核酸可以是长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个碱基中的任何一个。在一些实施方案中,抑制性核酸包含以下碱基序列或由其组成:与靶核酸的例如至少5、10、15、20、25或30个碱基,或至多30或40个碱基至少80%或90%互补的碱基序列;或者包含在靶核酸的10、15、20、25或30个碱基上具有至多6个错配的碱基序列。

[0058] 在一些实施方案中,本文提供的序列中的任何一个或多个胸腺嘧啶(T)核苷酸或尿嘧啶(U)核苷酸可以用适于与腺嘌呤核苷酸碱基配对(例如,通过沃森-克里克碱基对)的任何其它核苷酸替换。例如,T可以用U代替,U可以用T代替。在一些实施方案中,提供抑制中枢神经系统细胞中基因表达的抑制性核酸。在一些实施方案中,细胞是神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞。

[0059] 在一些实施方案中,抑制性核酸是miRNA。“microRNA”或“miRNA”是能够介导转录或翻译后基因沉默的非编码小RNA分子。通常,miRNA转录为发夹或茎环(例如,具有自身互补性、单链骨架)双链体结构,称为初级miRNA(pri-miRNA),其被酶促加工(例如,通过Drosha、DGCR8、Pasha等)为pre-miRNA.pri-miRNA的长度可以变化。在一些实施方案中,pri-miRNA的长度范围为约100至约5000个碱基对(例如,约100、约200、约500、约1000、约1200、约1500、约1800或约2000个碱基对)。在一些实施方案中,pri-miRNA的长度大于200个碱基对(例如,长度为2500、5000、7000、9000或更多碱基对)。

[0060] Pre-miRNA的特征还在于发夹或茎环双链体结构,其长度也可以不同。在一些实施方案中,pre-miRNA的大小范围为长度约40个碱基对至约500个碱基对。在一些实施方案中,pre-miRNA的大小范围为长度约50至100个碱基对。在一些实施方案中,pre-miRNA的大小范围为长度约50至约90个碱基对(例如,长度约50、约52、约54、约56、约58、约60、约62、约64、约66、约68、约70、约72、约74、约76、约78、约80、约82、约84、约86、约88或约90个碱基对)。

[0061] 通常,将pre-miRNA输出到细胞质中,并通过Dicer进行酶处理,以首先产生不完美的miRNA/miRNA*双链体,然后产生单链成熟miRNA分子,其随后被加载到RNA诱导的沉默复合物(RISC)中。通常,成熟miRNA分子的大小范围为长度约19至约30个碱基对。在一些实施

方案中,成熟miRNA分子的长度为约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29或30个碱基对。在一些实施方案中,本公开的分离的核酸包含编码pri-miRNA、pre-miRNA或成熟miRNA的序列,所述序列包含SEQ ID NO:4(miR-SOD-127)和/或SEQ ID NO:3中所示的序列或由其编码。

[0062] 在一些方面,本公开提供了编码一种或多种人工miRNA的分离的核酸和载体(例如rAAV载体)。如本文所用,“人工miRNA”或“amiRNA”是指内源pri-miRNA或pre-miRNA(例如,miRNA骨架,其是能够产生功能性成熟miRNA的前体miRNA),其中miRNA和miRNA*(例如,miRNA双链体的过客链)序列已被相应的amiRNA/amiRNA*序列替代,所述amiRNA/amiRNA*序列引导靶基因的高效RNA沉默,例如,如Eamens等(2014),Methods Mol.Biol.1062:211-224所述。例如,在一些实施方案中,人工miRNA包含miR-155pri-miRNA骨架,其中已插入编码成熟SOD1-特异性miRNA的序列(例如,SEQ ID NO:3和/或4;miR-SOD-127)以代替内源miR-155成熟miRNA编码序列。在一些实施方案中,本公开所述的miRNA(例如,人工miRNA)包含miR-155骨架序列、miR-30骨架序列、miR-64骨架序列、miR-106骨架、miR-21骨架、miR-1骨架、miR-451骨架、miR-126骨架或miR-122骨架序列。在一些实施方案中,抑制性核酸是包含具有miR-155或miR-30的侧翼区的靶向序列的microRNA。

[0063] 应当理解,在一些实施方案中,分离的核酸或载体(例如rAAV载体)包含编码一种以上(例如多种,例如2、3、4、5、10种或更多种)miRNA的核酸序列。在一些实施方案中,所述多于一种miRNA中的每一种均靶向(例如,特异性杂交或结合)相同靶基因(例如,编码三种独特miRNA的分离的核酸,其中每种miRNA均靶向SOD1基因)。在一些实施方案中,所述多于一种miRNA中的每一种靶向(例如,特异性杂交或结合)不同的靶基因。

[0064] 分离的核酸

[0065] 在一些方面,本公开涉及分离的核酸,其包含编码用于抑制内源SOD1表达的合成microRNA的第一表达构建体和表达对合成microRNA(miRNA)有抗性的外源SOD1的第二表达构建体。

[0066] “核酸”序列指DNA或RNA序列。在一些实施方案中,本公开的蛋白和核酸是分离的。如本文所用,术语“分离的”是指人工产生的。如本文所用的关于核酸的术语“分离的”是指:(i)体外扩增的,通过例如聚合酶链式反应(PCR);(ii)通过克隆重组产生;(iii)纯化的,如通过裂解和凝胶分离;或(iv)合成的,通过例如化学合成。分离的核酸是一种易于通过本领域熟知的重组DNA技术操作的核酸。因此,认为包含在载体中的核苷酸序列是分离的,其中的5'和3'限制性位点是已知的,或者对于该序列已经公开了聚合酶链式反应(PCR)引物序列,但是在其天然宿主中以其天然状态存在的核酸序列不是分离的。分离的核酸可以是基本上纯化的,但不是必需的。例如,在克隆或表达载体中分离的核酸不是纯的,因为它可能仅占其所驻留细胞中物质的极小百分比。然而,在该术语用于本文中时,这样的核酸是分离的,因为它容易通过本领域普通技术人员已知的标准技术来操作。如本文所用的关于蛋白或肽的术语“分离的”指从其天然环境中分离或人工生产(例如,通过化学合成、通过重组DNA技术等)的蛋白或肽。

[0067] 本公开的分离的核酸通常包含编码一种或多种靶向受试者的内源mRNA(例如,编码内源野生型SOD1和/或内源突变SOD1的mRNA)的抑制性RNA的一个或多个区域。分离的核酸通常还包含编码一种或多种外源mRNA的一个或多个区域。由一种或多种外源mRNA编码的

蛋白在序列组成上可以与由一种或多种内源mRNA编码的蛋白不同，也可以没有区别。例如，一种或多种内源mRNA可以编码特定蛋白的野生型和突变型，例如可以是受试者对于特定突变是杂合的情况，并且外源mRNA可以编码相同特定蛋白的野生型mRNA。在这种情况下，通常编码野生型蛋白的外源mRNA和内源mRNA的序列的区别足以使得该外源mRNA不被一种或多种抑制性RNA靶向。这可以通过例如将一个或多个沉默突变引入外源mRNA中，使其编码与内源mRNA相同的蛋白，但具有不同的核酸序列来实现。在这种情况下，外源mRNA可以被称为“强化的”。或者，抑制性RNA（例如miRNA）可以靶向内源mRNA的5'和/或3'非翻译区。然后，可以在外源mRNA中去除或替换这些5'和/或3'区，使得所述外源mRNA不被一种或多种抑制性RNA靶向。

[0068] 在另一个实例中，一种或多种内源mRNA可以仅编码特定蛋白的突变体形式，例如可以是受试者对于特定突变是纯合的情况，并且外源mRNA可以编码相同特定蛋白的野生型mRNA。在这种情况下，外源mRNA的序列可以如上所述被强化，或者一种或多种抑制性RNA可以被设计为将突变的内源mRNA与外源mRNA区分开。

[0069] 在一些实施方案中，分离的核酸通常包含编码一种或多种第一抑制性RNA（例如，miRNA）的第一区域，所述第一抑制性RNA包含具有与受试者的内源mRNA足够的序列互补的序列以与该内源mRNA（例如，内源SOD1 mRNA）杂交并抑制其表达的核酸。分离的核酸通常还包括编码外源mRNA（例如，外源SOD1）的第二区域，其中由外源mRNA编码的蛋白具有与第一蛋白至少95%相同的氨基酸序列，其中一种或多种第一抑制性RNA不包含具有足够的序列互补性以与外源mRNA杂交并抑制其表达的核酸。例如，第一区域可以位于任何合适的位置。第一区域可以位于第二区域的非翻译部分内。第一区域可以位于核酸的任何非翻译区，包括例如内含子、5'或3'非翻译区等。

[0070] 包含抑制性核酸的区域（例如，第一区域）可以位于分离的核酸的任何合适的位置。该区域可以位于核酸的任何非翻译区，包括例如内含子、5'或3'非翻译区等。

[0071] 在一些情况下，可能需要将所述区域（例如，第一区域）定位在编码蛋白的核酸序列的第一密码子上游（例如，编码外源SOD1蛋白编码序列的第二区域）。例如，该区域可以位于蛋白编码序列的第一密码子和第一密码子上游2000个核苷酸之间。该区域可以位于蛋白编码序列的第一密码子和第一密码子上游1000个核苷酸之间。该区域可以位于蛋白编码序列的第一密码子和第一密码子上游500个核苷酸之间。该区域可以位于蛋白编码序列的第一密码子和第一密码子上游250个核苷酸之间。该区域可以位于蛋白编码序列的第一密码子和第一密码子上游150个核苷酸之间。

[0072] 在某些情况下，可能需要将所述区域（例如，编码抑制性核酸的区域，如第一区域）定位在编码外源SOD1蛋白的区域的聚腺苷酸尾的上游。例如，该区域可位于聚腺苷酸尾的第一个碱基和第一个碱基上游2000个核苷酸之间。该区域可以位于聚腺苷酸尾的第一个碱基和第一个碱基上游1000个核苷酸之间。该区域可以位于聚腺苷酸尾的第一个碱基和第一个碱基上游500个核苷酸之间。该区域可以位于聚腺苷酸尾的第一个碱基和第一个碱基上游250个核苷酸之间。该区域可以位于聚腺苷酸尾的第一个碱基和第一个碱基上游150个核苷酸之间。所述区域可以位于聚腺苷酸尾的第一个碱基和第一个碱基上游100个核苷酸之间。该区域可位于聚腺苷酸尾的第一个碱基和第一个碱基上游50个核苷酸之间。所述区域可以位于聚腺苷酸尾的第一个碱基和第一个碱基上游20个核苷酸之间。在一些实施方案

中,所述区域位于启动子序列的最后一个核苷酸碱基和聚腺苷酸尾序列的第一个核苷酸碱基之间。

[0073] 在一些情况下,编码抑制性核酸的区域(例如,第一区域)可以位于编码外源SOD1蛋白的区域的聚腺苷酸尾的最后一个碱基的下游。该区域可以在聚腺苷酸尾的最后一个碱基和最后一个碱基下游2000个核苷酸的位置之间。该区域可以在聚腺苷酸尾的最后一个碱基和最后一个碱基下游1000个核苷酸的位置之间。该区域可以在聚腺苷酸尾的最后一个碱基和最后一个碱基下游500个核苷酸的位置之间。该区域可以在聚腺苷酸尾的最后一个碱基和最后一个碱基下游250个核苷酸的位置之间。该区域可以在聚腺苷酸尾的最后一个碱基和最后一个碱基下游150个核苷酸的位置之间。

[0074] 应当理解,在分离的核酸编码多于一种miRNA的情况下,每种miRNA可定位在构建体中的任何合适的位置。例如,编码第一miRNA的核酸可以位于编码外源SOD1蛋白的区域的内含子中,编码第二miRNA的核酸序列可以位于另一区域(例如,在蛋白编码序列的最后一个密码子和转基因的聚腺苷酸尾的第一个碱基之间)。

[0075] 在一些实施方案中,分离的核酸还包含编码一个或多个表达控制序列(例如,启动子等)的核酸序列。表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号,例如剪接和多聚腺苷酸化(polyA)信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白稳定性的序列;以及当需要时,增强编码产物分泌的序列。大量表达控制序列,包括天然的、组成型的、诱导型的和/或组织特异性的启动子,是本领域已知的并且可以利用。

[0076] “启动子”是指启动基因的特异性转录所需的、被细胞的合成机制或导入的合成机制识别的DNA序列。短语“有效地定位”、“在控制下”或“在转录控制下”是指启动子相对于核酸处于正确的位置和方向以控制RNA聚合酶的起始和基因的表达。

[0077] 对于编码蛋白的核酸,通常在转基因序列之后和3' AAV ITR序列之前插入聚腺苷酸化序列。可用于本公开的rAAV构建体也可含有内含子,其理想地位于启动子/增强子序列和转基因之间。一种可能的内含子序列衍生自SV-40,称为SV-40T内含子序列。可以使用的另一种载体元件是内部核糖体进入位点(IRES)。IRES序列被用于从单个基因转录物产生多种多肽。IRES序列将用于产生含有多条多肽链的蛋白。这些和其它常见的载体元件的选择是常规的,并且可获得许多这样的序列[参见,例如Sambrook等人,以及其在例如第3.18 3.26和16.17 16.27页引用的文献,和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,1989]。在一些实施方案中,口蹄疫病毒2A序列包括在多蛋白中;这是一种小肽(长度约18个氨基酸),已显示它介导多蛋白的裂解(Ryan,M D等人,EMBO,1994;4:928-933;Mattion,N M等人,J Virology,1996年11月;p.8124-8127;Furler,S等人,Gene Therapy,2001;8:864-873;和Halpin,C等人,The Plant Journal,1999;4:453-459)。2A序列的切割活性以前已在包括质粒和基因治疗载体(AAV和逆转录病毒)的人工系统中得到证实(Ryan,M D等人,EMBO,1994;4:928-933;Mattion,N M等人,J Virology,1996年11月;p.8124-8127;Furler,S等人,Gene Therapy,2001;8:864-873;和Halpin,C等人,The Plant Journal,1999;4:453-459;de Felipe,P等人,Gene Therapy,1999;6:198-208;de Felipe,P等人,Human Gene Therapy,2000;11:1921-1931.;和Klump,H等人,Gene Therapy,2001;8:811-817)。

[0078] 组成型启动子的例子包括但不限于逆转录病毒劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地与RSV增强子一起)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地与CMV增强子一起)[参见,例如Boshart等,Cell,41:521-530(1985)]、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 β -肌动蛋白启动子(例如CBA启动子)、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF1 α 启动子[Invitrogen]。在一些实施方案中,启动子是增强的鸡 β -肌动蛋白启动子(CAG启动子)。在一些实施方案中,启动子是H1启动子或U6启动子。

[0079] 诱导型启动子允许调节基因表达,并且可以通过外源提供的化合物、环境因素如温度或特定生理状态的存在来调节,所述生理状态例如急性期、细胞的特定分化状态或仅在复制细胞中。诱导型启动子和诱导型系统可从多种商业来源获得,包括但不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。许多其它系统已经有描述并且可以由本领域技术人员容易地选择。由外源提供的启动子调节的诱导型启动子的实例包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)-诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO98/10088);蜕皮激素昆虫启动子(No等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,93:3346-3351(1996)),四环素抑制系统(Gossen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551(1992)),四环素诱导系统(Gossen等人,Science,268:1766-1769(1995),也参见Harvey等人,Curr.Opin.Chem.Biol.,2:512-518(1998)),RU486-诱导系统(Wang等人,Nat.Biotech.,15:239-243(1997)和Wang等人,Gene Ther.,4:432-441(1997))和雷帕霉素诱导系统(Magari等人,J.Clin.Invest.,100:2865-2872(1997))。可用于本发明的其它类型的诱导型启动子是那些受特定生理状态调节的启动子,例如温度、急性期、细胞的特定分化状态或仅在复制细胞中。

[0080] 在另一个实施方案中,将使用SOD1的天然启动子(例如SEQ ID NO:16)。当希望转基因的表达应模拟天然表达时,天然启动子可以是优选的。当转基因的表达必须在时间上或发育上、或以组织特异性方式、或响应于特异性转录刺激而调节时,可以使用天然启动子。在另一个实施方案中,其它天然表达控制元件,例如增强子元件、聚腺苷酸化位点或Kozak共有序列也可用于模拟天然表达。

[0081] 在一些实施方案中,调节序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况下,组织特异性调控序列结合以组织特异性方式诱导转录的组织特异性转录因子。这样的组织特异性调控序列(例如,启动子、增强子等)是本领域众所周知的。示例性的组织特异性调控序列包括但不限于以下组织特异性启动子:肝特异性甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子、胰岛素启动子、胰高血糖素启动子、生长抑素启动子、胰多肽(PPY)启动子、突触蛋白-1(syn)启动子、肌酸激酶(MCK)启动子、哺乳动物结蛋白(DES)启动子、 α -肌球蛋白重链(a-MHC)启动子或心肌肌钙蛋白T(cTnT)启动子。其它示例性启动子包括 β -肌动蛋白启动子;乙型肝炎病毒核心启动子,Sandig等人,Gene Ther.,3:1002-9(1996);甲胎蛋白(AFP)启动子,Arbuthnot等人,Hum.Gene Ther.,7:1503-14(1996));骨骨钙蛋白启动子(Stein等人,Mol.Biol.Rep.,24:185-96(1997));骨唾液蛋白启动子(Chen等人,J.Bone Miner.Res.,11:654-64(1996));CD2启动子((Hansal等人,J.Immunol.,161:1063-8(1998);免疫球蛋白重链启动子;T细胞受体 α 链启动子;神经元如神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen等人,Cell.Mol.Neurobiol.,13:503-15(1993));神经丝轻链基因启动子(Piccioli等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:5611-5(1991));和神经元特异性vgf基因启

动子(Piccioli等人,Neuron,15:373-84(1995)),等等,这些启动子对于本领域技术人员是显而易见的。

[0082] 本公开的方面涉及包含多于一个启动子(例如,2、3、4、5或更多个启动子)的分离的核酸。例如,在具有包含编码抑制性RNA(例如miRNA)的第一区域和编码外源SOD1蛋白的第二区域的转基因的构建体中,可能需要使用第一启动子序列(例如第一启动子序列与抑制性核酸编码区有效地连接)来驱动抑制性RNA编码区的表达,并用第二启动子序列(例如第二启动子序列与外源SOD1编码区有效地连接)来驱动外源SOD1编码区的表达。通常,第一启动子序列和第二启动子序列可以是相同的启动子序列或不同的启动子序列。在一些实施方案中,第一启动子序列(例如,驱动蛋白编码区表达的启动子)是RNA聚合酶III(polIII)启动子序列。polIII启动子序列的非限制性实例包括U6和H1启动子序列。在一些实施方案中,第二启动子序列(例如,驱动外源SOD1 RNA表达的启动子序列)是RNA聚合酶II(polII)启动子序列。polII启动子序列的非限制性实例包括鸡β肌动蛋白启动子(CBA)、T7、T3、SP6、RSV和巨细胞病毒启动子序列。在一些实施方案中,polIII启动子序列驱动抑制性RNA(例如miRNA)编码区的表达。在一些实施方案中,polII启动子序列驱动蛋白编码区的表达。

[0083] 如下文进一步描述的,分离的核酸可以包含选自下组的AAV血清型的反向末端重复(ITR):AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11及其变体。

[0084] 多顺反子构建体

[0085] 本发明的一些方面提供了多顺反子(例如,双顺反子)表达构建体,其包含不同构成的两个或更多个表达盒。

[0086] 在不同的实施方案中,提供了多顺反子(例如,双顺反子)表达构建体,其中表达盒以不同的方式定位。例如,在一些实施方案中,提供了多顺反子表达构建体,其中第一表达盒位于第二表达盒附近。在一些实施方案中,提供了多顺反子表达构建体,其中第一表达盒包含内含子,并且第二表达盒位于第一表达盒的内含子内。在一些实施方案中,位于第一表达盒的内含子内的第二表达盒包含启动子和与该启动子有效连接的编码基因产物的核酸序列。

[0087] 在不同的实施方案中,提供了多顺反子(例如,双顺反子)表达构建体,其中表达盒以不同的方式定向。例如,在一些实施方案中,提供了多顺反子表达构建体,其中第一表达盒与第二表达盒处于相同的方向。在一些实施方案中,提供了多顺反子表达构建体,其包含处于相反方向的第一和第二表达盒。

[0088] 本文所用的与表达盒有关的术语“方向”是指给定的盒或结构的方向特征。在一些实施方案中,表达盒在编码核酸序列的5'端含有启动子,并且编码核酸序列的转录从有义链的5'端至3'端进行,使其成为定向盒(例如5'-启动子/(内含子)/编码序列-3')。由于实际上所有表达盒在这种意义上都是定向的,本领域技术人员可容易地确定给定表达盒相对于第二核酸结构(例如,第二表达盒、病毒基因组)或如果该盒包含在AAV构建体中则相对于AAV ITR的方向。

[0089] 例如,如果给定的核酸构建体包含两个表达盒,构成为5'-启动子1/编码序列1---启动子2/编码序列2-3',

[0090] >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

[0091] 则表达盒在同一方向,箭头表示每个表达盒的转录方向。例如,如果给定核酸构建

体包含有义链,该有义链包含构成为5'-启动子1/编码序列1---编码序列2/启动子2-3',
[0092] >>>>>>>>>>><<<<<<<<<

[0093] 则表达盒彼此呈相反方向,并且如箭头所示,表达盒的转录方向相对。在该实施例中,所示的链包含启动子2和编码序列2的反义链。

[0094] 对于另一个实例,如果表达盒包含在AAV构建体中,则该盒可以与AAV ITR处于相同的方向(例如图5中描述的结构等),或处于相反的方向。AAV ITR是定向的。例如,图5中举例说明的突变的5' ITR将与编码H1启动子/抑制性RNA的表达盒处于相同的方向,但是如果ITR和表达盒两者都在相同的核酸链上,则与3' ITR处于相反的方向。

[0095] rAAV载体

[0096] 本发明的分离的核酸可以是重组腺相关病毒(AAV)载体(rAAV载体)。在一些实施方案中,如本公开所述的分离的核酸包含含有第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)或其变体的区域(例如,第一区域)。分离的核酸(例如,重组AAV载体)可包装到衣壳蛋白中,并施予受试者和/或递送到选择的靶细胞。“重组AAV(rAAV)载体”通常至少由转基因及其调节序列,以及5'和3' AAV反向末端重复序列(ITR)组成。如本文其他地方所公开的,转基因可以包含编码一种或多种抑制性RNA(例如miRNA)的一个或多个区域,所述抑制性RNA包含靶向受试者的内源mRNA的核酸。转基因也可包含编码例如蛋白和/或表达控制序列(例如poly-A尾)的区域,如本公开中其它地方所述。

[0097] 通常,ITR序列的长度为约145个碱基对(bp)。优选地,基本上编码ITR的全部序列都用于分子中,尽管允许对这些序列进行一定程度的微小修饰。修饰这些ITR序列的能力在本领域技术人员的能力范围内。(参见,例如,诸如Sambrook等人,“Molecular Cloning. A Laboratory Manual”,2d ed.,Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989);和K.Fisher等人,J Virol.,70:520 532(1996))的教科书。本发明所用的这种分子的一个例子是含有转基因的“顺式作用”质粒,其中所选转基因序列和相关调节元件的侧翼为5'和3' AAV ITR序列。AAV ITR序列可从任何已知的AAV获得,包括目前鉴定的哺乳动物AAV类型。在一些实施方案中,分离的核酸(例如,rAAV载体)包含至少一种ITR,其具有选自AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11及其变体的血清型。在一些实施方案中,分离的核酸包含编码AAV2 ITR的区域(例如,第一区域)。

[0098] 在一些实施方案中,分离的核酸进一步包含含有第二AAV ITR的区域(例如,第二区域、第三区域、第四区域等)。在一些实施方案中,第二AAV ITR具有选自AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11及其变体的血清型。在一些实施方案中,第二ITR是缺少功能性末端解离位点(TRS)的突变体ITR。术语“缺乏末端解离位点”可指包含消除ITR的末端解离位点(TRS)的功能的突变(例如,有义突变,如非同义突变或错义突变)的AAV ITR,或指缺乏编码功能性TRS的核酸序列的截短的AAV ITR(例如,Δ TRS ITR)。不希望受任何特定理论的束缚,包含缺乏功能性TRS的ITR的rAAV载体产生自身互补的rAAV载体,例如如McCarthy (2008) Molecular Therapy 16(10):1648-1656所述。

[0099] 除了以上鉴定的重组AAV载体的主要元件外,该载体还包括常规的控制元件,该元件与转基因元件以一定方式有效地连接,该方式允许转基因在用载体转染的或用本发明生产的病毒感染的细胞中转录、翻译和/或表达。如本文所用,“有效地连接的”序列包括与目的基因邻接的表达控制序列和反式作用或在一定距离处其作用以控制目的基因的表达控

制序列。表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列；有效的RNA加工信号，例如剪接和多聚腺苷酸化(polyA)信号；稳定细胞质mRNA的序列；增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列)；增强蛋白稳定性的序列；以及当需要时，增强编码产物分泌的序列。许多表达控制序列，包括天然的、组成型的、诱导型的和/或组织特异性的启动子，都是本领域已知的并且可以被利用。

[0100] 如本文所用，当核酸序列(例如编码序列)和调节序列以使核酸序列的表达或转录处于调节序列的影响或控制下的方式共价连接时，称它们是有效地连接的。当希望核酸序列翻译成功能性蛋白时，如果在5'调节序列中诱导启动子导致编码序列的转录，并且如果两个DNA序列之间的连接的性质不(1)导致移码突变的引入，(2)干扰启动子区指导编码序列转录的能力，或(3)干扰相应RNA转录物翻译成蛋白的能力，则认为两个DNA序列是有效地连接的。因此，如果启动子区能够影响DNA序列的转录，使得所得转录物可以翻译成所需蛋白或多肽，则该启动子区与核酸序列是有效地连接。类似地，当两个或多个编码区的连接方式使得它们从共同启动子的转录导致两个或更多个已在框内翻译的蛋白的表达，则它们是有效地连接的。在一些实施方案中，有效地连接的编码序列产生融合蛋白。

[0101] 重组腺相关病毒(rAAV)

[0102] 在一些方面，本公开提供了分离的AAV。本文针对AAV所用的术语“分离的”是指已经人工生产或获得的AAV。分离的AAV可以使用重组方法产生。这种AAV在本文中称为“重组AAV”。重组AAV(rAAV)优选具有组织特异性靶向能力，使得rAAV的核酸酶和/或转基因将特异性递送至一种或多种预定组织。AAV衣壳是决定这些组织特异性靶向能力的重要元件。因此，可以选择具有适合于靶向组织的衣壳的rAAV。

[0103] 获得具有所需衣壳蛋白的重组AAV的方法是本领域公知的。(参见，例如，US2003/0138772)，其内容通过引用整体并入本文)。通常，所述方法包括培养含有编码AAV衣壳蛋白的核酸序列；功能性rep基因；由AAV反向末端重复序列(ITS)和转基因组成的重组AAV载体；和足够的辅助功能以允许重组AAV载体包装到AAV衣壳蛋白中的宿主细胞。在一些实施方式中，衣壳蛋白是由AAV的cap基因编码的结构蛋白。AAV包含三种衣壳蛋白，病毒粒子蛋白1至3(称为VP1、VP2和VP3)，所有这些病毒蛋白都是通过可选剪接从单个cap基因转录的。在一些实施方案中，VP1、VP2和VP3的分子量分别为约87kDa、约72kDa和约62kDa。在一些实施方案中，在翻译后，衣壳蛋白形成围绕病毒基因组的球形60-mer蛋白壳。在一些实施方案中，衣壳蛋白的功能是保护病毒基因组、递送基因组并与宿主相互作用。在一些方面，衣壳蛋白以组织特异性方式将病毒基因组递送至宿主。

[0104] 在一些实施方式中，AAV衣壳蛋白是选自由AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh.10、AAV.AAV.PHB和前述任意的变体组成的组的AAV血清型。在一些实施方式中，AAV衣壳蛋白是源自非人灵长类的血清型，例如AAVrh10血清型。在一些实施方案中，AAV衣壳蛋白是AAV9血清型的。

[0105] 可以将在宿主细胞中培养以将rAAV载体包装在AAV衣壳中的组分反式提供给宿主细胞。或者，任何一种或多种所需组分(例如重组AAV载体、rep序列、cap序列和/或辅助功能)可由稳定的宿主细胞提供，所述宿主细胞已使用本领域技术人员已知的方法工程化以含有一种或多种所需组分。最合适地，这种稳定的宿主细胞将含有在诱导型启动子控制下的所需组分。然而，所需的组分可以在组成型启动子的控制下。在适用于转基因的调节元件

的讨论中,本文提供了合适的诱导型和组成型启动子的实例。在另一个备选方案中,选择的稳定宿主细胞可以含有在组成型启动子控制下的所选组分和在一种或多种诱导型启动子控制下的其它所选组分。例如,可以产生稳定的宿主细胞,其来源于293细胞(其含有在组成型启动子控制下的E1辅助功能),但其含有在诱导型启动子控制下的rep和/或cap蛋白。本领域技术人员还可以产生其它稳定的宿主细胞。

[0106] 在一些实施方案中,本公开涉及含有核酸的宿主细胞,所述核酸包含编码靶向内源SOD1的抑制性核酸的序列和编码外源蛋白(例如,外源SOD1蛋白,任选地“强化的”外源SOD1蛋白)的序列。在一些实施方案中,本公开涉及包含上述宿主细胞的组合物。在一些实施方案中,包含上述宿主细胞的组合物还包含冷冻保存剂。

[0107] 可使用任何合适的遗传元件(载体)将产生本公开的rAAV所需的重组AAV载体、rep序列、cap序列和辅助功能递送至包装宿主细胞。所选的遗传元件可以通过任何合适的方法递送,包括本文所述的那些。用于构建本公开的任何实施方案的方法是核酸操作领域的技术人员已知的,并且包括遗传工程、重组工程和合成技术。参见,例如,Sambrook等人,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y..类似地,产生rAAV病毒粒子的方法是众所周知的,并且合适方法的选择不是对本公开的限制。参见,例如,K.Fisher等人,J.Virology,70:520-532(1993)和美国专利号5,478,745。

[0108] 在一些实施方案中,重组AAV可使用三重转染方法(详细描述于美国专利号6,001,650中)产生。通常,通过用待包装成AAV颗粒的重组AAV载体(包含转基因)、AAV辅助功能载体和辅助功能载体转染宿主细胞,来制备重组AAV。AAV辅助功能载体编码“AAV辅助功能”序列(即rep和cap),其反式作用用于生产性AAV复制和衣壳化。优选地,AAV辅助功能载体支持高效的AAV载体生产,而不产生任何可检测的野生型AAV病毒粒子(即含有功能性rep和cap基因的AAV病毒粒子)。适用于本公开的载体的非限制性实例包括pHLP19,描述于美国专利号6,001,650中,和pRep6cap6载体,描述于美国专利号6,156,303中,两者通过引用并入本文。辅助功能载体编码用于非AAV来源的病毒和/或细胞功能且AAV复制依赖于这些功能(即“辅助功能”)的核苷酸序列。辅助功能包括AAV复制所需的功能,包括但不限于参与AAV基因转录激活、阶段特异性AAV mRNA剪接、AAV DNA复制、cap表达产物合成和AAV衣壳组装的部分。基于病毒的附属功能可以源自任何已知的辅助病毒,例如腺病毒、疱疹病毒(除1型单纯疱疹病毒之外)和牛痘病毒。

[0109] 在一些方面,本公开提供了转染的宿主细胞。术语“转染”用于指细胞摄取外源DNA,并且当外源DNA被引入到细胞膜内部后,细胞被“转染”。许多转染技术通常是本领域已知的。参见,例如Graham等人(1973)Virology,52:456,Sambrook等人(1989)*Molecular Cloning,a laboratory manual*,Cold Spring Harbor Laboratories,New York,Davis等人(1986)*Basic Methods in Molecular Biology*,Elsevier,和Chu等人(1981)Gene 13:197。这样的技术可用于将一种或多种外源核酸,例如核苷酸整合载体和其它核酸分子,引入合适的宿主细胞。

[0110] “宿主细胞”是指携带或能够携带目的物质的任何细胞。通常宿主细胞是哺乳动物细胞。宿主细胞可用作AAV辅助构建体、AAV小基因质粒、辅助功能载体或其它与重组AAV生产相关的转移DNA的接受者。该术语包括已经转染的原始细胞的后代。因此,本文所用的“宿

“主细胞”可以指已经用外源DNA序列转染的细胞。应理解,由于天然、偶然或故意的突变,单个亲本细胞的后代可能不一定在形态学或基因组或总DNA补充物(DNA complement)上与原始亲本完全相同。

[0111] 如本文所用,术语“细胞系”是指能够在体外连续或延长的生长和分裂的细胞群。通常,细胞系是源自单个祖细胞的克隆群体。本领域还已知,在这种克隆群体的储存或转移期间,核型中可发生自发或诱导的变化。因此,源自所提及的细胞系的细胞可能与祖细胞或祖培养物不是精确相同的,并且所提及的细胞系包括这样的变化。

[0112] 本文所用的术语“重组细胞”是指其中导入了外源DNA片段的细胞,所述外源DNA片段例如导致生物活性多肽转录或生物活性核酸如RNA产生的DNA片段。

[0113] 本文所用的术语“载体”包括任何遗传元件,如质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、人工染色体、病毒、病毒粒子等,当与适当的控制元件结合时,其能够复制,并且其能够在细胞之间转移基因序列。因此,该术语包括克隆载体和表达载体,以及病毒载体。在一些实施方案中,所考虑的有用的载体是其中待转录的核酸区段位于启动子的转录控制下的那些载体。“启动子”是指启动基因的特异性转录所需的、被细胞的合成机制或导入的合成机制识别的DNA序列。短语“有效地定位”、“在控制下”或“在转录控制下”是指启动子相对于核酸处于正确的位置和方向以控制RNA聚合酶的起始和基因的表达。术语“表达载体或构建体”是指含有核酸的任何类型的遗传构建体,其中核酸编码序列的部分或全部能够被转录。在一些实施方案中,表达包括核酸的转录,例如,以从转录的基因产生生物活性多肽产物或功能性RNA(例如,引导RNA)。

[0114] 前述用于将重组载体包装在所需AAV衣壳中以产生本公开的rAAV的方法不意味着是限制性的,并且其它合适的方法对本领域技术人员是显而易见的。

[0115] 给药方式

[0116] 本公开的分离的核酸和rAAV可以根据本领域已知的任何合适的方法在组合物中递送至细胞或受试者。例如,优选悬浮在生理相容载体中(即,在组合物中)的rAAV可以施用给受试者,即宿主动物,例如人、小鼠、大鼠、猫、狗、绵羊、兔、马、牛、山羊、猪、豚鼠、仓鼠、鸡、火鸡或非人灵长类动物(例如,猕猴)。在一些实施方案中,宿主动物不包括人。

[0117] rAAV向哺乳动物受试者的递送可以通过例如肌内注射或通过施用至哺乳动物受试者的血流中。可以通过注射到静脉、动脉或任何其它血管导管中来施用到血流中。在一些实施方案中,通过分离肢体灌注将rAAV施用至血流中,分离肢体灌注是外科领域中公知的技术,该方法基本上使得技术人员能够在施用rAAV病毒粒子之前将肢体从体循环分离。技术人员也可以使用美国专利号6,177,403中描述的分离肢体灌注技术的变体,将病毒粒子施用于分离肢体的脉管系统,以潜在地增强向肌肉细胞或组织的转运。此外,在某些情况下,可能需要将病毒体粒子递送至受试者的CNS。“CNS”是指脊椎动物的脑和脊髓的所有细胞和组织。因此,该术语包括但不限于神经元细胞、神经胶质细胞、星形胶质细胞、脑脊液(CSF)、间质间隙、骨、软骨等。重组AAV可通过用针、导管或相关装置,使用本领域已知的神经外科技术,例如通过立体定向注射,注射到例如心室区域以及纹状体(例如纹状体的尾状核或壳核)、脊髓和神经肌肉接头或小脑小叶中,而直接递送到CNS或脑中(参见,例如Stein等人,J Virol 73:3424-3429,1999;Davidson等人,PNAS 97:3428-3432,2000;Davidson等人,Nat. Genet. 3:219-223,1993;和Alisky和Davidson,Hum. Gene Ther. 11:2315-2329,

2000)。在一些实施方案中,通过静脉内注射施用如本公开中所述的rAAV。在一些实施方案中,rAAV通过脑内注射施用。在一些实施方案中,rAAV通过鞘内注射施用。在一些实施方案中,rAAV通过纹状体内注射施用。在一些实施方案中,rAAV通过颅内注射递送。在一些实施方案中,rAAV通过小脑延髓池注射递送。在一些实施方案中,rAAV通过脑侧室注射递送。

[0118] 本公开的方面涉及包含重组AAV的组合物,所述重组AAV包含衣壳蛋白和编码转基因的核酸,其中所述转基因包含编码一种或多种miRNA的核酸序列。在一些实施方案中,每个miRNA包含SEQ ID NO:3和/或4 (miR-SOD-127) 中所示的序列或由其编码。在一些实施方案中,每个miRNA包含SEQ ID NO:5和/或6中所示的序列或由其编码。在一些实施方案中,核酸还包含AAV ITR。在一些实施方案中,rAAV包含由SEQ ID NO:8-15 (AAV载体序列) 中任一个所示序列或其部分表示的rAAV载体。在一些实施方案中,组合物还包含药学上可接受的载体。

[0119] 本公开的组合物可包含单独的rAAV,或与一种或多种其他病毒(例如,具有一种或多种不同转基因的第二rAAV编码)组合。在一些实施方案中,组合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种不同的rAAV,其各自具有一种或多种不同的转基因。

[0120] 本领域技术人员根据rAAV所针对的病症可以容易地选择合适的载体。例如,一种合适的载体包括盐水,其可以与多种缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)一起配制。其它示例性载体包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。载体的选择不是本公开的限制。

[0121] 任选地,本公开的组合物除了rAAV和载体之外还可含有其它常规药物成分,例如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性防腐剂包括三氯叔丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸酯、乙基香草醛、甘油、苯酚和对氯苯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0122] 给予足量的rAAV来转染所需组织的细胞,并提供足够水平的基因转移和表达,而没有不适当的副作用。常规的且药学上可接受的给药途径包括但不限于直接递送至选定器官(例如门静脉内递送至肝脏)、口服、吸入(包括鼻内和气管内递送)、眼内、静脉内、肌内、皮下、皮内、肿瘤内和其它肠胃外给药途径。如果需要,可以组合给药途径。

[0123] 实现特定“治疗效果”所需的rAAV病毒粒子的剂量,例如,以基因组拷贝/每千克体重表示的剂量单位(GC/kg),将基于若干因素而变化,所述因素包括但不限于:rAAV病毒粒子施用的途径、实现治疗效果所需的基因或RNA表达水平、所治疗的特定疾病或病症、以及基因或RNA产物的稳定性。本领域技术人员可基于上述因素以及本领域熟知的其它因素容易地确定治疗患有特定疾病或病症的患者的rAAV病毒粒子的剂量范围。

[0124] rAAV的有效量是足以靶向感染动物、靶向所需组织的量。在一些实施方案中,rAAV的有效量是足以产生稳定的体细胞转基因动物模型的量。有效量将主要取决于诸如对象的物种、年龄、体重、健康状况和待靶向的组织等因素,因此可在动物和组织之间变化。例如,rAAV的有效量通常在约1ml至约100ml含有约 10^9 至 10^{16} 个基因组拷贝的溶液的范围内。在一些情况下,约 10^{11} 至 10^{13} rAAV基因组拷贝之间的剂量是合适的。在某些实施方案中, 10^{12} 或 10^{13} 个rAAV基因组拷贝有效靶向CNS组织。在一些情况下,通过多剂量rAAV产生稳定的转基因动物。

[0125] 在一些实施方案中,每个日历天(例如,24小时的时间段)向受试者施用不超过一

次rAAV剂量。在一些实施方案中,每2、3、4、5、6或7个日历天向受试者施用不超过一次rAAV剂量。在一些实施方案中,每个日历周(例如7个日历日)向受试者施用不超过一次rAAV剂量。在一些实施方案中,将rAAV的剂量以不超过每两周(例如,在两个日历周内一次)施用于受试者。在一些实施方案中,每日历月不超过一次(例如,30个日历日一次)将rAAV剂量施用至受试者。在一些实施方案中,每六个月向受试者施用不超过一次rAAV剂量。在一些实施方案中,每个日历年(例如,365天或者在闰年中为366天)向受试者施用不超过一次rAAV剂量。

[0126] 在一些实施方案中,rAAV组合物被配制以减少组合物中AAV颗粒的聚集,特别是当存在高rAAV浓度(例如约 10^{13} GC/ml或更高)时。用于减少rAAV聚集的方法是本领域公知的,包括例如添加表面活性剂、pH调节、盐浓度调节等(参见,例如Wright FR等,Molecular Therapy (2005) 12, 171-178,其内容通过引用结合到本文中)

[0127] 药学上可接受的赋形剂和载体溶液的制剂是本领域技术人员公知的,在各种治疗方案中使用本文所述的特定组合物的合适的给药和治疗方案的开发也是公知的。

[0128] 通常,这些制剂可以含有至少约0.1%或更多的活性化合物,尽管活性成分的百分比当然可以变化,并且可以方便地在总制剂的重量或体积的约1或2%和约70%或80%或更多之间。当然,可以制备各治疗上有用的组合物中活性化合物的量,使得在化合物的任何给定单位剂量中获得合适的剂量。制备这类药物制剂的领域的技术人员将考虑诸如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品保存期以及其它药理学考虑因素,因此,可能需要多种剂量和治疗方案。

[0129] 在某些情况下,需要以皮下、胰内、鼻内、肠胃外、静脉内、肌内、鞘内或口服、腹膜内或通过吸入,在本文公开的合适配制的药物组合物中递送基于rAAV的治疗性构建体。在一些实施方案中,可以使用如美国专利号5,543,158;5,641,515和5,399,363(每个通过具体引用整体并入本文)中所述的施用形式递送rAAV。在一些实施方案中,优选的施用模式是通过门静脉注射。

[0130] 适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和在油中制备。在普通的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。在许多情况下,该形式是无菌的,并且具有容易注射的程度的流动性。它在生产和储存条件下必须是稳定的,并且保存必须防止微生物如细菌和真菌的污染。载体可以是溶剂或分散介质,包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和/或植物油。例如,通过使用包衣如卵磷脂,通过在分散体的情况下保持所需的粒径,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。预防微生物作用可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂来实现,例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0131] 例如,对于可注射水溶液的施用,如果需要,溶液可以适当地缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液特别适合于静脉内、肌内、皮下和腹膜内给药。在这方面,可以使用的无菌水性介质是本领域技术人员已知的。例如,一个剂量可以溶解在1ml等渗NaCl溶液中,加入到1000ml皮下溶解液中或注射到建议的输注部位

(参见例如"Remington's Pharmaceutical Sciences"第15版,1035-1038页和1570-1580页)。根据宿主的情况,剂量必然会发生一些变化。在任何情况下,负责给药的人将确定个体宿主的合适剂量。

[0132] 根据需要,通过将所需量的活性rAAV与本文列举的各种其它成分一起掺入适当溶剂中,随后过滤灭菌,制备无菌注射溶液。通常,通过将各种灭菌的活性成分掺入到无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物包含基本分散介质和来自以上列举的那些的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从其经先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。

[0133] 本文公开的rAAV组合物也可配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成),其与无机酸如盐酸或磷酸形成,或与有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱,例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。配制后,溶液将以与剂型制剂相容的方式和治疗有效量施用。该制剂易于以各种剂型给药,例如注射溶液、药物释放胶囊等。

[0134] 如本文所用,"载体"包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。这类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域公知的。补充的活性成分也可以掺入组合物中。短语"药学上可接受的"是指当施用于宿主时不产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。

[0135] 递送媒介物如脂质体、纳米胶囊、微粒、微球、脂质颗粒、囊泡等,可以用于将本公开的组合物引入合适的宿主细胞中。特别地,可以配制rAAV载体递送的转基因,以用于包封在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中的递送。

[0136] 对于本文公开的核酸或rAAV构建体的药学上可接受的制剂的引入,这样的制剂可以是优选的。脂质体的形成和使用通常是本领域技术人员已知的。最近,开发了具有改善的血清稳定性和循环半衰期的脂质体(美国专利号5,741,516)。此外,已经描述了脂质体和脂质体样制剂作为潜在药物载体的各种方法(美国专利号5,567,434;5,552,157;5,565,213;5,738,868和5,795,587)。

[0137] 脂质体已经成功地用于通常对通过其它方法的转染有抗性的许多细胞类型。此外,脂质体没有基于病毒的递送系统典型的DNA长度限制。脂质体已经被有效地用于将基因、药物、放射治疗剂、病毒、转录因子和别构剂引入到多种培养的细胞系和动物中。此外,已经完成了一些成功的临床试验,用于检验脂质体介导的药物递送的有效性。

[0138] 脂质体由分散在水性介质中的磷脂形成,并自发形成多层同心双层囊泡(也称为多层囊泡(MLV))。MLV通常具有25nm至4μm的直径。对MLV进行超声处理导致形成直径在200至500 Å范围内的小单层囊泡(SUV),其在核心包含水溶液。

[0139] 或者,可以使用rAAV的纳米胶囊制剂。纳米胶囊通常可以以稳定和可再现的方式捕获物质。为了避免由于细胞内聚合物过载引起的副作用,这种超细颗粒(尺寸为约0.1μm)应当使用能够在体内降解的聚合物来设计。考虑使用满足这些要求的可生物降解的聚氰基丙烯酸烷基酯纳米颗粒。

[0140] 除了上述递送方法之外,还考虑下列技术作为将rAAV组合物递送至宿主的替代方法。超声促渗(即超声)已经被使用并描述于美国专利号5,656,016中,作为用于提高药物渗

透进入和通过循环系统的速度和效率的装置。其它预期的药物递送替代方案是骨内注射(美国专利号5,779,708)、微芯片装置(美国专利号5,797,898)、眼用制剂(Bourlaiss等,1998)、透皮基质(美国专利号5,770,219和5,783,208)和反馈控制递送(美国专利号5,697,899)。

[0141] 使用方法

[0142] 本文提供了用于抑制与FTD和/或ALS相关的基因例如SOD1的表达的方法。在一些实施方案中,本公开所述的方法可用于治疗患有或疑似患有ALS和/或FTD的受试者。如本文所用,“治疗”是指(a)防止或延迟神经变性疾病(例如ALS/FTD等)的发作;(b)降低ALS/FTD的严重性;(c)减少或防止ALS/FTD的症状特征的发展;(d)和/或防止ALS/FTD的症状特征的恶化。

[0143] 在一些实施方案中,提供了抑制受试者(例如受试者的中枢神经系统(CNS))中内源性SOD1蛋白表达的方法。在一些实施方案中,所述方法涉及向受试者施用(例如,向受试者的CNS施用)分离的核酸或rAAV,其经工程化以表达靶向内源SOD1 mRNA的抑制性核酸和对所述抑制性核酸具有抗性的外源SOD1 mRNA转录物。在一些实施方案中,所述受试者患有或怀疑患有FTD或ALS(例如,已经例如通过诊断性DNA测试鉴定为具有SOD1基因,所述基因具有导致毒性功能获得增强的一个或多个突变,和/或表现出ALS的一种或多种体征或症状)。在一些实施方案中,所述方法涉及向受试者施用有效量的携带核酸的重组腺相关病毒(rAAV),所述核酸被工程化以在受试者的细胞中表达靶向内源SOD1 mRNA的抑制性核酸。在一些实施方案中,抑制性核酸包含SEQ ID NO:3(gacgtacctaaggtaacaagta)和/或4(miR-SOD-127)中所示的序列或由其编码。在一些实施方案中,抑制性核酸包含SEQ ID NO:5和/或6中所示的序列或由其编码。

[0144] 在一些实施方案中,提供了抑制细胞中SOD1表达的方法。在一些实施方案中,所述方法涉及向细胞递送如本公开所述的分离的核酸或rAAV,其中抑制性RNA是miRNA,其包含SEQ ID NO:3(GACGTACCTAAGGTACAAGTA)和/或4(CTGCATGGATTCCATGTTCAT)中所示序列的或该序列的互补序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个连续核苷酸,或由其编码。

[0145] 根据前述内容,本文提供的某些方法涉及向受试者施用有效量的携带本文公开的任何重组核酸的重组腺相关病毒(rAAV)。通常,rAAV的“有效量”是指足以引发所需生物反应的量。在一些实施方案中,有效量指有效转导离体细胞或组织的rAAV的量。在其它实施方案中,有效量指对将rAAV直接施用至对象有效的量。本领域普通技术人员应理解,本发明的重组AAV的有效量根据诸如所需生物学终点、表达产物的药代动力学、治疗的病症、给药方式和受试者等因素而变化。通常,rAAV与药学上可接受的载体一起施用,如本公开中其它地方所述。

[0146] 在一些情况下,在施用rAAV后,在受试者中评估与FTD或ALS相关的至少一种临床结果参数或生物标志物(例如,核内G₄C₂ RNA团簇、RAN-蛋白表达等)。通常,将施用rAAV后评估的临床结果参数或生物标志物与施用rAAV前一个时间测定的临床结果参数或生物标志物进行比较,以确定rAAV的有效性。通常施用rAAV后临床结果参数或生物标志物的改善表明了rAAV的有效性。可以使用任何适当的临床结果参数或生物标志物。通常,临床结果参数或生物标志物指示FTD或ALS的一种或多种症状。例如,在一些实施方案中,临床结果参数或

生物标志物可以是内源性SOD1表达、记忆丧失或运动障碍的存在或不存在,所述运动障碍例如不稳定、僵硬、缓慢、抽搐、肌肉无力或吞咽困难、言语和语言困难、抽搐(肌束震颤)和肌肉痉挛,包括手和脚中的那些。

[0147] 试剂盒和相关组合物

[0148] 在一些实施方案中,本文所述的重组核酸、组合物、rAAV载体、rAAV等可组装成药物或诊断或研究试剂盒以促进其在治疗、诊断或研究应用中的使用。试剂盒可以包括一个或多个容器,其容纳本发明的组分和使用说明书。具体地,这样的试剂盒可以包括一种或多种本文所述的试剂,以及描述这些试剂的预期应用和正确使用的说明书。在某些实施方案中,试剂盒中的试剂可以是适合于特定应用和适合于制剂的施用方法的药物制剂和剂量。用于研究目的试剂盒可以含有用于进行各种实验的适当浓度或量的组分。

[0149] 试剂盒可以设计成便于研究人员使用本文所述的方法,并且可以采取许多形式。在适用的情况下,试剂盒的每种组合物可以以液体形式(例如,在溶液中)或以固体形式(例如,干粉)提供。在某些情况下,一些组合物可以是可制定的或另外可加工的(例如,加工成活性形式),例如,通过添加合适的溶剂或其它物质(例如,水或细胞培养基),其可以或不可以与试剂盒一起提供。如本文所用,“说明书”可定义说明书和/或促销的组成部分,并且通常涉及本发明包装有关或与本发明包装相关的书面说明。说明书还可以包括以任何方式提供的任何口头或电子说明书,使得使用者清楚地认识到说明书与试剂盒相关,例如视听(例如录像带、DVD等)、因特网和/或基于网络的通信等。书面说明书可以是由管理药物或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式,该说明书也可反映制造、使用或销售机构对动物施用的批准。

[0150] 试剂盒可以在一个或多个容器中含有本文所述的任何一种或多种组分。作为一个实例,在一个实施方案中,试剂盒可以包括用于混合试剂盒的一种或多种组分和/或分离和混合样品并施用于受试者的说明书。试剂盒可以包括容纳本文所述的试剂的容器。所述试剂可以是液体、凝胶或固体(粉末)的形式。所述试剂可以无菌制备,包装在注射器中并冷冻运输。或者,它可以被容纳在小瓶或其它容器中以便储存。第二容器可以容纳无菌制备的其它试剂。或者,试剂盒可以包括预混合在注射器、小瓶、管或其它容器中并在其中运输的活性剂。试剂盒可以具有将试剂施用于受试者所需的一种或多种或所有组分,例如注射器、局部施用装置或IV针管和袋。

[0151] 通过以下实施例将更详细地描述本发明的示例性实施方案。这些实施方案是本发明的示例,本领域技术人员将认识到,本发明并不限于这些示例性实施例。

实施例

[0152] 实施例1

[0153] 本实施例描述了双表达基因治疗载体,其将(1)工程化以表达合成microRNA从而沉默内源性胞质Cu/Zn超氧化物歧化酶(SOD1)活性表达的第一构建体与(2)工程化以表达对所述合成microRNA有抗性的野生型SOD1的第二构建体的递送偶联起来。

[0154] 通过AAVrh10-抗SOD1-miRNA将SOD1沉默与对合成microRNA具有抗性的WT SOD1表达偶联的理论是基于两个因素。首先,SOD1蛋白的歧化活性具有神经保护性质。其次,SOD1沉默的ALS情况下的组织(特别是运动神经元)是不正常的,准确地说是因为它们表达野生

型(WT)和突变SOD1两者。实际上,当在疾病发作后开始SOD1沉默研究时,已经观察到运动神经元(和一些非神经元细胞)是明显病理性的。在这种情况下,消除WT SOD1分子赋予的SOD1歧化活性(以及一些突变SOD1蛋白产生的歧化活性)也消除了由该活性赋予的潜在神经保护作用。因此,对细胞的净效应反映了两个相反因素的平衡:(a)使突变蛋白及其神经毒性沉默,与(b)消除SOD1歧化活性的神经保护影响。在患病的运动神经元中,可以想象,尽管突变蛋白的水平同时降低,但净效应可能进一步损害靶细胞的活力。与这一观察结果一致,注意到尽管缺乏内在SOD1活性的小鼠在正常发育期间不发展成爆发性ALS,但它们的运动神经元对叠加损伤高度敏感;在那些SOD1阴性小鼠中面神经损伤导致的面神经损失比WT小鼠中多得多。此外,在生命后期,已经观察到这些SOD1阴性小鼠发展缓慢进行性、晚期发作的运动神经元疾病。

[0155] 本公开描述的双表达基因构建体解决了SOD1歧化作用导致的神经保护活性丧失的挑战。本公开的构建体中基因表达盒的配置允许正常水平的SOD1歧化活性(例如,WT SOD1的表达),即使WT和突变内源SOD1等位基因两者完全沉默。因此,本文所述构建体的净效应是降低突变SOD1蛋白(而不是WT SOD1蛋白)的水平,这在SOD1介导的ALS中是有益的。

[0156] 本公开的双表达构建体构建如下:产生了表达靶向SOD1的人工miRNA和具有使其对人工miRNA有抗性的沉默碱基对修饰的SOD1 cDNA两者的AAV构建体。该构建体同时允许从单个AAV载体的突变SOD1沉默和野生型SOD1表达增加。在一些实施方案中,构建体是如图1所示的双顺反子,其中构建体具有2个启动子;例如,抗SOD1表达由H1启动子驱动,SOD1 cDNA表达由CBA启动子驱动。抗SOD1-miR表达也可以由另一个pol III启动子,例如U6启动子,或pol II启动子驱动,以将miRNA表达限制至特定的细胞或器官类型。构建体的第二部分通常具有表达miRNA抗性SOD1cDNA的pol II启动子(例如,图1中的CBA)。如果希望SOD1 cDNA限制性表达于特定细胞群,则该第二启动子也可以是内源SOD1启动子,或另一种启动子,例如突触蛋白启动子。

[0157] 在一些实施方案中,双功能载体是表达人工miR和miR-抗性cDNA两者的单个pol II启动子(例如,CBA),如图2中所示。在该实施方案中,抗SOD1-miR可由SOD1cDNA表达盒中的内含子表达,或者作为miR抗性SOD1 cDNA表达盒的3'UTR(或5'UTR)的一部分表达。双功能载体构建体的其它非限制性实例示于图3-8中,并描述于SEQ ID NO:8-15。图9显示了野生型SOD1编码序列(SEQ ID NO:1)与“强化的”SOD1编码序列(SEQ ID NO:7)的一个实例的核酸序列比对。

[0158] 序列

[0159] >人SOD1编码序列(NCBI Ref.NM_000454.4)(SEQ ID NO:1)

[0160] ATGGCGACGAAGGCCGTGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGCCAGTGCAGGGCATCATCAATTGAGCAG
AAGGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGGAAAGCATTAAAGGACTGACTGAAGGCCTGCATGGATTCCATGTTCA
TGAGTTGGAGATAATACAGCAGGCTGTACCAAGTGCAGGTCTCACTTTAACCTCTATCCAGAAAACACGGTGGGC
CAAAGGATGAAGAGAGGCATGTTGGAGACTTGGCAATGTGACTGCTGACAAAGATGGTGTGGCCATGTGTCTATT
GAAGATTCTGTGATCTCACTCTCAGGAGACCATTGCATCATTGGCCGCACACTGGTGGTCCATGAAAAAGCAGATGA
CTTGGCAAAGGTGGAAATGAAGAAAGTACAAAGACAGGAAACGCTGGAAGTCGTTGGCTTGTGGTGAATTGGGA
TCGCCCAATAA

[0161] >SOD1 miR靶序列5'-3';注意在一些实施方案中,“T”被替换为“U”(SEQ ID NO:2)

- [0162] CTGCATGGATTCCATGTTCAT
- [0163] >SOD1 miR成熟miRNA 3' -5' ;注意在一些实施方案中，“T”被替换为“U” (SEQ ID NO:3)
- [0164] GACGTACCTAAGGTACAAGTA
- [0165] >SOD-miR-127成熟miRNA 5' -3' ;注意在一些实施方案中，“T”被替换为“U” (SEQ ID NO:4)
- [0166] CTGCATGGATTCCATGTTCAT
- [0167] >miR-SOD1 5' -3' 链 (SEQ ID NO:5) ;注意在一些实施方案中，“T”被替换为“U”
- [0168] TGCTGATGAACATGGAATCCATGCAGGTTGGCCACTGACTGACCTGCATGGTCCATGTTCAT
- [0169] >miR-SOD1 3' -5' 链 (SEQ ID NO:6) ;注意在一些实施方案中，“T”被替换为“U”
- [0170] ATGAACATGGACCATGCAGGTCACTCAGTGGCCAAACCTGCATGGATTCCATGTTCATCAGCA
- [0171] >强化的SOD1编码序列 (SEQ ID NO:7) ;相当于野生型SOD1编码序列的沉默碱基对突变为粗体
- [0172] ATGGCGACGAAGGCCGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGCCCAGTGCAGGGCATCA
TCAATTTCGAGCAGAAGGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGAAGCATTAA
AGGACTGACTGAAGGCCTGCACGGCTTCACGTCCACGAGTTGGAGATAATACA
GCAGGCTGTACCACTGCAGGTCTCACTTTAACCTCTATCCAGAAAACACGGTGG
GCCAAAGGATGAAGAGAGGCATGTTGGAGACTTGGCAATGTGACTGCTGACAAA
GATGGTGTGGCCGATGTCTATTGAAGATTCTGTGATCTCACTCTCAGGAGACCA
TTGCATCATTGGCCGCACACTGGTGGTCCATGAAAAAGCAGATGACTTGGCAAAG
GTGGAATGAAGAAAGTACAAAGACAGGAAACGCTGGAAGTCGTTGGCTTGTGG
TGTAATTGGATGCCAATAA
- [0173] >双顺反子H1-miR和CB-Sod1的序列 (SEQ ID NO:8)
- [0174] CTCTGGTCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGA
CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTACGG
TAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
GCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGACTTCCACTTGGCAGTACATCTACTCGAGGCCACGTT
CTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTGTATTATTATTAAATTATTTGTGCAG
CGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGCGGGCGAGGGCGGGCGGGCGAGGGCGGGCGAGGGCG
AGAGGTGCGGCCAGCCAATCAGAGCGCGCGCTCCGAAAGTTCTTTATGGCGAGGCGGCCGGCGCG
CTATAAAAAGCGAAGCGCGCGCGGGAGCGGGATCAGCCACCGCGTGGCGGCCTAGAGTCGACGAGGAAC
AAAAACAGAAAGTTAACTGGTAAGTTAGTCTTTGTCTTTATTCAGGTCCGGATCCGGTGGTGGTCAAAT
CAAAGAACTGCTCCTAGTGGATGTTGCCCTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAGCTGC
GGAATTGTACCGCGGCCGCTTAAACCTGCAAGGTCTAGAAAGCTTATCGATACCGTCAGAGCTCGCTGAT
CAGCCTCGACTGTGCCTCTAGTGCAGCCATCTGTTGCCCTCCCCGTGCCCTCCTGACCCCTGGAAGGT
GCCACTCCCAGTGCCTTCTAAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGG
GGGTGGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGAAGACAATAGCAGGGTACAAGTAAAGCGGCCCTAGCGTT
TCCGGCGACGGTGTAGACTCGAGGACGGGTGAACACTGCCTGAGGATCCGATCTTTCCCTGCAAAATTA
TGGGGACATCATGAAGCCCCTGAGCATCTGACTTCTGGCTAAATAAGGAAATTATTTCTGCAATAGTGTGTT
GGAATTGGTGTCTCACTCGGAAGCAATTGTTGATCTGAATTGACCACCCATAATACCAATTACCGTGT
AGATAAGTAGCATGGCGGGTTAACATTAACATAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGCCACTCCCTCTGCGCG

CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTGCCGACGCCGGGCTTGCCCCGGCGGCCTCAGTGAGCGAG
CGAGCGCGCAGCCTAATTAAACCTAATTCACTGGCCGTGTTACAACGTCGTGACTGGAAAACCCTGGCGTTAC
CCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGCACCGATGCCCTT
CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCCCTGTAGCGGCCATTAGCGCGGCGATTAAGCGCGGGGTGTGGTT
ACGCGCAGCGTACCGCTACACTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTCGCTTCTCCCTCCTTCGCCAC
GTTGCCGGCTTCCCCTCAAGCTCAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTAGTGCCTTACGGCACCTCG
ACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTATGGTTACGTAGTGGGCCATGCCCTGATAGACGGTTTCGCCCTTGACG
TTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTGTTCAAACGAAACACTCAACCCCTATCTGGTCTATTCTTT
TGATTATAAGGGATTTGCCGATTCGCCATTGGTTAAAAATGAGCTGATTAACAAAAATTAACGCGAATT
TTAACAAATATTAACGCTTACAATTAGTGGCACTTTCGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTTATT
TCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAATGCTCAATAATTGAAAAGGAAG
AGTATGAGTATTCAACATTCCGTGCGCCCTATTCCCTTTGCCGATTTGCCCTCTGCTTTGCTCACCC
AGAAACGCTGGTAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTGGGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTAAC
GCGTAAGATCCTTGAGAGTTGCCCGAAGAACGTTCCAATGATGAGCACTTAAAGTTCTGCTATG
GCGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTGGTGA
GTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA
GTGATAACACTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTGACAAACATG
GGGATCATGTAACCTGCCCTGATCGTGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTACACCAC
GATGCCGTAGCAATGCCAACACGTTGCCAAACTATTAACTGGCAACTACTACTCTAGCTCCGGCAACAAAT
TAATAGACTGGATGGAGGCCGATAAAGTTGAGGACCACTCTGCGCTGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCT
GATAAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGCTCGCGTATCATTGACGACTGGGCCAGATGTAAGCCCTCCGTAT
CGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC
TGATAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAACCTCATTAAATT
AAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTCTGCTCCACTGAGC
GTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTGAGATCCTTCTGCGCTAACGACTCTTCCGAAGGTAACGGCTC
AAAAACCCGCTACCAGCGTGGTTGTCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTCCGAAGGTAACGGCTC
AGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTAGTGTAGCGTAGTTAGGCCACCTCAAGAAACTCTGAC
GCCTACATACCGCTCTGCTAACCTGTTACAGTGGCTGCCAGTGGCGATAAGCGTCTTACCGGGTTGG
ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCAGCGTGGCTGAACGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTGGAG
CGAACGACCTACACCGAACTGAGACACCTACAGCGTAGCTATGAGAAAGGCCACGCTCCGAAGGAGAAAGGC
GGACAGGTATCCGTAAGCGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGGGAAACGCTGGTATC
TTTATAGTCCTGTCGGTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTGATTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTA
TGGAAAAACGCCAGCAACCGCCCTTTACGGTCTGGCTTTGCTGGCTTGTGATGCTTCCTG
GTTATCCCCTGATTCTGAGATAACCGTATTACCGCCTTGAGTGAGCTGATACCGCTGCCAGCGAACGACCG
ACCGCAGCGACTCACTGAGCGAGGAACCGGAAGAGGCCCAATACGAAACCCCTCTCCCCGCCGTTGCCGATT
CATTAATGCACTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTACCGTCAAGCAACCATAGTACCGGCCCTGTAGC
GGCGCATTAAGCGCGGGGTGTGGTTACGCGCAGCGTAGCGCTACACTGCCAGGCCCTAGCGCCCGCTCC
TTCGCTTCTCCCTTCTGCCACGTTGCCGGCTTCCCGTCAAGCTCAAATCGGGGCTCCCTTAG
GGTCCGATTAGTGCCTTACGGCACCTCGACCCAAAAACTGATTAGGGTATGGTCACGTAGTGGCCATCG

CCCTGATAGACGGTTTCGCCCTTGACGGTGGACTCCACGTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAAACTGGAAC
AACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTGCCATTGCCATTGGTAAAAATG
AGCTGATTTAACAAAATTAAACCGAATTAAACAAATATTACGCTACAATTAAATTTGCTTACAATC
TTCCTGTTTGGGGCTTCTGATTATCAACCGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTACGATTACC GTT CAT
CGCCCTGCGCGCTCGCTCGACTGAGGCCGCCGGCAAAGCCC GGCGT CGGGC GACCTTGGT CGCCGGC CT
CAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGATTCTAAATTCAATTGCATGTCGTATGTGTTCTGGAAAT
CACCATAAACGTGAAATGTCTTGGATTGGAATCTTATAAGTCTGTATGAGACC ACTCGCCTGGAGGCTGCTG
AAGGCTGTATGCTGATGAAACATGGAATCCATGCAGGTTTGGCCACTGACTGACCTGCATGGTCCATGTCATCAGG
ACACAAGGCCTGTTACTGCACTCACATGGAACAAATGCCCTTTCTAGGGTAC

[0175] >CB-抗-Sod1 miR和miRNA抗性Sod1的序列 (SEQ ID NO:9)

[0176] TCAATATTGCCATTAGCCATTATTCATTGGTTATAGCATAATCAATATTGGCTATTGGCATTGCAT
GCATACGGTATCTATCATAATATGTACATTATGGCTCATGTCCAATATGACGCCATGTTGGCATTGAT
TATTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGT CATTGACGTAGCCATATGGAGTTCCCGTACATAA
CTTACGGTAAATGCCCGCCTGGCTGACGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCAT
AGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCATTGACGTCAATGACGGTAAATGCCCGCCTGGCATTGCCCAGTAC
ATGACCTTACGGACTTCCACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCAGGTGAGGCC
CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTGTATTATTATTAAATTATTT
GTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGCGGGCGAGGGCGGGCGGGCG
AGGCGGAGAGGTGCGCGCGCAGCCAATCAGAGCGCGCGCTCCGAAAGTTCCTTTATGGCGAGGC GGCGGGCG
GCGCCCTATAAAAGCGAAGCGCGCGCGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCCTGCCCGTCCCCGCTCCGCC
GCCGCCCTCGCGCCGCCGCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGCCCTCTCC
TCCGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTGTTCTTCTGTGGCTGCGTGAAGCCTTGAGGGCTCC
GGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGTGCCTGCGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC
CCCGCGCTGCCCGGGCTGTGAGCGCTGCCCGCGCGGGCTTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCG
CGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCCGCGGGCTGCGAGGGAAACAAAGGCTGCGTGCAGGTGAGCG
GGGGGTGAGCAGGGGTGTGGCGCGCGGTGCGAGGGCTGCGTGGGGAGGGCGGGCGGCCGGAGCGCC
GGCGCGCTGTCAGGCGCGCGAGCCATTGCTTATGTAATCGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCC
GTCCCAAATCTGTGCGGAGCCAAATCTGGAGGCGCCGCACCCCTCTAGCGGGCGGGCGAAGCGGTGCG
GCGCCGGCAGGAAGGAAATGGCGGGAGGGCTCGTGCCTGCCGCCGTCCCTCTCCAGCCT
CGGGCGTCCCGCGGGGACGGCTGCCCTGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTGCGCTGTGACCG
CGGCTCTAGCCGGCGACCGGTATGCATCCTGGAGGCTGCTGAAGGCTGTATGCTGATGAAACATGGAATCCATGCAG
GTTTGGCCACTGACTGACCTGCATGGTCATGTTCATCAGGACACAAGGCCGTACTAGCACTCACATGGAACAA
ATGGCCCTAGCTCGCATGCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCCTCTTCTACAGCTCTGG
GCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGCTCATTTGGCAAAGAATTCTCGAAGATCTAGGAAATCGATATCAAGC
TTGGGGATTTCAAGGCACCACCTGACCTGGACAGTGTAAACGACACGATCCAATGGCGACGAAGGCCGTGCG
TGCTGAAGGGCGACGGCCAGTGCAGGGCATCATCAATTGAGCAGAAGGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGG

CN 118006607 A

GGAAAGCATTAAAGGACTGACTGAAGGCCTGCACGGCTTACGTCCACGAGTTGGAGATAATACAGCAGGCTGTAC
CAGTGCAGGTCTCACTTAATCCTCTATCCAGAAAACACGGTGGCCAAGGATGAAGAGAGGCATTTGGAGACT
TGGGCAATGTGACTGCTGACAAGATGGTGTGCCGATGTGCTATTGAAGATTCTGTATCTCACTTCAGGAGAC
CATTGCATCATTGCCGCACACTGGTGGCATGAAAAAGCAGATGACTTGGCAAAGGTGAAATGAAGAAAGTAC
AAAGACAGGAAACGCTGGAAGTCGTTGGCTTGGTGTAAATTGGGATGCCAATAAACATTCCCTGGATGTAGT
CTGAGGCCCTTAACTCATCTGTTATCCTGCTAGCTGTAGAAATGTATCCTGATAAACATTAAACACTGTAATCTTA
AAAGTGTAAATTGTGTGACTTTTCAGAGTTGCTTAAAGTACCTGTAGTGAGAAACTGATTATGATCACTGGAAAG
ATTGTATAGTTTATAAAACTCAGTAAAATGTCGTTCAAGGCCGCTCGAGCAGACATGATAAGATAACATTGA
TGAGTTGGACAAACCACAACAGAATGCAGTAAAAAAATGCTTATTGTGAAATTGTGATGCTATTGCTTTAT
TTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACACAAACAATTGCATTCAATTGTTCAAGGTTCAAGGGGAG
ATGTGGGAGGTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCGA

[0177] >双顺反子H1-SOD1-miR-CB-SOD1 (SEQ ID NO:10) 的序列;miR抗性SOD1靶为粗体; SOD1编码序列为小写字母

[0179] TGCTTATTGTGAAATTGTATGCTATTGTTATTGTAACCAATTATAAGCTGCA
ATAAACACAAGTTAACACAACAATTGCATTTCATTATGTTCAGGTTCAGGGGGAG
ATGTGGGAGGTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAA
GGATCT

[0180] >CB-miR-CB-SOD1 (SEQ_ID_NO:11) 的序列;miR抗性SOD1靶为粗体;SOD1编码序列为小写字母

- TCAATATTGCCATTAGCCATTTCATTGGTTATAGCATAAATCAATATTGG
 CTATTGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTATATTGGCTC
 ATGTCCAATATGACCGCCATGTTGCATTGATTATTGACTAGTTATTAGTAATC
 AATTACGGGTCAATTAGTCATAGCCCATAATGGAGTTCCCGTACATAACTTAC
 GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAA
 TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTG
 GAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG
 TCCGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAATGGCCCTGGCATTATGCCAGT
 ACATGACCTTACGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA
 TTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCT
 CCCCACCCCCAATTGTATTATTATTATTATTATTGTGCAGCGATGGGGC
 GGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGG
 CGGGCGAGGCAGAGGGTGCAGGCCAGCCAATCAGAGCGCGCCTCCGAAA
 GTTTCCTTTATGGCGAGGCCAGGCCAGGCCCTATAAAAGCGAAGCGC
 GCGGGCGGGAGTCGCTGCAGCCTGCCTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCC
 CTCGCAGCCGCCCGCCCGCTACTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGC
 GGGACGGCCCTCTCCTCCGGCTGTAATTAGCGCTGGTTAATGACGGCTTGT
 CTTTCTGTGGCTCGTGAAAGCCTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGG
 GGGGAGCGGCTCGGGGGTGCCTGCGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC
 GGCCCGCCTGCCCGCGCTGTGAGCGCTGCCGGCGCGGGGCTTGTGCG
 CTCCGAGTGTGCCAGGGGGAGCGCGGGCGGGCTGTAAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGA
 GTTGCAGCACGCCCGCTCGGGTGCAGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGGG
 GGCTCGCCGTGCCGGCGGGGGTGGCGGAGGTGGGGTGCAGGGGGCGGG
 GCCGCCTCGGCCCCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCCCCGGAGCGCC
 GCGGGCTGTCGAGGCAGGCCAGCCATTGCCCTTATGGAATCGTGC
 GAGGGCGCAGGGACTCCTTGTCCAAATCTGTGCGGAGCCAAATCTGGGAGGC
 GCCGCCGCACCCCCCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCCGCCAGGAA
 GGAAATGGCGGGGAGGGCCTCGTGCCTGCCGCCCTCTCCCT
 TCCAGCCTCGGGCTGTCCCGGGGGACGGCTGCCTCGGGGGACGGGAG
 GCGGGGGTCTGGCTCTGGCGTGTGACCGGGCTCTAGCCGCGACCGGTATGCA
 TCCTGGAGGCTGTGAAGGCTGTATGCTGATGAACATGGAATCCATGCAGGTTT
 GCCCACTGACTGACCTGCATGGCCATGTTCATCAGGACACAAGGCCTGTTACTAG
 CACTCACATGGAACAAATGGCCCCTAGCTCGCGATGCATCTAGAGCCTGCTAAC
 CATGTTCATGCCTCTTCTACAGCTCGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGC
 TGTCTCATCTTGGCAAAGAATTCTCGAAGATCTAGGAAATTGATATCAAGC
 TTGGGATTTCAGGCACCACACTGACCTGGACAGTGTAAACGACACGATCCAat
 ggcgacgaaggccgtgtcgctgaaggcgcggccactcatcaattcgagcagaaggaaagtatggaccagt
 gaagggtgtgggaagcattaaaggactgaaggc**ctgcacggcttcaegtcac**cgagttggagataatacagcaggctgtacc
 agtcaggcctcacttaatcctatccagaaaacacgggtggccaaaggatgaagagaggcatgtggagacttggcaatgtact
 gtcgacaaagatgggtggccatgtgtctattgaagattctgtatctcacttcaggagaccattgcattggccgcacactgggtgt
 cataaaaaagcagatgtggcaaaagggtggaaatgaagaaagtacaagacaggaaacgtgtaactgtgttttttttttttttt
 gggatcgcccaataaacattccctggatgttgtcgaggcccctaactcatctgttacccctgtactgttagaaatgtatctgtata
 aaacactgtaatctaaaagtgttaattgtgtgactttcaggttgcttaagtacctgttagtgatggaaactgtatgtacttgc
 gtatagtttataaaactcagttaaaatgtgttcaaGGCCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATAACATTGA
 TGAGTTGGACAAACCACAACAGAATGCAAGTGGAAAAAAATGCTTATTGTGAAA
 TTTGTGATGCTATTGCTTATTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTTAAC
 ACAACAATTGCATTCATTATGTTCAAGGTCAGGGGAGATGTGGGAGGTTTTT
 AAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCGA
- [0183] >自身互补的H1-SOD1-miR-CB-SOD1的序列(w/3' UTR) (SEQ ID NO:12); AAV ITRs
 为黑体

CCCTGCAGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGCAAAGCCCGGGCGTCG
GGCGACCTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA
GTGGAAATTCTAAATTCATATTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCAT
 AACGTGAAATGTCTTGGATTGGAAATCTTATAAGTCTGTATGAGACCACCGCC
 TGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGATGAACATGGAATCCATGCAGGTTTG
 CACTGACTGACCTGCATGGCCATGTCATCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCAC
 TCACATGGAACAAATGGCCCTTTCTAGTGGTACGTCGTTACATAACTACGGTA
 AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGAC
 GTATGTTCCCAGTAACCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT
 ATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG
 CCCCCATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAAGTACAT
 GACCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACTCGAGGCCACGTTCTGCTC
 ACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTGTATTATTTATTTTAAT
 TATTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGG
 GGGCGGGCGAGGGCGGGCGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGCAGCCAA
 TCAGAGCGCGCGCTCGAAAGTTCTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCG
 CCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGAGCGGGATCAGCCACCGCGGTGGC
 GCCCTAGAGTCGACGAGGAACGTAAAAACAGAAAGTTAACGGTAAGTTAGTC
 TTTTGTCCTTATTTCAGGTCCCGATCCGGTGGTGGTCAAATCAAAGAACTGCT
 CCTCAGTGGATTTGCCTTACTCTAGGCCTGTACGGAAAGTGTACTCTGCTCTA
 AAAGCTGCGGAATTGTACCCCGGGCGATCCAatggcgacgaaggccgtgtcgctgactgaag
 gccccagtgcaggcatcatcaattcgagcagaaggaaagtaatggaccagtgaaggtgtgggaaagcattaaaggactgactgaag
 gcctgcacggcittcacgtccacgcggatggagataatacagcaggctgtaccagtgcaggcctcacttaatcctatccagaaaacac
 ggtggccaaaggatgaagagaggcatgtggagacttggcaatgtactgtaccaaaagatgggtggccatgtgtctattgaat
 tctgtatctacttcaggagaccatgtcatatggccgcacactgtgggtccatgaaaaggcagatgacttggccaaagggtggaaatg
 aagaaagtacaagacagggaaacgcgtggaaactgtttggctgttaattggatgc
 gcccctaactcatctgttatctgtactgttagaaatgtatccgtataaactttaaaagtgtatgtgtactttca
 gagttgtttaaagtacctgttagtgagaaactgtattatgtatcttggaaatctgtttttca
 AGACATGATAAGATAACATTGATGAGTTGGACAAACCACAAACTAGAATGCAGTGA
 AAAAATGCTTATTGTGAAATTGTGATGCTATTGCTTATTGTAACCATTATA
 AGCTGCAATAAACAAAGTTAACACAAACAATTGCATTCTATTGTTCAAGGTCA
 GGGGGAGATGTGGAGGTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAA
 ATCGATAAGAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTGCGCGC
TCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCGGCCTT
GCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCCT

[0184]

>自身互补的H1-SOD1-miR-CB-SOD1(w/o 3' UTR)的序列(SEQ ID NO:13);AAV ITR
为黑体

[0186]

CCCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGCAAAGCCCGGGCGTCGGCGACCTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGAAATTCTAAATTCATATTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGAAATCACCATAACGTGAAATGTCTTGAGTGGAAATCTATAAGTTCTGTATGAGACCACACTGCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGATGAACATGGAATCCATGCAGGTTTGGCACTGACTGACCTGCATGGCCATGTCATCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCTTTTCTAGTGGTACGTCGTACATAACTTACGGTAATGGCCCGCCTGGCTGACGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATACTAACCACATAGTAACCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACTCGAGGCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTGTATTTATTTTTAATTATTTGTGCAAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCAGGGCAGCCAACTAGCGCGCGCTCCGAAAGTTCCATTGCGAGGCCGCGCGCGCGCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCCGGAGCGGGATCAGCCACCGCGCGTGGCGCTAGAGTCGACGAGGAACGTAAAAACAGAAAGTTAACCTGGTAAGTTAGTCCTTTGTCTTTATTTCAGGTCCCAGTCCGGTGGTGGTCAAAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTACTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTCTGCTCTAAAGCTGCCAATTGTACCCGCCGATCCAAtggcagcaaggccgtgtgcgtgtgaaggcgacggccagtgcagggcatcatattcgagcagaaggaaagtaatggaccagtgaaggtgtgggaagcattaaaggactgactgaaggcctgcacggcittcacgtccacgagttggagataatacagcaggctgtaccagtgcaggcctcatattcacttgcacacttgccgcacacttggtccatgaaaaggcagatgacttggccaaagggtggaaatgaaaggatacaaagacaggaaacgcgttgcgttgtgttaattggatgcgccaataaaCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTGGACAAACCACAAACTAGAACATGCAGTGGAAATTGCTTATTGTGAAATTGCTTATTGTAAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACAAACAACAATTGCATTCAATTGTTCAAGGTTCAAGGGGAGATGTGGGAGGTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCGATAAGAAGGAACCCCTAGTGTGGAGTTGCCACTCCCTCTCGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAGGTGCCGACGCCCGGGCTTGCCTGGCGCCTCACTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT

[0187]

>单链CB-miR-CB-SOD1 (w/3' UTR) 的序列 (SEQ ID NO:14) ; AAV ITR为黑体

GGGGGGGGGGGGGGGGTTGGCCACTCCCTCTCGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAGGTGCCGACGCCGGCTTGCCTGGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCAACTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTCAATATTGCCATTGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTATATTGGCTCATGTCATATGACCGCCATTGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAGTAGTAACTAACGGGTCAATTACGGGTCAATTGTCATAGCCCATATATGGAGTTCCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATTGTAACGCCAACAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTAT

[0188]

CATATGCCAAGTCCGCCCCATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCA
 TTATGCCCAAGTACATGACCTTACGGGACTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT
 AGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCAT
 CTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTGTATTATTATTAAATTATTTGTGCA
 GCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCAGGGCGGGCGGGCGGGC
 GAGGGGCGGGCGGGCGAGGCAGGGTGCAGGCAGGCCATCAGAGCGGC
 GCGCTCCGAAAGTTCTTTATGGCAGGGCGGGAGTCGCTGCAGCCTCGCCCCGTGCCCCGC
 TCCGCCGCCCTCGGCCGCCGCCGCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACA
 GGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTCTCCTCCGGCTGTAATTAGCGCTGGTTAAC
 GACGGCTTGTCTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTGAGGGGCTCCGGGAGGGC
 CCTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGTGCCTGCGTGTGTGCGTGGGA
 GCGCCGCGTGCAGGGCCCGCGCTGCCCGCGCTGTGAGCGCTGCAGGGCGGGCG
 GGGCTTGTGCGCTCCGAGTGTGCGAGGGGAGCGCGGGGGGGCGGTGCCC
 CGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAAACAAAGGCTGCGTGCAGGGGTGCGT
 GGGGGGGTGAAGCAGGGGTGTGGCGCGCGGTGGCTGTAACCCCCCTGCA
 CCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGCTTCGGGTGCGGGCTCCGTACGG
 GCGTGGCGCGGGCTCGCCGTGCCGGCGGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGTGCC
 GGGCGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGCGCGGGCG
 CCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCAGGCCAGGCCATTGCCTTAT
 GGTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTGTCCAAATCTGTGCGGAGCCG
 AAATCTGGAGGCAGCCGCACCCCTCTAGCGGGCGGGCGAACCGGTGCG
 GCGCCGGCAGGAAGGAATGGCGGGGAGGGCCTCTCGTGCCTGCCGCCCG
 TCCCTTCTCCCTCCAGCCTCGGGGCTGTCGCGGGGGACGGCTGCCCTCGGG
 GGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTGGCTTCTGGCGTGTGACCGGGCGGCTAGCCG
 GCGACCGGTATGCATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGATGAACATGGAA
 TCCATGCAGGTTTGCCACTGACTGACCTGCATGGCATGTCATCAGGACACA
 AGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCTAGCTCGCATGCA
 GAGCCTTGCTAACCATGTTCATGCCTCTTCTTACAGCTCCTGGCAACG
 TGCTGGTTATTGTGCTGTCATCTTGGCAAAGAATTCTCGAAGATCTAGGGAA
 ATTGATATCAAGCTGGGGATTTCAGGCACCACACTGACCTGGGACAGTGTAA
 ACGACAGTCCAatggcgacgaaggccgtgtcgctgacttgcggccatcatcaattcgagc
 agaaggaaagtaatggaccagtgaagggtgggaagcattaaaggactgactgaaggccctgcacggcttcacgtccacgaggatgg
 gataatacagcaggctgaccagtgcaggctacttaatcttatccagaaaacacgggtggccaaaggatgacttgcacggatcat
 ggagacttggcaatgtgactgtgacttgcacaaaggatgggtggccatgttgcatttgcacttgcacttcaggagaccatgcac
 atttggccgcacactgggtgtccatgaaaaaggacttgcacggatggcaaaaggatgacttgcacggatggcaatgg
 gtcgttggcttgtggtaattggatgcacaaaatcccttgatgttagtctgaggcccctaactcatctgttatcctgttagctgta
 gaaatgtatcgtataaacaactgtaatctaaaaggatgtaatgtgactttcaggttgcattaaaggatctgttagtgc
 atttatgatcacttggaaagattgtatgttataaaactcagttaaaatgttcaaGGCCGCTTCGAGCAGACATGA
 TAAGATACATTGATGAGTTGGACAAACCACAACACTAGAATGCAGTGAAAAAAATG
 CTTTATTGTGAAATTGTGATGCTATTGCTTATTGTAACCATTATAAGCTGCAAT
 AAACAAGTTAACAAACAATTGCATTCTTATGTTCAAGGTTCAAGGGGGAGAT
 GTGGGAGGGTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCGACGATA
 AGGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTGCGCGCTCG
CTCGCTCACTGAGGCCGCCGGCAAAGCCCAGGGTGGGACCTTGGT
CGCCCGGCCCTAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGCAA

[0189] >单链CB-miR-CB-SOD1 (w/3' UTR) 的序列 (SEQ ID NO:15) ; AAV ITR为黑体

GGGGGGGGGGGGGGGGGTGGCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
 GAGGCCGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTGCCCCGGCGGCCT
 CAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAATCCATCACTAGGGG
 TTCCTAGATCTAATATTGCCATTGCCATAGCATACGTTATCTATATCATAATATGTACATT
 TCAATATTGGCTATTGCCATTGCATACGTTATCTATATCATAATATGTACATT
 ATATTGGCTATGCCAATATGACGCCATGTCATTGATTGACTAGTTATT
 AATAGTAATCAATTACGGGTCTAGTCATAGCCATATGGAGTTCCCGCGTT
 ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACGCCAACGACCCCCCGCCCATT
 GACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGAC
 GTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTAT
 CATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCA
 TTATGCCAGTACATGACCTTACGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT
 AGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCAT
 CTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTGTTATTATTATTATTATTATTGCA
 GCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGCGGGCGGGCGGG
 GAGGGGCGGGGCGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGGAGCCAATCAGAGCGGC
 GCGCTCCGAAAGTTCTTTATGGCAGGGCGGGAGTCGCTGCAGCCTGCTCGCCCCGTGCCCCGC
 TCCGCCGCCGCTCGGCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACA
 GGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTCTCCTCCGGCTGTAATTAGCCTGGTTAAT
 GACGGCTGTTCTTCTGTCGTGAAAGCCTGAGGGCTCCGGAGGG
 CCTTGTGCGGGGGAGCGGGCTGGGGGTGCGTGTGTGCGTGGGA
 GCGCCGCGTGCAGCGCCGCTGCCGCTGAGGGAGCGCGGGCGGGCGCG
 GGGCTTGTGCGCTCCGAGTGTGCGCAGGGGAGCGCGGGCGGGCGCG
 CGCGGTGCGGGGGGGCTGCAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCAGGGGTGTGCGT
 GGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGCGCGGGCTGTAACCCCCCTGCA
 CCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTCAGGGTGCAGGGCTCCGTACGG
 GCGTGGCGCGGGCTGCCGTGCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 GGGCGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGCGCG
 CCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGCGAGGCGCGAGGCCAGCCATTGCTTTAT
 GGTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTTCTTTGTCCTAAATCTGTGCGGAGCCG
 AAATCTGGGAGGGCGCCCGCACCCCTCTAGCGGGCGGGCGAAGCGGTGCG
 GCGCCGGCAGGAAGGAATGGGGGGAGGGCCTCGTGCCTGCGCCGCCCG
 TCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGCTGTCGCGGGGGACGGCTGCCTCGGG
 GGGGACGGGGCAGGGCGGGGGTCCGGCTTCCGGTGTGACCGGGGGCTAGCCG
 GCGACCGGTATGCATCCTGGAGGCTGTAAGGCTGTATGCTGATGAACATGGAA
 TCCATGCAGGTTGGCCACTGACTGACCTGCATGGCCATGTTCATCAGGACACA
 AGGCCTGTTACTAGCACTACATGAAACAAATGGCCCTAGCTCGCATGCACT
 GAGCCTGCTAACCATGTTCATGCCTCTTCTTCTACAGCTCTGGCAACG
 TGCTGGTTATTGTGCTGTCATCTTGGCAAAGAATTCTCGAAGATCTAGGGA
 ATTGATATCAAGCTGGGGATTTCAGGCACCACACTGACCTGGACAGTGT
 ACGACACGATCCAatggcgacgaaggccgtgtcgctgaaggcgacggccagtg
 cagggcatcatcaatttcgagc
 agaaggaaagtaatggaccagtgaagggtgggaagcattaaaggactgact
 gaaggccgtgcacggccatgttccacgtccacgagtttgg
 gataatacagecaggctgtaccagtgcaggcctcaatttaatcccttatcc
 gagaaaacacggccatgttccacgtccacgagtttgg
 ggagactggccatgtgactgtgacaatgggtggccatgttccatgt
 gatctacttcaggagaccatgt
 atggccgcacactgggtggccatgaaaaagcagatgacttggcaaaagg
 gtggaaatgaagaaagttacaagacaggaaacaggcatgg
 gtcgttggctgtgtgtaattggatcgccaaataaaGAGCAGACATGATA
 AGATACATTGATGAGTTG
 GACAAACCAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTATTGTGAAATTGTGAT
 GCTATTGCTTATTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAGTTAACACAA
 TTGCATTCTTATGTTCAGGTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTAAAGCAA
 GTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCGACGATAAGGATCTAGGAACCCCTAGT
GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCC
GGGCAAAGCCCCGGCGTGGGCGACCTTGGTGCCTGGCCAGTGA
GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

[0193] >SOD1启动子插入序列 (SEQ ID N0:16)

[0194] GTGAGCTGAGATTGCACCACTGCACTCCAGCCTGGTACAGAGTGAGACTCCATATCAAATAATACA
 TAAATAAATAAAAACAGTGATTCTAACTGGGAGTGATTGGCAACGTCTGGAATTATTTGGTATCCCAGCCTG
 GCAGGGAGGGACAGGGTATTACTGGCATCTAGTGAGTAGGGCTAGGGATTCTACTGAACATCCTACAGTGACAGG
 ACAGCCTCCACAGCAAAGAACTGTCTGGCCAAAATGTCCATAGTGCCACATTGATGCCCTGCATTAGGAAGATA
 TAAATACTCTAAATATCACAGAGTTAAATTCTTACCCCTGTTAGCAGAGATGATATTCTGCGGGGGAGCAT
 CTTCTGGCTCAACACATTCTTCTCCATGGGAGATGATGCCAGAAGAGGGACAGAACAGGGCCAGTAAGCAT
 GGGCCTGGGCCAGGGACCCCCTGTTAGGTGTGACGACCACCTACGAAGGCACCACCCAGGCATCATTAGACC
 GTCTCAAAGAAGAGTAATTCACTGTCCAAAGCAGCTCTCGTGTGTGGCGGATCCCTGGCAAGTTACAA
 TGAACGTAAATCTGCCGAACCTCTGGAACCCAAAGAAACTTAGCCTGGCAAAGGCCTTGCCAGCATTG
 ACTGTTATGCAACCGTTAGAATATACGAATTATCTGGAGACTACTACCAAATAACACAGGCAAAACTGCAAATAT
 GTATACTTCCTAGAGGATGATAAAAAATGTGAATTGTATTCTCTGATAGAGGATGCATTAGAGTCTGAGGGTCTA
 AATAGCGTAAATAATAAGTAAATAATCGATAGTAGTGACTCCAACGAGGCTGGAATAGCTCTATTGTTG
 TTTCACACTGGACTTCAATTAGTCTCAGTATTGCCCCACTCAATATTAGTACTAGGCTGGACGTGGTGGCTCA
 TGTCTGTAATCCCAGCAGCTTGGGAGGCCAGGGTAGATGGCTGGCTGAGCTCAGGAGTTGAAACCAGCCTG
 GGCAACATGGTAAACCCATCTGTACCCAAAATACAAAATCAGCCAGGTGTGGCACATGCCGTGGTCCCAG
 GTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGGATGGCTGAACCCAGGAGGTGGAGGCTGCAGTGAGCTATGATGGCGCCACTG
 CACTCCAGCCTGGGTGACAGAGCGAGACCTGTCTCAAACAAACAAACCCCTGCCCGGACAAAGTAG
 TTTGCACTATTCTCATTCAAAATGTTTGAATATTCCCTGAAAGGTAAGTCATATTATCATTCTGT
 TGTATGGAGGCATCATAAATTATTCAACCATTCTACCCCTTGAGTGTGTTGCCATTAGGCCAGACAAAAACGCA
 GGTGATGCCCTAGAGCCAACAGCTAGTGCGTTGGTTATCTGTAGGGTTGCGCTGCCAACAGGAAAAATATAAA
 AAGAATACCGAATTCTGCCAACAAATAAGAAACTCTACTAAGGACTAAGAAAATGCAGGGAAAGAAAAGGTAA
 GTCCCGGGATTGAGGTGTAGCGACTTCTATACCCCTCAGAAAACAAAAACAGACAAAAAAATGAAAACACTACAAA
 AGCATCCATCTTGGGGCGTCCAAATTGCTGAGTAACAAATGAGACGCTGTGCCAACACTCAGTCATAACTAATGACA
 TTTCTAGACAAAGTACTTCAGATTCAAAGCGTACCCCTGTTACATCATTGCCAATTGCGTACTGCAACCG
 GCGGGCCACGCCCCCGTGAAGAAGGTTGTTCTCACATTGGGGTTCTGGACGTTCCGGCTGCCGGCG
 GGGGAGTCTCCGGCGCACGCCCTGGCCCGCCCCAGTCATTCCCGCCACTCGCAGCCGAGGCTGCCGA
 GGGGGCGGCTGAGCGCTGCGAGGCGATTGGTTGGGCCAGAGTGGCGAGGCGCGAGGTCTGCCATTAAAGT
 AGTCGCGGAGACGGGTGCTGGTTGCGTCTAGTCTCCTGCAGCGTCTGGGTTCCGTTGCACTCCTCGGAACCA
 GGACCTCGCGTGGCCTAGCGAGTT

[0195] >野生型SOD1氨基酸序列;NCBI参考序列NP_000445.1 (SEQ ID NO:17) MATKAVCVL
 KGDGPVQGIINFEQKESNGPVKVWGSIKGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHNPLSRKHGGPKDEERHVGDL
 GNVTDADGVADSVISLDHCIIGRTLVVHEKADDLGKGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ。

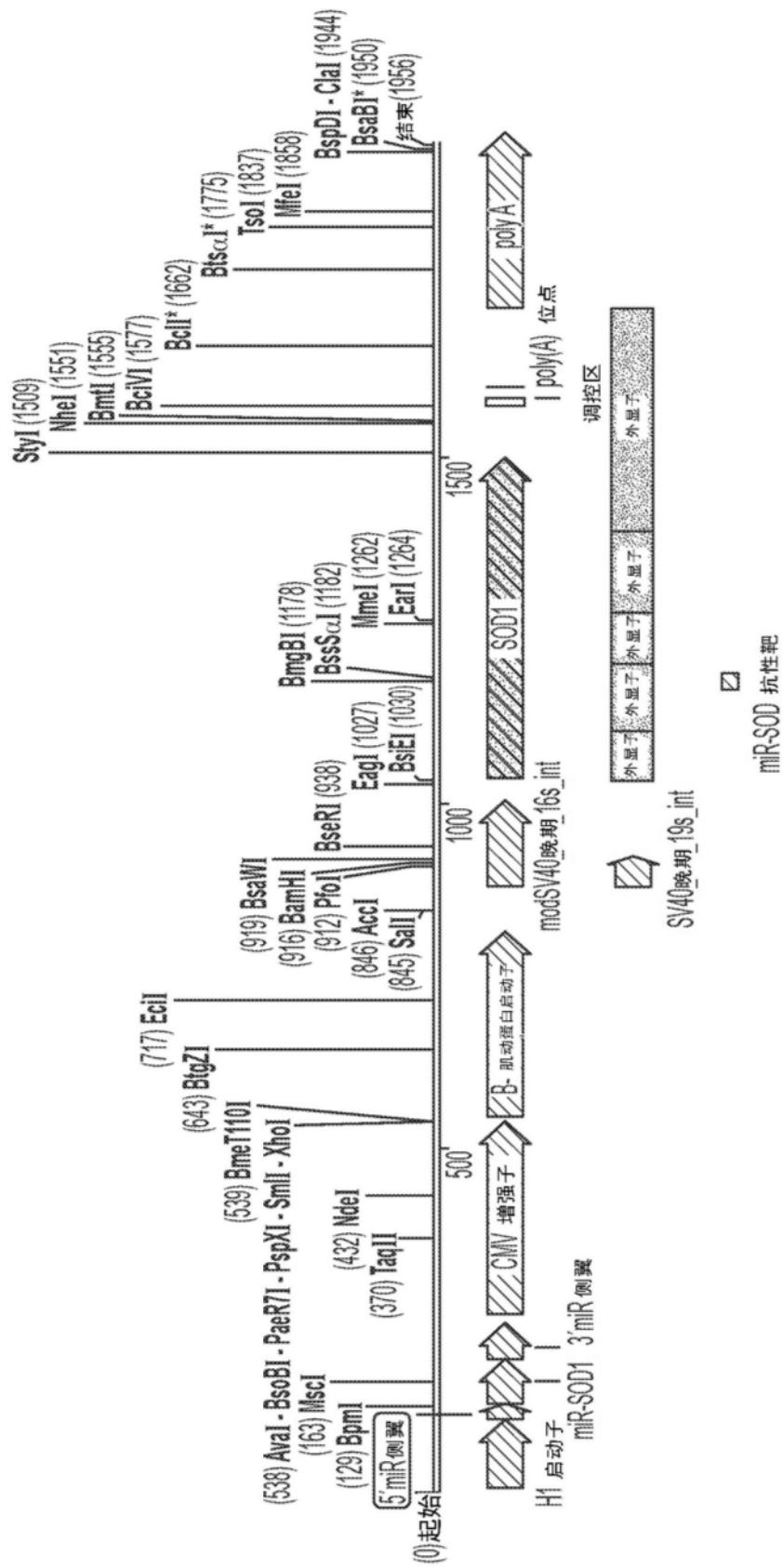


图1

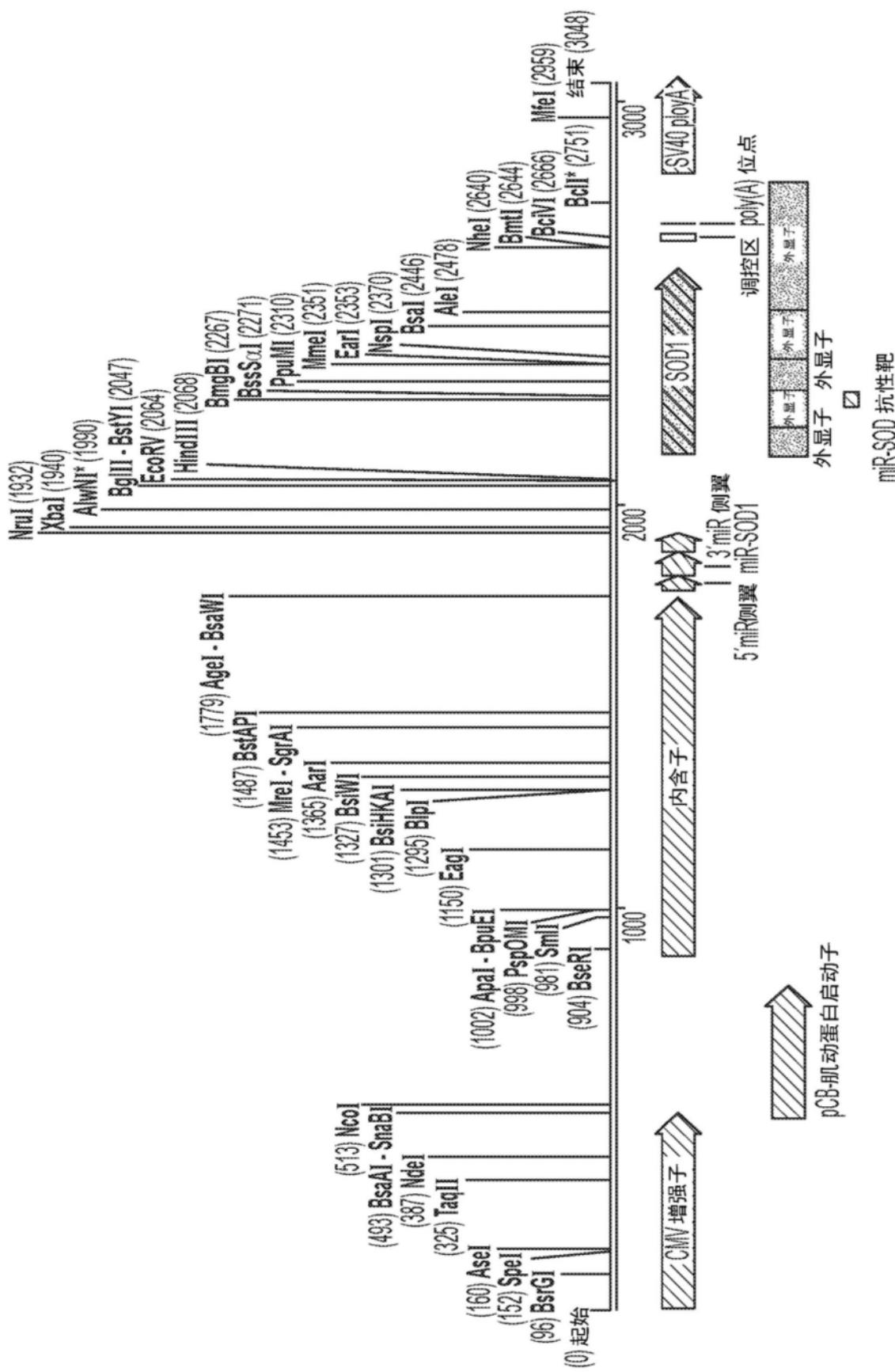


图2

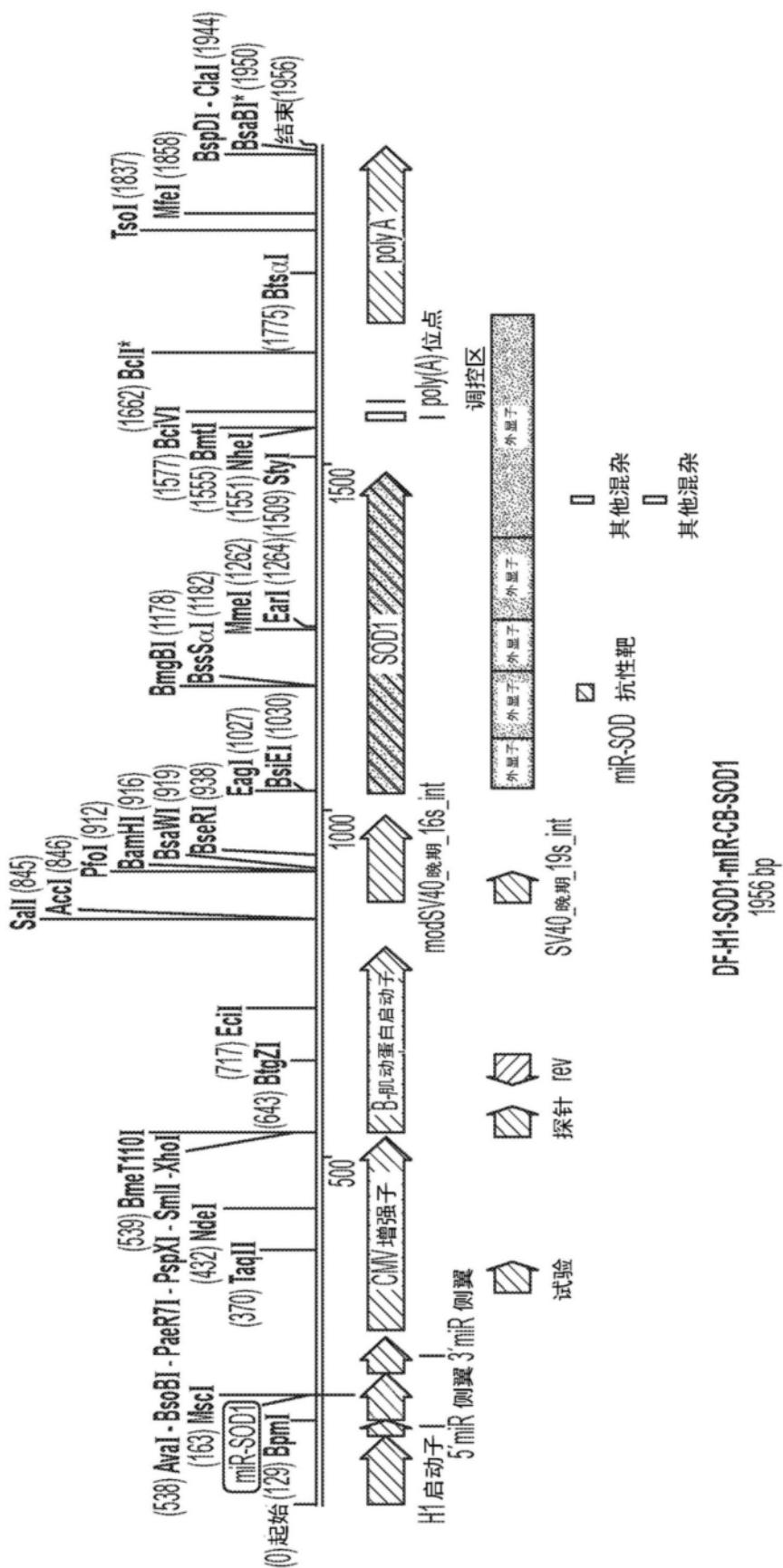


图3

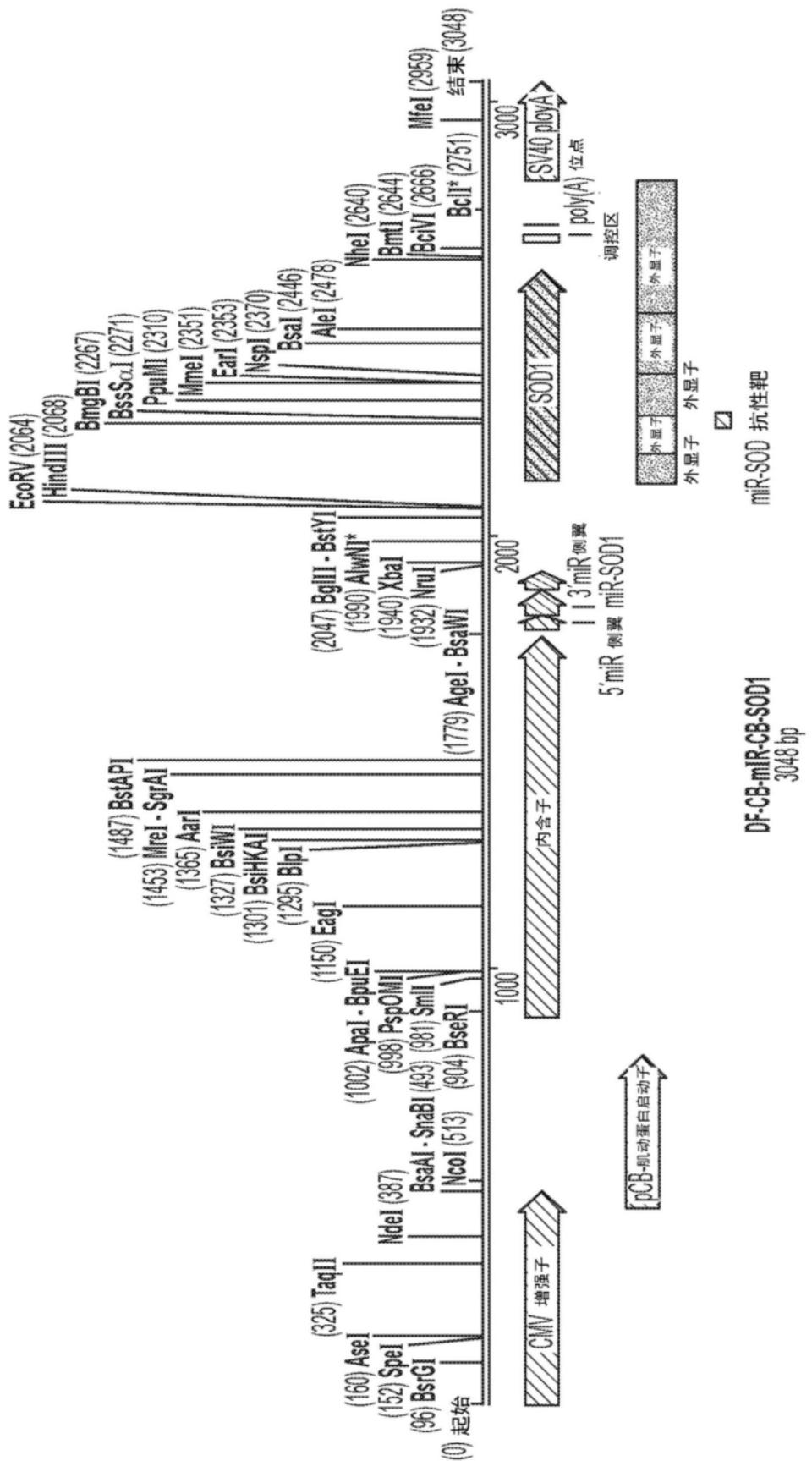


图4

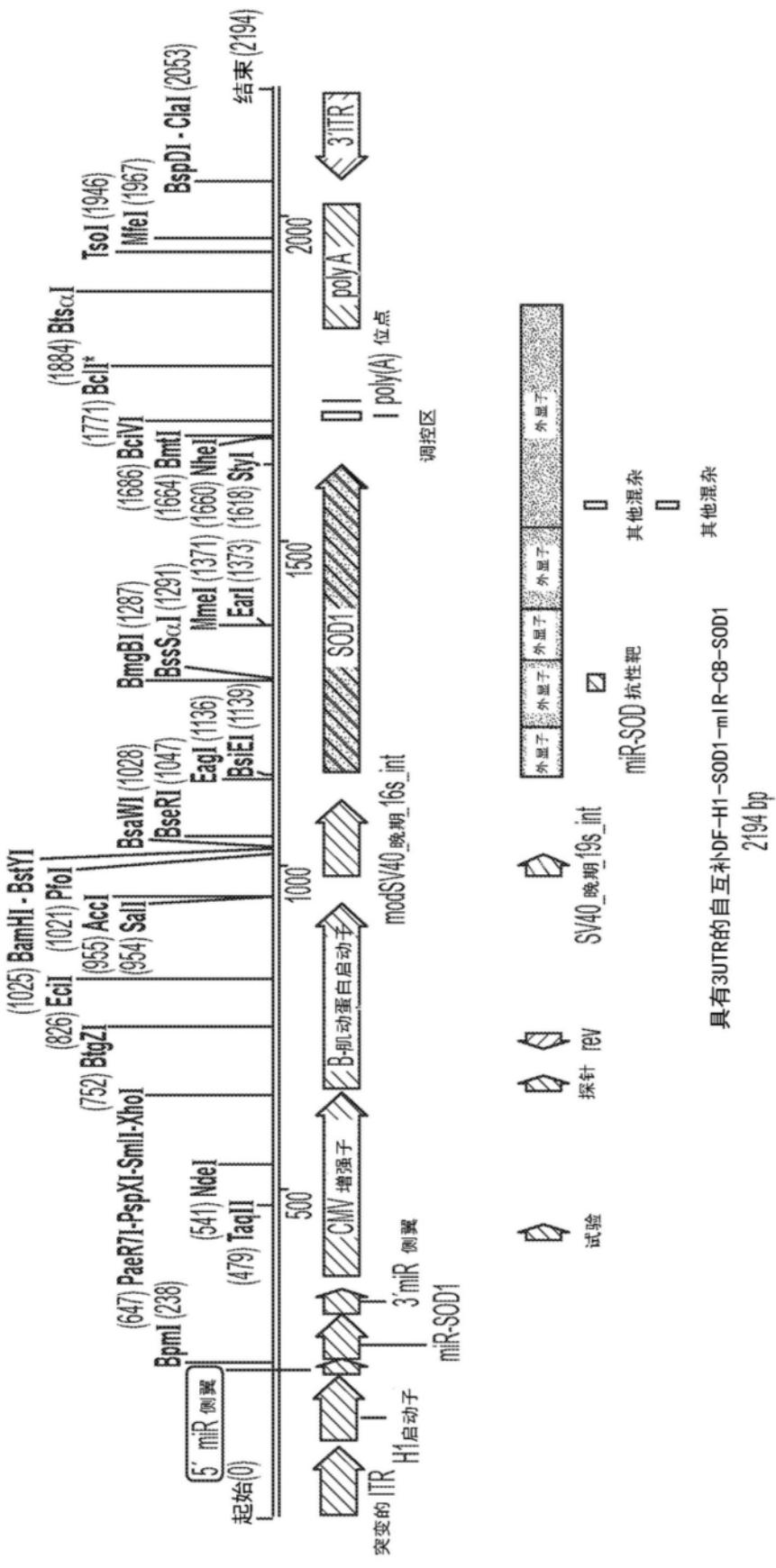


图5

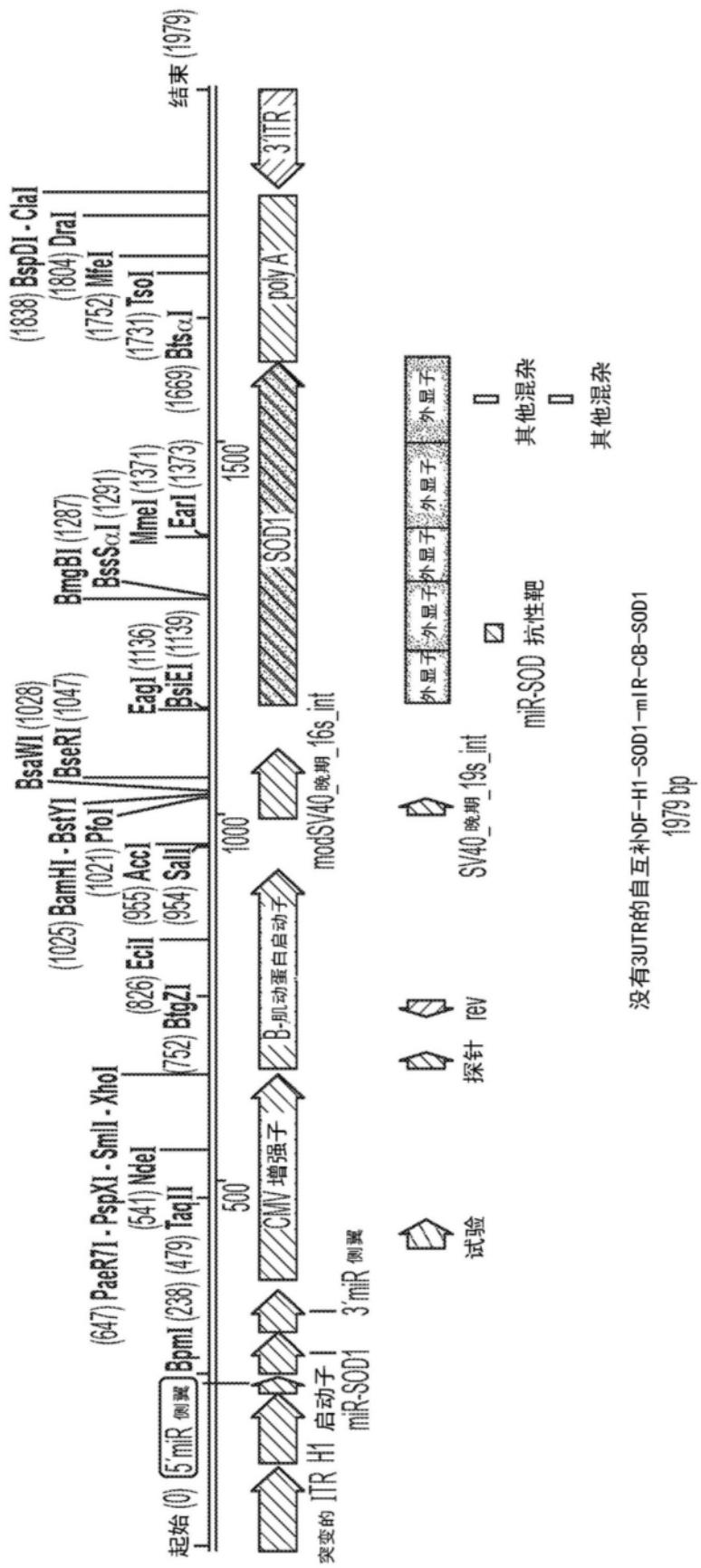


图6

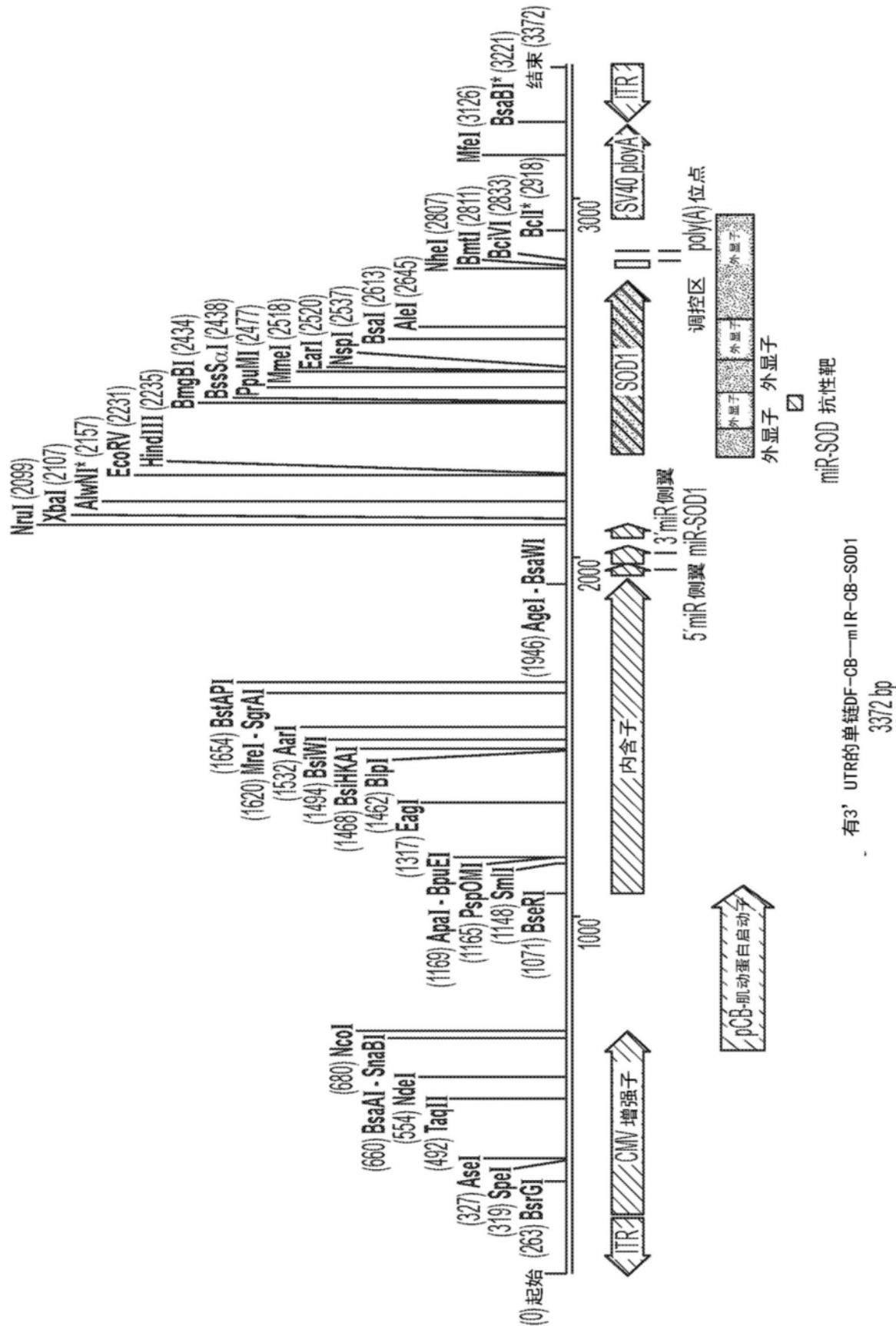
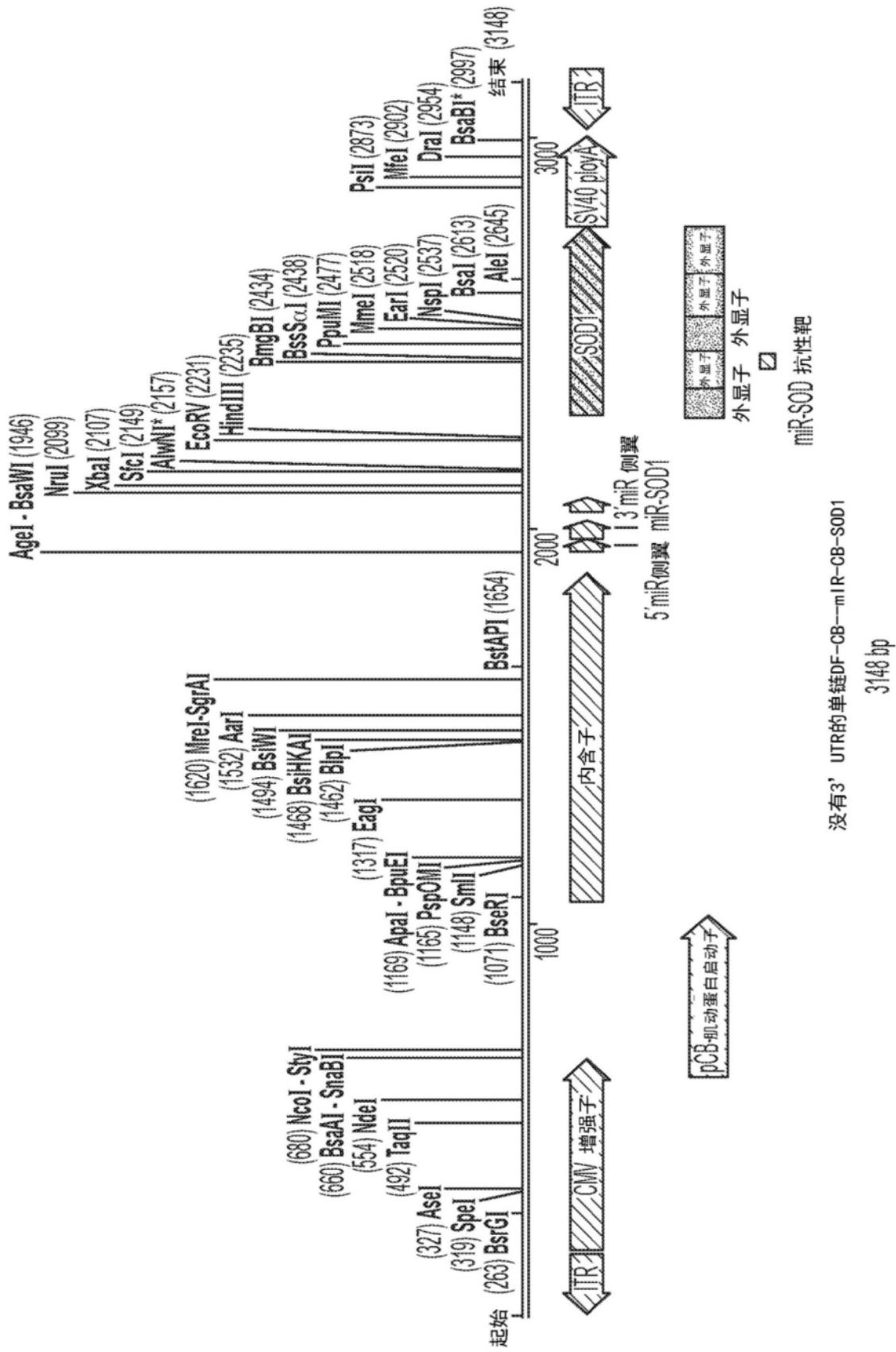


图7



野生型	atggcgacgaaggccgtgtcgctgctgaagggcgacggcccagtgcagggcatcatcaat	60
强化的	atggcgacgaaggccgtgtcgctgctgaagggcgacggcccagtgcagggcatcatcaat *****	60
野生型	ttcgagcagaaggaaagtaatggaccagtgaaggtgtgggaagcattaaaggactgact	120
强化的	ttcgagcagaaggaaagtaatggaccagtgaaggtgtgggaagcattaaaggactgact *****	120
野生型	gaaggcctgcatggattccatgttcatgagttggagataatacagcaggctgtaccagt	180
强化的	gaaggcctgacggcttcacgtccacgagttggagataatacagcaggctgtaccagt *****	180
野生型	gcaggtcctcacttaatcctctatccagaaaacacggtggccaaaggatgaagagagg	240
强化的	gcaggtcctcacttaatcctctatccagaaaacacggtggccaaaggatgaagagagg *****	240
野生型	catgtggagacttggcaatgtgactgctgacaaagatggtgtggccatgtgtctatt	300
强化的	catgtggagacttggcaatgtgactgctgacaaagatggtgtggccatgtgtctatt *****	300
野生型	gaagattctgtgatctcactctcaggagaccattgcatcattggccgcacactggtgtc	360
强化的	gaagattctgtgatctcactctcaggagaccattgcatcattggccgcacactggtgtc *****	360
野生型	cataaaaagcagatgacttggcaaagggtggaaatgaagaaagtacaaagacaggaaac	420
强化的	cataaaaagcagatgacttggcaaagggtggaaatgaagaaagtacaaagacaggaaac *****	420
野生型	gctggagtcgttggcttgtggtaattggatcgcccaataa	465
强化的	gctggagtcgttggcttgtggtaattggatcgcccaataa *****	465

图9