



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111448308 A

(43)申请公布日 2020.07.24

(21)申请号 201880064712.6

M·E·农嫩马赫 M·古利特

(22)申请日 2018.08.03

T·卡特

(30)优先权数据

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

62/540,776 2017.08.03 US

62/565,264 2017.09.29 US

62/572,706 2017.10.16 US

代理人 付文川 吴小瑛

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2020.04.03

C12N 7/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12N 15/86(2006.01)

PCT/US2018/045088 2018.08.03

A61K 39/12(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/028306 EN 2019.02.07

(71)申请人 沃雅戈治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 D·W-Y·沙 H·帕泽克 侯金兆

权利要求书8页 说明书223页 附图1页

(54)发明名称

递送AAV的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了用于预防和/或治疗疾病的腺相关病毒(AAV)颗粒的组合物以及制备、制造、配制方法和治疗用途。

1. 一种腺相关病毒 (AAV) 颗粒, 其包含衣壳和病毒基因组, 其中所述衣壳在递送 AAV 颗粒后穿透血脑屏障。

2. 根据权利要求 1 所述的 AAV 颗粒, 其中所述 AAV 颗粒包含衣壳或肽插入物, 所述衣壳或肽插入物选自 VOY101、VOY201、AAVPHP.B (PHP.B)、AAVPHP.A (PHP.A)、AAVG2B-26、AAVG2B-13、AAVTH1.1-32、AAVTH1.1-35、AAVPHP.B2 (PHP.B2)、AAVPHP.B3 (PHP.B3)、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP (3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3 (G2A3)、AAVG2B4 (G2B4)、AAVG2B5 (G2B5)、PHP.S、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、

AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、AAAV、BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhEr1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhEr1.23、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV改组100-1、AAV改组100-3、AAV改组100-7、AAV改组10-2、AAV改组10-6、AAV改组10-8、AAV改组100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真型AAV(ttAAV)、UPENN AAV 10、日本AAV 10血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AAV CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6.10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv1-1、AAV Clv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV Clv1-7、AAV Clv1-8、AAV Clv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、

AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8和/或AAVF9/HSC9,及其变体。

3. 根据权利要求2所述的AAV颗粒,其中所述衣壳是VOY101。

4. 根据权利要求3所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有至少95%的同一性。

5. 根据权利要求4所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有至少99%的同一性。

6. 根据权利要求5所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的氨基酸序列为SEQ ID NO:1。

7. 根据权利要求3所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的核酸序列与SEQ ID NO:1809具有至少95%的同一性。

8. 根据权利要求7所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的核酸序列与SEQ ID NO:1809具有至少99%的同一性。

9. 根据权利要求8所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的核酸序列为SEQ ID NO:1809。

10. 根据权利要求2所述的AAV颗粒,其中所述衣壳是VOY201。

11. 根据权利要求10所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的核酸序列与SEQ ID NO:1810具有至少95%的同一性。

12. 根据权利要求11所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的核酸序列与SEQ ID NO:1810具有至少99%的同一性。

13. 根据权利要求12所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的核酸序列是SEQ ID NO:1810。

14. 根据权利要求2所述的AAV颗粒,其中所述肽插入物是AAVPHP.N。

15. 根据权利要求2所述的AAV颗粒,其中所述肽插入物是AAVPHP.B。

16. 根据权利要求2所述的AAV颗粒,其中所述肽插入物是AAVPHP.A。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的AAV颗粒,其中递送是通过静脉内施用。

18. 根据权利要求17所述的AAV颗粒,其在静脉内施用后转导CNS结构。

19. 根据权利要求1-16中任一项所述的AAV颗粒,其中递送是通过颈动脉内施用。

20. 根据权利要求19所述的AAV颗粒,其在颈动脉内施用后转导CNS结构。

21. 根据权利要求18或20所述的AAV颗粒,其中所述CNS结构是选自以下的一个或多个区域:脑、脊髓、脑干核、小脑、大脑、运动皮层、尾状核、丘脑、下丘脑、颈脊髓、胸脊髓、腰脊髓、纹状体、黑质、海马体、杏仁核和/或大脑皮层。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的AAV颗粒,其中所述病毒基因组包含位于两个反向末端重复序列(ITR)之间的核酸序列,其中所述核酸在表达时抑制或阻抑细胞中目标基因的表达,其中所述核酸序列包含有义链序列和反义链序列,并且其中所述有义序列和反义链序列共享长度为至少四个核苷酸的互补区域。

23. 根据权利要求22所述的AAV颗粒,其中所述核酸序列包含siRNA双链体的有义链序列和反义链序列。

24. 根据权利要求22所述的AAV颗粒,其中所述目标基因选自SOD1、HTT、APOE和MAPT。

25. 根据权利要求22所述的AAV颗粒,其中所述互补区域的长度为至少17个核苷酸。

26. 根据权利要求25所述的AAV颗粒,其中所述互补区域的长度为19至21个核苷酸。

27. 根据权利要求26所述的AAV颗粒,其中所述互补区域的长度为19个核苷酸。

28. 根据权利要求22所述的AAV颗粒,其中所述有义链序列和所述反义链序列独立地为30个核苷酸或更少。

29. 根据权利要求22所述的AAV颗粒,其中所述有义链序列和所述反义链序列中的至少一个包含至少1个核苷酸的3'突出端。

30. 根据权利要求29所述的AAV颗粒,其中所述有义链序列和所述反义链序列中的至少一个包含至少2个核苷酸的3'突出端。

31. 根据权利要求22所述的AAV颗粒,其中以至少80%的比率从所述AAV颗粒切除所述反义链。

32. 根据权利要求22所述的AAV颗粒,其中以至少90%的比率从所述AAV颗粒切除所述反义链。

33. 根据权利要求22所述的AAV颗粒,其中以至少95%的比率从所述AAV颗粒切除所述反义链。

34. 根据权利要求22所述的AAV颗粒,其中以大于所述有义链的切除率的比率从所述AAV颗粒切除所述反义链。

35. 根据权利要求34所述的AAV颗粒,其中所述反义链的切除率比所述有义链的切除率大至少2倍。

36. 根据权利要求34所述的AAV颗粒,其中所述反义链的切除率比所述有义链的切除率大至少5倍。

37. 根据权利要求34所述的AAV颗粒,其中所述反义链的切除率比所述有义链的切除率大至少10倍。

38. 根据权利要求1-21中任一项所述的AAV颗粒,其中所述病毒基因组包含位于两个反向末端重复序列(ITR)之间的核酸序列,其中所述核酸编码靶蛋白,并且其中当所述核酸被表达时,细胞中所述靶蛋白的水平增加。

39. 根据权利要求38所述的AAV颗粒,其中所述靶蛋白是抗体、AADC、APOE2或Fratatin。

40. 一种药物组合物,其包含AAV颗粒,所述AAV颗粒包含AAV衣壳和病毒基因组,其中所述AAV衣壳在递送AAV颗粒后穿透血脑屏障。

41. 根据权利要求40所述的药物组合物,其中所述AAV衣壳是VOY101或VOY201。

42. 根据权利要求41所述的药物组合物,其中所述病毒基因组包含编码siRNA分子的核酸序列。

43. 根据权利要求42所述的药物组合物,其中所述siRNA分子靶向目标基因,其中所述目标基因选自SOD1、HTT、APOE和MAPT。

44. 根据权利要求41所述的药物组合物,其中所述病毒基因组包含编码靶蛋白的核酸。

45. 根据权利要求44所述的药物组合物,其中所述靶蛋白选自抗体、AADC、ApoE2和Fratatin。

46. 一种减少或抑制细胞中目标靶基因表达的方法,所述方法包括向该细胞施用包含权利要求1-37中任一项所述的AAV颗粒的组合物或权利要求40-43中任一项所述的组合物。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述哺乳动物细胞是CNS细胞。

49. 一种增加细胞中目标基因表达的方法,所述方法包括向所述细胞施用包含权利要

求38-39中任一项所述的AAV颗粒的组合物或权利要求44-45中任一项所述的药物组合物。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述哺乳动物细胞是CNS细胞。

52. 一种降低受试者CNS中目标蛋白水平的方法,所述方法包括向受试者施用包含权利要求1-37中任一项所述的AAV颗粒的组合物或权利要求40-43中任一项所述的组合物。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中施用途径是静脉内施用。

54. 根据权利要求52所述的方法,其中施用途径是颈动脉内施用。

55. 一种增加受试者CNS中目标蛋白水平的方法,所述方法包括向受试者施用包含权利要求38-39中任一项所述的AAV颗粒的组合物或权利要求44-45中任一项所述的药物组合物。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中施用途径是静脉内施用。

57. 根据权利要求55所述的方法,其中施用途径是颈动脉内施用。

58. 一种治疗和/或缓解需要治疗的受试者的神经学疾病的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的包含权利要求1-39中任一项所述的AAV颗粒的组合物或权利要求40-45中任一项所述的药物组合物。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中通过静脉内递送向所述受试者施用包含所述AAV颗粒的组合物。

60. 根据权利要求58所述的方法,其中通过颈动脉内递送向所述受试者施用包含所述AAV颗粒的组合物。

61. 根据权利要求58-60中任一项所述的方法,其中所述AAV颗粒包含编码目标蛋白的核酸序列。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述目标蛋白选自抗体、AADC、ApoE2和Frataxin。

63. 根据权利要求58-60中任一项所述的方法,其中所述AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述siRNA分子靶向目标基因,其中所述目标基因选自SOD1、HTT、APOE和MAPT。

65. 一种腺相关病毒(AAV)颗粒,其包含衣壳和病毒基因组,其中所述病毒基因组通过递送AAV颗粒转导心肌细胞。

66. 根据权利要求65所述的AAV颗粒,其中所述AAV颗粒包含选自以下的衣壳或肽插入物:VOY101、VOY201、AAVPHP.B(PHP.B)、AAVPHP.A(PHP.A)、AAVG2B-26、AAVG2B-13、AAVTH1.1-32、AAVTH1.1-35、AAVPHP.B2(PHP.B2)、AAVPHP.B3(PHP.B3)、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP(3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3(G2A3)、AAVG2B4(G2B4)、AAVG2B5(G2B5)、PHP.S、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、

AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、AAAV、BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhEr1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhEr1.23、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-

101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV改组100-1、AAV改组100-3、AAV改组100-7、AAV改组10-2、AAV改组10-6、AAV改组10-8、AAV改组100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真型AAV(ttAAV)、UPENN AAV 10、日本 AAV 10血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AAV CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6.10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv1-1、AAV Clv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV Clv1-7、AAV Clv1-8、AAV Clv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8和/或AAVF9/HSC9,及其变体。

67. 根据权利要求66所述的AAV颗粒,其中所述衣壳为VOY101。

68. 根据权利要求67所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的氨基酸序列是SEQ ID NO.1。

69. 根据权利要求67所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的核酸序列是SEQ ID NO.1809。

70. 根据权利要求66所述的AAV颗粒,其中所述衣壳为VOY201。

71. 根据权利要求70所述的AAV颗粒,其中所述衣壳的核酸序列是SEQ ID NO.1810。

72. 根据权利要求66所述的AAV颗粒,其中所述肽插入物选自AAVPHP.N、AAVPHP.B和AAVPHP.A。

73. 一种药物组合物,其包含AAV颗粒,所述AAV颗粒包含AAV衣壳和病毒基因组,所述病毒基因组编码目标蛋白,其中所述目标蛋白选自ATP2A2和S1001A1。

74. 一种增加受试者的心血管组织中目标蛋白水平的方法,其包括施用根据权利要求

73所述的药物组合物。

75.一种在有需要的受试者中治疗心血管疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求73所述的药物组合物。

76.一种在有需要的受试者中治疗心力衰竭的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求73所述的药物组合物。

77.根据权利要求74至76中任一项所述的方法,其中施用途径是静脉内施用。

递送AAV的组合物和方法

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求2017年8月3日提交的题为“跨越血脑屏障递送AAV的组合物和方法 (Compositions and methods for delivery of AAV a跨越血脑屏障)”的美国临时专利申请号62/540,776,2017年9月29日提交的题为“递送AAV的组合物和方法 (Compositions and methods for delivery of AAV)”的美国临时专利申请号62/565,264,2017年10月16日提交的题为“递送AAV的组合物和方法”的美国临时专利申请号62/572,706的优先权,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0003] 参考序列表

[0004] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表以标题为20571050PCTSL.txt的文件形式提供,该文件创建于2018年8月3日,大小为6,728,739字节。序列表的电子格式中的信息通过引用整体并入本文。

发明领域

[0005] 本发明涉及改善的生物分布的腺相关病毒衣壳的组合物以及其设计、制备、制造、使用和/或配制的方法和工艺。

[0006] 发明背景

[0007] 腺相关病毒 (AAV) 载体是治疗性基因递送的有希望的候选者,并且在临床试验中已被证明是安全有效的。

[0008] 已证明,将AAV递送到体内的某些系统特别具有挑战性,需要进行侵入性手术才能获得足够水平的基因转移。对于某些身体系统,从历史上看,静脉内递送导致基因转移受限,部分归因于无法有效地转导进入细胞。在本领域中仍然需要可以通过静脉内递送施用但仍能够有效地靶向治疗多种疾病的关键区域的AAV载体。

[0009] 中枢神经系统是其中递送具有挑战性的系统的一个实例。已证明,将AAV递送至中枢神经系统 (CNS) 区域特别具有挑战性,需要进行侵入性手术才能获得足够水平的基因转移 (参见例如Bevan等人,Mol Ther. 2011年9月;19 (11):1971-1980。从历史上看,静脉内输送导致基因向CNS的转移受限,部分归因于存在血脑屏障 (BBB)。在本领域中仍然需要可以通过静脉内递送施用但仍能够有效地跨越血脑屏障并靶向治疗多种CNS疾病的关键CNS区域的AAV载体。

[0010] 递送具有挑战性的系统的另一个实例是心血管系统。已证明,将AAV递送到心血管系统特别具有挑战性,需要进行侵入性手术才能获得足够水平的基因转移。从历史上看,静脉内递送导致基因向心血管系统的转移受限,部分归因于无法有效地转导进入心肌细胞。在本领域中仍然需要可以通过静脉内递送施用但仍然能够有效地靶向治疗多种疾病的关键心血管系统区域的AAV载体。

[0011] 本发明通过提供具有工程化衣壳蛋白的新型AAV颗粒满足了这一需求,所述衣壳蛋白允许在静脉内递送后有效转导CNS组织。此外,可以改变这些AAV颗粒的病毒基因组以迎合任何数量的CNS疾病的需要,提供用于跨越血脑屏障和靶向CNS组织的平台衣壳。

发明内容

[0012] 本发明提供了包含衣壳和病毒基因组的腺相关病毒 (AAV) 颗粒。

[0013] AAV颗粒可包含衣壳或肽插入物,例如但不限于VOY101、VOY201、AAVPHP.B (PHP.B)、AAVPHP.A (PHP.A)、AAVG2B-26、AAVG2B-13、AAVTH1.1-32、AAVTH1.1-35、AAVPHP.B2 (PHP.B2)、AAVPHP.B3 (PHP.B3)、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP (3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3 (G2A3)、AAVG2B4 (G2B4)、AAVG2B5 (G2B5)、PHP.S、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、

AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、AAAV、BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhER1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhER1.23、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV改组100-1、AAV改组100-3、AAV改组100-7、AAV改组10-2、AAV改组10-6、AAV改组10-8、AAV改组100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61AAV、BNP62AAV、BNP63AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真型AAV (ttAAV)、UPENN AAV 10、日本AAV 10血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AAV CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6.10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv1-1、AAV Clv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV Clv1-7、AAV Clv1-8、AAV Clv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、

AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8和/或AAVF9/HSC9,及其变体。在一方面,AAV颗粒的衣壳是VOY101。在一方面,AAV颗粒的衣壳是VOY201。在一方面,AAV颗粒包含肽插入物,并且肽插入物是AAVPHP.N。一方面,AAV颗粒包含肽插入物,并且肽插入物是AAVPHP.B。在一方面,AAV颗粒包含肽插入物,并且该肽插入物是AAVPHP.A。在一方面,AAV颗粒包含肽插入物,并且肽插入物是AAVPHP.S。

[0014] 在一方面,AAV颗粒包含病毒基因组,其包含两个反向末端重复序列(ITR)之间的核酸序列位置。

[0015] 在一方面,病毒基因组在递送AAV颗粒时转导心肌细胞。可以通过本领域已知的任何方法进行递送,例如但不限于静脉内施用或颈动脉内递送。

[0016] 在一方面,在递送AAV颗粒后,衣壳穿透血脑屏障。可以通过本领域已知的任何方法进行递送,例如但不限于静脉内施用或颈动脉内递送。

[0017] 施用后,本发明的AAV颗粒可以转导CNS结构。CNS结构的非限制性实例包括脑、脊髓、脑干核、小脑、大脑、运动皮层、尾状核、丘脑、下丘脑、颈脊髓、胸脊髓、腰脊髓、纹状体、黑质、海马体、杏仁核和/或大脑皮层。

[0018] 在一方面,AAV颗粒包含病毒基因组,该病毒基因组包含当被表达时抑制或阻抑细胞中目标基因(例如,SOD1、HTT、APOE和MAPT)表达的核酸序列。核酸序列包含有义链序列和反义链序列,其长度可以独立地为30个核苷酸或更少,并且有义和/或反义链可以包含至少1个或至少2个核苷酸的3'突出端。有义序列和反义链序列可以共享长度为至少四个核苷酸(例如,长度为至少17个核苷酸,长度为19至21个核苷酸,或长度为19个核苷酸)的互补区域。可以以至少80%、85%、90%、95%或大于95%、或大于98%或大于99%的比率从AAV颗粒切除反义链。可以以大于有义链切除率的比率(例如,大于2倍、5倍、10倍或大于10倍)从AAV颗粒切除反义链。

[0019] 本文提供了包含AAV颗粒的组合物(例如,药物组合物)。AAV颗粒可以包含病毒基因组,该病毒基因组包含编码目标蛋白(例如,抗体、AADC、APOE2、Fratxin、ATP2A2和/或S100A1)的核酸序列。AAV颗粒可以包含病毒基因组,该病毒基因组包含当被表达时抑制或阻抑细胞中目标基因(例如SOD1、HTT、APOE和/或MAPT)表达的核酸序列。

[0020] 本文提供了使用AAV颗粒的方法。

[0021] 在一方面,提供了抑制靶基因在细胞(例如,哺乳动物细胞、或CNS的哺乳动物细胞或心肌细胞)中表达的方法。

[0022] 在一方面,提供了增加靶基因在细胞如哺乳动物细胞(例如CNS的哺乳动物细胞或心肌细胞)中表达的方法。

[0023] 在一方面,提供了通过施用治疗有效量的包含本文所述的AAV颗粒的组合物来治疗和/或减轻受试者的神经学疾病的方法。施用可以通过静脉内或颈动脉内递送。该方法可用于增加目标蛋白(例如抗体、AADC、APOE2和/或Fratxin)的表达。该方法可用于减少目标基因(例如SOD1、HTT、APOE和/或MAPT)的表达量。

[0024] 在一方面,提供了通过施用本文所述的AAV颗粒来改变受试者中目标蛋白或基因水平的方法。该施用可以通过静脉内或颈动脉内递送。该方法可用于增加目标蛋白(例如抗体、AADC、APOE2、Fratxin、ATP2A2和/或S100A1)的表达。该方法可用于减少目标基因(例如SOD1、HTT、APOE和/或MAPT)的表达量。

[0025] 本文提供了通过施用本文所述的AAV颗粒的组合物在有需要的受试者中治疗心血管疾病的方法。可以通过本领域已知的任何方法进行递送,例如但不限于静脉内施用或颈动脉内递送。

[0026] 本文提供了通过施用本文所述的AAV颗粒的组合物在有需要的受试者中治疗心力衰竭的方法。可以通过本领域已知的任何方法进行递送,例如但不限于静脉内施用或颈动脉内递送。

[0027] 在以下描述中阐述了本发明的各种实施方案的细节。通过说明书和附图以及权利要求书,本发明的其他特征、目的和优点将变得显而易见。在说明书中,单数形式也包括复数,除非上下文另外明确指出。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。在有冲突的情况下,以本说明书为准。

[0028] 附图简要说明

[0029] 根据以下本发明的特定实施方案的描述,前述和其他目标、特征和优点将是显而易见的,如附图中所示。附图不必然按比例绘制,而是将重点放在说明本发明的各种实施方案的原理上。

[0030] 图1是本发明的病毒基因组的示意图。

[0031] 发明详述

[0032] 本发明的一个或多个实施方案的细节在以下所附描述中阐明。尽管与本文描述的那些材料或方法相似或等同的任何材料和方法都可以用于本发明的实践或测试中,但是现在描述优选的材料和方法。通过描述,本发明的其他特征、目标和优点将是显而易见的。在说明书中,单数形式也包括复数,除非上下文另外明确指出。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。在有冲突的情况下,以本说明书为准。

[0033] I. 本发明的组成

[0034] 腺相关病毒(AAV)和AAV颗粒

[0035] 细小病毒科(Parvoviridae family)的病毒是小的非包膜二十面体衣壳病毒,其特征是单链DNA基因组。细小病毒科病毒由两个亚科组成:感染脊椎动物的细小病毒亚科(Parvovirinae)和感染无脊椎动物的浓核病毒亚科(Densovirinae)。由于其结构相对简单,使用标准分子生物学技术易于操作,因此该病毒科可用作生物学工具。可以修饰病毒的基因组以使其包含用于组装功能性重组病毒或病毒颗粒的最少组分,所述重组病毒或病毒颗粒装载有或工程化以表达或递送所需的有效载荷,该有效载荷可以递送至靶细胞、组织、器官或生物体。

[0036] 细小病毒和细小病毒科的其他成员通常描述在Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication" (FIELDS VIROLOGY) (第3版,1996年)第69章中,其内容通过引用整体并入。

[0037] 细小病毒科包括依赖病毒属(dependovirus genus),其包括能够在脊椎动物宿主中复制的腺相关病毒(AAV),所述宿主包括但不限于人类、灵长类、牛、犬、马和羊。

[0038] AAV病毒基因组是线性单链DNA(ssDNA)分子,长度约为5,000个核苷酸(nt)。AAV病毒基因组可包含有效载荷区和至少一个反向末端重复序列(ITR)或ITR区。传统上,ITR位于

非结构蛋白(由Rep基因编码)和结构蛋白(由衣壳基因或Cap基因编码)的编码核苷酸序列的侧翼。尽管不希望受到理论的束缚,但AAV病毒基因组通常包含两个ITR序列。AAV载体基因组包含特征性T形发夹结构,其由形成能量稳定双链区的ssDNA的5'和3'端的自互补末端145nt限定。双链发夹结构包含多种功能,包括但不限于通过充当宿主病毒复制细胞的内源性DNA聚合酶复合物的引物来用作DNA复制的起点。

[0039] 除编码的异源有效载荷外,AAV颗粒还可全部或部分包含任何天然存在的和/或重组的AAV血清型核苷酸序列或变体的病毒基因组。AAV变体可在核酸(基因组或衣壳)和氨基酸水平(衣壳)上具有显著同源性的序列,以产生通常为物理和功能等同物的构建体,通过相似的机制复制,并通过相似的机制组装。Chiorini等人,J.Vir.71:6823-33(1997); Srivastava等人,J.Vir.45:555-64(1983);Chiorini等人,J.Vir.73:1309-1319(1999); Rutledge等人,J.Vir.72:309-319(1998);和Wu等人,J.Vir.74:8635-47(2000),其各自内容通过引用整体并入本文。

[0040] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒是复制缺陷的重组AAV病毒载体,在其病毒基因组中缺乏编码功能性Rep和Cap蛋白的序列。这些缺陷AAV颗粒可能缺乏大多数或全部亲本编码序列,并且基本上仅携带一个或两个AAV ITR序列和用于递送至细胞、组织、器官或生物体的目标核酸。

[0041] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的病毒基因组包含至少一种控制元件,该控制元件提供了其中编码的编码序列的复制、转录和翻译。并非总是需要存在所有的控制元件,只要编码序列能够在适当的宿主细胞中复制、转录和/或翻译。表达控制元件的非限制性实例包括用于转录起始和/或终止的序列、启动子和/或增强子序列、有效的RNA加工信号(例如剪接和聚腺苷酸化信号)、稳定细胞质mRNA的序列、增强翻译效率的序列(例如,Kozak共有序列)、增强蛋白稳定性的序列和/或增强蛋白加工和/或分泌的序列。

[0042] 根据本发明,用于治疗 and/或诊断的AAV颗粒包含已被提取(distilled)或减少至转导目标核酸有效载荷或货物所需的最小组分的病毒。以这种方式,AAV颗粒被工程化为用于特异性递送的载体,同时缺少在野生型病毒中发现的有害复制和/或整合特征。

[0043] 本发明的AAV颗粒可以重组产生,并且可以基于腺相关病毒(AAV)亲本或参考序列。如本文所用,“载体”是转运、转导或以其他方式充当异源分子(例如本文所述的核酸)的载体的任何分子或实体。

[0044] 除了单链AAV病毒基因组(例如ssAAV)之外,本发明还提供了自互补AAV(scAAV)病毒基因组。scAAV载体基因组包含DNA链,它们退火在一起形成双链DNA。通过跳过第二链合成,scAAV可在细胞中快速表达。

[0045] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒是scAAV。

[0046] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒是ssAAV。

[0047] 本领域公开了产生和/或修饰AAV颗粒的方法,例如假型AAV颗粒(PCT专利公开号W0200028004;W0200123001;W02004112727;W0 2005005610和W0 2005072364,其各自内容通过引用整体并入本文)。

[0048] 可以修饰AAV颗粒以增强递送效率。这样的修饰的AAV颗粒可以被有效地包装,并被用于以高频率和最小毒性成功地感染靶细胞。在一些实施方案中,根据美国公开号US 20130195801中描述的方法工程化AAV颗粒的衣壳,其内容通过引用整体并入本文。

[0049] 在一个实施方案中,可以将包含编码本发明的多肽的有效载荷区的AAV颗粒引入哺乳动物细胞中。

[0050] AAV血清型

[0051] 本发明的AAV颗粒可以包含或衍生自任何天然或重组AAV血清型。根据本发明,AAV颗粒可以利用或基于选自以下任一种的血清型,或包含选自以下任一种的肽:VOY101、VOY201、AAVPHP.B (PHP.B)、AAVPHP.A (PHP.A)、AAVG2B-26、AAVG2B-13、AAVTH1.1-32、AAVTH1.1-35、AAVPHP.B2 (PHP.B2)、AAVPHP.B3 (PHP.B3)、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP (3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3 (G2A3)、AAVG2B4 (G2B4)、AAVG2B5 (G2B5)、PHP.S、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、

AAVhu.t 19、AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、AAAV、BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhER1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhER1.23、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV改组100-1、AAV改组100-3、AAV改组100-7、AAV改组10-2、AAV改组10-6、AAV改组10-8、AAV改组100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61AAV、BNP62AAV、BNP63AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真型AAV (ttAAV)、UPENN AAV 10、日本AAV 10血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AAV CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6.10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv1-1、AAV Clv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV Clv1-7、AAV Clv1-8、AAV Clv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、

AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8和/或AAVF9/HSC9,及其变体。

[0052] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利申请公开号US20030138772中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV1 (US20030138772的SEQ ID NO:6和64)、AAV2 (US20030138772的SEQ ID NO:7和70)、AAV3 (US20030138772的SEQ ID NO:8和71)、AAV4 (US20030138772的SEQ ID NO:63)、AAV5 (US20030138772的SEQ ID NO:114)、AAV6 (US20030138772的SEQ ID NO:65)、AAV7 (US20030138772的SEQ ID NO:1-3)、AAV8 (US20030138772的SEQ ID NO:4和95)、AAV9 (US20030138772的SEQ ID NO:5和100)、AAV10 (US20030138772的SEQ ID NO:117)、AAV11 (US20030138772的SEQ ID NO:118)、AAV12 (US20030138772的SEQ ID NO:119)、AAVrh10 (US20030138772的SEQ ID NO:81的氨基酸1至738)、AAV16.3 (US20030138772SEQ ID NO:10)、AAV29.3/bb.1 (US20030138772SEQ ID NO:11)、AAV29.4 (US20030138772SEQ ID NO:12)、AAV29.5/bb.2 (US20030138772SEQ ID NO:13)、AAV1.3 (US20030138772SEQ ID NO:14)、AAV13.3 (US20030138772SEQ ID NO:15)、AAV24.1 (US20030138772SEQ ID NO:16)、AAV27.3 (US20030138772SEQ ID NO:17)、AAV7.2 (US20030138772SEQ ID NO:18)、AAVC1 (US20030138772SEQ ID NO:19)、AAVC3 (US20030138772SEQ ID NO:20)、AAVC5 (US20030138772SEQ ID NO:21)、AAVF1 (US20030138772SEQ ID NO:22)、AAVF3 (US20030138772SEQ ID NO:23)、AAVF5 (US20030138772SEQ ID NO:24)、AAVH6 (US20030138772SEQ ID NO:25)、AAVH2 (US20030138772SEQ ID NO:26)、AAV42-8 (US20030138772SEQ ID NO:27)、AAV42-15 (US20030138772SEQ ID NO:28)、AAV42-5b (US20030138772SEQ ID NO:29)、AAV42-1b (US20030138772SEQ ID NO:30)、AAV42-13 (US20030138772SEQ ID NO:31)、AAV42-3a (US20030138772SEQ ID NO:32)、AAV42-4 (US20030138772SEQ ID NO:33)、AAV42-5a (US20030138772SEQ ID NO:34)、AAV42-10 (US20030138772SEQ ID NO:35)、AAV42-3b (US20030138772SEQ ID NO:36)、AAV42-11 (US20030138772SEQ ID NO:37)、AAV42-6b (US20030138772SEQ ID NO:38)、AAV43-1 (US20030138772SEQ ID NO:39)、AAV43-5 (US20030138772SEQ ID NO:40)、AAV43-12 (US20030138772SEQ ID NO:41)、AAV43-20 (US20030138772SEQ ID NO:42)、AAV43-21 (US20030138772SEQ ID NO:43)、AAV43-23 (US20030138772SEQ ID NO:44)、AAV43-25 (US20030138772SEQ ID NO:45)、AAV44.1 (US20030138772SEQ ID NO:46)、AAV44.5 (US20030138772SEQ ID NO:47)、AAV223.1 (US20030138772SEQ ID NO:48)、AAV223.2 (US20030138772SEQ ID NO:49)、AAV223.4 (US20030138772SEQ ID NO:50)、AAV223.5 (US20030138772SEQ ID NO:51)、AAV223.6 (US20030138772SEQ ID NO:52)、AAV223.7 (US20030138772SEQ ID NO:53)、AAVA3.4 (US20030138772SEQ ID NO:54)、AAVA3.5 (US20030138772SEQ ID NO:55)、AAVA3.7 (US20030138772SEQ ID NO:56)、AAVA3.3 (US20030138772SEQ ID NO:57)、AAV42.12 (US20030138772SEQ ID NO:58)、AAV44.2 (US20030138772SEQ ID NO:59)、AAV42-2 (US20030138772SEQ ID NO:9),或其变体。

[0053] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利申请公开号US20150159173

中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV2 (US20150159173的SEQ ID NO:7和23)、rh20 (US20150159173的SEQ ID NO:1)、rh32/33 (US20150159173的SEQ ID NO:2)、rh39 (US20150159173的SEQ ID NO:3、20和36)、rh46 (US20150159173的SEQ ID NO:4和22)、rh73 (US20150159173的SEQ ID NO:5)、rh74 (US20150159173的SEQ ID NO:6)、AAV6.1 (US20150159173的SEQ ID NO:29)、rh.8 (US20150159173的SEQ ID NO:41)、rh.48.1 (US20150159173的SEQ ID NO:44)、hu.44 (US20150159173的SEQ ID NO:45)、hu.29 (US20150159173的SEQ ID NO:42)、hu.48 (US20150159173的SEQ ID NO:38)、rh54 (US20150159173的SEQ ID NO:49)、AAV2 (US20150159173的SEQ ID NO:7)、cy.5 (US20150159173的SEQ ID NO:8和24)、rh.10 (US20150159173的SEQ ID NO:9和25)、rh.13 (US20150159173的SEQ ID NO:10和26)、AAV1 (US20150159173的SEQ ID NO:11和27)、AAV3 (US20150159173的SEQ ID NO:12和28)、AAV6 (US20150159173的SEQ ID NO:13和29)、AAV7 (US20150159173的SEQ ID NO:14和30)、AAV8 (US20150159173的SEQ ID NO:15和31)、hu.13 (US20150159173的SEQ ID NO:16和32)、hu.26 (US20150159173的SEQ ID NO:17和33)、hu.37 (US20150159173的SEQ ID NO:18和34)、hu.53 (US20150159173的SEQ ID NO:19和35)、rh.43 (US20150159173的SEQ ID NO:21和37)、rh2 (US20150159173的SEQ ID NO:39)、rh.37 (US20150159173的SEQ ID NO:40)、rh.64 (US20150159173的SEQ ID NO:43)、rh.48 (US20150159173的SEQ ID NO:44)、ch.5 (US20150159173的SEQ ID NO 46)、rh.67 (US20150159173的SEQ ID NO:47)、rh.58 (US20150159173的SEQ ID NO:48)或其变体,包括但不限于Cy5R1、Cy5R2、Cy5R3、Cy5R4、rh.13R、rh.37R2、rh.2R、rh.8R、rh.48.1、rh.48.2、rh.48.1.2、hu.44R1、hu.44R2、hu.44R3、hu.29R、ch.5R1、rh64R1、rh64R2、AAV6.2、AAV6.1、AAV6.12、hu.48R1、hu.48R2和hu.48R3。

[0054] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利号US 7198951中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV9 (US7198951的SEQ ID NO:1-3)、AAV2 (US 7198951的SEQ ID NO:4)、AAV1 (US 7198951的SEQ ID NO:5)、AAV3 (US 7198951的SEQ ID NO:6)和AAV8 (US7198951的SEQ ID NO:7)。

[0055] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如N Pulicherla等人 (Molecular Therapy 19(6):1070-1078 (2011)),其内容通过引用整体并入本文)所述的AAV9序列中的突变,例如但不限于AAV9.9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84。

[0056] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利号US 6156303中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV3B (US6156303的SEQ ID NO:1和10)、AAV6 (US 6156303的SEQ ID NO:2、7和11)、AAV2 (US 6156303的SEQ ID NO:3和8)、AAV3A (US 6156303的SEQ ID NO:4和9),或其衍生物。

[0057] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利申请公开号US20140359799中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV8 (US20140359799的SEQ ID NO:1)、AAVDJ (US20140359799的SEQ ID NO:2和3),或其变体。

[0058] 在一些实施方案中,血清型可以是AAVDJ或其变体,例如AAVDJ8 (或AAV-DJ8),如 Grimm等人 (Journal of Virology 82(12):5887-5911 (2008)),通过引用整体并入本文)所述。AAVDJ8的氨基酸序列可以包含两个或更多个突变,以去除肝素结合域(HBD)。作为非限

制性实例,在美国专利号7,588,772中(其内容通过引用整体并入本文)被描述为SEQ ID NO:1的AAV-DJ序列可以包含两个突变:(1) R587Q,其中氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)变为谷氨酰胺(Q;Gln)和(2) R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)变为苏氨酸(T;Thr)。作为另一个非限制性实例,可包含3个突变:(1) K406R,其中氨基酸406处的赖氨酸(K;Lys)变为精氨酸(R;Arg), (2) R587Q,其中氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)变为谷氨酰胺(Q;Gln)和(3) R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)变为苏氨酸(T;Thr)。

[0059] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如国际公开号W01998011244中所述的AAV4的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV4(W01998011244的SEQ ID NO:1-20)。

[0060] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有AAV2序列中的突变以产生AAV2G9,如国际公开号W02014144229中所述,其通过引用整体并入本文。

[0061] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有国际公开号W02005033321中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV3-3(W02005033321的SEQ ID NO:217)、AAV1(W02005033321的SEQ ID NO:219和202)、AAV106.1/hu.37(W02005033321的SEQ ID No:10)、AAV114.3/hu.40(W02005033321的SEQ ID No:11)、AAV127.2/hu.41(W02005033321的SEQ ID NO:6和8)、AAV128.3/hu.44(W02005033321的SEQ ID No:81)、AAV130.4/hu.48(W02005033321的SEQ ID NO:78)、AAV145.1/hu.53(W02005033321的SEQ ID No:176和177)、AAV145.6/hu.56(W02005033321的SEQ ID NO:168和192)、AAV16.12/hu.11(W02005033321的SEQ ID NO:153和57)、AAV16.8/hu.10(W02005033321的SEQ ID NO:156和56)、AAV161.10/hu.60(W02005033321的SEQ ID No:170)、AAV161.6/hu.61(W02005033321的SEQ ID No:174)、AAV1-7/rh.48(W02005033321的SEQ ID NO:32)、AAV1-8/rh.49(W02005033321的SEQ ID NO:103和25)、AAV2(W02005033321的SEQ ID NO:211和221)、AAV2-15/rh.62(W02005033321的SEQ ID No:33和114)、AAV2-3/rh.61(W02005033321的SEQ ID NO:21)、AAV2-4/rh.50(W02005033321的SEQ ID No:23和108)、AAV2-5/rh.51(W02005033321的SEQ ID NO:104和22)、AAV3.1/hu.6(W02005033321的SEQ ID NO:5和84)、AAV3.1/hu.9(W02005033321的SEQ ID NO:155和58)、AAV3-11/rh.53(W02005033321的SEQ ID NO:186和176)、AAV3-3(W02005033321的SEQ ID NO:200)、AAV33.12/hu.17(W02005033321的SEQ ID NO:4)、AAV33.4/hu.15(W02005033321的SEQ ID No:50)、AAV33.8/hu.16(W02005033321的SEQ ID No:51)、AAV3-9/rh.52(W02005033321的SEQ ID NO:96和18)、AAV4-19/rh.55(W02005033321的SEQ ID NO:117)、AAV4-4(W02005033321的SEQ ID NO:201和218)、AAV4-9/rh.54(W02005033321的SEQ ID NO:116)、AAV5(W02005033321的SEQ ID NO:199和216)、AAV52.1/hu.20(W02005033321的SEQ ID NO:63)、AAV52/hu.19(W02005033321的SEQ ID NO:133)、AAV5-22/rh.58(W02005033321的SEQ ID No:27)、AAV5-3/rh.57(W02005033321的SEQ ID NO:105)、AAV5-3/rh.57(W02005033321的SEQ ID No:26)、AAV58.2/hu.25(W02005033321的SEQ ID No:49)、AAV6(W02005033321的SEQ ID NO:203和220)、AAV7(W02005033321的SEQ ID NO:222和213)、AAV7.3/hu.7(W02005033321的SEQ ID No:55)、AAV8(W02005033321的SEQ ID NO:223和214)、AAVH-1/hu.1(W02005033321的SEQ ID No:46)、AAVH-5/hu.3(W02005033321的SEQ ID No:44)、AAVhu.1(W02005033321的SEQ ID NO:144)、AAVhu.10(W02005033321的SEQ ID NO:156)、

AAVhu.11 (W02005033321的SEQ ID NO:153)、AAVhu.12 (W02005033321SEQ ID NO:59)、AAVhu.13 (W02005033321的SEQ ID NO:129)、AAVhu.14/AAV9 (W02005033321的SEQ ID NO:123和3)、AAVhu.15 (W02005033321的SEQ ID NO:147)、AAVhu.16 (W02005033321的SEQ ID NO:148)、AAVhu.17 (W02005033321的SEQ ID NO:83)、AAVhu.18 (W02005033321的SEQ ID NO:149)、AAVhu.19 (W02005033321的SEQ ID NO:133)、AAVhu.2 (W02005033321的SEQ ID NO:143)、AAVhu.20 (W02005033321的SEQ ID NO:134)、AAVhu.21 (W02005033321的SEQ ID NO:135)、AAVhu.22 (W02005033321的SEQ ID NO:138)、AAVhu.23.2 (W02005033321的SEQ ID NO:137)、AAVhu.24 (W02005033321的SEQ ID NO:136)、AAVhu.25 (W02005033321的SEQ ID NO:146)、AAVhu.27 (W02005033321的SEQ ID NO:140)、AAVhu.29 (W02005033321的SEQ ID NO:132)、AAVhu.3 (W02005033321的SEQ ID NO:145)、AAVhu.31 (W02005033321的SEQ ID NO:121)、AAVhu.32 (W02005033321的SEQ ID NO:122)、AAVhu.34 (W02005033321的SEQ ID NO:125)、AAVhu.35 (W02005033321的SEQ ID NO:164)、AAVhu.37 (W02005033321的SEQ ID NO:88)、AAVhu.39 (W02005033321的SEQ ID NO:102)、AAVhu.4 (W02005033321的SEQ ID NO:141)、AAVhu.40 (W02005033321的SEQ ID NO:87)、AAVhu.41 (W02005033321的SEQ ID NO:91)、AAVhu.42 (W02005033321的SEQ ID NO:85)、AAVhu.43 (W02005033321的SEQ ID NO:160)、AAVhu.44 (W02005033321的SEQ ID NO:144)、AAVhu.45 (W02005033321的SEQ ID NO:127)、AAVhu.46 (W02005033321的SEQ ID NO:159)、AAVhu.47 (W02005033321的SEQ ID NO:128)、AAVhu.48 (W02005033321的SEQ ID NO:157)、AAVhu.49 (W02005033321的SEQ ID NO:189)、AAVhu.51 (W02005033321的SEQ ID NO:190)、AAVhu.52 (W02005033321的SEQ ID NO:191)、AAVhu.53 (W02005033321的SEQ ID NO:186)、AAVhu.54 (W02005033321的SEQ ID NO:188)、AAVhu.55 (W02005033321的SEQ ID NO:187)、AAVhu.56 (W02005033321的SEQ ID NO:192)、AAVhu.57 (W02005033321的SEQ ID NO:193)、AAVhu.58 (W02005033321的SEQ ID NO:194)、AAVhu.6 (W02005033321的SEQ ID NO:84)、AAVhu.60 (W02005033321的SEQ ID NO:184)、AAVhu.61 (W02005033321的SEQ ID NO:185)、AAVhu.63 (W02005033321的SEQ ID NO:195)、AAVhu.64 (W02005033321的SEQ ID NO:196)、AAVhu.66 (W02005033321的SEQ ID NO:197)、AAVhu.67 (W02005033321的SEQ ID NO:198)、AAVhu.7 (W02005033321的SEQ ID NO:150)、AAVhu.8 (W02005033321SEQ ID NO:12)、AAVhu.9 (W02005033321的SEQ ID NO:155)、AAVLG-10/rh.40 (W02005033321的SEQ ID No:14)、AAVLG-4/rh.38 (W02005033321的SEQ ID NO:86)、AAVLG-4/rh.38 (W02005033321的SEQ ID No:7)、AAVN721-8/rh.43 (W02005033321的SEQ ID NO:163)、AAVN721-8/rh.43 (W02005033321的SEQ ID No:43)、AAVpi.1 (W02005033321SEQ ID NO:28)、AAVpi.2 (W02005033321SEQ ID NO:30)、AAVpi.3 (W02005033321SEQ ID NO:29)、AAVrh.38 (W02005033321的SEQ ID NO:86)、AAVrh.40 (W02005033321的SEQ ID NO:92)、AAVrh.43 (W02005033321的SEQ ID NO:163)、AAVrh.44 (W02005033321SEQ ID NO:34)、AAVrh.45 (W02005033321SEQ ID NO:41)、AAVrh.47 (W02005033321SEQ ID NO:38)、AAVrh.48 (W02005033321的SEQ ID NO:115)、AAVrh.49 (W02005033321的SEQ ID NO:103)、AAVrh.50 (W02005033321的SEQ ID NO:108)、AAVrh.51 (W02005033321的SEQ ID NO:104)、AAVrh.52 (W02005033321的SEQ ID NO:96)、AAVrh.53 (W02005033321的SEQ ID NO:97)、AAVrh.55 (W02005033321SEQ ID NO:37)、AAVrh.56 (W02005033321的SEQ ID NO:152)、AAVrh.57 (W02005033321的SEQ ID NO:105)、AAVrh.58

(W02005033321的SEQ ID NO:106)、AAVrh.59(W02005033321SEQ ID NO:42)、AAVrh.60(W02005033321SEQ ID NO:31)、AAVrh.61(W02005033321的SEQ ID NO:107)、AAVrh.62(W02005033321的SEQ ID NO:114)、AAVrh.64(W02005033321的SEQ ID NO:99)、AAVrh.65(W02005033321SEQ ID NO:35)、AAVrh.68(W02005033321SEQ ID NO:16)、AAVrh.69(W02005033321SEQ ID NO:39)、AAVrh.70(W02005033321SEQ ID NO:20)、AAVrh.72(W02005033321SEQ ID NO:9),或其变体,其包括但不限于AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVcy.6、AAVrh.12、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.25/42 15、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh14。变体的非限制性实例包括W02005033321的SEQ ID NO:13、15、17、19、24、36、40、45、47、48、51-54、60-62、64-77、79、80、82、89、90、93-95、98、100、101、109-113、118-120、124、126、131、139、142、151、154、158、161、162、165-183、202、204-212、215、219、224-236,其内容通过引用整体并入本文。

[0062] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有国际公开号W02015168666中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAVrh8R(W02015168666的SEQ ID NO:9)、AAVrh8R A586R突变体(W02015168666的SEQ ID NO:10)、AAVrh8R R533A突变体(W02015168666的SEQ ID NO:11),或其变体。

[0063] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利号US9233131中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAVhE1.1(US9233131的SEQ ID NO:44)、AAVhEr1.5(US9233131的SEQ ID NO:45)、AAVhEr1.14(US9233131的SEQ ID NO:46)、AAVhEr1.8(US9233131的SEQ ID NO:47)、AAVhEr1.16(US9233131的SEQ ID NO:48)、AAVhEr1.18(US9233131的SEQ ID NO:49)、AAVhEr1.35(US9233131的SEQ ID NO:50)、AAVhEr1.7(US9233131的SEQ ID NO:51)、AAVhEr1.36(US9233131的SEQ ID NO:52)、AAVhEr2.29(US9233131的SEQ ID NO:53)、AAVhEr2.4(US9233131的SEQ ID NO:54)、AAVhEr2.16(US9233131的SEQ ID NO:55)、AAVhEr2.30(US9233131的SEQ ID NO:56)、AAVhEr2.31(US9233131的SEQ ID NO:58)、AAVhEr2.36(US9233131的SEQ ID NO:57)、AAVhEr1.23(US9233131的SEQ ID NO:53)、AAVhEr3.1(US9233131的SEQ ID NO:59)、AAV2.5T(US9233131的SEQ ID NO:42),或其变体。

[0064] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利申请公开号US20150376607中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV-PAEC(US20150376607的SEQ ID NO:1)、AAV-LK01(US20150376607的SEQ ID NO:2)、AAV-LK02(US20150376607的SEQ ID NO:3)、AAV-LK03(US20150376607的SEQ ID NO:4)、AAV-LK04(US20150376607的SEQ ID NO:5)、AAV-LK05(US20150376607的SEQ ID NO:6)、AAV-LK06(US20150376607的SEQ ID NO:7)、AAV-LK07(US20150376607的SEQ ID NO:8)、AAV-LK08(US20150376607的SEQ ID NO:9)、AAV-LK09(US20150376607的SEQ ID NO:10)、AAV-LK10(US20150376607的SEQ ID NO:11)、AAV-LK11(US20150376607的SEQ ID NO:12)、AAV-LK12(US20150376607的SEQ ID NO:13)、AAV-LK13(US20150376607的SEQ ID NO:14)、AAV-LK14(US20150376607的SEQ ID NO:15)、AAV-LK15(US20150376607的SEQ ID NO:16)、AAV-LK16(US20150376607的SEQ ID NO:17)、AAV-LK17(US20150376607的SEQ ID NO:18)、AAV-LK18(US20150376607的SEQ ID NO:19)、AAV-LK19(US20150376607的SEQ ID NO:20)、AAV-PAEC2(US20150376607的SEQ ID NO:21)、

AAV-PAEC4 (US20150376607的SEQ ID NO:22)、AAV-PAEC6 (US20150376607的SEQ ID NO:23)、AAV-PAEC7 (US20150376607的SEQ ID NO:24)、AAV-PAEC8 (US20150376607的SEQ ID NO:25)、AAV-PAEC11 (US20150376607的SEQ ID NO:26)、AAV-PAEC12 (US20150376607的SEQ ID NO:27),或其变体。

[0065] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利号US9163261中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV-2-pre-miRNA-101 (US9163261SEQ ID NO:1) 或其变体。

[0066] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利申请公开号US20150376240中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV-8h (US20150376240的SEQ ID NO:6)、AAV-8b (US20150376240的SEQ ID NO:5)、AAV-h (US20150376240的SEQ ID NO:2)、AAV-b (US20150376240的SEQ ID NO:1),或其变体。

[0067] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利申请公开号US20160017295中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV SM 10-2 (US20160017295的SEQ ID NO:22)、AAV改组100-1 (US20160017295的SEQ ID NO:23)、AAV改组100-3 (US20160017295的SEQ ID NO:24)、AAV改组100-7 (US20160017295的SEQ ID NO:25)、AAV改组10-2 (US20160017295的SEQ ID NO:34)、AAV改组10-6 (US20160017295的SEQ ID NO:35)、AAV改组10-8 (US20160017295的SEQ ID NO:36)、AAV改组100-2 (US20160017295的SEQ ID NO:37)、AAV SM 10-1 (US20160017295的SEQ ID NO:38)、AAV SM 10-8 (US20160017295的SEQ ID NO:39)、AAV SM 100-3 (US20160017295的SEQ ID NO:40)、AAV SM 100-10 (US20160017295的SEQ ID NO:41),或其变体。

[0068] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利申请公开号US20150238550中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于BNP61AAV (US20150238550的SEQ ID NO:1)、BNP62AAV (US20150238550的SEQ ID NO:3)、BNP63AAV (US20150238550的SEQ ID NO:4),或其变体。

[0069] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有美国专利公开号US20150315612中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAVrh.50 (US20150315612的SEQ ID NO:108)、AAVrh.43 (US20150315612的SEQ ID NO:163)、AAVrh.62 (US20150315612的SEQ ID NO:114)、AAVrh.48 (US20150315612的SEQ ID NO:115)、AAVhu.19 (US20150315612的SEQ ID NO:133)、AAVhu.11 (US20150315612的SEQ ID NO:153)、AAVhu.53 (US20150315612的SEQ ID NO:186)、AAV4-8/rh.64 (US20150315612的SEQ ID No:15)、AAVLG-9/hu.39 (US20150315612的SEQ ID No:24)、AAV54.5/hu.23 (US20150315612的SEQ ID No:60)、AAV54.2/hu.22 (US20150315612的SEQ ID No:67)、AAV54.7/hu.24 (US20150315612的SEQ ID No:66)、AAV54.1/hu.21 (US20150315612的SEQ ID No:65)、AAV54.4R/hu.27 (US20150315612的SEQ ID No:64)、AAV46.2/hu.28 (US20150315612的SEQ ID No:68)、AAV46.6/hu.29 (US20150315612的SEQ ID No:69)、AAV128.1/hu.43 (US20150315612的SEQ ID No:80),或其变体。

[0070] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有国际公开号W02015121501中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于真型AAV (ttAAV) (W02015121501的SEQ ID NO:2)、“UPenn AAV10” (W02015121501的SEQ ID NO:8)、“日本AAV10” (W02015121501的

SEQ ID NO:9),或其变体。

[0071] 根据本发明,AAV衣壳血清型的选择或使用可以来自多种物种。在一个实施方案中,AAV可以是禽类AAV(AAAV)。AAAV血清型可以是或具有美国专利号US 9238800中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAAV(US 9,238,800的SEQ ID NO:1、2、4、6、8、10、12和14),或其变体。

[0072] 在一个实施方案中,AAV可以是牛AAV(BAAV)。BAAV血清型可以是或具有美国专利号US 9,193,769中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于BAAV(US 9,193,769的SEQ ID NO:1和6),或其变体。BAAV血清型可以是或具有美国专利号US7,427,396中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于BAAV(US7,427,396的SEQ ID NO:5和6),或其变体。

[0073] 在一个实施方案中,AAV可以是山羊AAV。山羊AAV血清型可以是或具有美国专利号US7,427,396中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于山羊AAV(US7,427,396的SEQ ID NO:3),或其变体。

[0074] 在其他实施方案中,可以将AAV工程化为来自两种或更多种亲本血清型的杂种AAV。在一个实施方案中,AAV可以是AAV2G9,其包含来自AAV2和AAV9的序列。AAV2G9AAV血清型可以是或具有美国专利申请公开号US20160017005中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文。

[0075] 在一个实施方案中,AAV可以是如Pulicherla等人(Molecular Therapy 19(6):1070-1078(2011))所述的由AAV9衣壳文库产生的具有390-627位氨基酸中突变(VP1编号)的血清型,其内容通过引用整体并入本文。血清型以及相应的核苷酸和氨基酸取代可以是但不限于AAV9.1(G1594C;D532H)、AAV6.2(T1418A和T1436X;V473D和I479K)、AAV9.3(T1238A;F413Y)、AAV9.4(T1250C和A1617T;F417S)、AAV9.5(A1235G、A1314T、A1642G、C1760T;Q412R、T548A、A587V)、AAV9.6(T1231A;F411I)、AAV9.9(G1203A、G1785T;W595C)、AAV9.10(A1500G、T1676C;M559T)、AAV9.11(A1425T、A1702C、A1769T;T568P、Q590L)、AAV9.13(A1369C、A1720T;N457H、T574S)、AAV9.14(T1340A、T1362C、T1560C、G1713A;L447H)、AAV9.16(A1775T;Q592L)、AAV9.24(T1507C、T1521G;W503R)、AAV9.26(A1337G、A1769C;Y446C、Q590P)、AAV9.33(A1667C;D556A)、AAV9.34(A1534G、C1794T;N512D)、AAV9.35(A1289T、T1450A、C1494T、A1515T、C1794A、G1816A;Q430L、Y484N、N98K、V606I)、AAV9.40(A1694T、E565V)、AAV9.41(A1348T、T1362C;T450S)、AAV9.44(A1684C、A1701T、A1737G;N562H、K567N)、AAV9.45(A1492T、C1804T;N498Y、L602F)、AAV9.46(G1441C、T1525C、T1549G;G481R、W509R、L517V)、9.47(G1241A、G1358A、A1669G、C1745T;S414N、G453D、K557E、T582I)、AAV9.48(C1445T、A1736T;P482L、Q579L)、AAV9.50(A1638T、C1683T、T1805A;Q546H、L602H)、AAV9.53(G1301A、A1405C、C1664T、G1811T;R134Q、S469R、A555V、G604V)、AAV9.54(C1531A、T1609A;L511I、L537M)、AAV9.55(T1605A;F535L)、AAV9.58(C1475T、C1579A;T492I、H527N)、AAV.59(T1336C;Y446H)、AAV9.61(A1493T;N498I)、AAV9.64(C1531A、A1617T;L511I)、AAV9.65(C1335T、T1530C、C1568A;A523D)、AAV9.68(C1510A;P504T)、AAV9.80(G1441A;G481R)、AAV9.83(C1402A、A1500T;P468T、E500D)、AAV9.87(T1464C、T1468C;S490P)、AAV9.90(A1196T;Y399F)、AAV9.91(T1316G、A1583T、C1782G、T1806C;L439R、K528I)、AAV9.93(A1273G、A1421G、A1638C、C1712T、G1732A、A1744T、A1832T;S425G、

Q474R、Q546H、P571L、G578R、T582S、D611V)、AAV9.94 (A1675T;M559L) 和 AAV9.95 (T1605A;F535L)。

[0076] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有国际公开号W02016049230中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAVF1/HSC1 (W02016049230的SEQ ID NO:2和20)、AAVF2/HSC2 (W02016049230的SEQ ID NO:3和21)、AAVF3/HSC3 (W02016049230的SEQ ID NO:5和22)、AAVF4/HSC4 (W02016049230的SEQ ID NO:6和23)、AAVF5/HSC5 (W02016049230的SEQ ID NO:11和25)、AAVF6/HSC6 (W02016049230的SEQ ID NO:7和24)、AAVF7/HSC7 (W02016049230的SEQ ID NO:8和27)、AAVF8/HSC8 (W02016049230的SEQ ID NO:9和28)、AAVF9/HSC9 (W02016049230的SEQ ID NO:10和29)、AAVF11/HSC11 (W02016049230的SEQ ID NO:4和26)、AAVF12/HSC12 (W02016049230的SEQ ID NO:12和30)、AAVF13/HSC13 (W02016049230的SEQ ID NO:14和31)、AAVF14/HSC14 (W02016049230的SEQ ID NO:15和32)、AAVF15/HSC15 (W02016049230的SEQ ID NO:16和33)、AAVF16/HSC16 (W02016049230的SEQ ID NO:17和34)、AAVF17/HSC17 (W02016049230的SEQ ID NO:13和35),或其变体或衍生物。

[0077] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利号US 8734809中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于,AAV CBr-E1 (US8734809的SEQ ID NO:13和87)、AAV CBr-E2 (US8734809的SEQ ID NO:14和88)、AAV CBr-E3 (US8734809的SEQ ID NO:15和89)、AAVCBr-E4 (US8734809的SEQ ID NO:16和90)、AAV CBr-E5 (US8734809的SEQ ID NO:17和91)、AAV CBr-e5 (US8734809的SEQ ID NO:18和92)、AAV CBr-E6 (US8734809的SEQ ID NO:19和93)、AAV CBr-E7 (US8734809的SEQ ID NO:20和94)、AAV CBr-E8 (US8734809的SEQ ID NO:21和95)、AAV CLv-D1 (US8734809的SEQ ID NO:22和96)、AAV CLv-D2 (US8734809的SEQ ID NO:23和97)、AAV CLv-D3 (US8734809的SEQ ID NO:24和98)、AAV CLv-D4 (US8734809的SEQ ID NO:25和99)、AAV CLv-D5 (US8734809的SEQ ID NO:26和100)、AAV CLv-D6 (US8734809的SEQ ID NO:27和101)、AAV CLv-D7 (US8734809的SEQ ID NO:28和102)、AAV CLv-D8 (US8734809的SEQ ID NO:29和103)、AAV CLv-E1 (US8734809的SEQ ID NO:13和87)、AAV CLv-R1 (US8734809的SEQ ID NO:30和104)、AAV CLv-R2 (US8734809的SEQ ID NO:31和105)、AAV CLv-R3 (US8734809的SEQ ID NO:32和106)、AAV CLv-R4 (US8734809的SEQ ID NO:33和107)、AAV CLv-R5 (US8734809的SEQ ID NO:34和108)、AAV CLv-R6 (US8734809的SEQ ID NO:35和109)、AAV CLv-R7 (US8734809的SEQ ID NO:36和110)、AAV CLv-R8 (US8734809的SEQ ID NO:X和X)、AAV CLv-R9 (US8734809的SEQ ID NO:X和X)、AAV CLg-F1 (US8734809的SEQ ID NO:39和113)、AAV CLg-F2 (US8734809的SEQ ID NO:40和114)、AAV CLg-F3 (US8734809的SEQ ID NO:41和115)、AAV CLg-F4 (US8734809的SEQ ID NO:42和116)、AAV CLg-F5 (US8734809的SEQ ID NO:43和117)、AAV CLg-F6 (US8734809的SEQ ID NO:43和117)、AAV CLg-F7 (US8734809的SEQ ID NO:44和118)、AAV CLg-F8 (US8734809的SEQ ID NO:43和117)、AAV CSp-1 (US8734809的SEQ ID NO:45和119)、AAV CSp-10 (US8734809的SEQ ID NO:46和120)、AAV CSp-11 (US8734809的SEQ ID NO:47和121)、AAV CSp-2 (US8734809的SEQ ID NO:48和122)、AAV CSp-3 (US8734809的SEQ ID NO:49和123)、AAV CSp-4 (US8734809的SEQ ID NO:50和124)、AAV CSp-6 (US8734809的SEQ ID NO:51和125)、AAV CSp-7 (US8734809的SEQ ID NO:52和126)、AAV

CSp-8 (US8734809的SEQ ID NO:53和127)、AAV CSp-9 (US8734809的SEQ ID NO:54和128)、AAV CHt-2 (US8734809的SEQ ID NO:55和129)、AAV CHt-3 (US8734809的SEQ ID NO:56和130)、AAV CKd-1 (US8734809的SEQ ID NO:57和131)、AAV CKd-10 (US8734809的SEQ ID NO:58和132)、AAV CKd-2 (US8734809的SEQ ID NO:59和133)、AAV CKd-3 (US8734809的SEQ ID NO:60和134)、AAV CKd-4 (US8734809的SEQ ID NO:61和135)、AAV CKd-6 (US8734809的SEQ ID NO:62和136)、AAV CKd-7 (US8734809的SEQ ID NO:63和137)、AAV CKd-8 (US8734809的SEQ ID NO:64和138)、AAV CLv-1 (US8734809的SEQ ID NO:35和139)、AAV CLv-12 (US8734809的SEQ ID NO:66和140)、AAV CLv-13 (US8734809的SEQ ID NO:67和141)、AAV CLv-2 (US8734809的SEQ ID NO:68和142)、AAV CLv-3 (US8734809的SEQ ID NO:69和143)、AAV CLv-4 (US8734809的SEQ ID NO:70和144)、AAV CLv-6 (US8734809的SEQ ID NO:71和145)、AAV CLv-8 (US8734809的SEQ ID NO:72和146)、AAV CKd-B1 (US8734809的SEQ ID NO:73和147)、AAV CKd-B2 (US8734809的SEQ ID NO:74和148)、AAV CKd-B3 (US8734809的SEQ ID NO:75和149)、AAV CKd-B4 (US8734809的SEQ ID NO:76和150)、AAV CKd-B5 (US8734809的SEQ ID NO:77和151)、AAV CKd-B6 (US8734809的SEQ ID NO:78和152)、AAV CKd-B7 (US8734809的SEQ ID NO:79和153)、AAV CKd-B8 (US8734809的SEQ ID NO:80和154)、AAV CKd-H1 (US8734809的SEQ ID NO:81和155)、AAV CKd-H2 (US8734809的SEQ ID NO:82和156)、AAV CKd-H3 (US8734809的SEQ ID NO:83和157)、AAV CKd-H4 (US8734809的SEQ ID NO:84和158)、AAV CKd-H5 (US8734809的SEQ ID NO:85和159)、AAV CKd-H6 (US8734809的SEQ ID NO:77和151)、AAV CHt-1 (US8734809的SEQ ID NO:86和160)、AAV CLv1-1 (US8734809的SEQ ID NO:171)、AAV CLv1-2 (US8734809的SEQ ID NO:172)、AAV CLv1-3 (US8734809的SEQ ID NO:173)、AAV CLv1-4 (US8734809的SEQ ID NO:174)、AAV CLv1-7 (US8734809的SEQ ID NO:175)、AAV CLv1-8 (US8734809的SEQ ID NO:176)、AAV CLv1-9 (US8734809的SEQ ID NO:177)、AAV CLv1-10 (US8734809的SEQ ID NO:178)、AAV.VR-355 (US8734809的SEQ ID NO:181)、AAV.hu.48R3 (US8734809的SEQ ID NO:183),或其变体或衍生物。

[0078] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有国际公开号W02016065001中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV CHt-P2 (W02016065001的SEQ ID NO:1和51)、AAV CHt-P5 (W02016065001的SEQ ID NO:2和52)、AAV CHt-P9 (W02016065001的SEQ ID NO:3和53)、AAV CBr-7.1 (W02016065001的SEQ ID NO:4和54)、AAV CBr-7.2 (W02016065001的SEQ ID NO:5和55)、AAV CBr-7.3 (W02016065001的SEQ ID NO:6和56)、AAV CBr-7.4 (W02016065001的SEQ ID NO:7和57)、AAV CBr-7.5 (W02016065001的SEQ ID NO:8和58)、AAV CBr-7.7 (W02016065001的SEQ ID NO:9和59)、AAV CBr-7.8 (W02016065001的SEQ ID NO:10和60)、AAV CBr-7.10 (W02016065001的SEQ ID NO:11和61)、AAV CKd-N3 (W02016065001的SEQ ID NO:12和62)、AAV CKd-N4 (W02016065001的SEQ ID NO:13和63)、AAV CKd-N9 (W02016065001的SEQ ID NO:14和64)、AAV CLv-L4 (W02016065001的SEQ ID NO:15和65)、AAV CLv-L5 (W02016065001的SEQ ID NO:16和66)、AAV CLv-L6 (W02016065001的SEQ ID NO:17和67)、AAV CLv-K1 (W02016065001的SEQ ID NO:18和68)、AAV CLv-K3 (W02016065001的SEQ ID NO:19和69)、AAV CLv-K6 (W02016065001的SEQ ID NO:20和70)、AAV CLv-M1 (W02016065001的SEQ ID NO:21和71)、AAV CLv-M11 (W02016065001的SEQ ID

NO:22和72)、AAV CLv-M2 (WO2016065001的SEQ ID NO:23和73)、AAV CLv-M5 (WO2016065001的SEQ ID NO:24和74)、AAV CLv-M6 (WO2016065001的SEQ ID NO:25和75)、AAV CLv-M7 (WO2016065001的SEQ ID NO:26和76)、AAV CLv-M8 (WO2016065001的SEQ ID NO:27和77)、AAV CLv-M9 (WO2016065001的SEQ ID NO:28和78)、AAV CHt-P1 (WO2016065001的SEQ ID NO:29和79)、AAV CHt-P6 (WO2016065001的SEQ ID NO:30和80)、AAV CHt-P8 (WO2016065001的SEQ ID NO:31和81)、AAV CHt-6.1 (WO2016065001的SEQ ID NO:32和82)、AAV CHt-6.10 (WO2016065001的SEQ ID NO:33和83)、AAV CHt-6.5 (WO2016065001的SEQ ID NO:34和84)、AAV CHt-6.6 (WO2016065001的SEQ ID NO:35和85)、AAV CHt-6.7 (WO2016065001的SEQ ID NO:36和86)、AAV CHt-6.8 (WO2016065001的SEQ ID NO:37和87)、AAV CSp-8.10 (WO2016065001的SEQ ID NO:38和88)、AAV CSp-8.2 (WO2016065001的SEQ ID NO:39和89)、AAV CSp-8.4 (WO2016065001的SEQ ID NO:40和90)、AAV CSp-8.5 (WO2016065001的SEQ ID NO:41和91)、AAV CSp-8.6 (WO2016065001的SEQ ID NO:42和92)、AAV CSp-8.7 (WO2016065001的SEQ ID NO:43和93)、AAV CSp-8.8 (WO2016065001的SEQ ID NO:44和94)、AAV CSp-8.9 (WO2016065001的SEQ ID NO:45和95)、AAV CBr-B7.3 (WO2016065001的SEQ ID NO:46和96)、AAV CBr-B7.4 (WO2016065001的SEQ ID NO:47和97)、AAV3B (WO2016065001的SEQ ID NO:48和98)、AAV4 (WO2016065001的SEQ ID NO:49和99)、AAV5 (WO2016065001的SEQ ID NO:50和100),或其变体或衍生物。

[0079] 在一个实施方案中,AAV可以是选自存在于表1中的任何血清型的血清型。

[0080] 在一个实施方案中,AAV可包含表1中序列的序列、片段或变体。

[0081] 在一个实施方案中,AAV可以由表1中所述的序列、片段或变体编码。

[0082] 表1.AAV血清型

[0083]

血清型	SEQ ID NO	参考信息
VOY101	1 或 1809	-
VOY201	1810	-
PHP.N/PHP.B-DGT	2	WO2017100671 SEQ ID NO: 46
AAVPHP.B 或 G2B-26	3	WO2015038958 SEQ ID NO: 8 和 13
AAVPHP.B	4	WO2015038958 SEQ ID NO: 9
AAVG2B-13	5	WO2015038958 SEQ ID NO: 12
AAVTH1.1-32	6	WO2015038958 SEQ ID NO: 14
AAVTH1.1-35	7	WO2015038958 SEQ ID NO: 15
PHP.S/G2A12	8	WO2017100671 SEQ ID NO: 47
AAV9/hu.14 K449R	9	WO2017100671 SEQ ID NO: 45
AAV1	10	US20150159173 SEQ ID NO: 11 、

[0084]

		US20150315612 SEQ ID NO: 202
AAV1	11	US20160017295 SEQ ID NO: 1 、 US20030138772 SEQ ID NO: 64 、 US20150159173 SEQ ID NO: 27 、 US20150315612 SEQ ID NO: 219 、 US7198951 SEQ ID NO: 5
AAV1	12	US20030138772 SEQ ID NO: 6
AAV1.3	13	US20030138772 SEQ ID NO: 14
AAV10	14	US20030138772 SEQ ID NO: 117
AAV10	15	WO2015121501 SEQ ID NO: 9
AAV10	16	WO2015121501 SEQ ID NO: 8
AAV11	17	US20030138772 SEQ ID NO: 118
AAV12	18	US20030138772 SEQ ID NO: 119
AAV2	19	US20150159173 SEQ ID NO: 7 、 US20150315612 SEQ ID NO: 211
AAV2	20	US20030138772 SEQ ID NO: 70 、 US20150159173 SEQ ID NO: 23 、 US20150315612 SEQ ID NO: 221 、 US20160017295 SEQ ID NO: 2、US6156303 SEQ ID NO: 4、US7198951 SEQ ID NO: 4、 WO2015121501 SEQ ID NO: 1
AAV2	21	US6156303 SEQ ID NO: 8
AAV2	22	US20030138772 SEQ ID NO: 7
AAV2	23	US6156303 SEQ ID NO: 3
AAV2.5T	24	US9233131 SEQ ID NO: 42
AAV223.10	25	US20030138772 SEQ ID NO: 75
AAV223.2	26	US20030138772 SEQ ID NO: 49
AAV223.2	27	US20030138772 SEQ ID NO: 76
AAV223.4	28	US20030138772 SEQ ID NO: 50

[0085]

AAV223.4	29	US20030138772 SEQ ID NO: 73
AAV223.5	30	US20030138772 SEQ ID NO: 51
AAV223.5	31	US20030138772 SEQ ID NO: 74
AAV223.6	32	US20030138772 SEQ ID NO: 52
AAV223.6	33	US20030138772 SEQ ID NO: 78
AAV223.7	34	US20030138772 SEQ ID NO: 53
AAV223.7	35	US20030138772 SEQ ID NO: 77
AAV29.3	36	US20030138772 SEQ ID NO: 82
AAV29.4	37	US20030138772 SEQ ID NO: 12
AAV29.5	38	US20030138772 SEQ ID NO: 83
AAV29.5 (AAVbb.2)	39	US20030138772 SEQ ID NO: 13
AAV3	40	US20150159173 SEQ ID NO: 12
AAV3	41	US20030138772 SEQ ID NO: 71 、 US20150159173 SEQ ID NO: 28 、 US20160017295 SEQ ID NO: 3、US7198951 SEQ ID NO: 6
AAV3	42	US20030138772 SEQ ID NO: 8
AAV3.3b	43	US20030138772 SEQ ID NO: 72
AAV3-3	44	US20150315612 SEQ ID NO: 200
AAV3-3	45	US20150315612 SEQ ID NO: 217
AAV3a	46	US6156303 SEQ ID NO: 5
AAV3a	47	US6156303 SEQ ID NO: 9
AAV3b	48	US6156303 SEQ ID NO: 6
AAV3b	49	US6156303 SEQ ID NO: 10
AAV3b	50	US6156303 SEQ ID NO: 1
AAV4	51	US20140348794 SEQ ID NO: 17
AAV4	52	US20140348794 SEQ ID NO: 5
AAV4	53	US20140348794 SEQ ID NO: 3
AAV4	54	US20140348794 SEQ ID NO: 14

[0086]

AAV4	55	US20140348794 SEQ ID NO: 15
AAV4	56	US20140348794 SEQ ID NO: 19
AAV4	57	US20140348794 SEQ ID NO: 12
AAV4	58	US20140348794 SEQ ID NO: 13
AAV4	59	US20140348794 SEQ ID NO: 7
AAV4	60	US20140348794 SEQ ID NO: 8
AAV4	61	US20140348794 SEQ ID NO: 9
AAV4	62	US20140348794 SEQ ID NO: 2
AAV4	63	US20140348794 SEQ ID NO: 10
AAV4	64	US20140348794 SEQ ID NO: 11
AAV4	65	US20140348794 SEQ ID NO: 18
AAV4	66	US20030138772 SEQ ID NO: 63 、 US20160017295 SEQ ID NO: 4 、 US20140348794 SEQ ID NO: 4
AAV4	67	US20140348794 SEQ ID NO: 16
AAV4	68	US20140348794 SEQ ID NO: 20
AAV4	69	US20140348794 SEQ ID NO: 6
AAV4	70	US20140348794 SEQ ID NO: 1
AAV42.2	71	US20030138772 SEQ ID NO: 9
AAV42.2	72	US20030138772 SEQ ID NO: 102
AAV42.3b	73	US20030138772 SEQ ID NO: 36
AAV42.3B	74	US20030138772 SEQ ID NO: 107
AAV42.4	75	US20030138772 SEQ ID NO: 33
AAV42.4	76	US20030138772 SEQ ID NO: 88
AAV42.8	77	US20030138772 SEQ ID NO: 27
AAV42.8	78	US20030138772 SEQ ID NO: 85
AAV43.1	79	US20030138772 SEQ ID NO: 39
AAV43.1	80	US20030138772 SEQ ID NO: 92
AAV43.12	81	US20030138772 SEQ ID NO: 41

[0087]

AAV43.12	82	US20030138772 SEQ ID NO: 93
AAV43.20	83	US20030138772 SEQ ID NO: 42
AAV43.20	84	US20030138772 SEQ ID NO: 99
AAV43.21	85	US20030138772 SEQ ID NO: 43
AAV43.21	86	US20030138772 SEQ ID NO: 96
AAV43.23	87	US20030138772 SEQ ID NO: 44
AAV43.23	88	US20030138772 SEQ ID NO: 98
AAV43.25	89	US20030138772 SEQ ID NO: 45
AAV43.25	90	US20030138772 SEQ ID NO: 97
AAV43.5	91	US20030138772 SEQ ID NO: 40
AAV43.5	92	US20030138772 SEQ ID NO: 94
AAV4-4	93	US20150315612 SEQ ID NO: 201
AAV4-4	94	US20150315612 SEQ ID NO: 218
AAV44.1	95	US20030138772 SEQ ID NO: 46
AAV44.1	96	US20030138772 SEQ ID NO: 79
AAV44.5	97	US20030138772 SEQ ID NO: 47
AAV44.5	98	US20030138772 SEQ ID NO: 80
AAV4407	99	US20150315612 SEQ ID NO: 90
AAV5	100	US7427396 SEQ ID NO: 1
AAV5	101	US20030138772 SEQ ID NO: 114
AAV5	102	US20160017295 SEQ ID NO: 5、US7427396 SEQ ID NO: 2、US20150315612 SEQ ID NO: 216
AAV5	103	US20150315612 SEQ ID NO: 199
AAV6	104	US20150159173 SEQ ID NO: 13
AAV6	105	US20030138772 SEQ ID NO: 65 、 US20150159173 SEQ ID NO: 29 、 US20160017295 SEQ ID NO: 6、US6156303 SEQ ID NO: 7

[0088]

AAV6	106	US6156303 SEQ ID NO: 11
AAV6	107	US6156303 SEQ ID NO: 2
AAV6	108	US20150315612 SEQ ID NO: 203
AAV6	109	US20150315612 SEQ ID NO: 220
AAV6.1	110	US20150159173
AAV6.12	111	US20150159173
AAV6.2	112	US20150159173
AAV7	113	US20150159173 SEQ ID NO: 14
AAV7	114	US20150315612 SEQ ID NO: 183
AAV7	115	US20030138772 SEQ ID NO: 2 、 US20150159173 SEQ ID NO: 30 、 US20150315612 SEQ ID NO: 181 、 US20160017295 SEQ ID NO: 7
AAV7	116	US20030138772 SEQ ID NO: 3
AAV7	117	US20030138772 SEQ ID NO: 1 、 US20150315612 SEQ ID NO: 180
AAV7	118	US20150315612 SEQ ID NO: 213
AAV7	119	US20150315612 SEQ ID NO: 222
AAV8	120	US20150159173 SEQ ID NO: 15
AAV8	121	US20150376240 SEQ ID NO: 7
AAV8	122	US20030138772 SEQ ID NO: 4 、 US20150315612 SEQ ID NO: 182
AAV8	123	US20030138772 SEQ ID NO: 95 、 US20140359799 SEQ ID NO: 1 、 US20150159173 SEQ ID NO: 31 、 US20160017295 SEQ ID NO: 8、 US7198951 SEQ ID NO: 7、 US20150315612 SEQ ID NO: 223
AAV8	124	US20150376240 SEQ ID NO: 8

[0089]

AAV8	125	US20150315612 SEQ ID NO: 214
AAV-8b	126	US20150376240 SEQ ID NO: 5
AAV-8b	127	US20150376240 SEQ ID NO: 3
AAV-8h	128	US20150376240 SEQ ID NO: 6
AAV-8h	129	US20150376240 SEQ ID NO: 4
AAV9	130	US20030138772 SEQ ID NO: 5
AAV9	131	US7198951 SEQ ID NO: 1
AAV9	132	US20160017295 SEQ ID NO: 9
AAV9	133	US20030138772 SEQ ID NO: 100 、 US7198951 SEQ ID NO: 2
AAV9	134	US7198951 SEQ ID NO: 3
AAV9 (AAVhu.14)	135	US7906111 SEQ ID NO: 3; WO2015038958 SEQ ID NO: 11
AAV9 (AAVhu.14)	136	US7906111 SEQ ID NO: 123; WO2015038958 SEQ ID NO: 2
AAVA3.1	137	US20030138772 SEQ ID NO: 120
AAVA3.3	138	US20030138772 SEQ ID NO: 57
AAVA3.3	139	US20030138772 SEQ ID NO: 66
AAVA3.4	140	US20030138772 SEQ ID NO: 54
AAVA3.4	141	US20030138772 SEQ ID NO: 68
AAVA3.5	142	US20030138772 SEQ ID NO: 55
AAVA3.5	143	US20030138772 SEQ ID NO: 69
AAVA3.7	144	US20030138772 SEQ ID NO: 56
AAVA3.7	145	US20030138772 SEQ ID NO: 67
AAV29.3 (AAVbb.1)	146	US20030138772 SEQ ID NO: 11
AAVC2	147	US20030138772 SEQ ID NO: 61
AAVCh.5	148	US20150159173 SEQ ID NO: 46 、 US20150315612 SEQ ID NO: 234
AAVcy.2 (AAV13.3)	149	US20030138772 SEQ ID NO: 15

[0090]

AAV24.1	150	US20030138772 SEQ ID NO: 101
AAVcy.3 (AAV24.1)	151	US20030138772 SEQ ID NO: 16
AAV27.3	152	US20030138772 SEQ ID NO: 104
AAVcy.4 (AAV27.3)	153	US20030138772 SEQ ID NO: 17
AAVcy.5	154	US20150315612 SEQ ID NO: 227
AAV7.2	155	US20030138772 SEQ ID NO: 103
AAVcy.5 (AAV7.2)	156	US20030138772 SEQ ID NO: 18
AAV16.3	157	US20030138772 SEQ ID NO: 105
AAVcy.6 (AAV16.3)	158	US20030138772 SEQ ID NO: 10
AAVcy.5	159	US20150159173 SEQ ID NO: 8
AAVcy.5	160	US20150159173 SEQ ID NO: 24
AAVCy.5R1	161	US20150159173
AAVCy.5R2	162	US20150159173
AAVCy.5R3	163	US20150159173
AAVCy.5R4	164	US20150159173
AAVDJ	165	US20140359799 SEQ ID NO: 3、US7588772 SEQ ID NO: 2
AAVDJ	166	US20140359799 SEQ ID NO: 2、US7588772 SEQ ID NO: 1
AAVDJ-8	167	US7588772; Grimm 等人 2008
AAVDJ-8	168	US7588772; Grimm 等人 2008
AAVF5	169	US20030138772 SEQ ID NO: 110
AAVH2	170	US20030138772 SEQ ID NO: 26
AAVH6	171	US20030138772 SEQ ID NO: 25
AAVhE1.1	172	US9233131 SEQ ID NO: 44
AAVhEr1.14	173	US9233131 SEQ ID NO: 46
AAVhEr1.16	174	US9233131 SEQ ID NO: 48
AAVhEr1.18	175	US9233131 SEQ ID NO: 49
AAVhEr1.23	176	US9233131 SEQ ID NO: 53

[0091]

(AAVhEr2.29)		
AAVhEr1.35	177	US9233131 SEQ ID NO: 50
AAVhEr1.36	178	US9233131 SEQ ID NO: 52
AAVhEr1.5	179	US9233131 SEQ ID NO: 45
AAVhEr1.7	180	US9233131 SEQ ID NO: 51
AAVhEr1.8	181	US9233131 SEQ ID NO: 47
AAVhEr2.16	182	US9233131 SEQ ID NO: 55
AAVhEr2.30	183	US9233131 SEQ ID NO: 56
AAVhEr2.31	184	US9233131 SEQ ID NO: 58
AAVhEr2.36	185	US9233131 SEQ ID NO: 57
AAVhEr2.4	186	US9233131 SEQ ID NO: 54
AAVhEr3.1	187	US9233131 SEQ ID NO: 59
AAVhu.1	188	US20150315612 SEQ ID NO: 46
AAVhu.1	189	US20150315612 SEQ ID NO: 144
AAVhu.10 (AAV16.8)	190	US20150315612 SEQ ID NO: 56
AAVhu.10 (AAV16.8)	191	US20150315612 SEQ ID NO: 156
AAVhu.11 (AAV16.12)	192	US20150315612 SEQ ID NO: 57
AAVhu.11 (AAV16.12)	193	US20150315612 SEQ ID NO: 153
AAVhu.12	194	US20150315612 SEQ ID NO: 59
AAVhu.12	195	US20150315612 SEQ ID NO: 154
AAVhu.13	196	US20150159173 SEQ ID NO: 16 、 US20150315612 SEQ ID NO: 71
AAVhu.13	197	US20150159173 SEQ ID NO: 32 、 US20150315612 SEQ ID NO: 129
AAVhu.136.1	198	US20150315612 SEQ ID NO: 165
AAVhu.140.1	199	US20150315612 SEQ ID NO: 166
AAVhu.140.2	200	US20150315612 SEQ ID NO: 167
AAVhu.145.6	201	US20150315612 SEQ ID No: 178
AAVhu.15	202	US20150315612 SEQ ID NO: 147

[0092]

AAVhu.15 (AAV33.4)	203	US20150315612 SEQ ID NO: 50
AAVhu.156.1	204	US20150315612 SEQ ID No: 179
AAVhu.16	205	US20150315612 SEQ ID NO: 148
AAVhu.16 (AAV33.8)	206	US20150315612 SEQ ID NO: 51
AAVhu.17	207	US20150315612 SEQ ID NO: 83
AAVhu.17 (AAV33.12)	208	US20150315612 SEQ ID NO: 4
AAVhu.172.1	209	US20150315612 SEQ ID NO: 171
AAVhu.172.2	210	US20150315612 SEQ ID NO: 172
AAVhu.173.4	211	US20150315612 SEQ ID NO: 173
AAVhu.173.8	212	US20150315612 SEQ ID NO: 175
AAVhu.18	213	US20150315612 SEQ ID NO: 52
AAVhu.18	214	US20150315612 SEQ ID NO: 149
AAVhu.19	215	US20150315612 SEQ ID NO: 62
AAVhu.19	216	US20150315612 SEQ ID NO: 133
AAVhu.2	217	US20150315612 SEQ ID NO: 48
AAVhu.2	218	US20150315612 SEQ ID NO: 143
AAVhu.20	219	US20150315612 SEQ ID NO: 63
AAVhu.20	220	US20150315612 SEQ ID NO: 134
AAVhu.21	221	US20150315612 SEQ ID NO: 65
AAVhu.21	222	US20150315612 SEQ ID NO: 135
AAVhu.22	223	US20150315612 SEQ ID NO: 67
AAVhu.22	224	US20150315612 SEQ ID NO: 138
AAVhu.23	225	US20150315612 SEQ ID NO: 60
AAVhu.23.2	226	US20150315612 SEQ ID NO: 137
AAVhu.24	227	US20150315612 SEQ ID NO: 66
AAVhu.24	228	US20150315612 SEQ ID NO: 136
AAVhu.25	229	US20150315612 SEQ ID NO: 49
AAVhu.25	230	US20150315612 SEQ ID NO: 146
AAVhu.26	231	US20150159173 SEQ ID NO: 17 、

[0093]

		US20150315612 SEQ ID NO: 61
AAVhu.26	232	US20150159173 SEQ ID NO: 33 、 US20150315612 SEQ ID NO: 139
AAVhu.27	233	US20150315612 SEQ ID NO: 64
AAVhu.27	234	US20150315612 SEQ ID NO: 140
AAVhu.28	235	US20150315612 SEQ ID NO: 68
AAVhu.28	236	US20150315612 SEQ ID NO: 130
AAVhu.29	237	US20150315612 SEQ ID NO: 69
AAVhu.29	238	US20150159173 SEQ ID NO: 42 、 US20150315612 SEQ ID NO: 132
AAVhu.29	239	US20150315612 SEQ ID NO: 225
AAVhu.29R	240	US20150159173
AAVhu.3	241	US20150315612 SEQ ID NO: 44
AAVhu.3	242	US20150315612 SEQ ID NO: 145
AAVhu.30	243	US20150315612 SEQ ID NO: 70
AAVhu.30	244	US20150315612 SEQ ID NO: 131
AAVhu.31	245	US20150315612 SEQ ID NO: 1
AAVhu.31	246	US20150315612 SEQ ID NO: 121
AAVhu.32	247	US20150315612 SEQ ID NO: 2
AAVhu.32	248	US20150315612 SEQ ID NO: 122
AAVhu.33	249	US20150315612 SEQ ID NO: 75
AAVhu.33	250	US20150315612 SEQ ID NO: 124
AAVhu.34	251	US20150315612 SEQ ID NO: 72
AAVhu.34	252	US20150315612 SEQ ID NO: 125
AAVhu.35	253	US20150315612 SEQ ID NO: 73
AAVhu.35	254	US20150315612 SEQ ID NO: 164
AAVhu.36	255	US20150315612 SEQ ID NO: 74
AAVhu.36	256	US20150315612 SEQ ID NO: 126
AAVhu.37	257	US20150159173 SEQ ID NO: 34 、

[0094]

		US20150315612 SEQ ID NO: 88
AAVhu.37 (AAV106.1)	258	US20150315612 SEQ ID NO: 10 、 US20150159173 SEQ ID NO: 18
AAVhu.38	259	US20150315612 SEQ ID NO: 161
AAVhu.39	260	US20150315612 SEQ ID NO: 102
AAVhu.39 (AAVLG-9)	261	US20150315612 SEQ ID NO: 24
AAVhu.4	262	US20150315612 SEQ ID NO: 47
AAVhu.4	263	US20150315612 SEQ ID NO: 141
AAVhu.40	264	US20150315612 SEQ ID NO: 87
AAVhu.40 (AAV114.3)	265	US20150315612 SEQ ID No: 11
AAVhu.41	266	US20150315612 SEQ ID NO: 91
AAVhu.41 (AAV127.2)	267	US20150315612 SEQ ID NO: 6
AAVhu.42	268	US20150315612 SEQ ID NO: 85
AAVhu.42 (AAV127.5)	269	US20150315612 SEQ ID NO: 8
AAVhu.43	270	US20150315612 SEQ ID NO: 160
AAVhu.43	271	US20150315612 SEQ ID NO: 236
AAVhu.43 (AAV128.1)	272	US20150315612 SEQ ID NO: 80
AAVhu.44	273	US20150159173 SEQ ID NO: 45 、 US20150315612 SEQ ID NO: 158
AAVhu.44 (AAV128.3)	274	US20150315612 SEQ ID NO: 81
AAVhu.44R1	275	US20150159173
AAVhu.44R2	276	US20150159173
AAVhu.44R3	277	US20150159173
AAVhu.45	278	US20150315612 SEQ ID NO: 76
AAVhu.45	279	US20150315612 SEQ ID NO: 127
AAVhu.46	280	US20150315612 SEQ ID NO: 82
AAVhu.46	281	US20150315612 SEQ ID NO: 159
AAVhu.46	282	US20150315612 SEQ ID NO: 224
AAVhu.47	283	US20150315612 SEQ ID NO: 77

[0095]

AAVhu.47	284	US20150315612 SEQ ID NO: 128
AAVhu.48	285	US20150159173 SEQ ID NO: 38
AAVhu.48	286	US20150315612 SEQ ID NO: 157
AAVhu.48 (AAV130.4)	287	US20150315612 SEQ ID NO: 78
AAVhu.48R1	288	US20150159173
AAVhu.48R2	289	US20150159173
AAVhu.48R3	290	US20150159173
AAVhu.49	291	US20150315612 SEQ ID NO: 209
AAVhu.49	292	US20150315612 SEQ ID NO: 189
AAVhu.5	293	US20150315612 SEQ ID NO: 45
AAVhu.5	294	US20150315612 SEQ ID NO: 142
AAVhu.51	295	US20150315612 SEQ ID NO: 208
AAVhu.51	296	US20150315612 SEQ ID NO: 190
AAVhu.52	297	US20150315612 SEQ ID NO: 210
AAVhu.52	298	US20150315612 SEQ ID NO: 191
AAVhu.53	299	US20150159173 SEQ ID NO: 19
AAVhu.53	300	US20150159173 SEQ ID NO: 35
AAVhu.53 (AAV145.1)	301	US20150315612 SEQ ID NO: 176
AAVhu.54	302	US20150315612 SEQ ID NO: 188
AAVhu.54 (AAV145.5)	303	US20150315612 SEQ ID No: 177
AAVhu.55	304	US20150315612 SEQ ID NO: 187
AAVhu.56	305	US20150315612 SEQ ID NO: 205
AAVhu.56 (AAV145.6)	306	US20150315612 SEQ ID NO: 168
AAVhu.56 (AAV145.6)	307	US20150315612 SEQ ID NO: 192
AAVhu.57	308	US20150315612 SEQ ID NO: 206
AAVhu.57	309	US20150315612 SEQ ID NO: 169
AAVhu.57	310	US20150315612 SEQ ID NO: 193
AAVhu.58	311	US20150315612 SEQ ID NO: 207
AAVhu.58	312	US20150315612 SEQ ID NO: 194

[0096]

AAVhu.6 (AAV3.1)	313	US20150315612 SEQ ID NO: 5
AAVhu.6 (AAV3.1)	314	US20150315612 SEQ ID NO: 84
AAVhu.60	315	US20150315612 SEQ ID NO: 184
AAVhu.60 (AAV161.10)	316	US20150315612 SEQ ID NO: 170
AAVhu.61	317	US20150315612 SEQ ID NO: 185
AAVhu.61 (AAV161.6)	318	US20150315612 SEQ ID NO: 174
AAVhu.63	319	US20150315612 SEQ ID NO: 204
AAVhu.63	320	US20150315612 SEQ ID NO: 195
AAVhu.64	321	US20150315612 SEQ ID NO: 212
AAVhu.64	322	US20150315612 SEQ ID NO: 196
AAVhu.66	323	US20150315612 SEQ ID NO: 197
AAVhu.67	324	US20150315612 SEQ ID NO: 215
AAVhu.67	325	US20150315612 SEQ ID NO: 198
AAVhu.7	326	US20150315612 SEQ ID NO: 226
AAVhu.7	327	US20150315612 SEQ ID NO: 150
AAVhu.7 (AAV7.3)	328	US20150315612 SEQ ID NO: 55
AAVhu.71	329	US20150315612 SEQ ID NO: 79
AAVhu.8	330	US20150315612 SEQ ID NO: 53
AAVhu.8	331	US20150315612 SEQ ID NO: 12
AAVhu.8	332	US20150315612 SEQ ID NO: 151
AAVhu.9 (AAV3.1)	333	US20150315612 SEQ ID NO: 58
AAVhu.9 (AAV3.1)	334	US20150315612 SEQ ID NO: 155
AAV-LK01	335	US20150376607 SEQ ID NO: 2
AAV-LK01	336	US20150376607 SEQ ID NO: 29
AAV-LK02	337	US20150376607 SEQ ID NO: 3
AAV-LK02	338	US20150376607 SEQ ID NO: 30
AAV-LK03	339	US20150376607 SEQ ID NO: 4
AAV-LK03	340	WO2015121501 SEQ ID NO: 12 、 US20150376607 SEQ ID NO: 31

[0097]

AAV-LK04	341	US20150376607 SEQ ID NO: 5
AAV-LK04	342	US20150376607 SEQ ID NO: 32
AAV-LK05	343	US20150376607 SEQ ID NO: 6
AAV-LK05	344	US20150376607 SEQ ID NO: 33
AAV-LK06	345	US20150376607 SEQ ID NO: 7
AAV-LK06	346	US20150376607 SEQ ID NO: 34
AAV-LK07	347	US20150376607 SEQ ID NO: 8
AAV-LK07	348	US20150376607 SEQ ID NO: 35
AAV-LK08	349	US20150376607 SEQ ID NO: 9
AAV-LK08	350	US20150376607 SEQ ID NO: 36
AAV-LK09	351	US20150376607 SEQ ID NO: 10
AAV-LK09	352	US20150376607 SEQ ID NO: 37
AAV-LK10	353	US20150376607 SEQ ID NO: 11
AAV-LK10	354	US20150376607 SEQ ID NO: 38
AAV-LK11	355	US20150376607 SEQ ID NO: 12
AAV-LK11	356	US20150376607 SEQ ID NO: 39
AAV-LK12	357	US20150376607 SEQ ID NO: 13
AAV-LK12	358	US20150376607 SEQ ID NO: 40
AAV-LK13	359	US20150376607 SEQ ID NO: 14
AAV-LK13	360	US20150376607 SEQ ID NO: 41
AAV-LK14	361	US20150376607 SEQ ID NO: 15
AAV-LK14	362	US20150376607 SEQ ID NO: 42
AAV-LK15	363	US20150376607 SEQ ID NO: 16
AAV-LK15	364	US20150376607 SEQ ID NO: 43
AAV-LK16	365	US20150376607 SEQ ID NO: 17
AAV-LK16	366	US20150376607 SEQ ID NO: 44
AAV-LK17	367	US20150376607 SEQ ID NO: 18
AAV-LK17	368	US20150376607 SEQ ID NO: 45
AAV-LK18	369	US20150376607 SEQ ID NO: 19

[0098]

AAV-LK18	370	US20150376607 SEQ ID NO: 46
AAV-LK19	371	US20150376607 SEQ ID NO: 20
AAV-LK19	372	US20150376607 SEQ ID NO: 47
AAV-PAEC	373	US20150376607 SEQ ID NO: 1
AAV-PAEC	374	US20150376607 SEQ ID NO: 48
AAV-PAEC11	375	US20150376607 SEQ ID NO: 26
AAV-PAEC11	376	US20150376607 SEQ ID NO: 54
AAV-PAEC12	377	US20150376607 SEQ ID NO: 27
AAV-PAEC12	378	US20150376607 SEQ ID NO: 51
AAV-PAEC13	379	US20150376607 SEQ ID NO: 28
AAV-PAEC13	380	US20150376607 SEQ ID NO: 49
AAV-PAEC2	381	US20150376607 SEQ ID NO: 21
AAV-PAEC2	382	US20150376607 SEQ ID NO: 56
AAV-PAEC4	383	US20150376607 SEQ ID NO: 22
AAV-PAEC4	384	US20150376607 SEQ ID NO: 55
AAV-PAEC6	385	US20150376607 SEQ ID NO: 23
AAV-PAEC6	386	US20150376607 SEQ ID NO: 52
AAV-PAEC7	387	US20150376607 SEQ ID NO: 24
AAV-PAEC7	388	US20150376607 SEQ ID NO: 53
AAV-PAEC8	389	US20150376607 SEQ ID NO: 25
AAV-PAEC8	390	US20150376607 SEQ ID NO: 50
AAVpi.1	391	US20150315612 SEQ ID NO: 28
AAVpi.1	392	US20150315612 SEQ ID NO: 93
AAVpi.2	393	US20150315612 SEQ ID NO: 30
AAVpi.2	394	US20150315612 SEQ ID NO: 95
AAVpi.3	395	US20150315612 SEQ ID NO: 29
AAVpi.3	396	US20150315612 SEQ ID NO: 94
AAVrh.10	397	US20150159173 SEQ ID NO: 9
AAVrh.10	398	US20150159173 SEQ ID NO: 25

[0099]

AAV44.2	399	US20030138772 SEQ ID NO: 59
AAVrh.10 (AAV44.2)	400	US20030138772 SEQ ID NO: 81
AAV42.1B	401	US20030138772 SEQ ID NO: 90
AAVrh.12 (AAV42.1b)	402	US20030138772 SEQ ID NO: 30
AAVrh.13	403	US20150159173 SEQ ID NO: 10
AAVrh.13	404	US20150159173 SEQ ID NO: 26
AAVrh.13	405	US20150315612 SEQ ID NO: 228
AAVrh.13R	406	US20150159173
AAV42.3A	407	US20030138772 SEQ ID NO: 87
AAVrh.14 (AAV42.3a)	408	US20030138772 SEQ ID NO: 32
AAV42.5A	409	US20030138772 SEQ ID NO: 89
AAVrh.17 (AAV42.5a)	410	US20030138772 SEQ ID NO: 34
AAV42.5B	411	US20030138772 SEQ ID NO: 91
AAVrh.18 (AAV42.5b)	412	US20030138772 SEQ ID NO: 29
AAV42.6B	413	US20030138772 SEQ ID NO: 112
AAVrh.19 (AAV42.6b)	414	US20030138772 SEQ ID NO: 38
AAVrh.2	415	US20150159173 SEQ ID NO: 39
AAVrh.2	416	US20150315612 SEQ ID NO: 231
AAVrh.20	417	US20150159173 SEQ ID NO: 1
AAV42.10	418	US20030138772 SEQ ID NO: 106
AAVrh.21 (AAV42.10)	419	US20030138772 SEQ ID NO: 35
AAV42.11	420	US20030138772 SEQ ID NO: 108
AAVrh.22 (AAV42.11)	421	US20030138772 SEQ ID NO: 37
AAV42.12	422	US20030138772 SEQ ID NO: 113
AAVrh.23 (AAV42.12)	423	US20030138772 SEQ ID NO: 58
AAV42.13	424	US20030138772 SEQ ID NO: 86
AAVrh.24 (AAV42.13)	425	US20030138772 SEQ ID NO: 31
AAV42.15	426	US20030138772 SEQ ID NO: 84
AAVrh.25 (AAV42.15)	427	US20030138772 SEQ ID NO: 28

[0100]

AAVrh.2R	428	US20150159173
AAVrh.31 (AAV223.1)	429	US20030138772 SEQ ID NO: 48
AAVC1	430	US20030138772 SEQ ID NO: 60
AAVrh.32 (AAVC1)	431	US20030138772 SEQ ID NO: 19
AAVrh.32/33	432	US20150159173 SEQ ID NO: 2
AAVrh.33 (AAVC3)	433	US20030138772 SEQ ID NO: 20
AAVC5	434	US20030138772 SEQ ID NO: 62
AAVrh.34 (AAVC5)	435	US20030138772 SEQ ID NO: 21
AAVF1	436	US20030138772 SEQ ID NO: 109
AAVrh.35 (AAVF1)	437	US20030138772 SEQ ID NO: 22
AAVF3	438	US20030138772 SEQ ID NO: 111
AAVrh.36 (AAVF3)	439	US20030138772 SEQ ID NO: 23
AAVrh.37	440	US20030138772 SEQ ID NO: 24
AAVrh.37	441	US20150159173 SEQ ID NO: 40
AAVrh.37	442	US20150315612 SEQ ID NO: 229
AAVrh.37R2	443	US20150159173
AAVrh.38 (AAVLG-4)	444	US20150315612 SEQ ID NO: 7
AAVrh.38 (AAVLG-4)	445	US20150315612 SEQ ID NO: 86
AAVrh.39	446	US20150159173 SEQ ID NO: 20 、 US20150315612 SEQ ID NO: 13
AAVrh.39	447	US20150159173 SEQ ID NO: 3 、 US20150159173 SEQ ID NO: 36 、 US20150315612 SEQ ID NO: 89
AAVrh.40	448	US20150315612 SEQ ID NO: 92
AAVrh.40 (AAVLG-10)	449	US20150315612 SEQ ID No: 14
AAVrh.43 (AAVN721-8)	450	US20150315612 SEQ ID NO: 43 、 US20150159173 SEQ ID NO: 21
AAVrh.43 (AAVN721-8)	451	US20150315612 SEQ ID NO: 163 、 US20150159173 SEQ ID NO: 37

[0101]

AAVrh.44	452	US20150315612 SEQ ID NO: 34
AAVrh.44	453	US20150315612 SEQ ID NO: 111
AAVrh.45	454	US20150315612 SEQ ID NO: 41
AAVrh.45	455	US20150315612 SEQ ID NO: 109
AAVrh.46	456	US20150159173 SEQ ID NO: 22 、 US20150315612 SEQ ID NO: 19
AAVrh.46	457	US20150159173 SEQ ID NO: 4 、 US20150315612 SEQ ID NO: 101
AAVrh.47	458	US20150315612 SEQ ID NO: 38
AAVrh.47	459	US20150315612 SEQ ID NO: 118
AAVrh.48	460	US20150159173 SEQ ID NO: 44 、 US20150315612 SEQ ID NO: 115
AAVrh.48.1	461	US20150159173
AAVrh.48.1.2	462	US20150159173
AAVrh.48.2	463	US20150159173
AAVrh.48 (AAV1-7)	464	US20150315612 SEQ ID NO: 32
AAVrh.49 (AAV1-8)	465	US20150315612 SEQ ID NO: 25
AAVrh.49 (AAV1-8)	466	US20150315612 SEQ ID NO: 103
AAVrh.50 (AAV2-4)	467	US20150315612 SEQ ID NO: 23
AAVrh.50 (AAV2-4)	468	US20150315612 SEQ ID NO: 108
AAVrh.51 (AAV2-5)	469	US20150315612 SEQ ID No: 22
AAVrh.51 (AAV2-5)	470	US20150315612 SEQ ID NO: 104
AAVrh.52 (AAV3-9)	471	US20150315612 SEQ ID NO: 18
AAVrh.52 (AAV3-9)	472	US20150315612 SEQ ID NO: 96
AAVrh.53	473	US20150315612 SEQ ID NO: 97
AAVrh.53 (AAV3-11)	474	US20150315612 SEQ ID NO: 17
AAVrh.53 (AAV3-11)	475	US20150315612 SEQ ID NO: 186
AAVrh.54	476	US20150315612 SEQ ID NO: 40
AAVrh.54	477	US20150159173 SEQ ID NO: 49 、

[0102]

		US20150315612 SEQ ID NO: 116
AAVrh.55	478	US20150315612 SEQ ID NO: 37
AAVrh.55 (AAV4-19)	479	US20150315612 SEQ ID NO: 117
AAVrh.56	480	US20150315612 SEQ ID NO: 54
AAVrh.56	481	US20150315612 SEQ ID NO: 152
AAVrh.57	482	US20150315612 SEQ ID NO: 26
AAVrh.57	483	US20150315612 SEQ ID NO: 105
AAVrh.58	484	US20150315612 SEQ ID NO: 27
AAVrh.58	485	US20150159173 SEQ ID NO: 48 、 US20150315612 SEQ ID NO: 106
AAVrh.58	486	US20150315612 SEQ ID NO: 232
AAVrh.59	487	US20150315612 SEQ ID NO: 42
AAVrh.59	488	US20150315612 SEQ ID NO: 110
AAVrh.60	489	US20150315612 SEQ ID NO: 31
AAVrh.60	490	US20150315612 SEQ ID NO: 120
AAVrh.61	491	US20150315612 SEQ ID NO: 107
AAVrh.61 (AAV2-3)	492	US20150315612 SEQ ID NO: 21
AAVrh.62 (AAV2-15)	493	US20150315612 SEQ ID No: 33
AAVrh.62 (AAV2-15)	494	US20150315612 SEQ ID NO: 114
AAVrh.64	495	US20150315612 SEQ ID No: 15
AAVrh.64	496	US20150159173 SEQ ID NO: 43 、 US20150315612 SEQ ID NO: 99
AAVrh.64	497	US20150315612 SEQ ID NO: 233
AAVRh.64R1	498	US20150159173
AAVRh.64R2	499	US20150159173
AAVrh.65	500	US20150315612 SEQ ID NO: 35
AAVrh.65	501	US20150315612 SEQ ID NO: 112
AAVrh.67	502	US20150315612 SEQ ID NO: 36
AAVrh.67	503	US20150315612 SEQ ID NO: 230

[0103]

AAVrh.67	504	US20150159173 SEQ ID NO: 47 、 US20150315612 SEQ ID NO: 113
AAVrh.68	505	US20150315612 SEQ ID NO: 16
AAVrh.68	506	US20150315612 SEQ ID NO: 100
AAVrh.69	507	US20150315612 SEQ ID NO: 39
AAVrh.69	508	US20150315612 SEQ ID NO: 119
AAVrh.70	509	US20150315612 SEQ ID NO: 20
AAVrh.70	510	US20150315612 SEQ ID NO: 98
AAVrh.71	511	US20150315612 SEQ ID NO: 162
AAVrh.72	512	US20150315612 SEQ ID NO: 9
AAVrh.73	513	US20150159173 SEQ ID NO: 5
AAVrh.74	514	US20150159173 SEQ ID NO: 6
AAVrh.8	515	US20150159173 SEQ ID NO: 41
AAVrh.8	516	US20150315612 SEQ ID NO: 235
AAVrh.8R	517	US20150159173 、 WO2015168666 SEQ ID NO: 9
AAVrh.8R A586R 突变体	518	WO2015168666 SEQ ID NO: 10
AAVrh.8R R533A 突变体	519	WO2015168666 SEQ ID NO: 11
BAAV (牛 AAV)	520	US9193769 SEQ ID NO: 8
BAAV (牛 AAV)	521	US9193769 SEQ ID NO: 10
BAAV (牛 AAV)	522	US9193769 SEQ ID NO: 4
BAAV (牛 AAV)	523	US9193769 SEQ ID NO: 2
BAAV (牛 AAV)	524	US9193769 SEQ ID NO: 6
BAAV (牛 AAV)	525	US9193769 SEQ ID NO: 1
BAAV (牛 AAV)	526	US9193769 SEQ ID NO: 5
BAAV (牛 AAV)	527	US9193769 SEQ ID NO: 3
BAAV (牛 AAV)	528	US9193769 SEQ ID NO: 11
BAAV (牛 AAV)	529	US7427396 SEQ ID NO: 5
BAAV (牛 AAV)	530	US7427396 SEQ ID NO: 6

[0104]

BAAV (牛 AAV)	531	US9193769 SEQ ID NO: 7
BAAV (牛 AAV)	532	US9193769 SEQ ID NO: 9
BNP61 AAV	533	US20150238550 SEQ ID NO: 1
BNP61 AAV	534	US20150238550 SEQ ID NO: 2
BNP62 AAV	535	US20150238550 SEQ ID NO: 3
BNP63 AAV	536	US20150238550 SEQ ID NO: 4
山羊 AAV	537	US7427396 SEQ ID NO: 3
山羊 AAV	538	US7427396 SEQ ID NO: 4
真型 AAV (ttAAV)	539	WO2015121501 SEQ ID NO: 2
AAAV (禽 AAV)	540	US9238800 SEQ ID NO: 12
AAAV (禽 AAV)	541	US9238800 SEQ ID NO: 2
AAAV (禽 AAV)	542	US9238800 SEQ ID NO: 6
AAAV (禽 AAV)	543	US9238800 SEQ ID NO: 4
AAAV (禽 AAV)	544	US9238800 SEQ ID NO: 8
AAAV (禽 AAV)	545	US9238800 SEQ ID NO: 14
AAAV (禽 AAV)	546	US9238800 SEQ ID NO: 10
AAAV (禽 AAV)	547	US9238800 SEQ ID NO: 15
AAAV (禽 AAV)	548	US9238800 SEQ ID NO: 5
AAAV (禽 AAV)	549	US9238800 SEQ ID NO: 9
AAAV (禽 AAV)	550	US9238800 SEQ ID NO: 3
AAAV (禽 AAV)	551	US9238800 SEQ ID NO: 7
AAAV (禽 AAV)	552	US9238800 SEQ ID NO: 11
AAAV (禽 AAV)	553	US9238800 SEQ ID NO: 13
AAAV (禽 AAV)	554	US9238800 SEQ ID NO: 1
AAV 改组 100-1	555	US20160017295 SEQ ID NO: 23
AAV 改组 100-1	556	US20160017295 SEQ ID NO: 11
AAV 改组 100-2	557	US20160017295 SEQ ID NO: 37
AAV 改组 100-2	558	US20160017295 SEQ ID NO: 29
AAV 改组 100-3	559	US20160017295 SEQ ID NO: 24

[0105]

AAV 改组 100-3	560	US20160017295 SEQ ID NO: 12
AAV 改组 100-7	561	US20160017295 SEQ ID NO: 25
AAV 改组 100-7	562	US20160017295 SEQ ID NO: 13
AAV 改组 10-2	563	US20160017295 SEQ ID NO: 34
AAV 改组 10-2	564	US20160017295 SEQ ID NO: 26
AAV 改组 10-6	565	US20160017295 SEQ ID NO: 35
AAV 改组 10-6	566	US20160017295 SEQ ID NO: 27
AAV 改组 10-8	567	US20160017295 SEQ ID NO: 36
AAV 改组 10-8	568	US20160017295 SEQ ID NO: 28
AAV SM 100-10	569	US20160017295 SEQ ID NO: 41
AAV SM 100-10	570	US20160017295 SEQ ID NO: 33
AAV SM 100-3	571	US20160017295 SEQ ID NO: 40
AAV SM 100-3	572	US20160017295 SEQ ID NO: 32
AAV SM 10-1	573	US20160017295 SEQ ID NO: 38
AAV SM 10-1	574	US20160017295 SEQ ID NO: 30
AAV SM 10-2	575	US20160017295 SEQ ID NO: 10
AAV SM 10-2	576	US20160017295 SEQ ID NO: 22
AAV SM 10-8	577	US20160017295 SEQ ID NO: 39
AAV SM 10-8	578	US20160017295 SEQ ID NO: 31
AAVF1/HSC1	579	WO2016049230 SEQ ID NO: 20
AAVF2/HSC2	580	WO2016049230 SEQ ID NO: 21
AAVF3/HSC3	581	WO2016049230 SEQ ID NO: 22
AAVF4/HSC4	582	WO2016049230 SEQ ID NO: 23
AAVF5/HSC5	583	WO2016049230 SEQ ID NO: 25
AAVF6/HSC6	584	WO2016049230 SEQ ID NO: 24
AAVF7/HSC7	585	WO2016049230 SEQ ID NO: 27
AAVF8/HSC8	586	WO2016049230 SEQ ID NO: 28
AAVF9/HSC9	587	WO2016049230 SEQ ID NO: 29
AAVF11/HSC11	588	WO2016049230 SEQ ID NO: 26

[0106]

AAVF12/HSC12	589	WO2016049230 SEQ ID NO: 30
AAVF13/HSC13	590	WO2016049230 SEQ ID NO: 31
AAVF14/HSC14	591	WO2016049230 SEQ ID NO: 32
AAVF15/HSC15	592	WO2016049230 SEQ ID NO: 33
AAVF16/HSC16	593	WO2016049230 SEQ ID NO: 34
AAVF17/HSC17	594	WO2016049230 SEQ ID NO: 35
AAVF1/HSC1	595	WO2016049230 SEQ ID NO: 2
AAVF2/HSC2	596	WO2016049230 SEQ ID NO: 3
AAVF3/HSC3	597	WO2016049230 SEQ ID NO: 5
AAVF4/HSC4	598	WO2016049230 SEQ ID NO: 6
AAVF5/HSC5	599	WO2016049230 SEQ ID NO: 11
AAVF6/HSC6	600	WO2016049230 SEQ ID NO: 7
AAVF7/HSC7	601	WO2016049230 SEQ ID NO: 8
AAVF8/HSC8	602	WO2016049230 SEQ ID NO: 9
AAVF9/HSC9	603	WO2016049230 SEQ ID NO: 10
AAVF11/HSC11	604	WO2016049230 SEQ ID NO: 4
AAVF12/HSC12	605	WO2016049230 SEQ ID NO: 12
AAVF13/HSC13	606	WO2016049230 SEQ ID NO: 14
AAVF14/HSC14	607	WO2016049230 SEQ ID NO: 15
AAVF15/HSC15	608	WO2016049230 SEQ ID NO: 16
AAVF16/HSC16	609	WO2016049230 SEQ ID NO: 17
AAVF17/HSC17	610	WO2016049230 SEQ ID NO: 13
AAV CBr-E1	611	US8734809 SEQ ID NO: 13
AAV CBr-E2	612	US8734809 SEQ ID NO: 14
AAV CBr-E3	613	US8734809 SEQ ID NO: 15
AAV CBr-E4	614	US8734809 SEQ ID NO: 16
AAV CBr-E5	615	US8734809 SEQ ID NO: 17
AAV CBr-e5	616	US8734809 SEQ ID NO: 18
AAV CBr-E6	617	US8734809 SEQ ID NO: 19

[0107]

AAV CBr-E7	618	US8734809 SEQ ID NO: 20
AAV CBr-E8	619	US8734809 SEQ ID NO: 21
AAV CLv-D1	620	US8734809 SEQ ID NO: 22
AAV CLv-D2	621	US8734809 SEQ ID NO: 23
AAV CLv-D3	622	US8734809 SEQ ID NO: 24
AAV CLv-D4	623	US8734809 SEQ ID NO: 25
AAV CLv-D5	624	US8734809 SEQ ID NO: 26
AAV CLv-D6	625	US8734809 SEQ ID NO: 27
AAV CLv-D7	626	US8734809 SEQ ID NO: 28
AAV CLv-D8	627	US8734809 SEQ ID NO: 29
AAV CLv-E1	628	US8734809 SEQ ID NO: 13
AAV CLv-R1	629	US8734809 SEQ ID NO: 30
AAV CLv-R2	630	US8734809 SEQ ID NO: 31
AAV CLv-R3	631	US8734809 SEQ ID NO: 32
AAV CLv-R4	632	US8734809 SEQ ID NO: 33
AAV CLv-R5	633	US8734809 SEQ ID NO: 34
AAV CLv-R6	634	US8734809 SEQ ID NO: 35
AAV CLv-R7	635	US8734809 SEQ ID NO: 36
AAV CLv-R8	636	US8734809 SEQ ID NO: 37
AAV CLv-R9	637	US8734809 SEQ ID NO: 38
AAV CLg-F1	638	US8734809 SEQ ID NO: 39
AAV CLg-F2	639	US8734809 SEQ ID NO: 40
AAV CLg-F3	640	US8734809 SEQ ID NO: 41
AAV CLg-F4	641	US8734809 SEQ ID NO: 42
AAV CLg-F5	642	US8734809 SEQ ID NO: 43
AAV CLg-F6	643	US8734809 SEQ ID NO: 43
AAV CLg-F7	644	US8734809 SEQ ID NO: 44
AAV CLg-F8	645	US8734809 SEQ ID NO: 43
AAV CSp-1	646	US8734809 SEQ ID NO: 45

[0108]

AAV CSp-10	647	US8734809 SEQ ID NO: 46
AAV CSp-11	648	US8734809 SEQ ID NO: 47
AAV CSp-2	649	US8734809 SEQ ID NO: 48
AAV CSp-3	650	US8734809 SEQ ID NO: 49
AAV CSp-4	651	US8734809 SEQ ID NO: 50
AAV CSp-6	652	US8734809 SEQ ID NO: 51
AAV CSp-7	653	US8734809 SEQ ID NO: 52
AAV CSp-8	654	US8734809 SEQ ID NO: 53
AAV CSp-9	655	US8734809 SEQ ID NO: 54
AAV CHt-2	656	US8734809 SEQ ID NO: 55
AAV CHt-3	657	US8734809 SEQ ID NO: 56
AAV CKd-1	658	US8734809 SEQ ID NO: 57
AAV CKd-10	659	US8734809 SEQ ID NO: 58
AAV CKd-2	660	US8734809 SEQ ID NO: 59
AAV CKd-3	661	US8734809 SEQ ID NO: 60
AAV CKd-4	662	US8734809 SEQ ID NO: 61
AAV CKd-6	663	US8734809 SEQ ID NO: 62
AAV CKd-7	664	US8734809 SEQ ID NO: 63
AAV CKd-8	665	US8734809 SEQ ID NO: 64
AAV CLv-1	666	US8734809 SEQ ID NO: 65
AAV CLv-12	667	US8734809 SEQ ID NO: 66
AAV CLv-13	668	US8734809 SEQ ID NO: 67
AAV CLv-2	669	US8734809 SEQ ID NO: 68
AAV CLv-3	670	US8734809 SEQ ID NO: 69
AAV CLv-4	671	US8734809 SEQ ID NO: 70
AAV CLv-6	672	US8734809 SEQ ID NO: 71
AAV CLv-8	673	US8734809 SEQ ID NO: 72
AAV CKd-B1	674	US8734809 SEQ ID NO: 73
AAV CKd-B2	675	US8734809 SEQ ID NO: 74

[0109]

AAV CKd-B3	676	US8734809 SEQ ID NO: 75
AAV CKd-B4	677	US8734809 SEQ ID NO: 76
AAV CKd-B5	678	US8734809 SEQ ID NO: 77
AAV CKd-B6	679	US8734809 SEQ ID NO: 78
AAV CKd-B7	680	US8734809 SEQ ID NO: 79
AAV CKd-B8	681	US8734809 SEQ ID NO: 80
AAV CKd-H1	682	US8734809 SEQ ID NO: 81
AAV CKd-H2	683	US8734809 SEQ ID NO: 82
AAV CKd-H3	684	US8734809 SEQ ID NO: 83
AAV CKd-H4	685	US8734809 SEQ ID NO: 84
AAV CKd-H5	686	US8734809 SEQ ID NO: 85
AAV CKd-H6	687	US8734809 SEQ ID NO: 77
AAV CHt-1	688	US8734809 SEQ ID NO: 86
AAV CLv1-1	689	US8734809 SEQ ID NO: 171
AAV CLv1-2	690	US8734809 SEQ ID NO: 172
AAV CLv1-3	691	US8734809 SEQ ID NO: 173
AAV CLv1-4	692	US8734809 SEQ ID NO: 174
AAV Clv1-7	693	US8734809 SEQ ID NO: 175
AAV Clv1-8	694	US8734809 SEQ ID NO: 176
AAV Clv1-9	695	US8734809 SEQ ID NO: 177
AAV Clv1-10	696	US8734809 SEQ ID NO: 178
AAV.VR-355	697	US8734809 SEQ ID NO: 181
AAV.hu.48R3	698	US8734809 SEQ ID NO: 183
AAV CBr-E1	699	US8734809 SEQ ID NO: 87
AAV CBr-E2	700	US8734809 SEQ ID NO: 88
AAV CBr-E3	701	US8734809 SEQ ID NO: 89
AAV CBr-E4	702	US8734809 SEQ ID NO: 90
AAV CBr-E5	703	US8734809 SEQ ID NO: 91
AAV CBr-e5	704	US8734809 SEQ ID NO: 92

[0110]

AAV CBr-E6	705	US8734809 SEQ ID NO: 93
AAV CBr-E7	706	US8734809 SEQ ID NO: 94
AAV CBr-E8	707	US8734809 SEQ ID NO: 95
AAV CLv-D1	708	US8734809 SEQ ID NO: 96
AAV CLv-D2	709	US8734809 SEQ ID NO: 97
AAV CLv-D3	710	US8734809 SEQ ID NO: 98
AAV CLv-D4	711	US8734809 SEQ ID NO: 99
AAV CLv-D5	712	US8734809 SEQ ID NO: 100
AAV CLv-D6	713	US8734809 SEQ ID NO: 101
AAV CLv-D7	714	US8734809 SEQ ID NO: 102
AAV CLv-D8	715	US8734809 SEQ ID NO: 103
AAV CLv-E1	716	US8734809 SEQ ID NO: 87
AAV CLv-R1	717	US8734809 SEQ ID NO: 104
AAV CLv-R2	718	US8734809 SEQ ID NO: 105
AAV CLv-R3	719	US8734809 SEQ ID NO: 106
AAV CLv-R4	720	US8734809 SEQ ID NO: 107
AAV CLv-R5	721	US8734809 SEQ ID NO: 108
AAV CLv-R6	722	US8734809 SEQ ID NO: 109
AAV CLv-R7	723	US8734809 SEQ ID NO: 110
AAV CLv-R8	724	US8734809 SEQ ID NO: 111
AAV CLv-R9	725	US8734809 SEQ ID NO: 112
AAV CLg-F1	726	US8734809 SEQ ID NO: 113
AAV CLg-F2	727	US8734809 SEQ ID NO: 114
AAV CLg-F3	728	US8734809 SEQ ID NO: 115
AAV CLg-F4	729	US8734809 SEQ ID NO: 116
AAV CLg-F5	730	US8734809 SEQ ID NO: 117
AAV CLg-F6	731	US8734809 SEQ ID NO: 117
AAV CLg-F7	732	US8734809 SEQ ID NO: 118
AAV CLg-F8	733	US8734809 SEQ ID NO: 117

[0111]

AAV CSp-1	734	US8734809 SEQ ID NO: 119
AAV CSp-10	735	US8734809 SEQ ID NO: 120
AAV CSp-11	736	US8734809 SEQ ID NO: 121
AAV CSp-2	737	US8734809 SEQ ID NO: 122
AAV CSp-3	738	US8734809 SEQ ID NO: 123
AAV CSp-4	739	US8734809 SEQ ID NO: 124
AAV CSp-6	740	US8734809 SEQ ID NO: 125
AAV CSp-7	741	US8734809 SEQ ID NO: 126
AAV CSp-8	742	US8734809 SEQ ID NO: 127
AAV CSp-9	743	US8734809 SEQ ID NO: 128
AAV CHt-2	744	US8734809 SEQ ID NO: 129
AAV CHt-3	745	US8734809 SEQ ID NO: 130
AAV CKd-1	746	US8734809 SEQ ID NO: 131
AAV CKd-10	747	US8734809 SEQ ID NO: 132
AAV CKd-2	748	US8734809 SEQ ID NO: 133
AAV CKd-3	749	US8734809 SEQ ID NO: 134
AAV CKd-4	750	US8734809 SEQ ID NO: 135
AAV CKd-6	751	US8734809 SEQ ID NO: 136
AAV CKd-7	752	US8734809 SEQ ID NO: 137
AAV CKd-8	753	US8734809 SEQ ID NO: 138
AAV CLv-1	754	US8734809 SEQ ID NO: 139
AAV CLv-12	755	US8734809 SEQ ID NO: 140
AAV CLv-13	756	US8734809 SEQ ID NO: 141
AAV CLv-2	757	US8734809 SEQ ID NO: 142
AAV CLv-3	758	US8734809 SEQ ID NO: 143
AAV CLv-4	759	US8734809 SEQ ID NO: 144
AAV CLv-6	760	US8734809 SEQ ID NO: 145
AAV CLv-8	761	US8734809 SEQ ID NO: 146
AAV CKd-B1	762	US8734809 SEQ ID NO: 147

[0112]

AAV CKd-B2	763	US8734809 SEQ ID NO: 148
AAV CKd-B3	764	US8734809 SEQ ID NO: 149
AAV CKd-B4	765	US8734809 SEQ ID NO: 150
AAV CKd-B5	766	US8734809 SEQ ID NO: 151
AAV CKd-B6	767	US8734809 SEQ ID NO: 152
AAV CKd-B7	768	US8734809 SEQ ID NO: 153
AAV CKd-B8	769	US8734809 SEQ ID NO: 154
AAV CKd-H1	770	US8734809 SEQ ID NO: 155
AAV CKd-H2	771	US8734809 SEQ ID NO: 156
AAV CKd-H3	772	US8734809 SEQ ID NO: 157
AAV CKd-H4	773	US8734809 SEQ ID NO: 158
AAV CKd-H5	774	US8734809 SEQ ID NO: 159
AAV CKd-H6	775	US8734809 SEQ ID NO: 151
AAV CHt-1	776	US8734809 SEQ ID NO: 160
AAV CHt-P2	777	WO2016065001 SEQ ID NO: 1
AAV CHt-P5	778	WO2016065001 SEQ ID NO: 2
AAV CHt-P9	779	WO2016065001 SEQ ID NO: 3
AAV CBr-7.1	780	WO2016065001 SEQ ID NO: 4
AAV CBr-7.2	781	WO2016065001 SEQ ID NO: 5
AAV CBr-7.3	782	WO2016065001 SEQ ID NO: 6
AAV CBr-7.4	783	WO2016065001 SEQ ID NO: 7
AAV CBr-7.5	784	WO2016065001 SEQ ID NO: 8
AAV CBr-7.7	785	WO2016065001 SEQ ID NO: 9
AAV CBr-7.8	786	WO2016065001 SEQ ID NO: 10
AAV CBr-7.10	787	WO2016065001 SEQ ID NO: 11
AAV CKd-N3	788	WO2016065001 SEQ ID NO: 12
AAV CKd-N4	789	WO2016065001 SEQ ID NO: 13
AAV CKd-N9	790	WO2016065001 SEQ ID NO: 14
AAV CLv-L4	791	WO2016065001 SEQ ID NO: 15

[0113]

AAV CLv-L5	792	WO2016065001 SEQ ID NO: 16
AAV CLv-L6	793	WO2016065001 SEQ ID NO: 17
AAV CLv-K1	794	WO2016065001 SEQ ID NO: 18
AAV CLv-K3	795	WO2016065001 SEQ ID NO: 19
AAV CLv-K6	796	WO2016065001 SEQ ID NO: 20
AAV CLv-M1	797	WO2016065001 SEQ ID NO: 21
AAV CLv-M11	798	WO2016065001 SEQ ID NO: 22
AAV CLv-M2	799	WO2016065001 SEQ ID NO: 23
AAV CLv-M5	800	WO2016065001 SEQ ID NO: 24
AAV CLv-M6	801	WO2016065001 SEQ ID NO: 25
AAV CLv-M7	802	WO2016065001 SEQ ID NO: 26
AAV CLv-M8	803	WO2016065001 SEQ ID NO: 27
AAV CLv-M9	804	WO2016065001 SEQ ID NO: 28
AAV CHt-P1	805	WO2016065001 SEQ ID NO: 29
AAV CHt-P6	806	WO2016065001 SEQ ID NO: 30
AAV CHt-P8	807	WO2016065001 SEQ ID NO: 31
AAV CHt-6.1	808	WO2016065001 SEQ ID NO: 32
AAV CHt-6.10	809	WO2016065001 SEQ ID NO: 33
AAV CHt-6.5	810	WO2016065001 SEQ ID NO: 34
AAV CHt-6.6	811	WO2016065001 SEQ ID NO: 35
AAV CHt-6.7	812	WO2016065001 SEQ ID NO: 36
AAV CHt-6.8	813	WO2016065001 SEQ ID NO: 37
AAV CSp-8.10	814	WO2016065001 SEQ ID NO: 38
AAV CSp-8.2	815	WO2016065001 SEQ ID NO: 39
AAV CSp-8.4	816	WO2016065001 SEQ ID NO: 40
AAV CSp-8.5	817	WO2016065001 SEQ ID NO: 41
AAV CSp-8.6	818	WO2016065001 SEQ ID NO: 42
AAV CSp-8.7	819	WO2016065001 SEQ ID NO: 43
AAV CSp-8.8	820	WO2016065001 SEQ ID NO: 44

[0114]

AAV CSp-8.9	821	WO2016065001 SEQ ID NO: 45
AAV CBr-B7.3	822	WO2016065001 SEQ ID NO: 46
AAV CBr-B7.4	823	WO2016065001 SEQ ID NO: 47
AAV3B	824	WO2016065001 SEQ ID NO: 48
AAV4	825	WO2016065001 SEQ ID NO: 49
AAV5	826	WO2016065001 SEQ ID NO: 50
AAV CHt-P2	827	WO2016065001 SEQ ID NO: 51
AAV CHt-P5	828	WO2016065001 SEQ ID NO: 52
AAV CHt-P9	829	WO2016065001 SEQ ID NO: 53
AAV CBr-7.1	830	WO2016065001 SEQ ID NO: 54
AAV CBr-7.2	831	WO2016065001 SEQ ID NO: 55
AAV CBr-7.3	832	WO2016065001 SEQ ID NO: 56
AAV CBr-7.4	833	WO2016065001 SEQ ID NO: 57
AAV CBr-7.5	834	WO2016065001 SEQ ID NO: 58
AAV CBr-7.7	835	WO2016065001 SEQ ID NO: 59
AAV CBr-7.8	836	WO2016065001 SEQ ID NO: 60
AAV CBr-7.10	837	WO2016065001 SEQ ID NO: 61
AAV CKd-N3	838	WO2016065001 SEQ ID NO: 62
AAV CKd-N4	839	WO2016065001 SEQ ID NO: 63
AAV CKd-N9	840	WO2016065001 SEQ ID NO: 64
AAV CLv-L4	841	WO2016065001 SEQ ID NO: 65
AAV CLv-L5	842	WO2016065001 SEQ ID NO: 66
AAV CLv-L6	843	WO2016065001 SEQ ID NO: 67
AAV CLv-K1	844	WO2016065001 SEQ ID NO: 68
AAV CLv-K3	845	WO2016065001 SEQ ID NO: 69
AAV CLv-K6	846	WO2016065001 SEQ ID NO: 70
AAV CLv-M1	847	WO2016065001 SEQ ID NO: 71
AAV CLv-M11	848	WO2016065001 SEQ ID NO: 72
AAV CLv-M2	849	WO2016065001 SEQ ID NO: 73

[0115]

AAV CLv-M5	850	WO2016065001 SEQ ID NO: 74
AAV CLv-M6	851	WO2016065001 SEQ ID NO: 75
AAV CLv-M7	852	WO2016065001 SEQ ID NO: 76
AAV CLv-M8	853	WO2016065001 SEQ ID NO: 77
AAV CLv-M9	854	WO2016065001 SEQ ID NO: 78
AAV CHt-P1	855	WO2016065001 SEQ ID NO: 79
AAV CHt-P6	856	WO2016065001 SEQ ID NO: 80
AAV CHt-P8	857	WO2016065001 SEQ ID NO: 81
AAV CHt-6.1	858	WO2016065001 SEQ ID NO: 82
AAV CHt-6.10	859	WO2016065001 SEQ ID NO: 83
AAV CHt-6.5	860	WO2016065001 SEQ ID NO: 84
AAV CHt-6.6	861	WO2016065001 SEQ ID NO: 85
AAV CHt-6.7	862	WO2016065001 SEQ ID NO: 86
AAV CHt-6.8	863	WO2016065001 SEQ ID NO: 87
AAV CSp-8.10	864	WO2016065001 SEQ ID NO: 88
AAV CSp-8.2	865	WO2016065001 SEQ ID NO: 89
AAV CSp-8.4	866	WO2016065001 SEQ ID NO: 90
AAV CSp-8.5	867	WO2016065001 SEQ ID NO: 91
AAV CSp-8.6	868	WO2016065001 SEQ ID NO: 92
AAV CSp-8.7	869	WO2016065001 SEQ ID NO: 93
AAV CSp-8.8	870	WO2016065001 SEQ ID NO: 94
AAV CSp-8.9	871	WO2016065001 SEQ ID NO: 95
AAV CBr-B7.3	872	WO2016065001 SEQ ID NO: 96
AAV CBr-B7.4	873	WO2016065001 SEQ ID NO: 97
AAV3B	874	WO2016065001 SEQ ID NO: 98
AAV4	875	WO2016065001 SEQ ID NO: 99
AAV5	876	WO2016065001 SEQ ID NO: 100
GPV	877	US9624274B2 SEQ ID NO: 192
B19	878	US9624274B2 SEQ ID NO: 193

[0116]

MVM	879	US9624274B2 SEQ ID NO: 194
FPV	880	US9624274B2 SEQ ID NO: 195
CPV	881	US9624274B2 SEQ ID NO: 196
AAV6	882	US9546112B2 SEQ ID NO: 5
AAV6	883	US9457103B2 SEQ ID NO: 1
AAV2	884	US9457103B2 SEQ ID NO: 2
ShH10	885	US9457103B2 SEQ ID NO: 3
ShH13	886	US9457103B2 SEQ ID NO: 4
ShH10	887	US9457103B2 SEQ ID NO: 5
ShH10	888	US9457103B2 SEQ ID NO: 6
ShH10	889	US9457103B2 SEQ ID NO: 7
ShH10	890	US9457103B2 SEQ ID NO: 8
ShH10	891	US9457103B2 SEQ ID NO: 9
rh74	892	US9434928B2 SEQ ID NO: 1 、 US2015023924A1 SEQ ID NO: 2
rh74	893	US9434928B2 SEQ ID NO: 2 、 US2015023924A1 SEQ ID NO: 1
AAV8	894	US9434928B2 SEQ ID NO: 4
rh74	895	US9434928B2 SEQ ID NO: 5
rh74 (RHM4-1)	896	US2015023924A1 SEQ ID NO: 5 、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 4
rh74 (RHM15-1)	897	US2015023924A1 SEQ ID NO: 6 、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 5
rh74 (RHM15-2)	898	US2015023924A1 SEQ ID NO: 7 、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 6
rh74 (RHM15-3/RHM15-5)	899	US2015023924A1 SEQ ID NO: 8 、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 7
rh74 (RHM15-4)	900	US2015023924A1 SEQ ID NO: 9 、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 8

[0117]

rh74 (RHM15-6)	901	US2015023924A1 SEQ ID NO: 10 、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 9
rh74 (RHM4-1)	902	US2015023924A1 SEQ ID NO: 11
rh74 (RHM15-1)	903	US2015023924A1 SEQ ID NO: 12
rh74 (RHM15-2)	904	US2015023924A1 SEQ ID NO: 13
rh74 (RHM15-3/RHM15-5)	905	US2015023924A1 SEQ ID NO: 14
rh74 (RHM15-4)	906	US2015023924A1 SEQ ID NO: 15
rh74 (RHM15-6)	907	US2015023924A1 SEQ ID NO: 16
AAV2 (包含肺特异性多肽)	908	US20160175389A1 SEQ ID NO: 9
AAV2 (包含肺特异性多肽)	909	US20160175389A1 SEQ ID NO: 10
Anc80	910	US20170051257A1 SEQ ID NO: 1
Anc80	911	US20170051257A1 SEQ ID NO: 2
Anc81	912	US20170051257A1 SEQ ID NO: 3
Anc80	913	US20170051257A1 SEQ ID NO: 4
Anc82	914	US20170051257A1 SEQ ID NO: 5
Anc82	915	US20170051257A1 SEQ ID NO: 6
Anc83	916	US20170051257A1 SEQ ID NO: 7
Anc83	917	US20170051257A1 SEQ ID NO: 8
Anc84	918	US20170051257A1 SEQ ID NO: 9
Anc84	919	US20170051257A1 SEQ ID NO: 10
Anc94	920	US20170051257A1 SEQ ID NO: 11
Anc94	921	US20170051257A1 SEQ ID NO: 12
Anc113	922	US20170051257A1 SEQ ID NO: 13
Anc113	923	US20170051257A1 SEQ ID NO: 14
Anc126	924	US20170051257A1 SEQ ID NO: 15
Anc126	925	US20170051257A1 SEQ ID NO: 16

[0118]

Anc127	926	US20170051257A1 SEQ ID NO: 17
Anc127	927	US20170051257A1 SEQ ID NO: 18
Anc80L27	928	US20170051257A1 SEQ ID NO: 19
Anc80L59	929	US20170051257A1 SEQ ID NO: 20
Anc80L60	930	US20170051257A1 SEQ ID NO: 21
Anc80L62	931	US20170051257A1 SEQ ID NO: 22
Anc80L65	932	US20170051257A1 SEQ ID NO: 23
Anc80L33	933	US20170051257A1 SEQ ID NO: 24
Anc80L36	934	US20170051257A1 SEQ ID NO: 25
Anc80L44	935	US20170051257A1 SEQ ID NO: 26
Anc80L1	936	US20170051257A1 SEQ ID NO: 35
Anc80L1	937	US20170051257A1 SEQ ID NO: 36
AAV-X1	938	US8283151B2 SEQ ID NO: 11
AAV-X1b	939	US8283151B2 SEQ ID NO: 12
AAV-X5	940	US8283151B2 SEQ ID NO: 13
AAV-X19	941	US8283151B2 SEQ ID NO: 14
AAV-X21	942	US8283151B2 SEQ ID NO: 15
AAV-X22	943	US8283151B2 SEQ ID NO: 16
AAV-X23	944	US8283151B2 SEQ ID NO: 17
AAV-X24	945	US8283151B2 SEQ ID NO: 18
AAV-X25	946	US8283151B2 SEQ ID NO: 19
AAV-X26	947	US8283151B2 SEQ ID NO: 20
AAV-X1	948	US8283151B2 SEQ ID NO: 21
AAV-X1b	949	US8283151B2 SEQ ID NO: 22
AAV-X5	950	US8283151B2 SEQ ID NO: 23
AAV-X19	951	US8283151B2 SEQ ID NO: 24
AAV-X21	952	US8283151B2 SEQ ID NO: 25
AAV-X22	953	US8283151B2 SEQ ID NO: 26
AAV-X23	954	US8283151B2 SEQ ID NO: 27

[0119]

AAV-X24	955	US8283151B2 SEQ ID NO: 28
AAV-X25	956	US8283151B2 SEQ ID NO: 29
AAV-X26	957	US8283151B2 SEQ ID NO: 30
AAVrh8	958	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 8
AAVrh8VP2FC5	959	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 9
AAVrh8VP2FC44	960	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 10
AAVrh8VP2ApoB100	961	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 11
AAVrh8VP2RVG	962	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 12
AAVrh8VP2Angiopep-2 VP2	963	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 13
AAV9.47VP1.3	964	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 14
AAV9.47VP2ICAMg3	965	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 15
AAV9.47VP2RVG	966	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 16
AAV9.47VP2Angiopep-2	967	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 17
AAV9.47VP2A-串 (String)	968	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 18
AAVrh8VP2FC5 VP2	969	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 19
AAVrh8VP2FC44 VP2	970	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 20
AAVrh8VP2ApoB100 VP2	971	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 21
AAVrh8VP2RVG VP2	972	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 22
AAVrh8VP2Angiopep-2 VP2	973	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 23
AAV9.47VP2ICAMg3 VP2	974	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 24
AAV9.47VP2RVG VP2	975	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 25
AAV9.47VP2Angiopep-2 VP2	976	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 26
AAV9.47VP2A-串 VP2	977	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 27

[0120]

rAAV-B1	978	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 1
rAAV-B2	979	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 2
rAAV-B3	980	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 3
rAAV-B4	981	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 4
rAAV-B1	982	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 5
rAAV-B2	983	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 6
rAAV-B3	984	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 7
rAAV-B4	985	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 8
rAAV-L1	986	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 9
rAAV-L2	987	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 10
rAAV-L3	988	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 11
rAAV-L4	989	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 12
rAAV-L1	990	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 13
rAAV-L2	991	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 14
rAAV-L3	992	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 15
rAAV-L4	993	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 16
AAV9	994	WO2016073739A1 SEQ ID NO: 3
rAAV	995	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 1
rAAV	996	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 2
rAAV	997	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 3
rAAV	998	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 4
rAAV	999	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 5
rAAV	1000	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 6
rAAV	1001	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 7
rAAV	1002	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 8
rAAV	1003	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 9
rAAV	1004	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 10
rAAV	1005	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 11
rAAV	1006	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 12

[0121]

rAAV	1007	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 13
rAAV	1008	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 14
rAAV	1009	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 15
rAAV	1010	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 16
rAAV	1011	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 17
rAAV	1012	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 18
rAAV	1013	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 19
rAAV	1014	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 20
rAAV	1015	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 21
rAAV	1016	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 22
rAAV	1017	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 23
rAAV	1018	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 24
rAAV	1019	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 25
rAAV	1020	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 26
rAAV	1021	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 27
rAAV	1022	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 28
rAAV	1023	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 29
rAAV	1024	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 30
rAAV	1025	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 31
rAAV	1026	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 32
rAAV	1027	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 33
rAAV	1028	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 34
rAAV	1029	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 35
rAAV	1030	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 36
rAAV	1031	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 37
rAAV	1032	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 38
rAAV	1033	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 39
rAAV	1034	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 40
rAAV	1035	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 41

[0122]

rAAV	1036	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 42
rAAV	1037	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 43
rAAV	1038	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 44
rAAV	1039	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 45
rAAV	1040	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 46
rAAV	1041	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 47
rAAV	1042	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 48
rAAV	1043	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 49
rAAV	1044	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 50
rAAV	1045	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 51
rAAV	1046	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 52
rAAV	1047	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 53
rAAV	1048	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 54
rAAV	1049	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 55
rAAV	1050	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 56
rAAV	1051	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 57
rAAV	1052	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 58
rAAV	1053	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 59
rAAV	1054	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 60
rAAV	1055	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 61
rAAV	1056	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 62
rAAV	1057	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 63
rAAV	1058	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 64
rAAV	1059	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 65
rAAV	1060	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 66
rAAV	1061	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 67
rAAV	1062	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 68
rAAV	1063	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 69
rAAV	1064	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 70

[0123]

rAAV	1065	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 71
rAAV	1066	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 72
rAAV	1067	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 73
rAAV	1068	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 74
rAAV	1069	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 75
rAAV	1070	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 76
rAAV	1071	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 77
rAAV	1072	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 78
rAAV	1073	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 79
rAAV	1074	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 80
rAAV	1075	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 81
rAAV	1076	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 82
rAAV	1077	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 83
rAAV	1078	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 84
rAAV	1079	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 85
rAAV	1080	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 86
rAAV	1081	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 87
rAAV	1082	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 88
rAAV	1083	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 89
rAAV	1084	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 90
rAAV	1085	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 91
rAAV	1086	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 92
rAAV	1087	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 93
rAAV	1088	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 94
rAAV	1089	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 95
rAAV	1090	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 96
rAAV	1091	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 97
rAAV	1092	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 98
rAAV	1093	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 99

[0124]

rAAV	1094	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 100
rAAV	1095	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 101
rAAV	1096	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 102
rAAV	1097	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 103
rAAV	1098	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 104
rAAV	1099	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 105
rAAV	1100	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 106
rAAV	1101	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 107
rAAV	1102	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 108
rAAV	1103	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 109
rAAV	1104	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 110
rAAV	1105	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 111
rAAV	1106	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 112
rAAV	1107	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 113
rAAV	1108	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 114
rAAV	1109	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 115
rAAV	1110	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 116
rAAV	1111	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 117
rAAV	1112	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 118
rAAV	1113	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 119
rAAV	1114	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 120
rAAV	1115	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 121
rAAV	1116	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 122
rAAV	1117	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 123
rAAV	1118	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 124
rAAV	1119	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 125
rAAV	1120	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 126
rAAV	1121	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 127
rAAV	1122	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 128

[0125]

AAV8 E532K	1123	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 133
AAV8 E532K	1124	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 134
rAAV4	1125	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 2
rAAV4	1126	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 3
rAAV4	1127	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 4
rAAV4	1128	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 5
rAAV4	1129	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 6
rAAV4	1130	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 7
rAAV4	1131	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 8
rAAV4	1132	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 9
rAAV4	1133	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 10
rAAV4	1134	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 11
rAAV4	1135	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 12
rAAV4	1136	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 13
rAAV4	1137	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 14
rAAV4	1138	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 15
rAAV4	1139	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 16
rAAV4	1140	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 17
rAAV4	1141	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 18
rAAV4	1142	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 19
rAAV4	1143	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 20
rAAV4	1144	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 21
AAV11	1145	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 22
AAV12	1146	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 23
rh32	1147	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 25
rh33	1148	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 26
rh34	1149	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 27
rAAV4	1150	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 28
rAAV4	1151	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 29

[0126]

rAAV4	1152	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 30
rAAV4	1153	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 31
rAAV4	1154	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 32
rAAV4	1155	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 33
AAV2/8	1156	WO2016131981A1 SEQ ID NO: 47
AAV2/8	1157	WO2016131981A1 SEQ ID NO: 48
祖先 AAV	1158	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 7
祖先 AAV 变体 C4	1159	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 13
祖先 AAV 变体 C7	1160	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 14
祖先 AAV 变体 G4	1161	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 15
祖先 AAV 变体、C4、C7 和 G4 的共有氨基酸序列	1162	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 16
祖先 AAV 变体、C4 和 C7 的共有氨基酸序列	1163	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 17
AAV8 (具有 AAV2 磷脂 酶结构域)	1164	WO2016150403A1 SEQ ID NO: 13
AAV VR-942n	1165	US20160289275A1 SEQ ID NO: 10
AAV5-A (M569V)	1166	US20160289275A1 SEQ ID NO: 13
AAV5-A (M569V)	1167	US20160289275A1 SEQ ID NO: 14
AAV5-A (Y585V)	1168	US20160289275A1 SEQ ID NO: 16
AAV5-A (Y585V)	1169	US20160289275A1 SEQ ID NO: 17
AAV5-A (L587T)	1170	US20160289275A1 SEQ ID NO: 19
AAV5-A (L587T)	1171	US20160289275A1 SEQ ID NO: 20
AAV5-A (Y585V/L587T)	1172	US20160289275A1 SEQ ID NO: 22
AAV5-A (Y585V/L587T)	1173	US20160289275A1 SEQ ID NO: 23
AAV5-B (D652A)	1174	US20160289275A1 SEQ ID NO: 25
AAV5-B (D652A)	1175	US20160289275A1 SEQ ID NO: 26

[0127]

AAV5-B (T362M)	1176	US20160289275A1 SEQ ID NO: 28
AAV5-B (T362M)	1177	US20160289275A1 SEQ ID NO: 29
AAV5-B (Q359D)	1178	US20160289275A1 SEQ ID NO: 31
AAV5-B (Q359D)	1179	US20160289275A1 SEQ ID NO: 32
AAV5-B (E350Q)	1180	US20160289275A1 SEQ ID NO: 34
AAV5-B (E350Q)	1181	US20160289275A1 SEQ ID NO: 35
AAV5-B (P533S)	1182	US20160289275A1 SEQ ID NO: 37
AAV5-B (P533S)	1183	US20160289275A1 SEQ ID NO: 38
AAV5-B (P533G)	1184	US20160289275A1 SEQ ID NO: 40
AAV5-B (P533G)	1185	US20160289275A1 SEQ ID NO: 41
AAV5-环 VII 中的突变	1186	US20160289275A1 SEQ ID NO: 43
AAV5-环 VII 中的突变	1187	US20160289275A1 SEQ ID NO: 44
AAV8	1188	US20160289275A1 SEQ ID NO: 47
Mut A (LK03/AAV8)	1189	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 1
Mut B (LK03/AAV5)	1190	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 2
Mut C (AAV8/AAV3B)	1191	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 3
Mut D (AAV5/AAV3B)	1192	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 4
Mut E (AAV8/AAV3B)	1193	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 5
Mut F (AAV3B/AAV8)	1194	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 6
AAV44.9	1195	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 4
AAV44.9	1196	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 5
AAVrh8	1197	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 6
AAV44.9 (S470N)	1198	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 9
rh74 VP1	1199	US20160375110A1 SEQ ID NO: 1
AAV-LK03 (L125I)	1200	WO2017015102A1 SEQ ID NO: 5
AAV3B (S663V+T492V)	1201	WO2017015102A1 SEQ ID NO: 6
Anc80	1202	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 1
Anc80	1203	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 2
Anc81	1204	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 3

[0128]

Anc81	1205	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 4
Anc82	1206	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 5
Anc82	1207	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 6
Anc83	1208	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 7
Anc83	1209	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 8
Anc84	1210	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 9
Anc84	1211	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 10
Anc94	1212	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 11
Anc94	1213	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 12
Anc113	1214	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 13
Anc113	1215	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 14
Anc126	1216	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 15
Anc126	1217	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 16
Anc127	1218	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 17
Anc127	1219	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 18
Anc80L27	1220	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 19
Anc80L59	1221	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 20
Anc80L60	1222	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 21
Anc80L62	1223	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 22
Anc80L65	1224	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 23
Anc80L33	1225	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 24
Anc80L36	1226	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 25
Anc80L44	1227	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 26
Anc80L1	1228	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 35
Anc80L1	1229	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 36
AAVrh10	1230	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 41
Anc110	1231	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 42
Anc110	1232	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 43
AAVrh32.33	1233	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 45

[0129]

AAVrh74	1234	WO2017049031A1 SEQ ID NO: 1
AAV2	1235	WO2017053629A2 SEQ ID NO: 49
AAV2	1236	WO2017053629A2 SEQ ID NO: 50
AAV2	1237	WO2017053629A2 SEQ ID NO: 82
细小病毒样病毒 (Parvo-like virus)	1238	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 1
细小病毒样病毒	1239	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 2
细小病毒样病毒	1240	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 3
细小病毒样病毒	1241	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 4
细小病毒样病毒	1242	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 5
细小病毒样病毒	1243	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 6
AAVrh.10	1244	WO2017070516A1 SEQ ID NO: 7
AAVrh.10	1245	WO2017070516A1 SEQ ID NO: 14
AAV2tYF	1246	WO2017070491A1 SEQ ID NO: 1
AAV-SPK	1247	WO2017075619A1 SEQ ID NO:28
AAV2.5	1248	US20170128528A1 SEQ ID NO: 13
AAV1.1	1249	US20170128528A1 SEQ ID NO: 15
AAV6.1	1250	US20170128528A1 SEQ ID NO: 17
AAV6.3.1	1251	US20170128528A1 SEQ ID NO: 18
AAV2i8	1252	US20170128528A1 SEQ ID NO: 28
AAV2i8	1253	US20170128528A1 SEQ ID NO: 29
ttAAV	1254	US20170128528A1 SEQ ID NO: 30
ttAAV-S312N	1255	US20170128528A1 SEQ ID NO: 32
ttAAV-S312N	1256	US20170128528A1 SEQ ID NO: 33
AAV6 (Y705、Y731 和 T492)	1257	WO2016134337A1 SEQ ID NO: 24
AAV2	1258	WO2016134375A1 SEQ ID NO: 9
AAV2	1259	WO2016134375A1 SEQ ID NO: 10

[0130] 在一个实施方案中, AAV血清型可以是或可以具有国际专利公开W02015038958中所述的序列, 其内容通过引用整体并入本文, 例如但不限于AAV9 (W02015038958的SEQ ID NO:2和11或本文中分别为SEQ ID NO:135和136)、PHP.B (W02015038958的SEQ ID NO:8和9, 本文的SEQ ID NO:3和4)、G2B-13 (W02015038958的SEQ ID NO:12, 本文的SEQ ID NO:5)、

G2B-26 (W02015038958的SEQ ID NO:13,本文的SEQ ID NO:3)、TH1.1-32 (W02015038958的SEQ ID NO:14,本文的SEQ ID NO:6)、TH1.1-35 (W02015038958的SEQ ID NO:15,本文的SEQ ID NO:7),或其变体。此外,W02015038958中描述的任何靶向肽或氨基酸插入物均可插入到任何亲本AAV血清型,例如但不限于AAV9 (DNA序列为SEQ ID NO:135,氨基酸序列为SEQ ID NO:136)。在一个实施方案中,将氨基酸插入物插入到亲本AAV (例如,AAV9) 的氨基酸586-592之间。在另一个实施方案中,氨基酸插入物插入到亲本AAV序列的氨基酸588-589之间。氨基酸插入物可以是但不限于以下任何氨基酸序列TLAVPFK (W02015038958的SEQ ID NO:1;本文的SEQ ID NO:1260)、KFPVALT (W02015038958的SEQ ID NO:3;本文的SEQ ID NO:1261)、LAVPFK (W02015038958的SEQ ID NO:31;本文的SEQ ID NO:1262)、AVPFK (W02015038958的SEQ ID NO:32;本文的SEQ ID NO:1263)、VPFK (W02015038958的SEQ ID NO:33;本文的SEQ ID NO:1264)、TLAVPF (W02015038958的SEQ ID NO:34;本文的SEQ ID NO:1265)、TLAVP (W02015038958的SEQ ID NO:35;本文的SEQ ID NO:1266)、TLAV (W02015038958的SEQ ID NO:36;本文的SEQ ID NO:1267)、SVSKPFL (W02015038958的SEQ ID NO:28;本文的SEQ ID NO:1268)、FTLTTPK (W02015038958的SEQ ID NO:29;本文的SEQ ID NO:1269)、MNATKNV (W02015038958的SEQ ID NO:30;本文的SEQ ID NO:1270)、QSSQTPR (W02015038958的SEQ ID NO:54;本文的SEQ ID NO:1271)、ILGTGTS (W02015038958的SEQ ID NO:55;本文的SEQ ID NO:1272)、TRTNPEA (W02015038958的SEQ ID NO:56;本文的SEQ ID NO:1273)、NGGTSSS (W02015038958的SEQ ID NO:58;本文的SEQ ID NO:1274) 或YTLSQGW (W02015038958的SEQ ID NO:60;本文的SEQ ID NO:1275)。可以编码氨基酸插入物的核苷酸序列的非限制性实例包括以下:AAGTTTCCTGTGGCGTTGACT (对于W02015038958的SEQ ID NO:3;本文的SEQ ID NO:1276)、ACTTTGGCGGTGCCTTTTAAG (W02015038958的SEQ ID NO:24和49;本文的SEQ ID NO:1277)、AGTGTGAGTAAGCCTTTTTTG (W02015038958的SEQ ID NO:25;本文的SEQ ID NO:1278)、TTTACGTTGACGACGCCTAAG (W02015038958的SEQ ID NO:26;本文的SEQ ID NO:1279)、ATGAATGCTACGAAGAATGTG (W02015038958的SEQ ID NO:27;本文的SEQ ID NO:1280)、CAGTCGTCGCAGACGCCTAGG (W02015038958的SEQ ID NO:48;本文的SEQ ID NO:1281)、ATTCTGGGGACTGGTACTTCG (W02015038958的SEQ ID NO:50和52;本文的SEQ ID NO:1282)、ACGCGGACTAATCCTGAGGCT (W02015038958的SEQ ID NO:51;本文的SEQ ID NO:1283)、AATGGGGGACTAGTAGTTCT (W02015038958的SEQ ID NO:53;本文的SEQ ID NO:1284) 或TATACTTTGTGCGAGGGTTGG (W02015038958的SEQ ID NO:59;本文的SEQ ID NO:1285)。

[0131] 在一个实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有国际专利公开W02017100671中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV9 (W02017100671的SEQ ID NO:45,本文的SEQ ID NO:9)、PHP.N (W02017100671的SEQ ID NO:46,本文的SEQ ID NO:2)、PHP.S (W02017100671的SEQ ID NO:47,本文的SEQ ID NO:8),或其变体。此外,在W02017100671中描述的任何靶向肽或氨基酸插入物可以插入到任何亲本AAV血清型,例如但不限于AAV9 (SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:131)。在一个实施方案中,将氨基酸插入物插入亲本AAV (例如,AAV9) 的氨基酸586-592之间。在另一个实施方案中,氨基酸插入物插入亲本AAV序列的氨基酸588-589之间。氨基酸插入物可以是但不限于以下任何氨基酸序列AQTLAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:1;本文的SEQ ID NO:1286)、AQSVSKPFLAQ (W02017100671的SEQ ID NO:2;本文的SEQ ID NO:1287)、AQFTLTTPKAQ (W02017100671的序

列表中的SEQ ID NO:3;本文的SEQ ID NO:1288)、DGT LAVPFKAQ (W02017100671的序列列表中的SEQ ID NO:4;本文的SEQ ID NO:1289)、EST LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:5;本文的SEQ ID NO:1290)、GGT LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:6;本文的SEQ ID NO:1291)、AQT LATPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:7和33;本文的SEQ ID NO:1292)、ATT LATPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:8;本文的SEQ ID NO:1293)、DGT LATPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:9;本文的SEQ ID NO:1294)、GGT LATPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:10;本文的SEQ ID NO:1295)、SGS LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:11;本文的SEQ ID NO:1296)、AQT LAQPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:12;本文的SEQ ID NO:1297)、AQT LQQPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:13;本文的SEQ ID NO:1298)、AQT LSNPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:14;本文的SEQ ID NO:1299)、AQT LAVPFSNP (W02017100671的SEQ ID NO:15;本文的SEQ ID NO:1300)、QGT LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:16;本文的SEQ ID NO:1301)、NQT LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:17;本文的SEQ ID NO:1302)、EGS LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:18;本文的SEQ ID NO:1303)、SGN LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:19;本文的SEQ ID NO:1304)、EGT LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:20;本文的SEQ ID NO:1305)、DST LAVPFKAQ (W02017100671的表1中的SEQ ID NO:21;本文的SEQ ID NO:1306)、AVT LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:22;本文的SEQ ID NO:1307)、AQT LSTPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:23;本文的SEQ ID NO:1308)、AQT LPQPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:24和32;本文的SEQ ID NO:1309)、AQT LSQPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:25;本文的SEQ ID NO:1310)、AQT LQLPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:26;本文的SEQ ID NO:1311)、AQT LTMPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:27和34和W02017100671的序列列表中的SEQ ID NO:35;本文的SEQ ID NO:1312)、AQT LTTPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:28;本文的SEQ ID NO:1313)、AQY TLSQGWAQ (W02017100671的SEQ ID NO:29;本文的SEQ ID NO:1314)、AQMNATKNVAQ (W02017100671的SEQ ID NO:30;本文的SEQ ID NO:1315)、AQVSGGHSAQ (W02017100671的SEQ ID NO:31;本文的SEQ ID NO:1316)、AQT LTAPFKAQ (W02017100671的表1中的SEQ ID NO:35;本文的SEQ ID NO:1317)、AQT LSKPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:36;本文的SEQ ID NO:1318)、QAVRTSL (W02017100671的SEQ ID NO:37;本文的SEQ ID NO:1319)、YTLSQGW (W02017100671的SEQ ID NO:38;本文的SEQ ID NO:1275)、LAKERLS (W02017100671的SEQ ID NO:39;本文的SEQ ID NO:1320)、T LAVPFK (W02017100671的序列列表中的SEQ ID NO:40;本文的SEQ ID NO:1260)、SVSKPFL (W02017100671的SEQ ID NO:41;本文的SEQ ID NO:1268)、FTLTTPK (W02017100671的SEQ ID NO:42;本文的SEQ ID NO:1269)、MNSTKNV (W02017100671的SEQ ID NO:43;本文的SEQ ID NO:1321)、VSGGHHS (W02017100671的SEQ ID NO:44;本文的SEQ ID NO:1322)、SAQT LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:48;本文的SEQ ID NO:1323)、SXXXLAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:49,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:1324)、SAQXXXVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:50,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:1325)、SAQTLXXXFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:51,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:1326)、SAQTLAVXXXAQAQ (W02017100671的SEQ ID NO:52,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:1327)、SAQTLAVPFXXXAQAQ (W02017100671的SEQ ID NO:53,其中X可以是任何氨基酸;本文

的SEQ ID NO:1328)、TNHQAQ(W02017100671的SEQ ID NO:65;本文的SEQ ID NO:1329)、AQAQTGW(W02017100671的SEQ ID NO:66;本文的SEQ ID NO:1330)、DGTLATPFK(W02017100671的SEQ ID NO:67;本文的SEQ ID NO:1331)、DGTLATPFKXX(W02017100671的SEQ ID NO:68,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:1332)、LAVPFKAQ(W02017100671的SEQ ID NO:80;本文的SEQ ID NO:1333)、VPFKAQ(W02017100671的SEQ ID NO:81;本文的SEQ ID NO:1334)、FKAQ(W02017100671的SEQ ID NO:82;本文的SEQ ID NO:1335)、AQTLAV(W02017100671的SEQ ID NO:83;本文的SEQ ID NO:1336)、AQTLAVPF(W02017100671的SEQ ID NO:84;本文的SEQ ID NO:1337)、QAVR(W02017100671的SEQ ID NO:85;本文的SEQ ID NO:1338)、AVRT(W02017100671的SEQ ID NO:86;本文的SEQ ID NO:1339)、VRTS(W02017100671的SEQ ID NO:87;本文的SEQ ID NO:1340)、RTSL(W02017100671的SEQ ID NO:88;本文的SEQ ID NO:1341)、QAVRT(W02017100671的SEQ ID NO:89;本文的SEQ ID NO:1342)、AVRTS(W02017100671的SEQ ID NO:90;本文的SEQ ID NO:1343)、VRTSL(W02017100671的SEQ ID NO:91;本文的SEQ ID NO:1344)、QAVRTS(W02017100671的SEQ ID NO:92;本文的SEQ ID NO:1345)或AVRTSL(W02017100671的SEQ ID NO:93;本文的SEQ ID NO:1346)。

[0132] 可以编码氨基酸插入物的核苷酸序列的非限制性实例包括以下：GATGGGACTTTGGCGGTGCCTTTTAAGGCACAG (WO2017100671的SEQ ID NO:54;本文的SEQ ID NO:1347)、GATGGGACGTTGGCGGTGCCTTTTAAGGCACAG (WO2017100671的SEQ ID NO:55;本文的SEQ ID NO:1348)、CAGGCGGTTAGGACGTCTTTG (WO2017100671的SEQ ID NO:56;本文的SEQ ID NO:1349)、CAGGTCTTCACGGACTCAGACTATCAG (WO2017100671的SEQ ID NO:57和78;本文的SEQ ID NO:1350)、CAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCG (WO2017100671的SEQ ID NO:58;本文的SEQ ID NO:1351)、ACTCATCGACCAATACTTGACTATCTCTCTAGAAC (WO2017100671的SEQ ID NO:59;本文的SEQ ID NO:1352)、GGAAGTATTCTTGTTTGAACCCA (WO2017100671的SEQ ID NO:60;本文的SEQ ID NO:1353)、GGTCGCGTTCTTGTTTGTGGAT (WO2017100671的SEQ ID NO:61;本文的SEQ ID NO:1354)、CGACCTTGAAGCGCATGAACTCCT (WO2017100671的SEQ ID NO:62;本文的SEQ ID NO:1355)、GTATTCCTTGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCCTGTGCMNNMNMN NMNNMNMNMNNMNTTGGGCACTCTGGTGGTTTGTG (WO2017100671的SEQ ID NO:63,其中N可以是A、C、T或G;本文的SEQ ID NO:1356)、GTATTCCTTGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCMNNMNMNMNNAAGGACCGCCAAAGTTTGGGCACT (WO2017100671的SEQ ID NO:69,其中N可以是A、C、T或G;本文的SEQ ID NO:1357)、GTATTCCTTGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCCTGTGCMNNMNMN MNACC GCCAAAGTTTGGGCACT (WO2017100671的SEQ ID NO:70,其中N可以是A、C、T或G;本文的SEQ ID NO:1358)、GTATTCCTTGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCCTGTGCCTTAAAMNN MNNMNCAAAGTTTGGGCACTCTGGTGG (WO2017100671的SEQ ID NO:71,其中N可以是A、C、T或G;本文的SEQ ID NO:1359)、GTATTCCTTGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCCTGTGCCTTAAAGG CACM NNMNMNNTTGGGCACTCTGGTGGTTTGTG (WO2017100671的SEQ ID NO:72,其中N可以是A、C、T或G;本文的SEQ ID NO:1360)、ACTTTGGCGGTGCCTTTTAAG (WO2017100671的SEQ ID NO:74;本文的SEQ ID NO:1277)、AGTGTGAGTAAGCCTTTTTT (WO2017100671的SEQ ID NO:75;本文的SEQ ID NO:1278)、TTTACGTTGACGACGCTAAG (WO2017100671的SEQ ID NO:76;本文的SEQ ID NO:1279)、TATACTTTGTGCGAGGGTTGG (WO2017100671的SEQ ID NO:77;本文的SEQ ID NO:1285)

或CTTGCGAAGGAGCGGCTTTTCG (W02017100671的SEQ ID NO:79;本文的SEQ ID NO:1361)。

[0133] 在一个实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有美国专利号US9624274中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV1 (US9624274的SEQ ID NO:181)、AAV6 (US9624274的SEQ ID NO:182)、AAV2 (US9624274的SEQ ID NO:183)、AAV3b (US9624274的SEQ ID NO:184)、AAV7 (US9624274的SEQ ID NO:185)、AAV8 (US9624274的SEQ ID NO:186)、AAV10 (US9624274的SEQ ID NO:187)、AAV4 (US9624274的SEQ ID NO:188)、AAV11 (US9624274的SEQ ID NO:189)、bAAV (US9624274的SEQ ID NO:190)、AAV5 (US9624274的SEQ ID NO:191)、GPV (US9624274的SEQ ID NO:192;本文的SEQ ID NO:992)、B19 (US9624274的SEQ ID NO:193;本文的SEQ ID NO:993)、MVM (US9624274的SEQ ID NO:194;本文的SEQ ID NO:994)、FPV (US9624274的SEQ ID NO:195;本文的SEQ ID NO:995)、CPV (US9624274的SEQ ID NO:196;本文的SEQ ID NO:996),或其变体。此外,US 9624274中描述的任何结构蛋白插入物都可以插入但不限于任何亲本AAV血清型的I-453和I-587,例如但不限于AAV2 (US9624274的SEQ ID NO:183)。氨基酸插入物可以是但不限于任何以下氨基酸序列:VNLTWSRASG (US9624274的SEQ ID NO:50;本文的SEQ ID NO:1362)、EFCINHRGYWVCGD (US9624274的SEQ ID NO:55;本文的SEQ ID NO:1363)、EDGQVMDVDLS (US9624274的SEQ ID NO:85;本文的SEQ ID NO:1364)、EKQRNGTLT (US9624274的SEQ ID NO:86;本文的SEQ ID NO:1365)、TYQCRVTHPHLPRALMR (US9624274的SEQ ID NO:87;本文的SEQ ID NO:1366)、RHSTTQPRKTKGSG (US9624274的SEQ ID NO:88;本文的SEQ ID NO:1367)、DSNPRGVSAVLSR (US9624274的SEQ ID NO:89;本文的SEQ ID NO:1368)、TITCLWDLAPSK (US9624274的SEQ ID NO:90;本文的SEQ ID NO:1369)、KTKGSGFFVF (US9624274的SEQ ID NO:91;本文的SEQ ID NO:1370)、THPHLPRALMRS (US9624274的SEQ ID NO:92;本文的SEQ ID NO:1371)、GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK (US9624274的SEQ ID NO:93;本文的SEQ ID NO:1372)、LPRALMRS (US9624274的SEQ ID NO:94;本文的SEQ ID NO:1373)、INHRGYWV (US9624274的SEQ ID NO:95;本文的SEQ ID NO:1374)、CDAGSVRTNAPD (US9624274的SEQ ID NO:60;本文的SEQ ID NO:1375)、AKAVSNLTESRSESLQS (US9624274的SEQ ID NO:96;本文的SEQ ID NO:1376)、SLTGDEFKAVLET (US9624274的SEQ ID NO:97;本文的SEQ ID NO:1377)、REAVAYRFEED (US9624274的SEQ ID NO:98;本文的SEQ ID NO:1378)、INPEIITLDG (US9624274的SEQ ID NO:99;本文的SEQ ID NO:1379)、DISVTGAPVITATYL (US9624274的SEQ ID NO:100;本文的SEQ ID NO:1380)、DISVTGAPVITA (US9624274的SEQ ID NO:101;本文的SEQ ID NO:1381)、PKTVSNLTESSESSESVQS (US9624274的SEQ ID NO:102;本文的SEQ ID NO:1382)、SLMGDEFKAVLET (US9624274的SEQ ID NO:103;本文的SEQ ID NO:1383)、QHSVAYTFEED (US9624274的SEQ ID NO:104;本文的SEQ ID NO:1384)、INPEIITRDG (US9624274的SEQ ID NO:105;本文的SEQ ID NO:1385)、DISLTGDPVITASYL (US9624274的SEQ ID NO:106;本文的SEQ ID NO:1386)、DISLTGDPVITA (US9624274的SEQ ID NO:107;本文的SEQ ID NO:1387)、DQSIDFEIDSA (US9624274的SEQ ID NO:108;本文的SEQ ID NO:1388)、KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS (US9624274的SEQ ID NO:109;本文的SEQ ID NO:1389)、KNVSEDLPLPT (US9624274的SEQ ID NO:110;本文的SEQ ID NO:1390)、CDSGRVRTDAPD (US9624274的SEQ ID NO:111;本文的SEQ ID NO:1391)、FPEHLLVDFLQSLS (US9624274的SEQ ID NO:112;本文的SEQ ID NO:1392)、DAEFRHDSG (US9624274的SEQ ID NO:65;本文的SEQ

ID NO:1393)、HYAAQWDFGNTMCQL (US9624274的SEQ ID NO:113;本文的SEQ ID NO:1394)、YAAQWDFGNTMCQ (US9624274的SEQ ID NO:114;本文的SEQ ID NO:1395)、RSQKEGLHYT (US9624274的SEQ ID NO:115;本文的SEQ ID NO:1396)、SSRTPSDKPVAHWANPQAE (US9624274的SEQ ID NO:116;本文的SEQ ID NO:1397)、SRTPSDKPVAHWANP (US9624274的SEQ ID NO:117;本文的SEQ ID NO:1398)、SSRTPSDKP (US9624274的SEQ ID NO:118;本文的SEQ ID NO:1399)、NADGNVDYHMNSVP (US9624274的SEQ ID NO:119;本文的SEQ ID NO:1400)、DGNVDYHMNSV (US9624274的SEQ ID NO:120;本文的SEQ ID NO:1401)、RSFKEFLQSSLRALRQ (US9624274的SEQ ID NO:121;本文的SEQ ID NO:1402)、FKEFLQSSLRA (US9624274的SEQ ID NO:122;本文的SEQ ID NO:1403)或QMWPQWGP (US9624274的SEQ ID NO:123;本文的SEQ ID NO:1404)。

[0134] 在一个实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有美国专利号US9475845中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV衣壳蛋白,其包含在天然AAV2衣壳蛋白的氨基酸位置585至590的一个或多个氨基酸修饰。进一步的修饰可以产生但不限于氨基酸序列RGNRQA (US9475845的SEQ ID NO:3;本文的SEQ ID NO:1405)、SSSTDP (US9475845的SEQ ID NO:4;本文的SEQ ID NO:1406)、SSNTAP (US9475845的SEQ ID NO:5;本文的SEQ ID NO:1407)、SNSNLP (US9475845的SEQ ID NO:6;本文的SEQ ID NO:1408)、SSTTAP (US9475845的SEQ ID NO:7;本文的SEQ ID NO:1409)、AANTAA (US9475845的SEQ ID NO:8;本文的SEQ ID NO:1410)、QQNTAP (US9475845的SEQ ID NO:9;本文的SEQ ID NO:1411)、SAQAQA (US9475845的SEQ ID NO:10;本文的SEQ ID NO:1412)、QANTGP (US9475845的SEQ ID NO:11;本文的SEQ ID NO:1413)、NATTAP (US9475845的SEQ ID NO:12;本文的SEQ ID NO:1414)、SSTAGP (US9475845的SEQ ID NO:13和20;本文的SEQ ID NO:1415)、QQNTAA (US9475845的SEQ ID NO:14;本文的SEQ ID NO:1416)、PSTAGP (US9475845的SEQ ID NO:15;本文的SEQ ID NO:1417)、NQNTAP (US9475845的SEQ ID NO:16;本文的SEQ ID NO:1418)、QAANAP (US9475845的SEQ ID NO:17;本文的SEQ ID NO:1419)、SIVGLP (US9475845的SEQ ID NO:18;本文的SEQ ID NO:1420)、AATAA (US9475845的SEQ ID NO:19和27;本文的SEQ ID NO:1421)、SQNTTA (US9475845的SEQ ID NO:21;本文的SEQ ID NO:1422)、QQDTAP (US9475845的SEQ ID NO:22;本文的SEQ ID NO:1423)、QTNTGP (US9475845的SEQ ID NO:23;本文的SEQ ID NO:1424)、QTNGAP (US9475845的SEQ ID NO:24;本文的SEQ ID NO:1425)、QQNAAP (US9475845的SEQ ID NO:25;本文的SEQ ID NO:1426)或AANTQA (US9475845的SEQ ID NO:26;本文的SEQ ID NO:1427)。在一个实施方案中,氨基酸修饰是在天然AAV2衣壳蛋白中的氨基酸位置262至265或另一AAV的衣壳蛋白中的相应位置处用靶向序列取代。靶向序列可以是但不限于下述任何氨基酸序列:NGRAHA (US9475845的SEQ ID NO:38;本文的SEQ ID NO:1428)、QPEHSST (US9475845的SEQ ID NO:39和50;本文的SEQ ID NO:1429)、VNTANST (US9475845的SEQ ID NO:40;本文的SEQ ID NO:1430)、HGPMQKS (US9475845的SEQ ID NO:41;本文的SEQ ID NO:1431)、PHKPPLA (US9475845的SEQ ID NO:42;本文的SEQ ID NO:1432)、IKNNEMW (US9475845的SEQ ID NO:43;本文的SEQ ID NO:1433)、RNLDTMP (US9475845的SEQ ID NO:44;本文的SEQ ID NO:1434)、VDSHRQS (US9475845的SEQ ID NO:45;本文的SEQ ID NO:1435)、YDSKTKT (US9475845的SEQ ID NO:46;本文的SEQ ID NO:1436)、SQLPHQK (US9475845的SEQ ID NO:47;本文的SEQ ID NO:1437)、STMQQNT (US9475845

的SEQ ID NO:48;本文的SEQ ID NO:1438)、TERYMTQ (US9475845的SEQ ID NO:49;本文的SEQ ID NO:1439)、DASLSTS (US9475845的SEQ ID NO:51;本文的SEQ ID NO:1440)、DLPNKKT (US9475845的SEQ ID NO:52;本文的SEQ ID NO:1441)、DLTAARL (US9475845的SEQ ID NO:53;本文的SEQ ID NO:1442)、EPHQFNY (US9475845的SEQ ID NO:54;本文的SEQ ID NO:1443)、EPQSNHT (US9475845的SEQ ID NO:55;本文的SEQ ID NO:1444)、MSSWPSQ (US9475845的SEQ ID NO:56;本文的SEQ ID NO:1445)、NPKHNAT (US9475845的SEQ ID NO:57;本文的SEQ ID NO:1446)、PDGMRTT (US9475845的SEQ ID NO:58;本文的SEQ ID NO:1447)、PNNKTT (US9475845的SEQ ID NO:59;本文的SEQ ID NO:1448)、QSTTHDS (US9475845的SEQ ID NO:60;本文的SEQ ID NO:1449)、TGSKQKQ (US9475845的SEQ ID NO:61;本文的SEQ ID NO:1450)、SLKHQAL (US9475845的SEQ ID NO:62;本文的SEQ ID NO:1451)、SPIDGEQ (US9475845的SEQ ID NO:63;本文的SEQ ID NO:1452)、WIFPWIQL (US9475845的SEQ ID NO:64和112;本文的SEQ ID NO:1453)、CDCRGDCFC (US9475845的SEQ ID NO:65;本文的SEQ ID NO:1454)、CNGRC (US9475845的SEQ ID NO:66;本文的SEQ ID NO:1455)、CPRECES (US9475845的SEQ ID NO:67;本文的SEQ ID NO:1456)、CTTHWGFTLC (US9475845的SEQ ID NO:68和123;本文的SEQ ID NO:1457)、CGRRAGGSC (US9475845的SEQ ID NO:69;本文的SEQ ID NO:1458)、CKGGRKDC (US9475845的SEQ ID NO:70;本文的SEQ ID NO:1459)、CVPELGHEC (US9475845的SEQ ID NO:71和115;本文的SEQ ID NO:1460)、CRRETAWAK (US9475845的SEQ ID NO:72;本文的SEQ ID NO:1461)、VSWFSHRYSPFAVS (US9475845的SEQ ID NO:73;本文的SEQ ID NO:1462)、GYRDGYAGPILYN (US9475845的SEQ ID NO:74;本文的SEQ ID NO:1463)、XXYXXX (US9475845的SEQ ID NO:75;本文的SEQ ID NO:1464)、YXNW (US9475845的SEQ ID NO:76;本文的SEQ ID NO:1465)、RPLPLP (US9475845的SEQ ID NO:77;本文的SEQ ID NO:1466)、APPLPPR (US9475845的SEQ ID NO:78;本文的SEQ ID NO:1467)、DVFYPYPYASGS (US9475845的SEQ ID NO:79;本文的SEQ ID NO:1468)、MYWYPY (US9475845的SEQ ID NO:80;本文的SEQ ID NO:1469)、DITWDQLWDLMK (US9475845的SEQ ID NO:81;本文的SEQ ID NO:1470)、CWDDXWLC (US9475845的SEQ ID NO:82;本文的SEQ ID NO:1471)、EWCEYLGGYLR CYA (US9475845的SEQ ID NO:83;本文的SEQ ID NO:1472)、YXCXXGPXTWXCXP (US9475845的SEQ ID NO:84;本文的SEQ ID NO:1473)、IEGPTLRQWLAARA (US9475845的SEQ ID NO:85;本文的SEQ ID NO:1474)、LWXXX (US9475845的SEQ ID NO:86;本文的SEQ ID NO:1475)、XFXXYLW (US9475845的SEQ ID NO:87;本文的SEQ ID NO:1476)、SSIISHFRWGLCD (US9475845的SEQ ID NO:88;本文的SEQ ID NO:1477)、MSRPACPPNDKYE (US9475845的SEQ ID NO:89;本文的SEQ ID NO:1478)、CLRSGRC (US9475845的SEQ ID NO:90;本文的SEQ ID NO:1479)、CHWMFSPWC (US9475845的SEQ ID NO:91;本文的SEQ ID NO:1480)、WXXF (US9475845的SEQ ID NO:92;本文的SEQ ID NO:1481)、CSSRLDAC (US9475845的SEQ ID NO:93;本文的SEQ ID NO:1482)、CLPVASC (US9475845的SEQ ID NO:94;本文的SEQ ID NO:1483)、CGFECVRQCPERC (US9475845的SEQ ID NO:95;本文的SEQ ID NO:1484)、CVALCREACGEGC (US9475845的SEQ ID NO:96;本文的SEQ ID NO:1485)、SWCEPGWCR (US9475845的SEQ ID NO:97;本文的SEQ ID NO:1486)、YSGKWGW (US9475845的SEQ ID NO:98;本文的SEQ ID NO:1487)、GLSGGRS (US9475845的SEQ ID NO:99;本文的SEQ ID NO:1488)、LMLPRAD (US9475845的SEQ ID NO:100;本文的SEQ ID NO:1489)、CSCFRDVCC (US9475845的SEQ ID NO:101;本文的SEQ ID NO:1490)、CRDVVSVIC

(US9475845的SEQ ID NO:102;本文的SEQ ID NO:1491)、MARSG (US9475845的SEQ ID NO:103;本文的SEQ ID NO:1492)、MARAKE (US9475845的SEQ ID NO:104;本文的SEQ ID NO:1493)、MSRTMS (US9475845的SEQ ID NO:105;本文的SEQ ID NO:1494)、KCCYSL (US9475845的SEQ ID NO:106;本文的SEQ ID NO:1495)、MYWGDSHWLQYWYE (US9475845的SEQ ID NO:107;本文的SEQ ID NO:1496)、MQLPLAT (US9475845的SEQ ID NO:108;本文的SEQ ID NO:1497)、EWLS (US9475845的SEQ ID NO:109;本文的SEQ ID NO:1498)、SNEW (US9475845的SEQ ID NO:110;本文的SEQ ID NO:1499)、TNYL (US9475845的SEQ ID NO:111;本文的SEQ ID NO:1500)、WDLAWMFRLPVG (US9475845的SEQ ID NO:113;本文的SEQ ID NO:1501)、CTVALPGGYVRVC (US9475845的SEQ ID NO:114;本文的SEQ ID NO:1502)、CVAYCIEHHCWTC (US9475845的SEQ ID NO:116;本文的SEQ ID NO:1503)、CVFAHNYDYLVC (US9475845的SEQ ID NO:117;本文的SEQ ID NO:1504)、CVFTSNYAFC (US9475845的SEQ ID NO:118;本文的SEQ ID NO:1505)、VHSPNKK (US9475845的SEQ ID NO:119;本文的SEQ ID NO:1506)、CRGDGWC (US9475845的SEQ ID NO:120;本文的SEQ ID NO:1507)、XRGCDX (US9475845的SEQ ID NO:121;本文的SEQ ID NO:1508)、PXXX (US9475845的SEQ ID NO:122;本文的SEQ ID NO:1509)、SGKGPRQITAL (US9475845的SEQ ID NO:124;本文的SEQ ID NO:1510)、AAAAAAAAAXXXXX (US9475845的SEQ ID NO:125;本文的SEQ ID NO:1511)、VYMSPF (US9475845的SEQ ID NO:126;本文的SEQ ID NO:1512)、ATWLPPR (US9475845的SEQ ID NO:127;本文的SEQ ID NO:1513)、HTMYHHYQHHL (US9475845的SEQ ID NO:128;本文的SEQ ID NO:1514)、SEVGCRAGPLQLCEKYFG (US9475845的SEQ ID NO:129;本文的SEQ ID NO:1515)、CGLLPVGRPDNRVWRWLC (US9475845的SEQ ID NO:130;本文的SEQ ID NO:1516)、CKGQCDRFKGLPWEC (US9475845的SEQ ID NO:131;本文的SEQ ID NO:1517)、SGRSA (US9475845的SEQ ID NO:132;本文的SEQ ID NO:1518)、WGFP (US9475845的SEQ ID NO:133;本文的SEQ ID NO:1519)、AEPMPHSLNFSQYLWYT (US9475845的SEQ ID NO:134;本文的SEQ ID NO:1520)、WAYXSP (US9475845的SEQ ID NO:135;本文的SEQ ID NO:1521)、IELLQAR (US9475845的SEQ ID NO:136;本文的SEQ ID NO:1522)、AYTKCSRQWRTCMTH (US9475845的SEQ ID NO:137;本文的SEQ ID NO:1523)、PQNSKIPGPTFLDPH (US9475845的SEQ ID NO:138;本文的SEQ ID NO:1524)、SMEPALPDWWWKMKF (US9475845的SEQ ID NO:139;本文的SEQ ID NO:1525)、ANTPCGPYTHDCPVKR (US9475845的SEQ ID NO:140;本文的SEQ ID NO:1526)、TACHQHVRMVRP (US9475845的SEQ ID NO:141;本文的SEQ ID NO:1527)、VPWMEPAYQRFL (US9475845的SEQ ID NO:142;本文的SEQ ID NO:1528)、DPRATPGS (US9475845的SEQ ID NO:143;本文的SEQ ID NO:1529)、FRPNRAQDYNTN (US9475845的SEQ ID NO:144;本文的SEQ ID NO:1530)、CTKNSYLMC (US9475845的SEQ ID NO:145;本文的SEQ ID NO:1531)、CXXTXXGXGC (US9475845的SEQ ID NO:146;本文的SEQ ID NO:1532)、CPIEDRPMC (US9475845的SEQ ID NO:147;本文的SEQ ID NO:1533)、HEWSYLAPYPWF (US9475845的SEQ ID NO:148;本文的SEQ ID NO:1534)、MCPKHPLGC (US9475845的SEQ ID NO:149;本文的SEQ ID NO:1535)、RMWPSSTVNLSAGR (US9475845的SEQ ID NO:150;本文的SEQ ID NO:1536)、SAKTAVSQRVWLPSHRGGEP (US9475845的SEQ ID NO:151;本文的SEQ ID NO:1537)、KSREHVNSACPSKRITAAL (US9475845的SEQ ID NO:152;本文的SEQ ID NO:1538)、EGFR (US9475845的SEQ ID NO:153;本文的SEQ ID NO:1539)、AGLGVR (US9475845的SEQ ID NO:

154; 本文的SEQ ID NO:1540)、GTRQGHTMRLGVSDG (US9475845的SEQ ID NO:155; 本文的SEQ ID NO:1541)、IAGLATPGWSHWLAL (US9475845的SEQ ID NO:156; 本文的SEQ ID NO:1542)、SMSIARL (US9475845的SEQ ID NO:157; 本文的SEQ ID NO:1543)、HTFEPGV (US9475845的SEQ ID NO:158; 本文的SEQ ID NO:1544)、NTSLKRISNKRIRRK (US9475845的SEQ ID NO:159; 本文的SEQ ID NO:1545)、LRIKRKRKRKKTRK (US9475845的SEQ ID NO:160; 本文的SEQ ID NO:1546)、GGG、GFS、LWS、EGG、LLV、LSP、LBS、AGG、GRR、GGH和GTV。

[0135] 在一个实施方案中, AAV血清型可以是或可以具有美国公开号US20160369298中所述的序列, 其内容通过引用整体并入本文, 例如但不限于, AAV2的位点特异性突变衣壳蛋白 (US 20160369298的SEQ ID NO:97; 本文的SEQ ID NO:1547) 或其变体, 其中所述特异性位点是选自VP1或其片段的位点R447、G453、S578、N587、N587+1、S662的至少一个位点。

[0136] 此外, 美国专利申请公开号US 20160369298中描述的任何突变序列可以是或可以具有但不限于任何以下序列: SDSGASN (US20160369298的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:231; 本文的SEQ ID NO:1548)、SPSGASN (US20160369298的SEQ ID NO:2; 本文的SEQ ID NO:1549)、SHSGASN (US20160369298的SEQ ID NO:3; 本文的SEQ ID NO:1550)、SRSGASN (US20160369298的SEQ ID NO:4; 本文的SEQ ID NO:1551)、SKSGASN (US20160369298的SEQ ID NO:5; 本文的SEQ ID NO:1552)、SNSGASN (US20160369298的SEQ ID NO:6; 本文的SEQ ID NO:1553)、SGSGASN (US20160369298的SEQ ID NO:7; 本文的SEQ ID NO:1554)、SASGASN (US20160369298的SEQ ID NO:8、175和221; 本文的SEQ ID NO:1555)、SESGTSN (US20160369298的SEQ ID NO:9; 本文的SEQ ID NO:1556)、STTGGSN (US20160369298的SEQ ID NO:10; 本文的SEQ ID NO:1557)、SSAGSTN (US20160369298的SEQ ID NO:11; 本文的SEQ ID NO:1558)、NNDSQA (US20160369298的SEQ ID NO:12; 本文的SEQ ID NO:1559)、NNRNQA (US20160369298的SEQ ID NO:13; 本文的SEQ ID NO:1560)、NNNKQA (US20160369298的SEQ ID NO:14; 本文的SEQ ID NO:1561)、NAKRQA (US20160369298的SEQ ID NO:15; 本文的SEQ ID NO:1562)、NDEHQA (US20160369298的SEQ ID NO:16; 本文的SEQ ID NO:1563)、NTSQKA (US20160369298的SEQ ID NO:17; 本文的SEQ ID NO:1564)、YYLSRTNTPSGTDTQSRLVFSQAGA (US20160369298的SEQ ID NO:18; 本文的SEQ ID NO:1565)、YYLSRTNTDSGTETQSGLDFSQAGA (US20160369298的SEQ ID NO:19; 本文的SEQ ID NO:1566)、YYLSRTNTESGTPTQSALEFSQAGA (US20160369298的SEQ ID NO:20; 本文的SEQ ID NO:1567)、YYLSRTNTHSGTHTQSPLHFSQAGA (US20160369298的SEQ ID NO:21; 本文的SEQ ID NO:1568)、YYLSRTNTSSGTITISHLIFSQAGA (US20160369298的SEQ ID NO:22; 本文的SEQ ID NO:1569)、YYLSRTNTRSGIMTKSSLMFQAGA (US20160369298的SEQ ID NO:23; 本文的SEQ ID NO:1570)、YYLSRTNTKSGRKTLSNLSFSQAGA (US20160369298的SEQ ID NO:24; 本文的SEQ ID NO:1571)、YYLSRTNDGSGPVTPSKLRFSQRGA (US20160369298的SEQ ID NO:25; 本文的SEQ ID NO:1572)、YYLSRTNAASGHATHSDLKFSQPGA (US20160369298的SEQ ID NO:26; 本文的SEQ ID NO:1573)、YYLSRTNGQAGSLTMSLGFSQVGA (US20160369298的SEQ ID NO:27; 本文的SEQ ID NO:1574)、YYLSRTNSTGGNQTTSQLLSQLSA (US20160369298的SEQ ID NO:28; 本文的SEQ ID NO:1575)、YFLSRTNNNTGLNTNSTLNFSQGRA (US20160369298的SEQ ID NO:29; 本文的SEQ ID NO:1576)、SKTGADNNNSEYSWTG (US20160369298的SEQ ID NO:30; 本文的SEQ ID NO:1577)、SKTDADNNNSEYSWTG (US20160369298的SEQ ID NO:31; 本文的SEQ ID NO:1578)、SKTEADNNNSEYSWTG

(US20160369298的SEQ ID NO:32;本文的SEQ ID NO:1579)、SKTPADNNNSEYSWTG
(US20160369298的SEQ ID NO:33;本文的SEQ ID NO:1580)、SKTHADNNNSEYSWTG
(US20160369298的SEQ ID NO:34;本文的SEQ ID NO:1581)、SKTQADNNNSEYSWTG
(US20160369298的SEQ ID NO:35;本文的SEQ ID NO:1582)、SKTIADNNNSEYSWTG
(US20160369298的SEQ ID NO:36;本文的SEQ ID NO:1583)、SKTMADNNNSEYSWTG
(US20160369298的SEQ ID NO:37;本文的SEQ ID NO:1584)、SKTRADNNNSEYSWTG
(US20160369298的SEQ ID NO:38;本文的SEQ ID NO:1585)、SKTNADNNNSEYSWTG
(US20160369298的SEQ ID NO:39;本文的SEQ ID NO:1586)、SKTVGRNNNSEYSWTG
(US20160369298的SEQ ID NO:40;本文的SEQ ID NO:1587)、SKTADRNNNSEYSWTG
(US20160369298的SEQ ID NO:41;本文的SEQ ID NO:1588)、SKKLSQNNNSKYSWQG
(US20160369298的SEQ ID NO:42;本文的SEQ ID NO:1589)、SKPTTGNNNSDYSWPG
(US20160369298的SEQ ID NO:43;本文的SEQ ID NO:1590)、STQKNENNSNYSWPG
(US20160369298的SEQ ID NO:44;本文的SEQ ID NO:1591)、HKDDEGKF (US20160369298的
SEQ ID NO:45;本文的SEQ ID NO:1592)、HKDDNRKF (US20160369298的SEQ ID NO:46;本文
的SEQ ID NO:1593)、HKDDTNKF (US20160369298的SEQ ID NO:47;本文的SEQ ID NO:1594)、
HEDSDKNF (US20160369298的SEQ ID NO:48;本文的SEQ ID NO:1595)、HRDGADSF
(US20160369298的SEQ ID NO:49;本文的SEQ ID NO:1596)、HGDNKSFR (US20160369298的
SEQ ID NO:50;本文的SEQ ID NO:1597)、KQGSEKTNVDFEEV (US20160369298的SEQ ID NO:
51;本文的SEQ ID NO:1598)、KQGSEKTNVDSEEV (US20160369298的SEQ ID NO:52;本文的SEQ
ID NO:1599)、KQGSEKTNVDVEEV (US20160369298的SEQ ID NO:53;本文的SEQ ID NO:1600)、
KQGSCKTNVDDAGV (US20160369298的SEQ ID NO:54;本文的SEQ ID NO:1601)、
KQGSSKTNVDPREV (US20160369298的SEQ ID NO:55;本文的SEQ ID NO:1602)、
KQGSRKTNVDHKQV (US20160369298的SEQ ID NO:56;本文的SEQ ID NO:1603)、
KQGSKGGNVDTNRV (US20160369298的SEQ ID NO:57;本文的SEQ ID NO:1604)、
KQGSGEANVDNGDV (US20160369298的SEQ ID NO:58;本文的SEQ ID NO:1605)、
KQDAAADNIDYDHV (US20160369298的SEQ ID NO:59;本文的SEQ ID NO:1606)、
KQSGTRSNAASSV (US20160369298的SEQ ID NO:60;本文的SEQ ID NO:1607)、
KENTNTNDTELTV (US20160369298的SEQ ID NO:61;本文的SEQ ID NO:1608)、
QRGNNVAATADVNT (US20160369298的SEQ ID NO:62;本文的SEQ ID NO:1609)、
QRGNNEAATADVNT (US20160369298的SEQ ID NO:63;本文的SEQ ID NO:1610)、
QRGNNPAATADVNT (US20160369298的SEQ ID NO:64;本文的SEQ ID NO:1611)、
QRGNNHAATADVNT (US20160369298的SEQ ID NO:65;本文的SEQ ID NO:1612)、
QEENNIAATPGVNT (US20160369298的SEQ ID NO:66;本文的SEQ ID NO:1613)、
QPPNNMAATHEVNT (US20160369298的SEQ ID NO:67;本文的SEQ ID NO:1614)、
QHHNNSAATTIVNT (US20160369298的SEQ ID NO:68;本文的SEQ ID NO:1615)、
QTTNNRAAFNMVET (US20160369298的SEQ ID NO:69;本文的SEQ ID NO:1616)、
QKKNNNAASKKVAT (US20160369298的SEQ ID NO:70;本文的SEQ ID NO:1617)、
QGGNNKAADDAVKT (US20160369298的SEQ ID NO:71;本文的SEQ ID NO:1618)、
QAAKGAADDAVKT (US20160369298的SEQ ID NO:72;本文的SEQ ID NO:1619)、

QDDRAAAANESVDT (US20160369298的SEQ ID NO:73;本文的SEQ ID NO:1620)、QQQHDDAAYQRVHT (US20160369298的SEQ ID NO:74;本文的SEQ ID NO:1621)、QSSSSLAAVSTVQT (US20160369298的SEQ ID NO:75;本文的SEQ ID NO:1622)、QNNQTAAIRNVTT (US20160369298的SEQ ID NO:76;本文的SEQ ID NO:1623)、NYNKKSDNVDT (US20160369298的SEQ ID NO:77;本文的SEQ ID NO:1624)、NYNKKSENVDT (US20160369298的SEQ ID NO:78;本文的SEQ ID NO:1625)、NYNKKSLNVDT (US20160369298的SEQ ID NO:79;本文的SEQ ID NO:1626)、NYNKKSPNVDT (US20160369298的SEQ ID NO:80;本文的SEQ ID NO:1627)、NYSKKSHCVDT (US20160369298的SEQ ID NO:81;本文的SEQ ID NO:1628)、NYRKTIYVDT (US20160369298的SEQ ID NO:82;本文的SEQ ID NO:1629)、NYKEKKDVHFT (US20160369298的SEQ ID NO:83;本文的SEQ ID NO:1630)、NYGHRAIVQFT (US20160369298的SEQ ID NO:84;本文的SEQ ID NO:1631)、NYANHQFVVCT (US20160369298的SEQ ID NO:85;本文的SEQ ID NO:1632)、NYDDPTGVLLT (US20160369298的SEQ ID NO:86;本文的SEQ ID NO:1633)、NYDDPTGVLLT (US20160369298的SEQ ID NO:87;本文的SEQ ID NO:1634)、NFEQQNSVEWT (US20160369298的SEQ ID NO:88;本文的SEQ ID NO:1635)、SQSGASN (US20160369298的SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:241;本文的SEQ ID NO:1636)、NNGSQA (US20160369298的SEQ ID NO:90;本文的SEQ ID NO:1637)、YYLSRTNTPSGTTTWSRLQFSQAGA (US20160369298的SEQ ID NO:91;本文的SEQ ID NO:1638)、SKTSADNNNSEYSWTG (US20160369298的SEQ ID NO:92;本文的SEQ ID NO:1639)、HKDDEEKF (US20160369298的SEQ ID NO:93、209、214、219、224、234、239和244;本文的SEQ ID NO:1640)、KQGSEKTNVDIEEV (US20160369298的SEQ ID NO:94;本文的SEQ ID NO:1641)、QRGNNQAATADVNT (US20160369298的SEQ ID NO:95;本文的SEQ ID NO:1642)、NYNKKSVNVDT (US20160369298的SEQ ID NO:96;本文的SEQ ID NO:1643)、SQSGASNYNTPSGTTTQSRLQFSTSADNNNSEYSWTGATKYH

[0137] (US20160369298的SEQ ID NO:106;本文的SEQ ID NO:1644)、SASGASNFNSEGGSLTQSSLGFSTDGENNNSDFSMTGATKYH

[0138] (US20160369298的SEQ ID NO:107;本文的SEQ ID NO:1645)、SQSGASNYNTPSGTTTQSRLQFSTDGENNNSDFSMTGATKYH

[0139] (US20160369298的SEQ ID NO:108;本文的SEQ ID NO:1646)、SASGASNYNTPSGTTTQSRLQFSTSADNNNSEFSWPGATTYH

[0140] (US20160369298的SEQ ID NO:109;本文的SEQ ID NO:1647)、SQSGASNFNSEGGSLTQSSLGFSTDGENNNSDFSMTGATKYH

[0141] (US20160369298的SEQ ID NO:110;本文的SEQ ID NO:1648)、SASGASNYNTPSGSLTQSSLGFSTDGENNNSDFSMTGATKYH

[0142] (US20160369298的SEQ ID NO:111;本文的SEQ ID NO:1649)、SQSGASNYNTPSGTTTQSRLQFSTSADNNNSDFSMTGATKYH

[0143] (US20160369298的SEQ ID NO:112;本文的SEQ ID NO:1650)、SGAGASNFNSEGGSLTQSSLGFSTDGENNNSDFSMTGATKYH

[0144] (US20160369298的SEQ ID NO:113;本文的SEQ ID NO:1651)、SGAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:176;本文的SEQ ID NO:1652)、NSEGGSLTQSSLGFS

(US20160369298的SEQ ID NO:177、185、193和202;本文的SEQ ID NO:1653)、TDGENNNSDFS (US20160369298的SEQ ID NO:178;本文的SEQ ID NO:1654)、SEFSWPGATT (US20160369298的SEQ ID NO:179;本文的SEQ ID NO:1655)、TSADNNNSDFS WT (US20160369298的SEQ ID NO:180;本文的SEQ ID NO:1656)、SQSGASNY (US20160369298的SEQ ID NO:181、187和198;本文的SEQ ID NO:1657)、NTPSGTTTQSRLQFS (US20160369298的SEQ ID NO:182、188、191和199;本文的SEQ ID NO:1658)、TSADNNNSEYSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:183;本文的SEQ ID NO:1659)、SASGASNF (US20160369298的SEQ ID NO:184;本文的SEQ ID NO:1660)、TDGENNNSDFS WTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:186、189、194、197和203;本文的SEQ ID NO:1661)、SASGASNY (US20160369298的SEQ ID NO:190和SEQ ID NO:195;本文的SEQ ID NO:1662)、TSADNNNSEFSWPGATTYH (US20160369298的SEQ ID NO:192;本文的SEQ ID NO:1663)、NTPSGSLTQSSLGFS (US20160369298的SEQ ID NO:196;本文的SEQ ID NO:1664)、TSADNNNSDFS WTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:200;本文的SEQ ID NO:1665)、SGAGASNF (US20160369298的SEQ ID NO:201;本文的SEQ ID NO:1666)、CTCCAGVSVSMRSR VCVNSGCAGCTDHCVSRNSGTCVMSACACAA (US20160369298的SEQ ID NO:204;本文的SEQ ID NO:1667)、CTCCAGAGAGGCAACAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAA (US20160369298的SEQ ID NO:205;本文的SEQ ID NO:1668)、SAAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:206;本文的SEQ ID NO:1669)、YFLSRTNTESGSTTQSTLRFSQAG (US20160369298的SEQ ID NO:207;本文的SEQ ID NO:1670)、SKTSADNNNSDFS (US20160369298的SEQ ID NO:208、228和253;本文的SEQ ID NO:1671)、KQGSEKTDVDIDKV (US20160369298的SEQ ID NO:210;本文的SEQ ID NO:1672)、STAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:211;本文的SEQ ID NO:1673)、YFLSRTNTTSGIETQSTLRFSQAG (US20160369298的SEQ ID NO:212和SEQ ID NO:247;本文的SEQ ID NO:1674)、SKTDGENNNSDFS (US20160369298的SEQ ID NO:213和SEQ ID NO:248;本文的SEQ ID NO:1675)、KQGAAADDVEIDGV (US20160369298的SEQ ID NO:215和SEQ ID NO:250;本文的SEQ ID NO:1676)、SEAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:216;本文的SEQ ID NO:1677)、YYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAG (US20160369298的SEQ ID NO:217、232和242;本文的SEQ ID NO:1678)、SKTSADNNNSEYS (US20160369298的SEQ ID NO:218、233、238和243;本文的SEQ ID NO:1679)、KQGSEKTNVDIEKV (US20160369298的SEQ ID NO:220、225和245;本文的SEQ ID NO:1680)、YFLSRTNDASGSDTKSTLLFSQAG (US20160369298的SEQ ID NO:222;本文的SEQ ID NO:1681)、STTPSENNNSEYS (US20160369298的SEQ ID NO:223;本文的SEQ ID NO:1682)、SAAGATN (US20160369298的SEQ ID NO:226和SEQ ID NO:251;本文的SEQ ID NO:1683)、YFLSRTNGEAGSATLSELRFSQAG (US20160369298的SEQ ID NO:227;本文的SEQ ID NO:1684)、HGDDADRF (US20160369298的SEQ ID NO:229和SEQ ID NO:254;本文的SEQ ID NO:1685)、KQGAEKSDVEVDRV (US20160369298的SEQ ID NO:230和SEQ ID NO:255;本文的SEQ ID NO:1686)、KQDSGGDNIDIDQV (US20160369298的SEQ ID NO:235;本文的SEQ ID NO:1687)、SDAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:236;本文的SEQ ID NO:1688)、YFLSRTNTEGGHDTQSTLRFSQAG (US20160369298的SEQ ID NO:237;本文的SEQ ID NO:1689)、KEDGGGSDVAIDEV (US20160369298的SEQ ID NO:240;本文的SEQ ID NO:1690)、SNAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:246;本文的SEQ ID NO:1691)和YFLSRTNGEAGSATLSELRFSQPG (US20160369298的SEQ ID NO:252;本文的SEQ ID NO:1692)。可以编码氨基酸突变位点的

核苷酸序列的非限制性实例包括以下:AGCVVMDCAGGARSCASCAAC (US20160369298的SEQ ID NO:97;本文的SEQ ID NO:1693)、AACRACRRSMRSMAGGCA (US20160369298的SEQ ID NO:98;本文的SEQ ID NO:1694)、CACRRGGACRRRCMSRRSARSTTT (US20160369298的SEQ ID NO:99;本文的SEQ ID NO:1695)、TATTTCTTGAGCAGAACAAACRVCVVSRS CGGAMNCVHSACGMHSTCA VVSCCTTV DSTTTTCTCAGSBCRGSGCG (US20160369298的SEQ ID NO:100;本文的SEQ ID NO:1696)、TCAAMAMMAVNSRVCSRSAACAACAACAGTRASTTCTCGTGGMMAGG A (US20160369298的SEQ ID NO:101;本文的SEQ ID NO:1697)、AAGSAARRCRSCRVS RVARVCRATRYCGMSNHCRMVRS GTC [0145] (US20160369298的SEQ ID NO:102;本文的SEQ ID NO:1698)、CAGVSVSVSMRSRV CV NSGCAGCTDHCVVSRNSGTCVMSACA

[0146] (US20160369298的SEQ ID NO:103;本文的SEQ ID NO:1699)、AACTWCRVSVAS MVSV HSDDTGTG SWSTKSACT (US20160369298的SEQ ID NO:104;本文的SEQ ID NO:1700)、TTGTTGAACATCACCACGTGACGCACGTTT (US20160369298的SEQ ID NO:256;本文的SEQ ID NO:1701)、TCCCGTGGTTCTACTACATAATGTGGCCG (US20160369298的SEQ ID NO:257;本文的SEQ ID NO:1702)、TTCCACACTCCGTTTTGGATAATGTTGAAC (US20160369298的SEQ ID NO:258;本文的SEQ ID NO:1703)、AGGGACATCCCCAGCTCCATGCTGTGGTCG (US20160369298的SEQ ID NO:259;本文的SEQ ID NO:1704)、AGGGACAACCCCTCCGACTCGCCCTAATCC (US20160369298的SEQ ID NO:260;本文的SEQ ID NO:1705)、TCCTAGTAGAAGACACCCTCTCACTGCCCCG (US20160369298的SEQ ID NO:261;本文的SEQ ID NO:1706)、AGTACCATGTACACCCACTCTCCCAGTGCC (US20160369298的SEQ ID NO:262;本文的SEQ ID NO:1707)、ATATGGACGTTTCATGCTGATCACCATACCG (US20160369298的SEQ ID NO:263;本文的SEQ ID NO:1708)、AGCAGGAGCTCCTTGGCCTCAGCGTGCAG (US20160369298的SEQ ID NO:264;本文的SEQ ID NO:1709)、ACAAGCAGCTTCACTATGACAACCACTGAC (US20160369298的SEQ ID NO:265;本文的SEQ ID NO:1710)、CAGCCTAGGAAGTGGCTTCTGACCCCTGTTACCGCCAGCAGAGAGTCTCAAMAMMAV NSRVCSRSAACAACAACAGTRASTTCTCCTGGMAGGAGCTACCAAGTACCACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTG AATCCCGGACCAGCTATGGCAAGCCACRRGGACRRRCMSRRSARSTTTTTCTCAGAGCGGGTTCTCATCTTTGG GAAGSAARRCRSCRVS RVARVCRATRYCGMSNHCRMVRS GTCATGATTACAGACGAAGAGGAGATCTGGAC

[0147] (US20160369298的SEQ ID NO:266;本文的SEQ ID NO:1711)、TGGGACAATGGCGGTC GTCTCTCAGAGTTKTKKT (US20160369298的SEQ ID NO:267;本文的SEQ ID NO:1712)、AGAGGA CCKKTCTCGATGGTTCATGGTGGAGTTA (US20160369298的SEQ ID NO:268;本文的SEQ ID NO:1713)、CCACTTAGGGCCTGGTCGATACCGTTCGGTG (US20160369298的SEQ ID NO:269;本文的SEQ ID NO:1714) 和TCTCGCCCCAAGAGTAGAAACCCTTCSTTYYG (US20160369298的SEQ ID NO:270;本文的SEQ ID NO:1715)。

[0148] 在一些实施方案中,AAV血清型可以包含国际专利公开W02016134375中所述的眼细胞靶向肽,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于W02016134375的SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。此外,可以将W02016134375中描述的任何眼细胞靶向肽或氨基酸插入任何亲本AAV血清型,例如但不限于AAV2 (W02016134375的SEQ ID NO:8;本文的SEQ ID NO:1716)或AAV9 (W02016134375的SEQ ID NO:11;本文的SEQ ID NO:1717)。在一些实施方案中,在AAV2蛋白P34-A35、T138-A139、A139-P140、G453-T454、N587-R588和/或R588-Q589处进行修饰,例如插入。在某些实施方案中,在AAV9的D384、G385、1560、T561、N562、E563、E564、

E565、N704和/或Y705处进行插入。眼细胞靶向肽可以是但不限于以下任何氨基酸序列：GSTPPPM(W02016134375的SEQ ID NO:1;本文的SEQ ID NO:1718)或GETRAPL(W02016134375的SEQ ID NO:4;本文的SEQ ID NO:1719)。

[0149] 在一些实施方案中,可以如美国专利申请公开号US 20170145405中所述修饰AAV血清型,其内容通过引用整体并入本文。AAV血清型可包括修饰的AAV2(例如,在Y444F、Y500F、Y730F和/或S662V处的修饰)、修饰的AAV3(例如,在Y705F、Y731F和/或T492V处的修饰)和修饰的AAV6(例如,在S663V和/或T492V处的修饰)。

[0150] 在一些实施方案中,AAV血清型可以如国际公开号W02017083722所述地修饰,其内容通过引用整体并入本文。AAV血清型可能包括AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3(Y705+731F)、AAV5、AAV 5(Y436+693+719F)、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)和AAV10(Y733F)。

[0151] 在一些实施方案中,AAV血清型可包含如国际专利公开W02017015102中所述的工程化表位,其内容通过引用整体并入本文,所述工程化表位包含氨基酸SPAKFA(W02017015102的SEQ ID NO:24;本文为SEQ ID NO:1720)或NKDKLN(W02017015102的SEQ ID NO:2;本文为SEQ ID NO:1721)。可以将表位插入基于AAV8的VP1衣壳的编号(W02017015102的SEQ ID NO:3)的氨基酸665至670和/或AAV3B的残基664至668(SEQ ID NO:3)的区域中。

[0152] 在一个实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有国际专利公开W02017058892中所述的序列(其内容通过引用整体并入本文),例如但不限于具有衣壳蛋白的AAV变体,其可包含AAV1的氨基酸残基262-268、370-379、451-459、472-473、493-500、528-534、547-552、588-597、709-710、716-722的一个或多个(例如2、3、4、5、6或7)处(以任意组合)或AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAVrh32.33、牛AAV或禽AAV的等同氨基酸残基处的取代。氨基酸取代可以是但不限于W02017058892中描述的任何氨基酸序列。在一个实施方案中,AAV可包含在以下残基处的氨基酸取代:AAV1(W02017058892的SEQ ID NO:1)的256L、258K、259Q、261S、263A、264S、265T、266G、272H、385S、386Q、S472R、V473D、N500E、547S、709A、710N、716D、717N、718N、720L、A456T、Q457T、N458Q、K459S、T492S、K493A、S586R、S587G、S588N、T589R和/或722T(以任意组合);AAV5(W02017058892的SEQ ID NO:5)的244N、246Q、248R、249E、250I、251K、252S、253G、254S、255V、256D、263Y、377E、378N、453L、456R、532Q、533P、535N、536P、537G、538T、539T、540A、541T、542Y、543L、546N、653V、654P、656S、697Q、698F、704D、705S、706T、707G、708E、709Y和/或710R(以任意组合);AAV5(W02017058892的SEQ ID NO:5)的248R、316V、317Q、318D、319S、443N、530N、531S、532Q 533P、534A、535N、540A、541T、542Y、543L、545G、546N、697Q、704D、706T、708E、709Y和/或710R(以任意组合);AAV6(SEQ ID NO:6W02017058892)的264S、266G、269N、272H、457Q、588S和/或589I(以任意组合);AAV8(SEQ ID NO:8W02017058892)的457T、459N、496G、499N、500N、589Q、590N和/或592A(以任意组合);AAV9(SEQ ID NO:9W02017058892)的451I、452N、453G、454S、455G、456Q、457N和/或458Q(以任意组合)。

[0153] 在一些实施方案中,AAV可包含国际公开号W0 2017066764中所述的VP1的155、156和157位或VP2的17、18、19和20位的氨基酸序列,其内容为本文通过引用整体并入。氨基酸

序列可以是但不限于N-S-S、S-X-S、S-S-Y、N-X-S、N-S-Y、S-X-Y和N-X-Y,其中N、X和Y独立地是但不限于非丝氨酸或非苏氨酸氨基酸,其中AAV可以是但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。在一些实施方案中,AAV可包含在VP1的156、157或158位或VP2的19、20或21位的至少一个氨基酸的缺失,其中AAV可以是但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。

[0154] 在一个实施方案中,AAV可以由Deverman等人(Nature Biotechnology 34:204-209 (2016))描述的基于Cre重组的AAV靶向进化(CREATE)产生的血清型,其内容通过引用整体并入本文。在一个实施方案中,与其他AAV血清型相比,以这种方式产生的AAV血清型具有改善的CNS转导和/或神经元和星形胶质细胞嗜性。作为非限制性实例,AAV血清型可以包含肽,例如但不限于PHP.B、PHP.B2、PHP.B3、PHP.A、PHP.S、G2A12、G2A15、G2A3、G2B4和G2B5。在一个实施方案中,这些AAV血清型可以是在氨基酸588-589之间具有7氨基酸插入物的AAV9 (SEQ ID NO:9和136) 衍生物。这些7氨基酸插入物的非限制性实例包括TLAVPFK (PHP.B; SEQ ID NO:1260)、SVSKPFL (PHP.B2; SEQ ID NO:1268)、FTLTTPK (PHP.B3; SEQ ID NO:1269)、YTLSQGW (PHP.A; SEQ ID NO:1275)、QAVRTSL (PHP.S; SEQ ID NO:1319)、LAKERLS (G2A3; SEQ ID NO:1320)、MNSTKNV (G2B4; SEQ ID NO:1321) 和/或VSGGHHS (G2B5; SEQ ID NO:1322)。

[0155] 在一个实施方案中,AAV血清型可以如Jackson等(Frontiers in Molecular Neuroscience 9:154 (2016))中所述,其内容通过引用整体并入本文。

[0156] 在本文引用和/或描述的DNA和RNA序列中,单个字母符号具有以下描述:A代表腺嘌呤;C代表胞嘧啶;G代表鸟嘌呤;T代表胸腺嘧啶;U代表尿嘧啶;W代表弱碱基,例如腺嘌呤或胸腺嘧啶;S代表强核苷酸,例如胞嘧啶和鸟嘌呤;M代表氨基核苷酸,如腺嘌呤和胞嘧啶;K代表酮核苷酸,如鸟嘌呤和胸腺嘧啶;R代表嘌呤腺嘌呤和鸟嘌呤;Y代表嘧啶胞嘧啶和胸腺嘧啶;B代表对于任何不是A的碱基(例如胞嘧啶、鸟嘌呤和胸腺嘧啶);D代表任何不是C的碱基(例如,腺嘌呤、鸟嘌呤和胸腺嘧啶);H代表任何不是G的碱基(例如,腺嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶);V代表任何不是T的碱基(例如,腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤);N代表任何核苷酸(不是空位);Z代表零。

[0157] 在本文提及和/或描述的任何氨基酸序列中,单字母符号具有以下描述:G (Gly) 代表甘氨酸;A (Ala) 代表丙氨酸;L (Leu) 代表亮氨酸;M (Met) 代表甲硫氨酸;F (Phe) 代表苯丙氨酸;W (Trp) 代表色氨酸;K (Lys) 代表赖氨酸;Q (Gln) 代表谷氨酰胺;E (Glu) 代表谷氨酸;S (Ser) 代表丝氨酸;P (Pro) 代表脯氨酸;V (Val) 代表缬氨酸;I (Ile) 代表异亮氨酸;C (Cys) 代表半胱氨酸;Y (Tyr) 代表酪氨酸;H (His) 代表组氨酸;R (Arg) 代表精氨酸;N (Asn) 代表天冬酰胺;D (Asp) 代表天冬氨酸;T (Thr) 代表苏氨酸;B (Asx) 代表天冬氨酸或天冬酰胺;J (Xle) 代表亮氨酸或异亮氨酸;O (Py1) 为吡咯赖氨酸;U (Sec) 代表硒代胱氨酸;X (Xaa) 代表任何氨基酸;Z (Glx) 代表谷氨酰胺或谷氨酸。

[0158] 在一些实施方案中,AAV血清型是PHP.B或AAV9。在一些实施方案中,与使用更普遍的启动子(即,CBA或CMV)时相比,AAV血清型与突触蛋白启动子配对以增强神经元转导。

[0159] 在一个实施方案中,AAV血清型是包含AAVPHP.N (PHP.N) 肽或其变体的血清型。

[0160] 在一个实施方案中,AAV血清型是包含AAVPHP.B (PHP.B) 肽或其变体的血清型。

[0161] 在一个实施方案中,AAV血清型是包含AAVPHP.A (PHP.A) 肽或其变体的血清型。

[0162] 在一个实施方案中, AAV血清型是包含PHP.S肽或其变体的血清型。

[0163] 在一个实施方案中, AAV血清型是包含PHP.B2肽或其变体的血清型。

[0164] 在一个实施方案中, AAV血清型是包含PHP.B3肽或其变体的血清型。

[0165] 在一个实施方案中, AAV血清型是包含G2B4肽或其变体的血清型。

[0166] 在一个实施方案中, AAV血清型是包含G2B5肽或其变体的血清型。

[0167] 在一个实施方案中, AAV血清型是VOY101或其变体。在一个优选的实施方案中, VOY101包含SEQ ID NO.1的氨基酸序列。在另一个实施方案中, 衣壳序列包含SEQ ID NO.1809的核酸序列。

[0168] 在一个实施方案中, AAV血清型是VOY201或其变体。在一个优选的实施方案中, VOY201包含SEQ ID NO.1810的核酸序列。

[0169] 在一个实施方案中, AAV衣壳是一种在静脉内施用后允许血脑屏障渗透的衣壳。这种AAV衣壳的非限制性实例包括VOY101、VOY201或包含肽插入物的AAV衣壳, 肽插入物例如但不限于AAVPHP.N (PHP.N)、AAVPHP.B (PHP.B)、PHP.S、G2A3、G2B4、G2B5、G2A12、G2A15、PHP.B2、PHP.B3和AAVPHP.A (PHP.A)。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳是VOY101。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳是VOY201。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳包含PHP.A肽插入物。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳包含PHP.B肽插入物。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳包含PHP.B2肽插入物。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳包含PHP.B3肽插入物。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳包含G2A3肽插入物。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳包含G2B4肽插入物。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳包含G2B5肽插入物。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳包含PHP.N肽插入物。在一个实施方案中, 穿透血脑屏障的衣壳包含PHP.S肽插入物。

[0170] 病毒基因组成分: 反向末端重复序列 (ITR)

[0171] 本发明的AAV颗粒包含具有至少一个ITR区和一个有效载荷区的病毒基因组。在一个实施方案中, 病毒基因组具有两个ITR。这两个ITR位于有效载荷区的侧翼, 在5' 和3' 端。ITR用作包含复制识别位点的复制的起点。ITR包含可以互补和对称排列的序列区。引入本发明的病毒基因组中的ITR可以由天然存在的多核苷酸序列或重组衍生的多核苷酸序列组成。

[0172] ITR可以衍生自与衣壳相同的血清型, 选自表1中列出的任何血清型或其衍生物。ITR可以具有与衣壳不同的血清型。在一个实施方案中, AAV颗粒具有多于一个ITR。在非限制性实例中, AAV颗粒具有包含两个ITR的病毒基因组。在一个实施方案中, ITR具有彼此相同的血清型。在另一个实施方案中, ITR具有不同的血清型。非限制性实例包括具有与衣壳相同血清型的零个、一个或两个ITR。在一个实施方案中, AAV颗粒的病毒基因组的两个ITR均为AAV2ITR。

[0173] 独立地, 每个ITR可以具有约100-150个核苷酸长度。ITR可以具有约100-105个核苷酸长度、106-110个核苷酸长度、111-115个核苷酸长度、116-120个核苷酸长度、121-125个核苷酸长度、126-130个核苷酸长度、131-135个核苷酸长度、136-140个核苷酸长度、141-145个核苷酸长度或146-150个核苷酸长度。在一个实施方案中, ITR具有140-142个核苷酸长度。ITR长度的非限制性实例是102、105、130、140、141、142、145个核苷酸长度, 以及与其具有至少90%同一性、与其具有至少95%同一性、与其具有至少98%同一性或其具有至

少99%同一性的核苷酸。

[0174] 病毒基因组组分：启动子

[0175] 在一个实施方案中，病毒基因组的有效载荷区包含至少一种增强转基因靶特异性和表达的元件（参见例如Powell等人，Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy, 2015；其内容通过引用整体并入本文）。增强转基因靶特异性和表达的元件的非限制性实例包括启动子、内源性miRNA、转录后调控元件（PRE）、聚腺苷酸化（PolyA）信号序列和上游增强子（USE）、CMV增强子和内含子。

[0176] 本领域技术人员可以认识到，本发明的多肽在靶细胞中的表达可能需要特异性启动子，包括但不限于物种特异性、诱导型、组织特异性或细胞周期特异性的启动子（Parr等人，Nat. Med. 3:1145-9 (1997)；其内容通过引用整体并入本文）。

[0177] 在一个实施方案中，当启动子驱动在AAV颗粒的病毒基因组的有效载荷区中编码的多肽的表达时，该启动子被认为是有效的。

[0178] 在一个实施方案中，启动子是当其在待靶向的细胞中驱动表达时被认为有效的启动子。

[0179] 在一个实施方案中，启动子是对所靶向细胞具有嗜性的启动子。

[0180] 在一个实施方案中，启动子驱动有效载荷在靶组织中表达一段时间。由启动子驱动的表达可以持续1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1个星期、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2个星期、15天、16天、17天、18天、19天、20天、3个星期、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或多于10年。表达可以持续1-5小时、1-12小时、1-2天、1-5天、1-2个星期、1-3个星期、1-4个星期、1-2个月、1-4个月、1-6个月、2-6个月、3-6个月、3-9个月、4-8个月、6-12个月、1-2年、1-5年、2-5年、3-6年、3-8年、4-8年或5-10年。作为非限制性实例，启动子是用于在神经组织中持续表达有效载荷的弱启动子。

[0181] 在一个实施方案中，启动子驱动本发明的多肽的表达持续至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50年、55年、60年、65年或多于65年。

[0182] 启动子可以是天然存在的或非天然存在的。启动子的非限制性实例包括病毒启动子、植物启动子和哺乳动物启动子。在一些实施方案中，启动子可以是人启动子。在一些实施方案中，启动子可以被截短或突变。

[0183] 在大多数组织中驱动或启动表达的启动子包括但不限于人延伸因子1 α 亚基（EF1 α ）、巨细胞病毒（CMV）立即早期增强子和/或启动子、鸡 β -肌动蛋白（CBA）及其衍生物CAG、 β

葡萄糖醛酸苷酸酶 (GUSB) 或泛素C (UBC)。组织特异性表达元件可用于将表达限制于某些细胞类型,例如但不限于肌肉特异性启动子、B细胞启动子、单核细胞启动子、白细胞启动子、巨噬细胞启动子、胰腺腺泡细胞启动子、内皮细胞启动子、肺组织启动子、星形胶质细胞启动子或神经系统启动子,其可用于将表达限制于神经元或神经元的亚型、星形胶质细胞或少突胶质细胞。

[0184] 肌肉特异性启动子的非限制性实例包括哺乳动物肌肉肌酸激酶 (MCK) 启动子、哺乳动物结蛋白 (DES) 启动子、哺乳动物肌钙蛋白I (TNNI2) 启动子和哺乳动物骨骼 α -肌动蛋白 (ASKA) 启动子 (参见例如美国专利申请公开号US 20110212529,其内容通过引用整体并入本文)。

[0185] 神经元的组织特异性表达元件的非限制性实例包括神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、血小板衍生生长因子B链 (PDGF- β)、突触蛋白 (Syn)、甲基-CpG结合蛋白2 (MeCP2)、 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶II (CaMKII)、代谢型谷氨酸受体2 (mGluR2)、神经丝轻肽 (neurofilament light, NFL) 或神经丝重肽 (neurofilament heavy, NFH)、 β -球蛋白小基因n β 2、前脑啡肽原 (PPE)、脑啡肽 (Enk) 和兴奋性氨基酸转运蛋白2 (EAAT2) 启动子。星形胶质细胞的组织特异性表达元件的非限制性实例包括神经胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) 和EAAT2启动子。少突胶质细胞的组织特异性表达元件的非限制性实例包括髓鞘碱性蛋白 (MBP) 启动子。

[0186] 在一个实施方案中,启动子可以小于1kb。启动子的长度可以是200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800或更多于800个核苷酸。启动子的长度可以是200-300、200-400、200-500、200-600、200-700、200-800、300-400、300-500、300-600、300-700、300-800、400-500、400-600、400-700、400-800、500-600、500-700、500-800、600-700、600-800或700-800。

[0187] 在一个实施方案中,启动子可以是相同或不同的起始或亲本启动子的两个或更多个组分的组合,例如但不限于CMV和CBA。每个组分的长度可以是200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800或更多于800。每个组分的长度可以是200-300、200-400、200-500、200-600、200-700、200-800、300-400、300-500、300-600、300-700、300-800、400-500、400-600、400-700、400-800、500-600、500-700、500-800、600-700、600-800或700-800。在一个实施方案中,启动子是382个核苷酸的CMV-增强子序列和260个核苷酸的CBA-启动子序列的组合。

[0188] 在一个实施方案中,病毒基因组包含遍在启动子。遍在启动子的非限制性实例包括CMV、CBA (包括衍生物CAG、CBh等)、EF-1 α 、PGK、UBC、GUSB (hGBp) 和UCOE (HNRPA2B1-CBX3的启动子)。

[0189] Yu等人 (Molecular Pain 2011, 7:63;其内容通过引用整体并入本文) 使用慢病毒载体评估了eGFP在大鼠DRG细胞和原代DRG细胞中在CAG、EF1 α 、PGK和UBC启动子下的表达,

发现UBC显示出比其他3种启动子更弱的表达,并且所有启动子仅观察到10-12%的神经胶质表达。Soderblom等人(E. Neuro 2015, 2 (2) :ENEURO.0001-15;其内容通过引用整体并入本文)评价了在运动皮层注射后,eGFP在具有CMV和UBC启动子的AAV8中和在具有CMV启动子的AAV2中的表达。鼻内施用含有UBC或EF1 α 启动子的质粒显示比用CMV启动子表达更强的持续气道表达(参见,例如,Gill等人, Gene Therapy 2001, 第8卷, 1539-1546;其内容为通过引用整体并入本文)。Husain等人(Gene Therapy 2009, 16 (7) :927-932;其内容通过引用整体并入本文)评估了具有hGUSB启动子、HSV-1LAT启动子和NSE启动子的HPH构建体,并且发现HPH构建体在小鼠脑中显示出比NSE弱的表达。Passini和Wolfe(J. Virol. 2001, 12382-12392,其内容通过引用整体并入本文)评估了在新生小鼠脑室内注射后HPH载体的长期作用,并发现其持续表达至少一年。Xu等人(Gene Therapy 2001, 8, 1323-1332;其内容通过引用整体并入本文)发现,与CMV-lacZ、CMV-luc、EF、GFAP、hENK、nAChR、PPE、PPE+wpre、NSE (0.3kb)、NSE (1.8kb) 和NSE (1.8kb+wpre) 相比,当使用NFL和NFH启动子时,在所有脑区域中表达低。Xu等人发现启动子活性按照降序是NSE (1.8kb)、EF、NSE (0.3kb)、GFAP、CMV、hENK、PPE、NFL和NFH。NFL是一个650个核苷酸的启动子,而NFH是一个920个核苷酸的启动子,它们在肝脏中都不存在,但是NFH在感觉本体感受神经元、大脑和脊髓中含量丰富,并且NFH存在于心脏中。SCN8A是一个470个核苷酸的启动子,可在整个DRG、脊髓和脑中表达,并在海马体神经元和小脑浦肯野细胞、皮层、丘脑和下丘脑中表现出特别高的表达(参见例如Drews等人, Identification of evolutionary conserved, functional noncoding elements in the promoter region of the sodium channel gene SCN8A, Mamm Genome (2007) 18:723-731;和Raymond等人, Expression of Alternatively Spliced Sodium Channel α -subunit genes, Journal of Biological Chemistry (2004) 279 (44) 46234-46241;其全部内容通过引用整体并入本文)。

[0190] 由前述Yu、Soderblom、Gill、Husain、Passini、Xu、Drews或Raymond教导的任何启动子都可以用于本发明。

[0191] 在一个实施方案中,启动子不是细胞特异性的。

[0192] 在一个实施方案中,该启动子是泛素c (UBC) 启动子。UBC启动子可以具有300-350个核苷酸的大小。作为非限制性实例,UBC启动子的长度是332个核苷酸。

[0193] 在一个实施方案中,启动子是 β -葡糖醛酸糖苷酶 (GUSB) 启动子。GUSB启动子的大小可以是350-400个核苷酸。作为非限制性实例,GUSB启动子的长度是378个核苷酸。

[0194] 在一个实施方案中,启动子是神经丝轻肽 (NFL) 启动子。NFL启动子可以具有600-700个核苷酸的大小。作为非限制性实例,NFL启动子的长度是650个核苷酸。

[0195] 在一个实施方案中,启动子是神经丝重肽 (NFH) 启动子。NFH启动子可以具有900-950个核苷酸的大小。作为非限制性实例,NFH启动子的长度为920个核苷酸。

[0196] 在一个实施方案中,启动子是SCN8A启动子。SCN8A启动子的大小可以是450-500个核苷酸。作为非限制性实例,SCN8A启动子的长度为470个核苷酸。

[0197] 在一个实施方案中,启动子是Frataxin (FXN) 启动子。

[0198] 在一个实施方案中,启动子是磷酸甘油酸激酶1 (PGK) 启动子。

[0199] 在一个实施方案中,启动子是鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子。

[0200] 在一个实施方案中,启动子是巨细胞病毒 (CMV) 启动子。

- [0201] 在一个实施方案中,启动子是H1启动子。
- [0202] 在一个实施方案中,启动子是工程化启动子。
- [0203] 在一个实施方案中,启动子是肝或骨骼肌启动子。肝启动子的非限制性实例包括人 α -1-抗胰蛋白酶(hAAT)和甲状腺素结合球蛋白(TBG)。骨骼肌启动子的非限制性实例包括结蛋白、MCK或合成C5-12。
- [0204] 在一个实施方案中,启动子是RNApol III启动子。作为非限制性实例,RNApol III启动子是U6。作为非限制性实例,RNApol III启动子是H1。
- [0205] 在一个实施方案中,启动子是心肌细胞特异性启动子。心肌细胞特异性启动子的非限制性实例包括 α MHC、cTnT和CMV-MLC2k。
- [0206] 在一个实施方案中,病毒基因组包含两个启动子。作为非限制性实例,启动子是EF1 α 启动子和CMV启动子。
- [0207] 在一个实施方案中,病毒基因组包含增强子元件、启动子和/或5' UTR内含子。增强子元件,在本文中也称为“增强子”,可以是但不限于CMV增强子,启动子可以是但不限于CMV、CBA、UBC、GUSB、NSE、突触蛋白、MeCP2和GFAP启动子,并且5' UTR/内含子可以是但不限于SV40和CBA-MVM。作为非限制性实例,组合使用的增强子、启动子和/或内含子可以是:(1) CMV增强子、CMV启动子、SV40 5' UTR内含子;(2) CMV增强子、CBA启动子、SV 40 5' UTR内含子;(3) CMV增强子、CBA启动子、CBA-MVM 5' UTR内含子;(4) UBC启动子;(5) GUSB启动子;(6) NSE启动子;(7) 突触蛋白启动子;(8) MeCP2启动子和(9) GFAP启动子。
- [0208] 在一个实施方案中,病毒基因组包含工程化启动子。
- [0209] 在另一个实施方案中,病毒基因组包含来自天然表达的蛋白的启动子。
- [0210] 病毒基因组组分:非翻译区(UTR)
- [0211] 根据定义,基因的野生型未翻译区(UTR)被转录但未翻译。通常,5' UTR在转录起始位点开始并在起始密码子处终止,3' UTR在终止密码子后立即开始,并一直持续到转录终止信号为止。
- [0212] 通常在特定靶器官的大量表达基因中发现的特征可以被工程化为UTR,以增强稳定性和蛋白产生。作为非限制性实例,来自正常在肝脏中表达的mRNA(例如白蛋白、血清淀粉样蛋白A、载脂蛋白A/B/E、转铁蛋白、 α 甲胎蛋白、促红细胞生成素或因子VIII)的5' UTR可以用在本发明的AAV颗粒的病毒基因组中,以增强在肝细胞系或肝脏中的表达。
- [0213] 尽管不希望受到理论的束缚,野生型5' 非翻译区(UTR)包含在翻译起始中起作用的特征。通常已知参与核糖体启动许多基因翻译的过程的Kozak序列通常包含在5' UTR中。Kozak序列具有共有CCR(A/G)CCAUGG,其中R是起始密码子(ATG)上游3个碱基的嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤),其后是另一个'G'。
- [0214] 在一个实施方案中,病毒基因组中的5' UTR包含Kozak序列。
- [0215] 在一个实施方案中,病毒基因组中的5' UTR不包含Kozak序列。
- [0216] 尽管不希望受到理论的束缚,已知野生型3' UTR具有嵌入其中的一段腺苷和尿苷。这些富含AU的特征在高周转率的基因中特别普遍。基于它们的序列特征和功能特性,富含AU的元件(ARE)可以分为三类(Chen等人,1995,其内容通过引用整体并入本文):I类ARE,例如但不限于c-Myc和MyoD,在富含U的区域内包含数个AUUUA基序的分散拷贝。II类ARE,例如但不限于GM-CSF和TNF- α ,具有两个或多个重叠的UUAUUUA(U/A)(U/A)九聚体。III类ARE的

定义不太明确,例如但不限于c-Jun和生肌蛋白(myogenin)。这些富含U的区域不包含AUUUA基序。已知大多数与ARE结合的蛋白都会使信使不稳定,而ELAV家族的成员(最值得注意的是HuR)已被证明可以增加mRNA的稳定性。HuR绑定到所有三类的ARE。将HuR特异性结合位点工程化到核酸分子的3' UTR中将导致HuR结合,并且从而使体内信息稳定。

[0217] 可以使用3' UTR富含AU的元件(ARE)的引入、去除或修饰来调节多核苷酸的稳定性。当工程化特定多核苷酸,例如病毒基因组的有效载荷区时,可以引入一个或多个ARE拷贝,以使多核苷酸的稳定性降低,从而减少翻译并降低所得蛋白的生产。同样,可以识别并去除或突变ARE,以增加细胞内稳定性,并且从而增加所得蛋白的翻译和生产。

[0218] 在一个实施方案中,病毒基因组的3' UTR可以包含寡聚(dT)序列,用于模板化添加poly-A尾。

[0219] 在一个实施方案中,病毒基因组可以包含至少一个miRNA种子、结合位点或完整序列。microRNA(或miRNA或miR)是19-25个核苷酸的非编码RNA,可与核酸靶位点结合并通过降低核酸分子的稳定性或抑制翻译来下调基因表达。microRNA序列包含“种子”区域,即成熟microRNA的2-8位区域中的序列,该序列与核酸的miRNA靶序列具有完美的Watson-Crick互补性。

[0220] 在一个实施方案中,可以对病毒基因组工程化以包含、改变或去除至少一个miRNA结合位点、全长序列或种子区域。

[0221] 可将来自本领域已知的任何基因的任何UTR引入AAV颗粒的病毒基因组中。这些UTR或其部分可以以与在选择它们的基因中相同的方向放置,或者可以改变方向或位置。在一个实施方案中,可以将AAV颗粒的病毒基因组中使用的UTR反转、缩短、延长、用本领域已知的一种或多种其他5' UTR或3' UTR制成。如本文所使用的,术语“改变”在涉及UTR时,表示相对于参考序列已经以某种方式改变了UTR。例如,可以通过如上所述的方向或位置的改变来相对于野生型或天然UTR改变3' 或5' UTR,或者可以通过包含额外的核苷酸、核苷酸的缺失、核苷酸的交换或转座来改变3' 或5' UTR。

[0222] 在一个实施方案中,AAV颗粒的病毒基因组包含至少一种人工UTR,其不是野生型UTR的变体。

[0223] 在一个实施方案中,AAV颗粒的病毒基因组包含UTR,该UTR选自其蛋白具有共同功能、结构、特征或特性的转录物家族。

[0224] 病毒基因组组分:聚腺苷酸化序列

[0225] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的病毒基因组包含至少一个聚腺苷酸化序列。AAV颗粒的病毒基因组可以在有效载荷编码序列的3' 端与3' ITR的5' 端之间包含聚腺苷酸化序列。

[0226] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列或“polyA序列”的长度范围可以从不存在到约500个核苷酸。聚腺苷酸化序列的长度可以是但不限于1、2、3、4、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、

129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499和500个核苷酸。

[0227] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是50-100个核苷酸。

[0228] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是50-150个核苷酸。

[0229] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是50-160个核苷酸。

[0230] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是50-200个核苷酸。

[0231] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是60-100个核苷酸。

[0232] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是60-150个核苷酸。

[0233] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是60-160个核苷酸。

[0234] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是60-200个核苷酸。

[0235] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是70-100个核苷酸。

[0236] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是70-150个核苷酸。

[0237] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是70-160个核苷酸。

[0238] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是70-200个核苷酸。

[0239] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是80-100个核苷酸。

[0240] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是80-150个核苷酸。

[0241] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是80-160个核苷酸。

[0242] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是80-200个核苷酸。

[0243] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是90-100个核苷酸。

[0244] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是90-150个核苷酸。

[0245] 在一个实施方案中，聚腺苷酸化序列的长度是90-160个核苷酸。

[0246] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是90-200个核苷酸。

[0247] 病毒基因组组分:内含子

[0248] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的病毒基因组包含至少一种增强转基因靶标特异性和表达的元件(参见例如Powell等人,Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy, Discov.Med,2015,19(102):49-57,其内容通过引用整体并入本文),例如内含子。内含子的非限制性实例包括MVM(67-97bp)、F.IX截短内含子1(300bp)、 β -球蛋白SD/免疫球蛋白重链剪接受体(250bp)、腺病毒剪接供体/免疫球蛋白剪接受体(500bp)、SV40晚期剪接供体/剪接受体(19S/16S)(180bp)和杂种腺病毒剪接供体/IgG剪接受体(230bp)。

[0249] 在一个实施方案中,内含子或内含子部分的长度可以是100-500个核苷酸。内含子的长度可以是80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490或500个核苷酸。内含子的长度可以是80-100、80-120、80-140、80-160、80-180、80-200、80-250、80-300、80-350、80-400、80-450、80-500、200-300、200-400、200-500、300-400、300-500或400-500个核苷酸。

[0250] 病毒基因组组分:填充物序列

[0251] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的病毒基因组包含至少一种改善包装效率和表达的元件,例如填充物序列或填充序列。填充物序列的非限制性实例包括白蛋白和/或 α -1抗胰蛋白酶。可以操作任何已知的病毒、哺乳动物或植物序列以用作填充物序列。

[0252] 在一个实施方案中,填充物或填充序列的长度可以是约100-3500个核苷酸。填充物序列的长度可以是大约100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900或3000个核苷酸。

[0253] 病毒基因组组分:miRNA

[0254] 在一个实施方案中,病毒基因组包含至少一个编码miRNA以减少转基因在特定组织中表达的序列。miRNA及其靶向组织是本领域众所周知的。作为非限制性实例,可以在病毒基因组中编码miR-122miRNA以减少病毒基因组在肝脏中的表达。

[0255] AAV产生

[0256] 本发明提供了通过在病毒复制细胞中进行病毒基因组复制来产生细小病毒颗粒(例如AAV颗粒)的方法。

[0257] 根据本发明,将包含有效载荷区的病毒基因组整合到病毒复制细胞中产生的AAV颗粒中。制备AAV颗粒的方法在本领域中是众所周知的,并且描述于例如美国专利号US6204059、US5756283、US6258595、US6261551、US6270996、US6281010、US6365394、US6475769、US6482634、US6485966、US6943019、US6953690、US7022519、US7238526、US7291498和US7491508、US5064764、US6194191、US6566118、US8137948;或国际公布号W01996039530、W01998010088、W01999014354、W01999015685、W01999047691、W02000055342、W02000075353和W02001023597;Methods in Molecular Biology, ed.Richard, Humana Press, NJ(1995); O'Reilly等人, Baculovirus Expression Vectors,

ALaboratory Manual,Oxford Univ.Press(1994);Samulski等人,J.Vir.63:3822-8(1989);Kajigaya等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA88:4646-50(1991);Ruffing等人,J.Vir.66:6922-30(1992);Kimbauer等人,Vir.219:37-44(1996);Zhao等人,Vir.272:382-93(2000);其各自内容通过引用整体并入本文。在一个实施方案中,使用国际专利公开W02015191508中描述的方法制备AAV颗粒,其内容通过引用整体并入本文。

[0258] 通常用于产生重组AAV病毒颗粒的病毒复制细胞包括但不限于HEK293细胞、COS细胞、HeLa细胞、KB细胞和其他哺乳动物细胞系,如描述于美国专利号US6156303、US5387484、US5741683、US5691176和US5688676;美国专利申请公开号2002/0081721,和国际专利公开号W0 2000047757、W0 2000024916和W0 1996017947,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0259] 在一些实施方案中,本发明提供了一种生产具有增强的(增加的、提高的)转导效率的AAV颗粒的方法,该方法包括以下步骤:1)用杆粒载体和病毒构建体载体和/或AAV有效载荷构建体载体共转染感受态细菌细胞,2)分离所得的病毒构建体表达载体和AAV有效载荷构建体表达载体,并分别转染病毒复制细胞,3)分离并纯化所得的有效载荷和包含病毒构建体表达载体或AAV有效载荷构建体表达载体的病毒构建体颗粒;4)用AAV有效载荷和包含病毒构建体表达载体或AAV有效载荷构建体表达载体的病毒构建体颗粒共同感染病毒复制细胞,5)收获并纯化包含细小病毒基因组的病毒颗粒。

[0260] 在一些实施方案中,本发明提供了一种生产AAV颗粒的方法,其包括以下步骤:1)同时用有效载荷区、表达rep和cap基因的构建体和辅助构建体共转染哺乳动物细胞(例如但不限于HEK293细胞),2)收获并纯化包含病毒基因组的AAV颗粒。

[0261] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒的病毒基因组任选地编码可选择标志物。可选择标志物可以包括细胞表面标志物,例如在细胞表面表达的任何蛋白,包括但不限于受体、CD标志物、凝集素、整联蛋白或其截短形式。

[0262] 在一些实施方案中,可选择标志物报告基因描述于国际公开号W01996023810和W0 1996030540;Heim等人,Current Biology 2:178-182(1996);Heim等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1995);或Heim等人,Science373:663-664(1995);其各自内容通过引用整体并入本文。

[0263] 基因组大小

[0264] 在一个实施方案中,包含本文所述的有效载荷的AAV颗粒可以是单链或双链病毒基因组。病毒基因组的大小可以是小、中等、大或最大大小。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0265] 在一个实施方案中,包含本文所述的有效载荷的病毒基因组可以是小单链病毒基因组。小单链病毒基因组的大小可以是2.1至3.5kb,例如2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4和3.5kb。作为非限制性实例,小单链病毒基因组的大小可以是3.2kb。作为另一非限制性实例,小单链病毒基因组的大小可以是2.2kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0266] 在一个实施方案中,包含本文所述的有效载荷的病毒基因组可以是小双链病毒基因组。小双链病毒基因组的大小可以是1.3到1.7kb,例如约1.3、1.4、1.5、1.6和1.7kb。作为非限制性实例,小双链病毒基因组的大小可以是1.6kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0267] 在一个实施方案中,包含本文所述的有效载荷(例如多核苷酸、siRNA或dsRNA或miRNA)的病毒基因组可以是中等单链病毒基因组。中等单链病毒基因组的大小可以是3.6至4.3kb,例如约3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2和4.3kb。作为非限制性实例,中等单链病毒基因组的大小可以是4.0kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0268] 在一个实施方案中,包含本文所述的有效载荷的病毒基因组可以是中等双链病毒基因组。中等双链病毒基因组的大小可以是1.8至2.1kb,例如约1.8、1.9、2.0和2.1kb。作为非限制性实例,中等双链病毒基因组的大小可以是2.0kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0269] 在一个实施方案中,包含本文所述的有效载荷的病毒基因组可以是单链病毒基因组。单链病毒基因组的大小可能为4.4至6.0kb,例如约4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9和6.0kb。作为非限制性实例,单链病毒基因组的大小可以是4.7kb。作为另一个非限制性实例,单链病毒基因组的大小可以是4.8kb。作为又一个非限制性实例,单链病毒基因组的大小可以是6.0kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0270] 在一个实施方案中,包含本文所述的有效载荷的病毒基因组可以是双链病毒基因组。双链病毒基因组的大小可以是2.2至3.0kb,例如约2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9和3.0kb。作为非限制性实例,双链病毒基因组的大小可以是2.4kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0271] 本发明的有效载荷

[0272] 本公开的AAV颗粒包含至少一个有效载荷区。如本文所用,“有效载荷”或“有效载荷区”是指由病毒基因组编码或在其中的一个或多个多核苷酸或多核苷酸区,或这种多核苷酸或多核苷酸区的表达产物,例如转基因、编码多肽或多重多肽(multi-polypeptide)的多核苷酸,或调节性核酸(modulatory nucleic acid)或调控核酸(regulatory nucleic acid)。本发明的有效载荷通常编码调节性多核苷酸或其片段或变体。

[0273] 有效载荷区可以构建成反映与mRNA的天然组织相似或镜像的区域。

[0274] 有效载荷区可以包含编码和非编码核酸序列的组合。

[0275] 在一些实施方案中,AAV有效载荷区可以编码编码RNA或非编码RNA。

[0276] 在一个实施方案中,AAV颗粒包含具有有效载荷区的病毒基因组,该有效载荷区包含编码多于一种目标多肽的核酸序列。在这样的实施方案中,可以复制编码多于一种多肽的病毒基因组,并将其包装到病毒颗粒中。用包含多于一种多肽的病毒颗粒转导的靶细胞可以在单个细胞中表达每种多肽。

[0277] 在一个实施方案中,AAV有效载荷区可包含如图1所示的组分。有效载荷区110位于病毒基因组100内。在有效载荷区100的5'和/或3'端可以存在至少一个反向末端重复序列(ITR)120。在一个实施方案中,在有效载荷区内存在启动子区130、内含子区140和编码区150。

[0278] 当AAV颗粒有效载荷区编码多肽时,该多肽可以是肽或蛋白。作为非限制性实例,有效载荷区可以编码载脂蛋白E(APOE)的至少一个等位基因,例如但不限于ApoE2、ApoE3和/或ApoE4。作为第二非限制性实例,有效载荷区可以编码人或灵长类Frataxin或其片段或变体。作为另一个非限制性实例,有效载荷区可以编码抗体或其片段。作为另一个非限制

性实例,有效载荷区可以编码人AADC或其片段或变体。作为另一个非限制性实例,有效载荷区可以编码人ATP2A2或其片段或变体。作为另一实例,有效载荷区可以编码人S100A1或其片段或变体。编码本文所述的多肽的AAV病毒基因组可用于人类疾病、病毒、感染、兽医应用和各种体内和体外环境的领域。

[0279] 在一些实施方案中,AAV颗粒在医学领域中可用于治疗、预防、缓解或改善神经学疾病和/或病症。

[0280] 在一些实施方案中,AAV颗粒在医学领域中可用于治疗、预防、缓解或改善tau蛋白病。

[0281] 在一些实施方案中,AAV颗粒在医学领域中可用于治疗、预防、缓解或改善阿尔茨海默氏病。

[0282] 在一些实施方案中,AAV颗粒在医学领域中可用于治疗、预防、缓解或改善弗里德希氏共济失调或因Fratatin蛋白的丧失或部分丧失而引起的任何疾病。

[0283] 在一些实施方案中,AAV颗粒在医学领域中可用于治疗、预防、缓解或改善帕金森病。

[0284] 在一些实施方案中,AAV颗粒在医学领域中可用于治疗、预防、缓解或改善肌萎缩性侧索硬化。

[0285] 在一些实施方案中,AAV颗粒在医学领域中可用于治疗、预防、缓解或改善亨廷顿病。

[0286] 在一些实施方案中,AAV颗粒在医学领域中可用于治疗、预防、缓解或改善心血管疾病。

[0287] 多肽和变体的性质

[0288] 由本发明的病毒基因组的有效载荷区编码的氨基酸序列可以翻译为完整的多肽、多个多肽或多肽片段,其可以独立地由一个或多个核酸、核酸片段或上述任何变体编码。如本文所用,“多肽”是指最通常通过肽键连接在一起的氨基酸残基(天然或非天然)的聚合物。如本文所用,该术语是指任何大小、结构或功能的蛋白、多肽和肽。在某些情况下,编码的多肽小于约50个氨基酸,并且然后将该多肽称为肽。如果多肽是肽,则其长度将是至少约2、3、4或至少5个氨基酸残基。因此,多肽包括基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同系物、直系同源物、旁系同源物、片段和前述的其他等同物、变体和类似物。多肽可以是单分子,也可以是多分子复合物,例如二聚体、三聚体或四聚体。它们还可以包含单链或多链多肽,并且可以结合或连接。术语多肽还可以应用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物。

[0289] 术语“多肽变体”是指其氨基酸序列与初始序列或参考序列不同的分子。与初始序列或参考序列相比,氨基酸序列变体可在氨基酸序列内的某些位置具有取代、缺失和/或插入。通常,变体与初始序列或参考序列具有至少约50%的同一性(同源性),并且优选地,它们与初始序列或参考序列具有至少约80%,更优选至少约90%的同一性(同源性)。

[0290] 在一些实施方案中,提供了“变体模拟物”。如本文所用,术语“变体模拟物”是包含一个或多个模拟激活的序列的氨基酸的变体。例如,谷氨酸可以充当磷酸苏氨酸和/或磷酸丝氨酸的模拟物。或者,变体模拟物可导致失活或含有该模拟物的灭活产物,例如苯丙氨酸可作为酪氨酸的失活取代物;或丙氨酸可作为丝氨酸的失活取代物。

[0291] 术语“氨基酸序列变体”是指与初始或起始序列相比其氨基酸序列具有一些差异的分子。氨基酸序列变体可以在氨基酸序列内的某些位置具有取代、缺失和/或插入。“初始”或“起始”序列不应与野生型序列混淆。如本文所用，初始或起始序列是相对术语，是指可以与之进行比较的原始分子。“初始”或“起始”序列或分子可以代表野生型（在自然界中发现的序列），但不必须是野生型序列。

[0292] 通常，变体与初始序列具有至少约70%的同源性，并且优选地，它们与初始序列将具有至少约80%，更优选至少约90%的同源性。适用于氨基酸序列的“同源性”定义为比对序列并在必要时引入缺口以达到最大的同源性百分比之后，候选氨基酸序列中与第二个序列的氨基酸序列中的残基相同的残基所占的百分比。用于比对的方法和计算机程序在本领域中是众所周知的。可以理解，同源性取决于同一性百分比的计算，但是由于计算中引入的空缺和罚分，其可能有所不同。

[0293] 应用于氨基酸序列时，“同源物”是指与第二物种的第二序列具有实质同一性的其他物种的相应序列。

[0294] “类似物”是指包含差别为一个或多个氨基酸改变（例如，仍然保持亲本多肽特性的氨基酸残基的取代、添加或缺失）的多肽变体。

[0295] 可以将序列标签或氨基酸（例如一种或多种赖氨酸）添加到本发明的肽序列中（例如，在N-末端或C-末端）。序列标签可用于肽纯化或定位。赖氨酸可用于增加肽溶解度或允许生物素化。或者，可以任选地缺失位于肽或蛋白的氨基酸序列的羧基和氨基末端区域的氨基酸残基，以提供截短的序列。取决于序列的使用，随着例如该序列作为可溶的或连接至固体支持体的较大序列的一部分表达时，某些氨基酸（例如，C-末端或N-末端残基）可以可选择地缺失。

[0296] 当涉及蛋白时，“取代变体”是指在初始或起始序列中至少一个氨基酸残基被除去并且在相同位置处插入了不同氨基酸的蛋白。取代可以是单个取代，其中分子中只有一个氨基酸被取代，也可以是多个取代，其中在同一分子中两个或更多个氨基酸已被取代。

[0297] 如本文所用，术语“保守氨基酸取代”是指序列中通常存在的氨基酸被具有相似大小、电荷或极性的不同氨基酸取代。保守取代的实例包括用非极性（疏水）残基如异亮氨酸、缬氨酸和亮氨酸取代另一个非极性残基。同样，保守取代的实例包括一个极性（亲水）残基取代另一个，例如精氨酸和赖氨酸之间，谷氨酰胺和天冬酰胺之间以及甘氨酸和丝氨酸之间。另外，保守取代的另外实例是用碱性残基（如赖氨酸、精氨酸或组氨酸）取代另一个，或用一种酸性残基（如天冬氨酸或谷氨酸）取代另一种酸性残基。非保守取代的实例包括用非极性（疏水）氨基酸残基（如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸）取代极性（亲水）残基（如半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或赖氨酸）和/或极性残基取代非极性残基。

[0298] 当涉及蛋白时，“插入变体”是指在初始或起始序列中特定位置的氨基酸紧邻地插入一个或多个氨基酸的蛋白。与氨基酸“紧邻”是指与氨基酸的 α -羧基或 α -氨基官能团连接。

[0299] 当涉及蛋白时，“缺失变体”是在初始或起始氨基酸序列中一个或多个氨基酸被去除的蛋白。通常，缺失变体将在分子的特定区域中缺失一个或多个氨基酸。

[0300] 如本文所用，术语“衍生物”与术语“变体”同义使用，并且是指相对于参考分子或起始分子以任何方式被修饰或改变的分子。在一些实施方案中，衍生物包括已经用有机蛋

白或非蛋白衍生剂修饰的初始或起始蛋白,以及翻译后修饰。传统上,共价修饰是通过使蛋白的目标氨基酸残基与能够与所选的侧链或末端残基反应的有机衍生剂反应,或通过利用在所选重组宿主细胞中起作用的翻译后修饰机制来引入的。所得的共价衍生物可用于针对识别对生物学活性、免疫测定或制备用于重组糖蛋白的免疫亲和纯化的抗蛋白抗体重要的残基的程序。这样的修饰在本领域普通技术人员范围内,并且无需过度实验即可进行。

[0301] 某些翻译后修饰是重组宿主细胞对表达的多肽起作用的结果。谷氨酰氨酰基和天冬氨酰氨酰基残基经常被翻译后脱氨酰基化为相应的谷氨酰基和天冬氨酰残基。或者,这些残基在中等酸性条件下脱氨酰。这些残基的任何一种形式都可以存在于根据本发明使用的蛋白中。

[0302] 其他翻译后修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酰或苏氨酰残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T.E.Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H.Freeman&Co., San Francisco, pp.79-86 (1983))。

[0303] 当涉及蛋白时,“特征”被定义为分子的不同基于氨基酸序列的组成。本发明蛋白的特征包括表面表现、局部构象形状、折叠、环、半环、结构域、半结构域、位点、末端或其任何组合。

[0304] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“表面表现”是指出现在最外表面上的蛋白的基于多肽的成分。

[0305] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“局部构象形状”是指位于蛋白的可定义空间内的蛋白的基于多肽的结构表现。

[0306] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“折叠”是指在能量最小化时所得的氨基酸序列的构象。折叠可能发生在折叠过程的第二或第三级水平。二级水平折叠的实例包括 β 折叠和 α 螺旋。三级折叠的实例包括归因于能量的聚集和分离而形成的结构域和区域。以这种方式形成的区域包括疏水口袋和亲水口袋等。

[0307] 如本文所用,涉及蛋白构象时,术语“转角”是指改变肽或多肽的主链方向并可能涉及一个、两个、三个或更多个氨基酸残基的弯曲。

[0308] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“环”是指肽或多肽的结构特征,其反转肽或多肽的主链的方向并包含四个或更多个氨基酸残基。Oliva等人已经识别出至少5类蛋白环(*J.Mol Biol*, 266 (4):814-830;1997)。

[0309] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“半环”是指所识别的环的一部分,其具有源自其的环的氨基酸残基数目的至少一半。应当理解,环可能并不总是包含偶数个氨基酸残基。因此,在其中环包含或被识别为包含奇数个氨基酸的情况下,奇数环的一个半环将包含该环的整数部分或下一个整数部分(环的氨基酸数/2+/-0.5个氨基酸)。例如,识别为7氨基酸环的环可以产生3氨基酸或4氨基酸的半环($7/2=3.5+/-0.5$ 为3或4)。

[0310] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“结构域”是指具有一个或多个可识别的结构或功能特征或性质(例如结合能力,用作蛋白-蛋白相互作用的位点)的多肽的基序。

[0311] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“半结构域”是指已识别的结构域的一部分,其具有源自其的结构域的氨基酸残基数目的至少一半。应当理解,结构域可能并不总是包含偶数个氨基酸残基。因此,在其中结构域包含或被识别为包含奇数个氨基酸的情况下,奇数结

构域的半结构域将包含结构域的整数部分或下一个整数部分(结构域的氨基酸数/2+/-0.5个氨基酸)。例如,识别为7氨基酸结构域的结构域可产生3氨基酸或4氨基酸的半结构域($7/2=3.5+/-0.5$ 为3或4)。还应理解,可以在结构域或半结构域内识别子结构域,这些子结构域具有少于源自其的结构域或半结构域中识别的所有结构或功能性质。还应理解,包含本文任何结构域类型的氨基酸不必沿着多肽的主链是连续的(即,不相邻的氨基酸可以在结构上折叠以产生结构域、半结构域或子结构域)。

[0312] 如本文所用,当涉及蛋白时,与基于氨基酸的实施方案有关的术语“位点”与“氨基酸残基”和“氨基酸侧链”同义使用。位点代表可以在本发明的基于多肽的分子内被修饰、操纵、改变、衍生或变化的肽或多肽内的位置。

[0313] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“末端(termini或terminus)”是指肽或多肽的末端。这样的末端不仅限于肽或多肽的第一个或最后一个位点,还可以包含末端区域的其他氨基酸。本发明的基于多肽的分子可以被表征为具有N末端(末端为具有游离氨基(NH₂)的氨基酸)和C末端(末端为游离羧基的氨基酸(COOH))。在某些情况下,本发明的蛋白由通过二硫键或通过非共价力结合在一起的多条多肽链组成(多聚体、寡聚体)。这些蛋白将具有多个N和C末端。或者,可以修饰多肽的末端,以使得它们可以视情况以基于非多肽的部分例如有机缀合物开始或终止。

[0314] 一旦任何特征被识别或定义为本发明分子的组成,就可以通过移动、交换、反转、删除、随机化或复制来进行这些特征的任何几种操纵和/或修饰。此外,应理解,特征的操纵可导致与对本发明分子的修饰相同的结果。例如,涉及删除结构域的操作将导致分子长度的改变,就像修饰核酸以编码少于全长分子那样。

[0315] 修饰和操作可通过本领域已知的方法例如定点诱变来完成。然后可以使用体外或体内测定法,例如本文所述的测定法或本领域已知的任何其他合适的筛选测定法,来测试所得修饰分子的活性。

[0316] 有效载荷:编码目标蛋白的核酸

[0317] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含一种或多种编码目标蛋白的核酸序列。

[0318] 载脂蛋白E(APOE)

[0319] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区域包含一个或多个编码载脂蛋白E(APOE)基因的等位基因(例如,ApoE2、ApoE3和/或ApoE4)的核酸序列。

[0320] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含编码序列为MKVLWAALLVTFLAGCQA (SEQ ID NO:1722)的氨基酸信号肽的核酸序列。

[0321] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含编码序列为MSSGASRKSWDPGNPWWP DWPITGRKMKVLWAALLVTFLAGCQA (SEQ ID NO:1723)的氨基酸信号肽的核酸序列。

[0322] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含表2中所述的编码氨基酸序列的核酸序列或其片段或其变体。

[0323] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含表2中所述的核酸序列或其片段或其变体。

[0324] 表2.载脂蛋白E序列

[0325]

识别	参考	SEQ ID NO
APOE SEQ-001	ENSP00000252486 ; NP_000032.1 ; NP_001289618.1 ; NP_001289619.1 ; NP_001289620.1	1724
APOE SEQ-002	ENSP00000252486 ; NP_000032.1 ; NP_001289618.1 ; NP_001289619.1 ; NP_001289620.1; 成熟肽	1725
APOE SEQ-003	ENSP00000413135	1726
APOE SEQ-004	ENSP00000413135; 成熟肽	1727
APOE SEQ-005	ENSP00000413653	1728
APOE SEQ-006	ENSP00000413653; 成熟肽	1729
APOE SEQ-007	ENSP00000410423	1730
APOE SEQ-008	ENSP00000410423; 成熟肽	1731
APOE SEQ-009	NP_001289617.1	1732
APOE SEQ-010	NP_001289617.1; 成熟肽	1733
APOE SEQ-011	ENST00000252486.8	1734
APOE SEQ-012	CCDS12647.1 for ENST00000252486.8	1735
APOE SEQ-013	ENST00000446996.5	1736
APOE SEQ-014	ENST00000485628.2	1737
APOE SEQ-015	ENST00000434152.5	1738
APOE SEQ-016	ENST00000425718.1	1739
APOE SEQ-017	NM_000041.3	1740
APOE SEQ-018	NM_001302689.1	1741
APOE SEQ-019	NM_001302690.1	1742
APOE SEQ-020	NM_001302691.1	1743
APOE SEQ-021	NM_001302688.1	1744

[0326] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含一种或多种编码SEQ ID NO:1724的一个或多个变体的核酸序列。该变体可以包含但不限于一个或多个以下变体: E21K (SEQ ID NO:1724的第21位的氨基酸E (Glu) 变为K (Lys))、E31K (SEQ ID NO:1724的第31位的氨基酸E (Glu) 变为K (Lys))、R43C (SEQ ID NO:1724的第43位的氨基酸R (Arg) 变为C (Cys))、L46P (SEQ ID NO:1724的第46位的氨基酸L (Leu) 变为P (Pro))、T60A (SEQ ID NO:1724的第60位的氨基酸T (Thr) 变为A (Ala))、Q64H (SEQ ID NO:1724的第64位的氨基酸Q (Gln) 变为H (His))、Q99K (SEQ ID NO:1724的第99位的氨基酸Q (Gln) 变为K (Lys))、P102R (SEQ ID NO:1724的第102位的氨基酸P (Pro) 变为R (Arg))、A117T (SEQ ID NO:1724的第117位的氨基

酸A (Ala) 变为T (Thr))、A124V (SEQ ID NO:1724的第124位的氨基酸A (Ala) 变为V (Val))、C130R (SEQ ID NO:1724的第130位的氨基酸C (Cys) 变为R (Arg))、G145D (SEQ ID NO:1724的第145位的氨基酸G (Gly) 变为D (Asp))、G145GEVQAMLG (SEQ ID NO:1724的位置145氨基酸G (Gly) 变为GEVQAMLG (Gly-Glu-Val-Gln-Ala-Met-Leu-Gly))、R152Q (SEQ ID NO:1724的第152位的氨基酸R (Arg) 变为Q (Gln))、R154C (SEQ ID NO:1724的第154位的氨基酸R (Arg) 变为C (Cys))、R154S (SEQ ID NO:1724的第154位的氨基酸R (Arg) 变为S (Ser))、R160C (SEQ ID NO:1724的第160位的氨基酸R (Arg) 变为C (Cys))、R163H (SEQ ID NO:1724的第163位的氨基酸R (Arg) 变为H (His))、R163P (SEQ ID NO:1724的第163位的氨基酸R (Arg) 变为P (Pro))、K164E (SEQ ID NO:1724的第164位的氨基酸K (Lys) 变为E (Glu))、K164Q (SEQ ID NO:1724的第164位的氨基酸K (Lys) 变为Q (Gln))、A170P (SEQ ID NO:1724的第170位的氨基酸A (Ala) 变为P (Pro))、R176C (SEQ ID NO:1724的第176位的氨基酸R (Arg) 变为C (Cys))、R242Q (SEQ ID NO:1724的第242位的氨基酸R (Arg) 变为Q (Gln))、R246C (SEQ ID NO:1724的第246位的氨基酸R (Arg) 变为C (Cys))、V254E (SEQ ID NO:1724的第254位的氨基酸V (Val) 变为E (Glu))、EE262-263KK (SEQ ID NO:1724的第262-263位的氨基酸EE (Glu-Glu) 变为KK (Lys-Lys))、R269G (SEQ ID NO:1724的第269位的氨基酸R (Arg) 变为G (Gly))、L270E (SEQ ID NO:1724的第270位的氨基酸L (Leu) 变为E (Glu))、R292H (SEQ ID NO:1724中的第292位的氨基酸R (Arg) 变为H (His))、S314R (SEQ ID NO:1724的第314位的氨基酸S (Ser) 变为R (Arg))、去除氨基酸167,或其组合。作为非限制性实例,AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码氨基酸序列的核酸序列,其中SEQ ID NO:1724的第130位的氨基酸C (Cys) 变为R (Arg)。作为非限制性实例,AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码氨基酸序列的核酸序列,该核酸序列编码一种氨基酸序列,其中SEQ ID NO:1724的第176位的氨基酸R (Arg) 变为C (Cys)。作为非限制性实例,AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码氨基酸序列的核酸序列,其中SEQ ID NO:1724的第130位的氨基酸C (Cys) 变为R,并且SEQ ID NO:1724的第176位的氨基酸R (Arg) 变为C (Cys)。

[0327] 在一些实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码ApoE分子的核酸序列,该ApoE分子包含如SEQ ID NO:1722或1723中给出的信号肽序列。作为非限制性实例,可在细胞加工期间切割信号肽以产生如SEQ ID NO:1725、1727、1729、1731和1733中给出的成熟肽。或者,AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码缺少信号肽序列的ApoE分子的核酸序列,如SEQ ID NO:1725、1727、1729、1731和1733中给出的。

[0328] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含编码SEQ ID NO:1725一个或多个变体的一个或多个核酸序列。变体可以包含但不限于一个或多个变体:C112R (SEQ ID NO:1725的第112位的氨基酸C (Cys) 变为R (Arg))或R158C (SEQ ID NO:1725的第158位的氨基酸R (Arg) 变为C (Cys))。

[0329] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码ApoE2的核酸序列(cys12、cys158)。

[0330] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码ApoE3的核酸序列(cys12、arg158)。

[0331] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码ApoE4的核酸序列(arg112、arg158)。

[0332] Frataxin (FXN)

[0333] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码Frataxin (FXN) 的核酸序列。

[0334] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含表3中所述的编码氨基酸序列的核酸序列或其片段或其变体。

[0335] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含表3中所述的核酸序列或其片段或其变体。

[0336] 表3. Frataxin序列

识别	参考	SEQ ID NO
FXN SEQ-001	NP_000135.2	1745
FXN SEQ-002	NP_852090.1	1746
FXN SEQ-003	NP_001155178.1	1747
FXN SEQ-004	NM_000144.4	1748
FXN SEQ-005	NM_181425.2	1749
FXN SEQ-006	NM_001161706.1	1750

[0338] 芳族L-氨基酸脱羧酶 (AADC)

[0339] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码芳族L-氨基酸脱羧酶 (AADC) 的核酸序列。

[0340] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含表4中所述的编码氨基酸序列的核酸序列或其片段或其变体。

[0341] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含表4中所述的核酸序列或其片段或其变体。

[0342] 表4. 芳族L-氨基酸脱羧酶序列

识别	参考	SEQ ID NO
AADC SEQ-001	NP_000781.1	1751
AADC SEQ-002	NM_000790.3	1752

[0344] ATP酶肌浆/内质网Ca²⁺转运2 (ATP2A2)

[0345] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码ATP酶肌浆/内质网Ca²⁺转运2 (ATP2A2) 的核酸序列。

[0346] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含表5中所述的编码氨基酸序列的核酸序列或其片段或其变体。

[0347] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含表5中所述的核酸序列或其片段或其变体。

[0348] 表5. ATP酶肌浆/内质网Ca²⁺转运2

识别	参考	SEQ ID NO
ATP2A2SEQ-001	NP_001672.1	1803
ATP2A2SEQ-002	NP_733765.1	1804
ATP2A2SEQ-003	NM_001681.3	1805

ATP2A2SEQ-004	NM_170665.3	1806
---------------	-------------	------

[0350] S100钙结合蛋白A1 (S100A1)

[0351] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个编码S100钙结合蛋白A1 (S100A1) 的核酸序列。

[0352] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含表6中所述的编码氨基酸序列的核酸序列或其片段或其变体。

[0353] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含表6中所述的核酸序列或其片段或其变体。

[0354] 表6. S100钙结合蛋白A1

识别	参考	SEQ ID NO
S100A1SEQ-001	NP_006262.1	1807
S100A1SEQ-002	NM_006271.1	1808

[0356] 抗Tau配对螺旋丝 (Tau-PHF) 抗体

[0357] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含一个或多个核酸序列, 该核酸序列编码对由异常折叠的Tau蛋白形成的成对螺旋丝 (PHF) (Tau-PHF) 具有特异性的抗体的重链和/或轻链。有效载荷区还可以包含一个或多个编码接头区的核酸序列, 该接头区位于编码重链和轻链的核酸序列之间。作为非限制性实例, 接头区包含弗林蛋白酶切割识别序列 (核酸序列示为SEQ ID NO:1811) 和/或2A顺式作用水解酶元件 (核酸序列示为SEQ ID NO:1812)。作为非限制性实例, 接头区的核酸序列是SEQ ID NO:1813。作为非限制性实例, 与Tau配对螺旋丝特异性结合的抗体是PHF-1。PHF-1抗体可包含如本公开中教导的重链和轻链。

[0358] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含表7中所述的编码氨基酸序列的核酸序列或其片段或其变体。

[0359] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含表7中所述的核酸序列或其片段或其变体。

[0360] 表7. 抗Tau配对螺旋丝抗体

识别	参考	SEQ ID NO
PHF-1SEQ-001	重链	1814
PHF-1SEQ-002	轻链	1815

[0362] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含核酸序列SEQ ID NO:1816, 其包含(5'至3') kozak (SEQ ID NO:1817)、重链 (SEQ ID NO:1814)、接头区 (其包含弗林蛋白酶切割识别序列 (SEQ ID NO:1811) 和2A顺式作用水解酶元件序列 (SEQ ID NO:1812))、PHF-1的轻链序列 (SEQ ID NO:1812) 和终止密码子TAG, 如W02015035190的图5A中所述, 其内容通过引用整体并入本文。

[0363] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含核酸序列SEQ ID NO:1818, 其包含(5'至3') kozak (SEQ ID NO:1817)、轻链 (SEQ ID NO:1815)、接头区 (包含弗林蛋白酶切割识别序列 (SEQ ID NO:1811) 和2A顺式作用水解酶元件序列 (SEQ ID NO:1812))、PHF-1的重链 (SEQ ID NO:1814), 和终止密码子TAG。

[0364] 在一个实施方案中, AAV颗粒的有效载荷区包含编码如W02015035190的图5A中教

导的PHF-1的重链和/或轻链的核酸,其内容通过引用整体并入本文,其中W02015035190中PHF-1的重链和/或轻链已被改变(例如,修饰和/或突变)。该序列可以被突变或修饰以改变分子的状态或结构。作为非限制性实例,该序列可以包含氨基酸的添加、氨基酸的取代和/或氨基酸的缺失。

[0365] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含编码PHF-1的轻链的核酸,其中轻链序列已被改变以在轻链氨基酸序列的开始处去除第二甲硫氨酸。作为非限制性实例,AAV颗粒的有效载荷区包含编码氨基酸序列的核酸,该氨基酸序列编码表8所示的PHF-1的轻链。

[0366] 表8. 抗Tau配对螺旋丝抗体

[0367]

识别	参考	SEQ ID NO
PHF-1SEQ-003	轻链	1819

[0368] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含核酸序列SEQ ID NO:1820,其包含(5'至3')kozak (SEQ ID NO:1817)、重链 (SEQ ID NO:1814)、接头区(包含弗林蛋白酶切割识别序列 (SEQ ID NO:1811) 和2A顺式作用水解酶元件序列 (SEQ ID NO:1812))、轻链序列 (SEQ ID NO:1819,在PHF-1轻链序列5'末端具有一个密码子“ATG”)和终止密码子TAG。

[0369] 在一个实施方案中,AAV颗粒的有效载荷区包含核酸序列SEQ ID NO:1821,其包含(5'至3')kozak (SEQ ID NO:1817)、轻链序列 (SEQ ID NO:1819,在轻链序列5'末端具有一个密码子“ATG”)、接头区(包含弗林蛋白酶切割识别序列 (SEQ ID NO:1811) 和2A顺式作用水解酶元件序列 (SEQ ID NO:1812))、PHF-1的重链 (SEQ ID NO:1814) 和终止密码子TAG。

[0370] 有效载荷:调节性多核苷酸作为有效载荷

[0371] 本公开的AAV颗粒包含至少一个有效载荷区域,所述有效载荷区域包含一个或多个调节性多核苷酸,例如作为治疗剂的RNA或DNA分子。实例性调节性多核苷酸可以是miRNA、dsRNA和siRNA双链体。RNA干扰介导的基因沉默可以特异性地抑制靶向基因的表达。然后,本发明提供了靶向目标基因的小双链RNA(dsRNA)分子(小干扰RNA,siRNA),包含此类siRNA的药物组合物及其设计方法。本发明还提供了其用于抑制目标基因的基因表达和蛋白产生以治疗神经学疾病的方法。

[0372] 本发明提供了靶向目标基因的mRNA以干扰基因表达和/或蛋白产生的小干扰RNA(siRNA)双链体(和编码它们的调节性多核苷酸)。

[0373] 在一个实施方案中,本发明的siRNA双链体可以沿着其各自核苷酸序列的任何片段靶向目标基因。

[0374] 在一个实施方案中,本发明的siRNA双链体可以将目标基因靶向在核苷酸序列内的单核苷酸多态性(SNP)或变体的位置。

[0375] 在一些实施方案中,将编码此类siRNA分子或siRNA分子的单链的核酸序列插入AAV颗粒的病毒基因组中,并引入细胞,特别是中枢神经系统的细胞中。

[0376] 因为几个独特的特征,已经针对siRNA递送研究了AAV载体。所述特征的非限制性实例包括(i)感染分裂的细胞和非分裂的细胞的能力;(ii)侵染性的广宿主范围,包括人细胞;(iii)野生型AAV尚未与任何疾病相关,且尚未被证实在受感染的细胞中复制;(iv)细胞介导的针对载体的免疫应答的缺乏,和(v)在宿主染色体中的不整合性质,由此减少长期表达的可能。此外,AAV载体感染对改变细胞基因表达模式均仅具有微小影响(Stilwell和

Samulski等人,Biotechniques,2003,34,148-150;其内容通过引用整体并入本文)。

[0377] 本发明的编码的siRNA双链体包含杂交在一起形成双链体结构的反义链和有义链,其中反义链与靶基因的核酸序列互补,并且其中有义链与靶基因的核酸序列同源。在一些方面,反义链的5'末端具有5'磷酸基团,而有义链的3'末端包含3'羟基基团。在其他方面,在每条链的3'末端没有核苷酸突出端、具有一个或两个核苷酸突出端。

[0378] 根据本发明,靶向目标基因的siRNA双链体的每条链的长度为约19至25、19至24或19至21个核苷酸,优选约19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸或25个核苷酸。在一些方面,siRNA可以是未修饰的RNA分子。

[0379] 在其他方面,siRNA可以包含至少一个修饰的核苷酸,例如碱基、糖或主链修饰。

[0380] 在一个实施方案中,siRNA或dsRNA包含至少两条彼此互补的序列。dsRNA包含具有第一序列的有义链和具有第二序列的反义链。反义链包含与编码靶基因的mRNA的至少一部分基本互补的核苷酸序列,并且互补区域的长度为30个核苷酸或更少并且至少15个核苷酸。通常,dsRNA的长度为19至25、19至24或19至21个核苷酸。在一些实施方案中,dsRNA的长度为约15至约25个核苷酸,在其他实施方案中,dsRNA的长度为约25至约30个核苷酸。在一些实施方案中,dsRNA的长度为约15个核苷酸,长度为16个核苷酸,长度为17个核苷酸,长度为18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、长度为24个核苷酸,长度为25个核苷酸,长度为26个核苷酸,长度为27个核苷酸,长度为28个核苷酸,长度为29个核苷酸,或长度为30个核苷酸。

[0381] 与表达靶蛋白的细胞接触后,在例如通过本文所述的方法测定时,无论是直接施用还是在表达载体中编码的dsRNA将蛋白表达抑制了至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%或至少40%或更多。

[0382] 根据本发明,设计并测试了siRNA双链体或dsRNA分子在培养细胞中减少靶基因表达的能力(例如,靶基因的mRNA水平)。siRNA设计工具在本领域中是可用的。可以使用任何商业软件来设计针对目标基因的siRNA双链体。

[0383] 根据本发明,产生了包含有效载荷区的AAV颗粒,所述有效载荷区具有siRNA双链体的核酸、siRNA双链体的一条链或靶向目标基因的dsRNA,所述AAV颗粒的血清型可以是或可以包括衣壳和/或肽插入物,例如但不限于VOY101、VOY201、AAVPHP.B(PHP.B)、AAVPHP.A(PHP.A)、AAVG2B-26、AAVG2B-13、AAVTH1.1-32、AAVTH1.1-35、AAVPHP.B2(PHP.B2)、AAVPHP.B3(PHP.B3)、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP(3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3(G2A3)、AAVG2B4(G2B4)、AAVG2B5(G2B5)、PHP.S、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、

AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、AAAV、BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhEr1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhEr1.23、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV改组100-1、AAV改组100-3、AAV改组100-7、AAV改组10-2、AAV改组10-6、AAV改组10-8、AAV改组100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61AAV、BNP62AAV、BNP63AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、

AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真型AAV(ttAAV)、UPENN AAV 10、日本AAV 10血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AAV CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6.10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv1-1、AAV Clv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV Clv1-7、AAV Clv1-8、AAV Clv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8和/或AAVF9/HSC9,及其变体。

[0384] 在一个实施方案中,siRNA双链体或编码的dsRNA分子可用于将靶蛋白的表达降低至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,靶蛋白表达的表达可降低50-90%。

[0385] 在一个实施方案中,siRNA双链体或编码的dsRNA分子可用于将靶mRNA的表达降低至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-

95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,靶mRNA表达的降低可降低50-90%。

[0386] 在一个实施方案中,siRNA双链体或编码的dsRNA分子可用于降低CNS的至少一个区域中的靶蛋白和/或mRNA的表达。在CNS的至少一个区域中,靶蛋白和/或mRNA的表达降低至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,神经元(例如皮层神经元)中靶蛋白和mRNA的表达降低了50-90%。作为非限制性实例,神经元(例如,皮层神经元)中靶蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。

[0387] 在一些实施方案中,将包含靶向目标基因的至少一个siRNA双链体的核酸序列的本发明的AAV颗粒施用于需要治疗和/或缓解疾病(例如神经学病症或心血管疾病)的受试者。AAV颗粒血清型可以是或包括肽,例如但不限于VOY101、VOY201、AAVPHP.B(PHP.B)、AAVPHP.A(PHP.A)、AAVG2B-26、AAVG2B-13、AAVTH1.1-32、AAVTH1.1-35、AAVPHP.B2(PHP.B2)、AAVPHP.B3(PHP.B3)、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP(3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3(G2A3)、AAVG2B4(G2B4)、AAVG2B5、PHP.S、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/

hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、AAAV、BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhER1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhER1.23、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV改组100-1、AAV改组100-3、AAV改组100-7、AAV改组10-2、AAV改组10-6、AAV改组10-8、AAV改组100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61AAV、BNP62AAV、BNP63AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真型AAV(ttAAV)、UPENN AAV 10、日本AAV 10血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AAV CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6.10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-

F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv1-1、AAV Clv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV Clv1-7、AAV Clv1-8、AAV Clv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8和/或AAVF9/HSC9,及其变体。

[0388] 在一些实施方案中,将包含至少一个靶向目标基因的siRNA双链体的核酸序列的AAVPHP.B颗粒(包含PHP.B肽插入物的AAV颗粒)施用于需要治疗和/或缓解神经学疾病的受试者。

[0389] 在一些实施方案中,将包含至少一个靶向目标基因的siRNA双链体的核酸序列的AAVPHP.A颗粒(包含PHP.A肽插入物的AAV颗粒)施用于需要治疗和/或缓解神经学疾病的受试者。

[0390] 在一些实施方案中,将包含至少一个靶向目标基因的siRNA双链体的核酸序列的AAVPHP.N颗粒(包含PHP.N肽插入物的AAV颗粒)施用于需要治疗和/或缓解神经学疾病的受试者。

[0391] 在一些实施方案中,包含PHP.S肽插入物的AAV颗粒包含靶向目标基因的至少一个siRNA双链体的核酸序列,并且所述AAV颗粒可以施用于需要治疗和/或缓解神经学疾病的受试者。

[0392] 在一些实施方案中,将具有VOY101血清型的AAV颗粒(其包含靶向目标基因的至少一个siRNA双链体的核酸序列)施用于需要治疗和/或缓解神经学疾病的受试者。在一个实施方案中,VOY101衣壳包含SEQ ID NO.1的氨基酸序列。在一个实施方案中,VOY101衣壳包含SEQ ID NO.1809的核酸序列。

[0393] 在一些实施方案中,将具有VOY201血清型的AAV颗粒(其包含靶向目标基因的至少一个siRNA双链体的核酸序列)施用于需要治疗和/或缓解神经学疾病的受试者。在一个实施方案中,VOY201衣壳包含SEQ ID NO.1810的核酸序列。

[0394] 在一些实施方案中,将具有AAV9变体血清型的AAV颗粒(包含靶向目标基因的至少一个siRNA双链体的核酸序列)施用于需要治疗和/或缓解神经学疾病的受试者。

[0395] 在一些实施方案中,可以选择包含靶向目标基因的至少一个siRNA双链体(例如,有效载荷)的核酸序列的第一AAV颗粒来施用于受试者,其中与包含相同有效载荷的第二AAV颗粒相比,第一AAV颗粒向细胞(例如星形胶质细胞)提供更高水平的病毒基因组。在一个实施方案中,第一病毒基因组在细胞中的水平比第二AAV颗粒的受试者的细胞中的水平

高0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9倍或多于9倍。在一个实施方案中,第一病毒基因组的水平比第二病毒基因组在细胞(例如星形胶质细胞)中的水平可以高1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或大于99%。在一个实施方案中,第一病毒基因组的水平比第二病毒基因组在细胞(例如星形胶质细胞)中的水平高1-10%、5-10%、10-15%、10-20%、15-20%、20-30%、25-30%、25-35%、30-35%、30-40%、35-40%、35-45%、40-45%、40-50%、45-50%、45-55%、50-55%、50-60%、55-60%、55-65%、60-65%、60-70%、65-70%、65-75%、70-75%、70-80%、75-80%、75-85%、80-85%、80-90%、85-90%、85-95%、90-95%、90-99%或95-99%。

[0396] 在一些实施方案中,可选择包含靶向目标基因的至少一个siRNA双链体的核酸序列的第一AAV颗粒用于施用于受试者,其中与受试者的肝脏中可见的量相比,第一颗粒向星形胶质细胞提供更高的病毒基因组。与肝脏中的量相比,第一颗粒可以向星形胶质细胞提供1、2、3、4、5、6、7、8、9或多于9倍的病毒基因组。

[0397] 在一些实施方案中,可例如通过输注到核壳中将siRNA分子或包含此类siRNA分子的AAV颗粒直接引入受试者的中枢神经系统。

[0398] 在一些实施方案中,可例如通过输注到受试者的丘脑,将siRNA分子或包含此类siRNA分子的AAV颗粒直接引入受试者的中枢神经系统。

[0399] 在一些实施方案中,可例如通过输注至受试者的白质,将siRNA分子或包含此类siRNA分子的AAV颗粒直接引入受试者的中枢神经系统。

[0400] 在一些实施方案中,可例如通过静脉内施用于受试者,将siRNA分子或包含此类siRNA分子的AAV颗粒引入受试者的中枢神经系统。

[0401] 在一些实施方案中,包含至少一种靶向目标基因的siRNA双链体的AAV颗粒可以用作单独疗法或联合疗法用于治疗疾病,例如,与一种或多种神经保护剂联合用于治疗神经元退化。

[0402] siRNA分子

[0403] 本发明涉及用于治疗神经学病症的RNA干扰(RNAi)诱导的基因表达抑制。本文提供了靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA(本文统称为“siRNA分子”)。此类siRNA双链体或编码的dsRNA可减少或沉默细胞(例如星形胶质细胞或小胶质细胞神经元、皮层神经元、海马体神经元、内嗅神经元、丘脑神经元、感觉神经元或运动神经元)中的基因表达,借此改善神经学疾病的症状。

[0404] RNAi(也称为转录后基因沉默(PTGS)、压抑或共抑制)是转录后基因沉默的过程,其中RNA分子以序列特异性方式抑制基因表达,通常是通过导致破坏特异性的mRNA分子。RNAi的活性组分是短/小双链RNA(dsRNA),称为小干扰RNA(siRNA),其通常包含15-30个核苷酸(例如19至25、19至24或19-21个核苷酸)和2个核苷酸的3'突出端,且其与靶基因的核酸序列匹配。这些短RNA物质可能是由Dicer介导的较大dsRNA的裂解在体内自然产生的,并且它们在哺乳动物细胞中具有功能。

[0405] 天然表达的小RNA分子,称为microRNA(miRNA),通过调节mRNA的表达引起基因沉默。包含RNA诱导沉默复合物(RISC)的miRNA靶向mRNA,所述mRNA与在miRNA的5'区中的核苷酸2-7(称为种子区)和其他具有其3'区的碱基对呈完美序列互补性。miRNA介导的基因表达

下调可能是由靶标mRNA的切割、靶标mRNA的翻译抑制或mRNA降解引起的。miRNA靶向序列通常位于靶mRNA的3'-UTR中。单个miRNA可以靶向来自多种基因的超过100个转录物,而一个mRNA可以被不同的miRNA靶向。

[0406] 可以设计和合成靶向特定mRNA的siRNA双链体或dsRNA,并在体外合成并引入细胞中以激活RNAi过程。Elbashir等人证明了21个核苷酸的siRNA双链体(称为小干扰RNA)能够在不诱导哺乳动物细胞的免疫应答的情况下有效地强烈且特异性地敲低基因(Elbashir SM等人,Nature,2001,411,494-498)。自从这份初步报告以来,通过siRNA进行转录后基因沉默迅速成为哺乳动物细胞遗传分析的有力工具,并具有产生新疗法的潜力。

[0407] 可以将体外合成的siRNA分子引入细胞中以激活RNAi。与内源性dsRNA相似,当将外源性siRNA双链体引入细胞时,其可以组装形成RNA诱导沉默复合物(RISC),这是一种在整个基因组中促进搜索RNA序列的多单位复合物,所述RNA序列与siRNA双链体的两条链之一互补(即反义链)。在此过程中,siRNA的有义链(或过客链)从复合物中丢失,而siRNA的反义链(或引导链)与其互补RNA匹配。尤其是,包含RISC复合物的siRNA的靶标是呈现完美序列互补性的mRNA。然后,通过切割、释放和降解靶标,发生siRNA介导的基因沉默。

[0408] siRNA双链体由与靶mRNA同源的有义链和与靶mRNA互补的反义链组成,其与单链(ss)-siRNA(例如反义链RNA或反义寡核苷酸)的使用相比,在破坏靶RNA的效率方面,siRNA双链体具有更多优势。在许多情况下,需要更高浓度的ss-siRNA才能实现对对应双链体的有效基因沉默效力。

[0409] 任何前述分子可以由AAV颗粒或病毒基因组编码。

[0410] 靶基因

[0411] 可以用本发明的调节性多核苷酸治疗的神经学疾病的非限制性实例包括tau蛋白病、阿尔茨海默氏病、亨廷顿病和/或肌萎缩性侧索硬化。靶基因可以是与任何神经学疾病相关的任何基因,例如但不限于本文列出的那些。

[0412] 在一个实施方案中,靶基因是载脂蛋白E(APOE)基因的等位基因(例如,ApoE2、ApoE3和/或ApoE4)。作为非限制性实例,靶基因是APOE,并且靶基因具有表2中教导的序列之一、其片段或变体。

[0413] 在另一个实施方案中,靶基因是超氧化物歧化酶(SOD1)。作为非限制性实例,靶基因是SOD1,并且靶基因具有SEQ ID NO:1753(NCBI参考编号NM_000454.4)的序列、其片段或变体。

[0414] 在另一个实施方案中,靶基因是亨廷顿蛋白(HTT)。作为非限制性实例,靶基因是具有核苷酸序列SEQ ID NO:1754(NCBI参考编号NM_002111.7)的HTT、其片段或变体。作为非限制性实例,靶基因是HTT,并且靶基因编码SEQ ID NO:1755的氨基酸序列(NCBI参考编号NP_002102.4)、其片段或变体。

[0415] 在另一个实施方案中,靶基因是微管相关蛋白tau(MAPT)。作为非限制性实例,靶基因是具有表9所示的任何核酸序列的核苷酸序列、其片段或变体的MAPT。作为非限制性实例,靶基因是MAPT,并且靶基因编码表9中所示的任何氨基酸序列的氨基酸序列、其片段或变体。

[0416] 表9.微管相关蛋白tau序列

	识别	参考	SEQ ID NO
[0417]	MAPT SEQ-001	NP_058519.3	1756
	MAPT SEQ-002	NP_005901.2	1757
	MAPT SEQ-003	NP_058518.1	1758
	MAPT SEQ-004	NP_058525.1	1759
	MAPT SEQ-005	NP_001116539.1	1760
	MAPT SEQ-006	NP_001116538.2	1761
	MAPT SEQ-007	NP_001190180.1	1762
	MAPT SEQ-008	NP_001190181.1	1763
	MAPT SEQ-009	NM_016835.4	1764
	MAPT SEQ-010	NM_005910.5	1765
	MAPT SEQ-011	NM_016834.4	1766
	MAPT SEQ-012	NM_016841.4	1767
	MAPT SEQ-013	NM_001123067.3	1768
[0418]	MAPT SEQ-014	NM_001123066.3	1769
	MAPT SEQ-015	NM_001203251.1	1770
	MAPT SEQ-016	NM_001203252.1	1771

[0419] siRNA双链体的设计和序列

[0420] 在本领域中已经提出了一些设计siRNA的指南。这些指南通常建议生成19个核苷酸的双链体区、对称的2-3个核苷酸的3' 突出端、5' -磷酸基团和3' -羟基,靶向待沉默的基因中的区域。其他可能影响siRNA序列偏好的规则包括但不限于:(i) 反义链5' 端的A/U;(ii) 有义链5' 端的G/C;(iii) 在反义链的5' 端三分之一的至少五个A/U残基;和(iv) 不存在长度超过9个核苷酸的任何GC片段。根据这样的考虑以及靶基因的特定序列,可以容易地设计阻遏哺乳动物靶基因表达所必需的高效siRNA分子。

[0421] 根据本发明,设计了靶向目标基因的siRNA分子(例如,siRNA双链体或编码的dsRNA)。这样的siRNA分子可以特异性地阻抑靶基因表达和蛋白产生。在某些方面,siRNA分子被设计并用于选择性“敲除”细胞中的靶基因变体,即在神经学疾病中识别的转录物。在一些方面,siRNA分子被设计并用于选择性“敲低”细胞中的靶基因变体。

[0422] 在一个实施方案中,本发明的siRNA分子包含有义链和互补反义链,其中两条链杂交在一起形成双链体结构。反义链与靶mRNA序列具有足够的互补性以引导靶特异性RNAi,即siRNA分子具有足以触发通过RNAi机制或过程破坏靶mRNA的序列。

[0423] 在一些实施方案中,反义链和靶mRNA序列具有100%的互补性。反义链可以与靶mRNA序列的任何部分互补。

[0424] 在其他实施方案中,反义链和靶mRNA序列包含至少一个错配。作为非限制性实例,反义链和靶mRNA序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、

85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%，或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%的互补性。

[0425] 根据本发明，siRNA分子的长度为约10-50个或更多个核苷酸，即每条链包含10-50个核苷酸(或核苷酸类似物)。优选地，siRNA分子的长度为每条链约15-30个核苷酸，例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸，其中一条链与靶区域充分互补。在一个实施方案中，siRNA分子的长度为约19至25、19至24或19至21个核苷酸。

[0426] 在一些实施方案中，本发明的siRNA分子可以是合成的RNA双链体，其包含约19个核苷酸至约25个核苷酸，以及在3'端两个突出核苷酸。在一些方面，siRNA分子可以是未修饰的RNA分子。在其他方面，siRNA分子可包含至少一个修饰的核苷酸，例如碱基、糖或主链修饰。

[0427] 在一个实施方案中，本发明的siRNA分子可以包含反义序列和有义序列，或其片段或变体。作为非限制性实例，反义序列和有义序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%，或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%的互补性。

[0428] DNA表达质粒可用于在细胞中稳定表达本发明的siRNA双链体或dsRNA，并实现对靶基因表达的长期抑制。一方面，siRNA双链体的有义和反义链通常通过短间隔序列连接，所述短间隔序列引起称为短发夹RNA(shRNA)的茎-环结构的表达。发夹被Dicer识别并切割，从而生成成熟的siRNA分子。

[0429] 在其他实施方案中，本发明的siRNA分子可以在AAV颗粒中编码以递送至细胞。在一个实施方案中，可将siRNA插入侧翼为ITR的AAV病毒基因组。

[0430] 根据本发明，包含编码siRNA分子(其靶向目标基因的mRNA)的核酸的AAV颗粒可以包括AAV颗粒血清型，和/或可以包含肽插入，例如但不限于VOY101、VOY201、AAVPHP.B(PHP.B)、AAVPHP.A(PHP.A)、AAVG2B-26、AAVG2B-13、AAVTH1.1-32、AAVTH1.1-35、AAVPHP.B2(PHP.B2)、AAVPHP.B3(PHP.B3)、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP(3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3(G2A3)、AAVG2B4(G2B4)、AAVG2B5、PHP.S、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、

AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、AAAV、BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhER1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhER1.23、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、

AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV改组100-1、AAV改组100-3、AAV改组100-7、AAV改组10-2、AAV改组10-6、AAV改组10-8、AAV改组100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61AAV、BNP62AAV、BNP63AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真型AAV (ttAAV)、UPENN AAV 10、日本AAV 10血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AAV CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6.10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv1-1、AAV Clv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV Clv1-7、AAV Clv1-8、AAV Clv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8和/或AAVF9/HSC9,及其变体。

[0431] 在一些实施方案中,本发明的siRNA双链体或编码的dsRNA阻遏(或降解)靶mRNA。因此,siRNA双链体或编码的dsRNA可用于基本上抑制细胞(例如神经元或星形胶质细胞)中的靶基因表达。在一些方面,靶基因表达的抑制是指抑制了至少约20%,优选抑制了至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此,靶基因的蛋白产

物可被抑制至少约20%，优选至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%，或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[0432] 在一些实施方案中，可以使用任何可用的设计工具来设计靶向目标基因的siRNA分子。根据本发明，设计并测试siRNA分子降低培养细胞中靶基因mRNA水平的能力。

[0433] 在一个实施方案中，设计并测试siRNA分子降低培养细胞中ApoE2水平的能力。

[0434] 在一个实施方案中，设计并测试siRNA分子降低培养细胞中ApoE3水平的能力。

[0435] 在一个实施方案中，设计并测试siRNA分子降低培养细胞中ApoE4水平的能力。

[0436] 在一个实施方案中，设计并测试siRNA分子降低培养细胞中SOD1水平的能力。

[0437] 在一个实施方案中，设计并测试siRNA分子降低培养细胞中HTT水平的能力。

[0438] 在一个实施方案中，设计并测试siRNA分子降低培养细胞中Tau水平的能力。

[0439] 在一个实施方案中，siRNA分子包含与引导链匹配的miRNA种子。在另一个实施方案中，siRNA分子包含与过客链匹配的miRNA种子。在又一个实施方案中，靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA不包含与引导链或过客链匹配的种子。

[0440] 在一个实施方案中，靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对引导链几乎没有显著的全长脱靶。在另一个实施方案中，靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对过客链几乎没有显著的全长脱靶。靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对过客链具有少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全长脱靶。在又一个实施方案中，靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可几乎没有对引导链或过客链的显著全长脱靶。靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对引导链或过客链具有少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全长脱靶。

[0441] 在一个实施方案中，靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可以在体外具有高活性。在另一个实施方案中，siRNA分子在体外可能具有低活性。在又一个实施方案中，靶向目标基因的siRNA双链体或dsRNA在体外可以具有高的引导链活性和低的过客链活性。

[0442] 在一个实施方案中，siRNA分子在体外具有高引导链活性和低过客链活性。引导链的目标敲低(KD)可以是至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%或100%。引导链的目标敲低可以是60-65%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、60-99%、60-99.5%、60-100%、65-70%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、

65-95%、65-99%、65-99.5%、65-100%、70-75%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、70-99%、70-99.5%、70-100%、75-80%、75-85%、75-90%、75-95%、75-99%、75-99.5%、75-100%、80-85%、80-90%、80-95%、80-99%、80-99.5%、80-100%、85-90%、85-95%、85-99%、85-99.5%、85-100%、90-95%、90-99%、90-99.5%、90-100%、95-99%、95-99.5%、95-100%、99-99.5%、99-100%或99.5-100%。作为非限制性实例，引导链的目标敲低(KD)大于70%。

[0443] 在一个实施方案中，最接近脱靶的过客链的 IC_{50} 大于100乘以靶引导链的 IC_{50} 。作为非限制性实例，如果最接近脱靶的过客链的 IC_{50} 大于100乘以靶引导链的 IC_{50} ，则认为siRNA分子具有体外高的引导链活性和低的过客链活性。

[0444] 在一个实施方案中，引导链的5'加工在体外或体内至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例，引导链的5'加工是精确的，并且在体外至少99%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例，引导链的5'加工是精确的，并且在体内至少99%的时间内在5'端正确开始(n)。

[0445] 在一个实施方案中，体外或体内引导链与过客链(G:P)（也称为反义链与有义链）比表示为1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:10、2:9、2:8、2:7、2:6、2:5、2:4、2:3、2:2、2:1、3:10、3:9、3:8、3:7、3:6、3:5、3:4、3:3、3:2、3:1、4:10、4:9、4:8、4:7、4:6、4:5、4:4、4:3、4:2、4:1、5:10、5:9、5:8、5:7、5:6、5:5、5:4、5:3、5:2、5:1、6:10、6:9、6:8、6:7、6:6、6:5、6:4、6:3、6:2、6:1、7:10、7:9、7:8、7:7、7:6、7:5、7:4、7:3、7:2、7:1、8:10、8:9、8:8、8:7、8:6、8:5、8:4、8:3、8:2、8:1、9:10、9:9、9:8、9:7、9:6、9:5、9:4、9:3、9:2、9:1、10:10、10:9、10:8、10:7、10:6、10:5、10:4、10:3、10:2、10:1、1:99、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5或99:1。引导链与过客链的比是指在引导链被切除之后引导链与过客链的比。例如，引导链与过客链的比为80:20，则每2条从前体中夹出的过客链中将有8条引导链。作为非限制性实例，体外引导链与过客链的比为80:20。作为非限制性实例，体内引导链与过客链的比为80:20。作为非限制性实例，体外引导链与过客链的比为8:2。作为非限制性实例，体内引导链与过客链的比为8:2。作为非限制性实例，体外引导链与过客链的比为9:1。作为非限制性实例，体内引导链与过客链的比为9:1。

[0446] 在一个实施方案中，体外或体内过客链与引导链(P:G)（也称为有义链与反义链）比为1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:10、2:9、2:8、2:7、2:6、2:5、2:4、2:3、2:2、2:1、3:10、3:9、3:8、3:7、3:6、3:5、3:4、3:3、3:2、3:1、4:10、4:9、4:8、4:7、4:6、4:5、4:4、4:3、4:2、4:1、5:10、5:9、5:8、5:7、5:6、5:5、5:4、5:3、5:2、5:1、6:10、6:9、6:8、6:7、6:6、6:5、6:4、6:3、6:2、6:1、7:10、7:9、7:8、7:7、7:6、7:5、7:4、7:3、7:2、7:1、8:10、8:9、8:8、8:7、8:6、8:5、8:4、8:3、8:2、8:1、9:10、9:9、9:8、9:7、9:6、9:5、9:4、9:3、9:2、9:1、10:10、10:9、10:8、10:7、10:6、10:5、10:4、10:3、10:2、10:1、1:99、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5或99:1。过客链与引导链的比是指在引导链被切除之后过客链与引导链的比。例如，过客链与引导链的比为80:20，则每2条从前体中夹出的引导链中将有8条过客链。作为非限制性实例，体外过客链与引导链的比为80:20。作为非限制性实例，体内过客链与引导链的比为80:20。作为非限制性实例，体外过客链与引导链的比为8:2。作为非限制性实

例,体内过客链与引导链的比为8:2。作为非限制性实例,体外过客链与引导链的比为9:1。作为非限制性实例,体内过客链与引导链的比为9:1。

[0447] 在一个实施方案中,编码dsRNA的病毒基因组的完整性为构建体全长的至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或多于99%。作为非限制性实例,病毒基因组的完整性为构建体全长的80%。

[0448] 在一个实施方案中,根据欧洲专利公开号EP 1752536中概述的方法和规则来设计过客链和/或引导链,其内容通过引用整体并入本文。作为非限制性实例,该序列的3'-末端碱基是腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶。作为非限制性实例,序列的5'-末端碱基是鸟嘌呤或胞嘧啶。作为非限制性实例,3'-末端序列包含七个碱基,所述七个碱基富含腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶中的一个或多个碱基。作为非限制性实例,碱基数在不引起细胞毒性的情况下引起RNA干扰的水平。

[0449] 分子支架

[0450] 在一个实施方案中,可以在还包含分子支架的调节性多核苷酸中编码siRNA分子。如本文所用,“分子支架”是框架或起始分子,其形成设计或制备后续分子所依据的序列或结构基础。

[0451] 在一个实施方案中,包含有效载荷(例如本文所述的siRNA、miRNA或其他RNAi试剂)的调节性多核苷酸包含分子支架,其包含至少一个5'侧翼序列,该序列可以是任何长度,并且可以全部或部分衍生自野生型microRNA序列或是完全人工的。3'侧翼序列可以在大小和来源上与5'侧翼序列镜像。侧翼序列都可以不存在。在一个实施方案中,不存在5'和3'侧翼序列。3'侧翼序列可任选地包含一个或多个CN(C)基序,其中“N”代表任何核苷酸。

[0452] 在一些实施方案中,5'和3'侧翼序列具有相同的长度。

[0453] 在一些实施方案中,5'侧翼序列的长度为1-10个核苷酸,长度为5-15个核苷酸,长度为10-30个核苷酸,长度为20-50个核苷酸,长度大于40个核苷酸,长度大于50个核苷酸,长度大于100个核苷酸或长度大于200个核苷酸。

[0454] 在一些实施方案中,5'侧翼序列的长度可以是1、2、3、4、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、

301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499或500个核苷酸。

[0455] 在一些实施方案中,3'侧翼序列的长度为1-10个核苷酸,长度为5-15个核苷酸,长度为10-30个核苷酸,长度为20-50个核苷酸,长度大于40个核苷酸,长度大于50个核苷酸,长度大于100个核苷酸或长度大于200个核苷酸。

[0456] 在一些实施方案中,3'侧翼序列的长度可以是1、2、3、4、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、

491、492、493、494、495、496、497、498、499或500个核苷酸。

[0457] 在一些实施方案中,5'和3'侧翼序列是相同的序列。在一些实施方案中,当彼此对齐时,它们相差2%、3%、4%、5%、10%、20%或大于30%。

[0458] 在一个实施方案中,分子支架包含至少一个3'侧翼区。作为非限制性实例,3'侧翼区可以包含3'侧翼序列,其可以具有任何长度,并且可以全部或部分源自野生型microRNA序列,或者是完全人工序列。

[0459] 形成茎环结构的茎至少是至少一个有效载荷序列的最低要求。在一些实施方案中,有效载荷序列包含至少一个核酸序列,该核酸序列与靶序列部分互补或杂交。在一些实施方案中,有效载荷是siRNA分子或siRNA分子的片段。

[0460] 在一些实施方案中,茎环的5'臂包含有义序列。

[0461] 在一些实施方案中,茎环的3'臂包含反义序列。在某些情况下,反义序列在最5'端包含一个“G”核苷酸。

[0462] 在其他实施方式中,有义序列可以位于茎环结构的茎的3'臂上,而反义序列可以位于茎环结构的茎的5'臂上。

[0463] 有义序列和反义序列在其大部分长度上可以完全互补。在其他实施方案中,有义序列和反义序列可以独立地在跨越至少50、60、70、80、80、85、90、95或99%的长度上具有至少70、80、90、95或99%互补性。

[0464] 有义序列的同一性或反义序列的同源性都不需要与靶具有100%的互补性。

[0465] 将茎环结构的有义序列和反义序列分开的是一个环(也称为环基序)。环可以具有任何长度,4-30个核苷酸、4-20个核苷酸、4-15个核苷酸、5-15个核苷酸、6-12个核苷酸、6个核苷酸、7个核苷酸、8个核苷酸、9个核苷酸、10个核苷酸、11个核苷酸和/或12个核苷酸。

[0466] 在一些实施方案中,环包含至少一个UGUG基序。在一些实施方案中,UGUG基序位于环的5'末端。

[0467] 间隔区可以存在于调节性多核苷酸中以将一个或多个模块彼此分开。可能存在一个或多个这样的间隔区。

[0468] 在一个实施方案中,在有义序列和侧翼序列之间可以存在8-20个(即8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个)核苷酸的间隔区。

[0469] 在一个实施方案中,间隔区是13个核苷酸,并且位于有义序列的5'末端和侧翼序列之间。在一个实施方案中,间隔物具有足够的长度以形成序列的大约一个螺旋角。

[0470] 在一个实施方案中,在反义序列和侧翼序列之间可以存在8-20个(即8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个)核苷酸的间隔区。

[0471] 在一个实施方案中,间隔序列的长度为10-13个(即10、11、12或13个)核苷酸,并且位于反义序列的3'末端和侧翼序列之间。在一个实施方案中,间隔子具有足以形成序列的大约一个螺旋角的长度。

[0472] 在一个实施方案中,调节性多核苷酸在5'至3'方向上包含5'侧翼序列、5'臂、环基序、3'臂和3'侧翼序列。作为非限制性实例,5'臂可包含有义序列,3'臂可包含反义序列。在另一个非限制性实例中,5'臂包含反义序列,而3'臂包含有义序列。

[0473] 在一个实施方案中,可以改变5'臂、有效载荷(例如有义和/或反义序列)、环基序和/或3'臂序列(例如,取代1个或更多个核苷酸、添加核苷酸和/或删除核苷酸)。该改变可

引起构建体功能的有益变化(例如,增加靶序列的敲低、减少构建体的降解、降低脱靶效应、增加有效载荷的效率并减少有效载荷的降解)。

[0474] 在一个实施方案中,将调节性多核苷酸的分子支架进行比对,以使引导链的切除率大于过客链的切除率。引导或过客链的切除率可以独立地为1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或超过99%。作为非限制性实例,引导链的切除率为至少80%。作为另一个非限制性实例,引导链的切除率为至少90%。

[0475] 在一个实施方案中,引导链的切除率大于过客链的切除率。一方面,引导链的切除率可以比过客链高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或大于99%。

[0476] 在一个实施方案中,引导链的切除效率为至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或大于99%。作为非限制性实例,引导链的切除效率大于80%。

[0477] 在一个实施方案中,从分子支架上切除引导链的效率大于切除过客链的效率。从分子支架切除引导链可以比切除过客链的效率高2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10倍。

[0478] 在一个实施方案中,分子支架包含双功能的靶向调节性多核苷酸。如本文所用,“双功能靶向”调节性多核苷酸是其中引导链和过客链均敲低相同靶或引导链和过客链敲低不同靶的多核苷酸。

[0479] 在一个实施方案中,本文所述的调节性多核苷酸的分子支架包含5'侧翼区、环区和3'侧翼区。在本文所述的分子支架中可使用的5'侧翼区、环区和3'侧翼区的序列的非限制性实例如表10-12所示。

[0480] 表10.5'分子支架的5'侧翼区

[0481]

5' 侧翼 区名称	5' 侧翼区序列	5' 侧翼 区 SEQ ID NO
5F1	UUUAUGCCUCAUCCUCUGAGUGCUGAAGGCU UGCUGUAGGCUGUAUGCUG	1772
5F2	GUGCUGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCUCCCGC AGAACACCAUGCGCUCUUCGGAA	1773
5F3	GAAGCAAAGAAGGGGCAGAGGGAGCCCGUGA GCUGAGUGGGCCAGGGACUGGGAGAAGGAGU GAGGAGGCAGGGCCGGCAUGCCUCUGCUGCU GGCCAGA	1774
5F4	GUGCUGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCUCCCGC AGAACACCAUGCGCUCUUCGGGA	1775
5F5	GUGCUGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCUCCCGC AGAACACCAUGCGCUCCACGGAA	1776
5F6	GGGCCCUCCCGCAGAACACCAUGCGCUCCACG GAA	1777
5F7	CUCCCGCAGAACACCAUGCGCUCCACGGAA	1778
5F8	GUGCUGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCUCCCGC AGAACACCAUGCGCUCCACGGAAG	1779
5F9	GUGCUGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCUCCCGC AGAACACCAUGCGCUCCUCGGAA	1780

[0482] 表11.环基序

[0483]

环基序 区名称	环基序区序列	环基序区 SEQ ID NO
L1	UGUGACCUGG	1781
L2	UGUGAUUUGG	1782

[0484]

L3	UAUAAUUUGG	1783
L4	CCUGACCCAGU	1784
L5	GUCUGCACCUGUCACUAG	1785
L6	GUGACCCAAG	1786
L7	GUGGCCACUGAGAAG	1787
L8	GUGACCCAAU	1788
L9	GUGACCCAAC	1789

[0485] 表12. 分子支架的3' 侧翼区

[0486]

3' 侧翼 区名称	3' 侧翼区序列	3' 侧翼区 SEQ ID NO
3F1	AGUGUAUGAUGCCUGUUACUAGCAUUCACA UGGAACAAAUUGCUGCCGUG	1791
3F2	CUGAGGAGCGCCUUGACAGCAGCCAUGGGA GGGCCGCCCCCUACCUCAGUGA	1792
3F3	CUGUGGAGCGCCUUGACAGCAGCCAUGGGA GGGCCGCCCCCUACCUCAGUGA	1793
3F4	UGGCCGUGUAGUGCUACCCAGCGCUGGCUG CCUCCUCAGCAUUGCAAUUCCUCUCCCAUC UGGGCACCAGUCAGCUACCCUGGUGGGAAU CUGGGUAGCC	1794
3F5	GGCCGUGUAGUGCUACCCAGCGCUGGCUGC CUCCUCAGCAUUGCAAUUCCUCUCCCAUCU GGGCACCAGUCAGCUACCCUGGUGGGAAUC UGGGUAGCC	1795
3F6	UCCUGAGGAGCGCCUUGACAGCAGCCAUGG GAGGGCCGCCCCCUACCUCAGUGA	1796
3F7	CUGAGGAGCGCCUUGACAGCAGCCAUGGGA	1797

[0487]

	GGGCC	
3F8	CUGCGGAGCGCCUUGACAGCAGCCAUGGGA GGGCCGCCCCCUACCUCAGUGA	1798

[0488] 表8-10中所述的任何区域均可用于本文所述的分子支架中。

[0489] 在一个实施方案中,分子支架可包含表10中列出的一个5'侧翼区。作为非限制性实例,分子支架可包含5'侧翼区5F1、5F2、5F3、5F4、5F5、5F6、5F7、5F8或5F9。

[0490] 在一个实施方案中,分子支架可包含表11中列出的一个环基序区。作为非限制性实例,分子支架可包含环基序区L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9或L10。

[0491] 在一个实施方案中,分子支架可包含表12中列出的一个3'侧翼区。作为非限制性实例,分子支架可包含3'侧翼区3F1、3F2、3F3、3F4、3F5、3F6、3F7或3F8。

[0492] 在一个实施方案中,分子支架可包含如表10和表11所述的至少一个5'侧翼区和至少一个环基序区。作为非限制性实例,分子支架可包含5F1和L1、5F1和L2、5F1和L3、5F1和L4、5F1和L5、5F1和L6、5F1和L7、5F1和L8、5F1和L9、5F1和L10、5F2和L1、5F2和L2、5F2和L3、5F2和L4、5F2和L5、5F2和L6、5F2和L7、5F2和L8、5F2和L9、5F2和L10、5F3和L1、5F3和L2、5F3和L3、5F3和L4、5F3和L5、5F3和L6、5F3和L7、5F3和L8、5F3和L9、5F3和L10、5F4和L1、5F4和L2、5F4和L3、5F4和L4、5F4和L5、5F4和L6、5F4和L7、5F4和L8、5F4和L9、5F4和L10、5F5和L1、5F5和L2、5F5和L3、5F5和L4、5F5和L5、5F5和L6、5F5和L7、5F5和L8、5F5和L9、5F5和L10、5F6和L1、5F6和L2、5F6和L3、5F6和L4、5F6和L5、5F6和L6、5F6和L7、5F6和L8、5F6和L9、5F6和L10、5F7和L1、5F7和L2、5F7和L3、5F7和L4、5F7和L5、5F7和L6、5F7和L7、5F7和L8、5F7和L9、5F7和L10、5F8和L1、5F8和L2、5F8和L3、5F8和L4、5F8和L5、5F8和L6、5F8和L7、5F8和L8、5F8和L9、5F8和L10、5F9和L1、5F9和L2、5F9和L3、5F9和L4、5F9和L5、5F9和L6、5F9和L7、5F9和L8、5F9和L9,或5F9和L10。

[0493] 在一个实施方案中,分子支架可包含如表11和12中所述的至少一个3'侧翼区和至少一个环基序区。作为非限制性实例,分子支架可包含3F1和L1、3F1和L2、3F1和L3、3F1和L4、3F1和L5、3F1和L6、3F1和L7、3F1和L8、3F1和L9、3F1和L10、3F2和L1、3F2和L2、3F2和L3、3F2和L4、3F2和L5、3F2和L6、3F2和L7、3F2和L8、3F2和L9、3F2和L10、3F3和L1、3F3和L2、3F3和L3、3F3和L4、3F3和L5、3F3和L6、3F3和L7、3F3和L8、3F3和L9、3F3和L10、3F4和L1、3F4和L2、3F4和L3、3F4和L4、3F4和L5、3F4和L6、3F4和L7、3F4和L8、3F4和L9、3F4和L10、3F5和L1、3F5和L2、3F5和L3、3F5和L4、3F5和L5、3F5和L6、3F5和L7、3F5和L8、3F5和L9、3F5和L10、3F6和L1、3F6和L2、3F6和L3、3F6和L4、3F6和L5、3F6和L6、3F6和L7、3F6和L8、3F6和L9、3F6和L10、3F7和L1、3F7和L2、3F7和L3、3F7和L4、3F7和L5、3F7和L6、3F7和L7、3F7和L8、3F7和L9、3F7和L10、3F8和L1、3F8和L2、3F8和L3、3F8和L4、3F8和L5、3F8和L6、3F8和L7、3F8和L8、3F8和L9,或3F8和L10。

[0494] 在一个实施方案中,分子支架可包含如表10和12中所述的至少一个5'侧翼区和至少3'侧翼区。作为非限制性实例,分子支架可包含5F1和3F1、5F1和3F2、5F1和3F3、5F1和3F4、5F1和3F5、5F1和3F6、5F1和3F7、5F1和3F8、5F2和3F1、5F2和3F2、5F2和3F3、5F2和3F4、5F2和3F5、5F2和3F6、5F2和3F7、5F2和3F8、5F3和3F1、5F3和3F2、5F3和3F3、5F3和3F4、5F3和3F5、5F3和3F6、5F3和3F7、5F3和3F8、5F4和3F1、5F4和3F2、5F4和3F3、5F4和3F4、5F4和3F5、5F4和3F6、5F4和3F7、5F4和3F8、5F5和3F1、5F5和3F2、5F5和3F3、5F5和3F4、5F5和3F5、5F5和3F6、5F5和3F7、5F5和3F8、5F6和3F1、5F6和3F2、5F6和3F3、5F6和3F4、5F6和3F5、5F6和3F6、5F6和3F7、5F6和3F8、5F7和3F1、5F7和3F2、5F7和3F3、5F7和3F4、5F7和3F5、5F7和3F6、5F7和3F7、5F7和3F8、5F8和3F1、5F8和3F2、5F8和3F3、5F8和3F4、5F8和3F5、5F8和3F6、5F8和3F7、

5F8和3F8、5F9和3F1、5F9和3F2、5F9和3F3、5F9和3F4、5F9和3F5、5F9和3F6、5F9和3F7,或5F9和3F8。

[0495] 在一个实施方案中,分子支架可包含如表10-12中所述的至少一个5'侧翼区、至少一个环基序区域和至少一个3'侧翼区。作为非限制性实例,分子支架可包含5F1、L1和3F1; 5F1、L1和3F2; 5F1、L1和3F3; 5F1、L1和3F4; 5F1、L1和3F5; 5F1、L1和3F6; 5F1、L1和3F7; 5F1、L1和3F8; 5F2、L1和3F1; 5F2、L1和3F2; 5F2、L1和3F3; 5F2、L1和3F4; 5F2、L1和3F5; 5F2、L1和3F6; 5F2、L1和3F7; 5F2、L1和3F8; 5F3、L1和3F1; 5F3、L1和3F2; 5F3、L1和3F3; 5F3、L1和3F4; 5F3、L1和3F5; 5F3、L1和3F6; 5F3、L1和3F7; 5F3、L1和3F8; 5F4、L1和3F1; 5F4、L1和3F2; 5F4、L1和3F3; 5F4、L1和3F4; 5F4、L1和3F5; 5F4、L1和3F6; 5F4、L1和3F7; 5F4、L1和3F8; 5F5、L1和3F1; 5F5、L1和3F2; 5F5、L1和3F3; 5F5、L1和3F4; 5F5、L1和3F5; 5F5、L1和3F6; 5F5、L1和3F7; 5F5、L1和3F8; 5F6、L1和3F1; 5F6、L1和3F2; 5F6、L1和3F3; 5F6、L1和3F4; 5F6、L1和3F5; 5F6、L1和3F6; 5F6、L1和3F7; 5F6、L1和3F8; 5F7、L1和3F1; 5F7、L1和3F2; 5F7、L1和3F3; 5F7、L1和3F4; 5F7、L1和3F5; 5F7、L1和3F6; 5F7、L1和3F7; 5F7、L1和3F8; 5F8、L1和3F1; 5F8、L1和3F2; 5F8、L1和3F3; 5F8、L1和3F4; 5F8、L1和3F5; 5F8、L1和3F6; 5F8、L1和3F7; 5F8、L1和3F8; 5F9、L1和3F1; 5F9、L1和3F2; 5F9、L1和3F3; 5F9、L1和3F4; 5F9、L1和3F5; 5F9、L1和3F6; 5F9、L1和3F7; 5F9、L1和3F8; 5F1、L2和3F1; 5F1、L2和3F2; 5F1、L2和3F3; 5F1、L2和3F4; 5F1、L2和3F5; 5F1、L2和3F6; 5F1、L2和3F7; 5F1、L2和3F8; 5F2、L2和3F1; 5F2、L2和3F2; 5F2、L2和3F3; 5F2、L2和3F4; 5F2、L2和3F5; 5F2、L2和3F6; 5F2、L2和3F7; 5F2、L2和3F8; 5F3、L2和3F1; 5F3、L2和3F2; 5F3、L2和3F3; 5F3、L2和3F4; 5F3、L2和3F5; 5F3、L2和3F6; 5F3、L2和3F7; 5F3、L2和3F8; 5F4、L2和3F1; 5F4、L2和3F2; 5F4、L2和3F3; 5F4、L2和3F4; 5F4、L2和3F5; 5F4、L2和3F6; 5F4、L2和3F7; 5F4、L2和3F8; 5F5、L2和3F1; 5F5、L2和3F2; 5F5、L2和3F3; 5F5、L2和3F4; 5F5、L2和3F5; 5F5、L2和3F6; 5F5、L2和3F7; 5F5、L2和3F8; 5F6、L2和3F1; 5F6、L2和3F2; 5F6、L2和3F3; 5F6、L2和3F4; 5F6、L2和3F5; 5F6、L2和3F6; 5F6、L2和3F7; 5F6、L2和3F8; 5F7、L2和3F1; 5F7、L2和3F2; 5F7、L2和3F3; 5F7、L2和3F4; 5F7、L2和3F5; 5F7、L2和3F6; 5F7、L2和3F7; 5F7、L2和3F8; 5F8、L2和3F1; 5F8、L2和3F2; 5F8、L2和3F3; 5F8、L2和3F4; 5F8、L2和3F5; 5F8、L2和3F6; 5F8、L2和3F7; 5F8、L2和3F8; 5F9、L2和3F1; 5F9、L2和3F2; 5F9、L2和3F3; 5F9、L2和3F4; 5F9、L2和3F5; 5F9、L2和3F6; 5F9、L2和3F7; 5F9、L2和3F8; 5F1、L3和3F1; 5F1、L3和3F2; 5F1、L3和3F3; 5F1、L3和3F4; 5F1、L3和3F5; 5F1、L3和3F6; 5F1、L3和3F7; 5F1、L3和3F8; 5F2、L3和3F1; 5F2、L3和3F2; 5F2、L3和3F3; 5F2、L3和3F4; 5F2、L3和3F5; 5F2、L3和3F6; 5F2、L3和3F7; 5F2、L3和3F8; 5F3、L3和3F1; 5F3、L3和3F2; 5F3、L3和3F3; 5F3、L3和3F4; 5F3、L3和3F5; 5F3、L3和3F6; 5F3、L3和3F7; 5F3、L3和3F8; 5F4、L3和3F1; 5F4、L3和3F2; 5F4、L3和3F3; 5F4、L3和3F4; 5F4、L3和3F5; 5F4、L3和3F6; 5F4、L3和3F7; 5F4、L3和3F8; 5F5、L3和3F1; 5F5、L3和3F2; 5F5、L3和3F3; 5F5、L3和3F4; 5F5、L3和3F5; 5F5、L3和3F6; 5F5、L3和3F7; 5F5、L3和3F8; 5F6、L3和3F1; 5F6、L3和3F2; 5F6、L3和3F3; 5F6、L3和3F4; 5F6、L3和3F5; 5F6、L3和3F6; 5F6、L3和3F7; 5F6、L3和3F8; 5F7、L3和3F1; 5F7、L3和3F2; 5F7、L3和3F3; 5F7、L3和3F4; 5F7、L3和3F5; 5F7、L3和3F6; 5F7、L3和3F7; 5F7、L3和3F8; 5F8、L3和3F1; 5F8、L3和3F2; 5F8、L3和3F3; 5F8、L3和3F4; 5F8、L3和3F5; 5F8、L3和3F6; 5F8、L3和3F7; 5F8、L3和3F8; 5F9、L3和3F1; 5F9、L3和3F2; 5F9、L3和3F3; 5F9、L3和3F4; 5F9、L3和3F5; 5F9、L3和3F6; 5F9、L3和3F7; 5F9、L3和3F8; 5F1、L4和3F1; 5F1、L4和3F2; 5F1、L4和3F3; 5F1、L4和3F4; 5F1、L4和3F5; 5F1、L4和3F6; 5F1、L4和

3F7; 5F1、L4和3F8; 5F2、L4和3F1; 5F2、L4和3F2; 5F2、L4和3F3; 5F2、L4和3F4; 5F2、L4和3F5; 5F2、L4和3F6; 5F2、L4和3F7; 5F2、L4和3F8; 5F3、L4和3F1; 5F3、L4和3F2; 5F3、L4和3F3; 5F3、L4和3F4; 5F3、L4和3F5; 5F3、L4和3F6; 5F3、L4和3F7; 5F3、L4和3F8; 5F4、L4和3F1; 5F4、L4和3F2; 5F4、L4和3F3; 5F4、L4和3F4; 5F4、L4和3F5; 5F4、L4和3F6; 5F4、L4和3F7; 5F4、L4和3F8; 5F5、L4和3F1; 5F5、L4和3F2; 5F5、L4和3F3; 5F5、L4和3F4; 5F5、L4和3F5; 5F5、L4和3F6; 5F5、L4和3F7; 5F5、L4和3F8; 5F6、L4和3F1; 5F6、L4和3F2; 5F6、L4和3F3; 5F6、L4和3F4; 5F6、L4和3F5; 5F6、L4和3F6; 5F6、L4和3F7; 5F6、L4和3F8; 5F7、L4和3F1; 5F7、L4和3F2; 5F7、L4和3F3; 5F7、L4和3F4; 5F7、L4和3F5; 5F7、L4和3F6; 5F7、L4和3F7; 5F7、L4和3F8; 5F8、L4和3F1; 5F8、L4和3F2; 5F8、L4和3F3; 5F8、L4和3F4; 5F8、L4和3F5; 5F8、L4和3F6; 5F8、L4和3F7; 5F8、L4和3F8; 5F9、L4和3F1; 5F9、L4和3F2; 5F9、L4和3F3; 5F9、L4和3F4; 5F9、L4和3F5; 5F9、L4和3F6; 5F9、L4和3F7; 5F9、L4和3F8; 5F1、L5和3F1; 5F1、L5和3F2; 5F1、L5和3F3; 5F1、L5和3F4; 5F1、L5和3F5; 5F1、L5和3F6; 5F1、L5和3F7; 5F1、L5和3F8; 5F2、L5和3F1; 5F2、L5和3F2; 5F2、L5和3F3; 5F2、L5和3F4; 5F2、L5和3F5; 5F2、L5和3F6; 5F2、L5和3F7; 5F2、L5和3F8; 5F3、L5和3F1; 5F3、L5和3F2; 5F3、L5和3F3; 5F3、L5和3F4; 5F3、L5和3F5; 5F3、L5和3F6; 5F3、L5和3F7; 5F3、L5和3F8; 5F4、L5和3F1; 5F4、L5和3F2; 5F4、L5和3F3; 5F4、L5和3F4; 5F4、L5和3F5; 5F4、L5和3F6; 5F4、L5和3F7; 5F4、L5和3F8; 5F5、L5和3F1; 5F5、L5和3F2; 5F5、L5和3F3; 5F5、L5和3F4; 5F5、L5和3F5; 5F5、L5和3F6; 5F5、L5和3F7; 5F5、L5和3F8; 5F6、L5和3F1; 5F6、L5和3F2; 5F6、L5和3F3; 5F6、L5和3F4; 5F6、L5和3F5; 5F6、L5和3F6; 5F6、L5和3F7; 5F6、L5和3F8; 5F7、L5和3F1; 5F7、L5和3F2; 5F7、L5和3F3; 5F7、L5和3F4; 5F7、L5和3F5; 5F7、L5和3F6; 5F7、L5和3F7; 5F7、L5和3F8; 5F8、L5和3F1; 5F8、L5和3F2; 5F8、L5和3F3; 5F8、L5和3F4; 5F8、L5和3F5; 5F8、L5和3F6; 5F8、L5和3F7; 5F8、L5和3F8; 5F9、L5和3F1; 5F9、L5和3F2; 5F9、L5和3F3; 5F9、L5和3F4; 5F9、L5和3F5; 5F9、L5和3F6; 5F9、L5和3F7; 或5F9、L5和3F8。

[0496] 在一个实施方案中,分子支架可包含一个或多个本领域已知的接头。接头可以将各区域或将一个分子支架与另一个分开。作为非限制性实例,分子支架可以是多顺反子。

[0497] 在一个实施方案中,使用以下特性中的至少一种来设计调节性多核苷酸:环变体、种子错配/凸起/摆动变体、茎错配、环变体和基茎错配变体、种子错配和基茎错配变体(basal stem mismatch variant)、茎错配和基茎错配变体、种子摆动和基茎摆动变体或茎序列变体。

[0498] 引入细胞

[0499] 可以将siRNA分子递送至靶细胞以靶向靶细胞内的目标基因。在一些实施方案中,细胞可以包括但不限于哺乳动物起源的细胞、人起源的细胞、胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、神经干细胞、神经祖细胞和分化的神经细胞。

[0500] 在一些实施方案中,siRNA分子(例如,siRNA双链体)可以使用病毒载体(例如AAV颗粒)引入细胞中。对这些AAV颗粒进行了工程化和优化,以促进siRNA分子进入不易被转染修饰的细胞,例如神经元。而且,一些合成的病毒载体具有将shRNA整合到细胞基因组中的能力,从而导致稳定的siRNA表达和靶基因的长期敲低。以这种方式,将病毒载体工程化为用于特定递送的载体,同时缺乏在野生型病毒中发现的有害复制和/或整合特征。

[0501] 在一些实施方案中,通过使细胞与包含亲脂性载体和含有编码siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒的组合物接触,将siRNA分子引入细胞。在其他实施方案中,通过用AAV颗粒

转染或感染细胞来将siRNA分子引入细胞,所述AAV颗粒包含当在细胞中转录时能够产生siRNA分子的核酸序列。在一些实施方案中,通过将包含当在细胞中转录时能够产生siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒注射到细胞中来将siRNA分子引入细胞。

[0502] 在一些实施方案中,可以将包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒转导到细胞中。

[0503] 在其他实施方案中,可以通过电穿孔将包含编码siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒递送到细胞中(例如,美国专利申请公开号20050014264;其内容通过引用整体并入本文)。

[0504] 引入包含本文所述的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒的其他方法可包括如美国专利申请公开号20120264807中所述的光化学内在化,其内容通过引用整体并入本文。

[0505] 在一个实施方案中,可以将来自任何相关物种(例如但不限于人、狗、小鼠、大鼠或猴)的AAV颗粒引入细胞中。

[0506] 在一个实施方案中,可以将AAV颗粒引入与待治疗的疾病相关的细胞中。作为非限制性实例,该疾病是tau蛋白病和/或阿尔茨海默氏病,并且靶细胞是内嗅皮层、海马体或皮层神经元。

[0507] 在一个实施方案中,可以将AAV颗粒引入具有高水平靶序列内源性表达的细胞中。

[0508] 在另一个实施方案中,可以将AAV颗粒引入具有低水平靶序列内源性表达的细胞中。

[0509] 在一个实施方案中,细胞可以是具有高AAV转导效率的细胞。

[0510] 在其他实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以用于将siRNA分子递送至中枢神经系统(例如,美国专利号6,180,613;其内容通过引用整体并入本文)。

[0511] 在一些方面,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以进一步包含修饰的衣壳,其包含来自非病毒来源的肽。在其他方面,AAV颗粒可以包含CNS特异性(例如CNS或CNS组织嗜性)嵌合衣壳,以促进将编码的siRNA双链体递送至脑和脊髓。例如,可以构建来自显示CNS嗜性的AAV变体的cap核苷酸序列的比对,以识别可变区(VR)序列和结构。

[0512] 在一个实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以编码作为多顺反子分子的siRNA分子。siRNA分子可在siRNA分子的区域之间另外包含一个或多个接头。

[0513] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以包含至少一个编码本文所述的siRNA序列或双链体中的至少一个的调节性多核苷酸。

[0514] 在一个实施方案中,表达载体或病毒基因组从ITR至ITR可包含(从5'至3'陈述)ITR、启动子、内含子、调节性多核苷酸、poly A序列和ITR。

[0515] 在一个实施方案中,编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子的下游,该启动子例如但不限于CMV、U6、H1、CBA或具有SV40内含子的CBA启动子。此外,编码的siRNA分子在表达载体中还可位于聚腺苷酸化序列的上游。作为非限制性实例,编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的1、2、3、4、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或多于30个氨基酸内。作为另一非限制性实例,编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、

10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30个核苷酸内。作为非限制性实例，编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或多于25%的核苷酸内。作为另一非限制性实例，编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的前1-5%、1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、5-10%、5-15%、5-20%、5-25%、10-15%、10-20%、10-25%、15-20%、15-25%或20-25%的核苷酸内。

[0516] 在一个实施方案中，编码的siRNA分子在表达载体中可位于聚腺苷酸化序列的上游。此外，编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子的下游，该启动子例如但不限于CMV、U6、CBA或具有SV40内含子的CBA启动子。作为非限制性实例，编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的1、2、3、4、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或多于30个核苷酸内。作为另一非限制性实例，编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30个核苷酸内。作为非限制性实例，编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或多于25%的核苷酸内。作为另一非限制性实例，编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的前1-5%、1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、5-10%、5-15%、5-20%、5-25%、10-15%、10-20%、10-25%、15-20%、15-25%或20-25%的核苷酸内。

[0517] 在一个实施方案中，编码的siRNA分子可以位于scAAV中。

[0518] 在一个实施方案中，编码的siRNA分子可以位于ssAAV中。

[0519] 在一个实施方案中，编码的siRNA分子在表达载体中可以位于flip ITR的5'端附近。在另一个实施方案中，编码的siRNA分子在表达载体中可以位于flip ITR的3'端附近。在又一个实施方案中，编码的siRNA分子在表达载体中可以位于flop ITR的5'端附近。在又一个实施方案中，编码的siRNA分子在表达载体中可以位于flop ITR的3'端附近。在一个实施方案中，编码的siRNA分子在表达载体中可以位于flip ITR的5'端和flop ITR的3'端之间。在一个实施方案中，编码的siRNA分子在表达载体中可以位于flip ITR的3'端和flop ITR的5'端之间（例如，在flip ITR的5'端与flop ITR的3'端或在flop ITR的3'端和flip ITR的5'端之间的中间）。作为非限制性实例，编码的siRNA分子在表达载体中可以位于ITR（例如Flip或Flop ITR）的5'或3'端下游的1、2、3、4、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或多于30个核苷酸内。作为非限制性实例，编码的siRNA分子在表达载体中可以位于ITR（例如Flip或Flop ITR）的5'或3'端上游的1、2、3、4、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或多于30个核苷酸内。作为另一个非限制性实例，编码的siRNA分子在表达载体中可以位于ITR（例如Flip或Flop ITR）的5'或3'端下游的1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30个核苷酸内。作为另一个非限制性实例，编码的siRNA分子在表达载体中可以位于ITR（例如Flip或Flop ITR）的5'或3'端上游的1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30个核苷酸内。

酸内。作为非限制性实例,编码的siRNA分子在表达载体中可以位于ITR(例如Flip或Flop ITR)的5'或3'端上游的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或大于25%的核苷酸内。作为另一个非限制性实例,编码的siRNA分子在表达载体中可以位于ITR(例如Flip或Flop ITR)的5'或3'端下游的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或大于25%内。

[0520] 在一个实施方案中,可以配制包含siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒用于CNS递送。可以使用穿过血脑屏障的药物。可以使用工程化用于有效跨越血脑屏障的衣壳。此类衣壳或肽插入物的非限制性实例包括VOY101、VOY201、AAVPHP.N、AAVPHP.A、AAVPHP.B、PHP.B2、PHP.B3、G2A3、G2B4、G2B5、PHP.S及其变体。例如,可以将siRNA分子靶向脑血屏障内皮的一些细胞穿透肽可用于配制靶向目标基因的siRNA双链体。

[0521] 在一个实施方案中,可以配制包含本发明目标有效载荷(例如Frataxin、APOE、Tau)的核酸序列的AAV颗粒用于CNS递送。可以使用穿过血脑屏障的药物。可以使用工程化用于有效跨越血脑屏障的衣壳。此类衣壳或肽插入物的非限制性实例包括VOY101、VOY201、AAVPHP.N、AAVPHP.A、AAVPHP.B、PHP.B2、PHP.B3、G2A3、G2B4、G2B5、PHP.S及其变体。例如,将有效载荷传递至脑血屏障内皮的一些细胞穿透肽可用于配制目标基因的有效载荷。

[0522] 在一个实施方案中,可以将包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒直接施用于CNS。作为非限制性实例,载体包含编码靶向ApoE2的siRNA分子的核酸序列。作为非限制性实例,载体包含编码靶向ApoE3的siRNA分子的核酸序列。作为非限制性实例,载体包含编码靶向ApoE4的siRNA分子的核酸序列。作为非限制性实例,载体包含编码靶向SOD1的siRNA分子的核酸序列。作为非限制性实例,载体包含编码靶向HTT的siRNA分子的核酸序列。作为非限制性实例,载体包含编码靶向Tau的siRNA分子的核酸序列。

[0523] 在特定的实施方案中,可以以促进载体或siRNA分子进入中枢神经系统并渗入CNS组织和/或细胞的方式施用包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒的组合物。

[0524] 在一个实施方案中,可以治疗有效量的siRNA双链体或dsRNA向受试者施用AAV颗粒(例如,通过鞘内施用于受试者的CNS),以靶向脊髓和/或脑干中的运动神经元和星形胶质细胞。作为非限制性实例,siRNA双链体或dsRNA可减少靶蛋白或mRNA的表达。作为另一个非限制性实例,siRNA双链体或dsRNA可以抑制靶基因或蛋白并降低靶基因或蛋白介导的毒性。靶蛋白和/或mRNA以及靶基因和/或蛋白介导的毒性的降低可以在几乎没有增强的炎症的情况下实现。

[0525] II. 制剂和递送

[0526] 药物组合物

[0527] 根据本发明,可以将AAV颗粒制备为药物组合物。应理解,这样的组合物必须包含一种或多种活性成分,并且最通常地是药学上可接受的赋形剂。

[0528] 根据本公开的药物组合物中的活性成分(例如AAV颗粒)、药学上可接受的赋形剂和/或任何额外成分的相对量可以变化,这取决于正在治疗的受试者的本性、大小和/或状况,并且还取决于要施用所述组合物的途径。例如,组合物可以包含0.1%至99%(w/w)的活性成分。作为实例,组合物可以包含0.1%至100%、例如0.5至50%、1-30%、5-80%、至少80%(w/w)的活性成分。

[0529] 在一些实施方案中,本文所述的AAV颗粒药物组合物可包含至少一种有效载荷。作

为非限制性实例,药物组合物可包含具有1、2、3、4或5种有效载荷的AAV颗粒。

[0530] 尽管本文提供的药物组合物的描述主要针对适合于对人施用的药物组合物,本领域技术人员应理解,此类组合物通常适合于施用于任何其他动物,例如非人类动物,例如非人类哺乳动物。修饰适合于施用于人的药物组合物以使组合物适合于施用于各种动物是众所周知的,并且本领域的兽医药理师可以仅通过普通的实验(如果有)设计和/或进行这种修饰。预期施用药物组合物的受试者包括但不限于人和/或其他灵长类;哺乳动物,包括与商业有关的哺乳动物,例如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠、大鼠、禽类,包括与商业相关的禽类,例如家禽、鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0531] 在一些实施方案中,将组合物施用于人、人类患者或受试者。

[0532] 制剂

[0533] 本发明的制剂可以包括但不限于盐水、脂质体,这样的制备方法包括将活性成分与脂质纳米颗粒、聚合物、肽、蛋白、被病毒载体转染的细胞(例如,用于转移或移植到细胞中)及其组合结合的步骤。

[0534] 本文所述的药物组合物的制剂可以通过药理学领域中已知的或以后开发的任何方法来制备。如本文所用,术语“药物组合物”是指包含至少一种活性成分和任选地一种或多种药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0535] 通常,赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分。如本文所用,短语“活性成分”通常是指带有编码本发明的多肽的有效载荷区的AAV颗粒,或由本文所述的AAV颗粒的病毒基因组编码的终产物。

[0536] 本文所述的AAV颗粒和药物组合物的制剂可以通过药理学领域中已知或以后开发的任何方法来制备。通常,这样的制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分结合,然后如果必要和/或期望,将产品分割、成型和/或包装成所需的单剂量或多剂量单位。

[0537] 根据本公开的药物组合物可以散装、作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量制备、包装和/或销售。本文中使用的“单位剂量”表示包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将要施用给受试者的活性成分的剂量,和/或这样的剂量的合宜分数,如这样的剂量的二分之一或三分之一。

[0538] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以在pH为约7.0的含0.001%普朗尼克酸(F-68)的PBS中配制。

[0539] 在一些实施方案中,本文所述的AAV制剂可包含足够的AAV颗粒以表达至少一种表达的功能有效载荷。作为非限制性实例,AAV颗粒可包含编码1、2、3、4或5个功能性有效载荷的病毒基因组。

[0540] 在一些实施方案中,本文所述的制剂可包含至少一个AAV颗粒,其包含编码目标蛋白的核酸序列。目标蛋白可以包括但不限于抗体、AADC、APOE2、Fratatin、ATP2A2和/或S100A1。

[0541] 在一些实施方案中,本文所述的制剂可包含至少一个AAV颗粒,其包含编码本文所述的siRNA分子的核酸序列。在一个实施方案中,siRNA分子可以在一个靶位点靶向目标基因。在另一个实施方案中,所述制剂包含多个AAV颗粒,每个AAV颗粒包含编码在不同靶位点靶向目标基因的siRNA分子的核酸序列。靶基因可以靶向2、3、4、5或超过5个位点。在一个实

施方案中,靶基因可以包括但不限于SOD1、HTT、APOE和MAPT。

[0542] 根据本发明,可以配制AAV颗粒用于CNS递送。可以使用穿过血脑屏障的药物。例如,可以将可以靶向分子到脑血屏障内皮的分子的一些细胞穿透肽用于配制(例如,Mathupala,Expert Opin Ther Pat.,2009,19,137-140;其内容通过引用整体并入本文)。

[0543] 在其他实施方案中,可以配制本发明的AAV颗粒以递送至其他组织和器官,例如心血管组织。

[0544] 赋形剂和稀释剂

[0545] 可以使用一种或多种赋形剂或稀释剂配制本发明的AAV颗粒,以(1)增加稳定性;(2)增加细胞转染或转导;(3)允许持续或延迟释放有效载荷;(4)改变生物分布(例如,将病毒颗粒靶向特定的组织或细胞类型);(5)增加编码蛋白的翻译;(6)改变编码蛋白的释放特性和/或(7)允许可调节地表达本发明的有效载荷。

[0546] 在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂可以是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯的。在某些实施方案中,赋形剂被批准用于人类和用于兽医学应用。在某些实施方案中,赋形剂可以被美国食品和药品管理局批准。在某些实施方案中,赋形剂可以属于药用级。在某些实施方案中,赋形剂可以满足美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0547] 本文中使用的赋形剂包括但不限于任意种和所有的溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体溶媒、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂等,只要它们适合于所希望的特定剂型。用于配制药物组合物的各种赋形剂和用于制备组合物的技术是本领域已知的(参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro,Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2006;通过引用整体并入本文)。在本公开的范围内可以预见到常规赋形剂介质的应用,但是除了任何常规赋形剂介质可能与物质或它的衍生物不相容以外,诸如通过产生任何不希望的生物学效应或另外以有害方式与药物组合物的任意其它组分相互作用。

[0548] 实例性的稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干燥的淀粉、玉米淀粉、糖粉等,和/或它们的组合。

[0549] 无活性成分

[0550] 在一些实施方案中,所述制剂可以包含至少一种无活性成分。本文所用的术语“无活性成分”表示一种或多种对制剂中包括的药物组合物的活性成分的活性没有贡献的试剂。在某些实施方案中,在本发明的制剂中可以使用的全部、没有或一些无活性成分可以被美国食品和药品管理局(FDA)批准。

[0551] 在一个实施方案中,AAV颗粒药物组合物包含至少一种无活性成分,例如但不限于1,2,6-己三醇;1,2-二肉豆蔻酰基-Sn-甘油-3-(磷酸-S-(1-甘油));1,2-二肉豆蔻酰基-Sn-甘油-3-磷酸胆碱;1,2-二油酰基-Sn-甘油-3-磷酸胆碱;1,2-二棕榈酰基-Sn-甘油-3-(磷酸-Rac-(1-甘油));1,2-二硬脂酰基-Sn-甘油-3-(磷酸-Rac-(1-甘油));1,2-二硬脂酰基-Sn-甘油-3-磷酸胆碱;1-O-甲苯基双胍;2-乙基-1,6-己二醇;乙酸;冰醋酸;乙酸酐;丙酮;丙酮亚硫酸氢钠;乙酰化羊毛脂醇;乙酰化甘油单酯;乙酰半胱氨酸;乙酰色氨酸,DL-;丙烯酸酯共聚物;丙烯酸-丙烯酸异辛酯共聚物;丙烯酸胶粘剂788;活性炭;Adcote

72A103;粘合带;己二酸;Aerotex树脂3730;丙氨酸;聚集白蛋白;胶体白蛋白;人类白蛋白;醇;脱水醇;变性醇;稀释醇; α 环糊精;海藻酸;烷基磺酸铵甜菜碱;烷基芳基磺酸钠;尿囊素;烯丙基 α -紫罗兰酮;杏仁油; α -松油醇; α -生育酚;乙酸 α -生育酚,D1-; α -生育酚,D1-;乙酸铝;尿囊素氯羟基铵(Aluminum Chlorhydroxy Allantoinate);氢氧化铝;水合氢氧化铝-蔗糖;氢氧化凝胶;氢氧化铝凝胶F 500;氢氧化铝凝胶F 5000;单硬脂酸铝;氧化铝;铝聚酯;硅酸铝;淀粉辛烯基琥珀酸铝;硬脂酸铝;碱式乙酸铝;无水硫酸铝;Amerchol C;Amerchol-Cab;氨基甲基丙醇;氨;氨溶液;浓氨溶液;乙酸铵;氢氧化铵;月桂基硫酸铵;壬苯醇醚-4硫酸铵;C-12-C-15线性伯醇乙氧基化物铵盐;硫酸铵;Ammonyx;Amphoteric-2;Amphoteric-9;茴香烯;无水柠檬酸;无水葡萄糖;无水乳糖;无水柠檬酸三钠;茴香油;Anoxid Sbn;消泡剂;安替比林;阿帕氟烷;杏仁油Peg-6酯;优色林(Aquaphor);精氨酸;阿拉西(Arlacel);抗坏血酸;棕榈酸抗坏血酸酯;天冬氨酸;秘鲁香脂;硫酸钡;蜂蜡;合成蜂蜡;Beheneth-10;膨润土;苯扎氯铵;苯磺酸;苜蓿素氯铵;苜蓿素溴铵;苯甲酸;苯甲醇;苯甲酸苯甲酯;苜蓿素; β 环糊精;二聚阿帕西肽;碱式没食子酸铋;硼酸;溴克利那;丁烷;丁基醇;乙烯基甲基醚/马来酸酐共聚物丁酯(125000Mw);硬脂酸丁酯;丁基化羟基茴香醚;丁基化羟甲苯;丁二醇;对羟基苯甲酸丁酯;丁酸;C20-40Pareth-24;咖啡因;钙;碳酸钙;氯化钙;葡庚糖酸钙;氢氧化钙;乳酸钙;考布曲钙;卡地酰胺钠;钙塞酸三钠(CaloxetateTrisodium);卡特里多钙(Calteridol Calcium);加拿大树胶(Canada Balsam);辛酸/癸酸甘油三酯;辛酸/癸酸/硬脂酸甘油三酯;卡普坦;Captisol;焦糖;卡波姆1342;卡波姆1382;卡波姆934;卡波姆934p;卡波姆940;卡波姆941;卡波姆980;卡波姆981;B型卡波姆均聚物(烯丙基季戊四醇交联);C型卡波姆均聚物(烯丙基季戊四醇交联);二氧化碳;羧基乙烯基共聚物;羧甲基纤维素;羧甲基纤维素钠;羧聚乙烯;角叉菜胶;角叉菜胶盐;蓖麻油;雪松叶油;纤维素;微晶纤维素;Cerasynt-Se;地蜡;Ceteareth-12;Ceteareth-15;Ceteareth-30;鲸蜡硬脂醇/Ceteareth-20;鲸蜡硬脂基己酸乙酯Ceteth-10;Ceteth-2;Ceteth-20;Ceteth-23;鲸蜡硬脂醇;西曲氯铵;鲸蜡醇;鲸蜡酯蜡;棕榈酸鲸蜡酯;鲸蜡基氯化吡啶;氯丁醇;氯丁醇半水合物;无水氯丁醇;氯甲酚;氯二甲苯酚;胆固醇;胆甾醇聚醚;胆甾醇聚醚-24;柠檬酸盐;柠檬酸;一水合柠檬酸;含水柠檬酸;椰油酰胺醚硫酸盐;可卡因氧化物;可可甜菜碱;可可二乙醇酰胺;可可单乙醇酰胺;可可脂;可可甘油;椰子油;氢化椰子油;氢化椰子油/棕榈仁油甘油酯;椰油酰基癸酰癸酸酯;光亮可乐果种子提取物;胶原;着色悬浮液;玉米油;棉籽油;乳膏基质;肌酸;肌酐酐;甲酚;交联羧甲基纤维素钠;交联聚维酮;硫酸铜;无水硫酸铜;环甲硅油;环甲硅油/二甲硅油共聚多元醇;半胱氨酸;盐酸半胱氨酸;无水半胱氨酸盐酸盐;半胱氨酸,D1-;D&C28号红;D&C33号红;D&C36号红;D&C39号红;D&C10号黄;达伐吡啶;Daubert 1-5Pestr(Matte)164z;癸基甲基亚砷;Dehydag Wax Sx;脱氢乙酸;Dehymuls E;苯甲酸地那铵;脱氧胆酸;葡聚糖;葡聚糖40;糊精;右旋糖;一水合右旋糖;葡右旋糖溶液;泛影酸;重氮烷基脲;二氯苄醇;二氯二氟甲烷;二氯四氟乙烷;二乙醇胺;焦碳酸二乙酯;癸二酸二乙酯;二乙二醇单乙基醚;邻苯二甲酸二乙基己酯;氨基乙酸二羟基铝;二异丙醇胺;己二酸二异丙酯;二亚油酸二异丙酯;聚二甲基硅氧烷350;聚二甲基硅氧烷共聚醇;聚二甲基硅氧烷Mdx4-4210;聚二甲基硅氧烷药液360;二甲基异山梨醇;二甲基亚砷;甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-甲基丙烯酸丁酯-甲基丙烯酸甲酯共聚物;二甲基二十八烷基铵膨润土;二甲基硅氧烷/甲基乙烯基硅氧烷共聚物;地乐酚

铵盐;二棕榈酰磷脂酰甘油,D1-;二丙二醇;椰油酰两性基二乙酸二钠;月桂醇聚醚磺基琥珀酸酯二钠;月桂基磺基琥珀酸二钠;黄基水杨酸二钠;地芬净;二乙烯基苯苯乙烯共聚物;Dmdm乙内酰脲;二十二醇;多库酯钠;Duro-Tak280-2516;Duro-Tak 387-2516;Duro-Tak 80-1196;Duro-Tak 87-2070;Duro-Tak87-2194;Duro-Tak 87-2287Duro-Tak 87-2296;Duro-Tak 87-2888;Duro-Tak87-2979;乙二胺四乙酸钙二钠;乙二胺四乙酸钠;无水乙二胺四乙酸二钠;乙二胺四乙酸钠;乙二胺四乙酸;蛋磷脂;辛苯氧磺钠(Entsufon);辛苯氧磺钠;依匹乳糖;盐酸差向四环素;精华花束9200(Essence Bouquet 9200);盐酸乙醇胺;乙酸乙酯;油酸乙酯;乙基纤维素;乙二醇;乙烯乙酸乙烯酯共聚物;乙二胺;乙二胺二盐酸盐;乙烯-丙烯共聚物;乙烯-乙酸乙烯酯共聚物(28%乙酸乙烯酯);乙烯-乙酸乙烯酯共聚物(9%乙酸乙烯酯);羟基硬脂酸乙基己酯;对羟基苯甲酸乙酯;桉树油;依沙美肟;可食用脂肪;硬脂;脂肪酸酯;脂肪酸季戊四醇酯;脂肪酸;脂肪醇柠檬酸酯;脂肪醇;Fd&C 1号蓝;Fd&C 3号绿;Fd&C 4号红;F&C 40号红;Fd&C 10号黄(已摘牌);Fd&C 5号黄;Fd&C 6号黄;氯化铁;氧化铁;调味剂89-186;调味剂89-259;调味剂Df-119;调味剂Df-1530;增味剂;调味剂Fig 827118;调味剂覆盆子Pfc-8407;调味剂罗地亚药品号Rf 451;氟氯烃;甲醛;甲醛溶液;分馏椰子油;香料3949-5;香料520a;香料6.007;香料91-122;香料9128-Y;香料93498g;香料冷杉号5124;香料芬芳10328;香料Chemoderm 6401-B;香料Chemoderm 6411;香料乳膏号73457;香料Cs-28197;香料Felton 066m;香料Firmenich 47373;香料Givaudan Ess 9090/1c;香料H-6540;香料草本10396;香料Nj-1085;香料P 0 Fl-147;香料Pa 52805;香料Pera Derm D;香料Rbd-9819;香料Shaw Mudge U-7776;香料Tf 044078;香料Ungerer Honeysuckle K 2771;香料Ungerer N5195;果糖;氧化钆;半乳糖;伽玛环糊精;明胶;交联明胶;明胶海绵;结冷胶(低酰基);Gelva 737;龙胆酸;龙胆酸乙醇酰胺;葡庚糖酸钠;葡庚糖酸钠二水合物;葡糖内酯;葡萄糖醛酸;谷氨酸D1-;谷胱甘肽;甘油;氢化松香甘油酯;柠檬酸甘油酯;异硬脂酸甘油酯;月桂酸甘油酯;单硬脂酸甘油酯;油酸甘油酯;油酸甘油酯/丙二醇;棕榈酸甘油酯;蓖麻酸甘油酯;硬脂酸甘油酯;甘油硬脂酸酯-月桂醇聚醚-23;甘油硬脂酸酯/Peg硬脂酸酯;甘油硬脂酸酯/Peg-100硬脂酸酯;甘油硬脂酸酯/Peg-40硬脂酸酯;硬脂酸甘油酯-硬脂酰氨基乙基二乙胺;三油酸甘油酯;甘氨酸;盐酸甘氨酸;二硬脂酸乙二醇酯;硬脂酸乙二醇酯;盐酸胍;瓜尔胶;护发素(18n195-1m);庚烷;羟乙基淀粉;己二醇;高密度聚乙烯;组氨酸;人白蛋白微球;透明质酸钠;烃;增塑剂凝胶;盐酸;稀释盐酸;氢化可的松;水凝胶聚合物;过氧化氢;氢化蓖麻油;氢化棕榈油;氢化棕榈/棕榈仁油Peg-6酯;氢化聚丁烯635-690;氢氧根离子;羟乙基纤维素;羟乙基哌嗪乙烷磺酸;羟甲基纤维素;羟基硬脂酸羟基二十八完醇酯;羟丙基纤维素;羟丙基甲基纤维素2906;羟丙基-β-环糊精;羟丙甲纤维素2208(15000Mpa.S);羟丙甲纤维素2910(15000Mpa.S);羟丙甲纤维素;咪脲;碘;碘沙酸;盐酸碘法明;爱尔兰苔藓提取物;异丁烷;Isoceteth-20;异亮氨酸;丙烯酸异辛酯;异丙醇;异硬脂酸异丙酯;肉豆蔻酸异丙酯;肉豆蔻酸异丙酯-肉豆蔻醇;棕榈酸异丙酯;硬脂酸异丙酯;异硬脂酸;异硬脂醇;等渗氯化钠溶液;Jelene;高岭土;Kathon Cg;Kathon Cg II;乳酸盐/酯;乳酸;D1-乳酸;L-乳酸;乳糖酸;乳糖;一水合乳糖;含水乳糖;Laneth;羊毛脂;羊毛脂醇-矿物油;羊毛脂醇;无水羊毛脂;羊毛脂胆固醇;羊毛脂非离子衍生物;乙氧基化羊毛脂;氢化羊毛脂;劳拉氯铵;氧化月桂胺;月桂基二甲基铵水解动物胶原蛋白;月桂醇聚醚硫酸盐;;月桂醇聚醚-2;月桂醇聚醚-23;月桂醇聚醚-4;月桂酸二乙醇酰胺;月桂酸

肉豆蔻二乙醇酰胺;月桂酰肌氨酸;乳酸月桂酯;月桂基硫酸盐;薰衣草花顶(Lavandula Angustifolia Flowering Top);卵磷脂;未漂白卵磷脂;鸡蛋卵磷脂;氢化卵磷脂;氢化大豆卵磷脂;大豆卵磷脂;柠檬油;亮氨酸;乙酰丙酸;利多苯宁;轻质矿物油;轻质矿物油(85Ssu);柠檬烯, (+/-)-;Lipocol Sc-15;赖氨酸;乙酸赖氨酸;一水合赖氨酸;硅酸铝镁;硅酸铝镁水合物;氯化镁;硝酸镁;硬脂酸镁;马来酸;甘露醇;磺化脂肪醇(Maprofix);甲溴苯宁(Mebrofenin);医用胶粘剂改性S-15;医用消泡剂A-F乳液;亚甲基双磷酸氢钠;亚甲基二磷酸;葡甲胺;薄荷醇;间甲酚;偏磷酸;甲磺酸;甲硫氨酸;甲醇;甲基葡萄糖-10;甲基葡萄糖-20;甲基葡萄糖酸20倍半硬脂酸酯;倍半硬脂酸甲基葡萄糖;月桂酸甲酯;甲基吡咯烷酮;水杨酸甲酯;硬脂酸甲酯;甲基硼酸;甲基纤维素(4000Mpa.S);甲基纤维素;甲基氯异噻唑啉酮;亚甲基蓝;甲基异噻唑啉酮;对羟基苯甲酸甲酯;微晶蜡;矿物油;甘油单酯和甘油二酯;柠檬酸单硬脂酯;一硫代甘油;多固醇提取物(Multisterol Extract);肉豆蔻醇;乳酸肉豆蔻酯;肉豆蔻基- γ -氯化吡啶甲酸;N-(氨基甲酰基-甲氧基Peg-40)-1,2-二硬脂酰基-脑磷脂钠;N,N-二甲基乙酰胺;烟酰胺;1,2-环己二酮二肟;硝酸;氮;碘化壬苯醇醚;壬苯醇醚-15;壬苯醇醚-9;诺氟烷;麦片;十八烯-1/马来酸共聚物;辛酸;水杨酸辛酯(Octisalate);辛苯聚醇-1;辛苯聚醇-40;辛苯聚醇-9;辛基十二烷醇;辛基酚聚亚甲基;油酸;Oleth-10/Oleth-5;Oleth-2;Oleth-20;油醇;油酸油酯;橄榄油;奥昔膦酸二钠;氧喹啉;棕榈仁油;氧化棕榈胺;对羟基苯甲酸酯;石蜡;白色软石蜡;Parfum Creme 45/3;花生油;精制花生油;果胶;Peg 6-32硬脂酸酯/乙二醇硬脂酸酯;Peg植物油;Peg-100硬脂酸酯;Peg-12月桂酸甘油酯;PEG-120硬脂酸甘油酯;Peg-120甲基葡萄糖二油酸酯;Peg-15椰油胺;Peg-150二硬脂酸酯;Peg-2硬脂酸酯;Peg-20失水山梨糖醇异硬脂酸酯;Peg-22甲醚/十二烷基二醇共聚物;Peg-25丙二醇硬脂酸酯;Peg-4二月桂酸酯;Peg-4月桂酸酯;Peg-40蓖麻油;Peg-40失水山梨聚糖二异硬脂酸酯;Peg-45/十二烷基二醇共聚物;Peg-5油酸酯;Peg-50硬脂酸酯;Peg-54氢化蓖麻油;Peg-6异硬脂酸酯;Peg-60蓖麻油;Peg-60氢化蓖麻油;PEG-7甲醚;Peg-75羊毛脂;Peg-8月桂酸酯;Peg-8硬脂酸酯;聚乙二醇7硬脂酸酯;十五内酯;季戊四醇可可酸酯(Pentaerythritol Cocoate);喷替酸五钠;喷替酸三钠钙;戊酸;薄荷油;全氟丙烷;香水25677;香水花束;香水E-1991;香水Gd 5604;香水Tana 90/42Scba;香水W-1952-1;凡士林;白色凡士林;石油馏分;苯酚;液化苯酚;Phenonip;苯氧乙醇;苯丙氨酸;苯乙醇;乙酸苯汞;硝酸苯汞;鸡蛋磷脂酰甘油;磷脂;鸡蛋磷脂;Phospholipon 90g;磷酸;松针油(Pinus Sylvestris);哌嗪六水合物;Plastibase-50w;聚克立林;泊利氯铵;泊洛沙姆124;泊洛沙姆181;泊洛沙姆182;泊洛沙姆188;泊洛沙姆237;泊洛沙姆407;聚(双(P-羧苯氧基)丙烷酐);癸二酸;聚(二甲基硅氧烷/甲基乙烯基硅氧烷/甲基氢硅氧烷)二甲基乙烯基或二甲基羟基或三甲基封端;聚(DL-乳酸-共-甘氨酸)乙酸,(50:50;聚(DL-乳酸-共-乙醇酸)乙酯封端,(50:50;聚丙烯酸(250000Mw);聚丁烯(1400Mw);聚卡波非;聚酯;聚酯多胺共聚物;聚酯人造丝;聚乙二醇1000;聚乙二醇1450;聚乙二醇1500;聚乙二醇1540;聚乙二醇200;聚乙二醇300;聚乙二醇300-1600;聚乙二醇3350;聚乙二醇400;聚乙二醇4000;聚乙二醇540;聚乙二醇600;聚乙二醇6000;聚乙二醇8000;聚乙二醇900;高密度含氧化铁黑聚乙烯(<1%);低密度含硫酸钡聚乙烯(20-24%);聚乙烯T;聚对苯二甲酸亚乙基酯;聚糖乳酸;聚甘油-3油酸酯;聚甘油-4油酸酯;聚甲基丙烯酸羟乙酯;聚异丁烯;聚异丁烯(1100000Mw);聚异丁烯(35000Mw);聚异丁烯178-236;聚异丁烯241-294;聚异丁烯35-

39;低分子量聚异丁烯;中等分子量聚异丁烯;聚异丁烯/聚丁烯胶粘剂;聚丙交酯;多元醇;聚氧乙烯-聚氧丙烯1800;聚氧乙烯醇;聚氧乙烯脂肪酸酯;聚氧乙烯丙烯;聚氧乙烯20十八硬脂基醚;聚氧乙烯35蓖麻油;聚氧乙烯40氢化蓖麻油;聚氧乙烯40硬脂酸酯;聚氧乙烯400硬脂酸酯;聚氧乙烯6和聚氧乙烯32棕榈硬脂酸酯;聚氧乙烯二硬脂酸酯;聚氧乙烯甘油硬脂酸酯;聚氧乙烯羊毛脂;聚氧乙烯棕榈酸酯;聚氧乙烯硬脂酸酯;聚丙烯;聚丙二醇;聚季铵盐-10;聚季铵盐-7 (70/30丙烯酰胺/二烯丙基二甲基氯化铵;聚硅氧烷;聚山梨酯20;聚山梨酯40;聚山梨酯60;聚山梨酯65;聚山梨酯80;聚氨酯;聚乙烯乙酸酯;聚乙烯醇;聚氯乙烯;聚氯乙烯-聚乙酸乙烯酯共聚物;聚乙烯吡啶;罂粟籽油;钾碱;乙酸钾;钾明矾;碳酸氢钾;亚硫酸氢钾;氯化钾;柠檬酸钾;氢氧化钾;焦亚硫酸钾;磷酸氢二钾;磷酸二氢钾;钾皂;山梨酸钾;聚维酮丙烯酸酯共聚物;聚维酮水凝胶;聚维酮K17;聚维酮K25;聚维酮K29/32;聚维酮K30;聚维酮K90;聚维酮K90f;聚维酮/二十碳烯共聚物;聚维酮;Ppg-12/Smdi共聚物;Ppg-15硬脂醚;Ppg-20甲基葡萄糖醚二硬脂酸酯;Ppg-26油酸酯;Product Wat;脯氨酸;Promulgen D;Promulgen G;丙烷;推进剂A-46;没食子酸丙酯;碳酸丙烯酯;丙二醇;丙二醇二乙酸酯;丙二醇二辛酸酯;丙二醇单月桂酸酯;丙二醇棕榈硬脂酸酯;丙二醇棕榈硬脂酸酯;丙二醇蓖麻油酸酯;丙二醇/重氮烷基脲/对羟基苯甲酸甲酯/对羟基苯甲酸丙酯;对羟基苯甲酸丙酯;硫酸鱼精蛋白;蛋白水解物;Pvm/Ma共聚物;季铵盐-15;顺式季铵盐-15;季铵盐-52;Ra-2397;Ra-3011;糖精;糖精钠;无水糖精钠;红花油;变性乙醇3a;变性乙醇40;变性乙醇40-2;变性乙醇40b;Sepineo P 600;丝氨酸;芝麻油;乳木果油;硅橡胶牌医用级管(Silastic Brand Medical Grade Tubing);硅橡胶医用胶粘剂,A型;牙科二氧化硅;硅;二氧化硅;胶体二氧化硅;硅酮;硅酮胶粘剂4102;硅酮胶粘剂4502;硅酮胶粘剂Bio-Psa Q7-4201;硅胶胶粘剂Bio-Psa Q7-4301;硅酮乳液;硅酮/聚酯薄膜带;二甲硅油;二甲硅油乳液;Sipon Ls 20np;苏打粉;乙酸钠;无水乙酸钠;烷基硫酸钠;抗坏血酸钠;苯甲酸钠;碳酸氢钠;硫酸氢钠;亚硫酸氢钠;硼酸钠;十水合硼酸钠;碳酸钠;十水合碳酸钠;一水合碳酸钠;鲸蜡硬脂基硫酸钠;氯酸钠;氯化钠;氯化钠注射液;抑菌氯化钠注射液;胆固醇硫酸钠;柠檬酸钠;椰油酰肌氨酸钠;脱氧胆酸钠;连二亚硫酸钠;十二烷基苯磺酸钠;甲醛次硫酸钠;葡萄糖酸钠;氢氧化钠;次氯酸钠;碘化钠;乳酸钠;L-乳酸钠;月桂醇聚醚-2硫酸钠;月桂醇聚醚-3硫酸钠;月桂醇聚醚-5硫酸钠;月桂酰肌氨酸钠;月桂基硫酸钠;月桂基磺基乙酸钠;焦亚硫酸钠;硝酸钠;磷酸钠;二水合磷酸钠;磷酸氢二钠;无水磷酸氢二钠;二水合磷酸氢二钠;十二水合磷酸氢二钠;七水合磷酸氢二钠;磷酸二氢钠;无水磷酸二氢钠;二水合磷酸二氢钠;一水合磷酸二氢钠;聚丙烯酸钠(2500000Mw);焦磷酸钠;吡咯烷酮羧酸钠;淀粉乙醇酸钠;琥珀酸钠六水合物;硫酸钠;无水硫酸钠;十水合硫酸钠;亚硫酸钠;磺基琥珀酸十一烯酸单烷醇酰胺钠(Sodium Sulfosuccinated Undecylenic Monoalkylolamide);酒石酸钠;硫代乙醇酸钠;硫代马来酸钠;硫代硫酸钠;无水硫代硫酸钠;三偏磷酸钠;二甲苯磺酸钠;Somay 44;山梨酸;失水山梨醇;失水山梨醇异硬脂酸酯;失水山梨酸单月桂酸酯;失水山梨醇单油酸酯;失水山梨糖单棕榈酸酯;失水山梨醇单硬脂酸酯;失水山梨醇倍半油酸酯;失水山梨酸三油酸酯;失水山梨酸三硬脂酸酯;山梨醇;山梨醇溶液;大豆粉;豆油;薄荷油;鲸蜡;角鲨烷;稳定的氧氯配合物(Stabilized Oxychloro Complex);2-乙基己酸亚锡;氯化亚锡;无水氯化亚锡;氟化亚锡;酒石酸亚锡;淀粉;预胶化淀粉1500;玉米淀粉;司拉氯铵;司拉氯铵水辉石/碳酸丙烯酯;硬脂酰氨基乙基二乙胺;硬脂醇聚醚-10;硬脂

醇聚醚-100;硬脂醇聚醚-2;硬脂醇聚醚-20;硬脂醇聚醚-21;硬脂醇聚醚-40;硬脂酸;硬脂酸二乙醇酰胺;硬脂氧基三甲基硅烷;硬脂基三甲基铵水解动物胶原蛋白 (Steartrimonium Hydrolyzed Animal Collagen);硬脂醇;吸入无菌水;苯乙烯/异戊二烯/苯乙烯嵌段共聚物;琥硫酸 (Succimer);琥珀酸;三氯蔗糖;蔗糖;蔗糖二硬脂酸酯;蔗糖聚酯;磺乙酰胺钠;磺丁基醚 β -环糊精;二氧化硫;硫酸;亚硫酸;Surfactol Qs;D-塔格糖;滑石;妥尔油;牛油甘油酯;酒石酸;D1-酒石酸;Tenox;Tenox-2;叔丁基醇;叔丁基过氧化氢;叔丁基对苯二酚;四(2-甲氧基异丁基异氰酸酯)四氟硼酸铜(I);正硅酸四丙基酯;替曲膦;茶碱;硫柳汞;苏氨酸;百里酚;锡;二氧化钛;生育酚;托可索仑;全胃肠外营养脂乳剂;三醋精;三辛酸甘油酯;三氯一氟甲烷;十三烷醇聚醚-10;三乙醇胺月桂基硫酸盐;三氟乙酸;中链甘油三酯;三羟基硬脂精;三(羊毛醇聚醚-4)磷酸酯;三(月桂醇聚醚-4)磷酸酯;柠檬酸三钠二水合物;HEDTA三钠;Triton 720;Triton X-200;三乙醇胺;曲金刚胺;三乙醇胺(TRIS);色氨酸;泰洛沙泊;酪氨酸;十一碳烯酸;Union 76Amsco-Res 6038;尿素;缬氨酸;植物油;氢化植物油甘油酯;氢化植物油;维塞胺;内脂素;粘胶/棉;维生素E;乳化蜡,;Wecobee Fs;白地蜡;白蜡;黄原胶;锌;乙酸锌;碳酸锌;氯化锌和氧化锌。

[0552] 本文公开的AAV颗粒的药物组合物制剂可包括阳离子或阴离子。在一个实施方案中,所述制剂包含金属阳离子,例如但不限于 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{+} 及其组合。作为非限制性实例,制剂可包括与金属阳离子络合的聚合物和组合物(参见例如美国专利号6,265,389和6,555,525,其各自内容通过引用整体并入本文)。

[0553] 本发明的制剂还可包含一种或多种药学上可接受的盐。本文中使用的“药学上可接受的盐”表示公开的化合物的衍生物,其中通过将现有的酸或碱部分转化成其盐形式(例如,通过使游离碱基团与合适的有机酸反应)来修饰母体化合物。药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基如胺的无机酸盐或有机酸盐;酸性残基如羧酸的碱盐或有机盐;等。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、乙酸、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯磺酸、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚糖酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等,以及无毒的铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。本公开的药学上可接受的盐包括形成的母体化合物的常规无毒盐,例如,从无毒的无机或有机酸形成。

[0554] 本公开的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常,通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的量的适当的碱或酸在水或有机溶剂或这两者的混合物中反应,可以制备这样的盐;通常,非水性介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。合适的盐的列表可在以下文献中找到: Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton, Pa.,1985,第1418页,Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,P.H.Stahl

和C.G.Wermuth(编),Wiley-VCH,2008,以及Berge等人,Journal of Pharmaceutical Science,66,1-19(1977);它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[0555] 本文中使用的术语“药学上可接受的溶剂合物”是指这样的本发明的化合物,其中合适的溶剂的分子引入晶格中。合适的溶剂在施用的剂量是生理学上可耐受的。通过从包括有机溶剂、水或其混合物的溶液结晶、重结晶或沉淀,可以制备溶剂合物。合适的溶剂的实例是乙醇、水(例如,一水合物、二水合物和三水合物)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲亚砜(DMSO)、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N'-二甲基乙酰胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苯甲醇、2-吡咯烷酮、苯甲酸苄酯等。当水是溶剂时,溶剂合物被称作“水合物”。

[0556] III. 施用和给药

[0557] 施用

[0558] 在一个实施方案中,可以以治疗有效量向受试者(例如,受试者的CNS)施用AAV颗粒,以减轻受试者的神经学疾病的症状(例如,使用已知的评估方法确定)。

[0559] 通过导致治疗上有效结果的任意递送途径,可以施用本发明的AAV颗粒。这些包括但不限于肠内(进入肠)、胃肠内、硬膜外(进入硬脑膜)、口服(通过口腔)、透皮、大脑内(进入大脑)、脑室内(进入脑室)、软膜下(软膜和CNS实质之间)、颈内动脉(进入颈内动脉)、表皮(应用在皮肤上)、真皮内(进入皮肤本身)、皮下(在皮肤下)、鼻施用(通过鼻)、静脉内(进入静脉)、静脉内快速浓注、静脉内滴注、动脉内(进入动脉)、肌肉内(进入肌肉)、心内(进入心脏)、骨内输注(进入骨髓)、鞘内(进入椎管)、实质内(进入脑组织)、腹膜内(输注或注射进腹膜)、膀胱内输注、玻璃体内(通过眼)、海绵窦内注射(进入病理性腔体)、腔内(进入阴茎的基底)、阴道内施用、子宫内、羊膜外施用、透皮(穿过完整皮肤扩散用于全身分布)、透粘膜(穿过粘膜扩散)、经阴道、吹入法(嗅吸法)、舌下、唇下、灌肠、滴眼(在结膜上)、滴耳、耳(在耳朵中或通过耳朵)、含服(朝向脸颊)、结膜、皮肤、牙(至一个或多个牙)、电渗透、宫颈内、窦内(endosinusal)、气管内、体外、血液透析、渗入、间质、腹部内、羊膜内、关节内、胆内、支气管内、囊内、软骨内(在软骨内)、脊尾内(在马尾内)、脑池内(在小脑延髓池内)、角膜内(在角膜内)、牙冠内(dental intracornal)、冠状动脉内(在冠状动脉内)、阴茎海绵体内(intracorporus cavernosum)(在阴茎海绵体的可扩张空间内)、椎间盘内(在椎间盘内)、导管内(在腺的导管内)、十二指肠内(在十二指肠内)、硬膜内(在硬膜内或下)、表皮内(至表皮)、食管内(至食管)、胃内(在胃内)、牙龈内(在牙龈内)、回肠内(在小肠的远侧部分内)、病灶内(在局部病灶内或直接引入局部病灶)、管腔内(在管腔内)、淋巴管内(在淋巴管内)、骨髓内(在骨的骨髓腔内)、脑膜内(在脑膜内)、心肌内(在心肌内)、眼内(在眼内)、卵巢内(在卵巢内)、心包内(在心包内)、胸膜内(在胸膜内)、前列腺内(在前列腺内)、肺内(在肺或它的支气管内)、窦内(在鼻或眼窝窦内)、椎管内(在脊柱内)、滑膜内(在关节的滑液腔内)、腱内(在肌腱内)、睾丸内(在睾丸内)、鞘内(在脑脊髓轴的任何水平在脑脊液内)、胸腔内(在胸腔内)、小管内(在器官的管内)、肿瘤内(在肿瘤内)、鼓室内(在aurus介质内)、血管内(在一个或多个血管内)、心室内(在心室内)、离子透入法(借助于电流,其中可溶性盐的离子迁移进身体的组织中)、冲洗(浸泡或冲洗开放性创伤或体腔)、喉头(直接在喉上)、鼻胃(穿过鼻并进入胃)、封闭敷裹技术(局部途径施用,其然后被封闭该区域的敷料覆盖)、眼(至外眼)、口咽(直接至口和咽)、胃肠外、经皮、关节周、硬膜外、神经周、牙周、直肠、呼吸

(在呼吸道内,为了局部或全身效应通过口或鼻吸入)、眼球后(脑桥后或眼球后)、软组织、蛛网膜下、结膜下、粘膜下、局部、经胎盘(通过或穿过胎盘)、经气管(穿过气管壁)、经鼓膜(穿过或通过鼓室)、输尿管(至输尿管)、尿道(至尿道)、阴道、骶管阻滞、诊断、神经传导阻滞、胆灌注、心脏灌注、体外光化学疗法和脊柱。

[0560] 在一些实施方案中,可以以允许它们穿过血脑屏障、血管屏障或其他上皮屏障的方式施用AAV颗粒和包含AAV颗粒的组合物。本发明的AAV颗粒可以以任何合适的形式,以液体溶液或悬浮液形式,以适合于液体溶液或在液体溶液中悬浮的固体形式施用。可以将AAV颗粒与任何适当的和药学上可接受的赋形剂一起配制。

[0561] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过单途径施用递送至受试者。

[0562] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可通过多部位施用途径递送至受试者。AAV颗粒可以在2、3、4、5或超过5个部位施用。

[0563] 在一个实施方案中,可以使用快速浓注向受试者施用本发明的AAV颗粒。

[0564] 在一个实施方案中,可以在数分钟、数小时或数天的时间内使用持续递送将本发明的AAV颗粒施用于受试者。输注速率可以根据受试者、分布、制剂或其他递送参数而改变。

[0565] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过肌肉递送途径来递送。(参见,例如,美国专利号6506379;其内容通过引用整体并入本文)。肌肉内施用的非限制性实例包括静脉内注射或皮下注射。

[0566] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过眼内递送途径来递送。眼内施用的非限制性实例包括玻璃体内注射。

[0567] 在一些实施方案中,可以通过外周注射将AAV颗粒施用给受试者。外周注射的非限制性实例包括腹膜内、肌肉内、静脉内、结膜或关节注射。本领域中公开了可以将周围施用的AAV颗粒运输到中枢神经系统,例如运输到运动神经元(例如,美国专利申请公开号20100240739;和20100130594;其各自内容通过引用整体并入本文)。

[0568] 在一个实施方案中,可以通过注射到CSF途径中来递送AAV颗粒。递送至CSF途径的非限制性实例包括鞘内和脑室内给药。

[0569] 在一个实施方案中,可以通过全身递送来递送AAV颗粒。作为非限制性实例,全身递送可以通过血管内施用。

[0570] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过颅内递送施用于受试者(参见,例如,美国专利号8,119,611;其内容通过引用整体并入本文)。

[0571] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过注射施用。作为非限制性实例,本发明的AAV颗粒可以通过注射施用于受试者。

[0572] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过肌肉注射施用。作为非限制性实例,本发明的AAV颗粒可以通过肌肉施用而施用给受试者。

[0573] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过肌肉施用来施用。作为非限制性实例,本发明的AAV颗粒可以通过肌肉内施用而施用于受试者。

[0574] 在一个实施方案中,将本发明的AAV颗粒施用于受试者并转导受试者的肌肉。作为非限制性实例,AAV颗粒通过肌肉内施用来施用。

[0575] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过实质内注射来施用。作为非限制性实例,本发明的AAV颗粒可以通过实质内施用而施用于受试者。

[0576] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过静脉内施用来施用。作为非限制性实例,本发明的AAV颗粒可以通过静脉内施用而施用于受试者。

[0577] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过静脉内递送来施用。

[0578] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过颈动脉内递送来施用。

[0579] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过单剂量静脉内递送来施用。作为非限制性实例,单剂量静脉内递送可以是一次性治疗。在神经疾病的情况下,单剂量静脉内递送可以使患有神经疾病和/或相关症状的受试者产生持久的缓解。缓解可以持续若干分钟,例如但不限于1、2、3、4、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59分钟或多于59分钟;若干小时,例如但不限于1、2、1、2、3、4、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或多于48小时;若干天,例如但不限于1、2、3、4、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或多于31天;若干星期,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或多于16星期;若干个月,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或多于24个月;若干年,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或多于15年。

[0580] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过静脉内递送至DRG伤害感受性神经元来施用。

[0581] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过单剂量静脉内递送至DRG伤害感受性神经元来施用。作为非限制性实例,单剂量静脉内递送可以是一次性治疗。在神经学疾病的情况下,单剂量静脉内递送可以为患有神经学疾病和/或相关症状的受试者提供持久的缓解。缓解可以持续若干分钟,例如但不限于1、2、3、4、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59分钟或多于59分钟;若干小时,例如但不限于1、2、1、2、3、4、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或多于48小时;若干天,例如但不限于1、2、3、4、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或多于31天;若干星期,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或多于16星期;若干个月,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或多于24个月;若干年,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或多于15年。

[0582] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过鞘内注射来施用。作为非限制性实例,本发明的AAV颗粒可以通过鞘内注射来施用。

[0583] 在一个实施方案中,可以以治疗有效量将AAV颗粒施用于小脑延髓池,以转导脊髓运动神经元和/或星形胶质细胞。作为非限制性实例,可以鞘内施用AAV颗粒。

[0584] 在一个实施方案中,可以使用鞘内输注以治疗有效量施用AAV颗粒,以转导脊髓运动神经元和/或星形胶质细胞。

[0585] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过单剂量鞘内注射来施用。作为非限

制性实例,单剂量鞘内注射可以是一次性治疗。在神经学疾病的情况下,单剂量鞘内注射可以为患有神经学疾病和/或相关症状的受试者提供持久的缓解。缓解可以持续若干分钟,例如但不限于1、2、3、4、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59分钟或多于59分钟;若干小时,例如但不限于1、2、1、2、3、4、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或多于48小时;若干天,例如但不限于1、2、3、4、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或多于31天;若干星期,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或多于16星期;若干个月,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或多于24个月;若干年,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或多于15年。

[0586] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过鞘内注射施用于DRG伤害感受性神经元。

[0587] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过单剂量鞘内注射施用于DRG伤害感受性神经元。作为非限制性实例,单剂量鞘内注射可以是一次性治疗。在神经学疾病的情况下,单剂量鞘内注射可以为患有神经学疾病和/或相关症状的受试者提供持久的缓解。缓解可以持续若干分钟,例如但不限于1、2、3、4、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59分钟或多于59分钟;若干小时,例如但不限于1、2、1、2、3、4、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或多于48小时;若干天,例如但不限于1、2、3、4、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或多于31天;若干星期,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或多于16星期;若干个月,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或多于24个月;若干年,例如但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或多于15年。

[0588] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒通过在C1处经鞘内(IT)输注来施用。输注可以持续1、2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或多于15小时。

[0589] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过实质内注射来施用。作为非限制性实例,本发明的AAV颗粒可以通过实质内注射施用于受试者。

[0590] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过实质内注射和鞘内注射来施用。作为非限制性实例,本发明的AAV颗粒可以通过实质内注射和鞘内注射来施用。

[0591] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过皮下注射来施用。作为非限制性实例,本发明的AAV颗粒可以通过皮下注射施用于受试者。

[0592] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以局部施用。作为非限制性实例,本发明的AAV颗粒可以局部施用于受试者。

[0593] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以通过直接注射到脑中来递送。作为非限制性实例,脑递送可以通过纹状体内施用。

[0594] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过纹状体内注射来施用。

[0595] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以通过纹状体内注射和本文所述的另一种给药途径来施用。

[0596] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以通过多于一种的施用途径来递送。作为联合施用的非限制性实例,AAV颗粒可以通过鞘内和脑室内或通过静脉内和实质内施用来递送。

[0597] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以以治疗有效量施用于CNS,以改善患有神经学疾病的受试者的功能和/或存活。作为非限制性实例,载体可以静脉内施用。

[0598] AAV颗粒可以以“治疗有效”量(即足以减轻和/或预防与疾病相关的至少一种症状或提供受试者状况改善的量)来施用。

[0599] 在一个实施方案中,导管可位于脊柱中的多于一个位点,以进行多部位递送。AAV颗粒可以连续和/或快速浓注的方式递送。每个递送位点可以是不同的给药方案,或者相同的给药方案可以用于每个递送位点。作为非限制性实例,递送位点可以在子宫颈和腰部区域中。作为另一个非限制性实例,递送位点可以在子宫颈区中。作为另一个非限制性实例,递送位点可以在腰部区域中。

[0600] 在一个实施方案中,可以在递送本文所述的AAV颗粒之前分析受试者的脊髓解剖结构和病理。作为非限制性实例,与没有脊柱侧弯的受试者相比,患有脊柱侧弯的受试者可以具有不同的给药方案和/或导管位置。

[0601] 在一个实施方案中,在AAV颗粒的递送期间受试者的脊柱的取向可以垂直于地面。

[0602] 在另一个实施方案中,在AAV颗粒的递送期间受试者的脊柱的取向可以与地面水平。

[0603] 在一个实施方案中,在递送AAV颗粒期间,受试者的脊椎可以与地面成一定角度。受试者的脊柱与地面成的角度可以是至少10度、20度、30度、40度、50度、60度、70度、80度、90度、100度、110度、120度、130度、140度、150度或180度。

[0604] 在一个实施方案中,选择递送方法和持续时间以在脊髓中提供广泛的转导。作为非限制性实例,鞘内递送用于沿着脊髓的顶部-尾部长度提供广泛的转导。作为另一个非限制性实例,多位点输注沿着脊髓的顶部-尾部长度提供了更均匀的转导。作为又一个非限制性实例,延长的输注沿着脊髓的顶部-尾部长度提供了更均匀的转导。

[0605] 肠胃外和注射施用

[0606] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物、AAV颗粒可以肠胃外施用。用于口服和肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微乳、溶液、混悬液、糖浆和/或酏剂。除活性成分外,液体剂型还可包含本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和失水山梨糖醇的脂肪酸酯,及其混合物。除惰性稀释剂外,口服组合物还可包括佐剂,例如湿润剂、乳化和悬浮剂、甜味剂、调味剂和/或加香剂。在用于肠胃外施用的某些实施方案中,将组合物与增溶剂(例如CREMOPHOR[®]、醇、油、改性油、二醇、聚山梨酸酯、环糊精、聚合物和/或其组合)混合。在其他实施方案中,包括表面活性剂,例如羟丙基纤维素。

[0607] 可以根据已知技术使用合适的分散剂、湿润剂和/或悬浮剂来配制可注射制剂,例

如无菌可注射水性或油性悬浮液。无菌可注射制剂可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂和/或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液和/或乳剂,例如1,3-丁二醇溶液。可以使用的可接受的溶媒和溶剂是水、U.S.P.级林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。无菌的不挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质。为此,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸如油酸可用于制备注射剂。

[0608] 可注射制剂可以例如通过细菌保持过滤器过滤和/或通过加入无菌固体组合物形式的灭菌剂进行灭菌,所述灭菌固体组合物可以在使用前溶解或分散在无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0609] 为了延长活性成分的作用,通常期望减慢皮下或肌肉内注射的活性成分的吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。活性成分的吸收速率取决于溶解速率,而溶解速率又取决于晶体尺寸和晶体形式。或者,通过将药物溶解或悬浮在油溶媒中来实现肠胃外施用的药物形式的延迟吸收。通过在可生物降解的聚合物(例如聚丙交酯-聚乙交酯)中形成药物的微胶囊基质来制备可注射的储库形式。根据药物与聚合物的比例和所用特定聚合物的性质,可以控制药物的释放速率。其他可生物降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳中来制备储库型可注射制剂。

[0610] 储库施用

[0611] 如本文所述,在一些实施方案中,将本发明的药物组合物、AAV颗粒配制在储库中以延长释放。通常,将特定的器官或组织(“目标组织”)作为施用靶。

[0612] 在本发明的一些方面,本发明的药物组合物、AAV颗粒在空间上保留在靶组织内或靶组织附近。提供了通过使靶组织(其包含一个或多个靶细胞)与药物组合物、AAV颗粒在以下条件下接触,将药物组合物、AAV颗粒提供给哺乳动物受试者的靶组织,所述条件使得药物组合物、AAV颗粒基本保留在靶组织中,意味着至少10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99或大于99.99%的组合物保留在靶组织中。有利地,通过测量进入一个或多个靶细胞的药物组合物和AAV颗粒的量来确定保留。例如,至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或大于99.99%的施用于受试者的药物组合物、AAV颗粒在施用后的一段时间内在细胞内存在。例如,可以使用包含本发明的药物组合物、AAV颗粒和一种或多种转染试剂的水性组合物对哺乳动物受试者进行肌肉注射,并且通过测量靶细胞中存在的药物组合物、AAV颗粒的量来确定保留。

[0613] 本发明的某些方面涉及通过使靶组织(其包含一个或多个靶细胞)与本发明的药物组合物、AAV颗粒在使它们基本保留在靶组织的条件下接触,将本发明的药物组合物、AAV颗粒提供给哺乳动物受试者的靶组织。药物组合物、AAV颗粒包含足够的活性成分,从而在至少一个靶细胞中产生目标作用。在一些实施方案中,药物组合物、AAV颗粒通常包含一种或多种细胞渗透剂,尽管也考虑了具有或不具有药学上可接受的载体的“裸”制剂(例如没有细胞渗透剂或其他试剂)。

[0614] 肺部施用

[0615] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物、AAV颗粒可以适于肺部施用的制剂的形式制备、包装和/或出售。在一些实施方案中,这种施用是通过口腔进行的。在一些实施方案

中,制剂可包含含有活性成分的干燥颗粒。在这样的实施方案中,干燥颗粒的直径可以在约0.5nm至约7nm或约1nm至约6nm的范围内。在一些实施方案中,制剂可以是干粉形式,用于使用包括干粉贮存器的装置施用,该装置可以将推进剂流引导至该干粉贮存器以将这种粉末分散。在一些实施方案中,可以使用自推进溶剂/粉末分配容器。在这样的实施方案中,活性成分可以溶解和/或悬浮在密封容器中的低沸点推进剂中。这样的粉末可包含如下颗粒,其中按重量计至少98%的颗粒具有大于0.5nm的直径和按数量计至少95%的颗粒具有小于7nm的直径。或者,按重量计至少95%的颗粒具有大于1nm的直径,并且按数量计至少90%的颗粒具有小于6nm的直径。干粉组合物可包括固体细粉稀释剂,例如糖,并以单位剂型方便地提供。

[0616] 低沸点推进剂通常包括在大气压下沸点低于65°F的液体推进剂。通常,推进剂可占组合物的50%至99.9% (w/w),而活性成分可占组合物的0.1%至20% (w/w)。推进剂可进一步包含其他成分,例如液体非离子和/或固体阴离子表面活性剂和/或固体稀释剂(其粒径可与包含活性成分的颗粒数量级相同)。

[0617] 配制用于肺部递送的药物组合物可以以溶液和/或悬浮液的液滴形式提供活性成分。这样的制剂可以包含活性成分的水性和/或稀醇溶液和/或悬浮液(任选地无菌)的形式来制备、包装和/或出售,并且可以方便地使用任何雾化和/或雾化装置施用。这样的制剂可以进一步包含一种或多种另外的成分,包括但不限于调味剂,例如糖精钠,挥发油,缓冲剂,表面活性剂和/或防腐剂,例如甲基羟基苯甲酸酯。通过这种施用途径提供的液滴的平均直径可以在约0.1nm至约200nm的范围内。

[0618] 鼻内、鼻部和颊施用

[0619] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物、AAV颗粒可以鼻部和/或鼻内施用。在一些实施方案中,可用于肺部递送的本文所述的制剂也可用于鼻内递送。在一些实施方案中,用于鼻内施用的制剂包含粗粉,所述粗粉包含活性成分并且具有约0.2 μ m至500 μ m的平均粒度。这样的制剂以吸食鼻烟的方式施用,即通过从保持在鼻附近的粉末容器快速吸入通过鼻道。

[0620] 适用于鼻部施用的制剂可以例如包含最低约0.1% (w/w)至最高约100% (w/w)的活性成分,并且可以包含一种或多种本文所述的其他成分。药物组合物可以适合于颊施用的制剂形式来制备、包装和/或出售。这样的制剂可以例如为使用常规方法制备的片剂和/或锭剂的形式,并且可以例如包含0.1%至20% (w/w)的活性成分,余量包含口服可溶解的和/或可降解的组合物以及任选地本文所述的一种或多种其他成分。或者,适合经颊施用的制剂可包括包含活性成分的粉末和/或气雾化和/或雾化溶液和/或悬浮液。当分散时,这样的粉状、气雾化和/或气雾化制剂可包含约0.1nm至约200nm范围内的平均颗粒和/或液滴尺寸,并且还可包含本文所述的任何一种或多种其他成分。

[0621] 眼部或耳部施用

[0622] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物、AAV颗粒可以以适合眼部和/或耳部施用的制剂形式来制备、包装和/或出售。这样的制剂可以例如为滴眼剂和/或滴耳剂的形式,包括例如0.1/1.0% (w/w)的活性成分在水性和/或油性液体赋形剂中的溶液和/或悬浮液。这样的滴剂可以进一步包含缓冲剂、盐和/或本文描述的任何一种或多种其他成分。其他有用的可眼部施用制剂包括以微晶形式和/或脂质体制剂中包含的活性成分的制剂。视网膜

下插入物也可以用作施用形式。

[0623] 递送、剂量和方案

[0624] 本发明提供了向有需要的受试者施用根据本发明的AAV颗粒的方法。本发明的药物、诊断或预防性AAV颗粒和组合物可以是使用有效预防、治疗、控制或诊断疾病、病症和/或状况的任何量和任何施用途向受试者施用。所需的确切量因受试者而异,取决于受试者的物种、年龄和一般状况,疾病的严重程度,特定的组成,其施用方式,其活性方式等。受试者可以是人、哺乳动物或动物。通常将本发明的组合物配制成单位剂型,以易于施用和剂量均匀。然而,应该理解,本发明的组合物的总日使用量可以由主治医师在合理的医学判断范围内决定。对于任何特定个体,特定的治疗有效、预防有效或适当的诊断剂量水平将取决于多种因素,包括正在治疗的疾病和疾病的严重程度;所使用的特定有效载荷的活性;使用的具体组成;患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;施用时间、施用途和所用特定AAV颗粒的排泄速率;治疗的持续时间;与使用的特定AAV颗粒组合使用或与之合用的药物;以及医学领域众所周知的类似因素。

[0625] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的递送由于AAV颗粒的递送而导致最小的严重不良事件(SAE)。

[0626] 在一个实施方案中,可以以多剂量方案递送AAV颗粒。多剂量方案可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10或大于10个剂量。

[0627] 在一个实施方案中,可以通过多位点施用途将AAV颗粒递送至受试者。可以在2、3、4、5或超过5个位点向受试者施用AAV颗粒。

[0628] 在某些实施方案中,根据本发明的AAV颗粒药物组合物可以以足以递送每天约0.0001mg/kg至约100mg/kg、约0.001mg/kg至约0.05mg/kg、约0.005mg/kg至约0.05mg/kg、约0.001mg/kg至约0.005mg/kg、约0.05mg/kg至约0.5mg/kg、约0.01mg/kg至约50mg/kg、约0.1mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg或约1mg/kg至约25mg/kg受试者体重的剂量水平每天一次或多次施用,以获得所需的治疗、诊断或预防效果。应当理解,本领域技术人员可以将上述给药浓度转化为每kg的vg或病毒基因组,或转化为总病毒基因组。

[0629] 在某些实施方案中,根据本公开的AAV颗粒药物组合物可以约10至约600 μ l/位点、50至约500 μ l/位点、100至约400 μ l/位点、120至约300 μ l/位点施用、140至约200 μ l/位点、约160 μ l/位点施用。作为非限制性实例,AAV颗粒可以50 μ l/位点和/或150 μ l/位点施用。

[0630] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物向细胞的递送包括由[VG/小时=mL/小时*VG/mL]定义的递送速率,其中VG是病毒基因组,VG/mL是组合物浓度,和mL/小时是延长递送的速率。

[0631] 在一个实施方案中,将包含根据本发明的AAV颗粒的组合物递送至细胞可以包括每受试者的总浓度为约 1×10^6 VG(病毒基因组)至约 1×10^{16} VG。在一些实施方案中,递送可包含的组合物浓度为约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 2.1×10^{11} 、 2.2×10^{11} 、 2.3×10^{11} 、 2.4×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 2.6×10^{11} 、 2.7×10^{11} 、 2.8×10^{11} 、 2.9×10^{11} 、

3x10¹¹、4x10¹¹、5x10¹¹、6x10¹¹、7x10¹¹、8x10¹¹、9x10¹¹、1x10¹²、2x10¹²、3x10¹²、4x10¹²、5x10¹²、6x10¹²、6.1x10¹²、6.2x10¹²、6.3x10¹²、6.4x10¹²、6.5x10¹²、6.6x10¹²、6.7x10¹²、6.8x10¹²、6.9x10¹²、7x10¹²、8x10¹²、9x10¹²、1x10¹³、2x10¹³、3x10¹³、4x10¹³、5x10¹³、6x10¹³、7x10¹³、8x10¹³、9x10¹³、1x10¹⁴、2x10¹⁴、3x10¹⁴、4x10¹⁴、5x10¹⁴、6x10¹⁴、7x10¹⁴、8x10¹⁴、9x10¹⁴、1x10¹⁵、2x10¹⁵、3x10¹⁵、4x10¹⁵、5x10¹⁵、6x10¹⁵、7x10¹⁵、8x10¹⁵、9x10¹⁵或1x10¹⁶VG。作为非限制性实例，总剂量为1x10¹³VG。作为另一非限制性实例，总剂量为2.1x10¹²VG。作为另一非限制性实例，总剂量为6.3x10¹²VG。

[0634] 在一个实施方案中,每剂量可以施用约 10^5 至 10^6 病毒基因组(单位)。

[0635] 在一个实施方案中,将包含根据本发明的AAV颗粒的组合物递送至细胞可以包含的总浓度为约 1×10^6 VG/mL至约 1×10^{16} VG/mL。在一些实施方案中,递送可包含的组合物浓度为约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1.1×10^{12} 、 1.2×10^{12} 、 1.3×10^{12} 、 1.4×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 1.6×10^{12} 、 1.7×10^{12} 、 1.8×10^{12} 、 1.9×10^{12} 、 2×10^{12} 、 2.1×10^{12} 、 2.2×10^{12} 、 2.3×10^{12} 、 2.4×10^{12} 、 2.5×10^{12} 、 2.6×10^{12} 、 2.7×10^{12} 、 2.8×10^{12} 、 2.9×10^{12} 、 3×10^{12} 、 3.1×10^{12} 、 3.2×10^{12} 、 3.3×10^{12} 、 3.4×10^{12} 、 3.5×10^{12} 、 3.6×10^{12} 、 3.7×10^{12} 、 3.8×10^{12} 、 3.9×10^{12} 、 4×10^{12} 、 4.1×10^{12} 、 4.2×10^{12} 、 4.3×10^{12} 、 4.4×10^{12} 、 4.5×10^{12} 、 4.6×10^{12} 、 4.7×10^{12} 、 4.8×10^{12} 、 4.9×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 6.1×10^{12} 、 6.2×10^{12} 、 6.3×10^{12} 、 6.4×10^{12} 、 6.5×10^{12} 、 6.6×10^{12} 、 6.7×10^{12} 、 6.8×10^{12} 、 6.9×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 6.7×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 或 1×10^{16} VG/mL。

[0636] 在一个实施方案中,将AAV颗粒递送至中枢神经系统(例如实质)的细胞可包含的总组合物浓度为约 1×10^6 VG/mL至约 1×10^{16} VG/mL。在一些实施方案中,递送可包含的总组合物浓度为约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 6.1×10^{12} 、 6.2×10^{12} 、 6.3×10^{12} 、 6.4×10^{12} 、 6.5×10^{12} 、 6.6×10^{12} 、 6.7×10^{12} 、 6.8×10^{12} 、 6.9×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 或 1×10^{16} VG/mL。在一个实施方案中,递送包含的组合物浓度为 1×10^{13} VG/mL。在一个实施方案中,递送包含的组合物浓度为 2.1×10^{12} VG/mL。在一个实施方案中,递送包含的组合物浓度为 1×10^{13} VG/mL。在一个实施方案中,递送包含的组合物浓度为 2×10^{13} VG/mL。在一个实施方案中,递送包含的组合物浓度为 3×10^{11} VG/mL。在一个实施方案中,递送包含的组合物浓度为 3×10^{12} VG/mL。在一个实施方案中,递送包含的组合物浓度为 6.3×10^{12} VG/mL。在一个实施方案中,递送包含的组合物浓度为 3×10^{13} VG/mL。

[0637] 在某些实施方案中,通过使用多次施用(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多次施用),可以递送期望的剂量。当采用多次施用时,可以使用分次剂量施用方案,诸如本文描述的那些。本文中使用的“分次剂量”是将“单一单位剂量”或总每日剂量分成两个或更多个剂量,例如,“单一单位剂量”的两次或更多次施用。本文中使用的“单一单位剂量”是在一个剂量/在一个时间/单个途径/单个接触点(即,单个施用事件)中施用的任何治疗剂的剂量。

[0638] 本发明的AAV颗粒的期望剂量可以“脉冲剂量”或“连续流”的形式施用。如本文所用,“脉冲剂量”是在一段时间内以设定的频率施用的任何治疗剂的一系列单一单位剂量。如本文所用,“连续流”是在单一途径/单接触点在一段时间内连续施用的治疗剂的剂量,即连续施用事件。可以通过这些方法中的任何一种,或以这些方法的组合,或通过任何适合于药物施用的任何其他方法来施用24小时内给定或处方的总日剂量。

[0639] 在一个实施方案中,将本发明的AAV颗粒递送至受试者提供了靶基因在受试者中的调节活性。调节活性可以是受试者中靶蛋白生产的增加或受试者中靶蛋白生产的减少。调节活性可以持续至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或多于10年。

[0640] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以使用单剂量一次性治疗施用于受试者。一次性治疗的剂量可以通过本领域已知和/或本文描述的任何方法来施用。如本文所用,“一次性治疗”是指仅施用一次的组合物。如果需要,可以对受试者施用加强剂量以确保达到适当的功效。加强剂量可以在一次性治疗后1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、24个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或多于10年施用。

[0641] 递送方法

[0642] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒或药物组合物可以使用美国专利号8,999,948或国际公开号W02014178863中描述的用于治疗疾病的方法来施用或递送,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0643] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒或药物组合物可以使用如美国专利申请公开号20150126590中所述的用于在阿尔茨海默氏病或其他神经退行性病况中递送基因疗法的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[0644] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒或药物组合物可以使用如美国专利号6,436,708和8,946,152以及国际公开号W02015168666中所述的用于递送CNS基因疗法的方法来施用或递送,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0645] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒或药物组合物可以使用欧洲专利申请号EP2678433中描述的使用AAV颗粒递送蛋白的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[0646] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒或药物组合物可以使用美国专利号US 6,211,163中描述的用于将DNA递送到血流中的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[0647] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒或药物组合物可以使用美国专利号US 7,588,757中描述的用于将有效载荷递送到中枢神经系统的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[0648] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒或药物组合物可以使用美国专利号US 8,283,151中描述的用于递送有效载荷的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[0649] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒或药物组合物可以使用在国际专利公开号W02001089583中描述的使用谷氨酸脱羧酶(GAD)递送载体递送有效载荷的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[0650] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒或药物组合物可以使用国际专利公开号W02012057363中描述的用于将有效载荷递送至神经细胞的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[0651] 递送至细胞

[0652] 本公开提供了一种将上述AAV颗粒中的任一种递送至细胞或组织或器官的方法,该方法包括使细胞或组织或器官与所述AAV颗粒接触,或使细胞或组织或器官与包含所述AAV颗粒的制剂接触,或使细胞或组织或器官与任何所述组合物接触,所述组合物包括包含AAV颗粒的药物组合物。将AAV颗粒递送至细胞或组织或器官的方法可以在体外、离体或体内完成。

[0653] 递送至受试者

[0654] 本公开另外提供了一种向受试者(包括哺乳动物受试者)递送任何上述AAV颗粒的方法,包括向受试者施用所述AAV颗粒,或向受试者施用包含所述AAV颗粒的制剂,或向受试者施用任何所述组合物,包括药物组合物。

[0655] 在一个实施方案中,哺乳动物受试者是人类。在一些方面,人类受试者是患有疾病例如神经学疾病或心血管疾病的患者。

[0656] 组合

[0657] AAV颗粒可以与一种或多种其他治疗剂、预防剂、研究剂或诊断剂组合使用。“与……组合”并不意味着药剂必须同时施用和/或配制用于一起递送,尽管这些递送方法在本发明的范围内。组合物可以与一种或多种其他所需的治疗或医学程序同时、之前或之后施用。通常,每种药剂将以针对该药剂确定的剂量和/或时间表施用。在一些实施方案中,本公开包括药物组合物、预防组合物、研究组合物或诊断组合物与可改善其生物利用度,减少和/或改变其代谢,抑制其排泄和/或改变其在体内的分布的药剂组合递送。

[0658] 表达的测量

[0659] 来自病毒基因组的有效载荷的表达可以使用本领域已知的多种方法来确定,例如但不限于免疫化学(例如,IHC)、原位杂交(ISH)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、亲和ELISA、ELISPOT、流式细胞仪、免疫细胞学、表面等离子体共振分析、动力学排斥分析、液相色谱-质谱(LCMS)、高效液相色谱(HPLC)、BCA分析、免疫电泳、Western印迹、SDS-PAGE、蛋白免疫沉淀和/或PCR。

[0660] 生物利用度

[0661] 当与本文所述的缺乏递送剂的组合物相比,当将AAV颗粒与本文所述的递送剂配制成组合物时,其可以显示出增加的生物利用度。如本文所用,术语“生物利用度”是指施用

于哺乳动物的给定量的AAV颗粒或表达的有效载荷的全身利用度。可以通过测量曲线下面积(AUC)或以下组合物的最大血清或血浆浓度(C_{\max})来评估生物利用度。AUC是曲线下面积的确定,该曲线是沿纵坐标(Y轴)的化合物(例如,AAV颗粒或表达的有效载荷)的血清或血浆浓度相对于沿横坐标(X轴)的时间变化来绘制的。通常,特定化合物的AUC可以使用本领域普通技术人员已知的方法计算,并且如G.S.Banker, *Modern Pharmaceutics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, v.72, Marcel Dekker, New York, Inc., 1996所述,其内容通过引用整体并入本文。

[0662] C_{\max} 值是在向哺乳动物施用AAV颗粒后,在哺乳动物的血清或血浆中获得的AAV颗粒或表达的有效载荷的最大浓度。可以使用本领域技术人员已知的方法来测量 C_{\max} 值。如本文所用,短语“增加生物利用度”或“改善药代动力学”是指当与本文所述的递送剂共同施用,与不进行此类共同施用的情况相比,以哺乳动物的AUC、 C_{\max} 或 C_{\min} 测量的第一AAV颗粒或表达的有效载荷的全身利用度更高。在一些实施方案中,生物利用度可增加至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0663] 治疗窗

[0664] 如本文所用,“治疗窗”是指引起治疗效果的高可能性的血浆浓度范围或作用位点处的治疗活性物质的水平范围。在一些实施方案中,本文所述的AAV颗粒的治疗窗可增加至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0665] 分布体积

[0666] 如本文所用,术语“分布体积”是指在体内包含的药物总量与血液或血浆中浓度相同所需的流体体积: V_{dist} 等于体内的药物量/血液或血浆中药物浓度。例如,对于10mg剂量和10mg/L的血浆浓度,分布体积将为1升。分布体积反映了药物在血管外组织中的存在程度。与血浆蛋白结合相比,分布体积大反映出化合物结合组织组分的趋势。在临床环境中, V_{dist} 可用于确定达到稳态浓度的负荷剂量。在一些实施方案中,本文所述的AAV颗粒的分布体积可减少至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%。

[0667] 生物效应

[0668] 在一个实施方案中,可以通过分析动物中的有效载荷表达来对递送至动物的AAV颗粒的生物学作用进行分类。有效载荷表达可以通过分析从施用了本发明的AAV颗粒的哺乳动物收集的生物样品来确定。例如,对于递送至哺乳动物的AAV颗粒编码的蛋白而言,蛋白表达为50-200pg/ml可被视为哺乳动物中蛋白的治疗有效量。

[0669] IV. 本发明的组合物的方法和用途

[0670] 基因表达

[0671] 本发明的AAV颗粒、包含AAV颗粒的组合物可以用于调节目标基因在细胞、组织、器官或受试者中的表达。

[0672] 根据本发明,提供了用于增加靶蛋白在细胞、组织、器官或受试者中表达的方法;所述方法包括向细胞、组织、器官或受试者施用有效量的AAV颗粒,所述AAV颗粒包含功能性有效载荷,所述功能性有效载荷包含编码靶蛋白的核酸序列。

[0673] 因此,靶蛋白可以增加至少约10%,优选增加至少约10%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[0674] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒、组合物和制剂可用于增加靶蛋白在CNS细胞如神经元、星形胶质细胞和/或少突胶质细胞中的表达。在一些实施方案中,该基因可以编码蛋白,包括但不限于抗体、AADC、APOE2和Fratatin。

[0675] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒、组合物和制剂可用于减少、抑制和阻抑目标基因在细胞、组织、器官或受试者中的表达。因此,AAV颗粒包含至少一种功能性有效载荷,该功能性有效载荷包含对目标靶基因具有特异性的siRNA双链体或dsRNA。

[0676] 在一些实施方案中,本发明提供了用于抑制/沉默靶基因在细胞中表达的方法。因此,siRNA双链体或编码的dsRNA可用于基本上抑制靶基因在细胞中的表达,所述细胞例如但不限于星形胶质细胞或小胶质细胞、皮层神经元、海马体神经元、内嗅神经元、丘脑神经元、运动神经元或初级感觉神经元。在一些方面,靶基因表达的抑制是指抑制了至少约20%,例如至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此,靶基因的蛋白产物可被抑制了至少约20%,优选至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[0677] 在一些实施方案中,待抑制的基因可以包括但不限于SOD1、HTT、APOE和/或MAPT。

[0678] 神经学疾病

[0679] 各种神经学疾病可以用本发明的药物组合物、AAV颗粒(特别是穿过血脑屏障的AAV颗粒)治疗。作为非限制性实例,神经学疾病可以是透明隔缺失(Absence of the Septum Pellucidum)、酸性脂肪酶病(Acid Lipase Disease)、酸性麦芽糖酶缺乏症(Acid Maltase Deficiency)、获得性癫痫样失语症(Acquired Epileptiform Aphasia)、急性弥

慢性脑脊髓炎 (Acute Disseminated Encephalomyelitis)、注意缺陷多动障碍 (Attention Deficit-Hyperactivity Disorder, ADHD)、艾迪瞳孔 (Adie's Pupil)、艾迪综合征 (Adie's Syndrome)、肾上腺脑白质营养不良 (Adrenoleukodystrophy)、胼胝体发育不全 (Agenesis of the Corpus Callosum)、失认症 (Agnosia)、艾卡迪综合征 (Aicardi Syndrome)、Aicardi-Goutieres综合征病症 (Aicardi-Goutieres Syndrome Disorder)、艾滋病-神经系统并发症 (AIDS-Neurological Complications)、亚历山大病 (Alexander Disease)、阿尔珀思病 (Alpers' Disease)、交替性偏瘫 (Alternating Hemiplegia)、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、无脑 (Anencephaly)、动脉瘤 (Aneurysm)、安格尔曼综合征 (Angelman Syndrome)、血管瘤病 (Angiomatosis)、缺氧 (Anoxia)、抗磷脂综合征 (Antiphospholipid Syndrome)、失语症 (Aphasia)、失用症 (Apraxia)、蛛网膜囊肿 (Arachnoid Cysts)、蛛网膜炎 (Arachnoiditis)、阿诺德-基亚里畸形 (Arnold-Chiari Malformation)、动静脉畸形 (Arteriovenous Malformation)、阿斯伯格氏综合征 (Asperger Syndrome)、共济失调 (Ataxia)、共济失调毛细血管扩张 (Ataxia Telangiectasia)、共济失调和小脑或脊髓小脑退化 (Ataxias and Cerebellar or Spinocerebellar Degeneration)、心房颤动和中风 (Atrial Fibrillation and Stroke)、注意缺陷多动障碍 (Attention Deficit-Hyperactivity Disorder)、自闭症谱系障碍 (Autism Spectrum Disorder)、自主神经功能障碍 (Autonomic Dysfunction)、背痛 (Back Pain)、Barth综合征 (Barth Syndrome)、Batten病 (Batten Disease)、Becker肌强直 (Becker's Myotonia)、Behcet病 (Behcet's Disease)、Bell麻痹 (Bell's Palsy)、良性原发性眼睑痉挛 (Benign Essential Blepharospasm)、良性局灶性肌萎缩 (Benign Focal Amyotrophy)、良性颅内高压 (Benign Intracranial Hypertension)、Bernhardt-Roth综合征 (Bernhardt-Roth Syndrome)、Binswanger病 (Binswanger's Disease)、眼睑痉挛 (Blepharospasm)、Bloch-Sulzberger综合征 (Bloch-Sulzberger Syndrome)、臂丛出生伤 (Brachial Plexus Birth Injuries)、臂丛损伤 (Brachial Plexus Injuries)、Bradbury-Eggleston综合征 (Bradbury-Eggleston Syndrome)、脑和脊柱肿瘤 (Brain and Spinal Tumors)、脑动脉瘤 (Brain Aneurysm)、脑损伤 (Brain Injury)、Brown-Sequard综合征 (Brown-Sequard Syndrome)、脊髓延髓肌萎缩症 (Bulbospinal Muscular Atrophy)、伴有皮层下梗死和白细胞性脑病的脑常染色体显性动脉病 (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Sub-cortical Infarcts and Leukoencephalopathy, CADASIL)、Canavan病 (Canavan Disease)、腕管综合征 (Carpal Tunnel Syndrome)、灼性神经痛 (Causalgia)、海绵状血管瘤 (Cavernomas)、海绵状血管瘤 (cavernous angioma)、海绵状畸形 (Cavernous Malformation)、中央颈脊髓综合征 (Central Cervical Cord Syndrome)、中枢脊髓综合征 (Central Cord Syndrome)、中枢疼痛综合征 (Central Pain Syndrome)、脑桥中央髓鞘溶解症 (Central Pontine Myelinolysis)、脑疾病 (Cephalic Disorders)、神经酰胺酶缺乏症 (Ceramidase Deficiency)、小脑退化 (Cerebellar Degeneration)、小脑发育不全 (Cerebellar Hypoplasia)、脑动脉瘤 (Cerebral Aneurysms)、脑动脉硬化 (Cerebral Arteriosclerosis)、大脑萎缩 (Cerebral Atrophy)、脑型脚气病 (Cerebral Beriberi)、脑海绵状畸形 (Cerebral Cavernous Malformation)、脑性巨人症 (Cerebral Gigantism)、脑缺氧 (Cerebral Hypoxia)、脑瘫 (Cerebral Palsy)、脑-眼-脸-骨骼综合征

(Cerebro-Oculo-Facio-Skeletal Syndrome, COFS)、Charcot-Marie-Tooth病(Charcot-Marie-Tooth Disease)、Chiari畸形(Ciari Malformation)、胆固醇酯贮积病(Cholesterol Ester Storage Disease)、舞蹈症(Chorea)、神经棘红细胞增多症(Choreoacanthocytosis)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy, CIPD)、慢性立位不耐受(Chronic Orthostatic Intolerance)、慢性疼痛、II型Cockayne综合征(Cockayne Syndrome Type II)、Coffin Lowry综合征(Coffin Lowry Syndrome)、枕角扩大(Colpocephaly)、昏迷(Coma)、复杂区域性疼痛综合征(Complex Regional Pain Syndrome)、先天性双侧面瘫(Congenital Facial Diplegia)、先天性肌无力(Congenital Myasthenia)、先天性肌病(Congenital Myopathy)、先天性血管性海绵状畸形(Congenital Vascular Cavernous Malformations)、皮层基底节变性(Corticobasal Degeneration)、颅动脉炎(Cranial Arteritis)、颅缝早闭(Craniosynostosis)、Cree脑病(Cree encephalitis)、Creutzfeldt-Jakob病(Creutzfeldt-Jakob Disease)、累积性创伤疾病(Cumulative Trauma Disorders)、Cushing综合征(Cushing's Syndrome)、巨细胞包涵体疾病(Cytomegalic Inclusion Body Disease)、巨细胞病毒感染(Cytomegalovirus Infection)、跳舞性眼-脚综合征(Dancing Eyes-Dancing Feet Syndrome)、Dandy-Walker综合征(Dandy-Walker Syndrome)、Dawson病(Dawson Disease)、De Morsier综合征(De Morsier's Syndrome)、Dejerine-Klumpke瘫痪(Dejerine-Klumpke Palsy)、痴呆、痴呆-多发性梗塞(Dementia-Multi-Infarct)、语义性痴呆(Dementia-Semantic)、皮层下痴呆(Dementia-Subcortical)、路易体痴呆(Dementia With Lewy Bodies)、齿状核小脑共济失调(Dentate Cerebellar Ataxia)、齿状核红核萎缩(Dentatorubral Atrophy)、皮炎(Dermatomyositis)、发展性运动障碍(Developmental Dyspraxia)、Devic综合征(Devic's Syndrome)、糖尿病性神经病(Diabetic Neuropathy)、弥漫性硬化症(Diffuse Sclerosis)、Dravet综合征(Dravet Syndrome)、自主神经机能异常(Dysautonomia)、书写困难(Dysgraphia)、诵读困难(Dyslexia)、吞咽困难(Dysphagia)、运用障碍(Dyspraxia)、肌阵挛性小脑性协调障碍(Dyssynergia Cerebellaris Myoclonica)、进行性小脑协同失调(Dyssynergia Cerebellaris Progressiva)、肌张力异常(Dystonias)、婴儿早期癫痫性脑病(Early Infantile Epileptic Encephalopathy)、空蝶鞍综合征(Empty Sella Syndrome)、脑炎、昏睡性脑炎(Encephalitis Lethargica)、脑突出(Encephaloceles)、脑病(Encephalopathy)、脑病(家族性婴儿性(familial infantile))、脑三叉神经血管瘤病(Encephalotrigeminal Angiomatosis)、癫痫(Epilepsy)、癫痫性偏瘫(Epileptic Hemiplegia)、Erb麻痹(Erb's Palsy)、Erb-Duchenne和Dejerine-Klumpke麻痹(Erb-Duchenne and Dejerine-Klumpke Palsies)、特发性震颤(Essential Tremor)、脑桥外髓鞘溶解(Extrapontine Myelinolysis)、Fabry病(Fabry Disease)、Fahr综合征(Fahr's Syndrome)、昏厥(Fainting)、家族性植物神经障碍(Familial Dysautonomia)、家族性血管瘤(Familial Hemangioma)、家族性特发性基底神经节钙化(Familial Idiopathic Basal Ganglia Calcification)、家族性周期性瘫痪(Familial Periodic Paralysis)、家族性痉挛性瘫痪(Familial Spastic Paralysis)、Farber病(Farber's Disease)、高热性惊厥(Febrile Seizures)、纤维肌发育不良(Fibromuscular Dysplasia)、Fisher综合征

(Fisher Syndrome)、软性婴儿综合征(Floppy Infant Syndrome)、足下垂(Foot Drop)、弗雷德里希氏病(Friedreich's Ataxia)、额颞痴呆(Frontotemporal Dementia)、Gaucher病(Gaucher Disease)、全身型神经节苷脂贮积病(Generalized Gangliosidoses)、Gerstmann综合征(Gerstmann's Syndrome)、Gerstmann-Straussler-Scheinker病(Gerstmann-Straussler-Scheinker Disease);巨轴索神经病(Giant Axonal Neuropathy);巨细胞动脉炎(Giant Cell Arteritis);巨细胞包涵体疾病(Giant Cell Inclusion Disease)、球样细胞脑白质营养不良(Globoid Cell Leukodystrophy)、舌咽神经痛(Glossopharyngeal Neuralgia)、糖原贮积病(Glycogen Storage Disease)、Guillain-Barré综合征(Guillain-Barré Syndrome)、Hallervorden-Spatz病(Hallervorden-Spatz Disease)、头损伤(Head Injury)、头痛、连续性偏头痛(Hemicrania Continua)、半面肌痉挛(Hemifacial Spasm)、交替性偏瘫(Hemiplegia Alterans)、遗传性神经病(Hereditary Neuropathies)、遗传性痉挛性截瘫(Hereditary Spastic Paraplegia)、多神经炎型遗传性共济失调(Heredopathia Atactica Polyneuritiformis)、带状疱疹(Herpes Zoster)、耳部带状疱疹(Herpes Zoster Oticus)、平山综合征(Hirayama Syndrome)、Holmes-Adie综合征(Holmes-Adie syndrome)、全前脑畸形(Holoprosencephaly)、HTLV-1相关的脊髓病(HTLV-1 Associated Myelopathy)、Hughes综合征(Hughes Syndrome)、亨廷顿病、积水性无脑畸形(Hydranencephaly)、脑积水(Hydrocephalus)、常压脑积水(Hydrocephalus-Normal Pressure)、脊髓积水(Hydromyelia)、皮层醇增多症(Hypercortisolism)、嗜睡症(Hypersomnia)、张力亢进(Hypertonia)、张力减退(Hypotonia)、缺氧(Hypoxia)、免疫介导的脑脊髓炎(Immune-Mediated Encephalomyelitis)、包涵体肌炎(Inclusion Body Myositis)、色素失调症(Incontinentia Pigmenti)、婴儿张力减退(Infantile Hypotonia)、婴儿神经轴索营养不良(Infantile Neuroaxonal Dystrophy)、婴儿植酸贮积症(Infantile Phytanic Acid Storage Disease)、婴儿Refsum病(Infantile Refsum Disease)、婴儿痉挛(Infantile Spasms)、炎性肌病(Inflammatory Myopathies)、枕骨裂脑露畸形(Iniencephaly)、肠性脂质营养不良(Intestinal Lipodystrophy)、颅内囊肿(Intracranial Cysts)、颅内高压(Intracranial Hypertension)、Isaacs综合征(Isaacs' Syndrome)、Joubert综合征(Joubert Syndrome)、Kearns-Sayre综合征(Kearns-Sayre Syndrome)、Kennedy病(Kennedy's Disease)、Kinsbourne综合征(Kinsbourne syndrome)、Kleine-Levin综合征(Kleine-Levin Syndrome)、Klippel-Feil综合征(Klippel-Feil Syndrome)、Klippel-Trenaunay综合征(Klippel-Trenaunay Syndrome, KTS)、Klüver-Bucy综合征(Klüver-Bucy Syndrome)、Korsakoff遗忘综合征(Korsakoff's Amnesic Syndrome)、Krabbe病(Krabbe Disease)、Kugelberg-Welander病(Kugelberg-Welander Disease)、库鲁病(Kuru)、Lambert-Eaton肌无力综合征(Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome)、Landau-Kleffner综合征(Landau-Kleffner Syndrome)、股外侧皮神经卡压(Lateral Femoral Cutaneous Nerve Entrapment)、延髓外侧综合征(Lateral Medullary Syndrome)、学习障碍(Learning Disabilities)、Leigh病(Leigh's Disease)、Lennox-Gastaut综合征(Lennox-Gastaut Syndrome)、Lesch-Nyhan综合征(Lesch-Nyhan Syndrome)、脑白质营养不良(Leukodystrophy)、Levine-Critchley综合征(Levine-

Critchley Syndrome)、路易体痴呆症(Lewy Body Dementia)、脂质贮积病(Lipid Storage Diseases)、类脂蛋白沉积症(Lipoid Proteinosis)、平脑症(Lissencephaly)、闭锁综合征(Locked-In Syndrome)、Lou Gehrig病(Lou Gehrig's Disease)、狼疮-神经性后遗症(Lupus-Neurological Sequelae)、莱姆病神经系统并发症(Lyme Disease-Neurological Complications)、Machado-Joseph病(Machado-Joseph Disease)、巨脑(Macrencephaly)、巨脑畸形(Megalencephaly)、Melkersson-Rosenthal综合征(Melkersson-Rosenthal Syndrome)、脑膜炎(Meningitis)、脑膜炎和脑炎(Meningitis and Encephalitis)、Menkes病(Menkes Disease)、感觉异常性股痛(Meralgia Paresthetica)、异染性脑白质营养不良(Metachromatic Leukodystrophy)、小头畸形(Microcephaly)、偏头痛(Migraine)、Miller Fisher综合征(Miller Fisher Syndrome)、小中风(Mini Stroke)、线粒体肌病(Mitochondrial Myopathy)、Moebius综合征(Moebius Syndrome)、单体肌萎缩(Monomelic Amyotrophy)、运动神经元疾病(Motor Neuron Diseases)、Moyamoya病(Moyamoya Disease)、粘脂贮积病(Mucopolysaccharidoses)、粘多糖贮积病(Mucopolysaccharidoses)、多发梗死性痴呆(Multi-Infarct Dementia)、多灶性运动神经病(Multifocal Motor Neuropathy)、多发性硬化(Multiple Sclerosis)、多系统萎缩(Multiple System Atrophy)、伴有直立性低血压的多系统萎缩(Multiple System Atrophy with Orthostatic Hypotension)、肌营养不良(Muscular Dystrophy)、先天性肌无力(Myasthenia-Congenital)、重症肌无力(Myasthenia Gravis)、髓鞘增生性弥漫性硬化(Myelinoclastic Diffuse Sclerosis)、婴儿肌阵挛性脑病(Myoclonic Encephalopathy of Infants)、肌阵挛(Myoclonus)、肌病(Myopathy)、先天性肌病(Myopathy-Congenital)、甲状腺毒性肌病(Myopathy-Thyrotoxic)、肌强直(Myotonia)、先天性肌强直(Myotonia Congenita)、发作性睡病(Narcolepsy)、神经棘红细胞病(Neuroacanthocytosis)、脑铁蓄积性神经退行性变(Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation)、神经纤维瘤病(Neurofibromatosis)、抗精神病药恶性综合征(Neuroleptic Malignant Syndrome)、AIDS的神经学并发症(Neurological Complications of AIDS)、莱姆病的神经学并发症(Neurological Complications of Lyme Disease)、巨细胞病毒感染的神经学后果(Neurological Consequences of Cytomegalovirus Infection)、庞贝病的神经学表现(Neurological Manifestations of Pompe Disease)、狼疮神经后遗症(Neurological Sequelae Of Lupus)、视神经脊髓炎(Neuromyelitis Optica)、神经性肌强直(Neuromyotonia)、神经元蜡样脂褐质沉积症(Neuronal Ceroid Lipofuscinosis)、神经元迁移障碍(Neuronal Migration Disorders)、遗传性神经病(Neuropathy-Hereditary)、神经结节病(Neurosarcoidosis)、神经性梅毒(Neurosyphilis)、神经毒性(Neurotoxicity)、海绵状痣(Nevus Cavernosus)、Niemann-Pick病(Niemann-Pick Disease)、O'Sullivan-McLeod综合征(O'Sullivan-McLeod Syndrome)、枕骨神经痛(Occipital Neuralgia)、大田原综合征(Ohtahara Syndrome)、橄榄体脑桥小脑萎缩(Olivopontocerebellar Atrophy)、Opsoclonus肌阵挛(Opsoclonus Myoclonus)、直立性低血压(Orthostatic Hypotension)、过度使用综合征(Overuse Syndrome)、慢性疼痛(Pain-Chronic)、泛酸激酶依赖型神经退行性疾病(Pantothenate Kinase-Associated Neurodegeneration)、副肿瘤综合征(Paraneoplastic Syndromes)、感觉异常(Paresthesia)、帕金森病、阵发性舞蹈手足徐动

症(Paroxysmal Choreaethetosis)、阵发性偏头痛(Paroxysmal Hemicrania)、Parry-Romberg病(Parry-Romberg)、Pelizaeus-Merzbacher病(Pelizaeus-Merzbacher Disease)、Pena Shokeir II综合征(Pena Shokeir II Syndrome)、神经周围囊肿(Perineural Cysts)、周期性麻痹(Periodic Paralysis)、周围神经病(Peripheral Neuropathy)、脑室周围白质软化(Periventricular Leukomalacia)、持续性植物状态(Persistent Vegetative State)、广泛性发育障碍(Pervasive Developmental Disorders)、植酸贮积病(Phytanic Acid Storage Disease)、Pick病(Pick's Disease)、神经挟捏(Pinched Nerve)、梨状肌综合征(Piriformis Syndrome)、垂体瘤(Pituitary Tumors)、多肌炎(Polymyositis)、Pompe病(Pompe Disease)、脑穿通畸形(Porencephaly)、脊髓灰质炎后综合征(Post-Polio Syndrome)、带状疱疹后神经痛(Postherpetic Neuralgia)、感染后脑脊髓炎(Postinfectious Encephalomyelitis)、体位性低血压(Postural Hypotension)、体位性直立性心动过速综合征(Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome)、体位性心动过速综合征(Postural Tachycardia Syndrome)、原发性齿槽萎缩(Primary Dentatum Atrophy)、原发性侧索硬化(Primary Lateral Sclerosis)、原发性进行性失语症(Primary Progressive Aphasia)、朊病毒病(Prion Diseases)、进行性面偏侧萎缩(Progressive Hemifacial Atrophy)、进行性运动性共济失调(Progressive Locomotor Ataxia)、进行性多灶性脑白质病(Progressive Multifocal Leukoencephalopathy)、进行性硬化性灰质萎缩(Progressive Sclerosing Poliodystrophy)、进行性核上性麻痹(Progressive Supranuclear Palsy)、脸盲症(Prosopagnosia)、假Torch综合征(Pseudo-Torch syndrome)、假弓形虫综合征(Pseudotoxoplasmosis syndrome)、假性脑瘤(Pseudotumor Cerebri)、心理运动(Psychogenic Movement)、Ramsay Hunt综合征I(Ramsay Hunt Syndrome I)、Ramsay Hunt综合征II(Ramsay Hunt Syndrome II)、Rasmussen脑炎(Rasmussen's Encephalitis)、反射性交感神经营养不良综合征(Reflex Sympathetic Dystrophy Syndrome)、Refsum病(Refsum Disease)、婴儿Refsum病(Refsum Disease-Infantile)、反复性运动障碍(Repetitive Motion Disorders)、重复性应激损伤(Repetitive Stress Injuries)、不宁腿综合征(Restless Legs Syndrome)、逆转录病毒相关性脊髓病(Retrovirus-Associated Myelopathy)、Rett综合征(Rett Syndrome)、Reye综合征(Reye's Syndrome)、风湿性脑炎(Rheumatic Encephalitis)、Riley-Day综合征(Riley-Day Syndrome)、骶神经根囊肿(Sacral Nerve Root Cysts)、圣维特斯舞蹈病(Saint Vitus Dance)、唾液腺疾病(Salivary Gland Disease)、Sandhoff病(Sandhoff Disease)、Schilder病(Schilder's Disease)、脑裂畸形(Schizencephaly)、Seitelberger病(Seitelberger Disease)、癫痫症(Seizure Disorder)、语义性痴呆(Semantic Dementia)、隔-视发育不良(Septo-Optic Dysplasia)、严重的婴儿肌阵挛性癫痫病(Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy, SMEI)、婴儿摇晃综合征(Shaken Baby Syndrome)、带状疱疹(Shingles)、Shy-Drager综合征(Shy-Drager Syndrome)、**Sjögren氏综合征(Sjögren's Syndrome)**、睡眠窒息症(Sleep Apnea)、睡眠病(Sleeping Sickness)、Sotos综合征(Sotos Syndrome)、痉挛(Spasticity)、脊柱裂(Spina Bifida)、脊髓梗死(Spinal Cord Infarction)、脊髓损伤(Spinal Cord Injury)、脊髓肿瘤(Spinal Cord Tumors)、脊髓性肌萎缩症(Spinal

Muscular Atrophy)、脊髓小脑萎缩症(Spinocerebellar Atrophy)、脊髓小脑退化(Spinocerebellar Degeneration)、Steele-Richardson-Olszewski综合征(Steele-Richardson-Olszewski Syndrome)、僵硬人综合征(Stiff-Person Syndrome)、纹状体黑质变性(Striatonigral Degeneration)、中风、Sturge-Weber综合征(Sturge-Weber Syndrome)、亚急性硬化性全脑炎(Subacute Sclerosing Panencephalitis)、皮层下动脉硬化性脑病(Subcortical Arteriosclerotic Encephalopathy)、持续时间短的单侧神经痛样(Short-lasting, Unilateral, Neuralgiform, SUNCT) 头痛、吞咽障碍(Swallowing Disorders)、Sydenham舞蹈病(Sydenham Chorea)、晕厥(Syncope)、梅毒性脊髓硬化症(Syphilitic Spinal Sclerosis)、脊髓空洞积水症(Syringohydromyelia)、脊髓空洞症(Syringomyelia)、全身性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus)、脊髓痨(Tabes Dorsalis)、迟发性运动障碍(Tardive Dyskinesia)、Tarlov囊肿(Tarlov Cysts)、Tay-Sachs病(Tay-Sachs Disease)、颞动脉炎(Temporal Arteritis)、脊髓栓系综合征(Tethered Spinal Cord Syndrome)、Thomsen肌强直(Thomsen's Myotonia)、胸廓出口综合征(Thoracic Outlet Syndrome)、甲状腺功能亢进性肌病(Thyrotoxic Myopathy)、三叉神经痛(Tic Douloureux)、Todd瘫痪(Todd's Paralysis)、抽动秽语综合征(Tourette Syndrome)、短暂性脑缺血发作(Transient Ischemic Attack)、传染性海绵状脑病(Transmissible Spongiform Encephalopathies)、横贯性脊髓炎(Transverse Myelitis)、外伤性脑损伤(Traumatic Brain Injury)、震颤(Tremor)、三叉神经痛(Trigeminal Neuralgia)、热带痉挛性轻瘫(Tropical Spastic Paraparesis)、Troyer综合征(Troyer Syndrome)、结节性硬化症(Tuberous Sclerosis)、血管勃起性肿瘤(Vascular Erectile Tumor)、中枢和外周神经系统的血管炎综合征(Vasculitis Syndromes of the Central and Peripheral Nervous Systems)、Von Economo病(Von Economo's Disease)、Von Hippel-Lindau病(Von Hippel-Lindau Disease, VHL)、Von Recklinghausen病(Von Recklinghausen's Disease)、Wallenberg综合征(Wallenberg's Syndrome)、Werdnig-Hoffman病(Werdnig-Hoffman Disease)、Wernicke-Korsakoff综合征(Wernicke-Korsakoff Syndrome)、West综合征(West Syndrome)、颈部过度屈伸(Whiplash)、Whipple病(Whipple's Disease)、Williams综合征(Williams Syndrome)、Wilson病(Wilson Disease)、Wolman病(Wolman's Disease)、X连锁性脊髓和延髓性肌萎缩(X-Linked Spinal and Bulbar Muscular Atrophy)。

[0680] 本公开另外提供了一种用于治疗或改善哺乳动物受试者(包括人类受试者)的神经学疾病的方法,该方法包括向该受试者施用药学有效量的本发明的任何AAV颗粒或药物组合物。在一个实施方案中,AAV颗粒是跨越血脑屏障的颗粒。在一些实施方案中,根据本文描述的方法治疗的神经学疾病包括但不限于tau蛋白病、阿尔茨海默氏病(AD)、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、亨廷顿病(HD)、帕金森病(PD)和/或弗里德希氏共济失调(FA)。在一些实施方案中,受试者中至少一种神经学疾病的症状得到改善和/或治疗。

[0681] 本公开提供了一种用于向有需要的受试者(包括人类受试者)施用治疗有效量的本发明的AAV颗粒以减缓、停止或逆转疾病进程的方法。作为非限制性实例,可以通过本领域技术人员已知的测试或诊断工具来测量疾病进程。作为另一个非限制性实例,可以通过受试者的脑、CSF或其他组织的病理特征的变化来测量疾病进程。

[0682] Tau蛋白病

[0683] Tau蛋白病是一组神经退行性疾病,其特征微管相关蛋白tau的功能障碍和/或聚集。Tau通常是一种非常易溶的蛋白,根据其磷酸化程度已知与微管结合。由于其独特的结构,Tau被认为是细胞内运输过程的重要组成部分,特别是在神经元细胞中。Tau的过度磷酸化降低了其与微管的结合和微管组装活性。此外,Tau的过度磷酸化使其易于错误折叠和聚集。在Tau蛋白病中,Tau过度磷酸化、错误折叠并聚集为成对螺旋丝(PHF)、扭曲带或直丝的NFT。这些NFT在很大程度上被认为指示即将发生的神经元细胞死亡,并被认为是导致广泛的神经元细胞损失,从而导致各种行为和认知缺陷。

[0684] 当显示出tau基因的突变导致常染色体显性遗传的tau蛋白病(即称为前期痴呆和与17号染色体相关的帕金森病(FTDP-17))时,描述了第一个遗传定义的tau蛋白病。这是tau变化可能导致脑神经退行性变化的第一个因果证据。这些分子被认为具有更大的淀粉样蛋白生成性,这意味着它们更可能被过度磷酸化并且更可能聚集成NFT(Hutton,M.等人,1998,Nature 393(6686):702-5)。

[0685] 其他已知的tau蛋白病包括但不限于阿尔茨海默氏病(AD)、额颞痴呆(FTD)、额颞叶变性(FTLD)、慢性创伤性脑病(CTE)、进行性核上性麻痹(PSP)、唐氏综合征、Pick病、皮层基底节变性(CBD)、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、朊病毒病、Creutzfeldt-Jakob病(CJD)、多系统萎缩症、缠结性痴呆和进行性皮层下神经胶质增生。

[0686] 尽管tau蛋白病主要与tau蛋白的功能失常和聚集有关,就像在AD中一样,ApoE也被认为在这组疾病的发病机理中起作用。当发现NFT对ApoE也具有免疫反应性时,首先怀疑胆固醇运输分子ApoE是在tau蛋白病中起作用。tau与ApoE之间的相关性研究显示出矛盾的结果,但表明ApoE4与NFT负荷增加之间存在联系。但是,与认知能力下降的相关性尚未显示。这方面的工作仍在积极地进行中。

[0687] 尽管可能提供一些症状缓解,但尚未确定针对tau蛋白病的治疗方法。本发明的AAV颗粒的递送可用于治疗患有tau蛋白病的受试者。在某些情况下,本发明的方法可以用于治疗怀疑发展为tau蛋白病的受试者。本发明的AAV颗粒的递送可以导致NFT的积累减少。此外,NFT负荷的这些减少可能会或可能不会与认知、语言或行为领域的改善相关。

[0688] 在一个实施方案中,包含ApoE2、ApoE3或ApoE4多核苷酸的本发明的AAV颗粒的递送可用于治疗患有tau蛋白病的受试者。

[0689] 在一个实施方案中,包含用于沉默ApoE2、ApoE3或ApoE4基因和/或蛋白表达的调节性多核苷酸的本发明的AAV颗粒的递送可以用于治疗患有tau蛋白病的受试者。

[0690] 在一个实施方案中,包含用于沉默tau基因和/或蛋白表达的调节性多核苷酸的本发明的AAV颗粒的递送可用于治疗患有tau蛋白病的受试者。

[0691] 在一个实施方案中,调节性多核苷酸是siRNA双链体或编码siRNA双链体或编码的dsRNA的核酸。

[0692] 在一个实施方案中,包含编码抗tau抗体的核酸的本发明的AAV颗粒的递送可用于治疗患有tau蛋白病的受试者。

[0693] 在一个实施方案中,本文所述的组合物与tau蛋白病的一种或多种已知或探索性治疗组合使用。此类治疗的非限制性实例包括tau聚集抑制剂(例如亚甲基蓝、吩噻嗪、葱醌、正苯胺或罗丹明)、微管稳定剂(例如NAP、泰素或紫杉醇)、激酶或磷酸酶抑制剂(例如靶

向GSK3 β (锂)的抑制剂或PP2A),和/或用tau磷酸表位免疫或用抗tau抗体治疗。

[0694] 阿尔茨海默氏病

[0695] 阿尔茨海默氏病(AD)是一种衰老性神经退行性疾病,也是当今老年人痴呆症的主要原因,目前估计在美国影响500万人,在全世界影响3500万人。AD在很大程度上是一种极度健忘的疾病,其中过正常生活的能力受到了极大的损害。该疾病的临床表现包括记忆力、执行功能(决策能力)和语言的逐渐下降。AD患者通常死于继发疾病,例如恶病质、肺炎或败血症。

[0696] AD可能是最著名的tau蛋白病,尽管它通常被表征为基于淀粉样蛋白的疾病。AD脑的特征在于存在两种形式的病理聚集体,一种是由 β -淀粉样蛋白(A β)组成的细胞外斑块,另一种是由磷酸化微管相关蛋白tau组成的细胞内神经原纤维缠结(NFT)。根据早期的遗传发现, β -淀粉样蛋白改变被认为是引发疾病的原因,tau的改变被认为是下游的。因此,大多数临床试验都是以A β 为中心的。

[0697] 除疾病的传统标志(A β 和tau)外,载脂蛋白E已被证明是晚期AD发病机理中的重要危险因素(AD的形式与A β 加工或产生的改变没有遗传联系,占AD人口的99%)。像其他载脂蛋白一样,ApoE有助于特定脂蛋白颗粒的结构,并将脂蛋白运输到特定细胞表面受体,并且是重要的胆固醇转运蛋白。ApoE在多种细胞类型中表达,在肝脏和大脑中具有最高的表达水平。在脑中,ApoE主要在星形胶质细胞和小胶质细胞中表达,并被认为有助于维持突触连接和突触形成。人们认为ApoE通过其在血脑屏障、先天免疫系统、突触功能和A β 积累中的作用来促进AD发病。

[0698] ApoE的三种最常见变体是ApoE2、ApoE3和ApoE4,其中ApoE2和ApoE4携带与AD发展相关的不同风险。ApoE2被认为是保护性等位基因,可降低AD的风险并延缓发病年龄,而ApoE4具有相反的作用,可显著增加发展成AD的风险并降低疾病的发病年龄。此外,ApoE2与减少的累积A β 负担相关,而ApoE4与增加的A β 负荷相关。

[0699] AD的早期发作形式(65岁之前,占AD病例的<5%)可能是由淀粉样 β 前体蛋白(APP)、早老素1(PS 1或PSEN1)或早老素2(PS2或PSEN2)的家族突变引起的。常见症状包括记忆力、执行功能、语言和其他认知领域的逐渐减退。这些症状通常是由大脑中的淀粉样斑块和/或神经原纤维缠结、神经元丢失、突触丢失、脑萎缩和/或炎症引起的。

[0700] 对AD的对症疗法已经有很多年了,但是没有一种能够改变疾病的病因。本发明的AAV颗粒的递送可以用于治疗患有AD和其他tau蛋白病的受试者。在某些情况下,本发明的方法可以用于治疗怀疑患有AD或其他tau蛋白病的受试者。本发明的AAV颗粒的递送可导致受试者的脑和心血管系统中的A β 负担减少或NFT的积聚减少。此外,A β 或NFT负荷的这些减少可能与认知、语言或行为领域的改善相关或不相关。

[0701] 在一个实施方案中,包含ApoE2、ApoE3或ApoE4多核苷酸的本发明AAV颗粒的递送可用于治疗患有AD和其他tau蛋白病的受试者。

[0702] 在一个实施方案中,包含用于沉默ApoE2、ApoE3或ApoE4基因和/或蛋白的调节性多核苷酸的本发明的AAV颗粒的递送可用于治疗患有AD和其他tau蛋白病的受试者。

[0703] 在一个实施方案中,包含用于沉默tau基因和/或蛋白的调节性多核苷酸的本发明的AAV颗粒的递送可用于治疗患有AD和其他tau蛋白病的受试者。

[0704] 在一个实施方案中,调节性多核苷酸是siRNA双链体或编码siRNA双链体或编码的

dsRNA的核酸。

[0705] 在一个实施方案中,包含编码抗-tau抗体的核酸的本发明的AAV颗粒的递送可以用于治疗患有AD和其他tau蛋白病的受试者。

[0706] 在一个实施方案中,本文所述的组合物与一种或多种已知的或用于AD或tau蛋白病的探索性治疗组合使用。此类治疗的非限制性实例包括胆碱酯酶抑制剂(多奈哌齐、利斯的明、加兰他敏)、NMDA受体拮抗剂(如美金刚)、抗精神病药、抗抑郁药、抗惊厥药、分泌酶抑制剂、淀粉样聚集抑制剂、铜或锌调节剂、BACE抑制剂、tau聚集抑制剂(例如亚甲基蓝、吩噻嗪、葱醌、正苯胺或罗丹明)、微管稳定剂(例如NAP、泰素或紫杉醇)、激酶或磷酸酶抑制剂(例如靶向GSK3 β (锂)或PP2A的抑制剂)和/或用A β 肽或tau磷酸表位免疫或用抗tau或抗淀粉样抗体治疗。

[0707] 在一个实施方案中,使用哺乳动物模型(例如但不限于,tau蛋白病和/或阿尔茨海默氏病的小鼠模型)评估本文所述的组合物。许多模拟tau蛋白病和/或阿尔茨海默氏病表型的小鼠模型可以使用。但是,没有现有的小鼠模型显示出人类tau蛋白病和/或阿尔茨海默氏病的所有特征。因此,在某些情况下,可以使用多于一种的小鼠模型或这些模型中的一种或多种的小鼠模型杂交来评估本发明的组合物的活性。tau蛋白病和/或阿尔茨海默氏病的实例性小鼠模型包括但不限于3XTg-AD、5XFAD、J20、Tg-SwDI、Tg-SwDI/Nos2、Tg2576、R1.40、APPPS1、APP23、PDAPP、APP NL-G-F、TgCRND8、TASD-41、BRI-A β 42A、PSAPP (Tg2576xPS1)、APP^{swe}/PSEN1dE9、2xKI、TAPP (Tg2576xJNPL3)、hTau、PS1M146V、rTg4510、rTg4510xCamk2a-tTA、PS19、rTg4510xNop-tTA、GFAP-apoE4、ApoE^{tm3 (APOE*4)}、APP.PS1/TRE4和ApoE敲除或敲入小鼠品系。(参见Onos等人,Brain Res Bull.2016;122:1-11;Hall和Roberson.,Brain Res Bull.2012;88(1):3-12;Elder等人,Mt Sinai J Med.2010;77(1):69-81,其内容通过引用整体并入本文)。

[0708] Tau转基因小鼠模型过表达野生型或突变型人tau蛋白。已产生了包含不同tau突变的20多个品系(请参阅Denk和Wade-Martins的表2,Neurobiol Aging.2009;30(1):1-13,其内容通过引用整体并入本文)。这些是患有tau蛋白病和/或阿尔茨海默氏病的患者中存在的突变,包括G272V、P301L、P301S、N297K、V337M和R406W。P301S转基因小鼠表达包含P301S突变的人tau蛋白。由Allen等人创建的一种P301S模型(在Thy 1.2启动子的控制下为4R/0N tau)表现出与人Tau蛋白病相似的特征,包括过度磷酸化tau的细丝积累、神经元变性和神经炎症。此外,这些小鼠在5-6个月大时会形成明显的运动表型(Allen等人,J Neurosci.2002;22(21):9340-51;Bellucci等人,Am J Pathol.2004;165(5):1643-52,其内容通过引用整体并入本文)。由Yoshiyama等人创建的另一种P301S小鼠品系(在小鼠朊病毒启动子的控制下为4R/1N tau)在3-6个月大时显示海马体突触丧失、突触功能受损和伴随的小胶质细胞活化。到9-12个月大时,这些动物还表现出病理性过度磷酸化tau积累、神经元丢失以及海马体和内嗅皮层萎缩(Yoshiyama等人,Neuron.2007;53(3):337-51,其内容通过引用整体并入本文)。

[0709] APOE敲入小鼠表达人的APOE同种型。在某些情况下,将人APOE基因工程化以替代内源性小鼠APOE等位基因(靶向替代)。这些ApoE2、ApoE3或ApoE4的靶向放置(TR)模型是在Nobuya Maeda的实验室中开发的(Sullivan等人,J Clin Invest.1998;102(1):130-5;Sullivan等人,J Biol Chem.1997;272(29):17972-80;Knouff等人,J Clin Invest.1999;

103 (11):1579-86,其内容通过引用整体并入本文)并在许多研究中被表征。ApoE TR小鼠在空间记忆表现和回避行为方面有所不同。与ApoE3-TR小鼠相比,ApoE4-TR小鼠显示出认知和突触可塑性受损。此外,ApoE4-TR小鼠在海马体和杏仁核中表现出解剖和功能异常(Grootendorst,Behav Brain Res.2005;159 (1):1-14;Bour等人,Behav Brain Res.2008;193 (2):174-82,其内容通过引用整体并入本文)。

[0710] 在一个实施方案中,可以将AAV-ApoE2颗粒施用于PDAPP或APP.PS1/TRE4小鼠,如Zhao等人2016Neurobiol Aging 159-172所述,其内容通过引用整体并入本文。脑内或丘脑内施用AAV-ApoE2 (AAV9-CAG-APOE2或AAVrh.10-CAG-APOE2) 显示脑A β (寡聚、可溶和不可溶)、淀粉样沉积和淀粉样病理显著降低,这是通过免疫组织化学、ELISA或Western印迹所测定的。更具体地,通过立体定向手术将AAV制剂(2 μ L, 1.0×10^{10} vg)以0.2 μ L/ μ m的速率双向注入成年小鼠的海马体或丘脑,并使其在事后分析的组织收集前表达8周。较低剂量的AAV-ApoE2或在病理的晚期进行递送被证明效果不佳。

[0711] 额颞痴呆 (FTD)

[0712] 额颞痴呆 (FTD),也称为额颞变性或Pick病,是指由大脑中进行性神经细胞丧失引起的一组疾病。这种神经细胞的丧失会导致大脑额叶和/或颞叶的功能丧失。在美国,大约有45,000人患有FTD,大多数人在45至65岁之间。

[0713] FTD有三种亚型:行为变异额颞痴呆 (bvFTD)、原发进行性失语症 (PPA) 和运动功能障碍。患有bvFTD的受试者倾向于在人格、人际关系和行为方面发生重大变化,而神经丧失在控制行为、同理心、预见性和判断力的领域最为突出。PPA影响语言技能、说话、写字和理解能力。在65岁以上的人群中,bvFTD和PPA都没有AD常见,但是在45至65岁的人群中,bvFTD和PPA几乎与AD同样常见。

[0714] tau突变与患有FTD的受试者在遗传上相关。

[0715] 肌萎缩性侧索硬化 (ALS)

[0716] 肌萎缩性侧索硬化症 (ALS),也称为Lou Gehrig病或经典运动神经元疾病,是一种快速进行性致命神经学疾病。ALS与细胞变性以及上运动神经元和下运动神经元的死亡相关,导致肌肉运动丧失、减弱、消瘦和失去对自愿肌肉运动的控制。早期症状包括手、腿和吞咽肌肉的肌肉无力,最终由于隔膜衰竭而发展为无法呼吸。根据疾病控制与预防中心 (CDC) 的数据,在美国,ALS影响了大约12,000-15,000人,大约5-10%的病例是家族性的。

[0717] ALS像其他非感染性神经退行性疾病一样,其特征是存在错误折叠的蛋白,包括但不限于tau、淀粉样蛋白 β (A β)、 α 突触核蛋白、HTT (亨廷顿蛋白) 或SOD1 (超氧化物歧化酶1蛋白) 和髓磷脂相关的抑制剂及其受体 (参见,例如,2011,N Biotechnol.28 (5):511-7和Musaro,2013,FEBS J.;280 (17):4315-22,以及其中的参考文献)。家族性ALS与TAR DNA结合蛋白43 (TDP-43) 和RNA结合蛋白FUS/TLS的突变有关。已经识别出一些蛋白可以减缓ALS的进展,例如但不限于生长因子,例如胰岛素样生长因子1 (IGF-1)、神经胶质细胞系生长因子、脑源性生长因子、血管内皮生长因子和睫状神经营养因子或促进肌肉生长的生长因子,例如肌生长抑制素。

[0718] 到目前为止,尚无ALS的预防或治疗方法。FDA批准的药物利鲁唑 (riluzole) 已被批准延长寿命,但对症状没有影响。另外,可以使用药物和医疗设备来耐受与ALS相关的疼痛和发作。仍然需要影响潜在病理生理的疗法。

[0719] 在一些实施方案中,本发明的方法可以用于治疗患有ALS的受试者。在某些情况下,本发明的方法可以用于治疗怀疑患有ALS的受试者。

[0720] 本发明中描述的AAV颗粒和使用AAV颗粒的方法可用于预防、管理和/或治疗ALS。作为非限制性实例,可用于治疗、预防或管理ALS的本发明的AAV颗粒可包含靶向SOD1、HTT和/或Tau的调节性多核苷酸。

[0721] 亨廷顿病

[0722] 亨廷顿病(HD)是一种罕见的遗传性疾病,会导致大脑运动控制区域以及其他区域的神经元退化。该病的典型症状包括运动失控(舞蹈病)、姿势异常、协调能力受损、言语不清以及进食和吞咽困难,伴有行为、判断和认知的改变。HD是由与亨廷顿蛋白(HTT)相关的基因突变引起的。突变导致DNA的(CAG)区段异常重复。在美国,HD影响大约30,000人。

[0723] HD的特征在于亨廷顿(HTT)蛋白的突变,其具有聚谷氨酰胺束(polyglutamine tract)的异常扩增,例如CAG重复编码的谷氨酰胺残基长度的扩增。疾病发生的扩增阈值被认为是大约35-40个残基。HD还与由HTT的N末端区域形成的纹状体神经元中富含 β 折叠的聚集体相关。随着HD的进展,扩增和聚集导致神经元逐渐丢失。另外,HD中的细胞死亡与已知诱导细胞凋亡的死亡受体6(DR6)相关。

[0724] 截至今天,尚无疗法或治疗可以预防疾病的发展。可用的药物治疗旨在管理症状。例如,FDA已批准将丁苯那嗪(tetrabenazine)处方用于预防舞蹈症。此外,例如抗精神病药可能有助于控制妄想、幻觉和暴力爆发。仍然需要影响潜在病理生理的疗法。

[0725] 在一些实施方案中,本发明的方法可以用于治疗患有HD的受试者。在某些情况下,本发明的方法可以用于治疗怀疑患有HD的受试者。

[0726] 本发明中描述的AAV颗粒和使用AAV颗粒的方法可用于预防、管理和/或治疗HD。作为非限制性实例,用于治疗、预防和/或管理HD的本发明的AAV颗粒可以包含靶向HTT的调节性多核苷酸,其中调节性多核苷酸是siRNA双链体或编码siRNA双链体或编码的dsRNA的核酸。

[0727] 帕金森病

[0728] 帕金森病(PD)是一种神经系统的进行性疾病,尤其会影响大脑的黑质。PD是由于产生多巴胺的脑细胞丧失而发展的。PD的典型早期症状包括肢体(例如手、胳膊、腿、脚和脸)的抖动或颤抖。其他特征性症状是肢体和躯干的僵硬、移动缓慢或无法移动、平衡与协调能力受损、认知变化以及精神疾病,例如抑郁症和视觉幻觉。PD具有家族和特发性形式,建议与遗传和环境原因相关。PD影响全球超过400万人。在美国,每年约有60,000例病例被发现。通常,PD开始于50岁或50岁以上。这种疾病的早发形式始于50岁以下,而少年PD则始于20岁。

[0729] 与PD相关的产生多巴胺的脑细胞的死亡与 α -突触核蛋白的聚集、沉积和功能障碍有关(参见例如Marques和Outeiro,2012,Cell Death Dis.3:e350,Jenner,1989,J Neurol Neurosurg Psychiatry,特别增补22-28及其中的参考文献)。研究表明, α -突触核蛋白在突触前信号传导、膜运输以及多巴胺释放和运输的调节中具有作用。 α -突触核蛋白聚集体(例如以寡聚体形式)被认为是导致神经元功能障碍和死亡的物质。已经确定了PD家族形式的 α -突触核蛋白基因(SNCA)突变,但也识别了环境因素,例如神经毒素影响 α -突触核蛋白的聚集。PD中脑细胞死亡的其他提示原因是蛋白体和溶酶体系统功能障碍,线粒体活性减少。

[0730] PD与同 α -突触核蛋白聚集有关的其他疾病相关,称为“共核蛋白病(synucleinopathy)”。这类疾病包括但不限于帕金森病痴呆症(PDD)、多系统萎缩症(MSA)、路易体痴呆症、少年发作的广泛性神经轴索营养不良(Hallervorden-Spatz病)、纯自主神经衰竭(PAF)、伴有1型脑铁蓄积的神经退行性变(NBIA-1)以及合并的阿尔茨海默氏病和帕金森病。

[0731] 迄今为止,尚未发现PD的治愈或预防性疗法。可用的多种药物疗法可缓解症状。对症状药物治疗的非限制性实例包括卡比多巴和左旋多巴的组合以减少僵硬和缓慢运动,以及抗胆碱能药以减少发抖和僵硬。其他可选疗法包括例如深层大脑刺激和手术。仍然需要影响潜在病理生理的疗法。

[0732] 在一些实施方案中,本发明的方法可以用于治疗患有PD和其他突触核蛋白病的受试者。在某些情况下,本发明的方法可以用于治疗怀疑患有PD和其他突触核蛋白病的受试者。

[0733] 弗里德希氏共济失调

[0734] 弗里德希氏共济失调(FA)是一种常染色体隐性遗传疾病,可导致神经系统进行性损害。参见,Parkinson等人,Journal of Neurochemistry,2013,126(增刊1),103-117,其内容通过引用整体并入本文。发病通常发生在青春期,并且总是在25岁时发生。参见,Campuzano等人,Science,271.5254(1996年3月8日):1423,其内容通过引用整体并入本文。FA是由于感觉神经元中线粒体蛋白Frataxin(FXN)的表达减少而导致脊髓神经组织变性所致,而感觉神经元是指导手臂和腿部肌肉运动所必需的(通过与小脑连接)。参见,Koeppen, Arnulf;J Neurol Sci.,2011,April 15;303(1-2):1-12,其内容通过引用整体并入本文。最初的症状包括协调性差,如步态不稳、平衡性差、腿部无力、行走减慢、协调性受损、构音障碍、眼球震颤、感觉受损、脊柱后侧凸和足部畸形。参见Parkinson等人,Journal of Neurochemistry,2013,126(增刊1),103-117。该疾病通常会发展到需要轮椅才能活动。高加索人群中FA的发病率约20,000分之1至约50,000分之1例之间,在欧洲人群中推算出的携带比例为约120分之1。参见Nageshwaran和Festenstien,Frontiers in Neurology,第6卷,第262期(2015);Campuzano等,Science,271.5254(1996年3月8日):1423,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0735] FXN基因中内含子GAA三联体重复序列的扩增是导致FA的Frataxin表达减少的遗传原因。参见,Parkinson等人,J Journal of Neurochemistry,2013,126(增刊1),103-117。随着时间的流逝,缺乏会引起上述症状,以及由于对细胞代谢的影响而导致的频繁疲劳。

[0736] 目前,对于FA尚无有效的治疗方法,并且通常仅对患者进行简单地监控来进行症状管理。因此,在本领域中长期需要开发用于治疗与FXN相关的疾病并减轻患有FA的患者的蛋白缺乏的药物组合物和方法。

[0737] 本发明的AAV颗粒的递送可以用于治疗患有弗里德希氏共济失调的受试者。在某些情况下,本发明的方法可以用于治疗怀疑患有弗里德希氏共济失调的受试者。本发明的AAV颗粒的递送可以导致Frataxin增加。此外,Frataxin的这种增加可能会或可能不会与移动性的改善相关。

[0738] 在一个实施方案中,包含Frataxin多核苷酸的本发明的AAV颗粒的递送可用于治

疗患有弗里德希氏共济失调的受试者。

[0739] 在一个实施方案中,可以将包含Fratxin多核苷酸的本发明的AAV颗粒递送至脊髓的小脑的齿状核、脑干核和/或克拉克柱。递送至这些区域中的一个或多个区域可以治疗和/或减轻弗里德希氏共济失调在受试者中的作用。

[0740] 在一个实施方案中,可以通过静脉内施用,将包含Fratxin多核苷酸的本发明的AAV颗粒递送至中枢神经系统、外周神经系统和/或外周器官,以治疗受试者的弗里德希氏共济失调。

[0741] 心血管疾病

[0742] 心血管疾病,也称为心脏病或心脏和血管疾病,是描述心脏和/或血管的许多疾病或病症的总称。心血管疾病中的许多疾病或病症都与动脉粥样硬化有关,在动脉粥样硬化中,斑块积聚在动脉壁中。这种积聚使动脉变窄,使血液更难流过。心血管疾病的非限制性实例包括心力衰竭(在心脏应该泵血时,心脏不能正常泵血)、心律不齐(心脏的心律异常,例如心动过缓(心率每分钟小于60次搏动)或心动过速(心率每分钟超过100次搏动))、心脏瓣膜问题(例如狭窄(瓣膜打开不足以在血液应该流过时不能正常流过)、回流(瓣膜无法适当关闭)和脱垂(瓣膜小叶突出或脱垂回到上腔))、中风(例如,向大脑供血的血管阻塞时的缺血性中风)和心脏病发作(当血液进入心脏被阻塞时)。

[0743] 本发明的AAV颗粒可以用于治疗患有心血管疾病的受试者。

[0744] 心力衰竭

[0745] 心力衰竭是美国死亡的主要原因,每年约有580万患者和30万人死亡。心力衰竭是由多种因素引起的心脏病的共同终点,这些因素包括但不限于饮食、吸烟、高血压或遗传学。心力衰竭可能是由于钙处理失调所致,其导致心肌收缩力受损。当前的心力衰竭治疗包括但不限于对症治疗(例如利尿剂、 β -肾上腺素能阻断剂和/或血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂)和器械或手术治疗(例如左心室辅助装置(LVAD)、瓣膜置换和/或血管成形术)。这些目前的疗法不能直接纠正心脏收缩性,而只能为该疾病提供短期解决方案。治疗心力衰竭的长期治疗选择是使用AAV传递的基因治疗。

[0746] 多数心脏AAV基因治疗方法集中于 β -肾上腺素能系统(BARKct,腺苷酸环化酶6)或钙处理蛋白(SERCA2a,PP1,S100100)以挽救心脏收缩性。参见例如Hulot等人,2016和Zouein&Booz 2013,其各自内容通过引用整体并入本文。然而,通过本文所述的AAV衣壳的全身或靶向递送增加的心肌细胞转导提供了治疗心力衰竭的最佳机会。

[0747] 纽约心脏协会(NYHA)创建了一个功能分类系统,对患有心力衰竭的受试者进行分类。NYHA根据受试者在体育活动过程中受到的限制,提供4类患者症状评估和4类客观评估。I类患者症状评估意味着受试者没有体育活动的限制,因为普通的体育活动不会导致受试者过度疲劳、心悸或呼吸急促。II类患者症状评估是指受试者的体育活动受到轻微的限制,因为他们在休息时感到舒适,但是他们的体育活动会导致疲劳、心悸和呼吸急促。III类患者症状评估是指受试者的体育活动受到限制,因为该受试者休息时感到舒服,但正常活动以外的活动会导致疲劳、心悸或呼吸急促。IV类患者症状评估意味着受试者无法舒适地进行任何体育活动。客观评估意味着受试者没有心血管疾病的客观证据,也没有症状或对普通体育活动的限制。B类客观评估意味着有心血管疾病极少、症状轻微的客观证据,在日常活动中略有限制,但受试者休息时感到舒适。C类客观评估意味着有中度严重心血管疾病的

客观证据,受试者仅在休息时才感到舒适,并且由于即使在比普通活动少的活动时有症状而具有明显的活动受限。D类客观评估意味着有严重心血管疾病的客观证据,受试者甚至在休息时都有症状,并且活动严重受限。

[0748] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的递送可以用于治疗患有心力衰竭的受试者。

[0749] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的递送在心肌损伤后进行。在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的递送在受试者的心室功能降低后进行。在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的递送在向受试者施用地高辛后进行。在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的递送与向受试者施用地高辛的同时发生。在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的递送在受试者的心室功能降低后但在受试者的心输出量降低前进行。在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的递送在向受试者施用 β -受体阻断剂前进行。

[0750] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒与地高辛、 β -受体阻断剂、ACEI、 α RB、螺内酯、利尿剂和/或血管扩张剂联合施用。

[0751] 在一个实施方案中,施用包含ATP2A2(也称为SERCA2a)多核苷酸的本发明的AAV颗粒以治疗患有心力衰竭的受试者。尽管不希望受到理论的束缚,但ATP酶肌浆/内质网 Ca^{2+} 转运2(也称为肌浆网 Ca^{2+} ATP酶)(SERCA2a)是心肌细胞中钙循环的组分。肌浆网(SR)中负责钙转运(Ca^{2+})的蛋白功能下降可能导致心力衰竭后出现的收缩/松弛缺陷。心力衰竭后在人组织中观察到ATP2A2的表达和活性降低(参见Arai等人,Circulation Research 72(2),2013年2月;其内容通过引用整体并入本文)。钙循环和收缩性可以通过受试者中的ATP2A2过表达来恢复。

[0752] 在一个实施方案中,包含ATP2A2多核苷酸的本发明的AAV颗粒的递送增加了ATP2A2在受试者中的表达。表达可以在目标细胞、组织和/或器官中增加。作为非限制性实例,ATP2A2的表达在心脏中增加。作为非限制性实例,ATP2A2的表达在心肌细胞中增加。

[0753] 在一个实施方案中,施用包含S100A1多核苷酸的本发明的AAV颗粒以治疗患有心力衰竭的受试者。尽管不希望受到理论的束缚,但S100钙结合蛋白A1增强了ATP2A2的活性、RyR、线粒体ATP产生和/或肌联蛋白介导的收缩。ATP2A2(肌浆网(SR)中负责钙转运(Ca^{2+})的蛋白)的活性增加,可纠正心力衰竭后出现的收缩/舒张缺陷。

[0754] 在一个实施方案中,包含S100A1多核苷酸的本发明的AAV颗粒的递送增加了S100A1在受试者中的表达。表达可以在目标细胞、组织和/或器官中增加。作为非限制性实例,S100A1的表达在心脏中增加。作为非限制性实例,S100A1的表达在心肌细胞中增加。

[0755] 在一个实施方案中,包含S100A1多核苷酸的本发明的AAV颗粒的递送增加了ATP2A2在受试者中的表达。表达可以在目标细胞、组织和/或器官中增加。作为非限制性实例,ATP2A2的表达在心脏中增加。作为非限制性实例,ATP2A2的表达在心肌细胞中增加。

[0756] 治疗神经学疾病的方法

[0757] 编码蛋白有效载荷的AAV颗粒

[0758] 本发明提供了将本发明的AAV颗粒引入细胞中的方法,该方法包括将足以增加靶mRNA和蛋白产生的量的任何载体引入所述细胞中。在一些方面,细胞可以是肌肉细胞、干细胞、神经元(例如但不限于运动神经元、海马体神经元、内嗅神经元、丘脑神经元或皮层神经元),以及神经胶质细胞,例如星形胶质细胞或小胶质细胞。

[0759] 本发明公开了在需要治疗的受试者中治疗与靶蛋白(例如,ApoE、FXN)的功能/存在不足相关的神经学疾病的方法。该方法任选地包括向受试者施用治疗有效量的包含本发明的AAV颗粒的组合物。作为非限制性实例,AAV颗粒可以增加靶基因的表达,增加靶蛋白的产生,并因此减少受试者中神经学疾病的一种或多种症状,从而对受试者进行治疗性治疗。

[0760] 在一些实施方案中,包含编码蛋白有效载荷的核酸的本发明的AAV颗粒包含AAV衣壳,其允许在静脉内施用后穿过血脑屏障传输。在一个示实例中,AAV衣壳为VOY101,在另一实例中,AAV衣壳为VOY201。

[0761] 在一个实施方案中,将包含本发明的AAV颗粒的组合物通过全身施用而施用于受试者的中枢神经系统。在一个实施方案中,全身施用是静脉内注射。

[0762] 在一些实施方案中,将包含本发明的AAV颗粒的组合物施用于受试者的中枢神经系统。在其他实施方案中,将包含本发明的AAV颗粒的组合物施用于受试者的组织(例如受试者的脑)。

[0763] 在一个实施方案中,通过实质内注射将包含本发明的AAV颗粒的组合物施用于受试者的中枢神经系统。实质内注射的非限制性实例包括丘脑内、纹状体内、海马体内或靶向内嗅皮层。

[0764] 在一个实施方案中,通过实质内注射和鞘内注射将包含本发明的AAV颗粒的组合物施用于受试者的中枢神经系统。

[0765] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以被递送到特定类型的靶细胞中,包括但不限于海马体神经元、皮层神经元、运动神经元或内嗅神经元;以及胶质细胞,包括少突胶质细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞;和/或其他围绕神经元的细胞,例如T细胞。

[0766] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以被递送至纹状体和/或皮层中的神经元。

[0767] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用作神经学疾病的疗法。

[0768] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用作tau蛋白病的疗法。

[0769] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用作阿尔茨海默氏病的疗法。

[0770] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用作肌萎缩性侧索硬化的疗法。

[0771] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用作亨廷顿病的疗法。

[0772] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用作帕金森病的疗法。

[0773] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用作弗里德希氏共济失调的疗法。

[0774] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可用于增加靶蛋白在星形胶质细胞中的表达,以治疗神经学疾病。星形胶质细胞中的靶蛋白可增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或多于95%, 5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、

25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0775] 在一些实施方案中,AAV颗粒可以用于增加小胶质细胞中的靶蛋白。小胶质细胞中靶蛋白的增加可以独立地增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0776] 在一些实施方案中,AAV颗粒可以用于增加皮层神经元中的靶蛋白。皮层神经元中目标蛋白的增加可以独立地增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、

30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0777] 在一些实施方案中,AAV颗粒可用于增加海马体神经元中的靶蛋白。海马体神经元中目标蛋白的增加可以独立地增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0778] 在一些实施方案中,AAV颗粒可用于增加DRG和/或交感神经元中的靶蛋白。DRG和/或交感神经元中目标蛋白的增加可以独立地增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-

50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0779] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用于增加感觉神经元中的靶蛋白,以治疗神经学疾病。感觉神经元中的靶蛋白可能会增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0780] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用于增加受试者的靶蛋白和减轻神经学疾病的症状。靶蛋白的增加和/或神经学疾病症状的减轻可以独立地改变(增加靶蛋白的产生和减轻神经学疾病症状)5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-

60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0781] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可用于减少通过标准评估系统(例如但不限于总功能容量(TFC)量表)测量的功能容量和日常生活活动的下降。

[0782] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用于改善用于测量神经学疾病症状的任何评估的表现。此类评估包括但不限于ADAS-cog(阿尔茨海默氏病评估量表-认知)、MMSE(小精神状态量表)、GDS(老年抑郁量表)、FAQ(功能活动问卷)、ADL(日常生活活动)、GPCOG(全科医生认知评估)、Mini-Cog、AMTS(心理测验评分的缩写)、画钟测试、6-CIT(6项认知障碍测验)、TYM(测验你的记忆力)、MoCa(蒙特利尔认知评估)、ACE-R(Addenbrookes认知评估)、MIS(记忆障碍筛查)、BADLS(Bristol日常生活活动量表)、Barthel指数、功能独立性量度、工具性日常生活活动、IQCODE(老年人认知下降的调查问卷)、神经精神病学量表、Cohen-Mansfield激越行为量表、BEHAVE-AD、EuroQol、Short Form-36和/或MBR照顾者应变仪或其他任何活动,如Sheehan B(Ther Adv Neurol Disord.5(6):349-358(2012))中所述的测试方法,其内容通过引用整体并入本文。

[0783] 在一些实施方案中,本发明的组合物作为用于神经学疾病治疗的单独治疗剂或作为联合治疗剂来施用。

[0784] 编码靶蛋白的AAV颗粒可以与一种或多种其他治疗剂组合使用。“与.....组合”并不意味着试剂必须同时施用和/或配制用于一起递送,尽管这些递送方法落入本公开的范围。组合物可以与一种或多种其它所需治疗剂或医疗程序同时、在其之前或之后施用。通常,将以针对每种药剂确定的剂量和/或按时间表施用该试剂。

[0785] 可以与本发明的AAV颗粒组合使用的治疗剂可以是小分子化合物,其是抗氧化剂、抗炎剂、抗凋亡剂、钙调节剂、抗谷氨酸能试剂、结构蛋白抑制剂、参与肌肉功能的化合物以及参与金属离子调节的化合物。作为非限制性实例,组合疗法可以与一种或多种神经保护剂(例如已经过测试其对运动神经元变性的神经保护作用的小分子化合物、生长因子和激素)组合。

[0786] 可以与本文所述的AAV颗粒组合使用的经测试可治疗神经学疾病的化合物包括但不限于胆碱酯酶抑制剂(多奈哌齐、利斯的明、加兰他敏)、NMDA受体拮抗剂(如美金刚)、抗精神病药、抗抑郁药、抗惊厥药(例如丙戊酸钠和用于肌阵挛的左乙拉西坦)、分泌酶抑制剂、淀粉样聚集抑制剂、铜或锌调节剂、BACE抑制剂、tau聚集抑制剂(例如亚甲基蓝、吩噻嗪、葱醌、正苯胺或罗丹明)、微管稳定剂(例如NAP、泰素或紫杉醇)、激酶或磷酸酶抑制剂(例如靶向GSK3 β (锂)或PP2A的抑制剂)、用AB肽或tau磷酸表位免疫、抗tau或抗淀粉样抗体、多巴胺消耗剂(例如用于舞蹈症的丁苯那唑)、苯并二氮卓类(例如氯硝西泮(用于肌阵挛、舞蹈症、肌张力障碍、僵硬和/或痉挛))、多巴胺的氨基酸前体(例如用于僵硬的左旋多巴)、骨骼肌松弛剂(例如用于僵硬和/或痉挛的巴氯芬、替扎尼定)、乙酰胆碱在神经肌肉接

头处释放导致肌肉麻痹的抑制剂(例如用于磨牙症和/或肌张力障碍的肉毒毒素)、非典型抗精神病药(例如用于精神病和/或易怒的奥氮平和喹硫平,用于精神病、舞蹈症和/或易怒的利司培酮、舒必利和氟哌啶醇,用于治疗抗性精神病的氯氮平、用于具有明显阴性症状的精神病的阿立哌唑)、选择性血清素再摄取抑制剂(SSRI)(例如用于抑郁、焦虑、强迫行为和/或易怒的西酞普兰、氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、米氮平、文拉法辛)、催眠药(例如环磷酰胺和/或唑吡坦用于改变睡眠周期)、抗惊厥药(例如用于狂躁症或轻躁狂的丙戊酸钠和卡马西平)和情绪稳定剂(例如用于狂躁症或轻躁狂的锂)。

[0787] 可以将神经营养因子与本发明的AAV颗粒联合治疗用于治疗神经学疾病。通常,神经营养因子定义为促进神经元的存活、生长、分化、增殖和/或成熟,或刺激神经元活性增加的物质。在一些实施方案中,本方法进一步包括将一种或多种营养因子递送至需要治疗的受试者中。营养因子可以包括但不限于IGF-I、GDNF、BDNF、CTNF、VEGF、Collivelin、扎利罗登、促甲状腺激素释放激素和ADNF及其变体。

[0788] 在一方面,本文所述的AAV颗粒可以与表达神经营养因子的AAV颗粒共同施用,神经营养因子例如AAV-IGF-I(参见例如,Vincent等人,Neuromolecular medicine,2004,6,79-85;其内容通过引用整体并入本文)和AAV-GDNF(参见例如Wang等人,J Neurosci.,2002,22,6920-6928;其内容通过引用整体并入本文)。

[0789] 在一些实施方案中,将用于治疗神经学疾病的本发明的组合物静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、实质内、鞘内和/或心室内施用于有需要的受试者,从而使AAV颗粒通过血-脑屏障和血液脊髓屏障中的一种或两种。在某些方面,该方法包括向受试者的中枢神经系统(CNS)(使用例如输注泵和/或递送支架)直接施用(例如实质内施用、脑室内施用和/或鞘内施用)治疗有效量的本发明的包含AAV颗粒的组合物。载体可用于增加靶基因的表达,和/或减轻受试者中神经学疾病的一种或多种症状,从而对受试者进行治疗性治疗。

[0790] 在一个实施方案中,向受试者施用本文所述的AAV颗粒可以增加受试者中的靶蛋白水平。靶蛋白水平可以在受试者(例如但不限于受试者的CNS区域或CNS的特定细胞)中增加约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的蛋白水平增加至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的蛋白水平增加至少40%。作为非限制性实例,受试者可具有10%的靶蛋白增加。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的蛋白水平相对于基线成倍增加。在一个实施方案中,AAV颗粒导致靶蛋白水平高5-6倍。

[0791] 在一个实施方案中,向受试者施用本文所述的AAV颗粒可以增加靶蛋白在受试者中的表达。靶蛋白的表达可以在受试者(例如但不限于受试者的CNS区域或CNS的特定细胞)中增加约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-

70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的表达增加至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的表达增加至少40%。

[0792] 在一个实施方案中,向受试者静脉内施用本文所述的AAV颗粒可以增加靶蛋白在受试者中的CNS表达。靶蛋白的表达可以在受试者(例如但不限于受试者的CNS区域或CNS的特定细胞)中增加约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒可将靶蛋白在CNS中的表达增加至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒可将靶蛋白在CNS中的表达增加至少40%。

[0793] 在一个实施方案中,向受试者施用AAV颗粒将增加靶蛋白在受试者中的表达,并且靶蛋白表达的增加将减轻受试者的神经学疾病的影响和/或症状。

[0794] 包含调节性多核苷酸的AAV颗粒

[0795] 本发明提供了将包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒引入细胞的方法,该方法包括将足以使靶mRNA降解发生的量的任何载体引入所述细胞,从而激活细胞中的靶特异性RNAi。在一些方面,细胞可以是肌肉细胞、干细胞、神经元(例如但不限于运动神经元、海马体神经元、内嗅神经元、丘脑神经元或皮层神经元),以及神经胶质细胞,例如星形胶质细胞或小胶质细胞。

[0796] 本发明公开了在需要治疗的受试者中治疗与靶蛋白功能障碍相关的神经学疾病的方法。该方法任选地包括向受试者施用治疗有效量的包含AAV颗粒的组合物,所述AAV颗粒包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。作为非限制性实例,siRNA分子可沉默靶基因的表达,抑制靶蛋白的产生,并减轻受试者中神经学疾病的一种或多种症状,从而对受试者进行治疗性治疗。

[0797] 在一些实施方案中,包含本发明的AAV颗粒的组合物包含编码siRNA分子的核酸序列,所述组合物包含AAV衣壳,其允许在静脉内施用后穿过血脑屏障的传输。

[0798] 在一些实施方案中,将包含AAV颗粒的组合物施用于受试者的中枢神经系统,所述AAV颗粒包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。在其他实施方案中,将包含AAV颗粒的组合物施用于受试者的组织(例如,受试者的脑),所述AAV颗粒包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。

[0799] 在一个实施方案中,将包含AAV颗粒的组合物通过全身施用而施用于受试者的中枢神经系统,所述AAV颗粒包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。在一个实施方案中,全身施用是静脉内注射。

[0800] 在一个实施方案中,将包含AAV颗粒的组合物通过实质内注射施用于受试者的中枢神经系统,所述AAV颗粒包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。实质内注射的非限制

性实例包括丘脑内、纹状体内、海马体内或靶向内嗅皮层。

[0801] 在一个实施方案中,通过实质内注射和鞘内注射将包含AAV颗粒的组合物施用于受试者的中枢神经系统,所述AAV颗粒包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。

[0802] 在一个实施方案中,可以将包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒递送至特定类型的靶向细胞,包括但不限于海马体神经元、皮层神经元、运动神经元或内嗅神经元;以及胶质细胞,包括少突胶质细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞;和/或其他围绕神经元的细胞,例如T细胞。

[0803] 在一个实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以被递送至纹状体和/或皮层中的神经元。

[0804] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以用作神经学疾病的疗法。

[0805] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以用作tau蛋白病的疗法。

[0806] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以用作阿尔茨海默氏病的疗法。

[0807] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以用作肌萎缩性侧索硬化的疗法。

[0808] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以用作亨廷顿病的疗法。

[0809] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以用作帕金森病的疗法。

[0810] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以用作弗里德希氏共济失调的疗法。

[0811] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可用于阻抑星形胶质细胞中的靶蛋白,以治疗神经学疾病。星形胶质细胞中的靶蛋白可被阻抑了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-

80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。星形胶质细胞中的靶蛋白可能减少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0812] 在一些实施方案中，包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可用于阻抑小胶质细胞中的靶蛋白。小胶质细胞中的靶蛋白可被独立地阻抑了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、

60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。减少可以是5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0813] 在一些实施方案中，包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可用于阻抑皮层神经元中的靶蛋白。皮层神经元中的靶蛋白可被独立地阻抑了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%

或90-95%。减少可以是5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0814] 在一些实施方案中，包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可用于抑制海马体神经元中的靶蛋白。海马体神经元中的靶蛋白可被独立地抑制了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。减少可以是5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-

30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0815] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可用于阻抑DRG和/或交感神经元中的靶蛋白。DRG和/或交感神经元中的靶蛋白可被独立地阻抑了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。减少可以是5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-

45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0816] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可用于抑制感受神经元中的靶蛋白,以治疗神经学疾病。感受神经元中的靶蛋白可被抑制5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。感受神经元中的靶蛋白可减少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、

15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0817] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以用于阻抑靶蛋白并减轻受试者的神经学疾病的症状。靶蛋白的阻抑和/或神经学疾病症状的减轻可以分别减少或阻抑5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0818] 在一个实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可用于减少通过标准评估系统(例如但不限于总功能容量(TFC)量表)测量的功能容量和日常生活活动的下降。

[0819] 在一些实施方案中,本发明的组合物作为用于神经学疾病治疗的单独治疗剂或作为联合治疗剂来施用。

[0820] 编码靶向目标基因的siRNA双链体的AAV颗粒可以与一种或多种其他治疗剂组合使用。“与……组合”并不意味着试剂必须同时施用和/或配制用于一起递送,尽管这些递

送方法落入本公开的范围。组合物可以与一种或多种其它所需治疗剂或医疗程序同时、在其之前或之后施用。通常,将以针对每种药剂确定的剂量和/或按时间表施用该试剂。

[0821] 可以与编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒组合使用的治疗剂可以是小分子化合物,其是抗氧化剂、抗炎剂、抗凋亡剂、钙调节剂、抗谷氨酸能试剂、结构蛋白抑制剂、参与肌肉功能的化合物以及参与金属离子调节的化合物。

[0822] 可以与包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒组合使用的经测试可治疗神经学疾病的化合物包括但不限于胆碱酯酶抑制剂(多奈哌齐、利斯的明、加兰他敏)、NMDA受体拮抗剂(如美金刚)、抗精神病药、抗抑郁药、抗惊厥药(例如丙戊酸钠和用于肌阵挛的左乙拉西坦)、分泌酶抑制剂、淀粉样聚集抑制剂、铜或锌调节剂、BACE抑制剂、tau聚集抑制剂(例如亚甲基蓝、吩噻嗪、葱醌、正苯胺或罗丹明)、微管稳定剂(例如NAP、泰素或紫杉醇)、激酶或磷酸酶抑制剂(例如靶向GSK3 β (锂)或PP2A的抑制剂)、用A β 肽或tau磷酸表位免疫、抗tau或抗淀粉样抗体、多巴胺消耗剂(例如用于舞蹈症的丁苯那唑)、苯并二氮卓类(例如氯硝西泮(用于肌阵挛、舞蹈症、肌张力障碍、僵硬和/或痉挛))、多巴胺的氨基酸前体(例如用于僵硬的左旋多巴)、骨骼肌松弛剂(例如用于僵硬和/或痉挛的巴氯芬、替扎尼定)、乙酰胆碱在神经肌肉接头处释放导致肌肉麻痹的抑制剂(例如用于磨牙症和/或肌张力障碍的肉毒毒素)、非典型抗精神病药(例如用于精神病和/或易怒的奥氮平和喹硫平,用于精神病、舞蹈症和/或易怒的利司培酮、舒必利和氟哌啶醇,用于治疗抗性精神病的氯氮平、用于具有明显阴性症状的精神病的阿立哌唑)、选择性血清素再摄取抑制剂(SSRI)(例如用于抑郁、焦虑、强迫行为和/或易怒的西酞普兰、氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、米氮平、文拉法辛)、催眠药(例如环磷酰胺和/或唑吡坦用于改变睡眠周期)、抗惊厥药(例如用于狂躁症或轻躁狂的丙戊酸钠和卡马西平)和情绪稳定剂(例如用于狂躁症或轻躁狂的锂)。

[0823] 可以将神经营养因子与编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒联合治疗用于治疗神经学疾病。通常,神经营养因子定义为促进神经元的存活、生长、分化、增殖和/或成熟,或刺激神经元活性增加的物质。在一些实施方案中,本方法进一步包括将一种或多种营养因子递送至需要治疗的受试者中。营养因子可以包括但不限于IGF-I、GDNF、BDNF、CTNF、VEGF、Collivelin、扎利罗登、促甲状腺激素释放激素和ADNF及其变体。

[0824] 在一方面,编码靶向目标基因的至少一个siRNA双链体的核酸序列的AAV颗粒可以与表达神经营养因子的AAV颗粒共同施用,神经营养因子例如AAV-IGF-I(参见例如,Vincent等人,Neuromolecular medicine,2004,6,79-85;其内容通过引用整体并入本文)和AAV-GDNF(参见例如Wang等人,J Neurosci.,2002,22,6920-6928;其内容通过引用整体并入本文)。

[0825] 在一些实施方案中,将用于治疗神经学疾病的本发明的组合物静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、实质内、鞘内和/或心室内施用于有需要的受试者,从而使siRNA分子或包含siRNA分子的载体通过血-脑屏障和血液脊髓屏障中的一种或两种。在某些方面,该方法包括向受试者的中枢神经系统(CNS)(使用例如输注泵和/或递送支架)直接施用(例如实质内施用、脑室内施用和/或鞘内施用)治疗有效量的组合物,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒。载体可用于沉默或阻抑靶基因的表达,和/或减轻受试者中神经学疾病的一种或多种症状,从而对受试者进行治疗性治疗。

[0826] 在一个实施方案中,向受试者施用编码本发明的siRNA的AAV颗粒可以降低受试者

中的靶蛋白水平。靶蛋白水平可以在受试者(例如但不限于受试者的CNS区域或CNS的特定细胞)中降低约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的蛋白水平降低至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的蛋白水平降低至少40%。

[0827] 在一个实施方案中,向受试者施用编码本发明的siRNA的AAV颗粒可以降低靶蛋白在受试者中的表达。靶蛋白的表达可以在受试者(例如但不限于受试者的CNS区域或CNS的特定细胞)中降低约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的表达降低至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的表达降低至少40%。

[0828] 在一个实施方案中,向受试者静脉内施用编码本发明的siRNA的AAV颗粒可以降低靶蛋白在受试者中的CNS表达。靶蛋白的表达可以在受试者(例如但不限于受试者的CNS区域或CNS的特定细胞)中降低约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒可使靶蛋白的表达降低至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒可使靶蛋白的表达降低至少40%。

[0829] 在一个实施方案中,向受试者施用AAV颗粒将减少靶蛋白在受试者中的表达,并且靶蛋白表达的减少将减轻受试者的神经学疾病的影响和/或症状。

[0830] 在一个实施方案中,AAV颗粒可用于减少受试者中的靶蛋白。减少可以独立地为5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、

20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。作为非限制性实例，受试者的靶蛋白可减少70%。作为非限制性实例，受试者的靶蛋白可减少50%。作为非限制性实例，受试者的靶蛋白可减少40%。作为非限制性实例，受试者的靶蛋白可减少10%。

[0831] 心血管疾病的治疗方法

[0832] 本发明提供了将本发明的AAV颗粒引入细胞中的方法，该方法包括将足以增加靶mRNA和蛋白产生的量发生的任何载体引入所述细胞中。在一些方面，细胞可以是肌肉细胞，例如但不限于心肌细胞。

[0833] 本发明公开了在需要治疗的受试者中治疗与靶蛋白(例如ATP2A2)的功能/存在不足相关的心血管疾病的方法。该方法任选地包括向受试者施用治疗有效量的包含本发明的AAV颗粒的组合物。作为非限制性实例，AAV颗粒可以增加靶基因的表达，增加靶蛋白的产生，并因此减少受试者中心血管疾病的一种或多种症状，从而对受试者进行治疗性治疗。

[0834] 在一些实施方案中，包含编码蛋白有效载荷的核酸的本发明的AAV颗粒包含AAV衣壳，其允许在静脉内施用后分布到心肌细胞。

[0835] 在一个实施方案中，将包含本发明的AAV颗粒的组合物通过全身施用而施用于受试者。在一个实施方案中，全身施用是静脉内注射。

[0836] 在一些实施方案中，将包含本发明的AAV颗粒的组合物直接施用于受试者的心血管系统。在其他实施方案中，将包含本发明的AAV颗粒的组合物施用于受试者的组织(例如受试者的心脏)。

[0837] 在一个实施方案中，通过鞘内注射将包含本发明的AAV颗粒的组合物施用于受试者的心血管系统。

[0838] 在一个实施方案中，本发明的AAV颗粒可以被递送到特定类型的靶细胞中，包括但不限于心肌细胞。

[0839] 在一个实施方案中，本发明的AAV颗粒可以被递送至心肌细胞。

[0840] 在一些实施方案中，本发明的AAV颗粒可以用作心血管疾病的疗法。

[0841] 在一些实施方案中，本发明的AAV颗粒可以用作扩张型心肌病(DCM)的疗法。DCM影响心脏的心室和心房，此处心肌开始扩张，引起心肌异常收缩，导致心脏无法有效地泵血。

[0842] 在一些实施方案中，AAV颗粒可用于增加心脏组织中的靶蛋白。心脏组织中靶蛋白的增加可以独立地增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-

30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0843] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用于增加靶蛋白在心肌细胞中的表达,以治疗心血管疾病。心肌细胞中的靶蛋白可以增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0844] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可用于增加受试者中的靶蛋白并减轻心血管疾病的症状。靶蛋白的增加和/或心血管疾病症状的减少可以独立地改变(靶蛋白的产生增加,和心血管疾病的症状减轻)5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、

5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0845] 在一些实施方案中,本发明的组合物作为用于心血管疾病治疗的单独治疗剂或作为联合治疗剂来施用。

[0846] 编码靶蛋白的AAV颗粒可以与一种或多种其他治疗剂组合使用。“与……组合”并不意味着试剂必须同时施用和/或配制用于一起递送,尽管这些递送方法落入本公开的范围。组合物可以与一种或多种其它所需治疗剂或医疗程序同时、在其之前或之后施用。通常,将以针对每种药剂确定的剂量和/或按时间表施用该试剂。

[0847] 可以与本发明的AAV颗粒组合使用的治疗剂可以是小分子化合物,其是抗氧化剂、抗炎剂、抗凋亡剂、钙调节剂、抗谷氨酸能试剂、结构蛋白抑制剂、参与肌肉功能的化合物、利尿剂、ACE抑制剂、 β -肾上腺素能阻断剂和参与金属离子调节的化合物。

[0848] 在一些实施方案中,将用于治疗心血管疾病的本发明的组合物静脉内、肌内、皮下、鞘内、冠状动脉顺行注射和/或脑室内施用于有需要的受试者,以允许将AAV颗粒递送至所需细胞、组织和/或器官。在一些方面,该方法包括(使用例如输注泵和/或递送支架)直接对受试者的心血管系统施用(例如实质内施用、心室内施用和/或鞘内施用)治疗有效量的包含本发明的AAV颗粒的组合物。载体可用于在受试者中增加靶基因表达,和/或减轻心血管疾病的一种或多种症状,从而对受试者进行治疗性治疗。

[0849] 在一个实施方案中,向受试者施用本文所述的AAV颗粒可以增加受试者中的靶蛋白水平。靶蛋白水平可以在受试者(例如但不限于受试者的心血管系统、心血管系统区域或心血管的特定细胞)中增加约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-

100%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的蛋白水平增加至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的蛋白水平增加至少40%。作为非限制性实例,受试者可具有10%的靶蛋白增加。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的蛋白水平相对于基线成倍增加。在一个实施方案中,AAV颗粒导致靶蛋白水平高5-6倍。

[0850] 在一个实施方案中,向受试者施用本文所述的AAV颗粒可以增加靶蛋白在受试者中的表达。靶蛋白的表达可以在受试者(例如但不限于受试者的心血管系统、心血管系统区域或心血管系统的特定细胞)中增加约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的表达增加至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使靶蛋白的表达增加至少40%。

[0851] 在一个实施方案中,向受试者静脉内施用本文所述的AAV颗粒可以增加靶蛋白在受试者中的心血管系统表达。靶蛋白的表达可以在受试者(例如但不限于受试者的心血管系统、心血管系统区域或心血管系统的特定细胞)中增加约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒使靶蛋白在心血管系统中的表达增加至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒将靶蛋白在心血管系统中的表达增加至少40%。

[0852] 在一个实施方案中,向受试者施用AAV颗粒将增加靶蛋白在受试者中的表达,并且靶蛋白表达的增加将减轻受试者的心血管疾病的影响和/或症状。

[0853] 心力衰竭的治疗方法

[0854] 本发明提供了将本发明的AAV颗粒引入细胞中的方法,该方法包括将足以增加靶mRNA和蛋白产生发生的量的任何载体引入所述细胞中。在一些方面,细胞可以是肌肉细胞,例如但不限于心肌细胞。

[0855] 本发明公开了在需要治疗的受试者中治疗与靶蛋白(例如ATP2A2)的功能/存在不足相关的心力衰竭的方法。该方法任选地包括向受试者施用治疗有效量的包含本发明的AAV颗粒的组合物。作为非限制性实例,AAV颗粒可以增加靶基因的表达,增加靶蛋白的产生,并因此减少受试者中心力衰竭的一种或多种症状,从而对受试者进行治疗性治疗。

[0856] 在一些实施方案中,包含编码蛋白有效载荷的核酸的本发明的AAV颗粒包含AAV衣壳,其允许在静脉内施用后分布到心肌细胞。

[0857] 在一个实施方案中,将包含本发明的AAV颗粒的组合物通过全身施用而施用于受试者。在一个实施方案中,全身施用是静脉内注射。

[0858] 在一些实施方案中,将包含本发明的AAV颗粒的组合物直接施用于受试者的心血管系统。在其他实施方案中,将包含本发明的AAV颗粒的组合物施用于受试者的组织(例如受试者的心脏)。

[0859] 在一个实施方案中,通过鞘内注射将包含本发明的AAV颗粒的组合物施用于受试者的心血管系统。

[0860] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以被递送到特定类型的靶细胞中,包括但不限于心肌细胞。

[0861] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可以被递送至心肌细胞。

[0862] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用作心力衰竭的疗法。

[0863] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可用于减少受试者的住院次数。

[0864] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可用于延长受试者的存活期。

[0865] 在一些实施方案中,AAV颗粒可用于增加心脏组织中的靶蛋白。心脏组织中靶蛋白的增加可以独立地增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0866] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以用于增加靶蛋白在心肌细胞中的表达,以治疗心力衰竭。心肌细胞中的靶蛋白可以增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、

20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0867] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可用于增加受试者中的靶蛋白并减轻心力衰竭的症状。靶蛋白的增加和/或心力衰竭症状的减少可以独立地改变(靶蛋白的产生增加,和心力衰竭的症状减轻)5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[0868] 在一些实施方案中,本发明的组合物作为用于心力衰竭治疗的单独治疗剂或作为联合治疗剂来施用。

[0869] 编码靶蛋白的AAV颗粒可以与一种或多种其他治疗剂组合使用。“与……组合”并不意味着试剂必须同时施用和/或配制用于一起递送,尽管这些递送方法落入本公开的范围。组合物可以与一种或多种其它所需治疗剂或医疗程序同时、在其之前或之后施用。通常,将以针对每种药剂确定的剂量和/或按时间表施用该试剂。

[0870] 可以与本发明的AAV颗粒组合使用的治疗剂可以是小分子化合物,其是抗氧化剂、抗炎剂、抗凋亡剂、钙调节剂、抗谷氨酸能试剂、结构蛋白抑制剂、参与肌肉功能的化合物、利尿剂、ACE抑制剂、 β -肾上腺素能阻断剂和参与金属离子调节的化合物。

[0871] 在一些实施方案中,将用于治疗心血管疾病的本发明的组合物静脉内、肌内、皮下、鞘内、冠状动脉顺行注射和/或脑室内施用于有需要的受试者,以允许将AAV颗粒递送至所需细胞、组织和/或器官。在一些方面,该方法包括(使用例如输注泵和/或递送支架)直接对受试者的心血管系统施用(例如实质内施用、心室内施用和/或鞘内施用)治疗有效量的包含本发明的AAV颗粒的组合物。载体可用于在受试者中增加靶基因表达,和/或减轻心力衰竭的一种或多种症状,从而对受试者进行治疗性治疗。

[0872] 在一个实施方案中,向受试者施用本文所述的AAV颗粒可以增加受试者中的靶蛋白水平。靶蛋白水平可以在受试者(例如但不限于受试者的心血管系统、心血管系统区域或心血管的特定细胞)中增加约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒使靶蛋白的蛋白水平增加至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒使靶蛋白的蛋白水平增加至少40%。作为非限制性实例,受试者具有10%的靶蛋白增加。作为非限制性实例,AAV颗粒使靶蛋白的蛋白水平相对于基线成倍增加。在一个实施方案中,AAV颗粒导致靶蛋白水平高5-6倍。

[0873] 在一个实施方案中,向受试者施用本文所述的AAV颗粒可以增加靶蛋白在受试者中的表达。靶蛋白的表达可以在受试者(例如但不限于受试者的心血管系统、心血管系统区域或心血管系统的特定细胞)中增加约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒使靶蛋白的表达增加至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒使靶蛋白的表达增加至少40%。

[0874] 在一个实施方案中,向受试者静脉内施用本文所述的AAV颗粒可以增加靶蛋白在受试者中的心血管系统表达。靶蛋白的表达可以在受试者(例如但不限于受试者的心血管系统、心血管系统区域或心血管系统的特定细胞)中增加约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒将靶蛋白在心血管系统中的表达增加至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒将靶蛋白在心血管系统中的表达增加至少40%。

[0875] 在一个实施方案中,向受试者施用本文所述的AAV颗粒可以增加靶蛋白在受试者的心肌细胞中的表达。靶蛋白的表达可增加约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[0876] 在一个实施方案中,向受试者施用本文所述的AAV颗粒可以在受试者的心肌细胞中表达ATP2A2。ATP2A2在心肌细胞中的表达可是20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。在一个实施方案中,可以在30%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在30-40%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在30-50%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在30%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在30-60%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在30-70%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在30-80%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在30-90%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在20%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在20-40%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在20-50%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在20%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在20-60%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在20-70%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在20-80%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。在一个实施方案中,可以在20-90%的心肌细胞中观察到ATP2A2的表达。

[0877] 在一个实施方案中,向受试者施用本文所述的AAV颗粒可以在受试者的心肌细胞中表达S100A1。S100A1在心肌细胞中的表达可以是20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。在一个实施方案中,可以在30%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在30-40%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在30-50%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在30%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在30-60%的

心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在30-70%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在30-80%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在30-90%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在20%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在20-40%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在20-50%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在20%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在20-60%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在20-70%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在20-80%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。在一个实施方案中,可以在20-90%的心肌细胞中观察到S100A1的表达。

[0878] 在一个实施方案中,向受试者施用AAV颗粒将增加靶蛋白在受试者中的表达,并且靶蛋白表达的增加将减轻受试者的心力衰竭的影响和/或症状。

[0879] 在一个实施方案中,向受试者施用 1×10^{13} VG剂量的本发明的AAV颗粒以治疗心力衰竭。作为非限制性实例,通过经皮冠状动脉内施用向受试者施用该剂量的AAV颗粒。

[0880] 在一个实施方案中,向受试者施用 1×10^{13} VG剂量的本发明的AAV颗粒以治疗心力衰竭。作为非限制性实例,通过静脉内施用向受试者施用该剂量的AAV颗粒。

[0881] 在一个实施方案中,向受试者施用 2×10^{13} VG剂量的本发明的AAV颗粒以治疗心力衰竭。作为非限制性实例,通过经皮冠状动脉内施用向受试者施用该剂量的AAV颗粒。

[0882] 在一个实施方案中,向受试者施用 2×10^{13} VG剂量的本发明的AAV颗粒以治疗心力衰竭。作为非限制性实例,通过静脉内施用向受试者施用该剂量的AAV颗粒。

[0883] 在一个实施方案中,向受试者施用 3×10^{13} VG剂量的本发明的AAV颗粒以治疗心力衰竭。作为非限制性实例,通过经皮冠状动脉内施用向受试者施用该剂量的AAV颗粒。

[0884] 在一个实施方案中,向受试者施用 3×10^{13} VG剂量的本发明的AAV颗粒以治疗心力衰竭。作为非限制性实例,通过静脉内施用向受试者施用该剂量的AAV颗粒。

[0885] 在一个实施方案中,向受试者施用 3×10^{11} VG剂量的本发明的AAV颗粒以治疗心力衰竭。作为非限制性实例,通过经皮冠状动脉内施用向受试者施用该剂量的AAV颗粒。

[0886] 在一个实施方案中,向受试者施用 3×10^{11} VG剂量的本发明的AAV颗粒以治疗心力衰竭。作为非限制性实例,通过静脉内施用向受试者施用该剂量的AAV颗粒。

[0887] 在一个实施方案中,向受试者施用 3×10^{12} VG剂量的本发明的AAV颗粒以治疗心力衰竭。作为非限制性实例,通过经皮冠状动脉内施用向受试者施用该剂量的AAV颗粒。

[0888] 在一个实施方案中,向受试者施用 3×10^{12} VG剂量的本发明的AAV颗粒以治疗心力衰竭。作为非限制性实例,通过静脉内施用向受试者施用该剂量的AAV颗粒。

[0889] V. 试剂盒和装置

[0890] 试剂盒

[0891] 在一个实施方案中,本发明提供了用于方便和/或有效地实施本发明的方法的多种试剂盒。通常,试剂盒将包含足够量和/或数量的组分,以允许使用者对受试者进行多种治疗和/或进行多种实验。

[0892] 本发明的任何AAV颗粒可以包含在试剂盒中。在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括用于产生和/或合成本发明的化合物和/或组合物的试剂和/或说明书。在一些实施方

案中,试剂盒还可包含一种或多种缓冲液。在一些实施方案中,本发明的试剂盒可包括用于制备蛋白或核酸阵列或文库的组分,因此可包括例如固体支持体。

[0893] 在一些实施方案中,试剂盒组分可以包装在水性介质中或处于冻干形式。试剂盒的容器装置通常将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器装置,可以将组分放置在其中,并且优选适当地等分。如果试剂盒的组分不止一种(标记试剂和标签可以包装在一起),试剂盒通常还可以包含第二、第三或其他额外的容器,可以在其中分别放置额外的组分。在一些实施方案中,试剂盒还可包含第二容器装置,用于容纳无菌的、药学上可接受的缓冲液和/或其他稀释剂。在一些实施方案中,组分的各种组合可以包含在一个或多个小瓶中。本发明的试剂盒通常还可以包括严格用于销售的用于容纳本发明的化合物和/或组合物的装置,例如蛋白、核酸和任何其他试剂容器。这样的容器可以包括其中保留有期望的小瓶的注射或吹塑塑料容器。

[0894] 在一些实施方案中,试剂盒组分以一种和/或多种液体溶液提供。在一些实施方案中,液体溶液是水溶液,尤其优选无菌水溶液。在一些实施方案中,试剂盒组分可以干燥粉末的形式提供。当试剂和/或组分以干粉形式提供时,可以通过添加适当体积的溶剂来重构此类粉末。在一些实施方案中,可以预见的是,也可以在另一容器装置中提供溶剂。在一些实施方案中,标记染料以干粉形式提供。在一些实施方案中,预期在本发明的试剂盒中提供了10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900、1000微克或至少或至多那些量的干染料。在这样的实施方案中,然后将染料重悬浮在任何合适的溶剂(例如DMSO)中。

[0895] 在一些实施方案中,试剂盒可包括使用试剂盒组分以及使用试剂盒中未包括的任何其他试剂的说明书。说明书可以包括可以实现的变型。

[0896] 装置

[0897] 在一个实施方案中,可使用递送AAV颗粒的装置和头部固定组件将AAV颗粒递送至受试者。头部固定组件可以是但不限于通过MRI interventions出售的任何头部固定组件。作为非限制性实例,头部固定组件可以是美国专利号8,099,150、8,548,569和9,031,636以及国际专利公开号W0201108495和W02014014585中描述的任何组件,其各自内容通过引用整体并入本文。头部固定组件可以与MRI兼容钻头结合使用,例如但不限于国际专利公开W02013181008和美国专利公开号US20130325012中的MRI兼容钻头,其内容通过引用整体并入本文。

[0898] 在一个实施方案中,可以使用用于将器具定位到受试者上的靶点以递送AAV颗粒的方法、系统和/或计算机程序来递送AAV颗粒。作为非限制性实例,该方法、系统和/或计算机程序可以是美国专利第8,340,743号中描述的方法、系统和/或计算机程序,其内容通过引用整体并入本文。该方法可以包括:确定身体的靶点和参考点,其中靶点和参考点定义延伸穿过每个点的计划轨迹线(PTL);确定可视化平面,其中PTL在照准点处与可视化平面相交;相对于主体安装导向装置以相对于PTL移动,其中导向装置不与可视化平面相交;确定引导轴和可视化平面之间的相交点(GPP);将GPP与可视化平面中的照准点对齐。

[0899] 在一个实施方案中,可以使用常规增强的递送装置将AAV颗粒递送至受试者。使用对流靶向递送药物的非限制性实例描述于美国专利申请公开号US20100217228、US20130035574和US20130035660以及国际专利公开号W02013019830和W02008144585,其各

自内容通过引用整体并入本文。

[0900] 在一个实施方案中,可以在递送AAV颗粒之前、期间和/或之后对受试者成像。成像方法可以是本领域已知和/或本文描述的方法,例如但不限于磁共振成像(MRI)。作为非限制性实例,可以将成像用于评估治疗效果。作为另一个非限制性实例,可以将成像用于AAV颗粒的辅助递送。

[0901] 在一个实施方案中,可使用MRI引导的装置来递送AAV颗粒。MRI引导的装置的非限制性实例描述于美国专利号No.9,055,884、9,042,958、8,886,288、8,768,433、8,396,532、8,369,930、8,374,677和8,175,677和美国专利申请公开号US20140024927,其各自内容通过引用整体并入本文。作为非限制性实例,MRI引导的设备可以能够实时提供数据,例如美国专利号8,886,288和8,768,433中描述的,其各自内容通过引用整体并入本文。作为另一个非限制性实例,MRI引导的装置或系统可以与靶向套管一起使用,例如美国专利号8,175,677和8,374,677中描述的系统,其各自内容通过引用整体并入本文。作为又一个非限制性实例,MRI引导的装置包括用于引导介入装置的轨迹引导框架,例如在美国专利号9,055,884和美国专利申请号US20140024927中描述的,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0902] 在一个实施方案中,可使用MRI兼容的尖端组件来递送AAV颗粒。MRI兼容的尖端组件的非限制性实例在美国专利公开号US20140275980中描述,其内容通过引用整体并入本文。

[0903] 在一个实施方案中,可使用MRI兼容的套管来递送AAV颗粒。MRI兼容的套管的非限制性实例包括国际专利公开号W02011130107中教导的那些,其内容通过引用整体并入本文。

[0904] 在一个实施方案中,可使用MRI兼容的导管来递送AAV颗粒。MRI兼容的导管的非限制性实例包括在国际专利公开号W02012116265、美国专利公开号8,825,133和美国专利公开号US20140024909中教导的那些,其内容通过引用整体并入本文。

[0905] 在一个实施方案中,可使用具有细长管状主体和隔膜的装置来递送AAV颗粒,如美国专利公开号US20140276582和US20140276614所述,其内容通过引用整体并入本文。

[0906] 在一个实施方案中,可使用MRI兼容的定位和/或引导系统来递送AAV颗粒,所述定位和/或引导系统例如但不限于美国专利申请公开号US20150223905和US20150230871中描述的那些,其各自内容通过引用整体并入本文。作为非限制性实例,MRI兼容的定位和/或引导系统可包括适于固定到患者的底座,具有配置成附接到底座的内腔从而能够以至少三个维度可控地转移的靶向套管,以及细长探针,该细长探针被配置为通过滑动紧贴地前进并在靶向套管内腔中缩回,该细长探针包括刺激或记录电极中的至少一个。

[0907] 在一个实施方案中,可以使用如美国专利申请公开号US20150031982和US20140066750以及国际专利公开号W02015057807和W02014039481中所述的轨迹框架将AAV颗粒递送至受试者,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0908] 在一个实施方案中,可以使用基因枪将AAV颗粒递送至受试者。

[0909] VI. 定义

[0910] 在本说明书的各个地方,以组或范围公开了本公开的化合物的取代基。特别意图表示的是,本公开包括这种基团和范围的成员的每个单独的子组合。

[0911] 除非另外说明,否则以下术语和短语具有下面描述的含义。所述定义无意在性质

上成为限制性的,且用于提供本发明的某些方面的更清楚理解。

[0912] 约:如本文所用,术语“约”是指所述值的 $\pm 10\%$ 。

[0913] 腺相关病毒:本文所用的术语“腺相关病毒”或“AAV”是指依赖病毒属的成员,其包含任何颗粒、序列、基因、蛋白或衍生自其的组分。

[0914] AAV颗粒:如本文所用,“AAV颗粒”是包含衣壳和病毒基因组的病毒,所述病毒基因组具有至少一个有效载荷区和至少一个ITR区。本公开的AAV颗粒可以重组产生并且可以基于腺相关病毒(AAV)的亲本或参考序列。AAV颗粒可衍生自本文所述或本领域已知的任何血清型,包括血清型的组合(即“假型”AAV)或多种基因组(例如单链或自互补型)。另外,AAV颗粒可能是复制缺陷的和/或靶向的。

[0915] 活性:如本文所用,术语“活性”是指事物正在发生或正在完成的状况。本发明的组合可以具有活性,并且该活性可以涉及一种或多种生物学事件。

[0916] 施用:如本文所用,术语“施用”是指向受试者提供药剂或组合。

[0917] 联合施用:如本文所用,术语“联合施用(administered in combination)”或“联合施用(combined administration)”是指将两种或更多种药剂同时或在一定间隔内施用于受试者,从而可能是每种药剂对患者的作用的重叠作用。在一些实施方案中,它们在彼此的约60、30、15、10、5或1分钟内施用。在一些实施方案中,药剂的施用间隔足够地紧密地在一起,从而实现组合(例如,协同)作用。

[0918] 改善:如本文所用,术语“改善(amelioration)”或“改善(ameliorating)”是指减轻至少一种病症或疾病指标的严重性。例如,在神经退行性疾病的背景下,改善包括神经元损失的减少。

[0919] 动物:如本文所用,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类。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的非人类动物。在某些实施方案中,非人类动物是哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物或猪)。在一些实施方案中,动物包括但不限于哺乳动物、禽类、爬行动物、两栖动物、鱼类和蠕虫。在一些实施方案中,动物是转基因动物、基因工程动物或克隆。

[0920] 反义链:如本文所用,siRNA分子的术语“反义链”或“第一链”或“引导链”是指与靶向沉默基因的mRNA的约10-50个核苷酸(例如约15-30、16-25、18-23或19-22个核苷酸)的区段基本互补的链。所述反义链或第一链具有与期望的靶mRNA序列足够互补的序列以指导靶标特异性的沉默,例如,足以触发RNAi机制或过程对期望的靶mRNA的破坏的互补性。

[0921] 大约:如本文所用,如应用于一个或多个值,术语“大约”或“约”是指类似于所述参考值的值。在某些实施例中,术语“大约”或“约”是指落入所述参考值的任一方向(大于或小于)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少内的值的范围,除非另有说明或从上下文中可以明显看出(除非该数字超过可能值的100%)。

[0922] 结合:如本文所用,术语“结合”、“共轭”、“连接”、“附接”和“拴系”,当针对两个或多个部分使用时,是指这些部分直接地或通过一个或多个另外的用作连接剂的部分物理上结合或彼此结合,以形成足够稳定的结构,从而在使用该结构的条件(例如生理条件)下,这些部分保持物理结合。“结合”不必严格地通过直接共价化学键来实现。也可能暗示离子或

氢键或基于杂交的连接性足够稳定,以使“结合的”实体保持物理结合。

[0923] 双功能:如本文所用,术语“双功能”是指能够或维持至少两种功能的任何物质、分子或部分。这些功能可能会实现相同或不同的结果。产生功能的结构可以相同或不同。

[0924] 生物相容性:如本文所用,术语“生物相容性”是指与活细胞、组织、器官或系统相容,所述活细胞、组织、器官或系统具有很少的或没有免疫系统的伤害、毒性或排斥风险。

[0925] 可生物降解的:如本文所用,术语“可生物降解的”是指能够通过生物的作用分解成无害的产品。

[0926] 生物学活性:如本文所用,短语“生物学活性”是指任何物质在生物系统和/或生物中具有活性的特征。例如,当施用于生物时对该生物具有生物学作用的物质被认为具有生物学活性。在特定的实施方案中,即使编码的有效载荷的一部分具有生物学活性或模拟被认为与生物学相关的活性,则本发明的AAV颗粒也可以被认为具有生物学活性。

[0927] 衣壳:如本文所用,术语“衣壳”是指病毒颗粒的蛋白壳。

[0928] 互补的和基本上互补的:本文使用的术语“互补的”表示多核苷酸彼此形成碱基对的能力。碱基对通常由反向平行的多核苷酸链中的核苷酸单元之间的氢键形成。互补的多核苷酸链可以以沃森-克里克方式(例如,A至T、A至U、C至G)或以允许形成双链体的任意其它方式形成碱基对。本领域技术人员知晓,当使用RNA而不是DNA时,尿嘧啶(而不是胸腺嘧啶)是被认为与腺苷互补的碱基。但是,当在本发明的上下文中提及U时,暗示置换T的能力,除非另有说明。完美互补性或100%互补性表示这样的情形:其中一个多核苷酸链的每个核苷酸单元都可以与第二个多核苷酸链的核苷酸单元形成氢键。小于完美互补性表示这样的情形:其中两个链的一些(但是并非全部)核苷酸单元可以彼此形成氢键。例如,对于两个20-聚体,如果在每个链上的仅两个碱基对可以彼此形成氢键,那么所述多核苷酸链表现出10%互补性。在相同的例子中,如果在每个链上的18个碱基对可以彼此形成氢键,那么所述多核苷酸链表现出90%互补性。本文使用的术语“基本上互补的”是指,所述siRNA具有足以结合期望的靶mRNA和触发靶mRNA的RNA沉默的序列(例如,在反义链中)。

[0929] 化合物:本公开的化合物包括存在于中间或最终化合物中的原子的所有同位素。“同位素”是指由原子核中中子数量不同产生的具有相同原子序数但具有不同质量数的原子。例如,氢的同位素包括氘和氚。

[0930] 本公开的化合物和盐可以通过常规方法与溶剂或水分子组合制备以形成溶剂化物和水合物。

[0931] 有条件的活性:如本文所用,术语“有条件的活性”是指野生型多肽的突变体或变体,其中该突变体或变体在生理条件下比亲本多肽具有或多或少的活性。此外,与亲本多肽相比,有条件的活性多肽在异常条件下的活性可能增加或降低。有条件的活性多肽可以在正常生理条件或异常条件下可逆地或不可逆地失活。

[0932] 保守的:如本文所用,术语“保守的”分别是指多核苷酸序列或多肽序列的核苷酸或氨基酸残基,其是在比较的两个或更多个序列的相同位置上未发生改变的那些。相对保守的核苷酸或氨基酸是比序列中其他地方出现的核苷酸或氨基酸更相关的序列中保守的核苷酸或氨基酸。

[0933] 在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此100%相同,则称它们为“完全保守的”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此至少70%相同、至少80%相同、至少

90%相同或至少95%相同,则被认为是“高度保守的”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此约70%相同、约80%相同、约90%相同、约95%、约98%或约99%相同,则被称为“高度保守”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此至少30%相同、至少40%相同、至少50%相同、至少60%相同、至少70%相同、至少80%相同,至少90%相同或至少95%相同,则被认为是“保守的”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此约30%相同、约40%相同、约50%相同、约60%相同、约70%相同、约80%相同、约90%相同、约95%相同,约98%相同或约99%相同,则被称为“保守”。序列的保守性可以应用于多核苷酸或多肽的全长,或者可以应用于其一部分、区域或特征。

[0934] 控制元件:如本文所用,“控制元件”、“调控调控元件”或“调控序列”是指启动子区域、聚腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节域、复制起点、内部核糖体进入位点(“IRES”)、增强子等,其在受体细胞中提供编码序列的复制、转录和翻译。只要选择的编码序列能够在适当的宿主细胞中复制、转录和/或翻译,并非总是需要所有这些控制元件。

[0935] 控制释放:如本文所用,术语“控制释放”是指符合释放的特定样式以实现治疗结果的药物组合物或化合物释放曲线。

[0936] 细胞抑制:如本文所用,“细胞抑制”是指抑制、减少、阻抑细胞(例如,哺乳动物细胞(例如,人细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合的生长、分裂或繁殖。

[0937] 细胞毒性:如本文所用,“细胞毒性”是指杀死细胞(例如,哺乳动物细胞(例如,人细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合或引起对其的伤害、毒性或致命作用。

[0938] 递送:如本文所用,“递送”是指递送AAV颗粒、化合物、物质、实体、部分、货物(cargo)或有效载荷。

[0939] 递送剂:如本文所用,“递送剂”是指至少部分促进AAV颗粒向靶细胞的体内递送的任何物质。

[0940] 不稳定的:如本文所用,术语“不稳定的”、“不稳定”或“不稳定区域”是指比相同区域或分子的起始、野生型或初始形式更不稳定的区域或分子。

[0941] 可检测标记:如本文所用,“可检测的标记”是指一种或多种标志物、信号或部分,其与易于通过本领域已知的方法检测的另一实体连接、相连或结合,所述方法包括放射线照相、荧光、化学发光、酶促活性、吸光度等。可检测的标记包括放射性同位素、荧光团、发色团、酶、染料、金属离子、诸如生物素、亲和素、链霉亲和素和半抗原之类的配体、量子点等。可检测的标记可以位于本文公开的肽或蛋白中的任何位置。它们可以在氨基酸、肽或蛋白内,或位于N或C末端。

[0942] 消化:如本文所用,术语“消化”是指分解成较小的碎片或组分。当涉及多肽或蛋白时,消化导致肽的产生。

[0943] 远端:如本文所用,术语“远端”是指位于远离中心或远离目标点或区域。

[0944] 给药方案:如本文所用,“给药方案”是施用的时间表,或医生确定的治疗、预防或姑息治疗方案。

[0945] 包封:如本文所用,术语“包封”是指封入、包围或围住。

[0946] 工程化:如本文所用,当本发明的实施方案被设计为具有不同于起始点、野生型或

初始分子的特征或特性时,则其是被“工程化的”。

[0947] 有效量:如本文所用,术语药剂的“有效量”是这样的量:所述量足以实现有益的或期望的结果,例如,临床结果,且这样,“有效量”取决于它所应用的上下文。例如,在施用治疗癌症的药剂的上下文中,与不施用该药剂获得的应答相比,该药剂的有效量例如是足以实现如本文所定义的治疗的量。

[0948] 表达:如本文所用,核酸序列的“表达”是指以下事件中的一个或多个:(1)从DNA序列产生RNA模板(例如,通过转录);(2)加工RNA转录物(例如,通过剪接、编辑、5'帽形成和/或3'末端加工);(3)将RNA翻译成多肽或蛋白;(4)多肽或蛋白的翻译后修饰。

[0949] 特征:如本文所用,“特征”是指特点、特性或独特要素。

[0950] 制剂:如本文所用,“制剂”包括至少一种AAV颗粒和递送剂。

[0951] 片段:如本文所用,“片段”是指一部分。例如,蛋白片段可包含通过消化从培养的细胞分离的全长蛋白而获得的多肽。

[0952] 功能性:如本文所用,“功能性”生物分子是以表现出表征其的性质和/或活性的形式的生物分子。

[0953] 基因表达:术语“基因表达”表示这样的过程:核酸序列通过该过程发生成功转录和(在大多数情况下)翻译以生产蛋白或肽。为了清楚起见,当提及“基因表达”的测量时,这应当被理解是指,可以测量转录的核酸产物(例如,RNA或mRNA)或翻译的氨基酸产物(例如,多肽或肽)。测量RNA、mRNA、多肽和肽的量或水平的方法是本领域众所周知的。

[0954] 同源性:如本文所用,术语“同源性”是指聚合物分子之间例如多核苷酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的整体相关性。在一些实施方案中,如果聚合物分子的序列为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%相同或相似、则被它们认为彼此“同源”。术语“同源的”必定是指至少两个序列(多核苷酸或多肽序列)之间的比较。根据本发明,如果两个多核苷酸序列编码的多肽是至少一个至少约20个氨基酸片段中的至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或至少99%,则它们被认为是同源的。在一些实施方案中,同源多核苷酸序列的特征在于能够编码至少4-5个独特指定的氨基酸片段的能力。对于长度少于60个核苷酸的多核苷酸序列,同源性由编码至少4-5个独特指定的氨基酸的片段能力决定。根据本发明,如果蛋白对于至少一个约20个氨基酸的片段至少约50%、60%、70%、80%或90%相同,则认为两个蛋白序列是同源的。

[0955] 异源区域:如本文所用,术语“异源区域”是指将不被视为同源区域的区域。

[0956] 同源区域:如本文所用,术语“同源区域”是指位置、结构、进化起源、特征、形式或功能相似的区域。

[0957] 同一性:如本文所用,术语“同一性”是指聚合物分子之间例如多核苷酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的整体相关性。例如,可以通过比对两个序列以达到最佳比对的目的来进行两个多核苷酸序列的同一性百分比的计算(例如,可以在第一和第二核酸序列中的一个或两个中引入缺口以实现最佳比对,以及出于比对的目的,可以忽略非同一的序列)。在某些实施方案中,为了比对的目的而比对的序列的长度为参考序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后比较相应核苷酸位置上的核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中

的相应位置相同的核苷酸占据时,则分子在该位置是相同的。考虑到缺口的数目和每个缺口的长度,两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置数的函数,需要引入所述缺口以实现两个序列的最佳比对。序列的比对和两个序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。例如,两个核苷酸序列之间的同一性百分数可以使用诸如以下描述的那些:Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.,ed.,Oxford University Press, New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.,ed., Academic Press,New York,1993;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;Computer Analysis of Sequence Data,Part I, Griffin,A.M.和Griffin,H.G.,eds.,Humana Press,New Jersey,1994;和Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.and Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York, 1991;其各自均通过引用并入本文。例如,可以使用Meyers和Miller(CABIOS,1989,4:11-17)的算法确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比,该算法已使用PAM120权重残基表、缺口长度罚分12和缺口罚分4合并到ALIGN程序(2.0版)中。或者,可以使用NWSgapdna.CMP矩阵使用GCG软件包中的GAP程序确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。通常用于确定序列之间的同一性百分比的方法包括但不限于在Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM J Applied Math.,48:1073(1988)中公开的那些方法,其通过引用并入本文。确定同一性的技术已编入公共可用的计算机程序中。确定两个序列之间的同源性的示例性计算机软件包括但不限于GCG程序包,Devereux,J.,等人,Nucleic Acids Research,12(1),387(1984),BLASTP, BLASTN和FASTA Altschul,S.F.等人,J.Molec.Biol.,215,403(1990))。

[0958] 抑制基因的表达:本文中使用的短语“抑制基因的表达”是指造成基因的表达产物的量的减少。所述表达产物可以是基因转录的RNA(例如mRNA)或从基因转录的mRNA所翻译成的多肽。通常,mRNA水平的降低会导致从其翻译的多肽的水平的降低。通过使用用于测量mRNA或蛋白的标准技术,可以确定表达的水平。

[0959] 体外:本文使用的术语“体外”表示在人工环境中,例如在试管或反应容器中、在细胞培养物中、在培养皿等中,发生的事件,而不是在生物(例如,动物、植物或微生物)内发生的事件。

[0960] 体内:本文使用的术语“体内”表示在生物(例如,动物、植物或微生物或其细胞或组织)内发生的事件。

[0961] 分离的:如本文所用,术语“分离的”是指已经从与之结合的至少一些组分中分离的物质或实体(无论是在自然界还是在实验环境中)。分离出的物质相对于与它们结合的物质可能具有不同的纯度水平。分离的物质和/或实体可以从最初与它们相连的至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或更多的其他组分分开。在一些实施方案中,分离的试剂大于约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、98%、约99%或大于约99%的纯度。如本文所用,如果物质基本上不含其他组分,则该物质是“纯的”。

[0962] 基本上分离的:“基本上分离的”是指物质与形成或检测出物质的环境实质上分离。部分分离可以包括例如富含本发明的物质或AAV颗粒的组合物。基本上分离可包括含有按重量计至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%或至少约99%的本公开化合物或其盐的组合物。分离化合物及其盐的方法是本领

域常规的。

[0963] 接头:如本文所用,“接头”是指连接两个分子的一个分子或一组分子。接头可以是连接编码两个不同多肽的两个核酸序列的核酸序列。接头可能会翻译,也可能不会翻译。接头可以是可裂解的接头。

[0964] MicroRNA(miRNA)结合位点:如本文所用,microRNA(miRNA)结合位点代表至少与miRNA的“种子”区域结合的核酸转录物的核苷酸位置或区域。

[0965] 修饰的:如本文所用,“修饰的”是指本发明分子的改变的状态或结构。分子可以多种方式被修饰,包括化学、结构和功能上的修饰。

[0966] 突变:如本文所用,术语“突变”是指基因结构的任何改变,从而形成可以传递至后代的变体(也称为“突变体”)。基因中的突变可能是由于DNA中单个碱基的交替,或基因或染色体较大部分的缺失、插入或重排引起的。

[0967] 天然存在的:如本文所用,“天然存在的”或“野生型”是指自然存在而没有人工辅助或人的介入。

[0968] 非人类脊椎动物:如本文所用,“非人类脊椎动物”包括智人以外的所有脊椎动物,包括野生和驯养的物种。非人类脊椎动物的实例包括但不限于哺乳动物,例如羊驼、白臀野牛、野牛、骆驼、猫、牛、鹿、狗、驴、大额牛、山羊、豚鼠、马、美洲驼、骡、猪、兔、驯鹿、绵羊、水牛和牦牛。

[0969] 脱靶:本文中使用的“脱靶”表示对任意一种或多种靶标、基因和/或细胞转录物的任何非目的效果。

[0970] 开放阅读框:如本文所用,“开放阅读框”或“ORF”是指在给定阅读框中不包含终止密码子的序列。

[0971] 有效地连接:如本文所用,短语“有效地连接”是指两个或更多个分子、构建体、转录本、实体、部分等之间的功能连接。

[0972] 颗粒:如本文所用,“颗粒”是由至少两种组分(蛋白衣壳和衣壳内包封的多核苷酸序列)组成的病毒。

[0973] 患者:如本文所用,“患者”是指可能寻求治疗或有治疗需要、需要治疗、正在接受治疗、将要接受治疗的受试者,或由受过训练的专业人员针对特定疾病或疾病进行护理的受试者。

[0974] 有效载荷:如本文所用,“有效载荷”或“有效载荷区”是指由病毒基因组编码或在其中的一个或多个多核苷酸或多核苷酸区,或此类多核苷酸或多核苷酸区的表达产物,例如转基因、编码多肽或多个多肽的多核苷酸,或调节核酸或调节性核酸。

[0975] 肽:如本文所用,“肽”的长度小于或等于50个氨基酸,例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0976] 药学上可接受的:本文中使用的短语“药学上可接受的”在本文中用于表示这样的化合物、物质、组合物和/或剂型:在合理的医学判断范围内,其适用于接触人类和动物的组织,而没有过度的毒性、刺激、变应性应答或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。

[0977] 药学上可接受的赋形剂:如本文所用,短语“药学上可接受的赋形剂”是指除本文所述化合物以外的任何成分(例如,能够悬浮或溶解活性化合物的溶媒),并且具有在患者

中基本上无毒且无炎症性的性质。赋形剂可以包括例如：抗粘剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料（着色剂）、润肤剂、乳化剂、填充剂（稀释剂）、成膜剂或包衣、调味剂、香料、助流剂（流动增强剂）、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂和水合水。示例性的赋形剂包括但不限于：丁基羟基甲苯（BHT）、碳酸钙、磷酸氢钙、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶化淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、视黄醇棕榈酸酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、淀粉羟乙酸钠、山梨醇、淀粉（玉米）、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C 和木糖醇。

[0978] 药学上可接受的盐：本公开还可包含本文所述的化合物的药学上可接受的盐。本文中使用的“药学上可接受的盐”表示公开的化合物的衍生物，其中通过将现有的酸或碱部分转化成其盐形式（例如，通过使游离碱基团与合适的有机酸反应）来修饰母体化合物。药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基如胺的无机酸盐或有机酸盐；酸性残基如羧酸的碱盐或有机盐；等。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、乙酸、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯磺酸、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚糖酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等，以及无毒的铵、季铵和胺阳离子，包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。本公开的药学上可接受的盐包括形成的母体化合物的常规无毒盐，例如，从无毒的无机或有机酸形成。本公开的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常，通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的量的适当的碱或酸在水或有机溶剂或这两者的混合物中反应，可以制备这样的盐；通常，非水性介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。合适的盐的列表可在以下文献中找到：Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, 第1418页, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl和C.G. Wermuth (编), Wiley-VCH, 2008, 以及Berge等人, Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977)；它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[0979] 药学上可接受的溶剂合物：本文中使用的术语“药学上可接受的溶剂合物”是指这样的本发明的化合物，其中合适的溶剂的分子掺入晶格中。合适的溶剂在施用的剂量是生理学上可耐受的。通过从包括有机溶剂、水或其混合物的溶液结晶、重结晶或沉淀，可以制备溶剂合物。合适的溶剂的实例是乙醇、水（例如，一水合物、二水合物和三水合物）、N-甲基吡咯烷酮（NMP）、二甲亚砜（DMSO）、N,N'-二甲基甲酰胺（DMF）、N,N'-二甲基乙酰胺（DMAC）、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮（DMEU）、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮（DMPU）、乙腈

(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苯甲醇、2-吡咯烷酮、苯甲酸苄酯等。当水是溶剂时，溶剂合物被称作“水合物”。

[0980] 药代动力学：如本文所用，“药代动力学”是指分子或化合物的任何一种或多种性质，当它涉及确定施用于活生物体的物质的命运时。药代动力学分为几个方面，包括吸收、分布、代谢和排泄的程度和速率。通常将其称为ADME，其中：(A) 吸收是物质进入血液循环的过程；(D) 分布是指物质在人体的所有液体和组织中的分散或扩散；(M) 代谢（或生物转化）是母体化合物不可逆地转化为子代代谢物；(E) 排泄（或消除）是指物质从体内消除。在极少数情况下，某些药物会不可逆地积聚在人体组织中。

[0981] 物理化学的：如本文所用，“物理化学的”是指物理或化学性质或与之有关。

[0982] 预防：如本文所用，术语“预防 (preventing)”或“预防 (prevention)”是指部分或完全延迟感染、疾病、病症和/或病状的发作；部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或病状的一种或多种症状、特征或临床表现的发作；部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或病状的一种或多种症状、特征或表现的发作；部分或完全延迟感染、特定疾病、病症和/或病状的进展；和/或降低发生与感染、疾病、病症和/或病状相关的病理的风险。

[0983] 增殖：如本文所用，术语“增殖”是指生长、扩增或增加，或引起迅速生长、扩增或增加。“增殖性”是指具有增殖的能力。“抗增殖性”是指具有与增殖性质相反或不适当的性质。

[0984] 预防的：如本文所用，“预防的”是指用于预防疾病传播的治疗或作用过程。

[0985] 预防 (Prophylaxis)：如本文所用，“预防”是指为维持健康和预防疾病传播而采取的措施。

[0986] 目标蛋白：如本文所用，术语“目标蛋白”或“所需蛋白”包括本文提供的蛋白及其片段、突变体、变体和改变。

[0987] 近端：如本文所用，术语“近端”是指位于更靠近中心或目标点或区域。

[0988] 纯化的：如本文所用，“纯化”、“纯化的”、“纯化”是指从不需要的组分、材料变质、掺混或混杂物 (imperfection) 中使之基本上纯化或澄清。“纯化”是指纯净的状态。“纯化”是指进行纯化的过程。

[0989] 区域 (region)：如本文所用，术语“区域”是指区域 (zone) 或一般区域 (general area)。在一些实施方案中，当涉及蛋白或蛋白模块时，区域可包含沿着蛋白或蛋白模块的氨基酸的线性序列，或可包含三维区域、表位和/或表位簇。在一些实施方案中，区域包含末端区域。如本文所用，术语“末端区域”是指位于给定试剂的端点或末端的区域。当涉及蛋白时，末端区域可包含N末端和/或C末端。N末端是指包含具有游离氨基的氨基酸的蛋白的末端。C末端是指包含具有游离羧基的氨基酸的蛋白的末端。N-和/或C-末端区域可以在那里包含N-和/或C-末端以及周围的氨基酸。在一些实施方案中，N-和/或C-末端区域包含约3个氨基酸至约30个氨基酸、约5个氨基酸至约40个氨基酸、约10个氨基酸至约50个氨基酸、约20个氨基酸至约100个氨基酸和/或至少100个氨基酸。在一些实施方案中，N末端区域可包含任何长度的氨基酸，其包含N末端，但不包含C末端。在一些实施方案中，C末端区域可包含任何长度的氨基酸，其包含C末端，但不包含N末端。

[0990] 在一些实施方案中，当涉及多核苷酸时，区域可以包含沿着多核苷酸的核酸的线性序列，或者可以包含三维区域、二级结构或三级结构。在一些实施方案中，区域包含末端区域。如本文所用，术语“末端区域”是指位于给定试剂的端点或末端的区域。当涉及多核苷

酸时,末端区域可包含5'和3'末端。5'末端是指包含具有游离磷酸基团的核酸的多核苷酸的末端。3'末端是指包含具有游离羟基的核酸的多核苷酸的末端。5'和3'区域可以在那里包含5'和3'末端以及周围的核酸。在一些实施方案中,5'和3'末端区域包含约9个核酸至约90个核酸、约15个核酸至约120个核酸、约30个核酸至约150个核酸、约60个核酸至约300个核酸和/或至少300个核酸。在一些实施方案中,5'区域可包含任何长度的核酸,其包含5'末端,但不包含3'末端。在一些实施方案中,3'区域可包含任何长度的核酸,其包含3'末端,但不包含5'末端。

[0991] RNA或RNA分子:本文使用的术语“RNA”或“RNA分子”或“核糖核酸分子”表示核糖核苷酸的聚合物;术语“DNA”或“DNA分子”或“脱氧核糖核酸分子”表示脱氧核糖核苷酸的聚合物。可以天然地合成(例如,分别通过DNA复制和DNA的转录)或化学地合成DNA和RNA。DNA和RNA可以是单链的(即,分别是ssRNA或ssDNA)或多链的(例如,双链的,即,分别是dsRNA和dsDNA)。本文中使用的术语“mRNA”或“信使RNA”表示编码一个或多个多肽链的氨基酸序列的单链RNA。

[0992] RNA干扰或RNAi:本文使用的术语“RNA干扰”或“RNAi”表示由RNA分子介导的序列特异性的调节机制,其导致对应的蛋白编码基因的表达的抑制或干扰或“沉默”。RNAi已经在许多类型的生物中观察到,包含植物、动物和真菌。RNAi天然地发生在细胞中以除去外来RNA(例如,病毒RNA)。天然RNAi通过从游离dsRNA切割的片段进行,其将降解机制引导至其它类似的RNA序列。RNAi由RNA诱导的沉默复合物(RISC)控制,且由细胞质中的短/小dsRNA分子起始,其中它们与催化性的RISC组分argonaute相互作用。可以将dsRNA分子外源地引入细胞中。外源dsRNA通过激活核糖核酸酶蛋白Dicer而起始RNAi,所述Dicer结合和切割dsRNA以产生21-25个碱基对的双链片段,其在每个末端上具有几个未配对的突出端碱基。这些短双链片段被称作小干扰RNA(siRNA)。

[0993] 样品:如本文所用,术语“样品”或“生物样品”是指其组织、细胞或组成部分(例如体液,包括但不限于血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊髓液、唾液、羊水、羊脐血、尿液、阴道液和精液)的子集。样品还可以包括从整个生物体或其组织、细胞或组成部分的子集或其一部分或部分制备的匀浆、裂解物或提取物,包括但不限于例如血浆、血清、脊髓液、淋巴液,皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外部区域、眼泪、唾液、乳汁、血细胞、肿瘤、器官。样品还可能包含细胞成分(例如蛋白或核酸分子)的培养基,例如营养肉汤或胶。

[0994] 自互补病毒颗粒:如本文所用,“自互补病毒颗粒”是由至少两种组分(蛋白衣壳和编码包封在所述衣壳内的自身互补基因组的多核苷酸序列)组成的颗粒。

[0995] 有义链:本文使用的术语siRNA分子的“有义链”或“第二条链”或“过客链”表示与反义链或第一链互补的链。siRNA分子的反义链和有义链发生杂交以形成双链体结构。本文中使用的“siRNA双链体”包括与为了沉默而靶向的基因的mRNA的约10-50个核苷酸的段具有足够互补性的siRNA链和具有足够互补性以与另一条siRNA链形成双链体的siRNA链。

[0996] 短干扰RNA或siRNA:本文使用的术语“短干扰RNA”、“小干扰RNA”或“siRNA”表示能够指导或介导RNAi的包含约5-60个核苷酸(或核苷酸类似物)的RNA分子(或RNA类似物)。优选地,siRNA分子包含约15-30个核苷酸或核苷酸类似物,诸如约16-25个核苷酸(或核苷酸类似物),约18-23个核苷酸(或核苷酸类似物),约19-22个核苷酸(或核苷酸类似物)(例如,19、20、21或22个核苷酸或核苷酸类似物),约19-25个核苷酸(或核苷酸类似物),和约19-24

个核苷酸(或核苷酸类似物)。术语“短”siRNA表示包含5-23个核苷酸、优选21个核苷酸(或核苷酸类似物)(例如,19、20、21或22个核苷酸)的siRNA。术语“长”siRNA表示包含24-60个核苷酸、优选约24-25个核苷酸(例如,23、24、25或26个核苷酸)的siRNA。在某些情况下,短siRNA可以包含少于19个核苷酸,例如,16、17或18个核苷酸,或少至5个核苷酸,前提条件是,较短的siRNA保留介导RNAi的能力。同样地,在某些情况下,长siRNA可以包含超过26个核苷酸,例如,27、28、29、30、35、40、45、50、55或甚至60个核苷酸,前提条件是,较长的siRNA保留介导RNAi或翻译抑制的能力,无需进一步加工(例如,酶促加工)成短siRNA。siRNA可以是单链RNA分子(ss-siRNA)或包含有义链和反义链的双链RNA分子(ds-siRNA),所述有义链和反义链杂交以形成被称作siRNA双链体的双链体结构。

[0997] 信号序列:如本文所用,短语“信号序列”是指可以指导蛋白的运输或定位的序列。

[0998] 单个单位剂量:如本文所用,“单个单位剂量”是指以一剂/一次/单途径/单接触点(即单次施用事件)施用的任何治疗剂的剂量。在一些实施方案中,提供单个单位剂量作为离散剂型(例如,片剂、胶囊、贴剂、装载的注射器、小瓶等)。

[0999] 相似性:如本文所用,术语“相似性”是指聚合物分子之间例如多核苷酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的整体相关性。聚合物分子彼此的相似性百分比的计算可以与计算同一性百分比相同的方式进行,除了相似性百分比的计算考虑了本领域已知的保守取代。

[1000] 分剂量:如本文所用,“分剂量”是将单个单位剂量或每日总剂量分成两个或更多个剂量。

[1001] 稳定:如本文所用,“稳定”是指足够强健以从反应混合物中存活分离到有用纯度并且优选能够配制成有效治疗剂的化合物。

[1002] 稳定的:如本文所用,术语“稳定(stabilize)”,“稳定的(stabilized)”,“稳定区域(stabilized region)”是指使得或变得稳定。

[1003] 受试者:本文使用的术语“受试者”或“患者”表示可以给其施用根据本发明的组合物的任何生物,例如,为了实验、诊断、预防和/或治疗目的。典型受试者包括动物(例如,哺乳动物诸如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人类)和/或植物。

[1004] 基本上:如本文所用,术语“基本上”是指展现出目标特征或特性的全部或接近全部程度或度的定性条件。生物学领域的普通技术人员将理解,生物学和化学现象很少(如果有的话)完全完成和/或进行到完全或达到或避免绝对结果。因此,本文中使用的术语“基本上”来捕获许多生物学和化学现象中固有的潜在的完整性缺乏。

[1005] 基本上相等:如在本文中所使用的,当它涉及剂量之间的倍数差时,该术语是指正/负2%。

[1006] 基本上同时:如本文所用并且在涉及多个剂量时,该术语表示在2秒内。

[1007] 患有:“患有”疾病、病症和/或病状的个体已被诊断出或表现出疾病、病症和/或病状一种或多种症状。

[1008] 易感:“易感”疾病、病症和/或病状的个体尚未被诊断为和/或未表现出该疾病、病症和/或病状的症状但具有发展疾病或其症状的倾向。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或病状(例如,癌症)的个体可以以下一种或多种为特征:(1)与疾病、病症和/或病状的发展相关的遗传突变;(2)与疾病、病症和/或病状发展相关的遗传多态性;(3)与疾病、病症

和/或病状相关的蛋白和/或核酸的表达和/或活性的增加和/或降低；(4) 与疾病、病症和/或病状发展相关的习惯和/或生活方式；(5) 疾病、病症和/或病状的家族病史；(6) 暴露于和/或感染与疾病、病症和/或病状发展相关的微生物。在一些实施方案中，易患疾病、病症和/或病状的个体将发展疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中，易患疾病、病症和/或病状的个体将不会发展疾病、病症和/或病状。

[1009] 持续释放：如本文所用，术语“持续释放”是指符合特定时间段内的释放速率的药物组合物或化合物释放曲线。

[1010] 合成的：术语“合成的”是指通过人手生产、制备和/或制造。本发明的多核苷酸或多肽或其它分子的合成可以是化学的或酶促的。

[1011] 靶向：如本文所用，“靶向”是指设计和选择将与靶核酸杂交并诱导所需作用的核酸序列的过程。

[1012] 靶细胞：如本文所用，“靶细胞”是指任何一种或多种目标细胞。可以在体外、体内、原位或生物体的组织或器官中发现细胞。该生物可以是动物，优选为哺乳动物，更优选为人，最优选为患者。

[1013] 治疗剂：术语“治疗剂”是指当施用于受试者时具有治疗、诊断和/或预防作用和/或引起期望的生物学和/或药理作用的任何药剂。

[1014] 治疗有效量：本文使用的术语“治疗有效量”是指要递送的药剂（例如，核酸、药物、治疗剂、诊断剂、预防剂等）的量，当施用给遭受或易患感染、疾病、病症和/或病状的受试者时，所述量足以治疗、诊断、预防所述感染、疾病、病症和/或病状，改善其症状，和/或延迟其发作。在一些实施方案中，以单剂量提供治疗有效量。在一些实施方案中，以包括多个剂量的剂量方案施用治疗有效量。本领域技术人员将理解，在一些实施方案中，如果单位剂型包含当作为这种剂量方案的一部分施用时有有效的量，则可以认为该单位剂型包含治疗有效量的特定试剂或实体。

[1015] 治疗有效的结果：如本文所用，术语“治疗有效的结果”是指在患有或易受感染、疾病、病症和/或病状的受试者中足以治疗、诊断、预防所述感染、疾病、病症和/或病状，改善其症状，和/或延迟其发作的结果。

[1016] 总日剂量：如本文所用，“总日剂量”是在24小时内给定或处方的剂量。它可以单个单位剂量施用。

[1017] 转染：如本文所用，术语“转染”是指将外源核酸引入细胞的方法。转染的方法包括但不限于化学方法、物理处理和阳离子脂质或混合物。

[1018] 治疗：如本文所用，术语“治疗”是指部分或完全缓解、改善、减轻特定的感染、疾病、病症和/或状况、延迟其发作、抑制其进展、降低其严重程度和/或降低其一种或多种症状或特征的发生率。例如，“治疗”癌症可以指抑制肿瘤的存活、生长和/或扩散。出于降低发展成与疾病、病症和/或病况相关的病理的风险，治疗可施用于不表现出疾病、病症和/或病况的体征的受试者和/或施用于仅表现出疾病、病症和/或病况的早期体征的受试者。

[1019] 未修饰的：如本文所用，“未修饰的”是指在以任何方式改变之前的任何物质、化合物或分子。未修饰的可能但并非总是指生物分子的野生型或初始形式。分子可以经历一系列修饰，由此每个修饰的分子可以用作随后修饰的“未修饰的”起始分子。

[1020] 载体：如本文所用，“载体”是运输、转导或以其他方式充当异源分子的载体的任何

分子或部分。本发明的载体可以重组产生,并且可以基于和/或可以包含腺相关病毒(AAV)亲本或参考序列。这样的亲本或参考AAV序列可以用作工程载体的原始、第二、第三或后续序列。在非限制性实例中,此类亲本或参考AAV序列可包含以下序列中的任何一个或多个:编码多肽或多个多肽的多核苷酸序列,该序列可以是野生型或从野生型修饰的,以及该序列可以编码蛋白、蛋白结构域或蛋白的一个或多个亚基的全长或部分序列;包含调节或调节性核酸的多核苷酸,其序列可以是野生型或从野生型修饰的;以及可以被或不被野生型序列修饰的转基因。这些AAV序列可以用作一个或多个密码子(在核酸水平)或氨基酸(在多肽水平)的“供体”序列或一个或多个密码子(在核酸水平)或氨基酸(在多肽水平上)的“受体”序列。

[1021] 病毒基因组:如本文所用,“病毒基因组”或“载体基因组”是包含至少一个反向末端重复序列(ITR)和至少一个编码的有效载荷的多核苷酸。病毒基因组编码至少一个有效载荷拷贝。

[1022] VII. 实施例

[1023] 实施例1. AAV颗粒的产生和纯化

[1024] 可以使用本领域已知的方法,例如三次转染或杆状病毒介导的病毒产生来产生本文所述的AAV颗粒。可以采用本领域已知的任何合适的允许或包装细胞来产生载体。哺乳动物细胞通常是优选的。还优选的是提供从复制缺陷性辅助病毒中缺失的功能的反式补充包装细胞系,例如293细胞或其他E1a-反式补充细胞。

[1025] 基因表达盒可包含一些或全部细小病毒(例如,AAV)cap和rep基因。然而,优选地,通过将编码衣壳和/或Rep蛋白的包装载体引入细胞中反式提供一些或全部的cap和rep功能。最优选地,基因表达盒不编码衣壳或Rep蛋白。或者,使用包装细胞系,其被稳定转化以表达cap和/或rep基因

[1026] 在某些情况下,重组AAV病毒颗粒是根据US20160032254(其内容通过引用并入本文)中所述的程序从培养上清液产生和纯化的。生产还可以涉及本领域已知的方法,包括使用293T细胞、sf9昆虫细胞、三重转染的方法或任何合适的生产方法。

[1027] 在某些情况下,用产生AAV所需的质粒(即AAV2rep)、腺病毒辅助构建体和侧接ITR的转基因表达盒,用CaP04转染293细胞。AAV2rep质粒还包含正在研究的特定病毒的cap序列。转染后二十四小时(发生在含DMEM的血清中),将培养基替换为有或无血清的新鲜培养基。转染后三(3)天,从293贴壁细胞的培养基中取样。随后,将细胞刮下并转移到容器中。离心去除细胞沉淀后,刮擦后从上清液中取出第二份样品。接着,通过三个连续的冻融循环(-80℃至37℃)实现细胞裂解。去除细胞碎片,并从培养基中取出样品3。通过Taqman.TM.PCR通过DNA酶抗性基因组滴定对样品中的AAV颗粒进行定量。这种转染的总产量等于样品3的颗粒浓度。

[1028] 根据基因组拷贝数(每毫升基因组颗粒数)测量AAV颗粒滴度。基因组颗粒浓度基于如先前报道的载体DNA的Taqman.RTM.PCR(Clark等人(1999)Hum.Gene Ther.,10:1031-1039;Veldwijk等人(2002)Mol.Ther.,6:272-278)。

[1029] 实施例2. 组织特异性表达

[1030] 为了评估组织中各种编码的有效载荷的表达,制备了一系列带有由一组普遍存在的组织特异性启动子驱动的编码序列的AAV颗粒。将这些颗粒例如通过适当的途径(例如,

单次静脉内注射) 全身性地施用至特定组织, 并且监测表达以确定该靶组织中有效载荷以及每种启动子的相对表达潜力。使用标准技术, 例如通过ELISA, 进行有效载荷产生的测量。

[1031] 在某些情况下, 巨细胞病毒即刻早期启动子 (cytomegalovirus immediate early promoter, CMV)、嵌合鸡 β -肌动蛋白 (CAG) 和泛素C (UBC)、CBA、H1、 α MHC、cTnT和CMV-MLC2k启动子提供了稳健的表达。

[1032] 实施例3. 用VOY101-GFP载体静脉内治疗后体内小鼠生物分布和表达水平

[1033] 将腺相关衣壳变体 (VOY101) 工程化, 用于广泛地将基因转移到大脑和心脏中。使用了包含AAV2野生型反向末端重复序列 (ITR)、CMV增强子和鸡 β -肌动蛋白启动子 (CBA) 组成的合成启动子、增强型绿色荧光蛋白变体 (eGFP) 和兔球蛋白聚腺苷酸化序列的病毒基因组通过三次转染入HEK293T细胞, 产生衣壳血清型为VOY101或AAV9的AAV颗粒。病毒基因组的ITR至ITR序列以SEQ ID NO: 1799提供。

[1034] 纯化单链AAV颗粒并将其配制在含0.001%F-68的磷酸缓冲盐水 (PBS) 中, 然后以 $\sim 4\text{ml/kg}$ 通过侧尾静脉注射施用于鼠龄6-7周的成年C57B1/6J小鼠, 载体浓度为 $5.0 \times 10^{12}\text{vg/mL}$ 。总剂量为 $2.0 \times 10^{13}\text{VG/kg}$ 。对照组用溶媒 (含0.001%F-68的PBS) 处理。

[1035] 施用后约28天, 收集了几个组织样品。将分配用于GFP蛋白定量或载体基因组定量的组织样品在液氮中速冻。将分配用于抗GFP免疫组织化学的组织样品在4%多聚甲醛中固定过夜。通过用抗GFP抗体进行免疫组织化学染色以及随后的DAB底物显色对组织样品进行的分析表明, 与施用AAV9-GFP颗粒相比, 全身注射VOY101-GFP颗粒导致整个大脑和脊髓的GFP水平升高。

[1036] GFP蛋白水平通过ELISA测定, 以 ng GFP/mg 总蛋白报告, 结果显示在表13中。使用针对CBA启动子的CMV增强子区的探针组进行载体基因组数字PCR定量, 将其标准化至宿主TFRC (转铁蛋白受体蛋白1) 并以每二倍体细胞的载体基因组 (VG/DC) 表达, 结果显示在表14和15。在表13、14和15中, “BLLQ”是指低于定量下限。

[1037] 表13. 静脉内注射后小鼠中的GFP表达

AAV 血清型 (蛋白 SEQ ID NO; 核苷酸 SEQ ID NO)	GFP 表达 (ng GFP/mg 总蛋白)				
	纹状体	腰脊髓	腰背根神经节	心脏	肝
VOY101 (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 1800)	30.4 ± 3.7	111.2 ± 18.2	4.2 ± 2.3	261.8 ± 127.8	428.2 ± 239.2
AAV9 (SEQ ID NO: 136; SEQ ID NO: 135)	0.5 ± 0.1	1.5 ± 0.4	14.3 ± 9.2	453.2 ± 138.1	2115.9 ± 951.0
溶媒	BLLQ	BLLQ	0.2 ± 0.5	BLLQ	BLLQ

[1039] 表14. 静脉内注射后小鼠中的载体基因组分布

AAV 血清型 (蛋白 SEQ ID NO; 核苷酸 SEQ ID NO)	VG 分布 (VG/DC)			
	纹状体	皮层	脑干	小脑皮层
[1040] VOY101 (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 1800)	27.8 ± 6.2	31.7 ± 8.2	33.5 ± 7.1	4.0 ± 1.2
AAV9 (SEQ ID NO: 136; SEQ ID NO: 135)	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.6	0.1 ± 0.1
溶媒	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ

[1041] 表15. 静脉内注射后小鼠中的载体基因组分布

AAV 血清型 (蛋白 SEQ ID NO; 核苷酸 SEQ ID NO)	GFP 表达 (ng GFP/mg 总蛋白)				
	齿状核	胸脊髓	胸背根神 经节	心脏	肝
[1042] VOY101 (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 1800)	34.0 ± 11.6	20.8 ± 2.4	2.1 ± 3.0	1.1 ± 0.6	17.7 ± 7.2
AAV9 (SEQ ID NO: 136; SEQ ID NO: 135)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.02	1.0 ± 0.2	95.8 ± 19.7
溶媒	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ

[1043] 在小鼠纹状体中,在静脉内注射 2.0×10^{13} VG/kg后28天,VOY101-GFP导致GFP水平比AAV9-GFP高58倍,载体基因组分布比AAV9-GFP高101倍。在小鼠脊髓中,静脉内注射 2.0×10^{13} VG/kg后28天,VOY101-GFP导致GFP水平比AAV9-GFP高74倍,载体基因组分布比AAV9-GFP高104倍。在小鼠肝脏中,静脉内注射 2.0×10^{13} VG/kg后28天,VOY101-GFP导致GFP水平比AAV9-GFP低4.9倍,载体基因组分布比AAV9-GFP低5.4倍。

[1044] 实施例4. 静脉内递送VOY101-FXN AAV颗粒

[1045] A. VOY101-FXN AAV颗粒静脉内治疗后小鼠体内的生物分布和表达水平

[1046] 当将病毒基因组与猕猴(食蟹猴)Frataxin(cFXN)转基因一起使用时,还观察到了广泛的基因转移到大脑和心脏。使用包含AAV2野生型ITR、CMV增强子和鸡 β -肌动蛋白启动子(CBA)组成的合成启动子、猕猴Frataxin(cFXN)和人类生长激素聚腺苷酸化序列的病毒基因组通过三次转染入HEK293T细胞,产生衣壳血清型为VOY101或AAV9的AAV颗粒。病毒基因组的ITR至ITR序列以SEQ ID NO:1801提供。

[1047] 纯化单链AAV颗粒并将其配制在含0.001%F-68的磷酸缓冲盐水(PBS)中,然后以 ~ 4 ml/kg通过侧尾静脉注射施用于鼠龄9周的成年C57B1/6J小鼠,载体浓度为 1.0×10^{12} vg/mL。总剂量为 2.0×10^{13} VG/kg。对照组用溶媒(含0.001%F-68的PBS)治疗。

[1048] AAV颗粒或媒介物施用后7天,收集了几个组织样本。组织样品在液氮中速冻。使用

针对CBA启动子的CMV增强子区的探针组进行载体基因组数字PCR定量,将其标准化至宿主TFRC,并以每二倍体细胞的载体基因组 (VG/DC) 表达。cFXN蛋白水平通过ELISA测定,以ng cFXN/mg总蛋白表示。表16和表17显示了cFXN蛋白水平和载体基因组分布。在表16和17中,“BLLQ”是指低于定量下限。

[1049] 表16. 静脉内注射后小鼠中的cFXN表达

AAV 血清型 (蛋白 SEQ ID NO; 核苷酸 SEQ ID NO)	cFXN 表达 (ng cFXN/mg 总蛋白)					
	皮层	腰脊髓	腰背根神经节	心脏	肝	三叉神经节
[1050] VOY101 (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 1800)	23.4 ± 13.8	64.1 ± 10.2	11.2 ± 2.4	17.8 ± 17.1	69.2 ± 51.1	6.0 ± 3.1
AAV9 (SEQ ID NO:)	BLLQ	BLLQ	BLLQ	1.9 ± 3.1	327.8 ±	0.4 ± 0.5
[1051] 136; SEQ ID NO: 135)					171.5	
溶媒	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ

[1052] 表17. 静脉注射后小鼠中的载体基因组分布

AAV 血清型 (蛋白SEQ ID NO; 核苷酸SEQ ID NO)	VG 分布 (VG/DC)					
	皮层	腰脊髓	胸背根神经节	心脏	肝	三叉神经节
[1053] VOY101 (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 1800)	14.85 ± 3.58	23.51 ± 1.96	6.49 ± 3.19	0.46 ± 0.13	8.74 ± 5.98	2.45 ± 1.27
AAV9 (SEQ ID NO: 136; SEQ ID NO: 135)	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.55 ± 0.40	0.17 ± 0.05	56.74 ± 30.60	0.04 ± 0.02
溶媒	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ

[1054] 在小鼠皮层中,在静脉内注射 4.2×10^{12} vg/kg 7天后,VOY101-cFXN导致载体基因组比AAV9-cFXN高165倍,并且cFXN蛋白表达比AAV9-cFXN高至少234倍。在小鼠腰脊髓中,在静脉内注射 4.2×10^{12} vg/kg 7天后,VOY101-cFXN导致载体基因组比AAV9-cFXN高336倍和cFXN蛋白表达比AAV9-cFXN高至少640倍。

[1055] 在背根神经节中,在静脉内注射 4.2×10^{12} vg/kg 7天后,VOY101-cFXN导致载体基因组比AAV9-cFXN高11.8倍,cFXN蛋白表达比AAV9-cFXN高112倍。在三叉神经节中,在静脉内注射 4.2×10^{12} vg/kg 7天后,VOY101-cFXN导致载体基因组比AAV9-cFXN高61倍,cFXN蛋白表达比AAV9-cFXN高至少16倍。

[1056] 在心脏中,静脉内注射 4.2×10^{12} VG/Kg 7天后,VOY101-cFXN导致载体基因组比AAV9-cFXN高2.7倍,cFXN蛋白表达比AAV9-cFXN高9.4倍,显示出与AAV9相比,表达显著更高。

[1057] B.用VOY101-FXN-HA AAV颗粒处理后cFXN表达的非人类灵长类动物的体内研究

[1058] 进行了食蟹猴(猕猴)的研究,以评估VOY101-cFXN-HA的IV给药后CNS内的cFXN表达。

[1059] 将包含HA标记的食蟹猴Frataxin(cFXN-HA)的病毒基因组工程化为单链表达载体。使用了包含AAV2野生型ITR、由CMV增强子和鸡 β -肌动蛋白启动子(CBA)组成的合成启动子、具有HA-tag 3'序列的猕猴Frataxin(cFXN)和人类生长激素聚腺苷酸化序列的病毒基因组通过三次转染入HEK293T细胞,产生衣壳血清型为VOY101的AAV颗粒。病毒基因组的ITR至ITR序列以SEQ ID NO:1801提供。

[1060] 纯化单链AAV颗粒VOY101-cFXN-HA)并将其配制在含0.001%F-68的磷酸缓冲盐水(PBS)中,然后以5ml/kg通过隐静脉注射施用于非人灵长类动物(猕猴),载体浓度为 1.34×10^{12} vg/mL,总剂量为 6.7×10^{12} VG/kg。另外,通过以 2×10^{13} VG/k的剂量静脉内注射测试了具有CBA启动子和包含cFXN-HA的病毒基因组的单链AAV9(AAV9-cFXN-HA)。

[1061] 施用AAV颗粒后约28天,收集了几个组织样品。速冻分配用于cFXN-HA蛋白定量或载体基因组定量的组织样品。将分配用于抗HA免疫组织化学的组织样品在2-8℃下在4%多聚甲醛中固定12至72小时。组织切片(厚度为20 μ m)用针对HA标签的兔单克隆抗体(1:1000或1:2000)染色,然后用山羊抗兔IgG生物素化的二抗(1:1000)染色,然后用DAB加镍显色。静脉内施用VOY101-cFXN后,在多个CNS区域观察到cFXN-HA染色。这些区域包括但不限于脊髓(颈、胸和腰区段)、脑干核、小脑(包括小脑齿状核)、丘脑、尾状核和大脑皮层。在以 6.7×10^{12} VG/kg的IV给药VOY101-cFXN-HA后,在脊髓的整个顶部-尾部范围内观察到均质的HA染色,特别是在腹侧角运动神经元中。尽管VOY101-cFXN-HA的剂量低了3倍,但与AAV9-cFXN-HA相比,用VOY101-cFXN-HA对脊髓(尤其是腹侧角运动神经元)标记程度要高得多。溶媒处理的对照非人灵长类动物基本上没有可检测的背景染色。

[1062] 与IT施用剂量相似剂量的单链rh10载体和包含cFXN-HA(AAVrh10-FXN-HA)的病毒基因组相比,IV VOY101-cFXN-HA(6.7×10^{12} VG/kg)后,腰腹角(包括运动神经元)中的HA染色相似。

[1063] 使用针对CBA启动子的CMV增强子区的探针组进行载体基因组数字PCR定量,将其标准化至宿主RnaseP,并以每二倍体细胞的载体基因组(VG/DC)表达。通过ELISA测量cFXN-HA蛋白水平。表18显示了cFXN-HA蛋白水平(ng cFXN-HA/mg总蛋白)和载体基因组分布(VG/DC)。在表18中,“BLLQ”是指低于定量下限,“NA”是指未分析。

[1064] 表18.静脉内注射后NHP中cFXN-HA的表达

[1065]

组织	NHP2001	
	cFXN-HA (ng/mg prot.)	VG (VG/DC)
额叶皮层	BLLQ	0.24
纹状体	BLLQ	0.04
脑干	112.9	0.50
小脑	BLLQ	0.02
颈脊髓	49.2	0.14
胸脊髓	14.1	0.15
腰脊髓	32.4	NA
颈背根神经节	195.4	0.71
胸背根神经节	88.2	1.18
腰/骶背根神经节	87.4	1.86
心室	212.4	9.1

[1066]	心房	358.0	7.23
	肝	4.48	224.83
	肾	BLLQ	0.93
	肺	BLLQ	0.58
	比目魚肌	1.1	0.44
	空肠	2.0	1.86
	脾	BLLQ	14.65

[1067] 这些结果表明,在静脉内注射 6.7×10^{12} VG/kg后28天的非人灵长类动物(NHP)中,VOY101-cFXN-HA导致脑转导。在许多CNS区域(包括脊髓(颈、胸和腰区段)和脑干)中检测到了显著水平的cFXN-HA蛋白。静脉内给药后,在许多CNS区域(包括脊髓(颈和胸区段)、脑干和皮层)中检测到显著水平的载体基因组。

[1068] C.用PHP.B-FXN-HA AAV颗粒处理后非人灵长类动物体内cFXN表达的体内生物分布和表达水平

[1069] 在食蟹猴(猕猴)中进行了剂量反应研究,以评估IV给药PHP.B-cFXN-HA后CNS中的cFXN表达。

[1070] 将包含HA标记的食蟹猴Frataxin(cFXN-HA)的病毒基因组工程化到单链表达载体。使用包含AAV2野生型ITR、由CMV增强子和鸡 β -肌动蛋白启动子(CBA)组成的合成启动子、具有HA-tag的3'序列的猕猴Frataxin(cFXN)、miR-122靶标的三重复序列(以减少转基因肝脏表达)和人类生长激素聚腺苷酸化序列的病毒基因组通过三次转染入HEK293T细胞,产生衣壳血清型为PHP.B的AAV颗粒。病毒基因组的ITR至ITR序列提供为SEQ ID NO:1802。

[1071] 纯化单链AAV颗粒,并在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中配制,然后通过隐静脉注射以5ml/kg施用于非人灵长类动物(食蟹猴),载体浓度为 1.54×10^{11} 至 4.75×10^{12} vg/mL。以 6.32×10^{11} 、 2.0×10^{12} 或 2.0×10^{13} VG/kg向动物给药。

[1072] 施用AAV颗粒后约28天,收集了几个组织样品。速冻分配用于cFXN-HA蛋白定量或载体基因组定量的组织样品。将分配用于抗HA免疫组织化学的组织样品在2至8℃下在4%多聚甲醛中固定12至72小时。组织切片(厚度为20 μ m)用针对HA标签的兔单克隆抗体(1:1000或1:2000)染色,然后用山羊抗兔IgG生物素化的二抗(1:1000)染色,然后用DAB加镍显色。在以 2×10^{13} vg/kg静脉内给药PHP.B-cFXN-HA后,在多个CNS区域观察到HA染色。这些区域包括但不限于脊髓(颈、胸和腰区段)、小脑(包括齿状核)、丘脑、纹状体、黑质以及感觉和运动皮层。此外,HA染色显示在多个CNS区域中大量神经元的转导,包括黑质、齿状核和丘脑的神经元形态的那些。此外,脊髓、运动和感觉皮层以及纹状体中神经元形态的细胞具有HA

免疫反应性。

[1073] 使用显色法对HA标签和神经元标志物NeuN进行双重标记。组织切片(厚度为20 μ m)用针对HA标签的兔单克隆抗体(1:1000)染色,然后用山羊抗兔IgG生物素化的二抗(1:1000)染色,然后用DAB(无镍)显色。然后将切片用NeuN二抗的小鼠单克隆抗体染色,再用山羊抗小鼠IgG生物素化的二抗染色。然后用绿色色原检测NeuN信号。多个HA+细胞用神经元标志物NeuN双重标记。这些结果表明,以 2×10^{13} VG/kg在静脉内注射PHP.B-cFXN-HA后,小脑齿状核的神经元被标记了HA标签。因此,在食蟹猴中 2×10^{13} vg/kg静脉内剂量后,转导小脑齿状核的神经元并表达转基因。

[1074] 以 6.32×10^{11} 、 2.0×10^{12} 或 2.0×10^{13} VG/kg IV注射PHP.B-cFXN-HA时,HA标签在腰背根神经节中的表达在较大(>40 μ m)和较小的感觉神经元中均存在,标记作用呈剂量依赖性增加。

[1075] 使用针对CBA启动子的CMV增强子区的探针组进行载体基因组数字PCR定量,将其标准化至宿主RnaseP,并以每二倍体细胞的载体基因组(VG/DC)表达。通过ELISA测量cFXN-HA蛋白水平。表19显示了cFXN-HA蛋白水平(ng cFXN-HA/mg总蛋白)和载体基因组分布(VG/DC)。在表19中,“BLLQ”是指低于定量下限,“NA”是指未分析。

[1076] 表19. 静脉内注射PHP.B-cFXN-HA后NHP中的cFXN-HA表达

[1077]

组织	6.3×10^{11} VG/kg		2×10^{12} VG/kg		2×10^{13} VG/kg	
	NHP003		NHP005		NHP007	
	NHP004		NHP009		NHP008	
	cFXN-HA (ng/mg prot.)	VG (VG/ DC)	cFXN-HA (ng/mg prot.)	VG (VG/ DC)	cFXN-HA (ng/mg prot.)	VG (VG/ DC)
额叶皮层	NA	0.03	NA	0.06	NA	0.27
	NA	0.05	NA	0.03	NA	0.54
纹状体	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	0.27
	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	0.81
脑干	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	29.4	0.73
	BLLQ	BLLQ	BLLQ	0.03	BLLQ	0.96
小脑	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	0.03
	5.1	BLLQ	BLLQ	BLLQ	5.1	0.22
颈脊髓	BLLQ	BLLQ	BLLQ	BLLQ	63.7	0.36
	BLLQ	0.02	BLLQ	BLLQ	85.0	0.12
胸脊髓	BLLQ	BLLQ	BLLQ	0.02	41.2	0.32
	BLLQ	0.06	BLLQ	BLLQ	44.5	0.32

[1078]

腰脊髓	BLLQ	0.01	BLLQ	0.01	43.9	0.37
	BLLQ	BLLQ	BLLQ	0.01	49.2	0.53
颈背根神经节	BLLQ	BLLQ	9.29	0.07	421.5	2.41
	2.8	0.03	BLLQ	0.06	509.9	1.87
胸背根神经节	BLLQ	BLLQ	6.1	0.05	227.2	2.92
	BLLQ	0.01	BLLQ	0.02	866.4	2.52
腰/骶背根神经节	BLLQ	BLLQ	4.9	0.04	122.2	3.68
	BLLQ	0.03	BLLQ	0.04	138.1	1.63
心室	BLLQ	BLLQ	22.9	0.5	1034.5	15.3
	6.0	0.2	BLLQ	0.4	185.6	7.7
心房	7.3	0.03	60.5	0.97	650.5	26.3
	5.2	0.08	BLLQ	0.13	810.0	26.6
肝	BLLQ	0.4	BLLQ	30.4	BLLQ	444.1
	BLLQ	7.9	BLLQ	74.8	BLLQ	284.4
肾	BLLQ	BLLQ	BLLQ	0.3	6.4	6.3
	BLLQ	0.1	BLLQ	0.1	2.8	2.5
肺	BLLQ	NA	BLLQ	NA	0.9	3.3
	BLLQ	NA	BLLQ	NA	BLLQ	3.6
比目鱼肌	BLLQ	NA	BLLQ	NA	69.9	13.4

[1079]		BLLQ	NA	BLLQ	NA	12.6	6.7
	空肠	BLLQ	NA	BLLQ	NA	BLLQ	0.6
		BLLQ	NA	BLLQ	NA	BLLQ	0.3
	脾	BLLQ	1.3	BLLQ	4.3	BLLQ	4.4
		BLLQ	1.2	BLLQ	4.6	2.1	2.3

[1080] 总之,在静脉内注射PHP.B-cFXN-HA后28天的非人灵长类动物(NHP)中,所有三种剂量水平均导致脑转导。在许多CNS区域(包括脊髓(颈、胸和腰区段)、脑干和小脑)中检测到了显著水平的cFXN-HA蛋白。IV给药后,在许多CNS区域(包括脊髓(颈、胸和腰区段)、纹状体、脑干、小脑和额叶皮层)检测到显著水平的载体基因组。观察到大量基因转移至NHP CNS,包括脊髓、脑干、感觉皮层、运动皮层、小脑、丘脑和黑质等区域,这些区域的神经元形态细胞表现出转基因表达。此外,背根神经节和心脏表现出剂量依赖性转基因表达,背根神经节的感觉神经元表现出转导作用。

[1081] D.VOY101-FXN-HA AAV颗粒处理后在cFXN表达的非人类灵长类动物中的体内剂量依赖性研究

[1082] 在两个不同IV剂量水平的单链VOY101-cFXN-HA后,在食蟹猴(猕猴)中进行了评估CNS中cFXN表达的研究。

[1083] 将包含HA标记的食蟹猴Frataxin(cFXN-HA)的病毒基因组工程化为单链表达载体。使用了包含AAV2野生型ITR、由CMV增强子和鸡β-肌动蛋白启动子(CBA)组成的合成启动子、具有HA-tag 3'序列的猕猴Frataxin(cFXN)和人类生长激素聚腺苷酸化序列的病毒基因组产生衣壳血清型为VOY101的AAV颗粒。病毒基因组的ITR至ITR序列以SEQ ID NO:1801提供。

[1084] 纯化单链AAV颗粒VOY101-cFXN-HA并将其配制在含0.001%F-68的磷酸缓冲盐水(PBS)中,然后以5ml/kg通过隐静脉注射施用于非人灵长类动物(猕猴),总剂量为 6.7×10^{12} VG/kg或 4.9×10^{13} VG/kg VOY101-cFXN-HA。还评估了溶媒阴性对照组。

[1085] 施用AAV颗粒后约28天,收集了几个组织样品。速冻分配用于cFXN-HA蛋白定量或载体基因组定量的组织样品。将分配用于抗HA免疫组织化学的组织样品在2-8℃下在4%多聚甲醛中固定12至72小时。组织切片(厚度为20μm)用针对HA标签的兔单克隆抗体(1:1000或1:2000)染色,然后用山羊抗兔IgG生物素化的二抗(1:1000)染色,然后用DAB加镍显色。

[1086] 使用针对CBA启动子的CMV增强子区的探针组进行载体基因组数字PCR定量,将其标准化至宿主TFRC,并以每细胞的载体基因组(VG/细胞)表达。表20显示了VOY101-cFXN-HA的载体基因组分布(均值+标准偏差)。在表20中,SC-C是颈脊髓,SC-L是腰脊髓。

[1087] 表20.静脉内注射VOY101-cFXN-HA后NHP中的载体基因组分布

	剂量	N	VG 分布 (VG/细胞)			
			SC-C	SC-L	脑干	运动皮层
[1088]	6.7×10^{12} VG/kg	3	0.14 ± 0.14	0.17 ± 0.12	0.11 ± 0.09	0.14 ± 0.13
	4.9×10^{13} VG/kg	3	1.44 ± 0.37	1.15 ± 0.44	1.32 ± 0.9	1.87 ± 0.41

[1089] 在IV给药VOY101-cFXN-HA后,在脊髓的整个顶部-尾部范围内(特别是在腹角运动神经元中)均观察到均匀的HA染色。接受剂量为 4.9×10^{13} VG/kg VOY101-cFXN-HA的动物的颈(C5)、胸(T12)和腰(L4)脊髓中的HA染色显示,在脊髓的整个顶部-尾部水平内(特别是在腹角运动神经元中)均出现了牢固的HA染色(图5)。在接受剂量为 4.9×10^{13} VG/kg VOY101-cFXN-HA的动物中观察到大量的HA+细胞,包括运动皮层、脑干(包括橄榄核、海马体、黑质和外侧膝状体)和小脑深核(包括齿状核)的神经元形态。溶媒处理的对照基本上没有显示可检测的或非常低的背景染色。

[1090] 实施例5.VOY101-FXN用于治疗弗里德希氏共济失调

[1091] A. 弗里德里希共济失调小鼠模型中静脉内给药VOY101-FXN的体内分布、表达和功效研究

[1092] 设计选择的包含编码人Fratxin的核酸的病毒基因组,并将其包装到单链VOY101衣壳中。

[1093] 从ITR到ITR的病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子(包括CMVie增强子、CBA或CMV,或Fratxin启动子,或截短的CBA或截短的CMV启动子和人 β 球蛋白内含子)、hFXN cDNA序列、人生长激素polyA序列、作为填充物序列的人白蛋白片段和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,纯化并配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1094] 六组约10只小鼠/组(7周龄时,性别和幼崽平衡)通过静脉内注射接受溶媒(含0.001%F-68的PBS;两组)或低(2组)或高剂量(2组)水平的VOY101-FXN载体(大约 6.3×10^{12} vg/kg- 2×10^{13} vg/kg体重)。

[1095] 为了测试VOY101-FXN在小鼠中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括肢体肌电图、缺口棒行走试验、挂绳试验、转棒试验、体重和/或存活率。其他读数包括通过ELISA、PCR、免疫组化和原位杂交获得的组织(例如背根神经节、心脏、小脑、脊髓)中的FXN蛋白和mRNA表达,以及组织(背根神经节)切片中线粒体酶功能的原位评估。通过PCR和ISH确定不同组织中的载体基因组水平。

[1096] 在18周,对三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)实施安乐死。将其余三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)维持6个月或更长时间,以评估其对生存的影响。对照组(n=10/组)包括野生型小鼠和给予对照载体的疾病模型小鼠。

[1097] 测量了人Fratxin(hFXN)在靶组织(例如但不限于接受hFXN载体的动物中的DRG、小脑、脊髓和心脏)中的分布和表达以及载体基因组分布,对于hFXN表达通过ELISA、PCR、ISH、IHC测量,对于载体基因组分析通过PCR和ISH测量。人Fratxin分析(通过ELISA、PCR、ISH、IHC)证明,在递送hFXN载体后,在靶组织(例如DRG、小脑、脊髓和心脏)中的表达随分布到靶组织而发生。线粒体酶活性的原位评估表明,递送hFXN载体后,DRG切片中的活性增加。肌电图、缺口棒、挂绳、转棒试验表明,与溶媒对照动物相比,其表现得到了改善。

[1098] B.在非人灵长类动物中静脉内给药VOY 101-FXN的体内分布和表达研究

[1099] 设计选择的包含编码人Fratxin的核酸序列的病毒基因组,并将其包装到单链VOY101衣壳中。

[1100] 从ITR到ITR的单链病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子(包括CMVie增强子、CBA或CMV,或Fratxin启动子,或截短的CBA或截短的CMV启动子和人β球蛋白内含子)、hFXN cDNA序列、人生长激素polyA序列、作为填充物序列的人白蛋白片段和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,纯化并配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1101] 八组约3只食蟹猴/组(约3岁或更大,每组每个性别至少有一只动物)通过静脉内注射接受溶媒(含0.001%F-68的PBS;两组)或低(2组)或高剂量(2组)水平的VOY101-FXN载体(大约 6.7×10^{12} vg/kg- 6×10^{13} vg/kg体重)。

[1102] 为了测试VOY101-FXN在NHP中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括体重随着时间变化的测量、临床监测、组织病理学和血液安全小组测试。其他读数包括通过ELISA、PCR、免疫组织化学和原位杂交评估的FXN蛋白和mRNA在组织(例如背根神经节、心脏、小脑、脊髓)中的表达。通过PCR和ISH确定不同组织中的载体基因组水平。

[1103] 在4周,对三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)实施安乐死。将其余三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)维持12周以评估长期基因表达。

[1104] 测量了人Fratxin(hFXN)在靶组织(例如但不限于接受hFXN载体的动物中的DRG、小脑、脊髓和心脏)中的分布和表达以及载体基因组分布,对于hFXN表达通过ELISA、PCR、ISH、IHC测量,对于载体基因组分析通过PCR和ISH测量。灵长类Fratxin表达数据与可在弗里德希氏共济失调基因小鼠模型中挽救FA疾病表型的Fratxin表达水平进行比较。根据这些结果,计算出用于人体试验的有效剂量。

[1105] 实施例6.VOY101-APOE miRNA用于治疗阿尔茨海默氏病

[1106] A.在阿尔茨海默氏病小鼠模型中静脉内施用scVOY 101-APOE miRNA的体内分布、表达和功效研究

[1107] 将选择的包含pri-miRNA表达盒的病毒基因组工程化到自互补(sc)VOY101-miRNA表达载体,该表达盒包含靶向APOE的引导链和过客链。

[1108] 从ITR到ITR的scAAV-miRNA病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、包含靶向ApoE的引导序列和过客序列的pri-miRNA表达盒、polyA序列、填充物序列和野生型ITR。

[1109] 将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,纯化并配制在含0.001%F-68的磷酸缓冲盐水(PBS)中。

[1110] 向三组P301S突变tau小鼠(约每组20只小鼠,2个月大)通过静脉内尾静脉注射施用溶媒(含0.001%F-68的PBS),或高剂量或低剂量水平(约 4×10^{12} vg/kg- 4×10^{13} vg/kg)的VOY101-APOE miRNA。

[1111] 可以利用本领域已知的任何测试来测试VOY101-APOE miRNA在小鼠中的功效、分布和表达。非限制性实例包括体重的测量、通过qRT-PCR测量的APOE mRNA的表达、通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的APOE蛋白的表达、通过免疫组织化学和酶联免疫吸附

测定评估的淀粉状- β 病理学水平、通过免疫组织化学评估的神经变性水平,和通过数字液滴PCR测量的载体基因组水平。

[1112] 评价所有动物的体重和存活率。对大约11个月大的动物实施安乐死,以评估大脑、脊髓和肝脏样品的APOE mRNA表达、tau和/或淀粉样病理以及神经变性。

[1113] PCR数据将证明在接受静脉内VOY101-APOE miRNA载体的动物中载体基因组在整个大脑中递送。表达数据应表明接受载体的动物的脑中APOE蛋白和mRNA的普遍减少。表现出明显降低APOE的大脑区域应该是对与tau蛋白病相关疾病重要的区域,包括内嗅皮层、海马体和皮层。接受该载体的群组可能会在病理性淀粉样 β 蛋白和神经变性方面表现出明显的减少。

[1114] B. 静脉内施用scVOY 101-APOE miRNA后在非人灵长类动物中APOE的体内分布和表达研究

[1115] 将选择的包含pri-miRNA表达盒的病毒基因组工程化到自互补(sc)VOY101-miRNA表达载体,该表达盒包含靶向APOE的引导链和过客链。

[1116] 从ITR到ITR的scAAV-miRNA病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、包含靶向ApoE的引导序列和过客序列的pri-miRNA表达盒、polyA序列、填充物序列和野生型ITR。

[1117] 将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,纯化并配制在含0.001%F-68的磷酸缓冲盐水(PBS)中。

[1118] 向三组中的非人灵长类动物(NHP)(食蟹猴,成年雄性,预先筛选AAV中和抗体)施用scVOY 101-ApoE miRNA载体,一组仅施用溶媒作为对照。使用静脉内递送来施用高剂量或低剂量水平(约 4×10^{12} vg/kg- 4×10^{13} vg/kg)的NHP。施用后4周,进行盐水灌注,将脑切成3mm的冠状块并速冻。

[1119] 为了测试VOY101-APOE miRNA在NHP中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括通过qRT-PCR测量APOE mRNA的表达、通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的tau蛋白表达,以及通过数字液滴PCR评估的载体基因组水平。

[1120] 预计可显著降低APOE的脑区域将覆盖对与tau蛋白病相关的疾病重要的区域,包括内嗅皮层、海马体和皮层。与表达数据一致,PCR可能会证明载体基因组在脑中的广泛分布。

[1121] 实施例7.VOY101-APOE2用于治疗阿尔茨海默氏病和其他tau蛋白病

[1122] A. 阿尔茨海默氏病和其他tau蛋白病小鼠模型中VOY 101-APOE2静脉内施用的体内分布、表达和功效研究

[1123] 将编码人APOE2(载脂蛋白E2等位基因)的核酸工程化到AAV病毒基因组中,并包装在VOY101衣壳中。

[1124] 从ITR至ITR的AAV-APOE2病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、编码人APOE2的核酸、polyA序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-APOE2颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[1125] 三组APP.PS1-21/TRE4小鼠(约20只小鼠/组,9个月大)通过静脉内尾静脉注射施用溶媒(含0.001%F-68的PBS)或高剂量或低剂量水平(约 4×10^{12} vg/kg- 4×10^{13} vg/kg)VOY101-APOE2。

[1126] 为了测试VOY101-APOE2在小鼠中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括体重的测量、通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的APOE2的表达、通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的淀粉样B病理学水平、通过免疫组织化学评估的神经变性,并通过数字液滴PCR测量的载体基因组水平。

[1127] 评价所有动物的体重和存活率。对大约11个月大的动物实施安乐死,以评估大脑、脊髓和肝脏样品的APOE2表达/淀粉样和/或tau蛋白病理学以及神经变性。

[1128] 通过PCR分析接受静脉内VOY101-APOE2的动物中载体基因组通过脑的分布。表达数据可能会显示接受VOY101-APOE2载体的动物中APOE2在整个大脑中的广泛表达。表现出显著APOE2表达的大脑区域可能会覆盖对与tau蛋白病相关疾病重要的区域,包括内嗅皮层、海马体和皮层。接受VOY101-APOE2载体的组应显示出病理性淀粉样 β 和/或tau蛋白和神经变性的明显降低。

[1129] B. 静脉内施用VOY101-APOE2在非人类灵长类动物体内的体内分布和表达研究

[1130] 将编码人APOE2(载脂蛋白E2等位基因)的核酸序列工程化到AAV病毒基因组中,并包装在VOY101衣壳中。

[1131] 从ITR至ITR的AAV-APOE2病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、编码人APOE2的核酸、polyA序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-APOE2颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[1132] 通过静脉内注射,向三组中的非人类灵长类动物(NHP)(食蟹猴,成年雄性,预先筛选AAV中和抗体)VOY101-APOE2载体,一组仅施用溶媒(含0.001%F-68的PBS)作为对照。使用静脉内递送来施用高剂量或低剂量水平(约 4×10^{12} vg/kg- 4×10^{13} vg/kg)的NHP。施用后4周,进行盐水灌注,将脑切成3mm的冠状块并速冻。

[1133] 为了测试VOY101-APOE2在NHP中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的APOE2表达的测量和通过数字液滴PCR评估的载体基因组水平。

[1134] 表达数据可能会显示接受VOY101-APOE2载体的动物中APOE2在整个脑中的广泛表达。表现出明显的APOE2水平的大脑区域可能覆盖了对与tau蛋白病相关疾病重要的区域,包括内嗅皮层、海马体和皮层。与表达数据一致,PCR可能会证明载体基因组在脑中的广泛分布。

[1135] 实施例8.VOY101-HTT miRNA用于治疗亨廷顿病

[1136] A.VOY 101-miRNA在亨廷顿病小鼠模型中的体内功效研究

[1137] 将选择的包含靶向HTT的引导链和过客链的pri-miRNA表达盒工程化到scAAV-miRNA病毒基因组,包装到VOY101衣壳中。

[1138] 从ITR到ITR的病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、CBA启动子(包括CMVie增强子、CBA启动子和SV40内含子)、包含靶向HTT的引导序列和过客序列的pri-miRNA表达盒、兔球蛋白poly A序列、人 α -1抗胰蛋白酶的片段(作为填充物序列)和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-HTT miRNA颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1139] 将使用双侧纹状体内给药。三组约12只小鼠/组(大约2个月大,性别平衡)接受溶媒(PBS和0.001%F-68)或高剂量或低剂量水平(每纹状体 3×10^9 vg- 5×10^{10} vg)VOY101-HTT

miRNA载体。

[1140] 为了测试VOY101-HTT miRNA在小鼠中的功效,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括体重的测量、转棒试验、Porsolt游泳试验,以及通过免疫组织化学评估的HTT蛋白聚集体的测量。

[1141] 将评估所有动物的体重、转棒试验、Porsolt游泳试验和存活率。一些动物在5个月大时(给药后3个月)被安乐死,以通过Western印迹或MSD测定评估纹状体组织样品中的HTT mRNA抑制(通过RT-qPCR)和HTT蛋白水平,而另一些动物将在大约8个月大(给药后6个月)被安乐死,用于评估聚集体(通过免疫组织化学)。

[1142] HTT测量数据应显示,在接受HTT miRNA载体的动物中,包括在主要靶区域(纹状体和皮层)中,人HTT蛋白和mRNA在整个大脑中普遍减少。接受HTT miRNA载体的群组还将显示病理HTT聚集体的减少,并显示寿命和运动活动的显著改善。

[1143] B. 静脉内给药scVOY101-HTT miRNA后非人灵长类动物的体内药理学和分布研究

[1144] 将选择的包含靶向HTT的引导链和过客链的pri-miRNA表达盒工程化到scAAV-miRNA病毒基因组,包装到VOY101衣壳中。

[1145] 从ITR到ITR的scAAV-miRNA病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、包含靶向HTT的引导序列和过客序列的pri-miRNA表达盒、poly A序列、填充物序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-HTT miRNA颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1146] 将三组中的非人类灵长类动物(NHP)(猕猴,成年雄性,预先筛选AAV中和抗体)施用scVOY101-HTT miRNA颗粒。使用静脉内或颈动脉内递送以高、中或低剂量水平(约 5×10^{12} vg/kg、 1.5×10^{13} vg/kg和 4.5×10^{13} vg/kg)施用NHP。施用后4周,进行盐水灌注,并且将收获部分脊髓、脑切片和选定的周围组织。组织的一部分将在液氮中速冻,一部分将在4%PFA中固定。

[1147] 为了测试VOY101-HTT miRNA在NHP中的功效,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括通过bDNA测定和/或qRT-PCR测量的HTT mRNA表达的测量,通过Western印迹和免疫组织化学评估的HTT蛋白的表达,以及通过数字液滴PCR评估的载体基因组水平。此外,还将分析中枢神经系统和周围组织的临床观察、血清和CSF临床病理学,CSF生物标志物以及组织病理学。

[1148] 实施例9.VOY101-SOD1miRNA用于治疗肌萎缩性侧索硬化

[1149] A. 在ALS小鼠模型中VOY101-SOD1miRNA的体内药理学研究

[1150] 将选择的包含靶向SOD1的引导链和过客链的pri-miRNA表达盒工程化到scAAV-miRNA病毒基因组,并包装到VOY101衣壳中。

[1151] 从ITR到ITR的病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、H1启动子、包含靶向SOD1的引导序列和过客序列的pri-miRNA表达盒、兔球蛋白poly A序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-SOD1miRNA颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1152] 三组大约10只小鼠/组(大约40-50天大,并且在性别、年龄和同窝仔数方面保持平衡)将接受溶媒(含0.001%F-68的PBS)或高剂量或低剂量水平(大约 5×10^{11} vg/小鼠或 2×10^{12} vg/小鼠)VOY101-SOD1miRNA载体。所有动物将静脉内给药。静脉内施用后约4周,将所

有动物安乐死。

[1153] 可以使用本领域已知的分析方法来评估药理学特征,主要读数将包括hSOD1mRNA和蛋白表达以及多个CNS区域和选择的外周组织中的载体基因组生物分布。次要读数包括体重、免疫组织化学和笼侧观察。

[1154] B.VOY101-SOD1miRNA在ALS小鼠模型中的体内功效研究

[1155] 将选择的包含靶向SOD1的引导链和过客链的pri-miRNA表达盒工程化到scAAV-miRNA病毒基因组,并包装到VOY101衣壳中。

[1156] 从ITR到ITR的scAAV-miRNA病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、H1启动子、包含靶向SOD1的引导序列和过客序列的pri-miRNA表达盒、兔球蛋白poly A序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-SOD1miRNA颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1157] 三组大约36只小鼠/组(大约40-50天大,并且在性别、年龄和同窝仔数方面保持平衡)将接受溶媒(含0.001%F-68的PBS)或高剂量或低剂量水平(大约 5×10^{11} vg/小鼠或 2×10^{12} vg/小鼠)载体。所有动物将静脉内给药。

[1158] 为了评估VOY101-SOD1miRNA在小鼠中的功效,本领域已知的分析方法可用于获取主要读数,并可包括体重、行为NeuroScore、存活率以及疾病发作和持续时间。神经学评分将每天进行测量。当该动物的NeuroScore达到4时,该动物将被安乐死。次要读数包括hSOD1mRNA/蛋白表达、载体基因组生物分布和IHC(骨骼肌和NMJ成像、脊髓)。

[1159] 数据表明,在将静脉内VOY101-SOD1miRNA载体递送至运动神经元、脑干和运动皮层后,SOD1蛋白和mRNA普遍减少。

[1160] C.VOY101-SOD1miRNA在作为ALS的疾病模型的犬退行性脊髓病中的体内功效研究

[1161] 将选择的包含靶向SOD1的引导链和过客链的pri-miRNA表达盒工程化到scAAV-miRNA病毒基因组,并包装到VOY101衣壳中。

[1162] 从ITR到ITR的scAAV-miRNA病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、H1启动子、包含靶向SOD1的引导序列和过客序列的pri-miRNA表达盒、兔球蛋白poly A序列、填充物序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-SOD1miRNA颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1163] 通过在体外中和抗体测定中评估血清样品,可以针对VOY101衣壳的预先免疫性对伴侣DM狗进行筛选。nAb阴性的狗将成为研究的候选者。将狗分为两个治疗组,并使用静脉内给药施用VOY101-SOD1miRNA或溶媒(含0.001%F-68的PBS)。

[1164] 为了评估VOY101-SOD1miRNA在狗中的功效,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括步态和神经系统结果的纵向监测、DTI和MRS、电诊断测试、MUNE和指定时间点的电阻抗肌电图(EIM)。

[1165] 在指定的时间和安乐死时收集血清和CSF样品,以评估犬的pNF-H和NFL水平。安乐死时,将收集CNS和周围组织用于SOD1mRNA定量和载体基因组生物分布分析。

[1166] 数据表明,当将静脉内VOY101-SOD1miRNA载体递送至运动神经元、脑干和运动皮层时,SOD1蛋白和mRNA减少。

[1167] D.静脉内给药scVOY101-SOD1miRNA后在非人类灵长类动物中的体内药理学和分布研究

[1168] 将选择的包含靶向SOD1的引导链和过客链的pri-miRNA表达盒工程化到scAAV-miRNA病毒基因组,并包装到VOY101衣壳中。

[1169] 从ITR到ITR的scAAV-miRNA病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、包含靶向SOD1的引导序列和过客序列的pri-miRNA表达盒、poly A序列、填充物序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-SOD1miRNA颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1170] 向三组中的非人灵长类动物(NHP)(食蟹猴,成年雄性,预先筛选AAV中和抗体)施用VOY101-SOD1miRNA载体。使用静脉内递送向NHP施用高、中或低剂量水平(约 5×10^{12} vg/kg、 1.5×10^{13} vg/kg和 4.5×10^{13} vg/kg)。施用后4周,进行盐水灌注,并且将收获部分脊髓、脑切片和选定的周围组织。收集的组织的一部分将在液氮中速冻,另一部分将在4%PFA中固定。

[1171] 为了确定NHP中的功效和分布,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括通过qRT-PCR测量SOD1mRNA的表达、通过WB和免疫组织化学评估的SOD1蛋白的表达,以及通过数字液滴PCR评估的载体基因组水平。此外,还将分析CNS和周围组织的临床观察、血清和CNS临床病理,CSF生物标志物以及组织病理学。

[1172] 数据表明,将VOY101-SOD1miRNA载体静脉内递送至脊髓运动神经元、脑干和运动皮层后,SOD1蛋白和mRNA的含量降低。

[1173] 实施例10.抗tau抗体递送用于治疗阿尔茨海默氏病和其他tau蛋白病

[1174] A.在阿尔茨海默氏病和其他tau蛋白病小鼠模型中静脉给药VOY101-抗Tau抗体的体内分布、表达和功效研究

[1175] 将编码靶向tau的单克隆抗体的核酸工程化到AAV病毒基因组中,并在VOY101衣壳中产生。

[1176] 从ITR至ITR的病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、编码靶向tau的单克隆抗体的核酸、polyA序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-抗Tau抗体颗粒配制在具有0.001%F-68的磷酸缓冲盐水(PBS)中。

[1177] 三组P301S小鼠(约20只小鼠/组,2个月大)通过静脉内尾静脉注射施用溶媒(含0.001%F-68的PBS)或高剂量或低剂量水平(约 4×10^{12} vg/kg- 4×10^{13} vg/kg)的VOY101-抗Tau抗体。

[1178] 为了测试VOY101-抗Tau抗体在小鼠中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括体重的测量、转棒、通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的抗Tau抗体的表达、通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的致病性tau水平、通过免疫组织化学评估的神经变性水平以及通过数字液滴PCR测量的载体基因组水平。评估所有动物的体重和生存。对大约5个月大的动物实施安乐死以评估脑、脊髓和肝样品的抗体表达、tau蛋白病理学和神经变性。

[1179] 在用于治疗阿尔茨海默氏病和tau蛋白病的VOY101-抗Tau抗体递送成功的情况下,可以预期PCR数据以证明在接受静脉内VOY101-抗-Tau抗体载体的动物中,载体基因组在整个脑中的递送。表达数据还将可能显示在接受载体的动物中,抗Tau抗体在脑中的广泛表达,其水平等于或超过被动免疫后的水平。预期显示出显著抗体水平的脑区域包括对与tau蛋白病相关疾病重要的区域,包括内嗅皮层、海马体和皮层。预期接受VOY101-抗Tau抗体载体的组将显示出病理性tau和神经变性的强烈降低,并显示出寿命和转杆表现的显著

改善。

[1180] B.VOY101-抗-Tau抗体在非人类灵长类动物中的静脉给药的体内分布和表达研究

[1181] 将编码靶向tau的单克隆抗体的核酸工程化到AAV病毒基因组中,并在VOY101衣壳中产生。

[1182] 从ITR至ITR的病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、编码靶向tau的单克隆抗体的核酸、polyA序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-抗Tau抗体颗粒配制在具有0.001%F-68的磷酸缓冲盐水(PBS)中。

[1183] 向三组中的非人灵长类动物(NHP)(食蟹猴,成年雄性,预先筛选AAV中和抗体)施用VOY101-抗Tau载体,一组仅施用溶媒作为对照。使用静脉内递送来施用高剂量或低剂量水平(约 4×10^{12} vg/kg- 4×10^{13} vg/kg)的NHP。施用后4周,进行盐水灌注,将脑切成3mm的冠状块并速冻。

[1184] 为了测试VOY101-抗Tau抗体在NHP中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的tau蛋白表达,以及通过数字液滴PCR评估的载体基因组水平。

[1185] 技术人员可能预期表达数据显示抗Tau抗体在NHP脑中广泛表达,其水平超过被动免疫后的水平。预期显示出显著抗体水平的脑区域包括对与tau蛋白病相关疾病重要的区域,包括内嗅皮层、海马体和皮层。与表达数据一致,PCR可能会证明载体基因组在脑中的广泛分布。

[1186] 实施例11.VOY101-Tau miRNA用于治疗tau蛋白病

[1187] A.在Tau蛋白病小鼠模型中静脉内给药scVOY101-Tau miRNA的体内分布、表达和功效研究

[1188] 将选择的包含靶向Tau的引导链和过客链的pri-miRNA表达盒工程化到scAAV-miRNA病毒基因组并包装到VOY101衣壳中。

[1189] 从ITR到ITR的scAAV-miRNA病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、包含靶向Tau的引导序列和过客序列的pri-miRNA表达盒、poly A序列、填充物序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-Tau miRNA颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1190] 三组P301S小鼠(约20只小鼠/组,2个月大)通过静脉内尾静脉注射施用溶媒(含0.001%F-68的PBS)或高剂量或低剂量水平(约 4×10^{12} vg/kg- 4×10^{13} vg/kg)的VOY101-Tau miRNA载体。

[1191] 为了测试VOY101-Tau miRNA在小鼠中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括体重的测量、转棒、通过qRT-PCR测量的tau mRNA的表达、通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的总人Tau的表达、通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的致病性tau水平、通过免疫组织化学评估的神经变性水平以及通过数字液滴PCR测量的载体基因组水平。

[1192] 评价所有动物的体重和存活率。对大约5个月大的动物实施安乐死,以评估脑、脊髓和肝样品中Tau mRNA的表达、tau蛋白病理学和神经变性。

[1193] 在用于治疗tau蛋白病的VOY101-Tau miRNA递送成功的情况下,可以预期PCR数据以证明在接受静脉内VOY101-Tau miRNA载体的动物中,载体基因组在整个脑中的递送。表

达数据也有望在接受VOY101-Tau miRNA载体的动物中显示出人tau蛋白和mRNA在整个脑中的广泛减少。可能显示出明显的tau减少的脑区域包括对与tau蛋白病相关疾病重要的区域,包括内嗅皮层、海马体和皮层。接受VOY101-Tau miRNA载体的群体可能会显示出病理性tau和神经变性的明显减少,并显示寿命和转杆表现的显著改善。

[1194] B. 静脉内给药scVOY101-Tau miRNA后非人类灵长类动物体内Tau的体内分布和表达研究

[1195] 将选择的包含靶向Tau的引导链和过客链的pri-miRNA表达盒工程化到scAAV-miRNA病毒基因组并包装到VOY101衣壳中。

[1196] 从ITR到ITR的病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、包含靶向Tau的引导序列和过客序列的pri-miRNA表达盒、poly A序列、填充物序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,进行纯化和配制。将VOY101-Tau miRNA颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1197] 向三组中的非人灵长类动物(NHP)(食蟹猴,成年雄性,预先筛选AAV中和抗体)施用scVOY101-Tau miRNA,一组仅施用溶媒(含0.001%F-68的PBS)作为对照。使用静脉内递送来施用高剂量或低剂量水平的VOY101-Tau miRNA(约 4×10^{12} vg/kg- 4×10^{13} vg/kg)。施用后4周,进行盐水灌注,将脑切成3mm的冠状块并速冻。

[1198] 为了测试VOY101-Tau miRNA在NHP中的分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括通过qRT-PCR的tau mRNA表达的测定,通过免疫组织化学和酶联免疫吸附测定评估的tau蛋白表达,以及通过数字液滴PCR评估的载体基因组水平。

[1199] 技术人员可能预期表达数据显示出tau蛋白和mRNA在脑中广泛减少。可能显示出明显的tau减少的脑区域包括对与tau蛋白病相关的疾病重要的区域,包括内嗅皮层、海马体和皮层。与表达数据一致,PCR可能证明载体基因组在脑中的广泛分布。

[1200] 实施例12.VOY101-ATP2A2用于心血管疾病(例如心力衰竭)

[1201] A. 在心血管疾病的小鼠模型中静脉内给药VOY101-ATP2A2的体内分布、表达和功效研究

[1202] 设计选择的包含编码人ATP2A2的核酸的病毒基因组,并将其包装到单链VOY101衣壳中。

[1203] 从ITR到ITR的病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、hATP2A2cDNA序列、人类生长激素polyA序列、人白蛋白片段(作为填充物序列)和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,纯化并配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1204] 六组大约10只小鼠/组(7周龄时、性别和幼崽平衡)通过静脉内注射接受溶媒(含0.001%F-68的PBS;两组)或低(2组)或高剂量(2组)水平(大约 6.3×10^{12} vg/kg- 2×10^{13} vg/kg)VOY101-ATP2A2载体。

[1205] 为了测试VOY101-ATP2A2在小鼠中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括肢体肌电图、缺口棒行走试验、挂绳试验、转棒试验、体重和/或存活率。其他读数包括通过ELISA、PCR、免疫组化和原位杂交获得的组织(例如背根神经节、心脏(例如心肌细胞)、小脑、脊髓)中的ATP2A2蛋白和mRNA表达,以及组织(背根神经节)切片中线粒体酶功能的原位评估。通过PCR和ISH确定不同组织中的载体基因组水平。

[1206] 在18周,对三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)实施安乐死。将其余三组动物(溶媒、

低剂量、高剂量)维持6个月或更长时间,以评估其对生存的影响。对照组(n=10/组)包括野生型小鼠和给予对照载体的疾病模型小鼠。

[1207] 测量了人ATP2A2在靶组织(例如但不限于接受hATP2A2载体的动物中的DRG、小脑、脊髓和心脏)中的分布和表达以及载体基因组分布,对于hATP2A2表达通过ELISA、PCR、ISH、IHC测量,对于载体基因组分析通过PCR和ISH测量。人ATP2A2分析(通过ELISA、PCR、ISH、IHC)证明,在递送hATP2A2载体后,在靶组织(例如心脏)中的表达随病毒基因组分布到靶组织而发生。线粒体酶活性的原位评估表明,递送hFXN载体后,心脏切片中的活性增加。心电图、缺口棒、挂绳、转棒试验表明,与溶媒对照动物相比,其表现得到了改善。

[1208] B.在非人灵长类动物中静脉给药VOY101-ATP2A2的体内分布和表达研究

[1209] 设计选择的包含编码人ATP2A2的核酸序列的病毒基因组,并将其包装到单链(ss)VOY101衣壳中。

[1210] 从ITR到ITR的单链病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、hATP2A2cDNA序列、人生长激素polyA序列、作为填充物序列的人白蛋白片段和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,纯化并配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1211] 八组约3只食蟹猴/组(3岁或更大,每组每个性别至少有一只动物)通过静脉内注射接受溶媒(含0.001%F-68的PBS;两组)或低(2组)或高剂量(2组)水平的VOY101-ATP2A2载体(大约 6.7×10^{12} vg/kg- 6×10^{13} vg/kg体重)。

[1212] 为了测试VOY101-ATP2A2在NHP中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括体重随着时间变化的测量、临床监测、组织病理学和血液安全小组测试。其他读数包括通过ELISA、PCR、免疫组织化学和原位杂交评估的ATP2A2蛋白和mRNA在组织(例如心脏)中的表达。通过PCR和ISH确定不同组织中的载体基因组水平。

[1213] 在4周,对三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)实施安乐死。将其余三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)维持12周以评估长期基因表达。

[1214] 测量了人ATP2A2(hATP2A2)在靶组织(例如但不限于接受ATP2A2载体的动物中的心脏)中的分布和表达以及载体基因组分布,对于hATP2A2表达通过ELISA、PCR、ISH、IHC测量,对于载体基因组分析通过PCR和ISH测量。灵长类ATP2A2表达数据与可在心血管疾病基因小鼠模型中挽救心血管疾病表型的ATP2A2表达水平进行比较。根据这些结果,计算出用于人体试验的有效剂量。

[1215] 实施例13.VOY101-S100A1用于治疗心血管疾病(例如心力衰竭)

[1216] A.在心血管疾病的小鼠模型中静脉内给药VOY101-S100A1的体内分布、表达和功效研究

[1217] 设计选择的包含编码人S100A1的核酸的病毒基因组,并将其包装到单链VOY101衣壳中。

[1218] 从ITR到ITR的病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、hS100A1cDNA序列、人生长激素polyA序列、作为填充物序列的人白蛋白片段和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,纯化并配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1219] 六组约10只小鼠/组(7周龄时,性别和幼崽平衡)通过静脉内注射接受溶媒(含0.001%F-68的PBS;两组)或低(2组)或高剂量(2组)水平的VOY101-S100A1载体(大约 6.3×10^{12} vg/kg- 2×10^{13} vg/kg体重)。

[1220] 为了测试VOY101-S100A1在小鼠中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括肢体肌电图、缺口棒行走试验、挂绳试验、转棒试验、体重和/或存活率。其他读数包括通过ELISA、PCR、免疫组化和原位杂交获得的组织(例如背根神经节、心脏(例如心肌细胞)、小脑、脊髓)中的S100A1蛋白和mRNA表达,以及组织(背根神经节)切片中线粒体酶功能的原位评估。通过PCR和ISH确定不同组织中的载体基因组水平。

[1221] 在18周,对三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)实施安乐死。将其余三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)维持6个月或更长时间,以评估其对生存的影响。对照组(n=10/组)包括野生型小鼠和给予对照载体的疾病模型小鼠。

[1222] 测量了人S100A1在靶组织(例如但不限于接受hS100A1载体的动物中的DRG、小脑、脊髓和心脏)中的分布和表达以及载体基因组分布,对于hS100A1表达通过ELISA、PCR、ISH、IHC测量,对于载体基因组分析通过PCR和ISH测量。人S100A1分析(通过ELISA、PCR、ISH、IHC)证明,在递送hS100A1载体后,在靶组织(例如心脏)中的表达随病毒基因组分布到靶组织而发生。线粒体酶活性的原位评估表明,递送hS100A1载体后,心脏切片中的活性增加。肌电图、缺口棒、挂绳、转棒试验表明,与溶媒对照动物相比,其表现得到了改善。

[1223] B.在非人类灵长类动物中静脉给药VOY101-S100A1的体内分布和表达研究

[1224] 设计选择的包含编码人S100A1的核酸序列的病毒基因组,并将其包装到单链(ss)VOY101衣壳中。

[1225] 从ITR到ITR的单链病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、hS100A1cDNA序列、人生长激素polyA序列、作为填充物序列的人白蛋白片段和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101衣壳中,纯化并配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1226] 八组约3只食蟹猴/组(约3岁或更大,每组每个性别至少有一只动物)通过静脉内注射接受溶媒(含0.001%F-68的PBS;两组)或低(2组)或高剂量(2组)水平的VOY101-S100A1载体(大约 6.7×10^{12} vg/kg- 6×10^{13} vg/kg体重)。

[1227] 为了测试VOY101-S100A1在NHP中的功效、分布和表达,可以利用本领域已知的任何测试。非限制性实例包括体重随着时间变化的测量、临床监测、组织病理学和血液安全小组测试。其他读数包括通过ELISA、PCR、免疫组织化学和原位杂交评估的S100A1蛋白和mRNA在组织(例如心脏)中的表达。通过PCR和ISH确定不同组织中的载体基因组水平。

[1228] 在4周,对三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)实施安乐死。将其余三组动物(溶媒、低剂量、高剂量)维持12周以评估长期基因表达。

[1229] 测量了人S100A1(hS100A1)在靶组织(例如但不限于接受hS100A1载体的动物中的心脏)中的分布和表达以及载体基因组分布,对于hS100A1表达通过ELISA、PCR、ISH、IHC测量,对于载体基因组分析通过PCR和ISH测量。灵长类S100A1表达数据与可在心血管疾病基因小鼠模型中挽救心血管疾病表型的S100A1表达水平进行比较。根据这些结果,计算出用于人体试验的有效剂量。

[1230] 实施例14.递送抗tau抗体用于治疗阿尔茨海默氏病和其他tau蛋白病

[1231] A.VOY101或VOY201-抗Tau抗体静脉给药的体内分布、表达和功效研究

[1232] 将编码靶向tau的单克隆抗体PHF-1的核酸工程化到AAV病毒基因组中,并在VOY101衣壳(衣壳序列提供为SEQ ID NO:1809)或VOY201衣壳(衣壳序列提供为SEQ ID NO:1810)中产生。

[1233] 从ITR到ITR的病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、编码靶向tau的单克隆抗体PHF-1的核酸(kozak、重链、接头区、轻链和终止密码子,提供为SEQ ID NO:1816)、poly A序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101或VOY201衣壳中,进行纯化并配制。将VOY101或VOY201-抗Tau抗体颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1234] 通过静脉内尾静脉注射,向三组野生型(WT)小鼠(约5只小鼠/组,2个月大)施用溶媒(含0.001%F-68的PBS)、 1.4×10^{13} vg/kg的VOY101-抗Tau抗体载体,或 1.4×10^{13} vg/kg的VOY201-抗Tau抗体载体。

[1235] 施用AAV颗粒后约28天,收集了几个组织样品。使用针对CBA启动子的CMV增强子区的探针组进行载体基因组数字PCR定量,将其标准化至宿主TFRC,并以每细胞的载体基因组表达(VG/细胞)。表21显示了VOY101.PHF-1和VOY201.PHF-1的载体基因组分布。在表21中,Hp是海马体,SC-C是颈脊髓,SC-T是胸脊髓,且SC-L是腰脊髓。

[1236] 表21. 静脉注射后野生型小鼠的病毒基因组分布

载体 (剂量: 1.4×10^{13} VG/kg)	VG/细胞 分布(括号中是标准偏差)				
	Hp	SC-C	SC-T	SC-L	脑干
[1237] 溶媒	0.06 (0.54)	0.01 (0.13)	0.01 (0.14)	0.003 (0.002)	0.02 (0.19)
VOY101.PHF-1	11.01 (6.22)	15.45 (8.20)	17.82 (9.67)	18.59 (9.49)	29.80 (14.68)
VOY201.PHF-1	4.68 (1.48)	9.30 (2.42)	7.42 (2.6)	9.52 (2.2)	16.16 (4.76)

[1238] 还通过检测与在ELISA板上涂布的PHF tau的相互作用,在收集的组织中测量了存在于组织裂解物可溶级分中的PHF-1的表达水平。使用HRP标记的抗小鼠IgG及其底物TMB对抗体-抗原复合物进行可视化和定量,然后在酶标仪上于OD450处读取读数,并标准化为输入组织蛋白量。对于VOY101.PHF-1和VOY201.PHF-1,来自AAV转导的细胞的PHF1表达在表22中示出。在表22中,Hp是海马体,SC是脊髓。

[1239] 表22. 静脉内注射后野生型小鼠的PHF-1表达分布

[1240]	载体 (剂 量 : 1.4×10^{13} VG/kg)	PHF-1 表达 (ng/mg 蛋白, 括号中是标准偏差)			
		Hp	皮层	SC	脑干
	溶媒	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	VOY101.PHF-1	82 (36.4)	94 (35.6)	718 (440.8)	394.0(301.3)
	VOY201.PHF-1	96 (35.1)	66 (19.6)	361 (147.4)	207.0(116.3)

[1241] 与被动免疫相比,VOY201中的PHF-1的IV给药导致小鼠CNS中抗tau抗体水平高15倍。脑中抗体的被动免疫水平为20-40ng/mg蛋白,VOY201在海马体中比被动免疫高2-5倍,在大脑中比被动免疫高5-10倍,在脊髓中比被动免疫高8-16倍。VOY101和VOY201的IV给药导致广泛的CNS生物分布和载体化抗体的转导。

[1242] 将小鼠大脑半切,并将组织样品分配用于抗体免疫组织化学,然后在4%多聚甲醛中固定过夜。使用抗小鼠IgG1抗体(PHF-1是小鼠IgG1抗体)通过免疫组织化学检测了PHF-1抗体。在通过静脉内尾静脉注射VOY101而给药 1.4×10^{13} vg/kg VOY101.PHF-1或VOY201.PHF-1的动物中,在整个大脑中(包括海马体、皮层、纹状体和丘脑)均观察到了染色。观察到许多PHF1+细胞,包括具有神经元和星形胶质细胞形态的细胞。溶媒处理的对照基本上没有可检测的背景染色。

[1243] 通过静脉内尾静脉注射施用 1.4×10^{13} vg/kg VOY101.PHF-1或VOY201.PHF-1后CNS中PHF-1表达通过小鼠抗IgG1和抗NeuN双标记免疫荧光染色来评估。PHF-1是小鼠IgG1抗体,因此可通过抗IgG1抗体染色来检测。共定位研究显示多个PHF1+细胞,包括用神经元标志物(NeuN)双重标记的细胞。

[1244] 通过静脉内尾静脉注射施用 1.4×10^{13} vg/kg VOY101.PHF-1后CNS中PHF-1表达通过小鼠抗IgG1和抗GFAP(胶质纤维酸性蛋白)双重标记免疫荧光染色来评估。PHF-1是小鼠IgG1抗体,因此可通过抗IgG1抗体染色进行检测。共定位研究显示多个PHF1+细胞,包括用星形胶质细胞标志物(GFAP)双重标记的细胞。

[1245] B. 小鼠模型中静脉内给药VOY101或VOY201-抗Tau抗体的体内分布、表达和功效研究

[1246] 三组P301S小鼠(约20只小鼠/组,2个月大)通过静脉内尾静脉注射施用溶媒(含0.001%F-68的PBS)、 1.4×10^{13} vg/kg的VOY101-抗Tau抗体载体(VOY101.PHF-1),或 5.0×10^{13} vg/kg的VOY201-抗Tau抗体载体(VOY201.PHF-1)。

[1247] 施用AAV颗粒后大约3个月,收集了几个组织样本。使用针对CBA启动子的CMV增强子区的探针组进行载体基因组数字PCR定量,将其标准化至宿主TFRC,并以每细胞的载体基因组表达(VG/细胞)。表23显示了VOY101.PHF-1和VOY201.PHF-1的载体基因组分布。在表23中,Hp是海马体,SC是脊髓。

[1248] 表23. 静脉内注射后P301S小鼠中的载体基因组分布

载体	VG/细胞分布 (括号中是标准偏差)				
	Hp	皮层	丘脑	SC	脑干
溶媒	0.09 (0.17)	0.06 (0.07)	0.03 (0.04)	0.07 (0.11)	0.06 (0.06)
VOY101.PHF-1 (剂 量 : 1.4×10^{13} VG/kg)	26.17 (10.01)	32.13 (11.8)	55.16 (20.75)	49.82 (29.57)	59.9 (24.85)
VOY201.PHF-1 (剂 量 : 5.0×10^{13} VG/kg)	16.2 (8.28)	22.29 (11.1)	30.92 (17.9)	27.46 (20.51)	45.86 (30.53)

[1250] 还通过检测与在ELISA板上涂布的PHF tau的相互作用,在收集的组织中测量了存在于组织裂解物可溶级分中的PHF-1的表达水平。使用HRP标记的抗小鼠IgG及其底物TMB对抗体-抗原复合物进行可视化 and 定量,然后在酶标仪上于OD450处读取读数,并标准化为输入组织蛋白量。对于VOY101.PHF-1和VOY201.PHF-1,来自AAV转导的细胞的PHF1表达在表24中示出。在表24中, Hp是海马体, SC是脊髓。

[1251] 表24. 静脉内注射后P301S小鼠中的PHF1表达

载体	PHF1 表达 (ng/mg 蛋白, 括号中是标准偏差)				
	Hp	皮层	丘脑	SC	脑干
溶媒	0.96 (4.07)	0 (0)	0.79 (3.33)	0 (0)	0 (0)
VOY101.PHF-1 (剂 量 : 1.4×10^{13} VG/kg)	193.8 (115.3)	338.1 (176.9)	220.3 (100.9)	1103 (404.8)	1152 (630.3)
VOY201.PHF-1 (剂 量 : 5.0×10^{13} VG/kg)	140.8 (87.45)	238.6 (120.5)	210.6 (103.8)	902.5 (317)	619.3 (386.8)

[1253] VOY101和VOY201的IV给药导致P301tau蛋白病小鼠CNS的抗体的高水平。在PHF1处理的小鼠中, AT8免疫反应性 (IR) 明显降低。使用VOY101和VOY201的IV给药导致在P301S tau蛋白病小鼠中广泛的CNS生物分布和载体化抗体的转导。

[1254] 实施例15. 抗tau抗体的递送可用于治疗tau蛋白病, 包括阿尔茨海默氏病

[1255] A. 静脉内给药VOY101或VOY201抗Tau抗体的体内分布、表达和功效研究

[1256] 将编码靶向tau的单克隆抗体PHF-1的核酸工程化到AAV病毒基因组中, 并在VOY101衣壳(由SEQ ID NO:1809提供的衣壳序列)或VOY201衣壳(由SEQ ID NO:1810提供的衣壳序列)中产生。

[1257] 从ITR到ITR的病毒基因组(从5'到3')包含野生型ITR、启动子、编码靶向tau的单克隆抗体PHF-1的核酸(轻链(SEQ ID NO:1819)、接头区域、重链(SEQ ID NO:1814)和终止密码子)、polyA序列和野生型ITR。将病毒基因组包装到VOY101或VOY201衣壳中, 进行纯化和配制。将VOY101或VOY201-抗Tau抗体颗粒配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[1258] 通过静脉内尾静脉注射, 向三组野生型(WT)小鼠(约5只小鼠/组, 2个月大)施用溶媒(含0.001%F-68的PBS)、 1.4×10^{13} vg/kg的VOY101-抗Tau抗体载体, 或 1.4×10^{13} vg/kg的VOY201-抗Tau抗体载体。

[1259] 施用AAV颗粒后约28天, 收集了几个组织样品。使用针对CBA启动子的CMV增强子区的探针组进行载体基因组数字PCR定量, 将其标准化至宿主TFRC, 并以每细胞的载体基因组表达(VG/细胞)。

[1260] 还通过检测与在ELISA板上涂布的PHF tau的相互作用, 在收集的组织中测量了存在于组织裂解物可溶级分中的PHF-1的表达水平。使用HRP标记的抗小鼠IgG及其底物TMB对抗体-抗原复合物进行可视化和定量, 然后在酶标仪上于OD450处读取读数, 并标准化为输入组织蛋白量。

[1261] 将小鼠大脑半切, 并将组织样品分配用于抗体免疫组织化学。样品在4%多聚甲醛中固定过夜。使用抗小鼠IgG1抗体(PHF-1是小鼠IgG1抗体)通过免疫组织化学检测了PHF-1抗体。

[1262] 通过静脉内尾静脉注射施用 1.4×10^{13} vg/kg VOY101.PHF-1或VOY201.PHF-1后CNS中PHF-1表达通过小鼠抗IgG1和抗GFAP(胶质纤维酸性蛋白)双标记免疫荧光染色来评估。PHF-1是小鼠IgG1抗体, 因此可通过抗IgG1抗体染色来检测。

[1263] B. 在小鼠模型中静脉内给药VOY101或VOY201-抗Tau抗体的体内分布、表达和功效研究

[1264] 三组P301S小鼠(约20只小鼠/组, 2个月大)通过静脉内尾静脉注射施用溶媒(含0.001%F-68的PBS)、 1.4×10^{13} vg/kg的VOY101-抗Tau抗体载体(VOY101.PHF-1), 或 5.0×10^{13} vg/kg的VOY201-抗Tau抗体载体(VOY201.PHF-1)。

[1265] 施用AAV颗粒后大约3个月, 收集了几个组织样本。使用针对启动子的探针组进行载体基因组数字PCR定量, 将其标准化至宿主TFRC, 并以每细胞的载体基因组表达(VG/细胞)。

[1266] 还通过检测与在ELISA板上涂布的成对螺旋丝tau的相互作用, 在收集的组织中测量了存在于组织裂解物可溶级分中的PHF-1的表达水平。使用HRP标记的抗小鼠IgG及其底物TMB对抗体-抗原复合物进行可视化和定量, 然后在酶标仪上于OD450处读取读数, 并标准化为输入组织蛋白量。

[1267] VIII. 等同和范围

[1268] 本领域技术人员会认识到或使用不超过例行实验能够确定根据本文描述的发明的具体实施方案的许多等同方案。本发明的范围无意限于上面的描述,而是如所附权利要求所述。

[1269] 在权利要求中,诸如“一个”、“一种”和“所述”的冠词可以是指一个/种或超过一个/种,除非指示相反情形或以其它方式从上下文显而易见。如果群体成员中的一个、超过一个或所有成员存在于指定的产品或过程中、在指定的产品或过程中使用或以其它方式与指定的产品或过程相关,则认为满足在一组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述,除非指示相反情形或以其它方式从上下文显而易见。本发明包括这样的实施方案,其中所述组的刚好一个成员存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或者以其它方式与给定产品或方法相关。本发明包括这样的实施方案,其中所述组成员中的超过一个或全部都存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或者以其它方式与给定产品或方法相关。

[1270] 还应当指出,术语“包含”意图是开放式的,并且允许但不要求包括额外的要素或步骤。因此,当在本文中使用术语“包含”时,还包括和公开术语“由……组成”。

[1271] 在给出范围的情况下,包括端点。此外,应当理解,除非另外指示或以其它方式从上下文和本领域普通技术人员的理解显而易见,以范围表述的数值在本发明的不同实施方案中可呈现处于所述范围内的任何具体数值或子范围,其精确至该范围的下限单位的十分之一,除非上下文另外清楚地指明。

[1272] 另外,应当理解,可以从任意一项或多项权利要求中明确地排除落在现有技术内的本发明的任何特定实施方案。因为这样的实施方案被视为本领域普通技术人员已知的,所以可以排除它们,即使所述排除并未在本文中明确地阐明。可以因为任何原因从任意一项或多项权利要求排除本发明的组合物的任何特定实施方案(例如,任何抗生素、治疗剂或活性成分;任何生产方法;任何使用方法等),无论是否与现有技术存在相关。

[1273] 应当理解,已经使用的词语是描述而不是限制的词语,并且可以在所附权利要求的范围内做出变化,而不背离在它的更宽方面的本发明的真实范围和精神。

[1274] 尽管已经就几个描述的实施方案而言相当详尽地且相当特定地描述了本发明,但是无意将本发明限于任何这样的细节或实施方案或任何具体实施方案,而是应当参考所附权利要求来解释本发明,从而考虑到现有技术提供这类权利要求的最广泛的可能解释,并因此有效地包括本发明的预期范围。

[1275] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用整体并入本文。如果发生冲突,以本说明书(包括定义)为准。另外,章节标题、材料、方法和实施例仅是说明性的,而非意图限制。

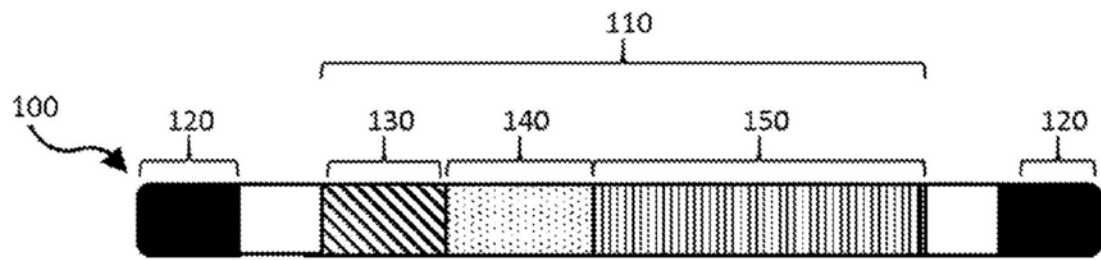


图1