



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104902923 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 09

(21) 申请号 201380069582. 2

A61P 25/28(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 11. 04

(30) 优先权数据

61/722, 434 2012. 11. 05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 07. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/068242 2013. 11. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/071282 EN 2014. 05. 08

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S·P·萨迪 L·希哈布丁 S·程

(74) 专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事
务所(特殊普通合伙) 11484

代理人 陈静

(51) Int. Cl.

A61K 38/46(2006. 01)

权利要求书3页 说明书38页

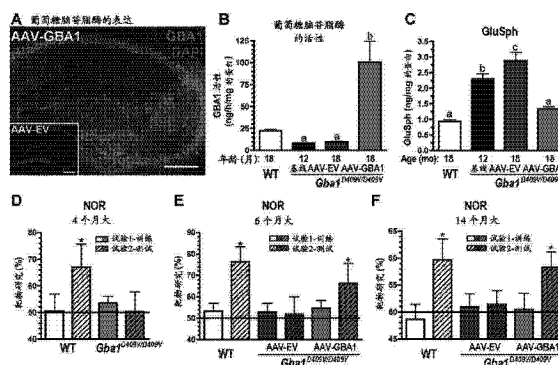
序列表3页 附图9页

(54) 发明名称

用于治疗蛋白质病的组合物和方法

(57) 摘要

本公开涉及用于在患有蛋白质病的哺乳动物中改善神经功能的方法,包括在哺乳动物中施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。还公开了用于在患有蛋白质病的哺乳动物中减少毒性脂质、减少 α -突触核蛋白和/或抑制蛋白聚集体积累的方法,包括施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。



1. 一种用于在患有蛋白质病 (proteinopathy) 的哺乳动物中改善神经功能的方法, 包括施用治疗上有效量的增加哺乳动物中葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述哺乳动物由于蛋白质病具有降低的神经功能。

3. 一种用于在有需要的哺乳动物中预防神经功能丧失的方法, 包括施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。

4. 权利要求 3 的方法, 其中所述哺乳动物患有蛋白质病。

5. 一种用于在患有蛋白质病的哺乳动物中降低毒性脂质、降低 α -突触核蛋白、降低 tau 或抑制蛋白聚集体积累的方法, 包括施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法, 其中所述哺乳动物在施用所述作用剂前具有降低的葡萄糖脑苷脂酶活性。

7. 权利要求 1-6 任一项的方法, 其中所述哺乳动物在葡萄糖脑苷脂酶 1 (GBA1) 基因中具有一种或多种突变。

8. 权利要求 7 的方法, 其中所述突变是 D409V 突变。

9. 权利要求 5 的方法, 其中所述方法包括降低 tau。

10. 权利要求 5 的方法, 其中所述方法包括降低 α -突触核蛋白。

11. 权利要求 5 的方法, 其中所述方法包括降低毒性脂质。

12. 权利要求 11 的方法, 其中所述毒性脂质是葡萄糖鞘氨醇。

13. 权利要求 12 的方法, 其中使所述毒性葡萄糖鞘氨醇降低至少约 30%。

14. 权利要求 12 的方法, 其中使所述毒性葡萄糖鞘氨醇降低至少约 50%。

15. 权利要求 12 的方法, 其中使所述毒性葡萄糖鞘氨醇降低至与未患有蛋白质病的哺乳动物相比无显著区别的水平。

16. 权利要求 5 的方法, 其中所述方法包括抑制蛋白聚集体的积累。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述蛋白聚集体包含选自下组的蛋白: 泛素、tau 和 α -突触核蛋白。

18. 权利要求 1-17 任一项的方法, 其中所述哺乳动物已诊断患有选自下组的疾病: 阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)、戈谢病 (Gaucher disease)、额颞叶痴呆 (frontotemporal dementia)、进行性核上麻痹 (progressive supranuclear palsy)、帕金森综合征 (Parkinsonism)、帕金森氏病 (Parkinson's disease)、Lytico-Bodig 病、路易体痴呆 (dementia with Lewy bodies)、纠缠主导型痴呆 (tangle-predominant dementia)、拳击员痴呆 (dementia pugilistica)、匹克病 (Pick's disease)、皮质基底节变性 (corticobasal degeneration)、嗜银颗粒病 (Argyrophilic grain disease)、神经节细胞胶质瘤 (ganglioglioma) 和神经节细胞瘤 (gangliocytoma)、脑膜血管瘤 (meningioangiomatosis)、亚急性硬化性全脑炎 (subacute sclerosing panencephalitis)、铅性脑病 (lead encephalopathy)、结节性硬化症 (tuberous sclerosis)、哈勒沃登-施帕茨病 (Hallervorden-Spatz disease) 和脂褐质沉积症 (lipofuscinosis)。

19. 权利要求 1、2 和 4-18 任一项的方法, 其中所述蛋白质病包含蛋白聚集体。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述蛋白聚集体包含选自下组的蛋白: 泛素、tau 和

α -突触核蛋白。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述蛋白质病是 tau 蛋白病 (tauopathy)。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述 tau 蛋白病是选自下组的疾病:阿尔茨海默氏病、额颞叶痴呆、进行性核上麻痹、帕金森综合征、帕金森氏病、Lytico-Bodig 病、路易体痴呆、纠缠主导型痴呆、拳击员痴呆、匹克病、皮质基底节变性、嗜银颗粒病、神经节细胞胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤、亚急性硬化性全脑炎、铅性脑病、结节性硬化症、哈勒沃登-施帕茨病和脂褐质沉积症。

23. 权利要求 20 的方法,其中所述蛋白质病是突触核蛋白病 (synucleinopathy)。

24. 权利要求 1-23 任一项的方法,其中所述作用剂包括小分子、抗体、核酸分子或多肽。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述作用剂是编码 GBA1 基因的核酸或其等价物。

26. 权利要求 24 的方法,其中所述作用剂是 GBA1 多肽或其等价物。

27. 权利要求 24 的方法,其中所述作用剂是特异性结合 GBA1 的抗体。

28. 权利要求 24 的方法,其中所述作用剂是小分子。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述小分子是葡萄糖脑苷脂酶活性的小分子激活剂。

30. 权利要求 24 的方法,其中所述作用剂是病毒。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述病毒包含编码 GBA1 基因的核酸或其等价物。

32. 权利要求 25 或 31 的方法,其中所述 GBA1 基因或其等价物与调节 GBA1 蛋白表达的启动子可操作地连接。

33. 权利要求 30-32 任一项的方法,其中所述病毒感染神经元细胞。

34. 权利要求 30-33 任一项的方法,其中所述病毒是腺相关病毒 (AAV)。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述 AAV 包含 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11 或 AAV12 血清型壳体。

36. 权利要求 34 或 35 的方法,其中所述 AAV 包含来自进化枝 (Clades) A-F 的 AAV 血清型壳体。

37. 权利要求 34 的方法,其中所述 AAV 包含 AAV 血清型 1 壳体。

38. 权利要求 34-37 任一项的方法,其中所述 AAV 包含 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11 或 AAV12 反向末端重复序列 (ITR)。

39. 权利要求 34-38 任一项的方法,其中所述 AAV 包含来自进化枝 A-F 的 AAV ITR。

40. 权利要求 38 的方法,其中所述 AAV 包含 AAV 血清型 2 ITR。

41. 权利要求 34-40 任一项的方法,其中所述 ITR 和所述壳体来源自相同的 AAV 血清型。

42. 权利要求 34-40 任一项的方法,其中所述 ITR 和所述壳体来源自不同的 AAV 血清型。

43. 权利要求 42 的方法,其中所述 AAV 包含 AAV1 壳体和 AAV2 ITR。

44. 权利要求 34-43 任一项的方法,其中所述 AAV 是自身互补 AAV。

45. 权利要求 44 的方法,其中所述核酸包含编码 GBA1 转基因的第一异源多核苷酸序列和编码 GBA1 转基因的补体的第二异源多核苷酸序列,其中所述第一异源多核苷酸序列可与所述第二多核苷酸序列形成链内碱基对。

46. 权利要求 45 的方法, 其中所述第一异源多核苷酸序列和所述第二异源多核苷酸序列由突变的 AAV ITR 连接。

47. 权利要求 46 的方法, 其中所述突变的 AAV ITR 包含 D 区的缺失并包含末端解析序列的突变。

48. 权利要求 32-47 任一项的方法, 其中所述启动子能够在中枢神经系统 (CNS) 的神经元中表达 GBA1 基因或其等价物。

49. 权利要求 32-48 任一项的方法, 其中所述启动子包含人 β -葡萄糖醛酸酶启动子或与鸡 β -肌动蛋白启动子连接的巨细胞病毒增强子。

50. 权利要求 1-49 任一项的方法, 其中所述作用剂在药物组合物中。

51. 权利要求 50 的方法, 其中所述药物组合物进一步包含可药用载剂。

52. 权利要求 1-51 任一项的方法, 其中所述作用剂或药物组合物通过注射施用。

53. 权利要求 52 的方法, 其中所述作用剂或药物组合物施用至 CNS 中。

54. 权利要求 53 的方法, 其中所述作用剂或药物组合物经由直接注射至脊髓中、经由鞘内注射、经由脑室内注射或经由海马体内注射施用。

55. 权利要求 1-54 任一项的方法, 其中所述方法包括在哺乳动物的神经元中增加葡萄糖脑苷脂酶活性至基线水平以上。

56. 权利要求 55 的方法, 其中所述方法包括增加哺乳动物的神经元中的葡萄糖脑苷脂酶活性至少约 2 倍至基线水平以上。

57. 权利要求 55 的方法, 其中所述方法包括增加哺乳动物的神经元中的葡萄糖脑苷脂酶活性至少约 3 倍至基线水平以上。

用于治疗蛋白质病的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2012 年 11 月 5 日提交的美国临时专利申请号 61/722,434 的优先权利益,其在此处以其全文通过提述并入。

[0003] 发明说明书

[0004] 在医学上,蛋白质病 (proteinopathy) 指一类疾病,该疾病中某些蛋白在结构上变得异常,并由此破坏机体的细胞、组织和器官的功能。通常所述蛋白不能折叠成为其正常构象。在该错误折叠状态,所述蛋白可以某种方式变得有毒 (获得毒性功能) 或其可丧失其正常的功能。所述蛋白质病包括的疾病如阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、朊病毒病、2 型糖尿病、淀粉状蛋白病和广泛的其他病症。

[0005] 蛋白质病遍布整个人群。举例来说,在美国近百万人患有帕金森氏病且多达五百一十万人患有阿尔茨海默氏病。目前对于这些疾病尚不能治愈,且许多疾病和疾病进程下的分子机制并不知晓。

[0006] 尽管对于这些破坏性疾病尚不能治愈,但可以相信的是一些症状可得到缓解。本领域对建立有效缓解或管理与蛋白质病相关症状的疗法存在需求。

[0007] 概述

[0008] 本公开涉及用于治疗蛋白质病的方法和组合物。一方面涉及用于在患有蛋白质病的哺乳动物中改善神经功能的方法,包括在哺乳动物中施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。蛋白质病指一种由畸形蛋白和 / 或蛋白积累引起的疾病 (例如,神经退行性疾病)。该类疾病的特征在于结构上异常的蛋白表征,所述结构上异常的蛋白可变得有毒、丧失其正常功能和 / 或破坏细胞功能。另一方面涉及用于在患有或有风险患上蛋白质病的哺乳动物中改善神经功能的方法,包括在哺乳动物中施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。

[0009] 当出现在中枢神经系统时,蛋白质病可导致认知功能损伤。认知功能或神经功能指记忆能力、注意力、语言、决策、解决问题等等。一方面,本发明的方法涉及在哺乳动物中通过增加葡萄糖脑苷脂酶活性改善认知功能,例如记忆功能。

[0010] 另一方面涉及用于在患有蛋白质病的哺乳动物中降低毒性脂质 (例如,葡萄糖鞘氨醇)、降低 α -突触核蛋白、降低 tau 或抑制 / 降低蛋白聚集体积累的方法,包括施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。另一方面涉及用于在患有或有风险患上 tau 蛋白质病的哺乳动物中降低毒性脂质 (例如,葡萄糖鞘氨醇)、降低 α -突触核蛋白、降低 tau 或抑制蛋白聚集体积累的方法,包括施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。增加哺乳动物中葡萄糖脑苷脂酶活性可带来有益的组织学变化。值得注意的是在患有蛋白质病的受试者中,已表明增加葡萄糖脑苷脂酶活性可减少毒性蛋白的种类。毒性脂质如葡萄糖鞘氨醇在 CNS 中积累并可作为神经毒素发挥作用。人体中 α -突触核蛋白是由 SNCA 基因编码的蛋白。在由路易体表征的病理性病症中, α -突触核蛋白可聚集成不溶性原纤维。称为突触核蛋白病的这些病症包括,举例来说,帕金森氏病和路易体痴呆 (Lew Body dementia)。增加葡萄糖脑苷脂酶活性也可降低细胞中的其他蛋白聚集体,如举

例来说 tau 和泛素。每种情况中,蛋白的异常形式至少部分促成哺乳动物的疾病状态。

[0011] 本公开的一方面涉及用于在患有蛋白质病的哺乳动物中降低葡萄糖脑苷脂脂质水平的方法,包括施用治疗上有效量的葡萄糖脑苷脂合酶小分子抑制剂或葡萄糖脑苷脂酶阳性调节剂。另一方面涉及用于在患有或有风险患上 tau 蛋白病的哺乳动物中降低葡萄糖脑苷脂脂质水平的方法,包括施用治疗上有效量的葡萄糖脑苷脂合酶小分子抑制剂或葡萄糖脑苷脂酶阳性调节剂。之前已描述底物减少疗法(参见,举例来说,McEachern KA et al. (2007) Mol. Genet. Metab. 91:259-67 ;Cabrera-Salazar MA et al. (2012) PLoS One 7:e43310 ;和美国申请号:8168587,其每一篇以其全文通过提述并入)。还公开了用于在有需要的哺乳动物(例如,患有或有风险患上蛋白质病的哺乳动物)中改善神经功能的方法和用于在有需要的哺乳动物中预防、抑制或降低神经功能丧失的方法,包括向所述哺乳动物施用治疗上有效量的葡萄糖脑苷脂合酶小分子抑制剂或葡萄糖脑苷脂酶阳性调节剂。

[0012] 另一方面涉及用于在有需要的哺乳动物中预防神经功能丧失的方法,包括施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。在一个实施方案中,所述哺乳动物患有或有风险患上 tau 蛋白病。在患有或有风险患上蛋白质病的哺乳动物中增加葡萄糖脑苷脂酶活性可预防与所述疾病相关的认知损害,例如记忆丧失和神经功能衰退。在实施方案中,该方法有利于已诊断患有蛋白质病但还未经历与所述疾病状态相关的认知损害典型征兆的受试者。此外,那些由于举例来说已知引起蛋白质病的受试者或受试者家族世系中的突变而有风险的受试者可受益于该治疗方法。

[0013] 在一些上述的实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0014] 在一些上述的实施方案中,所述哺乳动物已诊断患有选自下组的疾病:阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)、戈谢病 (Gaucher disease)、额颞叶痴呆 (frontotemporal dementia)、进行性核上麻痹 (progressive supranuclear palsy)、帕金森综合征 (Parkinsonism)、帕金森氏病 (Parkinson's disease)、Lytico-Bodig 病 (Lytico-Bodig disease)、路易体痴呆 (dementia with Lewy bodies)、纠缠主导型痴呆 (tangle-predominant dementia)、拳击员痴呆 (dementia pugilistica)、匹克病 (Pick's disease)、皮质基底节变性 (corticobasal degeneration)、嗜银颗粒病 (Argyrophilic grain disease)、神经节细胞胶质瘤 (ganglioglioma) 和神经节细胞瘤 (gangliocytoma)、脑膜血管瘤 (meningioangiomatosis)、亚急性硬化性全脑炎 (subacute sclerosing panencephalitis)、铅性脑病 (lead encephalopathy)、结节性硬化症 (tuberous sclerosis)、哈勒沃登-施帕茨病 (Hallervorden-Spatz disease) 和脂褐质沉积症 (lipofuscinosis)。

[0015] 在一些上述的实施方案中,所述哺乳动物可在施用所述作用剂前具有降低的葡萄糖脑苷脂酶活性。

[0016] 在一些上述的实施方案中,所述哺乳动物可在葡萄糖脑苷脂酶 1 (GBA1) 基因中具有一种或多种突变。GBA1 突变为本领域熟知,且非限制性实例描述于本文(例如,D409V 突变)。

[0017] 在一些上述的实施方案中,所述方法减少 tau、 α -突触核蛋白和/或毒性脂质(例如,葡萄糖鞘氨醇)。在相关的实施方案中,毒性葡萄糖鞘氨醇降低至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在相关的实施方案中,毒性葡萄糖鞘氨醇

降低至与不患有蛋白质病的哺乳动物相比无显著区别的水平。

[0018] 在一些上述的实施方案中,所述蛋白质病与蛋白聚集体相关(例如,泛素、tau 和/或 α -突触核蛋白)。在相关的实施方案中,所述方法涉及抑制蛋白聚集体(例如,包括泛素、tau 和/或 α -突触核蛋白的蛋白聚集体)的积累。在一些实施方案中,所述蛋白质病是 tau 蛋白病(例如阿尔茨海默氏病、额颞叶痴呆、进行性核上麻痹、帕金森综合征、帕金森氏病、Lytic-Bodig 疾病、路易体痴呆、纠缠主导型痴呆、拳击员痴呆、匹克病、皮质基底节变性、嗜银颗粒病、神经节细胞胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤、亚急性硬化性全脑炎、铅性脑病、结节性硬化症、哈勒沃登-施帕茨病和脂褐质沉积症)。在一些实施方案中,所述蛋白质病是突触核蛋白病。

[0019] 在一些上述的实施方案中,所述作用剂是(或包含)小分子、抗体、核酸分子或多肽。在实施方案中,所述作用剂是编码 GBA1 基因的核酸或其等价物(例如,编码催化葡萄糖脑苷脂裂解的多肽的片段、类似物或其衍生物)。在其他实施方案中,所述作用剂是 GBA1 多肽或其等价物(例如,编码催化葡萄糖脑苷脂裂解的片段、类似物或其衍生物)。在实施方案中,所述作用剂是特异性与 GBA1 结合的抗体或其片段。在实施方案中,所述作用剂是小分子(例如,小分子激活剂)。在实施方案中,所述作用剂是分子伴侣。在实施方案中,所述方法涉及施用有利于治疗与蛋白质病、突触核蛋白病、tau 蛋白病等相关的症状的第二作用剂。

[0020] 在一些上述的实施方案中,所述作用剂是病毒/病毒载体。在实施方案中,所述病毒包含编码 GBA1 基因的核酸或其等价物。在相关的实施方案中,所述 GBA1 基因或其等价物与调节 GBA1 蛋白表达的启动子(例如,能够在中枢神经系统的神经元中表达 GBA1 基因或其等价物的启动子,包括但不限于人 β -葡萄糖醛酸酶启动子或与鸡 β -肌动蛋白启动子连接的巨细胞病毒增强子)可操作地连接。

[0021] 在一些上述的实施方案中,所述作用剂是腺相关病毒(AAV)。在实施方案中,所述 AAV 包括 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11 或 AAV12 血清型壳体。在实施方案中,所述 AAV 包括来自进化枝(Clades)A-F 的 AAV 血清型壳体。在实施方案中,所述 AAV 包括 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11 或 AAV12 反向末端重复序列(ITR)。在实施方案中,所述 AAV 包括来自进化枝 A-F 的 AAV ITR。

[0022] 在一些实施方案中,所述 ITR 和所述壳体来源于相同的 AAV 血清型。

[0023] 在其他实施方案中,所述 ITR 和所述壳体来源于不同的 AAV 血清型。

[0024] 在一些实施方案中,所述 AAV 是自身互补 AAV。

[0025] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码 GBA1 转基因的第一异源多核苷酸序列和编码 GBA1 转基因补体(complement)的第二异源多核苷酸序列,其中所述第一异源多核苷酸序列可与所述第二多核苷酸序列形成链内碱基对。在相关的实施方案中,所述第一异源多核苷酸序列和所述第二异源多核苷酸序列由突变的 AAV ITR 连接(例如,所述突变的 AAV ITR 包含 D 区的缺失并包含末端解析序列的突变)。

[0026] 在一些上述的实施方案中,所述作用剂在药物组合物中。在相关的实施方案中,所述药物组合物进一步包含可药用载剂。

[0027] 在一些上述的实施方案中,所述作用剂或药物组合物经由口服途径、经由血管内

途径、经由静脉内途径、经由肌内途径、由通过粘膜组织（例如，鼻、口腔、阴道、直肠等等）的直接吸收、经由透皮途径、经由皮内途径、经由中枢神经系统（CNS）途径、经由脊髓、经由颅内途径、经由脑室内途径、经由鞘内途径或经由大脑内途径施用。

[0028] 在一些上述的实施方案中，所述作用剂或药物组合物通过注射施用。在实施方案中，所述作用剂或药物组合物施用至 CNS 中（例如，经由直接至脊髓中的注射、经由鞘内注射、经由脑室内注射或经由海马体内注射）。

[0029] 在一些上述的实施方案中，所述方法包括增加在神经元中的葡萄糖脑苷脂酶活性至基线水平以上（例如，神经元中基线水平以上至少 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍或更多）。

[0030] 本发明其他的目的和优势一部分将在随后说明书中进行阐述，而部分将从说明书中显而易见或可从本发明的实践中得知。本发明的目的和优势将通过本文公开的元素和组合的方式（包括附加的权利要求指出的那些内容）实现或获得。应该理解的是前文概述和随后的详述都仅为示例和说明而不是如权利要求般对本发明进行限制。并入并作为说明书组成的一部分的附图阐述本发明的数个实施方案，其与说明书共同用于诠释本发明的原理。

[0031] 附图简述

[0032] 附图 1A-C 表明 tau 聚集体在 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠脑中的进行性积累。(A) 图表明在 2 个月、6 个月和 12 个月大的 Gba1^{D409V/D409V} 和年龄匹配的野生型 (WT) 小鼠海马体中，用抗-tau 血清的免疫染色（绿色）和核染色 (DAPI, 蓝色)（比例尺，500 μ m）。(B) 处于 2、6 和 12 个月的野生型和 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠海马体中 Tau-5 免疫反应性的量化表明聚集体随年龄的进行性积累 ($n \geq 5$ 每组)。(C) 给出了来自 18 个月大的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠和年龄匹配的对照的海马体裂解物对于 AT8、AT180、AT270、Tau-5 和 β -微管蛋白的代表性免疫印迹。每条带代表独立的小鼠脑。克隆 AT8 抗体表明在大龄的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠中，tau 磷酸化 (S202/T205) 的增加。突变型和野生型小鼠之间未观察到 tau 总水平 (Tau-5) 或其他磷酸化品种 (AT180 或 AT270) 的区别。结果以平均值 $\pm$ SEM 代表。用不同文字标记的条形图彼此之间显著不同 ($p < 0.05$)。

[0033] 附图 2A-F 表明 AAV-GBA1 的 CNS 施用降低葡萄糖鞘氨醇水平并逆转记忆缺陷 (memory deficits)。对四个月和 12 个月大的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠给予 AAV-EV 或 AAV-GBA1 双边海马体注射。未注射的 Gba1^{D409V/D409V} 同窝动物在手术的同时进行安乐死作为用于生化和组织学终点的基线 ($n = 8$)。使用年龄匹配的、未注射的野生型 (WT, $n = 9$) 小鼠作为阳性对照。注射后 6 个月收集两同龄组的组织用于生化和病理分析。(A) 立体定位注射 6 个月后重组酶的海马体表达。图像表明 AAV-GBA1 注射的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠的葡萄糖脑苷脂酶免疫反应性（红色）和核 (DAPI, 蓝色) 染色（比例尺，400 μ m）。插图描绘 AAV-EV 注射小鼠中葡萄糖脑苷脂酶和核染色。向 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠海马体施用 AAV-GBA1 增加葡萄糖脑苷脂酶活性 (B, 红色条形, $n = 11$, $p < 0.05$) 并促进葡萄糖鞘氨醇 (GlcSph) 清除至 WT 水平 (C; 红色条形, $n = 11$, $p < 0.05$)，而 AAV-EV 治疗的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠显示葡萄糖脑苷脂酶活性无变化 (B, 蓝色条形, $n = 12$, $p > 0.05$) 并与基线水平相比持续积累 GlcSph (C, 黑色条形, $n = 8$, $p < 0.05$)。(D) 4 个月大的野生型 (WT) 和 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠的术前评估表明暴露于两种相同的物体时，其无物体偏好。来自试验 1 (训练) 的结果如白色 (WT) 和紫色 (Gba1^{D409V/D409V})。

^{D409V}小鼠)实心条形所示。24h 保留期后,向小鼠给出了新的物体。在试验 2(测试,阴影条形)中,WT 小鼠对新物体的研究显然更加频繁($n = 9, p < 0.05$)。相反, $Gba1^{D409V/D409V}$ 小鼠($n = 11$,蓝色阴影条形)对于新物体未表现出偏好,表明认知损害。(E)注射后 2 个月,小鼠进行新物体识别(NOR)测试。当在测试中给出新物体时,AAV-GBA1 治疗的 $Gba1^{D409V/D409V}$ 小鼠($n = 10$,蓝色阴影条形)而非 AAV-EV 治疗的动物($n = 9$,红色阴影条形)展示了其记忆缺陷的逆转。(F)另外的同龄组的 12 个月大的 $Gba1^{D409V/D409V}$ 小鼠用 AAV-EV($n = 12$)或 AAV-GBA1($n = 12$)注射。与 4 个月大的小鼠同龄组相似,对这些动物在注射后 2 个月(14 个月大)测试时观察到记忆功能障碍的逆转。结果以平均值 $\pm$ SEM 表示。(D-F)水平线界定 50%的靶物研究,其代表对任一物体无偏好(*,与 50%显著不同, $p < 0.05$);(B、C)。具有不同文字的条形彼此之间显著不同($p < 0.05$)。

[0034] 附图 3A-C 表明葡萄糖脑苷脂酶在有症状的 $Gba1^{D409V/D409V}$ 小鼠海马体中的表达减缓聚集的 α -突触核蛋白和 tau 的积累。用 AAV-EV 或 AAV-GBA1 双边注射入 4 个月或 12 个月大的两个同龄组的 $Gba1^{D409V/D409V}$ 小鼠的海马体。保留年龄匹配未注射的 WT 小鼠不进行治疗作为阳性对照。在注射时收获 $Gba1^{D409V/D409V}$ 同窝动物作为基线组。手术 6 个月后处死注射动物。图代表在 4 个月(左)或 12 个月(右)大注射的同龄组的泛素(A)、蛋白酶 K 抗性 α -突触核蛋白(B)和 tau 免疫反应性(C)的海马体定量。尽管该治疗在更大龄的小鼠中不那么有效,但在有症状的 $Gba1^{D409V/D409V}$ 小鼠的 CNS 中葡萄糖脑苷脂酶的增加降低了聚集蛋白的水平。图像表明用 AAV-EV 或 AAV-GBA1 治疗的 18 个月大的 $Gba1^{D409V/D409V}$ 小鼠海马体中泛素(A,绿色)、蛋白酶 K-抗性 α -突触核蛋白(B,红色)和 tau(C,绿色)免疫反应性。DAPI 核染色以蓝色展示(比例尺,100 μ m)。该结果以平均值 $\pm$ SEM 表示($n \geq 8$ 每组)。具有不同文字的条形彼此之间显著不同($p < 0.05$)。

[0035] 附图 4A-C 证明在 A53T α -突触核蛋白小鼠脑中增加葡萄糖脑苷脂酶减少 α -突触核蛋白水平。A53T α -突触核蛋白转基因小鼠展示减少的脑葡萄糖脑苷脂酶活性。(A)测定来自纯合($n = 9$)和杂合($n = 8$)的 α -突触核蛋白转基因和野生型同窝($n = 9$)小鼠的皮质匀浆中各种溶酶体酶的活性。葡萄糖脑苷脂酶活性与 α -突触核蛋白水平负相关,同时纯合小鼠展示更大的水解酶活性降低。两种其他溶酶体水解酶,己糖胺酶和 β -半乳糖苷酶的酶活性通过 A53T- α -突触核蛋白的表达保持不变。(B)四个月大的 A53T α -突触核蛋白小鼠各用 AAV-GFP($n = 6$)或 AAV-GBA1($n = 5$)单侧注射入右侧纹状体。对于每只动物,将左侧纹状体用作未注射对照以降低受试者间 α -突触核蛋白水平的可变性。四个月后,将小鼠安乐死并收集两侧纹状体。在 AAV-GBA1 注射的纹状体中,观察到较强的葡萄糖脑苷脂酶活性(高于未注射的对侧 7 倍)。葡萄糖脑苷脂酶的表达促进了胞浆组分(Tris 可溶物,非膜结合)中 α -突触核蛋白水平的降低($p < 0.05$)。(C)将 AAV-GFP 或 AAV-GBA1 注射入新生(P0)A53T- α -突触核蛋白小鼠腰椎脊髓。如预期所料,在 AAV-GBA1 注射小鼠中注意到较强的葡萄糖脑苷脂酶活性(超过对照 3 倍)。如在纹状体中,葡萄糖脑苷脂酶的表达降低胞浆组分(Tris 可溶物,非膜结合)中 α -突触核蛋白的水平($n = 7$ /组; $p < 0.05$)。数据以平均值 $\pm$ SEM 表示。*表示 $p < 0.05$ 的统计学显著性。

[0036] 附图 5A-B 表明减少的葡萄糖脑苷脂酶活性导致 α -突触核蛋白积累。(A)描绘了表明 $Gba1^{D409V/D409V}$ 戈谢小鼠中海马体 α -突触核蛋白和泛素聚集体的免疫组化图。(B)对 WT 和 $Gba1^{D409V/D409V}$ 小鼠的 α -突触核蛋白免疫反应性的百分比进行量化。PK = 蛋白酶 K。

[0037] 附图 6A-D 表明 Gba1^{D409V/D409V} 戈谢小鼠模型突触核蛋白病的表征。这些小鼠证明了泛素 (A) 和 α -突触核蛋白聚集体 (B) 的进行性积累和葡萄糖鞘氨醇的积累 (D)。此外, 这些小鼠在新物体识别测试中展现了记忆的损害 (C)。

[0038] 附图 7 证明 GBA1 增加改善 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠病理 (预防性研究)。新物体识别测试表明 AAV 介导向症状前小鼠 (2 个月大的 Gba1^{D409V/D409V}) 海马体中递送葡萄糖脑苷脂酶纠正了记忆损害。

[0039] 附图 8 表明葡萄糖脑苷脂酶在 A53T α -突触核蛋白小鼠脑中的表达减少 Tau 聚集体的积累。在 P0 用 AAV- 对照或 AAV-GBA1 双边注射入 A53T- α -突触核蛋白转基因小鼠侧脑室。保留年龄匹配、未注射的 WT 小鼠不进行治疗作为阴性对照。图像表明在野生型 (WT) 和 A53T- α -突触核蛋白过表达小鼠的海马体中使用抗 tau 血清的免疫染色 (绿色) 和核染色 (DAPI, 蓝色) (比例尺, 500 μ m)。

[0040] 附图 9A-B 表明在 tau 转基因小鼠 CNS 中葡萄糖脑苷脂酶活性的增加预防记忆功能障碍。(A) 给予两个月大的 Tau 转基因小鼠 AAV-EV 或 AAV-GBA1 双边海马体注射。年龄匹配、未注射的野生型 (WT; n = 8) 小鼠用作对于所述测试的阳性对照。来自测试 1 (训练) 的结果以白色 (WT)、绿色 (TAU+AAV-EV) 或红色 (TAU+AAV-GBA1) 实心条形显示。24 小时保留期后, 向小鼠给出了新的物体。在测试 2 中 (测试, 阴影条形), WT 小鼠在 4 或 8 个月大时都更频繁地研究新物体。相反地, 对照病毒注射的 Thy1-TAU22 转基因小鼠 (n = 9; 绿色阴影条形) 未显示对于新物体物的偏好, 表明测试的两个时间点都具有认知损害。AAV-GBA1 治疗的 Thy1-TAU22 小鼠 (n = 13; 红色阴影条形) 展示了治疗后 2 个月后记忆功能的改善趋势, 所述趋势在治疗 6 个月后测试时具有显著性。结果以平均值 $\pm$ SEM 表示。水平线界定 50% 靶物研究, 其代表对于任一物体都无偏好 (*, 与 50% 显著不同, P < 0.05)。

[0041] 发明详述

[0042] 定义

[0043] 除非另作定义, 本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通的技术人员通常理解相同的含义。尽管与本文描述的那些相似或等同的任何方法和材料可用于实践和测试本发明, 现将对示例方法、设备和材料进行描述。本文引用的所有技术和专利出版物以其全文通过提述并入。本文不存在应理解为对本发明没有资格早于那些在本发明前公开的承认。

[0044] 除非另外表明, 本发明公开的实践将采用本领域技术内的组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组 DNA 的常规技术。参见, 例如 Michael R. Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012); the series Ausubel 等 编 (2007) Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson 等 (1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson 等 (1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow and Lane 编 (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th edition; Gait ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; U. S. Patent No. 4,683,195; Hames and Higgins 编 (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins 编 (1984)

Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos 编 (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker 编 (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Herzenberg 等编 (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)); Sohail (ed.) (2004) Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application (CRC Press)。

[0045] 当适合时,所有数字指代,例如 pH、温度、时间、浓度和分子量,包括范围,是通过 0.1 或 1.0 的增量变化 (+) 或 (-) 的近似值。应该理解的是,尽管不总是明确规定,所有的数字指代之前均有术语“约”。还应该理解的是,尽不总是明确规定,本文描述的试剂仅是示例性的且其等价物为本领域已知。

[0046] 除非上下文另有清楚地有另外表明,如说明书和权利要求中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括对复数的涉及。举例来说,术语“细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0047] 除非特意表明或从上下文显而易见,如本文使用的术语“或”应理解为是包括性的。

[0048] 用于本文的术语“包括”表明短语“包括但不限于”,且可与其交换使用。

[0049] 如本文所用术语“包括”或“包含”意在表明组合物和方法包括记载的元素但不排除其他。当用“基本上由...组成”定义组合物和方法时,出于陈述目的其表明排除任何对于组合具有实质重要性的其他元素。因此,如本文定义的基本上由各个元素组成的组合物将不排除来自分离和纯化方法的痕量污染和可药用载剂(如磷酸缓冲盐水、防腐剂等等)。“由...组成”意为将排除不止痕量元素的其他成分和用于施用本发明组合物的实质性方法步骤或产生组合物或获得目标结果的加工步骤。由这些过度术语的每一个定义的实施方案都在本发明的保护范围内。

[0050] 术语“葡萄糖脑苷脂酶 1”与“GBA1”和“GBA1 多肽”可交换使用指代催化裂解鞘糖脂葡萄糖脑苷脂(葡萄糖苷酰鞘氨醇, GlcCer)的 β -糖苷连接基使其成为葡萄糖和神经酰胺的 β -葡萄糖脑苷脂酶蛋白或多肽。GBA1 也称为酸性 β -葡萄糖苷酶、D-葡萄糖基-N-酰基鞘氨醇葡萄糖水解酶、GCase 和葡萄糖苷酶、 β -、酸性和转录变体 1。

[0051] 术语“葡萄糖脑苷脂酶 1 基因”与“GBA1 基因”和“GBA1”可交换使用以指代编码 β -葡萄糖脑苷脂酶蛋白或多肽的核酸或多核苷酸。该基因中的突变可引起戈谢病,一种由葡萄糖脑苷脂和葡萄糖鞘氨醇积累表征的溶酶体贮积症。关于 GBA 的信息可在 Entrez Gene 数据库的 GeneID:2629 找到。

[0052] 术语“葡萄糖脑苷脂酶活性”指葡萄糖脑苷脂的裂解。

[0053] 术语“多核苷酸”、“核酸”和“寡核苷酸”可交换使用并指代任何长度的多聚形式核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物)。多核苷酸可具有任何三维结构并可实施任何已知或未知的功能。下列是多核苷酸的非限制性实施例:基因或基因片段(举例来说,探针、引物、EST 或 SAGE 标签)、外显子、内含子、信使 RNA (mRNA)、转移 RNA、核糖体 RNA、

核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可包含修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,对核苷酸结构的修饰可在多核苷酸装配之前或之后给予。核苷酸的序列可由非核苷酸组分中断。多核苷酸可在多聚化后进一步修饰,如通过与标记组分的接合。术语还指双链和单链分子两者。除非另外规定或要求,本发明任何是多核苷酸的实施方案涵盖双链形式还有已知或预测组成双链形式的两条互补单链形式的每一条。

[0054] 多核苷酸由四种核苷酸碱基的特定序列组成:腺嘌呤(A);胞嘧啶(C);鸟嘌呤(G);胸腺嘧啶(T)和当多核苷酸是 RNA 时的尿嘧啶(U)。因此,术语“多核苷酸序列”是多核苷酸分子的字母代表。该字母代表可输入具有中央处理器的计算机的数据库并用于生物信息学应用如功能性基因组和同源性搜索。

[0055] 术语“多肽”和“蛋白”可交换使用以指代氨基酸残基的多聚物,并无最小长度的限制。这种氨基酸残基多聚物可包含天然或非天然氨基酸残基,且包括但不限于氨基酸残基的肽、寡肽、二聚物、三聚物和多聚物。全长的蛋白及其片段都由定义涵盖。该术语还包括多肽的表达后修饰,举例来说糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等等。此外,就本发明而言,只要所述蛋白保持预期活性,“多肽”指包括对天然序列进行修饰,如缺失、添加和取代(通常在性质上是保守的)的蛋白。此等修饰可能是目的性的,如经由通过定点突变;或可能是偶然的,如通过产生所述蛋白的宿主的突变,或由于 PCR 扩增的误差。

[0056] “同源性”或“同一性”或“相似性”指两种肽之间或两种核酸分子之间序列的相似性。同源性可由比较每种序列中的位点确定,为达比较目的,可将序列对齐。当比较序列中的位点由相同碱基或氨基酸占用时,则所述分子在该位点是同源的。序列间的同源程度是由序列共享的匹配或同源位点数目的函数。“不相关”或“非同源”序列与本发明的一种序列共享少于 40% 的同一性,或可替换地少于 25% 的同一性。

[0057] 多核苷酸或多核苷酸区(或多肽或多肽区)与另一序列具有一定百分数的“序列同一性”(举例来说,70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或 99%)意为当比对时,该百分数的碱基(或氨基酸)在比较的两种序列中相同。该比对和百分同源性或序列同一性可使用本领域已知的软件程序确定,举例来说描述于 Ausubel 等编(2007)Current Protocols in Molecular Biology 的那些。默认参数可用于比对。一种比对程序是使用默认参数的 BLAST。示例的程序包括但不限于 BLASTN 和 BLASTP,使用下列默认参数:遗传密码=标准;过滤=无;链=两条;临界值=60;预期值=10;矩阵=BLOSUM62;说明=50 序列;排序方式=高分;数据库=非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS 翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的细节可在下列网址获得:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>。

[0058] 等价核酸、多核苷酸或寡核苷酸是一种与参照核酸、多核苷酸或寡核苷酸具有至少 80% 序列同一性,或可替换地至少 85% 序列同一性,或可替换地至少 90% 序列同一性,或可替换地至少 92% 序列同一性,或可替换地至少 95% 序列同一性,或可替换地至少 97% 序列同一性,或可替换地至少 98% 序列同一性的一种。

[0059] “基因”指包含至少一个转录或翻译后能够编码特定多肽或蛋白的开放阅读框(ORF)的多核苷酸。

[0060] 术语“表达”指基因产物的生产。

[0061] 如本文使用的“表达”指多核苷酸转录成为 mRNA 的过程和 / 或转录的 mRNA 随后翻译成肽、多肽或蛋白的过程。如果所述多核苷酸来源于基因组 DNA, 表达可包括 mRNA 在真核细胞中的剪接。

[0062] “基因产物”或可替换地“基因表达产物”指当基因转录和翻译时生成的氨基酸(例如, 肽或多肽)。

[0063] “异源”意为来源于基因型与其相比不同或在其被引入或并入其中的实体的其余部分的基因型与其不同的实体。举例来说, 由基因工程技术引入不同类型的细胞的多核苷酸是异源多核苷酸(并且, 表达时, 可编码异源多核苷酸)。同样地, 并入病毒载体的细胞序列(例如, 基因或其部分)就载体而言是异源核苷酸序列。

[0064] 术语“转基因”指引入细胞并能够转录成为 RNA 且任选地在合适条件下翻译和 / 或表达的多核苷酸。一些方面, 其赋予其被引入其中的细胞预期的特性, 或以其他方式带来预期的治疗或诊断结果。

[0065] “调节表达”是本领域熟知的术语, 并表明多核苷酸序列(通常是 DNA 序列)的转录依赖于其可操作地与有助于转录起始或促进转录的元件的连接。“可操作地连接”意为多核苷酸以使其在细胞中发挥功能的方式排列。一方面, 本发明提供与下游序列如葡萄糖脑苷脂酶 1 (GBA1) 可操作地连接的启动子。

[0066] 如应用于多核苷酸, 术语“编码”指称为“编码”多肽的多核苷酸, 如果其以天然状态或当通过本领域的技术人员已知的方法操纵时, 其可被转录和 / 或翻译以产生用于多肽和 / 或其片段的 mRNA。反义链是这种核酸的补体, 且编码序列可由此推断。

[0067] “可检测的标记”或“标志”包括但不限于放射性同位素、荧光染料、化学发光化合物、染料和包括酶的蛋白质。可检测的标记还可附着至多核苷酸、多肽、抗体或本文描述的组合物。

[0068] “杂交”指其中一个或多个多核苷酸反应以形成经由核苷酸残基的碱基间氢键稳定的复合物的反应。氢键可由 Watson-Crick 碱基配对、Hoogsteen 结合或以任何其他序列特异性的方式发生。所述复合物可包含形成双链结构的两条链、形成多重链复合物的三条或多条链, 单独的自杂交链或这些的任何组合。杂交反应可构成更广范围的过程中的一步, 如 PCR 反应的起始或通过核酶进行的多核苷酸的酶裂解。

[0069] 杂交反应可在不同的“严格”条件下实施。一般而言, 低严格杂交反应在约 40°C 的 10xSSC 或等价的离子强度 / 温度的溶液中实施。温和的严格杂交通常在约 50°C 的 6xSSC 中实施, 而高严格杂交反应通常在约 60°C 的 1xSSC 中实施。杂交反应还可在本领域的技术人员熟知的“生理条件”下实施。生理条件的非限制性实例是通常见于细胞中的温度、离子强度、pH 和 Mg^{2+} 浓度。

[0070] 当杂交在两条单链的多核苷酸间以反相平行构象发生时, 该反应称为“退火”, 且将这些多核苷酸描述为“互补的”。如果杂交可在第一多核苷酸链的一条链和第二多核苷酸间发生, 双链的多核苷酸可以与另一多核苷酸“互补”或“同源”。根据普遍接受的碱基配对原则, “互补性”或“同源性”(一条多核苷酸与另一多核苷酸的互补程度)可就预期彼此形成氢键的相对链中碱基的百分比来量化。

[0071] 如本文使用的术语“载体”指包含完整复制子由此当置于细胞中(举例来说通过转化方法)时所述载体可复制的非染色体核酸。载体可以是病毒或非病毒。病毒载体包括

逆转录病毒、腺病毒、疱疹病毒、杆状病毒、修饰的杆状病毒、乳多空病毒或以其他方式修饰的天然存在的病毒。典型的用于递送核酸的非病毒载体包括裸 DNA ;与阳离子脂质复合的 DNA,单独或与阳离子多聚物组合的 DNA ;阴离子和阳离子脂质体 ;DNA- 蛋白质复合物和包含与阳离子聚合物如异源多聚赖氨酸、界定长度的寡肽及聚乙烯亚胺缩合的 DNA 的颗粒,在一些情况下包含于脂质体中 ;和包含病毒与多聚赖氨酸 -DNA 三元复合物的使用。

[0072] “病毒载体”定义为重组产生的包含将在体内、离体或体外被递送入宿主细胞的多核苷酸的病毒或病毒颗粒。典型的病毒载体包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、单纯疱疹病毒载体、甲病毒载体等等。甲病毒载体,如基于 Semliki Forest 病毒的载体和基于 Sindbis 病毒的载体也已开发用于基因治疗和免疫治疗。参见 Schlesinger and Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439 和 Ying 等 (1999) Nat. Med. 5(7):823-827。

[0073] 如本领域的技术人员所知,已有 6 类病毒。DNA 病毒构成 I 和 II 类。RNA 病毒和逆转录病毒构成剩余类别。III 类病毒具有双链 RNA 基因组。IV 类具有正单链 RNA 基因组,该基因组本身作为 mRNA 发挥作用。V 类病毒具有作为用于 mRNA 合成的模板的负单链 RNA 基因组。VI 类病毒具有正单链 RNA 基因组且在复制和 mRNA 合成中都具有 DNA 中间体。逆转录病毒以 RNA 的形式携带其遗传信息,一旦所述病毒感染细胞,RNA 被逆转录成为整合入感染细胞基因组 DNA 中的 DNA 形式。整合的 DNA 形式称为原病毒。

[0074] 根据本发明的载体颗粒“基于”特定病毒意为所述载体来源于所述特定病毒。载体颗粒的基因组包含来自该病毒的组分作为骨架。载体颗粒包含与病毒基因组兼容的基本载体组分。尽管载体颗粒的一些结构组分通常来自该病毒,但一些组分可来自不同病毒(例如,给予所述载体颗粒不同特异性的结构组分)。

[0075] 术语“启动子”指起始特定基因转录的 DNA 区。启动子包括核心启动子,所述核心启动子是正确起始转录所需启动子的最小部分,且还可包括调节元件如转录因子结合位点。所述调节元件可促进转录或抑制转录。启动子中的调节元件可以是用于转录激活子或转录抑制子的结合位点。启动子可以是组成型的或诱导型的。组成型启动子指始终有活性和 / 或不断指导基因在转录基础水平以上转录的启动子。诱导型启动子是能够由添加至细胞或在细胞中表达的分子或因诱导的启动子。诱导型启动子在不存在诱导时仍可产生基础水平的转录,但诱导通常导致明显更多的蛋白产生。启动子还可以是组织特异性的。组织特异性启动子允许蛋白在一些具有合适的转录因子以激活启动子的细胞群体中产生。

[0076] “反向末端重复序列”或“ITR”序列是本领域熟知的术语且指在病毒基因组的末端处发现的相对短的相反方向序列。

[0077] 本领域熟知的术语“腺相关病毒 (AAV) 反向末端重复”序列是在天然单链 AAV 基因组两末端存在的约 145 个核苷酸的序列。ITR 的最外部 125 个核苷酸可以两种可替换的方向的任一种存在,导致不同 AAV 基因组间和单一 AAV 基因组中两末端间的异质性。最外部的 125 个核苷酸还包含数个自身互补的较短区(称为 A、A'、B、B'、C、C' 和 D 区),允许在 ITR 该部分内发生链内碱基配对。

[0078] “末端解析序列 (terminal resolution sequence)”或“trs”是病毒 DNA 复制过程中由 AAV rep 蛋白裂解的 AAV ITR 的 D 区中的序列。突变的末端解析序列难以由 AAV rep 蛋白裂解。

[0079] 术语“抗体”意为识别靶并特异性地与靶（如蛋白、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或前述组合）通过免疫球蛋白分子可变区内的至少一个抗原识别位点结合的免疫球蛋白分子。如本文使用的术语“抗体”涵盖完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、抗体片段（如 Fab、Fab’、F(ab’)₂、Fd 和 Fv 片段）、单链 Fv(scFv) 突变体、多重特异性抗体如从至少两种完整的抗体生成的双特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体抗原决定部分的融合蛋白和（只要所述抗体展示预期生物活性）任何其他包含抗原识别位点的修饰的免疫球蛋白分子。抗体可以是五种主要的免疫球蛋白类别中任一类：基于其分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链恒定结构域的身份，为 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 或其亚类（同型）（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）。不同类型的免疫球蛋白具有不同的已知的亚基结构和三维构象。抗体可以是裸抗体或与其他分子如毒素、放射性同位素等等缀合的抗体。

[0080] 术语“抗体片段”指完整抗体的部分并指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于 Fab、Fab’、F(ab’)₂、Fd 和 Fv 片段、线性抗体、单链抗体和由抗体片段形成的多重特异性抗体。

[0081] “单克隆抗体”指参与单抗原决定区或表位高度特异性识别和结合的同质抗体群。其与通常包括针对不同抗原决定区的不同抗体的多克隆抗体形成对比。术语“单克隆抗体”涵盖完整的以及全长的单克隆抗体以及抗体片段（如 Fab、Fab’、F(ab’)₂、Fd、Fv）、单链 (ScFv) 突变体、包含抗体部分的融合蛋白和任何其他包含抗原识别位点的修饰的免疫球蛋白分子。此外，“单克隆抗体”指这种以多种方式中的任何方式（包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达以及转基因动物）生成的这些抗体。

[0082] 术语“人源化抗体”指是包含最少非人（例如鼠类）序列的作为特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段的非人形式（例如鼠类）抗体。通常，人源化抗体是其中来自互补决定区 (CDR) 的残基来自具有预期特异性、亲和性和能力的非人种类的 CDR 的残基替换的人免疫球蛋白。（参见 Jones 等 (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann 等 (1988) *Nature* 332:323-327; 和 Verhoeyen 等 (1988) *Science* 239:1534-1536）。在一些实例中，人免疫球蛋白的 Fv 框架区 (FR) 残基用来自具有预期特异性、亲和性和能力的非人种类抗体中的对应残基取代。人源化抗体可进一步由在 Fv 框架区中和 / 或替换的非人残基内额外残基的取代修饰以完善和优化抗体特异性、亲和性和 / 或能力。一般来说，人源化抗体基本上将包含所有含对应于该非人类免疫球蛋白的所有或基本上所有 CDR 区的至少一个，一般为两个或三个可变结构域，而所有或基本上所有的 FR 区是人免疫球蛋白共有序列的 FR 区。人源化抗体还可包含免疫球蛋白恒定区或结构域 (Fc) 的至少一部分（通常是人免疫球蛋白的）。用来生成人源抗体的实例描述于美国专利 5, 225, 539。

[0083] 术语“人抗体”意为由人产生的抗体或具有对应由人产生的抗体的氨基酸序列的使用本领域任何技术产生的抗体。人抗体的定义包括完整的或全长的抗体、其片段和 / 或包含至少一条人重和 / 或轻链多肽的抗体，如举例来说包括鼠轻链和人重链多肽的抗体。

[0084] 术语“嵌合抗体”指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列来源于两种或更多物种的抗体。通常，轻链和重链的可变区都对应源自具有预期特异性、亲和性和能力的一种哺乳动物（例如，小鼠、大鼠、兔等）的抗体可变区，而恒定区与源自另外物种（通常是人类）的抗体中的序列同源以避免在该物种中引起免疫反应。

[0085] 术语“表位”或“抗原决定区”在本文可交换使用,并指能够由特定的抗体识别并特异性结合的抗原的那部分。当抗原是多肽时,表位可从邻近的氨基酸和由蛋白的三级折叠而紧靠的非邻近氨基酸形成。由邻近氨基酸形成的表位通常在蛋白变性中得以保持,而由三级折叠形成的表位通常在蛋白变性中丧失。表位通常包括至少 3、至少 5 或至少 8-10 个呈独特空间构象的氨基酸。

[0086] 抗体与表位或抗原分子“特异性结合”意为相比其他物质包括不相关的蛋白,抗体与表位或抗原分子更高频、更快速、以更长时间、更强亲和力或一些上述的组合进行反应或缔合。在实施方案中,“特异性结合”意思是举例来说抗体与蛋白以约 0.1mM 或更少但更经常少于约 1 μ M 的 KD 结合。在实施方案中,“特异性结合”意为抗体与蛋白有时以至少约 0.1 μ M 或更少的 KD 结合,且其他时间以至少约 0.01 μ M 或更少的 KD 结合。由于在不同物种中同源蛋白之间的序列同一性,特异性的结合可包括在多于一种物种中识别特定蛋白的抗体。应该理解的是特异性地与第一靶物结合的抗体或结合部分可以或不特异性地与第二靶物结合。由此,“特异性结合”不一定需要(尽管可以包括)排他性结合,例如与单一的靶结合。基本上,但不必须的是,提及结合时意为特异性结合。

[0087] 术语“蛋白质病”指一种疾病,其中某些蛋白变得结构上异常和/或以毒性的方式积累,且由此破坏机体的细胞、组织和器官功能。通常所述蛋白不能折叠成其正常的构象。处于这种错误折叠的状态,所述蛋白可变得有毒或可失去其正常的功能。蛋白质病非限制性的实例包括阿尔茨海默氏病、戈谢病、额颞叶痴呆、进行性核上麻痹、拳击员痴呆、帕金森综合征、帕金森氏病、路易体痴呆、皮克病、皮质基底节变性、嗜银颗粒病、神经节细胞胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅性脑病、结节性硬化症、哈勒沃登-施帕茨病和脂褐质沉积症、脑 β 淀粉样血管病、青光眼中的视网膜神经节细胞变性、朊病毒病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、亨廷顿氏病和其它三联体重复病症、亚历山大病、腓骨肌萎缩症(seipinopathies)、淀粉样神经病变、老年系统性淀粉样变性、腓骨肌萎缩症、淀粉样变性,包涵体肌炎/肌病、马洛里氏体、肺泡蛋白沉积症和危重病肌病(CIM)。

[0088] “受试者”、“个体”或“患者”在本文可交换使用并指脊椎动物如哺乳动物。哺乳动物包括但不限于鼠类、大鼠、兔、猿猴、牛、羊、猪、犬科动物、猫科动物、农场动物、竞技动物、宠物、马、灵长类动物和人。在实施方案中,所述哺乳动物包括马、狗和猫。在本发明的另一实施方案中,所述哺乳动物是人类患者。

[0089] “施用”在本文定义为以导致作用剂在受试者体内的方式提供作用剂或包含作用剂的组合物至受试者的含义。这种施用可由任何途径,包括但不限于口服、经皮(例如,阴道、直肠、口腔粘膜)、通过注射(例如,皮下、静脉内、肠胃外、腹膜内进入 CNS)或通过吸入(例如,口或鼻)。当然,药用制剂是通过适于每种施用途径的形式给予。

[0090] 疾病的“治疗”或“疗法”包括:(1) 预防所述疾病,即使得疾病的临床症状不在可能易患所述疾病但还未经历或展示所述疾病症状的患者中发展形成;(2) 抑制所述疾病,即阻止或减少所述疾病或其临床症状的发展;或(3) 缓解所述疾病,即使得所述疾病或其临床症状消退。

[0091] 术语“患有”与术语“治疗”相关时指已诊断患有或易感所述疾病的患者或个体。患者还可指由于在其家族谱系的疾病历史或由于存在与所述疾病相关的基因突变而“有风险患上”疾病。这样的患者还未发展出全部或一些特征性疾病病理。

[0092] “有效量”或“治疗上有效量”是足以产生有益或预期结果的量。有效量可以以一次或多次施用、应用或剂量进行施用。该递送依赖于多种变量包括个体给药单位使用的时程、治疗剂的生物利用度、施用途径等。然而，应该理解的是对于任何特定受试者，本发明治疗剂的特定剂量水平依赖于多个因素包括采用的特定化合物的活性、受试者的年龄、体重、总体健康、性别和饮食、施用时间、排泄速率、药物组合和治疗的特定病症的严重程度和施用形式。通常可滴定施用剂量以优化安全性和效力。通常，来自体外和 / 或体内测试的剂量 - 效果关系最初可提供关于用于患者施用的合适剂量的有用指导。一般而言，技术人员将希望施用有效实现血清水平与在体外发现的有效浓度相称的量的化合物。这些参数的确定为本领域熟知。这些注意事项以及有效的配制物和施用步骤为本领域熟知且已在标准教科书中描述。与本文使用的定义一致的是，术语“治疗上有效量”是足以在离体、体外或体内增加葡萄糖脑苷脂酶活性以治疗（例如，改善）一种或多种与蛋白质病相关的症状或水平异常 / 增加的毒性脂质、突触核蛋白、tau 或蛋白聚集体的量。

[0093] 本文使用的术语“可药用载剂”涵盖任何标准的药物载剂，如磷酸缓冲盐水溶液、水和乳剂如油 / 水或水 / 油乳剂和多种类型的湿润剂。所述组合物还包括稳定剂和防腐剂。载剂、稳定剂和佐剂的实例参见 Remington's Pharmaceutical Sciences (20th ed., Mack Publishing Co. 2000)。

[0094] 本文提供的范围应理解为是对于在该范围内所有值的简写。举例来说，1 至 50 的范围应理解为包括来自 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 或 50 组成的组的任何数字、数字的组合或子范围。

[0095] 本文任何变量定义中，化学基团列表的详述包括如任何单独基团或所列基团组合的该变量的定义。用于本文变量或一些方面的实施方案的详述包括如任何单独的实施方案或其与任何其他实施方案或其部分组合的实施方案。

[0096] 本文提供的任何组合物或方法可与本文提供的一种或多种任何其他组合物和方法联合。

[0097] 描述性实施方案

[0098] 本公开涉及用于治疗蛋白质病的方法和组合物。在哺乳动物中增加葡萄糖脑苷脂酶在治疗上具有有益的结果如改善神经功能、改善记忆功能、预防记忆或神经功能丧失、降低毒性脂质（例如，葡萄糖鞘氨醇）、降低 α -突触核蛋白、降低 tau 和抑制蛋白聚集体的积累。在一个实施方案中，在由于蛋白质病展示降低的记忆功能的受试者中观察到神经功能的改善。认知障碍的诊断在医生的常规技术范围内。认知测试为本领域已知且可包括测试如简略精神测试评分 (abbreviated mental test score; AMTS)、简易精神状态检查 (mini mental state examination; MMSE)、老年人中认知衰退信息问卷 (IQCODE) 和用于认知损害测试的全科医生认知评估 (General Practitioner Assessment of Cognition)。这些测试能够评估举例来说记忆、推理技巧、问题解决技巧、决策技巧、注意力和语言技巧方面的损害。成像方法也可用于诊断认知衰退。举例来说，单光子发射计算机断层扫描 (SPECT) 和正电子发射断层扫描 (PET) 的功能性神经影像学模式可用于评估认知功能障碍。一些方面，神经功能的改善由评估患者的记忆功能或认知功能测量。

[0099] 涉及用于预防认知衰退如记忆丧失的方法，使用碳 -11Pittsburgh 化合物 B 作

为放射性示踪剂的 PET 成像 (PIB-PET) 已用于多种蛋白质病的预测性诊断。举例来说, 研究发现 PIB-PET 在预测那些患有轻度认知损害的患者于两年内将发展阿尔茨海默氏病的精确度为 86 %。在另一研究中, 使用 PIB 或另一放射性示踪剂, 碳 -11 二氢丁苯 (dihydrotetrabenazine ;DTBZ) 使得对于超过四分之一的患有轻度认知损害或轻度痴呆的患者的诊断更加精确。

[0100] 在本文描述的方法的一些实施方案中, 所述哺乳动物在治疗前具有降低的葡萄糖脑苷脂酶活性。葡萄糖脑苷脂酶活性可由本领域已知的方法评估。举例来说, 葡萄糖脑苷脂酶活性可从哺乳动物的脑脊液测量。

[0101] 在一些实施方案中, 哺乳动物对于 GBA1 基因是“野生型”。术语“野生型”指不具有已知影响蛋白酶活的可检测的序列突变的基因或蛋白。这些序列为本领域熟知, 且非限制性实例可在 GenBank 登录编号 NM_000157.3(mRNA) 和 NP_000148.2(蛋白) 获得。成熟 GBA1 蛋白的典型序列为: ARPCIPKSFYGYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLSKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGI AVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSASVVVVLNRSSKDVP LTIKDPVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ (SEQ ID NO:1)

[0102] 当发现所述基因为野生型但观察到葡萄糖脑苷脂酶活性降低时, 所述活性的降低可能由于蛋白活性的抑制或所述基因 / 蛋白的转录或翻译受到阻抑。这些机制为本领域熟知。举例来说, 所述蛋白的产生可由异常的细胞机制阻抑。可替换地, 所述蛋白在细胞中可被修饰, 引起酶活的降低或丧失。

[0103] 在一些实施方案中, 所述哺乳动物在葡萄糖脑苷脂酶 1 (GBA1) 基因中具有一种或多种突变。GBA1 中可影响蛋白活性的特定突变包括 L444P、D409H、D409V、E235A 和 E340A (参见, 举例来说, Cullen et al. (2011) *Annals of Neurology* 69:940-953, 其由于所有目的通过提述并入)。在具体的实施方案中, 所述突变是 D409V 突变。

[0104] 本文公开的方法可用于治疗患有蛋白质病的哺乳动物。在一些实施方案中, 蛋白质病包含蛋白聚集体 (protein aggregates)。“蛋白聚集 (protein aggregation)”指细胞内或细胞外错误折叠蛋白聚集的生物学现象。这些蛋白聚集体可以是毒性的。在一些实施方案中, 所述蛋白聚集体包含选自下组的蛋白: 泛素、tau 和 α -突触核蛋白。泛素是在真核生物体几乎所有组织中发现的小蛋白。其是可与底物蛋白附着的 76 氨基酸蛋白。泛素的添加可导致蛋白降解、转录、翻译和蛋白定位的调节; 或蛋白活性 / 相互作用的调节。

[0105] 术语“tau”指发挥功能以稳定微管的 tau 蛋白。其在中枢神经系统的神经元中和星形胶质细胞及少突胶质细胞中大量存在。tau 蛋白的高度磷酸化 (tau 包含物、pTau) 可导致成对螺旋丝状体和直线丝状体的纠结自组装 (self-assembly of tangles of paired helical filaments and straight filaments), 其参与阿尔茨海默氏病和其他 tau 蛋白病的发病机制。本发明的一些方面涉及用于治疗或预防受试者中 tau 蛋白病的方法 (例如, 在患有 tau 蛋白病的哺乳动物中改善神经功能), 包括在哺乳动物中施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。tau 蛋白病是由 tau 的积累表征的神经退行性病症。典

型的 tau 蛋白病包括但不限于阿尔茨海默氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、帕金森氏病、与染色体 17 相关的帕金森综合征、Lytico-Bodig 疾病、纠缠主导型痴呆、嗜银颗粒病、神经节细胞胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅性脑病、结节性硬化症、哈勒沃登-施帕茨病、脂褐质沉积症、路易体痴呆、皮克病、皮质基底节变性、额颞痴呆和额颞叶变性。全部的六种 tau 异构体经常以高度磷酸化的状态存在于来自阿尔茨海默氏病脑的成对螺旋丝状体中。在其他神经退行性疾病中,已有报道一些 tau 异构体中富集了聚集体的沉积。当错误折叠时,这种本来非常可溶的蛋白可形成促成多种神经退行性疾病的极度不溶聚集体。

[0106] 在人体中,“ α -突触核蛋白”是由 SNCA 基因编码的蛋白。所述蛋白发现于神经组织中且主要表达在新皮质、海马体、黑质、丘脑和小脑中。除神经元,所述蛋白可在神经胶质细胞和黑色素细胞中发现。 α -突触核蛋白可聚集以在病理情况中形成不溶的原纤维,在一些实例中,所述病理情况的特征为路易体。在具体的实施方案中,蛋白质病是突触核蛋白病。突触核蛋白病非限制性的实例包括帕金森氏病、多系统萎缩和路易体痴呆。一些列为突触核蛋白病的疾病亦可具有 tau 蛋白的积累,且一些列为 tau 蛋白病的疾病还可具有 α -突触核蛋白的积累。

[0107] 在一些实施方案中,本文公开的方法记载的蛋白质病是选自下组的疾病:阿尔茨海默氏病、戈谢病、额颞痴呆、进行性核上性麻痹、帕金森综合征、帕金森氏病、Lytico-Bodig 病、路易体痴呆、纠缠主导型痴呆、拳击员痴呆、皮克病、皮质基底节变性、嗜银颗粒病、神经节细胞胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅性脑病、结节性硬化症、哈勒沃登-施帕茨病和脂褐质沉积症。

[0108] 本文描述的方法中使用的作用剂可以是在哺乳动物中增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。举例来说,所述作用剂可以是任何在哺乳动物中增加葡萄糖脑苷脂酶活性的小分子化合物、抗体、核酸分子、多肽或其生物等价物。

[0109] 一些方面,所述作用剂包含编码 GBA1 基因或其生物等价物(例如,编码催化葡萄糖脑苷脂裂解的多肽片段、类似物或其衍生物)的核酸。核酸的生物等价物可以是天然存在的多核苷酸等位基因变体或非天然存在的多核苷酸变体。在一些实施方案中,所述核酸可具有作为本文公开的 GBA1 多肽编码序列的等位基因变体的编码序列。如本领域已知,等位基因变体是具有举例来说一个或多个核苷酸的取代、缺失或添加的多核苷酸序列的可选形式,其基本上不改变编码多肽的功能。

[0110] 在实施方案中,所述 GBA1 的生物等价物是包含葡萄糖脑苷脂酶酶活所需最小序列的那种。在另一实施方案中,其生物等价物包含在高严格性条件下与本文描述的 GBA1 多核苷酸(例如,编码本文公开的 GBA1 氨基酸序列的多核苷酸)的补体杂交的核酸。在另一实施方案中,其生物等价物包含与本文描述的 GBA1 多核苷酸(例如,编码本文公开的 GBA1 氨基酸序列的多核苷酸)具有至少 80% 序列同一性,或可替换地至少 85% 序列同一性,或可替换地至少 90% 序列同一性,或可替换地至少 92% 序列同一性,或可替换地至少 95% 序列同一性,或可替换地至少 97% 序列同一性,或可替换地至少 98% 序列同一性的核酸。

[0111] 在实施方案中,核酸包含成熟 GBA1 多肽的编码序列或其生物等价物,其以相同阅读框融合于有助于例如从宿主细胞表达和分泌多肽的多核苷酸(例如,作为用于控制多肽从细胞转运的分泌序列发挥功能的前导序列)。具有前导序列的多肽是前蛋白

(preprotein),且由宿主细胞切割以生成成熟形式的多肽。多核苷酸还可编码为成熟蛋白加额外 5' 氨基酸残基的原蛋白 (proprotein)。具有原序列 (prosequence) 的成熟蛋白是原体蛋白且是无活性形式的蛋白。一旦切割了原序列,具有活性的成熟蛋白得以保留。

[0112] 在实施方案中,所述核酸包含允许举例来说编码多肽的检测或纯化的标记序列。这种标记为本领域熟知且典型的标记的概要可于 Michael R.Green and Joseph Sambrook,Molecular Cloning(4th ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012) 获得。典型的标记包括但不限于组氨酸标签;血凝素 (HA) 标签;钙调蛋白标签;FLAG 标签;Myc 标签;S 标签;SBP 标签;Softag1;Softag3;V5 标签;Xpress 标签;Isopeptag;SpyTag;生物素羧基载体蛋白 (BCCP) 标签;GST 标签;荧光蛋白标签如增强的绿色荧光蛋白 (EGFP)、红色荧光蛋白 (RFP)、绿色荧光蛋白 (GFP)、黄色荧光蛋白 (YFP) 等等、麦芽糖结合蛋白标签、Nus 标签、Strep 标签、硫氧还蛋白标签、TC 标签和 Ty 标签。

[0113] 本文描述的核酸可由本领域已知的任何适当方法产生。在实施方案中,所述核酸使用寡核苷酸合成仪由化学合成构建。在实施方案中,包含编码特定多肽的核苷酸序列的 DNA 寡聚物可以合成并随后连接。单独的寡核苷酸通常包含用于互补组装的 5' 或 3' 突出部分 (overhangs)。

[0114] 一旦组装,所述多核苷酸序列可以插入表达载体并任选地与适于蛋白在预期宿主中表达的表达控制序列可操作地连接。所述多核苷酸还可使用基于非载体的递送方法递送至细胞(例如,体内或体外)。参见,例如,Yuan,Non-Viral Gene Therapy(InTech 2011)。合适的组装可以由核苷酸测序、限制酶切定位、在合适宿主中生物活性多肽的表达等等进行确认。

[0115] 核酸可由本领域的技术人员公知的多种机制递送至细胞。病毒构建体可通过病毒在合适的宿主细胞中的产生进行递送。随后从所述宿主细胞收获病毒并与靶细胞接触。可将能够表达感兴趣的基因的病毒和非病毒载体经由 DNA/ 脂质体复合物、胶束和靶向的病毒蛋白-DNA 复合物递送至靶向的细胞。还包含靶向的抗体或其片段的脂质体可用于本发明的方法中。除将多核苷酸递送至细胞或细胞群,本文描述的蛋白向细胞或细胞群的直接引进可由蛋白转染的非限制性技术完成,可替换地,能够增强本发明的蛋白表达和/或促进其活性的培养条件是其非限制性的技术。

[0116] 递送编码本发明基因的载体的其他方法包括但不限于磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖转染、电穿孔、显微注射、原生质体融合或脂质体介导的转染。用本发明的载体转染的宿主细胞可包括(但不限于)大肠杆菌或其他细菌、酵母、真菌、昆虫细胞(举例来说,使用杆状病毒载体用于在 SF9 昆虫细胞中表达)或源自小鼠、人或其他动物的细胞(例如,哺乳动物)。还使用了由克隆 DNA 编码的蛋白、融合物、多肽片段或突变体的体外表达。分子生物学领域的技术人员将理解各种表达系统和纯化系统可用以产生重组蛋白及其片段。

[0117] 一些方面,所述作用剂是包含能够在体外、体内或离体被递送至靶细胞的异源多核苷酸的非病毒载体。该异源多核苷酸可包含感兴趣的序列并可与一种或多种调节元件可操作地连接,并可控制感兴趣的核酸序列的转录。如本文使用的载体不需要能在最终的靶细胞或受试者中复制。术语载体可包括表达载体和克隆载体。

[0118] 调节编码 GBA1 基因或其等价物的核酸表达的启动子可以是组成型的、诱导型的或组织特异性的启动子。在一些实施方案中,构建启动子时可使用诱导型系统。诱导型系

统的非限制性实例包括通过四环素、蜕皮激素、通过雌激素、孕激素、二聚化的化学诱导剂和异丙基- β -D1 硫代半乳糖苷 (EPTG) 的调节。

[0119] 可用于本公开的启动子可以是组成型或诱导型的。启动子的一些实例包括 SV40 早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒 LTR 启动子、腺病毒主要晚期启动子、单纯疱疹病毒启动子和 CMV 启动子。

[0120] 一些方面,作用剂是包含编码感兴趣基因(例如,GBA1 或其生物等价物)的核酸的病毒载体。病毒基因转移是用于哺乳动物中基因的治疗性基因转移的有效方法。适于在本发明中使用的病毒载体为本领域熟知。在实施方案中,病毒载体源自或基于向神经病毒(neurotropic virus)(或向神经病毒的组合)。向神经病毒的实例包括但不限于腺病毒、腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒、逆转录病毒和慢病毒。用于产生和使用这种病毒载体的方法为本领域熟知且描述于 Carol Shoskes Reiss, Neurotropic Viral Infections(Cambridge University Press, 2008); Michael G. Kaplitt and Matthew J. During, Gene Therapy of the Central Nervous System: From Bench to Bedside(Gulf Professional Publishing 2006); Jean-Michel H. Vos, Viruses in Human Gene Therapy(Springer 1995); Andres M. Lozano et al., Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery(Springer 2009); 和 Michael R. Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning(4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012), 每一篇以其全文通过提述并入。

[0121] 在实施方案中,所述病毒载体来自或基于野生型病毒。其实例包括但不限于人类免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、猿免疫缺陷病毒(SIV)和猫免疫缺陷病毒(FIV)。可替换地,可考虑其他逆转录病毒如鼠类白血病病毒(MLV)用作载体骨架的基础。显而易见的是根据本发明的病毒载体不需要受限于特定病毒的组件。该病毒载体可包含源自两种或更多种不同病毒的组件,且还可包含合成的组件。可对载体组件进行操作以获得理想的特性,如靶细胞特异性。

[0122] 美国专利号 6,924,123 公开了某些逆转录病毒序列促进向靶细胞基因组内的整合。该专利教导各逆转录病毒基因组包含称为 gag、pol 和 env 的编码病毒粒(virion)蛋白和酶的基因。这些基因的两个末端的侧翼是称为长末端重复序列(LTR)的区。LTR 负责原病毒的整合和转录。其还充当增强子-启动子序列。换言之,LTR 可控制病毒基因的表达。逆转录病毒 RNA 的壳体化借助位于病毒基因组 5'末端的 psi 序列发生。LTR 本身是可分成称为 U3、R 和 U5 的三个元件的相同序列。U3 源自 RNA 的 3'末端特异性序列。R 源自 RNA 两末端重复的序列,且 U5 源自 RNA 的 5'末端特异性序列。三种元件的大小可在不同逆转录病毒中具有相当大的变化。对于病毒基因组,多聚(A)添加(末端)位点位于右手侧 LTR 的 R 和 U5 之间的边界。U3 包含原病毒大多数的转录控制元件,包括启动子和对细胞应答的多重增强子序列且在一些情况中,包括病毒转录激活蛋白。

[0123] 关于结构基因 gag、pol 和 env 本身,gag 编码病毒的内部结构蛋白。Gag 蛋白由蛋白水解加工成成熟蛋白 MA(基质)、CA(壳体)和 NC(核壳体)。Pol 基因编码逆转录酶(RT),其包含介导基因组复制的 DNA 聚合酶、关联的 RNase H 和整合酶(IN)。

[0124] 对于病毒载体颗粒的产生,在宿主细胞中,载体 RNA 基因组可从编码它的 DNA 构建体表达。不由载体基因组编码的颗粒组件可以反式通过表达于宿主细胞中的额外的核酸序

列提供（“包装系统”，通常包括 gag/pol 和 env 基因中的任一种或两种）。病毒载体颗粒产生所需的序列组合可由瞬时转染转入宿主细胞，或其可整合入宿主细胞基因组或其可以混合的方式提供。涉及的技术为本领域已知。

[0125] 在实施方案中，所述病毒源自或基于腺病毒。腺病毒是相对而言表征充分的同质病毒组，包括超过 50 种血清型。参见，举例来说，国际 PCT 申请号 WO 95/27071。腺病毒较易生长且不需整合入宿主细胞基因组。还构建了重组腺病毒来源的载体，例如，降低野生型病毒重组和生成可能性的那些。参见，例如，国际 PCT 申请号 WO 95/00655 和 WO 95/11984。

[0126] 在实施方案中，所述病毒载体来源于或基于腺相关病毒（AAV）。在重组 AAV（rAAV）系统中，将编码感兴趣蛋白（例如，GBA1 蛋白）的核酸序列包装入 AAV 病毒颗粒中。该重组病毒基因组可包括任何元件以建立蛋白的表达，举例来说，启动子、转基因（例如，GBA1 转基因）、ITR、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择标记、内含子、多聚 A 信号和 / 或复制起点。

[0127] 一些方面，本发明的重组 AAV 颗粒可包含含有编码旁侧为一个或两个 ITR 的 GBA1 序列的核酸。所述核酸包被于 AAV 颗粒中。AAV 颗粒还包含壳体蛋白。在一些实施方案中，所述核酸包含在转录方向上与组件可操作地连接的感兴趣蛋白编码序列（例如，编码 GBA1 蛋白的转基因）、包括转录起始和终止序列的控制序列，由此形成表达盒。表达盒的 5' 和 3' 末端侧翼为至少一个功能性 AAV ITR 序列。“功能性 AAV ITR 序列”意为功能目的在于保全（rescue）、复制和包装 AAV 病毒粒的 ITR 序列。参见 Davidson 等 (2000) PNAS 97:3428-32；Passini 等 (2003) J. Virol. 77:7034-40；和 Pechan 等 (2009) Gene Ther. 16:10-16，上述所有在本文都以其全文通过提述并入。对于实践本发明的一些方面，所述重组载体包含至少全部用于壳体化和用于由 rAAV 感染的物理结构必须的 AAV 序列。AAV ITR 在本发明载体中的用途不需具有野生型核苷酸序列（例如，如 Kotin Hum. Gene Ther. (1994) 5:793-801）中所述，而可由核苷酸的插入、缺失或取代改变，或所述 AAV ITR 可源自数种 AAV 血清型中的任一种。

[0128] 已知多于 40 种的 AAV 血清型，且新的血清型和存在的血清型的变体被持续鉴定出来。参见 Gao 等 (2002) PNAS 99:11854-6；Gao 等 (2003) PNAS 100:6081-6；和 Bossis 等 (2003) J. Virol. 77:6799-810。任何 AAV 血清型的使用都应认为在本发明的保护范围之内。rAAV 载体可以是源自任何 AAV 血清型的载体，包括但不限于 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh. 8、AAVrh. 10、AAV11 或 AAV12 等等。AAV 中的核酸可包含 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh. 8、AAVrh. 10、AAV11、AAV12 等等的 ITR，且 rAAV 颗粒可包含 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh. 8、AAVrh. 10、AAV11、AAV12 的壳体蛋白。rAAV 颗粒还可包含来自源于进化枝 A-F 的任何 AAV 血清型的 ITR 或壳体蛋白 (Gao et al. (2004) J. Virol. 78(12):6381)。

[0129] 不同的 AAV 血清型可用于优化特定靶细胞的转导，或以在特定的靶组织（例如，疾病组织）内靶向特定的细胞类型。rAAV 颗粒可包含相同血清型或混合血清型的病毒蛋白和病毒核酸（即，假型 AAV）。假型 AAV 载体是含有一种 AAV 血清型的反向末端重复序列（ITR）和第二种 AAV 血清型的壳体的那些。举例来说，rAAV 颗粒可包含 AAV1 壳体蛋白和至少一种 AAV2 ITR，或其可包含 AAV2 壳体蛋白和至少一种 AAV1 ITR。在另一实例中，rAAV 可包含来自 AAV1 和至少一种额外的 AAV 血清型两者的壳体蛋白，且进一步包含至少一种 AAV2 ITR。本

文提供任何用于 rAAV 颗粒产生的 AAV 血清型的任何组合,正如每种组合都已在本文明确表述。

[0130] 本发明的 AAV 颗粒可以是包含重组自身互补基因组的病毒颗粒。具有自身互补基因组的 AAV 病毒颗粒和使用自身互补 AAV 基因组的方法描述于美国专利号 6,596,535 ; 7,125,717 ;7,765,583 ;7,785,888 ;7,790,154 ;7,846,729 ;8,093,054 和 8,361,457 ; 和 Wang Z. 等 (2003) Gene Ther 10:2105-2111,其每一篇在本文以其全文通过提述并入。包含自身互补基因组的 rAAV 凭借其部分互补序列的优势将迅速形成双链 DNA 分子(例如,转基因的互补编码和 / 或非编码链)。在实施方案中,本发明提供包含 AAV 基因组的 AAV 病毒颗粒,其中所述 rAAV 基因组包含第一异源多核苷酸序列(例如,GBA1 编码链)和第二异源多核苷酸序列(例如,GBA1 非编码或反义链),其中所述第一异源多核苷酸序列可与第二多核苷酸序列沿其长度的一些或大部分 / 全长形成链内碱基对。在实施方案中,所述第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列由促进链内碱基配对的序列连接(例如,发夹 DNA 结构)。在实施方案中,所述第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列由突变的 ITR 连接(例如,右侧 ITR)。在一些相关的实施方案中,所述突变的 ITR 包含含有末端解析序列的 D 区的缺失。其结果是在复制 AAV 病毒基因组时,rep 蛋白将不在突变的 ITR 处裂解病毒基因组,且由此在 5' 至 3' 顺序包含下列的重组病毒基因组将包装进病毒壳体:AAV ITR、包括调节序列的第一异源多核苷酸序列、突变的 AAV ITR、与第一异源多核苷酸方向相反的第二异源多核苷酸和第三 AAV ITR。

[0131] 使用 AAV 载体以产生 rAAV 颗粒的方法为本领域熟知。参见,例如,美国专利号 6,566,118 ;6,989,264 和 6,995,006。在本发明的实践中,用于产生 rAAV 颗粒的宿主细胞包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、微生物和酵母。宿主细胞还可以是 AAV rep 和 cap 基因稳定保持在所述宿主细胞中的包装细胞,或 AAV 载体基因组稳定保持其中的生产细胞(producer cell)。典型的包装和生产细胞源自 293、A549 或 HeLa 细胞。使用本领域已知的标准技术纯化和配制 AAV 载体。

[0132] 纯化 rAAV 颗粒的一些方面,如本文使用的术语“纯化”包括 rAAV 颗粒的制备,其中所述 rAAV 颗粒不含至少一些可能存在于 rAAV 颗粒天然出现处或最初从其中制备 rAAV 颗粒处的其他组件。因此,举例来说,分离的 rAAV 颗粒可使用纯化技术制备以从来源混合物如细胞裂解液或生产培养上清对其富集。富集可以多种方式测定,如举例来说,由存在于溶液中的抗 DNase 颗粒(DRPs)或基因组拷贝(gc)的比例,或由感染力,或相对于存在于来源混合物的第二潜在干扰物质进行测定,所述干扰物质如污染物,包括生产培养污染物或加工过程中污染物,包括辅助病毒、培养基组分等等。在实施方案中,所述病毒在哺乳动物中感染神经元细胞。术语“神经元细胞”或“神经元”指组成中枢和外周神经系统的电兴奋细胞。神经元可以是在动物机体内的细胞或动物机体外培养的培养细胞。术语“神经元细胞”或“神经元”还指已建立或原代组织培养的细胞系,其衍生于来自哺乳动物的神经细胞或为分化成神经元而制备的组织培养细胞系。“神经元”或“神经元细胞”还指已将其修饰来在染色体外或染色体表达特定的蛋白的任何上述细胞类型,还指转化神经元如大脑内的神经母细胞瘤细胞和支持细胞如神经胶质细胞。神经元细胞的感染可由多种本领域已知的机制完成。在一个实施方案中,所述病毒局部施用至 CNS。在相关的实施方案中,所述病毒由海马体内注射或可替换地由鞘内注射施用。

[0133] 一些方面,所述作用剂包含 GBA1 蛋白或其生物等价物(例如,其催化葡萄糖脑苷脂裂解的片段、类似物或衍生物)。本领域已知 GBA1 蛋白且对其进行了表征,且本文已提供了典型序列。一些实施方案中,所述作用剂包含具有葡萄糖脑苷脂酶活性的多肽且与本文公开的 GBA1 多肽具有至少 80%序列同一性、至少 85%序列同一性、至少 90%序列同一性、至少 91%序列同一性、至少 92%序列同一性、至少 93%序列同一性、至少 94%序列同一性、至少 95%序列同一性、至少 96%序列同一性、至少 97%序列同一性、至少 98%序列同一性或至少 99%序列同一性。生物等价物可以是保持理想葡萄糖脑苷脂酶活性的多肽(例如,野生型葡萄糖脑苷脂酶活性)。

[0134] 本文描述的多肽可由本领域已知的任何适当方法产生。在实施方案中,使用了直接的蛋白合成方法。在其他实施方案中,可使用重组表达载体扩增和表达编码感兴趣蛋白的 DNA(例如,GBA1 蛋白或其生物等价物)。参见 Michael R.Green and Joseph Sambrook, *Molecular Cloning*(4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012)。重组表达载体是可复制的 DNA 构建体,所述构建体具有合成或 cDNA 衍生的编码感兴趣蛋白的 DNA 片段,其与来源于哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适转录或翻译调节元件可操作地连接。如下文详细所述,转录单位通常包含由下列组成的装配体:(1) 基因元件或在基因表达中具有调节作用的元件,举例来说转录启动子或增强子,(2) 转录成为 mRNA 并翻译成为蛋白的结构或编码序列,和 (3) 合适的转录和翻译起始和终止序列。这样的调节元件可包括操纵子序列以控制转录。在宿主中的复制能力通常由复制起点赋予,且可额外并入促进转化体识别的选择基因。当彼此功能相关时 DNA 区可以可操作地连接。举例来说,如果作为参与多肽分泌的前体表达,用于信号肽的 DNA(分泌前导序列)可操作地与用于多肽的 DNA 连接;如果控制序列转录,启动子可操作地与编码序列连接;或如果定位用以允许翻译,核糖体结合位点可操作地与编码序列连接。基本上,可操作地连接意为邻接,且在分泌前导序列的情况下,意为邻接且在阅读框中。目的在于在酵母表达系统中使用的结构元件包括使翻译蛋白能够由宿主细胞胞外分泌的前导序列。可替换地,当重组蛋白在无前导或转运序列表达时,其可包括 N 末端甲硫氨酸残基。该残基随后可任选地从表达的重组蛋白裂解以提供最终产物。

[0135] 表达控制序列和表达载体的选择将依赖于宿主的选择。可采用各种表达宿主/载体组合。对于真核宿主有用的表达载体包括举例来说,包含来自 SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。对于细菌宿主有用的表达载体包括已知的细菌质粒,如来自大肠杆菌的载体,包括 pCR 1、pBR322、pMB9 及其衍生物、更广泛地宿主范围的质粒如 M13 和丝状单链 DNA 噬菌体。

[0136] 用于表达多肽的合适的宿主细胞包括在适当启动子控制下的原核生物、酵母、昆虫或更高等的真核生物。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,举例来说大肠杆菌或细菌。高等真核生物包括哺乳动物来源的已建立的细胞系。也可采用无细胞的翻译系统。用于与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的合适的克隆和表达载体为本领域熟知。参见 Pouwels 等, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (Elsevier Science 1985)。

[0137] 还可有利地采用多种哺乳动物或昆虫细胞培养系统以表达重组蛋白。可在哺乳动物细胞中进行重组蛋白的表达,因为这样的蛋白通常正确折叠、适当修饰并具有完整的功

能。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括由 Gluzman (1981) Cell 23:175 描述的猴肾细胞的 COS-7 细胞系,和其他能够表达合适载体的细胞系包括举例来说 L 细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢 (CHO)、HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体可包含非转录元件如复制起点、与将表达的基因连接的合适的启动子和增强子和其他 5' 或 3' 侧翼非转录序列,和 5' 或 3' 非翻译序列如必须的核糖体结合位点、多聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点及转录终止序列。用于异源蛋白在昆虫细胞中产生的杆状病毒系统由 Luckow and Summers (1988) Bio/Technology 6:47 进行了综述。

[0138] 由转化的宿主产生的蛋白可根据任何合适的方法纯化。这些标准的方法包括层析 (例如,离子交换、亲和和尺寸柱层析等等)、离心、差别溶解度或用于蛋白纯化的任何其他标准技术。亲和和标签如六聚组氨酸、麦芽糖结合结构域、流感包衣序列、谷胱甘肽-S-转移酶等等可附着至蛋白,以允许通过经过合适亲和柱进行纯化。分离的蛋白还可使用如蛋白水解、核磁共振和 X 射线晶体学这些技术进行物理表征。举例来说,来自分泌重组蛋白至培养介质的系统的上清可首先使用可商业获得的蛋白浓缩滤器 (举例来说,Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元) 进行浓缩。浓缩步骤后,将浓缩物应用于合适的纯化基质。可替换地,采用阴离子交换树脂,举例来说,具有二乙基氨基乙基 (DEAE) 侧基的基质或底物。基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或其他常应用于蛋白质纯化的类型。可替换地,可采用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换剂包括多种包含磺丙基或羧甲基基团的不溶基质。最终,可采用应用疏水 RP-HPLC 介质 (例如,具有甲基或其他脂肪侧基的硅胶) 的一个或多个反相高效液相层析 (RP-HPLC) 步骤。也可采用一些或全部前述纯化步骤的各种组合以提供匀质的重组蛋白。在细菌培养中产生的重组蛋白可以,举例来说通过从细胞沉淀的最初提取,随后进行一次或多次浓缩、盐析、水性离子交换或尺寸排阻层析步骤进行分离。可采用高效液相层析 (HPLC) 用于最终的纯化步骤。在重组蛋白的表达中采用的微生物细胞可由任何便利的方法破坏,包括冻融循环、超声、机械破坏或细胞裂解剂的使用。

[0139] 一些方面,所述作用剂包含特异性结合 GBA1 和增强 GBA1 活性的抗体或其片段。

[0140] 术语“抗体”涵盖全长抗体以及这些抗体的抗原结合片段、变体、类似物或其衍生物,例如,天然存在的抗体或免疫球蛋白分子或工程化的抗体分子或以与抗体分子相似的方式结合抗原的片段。

[0141] 抗体至少包含重链的可变结构域,且通常至少包含重链和轻链的可变结构域。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构已众所周知。参见,例如,Harlow 等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988), 其在此处以其全文通过提述并入。

[0142] 本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包括但不限于,人、人源化的、灵长类化的 (primatized) 或嵌合的抗体、单链抗体、表位结合片段,例如, Fab、Fab' 和 F(ab')₂、Fd、Fvs、单链 Fvs (scFv)、单链抗体、二硫键连接的 Fvs (sdFv)、包含 VL 或 VH 结构域的片段、由 Fab 表达文库产生的片段和抗独特型 (抗-Id) 抗体。ScFv 分子为本领域已知且描述于举例来说美国专利 5,892,019。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可以是任何类型 (例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、种类 (例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或亚型的免疫球蛋白分子。

[0143] 抗原结合分子,例如抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物可以根据抗原的部分

或表位例如其识别或特异性结合的靶多肽进行描述或详细说明。特异性地与抗体的抗原结合结构域相互作用的靶多肽的部分是“表位”或“抗原决定区”。靶多肽可以包含单表位,但通常包含至少两个表位,且取决于抗原的大小、构象和类型可包括任何数目的表位。此外,应该注意的是在靶多肽上的“表位”可以是或包括非多肽元件,例如表位可包括碳水化合物侧链。

[0144] 抗体可以是多克隆或单克隆抗体。

[0145] 多克隆抗体可以由任何已知的方法制备。多克隆抗体由通过相关抗原(纯化的肽片段、全长的重组蛋白、融合蛋白等等)的多次皮下或腹膜内注射的免疫动物(例如,兔、大鼠、小鼠、驴等等)产生,所述抗原任选地与钥孔血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白等等缀合,在无菌盐水中稀释并与佐剂(例如,完全或不完全弗氏佐剂)组合以形成稳定乳剂。随后从如此免疫的动物的血液、腹水等等回收多克隆抗体。凝结收集的血液,并倾倒血清,通过离心澄清,并用于抗体效价实验。多克隆抗体可从血清或腹水根据本领域标准的方法纯化,包括亲和层析、离子交换层析、凝胶电泳、透析等等。

[0146] 单克隆抗体可使用杂交瘤细胞方法制备,如那些由 Kohler and Milstein(1975) Nature 256:495 所述,其在此处以其全文通过提述并入。使用杂交瘤方法,将小鼠、仓鼠或其他合适的宿主动物如上述免疫以引发通过淋巴细胞产生的特异地与免疫抗原结合的抗体。淋巴细胞还可在体外免疫。免疫后,分离淋巴细胞并使用举例来说聚乙二醇与合适的骨髓瘤细胞系融合以形成杂交瘤细胞,随后可将其从未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞挑出。如由免疫沉淀、免疫印迹,或由体外结合实验(例如,放射免疫实验(RIA)和酶联免疫吸附实验(ELISA))所判断的,针对所选抗原特异性地产生单克隆抗体的杂交瘤随后可使用标准方法(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, 其在此处以其全文通过提述并入)在体外培养中或在体内如动物腹水肿瘤中进行增殖。随后可如上文对于多克隆抗体的描述,从培养基或腹水纯化该单克隆抗体。

[0147] 可替换地,单克隆抗体还可如美国专利 4,816,567 所述使用重组 DNA 方法生成,其在此处以其全文通过提述并入。编码单克隆抗体的多核苷酸分离自成熟的 B 细胞或杂交瘤细胞,如使用特异性扩增编码抗体重和轻链的基因的寡聚核苷酸引物通过 RT-PCR 分离,并使用常规方法确定其序列。编码重和轻链的分离的多核苷酸随后克隆入合适的表达载体,当其转染入本来并不产生免疫球蛋白的宿主细胞如大肠杆菌细胞、类人猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤时,由该宿主细胞产生单克隆抗体。此外,理想物种的重组单克隆抗体或其片段可如 McCafferty 等(1990) Nature 348:552-554; Clackson 等(1991) Nature 352:624-628; 和 Marks 等(1991) J. Mol. Biol. 222:581-597 描述从表达理想物种 CDR 的噬菌体展示文库分离,其每一篇在本文以其全文通过提述并入。

[0148] 编码单克隆抗体的多核苷酸可使用重组 DNA 技术以多种不同的方式进一步修饰以生成可替换的抗体。在一些实施方案中,举例来说,小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定结构域可替换为:1) 举例来说,人抗体的那些区,以生成嵌合抗体,或 2) 非免疫球蛋白多肽,以生成融合抗体。在一些实施方案中,所述恒定区被截短或去除以生成单克隆抗体的理想抗体片段。可变区的定点或高密度诱变可用于优化单克隆抗体的特异性、亲和性等等。

[0149] 因此,在实施方案中,所述抗体是人源化的抗体。在实施方案中,所述抗体是嵌合抗体。

[0150] 人抗体可使用多种本领域已知的技术直接制备。可生成体外免疫或分离自产生针对靶抗原的抗体的免疫个体的永生人 B 淋巴细胞（参见，例如，Cole 等，*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, p. 77 (Alan R. Liss 1985)；Boemer 等 (1991) *J. Immunol.* 147 :86-95；和美国专利 5,750,373，其每一篇在此处以其全文通过提述并入）。此外，人抗体可选自噬菌体文库，其中所述噬菌体文库表达人抗体，举例来说，如 (1996) *Nat. Biotech.* 14:309-314, Sheets 等 (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6157-6162, Hoogenboom and Winter (1991) *J. Mol. Biol.* 227:381, and Marks 等 (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581 所述，每一篇在此处以其全文通过提述并入。用于生成和使用抗体噬菌体文库的技术也描述于美国专利号 5,969,108、6,172,197、5,885,793、6,521,404；6,544,731；6,555,313；6,582,915；6,593,081；6,300,064；6,653,068；6,706,484；和 7,264,963；和 Rothe 等 (2007) *J. Mol. Bio.* 376:1182-1200，每一篇以其全文通过提述并入。亲和性成熟策略，如链改组 (chain shuffling) (Marks 等 (1992) *Bio/Technology* 10:779-783，在此处以其全文通过提述并入) 为本领域已知且可予以采用以生成高亲和性的人抗体。

[0151] 人源化抗体可在包含人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中生成，其能在无内源免疫球蛋白产生情况下在免疫时产生人抗体的所有组成部分。该手段描述于美国专利 5,545,807；5,545,806；5,569,825；5,625,126；5,633,425 和 5,661,016，其每一篇以其全文通过提述并入。

[0152] 本发明还涵盖双特异性抗体。双特异性抗体是能够特异性识别和结合至少两种不同表位的抗体。不同的表位可在相同分子（例如多核苷酸或多肽）内或在不同分子上两种方式。双特异性抗体可以是完整抗体或抗体片段。

[0153] 特别是在抗体片段的情况中，修饰抗体以增加其血清半衰期可能令人特别满意。举例来说，其可通过将补救受体结合表位由抗体片段中合适区的突变并入抗体片段，或通过表位并入肽标签，随后在任一末端或在中间融合至抗体片段实现（例如，通过 DNA 或肽合成）。

[0154] 异源接合抗体也在本发明的保护范围之内。异源接合抗体由两种共价接合的抗体组成。举例来说，已提出这种抗体可使免疫细胞靶向不需要的细胞（美国专利号 4,676,980，其在此处以其全文通过提述并入）。应该理解的是抗体可以在体外使用合成蛋白化学中已知的方法制备，包括涉及交联作用剂的那些。举例来说，可使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键构建免疫毒素。用于该目的合适试剂的实例包括亚胺基硫醇盐和 4-巯基丁酰亚胺甲酯 (methyl-4-mercaptobutyrimidate)。

[0155] 本发明进一步囊括与本文所述的嵌合、人源化和人的抗体或其抗体片段基本上同源的变体和等价物。这些可包含，举例来说，保守的取代突变，例如，通过相似氨基酸取代一个或多个氨基酸。举例来说，保守取代指将氨基酸用同一总类别中的另一氨基酸的取代，如举例来说，一个酸性氨基酸用另一酸性氨基酸、一个碱性氨基酸用另一碱性氨基酸或一个中性氨基酸由另一中性氨基酸的取代。通过保守氨基酸取代的目的在为领域熟知。

[0156] 一些方面，作用剂包含小分子化合物。在实施方案中，所述小分子化合物是葡萄糖脑苷脂酶活性的激活剂。参见，例如，国际专利公开号 W02013/148333。在一些实施方案中，“小分子”是具有低分子量 (MW) 的能够与感兴趣的蛋白结合由此改变蛋白功能的分子。在

一些实施方案中,小分子的MW不多于1000。用于筛选能够改变蛋白功能的小分子的方法为本领域已知。举例来说,用于在细胞中检测小分子蛋白相互作用的小型矩阵测试由 You 等 (1997) Chem. Biol. 4:961-968 讨论。

[0157] 在实施方案中,作用剂是分子伴侣。如本文使用的术语“分子伴侣”指特异性地与蛋白结合且具有一种或多种下列效果的分子(如小分子、多肽、核酸等等):恢复或增强至少部分野生型的功能和/或蛋白活性;增强蛋白稳定分子构象的形成;诱导蛋白从ER运输至另一细胞位置,例如,天然细胞位置,由此预防ER相关的蛋白降解;和/或预防错误折叠蛋白的聚集。在相关的实施方案中,所述分子伴侣恢复或增强至少部分野生型的功能和/或蛋白的活性。参见,例如,Patnaik 等 (2012) J. Med. Chem. 55:5734-5748。在其他实施方案中,任选地所述分子伴侣与增加GBA1活性的作用剂组合(例如,本文所述的作用剂,包括但不限于GBA1或其等价物或编码GBA1或其等价物的核酸)增加细胞残留活性(例如,来自患有蛋白质病、突触核蛋白病、tau蛋白病等等的细胞)。参见,例如,国际专利申请号WO 2012/177997;和Chang 等 (2006) FEBS J. 273:4082-4092。

[0158] 在一些方面,本发明涉及施用至少两种作用剂(例如,包含增加GBA1活性的作用剂联合另一作用剂的施用的组合疗法)。

[0159] 在一些实施方案中,本文描述的作用剂与另一有益于治疗与蛋白质病、突触核蛋白病、tau蛋白病等相关的症状的治疗作用剂组合施用。在实施方案中,本文描述的作用剂是核酸(例如,编码GBA1的核酸或其等价物)。在实施方案中,本文描述的作用剂是多肽(例如,GBA1或其等价物)。在实施方案中,本文描述的作用剂是小分子(例如,GBA1的激活剂)。在实施方案中,本文描述的作用剂是抗体或其片段(例如,与GBA1特异性结合的抗体或其片段)。在实施方案中,本文描述的作用剂是分子伴侣(例如,GBA1的分子伴侣)。

[0160] 在一些实施方案中,本发明涉及施用本文描述的至少两种作用剂。

[0161] 短语“组合疗法”囊括升高GBA1活性的作用剂和第二治疗作用剂的施用,作为意在提供来自这些治疗作用剂共同作用的有益效果的特定治疗方案的一部分。所述组合的有益效果包括但不限于治疗作用剂的组合引起的药代动力学或药效学共同作用。这些组合治疗作用剂的施用通常在限定的时间段实施(取决于选择的组合经常可以是数分钟、数小时、数天或数周)。“组合疗法”通常不意图涵盖施用作为独立的单一治疗方案的一部分的这些治疗剂中的两种或更多种顺便或随意地得到本发明的组合。“组合疗法”意在囊括以顺序的方式实施这些作用剂,也就是说,其中每种治疗作用剂在不同时间施用,以及这些治疗作用剂或至少其中两种治疗作用剂以基本上同时的方式的施用。基本上同时施用可以举例来说通过向受试者施用具有固定比例的每种治疗作用剂的单胶囊或用于每种治疗作用剂的单胶囊的多重形式来实现。每种治疗作用剂的顺序或基本上同时施用可由任何合适的途径产生,包括但不限于,口服途径、静脉内途径、肌肉途径和通过粘膜组织的直接吸收(例如,经鼻、口腔、阴道和直肠)。所述治疗作用剂可通过相同的途径或不同的途径施用。举例来说,特定组合的一种组分可以通过静脉注射施用而组合的其他组分可以口服施用。组分可以任何治疗上有效的顺序施用。短语“组合”囊括化合物的组或作为组合疗法的一部分有效的非药物疗法。

[0162] 在任何上述的方面和实施方案中,所述作用剂可进一步包含可检测的部分。可检测的部分为本领域熟知且可以通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、物理或化学的方

式检测。典型的部分包括但不限于酶、荧光分子、颗粒标记、电子密度试剂、放射性标记、生物素、洋地黄毒苷或半抗原或已制成可检测的蛋白。

[0163] 在任何上述的方面和实施方案中,所述作用剂可以包含额外的通常并非为作用剂一部分的化学和 / 或生物部分。那些衍生的部分可改善递送、溶解度、生物半衰期、作用剂的吸收等等。所述部分还可降低或消除任何所述作用剂的预期副作用等等。那些部分的概述可在 Remington's Pharmaceutical Sciences (20th ed., Mack Publishing Co. 2000) 中发现 (还参见 Pathan 等 (2009) Recent Patents on Drug Delivery & Formulation 3:71-89, 其在此处以其全文通过提述并入)。

[0164] 所述作用剂可共价或非共价与部分连接。在实施方案中,作用剂与所述部分共价连接。在相关的实施方案中,所述部分的共价连接基在多核苷酸 / 多肽的 N 末端。在相关的实施方案中,所述部分的共价连接基在多核苷酸 / 多肽的 C 末端。

[0165] 在上述实施方案的任何实例中,所述作用剂可以是在哺乳动物中增加葡萄糖脑苷脂酶活性超过基线水平的一种作用剂。在一些实施方案中,所述葡萄糖脑苷脂酶活性增加超过基线水平至少约 1.5 倍、约 2.0 倍、约 2.5 倍、约 3 倍、约 3.5 倍、约 4.0 倍、约 4.5 倍、约 5 倍或更多。在一些实施方案中,所述葡萄糖脑苷脂酶活性在神经元中增加超过基线水平至少约 1.5 倍、约 2.0 倍、约 2.5 倍、约 3 倍、约 3.5 倍、约 4.0 倍、约 4.5 倍、约 5 倍或更多。葡萄糖脑苷脂酶活性的基线水平可以通过本领域已知和本文描述的方法轻而易举测定。在一些实例中,所述基线水平是由不患有蛋白质病或不具有 GBA1 突变的个体平均展示的水平。

[0166] 另一方面涉及在患有蛋白质病的哺乳动物中用于降低 α -突触核蛋白的方法,包括施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。 α -突触核蛋白可在细胞的不同部分找到,如膜中、溶于胞浆中和不溶于胞浆中。在一些实施方案中,本文描述的方法在降低 α -突触核蛋白的特定级分上有效。在一个实施方案中,胞浆可溶 α -突触核蛋白得以降低。在另一实施方案中,膜相关 α -突触核蛋白得以降低。在实施方案中, α -突触核蛋白得以降低至少约 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%。在一个实施方案中,所述 α -突触核蛋白得以降低至与不患有特征为 α -突触核蛋白增加的蛋白质病的哺乳动物相比无显著差异的水平。

[0167] 另一方面涉及用于在患有蛋白质病的哺乳动物中降低 tau 的方法,包括施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。tau 可在细胞的不同部分发现如在膜中、溶于胞浆中和不溶于胞浆中。在一些实施方案中,本文描述的方法在降低 tau 的特定级分中有效。在一个实施方案中,胞浆可溶的 tau 得以降低。在另一实施方案中,膜相关 tau 得以降低。在实施方案中,tau 得以降低至少约 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%。在一个实施方案中,所述 tau 得以降低至与不患有特征为 tau 增加的蛋白质病的哺乳动物相比无显著差异的水平。

[0168] 另一方面涉及用于在患有蛋白质病的哺乳动物中降低毒性脂质 (例如葡萄糖鞘

氨醇)的方法,包括施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。在一个实施方案中,所述毒性脂质是葡萄糖鞘氨醇。在进一步的实施方案中,所述葡萄糖鞘氨醇得以降低至少约 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%。在一个实施方案中,所述葡萄糖鞘氨醇得以降低至与不患有特征为葡萄糖鞘氨醇增加的蛋白质病的哺乳动物相比无显著差异的水平。

[0169] 另一方面涉及用于抑制蛋白聚集体在患有蛋白质病的哺乳动物中积累的方法,包括施用治疗上有效量的增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂。在相关的实施方案中,所述蛋白聚集体选自下组:泛素、tau 和 α -突触核蛋白。

[0170] 组合物和试剂盒

[0171] 本发明还提供了包含本文描述的任一种或多种用于在有需要的哺乳动物中增加葡萄糖脑苷脂酶活性的作用剂的组合物或试剂盒。这些组合物和试剂盒在治疗上可如本文所述使用并与其他已知用于蛋白质病的疗法组合使用。举例来说,用于蛋白质病的常用治疗包括左旋多巴 (Levodopa)、多巴胺激动剂 (dopamine agonist)、MAO-B 抑制剂、金刚烷胺 (amantadine)、抗胆碱能药、手术、康复和饮食管理。对于阿尔茨海默氏症的常用疗法包括举例来说乙酰胆碱酯酶抑制剂如他克林 (tacrine)、利凡斯的明 (rivastigmine)、加兰他敏 (galantamine)、多奈哌齐 (donepezil)、美金刚 (memantine)。用于蛋白质病的进一步疗法包括心理干预、行为干预、怀旧治疗、验证疗法、支持性心理治疗、感觉统合、认知培训、康复、言语治疗等等。

[0172] “药物组合物”可包括作用剂和另一载剂,例如,化合物或组合物,惰性的或活性的,如可检测作用剂、标记、辅助剂、稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂溶剂、防腐剂、佐剂等等。载剂还包括药用赋形剂和添加剂,举例来说,蛋白、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如,糖包括单糖、二、三、四和寡糖;衍生糖如糖醇、醛糖酸、酯化的糖等等;和多糖或糖多聚物),其可单独或组合存在,包括单独或按重量或体积 1-99.99% 的组合。典型的蛋白赋形剂包括血清白蛋白如人血清白蛋白 (HSA)、重组人白蛋白 (rHA)、明胶、酪蛋白等等。代表性的也可在缓冲能力中发挥功能的氨基酸/抗体组分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酰苯丙氨酸甲酯等等。碳水化合物赋形剂也意在本发明的保护范围内,实例包括但不限于单糖如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等等;多糖如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等等;和糖醇如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇(葡萄糖醇)和肌醇。

[0173] 术语载剂进一步包括缓冲液或 pH 调节剂;通常,缓冲液是从有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲液包括有机酸盐如柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐;Tris、氨基丁三醇盐酸盐或磷酸盐缓冲剂。额外的载剂包括多聚赋形剂/添加剂如聚乙烯吡咯烷酮、聚蔗糖类 (ficoll)(一种聚合糖)、葡萄糖结合剂 (dextrate)(例如,环糊精,如 2-羟丙基正交环糊精)、聚乙二醇类、调味剂、抗微生物剂、甜味剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂(例如,聚山梨醇酯例如如“TWEEN 20”和“TWEEN80”)、脂质(例如,磷脂、脂肪酸)、类固醇(例如,胆固醇)和螯合剂(例如,EDTA)。

[0174] 如本文所用术语“可药用载剂”涵盖任何标准的药用载剂,如磷酸缓冲盐水溶液、水和乳液,如油/水或水/油乳液和多种类型的湿润剂。所述组合物还可包括稳定剂和防腐剂 and 任何上文指出的载剂,额外条件是其可被接受用于体内使用。载剂、稳定剂和佐剂的实例参见 Remington's Pharmaceutical Sciences (20th ed., Mack Publishing Co. 2000) 和 Physician's Desk Reference (52nd ed., Medical Economics 1998)。

[0175] 一般来说,本文所述作用剂和组合物以足以在受试者中增加葡萄糖脑苷脂酶活性的有效量或数量施用。通常,剂量可以在该范围内基于例如年龄、健康状况、体重、性别、饮食、施用时间和其他临床因素进行调整。有效量的测定在本领域技术人员的能力之内。

[0176] 递送本文描述的组合物方法包括但不限于口服、非口服(例如,局部,透皮,通过吸入或通过注射)。这些用于其中使用的施用模式和用于制备合适的药物组合物的方法描述于 Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care (1st ed., American Society of Health-System Pharmacists 2007), 其在本文通过提述并入。

[0177] 在实施方案中,所述药物组合物以固体形式口服施用。

[0178] 适于口服施用的药物组合物可以是胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质,通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉剂、颗粒剂,或作为在水或非水液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳液,或作为酞剂或糖浆剂、或作为软锭剂(使用惰性基质,如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等等,每种包含预先决定量的本文所述化合物、其衍生物或可药用的盐或其前药作为活性成分。所述活性成分也可作为大丸剂(bolus)、药糖剂(electuary)或糊剂进行施用。

[0179] 在用于口服施用的固态剂型中(例如,胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂、颗粒等等),所述活性成分与一种或多种可药用载剂、赋形剂或稀释剂(如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或下列任意混合:(1) 填充剂或增量剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2) 粘合剂,如举例来说,羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3) 保湿剂,如甘油;(4) 崩解剂,如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸,某些硅酸盐和碳酸钠;(5) 溶液阻滞剂,如石蜡;(6) 吸收促进剂,如季铵化合物;(7) 润湿剂,如举例来说,乙酰基醇和单硬脂酸甘油酯;(8) 吸收剂,如高岭土和膨润土;(9) 润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物;和(10) 着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况中,所述药用组合物可包含缓冲剂。相似类型的固态组合物的制备还可使用在软或硬填充的明胶胶囊中的填充剂和赋形剂如乳糖或牛奶糖,以及高分子量聚乙二醇等等。

[0180] 片剂可由压制或模制(任选地伴随一种或多种辅助成分)制成。压制的片剂可使用粘合剂(举例来说,明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(举例来说,羟基乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂和/或分散剂进行制备。模制片剂可通过在合适的机器中模制使用惰性液体稀释剂润湿的粉状活性成分的混合物制成。片剂或其他固体剂型,如锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒任选地可计分或与包衣和壳制备,如本领域熟知的肠溶包衣和其他包衣。

[0181] 还可配制所述药物组合物以提供缓慢、延长或受控的活性成分的释放,其中使用举例来说不同比例的羟丙基甲基纤维素(以提供预期的释放谱)、其他聚合物基质、脂质体和/或微球。药物组合物任选地还可包含乳浊剂(opacifying agent),且可为只释放活性

成分的组合物,或优先地在胃肠道某些部分释放,任选地以延迟的方式释放。嵌入组合物的实例包括聚合物物质和蜡。活性成分还可以是微封装的形式,如果合适的话,伴随一种或多种可药用载剂、赋形剂或本领域熟知的稀释剂(参见,例如 Remington's)。

[0182] 在实施方案中,所述药物组合物以液体形式口服施用。用于活性成分口服施用的液体剂型包括可药用乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除活性成分外,所述液体剂型可包含本领域常用的惰性稀释剂,如举例来说水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苧醇、苯甲酸苧酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(例如,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂,液体药物组合物可包括佐剂如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂等等。

[0183] 悬浮液除活性成分外可包含悬浮剂,如但不限于乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨糖醇酯(sorbitan ester)、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂-琼脂和黄蓍胶及其混合物。

[0184] 在实施方案中,药物组合物可通过非口服的方式施用,如通过局部施用、经皮施用、注射等等。在相关的实施方案中,药物组合物通过注射、输注或植入进行肠胃外施用(例如,静脉内、肌内、动脉内、皮下等等)。

[0185] 一些方面,理想的是将本公开的药物组合物和/或细胞直接施用至 CNS。对应地,在一些实施方案中,将组合物直接施用至 CNS 进而避免血脑屏障。在一些实施方案中,所述组合物可经由直接脊髓注射进行施用。在实施方案中,所述组合物通过鞘内注射进行施用。在一些实施方案中,所述组合物经由脑室内注射进行施用。在实施方案中,将所述组合物施入侧脑室。在实施方案中,将所述组合物施入双侧的侧脑室。在额外的实施方案中,所述组合物经由海马体内注射进行施用。

[0186] 所述组合物可以在一次注射或多次注射中进行施用。在其他实施方案中,将所述组合物施用至多于一处位置(例如,至 CNS 的两处位点)。

[0187] 用于肠胃外使用的组合物可以单位剂型的形式存在,例如,在包含数个剂量的安瓿或小瓶中,且其中可添加合适的防腐剂。这种组合物可以是溶液、悬浮液、乳液、输注装置、用于植入的递送装置的形式,或其在使用前可作为将与水或另一合适的媒介物重组的干粉存在。还可采用一种或多种共媒介,如乙醇。除所述活性成分,组合物可包含合适的肠胃外可接受的载剂和/或赋形剂,或所述活性成分可并入微球、微囊、纳米颗粒、脂质体等等用于受控的释放。此外,所述组合物还可包含悬浮剂、增溶剂、稳定剂、pH-调节剂,和/或分散剂。

[0188] 所述药物组合物可以是无菌注射剂的形式。所述药物组合物可由举例来说,通过细菌截留过滤器的过滤进行灭菌,或通过将灭菌剂并入的无菌固体形式的组合物进行灭菌,其能够在使用前立即溶于无菌水或一些其他无菌可注射介质。为制备这样的组合物,将活性成分溶于或悬浮于肠胃外可接受的液体媒介。典型的媒介和溶剂包括但不限于水、通过添加合适的量的盐酸、氢氧化钠或合适的缓冲剂、1,3-丁二醇、Ringer's 溶液和等渗氯化钠溶液调整至合适 pH 的水。药物组合物还可包含一种或多种防腐剂,举例来说,对羟基苯甲酸甲酯、乙酯或正丙酯。为改进溶解度,可添加溶解增强剂或增溶剂或所述溶剂可包含 10-60% w/w 的丙二醇等等。

[0189] 药物组合物可包含一种或多种可药用无菌等渗水或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液,或可在即将使用前重组入无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。这种药物组合物可包含抗氧化剂;缓冲剂;抑菌剂;使配制物与目标接受者的血液等渗的溶质;悬浮剂;增稠剂;防腐剂等等。

[0190] 可在本发明的药物组合物中采用的合适的水和非水载剂的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等等)及其合适的混合物、植物油如橄榄油和可注射的有机酯如油酸乙酯。合适的流动性,举例来说,可通过包衣材料如卵磷脂的使用保持,在分散液的情况中通过维持所需的颗粒尺寸保持,和通过表面活性剂的使用保持。在一些实施方案中,为延长活性成分的效果,理想的是减缓来自皮下或肌肉注射的化合物的吸收。其可通过使用具有较低水中溶解度的结晶或无定形材料的液体悬浮液实现。随后活性成分的吸收率取决于其溶解率,其转而取决于晶体大小和晶型。可替换地,肠胃外施用的活性成分的延迟吸收通过将化合物溶于或悬浮于油媒介实现。此外,可注射药物形式的延长吸收可由延迟吸收的作用剂如单硬脂酸铝和明胶的包含带来。

[0191] 受控释放的肠胃外组合物可以是水悬浮液、微球、微胶囊、磁性微球、油溶液、油混悬剂、乳剂的形式,或所述活性成分可并入生物相容性载剂、脂质体、纳米颗粒、植入物或输注装置。

[0192] 用于制备微球和/或微胶囊使用的材料包括但不限于生物可降解的/可生物降解的聚合物,如聚乳糖、多聚-(氰基丙烯酸异丁酯)、多聚(2-羟基乙基-L-谷氨酰胺)和多聚(乳酸)。

[0193] 配制受控释放的肠胃外配制物时可使用的生物相容性的载剂包括碳水化合物,如葡聚糖、蛋白质,如白蛋白、脂蛋白或抗体。

[0194] 用于植入物中使用的材料可以是生物降解的,例如聚二甲基硅氧烷,或生物降解的如例如,多聚(己内酯)、多聚(乳酸)、多聚(乙醇酸)或多聚(原酸酯)。

[0195] 本发明已在本文基本得以描述,提供下列实施例以进一步阐述本发明。

实施例

[0196] 在 CNS 中增加葡萄糖脑苷脂酶活性作为用于戈谢相关 tau 蛋白病和其他蛋白质病的治疗策略

[0197] 编码葡萄糖脑苷脂酶基因 GBA1 的突变代表发展形成突触核蛋白病帕金森氏病(PD)和具有路易体的痴呆(DLB)的共同遗传风险因子。具有或不具有 GBA1 突变的 PD 患者在中枢神经系统(CNS)中也展示了较低的葡萄糖脑苷脂酶水平,表明酶和疾病发展形成间可能的联系。该实施例描述戈谢-相关突触核蛋白病小鼠模型(Gba1^{D409V/D409V})和过表达 A53T α -突触核蛋白的转基因小鼠 CNS 中葡萄糖脑苷脂酶活性的增加。实施例 1 表明腺相关病毒介导的葡萄糖脑苷脂酶在有症状的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 CNS 中的表达完全纠正了毒性脂质葡萄糖鞘氨醇的异常积累并降低了泛素、tau 和抗蛋白酶 K α -突触核蛋白聚集体的水平。重要的是,当使用新物体识别测试检验时,葡萄糖脑苷脂酶在 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠海马体的表达(始于 4 个月或 12 个月大)也逆转了其认知损害。葡萄糖脑苷脂酶在 A53T α -突触核蛋白小鼠 CNS 中的过表达降低了可溶 α -突触核蛋白水平,表明该糖苷酶可调节 α -突触核蛋白病的发展形成。因此,在 CNS 中增加葡萄糖脑苷脂酶活性代表用于 GBA1-相关和

非 GBA1- 相关 tau 蛋白病的潜在治疗策略。

[0198] 据报道葡萄糖脑苷脂酶基因中的突变 (GBA1) 代表用于发展形成突触核蛋白病如帕金森氏病 (PD) 和具有路易体的痴呆 (DLB) 的最高遗传风险因子。(参见, 例如 Aharon-Peretz J 等 (2004) *N Engl J Med* 351:1972-1977; Sidransky E 等 (2009) *N Engl J Med* 361:1651-1661; Velayati A 等 (2010) *Curr Neurol Neurosci Rep* 10:190-198; Clark LN 等 (2007) *Neurology* 69:1270-1277; Mata IF 等 (2008) *Arch Neurol* 65:379-382; Bultron G 等 (2010) *J Inherit Metab Dis* 33:167-173; Rosenbloom B 等 (2010) *Blood Cells Mol Dis* 46:95-102; 及 Duran R 等 (2012) *Mol Genet Metab* 4:495-497)。呈现帕金森综合征和痴呆的戈谢患者和携带者的中枢神经系统 (CNS) 在海马神经元中含有 α -突触核蛋白阳性路易体 (LB) 和路易神经突 (lewy neurite; LN) 的沉积和与那些在患有经典 PD 和 DLB 的患者中注意到相似的进程 (参见, 举例来说, Spillantini MG 等 (1997) *Nature* 388:839-840; Spillantini MG 等 (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6469-6473; Tayebi N 等 (2003) *Mol Genet Metab* 79:104-109 和 Wong K 等 (2004) *Mol Genet Metab* 82:192-207)。已在数种神经性和非神经性戈谢病小鼠模型的 CNS 中注意到这些特性的各个方面 (参见, 举例来说, Xu YH 等 *Mol Genet Metab* (2010) 102:436-447; Cullen V 等 (2011) *Ann Neurol* 69:940-953; 和 Sardi SP 等 (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12101-12106)。因此, 表明了葡萄糖脑苷脂酶活性的丧失或未降解代谢物的溶酶体积累和 PD 和 DLB 的发展形成之间的因果关系。葡萄糖脑苷脂酶活性和 α -突触核蛋白代谢间更直接的关联已通过由药理或基因介入导致 α -突触核蛋白聚集体水平增加而表现葡萄糖脑苷脂酶活性降低的戈谢细胞和小鼠的研究加以强调。(参见, 举例来说, Cullen V 等 (2011) *Ann Neurol* 69:940-953; Sardi SP 等 (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12101-12106; Manning-Bog AB 等 (2009) *Neurotoxicology* 30:1127-1132; 和 Mazzulli JR 等 (2011) *Cell* 146:37-52)。此外, 在来自患有 PD 和 DLB 的受试者的 CSF 和脑样品中已经注意到葡萄糖脑苷脂酶活性的降低 (无论其在 GBA1 中是否含有突变), 表明葡萄糖脑苷脂酶活性降低可促成突触核蛋白病的发展形成 (参见, 举例来说, Balducci C 等 (2007) *Mov Disord* 22:1481-1484; Parnetti L 等 (2009) *Neurobiol Dis* 34:484-486; 和 Gegg ME 等 (2012) *Annals of Neurology* 72:455-63)。

[0199] 葡萄糖脑苷脂酶在突触核蛋白病发展中的作用进一步得到了患有戈谢相关帕金森综合征的受试者的临床观察结果的支持。这些个体呈现频率和严重程度增加的非运动症状 (例如, 认知损害), 其本质上损害其生活质量的 (参见, 举例来说, Brockmann K 等 (2011) *Neurology* 77:276-280; McNeill A 等 (2012) *Mov Disord* 27:526-532; 和 McNeill A 等 (2012) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:253-254)。GBA1 中含有突变的个体还具有较高的痴呆发生率, 其与 α -突触核蛋白聚集体的新皮层积聚的存在相关 (参见, 例如, Clark LN 等 (2009) *Arch Neurol* 66:578-583; 和 Neumann J 等 (2009) *Brain* 132:1783-1794)。的确, 目前将 GBA1 中的突变认作 PD 患者中发展出认知损害的独立风险因子 (参见, 例如, Alcalay RN 等 (2012) *Neurology* 78:1434-1440)。另一已表明与在 PD 中发展出痴呆的风险增加相关的基因是 MAPT (参见, 举例来说, Goris A 等 (2007) *Ann Neurol* 62:145-153)。该基因编码 tau, 一种在维持细胞骨架的正确组织和完整性中发挥作用的微管相关蛋白。Tau 和 α -突触核蛋白相关病理在患有 PD 和 LBD 的患者中经常先后被发现

(参见, 举例来说, McKeith IG 等 (1996) *Neurology* 47:1113-1124 ; Duda JE 等 (2002) *Acta Neuropathol* 104:7-11 ; 和 Giasson BI 等 (2003) *Science* 300:636-640)。

[0200] GBA1 中的突变及所导致的葡萄糖脑苷脂酶活性的缺陷是戈谢病 (溶酶体贮积症家族最流行的成员) 的分子基础 (参见, 举例来说, Brady RO 等 (1966) *J Clin Invest* 45:1112-1115 和 Sidransky (2004) *Mol Genet Metab* 83:6-15)。该疾病的特征在于未代谢的脂质底物 (首要是葡萄糖苷酰鞘氨醇) 在溶酶体中的进行性积累。患有戈谢病的受试者目前通过周期性施用聚糖修饰的重组葡萄糖脑苷脂酶进行管理 (参见, 举例来说, Cox TM (2001) *QJM* 94:399-402 和 Grabowski GA (2008) *Lancet* 372:1263-1271)。然而, 所述重组酶不能以充足的量穿过血脑屏障以解决神经性戈谢病患者的 CNS 表现 (参见, 举例来说, Grabowski GA (2008) *Lancet* 372:1263-1271 和 Grabowski GA 等 (1998) *Blood Rev* 12:115-133)。在 CNS 中增加葡萄糖脑苷脂酶水平的策略最近已成为研究热点 (参见, 举例来说, Cabrera-Salazar MA 等 (2010) *Exp Neurol* 225:436-444 ; Khanna R 等 (2010) *FEBS J* 277:1618-1638 ; Ashe KM 等 (2011) *PLoS One* 6:e21758 ; 和 Patnaik S 等 (2012) *J Med Chem* 55:5734-5748)。

[0201] 之前已对展示抗蛋白酶 K α -突触核蛋白 / 泛素聚集体进行性 CNS 积累的戈谢相关的突触核蛋白病小鼠模型进行了描述, 其让人联想到路易神经突 (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108:12101-12106)。这些小鼠还在其 CNS 中展示较高水平的神经毒素葡萄糖鞘氨醇 (GlcSph) 和可证实的海马记忆缺陷。本实施例表征了与这种戈谢相关的突触核蛋白病模型关联的病理特征包括蛋白 tau。此外, 验证了当在临床相关症状后阶段将葡萄糖脑苷脂酶施用至动物时是否可缓和或逆转异常。最后, 为进一步探究葡萄糖脑苷脂酶和 α -突触核蛋白之间的关系, 如本文所述对影响 A53T α -突触核蛋白小鼠中 α -突触核蛋白水平的溶酶体水解酶能力进行了评估。

[0202] 实施例 1: 戈谢病小鼠模型 CNS 展示 tau 聚集体的积累

[0203] α -突触核蛋白和 tau 包涵体的积累伴随导致的痴呆是多种神经退行性疾病的标志, 包括 PD 和 DLB (参见, 举例来说, McKeith IG 等 (1996) *Neurology* 47:1113-1124 ; Ishizawa T 等 (2003) *J Neuropathol Exp Neurol* 62:389-397 ; 和 Lee VM 等 (2004) *Trends Neurosci* 27:129-134)。之前报道了在鼠类 Gba1 基因座中含有单点突变的小鼠戈谢病模型 (Gba1^{D409V/D409V}) 在 CNS 中展示了 α -突触核蛋白 / 泛素聚集体的进行性和显著的积累及海马记忆中可测量的缺陷 (Sardi SP 等 (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12101-12106) (还参见图 5A 和 B 和图 6A-D)。为判断 Gba1 中的突变伴随导致的葡萄糖脑苷脂酶活性的损失是否也促进 tau 在 CNS 中的积累, 使用特异性识别 tau 的抗体以免疫组化法检测了 12 个月大的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠的脑切片。尽管在其他脑区域也观察到了免疫反应性的证据如大脑皮层和小脑, 主要在海马体区注意到了显著的点状染色 (图 1A)。还测定了在 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠脑中 tau 聚集体积累的起始和速率。2 个月大时, Gba1^{D409V/D409V} 小鼠中 tau 免疫反应性的程度与野生型对照中注意到的没有不同 (图 1A 和 B)。然而, 6 个月大的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠中 tau 染色的水平相比年龄匹配的对照显著更高。积累是进行性的, 12 个月大的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠展示更高量的 tau 聚集体 (FIG. 1A 和 B)。

[0204] 神经退行性疾病中的普遍发现是高度磷酸化的包含神经原纤维纠结的 tau 的存在增加 (参见, 举例来说, Goedert M 等 (1995) *Neurosci Lett* 189:167-169 ; 和 Hanger

DP 等 (2009) Trends Mol Med 15:112-119)。这些磷酸化种类可使用特定抗体检测,如 AT270(其识别在 Thr181 磷酸化的 tau), AT8(其识别 Ser202 和 Thr205 磷酸化的 tau),和 AT180(其识别 Thr231 磷酸化的 tau)。为探究在 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 CNS 中的 tau 聚集体的磷酸化状态,对来自 18 个月大的小鼠的海马体裂解物实施了免疫印迹分析。使用识别所有 tau 种类的抗体 (Tau-5) 的印迹染色揭示了 Gba1^{D409V/D409V} 和野生型小鼠间总蛋白水平无差异 (图 1C)。当使用 AT180 或 AT270 抗体检测印迹时观察到了对照和年龄匹配的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠间的染色程度无差异 (图 1C)。然而,检测 Ser202 和 Thr205 磷酸化的 AT8 染色在 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠的裂解物中适度但显著增加 (与野生型相比 1.3 ± 0.1 , $n = 6$, $p < 0.05$, 图 1C)。在 Ser202 和 Thr205 观察到的这种增加的磷酸化连同 tau 聚集体积累的的进行性特性 (除 α -突触核蛋白外) 表明 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠的 CNS 概括了于患有 PD 和 DLB 的受试者中注意到的特征。

[0205] 实施例 2:向海马体中施用葡萄糖脑苷脂酶逆转症状后 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠的生化和记忆异常

[0206] 为判断具有重组葡萄糖脑苷脂酶的 CNS 的重建是否能够纠正具有症状的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠的生化和记忆缺陷,将编码人葡萄糖脑苷脂酶的重组自身互补腺相关病毒载体 (血清型 1) (AAV-GBA1) 双侧施用至早期和晚期症状的小鼠 (分别 4 和 12 个月大) 海马体中。12 个月大时施用了 AAV-GBA1 且在 6 个月后分析的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 CNS 的免疫组化检测揭示了丰富和广泛的葡萄糖脑苷脂酶海马体表达 (图 2A)。用并不编码转基因的对照病毒 (AAV-EV) 处理的小鼠未展示染色 (图 2A, 插图)。测定 AAV-GBA1 处理的 (图 2B, 红色条形) 小鼠中的酶活相比基线 (图 2B, 黑色条形) 和施用了 AAV-EV 的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 (图 2B, 蓝色条形) 约 10 倍更高。在 4 个月大治疗并在治疗后 6 个月进行分析的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 CNS 中注意到了酶的相似分布 (数据未展示)。12 个月大的小鼠中葡萄糖脑苷脂酶的表达与 6 个月后大幅提高的脑葡萄糖鞘氨醇水平的标准化相关 (图 2C, 红色条形)。对比下,用对照病毒治疗的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠在相同时间间隔展示了持续的促炎性脂质积累 (图 2C, 蓝色条形)。

[0207] 使用新物体识别测试评估了海马体记忆。在治疗前对 4 个月大的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠进行测试证实了其在新物体追忆中展示损伤 (图 2D)。2 个月后将小鼠进行测试时,用 AAV-GBA1 对这些小鼠的治疗逆转了记忆缺陷 (6 个月大;图 2E, 红色条形, $n = 10$, $p < 0.05$)。相反,用对照病毒载体治疗的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠未展示可识别的改进 (图 2E, 蓝色条形, $n = 9$)。用 AAV-GBA1 在 12 个月大治疗并在 2 个月后测试的独立同龄组 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 (即具有较高事先存在的病理水平) 中实现了相似的结果 (在 14 个月大;图 2F, 红色条形, $n = 12$, $p < 0.05$; AAV-EV, 蓝色条形, $n = 12$)。因此,症状发生后的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 CNS 中增加的葡萄糖脑苷脂酶活性纠正了葡萄糖鞘氨醇的病理性积累且重要的是纠正了其记忆损伤 (还可参见图 7,其表明 GBA1 增加也可纠正 2 个月大的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠的记忆缺陷)。

[0208] 实施例 3:向具有症状的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠海马体施用葡萄糖脑苷脂酶降低脑中聚集蛋白的水平

[0209] 由于 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠在海马体中展示降低的葡萄糖脑苷脂酶活性和进行性的泛素、 α -突触核蛋白和 tau 聚集体的积累,因此测试了在脑中增加葡萄糖脑苷脂酶水平是否将减少这些异常蛋白材料在症状发生后动物中的水平。用 AAV-GBA1 或 AAV-EV 的 2E11 抗

DNA 酶颗粒 (drp) 双边立体定向注射 4 个月和 12 个月大的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 (后者呈现聚集体的更多积累和病理) 海马体。研究初始 (4 和 12 个月大) 及对照 AAV-EV 载体注射后 6 个月的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠的脑组织分析表明泛素、 α -突触核蛋白和 tau 聚集体在该时段的积累 (图 3A-C)。相反, 向 4 个月大的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠基因递送 AAV-GBA1 导致海马体泛素、抗蛋白酶 K α -突触核蛋白和 tau 聚集体的降低 (图 3A-C)。然而, 泛素的降低而非 α -突触核蛋白或 tau 的降低达到统计学显著性。6 个月后测试时, 葡萄糖脑苷脂酶在年龄较大 (12 个月大) 小鼠中的 CNS 表达与在年纪较轻的同龄组中注意到的表达相比产生相似但更温和的效果 (图 3A-C)。葡萄糖脑苷脂酶的递送表现出减缓的 tau 和 α -突触核蛋白积累速率但对泛素水平无影响, 表明这些蛋白积累的机制可能不同。在年纪较大动物中存在的较高水平聚集体的有效降低可能需要更长时段或更多葡萄糖脑苷脂酶。尽管如此, 该数据表明 CNS 中葡萄糖脑苷脂酶活性的增加可减缓具有症状的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠中病理上错误折叠的蛋白聚集体的积累程度。

[0210] 实施例 4: 转基因 A53T α -突触核蛋白小鼠的 CNS 与较低的葡萄糖脑苷脂酶活性相关

[0211] 患有 PD 或 DLB 的受试者 CSF 和脑样品的分析表明在作用个体中葡萄糖脑苷脂酶活性相比未作用个体较低, 表明溶酶体酶在这些突触核蛋白病的发展形成中的致病作用 (参见, 举例来说, Balducci C 等 (2007) Mov Disord 22:1481-1484; Parnetti L 等 Neurobiol Dis (2009) 34:484-486; 和 Gegg ME 等 (2012) Annals of Neurology 72:455-63)。近期数据已表明 α -突触核蛋白具有抑制溶酶体葡萄糖脑苷脂酶活性的能力 (参见, 举例来说, Mazzulli JR 等 (2011) Cell 146:37-52 和 Yap TL 等 (2011) J Biol Chem 286:28080-28088)。为判断 α -突触核蛋白的过表达是否负面影响葡萄糖脑苷脂酶的活性, 研究了来自转基因 A53T α -突触核蛋白小鼠 (表达带有 A53T 突变的突变人 α -突触核蛋白) 的脑裂解物。与在 GBA1 中不具有突变的 PD 患者中的发现相似的是, A53T α -突触核蛋白小鼠相比野生型动物展示了显著较低的溶酶体葡萄糖脑苷脂酶活性 (图 4A)。由于纯合 A53T α -突触核蛋白小鼠 CNS 相比表达更低 α -突触核蛋白水平的其 (Het) 同窝动物在酶活上展示更多降低, 因此该效果取决于 α -突触核蛋白的水平 (图 4, 阴影条形)。由于其他溶酶体酶 (即, 己糖胺酶和 β -半乳糖苷) 的活性未受影响, 因此该降低选择性地与葡萄糖脑苷脂酶相关。由于更强抑制与更高的 α -突触核蛋白水平相关, 该结果支持了 α -突触核蛋白的高水平能够抑制溶酶体葡萄糖脑苷脂酶活性的论点。

[0212] 实施例 5: AAV-介导的葡萄糖脑苷脂酶在转基因 A53T α -突触核蛋白小鼠 CNS 中的表达降低 α -突触核蛋白水平。

[0213] 之前, 注意到葡萄糖脑苷脂酶的过表达降低了 α -突触核蛋白聚集体在具有症状的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 CNS 中的积累 (图 3B)。为证实葡萄糖脑苷脂酶在减轻 α -突触核蛋白积累中的治疗潜力, 接下来对该降低是否还能在 A53T α -突触核蛋白小鼠中实现进行了测试。用 AAV-GBA1 或编码 GFP 的对照病毒 (AAV-GFP) 单边注射 4 个月大的杂合 A53T α -突触核蛋白小鼠的纹状体。如预期, 与对侧边或 AAV-GFP 注射的对照相比, 葡萄糖脑苷脂酶活性在 AAV-GBA1 注射小鼠中的同侧纹状体中显著增加 (~ 7 倍) (图 4B)。还将纹状体组织匀浆进行系列分馏以分离胞质可溶、膜结合和胞质不溶形式的 α -突触核蛋白。通过 ELISA 的量化揭示了胞质可溶 α -突触核蛋白水平通过葡萄糖脑苷脂酶的纹状体表达显著降低 (对

照的 $86 \pm 3\%$, $n = 5$, $p < 0.01$) (图 4B)。膜结合 α -突触核蛋白的水平在葡萄糖脑苷脂酶表达时也展示了适度的降低(对照的 $81 \pm 9\%$, $n = 5$, $p = 0.07$) (图 4B)。然而,不溶组分的量通过治疗无改变。

[0214] 还测定了葡萄糖脑苷脂酶在降低 A53T α -突触核蛋白小鼠脊髓中 α -突触核蛋白水平中的效力。用 AAV-GBA1 或 AAV-GFP 以 3E11drp per pup 的总剂量注射入新生 A53T α -突触核蛋白小鼠的脑侧脑室和其上腰椎脊髓。如预期, AAV-GBA1 而非对照载体在施用后于脊髓中实现了葡萄糖脑苷脂酶的强劲表达(相比对照 ~ 3 倍更高) (图 4C)。与纹状体注射相似的是, AAV-GBA1 的施用使可溶级分中 α -突触核蛋白水平降低至对照的 $67 \pm 7\%$ ($p < 0.01$, 图 4C)。总之, 这些结果表明葡萄糖脑苷脂酶活性的增加可降低 A53T α -突触核蛋白小鼠 CNS 中 α -突触核蛋白水平。

[0215] 实施例 6 : A53T α -突触核蛋白小鼠脑中葡萄糖脑苷脂酶的表达减少 Tau 聚集体的积累

[0216] 已在数种包括 α -突触核蛋白过表达小鼠的动物模型中观察到了 tau 的聚集(Haggerty 等 (2011) Eur J Neurosci 33:1598-1610)。为证实葡萄糖脑苷脂酶在减缓 tau 的积累中的治疗潜力, 接下来对该降低是否还能在 A53T α -突触核蛋白小鼠中实现进行了测试。用 AAV-对照或 AAV-GBA1 在 P0 双侧注射了 A53T- α -突触核蛋白转基因小鼠。保留未治疗的年龄匹配的、未注射 WT 小鼠作为阴性对照。A53T α -突触核蛋白小鼠的脑组织分析表现了与野生型对照相比更高数量的聚集体(图 8)。值得注意的是, GBA1 的过表达降低了年龄匹配的同窝小鼠中积累的 tau 的数目(图 8)。该数据与 CNS 中葡萄糖脑苷脂酶活性的增加可减缓病理性错误折叠蛋白聚集体积累程度的观点一致。

[0217] 实施例 7 : 葡萄糖脑苷脂酶在 Tau 转基因小鼠中的表达预防记忆功能障碍

[0218] Tau 转基因小鼠 (Thy1-TAU22) 是阿尔茨海默氏病和其他表达 Thy1.2 启动子控制下 G272V 和 P301S 突变的人 4-重复 tau 的 tau 蛋白病的小鼠模型。在不存在干扰记忆功能测试的任何运动功能障碍及肌张力障碍型姿势下, Thy1-TAU22 展现了 tau 病理。Thy1-TAU22 表明数种阿尔茨海默氏病相关的 tau 表位上 tau 的高度磷酸化(AT8、AT100、AT180、AT270、12E8、tau-pSer396 和 AP422)、具有罕见幽灵纠结(ghost tangle)与 PHF 样细丝的神经原纤维纠结样包涵体(Gallias 和 MC1-阳性)和轻微的星形胶质增生。这些小鼠还表现损害的行为包括延迟的学习能力和降低的空间记忆。

[0219] 为进一步评估增加的葡萄糖脑苷脂酶 (GBA1) 活性的治疗效力, 评估了 GBA1 的增加对 tau 转基因小鼠的影响。用 AAV1-GBA1 或 AAV1-对照病毒注射两个月大的 Thy1-TAU22 小鼠 (1×10^6 DRPs/ml)。麻醉小鼠并将病毒载体立体注射入其海马体(双边海马体注射, 每部位 3 微升) (图 9A)。与 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠一致的是, 用 AAV-GBA1 治疗小鼠逆转了记忆缺陷(FIG 9B)。注射后两个月存在认知改进的趋势, 其与治疗 6 个月对动物进行的测试统一(图 9B)。对比下, 用对照病毒载体治疗的 Thy1-TAU22 小鼠未表现出对新物体的偏好, 表明在两个时间点都具有记忆功能障碍(图 9B)。因此, 在 tau 转基因小鼠 CNS 中增加 GBA1 活性纠正了基因损伤。

[0220] 讨论

[0221] 在首次描述 GBA1 突变作为发展形成 PD 和 DLB 的风险因子后, 来自数次独立研究的发现已支持了葡萄糖脑苷脂酶在这些破坏性疾病的病理中的作用。葡萄糖脑苷脂酶

活性的减少和突变的葡萄糖脑苷脂酶的存在据称都可诱导 α -突触核蛋白 / 泛素聚集体 CNS 水平的增加 (参见, 举例来说, Xu YH 等 (2010) *Mol Genet Metab* 102:436-447; Cullen V 等 (2011) *Ann Neurol* 69:940-953; Sardi SP 等 (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12101-12106; Manning-Bog AB 等 (2009) *Neurotoxicology* 30:1127-1132; 和 Mazzulli JR 等 (2011) *Cell* 146:37-52)。在 Gba1 中含有突变的戈谢病小鼠模型的分析表明酶活的降低促进神经蛋白的错误加工和认知缺陷, PD 和 DLB 的两种特性 (参见, 举例来说, Xu YH 等 (2010) *Mol Genet Metab* 102:436-447; Cullen V 等 (2011) *Ann Neurol* 69:940-953; 和 Sardi SP 等 (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12101-12106)。然而, 酶的缺陷促成这些疾病病理的程度仍需测定。本研究为葡萄糖脑苷脂酶在这些疾病发展中的作用提供了进一步支持, 并验证了 CNS 中葡萄糖脑苷脂酶的增加是用于与 α -突触核蛋白错误折叠相关的疾病如 PD 和 DLB 的一种治疗方式。

[0222] 尽管 PD 和 LBD 精确的疾病发生仍不明确, LB 中 α -突触核蛋白和其他蛋白的进行性积累的发现暗示蛋白错误折叠是潜在的致病机制 (参见, 举例来说, Lee VM 等 (2004) *Trends Neurosci* 27:129-134 和 Dawson TM & Dawson VL (2003) *Science* 302:819-822)。在戈谢病模型 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠模型中复制了该蛋白质病, 其证明了除之前描述的 α -突触核蛋白和泛素聚集体积累外 tau 病理的进行性积累。 α -突触核蛋白和微管相关蛋白 tau 都被认为在数种疾病的神经退行性过程中起关键作用。SNCA 和 MAPT (分别编码 α -突触核蛋白和 tau 的基因) 的突变, 及导致的 α -突触核蛋白和 tau 聚集体的出现已牵涉多种神经退行性疾病, 包括阿尔茨海默氏病、PD、DLB 和额颞叶痴呆 (参见, 举例来说, Goris A 等 (2007) *Ann Neurol* 62:145-153; Lee VM 等 (2004) *Trends Neurosci* 27:129-134; 和 Schlossmacher M (2007) *α -synuclein and synucleinopathies*; 和 *The Dementias* 2 ed MN GJR (Butterworth Heinemann, Inc., Oxford), Vol 30, pp 186-215)。这些蛋白聚集的机制表现出不同, 举例来说, α -突触核蛋白可自发自身多聚化 (Conway KA 等 (1998) *Nat Med* 4:1318-1320), 而 tau 需要诱导剂的存在 (Goedert M 等 (1996) *Nature* 383:550-553)。此外, 据报道 α -突触核蛋白原纤维促进 tau 的多聚化 (Giasson BI 等 (2003) *Science* 300:636-640 和 Waxman EA & Giasson BI (2011) *J Neurosci* 31:7604-7618)。因此, 可能的是 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 CNS 中观察到的 tau 聚集在 α -突触核蛋白纤维化后发生。此外, 在大龄的 Gba1^{D409V/D409V} 脑中仅一种 tau 磷酸化种类 (Ser202 和 Thr205) 增加。戈谢小鼠模型中缺乏广泛的 tau 高度磷酸化表明磷酸化可能是晚期事件, 如由 Lasagna-Reeves 等 (2012) *FASEB J* 26:1946-1959 所提出。

[0223] 尽管 PD 通常作为运动病症出现, 已知其与多种程度的认知损害相关, 包括痴呆。在 GBA1 中含有突变的 PD 患者相比带有非 GBA1 突变的对应者通常具有较低的认知打分, 表明改变的 GBA1 增加了形成认知缺陷的易感性 (Alcalay RN 等 (2012) *Neurology* 78:1434-1440)。戈谢病的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠模型概括了多种在来自 PD 和 DLB 患者的脑中注意到的异常生化特性和记忆中可测量的缺陷。已表明通过用外源的酶来源补充可在发生症状前的动物的 CNS 中对这些疾进行改善 (Sardi SP 等 (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12101-12106)。由于预测 GBA1 相关认知损害形成中的固有困难, 测试相同的有益效果是否在具有明显疾病的动物中也可实现具有相关性。本实施例证明在早期和晚期症状的 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠中 AAV 介导的葡萄糖脑苷脂酶表达在逆转认知损害中也有效。该认知的

恢复与糖脂葡萄糖鞘氨醇的完全清除和病理聚集体积累的降低相关。在 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠 CNS 中增加葡萄糖脑苷脂酶活性降低了“毒性”代谢物水平并进而改进了溶酶体功能是可能的,其对于纠正突触功能 (Hernandez D 等 (2012) *Neuron* 74:277-284) 和使降解聚集蛋白的途径正确发挥功能 (Martinez-Vicente M&Cuervo AM(2007) *Lancet Neurol* 6:352-361 和 Cremades N 等 (2012) *Cell* 149:1048-1059) 是必需的。重要的是,这些结果强烈表明在 CNS 中增加葡萄糖脑苷脂酶活性可阻碍戈谢相关帕金森综合征和相关突触核蛋白病的一些临床方面的进展 (和甚至逆转)。

[0224] 持续研究不断提供葡萄糖脑苷脂酶和 α -突触核蛋白间关系的更多见解。显而易见的是葡萄糖脑苷脂酶活性的降低或突变葡萄糖脑苷脂酶的存在可促进 α -突触核蛋白的异常积累 (Sardi SP 等 (2012) *Neurodegener Dis* 10:195-202)。已有报道 α -突触核蛋白还可与葡萄糖脑苷脂酶相互作用以降低其至溶酶体的运输或抑制其活性,由此加剧疾病状态 (Mazzulli JR 等 (2011) *Cell* 146:37-52 和 Yap TL 等 (2011) *J Biol Chem* 286:28080-28088)。针对葡萄糖脑苷脂酶在疾病过程中的作用得到散发性 PD 患者脑和 CSF 中葡萄糖脑苷脂酶活性减少的发现支持,无论其是否含有 GBA1 突变 (Gegg ME 等 (2012) *Annals of Neurology* 72:455-63)。为与这些发现互补,上述实施例描述了在 CNS 中过表达 A53T- α -突触核蛋白的转基因 A53T α -突触核蛋白小鼠的研究。来自 A53T- α -突触核蛋白小鼠的脑裂解物的测量表明具有较高 α -突触核蛋白水平的小鼠与降低的葡萄糖脑苷脂酶活性量相关。重要的是,A53T- α -突触核蛋白小鼠脑中增加的葡萄糖脑苷脂酶活性降低了 α -突触核蛋白水平。这些结果表明在 A53T- α -突触核蛋白小鼠 CNS 中增加的葡萄糖脑苷脂酶活性通过其“synuclease”活性,可能中断 α -突触核蛋白对葡萄糖脑苷脂酶活性的有害反馈并进而恢复细胞降解 α -突触核蛋白的能力。因此,经由重组酶的施用增加 CNS 中葡萄糖脑苷脂酶的活性,编码溶酶体酶或水解酶的小分子激活剂的基因转移载体可降低错误折叠的蛋白的积累程度并由此减缓具有或不具有 GBA1 突变的受试者中 PD 的疾病进展。

[0225] 总之,增加的葡萄糖脑苷脂酶在调节 CNS 中聚集体积累程度的效力在 tau 和 α -突触核蛋白蛋白质病的三种鼠类模型中得以证明。在具有症状的戈谢相关帕金森综合征和痴呆小鼠模型中,葡萄糖脑苷脂酶活性在 CNS 中的增加纠正了脂质的异常积累,逆转了认知功能障碍并降低了聚集的 α -突触核蛋白和 tau 的水平。CNS 中增加的葡萄糖脑苷脂酶水平在降低 A53T α -突触核蛋白小鼠模型中的 α -突触核蛋白水平和 tau 聚集体中也有效。当增加 tau 转基因小鼠 CNS 中葡萄糖脑苷脂酶水平时,进一步观察到记忆功能障碍的改进。总之,这些结果支持了用于 PD 和相关突触核蛋白病和 tau 蛋白病的葡萄糖脑苷脂酶增加疗法的建立。

[0226] 材料和方法

[0227] 动物:Sanofi 公司的 Institutional Animal Care and Use Committee at Genzyme 批准了所有方法。戈谢病 Gba1^{D409V/D409V} 小鼠模型在鼠类葡萄糖脑苷脂酶 (Gba1) 基因在残基 409 含有点突变 (参见,举例来说,Xu YH 等 (2003) *Am J Pathol* 163:2093-2101)。转基因 A53T α -突触核蛋白小鼠表达在鼠类 PrP 启动子转录控制下的人 A53T α -突触核蛋白 (系 M83) (Giasson BI 等 (2002) *Neuron* 34:521-533)。使用 Applied Biosystems 7500 实时 PCR 系统 (Life Technologies, Carlsbad CA) 和用于人 SNCA 的引物探针集 (assay ID

Hs00240907_m1) 通过定量 PCR 实施了 A53T α -突触核蛋白小鼠的基因分型。将 SNCA 值标准化至小鼠 GADPH(4352339E)。

[0228] 自身互补 (sc) 的 AAV 载体: 将人 GBA1cDNA 的开放阅读框克隆入包含 scAAV2ITR 和 0.4kbGUSB 启动子的穿梭质粒 (Passini MA 等 (2010) J Clin Invest (2010) 120:1253-1264)。还将绿色荧光蛋白 (GFP) 开放阅读框或非编码填充 DNA (空载体, EV) 都克隆入相同的穿梭载体。每种重组质粒都通过人 293 细胞的三重质粒转染装载入 AAV 血清型 -1 壳体以生成 scAAV2/1-GusB-hGBA1 (AAV-GBA1)、scAAV2/1-GusB-GFP (AAV-GFP) 和 scAAV2/1-GusB-EV (AAV-EV)。重组 AAV 载体通过离子交换层析进行纯化。获得的 AAV-GBA1、AAV-GFP 和 AAV-EV 载体制备物通常具有 1E13 抗 DNA 酶颗粒 (drp)/ml 的滴度。

[0229] 立体定位注射: 用异氟醚麻醉 Gba1^{D409V/D409V}和 A53T α -突触核蛋白小鼠并将病毒载体 (AAV-GFP, AAV-GBA1, AAV-EV) 立体注射入海马体 (A-P:-2.00; M-L:1.50; D-V:-1.5, 距离前顶和硬脑膜; incisor bar:0.0) 或纹状体 (A-P:+0.50; M-L:2.00; D-V:-2.5, 距离前顶和硬脑膜; incisor bar:0.0)。每处注射位点使用 10- μ l Hamilton 注射器施用两微升 (0.5 μ l/min 的速率用于总 2E11drp/注射位点)。手术前一小时和手术后 24 小时, 给予小鼠酮洛芬 (5mg/kg s.c.) 用于镇痛。

[0230] 新生儿注射: 在出生日 (P0), 幼鼠接受了 3 次双侧半球脑侧脑室内和上腰椎脊髓注射 (在每处位点 2 μ l)。施用的 AAV-GBA1 和 AAV-GFP 载体的总剂量为 3E11drp 每动物。所有注射如之前所述用精拉玻璃微针实施 (Passini MA 等 (2010) J Clin Invest 120:1253-1264)。

[0231] 免疫印迹分析: 对于生化分析, 用磷酸缓冲盐水 (PBS) 灌注小鼠并如之前所述进行加工 (Sardi SP 等 (2012) Neurodegener Dis 10:195-202)。组织在液氮中快速冷冻并在 -80°C 保存直至实验。组织在包含蛋白酶鸡尾酒混合物 (Complete®; Roche, Germany) 和磷酸酶抑制剂 (Pierce, Rockford, IL) 的 T-PER 裂解缓冲液 (Pierce, Rockford, IL) 中匀浆化。离心后, 将裂解物解析于 4-12% SDS-PAGE, 转移至硝酸纤维素膜并用下列抗体探查: 小鼠抗 tau (Tau-5, 1:500, Millipore, Billerica, MA)、小鼠抗磷酸化 tau (AT8, Ser202/Thr205; AT180, Thr231; AT270, Thr181; 都来自 Pierce, Rockford, IL) 或兔抗 β -微管蛋白抗体 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)。用红外第二 (1:10,000) 抗体 (LI-COR Biosciences, Lincoln NB) 温育膜, 并使用 Odyssey 软件 (LI-COR Biosciences) 通过定量荧光可视化蛋白条带。

[0232] 葡萄糖脑苷脂酶活性和鞘糖脂水平的测量: 如之前所述使用 4-甲基伞形基 (4-MU)-D-葡萄糖苷作为人工底物测定脑和海马体的葡萄糖脑苷脂酶活性。分别使用 4-MU-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖苷 (glucosaminide) 和 4-MU- β -D-吡喃半乳糖苷测定己糖氨酶和 β -半乳糖苷酶的活性。组织葡萄糖神经酰胺 (GlcCer) 和葡萄糖鞘氨醇 (GlcSph) 水平如之前所述 (Cabrera-Salazar MA 等 Exp Neurol (2010) 225:436-444) 通过质谱进行测量。

[0233] 免疫组化: 如前文所述加工组织 (Sardi SP 等 (2012) Neurodegener Dis 10:195-202)。用蛋白酶 K (1:4 稀释; DAKO, Carpinteria, CA) 在室温预处理一些组织 7 分钟以使 α -突触核蛋白聚集体暴露。使用了下列一抗: 小鼠抗泛素 (1:50;

Millipore, Billerica, MA)、兔抗 α -突触核蛋白 (1:300 ;Sigma, St. Louis, MO) 和小鼠抗 tau (1:500, Tau-5, Millipore, Billerica, MA)。

[0234] 新物体识别测试:如之前所述实施测试 (Sardi SP 等 (2012) *Neurodegener Dis* 10:195-202)。简要地,连续 3 天使小鼠单独习惯探索开放场地盒子 (open-field box) 5 分钟。在第一次训练过程中 (T1),将两种相同物体彼此距离 14 英寸对称置于开放场地。允许动物探索 5 分钟。使用 Ethovision 视频跟踪软件 (Noldus, The Netherlands) 记录研究物体花费的时间。24 小时保留时段后,对动物测试 (T2) 其对新物体的识别。将小鼠放回开放场地的盒子 5 分钟,并记录研究熟悉的物体和新物体花费的时间。该结果以在训练 (T1) 或测试 (T2) 过程中靶物研究的百分数表示。对于靶物的 50% 研究的评分代表对于每种物体都无偏好。

[0235] α -突触核蛋白的分馏和量化:来自 A53T α -突触核蛋白小鼠的纹状体和脊髓如之前所述进行匀浆 (Cullen V 等 (2011) *Ann Neurol* 69:940-953) 以获得三种级分:胞浆 (Tris 可溶)、膜相关物 (Triton-X100 可溶) 和不溶物 (SDS-可溶)。人 α -突触核蛋白在不同级分中的浓度通过三明治 ELISA 量化 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。蛋白浓度通过 microBCA 实验测定 (Pierce, Rockford, IL)。

[0236] 统计学分析:通过 Student T 检验或方差分析 (ANOVA) 和随后的 Newman-Keuls' 事后检验实施统计学分析。对于新物体偏好定义为使用单样本 t 检验对新物体研究多于 50% 的时间。所有的统计学分析用 GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) 实施。p<0.05 的值认为具有显著性。

[0237] 应该理解的是尽管本发明已经结合上述实施方案进行了描述,之前的说明书和实施例意在阐述而非限制本发明的保护范围。其他方面,本发明保护范围内的优势和其修饰对于本发明所属领域的技术人员是显而易见的。

[0238] 此外,本发明的特征和方面以 Markush 群组的方式描述,本领域的技术人员由此将认可本发明还以 Markush 群组任何单独成员或亚群成员进行描述。

[0239] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献以其全文通过提述表述性地并入,如与每一篇都单独通过提述并入具有相同程度。在冲突的情况下,以本说明 (包括定义) 为准。

[0001]

序列表

<110> GENZYME CORPORATION

<120> 用于治疗蛋白质病的组合物和方法

<130> US2012-143 WO PCT

<140> US 61/722, 434

<141> 2012-11-05

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 497

<212> PRT

<213> 人类

<400> 1

Ala	Arg	Pro	Cys	Ile	Pro	Lys	Ser	Phe	Gly	Tyr	Ser	Ser	Val	Val	Cys
1			5						10					15	

Val	Cys	Asn	Ala	Thr	Tyr	Cys	Asp	Ser	Phe	Asp	Pro	Pro	Thr	Phe	Pro
		20						25					30		

Ala	Leu	Gly	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr	Glu	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Arg	Arg
		35					40					45			

Met	Glu	Leu	Ser	Met	Gly	Pro	Ile	Gln	Ala	Asn	His	Thr	Gly	Thr	Gly
	50					55					60				

Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Lys	Phe	Gln	Lys	Val	Lys	Gly
65					70					75					80

Phe	Gly	Gly	Ala	Met	Thr	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu
				85					90					95	

Ser	Pro	Pro	Ala	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ser	Glu	Glu
			100					105					110		

Gly	Ile	Gly	Tyr	Asn	Ile	Ile	Arg	Val	Pro	Met	Ala	Ser	Cys	Asp	Phe
		115					120					125			

Ser	Ile	Arg	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Pro	Asp	Asp	Phe	Gln	Leu
	130					135					140				

His	Asn	Phe	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Asp	Thr	Lys	Leu	Lys	Ile	Pro	Leu
145					150					155					160

Ile	His	Arg	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gln	Arg	Pro	Val	Ser	Leu	Leu	Ala
				165					170					175	

[0002]

Ser	Pro	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Trp	Leu	Lys	Thr	Asn	Gly	Ala	Val	Asn	
			180					185						190		
Gly	Lys	Gly	Ser	Leu	Lys	Gly	Gln	Pro	Gly	Asp	Ile	Tyr	His	Gln	Thr	
		195					200					205				
Trp	Ala	Arg	Tyr	Phe	Val	Lys	Phe	Leu	Asp	Ala	Tyr	Ala	Glu	His	Lys	
	210					215					220					
Leu	Gln	Phe	Trp	Ala	Val	Thr	Ala	Glu	Asn	Glu	Pro	Ser	Ala	Gly	Leu	
225					230					235					240	
Leu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe	Gln	Cys	Leu	Gly	Phe	Thr	Pro	Glu	His	Gln	
				245					250					255		
Arg	Asp	Phe	Ile	Ala	Arg	Asp	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Ala	Asn	Ser	Thr	
			260					265						270		
His	His	Asn	Val	Arg	Leu	Leu	Met	Leu	Asp	Asp	Gln	Arg	Leu	Leu	Leu	
		275					280					285				
Pro	His	Trp	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Thr	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Tyr	
	290						295				300					
Val	His	Gly	Ile	Ala	Val	His	Trp	Tyr	Leu	Asp	Phe	Leu	Ala	Pro	Ala	
305					310					315					320	
Lys	Ala	Thr	Leu	Gly	Glu	Thr	His	Arg	Leu	Phe	Pro	Asn	Thr	Met	Leu	
				325					330					335		
Phe	Ala	Ser	Glu	Ala	Cys	Val	Gly	Ser	Lys	Phe	Trp	Glu	Gln	Ser	Val	
			340					345					350			
Arg	Leu	Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Gly	Met	Gln	Tyr	Ser	His	Ser	Ile	Ile	
		355					360					365				
Thr	Asn	Leu	Leu	Tyr	His	Val	Val	Gly	Trp	Thr	Asp	Trp	Asn	Leu	Ala	
	370					375					380					
Leu	Asn	Pro	Glu	Gly	Gly	Pro	Asn	Trp	Val	Arg	Asn	Phe	Val	Asp	Ser	
385					390					395					400	
Pro	Ile	Ile	Val	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Phe	Tyr	Lys	Gln	Pro	Met	
				405					410					415		
Phe	Tyr	His	Leu	Gly	His	Phe	Ser	Lys	Phe	Ile	Pro	Glu	Gly	Ser	Gln	
			420					425					430			

[0003]

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
485 490 495

Gln

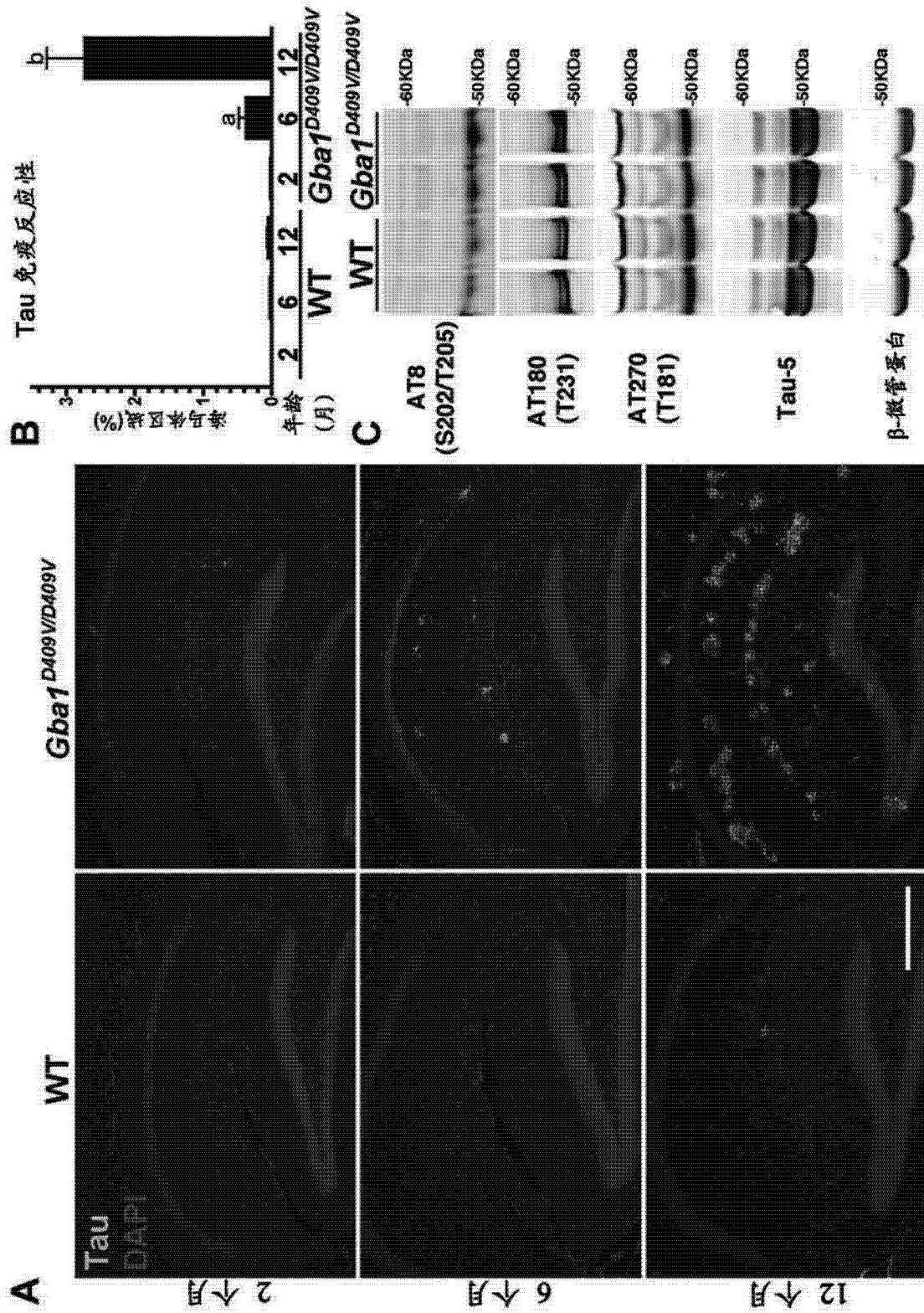


图 1

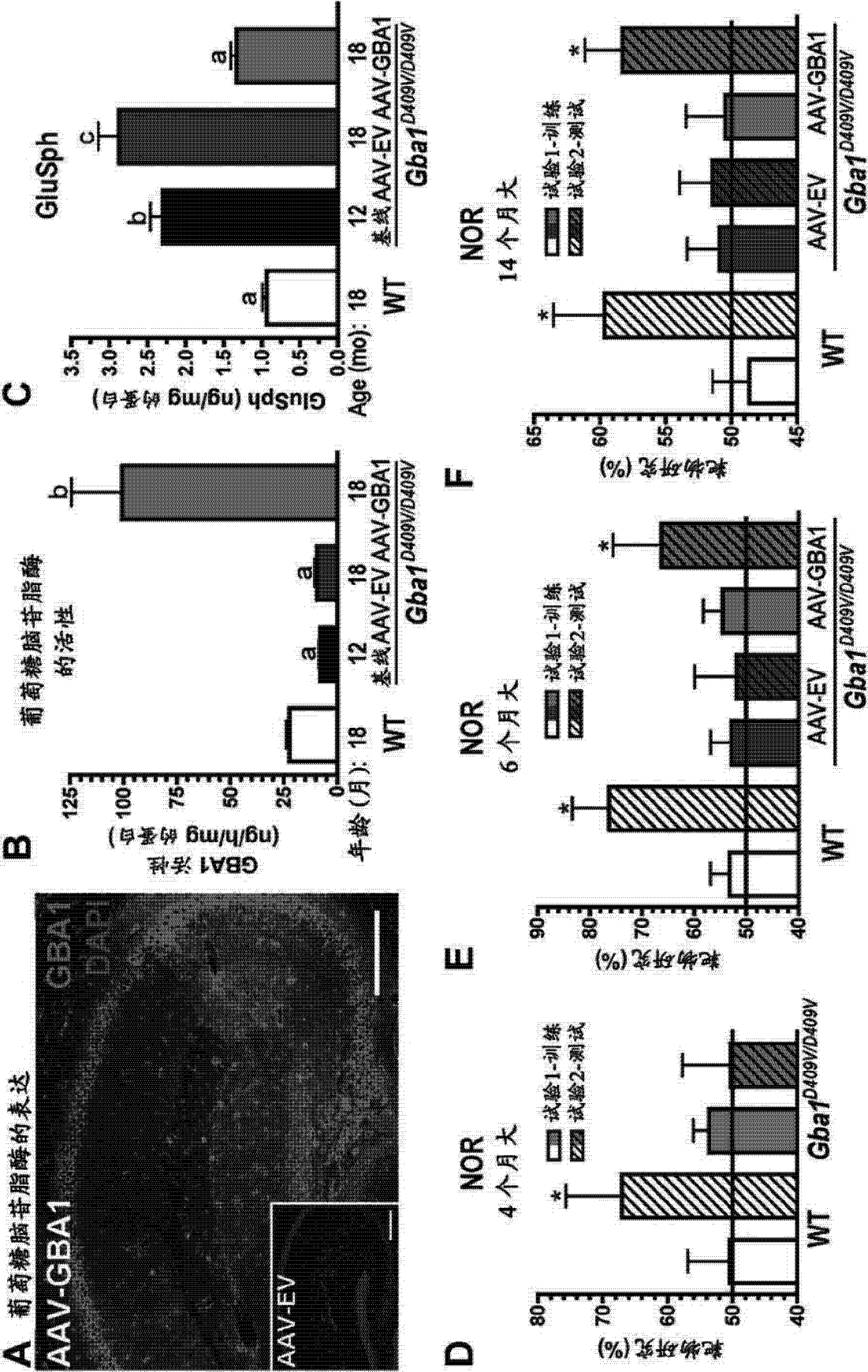


图 2

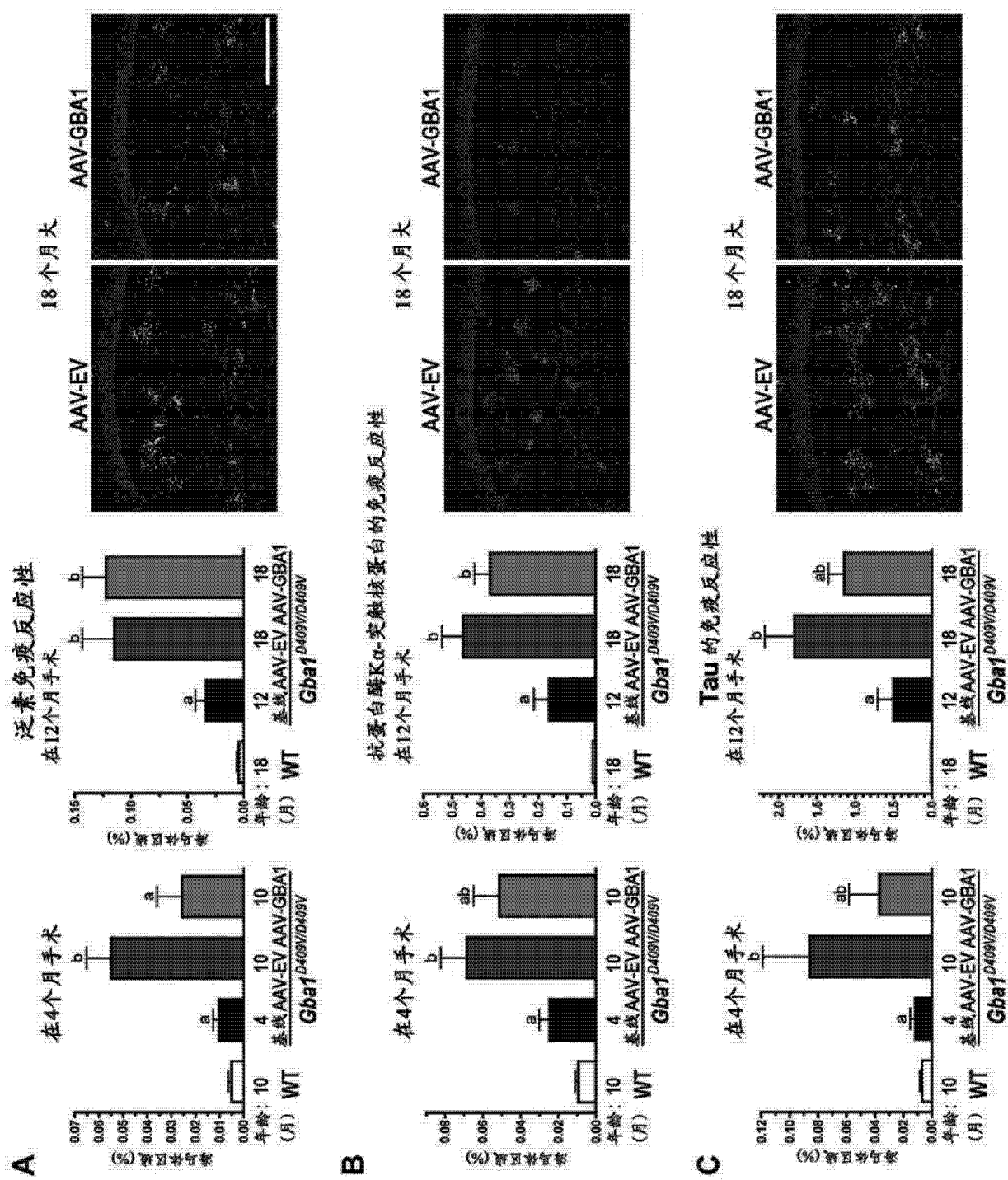


图 3

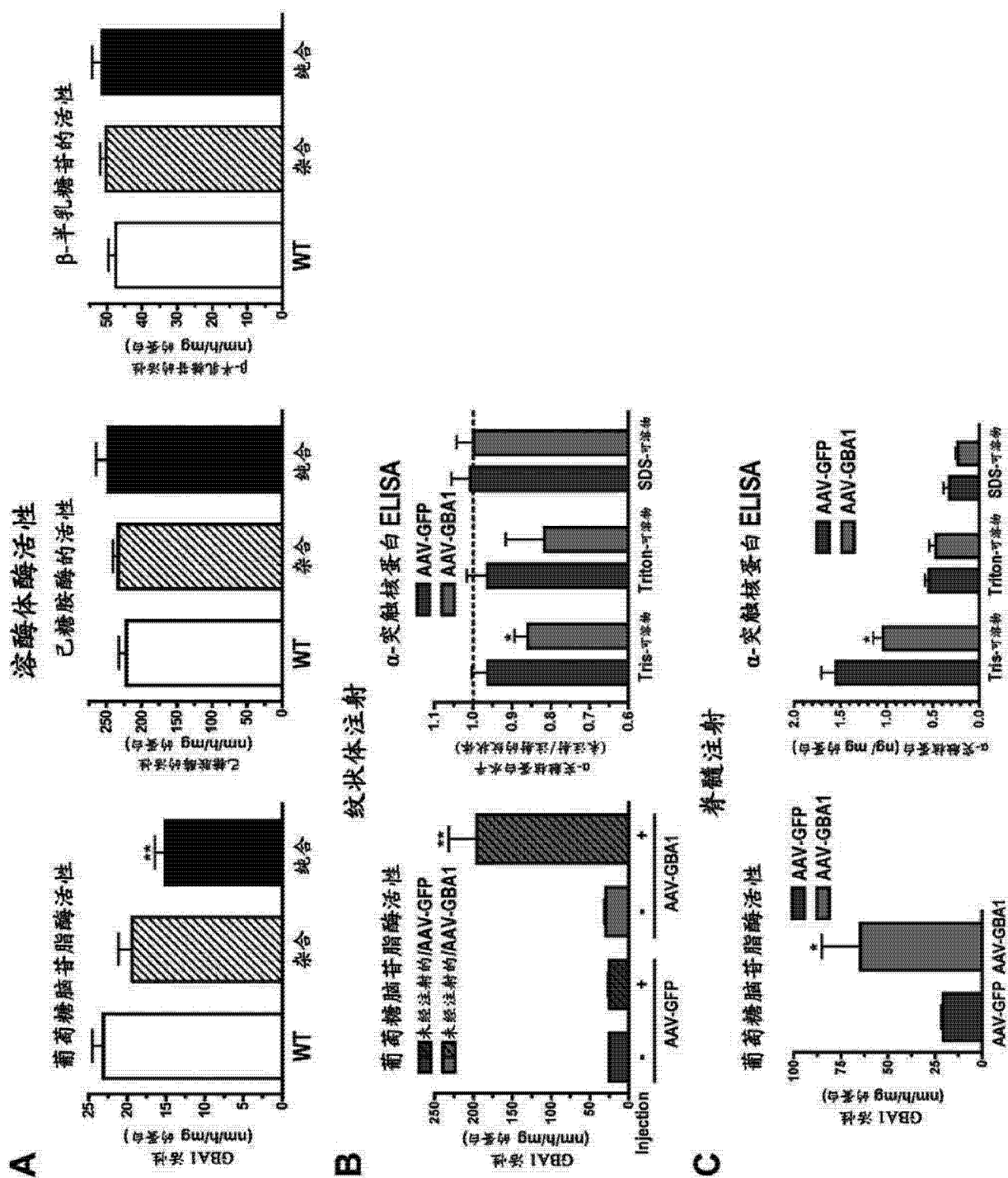


图 4

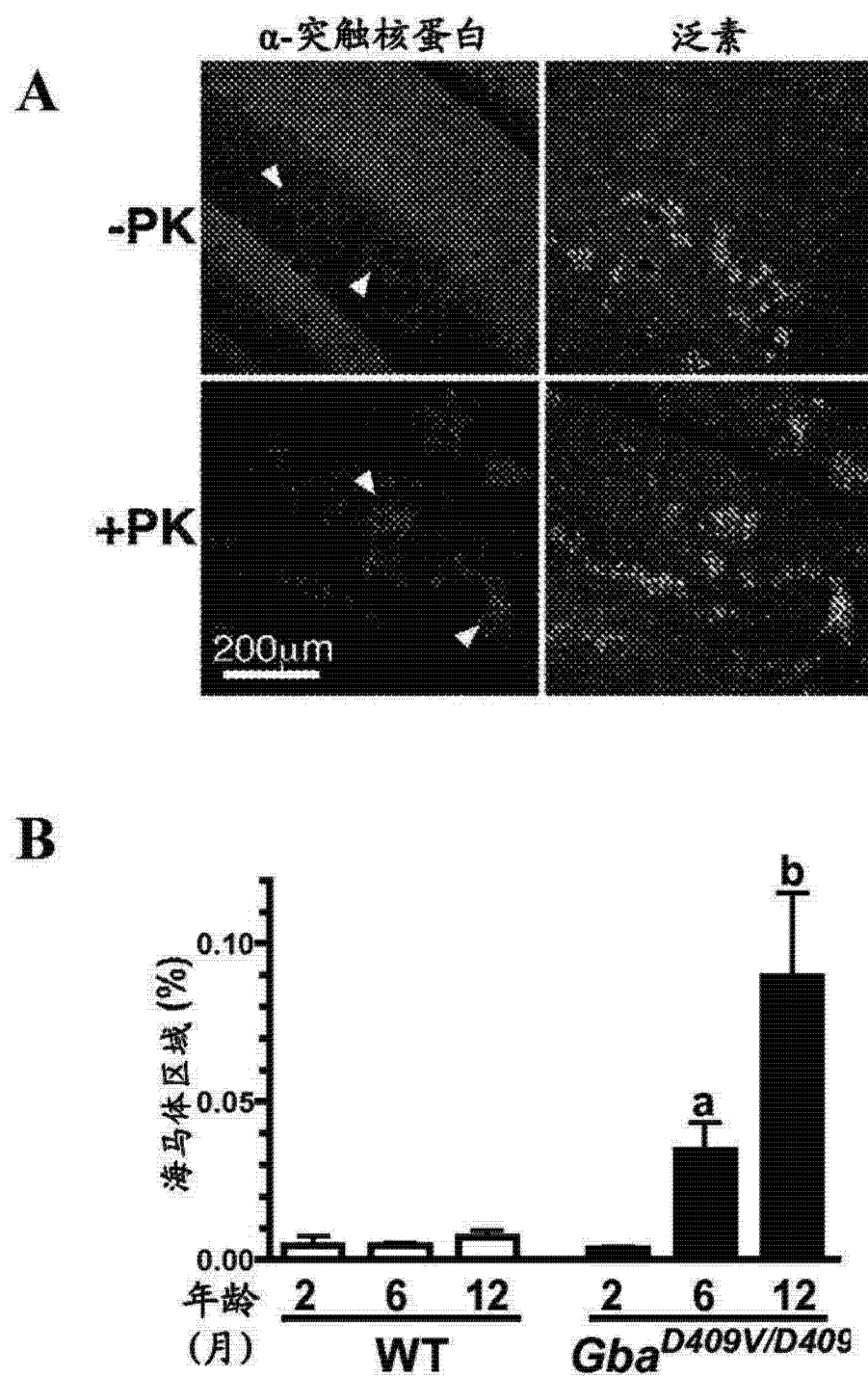


图 5

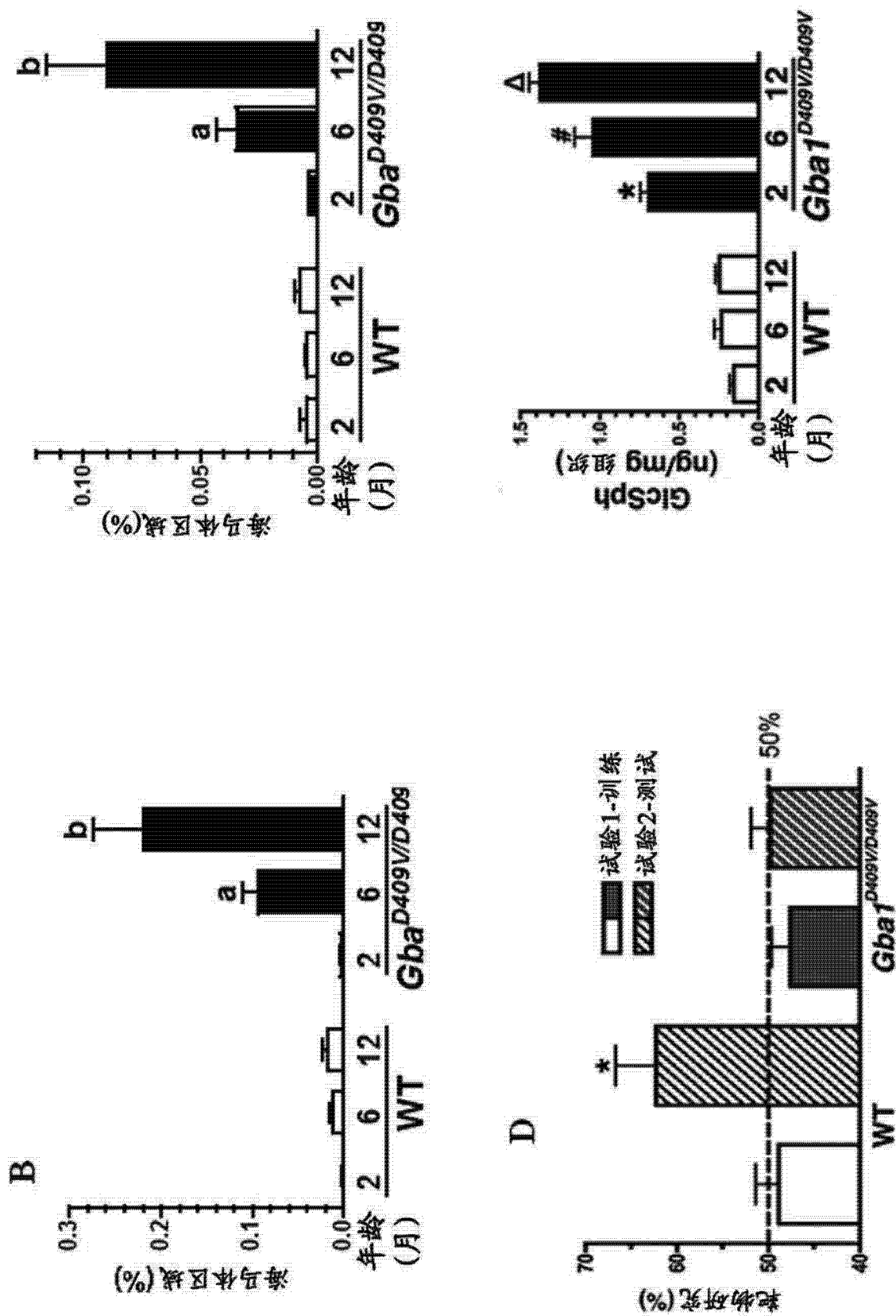


图 6

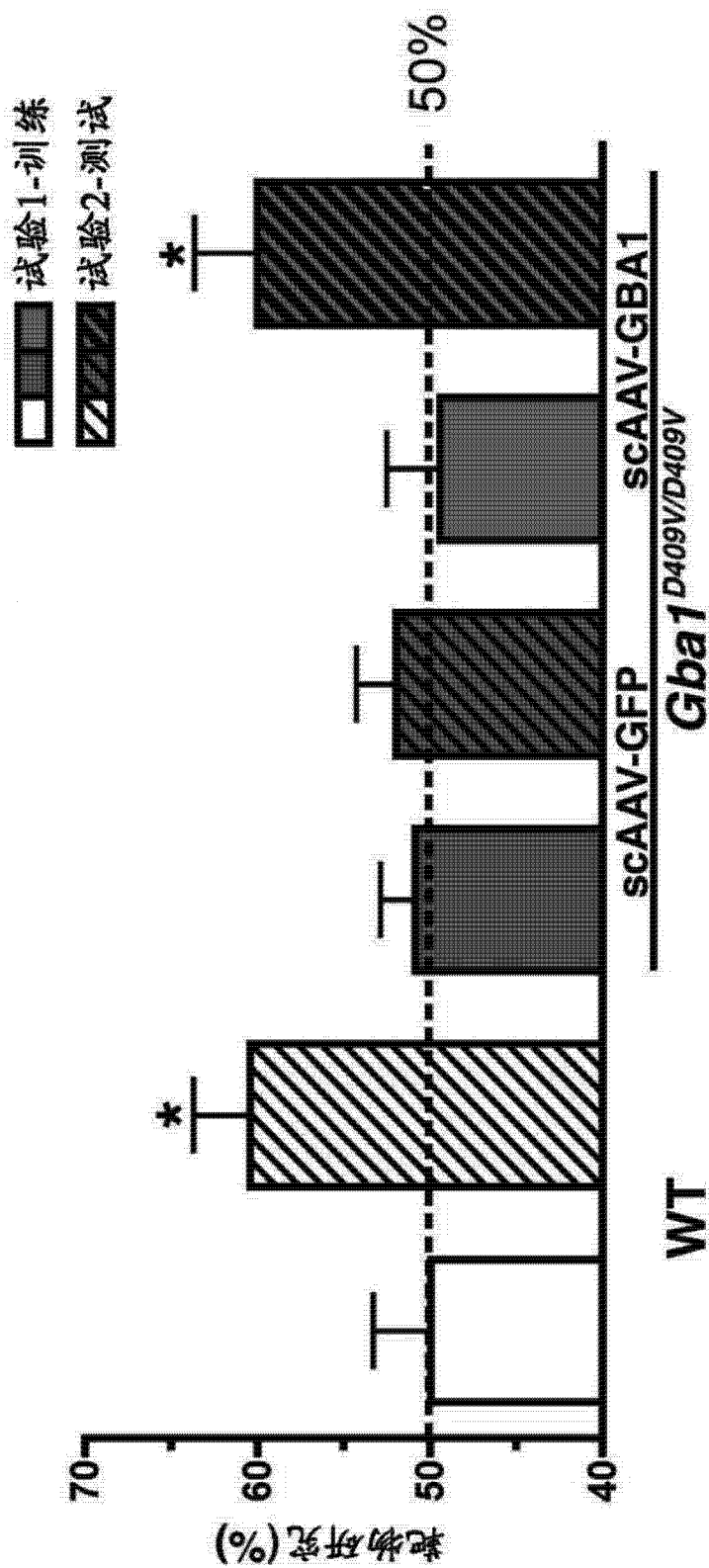


图 7



图 8

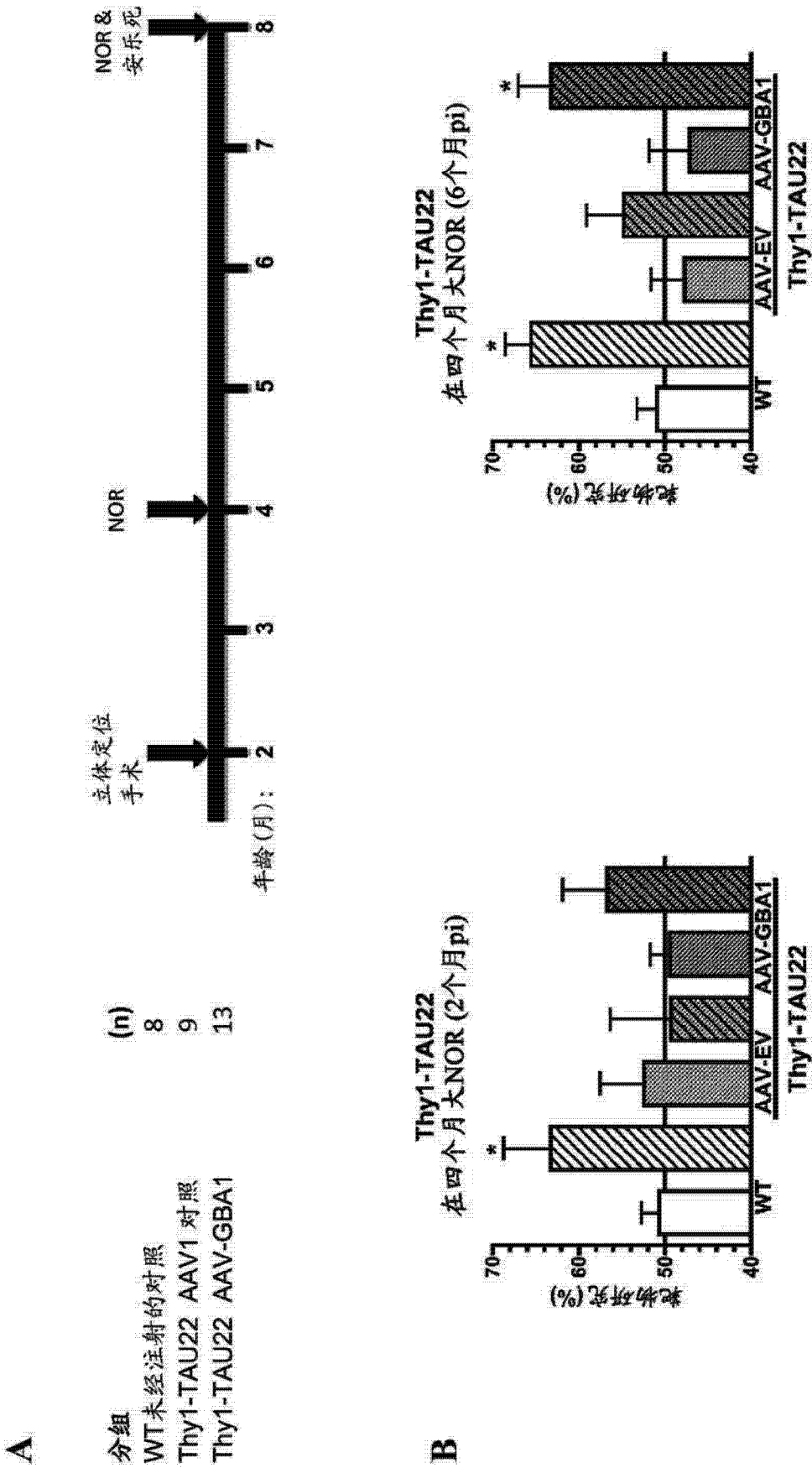


图 9