



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115835887 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 21

(21) 申请号 202080031494.3

(22) 申请日 2020.03.10

(30) 优先权数据

62/816,170 2019.03.10 US

62/871,007 2019.07.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.10.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2020/052073 2020.03.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/183374 EN 2020.09.17

(71) 申请人 牛津生物医学(英国)有限公司

地址 英国牛津郡

(72) 发明人 G.科克兰 M.斯顿

K.米特罗芬努斯 H.斯图尔特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 涂滔 陈丹丹

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书24页

序列表4页 附图16页

按照条约第19条修改的权利要求书2页

(54) 发明名称

用于治疗帕金森病的基因治疗组合物和方法

(57) 摘要

在患有神经退行性疾病或者患有受试者中内源性多巴胺水平降低的疾病的受试者中改善运动功能和减少运动障碍的方法,其包括向所述受试者施用有效量的包含核酸构建体的病毒载体,所述核酸构建体包含(i) 编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii) 编码GTP-环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列,(iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,或其任何组合。

1. 在患有神经退行性疾病或者患有受试者中内源性多巴胺水平降低的疾病的受试者中改善运动功能和减少运动障碍的方法,其包括向所述受试者施用有效量的包含核酸构建体的病毒载体,所述核酸构建体包含(i) 编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii) 编码GTP-环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列,(iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,或者其任何组合。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述神经退行性疾病或者所述内源性多巴胺水平降低的疾病是帕金森病。

3. 在患有帕金森病的受试者中治疗或改善运动功能和减少运动障碍的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含:(a) 包含核酸构建体的病毒载体,所述核酸构建体包含(i) 编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii) 编码GTP-环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列,(iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,或者其任何组合;和(b) 药学上可接受的赋形剂。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述受试者正在接受L-DOPA或者LED治疗。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中相对于施用前受试者的L-DOPA或者LED治疗剂量,所述受试者的L-DOPA或者LED治疗剂量在施用所述核酸构建体后三个月内降低。

6. 根据权利要求4-5中任一项所述的方法,其中平均L-DOPA或者LED治疗剂量在施用后三个月相比基线降低至少10%、至少12%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%或至少19%。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述病毒载体以 1×10^6 TU/受试者至 5×10^8 TU/受试者的目标剂量施用。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述目标剂量是约 4×10^6 TU/受试者至 8×10^6 TU/受试者; 8×10^6 TU/受试者至 4×10^7 TU/受试者;或者 1×10^7 TU/受试者至 5×10^8 TU/受试者。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中施用是单次施用。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中施用是施用至脑。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述施用是经输注施用至壳核。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其包括:(i) 编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii) 编码GTP环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列和(iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,其中所述编码TH的核苷酸序列与所述编码CH1的核苷酸序列连接,使得它们编码融合蛋白TH-CH1。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体包含:

$TH-L-CH1-IRES-AADC$;

$AADC-L-TH-L-CH1$;

$TH-L-CH1-L-AADC$;或

$TH-L-CH1-L-AADC$;

其中L是接头编码序列,IRES是内部核糖体进入位点,并且P是启动子。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述核酸构建体包含 $TH-L-CH1-IRES-AADC$ 。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体包含:(i) 编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii) 编码GTP-环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列和(iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,其中所述编码TH的核苷酸序列与所述编码

CH1的核苷酸序列连接,使得它们编码融合蛋白TH-CH1,其中所述构建体包含TH-L-CH1-IRES-AADC或者TH-L-CH1-P-AADC,其中L是接头编码序列,IRES是内部核糖体进入位点,以及P是启动子。

16.根据权利要求13-15中任一项所述的方法,其中所述接头(L) 未经密码子优化。

17.根据权利要求13-16中任一项所述的方法,其中所述接头(L) 包含如SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:3所示的序列。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体还包含启动子(P),所述启动子(P) 选自组成型启动子、组织特异性启动子或其组合。

19.根据权利要求18所述的方法,其中所述启动子是CMV启动子、磷酸甘油酸激酶启动子或者胸腺嘧啶核苷激酶启动子。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体或者腺相关病毒载体。

21.根据权利要求20所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述病毒载体是病毒颗粒。

23.根据权利要求22所述的方法,其中所述病毒颗粒是EIAV载体颗粒,并且其经VSV-G假型化。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述病毒载体配置成包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂的药物组合物。

25.根据权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述受试者的运动功能得以改善,如与基线相比,施用后3个月UPDRS-III (运动) OFF评分增加至少25%、至少30%、至少35%或者至少40%所示。

26.根据权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述受试者的运动障碍得以减少,如以下中的一项或者多项所示:(a) 与基线相比,施用后3个月麻烦运动障碍的Hauser日记ON时间减少至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%或者至少85%;(b) 与基线相比,施用后3个月UPDRS-IV评分减少至少50%、减少至少60%、至少65%、至少70%或者至少74%,和(c) 与基线相比,施用后3个月Rush运动障碍评分改善至少10%、至少12%、至少15%、至少18%。

27.根据权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述方法进一步改善受试者中选自震颤、运动徐缓、肌强直、姿势和/或平衡受损、自发运动丧失、说话困难、精细运动技能困难或其任何组合的一种或者多种症状。

28.根据权利要求1-27中任一项所述的方法,其中在施用后三个月内,与施用前受试者的基线相比,施用后所述受试者具有改善的运动功能、减少的运动障碍,以及降低的L-DOPA或者LED治疗剂量。

用于治疗帕金森病的基因治疗组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年3月10日提交的美国临时专利申请号62/816,170;以及于2019年7月5日提交的美国临时专利申请号62/871,007的权益,其中每一项通过引用整体并入本文。

[0003] 经EFS-WEB电子提交的序列表参考

[0004] 随本申请提交的电子提交序列表(名称:4226_038PC02_seqListing_ST25.txt,大小:4,044字节;以及创建时间:2020年3月10日)的内容通过引用整体并入本文。

发明领域

[0005] 本公开涉及用于帕金森病治疗的基因治疗组合物,其包括利用病毒载体颗粒递送的编码参与多巴胺合成途径酶活性的核苷酸序列。

[0006] 发明背景

[0007] 帕金森病(PD)是中枢神经系统(CNS)的神经退行性病症,其特征存在于黑质中多巴胺能神经元丧失。这最终导致纹状体中多巴胺耗竭,从而造成严重的运动缺陷。大多数患者PD的原因未知,称其为“散发性”或者“特发性”PD。据估计,在世界范围内有630万人患有PD,并且尽管大多数人将在60岁之后出现症状,但大约十人中有一人确诊于50岁之前(可于欧洲帕金森病协会网站查阅:www.epda.eu.com/en/pd-info/)。受侵袭的男性略多于女性。

[0008] 缺乏有疗效的治疗或疗法阻止PD疾病进展。现有治疗选项包括药理学和外科方案。疾病早期可以通过口服多巴胺能治疗有效地管理,诸如L-DOPA(多巴胺前体)疗法、多巴胺激动剂和旨在阻止外周L-DOPA或者多巴胺分解的酶抑制剂。口服多巴胺能治疗大约5年后,50%的患者出现运动问题,诸如运动障碍,特别是在延长的脉冲式使用之后。例如,随着疾病进展,L-DOPA疗法在运动缺陷的治疗中变得不太有效,从而需要使用存在严重副作用的更高剂量。

[0009] 一旦口服药物在中到晚期PD中开始失效,就没有了标准护理。在这一阶段,引入更有侵袭性的外科疗法以控制运动功能和减少活动度不足发作,包括深部脑刺激(DBS)、Duodopa®(联合左旋多巴/卡比多巴(carbidopa))和阿扑吗啡(多巴胺激动剂)泵。

附图说明

[0010] 图1显示了内源性多巴胺合成的示意图,内源性多巴胺合成包括酶将酪氨酸转化为左旋多巴(L-dopa)的酪氨酸羟化酶(TH)和环化水解酶1(CH1);以及将L-dopa转化为多巴胺的芳香族L-氨基酸脱羧酶(AADC)。

[0011] 图2A-2B分别显示了(A) Lenti-PD和(B) ProSavin®的基因构建体。两种构建体之间的区别包括:在Lenti-PD中,移动CH1更接近启动子以增强表达,并且在Lenti-PD中,TH和CH1通过柔性接头连接以确保共定位。

[0012] 图3显示了具有ProSavin®和Lenti-PD的原代人神经元中多巴胺和L-dopa的体外产生。

[0013] 图4A-4B显示了2期临床研究设计,其包括(A)A部分:剂量递增和(B)B部分:扩增队列与模拟外科手术。

[0014] 图5显示了通过UPDRS III部分(运动)OFF评分反映的PD患者进展。队列1受试者的基线评分为58和60。

[0015] 图6显示了对于Lenti-PD低剂量队列以及来自先前临床试验的 **ProSavin®** 的低剂量、中等剂量和高剂量队列和模拟(sham)对照,在第3个月时UPDRS III部分OFF评分相比基线的变化。

[0016] 图7A-7B显示了对于Lenti-PD低剂量队列以及 **ProSavin®** 的全部队列,在第3个月时分量表的UPDRS OFF相比基线的变化,(A)日常生活活动和(B)治疗的并发症。

[0017] 图8显示了Hauser患者日记和左旋多巴等效剂量(LED)。Hauser患者日记在研究访问前的两天内收集。要求患者在每个24小时周期内每30分钟完成一次日记。

[0018] 图9A-9D.图9A显示了对于Lenti-PD低剂量队列以及来自先前临床试验的 **ProSavin®** 的低剂量、中等剂量和高剂量队列和模拟对照,在第3个月和第6个月时UPDRS III部分OFF评分相比基线的变化。图9B和图9C显示了对于Lenti-PD低剂量队列以及 **ProSavin®** 全部队列,在第3个月和第6个月时分量表的UPDRS OFF相比基线的变化,(B)日常生活活动和(C)治疗的并发症。图9D显示了相对于 **ProSavin®**,PDQ-39综合指数的结果。PDQ-39是评估帕金森疾病特异性健康相关质量的问卷。患者在六个月经历了UPDRS II日常生活活动“OFF”评分相比基线19.5分,UPDRS IV治疗并发症“OFF”评分相比基线3分,PDQ-39综合指数相比基线32.1分的平均改善。

[0019] 图10A-10B显示了施用载体后PD的MPTP猕猴模型中的临床等级评分和移动总距离(TDM)变化百分比的量化。百分比根据每个时间点获得的最后3个TDM值计算。数据是相对于基线(对于MPTP后)或者相对于MPTP后的值(3和6月的数据)。数据表示平均值 $\pm$ s.e.m.; $p \leq 0.002^{***}$ 。

[0020] 发明概述

[0021] 本公开的某些方面涉及在患有神经退行性疾病或者患有受试者中内源性多巴胺水平降低的疾病的受试者中改善运动功能和减少运动障碍的方法,该方法包括向受试者施用有效量的包含核酸构建体的病毒载体,该核酸构建体包含(i)编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii)编码GTP-环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列,(iii)编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,或其任何组合。在一些实施方案中,神经退行性疾病或者内源性多巴胺水平降低的疾病是帕金森病。

[0022] 本公开的某些方面涉及在患有帕金森病的受试者中治疗或改善运动功能和减少运动障碍的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的组合物,该组合物包含:(a)包含核酸构建体的病毒载体,该核酸构建体包含(i)编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii)编码GTP-环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列,(iii)编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,或其任何组合;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0023] 在一些实施方案中,受试者正在接受L-DOPA或者左旋多巴等效剂量(LED)的治疗。在一些实施方案中,相对于施用前受试者的L-DOPA或者LED治疗剂量,受试者的每日L-DOPA或LED治疗剂量在施用核酸构建体后三个月内降低。在一些实施方案中,平均每日L-DOPA或

者LED治疗剂量在施用后三个月相比基线降低至少10%，至少12%，至少14%，至少15%，至少16%，至少17%，至少18%，至少19%或至少20%。

[0024] 在一些实施方案中，病毒载体以 1×10^6 TU/受试者至 5×10^8 TU/受试者的目标剂量施用。在一些实施方案中，目标剂量是约 4×10^6 TU/受试者至 8×10^6 TU/受试者； 8×10^6 TU/受试者至 4×10^7 TU/受试者；或者 1×10^7 TU/受试者至 5×10^8 TU/受试者。

[0025] 在一些实施方案中，施用是单次施用。在一些实施方案中，施用是施用至脑。在一些实施方案中，施用是经输注施用至壳核。

[0026] 在一些实施方案中，核酸构建体包含：(i) 编码酪氨酸羟化酶 (TH) 的核苷酸序列，(ii) 编码GTP环化水解酶I (CH1) 的核苷酸序列和 (iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶 (AADC) 的核苷酸序列，其中编码TH的核苷酸序列与编码CH1的核苷酸序列连接，使得它们编码融合蛋白TH-CH1。

[0027] 在一些实施方案中，核酸构建体包含：

[0028] $TH-L-CH1-IRES-AADC$ ；

[0029] $AADC-L-TH-L-CH1$ ；

[0030] $TH-L-CH1-L-AADC$ ；或

[0031] $TH-L-CH1-L-AADC$ ；

[0032] 其中L是接头编码序列，IRES是内部核糖体进入位点，并且P是启动子。

[0033] 在一些实施方案中，核酸构建体包含TH-L-CH1-IRES-AADC。

[0034] 在一些实施方案中，核酸构建体包含 (i) 编码酪氨酸羟化酶 (TH) 的核苷酸序列，(ii) 编码GTP-环化水解酶I (CH1) 的核苷酸序列和 (iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶 (AADC) 的核苷酸序列，其中编码TH的核苷酸序列与编码CH1的核苷酸序列连接，使得它们编码融合蛋白TH-CH1，其中构建体包含TH-L-CH1-IRES-AADC或TH-L-CH1-P-AADC，其中L是接头编码序列，IRES是内部核糖体进入位点，以及P是启动子。

[0035] 在一些实施方案中，接头 (L) 包含如SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:3所示的序列。在一些实施方案中，构建体还包含启动子 (P)，其选自组成型启动子、组织特异性启动子或其组合。在一些实施方案中，启动子是CMV启动子、磷酸甘油酸激酶启动子或者胸腺嘧啶核苷激酶启动子。

[0036] 在一些实施方案中，病毒载体是慢病毒载体或者腺相关病毒载体。在一些实施方案中，病毒载体是慢病毒载体。在一些实施方案中，病毒载体是病毒颗粒。在一些实施方案中，病毒颗粒是EIAV载体颗粒，并且其经VSV-G假型化。

[0037] 在一些实施方案中，病毒载体配制成包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂的药物组合物。

[0038] 在一些实施方案中，受试者的运动功能得以改善，如与基线相比，施用后3个月UPDRS-III (运动) OFF评分增加至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%所示。

[0039] 在一些实施方案中，受试者的运动障碍得以减少，如以下一项或多项所示：(a) 与基线相比，施用后3个月麻烦运动障碍的Hauser日记ON时间减少至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%；(b) 与基线相比，施用后3个月UPDRS-IV评分减少至少50%、减少至少60%、至少65%、至少70%、至少74%或至少75%，和(c) 与基线

相比,施用后3个月Rush运动障碍评分改善至少10%、至少12%、至少15%、至少18%、至少20%或至少25%。

[0040] 在一些实施方案中,该方法进一步改善受试者中选自震颤、运动徐缓、肌强直、姿势和/或平衡受损、自发运动丧失、说话困难、精细运动技能困难或其任何组合的一种或者多种症状。

[0041] 在一些实施方案中,在施用后三个月内,与施用前受试者的基线相比,施用后受试者具有改善的运动功能、减少的运动障碍,以及降低的L-DOPA或者LED治疗剂量。

[0042] 发明详述

[0043] 定义

[0044] 提供以下定义和方法以更好地定义本发明和指导本领域普通技术人员实践本发明。必须注意,如本文所用的和在所附权利要求中,单数形式“一个”或者“一种”或者“该”包括复数指示物,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“一种酶”包括多种酶。

[0045] 如本文所用,在一些实施方案中,术语“载体”用于指将核酸(如,DNA)片段从一个细胞转移至另一个细胞的核酸分子。术语“媒介”或者“递送载体”有时可与“载体”互换使用。其意在任何形式的媒介或者载体都涵盖在该定义内。例如,载体(如,病毒载体)包括但不限于病毒颗粒、质粒、转座子等。

[0046] 当第一核酸序列位于与第二核酸序列的功能关系中时,第一核酸序列与第二核酸序列是“可操作地连接的”。例如,如果启动子影响编码序列的转录或者表达,则启动子与编码序列是可操作地连接的。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的并且当需要连接两个蛋白质编码区时,在同一阅读框中。

[0047] 术语“突变体”包括与野生型序列相比包括一个或者多个氨基酸变化的酶。例如,突变体可以包括一个或多个氨基酸增加、删除或者置换。在一些实施方案中,突变体可以人为创建(例如通过定点诱变)。

[0048] 本文中,术语“同源物”意指与多巴胺合成酶具有一定同源性的蛋白质。本文中,术语“同源性”可以等同于“同一性”。

[0049] 术语“受试者”可与“患者”互换使用。本公开的受试者包括但不限于人和动物(如,猪、牛、狗、马、驴、小鼠、仓鼠、猴)受试者。

[0050] 核酸构建体

[0051] 本公开的某些方面涉及核酸构建体,其包括包含一个、两个或者三个感兴趣的核苷酸序列(NOI)的核苷酸序列,其中每个核苷酸序列编码酶。核酸构建体可以是DNA或RNA序列,例如合成的RNA/DNA序列、重组RNA/DNA序列(即通过利用重组DNA技术制备)、cDNA序列或者部分基因组DNA序列,包括其组合。本公开还涵盖载体,例如质粒,其包含本公开的核酸构建体。

[0052] 在一些实施方案中,核酸构建体中的NOI编码参与多巴胺合成的酶。如图1所示,示意图显示了内源性多巴胺合成包括酶:将酪氨酸转化为左旋多巴(L-dopa)的酪氨酸羟化酶(TH)和环化水解酶1(CH1);以及将L-dopa转化为多巴胺的芳香族L-氨基酸脱羧酶(AADC)。在一些实施方案中,NOI编码酪氨酸羟化酶(TH)、GTP-环化水解酶I(CH1)、芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC),或者其功能片段。在一些实施方案中,核酸构建体包含编码选自酪氨酸羟化酶(TH)、GTP-环化水解酶I(CH1)、芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)或其任何组合的酶的

核酸。所有三个全长的酶的序列是可获得的：登录号分别为X05290、U19523和M76180。

[0053] 在一些实施方案中，NOI可以编码多巴胺合成酶的全部或者部分。例如，NOI可以编码蛋白的截短形式，其保留酶活性。全长TH包含催化结构域、四聚体化结构域和N端调节结构域。在一些实施方案中，本公开构建体的编码TH的NOI编码截短的TH，其包含催化结构域和四聚体化结构域，但缺乏功能性N端调节结构域。在一些实施方案中，截短的TH避免了可能限制全长酶活性的多巴胺的反馈抑制。

[0054] 在一些实施方案中，NOI可以编码多巴胺合成酶的突变体、同源物或者变体。

[0055] 在一些实施方案中，在氨基酸或核苷酸水平上，同源序列与野生型或参考序列可以具有至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或者至少99%的同一性。在一些实施方案中，同源物将包含或编码与野生型或参考序列相同的活性位点等。同一性比对可以例如使用BLAST软件实施。

[0056] 在一些实施方案中，一个或多个NOI经密码子优化。在一些实施方案中，一个或多个NOI未经密码子优化。

[0057] 接头

[0058] 本公开的某些方面涉及例如包含本公开的慢病毒载体基因组的病毒载体，该病毒载体包含本公开的核酸构建体，该核酸构建体包含编码多巴胺合成酶的三个NOI。在一些实施方案中，至少两个NOI通过接头编码序列(L)连接，使得基因组编码包含酶氨基酸序列的融合蛋白。

[0059] 在一些实施方案中，合适的接头可以包含氨基酸重复，例如甘氨酸-丝氨酸重复。接头的目的是为了允许酶的正确形成和/或运作。其应该有足够的柔性和足够的长度来实现这一目的。由于NOI可以编码不同的酶，所以接头允许两种酶的运作。可以选择柔性接头的编码序列，使得其促进翻译暂停，并且因此导致NOI的蛋白质产物的独立折叠。

[0060] 在一些实施方案中，合适的接头包括以下公开的接头，但本公开不限于这些特定的接头。

[0061] 1. Somia et al., 1993 PNAS 90, 7889中描述的 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID NO:2)。

[0062] 2. (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₅ (SEQ ID NO:4)。

[0063] 3. 来自酵母HSF-1的 (Asn-Phe-Ile-Arg-Gly-Arg-Glu-Asp-Leu-Leu-Glu-Lys-Ile-Ile-Arg-Gln-Lys-Gly-Ser-Ser-Asn) (SEQ ID NO:5)，参见Wiederrecht et al., 1988 Cell 54, 841。

[0064] 4. 来自POU-特异性OCT-1的 (Asn-Leu-Ser-Ser-Asp-Ser-Ser-Leu-Ser-Ser-Pro-Ser-Ala-Leu-Asn-Ser-Pro-Gly-Ile-Glu-Gly-Leu-Ser) (SEQ ID NO:6)，参见Dekker et al., 1993 Nature 362, 852和Sturm et al., 1988 Genes and Dev. 2, 1582。

[0065] 5. 来自含RGD层粘连蛋白多肽的 (Gln-Gly-Ala-Thr-Phe-Ala-Leu-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-Gln-Gly) (SEQ ID NO:7)，参见Aumailly et al., 1990 FEBS Lett. 262, 82。

[0066] 6. 来自含LDV接头的 (Ser-Gly-Gly-Gly-Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr-Gly-Gly-Ser-Ser-Pro-Gly) (SEQ ID NO:8)，参见Wickham et al., Gene Therapy 1995 2, 750。

[0067] 在一些实施方案中，可以使用以下GS15柔性接头：(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃。(SEQ

ID NO:2)。GS5、GS15和GS30接头可同样合适。

[0068] 在一些实施方案中,核酸构建体包含两个接头,如,连接所有三种酶作为一个融合蛋白表达,可以选择两个不相同的接头编码序列,或者接头序列可以是相同的。接头序列在氨基酸水平上可以是相同的,但由于遗传密码的简并性,它们的编码核酸序列可以是不同的。

[0069] 在一些实施方案中,在TH和CH1基因之间使用改进的GS15接头编码序列(GS15mod)。在一些实施方案中,本公开的核苷酸序列中使用的接头编码序列可以是接头编码序列的改进形式,例如编码GS5、GS15和GS30的接头编码序列,该序列没有为了人使用而进行密码子优化。

[0070] 在一些实施方案中,接头编码序列可以包含以下序列:GGAGGTGGCGGGTCCGGGGGCGGGGGTAGCGGTGGCGGGGGCTCC (SEQ ID No.1)。

[0071] 在一些实施方案中,核苷酸序列可以编码具有如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的接头,并且核苷酸序列可以包含SEQ ID NO.3所示的序列。(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID No.2);GGGGGAGGCGTAGCGGCGGAGGGGGCTCCGGCGGAGGCGGGGAGC (SEQ ID No.3)。

[0072] 在一些实施方案中,构建体可以包含如SEQ ID No.1所示的序列。

[0073] IRES

[0074] 当位于mRNA的开放阅读框之间时,IRES通过促进核糖体在IRES元件处进入,随后启动下游翻译,从而允许下游开放阅读框的翻译。已经研究了逆转录病毒载体中IRES元件的使用(参见,例如WO 93/0314)。用于慢病毒载体的合适IRES序列描述于WO 02/29065中。在一些实施方案中,本公开的核酸构建体包含IRES。在一些实施方案中,核酸构建体包含TH_L-CH1-IRES-AADC。

[0075] 启动子

[0076] 在一些实施方案中,可以用启动子代替IRES,例如,以控制AADC基因的表达。在AADC表达受IRES控制的配置中,AADC水平可以限制多巴胺的产生。

[0077] 使用控制序列,如启动子/增强子和其他表达调节信号,可以控制NOI的表达。可以使用原核启动子和在真核细胞中运作的启动子。可以使用组织特异性或刺激物特异性启动子。也可以使用包含两个或多个不同启动子的序列元件的嵌合启动子。

[0078] 在一些实施方案中,合适的启动序列是强启动子,包括那些衍生自病毒基因组的启动子,例如衍生自多瘤病毒、腺病毒、禽痘病毒、牛乳头状瘤病毒、鸟肉瘤病毒、巨细胞病毒(CMV)、逆转录病毒和猿猴病毒40(SV40)的启动子,或者衍生自哺乳动物细胞启动子的启动子,例如肌动蛋白启动子或核糖体蛋白启动子。通过在载体中插入增强子序列,基因的转录可以进一步增加。增强子方向和位置相对独立;然而,可以采用来自真核细胞病毒的增强子,例如复制起点后侧的SV40增强子(bp 100-270)和CMV早期启动子增强子。增强子可以在启动子的5'或3'位置拼接到载体上,但优选位于启动子的5'位点。在一些实施方案中,本公开的核酸构建体包含CMV启动子。

[0079] 启动子还可以包括一些特征以确保或增加在合适宿主中的表达。例如,这些特征可以是保守的区域,如Pribnow盒或TATA盒。启动子甚至可以包含其他序列以影响(如保持、增强、减少)核苷酸序列的表达水平。合适的其他序列包括Sh1-内含子或ADH内含子。其他序列包括可诱导元件,例如温度、化学、光或压力诱导元件。此外,还可以存在合适的元件以增

强转录或翻译。

[0080] 在一些实施方案中,启动子可以例如是组成型的或组织特异性的。

[0081] 组成型启动子

[0082] 在一些实施例中,合适的组成型启动子包括CMV启动子、RSV启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK)和胸腺嘧啶核苷激酶(TK)启动子。

[0083] 组织特异性启动子

[0084] 在一些实施例中,合适的组织特异性启动子包括突触蛋白1、烯醇化酶、 α -钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II和GFAP。

[0085] 融合

[0086] 在某些实施方案中,病毒载体如慢病毒载体包含本公开的核酸构建体,该核酸构建体包含编码TH、CHI和/或AADC的NOI。例如,通过使用柔性接头,三种酶中的两种或所有三种酶可以融合。当两种酶融合时,编码第三种酶的NOI可以通过例如IRES与编码融合蛋白的核苷酸序列可操作地连接。IRES可以位于编码融合蛋白的核苷酸序列的5'或3'位置。或者,编码第三种酶的NOI可以与启动子可操作地连接。

[0087] 在一些实施方案中:

[0088] TH与CH1按顺序连接(即形成TH-CH1融合蛋白)的构建体获得高绝对水平的儿茶酚胺产量;以及

[0089] AADC和TH按任一顺序(即形成AADC-TH或TH-AADC融合蛋白)连接的构建体获得L-DOPA向多巴胺的高效率转化。

[0090] 在一些实施方案中,本公开的核酸构建体可以编码按TC顺序而非CT顺序的TH和CH1的融合物。

[0091] 在一些实施方案中,核酸构建体可以选自以下项:

[0092] $TH_{-L}-CH1_{-IRES}-AADC$;

[0093] $AADC_{-L}-TH_{-L}-CH1$;

[0094] $TH_{-L}-CH1_{-L}-AADC$;

[0095] $TH_{-L}-CH1_{-P}-AADC$;

[0096] $TH_{-L}-AADC_{-IRES}-CH1$;

[0097] $AADC_{-L}-TH_{-IRES}-CH1$;和

[0098] $TH1_{-L}-AADC_{-L}-CH1$;其中

[0099] L=接头编码序列,

[0100] IRES=内部核糖体进入位点,

[0101] P=启动子。

[0102] 如上所述,野生型TH包含催化结构域、四聚体化结构域和N端调节结构域。

[0103] 在一些实施方案中,编码TH的NOI可以编码截短的TH,其包含催化结构域和四聚体化结构域,但缺乏功能性N端调节结构域。

[0104] 在一些实施方案中,截短形式的TH经由GS15接头与CH1融合。

[0105] 病毒载体

[0106] 在一些实施方案中,本公开涉及病毒载体基因组的用途,例如包含根据本公开的核苷酸构建体序列的慢病毒载体基因组或腺相关病毒载体基因组的用途。本公开还提供了

包含这种基因组的病毒载体生产系统和载体颗粒。

[0107] 在一些实施方案中,本公开的病毒载体可以衍生或可衍生自任何合适的病毒。在一些实施方案中,重组病毒颗粒能够用感兴趣的核苷酸序列(NOI)转导靶细胞。

[0108] 对于逆转录病毒颗粒而言,其一旦进入细胞,来自该载体颗粒的RNA基因组即逆转录为DNA并整合到靶细胞的基因组中。

[0109] 慢病毒载体

[0110] 慢病毒是众多的逆转录病毒群体的一部分。慢病毒的详细清单可见于Coffin et al. (1997) "Retroviruses" Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: J M Coffin, S M Hughes, H E Varmus pp 758-763。简而言之,慢病毒可分为灵长类组和非灵长类组。灵长类慢病毒的示例包括但不限于:人类免疫缺陷病毒(HIV),其为获得性免疫缺陷综合症(AIDS)的病原体;以及猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。非灵长类慢病毒组包括原型“缓慢病毒(prototype slow virus)”visna/maedi病毒(VMV),以及相关的山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV),马传染性贫血病毒(EIAV),猫免疫缺陷病毒(FIV)和牛免疫缺陷病毒(BIV)。

[0111] 慢病毒与逆转录病毒家族的其他成员的区别在于慢病毒具有感染分裂和非分裂细胞两者的能力(Lewis et al (1992) EMBO J 11(8):3053-3058)和Lewis and Emerman (1994) J Virol 68(1):510-516)。相比而言,其他逆转录病毒如MLV不能感染非分裂或缓慢分裂的细胞如构成例如肌肉、眼睛、脑、肺和肝组织的那些细胞。

[0112] 马传染性贫血病毒(EIAV)是逆转录病毒家族慢病毒属的成员。野生型EIAV病毒具有二聚化的RNA基因组(单链,正极性),其被包装成含有核蛋白核心的球形包膜病毒体。野生型EIAV基因组的复制通过逆转录和整合至宿主细胞基因组发生。其基因组包含编码结构蛋白gag、pol和env的三个基因,以及位于整合的病毒基因组两端的长末端重复序列(LTR)。除了所有逆转录病毒共有的gag、pol和env序列,EIAV基因组还包含几个短的开放阅读框(ORF)。这些短的ORF翻译自多重剪接的mRNA。ORF S1编码转录反式激活蛋白lat。ORF S2编码一种功能未知的蛋白,以及ORF S3似乎编码rev蛋白。认为rev对gag、pot和env的有效表达是必需的。Rev通过与被称为rev应答元件(RRE)的RNA序列相互作用发挥转录后作用,该元件位于EIAV的env基因内。

[0113] EIAV的野生型基因组还包含几个顺式作用序列,包括R序列(基因组两端的短重复序列);U5序列(紧随R序列之后的独特序列元件);U3序列(位于结构蛋白下游的独特序列元件);控制整合的前病毒转录起始的启动子元件;包装序列(本文中可互换地指包装位点或包装信号);以及5'剪接供体位点。

[0114] 如本文所用,慢病毒载体可以是包含至少一个可衍生自慢病毒的组成部分的载体,如递送载体。优选地,该组成部分参与载体感染细胞、表达基因或复制的生物学机制。

[0115] 逆转录病毒和慢病毒基因组的基本结构共享许多共同特征,如5'LTR和3'LTR,在5'LTR和3'LTR之间或其内部含有使基因组能够被包装的包装信号,引物结合位点,使病毒基因组能够整合至宿主细胞基因组的接触位点,以及gag、pol和env基因编码包装组分,该包装组分是病毒颗粒组装所需的多肽。慢病毒具有额外的特征,如HIV中的rev和RRE序列,其使整合的前病毒的RNA转录物能够从被感染靶细胞的细胞核高效输出到细胞质。

[0116] 在前病毒中,病毒基因的两端侧接被称为长末端重复序列(LTR)的区域。LTR通过充当增强子-启动子序列和多腺苷酸化信号来负责转录,从而控制病毒基因的表达。

[0117] LTR本身是相同的序列,其可分为三种元件,称作U3、R和U5。U3衍生自RNA 3'端特有的序列。R衍生自在RNA两端重复的序列,U5衍生自RNA 5'端特有的序列。这三种元件的大小在不同的病毒中可显著不同。

[0118] 在复制缺陷型慢病毒载体基因组中,gag、pol和env可以不存在或者是非功能性的。

[0119] 在本公开的典型慢病毒载体中,可以从病毒中除去至少一部分对复制至关重要的一个或多个蛋白质编码区。这使得病毒载体是复制缺陷的。病毒基因组的部分也可以被NOI取代以便产生包含NOI的载体,该载体能够转导靶标非分裂宿主细胞和/或将其基因组整合到宿主基因组。

[0120] 在一个实施方案中,慢病毒载体是非整合载体,如WO 2007/071994 (其作为整体并入本文) 中公开的那些载体。

[0121] 在一些实施方案中,载体具有递送没有或缺乏病毒RNA的序列的能力。在另一个实施方案中,可以使用位于待递送RNA上的异源结合域(与gag异源)和gag或pol上的同源结合域以确保待递送RNA的包装。这两种载体在WO 2007/072056中描述。

[0122] 慢病毒载体可以是“非灵长类”载体,即衍生自不主要感染灵长类,特别是人类的病毒。

[0123] 在一些实施方案中,病毒载体可以衍生自EIAV。除了gag、pol和env基因之外,EIAV还编码另外三个基因:tat、rev和S2。Tat充当病毒LTR的转录激活剂(Derse and Newbold (1993) Virology 194 (2):530-536和Maury et al (1994) Virology 200 (2):632-642),并且Rev通过rev应答元件(RRE)调节和协调病毒基因的表达(Martarano et al. (1994) J Virol 68 (5):3102-3111)。这两种蛋白的作用机制被认为与灵长类病毒中的类似机制十分相似(Martarano et al. (1994) J Virol 68 (5):3102-3111)。S2的功能未知。此外,已鉴定出EIAV蛋白Ttm,其由在跨膜蛋白的开始处与env编码序列拼接的tat的第一外显子编码(Beisel et al. (1993) J Virol 67 (2):832-842)。

[0124] 术语“重组慢病毒载体”指具有充分的慢病毒遗传信息以允许在包装组分存在的情况下将RNA基因组包装成能够感染靶细胞的病毒颗粒的载体。靶细胞的感染可包括逆转录和整合至靶细胞的基因组。重组慢病毒载体携带待由载体递送至靶细胞的非病毒编码序列。重组慢病毒载体不能独立复制以在最终靶细胞内产生感染性慢病毒颗粒。通常,重组慢病毒载体缺乏功能性的gag-pol和/或env基因和/或其他对复制至关重要的基因。本公开的载体可以配置为断裂内含子(split intron)载体。PCT专利申请WO 99/15683中描述了断裂内含子载体。

[0125] 在一些实施方案中,本公开的重组慢病毒载体可以具有最小病毒基因组。

[0126] 如本文所用,术语“最小病毒基因组”意指病毒载体已被操作以除去非必要元件并保留必要元件,从而提供感染、转导和递送感兴趣的核苷酸序列到靶宿主细胞的必需功能。这一策略的进一步细节可见于WO 98/17815。

[0127] 在本公开的一些方面,载体是自失活载体。在某些方面,通过删除转录增强子或3'LTR的U3区域中的增强子和启动子来构建自失活逆转录病毒载体。经过一轮载体逆转录和整合,这些变化被复制到5'和3'LTR中,从而产生转录失活的前病毒(Yu et al (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83:3194-3198; Dougherty and Temin et al (1987)

Proc.Natl.Acad.Sci.84:1197-1201;Hawley (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.84:2406-2410和 Yee et al (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.91:9564-9568)。然而,这种载体中的LTR内部的任何启动子将仍然是转录活性的。这种策略被用来消除病毒LTR中的增强子和启动子对内部放置基因转录的影响。这种影响包括增加转录 (Jolly et al (1983) Nucleic Acids Res.11:1855-1872) 或抑制转录 (Emerman and Temin (1984) Cell 39:449-467)。这种策略也可以用于消除从3'LTR到基因组DNA的下游转录 (Herman and Coffin (1987) Science 236:845-848)。在人类基因治疗中这尤其令人关注,因为防止内源性致癌基因的意外激活相当重要。

[0128] 然而,用于在宿主细胞/包装细胞内产生病毒基因组的质粒载体将还包括转录调节控制序列,该调节控制序列可操作地连接至慢病毒基因组,以指导宿主细胞/包装细胞中基因组的转录。这些调节序列可以是与转录的慢病毒序列相关的天然序列,即5'U3区域,或者它们可以是异源启动子,如另一个病毒启动子,例如CMV启动子。为了有效的病毒生产,一些慢病毒基因组需要额外的序列。例如,就HIV而言,优选包含rev和RRE序列。然而,对rev和RRE的需求可以通过gag-pol的密码子优化(如WO 01/79518所述)和/或在LTR下游和内部启动子上游包含开放阅读框(如WO 03/064665所述)来减少或消除,例如在本文公开的某些构建体中使用了neo,然而,技术人员可以使用任何合适的开放阅读框。与rev/RRE系统实施相同功能的备选序列同样是已知的。例如,在Mason Pfizer猴病毒中发现了rev/RRE系统的功能类似物。这种元件被称为组成型转运元件(CTE),并且包括基因组中的RRE型序列,其被认为与被感染细胞中的因子相互作用。可以认为该细胞因子是rev类似物。因此,CTE可以用作rev/RRE系统的替代物。任何其他已知的或可获得的功能等同物都可与本公开有关。例如,已知HTLV-I的Rex蛋白可以功能性地替代HIV-1的Rev蛋白。还已知Rev和Rex与IRE-BP具有类似的作用。

[0129] 根据本公开的慢病毒载体可以包括自失活的最小慢病毒载体,其衍生自马传染性贫血病毒(EIAV),优选编码参与多巴胺合成途径的三种酶。这种载体编码的蛋白质可以包括人酪氨酸羟化酶基因的截短形式(其缺少参与TH反馈调节的N端的160个氨基酸)、人芳香族L-氨基酸脱羧酶(AADC)和人GTP-环化水解酶1(GTP-CH1)基因。该载体可以通过用三个质粒瞬时转染细胞(如HEK293T细胞)来产生,这三个质粒编码:(1)如本文所述的载体基因组,(2)合成的EIAV gag/pol表达载体(pESGPK,WO 01/79518和WO 05/29065)和(3)VSV-G包膜表达载体(pHGK)。

[0130] 包装序列

[0131] 术语“包装信号”可互换地称为“包装序列”或“psi”,用于指病毒颗粒形成过程中慢病毒RNA链衣壳化所需的非编码顺式作用序列。在HIV-1中,这一序列已经映射到从主要剪接供体位点(SD)的上游延伸到至少gag起始密码子的位点。

[0132] 如本文所用,术语“延伸的包装信号”或“延伸的包装序列”指使用在psi序列周围并进一步延伸到gag基因的序列。包含这些额外的包装序列可以提高载体RNA插入到病毒颗粒的效率。

[0133] 假型化

[0134] 在一些实施方案中,本公开的慢病毒载体是假型化的。在这方面,假型化可以赋予一个或多个优点。例如,对于慢病毒载体,基于HIV的载体的env基因产物将限制这些载体仅

感染表达称为CD4的蛋白质的细胞。但是,如果用来自其他病毒的env序列置换这些载体中的env基因,那么这些载体可以具有更广泛的感染谱(Verma and Somia (1997) Nature 389 (6648):239-242)。举例来说,Miller等人用来自兼嗜性逆转录病毒(amphotropic retrovirus) 4070A的包膜对MoMLV载体进行假型化(Mol.Cell.Biol.5:431-437)。其他人已用来自VSV的糖蛋白对基于HIV的慢病毒载体进行假型化(Verma and Somia (1997) Nature 389 (6648):239-242)。

[0135] 在一些实施方案中,Env蛋白是经修饰的Env蛋白,如突变或工程化的Env蛋白。可以进行或选择修饰以引入靶向能力或减少毒性或用于其他目的(Marin et al (1996) J Virol 70 (5):2957-2962;Nilson et al (1996) Gene Ther 3 (4):280-286;和Fielding et al (1998) Blood 91 (5):1802-1809和其中引用的文献)。

[0136] 在一些实施方案中,载体可以被假型化,例如用编码狂犬病G蛋白或VSV-G蛋白的至少部分的基因进行假型化。

[0137] VSV-G

[0138] 在一些实施方案中,弹状病毒水泡性口炎病毒(VSV)的包膜糖蛋白(G),是已显示能够使包括慢病毒在内的某些逆转录病毒假型化的包膜蛋白。

[0139] 其在缺少任何逆转录病毒包膜蛋白的情况下使基于MoMLV的逆转录病毒载体假型化的能力首先在Emi et al. (1991) J.Virol.65:1202-1207中显示。WO 94/294440教导了逆转录病毒载体可以用VSV-G成功地假型化。这些假型化的VSV-G载体可以用于转导广泛的哺乳动物细胞。最近,Abe et al. (1998) J.Virol 72 (8):6356-6361教导了非感染性逆转录病毒颗粒可以通过添加VSV-G而具有感染性。

[0140] Burns et al (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037成功地用VSV-G对逆转录病毒MLV进行假型化,这导致相比于天然形式的MLV,该载体具有改变的宿主范围。VSV-G假型化的载体已显示不仅能感染哺乳动物细胞,而且能感染来源于鱼类、爬行动物和昆虫的细胞系(Burns et al (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037)。对于各种细胞系,它们也显示出比传统的兼嗜性包膜更有效(Yee et al. (1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:9564-9568和Emi et al. (1991) J.Virol.65:1202-1207)。VSV-G蛋白也可以用于对某些慢病毒和逆转录病毒进行假型化,因为它的胞质尾能够与逆转录病毒核心相互作用。

[0141] 提供非慢病毒假型化包膜,如VSV-G蛋白显示出载体颗粒可以浓缩到高滴度而不丧失感染性的优势(Akkina et al (1996) J.Virol.70:2581-2585)。慢病毒和逆转录病毒的包膜蛋白显然不能承受超速离心过程中的剪切力,这可能是因为它们由两个非共价连接的亚单元组成。亚单元之间的相互作用可被离心破坏。相比之下,VSV糖蛋白由单个单元组成。因此,VSV-G蛋白假型化可以提供潜在优势。

[0142] WO 00/52188描述了由稳定生产细胞系生成假型化的逆转录病毒和慢病毒载体,该载体具有水泡性口炎病毒-G蛋白(VSV-G)作为膜相关病毒包膜蛋白;并提供了VSV-G蛋白的基因序列。

[0143] 罗斯河病毒

[0144] 罗斯河病毒包膜已用于对非灵长类慢病毒载体(FIV)进行假型化,并在全身施用后主要转导肝脏(Kang et al (2002) J Virol 76 (18):9378-9388)。据报道,其效率是用

VSV-G假型化载体所得效率的20倍,并且导致较小的细胞毒性,如提示肝脏毒性的肝酶的血清水平所测量的。

[0145] 罗斯河病毒(RRV)是由蚊子传播的甲病毒,其具有地方性并流行于澳大利亚的热带和温带地区。温带沿海地区正常人群的抗体率往往很低(6%到15%),但是在墨累谷河流系统的平原上血清患病率达到27%到37%。在1979年至1980年,罗斯河病毒在太平洋岛屿上变得流行。这种疾病不在人与人之间接触性传染并且从不致命,首先的症状是关节疼痛且约一半的病人有疲劳和嗜睡(Fields Virology Fifth Edition(2007)Eds.Knipe and Howley.Lippincott Williams and Wilkins)。

[0146] 杆状病毒GP64

[0147] 杆状病毒GP64蛋白已显示是用于病毒载体的VSV-G的有吸引力的替代物,该病毒载体用于临床和商业应用所需的高滴度病毒大规模生产(Kumar M,Bradow B P, Zimmerberg J(2003)Hum.Gene Ther.14(1):67-77)。与VSV-G假型化的载体相比,GP64假型化的载体具有类似的广嗜性(broad tropism)和类似的天然滴度。因为,GP64的表达不会杀死细胞,所以可以生成组成型表达GP64的基于293T的细胞系。

[0148] 狂犬病G

[0149] 在本公开中,载体可以经狂犬病G蛋白或其突变体、变体、同源物或片段的至少一部分假型化。

[0150] 关于狂犬病G蛋白及其突变体的教导可见于W0 99/61639以及Rose et al(1982)J.Virol.43:361-364,Hanham et al(1993)J.Virol.67:530-542;Tuffereau et al(1998)J.Virol.72:1085-1091,Kucera et al(1985)J.Virol.55:158-162;Dietzschold et al(1983)PNAS 80:70-74;Seif et al(1985)J.Virol.53:926-934;Coulon et al(1998)J.Virol.72:273-278;Tuffereau et al(1998)J.Virol.72:1085-10910;Burger et al(1991)J.Gen.Virol.72:359-367;Gaudin et al(1995)J.Virol.69:5528-5534;Benmansour et al(1991)J.Virol.65:4198-4203;Luo et al(1998)Microbiol.Immunol.42:187-193,Coll(1997)Arch.Virol.142:2089-2097;Luo et al(1997)Virus Res.51:35-41;Luo et al(1998)Microbiol.Immunol.42:187-193;Coll(1995)Arch.Virol.140:827-851;Tuchiya et al(1992)Virus Res.25:1-13;Morimoto et al(1992)Virology 189:203-216;Gaudin et al(1992)Virology187:627-632;Whitt et al(1991)Virology 185:681-688;Dietzschold et al(1978)J.Gen.Virol.40:131-139;Dietzschold et al(1978)Dev.Biol.Stand.40:45-55;Dietzschold et al(1977)J.Virol.23:286-293和Otvos et al(1994)Biochim.Biophys.Acta 1224:68-76。EP 0445625中也描述了狂犬病G蛋白。

[0151] 备选的包膜

[0152] 其他可用于对慢病毒载体进行假型化的包膜包括Mokola、埃博拉(Ebola)、4070A和LCMV(淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒)。

[0153] 腺相关病毒载体

[0154] 本领域已知腺相关病毒(AAV)载体具有有限的包装能力,因此对可以有效递送的基因数量产生负面影响。然而,现在已知这种限制取决于AAV血清型。例如,AAV5和AAV7血清型的衣壳可以包装高达8kb的基因组。这项工作已在U.S.Pat.No.7,943,374中描述。此外,

US 2009/0214478描述了具有高达9kb的包装能力的AAV2/5重组载体。

[0155] AAV载体的特征对于本领域普通技术人员来说通常是已知的。例如, AAV载体具有广泛的宿主范围, 并以相对低的免疫原性转导分裂和非分裂的细胞。同样众所周知的是, 如何用基因盒取代所有的AAV病毒基因, 使得在适当的位置仅留下顺式作用的AAV元件反向末端重复(ITR)、DNA包装信号和复制起点。参见例如Musatov et al., J.Virol., December 2002, 76 (24)。当AAV基因产物Rep和Cap以及其他辅助蛋白以反式提供时, AAV可以在生产细胞中包装。AAV包装系统已有描述。参见例如U.S.Pat.No.5,139,941。非AAV的辅助功能可由任何已知的辅助病毒如腺病毒、单纯疱疹病毒和痘苗病毒提供。这样的AAV包装系统已描述; 例如在U.S.Pat.No.4,797,368; U.S.Pat.No.5,139,941; U.S.Pat.No.5,866,552; U.S.Pat.No.6,001,650; U.S.Pat.No.6,723,551中描述。

[0156] 密码子优化

[0157] 在一些实施方案中, 本公开中使用的多核苷酸(包括核酸构建体、NOI和/或载体组分的全部或部分)可以进行密码子优化。密码子优化先前在W099/41397和W0 01/79518中已有描述。不同的细胞对特定密码子的用法不同。这种密码子偏倚对应于细胞类型中特定tRNA的相对丰度的偏倚。通过改变序列中的密码子, 使得它们被调整至与相应tRNA的相对丰度相匹配, 这可能提高表达。出于同样原因, 通过刻意选择相应tRNA已知是罕见于特定细胞类型的密码子可能减少表达。因此, 额外程度的翻译控制是可获得的。

[0158] 许多病毒, 包括HIV和其他慢病毒, 使用了大量的罕见密码子并且通过将这些密码子改变成对应于常用的哺乳动物密码子, 增加感兴趣的基因, 如哺乳动物生产细胞中NOI或包装组分的表达。哺乳动物细胞以及其他各种生物体的密码子使用表在本领域是已知的。

[0159] 病毒载体组分的密码子优化具有许多其他优点。由于其序列的改变, 编码在生产细胞/包装细胞中组装病毒颗粒所需的病毒颗粒包装组分的核苷酸序列中已消除了其中的RNA不稳定序列(INS)。同时, 保留包装组分的氨基酸序列编码序列, 使得该序列所编码的病毒组分保持相同, 或至少足够相似, 以使包装组分的功能不受损。在慢病毒载体中, 密码子优化还克服了Rev/RRE的输出要求, 从而呈现出不依赖于Rev的优化序列。密码子优化还减少了载体系统内不同构建体之间的同源重组(例如在gag-pol和env开放阅读框的重叠区域之间)。在一些实施方案中, 密码子优化的整体效果是病毒滴度的显著增加和安全性的提高。

[0160] 在一些实施方案中, 只有INS相关的密码子进行了密码子优化。然而, 在一些实施方案中, 序列全部进行了密码子优化, 但有一些例外, 例如包含gag-pol移码位点的序列(见下文)。

[0161] gag-pol基因包括两个重叠的编码gag-pol蛋白的阅读框。这两种蛋白的表达取决于翻译过程中的移码。这种移码的发生是翻译过程中核糖体“滑移”的结果。这种滑移被认为至少部分是由RNA二级结构引起的核糖体停顿(ribosome-stalling)造成的。这种二级结构存在于gag-pol基因移码位点的下游。对于HIV, 重叠区域从gag起始(其中第1个核苷酸是gag ATG的A)的下游第1222个核苷酸延伸到gag的末端(nt 1503)。因此, 跨越移码位点和两个阅读框的重叠区域的281bp片段优选不进行密码子优化。保留这个片段能够使gag-pol蛋白的表达更有效。

[0162] 对于EIAV, 认为重叠的起始是nt 1262(其中第1个核苷酸是gag ATG的A)。重叠的

终点位于1461bp。为了确保保留移码位点和gag-pol重叠,从nt 1156到1465保留野生型序列。

[0163] 可以从最佳密码子用法进行衍生,例如,以便提供方便的限制性位点,并向gag-pol蛋白引入保守的氨基酸变化。

[0164] 在一个实施方案中,密码子优化基于轻度表达的哺乳动物基因。可以改变每个密码子的第三个碱基,有时是第二和第三个碱基。

[0165] 由于遗传密码子的简并性,可以理解,许多gag-pol序列可以由熟练的技术人员实现。还存在许多描述的逆转录病毒变体可以用作生成密码子优化的gag-pol序列的起始点。慢病毒基因组可以是相当多变的。例如,存在许多仍有功能的HIV-1的准种(quasi-species)。EIAV也是如此。这些变体可以用来加强转导过程的特定部分。HIV-1变体的示例可见于洛斯阿拉莫斯国家安全局(Los Alamos National Security)经营的HIV数据库。EIAV克隆的详细资料可见于国家生物技术信息中心(NCBI)数据库。

[0166] 用于密码子优化的gag-pol序列的策略可用于关于任何逆转录病毒。这将适用于所有慢病毒,包括EIAV、FIV、BIV、CAEV、VMR、SIV、HIV-1和HIV-2。此外,这种方法可用于提高HTLV-1、HTLV-2、HFV、HSRV和人内源性逆转录病毒(HERV)、MLV和其他逆转录病毒的基因表达。

[0167] 密码子优化可以使gag-pol的表达不依赖于Rev。然而,为了能够在慢病毒载体中使用抗rev或RRE因子,有必要使病毒载体生成系统完全不依赖于Rev/RRE。因此,还需要对基因组进行修饰。这通过优化载体的基因组组分来实现。有利地,这些修饰也导致了更安全的系统的产生,在生产和转导细胞中都不存在所有的额外蛋白质。

[0168] 活性

[0169] 在本公开的某些方面,本公开的融合构建体产生功能性的多巴胺合成酶,并且与使用WO 02/29065中描述的编码多巴胺合成酶的所有三个基因由IRES序列隔开的构建体所得的水平相比,可以引起多巴胺产量的增加。

[0170] 在一些实施方案中,与WO 2001/04433中描述的载体pONYK1相比,本公开的载体在细胞内表达时可以引起L-DOPA和/或多巴胺产量增加。

[0171] 本公开的载体可以使多巴胺和/或L-DOPA产量增加至少2、3、5、10、15、20、30、40、50、60、80、80、90、100、120、130、140、150、160、200、500、1000倍。

[0172] 与pONYK1相比,本公开的载体在例如HEK293T细胞或PC-12细胞中表达时,可以引起L-DOPA和/或多巴胺产量增加。

[0173] 多巴胺或L-DOPA产量可以通过本领域中已知的许多方法中的任何方法如高效液相色谱法(HPLC)测量。

[0174] 不希望受理论约束,本发明人表明融合蛋白增加了L-DOPA和/或多巴胺的合成,因为编码的蛋白质在物理上靠近,从而促进它们与另一种蛋白质之间的相互作用。这对多巴胺生物合成途径的酶来说尤其有利,因为每个酶的物理上接近可以促进从一种酶流向另一种酶的有效代谢,从而使L-DOPA或多巴胺生产能够最大化。

[0175] 在一些实施方案中,与基线相比,以及在一些实施方案中与其他构建体如ProSavin®相比,本公开的融合构建体提供改善的L-DOPA产生和改善的多巴胺产生。

[0176] 药物组合物和剂量

[0177] 本公开的包含核酸构建体的病毒载体如慢病毒载体(如Lenti-PD),可以以药物组合物的形式提供。药物组合物可以用于通过基因疗法治疗个体,其中该组合物包含治疗有效量的病毒载体,如慢病毒载体,其包含本公开的构建体(如Lenti-PD)。

[0178] 在一些实施方案中,可以通过超速离心浓缩病毒制剂。在一些实施方案中,慢病毒载体可以根据W0 2009/153563中公开的任何方法进行处理,其通过引用整体并入本文。

[0179] 病毒载体的治疗有效量是足够将本发明的核酸构建体递送至靶细胞群或靶组织,使得病毒载体提供临床相关效应的量。有效量可取决于例如物种、年龄、体重、受试者的健康和待靶向的组织等因素,因此可在各个动物和组织之间不同。药物组合物可以用于治疗人类受试者。在一些实施方案中,受试者患有神经退行性疾病或患有受试者中多巴胺水平降低的疾病。在一些实施方案中,人类患有帕金森病,如,双侧特发性帕金森病。

[0180] 在一些实施方案中,药物组合物包含本公开的病毒载体,如慢病毒颗粒。在一些实施方案中,病毒载体的剂量可以包括至少 10^6 个转导单位(TU),例如 1×10^6 TU至 5×10^8 TU,包括端值。TU可以根据整合事件的数量计算,例如使用整合(DNA)滴度计算。载体滴度可以用TU/mL(TU/mL)表示针对标准HEK293T细胞系滴定的载体强度,或作为递送至受试者的目标剂量(TU/受试者)(如,相对于载体的目标强度计算)。

[0181] 在一些实施方案中,目标剂量包括 2×10^6 TU/受试者至 2×10^8 TU/受试者; 3×10^6 TU/受试者至 2×10^8 TU/受试者; 4×10^6 TU/受试者至 2×10^8 TU/受试者; 5×10^6 TU/受试者至 2×10^8 TU/受试者; 6×10^6 TU/受试者至 2×10^8 TU/受试者; 7×10^6 TU/受试者至 2×10^8 TU/受试者; 8×10^6 TU/受试者至 2×10^8 TU/受试者或 9×10^6 TU/受试者至 2×10^8 TU/受试者。

[0182] 在一些实施方案中,目标剂量包括 1×10^7 TU/受试者至 1×10^8 TU/受试者; 2×10^7 TU/受试者至 1×10^8 TU/受试者; 3×10^7 TU/受试者至 1×10^8 TU/受试者; 4×10^7 TU/受试者至 1×10^8 TU/受试者; 5×10^7 TU/受试者至 1×10^8 TU/受试者; 6×10^7 TU/受试者至 1×10^8 TU/受试者; 7×10^7 TU/受试者至 1×10^8 TU/受试者; 8×10^7 TU/受试者至 1×10^8 TU/受试者或 9×10^7 TU/受试者至 1×10^8 TU/受试者。

[0183] 在一些实施方案中,目标剂量包括 1×10^7 TU/受试者至 2×10^7 TU/受试者; 2×10^7 TU/受试者至 3×10^7 TU/受试者; 3×10^7 TU/受试者至 4×10^7 TU/受试者; 4×10^7 TU/受试者至 5×10^7 TU/受试者; 5×10^7 TU/受试者至 6×10^7 TU/受试者; 6×10^7 TU/受试者至 7×10^7 TU/受试者; 7×10^7 TU/受试者至 8×10^7 TU/受试者; 8×10^7 TU/受试者至 9×10^7 TU/受试者或 9×10^7 TU/受试者至 1×10^8 TU/受试者。

[0184] 在一些实施方案中,目标剂量为约 1×10^6 TU/受试者至 5×10^8 TU/受试者; 4×10^6 TU/受试者至 8×10^6 TU/受试者; 8×10^6 TU/受试者至 4×10^7 TU/受试者;或 1×10^7 TU/受试者至 5×10^8 TU/受试者。在一些实施方案中,目标剂量是约 1.5×10^7 TU/mL至 5×10^7 TU/mL。

[0185] 在一些实施方案中,目标剂量是约 2×10^6 TU/受试者,约 1.4×10^7 TU/受试者,约 1.5×10^7 TU/受试者,约 1.6×10^7 TU/受试者,约 1.7×10^7 TU/受试者,约 1.8×10^7 TU/受试者,约 1.9×10^7 TU/受试者,约 2×10^7 TU/受试者,约 2.1×10^7 TU/受试者,约 2.2×10^7 TU/受试者,约 2.3×10^7 TU/受试者,约 2.4×10^7 TU/受试者或约 2.5×10^7 TU/受试者。

[0186] 在一些实施方案中,目标载体剂量强度包含 5×10^6 TU/mL至 5×10^8 TU/mL, 5×10^6 TU/mL至 5×10^7 TU/mL, 1×10^7 TU/mL至 5×10^7 TU/mL, 1.5×10^7 TU/mL至 5×10^7 TU/mL或 5×10^7 TU/mL至 5×10^8 TU/mL。

[0187] 在一些实施方案中,以控制的速率(如约2-4 μ L/分钟)将总的目标载体剂量以多个小体积(如50-200 μ L)向受试者直接施用至壳核。

[0188] 组合物可以任选地包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂可以根据预期的施用途径和标准制药规范进行选择。药物组合物可以包含作为(或除此之外)载体、赋形剂或稀释剂,任何合适的黏合剂、润滑剂、助悬剂、被膜剂、增溶剂以及其他可辅助或增加病毒进入靶位点的载剂。在一些实施方案中,本公开的药物组合物包含选自张度剂、超低温保藏辅助剂、pH缓冲剂、pH调节剂或其任何组合的赋形剂。在一些实施方案中,张度剂包括氯化钠。在一些实施方案中,超低温保藏辅助剂包括甘露醇和/或蔗糖。在一些实施方案中,pH缓冲剂包括氨丁三醇(TRIS)。在一些实施方案中,pH调节剂包括盐酸(HCl)。在一些实施方案中,稀释剂是水。

[0189] 施用

[0190] 在一些实施方案中,包含本公开构建体(如Lenti-PD)的病毒载体施用至脑,例如经注射施用至尾状壳核(caudate putamen)。在一些实施方案中,病毒载体经注射施用至感觉运动壳核(sensorimotor putamen)。在一些实施方案中,病毒载体例如根据U.S.Pat.No.9,339,512中公开的任何方法持续输注至脑,该文件通过引用整体并入本文。

[0191] 在一些实施方案中,病毒载体经局部双侧立体定向输注施用至PD受试者的感觉运动壳核,从而使编码的蛋白质在非多巴胺能神经元中表达。在一些实施方案中,以控制的速率(约2-4 μ L/分钟,如3 μ L/分钟)以多个小体积(如50-200 μ L)直接施用至经由第一半球的1-6个如三个神经束和第二半球的1-6个如三个神经束构成的壳核。

[0192] 病毒载体可以经由每个半球一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个神经束来施用。

[0193] 在一些实施方案中,病毒载体可以如先前描述的慢病毒载体的施用系统施用(Jaraya et al (2009) Sci Transl Med 14:1 (2) 2-4),其通过引用整体并入本文。例如,病毒载体组合物可以以不连续或“点状”方式施用,通过在神经束底部施用等分样品(2-4 μ L),将针抽出少许,然后施用第二等分样品(2-4 μ L)并进一步将抽出少许(第二次);然后施用第三等分样品(2-4 μ L);因此,沿着每个针束在3个点处放置等分样品,共递送约10 μ L。

[0194] 使用方法

[0195] 本公开的某些方面涉及向患有帕金森病的受试者提供以下一项或多项的方法:(a)改善运动功能,(b)减少运动障碍,和/或(c)允许受试者的L-DOPA或LED每日剂量降低,其中该方法包括向有需要的受试者施用包含本文公开的核酸构建体(如Lenti-PD)的病毒载体。

[0196] 本公开的某些方面涉及在患有运动障碍的受试者中改善运动功能和/或减少运动障碍的方法,其包括施用包含本文公开的构建体的病毒载体。

[0197] 影响PD药物治疗的主要问题之一是决定何时开始实施L-dopa疗法。早期施用已显示出赋予最大的临床益处,但是已知长期使用L-dopa治疗与不期望的运动副作用有关。因此,许多内科医生优选推迟L-dopa作为初始治疗的实施。然而,L-dopa诱发运动障碍作为副作用。

[0198] 在一些实施方案中,受试者患有神经退行性疾病或患有受试者中内源性多巴胺水平降低的疾病。在一些实施方案中,受试者患有帕金森病。在一些实施方案中,受试者正在

接受L-DOPA(也称为左旋多巴)治疗。在一些实施方案中,受试者正在接受左旋多巴等效剂量(LED)的治疗。在一些实施方案中,受试者还施用了卡比多巴。

[0199] 在一些实施方案中,当向正在接受L-Dopa或LED治疗的患者施用,包含本文公开的核酸构建体(如Lenti-PD)的病毒载体允许L-Dopa的每日剂量减少,同时促使症状逐渐减弱并减少与L-Dopa或LED治疗的施用有关的运动障碍。联合治疗对帕金森病患者的运动功能产生了改善,也改善了药物治疗引起的运动波动。联合治疗特别地减少了运动障碍、“on-off”和疗效减退(wearing-off)现象。在一些实施方案中,运动障碍的减少根据在“OFF”和“ON”状态下使用Rush运动障碍评定量表(RDRS)从基线开始的评定量表来确定。

[0200] 在一些实施方案中,受试者的运动障碍得以减少,如以下一项或者多项所示:(a)与基线相比,施用后3个月麻烦运动障碍的Hauser日记ON时间减少至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%;(b)与基线相比,施用后3个月UPDRS-IV评分减少至少50%、减少至少60%、至少65%、至少70%,至少74%或至少75%,和(c)与基线相比,施用后3个月Rush运动障碍评分改善至少10%、至少12%、至少15%、至少18%、至少20%或至少25%。

[0201] 在一些实施方案中,运动功能的临床标准化测量值,例如,UPDRS-III(运动)OFF评分在施用包含本公开的核酸构建体(如Lenti-PD)的病毒载体后得以改善。在一些实施方案中,运动功能得以改善,如与基线相比,施用后3个月UPDRS-III(运动)OFF评分增加至少25%、至少30%、至少35%、至少40%,至少42%、至少45%或至少50%所示。在一些实施方案中,运动功能得以改善,如与基线相比,施用后3个月平均UPDRS-III(运动)OFF评分增加至少12、至少15、至少20、至少22、至少25、至少30或至少35分所示。

[0202] 在一些实施方案中,施用后约三个月,受试者的平均UPDRS OFF总评分相比基线改善至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少55%或至少60%。在一些实施方案中,受试者的基线UPDRS III部分(运动)OFF评分在30-60之间。

[0203] 在一些实施方案中,在施用包含本公开的核酸构建体(如Lenti-PD)的病毒载体后,UPDRS-II(日常生活活动)OFF评分得以改善。在一些实施方案中,UPDRS-II OFF评分得以改善,如与基线相比,施用后3个月平均UPDRS-II OFF评分增加至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少42%、至少45%、至少50%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%或至少80%所示。在一些实施方案中,运动功能得以改善,如与基线相比,施用后3个月平均UPDRS-II OFF评分增加至少12、至少15、至少20、至少22、至少25、至少30或至少35分所示。

[0204] 在一些实施方案中,在施用包含本公开的核酸构建体(如Lenti-PD)的病毒载体后,UPDRS-IV(治疗的并发症)OFF评分得以改善。在一些实施方案中,UPDRS-IV OFF评分得以改善,如与基线相比,施用后3个月平均UPDRS-IV OFF评分增加至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少42%、至少45%、至少50%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%或至少80%所示。在一些实施方案中,运动功能得以改善,如与基线相比,施用后3个月平均UPDRS-II OFF评分增加至少增加5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10或至少12分所示。

[0205] 在一些实施方案中,本公开的病毒载体可以用于治疗神经系统疾病。例如,载体可以用于治疗和/或预防神经退行性疾病如帕金森病(PD)。通过在受试者中产生L-DOPA和/或多巴胺,疾病可以是可治疗的。疾病可以是帕金森病,如双侧特发性帕金森病。在一些实施方案中,治疗针对PD晚期,如已经变为口服L-DOPA治疗难治的患者。

[0206] 本文所述的某些构建体增加L-DOPA的产生和/或增加多巴胺的产生。增加L-DOPA的产生对保留残余的AADC酶活性并且因而能够至少部分地将L-DOPA转化为多巴胺的患者可能是有用的。这些患者可能对常规L-DOPA治疗敏感。例如,TH_{-L}-CH1_{-IRES}-AADC构建体产生了高水平的多巴胺和L-DOPA,而TH_{-L}-AADC_{-IRES}-CH1和AADC_{-L}-TH_{-L}-CH1相对于L-DOPA产生了更高水平的多巴胺。

[0207] 增加的多巴胺的产生对缺乏足够的内源性AADC活性来加工L-DOPA,因而对常规L-DOPA治疗不太敏感的晚期病人可能是有用的。

[0208] 在一些实施方案中,受试者正在进行L-DOPA或LED治疗(LED=L-DOPA等效剂量的药物)。在一些实施方案中,受试者正在接受L-DOPA或LED治疗。在一些实施方案中,相对于施用核酸构建体前受试者的L-DOPA或LED治疗剂量,受试者的L-DOPA或LED治疗剂量在施用包含本公开的核酸构建体的病毒载体后降低。在一些实施方案中,平均每日L-DOPA或者LED治疗剂量在施用包含本公开的核酸构建体的病毒载体后三个月相比基线降低至少10%、至少12%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%或至少25%。

[0209] 在一些实施方案中,本公开的方法改善帕金森病的一种或多种症状。在一些实施方案中,一种或多种症状选自震颤、运动徐缓、肌强直、姿势和/或平衡受损、自发运动丧失、说话困难、精细运动技能困难。在一些实施方案中,症状包括震颤,或者颤动,通常开始于肢体,往往是手或手指。在一些实施方案中,症状包括运动徐缓(缓慢的运动)。随着时间的推移,帕金森病可使受试者的运动减缓,使简单的任务变得困难和耗时。在一些实施方案中,症状包括肌强直,如在受试者身体任何部位的肌肉僵硬。僵硬的肌肉可能是痛苦的并且可能限制运动范围。在一些实施方案中,症状包括姿势和/或平衡受损。在一些实施方案中,症状包括说话困难。在一些实施方案中,症状包括精细运动技能困难,如写作困难。

[0210] 现在将经由实施例来进一步描述本公开,这些实施例旨在帮助本领域的普通技术人员实施本公开,并非意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0211] 实施例1

[0212] “Lenti-PD”是一种非复制的非灵长类重组慢病毒载体(LV),其基于非致病性野生型马传染性贫血病毒(EIAV)。野生型EIAV基因组有6个不同的遗传单元,然而,已移除这些EIAV序列的大部分(约90%)以产生复制缺陷型最小载体系统,其含有少于10%的原始病毒基因组且不含有任何天然的病毒启动子或增强子,并且在EIAV基因组和包装系统中没有辅助蛋白的编码区。Lenti-PD含有多巴胺酶融合质粒,其编码截短形式的人酪氨酸羟化酶(TH)、人GTP-环化水解酶1(CH1)和人芳香族L-氨基酸脱羧酶(AADC)。Lenti-PD构建体显示于图2A。

[0213] ProSavin®是基于马传染性贫血病毒(EIAV)的LV。ProSavin®还含有包含编码序列TH、AADC和CH1的三顺反子构建体,在该构建体中,这些编码序列通过两个内部核糖体进入位点(IRES)可操作地连接。ProSavin®的构建体显示于图2B。

[0214] ProSavin®和Lenti-PD构建体之间的区别包括:在Lenti-PD中,移动CH1更接近

启动子以增强表达,并且在Lenti-PD中,TH和CH1通过柔性接头连接以确保共定位。

[0215] 为了制备质粒,使用了最小pONYK1基因组质粒,其最近被描述为pONY8.9.4TY(含有KanR基因)(Jarraya et al.,2009Science Translational Medicine 1,2ra4)。该质粒基于pONY8.0T,Azzouz M等人(Azzouz et al.,2002J Neurosci 22,10302-10312)对其进行了更详细的描述。简而言之,pONYK1是EIAV SIN载体基因组,其中插入了含有(按顺序):Neo、内部CMV启动子、截短的密码子优化的人类酪氨酸羟化酶(TH)、EMCV内部核糖体进入位点(IRES)、密码子优化的人芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)、脊髓灰质炎病毒IRES、GTP-环化水解酶I(GTP-CH1)和土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)的盒。包含两个融合基因(TH和CH1)和一个PV IRES元件的Lenti-PD融合质粒通过将合成的DNA区域(GeneArt, Germany)插入三顺反子盒中,用GS15接头取代EMCV IRES区域和第一个基因的终止密码子而生成。GS15接头编码4X甘氨酸氨基酸接着1X丝氨酸氨基酸,重复三次,从而产生15个氨基酸的接头。该GS15接头的DNA序列如下:

[0216] GGGGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGGGGCTCCGGCGGAGGCGGGAG C (SEQ ID NO:3)。

[0217] VSV-G包膜和EIAV合成的Gag/Pol质粒用于在HEK293T细胞中产生病毒载体。载体滴度,以转导单位/ml(TU/ml)计,通过整合(DNA)滴度测定进行估计。

[0218] 与ProSavin®相比,Lenti-PD在体外原代人神经元中实现了多巴胺和L-dopa产量的更大增长(图3)。

[0219] 实施例2

[0220] 2期帕金森病研究(低剂量队列1)

[0221] 关于Lenti-PD的2期研究(SUNRISE-PD,NCT03720418)已在患有双侧特发性帕金森病(PD)的受试者(48-70岁)中启动。使用UK帕金森病协会(PDS)脑库标准进行诊断,但没有特别排除具有一个以上受影响亲属的受试者。如图4A所示,临床试验研究设计的A部分是剂量递增部分。如图4B所示,临床试验研究的B部分是扩增队列与模拟外科手术部分。

[0222] Lenti-PD经由单个慢病毒载体递送编码三种酶的基因:人酪氨酸羟化酶(TH)的截短形式、人GTP-环化水解酶1(CH1)和人芳香族L-氨基酸脱羧酶(AADC),以编码多巴胺合成所需的一系列酶。

[0223] 在正在进行的2期研究的剂量递增部分的剂量水平1队列中,给予两名受试者 4.2×10^6 TU Lenti-PD的剂量,以测试Lenti-PD的最低计划剂量。从该“低剂量”队列(剂量水平1)收集了三个月的数据。该队列包括两名患有晚期帕金森病的患者,他们以低剂量接受了一次Lenti-PD施用。

[0224] 将Lenti-PD配制成用于纹状体输注的液体产品,其中包括:甘露醇(1.0%w/v)、氨丁三醇(TRIS)(20mM)、蔗糖(1.0%)、氯化钠(100mM)、盐酸(适量至pH 7.3)和注射用水。

[0225] 通过局部双侧立体定向输注到PD受试者的感觉运动壳核将Lenti-PD递送至受试者,从而允许编码的蛋白质在非多巴胺能神经元中表达。Lenti-PD以小体积(100μL)、控制的速率(约3μL/分钟)直接施用至由第一半球的三个神经束和第二半球的三个神经束构成的壳核。

[0226] 统一帕金森病评定量表(UPDRS)评分是由医生评估的量表,范围从0到199,较低的评分指示改善。UPDRS III部分(运动)OFF评分是客观的、经过充分验证的帕金森病运动功能的度量。OFF评分在受试者除去口服左旋多巴治疗时评估。通过评估处于左旋多巴“OFF”

状态时的受试者,UPDRS OFF评分被设计为捕获没有背景医学治疗潜在干扰作用的治疗益处。图5显示了通过UPDRS III部分(运动)OFF评分反映的进展。剂量水平1的受试者具有在30-60之间的基线UPDRS III部分(运动)OFF评分。

[0227] 为了进行“OFF”/“ON”临床和PET评估,撤销了受试者PD药物治疗。最后一次L-DOPA剂量必须在“OFF”评估前至少12小时。对于“ON”评估,给予受试者足以达到有效“ON”响应的L-DOPA攻击剂量,这将通常是他们日常早晨剂量的100%到150%。一旦如受试者和评估者所判断的达到了良好的“ON”响应,就记录“ON”评估。时间是施用后至少一个小时。如果在研究期间受试者对L-DOPA治疗的需求减少,则研究者相应地调整L-DOPA攻击剂量。

[0228] 在三个月时,剂量水平1队列的受试者在接受Lenti-PD后,经历了平均UPDRS OFF总评分改善54.5分,这代表相比基线改善55%。

[0229] 同样观察到了遍及多个UPDRS分量表的一致改善。受试者经历了如图6所示的运动检查分量表(UPDRS III部分OFF)相比基线改善25分,如图7A所示的日常生活活动分量表(UPDRS II部分OFF)相比基线改善22分,以及如图7B所示的治疗并发症分量表(UPDRS IV部分OFF)相比基线改善7分。

[0230] 在六个月时,受试者经历了如图9A所示的运动检查分量表(UPDRS III部分OFF)相比基线改善17分,如图9B所示的日常生活活动分量表(UPDRS II部分OFF)相比基线改善19.5分,以及如图9C所示的治疗并发症分量表(UPDRS IV部分OFF)相比基线改善3分。此外,进行了PDQ-39调查以评估从基线到三个月和六个月的变化。PDQ-39是评估帕金森疾病特异性健康相关质量的问卷。如图9D所示,与ProSavin®相比,受试者经历了32.1分的6个月平均改善。这代表平均总评分相比基线改善大约65%,比在三个月时间点测量的相比基线改善大约37%上升。这些数据是基于交叉试验的比较,而不是头对头临床试验。

[0231] Lenti-PD和ProSavin®编码多巴胺生物合成途径中相同的三种酶。ProSavin®的一项单独的已完成的I/II期研究是一项开放标签剂量递增研究(PS1/001/07,EudraCT 2007-001109-26),并且邀请来自该研究的受试者进入长期跟踪研究(PS1/001/09,EudraCT 2009-017253-35),其旨在监测治疗后长达10年的ProSavin®的安全性和耐受性。

[0232] 在最低剂量队列(总剂量为 4.2×10^6 TU)中,用Lenti-PD治疗的两名受试者展现出在UPDRS III部分OFF评分中的个人改善大于之前测试的ProSavin®任何剂量队列中所观察到的平均改善。综上所述,这些结果表明,与之前测试的ProSavin®最高剂量(总剂量为 1.0×10^8 TU)相比,Lenti-PD在3个月时的功效更高。针对该研究中的Lenti-PD和先前临床试验中的ProSavin®的UPDRS量表结果的详细汇总见下表1。

[0233] 表1

测量	3 个月时 Lenti-PD 队列 1 (低剂量: 4.2x10 ⁶ TU) (N=2)	3 个月时 ProSavin® 队列 3 (高剂量: 1.0x10 ⁸ TU) (N=6)
[0234]	UPDRS 总 OFF 评分。范围从 0 到 199	
	基线	99.0
	3 个月时	61.3
	相比基线的改善	18.0
	UPDRS I 部分 OFF 评分 (心理状态、行为和情绪)。范围从 0 到 16	
	基线	2.5
[0235]	3 个月时	0.8
	相比基线的改善	1.7
	UPDRS II 部分 OFF 评分 (日常生活活动)。范围从 0 到 52	
	基线	21.7
	3 个月时	19.3
	相比基线的改善	2.3
[0236]	UPDRS III 部分 OFF 评分 (运动)。范围从 0 到 108	
	基线	44.8
	3 个月时	34.0
	相比基线的改善	10.8
	UPDRS IV 部分 OFF 评分 (治疗的并发症)。范围从 0 到 23	
	基线	10.3
[0237]	3 个月时	7.2
	相比基线的改善	3.2

[0236] 受试者继续他们的标准临床护理以管理他们的PD药物治疗,包括左旋多巴。在3个月时,剂量水平1的受试者的平均左旋多巴等效剂量 (LED) 减少了208mg。这表示相比基线平均减少19%。

[0237] 剂量水平1的受试者在运动障碍方面也经历18%的改善,如通过Rush运动障碍评定量表ON评分所测量的,该量表是受试者在口服左旋多巴时对日常生活活动期间的功能性失能的客观评估。如表1所示,捕获失能和运动障碍持续时间以及其他治疗并发症的UPDRS

IV部分评分也得到了改善。此外,结果支持最低测试剂量的Lenti-PD比先前测试的最高剂量的ProSavin®具有显著更高的生物活性。

[0238] 从剂量水平1的受试者收集了主观受试者日记(Hauser患者日记)。虽然受试者记录的日记条目存在变化性,但两个受试者的运动障碍日记ON时间都展现出改善,相比基线平均减少3.5小时(57%)。在麻烦运动障碍的日记ON时间方面也观察到一致的益处,相比基线平均减少1.3小时(87%)。主观受试者日记和左旋多巴等效剂量(LED)的结果总结在图8。

[0239] 在壳核内恒定多巴胺能紧张水平的维持提供了减少L-DOPA水平和多巴胺激动剂治疗以及提供持续的具有较长“ON”周期和较短“OFF”周期的运动矫正的可能性。

[0240] 这些结果表明,Lenti-PD在患有晚期帕金森病的受试者中提供运动功能改善(如,3个月时获得的UPDRS-III(运动)OFF益处增加25分(42%),6个月时获得的UPDRS-III(运动)OFF益处增加17分(29%)),和运动障碍减少(如,麻烦运动障碍的日记ON时间减少87%;三个月时UPDRS-IV减少74%,六个月时UPDRS-IV减少32%,以及Rush运动障碍改善18%)。

[0241] 此外,在6个月时收集了患者报告的Hauser日记。平均而言,患者经历了无运动障碍ON时间相比基线改善2.7小时,运动障碍ON时间改善了3.9小时,无麻烦运动障碍ON时间改善0.3小时,麻烦运动障碍ON时间改善1.5小时,而OFF时间恶化0.9小时。在六个月时,平均左旋多巴等效日剂量(LEDD)减少了233mg,其代表相比基线平均减少21%。没有观察到与程序或载体施用有关的严重不良事件,且Lenti-PD普遍耐受良好。在第二队列受试者中待测试的总剂量为 1.4×10^7 TU。

[0242] 实施例3

[0243] 用于帕金森病研究的灵长类模型

[0244] 进行了一项灵长类研究以评估Lenti-PD在PD的MPTP猕猴模型中的功效。在灵长类中进行了单独的GLP研究以评估Lenti-PD的安全性。功效研究包括16只食蟹雄性猕猴,研究开始时年龄为4-5岁。将这些动物分成五个实验组。在载体施用后6个月,与对照组相比,所有经处理的动物在临床等级评分和自发自主活动方面显示出显著改善,并在Lenti-PD高剂量(HD)组中观察到最高的恢复。本研究中所用的载体制剂示于表2,剂量施用示于表3。在每个研究组中,4只动物经Lenti-PD全剂量或1/5剂量、ProSavin®、EIAV-LacZ或EIAV-Null处理。EIAV-LacZ和EIAV-null载体组都用作对照组。各组所用的剂量汇总详见表3。

[0245] 在GLP安全性研究中,招募到该研究的为6只雄性和6只雌性健康猕猴,年龄3-5岁,体重2.1-3.6kg。将这些动物平均分配到对照(TSSM缓冲液)组和测试Lenti-PD组。GLP毒理学研究的研究组和载体分配见表4。

[0246] 表2:MPTP功效研究的研究组和载体分配

[0247]	EIAV 载体	DNA 滴度 (TU*/ml)	生物滴度 (TU/ml)	无菌	支原体	内毒素
	Lenti-PD	7.62×10^7	7.57×10^7	通过	通过	通过
	Lenti-PD	3.67×10^7	4.47×10^7	通过	通过	通过

[0248]	Lenti-PD	1.09×10^7	7.03×10^7	通过	通过	通过
	ProSavin®	6.12×10^7	5.80×10^7	通过	通过	通过
	EIAV-CMV-Null	1.17×10^8	N/A	通过	通过	通过

[0249] *TU-转导单位;N/A-不适用

[0250] 表3:实验组剂量汇总

[0251]	动物组号	载体研究组	总载体剂量/动物
	1	ProSavin®	1.22×10^7
	2	Lenti-PD (FD)	1.52×10^7
			2.18×10^7
	3	Lenti-PD (LD) 1:5 稀释	3.04×10^6
			4.36×10^6
	4	EIAV-CMV-LacZ	5.64×10^7
	5	EIAV-CMV-Null	2.34×10^7

[0252] 表4:GLP安全性研究的研究组和载体分配

[0253]	处理组	组大小	总载体剂量/动物
	Lenti-PD	6 (3只雄性, 3只雌性)	7.0×10^6
	TSSM缓冲液 (对照)	6 (3只雄性, 3只雌性)	-

[0254] 临床评分

[0255] 功效研究根据欧洲 (EU指令86/609/EEC) 进行。已进行所有努力以使动物的痛苦最小化并且动物护理由精通NHP保健和饲养的兽医和动物技术人员监督。使16只平均年龄为 2.5 ± 0.1 岁和平均体重为 3.48 ± 0.1 kg的成年雄性食蟹猴 (*Macaca fascicularis*, 由菲律宾Sicombrec公司提供) 居住在标准环境条件下 (12小时明暗循环, 温度: $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度: 50%) 并自由获取食物和水。MPTP中毒之后, 所有研究动物都出现了帕金森症状, 并在所有组中观察到类似的临床等级评分 (CRS) 的增加 (见图10A)。

[0256] 载体施用之后, EIAV-Null组保持稳定的帕金森病, 所有时间点的评分与基线相似。对于所有其他治疗组 (ProSavin®, Lenti-PD LD、Lenti-PD HD), 在6个月的评估期间观察到CRS的逐步改善。在2至6个月的所有时间点, 所有三组都显示出与EIAV-Null对照组在CRS方面存在显著差异。重复测量ANOVA分析证明了显著的组别效应 ($P=0.0001$) 和时间效应 ($P<0.0001$)。Fisher的LSD事后分析揭示了所有处理组都与EIAV-Null载体对照组存在显著差异 (ProSavin®, $p=0.0005$; Lenti-PD HD, $p=0.001$; Lenti-PD LD, $p=0.001$)。

[0257] 自主活动

[0258] 对所有动物在基线、MPTP中毒后以及在载体施用后3个月和6个月的自主活动

(locomotor activity)进行了基于视频的量化。MPTP中毒之后,如通过总移动距离(TDM)所评估的,所有研究动物显示平均自发自主活动减少至少90%+/- (见图10B)。在载体施用后3个月和6个月,所有三个治疗组显示TDM相对于MPTP后的值增加。Lenti-PD HD组在这两个时间点都显示最大的TDM改善(3个月时87%+/-1和6个月时91%+/-1)。将自主活动方面的差异看作相比MPTP后的值的百分数变化的重复测量ANOVA显示出显著的组别效应($P=0.0003$)、时间效应($P<0.0001$)和时间组别效应($P<0.0001$)。LSD事后分析揭示了所有处理组与EIAV-Null载体对照组相比存在显著差异(**ProSavin®**, $p=0.001$; Lenti-PD LD, $p=0.002$; Lenti-PD HD, $p<0.001$)。

[0259] 生物分布

[0260] 在GLP安全性研究中,从每只动物收集血沉棕黄层样品并在第2和第4周进行分析,并且在处理后第2周收集血浆样品并通过qPCR或qRT-PCR分析载体的存在。在研究结束时,对多种组织进行了全面的宏观和微观检查,并测量了器官重量。还收集了另外的组织和液体样品用于分析脑外载体的存在,并且在整个研究过程中进行定期血样采集用于针对Lenti-PD载体或转基因组分的抗体应答的Western印迹分析。还对在载体或缓冲液施用前后得到的样品进行了全面的临床化学和尿液分析。全身生物分布分析显示,在来自Lenti-PD处理的动物的大多数生物样品中没有检测到载体相关的RNA和DNA序列。与载体相关的DNA序列仅在少数样品中检测到,其水平低于检测的定量下限。载体颗粒(RNA)在血浆中的播散或留存以及在脑脊液中的脱落都不存在。没有与载体相关的RNA或DNA序列持续或稳健存在的迹象。

[0261] 毒理学

[0262] 针对Lenti-PD的毒性评估基于死亡率、临床症状、体重和定性的食物消耗。此外,生活中的评估通过检眼镜检查、心电图描记术和血压测量进行。一项优良实验室规范(GLP)毒理学研究调查了在正常健康食蟹猴双侧纹状体内递送Lenti-PD载体的耐受性。该研究所用的载体使用良好操作规范(GMP)的制造过程生产。在26周的观察期内,证明了Lenti-PD耐受性良好,没有出现任何临床症状或异常观察结果。身体检查和活动评估、运动障碍评级和行为评分揭示了没有与Lenti-PD相关的影响。此外,体重、食欲、检眼镜检查、心电图(ECG)、血压、临床病理学、宏观结果或器官重量都没有与处理相关的变化。被认为与Lenti-PD处理有关的微观结果是注射部位具有/不具有色素性巨噬细胞浸润的极少到轻微的血管周围单核细胞浸润。这些与任何系统性观察结果无关。

[0263] 上述说明书中提到的所有出版物通过引用纳入本文。本公开所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域的技术人员来说是显而易见的且不偏离本公开的范围和精神。尽管本公开内容已经关于具体的优选实施方案进行了描述,但应该理解的是,本发明所要求保护的不应该不适当地限于这些具体的实施方案中。事实上,用于实施本发明的所描述模式的各种修改意在在以下权利要求的范围内,这对于分子生物学、病毒学、神经生物学或相关领域的技术人员来说是显而易见的。

序列表

<110> SIO基因治疗股份有限公司

牛津生物医学有限公司

<120> 用于治疗帕金森病的基因治疗组合物和方法

<130> 4226.038PC02/BNC/PMR

<150> US 62/871,007

<151> 2019-07-05

<150> US 62/816,170

<151> 2019-03-10

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成接头编码寡核苷酸

<400> 1

ggaggtggcg ggtccggggg cgggggtagc ggtggcgggg gctcc 45

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成接头肽

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成接头编码寡核苷酸

<400> 3

gggggaggcg gtagcggcgg agggggctcc ggcggaggcg ggagc 45

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成接头肽

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成接头肽

<400> 5

Asn Phe Ile Arg Gly Arg Glu Asp Leu Leu Glu Lys Ile Ile Arg Gln

1 5 10 15

Lys Gly Ser Ser Asn

20

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成接头肽

<400> 6

Asn Leu Ser Ser Asp Ser Ser Leu Ser Ser Pro Ser Ala Leu Asn Ser

1 5 10 15

Pro Gly Ile Glu Gly Leu Ser

20

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成接头肽

<400> 7

Gln Gly Ala Thr Phe Ala Leu Arg Gly Asp Asn Pro Gln Gly

1 5 10
 <210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成接头肽
 <400> 8
 Ser Gly Gly Gly Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr Gly Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Pro Gly
 <210> 9
 <211> 148
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸
 <220>
 <223> 截短的TH经由GS15接头连接到AADC
 <400> 9
 ggcgctccct ggagggtgtc caggatgagc tggacaccct tgcccatgcg ctgagcgcca 60
 tcggcggggg aggcggtagc ggcggagggg gctccggcgg aggcgggagc atggacgcca 120
 gtgagttccg aaggcgcggc aaggagat 148
 <210> 10
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成多肽
 <220>
 <223> 截短的TH经由GS15接头连接到AADC
 <400> 10
 Arg Arg Ser Leu Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His
 1 5 10 15
 Ala Leu Ser Ala Ile Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 Gly Gly Gly Gly Ser Met Asp Ala Ser Glu Phe Arg Arg Arg Gly Lys
 35 40 45
 Glu Met

50

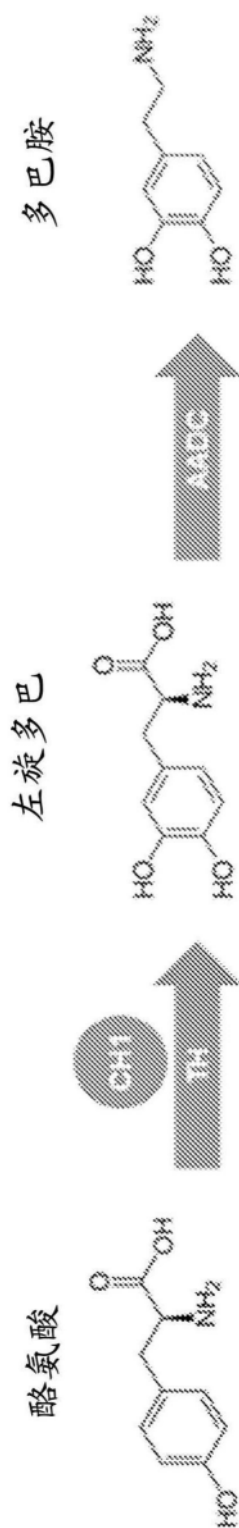


图1

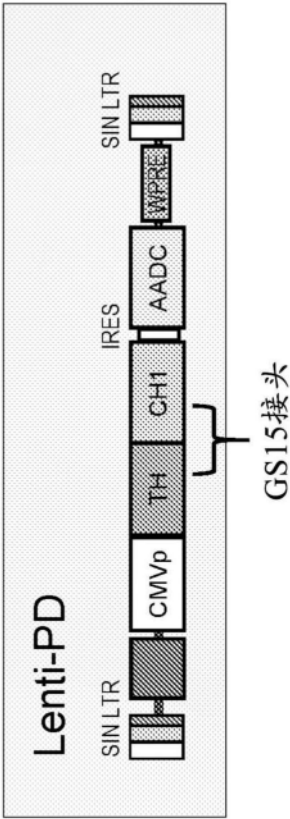


图2A

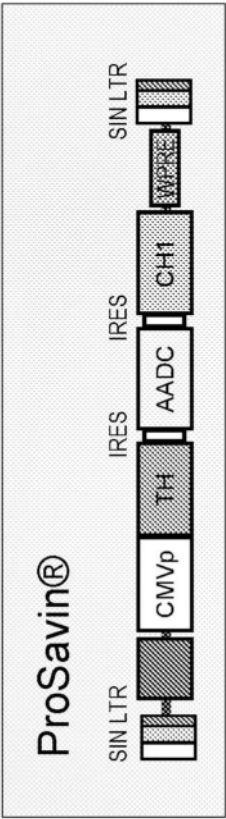


图2B

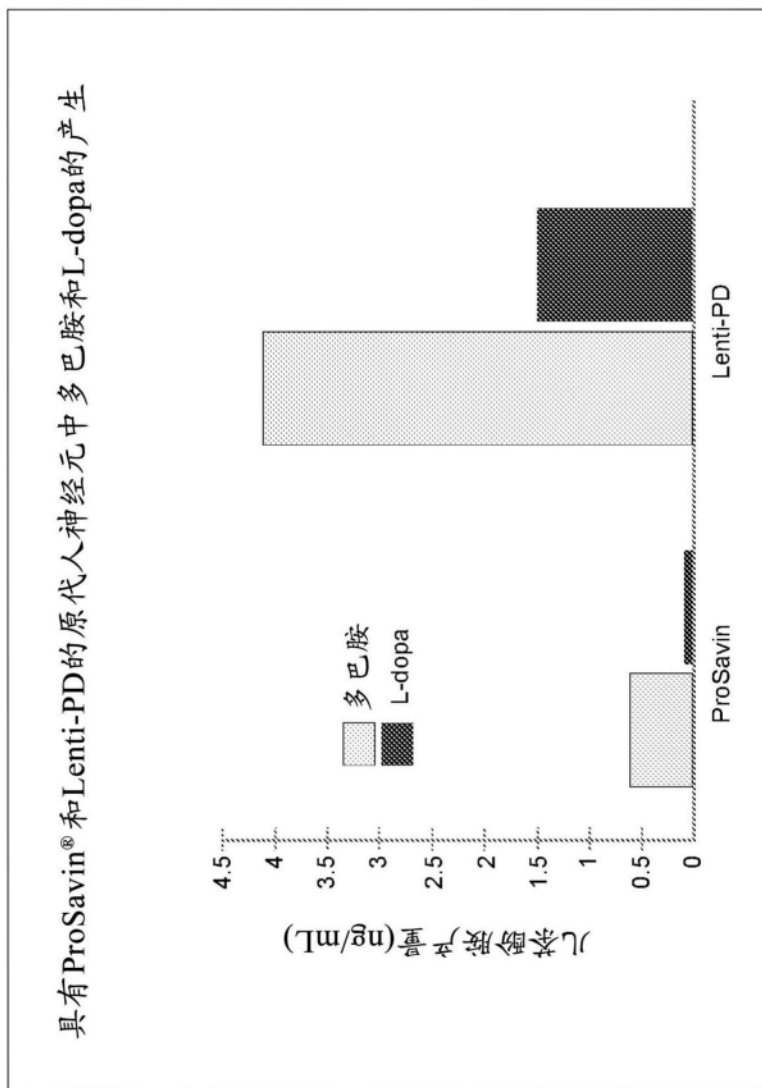


图3

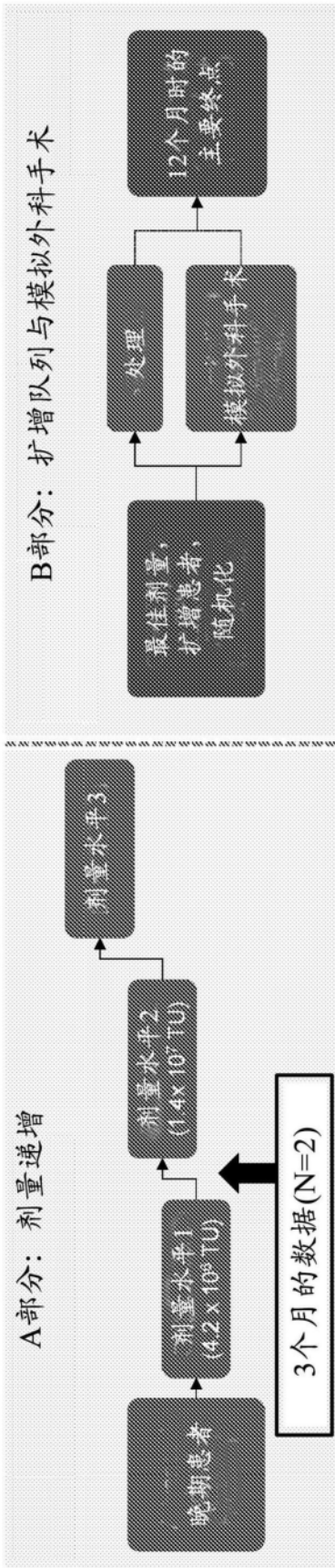


图 4B

图 4A

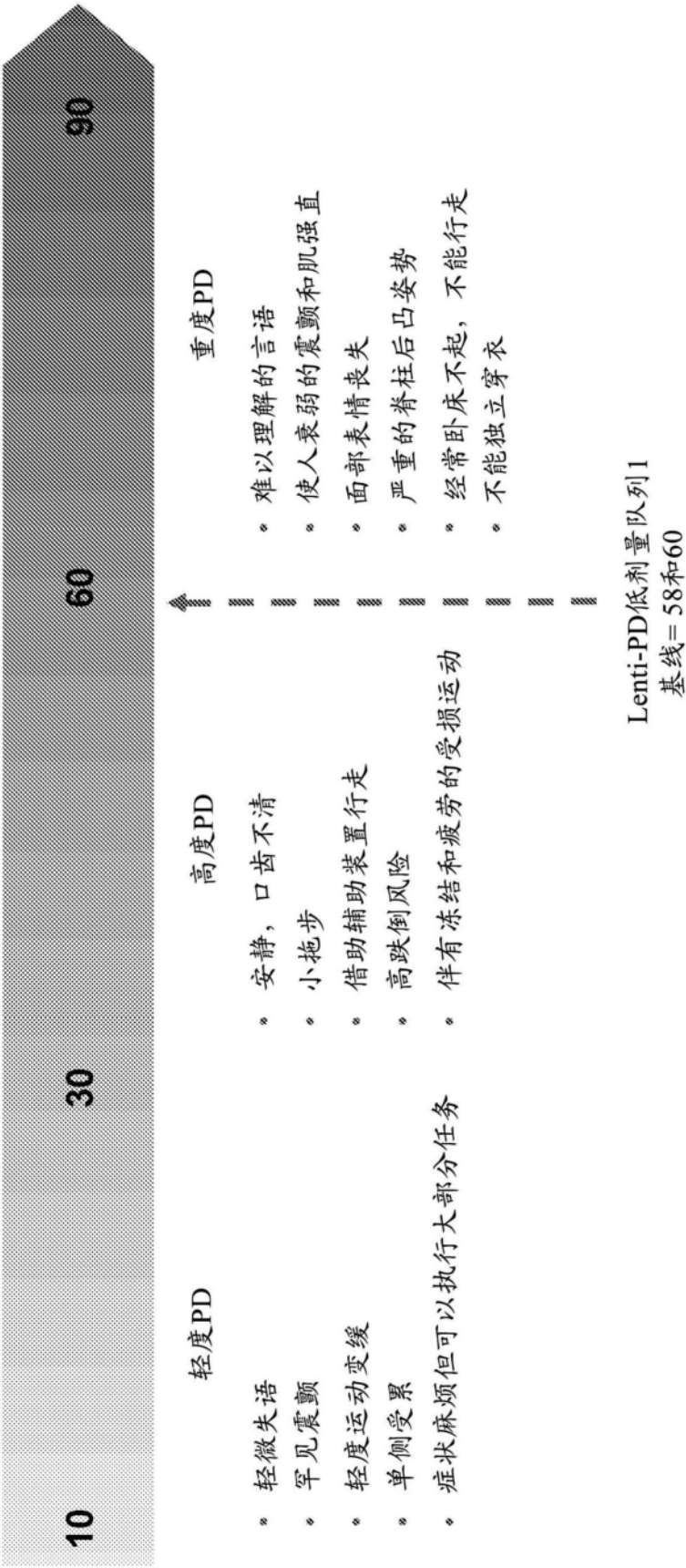


图5

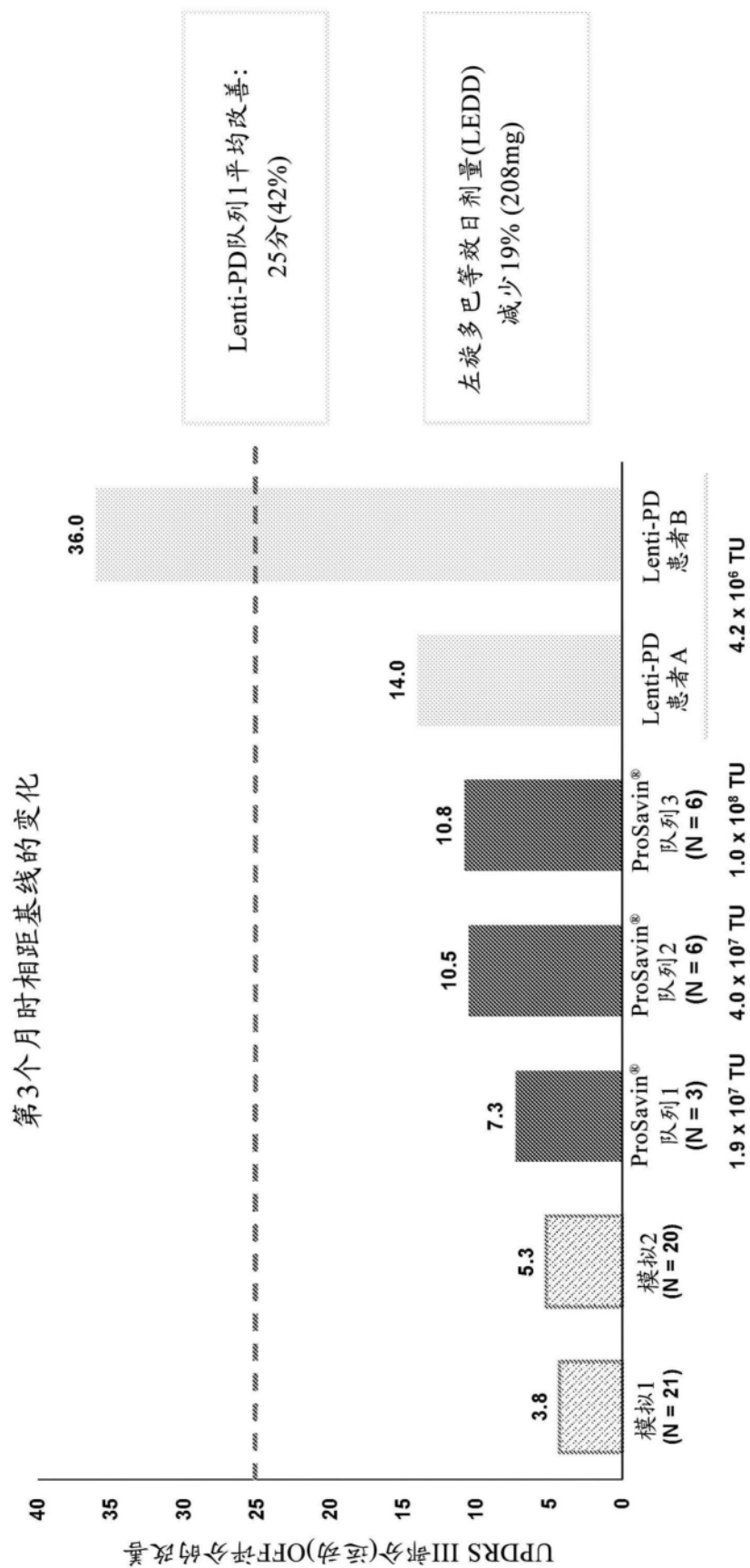


图6

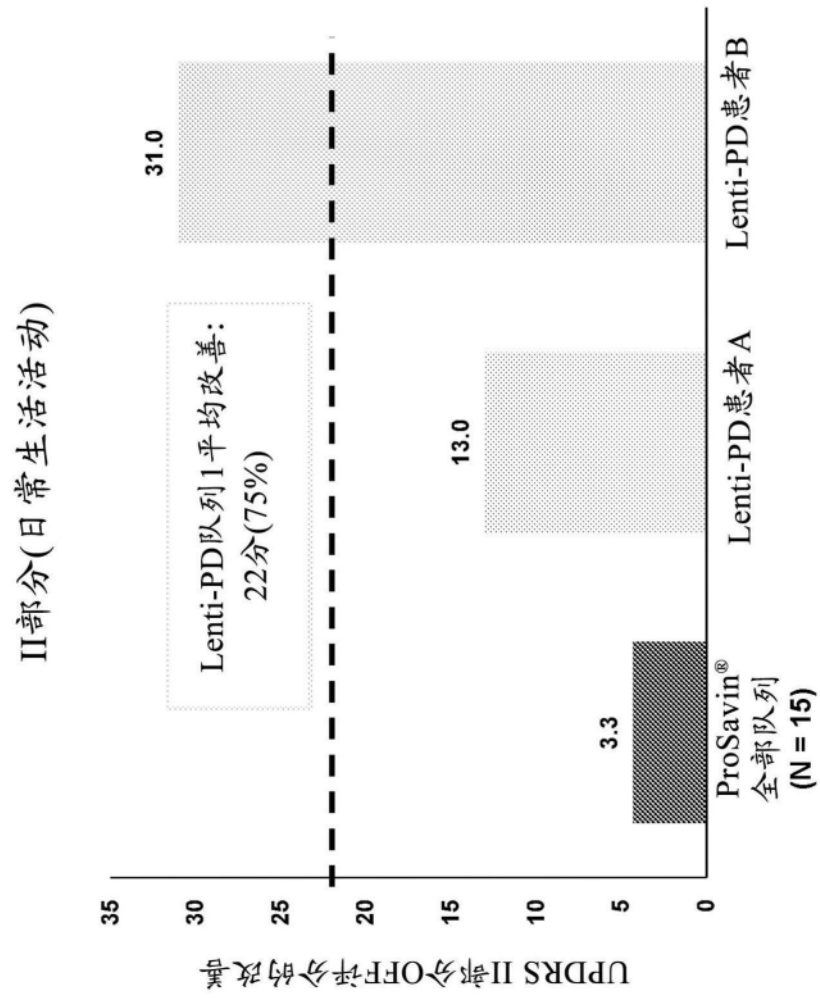


图7A

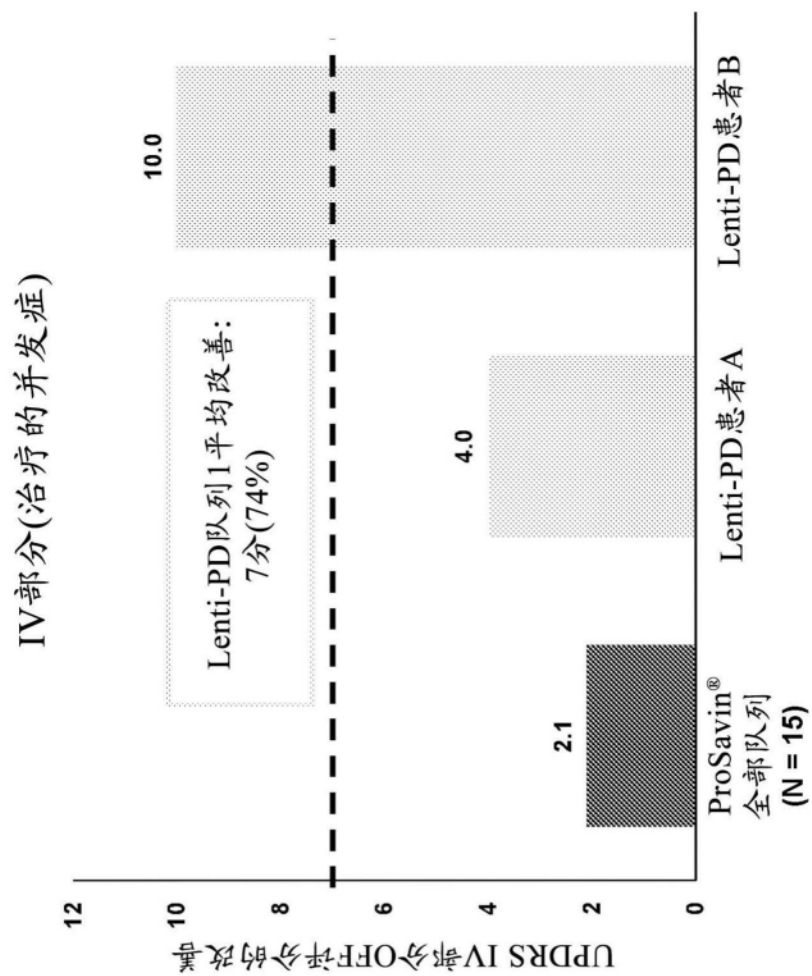


图7B

	基线 (最小值-最大值)	第3个月 (最小值-最大值)	相距基线的改善
无运动障碍的ON时间	8.0小时 (6.5 - 9.5)	10.1小时 (6.1 - 14.1)	2.1小时
有运动障碍的ON时间	6.1小时 (6.0 - 6.2)	2.6小时 (2.0 - 3.3)	3.5小时
无麻烦运动障碍的ON时间	12.5小时 (11.1 - 14.0)	12.4小时 (8.8 - 16.0)	-0.1小时
有麻烦运动障碍的ON时间	1.5小时 (1.5 - 1.6)	0.2小时 (0.0 - 0.5)	1.3小时
OFF时间	1.8小时 (0.5 - 3.1)	3.4小时 (0.0 - 6.7)	-1.6小时
左旋多巴等效剂量(LED)	1116.5 mg (1108 mg - 1125 mg)	908.5 mg (842 mg - 975 mg)	减少208 mg(19%)

Hauser患者日记

图8

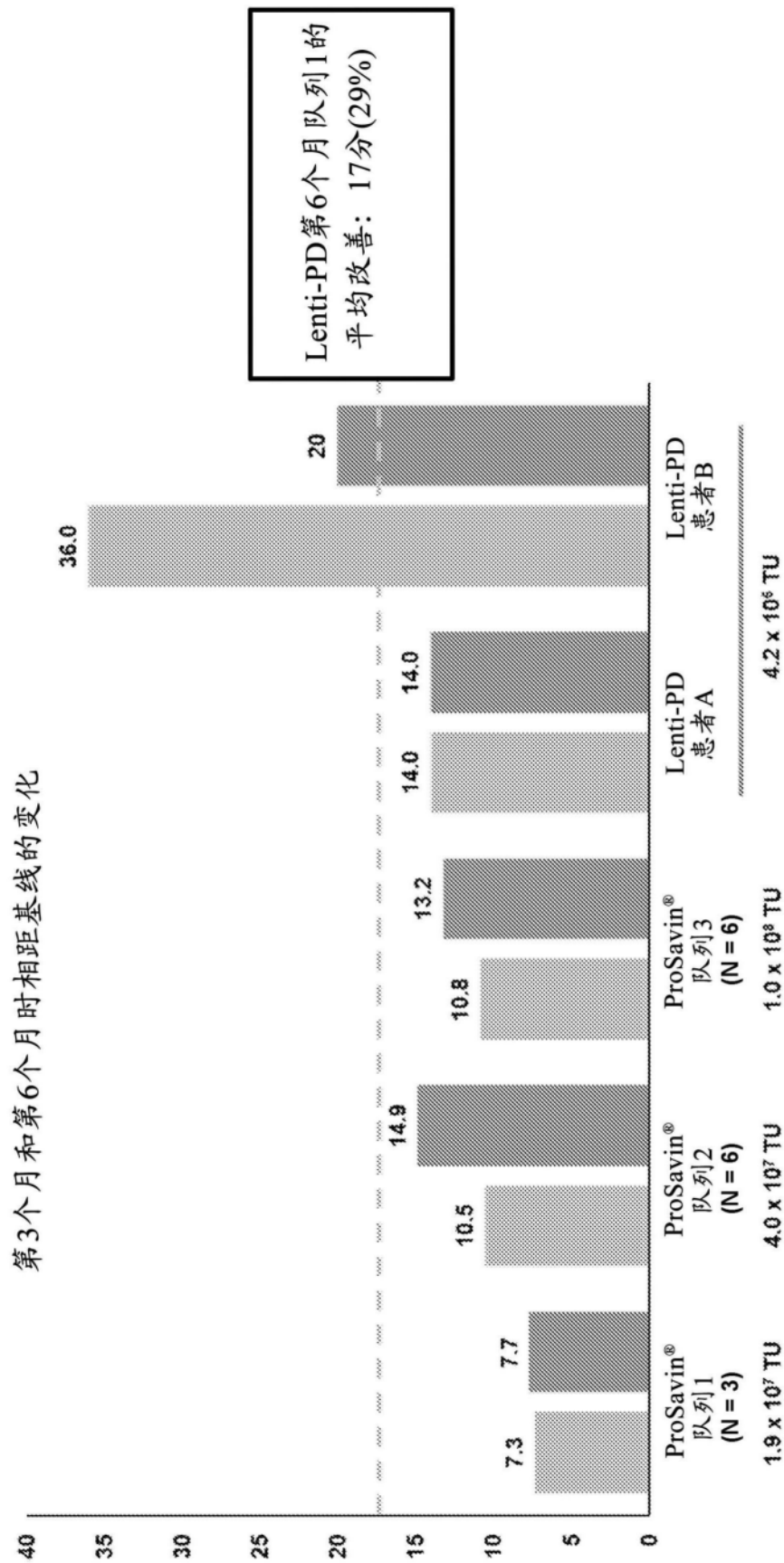


图9A

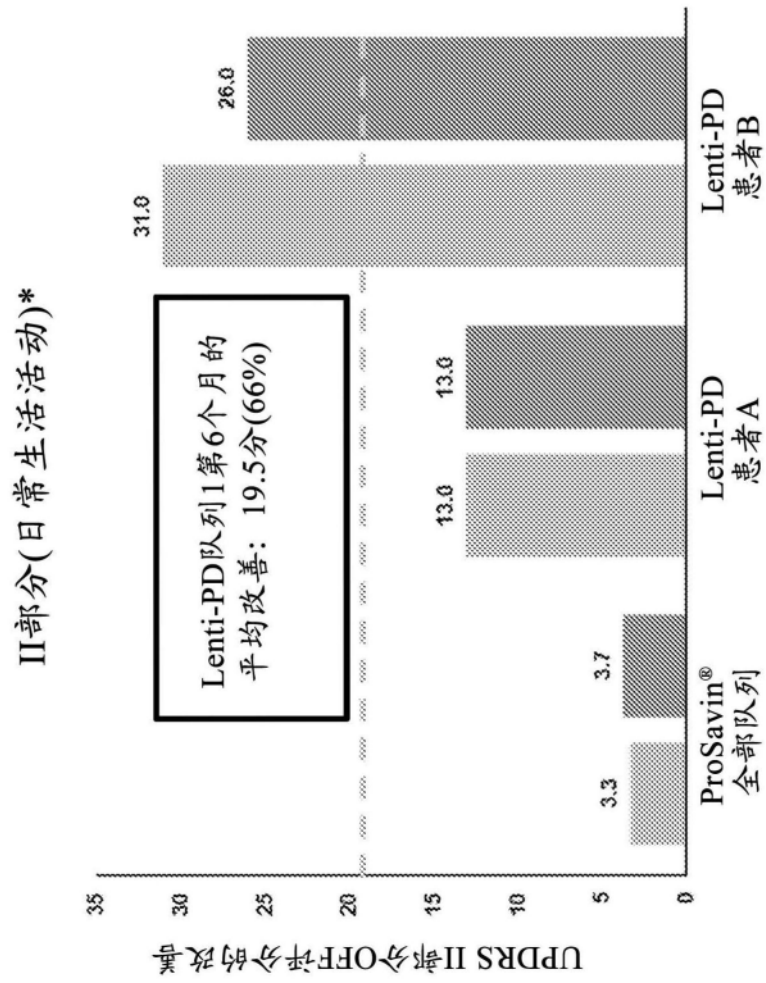
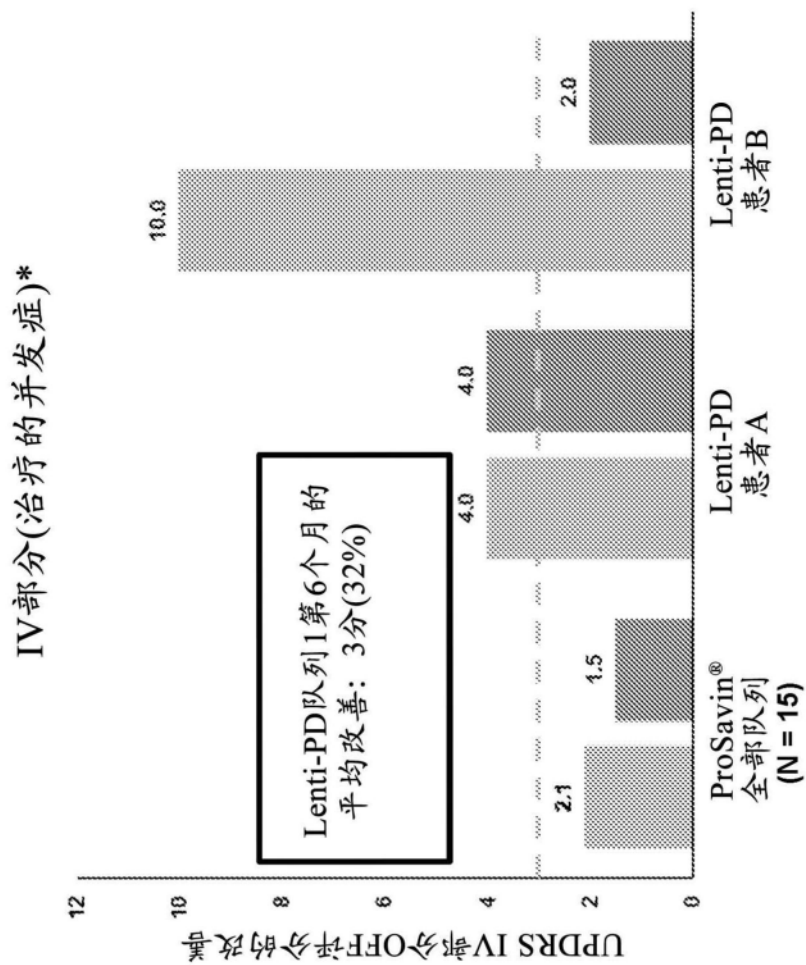


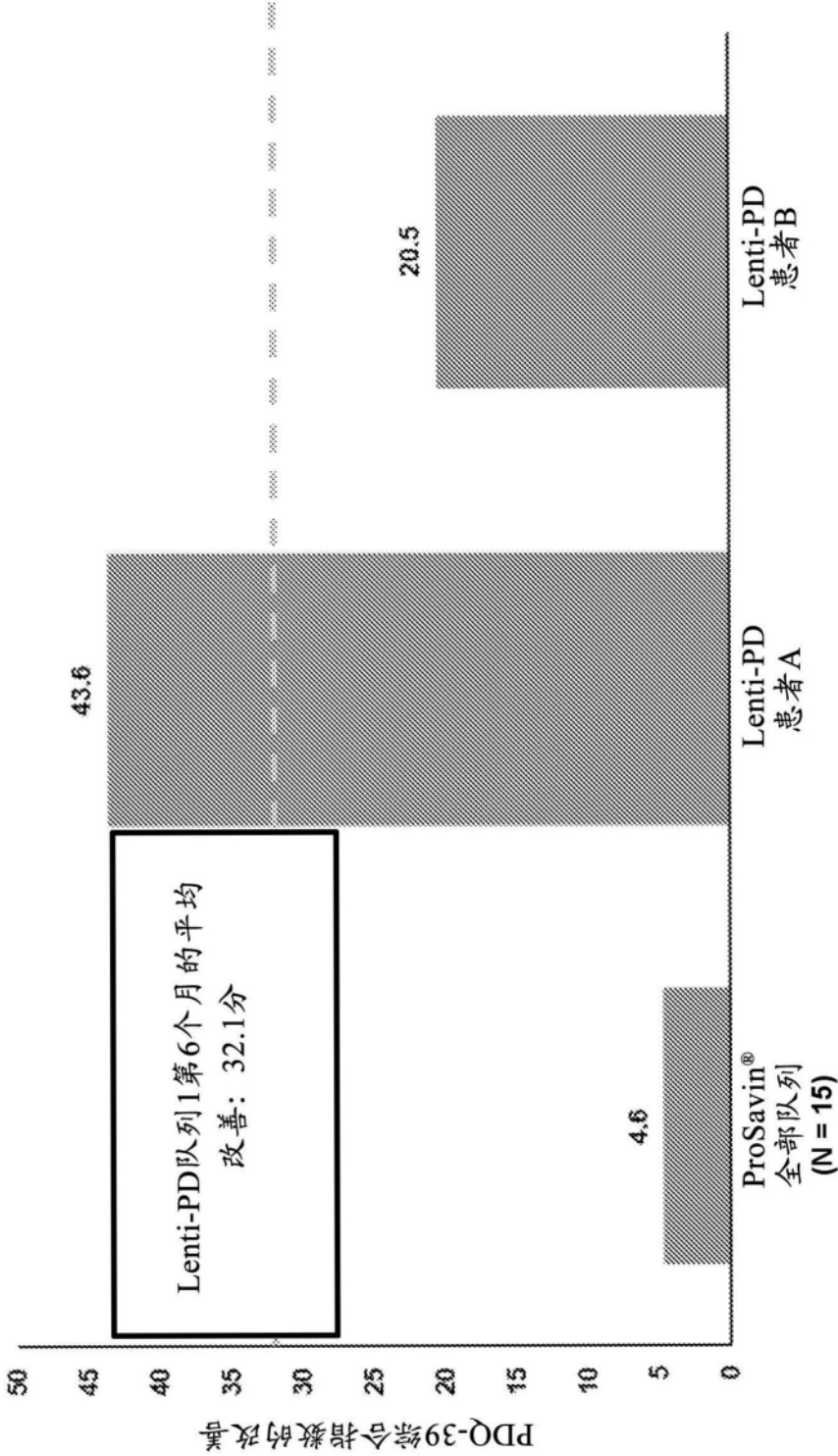
图9B



*这些数据基于交叉试验比较而不是头对头临床试验。
因此这些数据可能不能直接比较。

图9C

PDQ-39综合指数：第6个月时相距基线的变化*



* 这些数据基于交叉试验比较而不是头对头临床试验。因此这些数据可能不能直接比较。

图9D

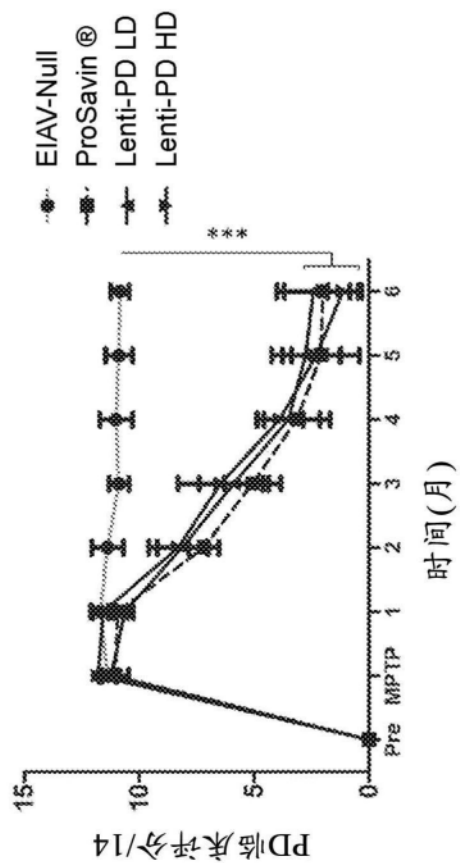


图10A

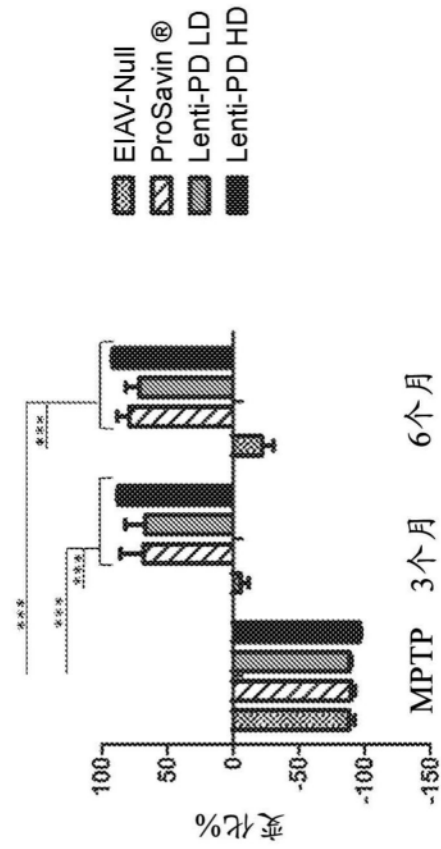


图10B

1. 在患有神经退行性疾病或者患有受试者中内源性多巴胺水平降低的疾病的受试者中改善运动功能和减少运动障碍的方法,其包括向所述受试者的脑施用有效量的包含核酸构建体的病毒载体,所述核酸构建体包含(i) 编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii) 编码GTP-环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列,(iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,或者其任何组合。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述神经退行性疾病或者所述内源性多巴胺水平降低的疾病是帕金森病。

3. 在患有帕金森病的受试者中治疗或改善运动功能和减少运动障碍的方法,其包括向所述受试者的脑施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含:(a) 包含核酸构建体的病毒载体,所述核酸构建体包含(i) 编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii) 编码GTP-环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列,(iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,或者其任何组合;和(b) 药学上可接受的赋形剂。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述受试者正在接受L-DOPA或者LED治疗。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中相对于施用前受试者的L-DOPA或者LED治疗剂量,所述受试者的L-DOPA或者LED治疗剂量在施用所述核酸构建体后三个月内降低。

6. 根据权利要求4-5中任一项所述的方法,其中平均L-DOPA或者LED治疗剂量在施用后三个月相比基线降低至少10%、至少12%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%或至少19%。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述病毒载体以 1×10^6 TU/受试者至 5×10^8 TU/受试者的目标剂量施用。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述目标剂量是约 4×10^6 TU/受试者至 8×10^6 TU/受试者; 8×10^6 TU/受试者至 4×10^7 TU/受试者;或者 1×10^7 TU/受试者至 5×10^8 TU/受试者。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中施用是单次施用。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述施用是经输注施用至壳核。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其包括:(i) 编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii) 编码GTP环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列和(iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,其中所述编码TH的核苷酸序列与所述编码CH1的核苷酸序列连接,使得它们编码融合蛋白TH-CH1。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体包含:

TH_L-CH1-IRES-AADC;

AADC_L-TH_L-CH1;

TH_L-CH1_L-AADC;或

TH_L-CH1_L-AADC;

其中L是接头编码序列,IRES是内部核糖体进入位点,并且P是启动子。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述核酸构建体包含TH_L-CH1-IRES-AADC。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体包含:(i) 编码酪氨酸羟化酶(TH)的核苷酸序列,(ii) 编码GTP-环化水解酶I(CH1)的核苷酸序列和(iii) 编码芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核苷酸序列,其中所述编码TH的核苷酸序列与所述编码CH1的核苷酸序列连接,使得它们编码融合蛋白TH-CH1,其中所述构建体包含TH-L-CH1-

IRES-AADC或者TH-L-CH1-P-AADC,其中L是接头编码序列,IRES是内部核糖体进入位点,以及P是启动子。

15.根据权利要求12-14中任一项所述的方法,其中所述接头(L)未经密码子优化。

16.根据权利要求12-15中任一项所述的方法,其中所述接头(L)包含如SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:3所示的序列。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体还包含启动子(P),所述启动子(P)选自组成型启动子、组织特异性启动子或其组合。

18.根据权利要求17所述的方法,其中所述启动子是CMV启动子、磷酸甘油酸激酶启动子或者胸腺嘧啶核苷激酶启动子。

19.根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体或者腺相关病毒载体。

20.根据权利要求19所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

21.根据权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述病毒载体是病毒颗粒。

22.根据权利要求21所述的方法,其中所述病毒颗粒是EIAV载体颗粒,并且其经VSV-G假型化。

23.根据权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述病毒载体配置成包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂的药物组合物。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述受试者的运动功能得以改善,如与基线相比,施用后3个月UPDRS-III(运动)OFF评分增加至少25%、至少30%、至少35%或者至少40%所示。

25.根据权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述受试者的运动障碍得以减少,如以下中的一项或者多项所示:(a)与基线相比,施用后3个月麻烦运动障碍的Hauser日记ON时间减少至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%或者至少85%;(b)与基线相比,施用后3个月UPDRS-IV评分减少至少50%、减少至少60%、至少65%、至少70%或者至少74%,和(c)与基线相比,施用后3个月Rush运动障碍评分改善至少10%、至少12%、至少15%、至少18%。

26.根据权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述方法进一步改善受试者中选自震颤、运动徐缓、肌强直、姿势和/或平衡受损、自发运动丧失、说话困难、精细运动技能困难或其任何组合的一种或者多种症状。

27.根据权利要求1-26中任一项所述的方法,其中在施用后三个月内,与施用前受试者的基线相比,施用后所述受试者具有改善的运动功能、减少的运动障碍,以及降低的L-DOPA或者LED治疗剂量。