(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119213120 A
(43)申请公布日 2024.12.27

(21)申请号 202380040795.6

(22)申请日 2023.05.15

(30)优先权数据
63/342,590 2022.05.16 US
63/459,564 2023.04.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.15

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/067013 2023.05.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/225481 EN 2023.11.23

(71)申请人 建新公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 S·拉玛钱德兰

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
C12N 9/16(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
C12N 15/864(2006.01)

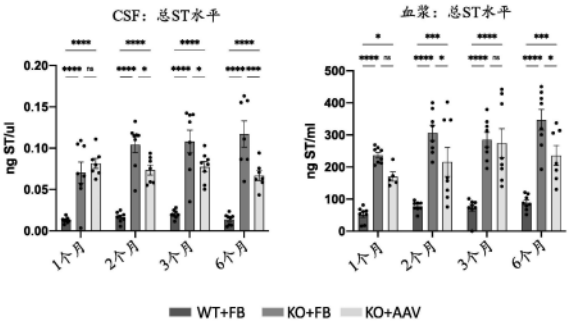
权利要求书3页 说明书49页
序列表（电子公布） 附图38页

(54)发明名称

治疗异染性脑白质营养不良的方法

(57)摘要

本文提供了用于在肝细胞中表达转基因的表达组件,其中该转基因编码ARSA多肽。还提供了治疗异染性脑白质营养不良(MLD)的方法。本文进一步提供了用于在有需要的个体中表达ARSA多肽的载体(例如,rAAV载体)、病毒颗粒、药物组合物和试剂盒。



CN 119213120 A

1.一种重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,该重组腺相关病毒(rAAV)颗粒包含(1)rAAV载体,该rAAV载体包含用于表达芳基硫酸酯酶A(ARSA)多肽的表达组件,其中该表达组件包含编码该ARSA多肽的基因,该ARSA多肽可操作地连接至启动子和任选的增强子,以及(2)经修饰的AAV9衣壳蛋白,该经修饰的AAV9衣壳蛋白包含具有SEQ ID NO:10的靶向肽。

2.如权利要求1所述的rAAV颗粒,其中该ARSA多肽包含SEQ ID NO:1。

3.如权利要求1或权利要求2所述的rAAV颗粒,其中该靶向肽在其N-末端和C-末端侧接接头序列。

4.如权利要求3所述的rAAV颗粒,其中所组合的靶向肽和接头序列包含SEQ ID NO:11。

5.如权利要求1-4中任一项所述的rAAV颗粒,其中经修饰的衣壳蛋白具有与SEQ ID NO:12至少98.5%相同的序列。

6.如权利要求5所述的rAAV颗粒,其中该经修饰的衣壳蛋白包含含有SEQ ID NO:12的序列。

7.如权利要求1-6中任一项所述的rAAV颗粒,其中该表达组件包含SEQ ID NO:2的密码子优化的ARSA基因。

8.如权利要求1-7中任一项所述的rAAV颗粒,其中该rAAV载体包含SEQ ID NO:4的5'AAV2 ITR和SEQ ID NO:5的3'AAV2 ITR。

9.如权利要求1-8中任一项所述的rAAV颗粒,其中该表达组件包含含有SEQ ID NO:6的CMV增强子元件。

10.如权利要求1-9中任一项所述的rAAV颗粒,其中该表达组件包含含有SEQ ID NO:7的鸡b-肌动蛋白启动子。

11.如权利要求1-10中任一项所述的rAAV颗粒,其中该rAAV载体进一步包含WPRE元件。

12.如权利要求11所述的rAAV颗粒,其中该WPRE元件包含SEQ ID NO:8的序列。

13.如权利要求1-12中任一项所述的rAAV颗粒,其中该rAAV载体包含SEQ ID NO:16的序列。

14.一种治疗有需要的人类患者的异染性脑白质营养不良(MLD)的方法,该方法包括向该患者的脑脊液(CSF)中施用包含有效量的如权利要求1-13中任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)病毒颗粒的组合物。

15.如权利要求14所述的方法,其中经由脑室内(ICV)施用而直接将该组合物施用至该患者的CSF。

16.如权利要求14所述的方法,其中经由直接脑池(dCM)施用而直接将该组合物施用至该患者的CSF。

17.如权利要求14所述的方法,其中利用鞘内微导管(IT-CM)而直接将该组合物施用至该患者的CSF。

18.如权利要求14-17中任一项所述的方法,其中在该患者的一生中仅施用一次该组合物。

19.如权利要求14-17中任一项所述的方法,其中每年仅向该患者施用一次该组合物。

20.如权利要求14-19中任一项所述的方法,其中所述施用使该患者的ARSA活性增加至少5%。

21.如权利要求14-19中任一项所述的方法,其中所述施用使该患者的ARSA活性增加至

少10％。

22.如权利要求14-19中任一项所述的方法,其中所述施用使该患者的ARSA活性增加至少20％。

23.如权利要求14-19中任一项所述的方法,其中所述施用使该患者的ARSA活性增加至少30％。

24.如权利要求14-19中任一项所述的方法,其中所述施用使该患者的ARSA活性增加至少50％。

25.一种在有需要的个体中增加ARSA的表达和/或活性的方法,该方法包括向患者的脑脊液(CSF)中施用包含有效量的如权利要求1-13中任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)病毒颗粒的组合物。

26.一种质粒,该质粒包含SEQ ID NO:3。

27.一种密码子优化的人ARSA序列,该密码子优化的人ARSA序列包含SEQ ID NO:2。

28.一种表达组件,该表达组件包含含有SEQ ID NO:2的密码子优化的人ARSA序列。

29.如权利要求28所述的表达组件,其进一步包含含有SEQ ID NO:7的鸡b-肌动蛋白启动子。

30.如权利要求28或权利要求29所述的表达组件,其进一步包含含有SEQ ID NO:6的CMV增强子元件。

31.一种载体,该载体包括如权利要求27-30中任一项所述的表达组件。

32.如权利要求31所述的载体,其进一步包含含有SEQ ID NO:8的WPRE元件。

33.一种药物组合物,该药物组合物包含如权利要求1-13中任一项所述的rAAV颗粒。

34.一种试剂盒,该试剂盒包含如权利要求33所述的药物组合物。

35.一种重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,该重组腺相关病毒(rAAV)颗粒包含(1)rAAV载体,该rAAV载体包含用于表达芳基硫酸酯酶A(ARSA)多肽的表达组件,其中该表达组件包含编码该ARSA多肽的基因,该ARSA多肽可操作地连接至启动子和任选的增强子,以及(2)经修饰的AAV9衣壳蛋白,该经修饰的AAV9衣壳蛋白包含具有SEQ ID NO:10的靶向肽,该重组腺相关病毒(rAAV)颗粒用于治疗MLD。

36.如权利要求35所述的rAAV颗粒,其中该ARSA多肽包含SEQ ID NO:1。

37.如权利要求35或权利要求36所述的rAAV颗粒,其中该靶向肽在其N-末端和C-末端侧接接头序列。

38.如权利要求37所述的rAAV颗粒,其中所组合的靶向肽和接头序列包含SEQ ID NO:11。

39.如权利要求35-38中任一项所述的rAAV颗粒,其中该经修饰的AAV9衣壳蛋白是经修饰的VP3衣壳蛋白。

40.如权利要求35-38中任一项所述的rAAV颗粒,其中该经修饰的VP3衣壳蛋白具有与SEQ ID NO:12至少98.5％相同的序列。

41.如权利要求40所述的rAAV颗粒,其中经修饰的VP3衣壳蛋白包含含有SEQ ID NO:12的序列。

42.如权利要求35-38中任一项所述的rAAV颗粒,其中VP1、VP2和VP3衣壳蛋白是未经修饰的AAV9衣壳蛋白。

43.如权利要求35-42中任一项所述的rAAV颗粒,其中该表达组件包含SEQ ID NO:2的密码子优化的ARSA基因。

44.如权利要求35-43中任一项所述的rAAV颗粒,其中该rAAV载体包含SEQ ID NO:4的5'AAV2 ITR和SEQ ID NO:5的3'AAV2 ITR。

45.如权利要求35-44中任一项所述的rAAV颗粒,其中该表达组件包含含有SEQ ID NO:6的CMV增强子元件。

46.如权利要求35-45中任一项所述的rAAV颗粒,其中该表达组件包含含有SEQ ID NO:7的鸡b-肌动蛋白启动子。

47.如权利要求35-46中任一项所述的rAAV颗粒,其中该rAAV载体进一步包含WPRE元件。

48.如权利要求47所述的rAAV颗粒,其中该WPRE元件具有包含SEQ ID NO:8的序列。

49.如权利要求35-48中任一项所述的rAAV颗粒,其中该rAAV载体具有包含SEQ ID NO:16的序列。

治疗异染性脑白质营养不良的方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2022年5月16日提交的美国临时申请号63/342,590和2023年4月14日提交的美国临时申请号63/459,564的优先权权益,这两个美国临时申请的内容各自通过引用以其全文并入。

参考电子序列表

[0002] 电子序列表的内容(159792018440seqlist.xml;大小:36,314字节;且创建日期为:2023年5月8日)通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0003] 本披露涉及提供用于治疗有需要的患者的异染性脑白质营养不良(MLD)的方法,这些方法包括向患者的脑脊液(CSF)中施用重组腺相关病毒(rAAV)病毒颗粒,该病毒颗粒包含编码芳基硫酸酯酶A(ARSA)的载体。

背景技术

[0004] 异染性脑白质营养不良(MLD)是一种由芳基硫酸酯酶A(ARSA)的突变引起的常染色体隐性神经系统变性病症。ARSA活性水平的降低导致硫苷酯的毒性蓄积,其特征为中枢和周围神经系统中髓鞘形成细胞(少突胶质细胞和施万细胞)变性。这会导致脱髓鞘、功能障碍、神经元变性和神经炎症(星形胶质细胞增生、小胶质细胞活化)。临床表现主要在神经系统,进而导致智力残疾、情绪和行为问题、运动技能(移动、说话、吞咽)丧失、肌肉功能差以及瘫痪、失明、听力丧失和癫痫发作。

[0005] 目前治疗MLD的方法包括自体造血干细胞移植(HSCT)和异基因骨髓移植。

发明内容

[0006] 在一些方面,本发明提供了用于治疗有需要的患者的异染性脑白质营养不良(MLD)的方法,这些方法包括向患者的脑脊液(CSF)中施用重组腺相关病毒(rAAV)病毒颗粒,该病毒颗粒包含编码芳基硫酸酯酶A(ARSA)(本文中也称为ARSA多肽)的载体。在一些实施例中,经由脑室内(ICV)施用、直接脑池(dCM)施用或鞘内微导管(IT-CM)直接将病毒颗粒施用至CSF。

[0007] 本发明至少部分地基于rAAV病毒颗粒的开发,这些rAAV病毒颗粒包含:(a)rAAV载体,该载体包含编码芳基硫酸酯酶A(ARSA)多肽的表达组件,以及(b)能够转导中枢神经系统(CNS)的细胞的衣壳。将病毒颗粒施用至CSF中会提供ARSA蛋白在脑中的高表达水平。在特定实施例中,病毒颗粒的表达组件能够驱动在中枢和周围神经系统中的转基因表达以治疗MLD。在一些实施例中,表达组件包含SEQ ID NO:2的ARSA基因。在一些实施例中,ARSA基因表达具有SEQ ID NO:1的ARSA多肽。

[0008] 在一些方面,本发明提供了一种重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,该重组腺相关病毒(rAAV)颗粒包含rAAV载体,其中该rAAV载体包含用于在中枢和周围神经系统中表达ARSA多

肽的表达组件,其中该表达组件包含与启动子且任选地与增强子可操作地连接的转基因,其中该转基因编码ARSA多肽,并且其中该AAV病毒颗粒包含能够转导中枢神经系统(CNS)的细胞的衣壳蛋白。在一些实施例中,AAV衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白(SEQ ID NO:9)。在一些实施例中,rAAV的衣壳是经修饰的AAV9衣壳蛋白。在一些实施例中,rAAV的衣壳是AAV.rh10衣壳蛋白。在一些实施例中,ARSA基因表达具有SEQ ID NO:1的ARSA多肽。

[0009] 在一些实施例中,本披露提供了用于CSF内施用ARSA多肽的rAAV颗粒,这些rAAV颗粒包含经修饰的AAV9衣壳蛋白,该经修饰的AAV9衣壳蛋白包含将rAAV颗粒靶向脑的靶向肽。这种经修饰的AAV9衣壳在国际公开号WO 2021/102234 A1(其特此通过引用以其全文并入)中描述。在特定实施例中,将经修饰的AAV9衣壳的靶向肽插入AAV9结构蛋白的残基588之后。在一些实施例中,靶向肽具有SEQ ID NO:10。在一些实施例中,靶向肽在该靶向肽的N-末端和C-末端侧接接头序列。在一些实施例中,N-端侧上的接头序列具有序列AAA。在一些实施例中,C-端侧上的接头序列是AS。在一些实施例中,插入在AAV9衣壳结构蛋白的残基588之后的完整序列具有SEQ ID NO:11。在一些实施例中,完整的经修饰的AAV9衣壳结构蛋白(VP1)具有SEQ ID NO:12。具有SEQ ID NO:12的衣壳蛋白在本文中被称为AAV1999。在一些实施例中,完整的经修饰的AAV9衣壳结构蛋白与SEQ ID NO:12至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%、至少98.5%、至少99%、至少99.2%、至少99.5%或至少99.8%)相同,其中经修饰的AAV9结构衣壳包含SEQ ID NO:10的靶向肽。

[0010] 如本文所披露,包含经修饰的AAV9衣壳蛋白的rAAV颗粒包含三种结构衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。这三种衣壳蛋白是选择性剪接变体。全长VP1蛋白具有SEQ ID NO:9的序列。VP2蛋白包含SEQ ID NO:9的氨基酸138至736。VP3蛋白包含SEQ ID NO:9的氨基酸203至736。在一些实施例中,将靶向肽(SEQ ID NO:10)插入至rAAV颗粒中的AAV9 VP3衣壳蛋白中。在一些实施例中,将靶向肽(SEQ ID NO:10)插入至rAAV颗粒中的AAV9 VP2衣壳蛋白中。在一些实施例中,将靶向肽(SEQ ID NO:10)插入至rAAV颗粒中的AAV9 VP1衣壳蛋白中。在一些实施例中,将靶向肽(SEQ ID NO:10)插入至rAAV颗粒内的VP1、VP2和VP3衣壳蛋白中。在一些实施例中,经修饰的AAV9衣壳蛋白中的靶向肽在该靶向肽的N-末端和C-末端侧接接头序列。在一些实施例中,N-端侧上的接头序列具有序列AAA。在一些实施例中,C-端侧上的接头序列是AS。

[0011] 已发现,包含经修饰的AAV9衣壳蛋白(其包含SEQ ID NO:10的靶向肽)的rAAV颗粒在施用至受试者的脑(例如,CSF内施用)后显示出非常高的转基因表达水平。例如,在CSF内施用rAAV颗粒之后,包含具有SEQ ID NO:12的经修饰的VP1衣壳蛋白(和/或具有SEQ ID NO:13的经修饰的VP2衣壳蛋白和/或具有SEQ ID NO:14的经修饰的VP2衣壳蛋白)的rAAV颗粒在脑和脊髓中的转基因表达水平高于包含能够转导CNS的细胞的其他衣壳(例如,AAV9和AAV.rh10)的rAAV颗粒。相反,在CSF内施用包含经修饰的AAV9衣壳(其包含SEQ ID NO:10的靶向肽)的rAAV颗粒之后,在例如心脏和肝脏等其他器官中表达的转基因水平显著降低。此外,相对于包含能够转导CNS的细胞的其他衣壳(例如,AAV9和AAV.rh10)的rAAV颗粒,较低剂量的包含经修饰的AAV9衣壳(其包含SEQ ID NO:10的靶向肽)的rAAV颗粒便可实现高的表达水平。因此,相对于包含AAV9衣壳或AAV.rh10衣壳的rAAV颗粒,包含经修饰的AAV9衣壳蛋白(其包含SEQ ID NO:10的靶向肽)的rAAV颗粒具有改善的治疗指数。

[0012] 因此,在一个方面,本发明提供了用于治疗有需要的患者的MLD的方法,这些方法

包括向患者的脑脊液(CSF)中施用重组腺相关病毒(rAAV)病毒颗粒,该病毒颗粒包含(1)编码ARSA多肽的载体以及(2)经修饰的AAV9衣壳蛋白,其中该经修饰的rAAV衣壳蛋白包含SEQ ID NO:10的靶向肽。在一些实施例中,包含SEQ ID NO:10的经修饰的AAV9衣壳蛋白与具有SEQ ID NO:12的衣壳蛋白至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%、至少98.5%、至少99%、至少99.2%、至少99.5%或至少99.8%)相同。在一些实施例中,衣壳蛋白具有SEQ ID NO:12。

[0013] 在上述方面的一些实施例中,rAAV颗粒包含载体,该载体包含侧接一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列的表达组件。在一些实施例中,该表达组件侧接两个AAV ITR。在一些实施例中,这些AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAV.rh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。在一些实施例中,这些AAV ITR是AAV2 ITR。在一些实施例中,载体是自身互补的载体。在一些实施例中,载体包含编码ARSA多肽的第一核酸序列和编码该ARSA多肽的互补序列的第二核酸序列,其中第一核酸序列可沿其大部分或全部长度与第二核酸序列形成链内碱基对。在一些实施例中,第一核酸序列与第二核酸序列通过突变的AAV ITR连接,其中突变的AAV ITR包含D区的缺失且包含末端解析序列(terminal resolution sequence)的突变。

[0014] 在一些方面,本发明提供了包含本文所述的任何rAAV颗粒的组合物。在一些实施例中,该组合物进一步包含药学上可接受的载剂。

[0015] 在一些方面,本发明提供了一种包含本文所述的任何rAAV颗粒的细胞。在一些方面,本发明提供了一种生产ARSA多肽的方法,该方法包括在生产ARSA多肽的条件下培养如本文所述的细胞。在一些实施例中,这些方法进一步包含对ARSA多肽进行纯化的步骤。

[0016] 在一些方面,本发明提供了用于治疗有需要的个体的MLD的方法,这些方法包括向该个体施用如本文所述的rAAV颗粒。在一些方面,本发明提供了用于治疗有需要的个体的MLD的方法,这些方法包括向该个体施用如本文所述的组合物。在一些实施例中,本发明提供了用于治疗有需要的个体的MLD的方法,这些方法包括向该个体施用如本文所述的细胞。在一些实施例中,该个体缺乏ARSA活性。

[0017] 在一些实施例中,本发明提供了在有需要的个体中将ARSA活性增加至少约5%的方法,这些方法包括向该个体施用如本文所述的rAAV颗粒。在其他实施例中,本发明提供了在有需要的个体中将ARSA活性增加至少约10%的方法,这些方法包括向该个体施用如本文所述的rAAV颗粒。在其他实施例中,本发明提供了在有需要的个体中将ARSA活性增加至少约20%的方法,这些方法包括向该个体施用如本文所述的rAAV颗粒。在其他实施例中,本发明提供了在有需要的个体中将ARSA活性增加至少约30%的方法,这些方法包括向该个体施用如本文所述的rAAV颗粒。在其他实施例中,本发明提供了在有需要的个体中将ARSA活性增加至少约50%的方法,这些方法包括向该个体施用如本文所述的rAAV颗粒。

[0018] rAAV颗粒的施用可通过各种途径进行。在一些实施例中,该施用包括直接脊髓注射和/或脑内施用。在一些实施例中,该施用在选自以下的部位进行:大脑、髓质、脑桥、小脑、颅内腔、脑周围脑膜、硬脑膜、蛛网膜、软膜、脑周围蛛网膜下腔的脑脊液(CSF)、小脑深部核(deep cerebellar nuclei of the cerebellum)、大脑脑室系统(ventricular system of the cerebrum)、蛛网膜下腔、纹状体、皮质、隔膜、丘脑、下丘脑和脑实质。在一

些实施例中,该施用包括脑室内注射至至少一个脑侧脑室中。在一些实施例中,该施用包括在颈部、胸部和/或腰部区中进行鞘内注射。在一些实施例中,该施用包括纹状体内注射。在一些实施例中,该施用包括丘脑内注射。

[0019] 在上述方面的一些实施例中,rAAV颗粒经由直接注射至脊髓中、通过鞘内注射和/或通过脑池内注射施用。在一些实施例中,rAAV颗粒被施用至脊髓或脑池的超过一个位置。在一些实施例中,rAAV颗粒被施用至脊髓的超过一个位置。在一些实施例中,rAAV颗粒被施用至脊髓的腰蛛网膜下腔、胸蛛网膜下腔和颈蛛网膜下腔中的一个或多个。在一些实施例中,rAAV颗粒被施用至脑池。

[0020] 在上述方面的一些实施例中,仅向有需要的患者施用一次rAAV颗粒。在一些实施例中,向有需要的患者施用多次rAAV颗粒(例如,在一个月或多个月或几年内)。在其他实施例中,向有需要的患者每年施用一次rAAV颗粒。在其他实施例中,向有需要的患者每年施用两次rAAV颗粒。

[0021] 在一些实施例中,本发明提供了包含如本文所述的rAAV颗粒、组合物或细胞中的任一种的试剂盒。在一些实施例中,该试剂盒进一步包含使用说明书;缓冲液和/或药学上可接受的赋形剂;和/或瓶子、小瓶和/或注射器。

附图说明

[0022] 图1A-1C示出使用包含两种不同表达组件的病毒颗粒的体内ARSA表达增加,从而驱动在MLD(ARSA$^{-/-}$)小鼠模型中更好地清除毒性硫苷酯沉积物(C24-ST)。图1A示出在病毒颗粒中使用的表达组件,一个表达组件具有WPRE元件且一个表达组件不具有WPRE元件。图1B示出向小鼠双侧眶后注射病毒颗粒后ARSA的表达水平。图1C示出向小鼠双侧眶后注射病毒颗粒后的C24-ST水平。

[0023] 图2示出经AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE治疗的晚期MLD(ARSA$^{-/-}$)小鼠在脑、脊髓和肝脏中显示出增加的ARSA介导的硫酸酯酶活性。

[0024] 图3描绘了经AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE治疗的晚期MLD(ARSA$^{-/-}$)小鼠在给药后3个月显示出在脑和脊髓中硫苷酯水平显著降低。

[0025] 图4示出在经AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE治疗的晚期MLD(ARSA$^{-/-}$)小鼠的脑中测得的改善的胼胝体髓鞘形成。

[0026] 图5示出在经AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE治疗的晚期MLD(ARSA$^{-/-}$)小鼠的脑中观察到增加的髓鞘形成和成熟少突胶质细胞数目。

[0027] 图6A-6B示出在经AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE治疗的晚期MLD(ARSA$^{-/-}$)小鼠的脑中ARSA蛋白交叉校正的程度。图6A示出在施用AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE后三个月后匹配的矢状脑半切片的信号叠加。图6B示出交叉校正因子的热力图。

[0028] 图7A-7B示出经AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE治疗的早期MLD(ARSA$^{-/-}$)小鼠显示出广泛的CNS人ARSA(hARSA)表达,并在脑、脊髓、背根神经节(DRG)和肝脏中显示出增加的ARSA介导的硫酸酯酶活性。图7A示出在给药后四个月,相对于人ARSA,通过IHC在矢状脑切片中观察到广泛的ARSA表达。图7B示出在用AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE治疗的动物中,脑、脊髓、DRG和肝脏表现出ARSA活性显著增加。

[0029] 图8A-8D示出在向早期(6个月)ARSA$^{-/-}$小鼠给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE后,脑

(图8A)、肝脏(图8B)、血浆(图8C)和CSF(图8D)中的硫苷酯水平。在施用AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE后,脑、脊髓、肝脏、血浆和CSF中的硫苷酯水平显著升高。

[0030] 图9A-9C示出利用低剂量和高剂量的病毒颗粒,通过AAV.rh10-ARSA-FLAG-WPRE施用进行治疗使得非人灵长类动物(NHP)的脑和脊髓中的硫酸酯酶活性显著增加。图9A示出脑中的硫酸酯酶活性。图9B示出脊髓中的硫酸酯酶活性。图9C示出在施用病毒颗粒后的代表性脑切片。

[0031] 图10A和10B示出与AAVrh.10相比,衣壳AAV1999在NHP的脑和脊髓中显示出更高的转基因表达。图10A示出在施用rAAV颗粒后绿色荧光蛋白(GFP)的表达水平。图10B示出在所有样本中,与经AAVrh.10治疗的NHP相比,经AAV1999治疗的NHP的脑中的GFP表达高出93%-123%。

[0032] 图11示出在向NHP施用AAV1999或AAVrh.10后,脑中GFP表达的热力图。

[0033] 图12示出与AAVrh10相比,在经AAV1999治疗的NHP中,利用针对eGFP的抗体染色的代表性匹配脑切片显示出稳健的表达,从而展现出优越的生物分布(图12)。

[0034] 图13示出在施用包含AAV1999-GFP的颗粒后,NHP的脊髓和DRG中的GFP表达。

[0035] 图14示出在经治疗的NHP中,与AAVrh10-GFP相比,心脏和肝脏中的AAV1999-GFP表达较低。

[0036] 图15A-15B示出在施用AAVrh10-GFP颗粒或AAV1999-GFP颗粒后各种组织中的AAVrh10和AAV1999载体基因组负荷。图15A示出脑、脊髓和DRG中的载体基因组负荷。AAV1999在脑、脊髓和DRG中的载体基因组负荷低于AAVrh10。图15B示出在施用AAVrh10-GFP或AAV1999-GFP后在肝脏、心脏、肺、肾脏和脾脏中的载体基因组负荷。

[0037] 图16示出GFP表达(y轴)与组织载体基因组(x轴)之间相关性的左移,其中AAV1999(红色)的相关性左移,表明与AAVrh.10相比,载体的蛋白质表达更高且组织剂量更低(约10倍)。

[0038] 图17示出用于rAAV颗粒生产的特定质粒的载体图。

[0039] 图18示出用AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠显示出持续的hARSA mRNA表达。给药后十三个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集脑和脊髓样本。进行RTdPCR以量化hARSA mRNA表达,并将其相对于小鼠Hprt基因归一化。每个数据点代表单个动物。FB=配制缓冲液。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析和图基多重比较检验。*<0.05;**<0.01;***<0.001;****<0.0001。WT+FB:向野生型小鼠给药配制缓冲液;KO+FB:向Arsa KO小鼠给药配制缓冲液;KO+AAV:向Arsa KO小鼠给药AAV1999-ARSA。

[0040] 图19示出1只经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠随时间的推移显示出持续的ARSA介导的硫酸酯酶活性。在给药后十三个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集脑、脊髓、DRG、坐骨神经、肝脏和血浆样本。使用硫酸酯酶活性测定测量了ARSA介导的硫酸酯酶活性;将数据相对于通过BCA测定测量的总蛋白归一化。每个数据点代表单个动物。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析和图基多重比较检验。*<0.05;**<0.01;***<0.001;****<0.0001。

[0041] 图20示出2只经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠的脑和脊髓中溶血-硫苷酯水平显著提高。在给药后十三个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集脑、脊髓、DRG、坐骨神经、肝脏、血浆和CSF样本。使用LC-MS测量硫苷酯水平。将数据相对于组织重量归一化:从ng/mL

(50μL)转换为μg/g。将数据从(30ul)ng/ml转换为ng/ml(血浆),且从ng/ml(5ul)转换为ng/ul(CSF)。每个数据点代表单个动物。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析和图基多重比较检验。*<0.05;**<0.01;***<0.001;****<0.0001。

[0042] 图21示出用AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠在关键炎症标记物的表达方面显示出显著改善。给药后十三个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集脑和脊髓样本。进行RTdPCR以量化Gfap、Aif1(Iba1基因)和Lamp1水平,并将其相对于小鼠Hprt基因归一化。每个数据点代表单个动物。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析和图基多重比较检验。*<0.05;**<0.01;***<0.001;****<0.0001。

[0043] 图22示出用AAV1999-hARSA治疗Arsa KO小鼠长期(给药后13个月)显著降低了血浆Nf-L水平。给药后十三个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集血浆样本。通过Quanterix平台测量了Nf-L水平。每个数据点代表单个动物。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析和图基多重比较检验。*<0.05;**<0.01;***<0.001;****<0.0001。

[0044] 图23示出Arsa KO小鼠的听力随时间的推移而逐渐减退;用AAV1999-ARSA治疗会预防听觉表型的进展:在给药后4、7、10和13个月,经由放置在经麻醉动物的头皮上的电极而记录了ABR测量值。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:双因素方差分析和图基多重比较检验。星号表示KO+FB组与KO+AAV组。*=KO+FB与KO+AAV;*<0.05;**<0.01;***<0.001;****<0.0001。

[0045] 图24A-24C示出经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠在脑和脊髓中显示出MLD相关病理的显著逆转:给药后十三个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集脑(图24A)、脊髓(图24B)和DRG(图24C)样本进行组织病理学评估。每个数据点代表单个动物。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析和图基多重比较检验。*<0.05;**<0.01;***<0.001;****<0.0001

[0046] 图25A-25C示出经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠随时间的推移显示出持续的ARSA介导的硫酸酯酶活性。在给药后一个月、两个月、三个月和六个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死并收集脑样本(图25A)。进行数字PCR(dPCR)以量化每个组织中的AAV1999-ARSA载体水平,并将其相对于Rab1a基因归一化。(图25B和图25C)使用硫酸酯酶活性测定试剂盒(ab204731)测量了ARSA介导的硫酸酯酶活性;将数据相对于通过BCA测定测量的总蛋白归一化。每个数据点代表单个动物。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:双因素方差分析和图基多重比较检验。

[0047] 图26A-26F示出经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠随时间的推移逐渐清除硫苷酯同种型。给药后一个月、两个月、三个月和六个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集脑样本。使用LC-MS测量(图26A)溶血-硫苷酯、(图26B)C16-硫苷酯同种型和(图26C)C18-硫苷酯同种型。将数据相对于组织重量归一化:从ng/mL(50μL)转换为μg/g。(图26D-26F)为了阐明硫苷酯清除的渐进性,对于(图26D)溶血硫苷酯、(图26E)C16-硫苷酯同种型和(图26F)C18-硫苷酯同种型,相对于KO+FB动物中剩余的平均ST,数据被呈现为KO+AAV动物中剩余ST的百分比。每个数据点代表单个动物。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:双因素方差分析和图基多重比较检验。*<0.05;**<0.01;***<0.001;****<0.0001。

[0048] 图27示出在用AAV1999-ARSA进行治疗后,Arsa KO小鼠的CSF和血浆中的总硫苷酯

水平显示出显著的降低。给药后一个月、两个月、三个月和六个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集CSF和血浆样本。使用LC-MS测量硫苷酯水平。将数据从(30ul)ng/ml转换为ng/ml(血浆),且从ng/ml(5ul)转换为ng/ul(CSF)。每个数据点代表单个动物。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:双因素方差分析和图基多重比较检验。

[0049] 图28示出与KO+FB组相比,给药AAV1999-ARSA后6个月,血浆Nf-L水平的初始升高有所降低。给药后一个月、两个月、三个月和六个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集血浆样本。通过Quanterix平台测量了Nf-L水平。每个数据点代表单个动物。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析和图基多重比较检验。*<0.05;**<0.01;***<0.001;****<0.0001。

[0050] 图29A-29D示出在经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠脑中发现最低严重程度的显微镜观察结果。给药后一个月、两个月、三个月和六个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集脑样本进行组织病理学分析。每个数据点代表单个动物;观察结果根据(图29A)脑干和小脑变性、(图29B)空泡形成、(图29C)浸润和(图29D)海马变性的发生率和严重程度进行分类。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:双因素方差分析和图基多重比较检验。

[0051] 图30A-30E示出经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠在DRG和周围神经中显示出最低至轻度的观察结果。给药后一个月、两个月、三个月和六个月,对Arsa KO小鼠实施安乐死,并收集DRG(图30A-30C)、脊髓(图30D)和坐骨神经(图30E)进行组织病理学分析。每个数据点代表单个动物。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:双因素方差分析和图基多重比较检验。

[0052] 图31示出在NHP脑中广泛的剂量依赖性AAV1999-ARSA载体生物分布。给药AAV1999-ARSA后五周,对NHP实施安乐死,并收集样本。将脑对半切开,将其中一个半球快速冷冻;从每个半球收集64个组织环切样品(punch),代表灰质(47个环切样品)和白质(17个环切样品)。进行数字PCR(dPCR)以量化每个组织环切样品中的AAV1999载体浓度,并将其相对于TUBB1基因内含子归一化。每个数据点代表该组织环切样品的VG/细胞暴露,其或者(左)取该组所有NHP的平均值,或者(右)由各别脑区呈现。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析和图基多重比较检验。依据NHP的剂量。

[0053] 图32示出在NHP中19个灰质脑区中广泛的剂量依赖性hARSA mRNA表达。给药后五周,对NHP实施安乐死,并收集样本。将脑对半切开,将其中一个半球快速冷冻;从每个半球收集47个组织环切样品,代表19个灰质区。进行逆转录数字PCR(RTdPCR)以量化hARSA mRNA表达,将其相对于食蟹猴次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶1(HPRT)基因归一化。每个数据点代表该组织环切样品中的归一化hARSA表达,其或者(左)取该组所有NHP的平均值,或者(右)由各别脑区呈现。左:散点图表示中位数;右:误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析和图基多重比较检验。

[0054] 图33A-33C示出NHP中19个灰质脑区中广泛的剂量依赖性hARSA蛋白表达。给药AAV1999-ARSA后五周,对NHP实施安乐死,并收集样本。将脑对半切开,将其中一个半球快速冷冻;从每个半球收集30个组织环切样品,代表灰质。进行LC-MS以量化人ARSA蛋白水平。每个数据点代表该组织环切样品中人ARSA的量,该组中三只动物的平均值,其或者呈现为该组中所有NHP的(图33A)平均值、或者(图33B)依据各别脑区呈现、或者(图33C)呈现为这些环切样品中与载体基因组的相关性。误差条表示平均值和标准误差。来自1e10 VG/克

(7.5e11 VG)和3.3e10 VG/克(2.5e12 Vg)的数据低于检测限值,且已被排除在外。左:散点图表示中位数;右:误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析和图基多重比较检验。

[0055] 图34A-34B示出沿着脊柱头-尾轴的均匀剂量依赖性AAV1999载体生物分布和hARSA mRNA表达。给药AAV1999-ARSA后五周,对NHP实施安乐死,并收集样本。将八个具有相邻DRG的脊髓节段(颈部、上胸部、下胸部和腰部各两个)快速冷冻并分离DNA/RNA。(图34A)进行数字PCR(dPCR)以量化AAV1999载体浓度,并将其相对于TUBB1基因内含子归一化。(图34B)进行RTdPCR以量化hARSA mRNA表达,并将其相对于内源性HPRT基因归一化。每个数据点代表该样本的背景减去VG/细胞暴露或归一化hARSA表达,在该组所有NHP中取平均值。误差条表示平均值和标准误差。

[0056] 图35示出AAV1999-ARSA载体在内脏器官和周围神经中的生物分布。给药后五周,对NHP实施安乐死,并收集来自内脏器官的样本。进行数字PCR(dPCR)以量化每个组织环切样品中的AAV1999载体浓度,并将其相对于TUBB1基因内含子归一化。每个数据点代表该组织环切样品的VG/细胞暴露,在该组所有NHP中取平均值。误差条表示平均值和标准误差。

[0057] 图36示出在1e11和3.3e11 VG/克脑重剂量下,NHP脑中人ARSA蛋白表达有可能满足治疗阈值。给药AAV1999-ARSA后五周,对NHP实施安乐死,并收集样本。将脑对半切开,将其中一个半球快速冷冻;从每个半球收集30个组织环切样品,代表灰质。进行LC-MS以量化人和内源性食蟹猴cyARSA蛋白水平,并以百分比(huARSA/cyARSA)表示。每个数据点被表示为该组织环切样品中hARSA与猕猴cyARSA蛋白的比率,该组中三只动物的平均值,其或者呈现为(左)该组中所有NHP的平均值,或者(右)依据各别脑区呈现。误差条表示平均值和标准误差。

[0058] 图37A-37B示出AAV1999-ARSA有效剂量具有治疗意义。图37A示出实行LC-MS以量化来自7名3-8岁健康器官捐献者的12个脑区中的人ARSA蛋白水平。组织自美国国立卫生研究院(NIH)脑库获得。图37B示出给药后五周,对NHP实施安乐死,并收集样本。将脑对半切开,将其中一个半球快速冷冻;从每个半球收集30个组织环切样品,代表灰质。进行LC-MS以量化人ARSA蛋白水平。呈现各组中的平均ARSA蛋白。赞助商呈现了人ARSA在NHP中的百分比,其可与健康器官捐献者的脑中的人ARSA相关。误差条表示平均值和标准误差。

[0059] 图38示出在两个给药组中在给药AAV1999-ARSA后第1周或第5周(尸检)在NHP中均未观察到临床症状(功能或行为缺陷)。在给药前、给药后第7天和尸检前(给药后5周)对NHP进行了35个功能和行为参数的测试。观察结果被评分为“在正常范围内”或“异常临床观察结果”。下图为尸检时的观察结果。由CRL兽医进行功能和行为评估。

[0060] 图39A-39C示出CM内注射AAV1999-ARSA具有良好的耐受性,从而产生预期的Nf-L升高;AAV1999-ARSA不会引发先天性或细胞介导的免疫反应。如图39A所示,在给药前和尸检时,通过Quanterix平台收集CSF并分析Nf-L水平。每个数据点代表该样本中的Nf-L水平,其为该组中所有NHP的平均值。如图39B所示,在给药前、给药后第2、-4、7、14天和尸检时分离血浆。使用Luminex测定来确定IL-1b、IL-1RA、IL-6、IL-10、IL-12/23(p40)、IL-15、IL-18、IFN-g、TNF-a、G-CSF、MCP-1、MIP-1b、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-5、IL-8、IL-13和IL-17A的浓度。每个数据点代表该样本中的细胞因子浓度,其为该组中所有NHP的平均值。如图39C所示,使从1e11和3.3e11 VG/克脑重给药组中的动物中分离的PBMC经受IFN-γ酶联免疫斑点

法(ELISpot)。误差条表示平均值和标准误差;统计分析:单因素方差分析与*图基和#Dunnett多重比较检验。

[0061] 图40示出在四种剂量下经AAV1999-ARSA治疗的NHP在脑中显示出轻度的显微镜观察结果。给药后五周,对NHP实施安乐死,并收集样本。将脑对半切开,对一个半球进行固定以用于组织病理学评估。每个数据点代表显微镜观察结果的发生率和严重程度,其为在该给药组中的所有动物的平均值,按单核细胞浸润、神经元或神经纤维变性和胶质细胞增生类别进行测量。误差条表示平均值和标准误差。

[0062] 图41A-41B示出经AAV1999-ARSA治疗的NHP在NHP的脊髓、桡神经和股神经中显示出中度的显微镜观察结果;在坐骨神经中有明显的观察结果。给药后五周,对NHP实施安乐死,并收集样本进行组织病理学评估。每个数据点代表显微镜观察结果的发生率和严重程度,其为在该给药组中的所有动物的平均值,按单核细胞浸润、神经元或神经纤维变性和胶质细胞增生类别进行测量。误差条表示平均值和标准误差。

[0063] 图42A-42B示出当在沿着脊柱头-尾轴的8个节段中取平均值时,经AAV1999-ARSA治疗的NHP在DRG中显示出轻度的观察结果。给药后五周,对NHP实施安乐死,并收集样本进行组织病理学评估。在左侧面板中,每个数据点代表在该给药组中的所有动物中,在来自8个脊髓节段的DRG中取平均值的显微镜观察结果的平均发生率和严重程度。在右侧面板中,每个数据点代表依据DRG的显微镜观察结果的发生率和严重程度,其为该给药组中所有动物的平均值。测量的类别是(图42A)变性和坏死以及(图42B)单核细胞浸润。误差条表示平均值和标准误差。

具体实施方式

[0064] 在一些方面,本发明提供了包含编码ARSA多肽的转基因的表达组件、重组腺相关病毒(rAAV)载体、以及病毒颗粒和药物组合物。在另一些方面,本发明例如通过以下方式而提供用于治疗异染性脑白质营养不良(MLD)的方法:增加ARSA活性,减少脑、脊髓、肝脏、血浆和CSF中的硫苷酯积累,增加胼胝体中的髓鞘形成并使其正常化,增加脑中的少突胶质细胞群体,以及改善CNS病理,由此清除脑区中的硫苷酯。在又一些方面,本发明提供了用于使用本披露的表达组件来治疗个体的MLD的试剂盒。

定义

[0065] 如本文所用的“载体”是指包含要在体外或体内递送至宿主细胞中的核酸的重组质粒或病毒。

[0066] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物,并且不限于最小长度。此类氨基酸残基的聚合物可以含有天然或非天然氨基酸残基,并且包括但不限于氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。全长蛋白质及其片段都涵盖在该定义中。这些术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等。此外,为了本披露的目的,“多肽”是指包括对天然序列的修饰,诸如缺失、添加和取代(通常在性质上是保守的)的蛋白质,只要该蛋白质维持所期望的活性即可。这些修饰可以是有意的,如通过定点诱变,或者可以是偶然的,诸如通过产生蛋白质的宿主的突变或由于PCR扩增的错误产生。

[0067] “重组病毒载体”是指包含一个或多个异源序列(即,非病毒来源的核酸序列)的重

组多核苷酸载体。在重组AAV载体的情况下,重组核酸侧接至少一个、并且在实施例中是两个反向末端重复序列(ITR)。

[0068] “重组AAV载体(rAAV载体)”是指包含一个或多个异源序列(即,非AAV来源的核酸序列)的多核苷酸载体,这些异源序列侧接至少一个、并且在实施例中是两个AAV反向末端重复序列(ITR)。当存在于已被合适的辅助病毒感染(或正在表达合适的辅助功能)并且正在表达AAV rep和cap基因产物(即,AAV Rep和Cap蛋白)的宿主细胞中时,此类rAAV载体可以复制并包装至感染性病毒颗粒中。当rAAV载体并入较大的多核苷酸中(例如,染色体中或另一种载体诸如用于克隆或转染的质粒中)时,则rAAV载体可称为“前载体”,其可以在AAV包装功能和合适的辅助功能的存在下通过复制和衣壳化得以“挽救”。rAAV载体可以是多种形式中的任一种,包括但不限于质粒、线性人工染色体、与脂质复合、包封在脂质体中以及在病毒颗粒中衣壳化,特别是在AAV颗粒中。rAAV载体可以包装至AAV病毒衣壳中以产生“重组腺相关病毒颗粒(rAAV颗粒)”。

[0069] “异源”意指源自与它进行比较或将它引入或并入其中的实体的其余部分基因型上不同的实体。例如,通过基因工程技术引入不同细胞类型中的多核苷酸是异源多核苷酸(并且当表达时,可以编码异源多肽)。类似地,并入病毒载体中的细胞序列(例如,基因或其部分)相对于载体是异源核苷酸序列。

[0070] 术语“转基因”是指引入细胞中并且能够转录成RNA并任选地在适当的条件下翻译和/或表达的多核苷酸。在一些方面,它赋予其被引入的细胞期望的性质,或以其他方式产生期望的治疗或诊断结果。

[0071] “鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子”是指源自鸡β-肌动蛋白基因(例如,Gallusβ肌动蛋白,由基因库Entrez基因(GenBank Entrez Gene)ID 396526表示)的多核苷酸序列。如本文所用,“鸡β-肌动蛋白启动子”可指含有巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件的启动子、鸡β-肌动蛋白基因的启动子和第一外显子和内含子、以及兔β-珠蛋白基因的剪接受体,例如在Miyazaki,J.等人(1989)Gene[基因]79(2):269-77中描述的序列。如本文所用,术语“CAG启动子”可以互换使用。如本文所用,术语“CMV早期增强子/鸡β肌动蛋白(CAG)启动子”可互换使用。

[0072] 如关于病毒滴度使用的术语“基因组颗粒(gp)”、“基因组当量”或“基因组拷贝”是指含有重组AAV DNA基因组的病毒体的数目,而与感染性或功能性无关。特定载体制剂中基因组颗粒的数目可通过诸如本文实例中或例如Clark等人(1999)Hum.Gene Ther.[人类基因疗法],10:1031-1039;Veldwijk等人(2002)Mol.Ther.[分子疗法],6:272-278中描述的程序测量。

[0073] 如本文所用的术语“载体基因组(vg)”可以指包含载体(例如,病毒载体)的一组多核苷酸序列的一种或多种多核苷酸。载体基因组可以在病毒颗粒中衣壳化。根据特定病毒载体,载体基因组可以包含单链DNA、双链DNA或单链RNA或双链RNA。载体基因组可以包括与特定病毒载体相关的内源序列和/或通过重组技术插入特定病毒载体中的任何异源序列。例如,重组AAV载体基因组可以包括在启动子、填充序列、目标序列(例如,RNAi)和聚腺苷酸化序列两侧的至少一个ITR序列。完整的载体基因组可以包括载体的一整套多核苷酸序列。在一些实施例中,病毒载体的核酸滴度可以按照vg/mL测量。适于测量这种滴度的方法是本领域已知的(例如,定量PCR)。

[0074] 如关于病毒滴度使用的术语“感染单位(iu)”、“感染性颗粒”或“复制单位”是指通过感染中心测定(也称为复制中心测定),如例如McLaughlin等人(1988)J.Virol.[病毒学杂志],62:1963-1973中所述测量的感染性和可复制重组AAV载体颗粒的数目。

[0075] 如关于病毒滴度使用的术语“转导单位(tu)”是指引起功能性转基因产物产生的感染性重组AAV载体颗粒的数目,如诸如本文实例中或例如Xiao等人(1997)Exp.Neurobiol.[实验神经生物学],144:113-124;或Fisher等人(1996)J.Virol.[病毒学杂志],70:520-532(LFU测定)中描述的功能性测定中所测量的。

[0076] “反向末端重复”或“ITR”序列是本领域众所周知的术语,是指在病毒基因组末端发现的处于相反取向的相对短的序列。

[0077] “AAV反向末端重复(ITR)”序列是本领域众所周知的术语,是存在于天然单链AAV基因组的两个末端的大约145个核苷酸的序列。ITR最外面的125个核苷酸可以以两个选择性取向中的任一取向存在,导致不同AAV基因组之间和单个AAV基因组的两个末端之间的异质性。最外面的125个核苷酸还含有几个较短的自身互补区(命名为A区、A’区、B区、B’区、C区、C’区和D区),允许在ITR的该部分内发生链内碱基配对。

[0078] “末端解析序列”或“trs”是AAV ITR的D区中在病毒DNA复制期间被AAV rep蛋白切割的序列。突变体末端解析序列是耐AAV rep蛋白切割的。

[0079] “AAV辅助功能”是指允许AAV被宿主细胞复制和包装的功能。AAV辅助功能可以按多种形式中的任一种提供,包括但不限于协助AAV复制和包装的辅助病毒或辅助病毒基因。其他AAV辅助功能是本领域已知的,例如基因毒性剂。

[0080] AAV的“辅助病毒”是指允许AAV(其是缺陷型细小病毒)被宿主细胞复制和包装的病毒。辅助病毒提供允许AAV复制的“辅助功能”。已经鉴定了许多此类辅助病毒,包括腺病毒、疱疹病毒和痘病毒诸如牛痘和杆状病毒。腺病毒涵盖许多不同的亚群,但是C亚群的5型腺病毒(Ad5)是最常用的。人、非人哺乳动物和禽类来源的许多腺病毒是已知的并且可从诸如ATCC等保藏机构获得。也可从诸如ATCC等保藏机构获得的疱疹家族的病毒包括例如单纯疱疹病毒(HSV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)和假狂犬病病毒(PRV)。用于AAV复制的腺病毒辅助功能的实例包括E1A功能、E1B功能、E2A功能、VA功能和E4orf6功能。可从保藏机构获得的杆状病毒包括苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)。

[0081] 如果感染性AAV颗粒与感染性辅助病毒颗粒的比率为至少约10^2:1;至少约10^4:1、至少约10^6:1;或至少约10^8:1或更大,则称rAAV制剂“基本上不含”辅助病毒。在一些实施例中,制剂也不含等量的辅助病毒蛋白(即,如果上述辅助病毒颗粒杂质以被破坏的形式存在,则由于此类水平的辅助病毒而存在的蛋白)。病毒和/或细胞蛋白质污染通常可以在SDS凝胶上作为考马斯染色条带的存在(例如,除了对应于AAV衣壳蛋白VP1、VP2和VP3的那些以外的条带的出现)而被观察到。

[0082] “有效量”是足以实现有益的或期望的结果,包括临床结果(例如,症状的改善、临床终点的实现等)的量。有效量能以一次或多次施用来施用。就疾病状态而言,有效量是足以改善、稳定或延迟疾病发展的量。

[0083] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如,奶牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类(例如,人和非人灵长类,诸如猴)、兔以及啮齿类(例如,小鼠和大

鼠)。在某些实施例中,个体或受试者是人。

[0084] 如本文所用,“治疗”是用于获得有益或期望的临床结果的方法。出于本披露的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病程度的减小、疾病状态的稳定(例如,不恶化)、防止疾病的传播(例如,转移)、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和,以及可检测或不可检测的缓解(部分或完全)。“治疗”还可以表示与未接受治疗的预期存活率相比延长存活率。

[0085] 如本文所用,术语“预防性治疗”是指这样的治疗,其中个体已知或怀疑患有病症或处于患有病症的风险中,但尚未展示出病症的症状或展示出病症的最小症状。进行预防性治疗的个体可以在症状发作之前进行治疗。

[0086] 本文中提及的“约”值或参数包括(并且描述)涉及该值或参数本身的实施例。例如,提及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0087] 如本文所用,除非另有指示,否则冠词的单数形式“一”、“一个(一种)”和“该”包括复数引用物。

[0088] 应理解,本文所述的本披露的方面和实施例包括“包含方面和实施例”、“由方面和实施例组成”和/或“基本上由方面和实施例组成”。

表达组件

[0089] 在一些实施例中,编码ARSA多肽的转基因是密码子优化的。在一些实施例中,编码ARSA多肽的转基因是密码子优化的,用于在特定细胞(例如,真核细胞)中表达。真核细胞可以是特定生物体(例如,哺乳动物,包括但不限于人类、小鼠、大鼠、兔子、狗或非人灵长类动物)的细胞或源自该特定生物体的细胞。一般来说,密码子优化是指在保持天然氨基酸序列的同时利用在该宿主细胞的基因中更频繁或最频繁使用的密码子来替换天然序列的至少一个密码子,由此来修饰核酸序列以增强在感兴趣的宿主细胞中的表达的过程。各种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特定的偏好。例如,在“密码子使用数据库”中可轻易地获得密码子使用表,并且这些表可以多种方式进行调整(参见例如,Nakamura,Y.等人(2000)Nucleic Acids Res.[核酸研究]28:292)。用于对特定序列进行密码子优化以在特定宿主细胞中表达的计算机算法也是可用的,例如基因制造(Gene Forge)(Aptagen;Jacobus,Pa.)、DNA2.0、基因艺术(GeneArt)(GA)或金斯瑞(Genscript)(GS)以及结合CpG含量减少的GS算法。在一些实施例中,使用GA算法对编码ARSA多肽的转基因进行密码子优化。在一些实施例中,编码ARSA多肽的转基因具有SEQ ID NO:1的序列。

[0090] 在一些实施例中,该表达组件进一步包含内含子。本领域技术人员已知用于在本发明中使用的各种内含子,且这些内含子包括MVM内含子、F IX截短内含子1、β-珠蛋白SD/免疫珠蛋白重链SA、腺病毒SD/免疫珠蛋白SA、SV40晚期SD/SA(19S/16S)和杂合腺病毒SD/IgG SA。(Wu等人,2008,Kurachi等人,1995,Choi等人,2014,Wong等人,1985,Yew等人,1997,Huang和Gorman(1990))。在一些实施例中,内含子是鸡β-肌动蛋白(CBA)/兔β-珠蛋白杂合内含子。在一些实施例中,内含子是鸡β-肌动蛋白(CBA)/兔β-珠蛋白杂合启动子和内含子,其中所有ATG位点都被去除以使错误的翻译起始位点最小化。在一些实施例中,内含子是MVM内含子、F IX截短内含子1、β-珠蛋白SD/免疫珠蛋白重链SA、腺病毒SD/免疫珠蛋白SA、SV40晚期SD/SA(19S/16S)或杂合腺病毒SD/IgG SA。在一些实施例中,内含子是鸡β-肌动蛋白(CBA)/兔β-珠蛋白杂合内含子。

[0091] 在一些实施例中,该表达组件进一步包含聚腺苷酸化信号。在一些实施例中,该聚腺苷酸化信号是牛生长激素聚腺苷酸化信号、SV40聚腺苷酸化信号或HSV TK pA。在一些实施例中,该聚腺苷酸化信号是如Levitt,N等人(1989),Genes Develop.[基因发展]3:1019-1025中所述的合成聚腺苷酸化信号。

[0092] 在一些实施例中,表达组件包含填充核酸。在一些实施例中,该填充核酸可包含编码报告多肽的序列。如本领域技术人员将理解的,填充核酸可位于核酸内的多个区中,并且可由核酸内的连续序列(例如,单个位置中的单个填充核酸)或多个序列(例如,超过一个位置(例如,2个位置、3个位置等)中的超过一个填充核酸)构成。在一些实施例中,填充核酸可位于编码ARSA多肽的转基因的下游。在实施例中,填充核酸可位于编码ARSA多肽的转基因的上游(例如,位于启动子与转基因之间)。本领域技术人员还将理解,多种核酸可以用作填充核酸。在一些实施例中,填充核酸包含人类α1-抗胰蛋白酶(AAT)填充序列或C16 P1染色体16P1克隆(人类C16)填充序列的全部或一部分。在一些实施例中,填充序列包含基因的全部或一部分。例如,填充序列包含人类AAT序列的一部分。本领域技术人员将认识到,基因的不同部分(例如,人类AAT序列)可以用作填充片段。例如,填充片段可以来自基因的5'端、基因的3'端、基因的中间、基因的非编码部分(例如,内含子)、基因的编码区(例如,外显子),或基因的非编码部分和编码部分的混合。本领域技术人员还将认识到填充序列的全部或一部分可以用作填充序列。在一些实施例中,填充序列被修饰以去除内部ATG密码子。

[0093] 在一些实施例中,表达组件被并入载体中。在一些实施例中,表达组件被并入病毒载体中。在一些实施例中,病毒载体是如本文所述的rAAV载体。

载体和病毒颗粒

[0094] 在某些方面,用于表达ARSA多肽(例如,野生型人ARSA多肽)的表达组件包含在载体中。在一些实施例中,本发明设想使用重组病毒基因组来引入编码ARSA多肽的核酸序列,以包装成病毒颗粒,例如下文所述的病毒颗粒。重组病毒基因组可包括用以建立ARSA多肽的表达的任何元件,例如启动子、ITR、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择标记物、内含子、聚合物A(polyA)信号和/或复制起点。下面更详细地描述病毒颗粒的示例性病毒基因组元件和递送方法。

非病毒递送系统

[0095] 常规的非病毒基因转移方法也可用于将核酸引入细胞或靶组织。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、裸核酸和与递送系统复合的核酸。例如,载体可与脂质(例如,阳离子或中性脂质)、脂质体、聚阳离子、纳米颗粒或增强核酸的细胞摄取的试剂复合。载体可与适用于本文所述的任何递送方法的试剂复合。在一些实施例中,核酸包含一种或多种病毒ITR(例如,AAV ITR)。

病毒颗粒

[0096] 在一些实施例中,包含用于表达ARSA多肽(例如,野生型人ARSA多肽)的表达组件的载体是重组病毒载体。重组病毒载体的一些实例包括AAV、慢病毒和腺病毒。在一个方面,病毒载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。在一些实施例中,用于表达ARSA多肽(例如,野生型人ARSA多肽)的表达组件侧接一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。在一些实施例中,病毒颗粒是包含用于表达ARSA多肽的表达组件的重组AAV颗粒,该表达组件侧接一个或两个ITR。在一些实施例中,用于表达ARSA多肽的表达组件侧接两个AAV ITR。

[0097] 在一些实施例中,本披露的用于表达ARSA多肽的表达组件在转录方向上可操作地连接组分、控制序列(包括转录起始序列和终止序列),从而形成表达组件。该表达组件在5'端和3'端侧接至少一个功能性AAV ITR序列。"功能性AAV ITR序列"意指ITR序列的功能如同预期用于AAV病毒体的挽救、复制和包装。参见Davidson等人,PNAS[美国国家科学院院刊],2000,97(7)3428-32;Passini等人,J.Virol.[病毒学杂志],2003,77(12):7034-40;以及Pechan等人,Gene Ther.[基因疗法],2009,16:10-16,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。为了实践本发明的一些方面,重组载体至少包含衣壳化所必需的所有AAV序列和供rAAV感染的物理结构。用于在本发明的载体中使用的AAV ITR不需要具有野生型核苷酸序列(例如,如Kotin,Hum.Gene Ther.[人类基因疗法],1994,5:793-801中所述),并且可通过插入、缺失或替换核苷酸来改变,或者AAV ITR可源自几种AAV血清型中的任一种。当前已知超过40种血清型的AAV,并且新的血清型和现有血清型的变体持续被鉴定出。参见Gao等人,PNAS[美国国家科学院院刊],2002,99(18):11854-6;Gao等人,PNAS[美国国家科学院院刊],2003,100(10):6081-6;以及Bossis等人,J.Virol[病毒学杂志],2003,77(12):6799-810。

[0098] 任何AAV血清型的使用都被认为在本发明的范围内。在一些实施例中,rAAV载体是源自AAV血清型的载体,包括但不限于AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAV.rh10、AAV11、AAV12、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV ITR等。在一些实施例中,AAV中的核酸包含ITR,AAV ITR为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV等。在某些实施例中,AAV ITR是AAV2 ITR。

[0099] 在一些实施例中,载体可包括填充核酸。在一些实施例中,填充核酸可编码绿色荧光蛋白(GFP)。在一些实施例中,填充核酸可位于表达组件的3'处,用于表达本披露的ARSA多肽。

[0100] 在一些方面,本发明提供了包含重组自身互补基因组的病毒颗粒。在一些实施例中,载体是自身互补的载体。在以下文献中描述了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: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;以及Wang Z.等人,(2003)Gene Ther[基因疗法]10:2105-2111,其各自通过引用以其全文并入本文。包含自身互补基因组的rAAV依靠其部分互补序列(例如,转基因的互补编码链和非编码链)将快速形成双链DNA分子。在一些实施例中,本发明提供了包含AAV基因组的AAV病毒颗粒,其中rAAV基因组包含第一异源多核苷酸序列(例如,本发明的ARSA多肽的编码链)和第二异源多核苷酸序列(例如,本披露的ARSA多肽的非编码或反义链),其中该第一异源多核苷酸序列可沿其大部分或全部长度与该第二多核苷酸序列形成链内碱基对。

[0101] 在一些实施例中,第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列通过促进链内碱基配对的序列(例如,发夹DNA结构)连接。发夹结构是本领域已知的,例如在siRNA分子中。在一些实施例中,第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列通过突变的ITR(例如,右侧ITR)连接。突变的ITR包含含有末端解析序列的D区的缺失。因此,在复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR处切割病毒基因组,并且因此,按5'至3'顺序包含以下项的重组病毒基因组将包装在病毒衣壳中:AAV ITR,包含调控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处于相反取向的第二异源多核苷酸,和第三AAV ITR。

[0102] 在一些实施例中,第一异源核酸序列和第二异源核酸序列通过突变的ITR(例如,右侧ITR)连接。在一些实施例中,ITR包含多核苷酸序列5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA CCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:15)。突变的ITR包含含有末端解析序列的D区的缺失。因此,在复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR处切割病毒基因组,并且因此,按5'至3'顺序包含以下项的重组病毒基因组将包装在病毒衣壳中:AAV ITR,包含调控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处于相反取向的第二异源多核苷酸,和第三AAV ITR。

[0103] 在一些实施例中,载体在病毒颗粒中衣壳化。在一些实施例中,病毒颗粒是包含重组AAV载体的重组AAV病毒颗粒。使用不同的AAV血清型来优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如,脑或脊髓)内的特定细胞类型。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。例如,在一些实施例中,rAAV颗粒可包含经修饰的AAV1999衣壳蛋白和至少一种AAV2 ITR,或者它可包含经修饰的AAV1999衣壳蛋白和至少一种AAV1 ITR。本文提供了用于产生rAAV颗粒的AAV血清型的任何组合,如同本文明确陈述了每种组合。

[0104] 已知AAV的衣壳(例如,AAV9、AAV1999等)包括三种衣壳蛋白:VP1、VP2和VP3。这些蛋白含有大量重叠的氨基酸序列和独特的N-端序列。AAV9衣壳包括按二十面体对称排列的60个亚基。AAV9以约为5:5:50的比率包括VP1、VP2和VP3衣壳蛋白。AAV9的VP蛋白是基因组的编码结构蛋白的开放阅读框的产物,称为cap,作为次要衣壳蛋白的VP1(约82kDa)和VP2(约73kDa)、以及作为主要衣壳蛋白的VP3(约61kDa)。由于使用了选择性剪接和渗漏扫描两者,当被表达时,各别VP共享涵盖整个VP3的C端,而VP1和VP2是N-端VP3延伸。VP1和VP2共享一个约73个氨基酸的区,该区在VP1中延伸了另外的约137个氨基酸,称为VP1独特区(VP1u)。参见Penzes等人,(2021),Journal of Virology[病毒学杂志]95(19)e0084321。在本文披露的经修饰的AAV9衣壳蛋白的一些实施例中,靶向肽(例如,SEQ ID NO:10)被并入VP1中。在本文披露的经修饰的AAV9衣壳蛋白的一些实施例中,靶向肽(例如,SEQ ID NO:10)被并入VP2中。在本文披露的经修饰的AAV9衣壳蛋白的一些实施例中,靶向肽(例如,SEQ ID NO:10)被并入VP3中。在本文披露的经修饰的AAV9衣壳蛋白的一些实施例中,靶向肽(例如,SEQ ID NO:10)被并入VP1、VP2和VP3中。

[0105] 在一些实施例中,本披露提供了用于CSF内施用ARSA多肽的rAAV颗粒,这些rAAV颗粒包含经修饰的AAV9衣壳蛋白,该经修饰的AAV9衣壳蛋白包含将rAAV颗粒靶向脑的靶向肽。在特定实施例中,将经修饰的AAV9衣壳的靶向肽插入AAV9结构蛋白的残基588之后。在一些实施例中,靶向肽具有SEQ ID NO:10。在一些实施例中,靶向肽在该靶向肽的N-末端和C-末端侧接接头序列。在一些实施例中,N-端侧上的接头序列具有序列AAA。在一些实施例中,C-端侧上的接头序列是AS。在一些实施例中,插入在AAV9衣壳结构蛋白的残基588之后的完整序列具有SEQ ID NO:11。

[0106] 在一些实施例中,完整的经修饰的AAV9衣壳结构蛋白(VP1)具有SEQ ID NO:12的序列。在一些实施例中,完整的经修饰的AAV9衣壳结构蛋白(VP1)与SEQ ID NO:12至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%、至少98.5%、至少99%、至少99.2%、至少99.5%或至少99.8%)相同,其中经修饰的AAV9结构衣壳包含SEQ ID NO:10的靶向肽。

[0107] 在一些实施例中,AAV9衣壳的经修饰的VP2衣壳具有SEQ ID NO:13的序列。在一些实施例中,AAV9的经修饰的VP2衣壳具有与SEQ ID NO:13至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%、至少98.5%、至少99%、至少99.2%、至少99.5%或至少99.8%)相同的序列,其中经修饰的AAV9结构衣壳包含SEQ ID NO:10的靶向肽。

[0108] 在一些实施例中,AAV9衣壳的经修饰的VP3衣壳具有SEQ ID NO:14的序列。在一些实施例中,AAV9的经修饰的VP3衣壳具有与SEQ ID NO:14至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%、至少98.5%、至少99%、至少99.2%、至少99.5%或至少99.8%)相同的序列,其中经修饰的AAV9结构衣壳包含SEQ ID NO:10的靶向肽。

AAV颗粒的生产

[0109] 本领域已知用于生产rAAV载体的诸多方法,这些方法包括转染、稳定的细胞系生产和感染性杂合病毒生产系统,这些系统包括腺病毒-AAV杂合物、疱疹病毒-AAV杂合物(Conway,JE等人,(1997)J.Virology[病毒学杂志]71(11):8780-8789)和杆状病毒-AAV杂合物(Urabe,M.等人,(2002)Human Gene Therapy[人类基因疗法]13(16):1935-1943;Kotin,R.(2011)Hum Mol Genet.[人类分子遗传学]20(R1):R2-R6)。用于生产rAAV病毒颗粒的rAAV生产培养物全部需要:1)合适的宿主细胞,2)合适的辅助病毒功能,3)AAV rep和cap基因和基因产物;4)侧接至少一个AAV ITR序列(例如,编码ARSA多肽的AAV基因组)的核酸(例如,治疗性核酸);和5)支持rAAV生产的合适的培养基和培养基组分。在一些实施例中,合适的宿主细胞是灵长类宿主细胞。在一些实施例中,合适的宿主细胞是人源性细胞系,例如HeLa、A549、293或Perc.6细胞。在一些实施例中,由野生型或突变体腺病毒(例如温度敏感型腺病毒)、疱疹病毒(HSV)、杆状病毒或提供辅助功能的质粒构建体提供合适的辅助病毒功能。在一些实施例中,AAV rep和cap基因产物可以来自任何AAV血清型。一般而言,但不是必须的,AAV rep基因产物与rAAV载体基因组的ITR具有相同的血清型,只要rep基因产物可以起到复制和包装rAAV基因组的作用即可。本领域已知的合适培养基可用于生产rAAV载体。这些培养基包括但不限于由海克隆实验室(Hyclone Laboratories)和JRH生产的培养基,包括改良的伊格尔培养基(MEM)、杜尔贝科改良的伊格尔培养基(DMEM),定制配制品诸如美国专利第6,566,118号中描述的那些定制配制品,和如美国专利第6,723,551号中描述的Sf-900 II SFM培养基,其各自通过引用以其全文并入本文,特别是关于用于生产重组AAV载体的定制培养基配制品。在一些实施例中,AAV辅助功能由腺病毒或HSV提供。在一些实施例中,AAV辅助功能由杆状病毒提供,并且宿主细胞是昆虫细胞(例如,草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)(Sf9)细胞)。

[0110] 用于生产rAAV颗粒的一种方法是三重转染法。简言之,可以将含有rep基因和衣壳基因的质粒与辅助腺病毒质粒一起转染(例如,使用磷酸钙方法)到细胞系(例如,HEK-293细胞)中,并且可以收集和任选地纯化病毒。因此,在一些实施例中,通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染到宿主细胞中来产生rAAV颗粒,其中将核酸转染到宿主细胞中产生能够生产rAAV颗粒的宿主细胞。

[0111] 在一些实施例中,rAAV颗粒可通过生产细胞系方法产生(参见Martin等人,(2013)Human Gene Therapy Methods[人类基因治疗方法]24:253-269;美国PG公开案第US2004/0224411号;以及Liu,X.L.等人(1999)Gene Ther.[基因疗法]6:293-299)。简言之,细胞系(例如,HeLa、293、A549或Perc.6细胞系)可利用含有rep基因、衣壳基因和包含启动子异源

核酸序列的载体基因组(例如,ARSA多肽)的质粒稳定地转染。可以筛选细胞系以选择用于rAAV生产的前导克隆物,然后可以将前导克隆物扩增到生产生物反应器中并用辅助病毒(例如,腺病毒或HSV)感染以启动rAAV生产。随后可以收获病毒,可以灭活(例如,通过加热)和/或去除腺病毒,并且可以纯化rAAV颗粒。因此,在一些实施例中,rAAV颗粒由包含以下中的一种或多种的生产细胞系产生:编码rAAV载体的核酸,编码AAV rep和cap的核酸,和编码AAV辅助病毒功能的核酸。如本文所述,与三重转染方法相比,生产细胞系方法可能有利于生产具有超大基因组的rAAV颗粒。

[0112] 在一些实施例中,编码AAV rep和cap基因和/或rAAV基因组的核酸稳定地保持在生产细胞系中。在一些实施例中,将编码AAV rep和cap基因和/或rAAV基因组的核酸在一个或多个质粒上引入细胞系中以产生生产细胞系。在一些实施例中,将AAV rep、AAV cap和rAAV基因组引入同一质粒上的细胞中。在其他实施例中,将AAV rep、AAV cap和rAAV基因组引入不同质粒上的细胞中。在一些实施例中,用质粒稳定地转染的细胞系在细胞系的多次传代(例如,细胞的5、10、20、30、40、50次或超过50次传代)中保持质粒。例如,一个或多个质粒可随着细胞的复制而复制,或者一个或多个质粒可整合至细胞基因组中。已鉴定出使得质粒能够在细胞(例如,人类细胞)中自主复制的多种序列(参见例如,Krysan,P.J.等人(1989)Mol.Cell Biol.[分子和细胞生物学]9:1026-1033)。在一些实施例中,一个或多个质粒可包含选择性标记物(例如,抗生素抗性标记物),其允许选择保持质粒的细胞。哺乳动物细胞中常用的选择性标记物包括但不限于杀稻瘟素、G418、潮霉素B、吉欧霉素、嘌呤霉素及其衍生物。用于将核酸引入细胞中的方法是本领域已知的,且包括但不限于病毒转导、阳离子转染(例如,使用阳离子聚合物如DEAE-葡聚糖或阳离子脂质如脂质体)、磷酸钙转染、显微注射、颗粒轰击、电穿孔和纳米颗粒转染(更多细节请参见例如,Kim,T.K.和Eberwine,J.H.(2010)Anal.Bioanal.Chem.[分析和生物分析化学]397:3173-3178)。

[0113] 在一些实施例中,编码AAV rep和cap基因和/或rAAV基因组的核酸稳定地整合至生产细胞系的基因组中。在一些实施例中,将编码AAV rep和cap基因和/或rAAV基因组的核酸在一个或多个质粒上引入细胞系中以产生生产细胞系。在一些实施例中,将AAV rep、AAV cap和rAAV基因组引入同一质粒上的细胞中。在其他实施例中,将AAV rep、AAV cap和rAAV基因组引入不同质粒上的细胞中。在一些实施例中,一个或多个质粒可包含选择性标记物(例如,抗生素抗性标记物),其允许选择保持质粒的细胞。本领域已知用于将核酸稳定整合至各种宿主细胞系中的方法。例如,可使用重复选择(例如,通过使用选择性标记物)来选择已整合含有选择性标记物(以及AAV cap和rep基因和/或rAAV基因组)的核酸的细胞。在其他实施例中,核酸可以位点特异性方式整合至细胞系中以产生生产细胞系。本领域已知几种位点特异性重组系统,例如FLP/FRT(参见例如,O'Gorman,S.等人(1991)Science[科学]251:1351-1355)、Cre/loxP(参见例如,Sauer,B.和Henderson,N.(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.[美国国家科学院院刊]85:5166-5170)、以及phi C31-att(参见例如,Groth,A.C.等人(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.[美国国家科学院院刊]97:5995-6000)。

[0114] 在一些实施例中,生产细胞系源自灵长类细胞系(例如,非人灵长类细胞系,例如Vero或FRhL-2细胞系)。在一些实施例中,细胞系源自人细胞系。在一些实施例中,生产细胞系源自HeLa、293、A549或PERC.6®(克鲁赛尔公司(Crucell))细胞。例如,在将编码AAV rep和cap基因和/或超大rAAV基因组的核酸引入和/或稳定保持/整合至细胞系中以产生生

产细胞系之前,该细胞系是HeLa、293、A549或PERC.6®(克鲁赛尔公司)细胞系或其衍生物。

[0115] 在一些实施例中,生产细胞系适于在悬浮液中生长。如本领域已知,在没有底物(例如,微载体珠)的情况下,贴壁依赖性细胞通常无法在悬浮液中生长。使细胞系适于在悬浮液中生长可包括例如在带有搅拌桨的旋动培养基中生长细胞系,使用缺乏钙和镁离子的培养基(以及任选的消泡剂)来防止聚集,使用涂布有硅化化合物的培养容器,并在每次传代时选择培养物中的细胞(而不是呈大的聚集体或位于容器侧面上的细胞)。进一步的说明请参见例如ATCC常见问题文档(可在www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx上获得)及其中引用的参考文献。

[0116] 在一些方面,提供了用于生产如本文披露的任何rAAV颗粒的方法,该方法包括(a)在生产rAAV颗粒的条件下培养宿主细胞,其中该宿主细胞包含(i)一个或多个AAV包装基因,其中每个所述AAV包装基因均编码AAV复制和/或衣壳化蛋白;(ii)rAAV原载体,其包含编码如本文所述的异源核酸的核酸,该核酸侧接至少一个AAV ITR,以及(iii)AAV辅助功能;以及(b)回收由该宿主细胞生产的rAAV颗粒。在一些实施例中,所述至少一个AAV ITR选自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR等组成的组。例如,在一些实施例中,AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10或AAVrh10。在某些实施例中,AAV中的核酸包括AAV2 ITR。在一些实施例中,所述衣壳化蛋白选自由以下组成的组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV1999、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合体、牛AAV、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1血清型、AAV-XL32或AAV-XL32.1衣壳蛋白或其突变体。在一些实施例中,衣壳化蛋白是AAV8衣壳蛋白。在一些实施例中,rAAV颗粒包含AAV9衣壳和包含AAV2 ITR的重组基因组、以及编码治疗性转基因/核酸的核酸(例如,用于表达ARSA多肽的表达组件)。在一些实施例中,rAAV颗粒包含AAV1999衣壳和包含AAV2 ITR的重组基因组、以及编码治疗性转基因/核酸的核酸(例如,用于表达ARSA多肽的表达组件)。

[0117] 本发明的合适的rAAV生产培养基可以0.5%-20%(v/v或w/v)的水平补充血清或血清衍生的重组蛋白。可替代地,如本领域已知,rAAV载体可在无血清条件下生产,其也可称为不含动物衍生产物的培养基。本领域普通技术人员可理解,被设计用于支持rAAV载体的生产的商业或定制培养基也可以补充有本领域已知的一种或多种细胞培养组分,包括但不限于葡萄糖、维生素、氨基酸和/或生长因子,以提高生产培养物中rAAV的滴度。

[0118] rAAV生产培养物可在适合所使用的特定宿主细胞的各种条件下(在宽温度范围内,持续不同时间长度等)生长。如本领域已知,rAAV生产培养物包括附着依赖性培养物,其可在合适的附着依赖性容器中培养,这些容器例如为滚瓶、中空纤维过滤器、微载剂和填充床或流化床生物反应器。rAAV载体生产培养物还可包括悬浮适应的宿主细胞,例如HeLa、293和SF-9细胞,这些细胞可以多种方式培养,包括例如旋动烧瓶、搅拌罐生物反应器和一次性系统例如波浪式(Wave)袋系统。

[0119] 本发明的rAAV载体颗粒可通过裂解生产培养物的宿主细胞或从生产培养物中收

获废培养基而从rAAV生产培养物收获,限制条件是细胞在本领域已知的条件下培养,以使rAAV颗粒从完整细胞释放至培养基中,如美国专利号6,566,118中更全面地描述)。裂解细胞的合适方法在本领域中也是已知的,且包括例如多次冷冻/解冻循环、超声处理、微流化和用化学物质如洗涤剂和/或蛋白酶进行处理。

[0120] 在另一个实施例中,纯化rAAV颗粒。如本文所用的术语"纯化"包括不含至少一些其他组分的rAAV颗粒的制剂,这些其他组分也可存在于rAAV颗粒天然存在或最初制备的地方。因此,例如,分离的rAAV颗粒可以使用纯化技术使其从来源混合物诸如培养裂解物或生产培养上清液中富集来制备。富集可以以多种方式测量,例如通过溶液中存在的DNA酶抗性颗粒(DRP)或基因组拷贝(gc)的比例,或通过感染性,或者可以相对于来源混合物中存在的第二种潜在干扰物质对富集进行测量,该第二种潜在干扰物质诸如为污染物,包括生产培养物污染物或过程中污染物,包括辅助病毒、培养基组分等。

[0121] 在一些实施例中,使rAAV生产培养物收获物澄清以去除宿主细胞碎片。在一些实施例中,通过一系列深度过滤器进行过滤来使生产培养物收获物澄清,这些深度过滤器包括例如DOHC级密理博(Millipore)Millistak+HC Pod过滤器、A1HC级密理博Millistak+HC Pod过滤器和0.2μm过滤器(Filter)Opticap XL10密理博快速SHC亲水膜过滤器(Millipore Express SHC Hydrophilic Membrane filter)。澄清还可以通过本领域已知的各种其他标准技术来实现,例如离心或通过本领域已知的0.2μm或更大孔径的任何醋酸纤维素过滤器进行过滤。

[0122] 在一些实施例中,进一步用Benzonase®对rAAV生产培养物收获物进行处理,以消化生产培养物中存在的任何高分子量DNA。在一些实施例中,在本领域已知的标准条件下进行Benzonase®消化,这些标准条件包括例如在介于环境温度至37℃的温度下Benzonase®的最终浓度为1-2.5单位/ml,持续30分钟至几小时的时段。

[0123] 可使用一个或多个以下纯化步骤对rAAV颗粒进行分离或纯化:平衡离心;流通式阴离子交换过滤;用于浓缩rAAV颗粒的切向流过滤(TFF);通过磷灰石色谱法捕获rAAV;辅助病毒的热灭活;通过疏水相互作用色谱法捕获rAAV;通过尺寸排阻色谱法(SEC)进行缓冲液交换;纳米过滤;以及通过阴离子交换色谱法、阳离子交换色谱法或亲和色谱法捕获rAAV。这些步骤可以单独使用、以各种组合或以不同顺序使用。在一些实施例中,该方法包括按照以下所述顺序的所有步骤。例如在Xiao等人,(1998)Journal of Virology[病毒学杂志]72:2224-2232;美国专利号6,989,264和8,137,948;以及WO 2010/148143中发现了对rAAV颗粒进行纯化的方法。

治疗方法

[0124] 本披露的某些方面涉及治疗MLD和/或提高有需要的个体中ARSA多肽的水平的方法。在一些实施例中,本发明提供了通过施用有效量的表达组件(例如,在rAAV颗粒中递送的表达组件)来治疗MLD的方法,该表达组件用于表达本披露的ARSA多肽。在一些实施例中,ARSA多肽是野生型ARSA多肽。用于表达ARSA多肽的表达组件(例如,在rAAV颗粒中递送的表达组件)可通过各种途径施用。在一些实施例中,该施用包括直接脊髓注射和/或脑内施用。在一些实施例中,该施用在选自以下的部位进行:大脑、髓质、脑桥、小脑、颅内腔、脑周围脑膜、硬脑膜、蛛网膜、软膜、脑周围蛛网膜下腔的脑脊液(CSF)、小脑深部核、大脑脑室系统、蛛网膜下腔、纹状体、皮质、隔膜、丘脑、下丘脑和脑实质。在一些实施例中,该施用包括脑室

内注射至至少一个脑侧脑室中。在一些实施例中,该施用包括在颈部、胸部和/或腰部区中进行鞘内注射。在一些实施例中,该施用包括纹状体内注射。在一些实施例中,该施用包括丘脑内注射。

[0125] 根据治疗目标施用有效量的rAAV(在一些实施例中呈颗粒的形式)。例如,当低百分比的转导可达到所需的治疗效果时,则治疗的目标通常是满足或超过这一转导水平。在一些情况下,这一转导水平可通过仅转导所需组织类型的约1%至5%的靶细胞、在一些实施例中转导所需组织类型的至少约20%的细胞、在一些实施例中转导所需组织类型的至少约50%的细胞、在一些实施例中转导所需组织类型的至少约80%的细胞、在一些实施例中转导所需组织类型的至少约95%的细胞、在一些实施例中转导所需组织类型的至少约99%的细胞来实现。rAAV组合物可通过一次或多次施用来施用,可以在同一程序期间施用,或者可以间隔几天、几周、几个月或几年施用。可使用本文所述的任何施用途径中的一种或多种。在一些实施例中,可以使用多个载体来治疗人类。

[0126] 在上述方面的一些实施例中,rAAV经由直接注射至脊髓中、通过鞘内注射或通过脑池内注射施用。在一些实施例中,rAAV被施用至脊髓或脑池的超过一个位置。在一些实施例中,rAAV被施用至脊髓的超过一个位置。在一些实施例中,rAAV被施用至脊髓的腰蛛网膜下腔、胸蛛网膜下腔和颈蛛网膜下腔中的一个或多个。在一些实施例中,rAAV被施用至脑池。

[0127] 鉴定由AAV病毒颗粒转导的细胞的方法是本领域已知的;例如,可使用免疫组织化学或使用标记物(例如,增强绿色荧光蛋白)来检测病毒颗粒的转导;例如包含具有一个或多个氨基酸取代的rAAV衣壳的病毒颗粒的转导。

[0128] 在一些实施例中,将有效量的rAAV颗粒同时或依次施用至超过一个位置。在其他实施例中,将有效量的rAAV颗粒施用至单个位置超过一次(例如,重复施用)。在一些实施例中,rAAV病毒颗粒的多次注射间隔不超过一小时、两小时、三小时、四小时、五小时、六小时、九小时、十二小时或24小时。

[0129] 在一些实施例中,本发明提供了一种通过施用有效量的药物组合物来治疗患有MLD的人的方法,该药物组合物包含本披露的编码ARSA多肽的重组病毒载体。在一些实施例中,该药物组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0130] 在一些实施例中,这些方法包括施用有效量的药物组合物以治疗有需要的个体的MLD,该药物组合物包含本披露的编码ARSA多肽的重组病毒载体。在一些实施例中,这些病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为至少约5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、10×10^{12}、11×10^{12}、15×10^{12}、20×10^{12}、25×10^{12}、30×10^{12}或50×10^{12}个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,这些病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为约5×10^{12}至6×10^{12}、6×10^{12}至7×10^{12}、7×10^{12}至8×10^{12}、8×10^{12}至9×10^{12}、9×10^{12}至10×10^{12}、10×10^{12}至11×10^{12}、11×10^{12}至15×10^{12}、15×10^{12}至20×10^{12}、20×10^{12}至25×10^{12}、25×10^{12}至30×10^{12}、30×10^{12}至50×10^{12}或50×10^{12}至100×10^{12}个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,这些病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为约5×10^{12}至10×10^{12}、10×10^{12}至25×10^{12}或25×10^{12}至50×10^{12}个基因组拷贝/mL中的任一种。在一些实施例中,这些病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为至少约5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、10×10^{9}、11×10^{9}、15×10^{9}、20×10^{9}、25×10^{9}、30×10^{9}或50×10^{9}个转导单位/mL中的任一种。在一些实

施例中,这些病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为约5×10^9至6×10^9、6×10^9至7×10^9、7×10^9至8×10^9、8×10^9至9×10^9、9×10^9至10×10^9、10×10^9至11×10^9、11×10^9至15×10^9、15×10^9至20×10^9、20×10^9至25×10^9、25×10^9至30×10^9、30×10^9至50×10^9或50×10^9至100×10^9个转导单位/mL中的任一种。在一些实施例中,这些病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为约5×10^9至10×10^9、10×10^9至15×10^9、15×10^9至25×10^9或25×10^9至50×10^9个转导单位/mL中的任一种。在一些实施例中,这些病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度至少为约5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、10×10^{10}、11×10^{10}、15×10^{10}、20×10^{10}、25×10^{10}、30×10^{10}、40×10^{10}或50×10^{10}个感染单位/mL中的任一种。在一些实施例中,这些病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度至少为约5×10^{10}至6×10^{10}、6×10^{10}至7×10^{10}、7×10^{10}至8×10^{10}、8×10^{10}至9×10^{10}、9×10^{10}至10×10^{10}、10×10^{10}至11×10^{10}、11×10^{10}至15×10^{10}、15×10^{10}至20×10^{10}、20×10^{10}至25×10^{10}、25×10^{10}至30×10^{10}、30×10^{10}至40×10^{10}、40×10^{10}至50×10^{10}或50×10^{10}至100×10^{10}个感染单位/mL中的任一种。在一些实施例中,这些病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度至少为约5×10^{10}至10×10^{10}、10×10^{10}至15×10^{10}、15×10^{10}至25×10^{10}或25×10^{10}至50×10^{10}个感染单位/mL中的任一种。在一些实施例中,这些病毒颗粒是rAAV颗粒。在一些实施例中,rAAV颗粒包含AAV1999衣壳蛋白。

[0131] 在一些实施例中,施用至个体的病毒颗粒的剂量为至少约1×10^8至约6×10^{13}个基因组拷贝/kg体重中的任一种。在一些实施例中,施用至个体的病毒颗粒的剂量为约1×10^8至约6×10^{13}个基因组拷贝/kg体重中的任一种。在一些实施例中,施用至个体的病毒颗粒的剂量为约1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、13×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}或1×10^{13}个基因组拷贝/kg体重中的任一种。

[0132] 在一些实施例中,施用至个体的病毒颗粒的总量为至少约1×10^9至约1×10^{14}个基因组拷贝中的任一种。在一些实施例中,施用至个体的病毒颗粒的总量为约1×10^9至约1×10^{14}个基因组拷贝中的任一种。在一些实施例中,施用至个体的病毒颗粒的总量为约1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、13×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、9×10^{13}或1×10^{14}个基因组拷贝中的任一种。

[0133] 本发明的组合物(例如,本披露的包含编码ARSA多肽的载体的重组病毒颗粒)可以单独使用或与一种或多种用于治疗MLD的另外的治疗剂组合使用。依次施用之间的间隔可以是至少(或者可替代地,少于)几分钟、几小时或几天。

[0134] 根据治疗目标施用有效量的rAAV(在一些实施例中呈颗粒的形式)。例如,当低百分比的转导可达到所需的治疗效果时,则治疗的目标通常是满足或超过这一转导水平。在一些情况下,这一转导水平可通过仅转导约1%至5%的靶细胞、在一些实施例中转导所需组织类型的至少约20%的细胞、在一些实施例中转导所需组织类型的至少约50%的细胞、在一些实施例中转导所需组织类型的至少约80%的细胞、在一些实施例中转导所需组织类型的至少约95%的细胞、在一些实施例中转导所需组织类型的至少约99%的细胞来实现。rAAV组合物可通过一次或多次施用来施用,可以在同一程序期间施用,或者可以间隔几天、

几周、几个月或几年施用。在一些实施例中,可以使用多个载体来治疗哺乳动物(例如,人)。

[0135] 在一些实施例中,本披露的rAAV组合物可用于施用至人。在一些实施例中,本披露的rAAV组合物可用于儿科施用。在一些实施例中,向小于一个月、小于两个月、小于三个月、小于四个月、小于五个月、小于六个月、小于七个月、小于八个月、小于九个月、小于十个月、小于十一个月、小于一岁、小于13个月、小于14个月、小于15个月、小于16个月、小于17个月、小于18个月、小于19个月、小于20个月、小于21个月、小于22个月、小于两岁、小于三岁、小于五岁或小于七岁的患者施用有效量的rAAV(在一些实施例中呈颗粒的形式)。

[0136] 在一些实施例中,本披露的rAAV组合物可用于向年轻成年人施用。在一些实施例中,向小于12岁、小于13岁、小于14岁、小于15岁、小于16岁、小于17岁、小于18岁、小于19岁、小于20岁、小于21岁、小于22岁、小于23岁、小于24岁或小于25岁的患者施用有效量的rAAV(在一些实施例中呈颗粒的形式)。

试剂盒或制品

[0137] 本文所述的表达组件(例如,用于表达ARSA多肽、例如野生型人ARSA多肽的表达组件)、rAAV载体、颗粒和/或药物组合物可包含在例如被设计用于在本文所述本发明方法之一中使用的试剂盒或制品内。

[0138] 通常,该系统包括适用于在本发明方法中使用的套管、一个或多个注射器(例如,1、2、3、4个或更多个)和一种或多种流体(例如,1、2、3、4种或更多种)。

[0139] 注射器可以是任何合适的注射器,只要它能够连接至套管以递送流体即可。在一些实施例中,该系统具有一个注射器。在一些实施例中,该系统具有两个注射器。在一些实施例中,该系统具有三个注射器。在一些实施例中,该系统具有四个或更多个注射器。适用于在本发明方法中使用的流体包括本文所述的流体,例如各自包含有效量的一种或多种本文所述的载体的一种或多种流体、以及包含一种或多种治疗剂的一种或多种流体。

[0140] 在一些实施例中,该试剂盒包含单一流体(例如,包含有效量的载体的药学上可接受的流体)。在一些实施例中,该试剂盒包含2种流体。在一些实施例中,该试剂盒包含3种流体。在一些实施例中,该试剂盒包含4种或更多种流体。流体可包括稀释剂、缓冲液、赋形剂或本文所述或本领域已知的适用于递送、稀释、稳定、缓冲或以其他方式运输表达组件以表达本披露的ARSA多肽或rAAV载体组合物的任何其他液体。在一些实施例中,该试剂盒包含一种或多种缓冲液,例如pH缓冲水溶液。缓冲液的实例可包括但不限于磷酸盐、柠檬酸盐、Tris、HEPES和其他有机酸缓冲液。

[0141] 在一些实施例中,该试剂盒包括容器。合适的容器可包括例如小瓶、袋、注射器和瓶子。容器可由例如玻璃、金属或塑料等材料中的一种或多种制成。在一些实施例中,容器用于容纳本披露的rAAV组合物。在一些实施例中,容器还可容纳流体和/或其他治疗剂。

[0142] 在一些实施例中,该试剂盒包含额外的治疗剂以及本披露的rAAV组合物。在一些实施例中,rAAV组合物与额外的治疗剂可进行混合。在一些实施例中,rAAV组合物与额外的治疗剂可保持分开。在一些实施例中,rAAV组合物与额外的治疗剂可处于同一容器中。在一些实施例中,rAAV组合物与额外的治疗剂可处于不同的容器中。在一些实施例中,rAAV组合物与额外的治疗剂可同时施用。在一些实施例中,rAAV组合物与额外的治疗剂可在同一天施用。在一些实施例中,rAAV组合物可在施用额外治疗剂的一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、两周、三周、四周、两个月、三个月、四个月、五个月或六个月内施用。

[0143] 在一些实施例中,试剂盒包含用于在AAV施用前暂时抑制免疫系统的治疗剂。在一些实施例中,患者在注射病毒前后不久受到短暂的免疫抑制,以抑制T细胞对AAV颗粒的反应(例如,参见Ferreira等人,Hum.Gene Ther.[人类基因疗法]25:180-188,2014)。在一些实施例中,试剂盒进一步提供了环孢霉素、霉酚酸酯和/或甲泼尼龙。

[0144] 本发明的rAAV颗粒和/或组合物还可包装成包括使用说明的试剂盒。在一些实施例中,试剂盒进一步包含用于递送(例如,本文所述的任何类型的胃肠外施用)rAAV颗粒的组合物的装置。在一些实施例中,使用说明包括根据本文所述方法之一的说明。在一些实施例中,这些说明印在为容器提供(例如,贴至容器上)的标签上。在一些实施例中,使用说明包括向个体(例如,人)施用有效量的rAAV颗粒例如用于治疗个体中的MLD的说明。

实例

[0145] 通过参考下述实例将更全面地理解本发明。然而,这些实例不应被解释为限制本发明的范围。应理解,本文所述的实例和实施例仅用于说明性目的,并且根据所述实例和实施例进行的各种修改或改变将是本领域技术人员所想到的并且应包括在本申请的精神和范围内以及所附实施例的范围内。

通用方法

组织均质化

[0146] 在冷冻的Omni珠破裂器中,利用添加在1.4mm陶瓷珠均质化管中的冷10mM Tris-1mM EDTA缓冲液对组织进行了均质化—20秒循环4.7振荡/秒。均质化后,取等分试样进行后续测定。

硫酸酯酶活性的组织增溶作用

[0147] 向经均质化的组织中加入Nonidet P-40至0.1%的最终浓度,使其在轨道摇床上在4℃下溶解1.5小时,然后在18,000x g下离心20分钟。取出上清液,并将其转移至冰上的艾本德(Eppendorf)管中。

BCA测定

[0148] 使用10ul在水中稀释的上清液通过BCA(二喹啉甲酸)测定(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific)23227)确定了总蛋白浓度。通过562nm处的吸光度,利用二喹啉甲酸(BCA)比色检测亚铜阳离子(Cu^{1+})。使用配备有SoftMax Pro 5.4.4版软件的美谷分子酶标仪(Molecular Devices SpectraMax)340PC-384来读取96孔微量滴定板。

硫酸酯酶活性

[0149] 使用针对4-硝基儿茶酚硫酸盐(PNCS)底物中水解的4-硝基儿茶酚(PNC)的硫酸酯酶活性测定法来测定十微升澄清上清液的总硫酸酯酶活性。(艾博抗(Abcam)Ab204731)。相对于PNC标准曲线通过样本的水解的4-硝基儿茶酚(PNC)确定了活性,并在515nm处读取吸光度。硫酸酯酶活性被报告为mU/mg(nmol/min/mg)。使用配备有SoftMax Pro 5.4.4版软件的美谷分子酶标仪(Molecular Devices SpectraMax)340PC-384来读取96孔微量滴定板。

脂质提取

[0150] 用20-100X提取溶液(5mM甲酸铵,0.2%甲酸乙腈溶液:甲醇(70:30),补充有10ng/ml C17-硫苷酯)提取组织匀浆(或液体)的等分试样。剧烈混合10分钟后,将样本静置5分钟,并再次快速涡旋(30s)。所有样本在4℃下以8,400rpm离心10分钟。将上清液的等分试样(200uL)转移至失活的Q-sert小瓶中进行LC-MS分析。

[0151] 使用具有C16、C18、C24和C24:1链长的硫苷酯(Matreya)和C18 2R-OH硫苷酯和溶血-硫苷酯(Avanti)在相同的提取溶液中制备标准曲线(线性范围为0.03-1000ng/mL,2x连续稀释)。

硫苷酯的LC-MS分析

[0152] 将沃特世(Waters)Acquity UPLC系统(米尔福德,马萨诸塞州)连接至配备有ESI源且以负离子模式运行的Qtrap 6500质谱仪系统(弗雷明汉,马萨诸塞州),参数如下:幕气25.0;离子喷雾电压-4.5kV;温度500℃;离子源气体:50和70;去簇电势-80V;入口电势-10V;碰撞能量-155V;以及碰撞单元出口电势-15V。

[0153] 在沃特世Acquity UPLC BEH酰胺(1.7μ,2.1x 100mm,P/N:186004801)上分离硫苷酯物种。将自动取样器和柱烘箱分别保持在10℃和20℃。流动相由以下组成:溶剂A:乙腈:水为95:5的5mM甲酸铵溶液;和溶剂B:甲醇:水为90:10的5mM甲酸铵溶液。

[0154] 梯度程序从0% B开始并保持2分钟,遵循从0% B至100% B的线性曲线。在100% B下再保持1分钟后,它在0% B下重新平衡。所有硫苷酯物种均相对于C17-硫苷酯的内部标准归一化,并通过对应标准硫苷酯的标准曲线进行计算。

硝基蓝髓鞘染色

[0155] 将切片转移至12孔板,并在自由浮动切片中实行所有步骤。在摇床上的TBA中将切片洗涤2x 1分钟。在硝基蓝溶液(西格玛(Sigma)目录号N5374)中孵育1小时,且在摇床上在TBA中冲洗2x 5分钟。将切片在DAB染色剂(西格玛试剂盒目录号D4293)中孵育1小时,且在反渗透(RO)水中冲洗2x 1。将切片在PBS中冲洗1分钟,将其装入PBS中并风干载玻片。用中性红溶液复染2分钟,在RO水中洗涤2x 2。将载玻片在95%试剂酒精中冲洗1分钟,在100%试剂酒精中冲洗2x 2分钟,在二甲苯中冲洗2x 2分钟,盖玻片使用Acrytol封固剂。

GFP ELISA

[0156] 使用来自艾博抗的GFP SimpleStep ELISA®试剂盒(ab171581)完成对GFP蛋白的测量。必须阅读每个试剂盒批次提供的方案插页,因为一些试剂浓度会随着不同批次而变化,特别是标准品。

[0157] 在开始之前,将所有试剂盒组件平衡至室温(18℃-25℃)至少30分钟。将一等分试样的经蛋白质处理的组织匀浆在冰上解冻。试剂和工作标准品按照试剂盒说明新鲜制备。如下在全细胞提取缓冲液中对样本进行稀释:灰质1:5,脊髓1:5,心脏:1:5,肝脏1:20。将稀释的样本和标准品加入适当的孔中,然后将抗体混合物加入每个孔中。将板密封,在室温下孵育1小时,以400RPM的速度振荡。用洗涤缓冲液洗涤孔3次,并确保完全去除液体。将TMB溶液加入每个孔中,并在室温下在黑暗中孵育10分钟,以400RPM的速度振荡。在TMB孵育后迅速向每个孔中加入终止溶液,并在板摇床上混合1分钟。使用Softmax软件在SpectraMax板阅读器(美谷分子公司(Molecular Devices))上在450nm下读取板。

FLAG IHC

[0158] 将NHP脑FFPE载玻片在90℃的EDTA溶液(pH.9.0)中处理20分钟以进行抗原修复,然后用3%过氧化氢封闭5分钟。然后将载玻片与Flag DDK抗体(艾博抗ab205606)在抗体稀释剂(细胞信号传导公司(Cell Signaling)#8112)中以1:200的稀释度在室温下孵育一小时,然后进行抗兔HRP(艾博抗ab6721)二抗孵育。Flag DDK信号的显色是通过在室温下将载玻片在DAB溶液中孵育3分钟而实现,且随后用苏木精对载玻片进行复染以进行细胞核染

色。

GFP IHC

[0159] 将NHP脑FFPE载玻片在90℃的EDTA溶液(pH.9.0)中处理20分钟以进行抗原修复,且随后用3%过氧化氢封闭10分钟,然后在室温下用5%马血清封闭45分钟。然后将载玻片与GFP抗体(赛默飞世尔A-11122)在抗体稀释剂(细胞信号传导公司#8112)中以1:500的稀释度在室温下孵育一小时,然后进行抗兔HRP(艾博抗ab6721)二抗孵育。GFP信号的显色是通过在室温下将载玻片在DAB溶液中孵育3分钟而实现,且用苏木精对载玻片进行复染以进行细胞核染色。

交叉校正分析

[0160] 相邻的5μm FFPE切片经过ARSA IHC和DAPI或WPRE ISH和DAPI处理。然后拼合各别图块,以获得IHC和ISH图像两种图像的矢状切片。然后用变换矩阵(旋转和平移参数)对这些图像进行全局注册,以对齐IHC和ISH图像。然后使用DAPI对矢状切片内的各别图块进行局部注册,以确保各别IHC和ISH图块之间的良好对齐。在每个图块中,通过在整个矢状切片上凭经验确定的阈值参数来估计IHC阳性细胞和ISH阳性细胞。在ISH的情况下,IHC阳性细胞必须与细胞核重叠至少20%才能被视为真正的ISH信号。对于IHC图像,使用没有ARSA染色的阴性对照来确定阈值参数。对每个图块估计交叉校正因子,即IHC阳性细胞与ISH阳性细胞的比率,并表示为热力图。

单细胞核测序

[0161] 细胞核分离:为了分离细胞核,将解剖的脑转移至微量离心管中,在干冰和乙醇的浆液中快速冷冻,并在-800℃下存储直至进行使用的时间。为了分离细胞核,将冷冻的小鼠脑放入1ml杜恩斯匀浆器(Dounce Homogenizer)(Wheaton)中的细胞核裂解缓冲液中,该缓冲液含有0.1%曲拉通-100(Triton-100)(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))、1mM DTT(西格玛奥德里奇公司)和0.2U/ul核糖核酸酶抑制剂(西格玛奥德里奇公司)。通过使用松散的杜恩斯研磨棒进行10次研磨且随后使用紧密的研磨棒进行10次研磨而对组织进行均质化,并在冰上孵育15分钟。使所得匀浆通过30μm细胞过滤器(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech)),并在500xg下离心5分钟,以沉淀细胞核。将细胞核重新悬浮在含有1xPBS(赛默飞世尔公司)、1%无核酸酶BSA(西格玛奥德里奇公司)、1mM DTT(西格玛奥德里奇公司)和0.2U/ul核糖核酸酶抑制剂(西格玛奥德里奇公司)的缓冲液中。将与PE缀合的小鼠抗NeuN(EMD密理博(Millipore))以1:500的稀释度加入制剂中,并在40℃下将样本孵育30分钟。然后将样本在500xg下离心5分钟以沉淀细胞核,并将沉淀物重新悬浮在1xPBS、1%BSA、1mM DTT和0.2U/ul核糖核酸酶抑制剂中。以0.1ug/ml的浓度加入DAPI。使用100μm喷嘴在Influx-83(BD生物科学公司(BD Biosciences))上进行单细胞核分选。通过DAPI和NeuN信号(PE)对细胞核进行门控。

文库制备和NovaSeq测序

[0162] 根据铬单细胞3'基因表达V3.1试剂盒的10x基因组学(Genomics)方案制备文库。简言之,在分选后立即将细胞核与90%的NeuN-和10%的NeuN+细胞核混合。在10X基因组学基因表达试剂盒(10x基因组学)中进行了GEM产生步骤。在产生GEM后,将样本保持在-20℃下用于进一步的步骤。从cDNA扩增、文库构建到文库测序,所有样本都一起处理。所有样本的cDNA和文库的量化都是可靠的。将这些文库在依诺米那公司(illumine)Novaseq 6000上

进行了测序。文库以约50K读取数/细胞核的中位数深度进行测序。由细胞兰杰(Cell Ranger)V5产生UMI计数矩阵。

[0163] 数据预处理:将生成的计数矩阵与细胞核条形码和基因标签一起加载到帕特克富卢(Partek Flow)上。对于质量控制(QC),根据小提琴图(violin plot)的检查按照标准方案来过滤细胞核。详细的截止值为250<nFeature_RNA<6000和nCount_RNA<30000。线粒体蛋白编码基因<2%。经过质量过滤后,保留147313个总细胞核,以供进一步分析。

载体基因组评估

[0164] HT gDNA分离:根据制造商的方案“QIAamp®96DNAQIAcube®HT手册”,使用QIAmp 96DNA QIAcube HT试剂盒(目录号51331)从50ul NHP组织匀浆中分离出gDNA。组织匀浆首先在56℃下用蛋白酶K处理过夜,然后转移至S块,并将样本放入QIAcube HT仪器中,用QIAcube HT-Prep Mange软件进行gDNA分离。然后用NANODROP 8000(赛默飞世尔科技公司)测量gDNA浓度。

[0165] 经由QIAcuty进行dPCR:经由由凯杰公司(QIAGEN)制造的QIAcuty,利用dPCR确定载体基因组。将从NHP组织中分离的7μg gDNA和含有1x探针PCR主混合物(目录号250103)的5μl主反应混合物;1x引物-探针混合物1(BGH)和混合物2(管家基因);0.25U HindIII限制性内切酶在标准PCR板中混合,且然后转移至纳米板。每孔的总反应体积为12ul。然后将纳米板放入QIAcuity仪器中,并使用制造建议循环进行dPCR。通过软件自动分析每个样本和每个基因的DNA拷贝。然后,每个细胞的载体基因组计算如下:2XBGH拷贝除以管家基因拷贝。

实例1.使用两种不同表达组件的体内ARSA表达

[0166] 载体有效载荷被设计用于表达由组成型嵌合CMV-鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子驱动的人类密码子优化的芳基硫酸酯酶A(ARSA)基因(SEQ ID NO:2)。通过添加土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE),转基因表达进一步增强。SEQ ID NO:3示出用于rAAV包装的质粒的代表性完整DNA序列,包括5’AAV2 ITR(SEQ ID NO:4)和3’AAV2 ITR(SEQ ID NO:5)、CMV增强子元件(SEQ ID NO:6)、鸡β-肌动蛋白启动子(SEQ ID NO:7)和WPRE元件(SEQ ID NO:8)。图17示出用于rAAV颗粒生产的特定质粒的图谱示意图。质粒的特定元件列于表1中。

表1.从5’ITR至3’ITR的序列注释

序列编号	注释
1-145	AAV2 5' ITR
173-553	CMV 增强子元件
554-873	鸡 b-肌动蛋白启动子
874-924	外显子 1 鸡 b-肌动蛋白
925-1799	内含子 1 鸡 b-肌动蛋白
1808-1848	内含子 2 兔 β 珠蛋白
1849-1902	外显子 3 兔 β 珠蛋白
1914-3443	密码子优化的人 ARSA
3446-4030	WPRE 元件
4043-4245	聚合物 A 信号序列；牛生长激素基因聚腺苷酸化序列
4253-4397	flip 取向的 AAV2 3 ITR 元件

[0167] 出生后第二天,通过静脉注射(IV)(双侧眶后注射)对$ARSA^{-/-}$小鼠施用PBS或AAV9(2e11 VG;2e14 VG/kg)rAAV病毒颗粒,这些rAAV病毒颗粒表达人ARSA且含有或不含WPRE元件。两个表达组件在图1A中示意性示出。图1B示出在施用病毒颗粒后前脑、中脑和后脑中hARSA表达的蛋白质印迹分析。将表达水平与$ARSA^{-/-}$小鼠和表达正常水平ARSA的小鼠(即,WT小鼠)的表达水平进行比较。

[0168] 如图1B所示,在施用包含两个表达组件的病毒颗粒后,表达水平增加。与没有WPRE元件的表达组件相比,在表达组件中包含WPRE元件会提高ARSA的表达水平。

[0169] 接下来,使用LC-MS测量C24-ST水平。将ST水平相对于组织重量归一化。图1C示出在施用包含两个表达组件的病毒颗粒后前脑、中脑和后脑中的CST水平。误差条表示平均值和标准偏差。单因素方差分析和图基多重比较检验。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。ELN:20200205-188、20200305-152、20200205-006。与$ARSA^{-/-}$小鼠中的C24-ST水平相比,向$ARSA^{-/-}$小鼠施用包含不含WPRE元件的表达组件的AAV9颗粒后的C24-ST水平显著降低。在向$ARSA^{-/-}$小鼠施用包含具有WPRE元件的表达组件的AAV9颗粒后,观察到C24-ST水平进一步降低。

实例2.对给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE的$ARSA^{-/-}$小鼠中的硫酸酯酶活性的评估

[0170] 对晚期(13个月)$ARSA^{-/-}$小鼠给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE(每只动物1.97e11 VG)。作为对照,向年龄匹配的WT和$ARSA^{-/-}$小鼠注射制剂缓冲液。给药后三个月,对小鼠实施安乐死,并收集其脑、脊髓和肝脏。使用硫酸酯酶活性测定试剂盒(ab204731)测量了ARSA介导的硫酸酯酶活性;将数据相对于通过BCA测定测量的总蛋白归一化。误差条表示平均值和标准偏差。双因素方差分析和图基多重比较检验。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。ELN:20201205-001、20210225-107、20210211-117。如图2所示,经AAV.rh10-CBA-

ARSA-WPRE治疗的晚期MLD(ARSA$^{-/-}$)小鼠在脑、脊髓和肝脏中显示出增加的ARSA介导的硫酸酯酶活性。

实例3.对给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE的ARSA$^{-/-}$小鼠中的硫苷酯的评估

[0171] 在MLD患者中硫苷酯沉积是毒性和神经元死亡的主要驱动因素。短链脂肪酸(C16、C18)主要积聚在神经元和星形胶质细胞中,而长链脂肪酸硫苷酯(C24:1、C24)积聚在髓鞘形成细胞中。溶血-硫苷酯是硫苷酯的脱酰形式,其在MLD患者的所有组织中积聚。

[0172] 对晚期(13个月)ARSA$^{-/-}$(ARSA KO)小鼠给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE。作为对照,向年龄匹配的WT和ARSA$^{-/-}$小鼠注射制剂缓冲液。给药后三个月,对小鼠实施安乐死,并收集其脑和脊髓。使用LC-MS测量硫苷酯水平。将数据相对于组织重量归一化:从ng/mL(50μL)转换为μg/g。误差条表示平均值和标准偏差。双因素方差分析和图基多重比较检验。

[0173] 使用LC-MS和给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE的ARSA$^{-/-}$小鼠的脑和脊髓两种样本测量的硫苷酯水平显示所有硫苷酯同种型水平均显著降低(图3)。

实例4.对给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE的ARSA$^{-/-}$小鼠中的髓鞘形成的评估

[0174] MLD患者表现出白质纤维束中髓鞘形成的显著丧失。为了说明基因疗法对晚期(13个月)ARSA$^{-/-}$小鼠的影响,对小鼠给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE。作为对照,向年龄匹配的WT和ARSA$^{-/-}$小鼠注射制剂缓冲液。给药后三个月,用硝基蓝对匹配的矢状脑半切片进行染色,并特别在胼胝体中进行信号强度定量。误差条表示平均值和标准偏差。单因素方差分析和图基多重比较检验。与对照相比,经AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE治疗的晚期MLD(ARSA$^{-/-}$)小鼠显示出胼胝体髓鞘形成有所改善(图4)。

实例5.对给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE的ARSA$^{-/-}$小鼠中髓鞘形成和成熟少突胶质细胞数目的评估

[0175] 对晚期(13个月)MLD ARSA$^{-/-}$小鼠给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE。作为对照,向年龄匹配的WT和ARSA$^{-/-}$小鼠注射制剂缓冲液。收集脑半球并将其快速冷冻;切除小脑、脑干和嗅球。对脑的其余部分进行单细胞核转录组测序(RNAseq),以测量不同细胞类型的相对丰度。误差条表示平均值和标准偏差。双因素方差分析和图基多重比较。图5示出,与未经治疗的ARSA$^{-/-}$小鼠相比,经AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE治疗的ARSA$^{-/-}$小鼠显示出少突胶质细胞计数正常化。

实例6.ARSA蛋白交叉校正研究

[0176] 对晚期(13个月)ARSA$^{-/-}$小鼠给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE。给药后三个月,对匹配的矢状脑半切片进行ARSA-mRNA原位杂合(ISH)和ARSA-蛋白免疫组织化学(IHC)。对切片进行成像和信号叠加分析。(图6A)利用用于细胞核的DAPI染色对来自小鼠脑的相邻矢状切片进行WPRE ISH或ARSA IHC处理。然后将矢状切片作为各别的1024x 1024像素图块进行分析。在每个图块中,通过在整个矢状图像中凭经验确定的阈值参数来确定ISH阳性细胞和IHC阳性细胞。交叉校正因子(即IHC+细胞与ISH+细胞的比率)被表示为热力图,其中高度交叉校正的图块以红色阴影显示(图6B)。来自每个图块的ISH+细胞计数与IHC+细胞计数被绘制为散点图,其中y=x线显示为红色。y=x线上方的图块表示交叉校正的细胞。在晚期神经病性小鼠中,与感染细胞相比,高出10倍的细胞经交叉校正,突显了这种策略实现的广泛交叉校正。

实例7.在早期(6个月)神经病理学阶段的MLD小鼠(Arsa$^{-/-}$)中AAV.rh10-hARSA-

WPRE介导的基因替换使得MLD相关病理逆转的评估

[0177] 对早期(6个月)ARSA$^{-/-}$小鼠给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE。作为对照,向年龄匹配的WT和ARSA$^{-/-}$小鼠注射制剂缓冲液。在给药后四个月,相对于人ARSA,通过IHC在矢状脑切片中观察到广泛的ARSA表达(图7A)。在相同的动物中,脑、脊髓、DRG和肝脏表现出ARSA活性显著增加(图7B)。因此,经AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE治疗的早期MLD(ARSA$^{-/-}$)小鼠表现出广泛的CNS人ARSA表达,并在脑、脊髓、DRG和肝脏中表现出增加的ARSA介导的硫酸酯酶活性。

实例8.在早期(6个月)神经病理学阶段的MLD小鼠(Arsa$^{-/-}$)中AAV.rh10-hARSA-WPRE介导的基因替换中硫苷酯水平的评估

[0178] 对早期(6个月)ARSA$^{-/-}$小鼠给药AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE。作为对照,向年龄匹配的WT和ARSA$^{-/-}$小鼠注射制剂缓冲液。给药后四个月,对动物实施安乐死,并收集(A)脑和脊髓、(B)肝脏、(C)血浆和(D)CSF。使用LC-MS测量硫苷酯水平。将数据相对于组织重量归一化:从ng/mL(50μL)转换为μg/g。流体:将数据转换为(30μL)ng/mL至ng/mL,且转换为ng/mL(5μL)至ng/uL。图8A-8D示出脑(图8A)、肝脏(图8B)、血浆(图8C)和CSF(图8D)中的硫苷酯水平。在施用AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE后,脑、脊髓、肝脏、血浆和CSF中的硫苷酯水平显著升高。

实例9:对非人灵长类动物(NHP)—硫酸酯酶活性的研究

[0179] 对AAVrh.10血清反应阴性的食蟹猴(雄性,毛里求斯2岁,2-3Kg)使用插入腰部区的带端口鞘内导管在颈部1-2级交界处按剂量鞘内施用AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE。动物以特伦德伦伯卧位(Trendelenburg position)以0.125mL/min的速度给药两次2.5mL输注液,两次施用大约间隔开六小时。施用两剂:7.5e12 VG/NHP(在1e11 VG/脑克下)和2.75e13VG/NHP(在3.3e11 VG/脑克下)。给药后29天,对动物实施安乐死,并对样本进行ARSA活性评估:59个组织环切样品来自脑且7个组织环切样品来自脊髓。观察到脑和脊髓中的硫酸酯酶活性显著增加,其中59%和86%的脑环切样品在低剂量和高剂量下分别显示出比背景至少增加10%的活性(图9A)。这超过了我们的目标标准,即50%的环切样品具有增加>10%的活性。同样地,在以低剂量和高剂量治疗的NHP的脊髓中分别观察到硫酸酯酶活性增加了25%和32%(图9B)。通过针对FLAG抗体的IHC在经治疗的NHP的脑中观察到广泛的ARSA生物分布(图9C)。我们的结果表明,AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE介导的基因替换是一种用以在中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS)中实现广泛和治疗水平的ARSA的可行的方法。

实例10:对非人灵长类动物(NHP)的研究—施用包含AAV1999或AAV.rh10的颗粒后转基因表达水平的比较

[0180] 对AAVrh10和AAV1999(VP1具有SEQ ID NO.12;VP2具有SEQ ID NO.13;且VP3具有SEQ ID NO:14)血清反应阴性的食蟹猴(雄性,毛里求斯2岁,2-3kg)使用插入腰部区的带端口鞘内导管在颈部1-2级交界处按剂量鞘内施用药物。动物以特伦德伦伯卧位以0.125mL/min的速度给药两次2.5mL输注液,两次施用大约间隔开6小时。以2.75e13 VG/NHP(在3.3e11 VG/脑克下)施用一剂AAV1999/rh10/Myo-CBA-eGFP。给药后两周,对动物实施安乐死,并通过ELISA评估样本中绿色荧光蛋白(GFP)的表达。

[0181] 与AAVrh.10相比,代表16个不同脑区的总共41个脑环切样品(灰质)显示出AAV1999的GFP表达明显更高(图10A)。在所有样本中,与经AAVrh.10治疗的NHP相比,经AAV1999治疗的NHP的脑中的GFP表达高出93%-123%(图10B)。热力图证明了这一点,其中

与经AAVrh10治疗的NHP相比,经AAV1999治疗的NHP中41个环切样品中有38个环切样品(在三个NHP中取平均值)显示出GFP表达最少增加了10%(图11)。与AAVrh10相比,在经AAV1999治疗的NHP中,利用针对eGFP的抗体染色的代表性匹配脑切片显示出稳健的表达,从而展现出优越的生物分布(图12)。此外,在脊髓和DRG中,与经AAVrh.10治疗的NHP相比,经AAV1999治疗的NHP中的GFP表达分别高出79%和22%。图13示出在NHP的脊髓和DRG中的GFP表达。与经AAVrh10-GFP治疗的NHP相比,心脏和肝脏中的AAV1999-GFP表达较低(图14)。

[0182] 与AAVrh.10相比,AAV1999载体基因组负荷在脑中低十倍,且在脊髓中低三倍(图15A)。这在GFP表达(y轴)与组织载体基因组(x轴)之间相关性的"左移"中显而易见,其中AAV1999(红色)的相关性左移,表明载体的蛋白质表达更高且组织剂量更低(约10倍)(图16)。此外,与AAVrh.10相比,DRG、肝脏、心脏、肺和肾脏也显示出较低的AAV1999载体基因组(图15B)。脾脏是唯一一个与AAVrh.10相比显示出更高AAV1999载体基因组的受试组织(图15B)。这些结果表明,AAV1999优于AAVrh.10,且在较低剂量下具有更广泛的生物分布和更高的转基因表达。

实例11:使用AAV1999-ARSA对神经病变前Arsa KO小鼠模型的长期药理学、疗效和耐久性研究

[0183] 本研究被设计用以评估AAV1999-ARSA在Arsa KO小鼠模型中的长期药理学和疗效。在表2中总结了研究设计。给两个月大的Arsa KO小鼠给药(双侧ICV注射;每个半球4uL)AAV1999-ARSA(批号VP091321),每只小鼠1.6e11 VG(3.3e11 VG/克脑重)。作为对照,向年龄匹配的WT和Arsa KO小鼠给药制剂缓冲液。给药后13个月对小鼠实施安乐死,并收集样本。

表2-Arsa KO小鼠(2个月-15个月)中的长期药理学、疗效和耐久性研究

分组	数目/性别	基因型	测试品	剂量	给药方案	时间点、样本采集、分析
1	12(6M,6F)	WT	配制缓冲液	N/A	双侧ICV,每侧4 ul	? 给药年龄:2个月 ? 尸检年龄:15个月(生命周期中的13个月) ? 脑、脊髓、DRG、坐骨神经、肝脏、CSF和血浆
2	12(6M,6F)	$ARSA^{-/-}$	配制缓冲液	N/A		
3	12(6M,6F)	$ARSA^{-/-}$	AAV1999-ARSA(批号VP091321)	1.6e11 VG(3.3e11 VG/克脑重)		

[0184] 在经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠的脑和脊髓中观察到稳健的hARSA mRNA表达(图18)。使用硫酸酯酶活性测定试剂盒(艾博抗,ab204731)测量了硫酸酯酶活性。给药AAV1999-ARSA的Arsa KO小鼠在脑、脊髓、DRG和坐骨神经中显示出正常(相当于WT)水平的硫酸酯酶活性(图19)。在接受治疗的小鼠的肝脏中观察到WT硫酸酯酶活性水平的可测量的提高(图19)。在MLD患者中硫苷酯沉积是毒性和神经元死亡的主要驱动因素。溶血-硫苷酯

(lyso-ST)是硫苷酯的脱酰形式,其在所有组织中积聚且是患者MLD相关病理的特征性标志。在经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠中,脑和脊髓中的溶血-ST水平恢复正常(类似于WT)(图20)。在DRG、坐骨神经和肝脏中也观察到溶血-ST水平的显著降低,同时接受治疗的动物的血浆和CSF中的总硫苷酯水平显著降低(图20)。由于脑和脊髓中的硫苷酯清除,经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠在脑和脊髓中在神经炎症标记物(Gfap和Aif1)和Lamp1表达(溶酶体健康标记物)方面显示出显著改善(图21)。此外,与经缓冲液处理的Arsa KO小鼠相比,在经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠中观察到血浆Nf-L水平显著降低(图22)。

[0185] MLD患者常出现听力障碍。听觉脑干反应(ABR)测试提供有关内耳(耳蜗)和听觉中枢通路的功能信息。ABR反映耳蜗神经节神经元和中枢听觉通路细胞核两者对声音刺激的电反应(Zhou等人,2006;Burkard等人,2007)。经由放置在麻醉动物头皮上的电极记录ABR。ABR阈值是指可产生可识别的电响应波的最低声压级(SPL)。Arsa KO小鼠显示出听力随时间逐渐减退,在经过AAV1999-ARSA治疗后听力逆转(图23)。早在给药后4个月(给药后测试的最早时间)就观察到表型的部分逆转(图23)。

[0186] 在所有Arsa KO小鼠的脑中都观察到空泡形成和神经变性,通常是在脑干和/或小脑中。在接受治疗的小鼠中,仅在10只小鼠中的4只中检测到组织学变化,且其严重程度低于Arsa KO小鼠(图24A)。所有Arsa KO小鼠在脊髓中均显示出最低严重程度的空泡形成,而在WT小鼠或经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠中未检测到任何变化(图24B)。最后,在任何组中的DRG中均未检测到病理变化(KO+AAV组中10只动物中有1只除外)(图24C)。因此,用AAV1999-ARSA治疗Arsa KO小鼠显著减少和/或预防了脑中的MLD相关病理,并预防了脊髓中的MLD相关病理。

实例12:使用AAV1999对早期神经病性ARSA KO小鼠模型的纵向药理学、疗效和耐久性研究

[0187] 本研究被设计用以评估Arsa KO模型在6个月的时段内MLD相关病理和生化表型的靶标结合和逆转情况。早期神经病性阶段(给药后6个月)被选为与目标患者群体最相关的阶段。在表3中总结了研究设计。给六个月大的Arsa KO小鼠给药(双侧ICV注射;每个半球4uL)AAV1999-ARSA(批号VP091321),剂量为每只小鼠5e10 VG(1e11 VG/克脑重)。向作为对照的年龄匹配的WT和Arsa KO小鼠给药制剂缓冲液。给药后1、2、3及6个月对小鼠实施安乐死,并收集样本。

表3-Arsa KO小鼠中的纵向药理学、疗效和耐久性研究

分组	数目和性别	基因型	测试品	剂量	给药方案	时间点、样本采集、分析
1	32(16M,16F)	WT	配制缓冲液	N/A	双侧ICV,每侧4 ul	? 给药年龄:6个月 ? 尸检年龄:7个月(生命周期中的1个月)、8个月(生命周期中的2个月)、9个月(生命周期
2	32(16M,16F)	*Arsa*$^{-/-}$	配制缓冲液	N/A		
3	32(16M,	*Arsa*$^{-/-}$	AAV1999-	5e10		

	16F)		ARSA(批号VP091321)	VG(1e11 VG/克脑重)		中的3个月)、12个月(生命周期中的6个月) ? 脑、脊髓、DRG、坐骨神经、肝脏、CSF和血浆

[0188] 在给药后6个月的时段内,AAV1999-ARSA载体基因组在脑中的暴露量保持一致(图25A)。这转化为随着时间的推移,ARSA介导的硫酸酯酶活性持续存在(图25B),在给药后1个月达到峰值硫酸酯酶活性(图25C)。在每个时间点,接受治疗的小鼠溶血-硫苷酯、C16-硫苷酯和C18-硫苷酯均显著减少(图26A-26C)。重要的是,清除是渐进的,硫苷酯水平(尤其是溶血-ST)在给药后6个月恢复正常(图26D-26F)。此外,经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠CSF和血浆中的总硫苷酯水平显著降低(图27)。最后,与KO+FB组相比,给药AAV1999-ARSA后6个月,血浆Nf-L水平的初始升高有所降低(图28)。

[0189] Arsa KO小鼠脑中的神经元和中性粒细胞变化在脑干和/或小脑核中观察到。值得注意的是,在用AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠中,早在给药后2个月便观察到这些变化的发生率和严重程度有所降低(图29A-29B)。一些经AAV1999-ARSA治疗的小鼠的脑(通常在海马附近)有最低程度的局灶性或多灶性血管周围单核细胞浸润(图29C)。每组1-2只动物中主要来自海马CA3区的神经元也有最低程度的变性/坏死(图29D)。

[0190] 一些经AAV1999-ARSA治疗的小鼠的背根神经节在神经胶质细胞和/或单核细胞的细胞性方面有局灶性或多灶性增加,其严重程度通常很低(图30A),一些经治疗的Arsa KO小鼠显示出最低程度的神经轴突变性(图30B-30C)。在所有组中的动物的脊髓中观察到显微镜观察结果,这些观察结果被认为是随机的或偶然的(图30D)。大多数Arsa KO小鼠在坐骨神经中表现出组织学变化(非常低或最低的轴突变性),而在经AAV1999-ARSA治疗的Arsa KO小鼠中发病率和严重程度偶尔会增加至最低/轻度或轻度(图30E)。WT小鼠的坐骨神经也有罕见的、非常低的偶发轴突变性背景(图30E)。在肝脏中未发现特定于测试品的观察结果。

[0191] 综上所述,这些数据表明,Arsa KO小鼠中AAV1999-ARSA介导的基因替换具有良好的耐受性,并且在雄性和雌性小鼠中都以相同的程度逆转MLD相关的表型。

实例13:评估AAV1999-ARSA的NHP药理学和剂量范围观察结果研究

[0192] 简言之,通过单次直接脑池(ICM)输注对AAV1999中和抗体血清反应阴性的专门繁殖的幼稚雄性/雌性食蟹猴(柬埔寨2-3岁,2.6-3.1kg)NHP给药药物。在给药期间,动物被放置成特伦德伦伯卧位。该给药模式包括以0.125ml/min的速度单次输注2.5mL AAV1999-ARSA(批号VP050322),然后用250ul制剂缓冲液进行冲洗。在给药后五周,对动物实施安乐死,并对样本进行载体生物分布(dPCR)和hARSA mRNA(RTdPCR)评估,同时进行安全性评估。样本代表了来自脑的64个环切样品,代表了19个不同的灰质区和7个不同的白质区,脊髓的8个节段以及相邻的DRG、周围神经和内脏器官。在表4中描述了研究设计。

表4-研究CRL.2021-5613:NHP剂量范围观察结果研究

分组	测试品	剂量/克脑重	剂量/动物	给药方案	动物编号	时间点、样本采集、分析
1	AAV1999-ARSA	1e10 VG	7.5e11 VG	RoA：ICM，将动物置于特伦德伦伯卧位 给药参数：在0.125 mL/min下，2.5 ml，冲洗250 ul	5（M/F）	生命周期中：35天尸检时的脑、脊髓、DRG、周围神经、内脏器官 CSF（研究前和尸检时） 血浆：研究前、给药后：2、4、7、14天和尸检时 神经病性/行为评估（给药前、给药后7天和5周）
2		3.3e10 VG	2.5e12 VG		5（M/F）	
3		1e11 VG	7.5e12 VG		5（M/F）	
4		3.3e11 VG	2.5e13 VG		5（M/F）	
5	配制缓冲液	n/a	n/a		3（M/F）	

[0193] 在给药ICM后，在NHP脑（包括灰质区（19个独特的脑区）和白质区（7个独特的脑区）二者）中观察到AAV1999-ARSA载体生物分布的剂量依赖性增加（图31）。AAV1999-ARSA治疗还使得在两种最高剂量下hARSA mRNA（图32）和蛋白质（图33）水平的广泛剂量依赖性增加：7.5e12 VG（1e11 VG/克脑重）和2.5e13 VG（3.3e11 VG/克脑重）。在DRG和脊髓中沿着脊柱头-尾轴观察到均匀的剂量依赖性载体生物分布和hARSA表达（图34）。在内脏器官中，肝脏、脾脏和颈部淋巴结显示出载体生物分布的剂量依赖性增加（图35）。

[0194] 为了探索AAV1999-ARSA的施用是否会在NHP脑中产生有意义的人ARSA表达，我们评估了AAV衍生的人ARSA蛋白的水平，并将其与1）内源性食蟹猴cyARSA蛋白（在同一样本中测量的19个脑区中的hARSA/cyARSA）和2）在7名3岁与8岁之间的健康人体器官捐献者的脑中（在12个脑区中）测量的人ARSA蛋白进行了比较。在1e11 VG/克和3.3e11VG/克脑重的剂量下，全脑平均人ARSA蛋白水平为天然cyARSA的约63％和约546％（图36）。此外，在1e11 VG/克和3.3e11 VG/克脑重的剂量下，全脑平均人ARSA蛋白水平为健康对照器官捐献者的人ARSA蛋白水平的约51％和约416％（图37）。因此，在NHP中的AAV1999-ARSA治疗在1e11和3.3e11 VG/克脑重下在CNS中产生有治疗意义的ARSA蛋白表达。

[0195] 与给药前试验相比，在给药后第1周或第5周（尸检），在两个给药组中的NHP中均未观察到临床症状（功能或行为缺陷）（图38）。CM内输注耐受性良好；正如所预期的那样，ICM过程使得CSF Nf-L水平显著升高，与经制剂缓冲液治疗的NHP相比，在经AAV1999-ARSA治疗的NHP中观察到CSF Nf-L水平的进一步升高（图39A）。然而，没有观察到剂量依赖性增加（图39A）。在任何剂量下，用AAV1999-ARSA治疗的NHP中均未观察到血浆细胞因子浓度的显著变化（图39B），并且在以两个高剂量利用AAV1999-ARSA进行治疗的NHP中未通过IFN-γ ELISpot发现对AAV1999衣壳或hARSA蛋白的细胞介导免疫反应（图39C）。此外，在尸检时任何动物均未发现与测试项目相关的明显观察结果。

[0196] 在大多数动物中,从1e10 VG/克脑重开始,脑脊液变化由有核细胞计数(主要是单核细胞)的微小、非剂量相关的增加组成。此外,在载体施用后5周,在≥3.3e10 VG/克脑重下,大多数动物的白蛋白和/或总蛋白增加。少数各别动物在3.3e10或3.3e11 VG/克脑重下具有可变数量的嗜碱性至嗜酸性颗粒物质,这些物质在形态上与神经材料相容。这些变化与来自中枢神经系统的各种切片中的神经元变性和单核细胞浸润相关。

[0197] 血液学变化由以下组成:在第7天,大多数≥1e10 VG/克脑重的雄性动物和少数1e11 VG/克脑重的零星雌性动物的网织红细胞计数短暂轻度增加,同时在少数个体中红细胞质量参数发生极小程度的下降。在3.3e10 VG/克脑重下,一些雄性和雌性动物的白细胞计数增加,继发于中性粒细胞、淋巴细胞和/或单核细胞计数的增加,这在一些动物中(主要是在以3.3e11 VG/克脑重施用的雄性动物中)仍然可观察到。未发现与测试品相关的对凝血或临床化学的影响。

[0198] 主要测试品影响由以下构成:神经元变性(影响脑、腰椎脊髓和DRG)、胶质细胞反应增加(小脑和脊髓)、神经纤维变性(影响脊髓白质和周围神经的神经纤维)、以及影响脑(小脑)、DRG和脊髓的单核细胞浸润(包括血管周围分布)(图40-42)。在任何剂量下,在内脏器官(心脏、肝脏、胆囊、脾脏、胰腺、肾上腺、肺、骨、胸骨/骨髓、卵巢、十二指肠、睾丸、附睾、胸腺、眼睛、子宫颈、肾脏)中均未观察到与测试品相关的观察结果。在最低剂量(1e10 VG/克脑重)和最高剂量(3.3e11 VG/克脑重量)之间,观察到某些部位的一些变化存在剂量反应,例如神经元变性(小脑、最高剂量下的腰椎DRG)、胶质增生(大脑皮层、小脑,但不在脊髓中)和单核细胞浸润(在大脑皮层中且在最高剂量下在腰椎DRG中)(图40-42)。

[0199] 总之,在食蟹猴(雄性和雌性两类)中在1e10、3.3e10、1e11和3.3e11 VG/克脑重的剂量水平下,通过直接脑池内(ICM)单次施用AAV1999-ARSA具有良好的耐受性,且1e11与3.3e11 VG/克脑重被认为是有效剂量。

序列

ARSA多肽序列

```
         10         20         30         40         50
MGAPRSLLLA LAAGLAVARP PNIVLIFADD LGYGDLGCYG HPSSTTPNLD
         60         70         80         90        100
QLAAGGLRFT DFYVPVSLCT PSRAALLTGR LPVRMGMYPG VLVPSSRGGL
        110        120        130        140        150
PLEEVTVAEV LAARGYLTGM AGKWHLGVGP EGAFLPPHQG FHRFLGIPYS
        160        170        180        190        200
HDQGPCQNLT CFPPATPCDG GCDQGLVPIP LLANLSVEAQ PPWLPGLEAR
        210        220        230        240        250
YMAFAHDLMA DAQRQDRPFF LYYASHHTHY PQFSGQSFAE RSGRGPFGDS
        260        270        280        290        300
LMELDAAVGT LMTAIGDLGL LEETLVIFTA DNGPETMRMS RGGCSGLLRC
        310        320        330        340        350
GKGTTYEGGV REPALAFWPG HIAPGVTHEL ASSLDLLPTL AALAGAPLPN
        360        370        380        390        400
VTLDGFDLSP LLLGTGKSPR QSLFFYPSYP DEVRGVFAVR TGKYKAHFFT
        410        420        430        440        450
QGSAHSDTTA DPACHASSSL TAHEPPLLYD LSKDPGENYN LLGGVAGATP
        460        470        480        490        500
EVLQALKQLQ LLKAQLDAAV TFGPSQVARG EDPALQICCH PGCTPRPACC

HCPDPHA  (SEQ ID NO:1)
```

密码子优化的ARSA DNA序列(人)

ATGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCTGT
GGCCAGACCTCCTAACATCGTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATC
TGGGCTGTTACGGACACCCTAGCAGCACCACACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCC
GGCGGACTGAGATTCACCGATTTCTACGTGCCCGTGTCTCTGTGCACACCTAGTAG
AGCTGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGTGCGGATGGGAATGTATCCTGGCGTG
CTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGTGACAGTTGCTGAAG
TGCTGGCCGCCAGAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGCACCTCGGAGT
TGGACCTGAAGGCGCTTTTCTGCCTCCTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCA
TCCCTTACAGCCACGATCAGGGCCCTTGCCAGAACCTGACCTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGAT
GGCGGCTGTGATCAGGGACTCGTGCCTATTCCTCTGCTGGCCAATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCTGC
CTGGCCTGGAAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCACGACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGACAGACCATTCTT
CCTGTACTACGCCAGCCACCACACACACTACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTCGCCGAGAGATCTGGCAGAGGC
CCTTTTGGCGATAGCCTGATGGAACTGGATGCCGCCGTGGGAACACTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGC
TGGAAGAGACACTGGTCATCTTCACCGCCGACAACGGCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGG
CCTGCTGAGATGTGGCAAGGGAACAACATACGAAGGCGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGACAT
ATTGCCCCTGGCGTGACACACGAACTGGCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGCTGGCGCTC
CTCTGCCTAATGTGACCCTGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAGAGCCCTAGACAGAG
CCTGTTCTTCTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTTTGCCGTGCGGACAGGCAAGTACAAGGCCCAC

TTTTTTACCCAAGGCAGCGCCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTTGTCACGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTC
ATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGAGAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGC
TACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTCCAGCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGA
CCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAGGACCCTGCTCTGCAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCT
GCTGTCACTGTCCTGATCCTCACGCTTGA(SEQ ID NO: 2)

用于rAAV包装的质粒的完整DNA序列;ARSA的编码序列带有下划线TTGGCCACTCCC
TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCT
CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTACGTACAATTGGGATCCC
GGACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATG
GAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAA
TAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA
TTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTA
TTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGG
CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTC
CTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTG
CCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAG
GTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGT
GGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG
TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTT
TGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGA
ACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCC
CCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGG
CTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCT
CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATG
GTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGC
ACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGT
CGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACG
GGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTC
TTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCTACGTACCAC
CATGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCTGTGGCCAGACCTCCTAACATC
GTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTTACGGACACCCTAGCAGCACCACACCTAACC
TGGATCAACTGGCTGCCGGCGGACTGAGATTCACCGATTTCTACGTGCCCGTGTCTCTGTGCACACCTAGTAGAGC
TGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGTGCGGATGGGAATGTATCCTGGCGTGCTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGA
CTGCCTCTGGAAGAAGTGACAGTTGCTGAAGTGCTGGCCGCCAGAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGC
ACCTCGGAGTTGGACCTGAAGGCGCTTTTCTGCCTCCTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTACAG
CCACGATCAGGGCCCTTGCCAGAACCTGACCTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCTGTGATCAGGGA
CTCGTGCCTATTCCTCTGCTGGCCAATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCTGCCTGGCCTGGAAGCCAGAT

ATATGGCCTTCGCTCACGACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGACAGACCATTCTTCCTGTACTACGCCAGCCA
CCACACACACTACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTCGCCGAGAGATCTGGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTG
ATGGAACTGGATGCCGCCGTGGGAACACTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTGGTCA
TCTTCACCGCCGACAACGGCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGGCCTGCTGAGATGTGGCAA
GGGAACAACATACGAAGGCGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGACATATTGCCCCTGGCGTGACA
CACGAACTGGCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGCTGGCGCTCCTCTGCCTAATGTGACCC
TGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAGAGCCCTAGACAGAGCCTGTTCTTCTACCCTAG
CTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTTTGCCGTGCGGACAGGCAAGTACAAGGCCCACTTTTTTACCCAAGGCAGC
GCCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTTGTCACGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGT
ACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGAGAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCA
GGCTCTGAAACAGCTCCAGCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGA
GGCGAGGACCCTGCTCTGCAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCCTGATC
CTCACGCTTGAGATTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTC
CTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTC
CTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGC
ACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTT
TCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG
CACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATT
CTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGG
CTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGA
TCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACT
CCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTG
GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTCGAAATTAGGAACCCCTAGTGAT
GGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC
TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAATCGCGACGGCCGACGTCTTTGTT
ACAACTTACTATATATATGCACACATATATATATATTTGGGTATATTGGGGGGGTTCTAATTTAAGAAATGCATAA
TTGGCTATAGACAGACAGTTGTCAGAACTTGGCAATGGGTACGTGCAGGTTCATTATACCAAGTCTACTTGTAGTT
GTTCAAAATGTATCATAATACAAGGCCGGGCGAGGTCGTCACGCCTGTAATCCCAGCATTTTGGGAGGCTAAGGCA
GGAGGATTGCTTGAGGTCAGGAGTTTGTGACCAGCCTGGGCAACAGAGCAAGACCCTGTCTCCAAAAAGAAAAAAA
ATAATTTTTTACAAAATAAAAACAAAATGTATCATCAGACGAAATTAAATAAGAGGCAATTCATTGTAATGACAAC
TTTTCCCAGCTTGACATTTAACAAAAAGTCTAAGTCCTCTTAATTCATATTTAATGATCAAATATCAAATACTAAT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCGCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCCTGGCT
CACTGCAAGCTCCGCCTCCCGGGTTCACGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGACATGC
GCCACCACGCCCGGCTAATTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGGCTGGTCTTGAATTT
CCCACCTCAGGTGATCTGCCTGCCTCAGCCTCACAAAGCAGTAGCTGGGACTACAGGCACCCACCACCACACTTGG
TTAATTCTTTTGTATTTTTTTTGTAAAGACGGGATTTCACCATGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGATCTCA
TGATCCGCCCGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCCCGCCCGGCCATCAAATACTAAT
TCTTAAATGGTAAGGACCCACTATTCAGAACCTGTATCCTTATCACTAATATGCAAATATTTATTGAATACTTACT
ATGTCATGCATACTAGAGAGAGTTAGATAAATTTGATACAGCTACCCTCACAGAACTTACAGTGTAATAGATGGCA

TGACATGTACATGAGTAACTGTGAACAGTGTTAAATTGCTATTTAAAAAAAAAGACGGCTGGGCGCTGTGGCTCAT
GCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAAGTTGATCGCTCGAGGTCAAGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCA
ACGTGGTAAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAAAAAATTAGCCAGGCATGGTGGCACAGGCCTGTAATCCC
AGCTACTAGGGAGGCTGAGACATGGAGAACTGCTTGAATCCAGGAGGCAGAGGTTACAGTGAGCCGAGATCATACC
ACTACACTCCAGCCTGAGTGACAGAGCGAGACTCCTGTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATACAGGTTAAGTG
TTATGGTAGTTGAAGAGAGAACTCAAACTCTGTCTCAGAAGCCTCACTTGCATGTGGACCACTGATATGAAATAAT
ATAAATAGGTATAATTCAATAAATAGGAACTTCAGTTTTAATCATCCCAAACACCAAAACTTCCTATCAAACAGGT
CCAATAAACTCAATCTCTATAAGAGCTAGACAGAAATCTACTTGGTGGCCTATAATCTTATTAGCCCTTACTTGTC
CCATCTGATATTAATTAACCCCATCTAATATGGATTAGTTAACAATCCAGTGGCTGCTTTGACAGGAACAGTTGGA
GAGAGTTGGGGATTGCAACATATTCAATTATACAAAAATGCATTCAGCATCTACCTTGATTAAGGCAGTGTGCAAC
AGAATTTGCAGGAGAGTAAAAGAATGATTATAAATTTACAACCCTTAAAGAGCTATAGCTGGGCGTGGTGGCTCAT
GCCTGTAAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATCACCTGAGGCCAGAAGTTCAAGACCAGCCTAGCC
AACATGGCGAAACCCTGTCTCTACAAAAAATACAAAAATTAGCCGGGTGTGGTGGCACGTGCCTGTAGTCCCAGTT
ACTTGGGAGGCCGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCTAGGAGGTGGAGGCTGCAGTGAGCCGAGATTGTGCCACTGC
ACTCCACTTCAGCCTGGGCGACAAGAGCAAGACTCCGTCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCTAAAATCTAGT
GGGAAAGGCATATATACATACAACTAACTGTATAGCATAATAAAGCTCATAATCTGTAACAAAATCTAATTCGACA
AGCCCAGAAACTTGTGATTTACCAAAAACAGTTATATATACACAAAAAGTAAACCTAGAACCCAAAGTTACCCAGC
ACCAATGATTCTCTCCCTAAGCAGTATCAAGTTTAAAGCAGTGATTACATTCTACTGCCTAGATTGTAAACTGAGT
AAAGGAGACCAGCACCTTTCTGCTACTGAACTAGCACAGCCGTGTAAACCAACAAGGCAATGGCAGTGCCCAACTT
TCTGTATGAATATAAGTTACATCTGTTTTATTATTTGTGACTTGGTGTTGCATGTGGTTATTATCAACACCTTCTG
AAAGAACAACTACCTGCTCAGGCTGCCATAACAAAATACCACAGACTGAGTGACTTAACAGAAACTTATTTCTCAC
AGTTTTGGAGGCTGGGAAGTCCAAAATTAAGCTAACTGCAAGGTAGGTTTCAATCTCAGGCCTCTTCTTTGGCTTG
AAGGTCTTCTAACTGTGTGCTCACATGACCTCTTCTAACAAGCTCTCTGGTGTCTCTTTTTTTTTTTTTTCTTTT
TTGAGACAGAGTCTCACTCTGTCACCCAGGCTGGAGTACAGTGGCACAATCTGGGCTCACTGCAACCTCCAACTCC
CGGGTTCAAGTGATTCTCATGCCTCACCCTCCCGAGTAGCTTGGATGACAGGAGCCCGCTACCACACCCAGCTAAT
TTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGTGTTTCACTACATTGGCCAGGCTGGTCTCAAACTCCTGACCTCGTGATCCACC
CACCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACTGCGCCCGTCCTGGTGTCTTTTCATATAAGGGC
ACTAATCCAATCAGACCTGGGCCCAACCCTCCCGACTTCTTCTAACTGTAATTACCTTCCAAAGGCCCTGTCTCCA
AATACCATCACACTGGGGGTTAGGACTTCAAAAAAGGTATGGGGGGGGTGTGGGAGGACATAAATGCTCAGTCCAT
AACAAGCACCCAACATAAAAATGGCTAGAACAGATCACAAAAAAAAGGTCCTGTATGGCTTTGGGGAAGGGCTCAA
CCCCAAAATATCTGAAAGCTCTGGAGGGGCCTAGAAGTGGTAAATGAATGAAAACGTGGTTACTCTCCCGATCTGC
CTTTCCCAAATATGGCCATTCTTGGCTGAATCAGAAATCAAAGGACAGGTTATTAATTACTAGCTCTAAGTTACTT
ACCATTTGCTGAGACAGTTCAGAAATCTGACTGCATCTCCTCAGGGATCTAGAACACAGTTCTCAAATTCTAACTT
ACTTGTGATATACTTGTGAATGATAAAAATCGCTACAGGTACTTTTATTAATCTGAAAGAGTATTGAGAAATTACC
TTTCATTCTGACTTTTGTCTGGAATGAAAATCAATACTTTTGCTATATTCCATTACTGAAATAATTTTACTTTCCA
GTAAAACTGGCATTATAATTTTTTTTAATTTTTAAAACTTCATAATTTTTTGCCAGACTGACCCATGTAAACATAC
AAATTACTAATAATTATGCACGTCACATCTGTAATAATGGCCTTCATGTAAACATTTTTGTGGTTTACACATAAAA
TCTCTAATTACAAAGCTATATTATCTAAAATTACAGTAAGCAAGAAAATTAATCCAAGCTAAGACAATACTTGCAA
CATCAATTCATCATCTGTGACAAGGACTGCTTAAGTCTCTTTGTGGTTGACGTCATTAATTAACTGGCCTCATGGG

CCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCT
TGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGGTAAAGCCTGGGGTGCCT
AATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCC
CCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG
TTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCC
CTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCT
GGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC
AGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTT
TGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTC
AGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAA
TTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT
GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGA
TACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATC
AGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATT
AATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCA
TCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATC
CCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG
AGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAA
TACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATC
TTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCA
GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAAT
ACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA
TGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAA
TATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATC
CCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTG
CGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCA
AGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAA
TACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCTAGGCGCGCCAACGCGT(SEQ ID NO:3)

下划线,密码子优化的ARSA DNA序列(人)

5’AAV2 ITR DNA序列

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC
GACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT
(SEQ ID NO:4)

Flip取向的3’AAV2 ITR DNA序列

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGG
GCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

(SEQ ID NO:5)

CMV增强子元件DNA序列(基因库:K03104.1)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT

AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTG

ACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA

CGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC

CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA

TGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGT ACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG(SEQ ID NO:6)

鸡-肌动蛋白启动子DNA序列

TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCC

CAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGG

GGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCG

AGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTT

TTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGG

CGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCC(SEQ ID NO:7)

WPRE元件DNA序列

TTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTAT

GTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATT

GCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTT

ATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCT

GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGAC

TTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCG

CTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGA

AATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGC TACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTC TTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTG(SEQ ID NO: 8)

AAV9衣壳氨基酸序列(VP1)

```
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1               5                  10                  15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
            20                  25                  30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
        35                  40                  45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
        115                 120                 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145                 150                 155                 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
                165                 170                 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
            180                 185                 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
    210                 215                 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225                 230                 235                 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
                245                 250                 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
```

```
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
    610                 615                 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
```

625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

(SEQ ID NO: 9)

靶向肽氨基酸序列

KGGGFHG(SEQ ID NO:10)

侧接接头的靶向肽-氨基酸序列

AAAKGGGFHGAS(SEQ ID NO:11)

AAV1999衣壳氨基酸序列(VP1)

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

```
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
            180                 185                 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
    210                 215                 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225                 230                 235                 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
                245                 250                 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510
```

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Ala Ala **Lys**
580 585 590

Gly Gly Gly Phe His Gly Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
595 600 605

Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
610 615 620

Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
625 630 635 640

Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
645 650 655

Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
660 665 670

Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
675 680 685

Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
690 695 700

Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
705 710 715 720

Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
725 730 735

Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu (SEQ ID NO:12)
740 745

AAV1999衣壳氨基酸序列(VP2)

Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Ala Ala **Lys**

Gly Gly Gly Phe His Gly Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val

Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val

Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn

Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro

Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr

Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr

Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser

Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser

Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro

Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu (SEQ ID NO:13)

AAV1999衣壳氨基酸序列(VP3)

Met Ala Ser Gly Gly Gly

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Ala Ala **Lys**

Gly Gly Gly Phe His Gly Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val

Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val

Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn

Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro

Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr

Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr

Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser

Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser

Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro

Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu (SEQ ID NO: 14)

载体的完整DNA序列;ARSA的编码序列带有下划线

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCC

CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA

GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTACGTACAATTGGGATCCCGG

ACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTA

GTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC

TGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCA

TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAA

ACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA

CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG

ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAG

GTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATT

TTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGG

GGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGC

GGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT

GGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGG

AGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCC

CGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCC

TTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTG

GCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGC

TCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGC

TGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAG

TGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTG

CGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGG

TGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTG

AGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGG

GGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCG

GCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGC

GCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGC

GGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCC

TTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGG

CTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTG

GGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCTACGTACCACCATGAGCATGGGAGCCCC

TAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCTGTGGCCAGACCTCCTAACATCGTGCTGATCTTCGCCGAC
GATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTTACGGACACCCTAGCAGCACCACACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCCG
GCGGACTGAGATTCACCGATTTCTACGTGCCCGTGTCTCTGTGCACACCTAGTAGAGCTGCTCTGCTGACAGGCAG
ACTGCCAGTGCGGATGGGAATGTATCCTGGCGTGCTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGTG
ACAGTTGCTGAAGTGCTGGCCGCCAGAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGCACCTCGGAGTTGGACCTG
AAGGCGCTTTTCTGCCTCCTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTACAGCCACGATCAGGGCCCTTG
CCAGAACCTGACCTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCTGTGATCAGGGACTCGTGCCTATTCCTCTG
CTGGCCAATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCTGCCTGGCCTGGAAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCACG
ACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGACAGACCATTCTTCCTGTACTACGCCAGCCACCACACACACTACCCTCA
GTTCTCTGGCCAGTCCTTCGCCGAGAGATCTGGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTGATGGAACTGGATGCCGCC
GTGGGAACACTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTGGTCATCTTCACCGCCGACAACG
GCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGGCCTGCTGAGATGTGGCAAGGGAACAACATACGAAGG
CGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGACATATTGCCCCTGGCGTGACACACGAACTGGCCTCTTCT
CTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGCTGGCGCTCCTCTGCCTAATGTGACCCTGGATGGCTTCGATCTGT
CTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAGAGCCCTAGACAGAGCCTGTTCTTCTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCG
GGGAGTGTTTGCCGTGCGGACAGGCAAGTACAAGGCCCACTTTTTTACCCAAGGCAGCGCCCACAGCGATACCACA
GCTGATCCTGCTTGTCACGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACC
CCGGCGAGAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTCCA
GCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAGGACCCTGCTCTG
CAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCCTGATCCTCACGCTTGAGATTAAT
CAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGAT
ACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTG
GTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCA
ACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCA
CGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGT
GTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTC
TGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGC
GTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGATCCTGTGCCTTCTAGTTG
CCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAA
TAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA
AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTCGAAATTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTC
TCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCA
GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA(SEQ ID NO:16)

下划线,密码子优化的ARSA DNA序列(人)。

组	治疗
1	ARSA$^{-/-}$ + ssAAV9-CBA-hARSA-WPRE-bGH
2	ARSA$^{-/-}$ + ssAAV9-CBA-hARSA-bGH
3	ARSA$^{-/-}$ + PBS



图 1A

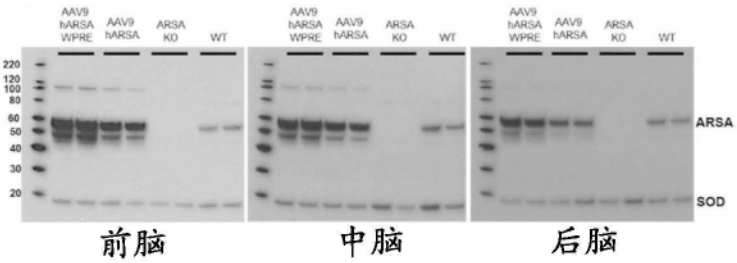


图 1B

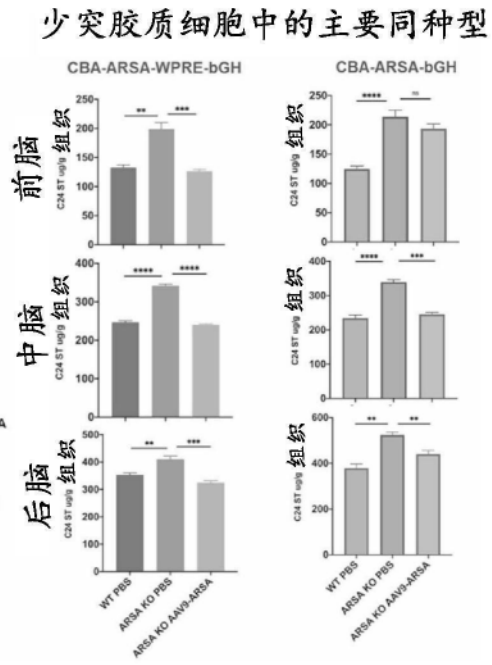


图 1C

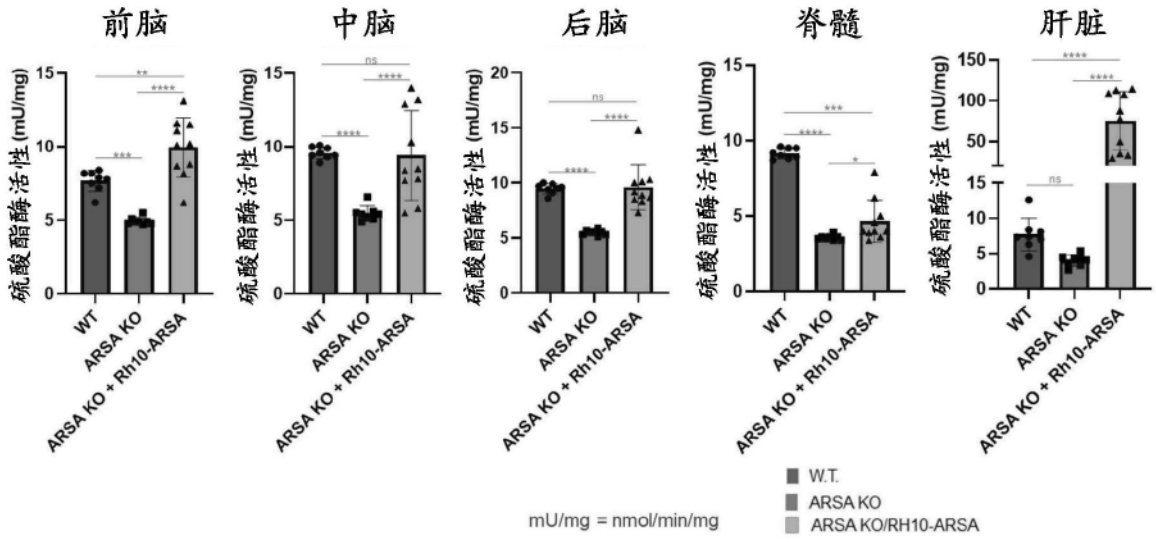


图2

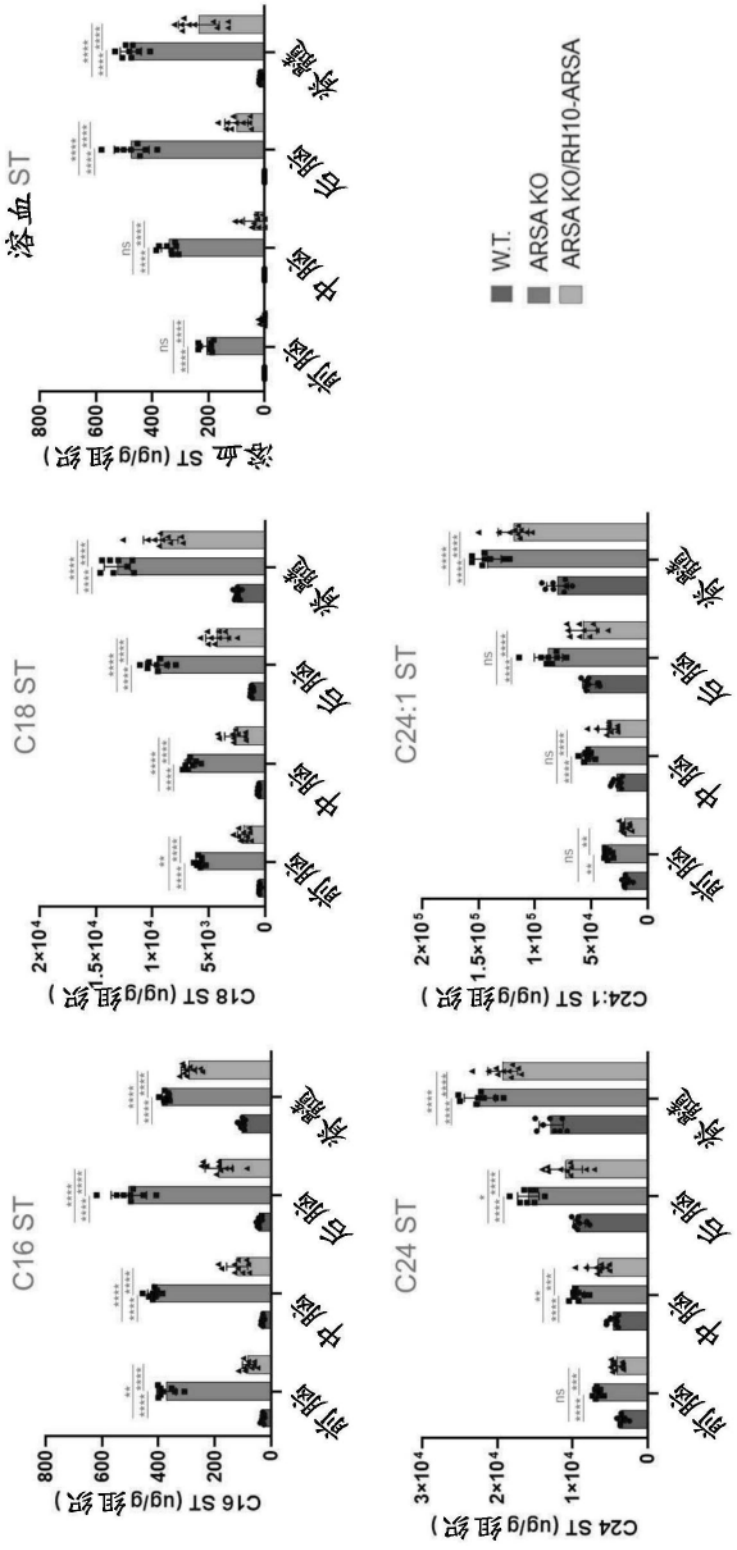

W.T.
ARSA KO
ARSA KO/RH10-ARSA
溶血 ST
溶血 ST (ug/g 组织)
C18 ST
C18 ST (ug/g 组织)
C24:1 ST
C24:1 ST (ug/g 组织)
C16 ST
C16 ST (ug/g 组织)
C24 ST
C24 ST (ug/g 组织)
前脑
中脑
小脑
脊髓

图3


野生型
ARSA KO
ARSA KO + AAV
硝基蓝阳性面积%
(脾脏体)
100
80
60
40
20
0
p = 0.0002
p = 0.0018
WT
ARSA KO
ARSA KO AAV
硝基蓝阳性面积
每个实心圆表示一只小鼠。

图4

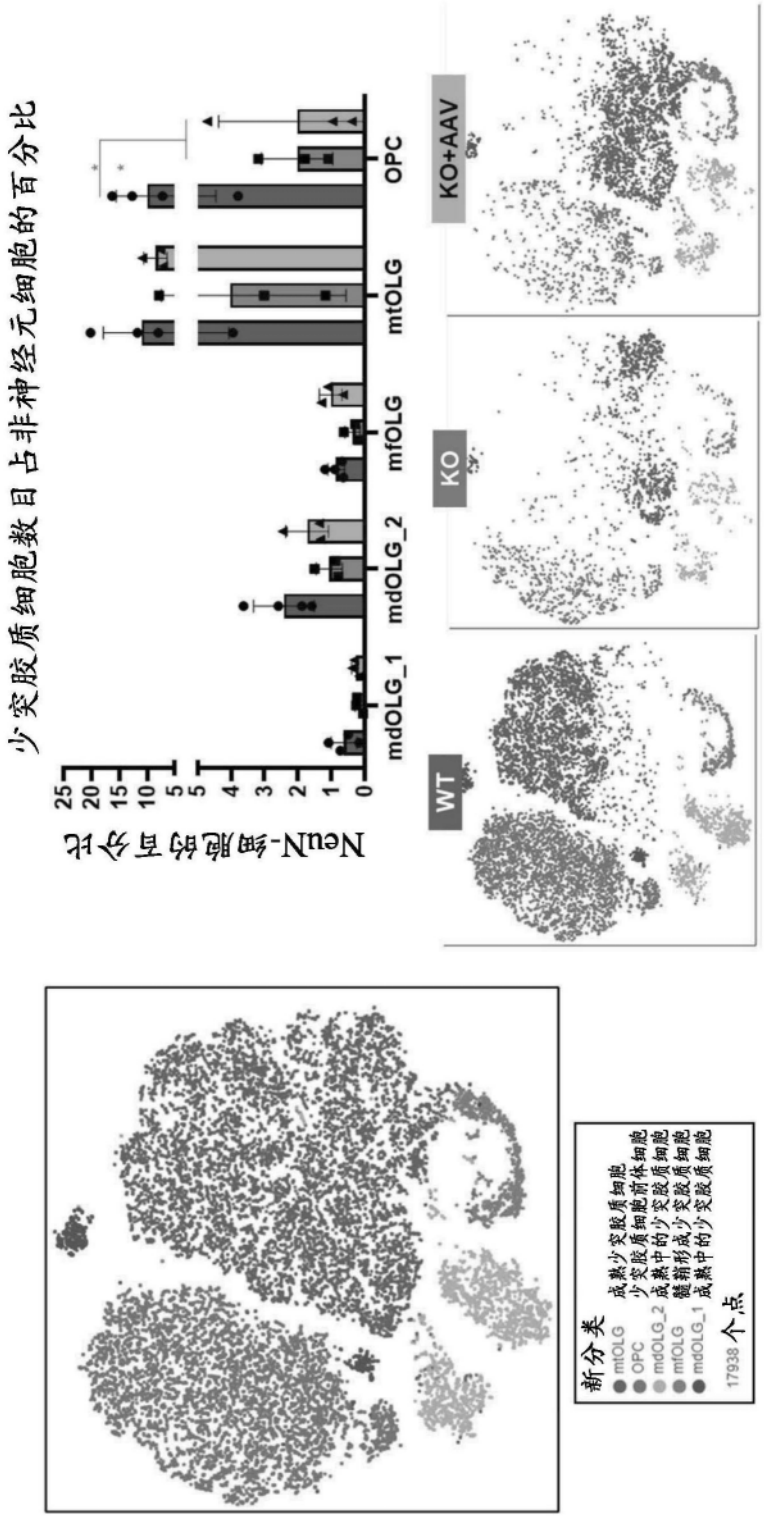

少突胶质细胞数目占非神经元细胞的百分比
NeuN-细胞的百分比
0
1
2
3
4
5
10
15
20
25
mdOLG_1
mdOLG_2
mfOLG
mtOLG
OPC
WT
KO
KO+AAV
新分类
mtOLG 成熟少突胶质细胞
OPC 少突胶质细胞前体细胞
mdOLG_2 少成熟中的少突胶质细胞
mfOLG 髓鞘形成少突胶质细胞
mdOLG_1 成熟中的少突胶质细胞
17938 个点

图5

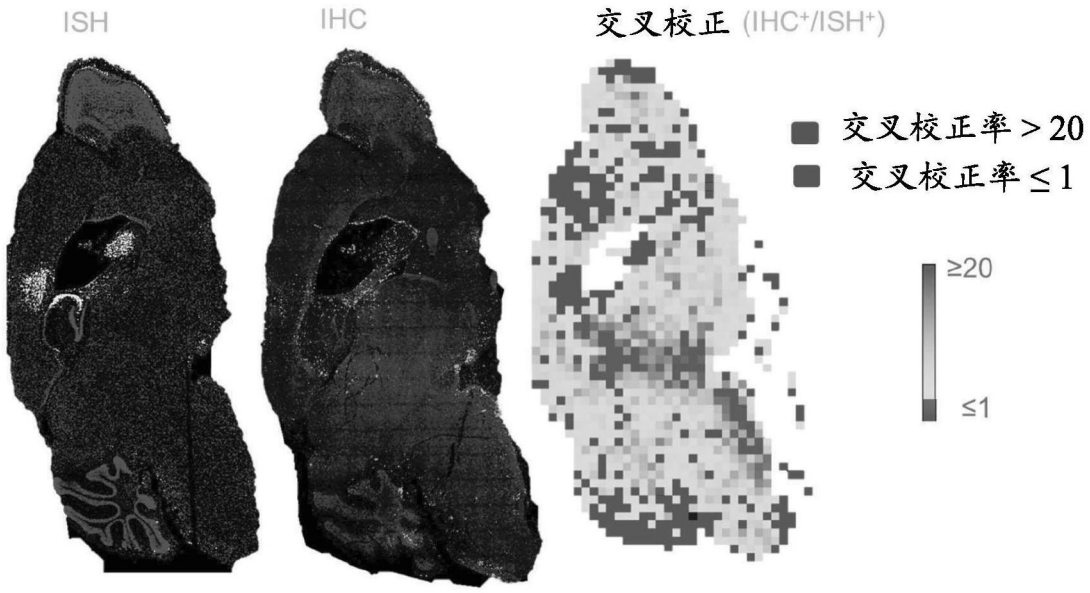

ISH
IHC
交叉校正 (IHC+/ISH+)
交叉校正率 > 20
交叉校正率 ≤ 1
≥20
≤1

图6A

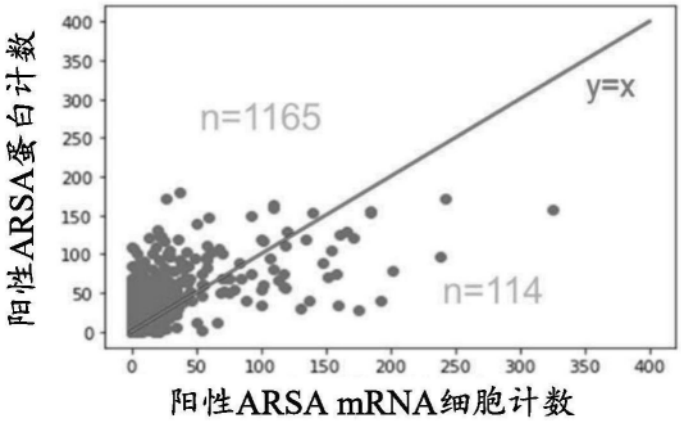

阳性ARSA蛋白计数
阳性ARSA mRNA细胞计数
n=1165
n=114
y=x
0
50
100
150
200
250
300
350
400

图6B

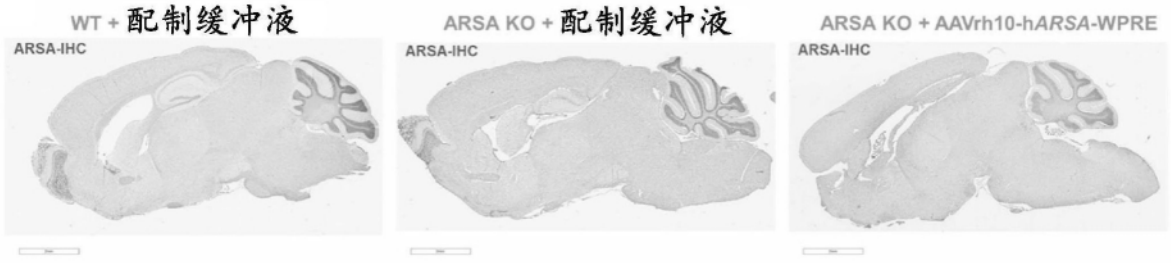

WT + 配制缓冲液
ARSA KO + 配制缓冲液
ARSA KO + AAVrh10-hARSA-WPRE
ARSA-IHC
ARSA-IHC
ARSA-IHC

图7A

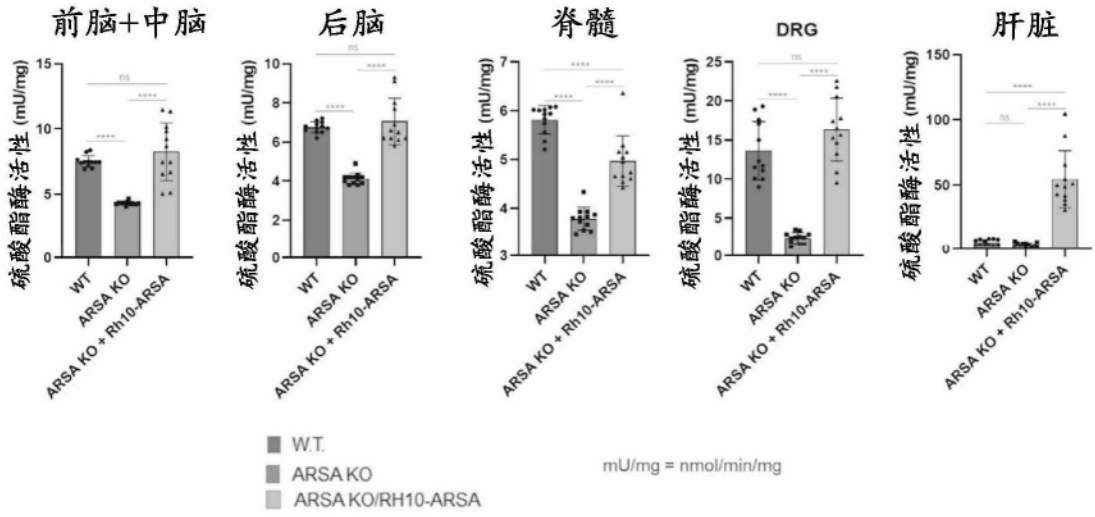

前脑+中脑
后脑
脊髓
DRG
肝脏
硫酸酯酶活性 (mU/mg)
WT
ARSA KO
ARSA KO + Rh10-ARSA
W.T.
ARSA KO
ARSA KO/RH10-ARSA
mU/mg = nmol/min/mg

图7B

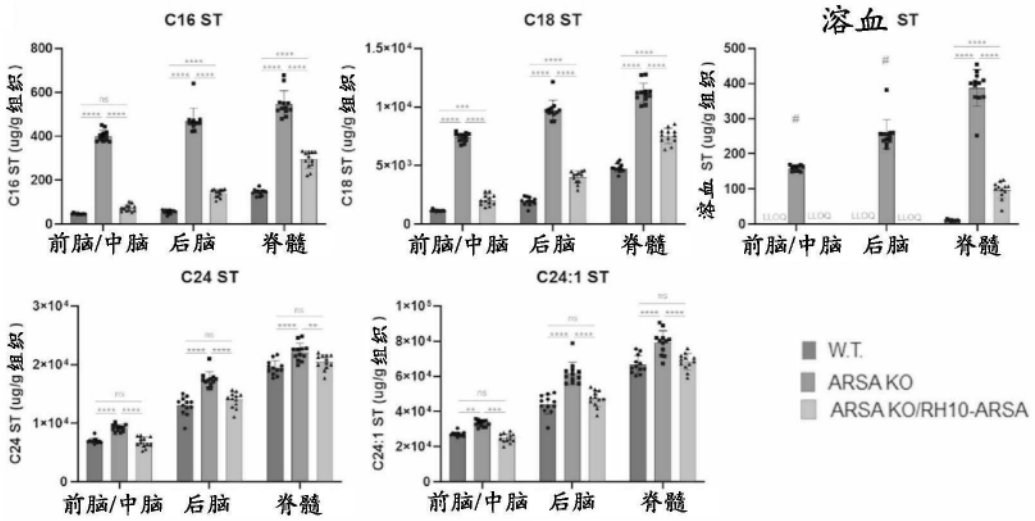

C16 ST
C18 ST
溶血 ST
C24 ST
C24:1 ST
C16 ST (ug/g 组织)
C18 ST (ug/g 组织)
溶血 ST (ug/g 组织)
C24 ST (ug/g 组织)
C24:1 ST (ug/g 组织)
前脑/中脑
后脑
脊髓
W.T.
ARSA KO
ARSA KO/RH10-ARSA

图8A

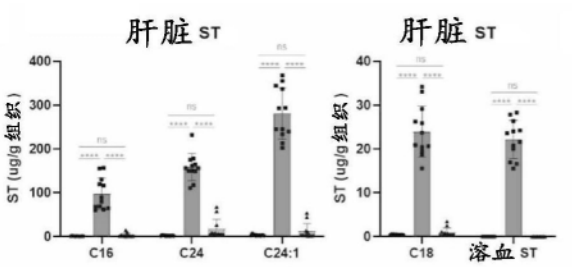
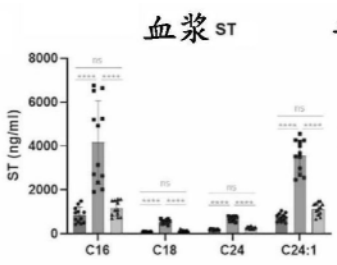


图 8B



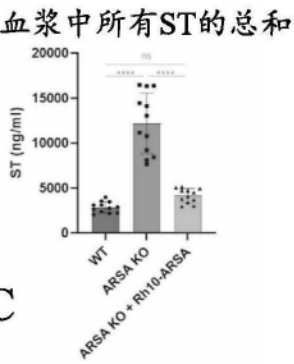
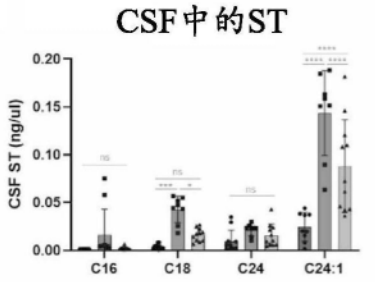


图 8C



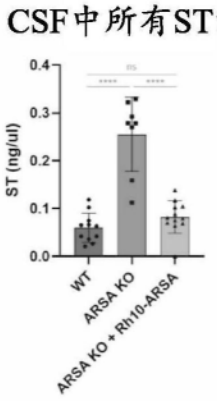
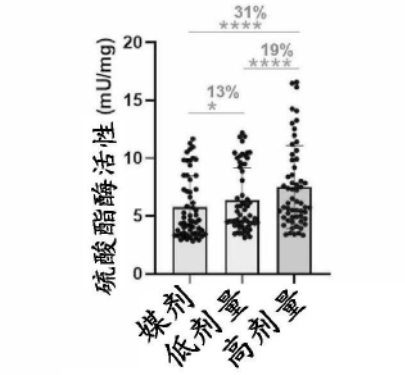


图 8D



硫酸酯酶活性高于背景
>10%的环切样品%
低剂量：59%
高剂量：86%
每个数据点为3个NHP的平均值

图9A

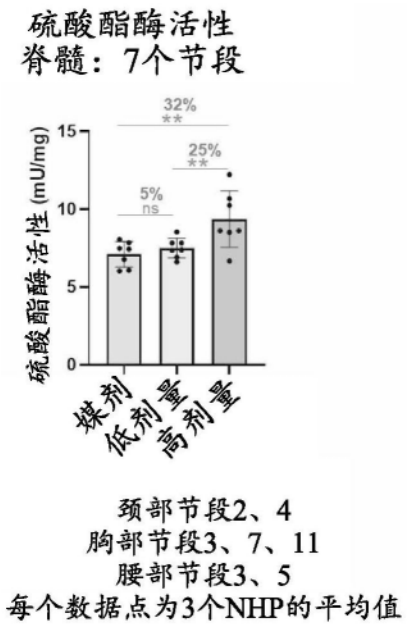

硫酸酯酶活性
脊髓：7个节段
硫酸酯酶活性 (mU/mg)
15
10
5
0
32%
**
25%
**
5%
ns
媒剂
低剂量
高剂量
颈部节段2、4
胸部节段3、7、11
腰部节段3、5
每个数据点为3个NHP的平均值

图9B

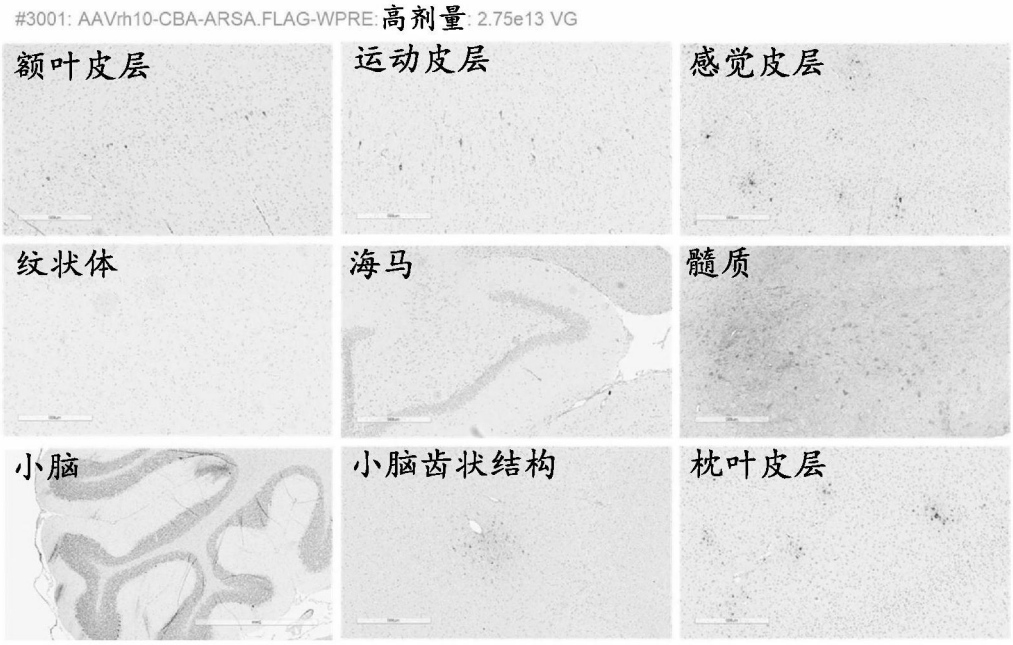

#3001: AAVrh10-CBA-ARSA.FLAG-WPRE: 高剂量: 2.75e13 VG
额叶皮层
运动皮层
感觉皮层
纹状体
海马
髓质
小脑
小脑齿状结构
枕叶皮层

图9C

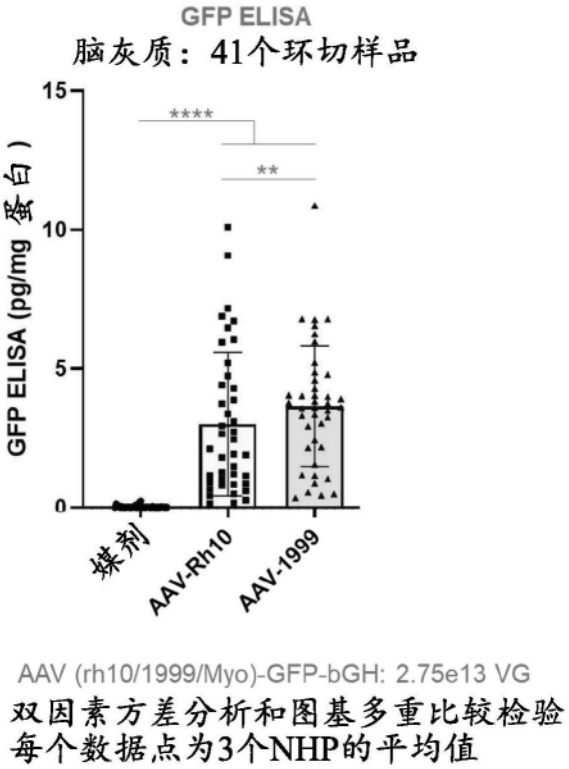

GFP ELISA
脑灰质：41个环切样品
GFP ELISA (pg/mg 蛋白)
15
10
5
0
****
**
媒剂
AAV-Rh10
AAV-1999
AAV (rh10/1999/Myo)-GFP-bGH: 2.75e13 VG
双因素方差分析和图基多重比较检验
每个数据点为3个NHP的平均值

图10A

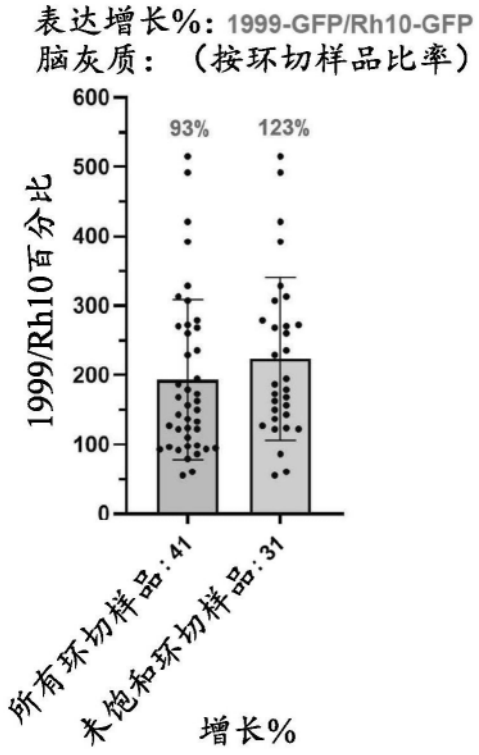

表达增长%：1999-GFP/Rh10-GFP
脑灰质：（按环切样品比率）
1999/Rh10百分比
600
500
400
300
200
100
0
93%
123%
所有环切样品：41
未饱和环切样品：31
增长%

图10B

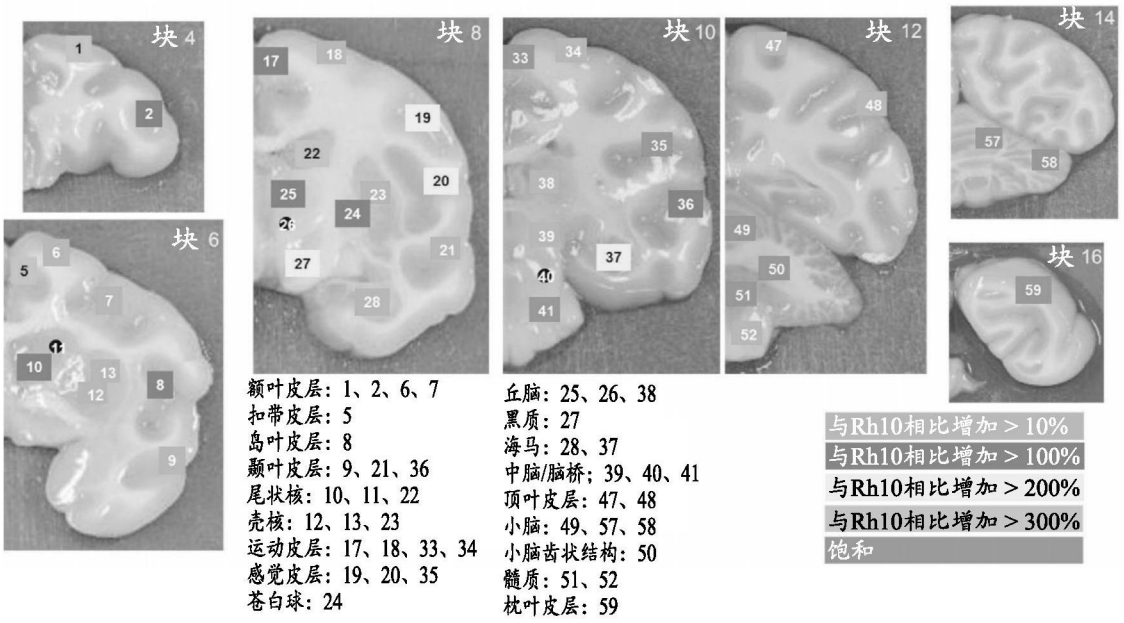

块 4
块 6
块 8
块 10
块 12
块 14
块 16
额叶皮层：1、2、6、7
扣带皮层：5
岛叶皮层：8
颞叶皮层：9、21、36
尾状核：10、11、22
壳核：12、13、23
运动皮层：17、18、33、34
感觉皮层：19、20、35
苍白球：24
丘脑：25、26、38
黑质：27
海马：28、37
中脑/脑桥；39、40、41
顶叶皮层：47、48
小脑：49、57、58
小脑齿状结构：50
髓质：51、52
枕叶皮层：59
与Rh10相比增加＞10%
与Rh10相比增加＞100%
与Rh10相比增加＞200%
与Rh10相比增加＞300%
饱和

图11

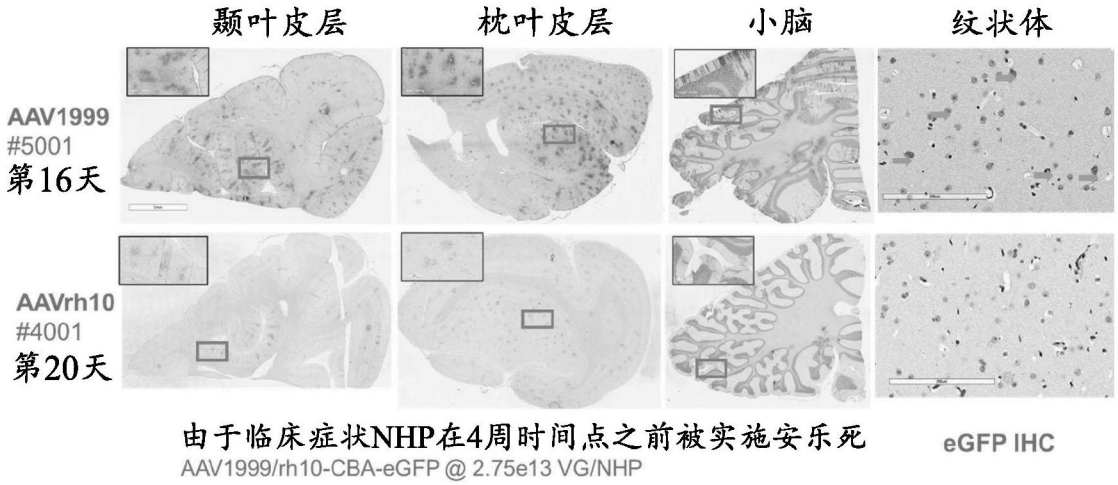

颞叶皮层
枕叶皮层
小脑
纹状体
AAV1999
#5001
第16天
AAVrh10
#4001
第20天
由于临床症状NHP在4周时间点之前被实施安乐死
AAV1999/rh10-CBA-eGFP @ 2.75e13 VG/NHP
eGFP IHC

图12

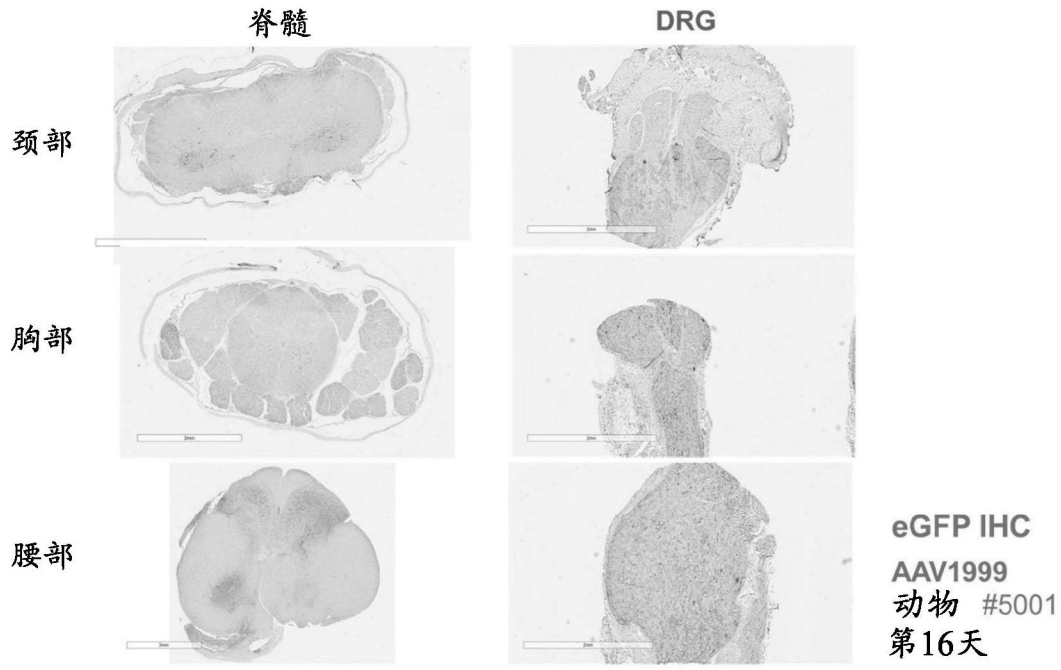

脊髓
DRG
颈部
胸部
腰部
eGFP IHC
AAV1999
动物 #5001
第16天
由于临床症状NHP在4周时间点之前被实施安乐死
AAV1999/rh10-CBA-eGFP @ 2.75e13 VG/NHP

图13

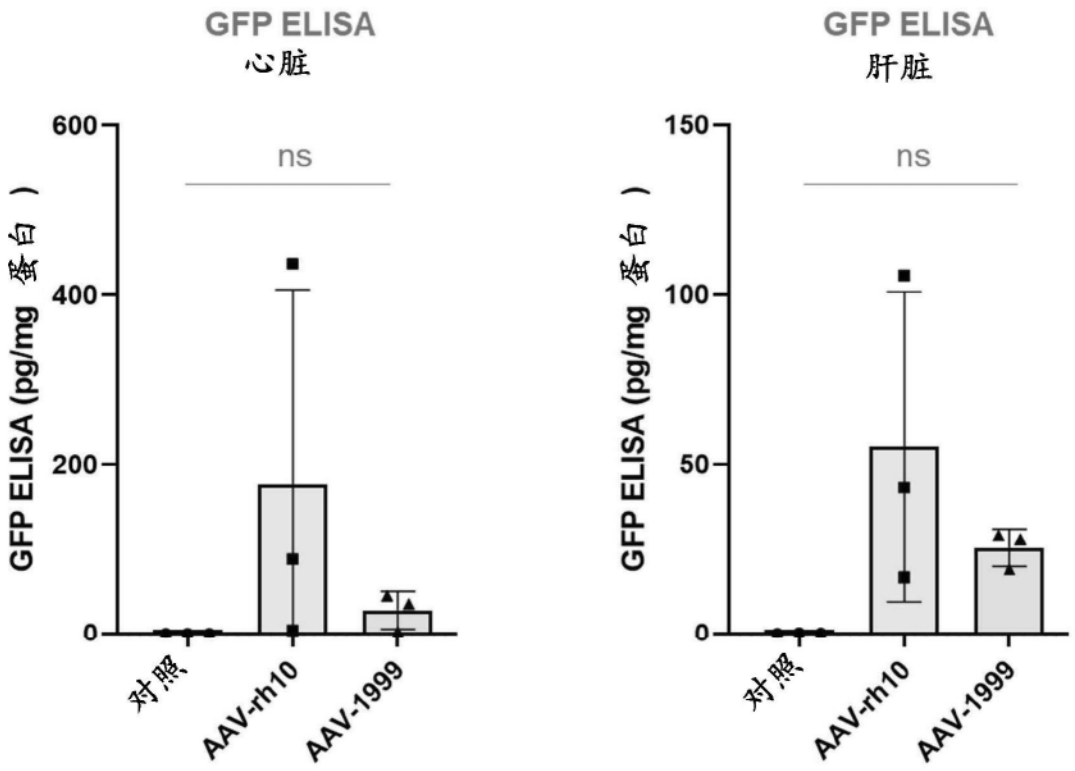

GFP ELISA
心脏
GFP ELISA (pg/mg 蛋白)
600
400
200
0
ns
对照
AAV-rh10
AAV-1999
GFP ELISA
肝脏
GFP ELISA (pg/mg 蛋白)
150
100
50
0
ns
对照
AAV-rh10
AAV-1999
AAV (rh10/1999/Myo)-GFP-bGH: 2.75e13 VG
单因素方差分析和图基多重比较检验
每个数据点为3个NHP的平均值

图14

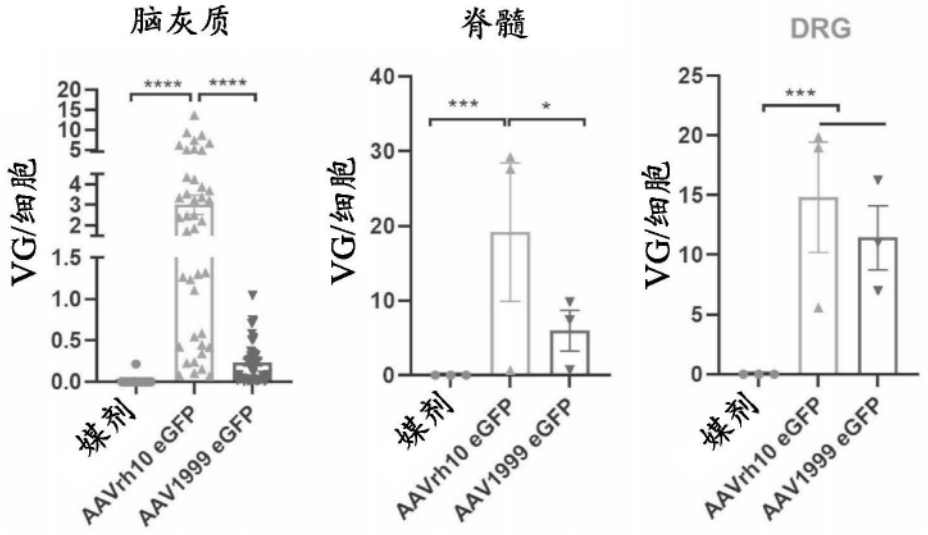

脑灰质
VG/细胞
****
****
20
15
10
5
4
3
2
1.5
1.0
0.5
0.0
媒剂
AAVrh10 eGFP
AAV1999 eGFP
脊髓
VG/细胞
***
*
40
30
20
10
0
媒剂
AAVrh10 eGFP
AAV1999 eGFP
DRG
VG/细胞
***
25
20
15
10
5
0
媒剂
AAVrh10 eGFP
AAV1999 eGFP

图15A

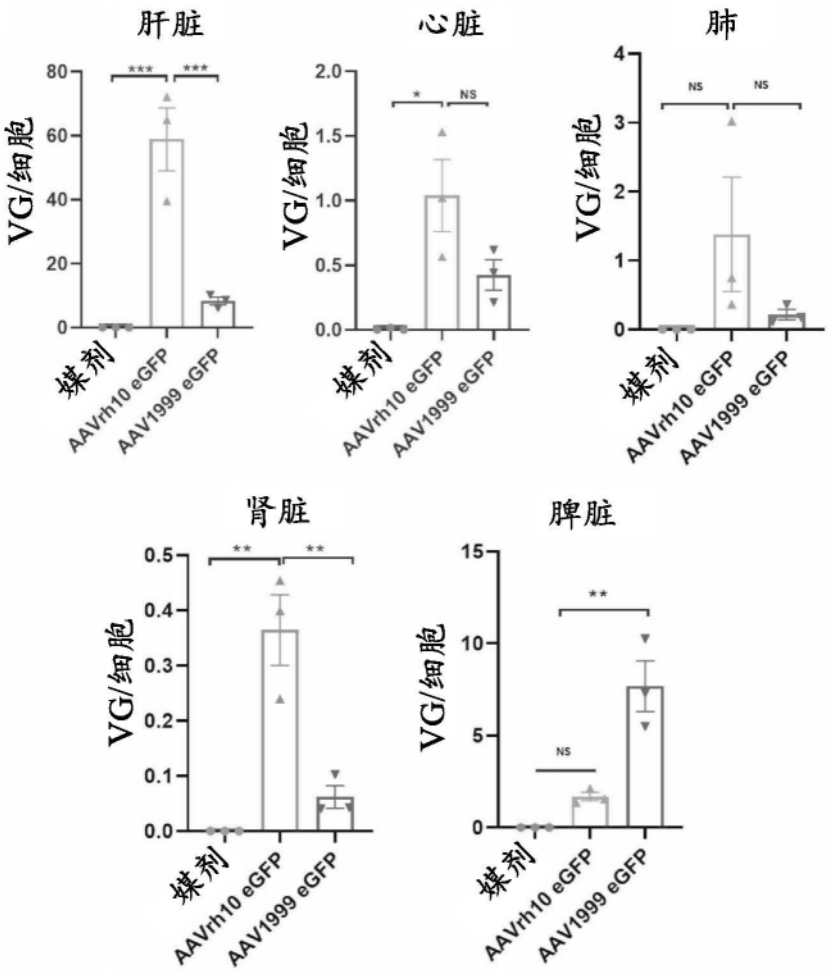

肝脏
心脏
肺
肾脏
脾脏
VG/细胞
媒剂
AAVrh10 eGFP
AAV1999 eGFP
***
*
NS
**

图15B

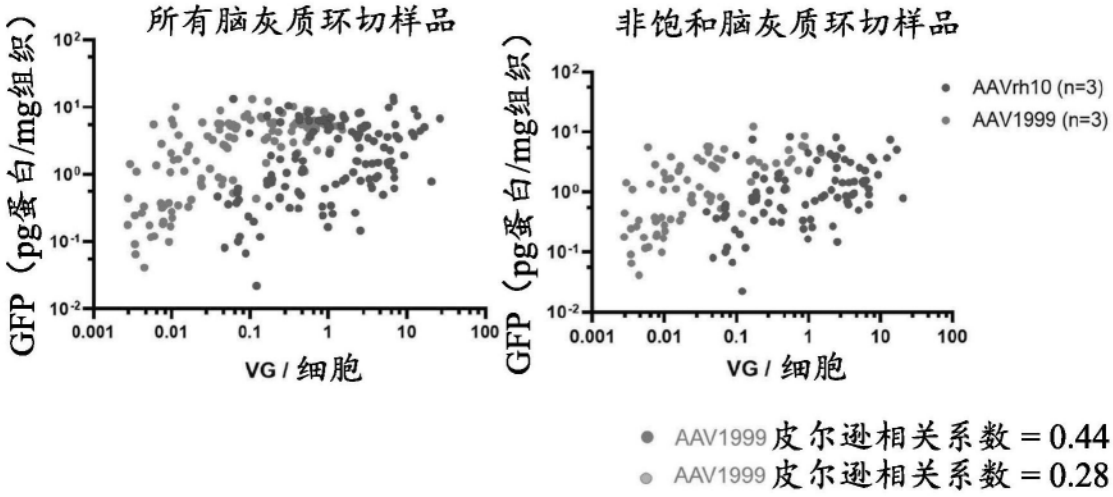

所有脑灰质环切样品
非饱和脑灰质环切样品
GFP（pg蛋白/mg组织）
VG / 细胞
AAVrh10 (n=3)
AAV1999 (n=3)
AAV1999 皮尔逊相关系数 = 0.44
AAV1999 皮尔逊相关系数 = 0.28

图16

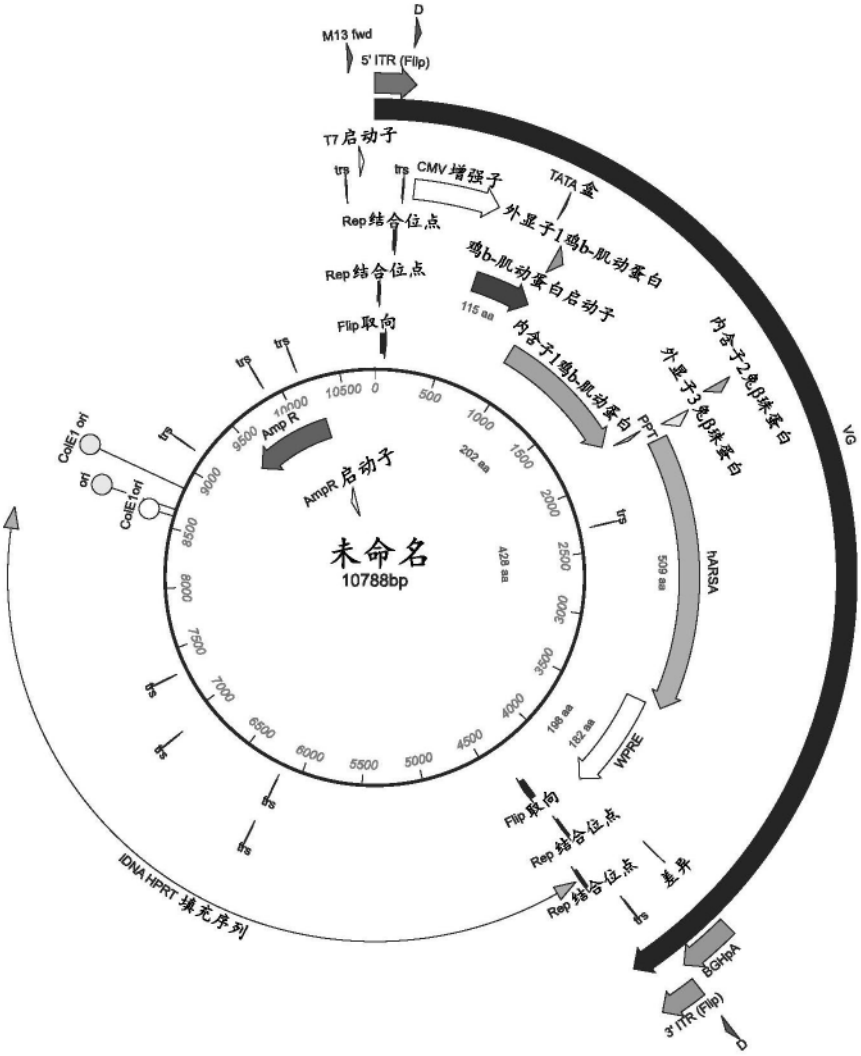

未命名
10788bp
M13 fwd
5' ITR (Flip)
D
T7启动子
trp
trs
CMV增强子
TATA盒
外显子1鸡b-肌动蛋白
Rep结合位点
Rep结合位点
鸡b-肌动蛋白启动子
115 aa
Flip取向
内含子1鸡b-肌动蛋白
外显子2兔β珠蛋白
外显子3兔β珠蛋白
VG
PPT
hARSA
509 aa
WPRE
168 aa
162 aa
AmpR启动子
Amp R
ori
ColE1 ori
ColE1ori
428 aa
202 aa
Flip取向
Rep结合位点
Rep结合位点
差异
BGHpA
3' ITR (Flip)
D
IDNA HPRT 填充序列

图17

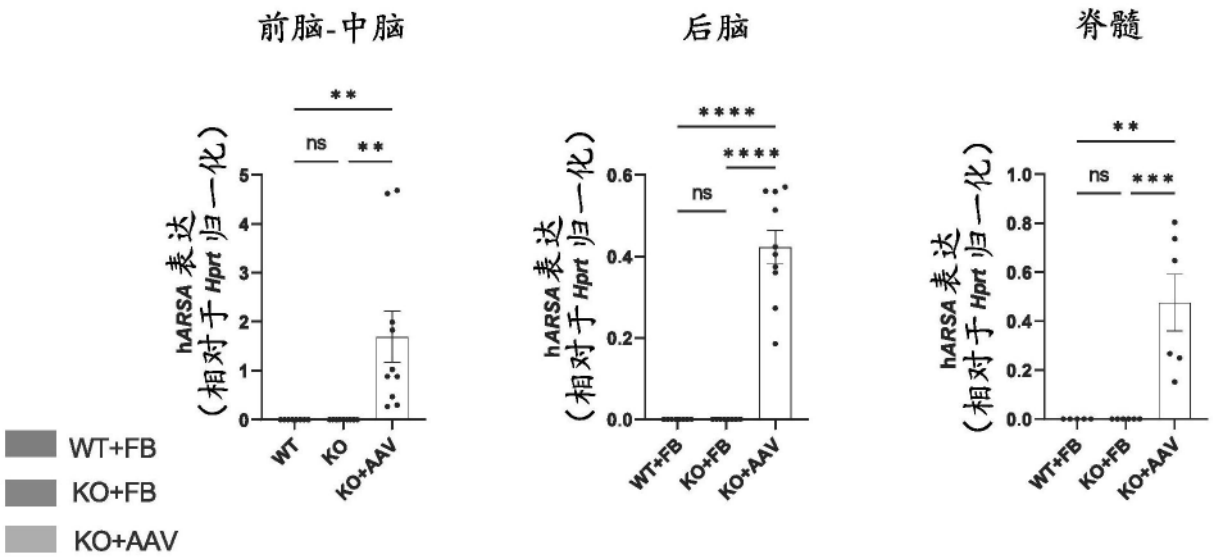

前脑-中脑
后脑
脊髓
hARSA 表达
（相对于 Hprt 归一化）
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
WT
KO
ns

图18

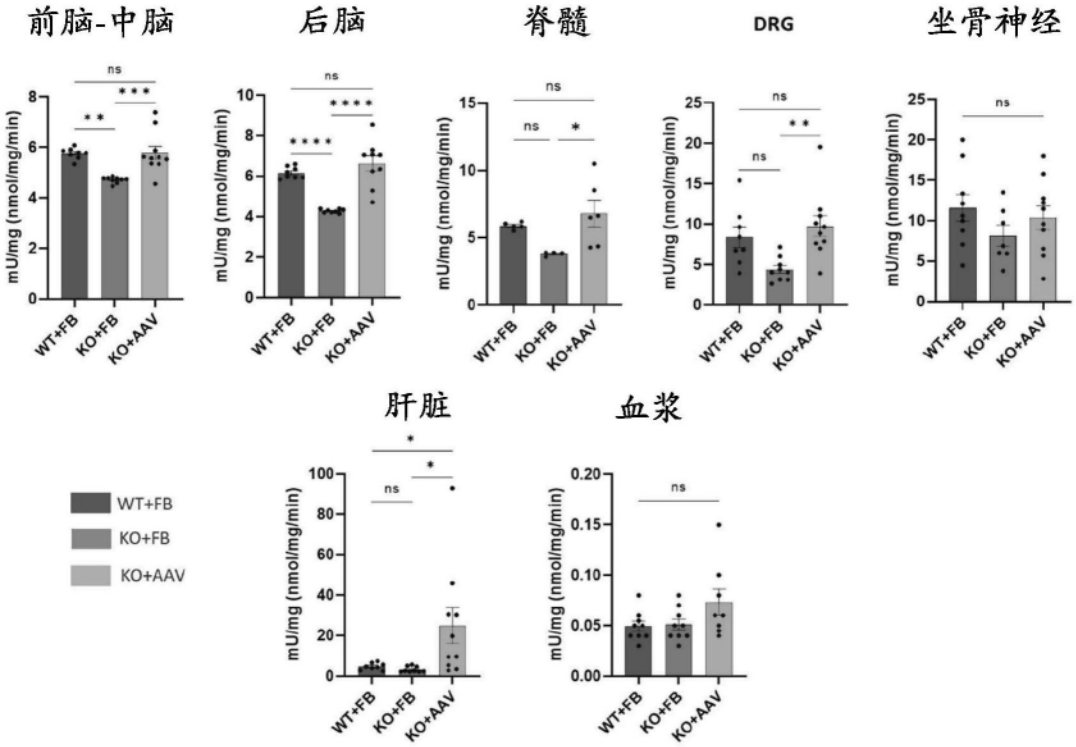

前脑-中脑
后脑
脊髓
DRG
坐骨神经
肝脏
血浆
mU/mg (nmol/mg/min)
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
ns

图19

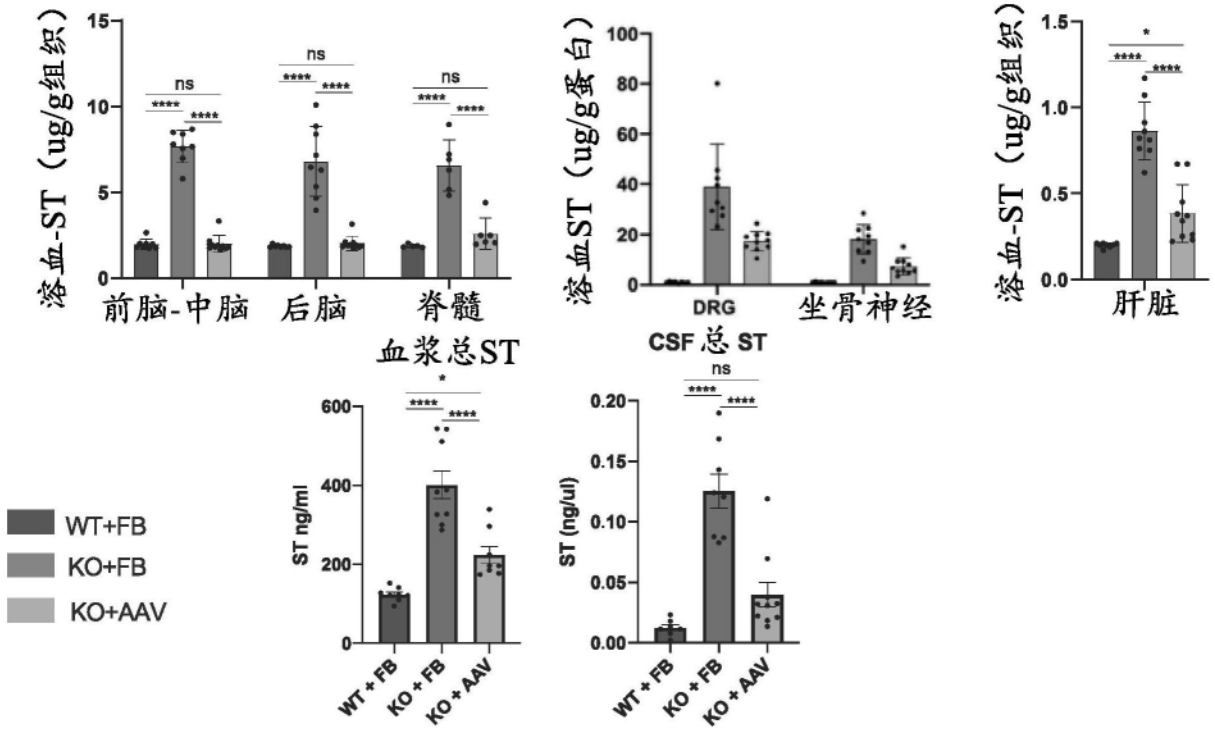

溶血-ST（ug/g组织）
前脑-中脑
后脑
脊髓
溶血ST（ug/g蛋白）
DRG
坐骨神经
CSF 总 ST
溶血-ST（ug/g组织）
肝脏
血浆总ST
ST ng/ml
ST (ng/ul)
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
WT + FB
KO + FB
KO + AAV
ns
*
****

图20

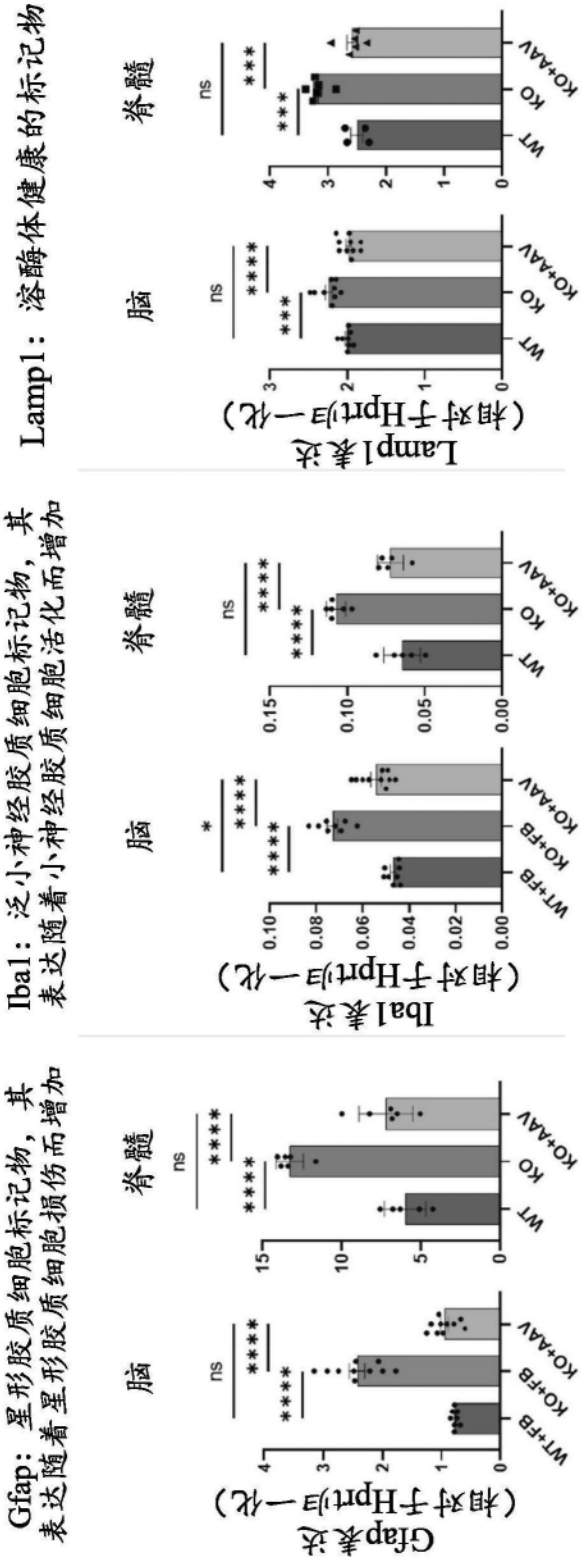

Gfap：星形胶质细胞标记物，其表达随着星形胶质细胞损伤而增加
Gfap表达（相对于Hprt以一化）
脑
脊髓
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
WT
KO
KO+AAV
Iba1：泛小神经胶质细胞标记物，其表达随着小神经胶质细胞活化而增加
Iba1表达（相对于Hprt以一化）
脑
脊髓
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
WT
KO
KO+AAV
Lamp1：溶酶体健康的标记物
Lamp1表达（相对于Hprt以一化）
脑
脊髓
WT
KO
KO+AAV

图21

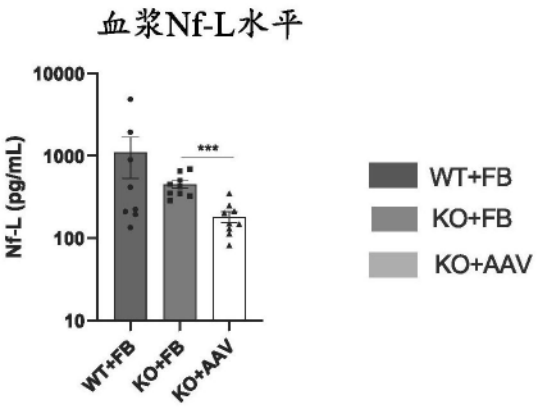

血浆Nf-L水平
Nf-L (pg/mL)
10000
1000
100
10
***
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
WT+FB
KO+FB
KO+AAV

图22

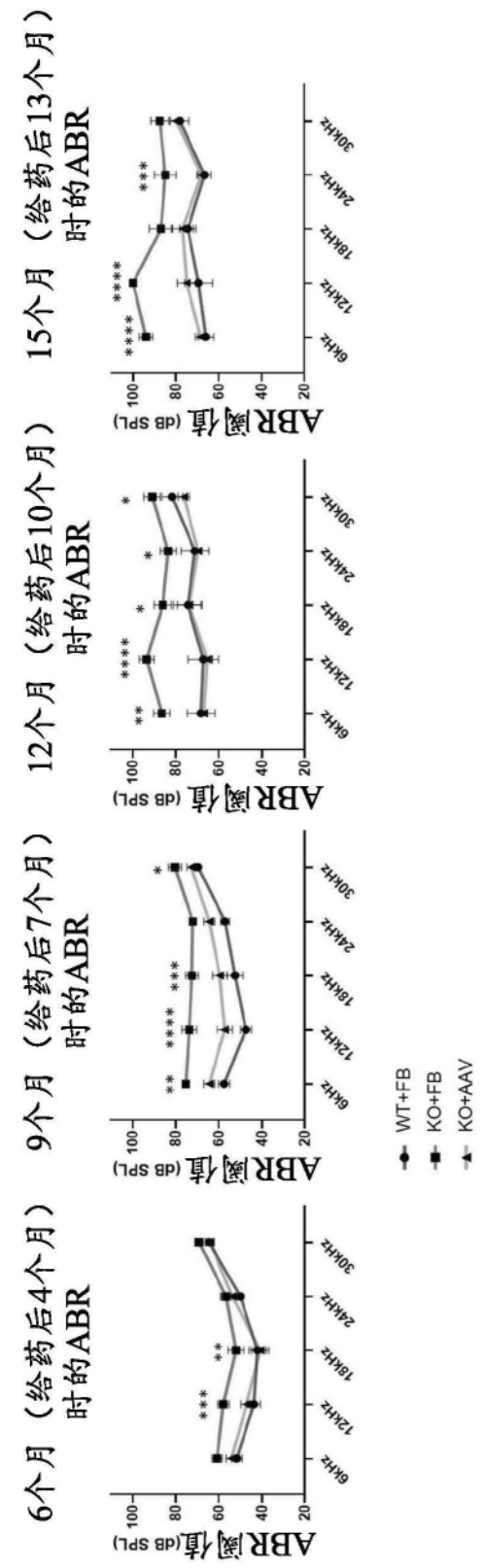

6个月（给药后4个月）时的ABR
9个月（给药后7个月）时的ABR
12个月（给药后10个月）时的ABR
15个月（给药后13个月）时的ABR
ABR阈值(dB SPL)
6kHz
12kHz
18kHz
24kHz
30kHz
WT+FB
KO+FB
KO+AAV

图23

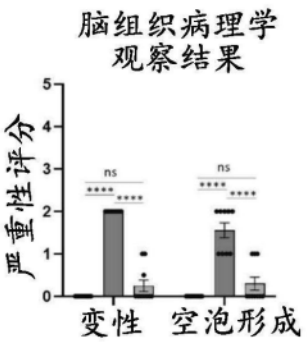


图 24A

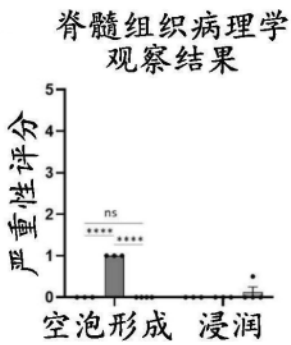


图 24B

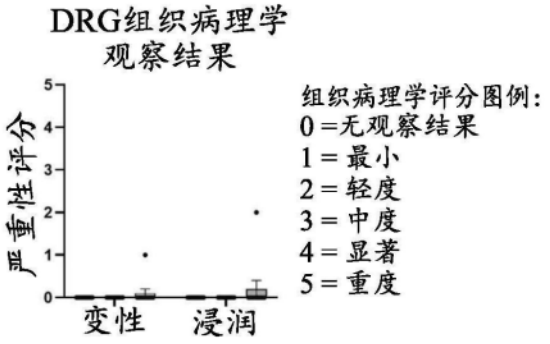
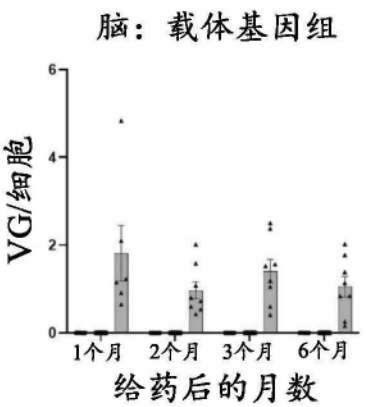


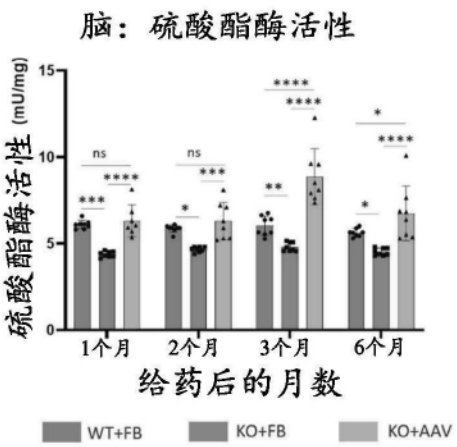
图 24C

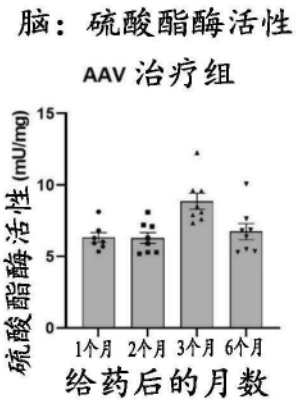
图 25A

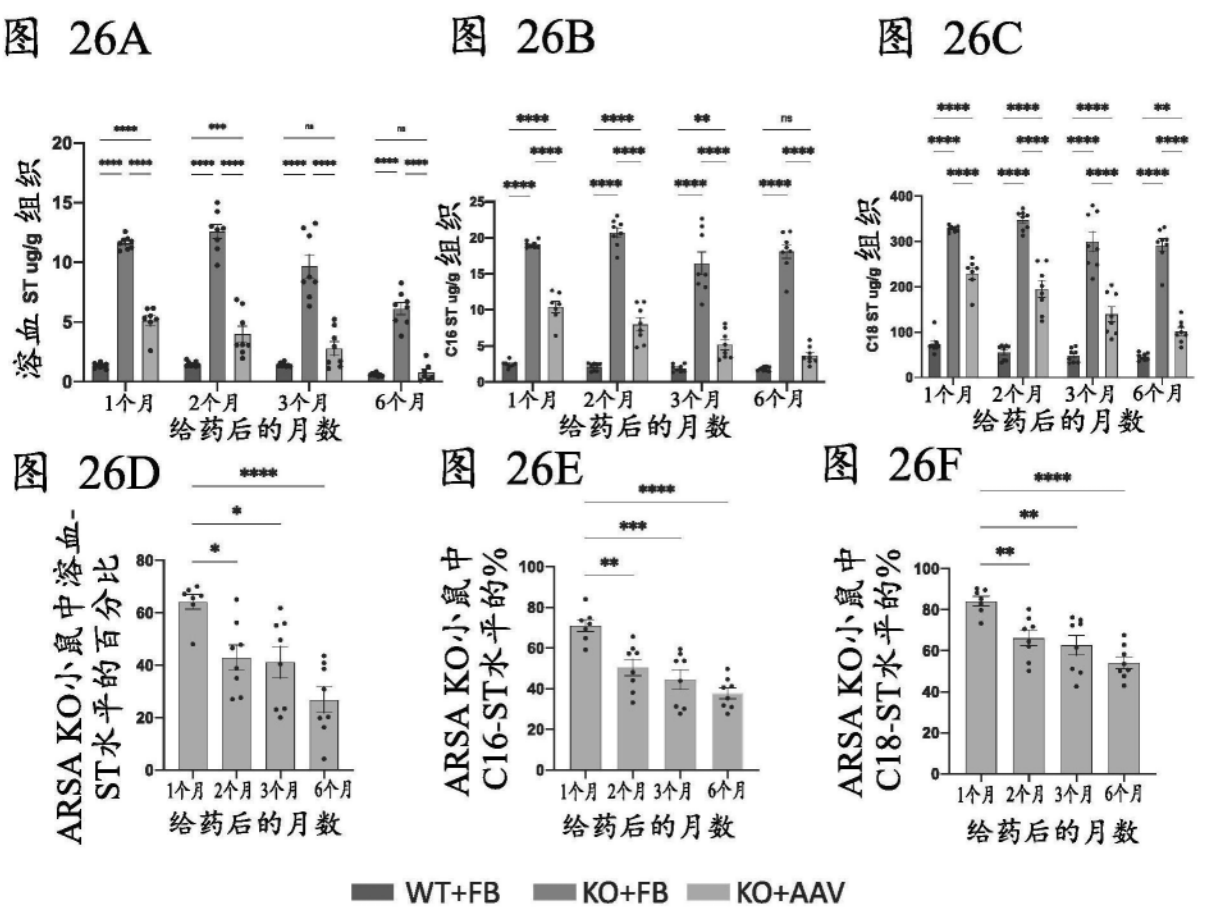
图 25B

图 25C








图 26A
图 26B
图 26C
溶血 ST ug/g 组织
C16 ST ug/g 组织
C18 ST ug/g 组织
1个月 2个月 3个月 6个月
给药后的月数
图 26D
图 26E
图 26F
ARSA KO小鼠中溶血-ST水平的百分比
ARSA KO小鼠中C16-ST水平的%
ARSA KO小鼠中C18-ST水平的%
WT+FB KO+FB KO+AAV

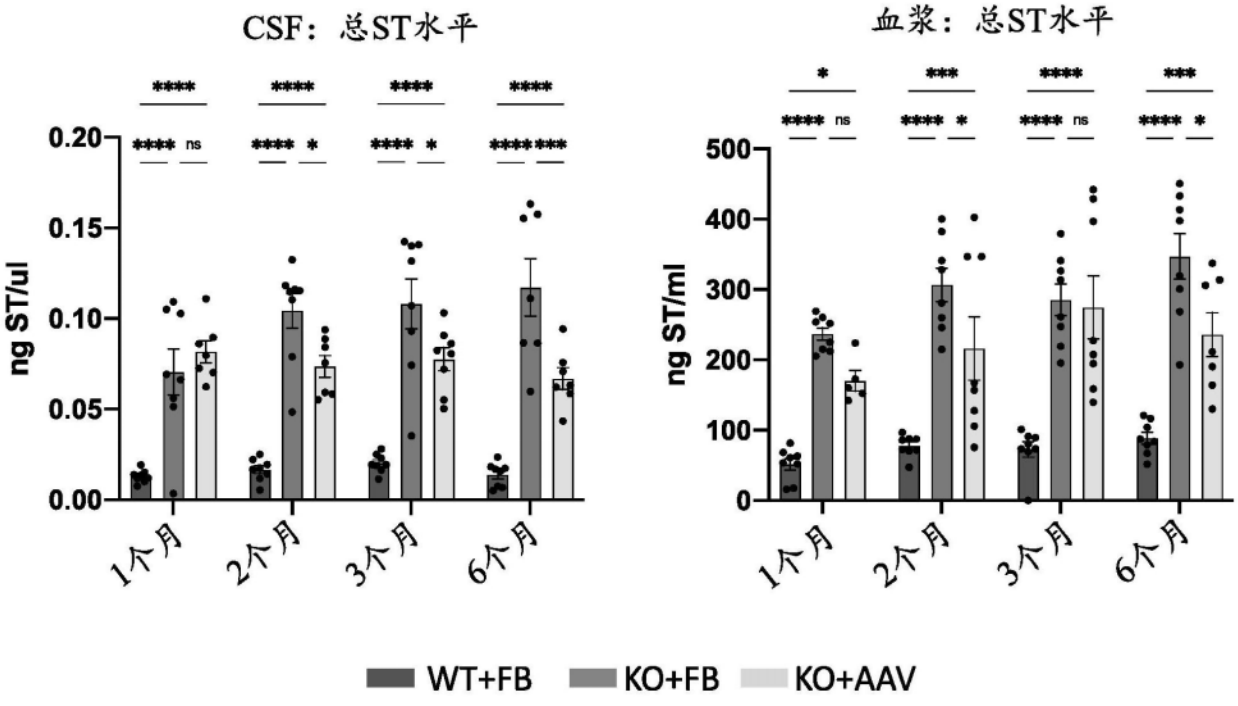

CSF：总ST水平
血浆：总ST水平
ng ST/ul
ng ST/ml
1个月 2个月 3个月 6个月
WT+FB KO+FB KO+AAV

图27

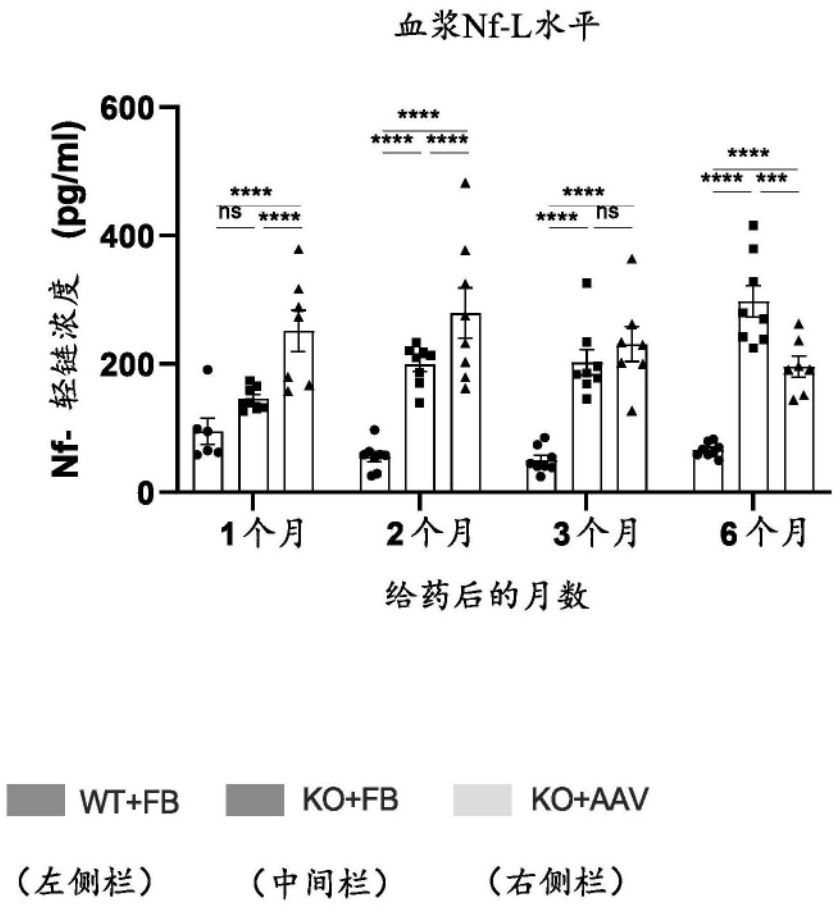

血浆Nf-L水平
Nf- 轻链浓度 (pg/ml)
600
400
200
0
****
ns
****
****
****
****
****
****
ns
****
****
***
1个月
2个月
3个月
6个月
给药后的月数
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
（左侧栏）
（中间栏）
（右侧栏）

图28

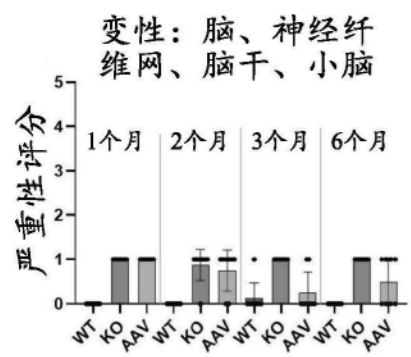


图 29A

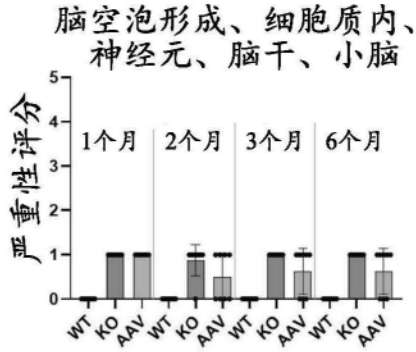


图 29B

组织病理学评分图例：
0 = 无观察结果
1 = 最小
2 = 轻度
3 = 中度
4 = 显著
5 = 重度

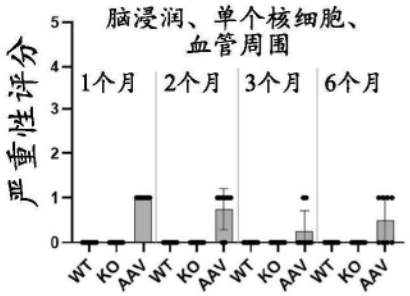


图 29C

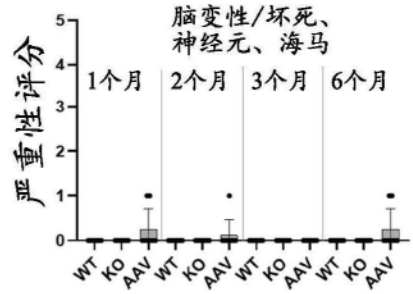


图 29D

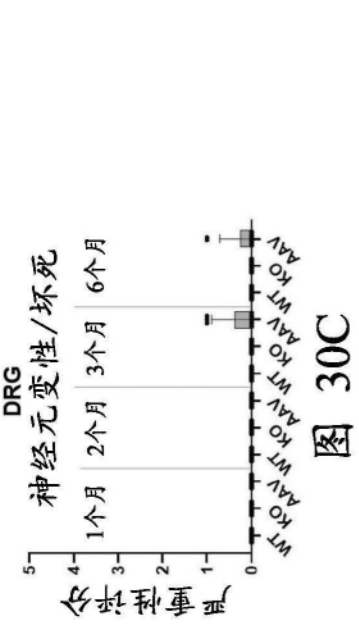


图 30A

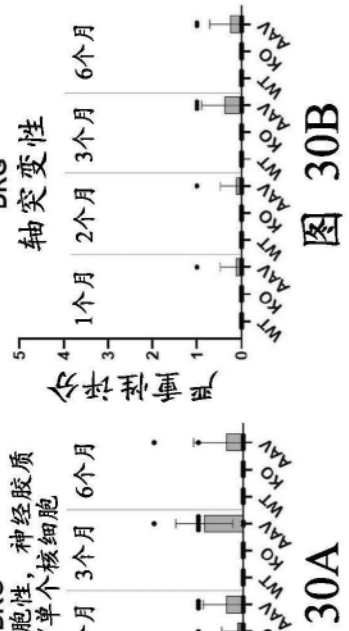


图 30B



图 30C

图 30D



图 30E

组织病理学评分图例：
0 = 无观察结果
1 = 最小
2 = 轻度
3 = 中度
4 = 显著
5 = 重度

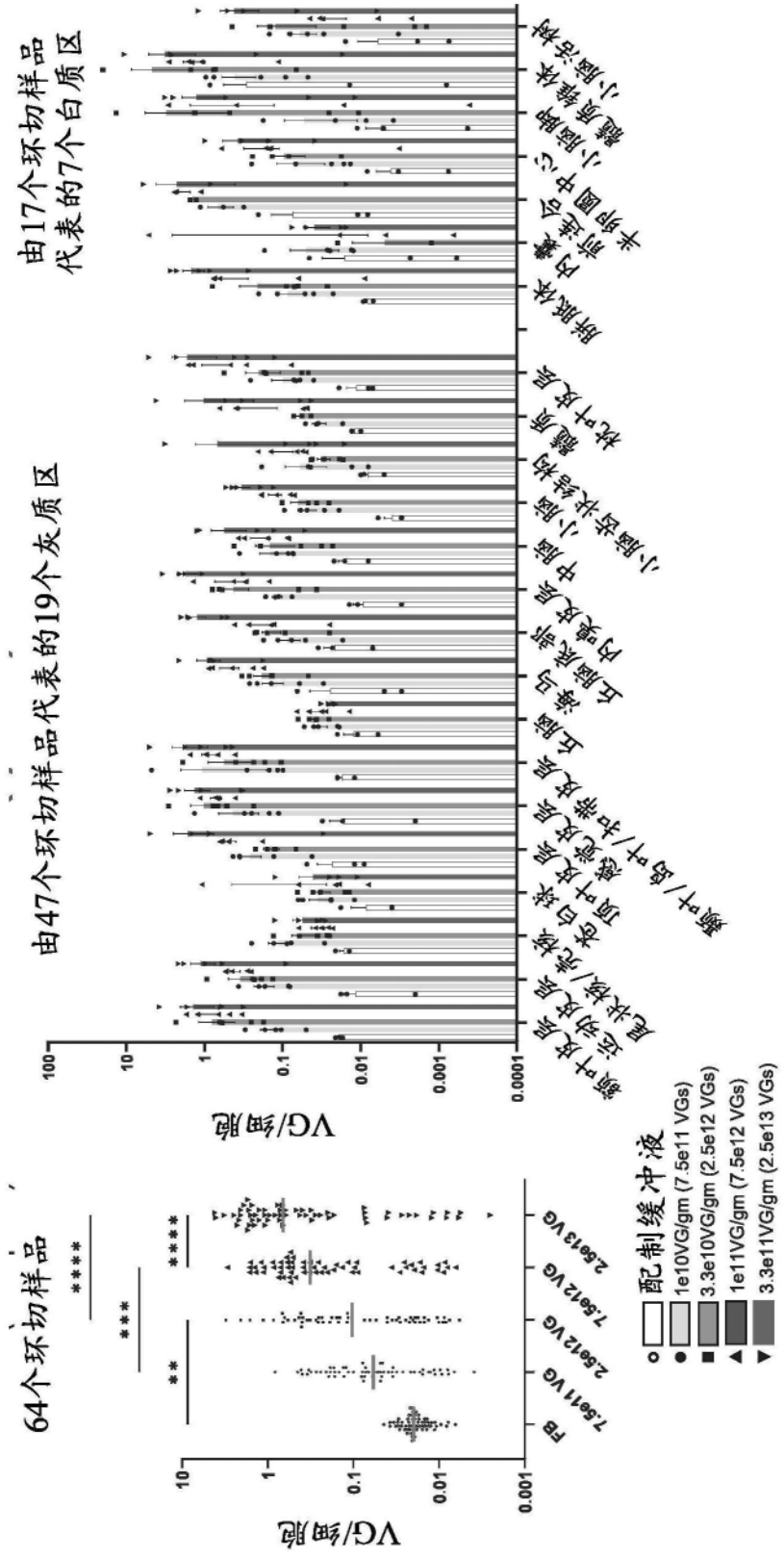

由17个环切样品
代表的7个白质区
由47个环切样品代表的19个灰质区
64个环切样品
VG/细胞
配制缓冲液
1e10VG/gm (7.5e11 VGs)
3.3e10VG/gm (2.5e12 VGs)
1e11VG/gm (7.5e12 VGs)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs)
PB
7.5e11 VG
2.5e12 VG
7.5e12 VG
2.5e13 VG

图31

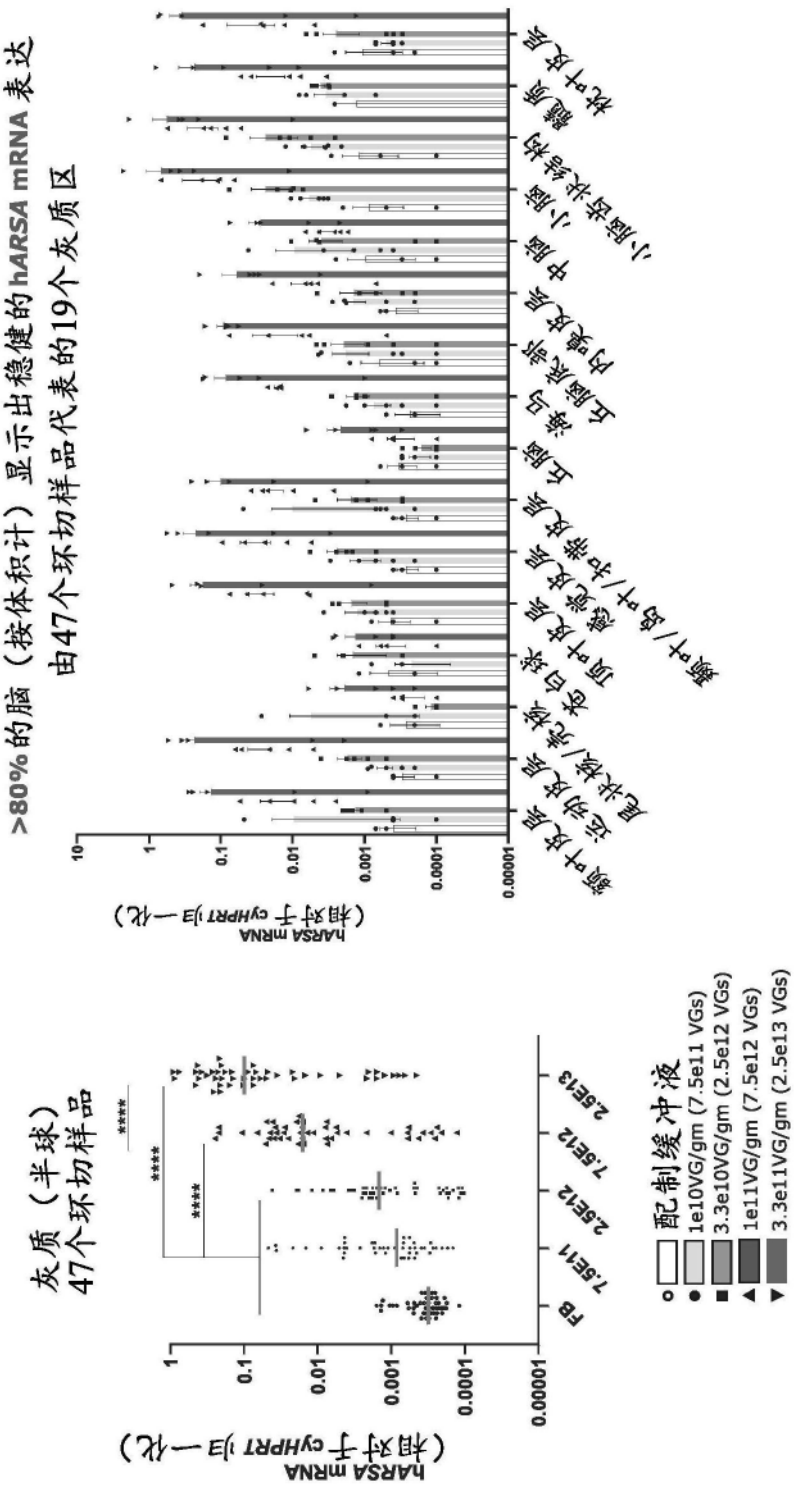

>80%的脑（按体积计）显示出稳健的hARSA mRNA表达
由47个环切样品代表的19个灰质区
hARSA mRNA（相对于cyHPRT对照）
灰质（半球）
47个环切样品
FB
7.5E11
2.5E12
7.5E12
2.5E13
配制缓冲液
1e10VG/gm (7.5e11 VGs)
3.3e10VG/gm (2.5e12 VGs)
1e11VG/gm (7.5e12 VGs)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs)

图32

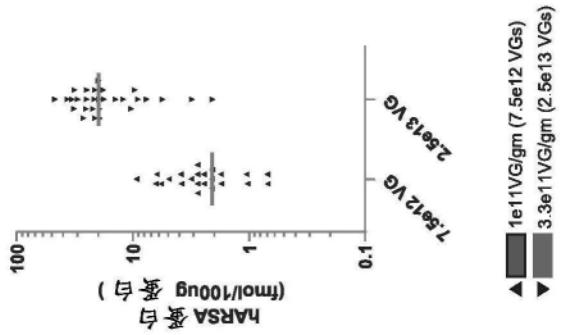

hARSA 蛋白
(fmol/100ug 蛋白)
100
10
1
0.1
7.5e12 VG
2.5e13 VG
1e11VG/gm (7.5e12 VGs)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs)

图33A

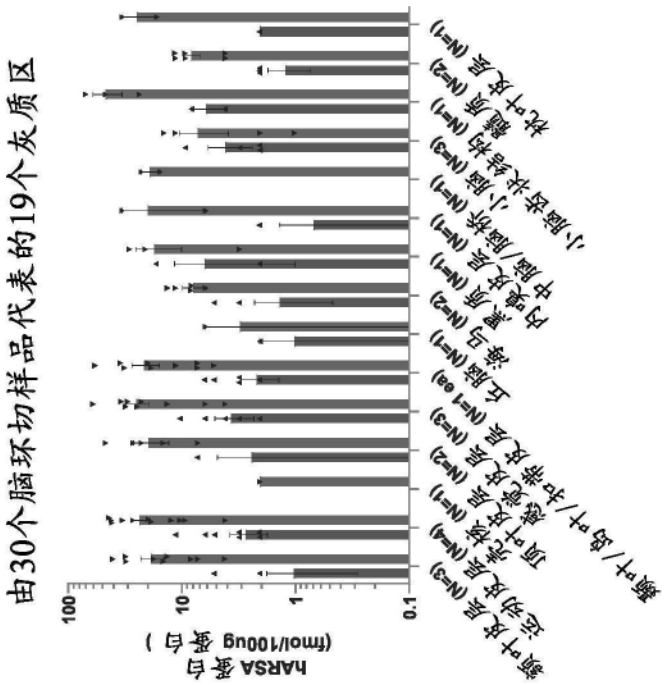

由30个脑环切样品代表的19个灰质区
hARSA 蛋白
(fmol/100ug 蛋白)
100
10
1
0.1
额叶皮层 (N=3)
岛叶皮层 (N=1)
顶叶皮层 (N=1)
颞叶皮层 (N=2)
枕叶皮层 (N=2)
丘脑 (N=1 ea)
海马 (N=2)
内嗅皮层 (N=1)
中脑/脑桥 (N=1)
小脑皮层 (N=2)
小脑齿状核 (N=1)
杏仁核 (N=2)
纹状体 (N=1)
额叶/岛叶/扣带皮层 (N=1 ea)

图33B

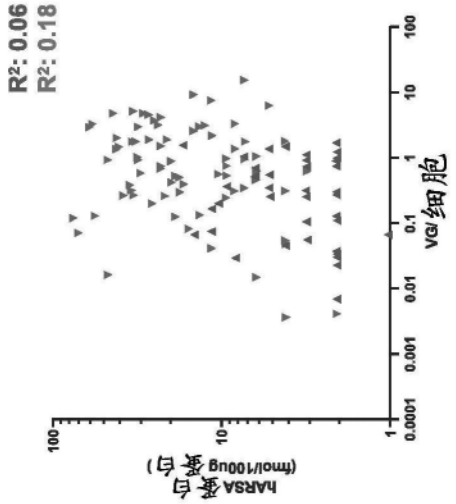

R²: 0.06
R²: 0.18
hARSA蛋白
(fmol/100ug蛋白)
VG/细胞
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001

图33C

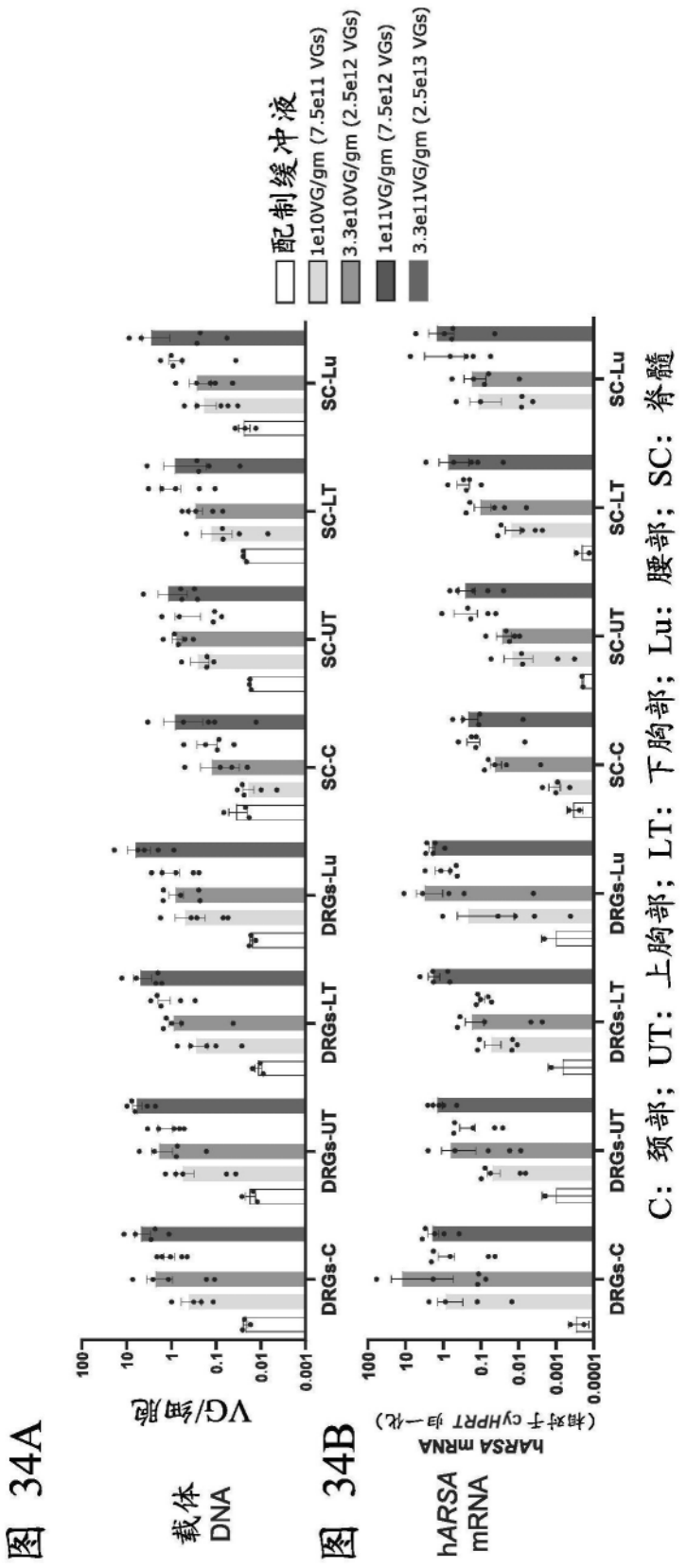

配制缓冲液
1e10VG/gm (7.5e11 VGs)
3.3e10VG/gm (2.5e12 VGs)
1e11VG/gm (7.5e12 VGs)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs)
VG/细胞
载体 DNA
hARSA mRNA
(相对于 cyHPRT 归一化)
DRGs-C
DRGs-UT
DRGs-LT
DRGs-Lu
SC-C
SC-UT
SC-LT
SC-Lu
C：颈部；UT：上胸部；LT：下胸部；Lu：腰部；SC：脊髓

图 34A

图 34B

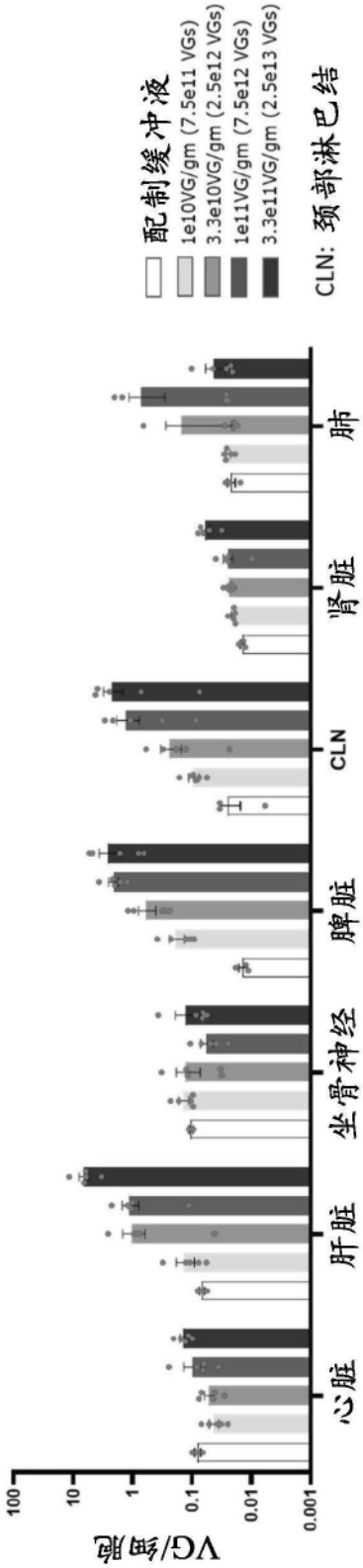

配制缓冲液
1e10VG/gm (7.5e11 VGs)
3.3e10VG/gm (2.5e12 VGs)
1e11VG/gm (7.5e12 VGs)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs)
CLN: 颈部淋巴结
VG/细胞
100
10
1
0.1
0.01
0.001
心脏
肝脏
坐骨神经
脾脏
CLN
肾脏
肺

图35

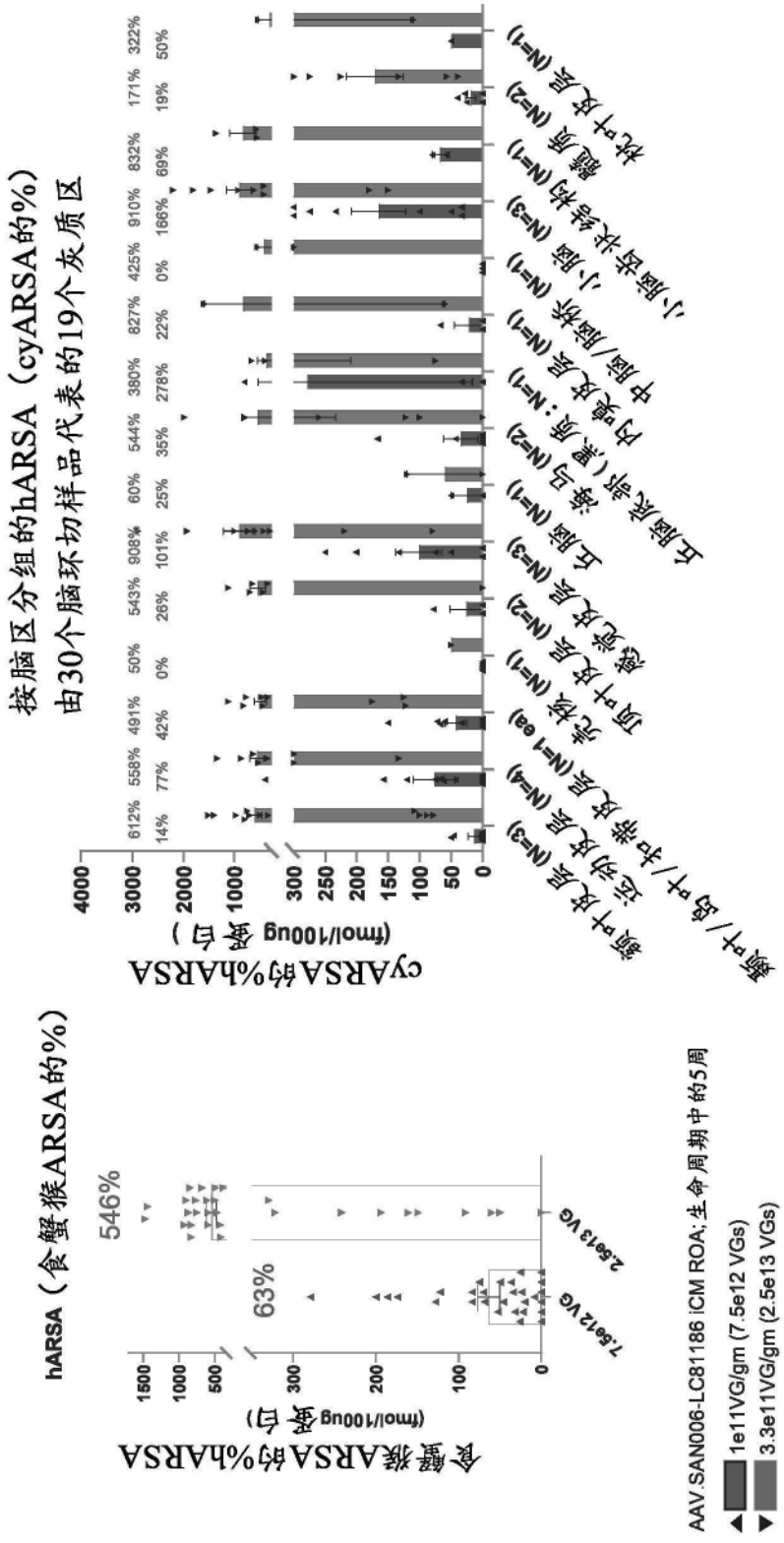

按脑区分组的hARSA（cyARSA的%）
由30个脑环切样品代表的19个灰质区
cyARSA的%hARSA
(fmol/100ug 蛋白)
4000
3000
2000
1000
300
250
200
150
100
50
0
612%
14%
558%
77%
491%
42%
50%
0%
543%
26%
908%
101%
60%
25%
544%
35%
380%
278%
827%
22%
425%
0%
910%
166%
832%
69%
171%
19%
322%
50%
额叶灰质 (N=3)
运动皮质 (N=4)
视觉皮质 (N=1 ea)
海马 (N=1)
顶叶灰质 (N=2)
颞叶皮质 (N=3)
丘脑 (N=1)
黑质 (N=2)
白质聚集 (深部 : N=1)
内囊及外囊 (N=1)
中脑/脑桥 (N=1)
小脑皮质 (N=3)
小脑齿状核 (N=1)
髓质 (N=2)
枕叶灰质 (N=1)
额叶/岛叶/扣带皮质 (N=1)
食蟹猴ARSA的%hARSA
(fmol/100ug 蛋白)
1500
1000
500
300
200
100
0
546%
63%
7.5e12 VG
2.5e13 VG
hARSA（食蟹猴ARSA的%）
AAV.SAN006-LC81186 iCM ROA; 生命周期中的5周
1e11VG/gm (7.5e12 VGs)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs)

图36

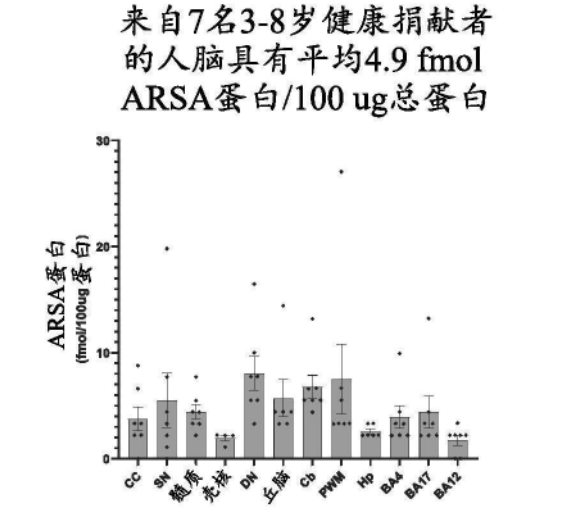

来自7名3-8岁健康捐献者
的人脑具有平均4.9 fmol
ARSA蛋白/100 ug总蛋白
ARSA蛋白
(fmol/100ug 蛋白)
30
20
10
0
CC
SN
髓质
壳核
DN
丘脑
Cb
PWM
Hp
BA4
BA17
BA12
BA，布罗德曼分区；CC，胼胝体；
Cb，小脑；DN，齿状核；Hp，海马；
PWM，脑室周围白质；SN，黑质

图37A

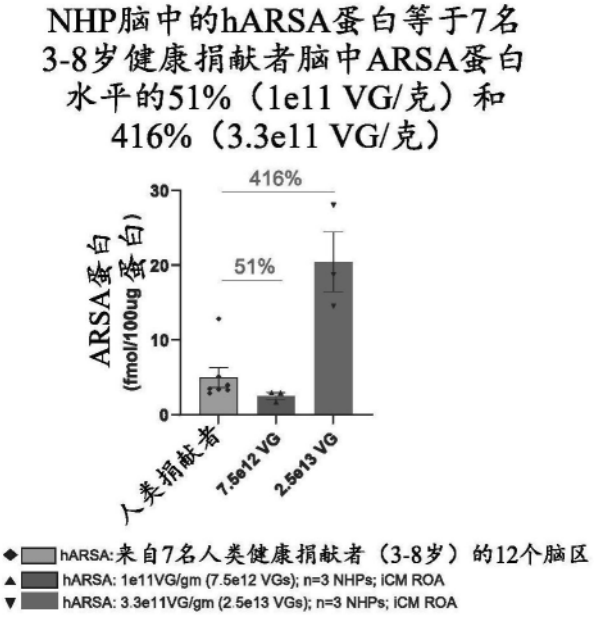

NHP脑中的hARSA蛋白等于7名
3-8岁健康捐献者脑中ARSA蛋白
水平的51%（1e11 VG/克）和
416%（3.3e11 VG/克）
416%
51%
ARSA蛋白
(fmol/100ug 蛋白)
30
20
10
0
人类捐献者
7.5e12 VG
2.5e13 VG
hARSA:来自7名人类健康捐献者（3-8岁）的12个脑区
hARSA: 1e11VG/gm (7.5e12 VGs); n=3 NHPs; ICM ROA
hARSA: 3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs); n=3 NHPs; ICM ROA

图37B

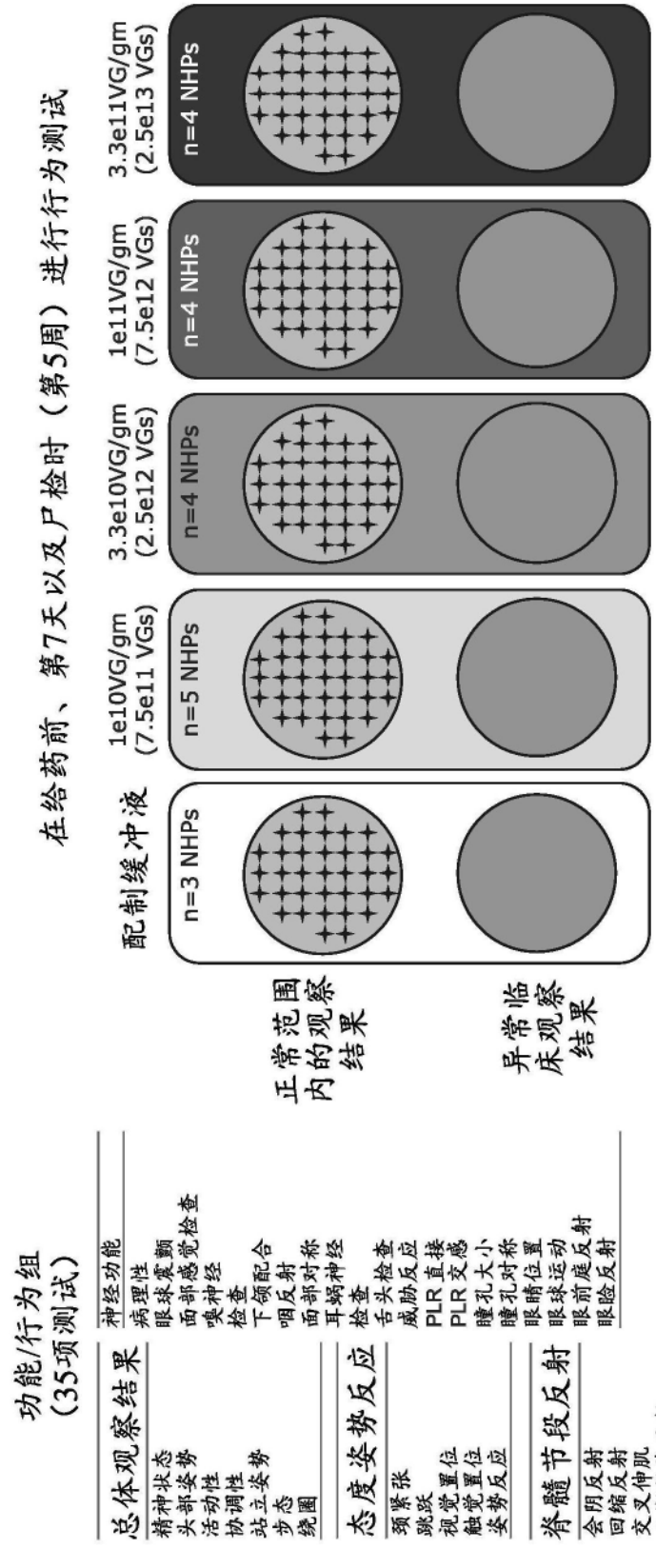

在给药前、第7天以及尸检时（第5周）进行行为测试
功能/行为组
（35项测试）
总体观察结果
精神状态
头部姿势
活动性
协调性
站立姿势
步态
绕圈
态度姿势反应
颈紧张
跳跃
视觉置位
触觉置位
姿势反应
脊髓节段反射
会阴反射
回缩反射
交叉伸肌
巴彬斯基反射
查多克反射
膝跳反射
神经功能
病理性
眼球震颤
面部感觉检查
嗅神经
检查
下颌配合
咽反射
面部对称
耳蜗神经
检查
舌头检查
威胁反应
PLR直接
PLR交感
瞳孔大小
瞳孔对称
眼睛位置
眼球运动
眼前庭反射
眼睑反射
正常范围内的观察结果
异常临床观察结果
配制缓冲液
n=3 NHPs
1e10VG/gm
(7.5e11 VGs)
n=5 NHPs
3.3e10VG/gm
(2.5e12 VGs)
n=4 NHPs
1e11VG/gm
(7.5e12 VGs)
n=4 NHPs
3.3e11VG/gm
(2.5e13 VGs)
n=4 NHPs
✦行为测试

图38

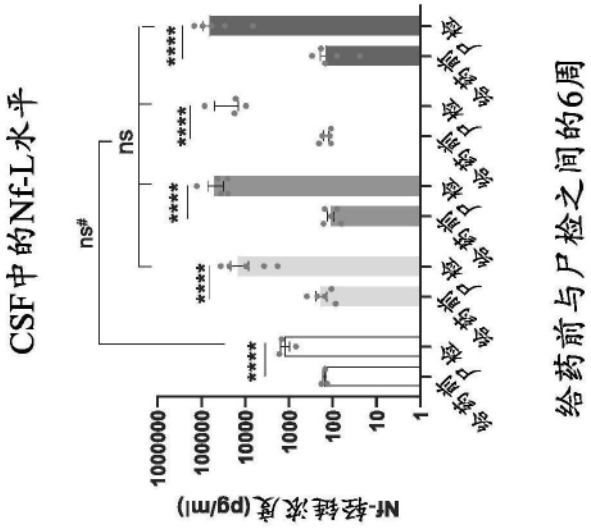

CSF中的Nf-L水平
NF-轻链浓度(pg/ml)
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
ns#
ns
****
****
****
****
给药前与尸检之间的6周

图39A

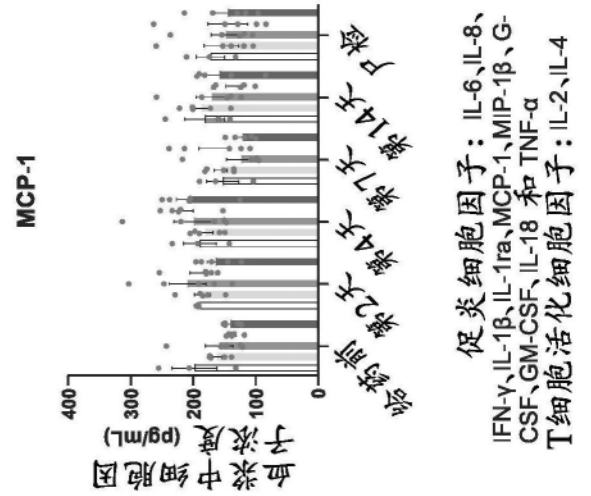

MCP-1
血浆中细胞因子浓度 (pg/mL)
400
300
200
100
0
促炎细胞因子：IL-6、IL-8、IFN-γ、IL-1β、IL-1ra、MCP-1、MIP-1β、G-CSF、GM-CSF、IL-18 和 TNF-α
T细胞活化细胞因子：IL-2、IL-4

图39B

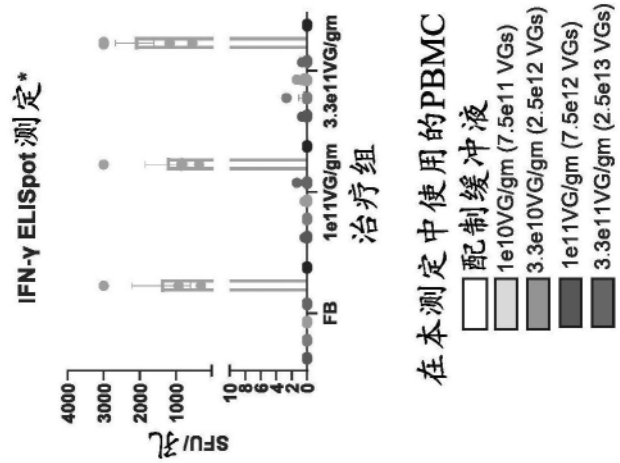

IFN-γ ELISpot 测定*
SFU/孔
4000
3000
2000
1000
10
8
6
4
2
0
FB
1e11VG/gm
3.3e11VG/gm
治疗组
在本测定中使用的PBMC
配制缓冲液
1e10VG/gm (7.5e11 VGs)
3.3e10VG/gm (2.5e12 VGs)
1e11VG/gm (7.5e12 VGs)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs)

图39C

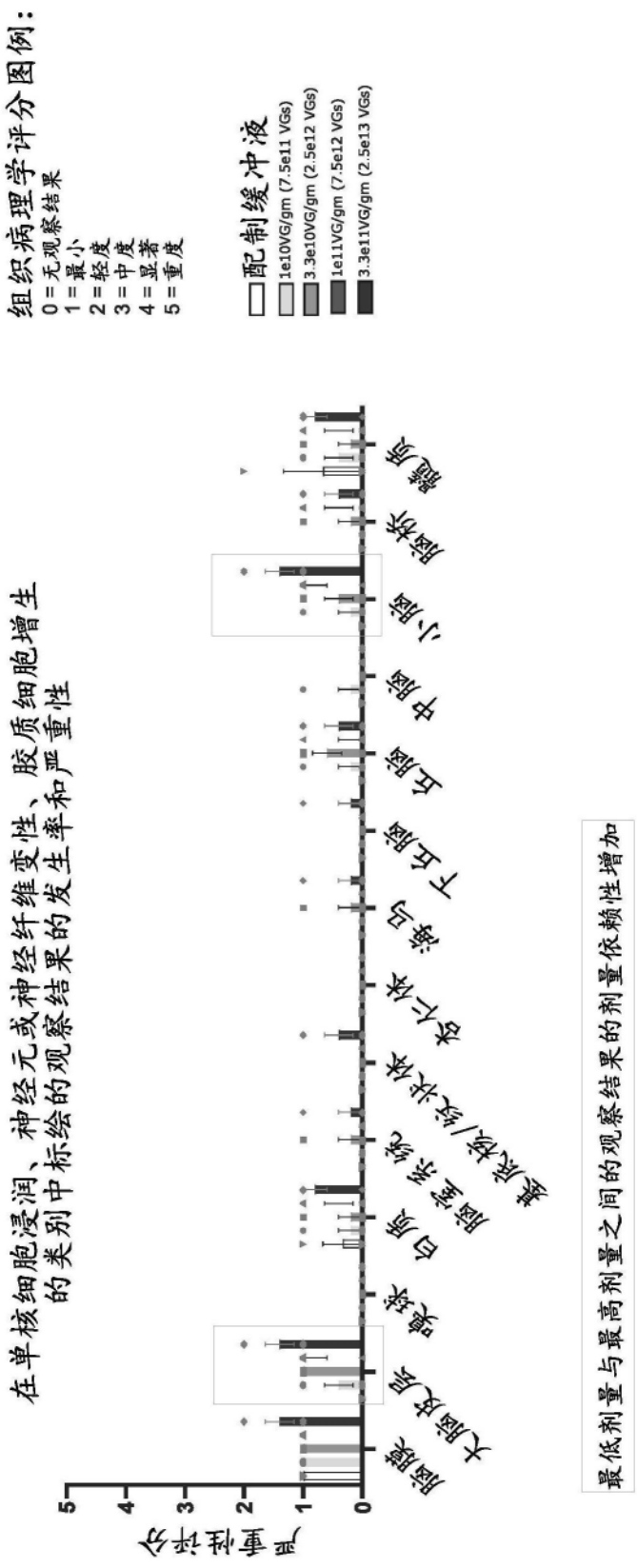

在单核细胞浸润、神经元或神经纤维变性、胶质细胞胞增生的类别中标绘的观察结果的发生率和严重性
组织病理学评分图例：
0 = 无观察结果
1 = 最小
2 = 轻度
3 = 中度
4 = 显著
5 = 重度
配制缓冲液
1e10VG/gm (7.5e11 VGs)
3.3e10VG/gm (2.5e12 VGs)
1e11VG/gm (7.5e12 VGs)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs)
严重程度评分
最低剂量与最高剂量之间的观察结果的剂量依赖性增加

图40

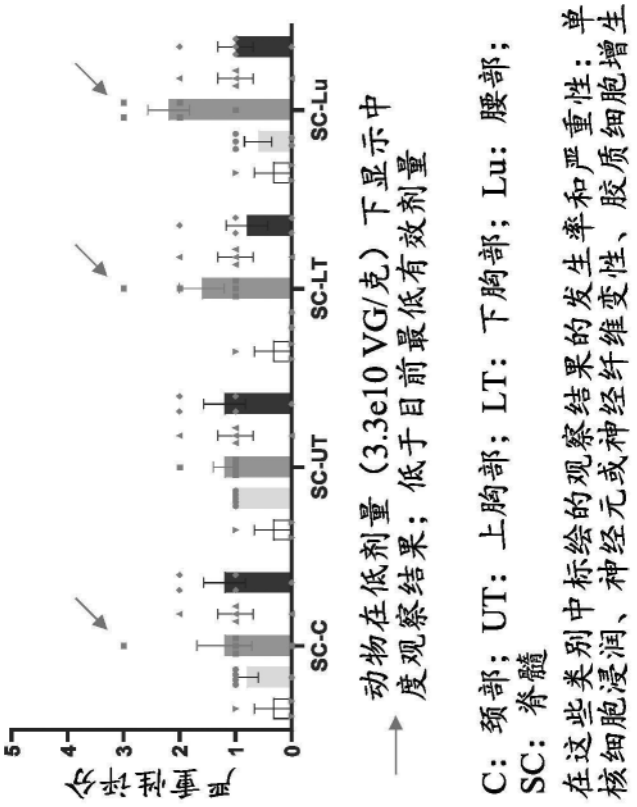

SC-C
SC-UT
SC-LT
SC-Lu
动物在低剂量（3.3e10 VG/克）下显示中度观察结果；低于目前最低有效剂量
C：颈部；UT：上胸部；LT：下胸部；Lu：腰部；SC：脊髓
在这些类别中标绘的观察结果的发生率和严重性：单核细胞浸润、神经元或神经纤维变性、胶质细胞增生

图41A

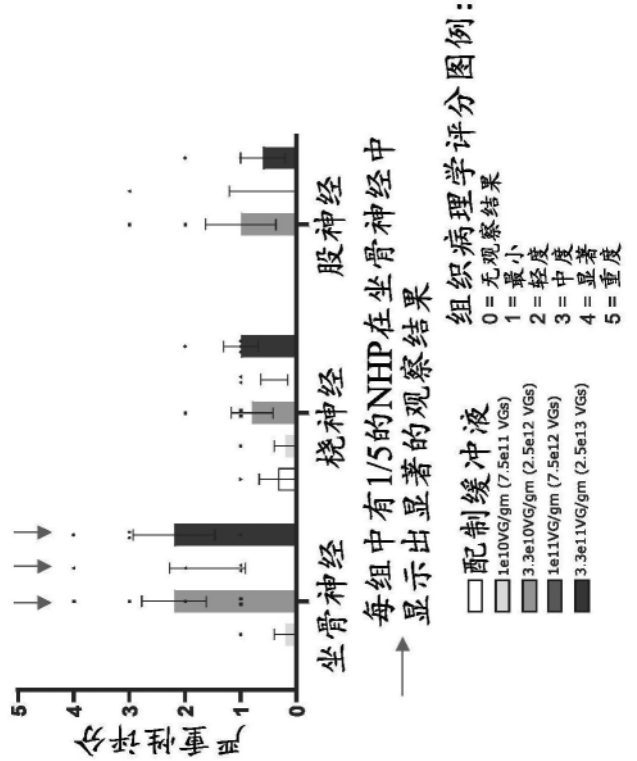
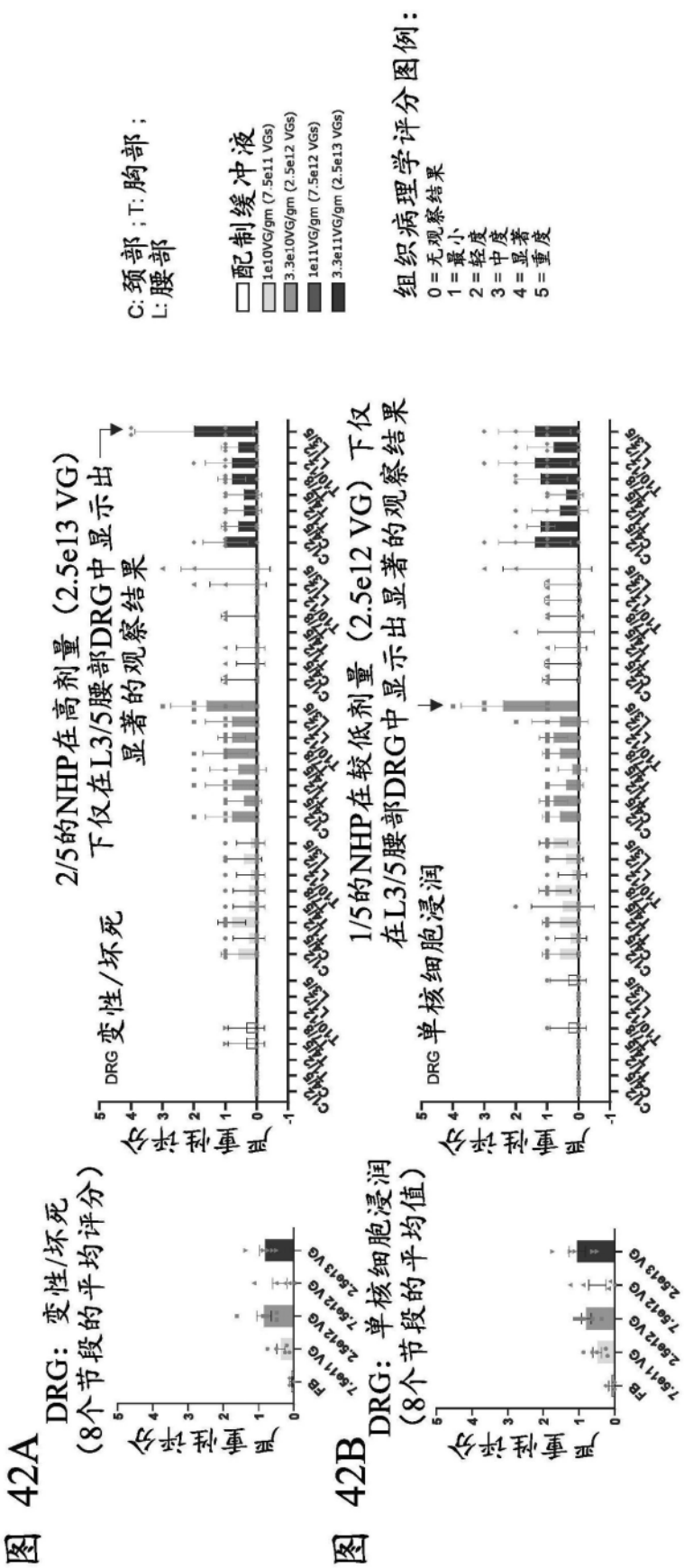

坐骨神经
桡神经
股神经
每组中有1/5的NHP在坐骨神经中显示出显著的观察结果
配制缓冲液
1e10VG/gm (7.5e11 VGs)
3.3e10VG/gm (2.5e12 VGs)
1e11VG/gm (7.5e12 VGs)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs)
组织病理学评分图例：
0 = 无观察结果
1 = 最小
2 = 轻度
3 = 中度
4 = 显著
5 = 重度

图41B


图 42A
DRG：变性/坏死
（8个节段的平均评分）
图 42B
DRG：单核细胞浸润
（8个节段的平均值）
2/5的NHP在高剂量（2.5e13 VG）
下仅在L3/5腰部DRG中显示出
显著的观察结果
1/5的NHP在较低剂量（2.5e12 VG）下仅
在L3/5腰部DRG中显示出显著的观察结果
DRG 变性/坏死
DRG 单核细胞浸润
C: 颈部；T: 胸部；
L: 腰部
配制缓冲液
1e10VG/gm (7.5e11 VGs)
3.3e10VG/gm (2.5e12 VGs)
1e11VG/gm (7.5e12 VGs)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VGs)
组织病理学评分图例：
0 = 无观察结果
1 = 最小
2 = 轻度
3 = 中度
4 = 显著
5 = 重度