(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107249646 B
(45)授权公告日 2021.06.29

(21)申请号 201580069717.4

(22)申请日 2015.12.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107249646 A

(43)申请公布日 2017.10.13

(30)优先权数据
62/092,501 2014.12.16 US
62/146,793 2015.04.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.06.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/066206 2015.12.16

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/100575 EN 2016.06.23

(73)专利权人 内布拉斯加大学董事会
地址 美国内布拉斯加州
专利权人 俄亥俄州立大学创新基金会

(72)发明人 塔米·基尔良 凯文·福斯特

(74)专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理事务所(普通合伙) 44348
代理人 倪小敏 何锦标

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)
C12N 15/864(2006.01)

(56)对比文件
WO 97/08308 A1,1997.03.06
US 2013/0225666 A1,2013.08.29
SONDHI D. et al..Partial Correction of the CNS Lysosomal Storage Defect in a Mouse Model of Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis by Neonatal CNS Administration of an Adeno-Associated Virus Serotype rh.10 Vector Expressing the Human CLN3 Gene.《HUMAN GENE THERAPY》.2014,223-239.
SONDHI D. et al..Partial Correction of the CNS Lysosomal Storage Defect in a Mouse Model of Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis by Neonatal CNS Administration of an Adeno-Associated Virus Serotype rh.10 Vector Expressing the Human CLN3 Gene.《HUMAN GENE THERAPY》.2014,223-239.
FU H.Y. et al..Correction of Neurological Disease of Mucopolysaccharidosis IIIB in Adult Mice by rAAV9 Trans-Blood-Brain Barrier Gene Delivery.《Molecular Therapy》.2011,1025-1033.

审查员 李影

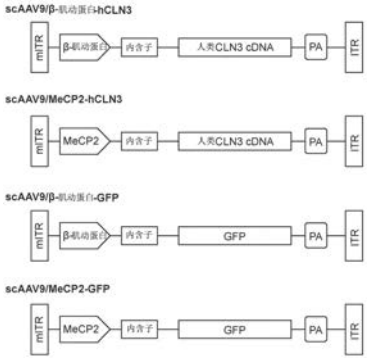
权利要求书2页 说明书26页
序列表21页 附图37页

(54)发明名称

用于青少年巴滕病的基因疗法

(57)摘要

本发明提供用于青少年神经元蜡样质脂褐质沉积症(JNCL)(又被称为青少年巴滕病)的治疗的组合物和方法。在某些实施方式中,所述组合物包括但不限于腺相关病毒(AAV)构建体,其包括自我互补的腺相关病毒(sc-AAV)构建体,其表达人类基因CLN3(或CLN3 cDNA)。



CN 107249646 B

1.重组的自我互补的腺相关病毒血清型9(scAAV9)载体在制备用于治疗和/或预防哺乳动物中的青少年神经元蜡样质脂褐质沉积症(JNCL)的药物中的应用,其中所述重组的scAAV9载体包含可操作地被连接至甲基-CPG结合蛋白2(MeCP2)启动子的编码CLN3的多聚核苷酸序列。

2.根据权利要求1所述的应用,其中所述哺乳动物是人类,并且所述CLN3是人类CLN3。

3.根据权利要求2所述的应用,其中所述人类对于CLN3突变是纯合的。

4.根据权利要求1所述的应用,其中所述哺乳动物是人类新生儿、人类婴儿或人类青少年。

5.根据权利要求1所述的应用,其中所述哺乳动物是人类成年人。

6.根据权利要求1所述的应用,其中所述哺乳动物是对于JNCL无症状的。

7.根据权利要求1所述的应用,其中所述哺乳动物是对于JNCL有症状的。

8.根据权利要求7所述的应用,其中所述哺乳动物表现为失明。

9.根据权利要求7所述的应用,其中所述哺乳动物表现为癫痫。

10.根据权利要求7所述的应用,其中所述哺乳动物表现为运动功能丧失。

11.根据权利要求7所述的应用,其中所述哺乳动物表现为认知衰退。

12.根据权利要求1所述的应用,其中所述CLN3是人类CLN3。

13.根据权利要求1所述的应用,其中所述CLN3是非人类CLN3。

14.根据权利要求1-13的任一项所述的应用,其中所述重组的scAAV9载体进一步包含选自SV40、CBA或MVM的5'UTR或内含子。

15.根据权利要求1-13的任一项所述的应用,其中所述重组的scAAV9载体进一步包含SV40内含子。

16.根据权利要求1-13的任一项所述的应用,其中所述重组的scAAV9载体进一步包含多聚腺苷酸化信号,所述多聚腺苷酸化信号选自牛生长激素多聚腺苷酸化序列、SV40晚期多聚腺苷酸化序列、SV40早期多聚腺苷酸化序列、AATAAA(SEQ ID NO:3)多聚腺苷酸化信号、CAATAAA(SEQ ID NO:4)多聚腺苷酸化信号、ATTAAA(SEQ ID NO:5)多聚腺苷酸化信号、或TANA(SEQ ID NO:6)多聚腺苷酸化信号。

17.根据权利要求1-13的任一项所述的应用,其中所述重组的scAAV9载体进一步包含转录后调节元件。

18.根据权利要求17所述的应用,其中所述转录后调节元件选自土拨鼠转录后调节元件(WPRE)、含有最小γ元件和部分α-β元件的WPRE2、或含有最小γ和α元件的WPRE3。

19.根据权利要求17所述的应用,其中所述转录后调节元件是B型肝炎病毒转录后调节元件(HPRE)。

20.根据权利要求1-13的任一项所述的应用,其中所述重组的scAAV9载体的每个单位剂量包含每千克约10^{10}至约10^{16}个基因组拷贝。

21.根据权利要求1-13的任一项所述的应用,其中所述重组的scAAV9载体的每个单位剂量包含每个对象约10^{10}至约10^{16}个基因组拷贝。

22.一种重组的自我互补的腺相关病毒血清型9(scAAV9)载体,其包含可操作地被连接至甲基-CPG结合蛋白2(MeCP2)启动子的编码CLN3的多聚核苷酸序列。

23.根据权利要求22所述的载体,其中所述CLN3是人类CLN3。

24.根据权利要求22所述的载体,其中所述CLN3是非人类CLN3。

25.根据权利要求22-24的任一项所述的载体,其中所述重组的scAAV9载体进一步包含选自SV40、CBA或MVM的5'UTR或内含子。

26.根据权利要求25所述的载体,其中所述载体进一步包含SV40内含子。

27.根据权利要求22-24的任一项所述的载体,其中所述载体进一步包含多聚腺苷酸化信号,所述多聚腺苷酸化信号选自牛生长激素多聚腺苷酸化序列、SV40晚期多聚腺苷酸化序列、SV40早期多聚腺苷酸化序列、AATAAA(SEQ ID NO:3)多聚腺苷酸化信号、CAATAAA(SEQ ID NO:4)多聚腺苷酸化信号、ATTAAA(SEQ ID NO:5)多聚腺苷酸化信号、或TANA(SEQ ID NO:6)多聚腺苷酸化信号。

28.根据权利要求22-24的任一项所述的载体,其中所述载体进一步包含转录后调节元件。

29.根据权利要求28所述的载体,其中所述转录后调节元件选自土拨鼠转录后调节元件(WPRE)、含有最小γ元件和部分α-β元件的WPRE2、或含有最小γ和α元件的WPRE3。

30.根据权利要求28所述的载体,其中所述转录后调控元件是B型肝炎病毒转录后调节元件(HPRE)。

31.一种宿主细胞,其被使用根据权利要求22-30的任一项所述的载体转导。

32.权利要求22-30的任一项所述的重组的scAAV9载体在制备用于转导细胞的药物中的应用,其中所述重组的scAAV9载体被引入细胞。

33.一种重组的腺相关病毒,其包含根据权利要求22-30的任一项所述的重组的scAAV9载体。

34.一种药物制剂,其包含根据权利要求33所述的重组的腺相关病毒以及药学上可接受的载体或稀释剂。

35.根据权利要求34所述的药物制剂,其中所述制剂被配制用于通过选自以下的途径给药:脑内给药,鞘内给药,静脉内的、口服的、雾化的给药,通过吸入给药,静脉内的、肌内的、皮下的、皮内的和直肠的给药。

36.根据权利要求35所述的药物制剂,其中所述制剂是可无菌注射的。

37.根据权利要求35所述的药物制剂,其中所述通过吸入给药包括鼻内和气管内递送。

用于青少年巴滕病的基因疗法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年12月16日提交的美国临时专利申请号62/092,501和2015年04月13日提交的美国临时专利申请号62/146,793的申请日的利益。前述申请的全文以引用的方式合并入本文中。

背景技术

[0003] 溶酶体贮积病是由在对于溶酶体功能重要的蛋白中的突变引起的一类代谢性病症。存在许多类型的溶酶体贮积病,并且尽管每一种都是相对地罕见的,但是它们的结合的流行率被估计为1/8000活产儿(Schultz *et al.* (2011) *Trends Neurosci.*, 34: 401-410)。青少年神经元蜡样质脂褐质沉积症(JNCL或青少年巴滕病(Juvenile Batten Disease))是致命的神经退行性的溶酶体贮积症,其出现于约1/100,000活产儿中,通常出现在5-10岁年纪之间的儿童中。JNCL作为失明开始,并且发展到癫痫、运动功能丧失、以及随后的认知衰退(Getty and Pearce (2011) *Cell. Mol. Life Sci.* 68:453-474)。

[0004] 青少年巴滕病是由于*CLN3*基因中的常染色体隐性突变引起的,最常见由于在外显子7和8中的1.02 kb缺失引起(Int. Batten Dis. Consortium (1995) *Cell*, 82: 949-957),并且尽管CLN3蛋白已经被显示存在于溶酶体膜和其他膜间隔中,但是它的功能仍然是难以捉摸的。CLN3已经涉及了几个细胞进程,尤其包括:内吞作用和细胞内蛋白质运输、溶酶体的稳态、自噬、线粒体功能、氨基酸转运、氧化应激、神经元兴奋性毒性和细胞周期调节。

[0005] 青少年巴滕病的特征在于溶酶体中的脂质体和蛋白(蜡样质脂褐质)的异常的细胞内的堆积,导致不溶的内含物的形成。尽管溶酶体内含物形成于体内所有细胞类型中,但是神经元是最敏感的并且经历进行性的细胞死亡(Getty and Pearce (2011) *Cell. Mol. Life Sci.* 68:453-474)。中枢神经系统(CNS)不能再生,该神经元细胞死亡的严重性被放大。目前,不存在用于青少年巴滕病的治疗, 其是一律地致命的并且与预期寿命降低至少年晚期和二十岁早期相关。

发明内容

[0006] 本发明提供了用于治疗青少年神经元蜡样质脂褐质沉积症(JNCL)(又被称为青少年巴滕病)以及相关的病症和症状的组合物和方法。在一些实施方式中,所述组合物包含腺相关病毒(AAV)构建体、或者基本上由其组成、或者由其组成,所述腺相关病毒构建体包含表达编码人类CLN3(人类基因CLN3(或CLN3 cDNA))的核酸的腺相关病毒构建体(例如自我互补的或非自我互补的腺相关病毒(sc-AAV)构建体)、或基本上由其组成、或由其组成。在一个示例性的但非限制性的实施方式中,使用了AAV-9构建体或scAAV-9构建体。在各种实施方式中,所述AAV构建体包含各种启动子和/或启动子/增强子组合,其可以被用于AAV构建体中来驱动人类-CLN3基因或CLN3 cDNA或其每一个的等效物的表达。可以被用于AAV构建体中的启动子的例子包括但不限于β-肌动蛋白启动子(例如鸡β-肌动蛋白启动子)、

MeCP2启动子等。AAV-hCLN3构建体可被用于恢复在脑部的和其他关键组织或器官中的野生型CLN3的表达，其反过来可以帮助治疗JNCL和/或改善与JNCL相关的症状。这种基因疗法可以通过多种途径而被施用，这些途径尤其包括静脉注射、颅内注射、鞘内注射等。

[0007] 本发明所设想的各种实施方式可以包括、但无需被限制至以下的一个或多个：

[0008] 在一个方面，本发明提供了一种载体，所述载体包含腺相关病毒(AAV)基因组或其衍生物以及启动子，所述启动子可操作地被连接至编码CLN3(例如人类CLN3或其每一个的等效物)的多核苷酸序列。

[0009] 在另一个方面，本发明提供了一种载体，所述载体包含自我互补的AAV9基因组或其衍生物以及启动子，所述启动子可操作地被连接至编码CLN3的多核苷酸序列，其中所述启动子驱动CLN3低表达。

[0010] 在另一个方面，本发明提供了一种用于哺乳动物中的青少年神经元蜡样质脂褐质沉积症(JNCL)的治疗和/或预防的方法，所述方法包含以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成：使用表达CLN3的构建体转化所述哺乳动物的细胞，其中CLN3被以有效量表达以治疗和/或预防JNCL。

[0011] 在一些实施方式中，所述CLN3是人类CLN3。在其他实施方式中，所述CLN3是非人类CLN3。

[0012] 在一些实施方式中，所述AAV基因组来自AAV的天然衍生血清型或分离物或分支(clade)。在一些实施方式中，所述AAV血清型选自AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8或AAV9。在优选的实施方式中，所述AAV血清型是AAV9。在其他实施方式中，所述AAV血清型是AAV2。

[0013] 在一些实施方式中，所述载体是AAV的衍生物，例如单链的AAV(ss-AAV)载体。在其他实施方式中，所述衍生物载体是自我互补的AVV(sc-AAV)载体。

[0014] 在一些实施方式中，所述启动子选自巨细胞病毒(CMV)、鸡β-肌动蛋白(CBA)、泛素C(UBC)、B-葡萄糖醛酸酶(GUSB)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、突触蛋白、MeCP2(甲基化-CPG结合蛋白2)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、β-肌动蛋白9(例如鸡β肌动蛋白)、或CBh(杂合CBA或含有CBA启动子的MVM内含子)。

[0015] 在一些实施方式中，所述启动子是神经元、星形胶质细胞、或少突胶质细胞特异性的启动子，或神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞优先的启动子，例如NSE、突触蛋白、MeCP2、少突胶质细胞转录因子1(Olig1)、硫酸软骨素蛋白聚糖 Cspg4)、CNP(2',3'-环核苷酸3'-磷酸二酯酶)、或GFAP启动子。

[0016] 在一些实施方式中，所述载体进一步包含选自SV40或CBA-MVM的5'UTR/内含子、或基本上由其组成、或由其组成。在一些实施方式中，所述载体进一步包含最小的SV40内含子、或基本上由其组成、或由其组成。在其他实施方式中，所述载体进一步包含多聚腺苷酸化信号、或基本上由其组成、或由其组成，所述多聚腺苷酸化信号选自牛血清生长激素多聚腺苷酸化序列、SV40晚期多聚腺苷酸化序列、SV40早期多聚腺苷酸化序列、AATAAA(SEQ ID NO:3)多聚腺苷酸化信号、CAATAAA(SEQ ID NO:4)多聚腺苷酸化信号、ATTAAA(SEQ ID NO:5)多聚腺苷酸化信号、或TANA(SEQ ID NO:6)多聚腺苷酸化信号。在其他实施方式中，所述载体进一步包含翻译后调节元件、或基本上由其组成、或由其组成，其非限制性的例子包括例如土拨鼠(Woodchuck)转录后调节元件(WPRE)、含有最小γ元件和部分α-β元件的WPRE2、

WPRE3并且包含最小γ和α元件、或B型肝炎病毒转录后调节元件(HPRE)。

[0017] 在一些实施方式中,所述载体包含一个或多个上述的元件,并且所述载体是包含自我互补的基因组的AAV9。

[0018] 在一些实施方式中,编码CLN3(例如人类CLN3或其等效物)的多聚核苷酸被可操作地连接至MeCP2启动子。

[0019] 在一些实施方式中,所述载体驱动CLN3或其等效物的低表达。

[0020] 在进一步的方面,如本发明所述的载体进一步包含基因或多肽,所述基因或多肽是可检测的标签。在图1中例证了这样的例子。

[0021] 在一些实施方式中,本发明提供了如本发明所述的载体的方法和用途,这些方法包含使用如本发明所述的载体转化哺乳动物的中枢神经系统的细胞。在其他实施方式中,所述方法包含使用如本发明所述的载体转化被包含在非-CNS组织之内的细胞。

[0022] 在一些实施方式中,所述方法在哺乳动物上被执行,在一个方面中所述哺乳动物是人类并且CLN3是人类CLN3或其等效物。

[0023] 在一些实施方式中,被治疗的人类对于CLN3突变是纯合的。在另一方面,所述CLN3突变与带有纯合突变的人类中的巴滕病的发展相关。

[0024] 在一些实施方式中,被治疗的哺乳动物是人类新生儿、人类婴儿、或人类青少年。在其他的实施方式中,被治疗的哺乳动物是成年人类。

[0025] 在一些实施方式中,哺乳动物(例如被治疗的人类患者)对于JNCL是无症状的。在其他实施方式中,被治疗的哺乳动物对于JNCL是有症状的,例如哺乳动物表现为失明、癫痫、运动功能丧失、认知衰退、或其任何组合。

[0026] 如本发明所述的方法包含以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:向需要这种治疗和/或预防的哺乳动物施用有效量的载体、和/或rAAV、和/或含有根据如本发明所述的任一个实施方式的载体的药物制剂。

[0027] 在一些实施方式中,给药是通过选自以下的一个或多个的途径:脑内给药,鞘内给药,静脉内、口服、雾化给药,通过吸入给药(包括鼻内的和气管内的递送),静脉内、肌内、皮下、皮内和直肠给药。

[0028] 在一些实施方式中,治疗方案包含单次给药,例如单次全身性给药。在其他实施方式中,所述治疗方案包含至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次、或至少10次给药。每一次给药的载体的剂量可以是相同的或不同的,由治疗医生或专业人员决定。

[0029] 在一些实施方式中,每一次给药包含每千克的被治疗的哺乳动物的体重约10^{10}至多约10^{16}个CLN3或其等效物的基因组拷贝。在其他实施方式中,每一次给药包含每一对象约10^{10}至多约10^{16}个CLN3或其等效物的基因组拷贝。

[0030] 在一个方面,本发明提供了一种宿主细胞,其被转导有根据本发明所述的任一个实施方式的载体。

[0031] 在一个方面,本发明提供了一种转导细胞的方法,所述方法包含以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:将组合物引入宿主细胞,所述组合物包含根据本发明所述的任一个实施方式的AAV载体。

[0032] 在另一方面,本发明提供了一种重组的腺相关病毒,所述病毒包含编码人类CLN3

或其等效物的核酸构建体。在一个实施方式中，所述腺相关病毒包含根据本发明所述的任一个实施方式的载体。

[0033] 在另一方面，本发明提供了根据上述任一个实施方式中的重组的腺相关病毒和载体，例如药学上可接受的载体或稀释剂。在一些实施方式中，制剂被配制用于通过选自以下的途径给药：脑内给药，鞘内给药，静脉内的、口服的、雾化的给药，通过吸入给药(包括鼻内和气管内递送)，静脉内的、肌内的、皮下的、皮内的和直肠的给药。在其他实施方式中，制剂为可无菌注射的。

[0034] 在另一方面，本发明提供了如本发明所述的任一个实施方式的载体的用于治疗和/或预防青少年神经元蜡样质脂褐质沉积症(JNCL)的应用。

附图说明

[0035] 图1描述了示例性的AAV9 hCLN3构建体。每一个构建体都包含相同的最小SV40内含子(标记为“内含子”)、人类CLN3 cDNA、牛生长激素多聚腺苷酸化信号(“PA”)和病毒性的反向末端重复以封装自我互补的(sc)病毒。第一构建体含有高表达的鸡β-肌动蛋白启动子，而第二构建体含有来自小鼠MeCP2基因的最小的基本启动子。对照构建体用编码绿色荧光蛋白(GFP)的多聚核苷酸替换人类CLN3 cDNA。

[0036] 图2A-图2F显示使用scAAV9/MeCP2-hCLN3的CLN3替换改善了在$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠中的运动行为。一月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠(8只/组)接受了scAAV9/MeCP2-hCLN3、scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3或作为对照的表达GFP的病毒的2×10^{12}个病毒基因组(vg) 的一次静脉(i.v.)注射，此后在1个月(图2A)、2个月(图2B)、3个月(图2C)、4个月(图2D)和5个月(图2E)时进行加速的转棒试验和爬杆实验。*, $p < 0.05$。图2F概括了图2A-2E中所示的数据，显示了在接受scAAV9/MeCP2-hCLN3 的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠中改善的运动行为。

[0037] 图3阐明了在sc AAV9转导之后在脑部内剂量-依赖的hCLN3表达。一月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠(4只/组)接受了scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3 或scAAV9/MeCP2-hCLN3 的2×10^{12}个vg的一次静脉注射，此后5个月之后通过qRT-PCR在指出的脑部区域(CB，小脑； TH，丘脑；HPC，海马；STR，纹状体；和VC，视觉皮层)中对hCLN3 mRNA表达进行定量。结果被表示为与scAAV9/MeCP2-hCLN3相比，在接受scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3的小鼠中hCLN3表达的倍数增加。

[0038] 图4阐明了在scAAV9转导之后在脑部中剂量-依赖的GFP表达。一个月龄$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠(3只/组)接受了2×10^{12} vg scAAV9/β-肌动蛋白-GFP或scAAV9/MeCP2-GFP的一次静脉注射，此后5个月之后通过免疫印迹法在指出的脑部区域(CB，小脑；TH，丘脑；HPC，海马；STR，纹状体 ；VC，视觉皮层；S1BF，体感皮层桶状区皮层)中对GFP的表达进行定量，其中β-肌动蛋白作为加样对照。

[0039] 图5A-5B分别显示了转导后5个月和13个月在脑部区域和视网膜中的如由共聚焦显微镜可视化的scAAV9/β-肌动蛋白-GFP或scAAV9/MeCP2-GFP的生物分布。

[0040] 图6A-6B显示了如GFP^{+}细胞的数量所示的在给药后5个月在$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠脑部中的scAAV9/β-肌动蛋白-GFP 或scAAV9/MeCP2-GFP的比较性生物分布。

[0041] 图7A-7G显示了CLN3替换减少了溶酶体的内含物。一个月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠(4只/组)接受了2×10^{12} vg scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3 或 scAAV9/MeCP2-hCLN3的一次静脉注

射，此后5个月之后通过定量共聚焦显微镜在体感皮层桶状区皮层(S1BF)(图7A)、纹状体(STR)(图7B)、视觉皮层(VC)(图7C)、丘脑(TH)(图7D)、海马(HP)(图7E)、小脑(CB)(图7F)中对溶酶体内含物进行定量。*，$p < 0.05$。在S1BF、VC和TH中的载体和MeCP2-hCLN3的比较的总结如图7G所示。

[0042] 图8A-8C显示了scAAV9的全身给药对于脑组织的转导的影响。图8A显示了scAAV9的全身给药转导在$CLN3^{\Delta ex7/8}$脑部中的神经元。一月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠(4只/组)接受了2×10^{12} vg scAAV9/MeCP2-GFP的一次静脉注射，此后5个月后采集脑部组织，并且在所指示的脑部区域对NeuN、GFP和细胞核(DAPI)进行染色，以用于共聚焦显微镜。小图表显示在更高的分辨率下指示的区域。图8B显示了scAAV9的全身给药转导$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠脑部中的星形胶质细胞。图8C显示了scAAV9的全身给药不会转导$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠脑部中的小神经胶质细胞。

[0043] 图9显示了在scAAV9/MeCP2-hCLN3的全身给药之后，$GFAP^{+}$活性星形胶质细胞(这是人类青少年巴滕病的标志并且同样在$CLN3^{\Delta ex7/8}$脑部中被观察到)在小鼠中被显著地降低。一月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$(4只/组)接受了scAAV9/MeCP2-hCLN3的一次静脉注射，此后5个月后通过定量共聚焦显微镜在体感皮层桶状区皮层中对活性星形胶质细胞($GFAP^{+}$)进行定量。***，$p < 0.001$。

[0044] 图10显示了使用scAAV9/MeCP2-hCLN3的CLN3替换改善了在$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠中的运动行为。一月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠(8只/组)接受了scAAV9/MeCP2-hCLN3、scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3或作为对照的表达GFP的病毒 的2×10^{12} vg 的一次静脉注射，此后在转导后11个月进行胶带移除实验，显示在接受scAAV9/MeCP2-hCLN3的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠中接触时间减少(左面板)并且移除时间减少(右面板)。

[0045] 图11阐明了AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-肌动蛋白-GFP scAAV9/MeCP2-GFP 的向$CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠的全身AAV9转基因递送的影响。结果以每周测量的体重(克)表示。

[0046] 图12表明了施用了AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、 AAV9/肌动蛋白-GFP或scAAV9/MeCP2-GFP 的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠的感染后1个月的正常血清化学分布。

[0047] 图13表明了施用了AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-肌动蛋白-GFP或scAAV9/MeCP2-GFP的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠的感染后10个月的正常血清化学分布。

[0048] 图14A-F表明了施用了AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-肌动蛋白-GFP或scAAV9/MeCP2-GFP的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠没有显示出全身性炎症改变的证据。

[0049] 发明详述

[0050] 应该理解的是，本发明不被限制至所述特定的实施方式，因为这些实施方式当然可能发生改变。还应该理解的是，本文所用的术语仅仅是为了描述特定的实施方式，并且并非旨在限制，因为本发明的范围将仅仅被附加的权利要求限制。

[0051] 本发明的详细描述被分为多个部分，这仅仅为了阅读者的方便，并且在任一部分的公开内容可以与在另一部分的公开内容结合。除非另有定义，否则本文所用的所有技术的和科学的术语都具有如属于本发明的技术领域的普通技术人员通常理解一样的含义。尽管也可以在本发明的实践中或试验中使用与本文所述的类似或等同的任何方法和材料，但是现在描述的是优选的方法和材料。所有的本文提及的公开文件都以引用的方式合并入文中，并且描述与被引用的公开文件相关的方法和/或材料。

[0052] 所有数字指定(包括范围),例如pH、温度、时间、浓度、以及分子质量,都是在适当时变化(+)或(-)0.1 或1.0的增值的近似值。应该理解的是,尽管并非总是明确地声明,但是所有的数字指定都有术语“约”在前。还应该理解的是,尽管并非总是明确地声明,但是本文所述的试剂仅仅是示例性的,并且这些试剂的等效物在本领域是已知的。

[0053] 必须指出的是,如在本文和在附加的权利要求中使用的,单数形式“一个”、“一种”、以及“所述”包括复数指代,除非文中另外明确地规定。因此,例如,对“一个细胞”的引用包括多个细胞。

[0054] 定义

[0055] 如本文所用的,以下术语具有以下含义。

[0056] 当被用在数字指定(例如温度、时间、数量、浓度等)(包括范围)之前时,术语“约”表明可以变化(+) 或 (-) 10 %、5 % 或1 %的近似值。

[0057] “包含”或“包括”旨在表明组合物(例如介质)和方法包括列举的元素,但不排除其他的。“基本上由……组成”当被用于界定组合物和方法时,将意味着排除对于用于所声明的目的的组合来说具有任何本质意义的其他元素。因此,基本上由本发明所限定的元素组成的组合物,不会排除不实质地影响本发明的基本和新颖的特征的其他物质或步骤。“由……组成”将意味着排除其他成分的微量以上元素和实质的方法步骤。由这些转变术语的每一个限定的实施方式都在本发明的范围之内。

[0058] 如本文所用的,术语“载体”指被用于将基因材料传送至宿主细胞的多聚核苷酸构建体,通常为质粒或病毒。载体可以是例如病毒、质粒、粘粒或噬菌体。如本文所用的载体可以由DNA或RNA组成。在一些实施方式中,载体由DNA组成。“表达载体”是这样的载体,它能够当存在于适当的环境中时引导由该载体携带的一个或多个基因编码的蛋白的表达。载体优选地能够自主复制。通常地,表达载体包含转录启动子、基因和转录终止子。基因表达通常处于启动子的控制之下,并且基因被称为“可操作地被连接至”启动子。

[0059] 如本发明所用的,术语“可操作地被连接”被用于描述在调节元件和基因或其编码区域之间的连接。通常地,基因的表达处于一个或多个调节元件的控制之下,例如但不限于,组成型或可诱导的启动子、组织特异性的调节元件、以及增强子。基因或编码区区被称为“可操作地连接至调节元件”或“可操作地与调节元件相连”,意为基因或编码区域被调节元件控制或影响。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子被可操作地连接至编码序列。

[0060] 术语“核酸”或“多聚核苷酸”在此可交换地被使用。在一些实施方式中,核酸包含至少两个共价地连接在一起的核苷酸。在一些实施方式中,本发明的核酸是单链的。在一些实施方式中,核酸是双链的。在一些实施方式中,核酸是三链的。在一些实施方式中,核酸包含磷酸二酯键。在一些实施方式中,核酸包含单链的或双链的脱氧核糖核酸(DNA),或单链的或双链的核糖核酸(RNA)。在一些实施方式中,核酸包含核酸类似物。在一些实施方式中,核酸类似物具有主链,其包含磷酸二酯键之外的键,例如通过非限制性的例子,磷酰胺、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或O-甲基磷酰胺连接。在一些实施方式中,核酸类似物选自含有主链的核酸类似物,所述主链选自正主链、非离子主链和非核糖主链。在一些实施方式中,核酸包含一个或多个碳环糖。在一些实施方式中,核酸包含其磷酸核糖主链的修饰。在一些实施方式中,这些修饰被执行来促进其他基团(例如标签)的加入。在一些实施方式中,这些修

饰被执行来增加在生理环境中这样的分子的稳定性和半衰期。

[0061] 术语“调节元件”和“表达控制元件”被可交换地使用，并且指可以影响在特定的宿主微生物中可操作地被连接的编码序列的表达的核酸分子。这些术语被广泛地用于和涵盖所有促进或调节转录的元件，包括启动子、RNA聚合酶和转录因子的基础反应所需的核心元件、上游元件、增强子和反应元件(参见例如，Lewin, "Genes V" (Oxford University Press, Oxford) pages 847-873)。原核生物中的示例性的但非限制性的调控元件包括启动子、操纵子序列核糖体结合位点、转录的和翻译的控制序列，例如启动子、增强子、剪接信号、多腺苷酸化信号、终止子、蛋白降解信号、内部核糖体进入元件(IRES)、2A序列等，其提供和/或调节在宿主细胞中编码序列的表达和/或被编码的多肽的生成。

[0062] 如本文所用的，术语“启动子”是允许RNA聚合酶的结合并且指引基因的转录的核酸序列。通常地，启动子位于基因的5’非编码区，在基因的转录起始位点附近。在转录的起始中作用的启动子内的序列元件通常特征在于一致的核苷酸序列。启动子的例子包括但不限于来自细菌、酵母、植物、病毒和哺乳动物(包括人类)的启动子。启动子可以是可诱导的、可抑制的、和/或组成型的。可诱导的启动子使得响应于在培养条件中的一些改变(例如温度上的改变)在它们的控制下从DNA转录的水平增加。

[0063] 如本文所用的，术语“增强子”指能够增加转录的效率的一类调节元件。在一些实施方式中，增强子作用来增加转录，不管增强子相对于转录的起始位点的距离或朝向。

[0064] 如本文所用的，术语“转染”是与“转导”同义的，以及指将核酸(例如外源性的核酸)引入宿主细胞。在某些实施方式中，所述引入是通过将细胞与含有将被引入的核酸(例如表达组件)的重组AAV病毒或载体接触。AAV基因组是整体或部分来源于影响人类和其他灵长类的腺相关病毒的基因组。AAV基因组由正向或负向的(positive- or negative-sensed)单链的DNA(ssDNA)组成。所述基因组包含在DNA的两端的反向末端重复(ITRs)和两个开放性阅读框。自我互补的AAV(scAAV)是从野生型的AAV创建的病毒载体。自我互补的AAV是AAV衍生物的例子，并且是来源于AAV的工程化的病毒载体，其已经被设计来形成分子内的双链DNA模板。

[0065] 如本文所用的，术语“转基因”指被转染进入靶细胞的任何核酸或DNA序列。包含转基因的构建体可以作为稳定的游离体存在，或可被整合进入靶细胞的一个或多个染色体。在一些实施方式中，转基因包含编码感兴趣的蛋白(例如CLN3)的多聚核苷酸。编码所期望的蛋白的多聚核苷酸，通常被可操作地连接至对于获得感兴趣的基因的所期望的表达有用的其他序列，例如启动子、增强子、转录调节序列等。

[0066] 如本文所用的，蜡样脂褐质沉积症神经元3基因或(“CLN3基因”)意指编码涉及溶酶体功能的蛋白的核酸。在这个基因中的突变引起神经元退行性疾病。编码人类蛋白的核酸和人类蛋白为本领域已知的，并且被提供于GenBank登记号NM_001042432(最后登录于2015年12月15日)，并且非人类CLN3基因的例子是大鼠的和小鼠的同源染色体，其可获取于网址genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report.hgnc_id=HGNC:2074，最后登录于2015年12月15日。

[0067] 本文所用的术语“治疗”包括但不限制于，缓解疾病或病症(例如青少年神经元蜡样质脂褐质沉积症(JNCL或青少年巴滕病))的症状和/或降低、抑制、阻止、减轻、改善或影响疾病或病症的进程、严重性和/或范围。“治疗”指治疗处理和预防或防止性措施的一者或

两者。需要治疗的对象包括已经被疾病或病症或非期望的生理状况影响的对象、以及其中疾病或病症或非期望的生理状况将被防止的对象。

[0068] 本文所用的术语“有效量”指能够治疗或改善疾病或病症或能够产生预期的治疗效果的量。在某些实施方式中，有效量是足以降低、防止、或延迟JNCL的一个或多个症状的起病的量。这样的症状可以包括但不限于视力问题或失明、癫痫、性格的和/或行为的改变、学习慢、笨拙、蹒跚、精神损害以及运动技能的丧失。

[0069] 术语“患者”“对象”或“哺乳动物对象”在此被可交换地使用，并且包括需要本发明所述的治疗或预防性方法(例如用于JNCL的治疗或预防的方法)的任何哺乳动物。这样的哺乳动物特别地包括人类(例如人类新生儿、人类婴儿、人类青少年、人类成年人等)。其他需要这样的治疗或预防的哺乳动物可以包括非人类哺乳动物，例如狗、猫、或其他饲养动物、马、家畜、实验动物(例如兔形目动物、非人灵长类动物等)等。所述对象可以是雄性或雌性。在某些实施方式中，所述对象是对于JNCL有风险但无症状的(例如在临床症状明显前具有JNCL的基因诊断的儿童(这很少出现)、或在临床症状发展前的年龄具有JNCL的基因诊断的儿童(即出生至4-5岁左右)，例如由年长同胞引发基因测试并且确诊为JNCL的情况)。在某些实施方式中，所述对象表达JNCL的症状。

[0070] 术语载体向对象的“施用”或“给药”包括向对象引入或递送载体以执行它的预期功能的任何途径。给药可以被以任何合适的途径实施，包括口服、鼻内、肠胃外(静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下)、颅内或局部。给药包括自我给药和他人给药。

[0071] 术语“多聚核苷酸”、“核酸”和“寡核苷酸”被可交换地使用，并且指脱氧核苷酸或核糖核苷酸或其类似物的任何长度的核苷酸的聚合形式。多聚核苷酸可以具有任意的三维构型，并且可以执行任何已知或未知的功能。以下是多聚核苷酸的非限制性的例子：基因或基因片段(例如探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多聚核苷酸、支链多聚核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物。多聚核苷酸可以包含被修饰的核苷酸，例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在，则对核苷酸结构的修饰可以在多聚核苷酸组装之前或之后被赋予。核苷酸序的列可以被非核苷酸组分中断。多聚核苷酸可以在聚合后进一步地被修饰，例如通过与标记组分的连接。所述术语也指双链和单链分子。除非另有说明或要求，关于多聚核苷酸的本发明的任何实施方式包含双链形式和已知或预期来组成双链形式的两个互补的单链形式的每一个。

[0072] 多聚核苷酸由四个核苷酸碱基的具体序列组成：腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、以及尿嘧啶(U)(当多聚核苷酸为RNA时替换胸腺嘧啶)。因此，术语“多聚核苷酸序列”是多聚核苷酸分子的字母表示。这种字母表示可以被输入具有中央处理单元的电脑中的数据库，并且用于生物信息学应用(例如功能基因组学和同源性搜索)。

[0073] “同源性”或“同一性”或“相似性”指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可以通过比较在为了进行比较而被对齐的每一个序列中的位置而确定同源性。当被比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时，则这个分子在该位置是同源的。序列之间的同源性的程度是序列共有的匹配的或同源的位置的数量的函数。“不相关的”或“非同源的”序列与本发明的序列中的一个共有低于40%的同一性、或低于25%的同一性。

[0074] 多聚核苷酸或多聚核苷酸区域(或多肽或多肽区域)与另一序列具有一定百分比

(例如70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99%)的“序列同一性”意为,当被对齐时,该百分比的碱基(或氨基酸)在两个序列的比较中是一样的。该对齐和百分比同源性或序列同一性可以使用本领域已知的软件程序来确定,例如在Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology中描述的软件程序。优选地,默认参数被用于对齐。一个对齐程序是BLAST,使用默认参数。特别地,程序为BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;筛选=空;链=两个;截点=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序= HIGH SCORE;数据库=不重复的,GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR。这些程序的详细可以在以下网址找到:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0075] 等效的或生物等效的核酸、多聚核苷酸或寡核苷酸或肽与参考的核酸、多聚核苷酸、寡核苷酸或肽具有至少70%的序列同一性、或至少80%的序列同一性、或至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少92%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%的序列同一性、或至少98%的序列同一性。替代的等效的多肽是由在高严格性的条件下杂合至参考多聚核苷酸或其补体的核酸编码的多肽。替代的等效的多聚核苷酸是在高严格性的条件下杂合至参考多聚核苷酸或其补体的多聚核苷酸。

[0076] “杂合”指在其中一个或多个多聚核苷酸反应以形成复合物的反应,所述复合物通过核酸残基的碱基之间的氢键结合而被稳定。氢键结合可以通过Watson-Crick碱基配对、Hoogstein 结合或以任何其他序列特异性的方式而发生。所述复合物可以包含形成双螺旋结构的两条链、形成多链复合物的三条或以上的链、单个自身杂合的链、或这些的任意组合。杂合反应可以构成更广泛的过程中的步骤,例如PCR反应的启动、或通过核酶的多核苷酸的酶裂解。

[0077] 杂合反应可以在不同“严格性”的条件下被执行。一般来说,低严格性的杂合反应在约40 °C 10 x SSC中或等效的离子强度/温度的溶液中被实施。中等严格性的杂合通常在约50 °C 6 x SSC中执行,而高严格性的杂合反应通常在约60 °C 1 x SSC中被执行。严格的杂合条件的其他例子包括:低严格性为约25°C 至约37°C的孵育温度,约6x SSC至约10x SSC的杂合缓冲液浓度,约0%至约 25%的甲酰胺浓度,以及约 4x SSC至约 8x SSC的冲洗溶液。中等杂合条件的例子包括:约40°C至约50°C的孵育温度,约9x SSC 至约 2x SSC的缓冲液浓度,约30%至约 50%的甲酰胺浓度,以及约5x SSC 至约 2x SSC的冲洗溶液。高严格性条件的例子包括:约55°C至约68°C的孵育温度,约1x SSC 至约 0.1x SSC的缓冲液浓度,约55%至约 75%的甲酰胺浓度,以及约1x SSC 至约 0.1x SSC的冲洗溶液、或去离子水。一般来说,杂合孵育时间为从5分钟至24小时,具有1次、2次或更多冲洗步骤,并且冲洗孵育时间为约1、2或15分钟。SSC为0.15 M NaCl和15 mM柠檬酸盐缓冲液。应该理解的是,使用于其他缓冲系统的SSC的等效物是可被应用的。杂合反应也可以在“生理条件”下被执行,该条件对于本领域的普通技术人员来说是已知的。生理条件的非限制性的例子是,通常在细胞中发现的温度、离子强度、pH和Mg^{2+}的浓度。

[0078] 如本文所用的,术语“低表达”是指与使用“高表达”启动子表达的相比更少,例如本领域已知的β-肌动蛋白或CMV启动子驱动基因的表达比天然的启动子更高。非限制性的低表达启动子是MeCP2启动子。

[0079] 实施本发明的模式

[0080] 青少年神经元蜡样质脂褐质沉积症(JNCL)或青少年巴滕病是由在*CLN3*中的常染色体隐性突变引起的溶酶体贮积病。JNCL出现于5-10岁之间的年龄,伴有进行性的视力丧失、癫痫、认知和运动衰退,并且死亡出现于青少年晚期至20岁前期。对于JNCL没有治愈方法,这强调了识别新的治疗方法的重要性,以改善患有这种致命疾病的儿童的寿命和生活质量。

[0081] 目前用于JNCL的治疗方法靶定病理性后遗症。然而,为了提供长久持续的保护,需要替代性的策略。一个这样的方法是基因疗法。基因疗法已经显示了在校正巴滕病的一些形式中的前景,这些巴滕病涉及在可溶性酶中的突变,这部分是由于相邻的非转染细胞的交叉校正。然而,由于CLN3是跨膜蛋白,基因疗法方法已经被认为对于JNCL的实用性较小。尽管如此,最近的证据已经表明对于JNCL的基因疗法可能是可行的,其中在包含人类CLN3的腺相关病毒(AAV)载体的颅内递送能够降低溶酶体内含物,尽管报道了在行为缺陷中没有改变。

[0082] 如本文在实施例中阐述,已经使用β-肌动蛋白或 MeCP2启动子来工程化AAV9/hCLN3构建体,以分别驱动hCLN3的高表达和低表达。一个(1)月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠被静脉地注射了AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3 或AAV9/MeCP2-hCLN3的2 x 10^{12}个病毒基因组(vg),使用驱动绿色荧光蛋白(GFP)表达的病毒(AAV9/β-肌动蛋白-GFP和 AAV9/MeCP2-GFP)作为对照。

[0083] 重要地,在几个脑部区域中确认了对于hCLN3的启动子-剂量效应,在这些区域中神经元注定会死于JNCL,这些区域包括海马(HPC)、纹状体(STR)、丘脑(TH)、视皮层(VC)和小脑(CB),在所述区域中,相对于AAV9/MeCP2-hCLN3,在接受高表达的AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3的$CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠中hCLN3的表达被提升3至8倍。接受AAV9/GFP构建体的动物显示,病毒主要转导$NeuN^{+}$神经元,少量的$GFAP^{+}$星形胶质细胞也被观察到,然而GFP表达在小胶质细胞内没有被检测到。在体感桶状区皮层(S1BF)、VC、STR、TH、HPC、SCN和CB中的GFP表达证明,在脑部内的病毒转导的范围是普遍的。

[0084] 重要地,只有驱动hCLN3 低表达的AAV9构建体(AAV9/MeCP2-hCLN3)能够使$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠的运动缺陷(加速转棒和爬杆)恢复至WT动物的典型的表现水平,这表明了脑部中的CLN3高表达对于改善运动协调不是有益的。通过溶酶体贮藏物质观察到相似的益处,其在接受AAV9/MeCP2-hCLN3的动物的S1BF、VC和 TH中显著地被降低。通过GFP对照构建体没有观察到AAV9/MeCP2-hCLN3在$CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠中的运动行为上的有益效果,这确认了对于hCLN3的作用的特异性。基于这些观察并且不受理论束缚地,可以相信,AAV/hCLN3(例如AAV9/hCLN3)介导的基因疗法将靶定足够数量的CNS细胞来显著地改善JNCL预后。就这一点而言,值得注意的是,CLN3突变的杂合载体(即½ 基因剂量)没有任何疾病或病理的证据表明这些"CLN3表达的水平下降"足以生成健康的细胞。本文所述的scAAV9/MeCP2-GFP病毒已经被用于确定在CNS中的转导的细胞的频率。即使在合适的频率,被用来鉴别转导有病毒构建体的细胞的方法(即使用GFP抗体进行免疫荧光染色)具有有限的灵敏度,这表明被转导的脑部中的细胞的数量可能被低估。尽管如此,如本文所述的在疾病读数中的极大的改善,表明如本文所述的AAV基因疗法方法是有效的。

[0085] 相应地在各种实施方式中,提供了AAV/hCLN3构建体、表达hCLN3的rAAV、以及使用AAV/hCLN3构建体的治疗和/或预防的方法。

[0086] AAV载体和组合物

[0087] 在某些实施方式中，编码CLN3蛋白的多聚核苷酸通过病毒载体的方式被递送至在中枢神经系统(CNS)的一个或多个组织内的细胞、或包含中枢神经系统的一个或多个组织的细胞，其中许多是本领域中已知的和可用的。此外，在各种实施方式中，CLN3也将被递送至全身组织，这是重要的，因为患有青少年巴滕病的儿童也具有全身性的疾病症状(即心脏缺陷)。就这一点而言，需要注意的是，CLN3被无所不在地表达于体内全部细胞类型中。病毒载体预期地是非毒性的、非免疫原性的、容易生成的、以及在保护和递送DNA进入靶细胞中有效的。在一个示例的但非限制的实施方式中，病毒载体是腺病毒相关病毒载体或其衍生物，并且包含含有编码CLN3多肽的核酸序列的腺相关病毒载体或其衍生物的治疗性组合物是在合适的启动子的控制之下的。

[0088] AVV的超过30种自然存在的血清型是可用的，并且在如本文所述的构建体和方法中是有用的。存在AAV衣壳中的许多天然的变形，其允许识别和使用具有特别适用于神经细胞和其他细胞类型的特性的AAV。AAV病毒可以通过常规的分子生物学技术被工程化，使得这些颗粒能够对于以下目的最优化：所期望的核酸序列的细胞特异性递送、最小化免疫原性、调整稳定性和颗粒寿命、有效的降解、准确递送至细胞核等。

[0089] AAV的使用是DNA的外源性递送的常规模式，这是由于它是相对地非毒性的，提供有效的基因转移，并且能够容易地被优化用于具体的目的。在从人类或非人类的灵长类(NHP)中分离的并且被良好地表征的AAV的血清型中，人类血清型2是作为基因转移载体而被开发的第一种AAV。该血清型已经被广泛用于在不同的靶组织和动物模型中的有效的基因转移实验。在本发明的载体和方法中有用的其他的AAV血清型包括但不限于AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43、CSP3等(参见例如WO 2005/033321 和美国专利 7,198,951对于各种血清型的AAV的讨论)。在某些实施方式中，血清型被选择来优化所预期的递送模式。例如，AAV1、AAV5和 AAV9提供了良好的载体传播和高转导效率。AAV1和AAV9提供了几乎专有的神经元趋向性，而AAV5提供了神经元和神经胶质的混合，并且AAV4主要地靶定星形胶质细胞(参见例如Davidson et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 97: 3428-3432); Burger et al. (2004) *Mol. Ther.* 10: 302-317; Cearley and Wolfe (2006) *Mol. Ther*. 13: 528-537)。AAV1 和AAV6在外周注射之后具有优越的逆行轴突运输能力(Hollis et al. (2008) *Mol. Ther.* 16: 296-301)，而AAV9在脑部中经历了有效的轴突运输(Cearley and Wolfe, (2006) *supra.*)。AAV6、AAV8和AAV9已经证明了在鞘内给药之后有效地递送至脊髓和背根神经节，根据具体的血清型靶定不同的细胞的亚集(Storek et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 105: 1055-1060; Towne et al. (2009) *Mol. Pain,* 5:52; Snyder et al. (2011) *Hum. Gene Ther.,* 22: 1129-1135)。AAV4的侧脑室内注射有效地转导室管膜细胞(Liu et al. (2005) *Gene Ther.* 12:1503-1508)。如本文所证明的，在静脉给药之后AAV9可以穿过血-脑屏障(BBB)来转染在脑内的神经元和神经胶质。在某些实施方式中，rh.10血清型被明确地排除。因此，在本发明的范围内的是，不同的AAV血清型的剂量可以被同时地和/或循序地施用至患者，以根据疾病的症状和进程来提供靶向的递送，从而使治疗个性化。

[0090] 用于装配进入载体的预期的AAV片段包括：本领域已知的cap蛋白，包括vpl (例如SEQ ID NO: 12 和 13)、vp2 (例如SEQ ID NO: 14和15)、vp3 (例如 SEQ ID NO: 16 和

17) 和高可变区;rep蛋白,包括 rep 78 (例如SEQ ID NO: 18)、rep 68 (例如SEQ ID NO: 19)、rep 52 (例如 SEQ ID NO: 20)和 rep 40 (例如SEQ ID NO: 21);以及编码这些蛋白及其等效物的序列。这些片段可以被容易地应用于各种载体系统和宿主细胞中。这些片段可以被单独地使用、与其他AAV血清型序列或片段结合使用、或者与来自其他AAV或非AAV病毒序列的元件结合使用。如本文所使用的,人工的AAV血清型包括但不限于具有非自然存在的衣壳蛋白的AAV。可以通过任何合适的技术生成这样的人工衣壳,其中与异源序列结合使用所选的AAV序列(例如vp1衣壳蛋白的片段),该异源序列可以获取自不同的所选的AAV血清型、相同的AAV血清型的非连续的部分、非AAV病毒来源、或非病毒来源。人工的AAV血清型不做限制地可以是假型AAV、嵌合的AAA''衣壳、重组的AAV衣壳、或"人类化"的AAV衣壳。其中一个AAV的衣壳被替换为异源衣壳蛋白的假型载体也是有用的(参见例如Asokan A. (2010) *Discov. Med.* 9(48):399-403)。

[0091] 在一个示例性的但非限制性的实施方式中,在本文所述的组合物和方法中有用的载体,在最低限度上包含编码所选的AAV血清型衣壳(例如 AAV9衣壳)的序列(例如SEQ ID NO: 13)或其片段或等效物。在另一个实施方式中,有用的载体在最低限度上包含编码所选的AAV血清型rep蛋白(例如AAV9 rep蛋白)的序列或其片段。任选地,这样的载体可以同时包含AAV cap蛋白和AAV rep蛋白。在同时提供了AAV rep 和cap的载体中,AAV rep和AAV cap序列可以都是一个血清型起源,例如全部AAV9起源。(参见例如Balakrishnan et al. (2014) *Curr. Gene. Therap.* 14:1-15;美国专利号8,962,330;美国专利号7,198,951)。

[0092] 替代地,可以使用这样的载体,其中rep序列来自的AAV血清型与提供cap序列的血清型不同。在一个实施方式中,rep和cap序列被表达自分别的来源(例如分别的载体、或宿主细胞和载体)。在另一个实施方式中,这些rep序列在框架内被融合至不同AAV血清型的cap序列,以形成嵌合的AAV载体,例如在美国专利号7,282,199中描述的AAV2/8。在一些实施方式中,AAV1 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列:AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、 AAV9、 rh.10、 rh.39、rh.43和CSP3。在一些实施方式中,AAV2 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列:AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、 AAV9、 rh.10、 rh.39、rh.43和CSP3。在一些实施方式中,AAV3蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列:AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、 AAV7、AAV8、 AAV9、 rh.10、rh.39、rh.43和CSP3。在一些实施方式中,AAV4 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列:AAV1、AAV2、AAV3、AAV5、AAV6、AAV6.2、 AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43和 CSP3。在一些实施方式中,AAV5 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43和 CSP3。在一些实施方式中,AAV6 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、 AAV7、AAV8、AAV9、 rh.10、 rh.39、rh.43和 CSP3。在一些实施方式中,AAV6.2 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、 AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、 rh.43和CSP3。在一些实施方式中,AAV7 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、AAV6.2、AAV8、AAV9、 rh.10、rh.39、rh.43和 CSP3。在一些实施方式中,AAV8 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、AAV6.2、AAV7、

AAV9、rh.10、rh.39、rh.43和 CSP3。在一些实施方式中，AAV9 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、AAV6.2、AAV7、AAV8、rh.10、rh.39、rh.43和 CSP3。在一些实施方式中，AAVrh.10 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、 AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、 rh.39、rh.43和CSP3。在一些实施方式中，AAVrh.39 rep蛋白在框架中被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、 rh.10、rh.43和CSP3。在一些实施方式中，AAVrh.43 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、 rh.39和 CSP3。在一些实施方式中，AAVCSP3 rep蛋白在框架内被融合至选自以下的AAV血清型的cap序列：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39和rh.43。

[0093] 通常载体最低限度下由转基因和它的必要的调节序列、以及5’和3’AAV反向末端重复(ITR)组成。ITR的非限制性的例子包括SEQ ID NO: 2的核苷酸662至 767和核苷酸3278 至 3418，以及其每一个的等效物。重组的AAV载体被包裹进入衣壳蛋白，并且被递送至所选的靶细胞。因此，在一个方面，被包含于衣壳和/或靶细胞内的载体是本发明的一方面。如本发明所设想的，转基因是编码CLN3基因产物的转基因，其例如是CLN3 多肽，参见例如International Batten Disease Consortium (1995) *Cell*, 82:949-957,、以及GenBank登记号: AAC05337 (SEQ ID NO:1)、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO:2的核苷酸1683至2999、及其每一个的等效物。编码CLN3基因产物的序列(例如SEQ ID NO: 11)的核酸和其等效物以允许在靶向组织的细胞内的转基因转录、翻译和表达的方式，被可操作地连接至调节组件。

[0094] 载体的AAV 序列通常地包含顺式作用的5’和 3’反向末端重复序列(参见例如Carter (1990) In *Handbook of Parvoviruses*, ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168)。ITR序列通常长度为约145 bp。在一些实施方式中，编码ITR的基本上整个序列被用于载体中，尽管这些序列的一定程度的修饰是可允许的。修饰这些ITR序列的能力是在本领域已知的技术(参见例如Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York; 和Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70: 520-532等)。这样的分子的例子是含有转基因的“顺式作用”的质粒，其中所选择的转基因序列和相关的调节元件被5’和 3’AAV ITR序列位于两侧。AAV ITR序列可以从任何已知的AAV获得，其包括目前确定的哺乳动物AAV型。***

[0095] 除了用于重组AAV载体的上述指出的主要元件之外，在一些实施方式中，载体通常也可以包括常规的控制元件，所述控制元件以允许其在被转染有质粒载体或感染有AVV病毒的细胞中转录、翻译和表达的方式被可操作地连接至转基因。表达控制序列包括例如适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列；高效的RNA处理信号，例如剪接和聚腺苷酸化(polyA)信号；稳定细胞质的mRNA的序列；提高翻译效率的序列(即Kozak共有序列)；增强蛋白质稳定性的序列；以及当需要时，增强编码产物的分泌的序列。包含天然的、组成性的、可诱导的和/或组织特性的启动子的大量的表达控制序列是本领域已知的并且可以被利用的。

[0096] 对于编码蛋白的核酸，聚腺苷酸化序列通常被插入转基因序列之后并且在3’AAV

ITR序列之前。合适的聚腺苷酸化序列包括但不限于牛生长激素多聚腺苷酸化序列(例如SEQ ID NO: 2的核苷酸3052至3198)、SV40晚期多聚腺苷酸化序列、SV40早期多聚腺苷酸化序列、AATAAA (SEQ ID NO: 3) 多聚腺苷酸化信号、CAATAAA (SEQ ID NO: 4) 多聚腺苷酸化信号、ATTAAA (SEQ ID NO: 5) 多聚腺苷酸化信号、TANA (SEQ ID NO: 6) 多聚腺苷酸化信号。

[0097] 在一些实施方式中,AAV载体也含有内含子,其理想地位于启动子/增强子序列和转基因之间。一个示例性的但非限制性的可能的内含子序列来源于SV-40,并且被称为SV-40 T内含子序列。其他内含子序列是本领域的技术人员已知的,并且包含尤其是CBA、和CBA-MVM(参见例如Gray *et al.* (2011) *Hum. Gene Ther.* 22(9):1143-1153 以及其中引用的文献)。

[0098] 可以任选地存在的另一种元件是翻译后调节元件。示例性的翻译后调节元件包括但不限于土拨鼠转录后调节元件(WPRE)、含有最小的γ元件和部分的α-β元件的WPRE2、以及含有最小的γ元件和α元件的WPRE3(参见例如Choi *et al.* (2014) *Molecular Brain* 7: 17-26)。非限制性的例子被提供于所附序列表中,并且以引用方式合并入本文中。

[0099] 宿主细胞中的基因表达所需的调节序列的准确的特性可以在物种、组织或细胞类型之间变化,但一般来说必要时应该包括分别涉及转录和翻译的起始的5’非转录序列和5’非翻译序列,例如TATA盒子、加帽序列、CAAT序列、增强子元件等。特别地,这样的5’非转录调节序列将包括启动子区域,其包括用于可操作地连接的基因的转录控制的启动子序列。调控的序列也可以包括所期望的增强子序列或上游激活子序列。载体可以任选地包括5’前导或信号序列。这样的信号肽的例子包括白蛋白、β-葡萄糖醛酸酶、碱性蛋白酶或纤连蛋白分泌信号肽。在一个方面,增强子是土拨鼠后调节元件(“WPRE”)(参见例如 Zufferey, R. et al. (1999) J. Virol. 73(4):2886-2992)。WPRE的非限制性的例子包括SEQ ID NO: 37或SEQ ID NO: 38。增强子元件可以在启动子和CLN3基因的下游。然而,增强子可以在任何位置。非限制性的例子被提供于所附序列表中,并且以引用的方式合并入本文中。

[0100] 合适的启动子的例子包括但不限于:逆转录病毒的罗氏肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地带有RSV增强子)(例如SEQ ID No: 28及其等效物)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地带有CMV增强子)(参见例如Boshart et al (1985) *Cell*, 41:521-530和例如SEQ ID No: 27 及其等效物)、SV40启动子(例如SEQ ID No: 29)、二氢叶酸还原酶启动子、β-肌动蛋白启动子(例如鸡β-肌动蛋白启动子)(例如SEQ ID No: 22、SEQ ID No: 23、及其等效物)、磷酸甘油激酶(PGK)启动子(例如SEQ ID No:30及其等效物)、EF1α启动子(例如SEQ ID No:31及其等效物)、CBA启动子(例如SEQ ID No:24及其等效物)、UBC启动子(例如SEQ ID No:34及其等效物)、GUSB启动子、NSE启动子(例如SEQ ID No:33及其等效物)、突触蛋白启动子(例如SEQ ID No:32及其等效物) MeCP2(甲基-CPG结合蛋白2)启动子(例如SEQ ID No:22、SEQ ID No:23及其等效物)、GFAP、CBh启动子等。可设想的是,不同的启动子可以被用于增加转基因(例如CLN3)的表达水平。例如,相比于另一个启动子,鸡β-肌动蛋白启动子(CBA)可以引起转基因的强的、普遍存在的表达,而MeCP2启动子可以导致转基因的低表达。在一些实施方式中,启动子可以以组织依赖的方式控制转基因表达。例如,与神经胶质相比,神经元中的启动子的活性可以更高。在一些实施方式中,启动子可以以发展性的阶段依赖的方式控制转基因表达。例如,启动子驱使的表达可以后天地上升,并且在整个成人期间

是必需的。

[0101] 在某些实施方式中，可以使用用于转基因的天然的启动子或其片段。当转基因的表达应该模仿天然表达是所需的时候，天然的启动子可以是优选的。在某些实施方式中，其他天然表达控制元件(例如增强子元件、多腺苷酸位点、或Kozak共有序列)也可以被用于模仿天然的表达。

[0102] 在一些实施方式中，调节序列给予了组织特异性的基因表达能力。在一些情况中，组织特异性的调节序列结合组织特异性转录因子，所述转录因子以组织特异性的方式诱导转录。这样的组织特异性的调节序列(例如启动子、增强子等)是在本领域已知的。示例性的组织特异性的调节序列包括但不限于以下组织特异性的启动子：神经元的启动子，例如神经元特异性的烯醇化酶(NSE)启动子(Anderson et al. (1993) *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13: 503-515)、神经丝轻链基因启动子(Piccioli et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5611-5615、以及例如GenBank登陆号：L04147.1 (SEQ ID No:25))、以及神经元特异性的vgf基因启动子(Piccioli et al. (1995) *Neuron*, 15: 373-384 和GenBank登记号: Y09938.1 (SEQ ID No:26))。在一些实施方式中，组织特异性的启动子是选自以下的基因的启动子：神经元核(NeuN)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)(Brenner et al. (1994) *J. Neurosci.*14(3):1030-1037)、腺瘤性息肉病大肠杆菌(APC)、以及离子化钙结合衔接分子1(Iba-1)。在一些实施方式中，启动子是鸡β-肌动蛋白启动子(例如SEQ ID No:24 或其等效物)或MeCP2启动子(例如 SEQ ID No:2的核苷酸775至1511、SEQ ID No:22、SEQ ID No:23、或其等效物)。

[0103] 在一些实施方式中，用于一个或多个miRNA的一个或多个结合位点被并入AAV载体的转基因中，以在含有转基因的对象的一个或多个组织(例如非CNS组织)中抑制转基因的表达。本领域的技术人员将会理解，结合位点可以被选择来以组织特异性的方式控制转基因的表达。例如，可以通过合并用于miR-122的结合位点的方式抑制在肝脏内的转基因的表达，使得从转基因表达的mRNA在肝脏中结合至miR-122并且被其抑制。可以通过合并用于miR-133a或miR-1的结合位点的方式抑制在心脏内的转基因的表达，使得从转基因表达的mRNA在心脏内结合至miR-133或miR-1并且被其抑制。在mRNA中的miRNA靶定位点可以在5’UTR、3’UTR中或在编码区中。通常地，靶位点是在mRNA的3’UTR中。进一步地，转基因可以被设计使得多个miRNA通过识别相同位点或多个位点的方式调节mRNA。多个miRNA结合位点的存在可以引起多个RISC的协同作用，并且提供表达的高效抑制。在某些实施方式中，靶位点序列可以包含总共5-100、10-60、或更多的核苷酸。在某些实施方式中，靶位点序列可以包含靶基因结合位点的序列的至少5个核苷酸。

[0104] CLN3转基因

[0105] 蜡样质脂褐质沉积病神经元3(CLN3)是杂合的跨膜蛋白，分布在多种细胞结构的细胞膜(包括溶酶体膜)中，但CLN3的分子功能是未知的。CLN3已经被涉及在几个细胞进程中，包括内吞作用和细胞内蛋白运输、溶酶体的稳态、自噬、线粒体功能、氨基酸转运、氧化应激、神经元兴奋性毒性、以及细胞周期调节。CLN3已知对于溶酶体的正常功能是重要的，后者是通常分解毒性物质并回收任何可再使用的组份的细胞内的腔室。

[0106] 已经在患有巴滕病的人中识别了CLN3基因中的超过60种突变。对于青少年巴滕病的最常见的突变是在CLN3基因中大约1 kb的核苷酸缺失。据估计超过90%的患有青少年巴

滕病的个体具有这样的突变。为了研究这种疾病，已经获得了几个动物模型，包括CLN3敲除(KO)小鼠和CLN3$^{\Delta ex7/8}$小鼠(重现在儿童中观察到的主要突变)。

[0107] 如上所提到的，本发明设想的构建体包括编码人类CLN3的多聚核苷酸序列(参见例如International Batten Disease Consortium (1995) *Cell*, 82:949-957和GenBank登记号: AAC05337 (SEQ ID NO:1))和其等效物。在一些实施方式中，多聚核苷酸序列是CLN3 cDNA。然而，将被认可的是，编码CLN3的核酸序列可以被改变，例如从而促进表达盒的构建、增强表达(例如通过编码优化)等。在一些实施方式中，被编码的CLN3肽可以被修饰，例如从而改善膜插入、改善活性和/或稳定性、减少免疫原性等。在一些实施方式中，可以使用非人类CLN3，特别是用于治疗或研究目的的AAV至非人类对象的应用。应该注意的是，对于大量哺乳动物的CLN3序列是已知的，这些哺乳动物包括但不限于犬类狼(*Canus lupus*)(例如GenBank 登记号: AAB05546.1 (SEQ ID NO: 7))、小鼠(*Mus musculus*)(例如GenBank 登记号: AAB69983 (SEQ ID NO: 8))、绵羊(*Ovis aries*)(例如GenBank 登记号: XP_011959725 (SEQ ID NO: 9))、猫(*Felis catus*)(例如GenBank 登记号: BAM42890 (SEQ ID NO: 10))等。

[0108] 在一些实施方式中，合适的CLN3核酸序列包含编码CLN3多肽的核苷酸序列、或者基本上由其组成、或者由其组成，其中CLN3多肽包含SEQ ID NO.: 1或等效的多肽，其中等效物包含的氨基酸序列与SEQ ID NO 1具有至少约80%、至少约 85%、至少约90%、至少约95%、至少约 99%、或 100% 的氨基酸序列同一性。其他非限制性的例子被提供在所附序列表中，以引用方式并入本文中。

[0109] 编码CLN3的核酸或其等效物可以包含SEQ ID NO: 11的多聚核苷酸或其生物学的等效物、或者基本上由其组成、或者由其组成。CLN3核酸的生物学的等效物的例子包含这样的核酸，所述核酸在高严格性的条件下杂合至SEQ ID NO: 11的补体，并且编码具有CLN3生物学活性的蛋白。另一个例子包括与SEQ ID NO: 11 或它的补体具有至少80%的序列同一性、并且编码具有CLN3生物学活性的蛋白的核酸。应该注意的是，人类CLN3变体在本领域是已知的。非限制性的例子包括GenBank 登记号: NM_001042432.1 (CLN3, 转录变体 1); GenBank 登记号:NM_001286104.1 (CLN3, 转录变体 3); GenBank 登记号:NM_001286105.1 (CLN3, 转录变体 4); GenBank 登记号:NM_001286109.1 (CLN3, 转录变体 5); GenBank 登记号:NM_001286110.1 (CLN3, 转录变体 6)、或与上列的例子的任一个或它的补体具有至少80%的序列同一性并且编码具有CLN3生物学活性的蛋白的核酸。

[0110] 在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由逆转录病毒的罗氏肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地带有RSV增强子)驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地带有CMV增强子)驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由SV40启动子驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由二氢叶酸还原酶启动子驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由β-肌动蛋白启动子驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由PGK启动子驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由EF1α启动子驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由UBC启动子驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由GUSB启动子驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由NSE启动子驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由突触蛋白启动子驱动的。在一些实施方式中，CLN3转基因的表达是由MeCP2启动子驱动的。在一些实施

方式中,CLN3转基因的表达是由GFAP启动子驱动的。在一些实施方式中,CLN3转基因的表达是由CBh启动子驱动的。在优选的实施方式中,CLN3转基因的表达是由CBA启动子(例如SEQ ID NO: 24)或其等效物驱动的。在更优选的实施方式中,CLN3转基因的表达是由MeCP2启动子(例如SEQ ID No: 2的核苷酸775至1511、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 23)或其每一个的等效物驱动的。在一些实施方式中,上述提及的启动子的任一个可以被明确地从CLN3转基因的驱动表达中被排除。

[0111] 重组AAV(rAAV)的生成

[0112] 在一些实施方式中,AAV基因组来自AAV的天然衍生血清型或分离物或分支。在一些实施方式中,AAV血清型选自AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8或 AAV9。在一些实施方式中,AAV血清型是AAV9。在一些实施方式中,AAV血清型是AAV2。

[0113] 非限制性的例子包括或重组AAV可以包含以下物质、或基本上由其组成、或由其组成:GenBank登记号: AF063497.1的多聚核苷酸(AAV1,完全基因组)、GenBank登记号: NC_001401.2的多聚核苷酸(AAV2,完全基因组)、GenBank登记号: NC_001829的多聚核苷酸(AAV4,完全基因组)、GenBank登记号: AX256321.1的多聚核苷酸(AAV5,合成的构建体)、GenBank登记号: AF028704.1的多聚核苷酸(AAV6,完全基因组)、SEQ ID No: 35的多肽、SEQ ID No: 36的多肽、或其生物学等效物。另一个例子包括与上述引用的多聚核酸具有至少80 %的序列同一性的核酸。

[0114] 适当的重组的腺相关病毒(AAV)可以通过培养宿主细胞生成,所述宿主细胞含有:编码腺相关病毒(AAV)血清型衣壳蛋白的核酸序列或其片段、功能化的rep基因;最低限度由AAV反向末端重复(ITR)和编码CLN3多肽(或如本文所述的其变体或等效物)的核酸序列组成的微小基因、以及足够的辅助功能(helper function)来允许将微小基因包裹进入AAV衣壳蛋白。

[0115] 在宿主细胞中被培养来将AAV载体包裹在AAV衣壳中的组份可以反式地被提供至宿主细胞。另外,所需的组份(例如重组AAV载体、rep序列、cap序列、和/或辅助功能)的任何一个或多个可以通过稳定的宿主细胞来提供,所述宿主细胞已经被使用本领域技术人员已知的方法而工程化来含有所需的组份的一个或多个。最适合地,这种稳定的宿主细胞将包含在可诱导的启动子的控制之下的所需的组份。然而,在某些实施方式中,所需的组份可以是在组成型启动子的控制之下的。

[0116] 在另一个选择中,所选的稳定的宿主细胞可以包含在组成型启动子的控制之下的所选的组份、以及在一个或多个可诱导启动子的控制之下的其他所选的组份。例如,可以生成稳定的宿主细胞,其来源于293个细胞(其包含在组成型启动子的控制之下的E1辅助功能),但其包含在可诱导启动子的控制之下的rep 和/或cap 蛋白。其他稳定的宿主细胞可以由本领域中的技术之一生成。

[0117] 生产rAAV所需的重组AAV载体、rep序列、cap序列和辅助功能可以使用任何合适的基因元件(载体)被递送至装配宿主细胞。所选的基因元件可以通过任何适当的方法(包括本文所述的那些)而被递送。这样的方法对于本领域的技术人员是已知的(参见例如Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。相似地,生成rAAV病毒体的方法是已知的(参见例如Fisher *et al.* (1993) *J. Virol.*, 70: 520-532; 美国专利号5,478,745等)。

[0118] 在一个示例性的但非限制性的实施方式中，可以使用三重转染方法(例如在美国专利号6,001,650中详细描述的方法)生成rAAV。通常，通过使用重组的AAV载体(包含转基因)转染宿主细胞来装配入AAV微粒、AAV辅助功能载体和附加功能载体，从而生成重组的AAV。AAV辅助功能载体编码“AAV辅助功能”序列(即rep和cap)，其反式地作用用于生产性的AAV复制和衣壳化。通常，AAV辅助功能载体支持有效的AAV载体生成，而不产生任何可检测的野生型AAV病毒体(即含有功能性的rep和cap基因的AAV病毒体)。载体的示例性的但非限制性的例子包括pHLP19 (参见美国专利号6,001,650)、pRep6cap6 载体 (参见例如美国专利号6,156,303)等。附加功能载体可以编码核酸序列，用于非AVV衍生的病毒的和/或细胞的功能，AAV依赖于所述功能用于复制(即“附加功能”)。所述附加功能可以包括AAV复制所需的功能，其包括但不限于在AAV基因转录的激活、阶段特异性的AAV mRNA剪接、AAV DNA复制、cap表达产物的合成、以及AAV衣壳组装中涉及的那些部分。基于病毒的附加功能可以源自于任何已知的辅助病毒，例如腺病毒、疱疹病毒(除了单纯疱疹病毒1型之外)和牛痘病毒。

[0119] 重组AAV给药

[0120] 通常以足够的量施用rAAV，以转染期望的组织的细胞，并且提供足够水平的基因转移和表达，而没有过度的负面作用。常规的和药学上可接受的给药途径包括但不限于：直接递送至所选的组织(例如脑内给药、鞘内给药)，静脉内的、口服的、雾化的给药，通过吸入给药(包括鼻内和气管内递送)，静脉内的、肌内的、皮下的、皮内的、直肠的和其他肠胃外途径的给药。如果需要，给药的途径可以被结合。

[0121] 在某些实施方式中，某种rAAV的向对象的递送例如可以是通过进入对象的血流的给药。进入血流的给药可以通过进入静脉、动脉或其他血管导管的注射。此外，在某些例子中，可能期望将rAAV递送至脑部组织、脑膜、神经元细胞、神经胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、脑脊液(CSF)、细胞间隙等。在一些实施方式中，重组的AAV可以通过以下方法被直接地递送至脊髓或脑部：注射进入脑室区域和纹状体(例如纹状体的尾状核或壳核)以及神经肌肉接合处、或小脑小叶，通过针头、导管或相关设备，使用本领域已知的神经外科技术(例如立体定向法注射)(参见例如 Stein et al. (1999) *J Virol.* 73: 3424-3429; Davidson et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; Davidson et al. (1993) *Nat. Genet.* 3:219-223; Alisky and Davidson (2000) *Hum. Gene Ther.* 11: 2315-2329等)。

[0122] 本发明提供在对象中将转基因递送至中枢神经系统(CNS)组织的方法。所述方法通常涉及将有效量的rAAV施用至对象，所述rAAV包含用于在对象中表达转基因(例如CLN3)的核酸载体。有效量指能够治疗或减轻青少年神经元蜡样质脂褐质沉积症(JNCL或青少年巴滕病)和/或降低、抑制、阻止、减轻、改善或影响疾病或病症的进程、严重性和/或范围的量。

[0123] 有效量将取决于各种因素，例如对象的种属、年龄、体重、健康状况、以及被靶定的CNS组织，因此其可以在对象和组织之间变化。有效量也可以取决于给药的方式。例如，在一些情况中，与通过鞘内或脑内注射的方式靶定CNS组织相比，通过血管内注射的方式靶定CNS组织可能需要不同的(例如更高的)剂量。在一些情况中，施用多个剂量的rAAV，而在其他的情况中，如本发明的实施例中阐明的，单一剂量可以是足够的。有效量也可以取决于使

用的rAAV。例如，用于靶定CNS组织的剂量可以取决于rAAV的血清型(例如衣壳蛋白)。例如，rAAV可以具有选自以下的AVV血清型的衣壳蛋白：AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43 和CSp3。在一些实施方式中，rAAV的有效量是每千克10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、或10^{14}、或10^{15}、或 10^{16}(个)基因组拷贝。在一些实施方式中，rAAV的有效量是每个对象10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、或10^{14}、或10^{15}、或10^{16}(个)基因组拷贝。当施用多个剂量时，相同的或不同的血清型可以被结合用于治疗。

[0124] 用于在对象中将转基因递送至CNS组织的方法可以包含通过单一途径或通过多个途径施用rAAV。例如，在对象中将转基因递送至CNS组织可以包含，通过静脉注射将有效量的穿过血脑屏障的rAAV施用至对象。在对象中将转基因递送至CNS组织可以包含，通过鞘内给药或脑内给药(例如通过脑室内注射)将有效量的rAAV施用至对象。在对象中将转基因递送至CNS组织的方法可以包含，通过两种不同的给药途径(例如通过鞘内给药和通过脑内给药)共同施用有效量的rAAV。共同给药可以在大约相同的时间或不同的时间进行。

[0125] 在一些实施方式中，要被靶定的CNS组织可以选自例如皮层、海马、丘脑、下丘脑、小脑、脑干、颈部脊髓、胸部脊髓和腰部脊髓。用于靶定CNS组织的给药途径通常地取决于如上讨论的AVV的血清型。

[0126] 在一些实施方式中，可以预期的是，在将有效量的包含用于在对象中表达转基因(例如CLN3)的核酸载体的AAV施用至对象之前，首先执行假定的对象的诊断性的确认(或用于携带者或产前测试)以识别在CLN3基因中的突变。例如，这样的测试可以通过如下方法进行：通过用于常见的1kb缺失的PCR扩增和粒度分析、或通过全序列分析以覆盖CLN3基因的15个外显子、以及相邻的内含子区域。测序可以揭露在CLN3基因中已经被全部报道的任何无义、错义、剪接突变、小插入和缺失突变。

[0127] 在某些情况下，期望的是，皮下地、胰腺内地、鼻内地、胃肠外地、静脉内地、肌内地、脑内地、鞘内地、脑内地、口服地、腹膜内地或通过吸入递送在本文所述的适当地配制的药物组合物中的基于rAAV的治疗性构建体。在一些实施方式中，如在美国专利号5,543,158、5,641,515 和5,399,363中所述的给药方式可以被用于递送rAAV。

[0128] 在一些实施方式中，本文所述的载体、重组的腺相关病毒、药物制剂等可以与其他治疗剂一起被施用。其他治疗剂的非限制性的例子包括霉酚酸酯、甘珀酸、甘草次酸、甘草酸、分子伴侣疗法、酶替代疗法、干细胞疗法、抗惊厥药物、抗氧化剂补充剂(例如维生素C、维生素E、甲硫氨酸、B6)、ω-3脂肪酸(参见例如Hobert *et al.*, (2006) *Biochimica et Biophysica Acta* 1762(10):945-953)。根据治疗类型等，对于其他治疗剂的剂量、治疗方案和给药的途径是本领域已知的和/或在熟练的临床医生的决定的能力之内的。

[0129] 在一个实施方式中，本发明所述的载体、重组的腺相关病毒、药物制剂等以及其他治疗剂被依序地施用。在另一个实施方式中，本发明所述的载体、重组的腺相关病毒、药物制剂等和其他治疗剂被同时地施用。在一个实施方式中，本发明所述的载体、重组的腺相关病毒、药物制剂等在其他治疗剂的施用的一段时间之后被施用。在进一步的方面，rAAV疗法与其他补充疗法被共同施用，以减轻或治疗疾病的症状。

[0130] 重组AVV组合物

[0131] 在一些实施方式中，可以以根据本领域已知的任何适当方法的组合物的形式将rAAV递送至对象。例如，悬浮于生理上相容的载体中(例如在组合物中)的rAAV可以被施用

至对象，例如人类、小鼠、大鼠、猫、狗、绵羊、兔、马、牛、山羊、猪、豚鼠、仓鼠、鸡、火鸡、或非人灵长类(例如猕猴)。所述组合物可以单独地包含rAAV，或与一个或多个其他病毒(例如编码具有一个或多个不同的转基因的第二rAAV)结合。在一些实施方式中，组合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多个不同的rAVV，其中每一个都具有一个或多个不同的转基因。

[0132] 本领域的技术人员根据rAAV指向的指征可以轻易地选择适当的载体。例如，一个合适的载体包括生理盐水，其可以与多种缓冲溶液(例如盐酸盐缓冲生理盐水)一起被配制。其他的示例性的载体包括但不限于无菌生理盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。

[0133] 任选地，除了rAAV和载体之外，本发明的组合物可以包含其他的常规的药学成分，例如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性的防腐剂包括但不限于氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸酯、乙基香草醛、甘油、苯酚和对氯苯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0134] 在一些实施方式中，rAAV组合物被配制来减少组合物中AAV颗粒的聚集，特别是存在高rAAV浓度(例如约10^{13} vg/ml或以上)的地方。用于减少rAAV聚集的方法是本领域已知的，并且包括例如加入表面活性剂、pH调节剂、盐浓度调节剂等(参见例如Wright et al. (2005) *Mol. Ther.* 12: 171-178等)。

[0135] 药学上可接受的赋形剂和载体溶液的制剂是本领域技术人员熟知的，在各种治疗方案中使用本文所述的特定组合物的合适的剂量和治疗方案的开发也一样。通常，这些制剂可以含有至少约0.1%的活性成分或更多，尽管活性成分的百分比当然可以被改变并且可以方便地是总制剂的重量或体积的例如约1%或2%和约70%或80%或更多。自然地，在每一个治疗上有益的组合物中的活性成分的量可以被制备使得将以化合物的任意给出的单位剂量的形式获得合适的剂量。本领域的技术人员将考虑制备这样的药学制剂的因素，例如溶解度、生物利用度、生物半衰期、给药的途径、产物保质期、以及和其他的药理学考量，因此，多种剂量和治疗方案可以是期望的。

[0136] 适用于可注射的应用的药物剂型通常包括无菌水溶液或分散体和无菌粉末，用于无菌可注射溶液或分散体的临时制备。分散体也可以被制备于甘油、液体聚乙二醇及其混合物中以及在油中。在储藏和使用的普通条件下，这些制剂含有防腐剂来预防微生物的生长。在许多情况下，所述剂型是无菌流体，以达到容易的可注射性存在的程度。制剂通常在制造和储存条件下是稳定的，并且针对微生物(例如细菌和真菌)的污染作用而被保存。在某些实施方式中，载体可以是溶剂或分散介质，其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物、和/或植物油。在某些实施方式中，可以例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、通过在分散的情况下维持所需的粒度、以及通过使用表面活性剂，维持适当的流动性。在各种实施方式中，可以通过各种抗细菌和抗真菌药剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)，实现微生物的作用的预防。在许多情况中，可能期望包括等渗剂，例如糖或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸酯和明胶)，实现可注射的组合物的长时间吸收。

[0137] 在用于可注射的水溶液的给药的某些实施方式中，例如，如果需要，溶液适当地可以是被缓冲的，液体稀释剂首先用足够生理盐水或葡萄糖使得溶液等渗。这些特定的水溶液尤其适合用于静脉内的、肌肉内的、皮下的和腹膜内的给药。在这种关系中，可以被使用

的无菌的水性介质对于本领域技术人员将是已知的。例如，一个剂量可以被溶解在1ml的等渗的NaCl溶液中，并且被加入至1000ml的皮下注射流体或被注射在输注的推荐位点处(参见例如"Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, 1035-1038和1570-1580页)。根据宿主的状况，可能出现一些剂量上的变化。在一些实施方式中，负责给药的人员将在任何情况下都将决定用于个体宿主的适当剂量。

[0138] 在某些实施方式中，可以通过以下方法制备无菌的可注射的溶液：将在适当的溶剂中的所需量的活性的rAAV与本文所列举的各种其他成分合并，然后按需要进行过滤灭菌。一般地，通过以下方法制备分散体：将各种灭菌的活性成分合并进无菌的载体，其包含基本的分散剂介质和来自上述列举的所需的其他成分。在用于制备无菌的可注射溶液的无菌的粉末的例子中，示例性的制备方法包括但不限于，真空干燥和冷冻干燥技术，其从其先前无菌地过滤的溶液中产生活性成分的粉末加上任何其他所需成分。

[0139] 在某些实施方式中，本发明所述的rAAV组合物也可以被配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐，包括酸加成盐(通过蛋白质的游离氨基形成)并且其由无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成。由游离羧基形成的盐也可以源于无机碱(例如钠、钾、铵、钙或氢氧化铁)和有机碱(例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。配制之后，将以与剂量制剂兼容的方式并且以治疗上有效的剂量施加溶液。制剂以各种剂量形式被轻易地施用，例如可注射溶液、药物释放胶囊等。

[0140] 如本发明所用的，"载体"包括任何和全部溶剂、分散介质、载体、包衣、稀释剂、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。这样的介质和药剂用于药物活性物质的应用在本领域是已知的。补充的活性成分也可以被并入组合物中。短语"药学上可接受的"指当被施用至宿主时不产生过敏的或类似的不良反应的分子实体和组合物。

[0141] 递送载体(例如脂质体、纳米胶囊、微粒、微球、脂质颗粒、囊泡等)可以被用于将本发明的组合物引入合适的宿主细胞。特别地，rAAV载体递送的转基因可以被配制用于在以下物质中递送或封装：脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等。

[0142] 在某些实施方式中，如此的制剂可以是本发明所公开的核酸或rAAV构建体的药学上可接受的制剂。脂质体的制剂和使用通常是本领域技术人员已知的(参见例如美国专利号5,741,516、5,567,434、5,552,157、5,565,213、5,738,868、5,795,587等)。

[0143] 脂质体已经成功地被使用于通过其他方法通常对转染具有抗性的许多细胞类型。此外，脂质体不受DNA长度限制，该限制对于基于病毒的递送系统是典型的。脂质体已经被有效地用于将基因、药物、放射治疗剂、病毒、转录因子和变构效应物引入各种培养细胞系和动物。此外，已经完成了几种成功的检验脂质体介导的药物递送的有效性的临床试验。

[0144] 脂质体由磷脂形成，所述磷脂被分散于水溶液介质中并且自发形成多层同心双层囊泡(又称为多层囊泡(MLV))。通常地MLV的直径为从25 nm至 4 μm。MLV的声波处理导致形成在核心含有水溶液的直径为200至500埃的小单层囊泡(SUV)。

[0145] 替代地，可以使用rAAV的纳米胶囊制剂。纳米胶囊通常地可以以稳定和可重复的方式捕获物质。为了避免由于细胞内聚合物超载而产生的副作用，可以使用能够在体内被降解的聚合物设计这样的超细粒子(大小约0.1 μm)。在某些实施方式中，预想使用符合这些要求的可生物降解的聚甲基-氰基丙烯酸酯纳米颗粒。

[0146] 除了如上所述的递送的方法之外，以下技术也被设想作为将rAAV组合物递送至宿主的替代的方法。超声导入(即超声)已经在美国专利号5,656,016中被使用和描述为用于增强药物渗透进入和穿过循环系统的速率和效力的装置。考虑的其他药物递送替代方法是骨内注射(美国专利号5,779,708)、微芯片装置(美国专利号5,797,898)、眼科的制剂、透皮基质(美国专利号5,770,219 和 5,783,208)和反馈控制的递送(美国专利号5,697,899)。

[0147] 试剂盒和相关的组合物

[0148] 在一些实施方式中，本文所述的药剂可以被组装进药学的或诊断性的或研究性的试剂盒，以便于其在治疗的、诊断性的或研究性的应用中使用。试剂盒可以包括一个或多个容器，其容纳本发明的组分以及使用说明。特别地，这样的试剂盒可以包括本文所述的一个或多个药剂、以及描述这些药剂的预期应用和适当用法的说明。在某些实施方式中，在试剂盒中的药剂可以是适用于药剂的特定应用和给药方法的药物制剂和剂量的形式。用于研究目的的试剂盒可以包含在用于运行各种实验的适当浓度或数量的组份。

[0149] 试剂盒可以被设计用于促进本文所述的方法的应用，并且可以采取多种形式。适用时，试剂盒的组合物的每一个都可以以液体形式(例如溶液)、或以固体形式(例如干燥粉末)提供。在某些情况下，组合物中的一些可以是可组成的或可加工的(例如活性形式)，例如，通过加入适当的溶剂或其他种类(例如水或细胞培养基)，其可以通过或不通过试剂盒提供。

[0150] 如本文所用的，“说明”可以定义说明和/或推广的组份，并且通常涉及对于本发明的包装或与其相关的书面说明。说明也可以包括以任何方式提供的任何口述的或电子的说明，使得使用者将清楚地认识，说明是与试剂盒相关的，例如视听(例如录像带、DVD等)、互联网和/或基于网站的通信等。书面的说明可以是由管理药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式，该说明也可以反映机构批准用于动物给药的制造、使用或销售。

[0151] 试剂盒可以包含在一个或多个容器中的本文所述的一个或多个组份。例如，在一个实施方式中，试剂盒可以包括这样的说明，所述说明用于混合试剂盒的一个或多个组份和/或分离和混合样品和应用至对象。所述试剂盒可以包括容纳本文所述的药剂的容器。所述药剂可以是液体、凝胶或固体(粉末)的形式。药剂可以被无菌地制备、包装于注射器中并且冷藏运输。替代地，它可以被容纳在小瓶或其他容器中以用于贮藏。第二容器可以具有无菌地制备的其他药剂。替代地，试剂盒可以包括预先混合的、并且在注射器、小瓶、试管或其他容器中运输的活性药剂。试剂盒可以具有将药剂施用至对象所需的一个或多个或全部的组件，例如注射器、局部施用装置或IV针管和袋。

[0152] 如本文所述的疗法可以与适当的诊断技术结合，以识别和选择用于该疗法的患者。例如，从患者分离样品，并且对样品测试已经与青少年巴滕病(纯合的或杂合的)的发展相关联的突变。因此，可以症状出现之前或在疾病的进展之前，识别含有突变的患者。

实施例

[0153] 以下实施例被提供来阐明本发明，而不是限制本发明。

[0154] 实施例1

[0155] 用于青少年巴滕病的治疗的基因疗法

[0156] 本实施例描述了用于青少年巴滕病的基因疗法的初步研究。虽然部分地由于相邻

的非转导细胞的交叉校正，基因疗法已经在改正涉及在可溶酶中的突变的巴滕病的形式中显示了前景(Passini *et al.* (2006) *J. Neurosci.* 26(5): 1334-1342; Sondhi *et al.* (2012) *Hum. Gene Ther. Meth.* 23(5): 324-335; Macauley *et al.* (2014) *J. Neurosci.* 34(39): 13077-13082)，但是这种方法已经被认为对于JNCL的治疗是有问题的，因为CLN3是跨膜蛋白(Cotman et al. (2012) Clin. Lipidol. 7(1): 79-91)，意味着必须转导更多细胞来产生表型效应。然而，本文提供的数据证明，可能在JNCL的小鼠模型中将CLN3递送至足够的细胞来改善运动行为。

[0157] 通过用于甲基-CpG结合蛋白2(MeCP2)的启动子驱动低CLN3表达水平，所述启动子先前在蕾特氏症(自闭症谱系障碍)的剂量依赖模型中是有效的(Garg *et al.* (2013) *J. Neurosci.* 33(34): 13612-13620)，其通过经由β-肌动蛋白驱动CLN3的高水平的单独的构建体。这种方法的基本原理是基于这样的预测，即正常细胞功能需要低CLN3水平，因为产后CLN3表达是受限的(Eliason *et al.* (2007) *J. Neurosci.* 27(37): 9826-9834)。本研究代表了体内CLN3剂量影响的首次证明，其中令人惊讶地观察到CLN3过表达的高水平掩饰了治疗的益处。

[0158] 如下所述，为了原理论证研究，1月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠静脉注射地接受了自我互补的(sc) AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3 (高表达) 或scAAV9/MeCP2-hCLN3 (低表达)的2×10^{12}个病毒基因组(vg)的一次剂量，使用驱动绿色荧光蛋白(GFP)表达的病毒(scAAV9/β-肌动蛋白-GFP 和scAAV9/MeCP2-GFP) 作为对照(参见图1)。重要地，在几个脑部区域中确认了对于hCLN3表达的启动子-剂量效应，在这些脑部区域中神经元注定会死于JNCL，这些区域包括海马(HPC)、纹状体(STR)、丘脑(TH)、视皮层(VC)和小脑(CB)，在其中相对于scAAV9/MeCP2-hCLN3，在接受scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3的$CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠中hCLN3水平被提升3至8倍。

[0159] 然而，在hCLN3水平和神经保护之间存在脱节，因为只有驱动hCLN3低表达的scAAV9构建体(scAAV9/MeCP2-hCLN3)能够校正在$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠中的运动缺陷(加速转棒和爬杆)，这证明了令人惊讶的结果，即在脑部中的CLN3高表达对于改善运动协调并非是有利的(参见图2A-2E)。通过溶酶体贮藏物质观察到相似的益处，其在接受scAAV9/MeCP2-hCLN3的动物的体感皮层桶状区皮层(S1BF) (参见图7A)、VC (参见图 7C)和TH (参见图7D) 中被显著地降低。

[0160] 通过scAAV9/GFP对照构建体没有观察到scAAV9/MeCP2-hCLN3在$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠中的运动行为上的有益效果，这确认了对于hCLN3的作用的特异性(参见图2A-2E)。如在S1BF、VC、STR、TH、HPC、和CB中的GFP表达证实(参见图4)，在脑部中病毒转导的范围是广泛。在1月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠中scAAV9/MeCP2-hCLN3转导了$NeuN^{+}$神经元和$GFAP^{+}$星形胶质细胞，然而在小神经胶质细胞中检测到有限的表达(参见图6A-6C)。尽管野生型CLN3表达仅仅在神经元和神经胶质的亚集中被恢复，但是这足以校正在$CLN3^{\Delta ex7/8}$动物中的疾病相关的病理(通过改善运动功能和减少溶酶体贮藏物质而测定)。不希望受理论束缚，设想的是，这可以反映在行为回路中细胞的剩余或通过其他机制来取代被不足的神经元/神经胶质CLN3弱化的回路进行的补偿，和/或可以反映被转导的细胞的数量被低估。

[0161] 根据这些观察，相信的是，scAAV9/MeCP2-hCLN3基因疗法将靶定足够数量的CNS细胞来显著地改善JNCL预后。

[0162] 方法和结果

[0163] 自我互补的AAV9(scAAV9)在非分裂细胞中持续作为稳定的游离体,有研究报道数年稳定的转基因表达。与传统的单链(ss)AAV载体相比,ScAAV9载体更有效10至100倍(McCarty *et al*. (2003) *Gene Ther*. 10(26): 2112-2118; McCarty *et al*. (2001) *Gene Ther*. 8(16): 1248-1254),但仅可以装配< 2.2 kb的外源DNA,这不是本发明所述的方法的限制,因为hCLN3 cDNA仅为1.3kb。scAAV9构建体被工程化来含有hCLN3,以促进它的翻译潜能(参见例如图1)。在某些构建体中,甲基CPG结合蛋白2(MeCP2)启动子被选择来驱动hCLN3表达。

[0164] 用于JNCL的基因疗法方法的可行性是通过数据支持的,所述数据显示,将scAAV9/MeCP2-hCLN3(单次剂量)全身性静脉注射地递送进入一月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠,显著地改善了运动行为,这没有通过含有GFP的对照病毒观察到(图2A)。在转导后的2个月(图2B)、在转导后的3个月(图2C)、在转导后的4个月(图2D)和在转导后的5个月(图2E)持续地观察到改善的运动行为。在1个月和在3个月的血液化学概况的分析显示,在任何治疗组中都没有异常(数据未图示)。

[0165] 分别使用β-肌动蛋白和MeCP2启动子,将scAAV9构建体工程化来获得在转导细胞中的hCLN3高表达和hCLN3低表达。通过眶后窦使用病毒转导1月龄的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠。小鼠在转导后5个月时和13个月时被处死,小鼠分别为6月龄和14月龄。从振荡切片机区段(300 μm厚)切开头部区域。对于两种hCLN3都确认了启动子的剂量效应,其中与低表达的scAAV9/MeCP2-hCLN3(图3)和GFP蛋白(图4)相比,在用scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3处理的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠的小脑(CB)、丘脑(TH)、海马(HPC)、纹状体(STR)、视觉皮层(VC)、体感皮层桶状区皮层(S1BF)和眼部中,表达被提升约3至8倍。

[0166] 此外,从采集自转导后5个月的小鼠的脑部横切片获取共聚焦图像,以进一步地可视化和确认分布和表达水平。使用相同的共聚焦设置获取图像,以突出表达差异。结果显示在用scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3和 scAAV9/MeCP2-hCLN3处理的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠中的广泛分布,在scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3处理的小鼠中GFP强度更大。图5A。结果也显示了scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3和scAAV9/MeCP2-hCLN3在转导之后13个月的小鼠的视网膜区域的分布。

[0167] 通过对GFP^{+}细胞和总的细胞数量($DAPI^{+}$)进行计数,确定在scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3和 scAAV9/MeCP2-hCLN3给药的5个月之后的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠的脑部中scAAV9/β-肌动蛋白-GFP或scAAV9/MeCP2-GFP的比较性分布。图6A。如在图6B中所概括的,scAAV9/MeCP2-hCLN3处理的小鼠显示了在脑部的S1BF、VPM/VPL和VC区域中在GFP^{+}细胞的百分比中的显著增加。

[0168] 通过在由两个启动子构建体转导的$NeuN^{+}$和$GFAP^{+}$细胞的百分比中的相似性(数据未显示),进一步证明了启动子的剂量效应的惊人发现。重要地,数据显示,接受低表达构建体(scAAV9/MeCP2-hCLN3)的单次注射的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠表现了在转导后5个月(到目前为止最新的间隔时间)在运动协调中的持续的改善,然而高表达构建体(scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3)是无效的(图2A-2E)。

[0169] 此外,在接受scAAV9/MeCP2-hCLN3的$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠的脑部中观察到在溶酶体贮藏物质中的显著减少(图7A-7G)。scAAV9的生物分布是广泛的,在S1BF、VC、HPC、STR、TH、CB和视交叉上核中$NeuN^{+}$神经元和$GFAP^{+}$星形胶质细胞被转导(SCN; 图8A以及数据未显示),这与

在Rett综合征和脊髓性肌萎缩(SMA)的模型中使用scAAV9的其他报道一致(Garg *et al.* (2013) *J. Neurosci.* 33(34): 13612-13620; Foust *et al.* (2010) *Nat. Biotechnol.* 28(3): 271-274)。如图8B所示,scAAV9的全身给药在$CLN3^{\Delta ex7/8}$脑部中转导星形胶质细胞。图8C显示,scAAV9的全身给药在$CLN3^{\Delta ex7/8}$脑部中不转导小神经胶质细胞。

[0170] 尽管似乎仅部分CNS细胞通过病毒被转导,但是在$CLN3^{\Delta ex7/8}$动物中的行为改善表明在神经元内的有益的固有作用和来自hCLN3转导的神经胶质的可能的非细胞的自主贡献。后者被期待来促进神经元存活,这是基于星形胶质细胞在三方突触处在调节谷氨酸水平和神经元活性中的非常好的作用(Perea *et al.* (2009) *Trends Neurosci.* 32(8): 421-431)。

[0171] JNCL的另一个常见症状是体重减轻。通过scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3或 scAAV9/GFP对照构建体没有观察到scAAV9/MeCP2-hCLN在$CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠中的体重增加上的有益效果,这确认了hCLN3作用的特异性(图11)。

[0172] 该指出的是,本发明所述的方法相对于常规疗法有利的地方在于,它能够采用全身性的递送途径来增强病毒的生物分布,以及独特的启动子(MeCP2)来驱动CLN3的低表达,因为最初数据显示高水平CLN3是无效的。总之,scAAV9/MeCP2-hCLN3的几个特性增加了改善JNCL预后的成功的可能性,即,1)这种方法将在疾病的根本原因上校正基因缺陷;2)所述病毒可以在青少年和成年动物中有效地转导CNS细胞,这是很关键的,因为JNCL直到5-10岁才会被诊断出来;3)MeCP2启动子驱动hCLN3的低表达,本发明所呈现的数据显示,这对于改善在$CLN3^{\Delta ex7/8}$小鼠的运动功能是必不可少的;并且4)构建病毒来含有hCLN3将加速它转变为临床实验。

[0173] 实施例2

[0174] 安全性、毒性和炎症评估

[0175] 在不同的实验鼠类上运行血清生化仪(Abaxis, Union City, CA, USA),以评估AAV治疗的安全性和毒性。测试的介质包括白蛋白(ALB)、碱性磷酸酶(ALP)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、淀粉酶(AMY)、胆红素(TBIL)、血液尿素氮(BUN)、钙(CA)、磷(PHOS)、葡萄糖(GLU)、钠 (Na^+)、钾(K^+)、总蛋白(TP)、球蛋白(GLOB)和肌酐(CRE)。病毒被施用至一月龄的小鼠,并且在感染后1个月 (图 12)、3个月 (数据未显示)、5个月 (数据未显示)、7个月(数据未显示)和 10个月 (图 13) 进行测试。数据显示了在某些分析物水平中的不同,例如,相比于其他实验组,在接受AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3的小鼠中的氨酸氨基转移酶水平增加,但是就每一个分析物的正常范围来说,这些不是统计上显著的。

[0176] 也使用MILLIPLEX®分析仪(EMD Millipore, Billerica, MA, USA) 进行了血清炎症介质分析。测试的介质包括:粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素γ(IFN-γ)、白介素-1α(IL-1α)、白介素-1ββ)、白介素-2(IL-2)、白介素-4(IL-4)、白介素-5(IL-5)、白介素-6(IL-6)、白介素-7(IL-7)、白介素-9 (IL-9)、白介素-10(IL-10)、白介素-12p70(IL-12p70)、白细胞介素-13(IL-13)、白介素-15(IL-15)、白介素-17(IL-17)、 趋化因子(C-C)配体2(CCL2)、趋化因子(CC)配体3(CCL3)、趋化因子(CC)配体5(CCL5/RANTES)、趋化因子(C-X-C)配体2(CXCL2)、趋化因子(C-X-C)配体9(CXCL9/MIG)、趋化因子(CXC)配体10(CXCL10)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和血管内皮生长因子(VEGF)。病毒被施用至一个月龄的小鼠。在转导后2个月和4个月采集样品,以评估AVV9是

否引出全身性的炎症的证据。在图14A-14F中仅显示被检测到的介质。与先前的研究一致，完全没有在对照处理的CLN3$^{\Delta ex7/8}$小鼠中系统性的炎症的证据，因为这些小鼠通常直到约一岁才会显示明显的全身性的或CNS炎症。此外，AAV9病毒没有显示全身性炎症改变的证据。这些数据一起表明了用于JNCL治疗的AAV9的安全性。

[0177] 实施例3

[0178] AAV制造

[0179] 通过瞬时转染程序生成AAV9，其中使用双链的基于AAV2-ITR的CB-GFP载体、编码Rep2Cap9序列的质粒、以及在293个细胞内的腺病毒的辅助质粒pHelper(Stratagene)。血清型9序列通过测序而被证实，并且等同于以前所描述的(Gao et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 11854-11859)。通过两个氯化铯密度梯度纯化步骤纯化病毒，针对PBS进行透析，并且使用0.001%Pluronic-F68进行配制以防止病毒聚集，并且储存于4 °C。使用Taq-Man技术，通过定量PCR滴定所有的载体制剂。

[0180] 所述AAV构建体含有在基因表达盒的侧面的两个反向末端重复。对左边的反向末端重复的修饰移除了Rep基因巧合(nicking)的位点，从而创造了自我互补的AAV基因组。表达盒含有如前所述的小鼠MeCP2启动子的片段(Garg et al. (2013) *J. Neurosci.* 33: 13612-13620; Adachi et al. (2005) *Hum Mol Genet.* 14: 3709-3722)以驱动转基因表达。表达盒含有SV40内含子和人类CLN3变体2 cDNA(GenBank登记号: NM_000086.2; SEQ ID NO: 11)，随后是牛生长激素多聚腺苷酸化序列。

[0181] 应该理解的是，本发明所述的实施例和实施方式仅用于示例性的目的，并且对本领域技术人员将会提出根据其的各种修改或改变，它们将被包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请(包括其中的序列表)的全部内容通过引用并入本文以用于所有目的。

[0001] 序列表

[0002] Sequence ID No: 1

[0003] LOCUS AAC05337 438 aa linear PRI 30-OCT-2002

[0004] DEFINITION CLN3 [智人种]

[0005] MGGCAGSRRRFSDSEGEETVPEPRLPLLDHQGAHWKNAVGFWLLGLCNNFSYVV

[0006] MLSAAHDILSHKRTSGNQSHVDPGPTPIPHNSSSRFDCNSVSTAAVLLADILPTLVIK

[0007] LLAPLGLHLLPYSPRVLVSGICAAGSFVLVAFSHSVGTSLCGVVFASISSGLGEVTFL

[0008] SLTAFYPRAVISWWSSGTGGAGLLGALSYLGLTQAGLSPQQTLLSMLGIPALLLAS

[0009] YFLLLTSPEAQDPGGEEEAESAARQPLIRTEAPESKPGSSSSLSLRERWTVFKGLLW

[0010] YIVPLVVVYFAEYFINQGLFELLFFWNTSLSHAQQYRWYQMLYQAGVFASRSSLRC

[0011] CRIRFTWALALLQCLNLVFLLADVWFGFLPSIYLVFLIILYEGLLGGAAYVNTFHNI

[0012] ALETSDEHREFAMAATCISDTLGISLSGLLALPLHDFLCQLS

[0013] Sequence ID No: 2

[0014] LOCUS scAAV_MP_CLN3 6055 bp DNA circular SYN 31-OCT-2014

[0015] 特征 Location/Qualifiers

[0016] misc_特征 662..767

[0017] /基因="突变的 ITR"

[0018] /SECDrawAs="区域"

[0019] /SECStyleId=1

[0020] misc_特征 775..1511

[0021] /基因="启动子"

[0022] /产物="mecp2 启动子--小鼠"

[0023] /SECDrawAs="区域"

[0024] /SECStyleId=1

[0025] misc_特征 1520..1550

[0026] /基因="SV40_late_19s_int"

[0027] /SECDrawAs="区域"

[0028] /SECStyleId=1

[0029] misc_特征 1520..1616

[0030] /基因="modSV40_late_16s_int"

[0031] /SECDrawAs="区域"

[0032] /SECStyleId=1

[0033] misc_特征 1589..1610

[0034] /基因="seq引物"

[0035] /SECDrawAs="区域"

[0036] /SECStyleId=1

[0037] CDS 1683..2999
[0038] /基因="CLN3"
[0039] /SECDrawAs="基因"
[0040] /SECStyleId=1
[0041] misc_特征 3052..3198
[0042] /基因="BGHpA"
[0043] /SECDrawAs="区域"
[0044] /SECStyleId=1
[0045] misc_特征 3278..3418
[0046] /基因="ITR"
[0047] /SECDrawAs="区域"
[0048] /SECStyleId=1
[0049] ORIGIN
[0050] 1 gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgattct
[0051] 61 aacgaggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg
[0052] 121 cgcattaagc gcggcgggtg tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc
[0053] 181 cctagcgccc gctcctttcg ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg ccggctttcc
[0054] 241 ccgtcaagct ctaaatcggg ggctcccttt agggttccga tttagtgctt tacggcacct
[0055] 301 cgaccccaaa aaacttgatt agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac
[0056] 361 ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac
[0057] 421 tggaacaaca ctcaacccta tctcggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat
[0058] 481 ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa
[0059] 541 aatattaacg cttacaattt aaatatttgc ttatacaatc ttcctgtttt tggggctttt
[0060] 601 ctgattatca accggggtac atatgattga catgctagtt ttacgattac cgttcatcgc
[0061] 661 cctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt
[0062] 721 tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggaat tctatcaaac

[0063] 781 catctgattc aacaatgaca gaccgatctc ttatgggctt ggcacacacc atctgcccat

[0064] 841 tataaacgtc tgcaaagacc aaggtttgat atgttgattt tactgtcagc cttaagagtg

[0065] 901 cgacatctgc taatttagtg taataataca atcagtagac cctttaaaac aagtcccttg

[0066] 961 gcttggaaca acgccaggct cctcaacagg caactttgct acttctacag aaaatgataa

[0067] 1021 taaagaaatg ctggtgaagt caaatgctta tcacaatggt gaactactca gcagggaggc

[0068] 1081 tctaataggc gccaagagcc tagacttcct taagcgccag agtccacaag ggcccagtta

[0069] 1141 atcctcaaca ttcaaatgct gcccacaaaa ccagcccctc tgtgccctag ccgcctcttt

[0070] 1201 tttccaagtg acagtagaac tccaccaatc cgcagctgaa tggggtccgc ctcttttccc

[0071] 1261 tgcctaaaca gacaggaact cctgccaatt gagggcgtca ccgctaaggc tccgccccag

[0072] 1321 cctgggctcc acaaccaatg aagggtaatc tcgacaaaga gcaaggggtg gggcgcgggc

[0073] 1381 gcgcaggtgc agcagcacac aggctggtcg ggagggcggg gcgcgacgtc tgccgtgcgg

[0074] 1441 ggtcccggca tcggttgcgc gcgcgctccc tcctctcgga gagagggctg tggtaaaacc

[0075] 1501 cgtccggaaa agttaactgg taagtttagt ctttttgtct tttatttcag gtcccggatc

[0076] 1561 cggtggtggt gcaaatcaaa gaactgctcc tcagtggatg ttgcctttac ttctaggcct

[0077] 1621 gtacggaagt gttacttctg ctctaaaagc tgcggaattg tacccgcggc cgatccaccg

[0078] 1681 gtatgggagg ctgtgcaggc tcgcggcggc gcttttcgga ttccgagggg gaggagaccg

[0079] 1741 tcccggagcc ccggctccct ctgttggacc atcagggcgc gcattggaag aacgcggtgg

[0080] 1801 gcttctggct gctgggcctt tgcaacaact tctcttatgt ggtgatgctg agtgccgccc

[0081] 1861 acgacatcct tagccacaag aggacatcgg gaaaccagag ccatgtggac ccaggcccaa

[0082] 1921 cgccgatccc ccacaacagc tcatcacgat ttgactgcaa ctctgtctct

acggctgctg

[0083] 1981 tgctcctggc ggacatcctc cccacactcg tcatcaaatt gttggctcct cttggccttc

[0084] 2041 acctgctgcc ctacagcccc cgggttctcg tcagtgggat ttgtgctgct ggaagcttcg

[0085] 2101 tcctggttgc cttttctcat tctgtgggga ccagcctgtg tggtgtggtc ttcgctagca

[0086] 2161 tctcatcagg ccttggggag gtcaccttcc tctccctcac tgccttctac cccagggccg

[0087] 2221 tgatctcctg gtggtcctca gggactgggg gagctgggct gctgggggcc ctgtcctacc

[0088] 2281 tgggcctcac ccaggccggc ctctcccctc agcagaccct gctgtccatg ctgggtatcc

[0089] 2341 ctgccctgct gctggccagc tatttcttgt tgctcacatc tcctgaggcc caggaccctg

[0090] 2401 gaggggaaga agaagcagag agcgcagccc ggcagcccct cataagaacc gaggccccgg

[0091] 2461 agtcgaagcc aggctccagc tccagcctct cccttcggga aaggtggaca gtgttcaagg

[0092] 2521 gtctgctgtg gtacattgtt cccttggtcg tagtttactt tgccgagtat ttcattaacc

[0093] 2581 agggactttt tgaactcctc tttttctgga acacttccct gagtcacgct cagcaatacc

[0094] 2641 gctggtacca gatgctgtac caggctggcg tctttgcctc ccgctcttct ctccgctgct

[0095] 2701 gtcgcatccg tttcacctgg gccctggccc tgctgcagtg cctcaacctg gtgttcctgc

[0096] 2761 tggcagacgt gtggttcggc tttctgccaa gcatctacct cgtcttcctg atcattctgt

[0097] 2821 atgaggggct cctgggaggc gcagcctacg tgaacacctt ccacaacatc gccctggaga

[0098] 2881 ccagtgatga gcaccgggag tttgcaatgg cggccacctg catctctgac acactgggga

[0099] 2941 tctccctgtc ggggctcctg gctttgcctc tgcatgactt cctctgccag ctctcctgac

[0100] 3001 ctgcaggtct agaaagctta tcgataccgt cgactagagc tcgctgatca gcctcgactg

[0101] 3061 tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg

[0102] 3121 aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga

[0103] 3181 gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg

[0104] 3241 aagacaatag caggcatgct ggggagagat cgatctgagg aacccctagt gatggagttg

[0105] 3301 gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg ggcgaccaaa ggtcgcccga

[0106] 3361 cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc

[0107] 3421 ccccccccccc ccccccccggc gattctcttg tttgctccag actctcaggc aatgacctga

[0108] 3481 tagcctttgt agagacctct caaaaatagc taccctctcc ggcatgaatt tatcagctag

[0109] 3541 aacggttgaa tatcatattg atggtgattt gactgtctcc ggcctttctc acccgtttga

[0110] 3601 atctttacct acacattact caggcattgc atttaaaata tatgagggtt ctaaaaattt

[0111] 3661 ttatccttgc gttgaaataa aggcttctcc cgcaaaagta ttacagggtc ataatgtttt

[0112] 3721 tggtacaacc gatttagctt tatgctctga ggctttattg cttaattttg ctaattcttt

[0113] 3781 gccttgcctg tatgatttat tggatgttgg aatcgcctga tgcggtattt tctccttacg

[0114] 3841 catctgtgcg gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc

[0115] 3901 gcatagttaa gccagccccg acacccgcca acacccgctg acgcgccctg acgggcttgt

[0116] 3961 ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag

[0117] 4021 aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt

[0118] 4081 ttataggtta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga

[0119] 4141 aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc

[0120] 4201 atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt

[0121] 4261 caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc

tgtttttgct

[0122] 4321 cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt

[0123] 4381 tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt

[0124] 4441 tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtattgac

[0125] 4501 gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac

[0126] 4561 tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct

[0127] 4621 gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg

[0128] 4681 aaggagctaa ccgcttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg

[0129] 4741 gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca

[0130] 4801 atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa

[0131] 4861 caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt

[0132] 4921 ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc

[0133] 4981 attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg

[0134] 5041 agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt

[0135] 5101 aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt

[0136] 5161 catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atccttttg ataatctcat gaccaaaatc

[0137] 5221 ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct

[0138] 5281 tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta

[0139] 5341 ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc

[0140] 5401 ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac

[0141] 5461 ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct

[0142] 5521 gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat

[0143] 5581 aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg

[0144] 5641 acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa

[0145] 5701 gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg

[0146] 5761 gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga

[0147] 5821 cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggcggga gcctatggaa aaacgccagc

[0148] 5881 aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct

[0149] 5941 gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct

[0150] 6001 cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagc

[0151] //

[0152] 多聚腺苷酸化信号

[0153] [SEQ ID NO:3]

[0154] AATAAA

[0155] 多聚腺苷酸化信号

[0156] [SEQ ID NO:4]

[0157] CAATAAA

[0158] 多聚腺苷酸化信号

[0159] [SEQ ID NO:5]

[0160] ATTAAA

[0161] 多聚腺苷酸化信号

[0162] [SEQ ID NO:6]

[0163] TANA

[0164] CLN3［犬类狼］

[0165] SEQ ID No: 7

[0166] MGGCAGSRRRLLDSEEEETAPEPRPPRSYHKGALWKNVMGFWLLGLCNNFSYVV

[0167] MLSAAHDILSHQRASGNQSHVDPDPPPTAHNSSSRFDCNSVSTAAVLLADILPTLIIK

[0168] LLAPLGLHLLPYSPRVLVSGICAAGSFILVAFSHSVGTSLCGVVLASISSGVGEVTFL

[0169] SLTAFYPRAVISWWSSGTGGAGLMGALSYLGLTQAGLSPQHTLLSMLGIPALMLAS

[0170] YFFLLTSPEPQDPGGEEEAETSARQPLIDSETPESKPDSSSNLSLQERWTVFKGLLWY

[0171] IVPLVLVYFAEYFINQGLFELLFFRNTSLNHAQQYRWYQMLYQAGVFVSRSSLHCC

[0172] RIRFTWVLALLQCLNLAFLLVDVWFSFLPSIYLVFLIILYEGLLGGAAYVNTFHNIAL

[0173] ETSDQHREFAMAAACISDTLGISLSGLLALPLHDFLCHLS

[0174] CLN3［小鼠］

[0175] SEQ ID No: 8

[0176] MGSSAGSWRRLEDSEREETDSEPQAPRLDSRSVLWKNAVGFWILGLCNNFSYVVM

[0177] LSAAHDILKQEQASGNQSHVEPGPTPTPHNSSSRFDCNSISTAAVLLADILPTLVIKL

[0178] LAPLGLHLLPYSPRVLVSGVCSAGSFVLVAFSQSVGLSLCGVVLASISSGLGEVTFLS

[0179] LTAFYPSAVISWWSSGTGGAGLLGSLSYLGLTQAGLSPQHTLLSMLGIPVLLLASYF

[0180] LLLTSPEPLDPGGENEAETAARQPLIGTETPESKPGASWDLSLQERWTVFKGLLWYI

[0181] IPLVLVYFAEYFINQGLFELLFFRNTSLSHAQQYRWYQMLYQAGVFASRSSLQCCRI

[0182] RFTWVLALLQCLNLALLLADVCLNFLPSIYLIFIIILYEGLLGGAAYVNTFHNIALETS

[0183] DKHREFAMEAACISDTLGISLSGVLALPLHDFLCHLP

[0184] CLN3［绵羊］

[0185] SEQ ID No: 9

[0186] MGGCAGSPRRLSDSEGEETDPAPRPPLQDSQGAHWKNAVGFWLLGLCNNFSYVV

[0187] MLSAAHDILSHQRTAGNQSHVDPDPTPTSHNSSSRFDCNPVSTAAVLLADILPTLIIK

[0188] LLAPLGLHLLPYSPRVLTSGICAAGSFLLVAFSHSVMISLCGVVLASISSGLGEVTFLS

[0189] LTAFYPRAVISCWSSGTGGAGLLGALSYLGLTQAGLSPQHTLLSMLGIPTLLLASYF

[0190] LLLTSPGPQDPRGEEDSDTAARQPLINNEASESKPGSGSPLSLQERWTVFKGLLHYI

[0191] VPLVLVYFAEYFINQGLFELLFFRNTFLTHAEQYRWYQMLYQAGVFASRSSLRCCPI

[0192] RHTWVLALLQCLNLAFLLVDVWLSFLPSIYLIFLIIVFEGLLGGAAYVNTFHNIALET

[0193] SDEHREFAMATACISDTLGISLSGLLALPLHDFLCQLT

[0194] CLN3［猫］

[0195] SEQ ID No: 10

[0196] MGGCAGSRRRLLDSEGEETAPEPRPRLLDRQGALWKNAMGFWLLGLCNNFSYVV

[0197] MLSAAHDILSHQRASGNQSHVDPDPAPTTHNSSSRFDCNSVSTAAVLLADILPTLVI

[0198] KLLAPLGLHLLPYSPRVLVSGICSAGSFILVAFSHSVGTSLCGVVLASISSGLGEVTFL

[0199] SLTAFYPRAVISWWSSGTGGAGLLGALSYLGLTQAGLSPQHTLLSMLGIPALLLAS

[0200] YFFLLTSPEPQDPGGEEEAETSARQPLINSEAPEAKPDSSSNLSLQERWTVFKGLLW

[0201] YIVPLVLVYFAEYFINQGLFELLFFRNTSLTHAQQYRWYQMLYQAGVFVSRSSLRC

[0202] CRIRFTWVLALLQCFNLAFLLVDVWLSFLPSIYLVFLIILYEGLLGGAAYVNTFHNIA

[0203] LETSDEHREFAMAXACISDTLGISLSGLLALPLHDFLCRLS

[0204] CLN3, 变体2 mRNA

[0205] [SEQ ID No 11]

[0206] ATGGGAGGCTGTGCAGGCTCGCGGCGGCGCTTTTCGGATTCCGAGGGGGAGGA

[0207] GACCGTCCCGGAGCCCCGGCTCCCTCTGTTGGACCATCAGGGCGCGCATTGGAA

[0208] GAACGCGGTGGGCTTCTGGCTGCTGGGCCTTTGCAACAACTTCTCTTATGTGGT

[0209] GATGCTGAGTGCCGCCCACGACATCCTTAGCCACAAGAGGACATCGGGAAACC

[0210] AGAGCCATGTGGACCCAGGCCCAACGCCGATCCCCCACAACAGCTCATCACGA

[0211] TTTGACTGCAACTCTGTCTCTACGGCTGCTGTGCTCCTGGCGGACATCCTCCCCA

[0212] CACTCGTCATCAAATTGTTGGCTCCTCTTGGCCTTCACCTGCTGCCCTACAGCCC

[0213] CCGGGTTCTCGTCAGTGGGATTTGTGCTGCTGGAAGCTTCGTCCTGGTTGCCTTT

[0214] TCTCATTCTGTGGGGACCAGCCTGTGTGGTGTGGTCTTCGCTAGCATCTCATCAG

[0215] GCCTTGGGGAGGTCACCTTCCTCTCCCTCACTGCCTTCTACCCCAGGGCCGTGAT

[0216] CTCCTGGTGGTCCTCAGGGACTGGGGGAGCTGGGCTGCTGGGGGCCCTGTCCTA

[0217] CCTGGGCCTCACCCAGGCCGGCCTCTCCCCTCAGCAGACCCTGCTGTCCATGCT

[0218] GGGTATCCCTGCCCTGCTGCTGGCCAGCTATTTCTTGTTGCTCACATCTCCTGAG

[0219] GCCCAGGACCCTGGAGGGGAAGAAGAAGCAGAGAGCGCAGCCCGGCAGCCCC

[0220] TCATAAGAACCGAGGCCCCGGAGTCGAAGCCAGGCTCCAGCTCCAGCCTCTCCC

[0221] TTCGGGAAAGGTGGACAGTGTTCAAGGGTCTGCTGTGGTACATTGTTCCCTTGG

[0222] TCGTAGTTTACTTTGCCGAGTATTTCATTAACCAGGGACTTTTTGAACTCCTCTT

[0223] TTTCTGGAACACTTCCCTGAGTCACGCTCAGCAATACCGCTGGTACCAGATGCT

[0224] GTACCAGGCTGGCGTCTTTGCCTCCCGCTCTTCTCTCCGCTGCTGTCGCATCCGT

[0225] TTCACCTGGGCCCTGGCCCTGCTGCAGTGCCTCAACCTGGTGTTCCTGCTGGCA

[0226] GACGTGTGGTTCGGCTTTCTGCCAAGCATCTACCTCGTCTTCCTGATCATTCTGT

[0227] ATGAGGGGCTCCTGGGAGGCGCAGCCTACGTGAACACCTTCCACAACATCGCC

[0228] CTGGAGACCAGTGATGAGCACCGGGAGTTTGCAATGGCGGCCACCTGCATCTCT

[0229] GACACACTGGGGATCTCCCTGTCGGGGCTCCTGGCTTTGCCTCTGCATGACTTCC

[0230] TCTGCCAGCTCTCCTGA

[0231] AAV2 VP1

[0232] [SEQ ID No 12]

[0233] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGP

[0234] FNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTS

[0235] FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQ

[0236] QPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGA

[0237] DGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHY

[0238] FGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQND

[0239] GTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG

[0240] SQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ

[0241] YLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNN

[0242] NSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTN

[0243] VDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVW

[0244] QDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA

[0245] AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGV

[0246] YSEPRPIGTRYLTRNL

[0247] AAV9 VP1

[0248] [SEQ ID No 13]

[0249] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYL

[0250] GPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKE

[0251] DTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKS

[0252] GAQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEG

[0253] ADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDN

[0254] AYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTD

[0255] NNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLN

[0256] DGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLI

[0257] DQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQ

[0258] NNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGR

[0259] DNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQGQRGNYSRGVDAQAAQTGW

[0260] VQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKN

[0261] TPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKS

[0262] NNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRY LTRNL

[0263] AAV2 VP2

[0264] [SEQ ID No 14]

[0265] MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPP

[0266] AAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRT

[0267] WALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLIN

[0268] NNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSA

[0269] HQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY

[0270] TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDI

[0271] RDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMA

[0272] SHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVST

[0273] NLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMG

[0274] GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKR

[0275] WNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0276] AAV9 VP2

[0277] [SEQ ID No 15]

[0278] DGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNA

[0279] YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDN

[0280] NGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLND

[0281] GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLID

[0282] QYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQN

[0283] NNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRD

[0284] NVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGM

[0285] VWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTA

[0286] FNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNT

[0287] EGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0288] AAV2 VP3

[0289] [SEQ ID No 16]

[0290] MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH

[0291] LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKR

[0292] LNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPA

[0293] DVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSS

[0294] YAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLP

[0295] GPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKF

[0296] FPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQA

[0297] ATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPP

[0298] QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTS

[0299] NYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0300] AAV9 VP3

[0301] [SEQ ID No 17]

[0302] MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH

[0303] LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKR

[0304] LNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPA

[0305] DVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSS

[0306] YAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLP

[0307] GPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKF

[0308] FPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQA

[0309] ATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPP

[0310] QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTS

[0311] NYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0312] AAV2 Rep78

[0313] [SEQ ID No 18]

[0314] MPGFYEIVIKVPSDLDEHLPGISDSFVNWVAEKEWELPPDSDMDLNLIEQAPLTVAE

[0315] KLQRDFLTEWRRVSKAPEALFFVQFEKGESYFHMHVLVETTGVKSMVLGRFLSQIR

[0316] EKLIQRIYRGIEPTLPNWFAVTKTRNGAGGNKVVDECYIPNYLLPKTQPELQWAW

[0317] TNMEQYLSACLNLTERKRLVAQHLTHVSQTQEQNKENQNPNSDAPVIRSKTSARY

[0318] MELVGWLVDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTA

[0319] PDYLVGQQPVEDISSNRIYKILELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPA

[0320] TTGKTNIAEAIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKMVIWWEEGKMTAKVVESA

[0321] KAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMF

[0322] KFELTRRLDHDFGKVTKQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDA

[0323] DISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRYQNKCSRHVGMNLMLFPCRQCERMNQ

[0324] NSNICFTHGQKDCLECFPVSESQPVSVVKKAYQKLCYIHHIMGKVPDACTACDLVN

[0325] VDLDDCIFEQ

[0326] AAV2 Rep68

[0327] [SEQ ID No 19]

[0328] MPGFYEIVIKVPSDLDEHLPGISDSFVNWVAEKEWELPPDSDMDLNLIEQAPLTVAE

[0329] KLQRDFLTEWRRVSKAPEALFFVQFEKGESYFHMHVLVETTGVKSMVLGRFLSQIR

[0330] EKLIQRIYRGIEPTLPNWFAVTKTRNGAGGGNKVVDECYIPNYLLPKTQPELQWAW

[0331] TNMEQYLSACLNLTERKRLVAQHLTHVSQTQEQNKENQNPNSDAPVIRSKTSARY

[0332] MELVGWLVDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTA

[0333] PDYLVGQQPVEDISSNRIYKILELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPA

[0334] TTGKTNIAEAIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKMVIWWEEGKMTAKVVESA

[0335] KAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMF

[0336] KFELTRRLDHDFGKVTKQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDA

[0337] DISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRLARGHSL

[0338] AAV2 Rep52

[0339] [SEQ ID No 20]

[0340] MELVGWLVDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTA

[0341] PDYLVGQQPVEDISSNRIYKILELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPA

[0342] TTGKTNIAEAIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKMVIWWEEGKMTAKVVESA

[0343] KAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMF

[0344] KFELTRRLDHDFGKVTKQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDA

[0345] DISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRYQNKCSRHVGMNLMLFPCRQCERMNQ

[0346] NSNICFTHGQKDCLECFPVSESQPVSVVKKAYQKLCYIHHIMGKVPDACTACDLVN

[0347] VDLDDCIFEQ

[0348] AAV2 Rep40

[0349] [SEQ ID No 21]

[0350] MELVGWLVDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTA

[0351] PDYLVGQQPVEDISSNRIYKILELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPA

[0352] TTGKTNIAEAIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKMVIWWEEGKMTAKVVESA

[0353] KAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMF

[0354] KFELTRRLDHDFGKVTKQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDA

[0355] DISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRLARGHSL

[0356] 小鼠MeCP2可变的启动子序列

[0357] [SEQ ID No 22]

[0358] GAACAACGCCAGGCTCCTCAACAGGCAACTTTGCTACTTCTACAGAAAA

[0359] TGATAATAAAGAAATGCTGGTGAAGTCAAATGCTTATCACAATGGTGAACTACT

[0360] CAGCAGGGAGGCTCTAATAGGCGCCAAGAGCCTAGACTTCCTTAAGCGCCAGA

[0361] GTCCACAAGGGCCCAGTTAATCCTCAACATTCAAATGCTGCCCACAAAACCAG

[0362] CCCCTCTGTGCCCTAGCCGCCTCTTTTTTCCAAGTGACAGTAGAACTCCACCAAT

[0363] CCGCAGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCCTAAACAGACAGGAACTCCT

[0364] GCCAATTGAGGGCGTCACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCA

[0365] ATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTG

[0366] CAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGAGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGG

[0367] TCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGT

[0368] AAAACCCGTCCGGAAAA

[0369] 小鼠MeCP2可变的启动子序列

[0370] [SEQ ID No 23]

[0371] TCAAACCATCTGATTCAACAATGCACGACCGATCTCTTATGGGCTTGGCACACA

[0372] CCATCTGCCCATTATAAACGTCTGCAAAGACCAAGGTTTGATATGTTGATTTTA

[0373] CTGTCAGCCTTAAGAGTGCGACATCTGCTAATTTAGTGTAATAATACAATCAGT

[0374] AGACCCTTTAAAACAAGTCCCTTGGCTTGGAACAACGCCAGGCTCCTCAACAGG

[0375] CAACTTTGCTACTTCTACAGAAAATGATAATAAAGAAATGCTGGTGAAGTCAAA

[0376] TGCTTATCACAATGGTGAACTACTCAGCAGGGAGGCTCTAATAGGCGCCAAGA

[0377] GCCTAGACTTCCTTAAGCGCCAGAGTCCACAAGGGCCCAGTTAATCCTCAACAT

[0378] TCAAATGCTGCCCACAAAACCAGCCCCTCTGTGCCCTAGCCGCCTCTTTTTTCCA

[0379] AGTGACAGTAGAACTCCACCAATCCGCAGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCC

[0380] TGCCTAAACAGACAGGAACTCCTGCCAATTGAGGGCGTCACCGCTAAGGCTCC

[0381] GCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGG

[0382] GGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGAGGGCG

[0383] GGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCCTC

[0384] CTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGGAAAA

[0385] 带有CMV增强子的CBA启动子

[0386] [SEQ ID No 24]

[0387] CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCG

[0388] CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT

[0389] CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA

[0390] TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG

[0391] GCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA

[0392] GTACATCTACTCGAGGCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCC

[0393] CACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGC

[0394] GGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGG

[0395] GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCC

[0396] GAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGA

[0397] AGCGCGCGGCGGGCGGGAG

[0398] 神经丝轻链基因启动子

[0399] [SEQ ID No 25]

[0400] GTAAATACTAAGAGTGTTTTATGCAGACTCACACACACTAAGTGTGGAACAATG

[0401] AGGTTTGCAGGGAGCAGGTTAACAAAATAATCCATTCTGCCATGCTTCATCTAC

[0402] ATATGGGTAATTGGGAGGAGACAACTCTATGGCTTATCTGGGTCCTTGTTCCAC

[0403] CCTCCGCCTCCAGAGAAGCCTATTCCACCCTTGAATTTCATGAGTGAAAAGACC

[0404] AAGGATAGCTAGGCTATGAAAAGTCAACAGAGTAAGTACCCTACCAAACCTGC

[0405] CAGGGACAAACAATATTCAGGACAGCCTCATGACCTTAGGCTTAAAATCTACA

[0406] ATATTTGGGCATGGATGGTCCTCTGAGATCACTTAGTCTTGATAGATTTAAACT

[0407] ACTAATTTTCAATATTTGTGAATTTGCATTATTTGCGACAACAGACATTGTTTAG

[0408] AAACCTGAGGAAAGTTATCTGCTGCAGTCTATCATGAGGACGGTGGGCTATCAC

[0409] AATCACAGGTATTTTTTTTGGGGGGGGGGATGAGAAAGGGCCTCTGAAGATAA

[0410] GCCTCACCCCATCCTTTCCTCGGGAGAGAGTGAAATGTCTCCAGAAGCAACTGC

[0411] ACCACTGCAAATACTTCACCCTCCAAGTATCACAGGGGAAGCCATTCCGGGCTT

[0412] CTCTATTTGAAAACAATTACCATATTCCCCCTCAGTTTGCCTCTTAAAAAAAACA

[0413] TAAGTTGCACAATCAAATGCTGCGATATACAAATAAAACAAAAACTAAATGCT

[0414] TGCTCAGATAAATCTTAGGTGTTTCGTGTAAATCTCTGCAATCCCTCCATGAAAC

[0415] CTGGGGGACTCCTAACATCATGCGTGTGAAAATGCCCTGCAAACCGTAGGGTTG

[0416] TATCCACGTGCGCTACCGCGTGCGCCAGTTTCAAGCATCTGGGTGCTTCCTGAA

[0417] GGAAATCCATGCATTCCTGACTGCATCTGTTTTCGGGTTATTACATTGTATCGGG

[0418] GAAGAGTCACGCGGCTATGGCTATTTTCTATCCGTTCCTGAAGAAGCCTGGGTG

[0419] CCGAGTTCTCCTCCCCAGAGACCACACCCAGCGCTTAGGGCTGGCCGCAGCGGC

[0420] TTCCCTGAAAATCAGCCAACTGCAAGGCTTATCGAAATCATCAGGTCGTGTGCT

[0421] ACACATGTGTAAAAAGAGGAAAGCGGACTTTAAATGTGCTGCGGTTGGTGGTA

[0422] GCAAGCAGGAATTTAGCTTGGTGAGGATCCAGGCAGCTTGAAGCTCCCGGCTG

[0423] CGGACGCGCGGCTCCCTCAGCAAGTCAGTCTCTGTGTTTCCAACTCTTTCTCTGC

[0424] CCTCACCACCCACACACTGCAACACGTTAAAGCCATCTGCGGCTTCATTCTCAG

[0425] TTAAGAAATGTGAAAATCTAGAAACACTAACAGGCGGATTAACTGCTGTAAGG

[0426] GTTTAAAAATGCTAAACCAATACCTGCAGTAGTGCCGCAGTTTCACGAGTGTGT

[0427] GTGTGTGTGTGTGTGTGCGCGCGCGCGCATCGCGCGACACTCCCTATGTGTTAA

[0428] GCAGCTCATTAAAGAAAAAGAAAAATAATCAGGAGAAAGGAAGATGAATTAC

[0429] AGAAAGTGCCAGAAAGCTAGAAAGAAATTAAAACTCTTCTCCATACATACTGC

[0430] ATACACATAACCTAGCCTATTTATTTGTATCTAAAATTCCCTAGCCGCACCATCA

[0431] CCGTAAACACCAAGGGAAAAAATTAAGGAGGTTCCTGGTGGGAAAAGGGCGA

[0432] GTTGGGGGGACAGGGTGTCTGCGAGGTGACGGGATACACAAAACTAGGGTGTC

[0433] AAAAGGGAGCAAGAACCTGTTTTGAGGGCAACTTAAGGATCCAAGTGTCACGG

[0434] GGTCTGGGCAATGAAGGACGGGAGGGGCTGCGTGAGTGAGTACAGAAGGGAA

[0435] ATGAGTGAGGGGGCATGGGATCTCAGAGAAAATCAGGGCCCTCTGAGCAAAGT

[0436] GGAAAGGACGACCGCCGCAGCTCCTCGGGCCGTAGCCCGACCCCGCCTTCCCTT

[0437] TTGCGCAGAATCCTCGCCTTGGCTGCAGCAGCGCGCTGCCCCCACTGGCCGGCG

[0438] TGCCGTGATCGATCGCAGGCTGCGTCAGGACCTCCCGGCGTATAAATAGGGGTG

[0439] GCAGAACGGCGCCGAGCCGCACACAACCATCCATCCTCCCCCTTCCCTCTCTCC

[0440] CCTGTCCTCTCTCTCCGGGCTCCCACCGCCGCCGCGGGCCGGGGAGCACCGGCC

[0441] GCCACCATGAGTTCCTTCAGCTACGAGCCGTACTACTCGACCTCCTACAAGCGG

[0442] CGCTACGTGGAGACGCCCCGGGT

[0443]

[0444]

[0445] 神经元特异性的vgf基因启动子

[0446] [SEQ ID No 26]

[0447]

[0448] CTCGAGGATCTGATTAAATACACAATTGCTTCCCCCCATTCCCTTTCTTTTTCTC

[0449] CCCGCCCCGGCCATGTATCTCATTCATCTCCATACACACATAAACACACATGCA

[0450] CAAGCCATGTACATGTACACGCAGGTGTGTGTGCATACACAAGCCAACAGGCA

[0451] AATACAGTTTCTCCAGGTGCCTGTCTTCTCTCATCTTGCAACTTGGTCTCTGATC

[0452] CCCATCAGCCACTCAGTCAGCCCCCTTGGCTCCCTCCCTCCCCTCTCCCTTCTCT

[0453] CTTGGATGGGTTCCCCTCCCCCTCTCCAGATGTCTGAGCCATCTTCTCTCTGATT

[0454] CATCCTCCTCAGGAAGGAACGTGACCCCCTCCCCATCCCACTGCCTCTGTATCA

[0455] GGCTGGGAAGATGAAGGGGACATGGGGGCGGGGAGAGGAAGGAGGGGAGGCC

[0456] GTGGTTAGTTGTGCGTGGGGATGGGAGGCATTGCCTGGGGTCTCCTACCCCCTC

[0457] TTTTCCCCTCCCTTTCTTTGGAATCTCCACTGTCACCTTGGTTCTCAGTTTTTTTTT

[0458] CTCCTTTAGCCTGCTCCTTCTACCTGTTCCAGATCCCTTCATTCCTTCCTCCTCCC

[0459] CTGCCCCCATCTCTTCTCTCTTTTCTCCCTCTCCACTCCTCCCCATTTCTTTCCCG

[0460] CCAAGAGCTGATGGGCTTTCTTCTGGGAAAGTCGAGCCACTGATGGAAGCGAG

[0461] AAGCCACTGCTGGTTATAGAGAGAAAGCACGTGAGTGTGTGTGTAGGGAGGGG

[0462] GAGGTTAGAAGGAGGGTCAGTGCCAGGAAGAGGTGAGGAGGGGGGGGAGGAC

[0463] CGTTTCTGAAAGAGTCTCTAAGACCCTGACAGACAGCCCTGACCTTGGTTTCCA

[0464] GAGTCTCAGGGTGCGGTGCCCTGCGTGTGCCCACAGAGCACCCCTATGTCCGCA

[0465] GTTCGTGTGTGTCTGGCGTGTGTCATTGTATTCCCCCCCCCTTGGGTGCCCAGGC

[0466] CCGCCACCGCTCTCTGCCAGCACCGCAGCCCCCTCCAGGCTTCCTCCCTCCCTCC

[0467] CCTTCATTCCTGCAGTGGCTGCCCCCCTTGCCACCCTCTCCTCTCCCCTGCCCCC

[0468] TCCCCATTTCCTGCCTCCCCCCCACCCGCCCCACGGCTGGTCTCCCTTGACCGGA

[0469] CCCAGCTCTCTGATGGATTCTCTTTGCGCAAATCTGTGCGTCATCGCCCCCACCC

[0470] CCGGAACCTCTAGCTGTCCAAGCCCCCAGCCCCAACCTCTCTGGCAGGAGATAC

[0471] GGTCGAAGGGGCTGGTGGCAGAGAGGGGCTATCTCTGACGTTGCAGGTCCCCC

[0472] TCCCATCGCGTTCAAACCTTCCCTTTAAGCGGTGGAGAGAGCTGGAGTTGAGTC

[0473] ACCCCCCCCCCCACCTGCGCAACCCCCTCCCCACCTGCTCTGGTCTCGCCCTCCA

[0474] AACGTCCTTGGGGGAGGGGAGCGGGCCAGGAGGGAAAGCGACTGGGGAGTGT

[0475] GGGAAGAGATGGGGCCGAAGGGGGCACAGCGGGGGGCCTTGACACAAGCGGC

[0476] AGTCAGGGGACAGAAGGACAGACACACCTTTTTCTCCAGACACAGCACGGATC

[0477] GTGAAACAGACACGACCCAGAGGCACACACATCCTCATTCTTTCCCTTTTCTCTT

[0478] CCGACTCGGACCCTTCCGATGGGATTACCAAAACCGCAAGATCCACCCATCTCC

[0479] GCTGTCAGGGGCTGCACCCCGACTGCCCATTCCGGGACAGCCGCAGGCGTGCA

[0480] GATCTGTCCCTCTGCACTCAGGTTCACGCCGTCCTTGGGGCCGTGGTCTCGGGG

[0481] TGGGGAACCGGCCCCTGGTCGGCTCTTGAATCTTTATCCTTCCCCTCCCCAGTAT

[0482] TGAGCTCCCACTGGTGCCCAGTCAGACGCTGGGACTACCCTTTTTCTATTCCACT

[0483] CAGCAACGCGGGCTCCATCCAGCAGCTCCAAGTTGCTCTGCAACCCACCCTCCC

[0484] GCCTTCCAGCGCCTCTGCATCCACCCTTCCATTCATTCTCCCATTCATTCATTCAT

[0485] CCTTTTCTCCTCGTCCCTCCTTCATTCATTCATAGCCCCCCGCCCTGCCCGCTTCA

[0486] GCATTTCATTCATTCATTCATTCATTCATTTCCCGGAGCTCCGCTAGCGCACACC

[0487] CCTTCAGCCGAAGCCCCAGCGCGCAGGCGCAGGCCGGGAGAGGCAGGCACCCT

[0488] CCAATCGTCGGGCGTCCTTCCTCCTCCGGGCGGCCGCCCGCTTCCCCATGAATG

[0489] AACATTGACGTCAATGGGGCGGGGCGCGCCCACGTGACCCCGCGCGCTCCCCTT

[0490] TATAAGGCGGTGGAGGCGCGGGGCTGTCCAGCGTGCTGAAGCGGAGCGAGCTA

[0491] GCCGCCCGGAGCCGCGCCGACCCAG

[0492] CMV启动子

[0493] [SEQ ID No 27]

[0494] TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT

[0495] ACATAACTTACGGTAAAT GGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC

[0496] ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG CCAATAGGGACTTTCCA

[0497] TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA

[0498] A GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC

[0499] CCGCCTGGCATTATGCCCAG TACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGT

[0500] ACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG CGGTTTTGGCAGTACA

[0501] TCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCA

[0502] TT GACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAAT

[0503] GTCGTAACAACTCCGCCCCA TTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG

[0504] GAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAG

[0505]

[0506] RSV启动子

[0507] [SEQ ID No 28]

[0508]

[0509] CGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGA

[0510] TGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAA

[0511] AAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTC

[0512] GCTTTTGCATAGGGAGGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTG

[0513] CAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACC

[0514] GTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGC

[0515] AACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCGCATTGCAGAG

[0516] ATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTCAC

[0517] CACATTGGTGTGCACCTCCAAGGCC

[0518] SV40启动子

[0519] [SEQ ID No 29]

[0520] CAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCA

[0521] GGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGCTCCCCAG

[0522] CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCG

[0523] CCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGC

[0524] CCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTC

[0525] TGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA

[0526] AAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTT

[0527]

[0528]

[0529] PGK启动子

[0530] [SEQ ID No 30]

[0531] GATCTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCT

[0532] TTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACA

[0533] CATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCTTC

[0534] GCGCCACCTTCTACCCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCGCCCCGCAGCTC

[0535] GCGTCATGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCA

[0536] AATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCCTTGGGGCAGCGGCC

[0537] AATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGT

[0538] CCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCCGAAGGTC

[0539] CTCCGGAGGCCCGGCATTCCGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTT

[0540] CTCTTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTTCGA

[0541]

[0542]

[0543] EFα启动子

[0544] [SEQ ID No 31]

[0545] GATCTCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGT

[0546] CCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGT

[0547] GGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCG

[0548] AGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCACTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTC

[0549] GCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGG

[0550] CCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGC

[0551] TGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTT

[0552] CGTGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGTGGCCTGGC

[0553] CTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCG

[0554] CTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT

[0555] TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCAGCACACTGGTAT

[0556] TTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATG

[0557] TTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT

[0558] CTCAAGCTGCCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCC

[0559] CGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGA

[0560] TGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCACAAAATGGAGGACGCGGCGCTC

[0561] GGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCT

[0562] CAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCG

[0563] ATTAGTTCTCCAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTA

[0564] TGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTG

[0565] GCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTC

[0566] ATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGT

[0567] GAAAACTACCCCTAAAAGCCAAAA

[0568]

[0569]

[0570] 突触蛋白启动子

[0571] [SEQ ID No 32]

[0572] AGATCTCTGCAGAAGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGAT

[0573] GAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGC

[0574] ACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGA

[0575] AACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGT

[0576] GCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGC

[0577] GCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCG

[0578] CGTCCGCGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAG

[0579] GGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGA

[0580]

[0581]

[0582] NSE启动子

[0583] [SEQ ID No 33]

[0584] ATGGCGCCGGGCCTTTCTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCATGGTGGCTTTACCAAC

[0585] AGtACCGGAATGCCAAGCTTACTTAGATCGCAGATCTCGGTGGTAGTGGCGGTG

[0586] GCGGTGGCGGTGGCGACGGCGGCGCTGAGAGAGCGGGAGTGGCAGTGGCGGC

[0587] GGCGGCTGCGGCTCCCGGGCGGCGGGCGGAGGAGGCGCCTATAGGGCCGCGCG

[0588] GGCGCATGTGACCCGGAGCCCCCGATGAGTCAGGAGCTGCCGGCGGAGGCGCA

[0589] CGTACGAGCGCGGGTGGGGGACCGACGAGGGTGGAGTGGGGAAGGGAGGAGG

[0590] ATGGGGGAAGGGTGGGG

[0591]

[0592] UBC启动子

[0593] [SEQ ID No 34]

[0594] GATCTGGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCCTCGTCAC

[0595] GGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGGAGCGTCCTGATCCTTCCGC

[0596] CCGGACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAACCCC

[0597] AGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTG

[0598] GTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGAT

[0599] TCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGC

[0600] GCCGGGTGTGGCACAGCTAGTTCCGTCGCAGCCGGGATTTGGGTCGCGGTTCTT

[0601] GTTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTAGCGGGCTGCTGGGCTGGCC

[0602] GGGGCTTTCGTGGCCGCCGGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAGAC

[0603] CGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTT

[0604] GGGGGGAGCGCAGCAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAAGACGCT

[0605] TGTGAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGGC

[0606] AAGAACCCAAGGTCTTGAGCCCTTCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTATTCGGGTG

[0607] AGATGGGCTGGGCACCATCTGGGGACCCTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGA

[0608] GAACTCGGTTTGTCGTCTGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGGCGGTGCCGTTGGGC

[0609] AGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCCCTCGTCGTGTCGTGACGTCACCCG

[0610] TTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTGTGCGGTAGG

[0611] CTTTTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGTTCGGGCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATC

[0612] GACAGGCGCCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTT

[0613] TGGTCGGTTTTATGTACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTGAACTA

[0614] TGCGCTCGGGGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTTAGGCACCTTTTGAAAT

[0615] GTAATCATTTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTTAGACTTGTAAATTGTCCGCT

[0616] AAATTCTGGCCGTTTTTGGCTTTTTTGTTAGACAACA

[0617] AAV 8

[0618] [SEQ ID No 35]

[0619] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYL

[0620] GPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQED

[0621] TSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKK

[0622] GQQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEG

[0623] ADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDN

[0624] TYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQN

[0625] EGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG

[0626] SQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ

[0627] YLYYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQ

[0628] NNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSNGILIFGKQNAAR

[0629] DNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGM

[0630] VWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTF

[0631] NQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTE

[0632] GVYSGPRPIGTRYLTRNL

[0633] AAV 9

[0634] [SEQ ID No 36]

[0635] CTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCA

[0636] GTCACCCCAAGAACCAGACTCATCCTCGGGCATCGGCAAATCAGGCCAGCAGC

[0637] CCGCTAAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCG

[0638] ACCCACAACCTCTCGGAGAACCTCCAGAAGCCCCCTCAGGTCTGGGACCTAATA

[0639] CAATGGCTTCAGGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGAC

[0640] GGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGGGAC

[0641] AGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCATTGCCCACCTACAACAACCA

[0642] CCTCTACAAGCAAATCTCCAATGGAACATCGGGAGGAAGCACCAACGACAACA

[0643] CCTACTTTGGCTACAGCACCCCCTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTG

[0644] CCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACTGGGGATTCCG

[0645] GCCAAAGAGACTCAACTTCAAGCTGTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTTACGA

[0646] CGAACGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACCGTCCAGGTC

[0647] TTTACGGACTCGGAGTACCAGCTACCGTACGTCCTAGGCTCTGCCCACCAAGGA

[0648] TGCCTGCCACCGTTTCCTGCAGACGTCTTCATGGTTCCTCAGTACGGCTACCTGA

[0649] CGCTCAACAATGGAAGTCAAGCGTTAGGACGTTCTTCTTTCTACTGTCTGGAAT

[0650] ACTTCCCTTCTCAGATGCTGAGAACCGGCAACAACTTTCAGTTCAGCTACACTTT

[0651] CGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCACACAGCCAGAGTCTAGATCGACT

[0652] GATGAACCCCCTCATCGACCAGTACCTATACTACCTGGTCAGAACACAGACAAC

[0653] TGGAACTGGGGGAACTCAAACTTTGGCATTCAGCCAAGCAGGCCCTAGCTCAAT

[0654] GGCCAATCAGGCTAGAAACTGGGTACCCGGGCCTTGCTACCGTCAGCAGCGCG

[0655] TCTCCACAACCACCAACCAAAATAACAACAGCAACTTTGCGTGGACGGGAGCT

[0656] GCTAAATTCAAGCTGAACGGGAGAGACTCGCTAATGAATCCTGGCGTGGCTAT

[0657] GGCATCGCACAAAGACGACGAGGACCGCTTCTTTCCATCAAGTGGCGTTCTCAT

[0658] ATTTGGCAAGCAAGGAGCCGGGAACGATGGAGTCGACTACAGCCAGGTGCTGA

[0659] TTACAGATGAGGAAGAAATTAAAGCCACCAACCCTGTAGCCACAGAGGAATAC

[0660] GGAGCAGTGGCCATCAACAACCAGGCCGCTAACACGCAGGCGCAAACTGGACT

[0661] TGTGCATAACCAGGGAGTTATTCCTGGTATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTA

[0662] CCTGCAGGGCCCTATTTGGGCTAAAATACCTCACACAGATGGCAACTTTCACCC

[0663] GTCTCCTCTGATGGGTGGATTTGGACTGAAACACCCACCTCCACAGATTCTAAT

[0664] TAAAAATACACCAGTGCCGGCAGATCCTCCTCTTACCTTCAATCAAGCCAAGCT

[0665] GAACTCTTTCATCACGCAGTACAGCACGGGACAAGTCAGCGTGGAAATCGAGT

[0666] GGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAGCGCTGGAATCCAGAGATCCAGTATACT

[0667] TCAAACTACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAATACCGAAGGTGTT

[0668] TACTCTGAGCCTCGCCCCATTGGTACTCGTTACCTCACCCGTAATTTGTAATTGC

[0669] CTGTTAATCAATAAACCGGTTAATTCGTTTCAGTTGAACTTTGGTCTCTGCG

[0670] WPRE增强子

[0671] [SEQ ID No 37]

[0672] CGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAA

[0673] CTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCAT

[0674] GCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCT

[0675] GTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCAC

[0676] TGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCT

[0677] CCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCC

[0678] GCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCC

[0679] GTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCA

[0680] CCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGC

[0681] GGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGC

[0682] CTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCG

[0683] WPRE增强子

[0684] [SEQ ID No 38]

[0685] CGACTGATCCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGG

[0686] TATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTT

[0687] TGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCC

[0688] TGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTG

[0689] GTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACC

[0690] TGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAAC

[0691] TCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTG

[0692] ACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTG

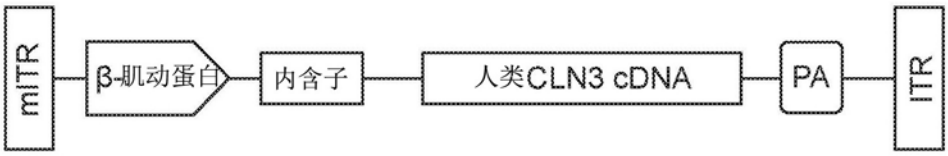
[0693] TGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTC

[0694] AATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGC

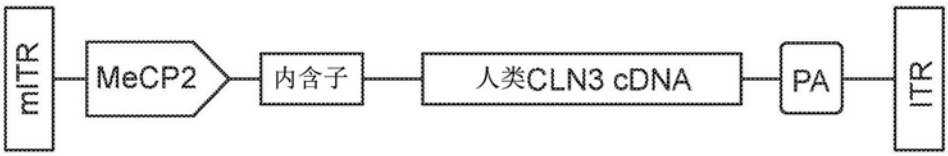
[0695] GTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCA

[0696] TCG

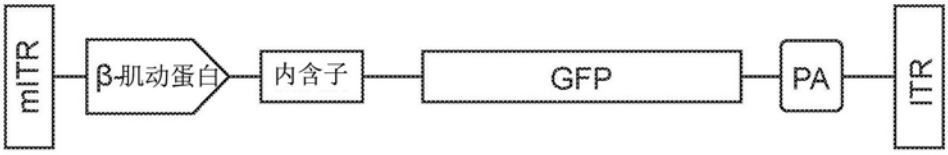
scAAV9/β-肌动蛋白-hCLN3



scAAV9/MeCP2-hCLN3



scAAV9/β-肌动蛋白-GFP



scAAV9/MeCP2-GFP

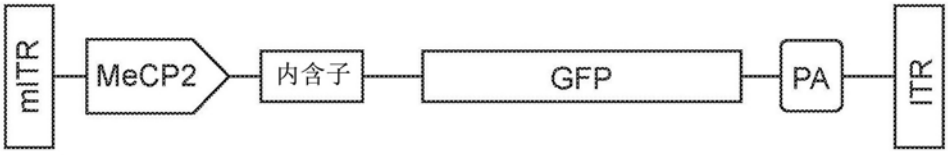


图1

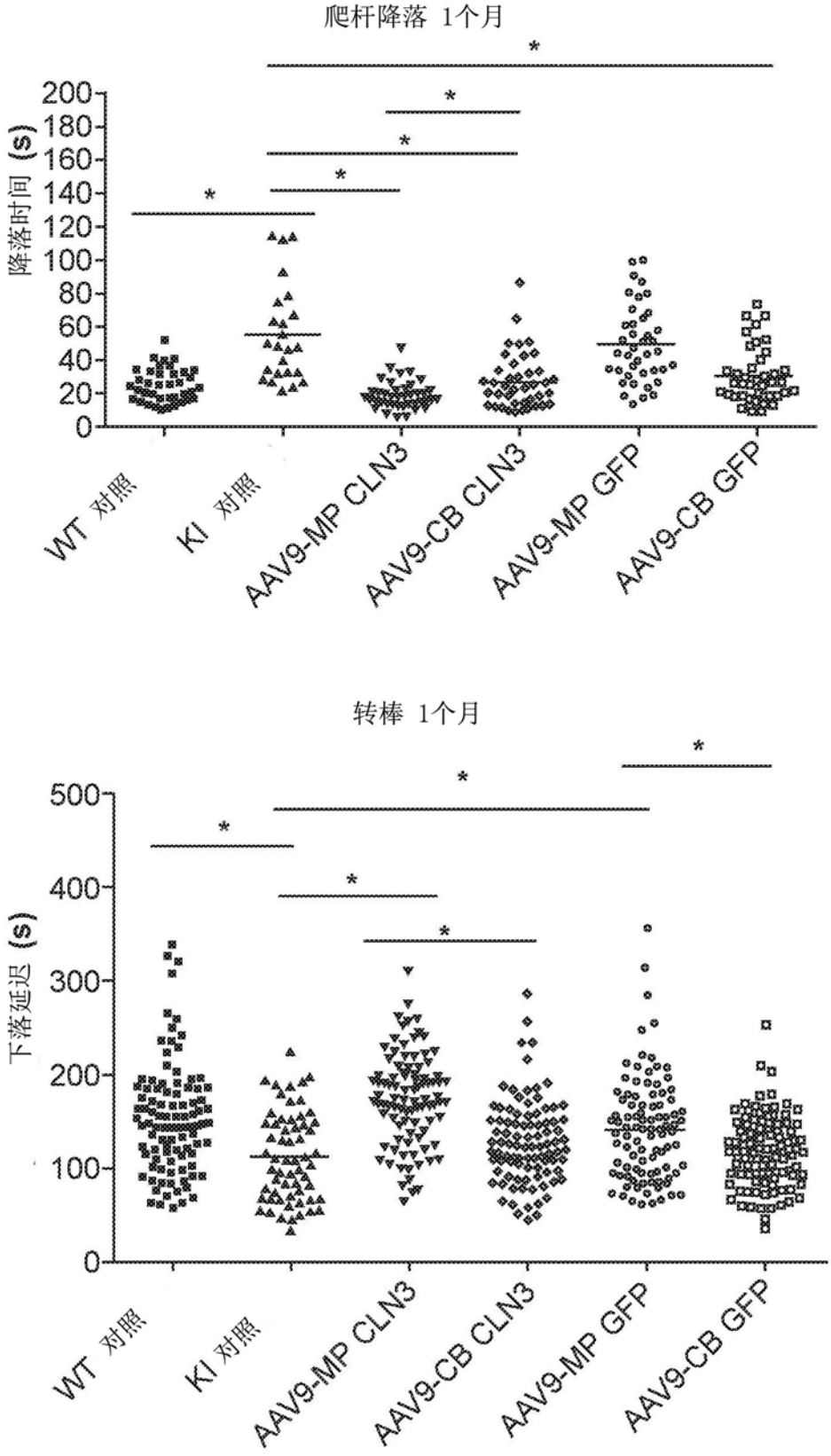

爬杆降落 1个月
降落时间 (s)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
WT 对照
KI 对照
AAV9-MP CLN3
AAV9-CB CLN3
AAV9-MP GFP
AAV9-CB GFP
转棒 1个月
下落延迟 (s)
500
400
300
200
100
0

图2A

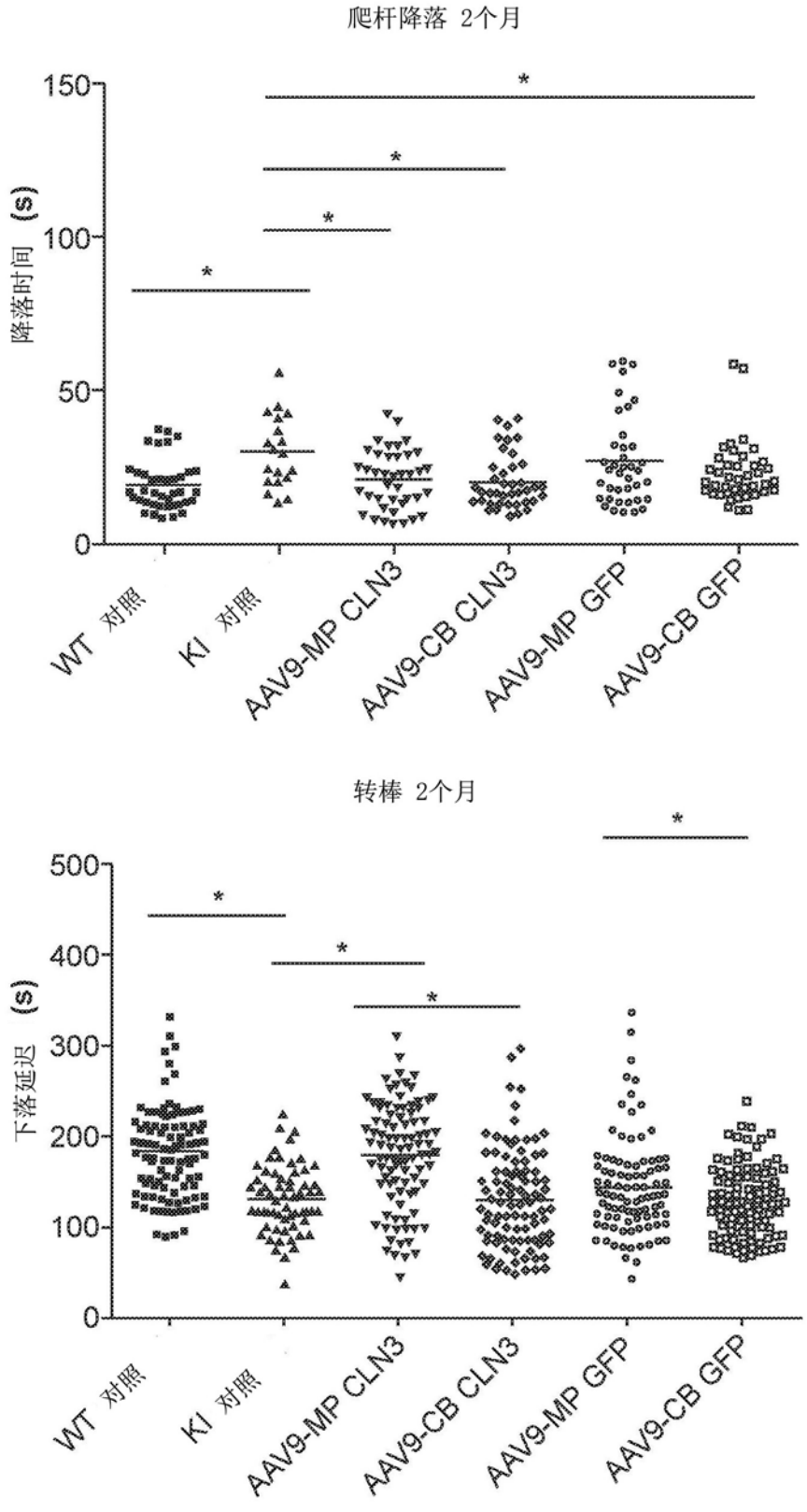

爬杆降落 2个月
降落时间 (s)
150
100
50
0
*
*
*
*
WT 对照
KI 对照
AAV9-MP CLN3
AAV9-CB CLN3
AAV9-MP GFP
AAV9-CB GFP
转棒 2个月
下落延迟 (s)
500
400
300
200
100
0
*
*
*
*
WT 对照
KI 对照
AAV9-MP CLN3
AAV9-CB CLN3
AAV9-MP GFP
AAV9-CB GFP

图2B

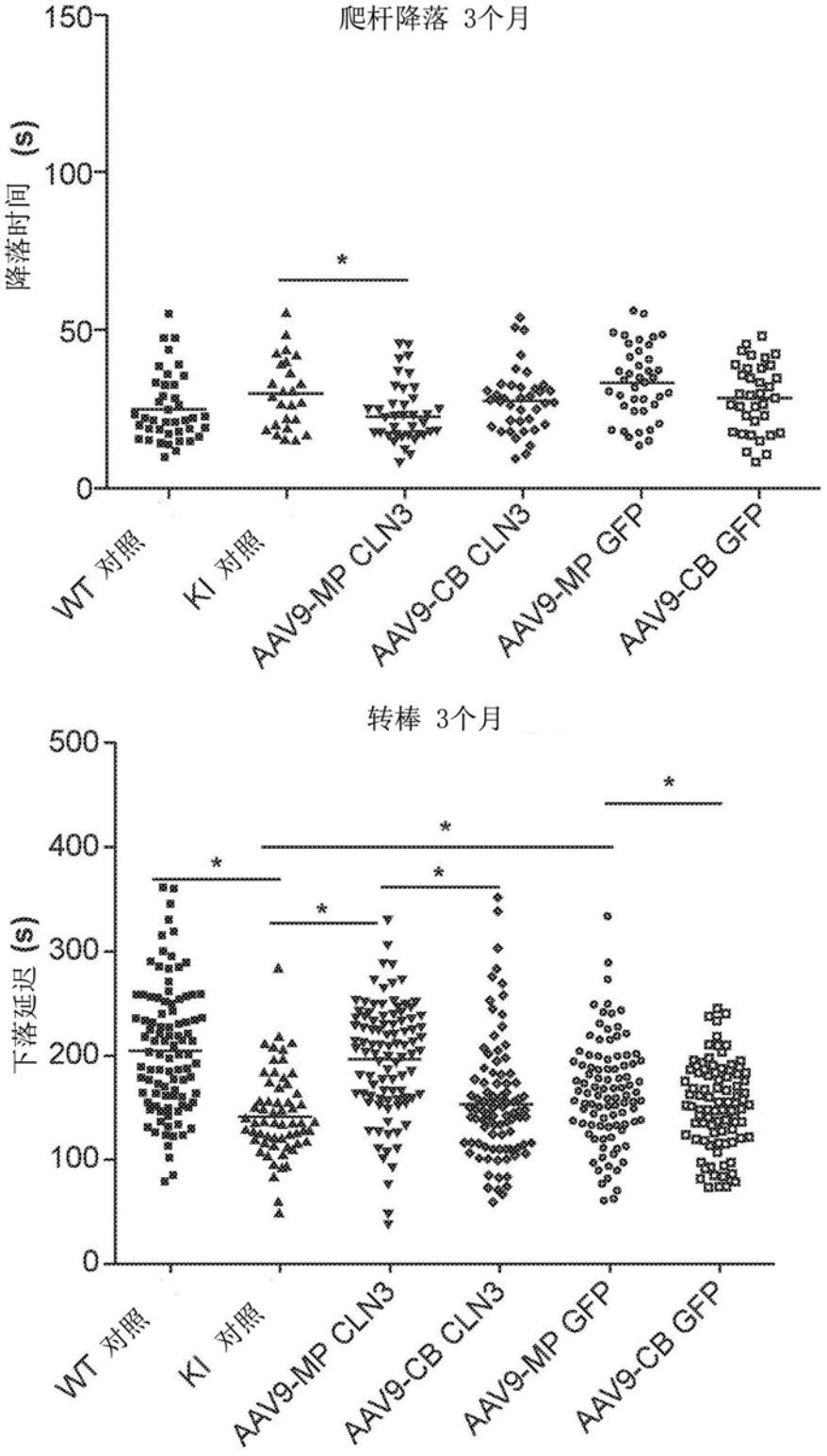

爬杆降落 3个月
降落时间 (s)
150
100
50
0
*
WT 对照
KI 对照
AAV9-MP CLN3
AAV9-CB CLN3
AAV9-MP GFP
AAV9-CB GFP
转棒 3个月
下落延迟 (s)
500
400
300
200
100
0
*
*
*
*
*
WT 对照
KI 对照
AAV9-MP CLN3
AAV9-CB CLN3
AAV9-MP GFP
AAV9-CB GFP

图2C

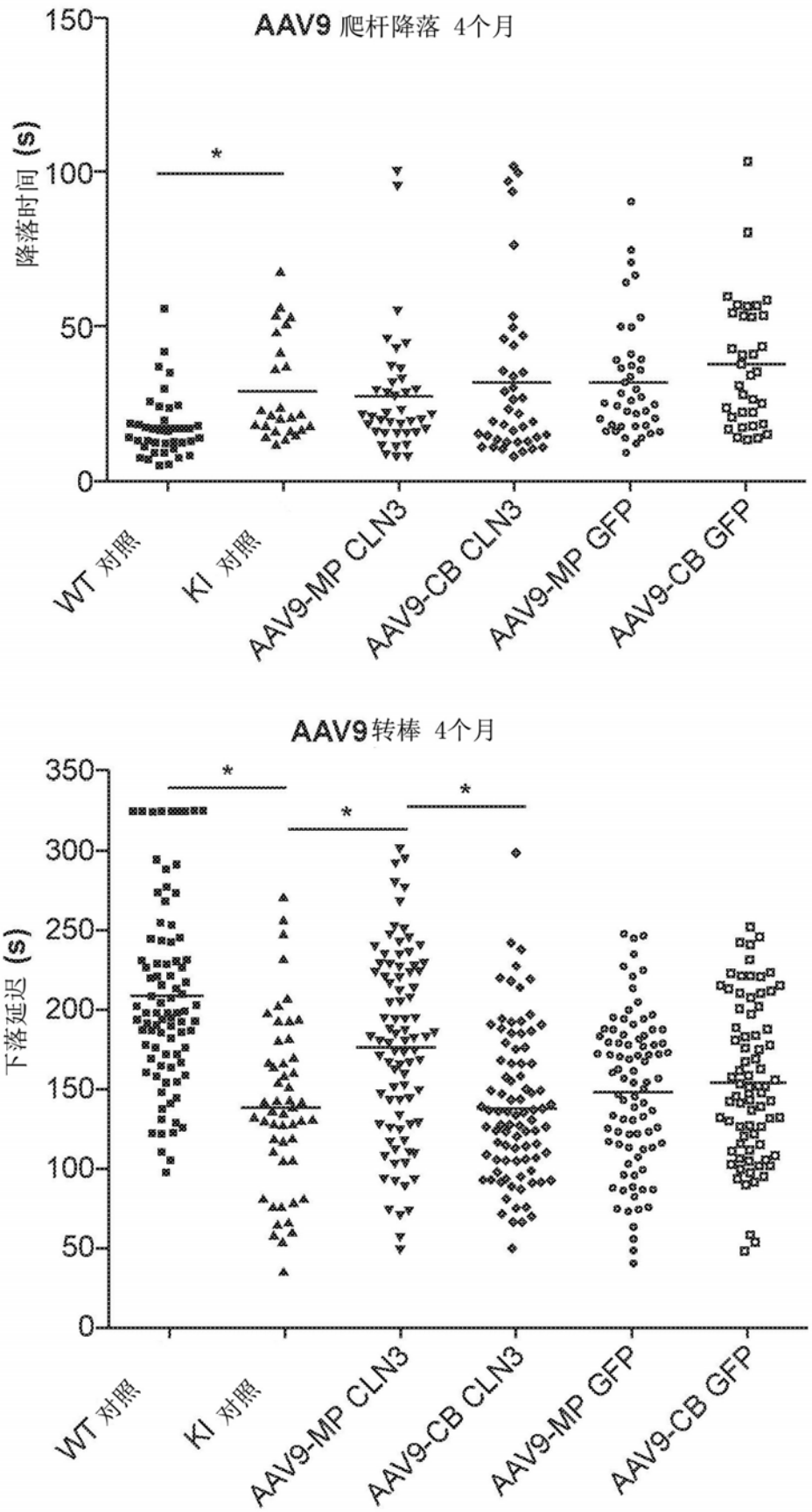

AAV9 爬杆降落 4个月
降落时间 (s)
150
100
50
0
*
WT 对照
KI 对照
AAV9-MP CLN3
AAV9-CB CLN3
AAV9-MP GFP
AAV9-CB GFP
AAV9转棒 4个月
下落延迟 (s)
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
*
WT 对照
KI 对照
AAV9-MP CLN3
AAV9-CB CLN3
AAV9-MP GFP
AAV9-CB GFP

图2D

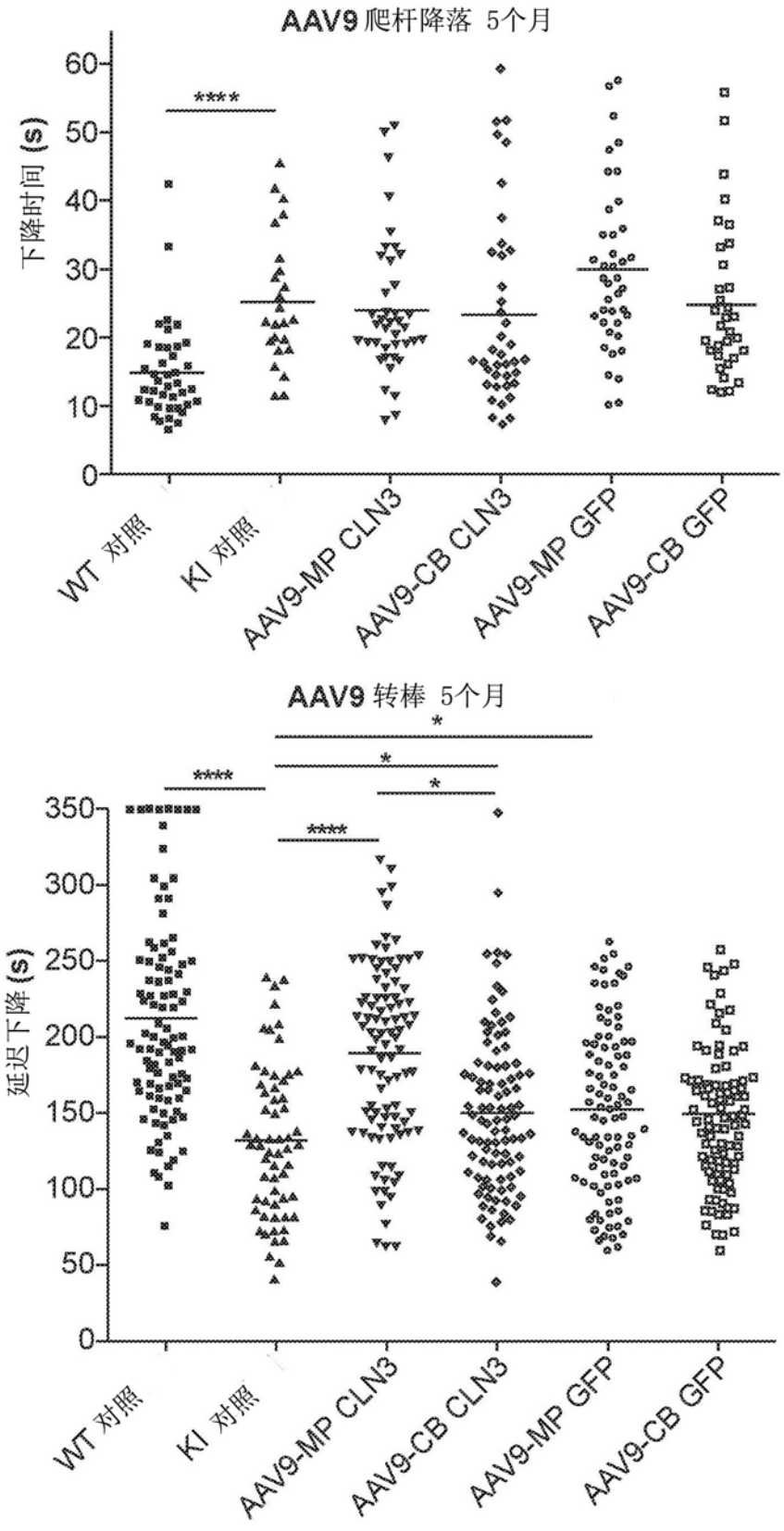

AAV9 爬杆降落 5个月
下降时间 (s)
0
10
20
30
40
50
60
****
WT 对照
KI 对照
AAV9-MP CLN3
AAV9-CB CLN3
AAV9-MP GFP
AAV9-CB GFP
AAV9 转棒 5个月
延迟下降 (s)
0
50
100
150
200
250
300
350
****
****
*
*
*
WT 对照
KI 对照
AAV9-MP CLN3
AAV9-CB CLN3
AAV9-MP GFP
AAV9-CB GFP

图2E

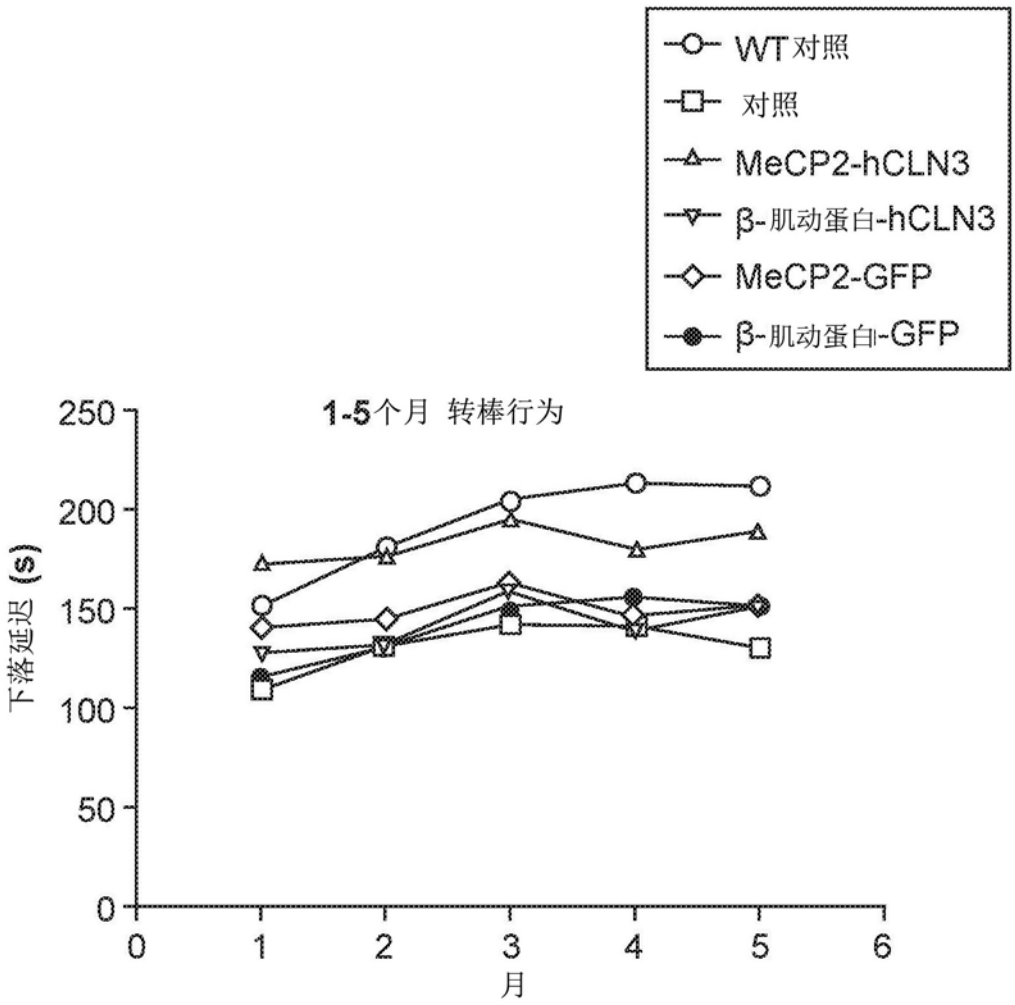

WT对照
对照
MeCP2-hCLN3
β-肌动蛋白-hCLN3
MeCP2-GFP
β-肌动蛋白-GFP
1-5个月 转棒行为
下落延迟 (s)
250
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
5
6
月

图2F

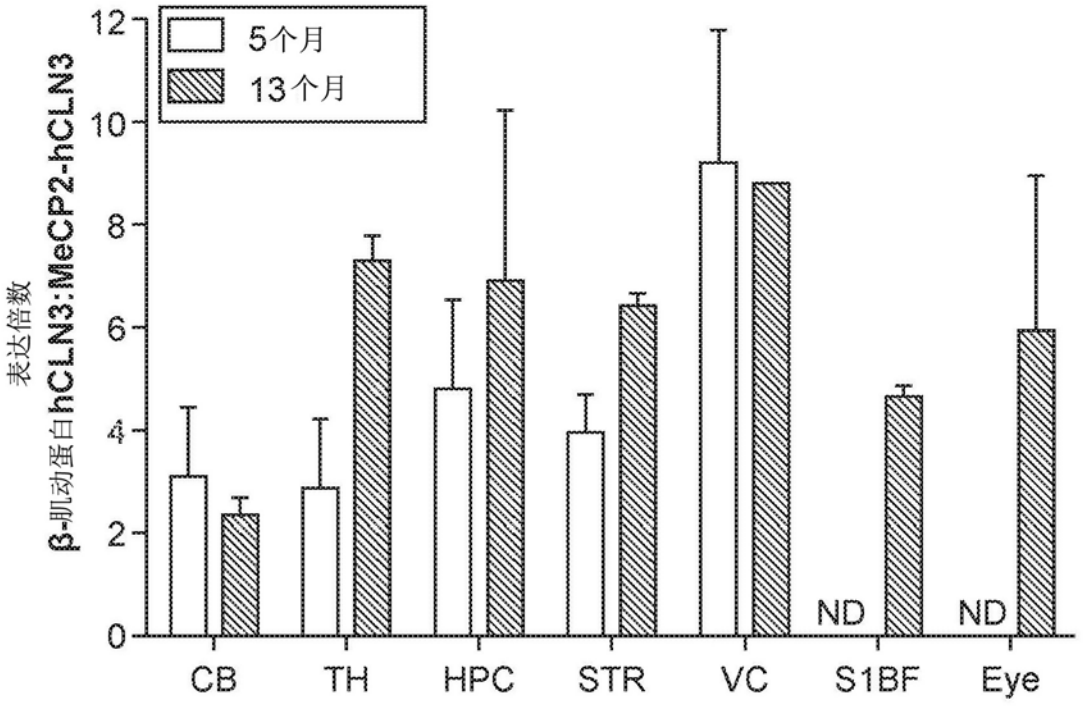

5个月
13个月
表达倍数
β-肌动蛋白hCLN3:MeCP2-hCLN3
12
10
8
6
4
2
0
ND
ND
CB
TH
HPC
STR
VC
S1BF
Eye

图3

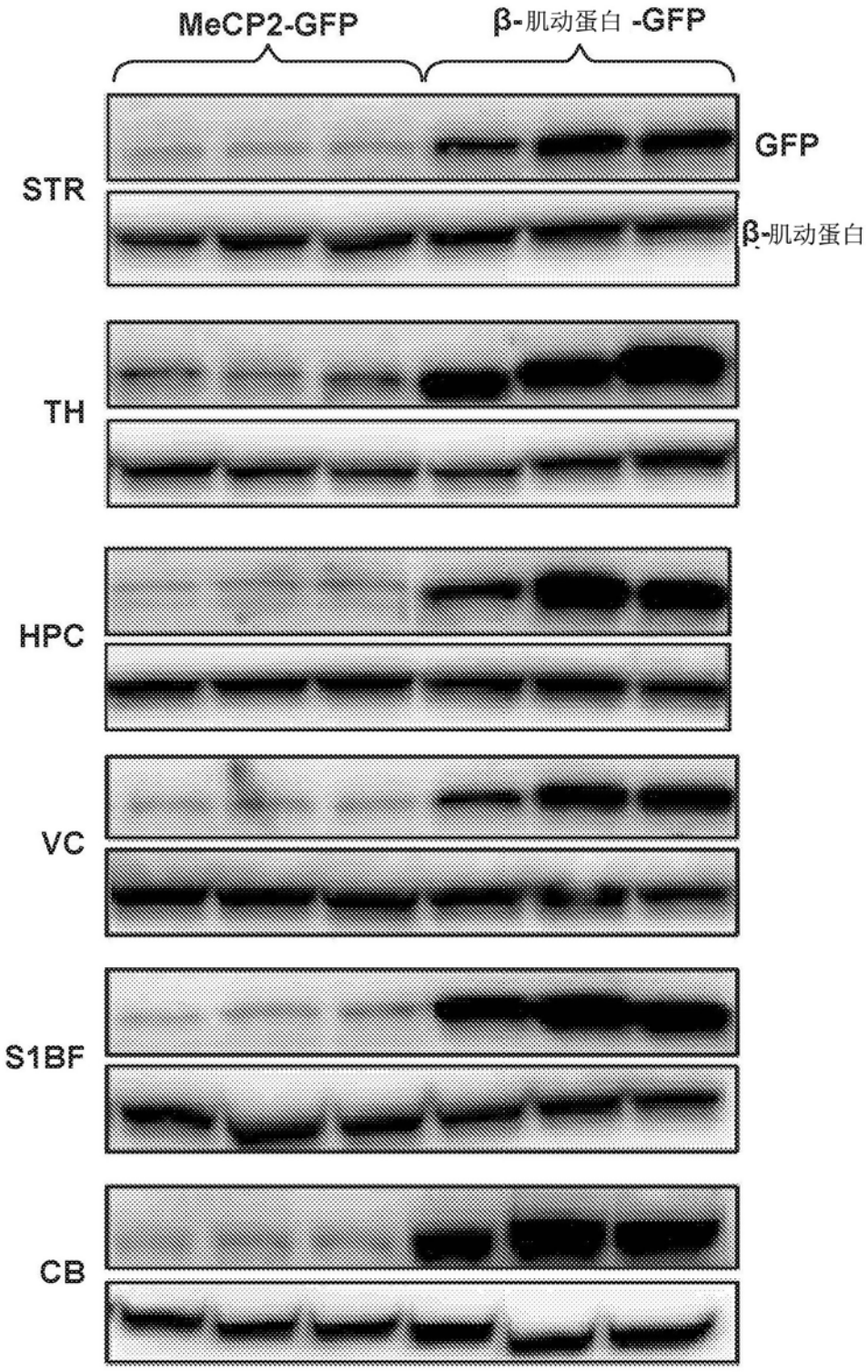


图4


scAAV9/β-肌动蛋白-GFP
scAAV9/MeCP2-GFP

图5A

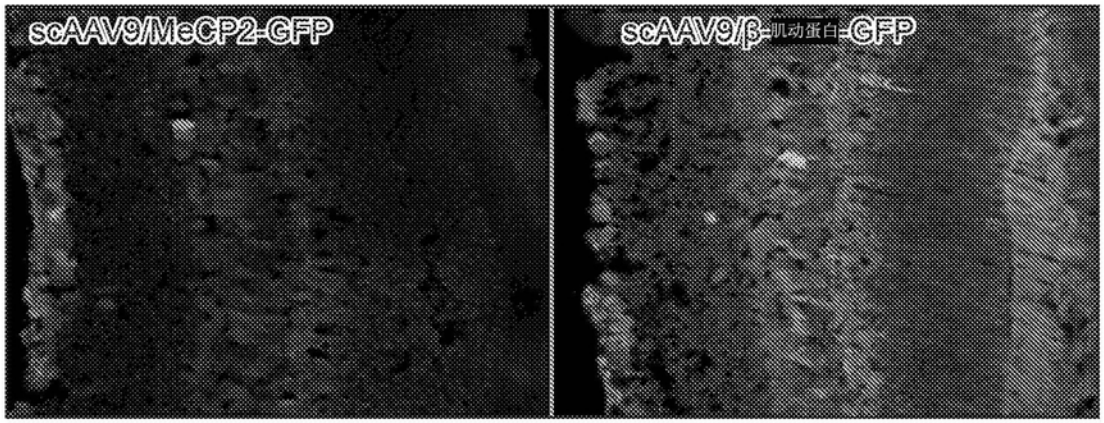

scAAV9/MeCP2-GFP
scAAV9/β-肌动蛋白-GFP

图5B

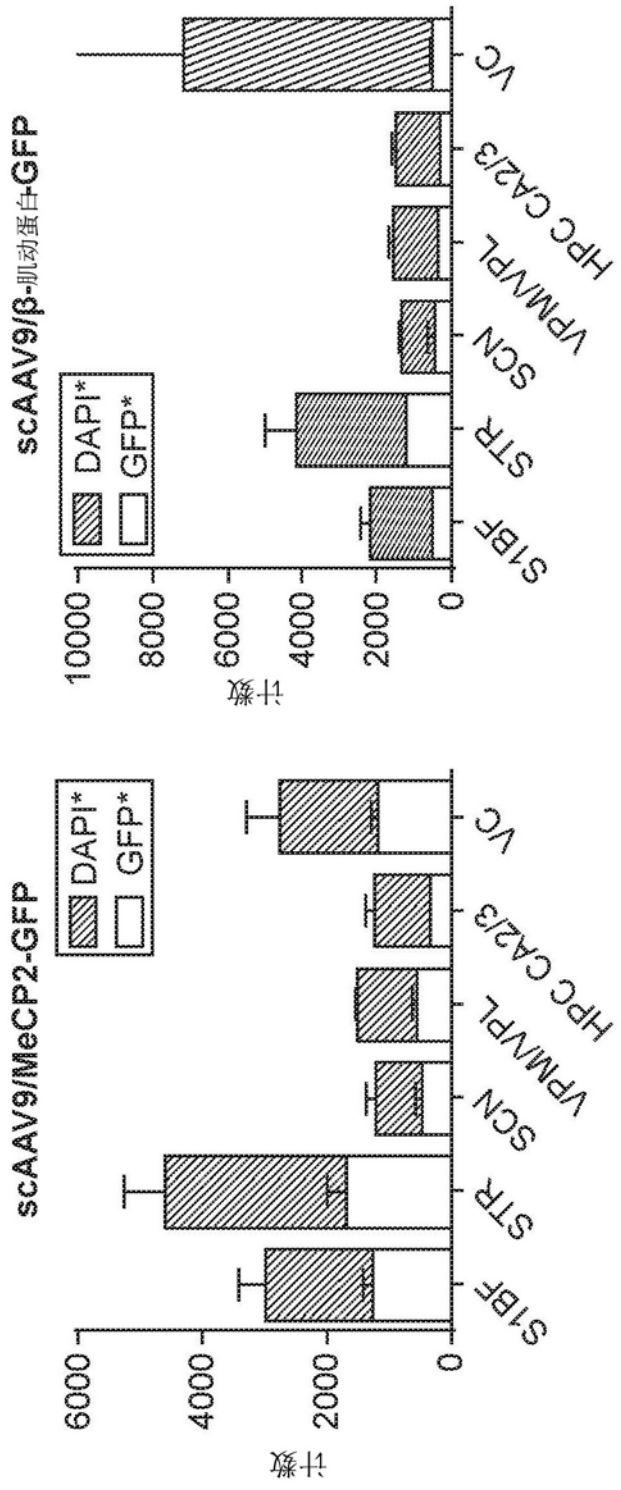

scAAV9/β-肌动蛋白-GFP
DAPI*
GFP*
计数
10000
8000
6000
4000
2000
0
S1BF
STR
SCN
VPM/VPL
HPC CA2/3
VC
scAAV9/MeCP2-GFP
DAPI*
GFP*
计数
6000
4000
2000
0
S1BF
STR
SCN
VPM/VPL
HPC CA2/3
VC

图6A

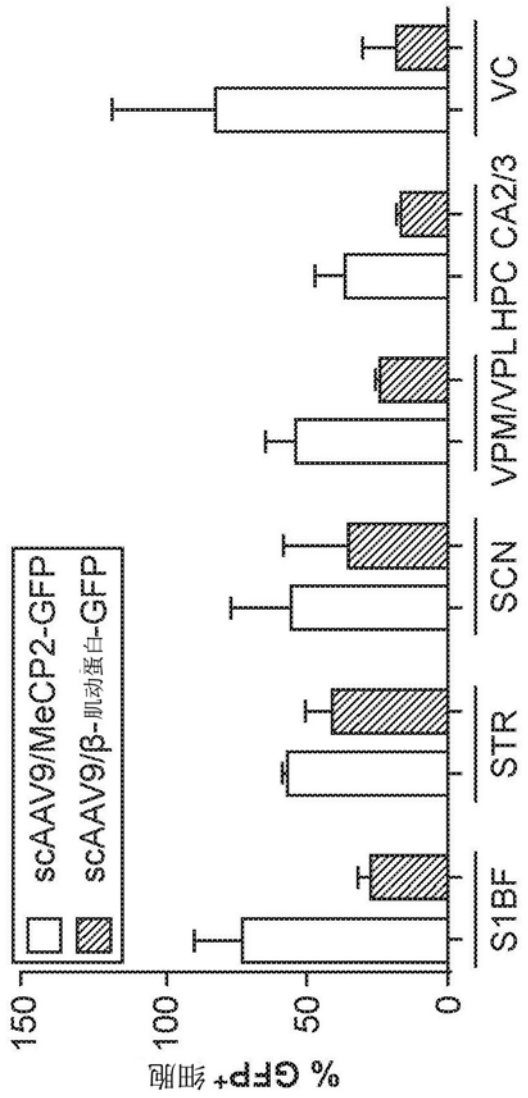

scAAV9/MeCP2-GFP
scAAV9/β-肌动蛋白-GFP
% GFP+ 细胞
150
100
50
0
S1BF
STR
SCN
VPM/VPL
HPC
CA2/3
VC

图6B

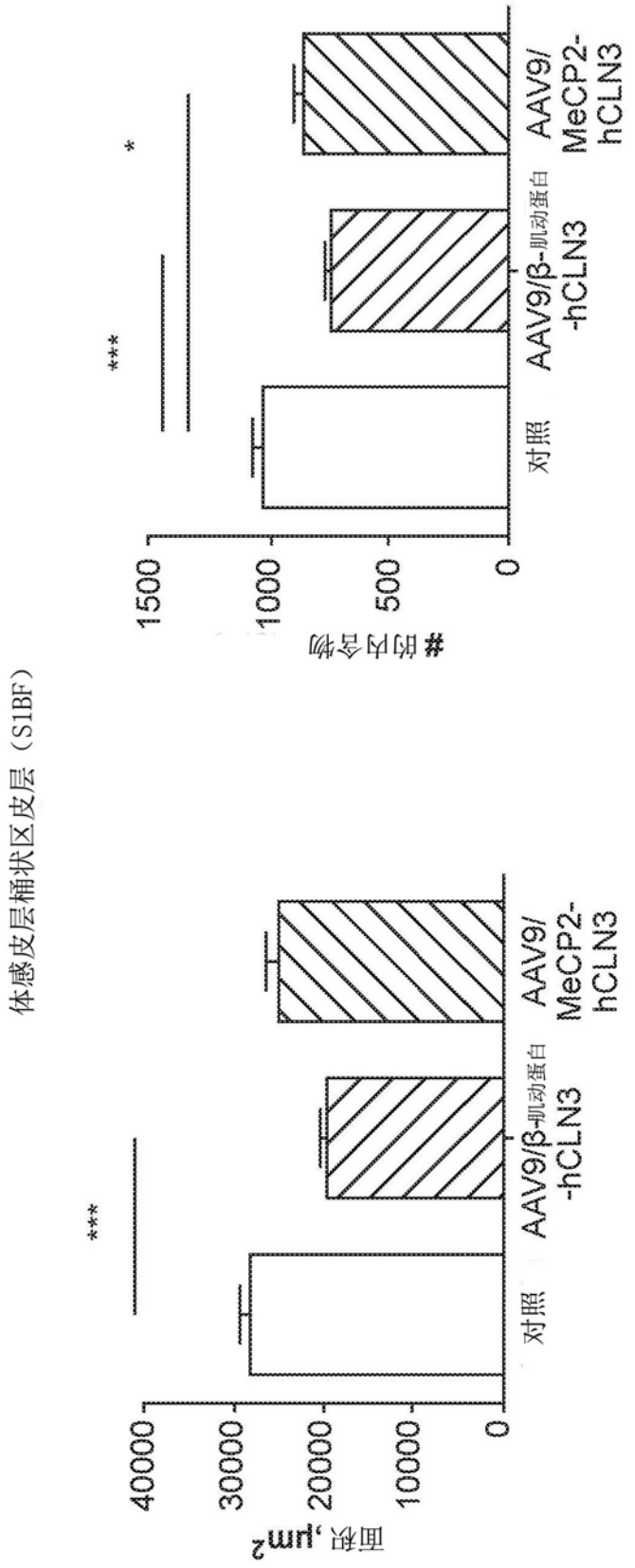

体感皮层桶状区皮层（S1BF）
面积，μm²
40000
30000
20000
10000
0
***
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3
#的内含物
1500
1000
500
0
***
*
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3

图7A

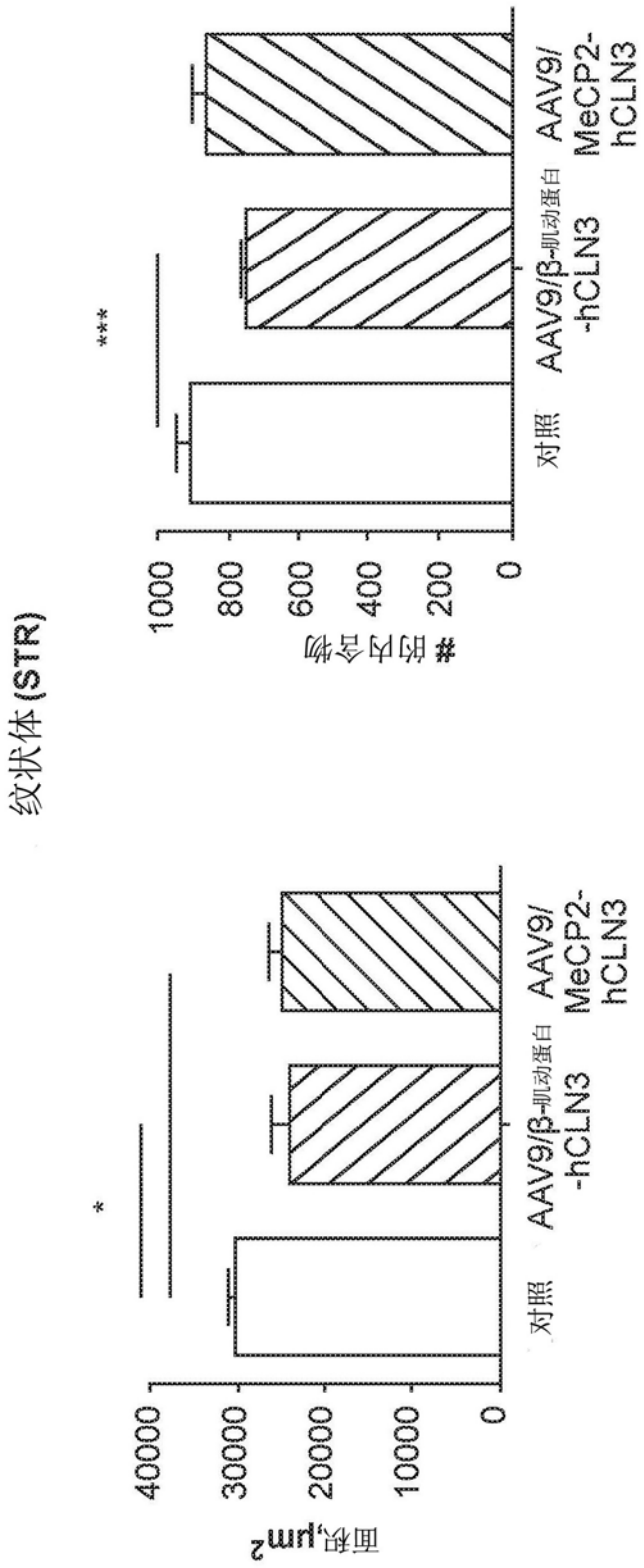

纹状体(STR)
面积,μm²
40000
30000
20000
10000
0
*
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3
的内含物
1000
800
600
400
200
0
***
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3

图7B

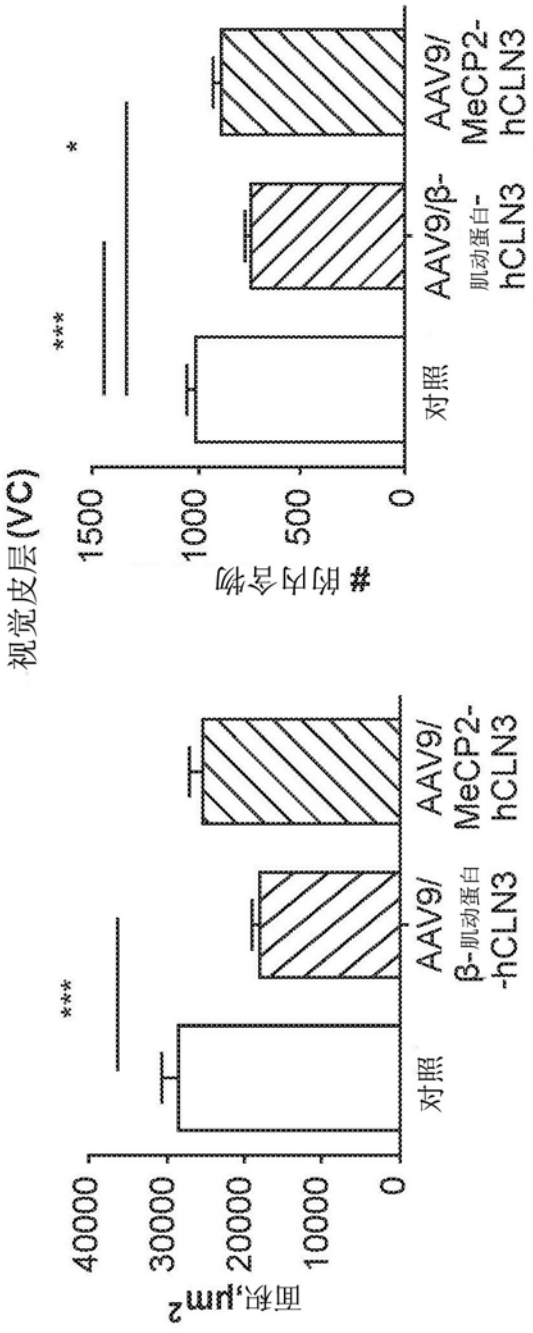

视觉皮层(VC)
面积,μm²
40000
30000
20000
10000
0
***
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3
的内含物
1500
1000
500
0
***
*
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3

图7C

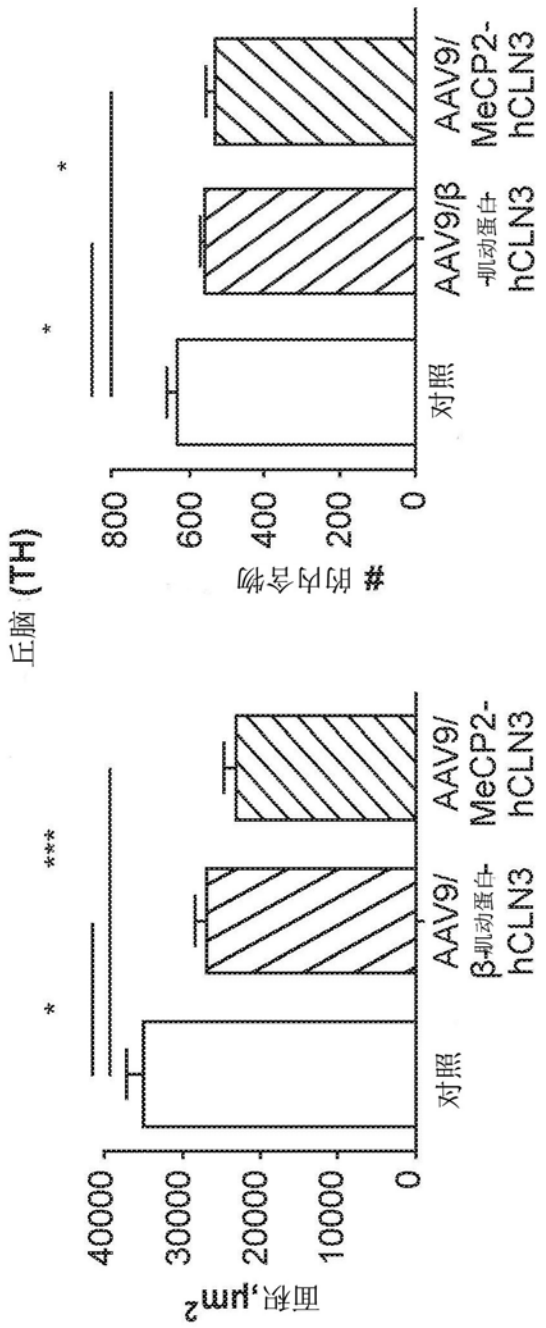

丘脑 (TH)
面积,μm²
40000
30000
20000
10000
0
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3
*
***
的内含物
800
600
400
200
0
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3
*
*
*

图7D

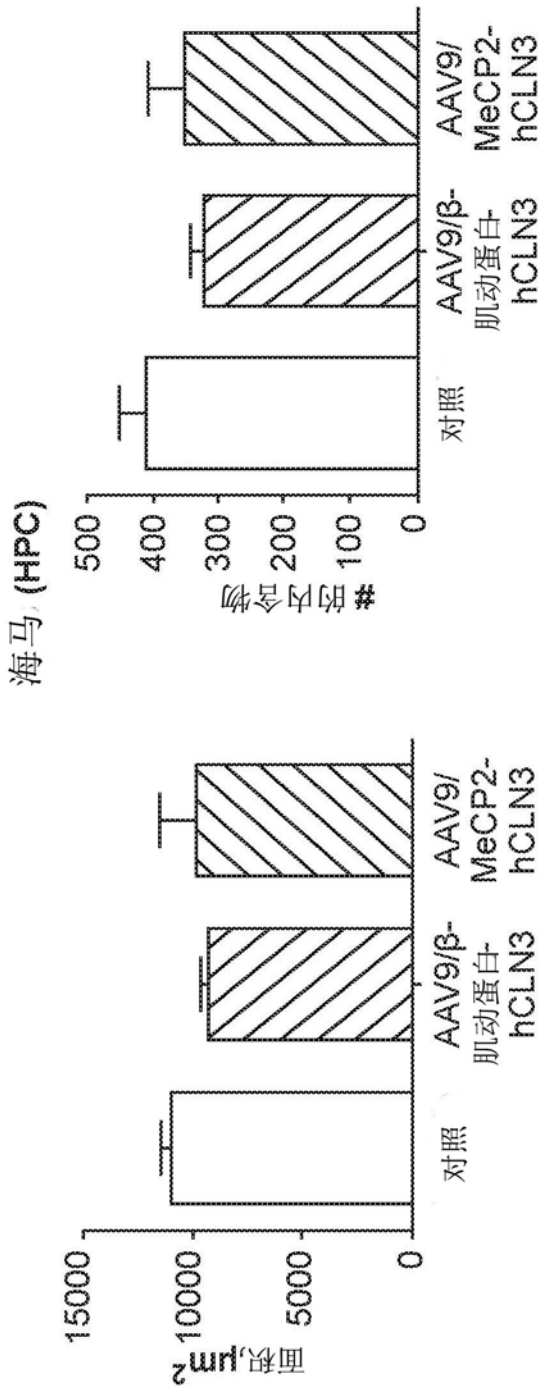

海马 (HPC)
的内含物
500
400
300
200
100
0
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3
面积,μm²
15000
10000
5000
0
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3

图7E

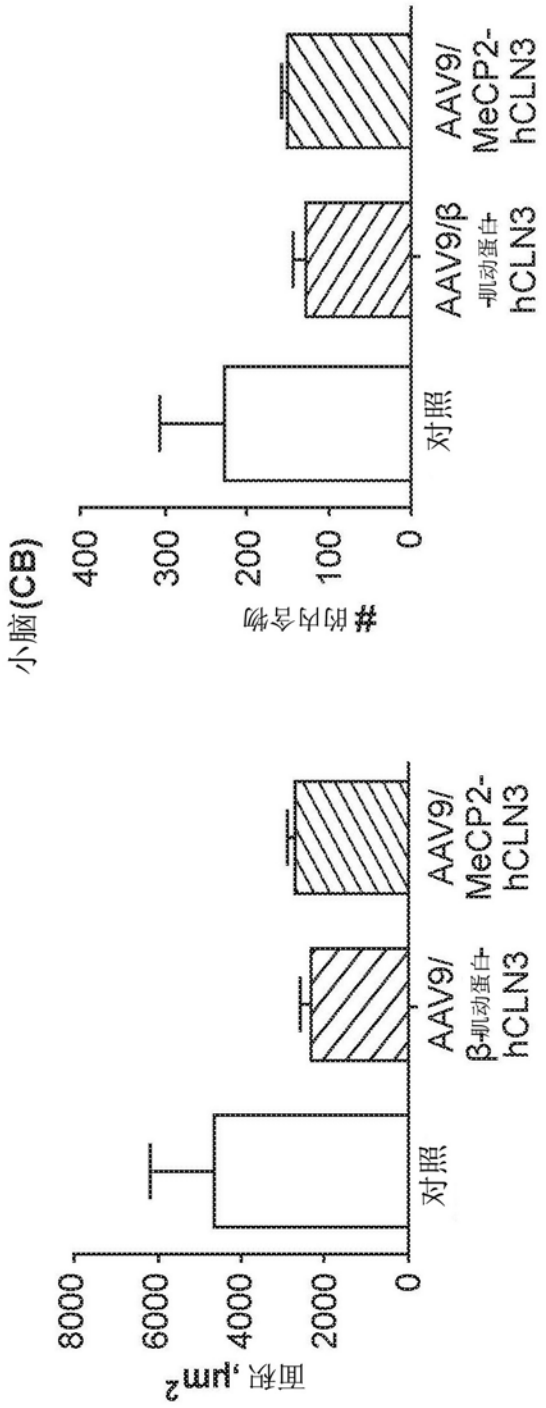

小脑(CB)
#的内含物
0
100
200
300
400
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3
面积,μm²
0
2000
4000
6000
8000
对照
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-hCLN3

图7F

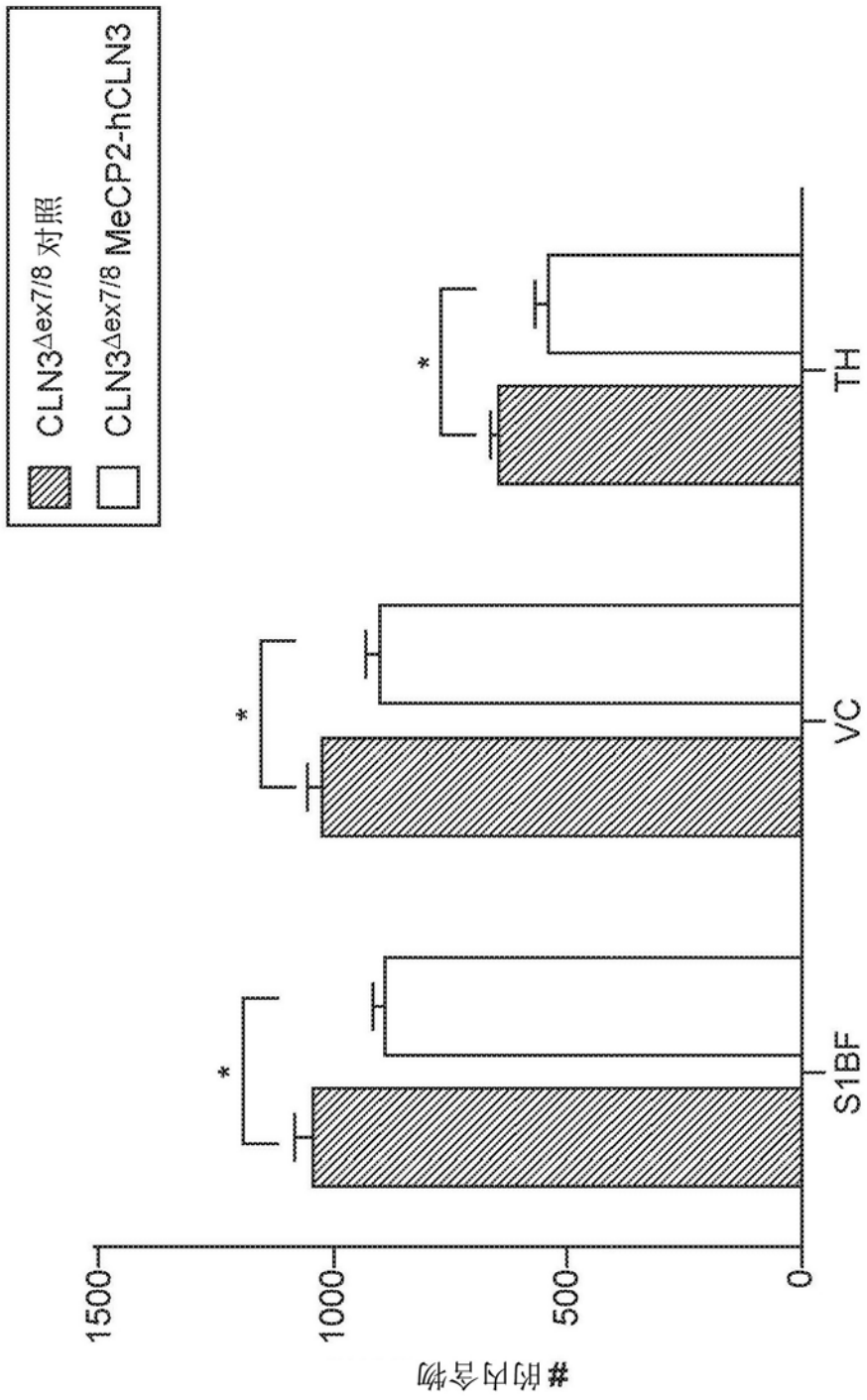

CLN3Δex7/8 对照
CLN3Δex7/8 MeCP2-hCLN3
#的内含物
1500
1000
500
0
S1BF
VC
TH
*
*
*

图7G

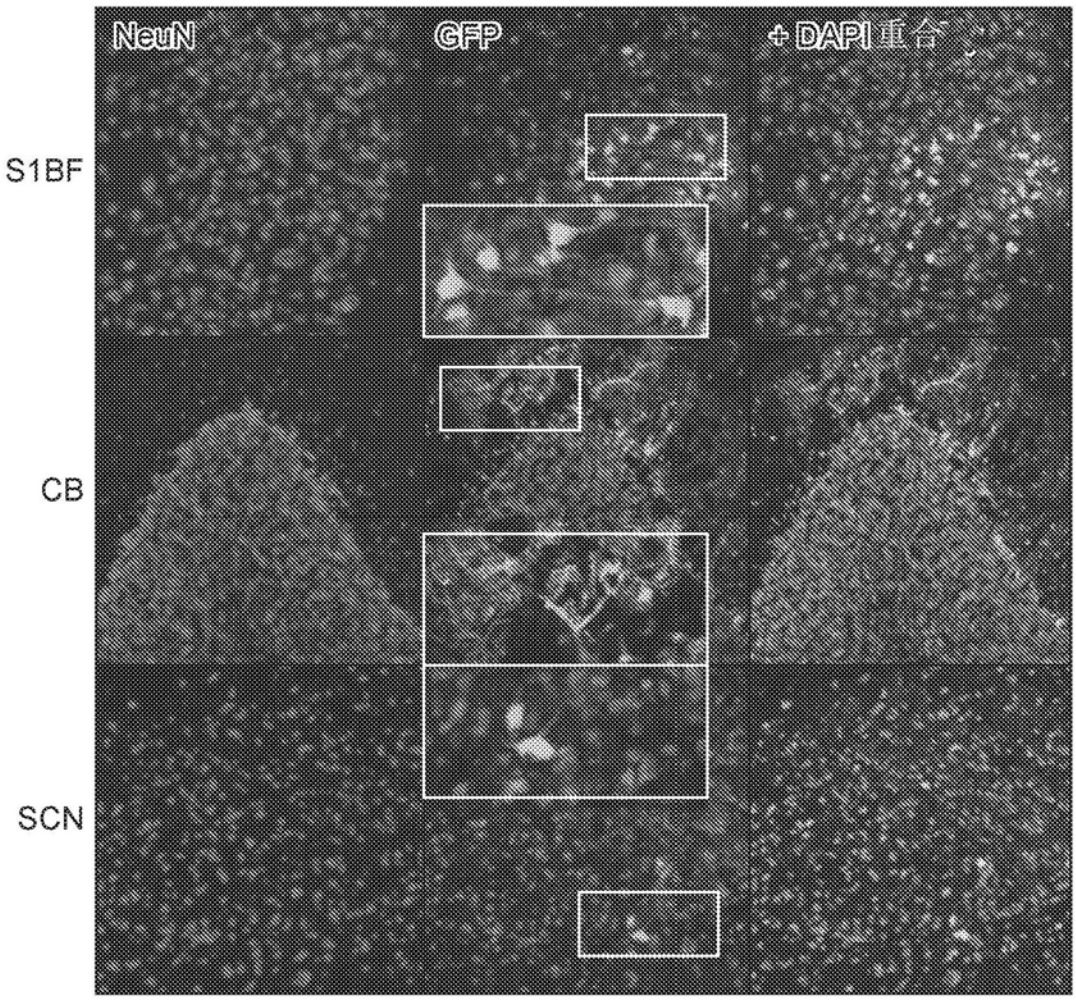


图8A

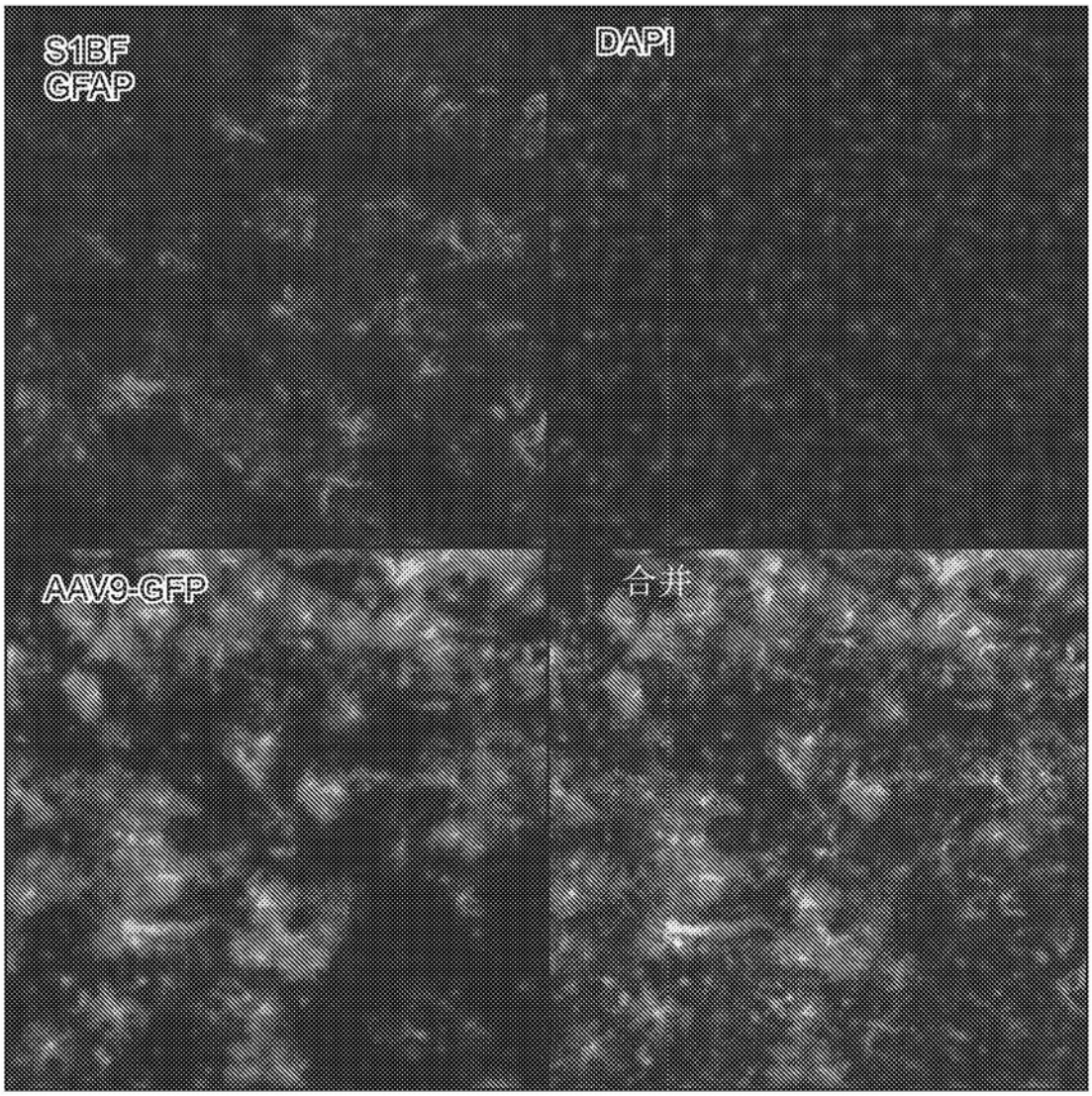


图8B

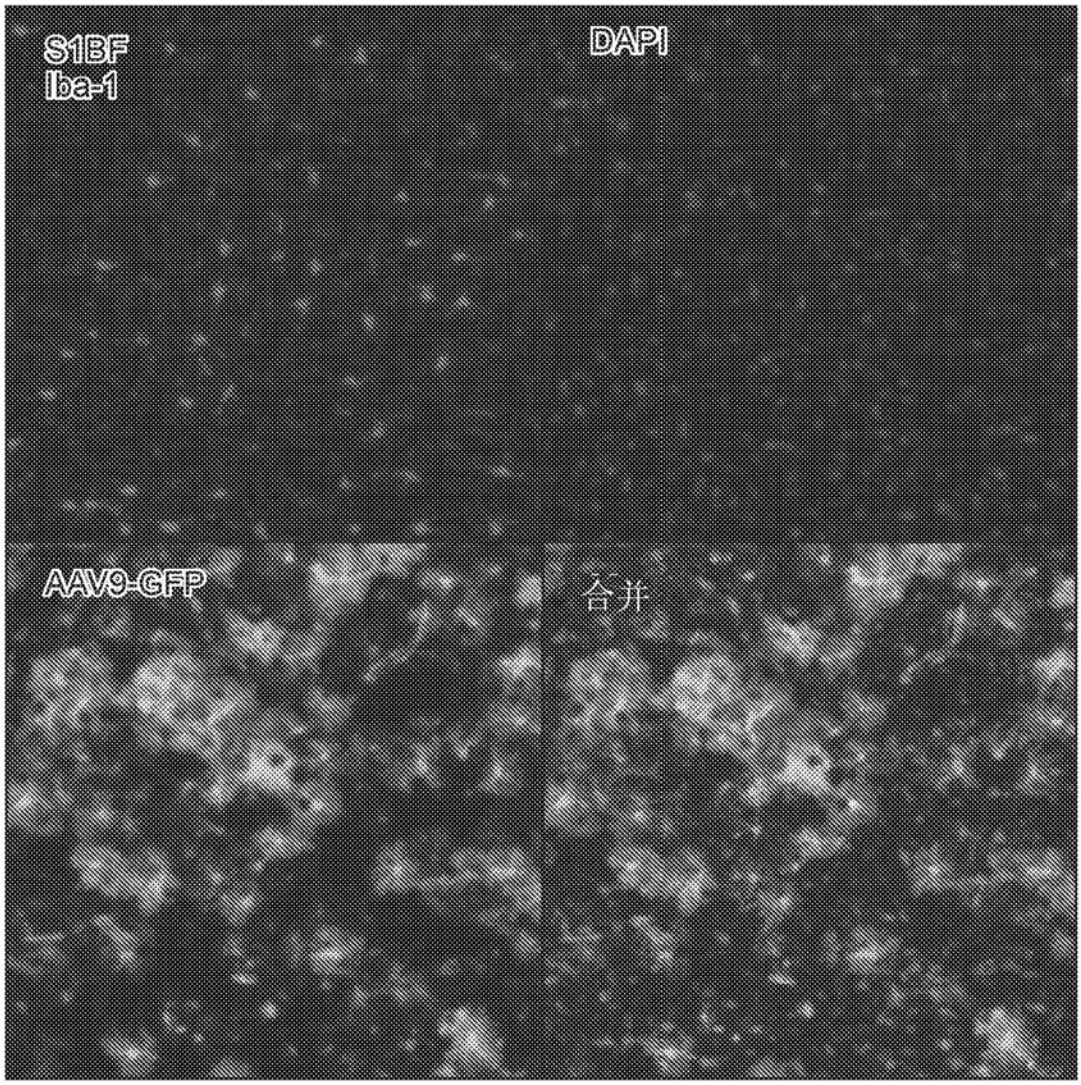


图8C

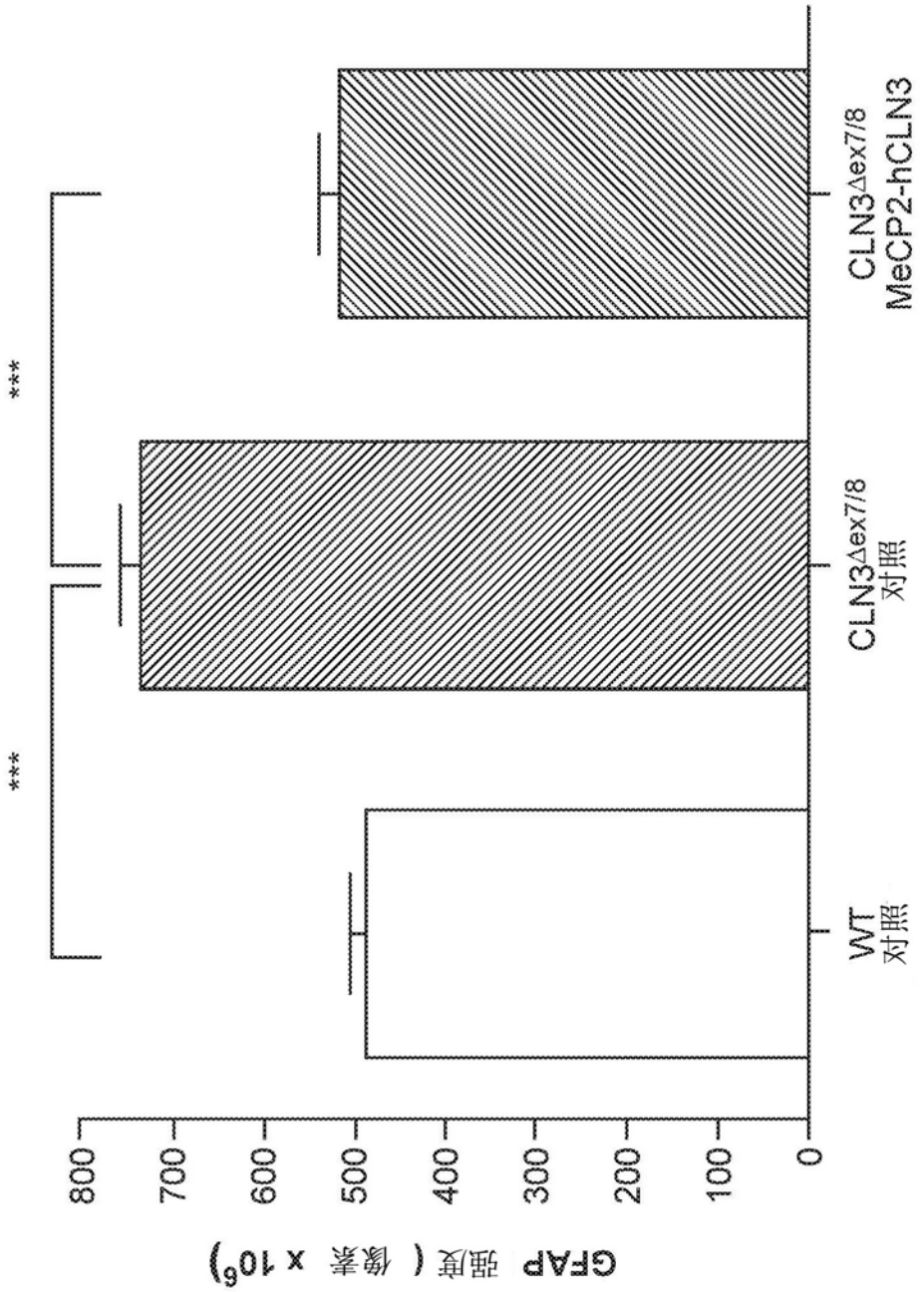

GFAP 强度 (像素 x 10^6)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
***
***
WT
对照
CLN3Δex7/8
对照
CLN3Δex7/8
MeCP2-hCLN3

图9

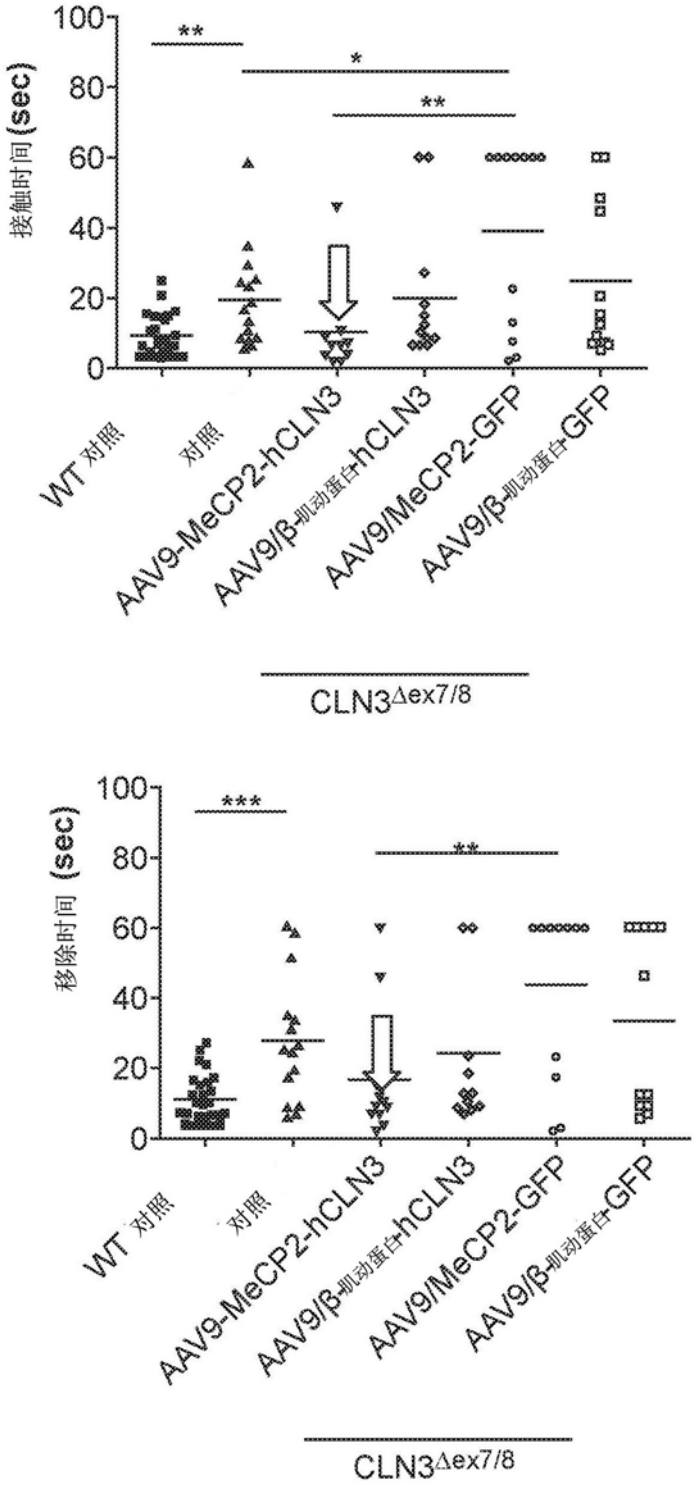

接触时间(sec)
100
80
60
40
20
0
**
*
**
WT 对照
对照
AAV9-MeCP2-hCLN3
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-GFP
AAV9/β-肌动蛋白-GFP
CLN3Δex7/8
移除时间 (sec)
100
80
60
40
20
0
***
**
WT 对照
对照
AAV9-MeCP2-hCLN3
AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
AAV9/MeCP2-GFP
AAV9/β-肌动蛋白-GFP
CLN3Δex7/8

图10

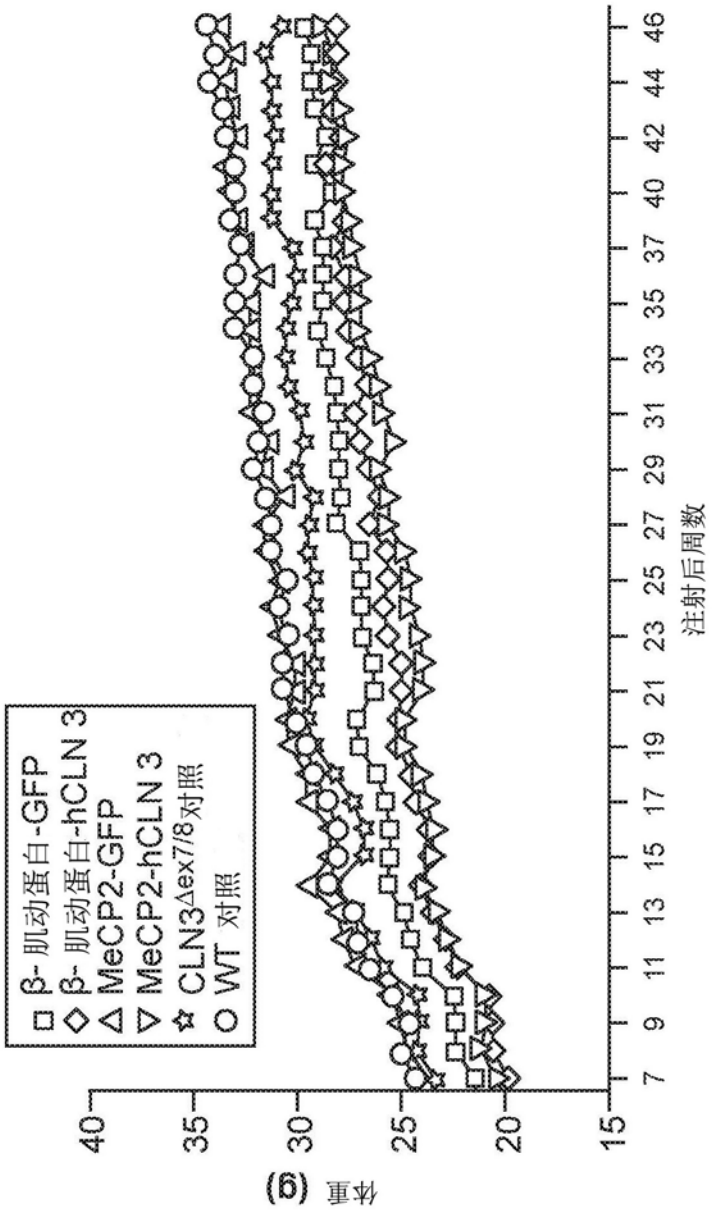

β- 肌动蛋白-GFP
β- 肌动蛋白-hCLN 3
MeCP2-GFP
MeCP2-hCLN 3
CLN3Δex7/8对照
WT 对照
体重 (g)
40
35
30
25
20
15
7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 40 42 44 46
注射后周数

图11

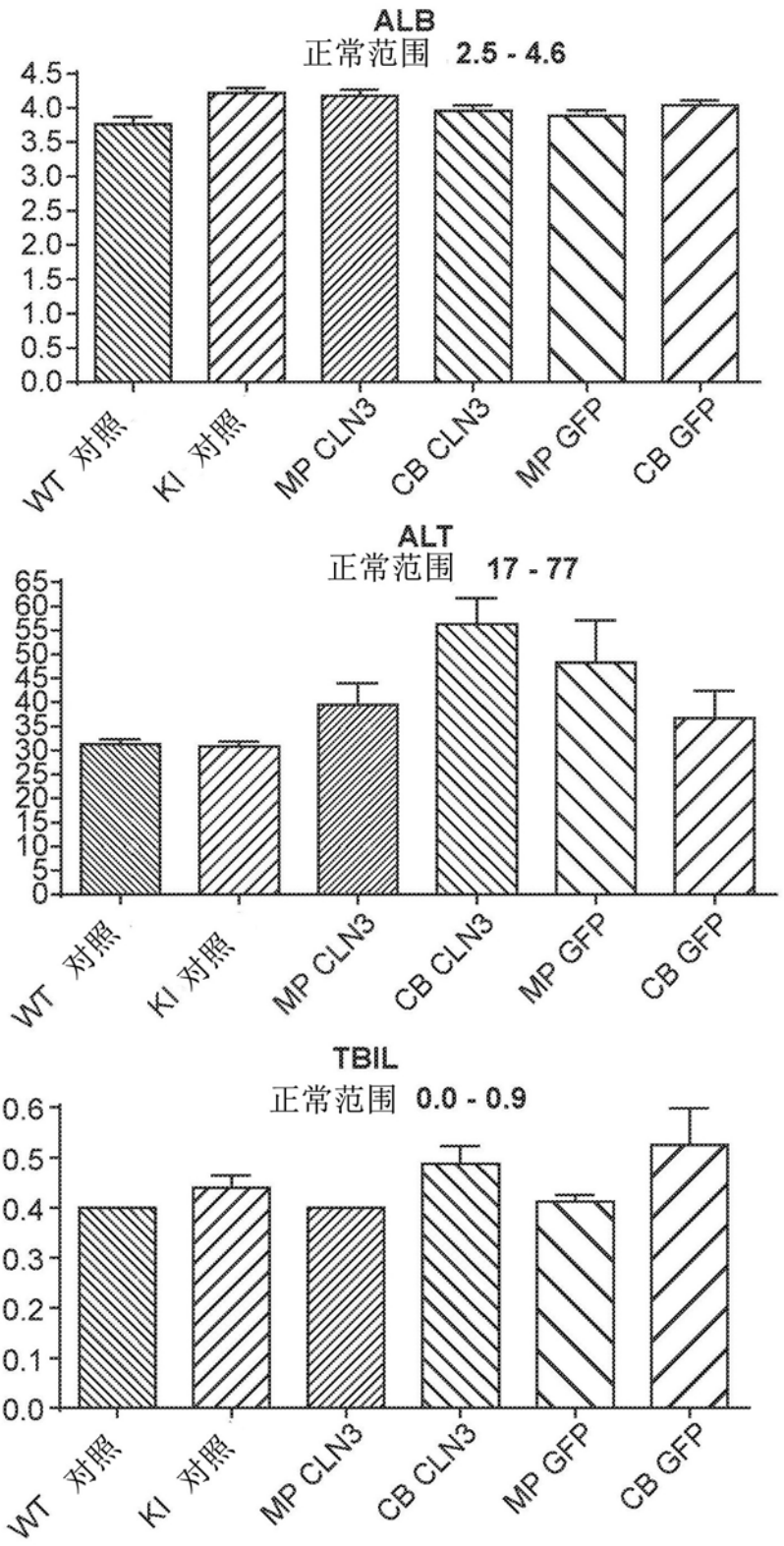

ALB
正常范围 2.5 - 4.6
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
ALT
正常范围 17 - 77
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
TBIL
正常范围 0.0 - 0.9
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP

图12

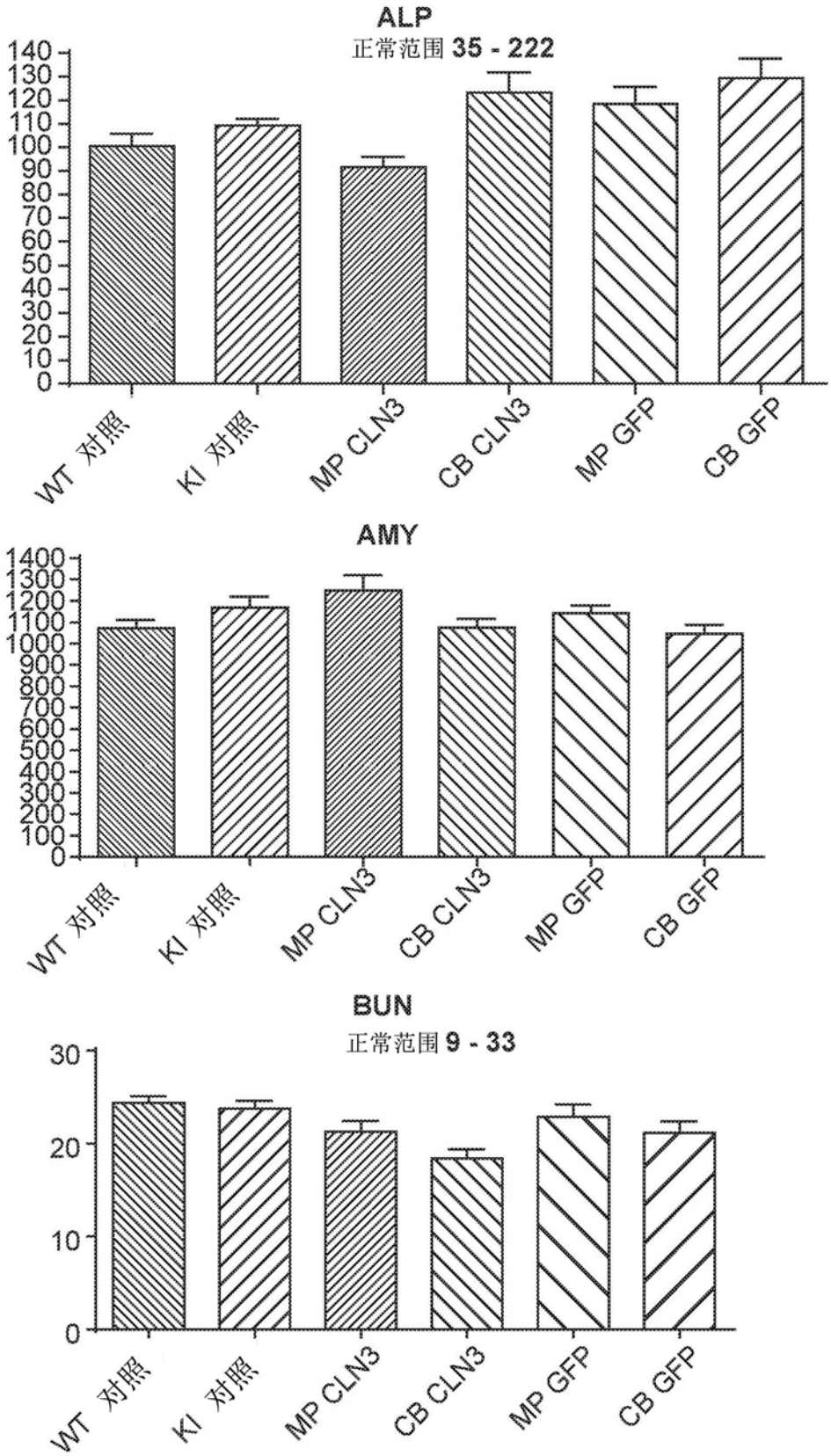

ALP
正常范围 35 - 222
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
AMY
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
BUN
正常范围 9 - 33
30
20
10
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP

图12(续)

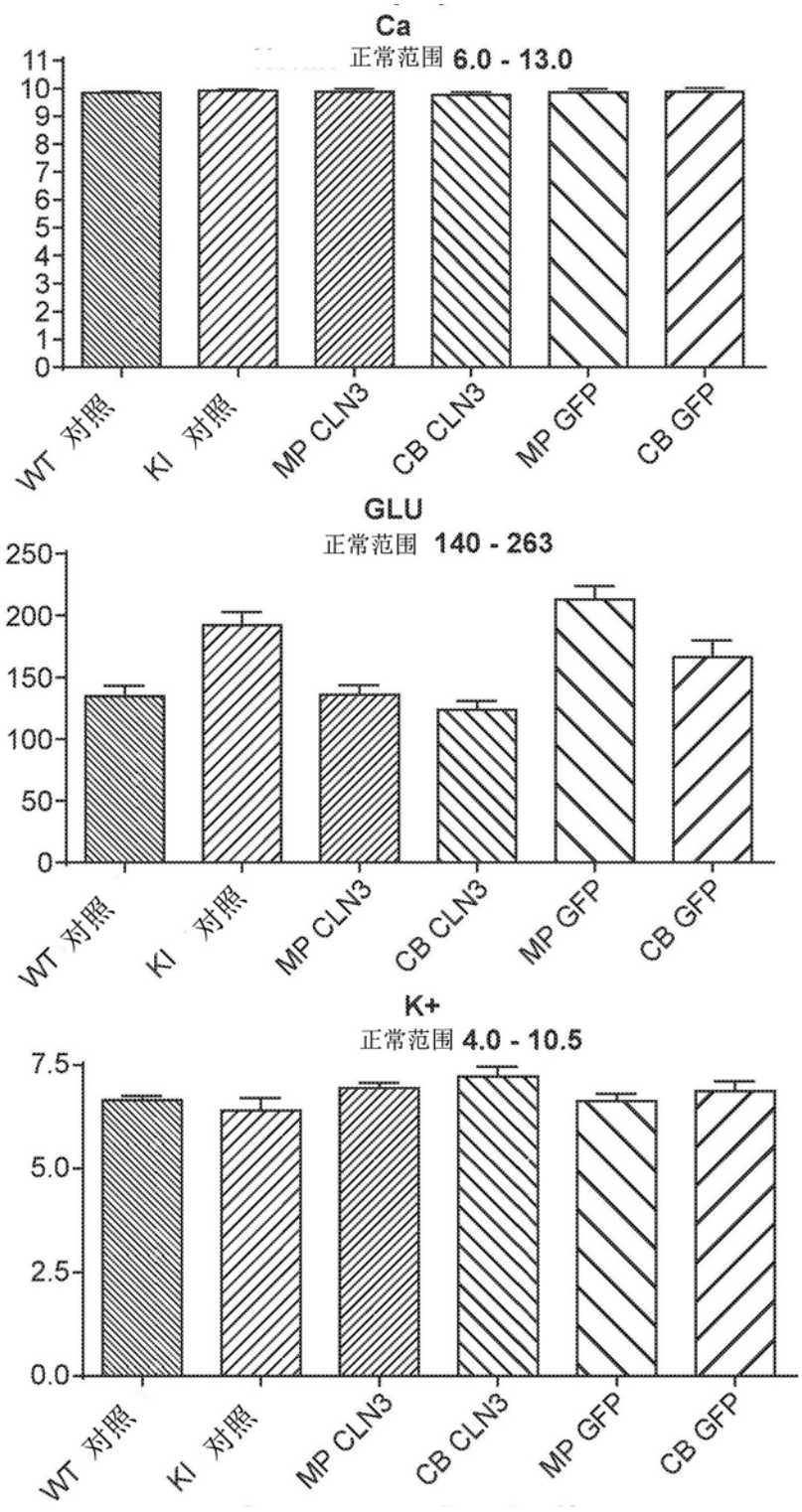

Ca
正常范围 6.0 - 13.0
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
GLU
正常范围 140 - 263
250
200
150
100
50
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
K+
正常范围 4.0 - 10.5
7.5
5.0
2.5
0.0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP

图12(续1)

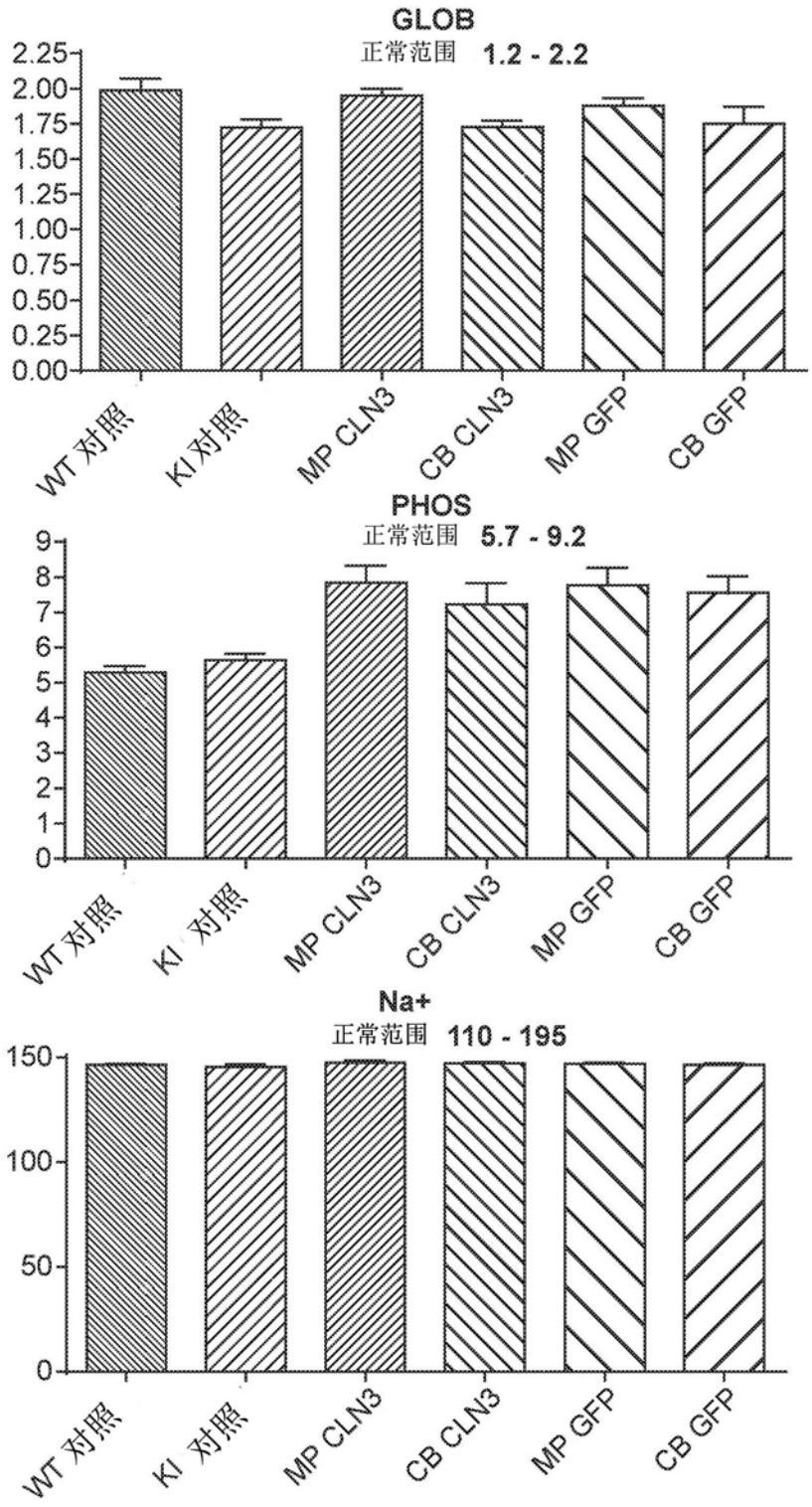
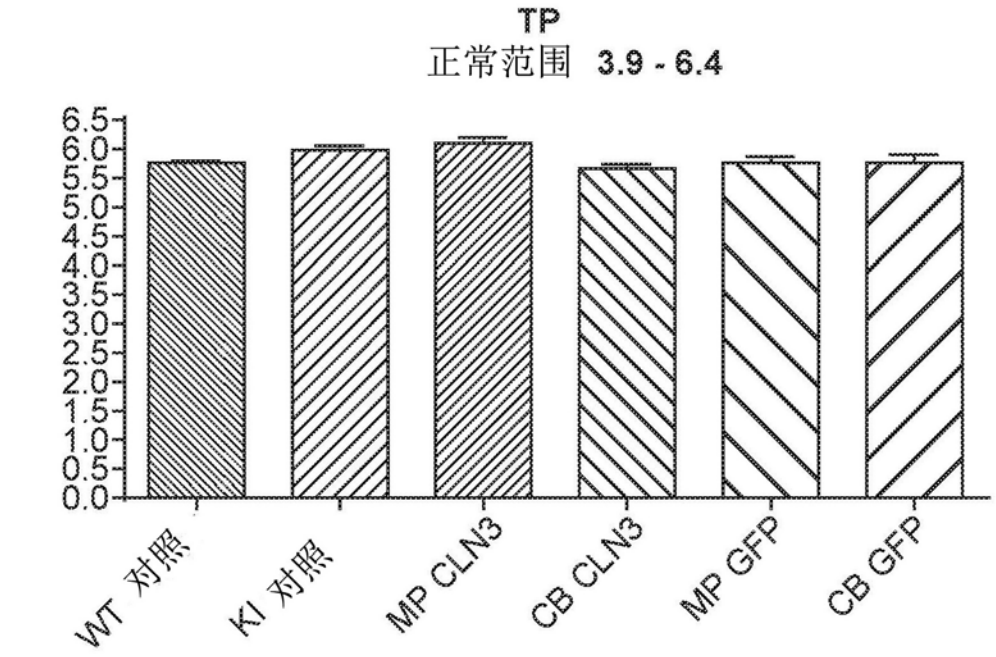

GLOB
正常范围 1.2 - 2.2
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
PHOS
正常范围 5.7 - 9.2
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
Na+
正常范围 110 - 195
150
100
50
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP

图12(续2)



WT 对照 : C57BL/6 WT 小鼠接受对照注射（PBS）
KI 对照 : $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠接受对照注射（PBS）
MP CLN3: $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠接受 AAV9/MeCP2-hCLN3
CB CLN3: $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠接受 AAV9/β-肌动蛋白-hCLN3
MP GFP: $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠接受AAV9/MeCP2-GFP
CB GFP: $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠接受AAV9/β-肌动蛋白-GFP

图12(续3)

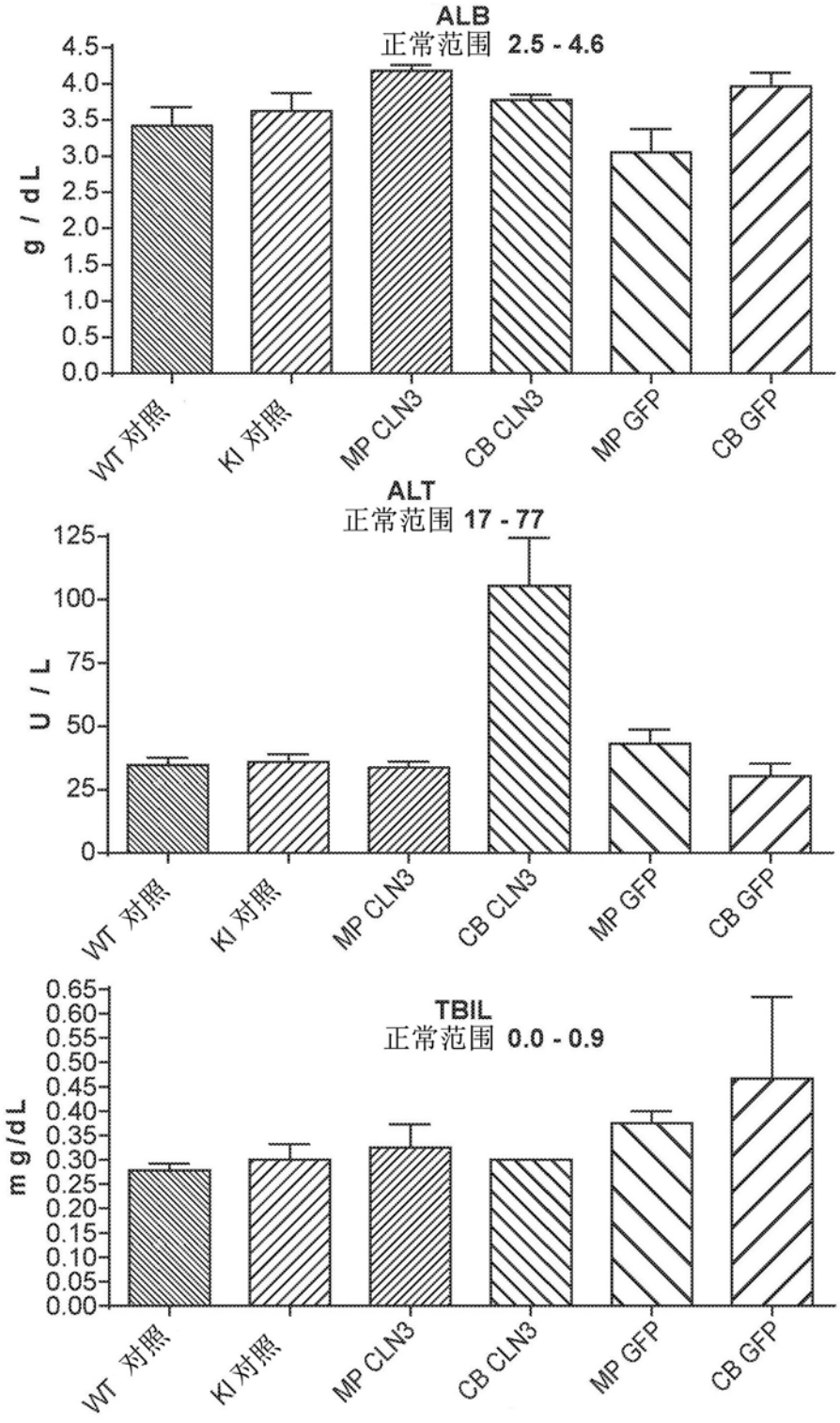

ALB
正常范围 2.5 - 4.6
g / dL
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
ALT
正常范围 17 - 77
U / L
125
100
75
50
25
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
TBIL
正常范围 0.0 - 0.9
m g/dL
0.65
0.60
0.55
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP

图13

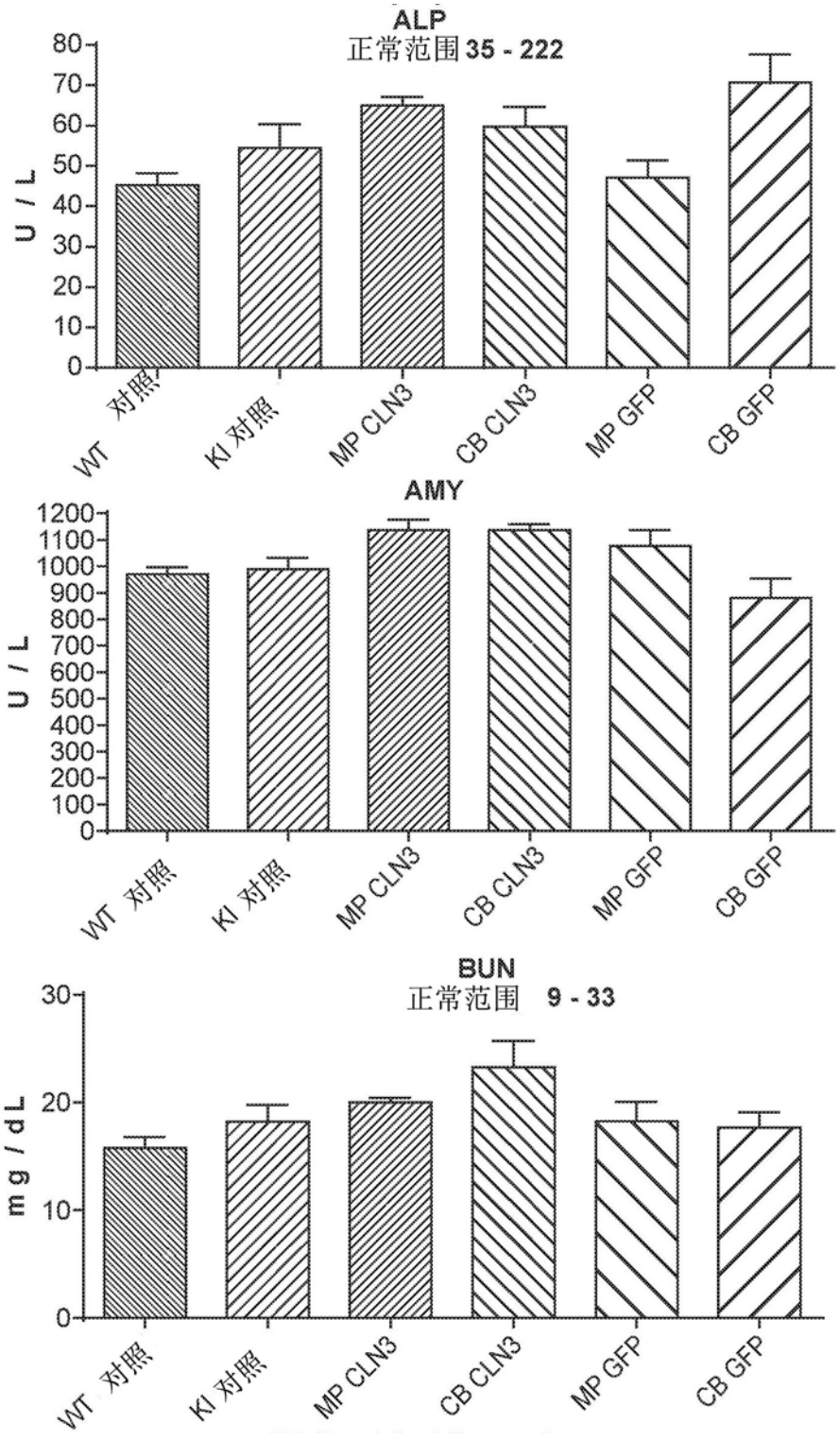

ALP
正常范围 35 - 222
U / L
80
70
60
50
40
30
20
10
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
AMY
U / L
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
BUN
正常范围 9 - 33
mg / dL
30
20
10
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP

图13(续)

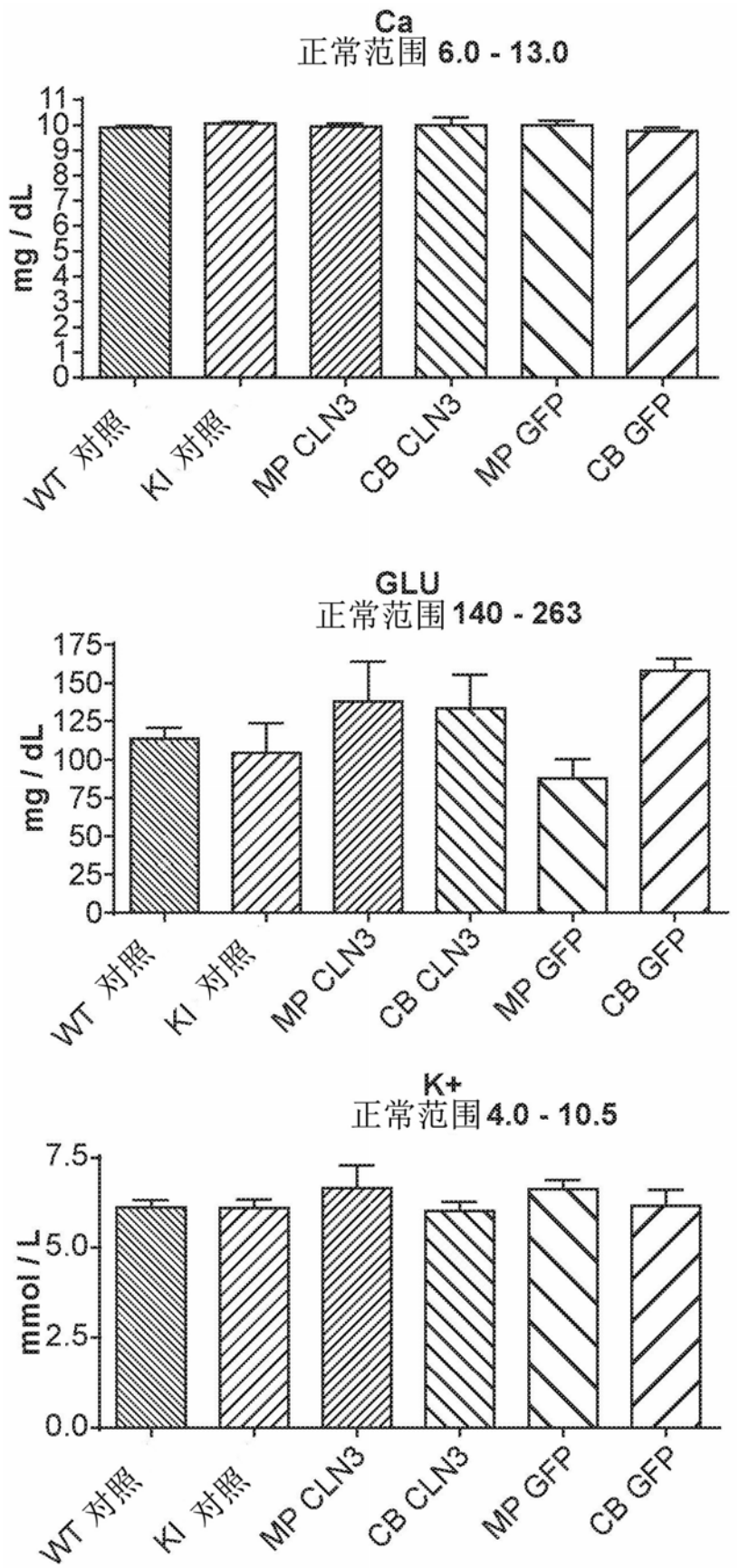

Ca
正常范围 6.0 - 13.0
mg / dL
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
GLU
正常范围 140 - 263
mg / dL
0
25
50
75
100
125
150
175
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
K+
正常范围 4.0 - 10.5
mmol / L
0.0
2.5
5.0
7.5
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP

图13(续1)

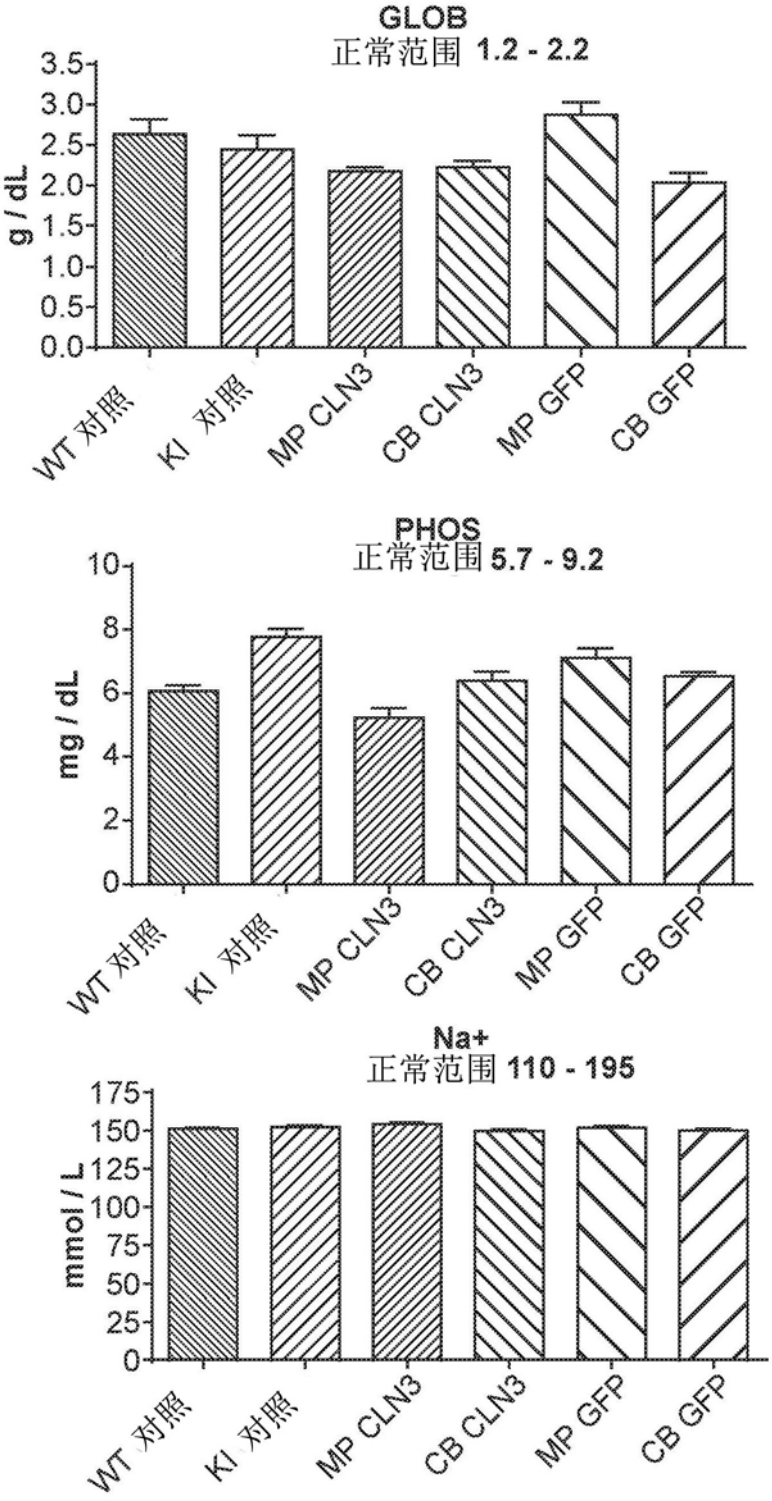

GLOB
正常范围 1.2 - 2.2
g / dL
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
PHOS
正常范围 5.7 - 9.2
mg / dL
10
8
6
4
2
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
Na+
正常范围 110 - 195
mmol / L
175
150
125
100
75
50
25
0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP

图13(续2)

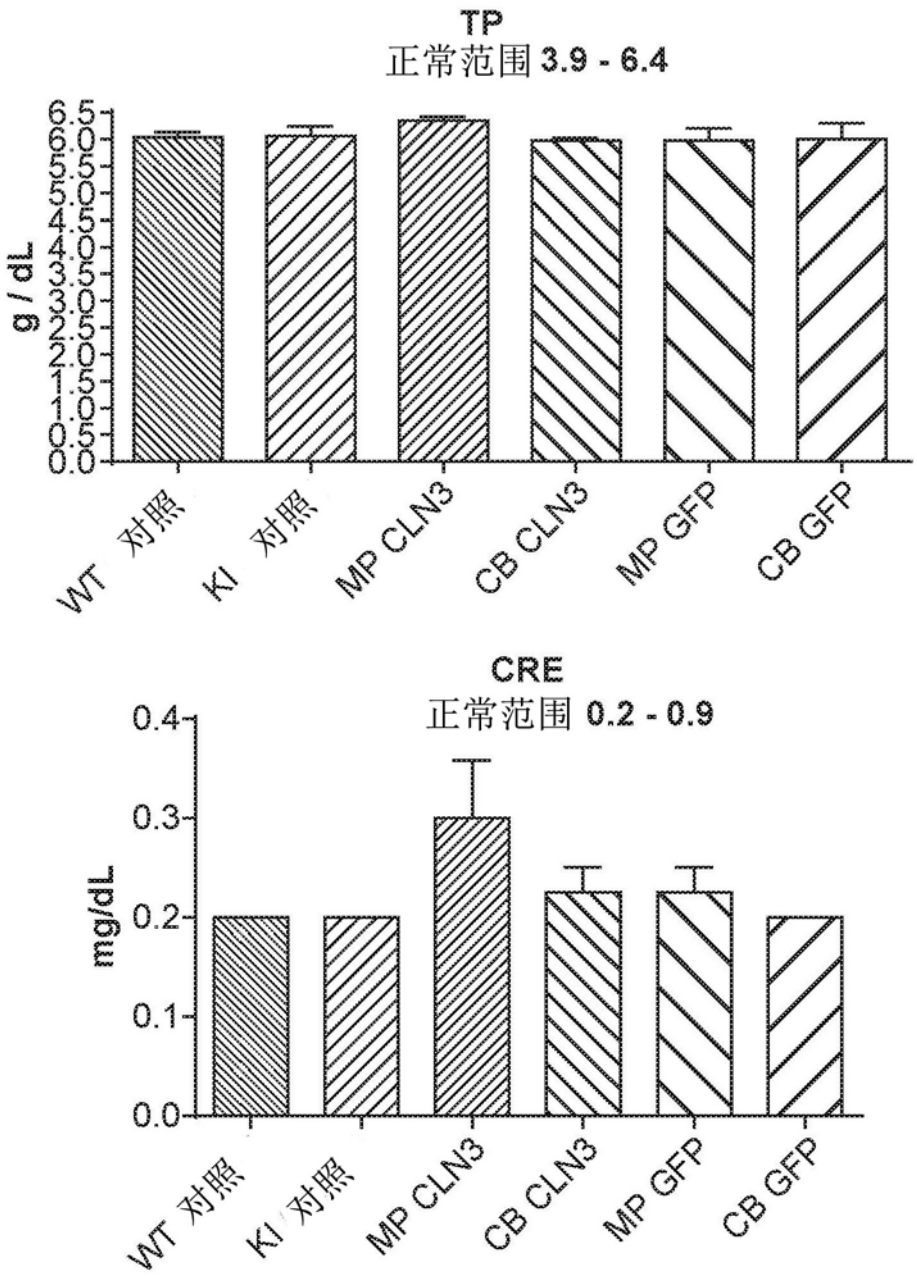

TP
正常范围 3.9 - 6.4
g / dL
6.5
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP
CRE
正常范围 0.2 - 0.9
mg/dL
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
WT 对照
KI 对照
MP CLN3
CB CLN3
MP GFP
CB GFP

图13(续3)

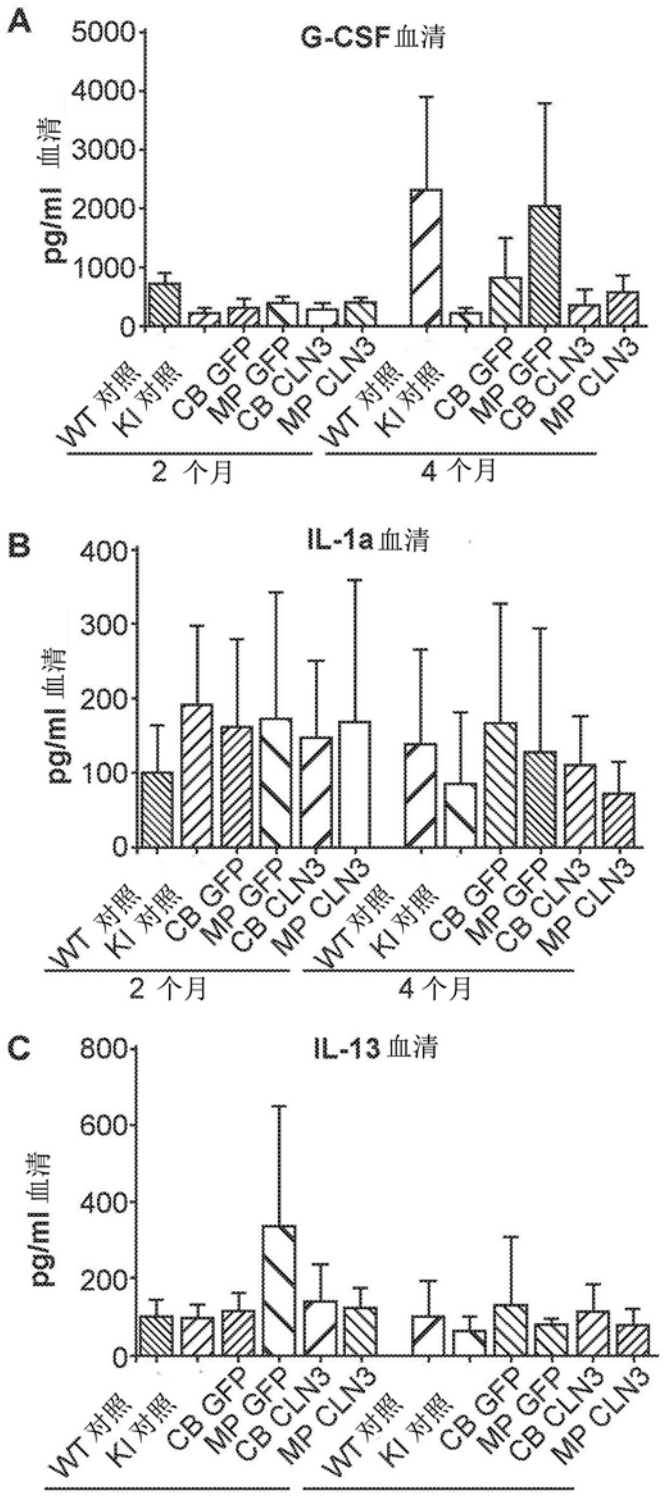

A
G-CSF血清
pg/ml 血清
5000
4000
3000
2000
1000
0
WT 对照
KI 对照
CB GFP
MP GFP
CB CLN3
MP CLN3
2 个月
4 个月
B
IL-1a血清
400
300
200
100
C
IL-13血清
800
600

图14

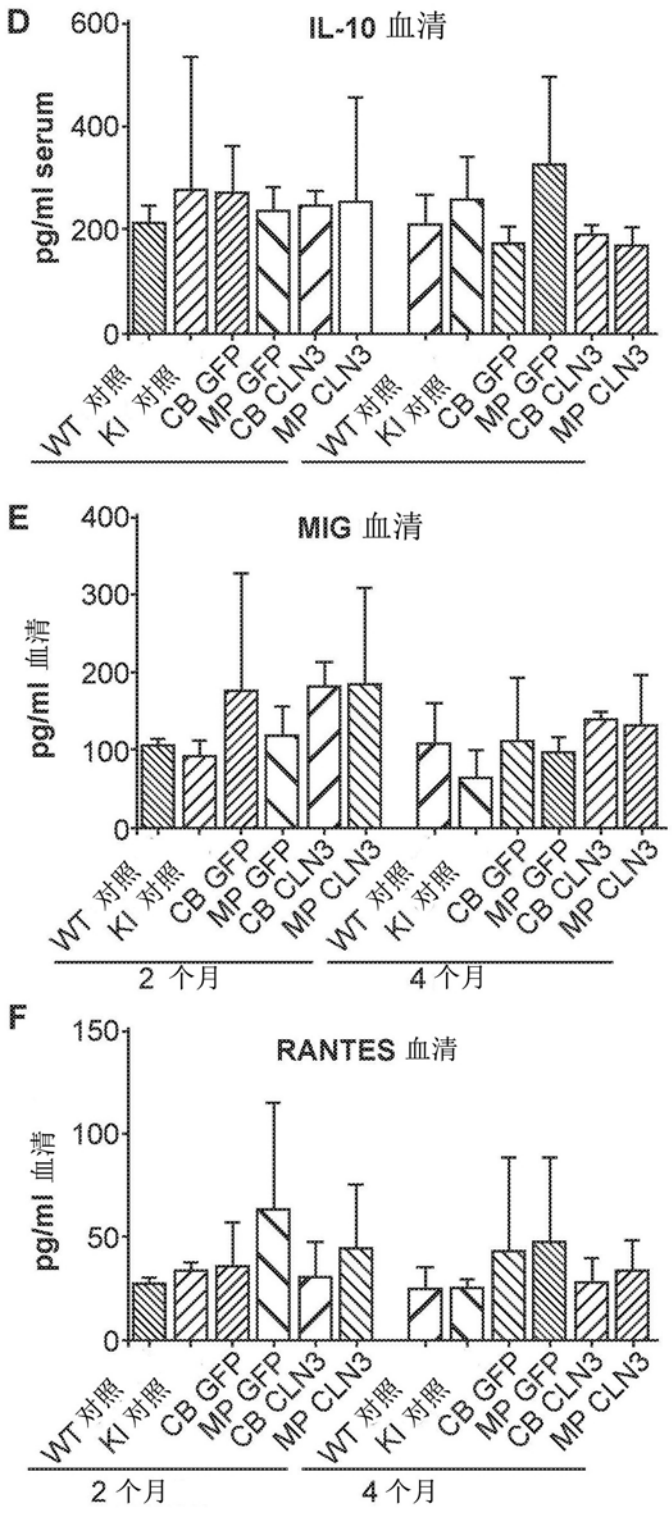

D
IL-10 血清
pg/ml serum
600
400
200
0
WT 对照
KI 对照
CB GFP
MP GFP
CB CLN3
MP CLN3
E
MIG 血清
pg/ml 血清
400
300
200
100
0
2 个月
4 个月
F
RANTES 血清
pg/ml 血清
150
100
50
0

图14(续)