(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116887867 A
(43)申请公布日 2023.10.13

(21)申请号 202180072913.2
(22)申请日 2021.08.26
(30)优先权数据
63/070,639 2020.08.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.04.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/047686 2021.08.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/046988 EN 2022.03.03
(71)申请人 宾夕法尼亚州大学信托人
地址 美国宾夕法尼亚州
(72)发明人 J·M·威尔逊 C·赫德尔 N·米勒
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 黄登高 梅黎
(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
A61K 38/18(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)
C07K 14/475(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)

权利要求书3页 说明书80页
序列表44页 附图35页

(54)发明名称

用于治疗GRN相关成人发作性神经退行性病变的重组腺相关病毒

(57)摘要

提供了一种可用于治疗人类患者的成人发作性神经退行性疾病的治疗方案,所述治疗方案包括施用具有AAV1衣壳和包括颗粒蛋白前体(GRN)编码序列的载体基因组的重组腺相关病毒(AAV)载体。还提供了包括重组AAV载体的组合物和治疗患者的成人发作性神经退行性疾病的方法,所述方法包括施用所述重组AAV载体。

CN 116887867 A

1.一种可用于治疗人类患者的成人发作性神经退行性疾病的治疗方案,其中所述方案包括施用具有AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组的重组腺相关病毒(AAV)载体,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列(ITR)、颗粒蛋白前体(GRN)编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列,所述施用包括小脑延髓池内(ICM)注射包括以下的单剂量:

(i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量;

(ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量;

(iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量;或

(iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。

2.根据权利要求1所述的方案,其中所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。

3.根据权利要求1或2所述的方案,其中所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的方案,其中所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的方案,其中所述患者已被鉴定为患有GRN单倍型不足和/或额颞叶痴呆(FTD)。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的方案,其中所述患者的年龄为至少35岁。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的方案,其中所述患者的CSF中具有低浓度的颗粒蛋白前体。

8.根据权利要求7所述的方案,其中所述患者的CSF中的颗粒蛋白前体浓度低于正常水平的50%。

9.根据权利要求7所述的方案,其中所述患者的CSF中的颗粒蛋白前体浓度是正常水平的约30%。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的方案,其进一步包括检测CSF、血清和/或血浆中的颗粒蛋白前体的水平。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的方案,其进一步包括测量

i)神经丝轻链(NfL)、总τ(T-τ)和磷酸化τ(P-τ)中的一种或多种的CSF水平;

ii)评估视网膜脂褐质;

iii)执行MRI以跟踪脑体积、白质完整性以及中额叶皮质和顶叶区域的厚度中的一个或多个的变化;

iv)执行FDG PET以评估额叶和/或颞叶中的代谢减退;和/或

v)测量EEG/诱发应答电势以评估疾病相关变化的减缓。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的方案,其中所述单剂量足以在以下组织类型中的任何一种或多种中提供10^{3}GC/μg DNA:额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质、枕叶皮质、髓质、小脑、颈脊髓、胸脊髓、腰脊髓、颈背根神经节、胸背根神经节、腰背根神经节和三叉神经节。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的方案,其中所述单剂量足以在以下组织类型中的任何一种或多种中提供10^{4}GC/μg DNA:额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质、枕叶皮质、髓质、小脑、颈脊髓、胸脊髓、腰脊髓、颈背根神经节、胸背根神经节、腰背根神经节和三叉神经节。

14.一种药物组合物,其包括包含AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组的重组AAV载

体,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列(ITR)、颗粒蛋白前体编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列,其中所述组合物被调配用于向有需要的人类患者进行小脑延髓池内(ICM)注射,以施用以下剂量:

(i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量;

(ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量;

(iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量;或

(iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。

15.根据权利要求14所述的药物组合物,其中所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。

16.根据权利要求14或15所述的药物组合物,其中所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。

17.根据权利要求14至16中任一项所述的药物组合物,其中所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。

18.一种治疗患有成人发作性神经退行性疾病的患者的方法,所述方法包括通过ICM注射向所述患者施用单剂量的重组AAV,其中所述重组AAV包括AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组,所述载体基因组包括AAV ITR、颗粒蛋白前体编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列,并且

其中所述单剂量是

(i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量;

(ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量;

(iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量;或

(iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。

19.根据权利要求18所述的方法,其中所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。

20.根据权利要求18或19所述的方法,其中所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。

21.根据权利要求18至20中任一项所述的方法,其中所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。

22.根据权利要求18至21中任一项所述的方法,其中所述患者已被鉴定为患有GRN单倍型不足和/或额颞叶痴呆(FTD)。

23.根据权利要求18至22中任一项所述的方法,其中所述患者的年龄为至少35岁。

24.根据权利要求18至23中任一项所述的方法,其中所述患者的CSF中具有低浓度的颗粒蛋白前体。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述患者的CSF中的颗粒蛋白前体浓度低于正常水平的50%。

26.根据权利要求24所述的方法,其中所述患者的CSF中的颗粒蛋白前体浓度是正常水平的约30%。

27.根据权利要求18至26中任一项所述的方法,其进一步包括检测CSF、血清和/或血浆

中的颗粒蛋白前体的浓度。

28.根据权利要求18至27中任一项所述的方法,其进一步包括测量

i)神经丝轻链(NfL)、总τ(T-τ)和磷酸化τ(P-τ)中的一种或多种的CSF浓度;

ii)评估视网膜脂褐质;

iii)执行MRI以跟踪脑体积、白质完整性以及中额叶皮质和顶叶区域的厚度中的一个或多个的变化;

iv)执行FDG PET以评估额叶和/或颞叶中的代谢减退;和/或

v)测量EEG/诱发应答电势以评估疾病相关变化的减缓。

29.一种呈单位剂型形式的药物组合物,所述药物组合物包括:

缓冲液中的约1.44×10^{13}至约4.33×10^{14}GC的重组AAV载体,

其中重组AAV包括AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列(ITR)、颗粒蛋白前体编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列。

30.根据权利要求29所述的药物组合物,其中所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。

31.根据权利要求29或30所述的药物组合物,其中所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。

32.根据权利要求29至31中任一项所述的药物组合物,其中所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。

33.根据权利要求29至32中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被调配用于ICM注射。

34.根据权利要求29至33中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲液包括磷酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁和泊洛沙姆188(poloxamer 188)。

35.根据权利要求29至34中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲液包括1mM磷酸钠、150mM氯化钠、3mM氯化钾、1.4mM氯化钙、0.8mM氯化镁和0.001%泊洛沙姆188。

36.根据权利要求29至35中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物的体积为约3.0mL、约4.0mL或约5.0mL。

37.根据权利要求29至36中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物用于治疗患有成人发作性神经退行性疾病的人类患者。

38.根据权利要求37所述的供使用的药物组合物,其中所述患者已被鉴定为患有GRN单倍型不足和/或额颞叶痴呆(FTD)。

39.根据权利要求37或38所述的供使用的药物组合物,其中所述组合物被调配用于施用以下剂量:

(i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量;

(ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量;

(iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量;或(iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。

用于治疗GRN相关成人发作性神经退行性病变的重组腺相关病毒

背景技术

[0001] 额颞叶痴呆(FTD)是通常在生命的第六个或第七个十年呈现执行功能、行为、言语或语言理解方面的缺陷的致命性神经退行性疾病。这些症状与影响额叶皮质和颞叶皮质的脑萎缩的特征性模式相关。患者普遍表现出自症状发作起平均8年存活期的渐进性过程(Coyle-Gilchrist IT等人,《神经病学(Neurology)》,2016;86(18):1736-43)。

[0002] FTD是高遗传性的,其中大约40%的患者具有阳性家族史(Rohrer JD等人,《神经病学》,2009;73(18):1451-6.)。在5%至10%的FTD患者中,可能在对颗粒蛋白前体(PGRN)进行编码的颗粒体蛋白(GRN)基因(即普遍存在的溶酶体蛋白)中鉴定出致病性功能丧失突变(Rohrer JD等人,《神经病学》,2009;73(18):1451-6)。GRN突变携带者表现出快速且广泛的脑萎缩并且可能呈现出其它神经退行性疾病,如进行性核上性麻痹、皮质基底节综合征、帕金森氏病(Parkinson's disease)、路易体痴呆(dementia with Lewy bodies)或阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)的临床特征(Le Ber I等人,《脑:神经病学杂志(Brain:a journal of neurology.)》,2008;131(3):732-46.)。GRN突变以常染色体显性方式遗传,到70岁时外显率大于90%(Gass J等人,《人类分子遗传学(Human molecular genetics.)》,2006;15(20):2988-3001)。虽然单个GRN突变的遗传导致FTD和其它晚发性神经退行性疾病,但是患有纯合子功能丧失突变的患者表现出在生命早期患有神经元蜡样质脂褐质沉积症(NCL,巴藤病(Batten disease)),其特征在于自荧光材料(脂褐质)在神经元溶酶体中的累积、迅速的认知减退和视网膜变性(Smith Katherine R等人,《美国人类遗传学杂志(American Journal of Human Genetics.)》,2012;90(6):1102-7)。尽管对GRN突变杂合的患者具有更晚的症状发作,但是所述患者的脑和视网膜最终患上与NCL患者相同的溶酶体贮积病变,并且同样经历进行性神经退行性病变(Ward ME等人,《科学转化医学(Science translational medicine.)》,2017;9(385);Gotzl JK等人,《神经病理学学报(Acta neuropathologica.)》,2014;127(6):845-60)。最新发现颗粒蛋白前体通过促进溶酶体酸化并用作溶酶体蛋白酶(包含组织蛋白酶(CTSD))的分子伴侣而在溶酶体功能中起关键作用(Beel S等人,《人类分子遗传学》,2017年8月1日;26(15):2850-2863;Tanaka Y等人,《人类分子遗传学》,2017;26(5):969-88)。对CTSD进行编码的基因的突变还产生支持与有缺陷的溶酶体蛋白酶活性相关的普通病理生理学的NCL表型(Siintola E等人,《脑:神经病学杂志》,2006;129(第6部分):1438-45)。

[0003] 目前尚无用于由GRN单倍型不足引起的成人发作性神经退行性病变的疾病修饰疗法。疾病管理包含旨在减少疾病相关行为、认知和/或移动症状的支持性护理和标签外治疗(Tsai和Boxer,2016,《神经化学杂志》,138增刊1:211-21)。进一步地,在早期阶段,可以通过筛查具有痴呆家族史的个体获得更多患者,鉴于缺乏治疗,所述痴呆家族史尚未表现出来。因此,这种疾病谱代表了高度未被满足的医疗需求的地区。

[0004] 需要的是,用于与GRN单倍型不足相关的成人发作性神经退行性疾病以及与其相关的症状的治疗。

发明内容

[0005] 一方面,本文提供了一种可用于治疗人类患者的成人发作性神经退行性疾病的治疗方案,其中所述方案包括施用具有AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组的重组腺相关病毒(AAV)载体,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列(ITR)、颗粒蛋白前体(GRN)编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列,所述施用包括小脑延髓池内(ICM)注射包括以下的单剂量:(i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量;(ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量;(iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量;或(iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。在某些实施例中,所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。在某些实施例中,所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。在某些实施例中,所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。在某些实施例中,所述患者已被鉴定为患有GRN单倍型不足和/或额颞叶痴呆(FTD)。

[0006] 一方面,本文提供了一种药物组合物,其包括包含AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组的重组AAV载体,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列(ITR)、颗粒蛋白前体编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列,其中所述组合物被调配用于向有需要的人类患者进行小脑延髓池内(ICM)注射,以施用以下剂量:(i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量;(ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量;(iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量;或(iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。在某些实施例中,所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。在某些实施例中,所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。在某些实施例中,所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。

[0007] 一方面,本文提供了一种治疗患有成人发作性神经退行性疾病的患者的方法,所述方法包括通过ICM注射向所述患者施用单剂量的重组AAV,其中所述重组AAV包括AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组,所述载体基因组包括AAV ITR、颗粒蛋白前体编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列,并且其中所述单剂量是(i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量;(ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量;(iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量;或(iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。在某些实施例中,所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。在某些实施例中,所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。在某些实施例中,所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。在某些实施例中,所述患者已被鉴定为患有GRN单倍型不足和/或额颞叶痴呆(FTD)。

[0008] 一方面,本文提供了一种单位剂型形式的药物组合物,所述药物组合物包括:缓冲液中的约1.44×10^{13}至约4.33×10^{14}GC的重组AAV载体,其中所述重组AAV包括AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列(ITR)、颗粒蛋白前体编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列。

[0009] 在某些实施例中,所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。在某些实施例中,所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。在某些实施例中,所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。在某些实施例中,所述组合物被调配用于ICM注射。在

某些实施例中,所述药物组合物用于患有成人发作性神经退行性疾病的人类患者的治疗用途。

[0010] 通过以下对本发明的详细描述,本发明的这些和其它方面将变得显而易见。

附图说明

[0011] 图1是AAV1.hPGRN载体基因组的线性映射。AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(以下也称为PBFT02)载体基因组包括在普遍存在的CB7启动子的控制下的人PGRN的编码序列,所述启动子由位于CMV IE增强子与鸡β-肌动蛋白启动子之间的杂合体构成。缩略语:BA,β-肌动蛋白;bp,碱基对;CMV IE,巨细胞病毒立即早期;ITR,反向末端重复序列;PolyA,聚腺苷酸化;rBG,兔β-珠蛋白。

[0012] 图2是携带载体基因组的顺式质粒的线性向量映射。

[0013] 图3A至图3D提供了$GRN^{-/-}$小鼠的脑中的脂褐质累积和氨基己糖苷酶活性的自然病程。在指定年龄处死$GRN^{-/-}$小鼠(KO)或$GRN^{+/+}$(WT)对照(n=10每时间点)。对海马体、丘脑和额叶皮质的未染色的脑切片进行成像以确定自发荧光材料(脂褐质),并且由三个盲审员对脂褐质沉积物进行定量并求平均值(图3A至图3C)。脂褐质计数是相对于所关注区域的总面积表达的。测量脑样品中的氨基己糖苷酶活性并且使其相对于总蛋白质浓度归一化(图3D)。值表达为与野生型对照的比率。

[0014] 图4示出了用表达人PGRN的AAV载体或媒剂处理的Grn-/-小鼠的CSF和脑中的人PGRN表达。媒剂-(PBS-)处理的WT小鼠、媒剂处理的Grn-/-小鼠和AAVhu68.hPGRN-(AAV-)处理的Grn-/-小鼠(ICV剂量:1.00×1011GC)在给药后65天进行尸检(N=10/组)。通过ELISA在CSF(WT+PBS:N=5;Grn-/-+PBS:N=6;Grn-/-+AAV:N=9)和来自额叶皮质的脑组织(N=10/组)上测量人PGRN蛋白的浓度。将脑PGRN浓度相对于从脑中分离的总蛋白归一化。ELISA的LOD是CSF为1.25ng/mL,并且脑为0.08ng/mg。

[0015] 图5示出了用表达人PGRN的AAV载体或媒剂处理的Grn-/-小鼠的脑和血清中的氨基己糖苷酶活性。媒剂-(PBS-)处理的WT小鼠、媒剂处理的Grn-/-小鼠和AAVhu68.hPGRN-(AAV-)处理的Grn-/-小鼠(ICV剂量:1.00×1011GC)在给药后65天进行尸检(N=10/组)。在来自额叶皮质的脑组织和血清中测量HEX活性(N=10/组,血清的Grn-/-+AAV除外,其中N=9)。将脑HEX活性相对于从脑中分离的总蛋白归一化。*p<0.05,***p<0.001,****p<0.0001,单向ANOVA,随后是图克多重比较检验(Tukey's multiple comparisons test)。

[0016] 图6示出了用表达人PGRN的AAV载体或媒剂处理的Grn-/-小鼠脑中脂褐质沉积的定量。媒剂-(PBS-)处理的WT小鼠、媒剂处理的Grn-/-小鼠和AAVhu68.hPGRN-(AAV-)处理的Grn-/-小鼠(ICV剂量:1.00×1011GC)在给药后65天进行尸检(N=10/组)。由盲审员定量海马体、丘脑和额叶皮质的未染色冰冻切片中的自发荧光脂褐质沉积(WT+PBS:N=10;Grn-/-+PBS:N=8;Grn-/-+AAV:N=10)。脂褐质计数是按照高倍视野表达的。*p<0.05,***p<0.001,****p<0.0001,单向ANOVA,随后是图克多重比较检验。

[0017] 图7A至图7C示出了通过AAV介导的PGRN表达对老年$GRN^{-/-}$小鼠的脑小胶质细胞增生进行的校正。通过单ICV注射媒剂(PBS)或表达人PGRN的AAVhu68载体(10^{11}GC)处理7月龄的$GRN^{-/-}$小鼠(KO)或$GRN^{+/+}$(WT)对照。注射后4个月处死动物,并且对脑切片进行染色以确定CD68。使用ImageJ软件,由盲审员定量海马体、丘脑和额叶皮质的图像中的CD68阳性面积。

面积是按照高倍视野表达的。*p<0.05,**p<0.005,***p<0.001,****p<0.0001,单向ANOVA,随后是图克多重比较检验。

[0018] 图8示出了ICM AAV施用后人PGRN蛋白在CSF和NHP的血浆中的表达。成年NHP(N=2/组)接受了剂量为3.0×10^{13}GC的AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)、AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG、AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG或AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40的单次ICM施用。在指定的研究日,通过ELISA测量CSF和血浆中的人PGRN蛋白。虚线表示健康人对照样品中的平均正常PGRN浓度。正常人对照CSF样品与NHP样品同时进行评估,而血浆的正常人PGRN浓度源自已公开的文献。由于与其它组相比,CSF中PGRN的表达水平较低,因此第21天和第28天未对AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40进行血浆分析。

[0019] 图9示出了ICM AAV施用后CSF和NHP的血清中的抗人PGRN抗体。成年NHP(N=2/组)接受了剂量为3.0×10^{13}GC的AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG的单次ICM施用。在指定的研究日,通过ELISA测量CSF和血清中的抗人PGRN抗体。未评估AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG和AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40的抗人PGRN抗体。

[0020] 图10示出了ICM AAV施用后NHP的体重。成年NHP(N=2/组)接受了剂量为3.0×10^{13}GC的AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)、AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG、AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG或AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40的单次ICM施用。在指定的时间点测量体重。

[0021] 图11示出了ICM AAV递送后NHP中的CSF白细胞计数。成年NHP(N=2/组)接受了剂量为3.0×10^{13}GC的AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)、AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG、AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG或AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40的单次ICM施用。在指定的时间点评估CSF白细胞计数。在所有分析的样品中,鉴定的细胞主要是小淋巴细胞。

[0022] 图12示出了在向非人灵长类动物ICM施用AAV1载体和AAVhu68载体之后的脑转导水平。通过ICM注射向成年恒河猴施用3×10^{13}GC的表达来自鸡β肌动蛋白启动子的GFP的AAVhu68(n=2)载体或AAV1(n=2)载体。载体施用后28天对动物进行尸检,并且在对GFP和DAPI进行染色的情况下,通过GFP免疫组织化学或免疫荧光分析脑右半球的五个区域的切片。用特定细胞类型的标志物(NeuN、GFAP和Olig2)进行共染色允许对经转导的星形胶质细胞和少突胶质细胞进行定量。计算所有采样的脑区域的每种细胞类型的平均转导。误差条=五个切片的SEM。

[0023] 图13提供了示出在向非人灵长类动物ICM施用AAV1(动物ID 1826和2068)载体和AAVhu68(动物ID 1518和2076)载体之后神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞转导百分比的表格。在研究第0天,通过ICM注射向成年恒河猴施用3×10^{13}GC的表达来自鸡β肌动蛋白启动子的GFP的GC AAVhu68(n=2)载体或AAV1(n=2)载体。载体施用后28天对动物进行尸检,并且在对特定细胞类型(NeuN、GFAP和Olig2)进行共染色的情况下,通过GFP免疫荧光分析脑右半球的五个区域的切片。使用HALO软件对每种细胞类型的总细胞和表达每种类型的细胞的GFP的数量进行定量。示出了针对每个区域转导的每种细胞类型的百分比。对于一些动物而言,分析来自第5区域的两个切片。

[0024] 图14示出了施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂的$Grn^{-/-}$小鼠的体重。以4.4×10^{9}GC、1.3×10^{10}GC、4.4×10^{10}GC或1.3×10^{11}GC的剂量向$Grn^{-/-}$小鼠ICV施用

AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(N＝15/组)。向$Grn^{-/-}$小鼠和WT小鼠(N＝15/组)ICV施用媒剂(ITFFB)作为对照。动物每周称重。误差条表示SEM。

[0025] 图15示出了施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂的$Grn^{-/-}$小鼠脑脊液中的转基因产物表达。以4.4×10^{9}GC(N＝12)、1.3×10^{10}GC(N＝12)、4.4×10^{10}GC(N＝13)或1.3×10^{11}GC(N＝11)的剂量向$Grn^{-/-}$小鼠ICV施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)。$Grn^{-/-}$(N＝7)和正常WT小鼠(N＝11)ICV施用媒剂(ITFFB)作为对照。在第90天,收集CSF并通过ELISA测量PGRN表达。误差条表示SEM。对于1:40稀释的CSF,ELISA测定的LOD为1.25ng/mL。

[0026] 图16A至图16C示出了施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂的$Grn^{-/-}$小鼠脑中脂褐质沉积的定量。以4.4×10^{9}GC(N＝15)、1.3×10^{10}GC(N＝14)、4.4×10^{10}GC(N＝15)、1.3×10^{11}GC(N＝15)的剂量向$Grn^{-/-}$小鼠ICV施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)。$Grn^{-/-}$和野生型小鼠ICV施用媒剂(ITFFB)作为对照(N＝15/组)。在第90天,收集脑并冷冻切片。丘脑(图16A)、皮质(图16B)和海马体(图16C)中的自发荧光脂褐质沉积使用自动图像分析软件进行定量。在第1天从未经处理的$Grn^{-/-}$和野生型小鼠收集的脑包含为基线对照。误差条表示SEM。基于对所有第90天组与媒剂处理的$Grn^{-/-}$对照进行单向ANOVA,随后是图克多重比较检验,*$p<0.05$,**$p<0.01$,***$p<0.001$并且****$p<0.0001$。

[0027] 图17A至图17C示出了施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂的$Grn^{-/-}$小鼠脑中CD68表达的定量。以4.4×10^{9}GC(N＝15)、1.3×10^{10}GC(N＝14)、4.4×10^{10}GC(N＝15)、1.3×10^{11}GC(N＝15)的剂量向$Grn^{-/-}$小鼠ICV施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)。$Grn^{-/-}$和野生型小鼠ICV施用媒剂(ITFFB)作为对照(N＝15/组)。在第90天,为CD68 IHC收集脑。丘脑(图17A)、皮质(图17B)和海马体(图17C)中的CD68染色使用自动图像分析软件定量为每个视野的阳性面积。在第1天从未经处理的$Grn^{-/-}$和野生型小鼠收集的脑包含为基线对照。误差条表示SEM。基于对所有第90天组与媒剂处理的$Grn^{-/-}$对照进行单向ANOVA,随后是图克多重比较检验,*$p<0.05$,**$p<0.01$,***$p<0.001$并且****$p<0.0001$。

[0028] 图18示出了施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂的$Grn^{-/-}$小鼠脑中氨基己糖苷酶活性的定量。以4.4×10^{9}GC(N＝15)、1.3×10^{10}GC(N＝13)、4.4×10^{10}GC(N＝15)、1.3×10^{11}GC(N＝15)的剂量向$Grn^{-/-}$小鼠ICV施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)。$Grn^{-/-}$和野生型小鼠ICV施用媒剂(ITFFB)作为对照(N＝15/组)。在第90天,收集脑第三额叶部分(主要是皮质组织)的脑样品,并且使用荧光底物测量HEX活性。来自在第1天尸检的未经处理的$Grn^{-/-}$和野生型小鼠的脑组织裂解物包含为基线对照。误差条表示SEM。基于对所有第90天组与媒剂处理的$Grn^{-/-}$对照进行单向ANOVA,随后是图克多重比较检验,*$p<0.05$,**$p<0.01$,***$p<0.001$并且****$p<0.0001$。

[0029] 图19示出了施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂的野生型小鼠的体重。野生型小鼠ICV施用了AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(1.3×10^{11}GC[N＝8/组])或媒剂(ITFFB;[N＝4/组])。给药后,在基线(第-4天)和每周对动物进行称重。将所有施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的小鼠(第2组、第4组、第6组和第8组)组合用于分析,并且将所有施用媒剂的组(第1组、第3组、第5组和第7组)组合用于分析。误差条表示SEM。

[0030] 图20示出了向野生型小鼠脑室内施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)后的载体生物分布。在单次ICV施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(1.3×10^{11}GC[N＝8/组])或媒剂(ITFFB;[N＝4/组])后10天、30天、60天和90天,在尸检时收集野生型小鼠的脑、心脏、肺、

肝脏、脾脏、肾脏和骨骼肌(股四头肌)。每个条代表每μgDNA检测到的平均载体基因组。误差条表示SEM。LOD为50GC/μg DNA。

[0031] 图21示出了施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂的野生型小鼠的CNS中的转基因产物表达。野生型小鼠ICV施用了AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(1.3×10^{11}GC[N=8/组])或媒剂(ITFFB;[N=4/组])。在第10天、第30天、第60天和第90天,收集CSF、脑和脊髓,并且通过ELISA测量人PGRN表达。误差条表示SEM。*基于未配对t检验,*p<0.05,**p<0.01并且****p<0.0001。

[0032] 图22示出了施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂的野生型小鼠的血清中的转基因产物表达。野生型小鼠ICV施用了AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(1.3×10^{11}GC[N=8/组])或媒剂(ITFFB;[N=4/组])。在第10天、第30天、第60天和第90天,收集血清,并且通过ELISA测量人PGRN表达。误差条表示SEM。对每个时间点进行未配对t检验。

[0033] 图23A至图23F示出了施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂的野生型小鼠的外周器官中的转基因产物表达。野生型小鼠ICV施用了AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(1.3×10^{11}GC[N=8/组])或媒剂(ITFFB;[N=4/组])。在第10天、第30天、第60天和第90天,收集心脏(图23A)、肝脏(图23B)、脾脏(图23C)、肾脏(图23D)、股四头肌(图23E)和颈淋巴结(图23F)。通过ELISA测量人PGRN表达。误差条表示SEM。基于未配对t检验,*p<0.05且**p<0.01。

[0034] 图24示出了从健康NHP的指II记录的来自典型正中神经SNAP的典型感觉神经动作电势波。感觉神经传导速度通过将刺激阴极与指II处的记录位点之间的距离除以起始潜伏期(即,刺激与SNAP起始之间的时间)来计算。SNAP振幅计算为SNAP起始时的电压与SNAP峰的差。

[0035] 图25示出了向NHP ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)后的感觉神经动作电势。在BL处和第28±3天以及第90±5天,成年NHP的代表性SNAP波形,所述成年NHP以3.0×10^{12}GC(低剂量)、1.0×10^{13}GC(中剂量)或3.0×10^{13}GC(高剂量)的剂量接受AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的单次ICM施用(N=3/组)。动物181323(第1组)、171229(第2组)、171311(第3组)和171246(第4组)分别代表了媒剂、低、中、高剂量组中所有动物的神经传导数据,但动物171123(媒剂,第1组)和180668(低剂量,第2组)(在第90±5天时,其表现出SNAP振幅显著单侧降低)以及动物171209(高剂量;第4组)(在第90±5天时,其表现出SNAP振幅显著双侧降低)除外。

[0036] 图26A和图26B示出了在ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)之后NHP中的SNAP振幅(图26A)和神经传导速度(图26B)。成年NHP接受剂量为3.0×10^{12}GC(低剂量)、1.0×10^{13}GC(中剂量)或3.0×10^{13}GC(高剂量)(N=3/组)的媒剂(ITFFB;N=2/组)或AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的单次ICM施用。在BL处以及第28天和第90天进行感觉神经传导研究。呈现了右正中神经和左正中神经的SNAP振幅和传导速度。

[0037] 图27示出了ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)后NHP的体重。成年NHP接受剂量为3.0×10^{12}GC(低剂量)、1.0×10^{13}GC(中剂量)或3.0×10^{13}GC(高剂量)(N=3/组)的媒剂(ITFFB;N=2/组)或AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的单次ICM施用。在第0天、第7天、第14天、第28天、第60天和第90天监测体重。

[0038] 图28示出了ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂后NHP的脑脊液中的

白细胞计数。成年NHP接受剂量为3.0×10^{12}GC(低剂量)、1.0×10^{13}GC(中剂量)或3.0×10^{13}GC(高剂量)(N=3/组)的媒剂(ITFFB;N=2/组)或AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的单次ICM施用。在第0天、第7天、第14天、第28天、第60天和第90天收集CSF。白细胞定量为每μl的CSF中白细胞(WBC)的数量。

[0039] 图29示出了在ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)后,IFN-γT细胞对NHP中的衣壳或转基因的应答的总结。

[0040] 图30示出了向NHP ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)后CSF和血清中的载体药代动力学。成年NHP接受剂量为3.0×10^{12}GC(低剂量)、1.0×10^{13}GC(中剂量)或3.0×10^{13}GC(高剂量)(N=3/组)的媒剂(ITFFB;N=2/组)或AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的单次ICM施用。在第0天、第7天、第14天和第60天收集CSF。在第0天、第7天、第14天、第28天和第60天收集全血。通过TaqMan qPCR定量载体基因组。

[0041] 图31示出了向NHP ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)后尿液和粪便中的载体排泄。成年NHP接受剂量为3.0×10^{12}GC(低剂量)、1.0×10^{13}GC(中剂量)或3.0×10^{13}GC(高剂量)(N=3/组)的媒剂(ITFFB;N=2/组)或AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的单次ICM施用。在基线处和第5天、第28天、第60天和第90天收集尿液和粪便。通过TaqMan qPCR定量载体基因组。

[0042] 图32示出了ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)后,NHP的脑脊液和血清中的人PGRN表达。成年NHP接受剂量为3.0×10^{12}GC(低剂量)、1.0×10^{13}GC(中剂量)或3.0×10^{13}GC(高剂量)(N=3/组)的媒剂(ITFFB;N=2/组)或AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的单次ICM施用。在第0天、第7天、第14天、第28天、第60天和第90天收集CSF。在BL处和第14天、第28天、第60天和第90天收集血清。通过ELISA分析样品以评估人PGRN表达水平。

[0043] 图33示出了ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)后NHP的脑脊液中的人PGRN蛋白。成年NHP接受剂量为3.0×10^{12}GC(低剂量)、1.0×10^{13}GC(中剂量)或3.0×10^{13}GC(高剂量)(N=3/组)的媒剂(ITFFB;N=2/组)或AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的单次ICM施用。通过ELISA分析第14天收集的CSF以评估人PGRN表达水平。

[0044] 图34示出了在ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)后,NHP的CSF和血清中的抗人PGRN抗体。成年NHP接受剂量为3.0×10^{12}GC(低剂量)、1.0×10^{13}GC(中剂量)或3.0×10^{13}GC(高剂量)(N=3/组)的媒剂(ITFFB;N=2/组)或AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的单次ICM施用。在第0天、第7天、第14天、第28天、第60天和第90天收集CSF。在BL处和第14天、第28天、第60天和第90天收集血清。通过ELISA分析样品以评估抗人PGRN抗体水平。

[0045] 图35示出了向NHP ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)90天后的载体生物分布。在以3.0×10^{12}GC(低剂量)、1.0×10^{13}GC(中剂量)或3.0×10^{13}GC(高剂量)(N=3/组)的剂量单次ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)90天后,在尸检时从成年NHP中收集所示组织。还从媒剂(ITFFB-)处理的NHP(N=2)收集组织作为对照。每个条代表每μg DNA检测到的平均载体基因组。误差条表示SEM。LOD为50GC/μg DNA。

具体实施方式

[0046] 提供了包括包含AAV1衣壳和具有颗粒蛋白前体编码序列的载体基因组的重组AAV的药物组合物。所述药物组合物可用于治疗人类患者的成人发作性神经退行性疾病的方法

和方案,包含颗粒蛋白前体(GRN)相关的额颞叶痴呆(FTD)。

[0047] 如本文所使用的,术语“AAV.hPGRN”或“rAAV.hPGRN”用于指重组腺相关病毒,所述重组腺相关病毒具有AAV衣壳,所述AAV衣壳内具有载体基因组,所述载体基因组包括在调控序列的控制下的人颗粒蛋白前体(GRN,也称为PGRN)编码序列。可以指定具体的衣壳类型,如例如,AAV1.hPGRN,其指具有AAV1衣壳的重组AAV;AAVhu68.hPGRN,其指具有AAVhu68衣壳的重组AAV;AAV5.hPGRN指具有AAV5衣壳的重组AAV。

[0048] “重组AAV”或“rAAV”是含有两个元件的DNA酶抗性病毒颗粒,所述两个元件即AAV衣壳和至少含有包装在AAV衣壳内的非AAV编码序列的载体基因组。除非另有说明,否则此术语可以与短语“rAAV载体”互换地使用。rAAV是“复制缺陷型病毒”或“病毒载体”,因为其缺少任何功能性AAV rep基因或功能性AAV cap基因并且不能产生子代。在某些实施例中,仅AAV序列是AAV反向末端重复序列(ITR),通常定位在载体基因组的5’和3’最末端处,以允许定位在ITR之间的基因和调控序列包装在AAV衣壳内。

[0049] 如本文所使用的,“载体基因组”是指包装在形成病毒颗粒的rAAV衣壳内部的核酸序列。此类核酸序列含有AAV反向末端重复序列(ITR)。在本文的实例中,载体基因组至少含有从5’到3’的AAV 5’ITR、编码序列和AAV 3’ITR。可以选择来自AAV2的ITR、不同于衣壳来源或除全长ITR之外的AAV。在某些实施例中,ITR来自与在产生或反式补充AAV期间提供rep功能的AAV来源相同的AAV。进一步地,可以使用其它ITR。进一步地,载体基因组含有引导基因产物表达的调控序列。在本文中更详细地讨论载体基因组的合适组分。

[0050] 治疗性蛋白和编码序列:

[0051] rAAV包含人颗粒蛋白前体(hPGRN)蛋白的编码序列或其执行hPGRN的生物学功能中的一个或多个生物学功能的变体。这种蛋白的编码序列被工程化为中枢神经系统(CNS)中用于表达的载体基因组。

[0052] 人PGRN1(hPGRN)最常见的特征在于GenBank NP_002078的593氨基酸序列,所述氨基酸序列在SEQ ID NO:1中重现。这种序列含有位置1到17处的信号肽,其中分泌的颗粒蛋白前体蛋白质或分泌的颗粒体蛋白包括氨基酸18到约593。这种蛋白质可以切割为8条链:颗粒体蛋白1(亦称颗粒体蛋白G:约aa 58到约氨基酸113)、颗粒体蛋白2(约氨基酸123到约179)、颗粒体蛋白3(约氨基酸206到约氨基酸261)、颗粒体蛋白4(约氨基酸281到约氨基酸336)、颗粒体蛋白5(约氨基酸364到约氨基酸417)、颗粒体蛋白6(约氨基酸442到约氨基酸496)和颗粒体蛋白7(约氨基酸518到约氨基酸573),参考SEQ ID NO:1的编号。在某些实施例中,异源信号肽可以取代天然信号肽。然而,其它实施例可以涵盖具有外源信号肽(例如,人IL2前导序列)的颗粒蛋白前体。还可以参考例如www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia。因此,含有颗粒蛋白前体和/或其片段的融合蛋白是可设想的。此类融合蛋白可以涵盖与彼此的各种组合中的活性GRN中的一种或多种活性GRN(例如,GRN 1、2、3、4、4、6或7),或者这些肽中的一个或多个肽可以与全长PGRN或另一个蛋白质或肽(例如,另一个活性蛋白或肽和/或对人PGRN具有外源性的信号肽)组合。

[0053] 载体基因组被工程化为携带这种蛋白质的编码序列并且表达人细胞中以及具体地中枢神经系统中的蛋白质。在某些实施例中,编码序列可以是在GenBank:NM_002087.3中找到的自然序列,所述自然序列在SEQ ID NO:2中重现。

[0054] 在某些实施例中,编码序列是在SEQ ID NO:3中提供的。某些其它实施例将涵盖与

SEQ ID NO:3的同一性在95％到99.9％或100％内(包含其之间的数值在内)的编码序列。在一些实施例中,编码序列被密码子优化以得出更好的治疗结果,例如,增强的哺乳动物细胞中的表达。可以通过具有信号(前导)序列的全长颗粒蛋白前体的编码序列、通过不具有信号(前导)序列的颗粒蛋白前体或通过如本文所定义的融合蛋白的编码序列的长度评估同一性。在某些实施例中,编码序列是在SEQ ID NO:3中提供的。某些其它实施例将涵盖与SEQ ID NO:4在95％至小于100％同一性内的编码序列。可以通过具有信号(前导)序列的全长颗粒蛋白前体的编码序列、通过不具有信号(前导)序列的颗粒蛋白前体或通过如本文所定义的融合蛋白的编码序列的长度评估同一性。

[0055] 适合地,这些编码序列对全长颗粒蛋白前体进行编码。然而,其它实施例可以涵盖具有异源信号肽(例如,人IL2前导序列)的活性颗粒体蛋白链。还可以参考例如www.signalpeptide.de/index.php?m＝listspdb_mammalia。

[0056] 在某些实施例中,可以利用人PGRN的编码序列(例如,SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4)的片段或与其具有约95％到99.9％或100％同一性的序列。此类片段可以对活性人GRN(aa 18-593)或包括具有活性人GRN的异源信号肽的融合肽进行编码。在某些实施例中,活性GRN中的一种或多种活性GRN(例如,GRN 1、2、3、4、4、6或7)的编码序列中的一个或多个编码序列可以包含在与彼此的各种组合的载体基因组内,或者这些肽中的一个或多个肽可以与全长PGRN或另一个编码序列组合。

[0057] 不希望受理论束缚,据信,CNS(例如,室管膜细胞)中的细胞亚群中的AAV介导的PGRN表达提供了分泌蛋白的储库。分泌PGRN蛋白(和/或一种或多种GRN)通过分拣蛋白(sortilin)或甘露糖-6-磷酸受体被其它细胞摄取,所述分泌PGRN蛋白随后在所述其它细胞中被转运到溶酶体。在某些实施例中,所述分泌蛋白是颗粒蛋白前体。在某些实施例中,所述分泌蛋白是颗粒体蛋白。在某些实施例中,所述分泌蛋白包含颗粒蛋白前体和颗粒体蛋白的混合物。

[0058] 在某些实施例中,除颗粒蛋白前体编码序列之外,另一种非AAV编码序列可以包含在内,例如,肽、多肽、蛋白质、功能性RNA分子(例如,miRNA、miRNA抑制剂)或所关注的其它基因产物。有用的基因产物可以包含miRNA。miRNA和其它小干扰核酸通过靶信使RNA(mRNA)的靶RNA转录物裂解/降解或转译抑制来调节基因表达。miRNA是天然表达的,通常作为最终的19-25种非转译的RNA产物。miRNA通过与靶mRNA的3'非转译区(UTR)的序列特异性相互作用展现出其活性。这些内源表达的miRNA形成发夹前体,所述发夹前体随后被加工成miRNA双链体,并且被进一步加工成“成熟的”单链miRNA分子。这种成熟的miRNA引导多蛋白复合物miRISC,所述多蛋白复合物基于与成熟的miRNA的互补性来鉴定靶mRNA的靶位点,例如在3'UTR区中。

[0059] 在某些实施例中,所述表达盒进一步包括一个或多个miRNA靶序列,所述一个或多个靶序列抑制背根神经节(drg)中的hPGRN的表达。在某些实施例中,所述表达盒包括drg特异性miRNA靶序列的至少两个串联重复序列,其中所述至少两个串联重复序列包括可以相同或不同的至少一个第一miRNA靶序列和至少一个第二miRNA靶序列。在某些实施例中,所述串联miRNA靶序列是连续的或由1到10个核酸的间隔子隔开,其中所述间隔子不是miRNA靶序列。在某些实施例中,至少两个drg特异性miRNA靶序列定位在hPGRN编码序列的3'处。在某些实施例中,所述至少两个drg特异性miRNA串联重复序列中的第一个的起点在距

hPGRN编码序列的3'端20个核苷酸内。在某些实施例中,所述至少两个drg特异性miRNA串联重复序列中的第一个的起点距hPGRN编码序列的3'端至少100个核苷酸。在某些实施例中,所述miRNA串联重复序列的长度包括200个至1200个核苷酸。在某些实施例中,至少两个drg特异性miRNA靶序列定位在hPGRN编码序列的5'处。在某些实施例中,至少两个drg特异性miRNA靶序列定位在hPGRN编码序列的5'和3'两者中。在某些实施例中,表达盒mRNA或DNA正链的至少第一和/或至少第二miRNA靶序列的miRNA靶序列选自:(i)AGTGAATTCTACCAGTGCCATA(miR183,SEQ ID NO:32);(ii)AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA(SEQ ID NO:33);(iii)AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA(SEQ ID NO:34);以及(iv)AGGGATTCCTGGGAAAACTGGAC(SEQ ID NO:35)来实现。在某些实施例中,两个或更多个连续的miRNA靶序列是连续的并且不由间隔子隔开。在某些实施例中,两个或更多个miRNA靶序列由间隔子隔开,并且每个间隔子独立地选自以下中的一个或多个:(A)GGAT;(B)CACGTG;或(C)GCATGC。在某些实施例中,定位在所述miRNA靶序列之间的间隔子可以定位在第一个miRNA靶序列的3'和/或最后一个miRNA靶序列的5'。在某些实施例中,所述miRNA靶序列之间的所述间隔子是相同的。参见于2020年2月12日提交的国际专利申请第PCT/US19/67872号,所述国际专利申请通过引用并入本文。

[0060] AAV1

[0061] 来自分枝F的AAVhu68可以用于产生靶向并表达CNS中的hPGRN的载体。然而,出人意料地观察到,AAV1介导的PGRN递送提供了高于AAVhu68的CNS中的PGRN表达,尽管观察到相当的血浆浓度。发明人已经发现,rAAV1.PGRN的鞘内递送是本文所述的疗法的具有吸引力的递送途径。因此,在特别期望的实施例中,选择了AAV1衣壳。

[0062] 在某些实施例中,提供了一种组合物,所述组合物包括适用于鞘内注射的水性液体和具有优先靶向室管膜细胞的AAV衣壳的rAAV原液,其中rAAV进一步包括具有PGRN编码序列的递送到中枢神经系统(CNS)的载体基因组。在某些实施例中,所述组合物被调配成枕骨下注射到小脑延髓池中(小脑延髓池内)。在某些实施例中,所述rAAV通过计算机断层扫描(CT)引导的rAAV注射施用。在某些实施例中,向患者施用单剂量的所述组合物。

[0063] AAV1衣壳是指具有AAV vp1蛋白、AAV vp2蛋白和AAV vp3蛋白的衣壳。在特定实施例中,所述AAV1衣壳包括组装到60个总vp蛋白的T1二十面体衣壳中的预定比率为约1:1:10的AAV vp1蛋白、AAV vp2蛋白和AAV vp3蛋白。AAV1衣壳能够包装基因组序列,以形成AAV颗粒(例如重组AAV,其中基因组是载体基因组)。通常,例如美国专利6,759,237、美国专利7,105,345、美国专利7,186,552、美国专利8,637,255和美国专利9,567,607中描述了对最长vp蛋白进行编码的衣壳核酸序列,即在产生具有AAV1衣壳的rAAV期间反式表达的VP1,所述专利通过引用并入本文中。

[0064] 衣壳编码序列不存在于最终组装的rAAV1.hPGRN中。然而,此类序列用于在产生重组AAV。在某些实施例中,AAV1衣壳编码序列是对SEQ ID NO:26的全长AAV1 VP1蛋白或其VP2或VP3区域进行编码的任何核酸序列。参考例如美国专利6,759,237、美国专利7,105,345、美国专利7,186,552、美国专利8,637,255和美国专利9,567,607,所述美国专利通过引用并入本文中。在某些实施例中,所述AAV1衣壳编码序列是SEQ ID NO:25。在某些实施例中,所述AAV1衣壳是在使用或不使用翻译后修饰的情况下由SEQ ID NO:25的编码序列产生的蛋白质。然而,使用AAV1 VP1、AAV1 VP2和/或AAV VP3氨基酸序列,这种编码序列的变体

可以被工程化和/或其它编码序列可以被反向翻译以用于期望的表达系统。

[0065] 在某些实施例中，基于SEQ ID NO:26中重现的AAV1 VP1的初级序列的编号，包括重组AAV1的组合物具有衣壳，其中AAV1含有高度脱酰胺化的五个氨基酸(N57、N383、N512和N718)。

[0066]

AAV1 修饰								
酶		胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶
覆盖%	N + 1	97.6	84.2	92.4	87.4	90.4	85.2	88.9
N35+脱酰胺化	Q	9.5						
约 N57+脱酰胺化	G	100.0	100.0	100.0	92.0	89.3	86.1	85.5
约 N94+脱酰胺化	H				2.3	3.7	4.9	2.2
N113+脱酰胺化	L		5.6					
约 N214+脱酰胺化	N				0.9	0.4	1.0	0.7
约 N223+脱酰胺化	A	21.4		25.9				

[0067]

N227+脱酰胺化	W	4.9		3.1				
约 N253+脱酰胺化	H		29.7					
Q259+脱酰胺化	I	24.6		14.2				
约 N269+脱酰胺化	D			21.6			5.2	
约 N271+脱酰胺化	H	27.7						
N286+脱酰胺化	R	5.4		5.2				
约 N302+脱酰胺化	**N**NN	43.7	48.6	18.8	12.4	28.7	16.3	11.9
约 N303+脱酰胺化	N**N**N		50.8	19.3				
约 N383+脱酰胺化	G	88.5	86.9	82.5	82.1	84.6	83.4	92.3
约 N408+脱酰胺化	N	58.2	43.2	40.5	30.1	25.7	28.3	22.8
约 N451+脱酰胺化	Q	20.5						
约 Q452+脱酰胺化	S	1.7						
N477+脱酰胺化	W	4.4	3.1	39.7	1.2	1.3	1.1	1.8
约 N496+脱酰胺化	**N**NN	1.1		69.9				
N512+脱酰胺化	G	93.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.3
N651+脱酰胺化	T	2.0	2.1	1.6	0.6			
N691+脱酰胺化	S			57.1				
约 N704+脱酰胺化	Y		9.4					
N718+脱酰胺化	G	98.7	98.1	98.2	89.5	91.9	92.3	87.4

[0068] 在某些实施例中，AAV1由VP同种型的异质群体的衣壳组合物表征，基于如使用质谱所测定的衣壳中的VP蛋白的总量，所述VP同种型如下表所定义的被脱酰胺化。在某些实施例中，在下文提供的如使用质谱所测定的范围内，在以下位置中的一个或多个位置处修饰AAV衣壳。残基编号基于公开的AAV1序列，在SEQ ID NO:26中重现。

[0069]

表	
基于 VP1 编号的 AAV1 衣壳位置	%
N35+脱酰胺化	1-15、5-10
约 N57+脱酰胺化	65-90、70-95、80-95、75 - 100、80-100 或 90-100
N113+脱酰胺化	0-8
约 N223+脱酰胺化	0-30、0、20-28
N227+脱酰胺化	0、1-5
约 N253+脱酰胺化	0、1-35
Q259+脱酰胺化	0、10-25
约 N269+脱酰胺化	0-25
约 N271+脱酰胺化	0-25
N286+脱酰胺化	2-10
约 N302+脱酰胺化	10-50
约 N303+脱酰胺化	0-55
约 N383+脱酰胺化	65-90、70-95、80-95、75 - 100、80-100 或 90-100

[0070]

约 N408+脱酰胺化	30-65
约 N451+脱酰胺化	0-25
约 Q452+脱酰胺化	0-5
N477+脱酰胺化	0-45
约 N496+脱酰胺化	0-75
N512+脱酰胺化	75 - 100、80-100、90-100
N651+脱酰胺化	0-3
N691+脱酰胺化	0、1-60
约 N704+脱酰胺化	0-10
N718+脱酰胺化	75 - 100、80-100、90-100

[0071] 合适的修饰包含上文的段落中描述的标记为脱酰胺化调节的修饰，其并入本文中。在某些实施例中，如本文所描述的修饰以下位置中的一个或多个位置或N之后的甘氨酸。在某些实施例中，构建了AAV1突变体，其中保存了位置57、383、512和/或718处的N之后的甘氨酸(即，保持未经修饰的)。在某些实施例中，在前一句中鉴定的四个位置处的NG与天然序列一起保存。残基编号基于公开的AAV1 VP1，在SEQ ID NO:26中重现。在某些实施例中，将人工NG引入到与上表所鉴定的位置之一不同的位置中。

[0072] rAAV载体

[0073] 如上文所指示的，具有AAV1衣壳的重组AAV是用于治疗FTD的本文所述的优选载体。在某些实施例中，例如，在下述实例中(例如，AAVhu68或AAV5)，其它AAV衣壳可以用于产生rAAV。在某些实施例中，可以选择AAV1衣壳，并且包括颗粒蛋白前体(GRN)编码序列的载体基因组的元件中的一个或多个元件可以被取代。

[0074] 如本文所使用的，AAVhu68衣壳是指如WO 2018/160582中所定义的衣壳，其通过引用并入本文中。如本文所述，rAAVhu68具有在表达来自AAVhu68核酸的衣壳的产生系统中产生的rAAVhu68衣壳(例如，SEQ ID NO:30)，所述衣壳对SEQ ID NO:31的vp1氨基酸序列以及任选地另外的核酸序列进行编码，例如对不含vp1和/或vp2独特区域的vp 3蛋白进行编码。使用单个核酸序列vp1从生产中产生的rAAVhu68产生vp1蛋白、vp2蛋白和vp3蛋白的异质群体。更具体地，AAVhu68衣壳含有具有来自SEQ ID NO:31中的预测的氨基酸残基的修饰的vp1蛋白内、vp2蛋白内和vp3蛋白内的亚群体。这些亚群体至少包含脱酰胺化的天冬酰胺(N

或Asn)残基。例如,天冬酰胺-甘氨酸对中的天冬酰胺是高度脱酰胺化的。在一个实施例中,AAVhu68 vp1核酸序列具有SEQ ID NO:30的序列或与其互补的链,例如,对应的mRNA或tRNA。在某些实施例中,vp2和/或vp3蛋白可以另外地或可替代地由不同于vp1的核酸序列表达,例如以改变所选表达系统中的vp蛋白的比率。在某些实施例中,还提供了对SEQ ID NO:31(约aa203至736)的AAVhu68 vp3氨基酸序列进行编码的核酸序列,所述氨基酸序列没有vp1独特区(约aa 1至约aa 137)和/或vp2独特区(约aa 1至约aa 202)或与其互补的链,即对应的mRNA或tRNA(SEQ ID NO:30的约nt 607至约nt 2211)。在某些实施例中,还提供了对SEQ ID NO:31(约aa 138至736)的AAVhu68 vp2氨基酸序列进行编码的核酸序列,所述氨基酸序列没有vp1独特区(约aa 1至约aa 137)或与其互补的链,即对应的mRNA或tRNA(SEQ ID NO:30的nt 411至2211)。

[0075] 如本文所使用的,AAV5衣壳具有SEQ ID NO:29的预测氨基酸序列。在某些实施例中,所述AAV5衣壳是由SEQ ID NO:28的核酸序列表达的。

[0076] 包装到AAV衣壳中并递送到宿主细胞的基因组序列通常至少由转基因及其调控序列和AAV反向末端重复序列(ITR)构成。单链AAV和自身互补(sc)AAV两者都涵盖在rAAV内。转基因是与载体序列异源的核酸编码序列,所述核酸编码序列对多肽、蛋白质、功能性RNA分子(例如,miRNA、miRNA抑制剂)或其它所关注的基因产物进行编码。核酸编码序列以允许转基因在靶组织的细胞中转录、翻译和/或表达的方式与调控组分可操作地连接。

[0077] 载体的AAV序列通常包括顺式作用的5'和3'反向末端重复序列(参见例如B.J.Carter,《细小病毒手册(Handbook of Parvoviruses)》,P.Tijsser编辑,CRC出版社,第155到168页(1990))。ITR序列的长度为约145bp。优选地,分子中使用了对ITR进行编码的基本上整个序列,尽管允许对这些序列进行一定程度的微小修饰。修饰这些ITR序列的能力在本领域的技术范围内。(参见例如,文本,如Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning.A Laboratory Manual)》,第2版,纽约的冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory,New York)(1989);以及K.Fisher等人,《病毒学杂志(J.Virol.)》,70:520 532(1996))。在本发明中采用的此类分子的实例是含有转基因的"顺式作用"质粒,其中所选转基因序列和相关的调控元件侧接有5'和3'AAV ITR序列。在一个实施例中,ITR来自与供应衣壳的AAV不同的AAV。在一个实施例中,ITR序列来自AAV2。已经描述了被称为ΔITR的5'ITR的缩短版本,其中缺失了D序列和末端解析位点(trs)。在其它实施例中,使用了全长AAV 5'和3'ITR。然而,可以选择来自其它AAV来源的ITR。在ITR的来源来自AAV2并且AAV衣壳来自另一个AAV来源的情况下,所得载体可以被称为假型的。然而,这些元件的其它构型可以是合适的。

[0078] 除重组AAV载体的上文鉴定的主要元件外,AAV载体还包含必需的常规控制元件,所述常规控制元件以允许其在用质粒载体转染或用由本发明产生的病毒感染的细胞中转录、翻译和/或表达的方式与转基因可操作地连接。如本文所使用的,"可操作地连接的"序列包含与所关注的基因邻接的表达控制序列和以反式或在远处起作用以控制所关注的基因的表达控制序列。

[0079] 调节控制元件通常含有作为表达控制序列的一部分的启动子序列,例如定位在所选5'ITR序列与编码序列之间。可以在本文所描述的载体中使用组成型启动子、可调控启动子[参见例如WO 2011/126808和WO 2013/04943]、组织特异性启动子或对生理学线索有应

答的启动子。一种或多种启动子可以选自不同的来源，例如人巨细胞病毒(CMV)立即早期增强子/启动子、SV40早期增强子/启动子、JC多瘤病毒启动子、髓鞘碱性蛋白(MBP)或胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子、单纯疱疹病毒(HSV-1)潜伏期相关启动子(LAP)、劳氏肉瘤病毒(RSV)长末端重复(LTR)启动子、神经元特异性启动子(NSE)、血小板源性生长因子(PDGF)启动子、hSYN、黑色素浓缩激素(MCH)启动子、CBA、基质金属蛋白启动子(MPP)和鸡β-肌动蛋白启动子。除了启动子之外，载体还可以含有一个或多个其它合适的转录起始、终止、增强子序列、有效的RNA加工信号，如剪接和聚腺苷酸化(polyA)信号；稳定胞质mRNA的序列，例如WPRE；增强翻译效率的序列(即，Kozak共有序列)；增强蛋白稳定性的序列；以及在期望时，增强编码的产物的分泌的序列。合适的增强子的实例是CMV增强子。其它合适的增强子包含适合于所期望的靶组织适应症的增强子。在一个实施例中，表达盒包括一种或多种表达增强子。在一个实施例中，表达盒含有两种或更多种表达增强子。这些增强子可以相同或彼此不同。例如，增强子可以包含CMV立即早期增强子。这种增强子可以存在于彼此相邻定位的两个拷贝中。可替代地，增强子的双拷贝可以被一个或多个序列隔开。在仍另一个实施例中，表达盒进一步含有内含子，例如，鸡β-肌动蛋白内含子。其它合适的内含子包含本领域已知的内含子，例如，如WO 2011/126808中描述的内含子。合适的polyA序列的实例包含例如SV40、SV50、牛生长激素(bGH)、人生长激素和合成polyA。任选地，可以选择一个或多个序列来稳定mRNA。此类序列的实例是经修饰的WPRE序列，其可以在polyA序列的上游和编码序列的下游被工程化[参见例如MA Zanta-Boussif等人，《基因疗法(Gene Therapy)》(2009)16:605-619。

[0080] 在一个实施例中，载体基因组包括：AAV 5'ITR、启动子、任选的增强子、任选的内含子、包括相同序列的人PGRN或融合蛋白的编码序列、poly A和AAV 3'ITR。在某些实施例中，载体基因组包括：AAV 5'ITR、启动子、任选的增强子、任选的内含子、包括相同序列的人PGRN或融合蛋白的编码序列、poly A和AAV 3'ITR。在某些实施例中，载体基因组包括：AAV 5'ITR、启动子、任选的增强子、任选的内含子、hPGRN编码序列、poly A和AAV 3'ITR。在某些实施例中，载体基因组包括：AAV2 5'ITR、EF1a启动子、任选的增强子、任选的启动子、hPGRN、SV40 poly A和AAV2 3'ITR。在某些实施例中，所述载体基因组是AAV2 5'ITR、UbC启动子、任选的增强子、任选的内含子、hPGRN、SV40 poly A和AAV2 3'ITR。在某些实施例中，所述载体基因组是AAV25'ITR、CB7启动子、内含子、hPGRN、SV40 poly A和AAV2 3'ITR。在某些实施例中，所述载体基因组是AAV2 5'ITR、CB7启动子、内含子、hPGRN、兔β珠蛋白poly A和AAV2 3'ITR。参见例如，SEQ ID NO:22(EF1a.hPGRN.SV40)、SEQ ID NO:23(UbC.PI.hPGRN.SV40)或SEQ ID NO:24(CB7.CI.hPGRN1.rBG)。hPGRN编码序列选自本说明书中定义的那些编码序列。参见例如，SEQ ID NO:3或与其95％到99.9％相同的序列、或SEQ ID NO:4或与其95％到99.9％相同的序列、或如本文所定义的其片段。提供了在以下实例中使用的载体元件的说明性序列，例如，在SEQ ID NO:6(兔珠蛋白polyA)中，AAV ITR(SEQ ID NO:7和8)、人CMV IE启动子(SEQ ID NO:9)、CB启动子(SEQ ID NO:10)、嵌合内含子(SEQ ID NO:11)、UbC启动子(SEQ ID NO:12)、EF-1a启动子(SEQ ID NO:17)、内含子(SEQ ID NO:13)和SV40晚期poly A(SEQ ID NO:14)。可以为本发明的某些实施例的载体基因组选择这些序列上的载体基因组或变型的其它元件。

[0081] 载体产生

[0082] 供产生AAV病毒载体(例如,重组(r)AAV)之用,表达盒可以携带在递送到包装宿主细胞的任何合适的载体(例如,质粒)上。可在本发明使用的质粒可以被工程化,使得其适合于在原核细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞以及其它细胞中进行体外复制和包装。合适的转染技术和包装宿主细胞是已知的和/或可以由本领域的技术人员容易地设计。

[0083] 用于产生和分离适合于用作载体的AAV的方法是本领域已知的。通常参见例如Grieger和Samulski,2005,“腺相关病毒作为基因疗法载体:载体开发、产生和临床应用(Adeno-associated virus as a gene therapy vector:Vector development, production and clinical applications)”,《生物化学工程/生物技术进展(Adv.Biochem.Engin/Biotechnol.)》99:119-145;Buning等人,2008,“腺相关病毒载体技术的最新开发(Recent developments in adeno-associated virus vector technology),”《基因医学杂志(J.Gene Med.)》10:717-733;以及下文引用的参考文献,这些参考文献中的每个参考文献通过引用整体并入本文中。为了将转基因包装到病毒粒子中,ITR是在与含有表达盒的核酸分子相同的构建体中需要的顺式的唯一AAV组分。cap和rep基因可以反式供应。

[0084] 在一个实施例中,本文所描述的表达盒被工程化到基因元件(例如,穿梭质粒),所述基因元件将其上携带的免疫球蛋白构建体序列转移到包装宿主细胞中以产生病毒载体。在一个实施例中,所选基因元件可以通过任何合适的方法递送到AAV包装细胞,所述方法包含转染、电穿孔、脂质体递送、膜融合技术、高速DNA包被的粒料、病毒感染和原生质体融合。也可以制备稳定的AAV包装细胞。可替代地,表达盒可以用于产生除AAV之外的病毒载体,或用于在体外产生抗体的混合物。用于制备此类构建体的方法对核酸操纵技术人员而言是已知的并且包含基因工程、重组工程以及合成技术。参见例如《分子克隆:实验室手册》,Green和Sambrook编辑,纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY)(2012)。

[0085] 术语“AAV中间体”或“AAV载体中间体”是指缺少包装在其中的所期望的基因组序列的组装的rAAV衣壳。这些也可以被称为“空”衣壳。此类衣壳可以不含有表达盒的可检测基因组序列,或者含有不足以实现基因产物的表达的仅部分包装的基因组序列。这些空衣壳是非功能性的以将所关注的基因转移到宿主细胞。

[0086] 可以使用已知的技术产生本文所描述的重组腺相关病毒(AAV)。参见例如WO 2003/042397;WO 2005/033321、WO 2006/110689;US 7588772 B2。此类方法涉及培养含有:编码AAV衣壳蛋白的核酸序列的宿主细胞;至少由AAV反向末端重复序列(ITR)和转基因构成的表达盒;以及足够的辅助功能以允许将表达盒包装到AAV衣壳蛋白中。已经描述了产生衣壳的方法、其编码序列以及产生rAAV病毒载体的方法。参见例如,Gao等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)》100(10),6081-6086(2003)和US 2013/0045186A1。

[0087] 在一个实施例中,提供了一种可用于产生重组AAV的产生细胞培养物。此类细胞培养物含有在宿主细胞中表达AAV衣壳蛋白的核酸;适合于包装到AAV衣壳中的核酸分子,例如,含有AAV ITR和编码基因产物的非AAV核酸序列的载体基因组,所述基因产物与引导产物在宿主细胞中表达的序列可操作地连接;以及足够的AAV rep功能和腺病毒辅助功能,以允许将核酸分子包装到重组AAV衣壳中。在一个实施例中,细胞培养物由哺乳动物细胞(例

如,人胚肾293细胞以及其它细胞)或昆虫细胞(例如,杆状病毒)构成。

[0088] 通常,rep功能来自作为提供侧接载体基因组的ITR的相同AAV源。在本文中的实例中,选择了AAV2 ITR,并且使用了AAV2 rep。编码序列在SEQ ID NO:27中重现。任选地,可以选择其它rep序列或另一种rep源(以及任选地另一种ITR源)。例如,所述rep可以是但不限于AAV1 rep蛋白、AAV2 rep蛋白;或rep 78、rep 68、rep 52、rep40、rep68/78和rep40/52;或其片段;或另一种来源。任选地,rep和cap序列在细胞培养物中位于同一基因元件上。rep序列与cap基因之间可以存在间隔子。这些AAV或突变体AAV衣壳序列中的任一种都可以在外源性调控控制序列的控制下,所述外源性调控控制序列引导其在宿主细胞中表达。

[0089] 在一个实施例中,在合适的细胞培养物(例如,HEK 293)细胞中制造细胞。用于制造本文所描述的基因疗法载体的方法包含本领域众所周知的方法,如产生用于产生基因疗法载体的质粒DNA、产生载体以及纯化载体。在一些实施例中,基因疗法载体是AAV载体,并且所产生的质粒是对AAV基因组和所关注的基因进行编码的AAV顺式质粒、含有AAV rep和cap基因的AAV反式质粒以及腺病毒辅助质粒。载体产生过程可以包含方法步骤,如开始细胞培养、进行细胞传代、接种细胞、用质粒DNA转染细胞、将转染后培养基交换为无血清培养基以及采集含载体的细胞和培养基。

[0090] 在某些实施例中,rAAV.hPGRN的制造工艺涉及用质粒DNA瞬间转染HEK293细胞。通过在PALL iCELLis生物反应器中对HEK293细胞进行PEI介导的三重转染来产生单批次或多批次。在可能的情况下,在一次性的、封闭的生物处理系统中通过澄清、TFF、亲和色谱和阴离子交换色谱对所采集的AAV材料依次进行纯化。

[0091] 所采集的含载体的细胞和培养基在本文中被称为粗细胞采集物。在又另一个系统中,通过用基于杆状病毒的载体进行感染来将基因疗法载体引入到昆虫细胞中。关于这些产生系统的综述,通常参见例如,Zhang等人,2009,“用于大规模重组腺相关病毒产生的腺病毒-腺相关病毒杂合体(Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production)”,《人类基因疗法(Human Gene Therapy)》20:922-929,这些参考文献中的每个参考文献的内容通过引用整体并入本文。在以下美国专利中也描述了制备和使用这些及其它AAV产生系统的方法,所述美国专利中的每个美国专利的内容通过引用整体并入本文:5,139,941;5,741,683;6,057,152;6,204,059;6,268,213;6,491,907;6,660,514;6,951,753;7,094,604;7,172,893;7,201,898;7,229,823;和7,439,065,这些文献通过引用并入本文。

[0092] 此后,可以使粗细胞采集物经受另外的方法步骤,如浓缩载体采集物、渗滤载体采集物、微流化载体采集物、核酸酶消化载体采集物、过滤经微流化的中间体、通过色谱法粗纯化、通过超速离心法粗纯化、通过切向流过滤进行缓冲液交换和/或调配和过滤以制备大量载体。

[0093] 在高盐浓度下进行两步亲和色谱纯化,然后使用阴离子交换树脂色谱来纯化载体药物产物并去除空衣壳。在于2016年12月9日提交的国际专利申请第PCT/US2016/065970号中更详细地描述了这些方法,所述国际专利申请通过引用并入本文中。针对于2016年12月9日提交的国际专利申请第PCT/US2016/065976号中的AAV8,以及于2016年12月9日提交,还于2015年12月11日提交的题为“AVrh10的可扩展纯化方法(Scalable Purification Method for AAVrh10)”的国际专利申请第PCT/US16/66013号中的rh10,以及于2016年12月

9日提交的国际专利申请第PCT/US2016/065974号中的AAV1、于2015年12月11日提交的“AAV1的可扩展纯化方法(Scalable Purification Method for AAV1)”的纯化方法全部通过引用并入本文中。

[0094] 为了计算空颗粒和完整颗粒的含量,将所选样品(例如,在本文的实例中经过碘克沙醇(iodixanol)梯度纯化的制剂,其中GC#＝颗粒#)的VP3带体积相对于加载的GC颗粒进行作图。所得线性等式(y＝mx+c)用于计算测试品峰的带状体积中的颗粒的数量。然后将加载的每20μL颗粒数量(pt)乘以50,以得到颗粒(pt)/mL。将Pt/mL除以GC/mL得到颗粒与基因组拷贝的比率(pt/GC)。Pt/mL-GC/mL得到空pt/mL。空pt/mL除以pt/mL并且x 100得到空颗粒的百分比。

[0095] 通常,用于测定具有包装的基因组的空衣壳和AAV载体颗粒的方法是本领域已知的。参见例如Grimm等人,《基因疗法》(1999)6:1322-1330;Sommer等人,《分子疗法(Molec.Ther.)》(2003)7:122-128。为了测试变性的衣壳,所述方法包含使经处理的AAV原液经受SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(由能够分离三种衣壳蛋白的任何凝胶组成,例如在缓冲液中含有3-8%三乙酸盐的梯度凝胶),然后运行凝胶直到分离出样品材料,并且将凝胶印迹到尼龙或硝酸纤维素膜(优选地尼龙)上。然后,将抗AAV衣壳抗体用作与变性的衣壳蛋白结合的初级抗体,优选地抗AAV衣壳单克隆抗体,最优选地B1抗AAV-2单克隆抗体(Wobus等人,《病毒学杂志》(2000)74:9281-9293)。然后使用次级抗体,所述次级抗体与初级抗体结合并且含有一种用于检测与初级抗体的结合的装置,更优选地是含有与其共价结合的检测分子的抗IgG抗体,最优选地是与辣根过氧化物酶共价连接的绵羊抗小鼠IgG抗体。一种用于检测结合的方法用于半定量地确定初级抗体与次级抗体之间的结合,优选地是能够检测放射性同位素发射、电磁辐射或比色变化的检测方法,最优选地是化学发光检测试剂盒。例如,对于SDS-PAGE,可以从柱级分中提取样品并在含有还原剂(例如,DTT)的SDS-PAGE上样缓冲液中加热,并且在预制的梯度聚丙烯酰胺凝胶(例如,Novex)上解析衣壳蛋白。可以根据制造商的说明使用SilverXpress(加利福尼亚州英杰公司(Invitrogen,CA))或其它合适的染色方法(即SYPRO红宝石色或考马斯染色)进行银染色。在一个实施例中,可以通过定量实时PCR(Q-PCR)测量柱级分中的AAV载体基因组(vg)的浓度。将样品稀释并用DNA酶I(或另一种合适的核酸酶)消化以去除外源性DNA。在核酸酶失活后,使用引物和对引物之间的DNA序列具有特异性的TaqMan™荧光探针进一步稀释和扩增样品。在Applied Biosystems Prism 7700序列检测系统上测量每种样品达到所定义的荧光水平所需的周期的数量(阈值周期,Ct)。含有与AAV载体中所含序列相同的序列的质粒DNA用于在Q-PCR反应中产生标准曲线。从样品获得的周期阈值(Ct)的值用于通过相对于质粒标准曲线的Ct值对其进行归一化来确定载体基因组效价。也可以使用基于数字PCR的终点测定。

[0096] 一方面,使用了经优化的q-PCR方法,所述方法利用了广谱丝氨酸蛋白酶,例如蛋白酶K(如可从凯杰公司(Qiagen)商购获得)。更具体地,经优化的qPCR基因组效价测定与标准测定类似,不同之处在于在DNase I消化之后,将样品用蛋白酶K缓冲液稀释并用蛋白酶K处理,然后进行热失活。合适地,以等于样品大小的量用蛋白酶K缓冲液稀释样品。蛋白酶K缓冲液可以浓缩2倍或更多倍。通常,蛋白酶K处理为约0.2mg/mL,但是可以在0.1g/mL至约1mg/mL之间变化。处理步骤通常在约55℃下进行持续约15分钟,但是可以在较低温度(例如,约37℃到约50℃)下进行持续较长的时间段(例如,约20分钟至约30分钟),或者在较高

的温度(例如,至多约60℃)下进行持续较短的时间段(例如,约5至10分钟)。类似地,热失活通常在约95℃下持续约15分钟,但是温度可以降低(例如,约70℃至约90℃)并且时间延长(例如,约20分钟至约30分钟)。然后将样品稀释(例如,1000倍),并如标准测定中所描述的进行TaqMan分析。

[0097] 另外地或可替代地,可以使用液滴数字PCR(ddPCR)。例如,已经描述了用于通过ddPCR确定单链和自身互补AAV载体基因组效价的方法。参见例如M.Lock等人,《人类基因疗法方法》,2014年4月;25(2):115-25.doi:10.1089/Hgtb.2013.131.电子版2014年2月14日。

[0098] 简而言之,用于从基因组缺陷型AAV中间体中分离具有包装的基因组序列的rAAV颗粒的方法涉及使包括重组AAV病毒颗粒和AAV衣壳蛋白中间体的悬浮液经受高效液相色谱,其中AAV病毒颗粒和AAV中间体与在高pH下平衡的强阴离子交换树脂结合,并经受盐梯度,同时监测洗脱液在约260和约280下的紫外线吸光度。可以基于所选AAV调整pH。参见例如,WO2017/160360(AAV9)、WO2017/100704(AAVrh10)、WO 2017/100676(例如,AAV8)和WO 2017/100674(AAV1),所述文献通过引用并入本文。在此方法中,当A260/A280的比率达到拐点时,从洗脱的级分中收集AAV完整衣壳。在一个实例中,对于亲和色谱法步骤,可以将经过渗滤的产物应用于有效捕获AAV2血清型的Capture Select™ Poros-AAV2/9亲和树脂(生命科技公司(Life Technologies))上。在这些离子条件下,显著百分比的残留的细胞DNA和蛋白质流过柱,而AAV颗粒则被有效地捕获。

[0099] 组合物

[0100] 本文提供了一种组合物,所述组合物含有至少一种rAAV.hPGRN原液(例如,rAAV原液)以及任选的载体、赋形剂和/或防腐剂。

[0101] 如本文所使用的,rAAV的“原液”是指rAAV的群体。尽管由于脱酰胺作用,其衣壳蛋白具有异质性,但是原液中的rAAV被期望共用相同的载体基因组。原液可以包含具有衣壳的rAAV,所述衣壳具有例如所选AAV衣壳蛋白和所选产生系统的特有的异质脱酰胺模式。原液可以从单个产生系统中产生,或者从产生系统的多次运行中池化。可以选择各种产生系统,包含但不限于本文所描述的产生系统。

[0102] 在某些实施例中,组合物包括病毒原液,所述病毒原液是适用于治疗颗粒蛋白前体相关的额颞叶痴呆(FTD)的重组AAV(rAAV),所述rAAV包括:(a)腺相关病毒1衣壳;以及(b)包装在AAV衣壳中的载体基因组,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列、人颗粒蛋白前体的编码序列以及引导所述颗粒蛋白前体表达的调控序列。在某些实施例中,所述载体基因组包括启动子、增强子、内含子、人PGRN编码序列以及聚腺苷酸化信号。在某些实施例中,所述内含子由鸡β肌动蛋白剪接供体和兔β剪接受体元件组成。在某些实施例中,所述载体基因组进一步包括侧接所述载体基因组的所有元件的AAV2 5'ITR和AAV2 3'ITR。

[0103] 可以将优选地悬浮于生理上相容的载体中的rAAV.hPGRN施用于人或非人哺乳动物患者。在某些实施例中,为了施用于人类患者,将rAAV适当地悬浮于含有盐水、表面活性剂和生理上相容的盐或盐的混合物的水溶液中。合适地,将调配物调整到生理上可接受的pH,例如,在pH 6至9、或pH 6.5至7.5、pH 7.0至7.7或pH 7.2至7.8的范围内。由于脑脊液的pH为约7.28至约7.32或者pH为7.2至7.4,对于鞘内递送,可能期望在此范围内的pH;而对于静脉内递送,可能期望的pH为约6.8至约7.2。然而,可以选择最宽范围和这些子范围内的其它pH用于其它递送途径。

[0104] 在某些实施例中，调配物可以含有不包括碳酸氢钠的缓冲盐水溶液。此类调配物可以含有缓冲盐水溶液，所述缓冲盐水溶液包括水中的磷酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁以及其混合物中的一种或多种，如哈佛缓冲液(Harvard's buffer)。水溶液可以进一步含有Kolliphor®P188，即可从BASF商购获得的泊洛沙姆(poloxamer)，其先前以商品名Lutrol®F68出售。水溶液可以为pH 7.2或pH 7.4。

[0105] 在另一个实施例中，调配物可以含有缓冲盐水溶液，所述缓冲盐水溶液包括1mM磷酸钠(Na_3PO_4)、150mM氯化钠(NaCl)、3mM氯化钾(KCl)、1.4mM氯化钙($CaCl_2$)、0.8mM氯化镁($MgCl_2$)和0.001％Kolliphor®188。参见例如harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html。在另一个实施例中，优选的是哈佛缓冲液。

[0106] 在其它实施例中，调配物可以含有一种或多种渗透增强剂。合适的渗透增强剂的实例可以包含例如甘露醇、甘氨胆酸钠、牛磺胆酸钠、脱氧胆酸钠、水杨酸钠、辛酸钠、癸酸钠、月桂基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基醚或EDTA。

[0107] 在另一个实施例中，组合物包含载体、稀释剂、赋形剂和/或佐剂。鉴于转移病毒所针对的适应症，本领域的技术人员可以容易地选择合适的载体。例如，一种合适的载体包含盐水，其可以与多种缓冲溶液(例如，磷酸盐缓冲盐水)一起调配。其它示例性载体包含无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。缓冲液/载体应包含防止rAAV粘附到输液管道上但不干扰rAAV体内结合活性的组分。

[0108] 任选地，除了rAAV和载体之外，组合物还可以含有其它常规药物成分，如防腐剂或化学稳定剂。适合的示例性防腐剂包含氯丁醇、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、苯酚以及对氯苯酚。适合的化学稳定剂包含明胶和白蛋白。

[0109] 如本文所使用的，“载体”包含任何和所有溶剂、分散介质、媒剂、涂层、稀释剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载剂溶液、悬浮液、胶质物等。将此类介质和药剂用于药物活性物质在本领域中是众所周知的。还可以将补充性活性成分并入到组合物中。短语“药学上可接受的”是指当向宿主施用时不会产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。如脂质体、纳米胶囊、微颗粒、微球、脂质颗粒、囊泡等递送媒剂可以用于将本发明的组合物引入到合适的宿主细胞中。具体地，rAAV载体递送的转基因可以被调配成用于递送或封装在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中。

[0110] 在一个实施例中，组合物包含适合于递送到受试者的最终调配物，所述组合物是例如缓冲到生理上相容的pH和盐浓度的水性液体悬浮液。任选地，调配物中存在一种或多种表面活性剂。在另一个实施例中，可以将组合物作为稀释以向受试者施用的浓缩物运输。在其它实施例中，可以在施用时将组合物冻干并重构。

[0111] 可以从无毒的非离子表面活性剂中选择合适的表面活性剂或表面活性剂的组合。在一个实施例中，选择终止于伯羟基的双官能嵌段共聚物表面活性剂，例如Pluronic®F68[巴斯夫公司(BASF)]，也被称为泊洛沙姆(Poloxamer)188，其具有中性pH，平均分子量为8400。可以选择其它表面活性剂和其它泊洛沙姆，即非离子型三嵌段共聚物，所述非离子型三嵌段共聚物由与聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))的两个亲水链侧接的聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))的中心疏水链、SOLUTOL HS 15(聚乙二醇-15羟基硬脂酸酯)、LABRASOL(聚氧辛酸甘油酯)、聚氧10油醚、TWEEN(聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯)、乙醇和聚乙二醇构成。在一个实施

例中，调配物含有泊洛沙姆。这些共聚物一般用字母“P”(代表泊洛沙姆)后续为三个数字命名:前两位数字x 100给出了聚氧丙烯核的近似分子量，并且最后一位数字x 10给出了聚氧乙烯含量的百分比。在一个实施例中，选择了泊洛沙姆188。表面活性剂可以以悬浮液的至多约0.0005％至约0.001％的量存在。

[0112] 以足够的量施用载体以转染细胞并提供足够水平的基因转移和表达，以便提供治疗益处，而不会产生过度的副作用或具有医学上可接受的生理作用，这可以由医学领域的技术人员确定。任选地，可以使用除鞘内施用之外的途径，例如，直接递送至需要的器官(例如，肝脏(任选地通过肝动脉)肺、心脏、眼睛、肾脏)、口腔、吸入、鼻内、气管内、动脉内、眼内、静脉内、肌肉内、皮下、皮肤内和其它胃肠外施用途径。如果期望，可以组合施用途径。

[0113] 病毒载体的剂量可以主要取决于如所治疗的病状、患者的年龄、体重和健康状况等因素，并且因此在患者之间可能有所不同。例如，病毒载体的治疗有效人剂量通常在约25到约1000微升到约100mL溶液范围内，所述溶液含有浓度为约1×10^{9}到1×10^{16}的基因组病毒载体(以治疗平均体重为70kg的受试者)，包含所述范围内的整数或分数量，并且对于人类患者，优选地为1.0×10^{12}GC到1.0×10^{14}GC。在一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}或9×10^{9}GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}或9×10^{10}GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}或9×10^{11}GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}或9×10^{12}GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}或9×10^{13}GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少1×10^{14}、2×10^{14}、3×10^{14}、4×10^{14}、5×10^{14}、6×10^{14}、7×10^{14}、8×10^{14}或9×10^{14}GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少1×10^{15}、2×10^{15}、3×10^{15}、4×10^{15}、5×10^{15}、6×10^{15}、7×10^{15}、8×10^{15}或9×10^{15}GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在一个实施例中，对于人类应用，剂量的范围可以为每剂量1×10^{10}至约1×10^{12}GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。

[0114] 在某些实施例中，剂量在约1×10^{9}GC/g脑质量到约1×10^{12}GC/g脑质量的范围内。在某些实施例中，剂量在约1×10^{10}GC/g脑质量到约3.33×10^{11}GC/g脑质量的范围内。在某些实施例中，剂量在约3.33×10^{11}GC/g脑质量到约1.1×10^{12}GC/g脑质量的范围内。在某些实施例中，剂量在约1.1×10^{12}GC/g脑质量到约3.33×10^{13}GC/g脑质量的范围内。在某些实施例中，剂量低于3.33×10^{11}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量低于1.1×10^{12}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量低于3.33×10^{13}GC/g脑质量。

[0115] 在某些实施例中，剂量为约1×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约2×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约2×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约3×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约4×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约5×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约6×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例

中，剂量为约7×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约8×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约9×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约1×10^{11}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约2×10^{11}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约3×10^{11}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约4×10^{11}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约3.3×10^{10}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约1.1×10^{11}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约2.2×10^{11}GC/g脑质量。在某些实施例中，剂量为约3.3×10^{11}GC/g脑质量。

[0116] 在某些实施例中，剂量以范围为约1.44×10^{13}至4.33×10^{14}GC的rAAV的固定剂量向人施用。在某些实施例中，剂量以范围为约1.44×10^{13}至2×10^{14}GC的rAAV的固定剂量向人施用。在某些实施例中，剂量以范围为约3×10^{13}至1×10^{14}GC的rAAV的固定剂量向人施用。在某些实施例中，剂量以范围为约5×10^{13}至1×10^{14}GC的rAAV的固定剂量向人施用。

[0117] 在某些实施例中，以剂量单位调配组合物以含有范围为约1×10^{13}至8×10^{14}GC的rAAV的AAV的量。在某些实施例中，以剂量单位调配组合物以含有范围为约1.44×10^{13}至4.33×10^{14}GC的rAAV的rAAV的量。在某些实施例中，以剂量单位调配组合物以含有范围为约3×10^{13}至1×10^{14}GC的rAAV的rAAV的量。在某些实施例中，以剂量单位调配组合物以含有范围为约5×10^{13}至1×10^{14}GC的rAAV的rAAV的量。

[0118] 在某些实施例中，施用足以在以下组织类型中的任何一种或多种中提供10^{3}GC/μgDNA的单剂量：额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质、枕叶皮质、髓质、小脑、颈脊髓、胸脊髓、腰脊髓、颈背根神经节、胸背根神经节、腰背根神经节和三叉神经节。在某些实施例中，施用足以在以下组织类型中的任何一种或多种中提供10^{4}GC/μg DNA的单剂量：额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质、枕叶皮质、髓质、小脑、颈脊髓、胸脊髓、腰脊髓、颈背根神经节、胸背根神经节、腰背根神经节和三叉神经节。

[0119] 在某些实施例中，rAAV是以单剂量施用于受试者的。在某些实施例中，需要多个剂量(例如，2个剂量)。

[0120] 可以调整剂量以平衡治疗益处与任何副作用，并且此类剂量可以根据采用重组载体的治疗应用而变化。可以监测转基因的表达水平以确定所得病毒载体的剂量频率，优选地含有微基因的AAV载体。任选地，与出于治疗目的描述的剂量方案类似的剂量方案可以用于使用本发明的组合物进行免疫。

[0121] 如本文所使用的，术语“鞘内递送”或“鞘内施用”是指通过注射到椎管中，更具体地注射到蛛网膜下腔中使得其到达脑脊液(CSF)的药物施用途径。鞘内递送可以包含腰椎穿刺、心室内(包含脑室内(ICV))、枕骨下/脑池内和/或C1-2穿刺。例如，可以通过腰椎穿刺引入材料以在整个蛛网膜下腔扩散。在另一个实例中，可以向小脑延髓池中注射或通过实质内递送注射。在某些实施例中，rAAV是通过计算机断层扫描(CT)引导的枕骨下注射施用于小脑延髓池中(小脑延髓池内)的。在某些实施例中，向患者施用单剂量。

[0122] 如本文所使用的，术语“脑池内递送”或“脑池内施用”是指药物直接进入到小脑延髓池(cisterna magna cerebellomedularis)的脑脊液中，更具体地是通过枕骨下穿刺或通过直接注射到小脑延髓池(cisterna magna)中或通过永久定位的管的施用途径。

[0123] 在某些实施例中，rAAV.hPGRN的原液是在鞘内最终调配缓冲液(ITFFB；具有0.001％普朗尼克F-68的人工CSF)中调配的。一个或多个批次被冻结，随后被解冻，在需要时被合并，被调整到目标浓度，通过0.22μm过滤器无菌过滤，并且装满小瓶。在某些实施例

中,包括调配缓冲液rAAV1.hPGRN的悬浮液被调整成pH为7.2到7.4。

[0124] 在一个实施例中,可以由本领域的技术人员确定用于递送本文所提供的rAAV1.hPGRN的剂量的体积以及浓度。例如,可以选择约1μL到150mL的体积,其中对于成人而言,选择更大的体积。通常,对于新生婴儿,合适的体积为约0.5mL到约10mL,对于年龄较大的婴儿,可以选择约0.5mL到约15mL。对于幼儿,可以选择约0.5mL到约20mL的体积。对于儿童,可以选择至多约30mL的体积。对于青春期前的少年和青少年,可以选择至多约50mL的体积。在仍其它实施例中,患者可以接受鞘内施用的体积选择为约5mL到约15mL或约7.5mL到约10mL。可以确定其它合适的体积和剂量。可以调整剂量以平衡治疗益处与任何副作用,并且这种剂量可以根据采用重组载体的治疗应用而变化。

[0125] 在某些实施例中,组合物包括:rAAV.EF1a.hPGRN.SV40、rAAV.UbC.PI.hPGRN.SV40或rAAVCB7.CI.hPGRN1.rBG。以下实例中展示了其中rAAV衣壳为AAVhu68、AAV5或AAV1的组合物。在特别优选的实施例中,rAAV是AAV1。在某些实施例中,hPGRN编码序列选自本说明书中所定义的那些编码序列。参见例如,SEQ ID NO:3或与其95%到99.9%相同的序列、或SEQ ID NO:4或与其95%到99.9%相同的序列、或如本文所定义的其片段。提供了在以下实例中使用的载体元件的说明性序列,例如,在SEQ ID NO:6(兔珠蛋白polyA)中,AAV ITR(SEQ ID NO:7和8)、人CMV IE启动子(SEQ ID NO:9)、CB启动子(SEQ ID NO:10)、嵌合内含子(SEQ ID NO:11)、UbC启动子(SEQ ID NO:12)、EF-1a启动子(SEQ ID NO:17)、内含子(SEQ ID NO:13)和SV40晚期poly A(SEQ ID NO:14)。

[0126] 用途

[0127] 如本文所使用的,PGRN单倍型不足是指PGRN基因中有突变的患者,所述突变导致有缺陷的PGRN和/或有缺陷的GRN水平。rAAV1-PGRN疗法的目标群体包含患有PGRN单倍型不足的患者和/或在其它方面具有有缺陷的PGRN或有缺陷的GRN水平的患者。在某些实施例中,患者对于PGRN突变是杂合的。在又另一个实施例中,患者对于PGRN突变是纯合的。在某些实施例中,结合本文所提供的rAAV1介导的hPGRN疗法向患者施用免疫抑制方案。

[0128] 在某些实施例中,rAAV1.PGRN可用于治疗患有GRN单倍型不足的患者。此类患者可能已经被诊断患有由GRN单倍型不足引起的成人发作性神经退行性病变或者可能是有症状前的。rAAV1.PGRN可以通过计算机断层扫描(CT)引导的枕骨下注射以单剂量施用于小脑延髓池中(小脑延髓池内[ICM])。以预定剂量水平施用单剂量。通过在NHP中进行的单ICM注射实现的优越的脑转导导致选择此施用途径。在某些实施例中,与另一种施用途径(例如,注射到侧脑室中)相比,向ICM中施用载体还导致降低的抗PGRN T细胞应答。一旦采用常见程序,ICM注射(也称为枕骨下穿刺术)先前就已经被腰椎穿刺代替。然而,可以选择其它剂量水平和递送途径和/或与此rAAV1介导的hPGRN疗法结合使用。

[0129] 在某些实施例中,本文所描述的rAAV1介导的疗法可以在约平均、正常、生理水平下向不具有GRN突变(单倍型不足)的人类提供PGRN表达。然而,即使PGRN表达的增加低于正常水平,但是治疗可以提供治疗效果,从而提供正常平均水平的约40%到99%,例如,35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或这些范围之间的其它数值。在某些实施例中,这可能是由高于治疗前患者的表达水平至少5%到约70%或更多的增加的PGRN水平导致的。在某些实施例中,治疗提供了治疗功效,其中施用rAAV1介导的hPGRN导致CSF中的PGRN水平升高(例如,是正常水平的10倍至40倍)。

[0130] 在某些实施例中,通过以下中的一个或多个评估功效:CSF中增加的PGRN蛋白水平和/或脑皮质厚度的变化。在某些实施例中,如通过以下中的一个或多个测量的,在施用单ICM剂量之后评估rAAV1介导的疗法的功效:如通过小型精神状态检查(MMSE)、临床总体变化印象量表(CGI-C)、额叶功能评定量表(FAB)、额颞叶痴呆评定量表(FRS)、额叶行为量表(FBI)、帕金森氏病统一评定量表(UPDRS)、言语流畅性测试、额颞叶变性的临床痴呆量表-总和(CDR-FTLD sb)和/或神经精神量表(NPI)评估的延长存活期和改善的临床症状和日常功能。在某些实施例中,功效是通过神经丝轻链(NfL)的CSF水平、τ、磷酸化τ和炎性标志物和/或增加的PGRN血浆水平改善展示的。在某些实施例中,功效是通过测量小胶质细胞增生水平的降低或逆转评估的。在某些实施例中,通过执行FDG PET来评估额叶和/或颞叶中的代谢减退来证明功效。

[0131] 在某些实施例中,功效是通过与GRN患者相关的临床症状中的一个或多个临床症状的改善测量的,包含例如行为缺陷(去抑制、冷漠、失去同情心或同理心、强迫或刻板行为、或口部过度活动)和认知缺陷(执行功能下降,而对情节记忆或视觉空间技能没有显著影响)。

[0132] 在某些实施例中,在一些其它更多的非典型症状中观察到改善,包含精神病特征(妄想、幻觉和强迫行为)和/或其它认知缺陷(情节记忆障碍、失用症和视觉空间功能障碍)。可以使用可以被评价的FTDC标准进行评估,包含额叶和/或颞叶退化体征的脑成像、临床评定量表上对减退的评估(如额颞叶变性的临床痴呆评定[CDR-FTLD]、额叶行为量表[FBI]、神经精神量表[NPI]和额颞叶痴呆评定量表[FRS])以及最终地用于确认致病GRN突变的基因检测。可以使用包含τ和淀粉样蛋白-β的脑脊液(CSF)生物标志物以及淀粉样蛋白正电子发射断层扫描(PET)成像。

[0133] 在某些实施例中,在患有特征为与言语和语言相关的症状的原发性进行性失语(PPA)的GRN突变携带者中观察到改善。可以使用基于梅苏拉姆(Mesulam)标准的指南诊断所述携带者,所述梅苏拉姆标准可以区分PPA的三种临床变异:语义变异PPA(svPPA)、迟滞型变异PPA(nfvPPA)和logopenic型变异PPA(lvPPA)(Gomo-Tempini等人,(2011).“原发性进行性失语及其变体的分类(Classification of primary progressive aphasia and its variants)”,《神经病学》,76(11):1006-14)。nfvPPA呈现出产生言语能力的缺陷,并且核心特征包含语言产生时的语法缺失、言语费力和言语失用症。svPPA呈现出理解词语意义能力的缺陷,并且核心特征包含受损的词语命名和单字理解。lvPPA的特征在于说话时难以找到适当的词语,而不伴随有词语理解的减退。lvPPA的核心特征在于词语检索和重复句子的能力的缺陷。GRN突变携带者最常见呈现出nfvPPA;然而,所述携带者可能具有跨越PPA临床表现的更广泛的症状,从而导致“未另行说明的PPA”的诊断(Gorno-Tempini等人,2011;Woollacott和Rohrer,2016)。

[0134] 提供了一种治疗患有与GRN单倍型不足相关的神经退行性病状的人类患者的方法。在某些实施例中,这种病状是颗粒蛋白前体相关的额颞叶痴呆(FTD)。所述方法包括通过具有腺相关病毒1(AAV1)衣壳的重组腺相关病毒(rAAV)将颗粒蛋白前体的编码序列递送到中枢神经系统(CNS),所述rAAV进一步包括包装在AAV衣壳中的载体基因组,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列、人颗粒蛋白前体的编码序列以及引导所述颗粒蛋白前体表达的调控序列。

[0135] 提供了一种用于治疗患有与颗粒蛋白前体相关的额颞叶痴呆相关的脑病变或与GRN单倍型不足相关的另一种神经退行性病状的人类患者的方法。所述方法包括通过具有腺相关病毒1(AAV1)衣壳的重组腺相关病毒(rAAV)向中枢神经系统(CNS)施用颗粒蛋白前体的编码序列,所述rAAV进一步包括包装在AAV衣壳中的载体基因组,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列、人颗粒蛋白前体的编码序列以及引导所述颗粒蛋白前体表达的调控序列。

[0136] 在某些实施例中,本文所提供的方法可以进一步包括通过以下监测治疗:(a)无创评估作为脑病变减少的预测因子的患者视网膜贮积病变减少;(b)进行磁共振成像以评估脑体积;和/或(c)测量所述CSF中的颗粒蛋白前体的浓度。任选地,可以评估血浆中的颗粒蛋白前体浓度。

[0137] 在某些实施例中,通过以下中的一个或多个评估rAAV.hPGRN组合物的功效:原发性认知、原发性行为或认知/其它方法。下文描述了合适的评估。

[0138] 原发性认知评估包含言语流畅性测试、FTLD的临床痴呆比率或小型精神状态检查(MMSE)。言语流畅性测试通过向每位受试者呈现相同的图片/照片并要求其口头描述来进行。在描述期间,对言语的速率(词语/分钟)进行计数、记录,并最终将其与反映神经标准成年人的速率进行比较。CDR-FTLD是经典CDR的扩展版本,所述典型CDR在过去用于评定阿尔茨海默氏病谱系病症的严重程度。评估包含CDR的原始6个领域(记忆、取向、判断以及解决问题、社区事务、家庭和爱好、个人护理)以及两个另外的领域:语言和行为,这允许对FTLD减退的检测具有更高灵敏度。评定为“0”表明正常行为或语言,而评分为“1”、“2”或“3”表明轻度到重度缺陷。“总和”或单独领域评分的总和用于确定总体痴呆严重程度。MMSE是临床和研究实践中广泛使用的11个问题的总体认知评估。如“今年是哪一年?哪个季节?日期?周几?哪个月?”等问题会被问到,并且每个正确答案得一分,其中每个问题会有最高评分。最高总评分为30分,其中24分和27分为两个截止值。这些截止值是认知减退的指标。

[0139] 原发性动作评估包含例如帕金森氏病统一评定量表(UPDRS)。UPDRS是对与帕金森症相关的若干个领域(如日常生活的精神、行为和情绪以及活动)的42项、4部分的评估。每个项包含范围通常为0(通常表明无损害)到4(通常表明最严重的损害)的评定量表。每个部分的评分被记录以提供疾病的严重程度的指示,其中最高评分199分表明最坏/最多的完全残废。

[0140] 原发性行为评估包含例如神经精神量表(NPI)或额叶行为量表(FBI)。NPI用于阐明患有脑病症的患者的精神病理学的表现。最初,其被开发用于阿尔茨海默氏病群体中;然而,其对评估其它病状的行为变化可能是有用的。评估由10个行为领域和2个植物性神经系统区域组成,其中有4个评分:频率、严重程度、总痛苦和照顾者痛苦。NPI总评分是通过将行为领域的域评分相加,再减去照顾者痛苦评分得到的。FBI是旨在评估特别与bvFTD相关的行为和性格的变化并且区分FTD与其它痴呆的24项评估。其以面对面访谈的形式施用于主要照顾者,因为诊断患有bvFTD的患者总体对这些类型的变化没有足够的洞察力。其集中于若干个行为和性格相关区域,对每个问题的评分从0(无)到3(严重/大多数时间)。总评分提供了对疾病的严重程度的深刻理解,并且可以用于评估随时间推移的变化。

[0141] 其它/认知和动作评估两者包含例如哥伦比亚自杀严重程度评定量表(C-SSRS)、临床总体变化印象量表(CGI-C)、额叶功能评定量表(FAB)和/或额颞叶痴呆评定量表

(FDR)。C-SSRS是3部分量表,通过评估自杀意念和行为的问题测定自杀意念、意念强度与自杀行为。这种评估的结果由直接从量表中得出的自杀行为致死率评定、自杀意念评分和自杀意念强度排名构成。基于评估指南,大于0的意念评分可能表明需要干预。强度评定的范围为0到25,其中0代表不认可自杀意念。CGI-C是由临床医生观察者评定的3项构成的简洁的、广泛使用的评估的三个部分之一。从参与研究开始,无论是否有完全因为治疗而出现的改善,CGI-C以7点量表进行评定,范围为1(很大程度上改善)到7(非常糟糕)。FAB是简单评估,以帮助区分具有额叶执行功能表型的痴呆与阿尔茨海默类型的痴呆。其尤其可用于轻度痴呆的患者(MMSE＞24)。评估由强调认知、动作和行为区域的6个部分组成,总评分为18,并且较高评分表明更好的表现。FDR是针对患有额颞叶痴呆的简洁分期评估,其检测FTD亚型随时间推移的疾病进展差异。这种简要访谈对主要照顾者进行,并且由分类为从未发生、有时或总是的30个项组成。然后计算评分百分比,并将其转换成罗吉特评分(logit score),并且最终转换成严重程度评分。严重程度评分的范围为非常轻度到极严重。

[0142] 功效的其它度量包含症状发作之后从诊断点起增加的存活期,所述存活期是功效的度量。当前,诊断患有由GRN突变引起的神经退行性病变的患者的期望寿命为从症状发作起7-11年。功效的另一个度量是中间额叶皮质和顶叶区域的厚度的萎缩的稳定和/或增加,所述中间额叶皮质和顶叶区域是目标群体中所有临床表现的最常受影响的脑区域。这可以使用MRI或其它成像技术评估。仍其它评估包含生物化学生物标志物。CSF和血浆中的PGRN蛋白的水平被测量为AAV转导的读数,并且预计在施用rAAV1.hPGRN之后在患者体内增加。在其它实施例中,评估了神经丝轻链(NFL)、τ、磷酸化τ和其它炎性标志物的CSF水平。在某些实施例中,调节和/或降低这些生物标志物水平与功效相关。

[0143] 尽管下文的实例集中于与杂合GRN单倍型不足相关的某些病状的治疗,但是在某些实施例中,本文所述的载体和组合物可以用于治疗其它疾病,例如与GRN基因的纯合突变相关的疾病,如神经元蜡样脂褐质沉积症、癌症(例如,卵巢癌、乳腺癌、肾上腺癌和/或胰腺癌)、动脉粥样硬化、2型糖尿病和新陈代谢疾病。

[0144] 另外的实施例如下所示为“A1”至“E3”。

[0145] A1.一种可用于治疗人类患者的成人发作性神经退行性疾病的治疗方案,其中所述方案包括施用具有AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组的重组腺相关病毒(AAV)载体,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列(ITR)、颗粒蛋白前体(GRN)编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列,所述施用包括小脑延髓池内(ICM)注射包括以下的单剂量:

[0146] (i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量;

[0147] (ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量;

[0148] (iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量;或

[0149] (iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。

[0150] A2.根据实施例A1所述的方案,其中所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。

[0151] A3.根据实施例A1或A2所述的方案,其中所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。

[0152] A4.根据实施例A1至A3中任一项所述的方案,其中所述载体基因组包括SEQ ID

NO:24。

[0153] A5.根据实施例A1至A4中任一项所述的方案,其中所述患者已被鉴定为患有GRN单倍型不足和/或额颞叶痴呆(FTD)。

[0154] A6.根据实施例A1至A5中任一项所述的方案,其中所述患者的年龄为至少35岁。

[0155] A7.根据实施例A1至A6中任一项所述的方案,其中所述患者的CSF中具有低浓度的颗粒蛋白前体。

[0156] A8.根据实施例A7所述的方案,其中所述患者的CSF中的颗粒蛋白前体浓度低于正常水平的50%。

[0157] A9.根据实施例A7所述的方案,其中所述患者的CSF中的颗粒蛋白前体浓度是正常水平的约30%。

[0158] A10.根据实施例A1至A9中任一项所述的方案,其进一步包括检测CSF、血清和/或血浆中颗粒蛋白前体的水平。

[0159] A11.根据实施例A1至A10中任一项所述的方案,其进一步包括测量

[0160] i)神经丝轻链(NfL)、总τ(T-τ)、血浆胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和磷酸化τ(P-τ)中的一种或多种的CSF水平;

[0161] ii)评估视网膜脂褐质;

[0162] iii)执行MRI以跟踪脑体积、白质完整性以及中额叶皮质和顶叶区域的厚度中的一个或多个的变化;

[0163] iv)执行FDG PET以评估额叶和/或颞叶中的代谢减退;和/或

[0164] v)测量EEG/诱发应答电势以评估疾病相关变化的减缓。

[0165] A12.根据实施例A1至A11中任一项所述的方案,其中所述单剂量足以在以下组织类型中的任何一种或多种中提供10^3GC/μg DNA:额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质、枕叶皮质、髓质、小脑、颈脊髓、胸脊髓、腰脊髓、颈背根神经节、胸背根神经节、腰背根神经节和三叉神经节。

[0166] A13.根据实施例A1至A12中任一项所述的方案,其中所述单剂量足以在以下组织类型中的任何一种或多种中提供10^4GC/μg DNA:额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质、枕叶皮质、髓质、小脑、颈脊髓、胸脊髓、腰脊髓、颈背根神经节、胸背根神经节、腰背根神经节和三叉神经节。

[0167] B1.一种药物组合物,其包括包含AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组的重组AAV载体,所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列(ITR)、颗粒蛋白前体编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列,其中所述组合物被调配用于向有需要的人类患者进行小脑延髓池内(ICM)注射,以施用以下剂量:

[0168] (i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量;

[0169] (ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量;

[0170] (iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量;或

[0171] (iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。

[0172] B2.根据实施例B1所述的药物组合物,其中所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。

[0173] B3.根据实施例B1或B2所述的药物组合物,其中所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。

[0174] B4.根据实施例B1至B3中任一项所述的药物组合物,其中所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。

[0175] C1.一种治疗患有成人发作性神经退行性疾病的患者的方法,所述方法包括通过ICM注射向所述患者施用单剂量的重组AAV,其中所述重组AAV包括AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组,所述载体基因组包括AAV ITR、颗粒蛋白前体编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列,并且

[0176] 其中所述单剂量是

[0177] (i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量;

[0178] (ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量;

[0179] (iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量;或

[0180] (iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。

[0181] C2.根据实施例C1所述的方法,其中所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95%同一性的序列。

[0182] C3.根据实施例C1或C2所述的方法,其中所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。

[0183] C4.根据实施例C1至C3中任一项所述的方法,其中所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。

[0184] C5.根据实施例C1至C4中任一项所述的方法,其中所述患者已被鉴定为患有GRN单倍型不足和/或额颞叶痴呆(FTD)。

[0185] C6.根据实施例C1至C5中任一项所述的方法,其中所述患者的年龄为至少35岁。

[0186] C7.根据实施例C1至C6中任一项所述的方法,其中所述患者的CSF中具有低浓度的颗粒蛋白前体。

[0187] C8.根据实施例C7所述的方法,其中所述患者的CSF中的颗粒蛋白前体浓度低于正常水平的50%。

[0188] C9.根据实施例C7所述的方法,其中所述患者的CSF中的颗粒蛋白前体浓度是正常水平的约30%。

[0189] C10.根据实施例C1至C9中任一项所述的方法,其进一步包括检测CSF、血清和/或血浆中颗粒蛋白前体的浓度。

[0190] C11.根据实施例C1至C10中任一项所述的方法,其进一步包括测量

[0191] i)神经丝轻链(NfL)、总τ(T-τ)、血浆胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和磷酸化τ(P-τ)中的一种或多种的CSF浓度;

[0192] ii)评估视网膜脂褐质;

[0193] iii)执行MRI以跟踪脑体积、白质完整性以及中额叶皮质和顶叶区域的厚度中的一个或多个的变化;

[0194] iv)执行FDG PET以评估额叶和/或颞叶中的代谢减退;和/或

[0195] v)测量EEG/诱发应答电势以评估疾病相关变化的减缓。

[0196] D1.一种呈单位剂型形式的药物组合物,所述药物组合物包括:

[0197] 缓冲液中的约1.44×10^{13}至约4.33×10^{14}GC的重组AAV载体，

[0198] 其中重组AAV包括AAV1衣壳和包装在其中的载体基因组，所述载体基因组包括AAV反向末端重复序列(ITR)、颗粒蛋白前体编码序列和引导所述颗粒蛋白前体在靶细胞中的表达的调控序列。

[0199] D2.根据实施例D2所述的药物组合物，其中所述颗粒蛋白前体编码序列是SEQ ID NO:3或与编码SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的SEQ ID NO:3共享至少95％同一性的序列。

[0200] D2.根据实施例D1或D2所述的药物组合物，其中所述载体基因组进一步包括CB7启动子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白poly A。

[0201] D4.根据实施例D1至D3中任一项所述的药物组合物，其中所述载体基因组包括SEQ ID NO:24。

[0202] D5.根据实施例D1至D4中任一项所述的药物组合物，其中所述组合物被调配用于ICM注射。

[0203] D6.根据实施例D1至D5中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液包括磷酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁和泊洛沙姆188。

[0204] D7.根据实施例D1至D6中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液包括1mM磷酸钠、150mM氯化钠、3mM氯化钾、1.4mM氯化钙、0.8mM氯化镁和0.001％泊洛沙姆188。

[0205] D8.根据实施例D1至D6中任一项所述的药物组合物，所述药物组合物的体积为约3.0mL、约4.0mL或约5.0mL。

[0206] E1.根据实施例D1至D8中任一项所述的药物组合物，所述药物组合物用于患有成人发作性神经退行性疾病的人类患者的治疗用途。

[0207] E2.根据实施例E1所述的供使用的药物组合物，其中所述患者已被鉴定为患有GRN单倍型不足和/或额颞叶痴呆(FTD)。

[0208] E3.根据实施例E1或E2所述的供使用的药物组合物，其中所述组合物被调配用于施用以下剂量：

[0209] (i)约3.3×10^{10}个基因组拷贝(GC)/克脑质量；

[0210] (ii)约1.1×10^{11}GC/克脑质量；

[0211] (iii)约2.2×10^{11}GC/克脑质量；或

[0212] (iv)约3.3×10^{11}GC/克脑质量。

[0213] 如本文中所使用的，术语计算机断层摄影(CT)是指放射线照相术，其中通过计算机由沿着轴线制成的一系列平面横截面图像构建身体结构的三维图像。

[0214] 当提及核酸或其片段时，术语“基本同源性”或“基本类似性”表示当与另一个核酸(或其互补链)的适当核苷酸插入或缺失进行最佳比对时，至少约95到99％的比对序列具有核苷酸序列同一性。优选地，同源性在全长序列、或其开放阅读框或长度为至少15个核苷酸的另一个合适的片段上。本文描述了合适片段的实例。

[0215] 在核酸序列的上下文中，术语“序列同一性”、“序列同一性百分比”或“相同百分比”是指两个序列中的残基在比对以获得最大对应性时是相同的。期望序列同一性比较的长度可以超过基因组的全长、基因编码序列的全长或至少约500至5000个核苷酸的片段。然而，也可能期望较小片段之间的同一性，例如至少约九个核苷酸，通常至少约20至24个核苷

酸、至少约28至32个核苷酸、至少约36个或更多个核苷酸。类似地，对于氨基酸序列，在蛋白质的全长或其片段上，可以容易地确定“序列同一性百分比”。合适地，片段长度为至少约8个氨基酸，并且可以至多约700个氨基酸。本文描述了合适片段的实例。

[0216] 当提及氨基酸或其片段时，术语“基本同源性”或“基本类似性”表示当与另一个氨基酸(或其互补链)的适当氨基酸插入或缺失进行最佳比对时，至少约95到99％的比对序列具有氨基酸序列同一性。优选地，同源性在全长序列、或其蛋白质(例如，cap蛋白、rep蛋白、或其长度为至少8个氨基酸、或更期望地至少15个氨基酸的片段)上。本文描述了合适片段的实例。

[0217] 术语“高度保守的”意指至少80％同一性、优选地至少90％同一性，并且更优选地超过97％同一性。通过使用本领域技术人员已知的算法和计算机程序，本领域技术人员可以容易地确定同一性。

[0218] 通常，当提及两种不同的腺相关病毒之间的“同一性”、“同源性”或“类似性”时，参考“比对”序列来确定“同一性”、“同源性”或“类似性”。“比对”序列或“比对”是指与参考序列相比，通常含有对丢失的或另外的碱基或氨基酸的校正的多个核酸序列或蛋白质(氨基酸)序列。在实例中，使用公开的AAV9序列作为参考点执行AAV比对。使用多种公开或可商购获得的多序列比对程序中的任一种进行比对。此类程序的实例包含“Clustal Ω”、“Clustal W”、“CAP序列组装”、“MAP”和“MEME”，这些程序可通过因特网上的Web服务器进行访问。此类程序的其它来源是本领域技术人员已知的。可替代地，也使用了载体NTI实用程序。本领域已知的许多算法可以用于测量核苷酸序列同一性，包含上述程序中包含的那些算法。作为另一个实例，可以使用GCG 6.1版本的程序Fasta™比较多核苷酸序列。Fasta™提供了查询序列与搜索序列之间最佳重叠区的比对和序列同一性百分比。例如，核酸序列之间的序列同一性百分比可以是使用如GCG 6.1版本中所提供的采用其默认参数(字号6和评分矩阵的NOPAM系数)的Fasta™所确定的，所述程序通过引用并入本文。多个序列比对程序也可用于氨基酸序列，这些程序例如“Clustal Ω”、“Clustal X”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“BLOCKMAKER”、“MEME”和“Match-Box”程序。通常，以默认设置使用这些程序中的任何程序，尽管本领域技术人员可以根据需要改变这些设置。可替代地，本领域技术人员可以利用另一种算法或计算机程序，所述算法或计算机程序提供至少与通过参考算法和程序所提供的一样水平的同一性或比对。参见例如J.D.Thomson等人，《核酸研究(Nucl.Acid.Res.)》，“多个序列比对的全面比较(A comprehensive comparison of multiple sequence alignments)”，27(13):2682-2690(1999)。

[0219] 应注意的是，术语“一个/一种(a)”或“一个/一种(an)”是指一个或多个/一种或多种。如此，术语“一个(a)”或“一种(an)”、“一或多个”以及“至少一个”在本文可互换地使用。

[0220] 词语“包括(comprise)”、“包括(comprises)”和“包括(comprising)”将被解释为是包含性而非排他性的。词语“由……组成(consist)”、“由……组成(consisting)”及其变体将被解释为是排他性的而非包含性。虽然说明书中的各个实施例是使用“包括”语言来呈现的，但是在其它情况下，也意图使用“由……组成”或“基本上由……组成”的语言来解释和描述相关的实施例。

[0221] 如本文所使用的，除非另有说明，否则术语“约”意指相对于给定参考的10％(±10％，例如，±1、±2、±3、±4、±5、±6、±7、±8、±9和±10或其之间的数值)的变化性。

[0222] 如本文所使用的，“疾病”、“病症”和“病状”可互换地用于指示受试者的异常状态。

[0223] 除非在本说明书中另有定义，否则本文所使用的技术术语和科学术语具有与本领域的普通技术人员和参照公开文本所通常理解的相同含义，这为本领域的技术人员提供了本申请中使用的许多术语的通用指南。

[0224] 术语“表达”在本文中以其最广泛的含义使用，并且包括RNA或RNA和蛋白质的产生。关于RNA，术语“表达”或“翻译”尤其涉及肽或蛋白质的产生。表达可以是暂时的或可以是稳定的。

[0225] 如本文所使用的，“表达盒”是指包括编码序列、启动子并可以包含其的其它调控序列的核酸分子，所述盒可以通过基因元件(例如，质粒)递送到包装宿主细胞，并包装到病毒载体(例如，病毒颗粒)的衣壳中。通常，用于产生病毒载体的此类表达盒含有本文所描述的基因产物的编码序列，所述编码序列侧接病毒基因组的包装信号和其它表达控制序列，如本文描述的序列。

[0226] 如本文所使用的，术语“可操作地连接”是指与所关注的基因邻接的表达控制序列以及以反式或在远处起作用以控制所关注的基因的表达控制序列两者。

[0227] 术语“异源性”当结合蛋白质或核酸使用时表明蛋白质或核酸包括在自然界中未发现彼此间的相同关系的两个或更多个序列或子序列。例如，核酸通常是重组地产生的，具有来自非有关基因的布置成产生新的功能性核酸的两个或更多个序列。例如，在一个实施例中，核酸具有来自一种基因的布置成引导编码序列从不同基因表达的启动子。因此，关于编码序列，启动子是异源的。

[0228] 在本发明的上下文中，术语“翻译”涉及核糖体的过程，其中mRNA链控制氨基酸序列的组装以产生蛋白质或肽。

[0229] 以下实例仅是说明性的，并且不旨在限制本发明。

[0230] 实例

[0231]

缩略语	描述
A	吸光度
aa	氨基酸
AAV	腺相关病毒
AAV1	腺相关病毒血清型 1
AAV2	腺相关病毒血清型 2
AAV5	腺相关病毒血清型 5
AAVhu68	腺相关病毒血清型 hu68
ACMG	美国医学遗传学学院（American College of Medical Genetics）
AD	阿尔茨海默氏病
AD & FDM	阿尔茨海默氏病和额颞叶痴呆突变数据库
Ad5	腺病毒血清型 5
AE	不良事件
AEX	阴离子交换
AmpR	氨苄青霉素抗性（基因）
ANOVA	方差分析
ARTFL	额颞叶变性的研究与治疗进展
AUC	分析超速离心
BA	β-肌动蛋白
BCA	二喹啉甲酸
BDS	散装药物物质
BMCB	细菌主细胞库
bp	碱基对
BRF	批次记录形式
BSA	牛血清白蛋白
BSE	牛海绵状脑病
BSC	生物学安全橱
bvFTD	行为变异额颞叶痴呆
BWCB	细菌工作细胞库
C9orf72	9 号染色体开放阅读框 72（基因，人类）
cap	衣壳（基因）
CB7	鸡 β-肌动蛋白启动子和 CMV 增强子
CBC	全血细胞计数

[0232]

缩略语	描述
CBER	生物制剂评价和研究中心（Center for Biologics Evaluation and Research）
CBS	皮质基底节综合征
CDR-FTLD sb	额颞叶变性的临床痴呆评定（CDR）量表-总和
CFR	《美国联邦法规（Code of Federal Regulations）》
CFU	集落形成单位
CGI-C	临床总体变化印象量表
CI	嵌合内含子
CMC	化学制造和控制
CMO	合同制造组织
CMV IE	巨细胞病毒立即早期增强子
CNS	中枢神经系统
COA	分析证书
CPE	细胞病变效应
CRL	查尔斯河实验室
CRO	合同研究组织
CSF	脑脊液
C-SSRS	哥伦比亚自杀严重程度评定量表
CT	计算机断层扫描
CTL	细胞毒性 T 淋巴细胞
CTSD	组织蛋白酶 D
ddPCR	液滴数字聚合酶链反应
DLS	动态光散射
DMEM	杜氏改性伊格尔介质（Dulbecco,s Modified Eagle Medium）
DMF	药物主文件
DNA	脱氧核糖核酸
DO	溶解氧
DP	药物产品
DRG	背根神经节
DS	药物物质
E1A	早期区 1A（基因）
ECG	心电图
EDTA	乙二胺四乙酸
ELISA	酶联免疫吸附测定
ELISpot	酶联免疫斑点
EU	内毒素单位
F	雌性
F/U	随访
FAB	额叶功能评定量表
FBI	额叶行为量表
FBS	胎牛血清
FDA	食品和药物管理局（Food and Drug Administration）
FDP	填充药物产品

[0233]

缩略语	描述
FFB	最终调配物缓冲液
FIH	首次人体
FRS	额颞叶痴呆评定量表
FTD	额颞叶痴呆
FTLD	额颞叶变性
FTDC	国际行为变异型 FTD 标准联盟
GC	基因组拷贝
GENFI	遗传性额颞叶痴呆倡议
GLP	良好实验室规范
GMP	良好制造规范
HCDNA	宿主细胞脱氧核糖核酸
HCP	宿主细胞蛋白
HEK293	人胚胎肾 293
HEX	氨基己糖苷酶（蛋白质）
hPGRN	人颗粒蛋白前体
hPGRN v2	人颗粒蛋白前体版本 2
ICH	国际协调会议
ICM	小脑延髓池内
ICP	颅内压
ICV	脑室内
IDS	艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶
IDUA	艾杜糖醛酸酶
IFN-γ	干扰素 γ
IND	试验性新药
IT	鞘内
ITFFB	鞘内最终调配物缓冲液
ITR	反向末端重复序列
IU	感染单位
IV	静脉内
KanR	卡那霉素抗性（基因）
kb	千碱基
KO	敲除
LAL	溶变形细胞裂解物
LBD	路易体痴呆
LEFFTDS	家族性额颞叶痴呆受试者的纵向评价
LFT	肝功测试
LLOQ	定量下限
LOD	检测限
LP	腰椎穿刺
LTFU	长期随访
lvPPA	Logopenic 型变异原发性进行性失语
M	雄性
MAPT	微管相关蛋白 τ（基因，人类）

[0234]

缩略语	描述
MBR	主批次记录
MCB	主细胞库
MED	最小有效剂量
MMSE	小型精神状态检查
MRI	磁共振成像
mRNA	信使核糖核酸
MS	质谱法
MTD	最大耐受剂量
N	受试者或动物的数量
N/A	不适用
NAb	中和抗体
NCL	神经元蜡样脂褐质沉积症
nfvPPA	非流利变异型原发性进行性失语
NFL	神经丝轻链
NGS	下一代测序
NHP	非人灵长类动物
NHS	自然历史研究
NPI	神经精神量表
NSAID	非甾体抗炎药
OL	开放标签
PBS	磷酸盐缓冲盐水
PD	帕金森氏病
PEI	聚乙烯亚胺
PES	聚醚砜
PET	正电子发射断层扫描
PGRN	颗粒蛋白前体（蛋白质）
PI	主要研究者
POC	概念验证
PolyA	聚腺苷酸化
PPA	原发性进行性失语
PSP	进行性核上性麻痹
QA	质量保证
QC	质量控制
qPCR	定量聚合酶链反应
rAAV	重组腺相关病毒
ROA	施用途径
rcAAV	有复制能力的腺相关病毒
rBG	兔β珠蛋白
rDNA	核糖体脱氧核糖核酸
rep	复制酶（基因）
RNA	核糖核酸
SA	单臂
SAE	严重不良事件

[0235]

缩略语	描述
SDS	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
SRT	安全审查触发
ssDNA	单链脱氧核糖核酸
svPPA	语义变异型原发性进行性失语
TBD	待确定
$TCID_{50}$	50%组织培养感染剂量
TDP-43 中的色谱图的溶剂梯度	TAR DNA 结合蛋白 43（蛋白质）
TE	Tris-EDTA
TFF	切向流过滤
UbC	泛素 C
UCSF	美国加州大学旧金山分校（University of California at San Francisco）
UPenn	宾夕法尼亚大学（University of Pennsylvania）
UPDRS	帕金森氏病统一评定量表
UPLC	超高效液相色谱法
US	美国
WT	野生型

[0236] 实例1:材料与方法

[0237] 载体

[0238] 将工程化的人PGRN cDNA克隆到表达构建体中,所述表达构建体含有鸡β肌动蛋白启动子与巨细胞病毒早期增强子、嵌合内含子和兔β-珠蛋白聚腺苷酸化序列(图1)。将第二工程化的人PGRN cDNA克隆到含有人泛素C启动子的表达构建体中。表达构建体侧接有AAV2反向末端重复序列。通过如前所述的HEK293细胞的三重转染和碘克沙醇纯化由此构建体产生腺相关病毒血清型1、5和人68(AAVhu68)(Lock M等人,《人类基因疗法》2010;21(10):1259-71)。

[0239] 动物程序

[0240] 所有动物方案均经宾夕法尼亚大学的机构动物护理和使用委员会(the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Pennsylvania)批准。从杰克逊实验室(The Jackson laboratory)购买育种对GRN敲除小鼠(库存#013175),并且将集落维持在宾夕法尼亚大学。野生型C57BL/6(库存#000664)用作对照。在第一项研究中,用异氟醚麻醉2月龄的小鼠并且以5μL的体积向侧脑室(ICV)注射1×10^{11}个载体基因组拷贝(GC)。注射后60天,在氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉下通过放血对小鼠实施安乐死,并且通过颈脱位法证实死亡。在第二项研究中,处理7月龄小鼠并在11月龄时处死小鼠。尸检时,通过心脏穿刺收集血清,并且使用连接到聚乙烯管的32号针通过枕骨下穿刺收集CSF。在干冰上立即冷冻血清和CSF样品,并且将其储存在-80度下直到分析为止。收集额叶皮质以用于生物化学分析,并在干冰上立即冷冻,而脑的其余部分被固定在10%福尔马林中以用于组织学分析。

[0241] 从科文斯(Covance)购买3到4岁的恒河猴。通过枕下穿刺到小脑延髓池(ICM注射),向动物单次注射指定的测试制品。所有动物均使用相同的装置和程序给药。

[0242] 在研究第0天,在给药前将动物镇静。测试制品施用之前,对动物进行称重并记录生命体征。向动物提供镇痛剂。

[0243] 然后将麻醉后的猕猴从动物饲养室转移出来，并且以侧卧位置放置在X光检查台上，头部向前弯曲，以用于收集CSF并给药到小脑延髓池中。将注射部位进行无菌处理。使用无菌技术，将21-27号Quincke脊柱针(碧迪公司(Becton Dickinson))推进到枕骨下空间中，直到观察到CSF流动。接下来，在给药前收集1.0mL CSF用于基线分析。穿过的解剖结构包含皮肤、皮下脂肪、硬膜外腔、硬脑膜和寰枕筋膜。针指向小脑延髓池的更宽的上间隙，以避免血液污染和潜在的脑干损伤。可以使用荧光镜(OEC9800 C-Arm，通用电气公司(GE))通过脊髓造影术验证针穿刺的正确放置。在CSF收集后，将leur通路延伸导管连接到脊柱针，以促进碘海醇(Iohexol)(商品名:欧乃派克(Omnipaque)180mg/mL，通用电气医疗公司(General Electric Healthcare))造影剂和测试制品的给药。通过导管和脊椎针施用至多2mL的碘海醇。在验证针头放置后，将含有测试制品的注射器(体积等于1.0mL加上注射器和接头死区的体积)连接到柔性接头并注射30±5秒。施用后，将针移除并且直接对穿刺部位施加压力。

[0244] 组织学和成像

[0245] 将小鼠脑固定在10％福尔马林中，低温保存在蔗糖中，包埋在最佳切割温度(OCT)化合物中并在恒冷箱中进行切片。对所关注区域的自发荧光材料(脂褐质)进行低放大成像。使用Image J软件，以盲检方式定量脂褐质沉积物。将非人灵长类动物组织固定在10％福尔马林中，石蜡包埋并用苏木精和伊红(H&E)染色。由经委员会认证的兽医病理学家(ELB)审查载玻片。对于用GFP载体处理的动物，用针对olig2、GFAP或NeuN的抗体对脑切片进行染色。用DAPI和针对GFP的抗体对所有切片进行共染色，随后是荧光次级抗体。在Leica Aperio Versa 200玻片扫描仪上扫描载玻片，并从eSlide Manager下载以在HALO成像软件(印迪卡实验室(Indica Labs))上进行分析。对每只动物的脑右半球的五个区域进行采样，并对具有每种细胞类型标志物的细胞进行定量。通过调整以下设置检测细胞:根据核检测标签，“最小核强度”、“核大小”、“核分割攻击性”和“最小核圆度”。然后，限定每种单独染料的标准，以进一步标识细胞并生成每种标志物的定量总细胞计数。基于检测所期望细胞类型的灵敏度和可靠性来凭经验确定设置;在一些情况下，如在细胞质中的NeuN检测等设置并不能反映标志物的真实细胞内定位，但提供了更大的检测特异性和灵敏度。对由自动化装置检测到的所有细胞进行人工验证。对于神经元，根据“染料1”标签，“神经元阳性阈值”和“细胞质阳性阈值”被调整为仅检测具有存在于核和细胞质两者中的NeuN的细胞。对于星形胶质细胞，选择了DAPI和GFAP标志物，并且两者必须存在于细胞的核和细胞质中以便将其包含在计数中。对于少突胶质细胞，如果DAPI和olig2两者都存在于核中，但没有出现在细胞的细胞质中，则对细胞进行计数。对于共定位，使用相同设置，然而GFP作为另外的染料被包含在神经元的核中，并且包含在星形胶质细胞的核和细胞质两者中。通过使用核或细胞质“遮蔽”功能对未表达所有选定标志物的细胞进行掩蔽来从所生成的结果表中去除所述细胞。因为与olig2共定位的GFP阳性细胞的缺乏，所以对经转导的少突胶质细胞进行手动计数。在一些情况下，血管的或脉络丛的部分表现出自发荧光并且使用“剪刀”工具手动勾画并排除。所产生的值表示为每种细胞类型标志物的GFP阳性细胞的百分比。

[0246] 评估神经炎症(CD68免疫组织化学)

[0247] 对每只动物的脑进行CD68的免疫组织化学染色。简言之，抗原修复是通过将载玻片在柠檬酸盐基抗原回收缓冲液(载体实验室(Vector Laboratories)，目录#H-3300)中温

育20分钟来进行的，所述缓冲液在100℃的diH$_2$0中稀释1:100。然后将载玻片洗涤，并且在室温下在1％驴血清中用0.2％ Triton-X封闭15分钟。将载玻片与兔抗小鼠CD68初级抗体(艾博抗公司(Abcam)，目录#125212)在4℃下温育过夜。第二天，将载玻片洗涤并在室温下与抗兔IgG TritC缀合的二级抗体一起温育1小时。将载玻片在PBS中洗涤，然后用diH2O洗涤1分钟。用Fluoromount G或含有DAPI作为核复染剂的类似培养基覆盖载玻片。使用VIS图像分析软件将CD68染色定量为每个视野的阳性面积。通过将平均视野大小除以视野大小，然后乘以CD68阳性面积，将CD68面积相对于总视野面积归一化(丹麦赫斯霍尔姆的Visiopharm公司(Visiopharm;Hoersholm,Denmark)；版本2019.07.0.6328)。

[0248] 用于氨基己糖苷酶(Hex)测定的样品制备

[0249] 通过将10μg的脑组织裂解物或5μl的血清与95μL的反应混合物(1mM 4-甲基伞形基N乙酰基βD-葡糖胺[Sigma M2133]、0.15M NaCl、0.05％ Triton X-100和0.1M乙酸钠，pH 3.58)在96孔黑色塑料测定板中混合来测量HEX活性。将平板密封并在37℃下温育30分钟，并且通过添加150μL的停止溶液(290mM甘氨酸和180mM柠檬酸钠，pH 10.9)停止反应。在365nm处激发时，在450nm的发射波长下测量来自反应产物的荧光。

[0250] DNA提取和生物分布(TaqMan qPCR)

[0251] 使用TaqMan定量聚合酶链式反应(qPCR)对收集用于载体生物分布分析的组织进行脱氧核糖核酸(DNA)提取和基因组拷贝的定量。简言之，组织被机械均质化并用蛋白酶K消化。用RNA酶A处理样品，并且通过在缓冲液AL(Cat.#19075，凯捷公司)中在70℃下温育1小时来裂解细胞。在QIAGEN旋转柱上提取并纯化DNA。稀释到≥90ng/μl且≤110ng/μl的浓度后，使用载体和/或转基因特异性引物重复进行qPCR反应。将信号与来自同一研究的原初或阴性对照动物的已知DNA浓度背景下线性化质粒DNA的标准曲线进行比较。计算每微克DNA的基因组拷贝数。使用另外的对照来排除PCR反应中的交叉污染和样品干扰。基于Ct值的预定义验收标准分析原始数据，并且确定每次运行的量化限值。所有数据都包含在和/或附加到批记录表单中。

[0252] 评估转基因表达(ELISA)

[0253] 使用Qiagen TissueLyzer将来自额叶皮质的冷冻脑组织样品在含有0.9％ NaCl(pH4.0)和0.05％ Triton-X100的溶液中在30Hz下均质化2分钟。将样品在干冰上冷冻，在室温下解冻，并短暂涡旋。通过在台式离心机中以10,000RPM离心10分钟来澄清裂解物。

[0254] 使用夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)测量脑组织裂解液或CSF中的人PGRN表达。简言之，在4℃下用抗人PGRN捕获抗体涂覆ELISA板过夜。将板洗涤，并且然后在室温下含1％牛血清白蛋白的PBS中的中封闭2小时。倾析平板，并且在室温下将100μl脑组织裂解物或CSF温育1小时。将板洗涤并在室温下与生物素缀合的抗人IgG抗体一起温育1小时。将板洗涤并在室温下与链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶一起温育1小时。将板洗涤并在室温下在含有3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色底物和0.004％H_2O_2的显影溶液中温育。观察反应的显色至多30分钟，直到任何孔的颜色达到饱和。然后通过添加含有H_2SO_4的停止缓冲液淬灭反应，并且在450nm处测量吸光度。

[0255] 抗转基因抗体(ELISA)的评估

[0256] 通过间接ELISA测量血清和CSF中的抗人PGRN抗体。简言之，在4℃下用重组人PGRN蛋白(1μg/mL)涂覆ELISA板过夜。将板洗涤，并且然后在室温下在含1％牛血清白蛋白的

DPBS中封闭1小时。血清样品在DPBS中稀释1:250，而CSF样品稀释1:5。将稀释的样品一式两份添加到ELISA板的孔中，并且在37℃下温育1小时。将板洗涤并在室温下与生物素化的抗小鼠IgG抗体一起温育1小时，然后用链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶二级抗体洗涤并一起温育1小时。将板洗涤并在室温下在含有3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色底物和0.004% H_2O_2的显影溶液中温育。观察反应的显色至多30分钟，直到任何孔的颜色达到饱和。通过添加含有H_2SO_4的停止缓冲液淬灭反应，并且在450nm处测量吸光度。

[0257] ELISpot测定的外周血单核细胞和淋巴细胞分离

[0258] 外周血单核细胞分离

[0259] 在预先标记的50mL离心管中，用无菌汉克氏平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution，HBSS)稀释至多10mL的血液。将样品充分混合，并且然后在100% Ficoll-Paque Plus密度梯度上离心。去除上部血浆级分。将下层含有PBMC的层置于新管中，洗涤，并且使用ACK裂解缓冲液裂解细胞。用DNA酶I处理悬浮液，离心，并且去除由裂解的红细胞组成的上清液。将白细胞沉淀物疏松，洗涤，用DNA酶I处理，并且离心。将沉淀物重新悬浮在完整的RPMI培养基(含有补充有L-谷氨酰胺、胎牛血清[FBS]、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸[HEPES]、pen/strep和硫酸庆大霉素的RPMI 1650培养基)中。

[0260] 肝淋巴细胞分离

[0261] 收集每只动物的肝脏切片，并且在室温下置于无菌RPMI 1640培养基中。肝脏收集后不久，将其在培养皿中切成块。将块在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤，并且使用手动处理器切成1mm大小的片段，或使用自动组织解离器均质化。用胶原酶消化组织，并且通过100μm和40μm过滤器过滤。将样品离心，并且用补充有1% FBS的PBS洗涤沉淀物以去除胶原酶。将沉淀物重新悬浮在补充有5% FBS的RPMI 1640培养基中。然后在20℃(±2℃)下，通过Percoll梯度以2000RPM离心20分钟，分离肝淋巴细胞。将肝淋巴细胞在补充有1% FBS的PBS中洗涤两次，然后以1600RPM离心5分钟，每次在20℃(±2℃)下洗涤。将肝淋巴细胞重新悬浮在RPMI 1640培养基中。

[0262] 脾脏淋巴细胞分离

[0263] 收集每只动物的脾脏，并且在室温下置于无菌L15培养基中。随后将其切成块，并且研磨或使用自动组织解离器均质化。将浆料通过细胞过滤器过滤到50mL锥形离心管中。将样品在20℃(±2℃)下以1700RPM离心5分钟，并且丢弃上清液。将细胞沉淀物在室温下重新悬浮在ACK裂解缓冲液中3分钟。然后将含有DNA酶I的RPMI 1640培养基添加到样品中，然后在20℃(±2℃)下以1700RPM立即离心5分钟。用RPMI 1640培养基洗涤细胞沉淀物以去除DNA酶I和裂解缓冲液并离心。将洗涤的脾细胞重新悬浮在RPMI 1640培养基中。

[0264] 骨髓淋巴细胞分离

[0265] 在室温下将骨髓收集到含有肝素和PBS的管中。将骨髓在无菌HBSS中稀释并通过70μm过滤器过滤，然后通过40μm过滤器，或使用自动组织解离器均质化。将过滤的骨髓置于新管中的Ficoll-Paque的顶部，并且在离心机停止的情况下以2500RPM离心25分钟。去除上部级分，并且将含有骨髓淋巴细胞的级分移液到新管中。用HBSS洗涤细胞，并且在1700RPM下离心5分钟。再次用完整的RPMI培养基(含有补充有L-谷氨酰胺、FBS、HEPES、pen/strep和硫酸庆大霉素的RPMI 1650培养基)洗涤细胞沉淀物，并且在1700RPM下离心5分钟。将沉淀物重新悬浮在RPMI 1640培养基中。

[0266] 中和抗体测定

[0267] 如前所述评估针对AAVhu68的中和抗体(Calcedo R等人,《传染病杂志(J Infect Dis.)》,2009;199(3):381-90)。

[0268] 感觉神经传导研究

[0269] 用氯胺酮/右美托咪定的组合镇静动物。以侧卧位或背卧位将经麻醉的动物置于手术台上使用热敷来维持体温。不使用电子保温装置,因为可能会干扰电信号采集。

[0270] 感觉神经传导研究(NCS)(也称为感觉神经传导速度(NCV)测试)使用Nicolet EDX®(Natus Neurology)和Viking®分析软件进行以测量感觉神经动作电势(SNAP)振幅和传导速度。简而言之,将刺激器探针定位在正中神经上方,其中阴极距记录位点最近。将两个针电极在远节指骨(参考电极)和近节指骨(记录电极)的水平处皮下插入指II,而将接地电极放置在刺激探针(阴极)的近侧。使用WR50 Comfort Plus探针儿科刺激器(Natus Neurology)。所引发的应答被不同程度地放大并显示在监测器上。为了确认缺少背景电信号,初始采集刺激强度被设置为0.0mA。为了找到最佳刺激位置,将刺激强度增加到10.0mA,并且在探针沿正中神经移动时产生一连串刺激,直到找到如由最大最后波形确定的最佳位置为止。将探针保持在最佳位置处,刺激强度逐渐地逐步增加到10.0mA,直到峰振幅应答不再增加为止。最后30个刺激应答被记录下拉并保存在软件中。对正中神经的至多10个最大刺激应答取平均值并报告。测量从记录位点到刺激阴极的距离(cm)并将其输入到软件中。使用应答的起始潜伏期和距离(cm)计算传导速度。报告了SNAP振幅的传导速度和平均值两者。从双侧测试正中神经。由仪器生成的所有原始数据都保留为研究文件的一部分。

[0271] 实例2:重组AAV1.hPGRN

[0272] rAAV1.PGRN是使用以下通过HEK293细胞的三重质粒转染产生的:1)对侧接有AAV ITR的转基因盒进行编码的AAV顺式质粒(称为pENN.AAV.CB7.CI.hPGRN.rBG.KanR);,2)对AAV2 rep和AAV1 cap基因进行编码的AAV反式质粒(称为pAAV2/1.KanR);以及3)辅助腺病毒质粒(称为pAdΔF6.KanR)。

[0273] A.AAV载体基因组质粒序列元件

[0274] 来自顺式质粒的载体基因组(称为pENN.AAV.CB7.CI.hPGRN.rBG.KanR(p4862))的线性映射。参见图2。

[0275] 顺式质粒含有以下载体基因组序列元件:

[0276] 1.反向末端重复序列(ITR):ITR是源自侧接载体基因组的所有组分的AAV2(130个碱基对[bp],GenBank:NC_001401)的相同、相反互补序列。当以反式方式提供AAV和腺病毒辅助功能时,ITR功能既充当载体DNA复制的起点,又充当载体基因组的包装信号。如此,ITR序列表示载体基因组复制和包装所需的唯一顺式序列。

[0277] 2.人巨细胞病毒立即早期增强子(CMV IE):从人源性CMV(382bp,GenBank:K03104.1)获得的这种增强子序列增加了下游转基因的表达。

[0278] 3.鸡β肌动蛋白启动子(BA):选择这种普遍存在的启动子(282bp,GenBank:X00182.1)以驱动任何CNS细胞类型中的转基因表达。

[0279] 4.嵌合内含子(CI):混合内含子由鸡β肌动蛋白剪接供体(973bp,GenBank:X00182.1)以及兔β珠蛋白剪接受体元件组成。内含子是转录的,但却通过剪接从成熟的mRNA中去除,从而将其任一侧的序列放在一起。表达盒中内含子的存在已经示出有助于将

mRNA从核转运到细胞质,因此增强用于翻译的稳定水平的mRNA的累积。这是旨在用于增加水平的基因表达的基因载体中的常见特征。

[0280] 5.编码序列:人GRN基因的工程化cDNA(1785bp,包含两个终止密码子)编码人PGRN(hPGRN)蛋白(593个氨基酸[aa],GenBank:NP_002078),这与溶酶体功能和其它神经系统作用有关。

[0281] 6.兔β珠蛋白聚腺苷酸化信号(rBG PolyA):rBG PolyA信号(127bp,GenBank:V00882.1)促进顺式转基因mRNA的高效聚腺苷酸化。此元件充当转录终止的信号、新生转录物的3′端处的特异性切割事件以及添加长聚腺苷酸尾的信号。

[0282] B.AAV1反式质粒:pAAV2/1.KanR(p0069)

[0283] AAV2/1反式质粒是pAAV2/1.KanR(p0069)。pAAV2/1.KanR质粒长度为8113bp并且对复制和包装AAV载体基因组所需的四个野生型AAV2复制酶(Rep)蛋白进行编码。pAAV2/1.KanR还对三个野生型AAV1病毒粒子蛋白衣壳(Cap)蛋白进行编码,所述蛋白被组装到AAV血清型1(AAV1)的病毒粒子壳中以容纳AAV载体基因组。从猿猴源中分离pAAV2/1.KanR上含有的AAV1 cap基因。

[0284] 为了产生pAAV2/1.KanR构建体,来自p5E18(2/2)的3.0千碱基(kb)片段、来自pAV1H的2.3-kb片段以及来自p5E18(2/2)的1.7-kb片段被合并以形成pAAV2/1(p0001),其含有氨苄青霉素抗性(AmpR)盒中的AAV2 rep和AAV1 cap(在文献中称为p5E18[2/1])。这种克隆策略也将AAV p5启动子序列(其一般驱动rep表达)从rep的5'端重新定位到cap的3'端,从而在rep的上游留下截短的p5启动子。这种截短的启动子用于下调rep的表达,并且因此使载体产生最大化(Xiao等人,(1999)基于腺相关病毒类型1的基因疗法载体(Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1),《病毒学杂志》73(5):3994-4003)。

[0285] 为了产生用于临床产品制造的pAAV2/1.KanR,pAAV2/1的主链序列中的氨苄青霉素抗性(AmpR)基因替换为卡那霉素抗性(KanR)基因。已通过直接测序验证了反式质粒的所有组分部分。

[0286] C.腺病毒辅助质粒:pAdDeltaF6(KanR)

[0287] 质粒pAdDeltaF6(KanR)是在宾夕法尼亚大学的James M.Wilson博士和其同僚的实验室中构建的,并且大小为15,774bp。质粒含有对AAV复制很重要的腺病毒基因组区域,即E2A、E4和VA RNA(腺病毒E1功能由HEK293细胞提供)。然而,质粒不含其它腺病毒复制或结构基因。质粒不含对于复制至关重要的顺式元件,如腺病毒ITR;因此,预期不产生感染性腺病毒。质粒源自Ad5的E1、E3缺失分子克隆(pBHG10,基于pBR322的质粒)。将缺失引入到Ad5中以消除不必要的腺病毒基因的表达并将腺病毒DNA的量从32kb减少到12kb。最后,用卡那霉素抗性基因替代氨苄青霉素抗性基因以产生pAdeltaF6(KanR)。保留在此质粒中的E2、E4和VAI腺病毒基因以及存在于HEK293细胞中的E1对于AAV载体产生都是必需的。

[0288] 如通过USP<791>确定的,最终产物的pH应在6.2到7.7的范围内,并且如通过USP<785>确定的,同渗重摩含量为260至320mOsm/kg,并且如通过ddPCR确定的,GC滴度大于或等于2.5×10^{13}GC/mL(Lock等人,(2014),"通过液滴数字PCR绝对测定单链和自互补腺相关病毒载体基因组滴度(Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital

PCR)”,《人类基因疗法方法》,25(2):115-25中所讨论的。

[0289] 实例3:人PGRN转基因在鼠类疾病模型中的AAV介导的递送

[0290] 使用如例如WO 2018/160582中描述的公开的三重转染技术产生重组AAV载体,所述重组AAV载体具有表达在CB7启动子和嵌合内含子(CB7.CI.hPGRN.rBG)的控制下的人PGRN(SEQ ID NO:3)的AAVhu68衣壳。

[0291] 评估人Grn转基因在Grn敲除小鼠模型中的AAV介导的递送。对Grn突变杂合的小鼠(Grn+/-)没有表现出Grn相关的神经退行性疾病的病理特征,这可能是因为小鼠寿命不允许产生GRN单倍型不足的后遗症,所述后遗症在几十年后首次在人类中表现出来。相比之下,(Grn-/-)小鼠中的完整PGRN缺陷概括了人类Grn单倍型不足的若干个早期特征,如溶酶体功能受损、自发荧光溶酶体贮积物质(脂褐质)累积和小胶质细胞活化,尽管Grn-/-小鼠甚至在至多两岁时没有表现出神经元脱失(Lui H等人,《细胞(Cell.)》,2016;165(4):921-35;Ward ME等人,《科学转化医学期刊(Sci Transl Med.)》,2017年4月12日;9(385):pii:eaah5642)。据报告,Grn+/-和Grn+/-小鼠两者表现出行为异常,但小组之间的结果并不一致(Ahmed Z等人,《美国病理学杂志(Am J Pathol.)》,2010;177(1):311-24;Wils H等人,《病理学杂志(The Journal of Pathology.)》,2012;228(1):67-76;Ghoshal N等人,《疾病神经生物学(Neurobiology of Disease.)》,2012;45(1):395-408;Filiano AJ等人,《神经科学杂志:神经科学学会官方杂志(The Journal of neuroscience:the official journal of the Society for Neuroscience.)》,2013;33(12):5352-61;Yin F等人,《美国药学科学家协会杂志(The FASEB journal.)》2010;24(12):4639-47)。同样,一些报告表明Grn-/-小鼠的存活率降低,而其它报告发现Grn-/-小鼠的寿命正常,这与经验一致(Ahmed Z等人,《美国病理学杂志》,2010;177(1):311-24;Wils H等人,《病理学杂志》,2012;228(1):67-76)。虽然$Grn^{-/-}$小鼠没有表现出明显的神经退行性病变或神经学体征,但与人类Grn单倍型不足显著的生物化学和组织学相似性使其成为评估新疗法的潜在信息模型。因此,分析集中在Grn-/-小鼠的这些生物化学和组织学发现。

[0292] 本研究的目的是评估将人Grn基因递送到脑是否可以消除$Grn^{-/-}$小鼠中现有的溶酶体贮积物质并使溶酶体功能正常化。响应于溶酶体贮积,细胞上调溶酶体酶的表达,所述溶酶体酶可以用作溶酶体贮积病的生物标志物(Hinderer C等人,《分子疗法:美国基因疗法学会杂志(Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy)》,2014;22(12):2018-27;Gurda BL等人,《分子疗法:美国基因疗法学会杂志》,2016;24(2):206-16;Karageorgos LE等人,《实验细胞研究(Experimental Cell Research.)》,1997;234(1):85-97)。评价了来自不同年龄$Grn^{-/-}$和$Grn^{+/+}$小鼠的脑组织中的溶酶体酶氨基己糖苷酶的活性以及皮质、海马体和丘脑中的脂褐质沉积物的活性(图3A至图3D)。在整个生命中升高的氨基己糖苷酶活性是明显的,而脂褐质表现出进行性累积。脂褐质早在2个月大时就是显而易见的,这与以前的发现一致(Klein ZA等人,《神经元(Neuron.)》,2017;95(2):281-96e6)。最初的研究是基于天然分离物AAVhu68使用AAV载体进行的,所述天然分离物与分支F分离物AAV9密切相关。通过脑室内(ICV)注射表达人Grn的AAVhu68载体或媒剂(PBS)处理2至3月龄的$Grn^{-/-}$小鼠(N=10每组)。另外,用媒剂注射一队列野生型小鼠(N=10)。由于2月龄小鼠的小尺寸使得通过ICM途径可靠地施用载体变得有挑战性,所述ICM途径是用于NHP研究和所提议的FIH临床试验的ROA,因此使用了ICV ROA

(涉及将AAV载体直接注射到的脑室的CSF中)。先前的研究表明,以针对此研究选定的剂量(10^{11}GC)ICV施用AAVhu68会导致转导局限于靠近所注射的脑室的脑区域,从而使所述脑区域成为有用系统以评价是否可以通过小细胞群体分泌PGRN来实现脑病变的整体改善。

[0293] 载体施用后两个月,对动物实施安乐死,并且收集脑、CSF和血清。脑中的人PGRN蛋白水平的定量证实了AAV处理的组的转导(图4)。PGRN是可以在CSF中测量到的分泌蛋白,并且在GRN突变携带者的CSF中减少(Lui H等人,《细胞》,2016;165(4):921-35;Meeter LH等人,《老年痴呆症及老年认知障碍摘录(Dement Geriatr Cogn Dis Extra.)》,2016;6(2):330-40)。因此,评估了AAV处理的$Grn^{-/-}$小鼠的CSF中的PGRN蛋白水平,这揭示出平均CSF浓度为14ng/mL,而在媒剂处理的组中,人PGRN低于检测水平(图4)。在AAV处理的$GRN^{-/-}$小鼠的脑中,PGRN的表达伴随有溶酶体酶表达的正常化,并且Hex活性水平恢复到接近正常水平(图5)。在血清中,媒剂处理的Grn-/-小鼠的HEX活性显著高于媒剂处理的WT小鼠。相比之下,AAV处理的Grn-/-小鼠的HEX活性显著低于媒剂处理的Grn-/-小鼠,并且与媒剂处理的WT小鼠类似。

[0294] 在确认$Grn^{-/-}$小鼠的脑中的PGRN表达之后,评估PGRN表达是否减少了海马体、丘脑和皮质中的脂褐质沉积物的数量。为此目的,将未染色的固定脑切片安装在盖玻片上,并且对自发荧光脂褐质进行成像并以盲检方式进行定量。与媒剂处理的WT小鼠相比,媒剂处理的Grn-/-小鼠的海马体、丘脑和额叶皮质中存在明显更多的脂褐质沉积。相比之下,AAV施用显著减少了Grn-/-小鼠所有三个脑区中脂褐质沉积的数量,其水平与媒剂处理的WT小鼠相当(图6)。

[0295] 最初的概念验证表明当贮积物质刚刚开始出现在脑中时在早期处理的小鼠中的AAV介导的PGRN表达的治疗活性。随后评估了基因转移对具有更严重既往病理的老年小鼠的影响。在本研究中,7月龄$Grn^{-/-}$小鼠接受单ICV注射表达人PGRN的AAVhu68载体或媒剂,并且在11月龄时处死。除了广泛的脑脂褐质沉积外,11月龄的$Grn^{-/-}$小鼠表现出广泛的小胶质细胞增生,类似于由Grn突变引起的FTD患者(图7A至图7C)(Ahmed Z等人,《神经炎症杂志(Journal of neuroinflammation.)》,《神经炎症杂志(JNeuroinflammation.)》,2007年2月11日;4:7)。GRN基因转移减少了老年小鼠的脑Hex活性和脂褐质沉积物,这与在年轻动物体内的发现类似(图5A至图5D)。另外,使经处理的小鼠的脑中的小胶质细胞的大小和数量正常化。

[0296] 向$Grn^{-/-}$小鼠的脑ICV递送表达人PGRN的AAV载体累积地清除了脂褐质聚集体并且使溶酶体酶活性几乎完全正常化,从而表明PGRN基因递送可以有效校正Grn相关神经退行性疾病的潜在病理生理学的关键方面。

[0297] 实例4:非人灵长类动物中的AAV介导的GRN基因递送

[0298] 本研究评估了四个表达人颗粒蛋白前体(GRN)基因的载体(AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)、AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG、AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40和AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG),所述人颗粒蛋白前体基因编码颗粒蛋白前体(PGRN)蛋白。然而,每个候选基因由不同的血清型、启动子、工程化转基因(SEQ ID NO:3或4)和转录终止子组合组成。

[0299] 将载体以3.0×10^{13}个基因组拷贝(GC)/动物的单个小脑延髓池内(ICM)剂量向成年非人灵长类动物(NHP)施用。生活评估包含日常观察、体重测量、血液和脑脊液(CSF)临床

病理学小组(细胞计数、差异、临床化学和/或总蛋白),以及CSF和血清中转基因表达的评估。在显示最高水平转基因表达的组中,还测量了CSF和血清中针对转基因的抗体。在第35天或第60天对所有NHP进行尸检,并且对转基因表达水平最高的组的脑和脊髓进行组织病理学评估。

[0300] 在组分配后,每只动物接受3.0×10^{13}GC(3.3×10^{11}GC/g脑)剂量的以下测试制品之一的单次ICM注射:

[0301] 1.AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)

[0302] 2.AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG

[0303] 3.AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG

[0304] 4.AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40

[0305] 下表中总结了研究设计。

[0306]

组	处理	动物ID	性别	剂量(GC/动物)	剂量(GC/g脑)[a]	尸检日
1	AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)	RA3151	M	3.0×10^{13}	3.3×10^{11}	35±2
		RA3170	M			
2	AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG	RA3155	M	3.0×10^{13}	3.3×10^{11}	35±2
		RA3160	M			
3	AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG	RA2981	F	3.0×10^{13}	3.3×10^{11}	35±2
		RA2982	F			
4	AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40	RA3027	M	3.0×10^{13}	3.3×10^{11}	60±4
		RA3153	M			

[0307] [a]使用90g成年恒河猴的脑质量计算值

[0308] 缩略语:F,雌性;GC,基因组拷贝;ICM,小脑延髓池内;ID,标识号;M,雄性;N/A,不适用;ROA,施用途径。

[0309] 在CSF中,在第7天对所有测试的载体检测到人PGRN的表达。到第14天,PGRN的表达超过了健康人对照样品中所有测试的载体的平均表达水平。在施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的NHP的CSF中,表达始终最高。从第7天至第35天,施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的动物的平均PGRN浓度约为正常人CSF PGRN水平的40倍(图8)。对于两种施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的NHP,CSF PGRN水平似乎在第21天至28天左右达到峰值。在血浆中,在第7天对所有测试的载体检测到人PGRN的表达。在第7天和第14天,施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG的NHP的PGRN表达水平超过了健康人对照样品的公布PGRN浓度,并且两种载体的表达似乎在约第14天至第21天达到峰值。相比之下,施用AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG的NHP显示血浆中PGRN的水平较低(图8)。

[0310] 由于在研究期间,与其它组相比,施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG的NHP在CSF和血浆中显示出更高水平的PGRN,因此仅评估了这些组对转基因的抗体应答。在CSF中,在7天至35天内,在施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG的NHP中检测到抗PGRN抗体的存在。与施用AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG的NHP相比,施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的NHP显示出更早的抗体应答(图9)。在血清中,在7天至14天内,在施用PBFT02或AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG的NHP中检测到抗PGRN抗体的存在。两个治疗组之间抗体应答

开始的时间相似(图9)。

[0311] 所有NHP均存活到预定研究终点(第1组至第3组第35±2天,第4组第60±4天)。对所有动物进行尸检。每日观察未发现治疗相关的异常。在整个研究过程中,所有动物的体重都是稳定的(图10)。

[0312] CSF分析显示所有施用的载体在AAV施用后7天至21天开始出现无症状的淋巴细胞性脑脊液细胞增多(图11)。与研究中的其它动物相比,施用AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG(RA2981和RA2982)的两只动物和施用AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40(RA3153)的一只动物的脑脊液细胞增多一般较轻。研究中大多数动物的CSF白细胞计数从峰值水平下降,但在尸检时仍保持升高。

[0313] 研究中的任何动物均未发现治疗相关的大体病理学发现。由于在研究期间,施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG的NHP在CSF和血浆中显示出较高水平的PGRN,因此仅对这些组进行了脑和脊髓的组织病理学检查。施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG的NHP显示脑膜和脉络丛偶尔出现少量淋巴细胞浸润。在一些DRG和脊髓切片中也观察到感觉神经元以及其相关轴突的退化。感觉神经元发现的严重程度一般为很小到轻微,与临床体征无关。

[0314] 在向非人灵长类动物ICM施用AAV1和AAVhu68载体之后的CNS转导的不同模式

[0315] 使用AAV1载体处理的NHP的CSF中的明显更高的PGRN表达进一步探索了AAV1、AAV5和AAVhu68载体的转导模式的差异。向NHP施用单ICM注射的表达GFP报告基因的AAV1、AAV5或AAVhu68载体(3×10^{13}GC,n=2每种载体)。注射后28天处死动物以对脑转导进行组织学分析。

[0316] 免疫组织化学揭示贯穿用AAV1和AAVhu68载体处理的NHP的脑的弥漫性、分散的转导。最低转导在接受AAV5载体的动物的脑中是明显的。为了更准确地表征AAV1与AAVhu68之间转导的差异,研发了半自动化方法来定量从多个脑区域收集的切片中的经转导的细胞。使用针对GFP的荧光标记的抗体和特定细胞类型的标志物对切片进行染色,分别通过NeuN、olig2和GFAP染色定量神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞的总数,随后是定量每种类型的表达GFP的细胞(图12、图13)。AAV1和AAVhu68各自转导所检查的所有区域中的小于百分之一的每种细胞类型。神经元的转导在两种载体之间几乎是相当的,而AAVhu68似乎转导了稍微更多数量的星形胶质细胞和少突胶质细胞。

[0317] 考虑到使用AAV1实现的显著更高的CSF PGRN水平,使用AAV1和AAVhu68载体观察到的大致相当的脑转导是出乎意料的。通过免疫组织化学评估用AAVhu68处理的动物和用AAV1处理的动物RA1826的侧脑室和第四脑室的多个区域中的室管膜细胞转导。有趣的是,来自含有脑室系统的部分的AAV1处理的动物(RA1826)的多个脑切片表明沿脑室排列成行的室管膜细胞的广泛转导,这在AAVhu68处理的动物中没有观察到(未示出)。平均48%的室管膜细胞跨所有采样区域转导,包含侧脑室的额角、颞角和后角和第四脑室。相比之下,只有1-2%的室管膜细胞在给予AAVhu68载体的动物的相同脑区域中被转导。可在第二AAV1处理的动物中评估一个侧脑室的仅小区段,这示出大约1%的室管膜细胞转导,尽管分析限于小采样区域。这些发现表明,考虑到两种血清型之间的其它细胞类型的转导看起来类似,AAV1处理的动物中的高度转导的室管膜细胞可能是CSF中的高水平PGRN的来源。由所分泌的PGRN介导的旁观者效应使由GRN突变引起的FTD对AAV基因疗法异常适合。由于细胞外

PGRN可以被神经元摄取,因此使用AAV1载体获得的高CSF PGRN水平——显然由稳健的室管膜细胞转导介导——使AAV1成为GRN基因疗法的理想选择。

[0318] 累计而言,这些研究确定了鞘内AAV递送在大动物模型CSF中达到治疗性PGRN表达水平的潜力。

[0319] 实例5:AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG的功效,(PBFT02)在$Grn^{-/-}$小鼠脑室内施用后确定最小有效剂量(MED)

[0320] 此药理学研究的目的是评估在脑室内(ICV)施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(一种表达人颗粒蛋白前体(GRN)基因的重组腺相关病毒(AAV)血清型1载体,所述人颗粒蛋白前体基因编码颗粒蛋白前体(PGRN)蛋白)后$Grn^{-/-}$小鼠的最低有效剂量(MED)和转基因表达水平。

[0321] 成年$Grn^{-/-}$小鼠(6.5至8.5月龄)接受了AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)的单次ICV施用,施用剂量为四个剂量水平之一:4.4×10^{9}个基因组拷贝[GC]/动物、1.3×10^{10}GC/动物、4.4×10^{10}GC/g动物或1.3×10^{11}GC/动物(分别为1.1×10^{10}GC/g脑、3.3×10^{10}GC/g脑,1.1×10^{11}GC/g脑、3.3×10^{11}GC/g脑)。另外的$Grn^{-/-}$小鼠和C57BL/6J野生型小鼠作为对照施用媒剂(鞘内最终调配物缓冲液[ITFFB])。

[0322] 下表中呈现了组命名、剂量水平和施用途径(ROA)。

[0323] 表.组命名、剂量水平和施用途径

[0324]

组编号	N 和性别	基因型	处理	剂量(GC/动物)	剂量(GC/g 脑)[a]	剂量体积(μL)	ROA	给药日	尸检日
1	6 M、9 F	*Grn*$^{-/-}$	AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG（PBFT02）	1.3×10^{11}	3.3×10^{11}	7.0	ICV	1	90 ± 3
2	9 M、6 F	*Grn*$^{-/-}$	AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG（PBFT02）	4.4×10^{10}	1.1×10^{11}	7.0	ICV	1	90 ± 3
3	9 M、6 F	*Grn*$^{-/-}$	AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG（PBFT02）	1.3×10^{10}	3.3×10^{10}	7.0	ICV	1	90 ± 3
4	9 M、6 F	*Grn*$^{-/-}$	AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG（PBFT02）	4.4×10^{9}	1.1×10^{10}	7.0	ICV	1	90 ± 3
5	6 M、9 F	*Grn*$^{-/-}$	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	90 ± 3
6	6 M、9 F	野生型	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	90 ± 3
7	6 M、9 F	*Grn*$^{-/-}$	未经处理	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1[b]
8	9 M、6 F	野生型	未经处理	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1[b]

[0325] [a]使用0.4g成年小鼠的脑质量计算值

[0326] [b]未经处理的基线队列(第7组和第8组)在第7天进行尸检,但出于分析目的,称为第1天。

[0327] 缩略语:F,雌性;GC,基因组拷贝;Grn,颗粒蛋白前体(基因,小鼠);ICV,脑室内;ID,标识号;ITFFB,鞘内最终调配物缓冲液;M,雄性;N,动物数量;N/A,不适用;ROA,施用途径。

[0328] 在基线(第-7天至第0天)时,在给药前从动物收集血液,并且储存以供将来分析。在给药当天(第1天),成年$Grn^{-/-}$小鼠(6.5至8.5月龄)接受AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(4.4×10^{9}GC/动物、1.3×10^{10}GC/动物,4.4×10^{10}GC/动物或1.3×10^{11}GC/动物)或媒剂(ITFFB)的单次ICV施用。年龄匹配的野生型小鼠也作为对照施用媒剂。在给药当天(第1天),还对未经处理的$Grn1^{-/-}$小鼠和野生型小鼠进行尸检作为对照,以评估临床病理学和

组织病理学的基线异常，以及AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)对疾病相关脑异常进展或解决的影响。

[0329] 每天监测施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂的小鼠的活力，并且每周称重。在第90天，对所有存活的小鼠进行尸检。尸检时，分别收集血液和组织进行临床病理学(CBC和血清化学)和组织病理学检查。收集CSF以测量转基因产物表达(人PGRN蛋白)。收集脑组织以评估$Grn^{-/-}$小鼠模型的疾病相关生物标志物特性。这些生物标志物包含脑储存物质积累(脂褐质沉积)和神经炎症(CD68免疫组织化学标记小胶质细胞)，其在丘脑、皮质和海马体中定量。脑第三额叶部分(包含额叶皮质)的裂解物用于评估溶酶体酶HEX的活性。

[0330] 在研究期间，所有组在AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)或媒剂施用后均维持体重(图14)。

[0331] 在AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)施用后90天，在尸检的小鼠的CSF中测量转基因产物表达(人PGRN蛋白)。与媒剂处理的$Grn^{-/-}$对照相比，在两种最高剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(4.4×10^{10}GC和1.3×10^{11}GC)下，CSF中的人PGRN表达增加(图15)。施用两种最低剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(4.4×10^{9}GC或1.3×10^{10}GC)的$Grn^{-/-}$小鼠中的人PGRN表达与媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠和野生型对照相似。然而，PGRN ELISA测定的LOD为1.25ng/mL，因此限制了在两个最低剂量下以及在媒剂处理的$Grn^{-/-}$和野生型对照中检测PGRN表达变化的能力。

[0332] 与媒剂处理的$Grn^{-/-}$对照相比，在第90天，CBC或血清化学小组中未观察到与AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)施用相关的异常。在盲法宏观和微观评估中，没有与AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)施用相关的组织病理学发现。

[0333] 在基线处和AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)施用后90天处死的小鼠的三个脑区(丘脑、皮质和海马体)中定量脂褐质沉积。在基线处和第90天，与皮质和海马体相比，丘脑中的脂褐质沉积更丰富，这表明丘脑可能比其它脑区对评估脂褐质聚集更敏感。在丘脑中，观察到未经处理的$Grn^{-/-}$小鼠的基线脂褐质计数高于未经处理的野生型对照。在第90天，媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠的平均脂褐质计数高于未经处理的$Grn^{-/-}$基线对照，表明脂褐质沉积逐渐增加。相比之下，所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)处理的组(4.4×10^{9}GC/动物、1.3×10^{10}GC/动物、4.4×10^{10}GC/动物和1.3×10^{11}GC/动物)的脂褐质计数显著低于媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠。由于所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)剂量组的脂褐质计数相似，因此未观察到剂量依赖性应答。由于所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)处理的组的平均脂褐质计数与未经处理的$Grn^{-/-}$基线对照相似，因此在90天的研究期间，所有剂量水平的AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)施用似乎可以防止脂褐质的逐渐累积(图16A至图16C)。在皮质和海马体中，观察到基线处未经处理的$Grn^{-/-}$小鼠的平均脂褐质计数高于未经处理的野生型对照。同样，在第90天，还观察到媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠的平均脂褐质计数高于媒剂处理的野生型小鼠。所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)处理的组(4.4×10^{9}GC/动物、1.3×10^{10}GC/动物、4.4×10^{10}GC/动物和1.3×10^{11}GC/动物)在第90天显示的平均脂褐质计数比媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠少，尽管在1.3×10^{10}GC/动物的剂量下，皮质的脂褐质减少仅在统计学上显著。由于所有四个AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)剂量组的脂褐质计数相似，因此未观察到剂量依赖性应答。

[0334] 在基线处和AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)施用后90天，在尸检的小鼠的三个

脑区(丘脑、皮质和海马体)中定量神经炎性标志物CD68。通过定量CD68染色阳性的组织面积来评估CD68表达。与未经处理的野生型对照相比,在基线处,未经处理的$Grn^{-/-}$小鼠的丘脑、皮质和海马体中观察到更高的平均CD68表达。类似地,与媒剂处理的野生型对照相比,在第90天,媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠的丘脑、皮质和海马体中观察到更高的平均CD68表达。在第90天的丘脑中,观察到三个最高PBFT02剂量组(1.3×10^{10}GC/动物、4.4×10^{10}GC/动物和1.3×10^{11}GC/动物)的总体剂量依赖性应答,与媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠相比,CD68表达显著降低(图17A)。值得注意的是,与媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠相比,施用最高剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)(1.3×10^{11}GC/动物)的小鼠表现出的CD68表达减少了大约4倍。在第90天,所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)处理的组的皮质中CD68的平均表达均减少,尽管减少与媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠的CD68表达无显著差异。未观察到剂量依赖性应答(图17B)。在第90天的海马体中,所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)剂量组(4.4×10^{9}GC/动物,1.3×10^{10}GC/动物、4.4×10^{10}GC/动物和1.3×10^{11}GC/动物)显示CD68表达显著低于媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠。此外,对于所有剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02),CD68表达与媒剂处理的野生型对照相似。此应答不是剂量依赖性的,因为在所有剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)下CD68的表达相似(图17C)。

[0335] 在基线处和AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)施用后90天,对主要由皮质组织组成的脑的第三额叶的裂解物进行HEX活性测定。在基线处,未经处理的$Grn^{-/-}$小鼠的脑HEX活性高于未经处理的野生型对照。在第90天,施用最高AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)剂量(1.3×10^{11}GC/动物)的$Grn^{-/-}$小鼠与媒剂处理的$Grn^{-/-}$小鼠相比,脑HEX活性显著降低。此外,最高剂量组(1.3×10^{11}GC/动物)的HEX活性与媒剂处理的野生型对照相似,表明在此剂量下脑HEX水平正常化(图18)。

[0336] 累计而言,$Grn^{-/-}$小鼠的AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理导致了与剂量相关的组织病理学校正,对最高剂量(1.3×10^{11}GC[3.3×10^{11}GC/g脑])下观察到的脂褐质、神经炎症和溶酶体酶活性具有最广泛的治疗相关影响。最低剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)(4.4×10^{9}GC[1.1×10^{10}GC/g脑])显著改善了患有GRN相关神经变性的患者的关键神经病理特征,包含防止丘脑中的脂褐质积聚和减少海马体中的小胶质细胞浸润(即由CD68表达定义的神经炎症)。而在此剂量下,组织学校正仅限于所检查的脑区的子集(可能是由于与$Grn^{-/-}$小鼠的皮质和海马体相比,丘脑中脂褐质沉积和CD68表达细胞的总体富集程度更高),并且溶酶体酶活性(通过HEX活性测量)未正常化,MED确定为4.4×10^{9}GC(1.1×10^{10}GC/g脑)。

[0337] 实例6:野生型小鼠脑室内施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)后的生物分布和转基因表达

[0338] 此药理学研究的目的是评估在脑室内(ICV)施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)(一种表达人颗粒蛋白前体(GRN)基因的重组腺相关病毒(AAV)血清型1载体,所述人颗粒蛋白前体基因编码颗粒蛋白前体(PGRN)蛋白)后,野生型小鼠体内的载体生物分布和转基因表达水平。

[0339] 给药当天(第1天),成年C57BL/6J野生型小鼠(3.5至5.5月龄)接受AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)(1.3×10^{11}基因组拷贝[GC]/动物[3.3×10^{11}GC/g脑])或媒剂(鞘内最终调配物缓冲液[ITFFB])的单次ICV施用。

[0340] 下表中呈现了组命名、剂量水平和施用途径(ROA)。

[0341] 表.组命名、剂量水平和施用途径

[0342]

组编号	N和性别	基因型	处理	剂量(GC/动物)	剂量(GC/g脑)[a]	剂量体积(μL)	ROA	给药日	尸检日
1	2M、2F	野生型	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	10±2
2	4M、4F	野生型	AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG（PBFT02）	1.3×10^{11}	3.3×10^{11}	7.0	ICV	1	10±2
3	2M、2F	野生型	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	30±3
4	4M、4F	野生型	AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG（PBFT02）	1.3×10^{11}	3.3×10^{11}	7.0	ICV	1	30±3

[0343]

5	2M、2F	野生型	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	60±3
6	4M、4F	野生型	AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG（PBFT02）	1.3×10^{11}	3.3×10^{11}	7.0	ICV	1	60±3
7	2M、2F	野生型	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	90±5
8	4M、4F	野生型	AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG（PBFT02）	1.3×10^{11}	3.3×10^{11}	7.0	ICV	1	90±5

[0344] [a]使用0.4g成年小鼠的脑质量计算值

[0345] 缩略语:F,雌性;GC,基因组拷贝;ICV,脑室内;ID,标识号;ITFFB,鞘内最终调配物缓冲液;M,雄性;N,动物数量;N/A,不适用;ROA,施用途径。

[0346] 选择1.3×10^{11}GC/动物的AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)剂量,因为其是剂量范围研究中评估的最高剂量,确定了最小有效剂量(实例5),并且接近小鼠的最大可行剂量,这受到体积限制和预期载体滴度的限制。预计此剂量能够全面评估小鼠在靶系统(CNS)以及血液和外周组织中的载体分布和转基因产物表达。

[0347] 给药当天(第1天),成年野生型小鼠(3.5至5.5月龄)接受AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)(1.3×10^{11}GC/动物)或媒剂(ITFFB)的单次ICV施用。每天监测所有小鼠的活力,并且每周称重一次。在第10天、第30天、第60天和第90天进行尸检时收集CSF、血清和全面的组织列表,以评估载体生物分布和转基因产物表达(人PGRN蛋白)。

[0348] 在整个研究过程中未发现与AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)施用相关的临床异常。在研究期间,所有组在AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)或媒剂施用后均维持体重(图9)。

[0349] 在载体施用后第10天,在AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的小鼠的靶组织(脑)和所有外周组织(心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏和骨骼肌)中可检测到AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体基因组。尽管在一些器官中,组织内载体基因组水平在第30天、第60天和第90天波动,但通常在第10天之后观察到v载体基因组水平的下降趋势,所有组织在第90天最终表现出比第10天更低的载体基因组水平。一个值得注意的例外是肾脏,其在第90天和第10天显示了类似水平的载体基因组。在整个研究过程中,与所有其它组织相比,脑呈现出最高浓度的载体基因组。在肝脏、脾脏、肾脏和心脏中观察到较低水平的载体基因组。在整个研究过程中,肺和骨骼肌表现出最低水平的载体基因组(图20)。

[0350] 在整个研究过程中,除了第60天(分别为动物8和7,[第5组])的脑和肺以及第30天(动物18[第3组])的心脏外,在媒剂处理的小鼠的组织中检测不到AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体基因组。由于在这些组织中观察到了低水平的载体基因组,其在媒剂处理的

小鼠中的存在可能是由于样品处理期间的污染。

[0351] 在向野生型小鼠施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)或媒剂后的第10天、第30天、第60天和第90天，在靶器官系统(CNS)以及血清和外周器官中测量转基因产物表达(人PGRN蛋白)。在CSF中，在整个研究过程中评估的所有媒剂处理的小鼠(14/14的动物)中均未检测到人PGRN表达水平。相比之下，AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)施用导致与媒剂处理的对照相比，第10天和第30天CSF中的人PGRN表达水平显著升高。尽管与媒剂处理的对照相比，第60天和第90天的表达水平没有显著升高，但在大多数评估的AAV1.CB7.CI.HPGRN.RBG(PBFT02)处理的小鼠(第60天2/5的动物，以及第90天7/8的动物)的CSF中仍然能检测到人PGRN表达。

[0352] AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的小鼠在第10天、第30天和第90天的平均人PGRN CSF浓度分别为49.93ng/mL、34.97ng/mL和31.41ng/mL。第60天是唯一的离群点，平均人PGRN浓度较低，为1.46ng/mL。尚不清楚为什么第60天人PGRN表达水平比其它时间点的AAV1.CB7.CI.HPGRN.RBG(PBFT02)处理的组低。此研究未分析人转基因产物的抗体;然而，第60天AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的组中的动物可能对人转基因产物具有抗体应答(图21)。

[0353] 在脑中，AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的小鼠在第10天、第30天和第90天与相同时间点的媒剂处理的对照相比，人PGRN水平显著升高。与在CSF中观察到的类似，与媒剂处理的对照相比，第60天脑中的人PGRN表达水平没有显著升高，这可能是由于第60天组中对人转基因产物的抗体应答(图21)。

[0354] 在脊髓中，在第10天、第30天、第60天或第90天，AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)施用并未显著增加人PGRN表达，使其高于媒剂处理的对照水平(图21)。

[0355] 在血清中，在第10天、第30天、第60天或第90天，AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)施用并未显著增加人PGRN表达，使其高于媒剂血清对照水平(图22)。

[0356] 在研究期间，AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的小鼠的肾脏、骨骼肌或颈淋巴结中未观察到人PGRN表达的显著升高。然而，AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的小鼠在心脏、肝脏和脾脏中表现出人PGRN表达的瞬时升高。在心脏和肝脏中，AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的小鼠在第60天表现出与媒剂处理的对照相比显著升高的人PGRN表达水平，但在第10天、第30天或第90天没有。在脾脏中，AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的小鼠在第10天表现出与媒剂处理的对照相比显著升高的人PGRN水平，但在第30天、第60天或第90天没有(图23A至图23F)。

[0357] 尽管AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体基因组在鞘内施用后广泛分布于组织中，但用于治疗GRN相关神经变性的靶器官系统(即CNS)在整个研究中表现出最高的载体转导整体水平和持续的转基因产物表达。

[0358] 实例7:成年恒河猴小脑延髓池内施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)的毒理学和生物分布

[0359] 此毒理学研究的目的是评估在非人灵长类动物(NHP)的小脑延髓池内(ICM)施用后，AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)(一种表达人颗粒蛋白前体(PGRN)蛋白的重组腺相关病毒血清型1(AAV1)载体)的安全性、耐受性、生物分布和排泄(脱落)情况。

[0360] 成年雄性和雌性恒河猴接受了单次ICM施用媒剂(鞘内最终调配物缓冲液

[ITFFB])或AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02),剂量为:3.0×10^{12}个基因组拷贝(GC)(低剂量;3.3×10^{10}GC/g脑)、1.0×10^{13}GC(中剂量;1.1×10^{11}GC/g脑)或3.0×10^{13}GC/g(高剂量;3.3×10^{11}GC/g脑)。

[0361] 剂量施用日(第0天)与表示尽可能多的研究组的动物跨施用日期交错。下表中总结了研究设计。

[0362] 表.组命名、剂量水平和施用途径

[0363]

组	处理(剂量)	剂量(GC)	剂量(GC/g脑)	动物ID	性别	ROA	施用体积(mL)	给药日	尸检日
1	ITFFB（媒剂）	N/A	N/A	171123	雌性	ICM	1.5	0	90±5
				181323	雄性				
2	AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG（PBFT02）（低剂量）	3.0×10^{12}	3.3×10^{10}	171229	雌性				
				171250	雌性				
				180668	雄性				
3	AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG（PBFT02）（中剂量）	1.0×10^{13}	1.1×10^{11}	171118	雌性				
				171306	雄性				
				171311	雄性				
4	AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG（PBFT02）（高剂量）	3.0×10^{13}	3.3×10^{11}	171209	雄性				
				171246	雌性				
				181330	雄性				

[0364] 缩略语:GC,基因组拷贝;ICM,小脑延髓池内;ID,标识号;ITFFB,鞘内最终调配物缓冲液;N/A,不适用;ROA,施用途径。

[0365] 评估的最高剂量(3.0×10^{13}GC)是基于预期载体滴度和最大施用体积的最大可行剂量。中剂量(1.0×10^{13}GC)和低剂量(3.0×10^{12}GC)分别是最大可行剂量的1/3和1/10。选择此范围是为了确保剂量不同,并且涵盖小鼠药理学研究中评估的剂量范围。

[0366] 此研究包含第90天尸检时间点。在之前的ICM项目中,已经观察到DRG和TRG神经元毒性,动力学可再现。载体施用后14天至21天内,DRG和TRG神经元持续变性。在细胞体变性之后,在载体施用后约30天,这些细胞的轴突在外周神经和脊髓背柱中发生变性(轴突病)。在载体施用后90天处死的动物中,轴突变化继续可见。在载体施用后180天,组织学病变的严重程度有时与第30天或第90天类似,但通常有所改善,可能是因为变性的神经元以及其相关轴突已被巨噬细胞清除,所述巨噬细胞出现在较早的处死时间点。基于这些动力学,预计90天的尸检时间点将足以评估DRG和TRG组织学发现以及任何相关的临床体征。

[0367] 在AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)施用前以及施用后第14天、第28天和第90天,在基线处进行标准化神经检查。动物偶尔不配合检查,排除了一些评估。然而,在大多数时间点,对每只动物进行了检查的所有必要组分的评估。一只施用中剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)(1.0×10^{13}GC;动物171311,第3组,N=1/3)的动物在第90天没有退避反射。然而,观察到所述动物用双手和双脚抓住笼杆和格栅,并且正常行走。无应答归因于焦虑,而不是深度疼痛感的丧失。在整个研究过程中,没有发现其它异常的神经体征。

[0368] 在AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)施用之前以及第28天和第90天,对所有动物在基线处进行感觉神经传导研究,以测量双侧正中神经感觉动作电势振幅和传导速度(图25)。

[0369] 对于SNAP振幅,动物间和动物内的变化性是明显的,尽管值通常保持在基线测量范围内(图26A)。一只媒剂处理的动物(ITFFB;动物171123,第1组,1/2的动物)和一只施用低剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)(3.0×10^{12}GC;动物180668,第2组,1/3的动物)的动物在第90天表现出单侧正中神经SNAP振幅的显著降低。一只施用高剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)(3.0×10^{13}GC;动物171209,第4组,1/3的动物)的动物在第90天左侧和右侧正中神经的双侧正中神经SNAP振幅均显著降低。这三只动物没有异常临床发现;然而,在高剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)(3.0×10^{13}GC)施用后,动物171209的NCS发现与正中神经的组织病理学发现相关。对于正中神经传导速度,在整个研究过程中,没有观察到任何动物中有显著变化(图26B)。

[0370] 在整个研究过程中,所有动物均维持正常体重(图27)。

[0371] 血液CBC、凝血研究或血清化学小组中未发现与测试制品相关的显著异常。所有组的若干只动物(5/11)在基线处和/或第0天出现短暂的肌酸激酶(CPK)升高(>1000U/L)。由于所有升高都涉及CPK的骨骼肌同种型,因此CPK升高可能是镇静或静脉穿刺期间肌肉创伤的继发,并且因此被认为与测试制品无关。一些AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的动物(2/9;动物180668,3.0×10^{12}GC,第2组;动物171209,3.0×10^{13}GC,第4组)表现出血清碱性磷酸酶(ALP;>600U/L)轻度升高,其最初出现在基线处或第60天。两种动物中ALP升高持续到第90天尸检。ALP具有多种同种型,包含在肝脏、肾脏和骨骼中发现的同种型,并由于动物的年龄,这些变化被认为是最可能的生理性变化。在第90天,在施用低剂量的AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)(3.0×10^{12}GC;动物17229,第2组)的单个动物中观察到轻度血小板减少,但缺乏相关临床体征和低发病率表明,这种减少可能是伪影。

[0372] 一些CSF样品含有红细胞,这归因于CSF收集期间的血液污染。5/9(56%)AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)处理的动物和0/2(0%)媒剂处理的对照中出现轻度脑脊液细胞增多(定义为≥6个白细胞[WBC]/μL)。脑脊液细胞增多是淋巴细胞性的(主要由淋巴细胞或淋巴细胞和巨噬细胞的混合物组成),并且被认为是与测试制品相关的(图28)。一只高剂量动物(3.0×10^{13}GC;动物171209,第4组)在第7天、一只高剂量动物(3.0×10^{13}GC,动物181330,第4组)在第14天、一只中剂量动物(1.0×10^{13}GC;动物171306,第3组)在第28天和一只低剂量动物(3.0×10^{12}GC;动物171229,第2组)在第60天出现了8WBC/μL至18WBC/μL的峰值CSF WBC计数。中剂量组中的一只动物(1.0×10^{13}GC;动物171118,第3组)在第28天和第90天表现出18WBC/μL的两个峰值CSF WBC计数,尽管第28天的结果可能是由于样品中的血液污染造成的伪影。在所有动物中,脑脊液细胞增多是自我限制的,并且与临床后遗症无关。

[0373] 在AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(PBFT02)施用前,3/11的动物(27%)的血清中可检测到针对AAV1衣壳的预先存在的NAb。媒剂处理的动物在第90天时血清NAb滴度没有表现出变化,而所有施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)的动物在第90天时,血清NAb滴度均表现出增加。低剂量(3.0×10^{12}GC)、中剂量(1.0×10^{13}GC)和高剂量(3.0×10^{13}GC)的NAb滴度在第90天相当,表明缺乏剂量依赖性应答。另外,在AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)以任何评估剂量施用之前,AAV1 NAb应答的量值似乎不受预先存在的AAV1 NAb的影响。下表中总结了血清中对AAV1的NAb应答。

[0374] 表.ICM施用AAV1.CB7.CI.HPGRN.RBG(PBFT02)后,血清中存在的针对AAV1衣壳的

中和抗体

[0375]

组	处理	剂量	动物ID	HEK293细胞中的AAV1 NAb[1,2]		
		(GC)		BL	第0天	第90天
1	ITFFB	N/A	171123	160	320*	160
			181323	<5	<5	<5
2	AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG (PBFT02)	3.0×10^{12}	171229	<5	<5	5120*
			171250	20	40	2560*
			180668	<5	<5*†	5120*
3	AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG (PBFT02)	1.0×10^{13}	171306	<5	<5*†	2560+
			171118	<5	<5*†	10240+
			171311	<5	<5*†	2560*
4	AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG (PBFT02)	3.0×10^{13}	171209	<5	<5*†	5120+
			171246	160	80*†	5120
			181330	<5	<5	5120+

[0376]

[0377] 呈现了在BL处和研究第0天和第90天,每只动物的血清稀释抑制AAV1.CMV.LacZ转导(β-gal表达)≥50%的倒数。蓝色阴影表示阴性NAb应答(<5;低于测定的LOD),而橙色表示阳性NAb应答。

[0378] *表示对样品进行了两次测试以确定终点滴度,并且第二数据集在表中示出。+表示对样品进行了三次测试以确定终点滴度,并且第三数据集在表中示出。†表示由于第一次测定中的高背景,再次测试了样品。由于高背景而重新测试的所有样品显示NAb滴度在原始值的2倍稀释范围内。

[0379] 缩略语:AAV1,腺相关病毒血清型1;BL,基线;GC,基因组拷贝;HEK293,人胚胎肾293;ID,标识号;ITFFB,鞘内最终调配物缓冲液;LOD,检测限;N/A,不适用;NAb,中和抗体。

[0380] 如图29中所总结的,在整个研究长度期间,两种媒剂处理的对照动物(ITFFB;2/2的动物)对衣壳(AAV1)和转基因产物(人PGRN)的IFN-γT细胞应答均保持阴性。相反,AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)施用在8/9(89%)的NHP中引发了对AAV1衣壳和/或人PGRN的IFN-γT细胞应答。单个非应答者是施用中剂量的动物(3.0×10^{12}GC;动物171311,第3组)。

[0381] 在显示IFN-γT细胞应答的动物中,6/8(75%)显示出对AAV1衣壳的阳性应答,并且6/8(75%)具有针对人PGRN的应答。在这些动物中,2/8(25%)的NHP仅对AAV1衣壳表现出T细胞应答,而2/8(25%)的NHP仅对人PGRN表现出T细胞应答。对AAV1衣壳的IFN-γ应答很低,每百万细胞中有58个至188个点形成单位(SFU)。在显示对AAV1衣壳有应答的六只动物中,3/6(50%)在研究期间的单个时间点显示出低瞬时IFN-γ应答,包含低剂量组(3.0×10^{12}GC;动物171250,第2组)中的一只动物、中剂量组(1.0×10^{13}GC;动物171118,第3组)中的一只动物和高剂量组(3.0×10^{13}GC;动物171209,第4组)中的一只动物。剩余3/6的动物(50%)表现出更持久的应答,开始于PBMC,并且在第90天尸检时通过至少一个组织淋巴细胞群体。只有2/6(33%)的NHP对肝脏中的AAV1衣壳有可检测到的IFN-γ应答。

[0382] 对于6/8只对人PGRN表现出IFN-γ应答的动物,除了高剂量组(3.0×10^{13}GC;动物171209,第4组)中单个动物的肝脏应答外,所有观察到的应答均较低(每百万细胞60至200SFU),其中第90天观察到中度至高度阳性应答(每百万个细胞280至520SFU)。对人PGRN的IFN-γ应答在尸检时分离的肝淋巴细胞(6/6的动物[100%])中比PBMC(4/6的动物

[67%])或脾细胞(2/6的动物[33%])中更普遍。

[0383] 对衣壳和转基因产物的T细胞应答与异常临床观察或血液学、凝血和血清化学参数的变化无关。

[0384] 未观察到测试品有关的大体发现。所有的总发现都被认为是偶然的。主要在DRG、三叉神经节TRG、脊髓背侧白质束和外周神经内观察到与测试制品相关的结果。这些发现由背根神经节(DRG)和三叉神经节(TRG)内单核细胞浸润的神经元变性组成,并且伴有脊髓背侧白质束和外周神经内的轴突变性(即轴突病),伴有或不伴有纤维化。总体而言,在所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的组中观察到这些发现。中剂量(1.0×10^{13}GC)和高剂量(3.0×10^{13}GC)组动物中的这些发现的严重程度往往更高。无论剂量如何,脊髓和外周神经中DRG/TRG变性和轴突病的发生率都相似,而在中剂量(1.0×10^{13}GC)和高剂量(3.0×10^{13}GC)下观察到更高的纤维化发生率。其它与测试制品相关的发现包含注射部位处的骨骼肌和脂肪组织的慢性炎症。

[0385] DRG/TRG神经元变性

[0386] 在所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)治疗的组中观察到DRG中的神经元细胞体变性和单核细胞浸润,其将轴突集中投射到脊髓背侧白质束,并且向外周神经外周投射。在TRG中观察到类似的发现。低剂量(最小;[3.0×10^{12}GC;第2组,2/3的动物,6/12的神经节])DRG/TRG神经元变性的严重程度最低,高剂量组紧随其后(最小至轻度;[3.0×10^{13}GC;第4组,3/3的动物,6/12的神经节])。尽管中剂量组的总体严重程度最高(最小至轻度;[1.0×10^{13}GC;第3组,3/3的动物,7/12的神经节]),但中剂量组与高剂量组之间未观察到明显的剂量应答。所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的组(第2组至第4组)的发病率相似。在一个媒剂处理的对照(动物171123[ITFFB;第1组,1/2的动物])中发生了最小神经元细胞体变性,但此发现与程序与背景的关系尚无法确定。另外,在中剂量组中的一只动物(动物171306[1.0×10^{13}GC;第3组,1/3的动物])和高剂量组中的一只动物(动物171209[3.0×10^{13}GC;第4组,1/3的动物])的脑神经IX、X和/或XI中观察到最小的轴突病。

[0387] 脊髓轴突病

[0388] DRG变性导致脊髓背侧白质束的轴突病。虽然AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的组的轴突病发生率相似,但观察到严重程度的剂量依赖性增加。严重程度从低剂量组(3.0×10^{12}GC;第2组,3/3的动物)的最小增加到中剂量(1.0×10^{13}GC[第3组,3/3的动物])和高剂量组(3.0×10^{13}GC[第4组,3/3的动物])的最小至显著。值得注意的是,中剂量组中的一只动物(动物171306[1.0×10^{13}GC;第3组,1/3的动物])和高剂量组中的一只动物(动物171209[3.0×10^{13}GC;第4组,1/3的动物])显示出总体严重程度高于施用相同剂量的其它动物。

[0389] 外周神经轴突病

[0390] DRG变性导致外周神经轴突病。外周神经轴突病表现出剂量依赖性应答。低剂量组的严重程度最低(最小至轻度;[3.0×10^{12}GC;第2组,23/30的神经]),并且从中剂量组(最小至中度;[1.0×10^{13}GC;第3组,26/30的神经])到高剂量组(最小至中度;[3.0×10^{13}GC;第4组,23/30的神经]升高。然而,所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的组的发病率相对相似。在对照动物(动物171123[ITFFB;第1组,1/30的神经])中很少观察到最小轴突病变,并且被认为是偶然的。

[0391] 神经内膜纤维化

[0392] 在外周神经中观察到剂量依赖性神经内膜纤维化(也称为轴突周围纤维化或神经周纤维化),并且认为其继发于轴突损伤。在低剂量组(3.0×10^{12}GC;第2组)的外周神经中未观察到纤维化,而从中剂量组(1.0×10^{13}GC;第3组,2/3的动物,4/30的神经)到高剂量组(3.0×10^{13}GC;第4组,2/3的动物,6/30的神经),观察到发病率和严重程度两者均增加的最小至中度纤维化。中剂量组中的一只动物(动物171306[1.0×10^{13}GC;第3组,1/3的动物])和高剂量组中的一只动物(动物171209[3.0×10^{13}GC;第4组,1/3的动物])观察到外周神经纤维化的发生率和严重程度最高,这与脊髓轴突病发现的严重程度相关。中剂量组中的一只动物(动物171306[1.0×10^{13}GC;第3组;1/3的动物,1/12的神经节)腰椎段的DRG神经根内也观察到轻度神经内膜纤维化,并且被认为是继发于轴突损伤。

[0393] 注射部位发现

[0394] 在所有组(包含对照动物)中观察到局部注射部位发现。在ICM注射/CSF收集部位和周围区域,媒剂处理的对照动物在骨骼肌筋膜内表现出最小的局部急性炎症或骨骼肌内的单核细胞浸润(ITFFB,第1组,2/2的动物)。AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的动物表现出这些发现的严重程度增加,由骨骼肌和脂肪组织中的最小至中度慢性炎症(9/9的动物)以及相关的肌纤维变化(8/9的动物)组成。AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的动物的注射部位发现的严重程度没有剂量依赖性。这些注射部位发现在一定程度上被认为与ICM注射和/或重复CSF收集有关。然而,由于测试制品的局部应答,可能会恶化。

[0395] ICM施用后,在CSF和外周血两者中均检测到AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体DNA。CSF中AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)的浓度在评估的第一时间点(第7天)后迅速下降,并且到第60天,除低剂量组中的一只动物(3.0×10^{12}GC;动物171229,第2组)和高剂量组中一只动物(3.0×10^{13}GC;动物181330,第4组)外,大多数动物都检测不到。对于动物171229和动物181330两者,在第60天的最后采样时间点,CSF中AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体DNA浓度呈下降趋势。AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体DNA浓度在血液中的下降较慢,这可能与外周血细胞的转导有关。峰值载体浓度在CSF或外周血中均不表现出剂量依赖性(图30)。

[0396] 在第0天,中剂量组中的两只动物(动物171306和171311[1.0×10^{13}GC;第3组])的CSF中检测到AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体DNA,但没有检测到血液。对第0天AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)阳性的CSF样品进行重新测试以证实结果。第0天CSF中检测到低水平的AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体DNA可能是由于ICM施用程序期间CSF样品污染所致。

[0397] 在载体施用后的第5天,在8/9的动物的尿液和所有能够分析的动物(5/5的动物)的粪便中检测到AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体DNA。在AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)施用后的第28天,所有动物(9/9的动物)的尿液中均未检测到AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体DNA。AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)载体DNA在第28天能够分析的所有动物的粪便中检测不到(3/3的动物),并且在第60天证实在所有粪便样品中检测不到(9/9的动物)。峰值尿液和粪便载体浓度不表现剂量依赖性。

[0398] 转基因产物表达(人PGRN蛋白)在媒剂处理的对照动物的CSF中检测不到。ICM施用AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)后,到第7天,所有动物的CSF和血清中都可检测到人

PGRN，只有一只低剂量动物(3.0×10^{12}GC；动物171250，第2组)和一只高剂量动物(3.0×10^{13}GC；动物171246，第4组)直到第14天才在CSF中表达可检测到的人PGRN。这两只动物都具有针对AAV1衣壳的基线NAb。CSF和血清两者的表达均为剂量依赖性(图32)。

[0399] 在CSF中，在第14天，1/3只中剂量动物(1.0×10^{13}GC；第3组)和2/3只高剂量动物(3.0×10^{13}GC；第4组)中观察到最大的人PGRN表达。低剂量组中的所有动物(3.0×10^{12}GC；第2组，N＝3/3)在第28天达到最大表达，中剂量组中的2/3的动物(1.0×10^{13}GC；第3组)和高剂量组中的1/3的动物(3.0×10^{13}GC；第4组)也达到了最大表达。在最大表达时，在中剂量组(11.58ng/mL)和高剂量组(11.77ng/mL)中观察到的人PGRN的平均浓度是在低剂量组(5.27ng/mL)中观察到的人PGRN的平均浓度的大约2倍(图32)。

[0400] 在血清中，除低剂量组中的一只动物(3.0×10^{12}GC；动物171229，第2组)和中剂量组中的一只动物(1.0×10^{13}GC；动物171118，第3组)外，大多数动物在第14天观察到人PGRN的最大表达，这两只动物在第28天都表现出最大表达。在低剂量(3.0×10^{12}GC，第2组)、中剂量(1.0×10^{13}GC，第3组)和高剂量(3.0×10^{13}GC，第4组)组中分别观察到109.03ng/mL、240.12ng/mL和430.52ng/mL的平均最大表达水平(图33)。

[0401] 到第60天，在所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的动物中，CSF和血清中的人PGRN表达从最高水平下降(图34)。这种下降一直持续到第90天，并且与所有AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的动物的CSF和血清两者中抗人PGRN抗体的出现相关(图34)。

[0402] 在第90天，在脑、脊髓、DRG、肝脏和脾脏中检测到高水平的载体基因组(图35)。在CNS组织中检测到的载体基因组的量通常观察到为剂量依赖性。与所有其它AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)处理的NHP相比，一只低剂量动物(3.0×10^{12}GC；动物171250，第2组)和一只高剂量动物(3.0×10^{13}GC；动物171246，第4组)中存在针对AAV1衣壳的基线NAb，这与肝脏的载体分布显著减少相关。

[0403] AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)施用导致DRG和TRG感觉神经元(8/9的动物)以及其相关的中枢和外周轴突(9/9的动物)的无症状变性。这些病变的严重程度从最小到轻微。这些发现表明，中剂量组和高剂量组的病变更严重。在脊髓轴突丢失和外周神经纤维化最严重的两只动物中，高剂量组中的一只动物(动物171209；3.0×10^{13}GC[3.3×10^{11}GC/g脑])在第90天显示双侧正中神经感觉动作电势幅度显著降低。由于在所有剂量组中均存在无症状的感觉神经元病变，因此未定义无观察不良反应水平(NOAEL)。评估的最高剂量(3.0×10^{13}GC)被视为最大耐受剂量(MTD)。

[0404] 实例8：人试验

[0405] 对GRN基因突变导致的成人发作性神经退行性疾病(包含额颞叶痴呆)患者进行了首次人体(FIH)1b期单次施用PBFT02的剂量递增研究(在下表中总结)。PBFT02旨在取代GRN基因。目前尚无用于由GRN单倍型不足引起的成人发作性神经退行性病变的疾病修饰疗法。疾病管理包含旨在减少疾病相关行为、认知和/或移动症状的支持性护理和标签外治疗。因此，这种疾病谱代表了高度未被满足的医疗需求的地区。这项FIH研究评估了安全性和耐受性，并且收集了对功效的初步数据。

[0406]

方案标题：	一项 1b 期开放标签、多中心、剂量递增研究，以评估单剂量 PBFT02 递送到患有额颞叶痴呆（FTD）和颗粒蛋白前体基因（*GRN*）突变的成年受试者的小脑延髓池内（ICM）的安全性、耐受性和药效学效应
方法学	前瞻性、多队列、开放标签、剂量递增研究。
研究持续时间	这将是一项为期 24 个月的研究。纳入将以滚动方式进行。为期 24 个月的研究之后将延长 36 个月。每名受试者的纳入时间将为总共 5 年。
研究群体	年龄为≥ 35 岁且≤ 75 岁的 FTD 受试者（定义为临床痴呆评定量表[CDR®]加上国家阿尔茨海默氏病协调中心额颞叶退化[NACC FTLD]全球评分= 0.5 或 1.0）和 GRN 突变（FTD-GRN）的遗传证据
受试者数量：	至多 15 名可评估受试者
目的：	*主要结果量度：* 安全性、耐受性 *次要结果量度：* *颗粒蛋白前体水平的药效学血浆和 CSF 生物标志物* 疾病进展 ● 疾病病理生理学的生物标志物，包含但不限于： ○ CSF 和血浆神经丝轻链（NfL） ○ 血浆胶质原纤维酸性蛋白（GFAP） ○ CSF t-τ、p-τ181 ● 脑体积、皮质厚度和白质完整性的 MRI 测量 ● 眼相干断层扫描（视网膜脂褐质评估） 临床进展 ● 行为、语言和认知评估 ○ CDR 加 NACC FTLD 总和（SB） ○ 额叶功能评定量表（FAB） ○ 额颞叶痴呆评定量表（FRS） ○ 波士顿命名测试（Boston Naming Test，BNT） ○ 多语言命名测试（MINT） ○ 数字范围测试 ○ 语言流畅性（音素测试） ○ 语义流畅性 ○ 连线测试（口头适应） ○ 加利福尼亚词语学习测试（California Verbal Learning Test）–简短形式（10 分钟回忆） ○ 本森复杂图形副本（Benson Complex Figure Copy）（10 分钟回忆） ○ 蒙特利尔认知评估（Montreal Cognitive Assessment，MoCA） ● 生活质量和功能活动评估 ○ 功能活动问卷（FAQ）

[0407]

	○ 施瓦布和英格兰日常生活活动量表（Schwab and England Activities of Daily Living scale，SEADL） ○ 临床总体变化和严重程度印象量表（CGI-C 和 CGI-S） 评估 PBFT02 对存活的影响
研究设计概述	这是一项 1b 期、首次人体（FIH）、前瞻性、多队列、开放标签、单臂、多中心、剂量递增研究。计划将至多十五名年龄≥ 35 岁且≤ 75 岁的患有早期症状 FTD-GRN 的受试者纳入研究。符合条件的受试者将通过 ICM 施用接受单剂量的 PBFT02。每名受试者的总体研究持续时间计划为总共 5 年；设计包含筛查、基线确定和载体施用（即治疗）以及随访。5 年随访期从给药当天开始。研究将分为两个部分进行：为期 24 个月的主要研究和为期 36 个月的延长研究。研究由至多 3 个队列组成，每个队列至多 5 名受试者，以单次 ICM 注射的方式施用 AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG（PBFT02）。在第一队列中，每名受试者按顺序纳入并施用最低计划剂量，每名受试者之间有预定的安全观察期。如果未观察到预定义的安全性审查触发因素，则独立数据监测委员会（IDMC）将在第一队列中最后一名受试者施用 AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG（PBFT02）后的预定时间审查第一队列的所有可用数据。 如果决定继续进行更高剂量，则下一队列至多 5 名受试者依次纳入并接受更高剂量，每名受试者之间有预定的安全观察期。如果未观察到预定义的安全性审查触发因素，则独立数据监测委员会（IDMC）将审查第二队列的所有可用数据。计划至多 3 个剂量递增队列，每个队列至多 5 名受试者。
受试者数量	在美国和美国以外的多个临床中心，有至多 15 名患有 FTD 和 *GRN* 单倍型不足的成年患者。
主要纳入和排除标准	纳入标准 1. 纳入时年龄≥ 35 岁且≤ 75 岁的男性或女性 2. 被证明是标记为 FTD 原因的 GRN 突变携带者 3. 筛查时血浆 PGRN 水平降低 4. 根据当前国际公认的诊断标准进行临床诊断 5. 血浆 NfL 水平> 50 pg/mL 6. 有可靠的通知人/看护人（以及后备通知人/看护人），其至少每周亲自与受试者交谈或查看受试者 7. CDR 加 NACC FTLD 总体评分 0.5 至 1.0 8. 应该住在社区（即不是养老院）；研究者可以自行决定是否允许某些水平的辅助生活 排除标准 1. 阿尔茨海默氏病（AD）的生物标志物证据。 2. 在 AD&FTDMDB 中将 GRN 突变分类为“非致病性”、“可能良性变异”、“良性变异”或“致病性质不明确” 3. 既往任何基因疗法。任何可能改变 PGRN 水平的其它疗法必须在进入此研究前至少经过 5 个半衰期的洗脱

[0408]

	4. 纯合 GRN 突变携带者 5. 罗斯改良的哈金斯基缺血性评分（Rosen-modified Hachinski Ischemic Scale score）> 7 6. 已知存在可以合理解释有症状受试者的症状的结构性脑损伤（例如，肿瘤、皮质梗塞） 7. 基于基因测试历史（如果进行），已知 PSEN1、PSEN2 或 APP 中存在导致 AD 的突变 8. 科萨科夫脑病（Korsakoff encephalopathy）既往史 9. 未经治疗的 B12 缺乏史是排除性的，除非后续实验室测试（同型半胱氨酸和甲基丙二酸）表明值在生理学上不显著。研究者在审查其诊断和治疗史记录后，可以纳入补充 B12 治疗的受试者，以确保疾病/治疗的稳定性和依从性 10. 不受调控的甲状腺功能减退症（促甲状腺激素[TSH] >正常的 150%）的病史或实验室测试证据 11. 血清肌酐> 2 mg/dL 12. 肝酶升高（丙氨酸转氨酶[ALT]或天冬氨酸转氨酶[AST] > 2 × 正常上限[ULN]或总胆红素> ULN） 13. 需要补充氧气的呼吸衰竭 14. 无法提供完全准许，或缺乏可以提供准许的具备适度接触的合法授权的照顾者 15. MRI 或腰椎穿刺（LP）的任何禁忌症（例如，局部感染、血小板减少、凝血病史） 16. ICM 施用程序的任何禁忌症 17. 可能增加小脑延髓池内注射、麻醉、LP 和/或 MRI 并发症风险的医学病状或实验室或生命体征异常 18. 免疫功能不全的患者 19. 外周轴突感觉神经病 20. 给药后 14 天内接种疫苗 21. 人类免疫缺陷病毒（HIV）或乙型肝炎或丙型肝炎的阳性测试结果；1 年内或筛查时确定的结核分枝杆菌（Mycobacterium tuberculosis）阳性测试 22. 恶性肿瘤（局部皮肤癌除外）或有遗传性癌症综合征病史。先前成功治疗恶性肿瘤并进行充分随访以排除复发（基于肿瘤学家意见）的受试者可以包含在内。受试者的年龄和性别适当的癌症筛查必须是最新的 23. 研究者认为可能导致与 GRN 突变无关的认知障碍的任何并发疾病，包含导致痴呆、神经梅毒、脑积水、中风、小血管缺血性疾病、不受控制的甲状腺功能减退或维生素缺乏的其它原因 24. 针对有生育潜能、在筛查访视时通过血清妊娠测试呈阳性、在施用研究产品前第 1 天通过血清结果呈阳性或在研究期间不愿意进行另外妊娠测试的女性。有生育潜力的女性必须使用高度有效的节育方法，或在给药后 90 天之内禁欲 25. 正在哺乳的妇女 26. 针对有生育潜能、不愿意使用医学上可接受的双屏障避孕（如与杀

[0409]

	精剂一起使用的避孕套/隔膜）方法或从筛查之日开始到给药后 90 天参与禁欲的男性 27. 研究人员认为，将给受试者带来不必要的风险或将干扰研究产物的评估或对受试者安全性或研究结果的解释的任何病状（例如，任何疾病病史、任何当前疾病的证据、任何身体检查时的发现或任何实验室异常。 28. 纳入 30 天内需要住院的任何急性疾病 29. 不符合方案规定的凝血测试标准的受试者 30. 筛查前 2 周内使用抗凝剂或研究期间预期使用抗凝剂是排除性的。抗血小板疗法可能是可以接受的 31. 已知或疑似对 PBFT02、其任何成分或密切相关的化合物不耐受或过敏
• 结果量度	*参见“目的”*
施用途径	在第 1 天，通过计算机断层扫描（CT）引导的枕下注射到小脑延髓池中（小脑延髓池内），将 PBFT02 作为单剂量向受试者施用。在第 1 天，由现场研究药房使用药房手册中提供的剂量计算制备研究药物的适当浓度。根据为研究制定的注射程序，将产品递送到小脑延髓池中。
安全性评估	安全性评估，包含不良事件（AE）和严重不良事件（SAE）的收集、身体和神经系统检查、生命体征、临床实验室测试（血清化学、血液学、凝血、肝酶和胆红素、尿液分析）、心电图（ECG）、神经传导研究（NCS）、总神经病评分护士（TNSn）、载体衣壳蛋白和转基因产物的免疫原性、载体脱落以及 CSF 细胞学和化学（细胞计数、蛋白质、葡萄糖）将在研究计划中指定的时间进行。潜在治疗相关恶性肿瘤的监测：受试者的血液工作将通过全血细胞计数（CBC）小组进行监测，并且受试者将通过 MRI 进行监测，在随访的 5 年内每年对脑和脊髓进行钆造影。
排除标准：	1. 参见上文

[0410] 目标群体:患有FTD和GRN单倍型不足的轻度症状受试者

[0411] 具有纯合GRN突变的受试者被描述为具有更严重和更早发病的巴藤病表型,这是一种影响青少年和年轻成人的溶酶体贮积病,并且因此被排除在此试验之外。GRN单倍型不足导致成人发作性神经退行性病变。在这些患者中,疾病持续时间范围通常为4.9年至10.0年。FTD的平均症状发作年龄为54.8岁至69.5岁,并且到70岁时疾病外显率超过90%。患者普遍表现出渐进的病程。症状发作后的平均存活期为8年,导致平均预期寿命为68±8岁。

[0412] 75岁的最大年龄确保纳入具有合理存活可能性的患者,这允许分析建议的终点,并且降低包含可能存在未发现的导致认知障碍的合并症的老年患者的可能性。

[0413] 目前的临床试验研究群体由年龄在≥35岁且≤75岁的具有致病性杂合GRN突变的早期FTD(CDR加NACC FTLD总体评分=0.5至1.0)的受试者。

[0414] 相信此群体提供了有利的风险/收益概况,因为其在接受治疗时已经出现了疾病的早期临床表现,并且预期在试验过程中会经历其初始临床综合征的进展以及其它FTD表现的发作;但由于其还没有发生广泛的神经退行性病变,其将受益于显著减缓或阻止FTLD病理生理学进展的干预措施。

[0415] FTLD中用于提高CNS颗粒蛋白前体水平以减缓神经退行性病变的疾病机制和基本原理

[0416] GRN编码PGRN蛋白产物(以下称为PGRN),其为分泌的糖蛋白。GRN在全身广泛的组织中表达,包含神经系统。虽然PGRN的确切分子功能尚不清楚,但新的证据表明,PGRN对成人发作性神经退行性变的致病作用与溶酶体的关键作用有关。

[0417] 最近发现PGRN促进溶酶体酸化,并且作为溶酶体蛋白酶的伴侣,包含组织蛋白酶D(CTSD)。与这些活动相一致的是,患有GRN单倍型不足的患者表现出称为脂褐质的自体荧光物质的溶酶体积聚。类似地,至少12种不同的遗传性病症导致神经元的溶酶体中脂褐质的异常积累。所有这些疾病都是由必需溶酶体蛋白缺乏引起的,并且都会导致神经退行性病变。在具有纯合功能缺失GRN突变的患者中也观察到了组织学上相同的溶酶体贮积病变,所述患者在早期就患有进行性神经退行性疾病神经元蜡样质脂褐质沉积症(NCL)(也称为巴藤病)。累计而言,这些观察表明,增加中枢PGRN可能纠正溶酶体病理学,并且减缓FTLD中的神经退行性病变。

[0418] ●AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)基因疗法的基本原理

[0419] 由GRN单倍型不足引起的成人发作性神经退行性病变是基因疗法的有吸引力的候选者,因为其是由分泌蛋白缺乏引起的单基因疾病。虽然新合成的PGRN可以直接从跨高尔基体网络运输到溶酶体,但其也可以通过分拣蛋白或甘露糖-6-磷酸受体被其它细胞分泌和吸收,随后被运送到溶酶体。转基因小鼠在神经元中选择性缺失Grn后,PGRN分泌的一个重要结果已被证实。与在所有细胞类型中完全缺乏PGRN蛋白的Grn-/-动物相比,仅神经元中PGRN表达的消融不会导致神经元脂褐质积累,这表明其它中枢神经系统(CNS)细胞向PGRN缺陷神经元供应PGRN蛋白。因此,在CNS中的细胞的子集中过度表达PGRN可以提供分泌蛋白库,所述库可以被周围细胞吸收,产生交叉校正的可能性。研究动物体内AAV载体的鞘内(IT)递送已被证明可以在整个CNS中转导细胞,这使得此途径成为治疗由GRN单倍型不足引起的FTLD的一种有吸引力的方法。此外,在Grn-/-敲除小鼠和NHP两者中的非临床研究表明,除了解决与Grn-/-敲除小鼠的PGRN缺乏相关的溶酶体贮积病变外,IT AAV递送还导致CSF和CNS中的稳健PGRN表达。

[0420] 研究的基本原理

[0421] FTLD是由五种已知疾病基因之一的突变引起的,其中包含颗粒蛋白前体(GRN)基因。GRN中的所有病理突变均被证实或预测会导致功能丧失,并且导致颗粒蛋白前体(PGN)mRNA水平(约50%)和蛋白质水平(约33%)降低。由GRN单倍型不足引起的FTLD是基因疗法的有吸引力的候选者,因为其是由分泌蛋白缺乏引起的单基因疾病。虽然新合成的PGRN可以直接从跨高尔基体网络运输到溶酶体,但其也可以通过分拣蛋白或甘露糖-6-磷酸受体被其它细胞分泌和吸收,随后被运送到溶酶体。研究动物体内AAV载体的IT递送已被证明可以在整个CNS中转导细胞,这使得此途径成为治疗FTLD-GRN单倍型不足的一种有吸引力的方法。此外,在Grn-/-敲除小鼠和NHP两者中的非临床研究表明,IT AAV递送导致CSF和CNS中的稳健PGRN表达,并且解决与Grn-/-敲除小鼠的PGRN缺乏相关的溶酶体贮积病变。

[0422] 研究目的

[0423] 主要目的

[0424] 评估施用单个ICM剂量后PBFT02的总体安全性和耐受性。

[0425] 次要目的

[0426] ●评估单个ICM剂量后PBFT02对CSF和血浆颗粒蛋白前体水平以及其它疾病生物

标志物的药效学作用的持久性。

[0427] ●评估用PBFT02治疗对FTLD的进展的影响，如使用神经影像学、神经退行性病变的流体和眼部生物标志物所评估的。

[0428] ●评估使用PBFT02治疗对FTD临床进展的影响(认知功能、行为、语言和运动体征以及症状)。

[0429] ●评估PBFT02对存活的影响。

[0430] 研究设计和基本原理

[0431] 研究设计概述

[0432] 这是一项1b期、FIH、开放标签、单臂、多中心剂量递增研究，评估了PBFT02作为单个ICM输注在5年内施用的安全性、耐受性和药效学，受试者年龄≥35岁且≤75岁，患有早期FTD和GRN单倍型不足。在2年内评估安全性、耐受性、药效学和临床功效，并且在PBFT02施用后5年内随访所有受试者，以长期评估安全性、耐受性、药效学和临床结果。

[0433] 所述研究由确定大约第-35天到第7天的每个可能受试者的合格性的筛查阶段组成。确认合格后，受试者接受基线评估，包含脑和脊髓磁共振成像(MRI)、腰椎穿刺以进行CSF收集、抽血、尿液收集、生命体征、ECG、体格检查、神经学检查、总神经病评分护士(TNSn)、神经传导研究和临床评估。基线评估在施用PBFT02之前的第-14天与第0天(含)之间发生。在治疗期间，受试者需在第1天的早晨入院。受试者在第1天接受单个ICM剂量的PBFT02，并且在给药后留在医院预定的时间以进行观察。随后的研究访视在给药后的预定时间(30天、60天、90天)进行，包含给药后前2年每6个月进行一次。在给药后5年内，每12个月进行一次长期随访，持续另外3年。

[0434] 研究由至多3个队列组成，每个队列至多5名受试者，以单次ICM注射的方式施用单剂量的PBFT02。在第一队列中，每名受试者按顺序纳入并施用最低计划剂量，每名受试者之间有60天的安全观察期。如果未观察到预定义的安全性审查触发因素，则独立数据监测委员会(IDMC)将在第一队列中所有受试者施用PBFT02后的90天审查第一队列的所有可用数据。

[0435] 如果决定继续进行更高剂量，至多5名受试者可以依次纳入并接受更高剂量，每个受试者之间有60天的安全观察期。独立数据监测委员会(IDMC)审查了第二队列的所有可用数据。

[0436] 如果尚未达到最大可行剂量，则可以依次纳入任选的第三队列，并且以比第二队列更高的剂量给药，每名受试者之间有60天的安全观察期。

[0437] 通知人(例如亲属、伴侣或朋友)也是本研究不可或缺的参与者(参见纳入标准)。通知人提供临床量表的受试者信息，并且可能有助于报告AE。由于通知人在此研究中发挥了关键作用，还应确定第二个后备通知人，优选地在第0天之前。

[0438] 安全审查触发因素

[0439] 研究药物施用后，在预定的时间内观察每名受试者的不良事件。不良事件的不良事件通用术语标准(CTCAE)将用于根据独立审查和道德委员会的要求对不良事件(AE)的严重程度进行分级。这些是研究人员认为4级或5级的任何不良和严重不良事件，或认为与研究药物相关的任何3级事件。在施用后的任何时间期间，如果发生这些事件，IDMC都需要审查这些事件，并且确定研究是否应该继续或是停止。

[0440] 如果发生了4级或更高级别的不被认为与研究药物相关的事件,或如果存在任何技术问题,则由临床研究医疗团队审查所述事件,并且召集IDMC进行审查。

[0441] 此循环持续到队列的最后一名受试者被纳入和审查。

[0442] 当来自队列中最后一名受试者的90天数据可用时,来自队列的所有可用数据都将汇总并提交给IDMC,以确定是否应继续剂量递增或应停止研究。

[0443] 如果决定递增剂量,受试者被纳入队列2,以接受更高剂量的PBFT02。纳入遵循与上述低剂量相同的程序。如前所述,当来自最后一名受试者的数据可用时,来自队列的所有可用数据都将汇总并提交给IDMC,以确定是否应继续研究或应停止研究。

[0444] 如果PBFT02在第二队列中耐受性良好,并且更高的剂量是可行的,则可以纳入第三队列,连续受试者之间至少间隔60天,以评估安全性和耐受性。

[0445] 除触发SRT的事件外,如果满足以下任一标准,则停止研究,并且不再纳入新受试者:

[0446] ●经研究者评估,认为与研究产品或ICM注射程序有关的任何死亡

[0447] ●经研究者评估,认为与研究产品或ICM注射程序相关的CNS出血、中风或急性麻痹

[0448] 独立数据监测委员会审查这些不良事件,并且就继续进行研究和受试者纳入做出决定。

[0449] 剂量递增标准

[0450] 剂量递增基于对安全性(包含临床和实验室评估)、耐受性和对CSF PGRN水平的影响的评估。在每名受试者纳入每个队列后进行评估。每个队列后也进行总结评估。已经建立安全审查触发标准,并且特别确定何时召开正式的独立数据监测委员会会议。否则,如果没有发现严重安全问题,当每个队列的汇总数据可用时,将定期召开独立数据监测委员会会议,并且其可以提供是否继续更高剂量的指导。除安全性考虑外,还对CSF颗粒蛋白前体水平进行评估,以确定PBFT02在多大程度上具有期望的药效学作用。

[0451] 研究设计原理

[0452] 盲法、对照、研究期、治疗组

[0453] 这是一项开放标签的剂量递增研究设计。每个队列由至多五名接受积极治疗的受试者组成。研究的最初两年部分足以评估对临床和生物标志物疾病进展的主要终点和可能的一些次要终点的影响。另外的3年延长期适用于评估长期安全性。最初,计划了两个队列,一个低剂量队列和一个高剂量队列。如果PBFT02在第二剂量队列中耐受性良好,并且增加剂量是可行的,则可以以高于第二队列的剂量纳入第三队列。这使得能够基于安全性、耐受性和对生物标志物的治疗效果(包含CSF PGRN水平,以及神经退行性病变的其它流体和神经成像生物标志物)来确定最佳剂量。

[0454] 研究群体

[0455] 此研究的目标群体由年龄≥35岁且≤75岁的受试者组成,具有轻度FTD体征和症状(如通过CDR加NACC FTLD总体评分0.5至1.0的定义);并且如通过低CSF PGRN水平和杂合致病性GRN突变的遗传生物标志物证据(如通过AD&FDMDB分类)证实的GRN单倍型不足,排除具有与阿尔茨海默氏病或其它CNS病症相一致的临床病史或生物标志物概况的受试者,所述病症疾病可能会混淆FTLD治疗的评估。

[0456] 作为基因疗法,PBFT02有可能使患有由GRN的一个或两个拷贝的致病性突变引起的神经退行性疾病的患者受益。AD&FTDMDB将已知的GRN突变定义为致病性突变,所述AD&FTDMDB是根据人类基因组变异学会(Human Genome Variation Society)制定的指南,对AD和FTLD患者的所有已知突变和非致病性编码变体进行了分类。这种突变解释方法通常被评估这些患者的临床医生所接受,在并且与FTLD疾病专家讨论后,此试验采用了所述方法。

[0457] 由GRN单倍型不足引起的成人发作性神经退行性病变的早期临床表现是异质的。随着疾病进展,这种异质性导致了具有另外的症状的各种初始临床表现。由于FTD患者通常在出现第一症状后迅速下降,此研究纳入了表现出主要临床FTD表型之一的受试者,包含行为变异(bvFTD),其中行为改变和执行功能障碍是突出的早期表现,以及原发性进行性失语(ppaFTD),其中语言的理解和/或产生受到损害。PPA根据具体的语言缺陷进一步分为迟滞型变异PPA(nfvPPA)和语义变异PPA(svPPA),这两种都有资格纳入。如果阿尔茨海默氏病的生物标志物与并发的AD不一致,PPA的第三种亚型,即logopenic变异lPPA也有资格纳入。

[0458] FTD谱还包含运动障碍表型,包含进行性核上麻痹综合征、皮质基底节综合征(CBS)和ALS。为了确保这项相对较小的1期研究中临床病程的一致性,仅有运动症状的受试者不符合纳入资格。然而,此研究包含伴有这些运动障碍伴随表现的患有bvFTD或ppaFTD的受试者。

[0459] 符合条件的受试者采用CDR加NACC FTLD量表进行筛查,所述量表旨在评估所有FTD临床表现的症状严重程度,包含记忆、定向、判断和问题解决、社区事务、家庭和爱好、个人护理、行为和语言。CDR加NACC FTLD的总体评分为0.5至1.0(包含轻度症状患者),允许纳入神经退行性病变早期的有症状患者,其中基因疗法的益处可能最大化。在这一早期阶段对患者进行纳入还允许随后检测疾病进展中的变化或稳定,并且延迟另外症状的发作。

[0460] 为了最小化受试者的风险,此研究排除了具有临床程序禁忌症、缺乏预测为致病性的GRN突变或患有神经系统或免疫系统相关疾病的患者。

[0461] 另外,此研究还包含将癌症相关风险最小化的排除标准。由于已观察到PGRN在多种肿瘤中的PGRN过表达,因此提出了癌症相关的排除标准。据推测,PGRN过表达可促进癌症进展。因此排除恶性肿瘤患者(局部皮肤癌除外)或有遗传性癌症综合征病史的患者。然而,研究者可以自行决定是否包含既往恶性肿瘤治疗成功且随访充分以排除复发的受试者。另外,此基因疗法预期不会导致血清PGRN表达高于生理水平。使用非人灵长类动物研究中高于将用于此FIH试验中的剂量的PBFT02剂量,发现在PBFT02ICM施用之后,PGRN在血清中表达的水平接近正常水平。由于纳入FIH试验中的受试者通常的基线循环PGRN水平为正常水平的大约30%,预计循环血清PGRN水平最多将恢复正常。因此,预计不会有任何异常高的PGRN全身暴露。

[0462] 由于CNS中的PGRN水平在某些脑区可能高于正常水平,因此密切监测患者是否存在潜在CNS肿瘤的迹象。受试者的血液工作通过CBC小组进行监测,并且受试者在下表规定的随访时间点通过MRI进行监测,每年对脑和脊髓进行钆造影,持续5年。钆滞留相关的潜在风险已被确认,但被认为与GRN介导的肿瘤的潜在风险相平衡。

[0463] 剂量选择(AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02))

[0464] PBFT02旨在取代GRN基因并提高中枢PGRN水平。由GRN单倍型不足引起的FTLD是基因疗法的有吸引力的候选者,因为其是由分泌蛋白缺乏引起的单基因疾病。虽然新合成的

PGRN可以直接从跨高尔基体网络运输到溶酶体,但其也可以通过分拣蛋白或甘露糖-6-磷酸受体被其它细胞分泌和吸收,随后被运送到溶酶体。转基因小鼠在神经元中选择性缺失Grn后,PGRN分泌的一个重要结果已被证实。与在所有细胞类型中完全缺乏PGRN蛋白的Grn-/-动物相比,仅神经元中PGRN表达的消融不会导致神经元脂褐质积累,这表明其它中枢神经系统(CNS)细胞向PGRN缺陷神经元供应蛋白质。因此,在CNS中的细胞的子集中过度表达PGRN可以提供分泌蛋白库,所述库可以被周围细胞吸收,产生交叉校正的可能性。

[0465] 起始AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)剂量水平由GLP NHP毒理学研究和小鼠疾病模型研究(在实例3中描述)确定。此FIH剂量递增研究由至多3个剂量队列组成。所有测试的剂量都有可能带来治疗益处。将按顺序施用剂量(低剂量后较高剂量),以使得能够基于安全性、耐受性和对生物标志物的治疗效果(包含CSF PGRN水平,以及神经退行性病变的其它流体和神经成像生物标志物)来确定最佳剂量。

[0466] 端点

[0467] 除了测量安全性和耐受性作为主要端点外,此研究还基于当前文献,并且与专门研究额颞叶痴呆的主要临床医生协商,选择了次要功效端点。这些端点跟踪临床结果和疾病生物标志物,目的是鉴定后续登记试验的适当端点。端点是与下表所呈现的那些时间点类似的预定时间点。选择这些时间点以促进全面评估AAV1.CB7.CI.hPGRN.RBG(PBFT02)的安全性和耐受性。其选择还考虑了GRN患者的疾病进展率,以便评估临床功效量度。在PBFT02施用后,根据草案"FDA行业指南:施用人类基因疗法产品后的长期随访(FDA Guidance for Industry:Long Term Follow-Up after Administration of Human Gene Therapy Products)"(2018年7月),将继续监测受试者的安全性和功效持续总共5年

[0468] 生物标志物

[0469] 下表呈现了此研究中评估的生物标志物以及其总体目的。此列表并非详尽无遗,并且将随着科学领域的发展而演变。这些生物标志物将在此方案的后续部分中详细描述。

[0470] 除方案中预先规定的生物标志物分析外,还应获得另外的生物标志物的知情同意。

[0471]

生物标志物	**受试者选择**	**药效学**	**疾病病理生理学进展/改变**
GRN 单倍型不足的遗传测试	X		
血浆总 τ、p-τ_{181}	X		X
PGRN 水平(CSF、血浆)	X	X	
CSF 神经丝轻链(NfL)(相对于基线减少)	X		X
视网膜脂褐质(相对于基线减少)			X
脑 MRI(皮质体积、皮质厚度、白质完整性的疾病相关变化减缓)	X		X
FDG-PET(脑代谢降低减缓)	X		X
EEG/诱发应答电势(疾病相关变化减缓)			X

[0472] GRN单倍型不足的确定

[0473] 受试者必须基于作为其医疗记录一部分的验证测定结果或基于作为此研究筛查程序一部分的临床站点进行的基因分型,证明其为GRN突变携带者。

[0474] 排除具有阿尔茨海默氏病病理学受试者的生物标志物

[0475] 阿尔茨海默氏病可能被误认为是FTD,或可能作为FTD患者的共病存在。因此,为避免AD对此试验结果解释的混淆影响,排除了具有阿尔茨海默氏病病理学生物标志物证据的受试者。使用排除标准中概述的经验证的测定评估受试者是否患有阿尔茨海默氏病。

[0476] 基线和治疗后CSF和血浆PGRN水平的确定

[0477] CSF和血浆中PGRN蛋白的水平在基线(包含)和随后的治疗后测量,作为AAV转导的指标。施用PBFT02后,患者的PGRN水平预期会增加。在其它量度中,CSF和血浆PGRN水平的治疗相关增加可以告知此试验的剂量增加和后续试验的剂量选择。

[0478] 神经退行性病变的流体生物标志物评估

[0479] 收集流体生物标志物以评估对神经退行性病变的潜在治疗效果,以及相关的神经炎症和小胶质细胞活性。在研究过程中,还跟踪了神经丝轻链(NfL)、总τ(T-τ)、磷酸化τ(P-τ)的CSF水平的治疗相关变化,尽管疾病稳定对这些端点的预测影响尚不清楚。

[0480] NfL

[0481] 神经丝是轴突细胞骨架的结构蛋白。在FTD中,与阿尔茨海默氏病(AD)相比,NfL亚基的CSF浓度更高。较高浓度的CSF NfL与FTD的存活期较短相关,这表明其是疾病强度/严重程度的标志物。NfL的血浆浓度与CSF密切相关,并且最近的数据表明,FTD的NfL血清或血浆水平升高,反映了疾病强度,并且通过磁共振成像预测了未来的临床恶化和脑体积损失。NfL被认为是神经元脱失或损害的一般指标。

[0482] GFAP

[0483] 在研究过程中,将跟踪与胶质纤维酸性蛋白治疗相关的血浆GFAP水平的变化。GFAP是星形胶质细胞增生的一种量度,这是FTD的一种已知病理过程。GFAP浓度升高似乎是FTD-GRN特有的,其水平可能在症状发作前增加,这表明GFAP可能是接近发作的重要标志物(Heller等人,2020)

[0484] τ

[0485] τ和磷酸化τ与AD、PD和某些形式的FTD亚型中的病理学相关,并且通常与神经元损伤或变性相关,而不考虑亚组(除了与潜在AD病理学相关的logopenic型变异原发性进行性失语[lvPPA])。FTD患者CSF中P-τ与T-τ的比率似乎较低。

[0486] 视网膜脂褐质

[0487] 视网膜变性发生在杂合子GRN突变携带者中,这也是在Grn敲除小鼠中观察到的一种表型。Grn敲除小鼠在整个中枢神经系统中也会形成自体荧光聚集物的明显沉积,称为脂褐质。非侵入性视网膜成像可以检测杂合子GRN突变携带者的视网膜脂褐质。此研究使用眼相干断层扫描(OCT)在筛查时以及与下表所列时间点类似的时间点评估视网膜脂褐质。

[0488] 神经退行性病变的神经影像学生物标志物评估

[0489] 磁共振成像(MRI)

[0490] GRN单倍型不足的患者主要表现为额叶和颞叶皮质神经元细胞脱失,并且症状发作后,整个脑体积通常以每年3.4%的速度减少。因此,此研究利用T1加权的MRI跟踪脑体积、白质完整性以及中额叶皮质和顶叶区域厚度的变化,这些区域是目标群体所有临床表现中最常见的受影响的脑区域。预期PBFT02的施用将稳定这些区域随着时间的推移萎缩的下降。收集其它皮质或皮质下脑区的其它探索性数据,因为不同临床表现中受萎缩影响的

脑区可能不同，并且这些数据可能有助于理解GRN相关的神经退行性病变的自然历史。MRI在筛查期间以及与下表所列时间点类似的时间点进行。

[0491] 氟脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描(FDG PET)

[0492] 在FTD中，代谢减退通常见于额叶和前颞叶，更具体地，双侧中间、下侧和上侧额叶皮质、前扣带、左侧颞叶和右侧顶叶皮质以及尾状核。通常，代谢减退与MRI上的萎缩相关，但通常先于萎缩。对于FTD，FDG PET扫描的灵敏度范围为47％至90％；特异性为68％至98％。随着时间的推移，可以看到异常的增加，这表明FDG PET作为疾病进展的生物标志物的潜在用途。PBFT02的施用预期稳定这些区域随着时间的推移观察到的代谢减退。FDG PET在筛查期间以及与下表所列时间点类似的时间点进行。

[0493] EEG/诱发应答电势

[0494] 事件相关EEG活动的幅度或源活动探测了丘脑皮层和上升活动系统在感觉和认知运动信息处理过程中的同步/去同步和耦接/去耦接机制，并且可以揭示轻度认知障碍和阿尔茨海默氏病的渐进效应和干预，特别是在疾病早期，并且可以用于其它形式的痴呆。

[0495] 临床结果量度

[0496] 评估PBFT02对临床进展、生活质量和功能的影响。由于目标患者群体表现出的表型异质性，因此采用了捕捉临床表现范围内症状进展的量表来测量随时间的变化。这些功效评估旨在捕捉PBFT02稳定症状随时间下降的能力。关于具有不同临床表现的患者的各种临床参数进一步下降的速率的数据用于进一步告知适当端点的选择，并限定登记试验的临床上有意义的变化。

[0497] 行为、语言和认知评估

[0498] CDR加NACC FTLD SB

[0499] CDR加NACC FTLD是经典临床痴呆评定(CDR)量表的扩展版本，所述量表在过去用于评定AD谱系病症的严重程度。评估包含CDR的原始六个领域(记忆、取向、判断以及解决问题、社区事务、家庭和爱好、个人护理)。还包含两个另外领域——语言和行为，这允许对FTLD谱系患者的减退的检测具有更高灵敏度。评定总体评分“0”表明正常行为或语言，而评分为0.5、1、2或3表明轻度到重度缺陷。CDR加NACC FTLD总和(CDR加NACC FTLD sb)评分表示单个域的总和，并且用于确定单个域和跨多个域的疾病严重程度的进展。

[0500] 额叶功能评定量表(FAB)

[0501] FAB是评估执行功能的简短评估。其尤其可用于轻度痴呆的患者(MMSE＞24)。评估由强调认知、动作和行为区域的六个部分组成。总评分为18或更高表明更好的表现。

[0502] 额颞叶痴呆评定量表(FRS)

[0503] FRS测量疾病进展。其是通过对从两个旧仪器中选出的30个探查问题的项目分析构建的，所述两个旧仪器旨在测量痴呆相关的行为和残疾。计算统计定义的阈值以定义严重程度水平。FRS检测FTD随时间推移的疾病进展差异。这种简要访谈对主要照顾者进行，并且由分类为“从未发生”、“有时”或“总是”的30个项组成。然后计算评分百分比，并将其转换成罗吉特评分，并且最终转换成严重程度评分。严重程度评分的范围为“非常轻度”到“极严重”。

[0504] 波士顿命名测试(BNT)

[0505] BNT是一种广泛使用的用于评估对抗命名能力的工具。BNT由物体的60幅黑白线条

图组成,所述物体按照词汇单词频率从床到算盘排序。图片刺激的顺序考虑到了一个发现,即患有举名困难的人在命名低频物体时通常会遇到更大的困难。

[0506] 多语言命名测试(MINT)

[0507] 32项MINT是BNT的一种替代方案,所述BNT最初用于测试4种语言(英语、西班牙语、希伯来语和普通话)的命名,注意区分不同语言的项目难度。MINT对阿尔茨海默氏病的命名障碍很敏感。

[0508] 数字范围测试

[0509] 数字范围测试用于测量个人的工作记忆数字存储容量,并且是执行功能的度量。参与者收到一系列数字(如'8、3、4'),并且必须立即重复。如果他们成功地做到了这一点,则会给他们更长的列表(例如,'9,2,4,0')。一个人能记住的最长列表的长度是这个人的数字范围。当参与者被要求在正向数字范围任务中按给定顺序输入数字时,在反向数字范围任务中,参与者需要颠倒数字的顺序。

[0510] 语义流畅性

[0511] 语义流畅性是一种被广泛接受的执行功能和语义记忆能力的量度。所述任务的评分由在60秒内口头说出尽可能多的一个类别中的单词。语义流畅性表现已经成功用于区分AD患者和健康老年个体。

[0512] 语言流畅性(音素测试)

[0513] 单词流畅性通过语义和字母单词列表生成测试和两个字母生成任务来衡量。每项任务需要60秒,并且将正确项目加总。注意错误和违反规则的情况。

[0514] 连线测试(口头适应)

[0515] 口头版本的连线测试是一种神经心理学测量,其可以在没有书面连线测试的运动和视觉要求的情况下,对连续的定势转换进行评估。最初的目的是作为连线测试的口头模拟,所述口头版本提供了一种评估身体受限患者的方法。这是执行功能的临床量度。

[0516] 本森复杂图形副本(10分钟回忆)

[0517] 本森复杂图形是对构造能力的测试。对图形元素的存在和放置进行评分。在延迟后测试再现,以测量保留记忆。

[0518] 加利福尼亚词语学习测试(CVLT),第二版

[0519] CVLT的结构效度作为情景言语学习和记忆的量度,在神经心理学文献中获得了相当多的支持。此测量使用四次学习试验中呈现的9个单词列表来评估最近的情景记忆。在30秒的干扰任务之后,立即进行自由回忆。10分钟延迟后进行自由回忆和语义提示回忆试验。

[0520] 蒙特利尔认知评估(MoCA)

[0521] MoCA是一项一页的30分测试,旨在作为轻度认知功能障碍的快速筛查工具。其评估不同的认知领域:注意力和专注力、执行功能、记忆、语言、视觉构造技能、概念思维、计算和定向。

[0522] 生活质量和功能活动评估

[0523] 功能活动问卷(FAQ)

[0524] FAQ衡量日常生活中的工具性活动,如准备均衡膳食和管理个人财务。由于与日常生活的基本活动相比,日常生活的工具性活动需要更高的认知能力,因此在痴呆过程中较早注意到功能变化,此工具有助于监测这些功能随时间的变化。

[0525] 施瓦布和英格兰日常生活活动量表(SEADL)

[0526] 施瓦布-英格兰量表对日常生活能力活动的评分为0％至100％,100％完全独立且无残疾。此量表是衡量日常生活的活动独立性和表现的有用的总体度量。

[0527] 严重程度的临床总体印象

[0528] CGI-S是一种简短的、广泛使用的工具,用于评估在评估时临床医生对患者病情严重程度的印象,以及临床医生对具有相同诊断的患者的过去经验。CGI-S向研究者提出一个问题:“考虑到您在此特定群体中的总体临床经验,患者此时的病情如何?”所述问题以7分量表评分:1＝正常,没有任何疾病;2＝边缘病;3＝轻度疾病;4＝中度疾病;5＝显著疾病;6＝重病;7＝病情最严重的患者。

[0529] 临床总体变化印象量表

[0530] CGI-C是简洁的、广泛使用的评估的三个部分之一。其由临床医生评定的三个项构成。从参与研究开始,无论是否有完全因为治疗而出现的改善,CGI-C以7点量表进行评定,范围为1(很大程度上改善)到7(非常糟糕)。

[0531] 剑桥行为量表-修订版(CBI-R)

[0532] CBI-R是一份代理问卷,包括45个项目,评估多个行为领域(即记忆和定向、日常技能、自我照顾、异常行为、情绪、信念、饮食习惯、睡眠、刻板印象和运动行为以及动机),每个项目以5分量表评分(0＝从不、1＝每月几次、2＝每周几次、3＝每天,以及4＝持续)。此问卷已用于区分bvFTD和AD与帕金森氏病和亨廷顿氏病。

[0533] 其它评估

[0534] C-SSRS

[0535] 使用哥伦比亚自杀严重程度评定量表(C-SSRS)评估自杀风险。C-SSRS是测量自杀意念、意念强度和自杀行为的三部分量表。这种评估的结果由直接从量表中得出的自杀行为致死率评定、自杀意念评分和自杀意念强度排名构成。基于评估指南,大于0的意念评分可能表明需要干预。强度评定的范围为0到25,其中0代表不认可自杀意念。

[0536] 安全性评估

[0537] 在治疗阶段,定期在与下表所列时间点类似的时间点进行安全性评估。这些安全性评估包含但不限于AE和伴随药物监测;收集血样用于临床实验室确定(血液学、临床化学、尿液分析);生命体征测量;身体和神经检查、神经传导研究和TNSn。

[0538] 为了最小化受试者的风险,此研究排除了具有临床程序禁忌症、缺乏预测为致病性的GRN突变或患有神经系统或免疫系统相关疾病的患者。

[0539] 由于CNS中的PGRN水平在某些脑区可能高于正常水平,因此密切监测患者是否存在潜在CNS肿瘤的迹象。受试者的血液工作通过CBC小组进行监测,并且受试者在下表规定的随访时间点通过MRI进行监测,每年对脑和脊髓进行钆造影,持续5年。钆滞留相关的潜在风险已被确认,但被认为与GRN介导的肿瘤的潜在风险相平衡。

[0540] 研究群体和参与持续时间

[0541] 研究参与的持续时间

[0542] 每名受试者的研究持续时间为60个月(安全性和功效的中期分析:24个月)。

[0543] 目标群体

[0544] 目标群体是年龄≥35岁且≤75岁的患者,其被诊断为GRN单倍型不足导致的成人

发作性神经退行性病变。

[0545] 受试者和站点数量

[0546] 在美国以外的全球站点，至多纳入15名成年受试者。受试者在向机构介绍期间或通过医院/医生转诊确定。还利用地方、区域和国家受试者倡导小组伙伴关系来提高对研究的认识。

[0547] 纳入标准

[0548] 1.纳入时年龄≥35岁且≤75岁

[0549] 2.通过以下标准之一确认GRN突变(在筛查期间或基于使用经验证的测定的病史)为原因：

[0550] ●根据美国医学遗传学学院(American College of Medical Genetics,ACMG)发布的指南，阿尔茨海默氏病和额颞叶痴呆突变数据库(AD&FTDMDB)将突变分类为致病性

[0551] ●没有证据表明GRN以外的突变可以解释疾病的存在。

[0552] 3.根据当前国际公认的可能的bvFTD或PPA(迟滞型变异[nfvPPA]、语义变异[svPPA]或logopenic型变异[lPPA])诊断标准的临床和影像学诊断：

[0553] ●根据Rascovsky(2011)标准可能的bvFTD

[0554] A.必须存在以下三种行为/认知症状(A-F)。确定症状需要持续或反复出现，而不是单个或罕见事件。

[0555] A.早期*行为去抑制[必须存在以下症状之一(A.1-A.3)]:A.1.社交不当行为

[0556] A.2.失礼或失仪

[0557] A.3.冲动、鲁莽或粗心的行为

[0558] B.早期冷漠或缺乏活力[必须存在以下症状之一(B.1-B.2)]:B.1.冷漠

[0559] B.2.缺乏活力

[0560] C.早期失去同情或同理心[必须存在以下症状之一(C.1-C.2)]:C.1.对他人需求和感受的应答减弱

[0561] C.2.社交兴趣、人际关系或个人热情减弱

[0562] D.早期固执、刻板或强迫/仪式性行为[必须存在以下症状之一(D.1-D.3)]:D.1.简单的重复动作

[0563] D.2.复杂、强迫或仪式性行为

[0564] D.3.言语刻板印象

[0565] E.口部过度活动和饮食变化[必须存在以下症状之一(E.1-E.3)]：

[0566] E.1.食物偏好改变

[0567] E.2.暴食、饮酒或吸烟增加

[0568] E.3.口腔探索或食用不可食用的物体

[0569] F.神经心理概况：记忆和视觉空间功能相对保留的执行/生成缺陷[必须存在以下所有症状(F.1-F.3)]:F.1.执行任务中的缺陷

[0570] F.2.情景记忆的相对保留

[0571] F.3.视觉空间技能的相对保留

[0572] B.表现出显著的功能下降(通过看护人报告或临床痴呆评定量表或功能活动问卷评分证明)

[0573] C.符合bvFTD的成像结果[必须存在以下(C.1-C.2)之一]：

[0574] C.1.MRI上的额叶和/或前颞叶萎缩

[0575] C.2.PET上的额叶和/或前颞叶代谢减退

[0576] ●根据Gomo-Tempini(2011)标准的原发性进行性失语变异

[0577] 基于Mesulam(2001)的标准诊断PPA

[0578] 1.最突出的临床特征是语言困难

[0579] 2.这些缺陷是日常生活活动受损的主要原因

[0580] 3.失语症应该是症状发作和疾病初期最突出的缺陷

[0581] 一旦确定PPA诊断,应使用以下方法对PPA变异进行分类：

[0582] A.迟滞型变异PPA[nfvPPA]

[0583] -必须至少存在两个以下核心特征之一：

[0584] 1.语言产生中的语法缺失

[0585] 2.由于语音错误和失真(言语失用症)而导致的费力、停顿的言语

[0586] -必须至少存在以下3项特征中的2项：

[0587] 1.对句法复杂句子的理解受损

[0588] 2.备用单字理解

[0589] 3.备用对象知识

[0590] -成像必须显示以下一个或多个结果：

[0591] a.MRI上的主要左后额岛萎缩,或

[0592] b.PET上的主要左后额岛代谢减退

[0593] B.语义变异PPA[svPPA]

[0594] -必须存在以下两个核心特征：

[0595] 1.对抗命名受损

[0596] 2.单个单词理解能力受损

[0597] -必须至少存在以下3项诊断特征：

[0598] 1.对象知识受损,尤其是对于低频率或低熟悉度的项目

[0599] 2.表面阅读障碍或书写困难

[0600] 3.备用重复

[0601] 4.备用语言产生(语法和运动语言)

[0602] -成像必须显示以下一个或多个结果：

[0603] a.MRI上的主要前颞叶萎缩

[0604] b.PET的主要前颞叶代谢减退

[0605] C.logopenic型变异[lPPA]

[0606] -必须存在以下两个核心特征：

[0607] 1.自发语言和命名中的单个词检索受损

[0608] 2.句子和短语重复受损

[0609] -必须至少存在以下3项特征：

[0610] 1.自发语言和命名中的语言(语音)错误

[0611] 2.备用单字理解和对象知识

[0612] 3.备用运动语言

[0613] 4.缺乏明显的语法缺失

[0614] -成像必须显示以下结果中的至少一个结果：

[0615] a.MRI上主要的左后外侧裂周区或顶叶萎缩

[0616] b.PET上主要的左后外侧裂周区或顶叶代谢减退

[0617] 4.包含伴有进行性核上麻痹综合征(PSP)、皮质基底综合征(CBS)或肌萎缩侧索硬化症(ALS)表现的bvFTD或ppaFTD(如标准#2中定义的)受试者(仅有运动症状的受试者不符合纳入资格)。

[0618] 5.有可靠的通知人,所述通知人至少每周亲自与受试者交谈或查看受试者

[0619] 6.CDR加NACC FTLD总体评分0.5或1.0

[0620] 7.低颗粒蛋白前体水平:对既往未确认低CSF颗粒蛋白前体水平的受试者进行血浆颗粒蛋白前体的筛查。如果血浆颗粒蛋白前体水平低,受试者可以纳入

[0621] 8.NfL升高:对既往未确认高NfL CSF水平的受试者进行血浆NfL水平筛查。如果血浆NfL水平升高,受试者可以纳入

[0622] 排除标准

[0623] 1.阿尔茨海默氏病的生物标志物证据。对先前未被确定具有阿尔茨海默氏病生物标志物证据的受试者,或在过去12个月内未进行阿尔茨海默氏病生物标志物测试的受试者进行血浆pτ181水平筛查;如果血浆pτ181与AD病理学一致,则排除受试者。

[0624] 2.罗斯改良的哈金斯基缺血性评分>7

[0625] 3.MRI上的Fazekas评分>1

[0626] 4.已知存在可以合理解释有症状参与者的症状的结构性脑损伤(例如,肿瘤、皮质梗塞)

[0627] 5.已知存在导致PSEN1、PSEN2或APP突变的阿尔茨海默氏病。

[0628] 6.既往有科萨科夫脑病、严重酒精依赖(痴呆发作后5年内)、频繁酒精或其它物质中毒史。

[0629] 7.除非后续实验室(同型半胱氨酸和甲基丙二酸)表明值在生理学上不显著,否则通过历史或实验室检测发现B12缺乏的证据是排除性的。研究者在审查其诊断和治疗历史记录后,经主办方的医疗监督员书面同意,可以纳入补充B12治疗的受试者,以确保疾病/治疗的稳定性和依从性。

[0630] 8.不受调控的甲状腺功能减退症(TSH>正常的150％)的病史或实验室测试证据

[0631] 9.肾衰竭(肌酐>2)

[0632] 10.肝衰竭(ALT或AST>正常的两倍)

[0633] 11.需要补充氧气的呼吸衰竭,

[0634] 12.大融合性白质病变

[0635] 13.严重的全身性疾病,如恶化的心血管疾病

[0636] 14.无法提供完全准许,或缺乏可以提供准许的具备适度接触的合法授权的照顾者

[0637] 15.MRI、ICM递送或LP的禁忌症(例如,局部感染、血小板减少、凝血障碍、由于占位性病变引起的颅内压升高[ICP])

[0638] 16.在AD&FDMDB中,将GRN突变分类为“非致病性”、“可能良性变异”或“良性变异”

[0639] 17.免疫功能不全的患者

[0640] 18.人类免疫缺陷病毒(HIV)或丙型肝炎的检测结果呈阳性的患者

[0641] 19.其它不由GRN突变引起的恶性肿瘤或慢性CNS病症

[0642] 20.研究者认为可能对患者构成风险的药物,如免疫抑制药物或全身用皮质类固醇。如果在筛查前30天内使用稳定剂量,并同意在试验持续时间内保持相同剂量,则非甾体抗炎药(NSAID)使用是可接受的

[0643] 21.恶性肿瘤(局部皮肤癌除外)或有遗传性癌症综合征病史。在经过主办方或指定方讨论和批准后,先前成功治疗恶性肿瘤并进行充分随访以排除复发(基于肿瘤学家意见)的受试者可以被包含

[0644] 22.研究者认为可能导致与GRN突变无关的认知障碍的任何并发疾病,包含导致痴呆、神经梅毒、脑积水、中风、小血管缺血性疾病、不受控制的甲状腺功能减退或维生素缺乏的其它原因

[0645] 23.针对有生育潜能、在筛查访视时通过血清妊娠测试确认尿液呈阳性、在施用研究产品前第1天通过血清结果确认尿液呈阳性或在研究期间不愿意进行另外妊娠测试的女性

[0646] 24.针对有生育潜能、不愿意使用医学上可接受的双屏障避孕(如与杀精剂一起使用的避孕套/隔膜)方法或从筛查之日开始到载体施用后52周参与禁欲的男性和女性

[0647] 25.研究人员认为,将给受试者带来不必要的风险或将干扰研究产物的评估或对受试者安全性或研究结果的解释的任何病状(例如,任何疾病病史、任何当前疾病的证据、任何身体检查时的发现或任何实验室异常。

[0648] 26.纳入30天内需要住院的任何急性疾病

[0649] 禁止和限制

[0650] 潜在受试者必须愿意并能够在研究过程期间遵守以下禁止和限制,才有资格参与研究:

[0651] • 研究完成(即最后随访访视)后至少90天内避免献血。

[0652] • 与伴随用药相关的任何禁止或限制。

[0653] • 在计划访问研究地点之前的24小时内,不允许使用含酒精的产品。

[0654] 剂量和施用

[0655] 剂量

[0656] 小脑延髓池内输注

[0657] 为了避免静脉内(IV)全身AAV施用治疗CNS的局限性,此研究使用鞘内(IT)载体递送到小脑延髓池中。使用CSF作为载体传播的媒剂,IT施用有可能通过单个的微创程序在整个CNS中实现转基因递送。动物研究表明,通过消除跨越血脑屏障的需要,与IV方法相比,IT递送可显著提高CNS基因转移的效率,载体剂量低得多。CSF通路有多种途径,包含腰椎穿刺(LP)和小脑延髓池内(ICM)。研究发现在转导脑和脊髓细胞方面,通过LP将AAV载体递送到CSF中的效率是在小脑延髓池水平下注射载体的效率的至多1/10。

[0658] 研究前和伴随药物

[0659] 筛查开始前30天内施用的所有研究前疗法必须在筛查时记录。

[0660] 从签署初始ICF开始，直到研究访视(随访访视)结束，必须在整个研究过程中记录所有伴随疗法。具体而言，与研究药物不同的任何疗法(处方药或非处方药，包含疫苗、维生素、草药补充剂；非药物疗法，如电神经刺激、针灸、特殊饮食、运动方案)必须记录在受试者的源记录中，并且输入eCRF。

[0661] 在此时间之后，还应记录伴随疗法以及新的或恶化的AE，直到事件解决。受试者应在开始任何新药物或补充剂之前，以及在改变任何当前伴随药物或补充剂的剂量之前咨询研究者或现场其它适当的研究人员。

[0662] eCRF中单独收集了有关特别关注的特定伴随药物(即AChE抑制剂、美金刚(memantine)、苯二氮卓类和抗抑郁药)的使用信息，包含剂量和施用途径、施用日期和使用适应症。

[0663] 必须提前(或之后尽快)通知主办方施用任何禁用疗法的情况。

[0664] 与AD相关的症状进展不应记录为AE，除非研究者认为其加速了。然而，在研究访视(随访访视)结束之前，记录任何症状治疗。

[0665] 不应为了将受试者纳入研究的明确目的而修改有效的现有疗法。

[0666] 如果受试者在研究药物给药开始前至少服用了6周稳定的药物，则允许对老年人群中可能经常出现的稳定医疗病状进行治疗。如果可能，受试者应在研究期间继续保持稳定药物。只有在临床上有指示且必须记录在eCRF的伴随药物部分时，才允许更改或添加药物。

[0667] 使用认知增强剂(例如，AChE抑制剂)或旨在治疗认知缺陷的药物进行治疗在纳入研究时被排除在外。研究期间认知能力下降的受试者允许接受经批准的AD疗法，但未经主办方基于医疗需要的明确许可，不允许接受预计会对认知能力产生影响的这些新疗法或疗法适应(例如，AChE抑制剂或美金刚)。在受试者开始、停止或改变预期会对认知产生影响的疗法剂量之前，必须联系主办方的医疗监督员，以确定受试者是否应继续研究，以及是否应进行临床结果测量。

[0668] 研究期间不允许连续(每日)使用苯二氮卓类；然而，允许偶尔摄入短效苯二氮卓类。如果受试者需要间歇性使用苯二氮卓类治疗，则从最后剂量的苯二氮卓类到随后的认知评估的间隔必须至少为该化合物的4个半衰期或24小时，以较长者为准。如果在任何访视或任何短期使用研究程序(如MRI、PET扫描、腰椎穿刺)中给予镇静药物，则必须在施用镇静药物前或在施用镇静药物后至少24小时或4个半衰期(以较长者为准)进行所有认知评估并完成。

[0669] 如果剂量在整个研究过程中旨在保持不变，则可给予影响中枢神经系统(CNS)功能的其它伴随药物。从随机化前6周开始，这些化合物的剂量应保持恒定。为避免对认知评估产生影响，以下内容适用，除非与主办方的医疗监督员讨论了有文件证明的医疗必要性：

[0670] ●受试者在随机化前至少6周内接受稳定剂量的影响CNS功能的药物，不应在研究期间停止施用此药物，并且不应改变此药物的剂量。

[0671] ●受试者在研究期间不应添加任何影响CNS功能的药物。

[0672] 如果在研究期间出现任何不可预见的影响CNS功能的疗法的开始、停止或为稳定剂量的改变，必须联系主办方的医疗监督员，以确定受试者是否应继续参与研究，以及是否应进行临床结果测量。

[0673] 关于CSF取样,除非本部分另有规定,否则应遵循与伴随疗法相关的局部指导。讨论可能为患者处方的伴随精神药物的使用。

[0674] 研究程序

[0675] 执行的评估

[0676] 与下表所列的研究访视相似,所有受试者都需要以下部分所确定的研究程序。

[0677] 书面知情同意书

[0678] 患者/看护人必须在任何研究相关程序(包含筛查评估)之前签署IRB/IEC批准的知情同意书(ICF)。

[0679] 病史和体格检查

[0680] 研究者收集并记录受试者的人口统计数据、既往病史、既往和伴随药物、身高和体重。医生在基线访视时进行全面的体格检查和全面的神经检查,包含力量、感觉、协调和反射测试。讨论病史的任何变化,包含不良事件或药物。

[0681] 血浆和血清生物标志物

[0682] 征得同意后,抽血获得血浆、血清、DNA和RNA。标准安全实验室在现场实验室或由现场承包的当地实验室进行,并且实验室值由现场工作人员输入eCRF。供中央实验室处理的样品储存在现场,并且按照研究操作手册的规定,分批在干冰上装运到现场。每次研究访视时,由经验丰富的研究工作人员使用标准程序进行抽血。抽血不需要禁食。如果受试者正在进行全身麻醉,可在此期间进行抽血以减轻疼痛和不适。

[0683] 神经传导研究(NCS)

[0684] 神经传导研究(NCS)包含使用研究手册中规定的标准表面记录技术测量两条感觉神经(一条在手臂中,一条在腿中)远端段的神经传导速度和振幅。NCS在基线处和预先指定的时间点进行评估。在每个时间点,都会采取重复措施以最小化可变性。感觉神经传导速度以米/秒为单位测量,并且在应答开始时记录。以微伏为单位从基线到峰值测量感觉神经振幅。在整个研究过程中,所有NCS均在个体受试者的同一侧进行,并且仔细记录和维持皮肤温度。临床现场由集中的核心实验室专家对NCS进行培训和鉴定,并且通过核心实验室和主办方的持续审查确保NCS数据的质量控制。

[0685] 心电图(ECG)

[0686] ECG是一种使用连接在受试者胸部、手臂和腿部的电极来记录心脏的电活动并检测异常的测试。在测量生命体征的访视期间,应首先完成ECG。

[0687] 脑的磁共振成像(MRI)

[0688] 在受试者同意后,在与下表所列类似的指定研究访视中对受试者进行MRI。

[0689] 获得T1加权MRI成像以评估疾病进展和钆造影的安全性监测。

[0690] 腰椎穿刺和CSF生物标志物

[0691] 在受试者同意后,在与下表所列类似的指定研究访视中收集所有受试者的CSF。程序涉及腰椎穿刺。在初步讨论病史期间,确定受试者目前是否服用抗血小板药物。如果受试者正在服用抗血小板药物,则该次访视不进行腰椎穿刺。

[0692] 腰椎穿刺由合格的现场工作人员根据标准医院程序进行。在腰椎穿刺前进行所有适当的测试前程序。腰椎穿刺和CSF收集可以在全身麻醉下进行。

[0693] 标准CSF化学和细胞学测试在现场实验室或由现场承包的当地实验室进行,并且

实验室值由现场工作人员输入eCRF。供中央实验室处理的样品储存在现场，并且现场工作人员在干冰上分批装运，用于FTD特异性生物标志物测试(PGRN蛋白、载体DNA、载体中和抗体)和未来研究(如果获得同意)。

[0694] 所有研究特定的样品收集、处理和储存程序均在研究操作手册中提供给现场。在指定的研究访视中收集受试者的CSF。在这些访视中的每次，都要确定受试者目前是否正在服用血液稀释剂。如果受试者正在服用抗血小板药物，则该次访视不进行腰椎穿刺。

[0695] 总神经病评分护士

[0696] 总神经病评分护士包含对受试者进行有针对性的询问，以治疗突发的感觉、运动和自主症状，以及定量的感觉测试(振动和针刺)。振动测试使用Rydel-Seiffer C64刻度音叉进行，并且针刺测试使用NeuroPen进行。在临床现场进行TNSn的个人应具有医学背景和患者护理经验(例如，护士、医生助理、非神经科医师、经验丰富的临床技术人员)。其应该在处理患者和收集临床数据方面游刃有余。所有执行TNSn的现场人员都需要完成主办方开发的培训模块，并记录其使用NeuroPen和Rydel-Seiffer C64刻度音叉的培训。

[0697] 受试者退出和提前终止

[0698] 受试者可以在不影响其护理的情况下随时退出研究。研究者也可以自行决定因缺乏依从性研究程序或访视时间表而中止其研究。研究者还可以出于安全或行政原因，让违反研究计划的受试者退出，以保护受试者。eCRF中记录了每名受试者是否完成研究以及提前退出/终止的原因(如适用)。提前退出的受试者，包含那些因开始使用任何研究产品治疗而提前终止的受试者，应尽一切努力参加最终的研究结束临床访视(访视第720天)，在此期间进行所有研究结束程序。如果提前终止的原因是死亡，则应将其记录在eCRF中，并且与受试者的来源一起收集和保存文件。

[0699] 从退出研究或提前终止研究的受试者收集/关于所述受试者的数据继续用于分析，直到其退出或终止的时间点。提前终止后，看护人可以撤回对运往中央实验室或生物库的实验室样品进行进一步检测的同意书;然而，不能从数据集中排除已经被取消识别的任何样品/样品数据。

[0700]

程序	筛查	基线和载体施用				随访期										
研究访视编号	1	2				3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
研究日/月	第-35 天至第-7 天	第-6 天至第 0 天（给药前）	第 1 天 ICM	给药后第 1 天	第 2 天*	第 7 天	14 ± 1	30 ± 2	3 个月 F/U ± 5	6 个月 F/U ± 5	12 个月 F/U ± 5	18 个月 F/U ± 5	24 个月 F/U ± 5	36 个月 F/U ± 5	48 个月 F/U ± 5	60 个月 F/U ± 5
一般程序和资格评估																
知情同意书	X															
病史	X															
伴随药物/程序	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
AE 评估	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
资格认证	X															
安全性、实验室、生物标志物和临床进展评估																
抽血用于血液学/化学/凝血/CPK LFT[a]	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
尿液分析	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HepB/HepC/HIV 血清学	X															
通过血清 HCG 确认尿液[b]	X		X													
血清和血浆疾病生物标志物[c]	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
血清和尿液中的载体 DNA 浓度								X	X	X		X		X	X	X
血清抗 AAV1 NAb	X							X	X	X		X		X	X	X

[0701]

程序	筛查	基线和载体施用				随访期										
研究访视编号	1	2				3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
研究日/月	第-35天至第-7天	第-6天至第0天（给药前）	第1天ICM	给药后第1天	第2天*	第7天	14±1	30±2	3个月F/U±5	6个月F/U±5	12个月F/U±5	18个月F/U±5	24个月F/U±5	36个月F/U±5	48个月F/U±5	60个月F/U±5
ELISpot（T细胞对AAV1载体的应答）								X		X	X		X	X	X	X
LP（用于CSF收集）		X						X		X	X		X	X	X	X
CSF细胞学和化学		X						X		X	X		X	X	X	X
CSF疾病生物标志物[c]		X						X		X	X		X	X	X	X
CSF抗AAV1 NAb		X						X		X	X		X	X	X	X
CSF中的载体DNA浓度		X						X		X	X		X			
另外的安全性和耐受性评估																
体格检查（包含身高和体重）	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
神经学检查	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TNSn	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
麻醉师检查		X														
生命体征	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ECG	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
神经传导研究	X							X	X	X	X		X	X	X	X
临床进展评估	X	X								X	X	X	X	X	X	X
C-SSRS	X	X								X	X	X	X	X	X	X

[0702]

程序	筛查	基线和载体施用				随访期										
研究访视编号	1	2				3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
研究日/月	第-35天至第-7天	第-6天至第0天（给药前）	第1天ICM	给药后第1天	第2天*	第7天	14±1	30±2	3个月F/U±5	6个月F/U±5	12个月F/U±5	18个月F/U±5	24个月F/U±5	36个月F/U±5	48个月F/U±5	60个月F/U±5
PBFT-02施用（CT引导）																
PBFT-02施用			X													
成像和其它生物标志物评估																
MRI脑和脊髓[d]	X										X		X	X	X	X
FDG-PET	X										X		X	X	X	X
眼相干断层扫描	X										X		X	X	X	X
ERP/EEG	X										X		X	X	X	X

[0703] X:表示现场访视。

[0704] *第2天不需要住院,但PI可以自行决定是否住院。

[0705] [a]给药前凝血和血小板由当地实验室进行,因为必须在给药前48小时内进行测试。给药前必须提供结果并阅读。

[0706] [b]如果尿液妊娠测试结果呈阳性或模棱两可,将进行血清妊娠测试。

[0707] [C]疾病生物标志物包含但不限于CSF中的PGRN蛋白、神经丝轻链、τ蛋白和磷酸化τ蛋白，以及血浆中的PGRN

[0708] [d]必须在治疗的45天内进行MRI筛查，以评估合格性。随访期间MRI与钆造影。在整个研究过程中，将通过现场访视和看护人报告评估存活。

[0709] 缩略语：AAV1，腺相关病毒血清型1；AE，不良事件；CDR加NACC FTLD，额颞叶退化总和的临床痴呆评定量表；CGI-C，临床总体变化印象量表；CPK，肌酸激酶；CSF，脑脊液；C-SSRS，哥伦比亚自杀严重程度评定量表；CT，计算机断层扫描；DNA，脱氧核糖核酸；ECG，心电图；ELISpot，酶联免疫斑点；F/U，随访；HepB，乙型肝炎；HepC，丙型肝炎；HIV，人类免疫缺陷病毒；ICM，小脑延髓池内；LFT，肝功能测试；LP，腰椎穿刺；MRI，磁共振成像；NAb，中和抗体；PI，主要研究者。

[0710] (序列表自由文本)

[0711] 对于在数字标识符<223>下含有自由文本的序列，提供了以下信息。

[0712]

SEQ ID NO	<223>下的自由文本
3	<223> 工程化的人 PGRN1 编码序列
4	<223> 工程化的 hPGRN2 编码序列 <220> <221> CDS <222> (1)..(1779)
5	<223> 合成构建体
6	<223> 兔珠蛋白 polyA
7	<223> 3' AAV ITR
8	<223> 5' AAV ITR
9	<223> 人 CMV IE 增强子

[0713]

10	<223> CB 启动子
11	<223> 嵌合内含子
12	<223> UbC 启动子
13	<223> 内含子
14	<223> SV40 晚期 polyA
15	<223> 氨苄青霉素抗性基因
16	<223> COL E1 起源
17	<223> EF-1a 启动子
18	<223> F1 起源
19	<223> 卡那霉素抗性基因
20	<223> P5 启动子
21	<223> LacZ 启动子
22	<223> EF1a.hPGRN.SV40 <220> <221> repeat_region <222> (1)..(130)
23	<223> Ubc.PI.hPGRN.SV40
24	<223> CB7.CI.hPGRN1.rBG <220> <221> misc_feature <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> misc_feature <222> (198)..(579) <223> CMV IE 增强子 <220> <221> misc_feature <222> (582)..(863) <223> 鸡 β-肌动蛋白启动子 <220> <221> misc_feature <222> (958)..(1930) <223> 嵌合内含子 <220> <221> misc_feature <222> (1942)..(3726) <223> hPGRN <220> <221> misc_feature <222> (3787)..(3913) <223> 兔 β 珠蛋白 poly A <220> <221> misc_feature <222> (4002)..(4131) <223> 3' ITR
25	<223> AAV1 VP1 基因 <220> <221> CDS

[0714]

	<222> (1)..(2208)
26	<223> 合成构建体
27	<223> AAV2 rep
28	<223> AAV5 衣壳 VP1 基因 <220> <221> CDS <222> (1)..(2172)
29	<223> 合成构建体
30	<223> AAVhu68 VP1 衣壳 <220> <221> CDS <222> (1)..(2211)
31	<223> 合成构建体
32	<223> miRNA 靶序列
33	<223> miRNA 靶序列
34	<223> miRNA 靶序列
35	<223> miRNA 靶序列

[0715] 本说明书中引用的所有文件通过引用并入本文中。随此提交的名称为“21-9658PCT_ST25.txt”的序列表及其中的序列和文本通过引用并入本文。于2019年2月22日提交的美国临时专利申请第62/809,329号、于2019年10月21日提交的美国临时专利申请第62/923,812号、于2020年2月2日提交的美国临时专利申请第62/969,108号、于2020年8月26日提交的美国临时专利申请第63/070,639号以及于2020年2月21日提交的国际专利申请第PCT/US20/19149号通过引用并入本文。虽然已经参考特定实施例描述了本发明,但应当理解,可以在不脱离本发明的精神的情况下进行修改。此类修改旨在落入所附权利要求的范围内。

序列表

<110> 宾夕法尼亚大学董事会
(The Trustees of the University of Pennsylvania)
<120> 用于治疗GRN相关成人发作性神经退行性病变的重组腺相关病毒
<130> 21-9658.PCT
<150> US 63/070,639
<151> 2019-02-22
<160> 35
<170> PatentIn版本3.5
<210> 1
<211> 593
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 1

Met Trp Thr Leu Val Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Gly Leu Val Ala
1 5 10 15
Gly Thr Arg Cys Pro Asp Gly Gln Phe Cys Pro Val Ala Cys Cys Leu
20 25 30
Asp Pro Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Cys Cys Arg Pro Leu Leu Asp Lys
35 40 45
Trp Pro Thr Thr Leu Ser Arg His Leu Gly Gly Pro Cys Gln Val Asp
50 55 60
Ala His Cys Ser Ala Gly His Ser Cys Ile Phe Thr Val Ser Gly Thr
65 70 75 80
Ser Ser Cys Cys Pro Phe Pro Glu Ala Val Ala Cys Gly Asp Gly His
85 90 95
His Cys Cys Pro Arg Gly Phe His Cys Ser Ala Asp Gly Arg Ser Cys
100 105 110
Phe Gln Arg Ser Gly Asn Asn Ser Val Gly Ala Ile Gln Cys Pro Asp
115 120 125
Ser Gln Phe Glu Cys Pro Asp Phe Ser Thr Cys Cys Val Met Val Asp
130 135 140
Gly Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met Pro Gln Ala Ser Cys Cys Glu Asp
145 150 155 160
Arg Val His Cys Cys Pro His Gly Ala Phe Cys Asp Leu Val His Thr
165 170 175
Arg Cys Ile Thr Pro Thr Gly Thr His Pro Leu Ala Lys Lys Leu Pro
180 185 190

Ala Gln Arg Thr Asn Arg Ala Val Ala Leu Ser Ser Ser Val Met Cys
195 200 205
Pro Asp Ala Arg Ser Arg Cys Pro Asp Gly Ser Thr Cys Cys Glu Leu
210 215 220
Pro Ser Gly Lys Tyr Gly Cys Cys Pro Met Pro Asn Ala Thr Cys Cys
225 230 235 240
Ser Asp His Leu His Cys Cys Pro Gln Asp Thr Val Cys Asp Leu Ile
245 250 255
Gln Ser Lys Cys Leu Ser Lys Glu Asn Ala Thr Thr Asp Leu Leu Thr
260 265 270
Lys Leu Pro Ala His Thr Val Gly Asp Val Lys Cys Asp Met Glu Val
275 280 285
Ser Cys Pro Asp Gly Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Gln Ser Gly Ala Trp
290 295 300
Gly Cys Cys Pro Phe Thr Gln Ala Val Cys Cys Glu Asp His Ile His
305 310 315 320
Cys Cys Pro Ala Gly Phe Thr Cys Asp Thr Gln Lys Gly Thr Cys Glu
325 330 335
Gln Gly Pro His Gln Val Pro Trp Met Glu Lys Ala Pro Ala His Leu
340 345 350
Ser Leu Pro Asp Pro Gln Ala Leu Lys Arg Asp Val Pro Cys Asp Asn
355 360 365
Val Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asp Thr Cys Cys Gln Leu Thr Ser Gly
370 375 380
Glu Trp Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val Cys Cys Ser Asp His
385 390 395 400
Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val Ala Glu Gly Gln Cys
405 410 415
Gln Arg Gly Ser Glu Ile Val Ala Gly Leu Glu Lys Met Pro Ala Arg
420 425 430
Arg Ala Ser Leu Ser His Pro Arg Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr
435 440 445
Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp
450 455 460
Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His
465 470 475 480
Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu
485 490 495
Lys Glu Val Val Ser Ala Gln Pro Ala Thr Phe Leu Ala Arg Ser Pro

500 505 510

His Val Gly Val Lys Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His

515 520 525

Asp Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys

530 535 540

Pro Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro

545 550 555 560

Ala Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu

565 570 575

Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu

580 585 590

Leu

<210> 2

<211> 1782

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

atgtggaccc tggtgagctg ggtggcctta acagcagggc tggtggctgg aacgcggtgc 60

ccagatggtc agttctgccc tgtggcctgc tgcctggacc ccggaggagc cagctacagc 120

tgctgccgtc cccttctgga caaatggccc acaacactga gcaggcatct gggtggcccc 180

tgccaggttg atgcccactg ctctgccggc cactcctgca tctttaccgt ctcagggact 240

tccagttgct gccccttccc agaggccgtg gcatgcgggg atggccatca ctgctgccca 300

cggggcttcc actgcagtgc agacgggcga tcctgcttcc aaagatcagg taacaactcc 360

gtgggtgcca tccagtgccc tgatagtcag ttcgaatgcc cggacttctc cacgtgctgt 420

gttatggtcg atggctcctg ggggtgctgc cccatgcccc aggcttcctg ctgtgaagac 480

agggtgcact gctgtccgca cggtgccttc tgcgacctgg ttcacacccg ctgcatcaca 540

cccacgggca cccacccccct ggcaaagaag ctccctgccc agaggactaa cagggcagtg 600

gccttgtcca gctcggtcat gtgtccggac gcacggtccc ggtgccctga tggttctacc 660

tgctgtgagc tgcccagtgg gaagtatggc tgctgcccaa tgcccaacgc cacctgctgc 720

tccgatcacc tgcactgctg cccccaagac actgtgtgtg acctgatcca gagtaagtgc 780

ctctccaagg agaacgctac cacggacctc ctcactaagc tgcctgcgca cacagtgggg 840

gatgtgaaat gtgacatgga ggtgagctgc ccagatggct atacctgctg ccgtctacag 900

tcgggggcct ggggctgctg ccctttttacc caggctgtgt gctgtgagga ccacatacac 960

tgctgtcccg cggggtttac gtgtgacacg cagaagggta cctgtgaaca ggggccccac 1020

caggtgccct ggatggagaa ggccccagct cacctcagcc tgccagaccc acaagccttg 1080

aagagagatg tcccctgtga taatgtcagc agctgtccct cctccgatac ctgctgccaa 1140

ctcacgtctg gggagtgggg ctgctgtcca atcccagagg ctgtctgctg ctcggaccac 1200

cagcactgct gcccccaggg ctacacgtgt gtagctgagg ggcagtgtca gcgaggaagc 1260

gagatcgtgg ctggactgga gaagatgcct gcccgccggg cttccttatc ccaccccaga 1320

gacatcggct gtgaccagca caccagctgc ccggtggggc agacctgctg cccgagcctg 1380
ggtgggagct gggcctgctg ccagttgccc catgctgtgt gctgcgagga tcgccagcac 1440
tgctgcccgg ctggctacac ctgcaacgtg aaggctcgat cctgcgagaa ggaagtggtc 1500
tctgcccagc ctgccacctt cctggcccgt agccctcacg tgggtgtgaa ggacgtggag 1560
tgtggggaag gacacttctg ccatgataac cagacctgct gccgagacaa ccgacagggc 1620
tgggcctgct gtccctaccg ccagggcgtc tgttgtgctg atcggcgcca ctgctgtcct 1680
gctggcttcc gctgcgcagc caggggtacc aagtgtttgc gcagggaggc cccgcgctgg 1740
gacgcccctt tgagggaccc agccttgaga cagctgctgt ga 1782

<210> 3
<211> 1785
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 工程化的人PRGN1编码序列
<400> 3

atgtggaccc tggtgtcttg ggttgcactg acagctggac tggtggccgg cacaagatgt 60
cctgacggcc agttttgccc cgtggcctgc tgtcttgatc ctggcggagc cagctacagc 120
tgctgcagac ctctgctgga taagtggccc accacactga gcagacacct cggaggacct 180
tgtcaggtgg acgcccactg ttctgccgga cacagctgca tctttaccgt gtctggcacc 240
tccagctgct gtccatttcc tgaggctgtg gcctgcggag acggccacca ctgttgtcct 300
agaggcttcc actgtagcgc cgacggcaga agctgctttc agagaagcgg caacaatagc 360
gtgggcgcca tccagtgtcc tgacagccag ttcgagtgcc ccgacttcag cacctgttgc 420
gtgatggtgg acggcagctg gggctgttgt ccaatgcctc aggctagctg ctgcgaggac 480
agagtgcact gttgccctca cggcgccttt tgcgatctgg tgcacacccg gtgcatcacc 540
ccaacaggca cacatcctct ggccaagaag ctgcctgctc agcggaccaa tagagccgtg 600
gctctgagca gcagcgtgat gtgccctgac gccagatcca ggtgtccaga cggctccaca 660
tgttgcgaac tgcccagcgg caaatacggc tgctgcccca tgcctaacgc cacatgctgt 720
agcgaccatc ttcactgctg cccacaagac accgtgtgcg acctgatcca gagcaagtgc 780
ctgagcaaag agaacgccac caccgacctg ctgaccaaac tgccagctca caccgtggga 840
gatgtgaagt gcgacatgga agtgtcttgc cccgacggct atacctgctg tagactgcaa 900
tctggcgcct ggggctgctg ccctttaca caagctgtgt gttgcgagga ccacatccat 960
tgctgccctg ccggcttcac ctgtgacaca cagaaaggca cctgcgagca gggccctcat 1020
caggtgccat ggatggaaaa agcccctgct cacctgagcc tgcctgatcc tcaagctctg 1080
aagagggacg tgccctgcga caatgtgtct agctgcccta gcagcgacac ctgctgccag 1140
ctgacatctg gcgagtgggg ctgctgtcct ataccagagg ccgtgtgttg ttccgaccac 1200
cagcattgct gtccccaagg ctacacctgt gtggccgaag gccaatgtca acggggctct 1260
gaaattgtgg ccggcctgga aaagatgccc gccagaaggg cttctctgtc tcacccccgg 1320
gacatcggct gcgaccagca cacatcttgt cctgtgggcc agacctgttg tccctctctt 1380
ggtggatcct gggcttgctg tcagctgcct cacgccgtgt gctgcgaaga tagacaacac 1440

tgctgtcccg ccggatacac ctgtaacgtg aaggccagat cctgcgagaa agaagtggtg 1500
tctgcccagc ctgccacctt cctggctaga agtcctcacg tgggcgtgaa ggacgtggag 1560
tgtggcgagg gccacttctg ccacgacaat cagacatgct gcagagacaa ccggcaaggc 1620
tgggcttgtt gcccatatag acagggcgtg tgctgtgccg acagaaggca ctgttgtcca 1680
gccggcttta gatgtgccgc caggggcaca aagtgtctga gaagggaagc ccctaggtgg 1740
gacgcccctc tgagagatcc tgctctgaga cagctgctct gatga 1785

<210> 4
<211> 1779
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 工程化的hPRGN2编码序列
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1779)
<400> 4

atg tgg acc ctg gtt agc tgg gtg gcc ctg acc gcc ggc ctg gtg gcc 48
Met Trp Thr Leu Val Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Gly Leu Val Ala
1 5 10 15

ggc acc agg tgc ccc gac ggc cag ttc tgc ccc gtg gcc tgc tgc ctg 96
Gly Thr Arg Cys Pro Asp Gly Gln Phe Cys Pro Val Ala Cys Cys Leu
20 25 30

gac ccc ggc ggc gcc agc tac agc tgc tgc aga ccc ctg ctg gac aag 144
Asp Pro Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Cys Cys Arg Pro Leu Leu Asp Lys
35 40 45

tgg ccc acc acc ctg agc aga cac ctg ggc ggc ccc tgc cag gtg gac 192
Trp Pro Thr Thr Leu Ser Arg His Leu Gly Gly Pro Cys Gln Val Asp
50 55 60

gcc cac tgc agc gcc ggc cac agc tgc atc ttc acc gtg agc ggc acc 240
Ala His Cys Ser Ala Gly His Ser Cys Ile Phe Thr Val Ser Gly Thr
65 70 75 80

agc agc tgc tgc ccc ttc ccc gag gcc gtg gcc tgc ggc gac ggc cac 288
Ser Ser Cys Cys Pro Phe Pro Glu Ala Val Ala Cys Gly Asp Gly His
85 90 95

cac tgc tgc ccc aga ggc ttc cac tgc agc gcc gac ggc aga agc tgc 336
His Cys Cys Pro Arg Gly Phe His Cys Ser Ala Asp Gly Arg Ser Cys
100 105 110

ttc cag aga agc ggc aac aac agc gtg ggc gcc atc cag tgc ccc gac 384
Phe Gln Arg Ser Gly Asn Asn Ser Val Gly Ala Ile Gln Cys Pro Asp

```
        115                 120                 125
agc cag ttc gag tgc ccc gac ttc agc acc tgc tgc gtg atg gtg gac  432
Ser Gln Phe Glu Cys Pro Asp Phe Ser Thr Cys Cys Val Met Val Asp
    130                 135                 140
ggc agc tgg ggc tgc tgc ccc atg ccc cag gcc agc tgc tgc gag gac  480
Gly Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met Pro Gln Ala Ser Cys Cys Glu Asp
145                 150                 155                 160
aga gtg cac tgc tgc ccc cac ggc gcc ttc tgc gac ctg gtg cac acc  528
Arg Val His Cys Cys Pro His Gly Ala Phe Cys Asp Leu Val His Thr
                165                 170                 175
agg tgc atc acc ccc acc ggc acc cac ccc ctg gcc aag aag ctg ccc  576
Arg Cys Ile Thr Pro Thr Gly Thr His Pro Leu Ala Lys Lys Leu Pro
            180                 185                 190
gcc cag aga acc aac aga gcc gtg gcc ctg agc agc agc gtg atg tgc  624
Ala Gln Arg Thr Asn Arg Ala Val Ala Leu Ser Ser Ser Val Met Cys
        195                 200                 205
ccc gac gcc aga agc agg tgc ccc gac ggc agc acc tgc tgc gag ctg  672
Pro Asp Ala Arg Ser Arg Cys Pro Asp Gly Ser Thr Cys Cys Glu Leu
    210                 215                 220
ccc agc ggc aag tac ggc tgc tgc ccc atg ccc aac gcc acc tgc tgc  720
Pro Ser Gly Lys Tyr Gly Cys Cys Pro Met Pro Asn Ala Thr Cys Cys
225                 230                 235                 240
agc gac cac ctg cac tgc tgc ccc caa gac acc gtg tgc gac ctg atc  768
Ser Asp His Leu His Cys Cys Pro Gln Asp Thr Val Cys Asp Leu Ile
                245                 250                 255
cag agc aag tgc ctg agc aag gag aac gcc acc acc gac ctg ctg acc  816
Gln Ser Lys Cys Leu Ser Lys Glu Asn Ala Thr Thr Asp Leu Leu Thr
            260                 265                 270
aag ctg ccc gcc cac acc gtg ggc gac gtg aag tgc gac atg gag gtt  864
Lys Leu Pro Ala His Thr Val Gly Asp Val Lys Cys Asp Met Glu Val
        275                 280                 285
agc tgt ccc gac ggc tac acc tgc tgc aga ctg cag agc ggc gcc tgg  912
Ser Cys Pro Asp Gly Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Gln Ser Gly Ala Trp
    290                 295                 300
ggc tgc tgc ccc ttc acc caa gcc gtg tgc tgc gag gac cac atc cac  960
Gly Cys Cys Pro Phe Thr Gln Ala Val Cys Cys Glu Asp His Ile His
305                 310                 315                 320
tgc tgc ccc gcc ggc ttc acc tgc gac acc cag aag ggc acc tgc gag 1008
Cys Cys Pro Ala Gly Phe Thr Cys Asp Thr Gln Lys Gly Thr Cys Glu
```

325 330 335

cag ggc ccc cac cag gtg ccc tgg atg gag aag gcc ccc gcc cac ctg 1056
Gln Gly Pro His Gln Val Pro Trp Met Glu Lys Ala Pro Ala His Leu
340 345 350

agc ctg ccc gac ccc cag gcc ctg aag aga gac gtg ccc tgc gac aac 1104
Ser Leu Pro Asp Pro Gln Ala Leu Lys Arg Asp Val Pro Cys Asp Asn
355 360 365

gtt agc agc tgc ccc agc agc gac acc tgc tgc cag ctg acc agc ggc 1152
Val Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asp Thr Cys Cys Gln Leu Thr Ser Gly
370 375 380

gag tgg ggc tgc tgc ccc atc ccc gag gcc gtg tgc tgc agc gac cac 1200
Glu Trp Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val Cys Cys Ser Asp His
385 390 395 400

cag cac tgc tgc ccc caa ggc tac acc tgc gtg gcc gag ggc cag tgc 1248
Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val Ala Glu Gly Gln Cys
405 410 415

cag aga ggc agc gag atc gtg gcc ggc ctg gag aag atg ccc gcc aga 1296
Gln Arg Gly Ser Glu Ile Val Ala Gly Leu Glu Lys Met Pro Ala Arg
420 425 430

aga gcc agc ctg agc cac ccc aga gac atc ggc tgc gac cag cac acc 1344
Arg Ala Ser Leu Ser His Pro Arg Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr
435 440 445

agc tgc ccc gtg ggc cag acc tgc tgc ccc agc ctg ggc ggc agc tgg 1392
Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp
450 455 460

gcc tgc tgc cag ctg ccc cac gcc gtg tgc tgc gag gac aga cag cac 1440
Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His
465 470 475 480

tgc tgc ccc gcc ggc tac acc tgc aac gtg aag gcc aga agc tgc gag 1488
Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu
485 490 495

aag gag gtg gtg agc gcc cag ccc gcc acc ttc ctg gcc aga agc ccc 1536
Lys Glu Val Val Ser Ala Gln Pro Ala Thr Phe Leu Ala Arg Ser Pro
500 505 510

cac gtg ggc gtg aag gac gtg gag tgc ggc gag ggc cac ttc tgc cac 1584
His Val Gly Val Lys Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His
515 520 525

gac aac cag acc tgc tgc aga gac aac aga cag ggc tgg gcc tgc tgc 1632
Asp Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys

530 535 540

ccc tac aga cag ggc gtg tgc tgc gcc gac aga aga cac tgc tgc ccc 1680
Pro Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro
545 550 555 560

gcc gga ttt agg tgc gcc gcc aga ggc acc aag tgc ctg aga aga gag 1728
Ala Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu
565 570 575

gcc ccc agg tgg gac gcc ccc ctg aga gac ccc gcc ctg aga cag ctg 1776
Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu
580 585 590

ctg 1779
Leu

<210> 5
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 5

Met Trp Thr Leu Val Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Gly Leu Val Ala
1 5 10 15
Gly Thr Arg Cys Pro Asp Gly Gln Phe Cys Pro Val Ala Cys Cys Leu
20 25 30
Asp Pro Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Cys Cys Arg Pro Leu Leu Asp Lys
35 40 45
Trp Pro Thr Thr Leu Ser Arg His Leu Gly Gly Pro Cys Gln Val Asp
50 55 60
Ala His Cys Ser Ala Gly His Ser Cys Ile Phe Thr Val Ser Gly Thr
65 70 75 80
Ser Ser Cys Cys Pro Phe Pro Glu Ala Val Ala Cys Gly Asp Gly His
85 90 95
His Cys Cys Pro Arg Gly Phe His Cys Ser Ala Asp Gly Arg Ser Cys
100 105 110
Phe Gln Arg Ser Gly Asn Asn Ser Val Gly Ala Ile Gln Cys Pro Asp
115 120 125
Ser Gln Phe Glu Cys Pro Asp Phe Ser Thr Cys Cys Val Met Val Asp
130 135 140
Gly Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met Pro Gln Ala Ser Cys Cys Glu Asp
145 150 155 160

Arg Val His Cys Cys Pro His Gly Ala Phe Cys Asp Leu Val His Thr
165 170 175
Arg Cys Ile Thr Pro Thr Gly Thr His Pro Leu Ala Lys Lys Leu Pro
180 185 190
Ala Gln Arg Thr Asn Arg Ala Val Ala Leu Ser Ser Ser Val Met Cys
195 200 205
Pro Asp Ala Arg Ser Arg Cys Pro Asp Gly Ser Thr Cys Cys Glu Leu
210 215 220
Pro Ser Gly Lys Tyr Gly Cys Cys Pro Met Pro Asn Ala Thr Cys Cys
225 230 235 240
Ser Asp His Leu His Cys Cys Pro Gln Asp Thr Val Cys Asp Leu Ile
245 250 255
Gln Ser Lys Cys Leu Ser Lys Glu Asn Ala Thr Thr Asp Leu Leu Thr
260 265 270
Lys Leu Pro Ala His Thr Val Gly Asp Val Lys Cys Asp Met Glu Val
275 280 285
Ser Cys Pro Asp Gly Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Gln Ser Gly Ala Trp
290 295 300
Gly Cys Cys Pro Phe Thr Gln Ala Val Cys Cys Glu Asp His Ile His
305 310 315 320
Cys Cys Pro Ala Gly Phe Thr Cys Asp Thr Gln Lys Gly Thr Cys Glu
325 330 335
Gln Gly Pro His Gln Val Pro Trp Met Glu Lys Ala Pro Ala His Leu
340 345 350
Ser Leu Pro Asp Pro Gln Ala Leu Lys Arg Asp Val Pro Cys Asp Asn
355 360 365
Val Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asp Thr Cys Cys Gln Leu Thr Ser Gly
370 375 380
Glu Trp Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val Cys Cys Ser Asp His
385 390 395 400
Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val Ala Glu Gly Gln Cys
405 410 415
Gln Arg Gly Ser Glu Ile Val Ala Gly Leu Glu Lys Met Pro Ala Arg
420 425 430
Arg Ala Ser Leu Ser His Pro Arg Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr
435 440 445
Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp
450 455 460
Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His

465 470 475 480
Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu
485 490 495
Lys Glu Val Val Ser Ala Gln Pro Ala Thr Phe Leu Ala Arg Ser Pro
500 505 510
His Val Gly Val Lys Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His
515 520 525
Asp Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys
530 535 540
Pro Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro
545 550 555 560
Ala Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu
565 570 575
Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu
580 585 590
Leu

<210> 6
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 兔珠蛋白polyA
<400> 6
gatcttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agcccttga gcatctgact 60
tctggctaat aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc 120
tcactcg 127
<210> 7
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 3’AAV ITR
<400> 7
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120
gagcgcgcag 130
<210> 8
<211> 130
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 5’AAV ITR
<400> 8
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct 130
<210> 9
<211> 382
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 人CMV IE启动子
<400> 9
ctagtcgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc 60
atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac 120
cgcccaacga cccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa 180
tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg actatttacg gtaaactgcc cacttggcag 240
tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc 300
ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct 360
acgtattagt catcgctatt ac 382
<210> 10
<211> 282
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> CB启动子
<400> 10
tggtcgaggt gagccccacg ttctgcttca ctctccccat ctccccccccc tccccacccc 60
caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc gatgggggcg gggggggggg 120
gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg gggcggggcg aggcggagag 180
gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc 240
ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc gg 282
<210> 11
<211> 973
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 嵌合内含子

<400> 11

gtgagcgggc gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg 60
cttgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc tccgggaggg ccctttgtgc 120
gggggggagcg gctcgggggg tgcgtgcgtg tgtgtgtgcg tggggagcgc cgcgtgcggc 180
tccgcgctgc ccggcggctg tgagcgctgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgctccgc 240
agtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc ggtgcggggg gggctgcgag 300
gggaacaaag gctgcgtgcg gggtgtgtgc gtgggggggt gagcaggggg tgtgggcgcg 360
tcggtcgggc tgcaaccccc cctgcacccc cctccccgag ttgctgagca cggcccggct 420
tcgggtgcgg ggctccgtac ggggcgtggc gcggggctcg ccgtgccggg cgggggggtgg 480
cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg ccgcctcggg ccggggaggg ctcgggggag 540
gggcgcggcg gcccccggag cgccggcggc tgtcgaggcg cggcgagccg cagccattgc 600
cttttatggt aatcgtgcga gagggcgcag ggacttcctt tgtcccaaat ctgtgcggag 660
ccgaaatctg ggaggcgccg ccgcaccccc tctagcgggc gcggggcgaa gcggtgcggc 720
gccggcagga aggaaatggg cggggagggc cttcgtgcgt cgccgcgccg ccgtcccctt 780
ctccctctcc agcctcgggg ctgtccgcgg ggggacggct gccttcgggg gggacggggc 840
agggcggggt tcggcttctg gcgtgtgacc ggcggctcta gagcctctgc taaccatgtt 900
catgccttct tctttttcct acagctcctg ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat 960
cattttggca aag 973

<210> 12
<211> 1227
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> UbC启动子
<400> 12

ggcctccgcg ccgggttttg gcgcctcccg cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgctg 60
ccacgtcaga cgaagggcgc aggagcgtcc tgatccttcc gcccggacgc tcaggacagc 120
ggcccgctgc tcataagact cggccttaga accccagtat cagcagaagg acattttagg 180
acgggacttg ggtgactcta gggcactggt tttctttcca gagagcggaa caggcgagga 240
aaagtagtcc cttctcggcg attctgcgga gggatctccg tggggcggtg aacgccgatg 300
attatataag gacgcgccgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc 360
gcggttcttg tttgtggatc gctgtgatcg tcacttggtg agtagcgggc tgctgggctg 420
gccggggctt tcgtggccgc cgggccgctc ggtgggacgg aagcgtgtgg agagaccgcc 480
aagggctgta gtctgggtcc gcgagcaagg ttgccctgaa ctgggggttg gggggagcgc 540
agcaaaatgg cggctgttcc cgagtcttga atggaagacg cttgtgaggc gggctgtgag 600
gtcgttgaaa caaggtgggg ggcatggtgg gcggcaagaa cccaaggtct tgaggccttc 660
gctaatgcgg gaaagctctt attcgggtga gatgggctgg ggcaccatct ggggaccctg 720
acgtgaagtt tgtcactgac tggagaactc ggtttgtcgt ctgttgcggg ggcggcagtt 780
atgcggtgcc gttgggcagt gcacccgtac ctttgggagc gcgcgccctc gtcgtgtcgt 840

gacgtcaccc gttctgttgg cttataatgc agggtggggc cacctgccgg taggtgtgcg 900
gtaggctttt ctccgtcgca ggacgcaggg ttcgggccta gggtaggctc tcctgaatcg 960
acaggcgccg gacctctggt gaggggaggg ataagtgagg cgtcagtttc tttggtcggt 1020
tttatgtacc tatcttctta agtagctgaa gctccggttt tgaactatgc gctcggggtt 1080
ggcgagtgtg ttttgtgaag ttttttaggc acctttgaa atgtaatcat ttgggtcaat 1140
atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa ttctggccgt ttttggcttt 1200
tttgttagac gaagctttat tgcggta 1227

<210> 13
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 内含子
<400> 13

gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 60
cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc 120
tttctctcca cag 133

<210> 14
<211> 232
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> SV40晚期polyA
<400> 14

cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga 60
aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc 120
tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag 180
atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat cg 232

<210> 15
<211> 858
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 氨苄青霉素抗性基因
<400> 15

atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct 60
gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca 120
cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc 180
gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc 240

cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac actattctca gaatgacttg 300
gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 360
tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc 420
ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 480
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg 540
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 600
tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 660
tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct 720
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 780
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc 840
tcactgatta agcattgg 858

<210> 16
<211> 589
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> COL E1起始
<400> 16

ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 60
agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 120
cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 180
caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 240
tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 300
ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 360
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 420
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 480
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 540
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaa 589

<210> 17
<211> 1184
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> EF1a启动子
<400> 17

cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60
tgggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccgaggg tgggggagaa ccgtatataa 180
gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240

gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300
gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360
ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420
cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480
ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgcttttt 540
tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600
gggccgcggg cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660
tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720
tgcctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780
caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840
ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900
ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc 960
tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttgggggggag gggttttatg 1020
cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080
tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140
agacagtggt tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtga 1184

<210> 18
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> F1 ori
<400> 18

acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg 60
ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgctc ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca 120
cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccctttaggg ttccgattta 180
gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc 240
catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga gtccacgttc tttaatagtg 300
gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc ggtctattct tttgatttat 360
aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta 420
acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caattt 456

<210> 19
<211> 816
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 卡那霉素抗性基因
<400> 19

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 60

accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 120
taggatggca agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180
tattaatttc ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac 240
tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca 300
gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg 360
cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata 480
ttcttctaat acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc 540
atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 660
caactctggc gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac 720
attatcgcga gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg 780
cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg gctcat 816

<210> 20
<211> 131
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> P5启动子
<400> 20

gtcctgtatt agaggtcacg tgagtgtttt gcgacatttt gcgacaccat gtggtcacgc 60
tgggtattta agcccgagtg agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga ggtttgaacg 120
cgcagccgcc a 131

<210> 21
<211> 295
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> LacZ启动子
<400> 21

gcggccgcca ccgcggtgga gctccagctt ttgttccctt tagtgagggt taattgcgcg 60
cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc 120
acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta 180
actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca 240
gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg ggcgc 295

<210> 22
<211> 3852
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> EF1a.huPGRN.SV40

<220>

<221> repeat_region

<222> (1)..(130)

<400> 22

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180
aggaagatcc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctaggctttt 240
gcaaaaagct ttgcaaagat ggataaagtt ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatg 300
gaccttctag gtcttgaaag gagtgcctcg tgaggctccg gtgcccgtca gtgggcagag 360
cgcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc 420
tagagaaggt ggcgcggggt aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt 480
cccgagggtg ggggagaacc gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc 540
aacgggtttg ccgccagaac acaggtaagt gccgtgtgtg gttcccgcgg gcctggcctc 600
tttacgggtt atggcccttg cgtgccttga attacttcca cctggctgca gtacgtgatt 660
cttgatcccg agcttcgggt tggaagtggg tgggagagtt cgaggccttg cgcttaagga 720
gcccccttcgc ctcgtgcttg agttgaggcc tggcctgggc gctggggccg ccgcgtgcga 780
atctggtggc accttcgcgc ctgtctcgct gctttcgata agtctctagc catttaaaat 840
ttttgatgac ctgctgcgac gctttttttc tggcaagata gtcttgtaaa tgcgggccaa 900
gatctgcaca ctggtatttc ggtttttggg gccgcgggcg gcgacggggc ccgtgcgtcc 960
cagcgcacat gttcggcgag gcggggcctg cgagcgcggc caccgagaat cggacggggg 1020
tagtctcaag ctggccggcc tgctctggtg cctggcctcg cgccgccgtg tatcgccccg 1080
ccctgggcgg caaggctggc ccggtcggca ccagttgcgt gagcggaaag atggccgctt 1140
cccggccctg ctgcagggag ctcaaaatgg aggacgcggc gctcgggaga gcgggcgggt 1200
gagtcaccca cacaaaggaa aagggccttt ccgtcctcag ccgtcgcttc atgtgactcc 1260
acggagtacc gggcgccgtc caggcacctc gattagttct cgagcttttg gagtacgtcg 1320
tctttaggtt gggggggaggg gttttatgcg atggagtttc cccacactga gtgggtggag 1380
actgaagtta ggccagcttg gcacttgatg taattctcct tggaatttgc ccttttgag 1440
tttggatctt ggttcattct caagcctcag acagtggttc aaagtttttt tcttccattt 1500
caggtgtcgt gaggaattag cttggtacta atacgactca ctatagggag acccaagctg 1560
gctaggtaag cttggtaccg agctcggatc aattcgccac catgtggacc ctggtgtctt 1620
gggttgcact gacagctgga ctggtggccg gcacaagatg tcctgacggc cagttttgcc 1680
ccgtggcctg ctgtcttgat cctggcggag ccagctacag ctgctgcaga cctctgctgg 1740
ataagtggcc caccacactg agcagacacc tcggaggacc ttgtcaggtg gacgcccact 1800
gttctgccgg acacagctgc atctttaccg tgtctggcac ctccagctgc tgtccatttc 1860
ctgaggctgt ggcctgcgga gacggccacc actgttgtcc tagaggcttc cactgtagcg 1920
ccgacggcag aagctgcttt cagagaagcg gcaacaatag cgtgggcgcc atccagtgtc 1980

ctgacagcca gttcgagtgc cccgacttca gcacctgttg cgtgatggtg gacggcagct 2040
ggggctgttg tccaatgcct caggctagct gctgcgagga cagagtgcac tgttgccctc 2100
acggcgcctt ttgcgatctg gtgcacaccc ggtgcatcac cccaacaggc acacatcctc 2160
tggccaagaa gctgcctgct cagcggacca atagagccgt ggctctgagc agcagcgtga 2220
tgtgccctga cgccagatcc aggtgtccag acggctccac atgttgcgaa ctgcccagcg 2280
gcaaatacgg ctgctgcccc atgcctaacg ccacatgctg tagcgaccat cttcactgct 2340
gcccacaaga caccgtgtgc gacctgatcc agagcaagtg cctgagcaaa gagaacgcca 2400
ccaccgacct gctgaccaaa ctgccagctc acaccgtggg agatgtgaag tgcgacatgg 2460
aagtgtcttg ccccgacggc tatacctgct gtagactgca atctggcgcc tggggctgct 2520
gccctttttac acaagctgtg tgttgcgagg accacatcca ttgctgccct gccggcttca 2580
cctgtgacac acagaaaggc acctgcgagc agggccctca tcaggtgcca tggatggaaa 2640
aagcccctgc tcacctgagc ctgcctgatc ctcaagctct gaagagggac gtgccctgcg 2700
acaatgtgtc tagctgccct agcagcgaca cctgctgcca gctgacatct ggcgagtggg 2760
gctgctgtcc tataccagag gccgtgtgtt gttccgacca ccagcattgc tgtccccaag 2820
gctacacctg tgtggccgaa ggccaatgtc aacggggctc tgaaattgtg gccggcctgg 2880
aaaagatgcc cgccagaagg gcttctctgt ctcacccccg ggacatcggc tgcgaccagc 2940
acacatcttg tcctgtgggc cagacctgtt gtccctctct tggtggatcc tgggcttgct 3000
gtcagctgcc tcacgccgtg tgctgcgaag atagacaaca ctgctgtccc gccggataca 3060
cctgtaacgt gaaggccaga tcctgcgaga aagaagtggt gtctgcccag cctgccacct 3120
tcctggctag aagtcctcac gtgggcgtga aggacgtgga gtgtggcgag ggccacttct 3180
gccacgacaa tcagacatgc tgcagagaca accggcaagg ctgggcttgt tgcccatata 3240
gacagggcgt gtgctgtgcc gacagaaggc actgttgtcc agccggcttt agatgtgccg 3300
ccaggggcac aaagtgtctg agaagggaag cccctaggtg ggacgcccct ctgagagatc 3360
ctgctctgag acagctgctc tgatgaggta cctctagagt cgacccgggc ggcctcgagg 3420
ccgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg 3480
cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt 3540
ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag 3600
ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taaaatcgat 3660
aaggatcttc ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta 3720
caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga 3780
ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga 3840
gcgagcgcgc ag 3852

<210> 23
<211> 3972
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> Ubc.PI.huPGRN.SV40
<400> 23

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180
aggaagatct ggcctccgcg ccgggttttg gcgcctcccg cgggcgcccc cctcctcacg 240
gcgagcgctg ccacgtcaga cgaagggcgc aggagcgtcc tgatccttcc gcccggacgc 300
tcaggacagc ggcccgctgc tcataagact cggccttaga accccagtat cagcagaagg 360
acattttagg acgggacttg ggtgactcta gggcactggt tttctttcca gagagcggaa 420
caggcgagga aaagtagtcc cttctcggcg attctgcgga gggatctccg tggggcggtg 480
aacgccgatg attatataag gacgcgccgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg 540
gatttgggtc gcggttcttg tttgtggatc gctgtgatcg tcacttggtg agtagcgggc 600
tgctgggctg gccggggctt tcgtggccgc cgggccgctc ggtgggacgg aagcgtgtgg 660
agagaccgcc aagggctgta gtctgggtcc gcgagcaagg ttgccctgaa ctgggggttg 720
gggggagcgc agcaaaatgg cggctgttcc cgagtcttga atggaagacg cttgtgaggc 780
gggctgtgag gtcgttgaaa caaggtgggg ggcatggtgg gcggcaagaa cccaaggtct 840
tgaggccttc gctaatgcgg gaaagctctt attcgggtga gatgggctgg ggcaccatct 900
ggggaccctg acgtgaagtt tgtcactgac tggagaactc ggtttgtcgt ctgttgcggg 960
ggcggcagtt atgcggtgcc gttgggcagt gcacccgtac ctttgggagc gcgcgccctc 1020
gtcgtgtcgt gacgtcaccc gttctgttgg cttataatgc agggtggggc cacctgccgg 1080
taggtgtgcg gtaggctttt ctccgtcgca ggacgcaggg ttcgggccta gggtaggctc 1140
tcctgaatcg acaggcgccg gacctctggt gaggggaggg ataagtgagg cgtcagtttc 1200
tttggtcggt tttatgtacc tatcttctta agtagctgaa gctccggttt tgaactatgc 1260
gctcggggtt ggcgagtgtg ttttgtgaag ttttttaggc acctttgaa atgtaatcat 1320
ttgggtcaat atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa ttctggccgt 1380
ttttggcttt tttgttagac gaagctttat tgcggtagtt tatcacagtt aaattgctaa 1440
cgcagtcagt gcttctgaca caacagtctc gaacttaagc tgcagaagtt ggtcgtgagg 1500
cactgggcag gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg 1560
cttgtcgaga cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat 1620
ccactttgcc tttctctcca caggtgtcca ctcccagttc aattacagct cttaaggcta 1680
gagtacttaa tacgactcac tataggctag aattcgccac catgtggacc ctggtgtctt 1740
gggttgcact gacagctgga ctggtggccg gcacaagatg tcctgacggc cagttttgcc 1800
ccgtggcctg ctgtcttgat cctggcggag ccagctacag ctgctgcaga cctctgctgg 1860
ataagtggcc caccacactg agcagacacc tcggaggacc ttgtcaggtg gacgcccact 1920
gttctgccgg acacagctgc atctttaccg tgtctggcac ctccagctgc tgtccatttc 1980
ctgaggctgt ggcctgcgga gacggccacc actgttgtcc tagaggcttc cactgtagcg 2040
ccgacggcag aagctgcttt cagagaagcg gcaacaatag cgtgggcgcc atccagtgtc 2100
ctgacagcca gttcgagtgc cccgacttca gcacctgttg cgtgatggtg gacggcagct 2160
ggggctgttg tccaatgcct caggctagct gctgcgagga cagagtgcac tgttgccctc 2220
acggcgcctt ttgcgatctg gtgcacaccc ggtgcatcac cccaacaggc acacatcctc 2280
tggccaagaa gctgcctgct cagcggacca atagagccgt ggctctgagc agcagcgtga 2340

tgtgccctga cgccagatcc aggtgtccag acggctccac atgttgcgaa ctgcccagcg 2400
gcaaatacgg ctgctgcccc atgcctaacg ccacatgctg tagcgaccat cttcactgct 2460
gcccacaaga caccgtgtgc gacctgatcc agagcaagtg cctgagcaaa gagaacgcca 2520
ccaccgacct gctgaccaaa ctgccagctc acaccgtggg agatgtgaag tgcgacatgg 2580
aagtgtcttg ccccgacggc tatacctgct gtagactgca atctggcgcc tggggctgct 2640
gccctttttac acaagctgtg tgttgcgagg accacatcca ttgctgccct gccggcttca 2700
cctgtgacac acagaaaggc acctgcgagc agggccctca tcaggtgcca tggatggaaa 2760
aagcccctgc tcacctgagc ctgcctgatc ctcaagctct gaagagggac gtgccctgcg 2820
acaatgtgtc tagctgccct agcagcgaca cctgctgcca gctgacatct ggcgagtggg 2880
gctgctgtcc tataccagag gccgtgtgtt gttccgacca ccagcattgc tgtccccaag 2940
gctacacctg tgtggccgaa ggccaatgtc aacggggctc tgaaattgtg gccggcctgg 3000
aaaagatgcc cgccagaagg gcttctctgt ctcacccccg ggacatcggc tgcgaccagc 3060
acacatcttg tcctgtgggc cagacctgtt gtccctctct tggtggatcc tgggcttgct 3120
gtcagctgcc tcacgccgtg tgctgcgaag atagacaaca ctgctgtccc gccggataca 3180
cctgtaacgt gaaggccaga tcctgcgaga aagaagtggt gtctgcccag cctgccacct 3240
tcctggctag aagtcctcac gtgggcgtga aggacgtgga gtgtggcgag ggccacttct 3300
gccacgacaa tcagacatgc tgcagagaca accggcaagg ctgggcttgt tgcccatata 3360
gacagggcgt gtgctgtgcc gacagaaggc actgttgtcc agccggcttt agatgtgccg 3420
ccaggggcac aaagtgtctg agaagggaag cccctaggtg ggacgcccct ctgagagatc 3480
ctgctctgag acagctgctc tgatgaggta cctctagagt cgacccgggc ggcctcgagg 3540
ccgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg 3600
cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt 3660
ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag 3720
ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taaaatcgat 3780
aaggatcttc ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta 3840
caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga 3900
ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga 3960
gcgagcgcgc ag 3972

<210> 24
<211> 4131
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> CB7.CI.hPGRN1.rBG
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(130)
<223> 5’ ITR
<220>

<221> misc_feature
<222> (198)..(579)
<223> CMV IE增强子
<220>
<221> misc_feature
<222> (582)..(863)
<223> 鸡β肌动蛋白启动子
<220>
<221> misc_feature
<222> (958)..(1930)
<223> 嵌合内含子
<220>
<221> misc_feature
<222> (1942)..(3726)
<223> hPGRN
<220>
<221> misc_feature
<222> (3787)..(3913)
<223> 兔β珠蛋白polyA
<220>
<221> misc_feature
<222> (4002)..(4131)
<223> 3’ ITR
<400> 24

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg 180
atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240
tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300
tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta 420
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 540
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac 600
gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat 660
tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg gggggcgcgc cgccaggcgg 720
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 780
gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 840
aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgc 900

tccgccgccg cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg 960
agcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt 1020
gtttcttttc tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggg 1080
gggagcggct cgggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgccgc gtgcggctcc 1140
gcgctgcccg gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt 1200
gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg 1260
aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg gggggggtgag caggggtgt gggcgcgtcg 1320
gtcgggctgc aaccccccct gcacccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggcttcg 1380
ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctcgccg tgccgggcgg ggggtggcgg 1440
caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggccg gggagggctc gggggagggg 1500
cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt 1560
ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg 1620
aaatctggga ggcgccgccg cacccccctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgcc 1680
ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgccg tccccttctc 1740
cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcgggggggg acggggcagg 1800
gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1860
gccttcttct ttttcctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920
tttggcaaag aattcgccac catgtggacc ctggtgtctt gggttgcact gacagctgga 1980
ctggtggccg gcacaagatg tcctgacggc cagttttgcc ccgtggcctg ctgtcttgat 2040
cctggcggag ccagctacag ctgctgcaga cctctgctgg ataagtggcc caccacactg 2100
agcagacacc tcggaggacc ttgtcaggtg gacgcccact gttctgccgg acacagctgc 2160
atctttaccg tgtctggcac ctccagctgc tgtccatttc ctgaggctgt ggcctgcgga 2220
gacggccacc actgttgtcc tagaggcttc cactgtagcg ccgacggcag aagctgcttt 2280
cagagaagcg gcaacaatag cgtgggcgcc atccagtgtc ctgacagcca gttcgagtgc 2340
cccgacttca gcacctgttg cgtgatggtg gacggcagct ggggctgttg tccaatgcct 2400
caggctagct gctgcgagga cagagtgcac tgttgccctc acggcgcctt ttgcgatctg 2460
gtgcacaccc ggtgcatcac cccaacaggc acacatcctc tggccaagaa gctgcctgct 2520
cagcggacca atagagccgt ggctctgagc agcagcgtga tgtgccctga cgccagatcc 2580
aggtgtccag acggctccac atgttgcgaa ctgcccagcg gcaaatacgg ctgctgcccc 2640
atgcctaacg ccacatgctg tagcgaccat cttcactgct gcccacaaga caccgtgtgc 2700
gacctgatcc agagcaagtg cctgagcaaa gagaacgcca ccaccgacct gctgaccaaa 2760
ctgccagctc acaccgtggg agatgtgaag tgcgacatgg aagtgtcttg ccccgacggc 2820
tatacctgct gtagactgca atctggcgcc tggggctgct gccctttttac acaagctgtg 2880
tgttgcgagg accacatcca ttgctgccct gccggcttca cctgtgacac acagaaaggc 2940
acctgcgagc agggccctca tcaggtgcca tggatggaaa aagcccctgc tcacctgagc 3000
ctgcctgatc ctcaagctct gaagagggac gtgccctgcg acaatgtgtc tagctgccct 3060
agcagcgaca cctgctgcca gctgacatct ggcgagtggg gctgctgtcc tataccagag 3120
gccgtgtgtt gttccgacca ccagcattgc tgtccccaag gctacacctg tgtggccgaa 3180
ggccaatgtc aacggggctc tgaaattgtg gccggcctgg aaaagatgcc cgccagaagg 3240

gcttctctgt ctcacccccg ggacatcggc tgcgaccagc acacatcttg tcctgtgggc 3300
cagacctgtt gtccctctct tggtggatcc tgggcttgct gtcagctgcc tcacgccgtg 3360
tgctgcgaag atagacaaca ctgctgtccc gccggataca cctgtaacgt gaaggccaga 3420
tcctgcgaga aagaagtggt gtctgcccag cctgccacct tcctggctag aagtcctcac 3480
gtgggcgtga aggacgtgga gtgtggcgag ggccacttct gccacgacaa tcagacatgc 3540
tgcagagaca accggcaagg ctgggcttgt tgcccatata gacagggcgt gtgctgtgcc 3600
gacagaaggc actgttgtcc agccggcttt agatgtgccg ccaggggcac aaagtgtctg 3660
agaagggaag cccctaggtg ggacgcccct ctgagagatc ctgctctgag acagctgctc 3720
tgatgaggta cctctagagt cgacccgggc ggcctcgagg acggggtgaa ctacgcctga 3780
ggatccgatc tttttccctc tgccaaaaat tatggggaca tcatgaagcc ccttgagcat 3840
ctgacttctg gctaataaag gaaatttatt ttcattgcaa tagtgtgttg gaatttttg 3900
tgtctctcac tcggaagcaa ttcgttgatc tgaatttcga ccacccataa tacccattac 3960
cctggtagat aagtagcatg gcgggttaat cattaactac aaggaacccc tagtgatgga 4020
gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gctcactgag gccgggcgac caaaggtcgc 4080
ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca g 4131

<210> 25
<211> 2208
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> AAV1 VP1基因
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2208)
<400> 25

atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc tct 48
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

gag ggc att cgc gag tgg tgg gac ttg aaa cct gga gcc ccg aag ccc 96
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

aaa gcc aac cag caa aag cag gac gac ggc cgg ggt ctg gtg ctt cct 144
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

ggc tac aag tac ctc gga ccc ttc aac gga ctc gac aag ggg gag ccc 192
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

gtc aac gcg gcg gac gca gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac 240
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

cag cag ctc aaa gcg ggt gac aat ccg tac ctg cgg tat aac cac gcc 288
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

gac gcc gag ttt cag gag cgt ctg caa gaa gat acg tct ttt ggg ggc 336
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aag aag cgg gtt ctc gaa cct 384
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

ctc ggt ctg gtt gag gaa ggc gct aag acg gct cct gga aag aaa cgt 432
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

ccg gta gag cag tcg cca caa gag cca gac tcc tcc tcg ggc atc ggc 480
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
145 150 155 160

aag aca ggc cag cag ccc gct aaa aag aga ctc aat ttt ggt cag act 528
Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

ggc gac tca gag tca gtc ccc gat cca caa cct ctc gga gaa cct cca 576
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
180 185 190

gca acc ccc gct gct gtg gga cct act aca atg gct tca ggc ggt ggc 624
Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

gca cca atg gca gac aat aac gaa ggc gcc gac gga gtg ggt aat gcc 672
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
210 215 220

tca gga aat tgg cat tgc gat tcc aca tgg ctg ggc gac aga gtc atc 720
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

acc acc agc acc cgc acc tgg gcc ttg ccc acc tac aat aac cac ctc 768
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

tac aag caa atc tcc agt gct tca acg ggg gcc agc aac gac aac cac 816
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
260 265 270

tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gat ttc aac aga ttc 864
Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe

```
        275                 280                 285
cac tgc cac ttt tca cca cgt gac tgg cag cga ctc atc aac aac aat  912
His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
    290                 295                 300
tgg gga ttc cgg ccc aag aga ctc aac ttc aaa ctc ttc aac atc caa  960
Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
305                 310                 315                 320
gtc aag gag gtc acg acg aat gat ggc gtc aca acc atc gct aat aac 1008
Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
                325                 330                 335
ctt acc agc acg gtt caa gtc ttc tcg gac tcg gag tac cag ctt ccg 1056
Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
            340                 345                 350
tac gtc ctc ggc tct gcg cac cag ggc tgc ctc cct ccg ttc ccg gcg 1104
Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
        355                 360                 365
gac gtg ttc atg att ccg caa tac ggc tac ctg acg ctc aac aat ggc 1152
Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
    370                 375                 380
agc caa gcc gtg gga cgt tca tcc ttt tac tgc ctg gaa tat ttc cct 1200
Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
385                 390                 395                 400
tct cag atg ctg aga acg ggc aac aac ttt acc ttc agc tac acc ttt 1248
Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
                405                 410                 415
gag gaa gtg cct ttc cac agc agc tac gcg cac agc cag agc ctg gac 1296
Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
            420                 425                 430
cgg ctg atg aat cct ctc atc gac caa tac ctg tat tac ctg aac aga 1344
Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
        435                 440                 445
act caa aat cag tcc gga agt gcc caa aac aag gac ttg ctg ttt agc 1392
Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
    450                 455                 460
cgt ggg tct cca gct ggc atg tct gtt cag ccc aaa aac tgg cta cct 1440
Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
465                 470                 475                 480
gga ccc tgt tat cgg cag cag cgc gtt tct aaa aca aaa aca gac aac 1488
Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
```

485 490 495

aac aac agc aat ttt acc tgg act ggt gct tca aaa tat aac ctc aat 1536
Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
500 505 510

ggg cgt gaa tcc atc atc aac cct ggc act gct atg gcc tca cac aaa 1584
Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

gac gac gaa gac aag ttc ttt ccc atg agc ggt gtc atg att ttt gga 1632
Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
530 535 540

aaa gag agc gcc gga gct tca aac act gca ttg gac aat gtc atg att 1680
Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
545 550 555 560

aca gac gaa gag gaa att aaa gcc act aac cct gtg gcc acc gaa aga 1728
Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
565 570 575

ttt ggg acc gtg gca gtc aat ttc cag agc agc agc aca gac cct gcg 1776
Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
580 585 590

acc gga gat gtg cat gct atg gga gca tta cct ggc atg gtg tgg caa 1824
Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

gat aga gac gtg tac ctg cag ggt ccc att tgg gcc aaa att cct cac 1872
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

aca gat gga cac ttt cac ccg tct cct ctt atg ggc ggc ttt gga ctc 1920
Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640

aag aac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac acg cct gtt cct gcg 1968
Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

aat cct ccg gcg gag ttt tca gct aca aag ttt gct tca ttc atc acc 2016
Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670

caa tac tcc aca gga caa gtg agt gtg gaa att gaa tgg gag ctg cag 2064
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

aaa gaa aac agc aag cgc tgg aat ccc gaa gtg cag tac aca tcc aat 2112
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn

690 695 700

tat gca aaa tct gcc aac gtt gat ttt act gtg gac aac aat gga ctt 2160
Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720

tat act gag cct cgc ccc att ggc acc cgt tac ctt acc cgt ccc ctg 2208
Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
725 730 735

<210> 26
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 26

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
145 150 155 160
Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser

450 455 460

Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro

465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn

500 505 510

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525
Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
565 570 575
Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
580 585 590
Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620
Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640
Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655
Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700
Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720
Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
725 730 735

<210> 27
<211> 1863
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> AAV2 rep
<400> 27

atgccggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga gcatctgccc 60
ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt gccgccagat 120
tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga gaagctgcag 180
cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggctct tttctttgtg 240

caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac caccggggtg 300
aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat tcagagaatt 360
taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac cagaaatggc 420
gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt gctccccaaa 480
acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag cgcctgtttg 540
aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc gcagacgcag 600
gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggtgatcag atcaaaaact 660
tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac ctcggagaag 720
cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc caactcgcgg 780
tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac taaaaccgcc 840
cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg gatttataaa 900
attttggaac taaacgggta cgatccccaa tatgcggctt ccgtctttct gggatgggcc 960
acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac taccgggaag 1020
accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt aaactggacc 1080
aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg ggaggagggg 1140
aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag caaggtgcgc 1200
gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagacccga ctcccgtgat cgtcacctcc 1260
aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca ccagcagccg 1320
ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga ctttgggaag 1380
gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cggtgggcaa aggatcacgt ggttgaggtg 1440
gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc cagtgacgca 1500
gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac gtcagacgcg 1560
gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca cgtgggcatg 1620
aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc aaatatctgc 1680
ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg tgtcagaatc tcaacccgtt 1740
tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat gggaaaggtg 1800
ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg catctttgaa 1860
caa 1863

<210> 28
<211> 2172
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> AAV5衣壳VP1基因
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2172)
<400> 28
atg tct ttt gtt gat cac cct cca gat tgg ttg gaa gaa gtt ggt gaa 48

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
1 5 10 15

ggt ctt cgc gag ttt ttg ggc ctt gaa gcg ggc cca ccg aaa cca aaa 96
Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

ccc aat cag cag cat caa gat caa gcc cgt ggt ctt gtg ctg cct ggt 144
Pro Asn Gln Gln His Gln Asp Gln Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly
35 40 45

tat aac tat ctc gga ccc gga aac ggt ctc gat cga gga gag cct gtc 192
Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val
50 55 60

aac agg gca gac gag gtc gcg cga gag cac gac atc tcg tac aac gag 240
Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu
65 70 75 80

cag ctt gag gcg gga gac aac ccc tac ctc aag tac aac cac gcg gac 288
Gln Leu Glu Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp
85 90 95

gcc gag ttt cag gag aag ctc gcc gac gac aca tcc ttc ggg gga aac 336
Ala Glu Phe Gln Glu Lys Leu Ala Asp Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn
100 105 110

ctc gga aag gca gtc ttt cag gcc aag aaa agg gtt ctc gaa cct ttt 384
Leu Gly Lys Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Phe
115 120 125

ggc ctg gtt gaa gag ggt gct aag acg gcc cct acc gga aag cgg ata 432
Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Thr Gly Lys Arg Ile
130 135 140

gac gac cac ttt cca aaa aga aag aag gcc cgg acc gaa gag gac tcc 480
Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser
145 150 155 160

aag cct tcc acc tcg tca gac gcc gaa gct gga ccc agc gga tcc cag 528
Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln
165 170 175

cag ctg caa atc cca gcc caa cca gcc tca agt ttg gga gct gat aca 576
Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr
180 185 190

atg tct gcg gga ggt ggc ggc cca ttg ggc gac aat aac caa ggt gcc 624
Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala
195 200 205

gat gga gtg ggc aat gcc tcg gga gat tgg cat tgc gat tcc acg tgg 672

Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
210 215 220

atg ggg gac aga gtc gtc acc aag tcc acc cga acc tgg gtg ctg ccc 720
Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro
225 230 235 240

agc tac aac aac cac cag tac cga gag atc aaa agc ggc tcc gtc gac 768
Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp
245 250 255

gga agc aac gcc aac gcc tac ttt gga tac agc acc ccc tgg ggg tac 816
Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
260 265 270

ttt gac ttt aac cgc ttc cac agc cac tgg agc ccc cga gac tgg caa 864
Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln
275 280 285

aga ctc atc aac aac tac tgg ggc ttc aga ccc cgg tcc ctc aga gtc 912
Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val
290 295 300

aaa atc ttc aac att caa gtc aaa gag gtc acg gtg cag gac tcc acc 960
Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr
305 310 315 320

acc acc atc gcc aac aac ctc acc tcc acc gtc caa gtg ttt acg gac 1008
Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
325 330 335

gac gac tac cag ctg ccc tac gtc gtc ggc aac ggg acc gag gga tgc 1056
Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
340 345 350

ctg ccg gcc ttc cct ccg cag gtc ttt acg ctg ccg cag tac ggt tac 1104
Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
355 360 365

gcg acg ctg aac cgc gac aac aca gaa aat ccc acc gag agg agc agc 1152
Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
370 375 380

ttc ttc tgc cta gag tac ttt ccc agc aag atg ctg aga acg ggc aac 1200
Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
385 390 395 400

aac ttt gag ttt acc tac aac ttt gag gag gtg ccc ttc cac tcc agc 1248
Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
405 410 415

ttc gct ccc agt cag aac ctc ttc aag ctg gcc aac ccg ctg gtg gac 1296

Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
420 425 430

cag tac ttg tac cgc ttc gtg agc aca aat aac act ggc gga gtc cag 1344
Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
435 440 445

ttc aac aag aac ctg gcc ggg aga tac gcc aac acc tac aaa aac tgg 1392
Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
450 455 460

ttc ccg ggg ccc atg ggc cga acc cag ggc tgg aac ctg ggc tcc ggg 1440
Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
465 470 475 480

gtc aac cgc gcc agt gtc agc gcc ttc gcc acg acc aat agg atg gag 1488
Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
485 490 495

ctc gag ggc gcg agt tac cag gtg ccc ccg cag ccg aac ggc atg acc 1536
Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
500 505 510

aac aac ctc cag ggc agc aac acc tat gcc ctg gag aac act atg atc 1584
Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
515 520 525

ttc aac agc cag ccg gcg aac ccg ggc acc acc gcc acg tac ctc gag 1632
Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
530 535 540

ggc aac atg ctc atc acc agc gag agc gag acg cag ccg gtg aac cgc 1680
Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
545 550 555 560

gtg gcg tac aac gtc ggc ggg cag atg gcc acc aac aac cag agc tcc 1728
Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
565 570 575

acc act gcc ccc gcg acc ggc acg tac aac ctc cag gaa atc gtg ccc 1776
Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro
580 585 590

ggc agc gtg tgg atg gag agg gac gtg tac ctc caa gga ccc atc tgg 1824
Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
595 600 605

gcc aag atc cca gag acg ggg gcg cac ttt cac ccc tct ccg gcc atg 1872
Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
610 615 620

ggc gga ttc gga ctc aaa cac cca ccg ccc atg atg ctc atc aag aac 1920

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
625 630 635 640

acg cct gtg ccc gga aat atc acc agc ttc tcg gac gtg ccc gtc agc 1968
Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser
645 650 655

agc ttc atc acc cag tac agc acc ggg cag gtc acc gtg gag atg gag 2016
Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu
660 665 670

tgg gag ctc aag aag gaa aac tcc aag agg tgg aac cca gag atc cag 2064
Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln
675 680 685

tac aca aac aac tac aac gac ccc cag ttt gtg gac ttt gcc ccg gac 2112
Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp
690 695 700

agc acc ggg gaa tac aga acc acc aga cct atc gga acc cga tac ctt 2160
Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu
705 710 715 720

acc cga ccc ctt 2172
Thr Arg Pro Leu

<210> 29
<211> 724
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 29

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
1 5 10 15

Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

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

Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val
50 55 60

Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu
65 70 75 80

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

Ala Glu Phe Gln Glu Lys Leu Ala Asp Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn

100 105 110

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

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

Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser
145 150 155 160

Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln
165 170 175

Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr
180 185 190

Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala
195 200 205

Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
210 215 220

Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro
225 230 235 240

Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp
245 250 255

Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
260 265 270

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln
275 280 285

Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val
290 295 300

Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr
305 310 315 320

Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
325 330 335

Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
340 345 350

Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
355 360 365

Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
370 375 380

Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
385 390 395 400

Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
405 410 415

Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
420 425 430
Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
435 440 445
Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
450 455 460
Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
465 470 475 480
Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
485 490 495
Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
500 505 510
Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
515 520 525
Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
530 535 540
Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
545 550 555 560
Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
565 570 575
Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro
580 585 590
Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
595 600 605
Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
610 615 620
Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
625 630 635 640
Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser
645 650 655
Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu
660 665 670
Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln
675 680 685
Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp
690 695 700
Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu
705 710 715 720
Thr Arg Pro Leu

<210> 30
<211> 2211
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> AAVhu68 VP1衣壳
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2211)
<400> 30

```
atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc agt        48
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1               5                  10                  15
gaa ggc att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct caa ccc        96
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
            20                  25                  30
aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct cgg ggt ctt gtg ctt ccg       144
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
        35                  40                  45
ggt tac aaa tac ctt gga ccc ggc aac gga ctc gac aag ggg gag ccg       192
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60
gtc aac gaa gca gac gcg gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac       240
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80
cag cag ctc aag gcc gga gac aac ccg tac ctc aag tac aac cac gcc       288
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95
gac gcc gag ttc cag gag cgg ctc aaa gaa gat acg tct ttt ggg ggc       336
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110
aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aaa aag agg ctt ctt gaa cct       384
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
        115                 120                 125
ctt ggt ctg gtt gag gaa gcg gct aag acg gct cct gga aag aag agg       432
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140
cct gta gag cag tct cct cag gaa ccg gac tcc tcc gtg ggt att ggc       480
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly
```

145 150 155 160

aaa tcg ggt gca cag ccc gct aaa aag aga ctc aat ttc ggt cag act 528
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

ggc gac aca gag tca gtc ccc gac cct caa cca atc gga gaa cct ccc 576
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190

gca gcc ccc tca ggt gtg gga tct ctt aca atg gct tca ggt ggt ggc 624
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

gca cca gtg gca gac aat aac gaa ggt gcc gat gga gtg ggt agt tcc 672
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

tcg gga aat tgg cat tgc gat tcc caa tgg ctg ggg gac aga gtc atc 720
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctg ccc acc tac aac aat cac ctc 768
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

tac aag caa atc tcc aac agc aca tct gga gga tct tca aat gac aac 816
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

gcc tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gac ttc aac aga 864
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285

ttc cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg caa aga ctc atc aac aac 912
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300

aac tgg gga ttc cgg cct aag cga ctc aac ttc aag ctc ttc aac att 960
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

cag gtc aaa gag gtt acg gac aac aat gga gtc aag acc atc gct aat 1008
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335

aac ctt acc agc acg gtc cag gtc ttc acg gac tca gac tat cag ctc 1056
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

ccg tac gtg ctc ggg tcg gct cac gag ggc tgc ctc ccg ccg ttc cca 1104
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro

```
        355                 360                 365
gcg gac gtt ttc atg att cct cag tac ggg tat cta acg ctt aat gat  1152
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380
gga agc caa gcc gtg ggt cgt tcg tcc ttt tac tgc ctg gaa tat ttc  1200
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400
ccg tcg caa atg cta aga acg ggt aac aac ttc cag ttc agc tac gag  1248
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415
ttt gag aac gta cct ttc cat agc agc tat gct cac agc caa agc ctg  1296
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430
gac cga ctc atg aat cca ctc atc gac caa tac ttg tac tat ctc tca  1344
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445
aag act att aac ggt tct gga cag aat caa caa acg cta aaa ttc agt  1392
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460
gtg gcc gga ccc agc aac atg gct gtc cag gga aga aac tac ata cct  1440
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480
gga ccc agc tac cga caa caa cgt gtc tca acc act gtg act caa aac  1488
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495
aac aac agc gaa ttt gct tgg cct gga gct tct tct tgg gct ctc aat  1536
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510
gga cgt aat agc ttg atg aat cct gga cct gct atg gcc agc cac aaa  1584
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525
gaa gga gag gac cgt ttc ttt cct ttg tct gga tct tta att ttt ggc  1632
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540
aaa caa gga act gga aga gac aac gtg gat gcg gac aaa gtc atg ata  1680
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560
acc aac gaa gaa gaa att aaa act acc aac cca gta gca acg gag tcc  1728
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
```

565 570 575

tat gga caa gtg gcc aca aac cac cag agt gcc caa gca cag gcg cag 1776
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

acc ggc tgg gtt caa aac caa gga ata ctt ccg ggt atg gtt tgg cag 1824
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

gac aga gat gtg tac ctg caa gga ccc att tgg gcc aaa att cct cac 1872
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

acg gac ggc aac ttt cac cct tct ccg ctg atg gga ggg ttt gga atg 1920
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

aag cac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac aca cct gta cct gcg 1968
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

gat cct cca acg gct ttc aac aag gac aag ctg aac tct ttc atc acc 2016
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

cag tat tct act ggc caa gtc agc gtg gag att gag tgg gag ctg cag 2064
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

aag gaa aac agc aag cgc tgg aac ccg gag atc cag tac act tcc aac 2112
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

tat tac aag tct aat aat gtt gaa ttt gct gtt aat act gaa ggt gtt 2160
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

tat tct gaa ccc cgc ccc att ggc acc aga tac ctg act cgt aat ctg 2208
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

taa 2211

<210> 31
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 31

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile

305 310 315 320
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> miRNA靶序列
<400> 32
agtgaattct accagtgcca ta 22
<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> miRNA靶序列
<400> 33
agcaaaaatg tgctagtgcc aaa 23
<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> miRNA靶序列
<400> 34
agtgtgagtt ctaccattgc caaa 24
<210> 35

<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> miRNA靶序列
<400> 35
agggattcct gggaaaactg gac 23

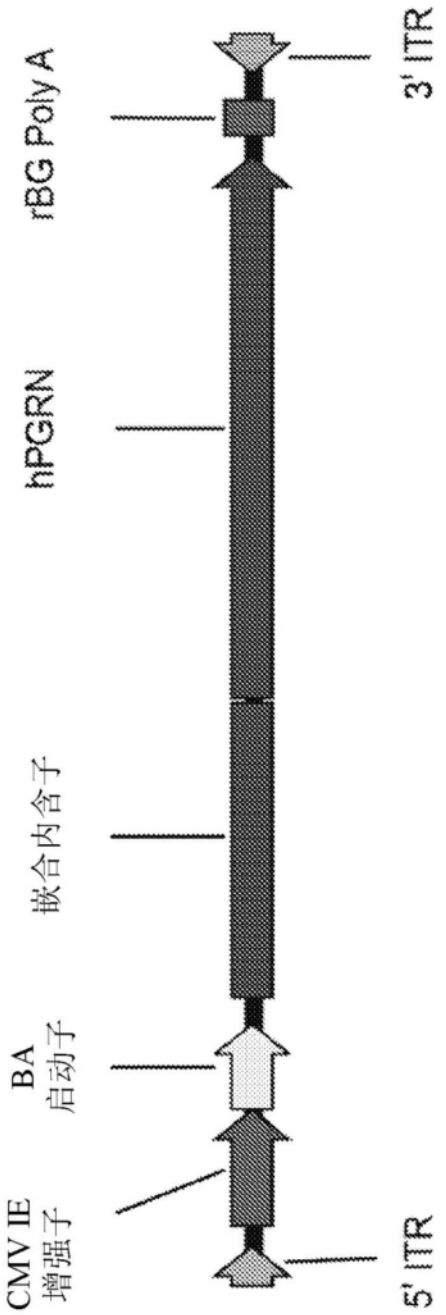

图1

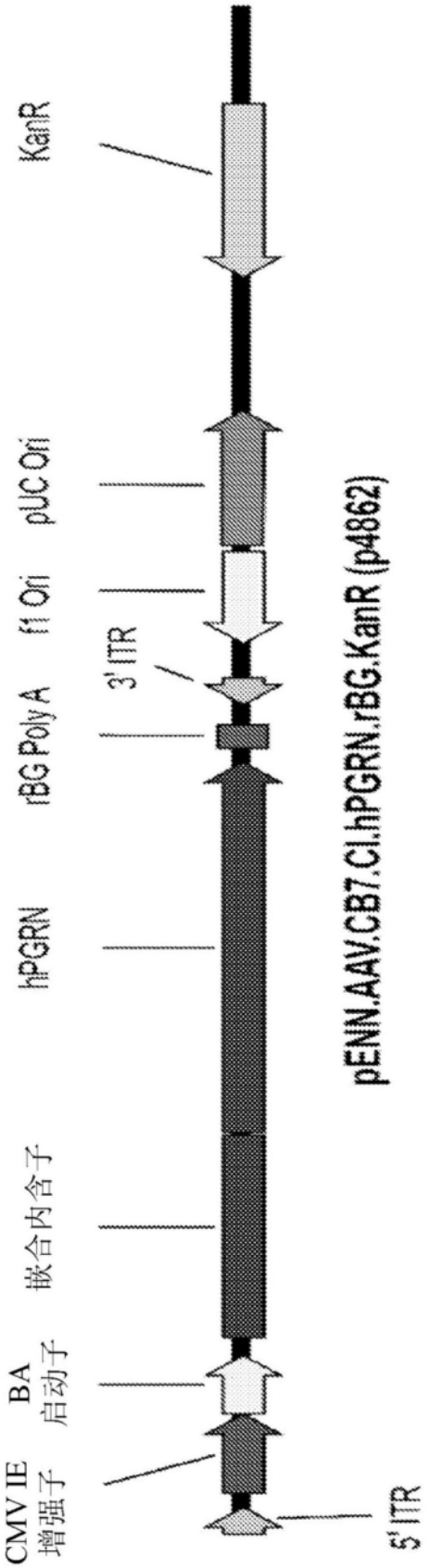
KanR
pUC Ori
f1 Ori
3' ITR
rBG Poly A
hPGRN
嵌合内含子
BA
启动子
CMV IE
增强子
5' ITR
pENN.AAV.CB7.CI.hPGRN.rBG.KanR (p4862)

图2

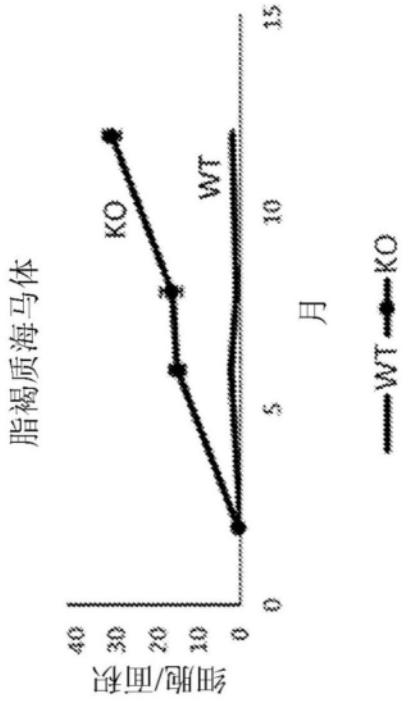
脂褐质海马体
细胞/面积
0
10
20
30
40
KO
WT
0
5
10
15
月
WT
KO

图3A

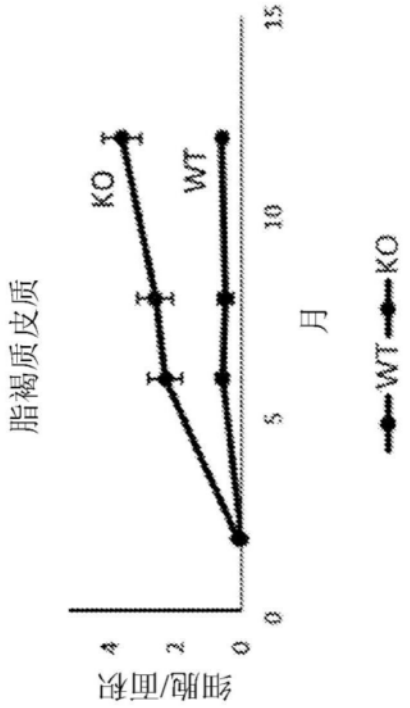
脂褐质皮质
细胞/面积
0
2
4
KO
WT
0
5
10
15
月
WT
KO

图3B

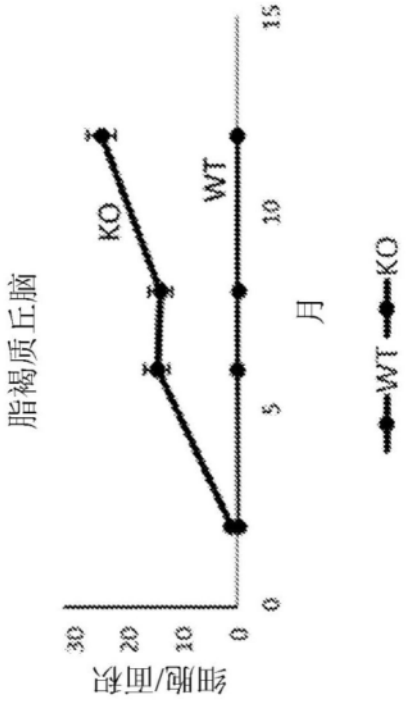
脂褐质丘脑
细胞/面积
30
20
10
0
0
5
10
15
月
KO
WT
WT
KO

图3C

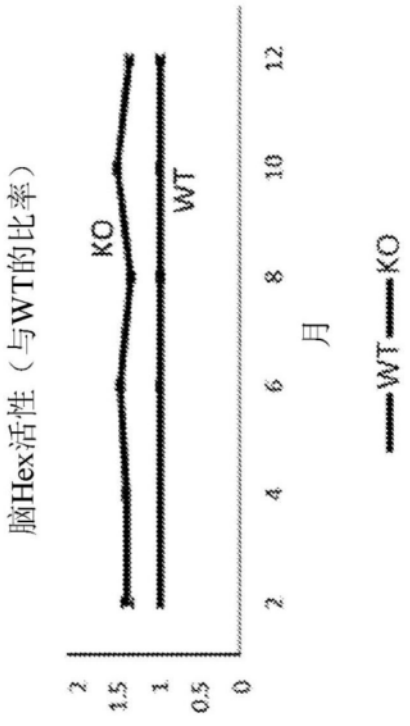
脑Hex活性（与WT的比率）
2
1.5
1
0.5
0
2
4
6
8
10
12
月
KO
WT
WT
KO

图3D

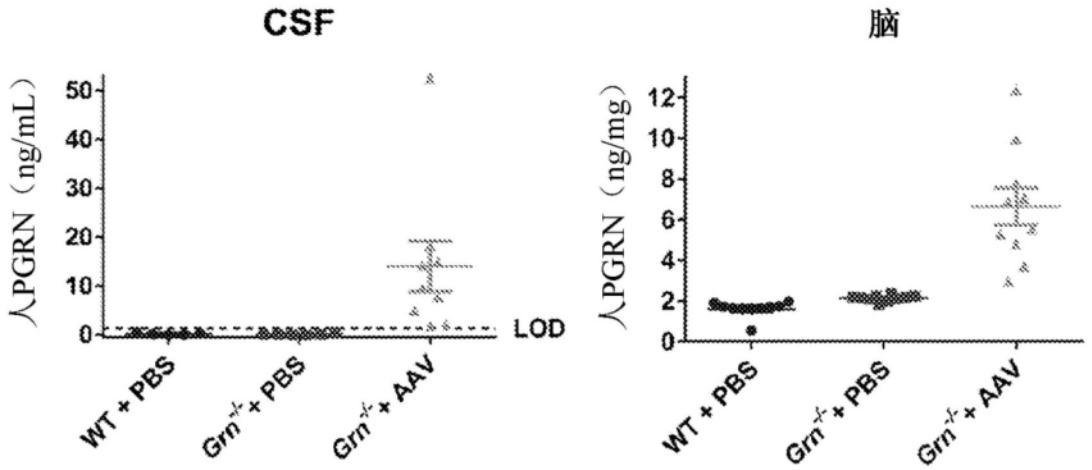
CSF
人PGRN（ng/mL）
50
40
30
20
10
0
LOD
WT + PBS
Grn-/- + PBS
Grn-/- + AAV
脑
人PGRN（ng/mg）
12
10
8
6
4
2
0
WT + PBS
Grn-/- + PBS
Grn-/- + AAV

图4

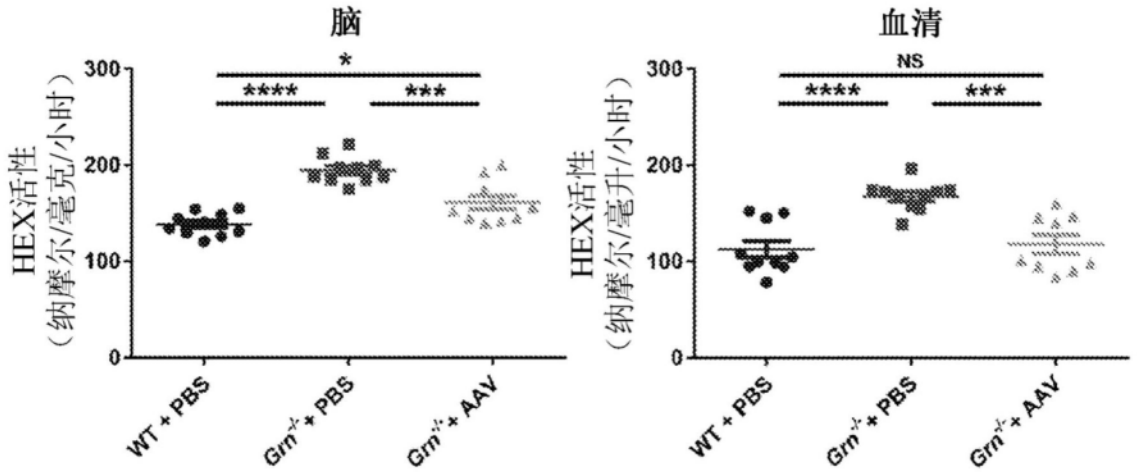
脑
HEX活性
（纳摩尔/毫克/小时）
300
200
100
0
*
****
***
WT + PBS
Grn-/- + PBS
Grn-/- + AAV
血清
HEX活性
（纳摩尔/毫升/小时）
NS
****
***

图5

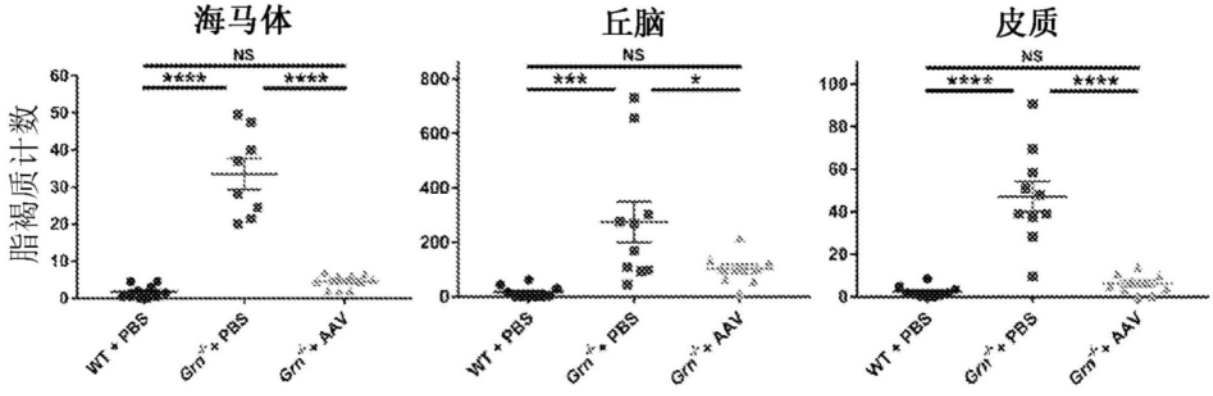
海马体
丘脑
皮质
脂褐质计数
NS
****
***
*
WT + PBS
Grn-/- + PBS
Grn-/- + AAV

图6

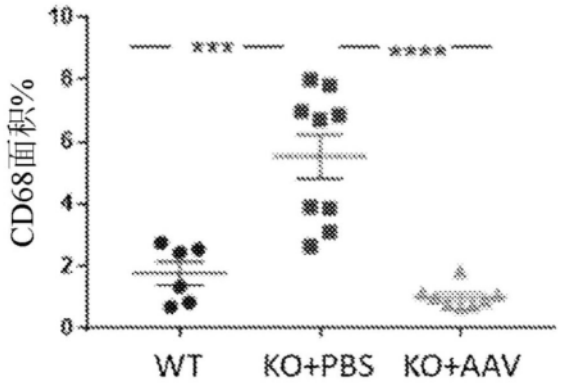
CD68面积%
10
8
6
4
2
0
***
****
WT
KO+PBS
KO+AAV

图7A

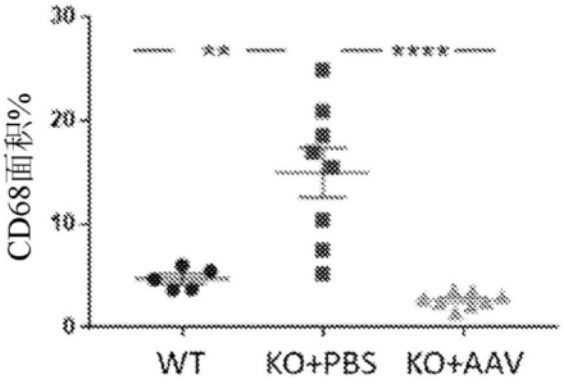
CD68面积%
30
20
10
0
**
****
WT
KO+PBS
KO+AAV

图7B

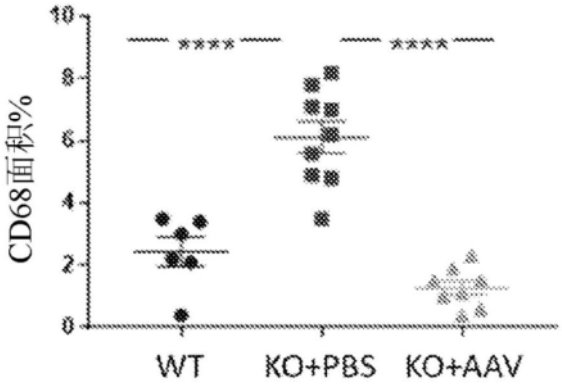
CD68面积%
10
8
6
4
2
0
****
****
WT
KO+PBS
KO+AAV

图7C

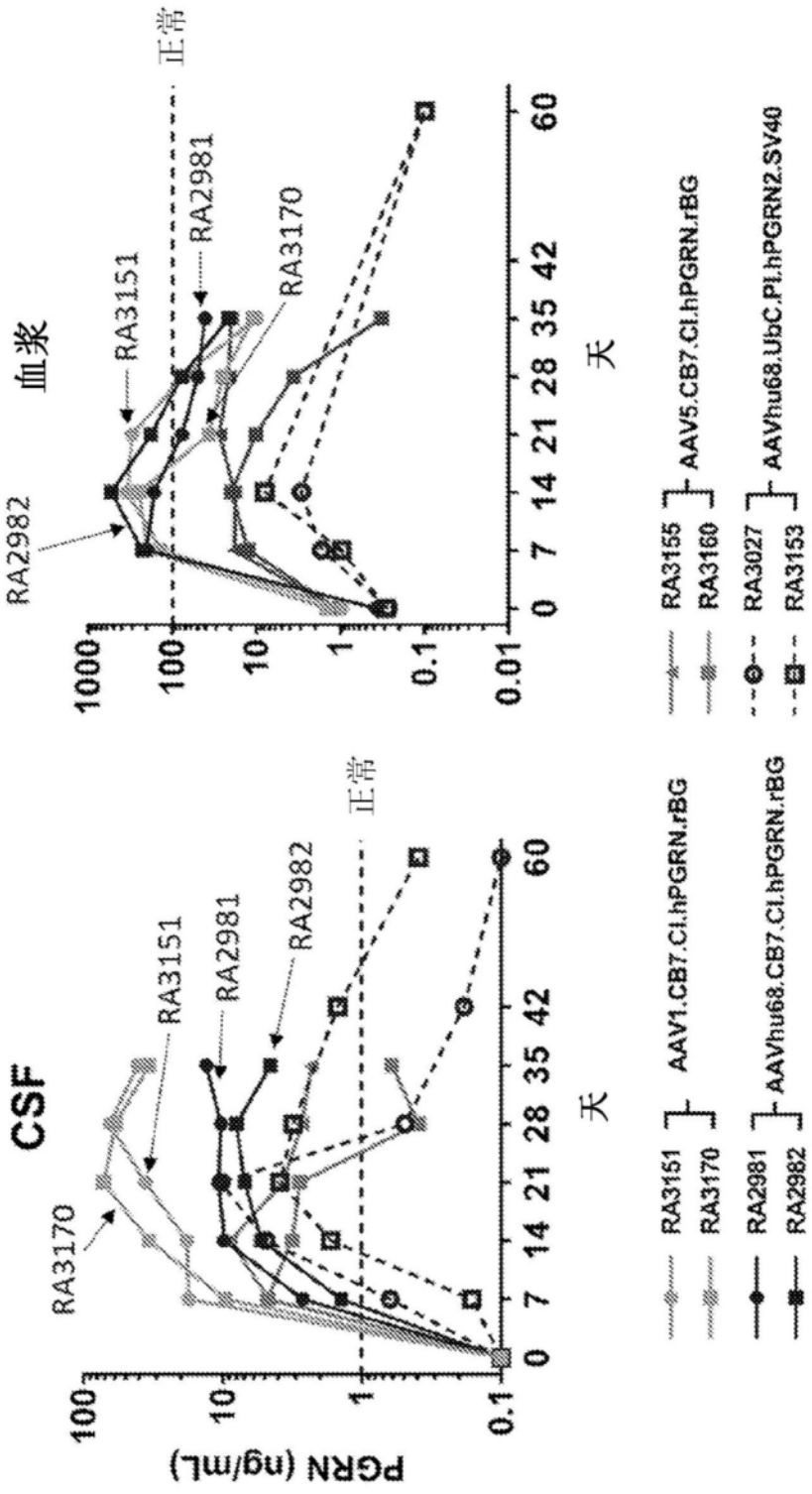
血浆
CSF
PGRN (ng/mL)
天
正常
RA2982
RA3151
RA2981
RA3170
RA3155
RA3160
RA3027
RA3153
AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG
AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG
AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG
AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40

图8

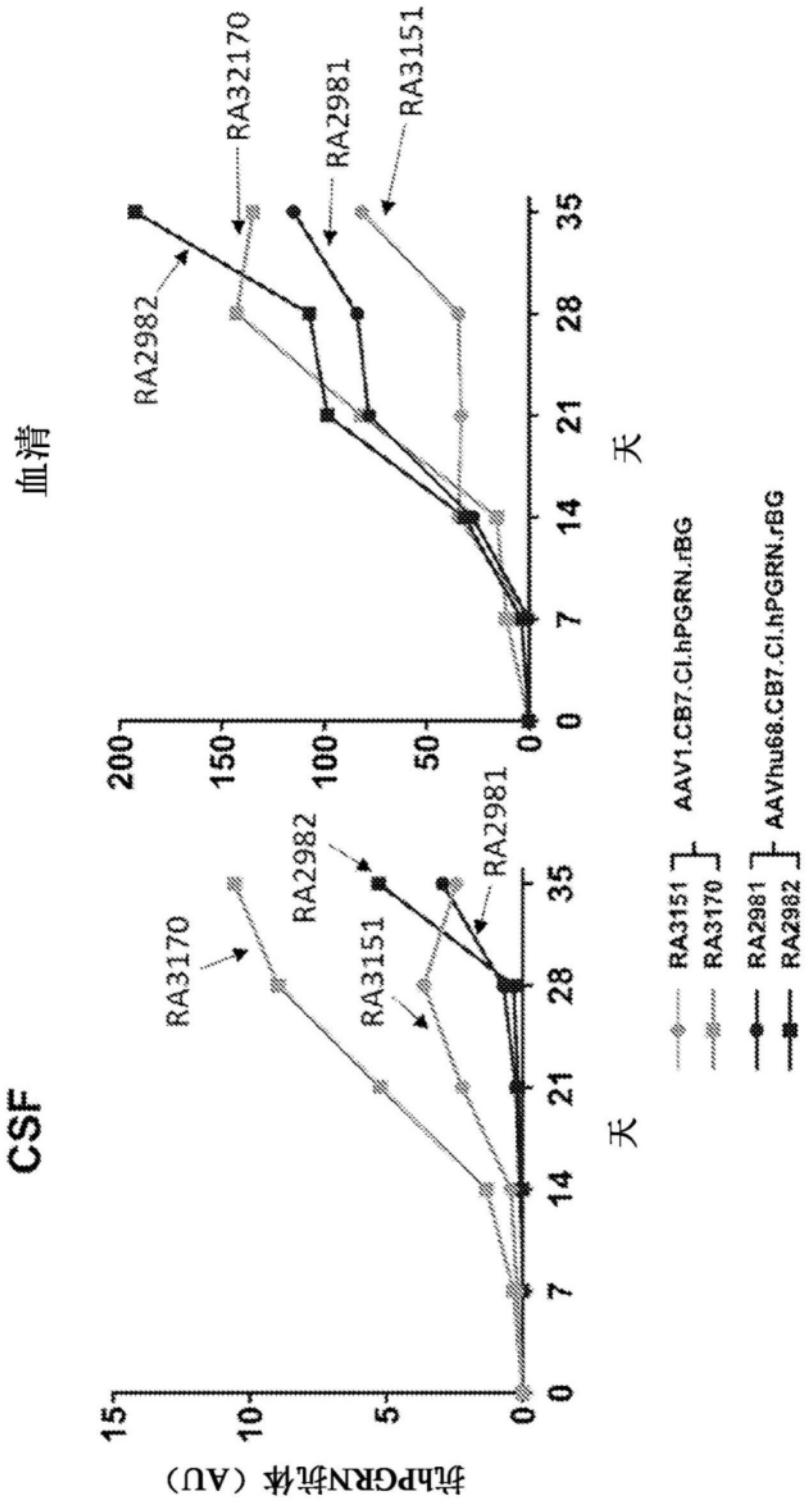
血清
CSF
抗hPGRN抗体（AU）
天
天
RA2982
RA32170
RA2981
RA3151
RA3170
RA2982
RA3151
RA2981
0
50
100
150
200
0
5
10
15
0
7
14
21
28
35
RA3151
RA3170
RA2981
RA2982
AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG
AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG

图9

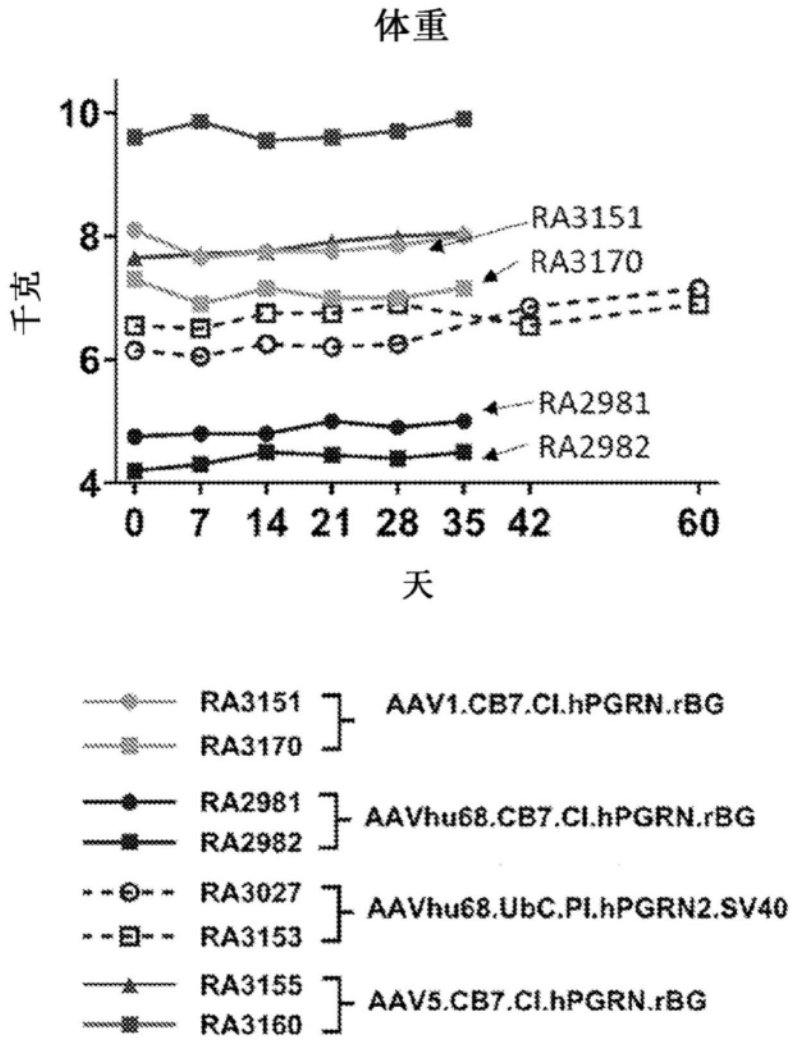
体重
10
8
6
4
千克
RA3151
RA3170
RA2981
RA2982
0 7 14 21 28 35 42 60
天
RA3151
RA3170
AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG
RA2981
RA2982
AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG
RA3027
RA3153
AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40
RA3155
RA3160
AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG

图10

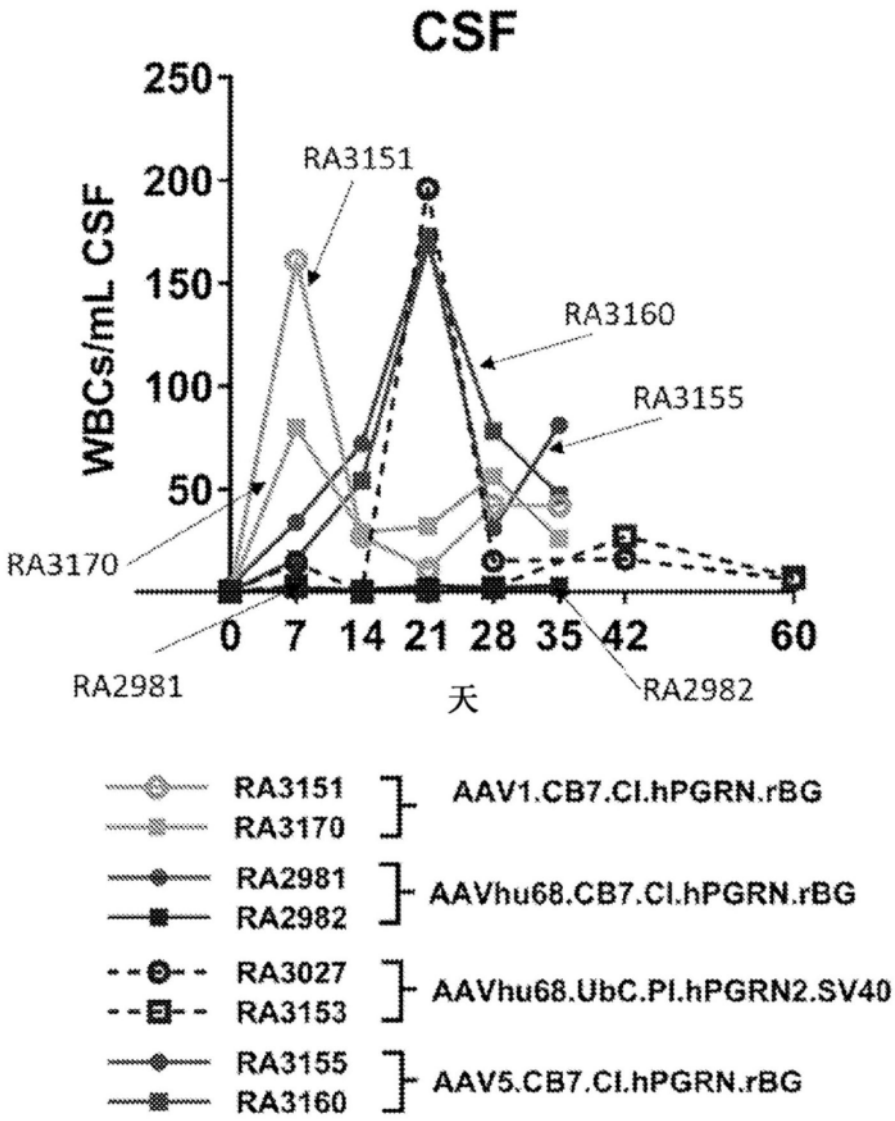
CSF
WBCs/mL CSF
250
200
150
100
50
0
7
14
21
28
35
42
60
天
RA3151
RA3160
RA3155
RA3170
RA2981
RA2982
RA3151
RA3170
AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG
RA2981
RA2982
AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG
RA3027
RA3153
AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40
RA3155
RA3160
AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG

图11

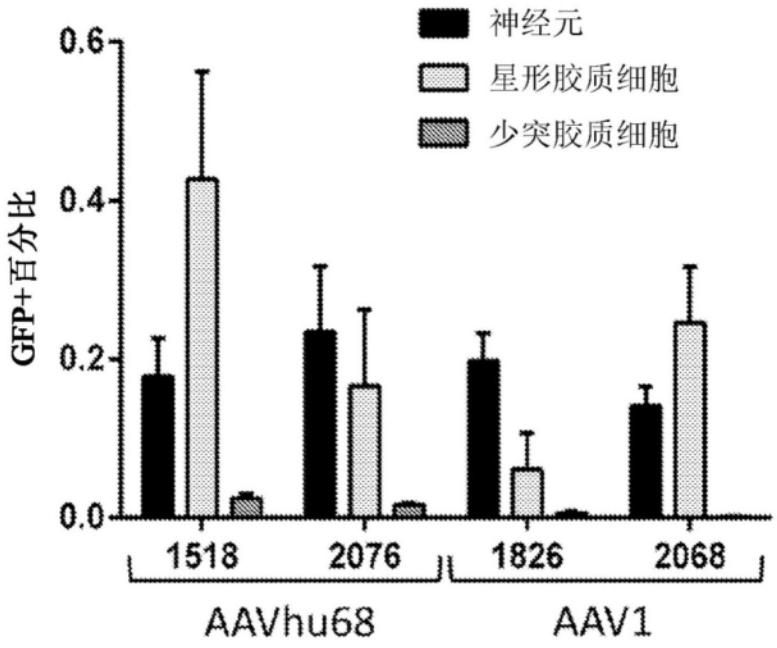

图12

		区域						
细胞标志物	动物ID	1	2	3	4	5		平均值
NeuN	1518	0.13	N/A	0.205	0.34	0.167	0.049	0.178
	2076	0.106	0.227	0.258	0.528	0.053	N/A	0.234
	1826	0.1	0.318	0.195	0.202	0.171	N/A	0.197
	2068	0.218	N/A	0.153	0.141	0.128	0.065	0.141
GFAP	1518	0.152	N/A	0.202	0.914	0.39	0.476	0.427
	2076	0.011	0.064	0.235	0.511	0.011	N/A	0.166
	1826	0.019	0.013	0.021	0.244	0.007	N/A	0.061
	2068	0.066	N/A	0.245	0.13	0.459	0.33	0.246
Olig2	1518	0.02	N/A	0.03	0.04	0.009	0.023	0.024
	2076	0.02	0.023	0.011	0.013	0.013	N/A	0.016
	1826	0	0.001	0.008	0.016	N/A	0.001	0.005
	2068	0.002	0	N/A	0.001	0.002	0.002	0.001

图13

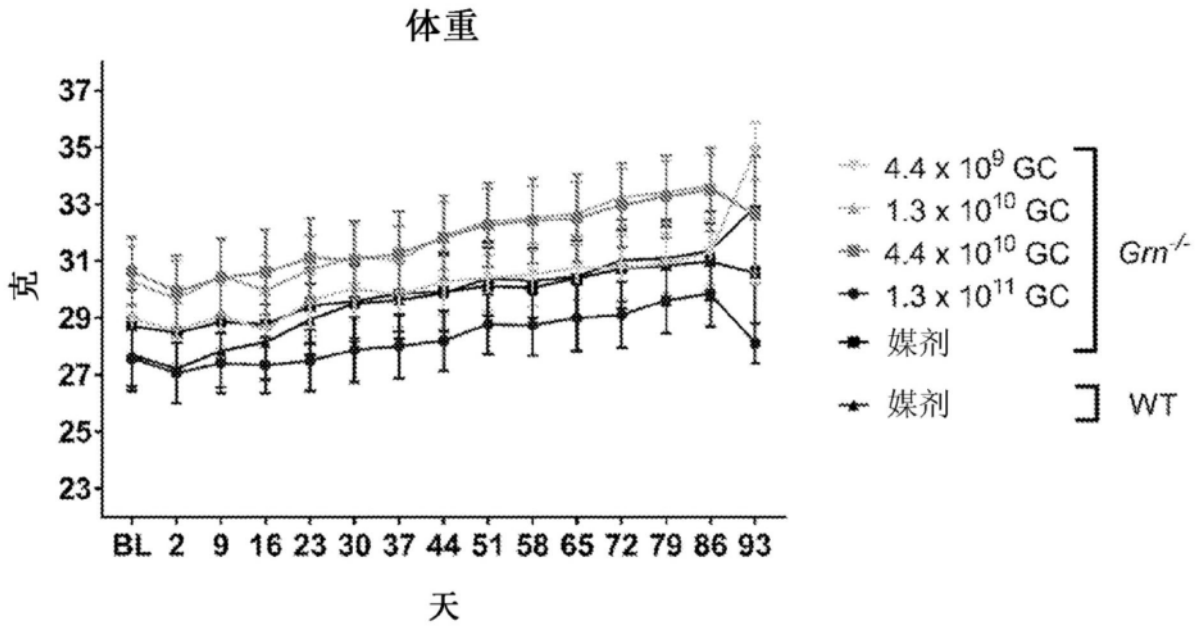
体重
克
37
35
33
31
29
27
25
23
BL 2 9 16 23 30 37 44 51 58 65 72 79 86 93
天
4.4 x 10^9 GC
1.3 x 10^10 GC
4.4 x 10^10 GC
1.3 x 10^11 GC
媒剂
Grn-/-
媒剂
WT

图14

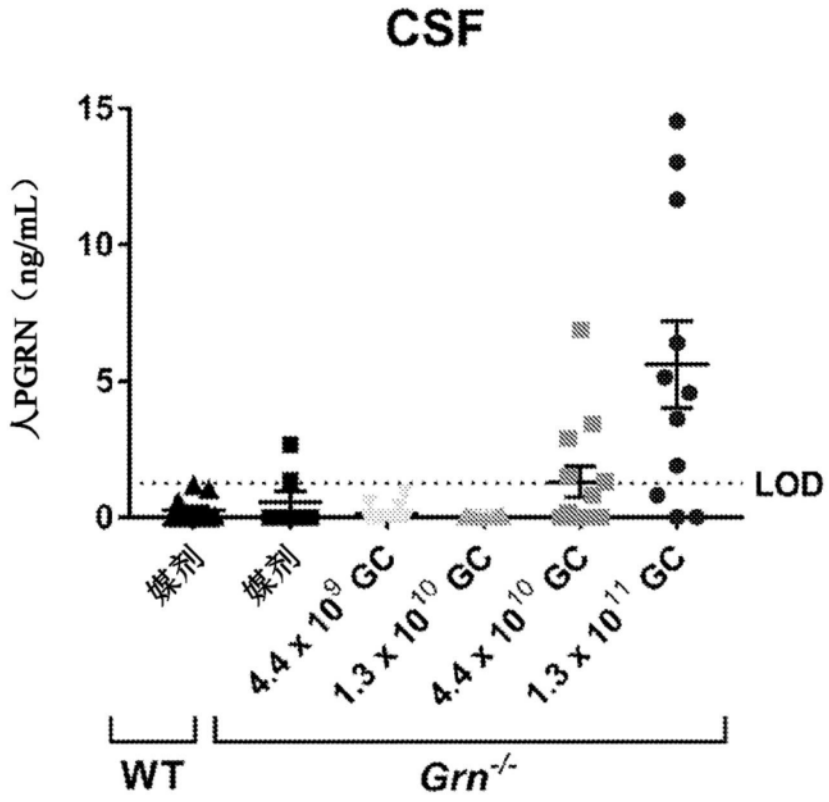
CSF
人PGRN（ng/mL）
15
10
5
0
LOD
媒剂
媒剂
4.4 x 10^9 GC
1.3 x 10^10 GC
4.4 x 10^10 GC
1.3 x 10^11 GC
WT
Grn-/-

图15

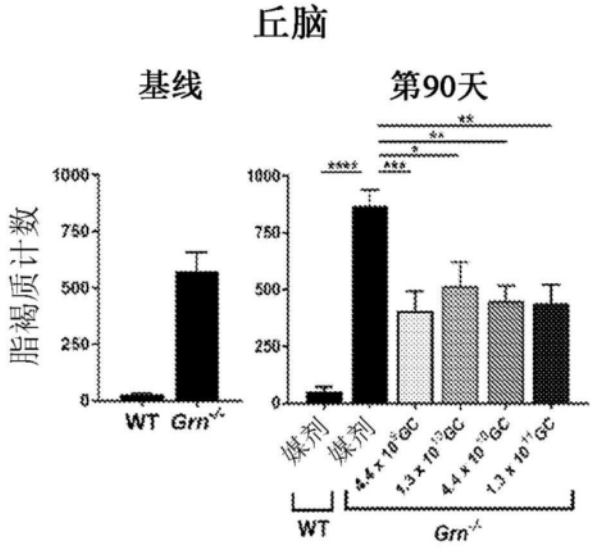
丘脑
基线
第90天
脂褐质计数
1000
750
500
250
0
WT
Grn-/-
媒剂
媒剂
4.4 x 10^8 GC
1.3 x 10^13 GC
4.4 x 10^12 GC
1.3 x 10^11 GC
WT
Grn-/-

图16A

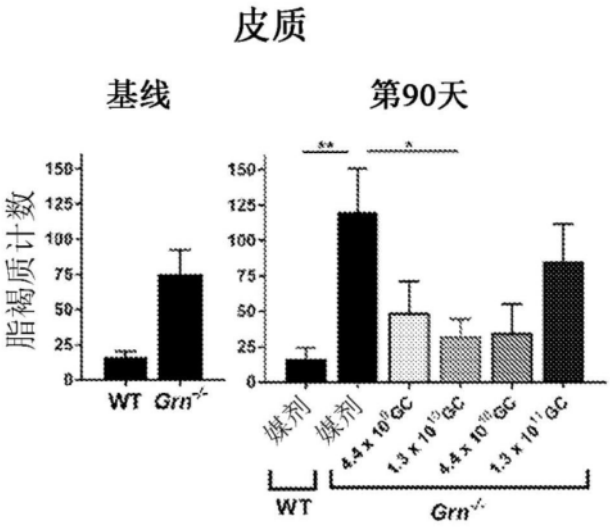
皮质
基线
第90天
脂褐质计数
150
125
100
75
50
25
0
WT
Grn-/-
媒剂
媒剂
4.4 x 10^8 GC
1.3 x 10^13 GC
4.4 x 10^12 GC
1.3 x 10^11 GC
WT
Grn-/-

图16B

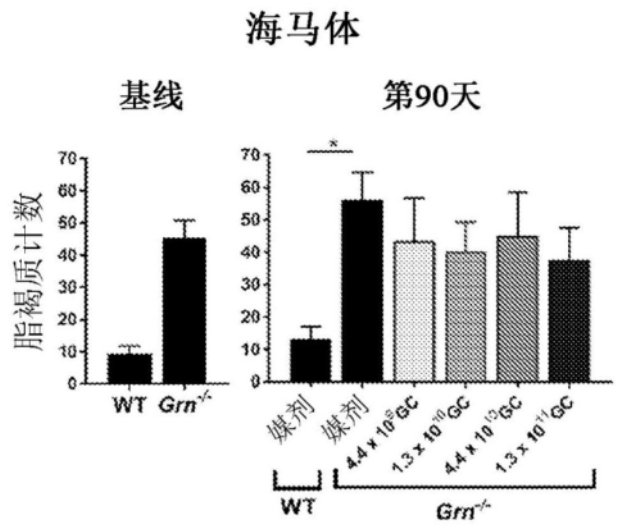
海马体
基线
第90天
脂褐质计数
WT
Grn-/-
媒剂
媒剂
4.4 x 10^9 GC
1.3 x 10^10 GC
4.4 x 10^10 GC
1.3 x 10^11 GC
WT
Grn-/-

图16C

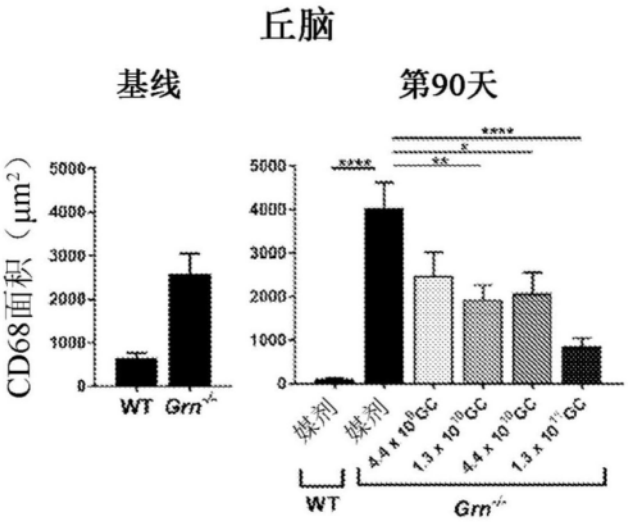
丘脑
基线
第90天
CD68面积（μm²）
WT
Grn-/-
媒剂
媒剂
4.4 x 10^9 GC
1.3 x 10^10 GC
4.4 x 10^10 GC
1.3 x 10^11 GC
WT
Grn-/-

图17A

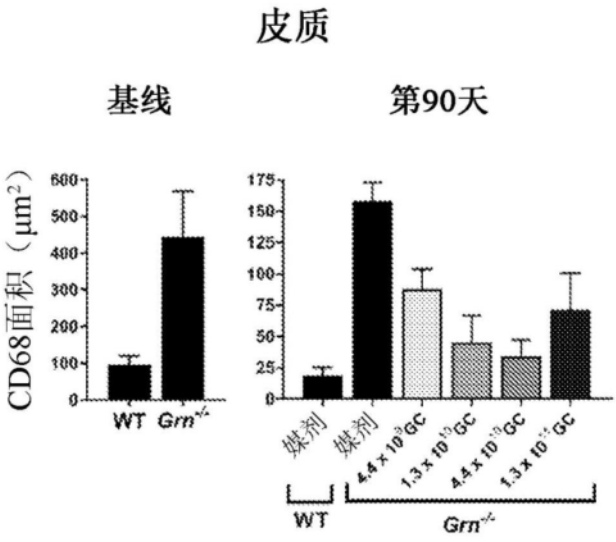
皮质
基线
第90天
CD68面积（μm²）
WT
Grn-/-
媒剂
媒剂
4.4 x 10⁹GC
1.3 x 10¹⁰GC
4.4 x 10¹⁰GC
1.3 x 10¹¹GC
WT
Grn-/-

图17B

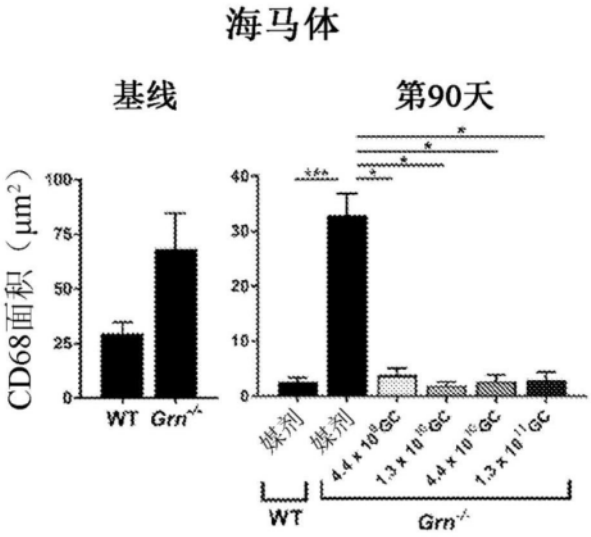
海马体
基线
第90天
CD68面积（μm²）
WT
Grn-/-
媒剂
媒剂
4.4 x 10⁹GC
1.3 x 10¹⁰GC
4.4 x 10¹⁰GC
1.3 x 10¹¹GC
WT
Grn-/-

图17C

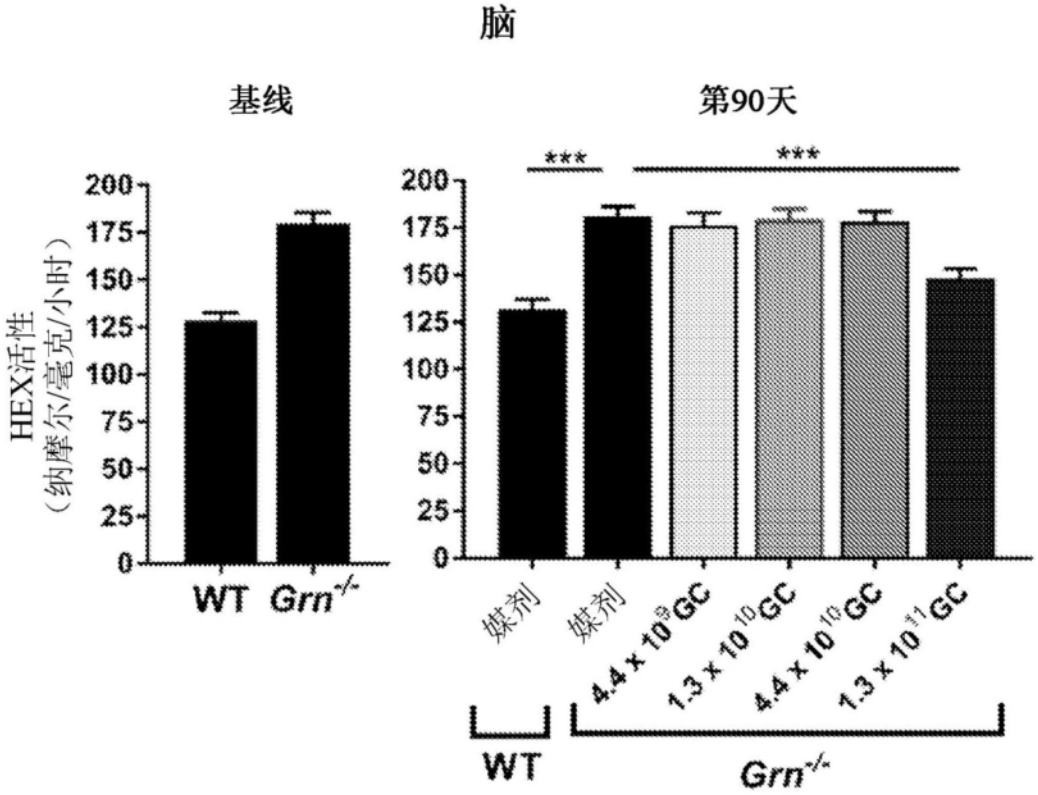
脑
基线
第90天
HEX活性
（纳摩尔/毫克/小时）
200
175
150
125
100
75
50
25
0
WT
Grn-/-
***
***
媒剂
媒剂
4.4 x 10^9 GC
1.3 x 10^10 GC
4.4 x 10^10 GC
1.3 x 10^11 GC
WT
Grn-/-

图18

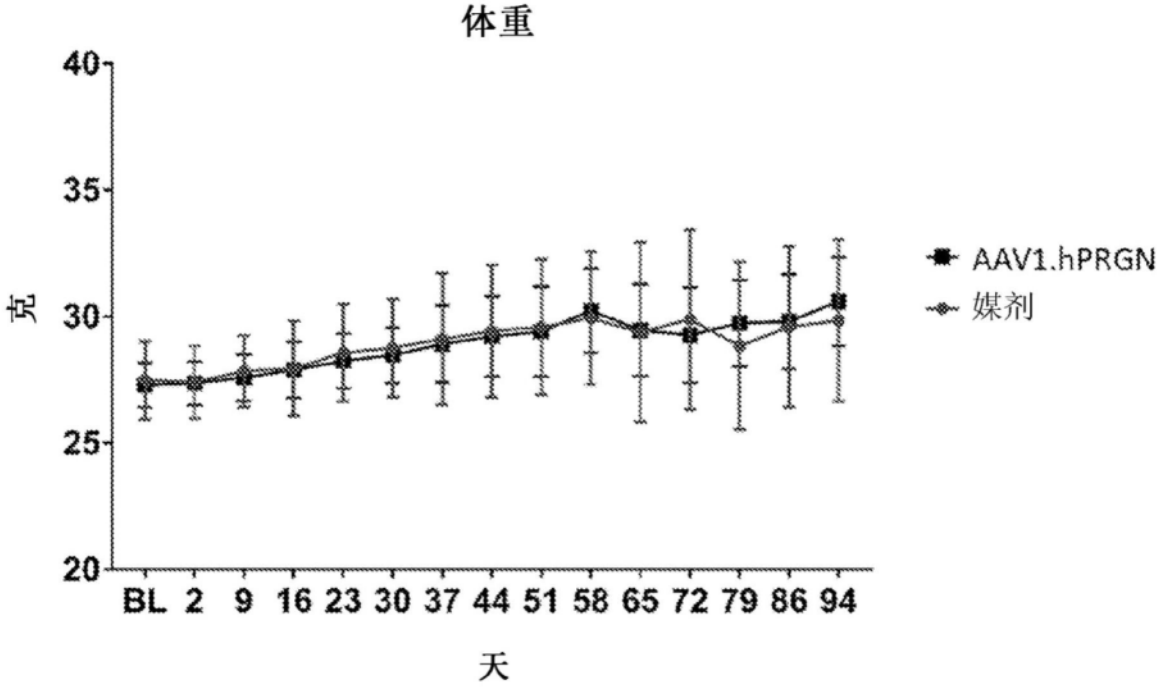
体重
克
40
35
30
25
20
BL 2 9 16 23 30 37 44 51 58 65 72 79 86 94
天
AAV1.hPRGN
媒剂

图19

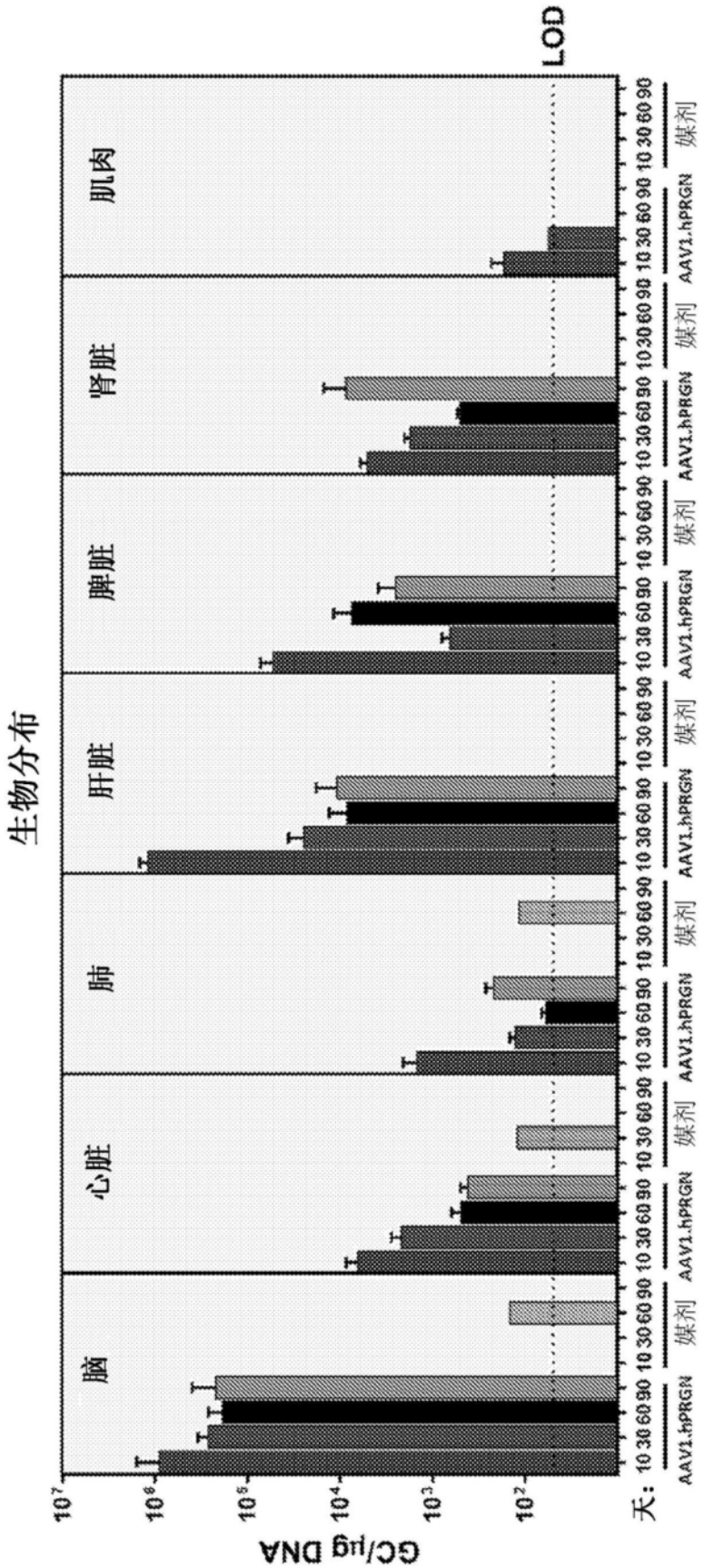

图20

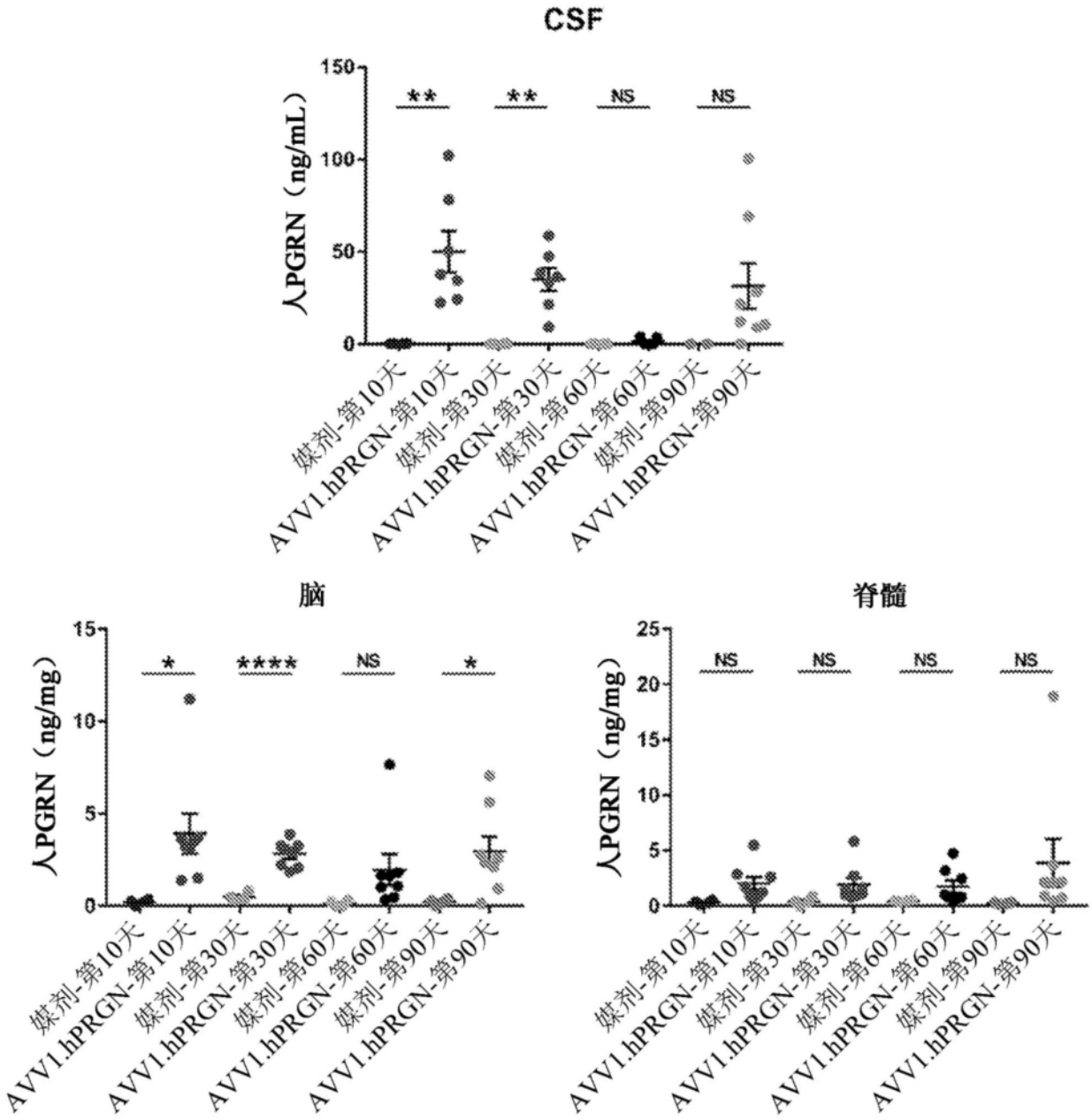
CSF
人PGRN（ng/mL）
150
100
50
0
**
**
NS
NS
媒剂-第10天
AVV1.hPRGN-第10天
媒剂-第30天
AVV1.hPRGN-第30天
媒剂-第60天
AVV1.hPRGN-第60天
媒剂-第90天
AVV1.hPRGN-第90天
脑
人PGRN（ng/mg）
15
10
5
0
*
****
NS
*
媒剂-第10天
AVV1.hPRGN-第10天
媒剂-第30天
AVV1.hPRGN-第30天
媒剂-第60天
AVV1.hPRGN-第60天
媒剂-第90天
AVV1.hPRGN-第90天
脊髓
人PGRN（ng/mg）
25
20
15
10
5
0
NS
NS
NS
NS
媒剂-第10天
AVV1.hPRGN-第10天
媒剂-第30天
AVV1.hPRGN-第30天
媒剂-第60天
AVV1.hPRGN-第60天
媒剂-第90天
AVV1.hPRGN-第90天

图21

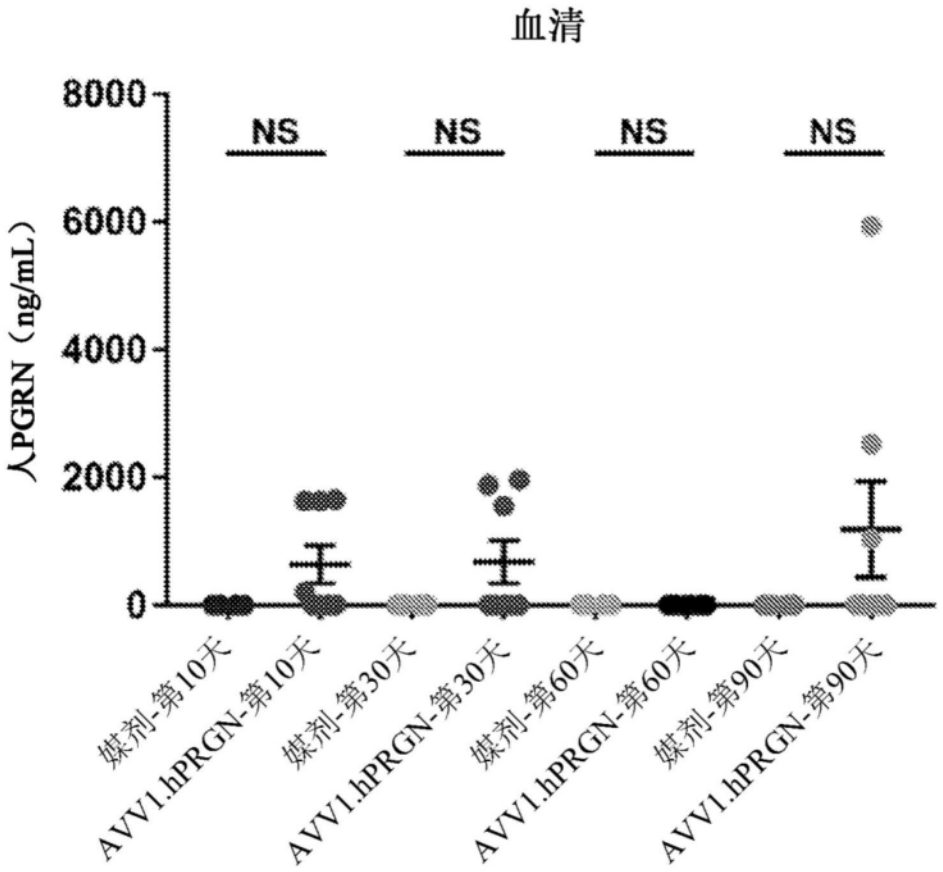
血清
8000
6000
4000
2000
0
人PGRN（ng/mL）
NS
NS
NS
NS
媒剂-第10天
AVV1.hPRGN-第10天
媒剂-第30天
AVV1.hPRGN-第30天
媒剂-第60天
AVV1.hPRGN-第60天
媒剂-第90天
AVV1.hPRGN-第90天

图22

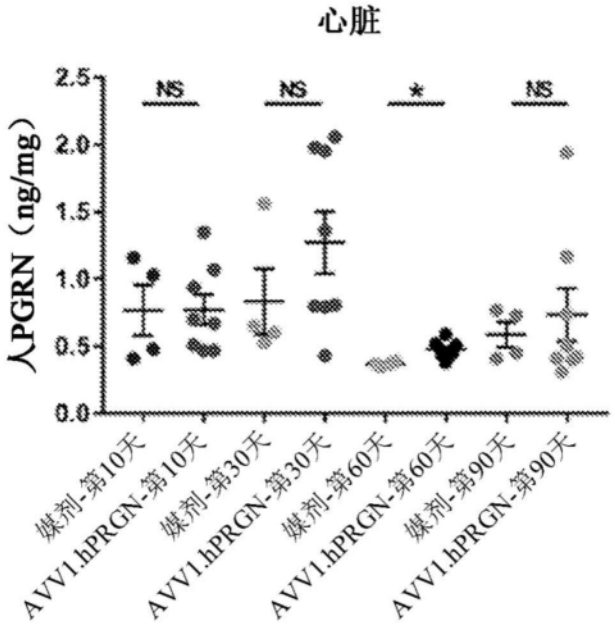
心脏
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
人PGRN（ng/mg）
NS
NS
*
NS
媒剂-第10天
AVV1.hPRGN-第10天
媒剂-第30天
AVV1.hPRGN-第30天
媒剂-第60天
AVV1.hPRGN-第60天
媒剂-第90天
AVV1.hPRGN-第90天

图23A

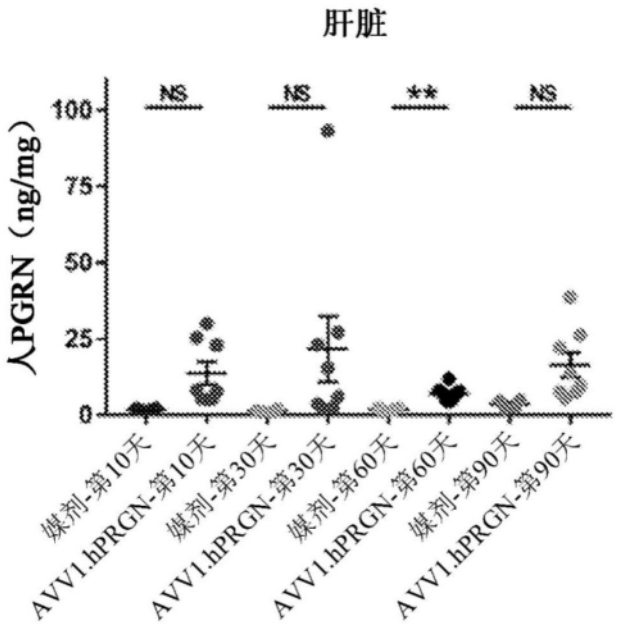
肝脏
人PGRN（ng/mg）
100
75
50
25
0
NS
NS
**
NS
媒剂-第10天
AVV1.hPRGN-第10天
媒剂-第30天
AVV1.hPRGN-第30天
媒剂-第60天
AVV1.hPRGN-第60天
媒剂-第90天
AVV1.hPRGN-第90天

图23B

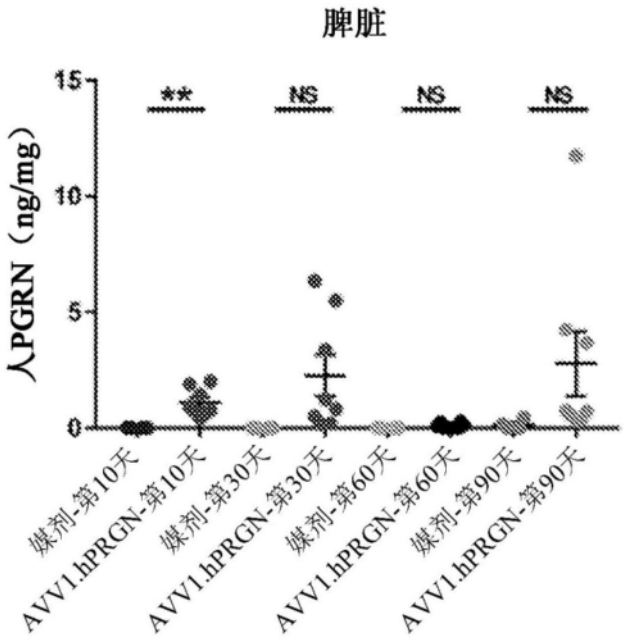
脾脏
人PGRN（ng/mg）
15
10
5
0
**
NS
NS
NS
媒剂-第10天
AVV1.hPRGN-第10天
媒剂-第30天
AVV1.hPRGN-第30天
媒剂-第60天
AVV1.hPRGN-第60天
媒剂-第90天
AVV1.hPRGN-第90天

图23C

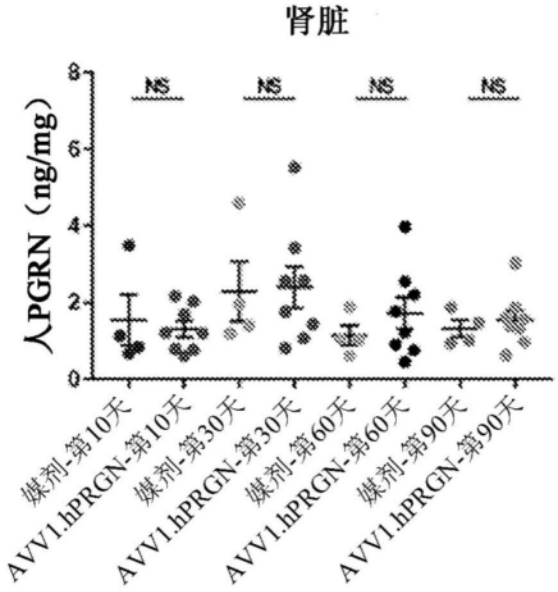
肾脏
人PGRN（ng/mg）
NS
媒剂-第10天
AVV1.hPRGN-第10天
媒剂-第30天
AVV1.hPRGN-第30天
媒剂-第60天
AVV1.hPRGN-第60天
媒剂-第90天
AVV1.hPRGN-第90天

图23D

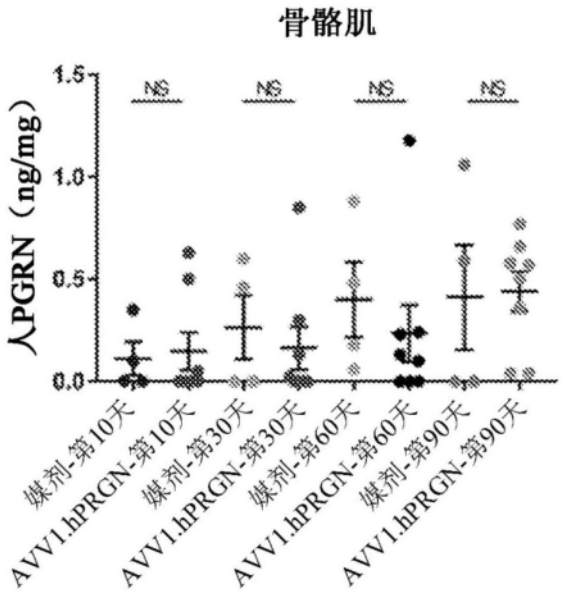
骨骼肌
人PGRN（ng/mg）
NS
媒剂-第10天
AVV1.hPRGN-第10天
媒剂-第30天
AVV1.hPRGN-第30天
媒剂-第60天
AVV1.hPRGN-第60天
媒剂-第90天
AVV1.hPRGN-第90天

图23E

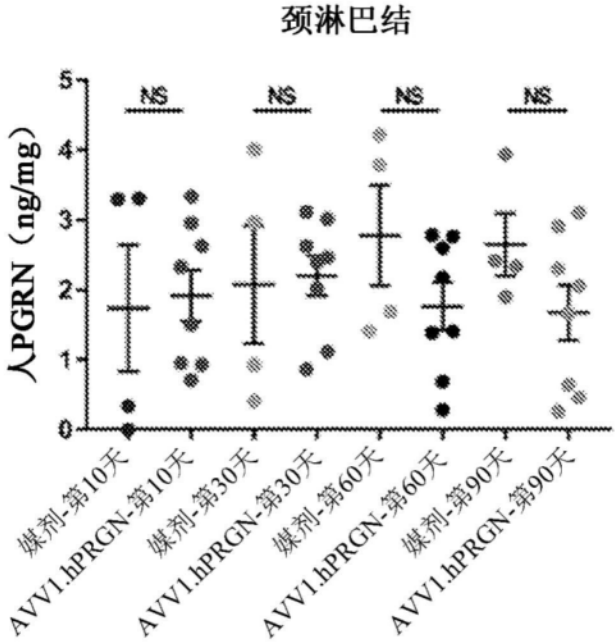
颈淋巴结
人PGRN（ng/mg）
NS
NS
NS
NS
媒剂-第10天
AVV1.hPRGN-第10天
媒剂-第30天
AVV1.hPRGN-第30天
媒剂-第60天
AVV1.hPRGN-第60天
媒剂-第90天
AVV1.hPRGN-第90天

图23F

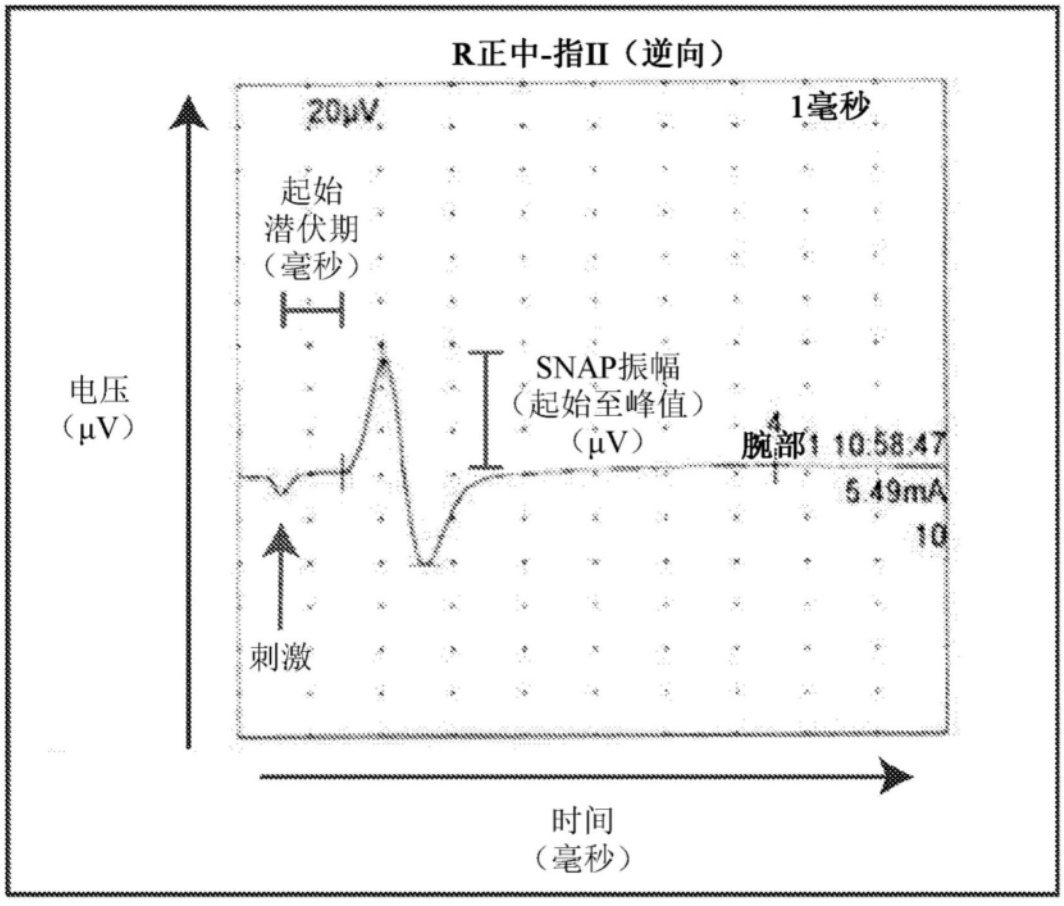
R正中-指II（逆向）
20μV
1毫秒
起始
潜伏期
（毫秒）
SNAP振幅
（起始至峰值）
（μV）
电压
（μV）
腕部1 10.58.47
5.49mA
刺激
时间
（毫秒）

图24

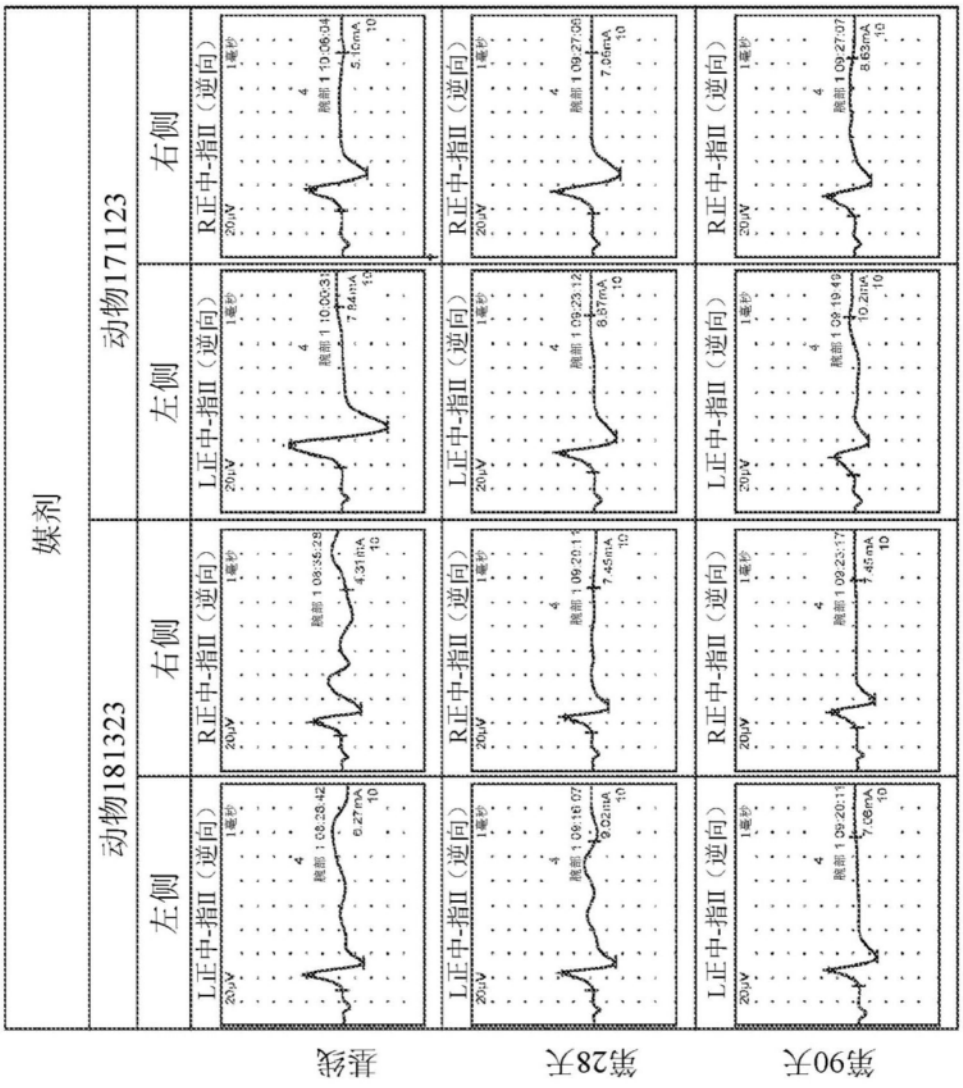
媒剂
动物181323
动物171123
左侧
右侧
左侧
右侧
L正中-指II（逆向）
R正中-指II（逆向）
L正中-指II（逆向）
R正中-指II（逆向）
20μV
1毫秒
基线
第28天
第90天

图25-1

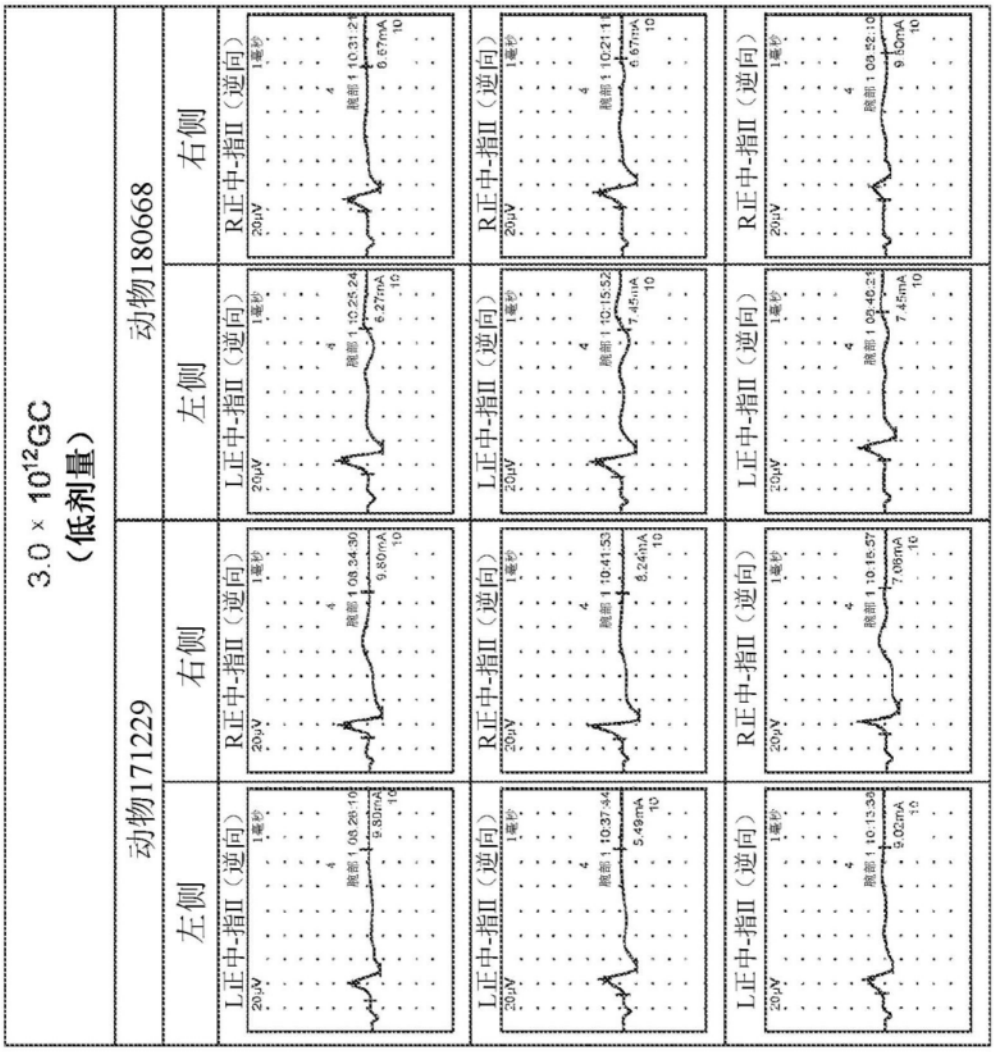
3.0 × 10^12GC
（低剂量）
动物171229
动物180668
左侧
右侧
左侧
右侧
L正中-指II（逆向）
R正中-指II（逆向）
L正中-指II（逆向）
R正中-指II（逆向）
20μV
1毫秒
10

图25-2

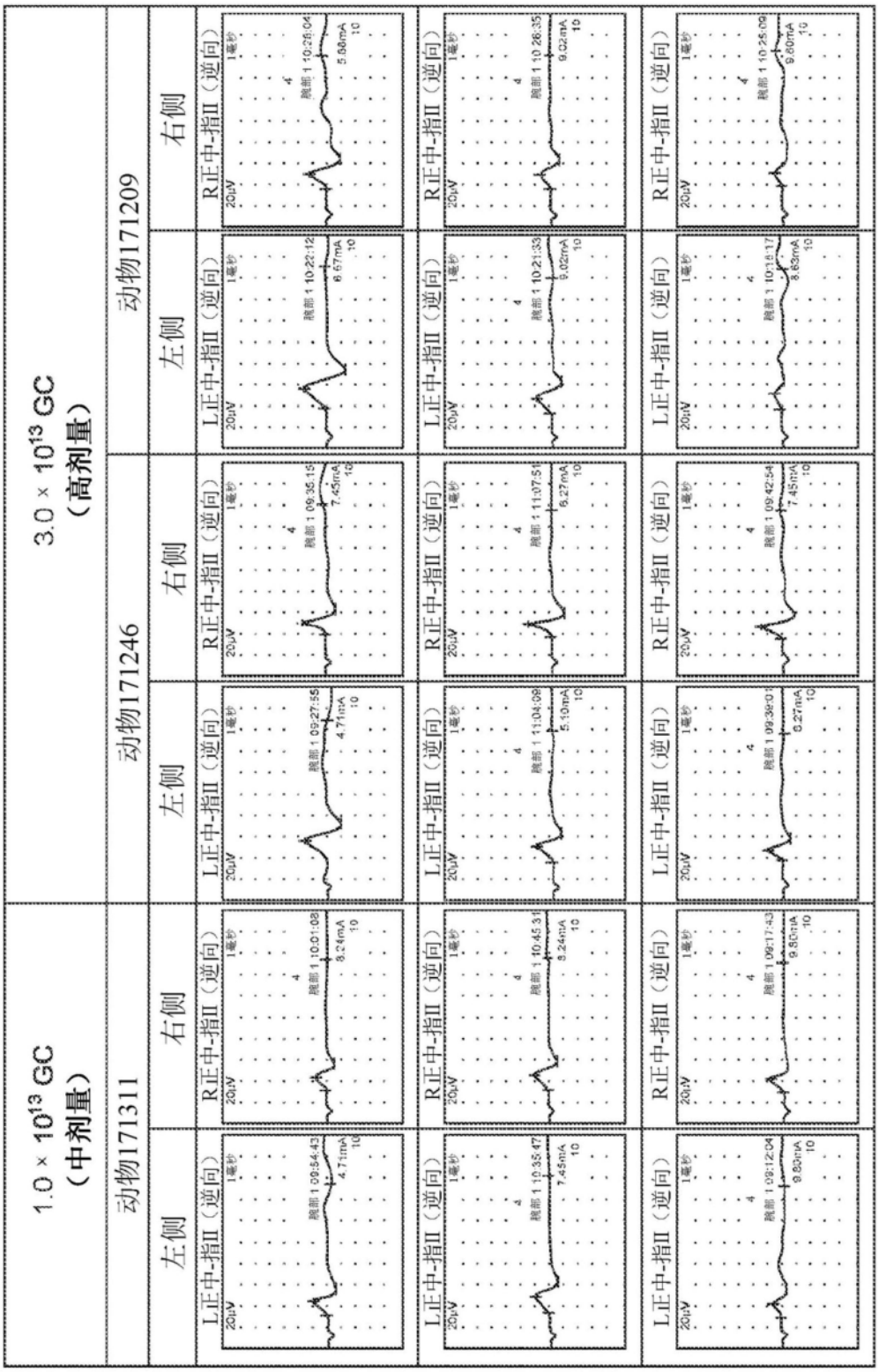
1.0 × 10¹³ GC
（中剂量）
3.0 × 10¹³ GC
（高剂量）
动物171311
动物171246
动物171209
左侧
右侧
左侧
右侧
左侧
右侧
L正中-指II（逆向）
R正中-指II（逆向）
L正中-指II（逆向）
R正中-指II（逆向）
L正中-指II（逆向）
R正中-指II（逆向）
20μV
1毫秒

图25-3

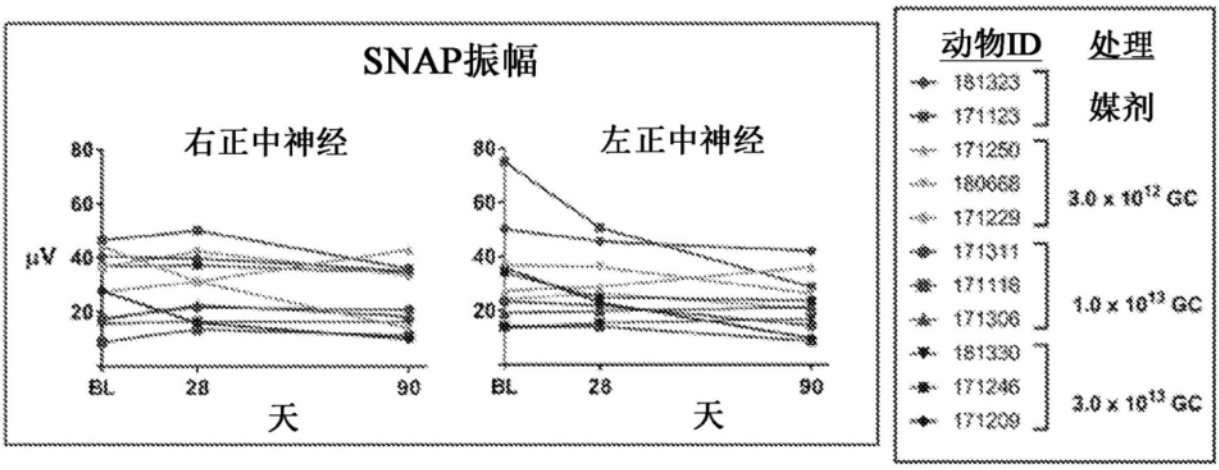
SNAP振幅
右正中神经
左正中神经
μV
80
60
40
20
BL
28
90
天
动物ID
处理
181323
171123
媒剂
171250
180668
171229
3.0 x 10^12 GC
171311
171118
171306
1.0 x 10^13 GC
181330
171246
171209
3.0 x 10^13 GC

图26A

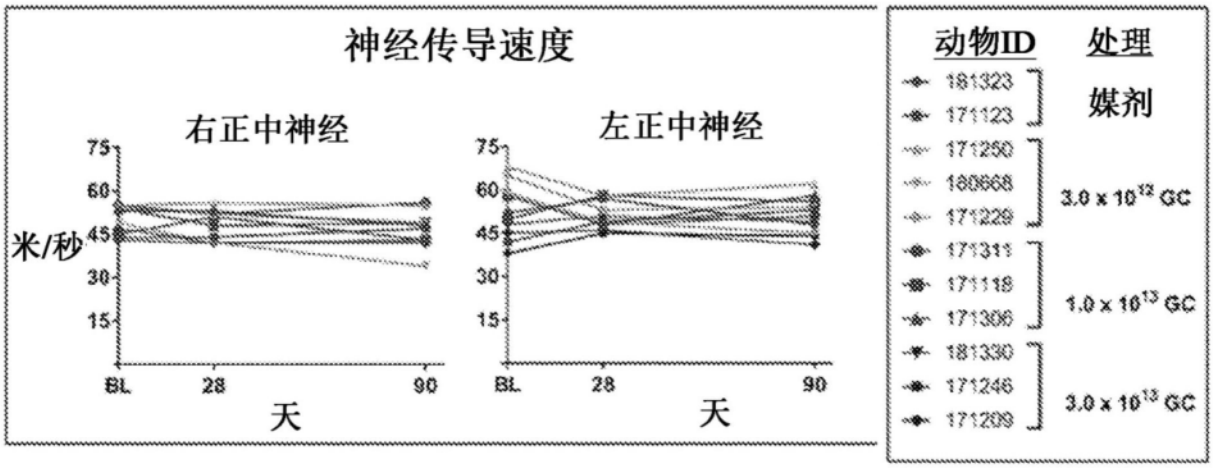
神经传导速度
右正中神经
左正中神经
米/秒
75
60
45
30
15
BL
28
90
天
动物ID
处理
181323
171123
媒剂
171250
180668
171229
3.0 x 10^12 GC
171311
171118
171306
1.0 x 10^13 GC
181330
171246
171209
3.0 x 10^13 GC

图26B

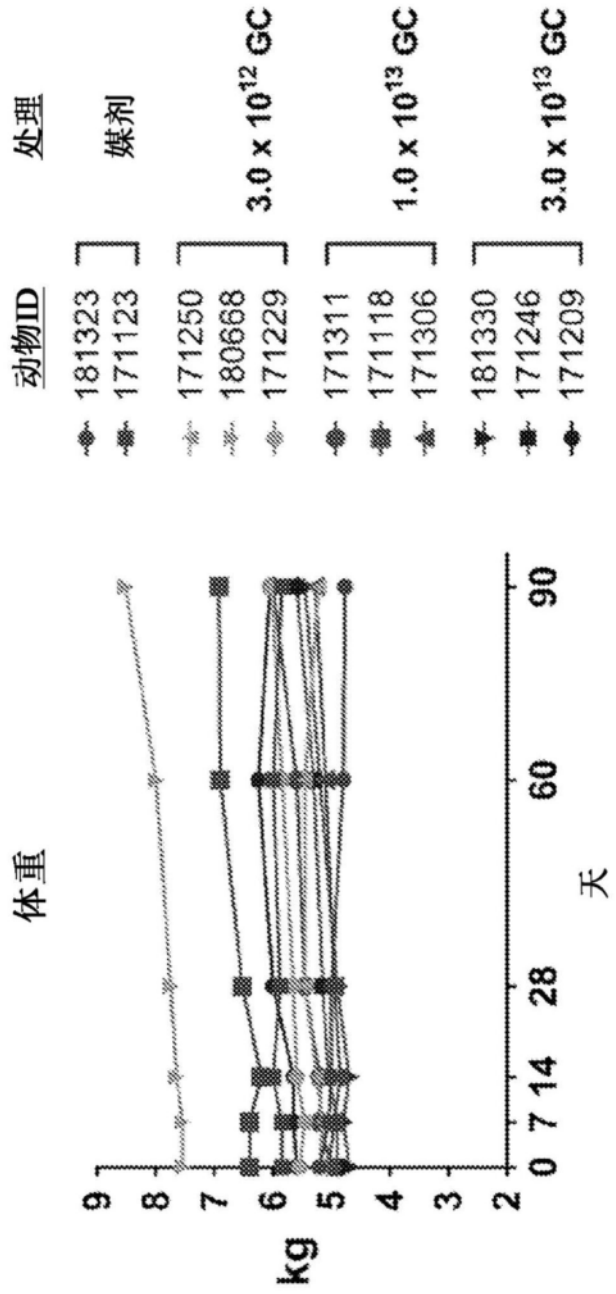
处理
媒剂
3.0 x 10^12 GC
1.0 x 10^13 GC
3.0 x 10^13 GC
动物ID
181323
171123
171250
180668
171229
171311
171118
171306
181330
171246
171209
体重
kg
9
8
7
6
5
4
3
2
0 7 14 28 60 90
天

图27

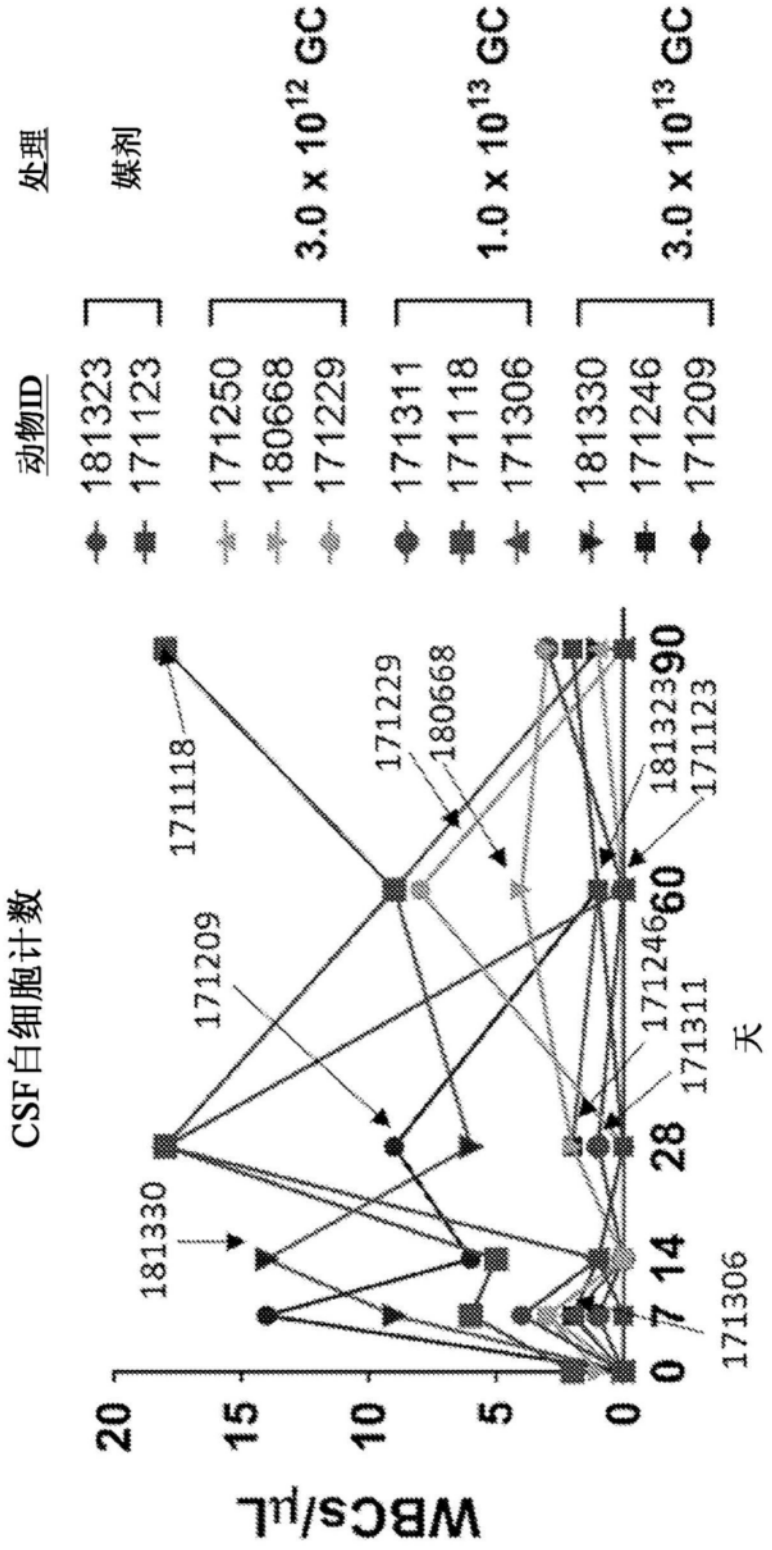
处理
动物ID
媒剂
181323
171123
3.0 x 10^12 GC
171250
180668
171229
1.0 x 10^13 GC
171311
171118
171306
3.0 x 10^13 GC
181330
171246
171209
CSF白细胞计数
WBCs/μL
20
15
10
5
0
0 7 14 28 60 90
天
171118
171209
181330
171306
171229
180668
181323
171123
171246
171311

图28

IFN-γ T细胞应答															
				AAV1（衣壳）						人PGRN（转基因）					
组	处理	剂量（GC/动物）	动物ID	PBMCs			组织特异性淋巴细胞			PBMCs			组织特异性淋巴细胞		
				BL	第28天	第90天	脾脏	肝脏	骨髓	BL	第28天	第90天	脾脏	肝脏	骨髓
1	ITFFB	N/A	171123												
			181323												
2	AAV1.hPRGN	3.0×10^{12}	171229											X	
			171250			X						X	X	X	
			180668		X	X	X								
3	AAV1.hPRGN	1.0×10^{13}	171118					X							
			171306		X	X	X					X		X	
			171311												
4	AAV1.hPRGN	3.0×10^{13}	171209		X						X		X	X	
			171246		X	X	X	X				X		X	
			181330											X	

缩略语：AAV1，腺相关病毒血清型1；BL，基线；GC，基因组拷贝；ID，标识号；IFN-γ，干扰素γ；ITFFB，鞘内最终调配物缓冲液；N/A，不适用；NAb，中和抗体。PBMC，外周血单核细胞；PGRN，颗粒蛋白前体（蛋白质）。

图29

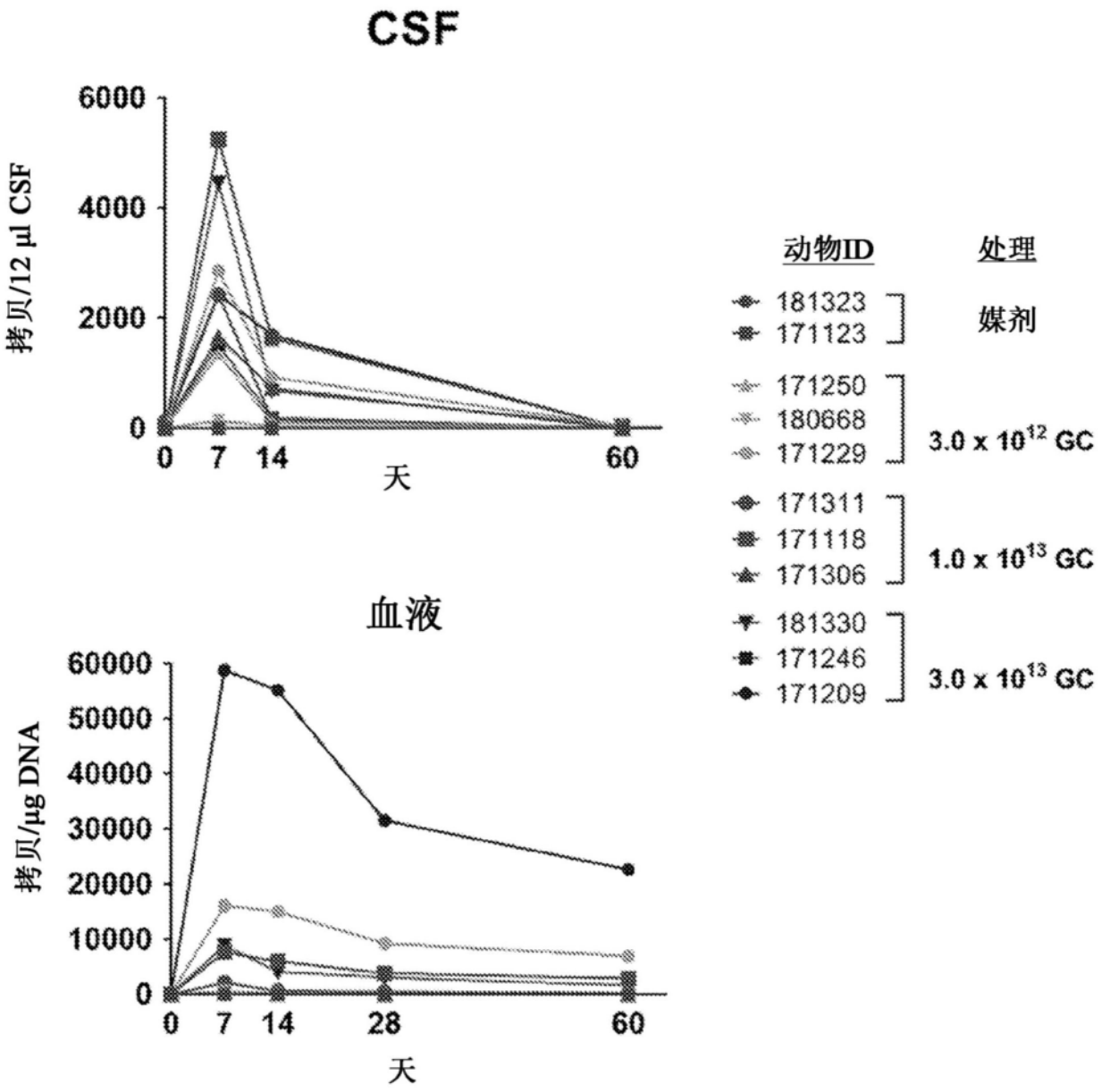
CSF
拷贝/12 µl CSF
6000
4000
2000
0
0 7 14 60
天
血液
拷贝/µg DNA
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0 7 14 28 60
天
动物ID
处理
181323
171123
媒剂
171250
180668
171229
3.0 x 10^12 GC
171311
171118
171306
1.0 x 10^13 GC
181330
171246
171209
3.0 x 10^13 GC

图30

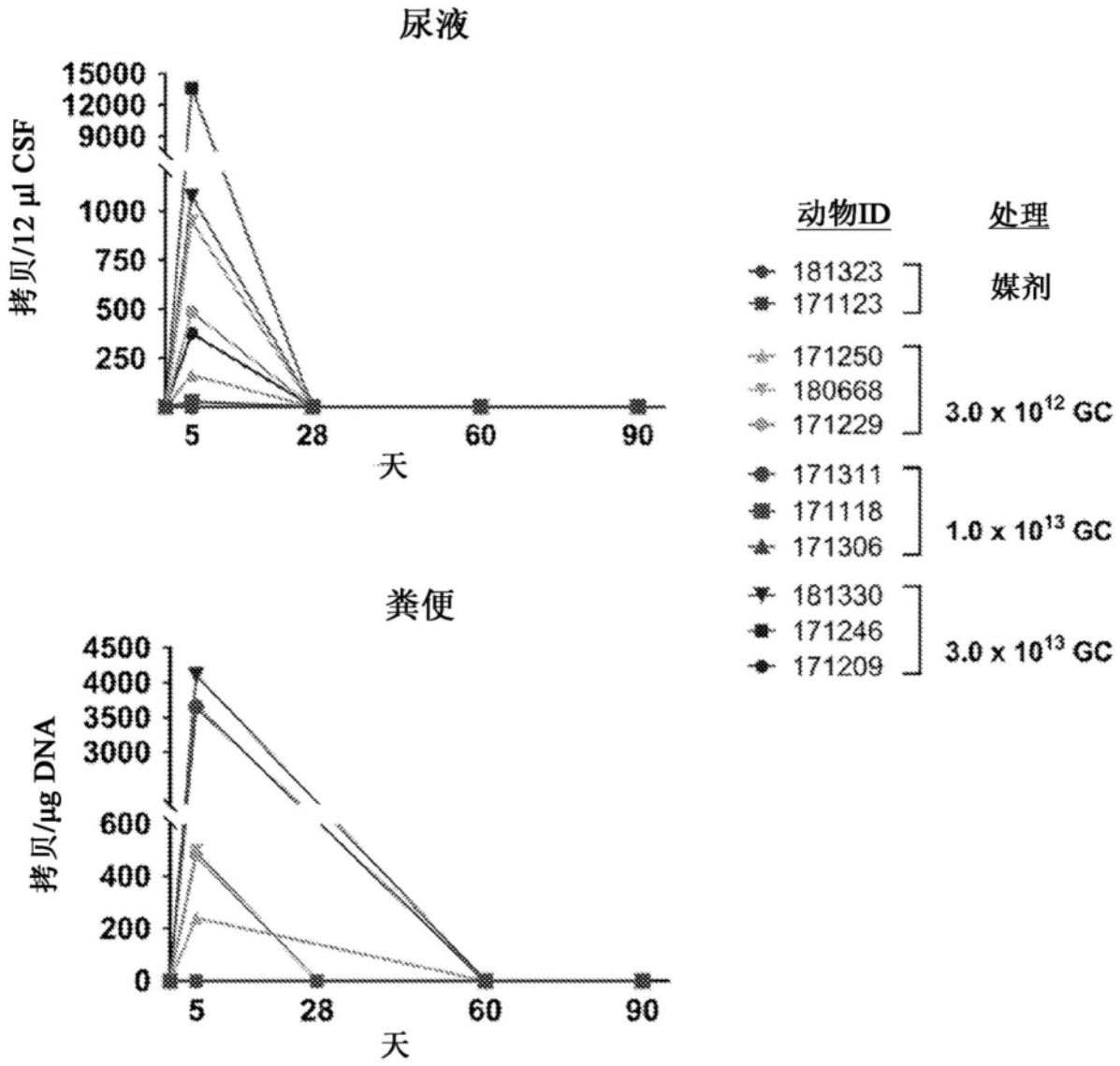
尿液
拷贝/12 µl CSF
15000
12000
9000
1000
750
500
250
5
28
60
90
天
动物ID
处理
181323
171123
媒剂
171250
180668
171229
3.0 x 10^12 GC
171311
171118
171306
1.0 x 10^13 GC
181330
171246
171209
3.0 x 10^13 GC
粪便
拷贝/µg DNA
4500
4000
3500
3000
600
400
200
0
5
28
60
90
天

图31

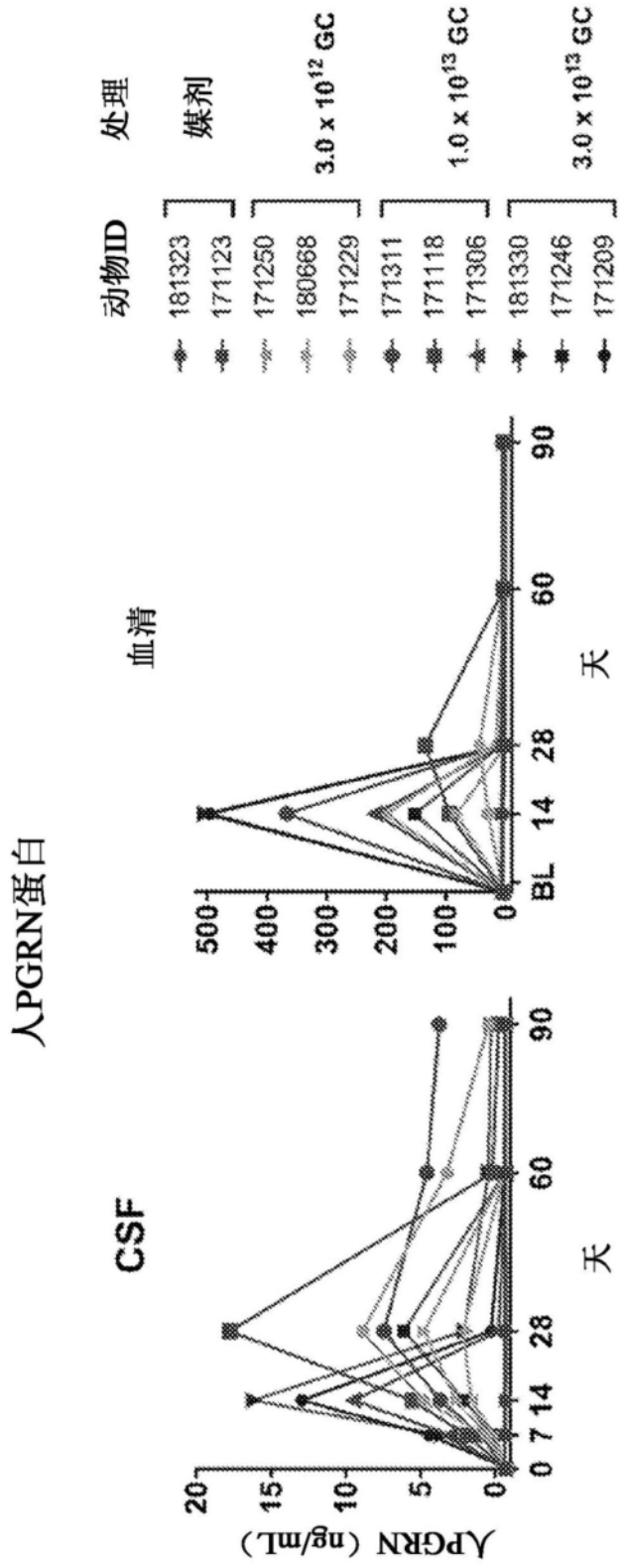
人PGRN蛋白
CSF
血清
hPGRN (ng/mL)
天
动物ID
处理
媒剂
3.0 x 10^12 GC
1.0 x 10^13 GC
3.0 x 10^13 GC
181323
171123
171250
180668
171229
171311
171118
171306
181330
171246
171209
BL

图32

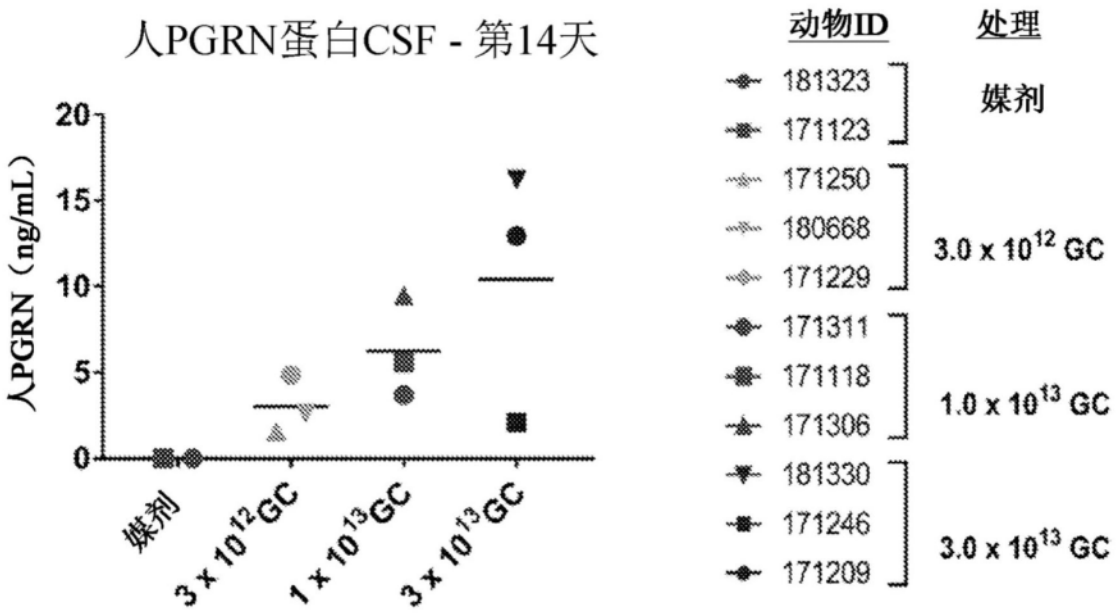
人PGRN蛋白CSF - 第14天
人PGRN（ng/mL）
20
15
10
5
0
媒剂
3 x 10^12 GC
1 x 10^13 GC
3 x 10^13 GC
动物ID
处理
181323
171123
媒剂
171250
180668
171229
3.0 x 10^12 GC
171311
171118
171306
1.0 x 10^13 GC
181330
171246
171209
3.0 x 10^13 GC

图33

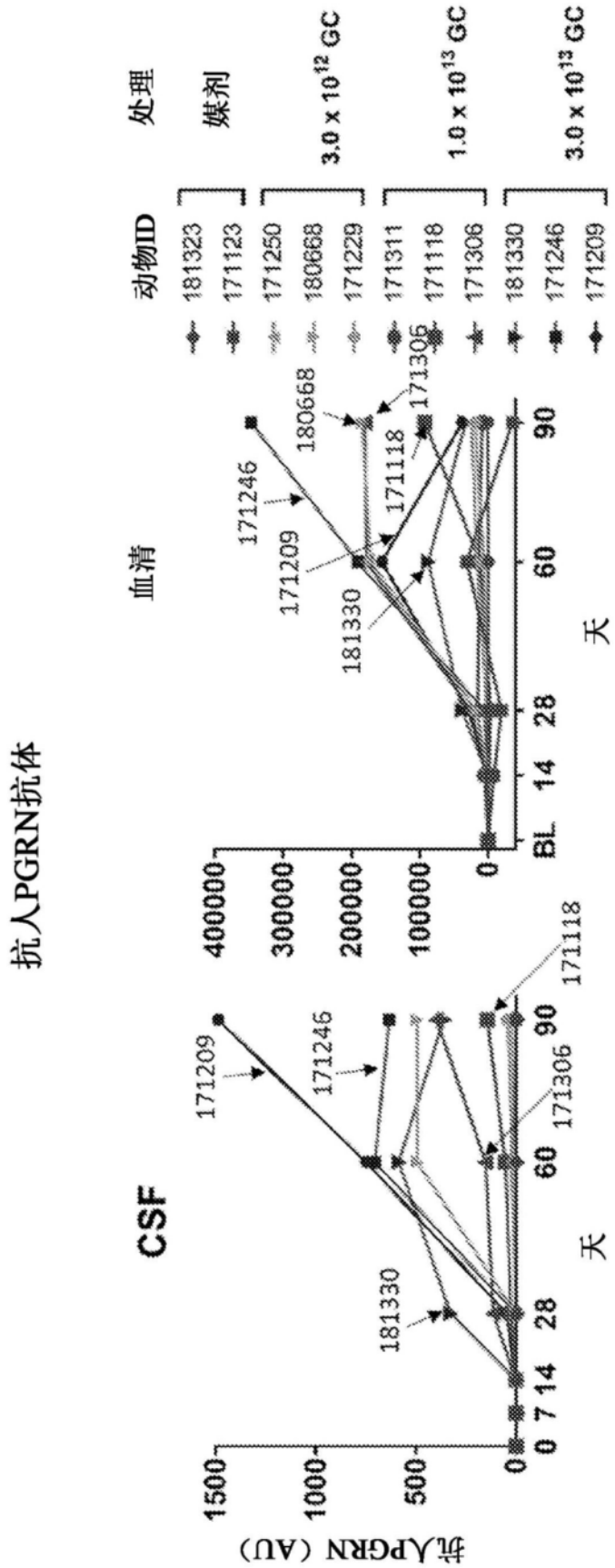
抗人PGRN抗体
血清
CSF
抗人PGRN (AU)
天
动物ID
处理
媒剂
3.0 x 10^12 GC
1.0 x 10^13 GC
3.0 x 10^13 GC
181323
171123
171250
180668
171229
171311
171118
171306
181330
171246
171209
BL
14
28
60
90
0
100000
200000
300000
400000
500
1000
1500
7

图34

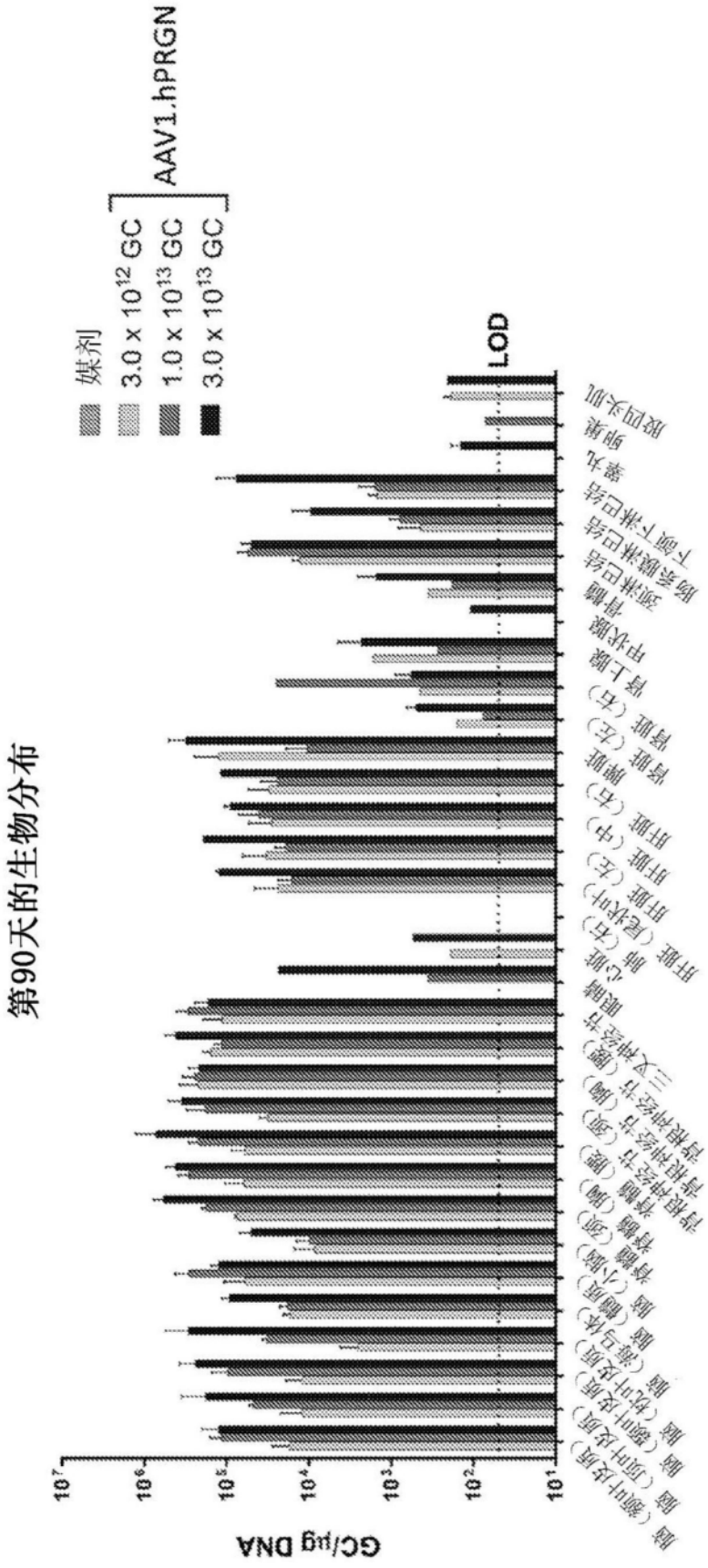
第90天的生物分布
GC/μg DNA
媒剂
3.0 x 10^12 GC
1.0 x 10^13 GC
3.0 x 10^13 GC
AAV1.hPRGN
LOD
脑（额叶皮质）
脑（顶叶皮质）
脑（颞叶皮质）
脑（枕叶皮质）
脑（海马体）
脑（小脑）
脊髓（颈）
脊髓（胸）
脊髓（腰）
背根神经节（颈）
背根神经节（胸）
背根神经节（腰）
三叉神经节
喉咙
心脏
肺（右）
肝脏（尾状叶）
肝脏（左）
肝脏（中）
肝脏（右）
脾脏
肾脏（左）
肾脏（右）
肾上腺
甲状腺
骨髓
颈淋巴结
股骨腹淋巴结
下颌下淋巴结
睾丸
卵巢
股四头肌

图35