(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120114618 A
(43)申请公布日 2025.06.10

(21)申请号 202510180683.1

(22)申请日 2020.12.07

(30)优先权数据
62/943,999 2019.12.05 US
63/074,578 2020.09.04 US

(62)分案原申请数据
202080093935.2 2020.12.07

(71)申请人 纽约市哥伦比亚大学理事会
地址 美国
申请人 康奈尔大学
梅拉格特克斯英国第二有限公司

(72)发明人 S·A·斯莫尔 G·佩茨科
Y·H·库雷什 S·D·瓦克萨尔
A·福布斯 R·考克斯

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 谢丽菲

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)

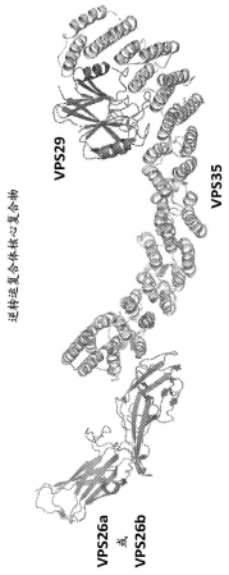
权利要求书3页 说明书33页
序列表（电子公布） 附图20页

(54)发明名称

用于治疗阿尔茨海默病和其他神经退行性病症的逆转运复合体的稳定化

(57)摘要

本公开内容涉及用于提高和稳定逆转运复合体以治疗和/或预防阿尔茨海默病和其他神经退行性疾病的方法和组合物。此外，本公开内容涉及用于治疗阿尔茨海默病(AD)和其他神经退行性疾病例如帕金森病(PD)、神经元蜡样脂褐质沉积症(NCL)和传染性海绵状脑病(TSE或朊病毒病)、多系统萎缩(MSA)、唐氏综合征和遗传性痉挛性截瘫以及tau蛋白病例如进行性核上性麻痹(PSP)、与染色体17q21-22及其亚型相关的额颞叶痴呆(FTLD-17/FTLD-Tau)、路易体病(LBD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶变性(FTD)、ALS-FTD和慢性创伤性脑病(CTE)的基于腺病毒的疗法。



CN 120114618 A

1.一种增加神经元细胞中的逆转运复合体功能的方法,其包括:

将编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的核酸和编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的核酸引入神经元细胞,

由此相对于仅将编码VPS26a或VPS35的核酸引入神经元细胞时的VPS35和VPS26a的水平,神经元细胞中的VPS35和VPS26a的水平增加,从而增加逆转运复合体功能;和/或

由此相对于仅将编码VPS26a或VPS35的核酸引入神经元细胞时的Sorl1的水平,神经元细胞中的Sorl1的水平增加,从而增加逆转运复合体功能。

2.权利要求1的方法,其中相对于仅将编码VPS26a或VPS35的核酸引入神经元细胞时的VPS35和VPS26a的水平,神经元细胞中的VPS35和VPS26a的水平增加,从而增加逆转运复合体功能。

3.权利要求1的方法,其中相对于仅将编码VPS26a或VPS35的核酸引入神经元细胞时的Sorl1的水平,神经元细胞中的Sorl1的水平增加,从而增加逆转运复合体功能。

4.一种增加神经元细胞中的逆转运复合体功能的方法,其包括:

将编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸引入神经元细胞,

由此相对于仅将编码VPS26b或VPS35的核酸引入神经元细胞时的VPS35、VPS26b和VPS29的水平,神经元细胞中的VPS35、VPS26b和VPS29的水平增加,从而增加逆转运复合体功能;和/或

由此相对于仅将编码VPS26a或VPS35的核酸引入神经元细胞时的Sorl1的水平,神经元细胞中的Sorl1的水平增加,从而增加逆转运复合体功能。

5.权利要求4的方法,其中相对于仅将编码VPS26b或VPS35的核酸引入神经元细胞时的VPS35和VPS26b的水平,神经元细胞中的VPS35和VPS26b的水平增加,从而增加逆转运复合体功能。

6.权利要求4的方法,其中相对于仅将编码VPS26b或VPS35的核酸引入神经元细胞时的Sorl1的水平,神经元细胞中的Sorl1的水平增加,从而增加逆转运复合体功能。

7.权利要求1-6中任一项的方法,其中编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的核酸和编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的核酸或编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸在一个或多个病毒载体中提供。

8.权利要求7的方法,其中编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的核酸和编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的核酸或编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸在一个病毒载体中提供。

9.权利要求7的方法,其中依次施用包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的核酸的病毒载体和包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的核酸或编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸的病毒载体。

10.权利要求7的方法,其中同时施用包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的核酸的病毒载体和包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的核酸或编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸的病毒载体。

11.病毒载体,其包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和编码选自VPS26a、VPS26b及其组合的逆转运复合体核心蛋白的至少一种转基因。

12.权利要求11的载体,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS35具有与VPS35的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)至少85%相同的氨基酸序列。

13.权利要求11的载体,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS35具有VPS35的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

14.权利要求11的载体,其中编码逆转运复合体核心蛋白Vps35的转基因包含人Vps35核酸序列。

15.权利要求11的载体,其中所述转基因具有与编码VPS35(SEQ ID NO:1)的核酸序列至少70%相同的核酸序列。

16.权利要求11的载体,其中所述转基因具有SEQ ID NO:10的核酸序列。

17.权利要求11的载体,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26a具有与VPS26a的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)至少85%相同的氨基酸序列。

18.权利要求11的载体,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白Vps26a具有VPS26a的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

19.权利要求11的载体,其中编码逆转运复合体核心蛋白Vps35的转基因包含人VPS26a核酸序列。

20.权利要求11的载体,其中所述转基因具有与编码VPS26a(SEQ ID NO:2)的核酸序列至少70%相同的核酸序列。

21.权利要求11的载体,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26b具有与VPS26b的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)至少85%相同的氨基酸序列。

22.权利要求11的载体,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26b具有VPS26b的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。

23.权利要求11的载体,其中编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因包含人VPS26b核酸序列。

24.权利要求11的载体,其中所述转基因具有与编码VPS26b(SEQ ID NO:3)的核酸序列至少70%相同的核酸序列。

25.权利要求11-24中任一项的载体,其中所述载体选自腺相关病毒(AAV)、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、痘病毒、杆状病毒、单纯疱疹病毒、牛痘病毒和合成病毒。

26.权利要求25的载体,其中所述病毒载体是AAV。

27.权利要求26的载体,其中所述AAV是AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10和AAVrh10。

28.权利要求26的载体,其中所述AAV选自AAV9和AAV2/9。

29.权利要求11-24中任一项的载体,其中所述转基因与诱导所述转基因在神经细胞中表达的启动子或增强子可操作地连接。

30.组合物,其包含至少一种病毒载体,所述病毒载体包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因和编码选自VPS26a、VPS26b及其组合的逆转运复合体核心蛋白的转基因。

31.权利要求30的组合物,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS35具有与VPS35的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)至少85%相同的氨基酸序列。

32.权利要求30的组合物,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS35具有VPS35的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

33.权利要求30的组合物,其中编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因包含人VPS35核酸序列。

34.权利要求30的组合物,其中所述转基因具有与编码VPS35(SEQ ID NO:1)的核酸序列至少70%相同的核酸序列。

35.权利要求30的组合物,其中所述转基因具有SEQ ID NO:10的核酸序列。

36.权利要求30的组合物,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26a具有与VPS26a的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)至少85%相同的氨基酸序列。

37.权利要求30的组合物,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26a具有VPS26a的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

38.权利要求30的组合物,其中编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因包含人VPS26a核酸序列。

39.权利要求30的组合物,其中所述转基因具有与编码VPS26a(SEQ ID NO:2)的核酸序列至少70%相同的核酸序列。

40.权利要求30的组合物,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26b具有与VPS26b的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)至少85%相同的氨基酸序列。

41.权利要求30的组合物,其中由所述转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26b具有VPS26b的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。

42.权利要求30的组合物,其中编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因包含人VPS26b核酸序列。

43.权利要求30的组合物,其中所述转基因具有与编码VPS26b(SEQ ID NO:3)的核酸序列至少70%相同的核酸序列。

44.权利要求30的组合物,其中所述载体选自腺相关病毒(AAV)、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、痘病毒、杆状病毒、单纯疱疹病毒、牛痘病毒和合成病毒。

45.权利要求44的组合物,其中所述病毒载体是AAV。

46.权利要求45的组合物,其中所述AAV是AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10和AAVrh10。

47.权利要求45的组合物,其中所述AAV选自AAV9和AAV2/9。

48.权利要求30-47中任一项的组合物,其中所述转基因与诱导所述转基因在神经细胞中表达的启动子或增强子可操作地连接。

49.权利要求30的组合物,其还包含药物承载体。

50.组合物,其包含编码VPS35和选自VPS26a、VPS26b及其组合的逆转运复合体核心蛋白的至少一种核酸。

51.权利要求50的组合物,其包含编码VPS35的第一核酸和编码选自VPS26a、VPS26b及其组合的逆转运复合体核心蛋白的第二核酸。

52.试剂盒,其包含权利要求30-51中任一项的组合物。

用于治疗阿尔茨海默病和其他神经退行性病症的逆转运复合体的稳定化

[0001] 本申请为分案,其母案申请的申请号为202080093935.2,申请日为2020年12月7日,发明名称为“用于治疗阿尔茨海默病和其他神经退行性病症的逆转运复合体的稳定化”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2019年12月5日提交的美国临时申请第62/943,999号和2020年9月4日提交的美国临时申请第63/074,578号的优先权,两者均通过引用整体并入本文。

技术领域

[0004] 本公开内容涉及用于提高和稳定逆转运复合体(retromer)以治疗和/或预防阿尔茨海默病和其他神经退行性疾病的方法和组合物。

背景技术

[0005] 阿尔茨海默病(AD)的特征是错误折叠的蛋白质和神经炎症的疾病。然而,针对淀粉样蛋白、tau、胆碱酯酶抑制剂、抗炎化合物的AD疗法和替代疗法(例如美金刚和营养补充剂)已经失败,该疾病仍然是死亡率、发病率和经济负担的主要来源。AD临床试验的失败迫使研究人员进一步调查该疾病的因果关系。许多临床前研究已经检查了新的AD相关基因、细胞内蛋白质稳态途径、神经元与其微环境和与神经胶质细胞的相互作用。多项研究仍在进行中。

[0006] 最近在阿尔茨海默病中的遗传和细胞生物学发现表明,“内体运输”在疾病病理生理学中发挥着核心作用。目前的文献主张四种基因类别与AD有关。这些基因类别是:1)内体运输;2)胆固醇代谢;3)免疫反应;和4)淀粉样前体蛋白(APP)加工。所有这四种基因类别都与内体运输缺陷直接或间接相关。内体运输缺陷也与其他神经退行性疾病有关,例如帕金森病(PD)、传染性海绵状脑病(TSE或朊病毒病)和神经元蜡样脂褐质沉积症(NCL)。

[0007] 逆转运复合体是一种与内体细胞器相关的蛋白质复合物,控制管状囊泡载体内某些细胞货物分子向反式高尔基网络的运输。这种运输中的缺陷与各种神经退行性疾病有关(Small和Petsko 2015;Anderson等人,2014)。神经退行性是神经元的结构或功能的进行性丧失的涵盖性术语,包括神经元的死亡。许多神经退行性疾病,包括肌萎缩侧索硬化(ALS)、帕金森病(PD)、阿尔茨海默病(AD)和亨廷顿病,都是神经退行性过程的结果。

[0008] 已经描述了使用小分子来改善逆转运复合体复合物功能。然而,开发在体内显示出积极药理动力学的成功药物将是困难的,并且可能需要很多年。迫切需要用于这些神经退行性疾病的有效治疗,目前还没有可以提供长期益处的基于基因的疗法。

发明内容

[0009] 本公开内容涉及可用于治疗患有神经退行性疾病或有发生神经退行性疾病风险的受试者(例如哺乳动物受试者,例如人类受试者)的组合物和方法,所述神经退行性疾病

包括但不限于阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、神经元蜡样脂褐质沉积症(NCL)、传染性海绵状脑病(TSE或朊病毒病)、唐氏综合征、遗传性痉挛性截瘫(HSP)和多系统萎缩(MSA),以及tau蛋白病例如进行性核上性麻痹(PSP)、与染色体17q21-22及其亚型相关的额颞叶痴呆(FTLD-17/FTLD-Tau)、路易体病(LBD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶变性(FTD)、ALS-FTD和慢性创伤性脑病(CTE)。

[0010] 使用本公开内容的组合物和方法,可以向患有上述疾病或处于患有上述疾病的风险的受试者(例如哺乳动物受试者,例如人类受试者)施用含有编码一种或多种本文所述的逆转运复合体蛋白的转基因的组合物。所述组合物可以包含载体,例如病毒载体,例如腺相关病毒(AAV)载体。在一些实施方案中,向受试者施用第二组合物,所述第二组合物包含编码一种或多种本文所述的逆转运复合体蛋白的转基因。第二组合物可以包含载体,例如病毒载体,例如AAV载体。在一些实施方案中,向受试者施用第三组合物,所述第三组合物含有编码一种或多种本文所述的逆转运复合体蛋白的转基因。第三组合物可以包含载体,例如病毒载体,例如AAV载体。

[0011] 在第一方面,本公开内容的特征在于包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或VPS26a和/或VPS26b的转基因的组合物。在实施方案中,转基因编码VPS35。在实施方案中,转基因编码VPS26a和/或VPS26b。在实施方案中,转基因编码VPS35和VPS26a或VPS26b。在实施方案中,转基因编码VPS35和VPS26a。在实施方案中,转基因编码VPS35和VPS26b。在实施方案中,转基因编码VPS26a和VPS26b。在其他方面,该组合物包含两种转基因,其中一种转基因编码VPS35,另一种编码VPS26a或VPS26b。在其他方面,该组合物包含两种转基因,其中一种转基因编码VPS26a,另一种编码VPS26b。在其他方面,该组合物包含三种转基因,其中一种转基因编码VPS35,另一种编码VPS26a,和另一种编码VPS26b。

[0012] 在一些实施方案中,转基因编码逆转运复合体核心蛋白VPS35。在一些实施方案中,逆转运复合体核心蛋白VPS35蛋白是人的。由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS35可以具有与VPS35的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列(例如,与VPS35的氨基酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列)。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS35具有与VPS35的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列(例如,与VPS35的氨基酸序列90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列)。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS35具有与VPS35的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列(例如,与VPS35的氨基酸序列95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列)。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS35具有通过一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失例如通过1至10、1至15、1至20、1至25或更多个氨基酸取代、插入和/或缺失(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个保守氨基酸取代)而与VPS35不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS35具有通过一个或多个保守氨基酸取代例如通过1至10、1至15、1至20、1至25或更多个保守氨基酸取代(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个保守氨基酸取代)而与VPS35不同的氨基酸序列。

[0013] 在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因包含人VPS35(基

因ID 55737)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因具有与编码VPS35的核酸序列至少70%相同的核酸序列(例如,与编码VPS35的核酸序列70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因具有与编码VPS35的核酸序列至少85%相同的核酸序列(例如,与编码VPS35的核酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因具有与编码VPS35的核酸序列至少90%相同的核酸序列(例如,与编码VPS35的核酸序列90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因具有与编码VPS35的核酸序列至少95%相同的核酸序列(例如,与编码VPS35的核酸序列95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的转基因是密码子优化的。

[0014] 在一些实施方案中,转基因编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a。在一些实施方案中,逆转运复合体核心蛋白VPS26a蛋白是人的。由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26a可以具有与VPS26a的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列(例如,与VPS26a的氨基酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列)。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26a具有与VPS26a的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列(例如,与VPS26a的氨基酸序列90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列)。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26a具有与VPS26a的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列(例如,与VPS26a的氨基酸序列95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列)。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26a具有通过一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失例如通过1至10、1至15、1至20、1至25或更多个氨基酸取代、插入和/或缺失(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个保守氨基酸取代)而与VPS26a不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,逆转运复合体核心蛋白VPS26a具有通过一个或多个保守氨基酸取代例如通过1至10、1至15、1至20、1至25或更多个保守氨基酸取代(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个保守氨基酸取代)而与VPS26a不同的氨基酸序列。

[0015] 在另外的实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的转基因包含人VPS26a(基因ID 9559)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的转基因具有与编码VPS26a的核酸序列至少70%相同的核酸序列(例如,与编码VPS26a的核酸序列70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的转基因具有与编码VPS26a的核酸序列至少85%相同的核酸序列(例如,与编码VPS26a的核酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的转基因具有与

编码VPS26a的核酸序列至少90％相同的核酸序列(例如,与编码VPS26a的核酸序列90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的转基因具有与编码VPS26a的核酸序列至少95％相同的核酸序列(例如,与编码VPS26a的核酸序列95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a的转基因是密码子优化的。

[0016] 在一些实施方案中,转基因编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b。在一些实施方案中,逆转运复合体核心蛋白VPS26b蛋白是人的。由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26b可以具有与VPS26b的氨基酸序列至少85％相同的氨基酸序列(例如,与VPS26b的氨基酸序列85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列)。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26b具有与VPS26b的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列(例如,与VPS26b的氨基酸序列90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列)。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26b具有与VPS26b的氨基酸序列至少95％相同的氨基酸序列(例如,与VPS26b的氨基酸序列95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列)。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26b具有通过一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失例如通过1至10、1至15、1至20、1至25或更多个氨基酸取代、插入和/或缺失(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个保守氨基酸取代)而与VPS26b不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,由转基因编码的逆转运复合体核心蛋白VPS26b具有通过一个或多个保守氨基酸取代例如通过1至10、1至15、1至20、1至25或更多个保守氨基酸取代(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个保守氨基酸取代)而与VPS26b不同的氨基酸序列。

[0017] 在另外的实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因包含人VPS26b(基因ID 112936)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因具有与编码VPS26b的核酸序列至少70％相同的核酸序列(例如,与编码VPS26b的核酸序列70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因具有与编码VPS26b的核酸序列至少85％相同的核酸序列(例如,与编码VPS26b的核酸序列85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因具有与编码VPS26b的核酸序列至少90％相同的核酸序列(例如,与编码VPS26b的核酸序列90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因具有与编码VPS26b的核酸序列至少95％相同的核酸序列(例如,与编码VPS26b的核酸序列95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸序列)。在一些实施方案中,编码逆转运复合体VPS26b核心蛋白的转基因是密码子优化的。

[0018] 在前述方面的一些实施方案中,所述组合物包含载体,例如病毒载体。病毒载体可

以是例如AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、痘病毒载体、杆状病毒载体、单纯疱疹病毒载体、痘苗病毒载体或合成病毒载体(例如嵌合病毒、花叶病毒或假型病毒,和/或含有外源蛋白质、合成聚合物、纳米颗粒或小分子的病毒)。

[0019] 在前述方面的一些实施方案中,病毒载体是AAV载体,例如AAV1(即,含有AAV1反向末端重复(ITR)和AAV1衣壳蛋白的AAV)、AAV2(即,含有AAV2 ITR和AAV2衣壳蛋白的AAV)、AAV3(即含有AAV3 ITR和AAV3衣壳蛋白的AAV)、AAV4(即含有AAV4 ITR和AAV4衣壳蛋白的AAV)、AAV5(即含有AAV5 ITR和AAV5衣壳蛋白的AAV)、AAV6(即含有AAV6 ITR和AAV6衣壳蛋白的AAV)、AAV7(即含有AAV7 ITR和AAV7衣壳蛋白的AAV)、AAV8(即含有AAV8 ITR和AAV8衣壳蛋白的AAV)、AAV9(即含有AAV9 ITR和AAV9衣壳蛋白的AAV)、AAVrh74(即含有AAVrh74 ITR和AAVrh74衣壳蛋白的AAV)、AAVrh.8(即含有AAVrh.8ITR和AAVrh.8衣壳蛋白的AAV)或AAVrh.10(即,包含AAVrh.10ITR和AAVrh.10衣壳蛋白的AAV)。

[0020] 在前述方面的一些实施方案中,病毒载体是假型AAV载体,包含来自一种AAV血清型的ITR和来自不同AAV血清型的衣壳蛋白。在一些实施方案中,假型AAV是AAV2/9(即,含有AAV2 ITR和AAV9衣壳蛋白的AAV)。在一些实施方案中,假型AAV是AAV2/10(即,含有AAV2 ITR和AAV10衣壳蛋白的AAV)。

[0021] 在前述方面的一些实施方案中,AAV载体含有重组衣壳蛋白,例如含有来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh74、AAVrh.8或AAVrh.10的衣壳蛋白中的一种或多种的嵌合体的衣壳蛋白。在实施方案中,衣壳是变体AAV衣壳,例如AAV2变体rAAV2-retro(来自WO2017/218842的SEQ ID NO:44,其通过引用并入本文)。

[0022] 在某些实施方案中,病毒载体是AAV10。例如,该组合物可以包含AAV10,该AAV10包含含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因的核酸序列。

[0023] 在某些实施方案中,病毒载体是AAV9。例如,该组合物可以包含AAV9,该AAV9包含含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因的核酸序列。

[0024] 在某些实施方案中,病毒载体是AAV2/10。例如,该组合物可以包含AAV2/10,该AAV2/10包含含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因的核酸序列。

[0025] 在某些实施方案中,病毒载体是AAV2/9。例如,该组合物可以包含AAV2/9,该AAV2/9包含含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因的核酸序列。

[0026] 在某些实施方案中,病毒载体是AAV载体并且转基因编码VPS35逆转运复合体核心蛋白。例如,该组合物可包含重组AAV(rAAV),例如AAV10,其包含含有编码功能性VPS35逆转运复合体核心蛋白的转基因的核酸序列。例如,该组合物可包含重组AAV(rAAV),例如AAV9,其包含含有编码功能性VPS35逆转运复合体核心蛋白的转基因的核酸序列。例如,该组合物可以包含重组AAV(rAAV),例如AAV2/9或AAV2/10,其包含含有编码功能性VPS35逆转运复合体核心蛋白的转基因的核酸序列。

[0027] 在某些实施方案中,病毒载体是AAV载体并且转基因编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a。例如,该组合物可以包含重组AAV(rAAV),例如AAV10,其包含含有编码功能性

VPS26a逆转运复合体核心蛋白的转基因的核酸序列。例如,该组合物可以包含重组AAV(rAAV),例如AAV9,其包含含有编码功能性逆转运复合体核心蛋白VPS26a的转基因的核酸序列。例如,该组合物可以包含重组AAV(rAAV),例如AAV2/9或AAV2/10,其包含含有编码功能性逆转运复合体核心蛋白VPS26a的转基因的核酸序列。

[0028] 在某些实施方案中,病毒载体是AAV载体并且转基因编码逆转运复合体核心蛋白VPS26b。例如,该组合物可以包含重组AAV(rAAV),例如AAV10,其包含含有编码功能性VPS26b逆转运复合体核心蛋白的转基因的核酸序列。例如,该组合物可以包含重组AAV(rAAV),例如AAV9,其包含含有编码功能性逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因的核酸序列。例如,该组合物可包含重组AAV(rAAV),例如AAV2/9或AAV2/10,其包含含有编码功能性逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因的核酸序列。

[0029] 在本公开内容的任何上述方面的一些实施方案中,所述组合物包含脂质体、囊泡、合成囊泡、外来体、合成外来体、树枝状聚合物或纳米颗粒。

[0030] 在本公开内容的任何上述方面的一些实施方案中,转基因可操作地连接至在神经元中诱导转基因表达的启动子。启动子可以是例如鸡β肌动蛋白启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、肌球蛋白轻链-2启动子、α肌动蛋白启动子、肌钙蛋白1启动子、Na+/Ca2+交换启动子、抗肌萎缩蛋白启动子、肌酸激酶启动子、α7整合素启动子、脑利钠肽启动子、αB-晶状体蛋白/小热休克蛋白启动子、α肌球蛋白重链启动子或心房利钠因子启动子。

[0031] 在本公开内容的任何上述方面的一些实施方案中,转基因与诱导转基因在神经元中表达的增强子可操作地连接。可以与本公开内容的组合物和方法结合使用的示例性增强子是CMV增强子、肌细胞增强因子2(MEF2)增强子和MyoD增强子。

[0032] 在另一个方面,本公开内容的特征在于通过施用一种或多种包含根据前述实施方案的一种或多种病毒载体的组合物来治疗有需要的受试者中的退行性疾病或病症的方法。在一些实施方案中,该组合物在受试者被诊断为患有退行性疾病或病症时立即或在受试者被诊断为患有退行性疾病或病症之后立即施用至受试者。在实施方案中,退行性疾病或病症是神经退行性疾病,例如阿尔茨海默病(AD)、帕金森病、神经元蜡样脂褐质沉积症(NCL)、传染性海绵状脑病(TSE或朊病毒病)、多系统萎缩(MSA)、唐氏综合征和遗传性痉挛性截瘫(HSP),以及tau蛋白病例如进行性核上性麻痹(PSP)、与染色体17q21-22及其亚型相关的额颞叶痴呆(FTLD-17/FTLD-Tau)、路易体病(LBD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶变性(FTD)、ALS-FTD和慢性创伤性脑病(CTE)。

[0033] 在另一个方面,本公开内容的特征在于通过施用一种或多种组合物来治疗有需要的受试者中的退行性疾病或病症的方法,所述组合物包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或VPS26a和/或VPS26b的转基因,如前述段落中所述。在实施方案中,组合物包含编码VPS35的转基因和编码VPS26a的转基因。在实施方案中,组合物包含编码VPS35的转基因和编码VPS26b的转基因。在实施方案中,组合物包含编码VPS26a的转基因和编码VPS26b的转基因。在实施方案中,组合物包含编码VPS35的转基因、编码VPS26a的转基因和编码VPS26b的转基因。在一些实施方案中,该组合物在受试者被诊断为患有退行性疾病或病症时立即或在受试者被诊断为患有退行性疾病或病症之后立即施用至受试者。在实施方案中,退行性疾病或病症是神经退行性疾病,例如阿尔茨海默病(AD)、帕金森病、神经元蜡样脂褐质沉积症(NCL)、传染性海绵状脑病(TSE或朊病毒病)、唐氏综合征、遗传性痉挛性截瘫

(HSP)和多系统萎缩(MSA),以及tau蛋白病例如进行性核上性麻痹(PSP)、与染色体17q21-22及其亚型相关的额颞叶痴呆(FTLD-17/FTLD-Tau)、路易体病(LBD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶变性(FTD)、ALS-FTD和慢性创伤性脑病(CTE)。

[0034] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的第一组合物,该第一组合物包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或VPS26a和/或VPS26b的转基因,如前述段落中所述。在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用治疗有效量的第二组合物,该第二组合物包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或VPS26a和/或VPS26b的转基因,如前述段落中所述。在实施方案中,该方法包括施用包含编码VPS35的转基因的第一组合物和施用包含编码VPS26a或VPS26b的转基因的第二组合物。在实施方案中,该方法包括施用包含编码VPS26a或VPS26b的转基因的第一组合物和施用包含编码VPS35的转基因的第二组合物。在实施方案中,该方法包括施用包含编码VPS26a的转基因的第一组合物和施用包含编码VPS26b的转基因的第二组合物。在实施方案中,该方法包括施用包含编码VPS26b的转基因的第一组合物和施用包含编码VPS26a的转基因的第二组合物。

[0035] 在一些实施方案中,该方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的第三组合物,该第三组合物包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或VPS26a和/或VPS26b的转基因,如前述段落中所述。在实施方案中,第一组合物、第二组合物和第三组合物分别包含编码VPS35、VPS26a或VPS26b的转基因。

[0036] 在一些实施方案中,将第一组合物和第二组合物同时施用至受试者。在一些实施方案中,将第一组合物、第二组合物和第三组合物同时施用至受试者。

[0037] 在一些实施方案中,在将第一组合物施用至受试者之后,将第二组合物施用至受试者。可以例如在将第一组合物施用至受试者的一天或多天或数周内将第二组合物施用至受试者。在一些实施方案中,在将第一组合物施用至受试者后至少一个月将第二组合物施用至受试者。在一些实施方案中,第一组合物的施用继续,同时第二组合物被施用至受试者。

[0038] 在一些实施方案中,在将第一组合物和第二组合物施用至受试者之后,将第三组合物施用至受试者。可以例如在将第一组合物和第二组合物施用至受试者的一天或多天或数周内将第三组合物施用至受试者。在一些实施方案中,在将第一组合物和第二组合物施用至受试者后至少一个月将第三组合物施用至受试者。在一些实施方案中,第一组合物和第二组合物的施用继续,同时第三组合物被施用至受试者。

[0039] 在一些实施方案中,第一组合物通过静脉内、鞘内、皮内、透皮、肠胃外、肌肉内、鼻内、皮下、经皮、气管内、腹膜内、动脉内、血管内、吸入、灌注、灌洗和/或口服施用的途径被施用至受试者。

[0040] 在一些实施方案中,第二组合物通过静脉内、鞘内、皮内、透皮、肠胃外、肌肉内、鼻内、皮下、经皮、气管内、腹膜内、动脉内、血管内、吸入、灌注、灌洗和/或口服施用的途径被施用至受试者。

[0041] 在一些实施方案中,第三组合物通过静脉内、鞘内、皮内、透皮、肠胃外、肌肉内、鼻内、皮下、经皮、气管内、腹膜内、动脉内、血管内、吸入、灌注、灌洗和/或口服施用的途径被施用至受试者。

[0042] 在另一方面,本公开内容的特征在于在有需要的受试者中治疗、预防和/或治愈神

经退行性疾病或病症的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种组合物，该组合物含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因。

[0043] 在另外的方面，本公开内容的特征在于在有需要的受试者中减轻与神经退行性疾病或病症相关的一种或多种症状的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种组合物，该组合物含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的转基因。

[0044] 作为前述方面的一部分，本公开内容还提供了一种或多种如本文所述的组合物，其用于如本文所述的方法中。本公开内容还提供了一种或多种如本文所述的组合物用于制备用于如本文所述的方法的一种或多种药物的用途。转基因可以编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b。

[0045] 作为前述方面的一部分，本公开内容因此还提供了一种组合物，其含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的一种或多种转基因，其用于治疗、预防和/或治愈神经退行性疾病或病症。还提供了一种或多种组合物，其含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的一种或多种转基因，其用于缓解与神经退行性疾病或病症相关的一种或多种症状。

[0046] 作为前述方面的一部分，本公开内容还提供了一种或多种组合物用于制备用于治疗、预防和/或治愈神经退行性疾病或病症的一种或多种药物的用途，所述组合物含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的一种或多种转基因。还提供了含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的一种或多种转基因的一种或多种组合物在制备用于缓解与神经退行性疾病或病症相关的一种或多种相关症状的一种或多种药物中的用途。

[0047] 在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是神经退行性疾病或病症。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是阿尔茨海默病(AD)。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是帕金森病。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是神经元蜡样脂褐质沉积症(NCL)。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是传染性海绵状脑病(TSE或朊病毒病)。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是多系统萎缩(MSA)。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是进行性核上性麻痹(PSP)。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是与染色体17q21-22及其亚型相关的额颞叶痴呆(FTLD-17/FTLD-Tau)。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是慢性创伤性脑病(CTE)。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是唐氏综合征。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是HSP。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是LBD。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是ALS。在任何前述方面的一些实施方案中，疾病或病症是FTD或ALS-FTD。

[0048] 在另一个方面，本公开内容的特征在于包含前述方面的组合物的试剂盒。试剂盒还可包含包装插页，例如指导试剂盒的使用者根据本公开内容的任何上述方面或实施方案的方法将组合物施用至受试者的包装插页。

附图简要说明

[0050] 为了说明本发明,在附图中描绘了本发明的某些实施方案。然而,本发明不限于附图中描绘的实施方案的精确布置和手段。

[0051] 图1显示了逆转运复合体货物识别核心的三维结构的骨架渲染(PyMOL,Schroedinger,Inc.),突出显示了VPS35(橙色)与VPS29(红色)和VPS26a(绿色)的相互作用。Vps26b以几乎相同的方式与Vps35结合(Collins等人,2008;Shi等人,2006)。原子坐标(PDB文件6vac)取自小鼠异三聚体的cryoEM结构(Kendall等人,2020)。

[0052] 图2显示仅VPS35表达不足以提升逆转运复合体的三聚体和功能。图2A是代表性的免疫印迹,显示了AAV9-VPS35-HA之后的逆转运复合体和Sorl1表达水平。AAV9-GFP和AAV9-EV(空载体)用作对照。图2B是条形图,显示逆转运复合体组分和Sorl1的平均水平,标准化至肌动蛋白;对照(左侧条,深灰色,n=23),VPS35过表达(右侧条,红色,n=16)。***P<0.001,ns=不显著。

[0053] 图3显示了实施例中使用的质粒的图谱。图3A显示了空框架对照质粒图谱。图3B显示了GFP对照质粒图谱。图3C显示了VPS35质粒图谱。图3D显示了VPS26a质粒图谱。图3E显示了VPS26b质粒图谱。

[0054] 图4显示了神经母细胞瘤细胞中组合的VPS35和VPS26表达的优化。图4A是代表性的免疫印迹,显示了在转染单独含有VPS35、VPS26a和VPS26b的质粒或双重转染VPS35与VPS26a或VPS26b后的逆转运复合体表达水平。GFP或空骨架质粒用作对照。为了正确控制在每种条件下引入的质粒DNA/lipofectamine复合物的量,只要仅转染逆转运复合体的一种成分,就包括对照质粒(GFP或空骨架)。VPS29显示出两条不同的条带,它们代表这些N2a细胞中这种蛋白质的两种不同同种型。图4B至4E是用含有空载体(EV)和GFP作为对照(EV+GFP)、单独的VPS35、单独的VPS26a、单独的VPS26b的病毒载体、VPS35载体+VPS26a载体和VPS35载体+VPS26b载体转染的神经母细胞瘤细胞中标准化至肌动蛋白的逆转运复合体核心蛋白(VPS35、VPS26a、VPS26b、VPS29)的平均水平的图。图4B显示了VPS35。图4C显示了VPS26a。图4D显示了VPS26b。图4E显示了VPS29。对照(深灰色,n=15),单独的VPS35(n=30)、VPS26a(n=30)和VPS26b(n=15)过表达(蓝色),VPS35+VPS26组合(红色,n=15)。***P<0.001,**P<0.01,!P=0.07,ns=不显著。

[0055] 图5显示组合的VPS35和VPS26表达在神经元中协同逆转运复合体功能。图5A是代表性的免疫印迹,显示了用含有VPS35、VPS26a和VPS26b的AAV9载体转导后的逆转运复合体表达水平。AAV9-GFP和AAV9-EV(含有空骨架质粒的AAV9)用作对照。实验性AAV9载体以所有可能的组合在神经元中表达:单蛋白表达(单独的VPS35、单独的VPS26a、单独的VPS26b);双蛋白表达(VPS35+VPS26a、VPS35+VPS26b、VPS26b+VPS26a);和三重蛋白表达(VPS35+VPS26a+VPS26b)。为了正确控制在每种情况下引入的DNA和AAV9的量,只要仅转导逆转运复合体的一种组分,就包括对照AAV9(GFP或EV)。图5B至5E是用包含空载体(EV)、GFP、VPS35、VPS26a或VPS26b的五种病毒载体(AAV9)中的一种或多种转染的神经母细胞瘤细胞中标准化至肌动蛋白的逆转运复合体核心蛋白(VPS35、VPS26a、VPS26b)平均水平的条形图。显示了空载体(EV)+GFP作为对照、单独的VPS35载体、单独的VPS26a载体、单独的VPS26b载体、VPS35载体+VPS26a载体、VPS35载体+VPS26b载体、VPS35载体+VPS26a载体+VPS26b载体和VPS26a载体+VPS26b载体的结果。图5B显示了VPS35。图5C显示了VPS29。图5D显示了VPS26a。图5E显示

了VPS26b。对照(深灰色,n＝9),VPS35、VPS26a或VPS26b的单一过表达(蓝色,n＝18),VPS35+VPS26a或VPS26b组合(红色,n＝9),VPS35+VPS26a+VPS26b(深红色,n＝9),VPS26a+VPS26b(粉红色,n＝9)。***P<0.001,**P<0.01,*P<0.05,ns＝不显著。

[0056] 图6显示了组合的VPS35和VPS26表达在神经元中协同逆转运复合体功能。图6A是代表性的免疫印迹,显示了用含有VPS35、VPS26a和VPS26b的AAV9载体转导后的Sorl1表达水平。AAV9-GFP和AAV9-EV(含有空骨架质粒的AAV9)用作对照。实验性AAV9载体以所有可能的组合在神经元中表达:单蛋白表达(单独的VPS35、单独的VPS26a、单独的VPS26b);双蛋白表达(VPS35+VPS26a、VPS35+VPS26b、VPS26b+VPS26a);和三重蛋白表达(VPS35+VPS26a+VPS26b)。为了正确控制在每种情况下引入的DNA和AAV9的量,只要仅转导逆转运复合体的一种组分,就包括对照AAV9(GFP或EV)。图6B是用包含空载体(EV)、GFP、VPS35、VPS26a或VPS26b的五种病毒载体(AAV9)中的一种或多种转染的神经元中标准化至肌动蛋白的Sorl1水平的条形图。结果显示为空载体(EV)+GFP作为对照、单独的VPS35载体、单独的VPS26a载体、单独的VPS26b载体、VPS35载体+VPS26a载体、VPS35载体+VPS26b载体、VPS35载体+VPS26a载体+VPS26b载体和VPS26a载体+VPS26b载体。对照(深灰色,n＝9),VPS35、VPS26a或VPS26b的单一过表达(蓝色,n＝18),VPS35+VPS26a或VPS26b组合(红色,n＝9),VPS35+VPS26a+VPS26b(深红色,n＝9),VPS26a+VPS26b(粉红色,n＝9)。***P<0.001,ns＝不显著。图6C和6D是从多元回归生成的散点图,表明VPS26a(t＝5.6,p＝1.4E-7)和VPS26b(F＝7.2,p＝3.2E-11)与Sorl1水平独立相关。图6C显示了VPS26a。图6D显示了VPS26b。

发明内容

[0057]

[0058] 定义

[0059] 本说明书中使用的术语在本发明的上下文和使用每个术语的特定上下文中通常具有它们在本领域中的普通含义。某些术语在下文或说明书的其他地方进行了讨论,以在描述本发明的方法以及如何使用它们时为从业者提供额外的指导。此外,可以理解的是,可以以不止一种方式表达同样的事情。因此,替代语言和同义词可用于本文讨论的任何一个或多个术语,对于术语是否在本文中详细阐述或讨论也没有任何特殊意义。提供了某些术语的同义词。一个或多个同义词的叙述并不排除其他同义词的使用。说明书中任何地方的示例的使用,包括本文讨论的任何术语的示例,仅是说明性的,并且绝不限制本发明或任何示例性术语的范围和含义。同样,本发明不限于其优选实施方案。

[0060] 术语“约”或“大约”是指在由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分取决于如何测量或确定该值,即测量系统的限制,即特定目的(例如药物制剂)所需的精确度。例如,根据本领域的实践,“约”可以表示在1个或多于1个标准偏差内。可替代地,“约”可表示给定值的至多20%,优选至多10%,更优选至多5%,更优选至多1%的范围。可替代地,特别是关于生物系统或过程,该术语可以表示值的数量级内,优选地在5倍内,更优选地在2倍内。在申请和权利要求书中描述了特定值的情况下,除非另有说明,否则应假定术语“约”表示在特定值的可接受误差范围内。

[0061] 本申请中使用的术语“受试者”是指需要治疗或预防性治疗的动物。受试者包括哺乳动物,例如犬科动物、猫科动物、啮齿动物、牛科动物、马科动物、猪科动物、绵羊科动物和灵长类动物。因此,所述组合物和方法可用于兽医学,例如治疗伴侣动物、农场动物、动物园

中的实验动物和野外动物。本文公开的组合物和方法对于人类医学应用是特别理想的。

[0062] 本申请中使用的术语“患者”是指人类受试者。在一些实施方案中,“患者”已知或怀疑患有神经退行性疾病或病症,所述神经退行性疾病或病症包括但不限于阿尔茨海默病(AD)、帕金森病、神经元蜡样脂褐质沉积症(NCL)、传染性海绵状脑病(TSE或朊病毒病)、多系统萎缩(MSA)、唐氏综合征和遗传性痉挛性截瘫(HSP)以及tau蛋白病例如进行性核上性麻痹(PSP)、与染色体17q21-22及其亚型相关的额颞叶痴呆(FTLD-17/FTLD-Tau)、路易体病(LBD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶变性(FTD)、ALS-FTD和慢性创伤性脑病(CTE)。在一些实施方案中,“患者”已知或怀疑患有与内体运输相关的病症或疾病,例如逆转运复合体功能障碍。

[0063] 短语“治疗有效量”在本文中用于表示足以引起受试者中临床显著病况的改善,或延迟或最小化或减轻与疾病或病症相关的一种或多种症状,或导致受试者中所需的有益生理变化的量。

[0064] 术语“治疗”、“医治”等是指减缓、缓解、改善或减轻疾病或病症的至少一种症状或在其发作后逆转疾病或病症的手段。

[0065] 术语“预防”、“防止”等是指在明显的疾病或病症发作之前采取行动,以防止疾病或病症发展或使疾病或病症的程度最小化,或减缓其发展过程。

[0066] 术语“治愈”等是指康复、好转或恢复健康,或允许一段时间没有疾病复发以使得复发的风险小。

[0067] 术语“有需要”将是已知或怀疑患有神经退行性疾病或病症或处于患有神经退行性疾病或病症的风险的受试者,所述神经退行性疾病或病症包括但不限于阿尔茨海默病(AD)、帕金森病、神经元蜡样脂褐质沉积症(NCL)、传染性海绵状脑病(TSE或朊病毒病)、多系统萎缩(MSA)、唐氏综合征和遗传性痉挛性截瘫(HSP),以及tau蛋白病例如进行性核上性麻痹(PSP)、与染色体17q21-22及其亚型相关的额颞叶痴呆(FTLD-17/FTLD-Tau)、路易体病(LBD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶变性(FTD)、ALS-FTD和慢性创伤性脑病(CTE)。

[0068] 如本文所用,术语“试剂”是指产生或能够产生效果的物质,并且包括但不限于载体、化学品、药物、生物制品、有机小分子、抗体、核酸、肽和蛋白质。

[0069] 如本文所用,术语“承载体”是指用于与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载料,并且包括任何和所有溶剂、分散介质、载料、包衣、稀释剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、承载体溶液、悬浮液、胶体等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域中是众所周知的。

[0070] 术语“药学上可接受的”是指当施用至宿主时不产生过敏或类似不良反应(例如施用至人时的胃部不适、头晕等)并且经联邦或州政府的监管机构批准或在美国药典或其他公认的药典中列出的用于动物和尤其是用于人类的分子实体和组合物。

[0071] “分离的核酸分子”是指不与分离的多核苷酸在自然界中存在于其中的多核苷酸的全部或部分相关联或与其在自然界中不连接于的多核苷酸连接的基因组、mRNA、cDNA或合成来源的DNA或RNA或它们的某种组合。出于本公开内容的目的,应当理解“包含”特定核苷酸序列的核酸分子不包括完整的染色体。“包含”特定核酸序列的分离的核酸分子除了特定序列外,还可以包括多达十个或甚至多达二十个或更多个其他蛋白质或其部分或片段的编码序列,或者可以包括可操作地连接的调节序列,其控制所述核酸序列的编码区的表达,

和/或可以包括载体序列。

[0072] 短语“控制序列”是指在特定宿主生物中表达可操作地连接的编码序列所必需的DNA序列。例如,适用于原核生物的控制序列包括启动子、任选地操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核细胞使用启动子、多腺苷酸化信号和增强子。

[0073] 当核酸与另一个核酸序列放置成功能关系时,该核酸是“可操作地连接”的。例如,如果前序列或分泌前导物的DNA表达为参与多肽分泌的前蛋白,则该DNA与多肽的DNA可操作地连接;如果启动子或增强子影响序列的转录,则该启动子或增强子与编码序列可操作地连接;或如果核糖体结合位点被定位以便于促进翻译,则其可操作地连接到编码序列。通常,“可操作地连接”是指被连接的DNA序列是连续的,并且在分泌前导物的情况下是连续的并且处于阅读阶段。然而,增强子不必是连续的。连接是通过在方便的限制性位点连接来完成的。如果这些位点不存在,则根据常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

[0074] 如本文所用,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用并且所有此类命名都包括后代。因此,词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试者细胞和由其衍生的培养物,而不考虑转移次数。还理解的是,由于有意或无意的突变,并非所有后代都具有完全相同的DNA内容物。包括具有与在最初转化的细胞中所筛选的相同的功能或生物活性的突变后代。在意指不同的命名的情况下,其根据上下文中将是清楚的。

[0075] 在一些方面,本公开内容提供了分离的腺相关病毒载体(AAV)。如本文关于AAV使用的,术语“分离的”是指已从其自然环境(例如,从宿主细胞、组织或受试者)中分离或人工产生的AAV。可以使用重组方法生产分离的AAV。这种AAV在本文中被称为“重组AAV”。重组AAV(rAAV)优选具有组织特异性靶向能力,使得rAAV的转基因将被特异性递送至一个或多个预定组织。AAV衣壳是确定这些组织特异性靶向能力的重要因素。

[0076] 已经描述了用于获得具有所需衣壳蛋白的重组AAV的方法(参见,例如,美国专利号7,906,111)。已经描述了许多不同的AAV衣壳蛋白,例如,Gao等人,J.Virology 78(12):6381-6388(2004年6月);Gao等人,Proc Natl Acad Sci USA 100(10):6081-6086(2003年5月13日);和美国专利号7,906,111;美国专利号8,999,678中公开的那些。在目前描述的构建体和方法的所需包装的实施方案中,重组AAV可以是AAV9或AAV10载体和衣壳。然而,应注意,其他合适的AAV,例如rAAVrh.8和rAAVrh.10,或其他类似的载体可以适用于本发明的方法和组合物。通常,方法包括培养宿主细胞,其含有编码AAV衣壳蛋白或其片段的核酸序列;功能性rep基因;由AAV反向末端重复(ITR)和转基因组成的重组AAV载体;和足够的辅助功能以允许将重组AAV载体包装到AAV衣壳蛋白中。

[0077] 待在宿主细胞中培养以将rAAV载体包装在AAV衣壳中的组分可以反式提供给宿主细胞。可替代地,任何一种或多种所需组分(例如,重组AAV载体、rep序列、cap序列和/或辅助功能)可以由稳定宿主细胞提供,所述宿主细胞已经使用本领域技术人员已知的方法工程改造以包含一种或多种所需组分。最合适地,这种稳定的宿主细胞将包含在诱导型启动子控制下的一种或多种所需组分。然而,一种或多种所需组分可能在组成型启动子的控制之下。在又一个替代方案中,选择的稳定宿主细胞可以包含在组成型启动子控制下的一种或多种选择的组分和在一种或多种诱导型启动子控制下的其他一种或多种选择的组分。例如,可以产生稳定的宿主细胞,其衍生自293细胞(其包含在组成型启动子控制下的E1辅助功能),但其包含在诱导型启动子控制下的rep和/或cap蛋白。

[0078] 可以使用任何合适的遗传元件(载体)将用于产生rAAV的重组AAV载体、rep序列、cap序列和辅助功能递送至包装宿主细胞。选择的遗传元件可以通过任何合适的方法递送,包括本文所述的那些。参见,例如,Fisher等人,J.Virology 70:520-532(1993)和美国专利号5,478,745。

[0079] 在一些实施方案中,可以使用三重转染方法(例如,如美国专利号6,001,650中详细描述的)产生重组AAV。通常,重组AAV是通过用重组AAV载体(包含转基因)转染宿主细胞产生的,重组AAV载体被包装成AAV颗粒、AAV辅助功能载体和辅助功能载体。AAV辅助功能载体编码"AAV辅助功能"序列(即,rep和cap),它们反式用于生产性AAV复制和封装。优选地,AAV辅助功能载体支持有效的AAV载体生产,而不产生任何可检测的野生型AAV病毒体(即,含有功能性rep和cap基因的AAV病毒体)。适用的载体的非限制性例子包括美国专利号6,001,650中描述的pHLP19和美国专利号6,156,303中描述的pRep6cap6载体,两者的全部内容通过引用并入本文。辅助功能载体编码AAV的复制所依赖于的非AAV衍生的病毒和/或细胞功能(即"辅助功能")的核苷酸序列。辅助功能包括AAV复制所需的那些功能,包括但不限于参与AAV基因转录激活、阶段特异性AAV mRNA剪接、AAV DNA复制、cap表达产物合成和AAV衣壳组装的那些部分。基于病毒的辅助功能可以衍生自任何已知的辅助病毒,例如腺病毒、疱疹病毒(单纯疱疹病毒1型除外)和牛痘病毒。

[0080] 如本文所用,术语"AAV1"、"AAV2"、"AAV3"、"AAV4"等是指包含分别来自AAV1、AAV2、AAV3或AAV4的ITR以及分别来自AAV1、AAV2、AAV3或AAV4的衣壳蛋白的AAV载体。术语"AAV2/1"、"AAV2/8"、"AAV2/9"等是指含有来自AAV2的ITR和分别来自AAV1、AAV8或AAV9的衣壳蛋白的假型AAV载体。

[0081] 关于转染的宿主细胞,术语"转染"用于指细胞对外源DNA的吸收,并且当外源DNA已被引入细胞膜内时,细胞已被"转染"。许多转染技术在本领域中通常是已知的。参见,例如,Graham等人,Virology 52:456(1973),Sambrook等人,Molecular Cloning,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratories,New York(1989),Davis等人,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier(1986)和Chu等人,Gene 13:197(1981)。此类技术可用于将一种或多种外源核酸(例如核苷酸整合载体和其他核酸分子)引入合适的宿主细胞。

[0082] "宿主细胞"是指含有或能够含有感兴趣的物质的任何细胞。通常宿主细胞是哺乳动物细胞。宿主细胞可用作AAV辅助构建体、AAV小基因质粒、辅助功能载体或与重组AAV载体的产生相关的其他转移DNA的接受者。该术语包括已转染的原始细胞的后代。因此,如本文所用的"宿主细胞"可以指已经用外源DNA序列转染的细胞。应当理解,由于自然的、偶然的或故意的突变,单个亲本细胞的后代在形态学或基因组或总DNA互补物上不一定与原始亲本完全相同。

[0083] 关于细胞,术语"分离的"是指已从其自然环境(例如,从组织或受试者)中分离的细胞。术语"细胞系"是指能够在体外连续或长期生长和分裂的细胞群。通常,细胞系是衍生自单个祖细胞的克隆群体。本领域还已知,在这种克隆群体的储存或转移过程中,在核型可能发生自发的或诱导的变化。因此,衍生自所提及的细胞系的细胞可能与祖先细胞或培养物不完全相同,并且所提及的细胞系包括此类变体。如本文所用,术语"重组细胞"是指外源DNA区段(例如导致生物活性多肽的转录或生物活性核酸例如RNA的产生的DNA区段)被引入

到其中的细胞。

[0084] 术语“载体”包括任何遗传元件,例如质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、人工染色体、病毒或病毒体,其能够在与适当的控制元件缔合时复制并且可以在细胞之间转移基因序列。因此,该术语包括克隆和表达载体,以及病毒载体。在一些实施方案中,预期有用的载体是其中待转录的核酸区段位于启动子的转录控制下的那些载体。“启动子”是指由细胞的合成机器或引入的合成机器识别的DNA序列,其是启动基因的特异性转录所需要的。短语“可操作地定位”、“可操作地连接”、“在控制下”或“在转录控制下”是指启动子相对于核酸处于正确的位置和方向以控制RNA聚合酶的起始和基因的表达。

[0085] 术语“表达载体”或“表达构建体”或“构建体”是指包含核酸的任何类型的遗传构建体,其中部分或全部核酸编码序列能够被转录。在一些实施方案中,表达包括核酸的转录,例如,以从转录基因产生生物活性多肽产物或抑制性RNA。

[0086] 分子生物学中的标准方法描述于Sambrook,Fritsch和Maniatis Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(1982&1989第2版,2001第3版);Sambrook和Russell Molecular Cloning,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(2001);Wu Recombinant DNA,Vol.217,Academic Press,San Diego,CA)(1993)。标准方法也出现在Ausbel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Vols.1-4,John Wiley and Sons,Inc.New York,NY(2001)中。

[0087] 逆转运复合体和神经退行性疾病

[0088] 阿尔茨海默病(AD)的遗传学、细胞病理学和细胞生物学已将内体运输视为AD发病机制中的一个关键缺陷。三条证据链表明AD中的逆转运复合体功能障碍。首先,遗传和基因表达研究已经确定了越来越多的与AD相关的逆转运复合体相关分子,包括真正的功能丧失突变。其次,逆转运复合体功能障碍概括了AD的细胞病理学,其特征是在其中积累淀粉样前体蛋白(APP)片段的扩大和功能失调的内体。第三,逆转运复合体功能障碍错误运输了许多AD相关分子,包括神经元中的APP和小胶质细胞中的吞噬受体。

[0089] 逆转运复合体是一种多蛋白复合物,其是内体运输的“主要指挥者”。逆转运复合体的核心是三种不同蛋白质的三聚体,使得其在技术上是异源三聚体。这些蛋白质都是“液泡蛋白质分选”(VPS)蛋白质家族的成员。VPS35是VPS29和VPS26结合的三聚体核心的中心蛋白。VPS26是唯一具有两个被称为VPS26a和VPS26b的旁系同源物的核心蛋白。因此,神经元具有两个不同的逆转运复合体核心:VPS29-VPS35-VPS26a和VPS29-VPS35-VPS26b。参见图1。

[0090] 这些核心蛋白在过表达时与内源性逆转运复合体组分结合,并且可导致增加的逆转运复合体功能。在细胞内这些蛋白质被非常严格地自动调节。为了克服这一障碍,如本文所述,同时共表达两种逆转运复合体蛋白。

[0091] 通过药理学伴侣蛋白或通过病毒载体增加VPS35水平增加了逆转运复合体的功能。与VPS35或VPS26相比,VPS29蛋白可能过剩存在。如本文所示,VPS35和VPS26a两者或VPS35和VPS26b两者的共表达分别对VPS35和VPS26a或VPS35和VPS26b的细胞水平具有协同作用。

[0092] 还通过Sorl1水平的约34%的增加显示了逆转运复合体功能的证据,该效应大小

反映了在阿尔茨海默病中观察到的Sorl1缺乏的程度(Sager等人,2007;Scherzer等人,204;Dodson等人,2006)。在研究中对Sorl1的效应的更广泛的比较提供了关于逆转运复合体功能性的信息。在第一项神经元研究中,当VPS35单独过表达时,三种逆转运复合体核心蛋白中的两种显著升高,但对逆转运复合体功能没有影响。在第二项神经元研究中,当由于协同作用所有三种三聚体蛋白均显著升高时,这导致逆转运复合体功能增加。这一结果提供了所有三种逆转运复合体核心蛋白都需要共同提升以上调逆转运复合体的整体功能的主要经验证据。本文的研究表明,通过利用逆转运复合体的化学计量和蛋白质-蛋白质相互作用,无需外源表达所有三种蛋白质。外源表达VPS35和VPS26也足以上调VPS29的水平并增加逆转运复合体的内体货物回收功能。

[0093] 重要的是,本文还显示了VPS26a和VPS26b的水平彼此独立,因此合适的组合选择允许相对于一种逆转运复合体三聚体选择性地增加另一种逆转运复合体三聚体。

[0094] 本文描述了一种提高体内逆转运复合体水平和功能的基于生物学的方法:通过使用重组AAV(腺相关腺病毒)技术过表达逆转运复合体。建立用于基于逆转运复合体的治疗的新型逆转运复合体-AAV工具将产生巨大影响,因为这种病毒递送系统(最近被批准用于临床应用)可以绕过小分子在生物体内将遇到的障碍(即低吸收率、降解、毒性、缺乏靶/器官特异性、血脑屏障通透性)。包含AAV载体和一种或多种逆转运复合体转基因的组合物具有许多优点,包括增加的治疗剂表达、绕过严格的蛋白质自动调节、稳定的蛋白质的长期表达的潜力和增加稳定的蛋白质的半衰期。

[0095] 治疗、预防和/或治愈神经退行性疾病的方法

[0096] 将从所描述的基因治疗的施用中受益的患者包括被诊断患有涉及内体运输缺陷的神经退行性疾病或病症的那些患者,所述神经退行性疾病或病症包括但不限于阿尔茨海默病(AD)、帕金森病、神经元蜡样脂褐质沉积症(NCL)、传染性海绵状脑病(TSE或朊病毒病)、多系统萎缩(MSA)、唐氏综合征和遗传性痉挛性截瘫(HSP),以及tau蛋白病例如进行性核上性麻痹(PSP)、与染色体17q21-22及其亚型相关的额颞叶痴呆(FTLD-17/FTLD-Tau)、路易体病(LBD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶变性(FTD)、ALS-FTD和慢性创伤性脑病(CTE)。

[0097] 在这些患者中,可以向患者施用含有编码一种或多种逆转运复合体核心蛋白的核酸的组合物(例如,含有这种核酸的病毒载体,例如AAV载体)。这些组合物可以单独施用或与其他药剂联合施用以治疗神经退行性疾病或病症。

[0098] 在一些实施方案中,本公开内容提供了通过向有需要的受试者施用治疗有效量的包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸的一种或多种组合物例如病毒载体(例如AAV)来治疗、预防、治愈神经退行性疾病或病症和/或降低神经退行性疾病或病症的严重性或程度的方法。在一些实施方案中,病毒载体是AAV,例如rAAV2-retro、AAV10、AAV2/10、AAV9或AAV2/9。在一些实施方案中,一旦诊断或怀疑患有神经退行性疾病或病症,就施用包含编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸的一种或多种组合物(例如病毒载体,例如AAV)。在实施方案中,施用的组合物包含编码VPS35和VPS26a或VPS26b的核酸。在实施方案中,该方法包括同时或依次施用包含编码VPS35的核酸和编码VPS26a或VPS26b的核酸的一种或多种组合物。在实施方案中,该方法包括同时或依次施用包含编码VPS35的核酸、编码VPS26a的核酸和编码VPS26b的核酸的一种

或多种组合物。在实施方案中,该方法包括同时或依次施用包含编码VPS26a的核酸和编码VPS26b的核酸一种或多种组合物。

[0099] 在一些实施方案中,施用的包含转基因的AAV载体的量为约4.2×10^{11}或4.2×10^{10}个基因组或载体或载体拷贝。

[0100] 本公开内容还提供了通过向有需要的受试者施用治疗有效量的含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸的第一组合物(例如,病毒载体,例如AAV)来治疗、预防、治愈神经退行性疾病或病症和/或降低神经退行性疾病或病症的严重性或程度的方法,并且进一步包括向受试者施用治疗有效量的含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸的第二组合物(例如病毒载体,例如AAV)。在实施方案中,该方法包括施用治疗有效量的含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的核酸的第一组合物和治疗有效量的含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a或VPS26b的核酸的第二组合物。在实施方案中,该方法包括施用治疗有效量的含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS26a或VPS26b的核酸的第一组合物和治疗有效量的含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35的核酸的第二组合物。

[0101] 本公开内容还提供了通过向有需要的受试者施用治疗有效量的含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸的第一组合物(例如,病毒载体,例如AAV)来治疗、预防、治愈神经退行性疾病或病症和/或降低神经退行性疾病或病症的严重性或程度的方法,并且进一步包括向受试者施用治疗有效量的含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸的第二组合物(例如病毒载体,例如AAV),并且进一步包括向受试者施用治疗有效量的含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的核酸的第三组合物(例如病毒载体,例如AAV)。在实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物和所述第三组合物分别含有编码逆转运复合体核心蛋白VPS35、VPS26a或VPS26b的核酸。

[0102] 在一些实施方案中,第一和第二和第三AAV载体各自独立地是编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的AAV9载体。在一些实施方案中,第一AAV载体和第二AAV载体和第三AAV载体同时施用。在一些实施方案中,第一AAV载体在第二AAV载体之前施用。在一些实施方案中,第二个AAV载体在第三个AAV载体之前施用。

[0103] 在一些实施方案中,一旦诊断或怀疑神经退行性疾病或病症就施用第一组合物(例如AAV载体),并且在第一组合物之后的时间点施用第二组合物(例如AAV载体)。在一些实施方案中,第二组合物(例如,AAV载体)在第一组合物(例如,AAV载体)的数小时内施用。在一些实施方案中,第二组合物(例如,AAV载体)在第一组合物(例如,AAV载体)的几天内施用。在一些实施方案中,第二组合物(例如,AAV载体)在第一组合物(例如,AAV载体)之后数周施用。在一些实施方案中,第一组合物(例如,AAV载体)和第二组合物(例如,AAV载体)在任何给定时间点同时施用。

[0104] 在一些实施方案中,第三组合物(例如,AAV载体)在第二组合物之后的时间点施用。在一些实施方案中,第三组合物(例如,AAV载体)在第二组合物(例如,AAV载体)的数小

时内施用。在一些实施方案中,第三组合物(例如,AAV载体)在第二组合物(例如,AAV载体)的数天内施用。在一些实施方案中,第三组合物(例如,AAV载体)在第二组合物(例如,AAV载体)之后数周施用。

[0105] 在一些实施方案中,第一组合物(例如,AAV载体)和第二组合物(例如,AAV载体)和第三组合物(例如,AAV载体)在任何给定时间点(包括在诊断或怀疑神经退行性疾病或病症时或之后的时间点)同时施用。在一些实施方案中,这三种组合物(例如,AAV载体)存在于相同的较大组合物中,并且在一些实施方案中,这三种是单独的组合物。

[0106] 在本文所述的方法的实施方案中,将包含编码VPS35和VPS26b(其优选在皮层中表达)的一种或多种核酸的一种或多种组合物施用至患有其中内体运输缺陷主要发生在皮层并且其中VPS35不受影响的病症或处于发生其中内体运输缺陷主要发生在皮层并且其中VPS35不受影响的病症的风险的受试者。其中VPS35不受影响的皮层内体运输病症的例子包括生物标志物阴性的散发性AD、具有SORL1突变的AD患者、FTD、朊病毒病和唐氏综合征。

[0107] 在本文所述方法的其他实施方案中,将包含编码VPS35和VPS26a(其优选在下皮层表达)的一种或多种核酸的一种或多种组合物施用至患有其中内体运输缺陷主要发生在下皮层区域的病症或处于发生其中内体运输缺陷主要发生在下皮层区域的病症(例如生物标志物阴性的散发性PD、HSP、朊病毒病和NCL)的风险的受试者。

[0108] 在本文所述方法的其他实施方案中,将包含编码VPS35、VPS26a和VPS26b的一种或多种核酸的一种或多种组合物施用至患有其中疾病更加分散的内体运输神经病症或处于发生其中疾病更加分散的内体运输神经病症(例如路易体病(LBD)、朊病毒病和ALS-FTD)的风险的受试者。

[0109] 除了治疗、预防、治愈神经退行性疾病或病症和/或降低神经退行性疾病或病症的严重性或程度之外,在实施方案中,本文描述的方法和组合物还用于治疗、预防、治愈与内体运输和逆转运复合体功能障碍相关的其他疾病或病症和/或降低与内体运输和逆转运复合体功能障碍相关的其他疾病或病症的严重性。

[0110] 重组AAV载体

[0111] 本文所述的“重组AAV(rAAV)载体”通常包含转基因(例如,编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b)。转基因侧翼为5’-和3’-ITR,并且可以以允许转基因在靶组织的细胞中转录、翻译和/或表达的方式可操作地连接到一个或多个调节元件。此类调节元件可包括启动子或增强子,例如鸡β肌动蛋白启动子或巨细胞病毒增强子,以及本文所述的其他元件。重组AAV基因组通常被衣壳蛋白(例如,来自与ITR所衍生自的AAV血清型相同的AAV血清型或来自与ITR所衍生自的AAV血清型不同的AAV血清型)包封。然后可以将AAV载体递送至选择的靶细胞类型或组织。在一些实施方案中,转基因是与载体序列异源的核酸序列,其编码VPS35、VPS26a和/或VPS26b中的一种或多种。本文描述了可与本公开内容的组合物和方法结合使用的示例性AAV载体的组分。

[0112] 任何AAV血清型或AAV血清型的组合可用于本公开内容的方法和组合物。因为本公开内容的方法和组合物用于治疗和治愈神经退行性疾病或病症,在一些实施方案中可以使用至少靶向中枢神经系统的AAV血清型并且其包括但不限于AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10。

[0113] 在一些实施方案中,使用具有广泛向性的AAV9血清型。在一些实施方案中,使用AAV2/9。

[0114] AAV载体的组分

[0115] 本文所述的AAV载体可包含顺式作用的5'和3'ITR(参见,例如,Carter,"Handbook of Parvoviruses",ed.,P.Tijsser,CRC Press,pp.155168(1990))。ITR序列的长度通常为约145bp。优选地,在分子中使用编码ITR的基本上完整的序列,尽管允许对这些序列进行某种程度的微小修饰。(例如,参见文本如Sambrook等人(1989)和Fisher等人(1996))。这种分子的一个例子是含有转基因的"顺式作用"质粒,其中选择的转基因序列和相关的调节元件侧接5'和3'AAV ITR序列。AAV ITR序列可以从任何已知的AAV中获得,包括目前鉴定的哺乳动物AAV类型。

[0116] 除了以上针对重组AAV载体鉴定的元件外,该载体还可以包括常规控制元件,其以允许其在用质粒载体转染或用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。如本文所用,"可操作地连接"的序列包括与感兴趣的基因邻接的表达控制序列和反式或远距离作用以控制感兴趣的基因的表达控制序列。表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;高效的RNA加工信号,例如剪接和多腺苷酸化(多聚A)信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;并且当需要时,增强编码的产物的分泌的序列。本领域已知并且可以使用大量的表达控制序列(包括天然的、组成型的、诱导型的和/或组织特异性的启动子)。

[0117] 如本文所用,当核酸序列(例如,编码序列)和调节序列以将核酸序列的表达或转录置于调节序列的影响或控制之下的方式共价连接时,它们被称为可操作地连接。如果需要将核酸序列翻译成功能蛋白,则如果在5'调节序列中启动子的诱导导致编码序列的转录,并且如果两个DNA序列之间的连接的性质不会(1)导致引入移码突变,(2)干扰启动子区域指导编码序列转录的能力,或(3)干扰相应的RNA转录物被翻译成蛋白质的能力,两个DNA序列被认为可操作地连接。因此,如果启动子区域能够影响该DNA序列的转录,使得得到的转录物可能被翻译成所需的蛋白质或多肽,则启动子区域将与核酸序列可操作地连接。类似地,当两个或更多个编码区以它们从共同启动子的转录导致两种或更多种蛋白质的表达的方式连接时,它们是可操作地连接的。在一些实施方案中,可操作地连接的编码序列产生融合蛋白。在一些实施方案中,可操作地连接的编码序列产生功能性RNA(例如,shRNA、miRNA)。在一些实施方案中,可操作地连接的编码序列产生两种或更多种单独的功能蛋白(例如,VPS35和VPS26a或VPS26b)。

[0118] 对于编码蛋白质的核酸,通常在转基因序列之后和3'AAV ITR序列之前插入多腺苷酸化序列。本公开内容的rAAV构建体还可以包含内含子,理想地位于启动子/增强子序列和转基因之间。一种可能的内含子序列衍生自SV-40,并且被称为SV-40T内含子序列。

[0119] 另一个可以使用的载体元件是内部核糖体进入位点(IRES)。IRES序列用于从单个转录物产生多于一种多肽或蛋白质。例如,可以使用IRES元件来表达来自相同AAV载体的VPS35和VPS26a、VPS35和VPS26b或VPS26a和VPS26b。

[0120] 宿主细胞中基因表达所需的调节序列的确切性质可能在物种、组织或细胞类型之间不同,但一般应在必要时包括分别参与转录和翻译的起始的5'非转录和5'转录的序列,例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列、增强子元件等。特别地,这样的5'非转录调节序列将包括

包含用于可操作地连接的基因的转录控制的启动子序列的启动子区域。根据需要,调节序列还可以包括增强子序列或上游激活序列。载体可以任选地包括5'前导或信号序列。

[0121] 组成型启动子的实例包括但不限于鸡β肌动蛋白启动子、逆转录病毒劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选带有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选带有CMV增强子)、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、β-肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和人延伸因子-1a(EF1a)启动子(Invitrogen)。

[0122] 诱导型启动子允许调节基因表达,并且可以通过外源提供的化合物、环境因素(例如温度)或特定生理状态例如急性期的存在、细胞的特定分化状态或仅在复制细胞中进行调节。诱导型启动子和诱导型系统可从多种商业来源获得,包括但不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。由外源供应的启动子调节的诱导型启动子的例子包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO98/10088);蜕皮激素昆虫启动子(No等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:3346-3351(1996))、四环素抑制性系统(Gossen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551(1992))、四环素诱导系统(Gossen等人,Science 268:1766-1769(1995))、RU486诱导系统(Wang等人,Nat.Biotech.15:239-243(1997)和Wang等人,Gene Ther.4:432-441(1997))和雷帕霉素诱导系统(Magari等人,J.Clin.Invest.100:2865-2872(1997))。其他类型的可用于此上下文的诱导型启动子是受特定生理状态(例如温度、急性期、细胞的特定分化状态,或仅在复制细胞中)调节的那些启动子。

[0123] 在另一个实施方案中,将使用转基因的天然启动子或其片段。当期望转基因的表达应该模拟天然表达时,天然启动子可能是优选的。当转基因的表达必须在时间上或发育上或以组织特异性方式或响应特定的转录刺激被调节时,可以使用天然启动子。在另一个实施方案中,其他天然表达控制元件,例如增强子元件、多腺苷酸化位点或Kozak共有序列也可用于模拟天然表达。

[0124] 在一些实施方案中,调节序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况下,组织特异性调节序列结合以组织特异性方式诱导转录的组织特异性转录因子。

[0125] 在一些实施方案中,将一种或多种miRNA的一个或多个结合位点掺入rAAV载体的转基因中,以抑制转基因在携带转基因的受试者的一种或多种组织中的表达。mRNA中的miRNA靶位点可以在5'-UTR、3'-UTR或编码区中。通常,靶位点位于mRNA的3'UTR中。此外,转基因可以设计成使得多个miRNA通过识别相同或多个位点来调节mRNA。多个miRNA结合位点的存在可能导致多个RISC的协同作用并提供高效的表达抑制。靶位点序列可以包含总共5-100、10-60或更多个核苷酸。靶位点序列可以包含靶基因结合位点序列的至少5个核苷酸。

[0126] 例如,可以将抑制肝脏中转基因表达的3'-UTR位点整合到转基因中。这对于编码对肝脏有毒的治疗性蛋白质的转基因是有益的,因为大多数施用的病毒(大约60至90%)最终在肝脏中发现。因此,抑制肝脏中的治疗基因表达可以减轻肝细胞的负担。

[0127] 在一些实施方案中,AAV载体将被修饰为自互补AAV。自互补AAV携带转基因的互补序列(即转基因的双拷贝)。自互补性使基因进入细胞后更加稳定。

[0128] 转基因编码序列

[0129] 本文所述的转基因的核酸序列可以基于将表达转基因的特定组合物(例如,病毒载体)的知识来设计。例如,一种类型的转基因序列包括报告序列,其在表达时产生可检测

的信号。在另一个例子中,转基因编码治疗性蛋白质或治疗性功能性RNA。在另一个例子中,转基因编码旨在用于研究目的的蛋白质或功能性RNA,例如,以创建含有转基因的体细胞转基因动物模型,例如,以研究转基因产物的功能。在另一个例子中,转基因编码旨在用于创建疾病动物模型的蛋白质或功能性RNA。合适的转基因编码序列对本领域技术人员来说是明显的。

[0130] 在实施方案中。转基因编码功能蛋白,包括但不限于逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b。在实施方案中,转基因编码VPS35和VPS26a或VPS26b。在实施方案中,转基因编码VPS35、VPS26a和VPS26b。在实施方案中,转基因编码VPS26a和VPS26b。在实施方案中,转基因仅编码VPS35、VPS26a和VPS26b之一。

[0131] 氨基酸序列信息可从国家生物技术信息中心(NCBI)获得,并在下文列出。

[0132] 编码人逆转运复合体核心蛋白VPS35(基因ID:55737)的基因可用于获得编码功能性逆转运复合体核心蛋白VPS35(SEQ ID NO:1)的转基因:

[0133] MPTTQQSPQDEQEKLLDEAIQAVKVQSFQMKRCLDKNKLMDALKHASNMLGELRTSMLSPKSYYELYMAISDELHYLEVYLTDEFAKGRKVADLYELVQYAGNIIPRLYLLITVGVVYVKSFPQSRKDILKDLVEMCRGVQHPLRGLFLRNYLLQCTRNILPDEGEPTDEETTGDISDSMDFVLLNFAEMNKLWVRMQHQGHSRDREKRERERQELRILVGTNLVRLSQLEGVNVERYKQIVLTGILEQVVNCRDALAQEYLMECIIQVFPDEFHLQTLNPFLRACAELHQNVNVKNIIIALIDRLALFAHREDGPGIPADIKLFDIFSQQVATVIQSRQDMPSEDVVSLQVSLINLAMKCYPDRVDYVDKVLETTVEIFNKLNLEHIATSSAVSKELTRLLKIPVDTYNNILTVLKLKHFHPLFEYFDYESRKSMSCYVLSNVLDYNTEIVSQDQVDSIMNLVSTLIQDQPDQPVEDPDPEDFADEQSLVGRFIHLLRSEDPDQQYLILNTARKHFGAGGNQRIRFTLPPLVFAAYQLAFRYKENSKVDDKWEKKCQKIFSFAHQTISALIKAELAELPLRLFLQGALAAGEIGFENHETVAYEFMSQAFSLYEDEISDSKAQLAAITLIIGTFERMKCFSEENHEPLRTQCALAASKLLKKPDQGRAVSTCAHLFWSGRNTDKNGEELHGGKRVMECLKKALKIANQCMDPSLQVQLFIEILNRYIYFYEKENDAVTIQVLNQLIQKIREDLPNLESSEETEQINKHFHNTLEHLRLRRESPESEGPIYEGLIL

[0134] 编码人逆转运复合体核心蛋白VPS26a的基因(基因ID:9559)可用于获得编码功能性逆转运复合体核心蛋白VPS26a(SEQ ID NO:2)的转基因:

[0135] MSFLGGFFGPICEIDIVLNDGETRKMAEMKTEDGKVEKHYLFYDGESVSGKVNLAFKQPGKRLEHQGIRIEFVGQIELFNDKSNTHEFVNLVKELALPGELTQSRSYDFEFMQVEKPYESYIGANVRLRYFLKVTIVRRLTDLVKEYDLIVHQLATYPDVNNSIKMEVGIEDCLHIEFEYNKSKYHLKDVIVGKIYFLLVRIKIQHMELQLIKKEITGIGPSTTTETETIAKYEIMDGAPVKGESIPIRLFLAGYDPTPTMRDVNKKFSVRYFLNLVLVDEEDRRYFKQQEIILWRKAPEKLRKQRTNFHQRFESPESQASAEQPEM

[0136] 编码人逆转运复合体核心蛋白VPS26b的基因(基因ID:112936)可用于获得编码功能性逆转运复合体核心蛋白VPS26b(SEQ ID NO:3)的转基因:

[0137] MSFFGFGQSVEVEILLNDAESRKRAEHKTEDGKKEKYFLFYDGETVSGKVSLALKNPNKRLEHQGIKIEFIGQIELYYDRGNHHEFVSLVKDLARPGEITQSQAFDFEFTHVEKPYESYTGQNVKLRYFLRATISRRLNDVVKEMDIVVHTLSTYPELNSSIKMEVGIEDCLHIEFEYNKSKYHLKDVIVGKIYFLLVRIKIKHMEIDIIKRETTGTGPNVYHENDTIAKYEIMDGAPVRGESIPIRLFLAGYELTPTMRDINKKFSVRYYLNLVLIDEEERRYFKQQEVVLWRKGDIVRKSMSHQAAIASQRFEGTTSLGEVRTPSQLSDNNCRQ

[0138] 逆转运复合体核心蛋白的野生型小鼠的小鼠mRNA序列(即编码序列)获自国家生

物技术信息中心(NCBI),并且如下所示。

[0139] mVPS35(SEQ ID NO:4)

[0140] ATGCCTACAACACAGCAGTCACCCCAGGATGAGCAGGAAAAACTTTTGGATGAAGCCATCCAGGCTGTG
AAGGTTCAGTCATTCCAGATGAAAAGATGCCTGGACAAAAACAAGCTGATGGATGCTCTGAAGCATGCCTCCAATAT
GCTTGGAGAGCTCCGGACCTCTATGCTGTCACCAAAGAGTTACTATGAACTTTATATGGCTATTTCTGATGAACTGC
ACTACTTGGAGGTCTACCTGACTGATGAATTTGCTAAAGGAAGAAAGGTGGCAGATCTCTATGAACTTGTACAGTAC
GCGGGAAACATTATTCCAAGGCTTTATCTCTTGATCACAGTTGGAGTTGTATATGTCAAGTCATTTCCTCAATCCAG
GAAAGATATTTTGAAAGATTTGGTAGAAATGTGCCGTGGTGTGCAGCATCCGCTAAGGGGTTTGTTTCTTCGAAATT
ACCTTCTTCAGTGTACTAGGAACATTTTACCTGATGAAGGAGAGCCAACAGATGAAGAAACAACTGGTGATATCAGT
GATTCCATGGATTTTGTACTACTCAACTTTGCAGAAATGAATAAGCTCTGGGTGCGGATGCAGCATCAAGGACATAG
TCGAGATAGAGAAAAAAGAGAACGAGAGAGACAAGAACTGAGAATTTTAGTGGGAACAAATTTGGTGCGCCTTAGTC
AGTTGGAAGGTGTAAATGTGGAACGTTACAAACAGATTGTTCTAACAGGCATTCTGGAGCAGGTTGTGAATTGTAGG
GATGCTCTGGCTCAGGAGTATCTCATGGAGTGCATCATTCAGGTTTTTCCTGATGAGTTTCATCTTCAGACTTTGAA
TCCTTTTCTTAGAGCTTGTGCTGAATTACACCAAAATGTAAATGTGAAAAACATAATCATTGCTTTAATTGACAGAT
TAGCTTTATTTGCTCATCGTGAAGATGGACCCGGAATTCCAGCTGAGATTAAACTTTTTGACATATTTTCACAACAG
GTGGCTACAGTCATACAGTCCAGACAAGACATGCCATCAGAGGATGTTGTATCTTTACAAGTCTCTCTCATTAATCT
TGCTATGAAATGTTACCCTGATCGTGTGGACTACGTCGATAAAGTTCTAGAAACAACAGTGGAGATATTCAATAAGC
TTAACCTTGAACATATTGCTACCAGTAGTGCAGTTTCAAAGGAGCTTACCAGACTTTTGAAGATACCTGTTGATACT
TACAACAATATCTTAACAGTATTAAAGTTAAAGCATTTCCACCCACTTTTTGAGTACTTTGACTACGAGTCCAGAAA
GAGCATGAGCTGTTATGTGCTTAGTAATGTTCTGGATTATAACACAGAAATCGTCTCTCAGGACCAGGTAGATTCCA
TAATGAATTTGGTGTCCACATTGATTCAGGATCAGCCAGACCAACCTGTAGAAGACCCTGATCCAGAAGACTTCGCT
GATGAACAGAGCCTTGTTGGCCGATTTATTCATCTGCTACGTTCTGATGATCCTGACCAGCAGTATTTGATTTTGAA
TACGGCACGAAAACATTTTGGGGCTGGTGGAAATCAGCGGATTCGCTTCACACTGCCACCTTTGGTATTTGCAGCTT
ACCAGTTGGCTTTTCGATACAAAGAGAATTCCCAAATGGATGACAAGTGGGAAAAGAAATGCCAGAAGATATTTTCA
TTTGCTCACCAGACTATCAGTGCTTTGATTAAAGCTGAGCTGGCTGAATTACCACTGAGACTTTTTCTTCAAGGAGC
ATTAGCTGCTGGAGAAATTGGCTTTGAAAATCATGAAACAGTAGCATATGAATTTATGTCCCAGGCATTTTCTCTAT
ATGAAGATGAAATCAGTGATTCTAAAGCACAGCTGGCTGCTATCACCTTGATCATCGGTACTTTTGAGAGGATGAAA
TGCTTCAGTGAAGAGAATCATGAACCCTTGAGAACTCAGTGTGCACTTGCTGCATCAAAACTTCTGAAAAAACCAGA
TCAAGGCCGAGCCGTGAGCACATGTGCGCATCTCTTTTGGTCTGGCCGAAACACAGACAAAAATGGGGAAGAGCTTC
ATGGAGGTAAAAGGGTCATGGAGTGCCTAAAGAAGGCACTAAAAATAGCAAATCAGTGCATGGACCCCTCTCTACAA
GTTCAGCTCTTTATAGAGATTCTGAACAGGTACATCTATTTCTATGAAAAAGAAAATGATGCGGTAACCATTCAAGT
CTTGAACCAACTTATTCAAAAGATTCGAGAAGATCTCCCAAATCTTGAGTCCAGTGAAGAAACAGAACAAATAAACA
AGCATTTTCACAACACATTGGAGCACTTGCGCTCAAGACGGGAATCACCAGAGTCTGAGGGGCCAATCTATGAAGGT
CTCATCCTTTAA

[0141] mVPS26a同种型A(SEQ ID NO:5)

[0142] ATGAGTTTTCTTGGAGGCTTTTTTGGTCCCATTTGTGAGATTGATGTTGCCCTTAATGATGGGGAAACC
AGGAAAATGGCAGAAATGAAAACTGAGGATGGCAAAGTAGAAAAACACTATCTCTTCTATGATGGCGAGTCTGTCTC
AGGAAAGGTAAACCTAGCCTTTAAGCAGCCTGGAAAGAGGCTAGAGCATCAAGGAATTAGAATTGAATTTGTAGGTC
AAATTGAGCTTTTCAATGACAAGAGTAATACTCATGAATTTGTAAACCTAGTGAAGGAACTAGCCTTGCCTGGAGAA

CTGACTCAGAGCAGAAGCTATGACTTTGAATTTATGCAAGTTGAAAAGCCATATGAGTCATACATCGGTGCCAATGT
CCGCCTGAGGTATTTTCTTAAGGTGACAATTGTGAGAAGATTGACAGACTTAGTGAAAGAGTACGATCTTATTGTTC
ATCAGCTAGCCACCTATCCTGATGTCAACAACTCTATTAAAATGGAAGTGGGCATTGAAGACTGTCTGCACATAGAG
TTTGAATATAATAAGTCCAAGTATCATTTAAAGGATGTAATTGTTGGAAAAATTTACTTCTTATTAGTAAGAATAAA
AATACAACACATGGAATTACAGCTGATCAAGAAAGAGATCACAGGAATTGGACCCAGCACCACAACAGAGACAGAAA
CAATCGCTAAGTATGAAATAATGGATGGGGCGCCAGTAAAAGGAGAATCTATTCCGATAAGATTGTTCTTAGCAGGG
TATGACCCAACCCCCACGATGAGAGATGTGAACAAGAAGTTTTCAGTAAGGTACTTTCTAAACCTCGTGCTTGTTGA
TGAGGAGGACCGAAGGTACTTCAAGCAGCAGGAGATCATCCTGTGGAGAAAAGCACCCGAGAAACTGAGAAAACAGA
GGACGAACTTTCACCAGCGGTTTGAATCTCCAGACTCGCAGGCCTCTGCGGAGCAGCCTGAGATGTAA

[0143] mVPS26b(SEQ ID NO:6)

[0144] ATGAGCTTCTTCGGCTTCGGGCAGAGCGTGGAGGTGGAAATCTTGCTGAATGATGCGGAGAGTAGGAAG
CGAGCGGAGCACAAGACTGAGGACGGGAAGAAGGAGAAATATTTCCTCTTCTACGACGGGGAAACCGTCTCGGGGAA
AGTGAGCCTATCACTGAAGAACCCCAACAAGCGACTAGAGCACCAGGGCATCAAGATCGAGTTCATTGGGCAGATCG
AACTCTACTATGACCGTGGGAACCACCATGAGTTTGTGTCTTTGGTGAAGGACCTGGCTCGGCCAGGAGAGATCACC
CAATCGCAGGCCTTCGACTTTGAGTTCACCCATGTGGAAAAGCCGTATGAATCCTACACAGGACAGAATGTGAAGCT
CCGCTATTTCCTTCGAGCCACCATCAGCCGCCGCCTCAATGATGTTGTTAAAGAGATGGACATTGTAGTTCACACAC
TTAGCACATACCCCGAGCTGAACTCATCCATCAAGATGGAAGTTGGCATTGAGGATTGCCTGCACATTGAATTTGAG
TACAACAAATCCAAATACCACTTGAAAGATGTCATTGTAGGGAAGATATACTTCCTGCTGGTGAGAATCAAGATCAA
GCACATGGAGATAGACATCATCAAACGAGAGACAACAGGCACGGGTCCCAACGTGTACCACGAGAACGACACAATAG
CGAAGTATGAGATCATGGACGGGGCACCAGTCCGAGGTGAGTCCATCCCCATCAGGCTCTTCCTGGCAGGGTATGAG
CTCACACCCACCATGCGTGACATAAATAAGAAGTTCTCTGTGCGCTATTACCTCAACTTGGTGCTGATAGATGAGGA
GGAACGGCGCTACTTCAAGCAGCAGGAAGTGGTGTTGTGGCGGAAGGGTGACATCGTACGGAAGAGCATGTCCCACC
AGGCAGCCATTGCCTCACAGCGCTTCGAGGGCACAACCTCCCTGGGTGAGGTGCGGACCCCTGGCCAACTGTCTGAC
AACAACAGCAGGCAGTAG

[0145] 转基因编码序列的密码子优化

[0146] 转基因编码序列的密码子优化可以提高基因治疗的效率。因此,在一些实施方案中,使用与编码治疗性蛋白质的转基因的编码序列至少70%相同的核酸(例如,与核酸序列70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列)。

[0147] 密码子优化工具是本领域已知的。

[0148] 示例性密码子优化的核酸如下。

[0149] 密码子优化的mVPS35(SEQ ID NO:7)

[0150] ATGCCCACAACACAGCAGAGCCCACAGGATGAACAGGAAAAGCTGCTGGATGAGGCCATCCAGGCTGTG
AAAGTGCAGTCCTTCCAGATGAAAAGATGTCTGGATAAGAATAAGCTGATGGACGCCCTGAAGCATGCCAGCAACAT
GCTGGGCGAGCTGAGGACCAGCATGCTGTCTCCCAAGTCCTACTACGAGCTGTACATGGCCATTTCTGACGAGCTGC
ACTACCTGGAGGTGTACCTCACAGATGAGTTCGCCAAGGGGAGAAAGGTGGCCGATCTGTATGAGCTGGTGCAGTAT
GCTGGCAACATCATCCCCAGGCTGTACCTGCTGATCACCGTGGGCGTGGTGTATGTGAAGAGCTTCCCCCAGTCTAG
AAAGGATATCCTGAAGGACCTGGTGGAAATGTGCAGGGGAGTGCAGCATCCTCTGAGAGGCCTGTTTCTGAGAAACT

ACCTGCTGCAGTGTACCAGGAATATCCTGCCCGACGAAGGCGAGCCTACTGATGAAGAAACAACCGGCGACATCAGC
GACAGCATGGATTTTGTGCTGCTGAACTTCGCCGAGATGAACAAACTGTGGGTGAGAATGCAGCACCAGGGACACAG
CAGGGACAGAGAGAAGAGAGAGAGGGAGAGACAGGAGCTGAGAATCCTGGTGGGCACCAACCTGGTGAGGCTGTCCC
AGCTGGAGGGCGTGAATGTGGAGAGATATAAGCAGATTGTGCTGACAGGAATCCTGGAGCAGGTGGTGAACTGCAGA
GATGCCCTGGCCCAGGAGTATCTGATGGAATGCATCATTCAGGTGTTCCCAGATGAGTTCCACCTGCAGACACTGAA
CCCTTTCCTGAGGGCCTGCGCCGAGCTGCATCAGAACGTGAACGTCAAGAACATCATCATTGCTCTGATTGACAGGC
TGGCCCTGTTTGCCCATAGAGAGGATGGACCTGGCATCCCAGCCGAGATCAAGCTGTTTGACATTTTCAGCCAGCAG
GTGGCCACCGTGATCCAGTCTAGGCAGGACATGCCTTCCGAAGATGTGGTGAGCCTGCAGGTGTCCCTGATCAATCT
GGCCATGAAGTGTTACCCTGATAGAGTGGATTACGTGGACAAGGTGCTGGAGACCACAGTGGAGATCTTCAACAAGC
TGAACCTGGAGCACATCGCCACTTCTTCTGCTGTGTCTAAAGAACTGACAAGACTGCTGAAGATCCCTGTGGACACC
TACAACAACATTCTGACCGTGCTGAAGCTGAAACACTTCCATCCACTGTTCGAGTACTTTGATTATGAGAGCAGGAA
GTCCATGAGCTGCTACGTGCTGAGCAATGTGCTGGACTACAATACAGAAATCGTGTCCCAGGATCAGGTGGACAGCA
TCATGAATCTGGTGAGCACACTGATCCAGGACCAGCCTGATCAGCCAGTGGAGGACCCCGACCCTGAGGACTTCGCT
GACGAGCAGAGCCTGGTGGGCAGGTTCATCCACCTGCTGAGGTCTGATGATCCAGACCAGCAGTACCTGATCCTGAA
CACCGCCAGGAAGCACTTTGGAGCCGGAGGCAACCAGAGGATCAGATTCACCCTGCCTCCCCTGGTGTTTGCCGCCT
ACCAGCTGGCTTTCAGATACAAGGAAAATTCCCAGATGGATGACAAGTGGGAGAAAAAATGCCAGAAGATCTTTTCT
TTTGCTCACCAGACCATCTCTGCCCTGATCAAAGCTGAGCTGGCTGAACTGCCACTGAGACTGTTCCTCCAGGGGGC
CCTGGCTGCCGGGGAGATCGGCTTTGAGAACCATGAGACTGTGGCCTATGAATTCATGTCTCAGGCCTTCTCTCTGT
ACGAAGATGAGATCAGCGACAGCAAGGCTCAGCTGGCTGCTATCACACTGATCATTGGAACATTTGAAAGGATGAAG
TGCTTCTCCGAGGAAAACCACGAGCCACTGAGAACACAGTGTGCACTGGCCGCCTCCAAGCTGCTGAAGAAGCCTGA
CCAGGGCAGAGCCGTGTCTACCTGTGCCCACCTGTTCTGGAGCGGAAGAAACACAGACAAAAATGGAGAGGAGCTGC
ATGGCGGCAAGAGGGTGATGGAGTGCCTGAAGAAAGCCCTGAAGATTGCCAACCAGTGCATGGACCCAAGCCTGCAG
GTGCAGCTGTTCATCGAGATCCTGAACAGGTACATCTACTTCTACGAGAAGGAGAATGACGCCGTGACCATTCAGGT
GCTGAATCAGCTGATCCAGAAAATCAGGGAAGACCTGCCCAACCTGGAGAGCTCTGAAGAGACAGAGCAGATCAACA
AGCATTTTCACAACACTCTGGAACATCTGAGGTCCAGGAGGGAGTCCCCAGAGTCTGAGGGACCCATCTATGAGGGG
CTGATCCTGTGA

[0151] 密码子优化的mVPS26a同种型A(SEQ ID NO:8)

[0152] ATGAGCTTCCTGGGCGGCTTCTTCGGCCCCATCTGTGAGATCGACGTGGCCCTGAACGACGGCGAGACC
AGAAAGATGGCCGAGATGAAGACAGAGGATGGCAAGGTGGAGAAGCACTACCTGTTCTACGACGGAGAGTCTGTGTC
CGGCAAGGTGAACCTGGCCTTCAAGCAGCCTGGGAAGAGGCTGGAGCACCAGGGCATCAGAATCGAGTTCGTGGGCC
AGATCGAGCTGTTCAACGACAAGAGCAACACCCACGAGTTTGTGAACCTGGTGAAGGAGCTGGCTCTGCCTGGCGAG
CTGACCCAGAGCAGAAGCTACGACTTCGAGTTCATGCAGGTGGAGAAGCCTTACGAGAGCTACATCGGCGCCAACGT
GAGACTGAGATACTTCCTGAAGGTGACCATCGTGAGGAGACTGACCGACCTGGTGAAGGAGTATGACCTGATCGTGC
ACCAGCTGGCCACCTACCCTGACGTGAACAACAGCATCAAGATGGAGGTGGGCATCGAGGACTGCCTGCACATCGAG
TTCGAGTACAACAAGTCCAAGTACCACCTGAAGGACGTGATCGTGGGCAAGATCTACTTCCTGCTGGTGAGGATCAA
GATCCAGCACATGGAGCTGCAGCTGATCAAGAAGGAGATCACCGGCATCGGCCCTTCCACAACCACCGAGACAGAGA
CAATCGCCAAGTACGAGATCATGGACGGCGCCCCTGTGAAGGGCGAGAGCATCCCTATCAGGCTGTTCCTGGCCGGC
TACGACCCTACCCCTACCATGAGAGACGTGAACAAGAAGTTCAGCGTGAGGTACTTCCTGAACCTGGTGCTGGTGGA
CGAGGAGGACAGAAGATACTTCAAGCAGCAGGAGATCATCCTGTGGAGGAAGGCCCCTGAGAAGCTGAGGAAGCAGA

GGACCAACTTCCACCAGAGATTCGAGTCCCCTGACAGCCAGGCCAGCGCCGAGCAGCCAGAGATGTGA

[0153] 密码子优化的mVPS26b(SEQ ID NO:9)

[0154] ATGAGTTTTTTTGGGTTTGGACAGTCAGTGGAGGTGGAGATCCTGCTGAACGACGCCGAGAGCAGGAAG
AGGGCCGAGCACAAGACAGAGGATGGCAAGAAGGAGAAGTACTTCCTGTTCTACGACGGAGAGACCGTGAGCGGCAA
GGTGTCCCTGAGCCTGAAGAACCCAAACAAGAGACTGGAGCACCAGGGCATCAAGATCGAGTTCATCGGCCAGATCG
AGCTGTACTACGACAGGGGCAACCACCACGAGTTCGTGAGCCTGGTGAAGGACCTGGCCAGACCTGGCGAGATCACC
CAGAGCCAGGCCTTCGACTTCGAGTTCACCCACGTGGAGAAGCCTTACGAGAGCTACACAGGCCAGAACGTGAAGCT
GAGGTACTTCCTGAGAGCCACCATCAGCAGAAGACTGAACGACGTGGTGAAGGAGATGGACATCGTGGTGCACACCC
TGAGCACCTACCCTGAGCTGAACTCTTCCATCAAGATGGAGGTGGGCATCGAGGACTGCCTGCACATCGAGTTCGAG
TACAACAAGAGCAAGTACCACCTGAAGGACGTGATCGTGGGCAAGATCTACTTCCTGCTGGTGAGAATCAAGATCAA
GCACATGGAGATCGACATCATCAAGAGAGAGACCACAGGCACAGGCCCTAACGTGTACCACGAGAACGACACCATCG
CCAAGTACGAGATCATGGACGGCGCCCCTGTGAGAGGCGAGAGCATCCCTATCAGGCTGTTCCTGGCCGGCTACGAG
CTGACCCCTACCATGAGGGACATCAACAAGAAGTTCAGCGTGAGATACTACCTGAACCTGGTGCTGATCGATGAGGA
GGAGAGAAGATACTTCAAGCAGCAGGAGGTGGTGCTGTGGAGAAAGGGCGACATCGTGAGAAAGAGCATGAGCCACC
AGGCCGCCATCGCCAGCCAGAGATTCGAGGGCACCACCAGCCTGGGCGAGGTGAGGACCCCTGGCCAGCTGAGCGAC
AACAACAGCAGACAGTGA

[0155] 人VPS35编码序列(某些密码子被修饰以去除限制性位点)(SEQ ID NO:10)

[0156] ATGCCTACAACACAGCAGTCCCCTCAGGATGAGCAGGAAAAGCTCTTGGATGAAGCCATACAGGCTGTG
AAGGTCCAGTCATTCCAAATGAAGAGATGCCTGGACAAAAACAAGCTCATGGATGCTCTAAAACATGCTTCTAATAT
GCTTGGTGAACTCCGGACTTCTATGTTATCACCAAAGAGTTACTATGAACTTTATATGGCCATTTCTGATGAACTGC
ACTACTTGGAGGTCTACCTGACAGATGAGTTTGCTAAAGGAAGGAAAGTGGCAGATCTCTACGAACTTGTACAGTAT
GCTGGAAACATTATCCCAAGGCTTTACCTTCTGATCACAGTTGGAGTTGTATATGTCAAGTCATTTCCTCAGTCCAG
GAAGGATATTCTGAAAGATTTGGTAGAAATGTGCCGTGGTGTGCAACATCCCTTGAGGGGTCTGTTTCTTCGAAATT
ACCTTCTTCAGTGTACCAGAAATATCTTACCTGATGAAGGAGAGCCAACAGATGAAGAAACAACTGGTGACATCAGT
GATTCCATGGATTTCGTACTGCTCAACTTTGCAGAAATGAACAAGCTCTGGGTGCGAATGCAGCATCAGGGACATAG
CCGAGATAGAGAAAAAAGAGAACGAGAAAGACAAGAACTGAGGATTCTAGTGGGAACAAATTTGGTGCGCCTCAGTC
AGTTGGAAGGTGTAAATGTGGAACGTTACAAACAGATTGTTCTGACTGGCATATTGGAGCAAGTTGTAAACTGTAGG
GATGCTTTGGCTCAAGAATATCTCATGGAGTGTATTATTCAGGTATTCCCTGATGAATTTCACCTCCAGACTTTGAA
TCCTTTCCTTCGGGCCTGTGCTGAGTTACACCAGAATGTAAATGTGAAGAACATAATCATTGCTTTAATTGATAGAT
TAGCTTTATTTGCTCACCGTGAAGATGGACCTGGAATCCCAGCGGATATTAAACTATTCGATATATTCTCACAGCAG
GTGGCTACAGTGATACAGTCAAGACAAGACATGCCTTCAGAGGATGTTGTATCTTTACAAGTATCTCTTATTAATCT
TGCCATGAAATGTTACCCTGATCGTGTGGACTATGTTGATAAAGTACTAGAAACAACAGTGGAGATATTCAATAAGC
TCAACCTTGAACATATTGCTACCAGTAGTGCAGTTTCAAAGGAACTCACCAGACTATTGAAAATACCAGTTGACACT
TACAACAATATATTAACAGTCTTGAAATTAAAACATTTCCACCCACTCTTTGAGTACTTTGACTACGAGTCCAGAAA
GAGCATGAGTTGTTATGTGCTTAGTAATGTTCTGGATTATAACACAGAAATTGTATCTCAAGACCAGGTGGATTCCA
TAATGAATTTGGTATCCACGTTGATTCAAGATCAGCCAGATCAACCTGTAGAAGACCCTGATCCAGAAGATTTCGCT
GATGAGCAGAGCCTTGTGGGCCGCTTCATTCATCTGCTGCGCTCTGAGGACCCTGACCAGCAGTACTTGATATTGAA
CACAGCACGAAAACATTTCGGAGCTGGTGGAAATCAGCGGATTCGCTTCACACTGCCACCTTTGGTATTTGCAGCTT
ACCAGCTGGCATTTCGATATAAAGAGAACTCTAAAGTGGATGACAAATGGGAAAAGAAATGCCAGAAGATATTCTCA

TTTGCCCACCAGACTATCAGTGCTTTGATCAAAGCAGAGCTGGCAGAATTGCCGTTAAGACTATTCCTTCAAGGAGC
ACTAGCTGCTGGGGAAATTGGATTTGAAAATCATGAAACAGTCGCATATGAATTCATGTCCCAGGCATTCTCTCTGT
ATGAAGATGAAATCAGCGATTCCAAAGCACAGCTTGCTGCCATCACCTTGATCATTGGCACATTTGAAAGGATGAAG
TGCTTCAGTGAAGAGAATCATGAACCTCTGAGGACTCAGTGTGCCCTTGCTGCATCCAAACTTCTAAAGAAACCTGA
TCAGGGCCGAGCTGTGAGCACCTGTGCACATCTCTTCTGGTCTGGCAGAAACACGGACAAAAATGGGGAGGAGCTTC
ACGGAGGCAAGAGGGTAATGGAGTGCCTAAAAAAAGCTCTAAAAATAGCAAATCAGTGCATGGACCCCTCTCTACAA
GTGCAGCTATTCATAGAAATTCTGAACAGATATATCTACTTCTATGAAAAGGAAAATGATGCGGTAACAATTCAGGT
ATTAAACCAGCTTATCCAAAAGATTCGAGAAGACCTCCCGAATCTTGAATCCAGTGAAGAAACAGAGCAGATTAACA
AACACTTTCATAACACACTGGAGCATTTGCGCTTGCGGCGGGAATCACCAGAATCCGAGGGGCCAATTTATGAAGGA
CTCATCCTTTAA

[0157] 施用途径和剂量

[0158] 本公开内容提供了用于治疗、预防和/或治愈神经退行性疾病或病症和/或在受试者中减轻与神经退行性疾病和/或病症相关的症状中的至少一种的方法的rAAV载体。在一些实施方案中,方法包括将在药学上可接受的承载体中的编码一种或多种治疗性多肽或蛋白质的rAAV载体以足以治疗、预防和/或治愈患有或怀疑患有神经退行性疾病或病症的受试者中的此类神经退行性疾病或病症的量和时间段施用至受试者。

[0159] rAAV载体可以根据本领域已知的任何合适方法在组合物中递送至受试者。rAAV载体(优选悬浮在生理相容的承载体中(例如,在组合物中))可以被施用至受试者。在某些实施方案中,组合物可包含单独的或与一种或多种其他载体(例如,具有一种或多种不同转基因的第二rAAV载体)组合的rAAV载体。在一个实施方案中,组合物可以包含含有核酸序列的rAAV9载体,所述核酸序列包含编码功能蛋白的转基因,所述功能蛋白包括但不限于逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b。在一个实施方案中,组合物可以包含含有核酸序列的rAAV2/9载体,所述核酸序列包含编码功能蛋白的转基因,所述功能蛋白包括但不限于逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b。在一个实施方案中,组合物可以包含rAAV10或rAAV2/10载体,其包含核酸序列,所述核酸序列包含编码功能蛋白的转基因,所述功能蛋白包括但不限于逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b。

[0160] 根据rAAV所针对的适应症,本领域技术人员可以容易地选择合适的承载体。例如,一种合适的承载体包括盐水,其可以与多种缓冲溶液(例如磷酸缓冲盐水)一起配制。其他示例性承载体包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。承载体的选择不是对本公开内容的限制。

[0161] 任选地,除了rAAV和一种或多种承载体之外,本文公开的组合物还可以包含其他常规药物组分,例如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性防腐剂包括氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸酯、乙基香草醛、甘油、苯酚和对氯苯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0162] 在一些实施方案中,配制rAAV组合物以减少组合物中AAV颗粒的聚集,特别是在存在高rAAV浓度(例如,约10^{13}GC/ml或更高)的情况下。用于减少rAAV聚集的方法在本领域是众所周知的,并且包括例如添加表面活性剂、pH调节和盐浓度调节(参见,例如Wright等人,

Molecular Therapy 12:171-178(2005))。

[0163] 适合注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉剂。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备分散体。在一般储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。在许多情况下,该形式是无菌的和流动性的以达到易于注射的程度。它必须在制造和储存条件下保持稳定,并且必须防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。承载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们的合适混合物和/或植物油。适当的流动性可以例如通过使用包衣例如卵磷脂、通过在分散体的情况下保持所需的粒度和通过使用表面活性剂来保持。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂来防止微生物的作用,例如对羟基苯甲酸酯、三氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可通过在组合物中使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射组合物的吸收。

[0164] 例如,对于可注射水溶液的施用,如果需要,可以适当地缓冲溶液,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液特别适用于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。在这方面,可以使用的无菌水性介质是本领域技术人员已知的。例如,可以将一个剂量溶解在1ml等渗NaCl溶液中,然后添加到1000ml皮下注射液中或在建议的输注部位注射。根据宿主的情况,一定会出现剂量的一些变化。在任何情况下,负责施用的人员将确定个体宿主的适当剂量。

[0165] 通过将所需量的活性rAAV与本文列举的各种其他组分(根据需要)掺入适当溶剂中,然后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常,分散体是通过将各种已灭菌的活性组分掺入无菌载料中来制备的,该载体含有基本分散介质和所需的来自上述列举的那些的其他组分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从其先前无菌过滤的溶液中产生活性组分加上任何其他所需组分的粉末。

[0166] 除了上述递送方法之外,还考虑以下技术作为将rAAV组合物递送至宿主的替代方法。在美国专利号5,656,016中已经使用并描述了超声导入法(即超声波)作为一种用于提高药物渗透进入和通过循环系统的速率和功效的装置。考虑的其他药物递送替代方案是骨内注射(美国专利号5,779,708)、微芯片装置(美国专利号5,797,898)、眼科制剂、透皮基质(美国专利号5,770,219和5,783,208)和反馈控制递送(美国专利号5,697,899)。

[0167] rAAVS通过施用途径以足够的量施用以转染所希望的组织的细胞并提供足够的基因转移和表达水平而没有过度的副作用。常规和药学上可接受的施用途径包括但不限于直接递送至所选组织(例如,脑内施用、鞘内施用)、静脉内、口服、吸入(包括鼻内和气管内施用)、眼内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内和其他肠胃外施用途径。如果需要,可以组合施用途径。施用方案取决于几个因素,包括治疗组合物的血清或组织更新率、症状水平和生物基质中靶细胞的可及性。优选地,施用方案递送足够的治疗组合物以实现目标疾病状态的改善,同时使不希望的副作用最小化。因此,递送的生物制剂的量部分取决于特定的治疗组合物和所治疗病况的严重性。

[0168] 本公开内容提供了包含rAAV病毒体的稳定药物组合物。即使在经历冻融循环和储存在由包括玻璃的各种材料制成的容器中时,该组合物仍保持稳定和活性。

[0169] 合适的剂量将取决于被治疗的受试者(例如,人或非人灵长类动物或其他哺乳动

物)、被治疗的受试者的年龄和一般状况、被治疗的病况的严重性、rAAV病毒体的施用方式以及其他因素。本领域技术人员可以容易地确定合适的有效量。

[0170] 实现期望效果或“治疗效果”所需的rAAV病毒体的剂量(例如载体基因组中的剂量单位/每千克体重(vg/kg))将根据几个因素而有所不同,包括但不限于:rAAV施用途径;达到治疗效果所需的基因或RNA表达水平;正在治疗的特定疾病或病症;以及基因或RNA产物的稳定性。基于上述因素以及本领域熟知的其他因素,本领域技术人员可以容易地确定rAAV病毒体的剂量范围以治疗患有特定疾病或病症的受试者。rAAV的有效量通常在包含每个受试者约10^9至10^{16}个基因组拷贝的约10μl至约100ml溶液的范围内。可以使用其他体积的溶液。使用的体积通常将取决于受试者的体型、rAAV的剂量和施用途径等。例如,对于鞘内或脑内施用,可以使用1μl至10μl或10μl至100μl范围内的体积。对于静脉内施用,可以使用10μl至100μl、100μl至1ml、1ml至10ml或更多的体积。在某些情况下,每个受试者大约10^{10}到10^{12}个rAAV基因组拷贝的剂量是合适的。在某些实施方案中,每个受试者10^{12}个rAAV基因组拷贝对靶向所需组织是有效的。在一些实施方案中,以每个受试者10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、或10^{15}个基因组拷贝的剂量施用rAAV。在一些实施方案中,rAAV以10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、或10^{14}个基因组拷贝/kg的剂量施用。

[0171] 因此,“治疗有效量”将落入可通过临床试验确定的相对宽的范围内。例如,对于体内注射,即直接注射到受试者,治疗有效剂量可以是大约10^5至10^{16}个rAAV病毒体,更优选10^8至10^{14}个rAAV病毒体。对于体外转导,要递送至细胞的有效量的rAAV病毒体可以是大约10^5至10^{13}个,优选10^8至10^{13}个rAAV病毒体。如果组合物包含将被递送回受试者的转导细胞,则药物组合物中转导细胞的量可为约10^4至10^{10}个细胞,更优选10^5至10^8个细胞。当然,剂量取决于转导效率、启动子强度、信息的稳定性以及由此编码的蛋白质。本领域普通技术人员可以通过建立剂量反应曲线的常规试验容易地建立有效剂量。

[0172] 剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案以最终递送上述指定量。此外,可以适当地向受试者施用尽可能多的剂量。因此,可以在单个剂量中给予受试者例如10^5至10^{16}个rAAV病毒体,或给予受试者共同导致递送例如10^5至10^{16}个rAAV病毒体的二、三、四、五、六或更多个剂量。本领域技术人员可以容易地确定合适数量的施用剂量。

[0173] 因此,药物组合物将包含足够的遗传物质以产生治疗有效量的感兴趣的蛋白质,即足以减少或改善所讨论的疾病状态的症状的量或足以赋予所需益处的量。因此,当以一个或多个剂量给予时,rAAV病毒体将以足以提供治疗效果的量存在于主题组合物中。rAAV病毒体可以作为冻干制剂提供并稀释在病毒体稳定组合物中以供立即或将来使用。可替代地,可在生产后立即提供rAAV病毒体并储存以备将来使用。

[0174] 药物组合物还将包含药学上可接受的赋形剂或承载体。这样的赋形剂包括任何本身不诱导产生对接受组合物的个体有害的抗体并且可以在没有过度毒性的情况下施用的药剂。药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体,例如水、盐水、甘油和乙醇。在其中可包括药学上可接受的盐,例如无机酸盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;以及有机酸盐,例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。另外,辅助物质例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等可以存在于这些载料中。Remington’sPharmaceutical Sciences and U.S.Pharmacopeia:National Formulary,Mack Publishing Company,Easton,PA(1984)中对药学上可接受的赋形剂进行了全面讨论。

[0175] 治疗剂和诊断剂的制剂可以通过与可接受的承载体、赋形剂或稳定剂以例如冻干粉末、浆液、水溶液或悬浮液的形式混合来制备。

[0176] 单独地或与另一种药剂组合地施用的治疗组合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中例如用于确定LD_{50}(对50％的群体致死的剂量)和ED_{50}(在50％的群体中治疗有效的剂量)的标准药学程序来确定。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数(LD_{50}/ED_{50})。在特定方面,表现出高治疗指数的治疗组合物是合乎需要的。从这些细胞培养试验和动物研究中获得的数据可用于制定用于人的一系列剂量。此类化合物的剂量优选地位于几乎没有毒性或没有毒性的包括ED_{50}的循环浓度的范围内。剂量可以在这个范围内变化,这取决于所使用的剂型和施用途径。

[0177] 合适剂量的确定由临床医生确定,例如,使用本领域已知或怀疑影响治疗的参数或因素。剂量可以从略低于最佳剂量的量开始,然后可以以小增量增加,直到相对于任何负面副作用实现所需或最佳效果。重要的诊断量度包括例如炎症的症状或产生的炎性细胞因子的水平。一般而言,希望将要使用的生物制剂衍生自与靶向治疗的动物相同的物种,从而最小化对试剂的任何免疫反应。

[0178] AAV的优选施用途径是静脉内。本文所述的rAAV载体的其他施用途径包括颅内、实质内、脊髓内。

[0179] 优选的剂量范围为约$1x10^{10}$至约$8x10^{11}$、约$2x10^{10}$至约$6x10^{11}$、约$4x10^{10}$至约$4x10^{11}$个基因组或病毒拷贝(vc)的总施用量。优选的剂量是大约$4x10^{11}$个基因组或病毒拷贝(vc)的rAAV总施用量。

[0180] 如果使用多于一种rAAV,则载体的优选总剂量范围为约$1x10^{10}$至约$6x10^{11}$、约$2x10^{10}$至约$5x10^{11}$、约$1x10^{10}$至约$4x10^{11}$个基因组或病毒拷贝(vc)的总施用量。总载体的优选剂量为约$3x10^{11}$。AAV可以以等量例如50/50的比率施用,或以或以约5/95、10/90、15/85、20/80、25/75、30/70、35/65、40/60、45/55、55/45、60/40、65/35、70/30、75/25、80/20、85/15、90/10和95/5的比率施用。

[0181] 可以调整剂量以优化在受试者中的效果。此外,可以在增加剂量之前监测受试者的病况的改善。可以通过观察受试者的肌肉力量和控制、活动能力以及身高和体重的变化来监测受试者对rAAV治疗施用的反应。如果施用后这些参数中的一个或多个增加,则可以继续治疗。如果这些参数中的一个或多个保持不变或降低,则可以增加剂量。

[0182] 试剂盒

[0183] 本公开内容还提供了以试剂盒形式包含本文所公开的组合的组分的试剂盒。本公开内容的试剂盒包括一种或多种组分,包括但不限于本文所述的病毒载体(例如,AAV载体)。如本文所讨论的,试剂盒还可包括药学上可接受的承载体。病毒载体可以配制成纯组合物或与药学上可接受的承载体组合在药物组合物中。

[0184] 在一些实施方案中,试剂盒包括在一个容器中(例如,在无菌玻璃或塑料小瓶中)的AAV载体,所述AAV载体含有本文所述的转基因。

[0185] 在一些实施方案中,试剂盒包括在一个容器中(例如,在无菌玻璃或塑料小瓶中)的含有本文所述转基因的AAV载体和在另一个容器中(例如,在无菌玻璃或塑料小瓶中)的编码本文所述转基因的第二AAV载体和在另一个容器中(例如,在无菌玻璃或塑料小瓶中)的编码本文所述转基因的第三AAV载体。

[0186] 在一些实施方案中,试剂盒包含在一个或多个容器中(例如,在无菌玻璃或塑料小瓶中)的编码逆转运复合体核心蛋白VPS35和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26a和/或逆转运复合体核心蛋白VPS26b的AAV载体,或其药物组合物。

[0187] 如果试剂盒包括一种或多种用于对受试者进行肠胃外施用的药物组合物,则试剂盒可以包括用于进行这种施用的装置。例如,该试剂盒可以包括一个或多个皮下注射针头或其他如上所讨论的注射装置。

[0188] 试剂盒可以包括包装插页,其包括关于试剂盒中的药物组合物和剂型的信息。通常,此类信息有助于患者和医生有效和安全地使用随附的药物组合物和剂型。例如,可在插页中提供关于组合的以下信息:药代动力学、药效学、临床研究、功效参数、适应症和用法、禁忌症、警告、注意事项、不良反应、剂量过量、适当的剂量和施用、如何提供、适当储存条件、参考资料、制造商/分销商信息和专利信息。

实施例

[0189] 参考以下非限制性实施例可以更好地理解本发明,提供这些实施例是为了更充分地说明本发明的优选实施方案。它们决不应被解释为限制本发明的广泛范围。

[0190] 实施例1-材料和方法

[0191] 质粒生产

[0192] VPS35、VPS26a和VPS26b的mRNA序列从国家生物技术信息中心(NCBI)获得。对序列进行密码子优化,然后从头合成。将合成的构建体亚克隆到具有AAV2反向末端重复(ITR)和普遍存在的鸡β肌动蛋白野生型启动子的AAV转移质粒中。转基因之后是牛生长激素多腺苷酸化信号。通过删除VPS35序列生成空框架载体对照。GFP对照旨在模仿靶VPS构建体的基本原理设计。它包含增强的绿色荧光蛋白、与VPS构建体相同的牛生长激素多聚A(BgH)和鸡β肌动蛋白野生型启动子。得到的质粒如图3所示。

[0193] AAV9生产

[0194] 使用来自MeiraGTx的衣壳和辅助质粒DNA,将上述每个构建体单独包装到重组腺相关病毒载体9(AAV9)中。简而言之,将转移质粒、rep-cap质粒和辅助质粒共转染到HEK293细胞中。使用millipore SHC XL150过滤器(140cm^2)澄清收获的含有病毒和细胞碎片的悬浮液。然后用AVB Sepharose,20mL柱纯化澄清的悬浮液,以3个柱体积洗脱。用100kD mPES中空纤维(Spectrum MicroKros cat#C02-E100-05-S)进行浓缩和渗滤。使用Amicon Ultra-4离心过滤器30kD(cat#UFC8030)进行进一步浓缩。

[0195] N2A培养

[0196] 小鼠神经母细胞瘤(N2a)细胞在含有青霉素和链霉素以防止微生物污染的50% DMEM(高葡萄糖)和50% Opti-MEM+10% FBS和谷氨酰胺(2mM)中培养。

[0197] 转染

[0198] 使用进行了一些修改的Lipofectamine转染方案。简而言之,使用lipofectamine LTX将Vps35和Vps26(Vps26a或Vps26b)质粒共转染到6孔格式的神经元样细胞Neuro2a(N2a)中。将100k细胞铺板在已经含有具有DNA-lipofectamine复合物的培养基的每个孔中。空框架和GFP用作对照质粒。每孔引入的DNA拷贝量为2.81E+11。如前所述(Qureshi等人,2019),在转染后48小时使用RIPA缓冲液收获细胞。

[0199] 神经元培养和转导

[0200] 如前所述实施原代小鼠皮层和海马神经元培养(Bhalla等人,2012)。在12孔板中铺板7天后,用逆转运复合体AAV9(2.27E+10个载体基因组/条件/孔)转导神经元(每孔450k细胞)。空框架AAV9和GFP AAV9用作对照。转导后维持培养物3周(总共4周)。在第28天,使用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解神经元。

[0201] 蛋白质印迹

[0202] 来自N2A和神经元培养物的细胞在RIPA中裂解,并如前所述分离蛋白质(Qureshi等人,2019;Kirby等人,2015)。来自样品的裂解物在**NuPAGE®**Bis-Tris 4-12%凝胶上运行,使用iblot转移到硝酸纤维素膜上并用抗体探测。

[0203] 使用了针对以下蛋白质的一抗:VPS35(ab57632,Abcam,1:1k);VPS26a(ab211530,Abcam,1:500);VPS26b(NBP1-92575,Novus,1:500或15915-1-AP,Proteintech,1:500);VPS29(sab2501105,Sigma-Aldrich,1:500);Sorl1(611861,BD-biosciences,1:2k和79322,Cell Signaling,1:500);和β-肌动蛋白(ab6276,Abcam,1:5k)。**IRDye®**800或680抗体(LI-COR)用作二抗,800CW的稀释度为1:10k,680RD的稀释度为1:15k,680LT抗体的稀释度为1:25k。如前所述(Eaton等人,2013),使用Odyssey成像系统扫描蛋白质印迹。

[0204] 对于Sorl1(BD-611861),过氧化物酶AffiniPure驴抗小鼠IgG(H+L)用作二抗(Jackson Immuno Research labs,1:2k),并在Fujifilm LAS-3000Imager上扫描印迹。

[0205] 统计学

[0206] 使用Microsoft Excel和SPSS进行统计分析。除非另有说明,否则所有实验都使用独立的双样本学生t检验,假设等方差,使用双尾分布。所有数据均以平均值表示,误差线表示平均值的标准误差。所有条形图均在GraphPad Prism8中创建。散点图在SPSS中创建。

[0207] 实施例2-单独的VPS35表达不足以提升逆转运复合体的三聚体和功能

[0208] 为了确定外源VPS35过表达在非缺陷状态下对逆转运复合体核心蛋白和对逆转运复合体功能的影响,使用AAV9-VPS35-HA并使用AAV9-GFP或AAV9-空载体(EV)作为对照条件转导培养的野生型小鼠神经元,3周后收获。

[0209] 通过免疫印迹测定所有逆转运复合体核心蛋白的水平(图2A)。与对照组相比,90% VPS35-HA过表达导致内源性VPS29的67%的显著增加(p=9E-09),在VPS26a中为22%的小幅增加(p=2E-08),而在VPS26b中没有增加(p=0.62)(图2B)。

[0210] Sorl1水平也通过免疫印迹测定。与对照组相比,单独的VPS35的过表达在Sorl1中略有增加(11%)且统计上不可靠(p=0.06)(图2B)。

[0211] 通过显示VPS35过表达导致VPS29的显著过表达,但在VPS26旁系同源物中没有增加或有不太多的增加,对逆转运复合体功能没有明显影响,这些结果证明研究VPS35和VPS26共表达的作用是合理的。

[0212] 实施例3-使用神经母细胞瘤细胞和质粒以及AAV9构建体的结果

[0213] 用表达单一蛋白质(VPS35、VPS26a或VPS26b)或蛋白质组合(VPS35+VPS26a或VPS35+VPS26b)的质粒转染神经母细胞瘤(N2A)细胞。表达GFP的质粒或空质粒用作对照。

[0214] 单一蛋白质条件导致每种蛋白质的高于对照水平的过表达:单独的VPS35(80%,p=3.4E-09)、单独的VPS26a(550%;p=2.2E-06)和单独的VPS26b(362%;p=0.0002)。与单一蛋白质条件相比,VPS35+VPS26a表达导致VPS35(31%;p=0.0003)、VPS29(17%;p=

0.0007)和VPS26a(52%;p=0.015)的显著增加,但在VPS26b中变化最小。VPS35+VPS26b表达导致VPS35(15%;p=0.07)和VPS26b(56%;p=0.14)中的不显著增加,VPS29中的显著增加(22%;p=0.0005),但在VPS26a中没有增加。参见图4。

[0215] 实施例4-使用神经元和AAV9构建体的结果

[0216] 为了测试VPS35和VPS26组合在培养的神经元中的作用,产生了五个实验性AAV9载体,表达小鼠VPS35、VPS26a、VPS26b和两个对照AAV9载体,一个表达GFP,另一个是空载体。实验载体以所有可能的组合在神经元中表达:单蛋白表达(单独的VPS35、单独的VPS26a、单独的VPS26b);双蛋白表达(VPS35+VPS26a、VPS35+VPS26b、VPS26b+VPS26a);和三重蛋白表达(VPS35+VPS26a+VPS26b)。

[0217] 在探索性研究中优化了每种病毒载体的剂量,并且当用于最终组合研究时,平均AAV9-VPS35过表达为11%(范围:1%至23%),平均AAV9-VPS26a为218%(范围:154%至354%),和平均AAV9-VPS26b为80%(范围:50%至107%)(图5B,蓝色条)。事实证明,此配置方式对于测试相互作用特别有用。

[0218] 通过比较在单一蛋白质条件下检测到的水平与在组合实验中检测到的水平,首先测试了是否存在对逆转运复合体核心蛋白表达的VPS35-VPS26相互作用。与单一蛋白表达相比,VPS35+VPS26a表达导致VPS35(70%;p=4.4E-18)、VPS26a(53%;p=2.1E-05)、VPS29(~42%;p<1.22E-05)而非VPS26b中的显著增加。VPS35+VPS26b表达导致VPS35(64%;p=3.6E-09)、VPS26b(15%;p=0.003)、VPS29(~18%;p<0.013)而非VPS26a中的显著增加。

[0219] 最后,与对照组(EV+GFP)相比,VPS35+VPS26a+VPS26b表达导致所有四种逆转运复合体的显著增加:VPS35(81%;p=5.6E-15)、VPS29(51%;p<1.8E-07)、VPS26a(220%;p=1.7E-08)和VPS26b(51%;p=9.8E-10)。

[0220] 参见图5。

[0221] 这些结果再次证明了VPS35+VPS26的共表达对VPS35表达以及对VPS26a和VPS26b的协同作用。

[0222] 虽然这一系列综合实验的主要目的是测试协同相互作用,但事实上VPS35+VPS26a对VPS26b没有作用,并且VPS35+VPS26b对VPS26a没有作用,这表明在神经元中,每个VPS26旁系同源物都以在生物化学上不同的三聚体存在。

[0223] 实施例5-组合的VPS35和VPS26表达在神经元中协同逆转运复合体功能

[0224] 接下来,通过比较在所有条件下测量的Sorl1水平,测试VPS35和VPS26组合是否对逆转运复合体功能具有协同作用,因为SORL1中的功能丧失突变是阿尔茨海默病的原因(Holstege等人,2017),以及即使在散发性疾病的早期阶段,也发现Sorl1蛋白减少了大约30%(Sager等人,2007年);Scherzer等人2004;Dodson等人2006)。

[0225] 使用单变量ANOVA,其中包括对照条件、单一条件和组合条件作为固定因素,以及包括Sorl1作为因变量。结果显示了群体效应(F=19.3,p=9.3E-8),其中简单的比较表明,虽然对照和单一条件之间没有差异(对比估计=0.1,p=0.9),但存在单一条件和组合条件之间的显著差异(对比估计=0.4,p=2.2E-7)。事后比较显示,每种组合条件与单一条件显著不同(图6B)。

[0226] 有趣的是,也观察到VPS26a+VPS26b过表达对Sorl1的显著作用(34%;p=0.006)(图6B),即使这种组合条件没有增加VPS35或VPS29的水平(图5B)。已发现Sorl1通过VPS26

与逆转运复合体核心相互作用(Suzuki等人,(2019),这一观察结果表明两个旁系同源物可能独立地与Sorl1相互作用。

[0227] 使用了生成的大规模数据集,其中有140多个实验或对照条件,并且其中在宽动态范围内测量了四种逆转运复合体核心蛋白和Sorl1。使用多元线性回归模型,其中包括Sorl1水平作为因变量,VPS35、VPS26、VPS26a和VPS26b水平作为自变量同时输入。发现与Sorl1水平的显著关系(F=19.5,p=1.1E-12),其中只有VPS26旁系同源物对模型有显著贡献。因此,该模型被修剪为包括两个旁系同源物,确认VPS26a(t=5.6,p=1.4E-7)和VPS26b(F=7.2,p=3.2E-11)与Sorl1水平独立相关(图6C和6D)。这一结果与神经元具有不仅在生物化学上不同而且在功能上也不同的两个三聚体(VPS26b-VPS35-VPS29和VPS26a-VPS35-VPS29)的解释一致。

[0228] 参考资料

[0229] Andersen等人,Securing the future of drug discovery for central nervous system disorders.Nature reviews.Drug discovery.2014;13(12):871-872.

[0230] Bhalla等人,The location and trafficking routes of the neuronal retromer and its role in amyloid precursor protein transport.Neurobiol Dis.2012;47(1):126-34.

[0231] Collins等人,Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex.Traffic 2008;9(3):366-79.

[0232] Dodson等人,LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease.J Neuropathol Exp Neurol,2006;65(9):866-72.

[0233] Eaton等人,Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting.PloS one.2013;8(8):e72457.

[0234] Holstege等人,Characterization of pathogenic SORL1 genetic variants for association with Alzheimer's disease:a clinical interpretation strategy.Eur J Hum Genet.2017.

[0235] Kendall等人,Mammalian Retromer Is an Adaptable Scaffold for Cargo Sorting from Endosomes.Structure.2020;28(4):393-405.e4.

[0236] Kirby等人,Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF.PNAS USA.2015;112(13):4128-33.Epub 2015/03/17.

[0237] Qureshi等人,Retromer repletion with AAV9-VPS35 restores endosomal function in the mouse hippocampus.bioRxiv.2019:618496.

[0238] Sager等人,Neuronal LR11/sorLA expression is reduced in mild cognitive impairment.Ann Neurol.2007;62(6):640-7.

[0239] Scherzer等人,Loss of apolipoprotein Ereceptor LR11 in Alzheimer disease.Arch Neurol.2004;61(8):1200-5.

[0240] Shi等人,The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain.Nat Struct Mol Biol.2006;13(6):540-8.

[0241] Small and Petsko Retromer in Alzheimer disease,Parkinson disease and other neurological disorders.Nature reviews.Neuroscience.2015;16(3):126-132.

[0242] Suzuki等人,A bipartite sorting signal ensures specificity of retromer complex in membrane protein recycling.J Cell Biol.2019;218(9):2876-2886.

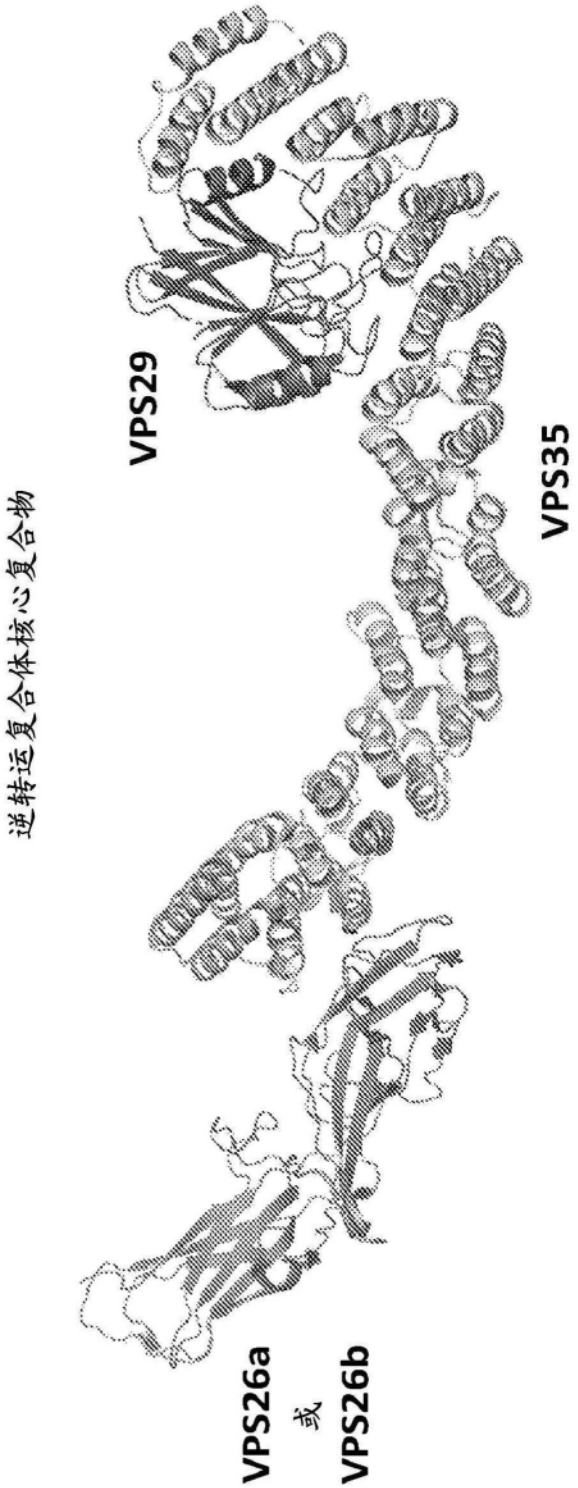


图1

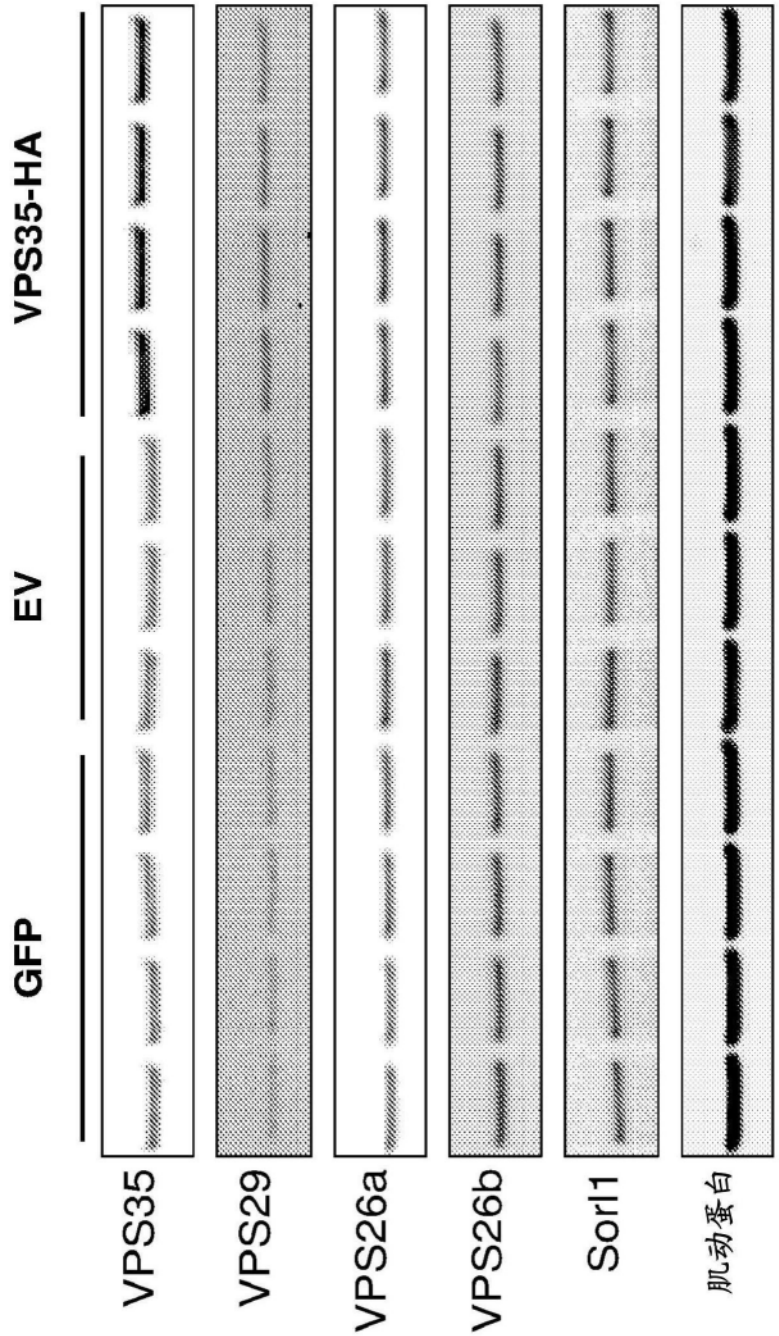


图2A

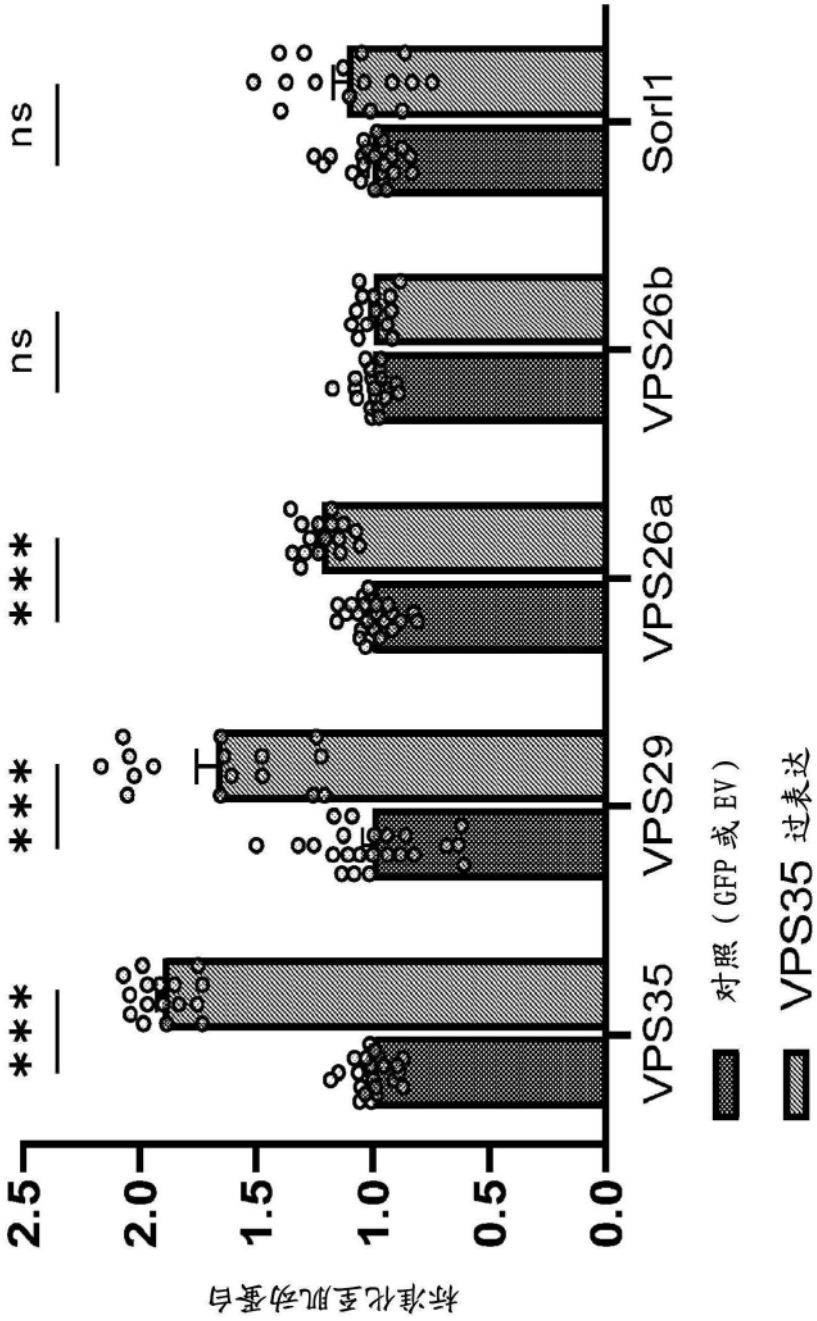

标准化至肌动蛋白
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
****
****
ns
****
ns
VPS35
VPS29
VPS26a
VPS26b
Sorl1
对照（GFP 或 EV）
VPS35 过表达

图2B

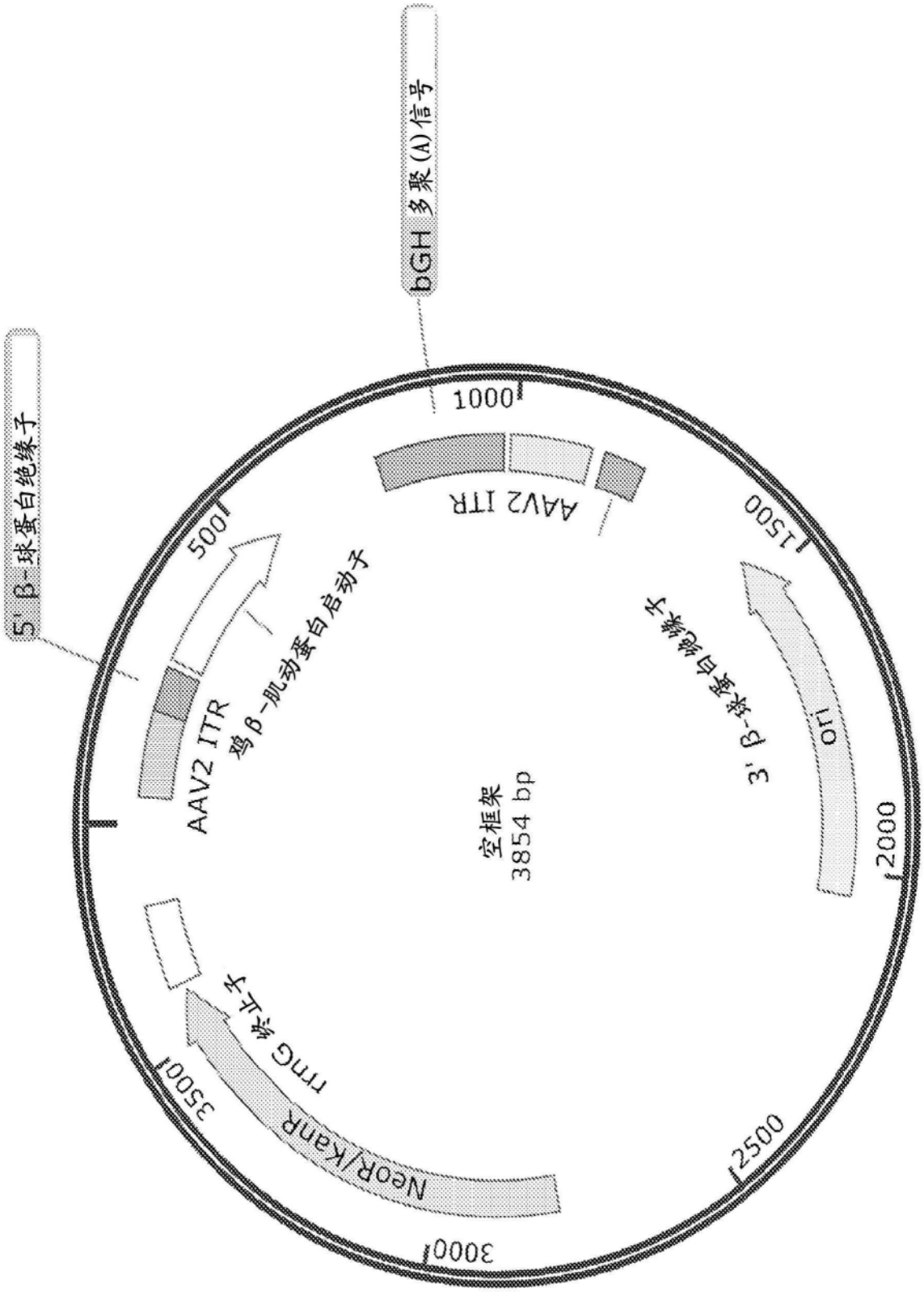

bGH 多聚(A)信号
5' β-球蛋白绝缘子
1000
AAV2 ITR
500
1500
鸡β-肌动蛋白启动子
AAV2 ITR
3' β-球蛋白绝缘子
空框架
3854 bp
ori
2000
trnG 启动子
3500
Neor/kanr
2500
3000

图3A

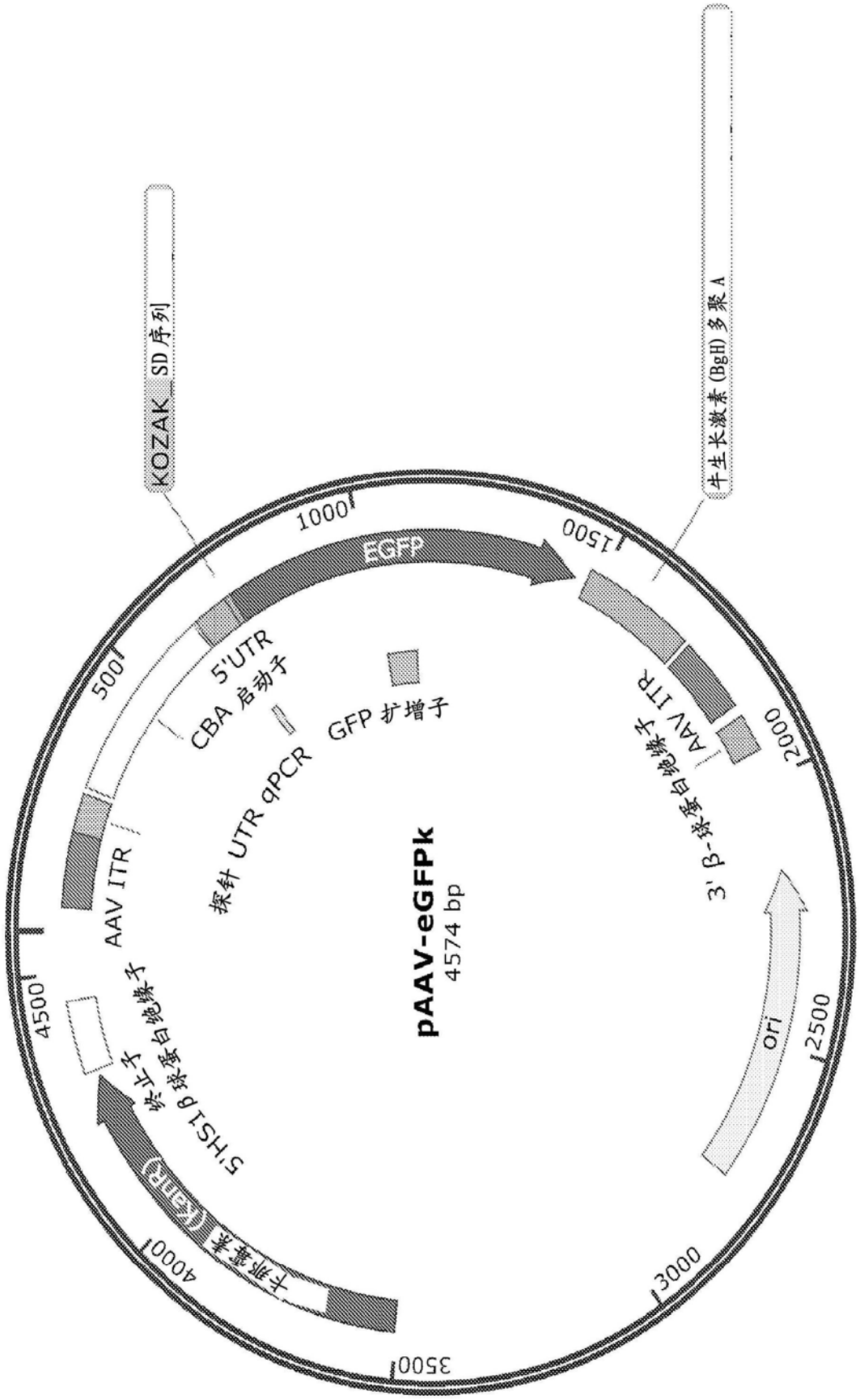

KOZAK_SD 序列
牛生长激素 (BgH) 多聚 A
1000
1500
EGFP
500
5'UTR
CBA 启动子
探针 UTR qPCR
GFP 扩增子
AAV ITR
3' β-球蛋白绝缘子
2000
pAAV-eGFPk
4574 bp
4500
终止子
5'HS1 β 球蛋白绝缘子
ori
2500
卡那霉素
4000
3000
3500

图3B

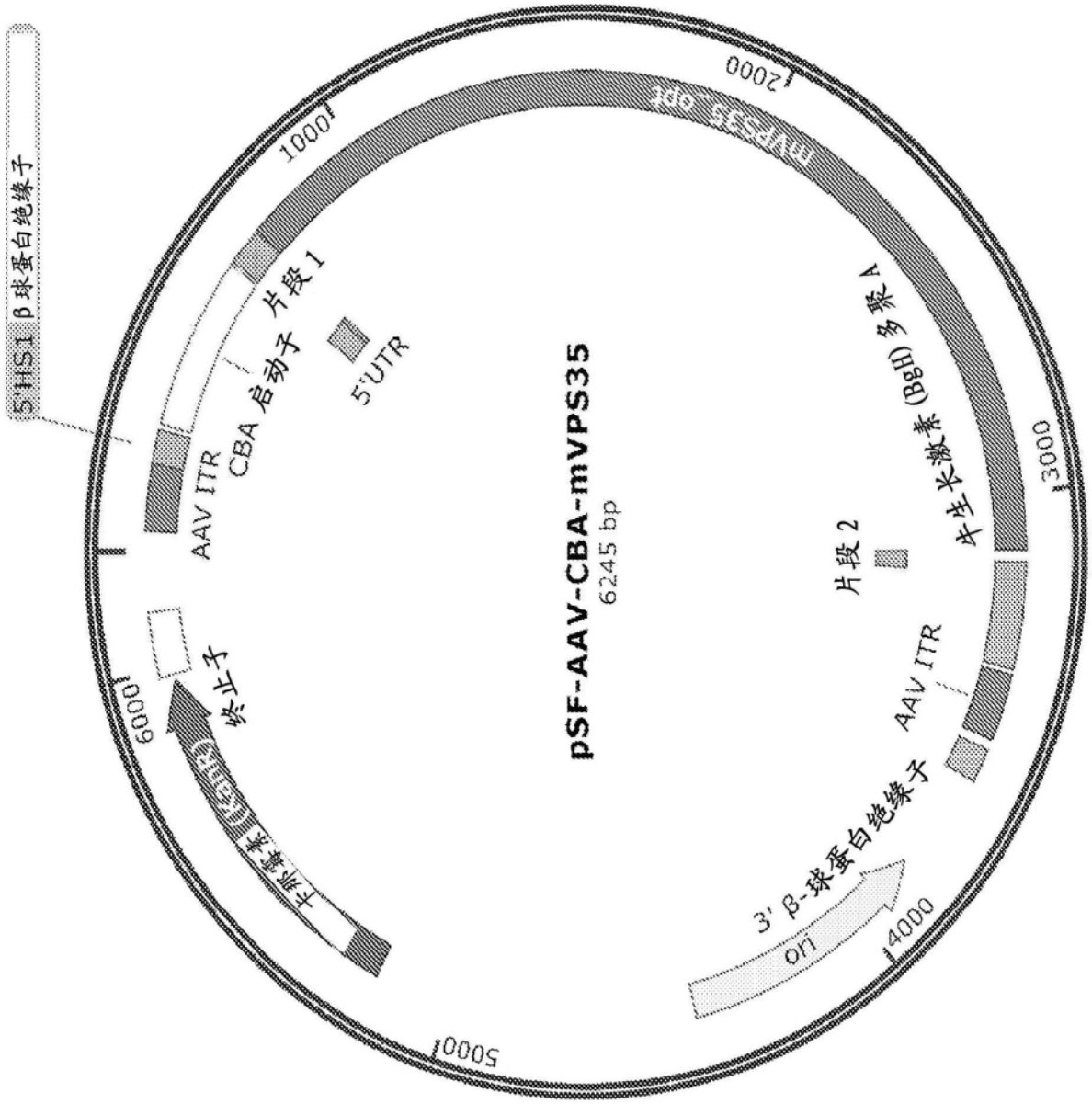

pSF-AAV-CBA-mVPS35
6245 bp
5'HS1 β球蛋白绝缘子
AAV ITR
CBA 启动子
片段 1
5'UTR
mVPS35_opt
片段 2
牛生长激素 (BGH) 多聚 A
AAV ITR
3' β-球蛋白绝缘子
ori
卡那霉素
终止子
1000
2000
3000
4000
5000
6000

图3C

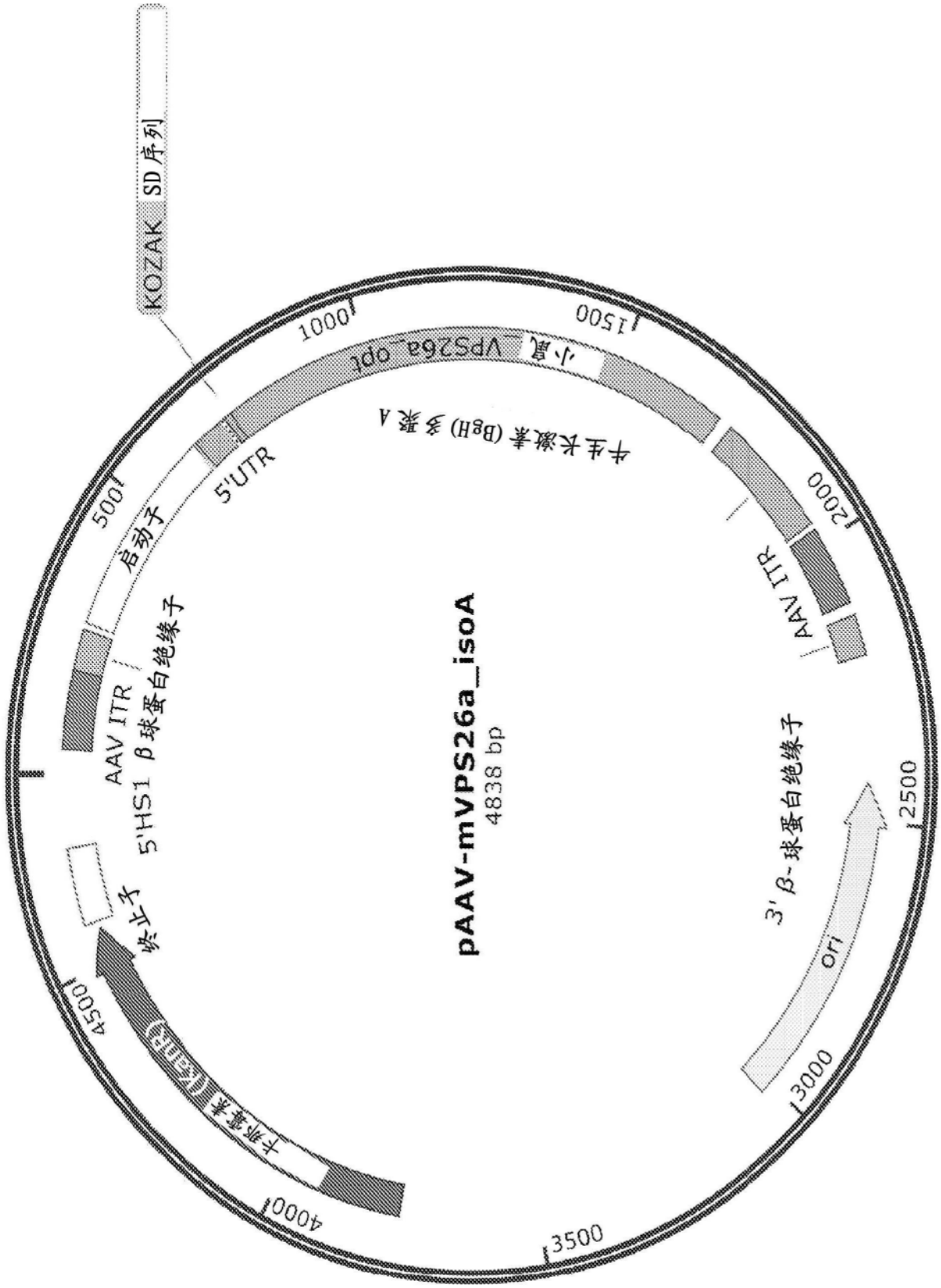

KOZAK
SD序列
1000
1500
小鼠 VPS26a_opt
牛生长激素 (BgH) 多聚 A
2000
AAV ITR
3' β-球蛋白绝缘子
2500
ori
3000
3500
卡那霉素 (Kan/Neo)
4000
4500
终止子
AAV ITR
5'HS1 β球蛋白绝缘子
启动子
5'UTR
500
pAAV-mVPS26a_isoA
4838 bp

图3D

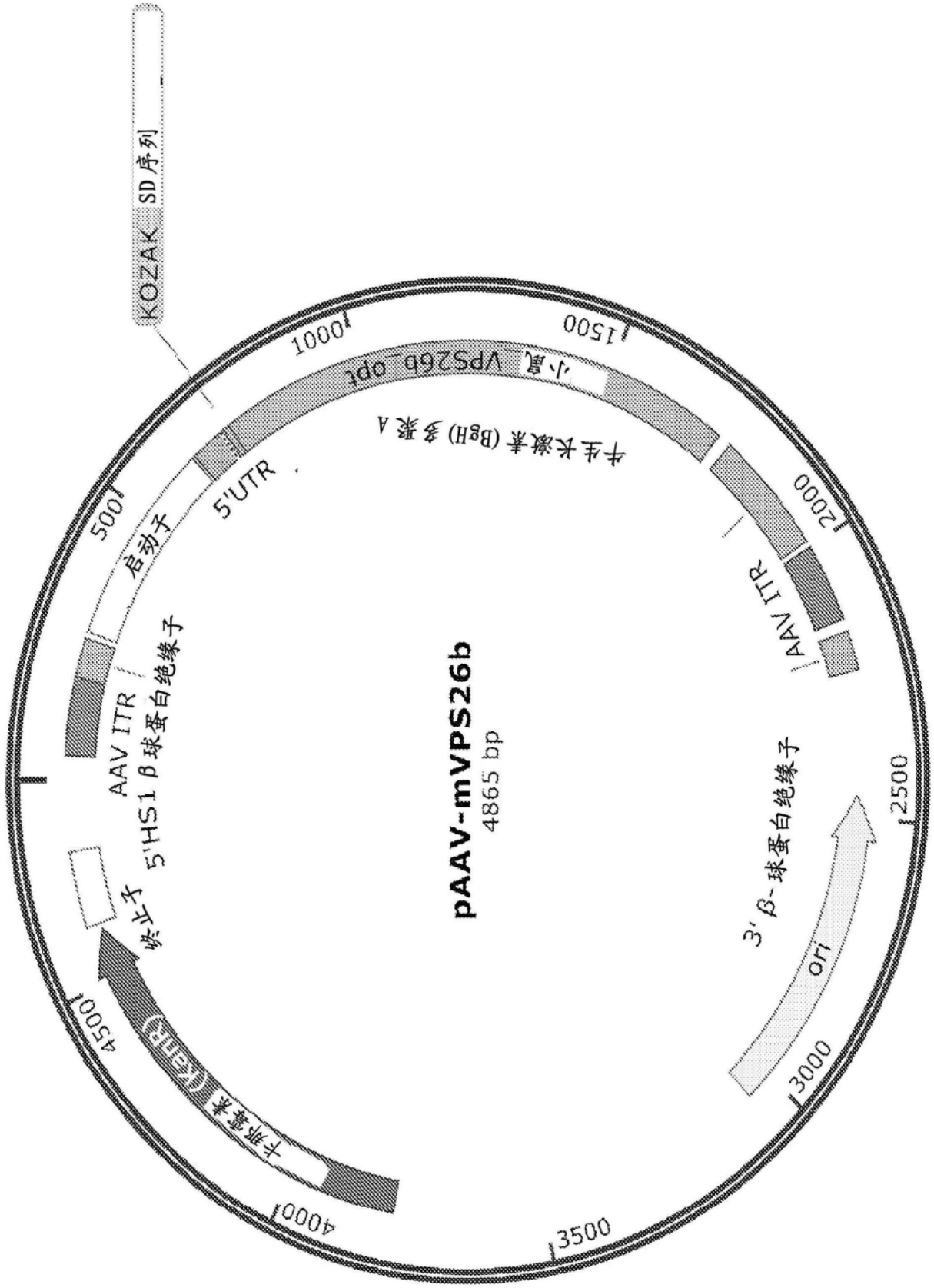

KOZAK
SD序列
1000
1500
小鼠 VPS26b opt
牛生长激素 (BgH) 多聚 A
5'UTR
500
启动子
AAV ITR
5'HS1 β球蛋白绝缘子
2000
AAV ITR
pAAV-mVPS26b
4865 bp
3' β-球蛋白绝缘子
2500
ori
3000
终止子
4500
卡那霉素
4000
3500

图3E

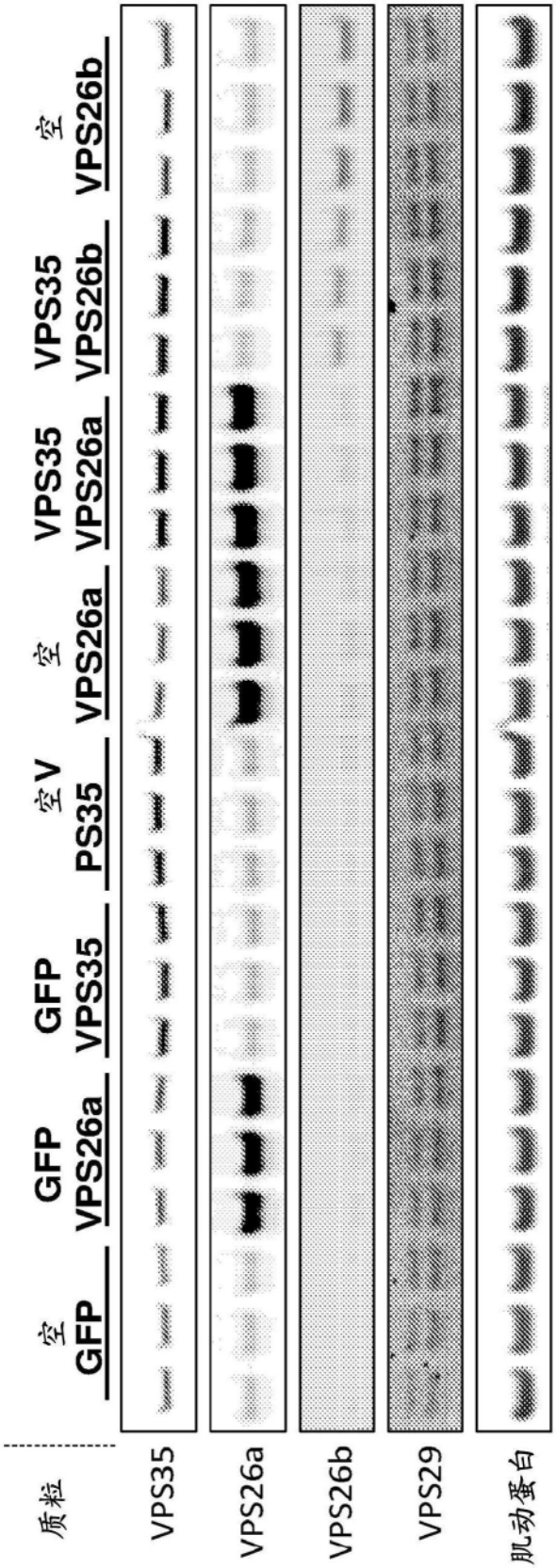

质粒
空
GFP
GFP
VPS26a
GFP
VPS35
空V
PS35
空
VPS26a
VPS35
VPS26a
VPS35
VPS26b
空
VPS26b
VPS35
VPS26a
VPS26b
VPS29
肌动蛋白

图4A

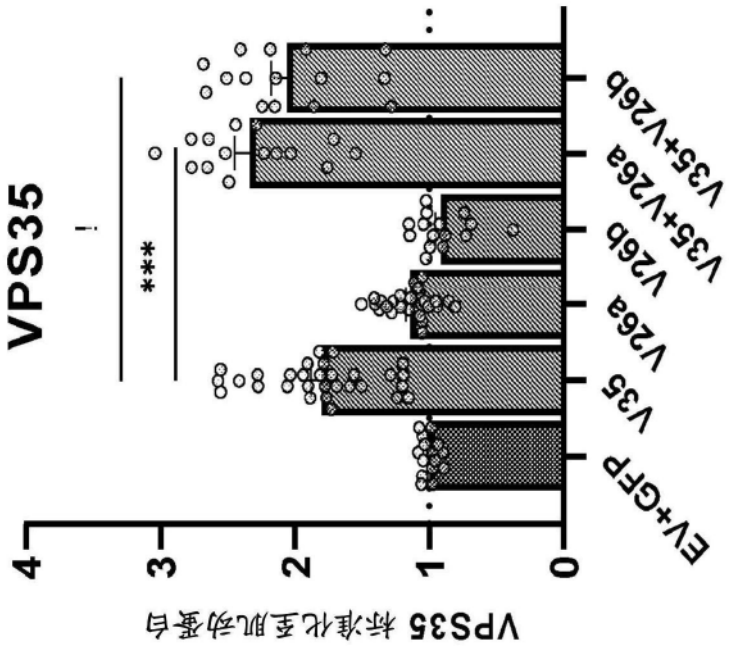

VPS35
***
EV+GFP
V35
V26a
V26b
V35+V26a
V35+V26b
0
1
2
3
4
VPS35 标准化至肌动蛋白

图4B

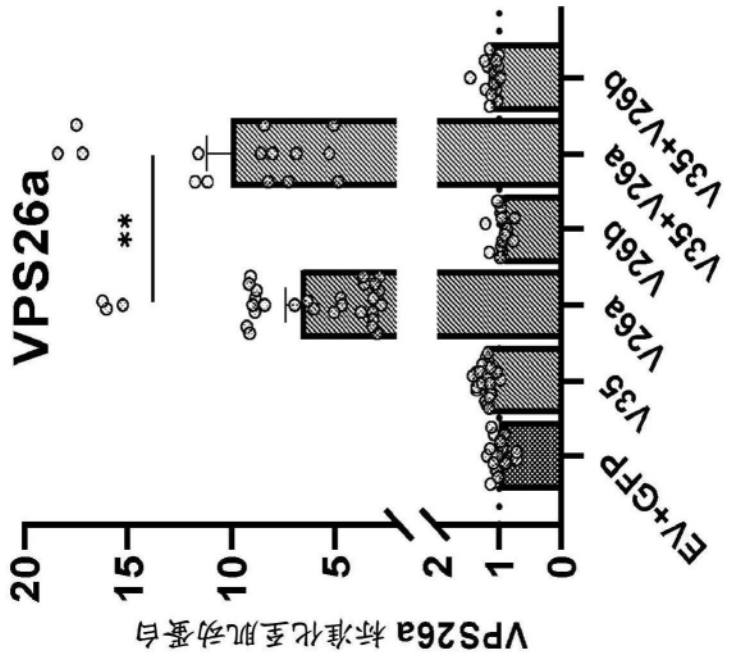

VPS26a
**
EV+GFP
V35
V26a
V26b
V35+V26a
V35+V26b
0
1
2
5
10
15
20
VPS26a 标准化至肌动蛋白

图4C

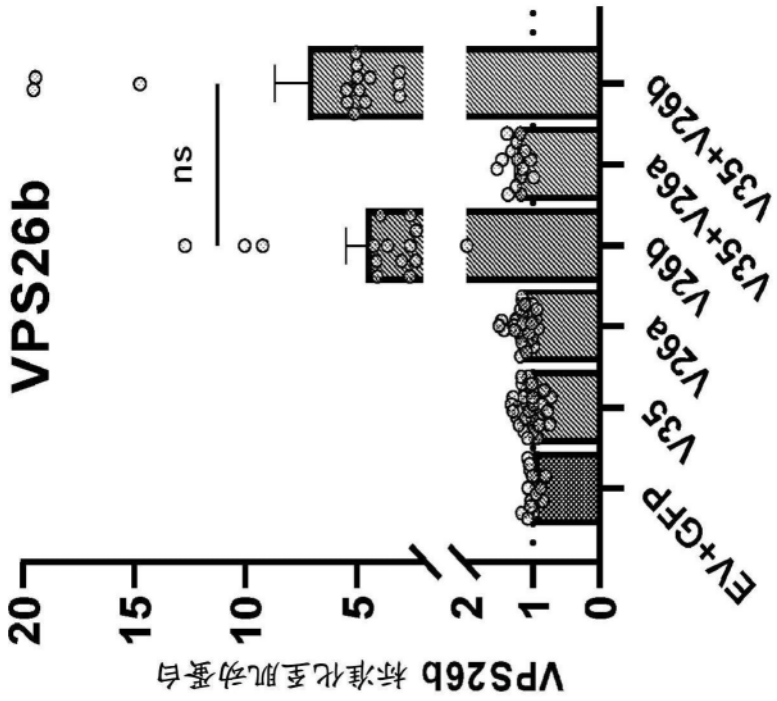

VPS26b
ns
VPS26b 标准化至肌动蛋白
20
15
10
5
2
1
0
EV+GFP
V35
V26a
V26b
V35+V26a
V35+V26b

图4D

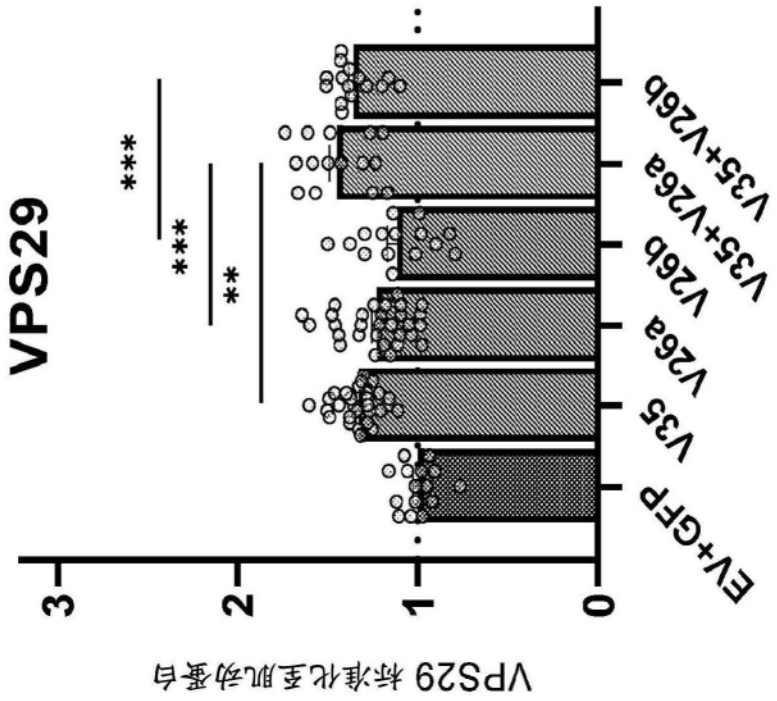

VPS29
***
***
**
VPS29 标准化至肌动蛋白
3
2
1
0
EV+GFP
V35
V26a
V26b
V35+V26a
V35+V26b

图4E

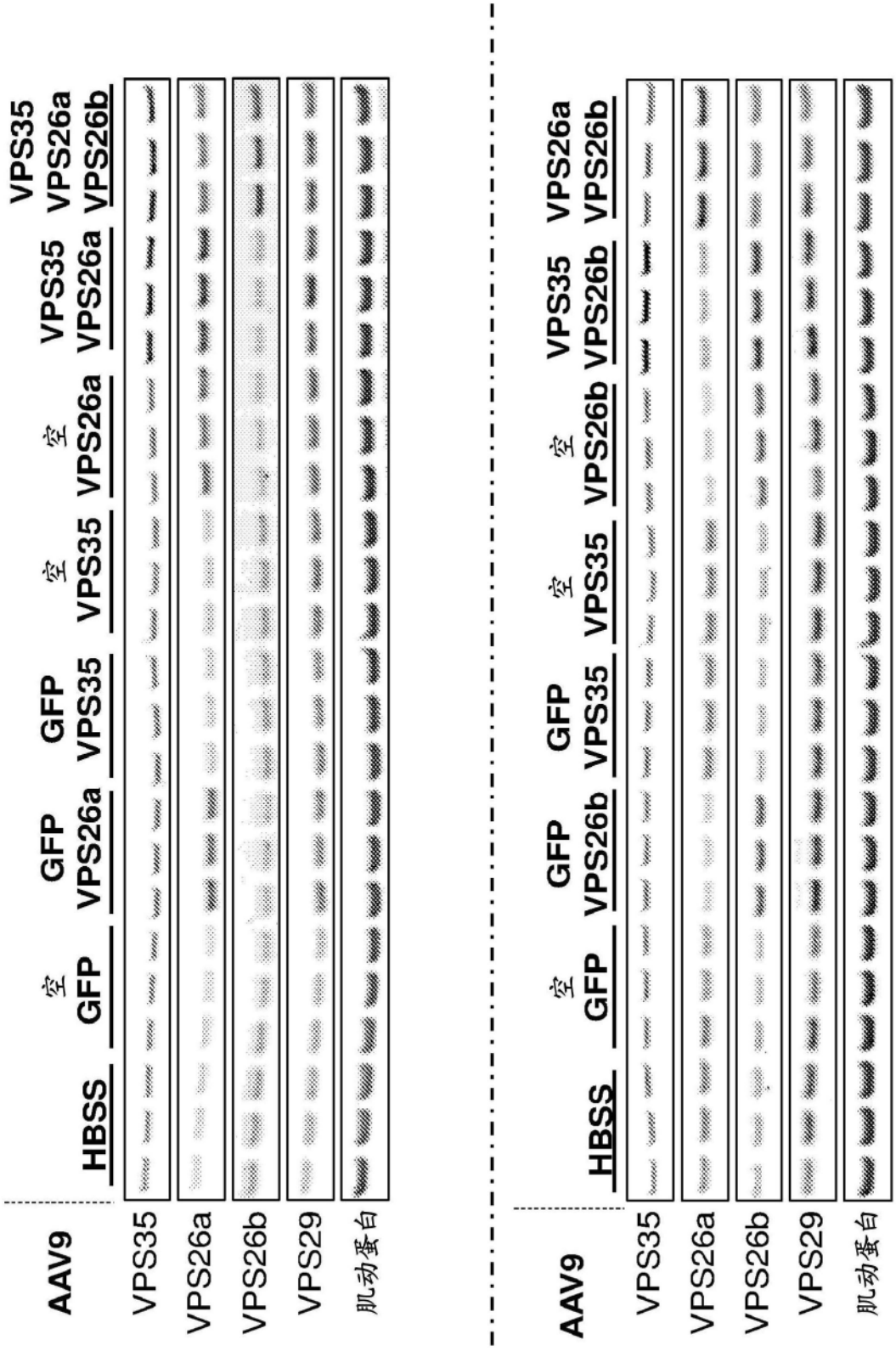

AAV9
HBSS
空
GFP
GFP VPS26a
GFP VPS35
空 VPS35
空 VPS26a
VPS35 VPS26a VPS26b
VPS35
VPS26a
VPS26b
VPS29
肌动蛋白
AAV9
HBSS
空
GFP
GFP VPS26b
GFP VPS35
空 VPS35
空 VPS26b
VPS35 VPS26b
VPS26a VPS26b
VPS35
VPS26a
VPS26b
VPS29
肌动蛋白

图5a

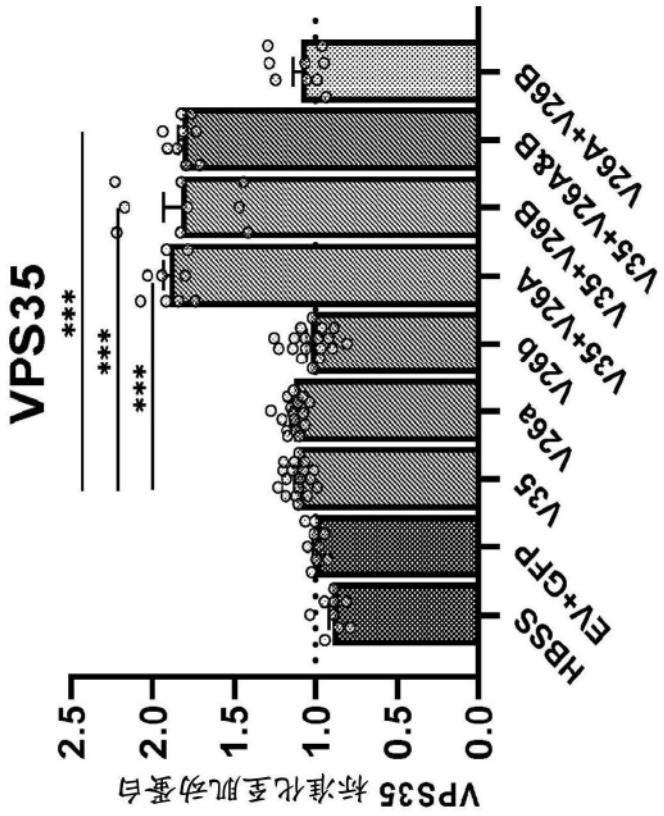

VPS35
***
***
***
HBSS
EV+GFP
V35
V26a
V26b
V35+V26A
V35+V26B
V35+V26A&B
V26A+V26B
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
VPS35 标准化至肌动蛋白

图5B

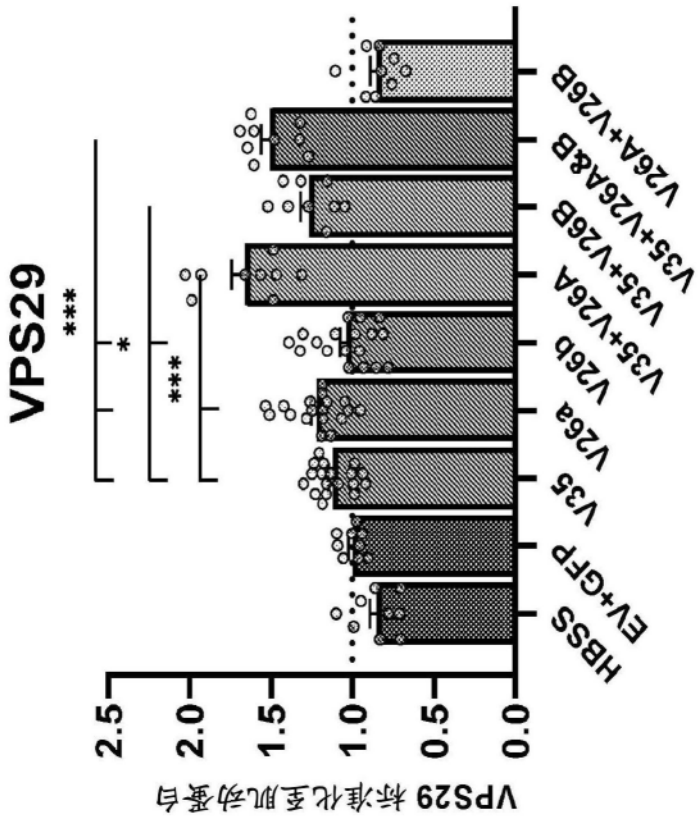

VPS29
***
*
***
HBSS
EV+GFP
V35
V26a
V26b
V35+V26A
V35+V26B
V35+V26A&B
V26A+V26B
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
VPS29 标准化至肌动蛋白

图5C

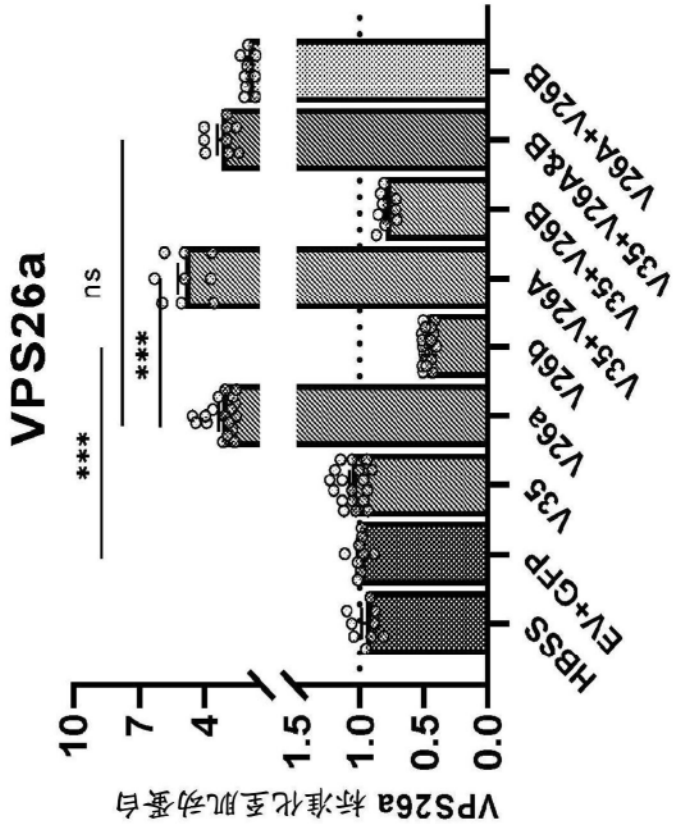

VPS26a
ns
***
***
HBSS
EV+GFP
V35
V26a
V26b
V35+V26A
V35+V26B
V35+V26A&B
V26A+V26B
10
7
4
1.5
1.0
0.5
0.0
VPS26a 标准化至肌动蛋白

图5D

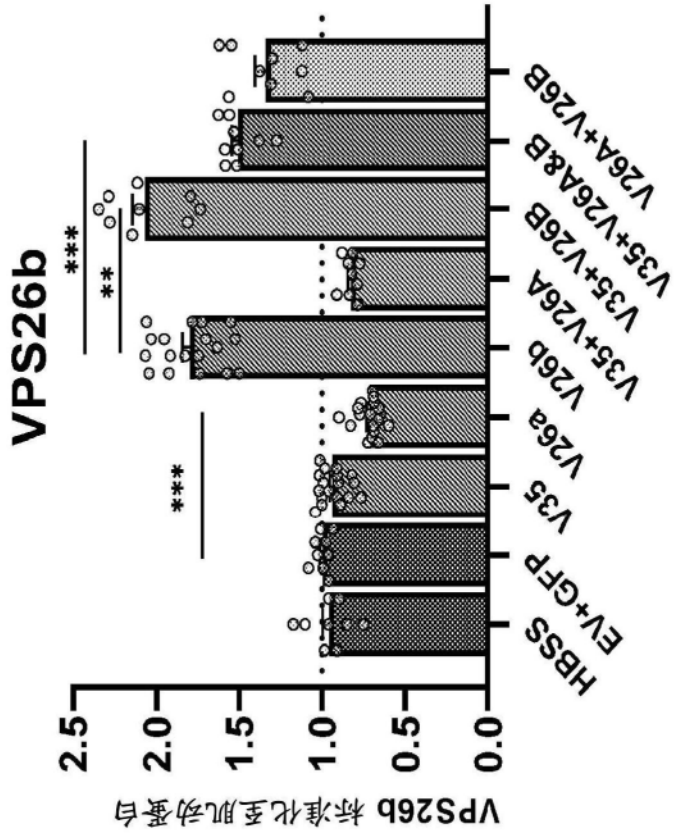

VPS26b
***
**
***
HBSS
EV+GFP
V35
V26a
V26b
V35+V26A
V35+V26B
V35+V26A&B
V26A+V26B
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
VPS26b 标准化至肌动蛋白

图5E

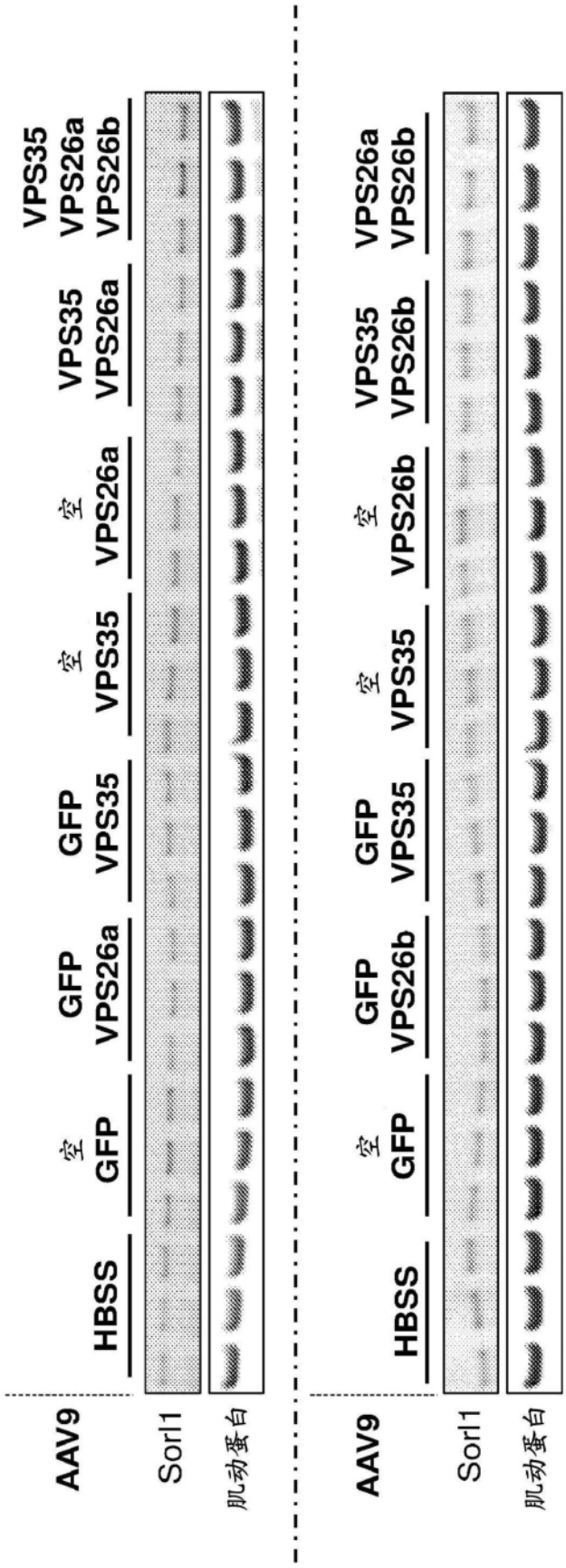

AAV9
HBSS
空
GFP
GFP
VPS26a
GFP
VPS35
空
VPS35
空
VPS26a
VPS35
VPS26a
VPS26b
Sorl1
肌动蛋白
AAV9
HBSS
空
GFP
GFP
VPS26b
GFP
VPS35
空
VPS35
空
VPS26b
VPS35
VPS26b
VPS26a
VPS26b
Sorl1
肌动蛋白

图6A

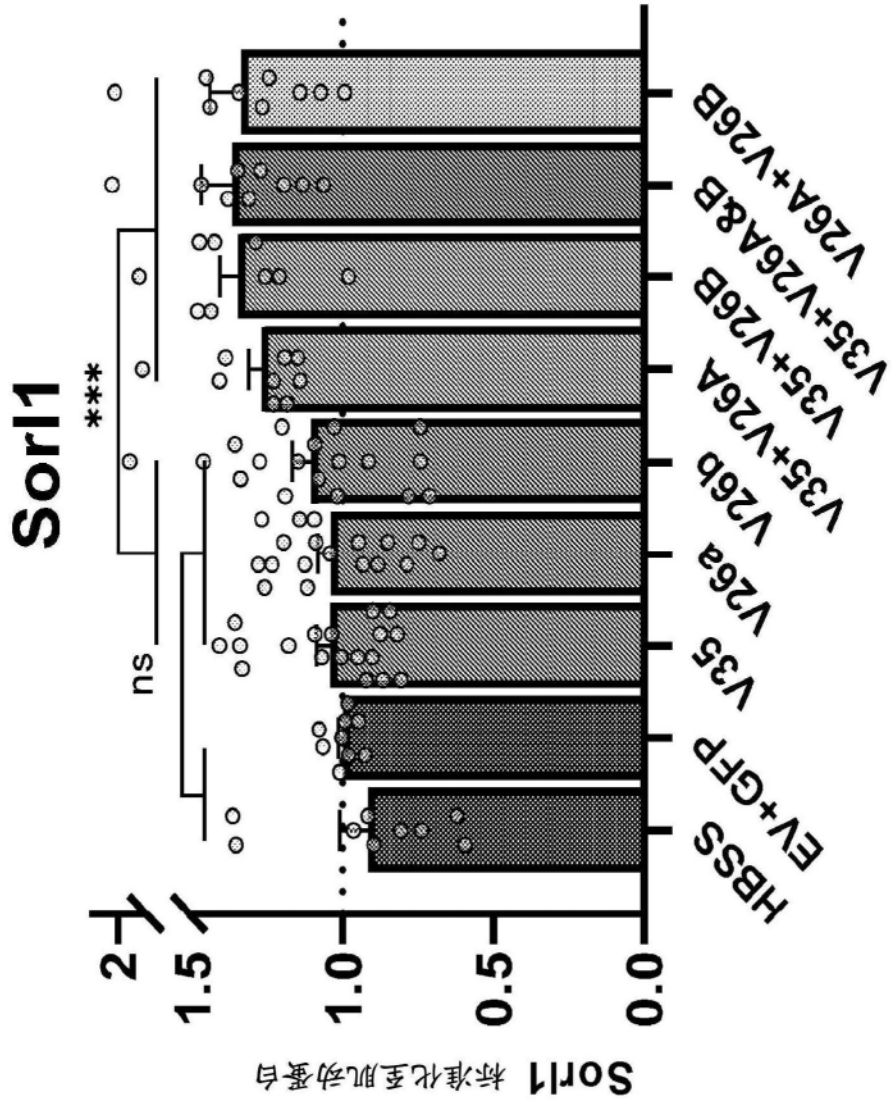

Sorl1
****
ns
HBSS
EV+GFP
V35
V26a
V26b
V35+V26A
V35+V26B
V35+V26A&B
V26A+V26B
2
1.5
1.0
0.5
0.0
Sorl1 标准化至肌动蛋白

图6B

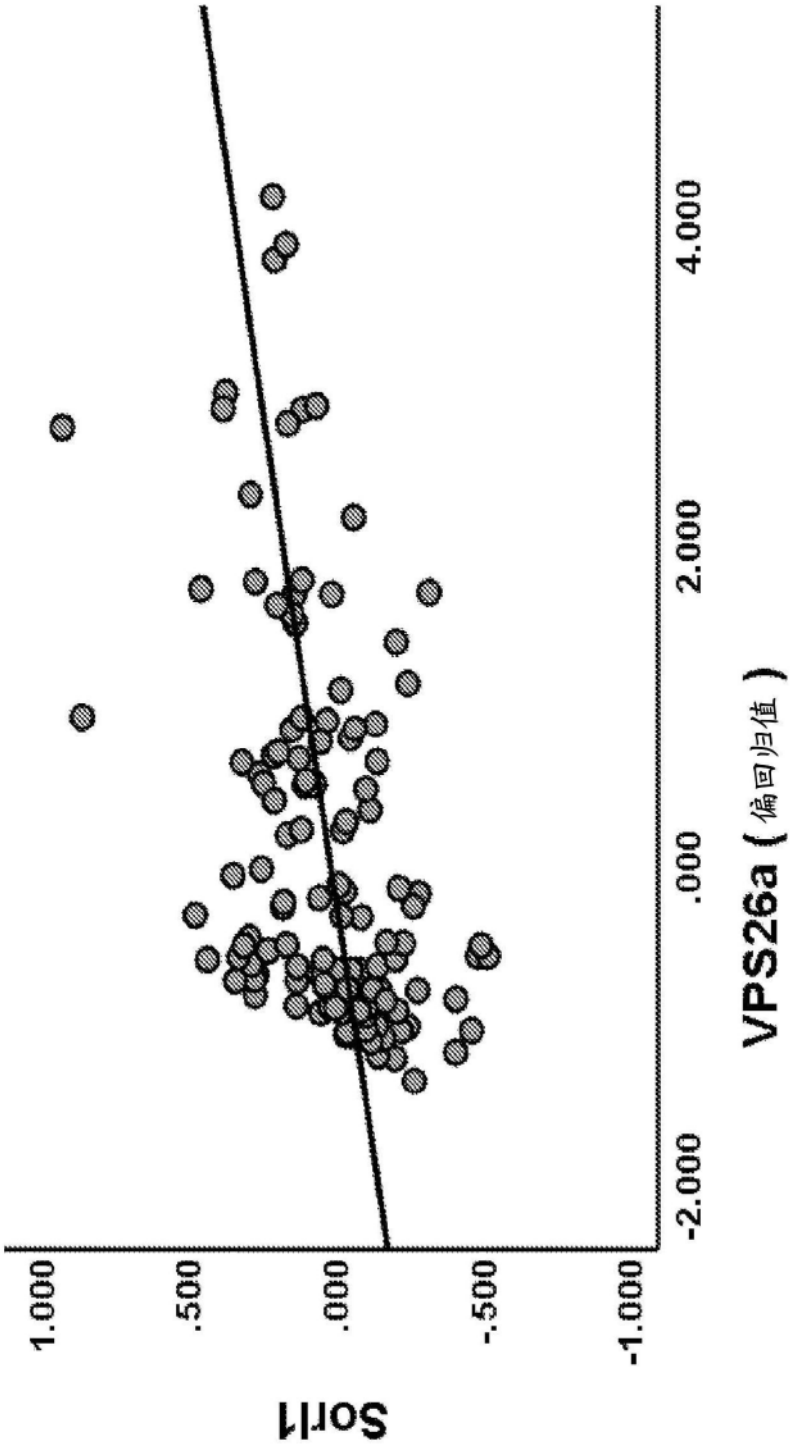


图6C

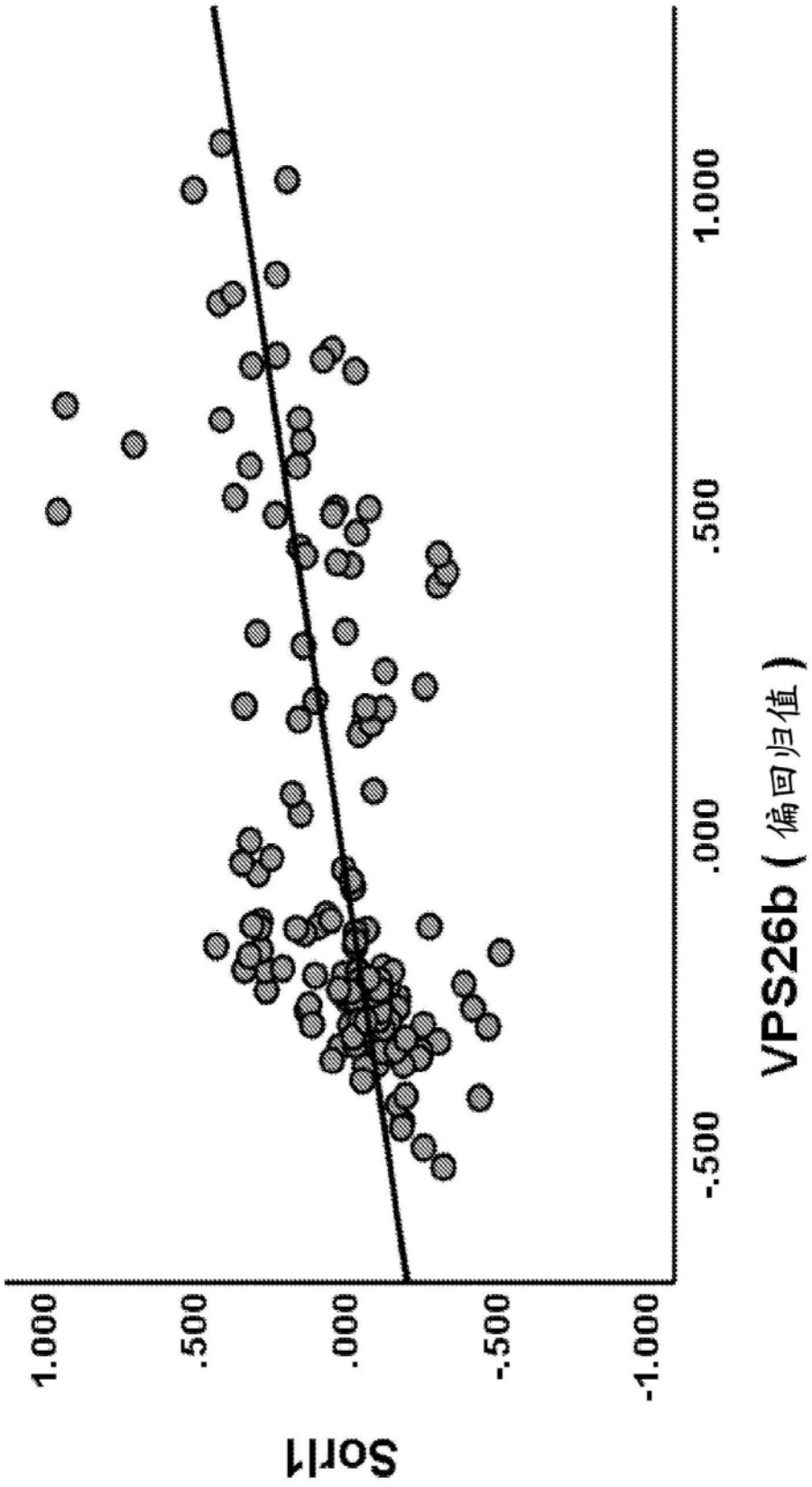


图6D