



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112673107 A

(43) 申请公布日 2021.04.16

(21) 申请号 201980054948.6

(22) 申请日 2019.08.30

(30) 优先权数据

62/724,780 2018.08.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.02.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/048985 2019.08.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/047368 EN 2020.03.05

(71) 申请人 罗文大学

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 杰里米·弗朗西斯 保罗·莱昂

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

*C12N 15/86* (2006.01)

*A61K 48/00* (2006.01)

*A61K 38/50* (2006.01)

*A61P 25/00* (2006.01)

权利要求书2页 说明书30页

序列表2页 附图9页

(54) 发明名称

治疗或防止肌萎缩性侧索硬化症的方法

(57) 摘要

本公开提供了用于借助于通过施用治疗有效量的组合物增加脊髓中的神经元天冬氨酸的量来治疗、改善或逆转受试者的肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的至少一种症状的方法,所述组合物包括编码ASPA或其功能片段的核酸。

1. 一种增加有患ALS的风险或患有ALS的受试者的脊髓中的神经元天冬氨酸的量的方法,所述方法包括:通过针对ALS筛选所述受试者来标识所述受试者,以及向所述受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包括编码ASPA或其功能片段的核酸,所述核酸具有与SEQ ID NO:1的序列至少75%相同的氨基酸序列,所述核酸在重组腺相关病毒(rAAV)载体上载运。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述rAAV载体为AAV9。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述组合物的施用增加了脊髓组织中的NAA分解代谢并增强了所述受试者的运动神经元存活。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用第二治疗剂。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述第二治疗剂在所述组合物之前、之后施用于所述受试者或与所述组合物同时施用于所述受试者。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述第二治疗剂为利鲁唑(Riluzole)、依达拉奉(Edaravone)或其盐或溶剂化物或其组合。

7. 一种治疗、改善或逆转有需要的受试者的肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的至少一种症状、标识需要增加细胞内天冬氨酸水平的患者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的增加所述受试者的至少一个细胞中的天冬氨酸酰化酶(ASPA)的水平或活性的组合物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述组合物包括基因疗法组合物。

9. 根据权利要求7或8所述的方法,其中所述组合物包括编码ASPA或其功能片段的核酸,所述核酸具有与SEQ ID NO:1的序列至少75%相同的氨基酸序列。

10. 根据权利要求7所述的方法,其中编码ASPA或其片段的所述核酸包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

11. 根据权利要求7或8所述的方法,其包括通过病毒转导将所述核酸引入到所述受试者的所述至少一个细胞。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述组合物提供有包括所述核酸的病毒或病毒样颗粒。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述核酸在重组腺相关病毒(rAAV)载体上载运。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述rAAV载体为AAV9。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中施用组合物增加了所述受试者的细胞中的ASPA的蛋白质表达水平。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其包括向所述受试者的脊髓的至少一部分施用所述组合物。

17. 根据权利要求16所述的方法,其包括向所述受试者的脊髓的所述部分局部施用所述组合物。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用第二治疗剂。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述第二治疗剂在所述组合物之前、之后施用于所述受试者或与所述组合物同时施用于所述受试者。

20. 根据权利要求12或13所述的方法,其中所述第二治疗剂为利鲁唑、依达拉奉或其盐

或溶剂化物或其组合。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述组合物通过选自口服、肠胃外、经皮、肺部、鼻内、颊、鞘内和静脉内的途径施用。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述组合物通过鞘内途径施用。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述受试者为哺乳动物。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述哺乳动物为人类。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述至少一个细胞处于所述受试者的脊髓中。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中ALS的所述至少一种症状为线粒体功能障碍。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述组合物的施用增强了用于所述受试者的能量代谢的底物。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述组合物的施用增加了所述受试者的细胞存活。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述组合物的施用增加了所述受试者的运动神经元存活。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述组合物的施用延长了所述受试者的预期寿命。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述组合物的施用增加了脊髓神经元的线粒体区中的NAA分解代谢的水平。

32. 一种用于增加受试者的细胞中的ASPA的水平或活性的试剂盒, 所述试剂盒包括rAAV载体或病毒样颗粒, 其中病毒或所述病毒样颗粒包括编码ASPA或其功能片段的核酸, 所述核酸具有与SEQ ID NO:1的序列至少75%相同的氨基酸序列。

33. 根据权利要求32所述的试剂盒, 其中编码ASPA或其片段的所述核酸包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

34. 根据权利要求32或33所述的试剂盒, 其中所述rAAV载体为AAV9。

35. 一种增加有患ALS的风险或患有ALS的受试者的脊髓线粒体中的NAA分解代谢的方法, 所述方法包括: 标识所述受试者, 以及向所述受试者施用治疗有效量的组合物, 所述组合物包括编码ASPA或其功能片段的核酸, 所述核酸具有与SEQ ID NO:1的序列至少75%相同的氨基酸序列, 所述核酸在重组腺相关病毒(rAAV)载体上载运。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述rAAV载体为AAV9。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述组合物的施用增加了所述受试者的运动神经元存活。

38. 根据权利要求37所述的方法, 其进一步包括向所述受试者施用第二治疗剂。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其中所述第二治疗剂在所述组合物之前、之后施用于所述受试者或与所述组合物同时施用于所述受试者。

40. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述第二治疗剂为利鲁唑、依达拉奉或其盐或溶剂化物或其组合。

## 治疗或防止肌萎缩性侧索硬化症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119(e) 要求2018年8月30日提交的美国临时专利申请第62/724,780号的优先权。前述申请通过引用并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明总体上涉及治疗或防止肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 的方法,并且更具体地涉及通过出于提供天冬氨酸的目的,增加受影响的细胞群体中的天冬氨酸酰化酶 (ASPA) 的细胞内活性来治疗、缓解、改善或逆转ALS的方法,所述天冬氨酸是苹果酸-天冬氨酸穿梭的为受影响的细胞提供利用细胞质NADH来促进线粒体氧化磷酸化的能力的速率限制组分。

### 背景技术

[0004] 肌萎缩性侧索硬化症 (ALS),也被称为运动神经元疾病 (MND) 或路盖里格氏 (Lou Gehrig's) 病,是导致控制随意肌的神经元死亡的疾病。其特征为进行性功能障碍的成年发作、运动皮层中的上运动神经元以及脑干、脊髓和其相关联的道中的下运动神经元的丧失。患有ALS或有风险的患者呈现出肌肉僵硬、肌肉抽搐,并且由于肌肉大小减小无力感逐渐恶化。这导致难以说话、吞咽以及最终难以呼吸。

[0005] 尚无对ALS的治疗,但是,FDA已批准了两种专门旨在减缓ALS的进展的治疗。利鲁唑 (Riluzole) (**Rilutek®**),FDA批准的针对ALS的第一药物可以将呈现出延髓发作的有限临床群体的寿命延长约二到三个月。依达拉奉 (Edaravone) (**Radicava®**)是FDA批准的针对ALS的另一治疗选项,其静脉内施用。临床数据表明,与对照安慰剂组相比,ALS功能评定量表 (ALSFRS-R) 得分有所提高。然而,依达拉奉在患有ALS的患者中的长期功效尚未确定。无创通气可以改善生命的质量和长度两者,但在本质上严格来说是治标的。所述疾病可能影响任何年龄的人,但通常开始于60岁左右,并且在遗传性病例中开始于50岁左右。从发作到死亡的平均存活率为2-4年。约10%存活超过10年,其中大部分死于呼吸衰竭。

[0006] 因此,本领域仍然迫切需要提供用于防止、治疗或逆转ALS的方法和药剂。

### 发明内容

[0007] 本公开解决了以上多个方面提到的需要。在一方面,本公开提供了一种治疗、改善或逆转有需要的受试者的肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 的至少一种症状的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物增加所述受试者的细胞中的天冬氨酸酰化酶 (ASPA) 的水平或活性,目的是提供用于线粒体氧化磷酸化的底物。在一些实施例中,施用组合物增加了所述受试者的所述细胞中的ASPA的蛋白质表达水平。

[0008] 在一些实施例中,所述组合物包括基因疗法组合物。在一些实施例中,所述组合物可以包含编码ASPA或其功能片段的核酸,所述核酸具有与SEQ ID NO:1的序列至少75%、85%、95%、99%相同的氨基酸序列。

[0009] 在一些实施例中,所述方法包括通过病毒转导将所述核酸引入到所述受试者的至

少一个细胞。所述组合物可以提供有包括所述核酸的病毒或病毒样颗粒。在一些实施例中，所述核酸在重组腺相关病毒 (rAAV) 载体，如AAV9上载运。

[0010] 在一些实施例中，所述方法包括向所述受试者的脊髓的至少一部分施用所述组合物。在一些实施例中，所述组合物局部施用于所述受试者的脊髓的所述一部分。

[0011] 在一些实施例中，所述方法进一步包括向所述受试者施用第二治疗剂。所述第二治疗剂可以在所述组合物之前、之后施用于所述受试者或与所述组合物同时施用于所述受试者。在一些实施例中，所述第二治疗剂为利鲁唑 (6- (三氟甲氧基) -2-苯并噻唑胺) 或其盐或溶剂化物。在一些实施例中，所述第二治疗剂为依达拉奉 (5-甲基-2-苯基-4H-吡唑-3-酮) 或其盐或溶剂化物。在一些实施例中，所述组合物可以通过选自口服、肠胃外、经皮、肺部、鼻内、颊内、鞘内和静脉内的途径施用。

[0012] 在一些实施例中，所述受试者为哺乳动物，如人类。在一些实施例中，至少一个细胞处于所述受试者的脊髓中。在一些实施例中，所述受试者表现出与ALS相关联的至少一种症状或突变。在一些实施例中，ALS的至少一种症状为线粒体功能障碍。线粒体结构、动力学和生物能学的破坏被广泛报道处于ALS患者和模型系统中，并已经表明直接涉及疾病发病机制。

[0013] 在一些实施例中，所述组合物的施用将增强用于所述受试者的线粒体能量代谢的底物。在一些实施例中，所述组合物的施用增加了所述受试者的细胞存活。在一些实施例中，所述组合物的施用增加了所述受试者的运动神经元存活。在一些实施例中，所述组合物的施用延长了所述受试者的预期寿命。

[0014] 同样在本公开的范围内的是一种用于增加受试者的细胞中的ASPA的水平或活性的试剂盒。所述试剂盒包括rAAV载体或病毒样颗粒，其中病毒或所述病毒样颗粒包括编码ASPA或其功能片段的核酸，所述核酸具有与SEQ ID NO:1的序列至少75%、85%、95%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施例中，编码ASPA或其片段的所述核酸包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些实施例中，所述rAAV载体为AAV9。

## 附图说明

[0015] 出于说明本发明的目的，在附图中描绘了本发明的某些实施方式。然而，本发明不限于在附图中描绘的实施例的精确布置以及手段。对于附图中呈现的数据，星号表示以下水平的统计显著性： $*p \leq 0.05$ ； $**p < 0.01$ ；以及 $***p \leq 0.001$ 。

[0016] 图1示出了在40天后在体外使用确立的方法从ALS患者来源的iPSC中分化的神经元。(Kiskinis等人, 2014,《细胞干细胞 (Cell Stem Cell)》)。细胞对神经元标志物TuJ-1和运动神经元标志物胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 为阳性。

[0017] 图2示出了用AAV-ASPA治疗之后的线粒体三磷酸腺苷 (ATP) 合成。在第28天，在培养物中用腺相关病毒载体 (AAV) 转导了从ALS iPSC生成的运动神经元培养物，以递送ASPA或GFP。在第40天，从细胞中分离出完整的线粒体并且针对ATP合成对所述完整线粒体进行了测定。对原始野生型、非ALS细胞 (WT)、原始ALS SOD1突变细胞 (ALS)、AAV-GFP SOD1突变细胞 (ALS GFP) 和AAV-ASPA SOD1突变细胞 (ALS ASPA) 进行了测定 ( $n=5$ /组)。相对于AAV-GFP阴性对照，在经AAV-ASPA处理的ALS细胞中观察到ATP合成速率 (分离的线粒体的每jig每分钟j<sub>i</sub>M ATP, 每反应使用15jig) 的1.5倍显著增加。 $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ 。

[0018] 图3示出了NAA含有衍生自糖酵解的乙酰辅酶A (AcCoA) 和天冬氨酸,所述天冬氨酸用于将细胞质还原等价物 (NADH) 转移到内部线粒体膜。两者都是用于线粒体ATP合成的底物,其中天冬氨酸在通过电子输送链的复合物I-V将糖酵解与氧化磷酸化连接中起着关键作用。因此,释放受神经退行性病理学影响的神经元中的此底物将增强能量储备。

[0019] 图4A、4B、4C和4D (统称为“图4”) 示出了用于代谢基因疗法的靶向神经元。将表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的AAV报告载体递送到成年小鼠的海马体。图4A示出了用神经元核抗原 (NeuN) 的抗体标记的GFP表达神经元的低功率共聚焦显微术图像。图4B示出了由图A中的白色箭头突出显示的更高放大率的区域,其示出了与NeuN (图4C) 共同标记以产生合并的黄色信号 (在图像的黑色和白色复制中显现为较浅的阴影) (图4D),从而体内确认神经元嗜性的单独GFP阳性细胞体。因此,可以使用合适的AAV来将任何所关注的治疗基因递送到哺乳动物大脑中的神经元,其程度为可以将其适当地封装。使用公开的方法生成数据 (Francis等人,2006,《神经科学研究杂志 (Journal of Neuroscience Research)》84 (1):151-169; Francis等人,2011,《神经胶质 (Glia)》59 (10):1435-1446)。

[0020] 图5示出了使用基因疗法靶向突触功能。由AAV递送的重组ASPA分解代谢的内源性NAA导致用于能量代谢的底物的增加以及用于支持神经元中的突触传输的可用ATP的增加。

[0021] 图6示出了借助于通过天冬氨酸转氨酶将氢离子转移到天冬氨酸将由胞质中的糖酵解产生的NADH的还原能力输送到内部线粒体膜空间,以生成苹果酸。将天冬氨酸从线粒体移动到细胞质,以交换谷氨酸。然后将细胞质天冬氨酸转化为苹果酸,携带细胞质NADH的氢离子的苹果酸可以自由地移动到线粒体内。一旦进入,苹果酸就会通过苹果酸脱氢酶转化回天冬氨酸,从而释放氢离子以形成NADH,所述NADH进而可用于驱动线粒体氧化磷酸化。

[0022] 图7示出了使通过由ASPA裂解NAA产生的游离天冬氨酸可用于苹果酸-天冬氨酸穿梭 (MAS),所述MAS将通过糖酵解产生的还原NADH转移到线粒体中。由此可用的NADH驱动电子输送链复合物I-V,最终达到新合成的ATP。

[0023] 图8是用于说明驱动分离的脊髓线粒体中的氧化磷酸化和ATP合成的ASPA产生的游离天冬氨酸的方法示意图。(1) 用组成表达的野生型人ASPA (WT) 或无功能突变同种型 (E285A) 的质粒对60mm培养皿的海拉 (HeLa) 细胞进行转染。(2) 48小时之后收获经转染的细胞,并通过超声处理对经转染的细胞进行机械裂解。(3) 将50 $\mu$ l的裂解物添加到含有5mM经纯化的NAA的反应混合物中并且在37 $^{\circ}$ C下温育2小时,以允许经转染的ASPA酶分解代谢NAA底物。(4) 对分解代谢反应进行热灭活,并且将50 $\mu$ l添加到反应混合物中的分离的线粒体中,以用于基于发光的ATP合成测定。

[0024] 图9示出了从G93A SOD脊髓分离并与衍生自野生型经ASPA转染的、经E285A ASPA转染的或经盐水处理的海拉细胞的反应混合物温育的线粒体中ATP合成的速率,如图8中示意性地概述的。添加野生型ASPA促进的反应产物导致ATP合成速率的显著提高 ( $p=0.039$ ),所述ATP合成速率与等分试样的天冬氨酸含量成正比 (见表1)。

[0025] 图10示出了在用鞘内施用的AAV9-ASPA的任一种盐水处理的SOD G93A突变小鼠中,12-16周龄的平均潜伏期。呈现了3个独立试验的均值,平均误差为均值 ( $n=15$ /组)。

[0026] 图11A和11B (统称为“图11”) 示出了野生型、经盐水处理的SOD和经AAV9-ASPA处理的SOD 16周龄小鼠脊髓中的NAA和三磷酸腺苷 (ATP):单磷酸腺苷 (AMP) 的比率 (以下称为ATP:AMP比率) 的HPLC分析。A). 相对于年龄匹配的野生型,在盐水SOD小鼠中观察到脊髓NAA

的显著降低,其中ATP:AMP比率相关联地减少,(B)指示NAA响应于ATP的生产相对于使用的降低的病理降低(以AMP的水平反应)。NAA的水平在经AAV9-ASPA处理的SOD脊髓中进一步降低,但是与ATP:AMP的对应增加相关联,这展示出了增加的ATP合成。

[0027] 图12示出了从野生型、经盐水处理的SOD和经AAV9-ASPA处理的SOD脊髓分离的线粒体中的ATP合成的速率。使用可商购的基于发光的试剂盒对线粒体进行了测定。从经AAV9-ASPA转导的SOD脊髓分离的线粒体中的ATP合成的速率显著优于经盐水处理的SOD脊髓线粒体,这表明通过ASPA基因疗法提供NAA衍生的天冬氨酸是增强能量代谢的有效手段,对ALS中的运动功能具有相关联的益处。呈现了平均ATP合成速率 $\pm$ sem(n=5/组)。

### 具体实施方式

[0028] 本发明一方面涉及出乎意料地发现细胞中的氨基酰化酶,如天冬氨酸酰化酶(ASPA)的增加的表达可以用于防止、治疗或恢复有需要的受试者的ALS的一种或多种症状。在某些实施例中,本发明的组合物和方法治疗或防止ALS患者的线粒体功能障碍。在其它实施例中,本发明的组合物和方法增强了用于受ALS影响的细胞中的能量代谢的底物。在又其它实施例中,本发明的组合物和方法促进ALS患者的细胞存活。在又其它实施例中,本发明的组合物和方法促进ALS患者的运动神经元存活。在又其它实施例中,脊髓中ASPA的过表达延长了ALS患者的预期寿命。在又其它实施例中,治疗利用了从诱导的多能干细胞(iPSC)产生的患者来源的运动神经元。在又其它实施例中,治疗利用了被工程化为过表达ASPA(或其功能片段)的干细胞、祖细胞或患者来源的诱导的多能干细胞(iPSC),以用于移植到患者神经系统的受影响区域中。在又其它实施例中,ASPA的表达和递送构建体的构建是离体进行的。在一些实施例中,ASPA的表达可以表现出人类肌肉组织外植体离体的退化速率与ALS受试者的那些相比降低。在另一个实施例中,治疗是针对ALS和相关病症的一次性基因疗法。

[0029] 虽然主要神经退行性疾病的病因是多因素的并且是不完全定义的,但是增强线粒体完整性的治疗策略有可能延迟更高功能的逐步丧失。特别是对于ALS,线粒体功能障碍似乎与所有与ALS相关联的假定毒性机制直接或间接相关,所述假定毒性机制包含兴奋性毒性、蛋白稳态丧失和轴突输送缺陷。尽管有所研究的不同体外和体内模型中的推测的致病机制的差异,但降低的线粒体电子输送链(ETC)活性和ATP水平在家族性和散发性ALS两者中均显现为常见特征。

[0030] 本发明提供了一种用于为ALS中的神经元供应进入被隔离在内源性氨基酸衍生物N-乙酰天冬氨酸(NAA)内的具体能量底物的方式的新颖基因疗法干预(图3)。NAA通常通过由神经胶质水解酶ASPA进行的分解代谢提供AcCoA来使脂质合成与氧化磷酸化解联,来保留发挥在蛋白质产生的神经胶质细胞中的ATP的作用。神经元不天然表达ASPA,并且因此不能够分解代谢NAA。ASPA对NAA的分解代谢得到了游离乙酸盐(通过胶质用于AcCoA的合成)和天冬氨酸。与乙酸盐不同,神经元中的天冬氨酸是穿梭机制的用于将糖酵解还原等效物转移到线粒体中的整体组分(图3),因为其为苹果酸-天冬氨酸穿梭的亚基的特性底物(Aralar1)。游离乙酸盐是神经元能量代谢的较差底物,因为与神经胶质细胞相比,能够处理乙酸盐以用于能量代谢的可用生化机制相对缺少,并且在支持神经元功能方面乙酸盐不能取代葡萄糖。实际上,对提供给神经系统的放射性标记的乙酸盐的通量的分析实际上记录了由神经胶质细胞相对于神经元的主要使用,并且乙酸盐不通过Aralar1参与细胞质

NADH向线粒体ETC的移动,即需要在细胞质中将天冬氨酸转化成苹果酸的过程。在某些非限制性实施例中,为神经元提供分解代谢内源性NAA的能力通过提供天冬氨酸以用于使糖酵解还原等价物穿梭到线粒体来促进面对病理性代谢异常的ATP储备的保存。在至少一个实施例中,本发明涉及增加天冬氨酸的有效性的方法,所述天冬氨酸用于穿梭于具有发展成ALS或患有ALS的风险的受试者中的线粒体的糖酵解还原性等物。

[0031] 腺相关病毒(AAV)已成为用于基因递送的具有确立的临床安全性和功效概况的高度有前途且有吸引力的方法,并且在靶向神经元方面极为有效。AAV载体设计和相关剂量技术的进步已实现了在大脑和脊髓中的广泛基因递送,并且使AAV非常适合于治疗神经生成性疾病。在至少一个实施例中,本发明采用AAV血清型来递送基因疗法组合物,所述基因疗法组合物包含编码ASPA或其功能片段的核酸,所述核酸具有与SEQ ID NO:1的序列至少75%、85%、95%、99%相同的氨基酸序列。

[0032] 本公开证明,在ALS的小鼠模型中的脊髓的运动神经元中表达氨基酰化酶导致了运动功能的长期改进,如通过使SOD(G93A)转基因小鼠中的旋转杆性能加速所测量的。旋转杆性能的提高与可检测的脊髓高能货币(ATP)的增加和可检测的游离天冬氨酸的增加相关联。结果指示天冬氨酸的生物利用度和线粒体功能与ETC功能以及能量货币的生成面对ALS病理的机械相关性。具体地,由于增加的ASPA活性而产生的额外生物可利用的天冬氨酸的提供被示出为促进苹果酸-天冬氨酸穿梭的活性,对于所述苹果酸-天冬氨酸穿梭,天冬氨酸是速率限制的,以用于产生ATP形式的能量货币。在至少一个实施例中,本发明方法增加了有患ALS的风险或患有ALS的受试者的脊髓中的天冬氨酸的生物利用度。

[0033] 在一方面,本公开提供了一种治疗、改善或逆转有需要的受试者的肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的至少一种症状的方法。所述方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物增加受试者的细胞中的天冬氨酸酰化酶(ASPA)的水平或活性。在一些实施例中,施用组合物增加了受试者的细胞中的ASPA的蛋白质表达水平。在又一个实施例中,本方法涉及增加患有ALS的患者的脊髓中的NAA分解代谢。

[0034] 在另一个实施例中,需要本治疗的受试者是已经经历运动功能降低或有经历运动功能障碍的风险的其病理学与认知障碍不同的那些。在另一个实施例中,如基于哈里斯-本尼迪克特公式(Harris and Benedict equation)所测量的,有患运动障碍的风险并且表现出可能示出高于1的代谢比率的代谢亢进状态的受试者是所提议的干预的候选者。在另一个实施例中,有需要的受试者可能表现出与脊髓的对动作电位的维持具有高代谢需求的运动神经元相关联的缺陷,所述缺陷可能不通过主要不影响运动系统的其它疾病表现。在其它实施例中,有需要的受试者可能示出逐渐发作、无痛、进行性肌无力,伴有绊倒、跌落东西、手臂和/或腿部异常疲劳、言语不清、肌肉痉挛和抽搐和/或失笑或哭泣时间段不受控。在一些实施例中,患有呼吸肌无力的受试者可能需要永久的通气支持以协助呼吸。

[0035] 在其它实施例中,需要本治疗的受试者可能示出在ALS的适当的诊断和发展中可能是决定性的突变,所述突变包含例如ALS2(alsin)、TBK1(TANK-结合激酶1)、TUBA4A(tubulin, $\alpha$ 4A)、ANG(血管生成素)、MATR3(matrin-3)、CHCHD10(含有螺旋螺旋螺旋螺旋螺旋结构域的10)、NEK1、PFN1(抑制蛋白-1)、C210RF2、MOBP、SCFD1、SETX(senataxin)、FUS、TDP43、VCP(含有valosin的蛋白质)或与ALS连接的酶(例如,KIF5A,inesin家族成员5A)和OPTN(视神经蛋白)处的突变。在另一个实施例中,突变可以处于C9ORF72基因处,或者造成



当基因突变时发生的RNA的积聚。在又一个实施例中,可以首先针对此类突变的存在筛选受试者。在又一个实施例中,所述筛选是用于上述所标识的突变的至少任何两个或更多个突变的标识。

[0036] 在另一个实施例中,本发明涉及在表现出以下处的突变的受试者体内施用治疗有效的基因疗法:ALS2、TBK1、TUBA4A、ANG、MATR3、CHCHD10、NEK1、PFN1、C210RF2、MOBP、SCFD1、SETX、FUS、TDP43、VCP或OPTN。在又另一方面,适当筛选的受试者可以接受基因疗法组合物,所述基因疗法组合物包括编码ASPA或其功能片段的核酸,所述核酸具有与SEQ ID NO:1的序列至少75%、85%、95%、99%相同的氨基酸序列。在另一实施例中,可以向所标识的受试者施用包括SEQ ID No.1和AAV-9的基因疗法组合物,并在其脊髓中表现出NAA分解代谢的水平升高。在至少一个实施例中,本发明涉及通过标识表现出ALS的临床症状以及以上所提及的基因突变或发生在涉及细胞轴突动力学的蛋白质和涉及细胞的清除机制的那些蛋白质中的基因突变中的至少一种的患者向表现出ALS症状的患者施用所公开的基因疗法,所述ALS症状还可能示出TBK1、TUBA4A、NEK1、C210RF2、MOBP、SCFD1、FUS和TDP43处的突变或此类突变的组合。

[0037] 在至少一个实施例中,本发明涉及向表现出Cu/Zn超氧化物歧化酶(SOD1)的突变的受试者施用即时基因疗法,以及增加此类患者,特别是表现出ALS的至少一种临床症状的患者的脊髓线粒体中的NAA分解代谢的水平。已经表明,仅5-10%具有遗传起源(家族性ALS),并且仅大约20%的家族性ALS病例具有Cu/Zn超氧化物歧化酶(SOD1)的突变。SOD1上的与ALS相关联的突变导致蛋白质稳定性降低。这些突变发生所有在蛋白质结构之上,包含活性位点、 $\beta$ 折叠和单体界面处。为此,本发明的至少一个实施例涉及向表现出SOD1突变的那些患者施用本基因疗法的方法。在又一个实施例中,本发明涉及以下方法:标识具有SOD1突变的受试者;向所述受试者施用包括编码ASPA或其片段的核酸的组合物,所述核酸包括SEQ ID NO:1和AAV-9的氨基酸序列;以及增加此类受试者的脊髓中的NAA分解代谢的水平。

[0038] 在其它实施例中,与健康患者相比,有需要的受试者在肌电图(EMG)研究之后示出了上和下运动神经元退化(具有或不具有进行性脑干退化)、神经病状减少降低,或表现出肌无力。然而,此类患者并未表现出降低的多巴胺受体占有,未对L-Dopa的施用作出反应,此类患者也不像患有阿尔茨海默氏病的患者那样表现出与认知的丧失相关联的症状。

[0039] 在一些实施例中,组合物包括基因疗法组合物。在一些实施例中,所述组合物可以包含编码ASPA或其功能片段的核酸,所述核酸具有与SEQ ID NO:1的序列至少75%、85%、95%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,编码ASPA或其片段的所述核酸包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

SEQ ID	序列	信息
SEQ ID NO: 1	MTSCHIAEEHIQKVAIFGGTHGNETGVFLVK HWLENGAEIQRGTGLEVKPFITNPRAVKKCTRY IDCDLNRIFDLENLGKKMSEDLPEVRRQEI NHLFGPKDSEDSYDIIFDLHNTTSNMGCTLILE DSRNNFLIQMFHYIKTSLAPLPCYVYLIEHPSL KYATTRSIKYPVGIEVGPQPGVLRADILDQ MRKMIKHALDFIHHFNEGKEFPFCAIEVYKIIIE KVDYPRDENGIEIAAIIHPNLQDQDWKPLHPG DPMFLTLDGKTIPLGGDCTVYPVFNAAAYYE KKEAFAKTTKLTLNAKSIRCCLH	ASPA (UniParc P45381-1)

[0040] 还处于本公开的范围内的变体、突变体以及与ASPA具有显著同一性的同源物。例如,此类变体和同源物的序列可以与本文所述的ASPA的序列具有至少约70%、约71%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的序列同一性。

[0042] 当参考多肽使用时,术语“变体”和“突变体”是指与另一个通常相关的多肽相差一个或多个氨基酸的氨基酸序列。所述变体可以具有“保守”变化,其中经取代的氨基酸具有相似结构或化学性质。一种类型的保守氨基酸取代是指具有相似侧链的残基的互换性。例如,具有脂肪族侧链的一组氨基酸为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族羟基侧链的一组氨基酸为丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺基的侧链的一组氨基酸为天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的一组氨基酸为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的一组氨基酸为赖氨酸、精氨酸和组氨酸;具有含硫的侧链的一组氨基酸为半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸取代基为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。更稀少地,变体可能具有“非保守”变化(例如,用色氨酸替代甘氨酸)。相似较小变化也可以包含氨基酸缺失或插入(即,添加)或两者。使用本领域中公知的计算机程序如DNASar软件,可以发现在确定可以不消除生物活性的情况下取代、插入或缺失哪些氨基酸残基并且取代、插入或缺失多少氨基酸残基方面的指导。可以在功能测定中测试变体。优选的变体具有小于10%、以及优选地小于5%、并且仍更优选地小于2%的变化(是否是取代、缺失等)。

[0043] 当参考多肽使用时,术语“同源物”或“同源”是指两个多肽之间的高度序列同一性,或三维结构之间的高度相似性,或活性位点与作用机制之间的高度相似性。在一个优选实施例中,同源物与参考序列具有大于60%的序列同一性以及更优选地大于75%的序列同一性以及仍更优选地大于90%的序列同一性。如应用于多肽的术语“基本同一性”是指两个肽序列在通过如使用默认间距权重的程序GAP或BESTFIT最佳比对时,享有至少75%的序列同一性。

[0044] 如本文所用,表达基因是指细胞产生由基因编码的全长多肽或全长多肽的功能片段。当与“片段”结合使用时,术语“功能性”是指具有生物活性的多肽,所述生物活性与作为所述多肽的片段的实体或分子的生物活性基本上相似。在此上下文中,“基本上相似”是指保留了相应野生型肽的至少25%、至少35%、至少50%的相关或期望的生物活性。例如,多肽的功能片段保留了与细胞中表达的由基因编码的全长多肽的酶活性基本相似的酶活性。

[0045] “过表达”是指细胞/生物体中的基因产物的产生超过正常或未经转换的细胞/生

物体中的产生水平。例如,其可以指代与表达基础水平的mRNA(例如,编码ASPA蛋白的那些)或具有基础水平的蛋白质的相似对应未经修饰的细胞/生物体相比,编码一种或多种蛋白质(例如,ASPA蛋白或其同源物)的mRNA的水平升高(例如异常水平)和/或细胞中的一种或多种蛋白质(例如,ASPA)的水平升高。在特定实施例中,ASPA或其同源物在被工程化为表现出ASPA的增加的mRNA、蛋白质和/或活性的细胞/生物体中,可以过表达至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、12倍、15倍或更多。

[0046] ASPA的表达可以通过引入携带编码ASPA多肽或其片段中的一个或多个的核酸的一个或多个表达载体诱导。多肽或其片段可以插入到载体的适当位点中(例如,与启动子可操作地连接)。表达载体通过众所周知的方法,如转染、转导、感染、电穿孔、显微注射、脂质转染或DEAE-葡聚糖方法或其它已知技术引入到所选宿主细胞中,以用于扩增和/或多肽表达。这些方法和其它合适方法是本领域的技术人员众所周知的。

[0047] 可以使用多种载体来表达ASPA蛋白。某些病毒通过受体介导的内吞感染细胞或进入细胞,并且整合到宿主细胞基因组并且稳定且有效地表达病毒基因的能力,已经使其成为用于将外来核酸转移到细胞中的有吸引力的候选物。因此,在某些实施例中,病毒载体用于将编码ASPA蛋白或其片段的核苷酸序列引入到宿主细胞中,以用于表达。病毒载体可以包括编码与一个或多个控制序列,例如启动子可操作地连接的ASPA蛋白或其片段的核苷酸序列。可替代地,病毒载体可以不含有控制序列,并且相反将依赖于宿主细胞内的用于驱动ASPA蛋白或其片段的表达的控制序列。可以用于递送核酸的病毒载体的非限制性实例包含腺病毒载体、AAV载体和逆转录病毒载体。

[0048] 例如,腺相关病毒(AAV)可以用于将编码ASPA蛋白或其片段的核苷酸序列引入到宿主细胞中,以用于表达。AAV系统先前已进行了描述,并且通常是本领域众所周知的(Kelleher和Vos,《生物技术(Biotechniques)》,17(6):1110-7,1994;Cotten等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》,89(13):6094-6098,1992;Curiel,《自然免疫学(Nat Immun)》,13(2-3):141-64,1994;Muzyczka,《微生物学和免疫学的当前课题(Curr Top Microbiol Immunol)》,158:97-129,1992)。关于rAAV载体的产生和使用的细节描述于例如美国专利第5,139,941号和第4,797,368号,所述美国专利出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0049] 在一些实施例中,逆转录病毒载体可以用于将编码ASPA蛋白或其片段的核苷酸序列引入到宿主细胞中,以用于表达。这些系统先前已进行了描述,并且是本领域众所周知的(Nicolas和Rubinstein,于:“载体:分子克隆载体和其用途的综述(A survey of molecular cloning vectors and their uses)”,Rodriguez和Denhardt编辑,斯通哈姆:巴特沃斯(Stoneham:Butterworth),第494-513页,1988;Temin,于:“基因转移(Gene Transfer)”,Kucherlapati(编辑),纽约:普莱南出版社(New York:Plenum Press),第149-188页,1986)。哺乳动物细胞中的用于真核表达的载体的实例包含AD5、pSVL、pCMV、pRc/RSV、pcDNA3、pBPV等,以及衍生自如牛痘病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、逆转录病毒等病毒系统的使用如CMV、SV40、EF-1、UbC、RSV、ADV、BPV和 $\beta$ -肌动蛋白等启动子的载体。

[0050] 也可以使用逆转录病毒和适当的包装系的组合,其中衣壳蛋白对于感染靶细胞将是功能性的。通常,细胞和病毒将在培养基中温育至少约24小时。然后在一些应用中允许细胞在培养基中生长短的间隔,例如,24-73小时或至少两周,并且可以在分析之前允许细胞

生长五周或更长。常用的逆转录病毒载体为“缺陷型的”即，不能够产生生产性感染所需的病毒蛋白。载体的复制需要在包装细胞系中生长。逆转录病毒的宿主细胞特异性通过囊膜蛋白env (p120) 确定。囊膜蛋白由包装细胞系提供。囊膜蛋白具有至少三种类型：嗜亲性、双嗜性和嗜异性。用嗜亲性囊膜蛋白封装的逆转录病毒，例如MMLV，能够感染大多数鼠和大鼠细胞类型。嗜亲性包装细胞系包含BOSC23。含双嗜性囊膜蛋白的逆转录病毒，例如4070A，能够感染大多数哺乳动物细胞类型，包含人、狗和小鼠。双嗜性包装细胞系包含PA12和PA317。用嗜异性囊膜蛋白封装的逆转录病毒，例如AKR env，能够感染除了鼠细胞除外的大多数哺乳动物细胞类型。载体可以包含必须之后使用例如重组酶系统，如Cre/Lox去除的基因；或例如，通过包含允许如疱疹病毒TK、bcl-xs等的选择性毒性的基因表达其被破坏的细胞。合适的可诱导启动子在期望的靶细胞类型-经转染的细胞或其后代中活化。

[0051] 在一些实施例中，基因组编辑技术，如CRISPR/Cas9系统、设计者锌指、转录激活因子样效应物 (TALE) 或归巢大范围核酸酶可用于诱导所描述的ASPA蛋白在细胞中的表达。一般而言，“CRISPR/Cas9系统”统一指代涉及CRISPR相关(“Cas”) 基因的表达或引导其活性的转录本和其它元素，包含编码Cas基因的序列、tracr (反式激活CRISPR) 序列 (例如tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr配对序列 (在内源性CRISPR系统中涵盖“直接重复序列”和经tracrRNA处理的部分直接重复序列)、指导序列 (在内源性CRISPR系统的上下文中也被称为“间隔子”) 或来自CRISPR基因座的其它序列和转录本。CRISPR系统的一个或多个元素可以衍生自I型、II型或III型CRISPR系统。可替代地，CRISPR系统一个或多个元素可以衍生自包括内源性CRISPR系统的特定生物体，如化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)。通常，CRISPR系统的特征在于促进靶序列的位点处的CRISPR复合物的形成的元素 (在内源性CRISPR系统的上下文中也被称为原间隔子)。在一些实施例中，基因组编辑技术，如CRISPR/Cas9系统、设计者锌指、转录激活因子样效应物 (TALE) 或归巢大范围核酸酶可用于诱导所描述的ASPA蛋白在细胞中的表达，所述表达产生用于线粒体氧化磷酸化的底物。

[0052] 在一些实施例中，方法包括通过病毒转导将核酸引入到受试者的至少一个细胞。所述组合物可以提供有包括所述核酸的病毒或病毒样颗粒。在一些实施例中，所述核酸在重组腺相关病毒 (rAAV) 载体，如AAV9上载运。

[0053] 在一些实施例中，rAAV是从其天然环境 (例如，从宿主细胞、组织或受试者) 人工产生的。例如，分离的AAV可以使用重组方法产生。此rAAV优选地具有组织特异性靶向能力，使得AAV转基因被特异性地递送到一个或多个预定组织。AAV衣壳是确定其组织特异性靶向能力的重要因素。为此，在至少一个实施例中，可以选择具有适合于脊髓组织的衣壳的重组AAV。用于获得具有所期望的衣壳蛋白的重组AAV的方法已经在例如专利申请公开第2003/0138772中进行了描述，所述专利申请公开通过引用以其整体并入本文。

[0054] 在另一方面，本发明提供了一种通过标识需要增加细胞内天冬氨酸水平的患者来治疗、改善或逆转有需要的受试者的ALS的至少一种症状的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的增加受试者的至少一个细胞中的天冬氨酸酰化酶 (ASPA) 的水平或活性的组合物，其中所述组合物包含编码ASPA或其功能片段的核酸，所述核酸具有与SEQ ID NO:1的序列至少75%相同的氨基酸序列。

[0055] 在一些实施例中，所述方法包括向所述受试者的脊髓的至少一部分施用所述组合物。在一些实施例中，所述组合物局部施用于所述受试者的脊髓的所述一部分。在一些实施

例中,所述组合物可以施用于脑干,以用于治疗ALS。在另一实施例中,用于治疗ALS的本发明的组合物可以与第二药物化合物组合,以治疗上和下运动神经元退化、减少进展或改善上和下运动功能。在一些实施例中,第二药物化合物可以为R(+)-N-炔丙基-1-氨基茛满与2-氨基-6-三氟甲氧基苯并噻唑的组合或其相应的药学上可接受的盐,包括但不限于甲磺酸盐、马来酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、乙磺酸盐、对甲苯磺酸盐、苯甲酸盐、乙酸盐、磷酸盐和硫酸盐。

**[0056] 基因疗法:**

**[0057]** 编码本发明内有用的一种或多种蛋白质的核酸可以在用于治疗本文设想的疾病或病症的基因疗法方案中使用,所述疾病或病症如表征为支持运动功能的中枢和外周神经系统的细胞的能量缺乏的疾病,所述中枢和外周神经系统包含大脑和脊髓的上和下运动神经元。在某些实施例中,所述疾病或病症包括肌萎缩性侧索硬化症(超氧化物歧化酶聚集)。可以将编码一种或多种蛋白质的改进的构建体插入到适当的基因疗法载体中,并且施用于患者,以治疗或防止所关注的疾病或病症。

**[0058]** 在现有技术中已经使用了如病毒载体等载体来将基因引入到多种不同的靶细胞中。通常,将载体暴露于靶细胞,使得可以在充足比例的细胞中发生转化,以从期望的多肽(例如受体)的表达中提供有用的治疗或预防性作用。可以将经转染的核酸永久掺入到靶细胞中的每个靶细胞的基因组中,以提供持久的作用,或者可替代地治疗必须周期性地重复。

**[0059]** 多种载体,病毒载体和质粒载体两者都是本领域已知的(参见例如美国专利第5,252,479号和WO 93/07282)。特别地,许多病毒已被用作基因转移载体,包含如SV40的乳多空病毒、牛痘病毒、包含HSV和EBV的疱疹病毒以及逆转录病毒。现有技术中的许多基因疗法方案已经采用了禁用的鼠逆转录病毒。几项最近发布的专利涉及用于执行基因疗法的方法和组合物(参见例如美国专利第6,168,916号、第6,135,976号、第5,965,541号和第6,129,705号)。前述专利中的每一个均通过引用以其整体并入本文。

**[0060] AAV介导的基因疗法:**

**[0061]** AAV,属于属依赖病毒的细小病毒,具有使其特别适合于基因疗法应用的几个特征。例如,AAV可以感染多种宿主细胞,包含非分裂细胞。此外,AAV可以感染来自多种物种的细胞。重要的是,AAV尚未与任何人类或动物疾病相关联,并且在整合后似乎不会改变宿主细胞的生理性质。

**[0062]** 最后,AAV在各种物理和化学条件下是稳定的,这使其适合于生产、储存和运输要求。AAV基因组作为含有大约4,700个核苷酸(AAV-2基因组由4,681个核苷酸组成,AAV-4基因组由4,767个组成)的线性、单链的DNA分子,通常包括通过反向末端重复序列(ITR)侧接在每个端部上的内部非重复区段。ITR的长度为大约145个核苷酸(AAV-1的ITR为143个核苷酸),并具有多种功能,包含充当复制的起点以及作为病毒基因组的包装信号。基因组的内部非重复部分包含两个大的开放阅读框(ORF),其被称为AAV复制(rep)和衣壳(cap)区。这些ORF编码复制和衣壳基因产物,这允许复制、组装和包装完整的AAV病毒体。更具体地,从AAV rep区表达至少四个病毒蛋白的家族:Rep 78、Rep 68、Rep 52和Rep 40,所有这些病毒蛋白均以其表观分子量命名。AAV帽区编码至少三种蛋白质:VP1、VP2和VP3。AAV是辅助依赖型病毒,也就是说,其需要与辅助病毒(例如腺病毒、疱疹病毒或牛痘病毒)共感染,以形成功能完整的AAV病毒体。在与辅助病毒的共感染不存在的情况下,AAV确立了潜伏状态,其中

病毒基因组插入到宿主细胞染色体中或以游离基因形式存在,但不产生感染性病毒体。

[0063] 辅助病毒的随后感染“拯救”了整合的基因组,允许其复制并封装到病毒衣壳中,从而重组感染性病毒体。虽然AAV可以感染来自不同物种的细胞,但辅助病毒必须与宿主细胞属于同一物种。因此,例如,人AAV将在已经被犬腺病毒共感染的犬细胞中复制。

[0064] 为了产生含有异源核酸序列的感染性重组AAV (rAAV),可以用含有异源核酸序列但缺乏AAV辅助功能基因rep和cap的AAV载体转染合适的宿主细胞系。然后可以在单独的载体上提供AAV辅助功能基因。而且,可以在载体上提供AAV产生需要的仅辅助病毒基因(即,附属功能基因),而不是提供具有复制能力的辅助病毒(如腺病毒、疱疹病毒或牛痘)。

[0065] 总之,可以在一种或多种载体上提供AAV辅助功能基因(即rep和cap)和附属功能基因。然后可以在宿主细胞中表达其中其将反式作用于含有异源核酸序列的rAAV载体的辅助和附属功能基因产物。然后将含有异源核酸序列的rAAV载体复制并封装,就像其是野生型(wt) AAV基因组一样,从而形成重组病毒体。当用产生的rAAV病毒体感染患者的细胞时,异源核酸序列进入患者的细胞并在患者的细胞中表达。由于患者的细胞缺乏rep和cap基因以及附属功能基因,因此rAAV无法进一步复制和封装其基因组。此外,在没有rep和cap基因的来源的情况下,在患者的细胞中不能形成wtAAV。

[0066] 在本发明的一方面,合适的AAV血清型或血清型变体包含AAV1到AAV12,如AAV2、AAV2.5、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12以及这些基于AAV的载体的经合理工程化的衣壳变体,如AAV9HR。

[0067] AAV-1到AAV-11已在本领域进行了描述(Mori等人,2004,《病毒学(Virology)》330(2):375-83)。AAV-2是人类群体中最普遍的血清型;一项研究估计,至少80%的普通群体已感染wt AAV-2(Berns和Linden,1995,《生物测定(Bioassays)》17:237-245)。AAV-3和AAV-5在人类群体中也是普遍的,其感染率高达60%(Georg-Fries等人,1984,《病毒学》134:64-71)。AAV-1和AAV-4为猿猴分离株,但是两种血清型均可以转导人细胞(Chiorini等人,1997,《病毒学杂志(J Virol)》71:6823-6833;Chou等人,2000,《分子疗法(Mol Ther)》2:619-623)。在六种已知的血清型中,AAV-2是最具特征的。例如,AAV-2已被用于体内转导实验的广泛测定中,并且已被示出为转导许多不同组织类型,包含:小鼠(美国专利第5,858,351号;美国专利第6,093,392号)、狗肌肉;小鼠肝脏(Couto等人,1999,《美国国家科学院院刊》96:12725-12730;Couto等人,1997,《病毒学杂志》73:5438-5447;Nakai等人,1999,《病毒学杂志》73:5438-5447;以及Snyder等人,1997,《自然遗传学(Nat. Genet.)》16:270-276);小鼠心脏(Su等人,2000,《美国国家科学院院刊》97:13801-13806);兔子肺部(Flotte等人,1993,《美国国家科学院院刊》90:10613-10617);以及啮齿动物感光器(Flannery等人,1997,《美国国家科学院院刊》94:6916-6921)。

[0068] 可以利用AAV-2的广泛组织嗜性来递送组织特异性转基因。例如,AAV-2载体已经用于递送以下基因:到兔子肺部的囊性纤维化跨膜电导调节基因(Flotte等人,1993,《美国国家科学院院刊》90:10613-10617);到小鼠肝脏、狗和小鼠肌肉(美国专利第6,093,392号)的因子NIII基因(Burton等人,1999,《美国国家科学院院刊》96:12725-12730)和因子IX基因(Nakai等人,1999,《病毒学杂志》73:5438-5447;Snyder等人,1997,《自然遗传学》16:270-276;美国专利第6,093,392号);到小鼠肌肉的促红细胞生成素基因(美国专利第5,858,351号);到小鼠心脏的血管内皮生长因子(VEGF)基因(Su等人,2000,《美国国家科学院

院刊》97:13801-13806);以及到猴神经元的芳香族1-氨基酸脱羧酶基因。某些rAAV递送的转基因的表达在实验动物中具有治疗作用,例如,因子IX的表达被报告在血友病B的狗模型中恢复了表型正常性(美国专利第6,093,392号)。此外,小鼠心肌中的rAAV递送的NEGF的表达导致了新血管形成(Su等人,2000,《美国国家科学院院刊》97:13801-13806),并且到帕金森氏猴的大脑的rAAV递送的AADC的表达导致多巴胺能功能的恢复。

[0069] 将所关注的蛋白质递送到哺乳动物的细胞通过首先生成包括编码所关注的蛋白质的DNA的AAV载体,并且然后向哺乳动物施用所述载体来完成。因此,本发明应被解释为包含包括编码所关注的蛋白质的DNA的AAV载体。一旦装备了本发明,包括编码这些蛋白质的DNA的AAV载体的生成对本领域的技术人员将是显而易见的。

[0070] 在某些实施例中,本发明的rAAV载体包括几种必需的DNA元素。在一些实施例中,这些DNA元素包含AAV ITR序列的至少两个拷贝、启动子/增强子元素、转录终止信号、侧接编码所关注的蛋白质或其生物活性片段的DNA的任何必要的5'或3'非翻译区。本发明的rAAV载体还可以包含所关注的蛋白质的内含子的一部分。并且,任选地,本发明的rAAV载体包括编码所关注的突变蛋白质的DNA。

[0071] 在某些实施例中,载体包括能够在许多不同细胞类型中将异源基因的表达驱动到高水平的启动子/调控序列,所述启动子/调控序列包括混杂启动子。此类启动子包含但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子/增强子序列、劳斯肉瘤病毒启动子/增强子序列等。在某些实施例中,本发明的rAAV载体中的启动子/调控序列是CMV立即早期启动子/增强子。然而,用于驱动异源基因的表达的启动子序列还可以是诱导型启动子,例如但不限于类固醇诱导型启动子,或者可以是组织特异性启动子,如但不限于骨骼-肌动蛋白启动子,所述骨骼-肌动蛋白启动子为肌肉组织特异性启动子/增强子和肌肉肌酸激酶启动子/增强子等。

[0072] 在某些实施例中,本发明的rAAV载体包括转录终止信号。尽管任何转录终止信号可以包含在本发明的载体中,但是在某些实施例中,转录终止信号是SV40转录终止信号。

[0073] 在某些实施例中,本发明的rAAV载体包括编码所关注的蛋白质或所关注的蛋白质的生物活性片段的分离的DNA。本发明应被解释为包含已知或未知的所关注的蛋白质的任何哺乳动物序列。因此,本发明应被解释为包含来自除了人之外的哺乳动物的基因,所述哺乳动物的蛋白质以与人类蛋白质基本相似的方式起作用。优选地,包括编码所关注的蛋白质的基因的核苷酸序列与编码所关注的蛋白质的基因约50%同源,更优选地约70%同源,甚至更优选地约80%或85%同源以及最优选地约90%、95%或99%同源。

[0074] 进一步地,本发明应被解释为包含野生型蛋白序列的天然存在的变体或重组衍生的突变体,所述变体或突变体使由此编码的蛋白质与全长蛋白质一样治疗有效,或者比本发明的基因疗法方法中的全长蛋白质甚至更治疗有效。

[0075] 本发明也应被解释为包含保留蛋白质的生物活性的DNA编码变体。此类变体包含已经或可以使用重组DNA技术修饰,使得所述蛋白质或多肽具有增强其用于本文所描述的方法的适合性的另外的性质的蛋白质或多肽,例如但不限于赋予血浆中的蛋白质增强的稳定性和赋予蛋白质的增强的特异性活性的变体。类似物可以通过保守氨基酸序列差异或不影响序列的修饰或通过两者而与天然存在的蛋白质或肽相异。例如,可以进行保守氨基酸改变,所述保守氨基酸改变尽管改变了蛋白质或肽的一级序列,但通常不会改变其功能。



[0076] 本发明不限于实验实例中例示的具体rAAV载体,相反,本发明应被解释为包含任何合适的AAV载体,包括但不限于基于AAV-1、AAV2.5、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-8、AAV-9等的载体。

[0077] 本发明中还包含以提供治疗效果有效的量治疗患有疾病或病症的哺乳动物的方法。所述方法包括向哺乳动物施用包括所关注的蛋白的rAAV载体。优选地,哺乳动物是人。

[0078] 通常,以单次注射施用的病毒载体基因组/哺乳动物的数量的范围为约 $1 \times 10^8$ 到约 $5 \times 10^{16}$ 。优选地,以单次注射施用的病毒载体基因组/哺乳动物的数量为约 $1 \times 10^{10}$ 到约 $1 \times 10^{15}$ ;更优选地,以单次注射施用的病毒载体基因组/哺乳动物的数量为约 $5 \times 10^{10}$ 到约 $5 \times 10^{15}$ ;并且最优选地,以单次注射向哺乳动物施用的病毒载体基因组的数量为约 $5 \times 10^{11}$ 到约 $5 \times 10^{14}$ 。

[0079] 当本发明的方法包括多位点同时注射或几个多位点注射时,病毒载体基因组所施用的总数量可以与单位点注射方法中所引用的数量或其分数或乘数相同,所述注射包括在几小时的时间段(例如,约少于一小时到约两到三小时)对不同位点的注射。

[0080] 为了以单位点注射施用本发明的rAAV载体,在某些实施例中,将包括病毒的组合物直接注射到受试者的大脑中。为了向哺乳动物进行施用,可以将rAAV载体悬浮于药学上可接受的载体中,例如,pH为约7.8的HEPES缓冲盐水。其它有用的药学上可接受的载体包含但不限于甘油、水、盐水、乙醇和其它药学上可接受的盐溶液,如磷酸盐和有机酸的盐。这些以及其它药学上可接受的载体的实例在《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》(1991,麦克出版公司(Mack Publishing Co.),新泽西州(New Jersey))中进行了描述。

[0081] 本发明的rAAV载体也可以以试剂盒的形式提供,所述试剂盒包括例如,载体于干盐调配物中的冻干制剂、用于悬浮载体/盐组合物的无菌水以及针对载体的悬浮和载体对哺乳动物的施用的说明书。

#### [0082] 组合疗法:

[0083] 使用本文描述的方法标识的组合物可与可用于治疗疾病或减轻本文所设想的病症的症状的一种或多种另外的化合物或组合物组合用于本发明的方法中。这些另外的化合物可以包括本文所标识的化合物或已知用于治疗、防止或减少本文所设想的疾病或病症的症状的化合物,例如可商购的化合物。

[0084] 另外的化合物的非限制性实例包含利鲁唑、依达拉奉或分别地其盐或溶剂化物或其组合。包含选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)的其它化合物,如氟西汀单独或与右美沙芬和/或奎尼丁的组合也可以与本基因疗法方案结合使用。因此,协同作用可以使用例如合适的方法,如Sigmoid-Emax方程式(Holford和Scheiner,19981,《临床药物动力学(Clin.Pharmacokinet.)》6:429-453)、Loewe相加方程式(Loewe和Muischnek,1926,《实验病理学药理学档案(Arch.Exp.Pathol Pharmacol.)》114:313-326)和中值效应方程式(Chou和Talalay,1984,《酶调节进展(Adv.Enzyme Regul.)》22:27-55)。上面提到的每个方程式都可以应用于实验数据以生成相应的图,以协助评估药物组合的效果。与以上所提及方程相关联的对应图表分别是浓度-效应曲线、等效线图曲线以及组合曲线。

#### [0085] 药物组合物和调配物:

[0086] 本发明还涵盖使用本发明的药物组合物来实践本发明的方法。此药物组合物可以



以适合于施用于受试者的形式提供,并且可以包括一种或多种药学上可接受的载体、一种或多种另外的成分或这些的某种组合。本发明的至少一种组合物可以包括生理上可接受的盐,如本发明内设想的化合物与如本领域公知的生理上可接受的阳离子或阴离子的组合。

[0087] 在一个实施例中,用于实践本发明的方法的药物组合物可以施用为递送1纳克/公斤/天到100毫克/公斤/天之间的剂量。在另一实施例中,用于实践本发明的药物组合物可以施用为递送1纳克/公斤/天到500毫克/公斤/天之间的剂量。

[0088] 本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的载体以及任何另外的成分的相对量将根据所治疗的受试者的同一性、大小和状况,以及进一步地根据组合物所施用的途径而变化。举例来说,组合物可以包括在0.1%与100% (w/w) 之间的活性成分。

[0089] 可用于本发明的方法的药物组合物可以适当地研发以便于吸入、口服、直肠、阴道、肠胃外、局部、经皮、肺部、鼻内、经颊、眼部、鞘内、颅内、静脉内或另一种给予途径。其它所设想的调配物包含投影的纳米颗粒、脂质体制剂、含有活性成分的再密封的红细胞以及基于免疫学的调配物。一种或多种施用途径对于本领域的技术人员将是显而易见的,并将取决于任何多种因素,包含所治疗的疾病的类型以及严重性、所治疗的兽医患者或人类患者的类型和年龄等。本文描述的药物组合物的调配物可以通过药理学领域已知的或今后开发的任何方法来制备。通常,此类制备方法包含以下步骤:使活性成分与载体或一种或多种其它辅助成分缔合,并且然后如果需要或期望,则将产物成形或包装成期望的单剂量或多剂量单位。

[0090] 如本文所使用的,“单位剂量”是包括预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将施用于受试者的活性成分的剂量或此剂量的方便部分,例如此剂量的一半或三分之一。单位剂型可以是单个日剂量或多个日剂量之一(例如约1到4次或更多次每天)。当使用多个日剂量时,单位剂型对于每个剂量来说可以是相同的或不同的。

[0091] 虽然本文提供的药物组合物的描述主要涉及适合于处方施用于人类的药物组合物,但是本领域的技术人员将理解,此类组合物通常适合于施用于各种种类的动物。为了使组合物适合于施用于各种动物,对适合于施用于人类的药物组合物进行修饰是容易理解的,并且普通的技术性兽医药理学家可以利用仅普通的(如果有的话)实验,来设计并执行此修饰。设想的本发明的药物组合物所施用的受试者包含但不限于人以及其它灵长类动物、哺乳动物,包含商业相关的哺乳动物,如牛、猪、马、绵羊、猫以及狗。

[0092] 在一个实施例中,本发明的组合物使用一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体来调配。在其它实施例中,本发明的药物组合物包括治疗有效量的本发明的至少一种组合物和药学上可接受的载体。有用的药学上可接受的载体包含但不限于甘油、水、盐水、乙醇和其它药学上可接受的盐溶液,如磷酸盐和有机酸的盐。这些以及其它药学上可接受的载体的实例在《雷明顿药物科学》(1991, 麦克出版公司, 新泽西州)中进行了描述。

[0093] 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、丙二醇以及液体聚乙二醇等)、其合适的混合物以及植物油。例如,通过使用如卵磷脂等包衣,通过在分散液的情况下维持所需的颗粒大小并且通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂以及抗真菌剂,例如尼泊金(paraben)、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现防止微生物的作用。在许多情况下,将优选的是在组合物中包含等渗剂,例如糖、氯化钠或多元醇,如甘露糖醇和山梨糖醇。可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单

硬脂酸铝或明胶来延长可注射组合物的吸收。

[0094] 调配物可以与常规赋形剂混合使用,即,适合于口服、肠胃外、鞘内、鼻内、静脉内、皮下、肠内或本领域已知的任何其它合适的施用模式的药学上可接受的有机或无机载体物质。药物制剂可以是灭菌的,并且如果期望的话可以与助剂,例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压缓冲液的盐、着色剂、调味剂和/或香味物质等混合。其还可以在期望时与其它活性剂,例如,其它镇痛剂组合。

[0095] 如本文所使用的,“另外的成分”包含但不限于以下中的一种或多种:赋形剂;表面活性剂;分散剂;惰性稀释剂;成粒剂和解崩剂;结合剂;润滑剂;甜味剂;调味剂;着色剂;防腐剂;生理上可降解的组合物,如明胶;水性媒剂和溶剂;油性媒剂和溶剂;悬浮剂;分散或润湿剂;乳化剂、缓和剂;缓冲液;盐;增稠剂;填充剂;乳化剂;抗氧化剂;抗生素;抗真菌剂;稳定剂;以及药学上可接受的聚合物材料和疏水材料。可以包含在本发明的药物组合物中的其它“另外的成分”是本领域已知的,并且描述于例如Genaro编辑(1985,《雷明顿药物科学》麦克出版公司,宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton,PA))中,其通过引用并入本文。

[0096] 按组合物的总重量计,本发明的组合物可以包括约0.005%到2.0%的防腐剂。所述防腐剂在暴露于环境中的污染物的情况下,用于防止腐坏。可根据本发明使用的防腐剂的实例包含但不限于选自由苧醇、山梨酸、尼泊金、咪脲以及其组合组成的组的那些。防腐剂的实例是约0.5%到2.0%的苧醇和0.05%到0.5%的山梨酸的组合。

[0097] 所述组合物优选地包含抑制化合物的降解的抗氧化剂和螯合剂。一些化合物的优选抗氧化剂是按组合物的总重量计在约0.01重量%到0.3重量%的优选范围内的BHT、BHA、 $\alpha$ -生育酚以及抗坏血酸,以及更优选地在0.03重量%到0.1重量%的范围内的BHT。优选地,按组合物的总重量计,螯合剂以0.01重量%到0.5重量%的量存在。按组合物的总重量计,特别优选的螯合剂包含在约0.01%到0%的重量范围内以及更优选地在0.02%到0.10%的范围内的乙二胺四乙酸盐(例如乙二胺四乙酸二钠)以及柠檬酸。螯合剂可用于螯合组合物中的对调配物的保质期可能有害的金属离子。尽管BHT和乙二胺四乙酸二钠分别是一些化合物的特别优选的抗氧化剂和螯合剂,但是其它合适的且等效的抗氧化剂和螯合剂也可以因此取代,如本领域的技术人员所了解的。

[0098] 可以使用常规方法制备液体悬浮液,以实现活性成分在水性或油性媒剂中的悬浮。水性媒剂包含例如水和等渗盐水。油性媒剂包含例如杏仁油、油性酯、乙醇、如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油等植物油、分馏植物油以及如液体石蜡等矿物油。液体悬浮液可以进一步包括一种或多种另外的成分,包含但不限于悬浮剂、分散剂或润湿剂、乳化剂、缓和剂、防腐剂、缓冲剂、盐、调味剂、着色剂以及甜味剂。油性悬浮液可以进一步包括增稠剂。已知的悬浮剂包含但不限于山梨糖醇糖浆、氢化可食用脂肪、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍树胶、阿拉伯树胶以及纤维素衍生物,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素。已知的分散剂或润湿剂包含但不限于如卵磷脂等天然存在的磷脂、烯化氧与脂肪酸的缩合产物、烯化氧与长链脂肪醇的缩合产物、烯化氧与衍生自脂肪酸以及己糖醇的偏酯的缩合产物或烯化氧与衍生自脂肪酸以及己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯、十七烯氧基鲸蜡醇、聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯以及聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯)。已知的乳化剂包含但不限于卵磷脂和阿拉伯胶。已知的防腐剂包含但不限于对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸正丙酯、抗坏血酸以及山梨酸。已知的甜味剂包

含例如甘油、丙二醇、山梨糖醇、蔗糖以及糖精。油性悬浮液的已知增稠剂包含例如蜂蜡、硬石蜡和鲸蜡醇。

[0099] 活性成分于水性或油性溶剂中的液体溶液可以以与液体悬浮液基本上相同的方式制备,主要区别在于活性成分被溶解而不是悬浮在溶剂中。如本文所使用的,“油性”液体是包括含碳液体分子并且表现出比水更小的极性特性的液体。本发明的药物组合物的液体溶液可以包括关于液体悬浮液描述的组分中的每种组分,应当理解,悬浮剂不一定会协助活性成分溶解在溶剂中。水性溶剂包含例如水和等渗盐水。油性溶剂包含例如杏仁油、油性酯、乙醇、如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油等植物油、分馏植物油以及如液体石蜡等矿物油。本发明的药物制剂的粉末和颗粒调配物可以使用已知方法制备。此类调配物可以直接适用于受试者,可以用于例如形成片剂、用于填充胶囊或用于通过向其添加水性或油性媒剂来制备水性或油性悬浮液或溶液。这些调配物中的每种调配物可以进一步包括分散剂或润湿剂、悬浮剂和防腐剂中的一种或多种。这些调配物中还可以包含另外的赋形剂,如填充剂以及甜味剂、调味剂或着色剂。

[0100] 本发明的药物组合物也可以以水包油乳液或油包水乳液的形式制备、封装或销售。油相可以是如橄榄油或花生油等植物油、如液体石蜡等矿物油或这些的组合。此类组合物可以进一步包括一种或多种乳化剂,如天然存在的树胶(如阿拉伯树胶或黄蓍树胶)、天然存在的磷脂(如大豆或卵磷脂磷脂)、衍生自脂肪酸与己糖醇酐的酯或偏酯(如山梨糖醇酐单油酸酯)以及此类偏酯与环氧乙烷的缩合产物(如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯)。这些乳液也可以含有另外的成分,包含例如甜味剂或调味剂。

[0101] 用于用化学组合物浸渍或涂覆材料的方法是本领域已知的,并且包含但不限于将化学组合物沉积表面上或使化学组合物与表面结合的方法、在材料的合成(即如用生理上可降解的材料进行的合成)期间将化学组合物掺入到材料的结构中的方法以及将水性或油性溶液或悬浮液吸收到吸收性材料中,随后进行或不进行干燥的方法。

[0102] 施用/给药:

[0103] 施用方案可能会影响什么构成有效量。可以在与疾病或病状相关联的症状表现之前或之后向患者施用治疗调配物。进一步地,可以每天或依序施用若干个分开的剂量以及交错的剂量,或者给药可以连续输注或可以是团注注射。进一步地,治疗调配物的剂量可以成比例增加或减少,如治疗或预防情况的迫切情况所指示的。

[0104] 向患者,优选地哺乳动物,更优选地人类施用本发明的组合物可以使用已知程序,以治疗患者的疾病或病状有效的剂量和时间段执行。实现治疗效果所需的治疗化合物的有效量可以根据如下因素而变化:所采用的特定化合物的活性;施用的时间;化合物的分泌速率;治疗的持续时间;与化合物组合使用的其它药物、化合物或材料;疾病或病状的状态、年龄、性别、重量、病状、一般健康和所治疗的患者的既往医疗历史以及医学领域众所周知的类似因素。剂量方案可以调整以提供最佳的治疗反应。例如,可以每天施用若干个分开的剂量,或者剂量可以成比例减少,如治疗情况的迫切情况所指示的。本发明的治疗化合物的有效剂量范围的非限制性实例为约0.01mg/kg体重/天到50mg/kg体重/天。本领域的普通技术人员将能够研究相关因素,并且在不进行过度实验的情况下进行关于治疗化合物的有效量的确定。

[0105] 化合物可以以每天几次频繁地施用于动物,或者其可以不那么频繁地施用,如每

天一次、每周一次、两周一次、每月一次或甚至更不频繁地施用,如每几个月一次或甚至每年一次或更不频繁地施用。应当理解,每天给药的化合物的量在非限制性实例中可以每天、每隔一天、每2天、每3天、每4天或每5天施用。例如,在每隔一天施用的情况下,可以在星期一开始5mg每天剂量,并且在星期三施用第一随后的5mg每天剂量,在星期五施用第二随后的5mg每天剂量等。剂量的频率对于本领域的技术人员将是显而易见的,并将取决于任何多种因素,如但不限于所治疗的疾病的类型和严重性、动物的类型和年龄等。

[0106] 本发明药物组合中活性成分的实际剂量水平可以变化,以获得有效实现特定患者、组合物以及给药方式的所需治疗响应的活性成分的量,并且对患者无毒性。

[0107] 具有本领域的普通技能的医生,例如医师或兽医可以容易地确定并且开出所需的药物组合物的有效量。例如,医师或兽医可以以比为了实现所期望的治疗效果所需的水平低的水平来开始药物组合物中采用的本发明的化合物的给药,并逐渐增加剂量直至达到所期望的效果。

[0108] 在特定实施例中,特别有利的是调配剂量单位形式的化合物,以便于剂量的施用和均一性。如本文使用的剂量单位形式是指适于作为待治疗的患者的单一剂量的物理上离散的单位;每个单位含有预定量的治疗化合物,所述预定量被计算为产生与所需的药物媒介剂相关联的所期望的治疗效果。本发明的剂量单位形式由以下因素决定并且直接取决于以下因素:(a) 治疗化合物的独特特性以及待实现的特定治疗效果,以及(b) 混配/调配用于治疗患者的癌症的此治疗化合物的领域中固有的限制。

[0109] 在一个实施例中,本发明的组合物以范围为一次到五次每天或更多的剂量适用于患者。在另一实施例中,本发明的组合物以一定范围的剂量施用于患者,所述剂量包含但不限于每天一次、每两天一次、每三天一次到每周一次以及每两周一次。对本领域的技术人员显而易见的是,本发明的各种组合组合物的施用的频率将在受试者之间有所变化,这取决于许多因素,所述因素包含但不限于年龄、待治疗的疾病或病症、性别、整体健康状况以及其它因素。因此,本发明不应该被理解为限于任何特定的剂量方案,并且要施用于任何患者的精确剂量和组合物将由主治医师考虑到关于患者的所有其它因素来确定。

[0110] 用于施用的本发明的化合物的范围可以为约1.ig到约7,500mg、约20.ig到约7,000mg、约40.ig到约6,500mg、约80.ig到约6,000mg、约100.ig到约5,500mg、约200.ig到约5,000mg、约400.ig到约4,000mg、约800.ig到约3,000mg、约1mg到约2,500mg、约2mg到约2,000mg、约5mg到约1,000mg、约10mg到约750mg、约20mg到约600mg、约30mg到约500mg、约40mg到约400mg、约50mg到约300mg、约60mg到约250mg、约70mg到约200mg、约80mg到约150mg以及其间的任何和所有整体或部分增量。

[0111] 在一些实施例中,本发明的化合物的剂量为约0.5.ig到约5,000mg。在一些实施例中,本文描述的组合物中使用的本发明的化合物的剂量少于约5,000mg、或少于约4,000mg、或少于约3,000mg、或少于约2,000mg、或少于约1,000mg、或少于约800mg、或少于约600mg、或少于约500mg、或少于约200mg、或少于约50mg。类似地,在一些实施例中,如本文描述的第二化合物的剂量少于约1,000mg、或少于约800mg、或少于约600mg、或少于约500mg、或少于约400mg、或少于约300mg、或少于约200mg、或少于约100mg、或少于约50mg、或少于约40mg、或少于约30mg、或少于约25mg、或少于约20mg、或少于约15mg、或少于约10mg、或少于约5mg、或少于约2mg、或少于约1mg、或少于约0.5mg以及其任何和所有整体或部分增量。

[0112] 在一个实施例中,本发明涉及经封装的药物组合物,所述经封装的药物组合物包括:容器,所述容器容纳治疗有效量的本发明化合物单独或与第二药剂组合;以及用于使用所述化合物来治疗、预防或减少患者的疾病或病症的一种或多种症状的说明书。

[0113] 术语“容器”包含用于容纳药物组合物的任何容器。例如,在一个实施例中,容器是含有药物组合物的封装。在其它实施例中,容器不是含有药物组合物的封装,即容器是含有经封装的药物组合物或未经封装的药物组合物以及用于使用所述药物组合物的说明书的容器,例如盒子或小瓶。此外,封装技术是本领域众所周知的。应当理解的是,用于使用药物组合物的说明书可以容纳在含有药物组合物的封装上,并且因此说明书与经封装的产物形成增加的功能关系。然而,应当理解的是,说明书可以含有与化合物执行其预期功能,例如治疗、防止或减少患者的疾病或病症的能力有关的信息。

[0114] 施用途径:

[0115] 本发明的组合物中的任何组合物的施用途径包含吸入、口服、鼻内、直肠、肠胃外、舌下、经皮、经粘膜(例如舌下、舌侧、(经)颊、(经)尿道、阴道(例如,经阴道以及阴道周围、鼻内(内)以及(经)直肠)、膀胱内、肺内、十二指肠内、胃内、鞘内、皮下、肌肉内、皮内、颅内、动脉内、静脉内、支气管内、吸入以及局部施用。

[0116] 合适的组合物以及剂型包含例如片剂、胶囊、囊片、丸剂、胶丸、锭剂、分散剂、悬浮剂、溶液剂、糖浆剂、颗粒剂、珠剂、经皮贴剂、凝胶剂、粉末剂、丸粒、乳浆剂、糖锭、霜剂、糊剂、膏药、洗剂、圆片、栓剂、用于鼻或口服施用的液体喷雾剂、用于吸入的干粉末或雾化调配物、用于膀胱内施用的组合物和调配物等。应当理解,可用于本发明的调配物和组合物不限于本文描述的具体调配物和组合物。

[0117] 口服施用

[0118] 对于口服应用,特别合适的是片剂、糖衣丸、液体、滴剂、栓剂或胶囊、囊片以及胶丸。适合于口服施用的其它调配物包含但不限于粉末或颗粒调配物、水性或油性悬浮液、水性或油性溶液、糊剂、凝胶、牙膏、漱口水、包衣、口腔清洗剂、或乳液。旨在用于口服使用的组合物可以根据本领域已知的任何方法制备,并且此类组合物可以含有选自适合于片剂的制造的情性、无毒药学赋形剂组成的组的一种或多种药剂。此类赋形剂包含例如情性稀释剂,如乳糖;成粒剂和解崩剂,如玉米淀粉;结合剂,如淀粉;以及润滑剂,如硬脂酸镁。

[0119] 片剂可以是未包衣的,或者其可以使用已知方法包衣,以在受试者的胃肠道中实现延迟崩解,由此提供活性成分的持续释放和吸收。例如,诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯的材料可用于将片剂包衣。进一步地,例如,片剂可以用美国专利第4,256,108号、第4,160,452号和第4,265,874号中描述的方法来包衣,以形成渗透控制释放的片剂。片剂可以进一步包括甜味剂、调味剂、着色剂、防腐剂或这些试剂的某种组合以提供药学上雅致并且可口的制剂。

[0120] 对于口服施用,本发明的化合物可以呈片剂或胶囊剂形式,所述片剂或胶囊剂通过常规方式用药学上可接受的赋形剂制备,所述药学上可接受的赋形剂如结合剂;填充剂;润滑剂;崩解剂;或润湿剂。如果期望,片剂可以使用合适的方法和包衣材料,如可从宾夕法尼亚州西点市的Colorcon公司(Colorcon, West Point, Pa)获得的OPADRY™薄膜包衣系统进行包衣(例如,OPADRY™ OY型、OYC型、有机肠溶OY-P型、水性肠溶OY-A型、OY-PM型和OPADRY™白色、32K18400)。

[0121] 用于口服施用的液体制剂可以呈溶液、糖浆或悬浮液的形式。液体制剂可以通过常规方式用药学上可接受的添加剂制备,所述药理学上可接受的添加剂如悬浮剂(例如,山梨糖醇糖浆、甲基纤维素或氢化可食用脂肪);乳化剂(例如卵磷脂或阿拉伯胶);非水性媒剂(例如杏仁油、油性酯或乙醇);以及防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。适用于口服施用的本发明的药物组合物的液体调配物可以以液体形式或以旨在用于在使用前用水或另一种合适的媒剂来重构的干燥产物的形式来制备、封装并销售。

#### [0122] 肠胃外施用

[0123] 如本文所使用的,药物组合物的“肠胃外施用”包含特征在于对受试者的组织进行物理破坏和通过组织的破坏进行药物组合物的施用的任何施用途径。肠胃外施用因此包含但不限于借助于注射组合物、借助于通过外科手术切口应用组合物、借助于通过穿透组织的非外科手术伤口应用组合物等来施用药物组合物。特别地,肠胃外施用被设想为包含但不限于颅内、皮下、静脉内、腹膜内、肌肉内、脊柱内、胸骨内、鞘内、脑干注射和肾脏透析输注技术。

[0124] 适合于肠胃外给药的药物组合物的调配物包括与药理学上可接受的载体(如无菌水或无菌等渗盐水)组合的活性成分。此类调配物可以以适合于团注施用或连续施用的形式制备、封装或出售。可注射调配物可以以单位剂型,如以安瓿或含有防腐剂的多剂量容器形式制备、封装或出售。用于肠胃外施用的调配物包含但不限于悬浮液、溶液、油性或水性媒剂中的乳液、糊剂以及可植入的持续释放的或生物可降解的调配物。此类调配物可以进一步包括一种或多种另外的成分,包含但不限于悬浮剂、稳定剂或分散剂。在用于肠胃外施用的调配物的一个实施例中,以干燥(例如,粉末或颗粒)形式提供活性成分,以用于在肠胃外施用经重组的组合物之前,用合适的媒剂(例如,无菌无热原的水)进行重组。

[0125] 药物组合物可以以无菌可注射水性或油性悬浮液或溶液的形式制备、封装或出售。此悬浮液或溶液可以根据已知技术调配,并且除活性成分外,可以包括另外的成分,如本文所描述的分散剂、湿润剂或悬浮剂。例如,此类无菌可注射调配物可以使用无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂,如水或1,3-丁二醇制备。其它可接受的稀释剂和溶剂包含但不限于林格氏溶液、等渗氯化钠溶液以及如合成甘油单酯或甘油二酯等固定油。可用的其它可肠胃外施用的调配物包含呈微晶形式、呈脂质体制剂形式或作为可生物降解的聚合物系统的组分的包括活性成分的那些。用于持续释放或植入的组合物可以包括药理学上可接受的聚合物材料或疏水材料,如乳液、离子交换树脂、微溶聚合物或微溶盐。

#### [0126] 另外的施用形式

[0127] 本发明的另外的剂型包含如美国专利第6,340,475号、第6,488,962号、第6,451,808号、第5,972,389号、第5,582,837号和第5,007,790号中所描述的剂型。本发明的另外的剂型还包含如美国专利第20030147952号、第20030104062号、第20030104053号、第20030044466号、第20030039688号和第20020051820号中所描述的剂型。本发明的另外的剂型还包含如PCT专利第W0 03/35041号、第W0 03/35040号、第W0 03/35029号、第W0 03/35177号、第W0 03/35039号、第W0 02/96404号、第W0 02/32416号、第W0 01/97783号、第W0 01/56544号、第W0 01/32217号、第W0 98/55107号、第W0 98/11879号、第W0 97/47285号、第W0 93/18755号和第W0 90/11757号中所描述的剂型。

#### [0128] 控制释放的调配物和药物递送系统

[0129] 本发明的药物组合物的控制释放或持续释放调配物可以使用常规技术制备。在一些情况下,待使用的剂型可以使用例如羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、凝胶、可渗透膜、渗透系统、多层包衣、微粒、脂质体或微球体或其组合以其中的一种或多种活性成分的缓慢或控制释放的形式来提供,以便提供不同比例的所期望释放概况。本领域的普通技术人员已知的合适的控制释放的调配物(包含本文描述的那些)可以容易地选择,以用于与本发明的药物组合物一起使用。因此,本发明涵盖适合于口服施用的单一单位剂型,如适用于控制释放的片剂、胶囊、胶丸和囊片。

[0130] 与通过其非受控对应物所实现的药物疗法相比,大多数控制释放的药物产物的共同目标是改进药物疗法。理想地,在医学治疗中使用最佳设计的控制释放的制剂的特征是在最少量的时间内采用最少的药物物质来治愈或控制病状。

[0131] 控制释放的调配物的优势包含药物活性延长、给药频率降低以及患者依从性增加。另外,控制释放的调配物可以用于影响动作发作的时间或如药物的血液水平等其它特性,并且因此可以影响副作用的发生。

[0132] 大多数控制释放调配物被设计为初始地释放快速产生所期望的治疗效果的药物的量,并且逐渐且连续释放用于在延长的时间段内保持此水平的治疗效果的药物的其它量。为了在身体内保持此恒定的药物水平,必须以将替代一定量从身体代谢和分泌的药物的速率从药剂型中释放药物。

[0133] 活性成分的控制释放可以通过各种诱导剂,例如pH、温度、酶、水或其它生理条件或化合物来刺激。在本发明的上下文中,术语“控制释放的组分”在本文中被定义为促进活性成分的控制释放的一种或多种化合物,包含但不限于聚合物、聚合物基质、凝胶、可渗透膜、脂质体或微球或其组合。

[0134] 在某些实施例中,本发明的调配物可以是但不限于短期、快速偏移以及受控(例如持续释放、延迟释放以及脉冲释放)调配物。

[0135] 术语持续释放以其常规含义使用,以指代在延长的时间段内提供药物的逐渐释放,并且可以但不一定在延长的时间段内导致药物的血液水平基本上恒定的药物调配物。所述时间段可能长达一个月或更多并且应该是比相同量的以团注形式施用的药剂的释放更长的释放。

[0136] 为了持续释放,化合物可以与为化合物提供持续释放性质的合适的聚合物或疏水性材料一起调配。如此,用于使用本发明方法的化合物可以以微粒的形式,通过例如注射或以薄片或圆片的形式,通过植入来施用。在本发明的优选实施例中,使用持续释放的调配物向患者施用本发明的化合物单独地或与另一种药剂组合。

[0137] 术语“延迟释放”在本文中以其常规含义使用,来指代在药物施用的某种延迟之后提供药物的初始释放并且可能但不一定包含约10分钟直至约12小时的延迟的药物调配物。

[0138] 术语脉冲释放在本文中以其常规含义使用,来指代以在药物施用之后产生药物的脉冲血浆概况的方式提供药物的释放的药物调配物。

[0139] 术语“立即释放”以其常规含义使用,来指代在药物施用之后立即释放药物的药物调配物。

[0140] 如本文所使用的,短期是指至多并包含约8小时、约7小时、约6小时、约5小时、约4小时、约3小时、约2小时、约1小时、约40分钟、约20分钟或约10分钟,以及在药物施用之后的



任何和所有全部或部分增量的任何时间段。

[0141] 如本文所使用的,快速偏移指至多并包含约8小时、约7小时、约6小时、约5小时、约4小时、约3小时、约2小时、约1小时、约40分钟、约20分钟或约10分钟,以及在药物施用之后的任何和所有全部或部分增量的任何时间段。

[0142] 本领域的技术人员将认识到,或使用仅例行实验就能够确信本文所描述的具体程序、实施例、权利要求和实例的许多等效物。此类等效物被视为处于本发明的范围内,并且由所附的权利要求涵盖。例如,应当理解的是,利用本领域认可的替代物并且使用仅例行实验,在反应条件(包括但不限于反应时间、反应大小/体积)以及实验试剂(如溶剂、催化剂、压力、气氛条件,例如氮气气氛)以及还原/氧化剂进行的修饰处于本申请的范围。

[0143] 定义

[0144] 为了辅助理解根据本公开的组合物和方法的详细描述,提供一些明确的定义以促进本公开的各个方面的明确公开。除非另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语都具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0145] 如本文所使用的,“表达”是指从DNA模板转录多核苷酸(如转录为mRNA或其它RNA转录本)的过程和/或随后将经转录的mRNA翻译为肽、多肽、或蛋白质的过程。转录本和经编码的多肽可以统称为“基因产物”。如果多核苷酸衍生自基因组DNA,则表达可以包含在真核细胞中剪接mRNA。

[0146] 术语“基因”是指核酸(例如DNA或RNA)序列,所述核酸序列包括产生RNA或多肽或其前体(例如胰岛素原)所需的编码序列。功能多肽可以由全长编码序列或由编码序列的任何部分来编码,条件是保持多肽的功能性质的期望的活性(例如,酶促活性、配体结合、信号转导等)。当参考基因使用时,术语“部分”是指所述基因的片段。片段的大小的范围可以为几个核苷酸到整个基因序列减去一个核苷酸。因此,“包括基因的至少一部分的核苷酸”可以包括基因的片段或整个基因。

[0147] 术语“基因”还涵盖结构基因的编码区,并且包含邻近于所述编码区在5'和3'端上距任一端约1kb定位以使得所述基因与全长mRNA的长度相对应的序列。位于编码区的5'并且存在于mRNA上的序列被称为5'非翻译序列。位于编码区的3'或下游并且存在于mRNA上的序列被称为3'非翻译序列。术语“基因”涵盖cDNA和基因组形式的基因。基因组形式或克隆的基因含有被称为“内含子”或“中间区”或“中间序列”的非编码序列打断的编码区。内含子是转录成核RNA(hnRNA)的基因的区段,内含子可以含有调控元素,例如增强子。内含子被从核转录本或初级转录本中去除或“剪接掉”;因此,信使RNA(mRNA)转录本中不存在内含子。mRNA在翻译期间起作用,从而指定新生多肽中的氨基酸的序列或次序。

[0148] “基因转移”和“基因递送”是指用于将特定核酸序列可靠地插入到靶细胞中的方法或系统。

[0149] 当涉及核酸分子时,术语“重组”是指包含通过分子生物技术的方式连接在一起的核酸的区段的核酸分子。当涉及蛋白质或多肽时,术语“重组”是指使用重组核酸分子表达的蛋白质分子。

[0150] 术语“可操作地连接”是指调控序列与异源核酸序列之间的导致后者表达的功能连接。例如,当第一核酸序列被放置成与第二核酸序列成功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子与编码序



列可操作地连接。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区的情况下,处于同一阅读框中。

[0151] 如本文所使用的,术语“体外”是指发生在人工环境,例如测试管或反应器皿中、细胞培养基等中而不是多细胞生物体内的事件。

[0152] 如本文所使用的,术语“体内”是指发生在多细胞生物体,如非人类动物内的事件。

[0153] 如本文所使用的,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”或“减轻”或“改善”可互换使用。这些术语是指获得有益或期望的结果的方法,包括但不限于治疗益处和/或预防益处。治疗益处是指治疗下的一种或多种疾病、病症或症状的任何与治疗相关的改善或对一种或多种疾病、病状或症状的作用。为了得到预防益处,可以将组合物施用于有患特定疾病、病状或症状的风险的受试者,或施用于报告疾病的生理症状中的一种或多种生理症状的受试者,即使所述疾病、病状或症状可能尚未显现也是如此。

[0154] 术语“防止(prevent)”、“防止(preventing)”、“防止(prevention)”、“预防性治疗(prophylactic treatment)”等是指降低未患有病症或病状但有患病症或病状的风险或易于患病症或病状的受试者患病症或病状的可能性。

[0155] 如本文所使用的术语“疾病”旨在是通常同义的,并且与术语“病症”和“病状”(如医学病状)可互换使用,因为所有均反映人或动物身体或其部分之一的使正常功能受损,通常表现为明显的体征和症状,并且使人或动物的生命的持续时间或质量降低的异常状况。

[0156] 术语“减少(decrease)”、“降低(reduced)”、“降低(reduction)”、“减少(decrease)”或“抑制”在本文中通常全部用于指统计学显著量的减少。然而,为了避免疑问,“降低(reduced)”、“降低(reduction)”、“减少(decrease)”或“抑制”意指与参考水平相比减少了至少10%,例如,与参考水平相比减少了至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或多达且包含100%的减少(例如,与参考样品相比不存在的水平)或介于10-100%之间的任何减少。

[0157] 如本文所使用的,术语“调节”意在指代生物状态的任何改变,即增加、减少等。

[0158] 术语“增加(increased)”、“增加(increase)”或“增强”或“激活”在本文中通常全部用来指统计显著量的增加;为了避免任何疑问,术语“增加(increased)”、“增加(increase)”或“增强”或“激活”意指与参考水平相比增加了至少10%,例如与参考水平相比增加了至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或高达且包含100%的增加或介于10-100%的任何增加,或与参考水平相比至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍或至少约10倍的增加或介于2倍与10倍或更大之间的任何增加。

[0159] 术语“有效量”、“有效给药”或“有效剂量”被定义为足以达到或至少部分地达到期望的效果的量。药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是药物的当单独或与另一种治疗剂组合使用时,促进通过疾病症状的严重度的降低、疾病的无症状阶段的频率和持续时间的增加或由于疾病困扰造成的损害或残疾的防止等证明的疾病消退的任何量。药物的“预防有效量”或“预防有效量”是药物的当单独或与另一种治疗剂组合施用于有患疾病或遭受疾病复发的风险的受试者时,抑制疾病的发展或复发的量。治疗剂或预防剂促进疾病消退或抑制疾病的发展或复发的能力可以使用熟练的技术人员已知的多种方法,如在临床试验期间的人类受试者中、在可预测人类中的功效的动物模型系统中或通过体外测定

中测定药剂的活性来评价。

[0160] 剂量通常表达为与体重相关。因此,以[g、mg或其它单位]/kg (或g、mg等)表示的剂量通常是指[g、mg或其它单位]“体重每kg (或g、mg等)”,即使未明确提及术语“体重”也是如此。

[0161] 术语“药剂”在本文中用于表示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子(如核酸、抗体、蛋白质或其部分,例如肽)或由如细菌、植物、真菌或动物(尤其是哺乳动物)细胞或组织等生物材料制成的提取物。此类药剂的活性可以使其适合作为“治疗剂”,所述治疗剂是在受试者中局部或全身地起作用的一种或多种生物、生理或药理活性物质。

[0162] 术语“治疗剂”、“有治疗能力的药剂”或“治疗药剂”可互换使用,并且是指施用于受试者时赋予某些有益作用的分子或化合物。有益作用包含实现诊断确定;改善疾病、症状、病症或病理病状;降低或防止疾病、症状、病症或病状的发作;以及通常抵抗疾病、症状、病状或病理病状。

[0163] 除非在上下文中另外清楚,否则如本文所使用的“组合”疗法旨在涵盖以协调的方式施用两种或更多种治疗剂,并且包含但不限于同时给药。具体地,组合疗法涵盖共同施用(例如,共同调配物的施用或单独的治疗组合物的同时施用)和连续或顺序施用两者,条件是一种治疗剂的施用以某种方式按照另一种治疗剂的施用调节。例如,一种治疗剂可以仅在不同的治疗剂已经施用并且允许在规定的时段起作用之后施用。参见例如Kohrt等人,(2011)《血液(Blood)》117:2423。

[0164] “样品”、“测试样品”和“患者样品”在本文中可互换使用。样品可以是血清、尿液、血浆、羊水、脑脊髓液、细胞(例如抗体产生细胞)或组织的样品。此样品可以在从患者获得时直接使用,或者可以如通过过滤、蒸馏、提取、浓缩、离心、对干扰组分的失活、试剂的添加等进行预处理,从而以如本文讨论的或另外如本领域已知的某种方式对样品的特性进行修饰。如本文使用的术语“样品”和“生物样品”通常是指被测试和/或疑似含有所关注的分析物,如抗体的生物材料。样品可以是来自受试者的任何组织样品。样品可以包括来自受试者的蛋白质。

[0165] 如本文所使用的“同源”是指两个聚合物分子之间,例如两个核酸分子,如两个DNA分子或两个RNA分子之间,或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子两者中的亚基位置被相同的单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子中每个DNA分子中的位置被腺嘌呤占据,则其在所述位置处是同源的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置的数量的直接函数;例如,如果两个序列中的一半位置(例如,长度为十个亚基的聚合物中的五个位置)是同源的,则两个序列是50%同源的;如果位置中的90%(例如10个中的9个)是匹配的或同源的,则两个序列是90%同源的。举例来说,DNA序列5'-ATTGCC-3'和5'-TATGGC-3'具有50%的同源性。

[0166] “诱导型”启动子为当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,使基因产物基本上仅当细胞中存在与所述启动子相对应的诱导子时产生于细胞中的核苷酸序列。

[0167] 如本文所使用的术语“抑制”和“拮抗”意指使分子、反应、相互作用、基因、mRNA和/或蛋白质的表达、稳定性、功能或活性降低可测量的量或完全防止。抑制剂是例如与蛋白质、基因和mRNA稳定性、表达、功能和活性结合、部分或完全阻断对蛋白质、基因和mRNA稳定性、表达、功能和活性的刺激,减少、防止、延迟对蛋白质、基因和mRNA稳定性、表达、功能和

活性的激活,使蛋白质、基因和mRNA稳定性、表达、功能和活性失活、脱敏或下调蛋白质、基因和mRNA稳定性、表达、功能和活性的化合物,例如,拮抗剂。

[0168] 如本文所使用的术语“说明材料”包含可以用于传达试剂盒中的本发明的任何组合物和/或化合物的有用性的出版物、记录、图表或任何其它表达介质。试剂盒的说明材料可以例如固定到含有本发明的任何组合物的容器上,或者与含有任何组合物的容器一起运输。可替代地,说明材料可以与容器分开运输,意图是接受者可协同使用说明材料和任何组合物。说明材料的递送可以例如通过实体递送传达试剂盒的有用性的出版物或其它表达介质,或者可替代地可以通过电子传输,例如借助于计算机,如通过电子邮件或从网站下载来实现。

[0169] “分离”是指从自然状态改变或去除。例如,天然存在于活体动物中的核酸或肽未进行“分离”,而是与其天然状态的共存材料部分或完全分开的相同核酸或肽进行了“分离”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在或可以存在于非天然环境中,例如宿主细胞中。

[0170] “分离的核酸”是指已经与以天然存在的状态使其侧接的序列分开的核酸区段或片段,即已经从通常与所述片段相邻的序列,即,与其天然存在的基因组中的片段相邻的序列中去除的DNA片段。所述术语还应用于已经从天然伴随核酸的其它组分,即在细胞中天然伴随核酸的RNA或DNA或蛋白质中基本纯化的核酸。因此,所述术语包含例如掺入到载体、自主复制质粒或病毒或原核生物或真核生物的基因组DNA中,或以不依赖于其它序列的单独分子形式存在(即作为通过PCR或限制酶消化产生的cDNA或基因组或cDNA片段)的重组DNA。其还包含作为编码另外的多肽序列的杂合基因的一部分的重组DNA。

[0171] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包含彼此的简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质或RNA的短语核苷酸序列还可以包含内含子,其程度为编码蛋白质的核苷酸序列在某些版本中可以含有一个或多个内含子。

[0172] 组合物的“肠胃外”施用包含例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射、鞘内或输注技术。

[0173] 如本文所使用的,术语“药物组合物”是指可用于本发明内的至少一种化合物与其它化学组分,如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂的混合物。药物组合物促进将化合物施用于生物体。

[0174] 施用本领域中存在的化合物的多种技术包含但不限于静脉内、口服、气雾剂、肠胃外、眼部、肺部和局部施用。

[0175] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的”是指不消除组合物的生物学活性或性质并且相对无毒的材料,如载体或稀释剂,即所述材料可以在不引起不期望的生物效应或者不会以有害的方式与含有所述材料的组合物的任何组分相互作用的情况下施用于个体。

[0176] 语言“药学上可接受的载体”包含涉及在受试者体内载运或输送携带本发明的一种或多种化合物或向受试者载运或输送本发明的一种或多种化合物,使得所述化合物可以执行其预期功能的药学上可接受的盐、药学上可接受的材料、组合物或载体,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包囊材料。通常,此类化合物从一个器官或身体的一部分载运或输送到另一个器官或身体的另一部分。在与所述调配物的其它成分相容并且对受试者无伤害的意义上,每种盐或载体必须是“可接受的”。可以充当药学上可接受的载体的材料

的一些实例包含：糖，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素和其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；粉状黄蓍；麦芽；明胶；滑石粉；赋形剂，如可可脂和栓剂蜡；油，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油以及大豆油；二醇，如丙二醇；多元醇，如甘油、山梨醇、甘露醇以及聚乙二醇；酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；海藻酸；无热原水；等渗盐水；林格氏溶液；乙醇；磷酸盐缓冲溶液；稀释剂；成粒剂；润滑剂；结合剂；崩解剂；润湿剂；乳化剂；着色剂；释放剂；包衣剂；甜味剂；调味剂；芳香剂；防腐剂；抗氧化剂；增塑剂；胶凝剂；增稠剂；固化剂；硬化剂；悬浮剂；表面活性剂；保湿剂；载体；稳定剂；以及药物调配物中采用的其它无毒的相容的物质或其任何组合。如本文所使用的，“药学上可接受的载体”还包含与化合物的活性相容并且对于受试者来说生理学可接受的任何和所有包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂以及吸收延迟剂等。也可以将补充活性化合物掺入到组合物总。

[0177] 如本文所使用的，语言“药学上可接受的盐”是指由药学上可接受的无毒酸制备的所施用的化合物的盐，所述无毒酸包含无机酸、有机酸、溶剂化物、水合物以及其包合物。

[0178] “多肽”是指由氨基酸残基、相关的天然存在的结构变体和通过肽键连接的其合成的非天然存在的类似物构成的聚合物。合成多肽可以例如使用自动化多肽合成仪合成。术语“蛋白质”通常是指大多肽。术语“肽”通常是指短多肽。

[0179] 本文使用常规符号来描绘多肽序列：多肽序列的左手端是氨基末端；多肽序列的右手端是羧基末端。如本文所使用的，“拟肽”是含有能够模拟亲本肽的生物作用的非肽结构元素的化合物。拟肽可以包括或不包括肽键。

[0180] 如本文所使用的术语“启动子”被定义为由启动多核苷酸序列的特异性转录所需的细胞的合成机制或引入的合成机制识别的DNA序列。

[0181] 如本文所使用的，术语“启动子/调控序列”是指表达与启动子/调控序列可操作地连接的基因产物所需的核酸序列。在一些情况下，此序列可以是核心启动子序列，并且在其它情况下，此序列也可以包含表达基因产物所需的增强子序列和其它调控元素。启动子/调节序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调节序列。

[0182] 如本文所使用的术语“重组多肽”被定义为通过使用重组DNA方法产生的多肽。如本文所使用的术语“重组DNA”被定义为通过连接来自不同来源的DNA的段而产生的DNA。

[0183] 如本文所使用的术语“RNA”被定义为核糖核酸。如本文所使用的术语“特异性结合 (specifically bind)”或“特异性结合 (specifically binds)”是指第一分子(例如，抗体)与第二分子(例如，特定抗原表位)优先结合，但不一定仅与所述第二分子结合。

[0184] 如本文所使用的，“受试者”是指人类或非人类哺乳动物。非人类哺乳动物包含例如牲畜和宠物，如绵羊、牛、猪、犬、猫和鼠类哺乳动物。在一些实施例中，受试者是人。“组织特异性”启动子是当与由基因编码或指定的多核苷酸可操作地连接时，使基因产物基本上仅在细胞为与启动子对应的细胞类型的细胞的情况下产生于细胞中的核苷酸序列。

[0185] 如本文所使用的术语“经转染的”或“经转换的”或“经转导的”是指将外源核酸转移或引入到宿主细胞中的过程。“经转染的”或“经转换的”或“经转导的”细胞已被外源核酸转染、转换或转导。所述细胞包含原代受试者细胞和其后代。

[0186] 如本文所使用的短语“在转录控制下”或“可操作地连接”是指启动子处于相对于多核苷酸的正确位置和朝向上，以控制通过RNA聚合酶进行的转录的启动和多核苷酸的表

达。如本文所用的术语“变体”是其序列分别与参考核酸序列或肽序列不同,但保留了参考分子的基本性质的核酸序列或肽序列。核酸变体的序列的变化可能不会改变由参考核酸编码的肽的氨基酸序列,或者可能导致氨基酸取代、添加、缺失、融合和截短。肽变体的序列的变化通常是有限的或保守的,使得参考肽和变体的序列总体上是非常相似的,并且在许多区是相同的。

[0187] 变体和参考肽的氨基酸序列的不同之处可以为任何组合的一个或多个取代、添加或缺失。核酸或肽的变体可以是天然存在的,如等位基因变体,或者可以是未知天然存在的变体。核酸和肽的非天然存在的变体可以通过诱变技术或通过直接合成来制备。

[0188] “载体”是包括分离的核酸并且可以用于将分离的核酸递送到细胞内部的物质的组合物。许多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子化合物或两亲性化合物相关联的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包含自主复制质粒或病毒。所述术语也应被解释为包含促进核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等。

[0189] 如本文所使用的,术语“病毒”被定义为由封闭在蛋白质包衣中的核酸(RNA或DNA)组成的,具有或不具有能够用其核酸转染细胞的外部脂质囊膜的颗粒。

[0190] 贯穿本公开,本发明的各个方面可以以范围格式来呈现。应当理解的是,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应被解释为对本发明范围的不灵活限制。因此,对范围的描述应当被视为具有具体公开的所有可能的子范围以及所述范围内的单独数值。例如,对1到6的范围的描述应被视为具有具体公开的子范围,如1到3、1到4、1到5、2到4、2到6、3到6等,以及所述范围内的单独数量,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0191] 在此必须指出,如在本说明书以及所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包含复数指示物,除非上下文另外清楚地指出。

[0192] 术语“包含”、“包括”、“含有”或“具有”和其变体旨在涵盖其后所列示的项和其等效物以及另外的主题,除非另有说明。

[0193] 短语“在一个实施例中”、“在各个实施例中”、“在一些实施例中”等重复使用。此类短语不一定指代相同的实施例,但是可以指代相同的实施例,除非上下文另外指出。

[0194] 术语“和/或”或“/”意指与此术语相关联的项中的任何一个项、所述项的任何组合或所有的项。

[0195] 词语“基本上”不排除“完全”,例如,“基本上无”Y的组合物可以完全无Y。在需要的情况下,可以从本发明的定义中省略词语“基本上”。

[0196] 如本文所使用的,术语“大约”或“约”,当应用于所关注的一个或多个值时,是指与所规定的参考值相似的值。在一些实施例中,术语“大约”或“约”是指在规定的参考值的任一方向(大于或小于)上落入25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内的值的范围,除非另外说明或另外从上下文变得显而易见的(除了此数量将超过可能值的100%的情况)。除非本文另外指出,否则术语“约”旨在包含接近在单独成分、组合物或实施例的功能方面相等的所引用的范围的值,例如重量%。

[0197] 应当理解,无论何时在本文提供了值和范围,这些值和范围所涵盖的所有值和范围都旨在涵盖在本发明的范围内。此外,落入这些范围内的所有值以及值的范围的上限或下限也是本申请所设想的。

[0198] 如本文所使用的,术语“每个”当参考项的集合使用时,旨在标识所述集合中的单独项,但是不一定指代所述集合中的每个项。如果明确公开或上下文另有明确规定,则可能有例外。

[0199] 本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“如”)的使用仅旨在更好地阐述本发明并且不对本发明的范围构成限制,除非另外声明。说明书中的任何语言都不应当被解释为指示任何未要求保护的元素为实践本发明所必需的。

[0200] 本文描述的所有方法以任何适合的顺序执行,除非本文另外指示或与上下文另外明显地矛盾。关于所提供的方法中的任何方法,该方法的步骤可以同时发生或依序发生。当方法的步骤依序发生时,步骤可以以任何顺序发生,除非另有说明。

[0201] 在方法包括步骤的组合的情况下,步骤中的每个步骤和每个组合或子组合都涵盖在本公开的范围内,除非本文另外指出。

[0202] 本文引用的每个出版物、专利申请、专利和其它参考文献在通过参考以其整体在此并入,其程度为其不与本公开不一致。本文公开的出版物的提供仅为了其在本发明的申请日之前公开。本文中的任何内容均不应被解释为承认本发明因现有发明而无权先于此发布。进一步地,提供的发布日期可能与实际发布日期不同,所述实际发布日期可能需要独立确认。

[0203] 应当理解,本文所描述的实例和实施例仅是出于说明性目的,并且根据其进行的各种修改或改变将启发本领域的技术人员并且将被包含在本申请的精神与权限范围内和所附权利要求书的范围内。

[0204] 实例

[0205] 实例1

[0206] 除非另有说明,否则所有起始材料都是从商业供应商处获得的,并且在不纯化的情况下使用。如本文所描述的,从NIH资助的生物储存库([www.nimhgenetics.org/available\\_data/ipsc/](http://www.nimhgenetics.org/available_data/ipsc/))获得了患者来源的经诱导的多能干细胞(iPSC)。使用了正常健康细胞和携带SOD1 (N139K)的突变并被诊断为家族性ALS的个体的细胞两者。已经确立了分化方案在用生长因子和专门培养基的定义的方案治疗40天后可导致对运动神经元的培养(图1)。将治疗性(ASPA)和对照(GFP)基因包封到AAV载体中,并对初始队列的细胞进行处理以评估对线粒体功能的影响。与野生型细胞相比,从SOD1突变运动神经元分离的线粒体被示出为具有较低的ATP合成速率,并且相对于AAV-GFP对照,用AAV-ASPA对这些突变细胞进行转导导致显著拯救了线粒体中的ATP合成速率,如通过基于发光的原位测定所评估的(图2)。

[0207] 实例2

[0208] 对来自16周龄SOD G93A小鼠脊髓的分离的线粒体中的ATP合成的ASPA衍生的游离天冬氨酸促进的分析。

[0209] 使用机械均质化和差异离心从整个16周龄SOD G93A脊髓中分离出线粒体。在用于测定之前,将线粒体保持在冰上。使用可商购的基于发光的试剂盒分析了30μg分离的线粒

体中的ATP合成速率。在含有萤光素酶和萤光素的溶液中制备含有1.0mM苹果酸、1.0mM谷氨酸、10mM NADH和0.2mM ADP的反应混合物,并添加30μg线粒体。2U/ml天冬氨酸转氨酶和3U/ml苹果酸脱氢酶的添加可驱动MAS并启动ATP合成。在本实例中,按照图8中的方案,用游离天冬氨酸取代通过来自过表达野生型ASPA或具有5mM NAA的非功能性突变ASPA的细胞的裂解物的温育产生的反应产物。将野生型ASPA反应产物添加到SOD脊髓线粒体中导致了ATP合成速率的显著增加,如通过3分钟的过程中的发光所测量的,而添加非功能性E285A ASPA突变反应产物则没有导致显著增加(图9)。通过HPLC(表1)评估了这些反应产物的天冬氨酸含量,其示出了野生型ASPA反应产物中的天冬氨酸增加了>800倍。

[0210] 表1示出了在将来自用具有5mM NAA的野生型ASPA质粒(WT)或无功能E285 ASPA(E285A)转染的海拉细胞的50μl裂解物孵育2小时之后,反应产物的天冬氨酸含量。在含有50mM三-HCL(pH 8.0)、50mM NaCl、0.5mM DTT、0.05% IPEGAL CA630和5mM NAA的200μl混合物中执行了反应。通过加热到95℃持续3分钟终止反应。通过OPA衍生化的样品的HPLC分析,针对天冬氨酸浓度对20μl反应混合物进行了测定。测定了每个转染组的5个单独样品。

[0211] 表1.ASPA活性测定中的天冬氨酸含量

[0212]

	天冬氨酸浓度(μMOL)	天冬氨酸含量,以50μL计
WT	860.67	215.1675
	978.22	244.555
	567.83	141.9575
	1063.22	265.805
	722.47	180.6175
均值	838.482	209.6205
SD	198.265903	49.5664759
SEM	88.6672075	22.1668019
E285A	1.27	0.3175
	0	0
	2.11	0.5275
	0	0
	0	0
均值	0.676	0.169
SD	0.97212653	0.24303163
SEM	0.4347482	0.10868705

[0213] 实例3

[0214] 对SOD G93A小鼠的AAV-ASPA处理

[0215] 用 $1 \times 10^{11}$  AAV9-CBh-ASPA载体基因组(vg)通过腰椎鞘内注射对8周龄雄性SOD G93A小鼠进行了转导。通过吸入麻醉(异氟烷,4%诱导,保持滴定直到起作用)对小鼠进行麻醉,并以5μl的体积递送载体。通过相同的施用途径(ROA)使对照动物接受5μl生理盐水(0.9%)。从9-16周龄开始,每周一次在加速的旋转杆(4-40rpm)上对动物进行测试。记录落入3次连续3分钟试验中的平均潜伏期(单独试验之间的30秒静止阶段)。9-11周被指定为训练期,并且在经盐水处理的组与经AAV9-ASPA处理的组之间,将落入12、13、14、15和16周的

潜伏 ( $n=15/\text{组}$ ) 进行比较。由对治疗组不知情的个体执行旋转杆分析。经AAV9-ASPA处理的突变小鼠在旋转杆性能方面呈现出长期改善 (跌落潜伏期), 所述旋转杆性能在15周和16周龄时是统计显著的 (分别 $p=0.0218; 0.0271$ )。

[0216] 经AAV9-ASPA处理的SOD G93A动物中的NAA分解代谢的增加与ATP:AMP比率增加相关联。

[0217] 在包含ALS的广谱的神经退行性疾病中, NAA的特征性减少与病理性能量不足的增加相关联。当前研究的主要假设是, 此代谢反应是由于考虑到两个合成过程对游离天冬氨酸的共同需求, 尝试将从线粒体氧化磷酸化进行的NAA合成与ATP合成合成解偶。因此, 按照图9中呈现的数据, 将期望通过外源地供应的ASPA从内源性NAA中释放天冬氨酸来支持线粒体通过促进通过线粒体电子输送链 (ETC) 将细胞质天冬氨酸导入到线粒体以供使用的穿梭机制的ATP合成。期望当前的干预措施支持其数据与在增加的可用能量货币中测量的充当ETC的燃料的NAA供应的天冬氨酸一致的此假设。在此上下文下, 主要指标是ASPA转基因的功能。紧接16周旋转杆分析之后, 在从16周龄的SOD G93A动物中分离的脊髓中证实了AAV递送的ASPA的功能。将年龄匹配的C57BL/6J野生型 (非SOD) 雄性小鼠用作校准参考对照。通过HPLC对来自AAV9-ASPA和盐水对照SOD G93A小鼠的脊髓的NAA、AMP和ATP含量进行了分析。紧接着16周旋转杆分析之后, 从16周龄的动物中获得了全闪冻脊髓。在沉淀溶液中使用机械分散元件对整个脊髓进行均质化, 并且用氯仿提取。对由此制备的样品进行等分, 并且在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下存储, 以供随后分析。使用从经纯化的参考标准品制备的标准曲线计算目标代谢物的绝对摩尔浓度。16周龄经盐水处理的SOD G93A小鼠呈现出的相对于野生型参考的脊髓NAA的减少 ( $p=0.0015, n=5/\text{组}$ ; 图11), 如先前报道临床群体和动物模型群体两者中的此代谢产物的减少。经盐水处理的突变小鼠脊髓还呈现出ATP:AMP比率降低 ( $p=0.0134$ ), 这指示ATP的水解 (即使用) 超过了其合成。经SOD G93A AAV9-ASPA处理的脊髓相对于经盐水处理的对照, 呈现出NAA降低了另外1.7倍 ( $p=0.011, n=5/\text{组}$ ), 这指示与ATP:AMP比率的显著增加 ( $p=0.0045$ ) 相关联的AAV递送的ASPA转基因的功能性, 这指示ATP产生增加并且能量状态提高。这表明由于用AAV9-ASPA转导而导致的增加的NAA分解代谢的产物支持可生物利用的能量货币, 其对运动功能具有相关联的益处 (图10)。

[0218] 经AAV9-ASPA处理的脊髓线粒体显示出相对于可用的NAA衍生的天冬氨酸显现的ATP合成水平增加。

[0219] 从经盐水和经AAV9-ASPA处理的SOD G93A突变小鼠的脊髓以及16周龄的年龄匹配的野生型对照中分离出完整线粒体, 并使用了所述完整线粒体来使用基于发光的测定对ATP合成的速率进行评估。向来自每个队列的线粒体提供ADP, 并在3分钟的过程内对到ATP的转化率进行评估, 并将所述转化率以线粒体蛋白的纳米/分钟/毫克的形式表示为平均ATP合成速率 (图12)。与年龄匹配的野生型对照相比, 16周龄的SOD G93A经盐水处理的脊髓线粒体中的ATP合成速率降低了1.7倍 ( $p=0.00058$ ), 这表明病理性能量危机。与盐水对照相比, 经AAV9-ASPA处理的SOD G93A线粒体中的ATP合成速率显著提高 ( $p=0.0022$ ), 与ATP:AMP比率的提高一致 (图10B), 这指示促进ASPA分解代谢天冬氨酸进行的线粒体氧化代谢能够拯救运动功能的恶化。

[0220] 尽管已经以实施例为重点描述了本发明, 但是对于本领域的普通技术人员而言显而易见的是, 可以使用组合物和方法的变化, 并且意图是可以以与本文具体描述的方式不



同的方式另外实践本发明。因此,本发明包含涵盖在如以下权利要求所限定的本发明的精神和范围内的所有修改。

## 序列表

&lt;110&gt; 罗文大学(Rowan University)

&lt;120&gt; 治疗或防止肌萎缩性

侧索硬化症的方法

&lt;130&gt; 189155.000002

&lt;150&gt; 62/724,780

&lt;151&gt; 2018-08-30

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 313

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 1

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

---

Asp Gln Met Arg Lys Met Ile Lys His Ala Leu Asp Phe Ile His His		
195	200	205
Phe Asn Glu Gly Lys Glu Phe Pro Pro Cys Ala Ile Glu Val Tyr Lys		
210	215	220
Ile Ile Glu Lys Val Asp Tyr Pro Arg Asp Glu Asn Gly Glu Ile Ala		
225	230	235 240
Ala Ile Ile His Pro Asn Leu Gln Asp Gln Asp Trp Lys Pro Leu His		
	245	250 255
Pro Gly Asp Pro Met Phe Leu Thr Leu Asp Gly Lys Thr Ile Pro Leu		
	260	265 270
Gly Gly Asp Cys Thr Val Tyr Pro Val Phe Val Asn Glu Ala Ala Tyr		
	275	280 285
Tyr Glu Lys Lys Glu Ala Phe Ala Lys Thr Thr Lys Leu Thr Leu Asn		
	290	295 300
Ala Lys Ser Ile Arg Cys Cys Leu His		
305	310	

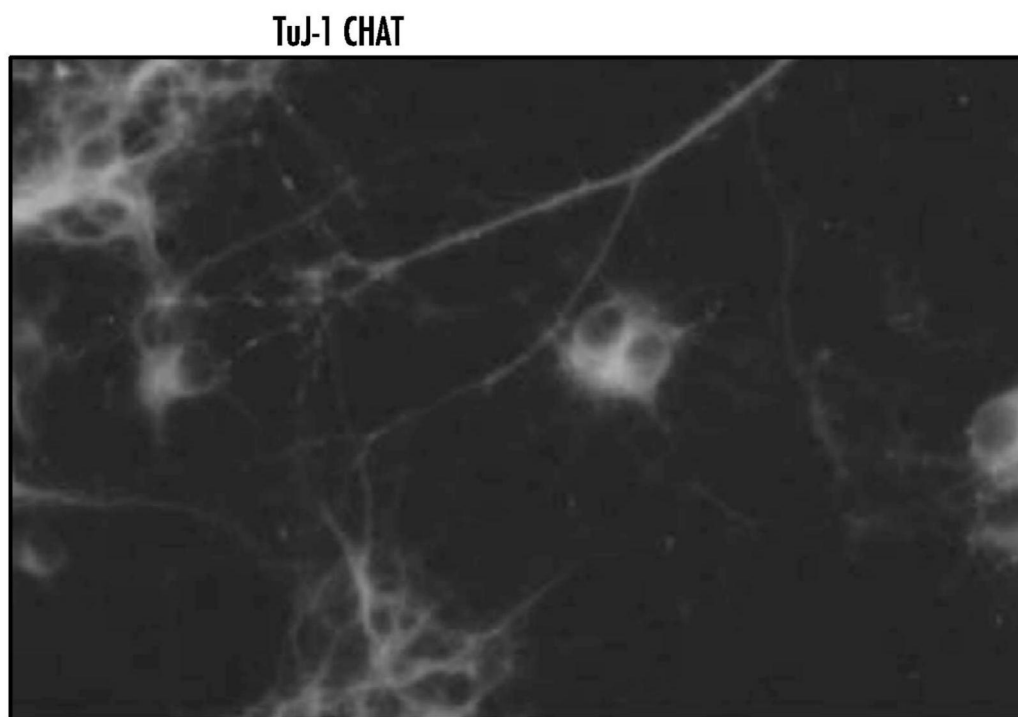


图1

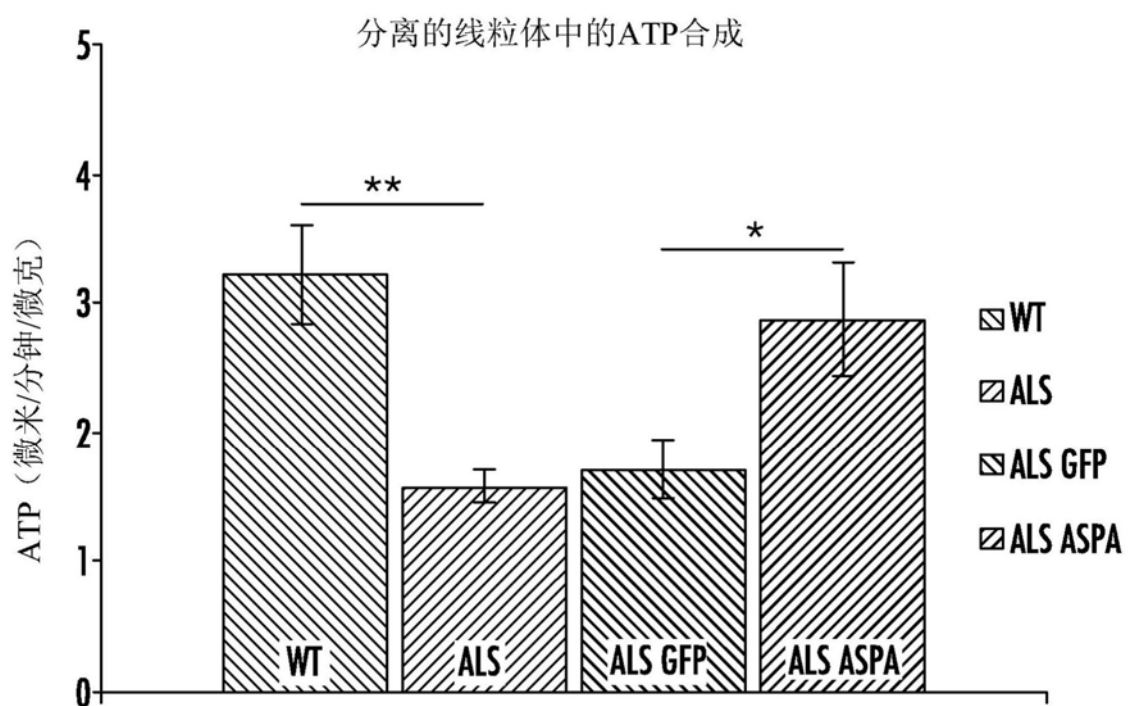


图2

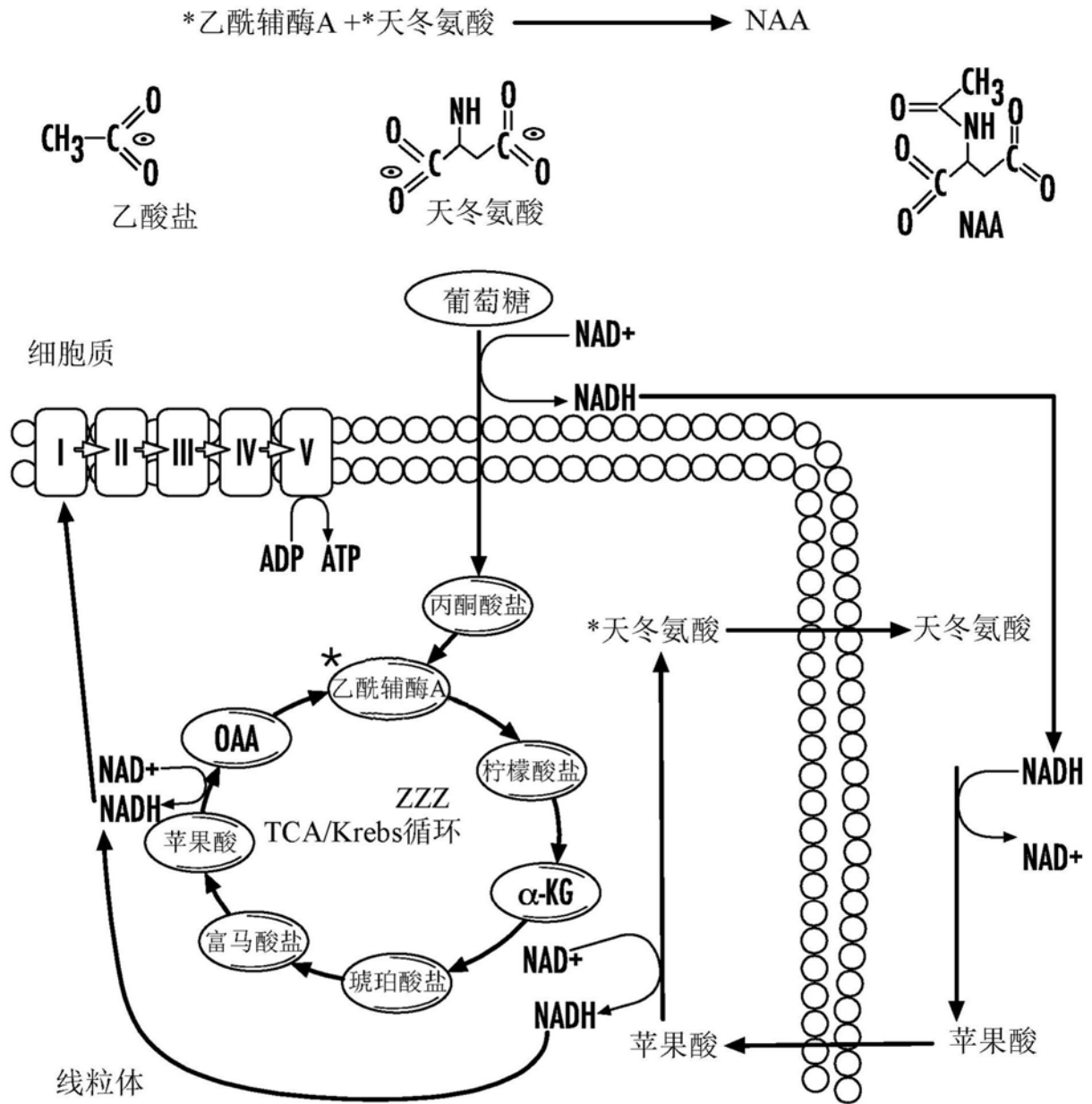


图3

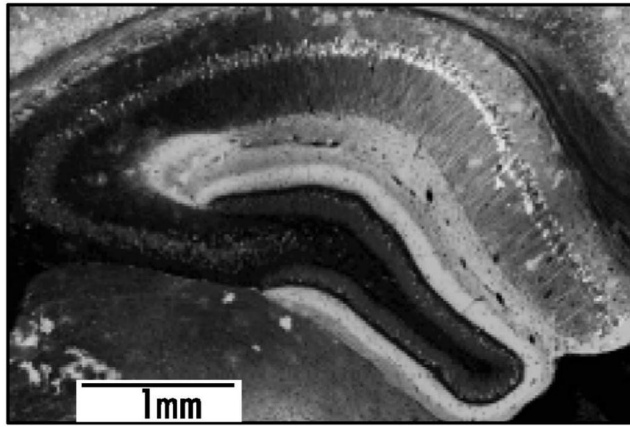


图4A

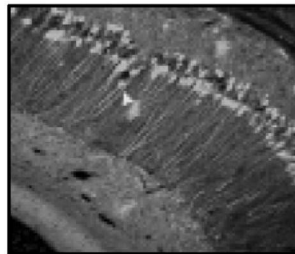


图4B

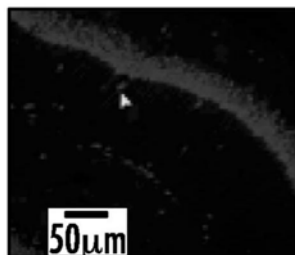


图4C

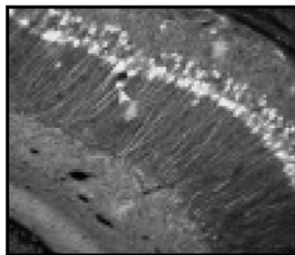


图4D

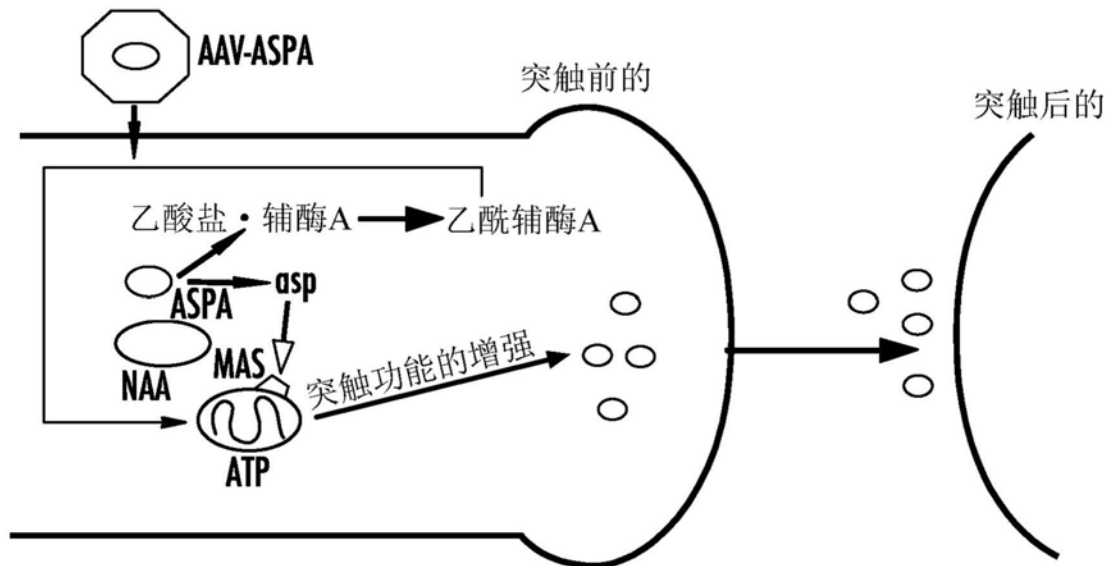


图5

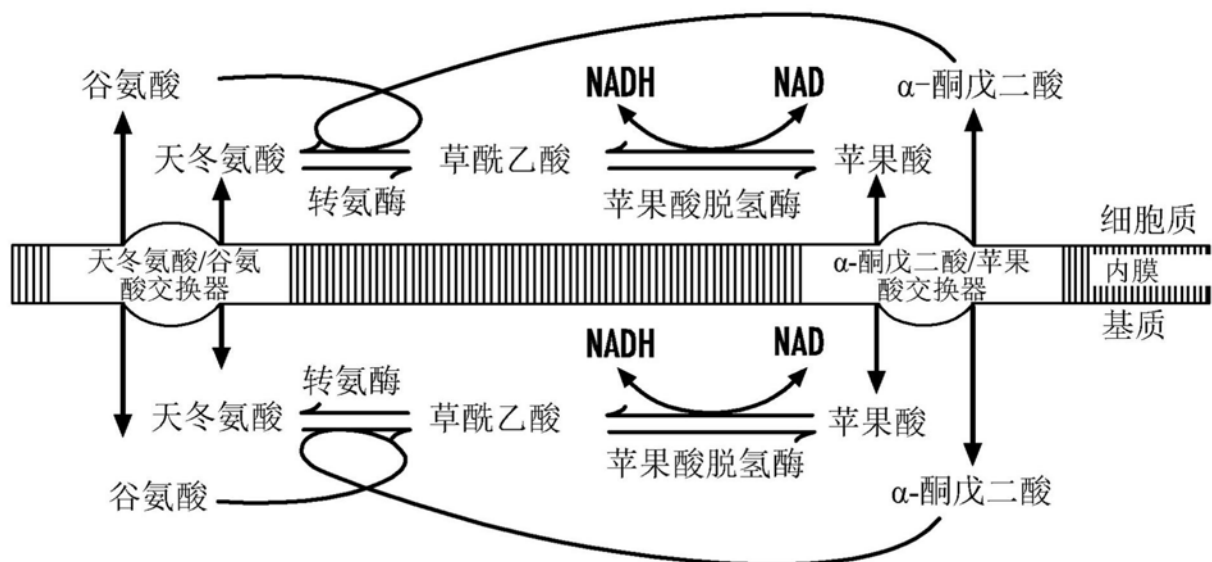


图6

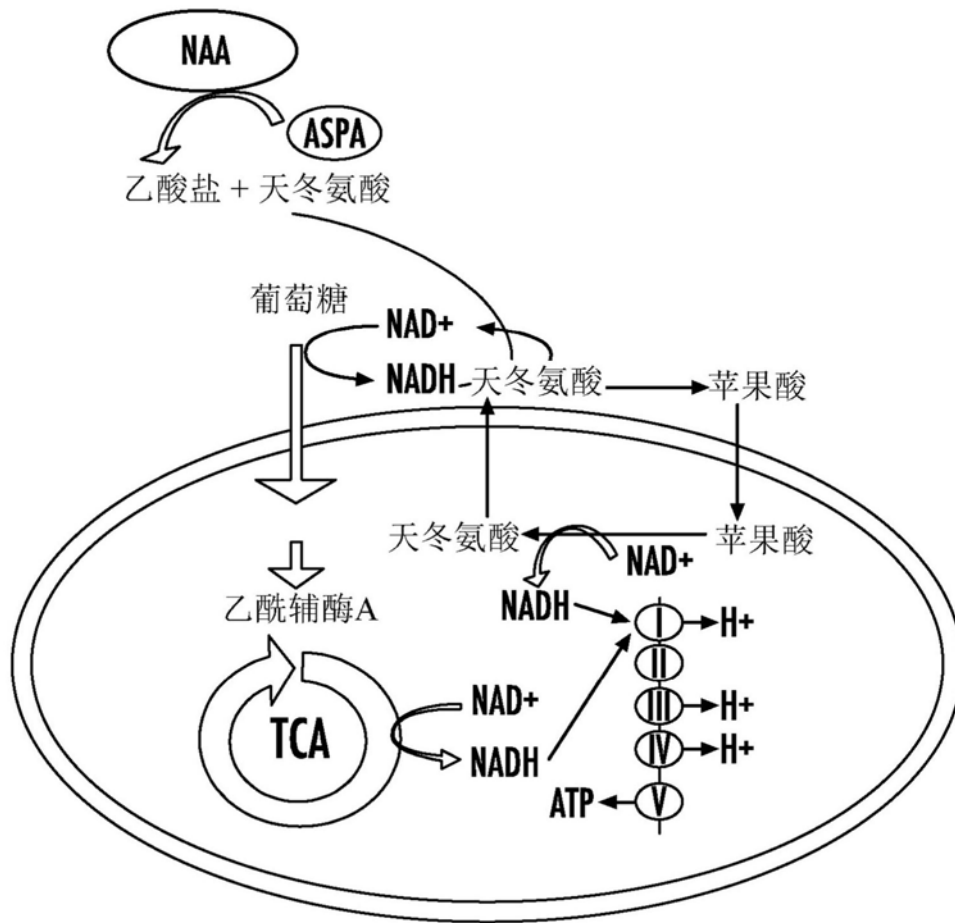


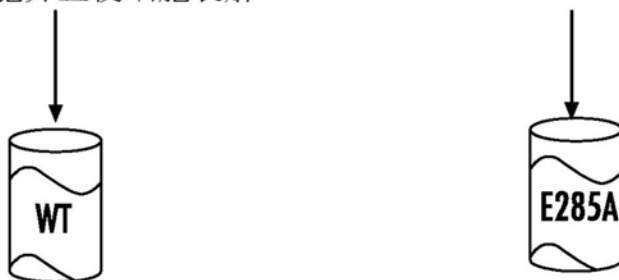
图7



1.用WT或E285A表达质粒转染海拉（Hela）细胞



2.收获细胞并且使细胞裂解



3.将裂解物添加到含有5mM NAA的分解代谢反应



4.将分解代谢反应产物添加到线粒体，以对ATP进行测定

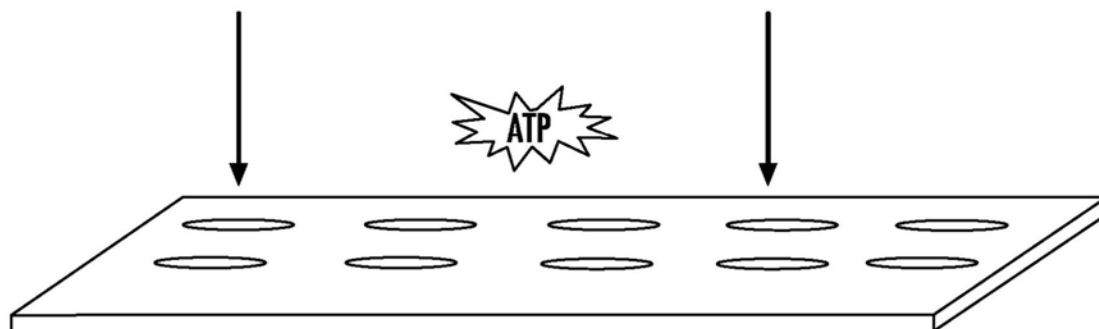


图8

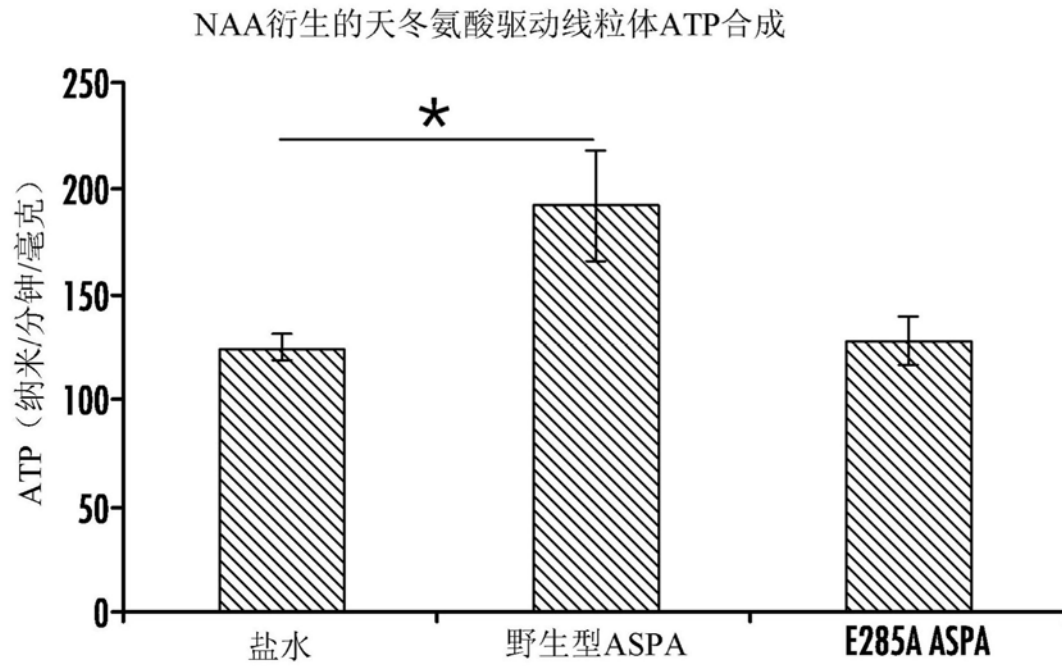


图9

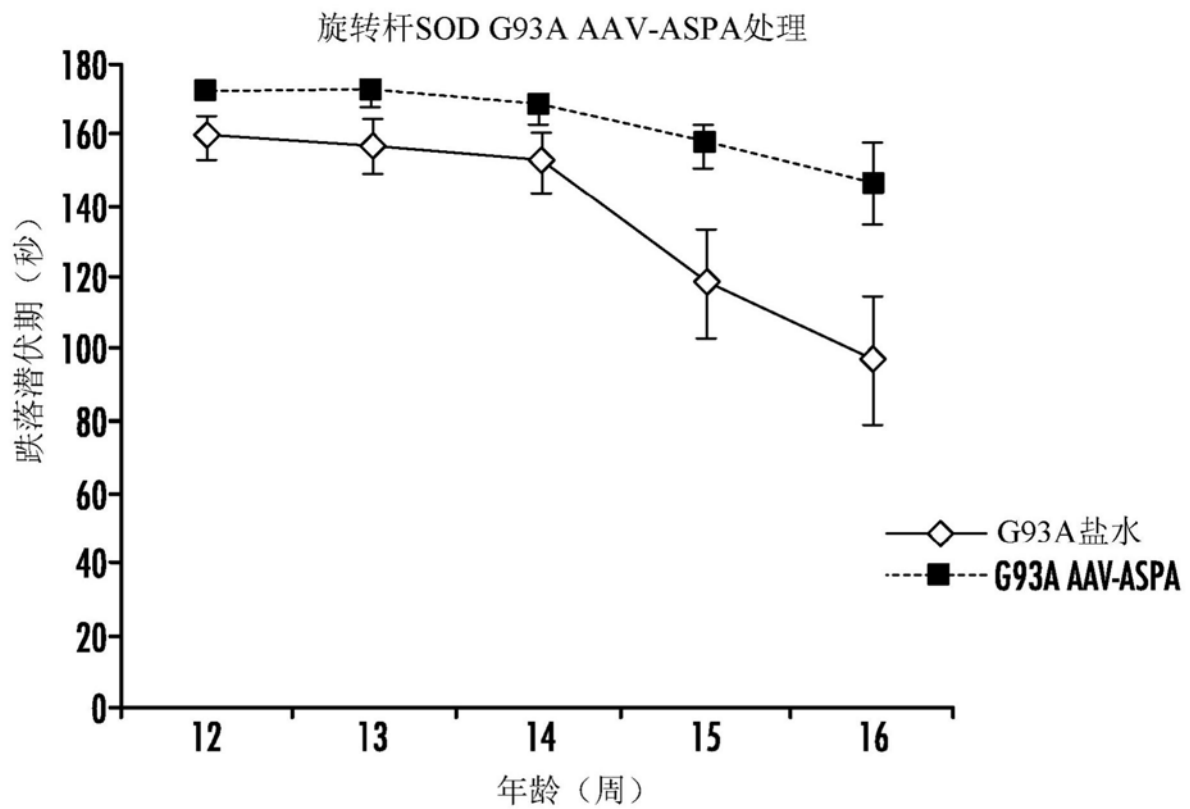


图10

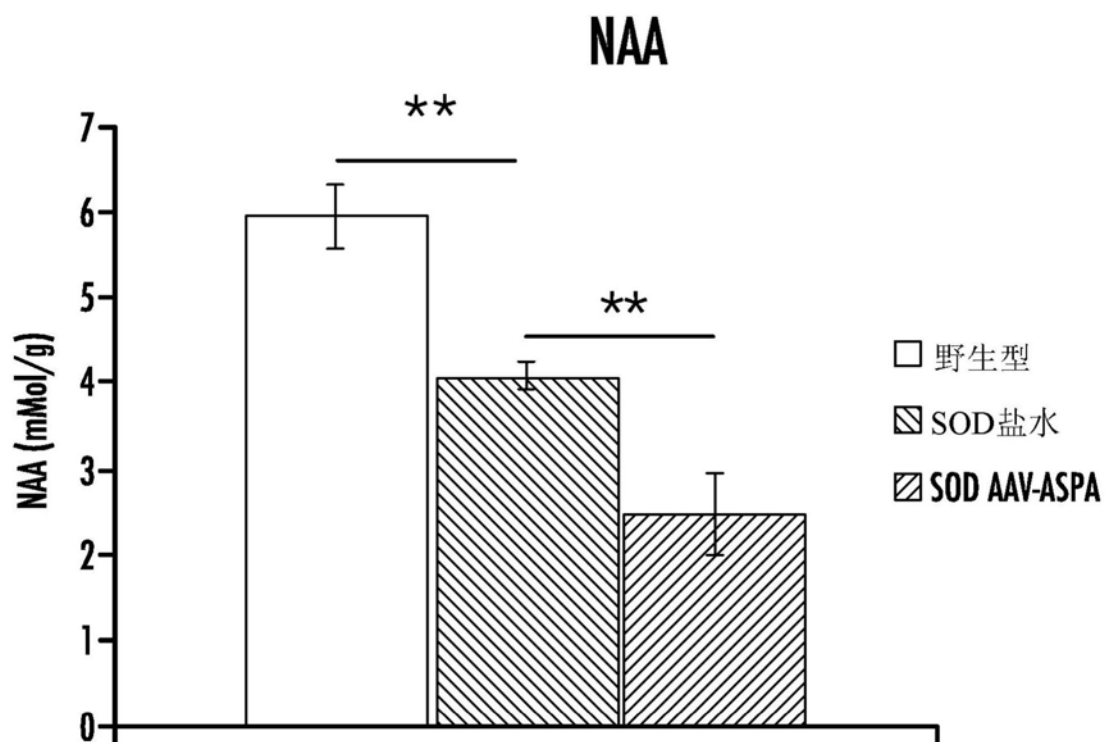


图11A

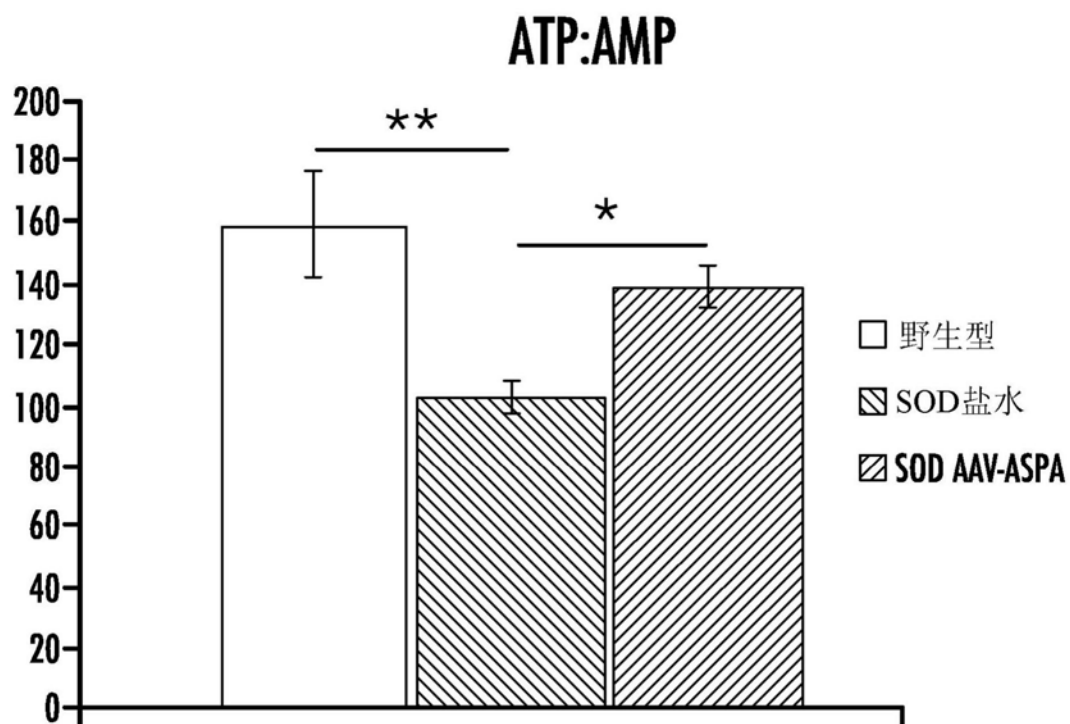


图11B

经ASPA处理的脊髓线粒体中的ATP合成

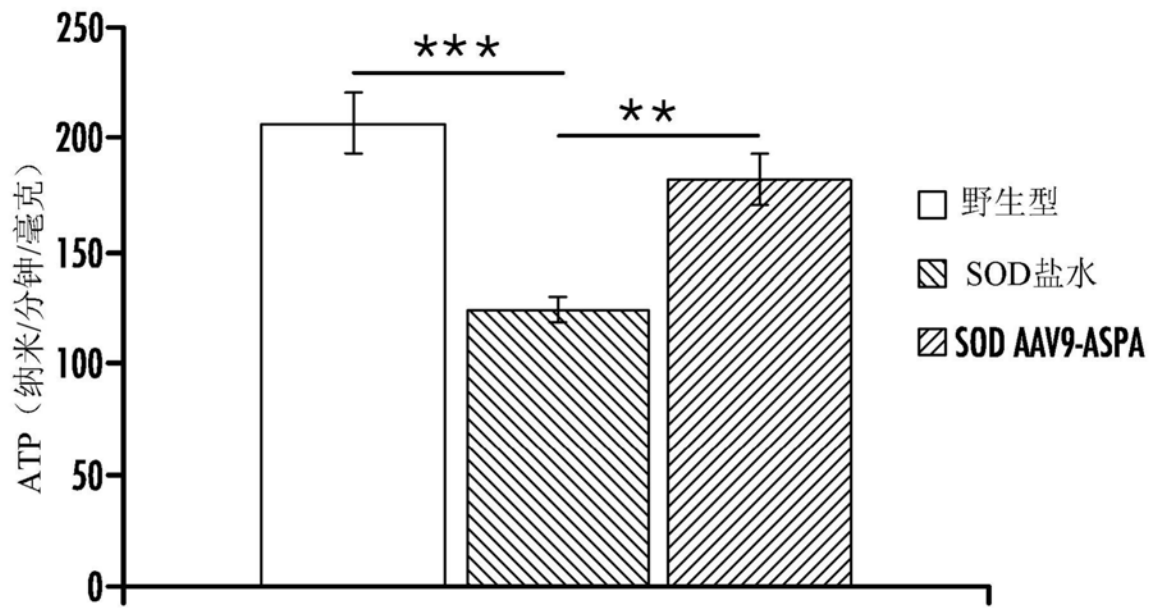


图12