



(10) 申请公布号 CN 116457466 A

(43) 申请公布日 2023.07.18

(21) 申请号 202180070652.0

(22) 申请日 2021.09.23

(30) 优先权数据

63/082,208 2020.09.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.04.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/051758 2021.09.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/066911 EN 2022.03.31

(71) 申请人 西洛斯治疗有限公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 拉吉·梅赫拉 蒂莫西·惠特克

(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

专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书4页 说明书37页

(54) 发明名称

用于抑制 α -突触核蛋白聚集的组合物和方法

(57) 摘要

本文提供了可用于治疗神经退行性疾病的方法和组合物,所述组合物包含编码抑制 α -突触核蛋白聚集的一种或多种肽的腺相关病毒载体。此类肽可用于治疗神经退行性疾病诸如阿尔茨海默病、路易体病、帕金森氏病(PD)、PD伴痴呆(PDD)、单纯自主神经衰竭(PAF)和多系统萎缩(MSA)。

1. 一种包含病毒载体的组合物,其中所述病毒载体包含编码包含以下氨基酸序列的肽的编码序列:

AVVWGVAV (SEQ ID NO:1) 或

AVVTGVAV (SEQ ID NO:2)。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述病毒载体包含编码包含以下氨基酸序列的肽的编码序列:

GAVVWGVAVKK (SEQ ID NO:3) 或

RAVVTGVAVAE (SEQ ID NO:4)。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体包含编码包含以下氨基酸序列的肽的编码序列:

GAVVWGVAVKKGRKKRRRQRRRPQ (SEQ ID NO:6) 或

YGRKKRRRRAVVTGVAVAE (SEQ ID NO:7)。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述肽的长度为9至45个氨基酸。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的组合物,其中所述肽的长度为30至40个氨基酸。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中所述肽的长度为34个氨基酸。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中所述肽的长度为36个氨基酸。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述肽通过与 α -突触核蛋白的残基68-78结合而抑制 α -突触核蛋白 (SEQ ID NO:8) 聚集。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体是AAV载体。

10. 如权利要求9所述的组合物,其中所述AAV载体是AAV血清型1载体 (AAV1)、AAV血清型2载体 (AAV2)、AAV血清型1和2混合载体 (AAV1/2)、AAV血清型3载体 (AAV3)、AAV血清型4载体 (AAV4)、AAV血清型5载体 (AAV5)、AAV血清型6载体 (AAV6)、AAV血清型7载体 (AAV7)、AAV血清型8载体 (AAV8) 或AAV血清型9载体 (AAV9)。

11. 如权利要求9-10中任一项所述的载体,其中所述AAV载体是AAV1载体、AAV2载体、AAV1/2载体、AAV4载体、AAV5载体、AAV8载体或AAV9载体。

12. 如权利要求9-11中任一项所述的组合物,其中所述AAV载体是AAV1/2载体。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体包含编码异源肽标签的编码序列。

14. 如权利要求13所述的组合物,其中所述异源肽标签偶联至所述肽。

15. 如权利要求13-14中任一项所述的组合物,其中所述异源肽标签是人流感血凝素 (HA) 标签。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体包含调控序列。

17. 如权利要求16所述的组合物,其中调控序列包含启动子。

18. 如权利要求17所述的组合物,其中所述启动子是诱导型启动子、组成型启动子或组织特异性启动子。

19. 如权利要求17-18中任一项所述的组合物,其中所述启动子是JC多瘤病毒启动子、血小板源性生长因子B链 (PDGF- β) 启动子、鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子或巨细胞病毒 (CMV) 启动子。

20. 如权利要求16所述的组合物,其中所述调控序列是SV40早期增强子/启动子元件、

混合CMV增强子/PDGF- β 启动子元件或混合CMV增强子/CBA启动子元件。

21. 如权利要求20所述的组合物,其中所述调控序列是混合CMV增强子/CBA启动子。

22. 如权利要求23所述的组合物,其中所述混合CMV增强子/CBA启动子包含SEQ ID NO: 9的核酸序列。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体包含转录后调控元件。

24. 如权利要求23所述的组合物,其中所述转录后调控元件是Woodchuck转录后调控元件。

25. 如权利要求24所述的组合物,其中所述Woodchuck转录后调控元件包含SEQ ID NO: 10的核酸序列。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体包含支架附着区序列。

27. 如权利要求26所述的组合物,其中所述支架附着区序列包含SEQ ID NO:12的核酸序列。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体包含聚腺苷酸化信号序列。

29. 如权利要求28所述的组合物,其中所述聚腺苷酸化序列是牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化信号序列。

30. 如权利要求29所述的组合物,其中所述牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化信号序列包含SEQ ID NO:11的核酸序列。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的核酸序列。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含药学上可接受的赋形剂。

33. 一种试剂盒,其包括如权利要求1-32中任一项所述的组合物。

34. 如权利要求33所述的试剂盒,其还包括包含所述组合物的预装注射器。

35. 一种腺相关病毒(AAV)载体,其中所述AAV载体包含编码包含以下氨基酸序列的肽的编码序列:

AVVWGVAV (SEQ ID NO:1) 或

AVVTGVAV (SEQ ID NO:2)。

36. 如权利要求35所述的AAV载体,其中所述AAV载体包含编码包含以下氨基酸序列的肽的编码序列:

GAVVWGVAVKK (SEQ ID NO:3) 或

RAVVTGVAVAE (SEQ ID NO:4)。

37. 如权利要求35-36中任一项所述的AAV载体,其中所述AAV载体包含编码包含以下氨基酸序列的肽的编码序列:

GAVVWGVAVKKGRKKRRRQRRRPQ (SEQ ID NO:6) 或

YGRKKRRRRAVVTGVAVAE (SEQ ID NO:7)。

38. 如权利要求35-37中任一项所述的AAV载体,其中所述肽的长度为9至45个氨基酸。

39. 如权利要求35-37中任一项所述的AAV载体,其中所述肽的长度为30至40个氨基酸。

40. 如权利要求35-37中任一项所述的AAV载体,其中所述肽的长度为34个氨基酸。

41. 如权利要求35-37中任一项所述的AAV载体,其中所述肽的长度为36个氨基酸。
42. 如权利要求35-41中任一项所述的AAV载体,其中所述肽通过与 α -突触核蛋白的残基68-78结合而抑制 α -突触核蛋白 (SEQ ID NO:8) 聚集。
43. 如权利要求35-42中任一项所述的AAV载体,其中所述AAV载体是AAV血清型1载体 (AAV1)、AAV血清型2载体 (AAV2)、AAV血清型1和2混合载体 (AAV1/2)、AAV血清型3载体 (AAV3)、AAV血清型4载体 (AAV4)、AAV血清型5载体 (AAV5)、AAV血清型6载体 (AAV6)、AAV血清型7载体 (AAV7)、AAV血清型8载体 (AAV8) 或AAV血清型9载体 (AAV9)。
44. 如权利要求35-42中任一项所述的AAV载体,其中所述AAV载体是AAV1载体、AAV2载体、AAV1/2载体、AAV4载体、AAV5载体、AAV8载体或AAV9载体。
45. 如权利要求35-42中任一项所述的AAV载体,其中所述AAV载体是AAV1/2载体。
46. 如权利要求35-45中任一项所述的AAV载体,其中所述AAV载体包含编码异源肽标签的编码序列。
47. 如权利要求46所述的AAV载体,其中所述异源肽标签偶联至所述肽。
48. 如权利要求46-47中任一项所述的AAV载体,其中所述异源肽标签是人流感血凝素 (HA) 标签。
49. 如权利要求35-48中任一项所述的AAV载体,其中所述AAV载体包含调控序列。
50. 如权利要求49所述的AAV载体,其中所述调控序列包含启动子。
51. 如权利要求50所述的AAV载体,其中所述启动子是诱导型启动子、组成型启动子或组织特异性启动子。
52. 如权利要求50-51中任一项所述的AAV载体,其中所述启动子是JC多瘤病毒启动子、血小板源性生长因子B链 (PDGF- β) 启动子、鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子或巨细胞病毒 (CMV) 启动子。
53. 如权利要求49所述的AAV载体,其中所述调控序列是所述SV40早期增强子/启动子元件、所述混合CMV增强子/PDGF- β 启动子元件或所述混合CMV增强子/CBA启动子元件。
54. 如权利要求53所述的AAV载体,其中所述调控序列是所述混合CMV增强子/CBA启动子。
55. 如权利要求54所述的AAV载体,其中所述混合CMV增强子/CBA启动子包含SEQ ID NO:9的核酸序列。
56. 如权利要求35-55中任一项所述的AAV载体,其中所述AAV载体包含转录后调控元件。
57. 如权利要求56所述的AAV载体,其中所述转录后调控元件是Woodchuck转录后调控元件。
58. 如权利要求57所述的AAV载体,其中所述Woodchuck转录后调控元件包含SEQ ID NO:10的核酸序列。
59. 如权利要求35-58中任一项所述的AAV载体,其中所述AAV载体包含支架附着区序列。
60. 如权利要求59所述的AAV载体,其中所述支架附着区序列包含SEQ ID NO:12的核酸序列。
61. 如权利要求35-60中任一项所述的AAV载体,其中所述AAV载体包含聚腺苷酸化序

列。

62. 如权利要求61所述的AAV载体,其中所述聚腺苷酸化序列是牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化序列。

63. 如权利要求62所述的AAV载体,其中所述牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化序列包含SEQ ID NO:11的核酸序列。

64. 如权利要求35-64中任一项所述的AAV载体,其中所述AAV载体包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的核酸序列。

65. 一种用于治疗受试者的神经退行性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如权利要求1-32中任一项所述的组合物或如权利要求35-64中任一项所述的AAV载体。

66. 如权利要求65所述的方法,其中所述神经退行性疾病是阿尔茨海默病或突触核蛋白病。

67. 如权利要求66所述的方法,其中所述突触核蛋白病选自由以下各项组成的组:路易体病、帕金森氏病(PD)、PD伴痴呆(PDD)、单纯自主神经衰竭(PAF)和多系统萎缩(MSA)。

68. 一种用于减少有需要的受试者中的 α -突触核蛋白(SEQ ID NO:8)聚集的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如权利要求1-32中任一项所述的组合物或如权利要求35-64中任一项所述的AAV载体。

69. 如权利要求68所述的方法,其中所述受试者患有神经退行性疾病。

70. 如权利要求69所述的方法,其中所述神经退行性疾病是阿尔茨海默病或突触核蛋白病。

71. 如权利要求70所述的方法,其中所述突触核蛋白病是路易体病、帕金森氏病(PD)、PD伴痴呆(PDD)、单纯自主神经衰竭(PAF)和多系统萎缩(MSA)。

72. 如权利要求65-71中任一项所述的方法,其中所述组合物或所述AAV载体肠胃外施用。

73. 如权利要求65-71中任一项所述的方法,其中所述组合物或所述AAV载体施用于所述受试者的中枢神经系统。

74. 如权利要求65-71中任一项所述的方法,其中所述组合物或所述AAV载体颅内施用。

75. 如权利要求65-71中任一项所述的方法,其中所述组合物或所述AAV载体施用于所述受试者的黑质。

76. 一种在哺乳动物细胞中表达抑制 α -突触核蛋白(SEQ ID NO:8)聚集的肽的方法,所述方法包括将如权利要求35-64中任一项所述的AAV载体引入所述哺乳动物细胞中。

77. 如权利要求76所述的方法,其中所述哺乳动物细胞是神经元或神经胶质细胞。

78. 如权利要求76所述的方法,其中所述哺乳动物细胞是神经元。

79. 一种试剂盒,其包括:

(i) 如权利要求1-32中任一项所述的组合物或如权利要求35-64中任一项所述的AAV载体;和

(ii) 用于执行如权利要求65-78中任一项所述的方法的说明书。

用于抑制 α -突触核蛋白聚集的组合物和方法

技术领域

[0001] 本公开提供了可用于治疗神经退行性疾病的方法和组合物。具体而言,本公开提供了可用于治疗神经退行性疾病诸如帕金森氏病(Parkinson's disease)的方法和组合物,所述方法是通过施用编码抑制 α -突触核蛋白聚集的一种或多种肽的腺相关病毒载体进行的。

背景技术

[0002] 诸如帕金森氏病(PD)、路易体痴呆(DLB)和多系统萎缩(MSA)的突触核蛋白病是一类神经退行性疾病,其特征在于 α -突触核蛋白(α -syn)的聚集物在选择性神经元和神经胶质群体的细胞质中的异常积聚。这些聚集物是路易体(PD和DLB的决定性组织学特征)和少突胶质细胞包涵体(在MSA中发现)两者的主要组分。已经证实此类聚集物伴随着神经元损伤(Spillantini等人Nature.1997;388(6645):839-40和Ubhi等人Trends Neurosci.2011年11月;34(11):581-590)。神经元和神经胶质中突触核蛋白的聚集物的沉积表明,对于这些病症而言可能存在共同的致病机制。

[0003] 基于结构研究,已经提出了许多不同的 α -突触核蛋白原纤维的模型。有限的蛋白质分解和NMR研究表明,原纤维芯由30-100个残基组成(Miake等人J.Biol.Chem.2002;277(21):19213-9)。晶体结构和NMR研究表明 α -syn原纤维的不同模型。在一个基于短区段晶体结构的模型中,每个折叠的两个单体形成延长的立体拉链(Rodriguez等人Nature.2015;525(7570):486-490)。在第二个基于ssNMR的模型中,已经证实了每个淀粉样蛋白层有一个单体的希腊钥匙拓扑结构(Tuttle等人Nat.Struct.Mol.Biol.2016;23(5):409-415)。总之,这些研究表明, α -syn可以形成多态纤维结构。

[0004] PD是最常见的运动障碍之一,并且DLB是退行性痴呆的第二最常见原因。 α -突触核蛋白淀粉样蛋白形成与疾病进展之间的因果联系通过以下发现得到支持,即增加淀粉样蛋白载量的基因重复和家族性突变也会导致早发性PD,并且90%以上的散发性PD患者的 α -突触核蛋白沉积物染色呈阳性。PD的主要临床特征包括运动缓慢、振幅和速度下降,以及动作迟缓、静止性震颤和僵直(参见Urbizu和Beyer.Int J Mol Sci.2020年7月;21(13):4718)。

[0005] 当前对于诸如PD的神经退行性疾病没有治愈方法。当前的治疗专注于缓解症状和改善生活质量。对于帕金森氏病(PD)和其他神经退行性疾病的当前疗法的价值受限于这样的事实,即它们(如果存在)对改变疾病的潜在进展几乎没有作用。具有改变疾病特性的疗法,如具有神经保护、神经修复或减缓、停止或甚至逆转疾病进展的疗法,将具有很大的价值。因此,需要鉴定防止和/或抑制 α -突触核蛋白聚集和/或细胞毒性的剂。

发明内容

[0006] 在一些实施方案中,本文提供了包括病毒载体的组合物,其中所述病毒载体包括编码包括以下氨基酸序列的肽的编码序列:AVVWGVTAV(SEQ ID NO:1)或AVVTGVTAV(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中,所述组合物包含编码包括以下氨基酸序列的肽的编码序列:

GAVVWGVTAVKK (SEQ ID NO:3) 或RAVVTGVTAVAE (SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,所述组合物包含编码包括以下氨基酸序列的肽的编码序列:GAVVWGVTAVKKGRKKRRRQRRRPQ (SEQ ID NO:6) 或YGRKKRRRQRRRAVVTGVTAVAE (SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,所述肽的长度为9至45个氨基酸。在一些实施方案中,所述肽的长度为30至40个氨基酸。在一些实施方案中,所述肽的长度为34个氨基酸。在一些实施方案中,所述肽的长度为36个氨基酸。在一些实施方案中,包含本文提供的病毒载体的组合物包含含有编码肽的编码序列的病毒载体,该肽通过与 α -突触核蛋白 (SEQ ID NO:8) 的残基68-78结合而抑制 α -突触核蛋白聚集。

[0007] 在一些实施方案中,所述病毒载体是AAV载体。在一些实施方案中,所述AAV载体是AAV血清型1载体 (AAV1)、AAV血清型2载体 (AAV2)、AAV血清型1和2混合载体 (AAV1/2)、AAV血清型3载体 (AAV3)、AAV血清型4载体 (AAV4)、AAV血清型5载体 (AAV5)、AAV血清型6载体 (AAV6)、AAV血清型7载体 (AAV7)、AAV血清型8载体 (AAV8) 或AAV血清型9载体 (AAV9)。在一些实施方案中,所述AAV载体是AAV1载体、AAV2载体、AAV1/2载体、AAV4载体、AAV5载体、AAV8载体或AAV9载体。在一些实施方案中,所述AAV载体是AAV1/2载体。

[0008] 在一些实施方案中,包含本文提供的病毒载体的组合物包含含有编码异源肽标签的编码序列的病毒载体。在一些实施方案中,所述异源肽标签偶联至所述肽。在一些实施方案中,所述异源肽标签是人流感血凝素 (HA) 标签。

[0009] 在一些实施方案中,包含本文提供的病毒载体的组合物包含含有调控序列的病毒载体。在一些实施方案中,所述调控序列包括启动子。在一些实施方案中,所述启动子是诱导型启动子、组成型启动子或组织特异性启动子。在一些实施方案中,所述启动子是JC多瘤病毒启动子、血小板源性生长因子B链 (PDGF- β) 启动子、鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子或巨细胞病毒 (CMV) 启动子。在一些实施方案中,所述调控序列是SV40早期增强子/启动子元件、混合CMV增强子/PDGF- β 启动子元件或混合CMV增强子/CBA启动子元件。在一些实施方案中,所述调控序列是混合CMV增强子/CBA启动子。在一些实施方案中,所述混合CMV增强子/CBA启动子包括SEQ ID NO:9的核酸序列。

[0010] 在一些实施方案中,包含本文提供的病毒载体的组合物包含含有转录后调控元件的病毒载体。在一些实施方案中,所述转录后调控元件是Woodchuck转录后调控元件。在一些实施方案中,Woodchuck转录后调控元件包括SEQ ID NO:10的核酸序列。

[0011] 在一些实施方案中,包含本文提供的病毒载体的组合物包含含有支架附着区序列的病毒载体。在一些实施方案中,所述支架附着区序列包括SEQ ID NO:12的核酸序列。

[0012] 在一些实施方案中,包含本文提供的病毒载体的组合物包含含有聚腺苷酸化信号序列的病毒载体。在一些实施方案中,所述聚腺苷酸化序列是牛生长激素 (BGH) 聚腺苷酸化信号序列。在一些实施方案中,所述牛生长激素 (BGH) 聚腺苷酸化信号序列包括SEQ ID NO:11的核酸序列。

[0013] 在一些实施方案中,包含本文提供的病毒载体的组合物包含含有SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的核酸序列的病毒载体。

[0014] 在一些实施方案中,包含本文提供的病毒载体的组合物还包括药学上可接受的赋形剂。

[0015] 在一些实施方案中,本文提供了试剂盒,其包括本文提供的包括病毒载体的任何组合物。在一些实施方案中,本文提供的试剂盒还包括包含组合物的预装注射器。

[0016] 在一些实施方案中,本文提供了腺相关病毒(AAV)载体,其中所述AAV包括编码包括以下氨基酸序列的肽的编码序列:AVVWGVTAV(SEQ ID NO:1)或AVVTGVTAV(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中,所述AAV包括编码包括以下氨基酸序列的肽的编码序列:GAVVWGVTAVKK(SEQ ID NO:3)或RAVVTGVTAVAE(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,所述AAV包括编码包括以下氨基酸序列的肽的编码序列:GAVVWGVTAVKKGRKKRRRQRRRPQ(SEQ ID NO:6)或YGRKKRRQRRRAVVTGVTAVAE(SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,所述肽的长度为9至45个氨基酸。在一些实施方案中,所述肽的长度为30至40个氨基酸。在一些实施方案中,所述肽的长度为34个氨基酸。在一些实施方案中,所述肽的长度为36个氨基酸。在一些实施方案中,本文提供的AAV包括编码肽的编码序列,该肽通过与 α -突触核蛋白(SEQ ID NO:8)的残基68-78结合而抑制 α -突触核蛋白聚集。

[0017] 在一些实施方案中,本文提供的AAV是AAV血清型1载体(AAV1)、AAV血清型2载体(AAV2)、AAV血清型1和2混合载体(AAV1/2)、AAV血清型3载体(AAV3)、AAV血清型4载体(AAV4)、AAV血清型5载体(AAV5)、AAV血清型6载体(AAV6)、AAV血清型7载体(AAV7)、AAV血清型8载体(AAV8)或AAV血清型9载体(AAV9)。在一些实施方案中,本文提供的AAV是AAV1载体、AAV2载体、AAV1/2载体、AAV4载体、AAV5载体、AAV8载体或AAV9载体。在一些实施方案中,所述AAV载体是AAV1/2载体。

[0018] 在一些实施方案中,本文提供的AAV包括编码异源肽标签的编码序列。在一些实施方案中,所述异源肽标签与所述肽偶联。在一些实施方案中,所述异源肽标签是人流感血凝素(HA)标签。

[0019] 在一些实施方案中,所述AAV载体包括调控序列。在一些实施方案中,所述调控序列包括启动子。在一些实施方案中,所述启动子是诱导型启动子、组成型启动子或组织特异性启动子。在一些实施方案中,所述启动子是JC多瘤病毒启动子、血小板源性生长因子B链(PDGF- β)启动子、鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子或巨细胞病毒(CMV)启动子。在一些实施方案中,所述调控序列是SV40早期增强子/启动子元件、混合CMV增强子/PDGF- β 启动子元件或混合CMV增强子/CBA启动子元件。在一些实施方案中,所述调控序列是混合CMV增强子/CBA启动子。在一些实施方案中,所述混合CMV增强子/CBA启动子包括SEQ ID NO:9的核酸序列。

[0020] 在一些实施方案中,所述AAV载体包括转录后调控元件。在一些实施方案中,所述转录后调控元件是Woodchuck转录后调控元件。在一些实施方案中,Woodchuck转录后调控元件包括SEQ ID NO:10的核酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,所述AAV载体包括支架附着区序列。在一些实施方案中,所述支架附着区序列包括SEQ ID NO:12的核酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,所述AAV载体包括聚腺苷酸化序列。在一些实施方案中,所述聚腺苷酸化序列是牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化序列。在一些实施方案中,所述牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化序列包括SEQ ID NO:11的核酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,所述AAV载体包括SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的核酸序列。

[0024] 在一些实施方案中,本文提供了用于治疗受试者的神经退行性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文提供的任何组合物或任何AAV载体。在一些实施方案中,所述神经退行性疾病是阿尔茨海默病或突触核蛋白病。在一些实施方案中,所述突触核蛋白病选自:路易体病、帕金森氏病(PD)、PD伴痴呆(PDD)、单纯自主神经衰竭(PAF)和多系

统萎缩(MSA)。

[0025] 在一些实施方案中,本文提供了用于减少有需要的受试者中的 α -突触核蛋白(SEQ ID NO:8)聚集的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文提供的任何组合物或任何AAV载体。在一些实施方案中,所述神经退行性疾病是阿尔茨海默病或突触核蛋白病。在一些实施方案中,所述突触核蛋白病选自:路易体病、帕金森氏病(PD)、PD伴痴呆(PDD)、单纯自主神经衰竭(PAF)和多系统萎缩(MSA)。

[0026] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述组合物或所述AAV载体肠胃外施用。在一些实施方案中,所述组合物或所述AAV载体施用于所述受试者的中枢神经系统。在一些实施方案中,所述组合物或所述AAV载体颅内施用。在一些实施方案中,所述组合物或所述AAV载体施用于所述受试者的黑质。

[0027] 在一些实施方案中,本文提供了在哺乳动物细胞中表达抑制 α -突触核蛋白(SEQ ID NO:8)聚集的肽的方法,所述方法包括将本文提供的任何AAV载体引入哺乳动物细胞中。在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞是神经元或神经胶质细胞。在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞是神经元。

[0028] 在一些实施方案中,本文提供了试剂盒,其包括本文提供的任何组合物或任何AAV载体,以及执行本文提供的任何方法的说明。

[0029] 术语“氨基酸”是指任何氨基酸,包括天然存在的氨基酸(例如, α -氨基酸)、非天然氨基酸和改性氨基酸。术语“氨基酸”包括D-氨基酸和L-氨基酸。非天然氨基酸的非限制性示例包括 β -氨基酸、高氨基酸、脯氨酸和丙酮酸衍生物、3-取代的丙氨酸衍生物、甘氨酸衍生物、环取代的苯丙氨酸和酪氨酸衍生物、线性核心氨基酸和N-甲基氨基酸。改性氨基酸可以是由氨基、羧基、侧链官能团处的反应或由杂原子置换任何氢而产生的氨基酸。氨基酸在本文中以其全称和/或其IUPAC单字母缩写表示。

[0030] 提到术语“约”在组合物的上下文中具有其通常的含义,以允许量的合理变化,这些变化可以达到相同的效果,并且在本文中也指所提供的值的正或负10%。例如,“约20”意指或包括从18到22并包括22的量。

[0031] 除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。如本文所用,除非另有说明,否则单数形式的“一”、“一种(个)”和“所述(该)”包括复数指示物。例如,“一种”赋形剂包括一个或多个赋形剂。

[0032] 本发明的一个或多个实施方案的细节在下面的附图和描述中有阐述。从说明书和附图以及从权利要求书中,本发明的其他特征、目的以及优点将会显而易见。除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。本文描述了用于在本发明中使用的方法和材料;也可使用本领域中已知的其他合适的方法和材料。所述材料、方法和实施例仅是说明性的并且不意图是限制性的。本文提到的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献均通过引用整体并入。在冲突的情况下,以包括定义在内的本说明书为准。

具体实施方式

[0033] 本公开提供了编码抑制 α -突触核蛋白聚集的一种或多种肽的病毒载体。还提供了使用编码抑制 α -突触核蛋白聚集的一种或多种肽的病毒载体抑制受试者中的 α -突触核蛋

白聚集的方法。 α -突触核蛋白,是一种在疾病条件下在神经元细胞中发现的140个氨基酸的蛋白质(SEQ ID NO:8),在突触核蛋白病诸如帕金森氏病、路易体痴呆和多系统萎缩的发病机制中起基本作用(参见,例如,Visanji等人Transl Neurodegener.2019;8:28)。 α -突触核蛋白的异常沉积也在各种其他疾病中观察到,包括阿尔茨海默病、单纯自主神经衰竭和REM睡眠行为障碍(Brás等人J Neurochem.2020;153(4):433-454)。因此,本文所述的方法可用于例如治疗 α -突触核蛋白聚集在受试者(例如,人类)中导致病状或疾病(例如,神经退行性疾病)的病理和/或症状和/或进展。本公开还提供了含有本文所述的病毒载体的组合物,以及使用编码抑制 α -突触核蛋白聚集的一种或多种肽的病毒载体,在例如有需要的受试者中表达所公开的肽抑制剂的方法。

[0034] “抑制 α -突触核蛋白聚集的肽”或“ α -突触核蛋白聚集的肽抑制剂”是表现出以下一种或多种活性的任何肽:降低 α -突触核蛋白聚集的速率,降低 α -突触核蛋白聚集的量,降低 α -突触核蛋白聚集的扩散,防止 α -突触核蛋白聚集,停止 α -突触核蛋白聚集,消除 α -突触核蛋白聚集,减少和/或消除 α -突触核蛋白聚集物的毒性,以及减少和/或消除 α -突触核蛋白聚集物的扩散。

[0035] 播种、病理蛋白聚集物沿着相连组织顺序转移,和/或 α -突触核蛋白聚集物的朊病毒式扩散,可以促进神经退行性疾病的进展和严重程度。例如,Braak分期已经显示,病理随着时间的推移逐渐在相连脑区扩散,并且细胞培养和动物模型显示,少量的 α -syn聚集物可以充当种子并诱导天然蛋白的聚集(参见,例如Braak H等人(2003)Neurobiol Aging 24(2):197-211;Braak等人(2009)Adv Anat Embryol Cell Biol 201:1-119;Masuda-Suzukake M等人(2013)Brain 136(4):1128-1138;Desplats P等人(2009)Proc Natl Acad Sci U S A 106(31):13010-13015;Luk KC等人(2009)Proc Natl Acad Sci 106(47):20051-20056)。在一些实施方案中,由本文提供的病毒载体表达的肽抑制 α -突触核蛋白的聚集。例如,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽与不存在该肽时观察到的 α -突触核蛋白聚集相比,可以抑制 α -突触核蛋白聚集约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽“盖住”生长中的 α -突触核蛋白聚集物,防止 α -突触核蛋白聚集物的扩散。

[0036] 基于细胞的测定可用于测试多肽可防止 α -突触核蛋白的播种和/或盖住生长中的 α -突触核蛋白聚集物的效率。例如,在细胞例如HE K293细胞中转染纳摩尔量的 α -突触核蛋白种子,并施用抑制 α -突触核蛋白聚集的肽之后,可以测量内源性蛋白的聚集或斑点形成。在一些实施方案中,细胞可以表达荧光标记的(例如,YFP标记的) α -突触核蛋白,并且可以通过荧光成像监测聚集(参见,例如,Sanders DW等人(2014)Neuron 82(6):1271-1288和美国申请号2019/0241613)。体外聚集测定也可用于测试抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的功效。例如,重组纯化的 α -突触核蛋白可以在肽的存在下聚集,并且可以通过测量硫磺素T(一种淀粉样蛋白结合染料)的荧光来监测聚集。在一些实施方案中,从组织样品(例如,来自PD患者的组织样品)中提取的不溶性蛋白质聚集物可用于体外和体内模型中的 α -突触核蛋白聚集播种。

[0037] 在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括AVVWGVTAV(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽是AVVWGVTAV(SEQ ID NO:1)。

在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括AVVTGVTAV (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽是AVVTGVTAV (SEQ ID NO:2)。已经证实,是或包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列的肽会防止形成有播种能力的聚集物以及盖住原纤维种子并防止其伸长(参见,例如,美国申请号2019/0241613)。

[0038] 在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽与 α -突触核蛋白的NACore (残基68-78)结合。NACore处于淀粉样蛋白沉积物中发现的35个残基的NAC(非淀粉样蛋白3组分)结构域内(Rodriguez J A等人(2015)Nature 525(7570):486-490)。NACore容易聚集,并且聚集物显示出与全长 α -syn相似的特性,诸如衍射图和细胞毒性(参见,例如,美国申请号2019/0241613)。在一些实施方案中,本文所述的病毒载体编码的多肽通过与 α -突触核蛋白的残基68-78结合来抑制 α -突触核蛋白聚集。 α -突触核蛋白的残基47-56称为“PreNAC”并且也可能导致聚集物的形成。

[0039] 在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的长度为约9至约45个氨基酸。例如,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的长度可为约9至约15、约9至约20、约9至约25、约9至约30、约9至约35、约9至约40、约40至约45、约35至约45、约30至约45、约25至约45、约20至约45或约15至约45个氨基酸。在一些实施方案中,该肽的长度为约25至约35、约30至约40或约35至约45个氨基酸。例如,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的长度可为31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个氨基酸。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的长度为34个氨基酸。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的长度为36个氨基酸。

[0040] 在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括异源肽标签。在一些实施方案中,可以帮助防止肽的自我聚集,增加肽的溶解度,利于对肽的监测,或其组合。此类异源肽标签的非限制性示例包括TAT标签、人流感血凝素(HA)标签、聚Lys标签、GST标签、GFP标签、聚His标签、V5标签、Myc标签和FLAG标签。参见表1中示例性异源肽标签的示例性序列。在一些实施方案中,所述异源肽标签是HA标签。

[0041] 表1.

[0042]

标签	SEQ ID NO	序列
TAT	15	GRKKRRQRRRPQ
HA	16	YPYDVPDYA
聚Lys	17	KKKKKK
聚His	18	HHHHHH
V5	19	GKPIPNPLLGLDST
Myc	20	EQKLISEEDL
FLAG	21	DYKDDDDK

[0043] 在一些实施方案中,所述异源肽标签处于抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的N端。在一些实施方案中,所述异源肽标签处于抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的C端。

[0044] 在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括氨基酸序列:AVVWGVTAV (SEQ ID NO:1)或GAVVWGVTAVKK (SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽是AVV WGVTAV (SEQ ID NO:1)或GAVVWGVTAVKK (SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括氨基酸序列:AVVTGVTAV (SEQ ID NO:2)或RAVVTGVTAVAE (SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽是AVVTGVTAV (SEQ ID NO:2)或

RAVVTGVTAVAE (SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽在抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的N端或C端包括一个或多个异源肽标签(例如,表1中的任何异源肽标签)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括聚Lys标签。例如,在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括氨基酸序列:GAVVWGVTAVKKKKK (SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽是GAVVWGVTAVKKK KK (SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽具有TAT标签。例如,在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括氨基酸序列:GAVVWGVTAVKKGRKKRRRQRRRPQ (SEQ ID NO:6)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽是GAVVWGVTAVKKGRKKRRRQRRRPQ (SEQ ID NO:6)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括氨基酸序列:YGRKKRR RRRRAVVTGVTAVAE (SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽是YGRKKRRRQRRRAVVTGVTAVAE (SEQ ID NO:7)。

[0045] 在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括两个或更多个被肽接头隔开的单体。例如,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽可以包括两个、三个、四个或更多个被肽接头隔开的单体。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括四个被肽接头隔开的单体。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括两个或更多个被肽接头隔开的单体,其中肽单体包括序列AVVWGVTAV (SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括两个或更多个被肽接头隔开的单体,其中肽单体包括序列GAVVWGVTAVKK (SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括两个或更多个被肽接头隔开的单体,其中肽单体包括序列GAVVWGVT AVKKKKK (SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括两个或更多个被肽接头隔开的单体,其中肽单体包括序列GAVVWGVTAVKKGRKKRRRQRRRPQ (SEQ ID NO:6)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括四个相同的单体,这些单体选自:AVVWGVTAV (SEQ ID NO:1)、GAVVWGVTAVKK (SEQ ID NO:3)、GAVVWGVTAVKKKKK (SEQ ID NO:5) 和GA VVWGVTAVKKGRKKRRRQRRRPQ (SEQ ID NO:6)。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括四个被肽接头隔开的单体,其中肽单体单独选自包括以下序列的单体:AVVWGVTAV (SEQ ID NO:1)、GAVVWGVTAVKK (SEQ ID NO:3)、GAVVWGVTAVKKK KK (SEQ ID NO:5) 或GAVVWGVTAVKKGRKKRRRQRRRPQ (SEQ ID NO:6)。

[0046] 在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括两个或更多个被肽接头隔开的单体,其中所述接头由具有选自下组的序列的核酸编码:

gggggaggtggctctggtggcggagggtca (SEQ ID NO:22)、ggaggcgg tgggagcggtagt (SEQ ID NO:23)、ggtgggggggaagtggagggg gtggctct (SEQ ID NO:24)、ggtggtggaggatctggggcggtggttct (SEQ ID NO:25) 及其组合。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括两个或更多个被肽接头隔开的单体,其中所述肽接头全部是相同的。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括两个或更多个被肽接头隔开的单体,其中两个、三个或四个肽接头是相同的。在一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽包括两个或更多个被肽接头隔开的单体,其中所述肽接头不全是相同的。

[0047] 病毒载体

[0048] 本文提供了编码抑制 α -突触核蛋白聚集的一种或多种肽(例如,本文所述的任何肽)的病毒载体。如本文所提及的术语“病毒载体”包括当与适当的控制元件缔合时能够复制并且可以在细胞间转移基因序列的任何病毒遗传元件。在一些实施方案中,有用的载体

被考虑是其中待转录的核酸区段定位在启动子的转录控制下的那些载体。病毒载体可以包括,例如,足够的表达顺式作用元件;其他表达元件可以由宿主哺乳动物细胞提供或处于体外表达系统中。病毒载体包括本领域所有已知的那样,诸如但不限于,腺相关病毒(AAV)载体、逆转录病毒载体、单纯疱疹病毒载体、甲病毒载体、黄病毒载体、基于棒状病毒的载体和嵌合病毒载体。

[0049] 在一些实施方案中,病毒载体是AAV载体(参见,例如,Asokan等人,Mol. Ther. 20: 699-7080, 2012)。“重组AAV载体”或“rAAV”通常至少由转基因或其一部分和调控序列,以及任选地5'和3' AAV反向末端重复序列(ITR)组成。此类重组AAV载体可以包装到衣壳中并递送至选定的靶细胞(例如,神经元细胞或神经胶质细胞)。载体的AAV序列通常包括顺式作用的5'和3'反向末端重复序列(参见,例如,B. J. Carter,在“Handbook of Parvoviruses”中,P. Tijsser编辑,CRC Press,第155-168页(1990))。ITR序列的长度为约145至约210个核苷酸。在一些实施方案中,在分子中使用编码ITR的基本上整个序列,但是容许对这些序列进行一定程度的轻微修改。修改这些ITR序列的能力在本领域的技术范围内(参见,例如,文字材料诸如Sambrook等人“Molecular Cloning. A Laboratory Manual”,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1989);和K. Fisher等人,J. Virol., 70: 520532(1996))。本发明采用的此类分子的一个示例是含有转基因的“顺式作用”质粒,其中选定的转基因序列和缔合的调控元件侧接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。

[0050] AAV载体的非限制性示例包括AAV血清型1载体(AAV1)、AAV血清型2载体(AAV2)、AAV血清型1和2混合载体(AAV1/2)、AAV血清型3载体(AAV3)、AAV血清型4载体(AAV4)、AAV血清型5载体(AAV5)、AAV血清型6载体(AAV6)、AAV血清型7载体(AAV7)、AAV血清型8载体(AAV8)或AAV血清型9载体(AAV9)。在一些实施方案中,所述AAV载体是AAV1载体、AAV2载体、AAV1/2载体、AAV4载体、AAV5载体、AAV8载体或AAV9载体。在一些实施方案中,所述AAV载体是AAV1/2载体。

[0051] 在一些实施方案中,所述病毒载体(诸如AAV载体)的核苷酸总数至多为约10kb。在一些实施方案中,所述病毒载体的核苷酸总数在以下范围:约1kb至约2kb、1kb至约3kb、约1kb至约4kb、约1kb至约5kb、约1kb至约6kb、约1kb至约7kb、约1kb至约8kb、约1kb至约9kb、约1kb至约10kb、约2kb至约3kb、约2kb至约4kb、约2kb至约5kb、约2kb至约6kb、约2kb至约7kb、约2kb至约8kb、约2kb至约9kb、约2kb至约10kb、约3kb至约4kb、约3kb至约5kb、约3kb至约6kb、约3kb至约7kb、约3kb至约8kb、约3kb至约9kb、约3kb至约10kb、约4kb至约5kb、约4kb至约6kb、约4kb至约7kb、约4kb至约8kb、约4kb至约9kb、约4kb至约10kb、约5kb至约6kb、约5kb至约7kb、约5kb至约8kb、约5kb至约9kb、约5kb至约10kb、约6kb至约7kb、约6kb至约8kb、约6kb至约9kb、约6kb至约10kb、约7kb至约8kb、约7kb至约9kb、约7kb至约10kb、约8kb至约9kb、约8kb至约10kb或约9kb至约10kb。在一些实施方案中,所述病毒载体的核苷酸总数为约6kb至约7kb。在一些实施方案中,所述病毒载体的核苷酸总数为约6.5kb。

[0052] 在一些实施方案中,如本文所述的病毒载体(例如,AAV载体)还包括一个或多个调控序列,这些调控序列与转基因(例如,编码抑制 α -突触核蛋白聚集的肽(例如,本文所述的任何肽)的核酸)以容许其在用病毒载体转染或用含有所述病毒载体的病毒感染的细胞中转录、翻译和/或表达的方式可操作地连接。术语“调控序列”是指调控与调控序列可操作地

连接的基因产物的表达的核酸序列。基因在宿主细胞中表达所需的调控序列的确切性质可因物种、组织或细胞类型而异,但必要时通常应包括分别参与转录和翻译的启动的5'非转录序列和5'非翻译序列,诸如TATA盒、封端序列、CAAT序列、增强子元件等。此类5'非转录调控序列可以包括启动子区,该启动子区包括用于可操作连接的基因的转录控制的启动子序列。本文所述的病毒载体还可以包括调控序列,诸如增强子序列、混合增强子/启动子序列以及所需的上游激活序列。参见,例如,Powell等人*Discov Med.* 2015;19(102):49-57和Hagedorn等人*Hum Gene Ther.* 2017;28(12):1169-1179。本文所述的病毒载体可以任选地包括5'前导序列或信号序列。适当载体的选择和设计在本领域普通技术人员的能力和判断范围内。

[0053] 如本文所用,当核酸序列(例如,编码序列)和调控序列以这样的方式共价连接以便将核酸序列的表达或转录置于调控序列的影响或控制之下时,可以说它们是“可操作地”连接的。如果期望核酸序列被翻译成功能性蛋白质或多肽,如果5'调控序列中的启动子的诱导引起编码序列的转录并且如果两个DNA序列之间的连接性质不会(1)引起移码突变的引入,(2)干扰启动子区指导编码序列转录的能力,或(3)干扰相应RNA转录物被翻译成蛋白质的能力,则可以说两个DNA序列是可操作地连接的。因此,如果启动子区能够实现该DNA序列的转录,使得产生的转录物可能被翻译成所需的蛋白质或多肽,则该启动子区将是与核酸序列可操作地连接的。类似地,当两个或更多个编码区以这样的方式连接,使得它们从共同的启动子转录引起两个或更多个已经在框内翻译的蛋白质的表达时,它们是可操作地连接的。

[0054] 术语“启动子”是指与编码多肽(例如,本文所述的肽,例如抑制 α -突触核蛋白聚集的肽)的核酸序列可操作地连接的,可以增加编码所述多肽的核酸序列的转录的核酸序列。短语“操作性定位”、“在控制下”或“在转录控制下”意指启动子相对于核酸处于正确的位置和取向,以控制RNA聚合酶的启动和基因的表达。

[0055] 在一些实施方案中,启动子是组成型的。组成型启动子的非限制性示例包括逆转录病毒劳斯肉瘤病毒(RSV) LTR启动子(任选地带有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地带有CMV增强子)(参见,例如Boshart等人*Cell.* 1985;41:521-530)、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EF1 α 启动子(Invitrogen)。

[0056] 在一些实施方案中,启动子是诱导型的。诱导型启动子允许对基因表达进行调控并且可受多种条件调控,包括但不限于外源性提供的化合物、环境因素(诸如温度),或存在特定的生理状态,诸如急性期、细胞的特定分化状态,或仅在复制的细胞中。诱导型启动子和诱导型系统可从各种商业来源获得,包括但不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。已经描述了许多其他系统并且可以被本领域的技术人员容易地选择。受外源性提供的化合物调控的诱导型启动子的非限制性示例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(WO 98/10088);昆虫蜕皮素启动子(No等人*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996;93:3346-3351)、四环素抑制系统(Gossen等人*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995;89:5547-5551)、四环素诱导系统(Gossen等人*Science*, 1995;268:1766-1769),另参见Harvey et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998;2:512-518)、RU486诱导系统(Wang等人*Nat. Biotech.*, 1997;15:239-243和Wang等人*Gene*

Then, 1997; 4: 432-441) 和雷帕霉素诱导系统 (Magari 等人 J. Clin. Invest. 1997; 100: 2865-2872)。在这种情况下可能有用的某些类型的诱导型启动子是受特定生理状态调控的那些, 所述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。

[0057] 在一些实施方案中, 调控序列赋予组织特异性基因表达能力。此类组织特异性调控序列 (例如, 启动子、增强子等) 在本领域是众所周知的。在一些实施方案中, 组织特异性调控序列是组织特异性启动子。术语“组织特异性”启动子是指与编码基因产物的多核苷酸可操作地连接时, 基本上只有当细胞是与启动子对应的组织类型的细胞时, 才会使基因产物在所述细胞中产生的核苷酸序列。在一些实施方案中, 组织特异性启动子结合以组织特异性方式诱导转录的组织特异性转录因子。组织特异性启动子的非限制性示例包括: 肝脏特异性甲状腺素结合球蛋白 (TBG) 启动子、胰岛素启动子、胰高血糖素启动子、生长抑制素启动子、胰多肽 (PPY) 启动子、突触蛋白-1 (Syn) 启动子、肌酸激酶 (MCK) 启动子、哺乳动物肌间线蛋白 (DES) 启动子、 α -肌球蛋白重链 (α -MHC) 启动子或心脏肌钙蛋白 T (cTnT) 启动子。

[0058] 可根据本文提供的材料和方法使用的其他示例性启动子包括 β -葡糖醛酸糖苷酶 (GUSB) 启动子、GUSB 最小启动子 (hGBp)、甲基 CpG 结合蛋白-2 (MECP2) 启动子、人肌间线蛋白 (DES) 启动子、人甲状腺素结合球蛋白 (TBG) 启动子、HNRPA2B1-CBX3 (UCOE) 启动子、肌肉肌酸激酶 (MCK) 启动子、合成肌肉启动子 C5-12、人 α (1) 抗胰蛋白酶 (hAAT) 启动子、人 EF1a 启动子、人巨细胞病毒 (CMV) 启动子 (美国专利号 5, 168, 062)、人泛素 C (UBC) 启动子、小鼠磷酸甘油酸激酶 1 启动子、多瘤腺病毒启动子、猿猴病毒 40 (SV40) 启动子、 β -珠蛋白启动子、 β -肌动蛋白启动子、 γ -珠蛋白启动子、 β -干扰素启动子、 γ -谷氨酰转移酶启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、大鼠胰岛素启动子、甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子、金属硫蛋白 II (MT II) 启动子、淀粉酶启动子、组织蛋白酶、MI 毒蕈碱型受体启动子、逆转录病毒 LTR (例如人 T 细胞白血病病毒 HTLV) 启动子、AAV ITR 启动子、白细胞介素-2 启动子、胶原酶启动子、血小板源性生长因子启动子、腺病毒 5E2 启动子、溶基质素、鼠 MX 基因启动子、葡萄糖调控蛋白 (GRP78 和 GRP94) 启动子、 α -2-巨球蛋白启动子、波形蛋白启动子、MHC I 类基因 H-2kb 启动子、HSP70 启动子、增殖蛋白、肿瘤坏死因子启动子、促甲状腺激素 α 基因启动子、免疫球蛋白轻链启动子、T 细胞受体启动子、HLADQa 和 DQP 启动子、白细胞介素-2 受体启动子、MHC II 类启动子、MHC II 类 HLA-DRa 启动子、肌肉肌酸激酶启动子、前白蛋白 (转甲状腺素蛋白) 启动子、弹性蛋白酶 I 启动子、白蛋白基因启动子、c-fos 启动子、c-HA-ras 启动子、神经细胞粘附分子 (NCAM) 启动子、H2B (TH2B) 组蛋白启动子、大鼠生长激素启动子、人血清淀粉样蛋白 (SAA) 启动子、肌钙蛋白 I (TN I) 启动子、杜氏肌营养不良启动子、人免疫缺陷病毒启动子、长臂猿白血病病毒 (GALV) 启动子、骨钙蛋白启动子、骨唾液蛋白启动子、乙型肝炎病毒核心启动子、CD2 启动子、免疫球蛋白重链启动子; T 细胞受体 α 链启动子、非神经元胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 启动子、髓鞘碱性蛋白 (MBP) 启动子, 以及神经元启动子诸如 hSyn、神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 启动子、神经丝轻链基因启动子、神经元特异性 vgf 基因启动子、mGluR2 启动子、NFL 启动子、NFH 启动子、 $n\beta$ 2 启动子、PPE 启动子、Enk 启动子、兴奋性氨基酸转运子-2 (EAAT2) 启动子和 CaMKII 启动子。参见, 例如, Sandig 等人, Gene Ther., 3: 1002-9 (1996); Arbuthnot 等人, Hum. Gene Ther., 7: 1503-14 (1996); Stein 等人, Mol. Biol. Rep., 24: 185-96 (1997); Chen 等人, J. Bone Miner. Res., 11: 654-64 (1996); Hansal 等人, J. Immunol., 161: 1063-8 (1998); Andersen 等人, Cell. Mol. Neurobiol., 13:

503-15 (1993); Piccioli等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991); Piccioli等人, Neuron, 15:373-84 (1995); 和Lodish, Molecular Cell Biology, Freeman and Company, New York 2007。

[0059] 启动子的其他非限制性示例包括JC多瘤病毒启动子、血小板源性生长因子B链(PDGF- β)启动子、鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子或巨细胞病毒(CMV)启动子(参见,例如,Do11等人Gene Ther. 1996;3(5):437-47)。启动子另外的示例在本领域中是已知的。

[0060] 术语“增强子”是指可以提高编码目标蛋白(例如,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽)的核酸的转录水平的核苷酸序列。增强子序列的长度通常为50-1500个碱基对,并且通常通过为转录相关蛋白(例如,转录因子)提供另外的结合位点来提高转录水平。在一些实施方案中,在内含子序列内发现增强子序列。与启动子相比,增强子序列通常可以在离转录起始位点更大的距离(例如,与启动子相比)发挥作用。增强子的非限制性示例包括RSV增强子、CMV增强子和SV40增强子。

[0061] 在一些实施方案中,所述调控序列是SV40早期增强子/启动子、混合CMV增强子/PDGF- β 启动子或混合CMV增强子/CBA启动子。在一些实施方案中,所述调控序列是具有或包括SEQ ID NO:9的核酸序列的混合CMV增强子/CBA启动子。

[0062] 在一些实施方案中,所述病毒载体包括转录后调控序列。转录后调控序列的非限制性示例包括乙型肝炎病毒转录后调控序列和Woodchuck转录后调控序列。在一些实施方案中,Woodchuck转录后调控序列具有或包括SEQ ID NO:10的核酸序列。

[0063] 在一些实施方案中,本文提供的任何病毒载体都可以包括聚腺苷酸化(聚(A))序列。“聚腺苷酸化”在本文中是指多聚腺苷酸部分或其经修饰的变体与信使RNA分子的共价连接。

[0064] 在真核生物中,大多数信使RNA(mRNA)分子在3'末端聚腺苷酸化。3'聚(A)尾是通过一种酶即聚腺苷酸聚合酶的作用添加到前mRNA上的腺嘌呤核苷酸(常常是几百个)的长序列。在高等真核生物中,聚(A)尾被添加到含有特定序列的转录物上,即聚腺苷酸化信号。聚(A)尾和与之结合的蛋白质有助于保护mRNA免受核酸外切酶的降解。聚腺苷酸化对转录终止、mRNA从细胞核的输出和翻译也很重要。聚腺苷酸化可以在DNA转录成RNA后立即在细胞核中发生,但也可以稍后在细胞质中发生。转录终止后,通过与RNA聚合酶缔合的核酸内切酶复合物的作用,裂解mRNA链。裂解位点的特征通常在于在裂解位点附近存在碱基序列AAUAAA。在mRNA裂解后,将腺苷残基添加到自由3'末端的裂解位点。

[0065] 如本文所用,“聚腺苷酸化信号序列”或“聚(A)信号序列”是触发核酸内切酶裂解mRNA并在裂解的mRNA的3'末端添加一系列腺苷的序列。对于包括编码蛋白质的转基因核酸的AAV载体,通常在转基因序列之后和3'AAV ITR序列之前插入聚腺苷酸化序列。在一些实施方案中,聚(A)信号序列定位在编码抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的C端的核酸序列的3'处。

[0066] 有几种聚(A)信号序列可用于本文所述的载体中,包括源自以下的那些:牛生长激素(bgh)(Woychik等人,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81(13):3944-3948,1984;美国专利号5,122,458)、人生长激素(hGH)、小鼠-p-珠蛋白、小鼠-a-珠蛋白(Orkin等人,EMBO J. 4(2):453-456,1985;Thein等人,Blood 7(2):3\3-3\9,1988)、人胶原蛋白、多瘤病毒(Batt等人,Mol. Cell Biol. 15(9):4783-4790,1995)、单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV TK)、IgG重

链基因聚腺苷酸化信号 (US 2006/0040354)、人生长激素 (hGH) (Szymanski 等人, Mol. Therapy 15(7):1340-1347, 2007)、由SV40聚(A)信号序列组成的组, 诸如SV40晚期和早期聚(A)信号序列 (Schek 等人, Mol. Cell Biol. 12(12):5386-5393, 1992)。在一些实施方案中, 聚(A)信号序列是序列AATAAA。AATAAA序列可以用其他与AATAAA具有同源性的、能够产生聚腺苷酸化信号的六核苷酸序列取代, 包括ATTAAA、AGTAAA、CATAAA、TATAAA、GATAAA、ACTAAA、AATATA、AAGAAA、AATAAT、AAAAAA、AATGAA、AATCAA、AACAAA、AATCAA、AATAC、AATAGA、AATTAA或AATAAG (参见, 例如, WO 06/12414)。在一些实施方案中, 所述牛生长激素 (BGH) 聚腺苷酸化序列具有或包括SEQ ID NO:11的核酸序列。

[0067] 在一些实施方案中, 聚(A)信号序列可以是合成的聚腺苷酸化位点 (参见, 例如, 见 Promega 的 pCl-neo 表达载体, 其基于 Levitt 等人, Genes Dev. 3(7):1019-1025, 1989)。在一些实施方案中, 聚(A)信号序列是可溶性神经纤毛蛋白-1 (s RP) (AAATAAAATACGAAATG) 的聚腺苷酸化信号 (参见, 例如, WO 05/073384)。聚(A)信号序列另外的示例在本领域中是已知的。

[0068] 在一些实施方案中, 本文所述的载体还可包括上游增强子元件 (USE), 其置于聚(A)信号序列的上游。此类USE的非限制性示例包括: 人免疫缺陷病毒1 (HIV-1) USE、SV40晚期2xUSE、地松鼠肝炎病毒 (GHV) USE、腺病毒 (L3) USE、人凝血酶原 (hTHGB) USE 和人C2补体基因 (hC2) USE。

[0069] 可用于本公开中的AAV构建体也可以含有内含子, 例如, 位于启动子/增强子序列和转基因之间。参见, 例如, Powell 等人 Discov Med. 2015;19(102):49-57。

[0070] 在一些实施方案中, 本文提供的任何病毒载体可以包括支架附着区 (SAR)。如本文所用, “架附着区”是指富含AT的DNA序列, 其与核支架的一个或多个组分特异性结合。参见 Boulikas, J. Cell. Biochem. 52:14(1993)。

[0071] 在一些实施方案中, SAR具有或包括SEQ ID NO:12的核酸序列。

[0072] 可以使用的另一载体元件是内部核糖体进入点 (IRES)。IRES序列用于从单个基因转录物产生一个以上的多肽。IRES序列将用于产生含有一条以上多肽链的蛋白质。选择这些和其他常见的载体元件是常规的, 并且许多此类序列是可以获得的 (参见, 例如, Sambrook 等人 “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989), 以及其中在例如3.18 3.26和16.17 16.27页引用的参考文献和 Ausubel 等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989)。

[0073] 在一些实施方案中, 所述病毒载体具有或包括SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的核酸序列。

[0074] 组合物

[0075] 本文还提供了包括本文所述的病毒载体 (例如, 编码抑制 α -突触核蛋白聚集的一种或多种肽的AAV载体) 的组合物。在一些实施方案中, 所述病毒载体 (例如, AAV载体) 能够在施用治疗组合物的人类受试者的靶细胞中表达 α -突触核蛋白肽抑制剂信使RNA。在一些实施方案中, 将所述病毒载体 (例如, 能够表达 α -突触核蛋白聚集肽抑制剂的AAV载体) 配制成药物组合。在一些实施方案中, 所述药物组合物可以包括一个或多个AAV载体, 如本文所述, 与一种或多种药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂组合。

[0076] 短语“药学上可接受的”指示,物质或组合物必须在化学和/或毒理学上与构成配制物的其他成分和/或用其治疗的哺乳动物相容。

[0077] 如本文所用,“载剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载剂溶液、悬浮液、胶体等等。对于药物活性物质使用此类介质和药剂是本领域中众所周知的。可用于本文所述的组合物中的药学上可接受的载剂的非限制性示例包括水、NaCl、生理盐溶液、乳酸林格氏液、正常蔗糖、正常葡萄糖、粘合剂、填料、崩解剂、润滑剂、包衣、甜味剂、调味剂和色素、脂质体、分散介质、微胶囊、阳离子脂质载剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。载剂也可以是用于为配制物提供稳定性、无菌性和等渗性的物质(例如,抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂),用于防止微生物作用的物质(例如,抗微生物剂和抗真菌剂,诸如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等等)或用于为配制物提供可食用风味的物质等。本领域的技术人员将认识到,其他药物载剂在本公开中是有用的。

[0078] 在一些实施方案中,本文所述的组合物还可以包括缓冲剂,诸如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖;甘露糖醇;蛋白质;多肽或氨基酸,诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。

[0079] 在一些实施方案中,本文所述的任何病毒载体可以使用天然和/或合成聚合物进行配制。可包括在本文所述的任何组合物中的聚合物的非限制性示例可包括但不限于 DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Pasadena, Calif)、来自 Minis Bio (Madison, Wis.) 和 Roche Madison (Madison, Wis.) 的配制物、PhaseRX 聚合物配制物,诸如但不限于 SMARTT POLYMER TECHNOLOGY® (PhaseRX, Seattle, Wash)、DMRI/DOPE、泊洛沙姆(poloxamer)、来自 Vical (San Diego, Calif) 的 VAXPECTIN® 佐剂、壳聚糖、来自 Calando Pharmaceuticals (Pasadena, Calif) 的环糊精、树枝状聚合物和聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)聚合物、RONDEL™ (RNAi/寡核苷酸纳米颗粒递送) 聚合物 (Arrowhead Research Corporation, Pasadena, Calif) 和 pH 反应性共嵌段聚合物,诸如但不限于由 PhaseRX (Seattle, Wash.) 生产的那些。许多这些聚合物已经在体内将寡核苷酸递送到哺乳动物细胞中展现出功效(参见,例如,deFougerolles, Human Gene Ther. 19:125-132, 2008; Rozema 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:12982-12887, 2007; Rozema 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:12982-12887, 2007; Hu-Lieskovan 等人, Cancer Res. 65: 8984-8982, 2005; Heidel 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:5715-5721, 2007)。

[0080] 补充活性化合物也可以掺入本文所述的任何组合物中。

[0081] 配制后,溶液可以以与剂量配方相容的方式和治疗有效的量进行施用。所述配制物可以容易地以各种剂型施用,诸如可注射溶液、可注射凝胶、药物释放胶囊等。

[0082] 在一些实施方案中,将本文所述的组合物配制用于肠胃外施用。在一些实施方案中,将本文所述的组合物配制用于颅内施用。在一些实施方案中,将本文所述的组合物配制用于静脉内施用。参见,例如, Lykken 等人 J Neurodev Disord. 2018; 10(1):16。

[0083] 适合注射使用的药物配制物包括但不限于无菌水溶液或分散体以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备。在一般储存和使用条件下,这些制剂可以含有防腐剂以防止微生物的生长。在许

多情况下,所述配制物是无菌的,而且是流动的,达到存在着易于注射的特点。在一些实施方案中,所述配制物在制造和储存条件下是稳定的,并能防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用。载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。适当的流动性可以通过使用包衣(诸如卵磷脂),在分散的情况下通过保持所需的颗粒大小以及使用表面活性剂来保持。防止微生物作用可通过各种抗细菌和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞(thimerosal)等)来达成。在许多情况下,可以包括等渗剂,例如糖或氯化钠。延长可注射组合物的吸收可通过在组合物中使用延迟吸收的药剂,例如单硬脂酸铝和明胶来达成。

[0084] 对于注射水溶液的施用,如有必要,可对该溶液进行适当的缓冲,并首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂变得等渗。这些特殊的水溶液特别适合静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。在这一点上,可以采用的无菌水性介质对于本领域的技术人员来说是已知的。例如,可将一个剂量溶解在1ml等渗NaCl溶液中并且添加到1000ml皮下输液液体中或在拟输注部位注射(参见例如,“Remington’s Pharmaceutical Sciences”第15版,第1035-1038页和第1570-1580页)。根据宿主的情况,剂量的一定变化是可以适应的。无论如何,负责施用的人将为个别宿主确定适当的剂量。

[0085] 无菌注射液可以通过以下方式制备:将所需量的活性病毒载体(例如,AAV载体)与本文列举的各种其他成分按要求掺入适当的溶剂中,然后进行过滤消毒。通常,通过将多种灭菌活性成分并入含有碱性分散介质和来自上文所列举那些成分的所需其他成分的无菌媒剂中来制备分散体。在用于制备无菌注射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,所述技术从先前无菌过滤的溶液中获得活性成分加上任何另外的所需成分的粉末。

[0086] 本文公开的组合物也可以配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐,包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成的),以及与无机酸诸如盐酸或磷酸,或有机酸诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成的酸加成盐。用游离羧基形成的盐也可以源自诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁的无机碱和诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等的有机碱。配制后,溶液将以与剂量配方相容的方式和治疗有效的量进行施用。所述配制物容易地以各种剂型施用,诸如可注射溶液、药物释放胶囊等。

[0087] 递送媒介物诸如脂质体、纳米胶囊、微粒、微球、脂质颗粒、囊泡等,可用于将本发明的组合物引入合适的宿主细胞中。在一些实施方案中,本文所述的病毒载体可以配制成封装在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中进行递送。脂质体的形成和使用通常对于本领域的技术人员来说是已知的。最近,开发出具有改善的血清稳定性和循环半衰期的脂质体(美国专利号5,741,516)。此外,已经描述了作为潜在药物载剂的脂质体和类似脂质体的各种制备方法(美国专利号:5,567,434;5,552,157;5,565,213;5,738,868和5,795,587)。

[0088] 脂质体已成功用于许多通常对其他程序转染有抗性的细胞类型。另外,脂质体没有DNA长度的限制,DNA长度的限制是基于病毒的递送系统典型的。脂质体已有效地用于将基因、药物、放射性治疗剂、病毒、转录因子和异位效应物引入各种培养的细胞系和动物中。另外,已经完成了几项成功的临床试验,检验了脂质体介导的药物递送的有效性。脂质体是由分散在水性介质中的磷脂形成的,并且自发形成多层同心双层囊泡(也称为多层囊泡

(MLV)。

[0089] 试剂盒

[0090] 本文还提供了包括本文所述的任何组合物的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒可以包括固体组合物(例如,包括本文所述的载体的冻干组合物)和用于溶解冻干组合物的液体。在一些实施方案中,试剂盒可以包括预装注射器,其包括本文所述的任何组合物的。

[0091] 在一些实施方案中,所述试剂盒包括小瓶,其包含本文所述的任何组合物(例如,配制成水性组合物,例如水性药物组合物)。

[0092] 在一些实施方案中,所述试剂盒可以包括用于执行本文所述的任何方法的说明书。

[0093] 方法

[0094] 本文还提供了将治疗有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体引入哺乳动物(例如,人)的细胞(例如,神经元细胞或神经胶质细胞)中的方法。还提供了在哺乳动物(例如,人)的细胞(例如,神经元细胞或神经胶质细胞)中表达抑制 α -突触核蛋白聚集的肽(例如,本文所述的任何 α -突触核蛋白聚集抑制肽)的方法,所述方法包括将治疗有效量的本文所述的任何病毒载体引入哺乳动物的中枢神经系统中。在将本文所述的任何组合物或病毒载体(例如,编码抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的组合物或病毒载体)引入细胞中的方法的一些实施方案中,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的表达在所述细胞中增加,例如,与抑制 α -突触核蛋白聚集的肽在参考细胞(例如,尚未引入所述组合物或病毒载体的参考细胞)中的表达相比。在一些实施方案中,参考细胞不会表达抑制 α -突触核蛋白聚集的肽,或者不会表达可检测量的抑制 α -突触核蛋白聚集的肽。

[0095] 还提供了治疗受试者(例如,人)的神经退行性疾病的方法,所述方法包括将治疗有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体(例如,AAV载体,例如编码抑制 α -突触核蛋白聚集(例如本文所述的任何 α -突触核蛋白聚集)的肽的AAV载体)施用于受试者的中枢神经系统。本文还提供了在有需要的受试者中减少 α -突触核蛋白聚集的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体(例如,AAV载体,例如编码抑制 α -突触核蛋白聚集(例如本文所述的任何 α -突触核蛋白聚集)的肽的AAV载体)。

[0096] 受试者的“治疗”或“疗法”是指对受试者进行的任何类型的干预或过程,或对其施用活性剂,目的是逆转、减轻、缓解、抑制或减缓与疾病(例如,阿尔茨海默病或突触核蛋白病)相关的症状、并发症、状况或生化指标的发作、进展、发展、严重程度或复发。在一些实施方案中,“治疗”包括特定病症的消退,包括病症的一个或多个症状的减轻和/或与病症(例如,阿尔茨海默病或突触核蛋白病)相关的一个或多个症状的严重程度的降低。

[0097] “受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括但不限于脊椎动物诸如非人灵长类动物、绵羊、狗,和啮齿动物诸如小鼠、大鼠和豚鼠。在一些实施方案中,受试者是人。

[0098] 治疗剂的“有效量”或“治疗有效量”是所述药剂单独使用或与一种或多种另外的疗法组合使用时,减缓病症(例如,阿尔茨海默病或突触核蛋白病)的发作或促进病症的消退的量,病症的消退表现为病症症状的严重程度降低,病症无症状期的频率和持续时间增加,或改善由于病症折磨造成的损伤或残疾。一种或多种另外的疗法促进病症消退的能力可以使用熟练从业者已知的各种方法进行评价,如在临床试验期间的人类受试者中,在预

测人类功效的动物模型系统中,或通过在体外测定中测定药剂的活性。在一些实施方案中,本文所述的任何病毒载体或包含病毒载体的组合物的有效量,当所述病毒载体或组合物施用于受试者时,足以覆盖受试者中的目标区域(例如黑质或壳核)。在一些实施方案中,本文所述的任何病毒载体或包含病毒载体的组合物的有效量是以每个脑部的基因组颗粒(gp/脑,例如gp/人脑)来测量的。在一些实施方案中,本文所述的任何病毒载体或包含病毒载体的组合物的有效量为约 1×10^9 、约 2×10^9 、约 3×10^9 、约 4×10^9 、约 5×10^9 、约 6×10^9 、约 7×10^9 、约 8×10^9 、约 9×10^9 、约 1.0×10^{10} 、约 1.1×10^{10} 、约 1.2×10^{10} 、约 1.3×10^{10} 、约 1.4×10^{10} 、约 1.5×10^{10} 、约 1.6×10^{10} 、约 1.7×10^{10} 、约 1.8×10^{10} 、约 1.9×10^{10} 、约 2.0×10^{10} 或约 3.0×10^{10} gp/脑。

[0099] “施用”是指使用本文所述的或本领域技术人员另外已知的各种方法和递送系统中的任一种,将治疗剂物理引入受试者体内。施用途径可包括但不限于颅内、口服、静脉内、鼻内、肌肉内、皮下、腹膜内、脊髓或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注(例如,静脉输注)。施用也可以进行,例如,一次、多次和/或在一个或多个较长的时期内。在一些实施方案中,治疗有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体仅向受试者施用一次。在治疗有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体仅向受试者施用一次的一些实施方案中,用病毒载体转染的细胞在该细胞(例如,神经元细胞或神经胶质细胞)的一生中在颗粒感染的所有非分裂细胞中继续产生所述病毒载体编码的肽(例如,抑制 α -突触核蛋白聚集的肽,例如,本文所述的任何 α -突触核蛋白聚集抑制肽)。

[0100] 在一些实施方案中,所述神经退行性疾病是阿尔茨海默病或突触核蛋白病。突触核蛋白病的非限制性示例包括路易体病、帕金森氏病(PD)、PD伴痴呆(PDD)、单纯自主神经衰竭(PAF)和多系统萎缩(MSA)。

[0101] 可以使用本文所述的或本领域另外已知的用于将本文所述的任何组合物引入哺乳动物细胞中的各种方法中的任一种(例如,通过使用病毒载体,例如,本文所述的任何病毒载体)。

[0102] 本文所述的组合物或病毒载体的施用可以以任何方便的方式进行,包括但不限于通过气溶胶吸入、注射、摄取、输注、植入或移植。本文所述的组合物可以经颅内、经动脉、皮下、皮内、结内、髓内、肌肉内、通过静脉(i.v.)注射或腹膜内施用于受试者。在一个方面,本文所述的组合物或病毒载体通过颅内注射施用于患者。

[0103] 检测抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的表达和/或活性的方法是本领域已知的。在一些实施方案中,可以直接检测抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的表达水平(例如,检测所述肽或检测编码所述肽的mRNA)。可用于直接检测抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的表达和/或活性的技术的非限制性示例包括:实时PCR、蛋白质印迹(Western blotting)、免疫沉淀、免疫组织化学或免疫荧光。在一些实施方案中,可以间接检测抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的表达,例如,通过监测神经退行性疾病诸如PD的试验。监测PD的试验的非限制性示例是那些监测运动徐缓、震颤、僵直和/或姿势不稳定的试验。在一些实施方案中,与尚未施用有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体(例如,AAV载体,例如编码抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的AAV载体)的受试者相比,已经施用有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体的受试者表现出PD或神经退行性症状(例如,在运动徐缓、震颤、僵直和/或姿势不稳定中的一个或多个方面)减轻。在一些实施方案中,与尚未施用有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体的受试者相比,已经施用有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体的受试者表现出一种或多

种症状减轻约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多。在一些实施方案中,与尚未施用有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体的受试者相比,已经施用有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体的受试者没有表现出PD或神经退行性症状。在一些实施方案中,与施用组合物或病毒载体(例如,AAV载体,例如编码抑制 α -突触核蛋白聚集的肽的AAV载体)之前受试者表现出的症状相比,已经施用有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体的受试者表现出PD或神经退行性症状(例如,在运动徐缓、震颤、僵直和/或姿势不稳定中的一个或多个方面)减轻。在一些实施方案中,与施用组合物或病毒载体之前受试者表现出的症状相比,已经施用有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体的受试者表现出一种或多种症状减轻约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多。在一些实施方案中,与施用组合物或病毒载体之前受试者表现出的症状相比,已经施用有效量的本文所述的任何组合物或病毒载体的受试者没有表现出PD或神经退行性症状。

[0104] 实施例

[0105] 本公开在以下实施例中有进一步描述,下列实施例不限制权利要求中描述的本公开的范围。

[0106] 实施例1.AAV载体的制备和包装

[0107] 大肠杆菌(E.coli)细胞的转化及质粒DNA的制备

[0108] 使用SUBCLONING EFFICIENCY™ DH5 α ™感受态细胞进行转化。使用PURELINK™ HiPure Plasmid Maxiprep试剂盒制备质粒。

[0109] 将DH5 α ™细胞在冰上解冻。用移液器枪头轻轻混合细胞。将用于每次转化的50 μ L细胞等分到单独、冷藏的1.5mL微量离心管中。将1至5 μ L质粒添加到细胞并轻轻混合。将管在冰上孵育30分钟。通过将管置于37°C水浴中5分钟使细胞热休克。然后将管置于冰上2分钟。添加250 μ L预温热的Luria肉汤(LB)培养基,并将管在37°C下孵育30分钟无需搅动。将每次转化的20 μ L至200 μ L铺到预先温热的LB-氨苄青霉素琼脂板上。将板在37°C的细菌孵育箱中孵育过夜。

[0110] 选择一个细菌菌落并用于无菌接种锥形瓶中90mL补充有100 μ g/mL氨苄青霉素的LB。将烧瓶置于细菌摇床中并在37°C下边搅动边孵育过夜(摇床设为220rpm)。

[0111] 第二天,将细菌培养物转移到两个50mL的管中。通过在4°C下以8,000x g离心5分钟使细胞团块化。将上清液从细胞团块中小心地倾倒出来并丢弃。将管在纸巾上倒置数分钟,以去除残留的上清液。向每支管中添加5mL含有RNA酶A的重悬缓冲液(R3),并使团块重悬浮。将来自两支管的细胞悬浮液合并。

[0112] 向管中添加10mL裂解缓冲液(L7),并通过轻轻倒置有盖的管数次来混合溶液。将管在室温下孵育5分钟。添加10mL沉淀缓冲液(N3)并通过将有盖的管倒置几次来将溶液轻轻混合,直到混合物看起来是均匀的。

[0113] 将管在4°C下以8,000x g离心30分钟。将上清液小心地转移到干净的50mL管中,同时避免转移任何沉淀物。通过施加30mL平衡缓冲液(EQ1)预先平衡HiPure maxi柱。使溶液随重力流排出。

[0114] 将上清液上样到平衡的柱上。使柱中的溶液随重力流通过。将柱用30mL洗涤缓冲液(W8)洗涤两次。使溶液随重力流排出。丢弃流过物。为了从柱上洗脱质粒,将50mL无菌管

置于柱的下方,向柱中添加15mL洗脱缓冲液(E4),并且使溶液随重力流排出。向洗脱物中添加10.5mL异丙醇。将洗脱物充分混合并在18°C下以8,000x g离心30分钟。小心地取出上清液并丢弃。将DNA团块重悬浮在0.4mL TE缓冲液中。将DNA转移到1.5mL微量离心管中。向管中添加20 μ L的3M醋酸钠和1mL的100%乙醇。将溶液充分混合并在室温下以17,000x g离心3分钟。

[0115] 取出上清液并丢弃。将DNA团块在0.7mL的79%乙醇中洗涤。将管在室温下以17,000x g离心1分钟。去除上清液并将团块风干10分钟。然后将纯化的DNA重新悬浮在200-500 μ L TE缓冲液中。将质粒储存在-20 μ C下。

[0116] HEK293细胞培养

[0117] 将完全DMEM温热到37°C。将冷冻的HEK293细胞从液氮储存中取出,并立即将管置于37°C水浴中。将细胞在37°C水浴中解冻30-60秒。将管转移到II类生物安全柜中,并将细胞悬浮液添加到50mL无菌锥形离心管中的10mL完全DMEM中。

[0118] 用1mL完全DMEM冲洗含有细胞的冷冻小瓶并添加到细胞悬浮液中。将细胞悬浮液在20°C下以300x g离心5分钟。弃去上清液,并将团块化的细胞通过轻轻吹打来重新悬浮在5mL完全DMEM中。将细胞悬浮液转移到含有35mL完全DMEM的T175烧瓶中。使细胞在37°C、5% CO₂的孵育箱中生长并维持。

[0119] 当HEK293细胞生长到大约90%汇合时,每3-4天分开HEK293细胞一次。在需要新一批细胞之前,细胞可以传代20次。将完全DMEM、1x PBS溶液和TrypLE Express温热到37°C。从烧瓶中取出培养基并丢弃。向烧瓶中添加20mL的1x PBS,并轻轻地前后倾斜烧瓶以洗涤细胞。取出PBS溶液并丢弃。

[0120] 将5mL的TrypLE Express添加细胞中。将细胞在37°C下孵育5-10分钟。轻轻旋转烧瓶以使细胞脱离。向烧瓶中添加5mL完全DMEM。将细胞悬浮液从烧瓶中转移到50mL无菌锥形离心管中。将管在20°C下以300x g离心5分钟。

[0121] 丢弃上清液,并通过轻轻叩击管的侧面使细胞团块松散。将细胞重新悬浮在8mL(对于3天周期)或10mL(对于4天周期)的完全DMEM中并轻轻混合。将1mL细胞悬浮液转移到含有35mL完全DMEM的新T175烧瓶中,即3天培养期的亚培养比率为1:8,或4天培养期的亚培养比率为1:10。将细胞返回37°C、5% CO₂的孵育箱中。

[0122] 细胞涂铺

[0123] 第1天,将HEK293细胞(人胚肾细胞293)接种到5x 15cm组织培养皿中,这些组织培养皿足够用于单批300 μ L的rAAV。在一个90%汇合的T175烧瓶中的细胞数目足以接种3.5-4.0x 15cm板(涂铺密度为每张板约15x 10⁶-20x 10⁶个细胞),使得在转染时达到70%的汇合率。如上所述,解离细胞并从T175烧瓶中收获。

[0124] 将收获的细胞团块重新悬浮在适当体积的完全杜尔贝科氏改良伊戈尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM)中,以产生足以产生1x 15cm皿/mL的细胞悬浮液(即,如果一个T175烧瓶生成3.5x 15cm的皿,则每个T175烧瓶使用3.5mL完全DMEM)。将1mL细胞悬浮液添加每个15cm组织培养皿内的20mL完全DMEM中并充分混合。将板返回37°C、5% CO₂的孵育箱中,从而确保板是水平的。

[0125] 转染

[0126] 在第2天进行细胞转染步骤。转染时板达到70%汇合。在转染前三小时,将每张板

的培养基吸出,丢弃并更换为20mL的IMDM(伊斯科夫氏改良杜尔贝科氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium))。

[0127] 在转染前三小时,通过从-20℃取出2.5M CaCl₂、HEBS(HEPES缓冲盐水)和质粒(参见上文)的等分试样,使转染试剂达到室温。

[0128] 在转染之前立即将试剂按下列顺序移液到50mL管中来制备DNA混合物:12mL无菌室温超纯水、1.65mL 2.5M CaCl₂、62.5μg pAAV表达质粒、125μg pF Δ 6和62.5μg衣壳质粒。

[0129] 使用0.2μm ACRODISC®注射器过滤器将DNA混合物过滤灭菌到75cm²的组织培养瓶中。对于转染:在用力涡旋DNA混合物(在烧瓶中)的同时,将最佳体积(6至13mL)的HEBS移液到烧瓶中并继续涡旋10-15秒。

[0130] 使转染混合物在室温下再静置2分钟。由于细小沉淀物的形成,转染混合物的外观略显不透明。

[0131] 将5x 15cm的HEK293细胞板从孵育箱中取出并且将1/5的转染混合液轻轻移液到呈环形滴加运动的每张板中。这个过程小心但迅速地进行,使得在5分钟内将混合物添加到所有板。将板轻轻搅动以确保转染混合物的均匀分布,并将其返回到组织培养孵育箱中。大约16-18小时后,取出培养基并丢弃。向板中添加20mL预先温热(37℃)的完全DMEM,并将板返回到孵育箱中。

[0132] 细胞收获和样品制备

[0133] 在转染后约65小时收获细胞。吸出培养基并丢弃。通过向每张板移取约20mL预先温热(37℃)的1x PBS(磷酸盐缓冲盐水)来轻轻洗涤细胞,将板轻轻旋转,并取出并丢弃PBS。

[0134] 向每张板再添加20mL 1x PBS,并将细胞使用细胞刮刀从板上脱离。将细胞悬浮液收集在无菌的50mL管中(每50mL管2张板,并且其余板的悬浮液在另一个50mL管中)。

[0135] 在配备有外旋转转子的离心机中,将板在4℃下以600x g离心30分钟。小心地取出上清液并丢弃。通过将细胞团块重新悬浮在裂解缓冲液中合并细胞,最终体积为8mL,每批5张板。

[0136] 添加10%的脱氧胆酸钠达到约0.5%的最终浓度(在8mL中添加400μL的10%脱氧胆酸钠)并添加BENZONASE®达到50U/mL的最终浓度。将管中的溶液充分混合,将管置于37℃水浴中持续60分钟。在孵育期期间,每15分钟将管涡旋一次。将裂解物储存在-20℃。

[0137] 碘克沙醇梯度制备

[0138] 将含有rAAV载体的粗制细胞裂解物解冻至室温。将裂解物在4℃下以7,000x g离心15分钟,以去除任何微粒物质。将细胞上清液转移到新管中。

[0139] 碘克沙醇梯度是在一次性35mL超速离心管中制备的。将溶液用附接到10mL一次性注射器上的脊椎穿刺针按下列顺序上样:7.5-8.0mL细胞上清液;8.5mL 15%碘克沙醇;6.0mL 25%碘克沙醇;5.0mL 40%碘克沙醇;和5.0mL 54%碘克沙醇。将针保持靠在管的侧面并将每种溶液缓慢排出,以便不扰乱上一层。将裂解缓冲液(150mM NaCl、50mM Tris,pH 8.5)添加到管顶部的细胞上清液中,直到低于管塞底部1-2mm,注意不要扰乱任何层。

[0140] 将管在SORVALL™超速离心机T865转子中以58,000rpm离心1小时45分钟(包括15分钟加速和90分钟自旋)。将附接到5mL注射器的18号针插入40-54%的碘克沙醇界面处。在管的顶部插入20号针,以利于空气进入管中。将18号针的斜面朝上,小心地抽出3.5-4.0mL含

有载体的40%碘克沙醇层并转移到50mL的管中。

[0141] 将10mL在1x PBS-MgCl₂中的0.001%普朗尼克酸添加到载体样品中,之后通过0.45μm注射器过滤器将样品过滤到15mL 100kDa分子量截止值的AMICON®浓缩器中。将样品以3,000x g离心,直到样品体积减少到约200μL。

[0142] 将14-15mL在1x PBS-MgCl₂中的0.001%普朗尼克酸添加到浓缩器中并如上进行离心。这样重复3-4次,直到去除碘克沙醇。在最后一次洗涤时,将样品离心至约200μL的体积并移液到1.5mL管中。将150μL在1x PBS-MK中的0.001%普朗尼克酸添加到浓缩器中以冲洗内部,将其与样品合并,得到总共约350μL AAV载体。

[0143] 将样品通过带有HT TUFFRYN®膜的13mm、0.2μm、低蛋白导结合的ACRODISC®过滤器过滤灭菌到新1.5mL无菌蛋白LOBIND®管中。将载体在-80℃下长期储存。

[0144] SDS-PAGE

[0145] 为了确认三种rAAV衣壳蛋白(VP1、2和3)的存在,并检查其他蛋白污染物的存在/不存在,使用微型-PROTEAN 3系统(Bio-Rad)进行凝胶制备和电泳,对rAAV样品进行SDS-PAGE分析。

[0146] rAAV载体滴定

[0147] rAAV载体制剂可以含有空头衣壳和含基因组的载体颗粒的混合物。为了标准化所使用的含DNA的载体颗粒的量,可以通过基于SYBR Green的qPCR,使用标准曲线法来确定病毒载体原液的基因组滴度。从完整的rAAV颗粒中提取的载体DNA相对于使用已知摩尔浓度的参考质粒生成的标准曲线进行测量,所述参考质粒已在10³至10⁷个质粒拷贝/μL的范围内连续稀释。还包括PCR级水的NTC并且每个反应一式三份地进行。每次运行还可以包括已知滴度的rAAV载体原液样品(滴定对照或参考标准),以允许运行之间滴度的标准化。然而,如果要在载体之间进行直接比较,应在同一qPCR实验中确定滴度。

[0148] 为每个未知的rAAV样品和rAAV参考标准(如果包括在内)以及一个NTC反应制备足够的DNA酶I主混合物,进行一式三份的DNA提取。在0.2mL PCR管中通过将48μL的DNA酶I主混合物和2μL的未知rAAV或rAAV参考标准品合并,建立反应。向NTC反应中添加2μL的超纯水或PCR级水,而不是rAAV。将管的内容物混合,并将管短暂地自转。

[0149] 将管在25℃下孵育15分钟,以去除未包装在rAAV病毒体内的任何污染性DNA。所有的孵育步骤都是在带有0.2mL区块的热循环仪中进行的。向每个管中添加1μL的50mM EDTA,混合管的内容物,并将管短暂地自旋。将DNA酶I在70℃下热灭活10分钟。通过向每51μL的DNA酶I消化物中添加49μL蛋白酶K主混合物来消化病毒衣壳。对样品进行短暂涡旋并离心。然后将样品在55℃下孵育1小时。蛋白酶K通过在95℃下加热20分钟来灭活。将样品储存在4℃下,直到qPCR需要。

[0150] 为了制备质粒标准品,产生含有可扩增序列的已知大小的质粒的1x 10³至1x 10⁷个拷贝/μL的稀释系列。将质粒使用无菌TE缓冲液或PCR级水稀释到25-100ng/μL,并使用高精度分光光度计测定浓度。还测定质粒的质量以及质粒原液的浓度(拷贝数/μL)。将质粒在TE缓冲液或PCR级水中稀释以生成1x 10⁹个拷贝/μL的原液。在TE缓冲液或PCR级缓冲液中对原液进行10倍连续稀释,生成1x 10³、1x 10⁴、1x 10⁵、1x 10⁶和1x 10⁷个拷贝/μL的质粒标准品。这些都是以100μL的等分试样储存在-80℃下。每次qPCR运行解冻一组新的标准品。

[0151] 对于qPCR,将100 μ L超纯水或PCR级水添加到上述100 μ L的rAAV DNA样品中。涡旋200 μ L样品并短暂自旋。生成上述每个一式三份的载体DNA制剂的1:5至1:50稀释液。涡旋样品并短暂自旋。

[0152] 为每种质粒标准品、载体DNA样品和NTC的一式三份PCR反应制备足够的SY3R Green PCR主混合物。为每个rAAV DNA样品、质粒标准品和NTC建立三个重复的125 μ L PCR反应,其中包含384孔光学反应板的孔中的10 μ L Green PCR主混合物和2.5 μ L样品。将板用光学胶盖密封并用铝箔包裹避光。将板储存在4 $^{\circ}$ C下,直到运行结束。

[0153] 将板在20 $^{\circ}$ C下以1700x g离心2分钟并转移到实时热循环仪(Applied Biosystem 7900HT实时PCR系统),并使用下列循环条件运行实时PCR:

[0154]	实时扩增	第1步(1个循环)	2分钟	50 $^{\circ}$ C
		第2步(1个循环)	10分钟	95 $^{\circ}$ C
		第3步(40个循环)	15秒	95 $^{\circ}$ C
			1分钟	60 $^{\circ}$ C
	解链曲线分析	第4步(1个循环)	15秒	95 $^{\circ}$ C
			15秒	60 $^{\circ}$ C
			15秒	95 $^{\circ}$ C

[0155] 使用仪器软件对数据进行分析。根据需要手动调节基线和阈值设置。检查每组三个重复的扩增曲线,并且省略显示出扩增变化的任何孔。评价Ct相对于log标准质粒输入拷贝数的标准曲线。标准曲线的斜率接近3.2并且相关系数(R²值)为0.99,否则用一组新的标准品重复运行。

[0156] 测定未知载体样品的一式三份DNA制剂的平均数量(每个反应的起始拷贝数),并计算原始载体的基因组滴度(载体基因组(vg)/mL)。

[0157] 实施例2.AAV1/2编码的肽在预形成的 α -突触核蛋白原纤维大鼠帕金森氏病模型中的神经保护潜力研究

[0158] 研究概述

[0159] 这是一项非GLP研究,以评估经由AAV1/2病毒载体递送的S62和S71在预先形成的 α -突触核蛋白(aSyn)原纤维大鼠PD模型中保护多巴胺能功能的能力。

[0160] 将完成编码S62和S71的AAV1/2载体的产生。

[0161] 第-14天(D-14),动物将接受AAV1/2-EV(第1组和第2组)、AAV1/2-S62 24MER(SEQ ID NO:6,第3组)或AAV1/2-S71 22MER(SEQ ID NO:7,第4组)向右侧黑质(SN)的立体定向注射。每个部位注射量将为2 μ l,最终载体滴度待定。

[0162] 在D1,动物将接受小鼠序列单体对照(mMC,第1组,StressMarq,BC,Canada,8 μ g/ml)或小鼠序列aSyn PFF(mPFF 1型,StressMarq,8 μ g/ml)向右侧纹状体的两个部位的立体定向注射(2x 2 μ l的8 μ g/ μ lmPFF=总共32 μ g)。

[0163] 该研究将并入总共四个处理组,每组N=12只动物(总共N=48,雌性Sprague-Dawley大鼠,Charles River,Canada)。

[0164] • 第1组AAV1/2-scr+mMC N=12

[0165] • 第2组AAV1/2-scr+mPFF N=12

[0166] • 第3组AAV1/2-S62+mPFF N=12

- [0167] • 第4组AAV1/2-S71+mPFF N=12
- [0168] 在D120,将杀死动物并将收集脑部样品、处理和储存,用于进一步分析。
- [0169] 主要死后措施将包括:
- [0170] • 通过IHC对pSer129 aSyn表达进行定性评估,以了解病理性aSyn在前脑(包括皮质区)的扩散程度。
- [0171] • 通过IHC和立体学对SN中的酪氨酸羟化酶阳性神经元和/或pSer129-aSyn阳性神经元进行定量评估。
- [0172] • 通过IF对新型肽(HA免疫反应性)在多巴胺能(TH免疫反应性)黑质纹状体通路内的表达和分布进行定性评估。
- [0173] 次要死后措施可包括,
- [0174] • 通过立体学定量评估皮层限定区内的pSer129 aSyn阳性皮层神经元(例如顶叶皮层、扣带皮层、岛叶皮层),通过对第2组(AAV1/2-scr+mPFF)的pSer129 aSyn表达的定性评估支持。
- [0175] 动物福利
- [0176] 动物研究是根据CCAC指南并按照IACUC批准的动物使用协议(IACUC-approved Animal Use Protocols,AUP)进行的。
- [0177] 在整个研究中,如果有任何未预见到的不良事件影响动物,导致痛苦、损伤、体重减轻超过起始体重的20%,或出现下列任何人道终点,则应立即对动物实施安乐死。
- [0178] • 姿势异常(驼背)
- [0179] • 无法进行梳理
- [0180] • 嗜眠(活动或响应性下降)
- [0181] • 步行能力受损或瘫痪
- [0182] • 发声异常
- [0183] • 持续性厌食和脱水,无法得到缓解
- [0184] • 出血性分泌物
- [0185] • 腹胀引起痛苦/疼痛
- [0186] • 呼吸困难
- [0187] • 心血管崩溃
- [0188] • 持续性自我创伤
- [0189] • 成年小鼠中肿瘤大小超过1.5cm
- [0190] • 肿瘤溃烂
- [0191] • 濒死前
- [0192] • 濒死(严重抑郁,无法对外部刺激做出响应,不能行走,无法自我纠正)
- [0193] 当给定动物需要安乐死时,将根据动物使用协议(Animal Use Protocol,AUP)中批准的方法或与临床兽医协商后对动物实施安乐死。所选择的方法将符合机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC)批准的方法,并将具有物种特异性。安乐死的建议在很大程度上基于2013年AVMA安乐死指南和CCAC科学用动物安乐死指南(CCAC Guidelines on the Euthanasia of Animals Used in Science, 2010)。

[0194] 在这项研究中,根据诸如工作人员的可用性和安乐死的紧迫性的情况,选择的安乐死方法将是使用异氟烷诱导全身麻醉,接着进行头颈分离操作,或使用异氟烷在全身麻醉下进行灌注。

[0195] 媒介物和畜牧业

[0196] 将完成编码两种新型肽S62和S71中的每一者的,并入血凝素(HA)标签的AAV1/2载体的产生。如果需要稀释,则本研究的媒介物将是无菌PBS。将使用空载体作为所用每个载体的对照。

[0197] 该研究将使用总共48只雌性Sprague-Dawley大鼠(Charles River,第一次手术时275-300g)。每个笼子将安置2只动物,并在任何程序开始前驯化至少一周。将动物安置在标准温度($21 \pm 2^\circ\text{C}$)下,在光照受控的环境中(早7:00至晚7:00光照),可随意获得食物(Teklad 7912,Harlan, Madison, WI)和水。动物将在驯化的第一天称重,然后此后每周称重一次。

[0198] 手术

[0199] 动物将接受一系列立体定向注射,首先注射到黑质(D-14),并在D1将PFF注射到纹状体。

[0200] 第-14天(AAV1/2-S62或AAV1/2-S71)

[0201] 在研究D-14天,动物将根据立体定向技术在单个部位接受空载体(AAV1/2-EV;第1组和第2组)、AAV1/2-S62(SEQ ID NO:6,第3组)或AAV1/2-S71(SEQ ID NO:7,第4组)的单侧鼻内施用。每个部位的注射量将为 $2\mu\text{l}$,浓度为 3.0×10^{12} gp/ml。所有载体将在PBS中稀释(如果需要)。注射部位将相对于Bregma是-5.2mm AP和-2mm ML(根据Paxinos和Watson的图集,1986),其中针头向下插入到颅骨下-7.5mm。

[0202] 第1天(mPFF)

[0203] 在D1,即施用编码两种肽中的每一种的载体两周后,将进行第二次立体定向手术。动物将接受小鼠序列单体对照(mMC,第1组,StressMarq,8g/ml)或小鼠序列aSyn PFF(mPFF 1型,StressMarq,8g/ml),单侧施用到两个部分中的每一个处的纹状体(2×21 的 $8\text{g}/1\text{mPFF} = 32\text{g}$ 总共)。注射部位将是+1.6mm AP和+2mm ML,针头从颅骨向下插入4mm(部位1);以及-0.1mm AP、+4.2mm ML,针头从颅骨向下插入5mm(部位2)。

[0204] 手术概述(所有手术)

[0205] 所有手术都将使用无菌技术进行。在异氟烷麻醉下(2%,氧流量 $2\text{L}/\text{min}$,异氟烷 USP 99.9%)并且在确认尾钳和角膜反射消失后,将大鼠置于Kopf小动物立体定向架中,切齿棒设置在耳棒(耳间线)下方3.3mm处。动物的头部将被剃光并使用消毒皂、异丙醇70% USP和碘外科擦洗液(7.5%聚维酮碘)彻底清洁皮肤。用无菌手术刀片沿中线前后方向产生切口($\sim 2\text{cm}$)。在使用棉签进行Bregma暴露后,根据Paxinos和Watson(1986)的图集,在颅骨中在SN(第-14天)或纹状体(第1天)上方按上述坐标钻出钻孔。对于所有注射,将使用带有45度斜面的定制的1英寸、26G汉密尔顿针头。每次注射后,针头将再留在原位5分钟,以确保溶液完全吸收。在最后一次注射后缓慢缩回针头之后,将通过伤口夹闭合切口并将给动物施用盐水($50\text{ml}/\text{kg}$, SC)。将为伤口涂覆止痛、抗细菌药膏。最后,动物将从架上移出并置于恢复笼中,定位在恒温控制垫上,并进行监测,直到意识清醒。

[0206] 处理组

[0207] 该研究将并入4组大鼠。在研究开始时,动物将随机分配到每个组。处理将如表2所示。

[0208] 表2.

	AAV1/2 测试项	mMC 或 mPFF	终末程序	
[0209]	D-14 i.c.	D1 i.c.	D120, 杀死, 脑解剖	N
	1 AAV1/2-scr	mMC	√	12
	2 AAV1/2-scr	mPFF	√	12
	3 AAV1/2-S62	mPFF	√	12
	4 AAV1/2-S71	mPFF	√	12

[0210] • AAV1/2-scr:具有HA标签的AAV1/2-乱序S62, 3.0×10^{12} gp/ml

[0211] • AAV1/2-S62:具有HA标签的AAV1/2-S62 24聚体, 3.0×10^{12} gp/ml

[0212] • AAV1/2-S71:具有HA标签的AAV1/2-S71 22聚体, 3.0×10^{12} gp/ml

[0213] • mMC:单体对照

[0214] • mPFF:小鼠序列aSyn预形成的原纤维

[0215] 尸体解剖和组织制备

[0216] 在D120,动物将接受过剂量的异氟烷,并通过穿心灌注含0.2%肝素的0.9%冰冷盐水的方式,使动物经由流血过多而被杀死。快速取出脑部,然后在4%多聚甲醛(PFA)中浸泡48小时进行固定,接着在分级蔗糖溶液(15%至30%蔗糖)中进行低温保护。所有组织将在上锁的冰箱中在-80℃下储存。

[0217] pSer129 aSyn免疫组织化学

[0218] 将处理前脑和中脑的固定后和低温保存的切片以获得pSer129aSyn免疫反应性。脑部将在滑动式切片器(Leica)上在冠状面以40μm的厚度冷冻切割,并将6个系列的切片储存在低温保护剂中。一系列切片将通过生物素标记的抗体程序进行处理以使pSer129 aSyn可视化。简言之,在含有0.1%吐温-20的PBS溶液中洗涤几次后,将在3%的过氧化氢溶液中猝灭内源性过氧化物酶。将通过将切片在柠檬酸钠缓冲液中在37℃下孵育1小时,接着在PBS中冲洗3次来进行抗原修复。在5%正常驴血清/2%牛血清白蛋白溶液中可抑制本底染色。然后将组织与抗pSer129 aSyn(1:5000;Abcam,ab51253)一起孵育过夜。在PBS中洗涤三次后,将切片依次在生物素化抗体IgG(驴抗兔,1:500;Jackson,West Grove,PA)和Elite亲合素-生物素复合物(ABC试剂盒;Vector,Burlingame,CA)中孵育1小时,之间间隔在PBS中洗涤三次。pSer129 aSyn免疫染色将在使用3,3'-二氨基联苯胺(ABC Elite,Vector Laboratories,目录号PK-6100)的反应后可视化。然后将切片固定在载玻片上,使其干燥,浸入dH₂O,通过分级醇(70%、95%、100%)脱水并在脱蜡剂(histo-clear)中清除,之后用Vecta-mount封固剂盖上盖玻片。

[0219] 将定性评估前脑中的pSer129 aSyn表达,以确定病理性aSyn扩散程度。另外,将通过立体学对SN中pSer129-aSyn阳性神经元进行定量评估(参见下文)。基于对皮层的定性评估结果,可以确定接下来应该进行定量评估。因此,通过立体学的方式,将在皮层限定区(诸如顶叶皮层、扣带皮层、岛叶皮层)内进行pSer129 aSyn阳性皮层神经元。目标区域将通过

对第2组(AAV1/2-scr+mPFF)中pSer129 aSyn表达的定性评估来支持和限定。

[0220] 黑质TH的免疫组织化学和立体学

[0221] 脑部将在冷冻滑动切片机(Leica Microsystems Inc.,Richmond Hill,ON)上在冠状面以40 μ m的厚度冷冻切片,并将6个系列的切片储存在低温保护剂(30%甘油、30%乙醇、40% PBS)中。单个系列的切片将通过生物素标记的抗体程序进行处理以使酪氨酸羟化酶(TH)可视化。简言之,在含有0.2% Triton X-100(PBS-T)的PBS溶液中洗涤几次后,将在3%过氧化氢溶液中猝灭内源性过氧化物酶并且在10%正常山羊血清/2%牛血清白蛋白溶液中抑制背景染色。然后将组织与一抗孵育过夜:兔抗TH抗体(1:1000,Pe1-Freez,Rogers,AR)。在PBS-T中洗涤三次后,切片将依次在生物素化的山羊抗兔或小鼠IgG(1:300;Vector,Burlingame,CA)中孵育1小时并且在Elite亲合素-生物素复合物(ABC试剂盒;Vector,Burlingame,CA)中孵育1小时,之间间隔在PBS中洗涤三次。然后在与3,3-二氨基联苯胺(Vector,Burlingame,CA)的反应后,将可视化免疫染色。将切片固定在载玻片上,使其干燥,浸入dH₂O,通过分级醇(70%、95%、100%)脱水,在二甲苯中清除,并用DPX封固剂(Electron Microscopy Sciences,Hatfield,PA)盖上盖玻片。

[0222] 将通过立体学来定量评估SN中的酪氨酸羟化酶阳性神经元。

[0223] 根据立体学原理,将使用Stereo Investigator软件(MBF Bioscience,Williston,VT)对黑质致密部(SNc)内的TH⁺ve神经元数目和/或pSer129⁺ve神经元数目进行估计。将使用6至8个切片用于对每种情况进行计数,每个切片从前部到后部SN相隔240 μ m。将使用与数码相机耦合的Zeiss显微镜(Carl Zeiss,Canada)进行立体学,以使组织切片可视化。将使用光学分馏法从带编码的载片估计TH⁺ve和/或pSer129-aSyn神经元的总数。对于所分析的每个组织切片,将根据经验评估切片厚度,并在每个切片的顶部和底部使用厚度~2 μ m的保护区。将在低放大倍率(5x)下描画SNc轮廓,并在40x放大倍率下对神经元进行计数。将使用Stereo Investigator软件(MicroBrightfield,VT,USA)根据经验确定立体学参数(即,网格大小、计数框架大小和解剖器高度)。可接受的误差系数(CE)将根据West及其同事的程序计算,也称为Gundersen CE(m=1)。将接受Gundersen值<0.10。

[0224] 酪氨酸羟化酶+血凝素免疫荧光

[0225] 使用单个系列的中脑和尾部纹状体切片,将进行双标签免疫荧光,以揭示血凝素(HA)标记的人aSyn和酪氨酸羟化酶(TH)。简言之,在自由漂浮的切片上,将通过双标记免疫荧光来评价TH(绵羊抗TH抗体,1:1000,Pe1 Freez,P60101;二抗,Alexa fluor驴抗绵羊,Fisher Scientific,A21099,1:500)和HA(兔抗HA,1:1000;Abcam,AB9110;Alexa Fluor驴抗兔,1:500,Fisher Scientific,A21206,1:500)的水平和分布。

[0226] 将定性评估HA标记的人aSyn和TH,以确定新型肽(HA免疫反应性)在多巴胺能(TH免疫反应性)黑质纹状体通路内的表达程度和分布。

[0227] 统计分析

[0228] 来源于死后终点的连续数据(黑质TH+ve细胞计数)将绘制成平均值 \pm SEM,并使用单因素或双因素方差分析(RM-ANOVA)进行分析,接着使用GraphPad Prism(v.8)进行适当的事后多重比较检验。

[0229] 实施例3.S62和S71肽的稳定性和渗透性研究

[0230] 在大鼠血浆中的稳定性

[0231] 将S62和S71肽(分别为SEQ ID NO:3和4)在体外在含有10%TCA和甲醇作为猝灭剂的大鼠血浆中孵育一段时间,经计算该段时间反映了施用于大鼠时所述肽将经受体内条件的回收率。S62和S71肽的回收率不够高,不足以检测。

[0232] 在Caco-2测定中的渗透性

[0233] 在Caco-2测定中使用甲醇评估S62和S71肽的渗透性。正如从表3中可以看出,两种肽都没有表现出渗透性。

[0234] 表3

化合物 ID	测定浓度 (μM)	平均 Papp A-B (10 ⁻⁶ cm/s)	平均 Papp B-A (10 ⁻⁶ cm/s)	平均 (B-A/A-B) 流出比率	平均 A-B 回收%	平均 B-A 回收%	A-B 渗透性等级评定
S62	10	0.00	0.00	不适用	70.1%	92.5%	在 T120 基底面或 T120 顶面未检测到化合物
S62 维拉帕米 (Verapamil) 25	10	0.00	0.00	不适用	59.7%	91.3%	在 T120 基底面或 T120 顶面未检测到化合物
S71	10	0.00	0.00	不适用	91.4%	74.7%	在 T120 基底面或 T120 顶面未检测到化合物
S71 维拉帕米 25	10	0.00	0.00	不适用	80.7%	92.7%	在 T120 基底面或 T120 顶面未检测到化合物
对照:							

华法林(Warfarin)	10	36.8	33.8	0.917	93.0%	93.4%	高于预期
他林洛尔(Talinolol)	10	0.404	6.09	15.1	86.3%	101.7%	如预期的那样流出
他林洛尔 维拉帕米 25uM	10	0.800	1.91	2.39	83.2%	94.2%	正如预期的那样,流出受到维拉帕米抑制
雷尼替丁(Ranitidine)	10	0.391	1.03	2.65	87.1%	95.2%	低于预期

[0237] 渗透性等级评定:较低的是<1x10⁻⁶ cm/s;较高的是>1x10⁻⁶cm/s。流出比率>2指

示所述化合物有可能成为Pgp或其他活性转运因子的底物。

序列

SEQ ID NO: 1

AVVWGVTA V

SEQ ID NO: 2

AVVTGVTAV

SEQ ID NO: 3

[0238]

GAVVWGVTA VKK

SEQ ID NO: 4

RAVVTGVTAVAE

SEQ ID NO: 5

GAVVWGVTA VKKKKK

SEQ ID NO: 6

GAVVWGVTA VKKGRKKRRQRRRPQ

SEQ ID NO: 7

YGRKKRRQRRRAVVTGVTAVAE

SEQ ID NO: 8

MDVFMKGLSKAKEGVVAAA EKTQGVAEAAGKTKEGVLYV
GSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEG
AGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMP
SEEGYQDYEPEA

SEQ ID NO: 9

[0239]

agcttgc atgcctgc aggtcactgt tctcatc acatcatatca aggtatata ccatcaatattgcc a
cagatgtt acttagc ctttaata tttctcta atttagt gtatatg caatgat agttctctg attctg agattg agt
ttctcatgt gaatgatt atttag agttctctt cactctgt tcaattttt gtctagttt atttttt actgattt gaag
actctttt ataactg catattaca attctctt actggggtgt gcaaatattt ctgtcattct atggcctgac
tttctta atggtttt aattttaa aataagtct taatattc atgcaatc taattaaca atctttctt gtggttag
gactttg agtcataa gaaatttt ctctac actgaagtc atgatggc atgcttct atattttt ctaaagattta
aagtttgc cttctcc atttag acttata attcact ggaattttt gtgtgt atggtat gacatat gggttccctt
tattttt acatataa atataatt cctgtttt ctaaaa agaaaa gatcatc atttcc cattgaaa atgcca
atttttt catagg tcaacta catata tcaatgg gctgttt ctgagct ctactct atttt atcagc ctaactgt cta
tccccac acatctc atgcttt gctctaa atcttg atattag tggaa cattctt cccattt gtctaca agaata
ttttgt attgtctt tggcctt ctatata catttg aaatg aggtgaca agttgg ggatcgtac ctaatatc ac
aaactgg aaatgt ctatca atatagt tgcctag ttatta atagta atcaattac ggggtc attagttc atag
cccatata tggagtcc gcgttac ataactac ggtaaatgg cccgcctgg ctgacc gccaacgacccc
cgcccatt gacgtca ataata gacgtatgt cccatag taacgcca atagg gacttcc attgacgt caatgg
gtggact atttac ggtaaact gcccactt ggcagtac atcaagt gatcatat gccaagtac gccccctatt
gacgtca atgacgg taaatgg cccgcctgg cattatg cccagta catgacct atgggactt tctacttg
gcagtac atctacgt attagtc atcgtatt accatgg tgcaggtg agccccac gttctgctt cactctccc

catctccccccctcccccccccaatthttgtatthttatthtttaattatthttgtgcagcgatggggggcggg
 gggggggggggggggcgcgccaggcggggcgggggcgggggcgagggggcgggggcgggggcgagg
 cggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagttctttatggcgaggcggc
 ggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcggggcgggagtcgctgcgacgctgccttcg
 ccccgctgccccgctccgcccgcctcgcgccgcccggcctctgactgaccgcttactcccac
 aggtgagcgggggggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgttggttaatgacggcttgttctt
 ttctgtggctgcgtgaaagccttgaggggctccgggagggccctttgtcgggggggagcggctcggg
 gctgtccgcggggggacggctgccttcgggggggacggggcagggcgggggttcggcttctggcgtg
 tgaccggcggctctagagcctctgtaacctatgttcatgccttcttcttttctacagctcctgggcaacgt
 gctggttattgtgctgtctcatcatttg

SEQ ID NO: 10

[0240] tcaacctctggattacaaaatthttgtgaaagattgactggattcttaactatgthttccttttacgctat
 gtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggcttctatttctccttgtataaa
 tcttggttctgtctctttatgaggagttgtggcccgttctcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgtttg
 ctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggacttctgcttcccc
 ctccctattgccacggcggaaactcatgccgcctgccttgcggctgctggacaggggctcggctgttg
 ggactgacaattccgtggtgttgcgggaaatcatcgtccttcttggctgctcgcctgtgttgcacc
 tggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccggg
 cctgctgccggctctcggcctcttccgcgtcttcgcttccgctcagacgagtcggatctcccttggg
 ccgctccccgc

SEQ ID NO: 11

aataaa

SEQ ID NO: 12

agcttgcctgcaggtcactgttctcatcacatcatcaaggttatataccatcaatattgcc
 cagatgttacttagccttttaataatthttcttaatttagtgatatgcaatgatagttctctgatttctgagattgagt
 ttctcatgtgtaatgattatttagagtttcttctcatctgttcaatthttgtctagttttactgatttgaag

actctttttataatctgcatattacaattctctttactgggggtgtgcaaataatttctgtcattctatggcctgac
 tttcttaatggtttttaattttaaaaataagctttaatattcatgcaatctaattaacaatctttctttgtggtag
 gactttgagtcataagaaattttctctacactgaagtcatgatggcatgcttctatattttctaaaagattta
 aagttttgccttctccatttagacttataattcactggaattttttgtgtgtatggatgacatatgggttccctt
 tatttttacatataaatatatttccctgttttctaaaaaagaaaaagatcatcattttccattgtaaaatgccat
 atttttcataggtcacttacatataatcaatgggtctgtttctgagctctactctattttatcagcctcactgtcta
 tccccacacatctcatgctttgctctaaatcttgatatttagtggaacattttccattttgttctacaagaata
 tttttgtattgtctttgggctttctatatacattttgaaatgaggttgacaagttggggatc

SEQ ID NO: 13

[0241]

tagctgcgcgctcgcctcactgaggccgccgggcaaagcccgggctcgggacacctt
 ggctgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagaggagtggccaactccatcactaggggt
 tccttgtagttaatgattaaccgccatgctacttactacgtagccatgctctaggtacgatcccagcttg
 catgcctgcaggtcactgttctcatcacatcatcaaggtatataccatcaatattgccacagatgttactt
 agccttttaataatttcttaatttagtgatgatgaatgatagttctctgatttctgagattgagtttctcatgtga
 atgattatttagagtttcttctcatctgttcaaatttttgtctagttttttttactgatttgaagactcttttata
 atctgcatattacaattctcttactgggggtgtgcaaataatttctgtcattctatggcctgacttttctaatgg
 ttttaattttaaaaataagctttaatattcatgcaatctaattaacaatctttctttgtggtaggactttgagca
 taagaaattttctctacactgaagtcatgatggcatgcttctatattttctaaaagatttaaagttttgcctt
 ctccatttagacttataattcactggaattttttgtgtgtatggatgacatatgggttccctttatttttacata
 taaatattttccctgttttctaaaaaagaaaaagatcatcattttccattgtaaaatgccatattttttcatag
 gtcacttacatataatcaatgggtctgtttctgagctctactctattttatcagcctcactgtctatccccacacat
 ctcatgctttgctctaaatcttgatatttagtggaacattttccattttgttctacaagaatattttgtattgt
 ctttgggctttctatatacattttgaaatgaggttgacaagttggggatcgtacctaatatcacaactggaa
 atgtctatcaatatatagttgctctagttattaatagtaatacaattacggggtcattagttcatagcccatatag
 gagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattg
 acgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactat
 ttacggtaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaat
 gacggtaaattggcccgcctggcattatgccagtacatgacctatgggactttcctacttggcagtacat
 ctacgtattagtcategctattaccatggctcgaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctcccc

ccctccccaccccccaatfttgtattattatfttttaattatfttgtgcagcgatggggggcggggggggggg
ggggggcgcgcgccagggcggggcggggcggggcgagggggcggggcgaggcggagagg
tgcggcgagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtfttctttatggcgaggcggcggcggg
cggccctataaaaagcgaagcgcgcggcggggcgggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgc
ccgctccgcgcgcctcgcgcgcgcccggcctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagc
gggggggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgttggttaatgacggcttgttctttctgtggc
tgcgtgaaagccttgaggggctccgggagggcctfttgcggggggagcggctcggggctgtccgc
ggggggacggctgccttcgggggggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggc
ggctctagagcctctgtaacctatgtcatgccttcttcttctacagctcctgggcaacgtgctggttatt
gtgctgtctcatctttggcaaagaattggatccactcagtagccatgggcgccgtggtgtggggcgt
gaccgccgtgaagaaggcaggaagaagaggaggcagaggaggaggccccagagatcttatccgt
atgatgtcctgattatgcttgatagtaagcttatcgataatcaacctctggattacaaafttggaaagattg
actggtattcttaactatgtgctcctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgatcatgctattgc
tcccgtatggcttcttctcctctgtataaatcctggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccgtg
tcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccac
ctgtcagctcctttccgggactttcgttccccctcctattgccacggcggaactcatcgccgcctgcct
tggcccgtgctggacaggggctcggctgttgggcaactgacaattccgtggtgttgcgggaaatcate
gtcctttccttggctgctcgcctgtgttccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcg
gccctcaatccagcggaccttctcccggcctgctgccggctctgcggccttctccgcgtcttcgct
tcgccctcagacgagtcggatcctccttggggcgcctccccgcacgataaccgtcgaactcgtgatcag
cctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgttggccctccccgtgccttcttgaccctggaagg
tgccactcccactgtccttcttaataaaaatgaggaaattgcacgcattgtctgagtaggtgtcattctattc
tgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggg
gatgcgggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctcgaactagagcatggctacg
tagataagtagcatggcgggtaataactacaaggaaccctagtgatggagttggcactccctct
ctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggtcggccgacgcccgggctfttggccggg
cggcctcagtgagcgcgcgcagagcftttgcaaaagcctaggcctccaaaaagcctcctc
actacttctggaatagctcagaggccgagggcgcctcggcctctgcataataaaaaaattagtcagcc
atggggcgagagaatgggcggaactgggcggagttagggcgggatgggcggagttagggcgggga
ctatggtgctgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccac

[0242]

acctggtgctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccac
accetaactgacacacattccacagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggttgc
gtattgggcgctcttccgcttctctcgtcactgactcgtcgcctcggctcgttcggctgcggcgagcggtg
tcagctcactcaaaggcggaataacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtga
gcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcggtttttccataggctccg
ccccctgacgagcatcacaatacgcagctcaagtcagagggtggcgaacccgacaggactataa
agataccaggcggtttccccctggaagctccctcgtgcgctctctgttccgacctgcccgttaccggata
cctgtccgcttttctccctcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtg
taggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgccttatccg
gtaactatcgtcttgagtccaaccggtaagacacgacttatcgcactggcagcagccactggtaacag
gattagcagagcgaggtatgtagcggtgctacagagttcttgaaagtgtggcctaactacggctacact
agaagaacagtatttggatctcgcctctgctgaagccagttacctcggaaaagagttgtagctcttg
atccggcaaaacaaccaccgctggtagcgggtggtttttgcaagcagcagattacgcgcagaaaa
aaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaaacgaaaactcacgta
agggttttggatgagattatcaaaaaggatcttccactagatcctttaaattaaaaatgaagtttaaatc
aatctaaagtataatgagtaaaactggctctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagc
gatctgtctatttcttccatagttgctgactccccgctgtagataactacgatacgggagggctta
ccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaata
aaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaacttatccgctccatccagtctatt
aattgtgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagttgcaacgttggccattgctaca
ggcatcgtgggtgcacgctcgtctgttggatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagtt
acatgatccccatggttgcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgttgcaagtaagttg
gccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgct
ttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgaggcgaccgagttgctcttgc
cggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtctcatcattggaaaacgctt
ttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagatgtaaccactcgtgcacca
actgatctcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgca
aaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcattt
atcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaataagggttccgc
gcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaccattattatcatgacattaacctataaaaata

[0243]

ggcgtatcacgaggcccttcgtctcgcgcgttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagct
cccggagacgggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtca
gcgggtgttgccgggtgtcggggctggcctaactatcgggcatcagagcagattgtactgagagtgcac
cattcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggtgaggccgttgagc
accgccgccgaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtccccggccacggggcct
gccaccatacccacgccgaaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggg
gatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccg
gcgtagaggatctggctagcgtgacctgctgattggctcgtgaccatttccgggtgcgggacggcg
ttaccagaaactcagaaggttcgtccaacaaaccgactctgacggcagtttacgagagagatgatagg
gtctgcttcagtaagccagatgtacacaattaggcttgtacatattgtcgttagaacgggctacaatta
acataaccttatgtatcatacacatacgatttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

SEQ ID NO: 14

[0244]

tagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccgggcaaagcccgggcgtcggggcagcttt
ggcgcgccggcctcagtgagcgcgagcgcgcgagagaggagtggccaaactccatcactaggggt
tccttgtagttaatgattaaccgccatgctacttatctacgtagccatgctctaggtacgatcccagcttg
catgcctgcaggcactgttctcatcacatcatatcaaggtatataccatcaatattgccacagatgttact
agccitttaataatttcttaatttagtgatgatgcaatgatagttctctgatttctgagattgagtttctcatgtga
atgattatttagagtttcttctcatctgttcaaattttgtctagtttttttactgatttgaagacttcttttata
atctgcatattacaattcttcttactgggggtgtgcaaataatttctgtcattctatggcctgactttcttaatggt
ttttaattttaaaaataagcttaataatcatgcaatcctaataacaatctttcttgggttaggactttgagtca
taagaaattttctctactgaagtcagtgatggcatgctctatattttctaaaagatttaaagtttgcctt
ctcatttagacttataattcactggaattttttgtgtgatggatgacatatgggttccctttatttttacata
taaataatctccctgttttctaaaaaagaaaaagatcatcatttccattgtaaaatgccatatttttcatag
gtcacttacatatatcaatgggtctgttctgagctctactctattttatcagcctcactgtctatccccacacat
ctcatgctttgctctaaatcttgatatttagtggaaacatttccatttggctacaagaatattttgttattgt
ctttgggctttctatatacatttgaaatgaggtgacaagttggggatcgtacctaatatcaciaaactggaa
atgtctatcaatatatagttgctctagttattaatagtaataacacggggcattagttcatagccatataatg
gagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgccattg
acgtcaataatgacgtatgtccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactat

ttacggtaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaat
gacggtaaattggcccgcctggcattatgccagtacatgacctatgggacttctacttggcagtacat
ctacgtattagtcacgctattaccatggctgaggtgagccccacgttctgcttacttccccatcccc
ccctccccaccccccaatttgtattattatTTTTAattatttTgtgcagcgatggggggcggggggggggg
ggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcggaggggcggggcggggcggaggcggagagg
tggggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtTtctttatggcgaggcggcggcggcg
cggccctataaaaagcgaagcgcgcggcggggcgggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgc
ccgctccgcgcgcctcgcgcgcgccgccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagc
gggggggacggcccttctctccgggctgtaattagcgttggTtaatgacggcttgtttctttctgtggc
tgcgtgaaagccttgaggggctccgggagggcccttTgtgcggggggagcggctcggggctgtccgc
ggggggacggctgccttcgggggggacggggcagggcggggTtcggcttctggcgtgtgaccggc
ggctctagacctctgctaacctatgtcatgccttcttctttctacagctcctgggcaacgtgctgttatt
gtgctgtctcatctttggcaaagaattggatccactcgagttagccatgtacggcaggaagaagagga
ggcagaggaggaggccgtggTgaccggcgtgaccgccgtggccgagagatcttatccgtatgatgtt
cctgattatgcttgatagtaagcttatcgataatcaacctctggattacaaaattTgaaagattgactgga
ttcttaactatgttgccttttacgctatgtggatacgtgcTttaatgccttTgtatcatgctattgcttccgt
atggcttctatttctctccttTgtataaatcctggtTgtgtctctttatgaggagttgtggcccgtTgtcaggc
aacgtggcgtggTgtgactgtgtTgtgacgcaacccccactggtTggggcattgccaccacctgca
gctccttccgggacttTcgttccccctcctattgccacggcggaaactcatcgcgcctgcctTgcccg
ctgctggacaggggctcggctgtTggcactgacaattccgtggTgtTgtcggggaaatcactcgtccttTc
ctggctgctcgcctgtgtTgccacctggattctgcgcgggacgctcctTctgctacgtccctTggccctca
atccagcggaccttcttccccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttTgccttgcct
cagacgagtcggatctccctTgggccgcctccccgcacgataaccgtcgaactcgtgatcagcctcga
ctgtgccttctagtTgccagccatctgtTttTccccctccccgtgccttctTgacctggaaggtgccac
tcccactgctcttTctaataaaaatgaggaaattgcacgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggggg
gtggggTggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcg
gtgggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctcTgactagagcatggctacgtagataa
gtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacccctagtTgatggagtTggccactccctctctgcgc
gctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcgccgacgcccgggcttTccccgggcggcct
cagtgagcgcgagcgcgcagagctttTgaaaagcctaggcctccaaaaagcctcctcactactt

[0245]

ctggaatagctcagaggccgagggcctcggcctctgcataataaaaaaattagtcagccatggg
gcggaatggcggaactggcgaggtagggcgggatggcgaggtagggcgggactatg
gttctgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacctg
gttctgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacct
aactgacacacattccacagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcgggagagggcgttgcgattg
ggcgtcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggcgttcggctcggcgagcggatcagc
tactcaaaggcggttaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaa
aaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgcggttttccataggctccgcccc
cctgacgagcatcacaatacgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataagata
ccaggcgttccccctggaagctccctcgtcgcctcctcgttccgacctgccgttaccggatacctgt
ccgctttctccctcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgagg
tcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgccttatccggtaa
ctatcgtcttgagccaaccggtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaacaggatt
agcagagcgaggtatgtagggcttacagagttctgaagtggcctaactacggctacactaga
agaacagtattggatctgcgctctgctgaagccagttacctcggaaaaagagttggtagctcttgatcc
ggcaaacaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacggcgagaaaaaag
gatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaaggg
attttggtcatgagattatcaaaaaggatctcacctagatccttttaataaaaatgaagtttaaatcaatc
aaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgtct
gtctattcgttcatccatagttgctgactccccgctgctgtagataactacgatacgggagggcttaccatc
tgccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccgctccagattatcagcaataaacca
gccagccggaaggccgagcgcagaagtggcctgcaactttatccgctccatccagcttattaattgt
tgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttggcattgctacaggcat
cgtggtgacgctcgtcgttggatggcttattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatg
atccccatgttgcataaaagcggtagctcctcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccg
cagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctg
tgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttggccggc
gtcaatacgggataataaccgcgccacatagcagaactttaaagtgcctcattggaaaacgttctcgg
ggcgaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagatgaaccactcgtgcacccaactg
atcttcagcatctttactttaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaa

[0246]

aggggaataagggcgacacggaaatgtgaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcatttatcag
ggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacat
ttccccgaaaagtccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacataaaaaataggcgta
tcacgaggecccttcgtctcgcgcgttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgga
gacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggt
gttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccattcga
cgtctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttagggccgttgagcaccgcc
gccgaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccgccacggggcctgccacc
atacccacgccgaaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcgggtgatgtc
ggcgatataggcggcagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtag
aggatctggctagcgtgacctgctgattggttcgctgaccatttccgggtgcgggacggcgttaccag
aaactcagaaggttcgtccaaccaaaccgactctgacggcagtttacgagagagatgatagggctctgctt
cagtaagccagatgctacacaattaggctgtacatattgtcgttagaacgcggtacaattaatacataac
cttatgtatcatacacatacgatttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

[0247]

SEQ ID NO: 15

GRKKRRQRRRPQ

SEQ ID NO: 16

YPYDVPDYA

SEQ ID NO: 17

KKKKKK

SEQ ID NO: 18

HHHHHH

SEQ ID NO: 19

GKPIPPLLGLDST

SEQ ID NO: 20

EQKLISEEDL

[0248]

SEQ ID NO: 21

DYKDDDDK

[0249] 其他实施方案

[0250] 应理解,虽然已经结合其具体实施方式对本公开进行了描述,但上述描述旨在说明而不是限制范围,范围由所附权利要求书限定。其他方面、优势和修改在以下权利要求的范围内。