



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119677545 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 21

(21) 申请号 202380031445.3

(22) 申请日 2023.01.27

(30) 优先权数据

63/303,673 2022.01.27 US

63/321,335 2022.03.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/011746 2023.01.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/147058 EN 2023.08.03

(71) 申请人 阿斯克生物公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 安娜·特里亚科娃

雷斯特·苏亚雷斯 安妮·布雷

迈克尔·L·罗伯茨

卡罗琳·佩德尔

伊莱亚娜·格雷里尼

胡安·曼努埃尔·伊格莱西阿斯

豪尔赫·奥马尔·亚内斯库纳

菲利普·穆利埃

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

专利代理师 董世豪 杨国强

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 25/20 (2006.01)

A61P 21/04 (2006.01)

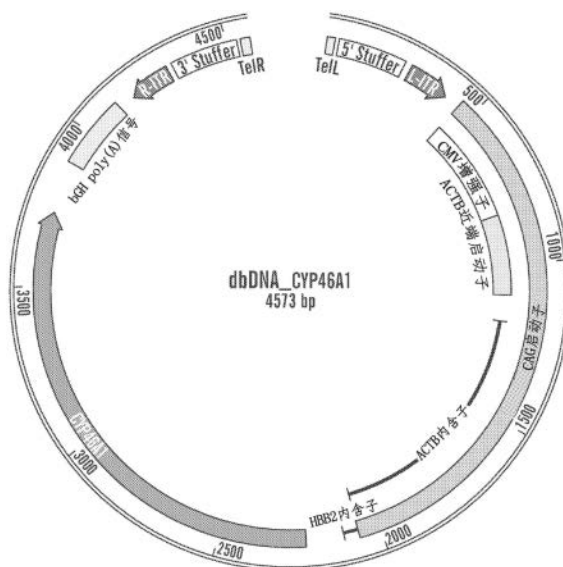
权利要求书9页 说明书153页 附图13页

(54) 发明名称

用于治疗神经系统疾病的组合物

(57) 摘要

本公开的方面涉及对治疗神经系统疾病和紊乱有用的组合物和方法。在一些实施方式中，本公开提供了治疗神经系统疾病或紊乱的方法，所述方法包括施用包含干扰性核酸(例如人工miRNA)的病毒载体和包含CYP46A1蛋白的病毒载体两者。在一些实施方式中，本公开提供了治疗亨廷顿病的方法，所述方法包括施用包含靶向亨廷顿基因(HTT)的干扰性核酸(例如人工miRNA)的病毒载体和包含CYP46A1蛋白的病毒载体两者。在一些实施方式中，病毒载体包含经修饰的病毒衣壳，例如用于优先靶向CNS或PNS中的细胞。



1. 一种治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的以下中的至少一个:

- (a) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA;以及
- (b) 编码CYP46A1蛋白的分离的核酸。

2. 一种治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的以下中的至少一个:

(a) 包含分离的核酸的重组病毒载体,所述核酸包含(i)第一区域和(ii)第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码一个或多个miRNA的转基因;以及

- (b) 包含编码所述CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中,所述神经系统疾病或紊乱是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、Canavan病、利氏病、脊髓性脑性共济失调、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、Krabbe病、Batten氏病、Refsum病、Tourette综合征、原发性侧索硬化症、肌萎缩侧索硬化症、进行性肌萎缩、皮克病、肌营养不良、多发性硬化症、重症肌无力、Binswanger病、神经性疼痛、脊髓或头部损伤引起的创伤、眼科疾病和紊乱、泰-萨二氏病、Lesch-Nyhan病、癫痫、脑梗塞、抑郁症、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性情绪障碍、精神分裂症、药物依赖、神经机能病、精神病、痴呆、妄想、注意缺陷性障碍、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食或体重障碍。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述神经系统疾病或紊乱是中枢神经系统(CNS)疾病或紊乱。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病或紊乱选自亨廷顿病、阿尔茨海默病、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、肌萎缩侧索硬化症和帕金森病。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病或紊乱是阿尔茨海默病,并且所述至少一个miRNA包含与淀粉样前体蛋白(APP)、早老蛋白1、早老蛋白2、ABCA7、SORL1、以及它们的疾病相关等位基因互补的种子序列。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病或紊乱是帕金森病,并且所述至少一个miRNA包含与SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PINK1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1、GBA1、以及它们的疾病相关等位基因互补的种子序列。

8. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病是亨廷顿病,并且至少一个miRNA包含与SEQ ID NO:4互补的种子序列,或者其中,至少一个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一个的序列,所述序列侧接有miRNA骨架序列。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病是亨廷顿病,并且至少一个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一个的序列。

10. 如权利要求8-9中任一项所述的方法,其中,所述miRNA中的至少一个与人亨廷顿基因杂交并抑制人亨廷顿基因的表达。

11. 如权利要求8-10中任一项所述的方法,其中,所述受试者包含具有多于36个CAG重复、多于40个重复、或多于100个重复的亨廷顿基因。

12. 如权利要求8-11中任一项所述的方法,其中,所述受试者的年龄小于20岁。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中,所述重组病毒载体选自于由以下组成的组: AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、甲病毒载体、痘病毒载体、杆状病毒载体和嵌合病毒载体。

14. 如权利要求2-13中任一项所述的方法,其中,包含(a)的所述重组病毒载体与包含(b)的所述重组病毒载体相同。

15. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中,(a)和(b)的所述分离的核酸包含在分开的重组病毒载体中。

16. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中,(a)和(b)的所述分离的核酸包含在相同的重组病毒载体中。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中,在基本上相同的时间施用(a)和(b)。

18. 如权利要求1-13和15中任一项所述的方法,其中,在不同的时间点施用(a)和(b)。

19. 如权利要求18所述的方法,其中,所述不同的时间点间隔至少1min、至少1小时、至少1天、至少1周、至少1个月、至少1年,或更长。

20. 如权利要求18-19中任一项所述的方法,其中,在(b)的施用之前施用(a)。

21. 如权利要求18-19中任一项所述的方法,其中,在(a)的施用之前施用(b)。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,(a)、(b)、或者(a)和(b)的施用重复至少一次。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中,所述转基因包含串联的两个miRNA,所述串联的两个miRNA侧接有内含子。

24. 如权利要求23所述的方法,其中,所述侧接的内含子是相同的。

25. 如权利要求23所述的方法,其中,所述侧接的内含子来自相同的物种。

26. 如权利要求23所述的方法,其中,所述侧接的内含子是hCG内含子。

27. 如权利要求1-26中任一项所述的方法,其中,所述转基因包含启动子。

28. 如权利要求27所述的方法,其中,所述启动子是synapsin (Syn1) 启动子或表10-表13的启动子。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的方法,其中,所述一个或多个miRNA位于所述转基因的非翻译部分。

30. 如权利要求29所述的方法,其中,所述非翻译部分是内含子。

31. 如权利要求30所述的方法,其中,所述非翻译部分在编码蛋白质的核酸序列的最后一个密码子和poly-A尾序列之间,或者在启动子序列的最后一个核苷酸碱基和poly-A尾序列之间。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的方法,进一步包括第三区域,所述第三区域包含第二腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体。

33. 如权利要求1-32中任一项所述的方法,其中,所述ITR变体缺乏功能性末端解析位

点 (TRS), 任选地, 其中, 所述 ITR 变体是 ATRS ITR。

34. 如权利要求 1-33 中任一项所述的方法, 其中, 所述施用使得将所述病毒载体或分离的核酸递送至所述受试者的所述中枢神经系统 (CNS)。

35. 如权利要求 1-34 中任一项所述的方法, 其中, 所述施用是通过注射、任选静脉内注射或纹状体内注射进行。

36. 如权利要求 2-35 中任一项所述的方法, 其中, 所述病毒载体是 AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或 AAV12、或其嵌合体。

37. 如权利要求 2-36 中任一项所述的方法, 所述病毒载体包含来自 AAV 血清型 AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或 AAV12、或其嵌合体的衣壳蛋白。

38. 如权利要求 37 所述的方法, 其中, 所述衣壳蛋白是 AAV9 衣壳蛋白。

39. 如权利要求 2-38 中任一项所述的方法, 其中, 所述病毒载体是自互补 AAV (scAAV)。

40. 如权利要求 2-39 中任一项所述的方法, 其中, 所述病毒载体被配制用于递送至所述中枢神经系统 (CNS)。

41. 一种组合物或组合, 包含以下中的至少一个:

(a) 编码转基因的分离的核酸, 所述转基因编码一个或多个 miRNA; 以及

(b) 编码 CYP46A1 蛋白的分离的核酸。

42. 一种组合物或组合, 包含以下中的至少一个:

(a) 包含分离的核酸的重组病毒载体, 所述核酸包含 (i) 第一区域, 和 (ii) 第二区域, 所述第一区域包含第一腺相关病毒 (AAV) 反向末端重复 (ITR) 或其变体, 所述第二区域包含编码一个或多个 miRNA 的转基因; 以及

(b) 包含编码 CYP46A1 蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

43. 如权利要求 41-42 中任一项所述的组合物或组合, 用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法中, 所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的所述组合物或组合。

44. 如权利要求 43 所述的组合物或组合, 其中, 所述神经系统疾病或紊乱是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、Canavan 病、利氏病、脊髓性脑性共济失调、Krabbe 病、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、Batten 氏病、Refsum 病、Tourette 综合征、原发性侧索硬化症、肌萎缩侧索硬化症、进行性肌萎缩、皮克病、肌营养不良、多发性硬化症、重症肌无力、Binswanger 病、神经性疼痛、脊髓或头部损伤引起的创伤、眼科疾病和紊乱、泰-萨二氏病、Lesch-Nyhan 病、癫痫、脑梗塞、抑郁症、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性情绪障碍、精神分裂症、药物依赖、神经机能病、精神病、痴呆、妄想、注意缺陷性障碍、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食或体重障碍。

45. 如权利要求 44 所述的组合物或组合, 其中, 所述神经系统疾病或紊乱是中枢神经系统 (CNS) 疾病或紊乱。

46. 如权利要求 45 所述的组合物或组合, 其中, 所述 CNS 疾病或紊乱选自亨廷顿病、阿尔茨海默病、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、肌萎缩侧索硬化症和帕金森病。

47. 如权利要求 41-46 中任一项所述的组合物或组合, 其中, 所述至少一个 miRNA 包含与淀粉样前体蛋白 (APP)、早老蛋白 1、早老蛋白 2、ABCA7、SORL1、以及它们的疾病相关等位基

因互补的种子序列。

48. 如权利要求41-46中任一项所述的组合物或组合,其中,所述至少一个miRNA包含与SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PINK1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1、GBA1、以及它们的疾病相关等位基因互补的种子序列。

49. 如权利要求41-46中任一项所述的组合物或组合,其中,所述至少一个miRNA包含与SEQ ID NO:4互补的种子序列,或者其中,所述至少一个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一个的序列,所述序列侧接有miRNA骨架序列。

50. 如权利要求41-46中任一项所述的组合物或组合,其中,所述至少一个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一个的序列。

51. 如权利要求49-50中任一项所述的组合物或组合,其中,所述miRNA中的至少一个与人亨廷顿基因杂交并抑制人亨廷顿基因的表达。

52. 如权利要求49-51中任一项所述的组合物或组合,其中,所述受试者包含具有多于36个CAG重复、多于40个重复、或多于100个重复的亨廷顿基因。

53. 如权利要求49-52中任一项所述的组合物或组合,其中,所述受试者的年龄小于20岁。

54. 如权利要求42-53中任一项所述的组合物或组合,其中,所述重组病毒载体选自自由以下组成的组:AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、甲病毒载体、痘病毒载体、杆状病毒载体和嵌合病毒载体。

55. 如权利要求42-54中任一项所述的组合物或组合,其中,包含(a)的所述重组病毒载体与包含(b)的所述重组病毒载体相同。

56. 如权利要求41-54中任一项所述的组合物或组合,其中,(a)和(b)的所述分离的核酸包含在分开的重组病毒载体中。

57. 如权利要求41-55中任一项所述的组合物或组合,其中,(a)和(b)的所述分离的核酸包含在相同的重组病毒载体中。

58. 如权利要求41-57中任一项所述的组合物或组合,其中,在基本上相同的时间施用(a)和(b)。

59. 如权利要求41-54和56中任一项所述的组合物或组合,其中,在不同的时间点施用(a)和(b)。

60. 如权利要求59所述的组合物或组合,其中,所述不同的时间点间隔至少1min、至少1小时、至少1天、至少1周、至少1个月、至少1年或更长。

61. 如权利要求59-60中任一项所述的组合物或组合,其中,在(b)的施用之前施用(a)。

62. 如权利要求59-60中任一项所述的组合物或组合,其中,在(a)的施用之前施用(b)。

63. 如权利要求59-60中任一项所述的组合物或组合,其中,(a)、(b)、或者(a)和(b)的施用重复至少一次。

64. 如权利要求41-63中任一项所述的组合物或组合,其中,所述转基因包含串联的两个miRNA,所述串联的两个miRNA侧接有内含子。

65. 如权利要求64所述的组合物或组合,其中,所述侧接的内含子是相同的。
66. 如权利要求64所述的组合物或组合,其中,所述侧接的内含子来自相同的物种。
67. 如权利要求64所述的组合物或组合,其中,所述侧接的内含子是hCG内含子。
68. 如权利要求41-67中任一项所述的组合物或组合,其中,所述转基因包含启动子。
69. 如权利要求68所述的组合物或组合,其中,所述启动子是synapsin (Syn1) 启动子或表10-表13的启动子。
70. 如权利要求41-69中任一项所述的组合物或组合,其中,所述一个或多个miRNA位于所述转基因的非翻译部分。
71. 如权利要求70所述的组合物或组合,其中,所述非翻译部分是内含子。
72. 如权利要求70所述的组合物或组合,其中,所述非翻译部分在编码蛋白质的核酸序列的最后一个密码子和poly-A尾序列之间,或在启动子序列的最后一个核苷酸碱基和poly-A尾序列之间。
73. 如权利要求41-72中任一项所述的组合物或组合,所述组合物或组合进一步包含第三区域,所述第三区域包含第二腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体。
74. 如权利要求41-73中任一项所述的组合物或组合,其中,所述ITR变体缺乏功能性末端解析位点(TRS),任选地,其中,所述ITR变体是ATRS ITR。
75. 如权利要求41-74中任一项所述的组合物或组合,其中,所述施用使得将所述病毒载体或分离的核酸递送至所述受试者的所述中枢神经系统(CNS)。
76. 如权利要求41-75中任一项所述的组合物或组合,其中,所述施用是通过注射、任选静脉内注射或纹状体内注射进行。
77. 如权利要求42-76中任一项所述的组合物或组合,其中,所述病毒载体是AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、或其嵌合体。
78. 如权利要求42-77中任一项所述的组合物,所述病毒载体包含来自AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或AAV12、或其嵌合体的衣壳蛋白。
79. 如权利要求78所述的组合物或组合,其中,所述衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白。
80. 如权利要求42-79中任一项所述的组合物或组合,其中,所述病毒载体是自互补AAV(scAAV)。
81. 如权利要求42-80中任一项所述的组合物或组合,其中,所述病毒载体被配制用于递送至所述中枢神经系统(CNS)。
82. 一种包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的组合物,所述核酸包含与SEQ ID NO: 110至少80%相同的序列。
83. 一种包含重组病毒载体的组合物,所述重组病毒载体包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸,所述核酸包含与SEQ ID NO: 110至少80%相同的序列。
84. 一种治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的权利要求82或83所述的组合物。
85. 如权利要求84所述的方法,其中,所述神经系统疾病或紊乱是阿尔茨海默病、帕金森

森病、亨廷顿病、Canavan病、利氏病、脊髓性脑性共济失调、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、Krabbe病、Batten氏病、Refsum病、Tourette综合征、原发性侧索硬化症、肌萎缩侧索硬化症、进行性肌萎缩、皮克病、肌营养不良、多发性硬化症、重症肌无力、Binswanger病、神经性疼痛、脊髓或头部损伤引起的创伤、眼科疾病和紊乱、泰-萨二氏病、Lesch-Nyhan病、癫痫、脑梗塞、抑郁症、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性情绪障碍、精神分裂症、药物依赖、神经机能病、精神病、痴呆、妄想、注意缺陷性障碍、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食或体重障碍。

86. 如权利要求84-85中任一项所述的方法,其中,所述神经系统疾病或紊乱是中枢神经系统(CNS)疾病或紊乱。

87. 如权利要求84-86中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病或紊乱选自亨廷顿病、阿尔茨海默病、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、肌萎缩侧索硬化症和帕金森病。

88. 如权利要求83-87中任一项所述的组合物或方法,其中,所述重组病毒载体选自于由以下组成的组: AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、甲病毒载体、痘病毒载体、杆状病毒载体和嵌合病毒载体。

89. 如权利要求84-88中任一项所述的方法,其中,所述施用重复至少一次。

90. 如权利要求84-89中任一项所述的方法,其中,所述施用使得将所述病毒载体或分离的核酸递送至所述受试者的中枢神经系统(CNS)。

91. 如权利要求84-90中任一项所述的方法,其中,所述施用通过注射、任选静脉内注射或纹状体内注射进行。

92. 如权利要求83-91中任一项所述的组合物或方法,其中,所述病毒载体是AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或AAV12、或其嵌合体。

93. 如权利要求83-92中任一项所述的组合物或方法,病毒载体包含来自AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或AAV12、或其嵌合体的衣壳蛋白。

94. 如权利要求93所述的组合物或方法,其中,所述衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白。

95. 如权利要求83-94中任一项所述的组合物或方法,其中,所述病毒载体是自互补AAV(scAAV)。

96. 如权利要求83-95中任一项所述的组合物或方法,其中,所述病毒载体被配制用于递送至所述中枢神经系统(CNS)。

97. 如权利要求82-96中任一项所述的组合物或方法,其中,所述核酸包含与SEQ ID NO:110至少90%相同的序列。

98. 如权利要求82-96中任一项所述的组合物或方法,其中,所述核酸包含与SEQ ID NO:110至少95%相同的序列。

99. 如权利要求82-96中任一项所述的组合物或方法,其中,所述核酸包含与SEQ ID NO:110相同的序列。

100. 如权利要求2-40、42-81、83-99中任一项所述的组合物或方法,其中,所述病毒载体包含经修饰的病毒衣壳。

101. 如权利要求2-40、42-81、83-99中任一项所述的组合物或方法,其中,所述病毒载

体包含对病毒衣壳的修饰。

102. 如权利要求100或101所述的组合物或方法,其中,所述修饰是所述病毒衣壳的化学、非化学或氨基酸修饰。

103. 如权利要求100或101所述的组合物或方法,其中,所述衣壳修饰的至少一种优先靶向CNS或PNS中的细胞。

104. 如权利要求100或101所述的组合物或方法,其中,所述化学修饰包含经化学修饰的酪氨酸残基,所述酪氨酸残基被修饰以包含共价连接的单糖或多糖部分。

105. 如权利要求104所述的组合物或方法,其中,所述经化学修饰的酪氨酸残基包含选自半乳糖、甘露糖、N-乙酰半乳糖胺、GalNAc桥和甘露糖-6-磷酸的单糖。

106. 如权利要求100或101所述的组合物或方法,其中,所述化学修饰包含通过-CSNH-键共价地连接至衣壳多肽的伯氨基基团的配体。

107. 如权利要求106所述的组合物或方法,其中,所述配体包含共价地结合至所述配体的亚芳基或杂亚芳基自由基。

108. 如权利要求100-107中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经修饰的病毒衣壳是嵌合衣壳或单倍体衣壳。

109. 如权利要求100-107中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经修饰的病毒衣壳是单倍体衣壳。

110. 如权利要求100-107中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经修饰的病毒衣壳是进一步包含修饰的嵌合衣壳或单倍体衣壳。

111. 如权利要求100-110中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经修饰的病毒衣壳为AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、或其突变的修饰形式、嵌合体、镶嵌体或合理的单倍体。

112. 如权利要求100-111中任一项所述的组合物或方法,其中,与未修饰的病毒衣壳相比,所述修饰改变了经修饰的病毒衣壳的抗原谱。

113. 如权利要求100-112中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经修饰的病毒衣壳可用于重复施用。

114. 一种合成的CNS特异性启动子,所述合成的CNS特异性启动子包含根据SEQ ID NO: 187-SEQ ID NO:189中的任一个的序列或其功能变体,或由根据SEQ ID NO:187-SEQ ID NO:189中的任一个的序列或其功能变体组成。

115. 如权利要求114所述的合成的CNS特异性启动子,其中,所述功能变体与SEQ ID NO:187-SEQ ID NO:189中的任一个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。

116. 一种CRE,所述CRE包含根据SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192中的任一个的序列或其功能变体,或由根据SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192中的任一个的序列或其功能变体组成。

117. 如权利要求116所述的CRE,所述CRE包含与SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192中的任一个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%

相同的序列。

118. 一种CRM, 所述CRM包含如权利要求116或117所述的CRE。

119. 一种最小启动子, 所述最小启动子包含根据SEQ ID NO:211的序列或其功能变体, 或由根据SEQ ID NO:211的序列或其功能变体组成。

120. 一种CNS特异性启动子, 所述CNS特异性启动子包含如权利要求116或117所述的CRE、如权利要求118所述的CRM或如权利要求119所述的最小启动子。

121. 一种表达盒, 所述表达盒包含如权利要求114、115或120中任一项所述的合成的CNS特异性启动子, 所述启动子可操作地连接至编码表达产物的序列。

122. 一种载体, 所述载体包含如权利要求114、115或120中任一项所述的合成的CNS特异性启动子或如权利要求121所述的表达盒。

123. 如权利要求122所述的载体, 其中, 所述载体是病毒载体。

124. 如权利要求123所述的载体, 其中, 所述病毒载体是AAV载体。

125. 一种病毒体, 所述病毒体包含如权利要求123或124所述的载体。

126. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含如权利要求114、115或120中任一项所述的合成的CNS特异性启动子、如权利要求121所述的表达盒、如权利要求122-124中任一项所述的载体或如权利要求125所述的病毒体。

127. 用于治疗中的如权利要求114、115或120中任一项所述的合成的CNS特异性启动子、如权利要求121所述的表达盒、如权利要求122-124中任一项所述的载体、如权利要求125所述的病毒体或如权利要求126所述的药物组合物。

128. 用于基因治疗中的如权利要求127所述的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体、病毒体或药物组合物, 适当地, 其中所述基因治疗涉及治疗性表达产物在CNS中的表达。

129. 用于CNS相关疾病的基因治疗中的如权利要求127或128所述的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体、病毒体或药物组合物。

130. 一种细胞, 所述细胞包含如权利要求114、115或120中任一项所述的合成的CNS特异性启动子、如权利要求121所述的表达盒、如权利要求122-124中任一项所述的载体或如权利要求125所述的病毒体。

131. 如权利要求130所述的细胞, 其中, 所述细胞是CNS细胞, 任选地是人类CNS细胞, 优选是神经元, 更优选是多巴胺能神经元。

132. 用于制造用来治疗医学病症或疾病的药物组合物中的如权利要求114、115或120中任一项所述的合成的CNS特异性启动子、如权利要求121所述的表达盒、如权利要求122-124中任一项所述的载体或如权利要求125所述的病毒体, 任选地, 其中所述疾病是CNS相关疾病。

133. 一种生产表达产物的方法, 所述方法包括: 将如权利要求121所述的合成的CNS特异性表达盒引入细胞中、任选地为CNS细胞; 以及, 使存在于合成的CNS特异性表达盒中的基因进行表达。

134. 一种在细胞、任选地为CNS细胞中表达治疗性转基因的方法, 其中, 所述方法包括向所述细胞中引入如权利要求121所述的表达盒、如权利要求122-124中任一项所述的载体或如权利要求125所述的病毒体。

135. 一种对有需要的受试者进行治疗的方法, 其中, 所述方法包括: 向所述有需要的受

试者施用如权利要求120所述的表达盒、如权利要求122-124中任一项所述的载体、或如权利要求125所述的病毒体、或如权利要求127或128所述的药物组合物,所述表达盒、载体、病毒体或药物组合物包含编码可操作地连接的治疗产品的序列。

用于治疗神经系统疾病的组合物

对相关申请的交叉引用

[0001] 本申请依据35 U.S.C. §119(e) 要求2022年1月27日提交的美国临时申请第63/303,673号以及2022年3月18日提交的美国临时申请第63/321,335号的权益,其各自的内容以其整体通过引用并入本文中。

技术领域

[0002] 本文所述技术涉及用于治疗神经系统疾病或紊乱的方法,例如亨廷顿病。

背景技术

[0003] 亨廷顿病(HD)是破坏性遗传性神经退行性疾病,由亨廷顿基因的外显子1中的CAG重复区的扩增引起。当亨廷顿蛋白(HTT)在全身表达时,多聚谷氨酰胺扩增蛋白对纹状体中的中棘神经元及它们的皮层连接而言尤其有毒。患者受困于情绪症状,包括抑郁和焦虑,以及特征性的运动障碍和舞蹈症。目前不存在亨廷顿病的治愈疗法;治疗选项限于改善疾病症状。

发明内容

[0004] 本文提供的一个方面描述了用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的如下中的至少一种:(a) 编码至少一种miRNA的核酸;以及(b) 编码CYP46A1蛋白的核酸。例如,单独施用编码至少一种miRNA的核酸,或将其与编码CYP46A1蛋白的核酸组合施用。或者,单独施用编码CYP46A1蛋白的核酸,或将其与编码至少一种miRNA的核酸组合施用。所述核酸可以是野生型或密码子优化的变体。

[0005] 本文所述的另一方面提供组合物或组合,所述组合物或组合包含如下中的至少一种:(a) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA;以及(b) 编码CYP46A1蛋白的分离的核酸。在一个方面中,本文所述的组合物或组合包含:(a) 包含分离的核酸的重组病毒载体,所述核酸包含(i) 第一区域和(ii) 第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码一个或多个miRNA的转基因;以及(b) 包含编码所述CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

[0006] 本文所述的另一方面提供了组合物或组合,所述组合物或组合包含(a) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码分离的核酸,所述核酸编码CYP46A1蛋白。在一些方面中,所述组合物或组合进一步包含(b) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA。在其它方面,所述组合物或组合不包含(b) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA。在一个方面中,本文所述的组合物或组合包含:(a) 包含分离的核酸的重组病毒载体,所述核酸包含(i) 第一区域和(ii) 第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码CYP46A1蛋白的转基因。在一些方面,所述组合物或组合进一步包含:(b) 包含编码一个或多个miRNA的分离的核酸的

重组病毒载体。在其它方面,所述组合物或组合不包含 (b) 包含编码一个或多个miRNA的分离的核酸的重组病毒载体。

[0007] 本文所述的另一方面提供了组合物或组合,所述组合物或组合包含 (a) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码分离的核酸,所述核酸编码一个或多个miRNA。在一些方面中,所述组合物或组合进一步包含 (b) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码CYP46A1蛋白。在其它方面,所述组合物或组合不包含 (b) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码CYP46A1蛋白。在一个方面中,本文所述的组合物或组合包含: (a) 包含分离的核酸的重组病毒载体,所述核酸包含 (i) 第一区域和 (ii) 第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码一个或多个miRNA的转基因。在一些方面,所述组合物或组合进一步包含: (b) 包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。在其它方面,所述组合物或组合不包含 (b) 包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

[0008] 本文所述的另一方面提供了用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的如下中的至少一种: (a) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA;以及 (b) 编码CYP46A1蛋白的分离的核酸。在一个方面中,本文所述的是用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的如下中的至少一种: (a) 包含分离的核酸的重组病毒载体,所述核酸包含 (i) 第一区域和 (ii) 第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码一个或多个miRNA的转基因;以及 (b) 包含编码所述CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

[0009] 本文所述的另一方面提供了用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的 (a) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码CYP46A1蛋白。在一些方面中,所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的 (b) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA。在其它方面中,所述方法不包括向受试者施用 (b) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA。在一个方面中,本文所述的是用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的 (a) 包含分离的核酸的重组病毒载体,所述核酸包含 (i) 第一区域和 (ii) 第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码CYP46A1蛋白的转基因。在一些方面中,所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的 (b) 包含编码一个或多个miRNA的分离的核酸的重组病毒载体。在其它方面,所述方法不包括向受试者施用治疗有效量的 (b) 包含编码一个或多个miRNA的分离的核酸的重组病毒载体。

[0010] 本文所述的另一方面提供了用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的 (a) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一

个或多个miRNA。在一些方面中,所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的(b)编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码CYP46A1蛋白。在其它方面中,所述方法不包括向受试者施用(b)编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码CYP46A1蛋白。在一个方面中,本文所述的是用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的(a)包含分离的核酸的重组病毒载体,所述核酸包含(i)第一区域和(ii)第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码一个或多个miRNA的转基因。在一些方面中,所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的(b)包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。在其它方面中,所述方法不包括向受试者施用治疗有效量的(b)包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

[0011] 在一些实施方式中,所述神经系统疾病或紊乱是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、Canavan病、利氏病(Leigh's disease)、脊髓性脑性共济失调(spinal cerebral ataxia)、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、Krabbe病、Batten氏病、Refsum病、Tourette综合征、原发性侧索硬化症、肌萎缩侧索硬化症、进行性肌萎缩、皮克病(Pick's disease)、肌营养不良、多发性硬化症、重症肌无力、Binswanger病、神经性疼痛、脊髓或头部损伤引起的创伤、眼科疾病和紊乱、泰-萨二氏病(Tay-Sachs disease)、Lesch-Nyhan病、癫痫、脑梗塞、抑郁、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性情绪障碍、精神分裂症、药物依赖、神经机能病、精神病、痴呆、妄想、注意缺陷性障碍、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食或体重障碍。在一些实施方式中,所述神经系统疾病或紊乱是中枢神经系统(CNS)疾病或紊乱。在一些实施方式中,所述CNS疾病或紊乱选自于亨廷顿病、阿尔茨海默病、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、肌萎缩侧索硬化症和帕金森病。

[0012] 在一些实施方式中,所述CNS疾病或紊乱是阿尔茨海默病,并且所述至少一个miRNA包含与淀粉样前体蛋白(APP)、早老蛋白1、早老蛋白2、ABCA7、SORL1以及它们的疾病相关等位基因互补的种子序列。

[0013] 在一些实施方式中,所述CNS疾病或紊乱是帕金森病,并且所述至少一个miRNA包含与SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PINK1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1、GBA1以及它们的疾病相关等位基因互补的种子序列。

[0014] 在一些实施方式中,所述CNS疾病是亨廷顿病,并且至少一个miRNA包含与SEQ ID NO:4互补的种子序列,或者其中,至少一个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一个的序列,所述序列侧接有miRNA骨架序列。在一些实施方式中,所述CNS疾病是亨廷顿病,并且至少一个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一个的序列。在一些实施方式中,所述miRNA中的至少一个与人亨廷顿基因杂交并抑制人亨廷顿基因的表达。在一些实施方式中,所述受试者包含具有多于36个CAG重复、多于40个重复、或多于100个重复的亨廷顿基因。在一些实施方式中,所述受试者的年龄小于20岁。

[0015] 在一些实施方式中,所述重组病毒载体选自于由以下组成的组:AAV载体、腺病毒

载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、甲病毒载体、痘病毒载体、杆状病毒载体和嵌合病毒载体。

[0016] 在一些实施方式中,包含(a)的重组病毒载体与包含(b)的重组病毒载体相同。在一些实施方式中,(a)和(b)的分离的核酸包含在分开的重组病毒载体中。在一些实施方式中,(a)和(b)的分离的核酸包含在相同的重组病毒载体中。

[0017] 在一些实施方式中,(a)和(b)在基本上相同的时间被施用。在一些实施方式中,(a)和(b)在不同的时间点被施用。在一些实施方式中,不同的时间点间隔至少1min、至少1小时、至少1天、至少1周、至少1个月、至少1年或更长。在一些实施方式中,在(b)的施用之前施用(a)。在一些实施方式中,在(a)的施用之前施用(b)。在一些实施方式中,(a)、(b)、或者(a)和(b)的施用重复至少一次。

[0018] 在一些实施方式中,所述转基因包含串联的两个miRNA,所述两个miRNA侧接有内含子。在一些实施方式中,所述侧接的内含子是相同的。在一些实施方式中,所述侧接的内含子来自相同的物种。在一些实施方式中,所述侧接的内含子是hCG内含子。

[0019] 在一些实施方式中,所述转基因包含启动子。在一些实施方式中,所述启动子是synapsin(Syn1)启动子,或表10-表13的启动子。

[0020] 在一些实施方式中,所述一个或多个miRNA位于转基因的非翻译部分中。在一些实施方式中,所述非翻译部分是内含子。在一些实施方式中,所述非翻译部分在编码蛋白质的核酸序列的最后的密码子和poly-A尾序列之间,或在启动子序列的最后的核苷酸碱基和poly-A尾序列之间。

[0021] 在一些实施方式中,所述核酸或病毒载体进一步包含第三区域,所述第三区域包含第二腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体。

[0022] 在一些实施方式中,所述ITR变体缺乏功能性末端解析位点(terminal resolution site;TRS),任选地,其中所述ITR变体是ATRS ITR。

[0023] 在一些实施方式中,施用使得将病毒载体或分离的核酸递送至受试者的中枢神经系统(CNS)。在一些实施方式中,所述施用通过注射、任选静脉内注射或纹状体内注射进行。

[0024] 在一些实施方式中,所述病毒载体是AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或AAV12,或其嵌合体(chimera)。在一些实施方式中,所述病毒载体包含来自AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或AAV12,或其嵌合体的衣壳蛋白。在一些实施方式中,所述衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白。在一些实施方式中,所述病毒载体是自互补的AAV(scAAV)。在一些实施方式中,将所述病毒载体配制用于递送至中枢神经系统(CNS)。

[0025] 在任何方面的一些实施方式中,所述病毒载体包含经修饰的病毒衣壳。

[0026] 在任何方面的一些实施方式中,所述病毒载体包含对病毒衣壳的修饰。

[0027] 在任何方面的一些实施方式中,所述修饰是病毒衣壳的化学、非化学或氨基酸修饰。

[0028] 在任何方面的一些实施方式中,所述衣壳修饰的至少一种优先靶向CNS或PNS中的细胞。

[0029] 在任何方面的一些实施方式中,所述化学修饰包括经化学修饰的酪氨酸残基,所述酪氨酸残基被修饰以包含共价连接的单糖或多糖部分。

- [0030] 在任何方面的一些实施方式中,所述经化学修饰的酪氨酸残基包含选自半乳糖、甘露糖、N-乙酰半乳糖胺、GalNac桥和甘露糖-6-磷酸的单糖。
- [0031] 在任何方面的一些实施方式中,所述化学修饰包含通过-CNH-键共价地连接至衣壳多肽的伯氨基基团的配体。
- [0032] 在任何方面的一些实施方式中,所述配体包含共价地结合至所述配体的亚芳基或杂亚芳基自由基。
- [0033] 在任何方面的一些实施方式中,所述经修饰的病毒衣壳是嵌合衣壳或单倍体衣壳。
- [0034] 在任何方面的一些实施方式中,所述经修饰的病毒衣壳是单倍体衣壳。
- [0035] 在任何方面的一些实施方式中,所述经修饰的病毒衣壳是进一步包含修饰的嵌合衣壳或单倍体衣壳。
- [0036] 在任何方面的一些实施方式中,所述经修饰的病毒衣壳是AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12,或其突变的修饰形式、嵌合体(chimera)、镶嵌体(mosaic)或合理的单倍体。
- [0037] 在任何方面的一些实施方式中,与未修饰的病毒衣壳相比,所述修饰改变了经修饰的病毒衣壳的抗原谱。
- [0038] 在任何方面的一些实施方式中,所述经修饰的病毒衣壳可用于重复施用。

附图说明

- [0039] 图1是示出了pJAL130-CYP46A1(7314bp)的HD质粒图谱的示意图,参见例如SEQ ID NO:111和表16,其示出了来自质粒的经密码子优化的CYP46序列(参见例如SEQ ID NO:110)的ITR至ITR序列。
- [0040] 图2示出了通过脑室内(ICV)和静脉内(IV)注射来递送的在CNS-1(参见例如SEQ ID NO:112)、CNS-2(参见例如SEQ ID NO:113)、CNS-3(参见例如SEQ ID NO:114)、CNS-4(参见例如SEQ ID NO:115)、CNS-5(参见例如SEQ ID NO:122)、CNS-6(参见例如SEQ ID NO:123)、CNS-7(参见例如SEQ ID NO:124)和CNS-8(参见例如SEQ ID NO:125)以及对照启动子hSyn1(参见例如SEQ ID NO:152)的控制下的转基因GFP在矢状切片中的颅内生物分布。比例尺为1mm。
- [0041] 图3A-图3B示出了冠状脑切片的图像。图3A示出了通过ICV递送的在CNS-1(参见例如SEQ ID NO:112)、CNS-2(参见例如SEQ ID NO:113)、CNS-3(参见例如SEQ ID NO:114)和CNS-4(参见例如SEQ ID NO:115)的控制下的转基因GFP的冠状切片中的颅内生物分布。比例尺为1mm。图3B示出了通过ICV递送的在CNS-5(参见例如SEQ ID NO:122)、CNS-6(参见例如SEQ ID NO:123)、CNS-7(参见例如SEQ ID NO:124)和CNS-8(参见例如SEQ ID NO:125)以及对照启动子hSyn1(参见例如SEQ ID NO:152)的控制下的转基因GFP的冠状切片中的颅内生物分布。比例尺为1mm。
- [0042] 图4示出了在由CNS1-8(参见例如SEQ ID NO:112-SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:122-SEQ ID NO:125)或Synapsin-1(参见例如SEQ ID NO:152)驱动的GFP的ICV或IV递送之后不同脑区中的GFP免疫反应性百分比。数据通过在皮层、海马体、纹状体、中脑和小脑中经由阈值分析对10张GFP染色强度的不重叠的RGB图像进行定量测量来获得(平均值±SEM)。

图像通过离散的脑区保持恒定设置以×40放大倍率进行拍摄。前景免疫染色 (foreground immunostaining) 通过最高和最低信号求平均值来定义。数据表示为各感兴趣的区域的每个场的免疫反应性的平均百分比面积 (n=3)。在ICV递送的情况下,在皮层和海马脑区中表达最高。CNS1-8 (参见例如SEQ ID NO:112-SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:122-SEQ ID NO:125) 在海马体中显示出比hSyn1对照更高的表达。在ICV递送的情况下,与hSyn1相比,CNS-1 (参见例如SEQ ID NO:112) 在海马体、中脑和小脑中显示出更高的表达。

[0043] 图5A-图5B示出了faf1和pitx3基因的组织表达模式,由此设计了来自CNS-5、CNS-5_v2、CNS-2、CNS-3和CNS-4的CRE/近端启动子。图5A示出了来自单细胞转录组数据的小鼠PNS神经元中faf1基因的表达模式 (Zeisel等,2018)。深灰色表示高表达,白色表示无表达,而浅灰色表示低表达。faf1在许多PNS神经元中表达。图5B示出了来自单细胞转录组数据的PNS神经元中pitx3基因的表达模式 (Zeisel等,2018)。深灰色表示高表达,白色表示无表达,而浅灰色表示低表达。pitx3在交感PNS神经元中表达。faf1在许多PNS神经元中表达,因此预期包含从faf1基因设计的近端启动子或CRE (例如CNS-5和CNS-5_v2) 的合成的启动子在PNS中具有强的表达。pitx3在交感PNS神经元中表达,因此预期包含从pitx3基因设计的CRE (例如CNS-2、CNS-3或CNS-4) 的合成的启动子在PNS交感神经元中具有表达。对lmx1b和pitx2的类似分析显示在PNS中没有高于分析的截止分数的表达 (三值化分数 (trinization score) 小于0.95;数据未显示),因此预期CNS-1、CNS-6、CNS-6_v2、CNS-7、CNS-7_v2、CNS-8和CNS-8_v2不在PNS神经元中活跃。

[0044] 图6A示出了HTT基因在来自成年小鼠大脑的矢状切片中的表达模式 (取自Allen小鼠大脑图集;mouse.brain-map.org)。HTT (亨廷顿) 在整个大脑中高度表达。

[0045] 图6B示出了CYP46A1基因在来自成年小鼠大脑的冠状切片中的表达模式 (取自Allen小鼠大脑图集;可在万维网mouse.brain-map.org上获得)。CYP46A1在大脑中广泛表达。

[0046] 图7A示出了合成的NS特异性启动子SP0013、SP0014、SP0030、SP0031、SP0032、SP0019、SP0020、SP0021、SP0022、SP0011、SP0034、SP0035、SP0036和对照启动子Synapsin-1相对于对照启动子CAG在来源于神经母细胞瘤的SH-SY5Y细胞中的中值GFP表达。NTC表示未转染的细胞。从三个生物重复中收集数据,所述生物重复的每个都是两个技术重复的平均数。误差条为标准误差。

[0047] 图7B示出了当用可操作地连接至GFP的合成的NS特异性启动子SP0013、SP0014、SP0030、SP0031、SP0032、SP0019、SP0020、SP0021、SP0022、SP0011、SP0034、SP0035、SP0036或对照启动子Synapsin-1和CAG进行转染时,在来源于神经母细胞瘤的SH-SY5Y细胞中的转染效率。NTC表示未转染的细胞。从三个生物重复中收集数据,所述生物重复的每个都是两个技术重复的平均值。误差条为标准误差。GFP阳性%表示所有细胞中GFP阳性的百分比。

[0048] 图8示出了用包含靶向HTT基因的外显子1的miRNA的质粒对源自患者的成纤维细胞进行核感染后HTT转录本的水平。N=1。

[0049] 图9是示出了dbDNA-CYP46A1 (4,573bp,参见例如SEQ ID NO:194) 的HD质粒图谱的示意图,其示出了包含经密码子优化的CYP46序列的ITR至ITR序列 (参见例如SEQ ID NO:212)、CAG启动子和来自质粒的bGH poly (a) 信号 (参见例如表24)。这是包装在rAAVrh.10中的质粒,用于向HD患者施用 (参见例如实施例6)。

具体实施方式

[0050] 本发明的各方面涉及施用干扰RNA (例如miRNA, 如人工miRNA) 和编码CYP46A1蛋白的核酸, 所述干扰RNA当递送至受试者时对于减少受试者中的致病基因的表达而言时有效的。因此, 在一些实施方式中, 本公开所述的方法和组合物对于治疗神经系统疾病或紊乱是有用的。

治疗方法

[0051] 本公开提供了向受试者递送核酸和/或转基因 (例如, 抑制性RNA, 如miRNA或编码CYP46A1的核酸) 的方法。所述方法通常涉及向受试者施用有效量的编码至少一种干扰RNA/抑制性核酸的至少一种核酸以及编码CYP46A1的核酸, 所述干扰RNA/抑制性核酸能够减少靶基因 (例如, 与神经系统疾病或紊乱相关的致病基因 (例如, 亨廷顿 (htt) 蛋白)) 的表达。例如, 单独施用编码至少一种miRNA的核酸, 或将其与编码CYP46A1蛋白的核酸组合施用。或者, 单独施用编码CYP46A1蛋白的核酸, 或将其与编码至少一种miRNA的核酸组合施用。在一些实施方式中, 所述核酸中的一种或两种在病毒载体中和/或在病毒颗粒 (例如rAAV) 中提供。

[0052] 因此, 本文所述的一个方面提供了用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法, 所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的 (a) 编码转基因的分离的核酸, 所述转基因编码CYP46A1蛋白。在一些方面中, 所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的 (b) 编码转基因的分离的核酸, 所述转基因编码一个或多个miRNA。在其它方面, 所述方法不包括向受试者施用 (b) 编码转基因的分离的核酸, 所述转基因编码一个或多个miRNA。在一个方面中, 本文所述的是用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法, 所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的 (a) 包含分离的核酸的重组病毒载体, 所述核酸包含 (i) 第一区域和 (ii) 第二区域, 所述第一区域包含第一腺相关病毒 (AAV) 反向末端重复 (ITR) 或其变体, 所述第二区域包含编码CYP46A1蛋白的转基因。在一些方面中, 所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的 (b) 包含编码一个或多个miRNA的分离的核酸的重组病毒载体。在其它方面中, 所述方法不包括向受试者施用治疗有效量的 (b) 包含编码一个或多个miRNA的分离的核酸的重组病毒载体。

[0053] 本文描述的另一方面提供了用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法, 所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的 (a) 编码转基因的分离的核酸, 所述转基因编码一个或多个miRNA。在一些方面中, 所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的 (b) 编码转基因的分离的核酸, 所述转基因编码CYP46A1蛋白。在其它方面, 所述方法不包括向受试者施用 (b) 编码转基因的分离的核酸, 所述转基因编码CYP46A1蛋白。在一个方面中, 本文描述的是用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法, 所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的 (a) 包含分离的核酸的重组病毒载体, 所述核酸包含 (i) 第一区域和 (ii) 第二区域, 所述第一区域包含第一腺相关病毒 (AAV) 反向末端重复 (ITR) 或其变体, 所述第二区域包含编码一个或多个miRNA的转基因。在一些方面中, 所述方法进一步包括向患者施用治

疗有效量的 (b) 包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。在其它方面中,所述方法不包括向受试者施用治疗有效量的 (b) 包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

[0054] 如本文所使用,“神经系统疾病或紊乱”可以指影响神经系统或与神经系统相关的任何疾病、紊乱或病症,即,影响中枢神经系统(大脑和脊髓)、周围神经系统(PNS;例如,周围神经和颅神经)和自主神经系统(它的一些部分位于中枢神经系统和周围神经系统中)的疾病、紊乱或病症。在人中已经鉴定了多于600种神经系统疾病。作为非限制性的例子,所述神经系统疾病或紊乱可以是透明隔缺如、酸性脂肪酶病、酸性麦芽糖酶缺乏症、获得性癫痫样失语症、急性播散性脑脊髓炎、注意缺陷多动障碍(ADHD)、艾迪氏瞳孔(Adie's Pupil)、艾迪氏综合征(Adie's Syndrome)、肾上腺脑白质营养不良、胼胝体发育不全、认识不能、Aicardi综合征、Aicardi-Goutieres综合征紊乱、AIDS-神经系统并发症、亚历山大病(Alexander Disease)、Alpers病、交替性偏瘫、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、无脑畸形、动脉瘤、天使综合征(Angelman syndrome)、血管瘤病、缺氧、抗磷脂综合征、失语症、失用症、蛛网膜囊肿、蛛网膜炎、Arnold-Chiari畸形、动静脉畸形、阿斯伯格综合征(Asperger Syndrome)、共济失调、共济失调毛细血管扩张症、共济失调及小脑或脊髓小脑变性症、房颤和中风、注意缺陷多动障碍、自闭症谱系障碍、自主神经功能失调、背痛、巴氏综合征(Barth Syndrome)、Batten病、Becker肌强直、白塞病、贝尔氏麻痹(Bell's Palsy)、良性原发性眼睑痉挛、良性局限性肌萎缩、良性颅内高压、伯-罗二氏综合征(Bernhardt-Roth Syndrome)、Binswanger病、眼睑痉挛、色素失禁症(Bloch-Sulzberger Syndrome)、臂丛神经分娩损伤、臂丛神经损伤、Bradbury-Eggleston综合征、脑和脊柱肿瘤、脑动脉瘤、脑损伤、脊髓半切综合症(Brown-Sequard Syndrome)、球脊髓(Bulbospinal)肌萎缩症、常染色体显性遗传脑动脉病伴皮层下梗死和白质脑病(CADASIL)、Canavan病、腕管综合征、灼痛、海绵状血管瘤(Cavernomas)、海绵状血管瘤(Cavernous Angioma)、海绵状血管畸形、中央颈髓综合征、中央脊髓综合征、中枢性疼痛综合征、脑桥中央髓鞘溶解症、头颅紊乱(Cephalic Disorders)、神经酰胺酶缺乏症、小脑变性、小脑发育不全、脑动脉瘤、脑动脉硬化、脑萎缩、脑型脚气病、脑海绵状血管畸形、脑性巨人症、脑缺氧、大脑性瘫痪、脑-眼-面-骨骼综合症(COFS)、腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth Disease)、小脑扁桃体下疝畸形、胆固醇酯贮积病、舞蹈症、神经棘红细胞症、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、慢性直立不耐受、慢性疼痛、II型科凯恩综合征(Cockayne Syndrome Type II)、Coffin Lowry综合征、空洞脑(Colpocephaly)、昏迷、复杂性区域疼痛综合征、先天性双侧面瘫、先天性肌无力、先天性肌病、先天性血管海绵状畸形、皮层基底节变性、颅动脉炎、颅缝早闭、Cree脑炎、克-雅氏病(Creutzfeldt-Jakob Disease)、累积性创伤障碍、库欣综合征(Cushing's syndrome)、巨细胞包涵体病、巨细胞病毒感染、舞眼-舞足综合征、Dandy-Walker综合征、Dawson病、De Morsier's综合征、Dejerine-Klumpke麻痹、痴呆、多发性梗塞性痴呆、语义痴呆、皮层下痴呆、路易体痴呆、齿状核小脑共济失调、齿状核红核萎缩、皮肤炎、发育性运动障碍、Devic's综合征、糖尿病神经病变、弥漫性硬化、Dravet综合征、家族性自主神经异常、书写障碍、诵读困难、吞咽困难、动作协调障碍、肌阵挛性小脑性协调障碍、进行性小脑协同失调、肌张力障碍、早期婴儿型癫痫性脑病、空蝶鞍综合征、脑炎、昏睡性脑炎、脑膨出、脑病、脑病(家族性婴儿型)、脑三叉神经血管瘤病、癫痫、癫痫性偏瘫、Erb's麻

痹、Erb-Duchenne麻痹和Dejerine-Klumpke麻痹、原发性震颤、脑桥外髓鞘溶解症、Fabry病、法尔综合征 (Fahr's Syndrome)、昏厥、家族性阿尔茨海默病、家族性自主神经功能障碍、家族性血管瘤、家族性特发性基底节钙化症、家族性周期性瘫痪、家族性痉挛性瘫痪、Farber's病、热性惊厥、纤维肌发育不良、Fisher综合征、婴儿松弛综合征、足下垂、Friedreich's共济失调、额颞叶痴呆、戈谢病、广泛性神经节苷脂沉积症 (Generalized Gangliosidoses)、格斯特曼综合征 (Gerstmann's Syndrome)、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、巨轴突神经病、巨细胞动脉炎、巨细胞包涵体病、球形细胞脑白质营养不良、舌咽神经痛、糖原贮积症、格林-巴利综合征、Hallervorden-Spatz病、颅脑损伤、头痛、连续性偏头痛、半面痉挛、交替性偏瘫、遗传性神经病、遗传性痉挛性截瘫、遗传性共济失调性多发性神经炎样病、带状疱疹、耳带状疱疹、Hirayama综合征、Holmes-Adie综合征、前脑无裂畸形 (Holoprosencephaly)、HTLV-1相关性脊髓病、Hughes综合征、亨廷顿病、积水性无脑畸形、脑积水、正常压力性脑积水、脊髓积水、皮层醇增多症、嗜睡、张力亢进、张力减退、缺氧、免疫介导的脑脊髓炎、包涵体肌炎、色素失调症、婴儿肌张力减退、婴儿神经轴索营养不良、婴儿植烷酸贮积病、婴儿Refsum病、婴儿痉挛、炎症性肌病、枕骨裂脑露畸形、肠性脂质营养不良、颅内囊肿、颅内高压、Isaacs综合征、Joubert综合征、卡恩斯-塞尔综合征 (Kearns-Sayre Syndrome)、肯尼迪病 (Kennedy's Disease)、Kinsbourne综合征、Kleine-Levin综合征、Klippel-Feil综合征、Klippel-Trenaunay综合征 (KTS)、克吕菲尔-布希综合征 (Kliiver-Bucy Syndrome)、柯萨可夫综合征 (Korsakoff's Amnesic Syndrome)、Krabbe病、库格尔贝格-韦兰德病 (Kugelberg-Welander Disease)、库鲁病 (Kuru)、Lambert-Eaton肌无力综合征、Landau-Kleffner综合征、股外侧皮神经卡压综合征、延髓背外侧综合征、学习障碍、利氏病、Lennox-Gastaut综合征、Lesch-Nyhan综合征、脑白质营养不良、Levine-Critchley综合征、路易体痴呆、脂质贮积病、类脂蛋白沉积症、无脑回畸形 (Lissencephaly)、闭锁综合征、肌萎缩性侧索硬化症 (Lou Gehrig's Disease)、狼疮-神经系统后遗症、莱姆病-神经系统并发症、马查多-约瑟夫病、巨脑、巨脑畸形、Melkersson-Rosenthal综合征、脑膜炎、脑膜炎和脑炎、门克斯病 (Menkes disease)、感觉异常性股痛、异染性脑白质营养不良、头小畸形、偏头痛、米勒费雪症候群、小卒中、线粒体肌病、Moebius综合征、单侧肌萎缩、运动神经元疾病、烟雾病、粘脂贮积病、粘多糖贮积症、多发性梗塞性痴呆、多灶性运动神经病、多发性硬化、多系统萎缩、伴有直立性低血压的多系统萎缩、肌营养不良、先天性重症肌无力、重症肌无力、髓鞘裂解性弥漫性硬化 (Myelinoclastic Diffuse Sclerosis)、婴儿肌阵挛性脑病、肌阵挛、肌病、先天性肌病、甲状腺毒性肌病、肌强直、先天性肌强直、嗜睡症、神经棘红细胞增多症、神经退行性变伴脑铁沉积、神经纤维瘤病、神经阻滞剂恶性综合征、AIDS的神经系统并发症、莱姆病的神经系统并发症、巨细胞病毒感染后的神经系统后果、庞贝病的神经系统表现、狼疮的神经系统后遗症、视神经脊髓炎、神经性肌强直、神经元蜡样质脂褐质沉积症、神经元移行异常、遗传性神经病、神经结节病、神经梅毒、神经毒性、海绵状痣、Niemann-Pick病、O'Sullivan-McLeod综合征、枕神经痛、大田原 (Ohtahara) 综合征、橄榄桥脑小脑萎缩、视性眼阵挛肌阵挛、直立性低血压、过用综合征、慢性疼痛、泛酸激酶依赖型神经退行性疾病、副肿瘤综合征、感觉异常、帕金森病、阵发性舞蹈手足徐动症、阵发性偏头痛、Parry-Romberg、佩梅病 (Pelizaeus-Merzbacher Disease)、Pena Shokeir II综合征、周围神经囊肿、周期性麻痹、周围神经病变、脑室旁白

质软化症、持续植物状态、广泛性发育障碍、植烷酸贮积病、皮克病(Pick's Disease)、神经挟捏、梨状肌综合征、垂体瘤、多发性肌炎、多聚谷氨酰胺重复性脊髓小脑共济失调、病、脑穿通畸形、脊髓灰质炎后综合征、带状疱疹后遗神经痛、感染后脑脊髓炎、体位性低血压、直立性心动过速综合征、体位性心动过速综合征、原发性齿状核萎缩(Primary Dentatum Atrophy)、原发性侧索硬化、原发性进行性失语、朊病毒病、进行性偏面萎缩、进行性运动性共济失调、进行性多灶性白质脑病、进行性硬化性灰质营养不良、进行性核上性麻痹、面孔失认、进行性肌萎缩、假性Torch综合征、假性弓形体病综合征、假性脑瘤、心因性运动、Ramsay Hunt综合征I、Ramsay Hunt综合征II、拉斯穆森脑炎(Rasmussen's Encephalitis)、反射性交感神经营养不良综合征、Refsum病、婴儿Refsum病、重复性运动障碍、重复性应激损伤、不宁腿综合征、逆转录病毒相关脊髓病、Rett综合征、Reye's综合征、风湿性脑炎、Riley-Day综合征、骶神经根囊肿、Saint Vitus舞蹈症、唾液腺疾病、Sandhoff病、Schilder's病、脑裂畸形、赛特贝格病(Seitelberger disease)、癫痫、语义痴呆、视隔发育不良、婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)、摇晃婴儿综合征、带状疱疹、Shy-Drager综合征、干燥综合征、睡眠呼吸暂停、昏睡病、Sotos综合征、痉挛状态、脊柱裂、脊髓梗死、脊髓损伤、脊髓肿瘤、脊髓性肌萎缩、脊髓小脑萎缩症、脊髓小脑变性、Steele-Richardson-Olszewski综合征、僵人综合征、纹状体黑质变性、中风、Sturge-Weber综合征、亚急性硬化性全脑炎、皮层下动脉硬化性脑病、单侧短暂性神经痛样(SUNCT)头痛、吞咽障碍、脊髓大脑性共济失调、Sydenham舞蹈病、晕厥、梅毒性脊髓硬化症、脊髓空洞积水症、脊髓空洞症、系统性红斑狼疮、脊髓痨、迟发性运动障碍、Tarlov囊肿、泰-萨二氏病、颞动脉炎、脊髓栓系综合征、Thomsen's肌强直、胸廓出口综合征、甲状腺毒性肌病、痛性痉挛、托德瘫痪(Todd's Paralysis)、Tourette综合征、短暂性脑缺血发作、传染性海绵状脑病、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、震颤、三叉神经痛、热带痉挛性瘫痪、Troyer综合征、结节性硬化、血管勃起肿瘤(Vascular Erectile Tumor)、中枢和外周神经系统血管炎综合征、Von Economo's病、Von Hippel-Lindau病(VHL)、Von Recklinghausen's病、Wallenberg's综合征、韦-霍二氏病(Werdnig-Hoffman Disease)、Wernicke-Korsakoff综合征、West综合征、Whiplash、Whipple's病、威廉斯综合征(Williams Syndrome)、威尔逊病(Wilson Disease)、Wolman's病、X-连锁脊髓延髓性肌萎缩、神经病理性疼痛、脊髓或头部损伤引起的创伤、眼科疾病与障碍、脑梗死、抑郁、持续性情感障碍、继发性心境障碍、精神分裂症、药物依赖、神经症、精神病、痴呆、偏执狂和性心理障碍。

[0055] 在一些实施方式中,所述CNS疾病选自于由以下所组成的列表:多巴胺转运体缺陷综合征、注意力缺陷/多动障碍(ADHD)、双相型障碍、癫痫、多发性硬化症、tauopathies、阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、Krabbe病、肾上腺脑白质营养不良、运动神经元疾病、大脑性瘫痪、Batten病、戈谢病、泰-萨二氏病、Rett综合征、Sandhoff病、腓骨肌萎缩症、天使综合征、Canavan病、晚期婴儿型神经元蜡样质脂褐质沉积症、粘多糖贮积症IIIA、粘多糖贮积症IIIB、异染性脑白质退化症、遗传性溶酶体贮积病(如C1型Niemann-Pick病)和/或神经元蜡样质脂褐质沉积症(如Batten病)、进行性核上性麻痹、皮层基底综合征和脑癌(包括星形细胞瘤和胶质母细胞瘤)。

[0056] 如本文所使用,“亨廷顿病”或“HD”是指由于HTT基因中三核苷酸重复扩展(例如,CAG,其被翻译成多聚谷氨酰胺、或PolyQ束)(导致产生致病的突变亨廷顿蛋白(HTT,或

mHTT)引起的神经退行性疾病,其特征是逐渐恶化的运动、认知和行为变化。

[0057] 如本文所使用,“HTT”或“亨廷顿”是指编码亨廷顿蛋白的基因。正常的亨廷顿蛋白在神经细胞中发挥作用,并且正常的HTT基因通常在5'端具有约7个至约35个CAG重复。在患有亨廷顿病的患者或处于发展出亨廷顿病的风险的患者中,所述HTT基因通常发生突变。在一些实施方式中,突变的亨廷顿蛋白加速了大脑特定区域的神经元细胞死亡速率。一般来说,HD的严重性与受试者中的三核苷酸重复扩展的大小相关。例如,具有包含36个至39个重复之间的CAG重复区(SEQ ID NO:157)的受试者的特征在于具有“降低的外显率”HD,而具有大于40个重复的受试者的特征在于具有“完全外显率”HD。因此,在一些实施方式中,患有HD或处于患HD风险的受试者具有包含约36个和约39个之间的CAG重复的HTT基因(例如36个、37个、38个或39个重复)。在一些实施方式中,患有HD或处于患HD风险的受试者具有包含40个以上(例如,40个、45个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、200个或更多个)的CAG重复(SEQ ID NO:156)的HTT基因。在一些实施方式中,具有包含超过100个CAG重复的HTT基因的受试者比具有少于100个CAG重复的受试者更早地发展出HD。在一些实施方式中,具有包含超过100个CAG重复的HTT基因的受试者可在约20岁之前发展出HD症状,并被称为患有青少年HD(也被称为运动不能-强直HD,或Westphal变异型HD)。受试者的HTT基因等位基因中CAG重复的数量可以通过本领域已知的任何合适的方式来确定。例如,可以从受试者的生物样本(例如血液)中分离出核酸(例如DNA),并且可以通过基于杂交的方法(例如PCR或核酸测序(例如Illumina测序、Sanger测序、SMRT测序等))确定HTT等位基因的CAG重复的数量。HTT基因的序列在一些物种中是已知的,例如,人HTT(NCBI Gene ID:3064)mRNA序列(NCBI Ref Seq:NM_002111.8,SEQ ID NO:4)和蛋白质序列(NCBI Ref Seq:NP_0021012.4,SEQ ID NO:5)。因此,在一些与治疗亨廷顿病有关的实施方式中,所述一个或多个抑制性核酸(例如miRNA)可以与HTT杂交和/或减少HTT的表达。

[0058] 如本文所使用,“阿尔茨海默病”或“AD”是指神经退行性疾病,其特征是逐渐恶化的记忆力、迷失方向、情绪波动,以及语言、动力和自理方面越来越困难。一些基因可能促成AD或增加AD的风险,包括淀粉样前体蛋白(APP;NCBI Gene ID:351)、早老蛋白1(PSEN1;NCBI Gene ID 5663)、早老蛋白2(PSEN2;NCBI Gene ID 5664)、ATP结合盒亚家族A成员7(ABCA7;NCBI Gene ID 10347)、和sortilin相关受体1(SORL1;NCBI Gene ID 6653)。这种AD相关基因的序列在许多物种中是已知的,例如,人mRNA和蛋白质序列可以在NCBI数据库中使用所提供的Gene ID号获得。这些AD相关基因和其它、以及其AD相关的等位基因(例如突变、SNP等)在本领域是已知的,并且在例如以下中进一步进行描述:Sims等,Nature Neuroscience 202023:311-22;Bellenguez等,Current Opinion in Neurobiology 2020 61:40-48;Tabuas-Pereira等,2020 Neurogenetics and Psychiatric Genetics 8:1-16;以及Porter等,“Neurodegeneration and Alzheimer's Disease”2019第15章;将其各自通过引用的方式以其整体并入本文。因此,在与治疗阿尔茨海默病有关的一些实施方式中,所述一个或多个抑制性核酸(例如miRNA)可以与APP、PSEN1、PSEN2、ABCA7和/或SORL1杂交,和/或减少APP、PSEN1、PSEN2、ABCA7和/或SORL1的表达。

[0059] “家族性阿尔茨海默病”或“FAD”是指经由常染色体显性遗传模式传代的单一遗传突变引起的阿尔茨海默病的子集。已知有三个基因与FAD相关、或引起FAD:14号染色体上的早老蛋白1(PS1);1号染色体上的早老蛋白2(PS2);以及21号染色体上的淀粉样前体蛋白

(APP)。因此,在一个实施方式中,受试者在PS1、PS2和APP中的至少一个中具有突变。

[0060] 如本文所使用,“帕金森病”或“PD”是指神经退行性疾病,其特征是逐渐恶化的颤抖和僵硬以及越来越多的平衡、行走和协调方面的问题。许多基因可能促成PD或增加PD的风险,包括突触核蛋白 α (SNCA;NCBI Gene ID:6622)、富亮氨酸重复激酶2 (LRRK2/PARK8;NCBI Gene ID 120892)、葡萄糖神经酰胺酶 β (GBA1;NCBI Gene ID 2629)、parkin RBR E3 泛素 (PRKN;NCBI Gene ID 5071)、PTEN诱导的激酶1 (PINK1;NCBI Gene ID 65018)、帕金森病相关去糖化酶 (DJ1/PARK7;NCBI Gene ID 11315)、VPS35 retromer复合物成分 (VPS35;NCBI Gene ID 55737)、真核翻译起始因子4 γ 1 (EIF4G1;NCBI Gene ID 1981)、DnaJ热休克蛋白家族成员C13 (DNAJC13;NCBI Gene ID 23317)、含卷曲螺旋-螺旋-卷曲螺旋-螺旋结构域2 (CHCHD2;NCBI Gene ID 51142)、和/或泛素C-末端水解酶L1 (UCHL1;NCBI Gene ID 7345)。许多物种中的此类PD相关基因的序列是已知的,例如,人mRNA和蛋白质序列可以在NCBI数据库中使用所提供的Gene ID号获得。这些PD相关基因和其它、以及其PD相关的等位基因(例如突变、SNP等)在本领域是已知的,并且在例如以下中进一步进行描述:D' Souza等,Acta Neuropsychiatrica 2020 32:10-22;Sardi等,Parkinsonism&Related Disorders 2019 59:32-38;Hardy等,Current Opinion in Genetics&Development 2009 19:254-65;Ferreria等,Neurologica 2017 135:273-84;Jain等,Clinical Science 2005 109:355-64;Fagan等,European Journal of Neurology 2017 24:561-e20;Campelo等,Parkinson's Disease 2017 4318416;以及Porter等,“Neurodegeneration and Alzheimer's Disease”2019第15章;将其各自都通过引用的方式以其整体并入本文。因此,在一些与治疗帕金森病有关的实施方式中,所述一个或多个抑制性核酸(例如miRNA)可以与SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PINK1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1和/或GBA1杂交,和/或减少SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PINK1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1和/或GBA1的表达。

[0061] 在一个实施方式中,所述神经系统疾病或紊乱为亨廷顿病。

[0062] 当疾病或紊乱为亨廷顿病时,所述方法可以进一步包括在给予编码CYP46A1的核酸(野生型或密码子优化的变体)之后的时间评估至少一种主要结果测量、至少一种次要结果测量或其组合。给予之后的时间可以是例如2周、4周、6周、8周、10周、15周、20周、25周、30周、35周、40周、45周、50周、52周、55周、60周或更长。主要结果测量的非限制性实例包括剂量限制性毒性(DLT)、治疗突发性不良事件(TEAE)、严重不良事件(SAE)及其组合的发生率。次要结果测量的非限制性实例包括通过MRI评估的受亨廷顿病影响的大脑区域的解剖学和体积测量、亨廷顿病综合统一评分量表(cUHDRS)分数、血液和/或脑脊液(CSF)中的突变亨廷顿蛋白(mHTT)浓度、血液和/或CSF中的神经丝轻链(NfL)水平、血液和/或CSF中的240H胆固醇浓度、磁共振波谱(MRS)代谢谱、正电子发射断层扫描(PET)氟脱氧葡萄糖(FDG)纹状体谱(striatal profile)及其组合。

[0063] 在一些实施方式中,确定受亨廷顿病影响的大脑区域的解剖学和体积测量。相对于基线变化的可变性和量级(即,在编码CYP46A1的核酸的rAAV施用时的大脑区域的测量,由皮层萎缩、心室扩张和纹状体结构的萎缩进展的斜率确定)可以维持(即,稳定)或改善(例如,降低)大于或等于约0.5vol%、大于或等于约1vol%、大于或等于约2vol%、大于或等于约3vol%、大于或等于约4vol%、大于或等于约5vol%、大于或等于约6vol%、大于或

等于约7vol%、大于或等于约8vol%、大于或等于约9vol%、大于或等于约10vol%、大于或等于约15vol%、大于或等于约20vol%、大于或等于约25vol%或更多,例如变化约0.5vol%、约1vol%、约2vol%、约3vol%、约4vol%、约5vol%、约6vol%、约7vol%、约8vol%、约9vol%、约10vol%、约11vol%、约12vol%、约13vol%、约14vol%、约15vol%、约16vol%、约17vol%、约18vol%、约19vol%、约20vol%、约25vol%或更多。

[0064] 在一些实施方式中,确定cUHDS分数并将其与基线cUHDS分数(即,在编码CYP46A1的核酸的rAAV施用时的cUHDS分数)进行比较。相对于基线cUHDS分数,所述cUHDS分数可以维持(即,稳定)或改善大于或等于约0.5%、大于或等于约1%、大于或等于约2%、大于或等于约3%、大于或等于约4%、大于或等于约5%、大于或等于约6%、大于或等于约7%、大于或等于约8%、大于或等于约9%、大于或等于约10%、大于或等于约15%、大于或等于约20%、大于或等于约25%或更多,例如改善约0.5%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约25%或更多。

[0065] 在一些实施方式中,确定血液和/或CSF中的mHTT浓度并将其与相应的基线mHTT浓度(即,在编码CYP46A1的核酸的rAAV施用时的血液和/或CSF中的mHTT浓度)进行比较。相对于基线mHTT浓度,所述mHTT浓度可以维持(即,稳定)或改善(即,降低)大于或等于约0.5%、大于或等于约1%、大于或等于约2%、大于或等于约3%、大于或等于约4%、大于或等于约5%、大于或等于约6%、大于或等于约7%、大于或等于约8%、大于或等于约9%、大于或等于约10%、大于或等于约15%、大于或等于约20%、大于或等于约25%或更多,例如改善约0.5%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约25%或更多。

[0066] 在一些实施方式中,确定血液和/或CSF中的NfL水平并将其与相应的基线NfL水平(即,在编码CYP46A1的核酸的rAAV施用时的血液和/或CSF中的NfL水平)进行比较。相对于基线NfL水平浓度,所述NfL水平可以维持(即,稳定)或改善(即,降低)大于或等于约0.5%、大于或等于约1%、大于或等于约2%、大于或等于约3%、大于或等于约4%、大于或等于约5%、大于或等于约6%、大于或等于约7%、大于或等于约8%、大于或等于约9%、大于或等于约10%、大于或等于约15%、大于或等于约20%、大于或等于约25%或更多,例如改善约0.5%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约25%或更多。

[0067] 在一些实施方式中,确定血液和/或CSF中的240H胆固醇浓度并将其与相应的基线240H胆固醇浓度(即,在编码CYP46A1的核酸的rAAV施用时的血液和/或CSF中的240H胆固醇浓度)进行比较。相对于基线240H胆固醇浓度,所述240H胆固醇浓度可以维持(即,稳定)或改善(即,增加)大于或等于约0.5%、大于或等于约1%、大于或等于约2%、大于或等于约3%、大于或等于约4%、大于或等于约5%、大于或等于约6%、大于或等于约7%、大于或等于约8%、大于或等于约9%、大于或等于约10%、大于或等于约15%、大于或等于约20%、大于或等于约25%或更多,例如改善约0.5%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约25%或更多。

[0068] 在一些实施方式中,确定MRS代谢概况并将其与相应的基线MRS代谢概况(即,在编

码CYP46A1的核酸的rAAV施用时的MRS代谢概况) 进行比较。相对于基线MRS代谢概况, 所述MRS代谢概况可以维持(即, 稳定) 或改善大于或等于约0.5%、大于或等于约1%、大于或等于约2%、大于或等于约3%、大于或等于约4%、大于或等于约5%、大于或等于约6%、大于或等于约7%、大于或等于约8%、大于或等于约9%、大于或等于约10%、大于或等于约15%、大于或等于约20%、大于或等于约25%或更多, 例如改善约0.5%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约25%或更多。

[0069] 在一些实施方式中, 确定PET FDG概况并将其与相应的基线PET FDG概况(即, 在编码CYP46A1的核酸的rAAV施用时的PET FDG概况) 进行比较。相对于基线PET FDG概况, 所述PET FDG概况可以维持(即, 稳定) 或改善大于或等于约0.5%、大于或等于约1%、大于或等于约2%、大于或等于约3%、大于或等于约4%、大于或等于约5%、大于或等于约6%、大于或等于约7%、大于或等于约8%、大于或等于约9%、大于或等于约10%、大于或等于约15%、大于或等于约20%、大于或等于约25%或更多, 例如改善约0.5%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约25%或更多。

[0070] 在一个实施方式中, 所述神经系统疾病或紊乱是阿尔茨海默病。

[0071] 在一个实施方式中, 所述神经系统疾病或紊乱是家族性阿尔茨海默病。

[0072] 在一个实施方式中, 所述神经系统疾病或紊乱是帕金森病。

[0073] 在一个实施方式中, 所述神经系统疾病或紊乱是多系统萎缩。

[0074] 物质的“有效量”是足以产生期望的效果的量。在一些实施方式中, 分离的核酸的有效量是足以转染(或在rAAV介导的递送的情况下感染) 足够数量的受试者目标组织的目标细胞。在一些实施方式中, 目标组织是中枢神经系统(CNS) 组织(例如大脑组织、脊髓组织、脑脊液(CSF) 等)。在一些实施方式中, 有效量的分离的核酸(例如, 其可通过rAAV递送) 可以是足以在受试者中具有治疗益处的量, 例如, 以减少致病基因或蛋白质(例如, HTT) 的表达, 以延长受试者的寿命, 以改善受试者中的一个或多个疾病症状(例如, 亨廷顿病的症状) 等。有效量将取决于各种因素, 例如, 如物种、年龄、重量、受试者的健康和将要靶向的组织, 并因此可能在受试者和组织之间有所不同, 如在本公开其它地方所述。

抑制性RNA

[0075] 在一些方面, 本公开提供了抑制性核酸(例如miRNA), 其特异性地结合(例如, 与之杂交) 靶标(例如, 人亨廷顿mRNA(例如SEQ ID NO:4) 的至少两个(例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个或更多个) 连续碱基。在一些实施方式中, 本公开提供了抑制性核酸(例如miRNA), 其特异性地结合(例如, 与之杂交) 人亨廷顿mRNA的外显子1(例如SEQ ID NO:3) 的至少两个(例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个或更多个) 连续碱基。本文所使用的“连续碱基”是指共价结合(例如通过一个或多个磷酸二酯键等) 至彼此(例如作为核酸分子的一部分) 的两个以上的核苷酸碱基。在一些实施方式中, 所述至少一个miRNA与靶标(例如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4) 的两个以上(例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25或

更多个)连续核苷酸碱基约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%或约100%相同。在一些实施方式中,抑制性RNA是包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中任一个所示的序列的miRNA,或者是由SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中任一个所示的序列编码的miRNA。

[0076] 在一个方面,本文描述的是可用于治疗神经系统疾病或紊乱的抑制性RNA。在任何方面的一些实施方式中,抑制性RNA的核酸序列包含以下中的一个:SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260,或与SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的至少一个序列是至少95%(例如,至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%)相同并保持与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4功能相同(例如,HTT抑制)的序列。

[0077] 在一些实施方式中,本文所述的载体包含至少一个miRNA,每个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中任一个所示的序列。在一些实施方式中,本文所述的载体包含至少一个miRNA,每个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中任一个所示的序列,其侧接有miRNA骨架序列。

[0078] 在一些实施方式中,本文所述的载体包含至少一个miRNA,每个miRNA包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:46-SEQ ID NO:49中的一个互补的种子序列。在一些实施方式中,本文所述的载体包含至少一个miRNA,每个miRNA包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:46-SEQ ID NO:49中的一个互补的种子序列,其侧接有miRNA骨架序列。在一些实施方式中,本文所述的载体包含至少一个miRNA,每个miRNA包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:46-SEQ ID NO:49中的一个基本上互补的种子序列。在一些实施方式中,本文所述的载体包含至少一个miRNA,每个miRNA包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:46-SEQ ID NO:49中的一个基本上互补的种子序列,其侧接有miRNA骨架序列。

[0079] 表1:与SEQ ID NO:4基本上互补的第一RNA序列

miRNA序列	SEQ ID NO:
5'-AAGGACUUGAGGGACUCGA-3'	6
5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAA-3'	7
5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAG-3'	8
5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAGG-3'	9
5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGC-3'	10

[0080] 表2:与表1中提供的一个或多个第一RNA序列基本上互补的第二RNA序列

miRNA序列	SEQ ID NO:
5'-UCGAGUCCCUC AAGUCCUU-3'	11
5'-UUCGAGUCCCUC AAGUCCUU-3'	12
5'-CUUCGAGUCCCUC AAGUCCUU-3'	13
5'-CCUUCGAGUCCCUC AAGUCCUU-3'	14
5'-GCCUUCGAGUCCCUC AAGUCCUU-3'	15
5'-CUUCGAGUCUCAAGUCCUU-3'	16
5'-ACGAGUCCCUC AAGUCCUC-3'	17

[0081] 表3:由表1和表2提供的miRNA靶向的、人HTT基因的外显子1中的靶标序列

靶标序列	SEQ ID NO:
aaggacuuga gggacucgaa	18
tccaagatgg acggccgctc a	19
ccaagatgga cggccgctca g	20
agatggacgg ccgctcaggt t	21
atggacggcc gctcaggttc t	22
gacggccgct caggttctgc t	23
cggccgctca ggttctgctt t	24
gtgctgagcg gcgccgag t	25
cgccgagagt cggcccagag c	26
accgccatgg cgaccctgga a	27
ccgccatggc gaccctgga a	28
gaaggccttc gagtccctca a	29
cttcgagtcc ctcaagtct t	30
ccgccgccc ctcctcagct t	31
gccgcctcct cagcttcctc a	32
tcagccgccg ccgcaggcac a	33
gccgcaggca cagccgctgc t	34
ggcacagccg ctgctgcctc a	35
gccgctgctg cctcagccgc a	36
cggcccggct gtggctgagg a	37
ctgtggctga ggagccgctg c	38
tgtggctgag gagccgctgc a	39

[0082] 在一些实施方式中,miRNA包含SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:11;SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:14;或SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:15。

[0083] 在一些实施方式中,所述载体包含具有SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:41的序列的pre-miRNA。这些pre-miRNA包括含有SEQ ID NO:8的支架。在SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的任一个中,可用本文所公开的替代性第一RNA序列代替SEQ ID NO:8。

[0084] 在一些实施方式中,所述载体包含具有SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:43的序列的pri-miRNA。SEQ ID NO:42的pri-miRNA包括含有SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:16的支架。在SEQ ID NO:42中,可用本文中公开的替代性RNA序列代替SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:16。SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44的pri-miRNA包括含有SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:17的支架。在SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44的任一个中,可用本文中公开的替代性RNA序列代替SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:17。

[0085] 表4:包含表1和表2中提供的miRNA的pre-miRNA和pri-miRNA

名称	序列	SEQ ID NO:
Pre-miR451a	5'-CUUGGGAAUGGCAAGGAAGGACUUGAGGGACUCGAAGACGA GUCCCUCAAGUCCUCUCUUGCUAUACCCAGA-3'	40
Pre-miR155	5'-UGCUGAAGGACUUGAGGGACUCGAAGGUUUUGGCCACUGACU GACCUUCGAGUCUCAAGUCCUUCAGGA-3'	41
	gcuaagcacu ucguggccgu cgaucguuua aagggaggua gugagucgac caguggaucc uggaggcuug cugaaggcug uaugcugaag gacuugaggg acucgaaggu uuuggccacu gacugaccuu cgagucucua guccuucagg acacaaggcc uguuacuagc acucacaugg aacaaauggc ccagaucugg ccgcacucga gauaucuaga cccagcuuuc uuguacaaag uggugaucu agagggcccc cgguucgug au	42
	gcuccugggc aacgugcugg uuauugugcu gucucaucau uuuggcaaag aaauaagggc gaauucgagc ucgguaccuc gcgaaugcau cuagauaucg gcgcuau gcu uccugugccc ccaguggggc ccuggcuggg auuucacau auacuguaag uuugcgauga gacacuacag uauagaugau guacuagucc gggcaccccc agcucuggag ccugacaagg aggacaggag agaugcugca agccccagaa gcucucugcu cagccuguca caaccuacug acugccaggg cacuugggaa uggcaaggaa ggacuugagg gacucgaaga cgagucccuc aaguccucuc uugcuauacc cagaaaacgu gccaggaaga gaacucagga cccugaagca gacuacugga agggagacuc cagcucaaac aaggcagggg uggggcgug ggauuggggg uaggggaggg aauagauaca uuucucuuu ccuguuguaa agaaauaaag auaagccagg cacaguggcu cacgccugua aucccaccac uuucagaggc caaggcgug gaucecagauc ucgagcggcc gcccc	43
	agucucgugc agauggacag caccgcugag caauggaagc ggguaaggccu uuggggcagc ggccaauagc agcuuugcuc cuucgcuuuc ugggucacaga ggcugggaag gggugggucc gggggcgggc ucaggggagg gcucaggggc ggggcgggcg cccgaagguc cuccggaggc ccggcauucg gcacgcuuca aaagcgcacg ucugcccgcg uguucuccuc uuccuacau cccggccuuu cgacccggau cccccgggcu gcaggaauc gagcucggua ccucgcaau gcaucua gcu aucggcgcu ugcuuucug gccccagug gggccucggc ugggaaucu ucauauacug uaaguugcg augagacac acagauaga ugaugua cua guccgggac ccccagcucu ggagccugac aaggaggaca ggagagau gcu ugcaagccca agaagcucuc ugcucagccu gucacaaccu acugacugcc agggcacuug ggaauaggca ggaaggacuu gagggaucg aagacgaguc ccucaagucc ucucuugcua uaccagaaa acgugccagg aagagaacuc aggaccucga agcagacuac uggaaaggag acuccagcuc aaacaaggca gggguggggg cgugggguug gggguagggg agggaauga uacauuuucu cuuuccuguu guaaagaaau aaagauaagc caggcacagu ggcucacgcc uguaauccca ccacuuucag aggccaaagg gcuggaucca gaucucgagc ggccgcccc	44

[0086] 在一些实施方式中,所述抑制性核酸可以包含国际专利公布W02017/201258的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:102和/或SEQ ID NO:103-SEQ ID NO:249中的一个或多个。在一些实施方式中,所述抑制性核酸可以包含选自国际专利公布W02017/201258的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:249的双链体组合中的一个或多个,它们在国际专利公布W02017/201258的表3-表5中予以提供。在一些实施方式中,所述载体可以包含国际专利公布W02017/201258的表9中提供的pri-miRNA或表10中提供的pri-mRNA中的一个或多个。将国际专利公布W02017/201258的内容通过引用的方式以其整体并入本文。

[0087] 在一些实施方式中,抑制性核酸可以包含国际专利公布W02018/204803的SEQ ID

NO:914-SEQ ID NO:1013和/或SEQ ID NO:1014-SEQ ID NO:1160中的一个或多个。在一些实施方式中,抑制性核酸可以包含选自国际专利公布W02018/204803的SEQ ID NO:914-SEQ ID NO:1160的双链体组合中的一个或多个,它们在国际专利公布W02018/204803的表4-表6中予以提供。将国际专利公布W02018/204803的内容通过引用的方式以其整体并入本文。

[0088] 在一些实施方式中,抑制性核酸可以包含国际专利公布W02018/204797的SEQ ID NO:916-SEQ ID NO:1015和/或SEQ ID NO:1016-SEQ ID NO:1162中的一个或多个。在一些实施方式中,抑制性核酸可以包含国际专利公布W02018/204797的SEQ ID NO:916-SEQ ID NO:1015、SEQ ID NO:1016-SEQ ID NO:1162、SEQ ID NO:1164-SEQ ID NO:1332和/或SEQ ID NO:1333-SEQ ID NO:1501中的一个或多个。在一些实施方式中,抑制性核酸可以包含选自国际专利公布W02018/204797的SEQ ID NO:916-SEQ ID NO:1162的双链体组合中的一个或多个,它们在国际专利公布W02018/204797的表4-表6中予以提供。在一些实施方式中,抑制性核酸可以包含选自国际专利公布W02018/204797的SEQ ID NO:1164-SEQ ID NO:1501的双链体组合中的一个或多个,它们在国际专利公布W02018/204797的表9中予以提供。将国际专利公布W02018/204797的内容通过引用的方式以其整体并入本文。

[0089] 在一些实施方式中,抑制性核酸可以靶向编码功能获得性突变亨廷顿蛋白的基因内的杂合SNP(例如,包含与编码功能获得性突变亨廷顿蛋白的基因内的杂合SNP互补或基本上互补的序列)。在一些实施方式中,所述SNP在样本群中具有至少10%的等位基因频率。在一些实施方式中,所述SNP存在于选自于由以下所组成的组中的基因组位点处:RS362331、RS4690077、RS363125、RS363075、RS362268、RS362267、RS362307、RS362306、RS362305、RS362304、RS362303和RS7685686。此类SNP在例如美国专利9,343,943中进行了更详细的描述,将所述专利通过引用的方式以其整体并入本文。在一些实施方式中,所述靶标序列是SEQ ID NO:45-SEQ ID NO:49中的一个。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包含SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:61中的一个或多个。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包含至少SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51(例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包含至少SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53,(例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包含至少SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55(例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包含至少SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57(例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包含至少SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59(例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包含至少SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:61(例如,在双链体中)。

[0090] 表5-靶标序列

靶标序列	SEQ ID NO:
ccacgccugc uccucaucc acugugugca cuucauccug	45
ccacgccugc uccucaucu acugugugca cuucauccug	46
uaagagauagg ggacaguaau ucaacgcuag aagaaca	47
uaagagauagg ggacaguacu ucaacgcuag aagaaca	48
cagatgcc atggcctgtgct gggccag	49

[0091] 表6:靶向人HTT基因中的SNP的正义和反义序列(或第一和第二RNA序列)

正义序列	SEQ ID NO:	反义序列	SEQ ID NO:
ucccucaucc acugugugaa c	50	gcacacagug gaugagggag c	51
ucccucaucu acugugugaa c	52	cgagggagua gaugacacac g	53
gggacaguua uucaacgcgu c	54	agcguugaau uacugucgcc a	55
gggacaguac uucaacgcgu c	56	acccuguca ugaaguugcg a	57
ugccauggcc ugugcugguc c	58	cccagcacag gccauaggca c	59
ugccauggca ugugcugguc c	60	cccagcacau gccuaggcau c	61

[0092] 在一个实施方式中,所述抑制性核酸(例如miRNA)能够与HTT基因的外显子1特异性杂交。与HTT基因的外显子1杂交的示例性miRNA如表17中所述,即,SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:160和SEQ ID NO:164-SEQ ID NO:166。

[0093] 在一个实施方式中,所述抑制性核酸(例如miRNA)能够与HTT基因的外显子1/外显子2边界特异性杂交。与HTT基因的外显子1/外显子2边界杂交的示例性miRNA如表17中所述,即,SEQ ID NO:161-SEQ ID NO:163和SEQ ID NO:167-SEQ ID NO:169(即,如星号所示)。

[0094] 在一个实施方式中,所述抑制性RNA的核酸序列包括SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:169中的至少一个或与SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:169中的至少一个的序列至少95%(例如,至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%)相同且保持相同的HTT抑制功能的序列。

[0095] 在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:158和SEQ ID NO:164(例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:159和SEQ ID NO:165(例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:160和SEQ ID NO:166(例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:161和SEQ ID NO:167(例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:162和SEQ ID NO:168(例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:163和SEQ ID NO:169(例如,在双链体中)。

	正义	SEQ ID NO:	SiRNA	SEQ ID NO:
Hel-1	CGCUCAGGUUCUGCUUUUA	158	UAAAAGCAGAACCUGAGCGgc	164
Hel-4	GCCCAGAGCCCAUUCAUU	159	AAUGAAUGGGGCUUGGGCCg	165
Hel-6	GGGACGGGUCCAAGAUGGA	160	UCCAUCUUGGACCCGUCCGg	166
Hel-8*	GCUGCACCGACCAAAGAAA	161	UUUCUUUGGUCGGUGCAGCg	167
Hel-9*	GAGCCGCGUCACCGACCAA	162	UUGGUCGGUGCAGCGGCUCcu	168
Hel-10*	GCACCGACCAAAGAAAGAA	163	UUCUUUCUUUGGUCGGUGCag	169

[0096] 在一个实施方式中,所述抑制性核酸(例如miRNA)能够与HTT基因的内含子1特异性杂交。与HTT基因的内含子1杂交的示例性miRNA如表18中所述,即,SEQ ID NO:170-SEQ ID NO:174和SEQ ID NO:178-SEQ ID NO:182。

[0097] 在一个实施方式中,所述抑制性核酸(例如miRNA)能够与HTT基因的外显子1/内含子1边界特异性杂交。与HTT基因的外显子1/内含子1边界杂交的示例性miRNA如表18中所述,即,SEQ ID NO:175-SEQ ID NO:177和SEQ ID NO:183-SEQ ID NO:185。(即,如星号所示)。

[0098] 在一个实施方式中,所述抑制性RNA的核酸序列包括SEQ ID NO:170-SEQ ID NO:185中的一个或与SEQ ID NO:170-SEQ ID NO:185中的至少一个的序列至少95% (例如至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%) 相同且保持相同的HTT抑制功能的序列。

[0099] 在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:170和SEQ ID NO:178 (例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:171和SEQ ID NO:179 (例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:172和SEQ ID NO:180 (例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:173和SEQ ID NO:181 (例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:174和SEQ ID NO:182 (例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:175和SEQ ID NO:183 (例如,在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:176和SEQ ID NO:184 (例如在双链体中)。在一些实施方式中,所述抑制性核酸序列包括至少SEQ ID NO:177和SEQ ID NO:185 (例如,在双链体中)。

[0100] 在一个实施方式中,本公开的分离的核酸包含编码miRNA的序列,所述miRNA包含SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185中的任一者所示的序列。

[0101] 在任一方面的一些实施方式中,所述抑制性RNA的核酸序列包括SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185中的一个或与SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185中的至少一个的序列至少95% (例如,至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%) 相同的序列,所述序列保持与SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185相同的功能 (例如,HTT抑制)。

[0102] 在一个实施方式中,优选的miRNA分子或其等同物或模拟物或isomiR包含在SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185中识别或识别为SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185的种子序列中存在的7个核苷酸中的至少6个,并且更优选地具有至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个核苷酸或更多的长度。

[0103] 本文描述了重组AAV,所述重组AAV包含衣壳蛋白和编码转基因的核酸,其中所述转基因包含编码一个或多个miRNA的核酸序列,并且其中每个miRNA包含SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185中的任一个所示的序列。

[0104] 本文描述了治疗CNS疾病 (例如,亨廷顿病) 的方法,所述方法包括向受试者施用重组AAV,所述重组AAV包含衣壳蛋白和编码转基因的核酸,其中所述转基因包含编码一个或多个miRNA的核酸序列,并且其中每个miRNA包含SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185中的任一个所示的序列。

[0105] 本文描述了治疗CNS疾病 (例如,亨廷顿病) 的方法,所述方法包括向受试者施用重组AAV、以及CYP461蛋白或编码CYP46A1蛋白的核酸序列,所述重组AAV包含衣壳蛋白和编码转基因的核酸,其中所述转基因包含编码一个或多个miRNA的核酸序列,并且其中每个miRNA包含SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185中的任一个所示的序列。

[0106] 本文描述了治疗CNS疾病 (例如,亨廷顿病) 的方法,所述方法包括向受试者施用重组AAV、以及免疫调节剂,所述重组AAV包含衣壳蛋白和编码转基因的核酸,其中所述转基因包含编码一个或多个miRNA的核酸序列,并且其中每个miRNA包含SEQ ID NO:158-SEQ ID

NO:185中的任一个所示的序列。

[0107] 本文描述了治疗CNS疾病(例如,亨廷顿病)的方法,所述方法包括向受试者施用重组AAV、CYP461蛋白或编码CYP46A1蛋白的核酸序列、以及免疫调节剂,所述重组AAV包含衣壳蛋白和编码转基因的核酸,其中所述转基因包含编码一个或多个miRNA的核酸序列,并且其中每个miRNA包含SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185中的任一个所示的序列。

[0108] 本文描述了具有如下基因组的重组AAV,所述基因组包含SEQ ID NO:194的序列、基本由SEQ ID NO:194的序列组成或由SEQ ID NO:194的序列组成。在各种实施方式中,SEQ ID NO:194的序列中描述的任何元件都可以被本文所述的任何元件替换。

[0109] 例如,在一个实施方式中,SEQ ID NO:194的序列中描述的增强子元件可被本文所述的任何增强子元件替换。在一个实施方式中,SEQ ID NO:194的序列中描述的启动子可被本文所述的任何启动子替换。在一个实施方式中,SEQ ID NO:194的序列中描述的CYP46A1转基因可被本文所述的任何CYP46A1转基因替换,例如,不同的密码子优化的CYP46A1转基因。在一个实施方式中,SEQ ID NO:194的序列中描述的poly(A)信号序列可被本文所述的任何poly(A)信号序列替换。在一个实施方式中,SEQ ID NO:194的序列中描述的内含子元件可被本文所述的任何内含子元件替换。在一个实施方式中,SEQ ID NO:194的序列中所述的原核端粒酶(protelomerase)识别序列可被本文所述的任何原核端粒酶识别序列替换。在一个实施方式中,SEQ ID NO:194的序列中所述的任何接头或填充序列(stuffer sequence)可被本文所述的任何接头或填充序列替换。在一个实施方式中,SEQ ID NO:194的序列中所述的ITR可被本文所述的任何ITR替换。

[0110] 在一个实施方式中,SEQ ID NO:194的序列被修饰以包括本文所述的任何miRNA。

[0111] 本文进一步描述了包含重组AAV的组合物,所述重组AAV具有如下的基因组,所述基因组包含SEQ ID NO:194的序列、基本上由SEQ ID NO:194的序列组成或由SEQ ID NO:194的序列组成。

[0112] 本文描述了用于治疗CNS疾病或紊乱的方法,所述方法包括向受试者施用重组AAV,所述重组AAV具有如下的基因组,所述基因组包含SEQ ID NO:194的序列、基本上由SEQ ID NO:194的序列组成或由SEQ ID NO:194的序列组成。在一个实施方式中,进一步向受试者施用免疫调节剂。

[0113] 本文描述了用于治疗亨廷顿病的方法,所述方法包括向受试者施用具有如下的基因组的重组AAV,所述基因组包含SEQ ID NO:194的序列、基本上由SEQ ID NO:194的序列组成或由SEQ ID NO:194的序列组成。

[0114] 本文的另一方面是治疗CNS疾病或紊乱(例如,亨廷顿病)的方法,所述方法包括向受试者施用具有如下的基因组的重组AAV,所述基因组包含已经如上文所述进行修饰的SEQ ID NO:194的序列、基本由已经如上文所述进行修饰的SEQ ID NO:194的序列组成或由已经如上文所述进行修饰的SEQ ID NO:194的序列组成,例如,SEQ ID NO:194所述的CYP46A1转基因序列已经被本文所述的另一个CYP46A1转基因序列替换。在一个实施方式中,进一步向受试者施用免疫调节剂。

[0115] 在一个实施方式中,进一步向受试者施用免疫调节剂。

[0116] 在一些实施方式中,所述载体包含本文所述的至少一种抑制性核酸序列(例如,miRNA),所述载体包含所述至少一种抑制性核酸序列的至少一个拷贝。例如,所述载体可以

包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个或更多个给定的miRNA。

	正义	SEQ ID NO:	SiRNA	SEQ ID NO:
HI-1	GGAUGGCGGUAACCCUGCA	170	UGCAGGGUUACCGCCAUCCcc	178
HI-5	GGUCAGAUUGUAAGUAUUU	171	AAAUACUUACAAUCUGACCAu	179
HI-6	GCAAACCCUUGUUCUCAU	172	AAUGAGAACAAGGGUUUGCA	180
HI-8	GGACAUAGACAGUAAGCAA	173	UUGCUIACUGUCUAUGUCCuu	181
HI-9	GGAGAGCAGUGUAGCUUA	174	UAAGCUAACACUGCUCUCCGA	182
HI-10*	GCUGCACCGACCGUGAGUU	175	AACUCACGGUCGGUGCAGCgg	183
HI-11*	GCACCGACCGUGAGUUUGG	176	CCAAACUCACGGUCGGUGCag	184
HI-12*	GCCGCUGCACCGACCGUGA	177	UCACGGUCGGUGCAGCGGCuc	185

[0117] 在一些实施方式中,抑制性核酸(例如miRNA)可以与本文所公开的基因之一中的多态性、突变或SNP进行特异性杂交,或者靶向本文所公开的基因之一中的多态性、突变或SNP。选择靶向HTT基因中的多态性(例如SNP)的抑制性核酸序列的方法在本领域中是已知的。例如,此类方法在美国专利8,679,750和7,947,658中公开,将其各自都通过引用的方式以其整体并入本文。在一些实施方式中,所述抑制性核酸可以包含例如美国专利8,679,750或7,947,658的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:342中的一个或多个的序列。

[0118] 在一些实施方式中,所述抑制性核酸可以包含SEQ ID NO:62-SEQ ID NO:66中的一个或多个。

[0119] 表7. 在一些实施方式中,大写字母包含2'-O-(2-甲氧基)乙基修饰。

	SEQ ID NO
5'-CTCAGtaacattgacACCAC-3'	62
5'-CTCGActaaagcaggATTTC-3	63
5'-CCTTCcctgaaggttCCTCC-3'	64
5'-GCAGGgttaccgccaTCCCC-3'	65
5'-CGAGAcagtgcgttcCACTT-3'	66

[0120] 进一步合适的序列在本领域中是已知的,例如在美国专利7,951,934; Miniarikova等, Molecular Therapy-Nucleic Acids 20155:e297;和Kordasiweicz等, Neuron 201274:1031-1044;将其各自都通过引用的方式以其整体并入本文。

[0121] 在任何方面的一些实施方式中,抑制性RNA(例如miRNA)结合和/或靶向靶标的5'非翻译区(UTR)。在任何方面的一些实施方式中,抑制性RNA(例如miRNA)结合和/或靶向靶标的一个或多个外显子。在任何方面的一些实施方式中,抑制性RNA(例如,miRNA)结合和/或靶向HTT的5'UTR、外显子1、CAG重复、CAG 5'-跨接区(CAG 5'-jumper)或CAG 3'跨接区。

[0122] 在一些实施方式中,抑制性RNA和/或载体不包含SEQ ID NO:67-SEQ ID NO:73中的任何一个的序列。在一些实施方式中,抑制性RNA和/或载体不包含与SEQ ID NO:67-SEQ ID NO:73中的任何一个具有多于80%、多于85%、多于90%、多于95%或多于98%的序列同一性的序列。

[0123] 在一些实施方式中,抑制性RNA和/或载体不包含SEQ ID NO:67-SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:135-SEQ ID NO:151中的任何一个的序列。在一些实施方式中,所述抑制性RNA和/或载体不包含与SEQ ID NO:67-SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:135-SEQ ID NO:151中的任

何一个具有多于80%、多于85%、多于90%、多于95%、或多于98%的序列同一性的序列。

[0124] 在一些实施方式中,抑制性RNA和/或载体确实包含SEQ ID NO:67-SEQ ID NO:73中的任何一个的序列。在一些实施方式中,抑制性RNA和/或载体确实包含与SEQ ID NO:67-SEQ ID NO:73中的任何一个具有多于80%、多于85%、多于90%、多于95%、或多于98%的序列同一性的序列。

[0125] 在一些实施方式中,抑制性RNA和/或载体确实包含SEQ ID NO:67-SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:135-SEQ ID NO:151中的任何一个的序列。在一些实施方式中,抑制性RNA和/或载体确实包含与SEQ ID NO:67-SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:135-SEQ ID NO:151中的任何一个具有多于80%、多于85%、多于90%、多于95%、或多于98%的序列同一性的序列。参见例如国际专利申请W0 2021/127455,将其内容通过引用的方式以其整体并入本文。

[0126] 表8

	SEQ ID NO:
CGAGGCCGGGGCGGGGCACA	67
CGGGGCGGGGCCGTGGAGGG	68
ACTGTGCCACTATGTTTTCA	69
GCCTTCATCAGCTTTTCCAG	70
GCTGCTGCTGCTGCTGCTGC	71
TGCTGGAAGGACTTGAGGGA	72
TGTTGCTGCTGCTGCTGCTG	73
TGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	135
GGCGGCGGGCGGCGGCGGCGG	136
GAGGGGTGGGGAGGCTGGGG	137
TCCTTGACCTGCTGCTGCAG	138
CCTTCCACTGGCCATGATGC	139
ACTGTGCCACTATGTTTTCA	140
TGAGGTATCAGATTGTCTAG	141
AAAttAATCTCTTACCTGAT	142
CCCAGGGCTAGCAAGGAACA	143
AATTCAGTAGCTTCCCTTAA	144
CTGGGCCCCGAGCGGAAGGG	145
TTATTGCTGTCTACTATCCG	146
TCAGTCCTTCCCAAAGCTCT	147
TAATCTCTTTACTGATATAA	148
TCAGCAGTGTTATTTCTTAC	149
AAACCGttACCAttACtGAGtt	150
AAAtCGctGAtttGtGtAGtC	151

[0127] 在靶向AD和/或PD相关靶标的抑制性核酸(例如,miRNA)中使用的合适的序列是本领域已知的,例如,参见国际专利公布W02011/133890、W02012/036433、W02013/007874;美国专利公布US2016/0264965;美国专利号7,829,694、8,415,319、10,125,363、10,011,835。将上述参考文献的内容通过引用的方式以其整体并入本文。

[0128] 在任何方面的一些实施方式中,治疗神经系统疾病或紊乱的药剂是抑制性核酸或

包含抑制性核酸。在任何方面的一些实施方式中,给定基因的表达的抑制剂可以是抑制性核酸。如本文所使用,“抑制性核酸”是指能够抑制靶标的表达的核酸分子,例如双链RNA(dsRNA)、抑制性RNA(iRNA)等。

[0129] 已经示出双链RNA分子(dsRNA)在被称为RNA干扰(RNAi)的高度保守的调控机制中阻断基因表达。本文所述的抑制性核酸可以包含RNA链(反义链),其具有长度为30个核苷酸以下(即长度为15个-30个核苷酸,长度一般为19个-24个核苷酸)的区域,所述区域与被靶向的mRNA转录本的至少一部分基本上互补。使用这些iRNA使得靶向性的mRNA转录本降解成为可能,造成靶标的表达和/或活性降低。

[0130] 如本文所使用,术语“iRNA”是指含有RNA(或如下文所述的经修饰的核酸)并通过RNA诱导的沉默复合体(RISC)途径介导RNA转录本的靶向切割的试剂。在任何方面的一些实施方式中,如本文所述的iRNA引起靶标的表达和/或活性的抑制。在任何方面的一些实施方式中,使细胞与抑制剂(例如iRNA)接触使得细胞中的靶标mRNA水平降低在没有iRNA存在的细胞中发现的靶标mRNA水平的至少约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、高至并包括100%。在任何方面的一些实施方式中,向受试者施用抑制剂(例如iRNA)可使得受试者中的靶标mRNA水平降低在没有iRNA存在的受试者中发现的靶标mRNA水平的至少约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、高至并包括100%。

[0131] 在任何方面的一些实施方式中,所述iRNA可以是dsRNA。dsRNA包含在将使用dsRNA的条件下足够互补以杂交形成双链体结构的两条RNA链。dsRNA的一条链(反义链)包含互补性区域,所述互补性区域与靶标序列基本上互补,并且通常完全互补。靶标序列可以来源于靶标的表达期间形成的mRNA的序列,例如,它可以跨越一个或多个内含子的边界。另一条链(正义链)包含与反义链互补的区域,使得两条链在合适的条件下结合时杂交并形成双链体结构。一般来说,双链体结构的长度在15(含)个至30(含)个碱基对之间,长度更通常在18(含)个至25(含)个碱基对之间,长度还更通常在19(含)个至24(含)个碱基对之间,并且长度最通常在19(含)个至21(含)个碱基对之间。相似地,与靶标序列互补的区域的长度在15(含)个至30(含)个碱基对之间,长度更通常在18(含)个至25(含)个碱基对之间,长度还更通常在19(含)个至24(含)个碱基对之间,并且长度最通常在19(含)个到21(含)个碱基对之间。在任何方面的一些实施方式中,dsRNA的长度在15(含)个至20(含)个核苷酸之间,并且在其它实施方式中,dsRNA的长度在25(含)个至30(含)个核苷酸之间。如普通技术人员将认识的那样,靶向切割的RNA的被靶向区域将往往是更大的RNA分子(通常是mRNA分子)的一部分。在相关情况下,mRNA靶标的“一部分”是mRNA靶标的连续序列,其长度足以作为RNAi定向切割的底物(即通过RISC途径切割)。在一些情况下,具有短至9个碱基对的双链体的dsDNA可以介导RNAi定向的RNA切割。最通常地,靶标的长度将为至少15个核苷酸,优选长度为15个-30个核苷酸。抑制性核酸类型的示例性实施方式可以包括例如siRNA、shRNA、miRNA、和/或amiRNA,它们是本领域众所周知的。

[0132] 在任何方面的一些实施方式中,所述抑制剂是miRNA。microRNA(miRNA)是17个-25个核苷酸的小RNA,其在真核细胞中作为基因表达的调节器发挥作用。“microRNA”或“miRNA”是能够介导转录基因沉默或翻译后基因沉默的小的非编码RNA分子。通常,miRNA被转录为发夹或茎环(例如,具有自互补性的单链骨架)双链体结构,被称为初级miRNA(pri-

miRNA),其被酶促加工(例如,由Drosha、DGCR8、Pasha等)成为pre-miRNA。所述双链体结构包含:a)第一RNA序列,其是与靶标序列基本上互补、并且一般是完全互补的互补性区域;以及b)第二RNA序列区域,其与第一RNA序列链互补使得两个序列在合适的条件下结合时杂交并形成双链体结构。靶标序列可以来源于靶标的表达期间形成的mRNA的序列,例如,它可以跨越一个或多个内含子的边界。一般来说,双链体结构的长度在15(含)个至30(含)个碱基对之间,长度更通常在18(含)个至25(含)个碱基对之间,长度还更通常在19(含)个至24(含)个碱基对之间,并且长度最通常在19(含)个至21(含)个碱基对之间。

[0133] miRNA最初作为长的初级转录本(称为初级miRNA(pri-miRNA))的一部分在细胞核中表达。pri-miRNA的长度可以变化。在一些实施方式中,pri-miRNA的长度范围从约100个至约5000个碱基对(例如,约100个、约200个、约500个、约1000个、约1200个、约1500个、约1800个或约2000个碱基对)。在一些实施方式中,pri-miRNA的长度大于200个碱基对(例如,长度为2500个、5000个、7000个、9000个或更多个碱基对)。

[0134] 在细胞核内,pri-miRNA被Drosha酶部分消化,以形成65个-120个核苷酸长的发夹前体miRNA(pre-miRNA),其被输出到细胞质用于由Dicer进一步加工成为更短的成熟miRNA,它们是活性分子。在动物中,这些短RNA包含5'近端“种子(seed)”区域(核苷酸2至8),其似乎是miRNA与靶标mRNA的3'非翻译区(3'-UTR)的配对特异性的主要决定因素。Pre-miRNA(其特征也在于发夹或茎环双链体结构)的长度也可以变化。在一些实施方式中,pre-miRNA大小的范围是从约40个碱基对的长度至约500个碱基对的长度。在一些实施方式中,pre-miRNA大小的范围是从约50个至100个碱基对的长度。在一些实施方式中,pre-miRNA大小的范围是从约50个至约90个碱基对的长度(例如,约50个、约52个、约54个、约56个、约58个、约60个、约62个、约64个、约66个、约68个、约70个、约72个、约74个、约76个、约78个、约80个、约82个、约84个、约86个、约88个、或约90个碱基对的长度)。

[0135] 一般来说,pre-miRNA被输出到细胞质中,并由Dicer进行酶促加工以首先产生不完全的miRNA/miRNA*双链体,然后产生单链的成熟miRNA分子,其随后被装载入RNA诱导的沉默复合体(RISC)。通常,成熟的miRNA分子大小的范围是从约19个至约30个碱基对的长度。在一些实施方式中,成熟的miRNA分子长度为约19个、约20个、约21个、约22个、约23个、约24个、约25个、约26个、约27个、约28个、约29个、或30个碱基对。在一些实施方式中,本公开的分离的核酸包含编码pri-miRNA、pre-miRNA或成熟miRNA的序列,其包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中任一个所示的序列。

[0136] 在本发明的背景下,miRNA分子或其等同物或模拟物或isomiR可以是合成的、或天然的、或重组的、或成熟的、或成熟miRNA的一部分、或人miRNA、或来源于人miRNA,如在专门用于一般定义的部分中进一步定义的那样。人miRNA分子是在人细胞、组织、器官或体液中发现的miRNA分子(即内源性人miRNA分子)。人miRNA分子也可以是通过取代、删除和/或添加核苷酸而由内源性人miRNA分子衍生的人miRNA分子。miRNA分子或其等同物或模拟物可以是单链或双链的RNA分子。优选地,miRNA分子或其等同物或模拟物的长度为6个至30个核苷酸,优选长度为12个至30个核苷酸,优选长度为15个至28个核苷酸,更优选所述分子的长度为至少6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个核苷酸或更多。

[0137] 在优选的实施方式中,miRNA分子或其等同物或模拟物或isomiR包含存在于所述miRNA分子或其等同物或模拟物或isomiR的种子序列中的7个核苷酸的至少6个。优选地,在这个实施方式中,miRNA分子或其等同物或模拟物或isomiR的长度为6个至30个核苷酸,并且更优选包含存在于所述miRNA分子或其等同物的种子序列中的7个核苷酸的至少6个。甚至更优选地,miRNA分子或其等同物或模拟物或isomiR的长度为15个至28个核苷酸,并且更优选地,包含存在于所述种子序列中的7个核苷酸的至少6个,甚至更优选地,miRNA分子的长度为至少6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个核苷酸或更多。

[0138] 因此,优选的miRNA分子或其等同物或模拟物或isomiR包含存在于确定为SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260或者在SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中确定的种子序列中的7个核苷酸的至少6个,并且更优选地长度为至少6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个核苷酸或更多。

[0139] miRNA的递送运载体包括但不限于以下:脂质体、聚合物纳米颗粒、病毒系统、脂质或受体结合分子的偶联物、外泌体、和噬菌体;参见例如Baumann和Winkler,miRNA-based therapies:Strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents,Future Med Chem.2014,6(17):1967-1984;美国专利8,900,627;美国专利9,421,173;美国专利9,555,060;WO 2019/177550;将其各自的内容都通过引用的方式以其整体并入本文。

[0140] microRNA序列包含“种子”区域,即成熟microRNA的第2位-8位的区域中的序列,其序列与核酸的miRNA靶标序列具有完美的Watson-Crick互补性。在一个实施方式中,病毒基因组可以被工程化以包含、改变或去除至少一个miRNA结合位点、序列或种子区域。

[0141] 术语实质互补性是指不要求第一和第二RNA序列完全互补,或者不要求第一RNA序列和参考或靶标序列(例如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4)完全互补。在一个实施方式中,RNA序列和靶标之间的实质互补性由以下组成:没有错配、具有一个错配的核苷酸、或具有两个错配的核苷酸。可以理解的是,一个错配的核苷酸是指在与靶标碱基配对的RNA序列的整个长度上,有一个核苷酸没有与靶标碱基配对。没有错配是指所有核苷酸与靶标碱基配对,并且具有2个错配是指有两个核苷酸没有与靶标碱基配对。

[0142] miRNA和/或包含一个或多个miRNA的转基因可以在支架序列中提供或包含支架序列。如本文所使用,“支架”是指miRNA编码序列的部分,所述部分在成熟的双链体结构之外。例如,支架可以包含环和/或茎区域。因此,支架在产生、编码和/或表达本文所述的miRNA中是有用的。本文所述的组合物和方法中使用的支架可以是内源性和/或天然存在的miRNA支架的序列、从内源性和/或天然存在的miRNA支架中获得的序列、和/或来源于内源性和/或天然存在的miRNA支架的序列,所述内源性和/或天然存在的miRNA支架例如人miRNA。在一些实施方式中,在本文所述的组合物和方法中使用的支架序列可以是miRNA的内源性和/或天然存在的miRNA支架的序列、从miRNA的内源性和/或天然存在的miRNA支架中获得的序列、和/或来源于miRNA的内源性和/或天然存在的miRNA支架的序列,所述miRNA在一个或多

个NS和/或CNS疾病中过表达。

[0143] 在一个实施方式中,在本文所述的组合物和方法中使用的支架序列可以是miRNA的内源性和/或天然存在的miRNA支架的序列、从miRNA的内源性和/或天然存在的miRNA支架中获得的序列、和/或来源于miRNA的内源性和/或天然存在的miRNA支架的序列,所述miRNA在亨廷顿病中过表达。在亨廷顿病中过表达的示例性支架在本文的表24中描述。

[0144] 在一个实施方式中,在本文所述的组合物和方法中使用的支架序列可以是miRNA的内源性和/或天然存在的miRNA支架的序列、从miRNA的内源性和/或天然存在的miRNA支架中获得的序列、和/或来源于miRNA的内源性和/或天然存在的miRNA支架的序列,所述miRNA在亨廷顿病中过表达。

[0145] 在一个实施方式中,本文所述的载体中使用的miRNA选自表24。

miRNA 名称-位置	初级序列 (5'-->3')	SEQ ID NO:
miH12-451	>miH12-451 CUUGGGAAUGGCAAGGAAGGACUUGAGGGACUCGAAGACGAGUCCCUCAAGUCCUCUCUUGCUAUJACCCAGA	217
Hsa-mir-9-1	>hsa-mir-9-1 MI0000466 CGGGGUUGGUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGGUGUGGAGUCUUCAUAAAGCUAGAUAAACCGAA AGUAAAAUAACCCCA	218
hsa-mir-10b	>hsa-mir-10b MI0000267 CCAGAGGUUGUAACGUUGUCUAUUAUUAUACCCUGUAGAACCAGAAUUUGUGUGGUUAUCCGUUAUGUACACAGAUUCGAU UCUAGGGGAAUAUUGGUCGAUGCAAAAACUUA	219
hsa-mir-16-1	>hsa-mir-16-1 MI0000070 GUCAGCAGUGCCUAGCAGCAGUAAAUAUUGGCGUUAAGAUUCUAAAUAUUCUCCAGUAUUAAACUGUGCUGCUG AAGUAAGGUUGAC	220
hsa-mir-16-2	>hsa-mir-16-2 MI0000115 GUUCCACUCUAGCAGCAGUAAAUAUUGGCGUAGUAAAUAUUAUUAACACCAUAUUAUACUGUGCUGCUUUA GUGUGAC	221
hsa-mir-21	>hsa-mir-21 MI0000077 UGUCGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUUAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGACA	222
hsa-mir-27b	>hsa-mir-27b MI0000440 ACCUUCUAACAAGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAGAUUGGUUCCGCUUUGUUCACAGUGGCUAAGU	223

	UCUGCACCUGAAGAGAAGGUG	
hsa-mir-29a	>hsa-mir-29a MI0000087 AUGACUGAUUCUUUUGGUUUUCAGAGUCAUAUAUUUUUCUAGCACCAUCUGAAAUCGGUUUAU	224
hsa-mir-30a	>hsa-mir-30a MI0000088 GCGACUGUAACAUCUCCGACUGGAAGCUGUGAAGCCACAGAUAGGCUUUUCAGUCGGAUUUUUCAGCUGC	225
hsa-mir-92a-1	>hsa-mir-92a-1 MI0000093 CUUUCUACACAGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCUGUGUUUCUGUAUUGGUUUGCAGCUUUGCCCGGCCUGUUGAGU UUGG	226
hsa-mir-92a-2	>hsa-mir-92a-2 MI0000094 UCAUCCUGGGUGGGGAUUUUGUCAUCAUCCUGGGUGGGGAUUUUGUCAUUAUUGUUCUAUUAAGUAU UGCACUUGUCCCGGCCUGUGGAAGA	227
hsa-mir-100	>hsa-mir-100 MI0000102 CCUGUUGCCACAAACCCGUAAGUCCGAACUUGGGUAUUAGUCCGCACAAGCUUGUAUCUAUAGGUUAUGUGUCUG UUAGG	228
hsa-mir-122	>hsa-mir-122 MI0000442 CCUUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUUUUGUGUCUAAACUAUCAAACGCCAUUAUCACACUAAAAGCUA CUGCUAGGC	229
Hsa-miR-124-1	>hsa-mir-124-1 MI0000443 AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAAUGUCCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGA AUGGGGUCUG	230
hsa-mir-124-2	>hsa-mir-124-2 MI0000444 AUCAGAUUAGAGGCUCUCUCUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAUGUCAUACAUAUUAAGGCACGCGGUGA AUGCCAAGAGCGGAGCCUACGGCUGCACUUGAA	231
hsa-mir-124-3	>hsa-mir-124-3 MI0000445 UGAGGGCCCCUCUGCGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAUGUCAUACAUAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGA GAGGCGCCUCC	232
hsa-mir-128-1	>hsa-mir-128-1 MI0000447 UGAGCUGUUGGAUUCGGGCGGUAACACUCUGUGAGAGGUUUACAUUUCUACAGUGAACCGGUCUUUUUUCAGC UGCUUC	233
hsa-mir-135b	>hsa-mir-135b MI0000810 CACUCUGCUGUGGCCUAUGGCUUUUAUUAUCCUAUGUAUUGCUGUCCCAAACUAUGUAGGGCUAAAAGCCAUGGGC UACAGUGAGGGGCGAGCUC	234
hsa-mir-140	>hsa-mir-140 MI0000456 UGUGUCUCUCUCUGUGUCCGCCAGUGGUUUUUAUCCUAUGGUAGGUUACGUCUAGCUGUUCUACACAGGGUAGAAC CACGGACAGGAUACCGGGCACC	235
hsa-mir-151b	>hsa-mir-151b MI0003772 ACCUCUGAUGUGCAGUCUCUCUUAGGGUCUCCGAGACACAGAAACAGACACCUGCCUCGAGGAGCUCACAGUCU AGACAAACAACCCAGGGU	236
hsa-mir-155	>hsa-mir-155 MI0000681 CUGUUAUUGCUAAUCGUAUAGGGUUUUUGCCUCCACUGACUCCUAUAUUAAGCAUUAACAG	237
hsa-mir-184	>hsa-mir-184 MI0000481 CCAGUCACGUCCCUUAUCACUUUCCAGCCAGCUUUUGACUGUAAGUGUUGGACGGAGAUCUGAUUAGGGUAGG UGAUUGA	238
hsa-mir-196a-1	>hsa-mir-196a-1 MI0000238 GUGAAUUAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGGCCUGGGUUUCUGAACACACAACAUUAACCACCCGAUUCAC	239
hsa-mir-196a-2	>hsa-mir-196a-2 MI0000279 UGCUCGCUCAGCUGAUCUGGGCUUAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGGAUUGAGUUUUGAACUCGGCAACAAGAAA CUGCCUGAGUUAUCAUCAGUCGGUUUUCGUCGAG GGC	240
hsa-mir-196b	>hsa-mir-196b MI0001150 ACUGGUCGGUGAUUUAGGUAGUUUCUGUUGUUGGGAUCCACCUUUCUCUCGACAGCAGACACUGCCUUCAUUAC UUCAG UUG	241
hsa-mir-200a	>hsa-mir-200a MI0000737 CCGGCCCCUGUGAGCAUCUACCGGACAGUCUGGAUUUCCAGCUUGACUCUACACUGUCUGGUAACGAUUGU	242

成而进行合成的。分离的核酸是容易地通过本领域众所周知的重组DNA技术进行操作的核酸。因此,在其中的5'和3'限制性位点已知或其聚合酶链式反应(PCR)引物序列已经公开的载体中含有的核苷酸序列被认为是分离的,但在其自然宿主中以其天然状态存在的核酸序列不是。分离的核酸可以是基本上纯化的,但不必须是。例如,在克隆或表达载体内分离的核酸不是纯的,因为它可能只包含其所居细胞中的极小百分比的物质。然而,这样的核酸是分离的,正如本文所使用的术语,因为它可容易地通过本领域普通技术人员已知的标准技术进行操作。如在本文中对蛋白质或肽所使用,术语“分离的”是指从其自然环境中分离的或人工生产(例如,通过化学合成,通过重组DNA技术等)的蛋白质或肽。

[0147] 本领域技术人员还将认识到,可以进行保守氨基酸取代,以提供功能等同的变体,或衣壳蛋白的同源物。在一些方面,本公开包括导致保守氨基酸取代的序列改变。如本文所使用,保守氨基酸取代是指不改变在其中进行了氨基酸取代的蛋白质的相对电荷或大小特征的氨基酸取代。可以根据本领域普通技术人员已知的改变多肽序列的方法来制备变体,例如在编写此类方法的参考文献中找到的方法,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook等编,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989,或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等编,John Wiley&Sons,Inc.New York。氨基酸的保守取代包括在以下组内的氨基酸之间进行的取代:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;和(g)E、D。因此,可以对本文所公开的蛋白质和多肽的氨基酸序列进行保守氨基酸取代。

[0148] 本发明的分离的核酸可以是重组腺相关病毒(AAV)载体(rAAV载体)。在一些实施方式中,如本公开所描述的分离的核酸包含含有第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体的区域(例如第一区域)。分离的核酸(例如,重组AAV载体)可被包装在衣壳蛋白内,并向受试者施用和/或递送至所选的靶标细胞。“重组AAV(rAAV)载体”通常至少由转基因及其调控序列、以及5'和3'AAV反向末端重复(ITR)组成。如本文其它地方所公开,转基因可包含一个或多个编码一个或多个抑制性RNA(例如miRNA)的区域,所述抑制性RNA包含靶向受试者的内源性mRNA的核酸。如本公开其它地方所述,转基因还可以包含编码例如蛋白质和/或表达控制序列(例如poly-A尾)的区域。

[0149] 一般来说,ITR序列的长度为约145bp。优选地,在分子中使用基本上整个的编码ITR的序列,尽管允许对这些序列进行一定程度的轻微修饰。修饰这些ITR序列的能力属于本领域的技术范畴。(参见例如以下文章:如Sambrook等,“Molecular Cloning.A Laboratory Manual”,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(1989);和K.Fisher等,J Virol.,70:520532(1996))。在本发明中应用的此类分子的例子是含有转基因的“顺式作用(cis-acting)”质粒,在其中所选的转基因序列和相关的调控元件侧接有5'和3'AAV ITR序列。AAV ITR序列可以从任何已知的AAV中获得,包括目前确定的哺乳动物AAV型。在一些实施方式中,分离的核酸(例如,rAAV载体)包含具有选自于AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11及其变体的血清型的至少一个ITR。在一些实施方式中,分离的核酸包含编码AAV2 ITR的区域(例如,第一区域)。

[0150] 在一些实施方式中,分离的核酸进一步包含含有第二AAV ITR的区域(例如,第二区域、第三区域、第四区域等)。在一些实施方式中,第二AAV ITR具有选自于AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11及其变体的血清型。在一些实

施方式中,第二ITR是缺乏功能性末端解析位点(TRS)的突变ITR。术语“缺乏末端解析位点”可以指包含废除了ITR的末端解析位点(TRS)的功能的突变(例如有义突变,如非同义突变,或错义突变)的AAV ITR,或指缺乏编码功能性TRS的核酸序列的截短AAV ITR(例如,ATRS ITR)。在不希望受到任何特定理论约束的情况下,包含缺乏功能性TRS的ITR的rAAV载体产生自互补的rAAV载体,例如由McCarthy(2008) *Molecular Therapy* 16(10):1648-1656所述。

[0151] 除了以上为重组AAV载体确定的主要元件以外,所述载体还包含常规控制元件,该控制元件以允许其在用所述载体转染或用本发明产生的病毒感染的细胞中转录、翻译和/或表达的方式与转基因的元件可操作地连接。如本文所使用,“可操作地连接”的序列包括与感兴趣的基因相邻的表达控制序列以及以反式或远距离作用来控制感兴趣的基因的表达控制序列。表达控制序列包括:合适的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA处理信号(例如剪接和聚腺苷酸化(polyA)信号;使细胞质mRNA稳定的序列;提高翻译效率的序列(即Kozak共有序列);提高蛋白质稳定性的序列;以及当期望时,提高编码产物的分泌的序列。一些表达控制序列(包括天然的、组成性的、可诱导的和/或组织特异性的启动子)是本领域已知的,并且可以被使用。

[0152] 如本文所使用,当核酸序列(例如编码序列)和调控序列以使得核酸序列的表达或转录处于调控序列的影响或控制之下的方式共价连接时,它们可以被称为可操作地连接。如果期望核酸序列被翻译成功能性蛋白质,如果5'调控序列中的启动子的诱导使得编码序列转录,并且如果两个DNA序列之间的连接的性质不会(1)导致引入移码突变,(2)干扰启动子区指导编码序列转录的能力,或(3)干扰相应的RNA转录本被翻译成蛋白质的能力,那么所述两个DNA序列被称为可操作地连接。因此,如果启动子区能够影响该DNA序列的转录,使得产生的转录本可能被翻译成所期望的蛋白质或多肽,则启动子区将可操作地连接至核酸序列。相似地,当两个以上的编码区以使得它们从共同的启动子转录的结果是表达已经在框内翻译的两个以上的蛋白质时,所述两个以上的编码区是可操作地连接的。在一些实施方式中,可操作地连接的编码序列产生融合蛋白。在一些实施方式中,可操作地连接的编码序列产生功能性RNA(例如,miRNA)。

[0153] 在一些方面,本公开提供了包含转基因的分离的核酸,其中,所述转基因包含编码一个或多个microRNA(例如miRNA)的核酸序列。

[0154] 应当理解的是,分离的核酸或载体(例如,rAAV载体)在一些实施方式中包含编码多于一个(例如,多个,例如2、3、4、5、10个或更多)的miRNA的核酸序列。在一些实施方式中,所述多于一个的miRNA中的每一个都靶向(例如,杂交或特异性结合至)相同的靶标基因(例如,编码三个独特的miRNA的分离的核酸,其中每个miRNA靶向HTT基因)。在一些实施方式中,所述多于一个的miRNA中的每一个都靶向(例如,杂交或特异性结合至)不同的靶标基因。

[0155] 在一些方面,本公开提供了编码一个或多个人工miRNA的分离的核酸和载体(例如,rAAV载体)。如本文所使用,“人工miRNA”或“amiRNA”是指内源性pri-miRNA或pre-miRNA(例如,miRNA骨架,其是能够产生功能性成熟miRNA的前体miRNA),其中miRNA和miRNA*(例如,miRNA双链体的过客链)序列已用相应的amiRNA/amiRNA*序列进行替代,所述amiRNA/amiRNA*序列引导所靶向基因的高效RNA沉默,例如由Eamens等(2014), *Methods*

Mol. Biol. 1062:211-224所述。例如,在一些实施方式中,人工miRNA包含miR-155pri-miRNA骨架,向其中插入了编码成熟HTT特异性miRNA的序列(例如SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任何一个)以替代内源性miR-155成熟miRNA编码序列。在一些实施方式中,由本公开所述的miRNA(例如,人工miRNA)包含miR-155骨架序列、miR-30骨架序列、mir-64骨架序列或miR-122骨架序列。

[0156] 包含转基因的区域(例如,第二区域、第三区域、第四区域等)可以定位在分离的核酸的任何合适的位置。所述区域可以定位在所述核酸的任何非翻译部分,包括例如内含子、5'或3'非翻译区等。

[0157] 在一些情况下,可能期望将所述区域(例如第二区域、第三区域、第四区域等)定位在编码蛋白质的核酸序列(例如蛋白质编码序列)的第一个密码子的上游。例如,所述区域可以定位在蛋白质编码序列的第一个密码子到第一个密码子上游2000个核苷酸之间。所述区域可以定位在蛋白质编码序列的第一个密码子到第一个密码子上游1000个核苷酸之间。所述区域可以定位在蛋白质编码序列的第一个密码子到第一个密码子上游500个核苷酸之间。所述区域可以定位在蛋白质编码序列的第一个密码子到第一个密码子上游250个核苷酸之间。所述区域可以定位在蛋白质编码序列的第一个密码子到第一个密码子上游150个核苷酸之间。在一些情况下(例如,当转基因缺乏蛋白质编码序列时),可能期望将所述区域(例如,第二区域、第三区域、第四区域等)定位在转基因的poly-A尾的上游。例如,所述区域可以定位在poly-A尾的第一个碱基和第一个碱基上游的2000个核苷酸之间。所述区域可以定位在poly-A尾的第一个碱基和第一个碱基上游的1000个核苷酸之间。所述区域可以定位在poly-A尾的第一个碱基和第一个碱基上游的500个核苷酸之间。所述区域可以定位在poly-A尾的第一个碱基和第一个碱基上游的250个核苷酸之间。所述区域可以定位在poly-A尾的第一个碱基和第一个碱基上游的150个核苷酸之间。所述区域可以定位在poly-A尾的第一个碱基和第一个碱基上游的100个核苷酸之间。所述区域可以定位在poly-A尾的第一个碱基和第一个碱基上游的50个核苷酸之间。所述区域可以定位在poly-A尾的第一个碱基和第一个碱基上游的20个核苷酸之间。在一些实施方式中,所述区域定位在启动子序列的最后一个核苷酸碱基和poly-A尾序列的第一个核苷酸碱基之间。

[0158] 在一些情况下,所述区域可以定位在转基因的poly-A尾的最后一个碱基的下游。所述区域可以在poly-A尾的最后一个碱基和最后一个碱基下游的2000个核苷酸的位置之间。所述区域可以在poly-A尾的最后一个碱基和最后一个碱基下游的1000个核苷酸的位置之间。所述区域可以在poly-A尾的最后一个碱基和最后一个碱基下游的500个核苷酸的位置之间。所述区域可以在poly-A尾的最后一个碱基和最后一个碱基下游的250个核苷酸的位置之间。所述区域可以在poly-A尾的最后一个碱基和最后一个碱基下游的150个核苷酸的位置之间。

[0159] 应当理解的是,在转基因编码多于一个miRNA的情况下,每个miRNA可以定位在转基因内的任何合适的位置。例如,编码第一miRNA的核酸可以定位在转基因的内含子中,并且编码第二miRNA的核酸序列可以定位在另一个非翻译区中(例如,在蛋白质编码序列的最后一个密码子和转基因的poly-A尾的第一个碱基之间)。

[0160] 启动子

[0161] 在一些实施方式中,所述转基因进一步包含编码一个或多个表达控制序列(例如,启动子等)的核酸序列。表达控制序列包括:适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA处理信号(例如剪接和聚腺苷酸化(polyA)信号);使细胞质mRNA稳定的序列;提高翻译效率的序列(即Kozak共有序列);提高蛋白稳定性的序列;以及当期望时,提高编码产物的分泌的序列。大量的表达控制序列(包括天然的、组成性的、可诱导的和/或组织特异性的启动子)是本领域已知的,并且可以被使用。

[0162] “启动子”是指由细胞的合成的装置或引入的合成的装置识别并需要它以启动基因的特异性转录的DNA序列。短语“可操作地定位”、“在……控制下”或“在转录控制下”是指启动子相对于核酸处于正确的位置和方向,以控制RNA聚合酶的启动和基因的表达。

[0163] 对于编码蛋白质的核酸,一般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。在本公开中有用的rAAV构建体也可含有内含子,期望位于启动子/增强子序列和转基因之间。一个可能的内含子序列来自SV-40,并被称为SV-40T内含子序列。另一个可以使用的载体元件是内部核糖体进入位点(IRES)。IRES序列被用于从单个基因转录本产生多于一个的多肽。IRES序列将被用于产生含有多于一条多肽链的蛋白质。选择这些和其它常见的载体元件是常规的,并且很多这样的序列是可获得的[参见例如Sambrook等,以及其中引用的参考文献,例如,第3.183.26和16.1716.27页;以及Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,1989]。在一些实施方式中,口蹄疫病毒2A序列被包含在多聚蛋白中;这是一种小肽(长度为约18个氨基酸),其已被示出介导多聚蛋白的切割(Ryan,M D等,EMBO,1994;4:928-933;Mattion,N M等,J Virology,1996年11月;p.8124-8127;Furler,S等,Gene Therapy,2001;8:864-873;和Halpin,C等,The Plant Journal,1999;4:453-459)。2A序列的切割活性之前已经在人工系统(包括质粒和基因治疗载体(AAV和逆转录病毒))中得到证实(Ryan,M D等,EMBO,1994;4:928-933;Mattion,N M等,J Virology,1996年11月;p.8124-8127;Furler,S等,Gene Therapy,2001;8:864-873;以及Halpin,C等,The Plant Journal,1999;4:453-459;de Felipe,P等,Gene Therapy,1999;6:198-208;de Felipe,P等,Human Gene Therapy,2000;11:1921-1931;以及Klump,H等,Gene Therapy,2001;8:811-817)。

[0164] 组成性启动子的例子包括但不限于逆转录病毒劳氏肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地与RSV增强子一起)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地与CMV增强子一起)[参见例如Boshart等,Cell,41:521-530(1985)]、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、以及EF1 α 启动子[Invitrogen]。在一些实施方式中,启动子是增强的鸡 β -肌动蛋白启动子。在一些实施方式中,启动子是U6启动子。在一些实施方式中,启动子是人synapsin(hSYN)启动子。在一些实施方式中,启动子是GFA2启动子。

[0165] 在一个实施方式中,所述启动子是CAG启动子。在一个实施方式中,所述CAG启动子具有SEQ ID NO:193的序列。在一些实施方式中,所述CAG启动子包含与SEQ ID NO:193中的任何一个至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列,或由与SEQ ID NO:193中的任何一个至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列组成。CAG启动子能够驱动例如与其可操作地连接的转基因在靶标神经元和星形胶质细胞中的表达。

gactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatattggagttccgcgttacataact
tacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccat
agtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactgccacttggcagtaca
tcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccaa
gtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgtattaccatgg**tcgaggt**
gagccccacgttctgtcttcactctccccatctccccccctccccaccccaaatttttgtattttat
attatttttgtgcagcga**tg**ggggg**g**ggggggggggggggg**gcgcgcgcagggcggggcggggcggggcggggcgg**
ggcggggcggagggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgcctccgaaagtttcctttatggcgagg
cggcggcggcggcggccctataaaaagogaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgcgctgccttcgccccgtg
ccccgtccgcccgcgctcgcgccgcccgcctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcggggcgg
gacggcccttctcctccgggtgtaattagcgttggtttaatgacggcttgtttctttctgtggtgcgtgaa
agccttgagggctccgggagggccctttgtcgggggagcggctcgggggtcgtgctgtgtgtgcgtg
gggagcgcgcgtgcggctccgcgtgcccggcggctgtgagcgcgtcggggcggcggcggggcctttgtgcgctc
cgcagtgtcgcgaggggagcgcggcggggggcgtgcccgcgggtcggggggggctgcgaggggaacaaaggc
tgcgtcgggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggggtgtgggcgcgtcggcgggctgcaacccccctgcac
ccccctccccaggttgcgtgagcagcccggttcgggtcggggctccgtacggggcgtggcgcggggctcgcc
gtgcggggcgggggtggcggcaggtgggggtgcggggcggggcggggcggcctcgggcccgggagggctcgggg
gaggggcgcggcggccccggagcgcggcggcgtgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgcctttatggtaa
tcgtgcgagagggcgcagggacttctttgtcccaatctgtcggagccgaaatctgggagggcgcggccgccc
ccctctagcgggcgggggcaagcgtgcccgcggcaggaaggaatggggggggagggccttcgtgcgtcg
ccgcgcgcgcctccccttctcctctccagcctcggggctgtccgcgggggaaggctgccttcgggggggacgg
ggcagggcgggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagag (SEQ ID NO: 193)

- [0166] 下划线文本(例如,SEQ ID NO:193的453bp-819bp)表示CMV增强子。
- [0167] 粗体、斜体文本(例如,SEQ ID NO:193的821bp-1094bp)表示ACTB近端启动子。
- [0168] 双下划线文本(例如,SEQ ID NO:193的1191bp-2065bp)表示ACTB内含子。
- [0169] 诱导型启动子允许对基因表达进行调控,并且可由外源性供应的化合物、环境因素(例如温度)或特定生理状态(如急性期、细胞的特定分化状态、或在仅复制中的细胞中)的存在进行调控。诱导性启动子和诱导系统可从各种商业来源获得,所述商业来源包括但不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。已经描述了许多其它系统,并且本领域技术人员可以容易地进行选择。由外源性供应的启动子调控的诱导性启动子的例子包括锌诱导的绵羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)诱导的小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO 98/10088);蜕皮激素昆虫启动子(No等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,93:3346-3351(1996))、四环素阻遏系统(Gossen等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551(1992))、四环素诱导系统(Gossen等,Science,268:1766-1769(1995)),还参见Harvey等,Curr.Opin.Chem.Biol.,2:512-518(1998))、RU486诱导系统(Wang等,Nat.Biotech.,15:239-243(1997)和Wang等,Gene Ther.,4:432-441(1997))、以及雷帕霉素诱导系统(Magari等,J.Clin.Invest.,100:2865-2872(1997))。可能在这种情况下有用的其它类型的诱导性启动子是那些由特定的生理状态(例如温度、急性期、细胞的特定分化状态、或仅在复制中的细胞中)调控的诱导性启动子。
- [0170] 在另一个实施方式中,将使用所述转基因的天然启动子。当期望转基因的表达应模仿天然表达时,天然启动子可能是优选的。当转基因的表达必须在时间上或发育上进行

调控、或以组织特异性的方式、或响应于特定的转录刺激时,可使用天然启动子。在进一步的实施方式中,也可使用其它天然表达控制元件(例如增强子元件、聚腺苷酸化位点或Kozak共有序列)以模仿天然表达。

[0171] 在一些实施方式中,调控序列赋予组织特异性的基因表达能力。在一些情况下,组织特异性的调控序列与以组织特异性的方式诱导转录的组织特异性的转录因子结合。此类组织特异性的调控序列(例如启动子、增强子等)是本领域内众所周知的。示例性的组织特异性的调控序列包括但不限于以下组织特异性启动子:肝特异性的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、生长抑素启动子、胰多肽(PPY)启动子、synapsin-1(Syn)启动子、肌酸激酶(MCK)启动子、哺乳动物结蛋白(mammalian desmin, 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。其它示例性启动子包括 β -肌动蛋白启动子;乙肝病毒核心启动子, Sandig等, *Gene Ther.*, 3:1002-9 (1996); 甲胎蛋白(AFP)启动子, Arbuthnot等, *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14(1996); 骨钙素启动子(Stein等, *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96(1997)); 骨涎蛋白启动子(Chen等, *J. Bone Miner. Res.*, 11:654-64(1996)); CD2启动子(Hansal等, *J. Immunol.*, 161:1063-8(1998)); 免疫球蛋白重链启动子; T细胞受体 α -链启动子; 神经元启动子, 例如神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen等, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15(1993)), 神经丝轻链基因启动子(Piccioli等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5(1991)), 以及神经元特异性的vgf基因启动子(Piccioli等, *Neuron*, 15:373-84(1995)), 以及对于熟练技术人员来说显而易见的其它启动子。考虑用于本方法和组合物的NS特异性启动子还包括在2020年9月4日提交的专利申请GB2013940.8和2020年4月20日提交的专利申请GB2005732.9中描述的启动子, 将所述专利申请通过引用的方式以其整体并入本文。在一些实施方式中, NS特异性启动子是表10的启动子, 或与表10的启动子具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%同一性的启动子。在一些实施方式中, NS特异性启动子是表10的启动子, 或与表10的启动子具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%的同一性并保留表10的启动子的NS特异性启动子活性的启动子。

[0172] 考虑用于本方法和组合物的CNS特异性启动子还包括在2021年4月19日提交的国际专利申请PCT/GB2021/050939中描述的启动子, 将其内容通过引用以其整体并入本文。在一些实施方式中, CNS特异性启动子是表11-表13的启动子, 或与表11-表13的启动子具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%同一性的启动子。在一些实施方式中, CNS特异性启动子是表11-表13的启动子, 或与表11-表13的启动子具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%同一性并保留表11-表13的启动子的CNS特异性启动子活性的启动子。

[0173] 在一些实施方式中, 所述核酸包含一个或多个CRE。在一些实施方式中, 所述核酸包含一个或多个NS特异性CRE或CNS特异性CRE。在一些实施方式中, 所述核酸包含表13-表15的一个或多个CRE, 或与表13-表15的CRE具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%同一性的CRE。在一些实施方式中, 所述CRE是表13-表15的CRE, 或与表13-表15的CRE具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%同一性并保留表13-表15的CRE的活性的CRE。

[0174] 在一些实施方式中, 所述CRE可以包含本领域中已知的一个或多个CRE。例如, 在一

个实施方式中,所述一个或多个CRE可以选自2020年9月4日提交的专利申请GB2013940.8中的SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38。例如,在一个实施方式中,所述一个或多个CRE可以选自:来自WO 2019/199867A1的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:8,来自WO 2020/076614A1的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:7,和来自WO 2020/097121的SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:177-SEQ ID NO:178、SEQ ID NO:188。将前述参考文献通过引用以其整体并入本文。

[0175] 表10-NS特异性启动子

名称	序列	长度
SP0013 (SEQ ID NO: 74)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTGCGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGTGTGTGGCGCCACCGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTTCAGCCTGTGCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCAGAAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGAGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACCCACCGACCCGTCACCCACCGAACAAGGGGACCCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGACCCGCTCCTGCCTCTGTCAGTCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGCAGATCCACGGTTCCTGGCGGGGCGGGCGGGTCCGCCCCCTCCCCCTCCCCGCCCCCTCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTGTGGAAACTCCCGA	795
SP0014 (SEQ ID NO: 75)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTGCGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGTGTGTGGCGCCACCGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTTCAGCCTGTGCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCAGAAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGATGCGGCGAGGCGGTGCGCACTGCCAGCTTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCGCTTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGGCTGACGTCACTGCGGTTCCCCGCAAACCTCCCCCTCCCCGGCCACCTTGGTTCGCGTCCGCGCCGCGCCGGCCAGCCGGACCGCACCGGAGGCGGAGATAGGGGGGACGGGCGCGACCACTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCTGCTGAGAGCGCAG	810
SP0026 (SEQ ID NO: 76)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTGCGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGTGTGTGGCGCCACCGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTTCAGCCTGTGCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCAGAAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGAAG	916

	CGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGGCGCGTCACAGCCGCGCTATTC TCAGCGTCTCTCCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAGCTGGGGTTGCTGGCAGCCTGGC TGGCACTGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACCCACCGACCCGTC ACCCACCGACCAAGGGGCACCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGACCCGCCCTC CTGCCCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCCT AAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGGCGATCCCACGGTTCCCG GCGGGGCGGGGCCCGGTGCGCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGT GCATTGTGGGAAACTCCCCGA	
SP0027 (SEQ ID NO: 77)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGA GCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGAC CTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGA CTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGC ACCCACGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTTAGCAGGGGGCTTGCATT GCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGG GCTGCCCTTGTGTGTGGCGCCACCGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTAGCCTG TGCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGG GAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCAGAAAGTCCAAGGACACAATGGGTGAGGGGAAG CGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGGCGCGTCACAGCCGCGCTATTC TCAGCGTCTCTCCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAGCTGGGGTTGCTGGCAGCCTGGC TGGCACTTGGCGGAGGGCGGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCC TTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGA CGTCACTCGCCGGTCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTTCGCGTCCGC GCCCGCCCGGGCCAGCCGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGACCGG GCGGACCATCTGCGCTGCGCGCCGCGGCACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGG GCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCTGAGAGCGCAG	931
SP0030 (SEQ ID NO: 78)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGA GCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGAC CTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGA CTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGC ACCCACGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTTAGCAGGGGGCTTGCATT GCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAAGCAGCACGGGCTAGGCCTG CGACCCACCCACCGACCCCTCACCCACCGACCCGTACCCACCGACCAAGGGGCA CCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGACCCGCCCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAG ATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCCTAAGTTTCTACCCCTGGATC TAAGCGGAGCTGGGTTTGGCGATCCCACGGTTCCCGGGGGGCGGGGCCCGGTGCG CCCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTGTGGGAAACTCCCCG A	617
SP0031 (SEQ ID NO: 79)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGA GCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGAC CTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGA CTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGC ACCCACGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTTAGCAGGGGGCTTGCATT GCACCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAAGCAGCACTGCGGCGAGGCG CGTGGCACTGCCAGCTTACGACCCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGC GCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGCTCACTCGCCGGTCCCCC GCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTTCGCGTCCGCGCCGCGCGGCCAGCCG GACCGCACCGGAGGCGGAGATAGGGGGGACGGGCGGACCATCTGCGCTGC GGCGCCGGGCACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGACGCGGAGGAGTCTGTC GTGCCCTGAGAGCGCAG	632
SP0032 (SEQ ID NO: 80)	TTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAAGCCCTGACCCC ATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAGTTC TCATTGCATCAATACTTGCAATTTGCTACAACAGAAGCTTTTGTCTCTTCTCACA TTCCCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAG CCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCCCTTGTGGGAGAAAACAATGTT GCTGCCAGGCCTTTCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCTGACCAGCCCCAGCAAG GCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGTGAATGGATGAAGG GAGAAGGGACATCCAAGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACCCAC CGACCCGTACCCACCGACCAAGGGGCACCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGG ACCCGCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTC TCGGACCCCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGGCGATCCCA CGTTTCCCGGCGGGGCGGGGCCCGGTGCGCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCC	701

	GGGAGCAGTGCATTGTGGGAAACTCCCGA	
SP0033 (SEQ ID NO: 81)	TTCAGAGGTCCGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGACCCC ATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAGTTC TCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTGTCTCTTCCCTACA TTCCCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAG CCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGAAAACAATGTT GCTGCCCAGGCCTTTCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCTGACCAGCCCCAGCAAG GCCCGGGCTGGCTGCCTAGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGTGAATGGATGAAGG GAGAAGGGACATCCAATGCGGCGAGGCGCGTGCACCTGCCAGCTTACGACCCGCG GACAGTGCCTTCGCCCCGCTGGCGGCGCGCCACC GCCCGCCTCAGCACTGAAG GCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGT CGCGTCCGCGCCGCGCCGCGCCAGCCGGACCGCACCGCGAGGGCGCGAGATAGG GGGGACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGGACTCAGCGCTGCCTCAGT CTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	716
SP0019 (SEQ ID NO: 82)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTGCTTTG ACAAGGTTTGTTCAGAGGTCCGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAG CCCTGACCCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGG CAGTGAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCT CTTCCCTCACATTCCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCA CTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGA AAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTTTCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCTGACCAG CCCCAGCAAGGCCCGGGCTGGCTGCCTAGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGTGAA TGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGAAGTGAAGAAGATCTTAACAGAAGGGCT AGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACCCACCGACCCGTACCCACCGACCA AGGGGCACCCCTGGCTTAGAGGGGATGCTGAGCGGGACCCGCTCCTGCCTCTGGCA GTCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCTAAGTTTCTACCC CTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGCAGTCCCACGGTTCGCGGGGGGGGGGGC CCGGTCCGCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTGTGGGAA ACTCCCGA	792
SP0020 (SEQ ID NO: 83)	CTTCTCTTATATTTACCAAGACTCAGTTCCTGAGCAAGAAACCACAGGCACAGC AAGTGCCATGAAAAGCGGCTTTGTGTGGGGTGGGCTCTTCAACTCCAATCTCCAC TTCTTCTCAAGGCCTCAAAAAAGTTGAAAATGAAAACAAAAGCCCTGCTGTGT TGAGCTGGGCTCTGGCGTTGCCATGGACCCAGGGCAAACAGCGGTGCTCCTGCTCT GCCCCGGCTCAGCTCATGCTGGGCTGCACCTTCTGGAAGGGAGCATGGACTTTGG AATGACTGGTTAGAACCCTAATGAATTAATGGAATTTGACATAGTTCAAAAATAAT AAAATGTGATACCCATGAAATGCTGATATTCTGCCTTAATTTGCCAGATTGGGGGC CGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACCCACCGACCCGTACCCAC CGACCAAGGGGCACCCCTGGCTTAGAGGGGATGCTGAGCGGGACCCGCTCCTGCCT CTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCTAAGTTT CTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGCAGTCCCACGGTTCGCGGGGGGG CGGGGCCCGGTGCGCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTG TGGGAAACTCCCGA	686
SP0021 (SEQ ID NO: 84)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTGCTTTG ACAAGGTTTGTTCAGAGGTCCGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAG CCCTGACCCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGG CAGTGAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCT CTTCTCACATTCCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCA CTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGA AAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTTTCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCTGACCAG CCCCAGCAAGGCCCGGGCTGGCTGCCTAGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGTGAA TGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGAAGTGAAGAAGATCTTAACAGAATGCGG CGAGGCGCGTGCACCTGCCAGCTTACGACCCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCGCC TGGCGGCGCGGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCG GTCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGTTCGCTCCGCGCCGCGCCGGC CCAGCCGGACCGCACCGCGAGGCGCGAGATAGGGGGCACGGGCGCGACCATCT GCGCTGCGGCGCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAG TCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	807
SP0022 (SEQ ID NO: 85)	CTTCTCTTATATTTACCAAGACTCAGTTCCTGAGCAAGAAACCACAGGCACAGC AAGTGCCATGAAAAGCGGCTTTGTGTGGGGTGGGCTCTTCAACTCCAATCTCCAC TTCTTCTCAAGGCCTCAAAAAAGTTGAAAATGAAAACAAAAGCCCTGCTGTGT	701

	TGAGCTGGGCTCTGGCGTTGCCATGGACCCAGGGCAAACAGCGGTGCTCCTGCTCT GCCCCGGCTCAGCTCATGCTGGGCTGCACCTTCTGGAAGGGAGCATGGACTTTGG AATGACTGGTTAGAACCCAAATGAATTAATGGAATTTGACATAGTTCAAAAATAAT AAAATGTGATACCCATGAAATGCTGATATTCTGCCTTAATTTGCCAGATTGGGGGC CTGCGGCGAGGGCGGTGCGCACTGCCAGCTTACGACCCGCGGACAGTGCCTTCGCC CCCCCTGGCGGCGCGGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTAC TCGCCGGTCCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCC GCCGCCAGCCGGACCCACCCACCGGAGGGCGGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGA CCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCG GAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	
SP0028 (SEQ ID NO: 86)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCTTTG ACAAGGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAG CCCTGACCCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGG CAGTGAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCT CTTCCTCACATTCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCA CTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACCCGTCTTTGTGGGAGA AAACAATGTTGCTGCCAGGCTTTCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCTGACCAG CCCCAGCAAGGCCCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGTGAA TGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGACTGAAGAAGATCTTAACAGAAAGCGC GCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGGCGCGTCACAGCCGCGCTATTCTCA GCGTCTCTCCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAGCTGGGGTTGCTGGCAGCCTGGCTGG CACTGGGCTAGGCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACCCACCGACCCGTCAAC CACCGACCAAGGGGCACCCCTGGCTTAGAGGGGATGCTGAGCGGACCCGCTCCTG CCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCCTAAG TTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGGCGATCCCACGGTTCCCGGCG GGGCGGGGCCCGGTCCGCCCTCCCTTCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCA TTGTGGGAAACTCCCGA	913
SP0029 (SEQ ID NO: 87)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCTTTG ACAAGGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAG CCCTGACCCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGG CAGTGAGTTCTCATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCT CTTCCTCACATTCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCA CTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACCCGTCTTTGTGGGAGA AAACAATGTTGCTGCCAGGCTTTCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCTGACCAG CCCCAGCAAGGCCCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGTGAA TGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGACTGAAGAAGATCTTAACAGAAAGCGC GCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGGCGCGTCACAGCCGCGCTATTCTCA GCGTCTCTCCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAGCTGGGGTTGCTGGCAGCCTGGCTGG CACTTGGCGGAGGGCGGTGCGCACTGCCAGCTTACGACCCGCGGACAGTGCCTTC GCCCCGCTGGCGGCGCGGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGT CACTGCGCGGTCCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCC GCCGCCGGCCAGCCGGACCCACCCACCGGAGGGCGGAGATAGGGGGGCACGGGCG CGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCA CGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	928
SP0011 (SEQ ID NO: 88)	CTAGCCACAGGAAATGTCTGTCTATATCCAGGCAAGTACCTTGTCTATTGGACCA ACCCGAAACTGTTAGGGAAAGATCAGGGAAATCAACTCAGTTACAAATGGGATAAT CATGCCCAGTAAAACTACCTGTGGTGAATAAAGAGTTAACCCCTGTTCCATCTTA GGTCACTATGCAGAGTACCAATGAGTACAAGAGATGGTGCCAAAGAGGGTGGCCCC TCCCTAGCTGGGAACAGTCAACCTTAGGAACTAGACTGTCAACACATCAGCCAGC CAGAGACAAGGGAAACCGTGGCAACCAAGTGTGCTGGCACATTGTGAGGTGGTGA TGGGAACTGCAGAGGCCCTGCACAGCATGCTAATGAGCCAGGCAAACATGAGCTC TCCCATAGCTGGGCTGCGGCCAACCCACCCCTCAGGCTATGCCAGGGGGTGT TGCCAGGGGCACCCGGGCATCGCCAGTCTAGCCCACTCCTTCATAAAGCCCTCGCA TCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGC	529
SP0034 (SEQ ID NO: 89)	TCCAAAGAAAAGCCAGATAAGTAGCTGATTATTGCATAGAGCTGACAGTATCACAG GAAGATCAGTAGTAGCAGCTCAAGTACAAAAAGGTTAATTAGCAATACTTAATAAG AAAACTACCTCTGGCAGGTGAAGAGTTAATCCCTGGTCAATTTTAAAGCTACTCTG CTGAGAGTACTAATAAGTGTAGGGTTGGAGCCAATGAGGGTGACCCCTTCTTGA TGGGAACAGTCATCCCTTAGGAACTGCCCTGGAAAGCATCAGCCAGCCAGAAAACA GGGAAAGAGGCTGAGAAACCGTGGTAACCAAGTTTGTGGCACTTTGTAAAATGG TAACTGCAACTGCCGAGGCTGTGCAGAGAATGCTAATAAGCCTAGGACAACCTGTA	646

	AAGAGTGGACCTAGAAAATGTCCACCCGCTAGAGAGAGGGAGCGAGCATGTGCGAT GAGCAATAGCTGTGGACCTTACAGTTGCTGCTAACTGCCCTGGTGTGTGTGAGGGA GAGAGAGGGAGGGAGGGAGAGAGAGCGCGCTAGCGCGAGAGAGCGAGTGAGCAAGC GAGCAGAAAAGAGGTGGAGAGGGGGGAATAAGAAAGAGAGAGAAGGAAAGGAGAG AAGGCAGGAAGAAGGCAAGGGACGAGACAA	
SP0035 (SEQ ID NO: 90)	CTAGCCACAGGAAATGTCTGTCTATATCCAGGCAAGTACCTTGTCTATTGGACCA ACCCGAAACTGTTT CAGGGAAGATCAGGGAATCAACTCAGTTACAAATGGGATAAT CATGCCCAGTAAAACTACCTGTGGTGAATAAAGAGTTAACCCCTGTTCCATCTTA GGTCACTATGCAGAGTACCAATGAGTACAAGAGATGGTGCCAAAGAGGGTGGCCCC TCCCTAGCTGGGAACAGTCAACCCCTTAGGAAGTACTGTCAACACATCAGCCAGC CAGAGACAAGGGAAACCGTGGCAACCAAGTGTGGTGGCACATTGTGAGGTGGTGA TGGGAACTGCAGAGGCCCTGCACAGCATGCTAATGAGCCAGGCAACATCGTAG AGAGAGGGAGCGAGCATGTGCGATGAGCAATAGCTGTGGACCTTACAGTTGCTGCT AACTGCCCTGGTGTGTGTGAGGGAGAGAGAGGGAGGGAGGGAGAGAGAGCGCGCTA GCGCGAGAGAGCGAGTGAGCAAGCGAGCAGAAAAGAGGTGGAGAGGGGGGAATAA GAAAGAGAGAGAAGGAAAGGAGAGAAGGCAGGAAGAAGGCAAGGGACGAGACAA	614
CNS-1 (SEQ ID NO: 91)	CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGTGCTTCCCTGG GCGCCTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCCTGTCTGGGAGATGAG CATTTAGGAATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGGGAGGGCCGGGTGGAGGGCGCAT CCCCACGGGGAGATTGGATGGAATGGCCTGCCAGTGTGTGTGTGAGTGTGCGCCT GTGGCAGCAGCAGAGTAAACAGCCGCTGCCCTGTCTCTCTGCGGCCGTGGCCAGG TACACAGGCCTGTTTGGACAGCTGCCCTTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGATGCTGG CTGATAGATGGGGATGGGCGGACTGTTAACCCCTCGTTGCCCTGCACTGCTATGTGC TTCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGTAGCCAGAAGGTGGTCCCTGGCTGTGCCCC CAGCTCCTCTCTAGGGGGGAAACCTCTAGTTCTGAGTCAGGGACAGAGTGAGGAGG GCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGTCTCCTCCCCGCACCAGGGAGCCAAGGACAGAGGA GAAGGGGTCTTCCCCAGTGGTACTAGGGGCAGAATATGTCTCTGAGTGAGTGTCT TGGAGCCTCCTCACCCCAACCCATGGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCC ATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	696
CNS-2 (SEQ ID NO: 92)	GGTGTGTGGAAGGGTGAGAGGCACACACACAGACACTGAAAGAATCCTAGGCCTGG TAGGCCTTAAACAAATGTCTGTTACAGACCAGAATTTTATTGCTGTTAGAGACCCA AGCCCTCATAGGAACAGTGAGAAACAGGTGCAGAAAGGCGGAGTAACCTTTATCTA AAGTCATAGGCTCCCTGAATAGCAGAGCTGACACCTACAAGGAAGCGTTGGAGACC AGATCTACCAGCTAGCCTCCCTGAGACCACGAGGTGGCGCCGAGCACCCGGCTGTG GCCGATGCCAGCCAGGTAGCCGGTTTCCCAGCTCCCCGCACGCACGCACCTCTTT GCTGCAGGAATCCCAGGGTCCCCGACCTGGAGTAGGGGGGGTGGTGGTGGGACT GAGTCCCTAGAAGCCTGGACCCCTCACTTCGTTTCTGTACATCCAGCTCGCCTGTAG ACAGTGGGGGAGGATGAAGGGAAGAGGACTCAAGCGCAACTTTGAATCATCACGCC TTCGACAGTCCGCGCACGTTTATTTTATTATCTTTGAAAACGAGGGAGGGGAAGC CTGGAGAAGGGGGATGGGCCAAGGGTGGTGGCCCCGGGAGCTGGTCCCTGT TCCTGGCTTTAGTCCCAGGGGCGCGGTCTGTGTGTAGGGCGGGCTGGGCATAAAAG TCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	709
CNS-3 (SEQ ID NO: 93)	TGCTACCAGAGCCGGGAGAGCTGCTCGGAGACGCCTCCGGGGTGGGGCTGGACAT GAGCAGCGGCTGCCGGTCTGGGACTAGGCCCCGCCATTTTGGATCCGCTGACAGG TCAGCGAAGTCTCTTCTTAGAGTTCGGGTGTCGTGAAGGCCGCCCTGACATCGCAA TAGGGAATTAGTGGGAAGGGCCCTTAAATGGGCGAGCCAAGGTGGGGGAGGATT GGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGAGAAAATCGGCCGA AACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGGCGGCCCGTGGCCTTCC CACCTGGCGCCGATCCACTTTCCTCGGGGTAGCGGCCCAACCCACTTCGCTGCCAG CCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTCTACTCTCGCCCACTTGGCTCT GCCTAAGCGTCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGCCACGTGGGGAGGGGGCGCGGCCGA GTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGGCGGGGTCTTGGCGTCTCGCCGG CCAGACCCCTCCCTCAAAGGCGGGCCCTGGAGATCCACAGCTGGAAGGGCGGGAGC CCAGCAGGGCAGCTGGAAGGGGCGGGCCCTGACGCGCGCGGCTCGCCGCGGCGG GCTGGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAAGTGAATGGGCGCGGCTGGGGGTGGCAGT ACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCCGAGAGTCCAGGAGCGCC	
CNS-4 (SEQ ID NO: 94)	AAGGAGAATGGTAAACAGCAGGAGCGAAGCGGCTGAGGAGAAAAGAAGAGGAAAGAA AGGCGAGACGTGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGAGACGGACAGCGA CAAGTGGAGAAAATCGGCCAAACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCC GGCGGCCCGTGGCCTTCCCACCTGGCGCCGATCCACTTTCCTCGGGGTAGCGGC CCAACCCACTTCGCTGCCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTCT	

	<p>ACTCTCGCCCACTTGGCTCTGCCTAAGCGTCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGCCAC GTGGGAGGGGCGCGCCGAGTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGGCGG GGTCTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCCCTCCCTCAAAGGGGGGGCCTGGAGATCC ACAGCTGGAAAGGGCGGAGCCCCAGCAGGGCAGCTGGAAAGGGGGGGGGCCTGACG CGCGCGGCTCGCCGCGGGGGTGGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAGTGAATGGG CGCCGGCTGGGGGTGGCAGTACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCCGAGAGTCCAGGAG CGCCGAGCGGAGAGGGCGGCCCGGAGCAGGGGGGGCGGCCCCACTCCGGCCGGGT GCCGGCCCCCTGGCCCCCTGCCTGCCCTCTAGATCGCCGCGCGAGCCGCGCTACTG GGAGTCTG</p>	
<p>CNS-5 (SEQ ID NO: 95)</p>	<p>ttgtAATGGGAATAAGGGCAGGACtcttgggtataagtagctcagctgatcccacc ctgcttctatgtgtaattcatttattcattcattcaacaagcatttggtaaatg ctctttgtgtcaggctcagcaggaagcagtggaataaaaatggtgaacaagaaaga ctcggggtttcttcatctatgttgatgtctgcagagaacagtatcagccttctagg aagtttgtaatcagatacattgttagagagatacttatctagtaaattcctactca tcctataaggctcaaaacaaatgcctctatgaaaccttccgtgattccctcaggca gagttaagagcttcccttccctggcctctatctccttccattagattataactgt ttaccagtttcccctctagactaaatttctcaaaagagagaatgaggtctctttca gtcttcttggcatctttaaactagcctgggtcccagcctgtttgatgaaagaaaca agaacactgatacaagccacagccccttggcaaaaaagatacccaatagcaatggc aatgtaaaatcagtttttagtaaatgaatcaagaattctgatgctttaggaaagta atgtgaacctggcaccattaaacaaattcagaactcttcttcttaggagctctctaa ctgaacagacagagggatgtcaaccctaaattcagcttgatcgatctcagcaact acatttaatgagacagtgaggaaaaagagagctgtccacttttaaatcagcatattt ctaactaaacaatggcaatggctaaatctttaaagtgcctatttctctcaagaaca ctgcaatggaacattttagactttgggaaagagattagtgatttacattgctatctc actgatttaatttaaagtctcttccaaaccaaacacacatgtgccgaagaggctac taagaaacccaacatgcagagttctctataaagtgcagccgacagtggtgactgaaa ctaaacttgaaaatccaggcactaatgcacaatatcaagcaataaaaacggcatct cttggcaatatttaatttaaaaaagaagaagagacagggcgaagatcaggcactg tctgttttgaggatcaaccattctgcatttcaaagcattggctccctgcaatatcc aggttactgtgctagaatctcgactattatctgcagttgtgagagggaggggcaaa gatgtgttactcagtgattaggcccttagaataagcctctagctcctagagagac agctcaccacttattcatttggccaattcacaagcctaggaagattaacatcc atgctgagaagacaagcgaatgcagacgggtgaaaaagaaataaaaaattctttaaaa actctgagatgacttcattattttccacaaggaaactttaggaaagtgtttagtt agagaaaaaccacattgacctctctctaaacccttaattcttcttcttgggtggc actgcttggtaagcagctgctgcctcgccctcttctcactggaagctgag agaaaaagactctggagaaacagtttctgctccagggaacaaacccctgacact gttaaacatgagatgccaggaaaaacacacttaaaaaaaaaattcccacttaagct ttagactgaatgtgagaaggagatgataaaaagagatcacaaGAGAATCTTCAG GCTGTGGG</p>	<p>1744</p>
<p>CNS-6 (SEQ ID NO: 96)</p>	<p>TTTGGCACTGTGAGCAGTTTACTtgacaaattctgtcaaatatttgctttctgaaa tctcgagaattggttgaatataattgtaacttaattggttggcaaaaataaataaatg ggactaaggacgttctatcattaattgtcagaaaagagagttgtcatttctgaaa atthaatgtcattgaagctctattccaatagcaaaaggagcactattgctaataga cttcagagcttgaaataaataaatcttggaaatcctgttgcatctcttggggtgtg acatttgacagctcttttatagcacagaaacgaaacaagtttgtgagctggaattcaa ttgtggcgtattgattccttgcacagtcattattcctgctgattgacaggtgaa aattggttacgttaagtatttcataatggttatattggctgacatttgcctgctgct cttgtgtcaatattggttgaagatctccagctttatgagatagcaatagacactg actgtggcttttgtgtgatgtccagtggttttctgacataaatttaagacatatt aaaaaccagcagcatcttccctcttgagaagcttaatgccaatattattgtcttcc aggggaagatcatgtatgctcataatcgggtgctaatttccaccagtagcctcatg tttaggcattaggcactataactgtaaaattgagccttctgattgattcatgtca agcctcatctcggctcctgcaggggaagtcacccgctgacctttttacactaaa agaagagatttgtgttcttcttcttcaactggaacctcaaatgactgaataatc tgtaatacattagtgctgacatttgttagggagaattaaacaagacacagtaatca ttcccagaataaaaattgtgtttgatttccagcagagttctattaaggaggagac agaatctgtctctccaaggtgaaaaatcgtgaatattcctctgcatattgaacca agttaacactttaattgcttatagaaccgagttctccaatgacagcattaaaagat agggaggctctgatttaTGGTCAACACAGATTTGTACCC</p>	<p>1104</p>

<p>CNS-7 (SEQ ID NO: 97)</p>	<p>TCAACATGGATAACCAAAGTTCTtaaaactacgctttcaatgaacacatatccttt gagcaagactaataatgaggaatgggagccagctcctgtgatatttatgcaactac taaatctcactgaagtcaatgggagtttgcttacgtaagggtgcaaaccttagc ctccagagattaaaggggaaaaaatccttaaactctttcaacattaatattgcct gtaaggaatccagccatgacctaagccatggagctttctgaacctagcaagtagaa gggtaaacagtaaacaccagttatTTAAGCACAATCTAATCAGAGTTCAATGAGA AGCAATATTATTTGATCTCTAAGGTATTAATACTTGTATATCACTATTAGACAT CTTATGTAGTCCATTATCCAACAATGGCTTAAGTCTGTGGTATTTAATAAATCA AGTTTCCATGGCGTGTGACTGAGTGGGAGTGGGGATGAAGCCTTTTTTCTTCAAT TTTTTTCTCAGGTGCAATCTGTGTTAATAAAGAGAAGTGTGGCTCTCTCT CATAGCACTAAAAGTGTGATAATCCCTGTGTAAGAAATCAGTAAGTCTGCTGCT TAATCTAGTCCAGTGTGAACTGTTGACATTTGTTCTTTTTCTATCATTATGTG ACTGGGCTGTTTTGTGCTGGATTAGGCACAAATCTCCTATGCAGCACATTTGGCA TGTTACTAGTAGTTTAACTTCATTAATAATGTATGAAGAAAATGTAATCCATGACA AGGAAGCAAAGAAAAGTATTTTTTTTTTTTTGCTTCTCCAAATCCTTTGGAAT GAGTAATTATTCAACATTTTATGTTTGTATGTTATTTTACAATTCAACTTCCATA GTGATATTTAAAAAGAAAATTTGGCAAATGCTTGCAAAAAACACACCTTTTACAA TTTTAAATGTGATTTACTGTAGGCCAGAATGTTAAACATAGTAGGAAATTAAT ATTTATTCATCTTATTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCT AATAACAAGAATTTCTACCAGTAAAGCTATTAACAGGCATCAAAATAGGGGTGCT TAAATTAAGATGAGATTGTAAGCAAAATAAGAACATACGCAGACTCGCATAGGAG TGCAAATGATCGTTTTCTGATTGAAATGTTTATAGCTAAATGAGTTTGGCTGAATTA AACACAAATGTTCCAAAAGATAAGCCGTAGCTGGTGTCTTTTTTCTGTTTTTTA AGCTGTTTTACAGACGAAAATGGAACATATTTGGAACAATGCTTTCTGTTTTTCC ATACTATTGATATTTGTGGAAAGTCAAAAATGGCCTAAGGAAGCTAAGCTCGCC CAAGCAGTGGTCACTTACAAGTACTTTTTGTACTCTGTACTCCTGTCAATTTGGGC GATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTTCAACAAAGATGAGTGTCAAGATAATCCT GTGAGATTCACATCCAACATCTTTGTAATTATGTCACATCAGTCAATGTAATGGA ATAATCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGATCCTTCTTAAACCTTCCCTGTGGAC TGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATATTTCTGTTACAAGATCTAGTGTCTCTCAGA GAAGTCAATGCTTCTGAAGCATCGTGTCTACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAAC ACATTTCTGAAAGCATCGTGTTTGGGGGGAGGGGTTGTATTTAATGAAGATATCA ATAATATGCTATGCTTCAATTTTCTCTAGGTGATCAAGATTCATTTCTTGTCT GTCAATCAAAATAGGCAGACAGAAAAGTGATTGAAATACATTA</p>	<p>1941</p>
<p>CNS-8 (SEQ ID NO: 98)</p>	<p>GCTGGTGTCTTTTTTCTGTTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATGGAACATAT ATTTGGAACAATGCTTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTGTGGAAAAGTCACAA AATGGCCTAAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAGTGGTCACTTACAAGTACTTTTTG TACTCTGTACTCCTGTCACTTTGGGCGATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTT CAACAAAGATGAGTGTCAAGATAATCCTGATGAGATTCACATCCAACATCTTTTGT AATTATGTCACTTCAAGCTGTAATGGAATAATTCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGA TCCTTTCTTAAACCTTTCCCTGTGGACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATATTTCT TGTTACAAGATCTAGTGTCTTCCCTCAGAGAAGTCATGCTTCTGAAGCATCGTGTCT ACAAGAACAATATCAAGTTTGCACAAACATTTCTGAAAGCATCGTGTTTTGGGGG GAGGGGTTGTATTTAATGAAGATATCAATAATATGC</p>	<p>540</p>

[0176] 表11-CNS特异性启动子

名称	序列	长度
<p>CNS-1 (SEQ ID NO: 112)</p>	<p>CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGTGCTTCCTGG GCGCCTCACCTCCTCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCCCTGTCTGGGAGATGAG CATTTAGGAATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGGGAGGGGCCGGGGTGGAGGGCGCAT CCCCACGGGAGATTGGATGAAATGGCCTGCCAGTGTGTGTGAGTGTGCGCCT GTGGCAGCAGCAGAGTAAACAGCCGCTGCCCTGTCTCTGCGCGCCGTGGCCAGG TACACAGGCCTGTTTGGACAGCTGCCTTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGATGCTGG CTGATAGATGGGGATGGGCGGACTGTTAACCCCTCGTTGCCCTGCACTGCTATGTGC TTCCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGTAGCCAGAAGGTGGTCTTGGCTGTGCCCC CAGCTCCTCTTAGGGGGAAACCTCTAGTTCTGAGTCAGGGACAGAGTGAGGAGG GCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGTCTCTCCCCGACCAGGGAGCCAAGGACAGAGGA GAAGGGGTCTTCCCAGTGGTGACTAGGGGCAGAATATGTCTCTGAGTGAGTGTC</p>	<p>696</p>

	TGGAGCCCTCCTCACCCAAACACCATGGGGCTGGGCATAAAAAGTCAGGGCAGAGCC ATCTATGCTTACATTGCTTCTG	
CNS-2 (SEQ ID NO: 113)	GGTGTGTGGAAGGGTGAAGGACACACACAGACTGAAAGAATCCTAGGCCTGG TAGGCCTTAACAAATGTCTGTTACAGACCAGAATTTTATTGCTGTTAGAGACCCA AGCCCCCATAGGAACAGTGAAGAACAGGTGCAGAAAGGCGGAGTAACTTTATCTA AAGTCATAGGCTCCCTGAATAGCAGAGCTGACACCTACAAGGAAGCGTTGGAGACC AGATCTACCAGCTAGCCTCCCTGAGACCACGAGGTGGCGCCGCAGCACCAGGCTGTG GCCGATGCCAGCCAGTAGCCGGTTTCCACAGTCCCCCGCACGCACGCACCTCTTT GCTGCAGGAATCCCGGGCTGCCCGACCTGGAGTAGGGGGGGTGGTGTGAGTGGGACT GAGTCCCTAGAAGCCTGGACCCTCACTTCGTTCCCTGTACATCCAGCTCGCCTGTAG ACAGTGGGGGAGGATGAAGGGAAGAGGACTCAAGCGCAACTTTGAATCATCACGCC TTTCAGAGTCCGCGCACGTTTATTTCATTTATCTTTGAAAACGAGGGAGGGGAAGC CTGGAGAAGCGGGATGGGCCAAGGGTGTGTTGGCCCCGGGGAGCTGGTCCCTGT TCCTGGCTTTAGTCCAGGGCGCGGTCTGTGTGTAGGGCGGGCTGGGCATAAAAAG TCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTGCTTCTG	709
CNS-3 (SEQ ID NO: 114)	TGCTACCAGAGCCGGGAGAGCTGCTCGGAGACGCCTCCGGGGTGCGGGCTGGACAT GAGCAGCGGCTGCCGGTCTCGGGACTAGGCCCCGCCATTTTGGATCCGCTGACAGG TCAGCGAAGTCTCTTCTAGAGTCCGGTGTCTGTGAAGGCCGCCCTGACATCGCAA TAGGGAATTAGTGGGAAGGGCCCTAAATTGGGGGAGCCAAGTTGGGGGAGGATT GGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGAGAAAATCGCGGA AACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGGCGGGCCCGTGCCTTCC CACCTGGCGCCGATCCACTTTCTCGGGGTAGCGGCCAACCCTTTCGCTGCCAG CCGATCCCTTTTACCCTGGCTACCGGGACCCTACTCTCGCCCACTTGGCTCT GCCTAAGCGTCTTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGCCACGTGGGGAGGGGCGCGGCCGA TTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGGCGGGGTTCTTGGCGTCTCGCCGG CCAGACCCCTCCCTCAAAGCGGGGCTGGAGATCCACAGCTGGAAAGGGCGGAGC CCCAGCAGGGCAGCTGGAAAGGGGCGGGCCTGACGCGCGCGGCTCGCCCGGGCGG GCTGGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAGTGAATGGGCGCCGGCTGGGGGTGGCAGT ACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCCGAGAGTCCAGGAGCGCC	
CNS-4 (SEQ ID NO: 115)	AAGGAGAATGGTAAACAGCAGGAGCGAAGCGGCTGAGGAGAAAGAAGAGGAAAGAA AGCCGAGACGTGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGAGACGGACAGCGA CAAGTGGAGAAAATCGGCGAAACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCC GGCGGCCCGTGCCTTCCCACCTGGCGCCGATCCACTTTCTCGGGGTAGCGGC CCAACCCTTTCGCTGCCAGCCGATCCCTTTTACCCTGGCTACCGGGACCCTCT ACTCTCGCCCACTTGGCTCTGCCTAAGCGTCTTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGCCAC GTGGGGAGGGGCGCGCCGAGTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGGCGG GGTTCTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCCCTCCCTCAAAGGCGGGGCTGGAGATCC ACAGCTGGAAAGGGCGGAGCCCCAGCAGGGCAGCTGGAAAGGGGCGGGCCTGACG CGCGCGCTCGCCCGGGCGGGCTGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAGTGAATGGG CGCCGGCTGGGGGTGGCAGTACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCCGAGAGTCCAGGAG CGCCGAGCGGAGAGGGCGCCGGGAGCAGGGGGCGGCCCCCACTCGGGCGGGGT GCCCCGCCCTGGCCCTGCCTGCCCTCTAGATCGCCGCGCAGCCGCCCTACTG GGAGTCTG	
CNS-5_v2 (SEQ ID NO: 116)	ttgtAATGGGAATAAGGGCAGGACTcctcctgggtataagtagctcagctgatcccaacc ctgcttctatgtgttaattcatttattcattcattcaacaagcatttggtgaaatg ctctttgtgtcaggctcagcaggaagcagtggaataaaatggtgaacaagaaga ctcggggtttcttctatctatgttgatgtctgcagagaacagatcagccttctagg aagtttgtaatcagatacattgtagagagatacttcttagtaaatcctactca tcctataaggctcaaaacaaatgcctctatgaaaccttccgtgattccctcaggca gagttaaagagcttcttctcctgggctctatctccttccattagtattataactgt ttaccagtttcccctctagactaaatctcaaaagagagaatgaggtctctttca gtcttctttgcatctttaaactagcctgggtcccagcctgttgatgaaagaaaca agaacactgatacaagccacagcccttggcaaaaagataccaatagcaatggc aatgtaaaatcagtttagtaaatgaatcaagaattctgatgcttagggaagta atgtgaacctggcaccattaacaaattcagaactcttcttcttaggagctctctaa ctgaacagacagaggatgtcaacccttaattcagcttgatcgtatctcagcaact acatttaatgagacagtggaagaaagagagctgtccacttttaaatcagcatattt ctaactaaacaatggcaatggctaaatctttaaagtgcctatttctctcaagaaca ctgcaatggaacatttagactttgggaaagagattagtgattacattgctatctc actgatttaatttaaatgctcttccaaaccaaacacacatgtgccaagagggctac taagaaacccaacatgcagagttctctataagtgacgagcagcagtggtgactgaaa	1744

	<p>ctaaacttggaatccagggcactaatgcacaatatcaagcaataaaacggcatct ctttggcaatatttaatttataaaaaagaagaagagacagggcgaagatcagggcactg tctgttttgaggatcaaccattctgcatttcaaagcattggccctgcaatatcc aggttactgtgctagaatctcgactattatctgcagttgtgagagggaggcaca gatgtgtttactcagtgattaggcccttagaataagcctctagctcctagagagac agctcaccacttattcatttgggccaattcacaagcctaggaagattaaacatcc atgctgagaagacaagcgaatgcagacgggtgaaaaagaaataaaaattcttataaa actctgagatgacttcatttatttttccacaaggaactttaggaagtgtttagtt agagaaaaaccacattgacctctctctaaacccttaattcttctttgtggtggc actgctttgtggttaagcgactggctcgctcgccctcttttactggaagctgag agaaaaagactctggagaaacagtttctgctccagggacacaaaccctgacact gttaaacatgagatgccaggaaaacacacttaaaaaaaaattcccactttaagct ttagactgaatgtgagaaaggagatgataaaaaagagtatcacaGAGAATCTTCAG GCTGTGGG</p>	
<p>CNS- 6_v2 (SEQ ID NO: 117)</p>	<p>TTTGGCACTGTGAGCAGTTTACTtgacaaattctgtcaaatatttgccttctgaaa tctcgagaattgggtgaatataattgtacttaattgttgcaaaaataataaatatg ggactaaggacgttctatcattaatttgtcagaaaagagagttgtcatttctgaaa atthaatgtcattgaagctctatttccaatagcaaggagcactattgctaataga cttcagagcttgaataaaataaatctttggaatcctgttgcatctcttgggggtg acatttgacagctctttatagcacagaaacgaaacaagtgtgtgagctggaattcaa ttgtggcgtattgattccttgcacagtcattattcctgctgattgacaggtgaa aattggttacgtaagtaatttcatatgttatattggctgacatttgcctgct cttgtgtcaatattgttgtaagatctccagctttagagatagcaatagacactg actgtggcttttgtgtgatgttccagtgtttctcctgacataatttaagacatatt aaaaaccagcagcatcttccctcttgagaagcttaatgccaatattattgtcttcc aggggaagatcatgtatgctcataatcggtgctaatctccaccagtaagctcatg tttaggcattaggcactataactgtaaaattgagcctcttgattgattcatgtca agcctcatctcggctcctgcaggggaagtcacccgctgacccttttacactaaa agaagagatttgtgttcttcttccactggaacatcaaattgactgaataatc tgtaatacattagtgtgacatttgttagggagaattaaacaagcacagtaatca ttccccagaataaaaattgtgtttgattccagcagagttctattaagggaggac agaatctgtctcttccaaggtggaaaaatcgtgaatattcctgcattaatgaacca agttaacactttaattgcttatagaaccgagttctccaatgacagcattaaaagat agggaggctctgatttaTGGTCAACACAGATTTGTAACCC</p>	<p>1104</p>
<p>CNS- 7_v2 (SEQ ID NO: 118)</p>	<p>TCAACATGGATAACCAAAGTTCTtaaaaactacgctttcaatgaacacatatcctt gagcaagactaataatgaggaatgggagccagctcctgtgatatttatgcaactac taaattctcactgaagtcaatgggagtttgccttacgtaagggctgcaaacctttagc ctccagagatataaggggaaaaaatccttaaaactcttcaacattaatattgctcct gtaaggaatccagccatgacctaagccatggagcttctgaacctagcaagtagaa gggtaaacagtaaacaccagttattttaaagcacaatctaactcagagttcaatgaga agcaatattatatttgatctctaaggtattaatacttgatatacattatagacat ctttatgtagtccattatccaaacaatggcttaagtctgtggtatttaataaatca agtttccatggccgtgagactgagtgaggagtgaggatgaagccttttcttctcatt tttttctcaggtgcaattctgtgttaataataagagaagtggtgcttctctct catagcactaaaagtgagataatcctgtgtaagaaatcagtaagtaaggctctgct taatctagtcccagtgtaaacctgttgacatttgttcttttctatcattatgtg actgggctgttttgtgctggattaggcacaatctcctatgcagcacatttggca tgttactagtgtttaaactcattaataatgtatgaagaaaatgtaatccatgaca aggaagcaagaaaagtaatttttttttttttttcttcccaatcctttggaa gagtaattattcaacattttatgtttgatgttatattttacaattcaactccata gtgatatttaaaaaagaaactttggcaaatgcttgcaaaaaacacaccttttaca ttttaaatgtgatttactgatggccagaacttggttaaacatagtaggaaatataat atattatcatttattcatttccagggcgtaaaacgctcctctgagtcattccc aataacaagaatttctaccagtaagctattaacagggcatcaaaaataggggagtg taaattaaagatgagattgtaaaagcaataagaacatacgcagactcgcataggag tgcaaatgatcgtttctgattgaaatgtttatagctaaatgagtttggctgaatta aacacaaatgttccaaaagataagccgtagctggtgcttcttttctgtttttta agctgctttacagacgaaaatggaactatatttggaacaatgctttctgttttcc atactattgatatttggaaagtcacaaatggcctaaggaagctaagctcggcc caagcagtggtcacttacaagtaactttgtactctgtactcctgtcacatttgggc gatcagagcaacagctggggagacttttcaacaaagatgagtgatcagataatcct</p>	<p>1941</p>

	gatgagattccacatccaacatcttttgaattatgtcacattcagctgtaaatgga ataattcaagctgaaaagaacaagctttgatccttcttaaacctttccctgtggac tggctatctaaaagatttaaagatatttctgtttacaagatctagtgtttcctcaga gaagtcagcttctgaagcatcgtgatctacaagaacaatatcaagtttgccaaac acatttctgaaagcatcgtgttttggggggaggggttgatttaagaagatatca ataatatgctatgcttcaatttctcagtgatcaagattcattttctgttct gtcatccaaataggcagacagaaaagtgattgaaatacattaTGGAGATGTGCAT TGCACA	
CNS-8_v2 (SEQ ID NO: 119)	GCTGGTGCTTCTTTTTTCTGTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATGGAACATAT ATTTGGAAACATGCTTCTGTTTTCCATACTATTGATATTTGTGGAAAGTCACAA AATGGCCTAAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAGTGGTCACTTACAAGTACTTTG TACTCTGTACTCCTGTACATTTGGGCGATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTT CAACAAAGATGAGTGTGAGATAATCTGATGAGATTCCACATCCAACATCTTTGT AATTATGTCACATTCAGCTGTAATGGAATAATTCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGA TCCTTTCTTAAACCTTTCCCTGTGGACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATATTT TGTTACAAGATCTAGTGTTCCTCAGAGAAGTCATGCTTCTGAAGCATCGTGATCT ACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAACATTTCTGAAAGCATCGTGTTTGGGGG GAGGGGTTGTATTTAATGAAGATATCAATAATATGC	540
CNS-1 + CMV-IE UTR 和 内含子 (SEQ ID NO: 120)	CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGTGCTTCTGG GCGCCTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCAGCCCTGTCTGGGAGATGAG CATTTAGGAATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGGGAGGGGCCGGGGTGGAGGGCGCAT CCCCACGGGAGATTGGATGGAATGGCCTGCCAGTGTGTGTGAGTGTGCGCCT GTGGCAGCAGCAGAGTAAACAGCCGCTGCCCTGTCTCTGCGGCCGTGGCCAGG TACACAGGCCCTGTTGGACAGCTGCCTTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGATGCTGG CTGATAGATGGGGATGGGGGACTGTTAACCCTCGTTGCCTGCACTGCTATGTGC TTCTGCTCATCCATGGGGTAGAAGGTAGCCAGAAGGTGGTCTGGCTGTGCCCC CAGCTCCTCTCTAGGGGGAAACCTCTAGTTCTGAGTCAGGGACAGAGTGAAGAGG GCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGCCTCCCCGACCAGGGAGCCAAGGACAGAGGA GAAGGGGGTCTTCCCCAGTGGTACTAGGGGCAGAATATGTCTGTGAGTGAAGTGC TGGAGCCCTCCTCACCCAACACCATGGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCC ATCTATTGCTTACATTTGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCAGCTGTTTGGACC TCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGA ACGCGGATTTCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGACTCTATAGGCA CACCCCTTTGGCTCTTATGCATGAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACT CGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTC TTTCCATGGGTCTTTTTCTGCAGATGCCACC	982
CNS-4+ CMV-IE UTR 和 内含子 (SEQ ID NO: 121)	AAGGAGAAATGGTAACAGCAGGAGCGAAGCGGCTGAGGAGAAAGAAGAGGAAAGAA AGGCGAGACGTGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGACGGACAGCGA CAAGTGGAGAAAATCGGCGAAACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCC GGCGGCCCGTGCCTTCCCACCTGGCGCGGATCCACTTTCCTCGGGGTAGCGGC CCAACCCACTTCGCTGCCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTCT ACTCTCGCCACTTGGCTCTGCCTAAGCGTCTAGCCGGAGCGGGTCTCTGCCAC GTGGGGAGGGCGCGCGGAGTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGGGCGG GGTTCTTGGCGTCTCGCGGCCAGACCCCTCCCTCAAAGGCGGGGCTGGAGATCC ACAGCTGGAAGGGCGGAGCCCCAGCAGGGCAGCTGGAAGGGGCGGGGCTGACG CGCGCGCTCGCCGCGCGGGGCTGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAGTGAATGGG CGCCGGCTGGGGGTGGCAGTACGCTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCAGCTGTT TTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGC ATTGGAACGCGGATTTCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCTATAGACTCTA TAGGCACACCCCTTTGGCTCTTATGCATGAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGC AGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGAC TGTTCTTCCATGGGTCTTTTTCTGCAGATGCCACC	876
CNS-5 (SEQ ID NO: 122)	GGAACATTTAGACTTTGGGAAAGAGATAGTGATTTACATTGCTATCTCACTGATT TAATTTAAATGCTCTTCCAACCAAACACACATGTGCCGAAGAGGCTACTAAGAAA CCCAACATGCAGAGTTCTCTATAAGTGCAGCCGACAGTGTGACTGAAACTAACT TGGAATCCAGGGCACTAATGCACAAATCAAGCAATAAAACGGCATCTCTTTGGC AATATTTAATTTAAAAAGAAGAAAGAGACAGGCCAAGATCAGGCACTGTCTGTTT TGGAGGATCAACCATTCTGCATTTCAAAGCATTGGTCCCTGCAATATCCAGGTAC TGTGCTAGAATCTCGACTATTATATCGCAGTTGTGAGAGGGAGGGCAAAGATGTGT TTACTCAGTGATTAGGCCCTTAGAATAAGCCTTAGCTCCTAGAGAGACAGCTCAC CACTTATTCATTTGGGCCAATTCACAAAGCCTAGGAAGATTAACATCCATGCTGA	835

	GAAGACAAGCGAATGCAGACGGTGAAAAAGAAATAAAAATTCCTTTAAAAACTCTGAGATGACTTCATTATTTTTCCACAAGGAAACTTTAGGAAAAGTGTTAGTTAGAGAAA AACCCACATTGACCTCTCTCTAAACCCTTAATCTTCCCTTGTGGTGGCACTGCTT TGTGGTAAGCGACTGGCTCGCCTCGCCCTCTTTCACTGGAAGCTGAGAGAAAA AGACTCTGGAGAAACAGTTTTCGTCCAGGGACACAAACCCTGACACTGTTAAGG GCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	
CNS-6 (SEQ ID NO: 123)	GAAAATTTAATGTCAATTGAAGCTCTATTTCCAATAGCAAAGGAGCACTATTGCTAA TAGACTTCAGAGCTTGAATAAATAAATCTTTGGAATCCTGTTGCATCTCTTGGGG TGTGACATTTGACAGCTTTTTATAGCACAGAACGAAACAAGTTTGTGAGCTGGAAT TCAATTGTGGCGTATTGATTCCCTGCATCAGTCATTATTCCCTGCTGATTGACAGG TGAAAATTGGTTACGTTAAGTATTTCATATGTTATATTGGCTGACATTTGCTTGCC TGCTCTTGTGTCAATATTGTTGTAAAGATCTCCAGCTTATGAGATAGCAATAGAC ACTGACTGTGGCTTTTGTGTGATGTTCCAGTGTTTTCTGACATAATTTAAGACA TATTTAAAACCAGCAGCATCTCCCTCTTGAGAAGCTTAATGCCAATATTATTGTC TTCCAGGGGAAGATCATGTATGCTCATAATCGGGTGCTAATTTCCACCAGTACGCT CATGTTTAGGCATTAGGCATAACTGTAAAATTGAGCCTTCTTGATTGATTGAT GTCAAGCCTCATCTCGCTCCTGCAGGGGAAGTCATCCGGCTGACCCCTTTTTACAC TAAAAGAAGAGATTTGTGTTCTTTCTTCCACCTGGAACCATCAAATTGACTGAAT AATCTGTAATACATTAGTGCTGACATTTGTTAGGGAGAATTAACAAGACACAGTA ATCATTCCCCAGAATAAAAATTGTGTTGATGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAG AGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	812
CNS-7 (SEQ ID NO: 124)	TGAGACTGAGTGGGAGTGGGGATGAAGCCTTTTTCTTCATTTTTTTTTCTCAGG TGCAATTCGTGTTAATATAAGAGAAGTGTGGCCTTCCTTCTCATAGCACTAAAAG TGAGATAATCCCTGTGTAAGAAATCAGTAAGTACGGTCTGCTTAATCTAGTCCAG TGTGAACTGTTGACATTTGTTCTTTTTCTATCATTATGTGACTGGGCCTGTTTT GTGCTGGATTAGGCACAAATCCTATGCAGCACATTTGGCATGTTACTAGTAGTT TAACTTCATTAATAATGTATGAAGAAAATGTAATCCATGACAAGGAAGCAAAGAAA AGTATTTTTTTTTTTTTGCTTCTCCAAATCCTTGGAAATGAGTAATTATTCAA CATTTTATGTTTGTATGTTATATTTACAATTCACCTCCATAGGGCTGGGCATAAA AGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	487
CNS-8 (SEQ ID NO: 125)	GCTGGTGCTTCTTTTTCTGTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATGGAACATAT ATTTGGAACAATGCTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTGTGAAAAGTCACAA AATGGCCTAAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAGTGGTCACTTACAAGTACTTTTG TACTCTGTACTCCTGTCACATTTGGGCGATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTT CAACAAAGATGAGTGTGAGATAATCCTGATGAGATCCACATCCAACATCTTTTGT AATTATGTCACATTCAGCTGTAATGGAATAATCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGA TCCTTTCTTAAACCTTCCCTGTGGACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATATTT TGTTACAAGATCTAGTGTTCCTCAGAGAAGTCATGCTTCTGAAGCATCGTGATCT ACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAACACATTTCTGAAAGCATCGTGTGTTGGGGG GAGGGGTGTATTTAATGAAGATATCAATAATATGCGGGCTGGGCATAAAAGTCAG GGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	593
CNS-10 (SEQ ID NO: 187)	CCTGAGGGCAGCACTCACCTCCACAGGGGTCCAGGGGCTCCCCAGCCTCAGCACC TGCCCTGGGCTCCTGCCTCCAGAGAGCCTGGCCCCAAGGAAGAGTCTAGTAAGCTT AGTTCCCATCGGGCTTCCATGAAAGCACAACTGGCCCGCAGGAAACCGAATTA AAGCAATATTTGTATCAGTGAAGACATTTGCTGAAAAGTTAAATCCACATCCGGC AGTGTGGCCATGAGCCTCCGGCGTGGTGTTCATCAGGCATGTCTCTCCTCCTGGC CTGGGCACCTGAGCACTGGGGCCGCCCTGGGCAGAGCTGGGGCGGGGTGCTGGGGG GCCTGGAGCTGCCTCACCGAGGGATCCTCAGCAGCCGACCCTGGGGGAGGCAAATG AGACTCTTCTGGGGACCTTGAGGGGAGCTCGGGGAGCCATGCAGAGCTTACCA GGCCTGGACACTGGGCATGGAGGCTGGGCCACCCAGGGCCATCACCAGGGACTCA GGTGGGTGGCCCTCAGCCTGGGTGACAGAAGCTCACGGGCCGAGGGCGAGGCCA GAGGCTGAGCCTCAGGCTGAGGTCTTGGAGGCAAATCCCTCCAACGCCCTTCTGA GCAGGCACCCAGACCTACTGTGGGCAGGACCCACAGGAGGTGGAGGCCTTTGGGGA ACACTGTGGAGGGGCATAGCATCTCCGAGAGAGGCAGGGTCTGCACTGGGTGCTG AGAGACAGCAGGGGCGAGCGGTAGGCTTCCCTGCCCCAGGGATGTTCCAGAGGA GCGCAAGGGAGGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATT TGCTTCTG	848
CNS-11 (SEQ ID NO: 188)	TAACTTAGCATAGTGAGACAGGAAGCAGCCACTGTGAGTGGTGGCCGAGAAGGGGA CTTACGCGGTTCATCCTGAACCATAGATTCTGGGAGTCTTGGAGCCTGGTGCAT ATTCTCTCATCTGTGTCAGGAGGGAGGGCTCTATAATGAGTGTAGGTGGCCGCTC GAGAACGAGGTATCCAGGGGAGGGAAATCCACCCAGGTCGGTCTTCCATCTCTGAT	734

	<p>ACTTAAATGTCAACAGAGCCAAATTGGCTGCTCAGCCAGCCCTTCTCCACCTCTG CTGCTAAGGCTCAGCAAACCTTGCCGCTGTGCCCGCCAAGAGGGGACACAGCCCTTGA GTCATCTCAGACCCTTCTGCTCATGCACTGGGTGACCTTGAACAGGTGATTGAG CCAGCCTGTGAGTCAGTCTGCTCTTGAACCTCACCTGGGGGCAGGTGAAGAGACA AGTCCTCGACCAAGATCATGGATATGGAGTGGATGGGTGGATGGATGGACAGACAA GACAGATGGACAGGGTAGAGAGACAGGGCAGAAGGGATACACAGGTAACATGTCA TTTCTCCTTTTGCACCTGTGTGATCACTATTTTATCGATCATAAAGACCTTGAGGA CCTACTGTGTGTTGTGCAGGGAAACAGTGCCTACATTTTGCACACCTACTCCTGGT GGTGCAGGAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTG CTTCTG</p>	
<p>CNS-13 (SEQ ID NO: 189)</p>	<p>CCTGAGGGCAGCACTCACCTCCACAGGGGTCCAGGGGCCTCCCCAGCCTCAGCACC TGGCCTGGGCTCCTGCCTCCAGAGAGCCTGGCCCCAAGGAAGAGTCTAGTAAGCTT AGTTCCCATCGGGCTTCCATGAAAGCACAACCTGGCCCGCAGGAAACCGAATTAAA AAGCAATATTTGTATCAGTGGAAAGACATTTGCTGAAAGGTTAAATCCACATCCGGC AGTGTGGGCCATGAGCCTCCGGCGTGGTGTTCATCAGGCATGTCTCTCCTCCTGGC CTGGGCACCTGAGCACTGGGGCCGCCCTGGGCAGAGCTGGGGCGGGGTGCTGGGGG GCCTGGAGCTGCCTCACCGAGGGATCCTCAGCAGCCGACCCTGGGGGAGGCAATG AGACTCTTCTGGGGACCTTGAGGGGAGCTCGGGGGAGCCATGCAGAGCTTACCA GGCCTGGCACTGGGCATGGAGGCTGGGCCACCCAGGGCCATCACCAGGGACTCA GGTGGGTGGGCCTCAGCCCTGGGTGACAGAAGCTCACGGGCCGAGGGCGAGGCCA GAGGCTGAGCCTTCAGGCTGAGGTCTTGAGGGCAAATCCCTCCAACGCCCTTCTGA GCAGGCACCCAGACCTACTGTGGGCAGGACCCACAGGAGGTGGAGGCCTTTGGGGA ACACTGTGGAGGGGCATAGCATCTCCGAGAGAGGACAGGGTCTGCACTGGGTGCTG AGAGACAGCAGGGGCCGAGCGGTAGGCTTCCCTGCCCCAGGGATGTTCCAGAGGA GCGCAAGGGAGTCCCTGTGTGCTCTTTGAGGGCTGTGGGGCCAGGGGACCTGG CTGTCTCAGCCCCCGCAGAGCACGAGCCCTGGTCCCCGCAAGCCCGGGCTGA GGATGATTCAGACAGGGCTGGGGAGTGAAGGCAATTAGATTCCACGGACGAGCCCT TTCTCCTGCGCCTCCCTCCTTCCACCCACCCCGCCTCCATCAGGCACAGCAGG CAGGGGTGGGGGATGTAAGGAGGGGAAGGTGGGGGACCCAGAGGGGGCTTTGACGT CAGCTCAGCTTATAAGAGGCTGCTGGGCCAGGGCTGTGGAGACGGAGCCCGGACCT CCACACTGAGCC</p>	<p>1132</p>

[0177] 表12-表11的启动子中包含的最小/近端启动子

名称	序列
<p>SYNP_CRE151 (SEQ ID NO: 126)</p>	<p>GGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG</p>
<p>CRE0001v1_Pitx 3 (SEQ ID NO: 127)</p>	<p>GGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGAGAAA ATCGGCGAAACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGGCGGCCCGTGC GCCTTCCCACCTGGCGCCGATCCACTTTCTCGGGGTAGCGGCCAACCCACTTCGC TGCCAGCCGATCCCTTTTACCGTGGCTACCGGGACCACTACTCTCGCCACTTG GCTCTGCCTAAGCGTCCTAGCCGAGCGCGGTCTCTGCCACGTGGGGAGGGGCGCGG CCGAGTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGGCGGGGTTCTTGGCGTCTGC CGGCCAGACCCCTCCCTCAAAGGGCGGGCCCTGGAGATCCACAGCTGGAAAGGGCGGA GCCCCAGCAGGGCAGCTGAAAGGGGCGGGCCCTGACGCGCGGGCTCGCCGCGGGC GGCTGGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAGTGAATGGGCGCCGCTGGGGGTGGCAGT ACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCCGAGAGTCCAGGAGCGCC</p>

[0178] 表13-合成的CNS特异性启动子概览

启动子名称	最小/近端启动子	CRE	UTR
CNS-1	SYNP_CRE151	CRE0004_Lmx1b	
CNS-2	SYNP_CRE151	CRE0003_Pitx3	
CNS-3	CRE0001v1_Pitx3	CRE0002_Gbf1	
CNS-4	CRE0001_Pitx3		
CNS-5 v2	CRE0005_faf1		
CNS-6 v2	CRE0006_Pitx2		
CNS-7 v2	CRE0007_Pitx2		
CNS-8 v2	CRE0008_Pitx2		
CNS-1 + CMV-IE UTR 和内含子	SYNP_CRE151	CRE0004_Lmx1b	CMV-IE UTR 和内含子
CNS-4 + CMV-IE UTR 和内含子	CRE0001_Pitx3		CMV-IE UTR 和内含子
CNS-5	SYNP_CRE151	CRE0005_faf1 short	
CNS-6	SYNP_CRE151	CRE0006_Pitx2 short	
CNS-7	SYNP_CRE151	CRE0007_Pitx2 short	
CNS-8	SYNP_CRE151	CRE0008_Pitx2 short	
CNS 10	CRE151	CRE00010	
CNS 11	CRE151	CRE00011	
CNS 13	CRE527	CRE00010	

[0179] 表14- 示例性CRE

名称	序列
CRE0006_GF AP (SEQ ID NO: 99)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCT GGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCA GCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGACTCACCTTG GCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCC CTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTTAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGAC AGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGG CGCCA
CRE0008_GF AP (SEQ ID NO: 100)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCT GGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCA GCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGACTCACCTTG GCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCC CTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTTAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGAC AGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCACC GGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATT CAGCCTGT GCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGA GGAGGGCTGTCTGCTTCCAGAAAGTCCAAGGACACAATGGGTGAGGGGA
CRE0006_A QP4 (SEQ ID NO: 101)	CTAGCCCACAGGAAATGTCTGTCTATATCCAGGCAAGTACCTTGCTCATTGGACCAACC CGAAACTGTT CAGGGAAGATCAGGGAAATCAACTCAGTTACAAATGGGATAATCATGCC CAGTAAAACTACCTGTGGTGAATAAAGAGTTAACCCCTGTTCCATCTTAGGTCACTAT GCAGAGTACCAATGAGTACAAGAGATGGTGCCAAAGAGGGTGGCCCTCCCTAGCTGGG AACAGTCAACCCCTTAGGAACTAGACTGTCAACACATCAGCCAGCCAGAGACAAGGGAAA CCGTGGCAACCAAGTGTGCTGGCACATTGTGAGGTGGTGATGGGAACTGCAGAGGCC TGCACAGCATGCTAATGAGCCCAGGCAACAT
CRE0008_A QP4 (SEQ ID NO: 102)	TCCAAAGAAAAGCCAGATAAGTAGCTGATTATTGCATAGAGCTGACAGTATCACAGGAA GATCAGTAGTAGCAGCTCAAGTACAAAAGGTTAATTAGCAATACTTAATAAGAAAAAC TACCTCTGGCAGGTGAAGAGTTAATCCCTGGTCAATTTTAAGCTACTCTGCTGAGAGTA CTAATAAGTGTAGGGGTGGAGCCAATGAGGGTGACCCCTTCCCTGATGGGAACAGTCA TCCCTTAGGAACTGCCCTGGAAAGCATCAGCCAGCCAGAAAACAGGGAAAGAGGCTGAG AAACCGTGGTAACCAAGTTTTGCTGGCACTTGTAAAATGGTAACTGCAACTGCCGAGG CTGTGCAGAGAATGCTAATAAGCCTAGGACAACCTGTAAAGAGTGGACCTAGAAAATGT CCACC
CRE0005_GF AP (SEQ ID NO: 103)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCT GGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCA GCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGACTCACCTTG GCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCC CTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTTAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGAC AGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGG CGCCACCGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATT CAGCCTGTGCCAGGAAAGGGGATCAGG GGATGCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCA GAAGTCCAAGGACACAATGGGTGAGGGGA
CRE0007_GF AP	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCT GGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCA

(SEQ ID NO: 104)	GCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGACTCACCTTG GCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGACCCCAGCCCC CTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCAGCCTGAC AGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCAC
CRE0012_Arc (SEQ ID NO: 105)	AGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGGCGGTACAGCCGCGTATTCT CAGCGTCTCCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAAGTGGGGTTGCTGGCAGCCTGGCTGGC ACT
CRE0001_S1 00B (SEQ ID NO: 106)	CTTCCTCTTATATTTACCAAGACTCAGTTCCTGAGCAAGAAACCACAGGCACAGCAAG TGCCATGAAAAGCGGCTTTGTGTGGGGTGGGCTCTCACACTCCAATCTCCACTTCCTT CTCAAGGCCTCAAAAAAAGTTGAAAAATGAAAACAAAAGCCTGCTGTGTGAGCTGGG CTCTGGCGTTGCCATGGACCCAGGGCAAACAGCGGTGCTCCTGCTCTGCCCCGGCTCA GCTCATGCTGGGCCTGCACCTTCTGGAAGGGAGCATGGACTTTGGAATGACTGGTTAGAA CCCAAATGAATTAATGGAATTTGACATAGTTCAAAAAATAATAAATGTGATACCCATGA AATGCTGATATTCTGCCTTAATTTGCCAGATTGGGGGCC
CRE0009_S1 00B (SEQ ID NO: 107)	TTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCCAAGCCCTGACCCCATG GCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAATTCATTG CATCAATACTTGCAATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCTTCTCACATTCTTTAG AACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGG CTTGGTGGCGGATGGCACCGTCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCAGGCCCTTT CTGGAATGACCCCTTCCACCCCTGACCAGCCCAAGCCAGCAAGGCCGGGCTGGCTGCCT AGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAA
CRE0002_S1 00B (SEQ ID NO: 108)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCTTTGACA AGGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCCAAGCCCTGA CCCCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAAT CTCATTGCATCAATACTTGCAATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCTTCTCACATT CCTTTAGAACACAAGCCTCCTTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCG TGAGTGGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCCA GGCCTTTCTGGAATGACCCCTTCCACCCCTGACCAGCCCAAGCCCGGGGGCTG GCTGCCTAGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCC AAGTGAAGTGAAGAAGATCTTAACAGAA

[0180] 表15. 表11的启动子中包含的顺式调控元件 (CRE)

名称	序列
CRE0004_Lmx1b (SEQ ID NO: 128)	CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGTGCTTCTTG GGCGCCTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCCTGTCTGGGAGATG AGCATTTAGGAATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGGGAGGGGCCGGGGTGGAGGGCG CATCCCCACGGGGAGATTGGATGGAATGGCCTGCCAGTGTGTGTGAGTGTGC GCCTGTGGCAGCAGCAGAGTAACAGCCGCTGCCCTGTCTCTCGCGCCGTGG CCAGGTACACAGGCCTGTTTGGACAGCTGCCTTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGA TGCTGGCTGATAGATGGGGATGGGCGGACTGTTAACCCCTCGTTGCCTGCACTGC TATGTGCTTCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGTAGCCAGAAGGTGGTCTTGGC TGTGCCCCAGCTCCTCTCTAGGGGGGAAACCTTAGTTCTGAGTCAGGGACAGA GTGAGGAGGGCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGTCTCCTCCCCGCACCAGGGAGCCAA GGACAGAGGAGAAGGGGGTCTTCCCCAGTGGTGAAGTGGGAGGAGGAGGAGGAGG GAGTGAGTGTCTGGAGCCCTCCTCACCCCAACACCATG
CRE0003_Pitx3 (SEQ ID NO: 129)	GGTGTGTGGAAGGGTGAAGGCACACACAGACTGAAAGAATCCTAGGCCTG GTAGGCACTTAACAAATGTCTGTTACAGACCAGAATTTTATTGCTGTTAGAGACC CAAGCCCTCATAGGAACAGTGAAGAACAGGTGCAGAAAGGCGGAGTAACTTTAT CTAAAGTCATAGGCTCCTGAATAGCAGAGCTGACACCTACAAGGAAGCGTTGGA GACCAGATCTACCAGTACCCTCCTGAGACCAGAGGTGGCGCGGCAGCACCGG CTGTGGCCGATGCCAGCCAGGTAGCCGTTTCCACGTCCCCGCACGCACGCAC CTCTTTGCTGCAGGAATCCCGGGCTGCCCGACCTGGAGTAGGGGGGGTGGTGA TGGGACTGAGTCCCTAGAAGCCTGGACCCTCACTTCGTTTCTGTACATCCAGCTC GCCTGTAGACAGTGGGGGAGGATGAAGGGAAGAGGACTCAAGCGCACTTTGAAT CATCAGCCTTCGACAGTCCGCGCACGTTTATTTCAATTTATCTTTGAAAACGAGG GAGGGGAAGCCTGGAGAAGGCGGGATGGGCCAAGGGTGAAGTTGGCCCCGGGGAG

	CTGGTCCCTGTTCCCTGGCTTTAGTCCCAGGGGCGCGGTCTGTGTGTAGGGC
CRE0002_Gbf1 (SEQ ID NO: 130)	TGCTACCAGAGCCGGGAGAGCTGCTCGGAGACGCCTCCGGGGTGCGGGCTGGACA TGAGCAGCGGCTGCCGGTCTTGGGACTAGGCCCCGCCATTTTGGATCCGCTGACA GGTCAGCGAAGTCTCTTCCCTAGAGTTCCGGTGTCTGTGAAGGCCGCCCTGACATCG CAATAGGGAATTAGTGGGAAGGGCCCTTAAATTGGGCGAGCCAAGGTGGG
CRE0005_faf1_sho rt (SEQ ID NO: 131)	GGAACATTTAGACTTTGGGAAAGAGATTAGTGATTTACATTGCTATCTCACTGAT TTAATTTAAATGCTCTTCCAAACCAAACACACATGTCCGAAGAGGCTACTAAGA AACCCAAACATGCAGAGTTCTCTATAAGTGCAGCCGACAGTGTGACTGAACTAA ACTTGGAAATCCAGGGCACTAATGCACAATATCAAGCAATAAAACGGCATCTCTT TGGCAATATTTAATTTAAAAAAGAAGAAAGAGACAGGCCAAGATCAGGCACGTGTC TGTTTTGGAGGATCAACCATTCTGCATTTCAAAGCATTTGGTCCCTGCAATATCCA GGTTACTGTGCTAGAATCTCGACTATTATATCGCAGTTGTGAGAGGGAGGGCAA GATGTGTTTACTCAGTGATTAGGCCCTTAGAATAAGCCTCTAGCTCCTAGAGAGA CAGCTCACCCTTATTCATTTGGGCCAATTCACAAAGCCTAGGAAGATTAACAT CCATGCTGAGAAGACAAGCGAATGCAGACGGTGAAAAGAAATAAAATTCCTTTA AAAACCTCTGAGATGACTTCATTATTTTTCCACAAGGAACTTTAGGAAAGTGT AGTTAGAGAAAAACCCACATTGACCTCTCTCTAAACCTTAATCTTTCCTTTGTG GTGGCACTGCTTTGTGGTAAGCGACTGGCTCGCCTCGCCCTCTTTTCACTGGAA GCTGAGAGAAAAAGACTCTGGAGAAACAGTTTTTCGTTCCAGGGACACAAACCC TGACACTGTAA
CRE0006_Pitx2_sh ort (SEQ ID NO: 132)	GAAAATTTAATGTCATTGAAGCTCTATTTCCAATAGCAAAGGAGCACTATTGCTA ATAGACTTCAGAGCTTGAATAAATAAATCTTTGGAATCCTGTTGCATCTCTTGG GGTGTGACATTTGACAGTCTTTTATAGCACAGAACGAAACAAGTTTGTGAGCTGG AATTC AATTGTGGCGTATTGATTCTTGCATCAGTCATTTATCCCTGCTGATTGA CAGGTGAAAATTGGTTACGTTAAGTATTTCATATGTTATATTGGCTGACATTTGC TTGCCTGCTCTTGTGTCAATATTGTTGTAAGATCTCCAGCTTTATGAGATAGCA ATAGACACTGACTGTGGCTTTTGTGTGATGTTCCAGTGTTTTTCTGACATAATT TAAGACATATTTAAAACCAGCAGCATCTTCCCTCTTGAAGGCTTAATGCCAATA TTATTGTCTTCCAGGGGAAGATCATGTATGCTCATAATCGGGTGCTAATTTCCAC CAGTACGCTCATGTTTAGGCATTAGGCCTATAACTGTAAAATTGAGCCTTCTTG ATTTGATTGATGTC AAGCCTCATCTCGGCTCCTGCAGGGGAAGTCATCCGGCTGAC CCTTTTTACACTAAAAGAAGAGATTTGTGTTCTTTTACCTTTTACCTGGAACCATCA AATTGACTGAATAATCTGTAATACATTAGTGCTGACATTTGTTAGGGAGAATTAA ACAAGACACAGTAATCATTTCCCAAGATAAAAATTGTGTTTAT
CRE0007_Pitx2_sh ort (SEQ ID NO: 133)	TGAGACTGAGTGGGAGTGGGGATGAAGCCTTTTTTCTTCATTTTTTTTTCTCAG GTGCAATTCGTGTTAATAATAAGAGAAGTGTGGCCTTCTTCTCATAGCACTAAA AGTGAGATAATCCCTGTGTAAGAAATCAGTAAGTACGGTCTGCTTAATCTAGTCC CAGTGTGAAACTGTTGACATTTGTTCTTTTTCTATCATTATGTGACTGGGCCTG TTTTGTGCTGGATTAGGCACAAATCTCCTATGCAGCACATTTGGCATGTTACTAG TAGTTTAACTTCATTAATAATGTATGAAGAAAATGTAATCCATGACAAGGAAGCA AAGAAAAGTATTTTTTTTTTTTTTGTCTTCCCAATCCTTTGGAATGAGTAAT TATTC AACATTTTATGTTTATATTTTTACAATTC AACTTCCATA
CRE0008_Pitx2_sh ort (SEQ ID NO: 134)	GCTGGTGCTTCTTTTTTCTGTTTTTAAAGCTGCTTTACAGACGAAAATGGAACATA TATTTGGAACAATGCTTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTGTGGAAAGTCAC AAAATGGCCTAAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAGTGGTCACTTACAAGTACTT TTGTA CTCTGACTCCTGTACATTTGGGCGATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACT TTTTCAACAAAGATGAGTGTGAGATAATCCTGATGAGATTTCCACATCCAACATCT TTTGTAATTATGTCACATTCAGCTGTAATGGAATAATTC AAGCTGAAAGAACAAG CTTTGATCCTTTCTTAAACCTTTCCCTGTGGACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAG ATATTTCTGTTACAAGATCTAGTGTTCCTCAGAGAAGTCATGCTTCTGAAGCAT CGTGATCTACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAACACATTTCTGAAAGCATCGTG TTTTGGGGGGAGGGGTTGATTTAATGAAGATATCAATAATATGC
CRE151 (SEQ ID NO: 190)	GGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG
CRE00010 (SEQ ID NO: 191)	CCTGAGGGCAGCACTCACCTCCACAGGGGTCCAGGGGCTCCCCAGCCTCAGCAC CTGGCCTGGGCTCCTGCCTCCAGAGAGCCTGGCCCCAAGGAAGAGTCTAGTAAGC TTAGTTCCCATCGGGCTTCCATGAAAGCACAACTGGCCCGGCAGGAAACCGAATT

	<p>AAAAAGCAATATTTGTATCAGTGGAAAGACATTTGCTGAAAGGTTAAATCCACATC CGGCAGTGTGGGCCATGAGCCTCCGGCGTGGTGTTCATCAGGCATGTCTCTCCTC CTGGCCTGGGCACCTGAGCACTGGGGCCGCCCTGGGCAGAGCTGGGGCGGGGTGC TGGGGGGCCTGGAGCTGCCTCACCGAGGGATCCTCAGCAGCCGACCCTGGGGGAG GCAAATGAGACTCTTTCTGGGGACCTTGAGGGGAGCTCGGGGGAGCCATGCAGAG CTTACCAGGCCTGGACACTGGGCATGGAGGCTGGGCCACCCAAGGGCCATCACC AGGGACTCAGGTGGGTGGGCCTCAGCCCTGGGTGACAGAAGCTCACGGGCCGAG GGCGAGGCCAGAGGCTGAGCCTTCAGGCTGAGGTCTTGGAGGCCAAATCCCTCCAA CGCCCTTCTGAGCAGGCACCCAGACCTACTGTGGGCAGGACCCACAGGAGGTGGA GGCCTTTGGGGAACTGTGGAGGGGCATAGCATCTCCGAGAGAGGACAGGGTCT GCACTGGGTGCTGAGAGACAGCAGGGGCCGAGCGGTAGGCTTCCCTGCCCCAGG GATGTTCCAGAGGAGCGCAAGGGAG</p>
CRE00011 (SEQ ID NO: 192)	<p>TAACTTAGCATAGTGAGACAGGAAGCAGCCACTGTCAGTGGTGGCCGAGAAGGGG ACTTCACGCGGTCACTCTGAACCATAGATTCTGGGAGTCTTGGAGCCTGGTGCAA TTATTCTCTCATCTGTGTGCAGGAGGGAGGGCTCTATAATGAGTGTAGGTGGCCG CTCGAGAACGAGGTATCCAGGGGAGGGAATCCACCCAGGTCGGTCTTCCATCTC TGATACTTAAATGTCAACAGAGCCAAATTGGCTGCTCAGCCAGCCCTTCTCCAC CTCTGCTGCTAAGGCTCAGCAAATTTGCCGCTGTGCCCGCCAAGAGGGGACACAG CCTTGAGTCATCTCAGACCCTTCTGCTCATGCACTGGGTGACCTTGAACAGGT GATTCAGCCAGCCTGTGAGTCAGTGTCTTGGAACCTCACCTGGGGGCAGGTG AAGAGACAAGTCCTCGACCAAGATCATGGATATGGAGTGGATGGGTGGATGGATG GACAGACAAGACAGATGGACAGGGTAGAGAGACAGGGCAGAAGGGATACACAGGT AAACATGTCATTTCTCCTTTTGCACCTGTGTGATCACTATTTTATCGATCATAAA GACCTTGAGGACCTACTGTGTGTTGTGCAGGGAACAGTGCCTACATTTTGACACA CCTACTCCTGGTGGTGCAGGA</p>
CRE527 (SEQ ID NO: 211)	<p>TCCCTGTGTGCTCTCTTGAGGGCTGTGGGGCCAAGGGGACCCTGGCTGTCTCAGC CCCCCGCAGAGCACGAGCCCTGGTCCCCGCAAGCCCGCGGGCTGAGGATGATTC AGACAGGGCTGGGGAGTGAAGGCAATTAGATTCCACGGACGAGCCCTTTCTCCTG CGCCTCCCTCCTTCCACCCACCCCGCCTCCATCAGGCACAGCAGGCAGGGGT GGGGGATGTAAGGAGGGGAAGGTGGGGGACCCAGAGGGGGCTTTGACGTCAGCTC AGCTTATAAGAGGCTGCTGGGCCAGGGCTGTGGAGACGGAGCCCGGACCTCCACA CTGAGCC</p>

[0181] 在本发明的进一步方面,提供了合成的中枢神经系统(CNS)特异性启动子,所述特异性启动子包含根据SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188或SEQ ID NO:189中的任一个的序列或其功能变体,或由根据SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188或SEQ ID NO:189中的任一个的序列或其功能变体组成。在一些实施方式中,所述合成的CNS特异性启动子包含与SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188或SEQ ID NO:189中的任一个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列,或由与SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188或SEQ ID NO:189中的任一个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列组成。

[0182] 因此,本发明提供各种合成的CNS特异性启动子及其功能变体。通常优选的是根据本发明的启动子是SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188或SEQ ID NO:189中的任一个的变体,该启动子保留了参考CNS特异性启动子(SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188或SEQ ID NO:189中的任一个)的活性的至少25%、至少50%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%。

[0183] 在本发明的一些实施方式中,所述CNS特异性启动子的长度为1200个或更少的核苷酸,优选为1175个或更少、1150个或更少、1125个或更少、1100个或更少、1075个或更少、

1050个或更少、1025个或更少、1000个或更少、975个或更少、950个或更少、925个或更少、900个或更少、875个或更少、850个或更少、825个或更少、800个或更少、775个或更少、750个或更少、740个或更少、730个或更少、720个或更少、710个或更少、700个或更少的核苷酸。

[0184] 在本发明的另一方面,提供了合成的CNS特异性启动子,所述启动子包含根据SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192中的任一个的顺式调控元件(CRE)或其功能变体。在一些实施方式中,所述CRE可以可操作地连接到启动子元件。在一些实施方式中,所述启动子元件可以是最小启动子或近端启动子。优选地,所述近端启动子是CNS特异性近端启动子。在一些实施方式中,所述最小启动子是CNS特异性最小启动子。在一些实施方式中,根据SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192中的任一个的CRE的功能变体包含与SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列,或由与SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列组成。

[0185] 在一些实施方式中,所述合成的CNS特异性启动子包含CRE00010(SEQ ID NO:191)或其功能变体,或由CRE00010(SEQ ID NO:191)或其功能变体组成,所述CRE00010或其功能变体可操作地连接到CRE151(SEQ ID NO:190)或其功能变体。

[0186] 在其它实施方式中,所述合成的CNS特异性启动子包含CRE00011(SEQ ID NO:192)或其功能变体,或由CRE00011(SEQ ID NO:192)或其功能变体组成,所述CRE00011或其功能变体可操作地连接到CRE151(SEQ ID NO:190)或其功能变体。

[0187] 所述元件CRE151是启动子元件。它与一个或多个CNS特异性CRE结合发挥作用,以提供来自包含它们的启动子的CNS特异性转录。它的序列及其功能变体将在下文进一步讨论。

[0188] 所述元件CRE00010和CRE00011是CNS特异性CRE。它们与启动子元件结合发挥作用,以调节(通常增强)包含它们的启动子的CNS特异性转录。它们的序列及其功能变体将在下文进一步讨论。

[0189] 在CRE00010可操作地连接到CRE151的实施方式中,CRE00010可以与相邻的CRE151连续(即,直接相邻定位),或者可以通过间隔区或其它序列将其分开。

[0190] 在CRE00011可操作地连接到CRE151的实施方式中,CRE00011可以与相邻的CRE151连续(即,直接相邻定位),或者可以通过间隔区或其它序列将其分开。

[0191] 在另一个实施方式中,所述合成的CNS特异性启动子包含CRE00010(SEQ ID NO:191)或其功能变体,或由CRE00010(SEQ ID NO:191)或其功能变体组成,所述CRE00010或其功能变体可操作地连接到CRE527(SEQ ID NO:211)或其功能变体。

[0192] 所述元件CRE527是启动子元件,适当地是最小启动子元件。在一些实施方式中,所述元件CRE527是CNS特异性启动子元件。

[0193] 在CRE00010可操作地连接到CRE527的实施方式中,CRE00010可以与相邻的CRE527连续(即,直接相邻定位),或者可以通过间隔区或其它序列将其分开。

[0194] 在一个实施方式中,所述合成的CNS特异性启动子包含CRE00010(SEQ ID NO:191)或其功能变体,或由CRE00010(SEQ ID NO:191)或其功能变体组成,所述CRE00010或其功能

变异体可操作地连接到CRE527 (SEQ ID NO:211) 或CRE151 (SEQ ID NO:190) 或其功能变体。

[0195] 在本发明的进一步方面,提供了最小启动子,所述最小启动子包含根据SEQ ID NO:211的序列或其功能变体,或由根据SEQ ID NO:211的序列或其功能变体组成。适当地,所述最小启动子的功能变体包括与SEQ ID NO:211至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%相同的序列。

[0196] 在本发明的另一方面,提供了合成的启动子,所述启动子包含根据SEQ ID NO:211的最小启动子或其功能变体。适当地,根据SEQ ID NO:211的最小启动子的功能变体包含与SEQ ID NO:211至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%相同的序列。

[0197] 在本发明的进一步方面,提供了CRE,所述CRE包含根据SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192中的任一个的序列或其功能变体,或由根据SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192中的任一个的序列或其功能变体组成。

[0198] 根据本发明的CRE可以与额外的CRE组合以形成顺式调控模块(CRM)。适当地,额外的CRE可以是根据SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192的CRE或其功能变体,或者它们可以是其它CRE。适当地,额外的CRE是CNS特异性的。

[0199] 适当地,在另一个方面,提供了包含本发明的CRE的CRM。适当地,在一些实施方式中,所述CRM包含根据SEQ ID NO:191和/或SEQ ID NO:192的CRE或其功能变体。在一个实施方式中,所述CRM包含根据SEQ ID NO:191的CRE或其功能变体。在另一个实施方式中,所述CRM包含根据SEQ ID NO:192的CRE或其功能变体。在另一个实施方式中,所述CRM包含根据SEQ ID NO:191的CRE或其功能变体和根据SEQ ID NO:192的CRE或其功能变体。在一些实施方式中,根据SEQ ID NO:191和/或SEQ ID NO:192中的任一个的CRE的功能变体包含与SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列,或由与SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列组成。

[0200] 在本发明的一个方面,提供了包含本发明的CRM的合成的中枢神经系统(CNS)特异性启动子。

[0201] 本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可以在CNS的一个或多个特定区域中活跃,优选在大脑的特定区域中活跃,或在特定大脑细胞类型或细胞类型或二者的组合中活跃。

[0202] 本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可以在CNS的各个部分的一个或多个中活跃。所述CNS主要由大脑和脊髓组成。视网膜、视神经、嗅觉神经和嗅觉上皮有时被认为是与大脑和脊髓并列的CNS的部分。这是因为它们直接与大脑组织连接而不需要中间神经纤维。适当地,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可以在大脑和脊髓中活跃。适当地,本发明的CRE、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可以在大脑中活跃,但在脊髓或CNS的任何其它部分中不活跃。适当地,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可以在脊髓中活跃,但在大脑中不活跃。优选地,本发明的

CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可以在大脑中活跃。

[0203] 适当地,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可以在大脑内的各个区域的一个或多个中活跃。大脑区域的非限制性实例包括:额叶、顶叶、枕叶、颞叶(包括海马和杏仁核)、小脑、中脑、脑桥、髓质和间脑(包括丘脑和下丘脑)。脊髓区域的非限制性实例包括:颈椎、胸椎、腰椎、骶椎和尾椎。在一些实施方式中,可能期望的是本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在大脑中表现出广泛的活性。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在大脑或CNS的所有部分(泛CNS)中活跃,优选在大脑的所有区域中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在大脑中活跃,但在CNS的其它部分(例如脊髓)中不活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或9个上述大脑区域中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在大脑的大多数区域中活跃,即9个上述大脑区域中的至少5个、至少6个、至少7个、至少8个或所有9个。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在4个至6个上述大脑区域中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在2个至4个上述大脑区域中活跃,例如中脑、颞叶和间脑。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可在上述大脑区域和脊髓区域中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在脊髓中具活跃,但在CNS的其它部分(例如大脑)中不活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在1个、2个、3个、4个或5个上述脊髓区域中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在脊髓的大多数区域中活跃,即5个上述脊髓区域中的至少3个、至少4个或所有5个。

[0204] 在一些实施方式中,可期望的是本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在CNS的一个区域(适当地在大脑的一个区域中)中表现出主要活性。适当地,可期望的是本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在大脑的一个区域中表现出活性,但在大脑或CNS的其余部分中不表现出活性或仅表现出最小活性。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子仅在上述大脑的CNS区域中的一个区域中(例如中脑)中活跃。在一些优选实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在中脑中特异性地活跃(中脑特异性的)。在一个优选实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在中脑中特异性地活跃(中脑特异性的),但在大脑的其它区域不表现出活性或仅表现出最小活性。本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可在CNS的各种细胞中活跃。大脑中的主要细胞类型是神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和室管膜细胞。可能存在其它细胞类型,特别是在炎症条件下。在一些实施方式中,启动子在许多不同细胞类型中活跃可能是期望的。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在CNS的几乎所有细胞(例如,神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞、室管膜细胞)中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在来自上述列出的CNS细胞类型的至少四种CNS细胞类型(例如神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞)中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异

性启动子在来自上述列出的CNS细胞类型的至少三种CNS细胞类型(例如,神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞)中活跃。在一些实施方式中,可期望的是启动子在有限数量的CNS细胞类型中活跃,或者在不超过一种CNS细胞类型中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在来自上述列出的CNS细胞类型的不超过4种、3种、2种或1种CNS细胞类型中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在来自上述列出的CNS细胞类型的不超过两种CNS细胞类型(例如,神经元和少突胶质细胞)中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在来自上述列出的CNS细胞类型的仅一种CNS细胞类型(例如,神经元)中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在CNS细胞的特定亚型(例如,多巴胺能神经元)中活跃。在一些特别优选的实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在大脑的多巴胺能神经元中活跃。在一些优选的实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在大脑的多巴胺能神经元中活跃,但在其它CNS细胞类型或其它CNS细胞亚型中不活跃。在一些优选的实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在GABA能神经元或谷氨酸能神经元中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在特定类型的CNS细胞或CNS细胞亚型中、以及在大脑的特定区域中活跃。本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在CNS以外的组织中可能活跃或可能不活跃。CNS以外的组织的非限制性实例是:心脏、肝脏、肾脏、骨骼肌和脾脏。适当地,在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在CNS以外的组织或细胞中不活跃或最小地活跃。适当地,在ICV递送中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在除上述CNS以外的组织中的不超过1个、2个、3个、4个组织中活跃。适当地,在IV递送中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在上述CNS以外的组织中的不超过1个、2个、3个、4个组织中活跃。

[0205] 适当地,在一些实施方式中,可期望的是本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在CNS中活跃,但在CNS以外的其它组织中也具有活性。适当地,在ICV递送中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可以在上述的CNS以外的至少1个、2个、3个、4个或5个组织中活跃。适当地,在IV递送中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可以在上述的CNS以外的至少1个、2个、3个、4个或5个组织中活跃。

[0206] 在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可以在CNS和周围神经系统(PNS)中活跃。如果本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在CNS和PNS中活跃,则本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子可被称为神经系统特异性的(NS特异性的)。所述PNS是指大脑和脊髓以外的神经系统的部分。周围神经系统的非限制性实例包括颅神经、臂丛、胸腹神经、腰丛、骶丛和神经肌肉接头。在一些实施方式中,可期望的是本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在PNS中表现出广泛的活性。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在上述PNS区域中的1个、2个、3个、4个、5个或6个区域中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、CRM、最小启动子或合成的CNS特异性启动子在PNS中的大多数区域中活跃,即在上述PNS的6个区域中的至少4个、至少5个或所有6个区域中活跃。

[0207] CNS特异性启动子可在其它非CNS细胞中表达。然而,其在CNS细胞中、例如在大脑

和脊髓的神经元细胞以及位于大脑和脊髓中的神经元支持细胞或非神经元细胞中具有更高的表达程度。例如,与位于CNS以外的细胞相比,在位于CNS中的细胞(包括位于大脑和脊髓中的神经元和非神经元细胞)中,CNS特异性启动子以更高至少25%、或至少35%、或至少45%、或至少55%、或至少65%、或至少75%、或至少80%、或至少90%、或至少95%或25%-95%之间的任何整数来表达基因。

[0208] 在本发明的进一步方面,提供了表达盒,所述表达盒包含根据本发明的任一方面的合成的CNS特异性启动子,所述启动子可操作地连接到编码表达产物的序列(适当地为基因,例如转基因)。在一个实施方式中,提供了表达盒,所述表达盒包含可操作地连接到编码表达产物的序列(适当地为基因,例如转基因)的CNS-10、CNS-11或CNS-13中的任一个或其功能变体。

[0209] 在本发明的进一步方面,提供了表达盒,所述表达盒包含可操作地连接到编码表达产物的序列(适当地为基因,例如转基因)的CNS-10或其功能变体。

[0210] 在本发明的另一方面,提供了表达盒,所述表达盒包含可操作地连接到编码表达产物的序列(适当地为基因,例如转基因)的CNS-11或其功能变体。

[0211] 在本发明的另一方面,提供了表达盒,所述表达盒包含可操作地连接到编码表达产物的序列(适当地为基因,例如转基因)的CNS-13或其功能变体。

[0212] 在一些实施方式中,所述转基因为选自于由以下所组成的组中的任何一个基因: NPC1、EAAT2、NPY、CYP46A1、GLB1、APOE(或APOE2)、HEX、CLN1、CLN2、CLN3、CLN4、CLN5、CLN6、SUMF1、DCTN1、PRPH、SOD1、NEFH、GBA、IDUA、NAGLU、GUSB、ARSA、MANB、AADC、GDNF、NTN、ASP、MECP2、PTCHD1、GJB1、UBE3A、HEXA、FXN、MOG和SLC6A3。适当地,在一些实施方式中,所述表达产物是治疗性表达产物。在一些实施方式中,所述表达产物是报告基因,例如但不限于GFP、RFP、YFP或荧光素酶。在一些实施方式中,当转基因是GDNF时,所述表达产物是GDNF蛋白。在一些特别优选的实施方式中,所述转基因是密码子优化的GDNF。在一些实施方式中,所述转基因是CpG耗竭的GDNF。更优选地,在一些实施方式中,所述转基因是CpG耗竭且密码子优化的GDNF。

[0213] 在进一步方面中,提供了载体,所述载体包含根据本发明的合成的CNS特异性启动子或表达盒。在一些实施方式中,所述载体是表达载体。在一些实施方式中,所述载体是病毒载体。在一些实施方式中,所述载体是基因治疗载体,适当地是AAV载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体或慢病毒载体。在优选的实施方式中,所述载体是AAV载体。

[0214] 在进一步方面中,根据本发明,提供了病毒体(病毒颗粒),所述病毒体包含病毒载体。

[0215] 在进一步方面中,提供了药物组合物,所述药物组合物包含根据本发明的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体或病毒体。

[0216] 在进一步方面中,提供了用于治疗(即,预防或治疗医学病症或疾病)中的根据本发明的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体、病毒体或药物组合物。适当地,所述病症或疾病与异常基因表达有关,任选地与CNS中的异常基因表达有关。适当地,所述用途用于基因治疗,优选用于治疗涉及异常基因表达的疾病。在一些实施方式中,所述疾病是CNS相关的疾病。CNS相关的疾病包括但不限于多巴胺转运体缺陷综合征(DTDS)、阿尔茨海默病、癫痫、帕金森病、多发性硬化症、运动神经元疾病和亨廷顿病。在优选的实施方式中,所述疾病

影响中枢神经系统中的多巴胺能神经元。

[0217] 适当地,所述基因治疗涉及在CNS中表达治疗性表达产物。

[0218] 在进一步方面中,提供了细胞,所述细胞包含如本文所述的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体或病毒体。在一些实施方式中,所述细胞是真核细胞,可选地是哺乳动物细胞,可选地是人类细胞。在一些实施方式中,所述细胞是CNS细胞,可选地,其中所述细胞是人类CNS细胞。适当地,在一些实施方式中,所述CNS细胞是神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞或室管膜细胞。在优选的实施方式中,所述CNS细胞是神经元,甚至更优选地是多巴胺能神经元。所述合成的CNS启动子或表达盒可以在载体中,或可以在细胞的基因组中。

[0219] 在进一步方面中,提供了用于制造用来治疗本文所讨论的医学病症或疾病的药物组合物中的根据本发明的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体或病毒体。在一些实施方式中,所述疾病是CNS相关疾病。

[0220] 在进一步方面中,提供了在细胞(优选CNS细胞)中表达治疗性转基因的方法,其中所述方法包括将本文所述的合成的CNS特异性表达盒、载体或病毒体引入细胞中。在一些优选的实施方式中,所述治疗性转基因是GDNF。

[0221] 在进一步方面中,提供了对有需要的受试者(优选人)进行治疗的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用如本文所述的表达盒、载体、病毒体或药物组合物,所述表达盒、载体、病毒体或药物组合物包含编码治疗产品的序列,所述序列与根据本发明的启动子可操作地连接;以及在所述受试者的CNS中表达治疗量的治疗产品。

[0222] 在一个实施方式中,治疗产品是GDNF蛋白。

[0223] 在一些实施方式中,将本文所述的表达盒、载体、病毒体或药物组合物直接施用到受试者的CNS中。

[0224] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括将本发明的表达盒、载体、病毒体或药物组合物引入受试者的CNS中,所述表达盒、载体、病毒体或药物组合物包含编码治疗产品的基因。在一些实施方式中,所述载体是病毒基因治疗载体,优选是AAV载体。

[0225] 在进一步方面中,提供了产生表达产物的方法,所述方法包括:将本发明的合成的CNS特异性表达盒引入CNS细胞中;以及,使存在于合成的CNS特异性表达盒中的基因进行表达。

[0226] 所述方法适当地包括在适当的条件下维持所述CNS细胞以表达基因。在培养中,这可以包括在适当的培养条件下孵育所述细胞或包含所述细胞的组织。表达当然可以是体外、离体或体内的,例如在受试者的CNS中的一个或多个细胞中。

[0227] 适当地,所述方法包括将合成的CNS特异性表达盒引入CNS细胞中的步骤。本领域熟知多种转染CNS细胞的方法。转染CNS细胞的优选方法是用包含合成的CNS特异性表达盒的病毒载体(例如AAV载体)转导细胞。

[0228] CRE及其功能变体

[0229] 本文公开了可用于构建CNS特异性启动子的CRE。适当地,所述CRE是CNS特异性的。这些CRE通常源自基因组启动子和增强子序列,但它们在本文中用于与它们的天然基因组环境完全不同的情况中。通常,所述CRE构成更大的基因组调控结构域的小部分,所述调控结构域控制着它们通常相关的基因的表达。出乎预料地发现,这些CRE(其中许多非常小)可

以从它们的正常环境中分离并保留CNS特异性调控活性。这是令人惊讶的,因为从基因组中复杂且“三维”的自然情况中去除调控序列通常导致活性的显著损失,因此没有理由期望给定的CRE保留从其自然环境中去除后观察到的活性水平。甚至更令人惊讶的是当CRE在AAV载体中保留CNS特异性活性。尤其是因为AAV载体包含反向末端重复(ITR),并且与基因组相比具有不同的DNA结构,并且已知ITR和DNA结构都会影响CRE的活性。应当注意的是本发明的CRE序列可以被改变而不导致活性的显著损失。可以通过修饰CRE的序列来制备CRE的功能变体,前提是避免对CRE活性有显著损害的修饰。鉴于本公开中提供的信息,修饰CRE以提供功能变体是简单的。此外,本公开提供了用于简单评估任何给定的CRE变体的功能性的方法(参见例如实施例3)。

[0230] 根据本发明的特定CRE的大小是有利的,因为它允许在载体中提供CRE(更具体地是包含它们的启动子),同时占用最小量的载体有效载荷(payload)。当将CRE用于容量有限的载体(例如基于AAV的载体)时,这一点尤其重要。

[0231] 本发明的CRE包含特定的CNS特异性TFBS。通常期望在所述CRE的功能变体中,这些CNS特异性TFBS保持功能性。技术人员充分意识到,TFBS序列可以变化但保留功能性。鉴于此,所述TFBS的序列通常由共有序列说明,其中通常存在一定程度的变化。可以使用位置权重矩阵(PWM)来说明关于TFBS中发生的变异的进一步信息,位置权重矩阵表示在共有序列的给定位置通常发现的给定核苷酸的频率。TF共有序列和相关位置权重矩阵的详情可在例如Jaspar或Transfac数据库<http://jaspar.genereg.net/>和<http://gene-regulation.com/pub/databases.html>中找到。此信息允许技术人员以保留(在一些情况下甚至增加)CRE功能的方式修饰CRE的任何给定TFBS中的序列。鉴于此,技术人员对如何可以修饰(同时保持结合期望的TF的能力)任何给定TF的TFBS具有充分的指导;例如,Jaspar系统将基于其与给定PWM的相似性对假定的TFBS进行评分。此外,可以针对JASPAR数据库中的所有PWM扫描CRE以识别/分析所有TFBS。技术人员当然可以在文献中找到其它指导,而且,可以使用常规实验来确认TF与任何变体CRE中的假定TFBS的结合。显然的是,可以在保留功能的同时对CRE(甚至对CRE中的TFBS)进行显著的序列修饰。本发明的CRE可以与多种合适的最小启动子或CNS特异性近端启动子结合使用。CRE的功能变体包括与参考CRE元件不同、但基本保留作为CNS特异性CRE的活性的序列。技术人员将认识到,可以改变CRE的序列,同时保留其招募合适的CNS特异性转录因子(TF)的能力并从而增强表达。与参考CRE相比,CRE的功能变体可以包括取代、缺失和/或插入,只要它们不会使CRE基本无功能即可。

[0232] 在一些实施方式中,CRE的功能变体可被视为当在启动子中取代参考CRE时基本保留其活性的CRE。例如,包含给定CRE的功能变体的CNS特异性启动子优选保留其活性的至少80%,更优选保留其活性的至少90%,更优选保留其活性的至少95%,还更优选保留其活性的100%(与包含未修饰的CRE的参考启动子相比)。适当地,CRE的功能变体保留与参考CRE的显著水平的序列同一性。适当地,功能变体包含与参考CRE至少70%相同的序列,更优选与参考CRE至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0233] 启动子元件及其功能变体

[0234] 本文公开的一个或多个启动子元件可以是最小启动子或近端启动子。适当地,在一些实施方式中,所述最小启动子或近端启动子可以是非组织特异性的(或普遍存在的)最

小启动子或近端启动子。在另一个实施方式中,所述最小启动子或近端启动子可以是CNS特异性的最小启动子或CNS特异性的近端启动子。虽然本发明的CRE可以与一系列合适的最小启动子或CNS特异性的近端启动子组合使用,但一些启动子元件与一个或多个CRE协同作用,以对CNS特异性启动子的活性具有显著贡献。

[0235] 启动子元件的功能变体包括与参考启动子元件不同的序列,但基本上保留了它们作为启动子元件的活性。本领域技术人员将理解,可以改变启动子元件的序列,同时保留募集RNA聚合酶II的能力,并在相关情况下结合CNS特异性TF以增强表达。与参考启动子元件相比,启动子元件的功能变体可以包括取代、缺失和/或插入,前提是所述取代、缺失和/或插入不会使启动子元件失去功能。

[0236] 在一些实施方式中,当在启动子中取代参考启动子元件时,CRE151的功能变体可被视为基本上保留其活性的启动子元件。本文公开了用于测定CNS特异性启动子活性的合适测定法,例如在实施例3中。

[0237] 适当地,启动子元件的功能变体保留了与参考启动子元件显著水平的序列同一性。适当地,CRE151的功能元件包含与SEQ ID NO:190至少70%相同的序列,更优选与SEQ ID NO:190至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。如上所讨论的,CRE151的功能变体基本上保留了参考启动子元件作为启动子元件的能力。例如,当CRE151的功能变体被替换到包含参考启动子元件的启动子中时,经修饰的启动子保留其活性的至少80%,更优选保留其活性的至少90%,更优选保留其活性的至少95%,并且更优选保留其活性的100%。适当地,CRE151的功能变体包含与SEQ ID NO:190具有至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列。

[0238] 在一些实施方式中,当在启动子中取代参考启动子元件时,CRE527的功能变体可被视为基本上保留其活性的启动子元件。本文公开了用于测定CNS特异性启动子活性的合适的测定法,例如在实施例1中。

[0239] 适当地,启动子元件的功能变体保留了与参考启动子元件显著水平的序列同一性。适当地,CRE527的功能元件包含与SEQ ID NO:211至少70%相同的序列,更优选与SEQ ID NO:211至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。如上所讨论的,CRE527的功能变体基本上保留了参考启动子元件作为启动子元件的能力。例如,当CRE527的功能变体被替换到包含参考启动子元件的启动子中时,经修饰的启动子保留其活性的至少80%,更优选保留其活性的至少90%,更优选保留其活性的至少95%,并且更优选保留其活性的100%。适当地,CRE527的功能变体包含与SEQ ID NO:211具有至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列。

[0240] 活性的保留可以通过比较如下来评估:在参考启动子控制下的适当的报告基因的表达与在等同条件下的包含取代的启动子元件的另外的相同的启动子。本文公开了用于评估CNS特异性启动子活性的合适的测定法,例如在实施例3中。

[0241] 本发明中使用的启动子元件可以是天然的(即从天然存在的基因启动子获得或衍生)或可以是合成的(即非天然存在的)。

[0242] 合成的CNS特异性启动子及其功能变体

[0243] 参考的合成的CNS特异性启动子的功能变体是包含与参考的合成的CNS特异性启动子不同的序列但基本保留CNS特异性启动子活性的启动子。本领域技术人员将理解,可以改变合成的CNS特异性启动子的序列,同时保留其招募合适的CNS特异性转录因子(TF)和招募RNA聚合酶II的能力以提供可操作地连接的序列(例如开放阅读框)的CNS特异性表达。与参考启动子相比,合成的CNS特异性启动子的功能变体可以包括取代、缺失和/或插入,前提是此类取代、缺失和/或插入不会使合成的CNS特异性启动子与参考启动子(例如CNS-10、CNS-11或CNS-13)相比基本上无功能。

[0244] 因此,在一些实施方式中,根据本发明的启动子的功能变体可被视为基本上保留参考启动子的CNS特异性启动子活性的变体。例如,根据本发明的启动子的功能变体优选保留参考启动子活性的至少70%,更优选保留其活性的至少80%,更优选保留其活性的至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%,更优选保留其活性的100%。

[0245] 在一些实施方式中,CNS-10的功能变体可被视为基本上保留参考启动子的CNS特异性启动子活性的变体。例如,CNS-10的功能变体优选保留参考启动子活性的至少70%,更优选保留其活性的至少80%,更优选保留其活性的至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%,更优选保留其活性的100%。

[0246] 在一些实施方式中,CNS-11的功能变体可被视为基本上保留参考启动子的CNS特异性启动子活性的变体。例如,CNS-11的功能变体优选保留参考启动子活性的至少70%,更优选保留其活性的至少80%,更优选保留其活性的至少90%,更优选保留其活性的至少95%,还更优选保留其活性的至少100%。

[0247] 在一些实施方式中,CNS-13的功能变体可被视为基本上保留参考启动子的CNS特异性启动子活性的变体。例如,CNS-13的功能变体优选保留参考启动子活性的至少70%,更优选保留其活性的至少80%,更优选保留其活性的至少90%,更优选保留其活性的至少95%,还更优选保留其活性的至少100%。

[0248] 合成的CNS特异性启动子的功能变体通常保留与参考的合成的CNS特异性启动子显著水平的序列相似性。

[0249] 因此,在一些实施方式中,根据本发明的合成的CNS特异性启动子的功能变体可被视为基本上保留参考启动子的CNS特异性启动子活性的变体。例如,根据本发明的合成的CNS特异性启动子的功能变体优选保留参考启动子活性的至少70%,更优选保留其活性的至少80%,更优选保留其活性的至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%,更优选保留其活性的100%。

[0250] 适当地,在一个实施方式中,CNS-10、CNS-11或CNS-13中的任一个的功能变体与SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188或SEQ ID NO:189中的任一个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。

[0251] 在一些实施方式中,CNS-10的功能变体包含与参考的合成的CNS特异性启动子至少70%相同的序列,更优选与参考的合成的CNS特异性启动子至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%

相同的序列。适当地, CNS-10的功能变体包含与SEQ ID NO:187至少70%相同的序列,更优选与SEQ ID NO:187至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0252] 在一些实施方式中, CNS-11的功能变体包含与参考的合成的CNS特异性启动子至少70%相同的序列,更优选与参考的合成的CNS特异性启动子至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。适当地, CNS-11的功能变体包含与SEQ ID NO:188至少70%相同的序列,更优选与SEQ ID NO:188至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0253] 在一些实施方式中, CNS-13的功能变体包含与参考的合成的CNS特异性启动子至少70%相同的序列,更优选与参考的合成的CNS特异性启动子至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。适当地, CNS-11的功能变体包含与SEQ ID NO:189至少70%相同的序列,更优选与SEQ ID NO:189至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0254] 功能变体中的活性可以通过比较如下来评估:在参考的合成的CNS特异性启动子控制下的适当的报告基因的表达来与在等同条件下的推定的功能变体。本文公开了用于评估CNS特异性启动子活性的合适的测定法,例如在实施例3中。

[0255] 给定的合成的CNS特异性启动子的功能变体可包含一个或多个CRE的功能变体和/或参考的合成的CNS特异性启动子中存在的启动子元件的功能变体。CNS-10的功能变体可以包括CRE00010的功能变体和/或CRE151的功能变体。CNS-11的功能变体可以包括CRE00011的功能变体和/或CRE151的功能变体。CNS-13的功能变体可以包括CRE00010的功能变体和/或CRE527的功能变体。

[0256] 给定的合成的CNS特异性启动子的功能变体可包含除参考的合成的CNS特异性启动子中存在的那些以外的一个或多个额外的CRE。这些额外的CRE可以是本文公开的CRE,也可以是其它CRE。

[0257] 与参考的合成的CNS特异性启动子相比,给定的合成的CNS特异性启动子的功能变体可包含一个或多个额外的调控元件。例如,它们可以包含诱导元件、内含子元件、边界控制元件(a boundary control element)、绝缘子(an insulator)、基因座控制区、应答元件、结合位点、末端重复片段、应答位点、稳定元件、去稳定元件和剪接元件等,前提是它们不会使启动子实质上无功能。功能变体还可以包括5'UTR序列。

[0258] 给定的合成的CNS特异性启动子的功能变体可包含相邻的CRE之间和/或CRE与启动子元件之间的额外的间隔区。

[0259] 本发明优选的合成的CNS特异性启动子表现出CNS特异性启动子活性,其为CNS细胞中的Synapsin-1、Camk2a、GFAP、MBP、IBA1或NSE启动子的活性的至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少125%、至少150%、至少175%、至少200%、至少300%或至少400%。在一些实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子表现出CNS特异性启动子活性,其为人TH启动子的活性的至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少

70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少125%、至少150%、至少175%或至少200%。在一些实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子适合于以如下水平促进CNS特异性转基因表达,其为CNS细胞中的Synapsin-1、Camk2a、GFAP、MBP、IBA1或NSE启动子的活性的至少100%,优选为Synapsin-1、Camk2a、GFAP、MBP、IBA1或NSE启动子中的任一个的活性的150%、200%、300%或500%。

[0260] 在一些实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子适合于以如下水平促进CNS特异性转基因表达,其为人TH启动子的活性的至少100%,优选为人TH启动子的活性的150%或200%。在许多情况下,优选较高水平的启动子活性,但情况并非总是如此;因此,在一些情况下,可能优选更适中的表达水平。在一些情况下,可能优选更适中的表达水平,例如,为了防止毒性或蛋白质积累。当以其它方面等同的表达构建体并在等同条件下提供如下两种启动子时,可以通过比较在合成的CNS特异性启动子控制下的报告基因的CNS特异性表达与在参考启动子控制下的相同报告基因的表达来评估与参考启动子(例如对照启动子)相比的本发明的给定的合成的CNS特异性启动子的活性。

[0261] 在一些实施方式中,相对于已知的CNS特异性启动子(适当地为Synapsin-1、Camk2a、GFAP、MBP、IBA1或NSE),本发明的合成的CNS特异性启动子能够使受试者的CNS中或CNS细胞中的基因(例如治疗基因或目的基因)的表达增加至少20%、至少40%、至少60%、至少80%、至少100%、至少200%、至少300%、至少500%、至少1000%或更多。在另一实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子能够增加基因(例如治疗基因或感兴趣的基因)在受试者的神经元(适当地为多巴胺能神经元)中的表达,相对于人TH启动子增加至少20%、至少40%、至少60%、至少80%、至少100%、至少200%、至少300%或更多。在优选的实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子能够增加基因(优选转基因)在神经元(可选地为多巴胺能神经元)中的表达。

[0262] 本发明的优选的合成的CNS特异性启动子在非CNS细胞(例如HEK293细胞)中表现出活性,其与CMV-IE相比为50%或更低,优选比起CMV-IE为25%或更低,更优选比起CMV-IE为10%或更低,并且在一些情况下比起CMV-IE为5%或更低,或比起CMV-IE为1%或更低。在一些实施方式中,如果相比于在非CNS细胞或组织中,启动子在CNS中更活跃,则该启动子是CNS特异性的。本发明的启动子可以在所有类型的CNS细胞(神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和室管膜细胞)中活跃。在一些实施方式中,相比于在CNS的其它细胞(例如小胶质细胞、星形胶质细胞、室管膜细胞和少突胶质细胞)中,本发明的合成的CNS特异性启动子在神经元中更活跃。在优选的实施方式中,相比于在CNS的其它细胞(例如小胶质细胞、星形胶质细胞、室管膜细胞和少突胶质细胞)中,合成的CNS特异性启动子在多巴胺能神经元中更活跃。

[0263] 技术人员将理解,本发明的合成的CNS特异性启动子的活性可能因向受试者施用的途径而异。适当地,在一些实施方式中,当脑室内(ICV)递送时,相比于在CNS的其它细胞中,所述合成的CNS特异性启动子在多巴胺能神经元中更活跃。或者,在一些实施方式中,当静脉内(IV)递送时,相比于在CNS的其它细胞中,所述合成的CNS特异性启动子在多巴胺能神经元中更活跃。适当地,在一个实施方式中,当通过ICV或IV递送而施用时,包含根据SEQ ID NO:187中的任一个的序列或其功能变体、或由根据SEQ ID NO:187中的任一个的序列或其功能变体组成的CNS特异性启动子在多巴胺能神经元中活跃。在一个实施方式中,当通过

ICV或IV递送而施用,包含根据SEQ ID NO:188中的任一个的序列或其功能变体、或由根据SEQ ID NO:188中的任一个的序列或其功能变体组成的CNS特异性启动子在中多巴胺能神经元中活跃。或者,在一个实施方式中,当通过ICV递送而施用,包含根据SEQ ID NO:189中的任一个的序列或其功能变体、或由根据SEQ ID NO:189中的任一个的序列或其功能变体组成的CNS特异性启动子在中多巴胺能神经元中活跃。

[0264] 本发明的合成的CNS特异性启动子可以在CNS的特定区域、特定CNS细胞或CNS细胞亚型或两者中活跃。在一些实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子可以在CNS的所有区域内的特定CNS细胞类型(例如神经元)中活跃。在其它实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子可以在CNS的不超过一个区域(例如中脑)内的特定CNS细胞类型(例如神经元)中活跃。在一些实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子可以在CNS的所有区域中的所有CNS细胞中活跃。在一些实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子可以在CNS的不超过一个区域(例如中脑)中活跃。适当地,在一些实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子可以仅在中脑的多巴胺能神经元中活跃。

[0265] 预期CNS-10和CNS-13在中多巴胺能神经元中特别活跃。预期CNS-11在内侧内嗅皮层中特别活跃。这已在初步体内实验中得到证实,籍此以CNS-10、CNS-11和CNS-13主要观察到神经元趋向性。具体而言,CNS-10和CNS-13示出混合神经元和最小星形胶质细胞表达。

[0266] 本公开的各方面涉及包含多于一个的启动子(例如,2个、3个、4个、5个以上的启动子)的分离的核酸。例如,在具有包含编码蛋白质的第一区域和编码抑制性RNA(例如miRNA)的第二区域的转基因的构建体的背景下,可能期望使用第一启动子序列(例如,可操作地连接至蛋白质编码区的第一启动子序列)驱动蛋白质编码区的表达,并用第二启动子序列(例如,可操作地连接至抑制性RNA编码区的第二启动子序列)驱动抑制性RNA编码区的表达。一般来说,第一启动子序列和第二启动子序列可以是相同的启动子序列或不同的启动子序列。在一些实施方式中,第一启动子序列(例如,驱动蛋白质编码区表达的启动子)是RNA聚合酶III(polIII)启动子序列。polIII启动子序列的非限制性实例包括U6和HI启动子序列。在一些实施方式中,第二启动子序列(例如,驱动抑制性RNA表达的启动子序列)是RNA聚合酶II(polII)启动子序列。polII启动子序列的非限制性实例包括T7、T3、SP6、RSV和巨细胞病毒启动子序列。在一些实施方式中,polIII启动子序列驱动抑制性RNA(例如miRNA)编码区的表达。在一些实施方式中,polII启动子序列驱动蛋白质编码区的表达。

[0267] 在一些实施方式中,所述核酸包含编码蛋白质的转基因。所述蛋白质可以是治疗性蛋白质(例如,对治疗或预防哺乳动物受试者中的疾病状态有用的肽、蛋白质或多肽)或报告蛋白。在一些实施方式中,所述蛋白是CYP46A1。在一些实施方式中,所述蛋白是人CYP46A1。在一些实施方式中,所述蛋白编码SEQ ID NO:2或包含SEQ ID NO:2的蛋白。在一些实施方式中,所述蛋白编码与SEQ ID NO:2具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%的序列同一性的蛋白。在一些实施方式中,所述治疗性蛋白对于治疗或预防亨廷顿病是有用的,例如聚谷氨酰胺结合肽1(QBP1)、PTD-QBP1、ED11、C4胞内抗体、VL12.3胞内抗体、MW7胞内抗体、Happ1抗体、Happ3抗体、mEM48胞内抗体、特定单克隆抗体(例如1C2)、以及肽P42及其变体,如在Marelli等(2016) Orphanet Journal of Rare Disease 11:24;doi:10.1186/s 13023-016-0405-3中所述的。在一些实施方式中,治疗性蛋白是野生型亨廷顿蛋白(例如,具有包含少于36个重复序列的PolyQ重复区的亨廷顿蛋白)。

CYP46A1

[0268] 胆固醇24-羟化酶是由CYP46A1基因编码的神经元酶。它将胆固醇转化为24-羟基胆固醇,并且在胆固醇从大脑的流出中具有关键作用(Dietschy, J.M.等,2004)。大脑胆固醇基本上是在原位产生的,但不能被降解,且完整的血脑屏障限制了胆固醇从大脑的直接运输(Dietschy, J.M.等,2004)。24-羟基胆固醇能够穿过细胞质膜和血脑屏障,并到达肝脏,它在那里被降解。

[0269] CYP46A1在HD的细胞模型中是神经保护性的(参见例如W02012/049314)。此外,在R6/2转基因HD小鼠模型的纹状体(该疾病中更为脆弱的大脑结构)中CYP46A1 mRNA减少。

[0270] 在AD的早期阶段,CSF中和外周循环中的24-羟基胆固醇的浓度高。在AD的晚期阶段,24-羟基胆固醇的浓度可能降低,其可能反映了神经元损失(Kolsch, H.等,2004)。CYP46A1在AD患者大脑中的神经炎症斑的淀粉样核心的周围表达(Brown, J.等,第三版,2004)。

[0271] 由CYP46A1编码的胆固醇24-羟化酶的激动作用在CNS疾病的小鼠模型中提供了神经病理学的显著减少和认知缺陷的改善。例如,在亨廷顿病模型中,CYP46A1与ExpHtt的共同表达促进了ExpHtt团聚体形成的强烈且显著的降低(58%比起27.5%)(W02012/049314)。(另外参见国际专利公开W02009/034127;将其通过引用的方式以其整体并入本文)。本文所述的方法涉及CYP46A1的激动作用与施用靶向特定其它靶标的miRNA的结合。例如,所述方法可以涉及施用病毒载体来治疗神经系统疾病或紊乱,其中所述载体在中枢神经系统的细胞中表达CYP46A1。

[0272] 在一些实施方式中,本文描述了用于治疗神经系统疾病或紊乱的病毒载体,所述载体包含编码胆固醇24-羟化酶的核酸。在一些实施方式中,所述病毒载体包含编码氨基酸序列SEQ ID NO:2的核酸序列。在一些实施方式中,所述病毒载体包含编码与SEQ ID NO:2具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或更多的序列同一性的氨基酸序列的核酸序列。在一些实施方式中,所述病毒载体包含与SEQ ID NO:1具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或更多的序列同一性的序列。在一些实施方式中,所述病毒载体包含SEQ ID NO:1的序列。在一些实施方式中,所述病毒载体可以是腺相关病毒(AAV)载体。

[0273] CYP46A1及其治疗用途(例如,用于阿尔茨海默病、ALS和共济失调)的进一步描述在本领域中进行了说明(例如,在W0 2012/049314、W0 2009/034127、W0 2018/138371和W02020/089154中)。在其中描述的序列、方法和组合物可以在本文所述的方法和组合物中使用。将前述参考文献都通过引用的方式以其整体并入本文。术语“基因”是指含有至少一个开放阅读框的多核苷酸,其能够在被转录或翻译后编码特定的多肽或蛋白质。

[0274] 术语“编码序列”或“编码特定蛋白质的序列”表示当置于适当的调控序列的控制下时在体外或体内被转录(在DNA的情况下)和翻译(在mRNA的情况下)成多肽的核酸序列。编码序列的边界由5' (氨基)末端的起始密码子和3' (羧基)末端的翻译终止密码子确定。编码序列可以包括但不限于来自原核生物或真核生物mRNA的cDNA、来自原核生物或真核生物DNA的基因组DNA序列、甚至合成的DNA序列。

[0275] 在Genbank登录号NM_006668(SEQ ID NO:1)中公开了CYP46A1的cDNA序列。在SEQ ID NO:2中示出了氨基酸序列。本发明利用包含序列SEQ ID NO:1或其变体的核酸构建体来

治疗神经系统疾病或紊乱。所述变体包括例如由于个体之间的等位基因变体(例如,多态性)、可选择的剪接形式等而来的天然存在的变体。术语变体还包括来自其它来源或有机体的CYP46A1基因序列。变体优选与SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2基本上同源,即表现为与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2通常具有至少约75%、优选至少约85%、更优选至少约90%、更优选至少约95%的核苷酸序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,所述核酸构建体包含与SEQ ID NO:1具有至少95%序列同一性并保留了SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的活性(例如,将胆固醇转化为24-羟基胆固醇的能力)的序列。CYP46A1基因的变体还包括在严格的杂交条件下杂交至如以上定义的序列(或其互补链)的核酸序列。通常的严格杂交条件包括温度高于30℃、优选高于35℃、更优选超过42℃,和/或盐度低于约500mM、优选低于200mM。杂交条件可由技术人员通过修改温度、盐度和/或其它试剂(例如SDS、SSC等)的浓度来调整。

[0276] 在一个实施方式中,所述CYP46A1是经密码子优化的CYP46A1。本文预期使用的示例性的经密码子优化的CYP46A1以SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:110提供。在一些实施方式中,所述病毒载体包含编码SEQ ID NO:109的氨基酸序列的核酸序列。在一些实施方式中,所述病毒载体包含编码与SEQ ID NO:109具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或更多序列同一性的氨基酸序列的核酸序列。在一些实施方式中,所述病毒载体包含SEQ ID NO:110的核酸序列。在一些实施方式中,所述病毒载体包含与SEQ ID NO:110的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或更多序列同一性的核酸序列。

[0277] 在一个实施方式中,所述CYP46A1核酸序列是经密码子优化的,即经密码子优化的变体。在一个实施方式中,所述野生型CYP46A1核酸序列(例如,SEQ ID NO:1)是经密码子优化的,即经密码子优化的变体。本领域已知的密码子优化的示例性方法在下文中描述。在一个实施方式中,利用多于一种的密码子优化方法。例如,所述CYP46A1核酸序列被修饰以具有减少的CpG基序和增加的GC含量。

[0278] 例如,通常出现在CYP46A1核酸序列中转录起始位点处或附近的至少一个或多个CpG岛(胞嘧啶碱基后紧接着鸟嘌呤碱基(CpG),其中胞嘧啶以这种排列倾向于甲基化)被删除和/或取代。在一个实施方式中,CpG岛的数量减少或缺失可以增强体内表达或降低转基因的固有免疫应答。在一个实施方式中,至少1个CpG基序被删除和/或取代,例如,至少1个、2个、3个、4个、5个或更多个CpG基序被删除和/或取代。在一个实施方式中,所述野生型CYP46A1核酸序列被优化为包含0%的CpG。在一个实施方式中,所述野生型CYP46A1核酸序列被优化为包含存在于野生型CYP46A1核酸序列中的不超过10%的CpG,或不超过20%的CpG,或不超过30%的CpG,或不超过40%的CpG,或不超过50%的CpG,或不超过60%的CpG,或不超过70%的CpG,或不超过80%的CpG,或不超过90%的CpG。下表23中描述了引起CpG岛的移除的对野生型CYP46A1核酸序列(SEQ ID NO:1)的示例性修饰。

[0279] 或者,可以通过编辑核酸以移除替代性阅读框来实现密码子优化。在一个实施方式中,替代性阅读框的缺失可以增强体内表达或降低转基因的固有免疫应答。在一个实施方式中,至少1个替代性阅读框(例如,至少2个、至少3个或更多个替代性阅读框)被删除。下表23中描述了引起替代性阅读框的移除的对野生型CYP46A1核酸序列(SEQ ID NO:1)的示例性修饰。

[0280] 在各种实施方式中,所述CYP46A1核酸序列通过增加总GC含量(即整个编码序列中鸟嘌呤和胞嘧啶的百分比)进行密码子优化;移除隐藏的剪接供体或受体位点;和/或添加或移除核糖体进入和/或起始位点(例如Kozak序列)。

[0281] 在一个实施方式中,所述野生型CYP46A1核酸(例如,SEQ ID NO:1)通过包含下表23中提供的至少一个修饰进行密码子优化。表23中描述的“新元件”意在是示例性的,而不是限制性的。例如,如表23中所描述的T222可被替换为“A”。然而,T22也可被替换为“G”或“C”,并且每个修饰都可引起替代性阅读框架的移除。在一个实施方式中,所述野生型CYP46A1核酸(例如,SEQ ID NO:1)通过包括下表23中提供的至少两个或更多个修饰来进行密码子优化。

基于SEQ ID NO:1的NT#	元件	处理	新元件	影响
27	C	替换	T	移除CpG
193-195	TTG	替换	CTA	移除替代性阅读框
222	T	替换	A	移除替代性阅读框
420	C	替换	G	移除替代性阅读框
477	G	替换	A	移除CpG
531-536	AGTGTC	替换	TGTGAG	移除替代性阅读框
1002-1005	GGTC	替换	AGTG	移除替代性阅读框
1114-1116	CGC	替换	AGG	移除替代性阅读框
1149	C	替换	G	移除替代性阅读框
1191	C	替换	G	移除替代性阅读框

[0282] 在一个实施方式中,通过修饰野生型CYP46A1核酸的非翻译区,对所述野生型CYP46A1核酸(例如,SEQ ID NO:1)进行密码子优化。

[0283] 在一个实施方式中,所述CYP46A1蛋白由经密码子优化的CYP46A1核酸序列编码,例如,用于以下中的任何一个或多个:(1)增强体内表达,(2)减少CpG岛或(3)降低固有免疫应答。

[0284] 在一些实施方式中,所述经密码子优化的CYP46A1变体相对于所述野生型CYP46A1表现出增强的长期表达,例如至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少1年、至少2年、至少3年、至少4年或至少5年的时间段。

[0285] 在一些实施方式中,所述经密码子优化的CYP46A1变体表现出相对于所述野生型CYP46A1降低的免疫应答。

[0286] 在一些方面,编码CYP46A1和/或CYP46A1变体的rAAV是使用缺乏细菌骨架序列的闭合线性DNA分子产生的。

[0287] 在一个方面,本文提供了组合物,所述组合物包含分离的核酸,所述分离的核酸包含与SEQ ID NO:110至少80%相同(例如至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%相同)的序列。在一个方面,本文提供了组合物,所述组合物包含重组病毒载体,所述重组病毒载体包含分离的核酸,所述分离的核酸包含与SEQ ID NO:110至少80%相同(例如至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%相同)的序列。在一些实施方式中,与SEQ ID NO:1相比,编码CYP46A1蛋白的分离的核酸包含SEQ ID NO:110的至

少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个或至少15个突变。前述组合物可用于例如在不存在施用的miRNA的情况下治疗如本文所述的神经系统疾病或紊乱。

[0288] SEQ ID NO:1 CYP46A1 mRNA

```

atg agc ccc ggg ctg ctg ctg ctc ggc agc gcc gtc ctg ctc gcc ttc      48
Met Ser Pro Gly Leu Leu Leu Leu Gly Ser Ala Val Leu Leu Ala Phe
1          5          10          15
ggc ctc tgc tgc acc ttc gtg cac cgc gct cgc agc cgc tac gag cac      96
Gly Leu Cys Cys Thr Phe Val His Arg Ala Arg Ser Arg Tyr Glu His
20          25          30
atc ccc ggg ccg ccg cgg ccc agt ttc ctt cta gga cac ctc ccc tgc      144
Ile Pro Gly Pro Pro Arg Pro Ser Phe Leu Leu Gly His Leu Pro Cys
35          40          45
ttt tgg aaa aag gat gag gtt ggt ggc cgt gtg ctc caa gat gtg ttt      192
Phe Trp Lys Lys Asp Glu Val Gly Gly Arg Val Leu Gln Asp Val Phe
50          55          60
ttg gat tgg gct aag aag tat gga cct gtt gtg cgg gtc aac gtc ttc      240
Leu Asp Trp Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Val Val Arg Val Asn Val Phe
65          70          75          80
cac aaa acc tca gtc atc gtc acg agt cct gag tcg gtt aag aag ttc      288
His Lys Thr Ser Val Ile Val Thr Ser Pro Glu Ser Val Lys Lys Phe
85          90          95
ctg atg tca acc aag tac aac aag gac tcc aag atg tac cgt gcg ctc      336
Leu Met Ser Thr Lys Tyr Asn Lys Asp Ser Lys Met Tyr Arg Ala Leu
100         105         110
cag act gtg ttt ggt gag aga ctc ttc ggc caa ggc ttg gtg tcc gaa      384
Gln Thr Val Phe Gly Glu Arg Leu Phe Gly Gln Gly Leu Val Ser Glu
115         120         125
tgc aac tat gag cgc tgg cac aag cag cgg aga gtc ata gac ctg gcc      432
Cys Asn Tyr Glu Arg Trp His Lys Gln Arg Arg Val Ile Asp Leu Ala
130         135         140
ttc agc cgg agc tcc ttg gtt agc tta atg gaa aca ttc aac gag aag      480
Phe Ser Arg Ser Ser Leu Val Ser Leu Met Glu Thr Phe Asn Glu Lys
145         150         155         160
gct gag cag ctg gtg gag att cta gaa gcc aag gca gat ggg cag acc      528
Ala Glu Gln Leu Val Glu Ile Leu Glu Ala Lys Ala Asp Gly Gln Thr
165         170         175
cca gtg tcc atg cag gac atg ctg acc tac acc gcc atg gac atc ctg      576
Pro Val Ser Met Gln Asp Met Leu Thr Tyr Thr Ala Met Asp Ile Leu
180         185         190
gcc aag gca gct ttt ggg atg gag acc agt atg ctg ctg ggt gcc cag      624
Ala Lys Ala Ala Phe Gly Met Glu Thr Ser Met Leu Leu Gly Ala Gln
195         200         205

```

aag cct ctg tcc cag gca gtg aaa ctt atg ttg gag gga atc act gcg	672
Lys Pro Leu Ser Gln Ala Val Lys Leu Met Leu Glu Gly Ile Thr Ala	
210 215 220	
tcc cgc aac act ctg gca aag ttc ctg cca ggg aag agg aag cag ctc	720
Ser Arg Asn Thr Leu Ala Lys Phe Leu Pro Gly Lys Arg Lys Gln Leu	
225 230 235 240	
cgg gag gtc cgg gag agc att cgc ttc ctg cgc cag gtg ggc agg gac	768
Arg Glu Val Arg Glu Ser Ile Arg Phe Leu Arg Gln Val Gly Arg Asp	
245 250 255	
tgg gtc cag cgc cgc cgg gaa gcc ctg aag agg ggc gag gag gtt cct	816
Trp Val Gln Arg Arg Arg Glu Ala Leu Lys Arg Gly Glu Glu Val Pro	
260 265 270	
gcc gac atc ctc aca cag att ctg aaa gct gaa gag gga gcc cag gac	864
Ala Asp Ile Leu Thr Gln Ile Leu Lys Ala Glu Glu Gly Ala Gln Asp	
275 280 285	
gac gag ggt ctg ctg gac aac ttc gtc acc ttc ttc att gct ggt cac	912
Asp Glu Gly Leu Leu Asp Asn Phe Val Thr Phe Phe Ile Ala Gly His	
290 295 300	
gag acc tct gcc aac cac ttg gcg ttc aca gtg atg gag ctg tct cgc	960
Glu Thr Ser Ala Asn His Leu Ala Phe Thr Val Met Glu Leu Ser Arg	
305 310 315 320	
cag cca gag atc gtg gca agg ctg cag gcc gag gtg gat gag gtc att	1008
Gln Pro Glu Ile Val Ala Arg Leu Gln Ala Glu Val Asp Glu Val Ile	
325 330 335	
ggt tct aag agg tac ctg gat ttc gag gac ctg ggg aga ctg cag tac	1056
Gly Ser Lys Arg Tyr Leu Asp Phe Glu Asp Leu Gly Arg Leu Gln Tyr	
340 345 350	
ctg tcc cag gtc ctc aaa gag tgc ctg agg ctg tac cca cca gca tgg	1104
Leu Ser Gln Val Leu Lys Glu Ser Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp	
355 360 365	
ggc acc ttt cgc ctg ctg gaa gag gag acc ttg att gat ggg gtc aga	1152
Gly Thr Phe Arg Leu Leu Glu Glu Glu Thr Leu Ile Asp Gly Val Arg	
370 375 380	
gtc ccc ggc aac acc ccg ctc ttg ttc agc acc tat gtc atg ggg cgg	1200
Val Pro Gly Asn Thr Pro Leu Leu Phe Ser Thr Tyr Val Met Gly Arg	
385 390 395 400	
atg gac aca tac ttt gag gac ccg ctg act ttc aac ccc gat cgc ttc	1248
Met Asp Thr Tyr Phe Glu Asp Pro Leu Thr Phe Asn Pro Asp Arg Phe	
405 410 415	
ggc cct gga gca ccc aag cca cgg ttc acc tac ttc ccc ttc tcc ctg	1296
Gly Pro Gly Ala Pro Lys Pro Arg Phe Thr Tyr Phe Pro Phe Ser Leu	
420 425 430	
ggc cac cgc tcc tgc atc ggg cag cag ttt gct cag atg gag gtg aag	1344
Gly His Arg Ser Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Gln Met Glu Val Lys	
435 440 445	
gtg gtc atg gca aag ctg ctg cag agg ctg gag ttc cgg ctg gtg ccc	1392
Val Val Met Ala Lys Leu Leu Gln Arg Leu Glu Phe Arg Leu Val Pro	
450 455 460	
ggg cag cgc ttc ggg ctg cag gag cag gcc aca ctc aag cca ctg gac	1440
Gly Gln Arg Phe Gly Leu Gln Glu Gln Ala Thr Leu Lys Pro Leu Asp	
465 470 475 480	
ccc gtg ctg tgc acc ctg cgg ccc cgc ggc tgg cag ccc gca ccc cca	1488
Pro Val Leu Cys Thr Leu Arg Pro Arg Gly Trp Gln Pro Ala Pro Pro	
485 490 495	
cca ccc ccc tgc tga gggggcctcc aggcaggacg agactcctcg ggcaagggcc	1543
Pro Pro Pro Cys	
500	
gtgcccgcc acctctgctg cccacggcca cccacccttc tcccctgccc cgccccctgg	1603
gccacccttc acgctggctt ccagcgggcc ctctgcccac cgctgcttc acaccctca	1663
gcgctcccctg tcgctcgcg actccatggc ccttctgga ctggcccttg cccaactccc	1723

```

agccaccacc actgtccta cactgagcc cttgcacagg ccacttgctc agacgagaca 1783
ccctaactct tgctcactcc ctaaagccct cttcaggggt cacctcctcc aagaagccct 1843
cettgccacc ccccgccggc aggggcccct cctctgtgct ccctcggta cctgtgctac 1903
ctctaaccac aactgacca cactgtatcg tgagtgtccg ttgacgtgac caattgccct 1963
gccaggctgt cagcgctca agggtagggg ctgcgtgtga tttgtctctg agccccctgt 2023
gccaccagcag gccccggcac agagtcgatg ctcaataaat gtgtgttgac tgcaaaaaaa 2083
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2138

```

[0289] SEQ ID NO:2 CYP46A1氨基酸序列

```

Met Ser Pro Gly Leu Leu Leu Gly Ser Ala Val Leu Leu Ala Phe
1      5      10      15
Gly Leu Cys Cys Thr Phe Val His Arg Ala Arg Ser Arg Tyr Glu His
20      25      30
Ile Pro Gly Pro Pro Arg Pro Ser Phe Leu Leu Gly His Leu Pro Cys
35      40      45
Phe Trp Lys Lys Asp Glu Val Gly Gly Arg Val Leu Gln Asp Val Phe
50      55      60
Leu Asp Trp Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Val Val Arg Val Asn Val Phe
65      70      75      80
His Lys Thr Ser Val Ile Val Thr Ser Pro Glu Ser Val Lys Lys Phe
85      90      95

Leu Met Ser Thr Lys Tyr Asn Lys Asp Ser Lys Met Tyr Arg Ala Leu
100      105      110
Gln Thr Val Phe Gly Glu Arg Leu Phe Gly Gln Gly Leu Val Ser Glu
115      120      125
Cys Asn Tyr Glu Arg Trp His Lys Gln Arg Arg Val Ile Asp Leu Ala
130      135      140
Phe Ser Arg Ser Ser Leu Val Ser Leu Met Glu Thr Phe Asn Glu Lys
145      150      155      160
Ala Glu Gln Leu Val Glu Ile Leu Glu Ala Lys Ala Asp Gly Gln Thr
165      170      175
Pro Val Ser Met Gln Asp Met Leu Thr Tyr Thr Ala Met Asp Ile Leu
180      185      190
Ala Lys Ala Ala Phe Gly Met Glu Thr Ser Met Leu Leu Gly Ala Gln
195      200      205
Lys Pro Leu Ser Gln Ala Val Lys Leu Met Leu Glu Gly Ile Thr Ala
210      215      220
Ser Arg Asn Thr Leu Ala Lys Phe Leu Pro Gly Lys Arg Lys Gln Leu
225      230      235      240
Arg Glu Val Arg Glu Ser Ile Arg Phe Leu Arg Gln Val Gly Arg Asp
245      250      255
Trp Val Gln Arg Arg Arg Glu Ala Leu Lys Arg Gly Glu Glu Val Pro
260      265      270
Ala Asp Ile Leu Thr Gln Ile Leu Lys Ala Glu Glu Gly Ala Gln Asp
275      280      285
Asp Glu Gly Leu Leu Asp Asn Phe Val Thr Phe Phe Ile Ala Gly His
290      295      300
Glu Thr Ser Ala Asn His Leu Ala Phe Thr Val Met Glu Leu Ser Arg
305      310      315      320
Gln Pro Glu Ile Val Ala Arg Leu Gln Ala Glu Val Asp Glu Val Ile
325      330      335
Gly Ser Lys Arg Tyr Leu Asp Phe Glu Asp Leu Gly Arg Leu Gln Tyr
340      345      350
Leu Ser Gln Val Leu Lys Glu Ser Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp
355      360      365
Gly Thr Phe Arg Leu Leu Glu Glu Thr Leu Ile Asp Gly Val Arg
370      375      380
Val Pro Gly Asn Thr Pro Leu Leu Phe Ser Thr Tyr Val Met Gly Arg
385      390      395      400

```

```

Met Asp Thr Tyr Phe Glu Asp Pro Leu Thr Phe Asn Pro Asp Arg Phe
                    405                               410                   415
Gly Pro Gly Ala Pro Lys Pro Arg Phe Thr Tyr Phe Pro Phe Ser Leu
                    420                               425                   430
Gly His Arg Ser Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Gln Met Glu Val Lys
                    435                               440                   445
Val Val Met Ala Lys Leu Leu Gln Arg Leu Glu Phe Arg Leu Val Pro
                    450                               455                   460
Gly Gln Arg Phe Gly Leu Gln Glu Gln Ala Thr Leu Lys Pro Leu Asp
465                               470                   475                   480
Pro Val Leu Cys Thr Leu Arg Pro Arg Gly Trp Gln Pro Ala Pro Pro
                    485                               490                   495
Pro Pro Pro Cys
                    500

```

载体

[0290] 在不希望受到任何特定理论的约束的情况下,与非等位基因特异性沉默(例如,野生型和突变型HTT等位基因的沉默)相比,由于在细胞中保留了野生型表达和功能,致病基因(例如突变亨廷顿(HTT))的等位基因特异性沉默可在受试者中提供改善的安全性。例如,本发明的各方面涉及发明人的认识和理解:引入了以非等位基因特异性的方式靶向HTT基因的一个或多个抑制性RNA(例如miRNA)序列、同时驱动硬化的野生型HTT基因(未被miRNA靶向的野生型HTT基因)的表达的分离的核酸和载体能够实现伴随突变型HTT敲低(例如在CNS组织中),并且野生型HTT的表达增加。一般来说,编码内源性野生型和突变型HTT mRNA的核酸与编码“硬化”的野生型HTT mRNA的转基因的核酸的序列是足够不同的,其使得“硬化”的野生型HTT转基因mRNA不被所述一个或多个抑制性RNA(例如miRNA)所靶向。例如,这可以通过向所述HTT转基因序列中引入一个或多个沉默突变,使得其编码与内源性野生型HTT基因相同的蛋白质但具有不同的核酸序列来实现。在这种情况下,所述外源性mRNA可被称为“硬化”的。或者,所述抑制性RNA(例如miRNA)可以靶向内源性野生型HTT mRNA的5'和/或3'非翻译区。这些5'和/或3'区域可以之后在转基因mRNA中被移除或替换,使得所述转基因mRNA不被一个或多个抑制性RNA所靶向。

[0291] 可在转基因中提供的报告序列(例如,编码报告蛋白的核酸序列)包括但不限于编码 β -内酰胺酶、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和本领域众所周知的其它项的DNA序列。当与驱动它们表达的调控元件相联系时,所述报告序列提供可通过常规手段(包括:酶法、射线照相法、比色法、荧光法或其它光谱法测定,荧光激活细胞分选测定和免疫学测定(包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和免疫组织化学))检测的信号。例如,当标记序列是LacZ基因时,通过对 β -半乳糖苷酶活性的测定来检测携带所述信号的载体的存在。当所述转基因是绿色荧光蛋白或荧光素酶时,可通过光度计中的颜色或光的产生可视化测量携带所述信号的载体。例如,此类报告子可用于验证核酸的组织特异性靶向能力和组织特异性启动子调控活性。重组腺相关病毒(rAAV)。

[0292] 在一些实施方式中,所述载体是腺相关病毒(AAV)或重组AAV。在一些方面,本公开提供了分离的AAV。如本文中关于AAV所使用,术语“分离的”是指已经人工产生或获得的AAV。可以使用重组方法生产分离的AAV。此类AAV在本文中被称作“重组AAV”。重组AAV(rAAV)优选具有组织特异性靶向能力,使得所述rAAV的转基因和/或核酸酶将被特异性地递送至一个或多个预先确定的组织。AAV衣壳是确定这些组织特异性的靶向能力的重要元

件。因此,可以选择具有适合于被靶向组织的衣壳的rAAV。

[0293] 优选将AAV载体用作自互补双链AAV载体(scAAV),以克服AAV转导中的限制步骤之一(即单链到双链AAV的转换),尽管本文也涵盖使用单链AAV载体(ssAAV)。在本发明的一些实施方式中,所述AAV载体是嵌合的,意味着它包含来自至少两种AAV血清型的成分,例如AAV2的ITR和AAV5的衣壳蛋白。已知AAV9特别有效地转导CNS细胞和组织,并且因此AAV9及其衍生物对于靶向CNS细胞和组织是特别令人感兴趣的。已知AAV2g9特别有效地转导CNS细胞和组织,并且因此AAV2g9及其衍生物对于靶向CNS细胞和组织是特别令人感兴趣的。已知AAVrh10特别有效地转导CNS细胞和组织,并且因此AAVrh10及其衍生物对于靶向CNS细胞和组织是特别令人感兴趣的。AAVrh10是特别优选的,因为已经发现AAVrh10的全身性或静脉内递送在中枢神经系统中提供高的转基因表达,如在(Tanguy等人,2015)中所述,其通过引用并入本文。已知AAVDJ8特别有效地转导CNS细胞和组织,并且因此AAVDJ8及其衍生物对于靶向CNS细胞和组织是特别令人感兴趣的。AAVDJ8是优选的,因为已显示出它有效地靶向大脑的多个区域并有效地靶向星形胶质细胞,如在(Hammond等人,2017)中所述,其通过引用并入本文。还已知AAV1、AAV2、AAV4、AAV5和AAV8靶向CNS细胞和组织,并且因此对于靶向CNS细胞和组织而言,这些AAV血清型及其衍生物也特别令人感兴趣。AAV-PHP.eB也是特别令人感兴趣的,因为已知它有效地穿过血脑屏障(Mathiesen等人,2020)。

[0294] 获得具有期望的衣壳蛋白的重组AAV的方法在本领域中是众所周知的。(参见例如US 2003/0138772),将其内容通过引用的方式以其整体并入本文)。通常,所述方法涉及培养宿主细胞,所述宿主细胞含有编码AAV衣壳蛋白的核酸序列;功能性rep基因;由AAV反向末端重复(ITR)和转基因构成的重组AAV载体;以及足够的辅助功能以允许将重组AAV载体包装在AAV衣壳蛋白内。在一些实施方式中,衣壳蛋白是由AAV的cap基因编码的结构蛋白。AAV包含三种衣壳蛋白,病毒粒子蛋白1至病毒粒子蛋白3(命名为VP1、VP2和VP3),它们所有都通过选择性剪接从单个cap基因转录而来。在一些实施方式中,VP1、VP2和VP3的分子量分别为约87kDa、约72kDa和约62kDa。在一些实施方式中,在翻译时,衣壳蛋白在病毒基因组周围形成球形的60-mer蛋白壳。在一些实施方式中,衣壳蛋白的功能是保护病毒基因组,递送基因组并与宿主相互作用。在一些方面,衣壳蛋白以组织特异性的方式将病毒基因组递送至宿主。

[0295] 在一些实施方式中,重组AAV(rAAV)衣壳蛋白具有选自于由以下所组成的组中的AAV血清型:AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAVrh8、AAVrh10、AAV2G9、AAV2.5G9、AAV9、AAVDJ8、AAV-PHP.eB和AAV10。在一些实施方式中,AAV衣壳蛋白具有源自非人类灵长类动物的血清型,例如AAVrh10血清型。在一些实施方式中,AAV衣壳蛋白具有AAV9血清型。在一些实施方式中,所述衣壳蛋白是AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12或AAV13衣壳蛋白或其嵌合体。在一些实施方式中,所述rAAV包含来自血清型AAV1、AAV2、AAV3a、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV2G9、AAV2.5G9、AAVrh8、AAVrh10、AAVrh74、AAV10或AAV11的衣壳蛋白或其嵌合体。在特定实施方式中,所述rAAV包含如W02017/212019中公开的经化学修饰的衣壳,例如,甘露糖配体与AAV2化学偶联。W02017/212019中公开的具有化学修饰衣壳的rAAV以引用的方式以其整体并入本文中。作为进一步实施方式,本发明的AAV衣壳蛋白和病毒衣壳可以是多倍体(也称为合理单倍体),因为它们可以在单个AAV衣壳中包含VP1、VP2和VP3 AAV血清型的不同组合,如PCT/

US18/22725、PCT/US2018/044632或US10,550,405中所述,将其以引用的方式并入本文中。

[0296] 在一个实施方式中,AAV是AAV9或其衍生物。

[0297] 在一个实施方式中,AAV是AAVrh10或其衍生物。

[0298] 在另一个实施方式中,AAV是AAV-PHP.eB或其衍生物。

[0299] 待在宿主细胞中培养以将rAAV载体包装在AAV衣壳中的成分可以以反式提供给宿主细胞。或者,任何一个或多个所需成分(例如,重组AAV载体、rep序列、cap序列和/或辅助功能)可由稳定的宿主细胞提供,已使用本领域技术人员已知的方法将所述稳定的宿主细胞工程化为含有所需成分中的一个或多个。最合适地,此类稳定的宿主细胞将含有在诱导型启动子的控制下的所需成分。然而,所需成分可在组成型启动子的控制下。在对适合与转基因一起使用的调控元件的讨论中,本文提供了合适的诱导型和组成型启动子的例子。在又一可选方式中,选定的稳定宿主细胞可含有在组成型启动子控制下的选定成分和在一个或多个诱导型启动子控制下的其它选定成分。例如,可生成稳定的宿主细胞,所述细胞来源于293细胞(其含有在组成型启动子的控制下的E1辅助功能),但其含有在诱导型启动子的控制下的rep和/或cap蛋白。其它稳定的宿主细胞可由本领域的技术人员生成。在一些实施方式中,本公开涉及含有核酸的宿主细胞,所述核酸包含编码蛋白质(例如野生型亨廷顿蛋白,任选“硬化的”野生型亨廷顿蛋白)的编码序列。在一些实施方式中,本公开涉及包含上述宿主细胞的组合物。在一些实施方式中,包含上述宿主细胞的组合物进一步包含冷冻保护剂。

[0300] 可使用任何适当的基因元件(载体)将生产本公开的rAAV所需的重组AAV载体、rep序列、cap序列和辅助功能递送至包装宿主细胞。可通过任何合适的方法(包括本文所述的那些方法)递送选定的基因元件。用于构建本公开的任何实施方式的方法是核酸操作领域的技术人员已知的,并包括基因工程、重组工程和合成技术。参见例如Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.。相似地,生成rAAV病毒体的方法是众所周知的,并且合适方法的选择不是对本公开的限制。参见例如K.Fisher等, *J.Virology*, 70:520-532 (1993) 和美国专利号5,478,745。

[0301] 在一些实施方式中,可使用三重转染方法(在美国专利号6,001,650中详细描述)生产重组AAV。通常,重组AAV通过用待包装成AAV颗粒的重组AAV载体(包含转基因)、AAV辅助功能载体和附属功能载体(an accessory function vector)转染宿主细胞来生产。AAV辅助功能载体编码“AAV辅助功能”序列(即rep和cap),其以反式起作用,用于富有成效的AAV复制和衣壳化。优选地,AAV辅助功能载体支持高效的AAV载体生产,而不产生任何可检测的野生型AAV病毒体(即含有功能性rep和cap基因的AAV病毒体)。适合与本公开一起使用的载体的非限制性例子包括pHLP19(在美国专利号6,001,650中描述)和pRep6cap6载体(在美国专利号6,156,303中描述),将二者的全部内容通过引用并入本文。附属功能载体编码AAV复制所依赖的非AAV来源的病毒和/或细胞功能(即“附属功能”)的核苷酸序列。附属功能包括AAV复制所需的那些功能,包括但不限于参与以下的那些部分:激活AAV基因转录、阶段特异性的AAV mRNA剪接、AAV DNA复制、cap表达产物的合成和AAV衣壳组装。基于病毒的附属功能可以来源于任何已知的辅助病毒,例如腺病毒、疱疹病毒(除了1型单纯疱疹病毒以外)和牛痘病毒。

[0302] 在一些方面,三重转染方法使用缺乏细菌骨架序列的闭合线性DNA分子,例如,如PCT/US2021/013689(公开为WO/2021/146591)中所述,其通过引用整体并入本文。

[0303] 在一些方面,本公开提供了经转染的宿主细胞。使用术语“转染”是用于指细胞对外来DNA的吸收,并且当外源性DNA被引入细胞膜内时,细胞被“转染”。许多转染技术在本领域中是众所周知的。参见例如Graham等(1973) *Virology*, 52:456; Sambrook等(1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York; Davis等(1986), *Basic Methods in Molecular Biology*; Elsevier, 和Chu等(1981), *Gene* 13:197。此类技术可用于将一个或多个外源性核酸(例如核苷酸整合载体和其它核酸分子)引入合适的宿主细胞。

[0304] “宿主细胞”是指容纳有或能够容纳感兴趣的物质的任何细胞。通常,宿主细胞是哺乳动物细胞。宿主细胞可用作以下的接受者: AAV辅助构建体、AAV小基因质粒、附属功能载体或其它与重组AAV的产生相关的转移DNA。该术语包括被转染的原始细胞的后代。因此,本文所使用的“宿主细胞”可指已用外源性DNA序列进行转染的细胞。可以理解的是,由于自然的、偶然的或故意的突变,单个亲代细胞的后代在形态学上或在基因组或总DNA互补体上可不必需与原始亲代完全相同。

[0305] 如本文所使用,术语“细胞系”是指能够在体外连续或长期生长和分裂的细胞的群体。通常,细胞系是来源于单个祖细胞的克隆群体。在本领域中进一步知晓的是,在此类克隆群体的储存或转移过程中,核型能够发生自发或诱导的改变。因此,来源于所指细胞系的细胞可不与祖先细胞或培养物精确相同,并且所指的细胞系包括此类变体。

[0306] 如本文所使用,术语“重组细胞”是指在其中引入外源性DNA区段(例如导致生物活性多肽的转录或生物活性核酸(如RNA)的产生的DNA区段)的细胞。

[0307] 如本文所使用,术语“载体”包括任何基因元件,例如质粒、噬菌体、转座子、黏粒(cosmid)、染色体、人工染色体、病毒、病毒体等,其在与适当的控制元件相关联时能够复制,并且其能够在细胞之间转移基因序列。因此,该术语包括克隆工具和表达工具,以及病毒载体。一种类型的载体是“质粒”,其是指环状双链DNA环,向其中连接另外的DNA区段。另一种类型的载体是病毒载体,其中,另外的DNA区段被连接到病毒基因组中。特定载体能够在它们被引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。此外,特定载体能够指导与它们所可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中被称为“表达载体”。一般来说,在重组DNA技术中有用的表达载体通常是质粒的形式。在本申请文件中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明旨在包括那样的其它形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷的逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),它们提供等同的功能。

[0308] 克隆载体是能够自主复制或整合在宿主细胞的基因组中的载体,其进一步的特征在于一个或多个核酸内切酶限制位点,在所述核酸内切酶限制位点处可以可确定的方式切割载体,并且可以将期望的DNA序列连接到其中,使得新的重组载体保持其在宿主细胞中复制的能力。在质粒的情况下,随着质粒在宿主细胞(例如宿主细菌)内拷贝数增加,所期望的序列的复制可以发生很多次,或者在宿主通过有丝分裂进行繁殖之前所期望的序列的复制在每个宿主仅一次。在噬菌体的情况下,复制可以在裂解期主动发生或在溶原期被动发生。

[0309] 表达载体是可通过限制和连接将所期望的DNA序列插入其中从而使得它可操作地

接合至调控序列并可表达为RNA转录本的载体。载体可以进一步含有一个或多个标记序列,所述标记序列适合用于识别已经或尚未转化或转染有载体的细胞。标记包括例如编码增加或减少对抗生素或其它化合物的抗性或敏感性的蛋白质的基因;编码其活性可通过本领域已知的标准测定进行检测的酶的基因(例如, β -半乳糖苷酶、荧光素酶或碱性磷酸酶);以及可视地影响经转化或转染的细胞、宿主、菌落或菌斑的表型(例如,绿色荧光蛋白)的基因。在特定实施方式中,本文使用的载体能够自主复制和表达存在于其可操作地连接至的DNA区段中的结构基因产物。

[0310] 本发明进一步提供了包含本发明的合成的CNS特异性启动子或表达盒的载体。在本发明的一些实施方式中,所述载体是质粒。此类质粒可以包含多种其它功能性核酸序列,例如一个或多个可选的标记、一个或多个复制起点、多个克隆位点等。在本发明的一些实施方式中,所述载体是病毒载体。

[0311] 在本发明的一些实施方式中,所述载体是用于在真核细胞中表达的表达载体。真核表达载体的例子包括但不限于可从Stratagene获得的pW-LNE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG;可从Amersham Pharmacia Biotech获得的pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL;以及可从Clontech获得的pCMVDsRed2-express、pIRES2-DsRed2、pDsRed2-Mito、pCMV-EGFP。许多其它载体是众所周知的并且可商购获得。对于哺乳动物细胞腺病毒载体,pSV和pCMV系列载体是特别众所周知的非限制性例子。存在许多众所周知的酵母表达载体,包括但不限于酵母整合质粒(YIp)和酵母复制质粒(YRp)。对于植物来说,农杆菌的Ti质粒是示例性的表达载体,并且植物病毒也提供了合适的表达载体,例如烟草花叶病毒(TMV)、马铃薯X病毒和豇豆花叶病毒。

[0312] 在一些优选实施方式中,所述载体是基因治疗载体。本领域已知各种基因治疗载体,并且可以提及AAV载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体和慢病毒载体。当所述载体是基因治疗载体时,所述载体优选包含可操作地连接到本发明的合成的CNS特异性启动子的核酸序列,该核酸序列编码治疗产品(适当地为治疗性蛋白质)。所述治疗性蛋白质可以是可分泌蛋白质。上文讨论了可分泌蛋白质的非限制性实例,并且示例性的可分泌治疗性蛋白质包括凝血因子,例如因子VIII或因子IX、胰岛素、促红细胞生成素、脂蛋白脂肪酶、抗体或纳米抗体、生长因子、细胞因子、趋化因子、血浆因子、毒性蛋白质等。

[0313] 在一些实施方式中,有用的载体被认为是在其中待转录的核酸区段被定位在启动子的转录控制之下的那些载体。如果期望编码序列被翻译为功能性蛋白质,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序列之间的连接的性质不会(1)导致引入移码突变、(2)干扰启动子区域指导编码序列转录的能力,或(3)干扰相应的RNA转录本被翻译成蛋白质的能力,则称所述两个DNA序列是可操作地接合的。因此,如果启动子区域能够实现该DNA序列的转录,使得产生的转录本能够被翻译成所期望的蛋白质或多肽,则所述启动子区域将是可操作地接合至编码序列的。

[0314] “启动子”是指由细胞的合成装置或引入的合成装置识别并需要其以启动基因的特异性转录的DNA序列。当编码本文所述的任何多肽的核酸分子在细胞中表达时,可使用各种转录控制序列(例如启动子/增强子序列)以指导其表达。启动子可以是天然启动子,即在其内源性环境中的基因的启动子,其提供了基因表达的正常调控。在一些实施方式中,所述启动子可以是组成型的,即启动子是不受调控的,允许其相关基因连续转录。也可以使用

各种条件性启动子,例如由分子的存在或不存在的启动子。

[0315] 本文所用的术语“合成的启动子”是指自然界中不存在的启动子。在目前情况下,它通常包括可操作地连接到启动子元件(例如最小(或核心)启动子或CNS特异性近端启动子)的本发明的CRE。本发明的一个或多个CRE用于增强可操作地连接到合成的启动子的基因的CNS特异性转录。合成的启动子的部分可能是天然存在的(例如最小启动子或启动子中的一个或多个CRE),但作为完整实体的合成的启动子不是天然存在的。

[0316] 基因表达所需的调控序列的精确性质可以在物种或细胞类型之间不同,但必要时一般而言可包括分别参与转录起始和翻译的5'非转录序列和5'非翻译序列,例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。特别是,此类5'非转录调控序列将包括启动子区域,所述启动子区域包含用于对可操作地接合的基因进行转录控制的启动子序列。如所期望的,调控序列还可以包括增强子序列或上游激活子序列。本发明的载体可以任选地包含5'前导或信号序列。适当载体的选择和设计在本领域普通技术人员的能力和自由裁量范围内。

[0317] 包含用于表达的所有必需元件的表达载体是商业可得的并且是本领域技术人员已知的。参见例如,Sambrook等,Molecular Cloning.:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989。通过将异源DNA(RNA)引入细胞来对细胞进行遗传工程化。所述异源DNA(RNA)被置于转录元件的可操作的控制之下,以允许所述异源DNA在宿主细胞中表达。

[0318] 短语“可操作地定位”、“处于控制下”或“处于转录控制下”意指启动子相对于核酸处于正确的位置和方向以控制RNA聚合酶起始和基因的表达。术语“表达载体或构建体”意指包含其中部分或全部核酸编码序列能够被转录的核酸的任何类型的遗传构建体。在一些实施方式中,表达包括核酸的转录,例如以从转录基因生成生物活性多肽产物或功能性RNA(例如,向导RNA)。

[0319] 用于将重组载体包装在期望的AAV衣壳中以产生本公开的rAAV的前述方法并不意味着限制,并且其它合适的方法对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0320] 在一些实施方式中,本文提供的序列(包括序列表中提供的序列)中的任一个或多个胸苷(T)核苷酸或尿苷(U)核苷酸可被适合与腺苷核苷酸碱基配对(例如,通过Watson-Crick碱基对)的任何其它核苷酸替换。例如,在一些实施方式中,本文提供的序列(包括序列表中提供的序列)中的任一个或多个胸苷(T)核苷酸可被适当地替换为尿苷(U)核苷酸,反之亦然。

[0321] 在任何方面的一些实施方式中,核酸(例如,miRNA)经化学修饰以增强稳定性或其它有益的特性。本文所述的核酸可通过本领域中充分确立的方法来合成和/或修饰,例如在“Current protocols in nucleic acid chemistry,”Beaucage,S.L等(编著),John Wiley&Sons,Inc.,New York,NY,USA中描述的那些方法,通过引用的方式将其并入本文。修饰包括例如,(a)末端修饰,例如5'端修饰(磷酸化、缀合、反向连接等)、3'端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向连接等);(b)碱基修饰,例如替换为稳定碱基、去稳定碱基或与扩展的伴侣库进行碱基配对的碱基,碱基移除(无碱基核苷酸),或缀合的碱基;(c)糖修饰(例如,在2'位置或4'位置)或糖的替换;以及(d)骨架修饰,包括磷酸二酯键的修饰或替换。在本文所述实施方式中有用的核酸化合物的具体实例包括但不限于包含经修饰的骨架或不含天然核苷间连接键的核酸。具有经修饰的骨架的核酸尤其包括在骨架中没有磷原子的核酸。出于

本申请文件的目的是,并且如本领域中有时提到的,在其核苷间骨架中不具有磷原子的经修饰的核酸也可以被认为是寡核苷。在任何方面的一些实施方式中,经修饰的核酸将在其核苷间骨架中具有磷原子。

[0322] 例如,经修饰的核酸骨架可包括硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、具有正常3'-5'连接键的硼磷酸酯、硫羰氨基磷酸酯、硫羰烷基磷酸酯(thionoalkylphosphonates)、和硫羰烷基磷酸三酯(thionoalkylphosphotriesters),它们的2'-5'连接类似物,以及具有相反极性的那些物质,其中,相邻的核苷单元对以3'-5'至5'-3'或2'-5'→至5'-2'连接。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。其中不包含磷原子的经修饰的核酸骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间连接键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间连接键、或一个或多个短链杂原子或杂环的核苷间连接键形成的骨架。这些骨架包括具有如下的骨架:吗啉代连接键(部分由核苷的糖部分形成);硅氧烷骨架;硫化物、亚砷和砷骨架;甲酰基(formacetyl)和硫代甲酰基(thioformacetyl)骨架;亚甲基甲酰基和硫代甲酰基骨架;含有烯烃的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;具有混合的N、O、S和CH₂组成部分的其它骨架,以及具有杂原子骨架的寡核苷,并且特别是--CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--和--N(CH₃)--CH₂--CH₂--[其中天然磷酸二酯骨架表示为--O--P--O--CH₂--]。

[0323] 在其它核酸模拟物中,核苷酸单元的糖和核苷间连接键(即骨架)二者都被新基团替换。保持碱基单元以用于与合适的核酸靶化合物杂交。一种此类寡聚化合物(示出了具有优异杂交特性的RNA模拟物)被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,RNA的糖骨架被替换为含有酰胺的骨架,特别是氨乙基甘氨酸骨架。核碱基被保留并直接或间接结合到骨架的酰胺部分的氮杂氮原子。

[0324] 还可以修饰核酸以包括一个或多个锁核酸(LNA)。锁核酸是具有经修饰的核糖部分的核苷酸,其中,所述核糖部分包含连接2'和4'碳的额外桥接。这种结构有效地将核糖“锁定”在3'-内结构构象中。已显示出向siRNA添加锁核酸使血清中siRNA的稳定性增加,并减少脱靶效应(Elmen, J.等,(2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, O.R.等,(2007) *Mol. Canc. Ther.* 6(3):833-843; Grunweller, A.等,(2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193)。

[0325] 经修饰的核酸还可以包含一个或多个取代的糖部分。本文所述的核酸可在2'位置包含以下之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中,所述烷基、烯基和炔基可为取代或未取代的C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基。示例性合适的修饰包括O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂和O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,其中n和m为1至约10。在任何方面的一些实施方式中,核酸在2'位置包含以下之一:C₁至C₁₀低级烷基,取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA剪切基团、报告基团、嵌入剂、改善核酸药代动力学性质的基团、或改善核酸药效学性质的基团,以及具有相似性质的其它取代基。在任何

方面的一些实施方式中,修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等,Helv.Chim.Acta,1995,78:486-504),即烷氧基-烷氧基基团。另一示例性修饰为2'-二甲氨基氧基乙氧基,即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团,也称为2'-DMAOE,如下文实施例中所述;以及2'-二甲氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂,也在下文的实例中有描述。

[0326] 其它修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)和2'-氟(2'-F)。也可在核酸上的其它位置、特别是3'末端核苷酸或2'-5'连接的dsRNA上糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置进行类似的修饰。核酸也可具有糖模拟物、例如环丁基部分来代替呋喃戊糖。

[0327] 核酸还可以包括核碱基(在本领域中经常简称为“碱基”)的修饰或取代。如本文所用,“未修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基可包括其它合成和天然核碱基,包括但不限于5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物,2-硫脲嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶(2-thiothymine)和2-硫代胞嘧啶(2-thiocytosine)、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫代尿嘧啶,8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代(特别是5-溴代)、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤(7-daazaadenine),以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。这些核碱基中的某些特别可用于增加本发明特征的抑制性核酸的结合亲和力。这些核碱基包括5-取代的嘧啶,6-氮杂嘧啶,和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤(包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶)。5-甲基胞嘧啶取代已显示出将核酸双链体稳定性提高0.6°C-1.2°C(Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T.和Lebleu, B., 编著, dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), 并且是示例性碱基取代, 当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时甚至更特别是。在任何方面的一些实施方式中, 经修饰的核碱基可以包括d5SICS和dNAM, 它们是可以单独或一起作为碱基对使用的非天然核碱基的非限制性实例(参见例如Leconte等, J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 7, 2336-2343; Malyshev等, PNAS. 2012. 109(30) 12005-12010)。在任何方面的一些实施方式中, 寡核苷酸标签(例如, Oligopaint) 包含本领域已知的任何经修饰的核碱基, 即由未修饰的和/或天然核碱基进行修饰而来的任何核碱基。

[0328] 上述所述的经修饰的核酸、骨架和核碱基的制备是本领域众所周知的。

[0329] 本发明中特征的核酸的另一修饰涉及将核酸与一个或多个配体、部分或缀合物化学连接, 所述配体、部分或缀合物增强所述核酸的活性、细胞分布、药代动力学性质或细胞摄取。此类部分包括但不限于脂质部分, 例如胆固醇部分(Letsinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556); 胆酸(Manoharan等, Biorg. Med. Chem. Let., 1994, 4: 1053-1060); 硫醚, 例如beryl-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660: 306-309; Manoharan等, Biorg. Med. Chem. Let., 1993, 3: 2765-2770); 硫代胆固醇(Oberhauser等, Nucl. Acids Res., 1992, 20: 533-538); 脂肪链, 例如, 十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等, EMBO J, 1991, 10: 1111-1118;

Kabanov等,FEBS Lett.,1990,259:327-330;Svinarchuk等,Biochimie,1993,75:49-54);磷脂,例如二-十六烷基-外消旋甘油或三乙基-铵1,2-二-0-十六烷基-外消旋-甘油-3-磷酸酯/盐(Manoharan等,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651-3654;Shea等,Nucl.Acids Res.,1990,18:3777-3783);聚胺或聚乙二醇链(Manoharan等,Nucleosides&Nucleotides,1995,14:969-973);或金刚烷乙酸(Manoharan等,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651-3654);棕榈基部分(Mishra等,Biochim.Biophys.Acta,1995,1264:229-237);或十八烷基胺或己氨基-羧基氧基胆固醇部分(Crooke等,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277:923-937)。

[0330] 在任何方面的一些实施方式中,所述载体是pEMBL。在任何方面的一些实施方式中,所述载体是pEMBL-D(+)Syn1。在任何方面的一些实施方式中,所述载体为pEMBL-D(+)Syn1-仅hCG内含子。在任何方面的一些实施方式中,所述载体是pEMBL-D(+)Syn1-hCGIn-2x对照pre-miR。在任何方面的一些实施方式中,所述载体是pEMBL-D(+)Syn1-hCGIn-2x人工pre-miR。在任何方面的一些实施方式中,所述载体是pEMBL-D(+)Syn1-CYP46A1-hCGIn-2x人工pre-miR。在任何方面的一些实施方式中,所述载体是pEMBL-D(+)Syn1-luc-HTT-3'UTR/突变体。在任何方面的一些实施方式中,所述载体包含以下中的至少一种:至少一个(例如2个)ITR;Syn1启动子;至少一个(例如2个)hCG内含子;premiR的至少一个(例如2个)拷贝(例如对照pre-miR,人工pre-miR;SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260);小polyA;CYP46A1;荧光素酶;HTT靶向序列;和/或HTT-3'UTR/突变体。在一些实施方式中,所述载体包含选自表10-表13的神经元特异性的合成的启动子和/或选自表13-表15的CRE。在实施方式的特定方面,所述miRNA靶向野生型HTT等位基因。在实施方式的其它方面,miRNA靶向突变型HTT等位基因。在又一个实施方式中,miRNA靶向野生型和突变型HTT等位基因。在又一个实施方式中,miRNA靶向任何HTT mRNA。

[0331] 在一些实施方式中,重组表达的基因中的一个或多个可以整合到细胞的基因组中。

[0332] 可以使用本领域标准的方法和技术将编码要求保护的发明的酶的核酸分子引入至一个或多个细胞中。例如,可以通过标准方案引入核酸分子,例如包括化学转化和电穿孔的转化、转导、粒子轰击等。表达编码要求保护的发明的酶的核酸分子也可以通过将所述核酸分子整合进基因组来实现。

[0333] 在一些实施方式中,所述启动子是synapsin (Syn1) 启动子(参见例如SEQ ID NO:152)。在一个方面,所述启动子包含与SEQ ID NO:152至少80%相同(例如,至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%相同)的核酸序列。在一个方面,本文提供的组合包含重组病毒载体,所述重组病毒载体包含启动子,所述启动子包含与SEQ ID NO:152至少80%相同(例如,至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%相同)的核酸序列。

[0334] Synapsin-1 (SEQ ID NO:152)

GAGGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGTGCCTACCTGACGACCG
 ACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAA
 ACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCCTGACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCCTTCGCCCCGCTGGCGGCG
 CGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGTGCCTGACTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCCCCTTCCCGGCC
 ACCTTGGTTCGCGTCCGCGCCGCCGCGCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGG
 GCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGT
 GCCTGAGAGCGCAGTCG (SEQ ID NO: 152)

[0335] 在一个方面,本文提供了包含分离的核酸的组合物,所述分离的核酸包含与SEQ ID NO:111至少80%相同(例如,至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%相同)的序列。在一个方面,本文提供了包含重组病毒载体的组合物,所述重组病毒载体包含分离的核酸,所述分离的核酸包含与SEQ ID NO:111至少80%相同(例如,至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%相同)的序列。在一些实施方式中,所述载体(例如,rAAV)包含启动子(例如,合成的神经系统特异性启动子;参见例如表10-表13)或其片段、增强子、和/或顺式调控元件(CRE;参见例如表13-表15)。在一些实施方式中,所述增强子是CMV增强子。在一些实施方式中,所述启动子是ACTB近端启动子。在一些实施方式中,所述载体进一步包含内含子。在一些实施方式中,所述内含子包括ACTB内含子/嵌合ACTB-HBB2内含子。参见例如SEQ ID NO:111,表16。前述组合物可用于、例如在不存在施用的miRNA的情况下治疗本文所述的神经系统疾病或紊乱。

[0336] SEQ ID NO:111, pJAL130-CYP46A1 (4036bp), 经密码子优化的CYP46序列的ITR序列到ITR(参见例如SEQ ID NO:110;参见例如图1)。

[0337] 加粗的文本(例如SEQ ID NO:111的核苷酸(nt)1-130)表示左ITR。

[0338] 斜体文本(例如SEQ ID NO:111的nt 182-436)表示增强子。

[0339] 粗斜体文本(例如,SEQ ID NO:111的nt 550-804)表示启动子。

[0340] 双下划线文本(例如SEQ ID NO:111的nt 824-1892)表示内含子。

[0341] 加粗的双下划线文本(例如SEQ ID NO:111的nt 1966-3465)表示经密码子优化的CYP46A1的编码序列(CDS)(参见例如SEQ ID NO:110)。

[0342] 斜体双下划线文本(例如SEQ ID NO:111的nt 3629-3853)表示polyA。

[0343] 加粗的斜体双下划线文本(例如SEQ ID NO:111的nt3907-4036)表示右ITR。

tcatcattttggcaagaattgattaattcgagcgaacgcgctcgagtcgctcggtacgatttaaattgaattcct
taagctatcataggaatgagccccggctgctgctgctcggtagcgcgctcctgctcgctctcgccctctgctgc
accttcgtgcaccgcgctcgcagccgctacgagcacaatccccgggcccgcggcccagtttctcttaggacac
ctcccctgcttttggaaaaaggaagaggttgggtggccgtgctcctcaagaatggttttCtAgattgggctaagaag
tatggacctgtAgtgcgggtcaacgtcttccacaaaacctcagtcacgtcagcagatcctgagtcgggttaagaag
ttcctgatgtcaaccaagtacaacaaggactccaagatgtaccgtgcgctccagactgtggttgggtgagagactc
ttcggccaagccttgggtgtccgaaatgcaactatgagcgcctggcacaagcagcggagagtGatagacctggccttc
agccggagctccttgggttagcttaatggaaacattcaacgaAaaggctgagcagctgggtggagattctagaagcc
aaggcagatgggcagaccccTgtGAGCaatgcaggacatgctgacctacaccgccaatggacaacctggccaaggca
gcttttgggatggagaccagtatgctgctgggtgccagaagcctctgtcccaggcagtgaaacttaagtggag
ggaatcactgcgtcccgaacactctggcaaaagtctcctgcccagggaagaggaagcagctccgggaggtccgggag
agcattcgtctcctgcccaggtgggcagggactgggtccagcgcgccgggaagccctgaagaggggagagag
gttctcctgcccagatcctcacacagattctgaaagctgaagagggagcccaggacgacgagggctctgctggacaac
ttcgtcacctcttctattgctggtcagcagacctctgccaaccacttggcgttcacagtgatggagctgtctcgc
cagccagagatcgtggcaaggctgcagccgaggtggaatgaAgtGattggttctaaagagttaccggatttcag
gacctggggagactgcagctacctgtcccaggtcctcaaagagtcgctgaggtgtaccaccagcatggggcacc
tttAGGctgctggaagaggagaccttgattgatgggtGagagctcccggcaacaccccgcctctgttcagcacc
tatgtGatggggcggatggacacatactttgaggaccgcctgactttcaaccccagctcgtctcggccctggagca
cccaagccacggttcacctaacttccccttctcccctgggccaccgctcctgcatcgggcagcagtttgcctcagatg
gaggtgaaaggtggtcatggcaaaagctgctgcagaggtcggagttccggctgggtgcccgggacagcctctcgggctg
caggagcagggccacactcaagccactggaccccgtgctgtgcacctgcccggcccgggctggcagcccgcaccc
ccaccacccccctgctgagtgatagcttgggtaccgagctogatccaattgcaatgatcatcatgacagatctgcg
cgcgatcgatatcagcgcctttaaatttgcgcatgcagctatagttctagagggccctattctatagtgctaccta
aatgctagagctcgtgatcagcctogaatgtgccttctagttgcccagccatctgttgtttgcccctcccccgta
ccttcttgaccctggaaggtgccaactcccactgtcctttcctaataaaatgagggaaattgcatcgcattgtctg
agtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcagg
catgctggggatgaggtgggctctatgggtttaaacGCGGCCGCTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATT
ACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCGGGCGAC
CAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID NO:

111)

[0344] 表16

特征	SEQ ID NO: 111中的位置		限定符
misc_feature	1	130	/label=L-ITR
增强子	182	548	/label=CMVe /label=CMV增强子 /note="GenBank: KX529075.1"
启动子	550	823	/label=ACTBp /label=ACTB 近端启动子
misc_feature	824	1892	/label= 嵌合 ACTB-HBB2 内含子
CDS	1966	3468	/codon_start=1 /product=">NM_006668.2智人细胞色素P450家族 46亚族A成员1 (CYP46A1), mRNA"
polyA_signal	3629	3853	/label=bGH polyA /label=bGH\poly(A)\signal /note="牛生长激素基因, complete cds. GenBank: M57764.1 ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M57764.1"
misc_feature	3907	4036	/label=R-ITR
来源	182	3853	/organism="重组的质粒" /mol_type="其它DNA" /note="/vntifkey=98"
来源	550	1794	/label=Gallus gallus sequence /note="/Transferred_From=CBA-启动子 UNC-AskBio_JMI edited" /note="/Transferred_Similarity=99.36%" /note="/created_by=User"
来源	1803	1892	/label=Oryctolagus cuniculus /note="/Transferred_From=CBA 启动子 UNC-AskBio_JMI edited" /note="/Transferred_Similarity=100.00%/note="/created_by=User" /note="/modified_by=User"

[0345] 在一个方面,本文提供了组合物,所述组合物包含分离的核酸,所述分离的核酸包含与SEQ ID NO:194至少80%相同的序列,例如至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%相同的序列。在一个方面,本文提供了组合物,所述组合物包含重组病毒载体,所述重组病毒载体包含分离的核酸,所述分离的核酸包含与SEQ ID NO:194至少80%相同(例如至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%相同)的序列。在一些实施方式中,所述载体(例如,rAAV)包含启动子(例如,合成的神经系统特异性启动子;参见例如表10-表13)或其片段、增强子和/或顺式调控元件(CRE;参见例如表13-表15)。在一些实施方式中,所述增强子是CMV增强子。在一些实施方式中,所述启动子是ACTB近端启动子。在一些实施方式中,所述启动子是CAG启动子。在一些实施方式中,所述载体进一步包含内含子。在一些实施方式中,所述内含子包含ACTB内含子/嵌合的ACTB-HBB2内含子。前述组合物可用于、例如在不存在施用的miRNA的情况下来治疗如本文所述的神经系统疾病或紊乱。

- [0346] SEQ ID NO:194, dbDNA-CYP46A1 (4,573bp), 经密码子优化的CYP46序列的ITR到ITR序列(参见例如SEQ ID NO:212;参见例如图9)。SEQ ID NO:212是在C端具有另外三个碱基对的SEQ ID NO:110的序列,所述碱基对翻译终止密码子。
- [0347] SEQ ID NO:194的碱基对1-28描述Te1N原核端粒酶识别序列;即SEQ ID NO:195。
- [0348] SEQ ID NO:194的碱基对29-37描述接头序列;即,SEQ ID NO:196。
- [0349] SEQ ID NO:194的碱基对38-249描述5'填充序列;即,SEQ ID NO:197。
- [0350] SEQ ID NO:194的碱基对250-271描述接头序列;即,SEQ ID NO:198。
- [0351] SEQ ID NO:194的碱基对272-401描述L-ITR序列;即SEQ ID NO:199。
- [0352] SEQ ID NO:194的碱基对402-452描述接头序列;即SEQ ID NO:200。
- [0353] SEQ ID NO:194的碱基对453-2073描述CAG启动子序列;即SEQ ID NO:193。
- [0354] SEQ ID NO:194的碱基对2074-2114描述HBB2内含子序列;即SEQ ID NO:201。
- [0355] SEQ ID NO:194的碱基对2115-2236描述接头序列;即SEQ ID NO:202。
- [0356] SEQ ID NO:194的碱基对2237-2379描述CYP46A1序列;即SEQ ID NO:212(SEQ ID NO:212是在C端具有另外三个碱基对的SEQ ID NO:110的序列,所述碱基对翻译终止密码子。)
- [0357] SEQ ID NO:194的碱基对2380-3899描述接头序列;即SEQ ID NO:203。
- [0358] SEQ ID NO:194的碱基对3900-4124描述bGH poly(A)信号序列;即SEQ ID NO:204。
- [0359] SEQ ID NO:194的碱基对4125-4177描述接头序列;即SEQ ID NO:205。
- [0360] SEQ ID NO:194的碱基对4178-4307描述R-ITR序列;即SEQ ID NO:206。
- [0361] SEQ ID NO:194的碱基对4308-4321描述接头序列;即,SEQ ID NO:207。
- [0362] SEQ ID NO:194的碱基对4322-4533描述3'填充序列;即,SEQ ID NO:208。
- [0363] SEQ ID NO:194的碱基对4534-4545描述接头序列;即,SEQ ID NO:209。
- [0364] SEQ ID NO:194的碱基对4546-4573描述Te1N原核端粒酶识别序列;即,SEQ ID NO:210。

表25-包含于dbDNA-CYP46A1中的序列, 参见SEQ ID NO: 194	
SEQ ID NO:	核酸序列
195	gcgtataatggactattgtgtgctgata
196	tctgtacac
197	ttaagggctagatcttagcttacgtcactagagggtccacggttagtttttaagatccattgatctccta aacgctgcaagattcgcaacctggtatacttagcctagggcgtaggtcctagtgacagcgggactttttt ctaaagtcggtgagaggaggagtcgtcagaccagatagctttgatgtcctgatcgggaaggatcgttggcc cc
198	CCTGCAGGCAGCTGTTAATTAA
199	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCCT
200	TGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGGCGCGCCacgcgt
201	Cctctgctaaccatgttcatgccttcttcttttctctacag
202	Ctccctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcttttggcaaagaattgattaattcgagcgaac gcgtcgagtcgctcggtacgatttaaattgaattccttaagctatcatagga
203	gtgatagcttggtaccgagctcgatccaattgcaatgatcatcatgacagatctgcgcgcatcgatc agcgctttaaatttgcgcatgcagctatagttctagagggccctattctatagtgtcacctaagtctag agctcgctgatcagcctcga
204	ctgtgccttctagttgccagccatctggtgttggccctccccgctgccttcttgaccctggaaggtgc cactcccactgtccttctctaataaaatgaggaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctatt ctggggggtggggtgggagcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatg cggtgggctctatgg
205	gtttaaacGCGGCCGCTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACA
206	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC AAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
207	TTAATTAAGGCGCC
208	ctagggcggacccttagactctgtactcagttctataaacgagccattggatacagagatccgtagattga aagggacacggaatatccccggacgcaatagacaccgggtggacagcttggtatcctgagcacagtgcgcg gtccgaatctagctctacttttagaggccccgattctgatggtcgtagaccgagaaccgattgggggga tg
209	agatctactagt
210	tatcagcacacaattgccattatacgc

合成的CNS特异性表达盒

[0365] 本发明还提供了合成的CNS特异性表达盒,所述表达盒包含本发明的合成的CNS特异性启动子,所述启动子可操作地连接到编码表达产物的序列,所述表达产物适当地为基因(例如转基因)。

[0366] 所述基因通常编码期望的基因表达产物,例如多肽(蛋白质)或RNA。所述基因可以是全长cDNA或基因组DNA序列,或其具有至少一些期望的生物活性的任何突变体或亚基、片段。

[0367] 当基因编码蛋白质时,蛋白质基本上可以是任何类型的蛋白质。通过非限制性实例,所述蛋白质可以是酶、抗体(例如单克隆抗体)、抗体片段、病毒蛋白(例如REP-CAP、REV、VSV-G或RD114)、治疗性蛋白质(例如FVIII)或毒性蛋白质(例如Caspase 3、Caspase 8或Caspase9)。

[0368] 本领域已描述了适合治疗上述病症的各种表达产物。适当地,编码可操作地连接到根据本发明的启动子或最小/近端启动子、CRE的表达产物的核酸可以是选自由以下组所组成的组中的基因之一: NPC1、EAAT2、NPY、CYP46A1、GLB 1、APOE(例如ApoE2、ApoE3或ApoE4)、HEX、CLN1、CLN2、CLN3、CLN4、CLN5、CLN6、SUMF1、DCTN1、PRPH、SOD1、NEFH、GBA、IDUA、NAGLU、GUSB、ARSA、MANB、AADC、GDNF、NTN、ASP、MECP2、PTCHD1、GJB1、UBE3A、HEXA、MOG或SLC6A3。另外或可替代地,可操作地连接到根据本发明的启动子或最小/近端启动子、CRE的

表达产物可以是针对疾病等位基因的miRNA/CRISPR Cas9。

[0369] 在一些实施方式中,有用的表达产物包括肌营养不良蛋白(包括微肌营养不良蛋白)、 β -1,4-n-乙酰半乳糖胺半乳糖基转移酶(GALGT2)、氨甲酰合成酶I、 α -1抗胰蛋白酶、鸟氨酸转氨甲酰酶、精氨酸琥珀酸合成酶、精氨酸琥珀酸裂解酶、精氨酸酶、延胡索酰乙酰乙酸水解酶、苯丙氨酸羟化酶、葡萄糖-6-磷酸酶、胆色素原脱氨酶、胱硫醚 β -合酶、支链酮酸脱羧酶、白蛋白、异戊酰CoA脱氢酶、丙酰CoA羧化酶、甲基丙二酰CoA变位酶、戊二酰CoA脱氢酶、胰岛素、 β -葡萄糖苷酶、丙酮酸羧化酶、肝磷酸化酶、磷酸化酶激酶、甘氨酸脱羧酶、H蛋白、T蛋白、囊性纤维化跨膜调节因子(CFTR)和多巴胺能转运体(hDAT)。

[0370] 其它有用的表达产物包括可用于酶替代疗法的酶,并且其可用于因酶活性缺陷而导致的各种病症。例如,含有甘露糖-6-磷酸的酶可用于治疗溶酶体贮积症(例如,合适的基因包括编码 β -葡萄糖醛酸酶(GUSB)的基因)。

[0371] 在一些实施方式中,示例性的多肽表达产物包括神经保护多肽和抗血管生成多肽。合适的多肽包括但不限于胶质源性神经营养因子(GDNF)、成纤维细胞生长因子2(FGF-2)、nurturin、睫状神经营养因子(CNTF)、神经生长因子(NGF;例如,神经生长因子- β)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3(NT-3)、神经营养因子-4(NT-4)、神经营养因子-6(NT-6)、表皮生长因子(EGF)、色素上皮源性因子(PEDF)、Wnt多肽、可溶性Fit-1、血管抑素、内皮抑素、VEGF、抗VEGF抗体、可溶性VEGFR、因子VIII(FVIII)、因子IX(FIX)和刺猬家族成员(音猬因子、印度刺猬因子和沙漠刺猬因子等)。

[0372] 在一些实施方式中,有用的治疗表达产物包括激素和生长及分化因子,包括但不限于胰岛素、胰高血糖素、生长激素(GH)、甲状旁腺激素(PTH)、生长激素释放因子(GRF)、促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素、血管抑素、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、红细胞生成素(EPO)、结缔组织生长因子(CTGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、表皮生长因子(EGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素生长因子I和胰岛素生长因子II(IGF-I和IGF-II)、转化生长因子 α 超家族中的任一种(包括TGF α 、激活素、抑制素或任何骨形态发生蛋白(BMP)BMPs 1-15)、生长因子的heregulin/神经调解蛋白/ARIA/neu分化因子(NDF)家族中的任一种、神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子NT-3和神经营养因子NT-4/5、睫状神经营养因子(CNTF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、nurturin、集聚蛋白(agrins)、semaphorins/collapsins家族中的任一种、netrin-1和netrin-2、肝细胞生长因子(HGF)、ephrins、noggin、音猬因子和酪氨酸羟化酶。

[0373] 在一些实施方式中,有用的表达产物包括调节免疫系统的蛋白质,包括但不限于细胞因子和淋巴因子,例如血小板生成素(TPO)、白细胞介素(IL)IL-1至IL-25(包括IL-2、IL-4、IL-12和IL-18)、单核细胞趋化蛋白、白血病抑制因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、Fas配体、肿瘤坏死因子 α 和肿瘤坏死因子 β 、干扰素(α 、 β 和 γ)、干细胞因子、flk-2配体/flt3配体。通过免疫系统产生的基因产物也可用于本发明。这些包括但不限于免疫球蛋白IgG、IgM、IgA、IgD和IgE、嵌合免疫球蛋白、人源化抗体、单链抗体、T细胞受体、嵌合T细胞受体、单链T细胞受体、I类MHC分子和II类MHC分子以及经工程化的免疫球蛋白和MHC分子。有用的基因产物还包括补体调节蛋白,例如补体调节蛋白、膜辅因子蛋白(MCP)、衰变加速因子(DAF)、CR1、CF2和CD59。

[0374] 在一些实施方式中,有用的表达产物包括生长因子、细胞因子、淋巴因子、调节蛋白、免疫系统蛋白和激素的受体中的任一种。有用的异源核酸序列还包括胆固醇调节和/或脂质调节的受体,包括低密度脂蛋白 (LDL) 受体、高密度脂蛋白 (HDL) 受体、极低密度脂蛋白 (VLDL) 受体和清道夫受体。本发明还涵盖使用基因产物,例如类固醇激素受体超家族的成员,包括糖皮质激素受体和雌激素受体、维生素D受体和其它核受体。此外,有用的基因产物包括转录因子,例如jun、fos、max、mad、血清应答因子 (SRF)、AP-1、AP-2、myb、MyoD和肌细胞生成素、含ETS盒的蛋白质、TFE3、E2F、ATF1、ATF2、ATF3、ATF4、ZF5、NFAT、CREB、HNF-4、C/EBP、S P1、CCAAT盒结合蛋白、干扰素调节因子 (IRF-1)、Wilms肿瘤蛋白、ETS结合蛋白、STAT、GATA盒结合蛋白 (例如GATA-3) 和有翼螺旋蛋白的叉头家族。

[0375] 在一些实施方式中,有用的表达产物包括非天然存在的多肽,例如具有包含插入、缺失或氨基酸取代的非天然存在的氨基酸序列的嵌合或杂交多肽。

[0376] 进一步合适的表达产物包括微小RNA (miRNA)、干扰RNA、反义RNA、核酶和适体。

[0377] 在本发明的一些实施方式中,所述合成的CNS特异性表达盒包含可用于基因编辑的基因,例如编码位点特异性核酸酶的基因,例如大范围核酸酶、锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活因子样效应物的核酸酶 (TALEN) 或成簇规律间隔短回文重复系统 (CRISPR-Cas)。适当地,所述位点特异性核酸酶适于通过进行切割 (通常是位点特异性双链断裂) 来编辑期望的目标基因组位点,然后通过非同源末端连接 (NHEJ) 或同源依赖性修复 (HDR) 进行修复,从而产生期望的编辑。所述编辑可以是功能失调的基因的部分或完全修复,或功能性基因的敲低或敲除。或者,编辑可以使用本领域已知的合适系统通过碱基编辑或先导编辑 (prime editing) 进行。

[0378] 适当地,所述合成的CNS特异性表达盒包含提供或编码以下的一个或多个 (并且优选全部) 的序列:核糖体结合位点、起始密码子、终止密码子和转录终止序列。适当地,所述表达盒包含编码转录后调控元件的核酸。适当地,所述表达盒包含编码polyA元件的核酸。

经修饰的衣壳

[0379] 在一个实施方式中,本文所述的衣壳被进一步修饰以增加对于CNS的趋向性。本文提供的组合物含有包含有效载荷 (payload) 的经修饰的病毒衣壳,其中,所述有效载荷包含靶向中枢神经系统紊乱的由反向末端重复 (ITR) 侧接的核酸序列以及调控序列,并且其中所述修饰是化学、非化学或氨基酸修饰。在一些实施方式中,所述有效载荷的核酸序列包含 (a) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA;和 (b) 编码CYP46A1蛋白的分离的核酸。在一些实施方式中,所述有效载荷的核酸序列包含编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA。在一些实施方式中,所述有效载荷的核酸序列包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸。

[0380] 本文进一步提供了一种组合物,所述组合物包含 (a) 包含第一有效载荷的第一经修饰的病毒衣壳,和 (b) 包含第二有效载荷的至少第二经修饰的病毒衣壳,其中,所述有效载荷包含靶向中枢神经系统紊乱的由反向末端重复 (ITR) 侧接的核酸序列以及调控序列,其中,第一经修饰的病毒衣壳和至少第二经修饰的病毒衣壳是相同的,并且第一有效载荷和第二有效载荷是不同的,并且其中所述修饰是化学、非化学或氨基酸修饰。在一些实施方式中,第一有效载荷或第二有效载荷的核酸序列包含编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA。在一些实施方式中,第一有效载荷或第二有效载荷的核酸序列包

含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸。

[0381] 本文进一步提供了一种组合物,所述组合物包含(a)包含第一有效载荷的第一经修饰的衣壳,和(b)包含第二有效载荷的至少第二经修饰的衣壳,其中,所述有效载荷包含靶向中枢神经系统紊乱的由反向末端重复(ITR)侧接的核酸序列以及调控序列,其中,所述第一经修饰的衣壳和至少第二经修饰的衣壳是不同的,并且第一有效载荷和第二有效载荷可以相同或不同,并且其中所述修饰是化学、非化学或氨基酸修饰。在一些实施方式中,第一有效载荷或第二有效载荷的核酸序列包含编码一个或多个miRNA的转基因的分离的核酸。在一些实施方式中,第一有效载荷或第二有效载荷的核酸序列包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸。

[0382] 本文所述的另一方面提供了组合物或组合,所述组合物或组合包含以下的至少一种:(a)编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA;以及(b)编码CYP46A1蛋白的分离的核酸。在一个方面,本文所述的组合物或组合包含:(a)包含分离的核酸的重组病毒载体,所述核酸包含(i)第一区域和(ii)第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码一个或多个miRNA的转基因;以及(b)包含编码所述CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

[0383] 本文描述的另一方面提供了组合物或组合,所述组合物或组合包含:(a)编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码分离的核酸,所分离的核酸编码CYP46A1蛋白。在一些方面,所述组合物或组合进一步包含:(b)编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA。在其它方面,所述组合物或组合不包含:(b)编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA。在一个方面,本文描述了组合物或组合,所述组合物或组合包含:(a)包含分离的核酸的重组病毒载体,所述分离的核酸包含:(i)第一区域和(ii)第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码CYP46A1蛋白的转基因。在一些方面,所述组合物或组合进一步包含:(b)包含编码一个或多个miRNA的分离的核酸的重组病毒载体。在其它方面,所述组合物或组合不包含:(b)包含编码一个或多个miRNA的分离的核酸的重组病毒载体。

[0384] 本文所述的另一个方面提供了组合物或组合,所述组合或组合物包含(a)编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码分离的核酸,所述分离的核酸编码一个或多个miRNA。在一些方面,所述组合物或组合进一步包含(b)编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码CYP46A1蛋白。在其它方面,所述组合物或组合不包含(b)编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码CYP46A1蛋白。在一个方面,本文描述的是组合物或组合,所述组合物或组合包含:(a)包含分离的核酸的重组病毒载体,所述分离的核酸包含(i)第一区域和(ii)第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码一个或多个miRNA的转基因。在一些方面,所述组合物或组合进一步包含:(b)包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。在其它方面,所述组合物或组合不包含(b)包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

[0385] 在特定实施方式中,经修饰的病毒衣壳包含使得其优先靶向CNS或PNS的修饰。例如,经修饰的病毒衣壳具有对于CNS而言增加的趋向性,和/或对于至少第二位置(例如肝脏)减少的趋向性。CNS的优先靶向性不排除对其它部位的靶向,而是表明与其它部位相比,它更高地靶向CNS。

[0386] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳包含使得其靶向CNS或PNS的修饰。例如,对通常靶向非CNS部位(例如肝脏)的衣壳的修饰可以将衣壳重新定向为现在靶向CNS和非CNS部位。在此类实施方式中,CNS靶向不需要是优先的。

[0387] 在一个实施方式中,对衣壳的修饰是氨基酸修饰,例如,氨基酸的缺失、插入或取代。在一个实施方式中,氨基酸修饰增加了对CNS或PNS的趋向性。在一个实施方式中,氨基酸修饰将经修饰的衣壳靶向CNS或PNS。

[0388] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳具有与美国专利申请号16/511,913的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:4有90%相同的核酸序列、或由与美国专利申请号16/511,913的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:4有90%相同的核酸序列组成、或基本上由与美国专利申请号16/511,913的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:4有90%相同的核酸序列组成,将其内容通过引用以其整体并入本文。这一美国专利申请描述了对少突胶质细胞表现出优势趋向性的嵌合AAV衣壳序列,并可用于创建转导受试者CNS中的少突胶质细胞的AAV载体。

[0389] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳是包含一个或多个氨基酸取代的AAV衣壳蛋白,其中所述取代将新的聚糖结合位点引入AAV衣壳蛋白中。在一些实施方式中,所述氨基酸取代在AAV2中的氨基酸266、氨基酸463-475和氨基酸499-502,或者AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8或AAV10中的相应的氨基酸位置。此类AAV衣壳蛋白在例如美国专利申请号16/110,773中进一步进行描述;将其内容通过引用以其整体并入本文。

[0390] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳是AAV衣壳蛋白,所述AAV衣壳蛋白包含AAV2.5衣壳蛋白(国际专利申请号PCT/US2020/029493的SEQ ID NO:1)(将其内容通过引用以其整体并入本文)、由AAV2.5衣壳蛋白组成组成、或基本上由AAV2.5衣壳蛋白组成,所述AAV2.5衣壳蛋白包含引入新聚糖结合位点的一个或多个氨基酸取代。这样的氨基酸取代可以使衣壳靶向神经元和胶质细胞(例如星形胶质细胞)。在国际专利申请号PCT/US2020/029493中所述的衣壳蛋白、衣壳、病毒载体和方法的实施方式中,所述一个或多个氨基酸取代包括A267S、SQAGASDIRDQSR464-476SX₁AGX₂SX₃X₄X₅X₆QX₇R(分别为SEQ ID NO:153和SEQ ID NO:154)(其中X₁₋₇可以是任何氨基酸)、和EYSW 500-503(SEQ ID NO:155)EX₈X₉W,其中X₈₋₉可以是任何氨基酸。在本文所述的衣壳蛋白、衣壳、病毒载体和方法的实施方式中,X₁是V或其保守取代;X₂是P或其保守取代;X₃是N或其保守取代;X₄是M或其保守取代;X₅是A或其保守取代;X₆是V或其保守取代;X₇是G或其保守取代;X₈是F或其保守取代;和/或X₉是A或其保守取代。在本文所述的衣壳蛋白、衣壳、病毒载体和方法的实施方式中,X₁是V,X₂是P,X₃是N,X₄是M,X₅是A,X₆是V,X₇是G,X₈是F,且X₉是A,其中新的聚糖结合位点是半乳糖结合位点。此类AAV衣壳蛋白在例如国际专利申请号PCT/US2020/029493中进一步进行描述;将其内容通过引用以其整体并入本文。

[0391] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳是包含表面结合的肽的AAV衣壳蛋白颗粒,其中,与AAV颗粒的表面结合的肽是Angiopep-2、GSH、HIV-1TAT(48-60)、ApoE(159-167)2、瘦素30(61-90)、THR、PB5-3、PB5-5、PB5-14,或它们的任何组合,如在例如美国专利申请号16/956,306中所述;将其内容通过引用以其整体并入本文。这种AAV衣壳允许(例如有效载荷)穿过血脑屏障的递送。

[0392] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳是AAV衣壳蛋白(例如AAV1、AAV5或AAV6衣壳蛋白),其中所述衣壳蛋白的VP3区域在对应于以下的位置包含修饰(例如用非酪氨酸残

基替换酪氨酸残基和/或用非苏氨酸残基替换苏氨酸残基):野生型AAV1衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:1;将其内容通过引用以其整体并入本文)的Y705、Y731和T492中的一个或多个、或每个;野生型AAV5衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:2)的Y436、Y693和Y719中的一个或多个、或每个;或者野生型AAV6衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:3)的Y705、Y731和T492中的一个或多个、或每个。这种AAV衣壳靶向神经元和星形胶质细胞。

[0393] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳是AAV衣壳蛋白(例如AAV1、AAV5或AAV6衣壳蛋白),其中所述衣壳蛋白在衣壳的VP3区域对应于以下的位置包含Y到F(酪氨酸到苯丙氨酸)的修饰或T到V(苏氨酸到缬氨酸)的修饰:野生型AAV1衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:1)的Y705F、Y731F和T492V中的一个或多个、或每个;野生型AAV5衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:2)的Y436F、Y693F和Y719F中的一个或多个、或每个;或野生型AAV6衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:3)的Y705F、Y731F和T492V中的一个或多个或每个。这种AAV衣壳靶向神经元和星形胶质细胞。

[0394] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳是AAV衣壳蛋白(例如AAV1、AAV5或AAV6衣壳蛋白),其中,所述衣壳蛋白的VP3区域在对应于以下的位置包含修饰(例如用非酪氨酸残基替换酪氨酸残基和/或用非苏氨酸残基替换苏氨酸残基):野生型AAV1衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:1)的Y705、Y731和T492中的一个或多个或每个;野生型AAV5衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:2)的Y436、Y693和Y719中的一个或多个或每个;或者野生型AAV6衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:3)的Y705、Y731和T492中的一个或多个或每个。这种AAV衣壳靶向神经元和星形胶质细胞。

[0395] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳是AAV衣壳蛋白(例如AAV1、AAV5或AAV6衣壳蛋白),所述衣壳蛋白在衣壳蛋白的VP3区域中对应于以下的位置包含Y到F(酪氨酸到苯丙氨酸)的修饰或T到V(苏氨酸到缬氨酸)的修饰:野生型AAV1衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:1)的Y705F、Y731F和T492V中的一个或多个或每个;野生型AAV5衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:2)的Y436F、Y693F和Y719F中的一个或多个或每个;或野生型AAV6衣壳蛋白(例如美国专利申请号16/565,191的SEQ ID NO:3)的Y705F、Y731F和T492V中的一个或多个或每个。这种AAV衣壳靶向神经元和星形胶质细胞。

[0396] 在一个实施方式中,氨基酸修饰允许经修饰的衣壳逃避中和抗体,例如针对病毒载体(例如相同血清型的病毒载体)产生的中和抗体。在一个实施方式中,氨基酸修饰允许经修饰的衣壳用于重复施用,例如,所述修饰将使得衣壳在再次施用时具有治疗效果。

[0397] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳是嵌合衣壳。本文中使用的“嵌合”衣壳蛋白是指如下的AAV衣壳蛋白(例如VP1、VP2或VP3的任一个或多个):所述AAV衣壳蛋白已通过相对于野生型在所述衣壳蛋白的氨基酸序列中的一个或多个(例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个等)氨基酸残基中的替换、以及相对于野生型在所述氨基酸序列中的一个或多个(例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个等)氨基酸残基的插入或缺失进行了修饰。在一些实施方式中,来自一个AAV血清型的完整或部分的结构域、功能区、表位等

可以以任何组合替换不同AAV血清型的相应野生型结构域、功能区、表位等,以产生本发明的嵌合衣壳蛋白。嵌合衣壳蛋白的产生可以根据本领域众所周知的方案进行,并且在文献中以及本文中描述了大量的可以包括于本发明的衣壳中的嵌合衣壳蛋白。

[0398] 在一个实施方式中,经修饰的病毒衣壳是单倍体衣壳。如本文所使用,术语“单倍体AAV”应指在国际申请W02018/170310或美国申请US2018/037149中描述的AAV,将其通过引用以其整体并入本文。在一些实施方式中,病毒体的群是单倍体AAV群,在其中可以构建病毒体颗粒,在所述病毒体颗粒中来自于由AAV衣壳蛋白、VP1、VP2和VP3组成的组中的至少一种病毒蛋白与其它形成能够封装AAV基因组的病毒体颗粒所需的病毒蛋白中的至少一种不同。对于存在的每个病毒蛋白(VP 1、VP2和/或VP3),所述蛋白是相同类型的(例如,都是AAV2 VP1)。在一个实例中,所述病毒蛋白中的至少一个是嵌合病毒蛋白,并且另外两个病毒蛋白中的至少一个不是嵌合的。在一个实施方式中,VP1和VP2是嵌合的,并且仅VP3是非嵌合的。例如,病毒颗粒仅由以下组成:来自嵌合AAV2/8的VP1/VP2(AAV2的N-端和AAV8的C-端)与仅来自AAV2的VP3配对;或仅嵌合VP1/VP2 28m-2P3(来自AAV8的N-端和来自AAV2的C-端,而没有VP3起始密码子突变)与仅来自AAV2的VP3配对。在另一个实施方式中,仅VP3是嵌合的,并且VP1和VP2是非嵌合的。在另一个实施方式中,所述病毒蛋白中的至少一个来自完全不同的血清型。例如,仅嵌合VP1/VP2 28m-2P3与来自仅AAV3的VP3配对。在另一个例子中,没有嵌合蛋白存在。

[0399] 在本文所述的技术的一些实施方式中,经修饰的病毒衣壳包含一个或多个修饰,例如对衣壳的化学修饰、非化学修饰或氨基酸修饰。这种修饰可以例如对经修饰的衣壳的组织型趋向性或细胞型趋向性以及其它进行修饰。

[0400] 修饰可以直接改变所述衣壳的特性(包括生化特性,例如受体结合),从而使所述修饰本身改变衣壳的行为,或者可以允许进一步的修饰(例如配体的附着,所述配体转而以期望的方式修饰所述衣壳的行为)。

[0401] 在一个实施方式中,半胱氨酸残基(其可以是天然存在的或通过衣壳多肽编码序列的基因修饰所引入的)的化学修饰允许通过形成二硫键来进行配体的共价附着(参见例如W0 2005/106046,将其内容通过引用并入本文)。

[0402] 考虑了各种配体,包括但不限于例如靶向由靶细胞表达的细胞表面蛋白的抗体或其抗原结合片段(参见例如W0 2000/002654,将其通过引用并入本文)。

[0403] W02015/062516(将其内容也通过引用并入本文)描述了通过所述衣壳基因的基因修饰插入包含叠氮基基团的氨基酸,然后通过所述叠氮基基团化学偶联配体。

[0404] Horowitz等,Bioconjugate Chem.,22:529-532(2011)描述了通过糖化或糖部分的化学偶联来修饰AAV衣壳的趋向性。如本文所述,该方法以及类似的方法被考虑用于衣壳的修饰。

[0405] 在其它实施方式中,特别考虑用聚合物(例如聚乙二醇(PEG)或聚-(N-羟丙基)甲基丙烯酰胺(pHPMA)包被病毒衣壳。这种修饰可以例如减少与非靶向组织的特异性和非特异性相互作用。

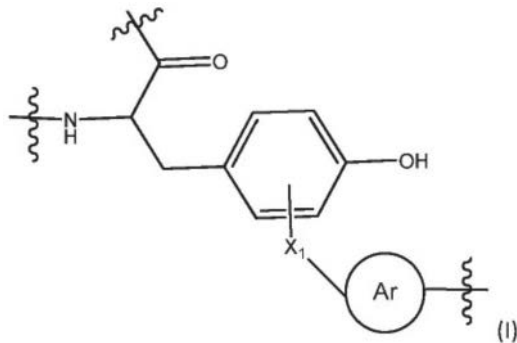
[0406] 在其它实施方式中,特别考虑了碳二亚胺偶联。参见例如Joo等,ACS Nano 5,标题为“Enhanced Real-time Monitoring of Adeno-Associated Virus Trafficking by Virus-Quantum Dot Conjugates”(2011)。

[0407] 在其它实施方式中,可以对病毒衣壳进行修饰,例如,如WO 2017/212019中所述,也参见美国国家阶段USSN 16/308,740,将其内容各自通过引用并入本文。其中描述的方法通过包含-CSNH-和芳香部分的键将病毒衣壳与配体耦合。虽然可以通过这种方法进一步修饰经基因修饰的病毒衣壳,但其中所述的修饰不要求所述病毒衣壳的基因修饰。其中描述的配体包括例如靶向剂、用于避免中和抗体相互作用的空间屏蔽剂、标记剂或磁性剂。其中所述的靶向配体包括例如细胞类型特异性的配体、蛋白质、单糖或多糖、类固醇激素、RGD基序肽(例如,Arg-Gly-Asp,一种可以模拟细胞粘附蛋白并结合至整合素的细胞粘附基序)、维生素和小分子。

[0408] 在一个实施方式中,本发明的化学修饰是国际专利申请PCT/EP2017/064089中所述的修饰,将其内容通过引用以其整体并入本文。

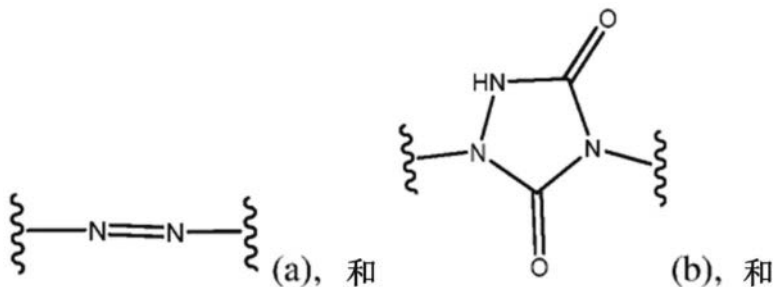
[0409] 在一个实施方式中,本发明的化学修饰是国际专利申请PCT/EP2020/069554中所述的修饰,将其内容通过引用以其整体并入本文。

[0410] 在一个实施方式中,所述衣壳在其衣壳中具有至少一个化学修饰的酪氨酸残基,其中所述化学修饰的酪氨酸残基为式(I):



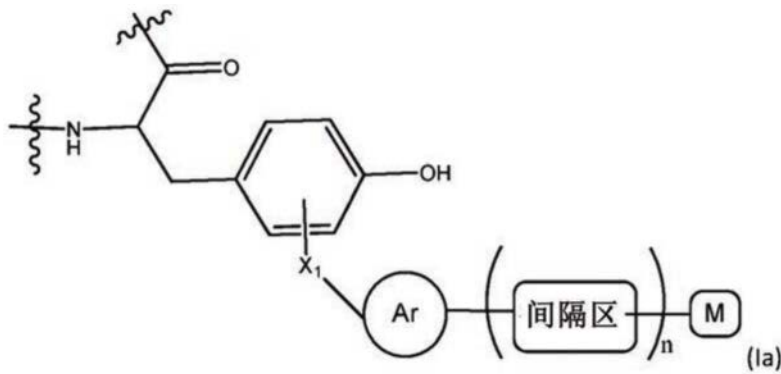
[0411] 其中:

[0412] $-X_1$ 选自于由以下组成的组:



[0413] $-Ar$ 是任选取代的芳基或杂芳基部分。

[0414] 在一个实施方式中,所述衣壳具有至少一个化学修饰的酪氨酸残基,其为式(Ia):



[0415] 其中：

[0416] $-X_1$ 、以及Ar如上文所定义，

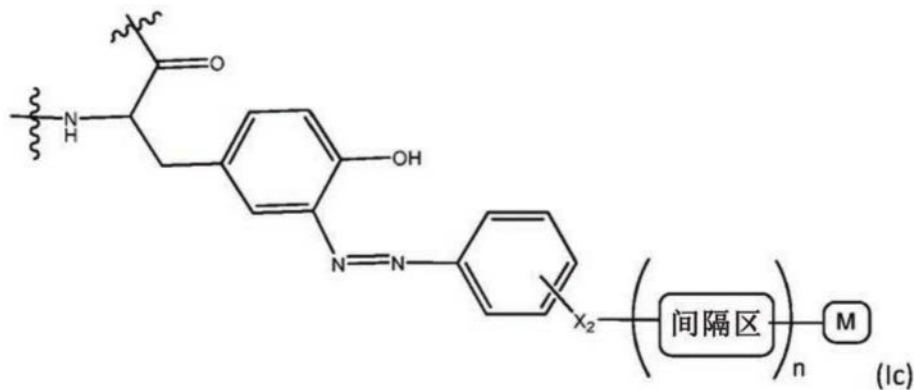
[0417] $-$ 间隔区是用于将“Ar”基团连接至官能部分“M”的基团，其优选包含多达1000个碳原子，并且其优选处于任选包含杂原子和/或环状部分的化学链的形式，

[0418] $-n$ 是0或1；并且

[0419] $-M$ 是包含位阻剂、标记剂、细胞类型特异性配体或药物部分的官能部分。

[0420] 在一个实施方式中， X_1 为式(a)和/或“Ar”选自取代或未取代的苯基、吡啶基、萘基和蒽基。

[0421] 在一个实施方式中，所述衣壳具有至少一个化学修饰的酪氨酸，其为式(Ic)：



[0422] 其中：

[0423] $-X_2$ 是 $-C(=O)-NH-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-C(=O)-O-C(=O)-$ 、 $O-C(=O)-$ 、 $NH-C(=O)-$ 、 $NH-C(=O)-NH-$ 、 $-O-C(=O)-O-$ 、 $O-$ 、 $NH-$ 、 $-NH(C=S)-$ 、或 $-C(S)=NH-$ ，优选 $-C(=O)-NH-$ 或 $-C(=O)-O-$ 。

[0424] $-X_2$ 在苯基基团的对位、间位或邻位，优选在对位，

[0425] $-$ 间隔区、 n 和M如上文所定义。

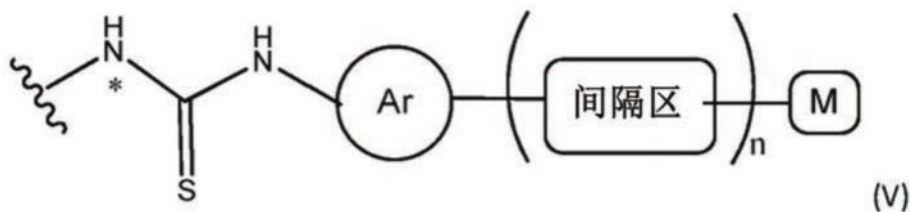
[0426] 在一个实施方式中，当存在时，“间隔区”选自由以下组成的组：饱和或不饱和的、直链或支链的 C_2-C_{40} 烃链，任选取代的聚乙二醇、聚丙二醇、pHPMA(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酸酯的聚合物)、聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、烷基二胺的聚合物，以及它们的组合，和/或

[0427] “M”包含细胞类型靶向配体或由细胞类型靶向配体组成，所述细胞类型靶向配体优选选自单糖或多糖、激素(包括类固醇激素)、肽(例如RGD肽(例如Arg-Gly-Asp，一种能够模拟细胞粘附蛋白并结合至整合素的细胞粘附基序)、肌肉靶向肽(MTP)或Angiopep-2)、蛋

白质或其片段、膜受体或其片段、适配体 (aptamer)、抗体 (包括重链抗体) 及其片段 (例如抗原结合片段 (Fab)、Fab' (其为进一步包含游离巯基基团的抗原结合片段)) 和VHH)、单链可变片段 (single-chain fragment variable, ScFv)、spiegelmer、肽适配体、维生素和药物 (例如大麻素受体1 (CB1) 和/或大麻素受体2 (CB2) 配体)。

[0428] 在一个实施方式中,“间隔区”(当存在时)选自于由以下组成的组:直链或支链的C₂-C₂₀烷基链、聚乙二醇、聚丙二醇、pHPMA、PLGA、烷基二胺的聚合物,及它们的组合,所述具有2个至20个单体的聚合物和/或“M”包含细胞类型特异性的配体或由细胞类型特异性的配体组成,所述细胞类型特异性的配体来源于:选自转铁蛋白、表皮生长因子 (EGF) 和碱性成纤维细胞生长因子13FGF的蛋白质;包含一个或数个半乳糖、甘露糖、N-乙酰半乳糖胺残基、GalNac桥或甘露糖-6-磷酸的单糖或多糖;选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:7的MTP;以及维生素 (例如叶酸)。

[0429] 在一个实施方式中,所述衣壳在衣壳中进一步具有至少一个额外的化学修饰的氨基酸残基,其不同于酪氨酸残基,所述氨基酸残基优选带有用式 (V) 的基团进行化学修饰的氨基基团:



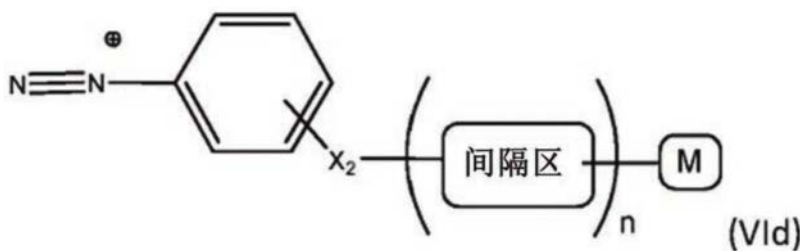
[0430] 其中:

[0431] -N*是氨基酸残基 (例如赖氨酸残基或精氨酸残基) 的氨基基团的氮,并且

[0432] -Ar、间隔区、n和M具有与权利要求2的式 (II) 的Ar、间隔区、n和M相同的定义。

[0433] 在一个实施方式中,在有利于使所述反应性基团与存在于衣壳中的酪氨酸残基进行反应的条件下,将衣壳与带有选自芳基重氮和4-苯基-1,2,4-三唑-3,5-二酮 (PTAD) 部分的反应性基团的化学试剂孵育,从而形成共价结合。

[0434] 在一个实施方式中,将衣壳与式VIId的化学试剂孵育,以获得式Ic的衣壳中的至少一个化学修饰的酪氨酸残基。



药物组合物

[0435] 本发明的表达盒、载体或病毒体可以与药学上可接受的赋形剂 (即,一种或多种药学上可接受的运载体物质和/或添加剂,例如缓冲液、运载体、赋形剂、稳定剂等) 一起配制成药物组合物。药物组合物可以以试剂盒的形式提供。

[0436] 因此,本发明的进一步面提供了药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的表达盒、载体或病毒体。

[0437] 在各个方面,所述药物组合物包含磷酸盐缓冲液。所述磷酸盐缓冲液包含约1mM至

约50mM磷酸盐,例如磷酸盐的浓度为约1mM、约2mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM或约50mM。所述磷酸盐从二元磷酸盐(例如 Na_2HPO_4 、 K_2HPO_4)和一元磷酸盐(例如 NaH_2PO_4 、 KH_2PO_4)的组合以二元磷酸盐:一元磷酸盐的摩尔比为约1:10至约10:1制备。例如,在各种示例性实施方式中,所述10mM磷酸盐包括9.5mM二元磷酸盐和0.5mM一元磷酸盐、9mM二元磷酸盐和1mM一元磷酸盐、8.5mM二元磷酸盐和1.5mM一元磷酸盐、或8mM二元磷酸盐和2mM一元磷酸盐。磷酸盐缓冲液的pH为约6.5至约7.5,例如pH为6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、6.95、7.0、7.05、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5。磷酸盐缓冲液还可包含浓度为约50mM至约200mM的NaCl,例如浓度为约50mM、约60mM、约70mM、约80mM、约90mM、约100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约135mM、约136mM、约137mM、约138mM、约139mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM或约200mM。所述磷酸盐缓冲液还可包含浓度为约0.5mM至约10mM的KCl,例如浓度为约0.5mM、约0.6mM、约0.7mM、约0.8mM、约0.9mM、约1mM、约2mM、约2.5mM、约2.6mM、约2.7mM、约2.8mM、约2.9mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM或约10mM。所述磷酸盐缓冲液还可包含浓度为约0.20mM至约10mM的 CaCl_2 ,例如浓度为约0.2mM、约0.3mM、约0.4mM、约0.5mM、约0.6mM、约0.7mM、约0.8mM、约0.81mM、约0.82mM、约0.83mM、约0.84mM、约0.85mM、约0.86mM、约0.87mM、约0.88mM、约0.89mM、约0.9mM、约1mM、约2mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM或约10mM。所述磷酸盐缓冲液还可包含浓度为约0.10mM至约1mM的 MgCl_2 ,例如浓度为约0.1mM、约0.2mM、约0.3mM、约0.4mM、0.41mM、0.42mM、0.43mM、0.44mM、0.45mM、0.46mM、0.47mM、0.48mM、0.49mM、约0.5mM、约0.6mM、约0.7mM、约0.8mM、约0.9mM或约1mM。所述磷酸盐缓冲液还可包括浓度为约0.0001wt%至约0.005wt%的泊洛沙姆188(例如,Pluronic™ F-68非离子表面活性剂),例如浓度为约0.0001wt%、约0.0002wt%、约0.0003wt%、约0.0004wt%、约0.0005wt%、约0.0006wt%、约0.0007wt%、约0.0008wt%、约0.0009wt%、约0.001wt%、约0.0015wt%、约0.002wt%、约0.0025wt%、约0.003wt%、约0.0035wt%、约0.004wt%、约0.0045wt%或约0.005wt%。所述磷酸盐缓冲液还可包含浓度为约0.005wt%至约10wt%的山梨醇,例如浓度为约0.005wt%、约0.075wt%、约0.01wt%、约0.02wt%、约0.03wt%、约0.04wt%、约0.05wt%、约0.06wt%、约0.07wt%、约0.08wt%、约0.09wt%、约0.1wt%、约0.2wt%、约0.3wt%、约0.4wt%、约0.5wt%、约0.6wt%、约0.7wt%、约0.8wt%、约0.9wt%、约1wt%、约2wt%、约3wt%、约4wt%、约5wt%、约6wt%、约7wt%、约8wt%、约9wt%或约10wt%。所述rAAV包含核酸(例如,AAVrh.10包含CAG启动子并且所述核酸包含与SEQ ID NO:194至少80%相同、例如至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%相同的序列;AAVrh10.CAG.hCYP46A1)在磷酸盐缓冲液中可以具有如下的滴度:约 $0.1 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 至约 $5 \times 10^{10} \text{vg}/\mu\text{l}$,例如滴度为约 $0.1 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $0.2 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $0.3 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $0.4 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $0.5 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $0.6 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $0.7 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $0.8 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $0.9 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $1 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $2 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $3 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $4 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $5 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $6 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $7 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $8 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $9 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $1 \times 10^{10} \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $1 \times 10^{10} \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $1 \times 10^{10} \text{vg}/\mu\text{l}$ 、约 $4 \times 10^{10} \text{vg}/\mu\text{l}$ 或约 $5 \times 10^{10} \text{vg}/\mu\text{l}$ 。

[0438] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $0.4 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$

AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0439] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐(9mM Na_2HPO_4 和1mM KH_2PO_4)、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $0.4 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0440] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $1.1 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0441] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐(9mM Na_2HPO_4 和1mM KH_2PO_4)、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $1.1 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0442] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $3 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0443] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐(9mM Na_2HPO_4 和1mM KH_2PO_4)、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $3 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0444] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $7 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0445] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐(9mM Na_2HPO_4 和1mM KH_2PO_4)、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $7 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0446] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $8.2 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0447] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐(9mM Na_2HPO_4 和1mM KH_2PO_4)、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $8.2 \times 10^9 \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0448] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $3 \times 10^{10} \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0449] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含10mM磷酸盐(9mM Na_2HPO_4 和1mM KH_2PO_4)、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和 $3 \times 10^{10} \text{vg}/\mu\text{l}$ AAVrh10.CAG.hCYP46A1。

[0450] 在替代实施方式中,所述药物组合物等同于任何上述示例性组合物,但磷酸盐浓度为约9.53mM,包含约8.06mM Na_2HPO_4 和约1.47mM KH_2PO_4 。

[0451] 在替代实施方式中,所述药物组合物等同于任何上述示例性组合物,但山梨醇浓度为约0.005wt%至约10wt%。

施用

[0452] 本公开的rAAV可根据本领域已知的任何合适的方法以组合物递送至受试者。例如,可将优选悬浮在生理上相容的运载体中(即在组合物中)的rAAV施用至受试者,即宿主动物,如人、小鼠、大鼠、猫、狗、绵羊、兔子、马、牛、山羊、猪、豚鼠、仓鼠、鸡、火鸡或非人灵长类动物(如猕猴)。在一些实施方式中,宿主动物不包括人。

[0453] 向哺乳动物受试者递送rAAV可通过例如肌肉内注射或通过向哺乳动物受试者的血流中施用而进行。向血流中施用可以是通过注射进入静脉、动脉或任何其它血管管道中。在一些实施方式中,所述rAAV通过隔离肢体灌注(一种在外科领域众所周知的技术)的方式向血流中施用,所述方法主要是使得技术人员在施用rAAV病毒体之前将肢体从全身性循环中隔离出来。隔离肢体灌注技术的变体(描述于美国专利号6,177,403中)也可以由技术人员采用以将病毒体施用至隔离肢体的脉管系统中,以潜在地增强向肌肉细胞或组织中的转导。此外,在特定情况下,可能期望将病毒体递送至受试者的CNS。“CNS”是指脊椎动物的大脑和脊髓的所有细胞和组织。因此,所述术语包括但不限于神经元细胞、胶质细胞、星形胶质细胞、脑脊液(CSF)、胞间隙、骨、软骨等。通过用针、导管或相关装置,使用本领域已知的神经外科技术(例如通过立体定向注射,参见例如Stein等,J Virol 73:3424-3429,1999; Davidson等,PNAS97:3428-3432,2000; Davidson等,Nat. Genet. 3:219-223,1993; 以及 Alisky和Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329,2000)注射到例如脑室区域中以及纹状体(例如,背侧纹状体的壳核和/或尾状核)、脊髓和神经肌肉接头、或小脑小叶而可将重组AAV直接递送至CNS或脑。在一些实施方式中,通过静脉内注射施用如本公开所述的rAAV。在一些实施方式中,通过脑内注射施用rAAV。在一些实施方式中,通过鞘内注射施用rAAV。在一些实施方式中,通过纹状体内注射施用rAAV。在一些实施方式中,通过颅内注射递送rAAV。在一些实施方式中,通过小脑延髓池注射递送rAAV。在一些实施方式中,通过大脑侧脑室注射递送rAAV。

[0454] 在一些实施方式中,所述rAAV通过沿单一轨迹进行多次注射来施用。例如,可以将套管穿过大脑定位到目标结构(例如,壳核)中的第一位置,并在第一位置进行第一注射。然后,将套管沿相同的单一轨迹延伸或缩回至目标结构内的第二位置,并在第二位置进行第二注射。可以通过沿相同的单一轨迹延伸或缩回套管,在目标结构内的其它位置进行进一步注射。可以通过将穿过大脑的套管定位在轨迹引导的MRI处来靶向大脑的结构。轨迹可以是前向的(例如,穿过额骨),或后向的(例如,穿过枕骨)。在其它实施方式中,使用多个轨迹来靶向单个组织或结构。

[0455] 本公开的各方面涉及包含重组AAV的组合物,所述重组AAV包含衣壳蛋白和编码转基因的核酸,其中所述转基因包含编码一个或多个miRNA的核酸序列。在一些实施方式中,每个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中任一个所示的序列。在一些实施方式中,所述核酸进一步包含AAV ITR。在一些实施方式中,所述ITR是AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12或AAV13 ITR。在一些实施方式中,组合物进一步包含药学上可接受的运载体。本公开的组合物可包含单独的rAAV,或与一个或多个其它病毒(例如,具有一个或多个不同转基因的第二rAAV编码)组合的rAAV。在一些实施方式中,组合物包含1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或以上的不同的rAAV,每个都具有一个或多个不同的转基因。

[0456] 本领域技术人员可以根据rAAV所针对的适应症来容易地选择合适的运载体。例如,一种合适的运载体包括盐水,其可以与多种缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)一起配制。其它示例性运载体包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。运载体的选择不是对本公开的限制。

[0457] 任选地,除了rAAV和运载体之外,本公开的组合物还可包含其它常规药物成分,例如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性防腐剂包括氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸酯类、乙基香兰素(ethyl vanillin)、甘油、苯酚和对氯苯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0458] 以足够的量施用rAAV以转染期望组织的细胞并提供足够水平的基因转移和表达而没有过度的不良作用。常规和药学上可接受的施用途径包括但不限于直接递送至所选的器官(例如,门静脉内递送至肝)、口服施用、吸入施用(包括鼻内和气管内递送)、眼内施用、静脉内施用、肌内施用、皮下施用、皮内施用、瘤内施用和其它胃肠外施用途径。如果需要,可以对施用途径进行组合。在一些实施方式中,经由包含至少一个DD- ITR的非病毒DNA构建体递送本文所公开的所有或至少一个核酸序列。例如,可以利用如WO 2019/246554中所述的非病毒DNA构建体来递送本文所述的核酸中的一个或多个。将WO 2019/246554通过引用以其整体并入本文。

[0459] 实现特定“治疗效果”所需的rAAV病毒体的剂量(例如以基因组拷贝/每千克体重(GC/kg)计的剂量单位)将基于数种因素而变化,包括但不限于:rAAV病毒体施用的途径、实现治疗效果所需的基因或RNA表达的水平、正在治疗的特定疾病或紊乱、以及基因或RNA产物的稳定性。基于上述因素以及本领域熟知的其它因素,本领域技术人员可以容易地确定rAAV病毒体的剂量范围以治疗患有特定疾病或紊乱的患者。

[0460] rAAV的有效量是足以靶向感染动物、靶向期望的组织的量。在一些实施方式中,rAAV的有效量是足以产生稳定的体细胞转基因动物模型的量。有效量将主要取决于例如受试者的物种、年龄、重量、健康状况和待靶向的组织等因素,并因此可因动物和组织而不同。例如,所述rAAV的有效量通常在含有约 10^9 个至 10^{16} 个基因组拷贝的约1mL至约100mL溶液的范围。在一些情况下,约 10^{11} 个到 10^{13} 个rAAV基因组拷贝之间的剂量是合适的。在特定实施方式中, 10^{12} 个或 10^{13} 个rAAV基因组拷贝对靶向CNS组织是有效的。在一些情况下,稳定的转基因动物由多剂量的rAAV产生。

[0461] 在其它情况下,施用的剂量取决于rAAV滴度和待注射的组织体积。例如,所述rAAV(或rAAV组合物)的滴度可为约 0.1×10^9 vg/ μ L至约 1.5×10^9 vg/ μ L,例如滴度为约 0.1×10^9 vg/ μ L、约 0.2×10^9 vg/ μ L、约 0.3×10^9 vg/ μ L、约 0.4×10^9 vg/ μ L、约 0.5×10^9 vg/ μ L、约 0.6×10^9 vg/ μ L、约 0.7×10^9 vg/ μ L、约 0.8×10^9 vg/ μ L、约 0.9×10^9 vg/ μ L、约 1×10^9 vg/ μ L、约 1.1×10^9 vg/ μ L、约 1.2×10^9 vg/ μ L、约 1.3×10^9 vg/ μ L、约 1.4×10^9 vg/ μ L或约 2.5×10^9 vg/ μ L。待注射的滴度的量可独立地取决于由MRI确定的至少一个目标组织或结构的体积。例如,待注射的组织的体积可以是组织或结构的总体积的约1%至约90%,例如组织或结构体积的约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%或约90%。类似地,待注射的组织或结构的体积可以是组织或结构体积的至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至

少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或更多。当靶向(即注射)多于一个的组织或结构时,待注射的各组织或结构的体积可以相同或不同。例如,在一些实施方式中,将滴度以独立的体积注射到左壳核和右壳核中,例如,所述独立的体积等同于例如每个壳核总体积的约25%。在其它实施方式中,将滴度以独立的体积注入左尾核和右尾核,例如,所述独立的体积等同于每个尾核总体积的约25%。在其它实施方式中,左壳核和右壳核以及左尾核和右尾核均接受滴度注射,例如,基于每个壳核和尾核的总体积大小的约25%。

[0462] 在一些实施方式中,以不超过每日历日一次(例如24小时期间)向受试者施用rAAV的剂量。在一些实施方式中,以不超过每2个、3个、4个、5个、6个或7个日历日一次向受试者施用rAAV的剂量。在一些实施方式中,以不超过每日历周一次(例如7个日历日)向受试者施用rAAV的剂量。在一些实施方式中,以不超过两周一次(例如,两个日历周期间一次)向受试者施用rAAV的剂量。在一些实施方式中,以不超过每个日历月一次(例如,每30个日历日一次)向受试者施用rAAV的剂量。在一些实施方式中,以不超过每六个月日历月一次向受试者施用rAAV的剂量。在一些实施方式中,以不超过每日历年一次(例如,365天或闰年的366天)向受试者施用rAAV的剂量。

[0463] 在一些实施方式中,对rAAV组合物进行配制以减少所述组合物中AAV颗粒的聚集,特别是在存在高rAAV浓度(例如, -10^{13} GC/mL或更高)的情况下。用于减少rAAV聚集的方法在本领域中是众所周知的,包括例如添加表面活性剂、pH调节、盐浓度调节等(参见例如,Wright FR等,Molecular Therapy(2005)12,171-178,其内容通过引用的方式并入本文)。

[0464] 药学上可接受的赋形剂和运载体溶液的剂型是本领域技术人员熟知的,开发用于在多种治疗方案中使用本文所述的特定组合物的合适的给药和治疗方案也是如此。

[0465] 通常,这些剂型可包含至少约0.1%的活性化合物或更多,尽管活性成分的百分比当然可以不同并且可以方便地在总剂型重量或体积的约1%或2%到约70%或80%或更多之间。自然地,每种治疗有用的组合物中的活性化合物的量可以在化合物的任何给定单位剂量中获得合适的剂量的此类方式来制备。制备此类药物剂型的本领域技术人员将考虑例如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品保质期以及其它药理学考虑的因素,正因如此,多种剂量和治疗方案可能是可期望的。

[0466] 在特定情况下,将期望皮下、胰内、鼻内、胃肠外、静脉内、肌内、鞘内、或口服、腹膜内或通过吸入递送处于本文公开的适当配制的药物组合物中的基于rAAV的治疗构建体。在一些实施方式中,如美国专利号5,543,158、5,641,515和5,399,363所述(每个都通过引用的方式将其整体具体地并入本文)的施用方式可用于递送rAAV。在一些实施方式中,优选的施用模式为通过门静脉注射。

[0467] 适用于可注射使用的药物形式包括无菌水性溶液或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中以及油中制备分散体。在一般的储存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物的生长。在许多情况下,所述形式为无菌的且流动的,达到易于注射的程度。在制造和储存条件下它必须是稳定的,并且必须防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。运载体可以是溶剂或分散介质,其包括例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们的合适混合物和/或植物油。适当的流动性可以例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、通过在分散体的情况

下保持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来保持。可以通过多种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯类、三氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)带来对微生物作用的防止。在许多情况下,将优选包括等渗剂(例如糖类或氯化钠)。可通过在组合物中使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)带来对可注射组合物吸收的延长。

[0468] 例如,对于可注射水性溶液的施用,如果需要,可适当地缓冲所述溶液,并且用足够的盐水或葡萄糖首先使液体稀释剂变得等渗。这些特定的水性溶液特别适用于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。在这方面,可以使用的无菌水性介质将是本领域技术人员已知的。例如,可以将一个剂量溶解在1mL等渗NaCl溶液中,并添加到1000mL的皮下灌注流体中或在输注的建议部位处予以注射(参见例如,“Remington’s Pharmaceutical Sciences”第15版,1035-1038页和1570-1580页)。根据宿主的情况,一定会发生剂量上的一些变化。在任何情况下,负责施用的人员将确定对于个体宿主而言的适当剂量。

[0469] 根据需要,无菌可注射溶液通过将所需量的活性rAAV与本文列举的各种其它成分掺入适当的溶剂中然后过滤灭菌来制备。通常,分散体通过将各种已灭菌的活性成分掺入无菌媒介中来制备,所述媒介包含来自上述列举的那些基本分散介质和所需的其它成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,所述技术从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分加上任何附加的期望成分的粉末。

[0470] 本文公开的rAAV组合物也可配制成中性或盐的形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基基团形成),并且其与无机酸(例如盐酸或磷酸)或与诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等的此类有机酸而形成。与游离羧基基团形成的盐也可以源自无机碱(例如钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物),以及诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等的此类有机碱。在配制时,溶液将以与制剂剂型相容的方式并以诸如治疗有效的量来施用。所述剂型易于以多种制剂形式(例如可注射溶液、药物释放胶囊等)来施用。

[0471] 如本文所使用的,“运载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介、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、运载体溶液、悬浮剂、胶体等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域中是众所周知的。补充的活性成分也可以掺入所述组合物中。短语“药学上可接受的”是指当向宿主施用时不产生变应性反应或类似不利反应的分子实体和组合物。

[0472] 递送媒介(例如脂质体、纳米胶囊、微颗粒、微球、脂质颗粒、囊泡等)可用于将本公开的组合物引入至合适的宿主细胞中。特别是,可将递送转基因的rAAV载体配制用于包裹在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中递送。

[0473] 此类剂型可优选用于引入本文公开的核酸或rAAV构建体的药学上可接受的剂型。脂质体的形成和使用通常是本领域技术人员已知的。最近,开发了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,已经描述了脂质体和脂质体样制剂作为潜在药物运载体的多种方法(美国专利号5,567,434;5,552,157;5,565,213;5,738,868和5,795,587)。

[0474] 脂质体已成功地与通常抵抗其它程序转染的许多细胞类型一起使用。此外,脂质体不受DNA长度限制(在基于病毒的递送系统是典型的)。脂质体已被有效地用于将基因、药物、放射治疗剂、病毒、转录因子和变构效应物引入各种经培养的细胞系和动物中。此外,已经完成了数项检测脂质体介导的药物递送有效性的成功临床试验。

[0475] 脂质体由分散在水性介质中的磷脂形成并自发形成多层同心双层囊泡(也称为多层囊泡(MLV))。MLV通常具有25nm至4 μ m的直径。MLV的超声处理使得形成直径在200A到500A范围内的小单层囊泡(SUV),其核心中含有水性溶液。

[0476] 或者,可以使用rAAV的纳米胶囊剂型。纳米胶囊通常可以以稳定且可重复的方式捕获物质。为避免由于细胞内聚合物超载而引起的副作用,此类超细小颗粒(尺寸约为0.1 μ m)应使用能够在体内降解的聚合物进行设计。考虑使用满足这些要求的可生物降解的聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米颗粒。

[0477] 除了上述递送方法之外,还考虑以下技术作为将rAAV组合物递送至宿主的替代方法。超声导入法(即超声)已被使用,并在美国专利号5,656,016中描述为提高药物渗透进入和通过循环系统的速率和功效的装置。考虑的其它药物递送替代方案为骨内注射(美国专利号5,779,708)、微芯片装置(美国专利号5,797,898)、眼科剂型(Bourlakis等,1998)、经皮矩阵(transdermal matrices)(美国专利号5,770,219和5,783,208)和经反馈控制的递送(美国专利号5,697,899)。

[0478] 在一些实施方式中,本文所述的方法涉及用本文所述的核酸治疗患有或诊断为患有神经系统疾病或紊乱(例如亨廷顿病)的受试者。患有神经系统疾病或紊乱(例如亨廷顿病)的受试者可以由医师使用当前诊断此类疾病和紊乱的方法来鉴别。例如,表征这些病症并有助于诊断的亨廷顿病的症状和/或并发症在本领域中是众所周知的,并且包括但不限于抑郁和焦虑以及具有特征性运动障碍和舞蹈症。可有助于诊断亨廷顿病的测试例如包括但不限于基因测试。亨廷顿病的家族史也可有助于确定受试者是否可能患有亨廷顿病或有助于进行亨廷顿病诊断。

[0479] 可以向患有或诊断为患有神经系统疾病或紊乱的受试者施用本文所述的组合物和方法。在一些实施方式中,本文所述的方法包括向受试者施用有效量的本文所述的组合物(例如本文所述的核酸)以减轻神经系统疾病或紊乱的症状。如本文所使用的,“减轻症状”是缓解与神经系统疾病或紊乱相关的任何病症或症状。与同等的未处理对照相比,此类减少为至少5%、至少10%、至少20%、至少40%、至少50%、至少60%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%或更多,通过任何标准技术测量。

[0480] 有效量、毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中的标准药理学程序来确定,例如,以确定最小有效剂量和/或最大耐受剂量。剂量可以根据使用的制剂形式和利用的施用途径而不同。治疗有效剂量最初可以通过细胞培养测定来估计。此外,可以在动物模型中配制剂量以达到最小有效剂量和最大耐受剂量之间的剂量范围。任何特定剂量的效果可以通过合适的生物测定(例如对于神经元退化和/或功能性等的测定)来监测。剂量可以由医师确定并进行调整(如果需要的话),以适应观察到的治疗效果。

[0481] 本发明还提供了用于任选地在CNS中治疗疾病、优选与异常基因表达相关的疾病(例如遗传性CNS疾病)的根据本发明的各个方面的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体、病毒体或药物组合物。相关病症、疾病和治疗性表达产物在上文中进行了讨论。

[0482] 本发明还提供了用作药物的根据本发明的各个方面的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体、病毒体。

[0483] 本发明还提供了用于制造用来治疗本文提及的任何病症或疾病的药物组合物中的根据本发明的各个方面的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体、病毒体。

[0484] 本发明进一步提供了细胞,所述细胞包含根据本发明的各个方面的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体、病毒体。适当地,所述细胞是真核细胞。所述真核细胞可以适当地是动物(后生动物)细胞(例如哺乳动物细胞)。适当地,所述细胞是人类细胞。

[0485] 在本发明的一些实施方式中,所述细胞是离体的,例如在细胞培养物中。在本发明的其它实施方式中,所述细胞可以是组织或多细胞生物的一部分。

[0486] 在优选的实施方式中,所述细胞是CNS细胞,所述细胞可以是离体的或体内的。所述CNS细胞可以是原代神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞或室管膜细胞。或者,所述CNS细胞可以是源自CNS的细胞系,例如永生化细胞系。

[0487] 在最优选的实施方式中,所述CNS细胞是神经元,适当地是多巴胺能神经元。

[0488] 所述细胞可以存在于CNS组织环境中(例如,在动物的CNS内),或者可以从CNS组织中分离,例如,它可以在细胞培养物中。适当地,所述原代细胞或原代细胞系是人类细胞。

[0489] 根据本发明的合成的CNS特异性启动子、表达盒或载体可以被插入细胞的基因组中,或者可以是附加型的(例如存在于附加型载体中)。

[0490] 对于本领域技术人员来说显而易见的是,根据本发明的各个方面的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体或病毒体可用于基因治疗。因此,此类核酸构建体在基因治疗中的用途构成了本发明的部分。

[0491] 因此,在一些实施方式中,本发明提供了用于对受试者进行基因治疗、优选通过治疗基因的CNS特异性表达进行基因治疗的根据本发明的表达盒、载体或病毒体。所述治疗可涉及通过从CNS细胞分泌治疗产品来治疗疾病(适当地涉及CNS中异常基因表达的疾病),如上所述。

[0492] 本发明还提供了在CNS细胞中表达治疗性转基因的方法,所述方法包括将根据本发明的表达盒或载体引入CNS细胞中。所述CNS细胞可以是体内或离体的。

[0493] 本发明还提供了对有需要的受试者(优选人类)进行基因治疗的方法,所述方法包括:向受试者施用(适当地引入到受试者的CNS中)本发明的合成的CNS特异性表达盒、载体、病毒体或药物组合物,所述合成的CNS特异性表达盒、载体、病毒体或药物组合物包含编码治疗产品的基因。

[0494] 所述方法适当地包括在所述受试者的CNS中表达来自基因的治疗量的治疗产品。上文讨论了可以治疗的各种病症和疾病。上文讨论了编码合适治疗产品的基因。

[0495] 所述方法适当地包括向受试者施用根据本发明的载体或病毒体。适当地,所述载体是病毒基因治疗载体,例如AAV载体。

[0496] 在一些实施方式中,所述方法包括全身施用基因治疗载体。全身施用可以是肠内施用(例如口服、舌下和直肠施用)或胃肠外施用(例如注射)。优选的注射途径包括静脉内注射、肌内注射、皮下注射、动脉内注射、关节内注射、鞘内注射和皮内注射。在一个实施方式中,所述基因治疗载体可以通过注射到脑脊液(CSF)通路中来递送。递送到CSF通路的非限制性实例包括鞘内和脑室内施用。

[0497] 特别优选的AAV载体或病毒体的施用途径是血管内,所述AAV载体或病毒体包含根据本发明的合成的CNS特异性启动子或表达盒。适当地,包含根据本发明的合成的CNS特异性启动子或表达盒的AAV载体或病毒体可以施用于手背静脉或前臂前部静脉中。前臂前部中的合适静脉是头静脉、正中静脉或贵要静脉。这是因为这种施用途径对患者而言通常是

安全的,同时仍允许一些渗透到CNS中。

[0498] 在一些实施方式中,所述病毒基因治疗载体可以与一种或多种额外的治疗剂或一种或多种被设计用于防止网状内皮系统清除载体的饱和剂同时或顺序施用。

[0499] 当所述载体是AAV载体时,所述载体的剂量可以是 1×10^{10} gc/kg至 1×10^{15} gc/kg或更多,适当地为 1×10^{12} gc/kg至 1×10^{14} gc/kg,适当地为 5×10^{12} gc/kg至 5×10^{13} gc/kg。

[0500] 一般来说,有需要的受试者是哺乳动物,并且优选是灵长类动物,更优选是人类。通常,有需要的受试者会表现出疾病的症状特征。所述方法通常包括通过表达治疗量的治疗产品来改善有需要的受试者表现出的症状。在一个实施方式中,本发明的治疗方法可用于减少功能能力和日常生活活动的下降,如通过标准评估系统(例如但不限于总功能能力(TFC)量表)测量的。在一个实施方式中,本发明的方法可用于改善用于测量神经系统疾病症状的任何评估的表现。此类评估包括但不限于ADAS-cog(阿尔茨海默病评估量表-认知)、MMSE(简易精神状态检查量表)、GDS(老年抑郁量表)、FAQ(功能活动问卷)、ADL(日常生活活动)、GPCOG(全科医生认知评估量表)、Mini-Cog、AMTS(简易智力检测量表)、画钟试验、6-CIT(6项认知损害测试)、TYM(测试你的记忆)、MoCa(蒙特利尔认知评估量表)、ACE-R(Addenbrookes认知评估)、MIS(记忆损害筛查)、BADLS(Bristol日常生活活动量表)、Barthel指数、功能独立性评测、工具性日常生活活动、IQCODE(老年人认知功能减退知情者问卷)、神经精神量表、Cohen-Mansfield激越情绪行为量表、BEHAVE-AD、EuroQol、Short Form-36和/或MBR护理人员应变仪(MBR Caregiver Strain Instrument)、或Sheehan B(Ther Adv Neurol Disord.5(6):349-358(2012))中所述的任何其它测试,其内容通过引用的方式以其整体并入本文。

[0501] 用于在体内和体外靶细胞中表达治疗性基因的基因治疗方案在本领域中是众所周知的,并且本文将不再详细讨论。简而言之,它们包括质粒DNA载体(裸露或在脂质体中)或病毒载体的静脉内施用或动脉内施用(例如,颈动脉内、肝动脉内、肝静脉内)、颅内施用、肌内注射、间质注射、气道滴注、施加至内皮和肝实质内。已经开发了各种装置来增强DNA对靶细胞的可用性。简单的方案是用含有相关载体的导管或可植入材料与靶细胞物理接触,而更复杂的方案可以使用喷射注射装置等。可以使用离体程序和体内程序将基因转移到哺乳动物的CNS细胞中。离体方案通常需要收获CNS细胞,用合适的表达载体进行体外转导,然后将经转导的CNS细胞重新引入CNS。由于在大脑中收获和重新引入CNS细胞的困难和危险,这种方案通常不太优选。体内基因转移是通过将DNA或病毒载体直接注射到CNS来实现的,例如通过颅内注射、或通过静脉内注射或动脉内注射病毒载体。

[0502] 在一个实施方式中,所述基因治疗载体可以以治疗有效量施用至受试者(例如,施用至受试者的CNS),以减轻受试者的神经系统疾病症状(例如,使用已知的评估方法确定)。在一些实施方式中,基因治疗载体和包含基因治疗载体的组合物可以以允许它们穿过血脑屏障、血管屏障或其它上皮屏障的方式施用。

[0503] 所述基因治疗载体可与一个或多个其它治疗、预防、研究或诊断剂组合使用。“组合”并不意味着所述药剂必须同时施用和/或配制用于一起递送,尽管这些递送方法在本发明的范围内。组合物可与一个或多个其它期望疗法或医疗程序同时、在其之前或在其之后施用。可以与本文描述的AAV颗粒组合使用的53种parker化合物包括但不限于胆碱酯酶抑制剂(多奈哌齐、利凡斯的明、加兰他敏)、NMDA受体拮抗剂(例如美金刚)、抗精神病药、抗抑

郁药、抗痉挛药 (anti-convulsants) (例如用于肌阵挛的左乙拉西坦和丙戊酸钠)、分泌酶抑制剂、淀粉样蛋白聚集抑制剂、铜或锌调节剂、BACE抑制剂、tau聚集抑制剂 (例如亚甲基蓝、吩噻嗪、葱醌、n-苯胺或罗丹明)、微管稳定剂 (例如NAP、紫杉醇 (taxol) 或紫杉醇 (paclitaxel))、激酶或磷酸酶抑制剂 (例如靶向GSK3 (锂) 或PP2A的抑制剂、用 β 肽或tau磷酸化表位免疫)、抗tau或抗淀粉样蛋白抗体、多巴胺耗竭剂 (例如用于舞蹈症的丁苯那嗪)、苯二氮卓类 (例如用于肌阵挛、舞蹈病、肌张力障碍、僵硬和/或痉挛的氯硝西泮)、多巴胺的氨基酸前体 (例如用于僵硬的左旋多巴)、骨骼肌松弛剂 (例如用于僵硬和/或痉挛的巴氯芬、替扎尼定)、造成肌肉麻痹的神经肌肉接头处乙酰胆碱释放的抑制剂 (例如用于磨牙症和/或肌张力障碍的肉毒毒素)、非典型抗精神病药 (例如用于精神病和/或易怒的喹硫平和奥氮平, 用于精神病、舞蹈病和/或易怒的氟哌啶醇、利培酮和舒必利, 用于难治性精神病的氯氮平, 用于伴有明显阴性症状的精神病的阿立哌唑); 选择性血清素再吸收抑制剂 (SSRI) (例如用于抑郁、焦虑、强迫性行为和/或易怒的文拉法辛、西酞普兰、氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、米氮平); 安眠药 (例如用于改变的睡眠-觉醒周期的唑吡坦和/或佐匹克隆 (xopiclone)); 抗惊厥药 (anticonvulsants) (例如用于躁狂或轻躁狂的卡马西平和丙戊酸钠) 和情绪稳定剂 (例如用于治疗躁狂或轻躁狂的锂)。

[0504] 根据一些优选的实施方式, 上述方法可用于治疗患有如上所述的CNS相关疾病 (例如多巴胺转运体缺陷综合征) 的受试者。

免疫调节剂

[0505] 在一些实施方式中, 本文所述的组合物包括免疫调节剂, 并且所述方法进一步包括施用免疫调节剂。所述免疫调节剂可以在施用前、施用时或施用后施用。在受试者被再次施用至少第二种组合物的情况下, 所述免疫调节剂可以在至少第二次施用之前、同时或之后施用。

[0506] 在优选的实施方式中, 所述免疫调节剂在施用重组病毒载体之前施用。在各种实施方式中, 所述免疫调节剂在施用重组病毒载体之前至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时、至少16小时、至少17小时、至少18小时、至少19小时、至少20小时、至少21小时、至少22小时、至少23小时、至少24小时或更长时间施用。在一个实施方式中, 所述免疫调节剂在施用重组病毒载体之前不超过24小时施用。

[0507] 在一个实施方式中, 所述免疫调节剂与所述重组病毒载体基本上同时施用, 例如, 在本文公开的重组病毒载体的施用之前稍早施用 (即, 在6小时内、或5小时内、或4小时内、或3小时内、或2小时内或1小时内)。在一些实施方式中, 所述免疫调节剂与病毒载体的施用同时施用或在病毒载体的施用后6小时内施用 (即, 在施用所公开的病毒载体组合物后1小时内、或2小时内、或3小时内、或4小时内、或5小时内、或6小时内或约6小时)。

[0508] 在一些实施方式中, 所述免疫调节剂允许将重组病毒载体施用至受试者, 所述受试者不是接受这种载体的良好候选者。不是接受这种载体的良好候选者的受试者是例如先前接受过重组病毒载体的施用和/或先前暴露至重组病毒载体并随后对所述载体发展出抗体应答的受试者。通常, 当受试者的病毒载体结合抗体的滴度小于1:5 (例如, 1:1、1:2、1:3或1:4) 时, 该受试者被视为施用重组病毒载体的候选者 (即良好候选者)。相反, 当受试者的病毒载体结合抗体的滴度为1:5或更高 (例如, 1:6、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:20、1:30、1:

50、1:100、1:1000或更高)时,该受试者被视为不是适合施用重组病毒载体的候选者。本领域技术人员可以使用本领域的标准技术评估受试者的抗体滴度,例如,通过从受试者采集生物样本(例如受试者的血液),用已知抗原刺激生物样本,并检测已知抗原的病毒结合抗体的存在。抗体滴度是样品中可以检测到50%病毒载体中和之前的样品可以稀释多少的量度。抗体滴度通常表示为比率,例如1:100,这意味着一份血清与100份盐溶液(即稀释剂)引起样本中50%的抗体中和,也就是说,抑制50%病毒感染所需的血清相互稀释可指定为50%抑制时的中和抗体滴度。因此,病毒载体抗体滴度为1:10指示病毒载体抗体水平低于1:100滴度。

[0509] 因此,在一个实施方式中,在施用基因疗法之前对所述受试者评估针对基因疗法的AAV载体的抗AAV抗体的存在。在一个实施方式中,在施用基因疗法之前对受试者评估针对基因疗法的AAV载体的中和抗AAV抗体的存在。检测中和抗AAV抗体的方法进一步描述于例如Kasprzyk T.等人,Mol Therapy.Methods&Clinical Dev.2022年1月6日,将其内容通过引用以其整体并入本文中。

[0510] 在一个实施方式中,将免疫调节剂施用至受试者,所述受试者具有的来自受试者的生物样品(例如,血液样品)中存在的病毒载体结合抗体的滴度小于约1:5(例如,1:1、1:2、1:3或1:4),其中1份生物样品稀释在10000份缓冲液中产生50%的病毒载体中和。

[0511] 在一个实施方式中,将所述免疫调节剂施用至受试者,所述受试者具有的来自受试者的血液制品或生物样品中存在的病毒载体结合抗体的滴度大于或等于1:5且小于约1:10(例如,1:6、1:7、1:8或1:9),其中将1份生物样品或血液制品稀释在10000份缓冲液中产生50%的病毒载体中和,以扩大可用AAV基因疗法有效治疗的受试者池。目前,病毒中和抗体水平为1:5或更高的潜在患者被排除在此类治疗之外,即,他们不是良好的候选者。向具有大于或等于1:5但小于1:10的抗体滴度的受试者施用免疫调节剂预期使受试者中现有的抗体滴度降低至小于1:5,从而使该受试者有资格作为施用重组病毒载体(例如,基因治疗载体)的候选者。

[0512] 在一个实施方式中,将所述免疫调节剂施用至受试者,发现所述受试者具有的来自受试者的生物样品(例如,血液样品)中存在的病毒载体结合抗体的滴度大于或等于1:5且小于约1:25(例如,1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23和1:24),其中将1份生物样品或血液产品稀释在10000份缓冲液中产生50%的病毒载体中和。例如,向具有大于或等于1:5但小于1:15的滴度的受试者施用免疫调节剂预期使受试者中现有的抗体滴度降低至小于1:5,从而使该受试者有资格作为施用重组病毒载体(例如,基因治疗载体)的候选者。在一个实施方式中,将所述免疫调节剂施用至受试者,所述受试者具有的来自受试者的生物样品中存在的病毒载体结合抗体的抗体滴度大于或等于1:5且小于约1:100(例如1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95和1:99),其中将1份生物样品或血液制品稀释在10000份缓冲液中产生50%的病毒载体中和。向具有大于或等于1:5但小于1:25的抗体滴度的受试者施用免疫调节剂预期使受试者中现有的抗体滴度降低至小于1:5,从而使受试者有资格作为施用重组病毒载体(例如,基因治疗载体)的候选者。

[0513] 在一些实施方式中,所述免疫调节剂使得能够进行本文公开的AAV载体的重复给

药或重复施用。例如,所述病毒载体(例如,本文公开的AAV载体)与免疫调节剂(在施用AAV载体的基本上同时、之前或之后)的施用可以在规定的时间段内多次(即,多于一次)施用。为了示例性目的,所述AAV载体可以在数周(例如,2周)至数月(例如,2个月)内施用数次(即,多于一次)。不希望受理论限制,作为非限制性示例,根据本文公开的方法的所述AAV载体与免疫调节剂的施用可以为在6个月的时间段内每月一次、在6周的时间段内3次-4次、在1个月(或约4周)或2个月(或约8周)的时间段内每周一次。在一些实施方式中,当将本文公开的AAV载体与免疫调节剂(在施用AAV载体的基本上同时、之前或之后)多次施用(例如,重复给药)时,所述病毒载体(例如,AAV载体)的剂量低于单剂量方案中通常使用的剂量,例如,剂量低于本文所述的单剂量方案。例如,所述AAV载体的剂量可以小于或等于约 10^{12} ,或低于约 10^{12} ,例如,剂量可以是约 10^7 、约 10^8 、约 10^9 、约 10^{10} 、约 10^{11} 或约 10^{12} ,或 10^7 和 10^{12} 之间的任何剂量。在一些实施方式中,当根据本文公开的方法将本文公开的AAV载体的重复剂量与免疫调节剂一起施用至受试者时,可以在不同剂量之间改变免疫调节剂,即,可以以重复剂量使用相同或不同的免疫调节剂。例如,当将第一剂量的AAV与免疫调节剂A共同施用,与第二剂量或第三剂量的AAV一起施用的第二免疫调节剂不同于免疫调节剂A,例如,第二免疫调节剂是免疫调节剂B。为了示例性目的,根据所公开的方法的给药方案可以是施用浓度为 10^{12} 或小于 10^{12} 的AAV载体,其中所述免疫调节剂作为A-B-C-D、或A-A-B-C、或A-B-A-C施用,其中A、B、C和D是本文所公开的不同的免疫调节剂。换句话说,给药方案可以包括在时间段内的多个的免疫调节剂的剂量,其中所述多个中的每个剂量包括独立地选自于免疫调节剂A、免疫调节剂B、免疫调节剂C、免疫调节剂D及其组合的免疫调节剂(即,每个剂量可以包含多于一种的免疫调节剂)。此类变化的免疫调节剂使得能够进行本文公开的AAV载体的重复给药。在一些实施方式中,例如,如本文所公开的,免疫调节剂“A”可以是imlifidase(例如IdeS),并且免疫调节剂“B”可以是ImmTOR™。在一些实施方式中,将本文公开的AAV载体在第一时间点与IdeS免疫调节剂一起施用,并且将本文公开的AAV载体在第二时间点与不同的免疫调节剂(例如免疫球蛋白降解蛋白或小分子,例如ImmTOR™)一起施用,反之亦然。例如,本文公开的AAV载体可以在第一时间点与ImmTOR™免疫调节剂一起施用,并且本文公开的AAV载体可以在第二时间点与IdeS一起施用。

[0514] 本文的一个方面提供了向先前已经接受重组病毒载体(例如,相同的重组病毒载体或具有相似血清型的另一个病毒载体)的受试者施用重组病毒载体(例如,基因治疗载体)的方法,所述方法包括在施用重组病毒载体之前,向受试者施用免疫调节剂。在一个实施方式中,先前接受的重组病毒载体引发免疫应答,产生靶向(即,识别和结合)至所施用的重组病毒载体的抗AAV抗体。

[0515] 本文的另一个方面提供了向先前暴露至病毒载体的受试者施用重组病毒载体(例如,基因治疗载体)的方法,其中所述暴露引发免疫应答,产生靶向待施用的重组病毒载体的抗AAV抗体,并且其中所述受试者具有的抗AAV抗体滴度为至少1:5-1:15、至少1:5-1:25、至少1:5-1:50或至少1:5-1:100,所述方法包括以下步骤:在施用重组病毒载体前,向所述受试者施用免疫调节剂。

[0516] 在一个实施方式中,所述免疫调节剂是全身施用的。

[0517] 在一些实施方式中,所述免疫调节剂穿过血脑屏障。在替代实施方式中,所述免疫调节剂不穿过血脑屏障。

[0518] 在一个实施方式中,所述免疫调节剂是局部施用的。例如,当将所述重组病毒载体局部施用至脑组织并且所述免疫调节剂不穿过血脑屏障时,优选将所述免疫调节剂局部施用至脑组织,例如,通过合适的导管,或者直接施用至大脑组织或通过在脊髓周围循环的脑脊液间接施用至大脑组织(即脊椎穿刺)。

[0519] 在一个实施方式中,将所述免疫调节剂局部施用至中枢神经系统(CNS)组织(例如,大脑组织、脊髓组织、脑脊液(CSF))。CNS组织还包括但不限于神经元细胞、胶质细胞、星形胶质细胞、脑脊液(CSF)、胞间隙、骨、软骨等。本文所述的任何组合物都可以通过注射到例如心室区域以及纹状体(例如,纹状体的尾状核或壳核)、脊髓和神经肌肉接头或小脑小叶而直接递送至CNS或大脑。

[0520] 在一个实施方式中,将所述免疫调节剂局部施用至以下中的任一个:神经通路、躯体感觉系统、视觉系统、听觉系统、神经、神经内分泌系统、神经血管系统、脑神经递质系统、硬脑膜脑膜系统或其组合。

[0521] 在一个实施方式中,将所述免疫调节剂局部施用至眼睛,例如玻璃体、视网膜或巩膜。

[0522] 在一个实施方式中,将所述免疫调节剂全身施用。

[0523] 在一些实施方式中,所述免疫调节剂是免疫球蛋白降解酶,例如IdeS、IdeZ、IdeS/Z、Endo S或它们的功能变体。此类免疫球蛋白降解酶及它们的用途的非限制性实例在US 7,666,582、US 8,133,483、US 20180037962、US 20180023070、US 20170209550、US 8,889,128、WO 2010057626、US 9,707,279、US 8,323,908、US 20190345533、US 20190262434、US 20210246469和WO 2020016318中描述,将其各自都通过引用的方式以其整体并入。

[0524] 在一些实施方式中,可以将本文公开的免疫调节剂以任何合适的剂量施用至受试者,例如由医学专业人员确定的合适剂量。例如,合适的剂量可以是约0.05mg/kg受试者体重至约5mg/kg受试者体重,或约0.1mg/kg受试者体重至约4mg/kg受试者体重。

[0525] 在一些实施方式中,将本文公开的免疫调节剂(例如,IdeZ)以约0.01mg/kg受试者体重至约10mg/kg受试者体重的剂量施用。例如,合适的剂量可以是约0.05mg/kg受试者体重至约5mg/kg受试者体重,或约0.1mg/kg受试者体重至约4mg/kg受试者体重。

[0526] 在一些实施方式中,将本文公开的免疫调节剂(例如,IdeS)以约0.01mg/kg受试者体重至约10mg/kg受试者体重的剂量施用。例如,合适的剂量可以是约0.05mg/kg受试者体重至约5mg/kg受试者体重,或约0.1mg/kg受试者体重至约4mg/kg受试者体重。

[0527] 在一些实施方式中,将本文公开的免疫调节剂(例如,EndoS)以约0.01mg/kg受试者体重至约10mg/kg受试者体重的剂量施用。例如,合适的剂量可以是约0.05mg/kg受试者体重至约5mg/kg受试者体重,或约0.1mg/kg受试者体重至约4mg/kg受试者体重。

[0528] 进一步,关于数值范围,例如“0.01至10”包括0.011、0.012、0.013等,以及9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10等,及诸如此类。例如,“约0.01mg/kg受试者体重至约10mg/kg受试者体重”的剂量包括0.011mg/kg、0.012mg/kg、0.013mg/kg、0.014mg/kg、0.015mg/kg等,以及9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg等,及诸如此类。

[0529] 在各种实施方式中,在向受试者施用重组病毒载体之前,先施用蛋白酶和/或糖苷酶以抑制、降低或阻止免疫应答(例如,体液免疫应答),所述免疫应答针对与异源多核苷酸或通过异源多核苷酸编码的肽或蛋白质结合的抗体、或重组病毒载体,所述异源多核苷酸

由病毒载体包裹。例如,在施用所述病毒载体之前,可以先施用蛋白酶和/或糖苷酶至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时、至少16小时、至少17小时、至少18小时、至少19小时、至少20小时、至少21小时、至少22小时、至少23小时;或至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天、至少25天、至少26天、至少27天、至少28天、至少29天、至少30天;或至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月;或至少1年、至少2年、至少3年、至少4年、至少5年或更长时间。

[0530] 在一个实施方式中,向受试者施用重组病毒载体与施用蛋白酶和/或糖苷酶同时进行,以抑制、降低或阻止免疫应答(例如,体液免疫应答),所述免疫应答针对与异源多核苷酸或通过异源多核苷酸编码的肽或蛋白质结合的抗体、或重组病毒载体,所述异源多核苷酸由病毒载体包裹。

[0531] 在特定实施方式中,在免疫应答(例如,体液免疫应答)之前(例如在发展出中和抗体或发展出与异源多核苷酸、通过异源多核苷酸编码的肽或蛋白质结合的抗体之前,所述异源多核苷酸由病毒载体包裹),向受试者施用蛋白酶和/或糖苷酶。在一个实施方式中,免疫应答发生在施用重组病毒载体后1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时内;或在1天、2天、3天、4天、5天或更长时间内。

[0532] 在一些实施方式中,所述免疫调节剂是蛋白酶体抑制剂。在一些实施方式中,所述免疫调节剂是蛋白酶或糖苷酶。在特定方面,所述蛋白酶体抑制剂是硼替佐米。在实施方式的一些方面中,所述免疫调节剂包括硼替佐米和抗CD20抗体,例如利妥昔单抗。在实施方式的其它方面中,所述免疫调节剂包括硼替佐米、利妥昔单抗、甲氨蝶呤和静脉注射丙种球蛋白。蛋白酶体抑制剂和它们与利妥昔单抗、甲氨蝶呤和静脉注射丙种球蛋白的组合的非限制性实例在US 10,028,993、US 9,592,247和US 8,809,282中描述,将其各自都通过引用的方式以其整体并入本文。

[0533] 在替代实施方式中,所述免疫调节剂为NF- κ B途径的抑制剂。在实施方式的特定方面,所述免疫调节剂是雷帕霉素或其功能变体。在以下描述了雷帕霉素的用途的非限制性实例,各自都通过引用的方式以其整体并入本文:US 10,071,114、US 20160067228、US 20160074531、US 20160074532、US 20190076458、US 10,046,064。在实施方式的其它方面,所述免疫调节剂为包含免疫抑制剂的合成型纳米载体。免疫抑制剂、与合成型纳米载体偶联的免疫抑制剂、包含雷帕霉素的合成型纳米载体和/或致耐受性合成型纳米载体、它们的剂量、施用和用途的非限制性实例在US20150320728、US 20180193482、US 20190142974、US 20150328333、US20160243253、US 10,039,822、US 20190076522、US 20160022650、US 10,441,651、US 10,420,835、US 20150320870、US 2014035636、US 10,434,088、US 10,335,395、US 20200069659、US 10,357,483、US 20140335186、US 10,668,053、US 10,357,482、US 20160128986、US 20160128987、US 20200038462、US 20200038463中描述,通过引用的方式将它们各自以其整体并入本文中。

[0534] 在一些实施方式中,所述免疫调节剂包含合成型纳米载体,所述合成型纳米载体包含雷帕霉素(即,ImmTOR™纳米颗粒),如在Kishimoto等,2016,NatNanotechnol,11(10):890-899;Maldonado等,2015,PNAS,112(2):E156-165和US20200038463、美国专利9,006,254中所公开的,通过引用的方式将它们各自以其整体并入本文。在一些实施方式中,所述免疫调节剂为经工程化的细胞,例如已经使用如W02017192786(通过引用的方式将其整体并入本文)中所述的SQZ技术修饰的免疫细胞。

[0535] 在一些实施方式中,所述免疫调节剂选自于由以下所组成的组:聚-ICLC、1018ISS、铝盐、Amplivax、AS15、BCG、CP-870,893、CPG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、单磷酸脂A、Montanide IMS1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PEPTEL、载体系统、PLGA微颗粒、resiquimod、SRL172、病毒体(Virosomes)和其它病毒样颗粒、YF-17D、VEGF trap、R848、 β -葡聚糖、Pam3Cys和Aquila的QS21刺激物及其组合。在另一进一步的实施方式中,所述免疫调节剂或聚-ICLC。

[0536] 在一些实施方式中,所述免疫调节剂为抑制细胞中固有免疫应答的小分子,例如氯喹(TLR信号转导抑制剂)和/或2-氨基嘌呤(PKR抑制剂),所述免疫调节剂也可以与包含如本文公开的至少一种rAAV的组合物联合施用。商业可得的TLR信号转导抑制剂的一些非限制性实例包括BX795、氯喹、CLI-095、OxPAPC、多粘菌素B和雷帕霉素(均可从INVIVOGEN购买得到)。此外,模式识别受体(PRR)(其参与固有免疫信号转导)的抑制剂(例如2-氨基嘌呤、BX795、氯喹和H-89)也可用于包含如本文所公开的至少一种rAAV载体的组合物和方法中以进行如本文公开的体内蛋白质表达。

[0537] 在一些实施方式中,所述免疫调节剂是光分离置换疗法,也被称为体外光化学疗法或ECP。光分离置换疗法治疗是针对受试者的血液进行的。使用IV或导管,血液通过装置从受试者中输送,所述装置分离出部分白细胞(白血球)。将分离的白细胞用称为8-甲氧基补骨脂素(8-MOP)的天然存在的光敏化学品处理,然后暴露至特定波长的紫外线(UVA)光。暴露至UVA光后,将血液施用回受试者。光分离置换疗法可以每天进行至少一次。在一个实施方式中,在施用重组病毒载体之前,每周进行至少1次、至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次光分离置换疗法。在一个实施方式中,在施用重组病毒载体之前,每周进行至少1次、至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次光分离置换疗法,持续至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少7周、至少8周、至少9周、至少10周、至少11周、至少12周或更多周,或持续至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月或至少12个月。因此,向受试者施用免疫调节剂可以包括对受试者进行光分离置换疗法。将理解的是,所述光分离置换疗法可以与第二免疫调节剂的施用结合进行和/或作为多次给药方案的部分进行,所述第二免疫调节剂选自本文所述的酶、纳米颗粒和化学组合物。

[0538] 在一些实施方式中,具有经修饰的病毒衣壳的rAAV载体还可以编码固有免疫的负调控物(例如NLRX1)。因此,在一些实施方式中,rAAV载体还可以任选地编码NLRX1、NS1、NS3/4A或A46R中的一种或多种。此外,在一些实施方式中,包含如本文公开的至少一种rAAV载体的组合物还可以包含固有免疫系统的合成的、经修饰的RNA编码抑制剂以避免由组织

或受试者产生的固有免疫应答。

[0539] 在一些实施方式中,用于本文公开的施用方法中的免疫调节剂为免疫抑制药物或免疫抑制剂。如本文所使用的,术语“免疫抑制药物或免疫抑制剂”是指抑制或干扰正常免疫功能的药剂。适用于本文公开的方法的免疫抑制药物或免疫抑制剂的实例包括抑制T-细胞/B-细胞共刺激途径的试剂(例如干扰T-细胞和B-细胞通过CTLA4和B7途径偶联的试剂),如在美国专利公开号2002/0182211中公开的,其以引用的方式以其整体并入本文中。在一个实施方式中,免疫抑制剂为环孢菌素A。免疫抑制剂的其它实例包括myophenylate mofetil、雷帕霉素和抗胸腺细胞球蛋白。在各个实施方式中,所述免疫抑制药物在包含至少一种如本文所公开的rAAV载体的组合物中施用,或以单独的组合物施用,但与根据本文公开的施用方法的包含至少一种rAAV载体的组合物的施用同时、或在其之前或在其之后施用。免疫抑制药物以与施用途径相容的制剂施用,并以足以实现期望的治疗效果的剂量施用至受试者。在一些实施方式中,所述免疫抑制药物被瞬时施用足够长的时间以诱导对本文公开的rAAV载体的耐受性。

[0540] 在本文所公开的方法和组合物的任何实施方式中,被施用如本文公开的组合物的受试者也被施用免疫抑制剂。已知多种方法会实现被施用AAV的患者中的免疫应答的免疫抑制。本领域已知的方法包括向患者施用免疫抑制剂(例如蛋白酶体抑制剂)。本领域已知的一种此类蛋白酶体抑制剂是硼替佐米,例如美国专利号9,169,492和美国专利申请号15/796,137中所公开的,将两者均以引用的方式整体并入本文。在一些实施方式中,所述免疫抑制剂是抗体,包括多克隆、单克隆、scfv或其它能够阻抑免疫应答的抗体衍生分子,例如,通过消除或阻抑产生抗体的细胞。在进一步的实施方式中,所述免疫抑制元件是短发夹RNA(shRNA)。在这个实施方式中,shRNA的编码区被包含在rAAV盒中并且通常位于下游,即,poly-A尾的3'。可以靶向shRNA以减少、减少或消除免疫刺激剂(例如细胞因子、生长因子(包括转化生长因子 β 1和 β 2、TNF以及本领域知晓的其它生长因子))的表达。

[0541] 此类免疫调节剂的使用促进了在数月和/或数年中使用多次给药(例如多次施用)的能力。这允许使用如下所讨论的多种药剂,例如编码多种基因的rAAV载体,或对受试者多次施用。

试剂盒

[0542] 在一个方面,本公开涉及包含以下的核酸或重组病毒载体:(i)一个或多个抑制性核酸(例如,miRNA);和(ii)编码CYP46A1蛋白的核酸。在一个方面,本公开涉及以下的组合:(i)一个或多个抑制性核酸(如miRNA);和(ii)编码CYP46A1蛋白的核酸。在(i)和(ii)的组合中,两个以上的元件可以以混合物或单一制剂的形式提供。或者,两个以上的元件可以在分开的制剂中提供,所述制剂被包装为套装或试剂盒或者作为套装或试剂盒提供。

[0543] 在一些实施方式中,本文所述的药剂(例如病毒载体)可组装到药物或诊断或研究试剂盒中以促进它们在治疗、诊断或研究应用中的使用。试剂盒可以包括容纳本公开的组分的一个或多个容器以及使用说明。具体而言,此类试剂盒可包含本文所述的一种或多种试剂,以及描述这些试剂的预期应用和正确使用的说明。在特定实施方式中,试剂盒中的试剂可以是适合于特定应用和试剂施用方法的药物剂型和剂量。用于研究目的的试剂盒可包含适当浓度或量的组分,以运行各种实验。

[0544] 以下将通过实施例更详细地描述本发明的示例性实施方式。这些实施方式对本发

明是示例性的,本领域技术人员将认识到本发明不限于这些示例性实施方式。

[0545] 在一些实施方式中,本公开涉及用于生产rAAV的试剂盒,所述试剂盒包含容纳以下一项或多项的容器:

a) 分离的核酸,所述分离的核酸包含miRNA,例如所述miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一项所示的序列或由SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一项所示的序列编码,或所述miRNA包含与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:46-SEQ ID NO:49互补的种子序列;

b) 重组病毒载体,所述重组病毒载体包含分离的核酸,所述分离的核酸包含编码一个或多个miRNA的转基因,

例如,其中每个miRNA包含与SEQ ID NO:4互补的种子序列,或其中每个miRNA包含SEQ ID NO:66-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中任一个所示的序列,所述序列侧接有miRNA骨架序列;

c) 包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体;和/或

d) 重组病毒载体,所述重组病毒载体包含含有转基因的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA,

例如,其中每个miRNA包含与SEQ ID NO:4互补的种子序列,或其中每个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中任一个所示的序列,所述序列侧接有miRNA骨架序列;以及

编码CYP46A1蛋白的核酸。

在一些实施方式中,试剂盒进一步包括容纳编码AAV衣壳蛋白(例如AAV9衣壳蛋白)的分离的核酸的容器。

[0546] 所述试剂盒可以设计为便于研究人员使用本文所述的方法并且所述试剂盒可以采用许多形式。在可应用的情况下,所述试剂盒的组合物的每一种可以以液体形式(例如,在溶液中)或以固体形式(例如,干粉)来提供。在特定情况下,一些组合物可为可构成的或别的可加工的(例如,形成活性形式),例如,通过添加合适的溶剂或其它物质(例如,水或细胞培养基),其可以或可能不随试剂盒提供。如本文所使用的,“说明”可以定义说明和/或促进的组分,并且通常涉及在本公开的包装上或与本公开的包装相关的书面说明。说明还可以包括以任何方式提供的任何口头或电子说明,使得用户将清楚地认识到说明与试剂盒相关联,例如视听(例如,录像带、DVD等)、互联网和/或基于网络的通信等。书面说明可以处于监管药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式,该说明还可以反映关于动物施用方面的制造、使用或销售的机构的批准。

[0547] 所述试剂盒可以在一个或多个容器中包含本文所述的组分的任一种或多种。作为实例,在一个实施方式中,所述试剂盒可以包括用于混合试剂盒的一种或多种组分和/或分离和混合样品以及应用于受试者的说明。所述试剂盒可包括容纳本文所述的试剂的容器。

所述试剂可以处于液体、凝胶或固体(粉末)的形式。所述试剂可以无菌地制备、包装在注射器中并冷藏运送。或者,它可以被容纳在小瓶或用于储存的其它容器中。第二容器可以具有无菌制备的其它试剂。或者,所述试剂盒可包括预先混合并在注射器、小瓶、管或其它容器中运送的活性剂。

[0548] 本发明的示例性实施方式将通过以下实施例更详细地描述。这些实施方式是本发明的示例,本领域技术人员将认识到本发明不限于所述示例性实施方式。

定义

[0549] 为方便起见,以下提供了本说明书、实施例和所附权利要求中使用的一些术语和短语的含义。除非另有说明或上下文中隐含,以下术语和短语包括以下提供的含义。提供所述定义以帮助描述具体的实施方式,而非旨在限制所要求保护的发明,因为本发明的范围仅由权利要求限制。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。如果本领域中术语的使用与本文提供的其定义之间存在明显差异,应以本说明书中提供的定义为准。

[0550] 为方便起见,将本说明书、实施例和所附权利要求中即本文使用的特定术语收集于此。

[0551] 术语“降低(decrease)”、“减少(reduced/reduction)”、或“抑制(inhibit)”在本文中均用于表示统计学上显著量的降低。在一些实施方式中,“减少”或“降低”或“抑制”通常是指与参比水平(例如不存在给定的治疗或药剂)相比,至少10%的降低,并且可包括例如至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或更多的降低。如本文所用,“减少”或“抑制”不包括与参比水平相比的完全抑制或减少。“完全抑制”为与参比水平相比的100%的抑制。降低可优选地下降至可接受作为不具有给定紊乱的个体的正常范围内的水平。

[0552] 术语“增加(increased/increase)”、“增强(enhance)”或“激活(activate)”在本文中均用于表示统计学上显著量的增加。在一些实施方式中,术语“增加”、“增强”或“激活”可表示与参比水平相比至少10%的增加,例如与参比水平相比至少约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%的增加或高达并包括100%增加或介于10%-100%之间的任意增加,或与参比水平相比至少约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倍和10倍之间或更多的任意增加。在标志物或症状的上下文中,“增加”是关于该水平的统计学上显著的增加。

[0553] 如本文所使用的,“受试者”意指人或动物。通常,动物为脊椎动物,例如灵长类动物、啮齿动物、家畜或狩猎动物。灵长类动物包括黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴(例如恒河猴)。啮齿动物包括小鼠、大鼠、土拨鼠、雪貂、兔子和仓鼠。家畜和狩猎动物包括奶牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科物种(例如家猫)、犬科物种(例如狗、狐狸、狼)、鸟类物种(例如鸡、鹌鹑、鸵鸟)以及鱼类(例如鳟鱼、鲑鱼和鲑鱼)。在一些实施方式中,受试者为哺乳动物,例如灵长类动物(例如人)。术语“个体”、“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0554] 优选地,受试者为哺乳动物。哺乳动物可为人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、

猫、马或牛,但不限于这些实例。人以外的哺乳动物可有利地用作代表亨廷顿病的动物模型的受试者。受试者可为雄性或雌性。

[0555] 受试者可为先前已被诊断患有或被鉴别为遭受或具有需要治疗的病症(例如亨廷顿病)或与此类病症相关的一种或多种并发症的受试者,并且任选地已经经历了对所述病症或与所述病症相关的一种或多种并发症的治疗的受试者。或者,受试者也可为先前未被诊断为患有所述病症或与所述病症相关的一种或多种并发症的受试者。例如,受试者可为表现出关于所述病症或与所述病症相关的一种或多种并发症的一种或多种风险因素的受试者或不表现出此类风险因素的受试者。

[0556] 对特定病症的治疗的“有需要的受试者”可为患有该病症、被诊断为患有该病症或处于发展出该病症的风险的受试者。

[0557] 如本文所使用的,术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用,以指代通过相邻残基的 α -氨基基团和羧基基团之间的肽键彼此连接的一系列氨基酸残基。术语“蛋白质”和“多肽”是指氨基酸的聚合物,包括经修饰的氨基酸(例如磷酸化、糖化、糖基化等)和氨基酸类似物,无论其大小或功能如何。“蛋白质”和“多肽”通常用于指相对大的多肽,而术语“肽”通常用于指小的多肽,但这些术语在本领域中的用法重叠。当涉及基因产物及其片段时,术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。因此,示例性多肽或蛋白质包括基因产物、天然存在的蛋白质、同系物、直系同源物、旁系同源物、片段,和上述的其它等同物、变体、片段和类似物。

[0558] 变体氨基酸或DNA序列可与天然或参比序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多的相同。例如可通过使用万维网上用于此目的的常用的免费可得的计算机程序(例如具有默认设置的BLASTp或BLASTn)比较两个序列,来确定天然序列和突变序列之间的同源性程度(同一性百分比)。

[0559] 天然氨基酸序列的改变可通过本领域技术人员已知的多种技术中的任一种来实现。可例如通过合成含有突变序列的寡核苷酸并且其侧接有限制性位点以能够与天然序列的片段连接,从而在特定基因座处引入突变。连接后,所得的重建序列编码具有期望的氨基酸插入、取代或缺失的类似物。或者,可采用寡核苷酸定向的位点特异性诱变程序来提供具有根据所需的取代、缺失或插入而改变的特定密码子的经改变的核苷酸序列。进行此类改变的技术已经非常成熟,且包括例如由以下公开的技术:Walder等,(Gene 42:133,1986); Bauer等,(Gene 37:73,1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith等,(Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981)和美国专利号4,518,584和4,737,462,通过引用的方式将它们整体并入本文。任何不参与维持多肽正确构象的半胱氨酸残基也可被取代,通常取代为丝氨酸,以提高分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可将一个或多个半胱氨酸键添加到多肽中以提高其稳定性或促进寡聚化。

[0560] 如本文所使用的,术语“核酸”或“核酸序列”是指合并核糖核酸、脱氧核糖核酸或其类似物的单元的任意分子,优选聚合物分子。所述核酸可为单链或双链。单链核酸可为变性的双链DNA的一条核酸链。或者,它可为不是源自任何双链DNA的单链核酸。在一个方面中,所述核酸可为DNA。在另一方面中,所述核酸可为RNA。合适的DNA可包括例如基因组DNA或cDNA。合适的RNA可包括例如mRNA、miRNA。

[0561] 在任何方面的一些实施方式中,可对如本文所述的多肽、核酸或细胞进行工程化。如本文所使用的,“经工程化的”是指已被人工操纵的方面。例如,当多肽的至少一个方面(例如其序列)已经由人工操纵使得其与自然界中存在的方面不同时,所述多肽被认为是“经工程化的”。如通常的操作以及本领域技术人员所理解的,经工程化的细胞的后代通常仍然被称为“经工程化的”,即使实际操作是在先前实体上进行的。

[0562] 变体氨基酸或DNA序列可与天然或参比序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多的相同。例如可通过使用万维网上用于此目的的常用的免费可得的计算机程序(例如具有默认设置的BLASTp或BLASTn)比较两个序列,来确定天然序列和突变序列之间的同源性程度(同一性百分比)。

[0563] 在任何方面的一些实施方式中,本文所述的miRNA是外源性的。在任何方面的一些实施方式中,本文所述的miRNA是异位的。在任何方面的一些实施方式中,本文所述的miRNA是非内源性的。

[0564] 术语“外源性的”是指存在于并非其天然来源的细胞中的物质。术语“外源性的”当在本文中使用时可指已通过人工参与的过程引入至其通常不存在于其中的生物系统(例如细胞或生物体)中的核酸(例如,编码多肽的核酸)或多肽,并且人们希望将所述核酸或多肽引入此类细胞或生物体。或者,“外源性的”可指已通过人工参与的过程引入至在其中以相对低的量存在的生物系统(例如细胞或生物体)中的核酸或多肽,并且人们希望增加该细胞或生物体中所述核酸或多肽的量(例如以产生异位表达或水平)。相反,术语“内源性的”是指生物系统或细胞的天然物质。如本文所使用的,“异位的”是指以不寻常的位置和/或量存在的物质。异位的物质可为通常在给定细胞中存在的物质,但以少得多的量和/或在不同时间存在。异位的还包括物质,例如在其自然环境中的给定细胞中并非天然存在或表达的多肽或核酸。

[0565] 如本文所使用的,术语“载体”是指设计用于递送至宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所使用的,载体可为病毒的或非病毒的。术语“载体”包括当与适当的控制元件相关联时能够复制并且可将基因序列转移至细胞的任何遗传元件。载体可包括但不限于克隆载体、表达载体、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒体等。

[0566] 在任何方面的一些实施方式中,所述载体是重组的(例如它包含源自至少两个不同来源的序列)。在任何方面的一些实施方式中,所述载体包含源自至少两个不同物种的序列。在任何方面的一些实施方式中,所述载体包含源自至少两个不同基因的序列,例如它包含融合蛋白或编码表达产物的核酸,所述核酸可操作地连接到至少一个非天然(例如异源)遗传控制元件(例如启动子、阻遏蛋白、激活子、增强子、应答元件等)。

[0567] 在任何方面的一些实施方式中,本文所述的载体或核酸是密码子优化的变体,例如核酸序列的天然或野生型序列已被改变或工程化以包括替代密码子,从而使得经改变的或工程化的核酸编码与天然/野生型序列相同的多肽表达产物,但将在期望的表达系统中以改善的效率进行转录和/或翻译。在任何方面的一些实施方式中,所述表达系统是除天然/野生型序列的来源之外的生物体(或从此类生物体获得的细胞)。在任何方面的一些实施方式中,本文所述的载体和/或核酸序列是密码子优化的,以在哺乳动物或哺乳动物细胞

(例如小鼠、鼠类细胞或人细胞)中表达。在任何方面的一些实施方式中,本文所述的载体和/或核酸序列是密码子优化的,以在人细胞中表达。在任何方面的一些实施方式中,本文所述的载体和/或核酸序列是密码子优化的,以在酵母或酵母细胞中表达。在任何方面的一些实施方式中,本文所述的载体和/或核酸序列是密码子优化的,以在细菌细胞中表达。在任何方面的一些实施方式中,本文所述的载体和/或核酸序列是密码子优化的,以在大肠杆菌(E.coli)细胞中表达。

[0568] 如本文所使用的,术语“表达载体”是指指导由与载体上的转录调控序列连接的序列表达RNA或多肽的载体。表达的序列通常(但不必须)与细胞为异源的。表达载体可包含附加的元件,例如表达载体可具有两个复制系统,从而允许其在两种生物体中维持(例如在人细胞中用于表达和在原核宿主中用于克隆和扩增)。

[0569] 如本文所使用的,术语“病毒载体”是指包括病毒来源的至少一个元件并且具有被包装到病毒载体颗粒中的能力的核酸载体构建体。病毒载体可以包含代替了非必需病毒基因的如本文所述的编码多肽的核酸。所述载体和/或颗粒可用于在体外或体内将任意核酸转移至细胞中的目的。病毒载体的多种形式在本领域中是已知的。本发明的病毒载体的非限制性实例包括AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、甲病毒载体、痘病毒载体、杆状病毒载体和嵌合病毒载体。

[0570] 应当理解的是,在一些实施方式中,本文所述的载体可以与其它合适的组合物和疗法组合。在一些实施方式中,所述载体是附加型的。使用合适的附加型载体提供了在受试者中将感兴趣的核苷酸维持高拷贝数染色体外DNA的方法,从而消除了染色体整合的潜在影响。

[0571] 如本文所使用的,术语“治疗(treat/treatment/treating)”或“缓解(amelioration)”是指治疗性治疗,其中目的是逆转、减轻、缓解、抑制、减慢或停止与疾病或紊乱(例如亨廷顿病)相关的病症的进展或严重程度。术语“治疗”包括减少或减轻病症、疾病或紊乱的至少一种不良作用或症状。如果一种或多种症状或临床标志物减少,治疗通常是“有效的”。或者,如果疾病的进展减少或停止,治疗是“有效的”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,还包括与在没有治疗的情况下预期的情况相比,中止或至少减缓症状的进展或恶化。有益的或期望的临床结果包括但不限于减轻一种或多种症状、减小疾病程度、稳定(即不恶化)疾病状态、延迟或减缓疾病进展、缓解或缓和疾病状态、减退(无论是部分还是全部)和/或降低的死亡率,无论是可检测的还是不可检测的。疾病的术语“治疗”还包括提供疾病的症状或副作用的减轻(包括姑息治疗)。

[0572] 如本文所使用的,术语“药物组合物”是指与药学上可接受的运载体(例如制药工业中常用的运载体)组合的活性剂。短语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理医学判断范围内适合与人和动物的组织接触使用而无过度的毒性、刺激、变应性反应或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。在任何方面的一些实施方式中,药学上可接受的运载体可为除水之外的运载体。在任何方面的一些实施方式中,药学上可接受的运载体可为乳膏、乳液、凝胶、脂质体、纳米颗粒和/或油膏。在任何方面的一些实施方式中,药学上可接受的运载体可为人工或工程化的运载体,例如在自然界中不会存在有该活性成分的运载体。

[0573] 如本文所使用的,术语“施用”是指通过方法或途径将如本文所公开的化合物放置

到受试者中,其引起药剂在期望位点处的至少部分递送。包含本文所公开的化合物的药物组合物可以通过在受试者中产生有效治疗的任何适当途径施用。在一些实施方式中,施用包括人的身体活动,例如注射、摄取动作、涂抹动作、和/或递送装置或机器的操作。此类活动可以例如由医学专业人员和/或被治疗的受试者进行。药剂对受试者的“施用”包括将药剂引入或递送至受试者以发挥其预期功能的任何途径。施用可以通过任何合适的途径进行,包括口服、鼻内、眼内、眼科地、肠胃外(静脉内、肌内、腹膜内或皮下)或局部。施用包括自我施用和通过他人施用。

[0574] 如本文所使用的,“接触”是指用于将药剂递送或暴露于至少一个细胞的任何合适方式。示例性递送方法包括但不限于直接递送至细胞培养基、灌注、注射或本领域技术人员公知的其它递送方法。在一些实施方式中,接触包括人的身体活动(例如注射;分配、混合和/或倾析的行为);和/或操作递送装置或机器。

[0575] 术语“CNS细胞(CNS cell/CNS cells)”涉及在CNS(CNS组织)中发现的细胞或源自CNS组织的细胞。CNS细胞可以是原代细胞或细胞系(例如SH-Sy5y、Neuro2A、U87-MG)。所述CNS细胞可以在体内(例如在CNS组织中)或体外(例如在细胞培养物中)。CNS细胞包括神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和室管膜细胞。在CNS组织中发现的神经元包括细胞体、长轴突和突触末端。神经元通过其长轴突将细胞体中接收的电信号传输到靠近它们的突触末端的其它细胞。少突胶质细胞是CNS中的一种胶质细胞,其产生髓鞘,髓鞘包裹神经元轴突以更快地传导电信号。星形胶质细胞呈星形,并且是大脑中最丰富的细胞类型。它们具有多种作用,其帮助和调节大脑内电脉冲的传输和神经功能。小胶质细胞是大脑中的常驻巨噬细胞,并参与免疫防御。室管膜细胞形成心室的上皮衬里。本文使用的术语“CNS细胞(CNS cell/CNS cells)”包括神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和/或室管膜细胞。本发明的启动子可以在任何CNS细胞(例如神经元)中活跃。本发明的启动子可以在多于一种的CNS细胞(例如神经元和星形胶质细胞)中活跃。本发明的启动子可以在所有类型的CNS细胞(神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和室管膜细胞)中活跃。此外,本发明的合成的CNS特异性启动子可以在CNS细胞类型的亚型中活跃,例如多巴胺能神经元或成熟少突胶质细胞。在一些实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子可能仅在CNS细胞类型的亚型中活跃,例如多巴胺能神经元或成熟少突胶质细胞。本发明的CRE、近端/最小启动子和启动子可以在CNS的特定区域、在特定的CNS细胞或CNS细胞亚型或两者中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、近端/最小启动子和启动子可以在CNS的所有区域内的特定CNS细胞类型(例如神经元)中活跃。在其它实施方式中,本发明的CRE、近端/最小启动子和启动子可以在CNS的不超过一个区域(例如中脑)内的特定CNS细胞类型(例如神经元)中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、近端/最小启动子和启动子可以在CNS的所有区域内的所有CNS细胞中活跃。在一些实施方式中,本发明的CRE、近端/最小启动子和启动子可以在CNS的不超过一个区域(例如中脑)内的所有CNS细胞中活跃。

[0576] 术语“顺式调控元件”或“CRE”是本领域技术人员熟知的术语,并且是指可以调控或调节邻近基因转录(即以顺式)的核酸序列,例如增强子、启动子、绝缘子或沉默子。CRE见于它们调控的基因附近。CRE通常通过结合至TF来调控基因转录,即它们包括TFBS。单个TF可以结合至许多CRE,并由此控制许多基因的表达(多效性)。CRE通常(但并非总是)位于它们调控的基因的转录起始位点(TSS)的上游。本文上下文中的“增强子”是增强(即上调)与

其可操作地关联的基因转录的CRE,并且可见于它们调控的基因的上游、下游以及甚至内含子内。多个增强子可以以协调的方式起作用,以调节一个基因的转录。本文上下文中的“沉默子”是指结合被称为阻遏蛋白的TF的CRE,沉默子的作用是阻止或下调基因的转录。术语“沉默子”也可以指信使RNA的3'非翻译区中的区域,沉默子结合阻抑该mRNA分子翻译的蛋白质,但这种用法不同于其在描述CRE中的用途。通常,本发明的CRE是CNS特异性增强子元件(通常是指CNS特异性CRE、或CNS特异性CRE增强子或诸如此类)。在本文上下文中,优选的是,CRE位于距转录起始位点(TSS)2500个核苷酸或更少的位置,更优选距TSS2000个核苷酸或更少的位置,更优选距TSS1500个核苷酸或更少的位置,并且适当地距TSS1000个、750个、500个、250个、200个、150个或100个核苷酸或更少的位置。本发明的CRE优选长度相对较短,优选长度为800个核苷酸或更短,例如,它们的长度可以为800个、795个、790个、785个、780个、775个、770个、765个、760个、755个、750个、745个、740个、735个、725个、700个、695个、690个、685个、680个、675个、670个、665个、660个、655个、650个、645个、640个、635个、630个、625个、620个、615个、610个、605个或600个核苷酸或更短。本发明的CRE通常与可操作地连接的启动子元件组合而被提供,所述启动子元件可以是最小启动子或近端启动子;本发明的CRE可以增强启动子元件的CNS特异性活性。

[0577] 术语“顺式调控模块”或“CRM”是指功能性调控核酸模块,所述功能性调控核酸模块通常包含两个或更多个CRE;在本发明中,所述CRE通常是CNS特异性增强子,并且因此CRM是合成的CNS特异性调控核酸。CRM可以包含多个CNS特异性CRE。适当地,CRM中包含的CRE中的至少一个是根据SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192的CRE或其功能变体。通常,CRM内的多个CRE一起作用(例如,相加地或协同地)以增强包含CRM的启动子可操作地关联的基因的转录。CRM内的CRE的改组(即重新排序)、反转(即反方向)和改变间距的范围很大。因此,本发明的CRM的功能变体尤其包括所引用的CRM的变体,其中,它们内的CRE已被改组和/或反转,和/或CRE之间的间距已被改变。

[0578] 如本文所用,“最小启动子”(也被称为“核心启动子”)是指短的DNA片段,其本身无活性或很大程度上无活性,但与其它转录调控元件结合时可介导转录。最小启动子序列可来自各种不同的来源,包括原核基因和真核基因。最小启动子的例子包括 β -珠蛋白最小启动子、多巴胺 β -羟化酶基因最小启动子、巨细胞病毒(CMV)立即早期基因最小启动子(CMV-MP)和疱疹胸苷激酶最小启动子(MinTK)。最小启动子通常包含转录起始位点(TSS)和直接上游的元件、RNA聚合酶II的结合位点和通用转录因子结合位点(通常是TATA盒)。最小启动子还可以包含TSS下游的一些元件,但这些元件通常在没有额外调控元件的情况下几乎没有功能性。

[0579] 如本文所用,“近端启动子”是指最小启动子加上基因上游的近端序列,所述近端启动子倾向于包含主要调控元件。它通常在TSS上游延伸约250个碱基对,并包含特定的TFBS。近端启动子还可以在TSS下游包含一个或多个调控元件,例如UTR或内含子。在本例中,所述近端启动子可以适当地是天然存在的CNS特异性近端启动子,其可以与本发明的一个或多个CRE结合。例如,所述CNS特异性近端启动子可以是人类近端TH启动子。然而,所述近端启动子可以是合成的。

[0580] 如本文所用,“启动子元件”是指如上定义的近端启动子或最小启动子。在本发明的上下文中,启动子元件可以与一个或多个CRE组合以提供本发明的合成的CNS特异性启动

子。

[0581] 在本发明的上下文中, CRE、CRM、启动子元件、启动子或其它调控核酸的“功能变体”是参考序列的变体, 其保留了以与参考序列相同的方式起作用的能力, 例如作为CNS特异性CRE、CNS特异性CRM或CNS特异性启动子。此类功能变体的替代术语包括“生物等同物”或“等同物”。将理解的是, 给定的CRE、CRM、启动子或其它调控序列作为CNS特异性增强子起作用的能力主要取决于所述序列与相同CNS特异性TF结合的能力, 所述TF结合至参考序列。因此, 在大多数情况下, CRE或CRM的功能变体将包含对于与参考CRE、CRM或启动子中的大多数或全部相同的TF而言的TFBS。功能变体的TFBS与参考CRE、CRM或启动子处于相同的相对位置(即顺序和通用位置)是优选的, 但并非必须的。功能变体的TFBS与参考序列处于相同的方向(将注意的是, TFBS在一些情况下可以以相反的方向存在, 例如作为相对于参考序列中的序列的反向互补序列)也是优选的, 但并非必须的。功能变体的TFBS位于与参考序列相同的链上也是优选的, 但并非必须的。因此, 在优选的实施方式中, 功能变体包含以与参考序列相同的顺序、相同的位置、相同的方向和在相同链上的对于相同TF而言的TFBS。还将理解的是, 位于TFBS之间的序列(在特定情况下是指间隔区序列或诸如此类)对CRE或CRM的功能影响较小。这样的序列通常可以有很大变化, 并且它们的长度可被改变。然而, 在优选实施方式中, 功能变体中的间隔(即相邻TFBS之间的距离)与参考序列中的间隔基本相同(例如, 其变化不超过20%, 优选不超过10%, 并且更优选大致相同)。显然, 在一些情况下, CRE的功能变体可以以相反的方向存在, 例如, 它可以是如上所述的CRE的反向互补物、或其变体。

[0582] 功能变体与参考序列之间的序列同一性水平也可以是标志物或保留的功能性。CRE的TFBS中的高水平序列同一性通常比间隔区序列(其中几乎不需要或不需要任何序列保守性)中的序列同一性更重要。然而, 将理解的是, 即使在TFBS中, 也可以容纳相当程度的序列变异, 因为功能性TFBS的序列不需要与共有序列精确匹配。

[0583] 一种或多种TF与给定功能变体中的TFBS结合的能力可以通过本领域已知的任何相关方法确定, 包括但不限于电迁移率变动分析(EMSA)、结合分析、染色质免疫沉淀(ChIP)和ChIP测序(ChIP-seq)。在优选的实施方式中, 一种或多种TF与给定功能变体结合的能力通过EMSA确定。执行EMSA的方法在本领域中是众所周知的。合适的方法在上文引用的Sambrook等人中进行了描述。有许多相关文章描述了此过程, 例如Hellman和Fried, *Nat Protoc.* 2007; 2(8): 1849-1861。

[0584] “CNS特异性”或“CNS特异性表达”是指以相对于其它组织(例如肝脏、肾脏、脾脏、心脏、肌肉和肺)优先或占优势的方式, 顺式调控元件、顺式调控模块或启动子增强或驱动CNS细胞(或源自CNS的细胞)中的基因表达的能力。基因的表达可以采用mRNA或蛋白质的形式。在优选的实施方式中, CNS特异性表达使得在其它(即非CNS)组织或细胞中表达可忽略不计, 即表达是高度CNS特异性的。

[0585] 本领域技术人员可以很容易地评估CRE、CRM或启动子作为CNS特异性CRE、CRM或启动子发挥作用的能力。因此, 技术人员可以很容易地确定上述特定CRE、CRM或启动子的任何变体是否仍然具有功能性(即, 它是如上定义的功能变体)。例如, 可以将任何给定的待评估的CRM可操作地连接到最小启动子(例如, 位于CMV MP上游), 并测量顺式调控元件驱动基因(通常是报告基因)的CNS特异性表达的能力。

[0586] 或者,可以将CRE或CRM的变体替换为合成的CNS特异性启动子以代替参考CRE或CRM,并且可以确定由所述经修饰的启动子驱动的对CNS特异性表达的影响并将其与未修饰的形式进行比较。类似地,技术人员可以容易地评估启动子驱动CNS特异性表达的能力(例如,如以下实施例中所述)。可以将由参考启动子的变体驱动的表达水平与由参考启动子驱动的表达水平进行比较。在一些实施方式中,当由变体启动子驱动的表达水平为参考启动子驱动的表达水平的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%时,可以说变体仍然具有功能性。可以容易地构建用于评估CNS特异性表达增强的合适的核酸构建体和报告测定法,并且下面列出的实施例给出了合适的方法。

[0587] 可以鉴别CNS特异性,其中基因(例如治疗基因或报告基因)的表达优先或主要发生在源自CNS的细胞中。可以定义优先表达或主要表达,例如,其中源自CNS的细胞中的表达水平显著高于其它类型的细胞(即非源自CNS的细胞)。例如,源自CNS的细胞中的表达比非CNS细胞适当地高至少5倍,优选比非CNS细胞高至少10倍,并且在一些情况下可能高50倍或更多。为方便起见,可以通过比较不同的非CNS细胞系中的表达水平来适当地证明CNS特异性表达,例如将原代CNS细胞或源自CNS的细胞系(例如SH-Sy5y、Neuro2A、U87-MG)的表达水平与源自肌肉的细胞系(例如C2C12或H2K细胞(骨骼肌)或H9C2细胞(心脏))、源自肝脏的细胞系(例如Huh7或HepG2)、源自肾脏的细胞系(例如HEK-293)、源自宫颈组织的细胞系(例如HeLa)和/或源自肺的细胞系(例如A549)中的表达水平进行比较。

[0588] 当与非组织特异性启动子(例如CMV-IE)相比时,本发明的合成的CNS特异性启动子优选在非源自CNS的细胞中(适当地在C2C12、H9C2、Huh7、HEK-293、HeLa和/或A549细胞中)表现出降低的表达。本发明的合成的CNS特异性启动子优选在非源自CNS的细胞中(适当地在C2C12、H9C2、Huh7、HEK-293、HeLa和/或A549中)具有相比于CMV-IE启动子50%或更低的活性,适当地为25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、或1%或更低。通常,优选将非源自CNS的细胞中的表达最小化,但在一些情况下这可能不是必要的。即使本发明的合成的CNS特异性启动子在例如一种或两种非CNS细胞中具有更高的表达,只要它在一系列CNS细胞中相对于非CNS细胞总体上具有更高的表达,它仍然可以是CNS特异性启动子。

[0589] 本发明的合成的CNS特异性启动子优选适用于促进受试者的CNS中的表达,例如驱动转基因的CNS特异性表达,优选治疗性转基因。本发明的优选合成的CNS特异性启动子适用于促进CNS特异性转基因表达,并且在CNS细胞中具有Synapsin-1、Camk2a、GFAP、MBP、IBA1或NSE启动子中任一种的活性的至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少125%、至少150%、至少175%、至少200%、至少250%、至少300%、至少350%或至少400%。在一些实施方式中,本发明的合成的CNS特异性启动子适合于促进CNS特异性转基因表达,其水平为人类TH启动子的活性的至少100%,优选为人类TH启动子的活性的150%或200%。这种CNS特异性表达是在源自CNS的细胞(例如SH-Sy5y、Neuro2A、U87-MG细胞系或原代CNS细胞(适当地为原代人类神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和/或室管膜细胞))中适当地确定的。相比于源自CNS的细胞(例如SH-Sy5y、Neuro2A、U87-MG细胞系或原代CNS细胞(适当地为原代人类神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和/或室管膜细胞))中的CMV-IE,本发明的合成的CNS特异性启动子还可以以至少50%、至少100%、至少150%或至少200%的水平

促进基因的CNS特异性表达。

[0590] 本文所用的术语“密码子优化的”是指如下的基因编码序列,通过用针对相同(同义)氨基酸的密码子取代编码序列中通常存在的一个或多个密码子,对该序列进行了优化以提高表达。以这种方式,由基因编码的蛋白质是相同的,但基因或相应mRNA的基础核碱基序列是不同的。密码子优化还可以包括消除CpG岛和/或替代阅读框和/或限制位点的取代。在一些实施方式中,优化用更频繁出现的同义密码子取代一个或多个稀有密码子(即,在来自特定物种的细胞中相对不频繁出现的tRNA密码子),以提高翻译效率。例如,在人类密码子优化中,编码序列中的一个或多个密码子被针对相同氨基酸的人类细胞中更频繁出现的密码子取代。密码子优化还可以通过其它机制(能够提高转录和/或翻译的效率)来增加基因表达。期望的是,经密码子优化的基因表现出改善的蛋白质表达,例如,与在其它方面相似的细胞中由野生型基因提供的蛋白质表达水平相比,由此编码的蛋白质在细胞中以可检测的更高水平表达。密码子优化还提供在体外或体内区分经密码子优化的基因和/或相应的mRNA与内源基因和/或相应的mRNA的能力。应理解,经密码子优化的序列不必尽可能充分地优化。还应理解,经密码子优化的序列可以包括核酸非翻译区的取代和/或取代,例如,以增强表达、增强核酸稳定性、消除CpG岛、消除限制位点和/或消除非编码RNA。

[0591] 术语“同一性”和“相同”等是指两个聚合物分子之间的序列相似性,例如两个核酸分子之间,如两个DNA分子之间。序列比对和序列同一性的确定可以例如使用最初由Altschul等人在1990年(J Mol Biol 215:403-10)描述的基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool;BLAST)进行,例如由Tatusova和Madden在1999年(FEMS Microbiol Lett 174:247-250)描述的“Blast 2sequences”算法。用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。各种程序和比对算法描述于例如:Smith和Waterman(1981)Adv. Appl. Math. 2:482;Needleman和Wunsch(1970)J. Mol. Biol. 48:443;Pearson和Lipman(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444;Higgins和Sharp(1988)Gene 73:237-44;Higgins和Sharp(1989)CABIOS 5:151-3;Corpet等人(1988)Nucleic Acids Res. 16:10881-90;Huang等人(1992)Comp. Appl. Biosci. 8:155-65;Pearson等人(1994)Methods Mol. Biol. 24:307-31;Tatiana等人(1999)FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50。序列比对方法和同源性计算的详细考虑可见于例如Altschul等人(1990)J. Mol. Biol. 215:403-10。

[0592] 美国国家生物技术信息中心(NCBI)基本局部比对搜索工具(BLASTTM;Altschul等人(1990))可从多个来源获得,包括美国国家生物技术信息中心(Bethesda, MD)和互联网,用于与多个序列分析程序结合使用。互联网上BLASTTM的“帮助”部分下可得到如何使用此程序确定序列同一性的说明。对于核酸序列的比较,可以采用BLASTTM(Blastn;Align Sequence Nucleotide BLAST)程序的“Blast 2sequences”功能,使用默认参数。通过此方法评估时,与参考序列相似度更高的核酸序列将显示增加的百分比同一性。通常,百分比序列同一性是相对于序列的整个长度计算的。

[0593] 例如,通过Needleman-Wunsch算法适当地找到全局最优比对,其具有以下评分参数:匹配得分:+2,错配得分:-3;空位罚分:空位开放5,空位延伸2。所得最优全局比对的百分比同一性通过比对碱基数与比对总长度的比率乘以100适当地算出,其中比对长度包括匹配和错配。

[0594] 术语“转录因子结合位点”(TFBS)是本领域众所周知的。对技术人员将显而易见的

是,可以使用替代的TFBS序列,只要它们被预期的TF结合即可。各种TFBS的共有序列是本领域已知的,并且技术人员可以容易地使用此信息来确定替代的TFBS。此外,TF与给定推定序列结合的能力可以由技术人员通过实验容易地确定(例如通过EMSA和本领域众所周知的并在本文中讨论的其它方法)。

[0595] “共有序列”的含义是本领域众所周知的。在本申请中,除非上下文另有规定,否则以下符号用于共有序列。考虑以下示例性DNA序列:

A[CT]N{A}YR

[0596] A表示在该位置始终存在A;[CT]表示在该位置存在C或T;N表示在该位置存在任何碱基;并且{A}表示在该位置存在除A之外的任何碱基。Y表示任何嘧啶,并且R表示任何嘌呤。

[0597] 本申请中的“合成”表示自然界中不存在的核酸分子。本发明的合成核酸表达构建体是人工产生的,通常通过重组技术产生。此类合成核酸可能包含天然存在的序列(例如启动子、增强子、内含子和其它此类调控序列),但这些序列存在于非天然存在的环境中。例如,合成基因(或基因的部分)通常包含一个或多个自然界中不连续的核酸序列(嵌合序列),和/或可能包含取代、插入和缺失及其组合。

[0598] 本文使用的“互补”或“互补性”是指两个核酸序列的沃森-克里克碱基配对。例如,序列5'-AGT-3'与互补序列3'-TCA-5'结合。两个核酸序列之间的互补性可以是“部分的”,其中只有一些碱基与它们的互补序列结合;或者当序列中的每个碱基都与它的互补碱基结合时,它可以是完全的。核酸链之间的互补程度对核酸链之间杂交的效率和强度具有显著影响。

[0599] 如本文所用,短语“转基因”是指外源核酸序列。在一个实例中,转基因是编码工业上或药学上有用的化合物的基因,或编码期望的性状的基因。在另一个实例中,所述转基因编码反义核酸序列,其中反义核酸序列的表达抑制靶核酸序列的表达。转基因优选编码治疗产品,例如蛋白质。

[0600] 术语“在区域或组织中特异性地活跃”是指启动子主要在该区域或组织中活跃,即在该区域或组织中比在其它区域或组织中更活跃。

[0601] 术语“统计学上显著的”或“显著地”是指统计学显著性并且通常意指两个标准差(2SD)或更大的差异。

[0602] 除在操作实例中或在另外指明的情况下之外,本文使用的表示成分或反应条件的量的所有数字应理解为在所有情况下由术语“约”修饰。与百分比结合使用时,术语“约”可表示±1%。

[0603] 如本文所使用的,术语“包括/包含”意指除所呈现的定义的要素之外,还可存在其它的要素。使用“包括/包含”表示包括而非限制。

[0604] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法及其各自的组分,其排除在实施方式的描述中未列举的任何要素。

[0605] 如本文所使用的,术语“基本上由……组成”是指给定实施方式所需的那些要素。该术语允许存在不实质上影响本发明的该实施方式的基本的和新颖或功能的特性的附加要素。

[0606] 如本文所使用的,术语“对应于”是指在第一多肽或核酸中所列举位置处的氨基酸

或核苷酸,或者与在第二多肽或核酸中所列举的氨基酸或核苷酸等同的氨基酸或核苷酸。可以通过使用本领域已知的同源性程度程序(例如BLAST)通过比对候选序列来确定等同的所列举的氨基酸或核苷酸。

[0607] 如本文所使用的,术语“特异性结合”是指两个分子、化合物、细胞和/或颗粒之间的化学相互作用,其中,第一实体以比它结合至非靶标的第三实体更大的特异性和亲和力结合至第二靶标实体。在一些实施方式中,特异性结合可指第一实体对第二靶标实体的亲和力为对第三非靶标实体的亲和力的至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更大。对给定的靶标具有特异性的试剂是在所使用的测定条件下表现出对该靶标特异性结合的试剂。

[0608] 除非上下文另有明确指出,单数术语“一个/一种(a/an)”和“该/所述(the)”包括复数所指对象。类似地,除非上下文另有明确说明,否则词语“或”旨在包括“和”。尽管在本公开的实践或测试中可以使用与本文所述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料,下文描述了合适的方法和材料。缩写“e.g.”源自拉丁语*exempli gratia*,且在本文用于表示非限制性实例。因此,缩写“e.g.”与术语“例如”同义。

[0609] 本文所公开的本发明的替代要素或实施方式的分组不应被解释为限制。每个组成员可单独或与组的其它成员或在本文中发现的其它要素任意组合被提及和要求保护。出于方便和/或可专利性的原因,组的一个或多个成员可包含在组中或从组中删除。当发生任何此类包含或删除时,本说明书在此被视为包含所修改的组,从而满足所附权利要求中使用的所有马库什组的书面描述。

[0610] 除非本文另有定义,否则与本申请结合使用的科学和技术术语应具有本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义。应当理解,本发明不限于本文所述的特定方法学、方案和试剂等,并因此可以变化。本文使用的术语仅用于描述具体实施方式的目的,并不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求限定。免疫学和分子生物学中常用术语的定义可见于:The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第20版,Merck Sharp&Dohme Corp.出版,2018(ISBN 0911910190,978-0911910421);Robert S.Porter等(编著),The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine,Blackwell Science Ltd.出版,1999-2012(ISBN 9783527600908);以及Robert A.Meyers(编著),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,VCH Publishers,Inc.出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);Immunology by Werner Luttmann,Elsevier出版,2006;Janeway's Immunobiology,Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver(编著),W.W.Norton&Company,2016(ISBN 0815345054,978-0815345053);Lewin's Genes XI,Jones&Bartlett Publishers出版,2014(ISBN-1449659055);Michael Richard Green和Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA(2012)(ISBN 1936113414);Davis等,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing,Inc.,New York,USA(2012)(ISBN 044460149X);Laboratory Methods in Enzymology:DNA,Jon Lorsch(编著)Elsevier,2013(ISBN 0124199542);Current Protocols in Molecular Biology(CPMB),Frederick M.Ausubel(编著),John Wiley and Sons,2014(ISBN 047150338X,9780471503385),Current Protocols in Protein Science

(CPPS), John E. Coligan (编著), John Wiley and Sons, Inc., 2005; 以及 Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (编著) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737); WO 2018/057855A; US 10,457,940; 通过引用的方式将它们各自的内容全部以其整体并入本文。

[0611] 在任何方面的一些实施方式中, 本文所述的公开不涉及用于克隆人的方法、用于改变人的种系遗传同一性的方法、用于工业或商业目的的人胚胎的用途、或用于可能导致动物受苦而对人或动物的医疗没有任何实质性益处的改变动物遗传同一性的方法以及由此方法产生的动物。

[0612] 其它术语在本文中本发明的各个方面的描述内定义。

[0613] 为了描述和公开的目的, 以引用的方式将本申请全文所引用的所有专利和其它出版物(包括参考文献、颁发的专利、公布的专利申请和共同未决的专利申请)明确并入本文, 例如此类出版物中描述的方法学可能与本文所述的技术结合使用。提供这些公开文本仅因为它们在本申请的申请日之前公开。在这方面的任何内容都不应被解释为承认因在先发明或任何其它原因而本发明人无权先于此类公开。所有关于日期的陈述或关于这些文件内容的表示均基于申请人可获得的信息, 并不构成对这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0614] 本公开的実施方式的描述并非旨在是穷尽的或将本公开限制为所公开的精确形式。虽然出于说明的目的本文中描述了本公开的特定实施方式和实例, 但是如相关领域的技术人员将认识到的, 在本公开的范围内各种等同修饰是可能的。例如, 虽然方法步骤或功能以给定的顺序呈现, 但替代实施方式可以以不同的顺序执行功能, 或者可基本同时地执行功能。本文提供的本公开的教导可适当地应用于其它程序或方法。可组合本文描述的各种实施方式以提供进一步的实施方式。如果需要, 可修改本公开的方面以采用以上参考文献和应用的组成、功能和概念来提供本公开的更进一步的实施方式。根据详细描述, 可对本公开做出这些和其它改变。所有这些修饰都旨在包括在所附权利要求的范围内。

[0615] 前述实施方式的任一个的特定要素可组合或替代其它实施方式中的要素。此外, 虽然已经在这些实施方式的上下文中描述了与本公开的特定实施方式相关的优点, 但其它实施方式也可展现出此类优点, 并且并非所有实施方式都必须展现出此类优点以落入本公开的范围內。

[0616] 本文描述的技术通过以下实施例进一步来说明, 所述实施例决不应被解释为进行进一步地限制。

[0617] 本文描述的技术的一些实施方式可以根据以下编号的段落中的任一项来定义:

1. 一种治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法, 所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的:

- (a) 编码转基因的分离的核酸, 所述转基因编码一个或多个miRNA; 以及
- (b) 编码CYP46A1蛋白的分离的核酸。

2. 一种治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法, 所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用

治疗有效量的：

(a) 包含分离的核酸的重组病毒载体,所述核酸包含(i)第一区域和(ii)第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码一个或多个miRNA的转基因;以及

(b) 包含编码所述CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

3. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述神经系统疾病或紊乱是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、Canavan病、利氏病、脊髓性脑性共济失调、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、Krabbe病、Batten氏病、Refsum病、Tourette综合征、原发性侧索硬化症、肌萎缩侧索硬化症、进行性肌萎缩、皮克病、肌营养不良、多发性硬化症、重症肌无力、Binswanger病、神经性疼痛、脊髓或头部损伤引起的创伤、眼科疾病和紊乱、泰-萨二氏病、Lesch-Nyhan病、癫痫、脑梗塞、抑郁症、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性情绪障碍、精神分裂症、药物依赖、神经机能病、精神病、痴呆、妄想、注意缺陷性障碍、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食或体重障碍。

4. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述神经系统疾病或紊乱是中枢神经系统(CNS)疾病或紊乱。

5. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病或紊乱选自亨廷顿病、阿尔茨海默病、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、肌萎缩侧索硬化症和帕金森病。

6. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病或紊乱是阿尔茨海默病,并且所述至少一个miRNA包含与淀粉样前体蛋白(APP)、早老蛋白1、早老蛋白2、ABCA7、SORL1、以及它们的疾病相关等位基因互补的种子序列。

7. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病或紊乱是帕金森病,并且所述至少一个miRNA包含与SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PINK1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1、GBA1、以及它们的疾病相关等位基因互补的种子序列。

8. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病是亨廷顿病,并且所述至少一个miRNA包含与SEQ ID NO:4互补的种子序列,或者其中,所述至少一个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一个的序列,所述序列侧接有miRNA骨架序列。

9. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病是亨廷顿病,并且所述至少一个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一个的序列。

10. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述miRNA中的至少一个与人亨廷顿基因杂交并抑制人亨廷顿基因的表达。

11. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述受试者包含具有多于36个CAG重复、多于40个重复、或多于100个重复的亨廷顿基因。

12. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述受试者的年龄小于20岁。

13. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述重组病毒载体选自自由以下组成的组:AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、甲病毒载体、痘

病毒载体、杆状病毒载体和嵌合病毒载体。

14. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,包含(a)的所述重组病毒载体与包含(b)的所述重组病毒载体相同。

15. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,(a)和(b)的分离的核酸包含在分开的重组病毒载体中。

16. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,(a)和(b)的分离的核酸包含在相同的重组病毒载体中。

17. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,在基本上相同的时间施用(a)和(b)。

18. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,在不同的时间点施用(a)和(b)。

19. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述不同的时间点间隔至少1min、至少1小时、至少1天、至少1周、至少1个月、至少1年,或更长。

20. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,在(b)的施用之前施用(a)。

21. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,在(a)的施用之前施用(b)。

22. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,(a)、(b)、或者(a)和(b)的施用重复至少一次。

23. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述转基因包含串联的两个miRNA,所述串联的两个miRNA侧接有内含子。

24. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述侧接的内含子是相同的。

25. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述侧接的内含子来自相同的物种。

26. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述侧接的内含子是hCG内含子。

27. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述转基因包含启动子。

28. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述启动子是synapsin(Syn1)启动子或表10-表13的启动子。

29. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述一个或多个miRNA位于所述转基因的非翻译部分。

30. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述非翻译部分是内含子。

31. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述非翻译部分在编码蛋白质的核酸序列的最后一个密码子和poly-A尾序列之间,或者在启动子序列的最后一个核苷酸碱基和poly-A尾序列之间。

32. 如前述段落中任一项所述的方法,进一步包括第三区域,所述第三区域包含第二腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体。

33. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述ITR变体缺乏功能性末端解析位点(TRS),任选地,其中,所述ITR变体是ATRS ITR。

34. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述施用使得将所述病毒载体或分离的核酸递送至所述受试者的所述中枢神经系统(CNS)。

35. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述施用是通过注射、任选静脉内注射或纹状体内注射进行。

36. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述病毒载体是AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或AAV12、或其嵌合体。

37. 如前述段落中任一项所述的方法,所述病毒载体包含来自AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或AAV12、或其嵌合体的衣壳蛋白。

38. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白。

39. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述病毒载体是自互补AAV(scAAV)。

40. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述病毒载体被配制用于递送至所述中枢神经系统(CNS)。

41. 一种组合物或组合,包含:

(a) 编码转基因的分离的核酸,所述转基因编码一个或多个miRNA;以及

(b) 编码CYP46A1蛋白的分离的核酸。

42. 一种组合物或组合,包含:

(a) 包含分离的核酸的重组病毒载体,所述核酸包含(i)第一区域,和(ii)第二区域,所述第一区域包含第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体,所述第二区域包含编码一个或多个miRNA的转基因;以及

(b) 包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的重组病毒载体。

43. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,用于治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法中,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的所述组合物或组合。

44. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述神经系统疾病或紊乱是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、Canavan病、利氏病、脊髓性脑性共济失调、Krabbe病、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、Batten氏病、Refsum病、Tourette综合征、原发性侧索硬化症、肌萎缩侧索硬化症、进行性肌萎缩、皮克病、肌营养不良、多发性硬化症、重症肌无力、Binswanger病、神经性疼痛、脊髓或头部损伤引起的创伤、眼科疾病和紊乱、泰-萨二氏病、Lesch-Nyhan病、癫痫、脑梗塞、抑郁症、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性情绪障碍、精神分裂症、药物依赖、神经机能病、精神病、痴呆、妄想、注意缺陷性障碍、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食或体重障碍。

45. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述神经系统疾病或紊乱是中枢神经系统(CNS)疾病或紊乱。

46. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述CNS疾病或紊乱选自亨廷顿病、阿尔茨海默病、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、肌萎缩侧索硬化症和帕金森病。

47. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述至少一个miRNA包含与淀粉样前体蛋白(APP)、早老蛋白1、早老蛋白2、ABCA7、SORL1、以及它们的疾病相关等位基因互补的种子序列。

48. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述至少一个miRNA包含与SNCA、LRRK2/PARK8、PRKN、PINK1、DJ1/PARK7、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、UCHL1、GBA1、以及它们的疾病相关等位基因互补的种子序列。

49. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述至少一个miRNA包含与SEQ ID NO:4互补的种子序列,或者其中,所述至少一个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID

NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一个的序列,所述序列侧接有miRNA骨架序列。

50. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述至少一个miRNA包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的任一个的序列。

51. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述miRNA中的至少一个与人亨廷顿基因杂交并抑制人亨廷顿基因的表达。

52. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述受试者包含具有多于36个CAG重复、多于40个重复、或多于100个重复的亨廷顿基因。

53. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述受试者的年龄小于20岁。

54. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述重组病毒载体选自由以下组成的组:AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、甲病毒载体、痘病毒载体、杆状病毒载体和嵌合病毒载体。

55. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,包含(a)的所述重组病毒载体与包含(b)的所述重组病毒载体相同。

56. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,(a)和(b)的所述分离的核酸包含在分开的重组病毒载体中。

57. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,(a)和(b)的所述分离的核酸包含在相同的重组病毒载体中。

58. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,在基本上相同的时间施用(a)和(b)。

59. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,在不同的时间点施用(a)和(b)。

60. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述不同的时间点间隔至少1min、至少1小时、至少1天、至少1周、至少1个月、至少1年或更长。

61. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,在(b)的施用之前施用(a)。

62. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,在(a)的施用之前施用(b)。

63. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,(a)、(b)、或者(a)和(b)的施用重复至少一次。

64. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述转基因包含串联的两个miRNA,所述串联的两个miRNA侧接有内含子。

65. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述侧接的内含子是相同的。

66. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述侧接的内含子来自相同的物种。

67. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述侧接的内含子是hCG内含子。

68. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述转基因包含启动子。

69. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述启动子是synapsin (Syn1) 启动子或表10-表13的启动子。

70. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述一个或多个miRNA位于所述转基因的非翻译部分。

71. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述非翻译部分是内含子。

72. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述非翻译部分在编码蛋白质的核酸序列的最后一个密码子和poly-A尾序列之间,或在启动子序列的最后一个核苷酸碱基和poly-A尾序列之间。

73. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,所述组合物或组合进一步包含第三区域,所述第三区域包含第二腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)或其变体。

74. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述ITR变体缺乏功能性末端解析位点(TRS),任选地,其中,所述ITR变体是ATRS ITR。

75. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述施用使得将所述病毒载体或分离的核酸递送至所述受试者的所述中枢神经系统(CNS)。

76. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述施用是通过注射、任选静脉内注射或纹状体内注射进行。

77. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述病毒载体本是AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、或其嵌合体。

78. 如前述段落中任一项所述的组合物,所述病毒载体包含来自AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或AAV12、或其嵌合体的衣壳蛋白。

79. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白。

80. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述病毒载体是自互补AAV(scAAV)。

81. 如前述段落中任一项所述的组合物或组合,其中,所述病毒载体被配制用于递送至所述中枢神经系统(CNS)。

82. 一种包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸的组合物,所述核酸包含与SEQ ID NO:110至少80%相同的序列。

83. 一种包含重组病毒载体的组合物,所述重组病毒载体包含编码CYP46A1蛋白的分离的核酸,所述核酸包含与SEQ ID NO:110至少80%相同的序列。

84. 一种治疗有需要的受试者中的神经系统疾病或紊乱的方法,所述方法包括向患有所述神经系统疾病或紊乱或者处于发展出所述神经系统疾病或紊乱的风险的受试者施用治疗有效量的前述段落中任一项的组合物。

85. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述神经系统疾病或紊乱是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、Canavan病、利氏病、脊髓性脑性共济失调、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、Krabbe病、Batten氏病、Refsum病、Tourette综合征、原发性侧索硬化

症、肌萎缩侧索硬化症、进行性肌萎缩、皮克病、肌营养不良、多发性硬化症、重症肌无力、Binswanger病、神经性疼痛、脊髓或头部损伤引起的创伤、眼科疾病和紊乱、泰-萨二氏病、Lesch-Nyhan病、癫痫、脑梗塞、抑郁症、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性情绪障碍、精神分裂症、药物依赖、神经机能病、精神病、痴呆、妄想、注意缺陷性障碍、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食或体重障碍。

86. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述神经系统疾病或紊乱是中枢神经系统(CNS)疾病或紊乱。

87. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述CNS疾病或紊乱选自亨廷顿病、阿尔茨海默病、多聚谷氨酰胺重复脊髓小脑性共济失调、肌萎缩侧索硬化症和帕金森病。

88. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述重组病毒载体选自由以下组成的组: AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、甲病毒载体、痘病毒载体、杆状病毒载体和嵌合病毒载体。

89. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述施用重复至少一次。

90. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述施用使得将所述病毒载体或分离的核酸递送至所述受试者的中枢神经系统(CNS)。

91. 如前述段落中任一项所述的方法,其中,所述施用通过注射、任选静脉内注射或纹状体内注射进行。

92. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述病毒载体是AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或AAV12、或其嵌合体。

93. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,病毒载体包含来自AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、或AAV12、或其嵌合体的衣壳蛋白。

94. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白。

95. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述病毒载体是自互补AAV(scAAV)。

96. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述病毒载体被配制用于递送至所述中枢神经系统(CNS)。

97. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述核酸包含与SEQ ID NO: 110至少90%相同的序列。

98. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述核酸包含与SEQ ID NO: 110至少95%相同的序列。

99. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述核酸包含与SEQ ID NO: 110相同的序列。

100. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述病毒载体包含经修饰的病毒衣壳。

101. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述病毒载体包含对病毒衣壳的修饰。

102. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述修饰是病毒衣壳的化

学、非化学或氨基酸修饰。

103. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述衣壳修饰的至少一种优先靶向CNS或PNS中的细胞。

104. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述化学修饰包含经化学修饰的酪氨酸残基,所述酪氨酸残基被修饰以包含共价连接的单糖或多糖部分。

105. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经化学修饰的酪氨酸残基包含选自半乳糖、甘露糖、N-乙酰半乳糖胺、GalNac桥和甘露糖-6-磷酸的单糖。

106. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述化学修饰包含通过-CNH-键共价地连接至衣壳多肽的伯氨基基团的配体。

107. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述配体包含共价地结合至所述配体的亚芳基或杂亚芳基自由基。

108. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经修饰的病毒衣壳是嵌合衣壳或单倍体衣壳。

109. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经修饰的病毒衣壳是单倍体衣壳。

110. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经修饰的病毒衣壳是进一步包含修饰的嵌合衣壳或单倍体衣壳。

111. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经修饰的病毒衣壳为AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、或其突变的修饰形式、嵌合体、镶嵌体或合理的单倍体。

112. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,与未修饰的病毒衣壳相比,所述修饰改变了经修饰的病毒衣壳的抗原谱。

113. 如前述段落中任一项所述的组合物或方法,其中,所述经修饰的病毒衣壳可用于重复施用。

114. 一种合成的CNS特异性启动子,所述合成的CNS特异性启动子包含根据SEQ ID NO:187-SEQ ID NO:189中的任一个的序列或其功能变体,或由根据SEQ ID NO:187-SEQ ID NO:189中的任一个的序列或其功能变体组成。

115. 如前述段落中任一项所述的合成的CNS特异性启动子,其中,所述功能变体与SEQ ID NO:187-SEQ ID NO:189中的任一个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。

116. 一种CRE,所述CRE包含根据SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192中的任一个的序列或其功能变体,或由根据SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192中的任一个的序列或其功能变体组成。

117. 如前述段落中任一项所述的CRE,所述CRE包含与SEQ ID NO:191或SEQ ID NO:192中的任一个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

118. 一种CRM,所述CRM包含如前述段落中任一项所述的CRE。

119. 一种最小启动子,所述最小启动子包含根据SEQ ID NO:211的序列或其功能变体,或由根据SEQ ID NO:211的序列或其功能变体组成。

120. 一种CNS特异性启动子,所述CNS特异性启动子包含如前述段落中任一项所述的CRE、如前述段落中任一项所述的CRM或如前述段落中任一项所述的最小启动子。

121. 一种表达盒,所述表达盒包含如前述段落中任一项所述的合成的CNS特异性启动子,所述启动子可操作地连接至编码表达产物的序列。

122. 一种载体,所述载体包含如前述段落中任一项所述的合成的CNS特异性启动子或如前述段落中任一项所述的表达盒。

123. 如前述段落中任一项所述的载体,其中,所述载体是病毒载体。

124. 如前述段落中任一项所述的载体,其中,所述病毒载体是AAV载体。

125. 一种病毒体,所述病毒体包含如前述段落中任一项所述的载体。

126. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如前述段落中任一项所述的合成的CNS特异性启动子、如前述段落中任一项所述的表达盒、如前述段落中任一项所述的载体或如前述段落中任一项所述的病毒体。

127. 用于治疗中的如前述段落中任一项所述的合成的CNS特异性启动子、如前述段落中任一项所述的表达盒、如前述段落中任一项所述的载体、如前述段落中任一项所述的病毒体或如前述段落中任一项所述的药物组合物。

128. 用于基因治疗中的如前述段落中任一项所述的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体、病毒体或药物组合物,适当地,其中所述基因治疗涉及治疗性表达产物在CNS中的表达。

129. 用于CNS相关疾病的基因治疗中的如前述段落中任一项所述的合成的CNS特异性启动子、表达盒、载体、病毒体或药物组合物。

130. 一种细胞,所述细胞包含如前述段落中任一项所述的合成的CNS特异性启动子、如前述段落中任一项所述的表达盒、如前述段落中任一项所述的载体或如前述段落中任一项所述的病毒体。

131. 如前述段落中任一项所述的细胞,其中,所述细胞是CNS细胞,任选地是人类CNS细胞,优选是神经元,更优选是多巴胺能神经元。

132. 用于制造用来治疗医学病症或疾病的药物组合物中的如前述段落中任一项所述的合成的CNS特异性启动子、如前述段落中任一项所述的表达盒、如前述段落中任一项所述的载体或如前述段落中任一项所述的病毒体,任选地,其中,所述疾病是CNS相关疾病。

133. 一种生产表达产物的方法,所述方法包括:将如前述段落中任一项所述的合成的CNS特异性表达盒引入细胞中、任选地为CNS细胞;以及,使存在于合成的CNS特异性表达盒中的基因进行表达。

134. 一种在细胞、任选地为CNS细胞中表达治疗性转基因的方法,其中,所述方法包括向所述细胞中引入如前述段落中任一项所述的表达盒、如前述段落中任一项所述的载体或如前述段落中任一项所述的病毒体。

135. 一种对有需要的受试者进行治疗的方法,其中,所述方法包括:向有需要的受试者施用如前述段落中任一项所述的表达盒、如前述段落中任一项所述的载体、或如前述段落中任一项所述的病毒体、或如前述段落中任一项所述的药物组合物,所述表达盒、载

体、病毒体或药物组合物包含编码可操作地连接的治疗产品的序列。

实施例

实施例1

[0618] 在本文中描述的一个方面是可用于治疗亨廷顿病的抑制性RNA。在任何方面的一些实施方式中,抑制性RNA的核酸序列包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的一个,或与SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260中的至少一个的序列至少95%(例如,至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%)相同并保持了与SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:40-SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:185或SEQ ID NO:217-SEQ ID NO:260相同的功能(例如,HTT抑制)的序列。

[0619] 本文描述的是包含人工miRNA的构建体。pEMBL-D(+)-Syn1-hCG内含子是对照载体,其插入有空白人绒毛膜促性腺激素(hCG)内含子(hCGin)并由synapsin启动子驱动。将两拷贝的对照miRNA前体(随机序列或无功能突变)插入载体pEMBL-D(+)-Syn1-hCGin-2x对照pre-miR中的hCGin中。将两拷贝的人工pre-miR(与3'-UTR靶向序列完美匹配,包含约100bp-150bp侧接的上游和下游序列)克隆到hCG内含子之间。载体pEMBL-D(+)-Syn1-CYP46A1-hCGin-2x人工pre-miR是可以同时产生CYP46A1和人工miRNA的combo构建体。为了鉴别pre-miRNA是否可以加工成为成熟的miRNA并与包含CAG扩增的HTT靶向序列(其与成熟miRNA完美互补)组合,将其插入荧光素酶基因的后面。由于包装尺寸的限制,构建体中使用了小poly A。

[0620] 以下序列是本领域已知的:pEMBL;synapsin启动子(Syn1);ITR(例如,来自AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12或AAV13);hCG内含子;小polyA;CYP46A1;荧光素酶;HTT靶向序列;和/或HTT-3'UTR/突变体。

[0621] synapsin1(Syn1)是synapsin基因家族的成员。synapsin编码与突触囊泡的细胞质表面相关联的神经元磷蛋白。家族成员的特征在于共同的蛋白质结构域,并且它们与突触发生和神经递质释放的调节有关,表明了为数种神经精神疾病中具有潜在作用。Syn1在轴突发生和突触发生的调控中起作用。Syn1蛋白作为数种不同蛋白激酶的底物发挥作用,并且磷酸化可能在神经末梢中此种蛋白的调控中发挥功能。该基因中的突变可能与伴有原发性神经元退化的X连锁紊乱(例如Retts综合征)有关联。或者,已经鉴别了编码不同亚型的剪接的转录本变体。在任何方面的一些实施方式中,Syn1启动子可以包含人启动子Syn1(参见例如与NCBI参考编号NG_008437.1RefSeqGene Range 5001-52957;NM_006950.3;NP_008881.2;NM_133499.2;NP_598006.1相关的Syn1启动子)。

[0622] CYP46A1是细胞色素P450酶超家族的成员。细胞色素P450蛋白是单加氧酶,催化许多涉及药物代谢以及胆固醇、类固醇和其它脂质合成的反应。这种内质网蛋白在大脑中表达,在大脑中它将胆固醇转化为24S-羟基胆固醇。虽然胆固醇不能通过血脑屏障,但24S-羟基胆固醇可以在大脑中被分泌进入到循环中,返回肝以进行分解代谢。在任何方面的一些实施方式中,CYP46A1可以包含人CYP46A1(参见例如NCBI ref编号NG_007963.1RefSeqGene Range 4881-47884;NM_006668.2;NP_006659.1)。CYP46A1是胆固醇降解的限速酶,在亨廷

顿病中具有神经保护性(参见例如Boussicault等,CYP46A1,the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation,is neuroprotective in Huntington's disease,Brain,2016年3月,139(Pt 3):953-70;Kacher等,CYP46A 1gene therapy deciphers the role of brain cholesterol metabolism in Huntington's disease,Brain,2019年8月1日;142(8):2432-2450;它们各自的内容通过引用的方式以其整体并入本文)。

[0623] 在任何方面的一些实施方式中,miRNA包含与侧接有miRNA骨架序列的SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4所示的序列的至少两个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个)连续碱基互补的序列。在任何方面的一些实施方式中,miRNA包含与和HTT(参见例如NCBI Gene ID:3064;例如SEQ ID NO:4)相关的侧接有miRNA骨架序列的非翻译区(例如,5'UTR、3'UTR)、外显子、CAG重复或CAG跨接区(例如CAG 5'跨接区、CAG 3'跨接区)的序列的至少两个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个)连续碱基互补的序列。

[0624] 当施用于同一患者时,编码转基因(编码一个或多个miRNA)的分离的核酸和编码CYP46A1蛋白的分离的核酸可以提供与单独施用任一者相比改善的治疗效果。当施用于同一患者时,编码转基因(编码一个或多个miRNA)的分离的核酸和编码CYP46A1蛋白的分离的核酸可以提供与单独施用任一者相比协同(而不是相加)改善的治疗效果。编码转基因(编码一个或多个miRNA)的分离的核酸和编码CYP46A1蛋白的分离的核酸可以按照本文所述的任何方法顺序地或同时地向受试者施用。

[0625] 实施例2--HDII外显子靶向miRNA分析

[0626] 材料和方法

[0627] 将从确诊为亨廷顿病(Coriell GM04281)的患者中分离的成纤维细胞在MEM(Gibco 11090)中培养,所述MEM补充有15%FBS(Gibco 10270106)、1%glutamax(Gibco 35050)、1%非必需氨基酸(Merck M7145)和1%青霉素-链霉素(Gibco 15140122)。使用针对原代哺乳动物成纤维细胞的基本核转染试剂盒(Lonza VPI-1002),以核转染程序U-023在Nucleofector 2b设备(Lonza)上用5 μ g质粒对1E+06细胞进行核转染。所述质粒在GFP基因的3'编码区中包含两拷贝的miRNA,受CMV启动子控制。核转染后48小时,将细胞用PBS清洗,然后用0.25%胰蛋白酶-EDTA(Gibco 25200056)解离。收集细胞,在90%PBS、10%FBS溶液中重悬,然后使细胞穿过过滤器(VWR 734-0001)。通过流式细胞术分离GFP阳性细胞,并使用RNeasy micro试剂盒(Qiagen 74004)提取RNA。使用M-MLV cDNA合成试剂盒(Thermo Fisher 28025013)和序列特异性引物UAPd18(序列GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT(SEQ ID NO:186))进行cDNA合成。使用Taqman Fast Advanced Master Mix(Thermo Fisher 4444554),使用qPCR计算相对于管家基因HPRT1(Hs02800695_m1)的HTT(HTT外显子1引物和探针序列取自Neueder等,2017)的相对表达

[0628] 结果

[0629] 用表达miRNA H12、Hel1-1、Hel1-4、Hel1-6、Hel1-8、Hel1-9或Hel1-10的质粒构建体对源自亨廷顿病患者的成纤维细胞进行核转染,这些miRNA在GFP编码区的3'端中,受普遍存在的CMV启动子控制。H12是获取自Minarikova等(2016)的阳性对照。核转染后,与GFP对照(其在GFP序列中不含miRNA)相比,miRNA H12、Hel1-1、Hel1-4、Hel1-9和Hel1-10表现

出HTT的敲低(参见例如图8)。

[0630] 参考文献

[0631] Miniarikova et al (2016) Design, Characterization, and Lead Selection of Therapeutic miRNAs Targeting Huntingtin for Development of Gene Therapy for Huntington's Disease. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 5, e297

[0632] Neueder et al. (2017) The pathogenic exon 1 HTT protein is produced by incomplete splicing in Huntington's disease patients. *Scientific Reports* 7(1): 1307

[0633] 实施例3-评估启动子活性的方法

[0634] 为了评估CRE、CRM、启动子元件或合成的CNS特异性启动子在CNS中的活性,期望将合成的CNS特异性启动子或者包含CRE、CRM、启动子元件的合成的CNS特异性启动子可操作地连接到报告基因(例如GFP、YFP或RFP)。将包含上述内容的表达构建体以穿过动物(例如小鼠或大鼠)的CNS的病毒载体静脉内施用。在一段时间(例如1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月)后,处死动物。将动物的CNS加工成组织切片,并可进行免疫染色(荧光和比色)以评估整个CNS和不同CNS细胞类型中报告基因的表达。技术人员将理解,可以使用细胞特异性标记物来识别不同的CNS细胞类型。例如,可以使用荧光标记的IBA1特异性抗体来识别小胶质细胞,可以使用荧光标记的GFAP特异性抗体来识别星形胶质细胞,可以使用荧光标记的Oligo2特异性抗体来识别少突胶质细胞,并且可以使用荧光标记的NeuN特异性抗体来识别神经元。如果需要量化,对CNS组织进行报告基因的蛋白质印迹。进行这些技术是常规且已知的。

[0635] 实施例4-在C57BL/6J小鼠纹状体中对多种滴度的AAV-eGFP-miHTT构建体的体内耐受性评估

[0636] 本研究的目的是评估在C57BL/6J小鼠的纹状体中以不同滴度施用后,在注射部位对AAV-miHTT构建体的耐受性。为此,通过免疫组织化学(IHC)分析神经元标记物,并通过量化注射部位处的局部细胞损失来评估耐受性。本研究通过分析纹状体中载体拷贝基因组/细胞和不同细胞类型中的eGFP免疫反应性来评估细胞向性。

[0637] 本研究评估了在C57BL/6J小鼠的纹状体中以三种不同滴度施用后,在注射部位的AVV-GFP-miHTT构建体的耐受性:根据先前研究(BV23)的 $1.0E9$ vg/ μ L被良好耐受;另外,测试了两种额外滴度($3.5.0E9$ vg/ μ L和 $6.5E9$ vg/ μ L),这些滴度未使用本表达盒(GFP-miHTT)在体内进行评估。为此,通过免疫组织化学(IHC)分析神经元和胶质细胞的标记物,并通过量化注射部位处的局部细胞损失来评估耐受性。本研究还包括通过分析小鼠大脑中不同细胞类型中的eGFP免疫反应性和分析纹状体中的载体拷贝基因组/细胞来评估细胞向性。

[0638] 将颅内注射的日期指定为第1天,随后的日期连续编号。将研究中颅内注射之前的日期连续编号。在两个不同的日期进行立体定位注射,在两个不同的日期进行小鼠的处死,以遵守相同的生命期(6周)。

[0639] 载体和载体制备

[0640] 以 $6.85E9$ vg/ μ L的浓度提供在CBA的控制下编码eGFP和miR-He11-9的AAVrh10(AAVrh10-CBA-eGFP-miR-He11-9)(lot-AAV-B367)。以 $1.73E10$ vg/ μ L的浓度提供在CBA的控

制下编码eGFP和miR-He11-10的AAVrh10 (AAVrh10-CBA-eGFP-miR-He1 1-10) (1ot-AAV-B368)。

[0641] 在载体的制造中使用了与配方缓冲液具有相同组成的稀释缓冲液(溶媒)(基于来自Lonza的参考物,#:BE1 7-513F):由VVC制造团队制备补充有0.001%Pluronic F68的dPBS, Ca²⁺/Mg²⁺。

[0642] 临使用前,在安全柜(BSC;层流下的L2限制)下在高压灭菌的0.5mL聚丙烯Eppendorf管(Eppendorf;ref.0030121.023)中将载体用溶媒(dPBS Ca²⁺/Mg²⁺Pluronic F680.001%)进行稀释,以获得适当的滴度,在立体定位程序期间,将其于冰上保持在4℃。将剂量配方吸入施用装置中:含有32G尖端3型的30毫米长度针头(Dutscher;ref:074753)的汉密尔顿注射器(Dutscher;1701RN 10μL;ref:074493),在每次剂量施用前填充在给药区域。

[0643] 实验设计

[0644] 本研究共使用21只8周龄雌性C57BL/6J小鼠,从15g到25g。将小鼠随机分配到各组,如表19所示,没有任何随机化程序。小鼠接受所示载体的双侧纹状体注射,体积为4μL/纹状体。对每只小鼠的左半球和右半球双侧注射以相同溶媒稀释的载体(4μL)。将载体从1.0E9vg/μL(4.0E9 vg/纹状体)到6.5E9 vg/μL(2.6E10vg/纹状体)进行施用。

[0645] 表19:组分配

组	小鼠	测试物	剂量			动物
			滴度 (vg/μL)	剂量 (vg/纹状体)	体积&注射 (μL/动物)	
1	C57BL/6J	溶媒	-		共8μL; 4μL/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
2	C57BL/6J	AAV-B637	1.0E9	4.0E9	共8 1.1L; 4μL/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
3	C57BL/6J	AAV-B637	3.5E9	1.4E10	共8μL; 4μL/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
4	C57BL/6J	AAV-B637	6.5E9	2.6E10	共8μL; 4μL/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
5	C57BL/6J	AAV-B638	1.0E9	4.0E9	共8μL; 4μL/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
6	C57BL/6J	AAV-B638	3.5E9	1.4E10	共8μL; 4μL/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
7	C57BL/6J	AAV-B638	6.5E9	2.6E10	共8μL; 4μL/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F

[0646] 表20:载体制备细节

TA	溶媒 (内部批号)	初始滴度 (vg/ μ L)	最终滴度 (vg/ μ L)	载体吸 取体积 (4)	溶媒吸 取体积 (μ L)	稀释溶 液总体 积 (μ L)	待注射的动 物数/组
AAVrh10- CBA-eGFP- miR-Hell-9	08	6.85E9	1.0E9	14.6	85.4	100*	3
	08	6.85E9	3.5E9	51.1	48.9	100*	3
	08	6.85E9	6.5E9	94.9	5.1	100*	3
AAVrh10- CBA-eGFP- miR-Hell-10	08	1.73E10	1.0E9	5.8	94.2	100*	3
	08	1.73E10	3.5E9	20.2	79.8	100*	3
	08	1.73E10	6.5E9	37.6	62.4	100*	3

[0647] 在小鼠纹状体中的脑内递送的总结方案:

[0648] 将载体通过脑内立体定位递送在小鼠纹状体内施用。施用由每个半球的单次施用组成。对于各单次注射,施用的持续时间为20min,然后将针头留在原位额外5min以避免回流。对于双侧注射的每只小鼠,总时间为40min注射+10min针头留置,对于单侧注射的每只小鼠,总时间为20min注射+5min针头留置。

[0649] 通过腹膜内注射氯胺酮(Imalgene 1000,100mg/Kg)/甲苯噻嗪(Rompun 2%,10mg/Kg)对小鼠进行麻醉,并将小鼠放置在立体定位框架(Stoelting,Wood Dale,USA)上。对于双侧注射的小鼠,通过汉密尔顿注射器以0.2 μ L/min的速率将4微升载体制剂注射入左侧纹状体和右侧纹状体,所述汉密尔顿注射器包含连接到自动注射器(KD Scientific;Phymep France;ref:78-8130 INT)的32G尖端3型30mm长的针头。对于单侧注射的小鼠,遵循相同的方案,只是载体制剂仅注射到左侧纹状体中。从前囟起的注射位点的立体定位坐标如下:前侧-后侧(+1mm);内侧-外侧(+/-2mm);背侧-腹侧(-3.5mm);齿条(tooth bar):0。所有载体稀释液均在紧临给药前制备。

[0650] 进行小鼠的每天观察/监测,以紧接在手术后和自从注射后第一天评估饮食/饮水消耗、一般行为(笼内活动和一般状态)、任何不良反应。注射后6周,在麻醉时称重每只动物,且每周称重一次,直至尸体剖检日。

[0651] 从所有动物中收集全脑组织,在4%PFA中固定后,用于IHC和表达分析。

[0652] 在尸体剖检当天,记录存活动物的终末体重,并进行麻醉。将致死剂量的Euthasol(Vetcare)(180mg/Kg)腹膜内施用至小鼠。然后,用处于0.1M PBS中的25mL冰冷的4%PFA进行心内灌注,对动物实施安乐死。

[0653] 在用处于0.1M PBS中的冰冷的4%PFA灌注小鼠后,立即从所有动物中收集大脑,并在4%PFA溶液中固定24小时。之后,更换4%PFA溶液,并通过在20%蔗糖/磷酸盐缓冲液中孵育24h来对大脑进行低温保护。随后,将固定后的大脑冷冻并使用冷冻切片器(Leica,Wetzlar,德国)获得冠状40 μ m自由漂浮(free-floating)的大脑切片。将大脑切片在-20 $^{\circ}$ C下储存在由1/10的冷冻保护溶液组成的溶液中,所述冷冻保护溶液由1/10的磷酸盐缓冲液(Sigma-Aldrich,ref.P3619-1GA)、3/10的蒸馏水、3/10的乙二醇(Sigma-Aldrich,ref:324558)和3/10的甘油(Life Sciences GE Healthcare)组成。

[0654] 在包含纹状体的整个喙部-尾部取样的连续冷冻大脑切片中进行IHC,所述IHC针对eGFP蛋白(兔抗eGFP;Abcam,参考:ab6556;稀释度:1:6000)、神经元标记物NeuN(Abcam,参考:ab177487;稀释度1/2000)和神经元标记物Iba1(Wako,参考:019-19741;稀释度1/2000),以分别评估eGFP表达、神经元表达和神经胶质表达,从而允许分别定性评估纹状体整个区域中的神经元保存、神经胶质活化和eGFP表达的区域。

[0655] 用Zeiss Axio Scan Z 1或Hamamatsu Nanozoomer S60获取经免疫染色的切片的图像。在切片扫描期间,动物之间的光强度、曝光时间、数值增益和放大倍数保持不变。

[0656] 冷冻大脑切片的量化

[0657] 使用ImageJ软件,在小鼠纹状体存在于其中的所有经冷冻的大脑切片中测量eGFP阳性区域、神经元损失区域的量化和小胶质细胞激活的量化。在切片扫描期间,动物之间的数值增益和放大率保持不变,以避免潜在的技术伪迹。首先将图像转换为8-bit灰度并进行二值化处理以突出显示阳性染色。所有评估区域均由同一位盲测实验者绘制并通过软件测量。

[0658] 为进行分析,将总的eGFP转导面积报告为纹状体总面积,并按如下计算每只小鼠的转导面积百分比:(转导面积/纹状体总面积)×100。

[0659] 为进行分析,将总的神经元耗竭面积(抗NeuN免疫染色)报告为纹状体总面积,并按如下计算每只小鼠的耗竭面积百分比:(纹状体中的转导面积/纹状体总面积)×100。

[0660] 为了进行分析,将总的Iba1染色面积(抗Iba1免疫染色)报告为纹状体总面积,并按如下计算每只小鼠的Iba1表达面积的百分比:(纹状体中的Iba1表达面积/纹状体总面积)×100。

[0661] 从冷冻大脑切片中分离DNA

[0662] 对于40 μ m大脑切片,将作为整个纹状体的代表的喙部-尾部连续取样(固定的冷冻切片)进行解剖以用于各切片。最后,将来自相同半球的所有纹状体切片汇集在相同聚丙烯管(Sarstedt参考:72706)中以用于DNA提取。根据制造商的说明,用QIAamp[®]DNA FFPE组织试剂盒(Qiagen参考:56404)进行大脑的DNA分离。

[0663] 对于每个样品,使用10ng DNA/孔。根据制造商的方案,使用LightCycler[®]480 SYBR[®]Green I Master (Roche, ref:04707516001)进行定量实时PCR反应,并在LightCycler[®]480 (Roche Diagnostics,德国)上运行。将mADCK3管家基因用于对hCYP46A1水平的量化进行归一化。

[0664] 引物序列:

[0665] eGFP(转基因):FW:5'-GACGACGGCAACTACAAGA-3'(SEQ ID NO:213)RW:5'-GCTTGTCGGCCATGATATAGA-3'(SEQ ID NO:214)

[0666] mADCK3(内源基因):FW:5'-CCACCTCTCCTATGGGCAGA-3'(SEQ ID NO:215):RW:5'-CCGGG CCTTTTCAATGTCT-3'(SEQ ID NO:216)

[0667] 将结果(每个细胞的载体基因组拷贝数,VGC/细胞)表示为相对于mADCK3基因拷贝(2N基因组的病毒基因组拷贝数)的转基因序列拷贝数(eGFP)的n倍差异。结果通过以下公式确定: $N_{eGFP} = 2^{2^{(C_t)}}$,其中样品的 AC_t 值通过从mADCK3基因的 C_t 值中减去靶基因的 C_t 值来确定。可以使用来自先前实验的阳性对照。使用纹状体和肝脏。收集大脑皮层并保存在-80 $^{\circ}$ C

下,并且不立即处理(VGC分析的可选处理)。

[0668] 所有分析均使用GraphPad Prism版本8(Graph Pad Software,La Jolla,美国)进行。所有数据均表示为平均值±SEM。对于体重增加、载体基因组拷贝、eGFP转导面积、NeuN耗竭面积和小胶质细胞活化面积的分析,使用单因素方差分析,然后进行Bonferroni事后检验(以处理作为独立因素),来评估统计学显著性;可使用学生T检验逐一比较用载体注射的组。对于体重测量,进行Bonferroni事后检验校正的双向方差分析,以时间和处理作为独立因素。提供了来自预先安排的动物的所有数值数据的汇总统计数据(平均值和平均值的标准误差)。对于所有分析,将统计学显著性设置为P值<0.05。

实施例5-在C57BL/6J小鼠纹状体中注射后的表达靶向亨廷顿基因序列的miRNA的不同AAV-eGFP-miHTT构建体的体内表征

[0669] 本研究的目的是评估含有靶向人类亨廷顿基因(HTT)(非等位基因特异性的)的不同miRNA序列的数种AAV-miHTT构建体的体内功能。为此,通过蛋白质印迹法评价总的eGFP蛋白水平和在C57BL/6J小鼠纹状体中注射各载体后的载体基因组拷贝数/细胞(vgc/细胞)来评估报告基因eGFP的表达。此外,通过免疫组织化学(IHC)分析小鼠大脑切片中的eGFP免疫反应性。

[0670] HTT蛋白中的聚谷氨酰胺(polyQ)束(tract)的扩张导致正常功能紊乱并诱导毒性功能获得,导致细胞功能障碍并最终导致在HD条件下观察到神经元死亡。不同的研究表明,在啮齿动物模型大脑中降低突变HTT可以改善分子、神经病理学和行为异常(Caron等,2020,Minarikova等,2017和Spronck等,2019)。因此,靶向和降低突变的HTT(和正常的亨廷顿基因)的水平被视为有前途的治疗策略。在选择靶向HTT的不同的miRNA序列后,通过在C57BL/6J小鼠大脑中注射表达每个miHTT序列和eGFP、报告基因的多种构建体来评估它们的体内功能。为此,通过用蛋白质印迹法评估总的eGFP蛋白水平以及在C57BL/6J小鼠纹状体中注射每个载体后的vgc/细胞的数量来评估eGFP表达。此外,通过免疫组织化学(IHC)分析小鼠大脑中的eGFP免疫反应性。

[0671] 将颅内注射的日期指定为第1天,随后的日期连续编号。颅内注射之前的研究日期连续编号。在三个不同的日期进行立体定位注射,并在三个不同的日期进行小鼠的处死,以遵循相同的生命期(2周)。

[0672] 载体和载体制备

[0673] 本研究使用以下载体:

[0674] 以 $6.85E9$ vg/ μ L的浓度提供在CBA启动子的控制下编码eGFP和miR-He11-9的AAVrh10(AAVrh10-CBA-eGFP-miR-He11-9(AAV-B637))。

[0675] 以 $1.73E10$ vg/ μ L的浓度提供在CBA启动子的控制下编码eGFP和miR-He11-10的AAVrh10(AAVrh10-CBA-eGFP-miR-He11-10(AAV-B638))。

[0676] 以 $3.73E10$ vg/ μ L的浓度提供在CBA启动子的控制下编码eGFP和miR-He4的AAVrh10(AAVrh10-CBA-eGFP-miR-He4(AAV-B639))。

[0677] 以 $1.11E10$ vg/ μ L的浓度提供在CBA启动子的控制下编码eGFP和miR-H12的AAVrh10(AAVrh10-CBA-eGFP-miR-H12(AAV-B640))。

[0678] 以 $1.52E10$ vg/ μ L的浓度提供在CBA启动子的控制下编码eGFP的AAVrh10(AAVrh10-CBA-eGFP(AAV-B641))。

[0679] 载体通过实施例4中描述的方案进行制备和稀释。剂量配方通过实施例4中描述的方案制定。

[0680] 实验设计

[0681] 本研究共使用25只8周龄雌性C57BL/6J小鼠,从15g到25g。将小鼠随机分配到各组,如表21所示,不进行任何随机化程序。小鼠接受指定载体的双侧纹状体注射,体积为4 μ L/纹状体。每只小鼠的左半球和右半球双侧注射以相同溶媒稀释的载体(4 μ L)。以1.0E9 vg/ μ L(4.0E9 vg/纹状体)施用载体。

[0682] 表21:组分配

组	小鼠	测试物	剂量			
			滴度 (vg/ μ L)	剂量 (vg/纹状体)	体积&注射 (μ L/动物)	动物
1	C57BL/6J	AAV-B637	1.0E9	4.0E9	共8 μ L; 4 μ L/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
					共4 μ L; 4 μ L/位点; 1位点/纹状体-单侧(LH)	2F
2	C57BL/6J	AAV-B638	1.0E9	4.0E9	共8 μ L; 4 μ L/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
					共4 μ L; 4 μ L/位点; 1位点/纹状体-单侧(LH)	2F
3	C57BL/6J	AAV-B639	1.0E9	4.0E9	共8 μ L; 4 μ L/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
					共4 μ L; 4 μ L/位点; 1位点/纹状体-单侧(LH)	2F
4	C57BL/6J	AAV-B640	1.0E9	4.0E9	共8 μ L; 4 μ L/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
					共4 μ L; 4 μ L/位点; 1位点/纹状体-单侧(LH)	2F
5	C57BL/6J	AAV-B641	1.0E9	4.0E9	共8 μ L; 4 μ L/位点; 1位点/纹状体-双侧	3F
					共4 μ L; 4 μ L/位点; 1位点/纹状体-单侧(LH)	2F

[0683] 表22:测试物制备细节

TA	溶媒(内部批号)	初始滴度 (vg/ μ L)	最终滴度 (vg/ μ L)	载体吸取 体积 (μ L)	溶媒吸取 体积 (μ L)	稀释溶液 总体积 (μ L)	待注射的动 物数/组
AAV-B637	08	6.85E9	1.0E9	14.6	85.4	100*	5
AAV-B638	08	1.73E10	1.0E9	5.8	94.2	100*	5
AAV-B639	08	3.73E10	1.0E9	2.7	97.3	100*	5
AAV-B640	08	1.11E10	1.0E9	9.0	91.0	100*	5
AAV-B641	08	1.52E10	1.0E9	6.6	93.4	100*	5

[0684] 将载体通过脑内递送在小鼠纹状体中施用,如实施例4所述。为了施用,将小鼠按照实施例4所述进行麻醉。

[0685] 从所有动物中收集全脑组织,在4%PFA中固定后,用于IHC和表达分析。

[0686] 按照实施例4中所述的尸体剖检和安乐死的方法和方案进行。使用处于0.1M PBS中的25mL冰冷的4%PFA进行心内灌注对动物进行安乐死。从所有动物中收集以下组织并冷冻用于eGFP蛋白水平和vgc/细胞分析,并在4%PFA中固定用于IHC分析:来自双侧注射的所有群组的左半球和右半球的纹状体穿刺;来自双侧注射的所有群组的左半球和右半球的大脑皮层穿刺;以及来自单侧注射的所有群组的全脑。

[0687] 对小鼠(n=3只小鼠)实施安乐死并用0.1M PBS灌注后,立即对双侧注射的每只动

物进行大脑的两个半球的解剖,并将来自每个半球的大脑皮层和纹状体收集到四个不同的1.5mL Eppendorf管中(Eppendorf参考:0030121.023),立即在干冰中冷冻并储存在-80℃下直至使用(每种条件下n=6)。然后,使用AllPrep^oDNA/RNA/Protein Mini Kit(Qiagen, ref:80004)从相同样本中同时提取DNA和蛋白质,然后将用于vgc检测的基因组DNA储存在-20℃下,并将用于蛋白质印迹的蛋白质储存在-80℃下。

[0688] 对小鼠灌注冰冷的0.1M PBS后,立即从单侧注射的所有动物(n=2/组)收集大脑,并在4%PFA溶液中固定24h。之后,更换4%PFA溶液,并通过在20%蔗糖/磷酸盐缓冲液中孵育24h来对大脑进行低温保护。随后,将固定后的大脑冷冻,并使用冷冻切片机(Leica, Wetzlar, 德国)获得冠状40μm自由漂浮的大脑切片。将大脑切片在-20℃下储存在由1/10的冷冻保护溶液组成的溶液中,所述冷冻保护溶液由1/10的磷酸盐缓冲液(Sigma-Aldrich, ref.P3619-1GA)、3/10的蒸馏水、3/10的乙二醇(Sigma-Aldrich, ref:324558)和3/10的甘油(Life Sciences GE Healthcare)组成。

[0689] 如实施例4所述,实施用于小鼠纹状体中的载体拷贝数/细胞的评估的定量PCR。在具有标准方案和Bio-rad耗材的Bio-rad仪器上进行电泳。用适当的抗兔或抗小鼠过氧化物酶偶联的二抗[1:6000, Invitrogen参考:A16023(抗兔)和A16011(抗小鼠)]和ECL化学发光反应(Bio-rad)揭示了一抗兔多克隆抗eGFP(1:1000, Abcam, 参考:ab6556)和小鼠单克隆抗GAPDH(1:6000, Abcam参考:ab8245)。

[0690] 在包含纹状体的整个喙部-尾部取样的连续冷冻大脑切片中进行针对eGFP蛋白(兔抗eGFP; Abcam, 参考:ab6556; 稀释度:1:6000)的IHC,以评估eGFP表达,从而使得能够定性评估纹状体整个区域中的表达eGFP的面积。如实施例4中所述,对冷冻大脑切片上的eGFP传导面积进行量化。

[0691] 统计分析

[0692] 所有分析均按照实施例4中所述的进行。

参考文献

Caron, N.S., Southwell, A.L., Brouwers, C.C., Cengio, L.D., Xie, Y., Black, H.F., Anderson, L.M., Ko, S., Zhu, X., van Deventer, S.J., Evers, M.M., Konstantinova, P., & Hayden, M.R. (2020). Potent and sustained huntingtin lowering via AAVS encoding miRNA preserves striatal volume and cognitive function in a humanized mouse model of Huntington disease. *Nucleic acids research*, 48(1), 36-54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz976>

Miniarikova, J., Zimmer, V., Martier, R., Brouwers, C.C., Pythoud, C., Richetin, K., Rey, M., Lubelski, J., Evers, M.M., van Deventer, S.J., Petry, H., Deglon, N., & Konstantinova, P. (2017). AAV5-miHTT gene therapy demonstrates suppression of mutant huntingtin aggregation and neuronal dysfunction in a rat model of Huntington's disease. *Gene therapy*, 24(10), 630-639. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.71>

Spronck, E.A., Brouwers, C.C., Valles, A., de Haan, M., Petry, H., van Deventer, S.J., Konstantinova, P., & Evers, M.M. (2019). AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Sustained Huntingtin Lowering and Functional Improvement in

Huntington Disease Mouse Models.Molecular therapy.Methods&clinical development,13,334-343.https://doi.org/10.1016/nomtm.2019.03.002.

实施例6-评估在患有早期表现 (Early Manifest) 的亨廷顿病的成年人中的纹状体施用AAVrh10.CAG.hCYP46A1的研究

[0693] 本实施例描述了在患有早期表现的亨廷顿病的成年人中的纹状体施用AAVrh10.CAG.hCYP46A1载体(即具有SEQ ID NO:194的序列)的安全性、耐受性和初步疗效的评估。基于例如以下提供的下述纳入和排除标准,所述实施例包括18名年龄在18岁-65岁之间的参与者:

[0694] 本实施例中的纳入标准:

- 同意时年龄在18岁(含)至65岁(含)之间的男性或女性受试者,能够提供知情同意书并能够理解和遵守所有研究程序。

- 有记录的亨廷顿基因中病理性CAG扩张的遗传确认 ≥ 40 。

- 早期表现的HD由UHDRS总功能容量(TFC)定义为评分为9至13且诊断分类水平(DCL)为4,或如果存在认知障碍和疾病进展的明确证据,则DCL为3。

- 每个半球的纹状体MRI体积:在筛查MRI上,壳核 $\geq 2.3\text{cm}^3$ (每侧);尾状核 $\geq 1.7\text{cm}^3$ (每侧)。

- 所有HD伴随药物在筛查(由研究人员自行决定)前保持稳定至少30天。

[0695] 本实施例中的关键排除标准:

- 在研究者看来影响受试者的安全和对研究程序的依从性的先前或持续中的医学状况、身体检查结果、ECG结果或实验室异常。

- 筛查前五年内有转移性肿瘤。

- 根据研究者的临床判断,筛查时存在临床相关的免疫、血液、肝脏、心脏或肾脏疾病。

- 目前未经治疗且不稳定的需要住院治疗的严重情绪紊乱或抑郁性紊乱。

- 根据研究者的判断,有自杀未遂史或即将自残的风险,或针对哥伦比亚自杀严重程度评定量表(C-SSRS)的第4项或第5项的回答“是”。

- 有确诊中风、已知颅内肿瘤、血管畸形或颅内出血史的患者。

- 根据神经外科医生的判断,受试者被认为不适合接受外科手术。

- 任何基因治疗、细胞移植或任何其它实验性脑外科手术史。

- 在筛查前6个月内使用过任何RNA或DNA靶向HD特异性研究药物,例如反义寡核苷酸。

- 受试者无法忍受或不愿意接受多次腰椎穿刺。

- 在治疗前12周或5个半衰期(以较长者为准)内参加过任何经批准或未批准的研究药物或干预的临床试验。

[0696] 载体和施用

[0697] 本实施例包括两个队列:低剂量组“队列1”和高剂量组“队列2”。

[0698] 队列1接受一次脑内双侧注射AAVrh10.CAG.hCYP46A1, AAVrh10.CAG.hCYP46A1是腺相关病毒载体血清型Rh10,包含人类胆固醇24-羟化酶基因,第一滴度为 $0.4 \times 10^9\text{vg}/\mu\text{L}$ 。队列2接受一次脑内双侧注射AAVrh10.CAG.hCYP46A1,第二滴度为 $1.1 \times 10^9\text{vg}/\mu\text{L}$ 。所述

AAVrh10.CAG.hCYP46A1组合物包含10mM磷酸盐(9mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和1mM KH_2PO_4)、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.88mM CaCl_2 、0.49mM MgCl_2 、0.001wt%泊洛沙姆188(pH 7.2)和各自的AAVrh10.CAG.hCYP46A1滴度,并且可通过将各自量的AAVrh10.CAG.hCYP46A1与0.02045mg NaCl、0.00242mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.00014mg KH_2PO_4 、0.00020mg KCl、0.050mg山梨醇、0.00001mg泊洛沙姆188和0.96mg水混合来制备。

[0699] 对于每个大脑半球,使用一个或多个套管(ClearPoint Cannulas;Solana Beach, CA)和两个轨迹进行注射:用于尾状核的一个前轨迹和用于壳核的一个后轨迹,伴随壳核中的两个沉积物沿相同的后轨迹定位。根据每个结构(两个尾状核和两个壳核)的体积MRI测量计算每个患者的病毒注射体积。例如,将每个结构的体积的25%以第一滴度注射给队列1,并且以第二滴度注射给队列2。神经外科医生根据基线MRI为每个大脑半球定义两个最佳轨迹,一个用于尾状核且一个用于壳核,以确保安全。

[0700] 本实施例由2个部分组成:剂量探索部分和扩展部分;每个部分由3个阶段组成:筛选阶段(8周,如果需要可延长至12周以适应安排)、治疗和初始随访阶段(52周)和长期随访阶段(4年)。在剂量探索部分,在每个队列中的3名-6名受试者中测试2个剂量滴度。一旦根据剂量限制性毒性选择了剂量,就会有另外6名受试者被纳入剂量扩展部分。

[0701] 主要结果测量

[0702] 施用后52周评估剂量限制性毒性(DLT)、治疗出现的不良事件(TEAE)和严重不良事件(SAE)的发生率。根据本领域已知的方案规范测量DLT、TEAE和SAE的发生率。施用后52周末观察到DLT、TEAE和SAE。

[0703] 次要结果测量

[0704] 施用后52周,将通过MRI评估受HD影响的大脑区域的解剖和体积测量。测量了由MRI评估的受HD影响的大脑区域的解剖和体积测量相对于基线变化的变异性 and 幅度。施用后52周,纹状体结构萎缩进展的斜率、心室扩张和皮层萎缩降低。

[0705] 施用后52周将评估综合统一亨廷顿病评分量表(cUHDRS)。测量cUHDRS相对于基线的变化;分数越高表示功能越好。与施用后52周的基线水平相比,临床分数稳定或改善。

[0706] 施用后52周将评估血液和脑脊液(CSF)中的突变亨廷顿蛋白(mHTT)浓度。测量血液和CSF中的mHTT相对于基线的变化。与施用后52周的基线水平相比,血液和CSF中的mHTT浓度降低。

[0707] 施用后52周将评估血液和CSF中的神经丝轻链(NfL)水平。测量血液和CSF的NfL相对于基线的变化。与基线水平相比,血液和CSF中的NfL降低,示出与施用后52周的基线水平相比的神经元改善。

[0708] 施用后52周将评估血液和CSF中的24OH胆固醇浓度。测量血液和CSF的24OH胆固醇相对于基线的变化。与施用后52周的基线浓度相比,血液和CSF中的24OH胆固醇浓度增加。

[0709] 施用后52周将使用磁共振波谱(MRS)评估代谢概况。测量了MRS代谢概况相对于基线的变化。与施用后52周的基线相比,代谢概况改善。

[0710] 施用后52周将评估正电子发射断层扫描(PET)氟脱氧葡萄糖(FDG)纹状体概况。评估了PET FDG纹状体概况相对于基线的变化。与施用后52周的基线水平相比,PET上的葡萄糖概况改善。

实施例7-序列

[0711] SEQ ID NO:3人类HTT基因的外显子1

```
uugcugugug aggcagaacc ugcgggggca ggggcgggcu gguucccugg ccagccaauug      60
gcagaguccg caggcuaggg cugucaauca ugcuggccgg cguggccccg ccuccgccgg      120
cgcgggccccg ccuccgccgg cgcacgucug ggacgcaagg cgccgugggg gcugccggga      180
cggguccaag auggacggcc gcucagguuc ugcuuuuacc ugcggcccag agccccauuc      240
auugccccgg ugcugagcgg cgccgcgagu cggcccgagg ccuccgggga cugccgugcc      300
gggcgggaga ccgccauggc gaccucggaa aagcugauga aggccuucga gucccucaag      360
uccuuccagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag      420
cagcagcagc aacagccgcc accgccgccg ccgccgccgc cgccuccuca gcuuccucag      480
ccgccgccgc aggcacagcc gcugcugccu cagccgcagc cgccccgcc gccgccccgc      540
ccgccacccg gcccggcugu ggcugaggag ccgcugcacc gaccgugagu uugggccccg      600
ugcagcuccc ugc      614
```

[0712] SEQ ID NO:4人类HTT mRNA序列

1 gctgccggga cgggtccaag atggacggcc gctcaggttc tgcttttacc tgcggcccag
61 agccccattc attgccccgg tgctgagcgg cgccgcgagt cggcccagag cctccgggga
121 ctgccgtgcc gggcgggaga ccgcatggc gaccctggaa aagctgatga aggccttcga
181 gtccctcaag tccttcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca
241 gcagcagcag cagcagcagc aacagccgcc accgccgccg ccgccgccgc cgcctcctca
301 gcttcctcag ccgccgccgc aggcacagcc gctgctgcct cagccgcagc cgcccccgcc
361 gccgcccccg ccgccaccgc gcccgctgt ggctgaggag ccgctgcacc gaccaaagaa
421 agaactttca gctaccaaga aagaccgtgt gaatcattgt ctgacaatat gtgaaaacat
481 agtggcacag tctgtcagaa attctccaga atttcagaaa cttctgggca tgcctatgga
541 actttttctg ctgtgcagtg atgacgcaga gtcagatgtc aggatggtgg ctgacgaatg
601 cctcaacaaa gttatcaaag ctttgatgga ttctaattctt ccaaggttac agctcgagct
661 ctataaggaa attaaaaaga atggtgcccc tcggagtttg cgtgctgccc tgtggaggtt
721 tgctgagctg gctcacctgg ttccgcctca gaaatgcagg ccttacctgg tgaaccttct
781 gccgtgcctg actcgaacaa gcaagagacc cgaagaatca gtccaggaga ccttggtctg
841 agctgttccc aaaattatgg cttcttttg caattttgca aatgacaatg aaattaaggt
901 tttgttaaag gccttcatag cgaacctgaa gtcaagctcc ccaccattc gggggacagc
961 ggctggatca gcagtgagca tctgccagca ctcaagaagg acacaatatt tctatagttg
1021 gctactaaat gtgctcttag gcttactcgt tcctgtcgag gatgaacact ccactctgct
1081 gattcttggc gtgctgctca ccctgaggta tttggtgccc ttgctgcagc agcaggtcaa
1141 ggacacaagc ctgaaaggca gcttcggagt gacaaggaaa gaaatggaag tctctccttc
1201 tgcagagcag cttgtccagg ttatgaact gacgttacat catacacagc accaagacca
1261 caatgttggtg accggagccc tggagctgtt gcagcagctc ttcagaacgc ctccaccgca
1321 gcttctgcaa accctgaccg cagtccgggg cattgggcag ctcaccgctg ctaaggagga
1381 gtctggtggc cgaagccgta gtgggagtat tgtggaactt atagctggag ggggttcctc
1441 atgcagccct gtcctttcaa gaaaacaaaa aggcaaagtg ctcttaggag aagaagaagc
1501 cttggaggat gactctgaat cgagatcgga tgtcagcagc tctgccttaa cagcctcagt
1561 gaaggatgag atcagtggag agctggctgc ttcttcaggg gtttccactc cagggctcagc
1621 aggtcatgac atcatcacag aacagccacg gtcacagcac aactgcagg cggactcagt
1681 ggatctggcc agctgtgact tgacaagctc tgccactgat ggggatgagg aggatattctt
1741 gagccacagc tccagccagg tcagcgcogt cccatctgac cctgccaatgg acctgaatga
1801 tgggaccag gcctcgtcgc ccatcagcga cagctcccag accaccaccg aagggcctga
1861 ttcagctgtt accccttcag acagttctga aattgtgta gacggtaccg acaaccagta

1921 tttgggcctg cagattggac agccccagga tgaagatgag gaagccacag gtattcttcc
1981 tgatgaagcc tggaggcct tcaggaactc ttccatggcc cttcaacagg cacatttatt
2041 gaaaaacatg agtcactgca ggcagccttc tgacagcagt gttgataaat ttgtgttgag
2101 agatgaagct actgaaccgg gtgatcaaga aaacaagcct tgccgcatca aaggtgacat
2161 tggacagtcc actgatgatg actctgcacc tcttgtccat tgtgtccgcc ttttatctgc
2221 ttcgtttttg ctaacagggg gaaaaaatgt gctggttccg gacagggatg tgagggtcag
2281 cgtgaaggcc ctggccctca gctgtgtggg agcagctgtg gccctccacc cggaatcttt
2341 cttcagcaaa ctctataaag ttctcttga caccacggaa taccctgagg aacagtatgt
2401 ctacagacatc ttgaactaca tcgatcatgg agaccacag gttcaggagg cactgccat
2461 tctctgtggg accctcatct gctccatcct cagcaggtcc cgctccacg tgggagattg
2521 gatgggcacc attagaacc tcacagaaa tacattttct ttggcggatt gcattccttt
2581 gctgcgaaa aactgaagg atgagtcttc tgttacttgc aagttagctt gtacagctgt
2641 gaggaactgt gtcattgatc tctgcagcag cagctacagt gagttaggac tgcagctgat
2701 catgatgtg ctgactctga ggaacagttc ctattggctg gtgaggacag agcttctgga
2761 aacccttgca gagattgact tcaggctggt gagctttttg gaggcaaaag cagaaaactt
2821 acacagaggg gctcatcatt atacagggtc tttaaaactg caagaacgag tgctcaataa
2881 tgttgtcatc ctttgcctt gagatgaaga ccccaggggt cgacatggtg ccgcagcatc
2941 actaattagg cttgtcccaa agctgtttta taaatgtgac caaggacaag ctgatccagt
3001 agtggccgtg gcaagagatc aaagcagtgt ttacctgaaa cttctcatgc atgagacgca
3061 gcctccatct ctttctccg tcagcacaat aaccagaata tatagaggct ataacctact
3121 accaagcata acagacgtca ctatggaaaa taacctttca agagttattg cagcagtttc
3181 tcatgaacta atcacatcaa ccaccagagc actcacattt ggatgctgtg aagctttgtg
3241 tcttctttcc actgccttcc cagtttgcag ttggagttta ggttggcact gtggagtgcc
3301 tccactgagt gcctcagatg agtctagtaa gagctgtacc gttgggatgg ccacaatgat
3361 tctgaccctg ctctcgtcag cttggttccc attggatctc tcagccatc aagatgcttt
3421 gattttggcc ggaaaacttg ttgcagccag tgctcccaaa tctctgagaa gttcatgggc
3481 ctctgaagaa gaagccaacc cagcagccac caagcaagag gaggtctggc cagccctggg
3541 ggaccgggcc ctggtgcca tgggtggagca gctcttctct cacctgctga aggtgattaa
3601 ctttgtgcc cacgtcctgg atgacgtggc tcttgaccg gcaataaagg cagccttgcc
3661 ttctctaaca aacccccctt ctctaagtcc catccgacga aaggggaagg agaaagaacc
3721 aggagaacaa gcatctgtac cgttgagtcc caagaaaggc agtgaggcca gtgcagcttc
3781 tagacaatct gatacctcag gtctgttac aacaagtaa tcctcatcac tggggagttt
3841 ctatcatctt cttcataacc tcaactgca tgatgtcctg aaagctacac acgctaacta
3901 caaggtcacg ctggatcttc agaacagcac ggaaaagttt ggagggtttc tccgctcagc
3961 cttggatggt ctttctcaga tactagagct ggccacactg caggacattg ggaagtgtgt
4021 tgaagagatc ctaggatacc tgaatcctg ctttagtcta gaaccaatga tggcaactgt
4081 ttgtgttcaa caattgttga agactctctt tggcacaac ttggcctccc agtttgatgg
4141 cttatcttcc aaccccagca agtcacaagg ccgagcacag cgccttggct cctccagtgt
4201 gaggccaggc ttgtaccact actgcttcat ggccccgtac acccacttca cccaggccct
4261 cgctgacgcc agcctgagga acatggtgca ggccggagcag gagaacgaca cctcgggatg
4321 gtttgatgtc ctccagaaa tgtctacca gttgaagaca aacctcacga gtgtcaca

4381 gaaccgtgca gataagaatg ctattcataa tcacattcgt ttgtttgaac ctcttggtat
4441 aaaagcttta aaacagtaca cgactacaac atgtgtgcag ttacagaagc aggttttaga
4501 tttgctggcg cagctgggtc agttacgggt taattactgt cttctggatt cagatcaggt
4561 gtttattggc tttgtattga aacagtttga atacattgaa gtgggccagt tcagggaatc
4621 agaggcaatc attccaaaca tctttttctt cttgggtatta ctatcttatg aacgctatca
4681 ttcaaaacag atcattggaa ttctaaaat cattcagctc tgtgatggca tcatggccag
4741 tggaaaggaag gctgtgacac atgccatacc ggctctgcag cccatagtcc acgacctctt
4801 tgtattaaga ggaacaaata aagctgatgc aggaaaagag cttgaaacc aaagagggt
4861 ggtgggtgca atgttactga gactcatcca gtaccatcag gtgttgaga tgttcattct
4921 tgtcctgcag cagtgcaca aggagaatga agacaagtgg aagcactgt ctogacagat
4981 agctgacatc atcctcccaa tgtagccaa acagcagatg cacattgact ctcatgaagc
5041 ccttgagtg ttaaatacat tatttgagat tttggccct tctcctcc gcctggtaga
5101 catgctttta cggagtatgt tcgtcactcc aaacacaatg gcgtccgtga gcaactgtca
5161 actgtggata tcgggaattc tggccatttt gagggttctg atttcccagt caactgaaga
5221 tattgttctt tctcgtatc aggagctctc cttctctccg tatttaattct cctgtacagt
5281 aattaatagg ttaagagatg gggacagtac ttcaacgcta gaagaacaca gtgaagggaa
5341 acaataaag aatttgccag aagaaacatt ttcaaggtt ctattacaac tggttggtat
5401 tcttttagaa gacattgtta caaacagct gaaggtggaa atgagtgagc agcaacatac
5461 tttctattgc caggaactag gcacactgct aatgtgtctg atccacatct tcaagtctgg
5521 aatgttccgg agaatcacag cagctgccac taggctgttc cgactgatg gctgtggcgg
5581 cagtttctac accctggaca gcttgaactt gcgggctcgt tccatgatca ccaccaccc
5641 ggccctggtg ctgctctggt gtcagatact gctgcttgtc aaccacaccg actaccgctg
5701 gtgggcagaa gtgcagcaga cccgaaaag acacagtctg tccagcaca agttacttag
5761 tccccagatg tctggagaag aggaggattc tgacttgga gccaaacttg gaatgtgcaa
5821 tagagaaata gtacgaagag gggctctcat tctctctgt gattatgtct gtcagaacct
5881 ccatgactcc gagcacttaa cgtggctcat tgtaaatcac attcaagatc tgatcagcct
5941 ttcccacgag cctccagtac aggacttcat cagtgccgtt catcggaact ctgctgccag
6001 cggcctgttc atocaggcaa ttcagtctcg ttgtgaaaac ctttcaact caaccatgct
6061 gaagaaaact cttcagtgtc tggaggggat ccatctcagc cagtcgggag ctgtgctcac
6121 gctgtatgtg gacaggcttc tgtgcacccc tttcogtgtg ctggctcgca tggctgacat
6181 ccttgcttgt cgccgggtag aaatgcttct ggctgcaaat ttacagagca gcatggcca
6241 gttgccaatg gaagaactca acagaatcca ggaatacctt cagagcagcg ggctcgtca
6301 gagacaccaa aggctctatt cctgctgga caggtttctg ctctccacca tgaagactc
6361 acttagtccc tctctccag tctcttcca cccgctggac ggggatggc acgtgtcact
6421 ggaaacagtg agtccggaca aagactggtc cgttcatctt gtcaaatccc agtgttgac
6481 caggtcagat tctgcaactg tggaaagtgc agagctgggtg aatcggattc ctgctgaaga
6541 tatgaatgcc tcatgatga actcggagt caacctaac ctgctagctc catgcttaag
6601 cctagggatg agtgaaattt ctgggtggca gaagagtgc ctttttgaag cagcccgtga
6661 ggtgactctg gccctgtgga gcggcaccgt gcagcagctc cctgctgtcc atcatgtctt
6721 ccagcccag ctgctgcag agccggcggc ctactggagc aagttgaatg atctgttgg
6781 ggatgctgca ctgtatcagt cctgcccac tctggcccgg gcctggcac agtacctggt

6841 ggtggtctcc aaactgcccc gtcatttgca ccttcctcct gagaaagaga aggacattgt
6901 gaaattcgtg gtggcaaccc ttgaggccct gtccctggcat ttgatccatg agcagatccc
6961 gctgagtctg gatctccagg cagggctgga ctgctgctgc ctggccctgc agctgcctgg
7021 cctctggagc gtggtctcct ccacagagtt tgtgaccac gcctgctccc tcatctactg
7081 tgtgcacttc atcctggagg ccgttgcagt gcagcctgga gagcagcttc ttagtccaga
7141 aagaaggaca aataccccaa aagccatcag cgaggaggag gaggaagtag atccaaacac
7201 acagaatcct aagtatatca ctgcagcctg tgagatggtg gcagaaatgg tggagtctct
7261 gcagtcggtg ttggccttgg gtcataaaag gaatagcggc gtgccggcgt ttctcacgcc
7321 attgctaagg aacatcatca tcagcctggc ccgctgccc cttgtcaaca gctacacacg
7381 tgtgccccca ctggtgtgga agcttggatg gtcacccaaa ccgggagggg attttggcac
7441 agcattccct gagatccccg tggagttcct ccaggaaaag gaagtcttta aggagttcat
7501 ctaccgcatc aacacactag gctggaccag tcgtactcag tttgaagaaa cttggggccac
7561 cctccttggg gtccctggga cgcagcccct cgtgatggag caggaggaga gccaccaga
7621 agaagacaca gagaggacc agatcaacgt cctggccgtg caggccatca cctcactggt
7681 gctcagtgca atgactgtgc ctgtggccgg caaccagct gtaagctgct tggagcagca
7741 gccccggaac aagcctctga aagctctcga caccaggttt gggaggaagc tgagcattat
7801 cagagggatt gtggagcaag agattcaagc aatggtttca aagagagaga atattgccac
7861 ccatcattta taccaggcat gggatcctgt cccttctctg tctccggtta ctacaggtgc
7921 cctcatcagc cacgagaagc tgctgtaca gatcaacccc gagcgggagc tggggagcat
7981 gagctacaaa ctccggccagg tgcataca ctccgtgtgg ctggggaaca gcatcacacc
8041 cctgaggagg gaggaatggg acgaggaaga ggaggaggag gccgacccc ctgcacctc
8101 gtcaccaccc acgtctccag tcaactccag gaaacaccgg cctggagttg acatccactc
8161 ctgttcgagc tttttgcttg agttgtacag ccgctggatc ctgccgtcca gctcagccag
8221 gaggaccccg gccatcctga tcagtggagt ggtcagatcc cttctagtgg tctcagactt
8281 gttcaccgag cgcaaccagt ttgagctgat gtatgtgacg ctgacagaac tgogaagggt
8341 gcacccttca gaagacgaga tcctcgtcga gtacctggtg cctgccacct gcaaggcagc
8401 tgccgtcctt gggatggaca aggccgtggc ggagcctgtc agccgcctgc tggagagcac
8461 gctcaggagc agccacctgc ccagcagggt tggagccctg cacggcgtcc tctatgtgct
8521 ggagtgcgac ctgctggacg aactgcca gacagctatc ccggtcatca ggcactatct
8581 cctctccaac ctgaaaggga tcgccactg cgtgaacatt cacagccagc agcacgtact
8641 ggtcatgtgt gccactgctg tttacctcat tgagaactat cctctggacg tagggccgga
8701 attttcagca tcaataatac agatgtgtgg ggtgatgctg tctggaagtg aggagtccac
8761 ccctccatc atttaccact gtgccctcag aggcctggag cgcctcctgc tctctgagca
8821 gctctcccgc ctggatgcag aatcgtggt caagctgagt gtggacagag tgaacgtgca
8881 cagcccgcac cgggccatgg cggctctggg cctgatgctc acctgcatgt acacaggaaa
8941 ggagaaagtc agtccgggta gaacttcaga ccctaactct gcagcccccg acagcgagtc
9001 agtgattggt gctatggagc gggatctgt tctttttgat aggatcagga aaggctttcc
9061 ttgtgaagcc agagtgggtg ccaggatcct gcccagttt ctgacgact tcttcccacc
9121 ccaggacatc atgaacaaag tcatcggaga gtttctgtcc aaccagcagc cataccccca
9181 gttcatggcc accgtggtgt ataaggtgtt tcagactctg cacagcaccg ggcagtcgtc
9241 catggtccgg gactgggtca tgctgtccct ctccaacttc acgcagaggg ccccggtcgc

9301 catggccaag tggagcctct cctgcttctt tgtcagcgcg tccaccagcc cgtgggtcgc
9361 ggcgatcctc ccacatgtca tcagcaggat gggcaagctg gagcagggtg acgtgaacct
9421 tttctgcctg gtcgccacag acttctacag acaccagata gaggaggagc tcgaccgcag
9481 ggcttccag tctgtgcttg aggtggttg agccccagga agccatatac accggctgct
9541 gacttgttta cgaaatgtcc acaaggtcac cacctgctga gcgccatggt gggagagact
9601 gtgaggcggc agctggggcc ggagcctttg gaagtctgcg cccttgtgcc ctgcctccac
9661 cgagccagct tggtcctat gggcttccgc acatgccgcg ggcggccagg caacgtgctg
9721 gtctctgcca tgtggcagaa gtgctctttg tggcagtggc caggcagggg gtgtctgcag
9781 tcctggtggg gctgagcctg aggccttcca gaaagcagga gcagctgtgc tgcaccccat
9841 gtgggtgacc aggtccttct tctgatagt cacctgctgg ttggtgccag gttgcagctg
9901 ctcttgcatc tgggccagaa gtccctcctc ctgcaggctg gctgttgcc cctctgctgt
9961 cctgcagtag aagggtccgt gagcaggctt tgggaacact ggcctgggtc tccctggtgg
10021 ggtgtgcatg ccacgccccg tgtctggatg cacagatgcc atggcctgtg ctgggccagt
10081 ggctgggggt gctagacacc cggcaccatt ctcccttctc tcttttcttc tcaggattta
10141 aaatttaatt atatcagtaa agagattaat tttaacgtaa ctctttctat gccctgtaa
10201 agtatgtgaa tcgcaaggcc tgtgctgcat gcgacagcgt ccggggtggt ggacagggcc
10261 cccggccaag ctccctctcc tgtagccact ggcatagccc tcctgagcac ccgctgacat
10321 ttccgttgta catgttctg tttatgcatt cacaaggtga ctgggatgta gagaggcgtt
10381 agtgggcagg tggccacagc aggactgagg acaggcccc attatcctag ggggtgcctc
10441 acctgcagcc cctcctcctc gggcacagac gactgtcgtt ctccaccac cagtcaggga
10501 cagcagcctc cctgtcactc agctgagaag gccagccctc cctggctgtg agcagcctcc
10561 actgtgtcca gagacatggg cctcccactc ctgttctctg ctagccctgg ggtggcgtct
10621 gcctaggagc tggctggcag gtgttgggac ctgctgctcc atggatgcat gccctaagag
10681 tgtcactgag ctgtgtttt tctgagcctc tctcggtaa cagcaaagct tgggtgtctg
10741 gactgttag tgacagagcc cagcatccct tctgccccg tccagctga catcttgac
10801 ggtgaccct tttagtcagg agagtgcaga tctgtgctca tcggagactg ccccaaggcc
10861 ctgtcagagc cgcactcct atccccaggc caggctcctg gaccagcctc ctgtttgag
10921 gcccagagga gccaaatcat taaaatggaa gtggattctg gatggccggg ctgctgctga
10981 tgtaggagct ggatttggga gctctgcttg ccgactggct gtgagacgag gcaggggctc
11041 tgcttctca gccctagagg cgagccaggc aaggttggcg actgtcatgt ggcttggttt
11101 ggtcatgccc gtcgatgtt tgggtattga atgtggtaag tggaggaaat gttggaactc
11161 tgtgcaggtg ctgccttgag accccaagc ttccacctgt ccctctccta tgtggcagct
11221 ggggagcagc tgagatgtgg acttgtatgc tgcccacata cgtgagggg agctgaaagg
11281 gagcccctc tctgagcagc ctctgccagg cctgtatgag gcttttcca ccagctcca
11341 acagaggcct cccccagca ggaccacctc gtccctcgtg cggggcagca ggagcggtag
11401 aaaggggtcc gatgtttgag gaggccctta agggaagcta ctgaattata acacgtaaga
11461 aatcaccat tccgtattgg ttgggggctc ctgtttctca tcctagcttt ttctggaaa
11521 gcccgtaga aggttggga acgaggggaa agttctcaga actgttggtc gctccccacc
11581 cgctccgc ctccccgca ggttatgtca gcagctctga gacagcagta tcacaggcca
11641 gatgttgctc ctggctagat gtttacattt gtaagaaata aactgtgaa tgtaaacag
11701 agccattccc ttggaatgca tatcgtggtg ctcaacatag agtttgtctt cctctgttt

```

11761 acgacgtgat ctaaaccagt ccttagcaag gggctcagaa caccocgctc tggcagtagg
11821 tgtccccac ccccaaagac ctgectgtgt gctccggaga tgaatatgag ctcatagta
11881 aaaatgactt caccacgca tatacataaa gtatccatgc atgtgcatat agacacatct
11941 ataattttac acacacacct ctcaagacgg agatgcatgg cctctaagag tgcccggtgc
12001 ggttcttctt ggaagttgac tttccttaga cccgccaggt caagttagcc gcgtagcggg
12061 catccaggcg tgggacgtgg tcagggcagg gctcattcat tgcccactag gatcccactg
12121 gcgaagatgg tctccatata agctctctgc agaagggagg aagactttat catgttctta
12181 aaaatctgtg gcaagcacc atcgtattat ccaaattttg ttgcaaagt gattaatttg
12241 gttgtcaagt tttgggggtg ggctgtgggg agattgcttt tgttttctctg ctggtaatat
12301 cgggaaagat tttaatgaaa ccagggtaga attgtttggc aatgactga agcgtgtttc
12361 tttccaaaaa tgtgcctccc ttccgctgcg ggcccagctg agtctatgta ggtgatgttt
12421 ccagctgcca agtgctcttt gttactgtcc accctcattt ctgccagcgc atgtgtcctt
12481 tcaaggggaa aatgtgaagc tgaacccctt ccagacacc agaatgtagc atctgagaag
12541 gccctgtgcc ctaaaggaca ccctcgcgcc ccatcttcat ggagggggtc atttcagagc
12601 cctcggagcc aatgaacagc tcctcctctt ggagctgaga tgagccccac gtggagctcg
12661 ggacggatag tagacagcaa taactcgggtg tgtggccgcc tggcaggtgg aacttctctc
12721 cgttgccggg tggagtgagg ttagttctgt gtgtctggtg ggtggagtca ggcttctctt
12781 gctacctgtg agcatccttc ccagcagaca tcctcatcgg gctttgtccc tccccgctt
12841 cctccctctg cggggaggac ccgggaccac agctgctggc cagggtagac ttggagctgt
12901 cctccagagg ggtcacgtgt aggagtgaga agaaggaaga tcttgagagc tgctgagggg
12961 ccttgagagc ctcaggatgg ctcagacgag gacctcgtt tgccgggctt gggcctcctg
13021 ggaaggaggg agctgctcag aatgccgcat gacaactgaa ggcaacctgg aaggttcagg
13081 ggccgctctt ccccatgtg cctgtcacgc tctggtgcag tcaaaggaac gccttccctt
13141 cagttgtttc taagagcaga gtctccgctt gcaatctggg tggttaactgc cagccttggg
13201 ggatcgtggc caacgtggac ctgcctacgg aggtgggctt ctgaccaag tggggcctcc
13261 ttgtccaggt ctactgctt tgcaccgtgg tcagagggac tgtcagctga gcttgagctc
13321 ccctggagcc agcagggctg tgatgggcca gtcccggagc cccaccaga cctgaatgct
13381 tctgagagca aagggaagga ctgacgagag atgtatattt aattttttaa ctgctgcaaa
13441 cattgtacat ccaaattaa gaaaaaaat ggaaaccatc aaaaaaaaaa aaaaaaaaa

```

[0713] SEQ ID NO:5 人类HTT蛋白序列

```

1 matleklmka feslksfqqq qqqqqqqqqq qqqqqqqqqq pppppppppp pqlpqpqpqa
61 qpllpqpqp pppppppppp avaeplhrp kkelsatkkd rvnhcltice nivaqsvrns
121 pefqkllgia melflcsdd aesdvrnvad eclnkvikal mdsnlprlql elykeikkng
181 aprslraalw rfaelahlvr pqkcrpylvn llpcltrtsk rpeesvqetl aaavpkimas
241 fgnfandnei kvllkafian lkssstirr taagsavsic qhsrrtqyfy swllnvllgl
301 lvpvedehst llilgvlltl rylvplllqq vkdtslkgsf gvtrkemevs psaeqlvqvy
361 eltlhhtqh q dhnvvtgale llqqlfrtpp pellqtltav ggigqltaak eesggrsrsg
421 sivealiagg sscspvlrk qkgkvllgee ealedsesr sdvsssalta svkdeisgel
481 aassgvstpg saghdiiteq prsqhtlqad svdlascldt ssatdgeded ilshsssqs
541 avpsdpamd l ndgtqasspi sdssqtteq pdsavtpps seivldgtdn qylglqigqp
601 qdedeatgi lpdeaseafr nssmalqqah llknmshcrq psdssvdkfv lrdeatepgd

```

661 qenkcprkig digqstddds aplvhcvrll sasflltgk nvlvpdrdvr vsvkalalsc
721 vgaavalhpe sffsklykvp ldtteypeeq yvsdilnyid hgdpqvrqat ailcgtlics
781 ilsrsrfhvg dwmgtirtlt gntfsladci pllrltkde ssvtcklact avrncvmslc
841 sssyselglq liidvltlrn ssywlvrteletlaeidfr lvsfleakae nlhrghahyt
901 gllklqervl nnvvihlldg edprvrhvae aslirlvpkl fykcdqgqad pvvavardqs
961 svylklmhe tppshfsvs titriyrgyn llpsitdvtm ennlsviaa vshelitstt
1021 raltfgcea lcllstaftp ciwslgwhcg vpplsasdes rksctvgmat miltllssaw
1081 fpldlsahqd alilagnlla asapkslrss waseeeanpa atkqeevwa lgdralvpmv
1141 eqlfshllkv inicahvldd vapgaikaa lpsltnppsl spirrkgek egeqasvpl
1201 spkkgseasa asrqsdtsgp vttskssslg sfyhlpsylk lhdvdkatha nykvtldlqn
1261 stekfggflr saldvlsql elatlqdigk cveeilgyk scfsrepmma tvcvqqlkt
1321 lfgtnlasqf dglssnpsks qgraqlgss svrpglyhyc fmapsyhtq aladaslrnm
1381 vqaeqendts gwfdvlqkvs tqktnltsv tknradknai hnhirlfepl vikalkqytt
1441 ttcvqlqkv ldllaqlvql rvnyclldsd qvfigfvlkq feyievgqfr eseaiipnif
1501 fflvllsyer yhskqiigip kiiqlcdgim asgrkavtha ipalqipvhd lfvrlrgtnka
1561 dagkeletqk evvvsmlrl iqyhqvlemf ilvlqqchke nedkwkrlsr qiadiilpml
1621 akqgmhidsh ealgvntlf eilapsslrp vdmllrsmfv tpntmasvst vqlwisgila
1681 ilrvlisqst edivlsriqe lsfspylisc tvinrlrdgd ststleehse gkqiknlpee
1741 tfsrllqlv gilledivtk qlkvemseqq htfcyqelgt llmclihifk sgmfrritaa
1801 atrlfrsdgc ggsfytdsl nlrarsmitt hpalvllwcq illlvnhtdy rwwaevqgtp
1861 krhslsstkl lspqmsgeee dsdlaaklgn cnreivrrga lilfcdyvcq nlhdsehlw
1921 livnhiqdli slsheppvqd fisavhrnsa asglfiqaiq srcenlstpt mlkktlqcle
1981 gihlsqsgav ltlyvdrllc tpfrvlarmv dilacrrvem llaanlqssm aqlpmeelnr
2041 iqeylqssgl aqrhqrlysl ldrfrlstmq dslspspvvs shpldgdghv sletvspdkd
2101 wyvhlvksqc wtrsdalle gaelvnripa edmnafmms efnslapc lslgmseisg
2161 gqksalfeaa revtlarvsg tvqqpavhh vfqpelpaep aaywsklndl fgdaalyqsl
2221 ptlaralagy lvvvsklpsh lhlppekekd ivkfvvatle alswhliheq ipslsdlqag
2281 ldccclalql pglwsvsst efvthacsli ycvhfileav avqpgeqls pertrntpka
2341 iseeeee vdp ntqnpkyita acemvaemve slqsvlalgh krnsgvpafll tpllrniis
2401 larlplvnsy trvpplvwkl gwspkpggdf gtafpeipve flqekevfke fiyrintlgw
2461 tsrtqfeetw atllgvlvtq plvmeqeesp peedttertqi nvlavqaits lvlsamtvpv
2521 agnpavscle qqprnkplka ldtrfgrkls iirgiveqei gamvskreni athhlyqawd
2581 pvpslspatt galishekll lqinperelg smsyklgqvs ihsvwlgnsi tplreeewde
2641 eeeeeadapa psspptsavn srkhragvdi hscsqfllel ysrlwlpss artpailis
2701 evvrsllvvs dlfternqfe lmyvtlrel rvhpsedeil aqylvpatck aaavlgmdka
2761 vaepvsrllc stlrsshlpv rgalgvly vlecdlldt akqlipvisd yllsnlkgia
2821 hcvnihsqqh vlvmcatafy lienypdv pefsasiqm cgvmisgsee stpsiiyhca
2881 lrglerllls eqslrldaes lvklsvdrvn vhsphramaa lglmltcmty gkekvspgrt
2941 sdpnpaapds esvivamerv svlfdirkq fpcearvvar ilpqflddff ppqdimnkvi
3001 geflsnqqpy pqfmatvvyk vftlhstgq ssmvrdwvml slsntqrap vamatwslsc
3061 ffvsastspw vaailphvis rmgleqvvd nlfclvatdf yrhqieeeld rrafqsvlev
3121 vaapgsphyrltclrnvhk vtte

[0714] SEQ ID NO:109;经密码子优化的CYP46A1序列(SEQ ID NO:110)的翻译

MSPGLLLLGSVLLAFGLCCTFVHRARSRYEHIPGPPRPSFLLGHLPCFWKKDEVGGRVLQDVFLDWAKKYGPVV
 RVNVFHKTSVIVTSPESVKKFLMSTKYNKDSKMYRALQTVFGERLFGQGLVSECNYERWHKQRRVIDLAFSRSSL
 VSLMETFNEKAEQLVEILEAKADGQTPVSMQDMLTYTAMDILAKAAFGMETSMLLGAQKPLSQAVKLMLEGITAS
 RNTLAKFLPGKRKQLREVRESIRFLRQVGRDWVQRRREALKRGEVVPADILTQILKAEEGAQDDEGLLDNFVTFE
 IAGHETSANHLAFTVMELSRQPEIVARLQAEVDEVI GSKRYLDFEDLGRQLSQVLKESLRLYPPAWGTRFLE
 EETLIDGVRVPGNTPLLFSTYVMGRMDTYFEDPLTFNPDRFGPGAPKPRFTYFFSLGHRSCIGQQFAQMEVKVV
 MAKLLQRLEFRLVPGQRFGLEQATLKLPLDPVLCCLRPRGWQPAPPPPPC

[0715] SEQ ID NO:110;经密码子优化的CYP46A1 CDS

atgagccccgggctgctgctgctcggtagcgcgctcctgctcgccttcggcctctgctgcaccttcgtgcaccgc
 gctcgcagccgctacgagcacatccccgggcccgcgcccagtttccttctaggacacctcccctgcttttgg
 aaaaaggatgaggttggggccgctgctccaagatgtgttCtAgattgggctaagaagtatggacctgtAgtg
 cgggtcaactcctccacaaaacctcagtcacgtcagcagctcctgagtcggttaagaagttcctgatgtcaacc
 aagtacaacaaggactccaagatgtaccgtgcgctccagactgtgtttggtgagagactcttcggccaaggcttg
 gtgtccgaatgcaactatgagcgtggcacaagcagcggagagtGatagacctggccttcagccggagctccttg
 gttagcttaatggaaacattcaacgaAaaggctgagcagctggtggagattctagaagccaaggcagatgggag
 acccTgtGAGCatgcaggacatgctgacctacaccgcatggacatcctggccaaggcagcttttgggatggag
 accagtatgctgctgggtgccagaagcctctgtcccaggcagtgaaacttatgttgagggaatcactgcgtcc
 cgcaacactctggcaaagtccctgccagggaagaggaagcagctccgggaggtccgggagagcattcgcttcctg
 cgccaggtgggagggactgggtccagcgcgcccgggaagccctgaagaggggagggaggtcctgccgacatc
 ctcacacagattctgaaagctgaagagggagcccaggacgacgagggctctgctggacaacttcgtcaccttctc
 attgctggtcagcagacctctgccaaccacttggcgcttcacagtgatggagctgtctgccagccagagatcgtg
 gcaaggctgcaggccgaggtggatgaAgtGattggttctaagaggtacctggatttcgaggacctgggagactg
 cagtacctgtcccaggtcctcaaagagtcgctgaggtgtaccaccagcatggggcacctttAGGctgctggaa
 gaggagaccttgattgatggggGagagtccccggcaacaccccgctctgttcagcacctatgtGatggggcgg
 atggacacatactttgaggaccgctgactttcaacccgatcgcttcggccctggagcaccacaagccaggttc
 acctactccccttctccctgggcccaccgctcctgcatcgggcagcagtttctcagatggaggtgaaggtggtc
 atggcaaaagctgctgcagaggctggagttccggctggtgccgggagcagccttcgggctgcaggagcaggccaca
 ctcaagccactggaccccgctgctgtgcacctgcccggcccgctggcagcccgcacccccacccccctgc

[0716] SEQ ID NO:194;dbDNA_CYP46A1

gcgtataatggactattgtgtgctgataTctgtacacttaagggetagatcttagcttacgtcactagagggctcc
 acgttttagttttaagatccattgatctcctaaacgctgcaagattcgcaacctggatacttagcctaggcgt
 aggtcctagtgacagcgggacttttttctaaagtctgttgagaggaggagtcgacagaccagatagctttgatgtc
 ctgatcggaaaggatcgttggccccCCTGCAGGCAGCTGTTAATTAAGTGCAGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC
 CCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGGGAGT
 GGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCATGCTACTTATCTACGGCGGCCacgc
 gtgactagttattaatagtaataattacggggctcattagttcatagccatatatggagttccgcttacataa
 cttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccc
 atagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatattacggtaaactgccacttggcagta

catcaagtgtatcatatgccaaagtaacccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccccctggcattatgcc
 cagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatggctgag
 gtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctcccccccccccccaattttgtatttatttttttt
 taattattttgtgacgagcgtggggggcgggggggggggggcgcgccagggcgggggcgggggcgagggggc
 gggggcgggcgagggcgagaggtgcgggcgagccaatcagagcgggcgctccgaaagtctcttttatggcga
 gggggcgggcgggcgccctataaaaagcgaagcgcgggcggggggagtcgctgcgcgctgccttcgccccg
 tggccccctccgccccgctcgcgccccgccccggctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcgggc
 gggagggcccttctcctccgggctgtaattagcgttggtttaatgacggcttgtttctttctgtggtgctg
 aaagccttgaggggctccgggagggccctttgtgcggggggagcggtcggggggtgctgctgctgtgtgtgctg
 tggggagcgccgctgctgctccgctgctgccccgggctgtgagcgtgcgggcgggcggggctttgtgctg
 tccgcagtgctgaggggagcgcgggcgggggcggtgccccgggtgcggggggggctgaggggaaacaaag
 gctgctgcggggtgtgtgctggtgggggtgagcaggggtgtggcgctgctgctgggctgcaacccccctgc
 accccccctccccgagttgctgagcacggccccgcttccgggtgcggggctccgtacggggcgtggcggggctcg
 ccgtgccccgggggggtggcgccaggtgggggtgccccggggcggggccccctcgggccggggagggctcgg
 gggagggcgcgggcgccccggagcgccgggctgtcgagggcgggcgagccgcagccattgccttttatggt
 aatcgctgagagggcgagggacttctttgtccaaatctgtgaggagccgaaatctgggagggcgcccgca
 cccccctagcggggcgggggcgaagcgtgcgggcgccggcaggaaggaaatgggggggagggccttcgtgctg
 cgccgccccgctcccccttctcctctccagcctcggggctgctccgccccgggagcggtgccttcgggggggac
 ggggacaggggggttctgcttctgctgctgaccggcggtctagagcctctgctaaccatgttcatgccttct
 tcttttctacagctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgctcatcattttggcaagaattgattaatt
 cgagcgaacgcgctcagctcgtcggtagcatttaaattgaattccttaagctatcataggaatgagccccgggct
 gctgctgctcggtagcggctcctgctcgccttcggcctctgctgcaccttcgtgcaccgctcgcagccgcta
 cgagcacatccccgggccccgccccagtttctcttaggacacctccccctgcttttgaaaaaggatgaggt
 tgggtggcgtgctccaagatgtgttCtAgattgggctaagaagtatggacctgtAgtgcggtcaacgtctt
 ccacaaaacctcagtcacgtcagctcctgagtcggtaagaagttcctgatgtcaaccaagtaacaagga
 ctccaagatgtaccgtgctccagactgtgttggtagagactcttcggccaaggttgggtgccaatgcaa
 ctatgagcgtggcacaagcagcggagagtGatagacctggccttcagccggagctccttggttagcttaatgga
 aacattcaacgaAaaggctgagcagctggtggagattctagaagccaaggcagatgggcagaccccTgtGAGCat
 gcaggacatgctgacctacaccgcatggacatcctggccaaggcagcttttgggatggagaccagtatgctgct
 ggggtgccagaagcctctgctcccaggcagtgaaacttatgttggagggaaatcactgctcccgaacactctggc
 aaagttcctgccagggaaaggaagcagctccgggaggtccgggagagcattcgcttctgccccaggtgggag
 ggactgggtccagcgccgccccggaagcctgaagagggcgaggggttctgccccgacatcctcacacagattct
 gaaagctgaagagggagccccaggacgaggggtctgctggacaacttcgtcaccttcttcatgctggtcacga
 gacctctgccaaccacttggcgttcacagtgatggagctgtctcgccagccagagatcgtggcaaggctgcaggc
 cgaggtggatgaAgtGattggttctaagaggtacctggatttcaggagacctggggagactgcagtaacctgtcca
 ggtcctcaaagagtcgctgaggtgtaccaccagcagtggggcaactttAGGctgctggaagaggagacctgat
 tgatggggGagagtccccggcaacccccgctcttgttcagcacctatgtGatggggcggtggacacatactt
 tgaggaccgctgactttcaaccccgatcgttccggcctggagcaccacaagccaaggttcacctacttccccct
 ctccccggccaccgctcctgcatcgggcagcagtttctcagatggaggtgaaggtggtcatggcaagctgct
 gcagaggtggagttccggctggtgccccggcagcgcttccggctgcaggagcagggccacactcaagccactgga
 cccccgtgctgacacctgcccccggtggcagcccccaacccccctgctgagtgatagctt

gtaccgagctcgatccaattgcaatgatcatcatgacagatctgcgcgatcgatatcagcgctttaattgc
gcatgcagctatagttctagagggccctattctatagtggtcacctaaatgctagagctcgctgatcagcctcgac
tgtgccttctagttgccagccatctggtgtttgcccctccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcc
cactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtg
ggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctgggatgcggtgggctctatggg
tttaaacGCGGCCGCTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG
GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCCGGCTTTGCC
CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGTTAATTAAGGCGCCctaggccgacccttagactctgtactcag
ttctataaacgagccattggatacgagatccgtagattgataagggacacggaatatccccggacgcaatagaca
ccggtggacagcttggtatcctgagcacagtcgcgcggtccgaatctagctctacttttagaggccccggattctga
tggtcgtagaccgcagaaccgattggggggatgagatctactagttatcagcacacaattgccattatacgc

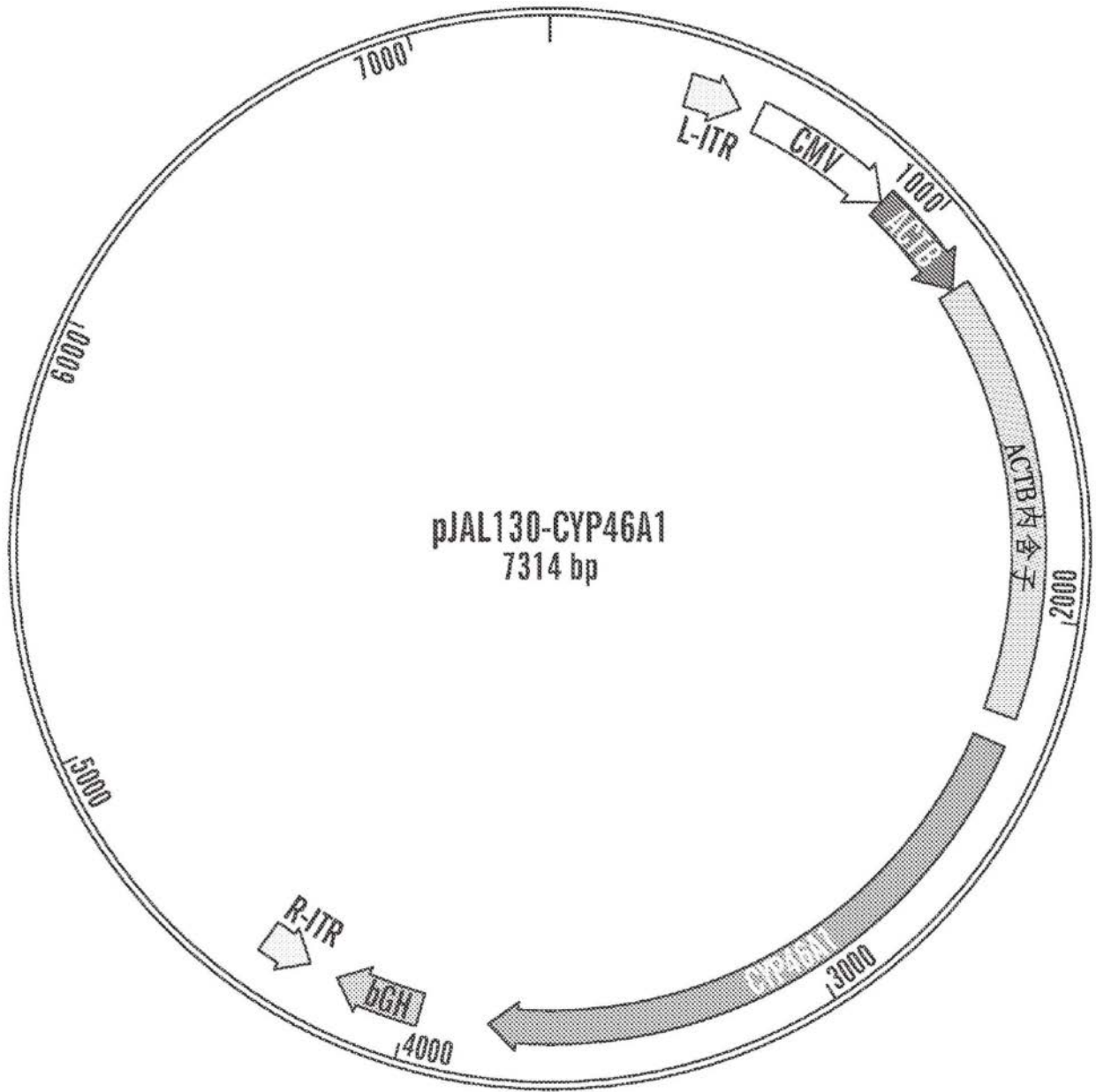


图1

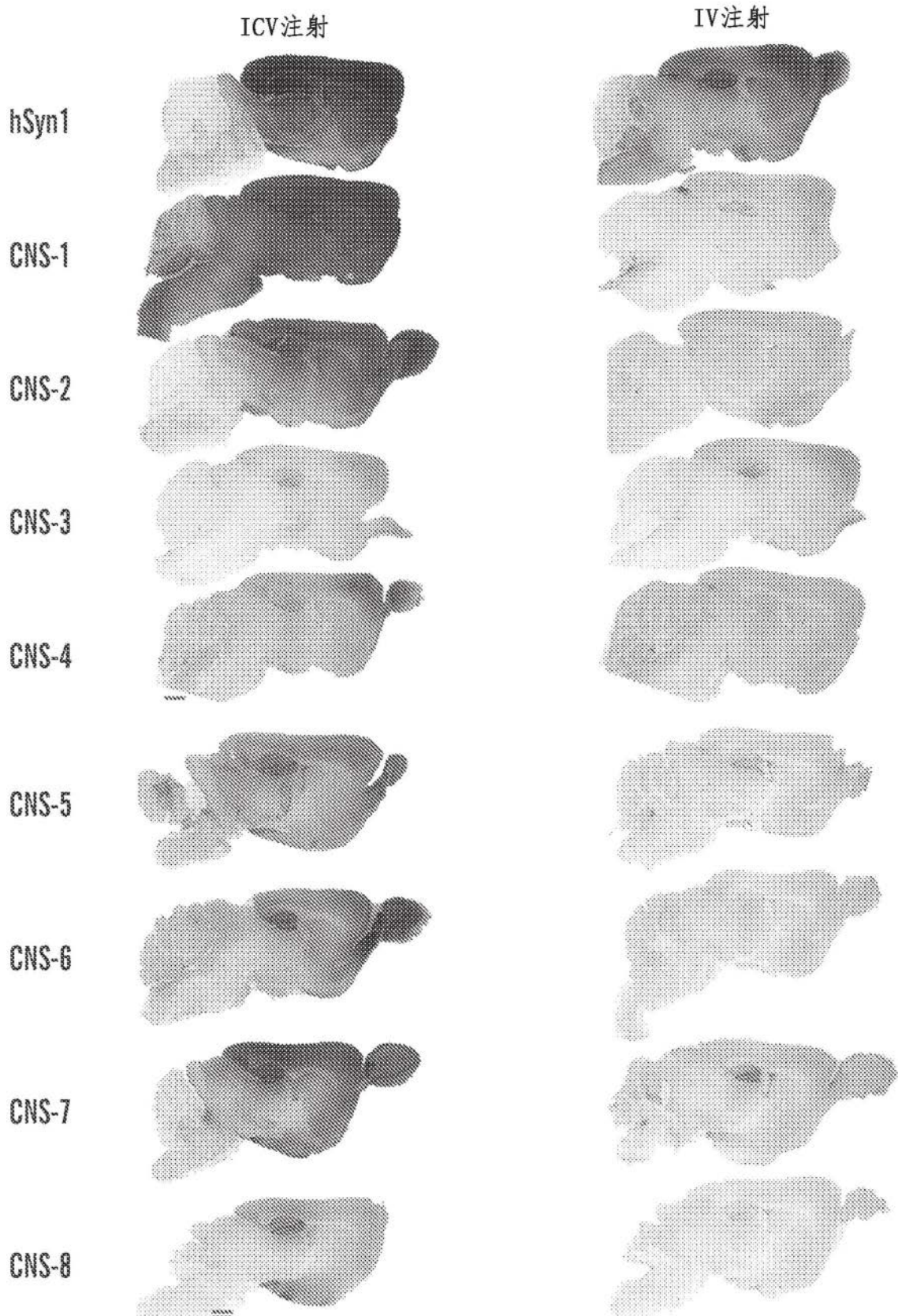


图2

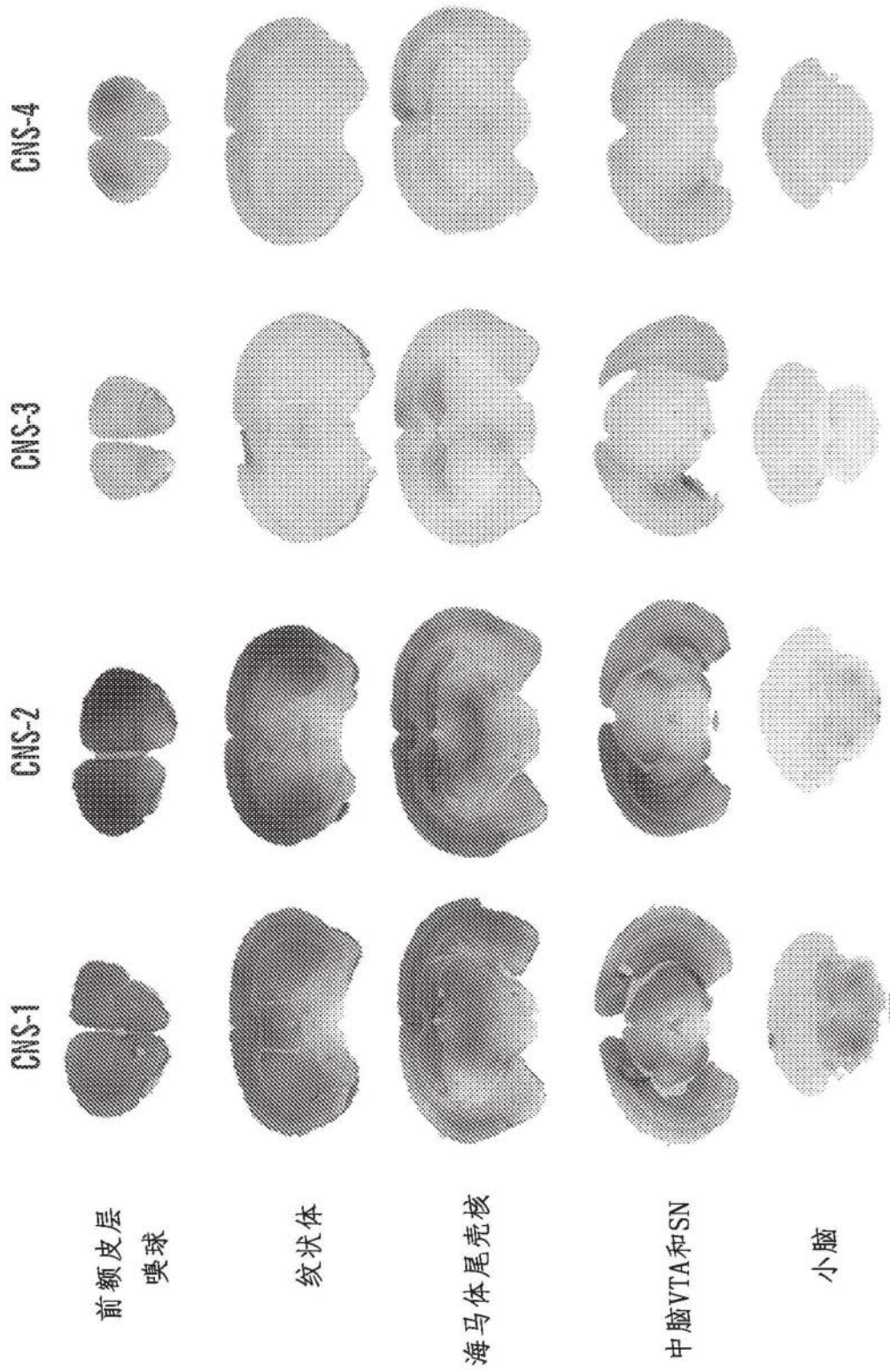


图3A

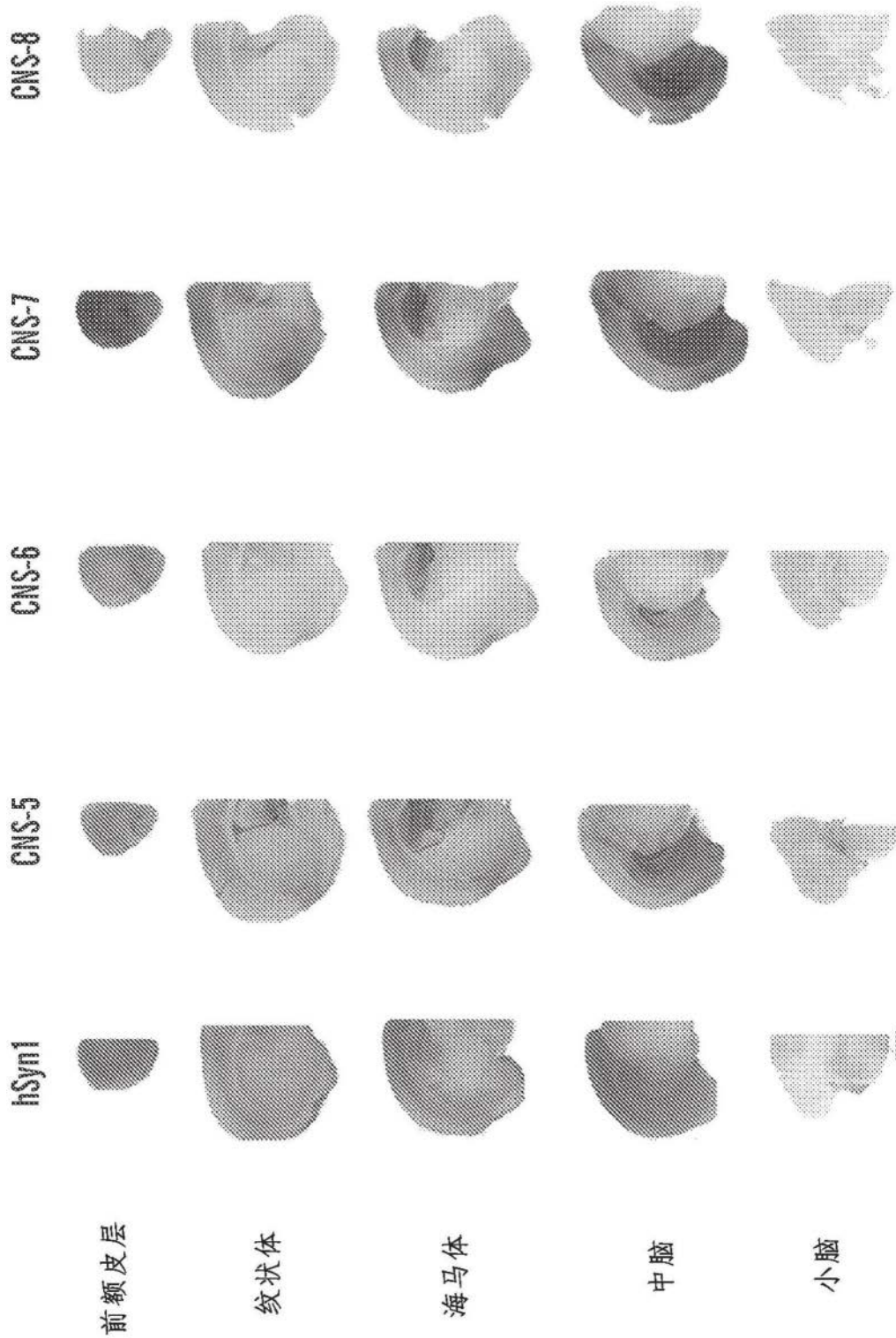


图3B

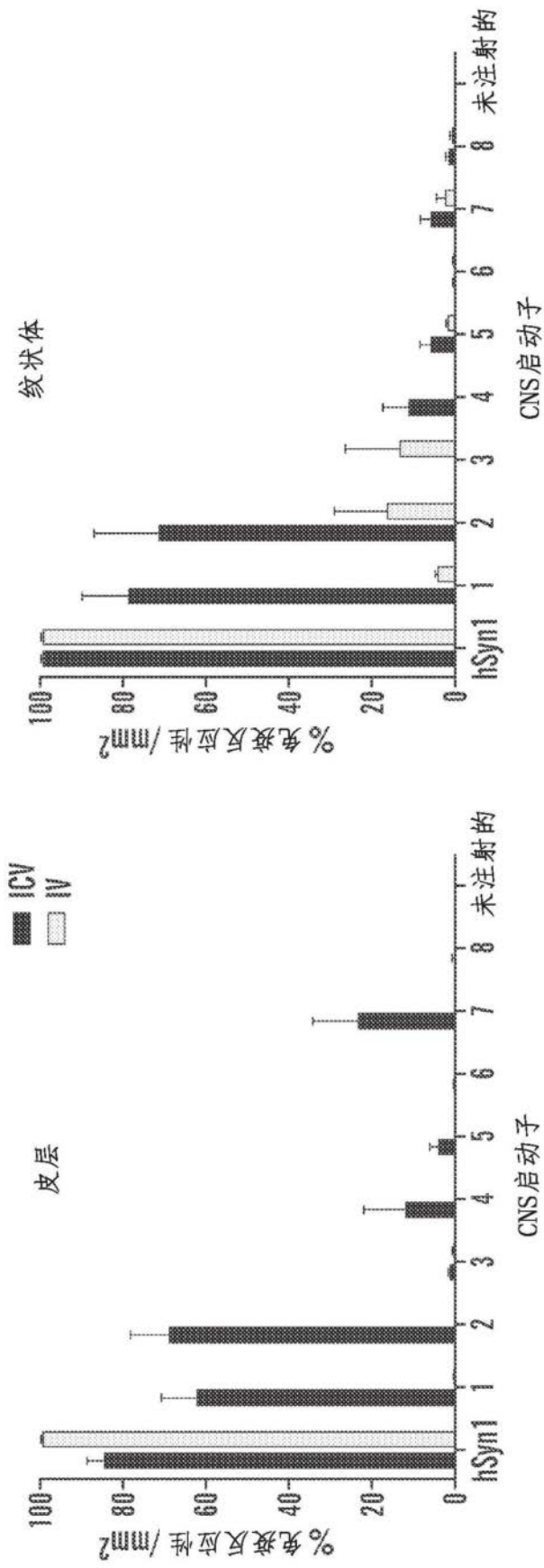


图4

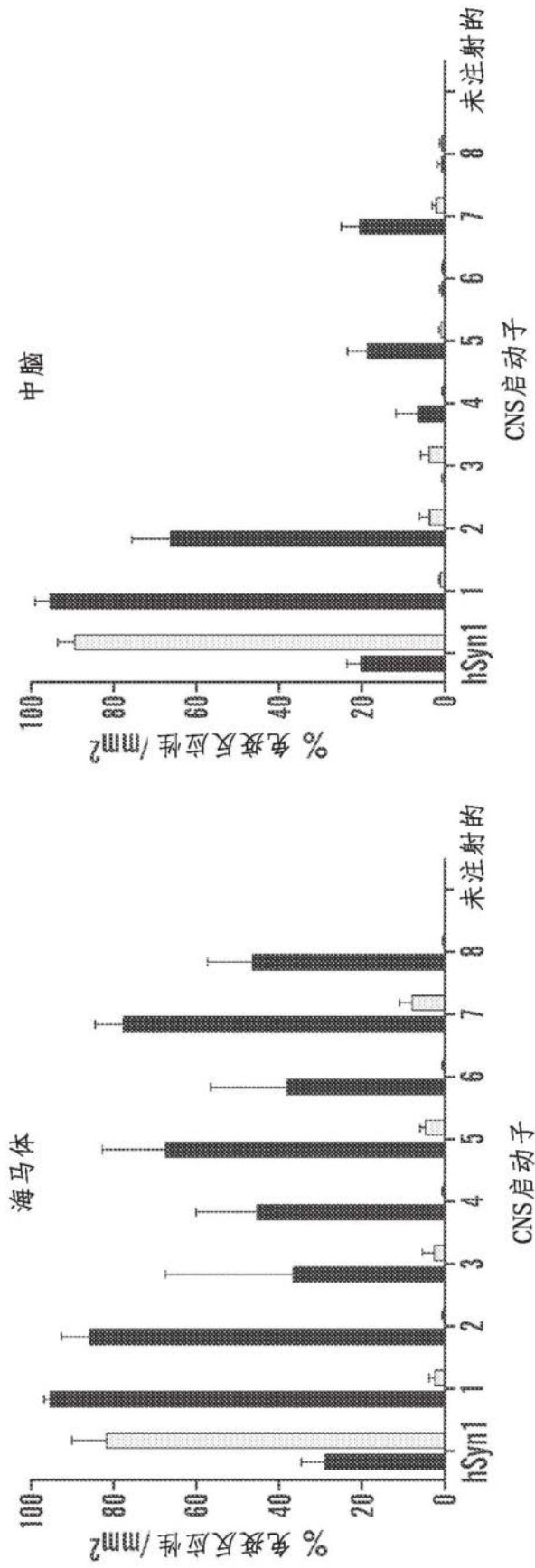


图4 (续)

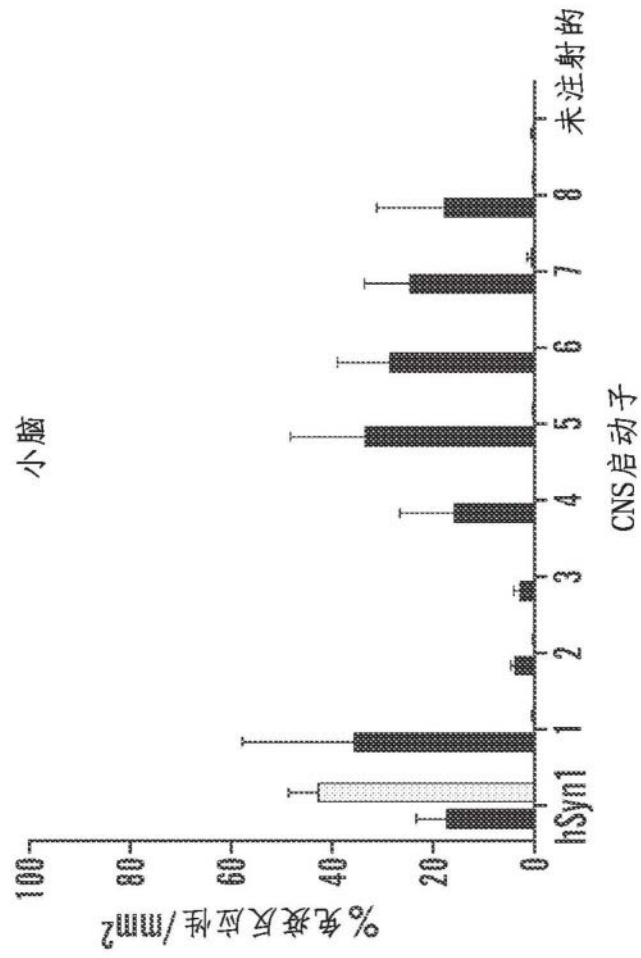


图4(续)

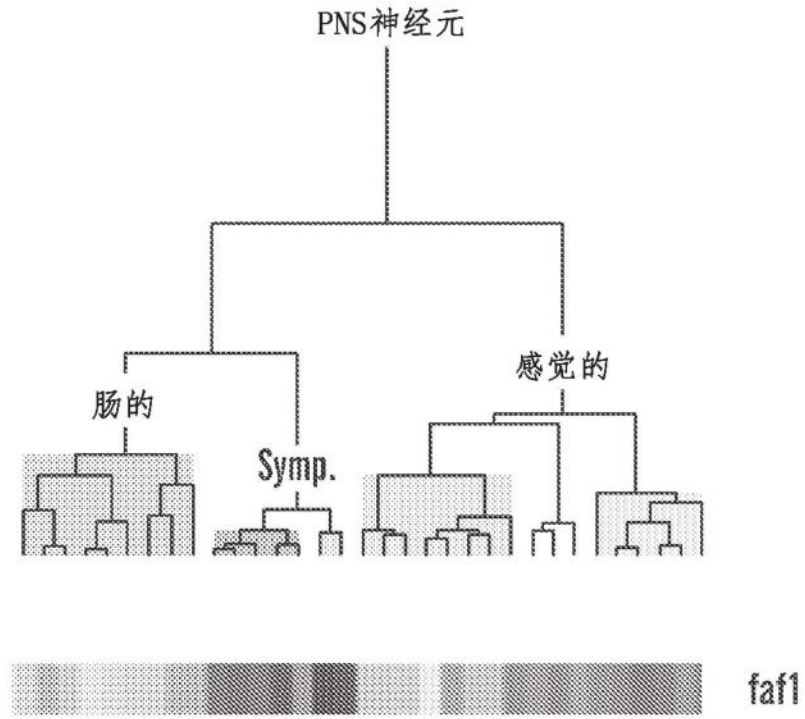


图5A

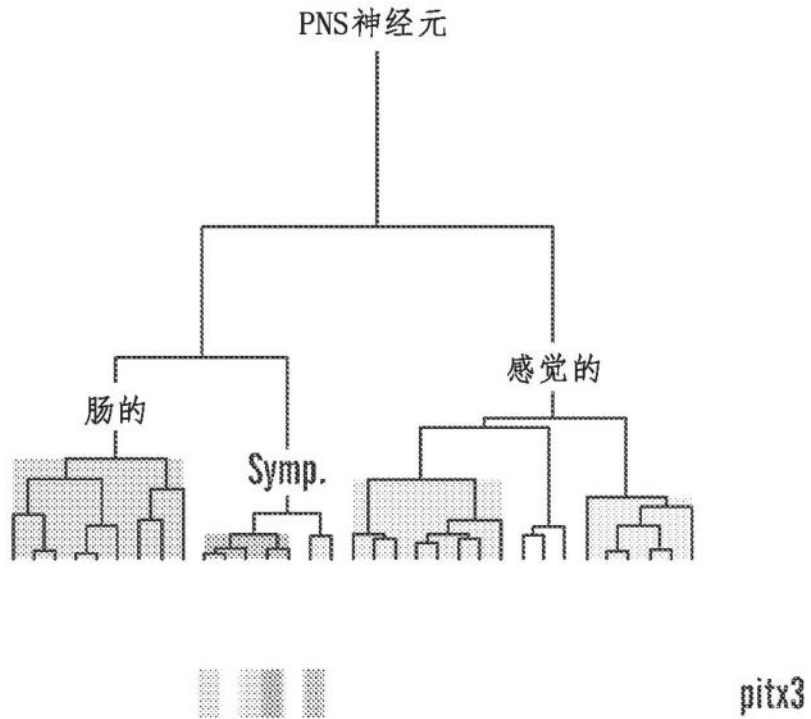


图5B

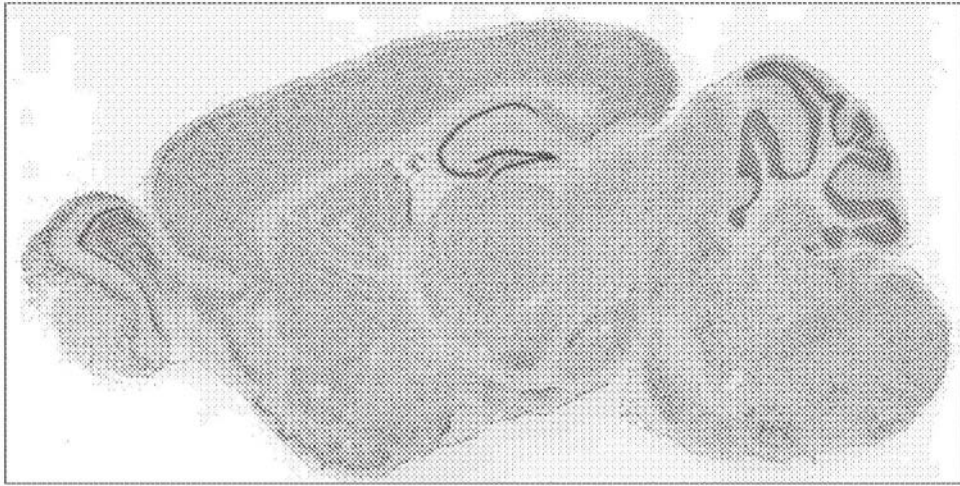


图6A

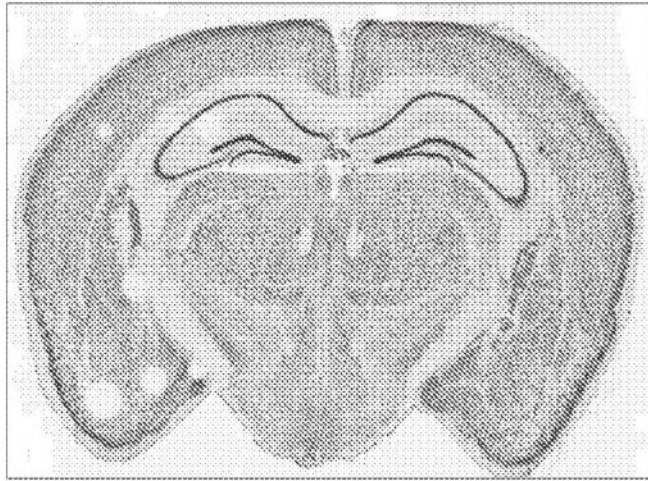


图6B

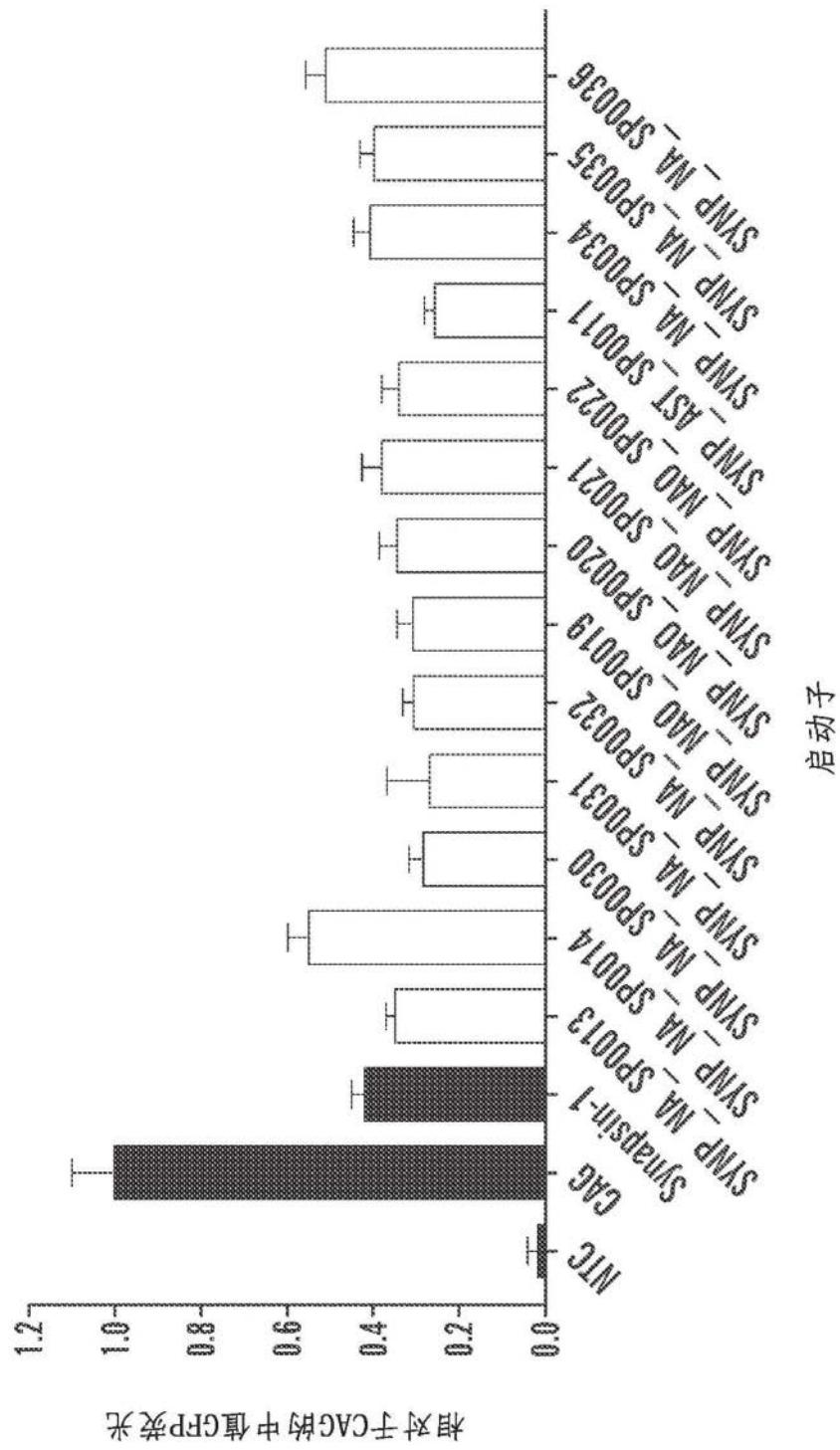


图7A

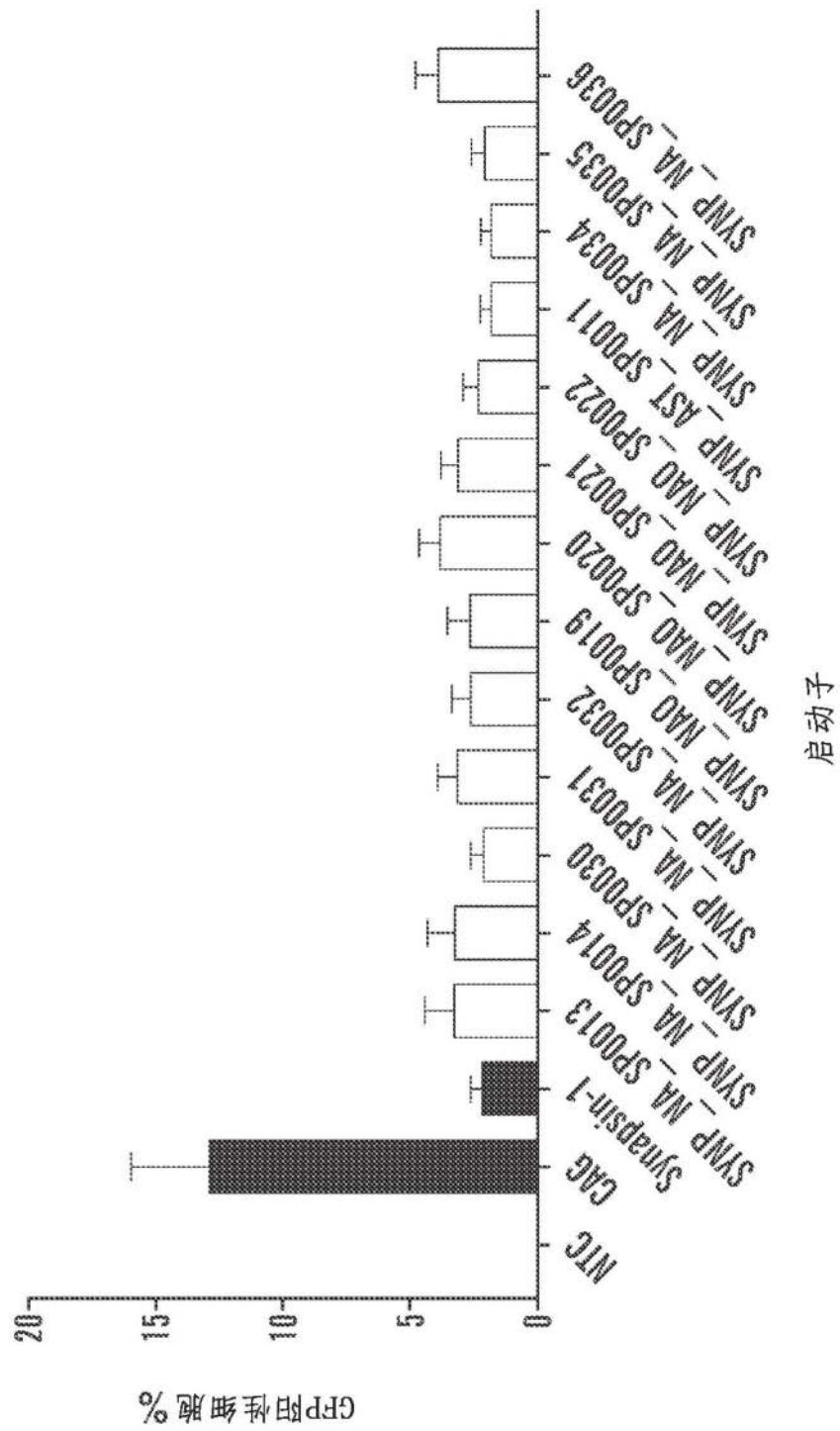


图7B

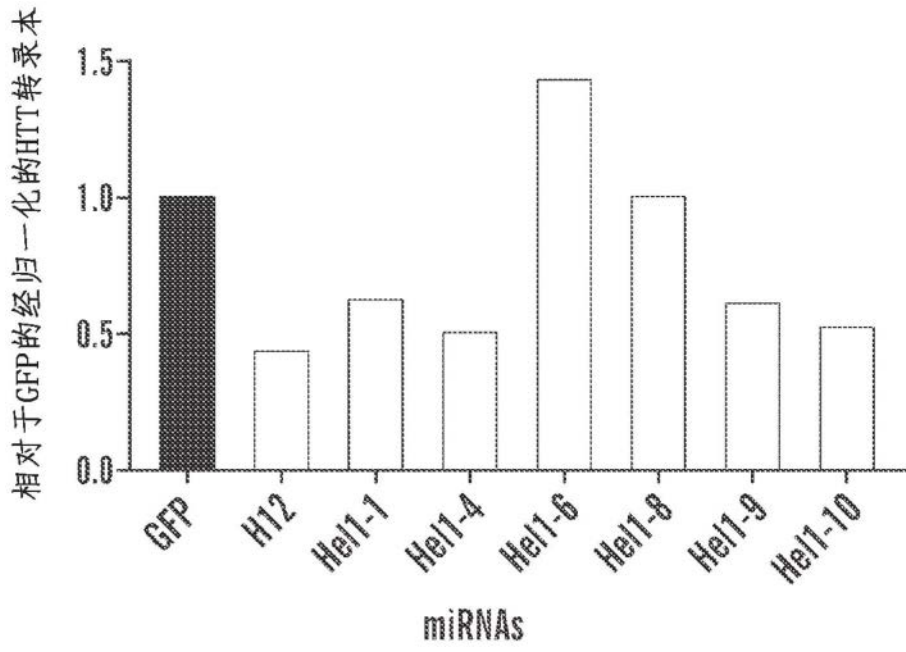


图8

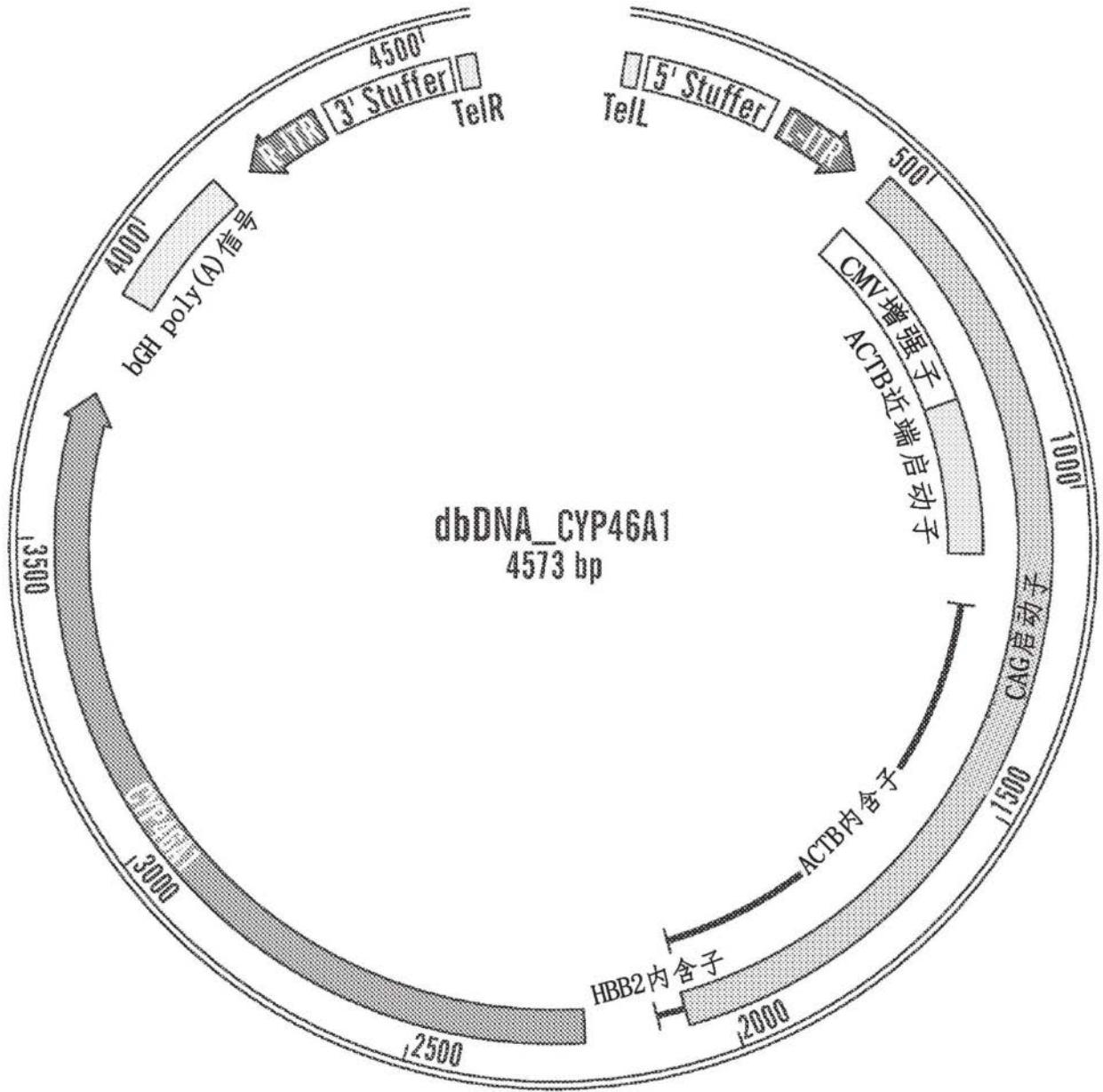


图9