(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119343455 A
(43)申请公布日 2025.01.21

(21)申请号 202380029723.1

(22)申请日 2023.01.31

(30)优先权数据
63/304,960 2022.01.31 US
63/312,480 2022.02.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/061702 2023.01.31

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/147604 EN 2023.08.03

(71)申请人 特拉梅斯生物股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 安纳希塔·克拉瓦拉

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 张文辉

(51)Int.Cl.
C12N 15/85(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)

权利要求书10页 说明书94页
序列表（电子公布） 附图12页

(54)发明名称

用于治疗癫痫和神经性疼痛的表达盒

(57)摘要

本公开提供用于在细胞例如神经元中表达转基因的表达盒、载体和方法。还提供在神经元细胞中实现转基因的期望表达水平的方法，例如，用于与小分子配体组合以治疗局灶性癫痫或神经性疼痛。

盒#	SEQ ID NO:	5' 增强子	非翻译元件	启动子	内含子	5'UTR	内含子	转基因	3' 增强子	3'UTR	PolyA
1	71	CMV		mMecp2			hTPI	CODA-R	FullEES		rβ球蛋白
2	72	CMV		mCaMKIIa		mCaMKII	TPL+eMLP	CODA-R	FullEES		rβ球蛋白
3	73	CMV		hSyn		hSyn	hTPI	CODA-R	FullEES		rβ球蛋白
4	74	CMV		hMecp2			TPL+eMLP	CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
5	75	CMV		hCaMKIIa		hCaMKII	TPL+eMLP	CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
6	76	CMV		by海绵蜂			TPL+eMLP	CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
7	77	CMV	NRSE	cβ肌动蛋白	cβAct+rGlob	rGlob		CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
8	78	CMV		hPDGFβ			hSyn	CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
9	79	CMV		mMecp2			hSyn	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
10	80	CMV		mCaMKIIa		mCaMKII-V2	hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
11	81	CMV		hSyn		hSyn	hSyn	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
12	82	CMV		hMecp2			hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
13	83	CMV		hCaMKIIa		hCaMKII	hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
14	84	CMV		by海绵蜂			hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
15	85	CMV	NRSE	cβ肌动蛋白	cβAct+rGlob	rGlob		CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
16	86	CMV		hPDGFβ				CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
17	87	CMV		cβ肌动蛋白	cβAct+rGlob	rGlob		CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
18	88	CMV-V2		hSyn-V2				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
19	89			hSyn-V2				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
20	90	CMV-V3	NRSE*	CMV				CODA-R	WPREx-V2		bGH
21	91	CMV-V3		CMV				CODA-R	WPREx-V2		bGH
23	92	CMV-V2		hCaMKIIa				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
24	93	CMV-V2		hsCaMKIIa				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2

CN 119343455 A

1.重组核酸,其包含表达盒,所述表达盒以5'至3'的顺序包含5'增强子、启动子、5'非翻译区(UTR)、转基因、3'增强子和聚腺苷酸化序列(polyA)中的一种或多种,其中所述转基因可操作地连接至所述启动子。

2.根据权利要求1所述的重组核酸,其中所述表达盒包含5'增强子,所述5'增强子包括与SEQ ID NO:37-39中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

3.根据权利要求1所述的重组核酸,其中所述表达盒不包含5'增强子。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含启动子,所述启动子包括与SEQ ID NO:41-51中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的重组核酸,其中所述启动子是神经元特异性启动子。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含位于所述启动子和所述转基因之间的内含子。

7.根据权利要求1-5中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含位于所述5'UTR和所述转基因之间的内含子。

8.根据权利要求1-5中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含位于所述启动子和所述5'UTR之间的内含子。

9.根据权利要求6-8中任一项所述的重组核酸,其中所述内含子包括与SEQ ID NO:57-61中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

10.根据权利要求1-5中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒不包含内含子。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含5'UTR,所述5'UTR包括与SEQ ID NO:52-56中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含3'增强子,所述3'增强子包括与SEQ ID NO:62-65中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含polyA,所述polyA包括与SEQ ID NO:67-70中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含嵌入所述启动子中的非神经元沉默元件,并且其中所述非神经元沉默元件包括与SEQ ID NO:40至少90%相同的多核苷酸序列。

15.根据权利要求1-13中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含位于所述5'增强子与所述启动子之间的非神经元沉默元件,并且其中所述非神经元沉默元件包括与SEQ ID NO:40至少90%相同的多核苷酸序列。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含位于所述3'增强子与所述polyA之间的3'UTR,并且其中所述3'UTR包括与SEQ ID NO:66至少90%相同的多核苷酸序列。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的重组核酸,其中所述转基因编码配体门控离子通道(LGIC)。

18.根据权利要求17所述的重组核酸,其中所述配体门控离子通道包括衍生自人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)的配体结合域。

19.根据权利要求18所述的重组核酸,其中所述配体结合域包括与SEQ ID NO:25的氨

基酸残基23-220具有至少85%同一性的氨基酸序列。

20.根据权利要求18或19所述的重组核酸,其中所述配体结合域包括表5中列出的一种或多种氨基酸突变。

21.根据权利要求18-20中任一项所述的重组核酸,其中配体门控离子通道包括衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。

22.根据权利要求21所述的重组核酸,其中所述离子孔域包括与SEQ ID NO:26的氨基酸255-457、SEQ ID NO:27的氨基酸260-452、SEQ ID NO:28的氨基酸259-464或SEQ ID NO:29的氨基酸259-449具有至少85%同一性的氨基酸序列。

23.根据权利要求21或22所述的重组核酸,其中所述工程化受体的配体结合域包括衍生自人甘氨酸受体的Cys环域。

24.根据权利要求21-23中任一项所述的重组核酸,其中所述配体门控离子通道包括与SEQ ID NO:25-31和33中任一项具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

25.根据权利要求21-23中任一项所述的重组核酸,其中所述人甘氨酸受体是人甘氨酸受体α1,并且其中所述配体门控离子通道包括与SEQ ID NO:33具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

26.根据权利要求1-25中任一项所述的重组核酸,其中所述转基因包含以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:32具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性。

27.根据权利要求1-26中任一项所述的重组核酸,其中所述转基因针对在人细胞中的表达进行密码子优化。

28.根据权利要求27所述的重组核酸,其中所述人细胞是神经元。

29.根据权利要求1-28中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:

(i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(ii)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(iii)hCaMKII 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:53具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(iv)hCMV+rGlob内含子,其包括与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(v)所述转基因;

(vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

(viii)hGH polyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

30.根据权利要求29所述的重组核酸,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID

NO:108的核苷酸173-1877具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:108的核苷酸3237-4315具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

31.根据权利要求1-28中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:

(i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(iv)hSyn内含子,其包括与SEQ ID NO:59具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(v)所述转基因;

(vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

(viii)hGH PolyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

32.根据权利要求31所述的重组核酸,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:106的核苷酸173-1159具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:106的核苷酸2519-3597具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

33.根据权利要求1-28中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:

(i)CMV-V2 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:38具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(ii)hSyn-V2启动子,其包括与SEQ ID NO:49具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(iii)所述转基因;

(iv)WPREx-V2 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

(v)hGH-V2 PolyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

34.根据权利要求33所述的重组核酸,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:125的核苷酸149-946具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少

99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:125的核苷酸2285-3416具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

35.根据权利要求1-28中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒以5’至3’的顺序包含:

(i)CMV-V2 5’增强子,其包括与SEQ ID NO:38具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(ii)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(iii)所述转基因;

(iv)WPREx-V2 3’增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

(v)hGH-V2 PolyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

36.根据权利要求35所述的重组核酸,其中所述表达盒以5’至3’的顺序包含:与SEQ ID NO:126的核苷酸149-1527具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:126的核苷酸2848-3979具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

37.根据权利要求1-28中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒以5’至3’的顺序包含:

(i)hSyn-V2 5’增强子,其包括与SEQ ID NO:49具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(ii)所述转基因;

(iii)WPREx-V2 3’增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

(iv)hGH-V2 PolyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

38.根据权利要求37所述的重组核酸,其中所述表达盒以5’至3’的顺序包含:与SEQ ID NO:127的核苷酸153-661具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:127的核苷酸1982-3113具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

39.根据权利要求1-28中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒以5’至3’的顺序包含:

(i)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(ii)所述转基因;

(iii)WPREx-V2 3’增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少

96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

(iv)hGH-V2 PolyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

40.根据权利要求39所述的重组核酸,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:128的核苷酸153-1224具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:128的核苷酸2545-3676具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

41.根据权利要求1-28中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:

(i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(iv)hTPI内含子,其包括与SEQ ID NO:60具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

(v)所述转基因;

(vi)FullEES 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:63具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

(vii)α球蛋白PolyA,其包括与SEQ ID NO:70具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

42.根据权利要求41所述的重组核酸,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:98的核苷酸173-1188具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:98的核苷酸2548-3824具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

43.根据权利要求1-42中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含(i)与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:71-93中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列,或(ii)与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:32)的SEQ ID NO:121-124中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列。

44.根据权利要求1-42中任一项所述的重组核酸,其中所述表达盒包含与SEQ ID NO:71-93和121-124中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列。

45.根据权利要求1-44中任一项所述的重组核酸,其包括位于所述表达盒的每个末端侧翼的腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)。

46.根据权利要求45所述的重组核酸,其包括与SEQ ID NO:94或119具有至少90％同一性的5'ITR序列和与SEQ ID NO:95或120具有至少90％同一性的3'ITR序列。

47.根据权利要求1-45中任一项所述的重组核酸,其包括(i)与排除所述转基因的序列

(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:96-118中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列,或(ii)与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:32)的SEQ ID NO:125-128中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列。

48.根据权利要求1-45中任一项所述的重组核酸,其包括与SEQ ID NO:96-118和125-128中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列。

49.载体,其包括权利要求1-48中任一项所述的重组核酸。

50.根据权利要求49所述的载体,其中所述载体是非病毒载体。

51.根据权利要求49所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

52.根据权利要求51所述的载体,其中所述载体包括AAV载体基因组或由AAV载体基因组组成。

53.AAV,其包括权利要求51或52所述的载体。

54.根据权利要求53所述的AAV,其中所述AAV是AAV9血清型。

55.根据权利要求53或54所述的AAV,其中所述AAV是自互补AAV或单链AAV。

56.根据权利要求53-55中任一项所述的AAV,其中所述AAV是野生型AAV或修饰的AAV。

57.根据权利要求53-56中任一项所述的AAV,其中所述AAV包括与AAV9衣壳蛋白(SEQ ID NO:8)或AAV9-TV衣壳蛋白(SEQ ID NO:9)具有至少95％同一性的衣壳蛋白。

58.宿主细胞,其包括权利要求1-48中任一项所述的核酸,或权利要求49-52中任一项所述的载体。

59.产生权利要求53-57中任一项所述的AAV的方法。

60.试剂盒,其包括权利要求1-48中任一项所述的重组核酸、权利要求49-52中任一项所述的载体或权利要求53-57中任一项所述的AAV。

61.在细胞中表达转基因的方法,其包括将权利要求1-48中任一项所述的重组核酸或权利要求49-52中任一项所述的载体递送至所述细胞。

62.转导细胞的方法,其包括使所述细胞与权利要求53-57中任一项所述的AAV接触。

63.根据权利要求61或62所述的方法,其中所述细胞是神经元。

64.根据权利要求63所述的方法,其中所述神经元是海马神经元。

65.根据权利要求64所述的方法,其中所述神经元是兴奋性神经元。

66.根据权利要求65所述的方法,其中所述神经元是CAMK2阳性神经元。

67.根据权利要求64所述的方法,其中所述神经元是抑制性神经元。

68.根据权利要求67所述的方法,其中所述神经元是GABA能神经元。

69.根据权利要求63所述的方法,其中所述神经元是背根神经节神经元或三叉神经节神经元。

70.根据权利要求69所述的方法,其中所述神经元包括同工凝集素B4(IB4)阳性神经纤维。

71.根据权利要求69或70所述的方法,其中所述神经元包括NF200阳性神经纤维。

72.根据权利要求69-71中任一项所述的方法,其中所述神经元包括CGRP阳性神经纤维。

73.根据权利要求69-72中任一项所述的方法,其中所述神经元包括C纤维。

74.根据权利要求69-73中任一项所述的方法,其中所述神经元包括Aδ纤维。

75.根据权利要求61-74中任一项所述的方法,其中所述细胞是离体细胞。

76.根据权利要求61-74中任一项所述的方法,其中所述细胞是受试者的体内细胞,任选地其中所述受试者是人。

77.根据权利要求61-76中任一项所述的方法,其中与包含对照表达盒的相应细胞相比,包含所述表达盒的所述细胞具有更高的所述转基因表达水平,任选地其中所述更高的表达为比包含排除所述转基因序列的SEQ ID NO:88的多核苷酸序列的对照表达盒的转基因表达水平高至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍或至少十倍。

78.根据权利要求61-76中任一项所述的方法,其中与包含对照表达盒的相应细胞相比,包含所述表达盒的所述细胞具有相当或更高的所述转基因表达水平,任选地其中所述转基因表达水平为包含排除所述转基因序列的SEQ ID NO:87的多核苷酸序列的对照表达盒的转基因表达水平的至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍或至少十倍。

79.治疗有此需要的受试者的疾病或病症的方法,包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-48中任一项所述的重组核酸、权利要求49-52中任一项所述的载体或权利要求53-57中任一项所述的AAV。

80.根据权利要求79所述的方法,其中所述疾病或病症是癫痫、精神分裂症、自闭症谱系病症、阿尔茨海默病、雷特综合征或脆性X综合征。

81.根据权利要求79所述的方法,其中所述疾病或病症是局灶性癫痫。

82.根据权利要求79所述的方法,其中所述疾病或病症是内侧颞叶癫痫(mTLE)。

83.根据权利要求61-82中任一项所述的方法,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:

(i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(ii)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(iii)hCaMKII 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:53具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(iv)hCMV+rGlob内含子,其包括与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(v)所述转基因;

(vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

(viii)hGH PolyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列,

任选地其中所述转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。

84.根据权利要求61-82中任一项所述的方法,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:

(i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(iv)hSyn内含子,其包括与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(v)所述转基因;

(vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

(viii)hGH PolyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列,

任选地所述转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。

85.根据权利要求79-84中任一项所述的方法,其中所述重组核酸、所述载体或所述AAV通过如下方式施用:颅内施用、鞘内(脊柱)施用、鞘内(小脑延髓池)施用、脑内施用、心室内施用或直接注射到海马的癫痫病灶中。

86.根据权利要求79-84中任一项所述的方法,其中所述重组核酸、所述载体或所述AAV通过直接注射到海马的癫痫病灶中来施用。

87.根据权利要求79-86中任一项所述的方法,其中将1×10^{9}-1×10^{14}拷贝的所述重组核酸或AAV载体基因组施用给所述受试者。

88.根据权利要求79-87中任一项所述的方法,其中所述AAV包括AAV9的衣壳蛋白(SEQ ID NO:8)。

89.根据权利要求79-88中任一项所述的方法,其中所述方法使癫痫的持续时间、强度和/或频率降低至少10%。

90.治疗有此需要的受试者的疾病或病症的方法,包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-48中任一项所述的重组核酸、权利要求49-52中任一项所述的载体或权利要求53-57中任一项所述的AAV,其中所述疾病或病症是神经性疼痛、痉挛、脊髓损伤或撕脱伤。

91.根据权利要求90所述的方法,其中所述疾病或病症是神经性疼痛。

92.根据权利要求91所述的方法,其中所述神经性疼痛是周围神经病。

93.根据权利要求91所述的方法,其中所述神经性疼痛是三叉神经痛。

94.根据权利要求61-78和90-93中任一项所述的方法,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:

(i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(iv)hTPI内含子,其包括与SEQ ID NO:60具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(v)所述转基因;

(vi)FullEES 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:63具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

(vii)rβ球蛋白PolyA,其包括与SEQ ID NO:70具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列,

任选地所述转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。

95.根据权利要求61-78和90-93中任一项所述的方法,其中所述表达盒以5'至3'的顺序包含:

(i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(iv)hSyn内含子,其包括与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(v)所述转基因;

(vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

(vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

(viii)hGH PolyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列,

任选地所述转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。

96.根据权利要求90-95中任一项所述的方法,其中所述重组核酸、所述载体或所述AAV通过鞘内(IT)或神经节内(IG)施用来施用。

97.根据权利要求90-95中任一项所述的方法,其中所述重组核酸、所述载体或所述AAV通过直接施用至背根神经节或三叉神经节中的神经节内(IG)施用来施用。

98.根据权利要求90-97中任一项所述的方法,其中将1×10^{9}-1×10^{14}拷贝的所述重组核酸或AAV载体基因组施用给所述受试者。

99.根据权利要求90-98中任一项所述的方法,其中所述AAV包括AAV9-TV的衣壳蛋白

(SEQ ID NO:9)。

100.根据权利要求91-99中任一项所述的方法,其中所述方法将疼痛水平降低至少10%。

101.根据权利要求79-100中任一项所述的方法,其中所述重组核酸、所述载体或所述AAV通过如下方式施用:全身、肠胃外、静脉内、脑、脑脊髓、鞘内、脑池内、壳核内、海马内、纹状体内或脑室内注射。

102.根据权利要求79-101中任一项所述的方法,其中将1×10^{9}-1×10^{14}拷贝的所述重组核酸或AAV载体基因组施用给所述受试者。

103.根据权利要求79-102中任一项所述的方法,其中所述方法包括施用由所述转基因编码的配体门控离子通道的配体。

104.根据权利要求103所述的方法,其中所述配体选自由AZD-0328、TC-6987、ABT-126、TC-5619、TC-6683、瓦伦尼克林和Facinicline/RG3487组成的组。

用于治疗癫痫和神经性疼痛的表达盒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年1月31日提交的美国临时申请号63/304,960和2022年2月22日提交的美国临时申请号63/312,480的权益,每个申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 电子序列表的引用

[0004] 电子序列表的内容(SWCH_038_02WO_SeqList_ST26.xml;大小:383,720字节;和创建日期:2023年1月29日)的全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0005] 顽固性神经系统疾病经常与异常作用的神经元相关。开发用于治疗这些病况的疗法的尝试已经受与该疾病相关联的易处理的靶蛋白的缺乏阻碍。

[0006] 局灶性癫痫是一种慢性且使人衰弱的神经系统病症,在美国影响超过200万人,并且特征在于从脑中的特定位置起始的不可预测的癫痫发作。复发性癫痫发作会导致认知和情绪缺乏,目前的干预提供有限的功效以及多种副作用。局灶性癫痫发作源于神经元子集的异常放电,但大多数抗癫痫药物依赖于全身性化合物施用并改变全脑活动。因此,患有癫痫的患者由于参与正常认知的神经元的无意识调节和其他生物系统中的不希望脱靶变化而承受重大副作用。内侧颞叶癫痫(mTLE)是局灶性癫痫最常见的形式,并且其通常与作为组织病理学异常的海马硬化相关。

[0007] 神经性疼痛包括周围神经病和三叉神经痛等。前者是由周围神经系统的损伤或功能病症导致的常见神经系统病症。其特征是麻木、刺痛和疼痛,通常始于手和脚,但也可能影响身体的其他区域。三叉神经痛也称为自杀性疾病,由保护三叉脑神经的髓鞘的损伤引起。它引起极端且散发的休克样面部疼痛,可能持续几秒钟到几分钟。当前的药理学和外科手术方法几乎没有缓解作用,并且有成瘾的可能,同时具有显著的副作用。

[0008] 慢性疼痛最常使用的疗法是应用阿片类镇痛药和非甾体抗炎药,但这些药物可能导致成瘾,并可能引起副作用,诸如药物依赖性、耐受性、呼吸抑制、镇静、认知病症、幻觉和其他全身性副作用。尽管药物的使用广泛,但其有效缓解疼痛的成功率却惊人地低。用于治疗疼痛的更具侵入性的选择包括神经传导阻滞和电刺激。用于管理疼痛的最具侵入性且最不受欢迎的方法是通过手术完全去除引起疼痛的神经或其部分。

[0009] 理想的疼痛和局灶性癫痫治疗将仅改变引起疼痛和/或癫痫发作生成的特定神经元的活动。因此,治疗疼痛或局灶性癫痫的新策略是将重组核酸编码的异源蛋白递送到神经元亚群中以控制异常活动。

[0010] 这种策略的一个考虑因素是用于控制神经元活动的异源蛋白的选择及其在靶细胞中的表达。最近,专门由设计药物激活的设计受体(DREADD)来改变癫痫发作活动已经在动物癫痫模型中产生有前景的结果。然而,抑制性DREADD依赖于通过第二信使间接激活离子通道的G蛋白偶联受体,并且可能不一致地改变神经元电位。

[0011] 替代的治疗方法是用编码后续可以对外源配体有响应的工程化配体门控离子通道(LGIC)的转基因转导靶神经元。口服施用这种设计为仅与工程化LGIC相互作用的小分子

配体,可以进行精细调节以控制神经元的异常活动并抑制癫痫发作,而不会产生副作用。

[0012] 本领域需要设计允许转基因在靶细胞中稳健表达以控制神经元活动的最佳表达盒。此类表达盒可以用于治疗神经性疼痛,诸如周围神经病和三叉神经痛,或局灶性癫痫,例如内侧颞叶癫痫。本公开提供此类表达盒、载体、方法等等。

发明内容

[0013] 一方面,本发明提供重组核酸,其包括表达盒,所述表达盒以5'至3'的顺序包含5'增强子、启动子、5'非翻译区(UTR)、转基因、3'增强子和聚腺苷酸化序列(polyA)中的一种或多种,其中所述转基因可操作地连接至所述启动子。

[0014] 在一些实施方案中,表达盒包含5'增强子,所述5'增强子包括与SEQ ID NO:37-39中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,表达盒不包含5'增强子。

[0016] 在一些实施方案中,启动子包括与SEQ ID NO:41-51中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。在一些实施方案中,启动子是神经元特异性启动子。

[0017] 在一些实施方案中,表达盒包含位于启动子和转基因之间的内含子。在一些实施方案中,表达盒包含5'UTR和转基因之间的内含子。在一些实施方案中,表达盒包含启动子和5'UTR之间的内含子。在一些实施方案中,内含子包括与SEQ ID NO:57-61中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,表达盒不包含内含子。

[0019] 在一些实施方案中,表达盒包含5'UTR,所述5'UTR包括与SEQ ID NO:52-56中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0020] 在一些实施方案中,表达盒包含3'增强子,所述3'增强子包括与SEQ ID NO:62-65中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,表达盒包含polyA,所述polyA包括与SEQ ID NO:67-70中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,表达盒包含嵌入启动子中的非神经元沉默元件,并且其中所述非神经元沉默元件包括与SEQ ID NO:40至少90%相同的多核苷酸序列。在一些实施方案中,表达盒包含位于5'增强子和启动子之间的非神经元沉默元件,并且其中所述非神经元沉默元件包括与SEQ ID NO:40至少90%相同的多核苷酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,表达盒包含位于3'增强子与polyA之间的3'UTR,并且其中所述3'UTR包括与SEQ ID NO:66至少90%相同的多核苷酸序列。

[0024] 在一些实施方案中,转基因编码配体门控离子通道(LGIC)。在一些实施方案中,配体门控离子通道包括衍生自人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)的配体结合域。在一些实施方案中,配体结合域包括与SEQ ID NO:25的氨基酸残基23-220具有至少85%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,配体结合域包括表5中列出的一种或多种氨基酸突变。在一些实施方案中,配体门控离子通道包括衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。在一些实施方案中,离子孔域包括与SEQ ID NO:26的氨基酸255-457、SEQ ID NO:27的氨基酸260-452、SEQ ID NO:28的氨基酸259-464或SEQ ID NO:29的氨基酸259-449具有至少85%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化受体的配体结合域包括衍生自人甘氨酸受体的Cys环域。在

一些实施方案中,配体门控离子通道包括与SEQ ID NO:25-31和33中任一项具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,人甘氨酸受体是人甘氨酸受体α1,并且其中所述配体门控离子通道包括与SEQ ID NO:33具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,转基因包含以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:32具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,转基因针对在人细胞中的表达进行密码子优化。在一些实施方案中,人细胞是神经元。

[0025] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:(i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;(ii)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;(iii)hCaMKII 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:53具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;(iv)hCMV+rGlob内含子,其包括与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;(v)所述转基因;(vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;(vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和(viii)hGH polyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0026] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:108的核苷酸173-1877具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:108的核苷酸3237-4315具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的序列。

[0027] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:(i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0028] (ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0029] (iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0030] (iv)hSyn内含子,其包括与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0031] (v)所述转基因;

[0032] (vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0033] (vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、

至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0034] (viii)hGH polyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0035] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:106的核苷酸173-1159具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:106的核苷酸2519-3597具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0036] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:(i)CMV-V2 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:38具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0037] (ii)hSyn-V2启动子,其包括与SEQ ID NO:49具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0038] (iii)所述转基因;

[0039] (iv)WPREx-V2 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0040] (v)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0041] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:125的核苷酸149-946具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:125的核苷酸2285-3416具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0042] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:(i)CMV-V25'增强子,其包括与SEQ ID NO:38具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0043] (ii)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0044] (iii)所述转基因;

[0045] (iv)WPREx-V2 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0046] (v)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0047] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:126的核苷酸149-1527具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:126的核苷酸2848-3979具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0048] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:(i)hSyn-V2增强子,其包括与

SEQ ID NO:49具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0049] (ii)所述转基因；

[0050] (iii)WPREx-V2 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0051] (iv)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0052] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:127的核苷酸153-661具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:127的核苷酸1982-3113具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0053] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:(i)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0054] (ii)所述转基因；

[0055] (iii)WPREx-V2 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0056] (iv)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0057] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:128的核苷酸153-1224具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:128的核苷酸2545-3676具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0058] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:(i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0059] (ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0060] (iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0061] (iv)hTPI内含子,其包括与SEQ ID NO:60具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0062] (v)所述转基因；

[0063] (vi)FullEES 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:63具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0064] (vii)rβ球蛋白polyA,其包括与SEQ ID NO:70具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0065] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:98的核苷酸173-1188具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:98的核苷酸2548-3824具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的序列。

[0066] 在一些实施方案中,表达盒包含与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:71-93中任一项具有至少90%同一性的多核苷酸序列,在一些实施方案中,表达盒包含与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:32)的SEQ ID NO:121-124中任一项具有至少90%同一性的多核苷酸序列,在一些实施方案中,表达盒包含与SEQ ID NO:71-93和121-124中任一项具有至少90%同一性的多核苷酸序列。

[0067] 在一些实施方案中,重组核酸包括位于表达盒的每个末端侧翼的腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)。在一些实施方案中,重组核酸包括与SEQ ID NO:94或119具有至少90%同一性的5'ITR序列和与SEQ ID NO:95或120具有至少90%同一性的3'ITR序列。

[0068] 在一些实施方案中,重组核酸包括与SEQ ID NO:96-118和125-128中任一项具有至少90%同一性的多核苷酸序列。在一些实施方案中,重组核酸包括与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:96-118中任一项具有至少90%同一性的多核苷酸序列,在一些实施方案中,重组核酸包括与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:32)的SEQ ID NO:125-128中任一项具有至少90%同一性的多核苷酸序列。

[0069] 一方面,本公开提供包括本公开的重组核酸的载体。在一些实施方案中,载体是非病毒载体。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,载体包括AAV载体基因组或由AAV载体基因组组成。

[0070] 在一方面,本公开提供包括本公开的载体的AAV。在一些实施方案中,AAV是AAV9血清型。在一些实施方案中,AAV是自互补AAV或单链AAV。在一些实施方案中,AAV是野生型AAV或修饰的AAV。在一些实施方案中,AAV包括与AAV9衣壳蛋白(SEQ ID NO:8)或AAV9-TV衣壳蛋白(SEQ ID NO:9)具有至少95%同一性的衣壳蛋白。

[0071] 一方面,本公开提供包括本公开的核酸或本公开的载体的宿主细胞。

[0072] 一方面,本公开提供产生本公开的AAV的方法。

[0073] 一方面,本公开提供包括本公开的重组核酸、本公开的载体或本公开的AAV的试剂盒。

[0074] 一方面,本公开提供在细胞中表达转基因的方法,包括将本公开的重组核酸或本公开的载体递送至细胞。

[0075] 一方面,本公开提供转导细胞的方法,包括使细胞与本公开的AAV接触。在一些实施方案中,细胞是神经元。在一些实施方案中,神经元是海马神经元。在一些实施方案中,神经元是兴奋性神经元。在一些实施方案中,神经元是CAMK2阳性神经元。在一些实施方案中,神经元是抑制性神经元。在一些实施方案中,神经元是GABA能神经元。在一些实施方案中,神经元是背根神经节神经元或三叉神经节神经元。在一些实施方案中,神经元包括同工凝集素B4(IB4)阳性神经纤维。在一些实施方案中,神经元包括NF200阳性神经纤维。在一些实施方案中,神经元包括CGRP阳性神经纤维。在一些实施方案中,神经元包括C纤维。在一些实施方案中,神经元包括Aδ纤维。在一些实施方案中,细胞是离体细胞。在一些实施方案中,细胞是受试者的体内细胞,任选地,其中受试者是人。在一些实施方案中,与包含对照表达盒

的相应细胞相比,包含所述表达盒的细胞具有更高的转基因表达水平,任选地,其中所述更高的表达为比包括排除所述转基因序列的SEQ ID NO:88的多核苷酸序列的对照表达盒的转基因表达水平高至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍或至少十倍。在一些实施方案中,与包含对照表达盒的相应细胞相比,包含所述表达盒的细胞具有相当或更高的转基因表达水平,任选地,其中所述转基因表达水平为包括排除所述转基因序列的SEQ ID NO:87的多核苷酸序列的对照表达盒的转基因表达水平的至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍或至少十倍。

[0076] 一方面,本公开提供在有此需要的受试者中治疗疾病或病症的方法,包括向受试者施用有效量的本公开的重组核酸、本公开的载体、或本公开的AAV,其中所述疾病或病症是癫痫症、精神分裂症、自闭症谱系病症、阿尔茨海默病、雷特综合征或脆性X综合征。在一些实施方案中,癫痫是局灶性癫痫。在一些实施方案中,癫痫是内侧颞叶癫痫(mTLE)。在一些实施方案中,重组核酸、载体或AAV通过如下方式施用:颅内施用、鞘内(脊柱)施用、鞘内(小脑延髓池)施用、脑内施用、心室内施用或直接注射到海马的癫痫病灶中。在一些实施方案中,重组核酸、载体或AAV通过直接注射到海马的癫痫病灶中来施用。在一些实施方案中,将1×10^{9}-1×10^{14}拷贝的重组核酸或AAV载体基因组施用给所述受试者。在一些实施方案中,AAV包括AAV9的衣壳蛋白(SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,所述方法使癫痫的持续时间、强度和/或频率降低至少10%。

[0077] 一方面,本公开提供治疗有此需要的受试者的疾病或病症的方法,包括向所述受试者施用有效量的本公开的重组核酸、本公开的载体或本公开的AAV,其中所述疾病或病症是神经性疼痛、痉挛、脊髓损伤或撕脱伤。在一些实施方案中,疾病或病症是神经性疼痛。在一些实施方案中,神经性疼痛是周围神经病。在一些实施方案中,神经性疼痛是三叉神经痛。在一些实施方案中,重组核酸、载体或AAV通过鞘内(IT)或神经节内(IG)施用来施用。在一些实施方案中,其中重组核酸、载体或AAV通过神经节内(IG)施用直接施用至背根神经节或三叉神经节中。在一些实施方案中,将1×10^{9}-1×10^{14}拷贝的重组核酸或AAV载体基因组施用给所述受试者。在一些实施方案中,AAV包括AAV9-TV的衣壳蛋白(SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,所述方法将疼痛水平降低至少10%。

[0078] 在一些实施方案中,重组核酸、载体或AAV通过以下方式施用:全身、肠胃外、静脉内、脑、脑脊髓、鞘内、脑池内、壳核内(intraputaminal)、海马内、纹状体内或脑室内注射。在一些实施方案中,将1×10^{9}-1×10^{14}拷贝的重组核酸或AAV载体基因组施用给所述受试者。

[0079] 在一些实施方案中,所述方法包括施用由所述转基因编码的配体门控离子通道的配体。在一些实施方案中,所述配体选自由AZD-0328、TC-6987、ABT-126、TC-5619、TC-6683、瓦伦尼克林和Facinicline/RG3487组成的组。在一些实施方案中,配体是TC-5619。

附图说明

[0080] 专利或申请文件包括至少一幅彩色附图。

[0081] 图1显示27种表达盒的设计。对于每种盒,左侧元件位于右侧元件的上游(5')。盒#

20中的“*”符号表示NRSE元件嵌入该盒中的CMV启动子中,而不是放置在其上游。

[0082] 图2显示用所指示的盒转染的SK-N-AS细胞和HeLa细胞中与β-肌动蛋白管家基因相比的CODA受体mRNA比率的ddPCR结果。

[0083] 图3显示用所指示的盒转染的SK-N-AS细胞和HeLa细胞中CODA受体蛋白的FLAG ELISA结果。

[0084] 图4显示包装为AAV9载体并在新生大鼠海马混合培养物中转导的九种表达盒的与β-肌动蛋白管家基因相比的CODA受体mRNA表达比率的ddPCR结果。

[0085] 图5显示直接体内注射携带六种表达盒的AAV9的大鼠海马中与β-肌动蛋白管家基因相比的CODA受体mRNA比率的ddPCR结果。

[0086] 图6显示来自于大鼠海马中体内测试的六种表达盒的FLAG标签化CODA受体的免疫荧光定位。

[0087] 图7显示注射包含所指示的表达盒的AAV随后重复给药TC-5619的KA局灶性癫痫小鼠模型中的癫痫发作频率。

[0088] 图8显示使用注射包含所指示的表达盒的AAV的KA局灶性癫痫小鼠模型的功效研究的设计。

[0089] 图9显示包装为AAV6载体并在人iPSC衍生感觉神经元祖细胞中转导的十种表达盒的与β-肌动蛋白管家基因相比的CODA受体mRNA表达比率的ddPCR结果。

[0090] 图10显示直接体内注射携带四种表达盒的AAV6的大鼠L3和L4 DRG中与β-肌动蛋白管家基因相比的CODA受体mRNA比率的ddPCR结果。

[0091] 图11显示来自于大鼠L5 DRG中体内测试的四种表达盒的FLAG标签化CODA受体的免疫荧光定位。

[0092] 发明详述

[0093] 在下面的所附说明书中阐述了本公开的细节。尽管与本文所述的那些类似或等同的方法和材料可以用于本公开的实践或测试,但现在描述说明性方法和材料。根据说明书和权利要求,本公开的其他特征、目标和优点将清楚。在说明书和所附权利要求中,除非上下文另外明确规定,否则单数形式还包括复数。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。将本说明书中引用的所有专利和出版物均通过引用以其整体并入本文。

[0094] 将在下文更全面地描述根据本公开的实施方案。然而,本公开的各方面可以以不同的形式实施,并且不应被解释为限于本文阐述的实施方案。相反,提供这些实施方案使得本公开将是全面的和完整的,并且将向本领域技术人员充分传达本公开的范围。除非另有明确指示,否则所有指定的一些实施方案、特征和术语旨在包括所述的实施方案、特征或术语及其生物学等效物。本文说明书中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不旨在限制。

[0095] 在描述本发明的方法和组合物之前,应理解,本公开并不限于所描述的特定方法或组合物,因为此类方法和组合物当然可以变化。还应理解,本文所用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在是限制性的,因为本公开的范围将仅受所附权利要求的限制。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0096] 在阅读本公开之后,如对于本领域技术人员应清楚的是,本文描述和说明的单独实施方案中的每个实施方案具有离散的组成部分和特征,所述组成部分和特征可以在不偏离本公开的范围或精神的情况下容易地与任何其他若干实施方案的特征分离或组合。可以按所叙述的事件的顺序或按逻辑上可能的任何其他顺序来执行所叙述的任何方法。

[0097] 定义

[0098] 在本公开整篇中,除非内容明确指示其他含义,否则单数形式“一种/个(a/an)”和“所述(the)”包括复数指示物。因此,例如,提及“一个细胞”包括多个这样的细胞,并且提及“肽”包括提及一种或多种肽及其本领域技术人员已知的等同物(例如多肽),等等。

[0099] 在本说明书整篇中,除非另外说明,否则术语“和/或”在本公开中用于指“和”或“或”。

[0100] 在本公开整篇中,除非上下文另外要求,否则词语“包含(comprise)”或变体(如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”是指包括所陈述的要素或整数或者要素或整数的组,但不排除任何其他要素或整数或者要素或整数的组。另外,在本说明书整篇中对数值范围的陈述明确包括在之间的所有整数和小数点。

[0101] 在本公开整篇中,除非上下文另外要求,否则短语“基本上由……组成”是指所描述的组合物、方法或试剂盒的范围限于不会实质上影响本主题公开内容的一种或多种基本和新颖特征的指定材料或步骤。例如,“基本上由所公开的序列组成”的多肽具有所公开的序列的氨基酸序列加上或减去在序列边界处的约5个氨基酸残基,例如比所叙述的边界氨基酸残基少约5个残基、4个残基、3个残基、2个残基或约1个残基,或比所叙述的边界氨基酸残基多约1个残基、2个残基、3个残基、4个残基或5个残基。

[0102] 在本公开整篇中,除非上下文另外要求,否则短语“由……组成”表示在组合物、方法或试剂盒中不包括权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。例如,“由所公开的序列组成”的多肽仅由所公开的氨基酸序列组成。

[0103] 术语“约”和“大约”"作为等价词使用。在本申请中使用的具有或不具有约/大约的任何数值意味着覆盖相关领域的普通技术人员所理解的任何正常波动。在某些实施方案中,除非另外陈述或者上下文另有明确含义,否则术语“大约”或“约”是指落在所陈述参考值的任一方向(大于或小于)上的10%内的值的范围(此类数字超过可能值的100%的情况除外)。

[0104] 术语“分离的”意指实质上或基本上不含在其天然状态下发现通常伴随它的组分的材料。在一些实施方案中,术语“获得的”与分离的同义使用。

[0105] 术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用,以指代脊椎动物,如哺乳动物哺乳动物可以是例如小鼠、大鼠、兔、猫、狗、猪、绵羊、马、非人灵长类动物(例如,食蟹猴、黑猩猩)或人。还涵盖体内获得的或体外培养的受试者的组织、细胞或其衍生物。人受试者可以是成人、青少年、儿童(2岁至14岁)、婴儿(1个月至24个月)或新生儿(最大1个月)。在一些实施方案中,成人是约65岁或更老或约60岁或更老的老年人。

[0106] 术语“样品”是指一定体积和/或质量的经受分析的生物学材料。在一些实施方案中,样品包括组织样品、细胞样品、流体样品等。在一些实施方案中,样品取自受试者(例如,人受试者)或由其提供。在一些实施方案中,样品包括取自任何内脏器官、癌性、癌前或非癌性肿瘤、脑、皮肤、毛发(包括毛根)、眼睛、肌肉、骨髓、软骨、白色脂肪组织和/或褐色脂肪组

织的一部分组织。在一些实施方案中,流体样品包括口腔拭子、血液、脐带血、唾液、精液、尿液、腹水、胸膜液、脊髓液、肺灌洗液、泪液、汗液等。本领域普通技术人员将理解,在一些实施方案中,“样品”是“初级样品”,因为它是直接从来源(例如,受试者)获得的。在一些实施方案中,“样品”是加工初级样品的结果,例如去除某些潜在污染组分、分离某些组分和/或纯化某些感兴趣的组分。在一些实施方案中,样品是细胞或细胞群(例如,神经元细胞)。细胞样品可以直接衍生自受试者(例如,初级样品)或者可以是细胞系。细胞系可以包括非哺乳动物细胞(例如,昆虫细胞、酵母细胞和/或细菌细胞)或哺乳动物细胞(例如,永生化细胞系)。

[0107] 本文所用的术语“治疗(treating或treatment)”及其语法等效词通常是指使用组合物或方法来减少、消除或预防疾病的症状,并且包括实现治疗益处和/或预防益处。治疗益处意指减慢所治疗的病症或病况的症状的进展、使其进展停止、逆转其进展或根除或减轻所述症状。治疗的预防益处包括降低病况的风险、延缓病况的进展、或减小病况发生的可能性。在一些实施方案中,治疗是指将组合物递送至受试者和/或细胞群以影响生理结果。在一些实施方案中,治疗导致一种或多种疾病症状的改善(例如,降低、减轻或补救)。改善可以是可观察的或可测量的改善,或者可以是受试者的健康状况的一般感觉的改善。疾病的治疗可以指疾病症状严重程度的降低。在一些实施方案中,治疗可以指将疾病症状的严重程度降低至与疾病发作前相当的水平。在一些实施方案中,治疗可以指疾病症状的短期(例如,暂时或急性)和/或长期(例如,持续或慢性)减少。在一些实施方案中,治疗可以指疾病症状的缓解。在一些实施方案中,治疗可以指处于患上特定疾病的风险中的受试者的预防性治疗,以便预防疾病发展。预防疾病发展可以指完全预防疾病症状,延迟疾病发作,减轻随后发展的疾病的症状的严重程度,或降低疾病发展的可能性。

[0108] 术语“管理”或“控制”是指使用本公开中考虑的组合物或方法来改善患有特定疾病的个体的生活质量。

[0109] 术语“有效量”是指可以实现所指示的结果(例如,转导靶神经元)的量。在一些实施方案中,用于体内施用的有效量是指可以实现期望的结果的剂量,诸如例如,转导足够量的靶神经元以用于治疗目的。

[0110] “治疗有效量”是可以实现期望的治疗结果的组合物的量。治疗有效量可以根据例如但不限于疾病状态以及受试者的年龄、性别和体重的因素而变化。一般而言,治疗有效量也是组合物的治疗有益效果超过其任何毒性或有害影响的量。“治疗有效量”包括组合物有效治疗受试者的量。

[0111] “增加”是指与参考或对照水平相比至少5%的值的增加(例如,增加的转导效率)。例如,增加可以包括5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%或更多的增加。增加还指比参考或对照水平高1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)的增加。

[0112] “减少(decrease)”、“降低(reduce)”、“减弱(diminish)”或其同义词是指与参考或对照水平相比至少5%的值的降低(例如,减少的转导效率)。例如,减少可以包括5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%或更多的减少。减少还意指比参考或对照

水平低1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)的减少。

[0113] 术语“参考”或“对照”水平在本公开整篇中可互换使用,并且是指在未用本公开的组合物治疗的受试者或样品中或在已经用对照治疗的受试者或样品中的特定生理学和/或治疗效果的值。在一些实施方案中,对照是媒介物对照。在一些实施方案中,参考水平是指在施用本公开的组合物前作为受试者或样品中的量度的特定生理学和/或治疗效果的值(例如,基线水平)。

[0114] 术语“配体”是指结合另一种较大分子的分子。在一些实施方案中,配体结合受体。在一些实施方案中,配体与受体的结合改变受体的功能,即激活或阻遏其功能。在一些实施方案中,配体与受体(如配体门控离子通道(LGIC))的结合导致离子通道的打开或关闭。术语“配体”可以指内源性的或天然存在的配体。例如,在一些实施方案中,配体是指神经递质(例如λ-氨基丁酸(GABA)、乙酰胆碱、血清素等)和信号传导中间体(例如磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(PIP2))、氨基酸(例如甘氨酸)或核苷酸(例如ATP)。在一些实施方案中,配体可以指非天然的,即合成的或非天然存在的配体(例如,结合剂)。例如,在一些实施方案中,配体是指小分子。配体结合可以通过本领域已知的多种方法(例如,检测与放射性标记的配体的缔合)来测量。“受体-配体结合”和“配体结合”在本公开整篇中可互换使用,并且是指受体(例如,LGIC)与配体之间的物理相互作用。

[0115] “结合亲和力”通常是指在受体与配体的单个结合位点之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如在本公开整篇中所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,受体与配体)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以表示为解离常数(Kd)。亲和力可以通过本领域已知的常用方法(包括本公开所述的那些)测量。

[0116] 术语“野生型”或“天然的”是技术人员理解的本领域的术语,并且意指生物体、菌株、基因、蛋白质或特征在自然界中存在的不同于突变体或变体形式的典型形式。例如,野生型蛋白质是该蛋白质在自然界中的典型形式。

[0117] 术语“非天然的”、“变体”和“突变体”在整篇说明书和权利要求中可互换使用,指代天然或野生型组成的突变体,例如与天然或野生型序列具有小于100%序列同一性的变体多肽。

[0118] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指氨基酸的聚合物。术语还涵盖修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、磷酸化、甲基化、羧化、脱酰胺化、乙酰化或与标记组分缀合。

[0119] 氨基酸修饰可以是氨基酸取代、氨基酸缺失和/或氨基酸插入。氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代。保守替换(也称为保守突变、保守取代或保守变异)是蛋白质中的这样的氨基酸替代:其将给定的氨基酸变成具有类似生化特性(例如电荷、疏水性和大小)的不同氨基酸。如在本公开整篇中所用,“保守变异”是指将一个氨基酸残基用另一个生物学上类似的残基替代。保守变异的示例包括:一个疏水残基(如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸)取代另一个疏水残基;或一个极性残基取代另一个极性残基,如精氨酸取代赖氨酸、谷氨酸取代天冬氨酸、或谷氨酰胺取代天冬酰胺等。保守取代的其他说明性示例包括以下的变化:丙氨酸变为丝氨酸;精氨酸变为赖氨酸;天冬酰胺变为谷氨酰胺或

组氨酸;天冬氨酸盐变为谷氨酸盐;半胱氨酸变为丝氨酸;谷氨酰胺变为天冬酰胺;谷氨酸盐变为天冬氨酸盐;甘氨酸变为脯氨酸;组氨酸变为天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸变为亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸变为缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸变为精氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸盐;甲硫氨酸变为亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸变为酪氨酸;亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸变为苏氨酸;苏氨酸变为丝氨酸;色氨酸变为酪氨酸;酪氨酸变为色氨酸或苯丙氨酸;缬氨酸变为异亮氨酸或亮氨酸,等等。

[0120] 术语“工程化”在整个说明书和权利要求中用于指非天然存在的组合物或蛋白质,其具有与其来源亲本组合物或蛋白质不同的特性。

[0121] 通常,“序列同一性”或“序列同源性”分别是指两个多核苷酸或多肽序列的核苷酸与核苷酸对应性或氨基酸与氨基酸对应性。典型地,用于确定序列同一性的技术包括确定多核苷酸的核苷酸序列和/或确定由其编码的氨基酸序列,并将这些序列与第二核苷酸或氨基酸序列进行比较。两个或更多个序列(多核苷酸或氨基酸)可以通过确定它们的“同一性百分比”来比较。两个序列(核苷酸或氨基酸序列)的同一性百分比是两个比对序列之间的精确匹配数除以较短序列的长度并且乘以100。同一性百分比也可以例如通过使用可从国立卫生研究获得的高级BLAST计算机程序(包括2.2.9版)比较序列信息来确定。BLAST程序基于Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.;以及Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402(1997)中所讨论的比对方法。简而言之,BLAST程序将同一性定义为相同比对符号(通常是核苷酸或氨基酸)的数量除以两个序列中较短序列中的符号的总数。该程序可以用于确定在被比较的蛋白质的全长上的同一性百分比。提供默认参数以优化例如blast程序中用短查询序列的搜索。该程序还允许使用SEG过滤器以屏蔽查询序列的区段,如通过Wootton和Federhen,Computersand Chemistry 17:149-163(1993)的SEG程序所确定的。期望的序列同一性程度的范围是大约80%至100%以及其间的整数值。典型地,在公开的序列与要求保护的序列之间的同一性百分比为至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%。

[0122] 如在本公开整篇中所用,“基本上相同的”是指具有85%或更多,例如90%或更多,例如,95%,96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或100%的序列同一性,其中组合物的活性不会被序列中导致序列同一性差异的修饰改变。

[0123] 如在本公开整篇中所用,“氨基酸突变”是指氨基酸序列相对于对应亲本序列的任何差异,例如,氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0124] 如在本公开整篇中所用,术语“病毒载体(virus vector)”或“病毒载体(viral vector)”是指充当核酸递送媒介物的病毒颗粒,并且其包含包装在病毒粒子内的核酸(例如,AAV表达盒)。本公开的示例性病毒载体包括腺病毒载体、腺相关病毒载体(AAV)、慢病毒载体和逆转录病毒载体。

[0125] “AAV病毒粒子”或“AAV病毒”或“AAV病毒颗粒”或“AAV载体颗粒”或“AAV载体”是指包括至少一种AAV衣壳多肽和衣壳化多核苷酸(例如,包含表达盒的AAV载体基因组)的病毒颗粒。多核苷酸可包括异源核酸(即,除野生型AAV基因组之外的多核苷酸,如待递送至哺乳动物细胞的表达盒)。通常基于衣壳多肽的名称(血清型)来命名AAV载体。例如,AAV5载体指示AAV载体包含AAV5衣壳多肽。

[0126] 如关于病毒滴度使用的术语“载体基因组单位”、“基因组单位”、“基因组颗粒

(gp)”或“基因组拷贝(gc)”是指在病毒粒子中衣壳化的载体基因组的数量,与感染性或功能无关。通过本领域充分理解的方法,例如,基因组DNA的定量PCR,或例如在Clark et al.(1999)Hum.Gene Ther.,10:1031-1039;Veldwijk et al.(2002)Mol.Ther.,6:272-278中,可以测量在特定载体制剂中的基因组颗粒的数量:。

[0127] 如参考病毒滴度使用的术语“感染单位(iu)”、“感染性颗粒”或“复制单位”是指具有感染和复制能力的重组AAV载体颗粒的数量,如通过感染中心测定(也称为复制中心测定)所测量,例如在McLaughlin et al.(1988)J.Virol.,62:1963-1973中描述的。

[0128] “感染性”病毒粒子、病毒或病毒颗粒是包括可递送至对病毒种类呈嗜性的细胞中的多核苷酸组分的病毒粒子、病毒或病毒颗粒。该术语并不一定意味着病毒有任何复制能力。如本文所使用的,“感染性”病毒或病毒颗粒是在接近靶细胞后可以感染靶细胞并且可以在靶细胞中表达异源核酸的病毒或病毒颗粒。因此,“感染性”是指病毒颗粒接近靶细胞、进入靶细胞并在靶细胞中表达异源核酸的能力。感染性可以指体外感染性或体内感染性。病毒感染性可以表示为感染性病毒颗粒与总病毒颗粒的比率。

[0129] 如参考病毒滴度使用的术语“转导单位”(tu)”是指导致功能性转基因产物产生的感染性重组AAV载体颗粒的数量,如在功能测定中所测量的,如在例如在Xiao et al.(1997)Exp.Neurobiol.,144:113-124中;或在Fisher et al.(1996)J.Virol.,70:520-532(LFU测定)中描述的。

[0130] 病毒颗粒在细胞中表达异源核酸的能力可以称为“转导”。可以使用多种技术测定病毒颗粒在细胞中表达异源核酸的能力,包括评估标记基因,如绿色荧光蛋白(GFP)测定(例如,其中病毒包括编码GFP的核苷酸序列),其中GFP在感染病毒颗粒的细胞中产生并被检测和/或测量;或测量产生的蛋白质,例如通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或荧光激活细胞分选法(FACS)。

[0131] 术语“嗜性”是指AAV载体感染一种或多种指定细胞类型的能力,但也可以涵盖载体如何发挥作用以在一种或多种指定细胞类型中转导细胞;即,嗜性是指AAV病毒粒子优先进入一种或多种某些细胞或组织类型和/或与细胞表面优先相互作用以促进进入某些细胞或组织类型,任选地且优选地随后在细胞中表达(例如,转录和任选地翻译)AAV病毒粒子携带的序列,例如对于重组病毒而言表达异源核苷酸序列。

[0132] 术语“嗜性概况”是指通过本文所述的AAV载体对一种或多种靶细胞、组织和/或器官的转导的模式。

[0133] 除非另有指示,否则“高效转导”或“高效嗜性”或类似术语可以通过参考合适的对照来确定(例如,分别是对照的转导或嗜性的至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、125%、150%、175%或200%或更多)。合适的对照将取决于多种因素,包括所期望的嗜性概况。类似地,可以通过参考合适的对照来确定衣壳和/或病毒是否“不高效转导”靶组织或对靶组织“不具有高效嗜性”或类似术语。

[0134] 如在本公开整篇中所用,“神经元活动”、“神经元的活动”、“神经元放电”及其变体和同义词是指由神经元的刺激或兴奋引起的电活动。在一些实施方案中,神经元活动使用自动化的或手动的膜片钳技术测量。在一些实施方案中,确定神经元的活动包括确定神经元的兴奋性突触后电位(EPSP)、抑制性突触后电位(IPSP)和/或动作电位。在一些实施方案中,神经元的活动水平依赖于兴奋性突触后电位(EPSP)、抑制性突触后电位(IPSP)和/或动

作电位,或者受其影响。

[0135] 如在本公开整篇中所用,“神经系统疾病”或“神经系统病症”是指神经系统的疾病或病症。在一些实施方案中,神经系统疾病与脑、脊髓、神经或神经系统的任何组分中的结构、生化和/或电异常相关,由这些异常造成,或起因于这些异常。

[0136] 如在本公开整篇中所用,疾病的“症状”是指被视为指示疾病状况的身体或精神特征,特别是对于患者明显的此类特征。在一些实施例中,症状由患者主观评价。例如,在一些实施方案中,症状是疼痛;在一些实施方案中,症状是癫痫发作。

[0137] 如在本公开整篇中关于氨基酸的位置所用,术语“对应于(correspondingto或correspondto)”是指当将第一多肽序列和参考多肽序列进行比对时,第一多肽序列中的氨基酸与参考多肽序列中的给定氨基酸对齐。本领域技术人员使用为此目的而设计的软件,例如ClustalOmega1.2.4版和该版本的默认参数进行比对。

[0138] 如本公开全文所使用的,术语“表达盒”是指含有一个或多个待转录转基因和一个或多个调控元件(包括,(但不限于启动子、增强子、内含子、UTR和/或polyA)的DNA区段。当引入适当的宿主细胞时,表达盒尤其能够指导细胞的机制将转基因转录成RNA。

[0139] 如在本公开整篇中所用,术语“启动子”是指指导可操作地连接的核酸的转录的一个或多个核酸控制序列。启动子可以包括转录起始位点附近的核酸序列,例如TATA元件。启动子还可以包括可以被转录因子结合的顺式作用多核苷酸序列。“组成型”启动子是在大多数环境和发育条件下有活性的启动子。启动子可以是诱导型或抑制型的。“诱导型”启动子响应外部条件(例如温度、特定分子的浓度、或氧气或营养水平)的某些变化,启动增加可操作连接的核酸的转录水平。在一些实施方案中,启动子是“组织特异性的”,其导致可操作连接的核酸在特定细胞类型或组织中以比在对照细胞类型或组织中显著更高的水平表达。在一些实施方案中,启动子可以是神经元特异性的并且赋予可操作连接的核酸在神经元中以比在非神经元中显著更高的表达(例如,高2倍、5倍或10倍)。

[0140] 如在本公开整篇中所用,术语“可操作地连接”是指核酸表达控制序列(例如启动子或转录因子结合位点的阵列)与第二核酸序列之间的功能性联接,其中表达控制序列指导第二核酸序列的转录。

[0141] 如在本公开整篇中所用,术语“增强子”指通常作用于顺式位置中的启动子的活性并因此刺激与启动子可操作地连接的基因的转录的多核苷酸序列。通常,增强子的作用相当独立于位置和方向,并且因此它可以位于启动子的前面或后面、内含子内或者甚至基因编码区内。增强子可以位于基因编码区或启动子紧邻处,或者与启动子相距相当远。也可能与启动子具有物理和/或功能重叠。

[0142] 概述

[0143] 本公开提供用于在靶细胞中表达转基因的表达盒。在一些实施方案中,靶细胞是海马神经元。在一些实施方案中,靶细胞是背根神经节神经元。在一些实施方案中,靶细胞是三叉神经节神经元。

[0144] 在一些实施方案中,本公开的表达盒针对以下一种或多种特性进行优化:

[0145] • 在神经元中优先表达;

[0146] • 促进持续基因表达;

[0147] • 以足够的水平表达,以有效而不会引起严重的细胞健康问题;

[0148] • 容易包装到AAV载体中。

[0149] 在一些实施方案中,进一步优化表达盒以平衡表达水平、功效和毒性。在一些实施方案中,本公开的表达盒允许转基因在靶细胞中以中至低水平表达,但与允许转基因以更高表达的对照表达盒相比,能够使体内治疗窗更宽(例如,转基因的对应小分子配体可以在更广泛的范围内施用而不引起毒性)。

[0150] 在一些实施方案中,本公开的表达盒介导所编码的转基因在背根神经节(DRG)和/或三叉神经节(TGG)神经元中的高水平表达。在一些实施方案中,与对照表达盒相比,本公开的表达盒增强所编码的转基因的表达。在一些实施方案中,将本公开的表达盒递送至DRG和/或TGG神经元以治疗神经性疼痛。在一些实施方案中,表达盒包含编码工程化配体门控离子通道(eLGIC)受体或其嵌合形式的多核苷酸。

[0151] 在一些实施方案中,与对照表达盒相比,表达盒在体内介导所编码的转基因在人背根神经节和/或三叉神经节神经元中更高水平的表达。在一些实施方案中,与对照表达盒相比,表达盒在体外介导所编码的转基因在人背根神经节和/或三叉神经节神经元中更高水平的表达。在一些实施方案中,与对照表达盒相比,表达盒离体介导所编码的转基因在人背根神经节和/或三叉神经节神经元中更高水平的表达。

[0152] 在一些实施方案中,本公开的表达盒介导所编码的转基因在海马神经元中的高水平表达。在一些实施方案中,表达盒介导所编码的转基因优先在海马的兴奋性神经元中的高水平表达。在一些实施方案中,与对照表达盒相比,本公开的表达盒增强所编码的转基因的表达。在一些实施方案中,将本公开的表达盒递送至海马神经元以治疗局灶性癫痫。在一些实施方案中,表达盒包含编码工程化配体门控离子通道(eLGIC)受体或其嵌合形式的多核苷酸。

[0153] 在一些实施方案中,与对照表达盒相比,表达盒介导所编码的转基因在海马神经元中更高水平的表达。在一些实施方案中,与对照表达盒相比,表达盒介导所编码的转基因在海马神经元中更高水平的表达。

[0154] 在一些实施方案中,与对照表达盒相比,表达盒在体内介导所编码的转基因在人海马神经元中更高水平的表达。在一些实施方案中,与对照表达盒相比,表达盒在体外介导所编码的转基因在人海马神经元中更高水平的表达。在一些实施方案中,与对照表达盒相比,表达盒离体介导所编码的转基因在人海马神经元中更高水平的表达。

[0155] 在一些实施方案中,表达盒包含在载体(例如病毒载体或非病毒载体)中。在一些实施方案中,表达盒包含在AAV载体内。在一些实施方案中,表达盒是CRISPR/CAS表达系统。在一些实施方案中,表达盒编码治疗性蛋白或抗体。

[0156] 本公开提供以疗法的治疗方案、疫苗或研究工具开发方式使用本公开的表达盒或对应载体的方法。

[0157] 本公开还提供使用本公开的表达盒来降低施用于受试者的总核酸的量的方法。所述方法包括与当所述核酸包括对照表达盒时施用给所述受试者的核酸的量相比,向所述受试者施用更少的总核酸量。

[0158] 本公开还提供治疗有此需要的受试者的神经性疼痛(例如周围神经病和三叉神经痛)的方法,包括施用有效量的包括表达盒的重组核酸,其中表达盒包含编码配体门控离子通道或其嵌合形式的转基因。

[0159] 本公开还提供治疗有此需要的受试者的局灶性癫痫的方法,所述方法包括施用有效量的包括表达盒的重组核酸,其中表达盒包含编码配体门控离子通道或其嵌合形式的转基因。

[0160] 表达盒

[0161] 在一些实施方案中,表达盒包含下表1中提供的一种或多种调控元件。图1中提供了各种元件的示例性排列。

[0162] 表1:调控元件的非限制性示例

[0163]

类型	调控元件名称	SEQ ID NO:
5'增强子	CMV 5'增强子	37
	CMV-V2 5'增强子	38
	CMV-V3 5'增强子	39
非神经元沉默元件	NRSE	40
启动子	cβ 肌动蛋白启动子	41
	CMV 启动子	42
	hCaMKIIa 启动子	43
	hsCaMKIIa 启动子	44
	hγ 烯醇酶启动子	45
	hMecp2 启动子	46
	hPDGFb 启动子	47
	hSyn 启动子	48
	hSyn-V2 启动子	49
	mMecp2 启动子	50
	msCaMKIIa 启动子	51
5' UTR	fGlob 5' UTR	52

[0164]

类型	调控元件名称	SEQ ID NO:
	hCaMKII 5' UTR	53
	hSyn 5' UTR	54
	mCaMKII 5' UTR	55
	mCaMKII-V2 5' UTR	56
内含子	cbAct+rGlob 内含子	57
	hCMV+rGlob 内含子	58
	hSyn 内含子	59
	hTPI 内含子	60
	TPL+eMLP 内含子	61
3'增强子	511-810EES 3'增强子	62
	FullEES 3'增强子	63
	WPREx 3'增强子	64
	WPREx-V2 3'增强子	65
3' UTR	α 球蛋白 3' UTR	66
PolyA	bGH polyA	67
	hGH polyA	68
	hGH-V2 polyA	69
	rβ 球蛋白 polyA	70

[0165] 5'增强子

[0166] 在一些实施例中,本公开的表达盒包含5'增强子。

[0167] 在一些实施方案中,5'增强子包括CMV增强子或由CMV增强子组成。在一些实施方案中,CMV增强子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:37具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,CMV增强子包括与SEQ ID NO:37的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0168] 在一些实施方案中,5'增强子包括CMV-V2增强子或由CMV-V2增强子组成。在一些实施方案中,CMV-V2增强子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:38具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,CMV-V2增强子包括与SEQ ID NO:38的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0169] 在一些实施方案中,5'增强子包括CMV-V3增强子或由CMV-V3增强子组成。在一些实施方案中,CMV-V3增强子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核

苷酸序列与SEQ ID NO:39具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,CMV-V3增强子包括与SEQ ID NO:39的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0170] 在一些实施方案中,本公开的表达盒不包含5'增强子。

[0171] 非神经元沉默元件

[0172] 在一些实施方案中,本公开的表达盒包含非神经元沉默元件,也称为神经元限制性沉默元件(NRSE)。

[0173] NRSE已在多个神经元基因中被识别,并通过沉默非神经元细胞中的转录而赋予神经元特异性。例如,神经元限制性沉默元件存在于决定其在神经系统中的神经元特异性表达的神经元烟碱乙酰胆碱受体β2亚基基因的启动子中。在一些实施方案中,此类NRSE可以依据神经系统内的细胞环境沉默或增强转录。研究表明,某些NRSE在位于5'非翻译区下游或位于TATA盒上游距离小于50bp时可能激活合成启动子的转录,但在位于更上游时会转换为沉默子。有关NRSE的更多讨论,请参阅BBessis et al.,Proc Natl Acad Sci USA.1997May 27;94(11):5906-5911,其内容出于全部目的通过引用整体并入。

[0174] 在一些实施方案中,本公开的NRSE包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:40具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,NRSE包括与SEQ ID NO:40的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0175] 在一些实施方案中,NRSE嵌入本公开的启动子中。在一些实施方案中,NRSE放置于表达盒中TATA盒之后30至50个碱基对之间。

[0176] 在一些实施例中,本公开的表达盒不包含神经元限制性沉默元件(NRSE)。

[0177] 启动子

[0178] 在一些实施方案中,本公开的表达盒包含启动子。在一些实施方案中,启动子可操作地连接至表达盒的转基因。在一些实施方案中,启动子是组织特异性启动子。在一些实施方案中,启动子是神经元特异性启动子。

[0179] 在一些实施方案中,启动子包括cβ肌动蛋白启动子或由cβ肌动蛋白启动子组成。在一些实施方案中,cβ肌动蛋白启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:41具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,cβ肌动蛋白启动子包括与SEQ ID NO:41的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0180] 在一些实施方案中,启动子包括CMV启动子或由CMV启动子组成。在一些实施方案中,CMV启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:42具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,CMV启动子包括与SEQ ID NO:42的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0181] 在一些实施方案中,启动子包括hCaMKIIa启动子或由hCaMKIIa启动子组成。在一些实施方案中,hCaMKIIa启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:43具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,hCaMKIIa启动子包括与SEQ ID NO:43的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0182] 在一些实施方案中,启动子包括hsCaMKIIa启动子或由hsCaMKIIa启动子组成。在一些实施方案中,hsCaMKIIa启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:44具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,hsCaMKIIa启动子包括与SEQ ID NO:44的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0183] 在一些实施方案中,启动子包括hγ烯醇酶启动子或由hγ烯醇酶启动子组成。在一些实施方案中,hγ烯醇酶启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:45具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,hγ烯醇酶启动子包括与SEQ ID NO:45的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0184] 在一些实施例中,启动子包括hMecp2启动子或由hMecp2启动子组成。在一些实施方案中,hMecp2启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:46具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,hMecp2启动子包括与SEQ ID NO:46的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0185] 在一些实施方案中,启动子包括hPDGF 启动子或由hPDGF启动子组成。在一些实施方案中,hPDGF启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:47具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,hPDGF启动子包括与SEQ ID NO:47的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0186] 在一些实施方案中,启动子包括hSyn启动子或由hSyn启动子组成。在一些实施方案中,hSyn启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:48具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,hSyn启动子包括与SEQ ID NO:48的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0187] 在一些实施方案中,启动子包括hSyn-V2启动子或由hSyn-V2启动子组成。在一些实施方案中,hSyn-V2启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:49具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,hSyn-V2启动子包括与SEQ ID NO:49的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0188] 在一些实施方案中,启动子包括mMecp2启动子或由mMecp2启动子组成。在一些实施方案中,mMecp2启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:50具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,mMecp2启动子包括与SEQ ID NO:50的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0189] 在一些实施方案中,启动子包括msCaMKIIa启动子或由msCaMKIIa启动子组成。在一些实施方案中,msCaMKIIa启动子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:51具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,msCaMKIIa启动子包括与SEQ ID NO:51的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0190] 在一些实施方案中,本公开的表达盒不包含启动子。

[0191] 5’非翻译区(5’UTR)

[0192] 在一些实施方案中,本公开的表达盒包含5’非翻译区(5’UTR)。

[0193] 在一些实施方案中,5’UTR包括fGlob 5’UTR或由fGlob 5’UTR组成。在一些实施方案中,fGlob 5’UTR包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:52具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,fGlob 5’UTR包括与SEQ ID NO:52的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0194] 在一些实施方案中,5’UTR包括hCaMKII 5’UTR或由hCaMKII 5’UTR组成。在一些实施方案中,hCaMKII 5’UTR包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:53具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,hCaMKII 5’UTR包括与SEQ ID NO:53的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0195] 在一些实施方案中,5’UTR包括hSyn 5’UTR或由hSyn 5’UTR组成。在一些实施方案中,hSyn 5’UTR包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:54具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,hSyn 5’UTR包括与SEQ ID NO:54的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0196] 在一些实施方案中,5’UTR包括mCaMKII 5’UTR或由mCaMKII 5’UTR组成。在一些实施方案中,mCaMKII 5’UTR包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:55具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,mCaMKII 5'UTR包括与SEQ ID NO:55的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0197] 在一些实施方案中,5'UTR包括mCaMKII-V2 5'UTR或由mCaMKII-V2 5'UTR组成。在一些实施方案中,mCaMKII-V2 5'UTR包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:56具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,mCaMKII-V2 5'UTR包括与SEQ ID NO:56的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0198] 在一些实施方案中,本公开的表达盒不包含5'UTR。

[0199] 内含子

[0200] 在一些实施方案中,本公开的表达盒包含内含子。在一些实施方案中,内含子位于启动子和转基因之间。在一些实施方案中,内含子位于5'UTR和转基因之间。在一些实施方案中,内含子位于启动子和5'UTR之间。

[0201] 在一些实施方案中,内含子包括cβAct+rGlob内含子或由cβAct+rGlob内含子组成。在一些实施方案中,cβAct+rGlob内含子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:57具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,cβAct+rGlob内含子包括与SEQ ID NO:57的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0202] 在一些实施方案中,内含子包括hCMV+rGlob内含子或由hCMV+rGlob内含子组成。在一些实施方案中,hCMV+rGlob内含子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:58具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,hCMV+rGlob内含子包括与SEQ ID NO:58的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0203] 在一些实施方案中,内含子包括hSyn内含子或由hSyn内含子组成。在一些实施方案中,hSyn内含子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:59具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,hSyn内含子包括与SEQ ID NO:59的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0204] 在一些实施方案中,内含子包括hTPI内含子或由hTPI内含子组成。在一些实施方案中,hTPI内含子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:60具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,hTPI内含子包括与SEQ ID NO:60的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0205] 在一些实施方案中,内含子包括TPL+eMLP内含子或由TPL+eMLP内含子组成。在一

些实施方案中,TPL+eMLP内含子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:61具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,TPL+eMLP内含子包括与SEQ ID NO:61的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0206] 在一些实施方案中,本公开的表达盒不包含内含子。

[0207] 3'增强子

[0208] 在一些实施方案中,本公开的表达盒包含3'增强子。

[0209] 在一些实施方案中,3'增强子包括511-810EES 3'增强子或由511-810EES 3'增强子组成。在一些实施方案中,511-810EES 3'增强子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:62具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,511-810EES 3'增强子包括与SEQ ID NO:62的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0210] 在一些实施方案中,3'增强子包括FullEES 3'增强子或由FullEES 3'增强子组成。在一些实施方案中,FullEES 3'增强子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:63具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,FullEES 3'增强子包括与SEQ ID NO:63的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0211] 在一些实施方案中,3'增强子包括WPREx 3'增强子或由WPREx 3'增强子组成。在一些实施方案中,WPREx 3'增强子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:64具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,WPREx 3'增强子包括与SEQ ID NO:64的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0212] 在一些实施方案中,3'增强子包括WPREx-V2 3'增强子或由WPREx-V23'增强子组成。在一些实施方案中,WPREx-V2 3'增强子包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:65具有至少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%、至少99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,WPREx-V2 3'增强子包括与SEQ ID NO:65的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0213] 在一些实施方案中,本公开的表达盒不包含3'增强子。

[0214] 3'非翻译区(3'UTR)

[0215] 在一些实施方案中,本公开的表达盒包含3'非翻译区(3'UTR)。

[0216] 在一些实施例中,3'UTR包括α球蛋白3'UTR或由α球蛋白3'UTR组成。在一些实施方案中,α球蛋白3'UTR包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:66具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,α球蛋白3'UTR包括与SEQ ID NO:66的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0217] 在一些实施方案中,本公开的表达盒不包含3'UTR。

[0218] 聚腺苷酸化序列(PolyA)

[0219] 在一些实施方案中,本公开的表达盒包含聚腺苷酸化序列(“polyA”,也称为“polyA尾”、“poly-A”或“poly-A尾”)。

[0220] 在一些实施方案中,polyA包括bGH polyA或由bGH polyA组成。在一些实施方案中,bGH polyA包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:67具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,bGH polyA包括与SEQ ID NO:67的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0221] 在一些实施方案中,polyA包括hGH polyA或由hGH polyA组成。在一些实施方案中,hGH polyA包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:68具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,hGH polyA包括与SEQ ID NO:68的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0222] 在一些实施方案中,polyA包括hGH-V2 polyA或由hGH-V2 polyA组成。在一些实施方案中,hGH-V2 polyA包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:69具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,hGH-V2polyA包括与SEQ ID NO:69的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0223] 在一些实施方案中,polyA包括rβ球蛋白polyA或由rβ球蛋白polyA组成。在一些实施方案中,rβ球蛋白polyA包括以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:70具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,rβ球蛋白polyA包括与SEQ ID NO:70的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列,或由其组成。

[0224] 在一些实施方案中,本公开的表达盒不包含polyA。

[0225] 具有集成元件的盒

[0226] 示例性表达盒在图1中说明。在一些实施方案中,调控元件的顺序(5'至3'顺序)遵循下面表2中提供的示例之一。

[0227]

表 2：表达盒的非限制性示例

No.	5'增强子	NRSE	启动子	内含子	5' UTR	内含子	转基因	3'增强子	3' UTR	PolyA
1	CMV		mMecp2			hTPI	CODA-R	FullEES		rβ 球蛋白
2	CMV		msCaMKIIa		mCaMKII	TPL+eMLP	CODA-R	FullEES		rβ 球蛋白
3	CMV		hSyn		hSyn	hTPI	CODA-R	FullEES		rβ 球蛋白
4	CMV		hMecp2			TPL+eMLP	CODA-R	511-810EES		rβ 球蛋白
5	CMV		hCaMKIIa		hCaMKII	TPL+eMLP	CODA-R	511-810EES		rβ 球蛋白
6	CMV		hγ 烯醇酶			TPL+eMLP	CODA-R	511-810EES		rβ 球蛋白
7	CMV	NRSE	cβ 肌动蛋白	cbAct+rGlob	fGlob		CODA-R	511-810EES		rβ 球蛋白
8	CMV		hPDGFb			hSyn	CODA-R	511-810EES		rβ 球蛋白
9	CMV		mMecp2			hSyn	CODA-R	WPREx	α 球蛋白	hGH
10	CMV		msCaMKIIa		mCaMKII-V2	hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α 球蛋白	hGH
11	CMV		hSyn		hSyn	hSyn	CODA-R	WPREx	α 球蛋白	hGH
12	CMV		hMecp2			hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α 球蛋白	hGH
13	CMV		hCaMKIIa		hCaMKII	hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α 球蛋白	hGH
14	CMV		hg 烯醇酶			hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α 球蛋白	hGH
15	CMV	NRSE	cβ 肌动蛋白	cbAct+rGlob	fGlob		CODA-R	WPREx	α 球蛋白	hGH
16	CMV		hPDGFb				CODA-R	WPREx	α 球蛋白	hGH
17	CMV		cβ 肌动蛋白	cbAct+rGlob	fGlob		CODA-R	511-810EES		rβ 球蛋白
18	CMV-V2		hSyn-V2				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
19			hSyn-V2				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
20	CMV-V3	NRSE*	CMV				CODA-R	WPREx-V2		bGH
21	CMV-V3		CMV				CODA-R	WPREx-V2		bGH
23	CMV-		hCaMKIIa				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2

[0228]

No.	5'增强子	NRSE	启动子	内含子	5' UTR	内含子	转基因	3'增强子	3' UTR	PolyA
	V2									
24	CMV-V2		hsCaMKIIa				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
33	CMV-V2		hSyn-V2				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
34	CMV-V2		hCaMKIIa				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
35			hSyn-V2				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
36			hCaMKIIa				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2

"*": 示例#20 中的 NRSE 元件嵌入此盒中的 CMV 启动子中，而不是放置于其上游。

[0229] 在一些实施方案中,表达盒包含与排除转基因区(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:71-93中任一项具有至少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％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。在一些实施方案中,表达盒包含与排除转基因区(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:71-93中任一项相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列。

[0230] 在一些实施方案中,表达盒包含与排除转基因区(SEQ ID NO:32)的SEQ ID NO:121-124中任一项具有至少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％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。在一些实施方案中,表达盒包含与排除转基因区(SEQ ID NO:32)的SEQ ID NO:121-124中任一项相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列。

[0231] 在一些实施方案中,表达盒包含与SEQ ID NO:71-93和121-124中任一项具有至少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％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。在一些实施方案中,表达盒包含与SEQ ID NO:71-93和121-124中任一项相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列。

[0232] 在一些实施方案中,本公开提供重组核酸,所述重组核酸包括本公开的表达盒和位于表达盒的每个末端侧翼的腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)。在一些实施方案中,重组核酸包括5'ITR序列,所述5'ITR序列与SEQ ID NO:94或119具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。在一些实施方案中,重组核酸包括3'ITR序列,所述5'ITR序列与SEQ ID NO:95或120具有至少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％、至少99.5％或100％同一性。

[0233] 在一些实施方案中,重组核酸包括与SEQ ID NO:96-118和125-128中任一项具有至少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％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。在一些实施方案中,重组核酸包括与SEQ ID NO:96-118和125-128中任一项相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列。

[0234] 在一些实施方案中,重组核酸包括与排除转基因区(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:96-118中任一项具有至少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％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。在一些实施方案中,重组核酸包括与排除转基因区(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:96-118中任一项相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列。

[0235] 在一些实施方案中,重组核酸包括与排除转基因区(SEQ ID NO:32)的SEQ ID NO:125-128中任一项具有至少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％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。在一些实施方案中,重组核酸包括与排除转基因区(SEQ ID NO:32)的SEQ ID NO:125-128中任一项相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)核苷酸的多核苷酸序列。

[0236] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0237] (i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0238] (ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0239] (iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0240] (iv)hTPI内含子,其包括与SEQ ID NO:60具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0241] (v)转基因;

[0242] (vi)FullEES 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:63具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0243] (vii)rβ球蛋白polyA,其包括与SEQ ID NO:70具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0244] 在一些实施方案中,转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。在一些实施方案中,表达盒包含与SEQ ID NO:73具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0245] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0246] (i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0247] (ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0248] (iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0249] (iv)hSyn内含子,其包括与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0250] (v)转基因;

[0251] (vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0252] (vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

[0253] (viii)hGH polyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0254] 在一些实施方案中,转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。在一些实施方案中,表达盒包含与SEQ ID NO:81具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0255] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0256] (i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0257] (ii)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0258] (iii)hCaMKII 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:53具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0259] (iv)hCMV+rGlob内含子,其包括与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0260] (v)转基因;

[0261] (vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0262] (vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

[0263] (viii)hGH polyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0264] 在一些实施方案中,转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。在一些实施方案中,表达盒包含与SEQ ID NO:83具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0265] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0266] (i)CMV-V2 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:38具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0267] (ii)hSyn-V2启动子,其包括与SEQ ID NO:49具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0268] (iii)所述转基因;

[0269] (iv)WPREx-V2 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

[0270] (v)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0271] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0272] (i)CMV-V2 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:38具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0273] (ii)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0274] (iii)所述转基因;

[0275] (iv)WPREx-V2 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

[0276] (v)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0277] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0278] (i)hSyn-V2 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:49具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0279] (ii)所述转基因;

[0280] (iii)WPREx-V2 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

[0281] (iv)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0282] 在一些实施方案中,表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0283] (i)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0284] (ii)所述转基因;

[0285] (iii)WPREx-V2 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

[0286] (iv)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0287] 载体

[0288] 在一些实施方案中,本公开提供包括重组核酸的载体,其中所述重组核酸包括本公开的表达盒。

[0289] 在一些实施方案中,载体是非病毒载体。在一些实施方案中,载体是质粒。在一些实施方案中,载体是杆粒。

[0290] 在一些实施方案中,载体被封装在颗粒中,例如脂质纳米颗粒或外泌体。

[0291] 在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体衍生自复制缺陷型病毒。在一些实施方案中,病毒载体是腺病毒、逆转录病毒(例如慢病毒)、腺相关病毒(AAV)、痘病毒、甲病毒、痘苗病毒或单纯疱疹病毒(例如HSV-1)。

[0292] 腺相关病毒(AAV)载体

[0293] 腺相关病毒(AAV)是细小病毒科的成员,是一种小的无包膜二十面体病毒,具有约4.7千碱基(kb)的单链线性DNA基因组。AAV被分配到依赖病毒属(Dependovirus),因为该病毒被发现是纯化腺病毒库存中的污染物(D.M.Knipe,P.M.Howley,Field's Virology,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,ed.第六版,2013)。在野生型状态下,AAV依赖辅助病毒(通常是腺病毒)来提供用于复制所必需的蛋白质因子,因为AAV天然是复制缺陷的。AAV的4.7kb基因组两侧是两个折叠成对于复制重要的发夹形状的反向末端重复(ITR)。AAV具有天然复制缺陷,并且能够转导人体内几乎所有细胞类型,因此是用于基因疗法中的治疗用途或疫苗递送的理想载体。在野生型状态下,AAV的生命周期包括潜伏期和感染期,在潜伏期期间,AAV基因组在感染后被位点特异性地整合到宿主染色体中,在感染期期间,在腺病毒或单纯疱疹病毒感染后,经整合的基因组随后被挽救、复制并包装进感染性病毒中。当载体化时,AAV的病毒Rep和Cap基因在病毒生产过程中被除去并以反式方式提供,使ITR成为唯一剩余的病毒DNA(A.Vasileva,R.Jessberger,Nature reviews.Microbiology,3,837-847(2005))。然后用一系列可能的转移载体配置替换Rep和

Cap,以执行基因添加或基因靶向。这些载体化的AAV转导分裂细胞和非分裂细胞,并在静止组织中显示出强劲的稳定表达。多个已公布的美国申请描述了AAV载体和病毒粒子,包括美国公开号2015/0176027、015/0023924、2014/0348794、2014/0242031和2012/0164106;所有这些文献通过引用以其整体并入本文。

[0294] 然而,尽管AAV载体具有令人印象深刻的转导各种组织和细胞类型的能力,但本领域仍然需要具有在转导效率和希望的嗜性两者方面改进的对特定神经元细胞的转导的AAV载体。此外,施用方法还可影响被转导的细胞的位置、量和类型。递送到神经元需要高水平的转导和正确的嗜性,因为在单次注射中可以递送多少AAV存在物理限制,并且希望的结果(例如,治疗结果)与刺激或抑制受试者中正确的神经元组的活动有关。

[0295] 本公开提供了AAV衣壳多肽,其在体内、体外和/或离体展现出对受试者中神经元亚群的显著改进的转导。

[0296] 所有已知AAV血清型的基因组结构是类似的。AAV的基因组是长度小于约5,000个核苷酸(nt)的线性单链DNA分子。反向末端重复(ITR)位于非结构复制(Rep)蛋白和结构(VP)蛋白的独特编码核苷酸序列两侧。VP蛋白(VP1、VP2和VP3)形成衣壳并且有助于病毒的嗜性。末端145ntITR是自互补的,并且被组织,使得可以形成能量稳定的分子内双链体,该双链体形成T形发夹。这些发夹结构作为病毒DNA的复制起点起作用,从而充当细胞DNA聚合酶复合物的引物。在哺乳动物细胞中的野生型(wt)AAV感染后,Rep基因被表达并且在病毒基因组的复制中起作用。

[0297] 在一些实施方案中,病毒载体的外部蛋白“衣壳”在自然界中存在,例如,AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10。在一些实施方案中,衣壳被合成工程化(例如,通过定向进化或合理设计)以具有在自然界中不存在的某些独特特性,如改变的嗜性、增加的转导效率和/或免疫逃避。合理设计的衣壳的示例是在VP3病毒衣壳多肽上一个或多个表面暴露的酪氨酸(Y)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和赖氨酸(K)残基的突变。

[0298] 可以用于AAV载体中的AAVITR的非限制性示例包括来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12的ITR、AAV13、AAV14、AAV15和AAV16。

[0299] 包含两个ITR的AAV载体具有约4.4kB的有效载荷容量。自互补AAV(scAAV)载体含有第三个ITR并包装载体重组部分的两条链,仅留下约2.1kB用于本文所考虑的多核苷酸。在一个实施方案中,AAV载体是scAAV载体。

[0300] 已经使用双AAV载体策略实现了大体上两倍AAV的包装容量的扩展包装容量(约9kB)。可用于产生本文考虑的AAV的双载体策略包括但不限于剪接(反式剪接)、同源重组(重叠)或两者的组合(杂交)。在双AAV反式剪接策略中,将剪接供体(SD)信号放置于5’半部分载体的3’端处,并且将剪接接纳体(SA)信号放置于3’半部分载体的5’端处。当同一个细胞被两种AAV载体共感染,并通过反向末端重复(ITR)介导的两个半部分的头尾连环化(concatemerization)时,反式剪接作用会导致产生成熟的mRNA和全长蛋白(Yan等人,2000年)。反式剪接已成功用于在肌肉和视网膜中表达大基因(Reich等,2003;Lai等,2005)。可替代地,在双AAV载体中所含的大表达盒的两个半部分可以含有同源重叠序列(在5’半部分载体的3’端和在3’半部分载体的5’端,双AAV重叠),同源重叠序列将介导通过同源重组对单个大基因组的重构(Duan等人,2001)。此策略依赖于转基因重叠序列的重组发生特性(Ghosh等人,2006)。第三种双AAV策略(杂合)是基于将来自外源基因(即,碱性磷酸酶;

Ghosh等人,2008;Ghosh等人,2011))的高重组发生区添加到反式剪接载体中。为了增加在双AAV之间的重组,将添加的区放置在5'半部分载体中的SD信号的下游且在3'半部分载体中的SA信号的上游。

[0301] "杂合AAV"是指用不同AAV血清型(以及优选地,与一个或多个AAVITR不同的血清型)的衣壳包装的AAV基因组,并且另外可以称为假型化AAV。例如,AAV1型、AAV2型、AAV3型、AAV4型、AAV5型、AAV6型、AAV7型、AAV8型、AAV9型、AAV10型、AAV11型、AAV12型、AAV13型、AAV14型、AAV15型或AAV16型基因组可以被包衣进AAV1型、AAV2型、AAV3型、AAV4型、AAV5型、AAV6型、AAV7型、AAV8型、AAV9型、AAV10型、AAV11型、AAV12型、AAV13型、AAV14型、AAV15型或AAV16型衣壳或其变体中,条件是AAV衣壳和基因组(以及优选地,一个或多个AAVITR)属于不同的血清型。在某些实施方案中,假型化AAV颗粒可以称为属于"x/y"型,其中"x"指示ITR的来源,并且"y"指示衣壳的血清型,例如2/5AAV颗粒具有来自AAV2的ITR和来自AAV5的衣壳。

[0302] "宿主细胞"包括用本公开的重组载体或多核苷酸体内、离体或体外转染、感染或转导的细胞。宿主细胞可以包括产生病毒的细胞和用病毒载体感染的细胞。在一些实施方案中,用本文考虑的病毒载体体内感染宿主细胞。

[0303] 高滴度AAV制剂可以使用本领域已知的技术生产,例如,如以下文献中所述:美国专利号5,658,776;6,566,118;6,989,264;和6,995,006;美国2006/0188484;WO98/22607;WO2005/072364;和WO/1999/011764;和Viral Vectors for Gene Therapy:Methods and Protocols,ed.Machida,Humana Press,2003;Samulski et al.,(1989)J.Virology 63,3822;Xiao et al.,(1998)J.Virology72,2224;lnoue et al.,(1998)J.Virol.72,7024。还已经报道了生产假型化AAV载体的方法(例如,WO00/28004),以及AAV载体的各种修饰或配制剂,以减少其在体内施用后的免疫原性(参见,例如,WO01/23001;WO00/73316;WO04/112727;WO05/005610;WO99/06562)。

[0304] 在一些实施方案中,包括AAV衣壳多肽(或本公开的突变体)的AAV载体有助于工程化受体对于受试者中的细胞或神经元亚群的靶向表达。在一些实施方案中,神经元是伤害性感受器。

[0305] 在一些实施例中,AAV包括自互补基因组。如本文所定义,包括"自互补"或"双链"基因组的AAV是指已被工程化使得AAV的编码区被配置为形成分子内双链DNA模板的AAV,如McCarty等人Self-complementary recombinant adeno-associated virus(scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis.Gene Therapy.8(16):1248-54(2001)中描述的,其全部内容通过引用并入。在一些情况下,本公开考虑使用包括自互补基因组的AAV,因为在感染(此类转导)时,scAAV的两个互补半部分将关联(associate)形成一个双链DNA(dsDNA)单元以准备立即复制和转录而不是等待细胞介导的AAV基因组第二链的合成。应当理解,包括自互补基因组的AAV仅能容纳AAV中发现的全部编码容量(4.7-6kb)的约一半(约2.4kb),而不是全部编码容量。

[0306] 在一些实施方案中,AAV包括单链基因组。如本文所定义,"单链"基因组是指非自互补的基因组。在一些实施方案中,本公开涉及能够实现将基因高效转移到小鼠眼球前节的单链AAV载体。参见Wang等人.Single stranded adeno-associated virus achieves efficient gene transfer to anterior segment in the mouse eye.PLoS ONE 12(8):

e0182473(2017),其内容通过引用整体并入。

[0307] 衣壳多肽

[0308] 在一些实施方案中,本公开提供衣壳多肽,其使得对应的衣壳化AAV载体实现对至少一个神经元细胞亚群的增强的转导和/或嗜性。本公开的说明性衣壳多肽列于下表3中:

[0309] 表3:说明性衣壳多肽

[0310]

名称	氨基酸序列	核苷酸序列
AAV2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 13
AAV2.5	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 14
AAV2.5-TV	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 15
AAV2.5-2YF	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 16
AAV2.5-TV2YF	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 17
AAV5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 18

[0311]

名称	氨基酸序列	核苷酸序列
AAV6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 19
AAV9	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 20
AAV9-TV	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 21
AAV9-2YF	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 22
AAV9-TV2YF	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 23

[0312] 在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽是AAV2。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:1的序列、基本上由根据SEQ ID NO:1的序列组成或由根据SEQ ID NO:1的序列组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:1的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:13具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0313] 在一些实施例中,本公开的衣壳多肽是AAV2.5。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:2的序列、基本上由根据SEQ ID NO:2的序列组成或由根据SEQ ID NO:2的序列组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:2具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:2的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸

序列,基本上由其组成,或由其组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:14具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0314] 在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽是AAV2.5-TV。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:2的T492的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括对应于SEQ ID NO:2的T492V的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:3的序列、基本上由根据SEQ ID NO:3的序列组成或由根据SEQ ID NO:3的序列组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:3具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:3的V492的位置处的缬氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:3的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:3的V492的位置处的缬氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:15具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0315] 在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽是AAV2.5-2YF。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:2的Y705和/或Y731的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括对应于SEQ ID NO:2的Y705F和/或Y731F的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:4的序列、基本上由根据SEQ ID NO:4的序列组成或由根据SEQ ID NO:4的序列组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:4具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:4的F705/F731的位置处的苯丙氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:4的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:4的F705和/或F731的位置处的苯丙氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:16具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0316] 在一些实施例中,本公开的衣壳多肽是AAV2.5-TV2YF。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:2的T492、Y705和/或Y731的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开内容的衣壳多肽包括对应于SEQ ID NO:2的T492V、Y705F和/或Y731F的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:5的序列、基本上由根据SEQ ID NO:5的序列组成或由根据SEQ ID NO:5的序列组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基

酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:5具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:5的V492的位置处的缬氨酸,并且其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:5的F705和/或F731的位置处的苯丙氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:5的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:5的V492的位置处的缬氨酸,并且其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:5的F705和/或F731的位置处的苯丙氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:17具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0317] 在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽是AAV5。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:6的序列、基本上由根据SEQ ID NO:6的序列组成或由根据SEQ ID NO:6的序列组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:6具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:6的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:18具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0318] 在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽是AAV6。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:7的序列、基本上由根据SEQ ID NO:7的序列组成或由根据SEQ ID NO:7的序列组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:7具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:7的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:19具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0319] 在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽是AAV9。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:8的序列、基本上由根据SEQ ID NO:8的序列组成或由根据SEQ ID NO:8的序列组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:8具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:8的

序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:20具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0320] 在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽是AAV9-TV。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:8的T492的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括对应于SEQ ID NO:8的T492V的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:9的序列、基本上由根据SEQ ID NO:9的序列组成或由根据SEQ ID NO:9的序列组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:9具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:9的V492的位置处的缬氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:9的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:9的V492的位置处的缬氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:21具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0321] 在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽是AAV9-2YF。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:8的Y705和/或Y731的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括对应于SEQ ID NO:8的Y705F和/或Y731F的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:10的序列、基本上由根据SEQ ID NO:10的序列组成或由根据SEQ ID NO:10的序列组成。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:10具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:10的F705/F731的位置处的苯丙氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:10的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成,其中衣壳多肽在对应于SEQ ID NO:10的F705和/或F731的位置处包括苯丙氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:22具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0322] 在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽是AAV9-TV2YF。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:8的T492、Y705和/或Y731的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括对应于SEQ ID NO:8的T492V、Y705F和/或Y731F的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括根据SEQ ID NO:11的序列、基本上由根据SEQ ID NO:11的序列组成或由根据SEQ ID NO:11的序列组成。在一些实施方案中,

本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:11具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:11的V492的位置处的缬氨酸,并且其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:11的F705和/或F731的位置处的苯丙氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:11的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:11的V492的位置处的缬氨酸,并且其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:11的F705和/或F731的位置处的苯丙氨酸。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括由与SEQ ID NO:23具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0323] 在一些实施方案中,AAV载体包括AAV衣壳多肽,所述AAV衣壳多肽包括在对应于AAV9衣壳多肽(SEQ ID NO:8)的T492、Y705和/或Y731的一个或多个位置处的氨基酸突变,其中AAV衣壳多肽是血清型AAV2、AAV2.5、AVV5、AAV6、AAV9或另一种AAV血清型。在一些实施方案中,一个或多个位置是两个或更多个位置、两个位置或三个位置。在一些实施方案中,病毒载体包括AAV衣壳多肽,所述AAV衣壳多肽包括对应于AAV9衣壳多肽(SEQ ID NO:8)的T492V、Y705F和/或Y731F或其任何组合的一个或多个氨基酸取代,其中所述AAV衣壳多肽多肽是血清型AAV2、AAV2.5、AVV5、AAV6、AAV9或另一种AAV血清型。在一些实施方案中,所述一个或多个取代是两个或更多个取代、两个取代或三个取代。

[0324] 如本文所用,“T492、Y705和/或Y731”是指例如T492+Y705、T492+Y731、T492+Y705+Y731或其任何其他可能的组合。类似地,“T492V、Y705F和/或Y731F”是指例如T492V+Y705F、T492V+Y731F、T492V+Y705F+Y731F或其任何其他可能的组合。

[0325] 在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:8具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或99.7%序列同一性,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:8的T492的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的衣壳多肽包括与SEQ ID NO:8的序列相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变(取代、缺失和/或添加)氨基酸的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成,其中衣壳多肽包括在对应于SEQ ID NO:8的T492的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是T492V。在一些实施方案中,取代是T492I。在一些实施方案中,取代是T492L。在一些实施方案中,T492残基被选自缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)和异亮氨酸(Ile)的疏水性氨基酸取代。在一些实施方案中,T492残基被选自甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、甲硫氨酸(Met)和色氨酸(Trp)的疏水性氨基酸取代。

[0326] 神经元和神经纤维

[0327] 在一些实施方案中,本公开提供将包括表达盒的重组核酸递送至位于海马中的靶神经元(即,海马神经元)中的方法。

[0328] 在一些实施方案中,海马神经元是兴奋性神经元。在一些实施方案中,表达盒包含

CAMKII家族启动子(例如hCaMKIIa)并导致所编码的转基因在兴奋性海马神经元中高表达和/或选择性表达。在一些实施方案中,海马神经元是Ca2+/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMKII)阳性兴奋性神经元。

[0329] 在一些实施方案中,海马神经元是抑制性神经元。在一些实施方案中,海马神经元是GABA能神经元。

[0330] 在一些实施方案中,本公开提供将包括表达盒的重组核酸递送至位于背根神经节(或脊神经节;也称为后根神经节)中的靶神经元的方法。背根神经节(DRG)是脊神经背根中的神经元集(神经节)。被称为一级神经元的感觉神经元的细胞体位于背根神经节中。背根神经节神经元的轴突称为传入神经(afferents)。在周围神经系统中,传入神经是指将感觉信息传递到中枢神经系统(即脑和脊髓)的轴突。

[0331] 在一些实施方案中,本公开提供将包括表达盒的重组核酸递送至位于三叉神经节(trigeminal ganglia)(或加塞神经节(Gasserian ganglion)、或半月神经节(semilunar ganglia)、或加塞氏神经节(Gasser's ganglion))中的靶神经元的方法。三叉神经节(TGG)是三叉神经(CNV)的感觉神经节,在硬膜中占据一个腔(麦氏腔),覆盖颞骨岩部尖附近的三叉神经压迹。

[0332] 轴突(也称为神经纤维)是脊椎动物神经元细胞的细长突起,通常将电脉冲(称为动作电位)传导远离神经细胞体。每个神经元只有一个轴突。因此,神经元细胞可以根据其轴突(神经纤维)分类。

[0333] Erlanger和Gasser将神经纤维分为三个一般类别(A、B和C组)。A组神经纤维高度有髓鞘,B组神经纤维中度有髓鞘,并且C组神经纤维无髓鞘。

[0334] A组神经纤维(A纤维)有四个细分:阿尔法(α)、贝塔(β)、伽马(γ)和德尔塔(δ)。这些细分具有不同量的髓鞘形成和轴突厚度,并且因此以不同的速度传送信号。Aα型纤维包括替代性分类系统的Ia型和Ib型感觉纤维,并且分别是来自肌梭末端和高尔基腱的纤维。Aβ型纤维和Aγ型纤维是来自牵张感受器的II型传入纤维。来自皮肤的Aβ型纤维主要用于触觉。Aδ型纤维是伤害性感受器的传入纤维。Aδ纤维将信息从周围机械感受器和温度感受器传送到脊髓背角。Aδ纤维用于接收和传送主要与急性疼痛(尖锐、立刻且持续时间相对较短)有关的信息。这种类型的疼痛可能是由以下几种刺激物导致的:温度诱导的、机械的和化学的。这可能是由激活回缩反应的反射弧中的AS纤维引发的回缩反射的一部分。Aδ纤维携带冷、压力和急性疼痛信号;因为Aδ纤维很细(直径为2-5μm)并且有髓鞘,所以Aδ纤维比无髓鞘的C纤维更快地发出脉冲,但比其他更厚的有髓鞘的A组神经纤维更慢。Aδ纤维的传导速度适中。

[0335] B组神经纤维(B纤维)是轴突,其中度有髓鞘,这表示比A组神经纤维更少髓鞘,并且比C组神经纤维更多髓鞘。B组神经纤维通常是自主神经系统的一般内脏传入纤维和节前神经纤维。

[0336] C组神经纤维(C纤维)无髓鞘并且直径小并且传导速度慢。C组纤维包括自主神经系统(ANS)中的节后纤维和背根处的神经纤维(IV纤维)。这些纤维传递感觉信息。这些神经纤维的损伤或损害会导致神经性疼痛。

[0337] 成熟伤害性感受器的周围末端是检测刺激并将刺激转换为电能的地方。当电能达到阈值时,就会诱发动作电位并将其驱动至中枢神经系统(CNS)。这导致了一系列事件,使

人们能够有意识地意识到疼痛。通过高阈值确定伤害性感受器仅对刺激的特定特征具有感觉特异性。仅当化学、温度或机械环境达到高阈值时,才会触发伤害性感受器。大多数伤害性感受器根据其作出反应的环境形态来分类。一些伤害性感受器对这些形态中的多于一种有反应,并且因此被指定为多觉型。其他伤害性感受器对这些形态都没有反应(尽管其可能在炎症条件下对刺激有反应),并且称为睡眠或沉默。

[0338] 伤害性感受器有两种不同类型的轴突。第一种是Aδ纤维轴突。Aδ纤维轴突有髓鞘,并且可以使动作电位以约20米/秒的速率向CNS行进。另一种类型是更慢的传导C纤维轴突。C纤维轴突只能以2米/秒左右的速率传导。这是由于C纤维轴突轻度有髓鞘或无髓鞘。因此,疼痛分为两个阶段。第一阶段由快速传导的Aδ纤维介导,并且第二阶段由(多觉型)C纤维介导。与Aδ纤维相关的疼痛可能与最初的极端尖锐疼痛有关。第二阶段是由于急性损伤导致的疼痛的时间更长、强度稍低的感觉。如果大量或长时间向C纤维输入,则会在脊髓背角中逐渐积聚;这种现象类似于肌肉中的破伤风,但称为发条拧紧(wind-up)。如果发生发条拧紧,则存在增加对疼痛敏感性的可能性。

[0339] 可以通过生物标记物如神经丝200(NF200,也称为神经丝重多肽)、降钙素基因相关肽(CGRP)和同工凝集素B4(IB4)来区分不同类别的神经纤维。Aα和Aβ纤维通常为NF200阳性,但IB4阴性。Aδ纤维通常对NF200和IB4均呈阳性。C纤维通常为IB4阳性,但NF200阴性。因此,NF200+神经元主要包括高度有髓鞘的Aα或中度有髓鞘的Aβ纤维。在一些情况下,这些神经元介导轻触和本体感受的信号。但一些NF200+神经元也可能介导伤害性感受信号。IB4+神经元主要包括用于伤害性感受的无髓鞘C纤维或Aδ纤维。并且CGRP+神经元主要包括用于伤害性感受的无髓鞘的C纤维或轻度有髓鞘的Aδ纤维。

[0340] 表达盒的特性

[0341] 在一些实施方案中,与对照表达盒(例如,具有组织特异性表达的对照)相比,本公开的表达盒介导所编码的转基因在一个或多个神经元中更高水平的表达。在一些实施方案中,对照表达盒包含表2中18号表达盒的所有调控元件,18号表达盒包含用于神经元特异性表达的hSyn-V2启动子。在一些实施方案中,此类对照表达盒包含排除转基因的序列(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:88的多核苷酸序列。在一些实施方案中,与具有普遍存在的而非组织特异性的转基因表达的对照表达盒相比,本公开的表达盒介导所编码的转基因在一个或多个神经元中相当或更高水平的表达。在一些实施方案中,对照表达盒包含表2中第17号表达盒的所有调控元件,该17号表达盒包含用于在真核细胞中强且普遍存在的表达的CAG(CMV增强子、cβ肌动蛋白启动子和rβ肌动蛋白-rGlob内含子)调控元件。在一些实施方案中,此类对照表达盒包含排除转基因的序列(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:87的多核苷酸序列。技术人员将容易地认识到在每种情况下使用的适当对照,并且通常对照表达盒将具有与比较的表达盒相同的转基因多核苷酸序列。

[0342] 可以通过本领域已知的技术(包括例如ELISA、ddPCR和/或免疫荧光分析)来测量转基因的表达水平,包括在本公开的实施例部分中描述的那些,以及本领域已知的其他方法。

[0343] 在一些实施方案中,与对照表达盒(例如,具有组织特异性表达的对照)相比,表达盒介导所编码的转基因在一个或多个靶神经元中更高水平的表达。在一些实施方案中,与对照表达盒相比,转基因表达水平增加约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％、约90％、约95％、约100％、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约7倍、约10倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约70倍或约100倍,包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中,与对照表达盒相比,转基因表达水平增加至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、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100％、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少7倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少70倍或至少100倍,包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中,对照表达盒包含与排除转基因的序列的SEQ ID NO:88(表2中的18号表达盒)具有至少90％、至少95％、至少99％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0344] 在一些实施方案中,与具有普遍存在的而非组织特异性的转基因表达的对照表达盒相比,表达盒介导所编码的转基因在一个或多个靶神经元中相当或更高水平的表达。在一些实施方案中,转基因表达水平是对照表达盒的转基因表达水平的至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、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100％、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少7倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少70倍或至少100倍,包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中,对照表达盒包含与排除转基因的序列的SEQ ID NO:87(表2中的17号表达盒)具有至少90％、至少95％、至少99％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0345] 在一些实施方案中,转基因表达水平是指mRNA表达水平。在一些实施方案中,转基因表达水平是指蛋白质表达水平。

[0346] 在一些实施方案中,靶神经元是海马神经元。在一些实施方案中,靶神经元是兴奋性神经元。

[0347] 在一些实施方案中,靶神经元是DRG或TGG神经元。

[0348] 在一些实施方案中,靶神经元包括A纤维。在一些实施方案中,靶神经元包括Aα或Aβ纤维。在一些实施方案中,靶神经元包括Aδ纤维。在一些实施方案中,靶神经元包括C纤维。

[0349] 在一些实施方案中,靶神经元包括NF200阳性且IB4阴性的神经纤维。在一些实施方案中,靶神经元包括NF200阳性且IB4阳性的神经纤维。在一些实施方案中,靶神经元包括NF200阴性且IB4阳性的神经纤维。在一些实施方案中,靶神经元包括CGRP阳性的神经纤维。

[0350] 转基因

[0351] 在一些实施方案中,本公开的表达盒包含转基因。在一些实施方案中,转基因编码蛋白质、肽、miRNA、siRNA或gRNA。在一些实施方案中,转基因编码由内部核糖体进入位点分隔的两个或更多个生物分子(例如,蛋白质),从而允许两个或更多个生物分子的共表达。

[0352] 在一些实施方案中,本公开的表达盒包含编码受体的转基因。在一些实施方案中,受体是工程化配体门控离子通道(eLGIC)或其嵌合形式。在一些实施方案中,工程化LGIC可以被小分子配体激活。在一些实施方案中,编码eLGIC的表达盒的施用将其递送至受试者的神经元细胞亚群中并引起eLGIC在神经元内的表达。在一些实施方案中,eLGIC的表达允许通过施用对应的小分子配体来调节这些神经元的活动。

[0353] 在一些实施方案中,转基因可操作地连接至一个或多个指导转基因的转录或表达

的控制/调控元件。控制元件(即调控元件)可以包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;高效的RNA加工信号,例如剪接和聚腺苷酸化(polyA)信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及当期望时,增强编码产物分泌的序列。本公开描述了示例性调控元件。

[0354] 此类控制元件可以包括通常与所选择的基因相关的控制序列(例如,内源细胞控制元件)。或者,可以使用异源控制序列。有用的异源控制序列通常包括衍生自编码哺乳动物或病毒基因的序列的那些序列。示例包括但不限于SV40早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复(LTR)启动子;腺病毒主要晚期启动子(AdMLP);单纯疱疹病毒(HSV)启动子、与目的基因异源的内源细胞启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子,例如CMV即刻早期启动子区(CMV-IE)、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、合成的启动子、杂合启动子等。另外,也可以使用衍生自非病毒基因(例如鼠金属硫蛋白基因)的序列。

[0355] 在一些实施方案中,细胞类型特异性或组织特异性启动子可以可操作地连接至转基因,允许在特定细胞类型或组织中选择性地或优先地产生由转基因编码的对应基因产物。在一些实施方案中,诱导型启动子可操作地连接至转基因。

[0356] 在一些实施方案中,可以使用非病毒方法(例如,使用非病毒载体、合成纳米颗粒等)将编码转基因的表达盒递送至神经元。

[0357] 工程化配体门控离子通道(eLGIC)

[0358] 本公开描述了受体、其突变体以及其用于在治疗局灶性癫痫和/或神经性疼痛(如周围神经病和三叉神经痛)中的用途的方法。在一些实施方案中,受体是工程化配体门控离子通道(LGIC)。在一些实施方案中,受体是嵌合eLGIC。

[0359] 在一些实施方案中,受体是工程化受体(例如,eLGIC)。本文使用的术语“工程化受体”是指已经经过实验改变使得其在物理上和/或在功能上不同于对应的亲本受体的受体。在一些实施方案中,亲本受体是野生型受体。本文使用的术语“野生型受体”是指具有与在自然界中发现的蛋白质的多肽序列相同的多肽序列的受体。野生型受体包括天然存在于人中的受体以及天然存在于其他真核生物(例如原生生物、真菌、植物或动物,例如酵母、昆虫、线虫、海绵、哺乳动物、非哺乳动物脊椎动物)中的直系同源物。在一些实施方案中,亲本受体是非天然受体;也就是说,它是自然界中不存在的受体,例如从野生型受体工程化的受体。例如,亲本受体可以是工程化受体,其包括来自一种野生型受体的一个或多个亚基和来自第二种野生型受体的一个或多个亚基。因此,所得蛋白质由来自两种或更多种野生型受体的亚基组成。因此,在一些实施方案中,亲本受体是嵌合受体。本公开的工程化受体包括例如亲本受体突变体和转换受体。

[0360] 在一些实施方案中,本公开的工程化受体包括相对于对应的亲本受体的至少一个氨基酸突变,例如野生型受体的一个或多个域中的一个或多个突变。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。在一些实施方案中,工程化受体具有对应的亲本受体的约99%、约98%、约95%、约90%、约85%、约80%、约70%、约60%、约50%或更低的序列同一性,包括位于其间的所有值和子范围。在一些实施方案中,亲本受体突变体与对应的亲本受体具有85%或更高的序列同一性,例如与对应的亲本受体具有90%或更高或95%或更高,例如约96%、约97%、约98%或约99%的同一性,包括位于其间的所有值和子范围。在一些实施方案中,工程化受体(例如,亲代受体突变体)通过易错PCR生成。

[0361] 在一些实施方案中,本公开的工程化受体的配体结合域(LBD)包括相对于亲本受体的对应配体结合域的至少一个氨基酸突变,例如,野生型受体的配体结合域中的一个或多个突变。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。在一些实施方案中,工程化受体的配体结合域与亲本受体的对应配体结合域具有85%或更高的序列同一性,例如与亲本受体的对应配体结合域具有90%或更高或95%或更高,例如约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%同一性或100%同一性,包括位于其间的所有值和子范围。在一些实施方案中,工程化受体的配体结合域与亲本受体的对应配体结合域具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性,包括位于其间的所有值和子范围。

[0362] 在一些实施方案中,本公开的工程化受体的离子孔域(IPD)包括相对于亲代受体的对应离子孔域的至少一个氨基酸突变,例如,野生型受体的离子孔域中的一个或更多突变。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。在一些实施方案中,工程化受体的离子孔域与亲本受体的对应离子孔域具有85%或更高的序列同一性,例如与亲本受体的对应离子孔域具有90%或更高或95%或更高,例如约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%同一性或100%同一性,包括位于其间的所有值和子范围。在一些实施方案中,工程化受体的离子孔域与亲本受体的对应离子孔域具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性,包括位于其间的所有值和子范围。

[0363] 在一些实施方案中,氨基酸突变是相对于对应亲本受体的功能丧失氨基酸突变。“功能丧失”氨基酸突变是指这样的一个或多个突变:相对于亲本受体,其降低、显著减少或消除工程化受体的功能,例如通过相对于内源性配体与亲本受体的结合降低内源性配体与工程化受体的结合,或通过降低在工程化受体下游的信号传导途径的活性,所述信号传导途径通常响应于配体与对应亲本受体的结合而被激活。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。

[0364] 在一些实施方案中,氨基酸突变是相对于对应亲本受体的功能获得氨基酸突变。“功能获得”氨基酸突变是指这样的一个或多个突变:其相对于亲本受体改变工程化受体的功能,例如通过改变或增强工程化受体对配体相对于内源性配体与亲本受体的结合的亲和力,或通过改变或增强响应于配体与工程化受体的结合而被激活的信号传导途径相对于内源性配体与对应亲本受体的结合的活性。在一些实施方案中,功能获得突变导致工程化受体对配体的亲和力增加。在特定实施方案中,功能获得突变导致工程化受体对激动剂配体的亲和力增加。在一些实施方案中,功能获得突变导致拮抗剂配体在与工程化受体结合后充当激动剂配体(例如,导致激动剂信号传导途径而不是拮抗剂信号传导途径的激活)。在一些实施方案中,功能获得突变导致调节剂配体在与工程化受体结合后充当激动剂配体。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。

[0365] 在一些实施方案中,本公开的主题工程化受体或其配体结合域和/或离子孔域包括相对于对应亲本受体的一个或多个功能丧失氨基酸突变和一个或多个功能获得氨基酸突变。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。

[0366] 在一些实施方案中,功能丧失突变和功能获得突变处于相同残基处,即它们是相同突变。在其他实施方案中,功能丧失突变和功能获得突变是不同氨基酸残基处的突变。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。在一些实施方案中,包括功能丧失突变和/或功能获

得突变的主题工程化受体(或其配体结合域和/或其离子孔域)与对应的亲本受体(例如野生型受体或非天然受体)(或其配体结合域和/或离子孔域)具有约99%、约98%、约95%、约90%、约85%、约80%、约70%、约60%、约50%(包括其间的所有范围和子范围)或更低的序列同一性。在一些实施方案中,主题工程化受体(或其配体结合域和/或其离子孔域)与对应的亲本受体(或其配体结合域和/或离子孔域)具有约85%或更高的序列同一性,例如,85%、90%或95%或更高的序列同一性,在一些情况下96%、97%、98%或更高的序列同一性,例如99%或99.5%或更高的序列同一性,包括位于其间的所有值和子范围。

[0367] 在一些方面,本公开的工程化受体包括由衍生自一种野生型受体的一个或多个氨基酸序列(例如亚基)与衍生自第二种野生型受体的一个或多个氨基酸序列(例如亚基)的组合产生的受体。换句话说,工程化受体包括彼此异源的氨基酸序列,其中"异源的"是指不在自然界中一起出现。此类受体在本文中称为"嵌合受体"。在一些实施方案中,嵌合受体充当亲本受体,由其产生本公开的工程化受体。在一些实施方案中,嵌合受体包括来自第一LGIC的配体结合域和来自第二LGIC的离子孔域。

[0368] 在一些实施方案中,亲本受体突变体表现出对激动剂配体增加的亲和力。在一些实施方案中,在与野生型受体结合时具有拮抗剂或调节剂的功能的配体在与亲本受体突变体结合时具有激动剂的功能。

[0369] 在一些实施方案中,工程化受体是"配体门控离子通道"或LGIC。LGIC是指一大类跨膜蛋白,它们在被特定配体激活后允许离子穿过。LGIC由至少两个域构成:配体结合域和跨膜离子孔域。配体与LGIC的结合导致LGIC的激活和离子孔的打开。配体结合引起通道对一种或多种特定离子的通透性的剧烈变化;当通道无活性或关闭时,实际上没有离子可以穿过通道,但是在配体结合后每秒多达107个离子可以穿过。在一些实施方案中,LGIC响应细胞外配体(例如,神经递质)并促进离子流入胞质溶胶。在一些实施方案中,LGIC响应细胞内配体(例如,ATP等核苷酸和诸如PIP2等信号传导中间体)并促进离子从胞质溶胶流出到细胞外环境中。重要的是,LGIC的激活导致离子(例如Ca2+、Na+、K+、Cl-等)跨细胞膜转运,并不会导致配体本身的转运。

[0370] LGIC受体由多个亚基组成并且可以是同聚体受体或异聚体受体。同聚体受体由全部是相同类型的亚基组成。异聚体受体由这样的亚基构成:其中至少一个亚基不同于在所述受体内包括的至少一个其他亚基。例如,甘氨酸受体由5个亚基组成,其中有两种类型:α亚基,其中有四种同等型(α1-α4)和β亚基,其中有一个已知的同等型。示例性同聚体GlyR是由5个α1-GlyR亚基组成的GlyR。类似地,同聚体GABAA受体可以由β3-GABAA亚基组成,并且nAchR受体可以由α7-nAchR亚基组成。示例性的异聚体GlyR可以由一个或多个α-亚基和一个或多个β-亚基(例如,α1β-GlyR)组成。示例性LGIC受体的亚基如表4所示。

[0371] 表4:LGIC受体和亚基

[0372]

受体	亚基	亚基同等型
GlyR	GLRA1	
	GLRA2	
	GLRA3	
	GLRA4	
	GLRB	
$5HT_3$	5-HT3A	
	5-HT3B	
	5-HT3C	
	5-HT3D	
	5-HT3E	
nAChR	α	α1
		α2
		α3
		α4
		α5
		α6
		α7
		α8
		α9
		α10
	β	β1
		β2
		β3

[0373]

受体	亚基	亚基同等型
		β4
	γ	γ
	δ	δ
	ε	ε
$GABA_A$	α	α1
		α2
		α3
		α4
		α5
$GABA_A$	α	α6
	β	β1
		β2
		β3
	γ	γ1
		γ2
		γ3
	δ	δ
	ε	ε
	π	π
	ρ	ρ1
		ρ2
		ρ3
P2X	P2X1	
	P2X2	
	P2X3	
	P2X4	
	P2X5	
	P2X6	
	P2X7	
KCNQ	α	K_vα1
		K_vα2
		K_vα3
		K_vα4
		K_vα5
		K_vα6
		K_vα7
		K_vα8
		K_vα9
		K_vα10
		K_vα11
		K_vα12
	β	K_vβ1
		K_vβ2
		K_vβ3
		minK
		MiRP1
		MiRP2
		MiRP3
		KCNE1 样

[0374]

受体	亚基	亚基同等型
		KCNIP1
		KCNIP2
		KCNIP3
		KCNIP4

[0375] 适合用于特定实施方案中的LGIC家族的说明性示例包括但不限于Cys-环受体,如甘氨酸受体(GlyR)、血清素受体(例如,5-HT3受体)、λ-氨基丁酸A(GABA-A)受体和烟碱型乙酰胆碱受体(nAchR);以及酸敏感(质子门控的)离子通道(ASIC)、上皮钠通道(ENaC)、促离子型谷氨酸受体、IP3受体、P2X受体、雷诺丁受体和锌激活通道(ZAC)。

[0376] 适合于与本文所述的方法一起使用的LGIC的具体非限制性示例包括:HTR3A;HTR3B;HTR3C;HTR3D;HTR3E;ASIC1;ASIC2;ASIC3;SCNN1A;SCNN1B;SCNN1D;SCNN1G;GABRA1;GABRA2;GABRA3;GABRA4;GABRA5;GABRA6;GABRB1;GABRB2;GABRB3;GABRG1;GABRG2;GABRG3;GABRD;GABRE;GABRQ;GABRP;GABRR1;GABRR2;GABRR3;GLRA1;GLRA2;GLRA3;GLRA4;GLRB;GRIA1;GRIA2;GRIA3;GRIA4;GRID1;GRID2;GRIK1;GRIK2;GRIK3;GRIK4;GRIK5;GRIN1;GRIN2A;GRIN2B;GRIN2C;GRIN2D;GRIN3A;GRIN3B;ITPR1;ITPR2;ITPR3;CHRNA1;CHRNA2;CHRNA3;CHRNA4;CHRNA5;CHRNA6;CHRNA7;CHRNA9;CHRNA10;CHRNB1;CHRNB2;CHRNB3;CHRNB4;CHRNG;CHRND;CHRNE;P2RX1;P2RX2;P2RX3;P2RX4;P2RX5;P2RX6;P2RX7;RYR1;RYR2;RYR3和ZACN。

[0377] 可用于产生本公开的工程化受体的野生型LGIC受体的序列的非限制性示例包括以下。在序列中,信号肽用斜体表示,配体结合域用粗体表示,离子孔域用下划线表示:

[0378] 在一些实施方案中,野生型LGIC受体是人烟碱胆碱能受体α7亚基(α7-nAchR)(GenBank登录号NP_000737.1,SEQ ID NO:25),由CHRNA7基因(GenBank登录号NM_000746.5)编码:

[0379]

```
          10         20         30         40         50         60
MRCSPGGVWL ALAASLLHVS LQGEFQRKLY KELVKNYNPL ERPVANDSQP LTVYFSLSLL
          70         80         90        100        110        120
QIMDVDEKNQ VLTTNIWLQM SWTDHYLQWN VSEYPGVKTV RFPDGQIWKP DILLYNSADE
```

130 140 150 160 170 180

RFDATFHTNV LVNSSGHCQY LPPGIFKSSC YIDVRWFPFD VQHCKLKFGS WSYGGWSLDL

190 200 210 220 230 240

QMQEADISGY IPNGEWDLVG IPGKRSERFY ECCKEPYPDV TFTVTMRRRT LYYGLNLLIP

250 260 270 280 290 300

CVLISALALL VFLLPADSGE KISLGITVLL SLTVFMLLVA EIMPATSDSV PLIAQYFAST

310 320 330 340 350 360

[0380] MIIVGLSVVV TVIVLQYHHH DPDGGKMPKW TRVILLNWCA WFLRMKRPGE DKVRPACQHK

370 380 390 400 410 420

QRRCSLASVE MSAVAPPPAS NGNLLYIGFR GLDGVHCVPT PDSGVVCGRM ACSPTHDEHL

430 440 450 460 470 480

LHGGQPPEGD PDLAKILEEV RYIANRFRCQ DESEAVCSEW KFAACVVDRL CLMAFSVFTI

490 500 502

ICTIGILMSA PNFVEAVSKD FA

(SEQ ID NO:25)。

[0381] 在一些实施方案中,野生型LGIC受体是人α1甘氨酸受体(GlyRα1)(GenBank登录号NP_001139512.1,SEQ ID NO:26),由GLRA1基因(GenBank登录号NM_001146040.1)编码:

10 20 30 40 50 60

*MYSFNTLRLY LWETIVFFSL AASKEAEA***AR SAPKPMSPSD FLDKLMGRTS GYDARIRPNF**

70 80 90 100 110 120

KGPPVNVSCN IFINSFGSIA ETTMDYRVNI FLRQQWNDPR LAYNEYPDDS LDLDPSMLDS

130 140 150 160 170 180

IWKPDLFFAN EKGAHFHEIT TDNKLLRISR NGNVLYSIRI TLTLACPMDL KNFPMDVQTC

[0382]

190 200 210 220 230 240

IMQLESFGYT MNDLIFEWQE QGAVQVADGL TLPQFILKEE KDLRYCTKHY NTGKFTCIEA

250 260 270 280 290 300

RFHLERQMGY YLIQMYIPSL LIVILSWISF WINMDAAPAR VGLGITTVLT MTTQSSGSRA

310 320 330 340 350 360

SLPKVSYVKA IDIWMAVCLL FVFSALLEYA AVNFVSRQHK ELLRFRRKRR HHKSPMLNLF

[0383]

```
        370        380        390        400        410        420
QEDEAGEGRF NFSAYGMGPA CLQAKDGISV KGANNSNTTN PPPAPSKSPE EMRKLFIQRA
        430        440        450        457
KKIDKISRIG FPMAFLIFNM FYWIIYKIVR REDVHNQ
```

(SEQ ID NO:26)。

[0384] 在一些实施方案中,野生型LGIC受体是人α2甘氨酸受体(GlyRα2)(GenBank登录号NP_001112357.1,SEQ ID NO:27),由GLRA2基因(GenBank登录号NM_001118885.1)编码:

```
        10         20         30         40         50         60
MNRQLVNILT ALFAFFLETN HFRTAFCKDH DSRSGKQPSQ TLSPSDFLDK LMGRTSGYDA
        70         80         90        100        110        120
RIRPNFKGPP VNVTCNIFIN SFGSVTETTM DYRVNIFLRQ QWNDSRLAYS EYPDDSLDLD
       130        140        150        160        170        180
PSMLDSIWKP DLFFANEKGA NFHDVTTDNK LLRISKNGKV LYSIRLTLTL SCPMDLKNFP
       190        200        210        220        230        240
MDVQTCTMQL ESFGYTMNDL IFEWLSDGPV QVAEGLTLPQ FILKEEKELG YCTKHYNTGK
       250        260        270        280        290        300
FTCIEVKFHL ERQMGYYLIQ MYIPSLLIVI LSWVSFWINM DAAPARVALG ITTVLTMTTQ
       310        320        330        340        350        360
SSGSRASLPK VSYVKAIDIW MAVCLLFVFA ALLEYAAVNF VSRQHKEFLR LRRRQKRQNK
       370        380        390        400        410        420
EEDVTRESRF NFSGYGMGHC LQVKDGTAVK ATPANPLPQP PKDGDAIKKK FVDRAKRIDT
       430        440        450  452
ISRAAFPLAF LIFNIFYWIT YKIIRHEDVH KK
```

(SEQ ID NO:27)。

[0386] 在一些实施方案中,野生型LGIC受体是人α3甘氨酸受体(GlyRα3)同等型L(GenBank登录号NP_006520.2,SEQ ID NO:28),由GLRA3基因(GenBank登录号NM_006529.3)编码:

[0387]

```
          10         20         30         40         50         60
MAHVRHFRTL VSGFYFWEAA LLLSLVATKE TDSARSRSAP MSPSDFLDKL MGRTSGYDAR
                  70         80         90        100        110        120
IRPNFKGPPV NVTCNIFINS FGSIAETTMD YRVNIFLRQK WNDPRLAYSE YPDDSLDLDP
         130        140        150        160        170        180
SMLDSIWKPD LFFANEKGAN FHEVTTDNKL LRIFKNGNVL YSIRLTLTLS CPMDLKNFPM
         190        200        210        220        230        240
DVQTCIMQLE SFGYTMNDLI FEWQDEAPVQ VAEGLTLPQF LLKEEKDLRY CTKHYNTGKF
         250        260        270        280        290        300
TCIEVRFHLE RQMGYYLIQM YIPSLLIVIL SWVSFWINMD AAPARVALGI TTVLTMTTQS
         310        320        330        340        350        360
SGSRASLPKV SYVKAIDIWM AVCLLFVFSA LLEYAAVNFV SRQHKELLRF RRKRKNKTEA
         370        380        390        400        410        420
FALEKFYRFS DMDDEVRESR FSFTAYGMGP CLQAKDGMTP KGPNHPVQVM PKSPDEMRKV
         430        440        450        460   464
FIDRAKKIDT ISRACFPLAF LIFNIFYWVI YKILRHEDIH QQQD
```

(SEQ ID NO:28)。

[0388] 在一些实施方案中,野生型LGIC受体是人α3甘氨酸受体(GlyRα3)同等型K(GenBank登录号NP_001036008.1,SEQ ID NO:29),由GLRA3基因(GenBank登录号NM_001042543.3)编码:

[0389]

```
          10         20         30         40         50
MAHVRHFRTL VSGFYFWEAA LLLSLVATKE TDSARSRSAP MSPSDFLDKL
          60         70         80         90        100
MGRTSGYDAR IRPNFKGPPV NVTCNIFINS FGSIAETTMD YRVNIFLRQK
         110        120        130        140        150
WNDPRLAYSE YPDDSLDLDP SMLDSIWKPD LFFANEKGAN FHEVTTDNKL
         160        170        180        190        200
LRIFKNGNVL YSIRLTLTLS CPMDLKNFPM DVQTCIMQLE SFGYTMNDLI
         210        220        230        240        250
```

[0390]

FEWQDEAPVQ VAEGLTLPQF LLKEEKDLRY CTKHYNTGKF TCIEVRFHLE

260 270 280 290 300

RQMGYYLIQM YIPSLLIVIL SWVSFWINMD AAPARVALGI TTVLTMTTQS

310 320 330 340 350

SGSRASLPKV SYVKAIDIWM AVCLLFVFSA LLEYAAVNFV SRQHKELLRF

360 370 380 390 400

RRKRKNKDDE VRESRFSFTA YGMGPCLQAK DGMTPKGPNH PVQVMPKSPD

410 420 430 440

EMRKVFIDRA KKIDTISRAC FPLAFLIFNI FYWVIYKILR HEDIHQQQD

(SEQ ID NO:29)。

[0391] 在一些方面,工程化受体是嵌合LGIC受体。在一些实施方案中,嵌合受体包括衍生自至少第一LGIC的配体结合域序列和衍生自至少第二LGIC的离子孔传导域序列(或更简单地,“离子孔域序列”)。在一些实施方案中,衍生的氨基酸序列与其衍生自的LGIC的对应区相同。在一些实施方案中,与其衍生自的LGIC的对应区相比,衍生的氨基酸序列可以含有至少一个氨基酸位置中的改变。在一些实施方案中,衍生自LGIC序列的氨基酸序列与原始氨基酸序列的对应区相差最多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基。在一些实施方案中,衍生的氨基酸序列与LGIC氨基酸序列的对应区具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%(包括其间的所有范围和子范围)的序列同一性。

[0392] 在一些实施方案中,第一和第二LGIC是Cys环受体。Cys环受体的配体结合域序列和离子孔域序列是本领域熟知的,并且可以通过使用公开可以得到的软件例如PubMed、Genbank、Uniprot等从文献中容易地鉴定。在一些实施方案中,嵌合受体的配体结合域与第一LGIC的配体结合域具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性。在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域与第二LGIC的离子孔域具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少具有99.5%或100%序列同一性。在上述序列中,配体结合域用粗体表示,离子孔域用下划线表示。

[0393] 在一些实施方案中,嵌合受体的配体结合域衍生自人甘氨酸受体的配体结合域序列。在一些实施方案中,人甘氨酸受体是人GlyRα1(SEQ ID NO:26)。在一些实施方案中,配体结合域包括与GlyRα1的约氨基酸29-235(例如SEQ ID NO:26的氨基酸29-235、氨基酸29-240、氨基酸29-246、氨基酸29-248、氨基酸29-250或氨基酸29-252)具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些此类实施方案中,配体结合域基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸29-235组成、基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸29-240组成、基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸29-246组成、基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸29-248组成、基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸29-250组成、基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸29-252组成。在一些实施方案中,离子孔域

序列衍生自除人GlyRα1以外的Cys环受体。

[0394] 在一些实施方案中,嵌合受体的配体结合域包括人烟碱胆碱能受体的配体结合域序列。在一些实施方案中,人烟碱胆碱能受体是人α7-nAChR。在一些实施方案中,配体结合域包括人α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的约氨基酸23-220(例如SEQ ID NO:25的氨基酸23-220、氨基酸23-221、氨基酸23-222、氨基酸23-223、氨基酸23-224、氨基酸23-225、氨基酸23-226、氨基酸23-227、氨基酸23-228、氨基酸23-229、氨基酸23-230或氨基酸23-231)。在一些实施方案中,配体结合域基本上由SEQ ID NO:25的氨基酸23-220、氨基酸23-221、氨基酸23-222、氨基酸23-223、氨基酸23-224、氨基酸23-225、氨基酸23-226、氨基酸23-227、氨基酸23-228、氨基酸23-229、氨基酸23-230或氨基酸23-231组成。在一些实施方案中,离子孔域序列衍生自除人α7-nAChR以外的Cys环受体。

[0395] 在一些实施方案中,嵌合受体的配体结合域衍生自人烟碱胆碱能受体的配体结合域序列。在一些实施方案中,人烟碱胆碱能受体是人α7-nAChR。在一些实施方案中,配体结合域包括与人α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的约氨基酸23-220(例如SEQ ID NO:25的氨基酸23-220、氨基酸23-221、氨基酸23-222、氨基酸23-223、氨基酸23-224、氨基酸23-225、氨基酸23-226、氨基酸23-227、氨基酸23-228、氨基酸23-229、氨基酸23-230或氨基酸23-231)具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,离子孔域序列衍生自除人α7-nAChR以外的Cys环受体。

[0396] 在一些实施方案中,工程化受体的离子孔域衍生自人甘氨酸受体的离子孔域序列。在一些实施方案中,人甘氨酸受体是人GlyRα1。在一些实施方案中,离子孔域包括与GlyRα1(SEQ ID NO:26)的约氨基酸245-457(例如SEQ ID NO:26的氨基酸240-457、氨基酸245-457、氨基酸248-457、氨基酸249-457、氨基酸250-457、氨基酸255-457或氨基酸260-457)具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,离子孔域基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸245-457组成,基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸248-457组成,基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸249-457组成,或基本上由SEQ ID NO:26的氨基酸250-457组成。

[0397] 在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括人GlyRα2的离子孔域序列(SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括衍生自人GlyRα2的离子孔域序列(SEQ ID NO:27)的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与人GlyRα2的离子孔域序列(SEQ ID NO:27)具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%序列同一性。在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括与人GlyRα2的离子孔域序列(SEQ ID NO:27)相同的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,人GlyRα2的离子孔域序列包括SEQ ID NO:27的氨基酸254-452、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,人GlyRα2的离子孔域序列包括SEQ ID NO:27的氨基酸254-452、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,人GlyRα2的离子孔域序列包括SEQ ID NO:27的氨基酸258-452、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,人GlyRα2的离子孔域序列包括SEQ ID NO:27的氨基酸260-452、基本上由其组成或由其组成。

[0398] 在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括人GlyRα3同等型L的离子孔域序列(SEQ ID NO:28)。在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括衍生自人GlyRα3同等型L的离子孔域序列(SEQ ID NO:28)的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与人GlyRα3同等型L的离子孔域序列(SEQ ID NO:28)具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%序列同一性。在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括与人GlyRα3同等型L的离子孔域序列(SEQ ID NO:28)相同的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,人GlyRα3同等型L的离子孔域序列包括SEQ ID NO:28的氨基酸253-464、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,人GlyRα3同等型L的离子孔域序列包括SEQ ID NO:28的氨基酸257-464、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,人GlyRα3同等型L的离子孔域序列包括SEQ ID NO:28的氨基酸259-464、基本上由其组成或由其组成。

[0399] 在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括人GlyRα3同等型K的离子孔域序列(SEQ ID NO:29)。在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括衍生自人GlyRα3同等型K的离子孔域序列(SEQ ID NO:29)的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序列组成或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与人GlyRα3同等型K的离子孔域序列(SEQ ID NO:29)具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%序列同一性。在一些实施方案中,嵌合受体的离子孔域包括与人GlyRα3同等型K的离子孔域序列(SEQ ID NO:29)相同的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,人GlyRα3同等型K的离子孔域序列包括SEQ ID NO:29的氨基酸253-449、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,人GlyRα3同等型K的离子孔域序列包括SEQ ID NO:29的氨基酸257-449、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,人GlyRα3同等型K的离子孔域序列包括SEQ ID NO:29的氨基酸259-449、基本上由其组成或由其组成。

[0400] 在一些实施例中,离子孔域衍生自人烟碱胆碱能受体的离子孔域序列。在一些实施方案中,人烟碱胆碱能受体是人α7-nAChR。在一些实施方案中,离子孔域包括与α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的约氨基酸230-502(例如氨基酸227-502、氨基酸230-502、氨基酸231-502、氨基酸232-502或氨基酸235-502)具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些此类实施方案中,离子孔域基本上由SEQ ID NO:25的氨基酸227-502组成、基本上由SEQ ID NO:25的氨基酸230-502组成、基本上由SEQ ID NO:25的氨基酸231-502组成、基本上由SEQ ID NO:25的氨基酸232-502组成或基本上由SEQ ID NO:25的氨基酸235-502组成。

[0401] 在一些实施方案中,主题嵌合配体门控离子通道的离子孔域包括与离子孔域的M2-M3接头域异源的M2-M3接头域。“M2-M3接头域”或“M2-M3接头”是指LGIC的离子孔域内的序列,该序列在其氨基(N)末端侧接受体的跨膜域2(M2)的C末端并且在其羧基(C)末端侧接受体的跨膜域3(M3)的N末端。LGIC的M2-M3接头可以从本领域和/或通过使用任何公众可得到的蛋白质分析工具(例如Expasy、uniProt等)容易地确定。在一些实施方案中,当嵌合受体的离子孔域包括异源M2-M3接头时,M2-M3接头与嵌合受体的配体结合域衍生自相同的受体。例如,当主题配体门控的离子通道包括来自AChR的配体结合域和来自GlyR的离子孔域

时,其离子孔域序列可以包括衍生自AChR的M2-M3接头序列。在一些实施方案中,离子孔域衍生自GlyRα1并且M2-M3接头衍生自α7-nAChR。在一些实施方案中,从离子孔域去除的天然M2-M3接头序列对应于GlyRα1(SEQ ID NO:26)的约氨基酸293-313,例如氨基酸304-310、293-306、298-310、305-311、302-313等。在一些此类实施方案中,插入的M2-M3接头衍生自α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的约氨基酸281-295,例如,氨基酸290-295、281-290、281-295、283-295、287-292等,或与α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的氨基酸281-295或283-295至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%相同的序列。

[0402] 在一些实施方案中,主题嵌合配体门控离子通道的配体结合域包括与配体结合域的Cys环序列异源的Cys环域序列。"Cys环域序列"或"Cys环序列"是指Cys环LGIC的配体结合域内的域,该域形成在N末端和C末端侧接半胱氨酸的环结构。不希望受理论束缚,认为在配体与配体结合域结合后,Cys环在结构上移动到与M2-M3环非常接近,此移动介导胞外域中的配体结合生物物理转换为离子孔域中的信号转导(如在Miller and Smart,Trends in Pharmacological Sci 2009:31(4)中所综述的)。用异源Cys环序列取代内源Cys环序列可以使LGIC的电导率增加1.5倍或更多,例如至少2倍、3倍或4倍,在一些情况下,至少5倍或6倍,并且在某些剂量下,至少7倍、8倍、9倍或10倍。Cys环受体的Cys环域可以从本领域和/或通过使用任何公众可得到的蛋白质分析工具(例如Expasy、uniProt等)容易地确定。典型地,当嵌合受体的配体结合域包括异源Cys-环序列时,该Cys-环序列与嵌合受体的离子孔域衍生自相同的受体。例如,当主题嵌合配体门控离子通道包括来自AChR的配体结合域和来自GlyR的离子孔域时,主题配体门控的离子通道可以包括来自AChR的配体结合域序列,但是Cys-环域的序列除外,其替代性地衍生自GlyR。在一些实施方案中,配体结合域衍生自a7-nAChR并且Cys-环序列衍生自GLyR。在一些实施方案中,从配体结合域去除的Cys环序列对应于α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的约氨基酸150-164,例如α7-nAChR的氨基酸150-157。在一些实施方案中,插入的Cys环序列衍生自GlyRα1(SEQ ID NO:26)的约氨基酸166-180,例如GlyRα1的氨基酸166-172,或与GlyRα1的氨基酸166-180至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同的序列。在一些实施方案中,插入的Cys环序列衍生自GlyRα2(SEQ ID NO:27)的约氨基酸172-186,例如GlyRα2的氨基酸172-178,或与GlyRα2的氨基酸172-186至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同的序列。在一些实施方案中,插入的Cys环序列衍生自GlyRα3(SEQ ID NO:28或29)的约氨基酸171-185,例如GlyRα3的氨基酸171-177,或与GlyRα3的氨基酸171-185至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同的序列。

[0403] 在一些实施方案中,主题嵌合配体门控离子通道的配体结合域包括与配体结合域的β1-2环域序列异源的β1-2环域序列。"β1-2环域序列"或"β1-2环或β1-β2环"是指Cys-环LGIC的配体结合域内的域,该域在其N末端侧接β1折叠的C末端且在其C末端侧接β2折叠的N末端。不希望受理论束缚,认为β1-2环有助于介导胞外域中的配体结合生物物理转换至离子孔域和随后的信号转导(即,在GlyR的情况下的氯离子流入)。认为在配体结合后,β1-2环与Cys环一起非常接近M2-M3环,以介导细胞外域中的配体结合的生物物理转换为M2-M3环所在的离子孔域中的信号转导(如在Miller和Smart,同上中所综述的)。用异源β1-2环序列取代内源β1-2环序列可以使LGIC的电导率增加1.5倍或更多,例如至少2倍、3倍或4倍,在一些情况下,至少5倍或6倍,并且在某些剂量下,至少7倍、8倍、9倍或10倍。Cys环受体的β1-2

环域可以从本领域和/或通过使用任何公众可得到的蛋白质分析工具(例如Expasy、uniProt等)容易地确定。典型地,当嵌合受体的配体结合域包括异源β1-2环序列时,该β1-2环序列与嵌合受体的离子孔域衍生自相同的受体。例如,当主题嵌合配体门控离子通道包括衍生自AChR的配体结合域和衍生自GlyR的离子孔域时,该配体结合域的β1-2环域的序列可以衍生自GlyR。在一些实施方案中,配体结合域衍生自α7-nAChR。在一些实施方案中,从配体结合域去除的β1-2环序列对应于α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的约氨基酸64-72或67-70,例如α7-nAChR的氨基酸67-70、66-71或64-72。在一些实施方案中,插入的β1-2环序列是GlyRα1(SEQ ID NO:26)的约氨基酸79-85,例如GlyRα1的氨基酸80-85、81-84、79-85或81-84,具有至多3个、至多2个、至多1个氨基酸突变,或没有氨基酸突变。在一些实施方案中,离子孔域衍生自GlyRα2并且插入的β1-2环对应于GlyRα2(SEQ ID NO:27)的约氨基酸86-91,具有至多3个、至多2个、至多1个氨基酸突变,或没有氨基酸突变。在一些实施方案中,离子孔域衍生自GlyRα3并且插入的β1-2环对应于GlyRα3(SEQ ID NO:28或29)的约氨基酸85-90,具有至多3个、至多2个、至多1个氨基酸突变,或没有氨基酸突变。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。

[0404] 在一些实施方案中,本公开提供嵌合LGIC受体,嵌合LGIC受体包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域,其中配体结合域包括本公开的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,人甘氨酸受体是人甘氨酸受体α1、人甘氨酸受体α2或人甘氨酸受体α3。在一些实施方案中,配体结合域包括衍生自人甘氨酸受体的Cys环域。在一些实施方案中,配体结合域包括衍生自人甘氨酸受体的β1-2环域。

[0405] 本公开的嵌合LGIC受体序列的非限制性示例包括本文公开的序列SEQ ID NO:30-31和33。在一些实施方案中,嵌合LGIC受体与本文SEQ ID NO:30-31和33中提供的序列具有85%或更高的序列同一性,与SEQ ID NO:30-31和33中提供的序列具有90%或更高、93%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%的序列同一性。在序列中,信号肽用斜体表示,配体结合域用粗体表示,离子孔域用下划线表示。

[0406] 在一些实施方案中,嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1嵌合体,其包括人α7-nAChR信号肽(斜体)和配体结合域(粗体),所述配体结合域包括GlyRα1Cys环序列(小写字母);其与人GlyRα1离子孔域(带下划线)融合。在一些实施方案中,嵌合LGIC受体包括与SEQ ID NO:33具有80%或更高、85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%序列同一性的氨基酸序列:

[0407]

```
        10         20         30         40         50         60
MRCSPGGVWL ALAASLLHVS LQGEFQRKLY KELVKNYNPL ERPVANDSQP LTVYFSLSLL
        70         80         90        100        110        120
QIMDVDEKNQ VLTTNIWLQM SWTDHYLQWN VSEYPGVKTV RFPDGQIWKP DILLYNSADE
       130        140        150        160        170        180
RFDATFHTNV LVNSSGHCQY LPPGIFKSSc pmdlknfpmd vqtcKLKFGS WSYGGWSLDL
       190        200        210        220        230        240
QMQEADISGY IPNGEWDLVG IPGKRSERFY ECCKEPYPDV TFTVTMRRRM GYYLIQMYIP
       250        260        270        280        290        300
SLLIVILSWI SFWINMDAAP ARVGLGITTV LTMTTQSSGS RASLPKVSYV KAIDIWMAVC
       310        320        330        340        350        360
LLFVFSALLE YAAVNFVSRQ HKELLRFRRK RRHHKSPMLN LFQEDEAGEG RFNFSAYGMG
       370        380        390        400        410        420
PACLQAKDGI SVKGANNSNT TNPPPAPSKS PEEMRKLFIQ RAKKIDKISR IGFPMAFLIF
       430        439
NMFYWIIYKI VRREDVHNQ
```

[0408] (SEQ ID NO:33,由SEQ ID NO:32编码)。

[0409] 在一些实施方案中,嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1嵌合体,其包括人α7-nAChR信号肽(斜体)和配体结合域(粗体),所述配体结合域包括GlyRα1β1-2环序列(小写字母)和Cys环序列(小写字母);与人GlyRα1离子孔域融合(带下划线):

[0410]

```
MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFSLSL
LQIMDVDettmVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDGQIWKPDILLYNSA
DERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSScpmdlknfpmdvqtcKLKFGSWSYGGWS
LDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRMGYYLIQ
MYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDI
WMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNF
SAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGF
PMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ
```

[0411] (SEQ ID NO:30)。

[0412] 在一些实施方案中,嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1嵌合体(R229连接处),其包括人α7-nAChR信号肽(斜体)和配体结合域(粗体),与人GlyRα1离子孔域(带下划线)融合:

[0413] *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFSLSL LQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDGQIWKPDILLYNSA DERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWS LDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRR**MGYYLIQ MYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDI WMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNF SAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGF PMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

((SEQ ID NO: 31)。

[0414] 配体门控离子通道中的氨基酸突变

[0415] 如上文所讨论的,在一些方面,主题工程化受体包括至少一个氨基酸突变,相对于配体对未突变的亲本受体的效力,所述氨基酸突变改变配体对工程化受体的效力。换句话说,相对于未突变的亲本受体的效力,一个或多个氨基酸突变,例如功能丧失突变或功能获得突变,转变工程化受体对配体的效力。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个突变位于工程化受体的配体结合域中。在一些实施方案中,当工程化受体的配体结合域是Cys环受体蛋白时,一个或多个氨基酸突变是在对应于α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的选自由W77、Y94、R101、W108、Y115、T128、N129、V130、L131、Q139、L141、Y151、S170、W171、S172、S188、Y190、Y210、C212、C213和Y217组成的组的残基对应的残基处的取代。在一些实施方案中,一个残基被取代。在一些实施方案中,2、3、4或5个或更多个残基被取代,例如6、7、8、9或10个残基被取代。在某些实施方案中,该残基对应于α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的选自由W77、R101、Y115、N129、L131、S170、S172和S188组成的组的残基。在某些实施方案中,一个或多个取代位于α7-nAChR序列内。

[0416] 在一些实施方案中,一个或多个取代降低工程化受体对乙酰胆碱和非天然配体的效力,例如降低2倍或更多、3倍或更多、4倍或更多、5倍或更多、10倍或更多、20倍或更多、30倍或更多、50倍或更多或100倍。在某些实施方案中,一个或多个取代是对应于α7-nAChR的R101I、R101S、R101D、Y115L、Y115M、Y115D、Y115T、T128M、T128R、T128I、N129I、N129V、N129P、N129W、N129T、N129D、N129E、L131E、L131P、L131T、L131D、L131S、L141S、L141R、W171F、W171H、S172F、S172Y、S172R、S172D、C212A、C212L或C213P的取代。在其他情况下,一种或多种取代选择性地降低乙酰胆碱在工程化受体上的效力。换言之,该一个或多个取代降低工程化受体对乙酰胆碱的效力,同时基本上维持对非天然配体的效力,或者不然,该一个或多个取代降低工程化受体对乙酰胆碱的效力比其降低工程化受体对非天然配体的效力多2倍或更多,例如3倍、4倍、5倍或更多,在一些情况下10倍、20倍、50倍或100倍或更多。在一些实施方案中,取代对应于α7-nAChR的L131E、L131S、L131T、L131D或S172D。在又其他实施方案中,该一个或多个取代选择性地降低非天然配体在工程化受体上的效力。换言之,该一个或多个取代降低工程化受体对非天然配体的效力,同时基本上维持对乙酰胆碱的效力,或者不然,该一个或多个取代降低工程化受体对非天然配体的效力比其降低工程化受体对乙酰胆碱的效力多2倍或更多,例如3倍、5倍或更多,在一些情况下10倍、20倍或50倍或

更多。在一些实施方案中,取代对应于α7-nAChR的W77M、Y115W、S172T或S172C。在某些实施方案中,一个或多个取代位于α7-nAChR序列内。在某些实施方案中,非天然配体选自AZD-0328、TC6987、ABT-126和Facinicline/RG3487。

[0417] 在一些实施方案中,一个或多个取代增加工程化受体对乙酰胆碱和/或非天然配体的效力,例如增加2倍或更多、3倍或更多、4倍或更多、5倍或更多、10倍或更多、20倍或更多、30倍或更多、50倍或更多、或100倍。在一些实施方案中,取代对应于L131N、L141W、S170G、S170A、S170L、S170I、S170V、S170P、S170F、S170M、S170T、S170C、S172T、S172C、S188I、S188V、S188F、S188M、S188Q、S188T、S188P或S188W。在一些实施方案中,该一个或多个取代增加乙酰胆碱和非天然配体两者的效力。在一些实施方案中,取代对应于α7-nACh的L131N、S170G、S170A、S170L、S170I、S170V、S170P、S170F、S170M、S170T、S170C、S172T、S188I、S188V、S188F、S188M、S188Q或S188T。在其他情况下,一种或多种取代选择性地增加乙酰胆碱在工程化受体上的效力。换言之,该一个或多个取代增加工程化受体对乙酰胆碱的效力,比其增加工程化受体对非天然配体的效力多2倍或更多,例如3倍、4倍或5倍或更多,在一些情况下10倍、20倍、50倍或100倍。在一些实施方案中,取代对应于α7-nAChR的L141W、S172T、S172C、S188P或S188W。在某些实施方案中,一个或多个取代位于α7-nAChR序列内。在某些实施方案中,非天然配体选自AZD-0328、TC-5619、TC6987、ABT-126和Facinicline/RG3487。在又其他实施方案中,该一个或多个取代选择性地增加非天然配体在工程化受体上的效力。换言之,该一个或多个取代增加工程化受体对非天然配体的效力,比其增加工程化受体对乙酰胆碱的效力多2倍或更多,例如3倍、5倍或更多,在一些情况下10倍、20倍、50倍或更多。

[0418] 在一些实施方案中,主题工程化受体中突变的氨基酸残基不是对应于野生型a7nAChR(SEQ ID NO:25)的R27、E41、Q79、Q139、L141、G175、Y210、P216、Y217或D219的氨基酸。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。在一些实施方案中,主题工程化受体中突变的氨基酸残基是对应于野生型a7nAChR(SEQ ID NO:25)的R27、E41、Q79、Q139、L141、G175、Y210、P216、Y217或D219的氨基酸。在一些实施方案中,取代不是对应于野生型α7nAChR中的W77F、W77Y、W77M、Q79A、Q79Q、Q79S、Q79G、Y115F、L131A、L131G、L131M、L131N、L131Q、L131V、L131F、Q139G、Q139L、G175K、G175A、G175F、G175H、G175M、G175R、G175S、G175V、Y210F、P216I、Y217F或D219A。在一些实施方案中,取代是对应于野生型α7nAChR中的W77F、W77Y、W77M、Q79A、Q79Q、Q79S、Q79G、Y115F、L131A、L131G、L131M、L131N、L131Q、L131V、L131F、Q139G、Q139L、G175K、G175A、G175F、G175H、G175M、G175R、G175S、G175V、Y210F、P216I、Y217F或D219A的取代。在一些实施方案中,当这样的取代存在于工程化受体内时,其与本文所述的氨基酸突变中的一个或多个组合存在。

[0419] 在一些实施方案中,α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的残基Y94、Y115、Y151和Y190介导天然配体乙酰胆碱的结合。在一些实施方案中,这些残基处的突变可以减少乙酰胆碱的结合,并且因此被认为是功能丧失突变。在一些实施方案中,α7-nAChR的残基W77、Y115、N129、V130、L131、Q139、L141、S170、Y210、C212、C213和Y217可以介导非天然配体AZD0328与此受体的结合,并且这些残基的突变可以增加AZD0328和/或其他配体对此受体的亲和力,并且因此被认为是功能获得突变。在一些实施方案中,主题工程化受体包括α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的配体结合域区或包括α7-nAChR的配体结合域区的嵌合受体的配体结合域的一个

或多个氨基酸残基中的突变,其中一个或多个氨基酸残基选自由W77、Y94、Y115、N129、V130、L131、Q139、L141、Y151、S170、Y190、Y210、C212、C213和Y217组成的组。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。在某些实施方案中,在α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的配体结合域区或包括α7-nAChR的配体结合域区的嵌合受体的配体结合域的一个或多个氨基酸残基中的突变是在选自由W77、Y94、Y115、N129、V130、L131、Q139、L141、Y151、S170、Y190、Y210、C212、C213和Y217组成的组的一个或多个氨基酸残基处的取代。

[0420] 在一些实施方案中,α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的残基Y115、L131、L141、S170、W171、S172、C212和Y217可以介导乙酰胆碱和/或烟碱的结合,并且位于这些残基中的一个或多个位置的突变可以降低乙酰胆碱和/或烟碱的结合。在一些实施方案中,α7-nAChR的R101、Y115、L131、L141、W171、S172、S188、Y210和Y217可以介导非天然配体ABT126的结合,并且这些残基中的一个或多个的突变可以增加ABT126和/或其他配体对α7-nAChR的亲和力。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。在一些实施方案中,α7-nAChR的R101、Y115、T128、N129、L131、L141、W171、S172、Y210、C212、C213和Y217可以介导非天然配体TC6987的结合,并且这些残基中的一个或多个的突变可以增加TC6987和/或其他配体对α7-nAChR的亲和力。在一些实施方案中,α7-nAChR的R101、N120、L131、L141、S170、W171、S172、Y210和Y217可以介导非天然配体Facinicline/RG3487的结合,并且这些残基中的一个或多个的突变可以增加Facinicline/RG3487和/或其他配体对α7-nAChR的亲和力。在一些实施方案中,主题工程化受体包括α7-nAChR的配体结合域区或包括α7-nAChR的配体结合域区的嵌合受体的配体结合域的一个或多个氨基酸残基中的突变,其中一个或多个氨基酸残基选自由R101、Y115、T128、N120、N129、L131、L141、S170、W171、S172、S188、Y210、C212、C213和Y217组成的组。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸残基改变乙酰胆碱和/或烟碱与α7-nAChR的结合,其中所述氨基酸选自由α7-nAChR的Y115、L131、L141、S170、W171、S172、C212和Y217组成的组。在某些此类实施方案中,氨基酸选自C212和S170。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸残基中的突变改变ABT126与α7-nAChR的结合,其中一个或多个氨基酸残基选自由α7-nAChR的R101、Y115、L131、L141、W171、S172、S188、Y210和Y217组成的组。在某些此类实施方案中,氨基酸选自R101、S188和Y210。在一些实施方案中,在该一个或多个氨基酸残基中的突变改变TC6987与a7-nAChR的结合,其中一个或多个氨基酸残基选自由α7-nAChR的R101、Y115、T128、N129、L131、L141、W171、S172、Y210、C212、C213和Y217组成的组。在某些此类实施方案中,氨基酸选自R101、T128、N129、Y210和C213。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸残基中的突变改变Facinicline/RG3487与α7-nAChR的结合,其中一个或多个氨基酸残基选自由α7-nAChR的R101、N120、L131、L141、S170、W171、S172、Y210和Y217组成的组。在某些此类实施方案中,氨基酸选自Y210、R101和N129。

[0421] 本公开提供工程化受体,其与亲本受体相比具有两个或更多个突变,如氨基酸取代。在一些实施方案中,亲本受体包括衍生自人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)的配体结合域。在一些实施方案中,亲本受体是嵌合受体。在一些实施方案中,亲本受体包括衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。在一些实施方案中,人甘氨酸受体是人甘氨酸受体α1、人甘氨酸受体α2或人甘氨酸受体α3。在一些实施方案中,工程化受体的配体结合域包括衍生自人甘氨酸受体的Cys环域。在一些实施方案中,亲本受体包括SEQ ID NO:33的氨基酸序列。在一些实施方案中,与包括SEQ ID NO:33的氨基酸序列的亲本受体相比,工程化受体包括两个

氨基酸取代。在一些实施方案中,工程化受体的配体结合域包括来自人甘氨酸受体α1亚基的β1-2环域。

[0422] 在一些实施方案中,工程化受体的配体结合域包括在选自对应于人α7-nAChR(SEQ ID NO:25)的W77、R101、Y115、L131、Q139、Y140、S170、S172和Y210的那些氨基酸残基两个或更多个氨基酸残基处的氨基酸取代。

[0423] 在一些实施方案中,两个氨基酸取代位于选自由L131和S172、Y115和S170、以及Y115和L131组成的组的一对氨基酸残基处。在一些实施方案中,配体结合域包括在选自由L131和S172、Y115和S170、以及Y115和L131组成的组的一对氨基酸残基处的两个氨基酸取代。在一些实施方案中,配体结合域包括在残基L131处的氨基酸取代和S172D处的氨基酸取代。在一些实施方案中,配体结合域包括在残基L131处的氨基酸取代和Y115D处的氨基酸取代。在一些实施方案中,配体结合域包括选自由L131S和S172D、L131T和S172D、L131D和S172D、Y115D和S170T、Y115D和L131Q、以及Y115D和L131E组成的组的一对氨基酸取代。在一些实施方案中,配体结合域包括L131E的氨基酸取代。

[0424] 在一些实施方案中,配体结合域包括在选自由Y140、R101、L131、Y115和Y210组成的组的氨基酸残基处的一个或多个氨基酸取代,其中氨基酸残基对应于α7-nAChR的氨基酸残基。在一些实施方案中,配体结合域包括R101W和/或Y210V氨基酸取代。在一些实施方案中,配体结合域包括在选自由R101、L131、Y115、Y210和Y140组成的组的氨基酸残基处的两个或更多个氨基酸取代。在一些实施方案中,配体结合域包括在选自由R101、L131、Y115、Y210和Y140组成的组的氨基酸残基处的两个氨基酸取代。在一些实施方案中,配体结合域包括在选自由以下组成的组的一对氨基酸残基处两个氨基酸取代:R101和L131、Y115和Y210、R101和Y210。在一些实施方案中,配体结合域包括选自由以下组成的组的一对氨基酸取代:R101F和L131G、R101F和L131D、Y115E和Y210W、R101W和Y210V、R101F和Y210V、R101F和Y210F、R101M和L131A、以及R101M和L131F。在一些实施方案中,配体结合域包括在氨基酸残基R101、Y115和Y210处的三个氨基酸取代。在一些实施方案中,配体结合域包括氨基酸取代R101W、Y115E和Y210W,或氨基酸取代R101F、Y115E和Y210W。

[0425] 在一些实施方案中,配体结合域包括在残基L131处的氨基酸取代和R101F或R101M的氨基酸取代。在一些实施方案中,残基L131处的氨基酸取代是L131G、L131D、L131A、L131F或L131N。

[0426] 在一些实施方案中,配体结合域包括在残基Y210处的疏水性氨基酸取代和R101W或R101F的氨基酸取代。在一些实施方案中,在残基Y210处的氨基酸取代是Y210V、Y210F或Y210W。

[0427] 本领域技术人员将容易地识别用于与本公开的工程化受体比较的适当的对照受体。在一些实施方案中,除了一个或多个有区别的氨基酸突变(例如,取代)之外,对照受体在序列上与工程化受体相同。在所有情况下,提及对照受体意欲表明,所列举的特性(例如,对配体的效力)的变化是本公开的工程化受体的一个或多个氨基酸突变的结果。

[0428] 本公开提供工程化受体,其中工程化受体是嵌合配体门控离子通道(LGIC)受体并且包括:(a)衍生自人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)并包括来自人甘氨酸受体α1亚基的Cys环域的配体结合域;和(b)衍生自人甘氨酸受体α1亚基的离子孔域。在一些实施方案中,工程化受体衍生自包括SEQ ID NO:33的氨基酸序列或由SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成

的亲本工程化受体,并且进一步包括基于亲本工程化受体的一个或多个氨基酸取代。

[0429] 在一些实施方案中,工程化受体对乙酰胆碱的效力低于人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)对乙酰胆碱的效力。在一些实施方案中,工程化受体对乙酰胆碱的效力比人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)对乙酰胆碱的效力低至少约1.5倍(例如,低约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约12倍、约15倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍或约100倍,包括位于其间的所有子范围和值)。在一些实施方案中,基于使用YFP荧光淬灭的细胞报告物测定,通过工程化受体对乙酰胆碱的EC50评价工程化受体对乙酰胆碱的效力。在一些实施方案中,工程化受体对乙酰胆碱的EC50为至少100uM、至少200uM、至少300uM、至少500uM、至少700uM、至少1mM、至少2mM、至少3mM、至少4mM、至少5mM、至少6mM、至少7mM、至少8mM、至少9mM或至少10mM。在一些实施方案中,工程化受体对乙酰胆碱的EC50为至少1mM。在一些实施方案中,工程化受体对乙酰胆碱的EC50为至少3mM。在一些实施方案中,对乙酰胆碱具有更高EC50允许工程化受体在细胞中或在细胞表面上具有更高的表达水平,而在存在生理浓度的乙酰胆碱的情况下不会有大量电流流入细胞中。

[0430] 在一些实施方案中,工程化受体对非天然配体的效力与人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)对非天然配体的效力大致相同。在一些实施方案中,工程化受体对非天然配体的效力高于人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)对非天然配体的效力。在一些实施方案中,工程化受体对非天然配体的效力比人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)对非天然配体的效力高至少约1.5倍(例如,高约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约12倍、约15倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍或约100倍,包括位于其间的所有子范围和值)。在一些实施方案中,确定效力包括如本公开的实施例2中所述基于使用YFP荧光淬灭的细胞报告物测定来确定EC50。在一些实施方案中,工程化受体对非天然配体的EC50小于1nM、小于2nM、小于3nM、小于4nM、小于5nM、小于6nM、小于7nM、小于8nM、小于9nM、小于10nM、小于15nM、小于20nM、小于30nM、小于40nM、小于50nM、小于60nM、小于70nM、小于80nM、小于90nM、小于100nM、小于150nM、小于200nM、小于300nM、小于400nM、小于500nM、小于600nM、小于700nM、小于800nM、小于900nM、小于1μM、小于2μM、小于3μM、小于4μM、小于5μM、小于6μM、小于7μM、小于8μM、小于9μM或小于10μM。在一些实施方案中,工程化受体对非天然配体的EC50小于10nM。在一些实施方案中,工程化受体对非天然配体的EC50小于100nM。在一些实施方案中,工程化受体对非天然配体的EC50小于1μM。

[0431] 在一些实施方案中,工程化受体在存在非天然配体的情况下的功效高于人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)在存在非天然配体的情况下的功效。在一些实施方案中,工程化受体在存在非天然配体的情况下的功效比人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)在存在非天然配体的情况下的功效高至少约1.5倍(例如,高约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约12倍、约15倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍或约100倍,包括位于其间的所有子范围和值)。在一些实施方案中,确定功效包括在存在非天然配体的情况下体外确定穿过工程化受体的电流量。

[0432] 在一些方面,主题配体门控离子通道包括一个或多个非脱敏突变。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。当在配体门控离子通道的情境中使用时,“脱敏”是指在激动剂的长期存在下离子通量的逐渐减少。这导致神经元对配体的效力逐渐丧失。非脱敏突变是指

阻止LGIC变得对配体脱敏,从而阻止神经元变得对配体反应降低或无反应的氨基酸突变。通过将携带突变的LGIC引入神经元中并分析在长期暴露于配体期间随时间变化的电流通量,可以容易地鉴定非脱敏突变。如果LGIC不包括非脱敏突变,则电流将在长时间暴露期间从峰值恢复到稳定状态,而如果LGIC包括非脱敏突变,则电流将在暴露于配体的持续时间内保持在峰值通量。导致脱敏的示例性氨基酸突变包括人GlyRα1中的V322L突变(蛋白质原的V294L后处理以去除信号肽)。LGIC脱敏、用于测量LGIC脱敏的方法和非脱敏的突变是本领域熟知的;参见,例如,Gielen et al.Nat Commun 2015Apr 20,6:6829,和Keramidas et al.Cell Mol Life Sci。2013Apr;70(7):1241-53,其全部公开内容通过引用并入本文。

[0433] 在一些方面,主题配体门控离子通道包括一个或多个转化突变。在一些实施方案中,突变是氨基酸取代。转化突变是指改变LGIC的离子孔域的渗透性的突变,变得允许非天然离子的电导。转化突变是指这样的突变:其改变了LGIC的离子孔域的通透性,使得其变得允许传导非天然离子(即天然地不允许穿过的离子)。在一些情况下,突变将通透性从阳离子转化为阴离子,例如用肽序列PAKIGLGITVLLSLTTFMSGVAN(SEQ ID NO:35)替代人α7-nAChR(CHRNA7)中的氨基酸残基260-281(EKISLGITVLLSLTVFMLLVAE,SEQ ID NO:34)或另一种阳离子透过性LGIC中的对应氨基酸。在一些情况下,突变将通透性从阴离子转化为阳离子,例如,将GLRA1的氨基酸残基279或另一种阴离子透过性LGIC中的对应氨基酸取代为谷氨酸(E)(如同GLRA1中的A293E取代那样,其将LGIC从允许阴离子转化为允许钙)、或GLRA1的氨基酸残基278或另一种阴离子透过性LGIC中的对应氨基酸的缺失、将GLRA1的氨基酸残基279或另一种阴离子透过性LGIC中的对应氨基酸取代为谷氨酸(E),以及将GLRA1的氨基酸残基293或另一种阴离子透过性LGIC中的对应氨基酸取代为缬氨酸(V)(如同GLRA1中的P278A、A279E、T293V那样,其将LGIC从允许阴离子转化为允许阳离子)。

[0434] 通过体外筛选和验证方法,可以鉴定除了本文描述的那些以外的另外的工程化受体。在一些实施方案中,从有限数量的亲本受体生成亲本受体突变体的文库。亲本受体可以使用本领域已知的方法突变,包括易错PCR进行突变。在一些实施方案中,然后将亲本受体突变体的文库转染到酵母或哺乳动物细胞中,并且以高通量筛选以鉴定功能性受体(例如,以鉴定能够响应于配体而进行信号传导的亲本受体突变体)。在一些实施方案中,然后将在此初步筛选中鉴定的功能性亲本受体突变体在哺乳动物细胞中表达,并且针对对配体的效力进行筛选,例如通过本文描述的酶标仪和/或电生理学测定来进行。然后可以选择对激动剂配体展示出增加的结合亲和力或使得能够在二次筛选中使用拮抗剂或调节剂配体作为激动剂的亲本受体突变体,并且完成进一步的体外和/或体内验证和表征测定。此类筛选测定是本领域已知的,例如Armbruster,B.N.et al.(2007)PNAS,104,5163-5168;Nichols,C.D.and Roth,B.L.(2009)Front.Mol.Neurosci.2,16;Dong,S.et al.(2010)Nat.Protoc.5,561-573;Alexander,G.M.et al.(2009)Neuron 63,27-39;Guettier,J.M.et al.(2009)PNAS106,19197-19202;Ellefson J.W.et al.(2014)Nat Biotechnol.32(1):97-101;Maranhao AC and Ellington AD.(2017)ACS Synth Biol.20;6(1):108-119;Talwar S et al.(2013)PLoS One;8(3):e58479;Gilbert D.F.et al.(2009)Front Mol Neurosci.30;2:17;Lynagh and Lynch,(2010),Biol Chem.14:285(20),14890-14897;Islam R.et al.(2016)ACS Chem Neurosci.21;7(12):1647-1657;和Myers et al.(2008)Neuron.8:58(3):362-373。

[0435] 这些示例性工程化受体的总结提供于下表5中。除指示的氨基酸突变之外,这些受体中的每一个包括SEQ ID NO:33的氨基酸序列或由其组成。

[0436] 表5:示例性工程化受体

[0437]

名称	序列
CODA71	SEQ ID NO: 33
CODA536	SEQ ID NO: 33 中的 L131D、S172D
CODA534	SEQ ID NO: 33 中的 L131S、S172D
CODA535	SEQ ID NO: 33 中的 L131T、S172D
CODA807	SEQ ID NO: 33 中的 Y115D、L131E
CODA806	SEQ ID NO: 33 中的 Y115D、L131Q
CODA805	SEQ ID NO: 33 中的 Y115D、S170T
CODA952	SEQ ID NO: 33 中的 Y140I
CODA1025	SEQ ID NO: 33 中的 R101F、L131G
CODA1027	SEQ ID NO: 33 中的 R101F、L131D
CODA1039	SEQ ID NO: 33 中的 Y115E、Y210W
CODA1045	SEQ ID NO: 33 中的 R101W、Y210V
CODA1047	SEQ ID NO: 33 中的 R101F、Y210V
CODA1048	SEQ ID NO: 33 中的 R101F、Y210F
CODA1053	SEQ ID NO: 33 中的 R101M、L131A
CODA1054	SEQ ID NO: 33 中的 R101M、L131F
CODA1055	SEQ ID NO: 33 中的 R101W、Y115E、Y210W
CODA1056	SEQ ID NO: 33 中的 R101F、Y115E、Y210W

[0438]

名称	序列
CODA1138	SEQ ID NO: 33 中的 W77F、R101F、L131D
CODA1140	SEQ ID NO: 33 中的 R101F、L131N、S172D
CODA1157	SEQ ID NO: 33 中的 Q139E、S172D
CODA1173	SEQ ID NO: 33 中的 S172D, Y210W
CODA965	SEQ ID NO: 33 中的 Y140C

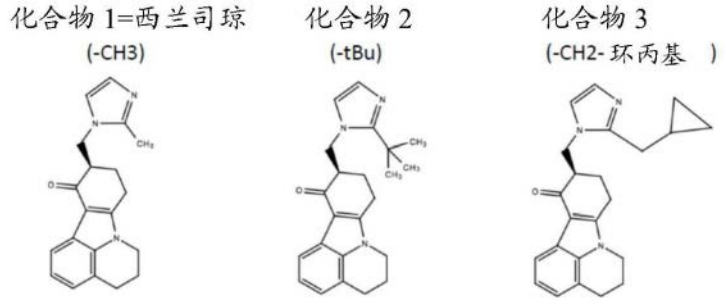
[0439] 配体

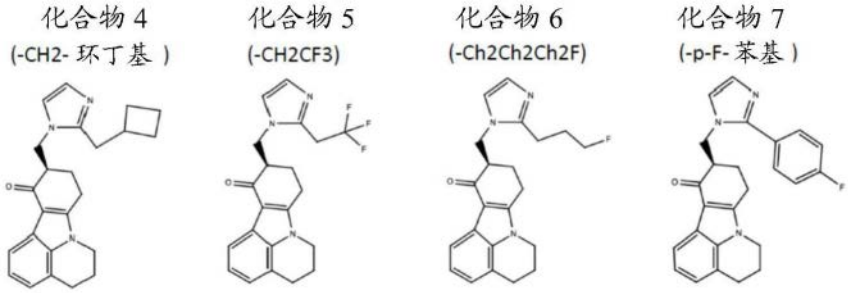
[0440] 在一些实施方案中,本公开的配体是指对哺乳动物细胞具有已知作用机制的外源性药物或化合物(例如,已知充当受体的激动剂、拮抗剂或调节剂)。此类配体也可以称为“结合剂”。本公开的配体可以包括蛋白质、脂质、核酸和/或小分子。在一些实施方案中,配体包括已被美国食品药物监督管理局(FDA)批准用于临床应用以治疗特定疾病(例如,神经系统疾病)的药物或化合物。在一些实施方案中,配体包括尚未被FDA批准用于临床应用的

药物或化合物,但该药物或化合物已在一项或多项临床试验中进行过测试,当前正在一项或多项临床试验中进行测试,和/或预期会在一项或多项临床试验中进行测试。在一些实施方案中,配体包括尚未被FDA批准用于临床应用,但常规地用在实验室研究中的药物或化合物。在一些实施方案中,配体是上述配体之一的类似物。在一些实施方案中,配体选自由AZD0328、ABT-126、AQW-051、大麻二酚、西兰司琼、PH-399733、Facinicline/RG3487/MEM-3454、TC-6987和TC-5619/AT-101组成的组。在一些实施方案中,所述配体选自由ABT-126、AZD-0328、RG3487、TC-6987、TC-6683、瓦伦尼克林和TC-5619组成的组。在一些实施方案中,配体是TC-5619。

[0441] 在特定的实施方案中,配体是西兰司琼的类似物,例如如以下化合物式2-7之一所描述,呈其R或S对映异构体:

[0442]

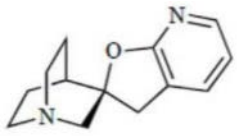




[0443] 在一些实施方案中,配体充当激动剂。本文所用,术语"激动剂"是指诱导信号传导应答的配体。在一些实施方案中,配体充当拮抗剂。本文使用的术语拮抗剂是指抑制信号传导应答的配体。

[0444] 在一些实施方案中,配体是根据下式的AZD-0328:

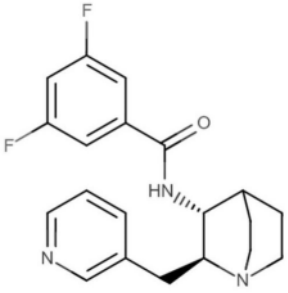
[0445]



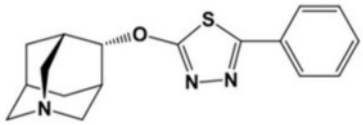
AZD0328

[0446] 在一些实施方案中,配体是根据下式的TC-6987:

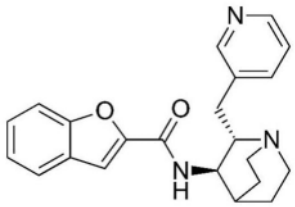
[0447]



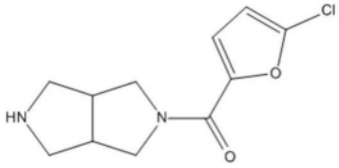
[0448] 在一些实施方案中,配体是根据下式的ABT-126:

[0449] 

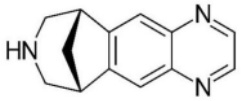
[0450] 在一些实施方案中,配体是根据下式的TC-5619/Bradanicline:

[0451] 

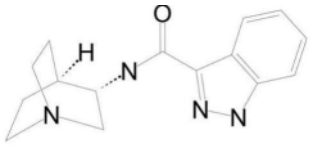
[0452] 在一些实施方案中,配体是根据下式的TC-6683:

[0453] 

[0454] 在一些实施方案中,配体是根据下式的瓦伦尼克林:

[0455] 

[0456] 在一些实施方案中,配体是根据下式的Facinicline/RG3487:

[0457] 

[0458] 本文所述的工程化受体和非天然配体的示例性组合提供于下表6中。表6中的每种工程化受体可以作为蛋白质、编码蛋白质的多核苷酸或包括编码蛋白质的多核苷酸的载体存在。在一些实施方案中,工程化受体包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域。在一些实施方案中,工程化受体包括衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。在一些实施方案中,人甘氨酸受体是人甘氨酸受体α1。在一些实施方案中,工程化受体包括除了表6中所示的突变之外与SEQ ID NO:33具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的多肽序列。

[0459] 表6:工程化受体和非天然配体组合的非限制性示例

[0460]

对应于 SEQ ID NO: 25 中的指示的位置处具有氨基酸取代的工程化受体	非天然配体	工程化受体的非限制性示例
L131D_S172D	AZD-0328	CODA536
L131D_S172D	Facinicline	CODA536
Y115D_S170T	Facinicline	CODA805

[0461]

对应于 SEQ ID NO: 25 中的指示的位置处具有氨基酸取代的工程化受体	非天然配体	工程化受体的非限制性示例
Y115D_S170T	TC-6987	CODA805
Y115D_L131Q	AZD-0328	CODA806
Y115D_L131Q	Facinicline	CODA806
Y115D_L131Q	TC-6987	CODA806
Y115D_L131E	TC-5619	CODA807
Y115D_L131E	AZD-0328	CODA807
Y115D_L131E	Facinicline	CODA807
Y115D_L131E	TC-6987	CODA807
Y140I	TC-5619	CODA952
Y140I	Facinicline	CODA952
Y140C	TC-5619	CODA965
Y140C	ABT-126	CODA965
Y140C	TC-6987	CODA965
R101F_L131G	TC-5619	CODA1025
R101F_L131G	AZD-0328	CODA1025
R101F_L131G	TC-6987	CODA1025
R101F_L131G	瓦伦尼克林	CODA1025
R101F_L131D	TC-5619	CODA1027
R101F_L131D	TC-6987	CODA1027
Y115E_Y210W	TC-5619	CODA1039
Y115E_Y210W	ABT-126	CODA1039
R101W_Y210V	TC-5619	CODA1045
R101F_Y210V	TC-5619	CODA1047
R101F_Y210F	TC-5619	CODA1048
R101M_L131A	TC-5619	CODA1053
R101M_L131A	瓦伦尼克林	CODA1053
R101M_L131F	TC-5619	CODA1054
R101M_L131F	瓦伦尼克林	CODA1054

[0462]

对应于 SEQ ID NO: 25 中的指示的位置处具有氨基酸取代的工程化受体	非天然配体	工程化受体的非限制性示例
R101W_Y115E_Y210W	TC-5619	CODA1055
R101F_Y115E_Y210W	TC-5619	CODA1056
W77F_R101F_L131D	ABT-126	CODA1138
S172D_Y210W	ABT-126	CODA1173

[0463] 组合物

[0464] 本公开还提供组合物(例如,药物组合物)。在一些实施方案中,组合物或药物组合物包括重组核酸,所述重组核酸包括本公开的表达盒。在一些实施方案中,表达盒包含编码本公开的工程化受体(例如,配体门控离子通道)的转基因。在一些实施方案中,转基因编码SEQ ID NO:33或其突变体。在一些实施方案中,组合物或药物组合物包括药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂和/或缓冲剂。在一些实施方案中,药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂和/或缓冲剂适合用于人类。

[0465] 这样的赋形剂、载剂、稀释剂和/或缓冲剂(一起作为“药物媒介物”)包括可以在没有过度毒性的情况下施用的任何药剂。其可以由美国联邦政府或州政府的监管机构批准或在美国药典或其他普遍认可的药典中列出用于在哺乳动物如人中使用。此类药物媒介物可以是液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。药物媒介物可以是盐水、阿拉伯胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、尿素等。另外,可以使用辅助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。当施用于哺乳动物时,本公开的化合物和组合物以及药学上可接受的媒介物、赋形剂或稀释剂可以是无菌的。在一些情况下,当将本公开的化合物静脉内施用时,采用水性介质作为媒介物,该水性介质如水、盐水溶液以及右旋糖水溶液和甘油水溶液。

[0466] 药物组合物可以采取胶囊、片剂、丸剂、团粒剂、锭剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、酏剂、溶液、混悬剂、乳剂、栓剂或其持续释放配制品的形式,或适合施用于哺乳动物的任何其他形式。在一些情况下,将药物组合物配制成用于作为适于口服或静脉内施用于人的药物组合物根据常规程序施用。合适药物媒介物及其配制方法的示例描述在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Alfonso R.Gennaro ed.,Mack Publishing Co.Easton,Pa.,第19版,1995年,第86、87、88、91和92章中,所述文献通过引用并入本文。

[0467] 药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体例如水、盐水、甘油和乙醇。其中可以包括药学上可接受的盐,例如无机酸盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;和有机酸的盐,例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。另外,辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等,可以存在于此类媒介物中。多种药学上可接受的赋形剂是本领域已知的并且不需要在本文中详细讨论。药学上可接受的赋形剂已在多种出版物中充分描述,包括例如A.Gennaro,(2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th edition,Lippincott,Williams,&Wilkins;Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(1999)H.C.Ansel et al.,eds.,7th ed.,Lippincott,Williams,&Wilkins;and Handbook of Pharmaceutical Excipients(2000)A.H.Kibbe et al.编,第3

版Amer.Pharmaceutical Assoc。

[0468] 在一些实施方案中,药物组合物包括液体,所述液体包括溶液、悬浮液或两者中的重组核酸。如本文所用,液体组合物包括凝胶。在一些实施方案中,液体组合物是水性的。在一些实施方案中,组合物是原位可胶凝水性组合物,例如,原位可胶凝的水溶液。

[0469] 组合物的非限制性示例包括与药物施用或体内接触或递送相容的溶剂(水性或非水性)、溶液(水性或非水性)、乳剂(例如,水包油或油包水)、混悬剂、糖浆、酏剂、分散和悬浮介质、包衣、等渗和吸收促进剂或延迟剂。水性和非水性溶剂、溶液和悬浮液可包括悬浮剂和增稠剂。此类药学上可接受的载剂包括片剂(包衣或未包衣)、胶囊(硬或软)、微珠、粉末、颗粒和晶体。补充活性化合物(例如防腐剂、抗菌剂、抗病毒剂和抗真菌剂)也可以掺入组合物中。

[0470] 在一些实施方案中,药物组合物被配制为与特定的施用或递送途径相容。因此,药物组合物包括适合于通过各种途径施用的载剂、稀释剂和/或赋形剂。

[0471] 赋形剂的选择将部分地取决于特定载体以及用于施用组合物的特定方法。因此,存在本公开的药物组合物的多种合适的制剂。

[0472] 例如,可以通过以下方式将载体配制成注射用制剂:将载体溶解、悬浮或乳化在水性或非水性溶剂(如植物油或其他类似的油、合成脂肪酸甘油酯、高碳脂肪酸酯或丙二醇);并且如果期望的话,具有常规添加剂(如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂)。

[0473] 适合于肠胃外施用的组合物包括活性化合物的水性和非水性溶液、悬浮剂或乳化剂。制剂通常是无菌的并且可以与预期接受者的血液等渗。非限制性说明性示例包括水、盐水、右旋糖、果糖、乙醇、动物油、植物油或合成油。

[0474] 可以将助溶剂和佐剂添加到制剂中。助溶剂的非限制性示例包括羟基或其他极性基团,例如醇,例如异丙醇;二醇,例如丙二醇、聚乙二醇、聚丙二醇、二醇醚;甘油;聚氧乙烯醇和聚氧乙烯脂肪酸酯。佐剂包括,例如,表面活性剂,例如大豆卵磷脂和油酸;脱水山梨糖醇酯,例如脱水山梨糖醇三油酸酯;和聚乙烯吡咯烷酮。

[0475] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物适合于肠胃外施用,例如作为水性和非水性的等渗无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性的无菌混悬剂,其可以包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。制剂可以以单位剂量或多剂量密封容器(如安瓿和小瓶)呈现,并且可以在冷冻干燥(冻干)条件下储存,仅需要在使用前即刻添加无菌液体赋形剂(例如,水)以供注射。临时注射溶液和混悬剂可以由前述种类的无菌散剂、颗粒剂和片剂制备。

[0476] 作为另一个示例,可以将化合物配制成适合口服施用的制剂,包括(a)液体溶液,如溶解在稀释剂(如水或盐水)中的有效量的化合物;(b)胶囊、囊剂或片剂,其各自含有预定量的作为固体或颗粒的活性成分;(c)在适当液体中的混悬剂;和(d)合适的乳剂。片剂形式可以包括以下中的一种或多种:乳糖、甘露糖醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、阿拉伯胶、明胶、胶体二氧化硅、交联羧甲纤维素钠、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸和其他赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、调味剂和药理学上相容的赋形剂。锭剂形式可以包括在调味剂(通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)中的活性成分,以及包括在惰性基质(如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)中的活性成分的糖锭剂、乳剂、凝胶等,除了活性成分之外,

其还含有如本文所述的此类赋形剂。

[0477] 如本文所用,术语“单位剂型”是指适合作为人和动物受试者的单位剂量的物理上离散的单元,每个单元含有与药学上可接受的稀释剂、载剂或媒介物联合的预定量的本公开的化合物,该预定量计算为足以产生期望作用的量。本公开的新型单位剂型的规格取决于所采用的特定化合物和待实现的效果以及在宿主中与每种化合物相关的药效学。

[0478] 方法

[0479] 在本公开的一些方面,本文公开的组合物和方法可用于治疗有此需要的受试者的神经系统疾病或病症。在一些方面,本文公开的组合物和方法可用于在神经元中表达转基因。在一些方面,本文公开的组合物和方法可用于测定。在一些方面,本文公开的组合物和方法可以用作研究工具。在一些方面,本文公开的组合物和方法可以用作核酸递送工具。

[0480] 在本公开的一些方面,提供治疗受试者的神经系统疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括本公开的表达盒的重组核酸。在一些实施方案中,将重组核酸递送至海马神经元。在一些实施方案中,将重组核酸递送至背根神经节神经元或三叉神经节神经元。在一些实施方案中,表达盒包含转基因。在一些实施方案中,转基因编码工程化LGIC。在一些实施方案中,所述方法进一步包括施用激活工程化LGIC的小分子配体/药物/激动剂,工程化LGIC进而调节靶神经元的活动,并由此治疗受试者的神经系统疾病或病症(例如疼痛或癫痫)。

[0481] 在本公开的一些方面,提供治疗受试者的局灶性癫痫的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括表达盒的重组核酸,其中表达盒包含编码本公开的工程化LGIC受体的转基因。在一些实施方案中,将重组核酸递送至海马神经元中。在一些实施方案中,所述方法进一步包括施用激活工程化LGIC的小分子配体,工程化LGIC进而调节靶神经元的活动,并由此治疗受试者的局灶性癫痫。

[0482] 在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于制备用于治疗神经系统疾病或病症的药物。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于制备用于治疗与海马神经元失调相关的神经系统疾病或病症,例如局灶性癫痫、精神分裂症、自闭症谱系病症、阿尔茨海默病、雷特病综合征和脆性X综合征。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于治疗局灶性癫痫。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于治疗精神分裂症。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于治疗自闭症谱系病症。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于治疗阿尔茨海默病。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于治疗雷特综合征。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于治疗脆性X综合征。

[0483] 本公开部分地考虑了用于控制、管理、预防或治疗受试者的癫痫的组合物和方法。在一些实施方案中,癫痫是局灶性癫痫。在一些实施方案中,局灶性癫痫是内侧颞叶癫痫(mTLE)。

[0484] 在一些实施方案中,本文的组合物和方法可以用于减轻受试者癫痫发作的水平。在一些实施方案中,本文的组合物和方法可用于预防或控制受试者癫痫发作的水平。癫痫发作可以分为强直-阵挛性、强直性、阵挛性、肌阵挛性、失神性或失张力性发作。

[0485] 在一些实施方案中,本文的组合物和方法可以将受试者经历的癫痫发作的次数或频率降低约5%、约10%、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％、约90％、约95％、约99％或100％，包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中，本文的组合物和方法可以将受试者经历的癫痫发作的次数或频率降低至少5％、至少10％、至少10％、至少15％、至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、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99％或100％，包括其间的所有范围和子范围。

[0486] 在一些实施方案中，本文的组合物和方法可以将受试者经历的癫痫发作的水平和/或持续时间降低约5％、约10％、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％、约90％、约95％、约99％或100％，包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中，本文的组合物和方法可以将受试者经历的癫痫发作的水平和/或持续时间降低至少5％、至少10％、至少10％、至少15％、至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、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99％或100％，包括其间的所有范围和子范围。

[0487] 在各种实施方案中，用于控制、管理、预防或治疗受试者的癫痫(例如，局灶性癫痫)的方法包括向受试者施用有效量的包含本公开的表达盒的重组核酸。不希望受任何特定理论的束缚，本公开考虑使用包括编码本文公开的工程化LGIC的转基因的表达盒来调节神经元活动以缓解受试者的癫痫。

[0488] 在各种实施方案中，将包括编码激活或去极化神经元细胞的工程化受体的表达盒的载体和/或重组核酸施用至(或引入到)控制癫痫的一个或多个神经元细胞中。在存在配体的情况下，表达工程化受体的神经元细胞被激活并且降低对癫痫的敏感性。

[0489] 在一些实施方案中，癫痫是局灶性癫痫(局灶性癫痫发作)。局灶性癫痫是神经系统病况，其中主要症状是影响脑的一个半球(一半)的反复癫痫发作。

[0490] 局灶性癫痫分为四类：(a)局灶性知觉保留癫痫发作，其中受试者知道癫痫发作期间发生了什么；(b)局灶性知觉受损癫痫发作，其中受试者感到困惑或不知道癫痫发作期间发生了什么或不记得癫痫发作；(c)局灶性运动性癫痫发作，其中受试者在某种程度上运动-从抽搐、痉挛、到摩擦手到四处走动等；以及(d)局灶性非运动性癫痫发作，其中受试者在癫痫发作期间不会抽搐或进行其他运动。替代地，它会引起受试者的感觉或思维方式发生变化(例如，感到强烈的情绪，奇怪的感觉或如心跳加速、起鸡皮疙瘩或感到热或冷的症状)。

[0491] 局灶性癫痫的特征是由脑的特定部分(脑叶)引起的癫痫发作。局灶性癫痫包括特发性位置相关癫痫(ILRE)、额叶癫痫、颞叶癫痫、顶叶癫痫和枕叶癫痫。

[0492] 特发性位置相关癫痫(ILRE)是由未知因素引起的。

[0493] 额叶癫痫是关于从额叶(前额后面的脑区域)开始的反复癫痫发作的术语。

[0494] 颞叶癫痫是关于从颞叶(位于太阳穴和颧骨后面的头两侧的脑的部分)开始的反复癫痫发作的术语。颞叶是脑中最常引起癫痫发作的区域。两个颞叶的近中部分(中间)在癫痫中非常重要-其经常是癫痫发作的来源，并且容易损伤或留下瘢痕。内侧颞叶癫痫(mTLE)是人癫痫最常见的形式。很多时候，其病理生理学基础是海马硬化。因此，治疗局灶性癫痫(例如mTLE)的一种策略是靶向海马神经元。

[0495] 顶叶癫痫。顶叶是在头顶部和两侧的脑的部分。顶叶称为“联络皮质”,负责将意义与脑功能联系起来。正是在这里,脑创造视觉图像,声音被识别为语言,并且触觉与特定对象相关联。在一些方面,顶叶是感知与物理现实相吻合的地方。

[0496] 枕叶癫痫。枕叶癫痫是关于从枕叶(在脑中主要负责视力的头后部的部分)开始的反复癫痫发作的术语。

[0497] 在本公开的一些方面,提供治疗受试者的神经性疼痛(例如周围神经病和三叉神经痛)的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的重组核酸,其中所述重组核酸包括表达盒,所述表达盒包含编码本公开的工程化LGIC受体的转基因。在一些实施方案中,将重组核酸递送至DRG或TGG神经元中。在一些实施方案中,所述方法还包括施用激活工程化LGIC的小分子配体,工程化LGIC进而调节靶神经元的活动,并由此治疗受试者的神经性疼痛,例如周围神经病和三叉神经痛。

[0498] 在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于制备用于治疗神经系统疾病或病症的药物。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于制备用于治疗与DRG/TGG神经元失调相关的神经疾病或病症(例如神经性疼痛)的药物。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于制备用于治疗脊髓相关疾病例如痉挛、脊髓损伤和撕脱伤的药物。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于治疗痉挛。在一些实施例中,治疗痉挛包括转导脊柱中的神经元。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于治疗脊髓损伤。在一些方面,本文公开的载体、重组核酸或组合物用于治疗撕脱伤。在一些实施方案中,治疗脊髓损伤或撕脱伤包括转导在背角中的神经元。

[0499] 本公开部分地考虑了用于控制、管理、预防或治疗受试者的疼痛的组合物和方法。在一些实施方案中,疼痛是神经性疼痛。“疼痛”是指受试者体内的不舒服的感觉和/或不愉快的感觉。疼痛感觉的范围可以是从轻微且偶发的到严重且持续的。疼痛可分为急性疼痛或慢性疼痛。疼痛可以是伤害性疼痛(即,由组织损伤引起的疼痛)、神经性疼痛或心因性疼痛。在一些情况下,疼痛是由疾病(例如癌症、关节炎、糖尿病)引起的或与疾病相关的。在其他情况下,疼痛是由损伤(例如运动损伤、创伤)引起的。适于用本文的组合物和方法治疗的疼痛的非限制性示例包括:神经性疼痛,包括周围神经病、糖尿病性神经病变、疱疹后神经痛、三叉神经痛、背痛、与癌症相关的神经病变、与HIV/AIDS相关的神经病变、幻肢痛、腕管综合征、中风后中枢性疼痛、与慢性酒精中毒相关的疼痛、甲状腺功能减退、尿毒症、与多发性硬化相关的疼痛、与脊髓损伤相关的疼痛、与帕金森病相关的疼痛、癫痫、骨关节炎疼痛、类风湿性关节炎疼痛、内脏痛以及与维生素缺乏症相关的疼痛;以及伤害性疼痛,包括与中枢神经系统创伤、劳损/扭伤和烧伤相关的疼痛;心肌梗塞、急性胰腺炎、手术后疼痛、创伤后疼痛、肾绞痛、与癌症相关的疼痛、与纤维肌痛相关的疼痛、与腕管综合征相关的疼痛以及背痛。

[0500] 本文的组合物和方法可用于减轻受试者的疼痛水平。在一些情况下,将受试者的疼痛水平减轻至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、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99%或约100%,包括其间的所有范围和子范围。可以通过多种方法评估受试者的疼痛水平。在一些情况下,通过自我报告(即,人受试者口头报告他/她正在经历的疼痛程度)来评估疼痛程度。在一些情况下,通过疼痛的行为指标

来评估疼痛水平,这些指标例如面部表情、肢体活动、发声、躁动和防卫。例如,当受试者不能自我报告(例如,婴儿、无意识的受试者、非人受试者)时,这些类型的评估可能是有用的。可以在用本公开的组合物治疗之后,与用组合物治疗之前受试者正经历的疼痛水平相比,评估疼痛水平。

[0501] 在多个实施方案中,用于控制、管理、预防或治疗受试者疼痛的方法包括向受试者施用有效量的重组核酸,所述重组核酸包括编码本公开的工程化LGIC的表达盒。不希望受任何特定理论约束,本公开考虑了使用编码本文公开的工程化LGIC的载体和/或重组核酸调节神经元活动以缓解受试者的疼痛。

[0502] 在各种实施方案中,将包括编码激活或去极化神经元细胞的工程化受体的表达盒的重组核酸施用至(或引入到)减少痛觉的一个或多个神经元细胞(例如,抑制性中间神经元)中。在存在配体的情况下,表达工程化受体的神经元细胞被激活并且减少对疼痛的敏感性,从而加强刺激这些神经元细胞的镇痛作用。

[0503] 在各种实施方案中,将包括编码使神经元细胞失活或超极化的工程化受体的表达盒的重组核酸施用至(或引入到)增加痛觉或对疼痛的敏感性的一个或多个神经元细胞(例如伤害性感受器、周围感觉神经元、C纤维、Aδ纤维、Aβ纤维、DRG神经元、TGG神经元等)中。在存在配体的情况下,表达所述工程化受体的神经元细胞失活并且减少对疼痛的敏感性,并且加强镇痛作用。

[0504] 在一些实施方案中,本公开的组合物和方法有效减轻疼痛。适合用本公开的组合物和方法治疗的疼痛的说明性示例包括但不限于急性疼痛、慢性疼痛、神经性疼痛、伤害性疼痛、痛觉超敏、炎性疼痛、炎性痛觉过敏、神经病、神经痛、糖尿病性神经病变、人免疫缺陷病毒相关的神经病变、神经损伤、类风湿性关节炎疼痛、骨关节炎疼痛、烧伤、背痛、眼痛、内脏痛、癌痛(例如,骨癌痛)、牙痛、头痛、偏头痛、腕管综合征、纤维肌痛、神经炎、坐骨神经痛、骨盆超敏性、骨盆痛、疱疹后神经痛、手术后疼痛、中风后疼痛和月经痛。

[0505] 疼痛可以分为急性的或慢性的。“急性疼痛”是指突然开始并且通常在程度上尖锐的疼痛。急性疼痛可能是轻度的并且仅持续片刻,或者可能是重度的并且持续数周或数月。在大多数情况下,急性疼痛不会持续超过三个月,并且当疼痛的根本原因已经得到治疗或已经治愈时,它会消失。然而,未缓解的急性疼痛可能会导致慢性疼痛。慢性疼痛”是指持续的或复发的疼痛,其持续超过急性疾病或损伤的常见病程或持续超过三至六个月,并且其不利地影响个体的健康状况。在一些实施方案中,术语“慢性疼痛”是指在不应持续时持续的疼痛。慢性疼痛可以是伤害性疼痛或神经性疼痛。

[0506] 在一些实施方案中,预料或预期疼痛的发展与损伤、感染或医学干预相关或由其所致。在一些实施方案中,感染引起神经损伤。在一些实施方案中,医学干预是手术,例如对身体的中央核心的手术。在一些实施方案中,医学干预是切除体内一个或多个组织、肿瘤或器官的部分或全部的手术。在一些实施例中,医学干预是截肢。在一些实施方案中,本公开的组合物和方法有效减轻急性疼痛。在一些实施方案中,本公开的组合物和方法有效减轻慢性疼痛。

[0507] 当不适和异常敏感性成为患者症状中的特征时,存在临床疼痛。个体可以呈现各种疼痛症状。此类症状包括:1)自发性疼痛,其可以是钝痛、灼痛或刺痛;2)对有害刺激过度的疼痛反应(痛觉过敏);以及3)由通常无害的刺激产生的疼痛(allodynia-Meyer et al.,

1994,Textbook of Pain,13-44)。尽管患有各种形式的急性和慢性疼痛的患者可能具有类似的症状,但是根本机制可能不同,并且可能因此需要不同的治疗策略。因此,还可以根据不同的病理生理学将疼痛分成许多不同的亚型,包括伤害性疼痛、炎性疼痛和神经性疼痛。

[0508] 在一些实施方案中,本公开的组合物和方法有效减轻伤害性疼痛。在一些实施方案中,本公开的组合物和方法有效减轻炎性疼痛。在一些实施方案中,本公开的组合物和方法有效减轻神经性疼痛。

[0509] 伤害性疼痛是由组织损伤或由可能引起损伤的强烈刺激诱导的。中度至重度急性伤害性疼痛是来自中枢神经系统创伤、劳损/扭伤、烧伤、心肌梗塞和急性胰腺炎、手术后疼痛(任何类型的外科手术后的疼痛)、创伤后疼痛、肾绞痛、癌痛和背痛的疼痛的突出特征。癌症疼痛可以是慢性疼痛,例如肿瘤相关疼痛(例如骨痛、头痛、面部疼痛或内脏疼痛)或与癌症疗法相关的疼痛(例如化疗后综合征、慢性术后疼痛综合征或放射后综合征)。癌症疼痛也可能响应于化疗、免疫疗法、激素疗法或放射疗法而发生。背痛可能是由于椎间盘突出或破裂,或腰椎椎间小关节、骶髂关节、椎旁肌或后纵韧带的异常所致。背痛可以自然消退,但在一些患者中,在背痛持续超过12周的情况下,背痛变成可能使人特别虚弱的慢性病况。

[0510] 神经性疼痛可以定义为由神经系统中的原发性病变或功能病症引发或造成的疼痛。神经性疼痛的病因包括例如周围神经病、糖尿病性神经病变、疱疹后神经痛、三叉神经痛、背痛、癌症神经病变、HIV神经病变、幻肢痛、腕管综合征、中枢性中风后疼痛以及与慢性酒精中毒、甲状腺功能减退、尿毒症、多发性硬化、脊髓损伤、帕金森病、癫痫和维生素缺乏相关的疼痛。

[0511] 神经性疼痛可以与疼痛病症有关,术语疼痛病症是指与疼痛相关或由疼痛造成的疾病、病症或病况。疼痛病症的说明性示例包括关节炎、痛觉超敏、典型三叉神经痛、三叉神经痛、躯体形式病症、感觉减退、痛觉过敏、神经痛、神经炎、神经源性疼痛、痛觉缺失、痛性感觉缺失、灼性神经痛、坐骨神经疼痛病症、退化性关节病、纤维肌痛、内脏性疾病、慢性疼痛病症、偏头痛/头痛、慢性疲劳综合征、复杂性局部疼痛综合征、神经营养不良、跖筋膜炎或与癌症相关的疼痛。

[0512] 在一些实施方案中,所述神经性疼痛是周围神经病。周围神经病是指在脑和脊髓与身体其他部位之间来回携带信息的神经受损或患病时导致的病况。各种周围神经病的范围为从腕管综合征(长期重复使用手和手腕如使用计算机后常见的创伤性损伤)到与糖尿病有关的神经损伤。通常,周围神经病可分为单神经病和多发性神经病。单神经病包括腕管综合征、尺神经麻痹、桡神经麻痹和腓神经麻痹。当全身多个周围神经同时出现故障时,就会出现多发性神经病。多发性神经病可能有多种原因,包括暴露于某些如与酒精滥用相关的毒素、营养不良(特别是维生素B缺乏症)以及如癌症或肾衰竭等疾病引起的并发症。慢性多发性神经病的最常见形式之一是糖尿病性神经病(发生在糖尿病患者中的病况)。对于血糖水平控制不佳的人更为严重。虽然不太常见,但糖尿病也会引起单神经病。最严重的多发性神经病之一是吉兰-巴雷综合征,这是一种当身体免疫系统在神经离开脊髓时攻击体内神经时突发的罕见疾病。症状往往会很快出现并迅速恶化,有时会导致瘫痪。早期症状包括虚弱和刺痛,最终可能向上扩散到手臂。更严重的情况下可能会出现血压问题、心律问题和呼吸困难。慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病变(CIDP)是吉兰-巴雷的一种慢性形式,其症状持续数月甚至数年。早期诊断和治疗对于CIDP患者至关重要,30%的CIDP患者有最终被限

制在轮椅上的风险。

[0513] 在一些实施方案中,神经性疼痛是三叉神经痛。三叉神经痛(TN),也称为痛性痉挛,是一种影响在头部分布最广泛的神经之一即三叉神经或第5脑神经的慢性疼痛病况。三叉神经是一组头部脑神经。它是负责为面部提供感觉的神经。一根三叉神经延伸到头部的右侧,另一根则延伸到左侧。这些神经中的每一个都有三个不同的分支。在三叉神经离开脑并进入头骨后,三叉神经分为三个更小的分支,控制整个面部的感觉:眼神经(V1):第一分支控制人的眼睛、上眼睑和前额的感觉。上颌神经(V2):第二分支控制下眼睑、脸颊、鼻孔、上唇和上牙龈的感觉。下颌神经(V3):第三分支控制下颌、下唇、下牙龈和一些用于咀嚼的肌肉的感觉。

[0514] TN是神经性疼痛的一种形式。这种病症的典型或“经典”形式(称为“1型”或TN1)会引起极端、散发、突然的灼痛或休克样面部疼痛,每次发作持续数秒至长达两分钟。这些发作可以连续快速发生,连发持续长达两小时。这种病症的“非典型”形式(称为“2型”或TN2)的特征是持续的疼痛、灼痛、刺痛,其强度稍微比1型低。两种形式的疼痛可出现在同一个人身上,有时同时出现。疼痛的强度可能是身体和精神上丧失能力。TN与多种病况有关。TN可能是在三叉神经出脑干时由血管压迫在三叉神经上引起的。这种压迫会导致神经周围的保护层(髓鞘)磨损或损坏。多发性硬化症患者也可能出现TN症状,多发性硬化症会引起三叉神经髓鞘退化。罕见地,TN的症状可由肿瘤引起的神经压迫或称为动静脉畸形的动脉和静脉缠结引起。三叉神经损伤(可能是鼻窦手术、口腔手术、中风或面部创伤的结果)也可产生神经性面部疼痛。

[0515] 炎性过程是复杂的一系列生化和细胞事件,它们响应于组织损伤或外来物质的存在而被激活,这导致了肿胀和疼痛。关节炎疼痛是常见的炎性疼痛。

[0516] 适于用本公开的组合物和方法治疗的其他疼痛类型包括但不限于由肌肉骨骼病症引起的疼痛,包括肌痛、纤维肌痛、脊柱炎、血清阴性的(非类风湿性)关节病、非关节风湿病、抗肌萎缩蛋白病、糖原分解症、多发性肌炎和脓性肌炎;心脏和血管疼痛,包括由心绞痛、心肌梗塞、二尖瓣狭窄、心包炎、雷诺现象、硬肿病(scleredoma)和骨骼肌缺血引起的疼痛;头痛,如偏头痛(包括先兆偏头痛和无先兆偏头痛)、丛集性头痛、紧张型头痛、混合型头痛和与血管病症相关的头痛;以及颌面部痛,包括牙痛、耳痛、灼口综合征和颞下颌肌筋膜疼痛。

[0517] 可以使用多种疼痛量表来确定本公开的组合物和方法减少人受试者经历的疼痛量的有效量。可以使用患者自我报告来评估疼痛是否减少;参见,例如Katz and Melzack(1999)Surg.Clin.North Am.79:231。可替代地,可以使用观察性疼痛量表。可以使用LANSS疼痛量表来评估疼痛是否减少;参见例如,Schmader(2002)Clin。可以使用视觉模拟疼痛量表;参见,例如,Schmader(2002)Clin.J.Pain 18:350。可以使用Likert疼痛量表;例如,其中0表示无疼痛,5表示中度疼痛,以及10表示可能最严重的疼痛。用于儿童的自我报告疼痛量表包括,例如,面部疼痛量表;Wong-Baker面部表情疼痛评级量表;和彩色模拟量表。用于成人的自我报告疼痛量表包括,例如,视觉模拟量表;言语数值评级量表;言语描述量表;和简要疼痛调查表。疼痛测量量表包括,例如,AlderHey分诊疼痛评分(Stewart et al.(2004)Arch.Dis.Child.89:625);行为疼痛量表(Payen et al.(2001)Critical Care Medicine 29:2258);简明疼痛量表(Cleeland and Ryan(1994)Ann.Acad.Med.Singapore

23:129);非言语性疼痛指标检查表(Feldt(2000)Pain Manag.Nurs.1:13);重症监护疼痛观察工具(Gelinas et al.(2006)Am.J.Crit.Care 15:420);舒适量表(Ambuel et al.(1992)J.Pediatric Psychol.17:95);达拉斯疼痛问卷(Ozguler et al.(2002)Spine 27:1783);测痛计疼痛指数(Hardy et al.(1952)Pain Sensations and Reactions Baltimore:The Williams&Wilkins Co.);修订版面部表情疼痛量表(Hicks et al.(2001)Pain 93:173);表情、腿部、活动、哭闹、可抚慰性量表;麦吉尔疼痛问卷(Melzack(1975)Pain 1:277);描述语区分量表(Gracely and Kwilosz(1988)Pain 35:279);数值1 1分盒(Jensen et al.(1989)Clin.J.Pain 5:153);数字评定量表(Hartrick et al.(2003)Pain Pract.3:310);Wong-Baker面部表情疼痛评定量表;以及视觉模拟量表(Huskisson(1982)J.Rheumatol.9:768)。

[0518] 在一些实施方案中,提供缓解受试者疼痛的方法,所述方法包括施用包括本公开的表达盒的重组核酸,其将由转基因编码的工程化LGIC引入到神经元细胞通过提供有效量的激活工程化受体的配体来控制细胞的活性,从而减轻受试者的疼痛。所述方法针对疼痛提供了显著的镇痛,而无脱靶效应,如一般的中枢神经系统抑制。在某些实施方案中,与未治疗的受试者相比,所述方法提供至少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多(包括其间的所有范围和子范围)的受试者的神经性疼痛减少。在一些实施方案中,所述方法包括在施用配体之前和之后测量受试者的疼痛的步骤,其中受试者的疼痛减少至少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多(包括其间的所有范围和子范围)。在这样的情况下,测量可以在施用所述配体之后4小时或更长时间进行,例如在施用配体之后8小时、12小时、16小时、24小时、36小时、48小时、3天、或4天或更长时间进行。

[0519] 在一些情况下,所述组合物和方法用于治疗创伤后应激病症(PTSD)、胃食管返流疾病(GERD)、成瘾(例如,酒精、药物)、焦虑症、抑郁症、记忆丧失、痴呆、睡眠呼吸暂停、中风、尿失禁、发作性睡病、特发性震颤、运动病症、心房颤动、癌症(例如,脑瘤)、帕金森病或阿尔茨海默病。可以通过本文的组合物和方法治疗的神经系统疾病或病症的其他非限制性示例包括:意志缺失、失写症、酒精中毒、失读症、动脉瘤、一过性黑朦、健忘症、肌萎缩侧索硬化(ALS)、快乐木偶综合征、失语症、失用症、蛛网膜炎、阿诺德-基亚里畸形、阿斯佩格综合征、共济失调、共济失调-毛细血管扩张症、注意缺陷多动病症、听觉处理病症、孤独症谱系、双相病症、贝尔麻痹、臂丛损伤、脑损害、脑损伤、脑肿瘤、卡纳万病、卡普格拉妄想症、腕管综合征、灼性神经痛、中枢神经痛综合征、脑桥中央髓鞘溶解、中央核肌病、头部病症、脑动脉瘤、脑动脉硬化症、脑萎缩、伴皮质下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传性脑动脉病(CADASIL)、脑性巨人症、脑性瘫痪、脑血管炎、颈椎管狭窄、腓骨肌萎缩病、基亚里畸形、舞蹈症、慢性疲劳综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病变(CIDP)、慢性疼痛、科芬-劳里综合征、昏迷、复杂性区域疼痛综合征、压迫性神经病、先天性双侧面瘫、皮质基底节变性、颅动脉炎、颅缝早闭、克罗伊茨费尔特-雅各布病、劳损性功能病症、库欣综合征、循环性情绪病症、巨细胞包涵体病(CIBD)、巨细胞病毒感染、丹迪-沃克综合征、道森病、德莫尔斯综合征、德热里纳-克隆普克麻痹、德热里纳-索塔斯病、睡眠时相延迟综合征、痴呆、皮肌炎、发

展性协调病症、糖尿病性神经病、弥漫性硬化、复视、唐氏综合征、德拉韦综合征、迪谢内肌营养不良、构音病症、自主神经功能病症、计算困难、书写困难、运动病症、失读症、肌张力病症、空蝶鞍综合征、脑炎、脑膨出、脑三叉神经血管瘤病、遗粪症、遗尿、癫痫、女性癫痫智力病症、厄尔布氏麻痹、红斑性肢痛症、头部爆炸感综合征、法布里病、法尔综合征、昏厥、家族性痉挛性瘫痪、热性惊厥、费希尔综合征、弗里德赖希共济失调、纤维肌痛、福维尔综合征、胎儿酒精综合征、脆性X综合征、脆性X相关震颤/共济失调综合征(FXTAS)、戈谢病、全面性癫痫伴热性惊厥附加症、格斯特曼综合征、巨细胞动脉炎、巨细胞包涵体病、球形细胞脑白质营养不良、灰质异位症、吉兰-巴雷综合征、广泛性焦虑症、HTLV-1相关脊髓病、哈勒沃登-施帕茨病、头部损伤、头痛、偏侧面肌痉挛、遗传性痉挛性截瘫、遗传性共济失调性多发性神经炎样病、耳带状疱疹、带状疱疹、平山综合征、希尔施普龙病、霍-艾(Holmes-Adie)综合征、前脑无裂畸形、亨廷顿病、积水性无脑畸形、脑积水、皮质醇增多症、缺氧、免疫介导的脑脊髓炎、包涵体肌炎、色素失调症、婴儿雷夫叙姆病、婴儿痉挛、炎性肌病、颅内囊肿、高颅压、等臂双着丝粒15、朱伯特综合征、Karak综合征、卡恩斯-塞尔综合征、Kinsbourne综合征、克莱恩-莱文综合征、克利佩尔-费尔综合征、克拉伯病、拉福拉病、兰伯特-伊顿肌无力综合征、兰道-克勒夫纳综合征、延髓背外侧(瓦伦贝格)综合征、学习无能、利氏病、伦诺克斯-加斯托综合征、莱施-奈恩综合征、脑白质营养不良、白质消融性白质脑病、路易体痴呆、无脑回畸形、闭锁综合征、腰椎间盘疾病、腰椎管狭窄症、莱姆病-神经系统后遗症、马查多-约瑟夫病(3型脊髓小脑性共济失调)、巨脑、视物显大症、登陆病综合征、伴皮层下囊肿的巨脑性白质脑病、巨脑畸形、梅-罗综合征、梅尼埃病、脑膜炎、门克斯病、异染性脑白质营养不良、小头畸形、视物显小症、偏头痛、米-费综合征、小中风(短暂性脑缺血发作)、恐音症、线粒体肌病、莫比斯综合征、单肢肌萎缩、运动技能病症、烟雾病、黏多糖贮积症、多发性脑梗死性痴呆、多灶性运动神经病、多发性硬化、多系统萎缩、肌营养不良、肌痛性脑脊髓炎、重症肌无力、髓鞘破坏性弥漫性硬化、婴儿肌阵挛脑病、肌阵挛、肌病、肌管性肌病、先天性肌强直、发作性睡病、神经白塞病、神经纤维瘤病、神经阻滞剂恶性综合征、AIDS的神经系统表现、狼疮的神经系统后遗症、神经性肌强直、神经元蜡样质脂褐质沉积症、神经元移行障碍、神经病、神经症、尼曼-皮克病、非24小时睡眠-觉醒病症、非言语学习病症、O'Sullivan-McLeod综合征、枕神经痛、隐性脊柱闭合不全序列、大田原综合征、橄榄体脑桥小脑萎缩、斜视性眼阵挛-肌阵挛综合征、视神经炎、直立性低血压、耳硬化、过用综合征、持续后像、感觉异常、帕金森病、先天性副肌强直症、副肿瘤病、阵发性发作、帕里-龙贝格综合征、PANDAS、佩利措伊斯-梅茨巴赫病、周期性麻痹、周围神经病、广泛性发育病症、强光喷嚏反射、植烷酸贮积病、皮克病、神经受压、垂体瘤、PMG、多发性神经病、脊髓灰质炎、多小脑回畸形、多肌炎、脑穿通畸形、脊髓灰质炎后综合征、疱疹后神经痛(PHN)、体位性低血压、普拉德-威利综合征、原发性侧索硬化、朊病毒病、进行性半侧颜面萎缩、进行性多灶性白质脑病、进行性核上性麻痹、面容失认症、假性脑瘤、象限盲、四肢瘫痪、狂犬病、神经根病变、I型拉姆齐-亨特综合征、II型拉姆齐-亨特综合征、III型拉姆齐-亨特综合征、拉斯马森脑炎、反射神经血管营养不良、雷夫叙姆病、快速眼动睡眠行为病症、重复性应激损伤、下肢不宁综合征、逆转录病毒相关脊髓病、雷特综合征、瑞氏综合征、节律性运动病症、龙贝格综合征、圣维特斯舞蹈症、桑德霍夫病、希尔德病、脑裂畸形、感觉处理病症、隔-视发育不良、摇晃婴儿综合征、带状疱疹、夏-德综合征、干燥综合征、睡眠呼吸暂停、睡眠病、打喷嚏饱和、小儿巨脑畸形综合

征、痉挛状态、脊柱裂、脊髓损伤、脊髓肿瘤、脊髓性肌萎缩、脊髓延髓性肌萎缩、脊髓小脑性共济失调、裂脑、斯蒂尔-理查森-奥尔谢夫斯基综合征、僵人综合征、中风、斯德奇-韦伯综合征、口吃、亚急性硬化性全脑炎、皮质下动脉硬化性脑病、表面铁沉积症、小舞蹈症、晕厥、通感、脊髓空洞症、跗管综合征、迟发性运动病症、迟发性精神病症、Tarlov囊肿、泰-萨克斯病、颞动脉炎、颞叶癫痫、破伤风、脊髓栓系综合征、汤姆森病、胸廓出口综合征、痛性痉挛、托德瘫痪、图雷特综合征、中毒性脑病、短暂性脑缺血发作、传染性海绵状脑病、横贯性脊髓炎、颅脑损伤、震颤、拔毛狂、三叉神经痛、热带痉挛性轻截瘫、锥体虫病、结节性硬化症、肌阵挛癫痫(Unverricht-Lundborg disease)、希佩尔-林道病(VHL)、Viliuisk脑脊髓炎(VE)、瓦伦贝格综合征、韦斯特综合征、挥鞭伤、威廉姆斯综合征、威尔逊氏症或泽尔韦格综合征。

[0520] 通过本文公开的方法和组合物治疗的受试者可以是人,或非人动物。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施例中,人是成年人(≥18岁)。非人动物的非限制性示例包括非人灵长类动物、家畜动物、家养宠物和实验动物。非人动物可以是猿(例如,黑猩猩、狒狒、大猩猩或猩猩)、旧大陆猴(例如,恒河猴)、新大陆猴、狗、猫、野牛、骆驼、牛、鹿、猪、驴、马、骡、美洲驼、绵羊、山羊、水牛、驯鹿、牦牛、小鼠、大鼠、兔或任何其他非人动物。本文所述的组合物和方法适合于治疗兽医动物。兽医动物可以包括但不限于狗、猫、马、牛、绵羊、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、蛇、乌龟和蜥蜴。在一些方面,使组织或细胞群与组合物接触包括向细胞群或受试者施用组合物。在一些实施方案中,施用在体外进行,例如通过将组合物添加至细胞培养系统中。在一些方面,施用在体内进行,例如通过特定途径施用。当施用多于一种组合物时,组合物可以在同一时间(例如,在同一天)经由相同途径施用,或在不同时间经由相同途径施用。替代地,组合物可以在同一时间(例如,在同一天)经由不同途径施用或在不同时间经由不同途径施用。

[0521] 施用

[0522] 本公开提供用于施用包括本公开的表达盒的重组核酸或其药物组合物的给药方案。在一些实施方案中,将重组核酸掺入载体(例如,AAV载体)中用于施用。

[0523] 在一些实施方案中,将重组核酸施用至或引入到一个或多个神经元细胞中。神经元细胞可以是相同类型的神经元细胞,或者是不同类型神经元细胞的混合群体。

[0524] 在一些实施方案中,神经元细胞是海马神经元。在一些实施方案中,神经元细胞是兴奋性神经元。在一些实施方案中,将重组核酸施用至或引入到一个或多个海马神经元细胞中。

[0525] 在一些实施例中,神经元细胞是伤害性感受器或外周感觉神经元。感觉神经元的说明性示例包括但不限于背根神经节(DRG)神经元和三叉神经节(TGG)神经元。在一些实施方案中,神经元细胞是参与神经元疼痛回路的抑制性中间神经元。在一些实施方案中,将本公开的重组核酸施用至或引入到一个或多个DRG神经元细胞中。在一些实施方案中,将本公开的重组核酸施用至或引入到一个或多个TGG神经元细胞中。

[0526] 施用方法的非限制性示例包括皮下施用、静脉内施用、肌内施用、皮内施用、腹膜内施用、口服施用、输注、颅内施用、鞘内施用、鼻内施用、神经节内施用、脊柱内施用、小脑延髓池施用和神经内施用。在一些实施方案中,施用可以涉及注射重组核酸或包括所述重组核酸的载体的液体制剂。在一些实施方案中,施用可以涉及载体或重组核酸的固体制剂

的口服递送。在一些实施方案中,可以将口服制剂与食物一起施用。在一些实施方案中,将本公开的重组核酸肠胃外、静脉内、肌内、腹膜内、鞘内、神经内、神经节内、脊柱内或心室内施用给受试者,以将重组核酸引入一个或多个神经元细胞中。

[0527] 在一些实施方案中,将本公开的重组核酸通过颅内、鞘内(IT)、脑内、心室内或通过直接注射至海马中的癫痫病灶内施用于神经元。

[0528] 在一些实施方案中,通过鞘内(IT)或神经节内(IG)向感觉神经元或伤害性感受器例如DRG神经元、TGG神经元等施用本公开的重组核酸。

[0529] 鞘内(IT)施用包括通过脊柱或通过小脑延髓池递送。IT途径将重组核酸递送至脑脊液(CSF)。这种施用途径可以适合于治疗,例如慢性疼痛或其他周围神经系统(PNS)或中枢神经系统(CNS)适应症。在动物中,通过将IT导管插入小脑延髓池并将其尾部推进至腰椎水平来实现IT施用。在人中,通过腰椎穿刺(LP)(一种具有出色安全性的常规床边手术)可以容易地进行IT递送。

[0530] 在一些实施方案中,本公开的重组核酸通过神经节内施用施用于受试者。神经节内施用可以涉及直接注射到一个或多个神经节中。IG途径可以将重组核酸直接递送至DRG或TGG实质中。在一些实施方案中,通过开放神经外科手术进行向DRG施用IG。在一些实施方案中,开放神经外科手术是侵入性的并且在人中是不希望的。在一些实施方案中,可以使用微创、CT成像引导技术来安全地靶向DRG,例如用于人受试者。可以使用用于对流增强递送(CED)的定制针组件将重组核酸递送至DRG实质中。在非限制性实例中,可以将本公开的重组核酸递送至一个或多个背根神经节和/或三叉神经节以治疗慢性疼痛。在另一个非限制性实例中,可以将本公开的重组核酸递送至结状神经节(迷走神经)以治疗癫痫。

[0531] 在一些实施方案中,通过颅内施用(即,直接进入脑中)将本公开的重组核酸施用于受试者。在颅内施用的非限制性实例中,可以将本公开的重组核酸递送至脑皮质中以治疗例如癫痫发作病灶,递送至室旁下丘脑中以治疗例如饱腹感病症,或递送到杏仁核中央核以治疗例如饱腹感病症。在一些实施方案中,可以通过神经内注射(即,直接进入神经)将重组核酸施用于受试者。可以基于待治疗的适应症来选择神经,例如注射到坐骨神经中以治疗慢性疼痛或注射到迷走神经中以治疗癫痫或饱腹感病症。在又一具体情况中,可以通过注射将重组核酸施用于受试者,例如注射到感觉神经末梢中以治疗慢性疼痛。在一些实施方案中,通过直接注射到海马中的癫痫病灶中将本公开的重组核酸施用于受试者。

[0532] 剂量可以变化,并取决于治疗是预防性的还是治疗性的,所涉及的疾病治疗的类型、开始、进展、严重程度、频率、持续时间或概率,所需临床终点,先前或同时治疗,受试者的一般健康状况、年龄、性别、种族或免疫能力,以及熟练技术人员将理解的其他因素。如治疗或疗法的任何不良副作用、并发症或其他风险因素以及受试者的状态所指示的,剂量、数量、频率或持续时间可以成比例地增加或减少。熟练技术人员将理解可能影响提供足以提供治疗或预防益处的量所需的剂量和时间的因素。

[0533] 在一些实施方案中,重组核酸掺入载体,例如病毒载体中。在一些实施方案中,载体剂量可以表示为递送至受试者的载体基因组单位的数量。单个载体基因组的大小通常取决于所使用的病毒载体的类型。本公开的载体基因组可为约1.0千碱基、1.5千碱基、2.0千碱基、2.5千碱基、3.0千碱基、3.5千碱基、4.0千碱基、4.5千碱基至5.0千碱基、或多于5.0千碱基,包括其间的所有范围和子范围。

[0534] 在一些实施方案中,施用的载体剂量具有约$1x10^6$、约$2x10^6$、约$3x10^6$、约$4x10^6$、约$5x10^6$、约$6x10^6$、约$7x10^6$、约$8x10^6$、约$9x10^6$、约$1x10^7$、约$2x10^7$、约$3x10^7$、约$4x10^7$、约$5x10^7$、约$6x10^7$、约$7x10^7$、约$8x10^7$、约$9x10^7$、约$1x10^8$、约$2x10^8$、约$3x10^8$、约$4x10^8$、约$5x10^8$、约$6x10^8$、约$7x10^8$、约$8x10^8$、约$9x10^8$、约$1x10^9$、约$2x10^9$、约$3x10^9$、约$4x10^9$、约$5x10^9$、约$6x10^9$、约$7x10^9$、约$8x10^9$、约$9x10^9$、约$1x10^{10}$、约$2x10^{10}$、约$3x10^{10}$、约$4x10^{10}$、约$5x10^{10}$、约$6x10^{10}$、约$7x10^{10}$、约$8x10^{10}$、约$9x10^{10}$、约$1x10^{11}$、约$2x10^{11}$、约$3x10^{11}$、约$4x10^{11}$、约$5x10^{11}$、约$6x10^{11}$、约$7x10^{11}$、约$8x10^{11}$、约$9x10^{11}$、约$1x10^{12}$、约$2x10^{12}$、约$3x10^{12}$、约$4x10^{12}$、约$5x10^{12}$、约$6x10^{12}$、约$7x10^{12}$、约$8x10^{12}$、约$9x10^{12}$、约$1x10^{13}$、约$2x10^{13}$、约$3x10^{13}$、约$4x10^{13}$、约$5x10^{13}$、约$6x10^{13}$、约$7x10^{13}$、约$8x10^{13}$、约$9x10^{13}$、约$1x10^{14}$、约$2x10^{14}$、约$3x10^{14}$、约$4x10^{14}$、约$5x10^{14}$、约$6x10^{14}$、约$7x10^{14}$、约$8x10^{14}$、约$9x10^{14}$、约$1x10^{15}$、约$2x10^{15}$、约$3x10^{15}$、约$4x10^{15}$、约$5x10^{15}$、约$6x10^{15}$、约$7x10^{15}$、约$8x10^{15}$、约$9x10^{15}$、约$1x10^{16}$、约$2x10^{16}$、约$3x10^{16}$、约$4x10^{16}$、约$5x10^{16}$、约$6x10^{16}$、约$7x10^{16}$、约$8x10^{16}$、约$9x10^{16}$、约$1x10^{17}$或更多个载体基因组单位,包括其间的所有范围和子范围。

[0535] 在一些实施方案中,施用的载体剂量具有至少$1x10^6$、至少$2x10^6$、至少$3x10^6$、至少$4x10^6$、至少$5x10^6$、至少$6x10^6$、至少$7x10^6$、至少$8x10^6$、至少$9x10^6$、至少$1x10^7$、至少$2x10^7$、至少$3x10^7$、至少$4x10^7$、至少$5x10^7$、至少$6x10^7$、至少$7x10^7$、至少$8x10^7$、至少$9x10^7$、至少$1x10^8$、至少$2x10^8$、至少$3x10^8$、至少$4x10^8$、至少$5x10^8$、至少$6x10^8$、至少$7x10^8$、至少$8x10^8$、至少$9x10^8$、至少$1x10^9$、至少$2x10^9$、至少$3x10^9$、至少$4x10^9$、至少$5x10^9$、至少$6x10^9$、至少$7x10^9$、至少$8x10^9$、至少$9x10^9$、至少$1x10^{10}$、至少$2x10^{10}$、至少$3x10^{10}$、至少$4x10^{10}$、至少$5x10^{10}$、至少$6x10^{10}$、至少$7x10^{10}$、至少$8x10^{10}$、至少$9x10^{10}$、至少$1x10^{11}$、至少$2x10^{11}$、至少$3x10^{11}$、至少$4x10^{11}$、至少$5x10^{11}$、至少$6x10^{11}$、至少$7x10^{11}$、至少$8x10^{11}$、至少$9x10^{11}$、至少$1x10^{12}$、至少$2x10^{12}$、至少$3x10^{12}$、至少$4x10^{12}$、至少$5x10^{12}$、至少$6x10^{12}$、至少$7x10^{12}$、至少$8x10^{12}$、至少$9x10^{12}$、至少$1x10^{13}$、至少$2x10^{13}$、至少$3x10^{13}$、至少$4x10^{13}$、至少$5x10^{13}$、至少$6x10^{13}$、至少$7x10^{13}$、至少$8x10^{13}$、至少$9x10^{13}$、至少$1x10^{14}$、至少$2x10^{14}$、至少$3x10^{14}$、至少$4x10^{14}$、至少$5x10^{14}$、至少$6x10^{14}$、至少$7x10^{14}$、至少$8x10^{14}$、至少$9x10^{14}$、至少$1x10^{15}$、至少$2x10^{15}$、至少$3x10^{15}$、至少$4x10^{15}$、至少$5x10^{15}$、至少$6x10^{15}$、至少$7x10^{15}$、至少$8x10^{15}$、至少$9x10^{15}$、至少$1x10^{16}$、至少$2x10^{16}$、至少$3x10^{16}$、至少$4x10^{16}$、至少$5x10^{16}$、至少$6x10^{16}$、至少$7x10^{16}$、至少$8x10^{16}$、至少$9x10^{16}$或至少$1x10^{17}$个载体基因组单位,包括其间的所有范围和子范围。

[0536] 在一些实施方案中,施用的载体剂量具有不多于$1x10^6$、不多于$2x10^6$、不多于$3x10^6$、不多于$4x10^6$、不多于$5x10^6$、不多于$6x10^6$、不多于$7x10^6$、不多于$8x10^6$、不多于$9x10^6$、不多于$1x10^7$、不多于$2x10^7$、不多于$3x10^7$、不多于$4x10^7$、不多于$5x10^7$、不多于$6x10^7$、不多于$7x10^7$、不多于$8x10^7$、不多于$9x10^7$、不多于$1x10^8$、不多于$2x10^8$、不多于$3x10^8$、不多于$4x10^8$、不多于$5x10^8$、不多于$6x10^8$、不多于$7x10^8$、不多于$8x10^8$、不多于$9x10^8$、不多于$1x10^9$、不多于$2x10^9$、不多于$3x10^9$、不多于$4x10^9$、不多于$5x10^9$、不多于$6x10^9$、不多于$7x10^9$、不多于$8x10^9$、不多于$9x10^9$、不多于$1x10^{10}$、不多于$2x10^{10}$、不多于$3x10^{10}$、不多于$4x10^{10}$、不多于$5x10^{10}$、不多于$6x10^{10}$、不多于$7x10^{10}$、不多于$8x10^{10}$、不多于$9x10^{10}$、不多于$1x10^{11}$、不多于$2x10^{11}$、不多于$3x10^{11}$、不多于$4x10^{11}$、不多于$5x10^{11}$、不多于$6x10^{11}$、不多于$7x10^{11}$、不多于$8x10^{11}$、不多于$9x10^{11}$、不多于$1x10^{12}$、不多于$2x10^{12}$、不多于$3x10^{12}$、不多于$4x10^{12}$、不多于$5x10^{12}$、不多于$6x10^{12}$、不多于$7x10^{12}$、不多于$8x10^{12}$、不多于$9x10^{12}$、不多于$1x10^{13}$、不多于$2x10^{13}$、不多于$3x10^{13}$、不多于$4x10^{13}$、不多于$5x10^{13}$、不多于$6x10^{13}$、不多于$7x10^{13}$、不多于$8x10^{13}$、不多于

$9x10^{13}$、不多于$1x10^{14}$、不多于$2x10^{14}$、不多于$3x10^{14}$、不多于$4x10^{14}$、不多于$5x10^{14}$、不多于$6x10^{14}$、不多于$7x10^{14}$、不多于$8x10^{14}$、不多于$9x10^{14}$、不多于$1x10^{15}$、不多于$2x10^{15}$、不多于$3x10^{15}$、不多于$4x10^{15}$、不多于$5x10^{15}$、不多于$6x10^{15}$、不多于$7x10^{15}$、不多于$8x10^{15}$、不多于$9x10^{15}$、不多于$1x10^{16}$、不多于$2x10^{16}$、不多于$3x10^{16}$、不多于$4x10^{16}$、不多于$5x10^{16}$、不多于$6x10^{16}$、不多于$7x10^{16}$、不多于$8x10^{16}$、不多于$9x10^{16}$或不多于$1x10^{17}$个载体基因组单位，包括其间的所有范围和子范围。

[0537] 在一些实施例中，载体剂量表示为每千克受试者体重的载体基因组单位(vg/kg)。在一些实施方案中，上述载体剂量数量是基于体重50kg的受试者，并且剂量可以相应地转换为vg/kg并基于受试者的体重应用于另一受试者。例如，用于体重为50kg的受试者的约$5x10^{14}$载体基因组单位的剂量可转换为每千克约$1x10^{13}$载体基因组单位(vg/kg)。

[0538] 在一些实施方案中，根据施用于受试者的载体的浓度或滴度来表示载体剂量。在一些实施方案中，载体剂量可以表示为每体积的单位数(例如，基因组单位/体积)乘以体积。

[0539] 在一些实施方案中，在一定体积的流体中施用本公开的载体。在一些实施方案中，按以下的体积施用载体：约0.01mL、约0.02mL、约0.03mL、约0.04mL、约0.05mL、约0.06mL、约0.07mL、约0.08mL、约0.09mL、约0.1mL、约0.15mL、约0.2mL、约0.25mL、约0.3mL、约0.4mL、约0.5mL、约0.6mL、约0.7mL、约0.8mL、约0.9mL、约1.0mL、约2.0mL、约3.0mL、约4.0mL、约5.0mL、约6.0mL、约7.0mL、约8.0mL、约9.0mL、约10.0mL、约11.0mL、约12.0mL、约13.0mL、约14.0mL、约15.0mL、约16.0mL、约17.0mL、约18.0mL、约19.0mL、约20.0mL、约25.0mL或大于25.0mL，包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中，按以下的体积施用载体：至少0.01mL、至少0.02mL、至少0.03mL、至少0.04mL、至少0.05mL、至少0.06mL、至少0.07mL、至少0.08mL、至少0.09mL、至少0.1mL、至少0.15mL、至少0.2mL、至少0.25mL、至少0.3mL、至少0.4mL、至少0.5mL、至少0.6mL、至少0.7mL、至少0.8mL、至少0.9mL、至少1.0mL、至少2.0mL、至少3.0mL、至少4.0mL、至少5.0mL、至少6.0mL、至少7.0mL、至少8.0mL、至少9.0mL、至少10.0mL、至少11.0mL、至少12.0mL、至少13.0mL、至少14.0mL、至少15.0mL、至少16.0mL、至少17.0mL、至少18.0mL、至少19.0mL、至少20.0mL或至少25.0mL，包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中，按以下的体积施用载体：不多于0.01mL、不多于0.02mL、不多于0.03mL、不多于0.04mL、不多于0.05mL、不多于0.06mL、不多于0.07mL、不多于0.08mL、不多于0.09mL、不多于0.1mL、不多于0.15mL、不多于0.2mL、不多于0.25mL、不多于0.3mL、不多于0.4mL、不多于0.5mL、不多于0.6mL、不多于0.7mL、不多于0.8mL、不多于0.9mL、不多于1.0mL、不多于2.0mL、不多于3.0mL、不多于4.0mL、不多于5.0mL、不多于6.0mL、不多于7.0mL、不多于8.0mL、不多于9.0mL、不多于10.0mL、不多于11.0mL、不多于12.0mL、不多于13.0mL、不多于14.0mL、不多于15.0mL、不多于16.0mL、不多于17.0mL、不多于18.0mL、不多于19.0mL、不多于20.0mL或不多于25.0mL，包括其间的所有范围和子范围。

[0540] 在一些实施方案中，将本文考虑的载体按以下的滴度施用于受试者：至少$1x10^{9}$个基因组单位/mL、至少$1x10^{10}$个基因组单位/mL、至少$5x10^{10}$个基因组单位/mL、至少$1x10^{11}$个基因组单位/mL、至少$5x10^{11}$个基因组单位/mL、至少$1x10^{12}$个基因组单位/mL、至少$5x10^{12}$个基因组单位/mL、至少$6x10^{12}$个基因组单位/mL、至少$7x10^{12}$个基因组单位/mL、至少$8x10^{12}$个基因组单位/mL、至少$9x10^{12}$个基因组单位/mL、至少$10x10^{12}$个基因组单位/mL、至少$15x10^{12}$

个基因组单位/mL、至少$20x10^{12}$个基因组单位/mL、至少$25x10^{12}$个基因组单位/mL、至少$50x10^{12}$个基因组单位/mL或至少$100x10^{12}$个基因组单位/mL,包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中,将本文的载体按以下的滴度施用于受试者:约$1x10^{9}$个基因组单位/mL、约$1x10^{10}$个基因组单位/mL、约$5x10^{10}$个基因组单位/mL、约$1x10^{11}$个基因组单位/mL、约$5x10^{11}$个基因组单位/mL、约$1x10^{12}$个基因组单位/mL、约$5x10^{12}$个基因组单位/mL、约$6x10^{12}$个基因组单位/mL、约$7x10^{12}$个基因组单位/mL、约$8x10^{12}$个基因组单位/mL、约$9x10^{12}$个基因组单位/mL、约$10x10^{12}$个基因组单位/mL、约$15x10^{12}$个基因组单位/mL、约$20x10^{12}$个基因组单位/mL、约$25x10^{12}$个基因组单位/mL、约$50x10^{12}$个基因组单位/mL或约$100x10^{12}$个基因组单位/mL,包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中,将公开的载体按以下的滴度施用于受试者:不多于$1x10^{9}$个基因组单位/mL、不多于$1x10^{10}$个基因组单位/mL、不多于$5x10^{10}$个基因组单位/mL、不多于$1x10^{11}$个基因组单位/mL、不多于$5x10^{11}$个基因组单位/mL、不多于$1x10^{12}$个基因组单位/mL、不多于$5x10^{12}$个基因组单位/mL、不多于$6x10^{12}$个基因组单位/mL、不多于$7x10^{12}$个基因组单位/mL、不多于$8x10^{12}$个基因组单位/mL、不多于$9x10^{12}$个基因组单位/mL、不多于$10x10^{12}$个基因组单位/mL、不多于$15x10^{12}$个基因组单位/mL、不多于$20x10^{12}$个基因组单位/mL、不多于$25x10^{12}$个基因组单位/mL、不多于$50x10^{12}$个基因组单位/mL或不多于$100x10^{12}$个基因组单位/mL,包括其间的所有范围和子范围。

[0541] 在一些实施方案中,将本文考虑的载体按以下的滴度施用于受试者:约$5x10^{9}$个感染单位/mL、约$6x10^{9}$个感染单位/mL、约$7x10^{9}$个感染单位/mL、约$8x10^{9}$个感染单位/mL、约$9x10^{9}$个感染单位/mL、约$1x10^{10}$个感染单位/mL、约$1.5x10^{10}$个感染单位/mL、约$2x10^{10}$个感染单位/mL、约$2.5x10^{10}$个感染单位/mL、约$5x10^{10}$个感染单位/mL、约$1x10^{11}$个感染单位/mL、约$2.5x10^{11}$个感染单位/mL、约$5x10^{11}$个感染单位/mL、约$1x10^{12}$个感染单位/mL、约$2.5x10^{12}$个感染单位/mL、约$5x10^{12}$个感染单位/mL、约$1x10^{13}$个感染单位/mL、约$5x10^{13}$个感染单位/mL或约$1x10^{14}$个感染单位/mL,包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中,将本文考虑的载体按以下的滴度施用于受试者:至少$5x10^{9}$个感染单位/mL、至少$6x10^{9}$个感染单位/mL、至少$7x10^{9}$个感染单位/mL、至少$8x10^{9}$个感染单位/mL、至少$9x10^{9}$个感染单位/mL、至少$1x10^{10}$个感染单位/mL、至少$1.5x10^{10}$个感染单位/mL、至少$2x10^{10}$个感染单位/mL、至少$2.5x10^{10}$个感染单位/mL、至少$5x10^{10}$个感染单位/mL、至少$1x10^{11}$个感染单位/mL、至少$2.5x10^{11}$个感染单位/mL、至少$5x10^{11}$个感染单位/mL、至少$1x10^{12}$个感染单位/mL、至少$2.5x10^{12}$个感染单位/mL、至少$5x10^{12}$个感染单位/mL、至少$1x10^{13}$个感染单位/mL、至少$5x10^{13}$个感染单位/mL或至少$1x10^{14}$个感染单位/mL,包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中,将本文考虑的载体按以下的滴度施用于受试者:不多于$5x10^{9}$个感染单位/mL、不多于$6x10^{9}$个感染单位/mL、不多于$7x10^{9}$个感染单位/mL、不多于$8x10^{9}$个感染单位/mL、不多于$9x10^{9}$个感染单位/mL、不多于$1x10^{10}$个感染单位/mL、不多于$1.5x10^{10}$个感染单位/mL、不多于$2x10^{10}$个感染单位/mL、不多于$2.5x10^{10}$个感染单位/mL、不多于$5x10^{10}$个感染单位/mL、不多于$1x10^{11}$个感染单位/mL、不多于$2.5x10^{11}$个感染单位/mL、不多于$5x10^{11}$个感染单位/mL、不多于$1x10^{12}$个感染单位/mL、不多于$2.5x10^{12}$个感染单位/mL、不多于$5x10^{12}$个感染单位/mL、不多于$1x10^{13}$个感染单位/mL、不多于$5x10^{13}$个感染单位/mL或不多于$1x10^{14}$个感染单位/mL,包括其间的所有范围和子范围。

[0542] 在一些实施方案中,将本公开的载体按以下的滴度施用于受试者:约$5x10^{10}$个转导

单位/mL、约$1x10^{11}$个转导单位/mL、约$2.5x10^{11}$个转导单位/mL、约$5x10^{11}$个转导单位/mL、约$1x10^{12}$个转导单位/mL、约$2.5x10^{12}$个转导单位/mL、约$5x10^{12}$个转导单位/mL、约$1x10^{13}$个转导单位/mL、约$5x10^{13}$个转导单位/mL或约$1x10^{14}$个转导单位/mL,包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中,将本公开的载体按以下的滴度施用于受试者:至少$5x10^{10}$个转导单位/mL、至少$1x10^{11}$个转导单位/mL、至少$2.5x10^{11}$个转导单位/mL、至少$5x10^{11}$个转导单位/mL、至少$1x10^{12}$个转导单位/mL、至少$2.5x10^{12}$个转导单位/mL、至少$5x10^{12}$个转导单位/mL、至少$1x10^{13}$个转导单位/mL、至少$5x10^{13}$个转导单位/mL或至少$1x10^{14}$个转导单位/mL,包括其间的所有范围和子范围。在一些实施方案中,将本公开的载体按以下的滴度施用于受试者:不多于$5x10^{10}$个转导单位/mL、不多于$1x10^{11}$个转导单位/mL、不多于$2.5x10^{11}$个转导单位/mL、不多于$5x10^{11}$个转导单位/mL、不多于$1x10^{12}$个转导单位/mL、不多于$2.5x10^{12}$个转导单位/mL、不多于$5x10^{12}$个转导单位/mL、不多于$1x10^{13}$个转导单位/mL、不多于$5x10^{13}$个转导单位/mL或不多于$1x10^{14}$个转导单位/mL,包括其间的所有范围和子范围。

[0543] 在一些实施方案中,通过施用途径确定载体剂量。在一些实施方案中,神经节内注射可以包括在约0.1mL至约1.0mL的体积中的约1×10^{9}至约1×10^{13}个载体基因组。在一些实施方案中,鞘内注射可以包括在约1.0mL至约12.0mL的体积中的约1×10^{10}至约1×10^{15}个载体基因组。在一些实施例中,颅内注射可以包括在约0.1mL至约1.0mL的体积中的约1×10^{9}至约1×10^{13}个载体基因组。在一些实施例中,神经内注射可以包括在约0.1mL至约1.0mL的体积中的约1×10^{9}至约1×10^{13}个载体基因组。在一些实施例中,脊柱内注射可以包括在约0.1mL至约1.0mL的体积中的约1×10^{9}至约1×10^{13}个载体基因组。在一些实施方案中,小脑延髓池输注可以包括在约0.5mL至约5.0mL的体积中的约5×10^{9}至约5×10^{13}个载体基因组。在一些实施方案中,皮下注射可以包括在约0.1mL至约1.0mL的体积中的约1×10^{9}至约1×10^{13}个载体基因组。

[0544] 在一些实施方案中,载体剂量是单次施用的总剂量。在一些实施方案中,载体剂量是一个时间段内的总剂量。在一些实施方案中,所述时间段是约3小时、约6小时、约12小时、约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约12个月或长于12个月。在一些实施方案中,所述时间段是3小时内、6小时内、12小时内、1天内、2天内、3天内、4天内、5天内、6天内、1周内、2周内、3周内、4周内、1个月内、2个月内、3个月内、4个月内、5个月内、6个月内或12个月内。

[0545] 在一些实施方案中,通过输注将本公开的重组核酸递送至受试者。通过输注递送至受试者的剂量可以测量为输注速率。输注速率的非限制性示例包括:对于神经节内、脊柱内、颅内或神经内施用,1-10μL/min;和对于鞘内或小脑延髓池施用,10-1000μL/min。在一些情况下,通过MRI引导的对流增强递送(CED)将重组核酸递送至受试者。此技术能够增加分布在脑部的整个大体积中的病毒扩散和转导以及减少载体和/或核酸沿针路径的回流。

[0546] 本公开还提供用于在所施用的重组核酸编码工程化LGIC的情况下施用配体(例如,小分子LGIC激动剂)的给药方案。

[0547] 可以每天或在更长时间段内施用治疗有效量的配体一次或多于一次。在一些情况下,根据需要(例如,当需要缓解疼痛或控制癫痫时)施用治疗有效量的配体。可以连续施用(例如,在治疗方案的持续时间内每天不间断地施用)配体。在一些情况下,治疗方案可以是少于一周、一周、两周、三周、一个月或大于一个月。在一些情况下,施用治疗有效量的配体

一天、至少连续两天、至少连续三天、至少连续四天、至少连续五天、至少连续六天、至少连续七天、至少连续八天、至少连续九天、至少连续十天或至少连续大于十天。在特定情况下，施用治疗有效量的配体连续三天。在一些情况下，可以每周1次、每周2次、每周3次、每周4次、每周5次、每周6次、每周7次、每周8次、每周9次、每周10次、每周11次、每周12次、每周13次、每周14次、每周15次、每周16次、每周17次、每周18次、每周19次、每周20次、每周25次、每周30次、每周35次、每周40次或每周大于40次施用治疗有效量的配体。在一些情况下，可以每天1次、每天2次、每天3次、每天4次、每天5次、每天6次、每天7次、每天8次、每天9次、每天10次或每天大于10次施用治疗有效量的配体。在一些情况下，至少每小时、至少每2小时、至少每3小时、至少每4小时、至少每5小时、至少每6小时、至少每7小时、至少每8小时、至少每9小时、至少每10小时、至少每11小时、至少每12小时、至少每13小时、至少每14小时、至少每15小时、至少每16小时、至少每17小时、至少每18小时、至少每19小时、至少每20小时、至少每21小时、至少每22小时、至少每23小时，或者至少每天施用治疗有效量的配体。可以如下将所述剂量的配体施用于受试者：连续地，或每天1次、2次、3次、4次或5次；每周1次、2次、3次、4次、5次、6次或7次，每月1次、2次、3次或4次，每2个月一次、每3个月一次、每4个月一次、每5个月一次或每6个月一次，或一年一次，或以甚至更长的间隔。治疗持续时间可以持续一天、1、2或3周、1、2、3、4、5、7、8、9、10或11个月、1、2、3、4、5或更多年，或者更长时间。

[0548] 将组合物施用于有此需要的受试者的次数取决于医学专业人员的判断、病症、病症的严重程度以及受试者对配制剂的反应。在一些实施方案中，组合物的施用进行至少一次。在一些实施方案中，施用在给定阶段内进行多于一次，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10次或更多次。每次施用的剂量和/或施用的频率可以基于患者的病况和生理学反应根据需要进行调整。

[0549] 用于生成AAV病毒粒子的方法

[0550] 在一方面，本公开提供用于生成本公开的AAV病毒粒子的方法。通常，这些方法涉及将本公开的AAV载体插入或转导到能够将AAV载体包装到AAV病毒粒子中的宿主细胞中。下面描述和引用示例性方法；然而，本领域技术人员已知的任何方法可以用于生成本公开的AAV病毒粒子。

[0551] 可以使用本领域熟知的方法构建包括异源核酸并用于生成AAV病毒粒子的AAV载体。参见，例如，Koerber et al.(2009)Mol.Ther.,17:2088;Koerber et al.(2008)Mol Ther.,16:1703-1709;以及美国专利号7,439,065、6,951,758和6,491,907。例如，可以将异源序列直接插入到AAV基因组中，并从中切除主要AAV开放阅读框(“ORF”)。AAV基因组的其他部分也可以被删除，只要保留足够的ITR部分以允许复制和包装功能。

[0552] 为了产生AAV病毒粒子，使用已知技术例如通过转染将AAV载体引入合适的宿主细胞中。用于产生AAV病毒粒子的合适宿主细胞包括可以或已经被用作异源AAV DNA分子的接受者并且可以支持来自辅助病毒的所需AAV生产辅因子的表达的任何种类和/或类型的细胞。此类宿主细胞可以包括但不限于可以或已经被用作异源DNA分子的接受者的微生物、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。该术语包括转染的原始细胞的后代。因此，如本文所用，“宿主细胞”通常指经外源DNA序列转染的细胞。可以使用来自稳定的人细胞系HEK293的细胞(通过例如，美国典型培养物保藏中心，在保藏编号ATCC CRL1573下可以容易获得)。

[0553] 在昆虫细胞中产生AAV病毒粒子的方法是本领域已知的，并且可以用于产生主题

AAV病毒粒子。参见,例如,美国专利公开号2009/0203071;美国专利号7,271,002;和Chen(2008)Mol.Ther.16:924。

[0554] 试剂盒

[0555] 一方面,本公开提供包括重组核酸的试剂盒,其中所述重组核酸包括本公开的表达盒。在一些实施方案中,重组核酸的表达盒包含编码本公开的工程化受体的转基因。在一些实施方案中,将重组核酸掺入载体中。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,载体是AAV载体。在一些实施方案中,试剂盒包括本公开的非天然配体。

[0556] 在一些实施方案中,试剂盒包括(a)重组核酸或包括重组核酸的载体;和(b)用于将重组核酸或载体施用至背根神经节神经元或三叉神经节神经元的说明书。在一些实施方案中,试剂盒包括适合于鞘内(IT)或神经节内(IG)施用的装置。

[0557] 在一些实施方案中,试剂盒包括(a)重组核酸或包括重组核酸的载体;和(b)用于将重组核酸或载体施用至海马神经元的说明书。在一些实施方案中,试剂盒包括适合于颅内施用的装置。

[0558] 在一些实施方案中,试剂盒进一步包括包装材料和其中的一种或多种组分。试剂盒典型地包括标签或包装插页,标签或包装插页包括对组分的描述或其中的组分的体外、体内或离体使用说明书。试剂盒可以包括例如以下的此类组分的集合:重组核酸或对应的载体,以及任选地第二活性成分,例如另一种化合物、试剂、药物或组合物。在一些实施方案中,重组核酸编码LGIC(例如,工程化LGIC)并且第二活性剂是LGIC的配体(例如,小分子药物)。

[0559] 试剂盒是指容纳试剂盒的一种或多种组分的物理结构。包装材料可以保持组分无菌,并且可以由通常用于此类目的的材料(例如,纸、波纹纤维、玻璃、塑料、箔、安瓿、小瓶、管等)制成。

[0560] 标签或插页可以包括其中的一种或多种组分的标识信息、剂量、一种或多种活性成分的临床药理学(包括作用机制)、药代动力学和药效学。标签或插页可以包括标识制造商、批号、制造商位置和日期、到期日的信息。标签或插页可以包括标识制造商信息、批号、制造商位置和日期的信息。标签或插页可以包括关于试剂盒组分可被用于的疾病的信息。标签或插页可以包括临床医生或受试者在方法、用途或治疗方案(treatment protocol)或治疗方案(therapeutic regimen)中使用试剂盒组分中的一种或多种的说明书。说明书可以包括剂量、频率或持续时间、以及用于实施本文所述的方法、用途、治疗方案或预防性或治疗性方案中的任一种的说明书。

[0561] 标签或插页可以包括关于组分可以提供的任何益处(如预防性或治疗性益处)的信息。标签或插页可以包括关于潜在的不良副作用、并发症或反应的信息,如关于将不适合使用特定组合物的情况对受试者或临床医生的警告。当受试者已经、将要或正在服用一种或多种可能与组合物不相容的其他药物,或者受试者已经、将要或正在经历另一种不相容的治疗方案(treatment protocol)或治疗方案(therapeutic regimen)时,也可能发生不良副作用或并发症,并且因此,说明书可以包括关于此类不相容性的信息。

[0562] 进一步编号的实施方案

[0563] 本公开的进一步编号的实施方案提供如下:

[0564] 实施方案1.一种重组核酸,其包括表达盒,所述表达盒以5'至3'的顺序包含5'增

强子、启动子、5’非翻译区(UTR)、转基因、3’增强子和聚腺苷酸化序列(polyA)中的一种或多种,其中所述转基因可操作地连接至所述启动子。

[0565] 实施方案2.实施方案1的重组核酸,其中所述表达盒包含5’增强子,所述5’增强子包括与SEQ ID NO:37-39中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0566] 实施方案3.实施方案1的重组核酸,其中所述表达盒不包含5’增强子。

[0567] 实施方案4.实施方案1-3中任一项的重组核酸,其中所述表达盒包含启动子,所述启动子包括与SEQ ID NO:41-51中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0568] 实施方案5.实施方案1-4中任一项的重组核酸,其中启动子是神经元特异性启动子。

[0569] 实施方案6.实施方案1-5中任一项的重组核酸,其中表达盒包含位于所述启动子和所述转基因之间的内含子。

[0570] 实施方案7.实施方案1-5中任一项的重组核酸,其中表达盒包含位于所述5’UTR和所述转基因之间的内含子。

[0571] 实施方案8.实施方案1-5中任一项的重组核酸,其中表达盒包含位于所述启动子和所述5’UTR之间的内含子。

[0572] 实施方案9.实施方案6-8中任一项的重组核酸,其中内含子包括与SEQ ID NO:57-61中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0573] 实施方案10.实施方案1-5中任一项的重组核酸,其中表达盒不包含内含子。

[0574] 实施方案11.实施方案1-10中任一项的重组核酸,其中表达盒包含5’UTR,所述5’UTR包括与SEQ ID NO:52-56中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0575] 实施方案12.实施方案1-11中任一项的重组核酸,其中表达盒包含3’增强子,所述3’增强子包括与SEQ ID NO:62-65中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0576] 实施方案13.实施方案1-12中任一项的重组核酸,其中表达盒包含polyA,所述polyA包括与SEQ ID NO:67-70中任一项至少90%相同的多核苷酸序列。

[0577] 实施方案14.实施方案1-13中任一项的重组核酸,其中表达盒包含嵌入所述启动子中的非神经元沉默元件,并且其中所述非神经元沉默元件包括与SEQ ID NO:40至少90%相同的多核苷酸序列。

[0578] 实施方案15.实施方案1-13中任一项的重组核酸,其中表达盒包含位于所述5’增强子与所述启动子之间的非神经元沉默元件,并且其中所述非神经元沉默元件包括与SEQ ID NO:40至少90%相同的多核苷酸序列。

[0579] 实施方案16.实施方案1-15中任一项的重组核酸,其中表达盒包含位于所述3’增强子与所述polyA之间的3’UTR,并且其中所述3’UTR包括与SEQ ID NO:66至少90%相同的多核苷酸序列。

[0580] 实施方案17.实施方案1-16中任一项的重组核酸,其中转基因编码配体门控离子通道(LGIC)。

[0581] 实施方案18.实施方案17的重组核酸,其中配体门控离子通道包括衍生自人α7烟碱乙酰胆碱受体(α7-nAChR)的配体结合域。

[0582] 实施方案19.实施方案18的重组核酸,其中配体结合域包括与SEQ ID NO:25的氨基酸残基23-220具有至少85%同一性的氨基酸序列。

[0583] 实施方案20.实施方案18或19的重组核酸,其中配体结合域包括表5中列出的一种或多种氨基酸突变。

[0584] 实施方案21.实施方案18-20中任一项的重组核酸,其中配体门控离子通道包括衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。

[0585] 实施方案22.实施方案21的重组核酸,其中离子孔域包括与SEQ ID NO:26的氨基酸255-457、SEQ ID NO:27的氨基酸260-452、SEQ ID NO:28的氨基酸259-464或SEQ ID NO:29的氨基酸259-449具有至少85%同一性的氨基酸序列。

[0586] 实施方案23.实施方案21或22的重组核酸,其中工程化受体的配体结合域包括衍生自人甘氨酸受体的Cys环域。

[0587] 实施方案24.实施方案21-23中任一项的重组核酸,其中配体门控离子通道包括与SEQ ID NO:25-31和33中任一项具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0588] 实施方案25.实施方案21-23中任一项的重组核酸,其中人甘氨酸受体是人甘氨酸受体α1,并且其中所述配体门控离子通道包括与SEQ ID NO:33具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0589] 实施方案26.实施方案1-25中任一项的重组核酸,其中转基因包含以下多核苷酸序列或由以下多核苷酸序列组成:所述多核苷酸序列与SEQ ID NO:32具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性。

[0590] 实施方案27.实施方案1-26中任一项的重组核酸,其中转基因针对在人细胞中的表达进行密码子优化。

[0591] 实施方案28.实施方案27的重组核酸,其中人细胞是神经元。

[0592] 实施方案29.实施方案1-28中任一项的重组核酸,其中表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0593] (i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0594] (ii)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0595] (iii)hCaMKII 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:53具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0596] (iv)hCMV+rGlob内含子,其包括与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0597] (v)转基因;

[0598] (vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0599] (vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

[0600] (viii)hGH polyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列。

[0601] 实施方案30.实施方案29的重组核酸,其中表达盒以5'至3'的顺序包含:与SEQ ID NO:108的核苷酸173-1877具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少

99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:108的核苷酸3237-4315具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0602] 实施方案31.实施方案1-28中任一项的重组核酸,其中所述表达盒以5’至3’的顺序包含,

[0603] (i)CMV 5’增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0604] (ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0605] (iii)hSyn 5’UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0606] (iv)hSyn内含子,其包括与SEQ ID NO:59具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0607] (v)转基因;

[0608] (vi)WPREx 3’增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0609] (vii)α球蛋白3’UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0610] (viii)hGH polyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0611] 实施方案32.实施方案31的重组核酸,其中表达盒以5’至3’的顺序包含:与SEQ ID NO:106的核苷酸173-1159具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:106的核苷酸2519-3597具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0612] 实施方案33.实施方案1-28中任一项的重组核酸,其中表达盒以5’至3’的顺序包含:

[0613] (i)CMV-V2 5’增强子,其包括与SEQ ID NO:38具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0614] (ii)hSyn-V2启动子,其包括与SEQ ID NO:49具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0615] (iii)转基因;

[0616] (vi)WPREx-V2 3’增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0617] (viii)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0618] 实施方案34.实施方案33所述的重组核酸,其中所述表达盒以5’至3’的顺序包含:与SEQ ID NO:125的核苷酸149-946具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:125的

核苷酸2285-3416具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0619] 实施方案35.实施方案1-28中任一项的重组核酸,其中表达盒以5’至3’的顺序包含:

[0620] (i)CMV-V2 5’增强子,其包括与SEQ ID NO:38具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0621] (ii)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0622] (iii)转基因;

[0623] (vi)WPREx-V2 3’增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0624] (viii)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0625] 实施方案36.实施方案35的重组核酸,其中表达盒以5’至3’的顺序包含:与SEQ ID NO:126的核苷酸149-1527具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:126的核苷酸2848-3979具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0626] 实施方案37.实施方案1-28中任一项的重组核酸,其中表达盒以5’至3’的顺序包含:

[0627] (i)hSyn-V2启动子,其包括与SEQ ID NO:49具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0628] (ii)转基因;

[0629] (iii)WPREx-V2 3’增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0630] (iv)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0631] 实施方案38.实施方案37的重组核酸,其中表达盒以5’至3’的顺序包含:与SEQ ID NO:127的核苷酸153-661具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:127的核苷酸1982-3113具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0632] 实施方案39.实施方案1-28中任一项的重组核酸,其中表达盒以5’至3’的顺序包含:

[0633] (i)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0634] (ii)转基因;

[0635] (iii)WPREx-V2 3’增强子,其包括与SEQ ID NO:65具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0636] (iv)hGH-V2 polyA,其包括与SEQ ID NO:69具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0637] 实施方案40.实施方案39的重组核酸,其中表达盒以5’至3’的顺序包含:与SEQ ID NO:128的核苷酸153-1224具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:128的核苷酸2545-3676具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0638] 实施方案41.实施方案1-28中任一项的重组核酸,其中表达盒以5’至3’的顺序包含:

[0639] (i)CMV 5’增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0640] (ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0641] (iii)hSyn 5’UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;

[0642] (iv)hTPI内含子,其包括与SEQ ID NO:60具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;(v)转基因;

[0643] (vi)FullEES 3’增强子,其包括与SEQ ID NO:63具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0644] (viii)rβ球蛋白polyA,其包括与SEQ ID NO:70具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列。

[0645] 实施方案42.实施方案41的重组核酸,其中表达盒以5’至3’的顺序包含:与SEQ ID NO:98的核苷酸173-1188具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列,所述转基因,以及与SEQ ID NO:98的核苷酸2548-3824具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的序列。

[0646] 实施方案43.实施方案1-42中任一项的重组核酸,其中表达盒包含(i)与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:71-93中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列,或(ii)与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:32)的SEQ ID NO:121-124中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列。

[0647] 实施方案44.实施方案1-42中任一项的重组核酸,其中表达盒包含与SEQ ID NO:71-93和121-124中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列。

[0648] 实施方案45.实施方案1-44中任一项的重组核酸,其包括位于表达盒的每个末端侧翼的腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)。

[0649] 实施方案46.实施方案45的重组核酸,其包括与SEQ ID NO:94或119具有至少90％同一性的5’ITR序列和与SEQ ID NO:95或120具有至少90％同一性的3’ITR序列。

[0650] 实施方案47.实施方案1-45中任一项的重组核酸,其包括(i)与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:36)的SEQ ID NO:96-118中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列,或(ii)与排除所述转基因的序列(SEQ ID NO:32)的SEQ ID NO:125-128中任一项具有至少

90％同一性的多核苷酸序列。

[0651] 实施方案48.实施方案1-45中任一项的重组核酸,其包括与SEQ ID NO:96-118和125-128中任一项具有至少90％同一性的多核苷酸序列。

[0652] 实施方案49.载体,其包括实施方案1-48中任一项的重组核酸。

[0653] 实施方案50.实施方案49的载体,其中载体是非病毒载体。

[0654] 实施方案51.实施方案49的载体,其中载体是病毒载体。

[0655] 实施方案52.实施方案51的载体,其中载体包括AAV载体基因组或由AAV载体基因组组成。

[0656] 实施方案53.AAV,其包括实施方案51或52的载体。

[0657] 实施方案54.实施方案53的AAV,其中AAV是AAV9血清型。

[0658] 实施方案55.实施方案53或54的AAV,其中AAV是自互补AAV或单链AAV。

[0659] 实施方案56.实施方案53-55中任一项的AAV,其中AAV是野生型AAV或修饰的AAV。

[0660] 实施方案57.实施方案53-56中任一项的AAV,其中AAV包括与AAV9衣壳蛋白(SEQ ID NO:8)或AAV9-TV衣壳蛋白(SEQ ID NO:9)具有至少95％同一性的衣壳蛋白。

[0661] 实施方案58.宿主细胞,其包括实施方案1-48中任一项的核酸,或实施方案49-52中任一项的载体。

[0662] 实施方案59.产生实施方案53-57中任一项的AAV的方法。

[0663] 实施方案60.试剂盒,其包括实施方案1-48中任一项的重组核酸、实施方案49-52中任一项的载体或实施方案53-57中任一项的AAV。

[0664] 实施方案61.在细胞中表达转基因的方法,其包括将实施方案1-48中任一项的重组核酸或实施方案49-52中任一项的载体递送至细胞。

[0665] 实施方案62.转导细胞的方法,其包括使细胞与实施方案53-57中任一项的AAV接触。

[0666] 实施方案63.实施方案61或62的方法,其中细胞是神经元。

[0667] 实施方案64.实施方案63的方法,其中神经元是海马神经元。

[0668] 实施方案65.实施方案64的方法,其中神经元是兴奋性神经元。

[0669] 实施方案66.实施方案65的方法,其中神经元是CAMK2阳性神经元。

[0670] 实施方案67.实施方案64的方法,其中神经元是抑制性神经元。

[0671] 实施方案68.实施方案67的方法,其中神经元是GABA能神经元。

[0672] 实施方案69.实施方案63的方法,其中神经元是背根神经节神经元或三叉神经节神经元。

[0673] 实施方案70.实施方案69的方法,其中神经元包括同工凝集素B4(IB4)阳性神经纤维。

[0674] 实施方案71.实施方案69或70的方法,其中神经元包括NF200阳性神经纤维。

[0675] 实施方案72.实施方案69-71中任一项的方法,其中神经元包括CGRP阳性神经纤维。

[0676] 实施方案73.实施方案69-72中任一项的方法,其中神经元包括C纤维。

[0677] 实施方案74.实施方案69-73中任一项的方法,其中神经元包括Aδ纤维。

[0678] 实施方案75.实施方案61-74中任一项的方法,其中细胞是离体细胞。

[0679] 实施方案76.实施方案61-74中任一项的方法,其中细胞是受试者的体内细胞,任选地,其中所述受试者是人。

[0680] 实施方案77.实施方案61-76中任一项的方法,其中与包含对照表达盒的相应细胞相比,包含所述表达盒的所述细胞具有更高的所述转基因表达水平,任选地,其中所述更高的表达为比包括排除所述转基因序列的SEQ ID NO:88的多核苷酸序列的对照表达盒的转基因表达水平高至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍或至少十倍。

[0681] 实施方案78.实施方案61-76中任一项的方法,其中与包含对照表达盒的相应细胞相比,包含所述表达盒的所述细胞具有相当或更高的所述转基因表达水平,任选地,其中所述转基因表达水平为包括排除所述转基因序列的SEQ ID NO:87的多核苷酸序列的对照表达盒的转基因表达水平的至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍或至少十倍。

[0682] 实施方案79.治疗有此需要的受试者的疾病或病症的方法,包括向受试者施用有效量的实施方案1-48中任一项的重组核酸、实施方案49-52中任一项的载体或实施方案53-57中任一项的AAV。

[0683] 实施方案80.实施方案79的方法,其中疾病或病症是癫痫、精神分裂症、自闭症谱系病症、阿尔茨海默病、雷特综合征或脆性X综合征。

[0684] 实施方案81.实施方案79的方法,其中疾病或病症是局灶性癫痫。

[0685] 实施方案82.实施方案79的方法,其中疾病或病症是内侧颞叶癫痫(mTLE)。

[0686] 实施方案83.实施方案61-82中任一项的方法,其中表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0687] (i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0688] (ii)hCaMKIIa启动子,其包括与SEQ ID NO:43具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0689] (iii)hCaMKII 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:53具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0690] (iv)hCMV+rGlob内含子,其包括与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0691] (v)转基因;

[0692] (vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0693] (vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

[0694] (viii)hGH polyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列,

[0695] 任选地,其中转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。

[0696] 实施方案84.实施方案61-82中任一项的方法,其中表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0697] (i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0698] (ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0699] (iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0700] (iv)hSyn内含子,其包括与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0701] (v)转基因;

[0702] (vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0703] (vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;和

[0704] (viii)hGH polyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列,

[0705] 任选地,转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。

[0706] 实施方案85.实施方案79-84中任一项的方法,其中重组核酸、所述载体或所述AAV通过如下方式施用:颅内施用、鞘内(脊柱)施用、鞘内(小脑延髓池)施用、脑内施用、心室内施用或直接注射到海马的癫痫病灶中。

[0707] 实施方案86.实施方案79-84中任一项的方法,其中重组核酸、载体或AAV通过直接注射到海马的癫痫病灶中来施用。

[0708] 实施方案87.实施方案79-86中任一项的方法,其中将1×109-1×1014拷贝的重组核酸或AAV载体基因组施用给受试者。

[0709] 实施方案88.实施方案79-87中任一项的方法,其中AAV包括AAV9的衣壳蛋白(SEQ ID NO:8)。

[0710] 实施方案89.实施方案79-88中任一项的方法,其中所述方法使癫痫的持续时间、强度和/或频率降低至少10%。

[0711] 实施方案90.治疗有此需要的受试者的疾病或病症的方法,包括向受试者施用有效量的实施方案1-48中任一项的重组核酸、实施方案49-52中任一项的载体或实施方案53-57中任一项的AAV,其中疾病或病症是神经性疼痛、痉挛、脊髓损伤或撕脱伤。

[0712] 实施方案91.实施方案90的方法,其中疾病或病症是神经性疼痛。

[0713] 实施方案92.实施方案91的方法,其中神经性疼痛是周围神经病。

[0714] 实施方案93.实施方案91的方法,其中神经性疼痛是三叉神经痛。

[0715] 实施方案94.实施方案61-78和90-93中任一项的方法,其中表达盒以5'至3'的顺序包含:

[0716] (i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的多核苷酸序列;

[0717] (ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90%、至少95%、至少96%、至

少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0718] (iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0719] (iv)hTPI内含子,其包括与SEQ ID NO:60具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0720] (v)转基因；

[0721] (vi)FullEES 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:63具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0722] (vii)rβ球蛋白polyA,其包括与SEQ ID NO:70具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸,

[0723] 任选地,转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。

[0724] 实施方案95.实施方案61-78和90-93中任一项的方法,其中表达盒以5'至3'的顺序包含：

[0725] (i)CMV 5'增强子,其包括与SEQ ID NO:37具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0726] (ii)hSyn启动子,其包括与SEQ ID NO:48具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0727] (iii)hSyn 5'UTR,其包括与SEQ ID NO:54具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0728] (iv)hSyn内含子,其包括与SEQ ID NO:59具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0729] (v)转基因；

[0730] (vi)WPREx 3'增强子,其包括与SEQ ID NO:64具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列；

[0731] (vii)α球蛋白3'UTR,其包括与SEQ ID NO:66具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列;和

[0732] (viii)hGH polyA,其包括与SEQ ID NO:68具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％同一性的多核苷酸序列,

[0733] 任选地,转基因编码配体门控离子通道,所述配体门控离子通道包括衍生自人α7-nAChR的配体结合域和衍生自人甘氨酸受体的离子孔域。

[0734] 实施方案96.实施方案90-95中任一项的方法,其中重组核酸、载体或AAV通过鞘内(IT)或神经节内(IG)施用来施用。

[0735] 实施方案97.实施方案90-95中任一项的方法,其中重组核酸、载体或AAV通过神经节内(IG)施用直接施用至背根神经节或三叉神经节中。

[0736] 实施方案98.实施方案90-97中任一项的方法,其中将1×109-1×1014拷贝的重组核酸或AAV载体基因组施用给受试者。

[0737] 实施方案99.实施方案90-98中任一项的方法,其中AAV包括AAV9-TV的衣壳蛋白(SEQ ID NO:9)。

[0738] 实施方案100.实施方案91-99中任一项的方法,其中所述方法将疼痛水平降低至少10%。

[0739] 实施方案101.实施方案79-100中任一项的方法,其中重组核酸、载体或AAV通过以下方式施用:全身、肠胃外、静脉内、脑、脑脊髓、鞘内、脑池内、壳核内、海马内、纹状体内或脑室内注射。

[0740] 实施方案102.实施方案79-101中任一项的方法,其中将1×10^{9}-1×10^{14}拷贝的重组核酸或AAV载体基因组施用给受试者。

[0741] 实施方案103.实施方案79-102中任一项的方法,其中所述方法包括施用由转基因编码的配体门控离子通道的配体。

[0742] 实施方案104.实施方案103的方法,其中配体选自由AZD-0328、TC-6987、ABT-126、TC-5619、TC-6683、瓦伦尼克林和Facinicline/RG3487组成的组。

实施例

[0743] 虽然本文已经显示并描述了本公开的优选实施例,但对本领域技术人员而言将显而易见的是,此类实施方案仅以实例的方式提供。本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替换而不偏离本公开。应理解,在实践本公开时可以采用本文所述的本公开的实施方案的各种替代方案。旨在的是,以下权利要求确定本公开的范围,并由此涵盖这些权利要求及其等效物范围内的方法和结构。

[0744] 实施例1:用于治疗局灶性癫痫的具有最佳海马神经元表达的表达盒的体外评估。

[0745] 表达盒:通过DNA合成和使用通常的重组DNA克隆技术,生成了具有侧接调控元件的不同组合的ITR的23种表达盒。

[0746] SK-N-AS和HeLa细胞的培养和转染:将细胞解冻并铺板于完全生长培养基中。转染前一天,将细胞以96孔板的每孔2E4个细胞铺板,并且随后使用FuGENE HD试剂以3:1(FuGENE(mL):DNA(mg))的比率重复转染23种不同的表达盒。

[0747] 新生大鼠海马混合培养物的培养和转导:从怀孕18天的雌性大鼠中提取胚胎海马组织,解离并铺板于适当的细胞培养基中。用携带不同表达盒的AAV9以3E5的MOI转导细胞,并在3至5天后进行处理用于mRNA或蛋白质分析。

[0748] ddPCR评估:使用RNeasy Plus Mini Kit和PureLink™DNase的制造商的方案从细胞中分离RNA。使用SuperScript™IV VILO™Master Mix和ezDNase™Enzyme试剂盒合成cDNA。用从Integrated DNA Technologies购买的定制引物、来自Thermo Fisher Scientific的TaqMan™探针以及来自Bio-Rad的其余试剂和仪器进行ddPCR反应。将受体转基因的表达与同一反应中的管家基因进行比较,并表示为两者的比率。

[0749] ELISA评估:根据制造商的方案,使用DYKDDDDK-Tag Protein ELISA Kit处理细胞培养物样品。根据制造商的方案,使用Micro BCA™Protein Assay Kit确定每个样品的总蛋白浓度。

[0750] 实验描述:生成一系列基于AAV的表达盒,并在海马的靶细胞中测试编码的配体门控离子通道(LGIC)的表达。LGIC是FLAG标签化CODA受体,其具有SEQ ID NO:36的多核苷酸序列。

[0751] 用23种独特的表达盒体外进行第一轮选择,这些表达盒含有调控元件的各种组

合,这些调控元件包括增强子、启动子、内含子、5'非翻译区、3'非翻译区和/或polyA尾(图1)。将具有侧接驱动LGIC表达的表达盒的ITR的质粒转染到SKNAS细胞(一种神经母细胞瘤细胞系)以及HeLa细胞中,以确定哪些基因盒能够更高效地靶向这些细胞并提供高水平的LGIC表达。通过ddPCR(图2)和ELISA(图3)的分析显示不同的表达水平,其中在含有CMV启动子的盒中观察到最高的表达水平,其次是具有各种组织特异性启动子的那些。对于第二轮选择,将从第一轮选择的9种表达盒包装到AAV9载体中并转导到新生大鼠海马混合培养物中。ddPCR分析(图4)揭示了CaMKII和Syn-驱动的基因盒的高水平的LGIC mRNA表达,这与强大且普遍存在的CAG启动子相当。

[0752] 实施例2:用于治疗局灶性癫痫的具有最佳海马神经元表达的表达盒的体内评估。

[0753] ddPCR评估:使用Pink RINO RNA Lysis Kit对大鼠海马组织进行均质化。使用RNeasy Plus Mini Kit和PureLink™DNase的制造商的方案分离RNA。使用SuperScript™IV VILO™Master Mix和ezDNase™Enzyme试剂盒合成cDNA。用从Integrated DNA Technologies购买的定制引物、来自Thermo Fisher Scientific的TaqMan™探针以及来自Bio-Rad的其余试剂和仪器进行ddPCR反应。将转基因的表达与同一反应中的管家基因进行比较,并表示为两者的比率。

[0754] 免疫荧光评估:将全脑灌注并固定在4% PFA中。进行免疫荧光染色以观察海马中的FLAG标签表达。

[0755] 数据分析/解读:使用ddPCR和免疫荧光技术来确定细胞嗜性的mRNA分析展示出来自人版本的Syn(C#11)和CaMKII驱动的盒(C#13)的表达的高水平。

[0756] 实验描述:来自上一个实施例中第二轮选择的表达量最高的盒随后在通过AAV9介导的定向注射在雄性Sprague Dawley大鼠的海马中进行了体内评估。针对细胞嗜性使用ddPCR(图5)和免疫荧光技术(图6)的mRNA分析展示出来自人版本的Syn-和CaMKII驱动的盒的表达的高水平。将在局灶性癫痫的动物模型中进行进一步评估两个选定的盒,一个由泛神经元hSyn启动子驱动(表2中的表达盒#11),另一个由兴奋性细胞特异性启动子CaMKII驱动(表2中的表达盒#13),以确定最终的开发候选药物。

[0757] 实施例3:使用重复单剂量非天然受体配体治疗局灶性癫痫的体外研究。

[0758] 六种表达盒——表2中的#11、#13、#33、#34、#35和#36——分别包装到AAV载体中并在红藻氨酸(KA)局灶性癫痫小鼠模型中测试。然后在重复给药TC-5619(由这些表达盒编码的CODA71受体转基因的激活剂)后监测动物的癫痫发作频率。结果(图7)显示,TC-5619的重复给药导致癫痫发作频率的剂量依赖性降低,并且较高剂量范围的TC-5619显著降低癫痫发作负担。此外,重复单剂量TC-5619继而冲洗使所有动物恢复到相同的基线水平,表明该药物没有残留效应。因此,本研究表明,这些表达盒的AAV递送,与对应的受体激活剂组合,可以成功控制体内局灶性癫痫。

[0759] 将根据图8在KA局灶性癫痫模型中进行进一步的功效研究。包含这六种编码CODA71的表达基因盒之一的AAV将在红藻氨酸(KA)施用后四周经由在KA病变部位的1uL团注的立体定向注射施用,并且将植入记录深度电极。在以随机交叉设计TC-5619给药动物前,将允许额外四周时间用于最大受体表达,以评估不同单剂量药物的癫痫发作降低,之后将通过微型泵长期施用TC-5619或安慰剂7天。还将进行受体表达的组织学分析和细胞健康测量。

[0760] 实施例4:用于治疗神经性疼痛的具有最佳DRG感觉神经元表达的表达盒的体外和体内评估。

[0761] 此处使用的表达盒具有与上述实施例1中使用的那些相同的编号。

[0762] 人iPSC衍生感觉神经元祖细胞的培养和转导:将细胞解冻并以100,000个细胞/cm^2铺板于补充有10μM Y-27632(ROCK抑制剂)的神经板培养基中。将培养基完全更换为补充有生长因子的感觉神经元维持培养基,并在转导前用丝裂霉素C处理。用携带不同表达盒的AAV6以3E5的MOI转导细胞,并在3至5天后进行处理用于mRNA或蛋白质分析。

[0763] 来自体外研究的转导细胞的ddPCR评估:使用RNeasy Plus Mini Kit和PureLink™DNase的制造商的方案从细胞中分离RNA。使用SuperScript™IV VILO™Master Mix和ezDNase™Enzyme试剂盒合成cDNA。用从Integrated DNA Technologies购买的定制引物、来自Thermo Fisher Scientific的TaqMan™探针以及来自Bio-Rad的其余试剂和仪器进行ddPCR反应。将受体转基因的表达与同一反应中的管家基因进行比较,并表示为两者的比率。

[0764] 来自体外研究的转导细胞的ELISA评估:根据制造商的方案,使用DYKDDDDK-Tag Protein ELISA Kit处理细胞培养物样品。根据制造商的方案,使用Micro BCA™Protein Assay Kit确定每个样品的总蛋白浓度。

[0765] 对来自体内研究的直接注射的大鼠L3和L4DRG的ddPCR评估:使用Pink RINO RNA Lysis Kit对大鼠L3和L4 DRG组织进行均质化。使用RNeasy Plus Mini Kit和PureLink™DNase的制造商的方案分离RNA。使用SuperScript™IV VILO™Master Mix和ezDNase™Enzyme试剂盒合成cDNA。用从Integrated DNA Technologies购买的定制引物、来自Thermo Fisher Scientific的TaqMan™探针以及来自Bio-Rad的其余试剂和仪器进行ddPCR反应。将转基因的表达与同一反应中的管家基因进行比较,并表示为两者的比率。

[0766] 来自体内研究的直接注射的大鼠L5 DRG的免疫荧光评估:L5 DRG在PBS中漂洗并在4% PFA中固定。进行免疫荧光染色观察FLAG标签的表达,并用针对L5 DRG中感觉神经元(NeuN)的抗体复染。

[0767] 体内研究结果的分析/解读:使用ddPCR和免疫荧光技术来确定细胞嗜性的mRNA分析展示出由Syn驱动的盒(盒#3和盒#11)的表达的高水平。

[0768] 实验描述:对于体外研究,将从上述实施例1中选出的十种表达盒包装到AAV6载体中,并转导人iPSC衍生感觉神经元祖细胞。通过ddPCR的分析(图9)展示出由Syn驱动的盒表达的LGIC mRNA的高水平,这与强大且普遍存在的CAG启动子相当。

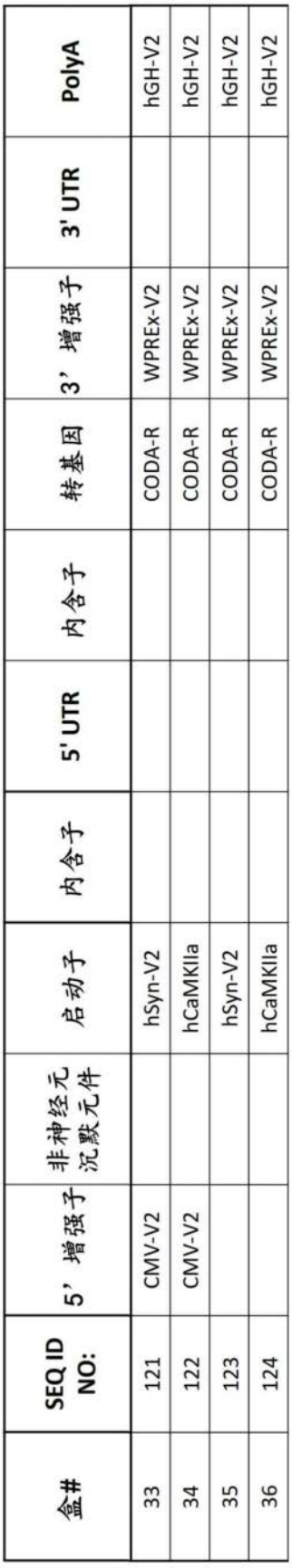
[0769] 来自体外研究的表达量最高的盒随后通过AAV6介导的定向注射在雄性Sprague Dawley大鼠的DRGs中进行了体内评估。针对细胞嗜性使用ddPCR(图10)和免疫荧光技术(图11)的mRNA分析展示出来自人版本的Syn驱动的盒(表2中的表达盒#3和#11)的表达的高水平。

[0770] 通过引用并入

[0771] 将本文引用的所有参考文献、文章、出版物、专利、专利公布和专利申请都出于所有目的通过引用以其整体而并入。然而,提及本文引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利公布和专利申请并非并且不应当被视为承认或以任何形式暗示它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家公知常识的一部分。

盒#	SEQ ID NO:	5’ 增强子	非神经元沉默元件	启动子	内含子	5' UTR	内含子	转基因	3’ 增强子	3' UTR	PolyA
1	71	CMV		mMecp2			hTPI	CODA-R	FullEES		rβ球蛋白
2	72	CMV		msCaMKIIa		mCaMKII	TPL+eMLP	CODA-R	FullEES		rβ球蛋白
3	73	CMV		hSyn		hSyn	hTPI	CODA-R	FullEES		rβ球蛋白
4	74	CMV		hMecp2			TPL+eMLP	CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
5	75	CMV		hCaMKIIa		hCaMKII	TPL+eMLP	CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
6	76	CMV		hγ烯醇酶			TPL+eMLP	CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
7	77	CMV	NRSE	cβ肌动蛋白	cβAct+rGlob	fGlob		CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
8	78	CMV		hPDGFβ			hSyn	CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
9	79	CMV		mMecp2			hSyn	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
10	80	CMV		msCaMKIIa		mCaMKII-V2	hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
11	81	CMV		hSyn		hSyn	hSyn	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
12	82	CMV		hMecp2			hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
13	83	CMV		hCaMKIIa		hCaMKII	hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
14	84	CMV		hγ烯醇酶			hCMV+rGlob	CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
15	85	CMV	NRSE	cβ肌动蛋白	cβAct+rGlob	fGlob		CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
16	86	CMV		hPDGFβ				CODA-R	WPREx	α球蛋白	hGH
17	87	CMV		cβ肌动蛋白	cβAct+rGlob	fGlob		CODA-R	511-810EES		rβ球蛋白
18	88	CMV-V2		hSyn-V2				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
19	89			hSyn-V2				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
20	90	CMV-V3	NRSE*	CMV				CODA-R	WPREx-V2		bGH
21	91	CMV-V3		CMV				CODA-R	WPREx-V2		bGH
23	92	CMV-V2		hCaMKIIa				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
24	93	CMV-V2		hsCaMKIIa				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2

图1



盒#	SEQ ID NO:	5’ 增强子	非神经元沉默元件	启动子	内含子	5' UTR	内含子	转基因	3’ 增强子	3' UTR	PolyA
33	121	CMV-V2		hSyn-V2				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
34	122	CMV-V2		hCaMKIIa				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
35	123			hSyn-V2				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2
36	124			hCaMKIIa				CODA-R	WPREx-V2		hGH-V2

图1(续)

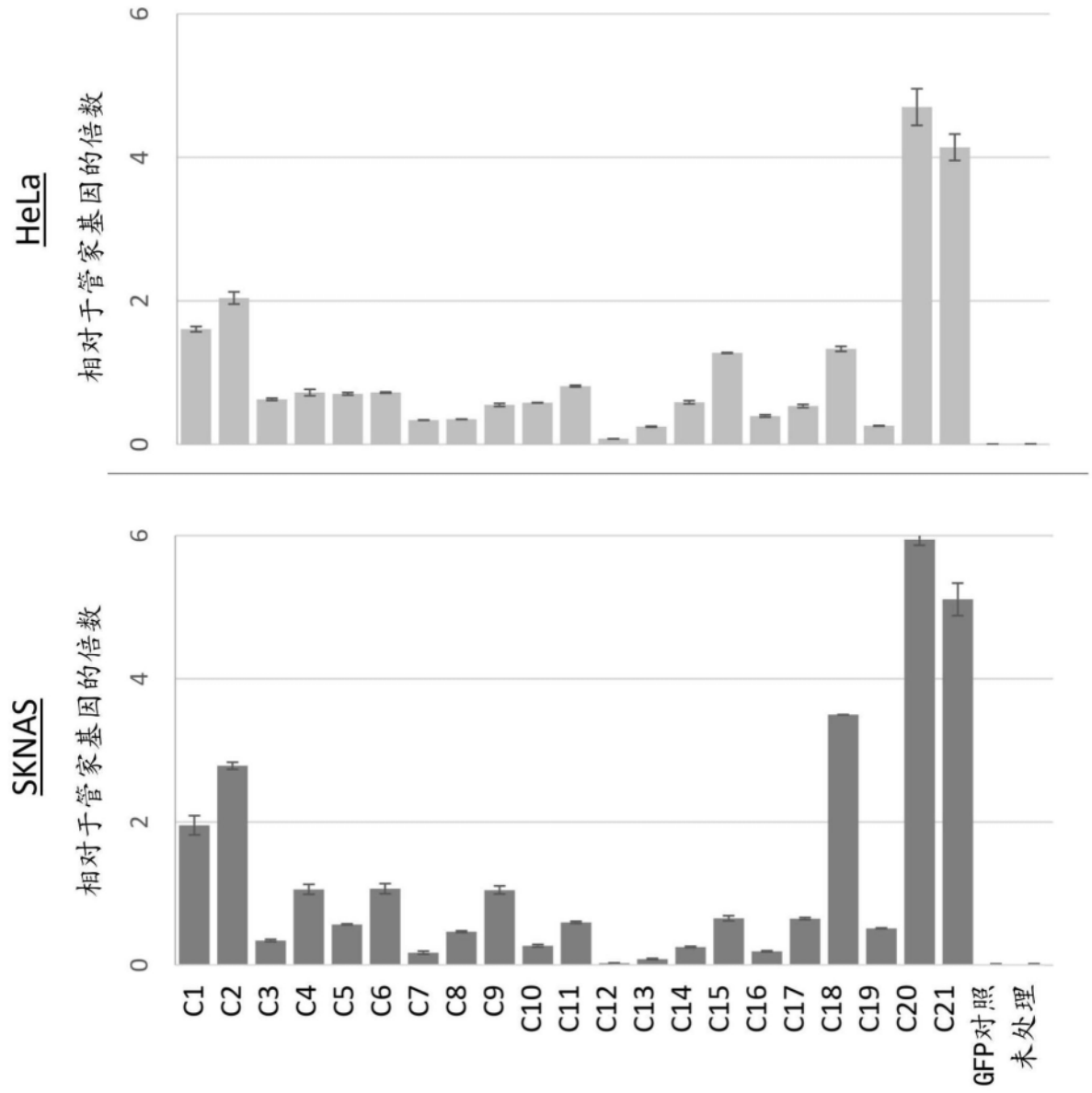

HeLa
相对于管家基因的倍数
0
2
4
6
SKNAS
相对于管家基因的倍数
0
2
4
6
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
C10
C11
C12
C13
C14
C15
C16
C17
C18
C19
C20
C21
GFP对照
未处理

图2

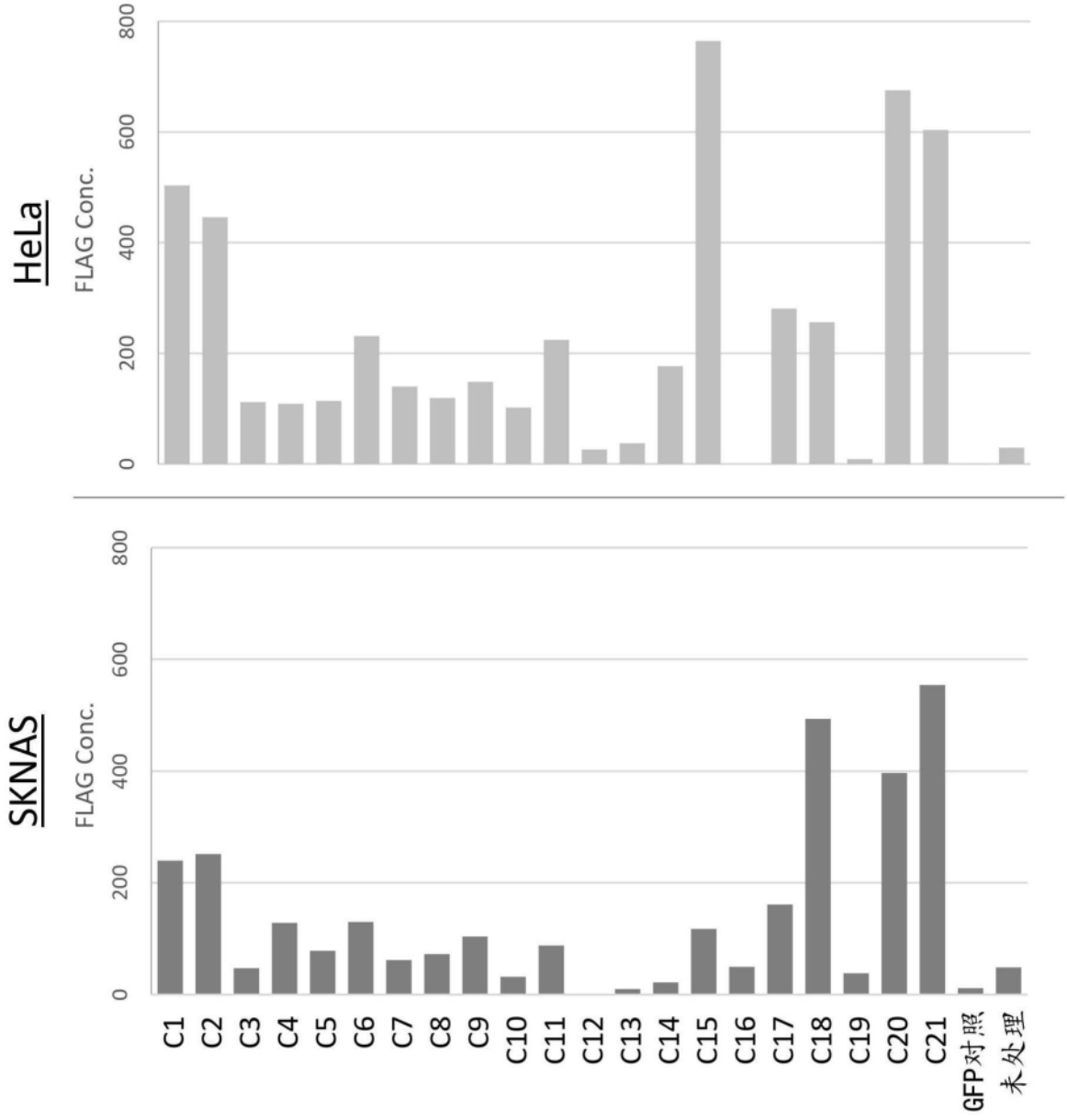

HeLa
FLAG Conc.
0
200
400
600
800
SKNAS
FLAG Conc.
0
200
400
600
800
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
C10
C11
C12
C13
C14
C15
C16
C17
C18
C19
C20
C21
GFP对照
未处理

图3

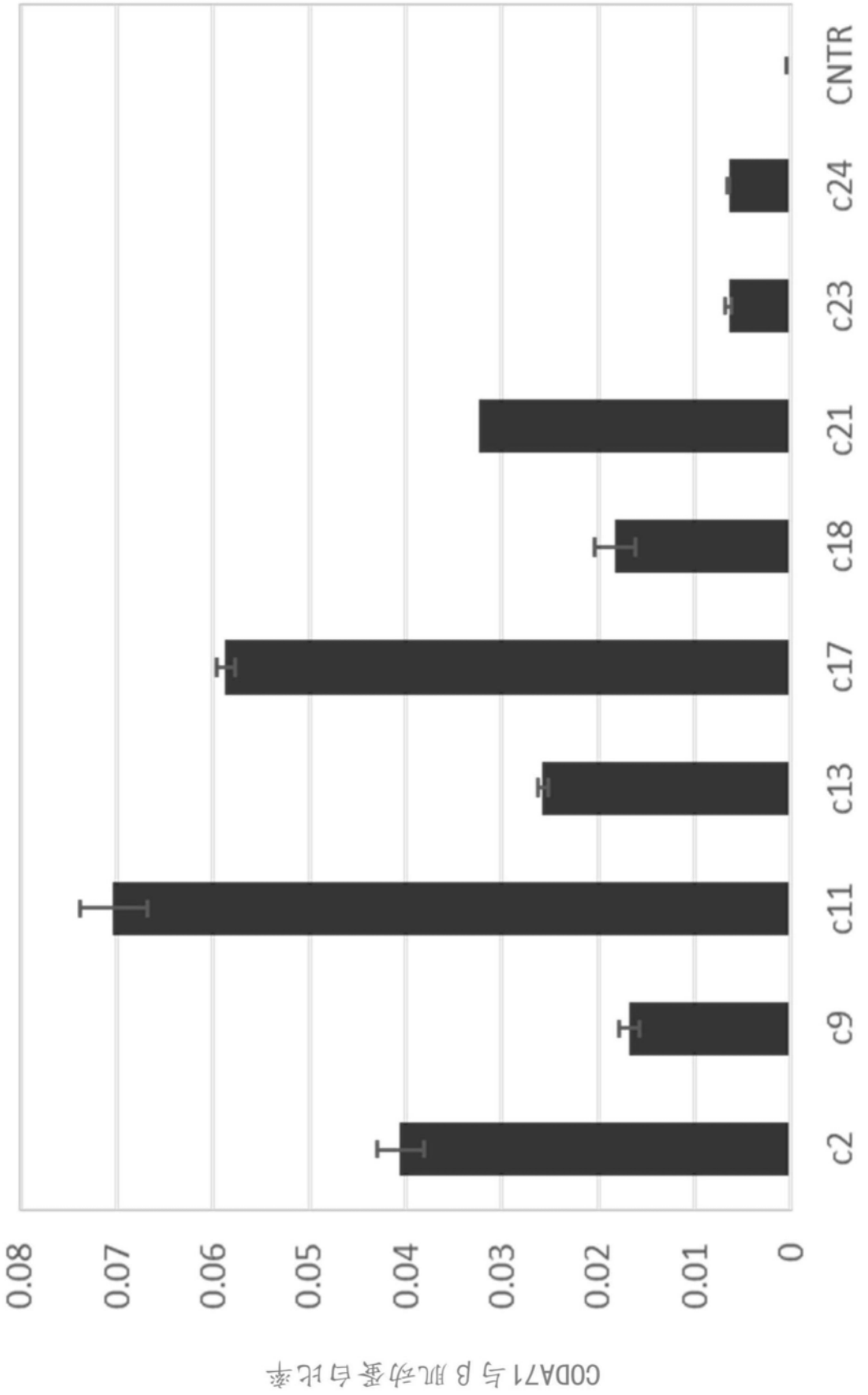

CODA71与β肌动蛋白比率
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
c2
c9
c11
c13
c17
c18
c21
c23
c24
CNTR

图4

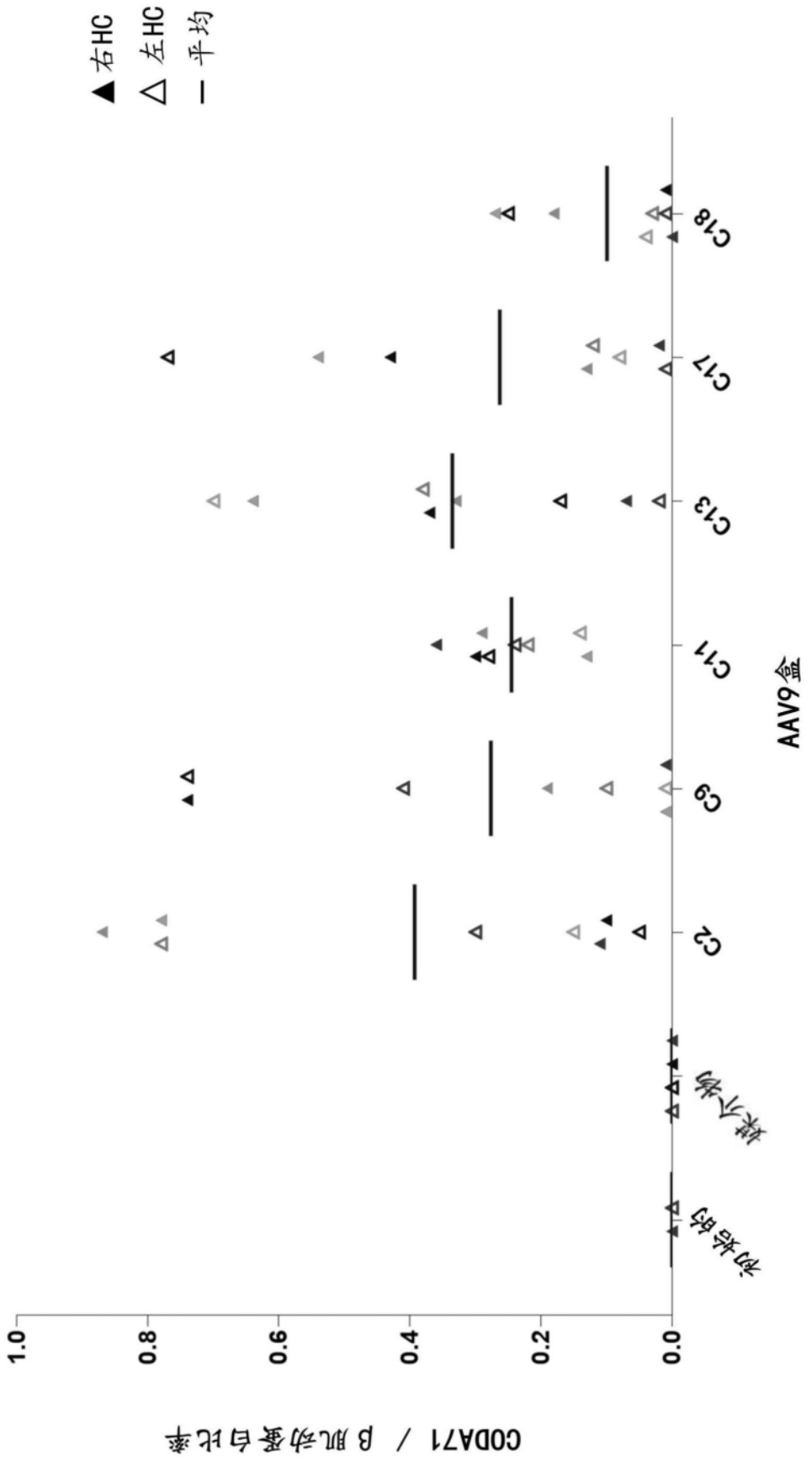

▲右HC
△左HC
—平均
CODA71 / β肌动蛋白比率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
病态的
健康的
C2
C3
C11
C13
C17
C18
AAV9盒

图5

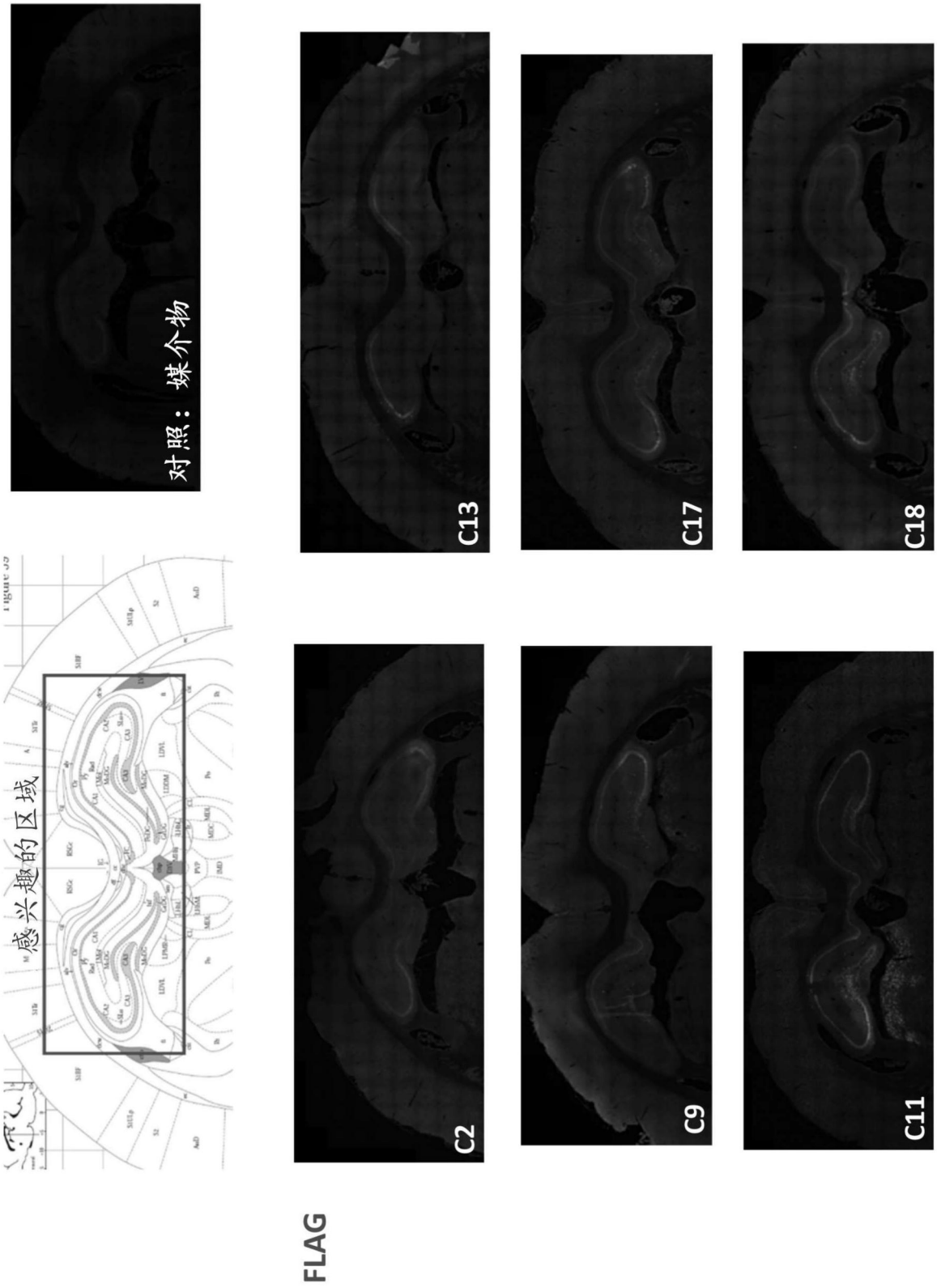


图6

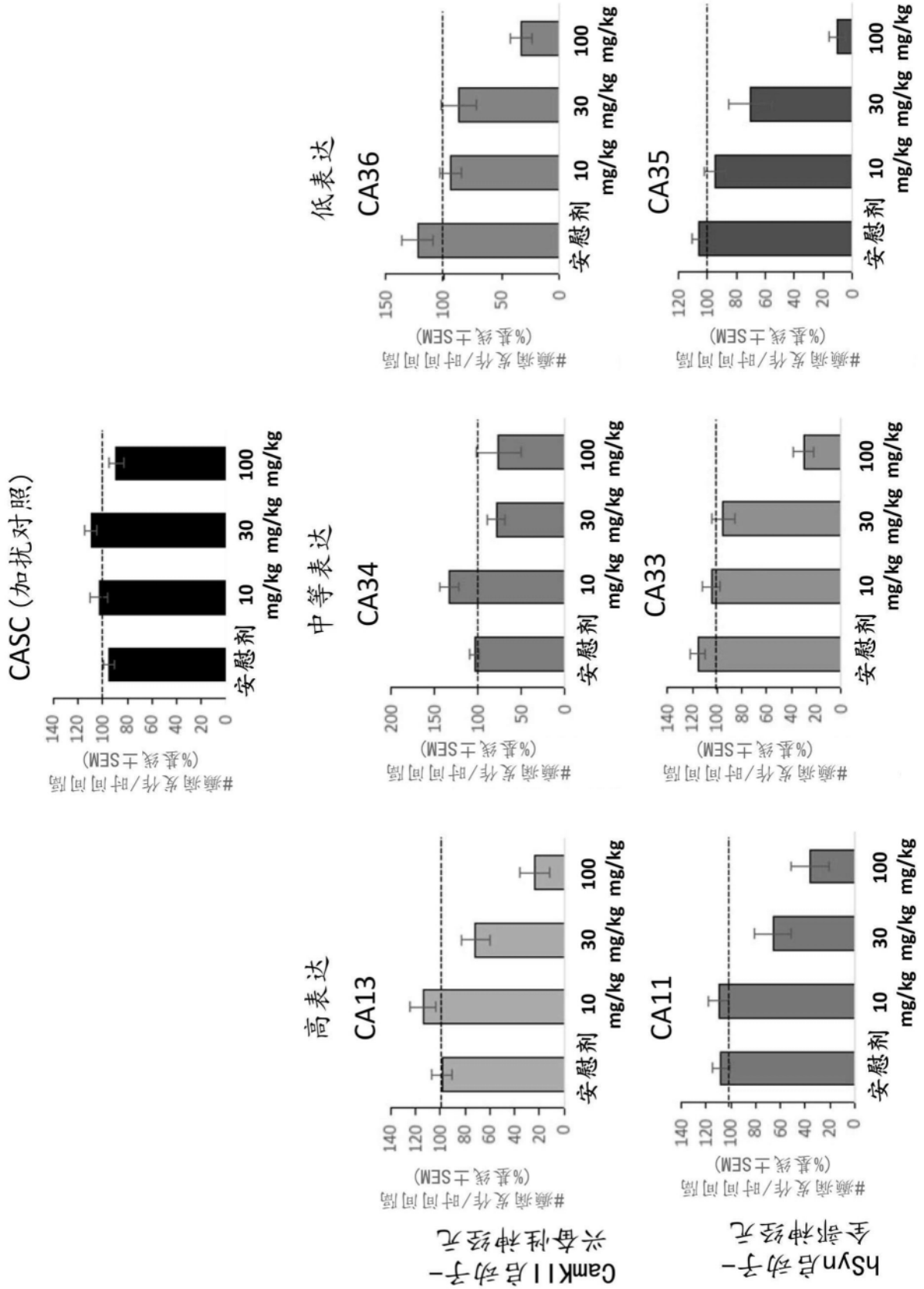

hSyn启动子-
全部神经元
CamKII启动子-
兴奋性神经元
高表达
中等表达
低表达
CASC（加扰对照）
CA11
CA13
CA33
CA34
CA35
CA36
#癫痫发作/时间间隔
（%基线±SEM）
安慰剂
10 mg/kg
30 mg/kg
100 mg/kg

图7

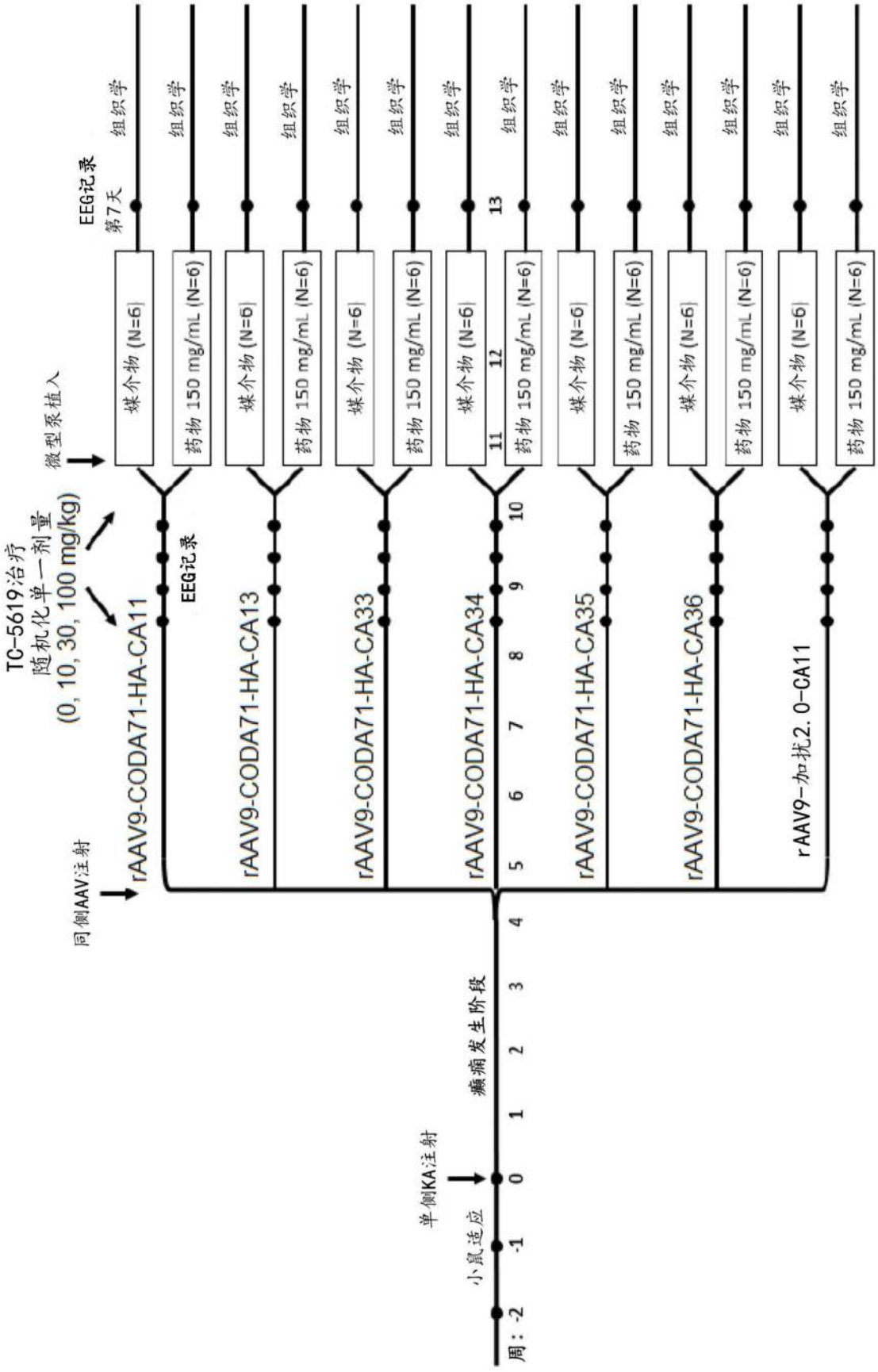

周：-2
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
小鼠适应
单侧KA注射
癫痫发生阶段
同侧AAV注射
rAAV9-CODA71-HA-CA11
rAAV9-CODA71-HA-CA13
rAAV9-CODA71-HA-CA33
rAAV9-CODA71-HA-CA34
rAAV9-CODA71-HA-CA35
rAAV9-CODA71-HA-CA36
rAAV9-加扰2.0-CA11
TC-5619治疗
随机化单一剂量
(0, 10, 30, 100 mg/kg)
微型泵植入
EEG记录
EEG记录
第7天
媒介物 (N=6)
药物 150 mg/mL (N=6)
组织学

图8

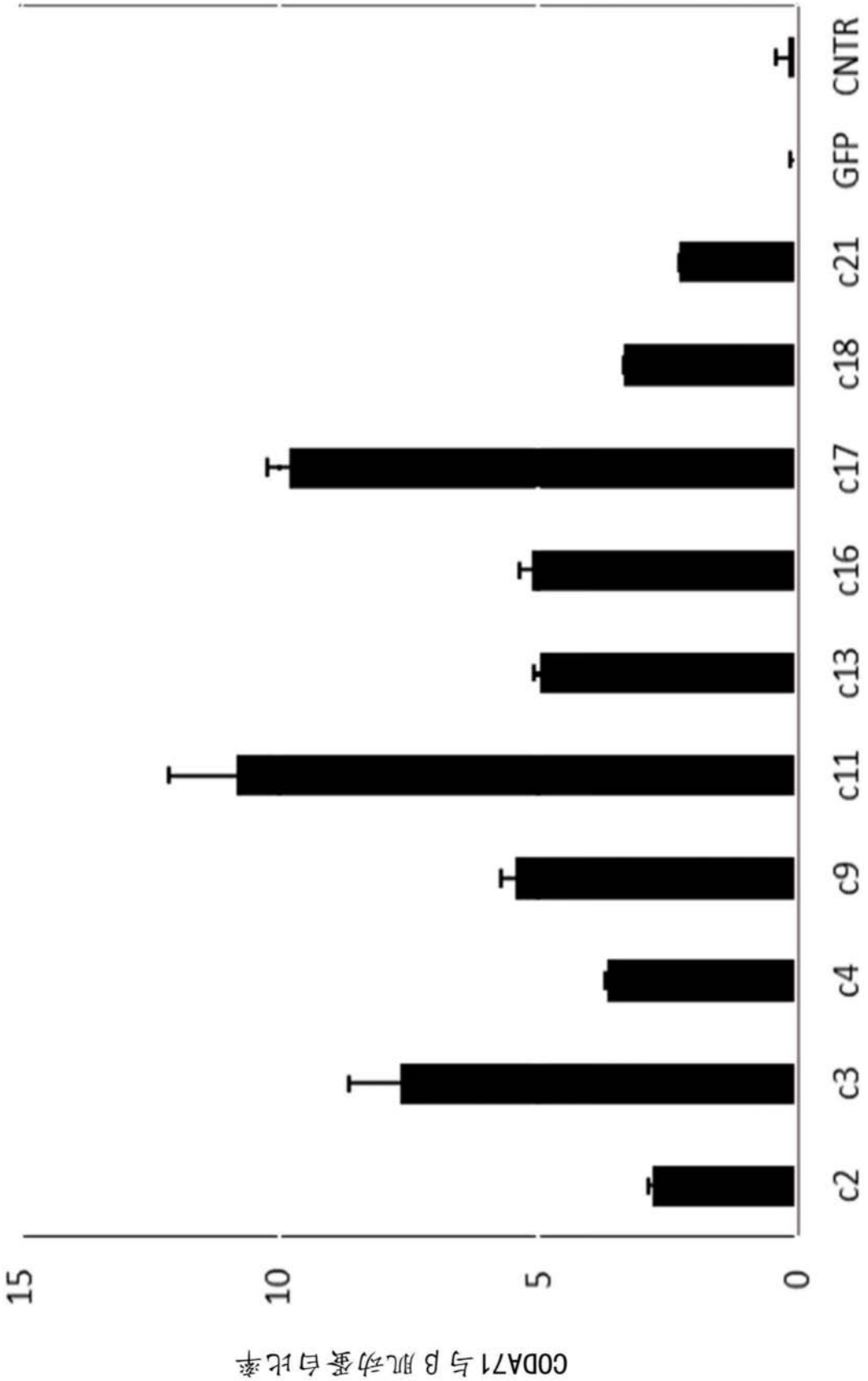

CODA71与β肌动蛋白比率
0
5
10
15
c2
c3
c4
c9
c11
c13
c16
c17
c18
c21
GFP
CNTR

图9

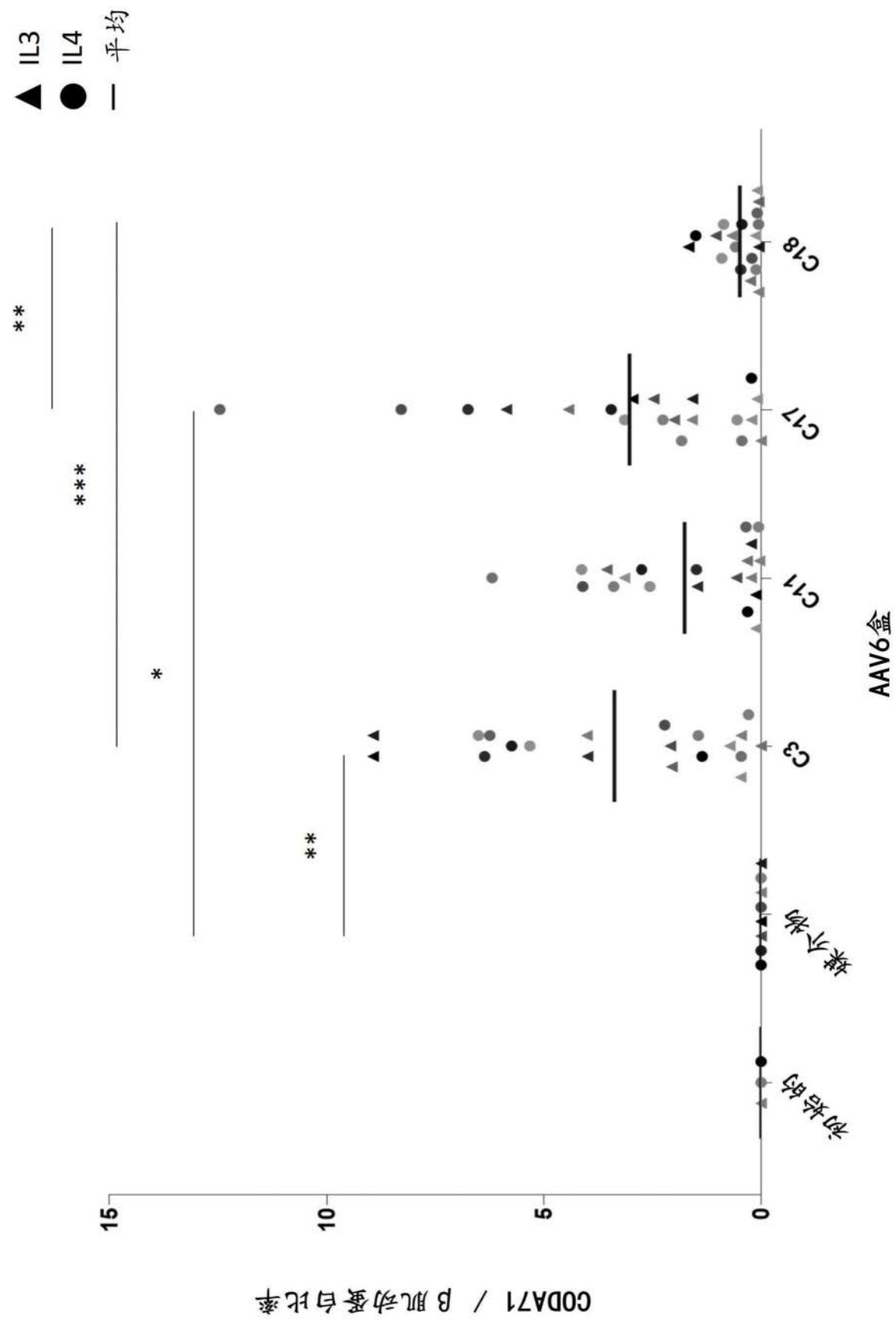


图10

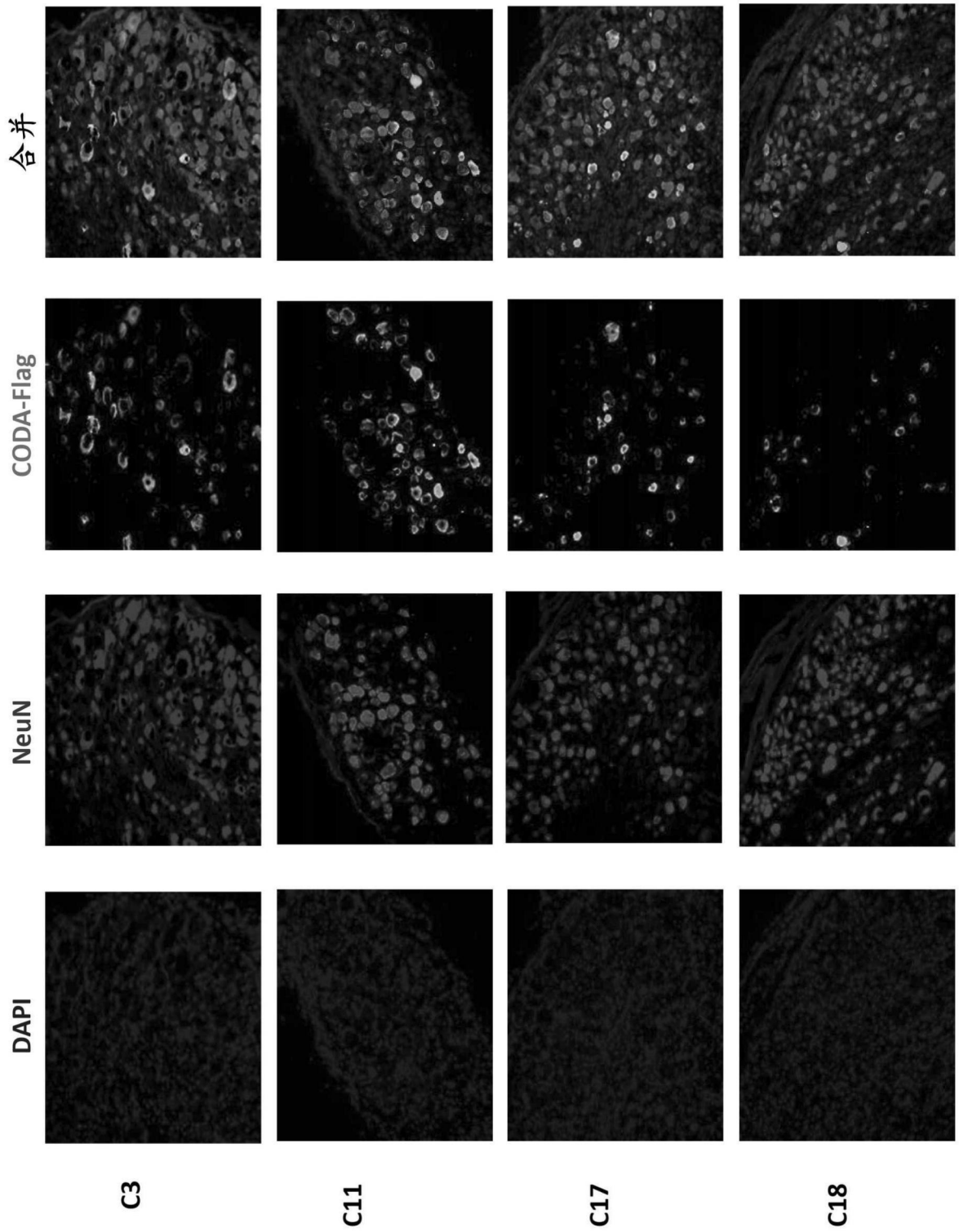


图11