



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118490845 A

(43) 申请公布日 2024.08.16

---

(21) 申请号 202410270436.6 *C12N 15/12* (2006.01)  
(22) 申请日 2017.11.17 *C12N 15/864* (2006.01)  
(30) 优先权数据 *A61K 38/17* (2006.01)  
62/423,618 2016.11.17 US *A61K 9/00* (2006.01)  
(62) 分案原申请数据 *A61P 43/00* (2006.01)  
201780072105.X 2017.11.17 *A61P 25/00* (2006.01)  
(71) 申请人 全国儿童医院公司  
地址 美国  
申请人 俄亥俄州创新基金会  
(72) 发明人 B·K·卡斯帕 K·福斯特  
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247  
专利代理师 陈迎春 黄革生  
(51) Int. Cl.  
*A61K 48/00* (2006.01)

权利要求书1页 说明书22页  
序列表(电子公布) 附图57页

---

(54) 发明名称  
编码甲基-CpG结合蛋白2的重组腺相关病毒的鞘内递送

(57) 摘要  
提供了用于对编码甲基-CpG结合蛋白2 (MECP2) 的重组腺相关病毒9 (rAAV9) 进行鞘内递送的方法和材料。例如,设想了这些方法和材料用于治疗瑞特综合征的用途。

1. 一种治疗患者的瑞特综合征的方法,该方法包括以下步骤:向有需要的患者鞘内给予编码甲基-CpG结合蛋白2 (MECP2) 的重组腺相关病毒9 (rAAV9),其中该rAAV9包含编码MECP2B的自身互补基因组,并且其中该自身互补基因组的序列在SEQ ID NO:1中列出。
2. 如权利要求1所述的方法,其中该rAAV9是rAAV9 AVXS-201。
3. 如权利要求1或2所述的方法,该方法进一步包括鞘内给予碘海醇、碘比醇、碘美普尔、碘异酞醇、碘喷托、碘普胺、碘佛醇或碘昔兰、或其中两种或更多种的混合物。
4. 如权利要求1、2或3所述的方法,该方法进一步包括使该患者处于头低脚高位。

## 编码甲基-CpG结合蛋白2的重组腺相关病毒的鞘内递送

[0001] 本申请为申请日2017年11月17日,发明名称为“编码甲基-CpG结合蛋白2的重组腺相关病毒的鞘内递送”的中国申请201780072105.X的分案申请。

[0002] 本申请要求2016年11月17日提交的美国临时专利申请系列号62/423,618的优先权。

[0003] 通过电子提交材料的引用并入

[0004] 通过引用以其整体并入的是同时提交并且鉴定如下的计算机可读形式的序列列表: ASCII文本文件名为“50215PCT\_SeqListing.txt”,24,148字节,2017年11月17日创建。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及用于对编码甲基-CpG结合蛋白2 (MECP2) 的重组腺相关病毒9 (rAAV9) 进行鞘内递送的方法和材料。例如,设想了这些方法和材料用于治疗瑞特综合征 (Rett syndrome) 的用途。

### 背景技术

[0006] 瑞特综合征是一种神经发育X连锁显性病症,发病率是10,000个女孩中有大约1个患病。半合子男性通常死于新生儿脑病。杂合子女性存活到成年期,但是表现出严重的症状,包括小头畸形、失去有目的手运动和语言能力、以及运动异常,这些症状在表面上正常发育期之后出现。发作年龄在6-18个月左右。

[0007] 瑞特综合征被分类为典型的(或经典的)瑞特综合征或非典型瑞特综合征。编码转录因子甲基-CpG结合蛋白2 (MECP2) 的自发突变基因引起两种分类中大部分(大约90%)病例,尽管非典型瑞特综合征可能是由MECP2以外的基因的突变引起的。MECP2突变的性质(例如缺失对比点突变)和X染色体失活偏移影响疾病严重性。MECP2转录因子调节数千种基因的转录。治疗努力已经集中在MECP2下游的靶,包括神经递质、生长因子和代谢途径。已经报道了针对瑞特综合征的至少九种临床试验跨不同措施的积极结局,但是这些发现尚未独立地进行验证或产生新的治疗[Katz等人,Trends in Neurosciences[神经科学趋势],39:100-113(2016)]。对于瑞特综合征,目前还没有经认可的疗法。

[0008] 存在雄性和雌性小鼠模型,其中小鼠表现出RTT样行为[Guy等人,Nature Genetics[自然遗传学],27:322-326(2001);Chen等人,Nature Genetics[自然遗传学]27:327-331(2001);以及Katz等人,5:733-745(2012)]。

[0009] MECP2是52kD核蛋白,它在多种组织中表达,但是在神经元中富集,并且已经在神经系统中对其进行了最多研究。在人类中存在MECP2的两种同种型,称为MECP2A和MECP2B(图1)[Weaving等人,Journal of Medical Genetics[医学遗传学杂志],42:1-7(2005)]。这两种同种型源自可变剪接mRNA转录物,并且具有不同翻译起始位点。MECP2B包括外显子1、3和4并且是脑中的主要同种型。MECP2可逆地结合甲基化DNA并且调节基因表达[Guy等人,Annual Review of Cell and Developmental Biology[细胞与发育生物学年度评论],27:631-652(2011)]。这些功能分别映射到甲基结合结构域(MBD)和转录阻遏因子结构域

(TRD) [Nan和Bird, Brain&Development [脑和发育], 23, 增刊1:S32-37 (2001)]。MECP2最初被认为是转录阻遏因子, 可以同时诱导和抑制靶基因表达 [Chahrour等人, Science [科学], 320:1224-1229 (2008)]。假设MECP2支持正确的神经发育和维持。在神经元中, MECP2通过DNA结合和与不同结合配偶体相互作用, 促进突触活动转化为基因表达 [Ebert等人, Nature [自然], 499:341-345 (2013) 和Lyst等人, Nature Neuroscience [自然神经科学], 16:898-902 (2013)]。在星形胶质细胞中, MECP2缺陷与小鼠中的窒息事件相关联 [Lioy等人, Nature [自然], 475:497-500 (2011)]。MECP2缺陷会引起脑尺寸减小, 增加神经元填充密度和降低树突复杂性 [Armstrong等人, Journal of Neuropathology and Experimental Neurology [神经病理学和实验神经学杂志], 54:195-201 (1995)]。重要地是, 神经元死亡MECP2缺陷不相关联 [Leonard等人, Nature Reviews, Neurology [自然评论, 神经学], 13:37-51 (2017)]。还在神经系统外发现了MECP2, 不过它的水平在不同组织间不同 (图2)。最近的研究检查了小鼠中瑞特综合征对于外周Mecp2表达的依赖性 [Ross等人, Human Molecular Genetics [人类分子遗传学], 25:4389-4404 (2016)]。外周缺陷活动过少、运动疲劳和骨异常相关联。外周MECP2敲除小鼠中缺失大部分RTT相关行为、感觉运动、步态和自主 (呼吸和心脏) 表型。

[0010] 因为MECP2是X连锁基因, 所以在雌性中, 由于X染色体失活 (Xci), MECP2的一个拷贝被沉默。在每个细胞基础上, Xci被认为是随机的, 这导致瑞特雌性MECP2嵌合状态。无论活性X染色体含有完整的还是突变的MECP2基因, 疾病严重性都受到影响。这被称为偏移Xci。雄性并不经历Xci, 因此MECP2缺陷更严重, 因为没有细胞会具有MECP2的功能拷贝。MECP2突变的性质还影响疾病严重性。在RettBASE数据库 (<http://mecp2.chw.edu.au/>) 中描述了MECP2基因的超过600种不同突变, 包括缺失、无义突变和点突变。最常见的突变 (大约9%的患者) 是T185M等位基因, 它影响甲基结合结构域。其他常见突变示出在图3中 (Leonard, 同上)。这些总计占RettBASE中列出的超过40%的病例。在8%-10%的病例中发现涉及MECP2的大规模缺失 [Li等人, Journal of Human Genetics [人类遗传学杂志], 52:38-47 (2007) 和Hardwick等人, European Journal of Human Genetics [欧洲人类遗传学杂志], 15:1218-1229 (2007)]。存在R133C、R294X和C末端突变与缺失 (TRD的下游) 的基因型-表型相关性, 引起更温和的疾病。大的缺失和早期截短突变 (R270X、R255X和R168X) 严重的瑞特综合征相关联。表1描述了最近由一组国际瑞特临床医生汇编的共识性瑞特诊断标准 [Neul等人, Annals of Neurology [神经学年报], 68:944-950 (2010)]。

|        |   |
|--------|---|
|        | <p>表 1</p> <p><u>RTT 诊断标准 2010</u></p> <p>-当观察到产后头生长减速时，考虑诊断。</p>   |
|        | <p><i>典型的或经典的 RTT 所要求的</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 倒退期随后是恢复或稳定化。*</li> <li>2. 所有主要标准和所有排除标准</li> <li>3. 并不要求支持标准，尽管通常存在于典型的 RTT 中</li> </ol>  |
|        | <p><i>非典型的或变体的 RTT 所要求的</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 倒退期随后是恢复或稳定化</li> <li>2. 4 个主要标准中的至少 2 个</li> <li>3. 11 个支持标准中的 5 个</li> </ol>  |
| [0011] | <p><b>主要标准</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 获得性有目的手技能的部分或完全失去。</li> <li>2. 获得性口语的部分或完全失去**</li> <li>3. 步态异常：能力的损害（运用障碍）或不存在。</li> <li>4. 刻板手运动，例如拧手/挤手、拍手/手敲击、含手行为和洗手/搓手等自动症。</li> </ol> |
|        | <p><b>RTT 的排除标准</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 继发于创伤的脑损伤（产期或产后）、神经代谢疾病、或引起神经学问题的严重感染***</li> <li>2. 在生命前 6 个月的内，大体上异常的意识运动发育#</li> </ol>   |
|        | <p><b>非典型 RTT 对的支持标准###</b></p> <p>醒时的呼吸紊乱</p> <p>醒时的夜磨牙症</p> <p>损害的睡眠型式</p>  |

异常的肌张力  
 外周的血管舒缩障碍  
 脊柱侧弯/脊柱后凸  
 生长迟缓  
 小的冷的手和脚  
 不合时宜的笑/尖叫  
 对疼痛的减弱响应  
 强烈的眼神交流-“凝视”

[0012]

\* = 因为在倒退的任何清楚的证据之前，目前在一些个体中鉴定了 *MECP2* 突变，所以“可能的”RTT 的诊断应给予那些 3 岁以下的个体，这些个体未失去任何技能，然而在其他方面却具有暗示 RTT 的临床特征。应针对倒退的证据，每 6-12 个月重新评估这些个体。如果倒退明显，则诊断应改变为确定的 RTT。然而，如果到 5 岁，儿童仍未显示倒退的任何证据，则应怀疑 RTT 的诊断。

\*\* = 获得性语言的失去是基于最佳获得性口语技能，并不是严格基于不同的词或更高语言技能的获得。因此，已经学会呀呀学语但另一方面却失去此能力的个体被认为已经失去了获得性语言。

\*\*\* = 应存在清楚的证据（神经学的或眼科的检查和 MRI/CT），其中假定的损害直接导致神经功能障碍。

# = 不符合大体上异常，该异常达到了正常标志的程度（获得头部控制、吞咽、发展社交性微笑）。在生命的前六个月期间，温和的广义张力减退或其他先前报道的细微发育改变，是 RTT 中常见的，并且不构成排除标准。

## = 如果个体具有或以至具有列出的临床特征，则它被计为支持标准。很多这些特征具有年龄依赖性，在某个年龄不断显现并且变得更显著。因此，与年龄更小的个体相比，对于年龄更大的个体，非典型 RTT 的诊断可以更早。在更幼小个体的情况下（5 岁以下），他们具有倒退期和  $\geq 2$  个主要标准，但是并不满足 5/11 的支持标准

[0013] 的要求, 可以给出“可能是非典型 RTT”的诊断。随着他们的年龄增长, 属于此类别的个体应被重新评估, 并且相应地, 修改诊断。

[0014] 腺相关病毒(AAV)是复制缺陷型细小病毒,它的单链DNA基因组是约4.7kb长并且包括145个核苷酸的反向末端重复序列(ITR)。AAV血清型2(AAV2)基因组的核苷酸序列呈现在以下文献中:Srivastava等人,J Virol[病毒学杂志],45:555-564(1983),由以下文献修正:Ruffing等人,J Gen Virol[普通病毒学杂志],75:3385-3392(1994)。ITR内含有指导病毒DNA复制(rep)、包壳/包装和宿主细胞染色体整合的顺式作用序列。三个AAV启动子(针对其相对图定位称为p5、p19、和p40)驱动编码rep和cap基因的两个AAV内部开放读码框的表达。两个rep启动子(p5和p19),偶联单个AAV内含子的差别剪接(在核苷酸2107和2227),导致从rep基因产生四种rep蛋白(rep 78、rep 68、rep 52、和rep 40)。Rep蛋白具有多种酶学特性,这些特性最后负责复制病毒基因组。cap基因从p40启动子表达,并且它编码三种衣壳蛋白VP1、VP2、和VP3。可变剪接和非共有翻译其实位点负责产生三种相关衣壳蛋白。单个共有聚腺苷酸化位点位于AAV基因组的图位置95。在以下文献中综述了AAV的生存周期和遗传学:Muzyczka,Current Topics in Microbiology and Immunology[微生物学和免疫学的当前主题],158:97-129(1992)。

[0015] 例如,AAV具有以下特点,使得它作为基因疗法中,用于递送外源DNA到细胞中的载体是有吸引力的。在培养中细胞的AAV感染是非致细胞病的,并且人类和其他动物的天然感染是沉默并且无症状的。此外,AAV感染多种哺乳动物细胞,允许在体内靶向很多不同组织的可能性。此外,AAV转导缓慢分裂的和不分裂的细胞,并且可以作为转录活性核游离体(染色体外因子),实质上持续那些细胞的生命期。AAV前病毒基因组是易感染的,为质粒中的克隆DNA,它使得构建重组基因组是可行的。此外,因为AAV基因组的ITR内也含有指导AAV复制、基因组包壳和整合的信号,所以内部大约4.3kb的基因组的一些或全部(编码复制和结构衣壳蛋白rep-cap)可以被外源DNA(例如含有启动子、目的DNA和聚腺苷酸化信号的基因盒)替换。可以按反式提供rep和cap蛋白。AAV的另一显著特征是它是极端稳定的并且健壮的病毒。它容易地经受住用于灭活腺病毒的条件(56°C至65°C持续若干小时),使得AAV的冷藏更不关键。AAV甚至可以被冻干。最后,AAV感染的细胞对于重复感染没有抗性。存在AAV的多种血清型并且提供了不同的组织嗜性。例如,已知血清型包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13和AAVrh74。在美国专利号7,198,951和Gao等人,J.Virol.[病毒学杂志],78:6381-6388(2004)中描述了AAV9。

[0016] 对于用于将MECP2多核苷酸递送至中枢神经系统并且在其中表达该多核苷酸的方法和产品,本领域中仍然存在需要。

## 发明内容

[0017] 本披露提供了用于在有需要的患者中治疗瑞特综合征的方法和材料。

[0018] 提供了治疗患者的瑞特综合征的方法,该方法包括以下步骤:向有需要的患者鞘内给予编码甲基-CpG结合蛋白2(MECP2)的重组腺相关病毒9(rAAV9),其中该rAAV9包含编码MECP2B的自身互补基因组,并且其中该自身互补基因组的序列在SEQ ID NO:1中列出。在称为AVXS-201的scAAV中提供了示例性rAAV9。

[0019] 提供的方法进一步包括以下步骤:向患者鞘内给予碘海醇、碘比醇、碘美普尔、碘异酞醇、碘喷托、碘普胺、碘佛醇或碘昔兰、或其中两种或更多种的混合物,和/或该方法进一步包括使患者处于头低脚高位。

## 附图说明

[0020] 图1:人类MECP2基因座的图。该图示出成熟mRNA的可变转录起始位点(箭头)、外显子(框)和剪接方式。MECP2B是脑中最丰富的同种型,并且由AVXS-201编码。

[0021] 图2:图描绘了如通过免疫组织化学检测,在不同人类组织中,相对MECP2蛋白表达水平。修改自人类蛋白质图谱([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org))。

[0022] 图3:在瑞特患者中发现的MECP2蛋白的关键功能性结构域和常见突变。MBD=甲基-CpG-结合,TRD=转录阻遏结构域,NID=NCOR-SMRT相互作用结构域(NID),和核定位信号(NLS)

[0023] 图4:概念证明,其中在雄性瑞特小鼠(Rett mice)中,AAV9介导的Mecp2表达的恢复。A)重组AAV基因组的动画。B)实验设计。C)卡普兰-迈耶存活曲线示出,与用对照载体治疗的动物相比,scAAV9.738.Mecp2治疗的瑞特小鼠的增加的存活。D)当通过博德评分(Bird scoring)测量时,载体介导的Mecp2恢复改善了行为表型(框1)。

[0024] 图5:雌性瑞特消除的scAAV9.738.Mecp2治疗造成了Mecp2的生理学水平,并且改善了异常行为。A)实验设计B)来自野生型和scAAV9.738.Mecp2治疗的瑞特小鼠,来自免疫标记Mecp2的脑切片,荧光强度测量值。在两个组之间,强度测量值的分布是相似的。C)博德表型评分(Bird phenotype scoring)示出,接受scAAV9.738.Mecp2的动物中的症状减轻。D-G)在scAAV9.738.Mecp2治疗的动物对比对照治疗的动物中,分别进行了旋转试验、翻转网栅试验、平台试验和筑巢行为评估,均示出改善。

[0025] 图6:动画描绘了本文描述的第一代(A)和修改的(B,AVXS-201)重组AAV基因组。颜色反映了构建体之间的相似性和差异。在scAAV9.738.Mecp2和AVXS-201之间,启动子缩短了,关键元件之间的插入序列缩短了,鼠Mecp2 $\alpha$ cDNA被替换为人类MECP2B cDNA,并且将牛生长激素聚腺苷酸化信号被改变为更短的合成元件。这些改变的总体目的是改善包装效率,同时维持临床相关MECP2 cDNA的生理学表达水平。

[0026] 图7:在Mecp2<sup>-y</sup>小鼠中,AVXS-201的剂量反应。A)用于治疗Mecp2<sup>-y</sup>小鼠的不同剂量的卡普兰-迈耶图。剂量组的中位存活期被颜色编码并且由短划线指示。与对照治疗的无效小鼠(null mice)相比,接受AVXS-201的每个群体都具有增加的存活。B)绘制了来自每个组的中位存活期数据,来示出剂量反应曲线。短划线表示PBS治疗的Mecp2<sup>-y</sup>的中位存活期。这些数据与MECP2缺陷和过多的已知效果是一致的。

[0027] 图8:用AVXS-201治疗的Mecp2<sup>-y</sup>小鼠的博德行为评分(Bird behavioral scoring)。A)随着年龄增加,对照治疗的受影响小鼠累积缺陷。无论剂量,AVXS-201治疗减轻了行为缺陷。B)重新绘制了如(A)中的相同数据,仅示出对照治疗的和AVXS-201 1.44x10<sup>10</sup> vg的组。

[0028] 图9:AVXS-201治疗的Mecp2无效小鼠恢复了自发移动。旷场分析示出,与对照治疗的无效小鼠相比,AVXS-201治疗的无效小鼠穿过了(A)更大距离,并且是以增加的(B)平均速度。C)在3月龄时的旋转试验表现也伴随中等剂量的AVXS-201得以改善。+=p≤0.001;\*

$=p \leq 0.05; \zeta = p \leq 0.0001$ 。

[0029] 图10: AVXS-201造成了处于治疗剂量的中等量的MECP2。A) 来自用雄性野生型(PBS)或Mecp2<sup>-/-</sup>小鼠制成的脑半球匀浆的抗MeCP2蛋白质印迹。Mecp2无效小鼠是未注射的(KO)或接受了指示剂量的AVXS-201。B) 图A的量化。1.44x10<sup>10</sup>vg的靶治疗剂量产生了11%野生型水平的蛋白。

[0030] 图11: 在野生型小鼠中, AVXS-201是良好耐受的。A) 接受AVXS-201的P1 ICV给予的雄性野生型小鼠的卡普兰-迈耶存活图。B) 治疗的和野生型小鼠的博德表型评分示出广大范围的剂量都是良好耐受的。最高剂量(1.13x10<sup>11</sup>, 蓝线)产生了温和的行为损害。

[0031] 图12: 野生型动物中的AVXS-201治疗并未损害移动。用AVXS-201治疗的野生型雄性小鼠的旷场分析示出了与对照治疗的野生型小鼠相似的(A)行走距离和(B)平均速度。C) 接受高剂量AVXS-201的野生型动物中, 旋转试验表现变弱。+ =  $p \leq 0.001$ , \* =  $p \leq 0.05$

[0032] 图13: 在野生型脑中, AVXS-201产生了MECP2蛋白的剂量依赖性增加。A) 在P1 ICV注射后3周, 在不同脑区中, 抗MeCP2蛋白质印迹示出了总MeCP2蛋白的剂量依赖性升高。(Cb = 小脑, Med = 延髓, Hipp = 海马体, Ctx = 皮质, Mid = 中脑)。TG3指示了取自MeCP2重复综合征的严重小鼠模型的样品<sup>1</sup>。B) 图A的量化。在选择的大脑区中, 高剂量(而不是中等剂量)的AVXS-201使MECP2表达加倍。

[0033] 图14: 在非人类灵长动物中, AVXS-201的鞘内输注并不损害体重增长。用红色示出了三只AVXS-201治疗的动物, 并且用蓝色示出了对照受试者的体重。

[0034] 图15: 直至注射后18个月, 在非人类灵长动物中, AVXS-201的鞘内输注并不影响血液学值。用红色示出了三只AVXS-201治疗的动物的值, 并且用蓝色示出了对照受试者。

[0035] 图16: 直至注射后12-18个月, 在非人类灵长动物中, AVXS-201的鞘内输注并不影响血清化学。在AVXS-201和对照治疗的受试者之间, 肝脏和电解质值是相似的。用红色示出了三只AVXS-201治疗的动物的值, 并且用蓝色示出了对照受试者。

[0036] 图17: 直至注射后12-18个月, 在非人类灵长动物中, AVXS-201的鞘内输注并不影响血清化学。在AVXS-201和对照治疗的受试者之间, 心脏和肾脏值是相似的。用红色示出了三只AVXS-201治疗的动物的值, 并且用蓝色示出了对照受试者。

[0037] 图18: 相似水平的MeCP2表达遍布AVXS-201治疗的和对照非人类灵长动物的脑。抗MeCP2免疫组织化学揭示, 在MeCP2表达方面, 没有总体结构性异常或明显差异。OC = 枕叶皮质, TC = 颞皮质, LSc = 腰部脊髓, Thal = 丘脑, Hipp = 海马体, Cb = 小脑。

[0038] 图19: 来自对照和AVXS-201注射动物的脑区的蛋白质印迹示出了相似水平的MeCP2。总MeCP2水平以绿色示出, 并且GAPDH加载对照以红色示出。以下示出了图A和B的量化, 示出了其各自的印迹。图中的短划线指示了跨对照检测的平均归一化值。OC = 枕叶皮质, TC = 颞皮质, LSc = 腰部脊髓, Thal = 丘脑, Hipp = 海马体, Cb = 小脑。值示出为平均值 ± SEM。

[0039] 图20: 原位杂交示出了来自AVXS-201治疗的动物而不是对照的脑, 所有检查的区域中的载体来源的转录物。图示出了伴随核标记(Dapi, 蓝色), 针对Gapdh的探针(红色)和针对载体来源的MECP2 mRNA的探针(绿色)。OC = 枕叶皮质, TC = 颞皮质, LSc = 腰部脊髓, Hipp = 海马体, Cb = 小脑。比例尺 = 20 μm。

[0040] 图21: 原位杂交示出了注射后18个月, 来自AVXS-201治疗的动物而不是对照的脑,

所有检查的区域中的载体来源的转录物。图示出了伴随核标记 (Dapi, 蓝色), 针对Gapdh的探针 (红色) 和针对载体来源的MECP2 mRNA的探针 (绿色)。OC=枕叶皮质, TC=颞皮质, CA1和CA3=海马体的区域, CC=胼胝体, Thal=丘脑, Cau=尾状核, Put=核壳, SCo11=上丘, Med=延髓, Cb=小脑, Cerv=颈部脊髓, Thor=胸部脊髓, Lumb=腰部脊髓。比例尺=20 $\mu$ m。

[0041] 图22提供了dsAAV MsMeCPE2 (5856bp) 的载体图谱。

[0042] 图23描述了瑞特综合征的临床病理学, 瑞特综合征是一种X连锁神经发育自闭症谱系病症 (ASD), 影响约1/10,000名女孩。

[0043] 图24证明瑞特综合征是可逆的, 因为在无效小鼠中重新表达MECP2可改善存活和行为表型。

[0044] 图25提供了AAV9.P456.hMeCP2的示意图, 并提供了治疗参数。

[0045] 图26提供的数据证明注射AAV9.P456.MeCP2的野生型小鼠中MeCP2的调节。

[0046] 图27提供了AAV9.P456.MeCP2 ICV注射后MeCL2无效小鼠中MeCP2的相对表达。

[0047] 图28A-B展示了直接递送至MeCP2<sup>y/-</sup>小鼠中神经系统的AAV9.P456.MeCP2对行为评分的剂量效应。

[0048] 图29展示了直接递送至MeCP2<sup>y/-</sup>小鼠中神经系统的AAV9.P456.MeCP2挽救了运动活性。

[0049] 图30A-F展示了ICV直接递送至神经系统的AAV9.P456.MeCP2提高了MeCP2<sup>y/-</sup>小鼠的存活率。

[0050] 图31A-B提供了在食蟹猴中进行的非人类 (NHP) 安全性研究的摘要, 以及注射后5周内各种器官 (胸部脊髓、颈部脊髓、纹状体、颞皮质、小脑) 中的MeCP2表达水平。

[0051] 图32提供了在鞘内注射AAV9-P546-MeCP2后5周内食蟹猴中MeCP2的相对表达。

[0052] 图33表明直接递送至野生型小鼠的CNS的AAV9-P546-MeCP2不会影响存活率。

[0053] 图34表明AAV9-P546-MeCP2处理的MeCP2<sup>y/-</sup>小鼠的小鼠皮质中的MeCP2免疫染色。

[0054] 图35展示了将AAV9-P546-MeCP2直接递送至MeCP2<sup>y/-</sup>小鼠的CNS对行为评分的影响。

[0055] 图36展示了将AAV9-P546-MeCP2直接递送至野生型小鼠的CNS对旷场活动的影响。

[0056] 图37展示了将AAV9-P546-MeCP2直接递送至野生型小鼠的CNS对旋转实验表现的影响。

[0057] 图38提供了AAV-P546-hMeCP2与AAV-P739-mMeCP2序列的比较。

[0058] 图39展示了AAV9-P546-MeCP2在星形胶质细胞中产生稳健表达。

[0059] 图40表明AAV9-P546-MeCP2在神经元中产生稳健表达。

[0060] 图41表明AAV9-P546-MeCP2允许同时靶向小鼠脑中的神经元和星形胶质细胞。

[0061] 图42表明在新生MeCP2<sup>y/-</sup>小鼠中ICV注射AAV9-P546-MeCP2导致神经元和星形胶质细胞的高转导。

[0062] 图43表明ICV注射AAV9-P546-MeCP2大大延长了MeCP2<sup>y/-</sup>小鼠的寿命。

[0063] 图44表明AAV9-P546-MeCP2改善了MeCP2<sup>y/-</sup>小鼠的行为评分, 并且没有改变接受治疗的野生型小鼠的行为。

[0064] 图45表明AAV9-P546-MeCP2改善了MeCP2<sup>y/-</sup>小鼠的表现。

[0065] 图46表明在新生野生型小鼠中ICV注射AAV9-P546-MeCP2不会导致肝毒性。

[0066] 综上所述,图22-31表明i)瑞特综合征是可逆的,ii)AAV9-P546-MeCP2载体允许在小鼠和非人类灵长类动物CNS中控制MeCP2表达,iii)MeCP2无效小鼠的行为表型和存活率显著改善,以及iv)初始非人类灵长类动物数据显示在之前的临床试验中使用的剂量可能是安全的。

[0067] 综上所述,图32-46表明,在新生MeCP2 KO小鼠中,AAV9-P546-MeCP2 CSF递送i)延长生存期,使MeCP2y<sup>-/-</sup>小鼠的寿命增加一倍,ii)改善行为评分,iii)改善运动表现。此外,表明在野生型小鼠中,AAV9-P546-MeCP2 CSF递送i)对生存的影响极小甚至没有影响,ii)没有“MeCP2”复制样综合征,iii)迄今为止没有肝毒性的证据。

### 具体实施方式

[0068] 在一个方面,本发明提供了用于鞘内给予(即给予到脑或脊髓的蛛网膜下的空间)编码MECP2的多核苷酸至患者的方法,包括给予具有基因组(包括多核苷酸)的rAAV9。在一些实施例中,rAAV9是自身互补基因组。在其他实施例中,rAAV9基因组是单链基因组。

[0069] 这些方法递送编码MECP2的多核苷酸至患者的脑和脊髓(即患者的中枢神经系统)。考虑的一些脑的靶区域包括但不限于皮层运动区和脑干。考虑的用于递送的一些中枢神经系统的靶细胞包括但不限于神经细胞和胶质细胞。胶质细胞的实例是小胶质细胞、少突胶质细胞和星形胶质细胞。

[0070] 例如,编码MECP2的递送适用于治疗瑞特综合征。

[0071] “治疗”包括以下步骤:经由鞘内途径给予有效剂量,或有效的多个剂量的包含本发明的rAAV的组合物至有需要的受试者动物(包括人类患者)。如果在病症/疾病发展前给予剂量,则给予是预防的。如果在病症/疾病发展后给予剂量,则给予是治疗的。在本发明的实施例中,有效剂量是这样的剂量:缓解(消除或减轻)关联正治疗的病症/疾病状态的至少一种症状,改善关联正治疗的病症/疾病状态的至少一种症状,延缓或预防病症/疾病状态的进展,减轻疾病的程度,导致疾病的缓解(部分的或总共的),和/或延长存活期。

[0072] 在瑞特综合征的治疗中,这些方法导致受试者中的效果,包括但不限于恢复有目的的手运动、语言能力改善、窒息减少、癫痫发作减少、焦虑减轻、社会化增强、IQ提高、睡眠型式正常化和/或活动性增加。

[0073] 本发明也考虑了联合治疗。如本文使用的联合包括同时治疗和顺序治疗二者。具体考虑了将本发明的方法与针对瑞特综合征的标准医学治疗联合,如与新的疗法联合。

[0074] 尽管考虑了在出生后递送至有需要的个体,但是也考虑了子宫内递送至胎儿。

[0075] 在另一个方面,本发明提供了rAAV基因组。rAAV基因组包含侧翼是编码MECP2的多核苷酸的一个或多个AAV ITR。该多核苷酸可操作地连接至转录控制DNA,具体地是功能是靶向细胞从而形成“基因盒”的启动子DNA和聚腺苷酸化信号序列DNA。基因盒可以包括允许在神经元内特异性地表达,或在胶质细胞内特异性地表达的启动子。实例包括神经元特异性烯醇化酶和神经胶质元纤维酸性蛋白启动子。也可以使用在摄取药物的控制下的诱导型启动子。实例包括但不限于多个系统,例如四环素(TET开/关)系统[Urlinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]97(14):7963-7968(2000)]和蜕皮激素受体可调节系统[Palli等人,Eur J.Biochem[欧洲生物化学杂志]270:1308-1315(2003)]。基因盒可以进一步包括内含子序列,用于在哺乳动物细胞中表达该多核苷酸时,促进RNA转录

物的加工。

[0076] 本发明的rAAV基因组缺少AAV rep和cap DNA。rAAV基因组中的AAV DNA(例如ITR)可以来自任何AAV血清型,可以衍生重组病毒的AAV血清型包括但不限于以下AAV血清型: AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13和AAVrh74。AAV血清型的基因组的核苷酸序列是本领域已知的。例如,在以下文献中提供了AAV9基因组:Gao等人,J.Virol.[病毒学杂志],78:6381-6388(2004)。

[0077] 在另一个方面,本发明提供了包含本发明的rAAV基因组的DNA质粒。将这些DNA质粒转移到允许用AAV的辅助病毒(例如腺病毒、E1-缺失的腺病毒或疱疹病毒)感染的细胞中,以便将rAAV基因组组装到具有AAV9衣壳蛋白的感染性病毒颗粒上。用于产生rAAV颗粒的技术,其中将要包装的AAV基因组、rep和cap基因、以及辅助病毒功能提供给细胞,这在本领域是标准的。rAAV的产生要求单细胞(本文称为包装细胞)内存在以下组分:rAAV基因组、与rAAV基因组分开(即不存在于其中)的AAV rep和cap基因、以及辅助病毒功能。例如,假型rAAV的产生披露于WO 01/83692中,将其通过引用整体并入本文。在不同实施例中,可以修饰AAV衣壳蛋白从而增强重组载体的递送。对衣壳蛋白的修饰是本领域普遍已知的。参见例如US2005/0053922和US2009/0202490,将其披露内容通过引用整体并入本文。

[0078] 产生包装细胞的方法是:产生对于AAV颗粒产生而言,稳定表达所有必需组分的细胞系。例如,将包含以下项的质粒(或多个质粒)整合到细胞的基因组中:缺少AAV rep和cap基因的rAAV基因组、与rAAV基因组分开的AAV rep和cap基因、以及选择性标记(例如新霉素耐药性基因)。已经通过以下程序将AAV基因组引入细菌质粒中:例如GC加尾(Samulski等人,1982,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],79:2077-2081)、含有限制性内切核酸酶切割位点的合成接头的添加(Laughlin等人,1983,Gene[基因],23:65-73)或通过直接的平端连接(Senapathy和Carter,1984,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],259:4661-4666)。然后用辅助病毒,例如腺病毒感染包装细胞。此方法的优点是,细胞是可选择的,并且适合rAAV的大规模生产。适合的方法的其他实例采用了腺病毒或杆状病毒而不是质粒来将rAAV基因组和/或rep和cap基因引入包装细胞中。

[0079] 例如,在以下文献中综述了rAAV生产的一般原理:Carter,1992,Current Opinions in Biotechnology,1533-539[生物技术新见];以及Muzyczka,1992,Curr.Topics in Microbial.and Immunol.[微生物学和免疫学的当前主题],158:97-129)。以下文献中描述了不同方法:Mol.Cell.Biol.[分子和细胞生物学]4:2072(1984); Hermonat等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],81:6466(1984); Tratschin等人,Mol.Cell.Biol.[分子和细胞生物学]5:3251(1985);McLaughlin等人,J.Virol.[病毒学杂志],62:1963(1988);以及Lebkowski等人,1988Mol.Cell.Biol.[分子和细胞生物学],7:349(1988)。Samulski等人(1989,J.Virol.[病毒学杂志],63:3822-3828);美国专利号5,173,414;WO 95/13365和相应的美国专利号5,658,776;WO 95/13392;WO 96/17947;PCT/US 98/18600;WO 97/09441(PCT/US 96/14423);WO 97/08298(PCT/US 96/13872);WO 97/21825(PCT/US 96/20777);WO 97/06243(PCT/FR 96/01064);WO 99/11764;Perrin等人(1995)Vaccine[疫苗]13:1244-1250;Paul等人(1993)Human Gene Therapy[人基因疗法]4:609-615;Clark等人(1996)Gene Therapy[基因疗法]3:1124-1132;美国专利号5,786,211;美国专利号5,871,982;和美国专利号6,258,595。将以上文件

通过引用整体并入本文,其中特别强调的是涉及rAAV生产的文件的那些章节。

[0080] 本发明提供了产生复制缺陷型感染性rAAV的包装细胞。在一个实施例中,包装细胞可以是稳定转化的癌细胞,例如海拉细胞(HeLa cell)、293细胞和PerC.6细胞(同源293系)。在另一个实施例中,包装细胞是:不是转化的癌细胞的细胞,例如低传代293细胞(用腺病毒的E1转化的人胎儿肾细胞)、MRC-5细胞(人胎儿成纤维细胞)、WI-38细胞(人胎儿成纤维细胞)、Vero细胞(猴肾细胞)和FRhL-2细胞(恒河猴胎儿肺细胞)。

[0081] 因此,在另一个方面,本发明提供了rAAV,例如rAAV9(即复制缺陷型感染性包壳rAAV9颗粒),其包含本发明的rAAV基因组。rAAV的基因组缺少AAV rep和cap DNA,即,在基因组的ITR之间不存在AAV rep或cap DNA。在一些实施例中,rAAV基因组是自身互补基因组。在一些实施例中,rAAV基因组是单链基因组。

[0082] 提供了rAAV,例如自身互补AAV9(scAAV9),称为“AVXS-201”。其基因盒(SEQ ID NO:1中列出的AVXS-201基因组的核苷酸151-2558)按顺序具有来自小鼠MECP2基因的546bp启动子片段(SEQ ID NO:2)(处于相反方向的NC\_000086.7的核苷酸74085586-74086323)、SV40内含子、人类MECP2B cDNA(SEQ ID NO:3)(CCDS数据库编号CCDS48193.1)、以及合成的聚腺苷酸化信号序列(SEQ ID NO:4)。基因盒的侧翼是突变型AAV2反向末端重复序列(ITR)和野生型AAV2反向末端重复序列,这些序列一起实现自身互补AAV基因组的包装。基因组缺少AAV rep和cap DNA,即,在基因组的ITR之间不存在AAV rep或cap DNA。

[0083] 提供了rAAV,例如scAAV9,称为“scAAV9.738.Mecp2”。其基因盒(SEQ ID NO:5中列出的scAAV9.738.Mecp2基因组的核苷酸198-2890)按顺序具有来自小鼠MECP2基因的738bp启动子片段(SEQ ID NO:6)(处于相反方向的NC\_000086.7的核苷酸74085586-74086323)、SV40内含子、小鼠MECP2 $\alpha$ cDNA(SEQ ID NO:7)(CCDS数据库编号CCDS41016.1)、以及来自牛生长激素基因的聚腺苷酸化信号序列。基因盒的侧翼是突变型AAV2反向末端重复序列(ITR)和野生型AAV2反向末端重复序列,这些序列一起实现自身互补AAV基因组的包装。基因组缺少AAV rep和cap DNA,即,在基因组的ITR之间不存在AAV rep或cap DNA。

[0084] 考虑了rAAV9基因组中的保守核苷酸取代,包括但不限于在rAAV9基因组的基因盒中。例如,基因盒中的MECP2 cDNA可以与scAAV9.738.Mecp2中的MECP2 $\alpha$ cDNA或AVXS-201中的MECP2BcDNA具有80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0085] 在一些实施例中,由本发明的rAAV9编码的MECP2多肽可以是变体MECP2多肽。变体多肽保留了MECP2活性并且具有一个氨基酸序列,该氨基酸序列与由scAAV9.738.Mecp2中的MECP2 $\alpha$ cDNA或AVXS-201中的MECP2B cDNA编码的MECP2多肽的氨基酸序列具有至少约60、70、80、85、90、95、97、98、99或99.5%同一性。

[0086] 可以通过本领域的标准方法,例如柱色谱法或氯化铯梯度纯化rAAV。用于纯化来自辅助病毒的rAAV载体的方法是本领域已知的,并且包括披露于例如以下文献的方法:Clark等人,Hum.Gene Ther.[人类基因疗法],10(6):1031-1039(1999);Schenpp和Clark,Methods Mol.Med.[分子医学方法],69:427-443(2002);美国专利号6,566,118和WO 98/09657。

[0087] 在另一个方面,本发明考虑了组合物,其包含rAAV,例如编码MECP2多肽的rAAV9。

[0088] 本发明的组合物包含在药学上可接受的载体中的rAAV。这些组合物还包含其他成

分,例如稀释剂和辅助剂。可接受的载体、稀释剂和辅助剂在所用剂量和浓度下对受者无毒并且优选是惰性的,并且包括缓冲剂,例如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,例如抗坏血酸;低分子量多肽;蛋白,例如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖醇,例如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子,例如钠;和/或非离子表面活性剂,例如Tween (吐温)、pluronic (普朗尼克)或聚乙二醇(PEG)。

[0089] 可以通过根据需要,将所需用量的适当溶剂中的rAAV与以上列举的不同其他成分合并,随后过滤灭菌制备无菌可注射溶液。通常,通过将灭菌的活性成分掺入无菌媒介物制备分散体,所述无菌媒介物含有碱性分散介质和所需的来自以上列举的那些的其它成分。就用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末而言,优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,这些方法产生活性成分的粉末以及来自其以前的无菌过滤溶液的任何另外的所希望的成分。

[0090] 待用于在本发明的方法中给予的rAAV的效价和剂量将变化,例如取决于具体的rAAV、给予方式、治疗目标、个体、给予的时间、以及要靶向的一个或多个细胞类型,并且可以通过本领域的标准方法确定。rAAV的效价的范围可以从约 $1 \times 10^6$ 、约 $1 \times 10^7$ 、约 $1 \times 10^8$ 、约 $1 \times 10^9$ 、约 $1 \times 10^{10}$ 、约 $1 \times 10^{11}$ 、约 $1 \times 10^{12}$ 、约 $1 \times 10^{13}$ 至约 $1 \times 10^{14}$ 或更多DNA酶抗性颗粒(DRP)/ml。可以按病毒基因组(vg)的单位表达剂量。这些rAAV的剂量可以范围是从约 $1 \times 10^9$ vg或更多、约 $1 \times 10^{10}$ vg或更多、约 $1 \times 10^{11}$ vg或更多、约 $1 \times 10^{12}$ vg或更多、约 $6 \times 10^{12}$ 或更多、约 $1 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $1.3 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $1.4 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $2 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $3 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $6 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $1 \times 10^{14}$ vg或更多、约 $3 \times 10^{14}$ 或更多、约 $6 \times 10^{14}$ 或更多、约 $1 \times 10^{15}$ vg或更多、约 $3 \times 10^{15}$ 或更多、约 $6 \times 10^{15}$ 或更多、约 $1 \times 10^{16}$ 或更多、约 $3 \times 10^{16}$ 或更多、或约 $6 \times 10^{16}$ 或更多。对于新生儿而言,rAAV的剂量可以范围是从约 $1 \times 10^9$ vg或更多、约 $1 \times 10^{10}$ vg或更多、约 $1 \times 10^{11}$ vg或更多、约 $1 \times 10^{12}$ vg或更多、约 $6 \times 10^{12}$ 或更多、约 $1 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $1.3 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $1.4 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $2 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $3 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $6 \times 10^{13}$ vg或更多、约 $1 \times 10^{14}$ vg或更多、约 $3 \times 10^{14}$ 或更多、约 $6 \times 10^{14}$ 或更多、约 $1 \times 10^{15}$ vg或更多、约 $3 \times 10^{15}$ 或更多、约 $6 \times 10^{15}$ 或更多、约 $1 \times 10^{16}$ 或更多、约 $3 \times 10^{16}$ 或更多、或约 $6 \times 10^{16}$ 或更多。

[0091] 本发明的方法导致靶细胞(包括但不限于神经细胞或胶质细胞)的转导。术语“转导”用于指经由本发明的复制缺陷型感染性rAAV,在体内或体外将多核苷酸给予/递送至靶细胞,导致受体细胞表达功能性MECP2多肽。

[0092] 使用本发明的rAAV转导细胞导致由rAAV编码的MECP2多肽的持续表达。在一些实施例中,考虑的靶表达水平是在不患有瑞特综合征的受试者中的正常(或野生型)生理学表达水平的约75%至约125%。靶表达水平可以是正常表达水平的约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约100%、约105%、约110%、约115%、约120%或约125%。

[0093] 在本发明的治疗方法的一些实施例中,还给予患者非离子低渗造影剂。此类造影剂包括但不限于碘比醇、碘海醇、碘美普尔、碘异酞醇、碘喷托、碘普胺、碘佛醇、碘昔兰、和这些造影剂中的两种或更多种的混合物。在一些实施例中,治疗方法因此进一步给予碘海醇至患者。考虑了非离子低渗造影剂来增加患者的中枢神经系统中的靶细胞的转导。考虑到,相对于单独使用本披露的rAAV时的细胞的转导,与如本文描述的造影剂组合使用本披

露的rAAV时,增加了细胞的转导。在不同实施例中,相对于未与造影剂组合使用时本披露的载体的转导,与如本文描述的造影剂组合使用本披露的载体时,细胞的转导增加了至少约1%、或至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约120%、至少约150%、至少约180%、至少约200%、至少约250%、至少约300%、至少约350%、至少约400%、至少约450%、至少约500%或更多。在另外的实施例中,相对于未与造影剂组合使用时本披露的载体的转导,与如本文描述的造影剂组合使用本披露的载体时,细胞的转导增加了约10%至约50%、或约10%至约100%、或约5%至约10%、或约5%至约50%、或约1%至约500%、或约10%至约200%、或约10%至约300%、或约10%至约400%、或约100%至约500%、或约150%至约300%、或约200%至约500%。

[0094] 在一些实施例中,考虑到,当使患者处于头低脚高位(头低位)时,细胞的转导增加。在一些实施例中,在鞘内载体输注期间后之后,按以下角度,以头低位倾斜患者:约1度至约30度、约15至约30度、约30至约60度、约60至约90度、或约90上至约180度。在不同实施例中,相对于未使用头低脚高位时,如本文描述使用头低脚高位时,细胞的转导增加了至少约1%、或至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约120%、至少约150%、至少约180%、至少约200%、至少约250%、至少约300%、至少约350%、至少约400%、至少约450%、至少约500%或更多。

[0095] 在另外的实施例中,相对于未与造影剂和头低脚高位组合使用时本披露的载体的转导,与如本文描述的造影剂和头低脚高位组合使用本披露的载体时,细胞的转导增加了约10%至约50%、或约10%至约100%、或约5%至约10%、或约5%至约50%、或约1%至约500%、或约10%至约200%、或约10%至约300%、或约10%至约400%、或约100%至约500%、或约150%至约300%、或约200%至约500%。

[0096] 本披露还提供了治疗方法实施例,其中鞘内给予本披露的载体和造影剂至有需要的患者的中枢神经系统,导致相对于不存在造影剂的情况下,给予本披露的载体时患者的存活,患者的增加的存活。在不同实施例中,给予本披露的载体和造影剂至有需要的患者的中枢神经系统,导致相对于不存在造影剂的情况下,给予本披露的载体时患者的存活,患者的存活增加了至少约1%、至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或更多。

[0097] 本披露还提供了治疗方法实施例,其中鞘内给予本披露的载体和造影剂至处于头低脚高位的有需要的患者的中枢神经系统,导致相对于不存在造影剂和头低脚高位的情况下,给予本披露的载体时患者的存活,患者的进一步增加的存活。在不同实施例中,给予本披露的载体和造影剂至处于头低脚高位的有需要的患者的中枢神经系统,导致相对于不存在造影剂和头低脚高位的情况下,给予本披露的载体时患者的存活,患者的存活增加了至少约1%、至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或更多。

[0098] 实例

[0099] 本发明通过以下内容来说明。

[0100] • 在雌性和雄性瑞特小鼠模型中的概念证明研究示出,在静脉注射scAAV9.738.Mecp2后的治疗效能。(实例1)

[0101] • 第二代基因疗法载体AVXS-201,示出在Mecp2<sup>-y</sup>小鼠的侧脑室内(ICV)治疗后,在广大范围的剂量内,存活期的延长。在AVXS-201治疗后,中位存活期的最大增加是477%。(实例2)

[0102] • 用AVXS-201治疗的雄性Mecp2<sup>-y</sup>小鼠示出,如通过针对瑞特小鼠开发的综合评级测量,行为的持久改善。(实例3)

[0103] • 用中等水平的蛋白表达获得了用AVXS-201治疗的Mecp2<sup>-y</sup>小鼠中的表型益处。(实例4)

[0104] • 跨越所有测试的剂量,用AVXS-201治疗野生型小鼠是良好耐受的,具有仅在高剂量组中标注的行为评分的一致改变。(实例5和实例6)

[0105] • 非人类灵长动物中的鞘内给药指示直至注射后18个月,AVXS-201是安全并且良好耐受的。(实例7)

[0106] • 在一次鞘内注射后,在非人类灵长动物脑和脊髓中,AVXS-201以生理学水平广泛表达转基因。(实例8)

[0107] 实例1

[0108] 在雌性瑞特小鼠中,针对瑞特综合征的基因疗法,概念证明研究

[0109] 作为概念证明,用scAAV9.738.Mecp2静脉内治疗有症状雄性和雌性瑞特小鼠 [Garg等人,The Journal of Neuroscience:The Official Journal of the Society for Neuroscience [神经科学杂志:神经科学学会的官方期刊],33:13612-13620 (2013)]。scAAV9.738.Mecp2的重组病毒基因组 (SEQ ID NO:5) 包括:来自小鼠Mecp2基因的738bp启动子片段(其驱动小鼠Mecp2 $\alpha$ cDNA (CCDS数据库编号CCDS41016.1)的表达) [Adachi等人, Human Molecular Genetics [人类分子遗传学],14:3709-3722 (2005)],以及牛生长激素聚腺苷酸化信号。基因盒 (SEQ ID NO:5的核苷酸198-2890) 的侧翼是突变型AAV2反向末端重复序列 (ITR) 和野生型AAV2 ITR,这些序列一起实现自身互补AAV基因组的包装。

[0110] 在293细胞中,使用基于双链AAV2-ITR的载体,与编码如先前描述的Rep2Cap9序列的质粒一起 [Gao等人,J.Virol. [病毒学杂志],78:6381-6388 (2004)],连同腺病毒辅助质粒pHelper (斯特吉公司 (Stratagene), 圣克拉拉 (Santa Clara), 加利福尼亚州 (CA)), 通过瞬时转染程序,产生自身互补AAV9 (scAAV9)。分三个独立批次产生病毒用于实验,并且通过两个氯化铯密度梯度纯化步骤进行纯化,针对PBS进行透析,并且用0.001% Pluronic (普朗尼克) -F68进行配制从而防止病毒聚集并且储存在4°C。使用Taq-Man技术,通过定量PCR确定所有载体制剂的效价。通过4%-12%十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶电泳和银染色 (英杰公司 (Invitrogen), 卡尔斯巴德 (Carlsbad), 加利福尼亚州 (CA)) 评估载体的纯度。

[0111] 在4-6周龄之间,用3x10<sup>12</sup>vg的scAAV9.738.Mecp2或scAAV9对照载体静脉内治疗具有Mecp2无效等位基因的雄性小鼠。跟踪动物的存活并且每周评估表型评分 [Guy等人, Science [科学], 315:1143-1147 (2007)]。

[0112] 来自Guy等人,2007的表型评分的组分。

[0113] A. 活动性:当放置在工作台上时,然后轻轻处理,观察小鼠。0=为野生型。1=与野

生型相比时,减少的运动:当首先放置在工作台上时延长的不动期,并且更长时期保持不动。2=当放置在工作台上时,无自发运动;小鼠不能响应温和刺激或附近放置的食物小球而运动。(注释:当处于小鼠自己的笼子环境中时,小鼠可能变得更活跃。)

[0114] B.步态:0=为野生型。1=当用减少的骨盆升高行走或跑动时,与野生型相比,后肢活动范围更广,导致“蹒跚步态”步态。2=更严重的异常:当足抬起时震颤,向后行走,或由于同时抬起两只后足,“像兔子一样跳”。

[0115] C.后肢抱握:当通过抓住尾根悬垂时观察小鼠。0=腿向外张开。1=后肢彼此相向拉伸(不接触),或一条腿缩回身体内。2=两条腿都紧紧拉动,彼此接触或接触身体。

[0116] D.震颤:当站立在平放手掌上时观察小鼠。0=未震颤。1=间歇的温和震颤。2\*=连续的震颤或间歇的猛烈震颤

[0117] E.呼吸:当动物仍站立时观察肋部的运动。0=正常呼吸。1=均匀呼吸期,间隔有短期的更快速呼吸或呼吸暂停。2\*=非常不均匀的呼吸-喘息或喘呼吸。

[0118] F.一般条件:针对一般健康情况的指标,例如皮毛条件、眼睛、身体姿态,观察小鼠。0=清洁发亮的皮毛、清澈的眼睛、正常姿态。1=眼睛呆滞,皮毛无光泽/凌乱,在某种程度上缩成一团。2\*=眼睛结壳或变小,立毛,缩成一团。

[0119] 图4示出,在实验时间期间,用scAAV9.738.Mecp2治疗的组并未达到中位存活期,但是与对照治疗的动物相比,在公开时,超出了多于10周。与对照治疗的动物相比,用scAAV9.738.Mecp2治疗的动物还具有更低的行为评分。用受影响的雌性小鼠重复该实验(图5)。与先前用雄性小鼠一样,用scAAV9.738.Mecp2或对照静脉内(IV)治疗动物。在10-12月龄之间,当瑞特小鼠有症状时,治疗雌性小鼠。在注射后,跟踪动物持续大约6个月并且测试其表型评分。重要地,雌性瑞特小鼠并不像更严重的雄性小鼠一样,不具有早期致死性[Guy等人,Nature Genetics[自然遗传学],27:322-326(2001)]。用scAAV9.738.Mecp2治疗阻止了疾病的进展,并且指示疾病严重性的逆转,具有后退至接近1的评分。这与对照治疗的动物形成鲜明对比,对照动物在结束实验时,表型评分接近6,指示症状的恶化(图5C)。与对照治疗的动物相比,来自旋转试验、翻转网栅试验、平台试验和筑巢能力的的数据均支持在用scAAV9.738.Mecp2治疗的动物中,行为改善。来自scAAV9.738.Mecp2治疗的雌性小鼠的脑的死后分析示出,MECP2表达的荧光强度测量值反映出野生型脑的样子,指示基因疗法转基因表达水平大约在生理学水平。

[0120] 实例2

[0121] AVXS-201临床前效能研究

[0122] 为了改善包装效率并且为了掺入临床相关人类MECP2 cDNA,同时维持基因表达的生理学水平,将scAAV9.738.Mecp2重新工程化,与更短启动子、人类MECP2B cDNA、和成的聚腺苷酸化信号一起。如一下描述,将重新工程化的基因组包装到AAV9衣壳中,并且将所得scAAV随后命名为“AVXS-201”(图6)。AVXS-201最初命名为“AAV9-P545-MeCP2”。

[0123] 启动子区域序列(小鼠MeCP2启动子片段)(SEQ ID NO:2)

[0124] GTGAACAACGCCAGGCTCCTCAACAGGCAACTTTGCTACTTCTACAGAAAATGATAATA  
AAGAAATGCTGGTGAAGTCAAATGCTTATCACAATGGTGAAGTACTCAGCAGGGAGGCT  
CTAATAGGCGCCAAGAGCCTAGACTTCCCTAAGCGCCAGAGTCCACAAGGGCCAGTT  
AATCCTCAACATTCAAATGCTGCCACAAAACCAGCCCCTCTGTGCCCTAGCCGCCTCT  
TTTTTCCAAGTGACAGTAGAACTCCACCAATCCGCAGCTGAATGGGGTCCGCCTTTTT  
CCCTGCCTAAACAGACAGGAACTCCTGCCAATTGAGGGCGTCACCGCTAAGGCTCCGC  
CCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGTGGG  
GCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGAGGGCGGGGCGCGAC  
GTCTGCCGTGCGGGTCCCAGCATCGGTTGCGCGCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGA  
GGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGAAAAC

[0125] 编码区序列(人类MeCP2B cds) (SEQ ID NO:3)

ATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGGCGAGGAGG  
AGAGACTGGAAGAAAAGTCAAGAACAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCT  
CAAGTTTAAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCC  
GTGCAGCCATCAGCCCACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACA  
TCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCAAACAG  
CGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCACCCCTGCCTGAAG  
GCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAAGTATGATGT  
GTATTTGATCAATCCCAGGGAAAAGCCTTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACT  
TCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGG  
AGAGGGAGCCCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAA  
GCTCCAGGAACTGGCAGAGGCCGGGGACGCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACC  
CAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTGG  
GAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACCTTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGGGT  
GGGGCCACCACATCCACCCAGGTGATGGTATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCGAAAA  
GCTGAGGCCGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTG  
GTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGA  
TCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAGC  
ATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGC  
GGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAAGCAAGGAGAGCAGCCCC  
AAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCAAGAAGGAGCACCACCACCATCAC  
CACCCTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCACCTC  
CACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCACAGCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGA  
GCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAGCGACG  
GCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCG  
CAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGACATTGTTTCATCCTCCAT  
GCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGACCGAGAGAGT  
TAGCTGA

[0127] 聚A序列(合成的) (SEQ ID NO:4)

[0128] AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG

[0129] 在293细胞中,使用基于双链AAV2- ITR的载体,与编码如先前描述的Rep2Cap9序列的质粒一起[Gao等人,同上],连同腺病毒辅助质粒pHelper (斯特吉公司,圣克拉拉,加利福尼亚州),通过瞬时转染程序,产生scAAV9。分三个独立批次产生病毒用于实验,并且通过两个氯化铯密度梯度纯化步骤进行纯化,针对PBS进行透析,并且用0.001%Pluronic (普朗尼克)-F68进行配制从而防止病毒聚集并且储存在4°C。使用Taq-Man技术,通过定量PCR确定所有载体制剂的效价。通过4%-12%十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶电泳和银染色(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)评估载体的纯度。

[0130] 在与图4中相同品系的瑞特小鼠中进行效能和给药研究。由于效价确定方法的改善,并未比较实例1和实例2之间的剂量。实例1中的实验使用了病毒制剂的视觉效价确定,而实例2和其下内容中的研究使用了更准确的微滴式数字PCR效价。为了模拟提出的鞘内给予的临床递送途径,在出生后1天幼崽中,按侧脑室内(ICV)进行这些注射。选择鞘内递送来将AVXS-201直接递送至神经系统,那里是瑞特综合征的关键作用部位。针对幼崽的自然生活跟踪它们,并且评估其存活、复合表型评分、旷场和旋转试验行为。关于两个对数剂量范围的存活数据示出在图7中。图7中示出的结果证明,用于本发明的治疗方法的载体和技术的组合实现了改善的结果。与对照治疗的Mecp2<sup>y/-</sup>小鼠相比,所有测试的剂量均延长了中位存活期,其中与对照治疗的瑞特小鼠的93天相比,观察到的最大个体存活期达到了500天(进行中)。用 $1.44 \times 10^{10}$ vg/动物的中等剂量实现了最高中位寿命(315d)。数据示出了钟形剂量反应(图7B),这将本文实现的结果与先前观察到的不当MECP2剂量(基因拷贝数)区别开[参见例如Lombardi等人,The Journal of Clinical Investigation[临床研究杂志],125:2914-2923(2015)]。重要地,即使按测试的最高剂量,相对于对照治疗,AVXS-201治疗并未缩短Mecp2<sup>y/-</sup>小鼠的存活期。

[0131] 除了存活期,针对瑞特表型(先前实例列出的表型),每周对治疗的和对照的小鼠进行评分。在10周龄时,未治疗的雄性小鼠快速从0的评分进展至5.25的平均峰值(图8)。相反,在17周龄时,所有治疗组的表型评分仅达到约2的评分,除了 $5.56 \times 10^{10}$ v组在第18周时达到了5的评分。还在旷场和旋转试验中评估了治疗的和对照的动物(图9)。减少的自发运动是瑞特雄性小鼠的症状。在各组到2-3月龄时,进行旷场分析来评估自发运动和速度。与野生型小鼠相比,在总爬行距离方面,受影响动物具有接近43%的减少。与对照治疗的Mecp2敲除雄性小鼠相比,用AVXS-201治疗的组,所有组,除了其中两个组,均注意到爬行距离方面的显著增加。与对照治疗的敲除小鼠相比,速度也显著改善。这些结果示出,雄性瑞特小鼠模型的AVXS-201治疗改善了探究行为和移动。在3月龄时,测试了治疗的和对照的动物在旋转试验中的表现,它是运动协调的量度。连续3天测试动物,并且跨越天数和剂量将评分平均。所得数据示出于图9C中。于对照治疗的野生型同窝仔畜相比,在旋转试验中,对照治疗的Mecp2<sup>y/-</sup>小鼠表现显著更差。在 $7.00 \times 10^9$ 和 $1.44 \times 10^{10}$ vg组中,与对照治疗相比,旋转试验表现显著改善。

[0132] 实例3

[0133] 在经治疗的瑞特小鼠脑中,MECP2蛋白的AVXS-201表达

[0134] 在注射后3周时,将PBS治疗的雄性野生型动物、未治疗的瑞特动物和载体治疗的动物处死,从而在产后第1天的AVXS-201的ICV注射后,检查脑中的MECP2蛋白水平。将一个

脑半球匀浆并且进行蛋白质印迹,从而监测MECP2表达。代表性印记和量化示出在图10中。在归一化至PBS治疗的野生型脑后,敲除的和 $1.75 \times 10^9$ vg AVXS-201剂量的组不具有可检测水平的MECP2。用 $3.50 \times 10^9$ vg和 $7.00 \times 10^9$ vg治疗产生了可检测的MECP2水平,分别达到了野生型水平的大约1%和3.6%。当通过中位存活期增加测量时的最大有效剂量( $1.44 \times 10^{10}$ vg)产生了野生型MECP2水平的大约11%。通过蛋白质印迹检查的 $5.56 \times 10^{10}$ vg剂量产生了野生型的大约54%的MECP2水平,而 $1.13 \times 10^{11}$ 达到了多于2x的野生型水平。这些数据示出,遍布脑的蛋白表达水平和分布是预测MECP2基因疗法的有效性的关键因素。

#### [0135] 实例4

[0136] 用AVXS-201治疗野生型小鼠是安全和良好耐受的

[0137] MECP2替补疗法的重要关注点是评估对表达完整拷贝的MECP2的细胞的影响。在脑中的这个考虑因素下设计AVXS-201,通过将鼠Mecp2启动子的片段并入,从而支持MECP2转基因的生理学调节。为了测试AVXS-201的安全性,正如在雄性瑞特小鼠中一样,对接受AVXS-201的P1 ICV注射的野生型小鼠的组进行存活和行为分析。

[0138] 用不同ICV剂量的AVXS-201治疗总计131只野生型雄性小鼠,并且跟踪存活(图11)。在靶治疗剂量( $1.44 \times 10^{10}$ vg)下未记录到死亡,其中21只治疗的动物一直活到P342。在PBS治疗的组中未记录到死亡,并且在 $3.50 \times 10^9$ 、 $2.78 \times 10^{10}$ 和 $1.13 \times 10^{11}$ vg治疗的组中,各自记录到一只死亡。使用来自框1中的标准对行为评分,示出载体治疗组大部分具有<1的平均表型评分。仅在两个最高剂量组( $5.56 \times 10^{10}$ 和 $1.13 \times 10^{11}$ vg)中,注意到>1的平均总评分。在2-3月龄时的旷场测试示出,在载体和PBS治疗的野生型雄性小鼠之间,没有显著差异(图12)。有趣的是,在三个月龄时,与对照治疗的野生型小鼠相比,在 $1.13 \times 10^{11}$ vg组中检测到旋转试验表现显著增加。这些数据暗示,在更高AVXS-201剂量下,MECP2过表达的毒性作用。总之,这些数据指示,AVXS-201治疗的“最坏情况情景”仅是转导了野生型细胞,在靶治疗剂量下,仅对动物存活和行为具有最小影响。

#### [0139] 实例5

[0140] 用治疗剂量的AVXS-201治疗的野生型小鼠的脑中维持了MECP2的生理学水平

[0141] 为了进一步研究与有症状MECP2过表达关联的水平,在 $1.44 \times 10^{10}$ vg的治疗靶下,或在测试的最高剂量 $1.13 \times 10^{11}$ vg下,野生型雄性小鼠接受PBS或AVXS-201的P1 ICV注射。在注射后3周时处死动物,并且收集脑用于蛋白质印迹。为了比较,将来自MECP2过表达的小鼠模型的组织印迹在其脑旁边,称为Tg3。将脑切割成分开的区域(Cb=小脑,Med=延髓,Hipp=海马体,Ctx=皮质,并且Mid=中脑;图13),并且将单个区域匀浆用于印迹。将数据归一化至PBS治疗的野生型脑中的MECP2水平。跨越检查的所有区域,用靶治疗剂量( $1.44 \times 10^{10}$ vg)治疗具有1和1.5x野生型组织之间的MECP2水平。最高剂量( $1.13 \times 10^{11}$ vg)范围是从1.31-2.56x野生型水平,但是并未达到Tg3组织的2.31-3.93x水平。这些数据,连同更早示出的行为和存活数据,给出了以下信心:当按靶剂量给予时,AVXS-201按接近生理学水平表达蛋白。重要地,治疗给药剂量未接近与MECP2重复综合征关联的2x蛋白水平。这示出,使用基因疗法的MECP2替补方法的安全性。

#### [0142] 实例6

[0143] 鞘内注射AVXS-201后18个月,在非人类灵长动物中,体重、血液学和血清化学是不显著的

[0144] 为了研究AVXS-201及其相关鞘内注射程序的安全性和耐受性,在注射后,跟踪了3只经治疗的雄性食蟹猴18个月。给药参数示出在表2中。

| 表 2      | 动物 ID | 总病毒基因组 (vg)          | 注射时的体重 (kg) | 载体基因组/体重 (vg/kg)     | Tx 后持续时间 |
|----------|-------|----------------------|-------------|----------------------|----------|
| 血液学和血清化学 | 15C34 | $6.0 \times 10^{12}$ | 1.23        | $4.9 \times 10^{12}$ | 18 个月    |
|          | 15C40 | $1.4 \times 10^{13}$ | 1.79        | $7.8 \times 10^{12}$ | 18 个月    |
|          | 15C48 | $1.4 \times 10^{13}$ | 1.83        | $7.7 \times 10^{12}$ | 18 个月    |
| MECP2 表达 | 15C38 | $1.3 \times 10^{13}$ | 1.68        | $7.7 \times 10^{12}$ | 6 周      |
|          | 15C49 | $1.0 \times 10^{13}$ | 1.30        | $7.7 \times 10^{12}$ | 6 周      |

[0146] 按目的治疗剂量(以每kg的体重基础,大约 $1.44 \times 10^9$ vg当量)治疗两只动物,并且一只动物接受低大约2倍的剂量(以每kg的体重基础,大约 $7.00 \times 10^8$ vg当量)。先前在Meyer等人,Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy[分子疗法:美国基因疗法学会杂志],23:477-487(2015)中描述了鞘内注射程序。简言之,将载体与造影剂混合,用于验证载体扩散。将麻醉的受试者放置在侧卧位置,并且制备在大约L4/5水平(脊髓的圆锥的下方)的后正中中线注射部位。在无菌条件下,插入具有口锥的腰椎穿刺针,并且用从该针流出的澄清CSF确认蛛网膜下套管插入术。就在注射载体溶液后,立即排出0.8ml的CSF以便减小蛛网膜下隙中的压力。注射后,将动物保持在头低脚高位,并且头向下倾斜身体持续10分钟。治疗的动物在6或12月龄给药,在注射后前6个月每月一次,并且在其后每两个月一次,收集体重、血细胞计数和血清化学。体重示出在图14中,血细胞计数示出在图15中,并且血清化学示出在图16和17中,其中绘制了来自对照动物的值,这些动物是来自曼海姆基金会的同一种群(霍姆斯特德(Homestead),佛罗里达州(FL))。总之,来自载体治疗的动物的体重、细胞计数和血清值与对照治疗的动物一致。在给定动物中,没有值实质上偏离对照值多于2个连续观察值,除了在基线,在两只载体处理的动物中,淀粉酶更高。这些数据示出,AVXS-201和鞘内注射程序是安全和良好耐受的。

#### [0147] 实例7

[0148] 在鞘内注射AVXS-201后,来自非人类灵长动物的组织的组织病理学分析

[0149] 除了体内(实例6)和死后分析(实例8),将来自动物15C38、15C49和15C34(表1)的内脏和神经系统的样品发送至GEMpath公司(朗蒙特(Longmont),科罗拉多州(CO)),进行石蜡包埋、切片以及苏木精和伊红染色。剩余动物(表8.2)仍存活,并且将发送用于研究结论下的分析。由GEMpath委员会认证的兽医病理学家读取切片并且准备报告。取样和检查的组织示出在表3中。病理学报告指出,在6周或18个月的时间点,在任何方案指定组织中,AVXS-201治疗并未诱导病变。

[0150] 表3

|        | 动物 ID          | 组织   |
|--------|----------------|--|
| [0151] | 15C38<br>15C49 | 肾上腺, 脑 (杏仁核、纹状体、海马体、枕叶皮质、颞皮质、中脑、脑干、小脑), 眼睛和视神经, 心脏, 肾脏, 肝脏, 肺, 淋巴结 (腹股沟的), 胰脏, 脊髓 (来   |
|        |                | 自颈椎、胸椎、腰椎和骶骨区域的节段; 一些节段具有附着的背根神经节), 小肠 (空肠和回肠), 骨骼肌 (膈肌、腓肠肌、股四头肌、肱三头肌、横腹肌、胫骨前肌), 脾脏, 睾丸/附睾, 胸腺, 膀胱   |
| [0152] | 15C34          | 肾上腺, 脑 (杏仁核、纹状体、海马体、下丘脑、视皮质、运动和躯体感觉皮质、联络皮质、听觉皮质、上丘和下丘、小脑、小脑深部核、桥脑和延髓), 眼睛和视神经, 心脏, 肾脏, 肝脏, 肺, 淋巴结, 胰脏, 脊髓 (来自颈椎、胸椎、腰椎和骶骨区域的节段), 小肠 (空肠和回肠), 骨骼肌 (膈肌、腓肠肌、股四头肌、肱三头肌、横腹肌、胫骨前肌), 脾脏, 睾丸/附睾, 胸腺, 膀胱 |

[0153] 实例8

[0154] 在鞘内注射AVXS-201后,在非人类灵长动物脑中,MeCP2的生理学水平

[0155] 如以上描述,两只12个月龄雄性食蟹猴接受鞘内注射 $7.7 \times 10^{12}$ vg/kg的AVXS-201。在注射后动物存活六周,并且处死以便分析MeCP2表达。通过免疫组织化学,针对总MeCP2表达,分析选择的脑区(图18)。在皮质和皮质下区域,以及注射部位近端(腰部脊髓),未检测到MeCP2的明显升高。重要地,这些数据还未示出,在来自接受AVXS-201注射的动物的组织中的任何大体异常。为了进一步检查转基因表达,将脑区匀浆,并且针对来自动物(来自同一种群)的历史对照组织,进行比较(图19)。通过蛋白质印迹,针对总MeCP2表达,分析了枕骨的颞的皮质、下丘脑、腰部脊髓、丘脑、杏仁核、海马体和小脑的样品。跨越检查的所有区域,没有区域示出高于对照 $\geq 2x$ 水平的MeCP2表达。分别在为第3脑室和侧脑室的近端的区域的下丘脑和杏仁核中,而不是小脑中,检测到了升高的MeCP2。另外,在注射部位近端的腰部脊髓并未示出升高的MeCP2水平。这些数据提示,病毒剂量和表达构建体的组合正调节MECP2表达。另外,在注射后6周和18个月进行原位杂交(ISH)来检测载体来源的转录物并且确定其在脑中的分布(图20和21)。所有在脑和脊髓中检查的区域(枕叶皮质、颞皮质、海马体、胼胝体、丘脑、尾状核、核壳、上丘、桥脑、延髓、小脑,颈部、胸部和腰部脊髓)均示出,在来自对照治疗的动物的组织中不存在的载体来源的转录物的表达。这些数据示出,针对载体来源的MECP2转录物的ISH探针的特异性,并且示出,在NHP神经系统组织中,AVXS-201启动子构建体是有功能的。这些数据示出,当经由腰椎穿刺给予时,AVXS-201广泛分布于CNS中并且以生理学水平表达。

[0156] 来自临时专利申请号62/423,618的披露内容用于瑞特综合征的基因疗法

[0157] 用于恢复转录因子MeCP2的基因疗法似乎是用于治疗瑞特综合征(一种进行性神

经发育障碍,导致明显的自闭症行为、失去运动功能和早期死亡)的可行策略。我们已经开发了腺相关病毒血清型9(AAV9),其在截短的内源启动子控制下表达人类MECP2。此工作的目的是评估此载体在小鼠(MeCP2无效和野生型)和非人类灵长动物中的效能和安全性。通过继续研究,我们的目的是使此治疗实现从科研到临床。

[0158] AAV9-P545-MeCP2

[0159] 启动子区域序列(小鼠MeCP2启动子片段)

[0160] GTGAACAACGCCAGGCTCCTCAACAGGCAACTTTGCTACTTCTACAGAAAATGATAATAAAGAAATGCTGGTGAAGTCAAATGCTTATCACAATGGTGAAGTACTCAGCAGGGAGGCTCTAATAGGCGCCAAGAGCCTAGACTTCC TTAAGCGCCAGAGTCCACAAGGGCCAGTTAATCCTCAACATTCAAATGCTGCCACAAAACCAGCCCCTCTGTGCC CTAGCCGCTCTTTTTTCCAAGTGACAGTAGAACTCCACCAATCCGCAGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGC CTAAACAGACAGGAAGTCTGCCAATTGAGGGCGTACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATG AAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGTGGGGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGAGGGC GGGGCGCGACGTCTGCCGTGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGT AAAACCCGTCCGAAAAC

[0161] 编码区序列(人类MeCP2B cds)

[0162] ATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGACTGGAAGAA AAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAAACCCCTCAAGTTAAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAAAGA AGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCCACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAG AGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGAAAGCTTCTGCCTCCCCAAACAGCGGGCTCCATCATC CGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCACCCCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGG CCGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTGATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTG CGTACTTCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGCCCC TCCCGGCAGAGCAGAAAACCACTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGGCCGGGGACGCCC CAAAGGGAGCGCACCACGAGACCAAGGCGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCTGGAGAAAAGTC CTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACCTTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGGGTGGGGCCACCACATCC ACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCGGAGGAAAGCGAAAAGCTGAGGCCGACCCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACG GGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCC GATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTG GTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAA AAGCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCTCCTCACCCCCAAGAAGGAGCACCACCACCATCACC ACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCACCTCCACCTGAGCCCAGAGCTCC GAGGACCCCACCAGCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCAGAGGAGG CTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGAG AAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGACATTGTTTCATCTCCATGCCAAGGCCAAAACAGAGAGGAG CCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCTGA

[0163] 聚A序列(合成的)

[0164] AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG

[0165] 尽管已经以不同实施例和实例的形式描述了本发明,但是应理解,本领域技术人员将能想到其变化和改善。因此,仅权利要求书中出现的此类限制应置于本发明上。

[0166] 本文引用的所有文件通过引用整体并入。

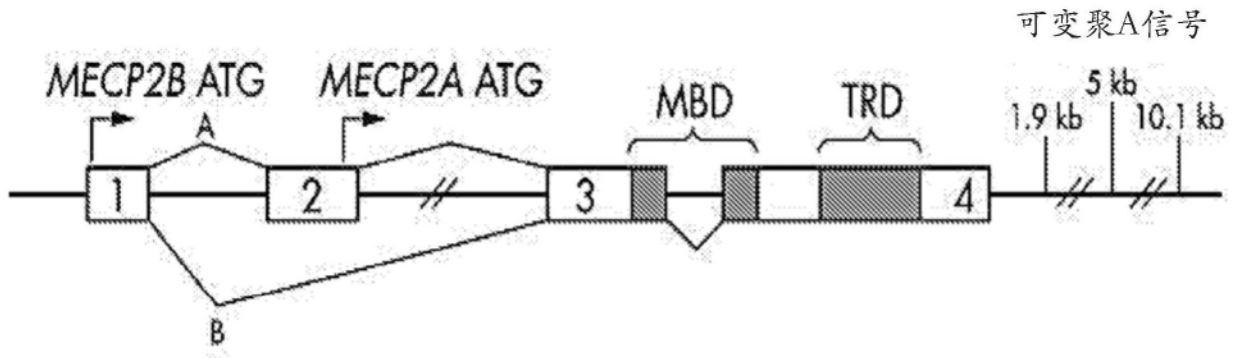


图1

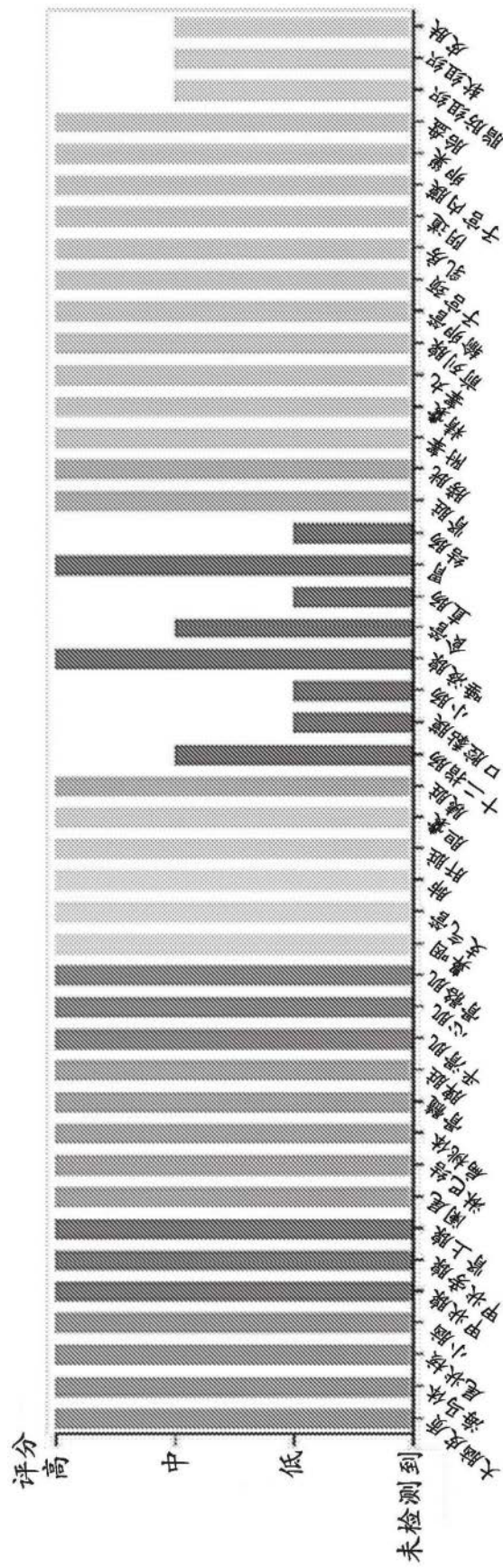


图2

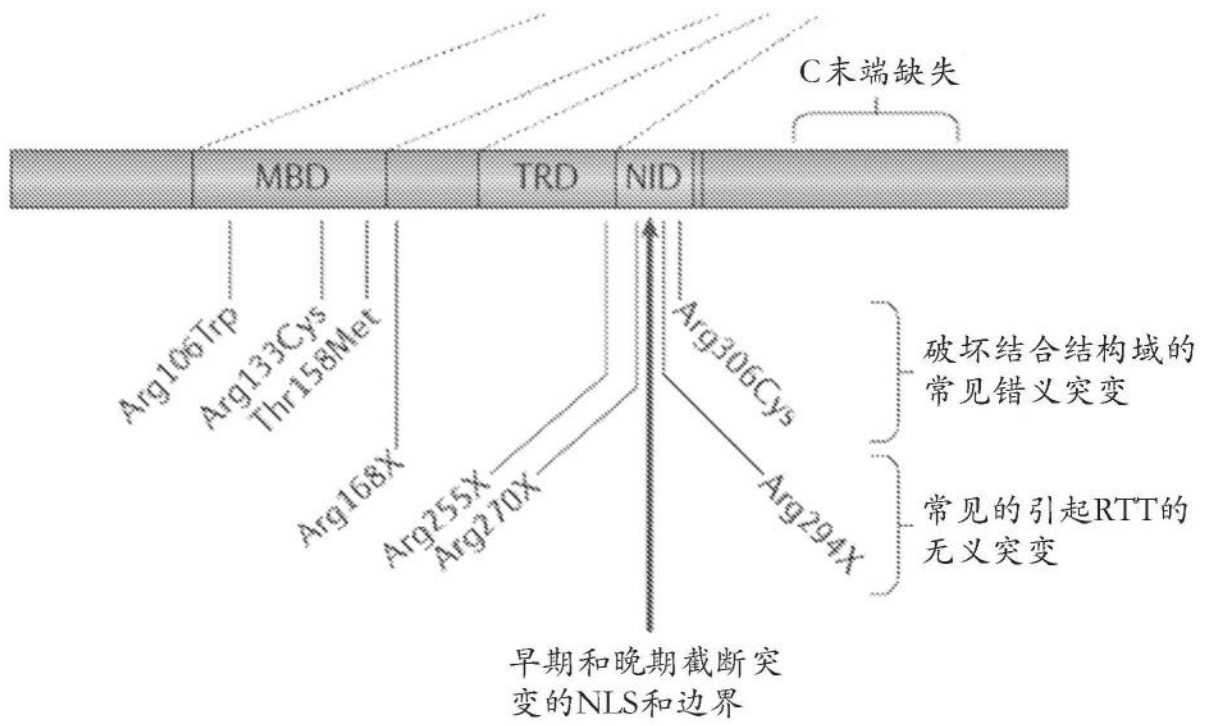


图3

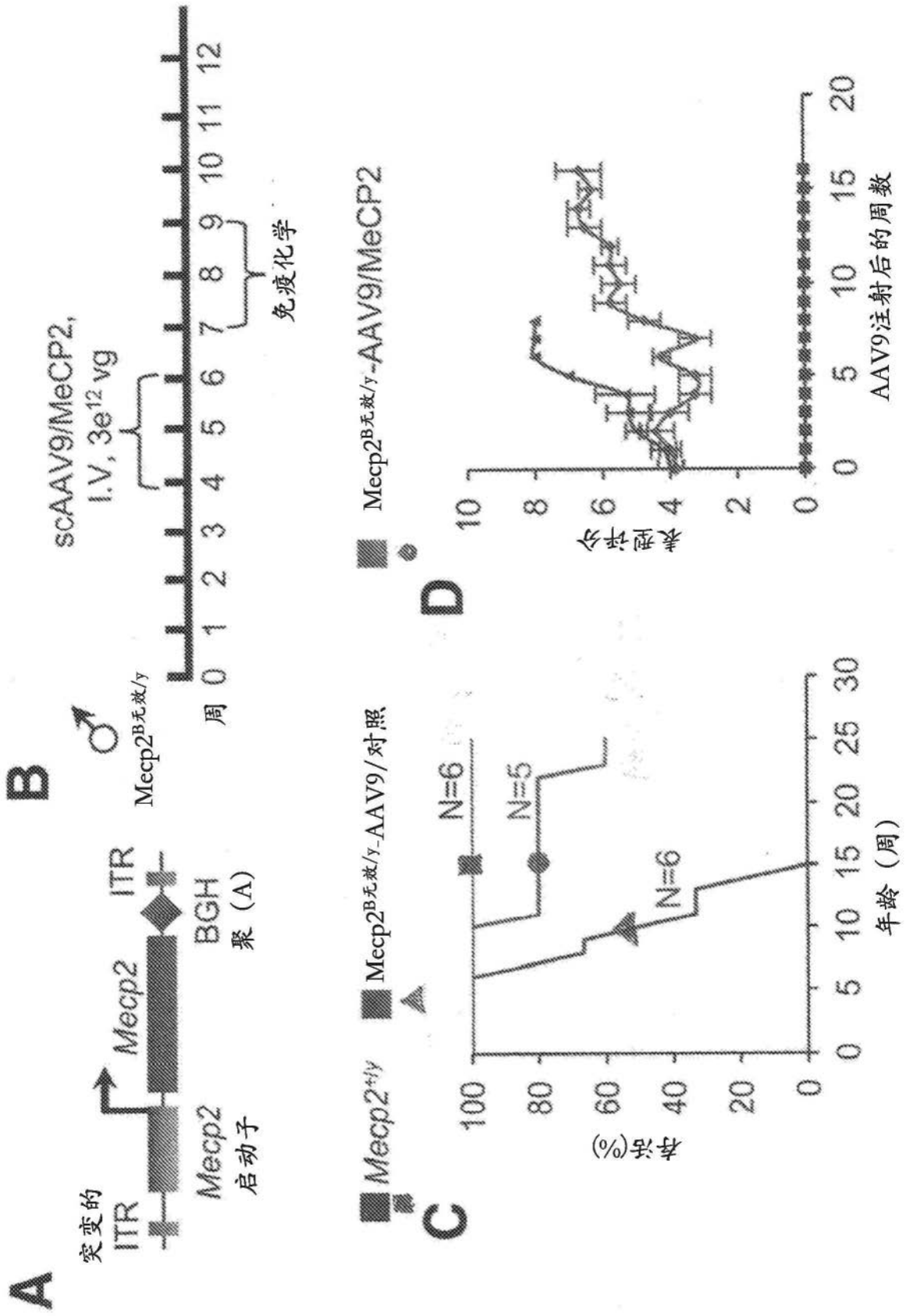


图4

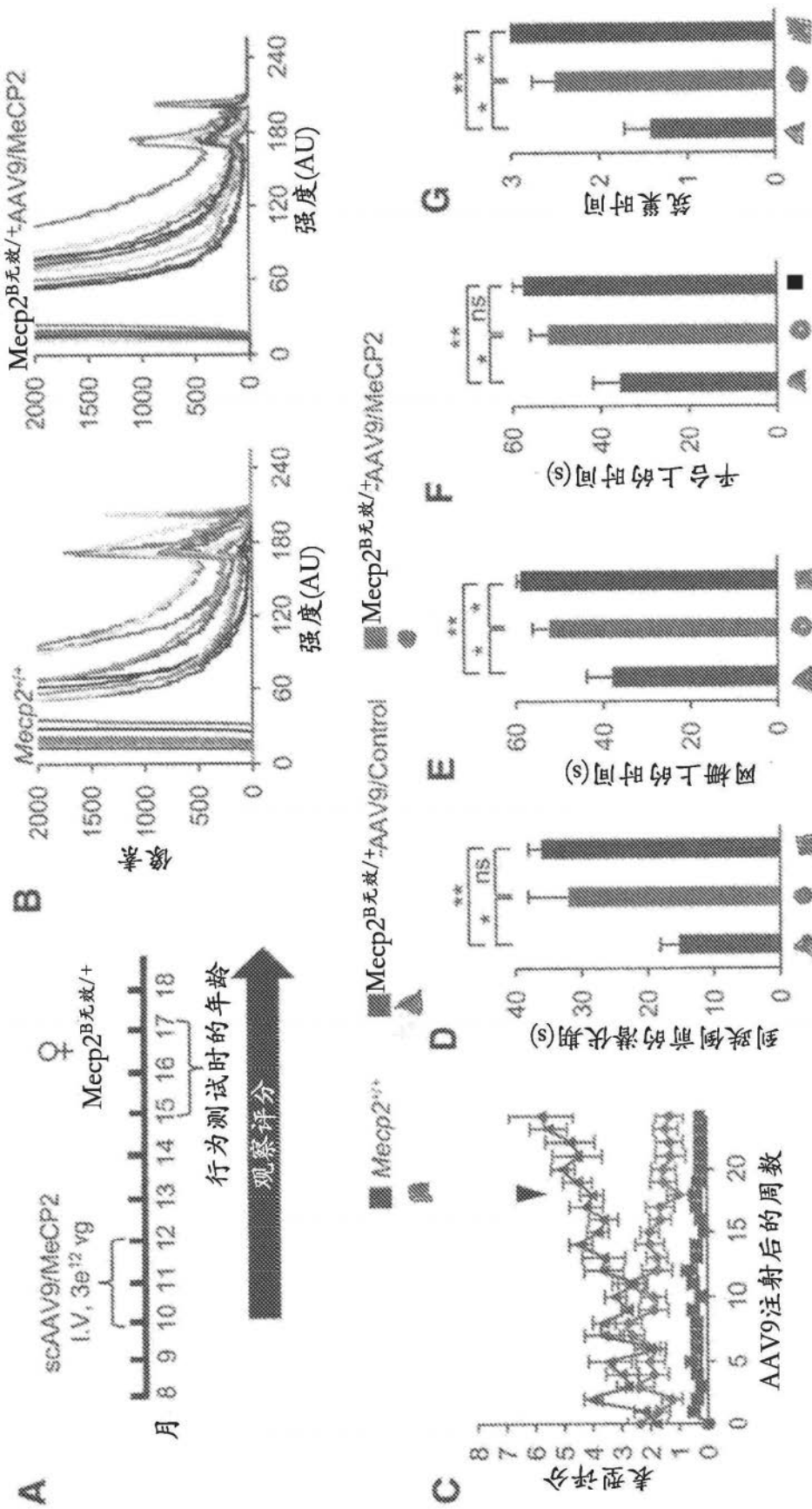


图5

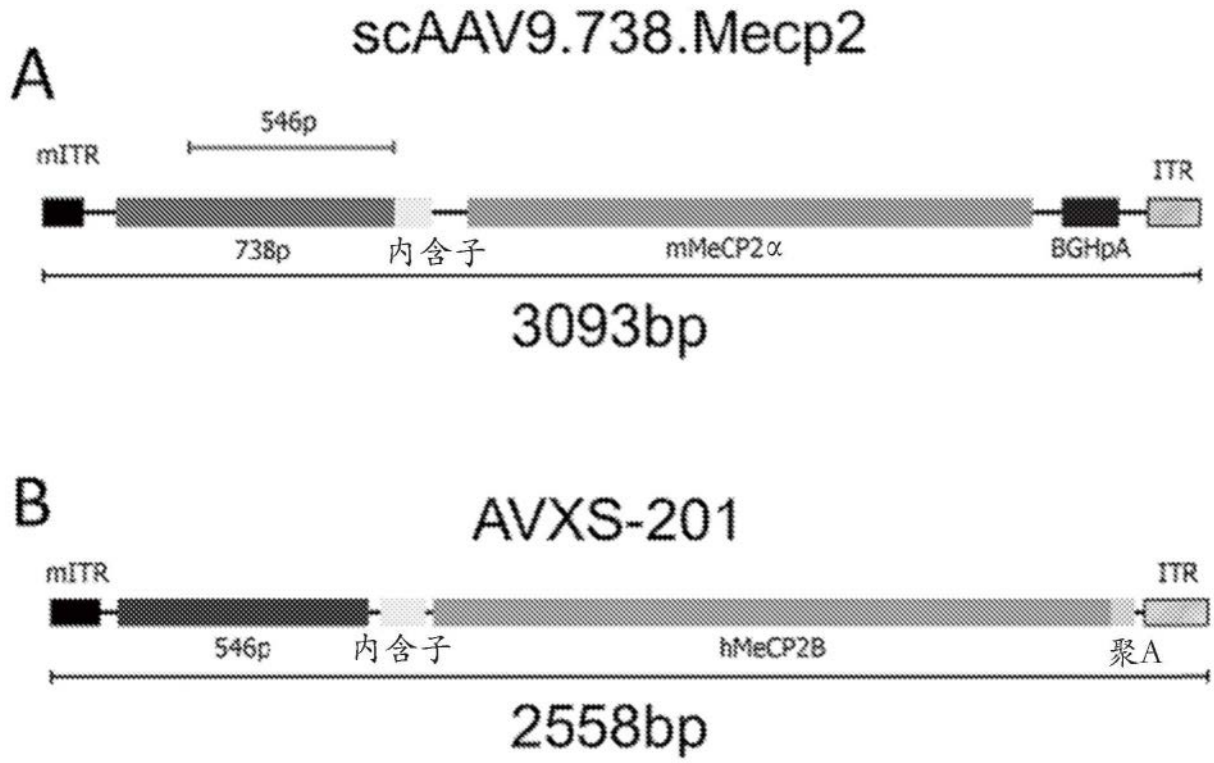


图6

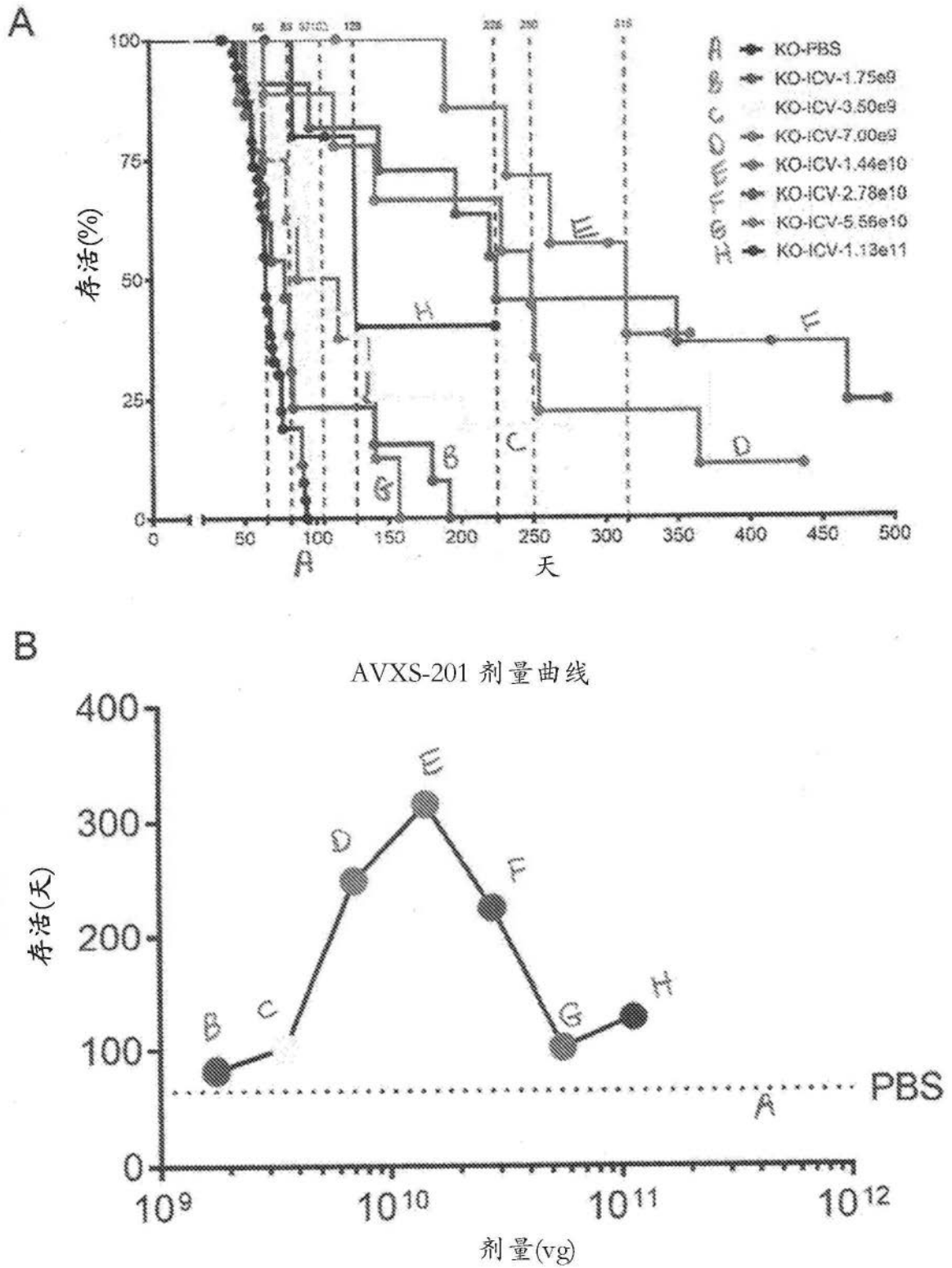


图7

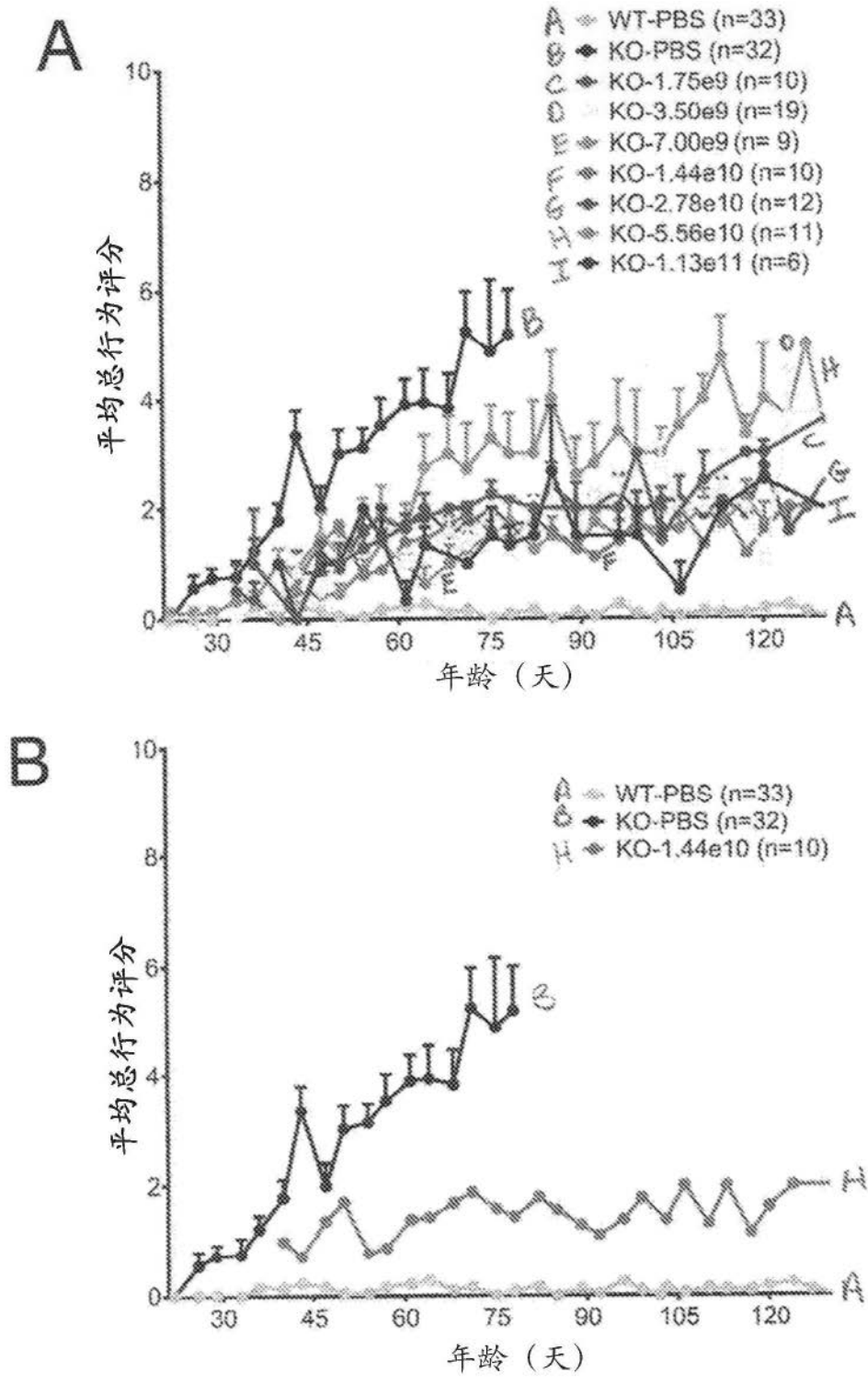


图8

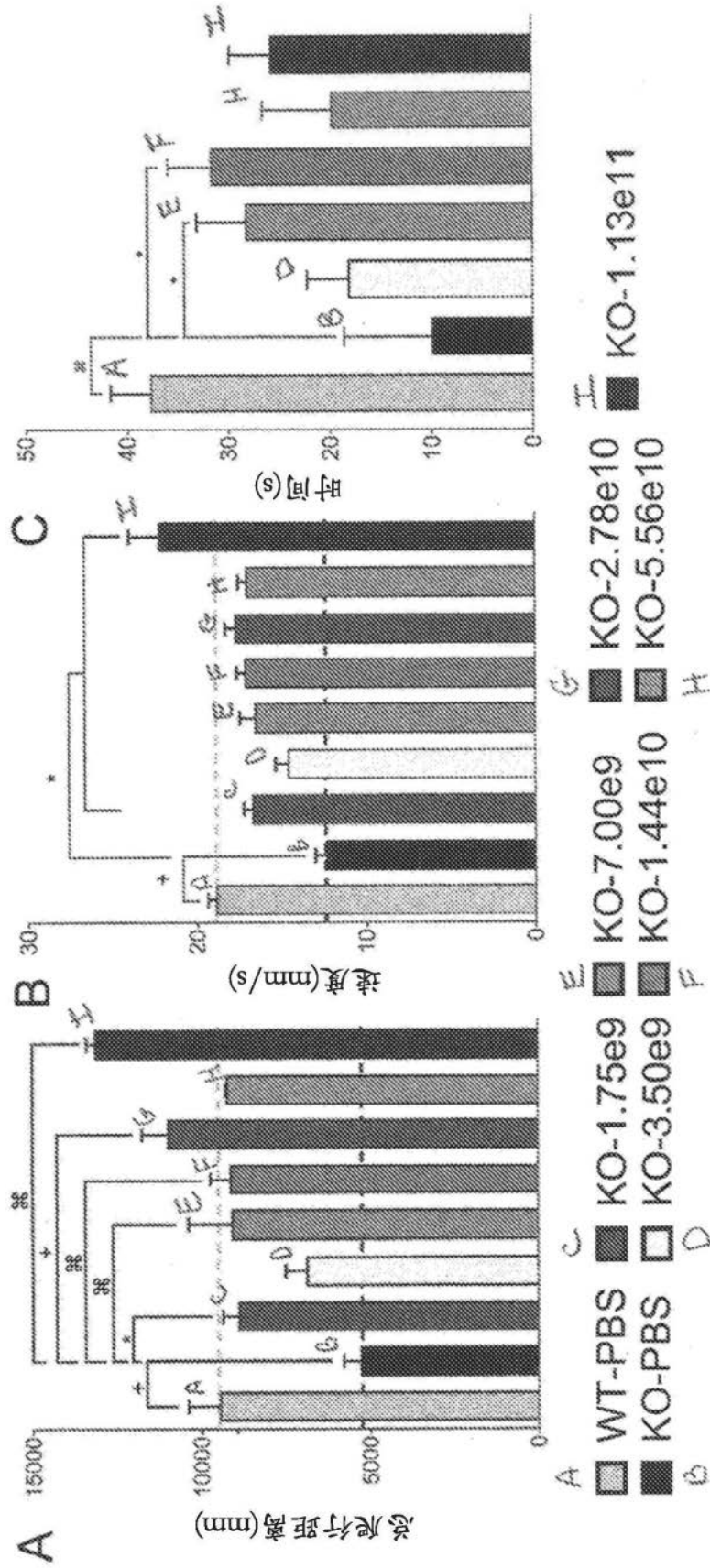
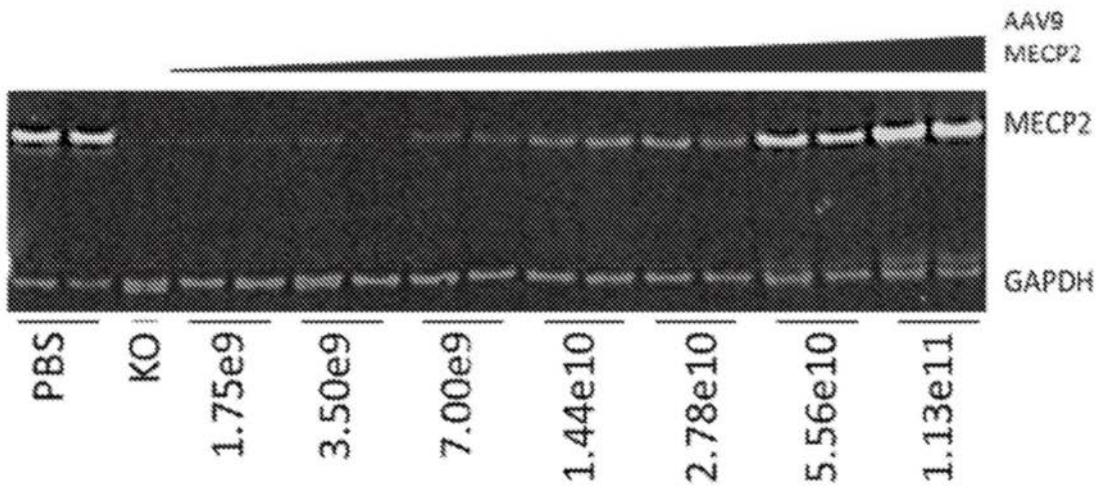


图9

A



B

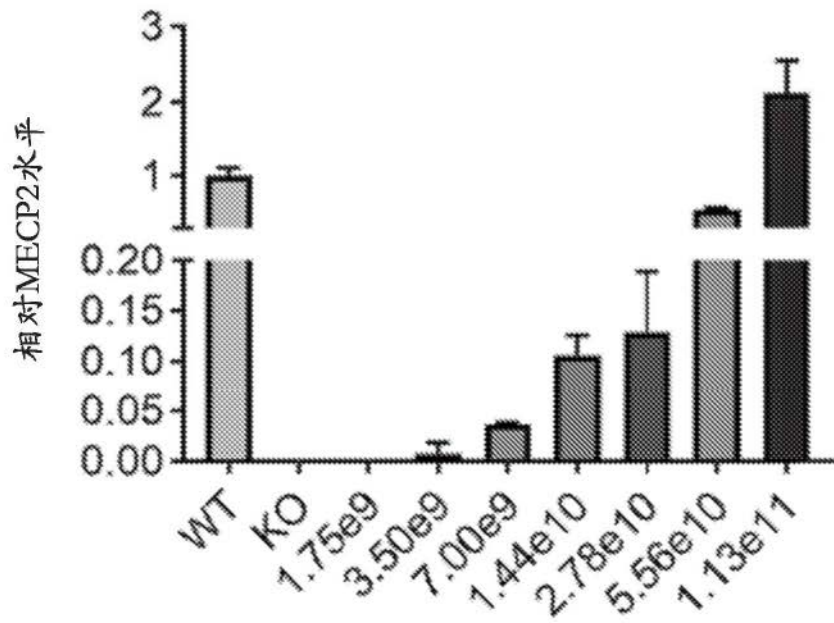


图10

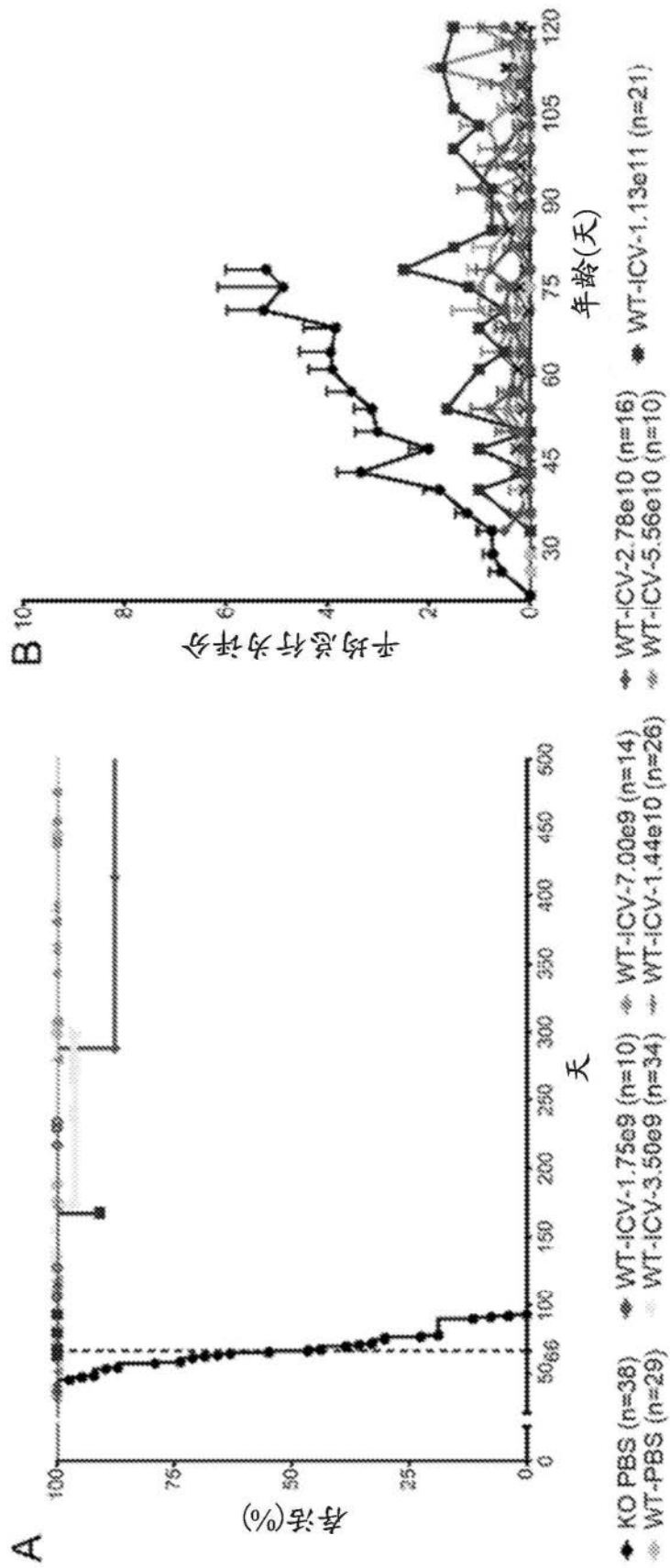


图11

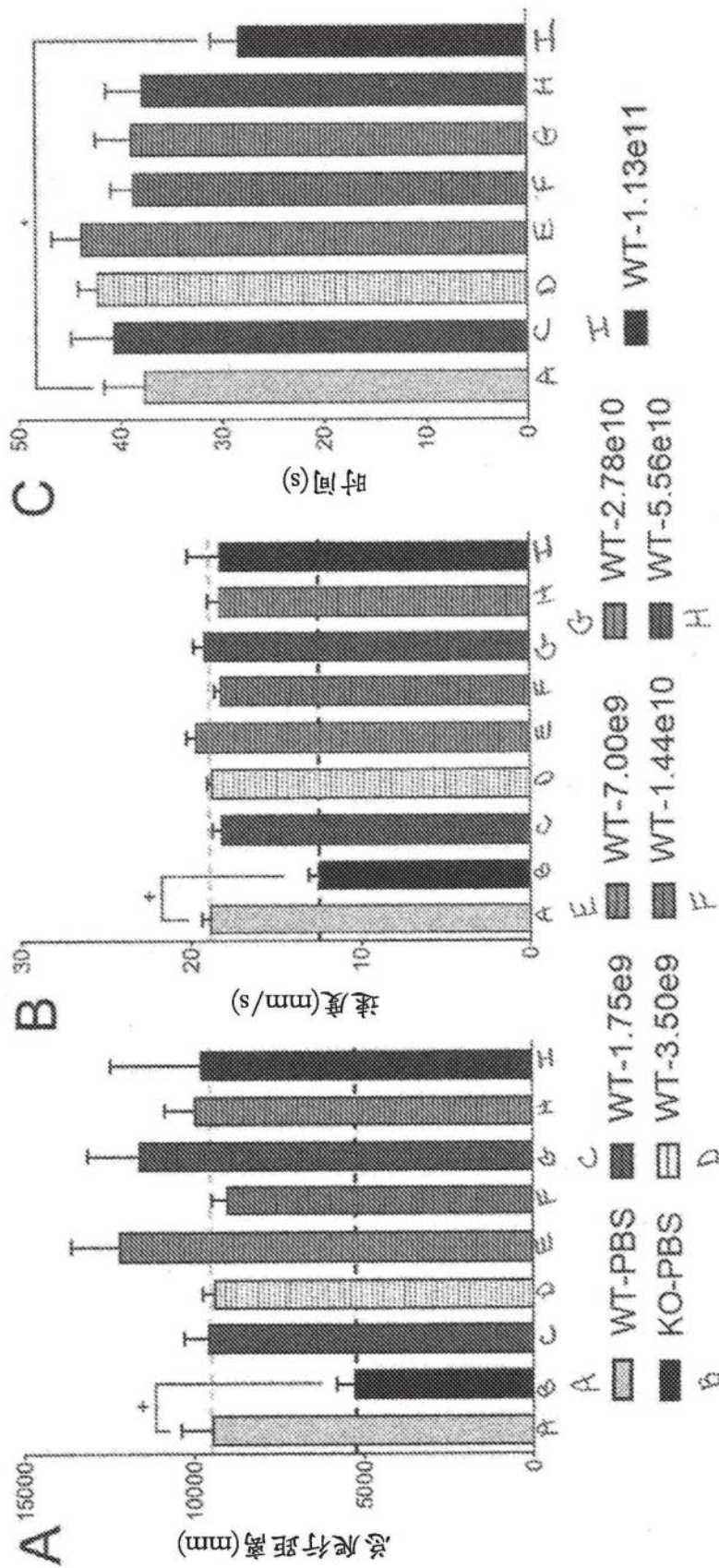


图12

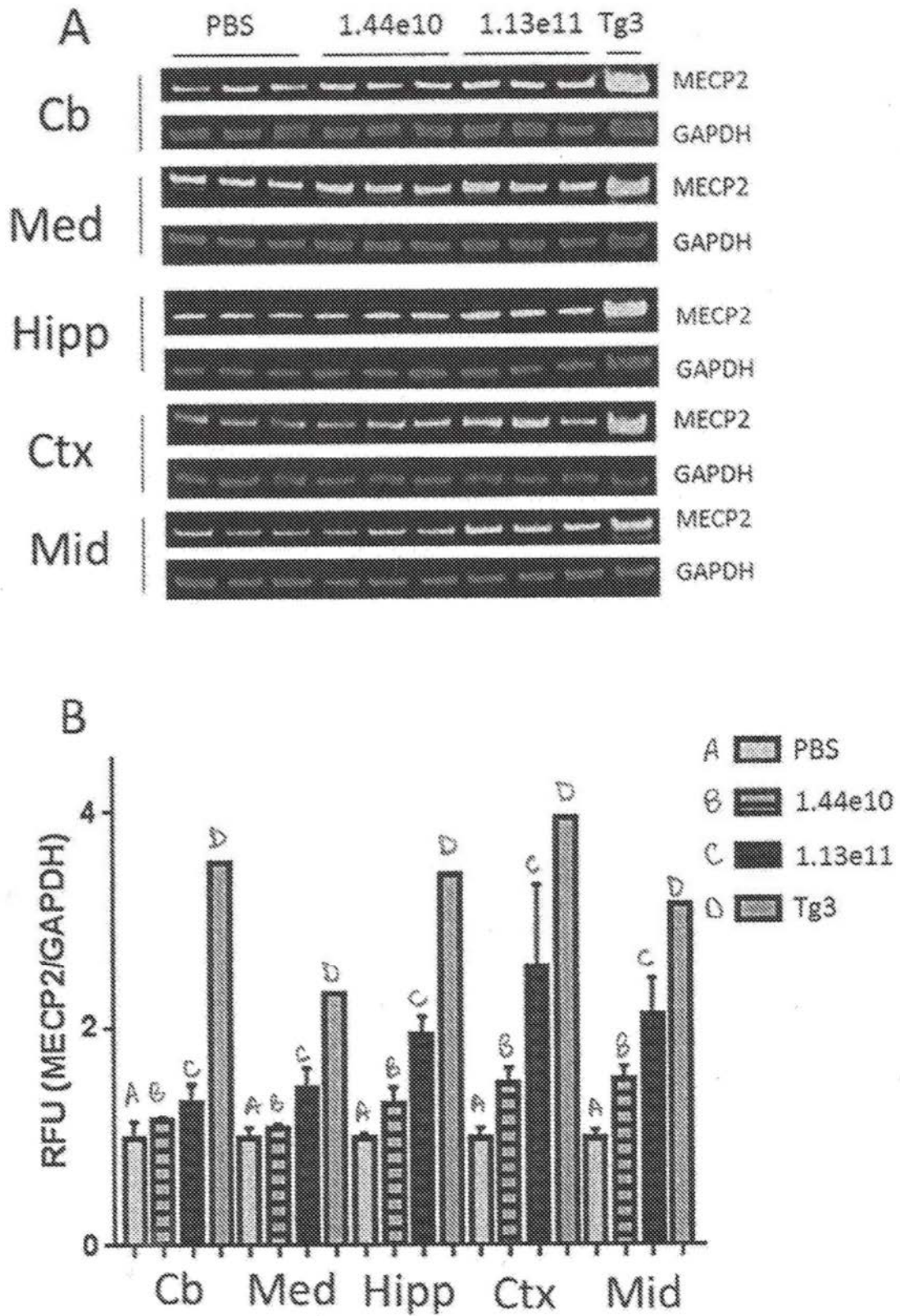


图13

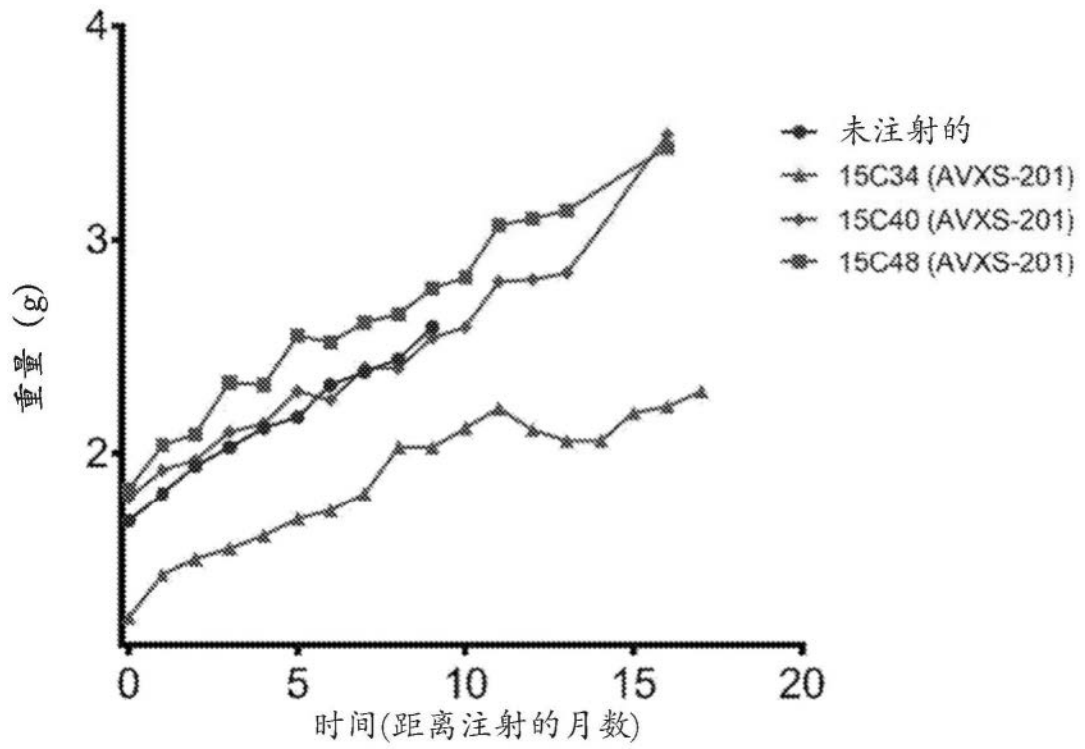


图14

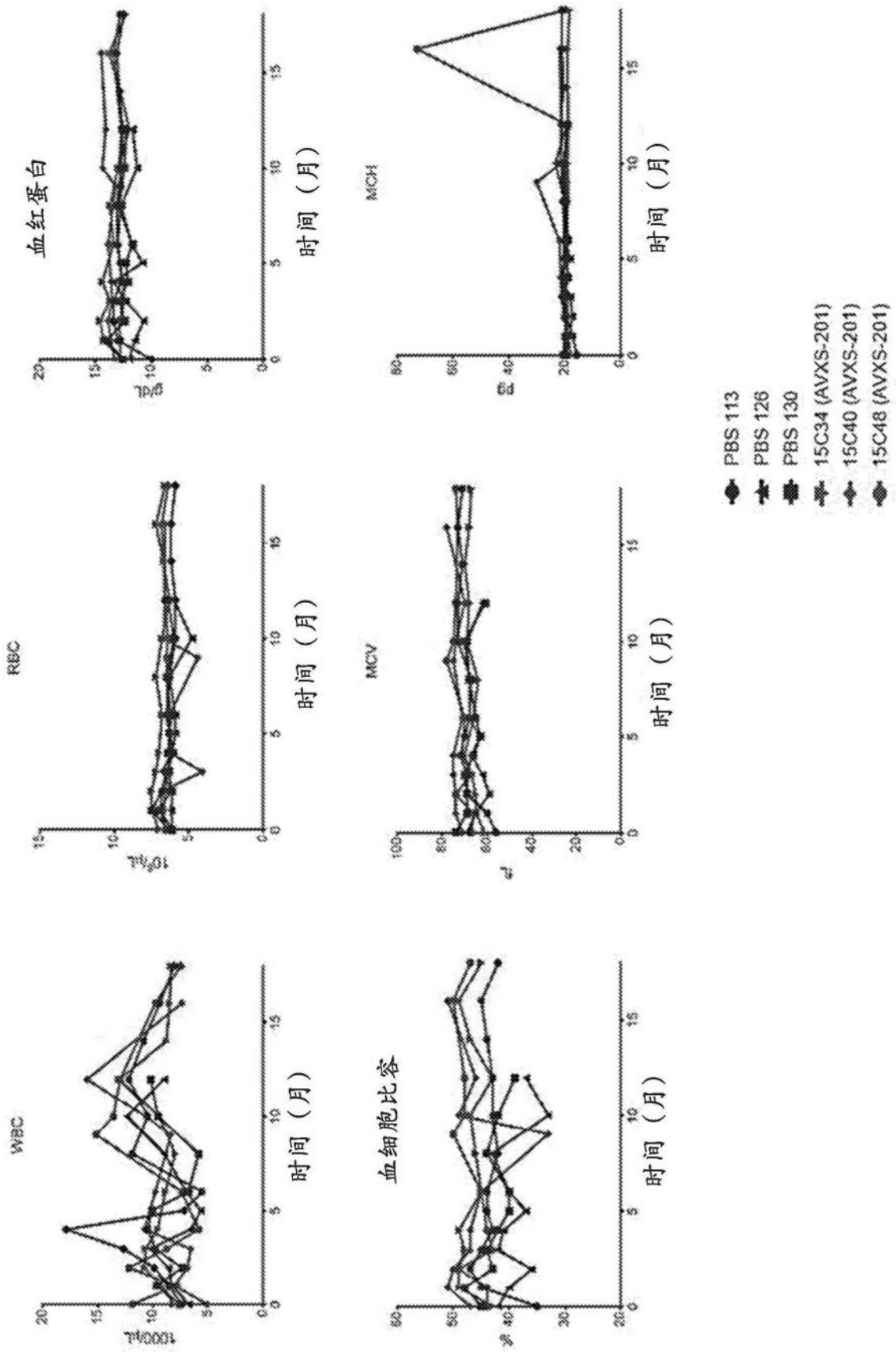


图15

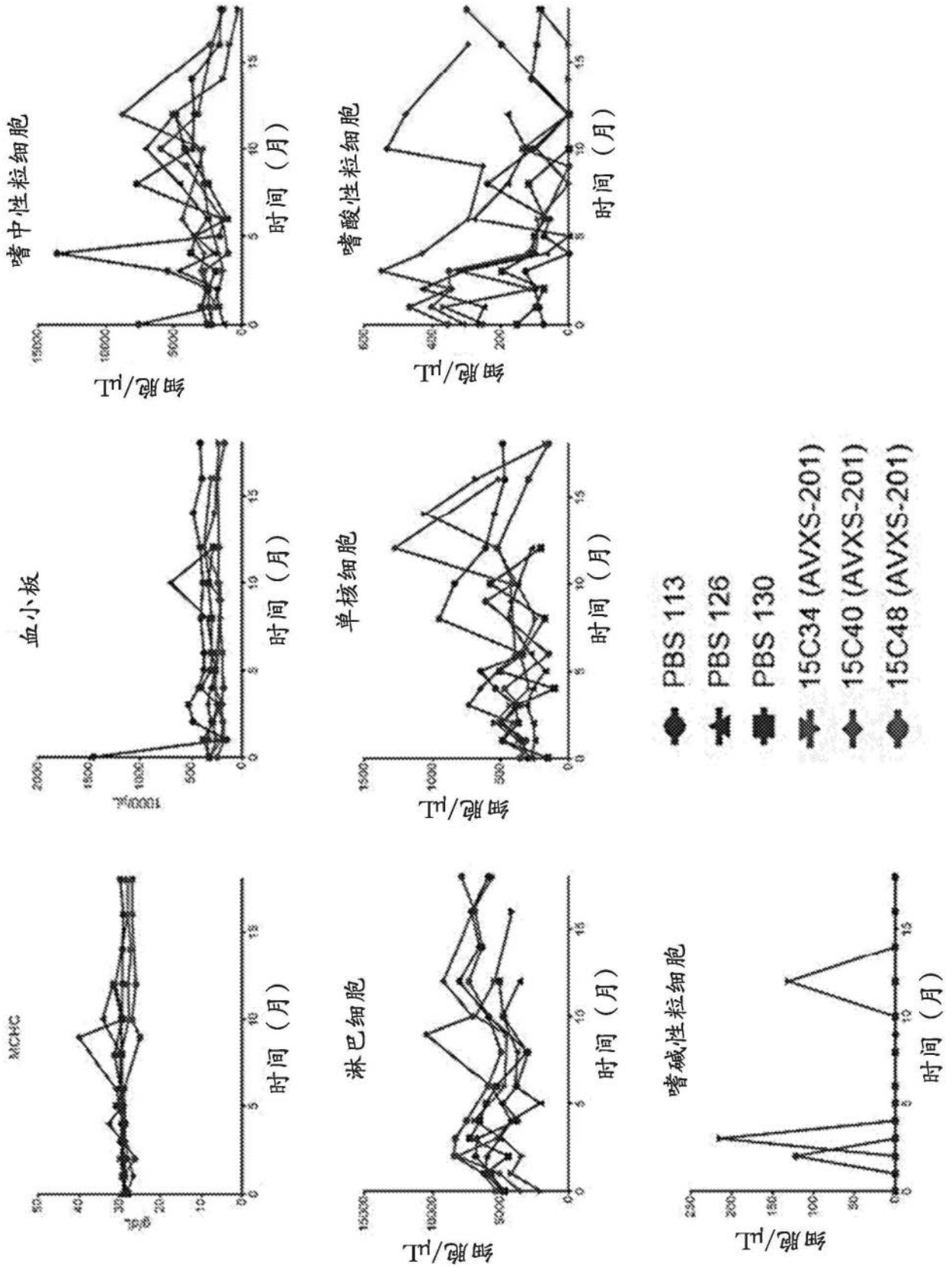


图15续

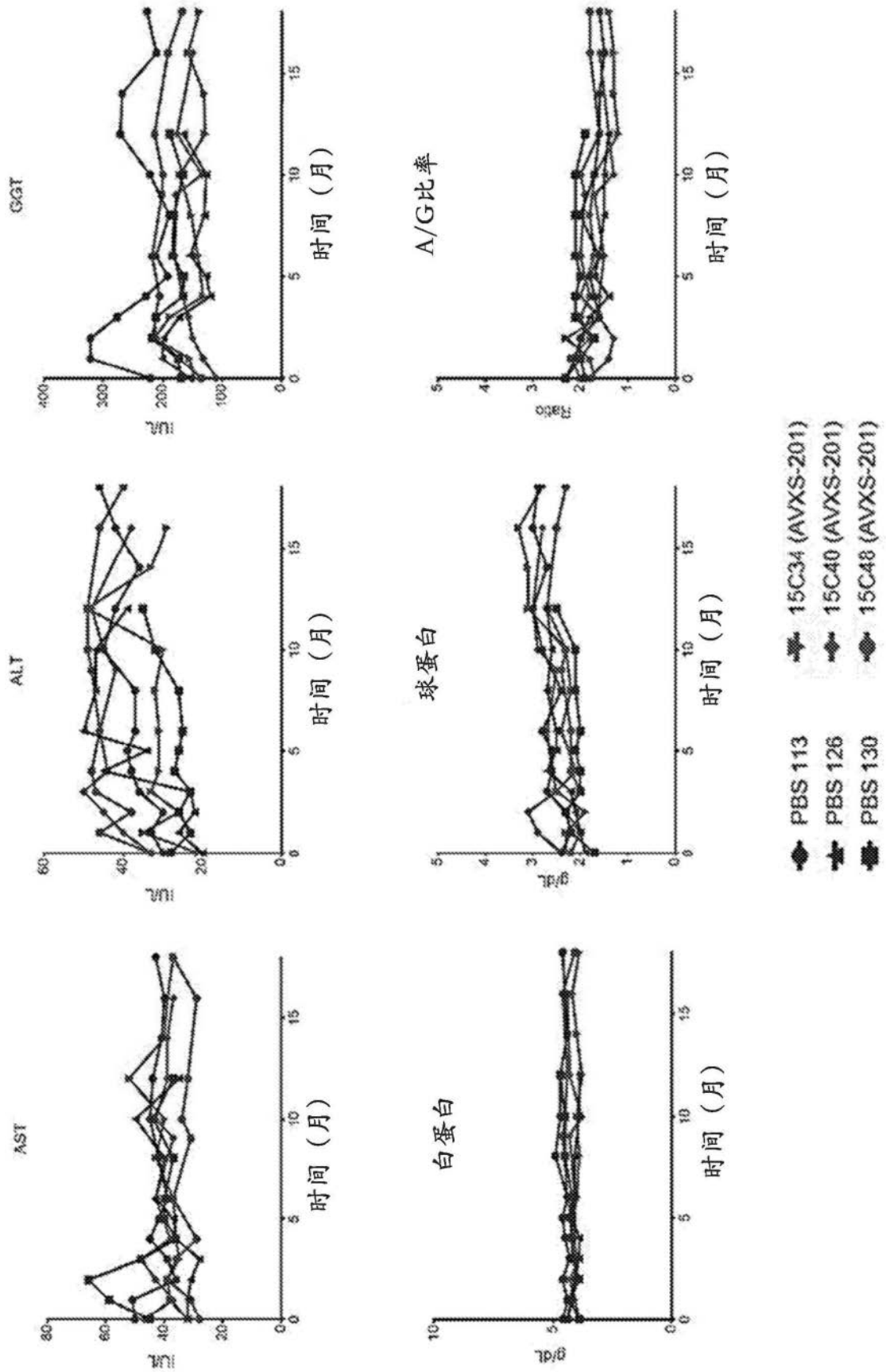


图16

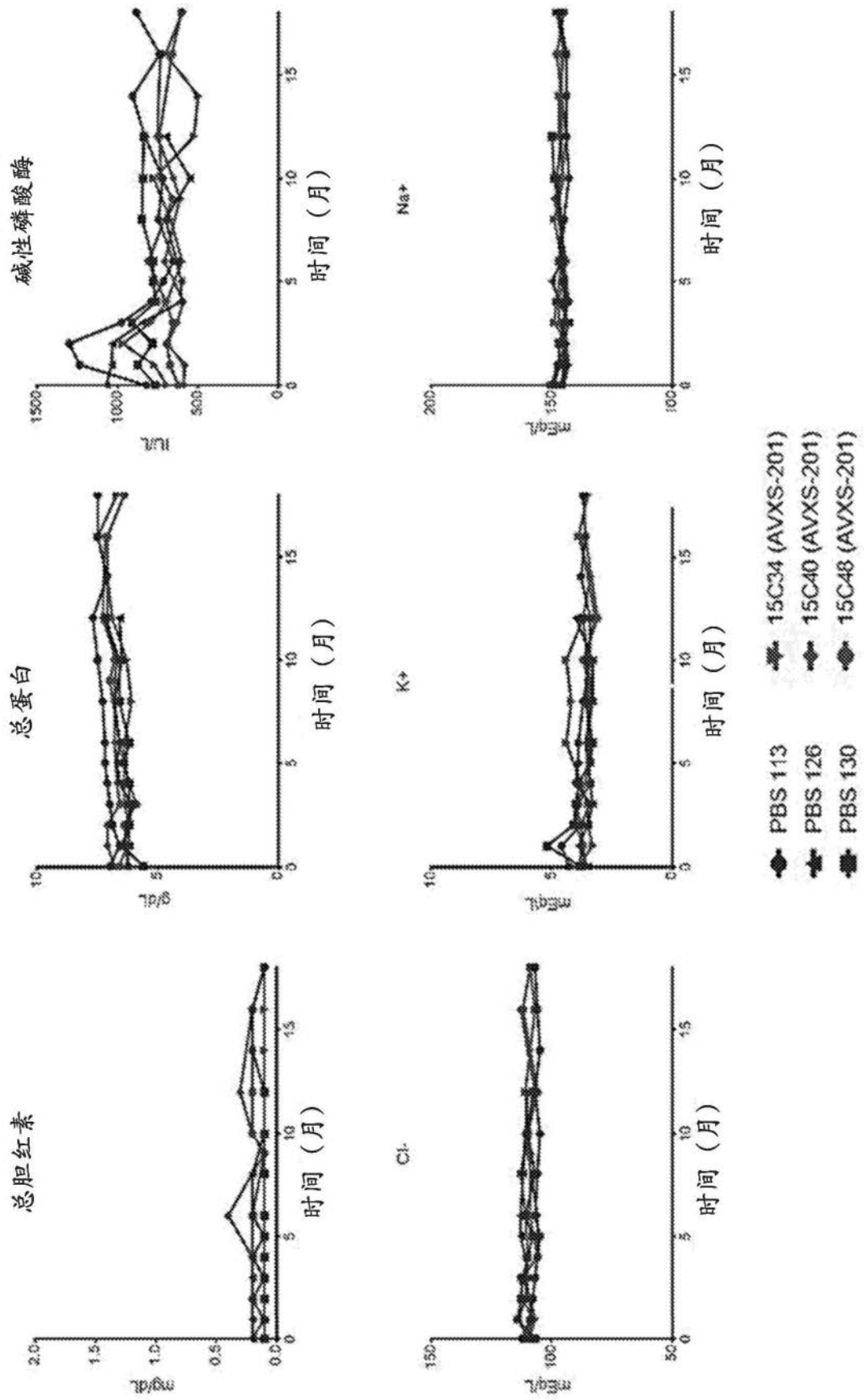


图16续

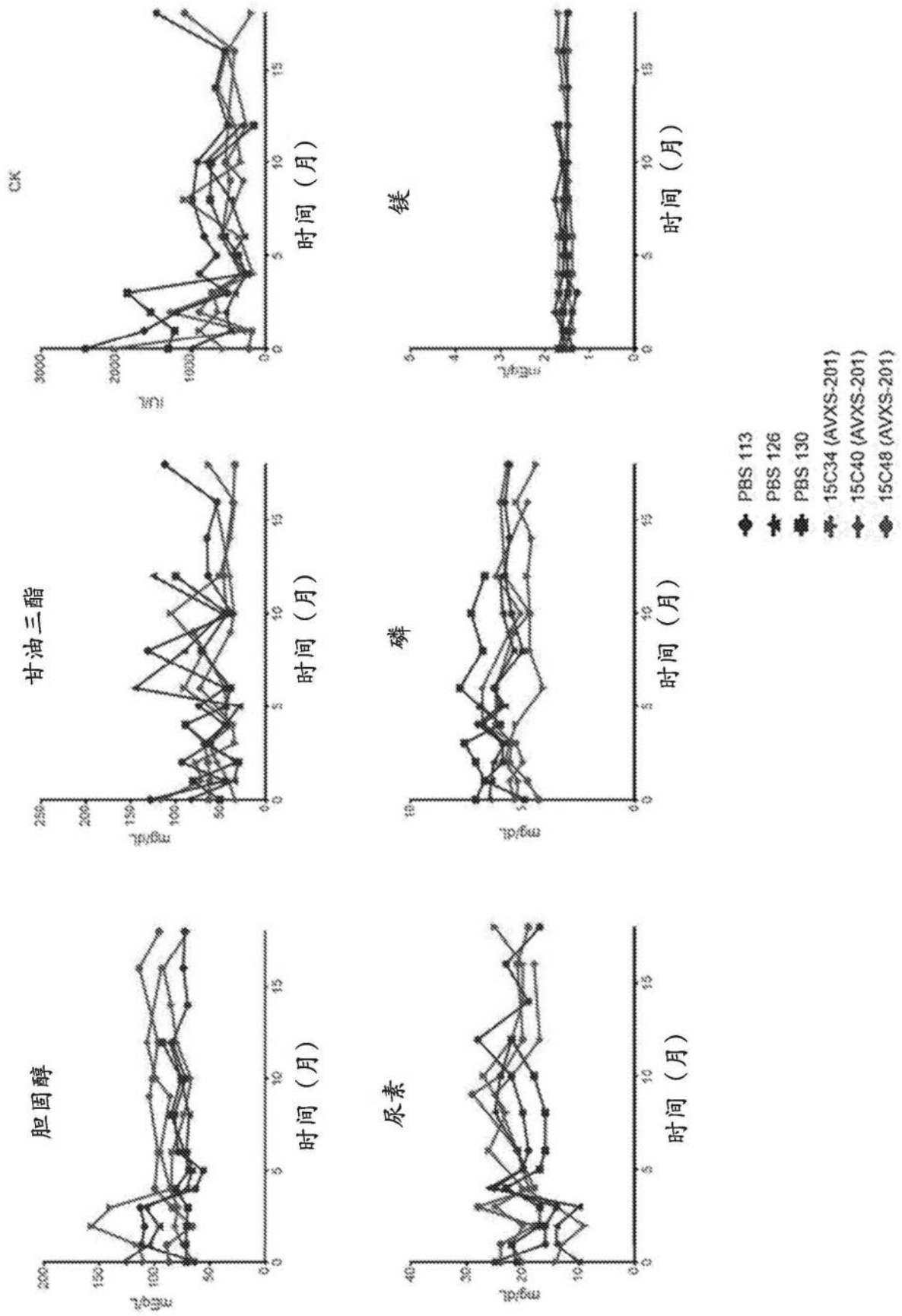


图17

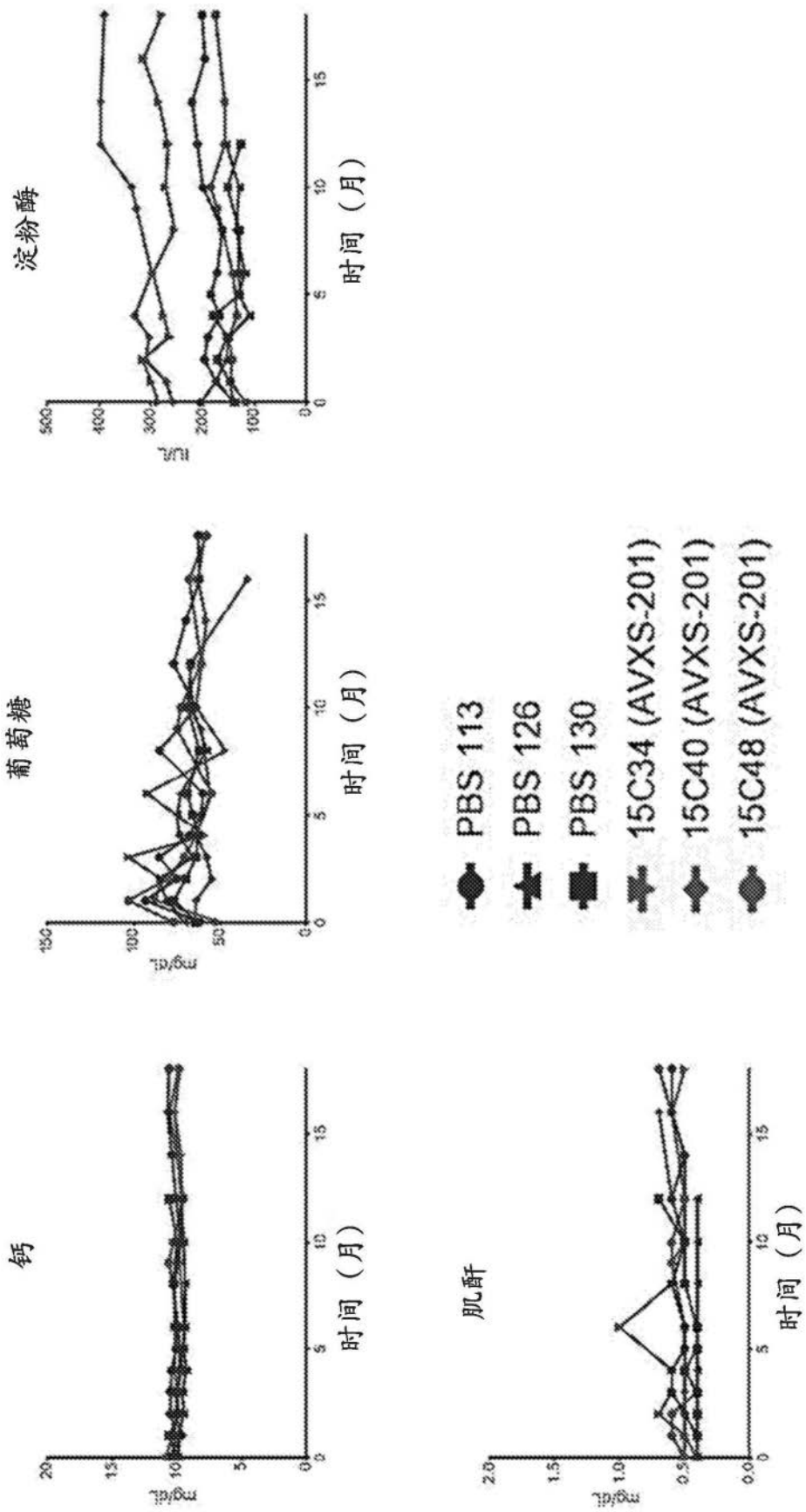


图17续

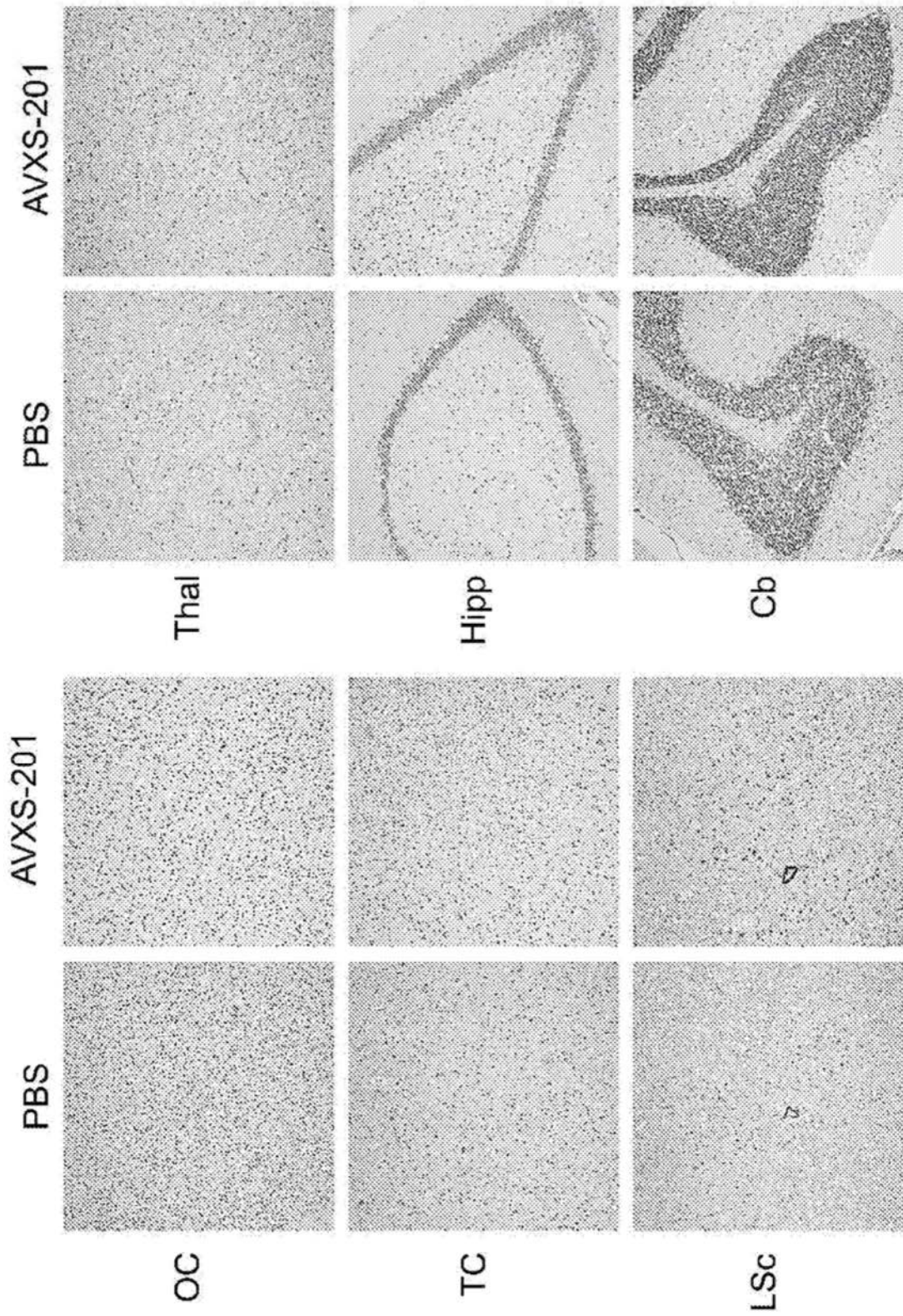


图18

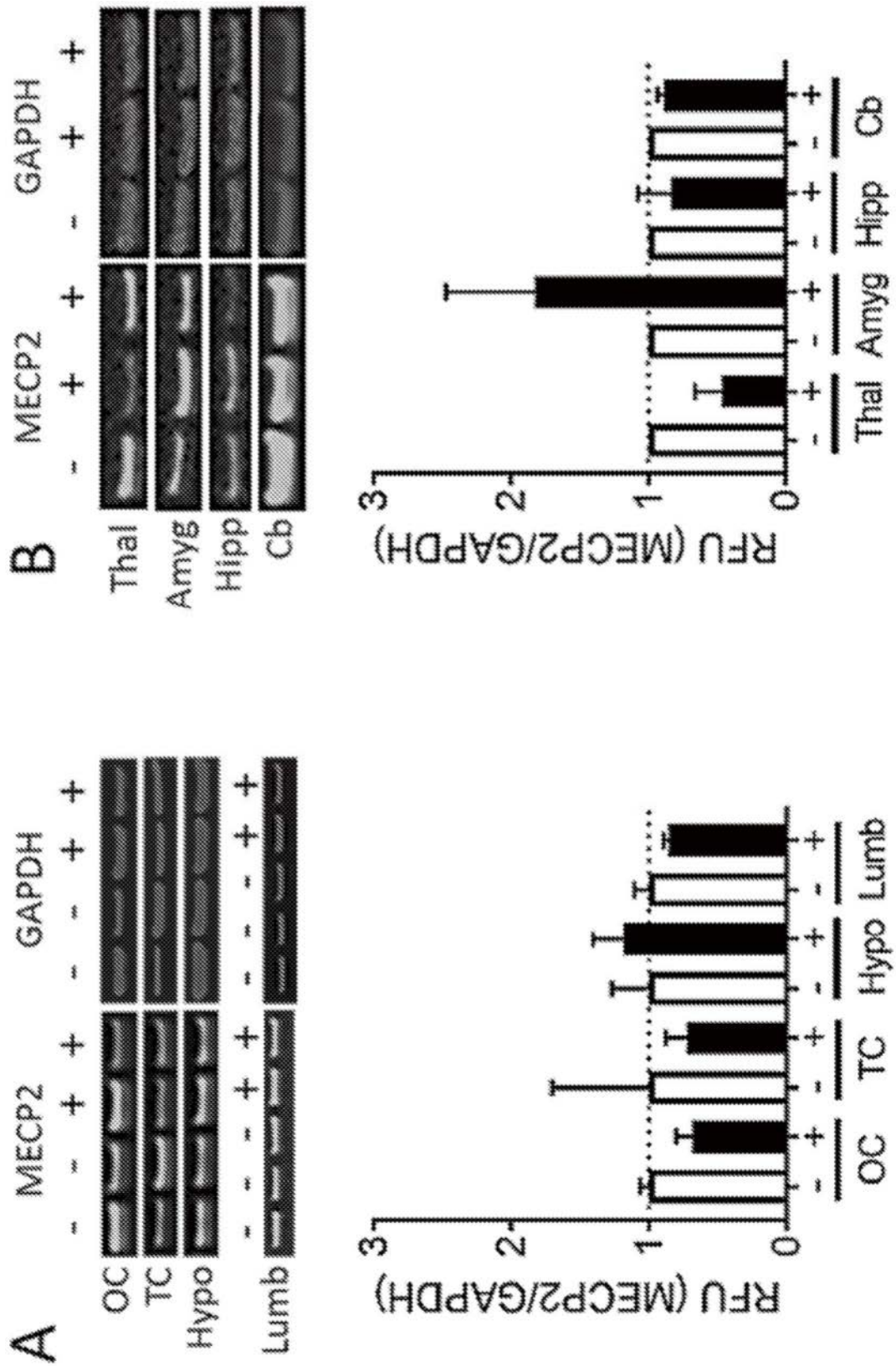


图19

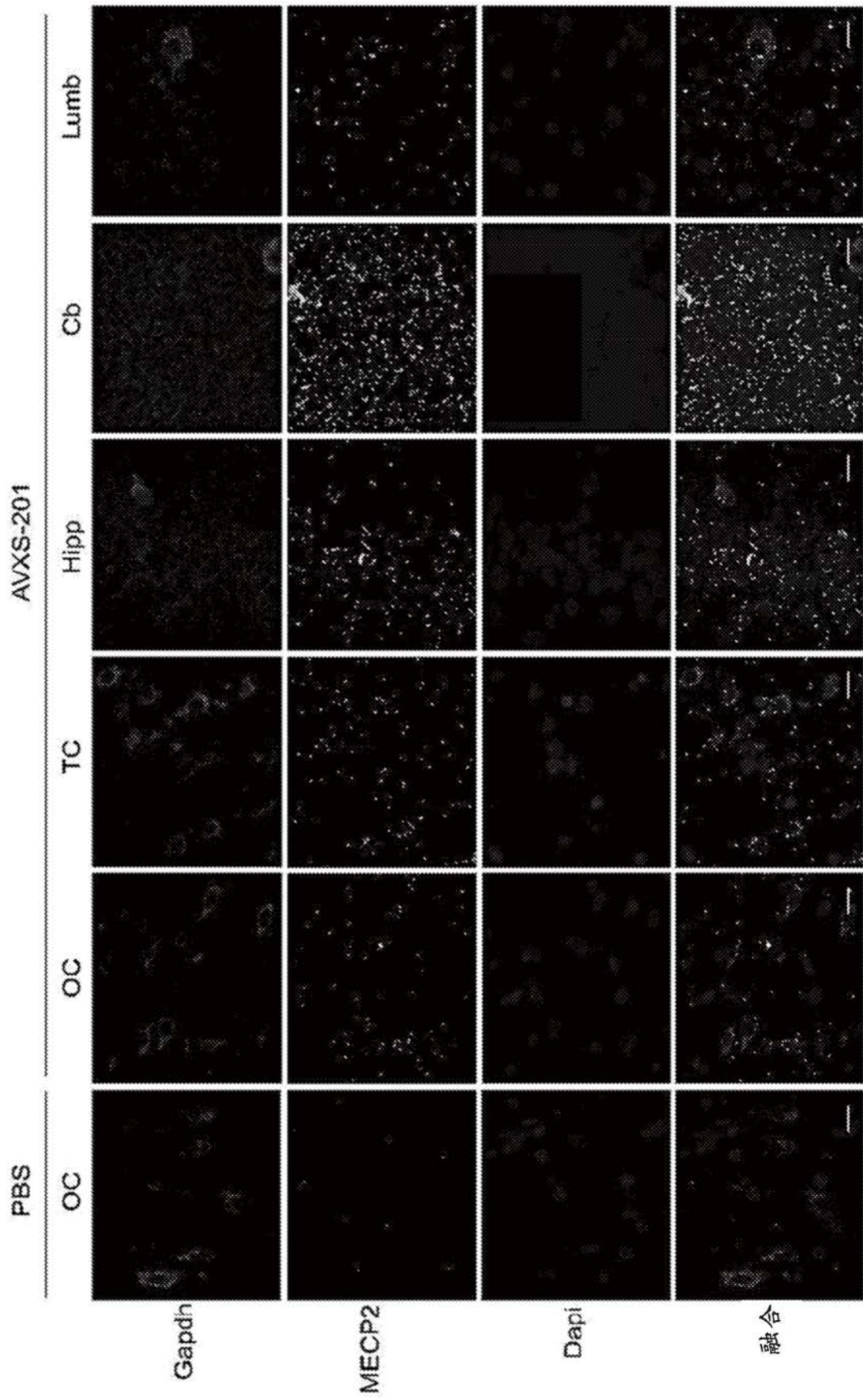


图20

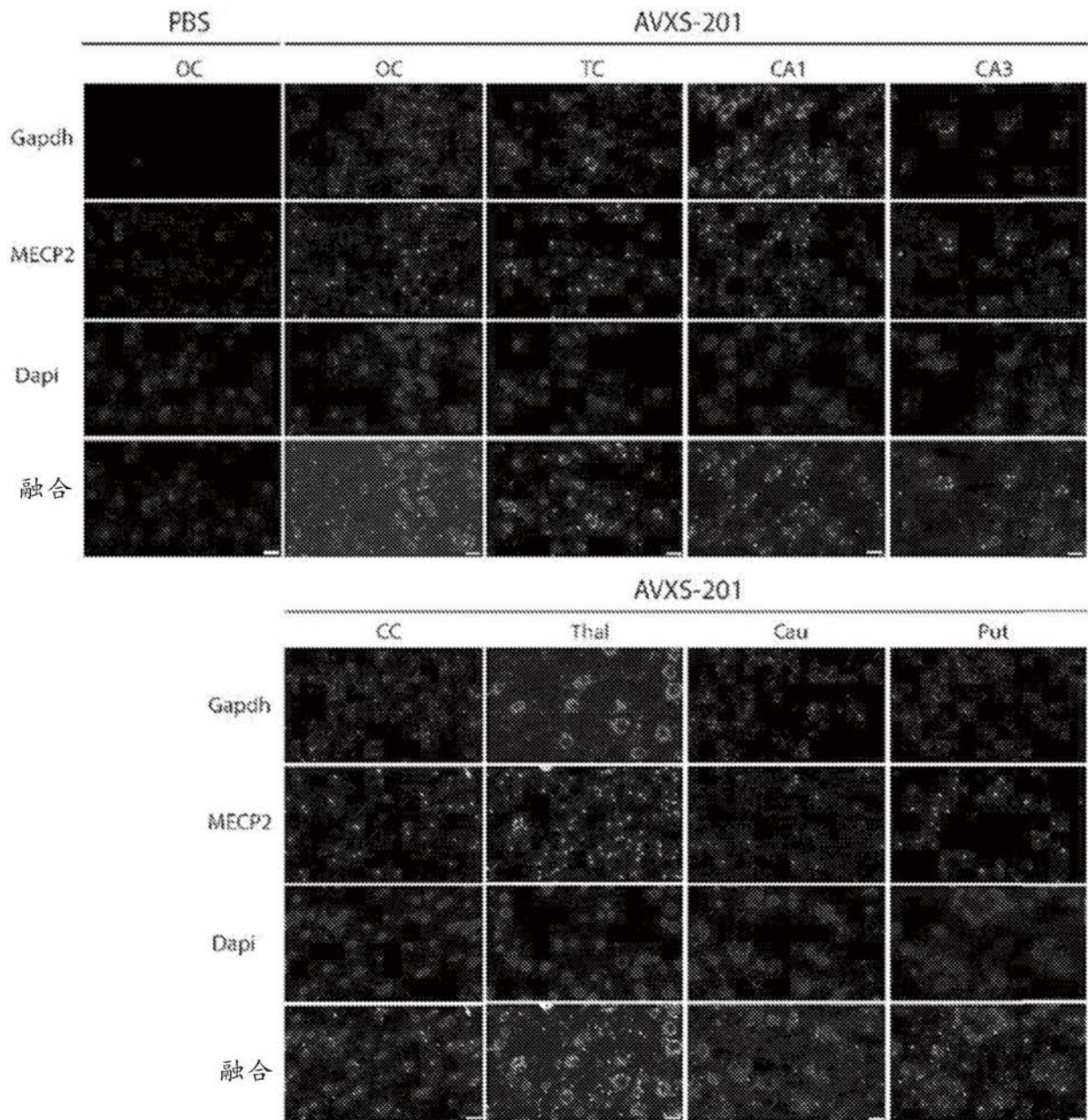


图21

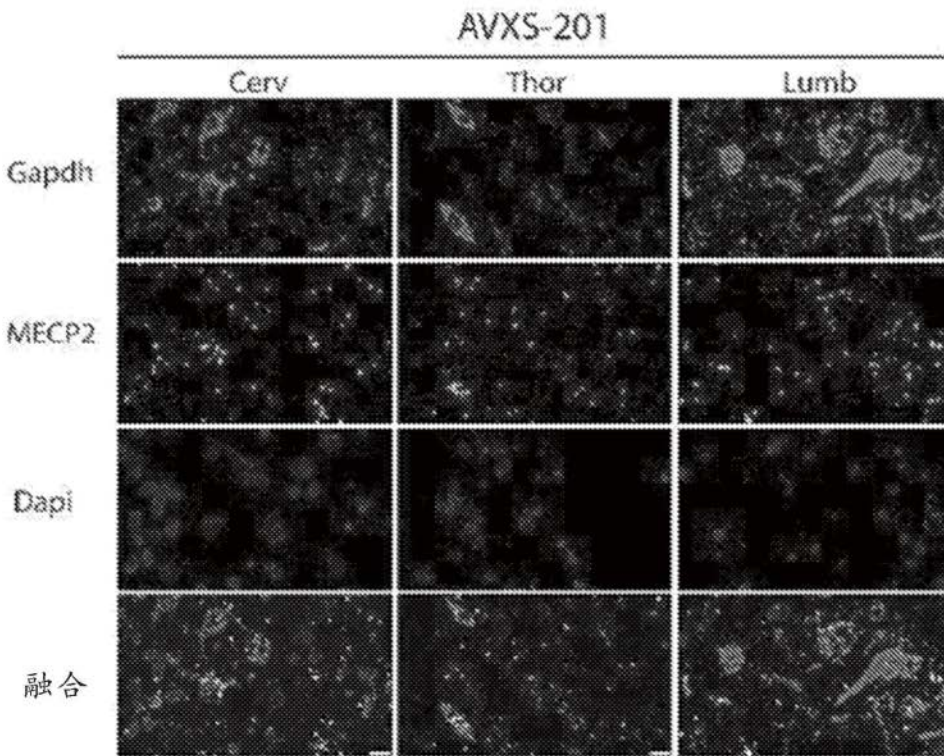
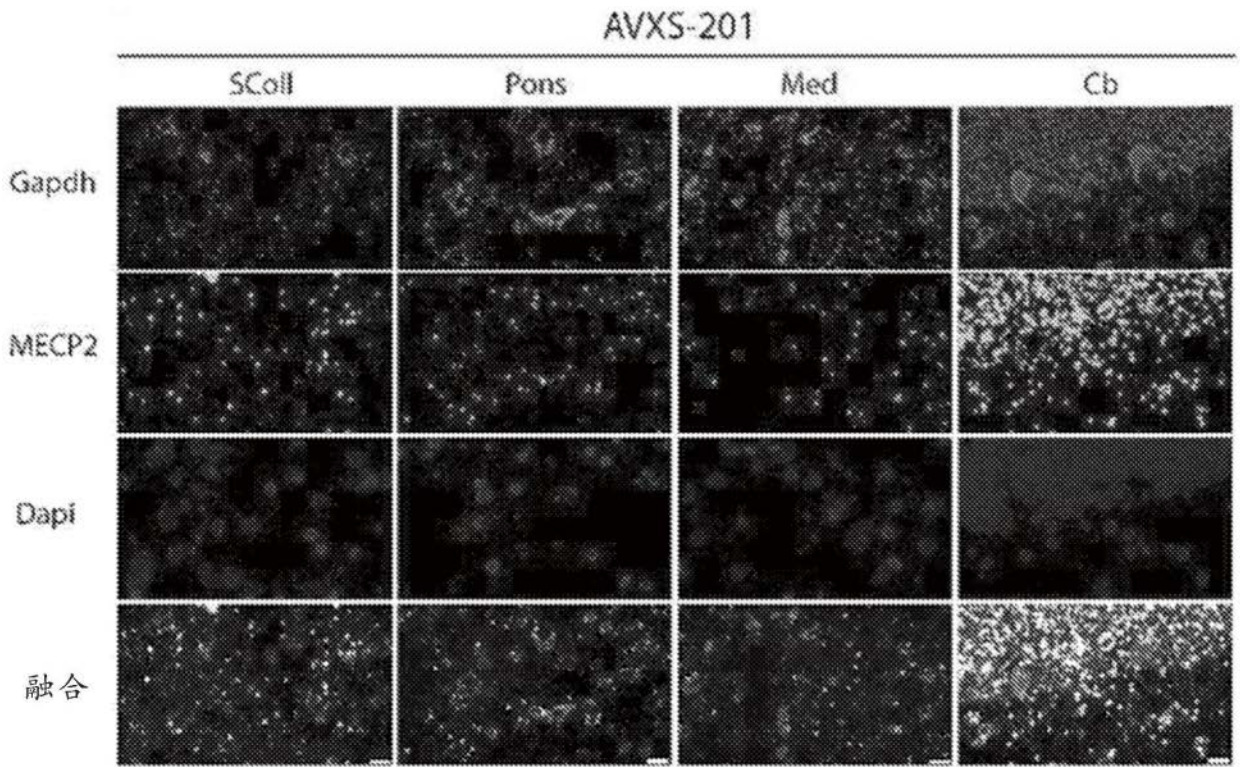


图21续

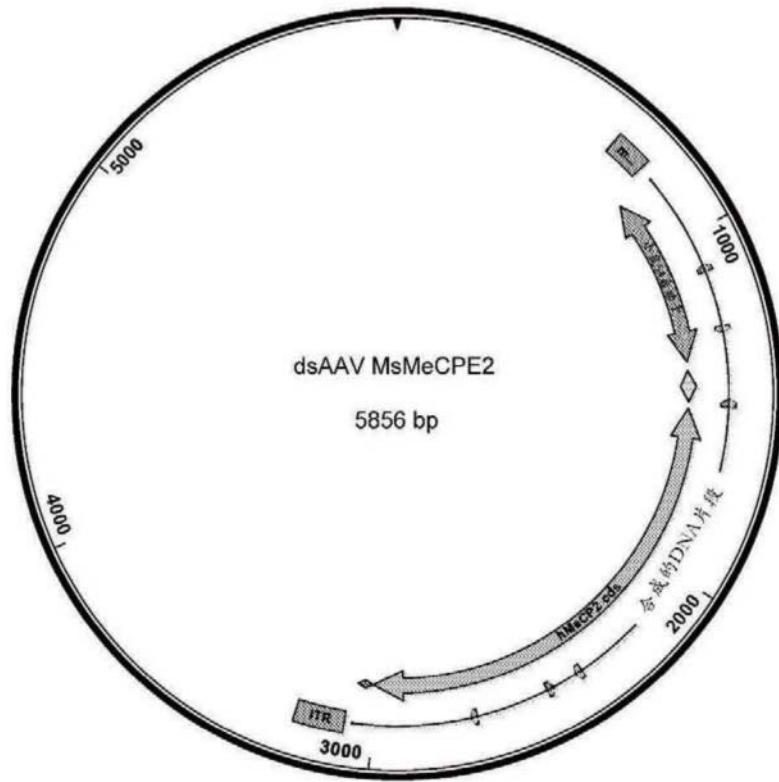


图22

瑞特综合征—临床病理学

X连锁神经发育自闭症谱系病症 (ASD)，发病率是10,000个女孩中有大约1个患病

发作年龄：6-18月龄

- 失去运动功能、语言能力、手功能

90%的病例源自甲基CpG结合蛋白2 (MeCP2) 中的突变

- 转录因子，调节数千种基因



Brookline (布鲁克莱恩)，6岁

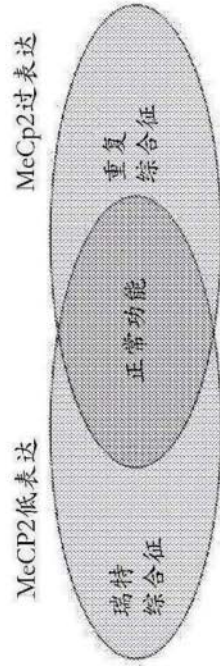
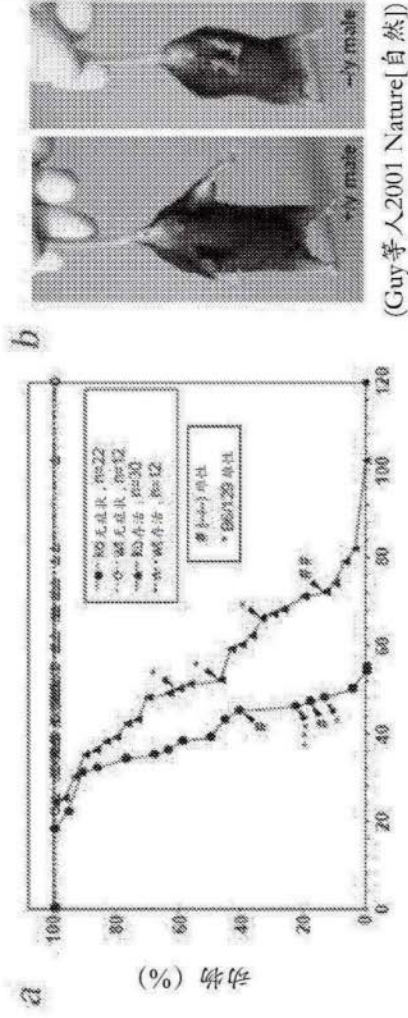


图23

瑞特综合征是可逆的!

模型表达  
瑞特综合征样表型:

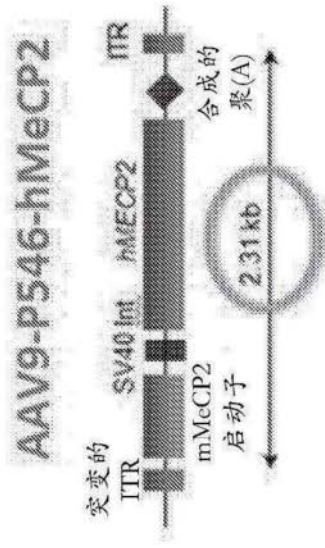
- 减少的存活
- 肌无力
- 增加的焦虑



在无效小鼠中重新表达MeCP2改善了存活和行为表型

图24

针对瑞特综合征的基因疗法



腺相关病毒血清型9 (AAV9)  
介导将MeCP2递送至CNS

- 内源启动子
- 非致病的
- 神经元和星形胶质细胞的有效靶向

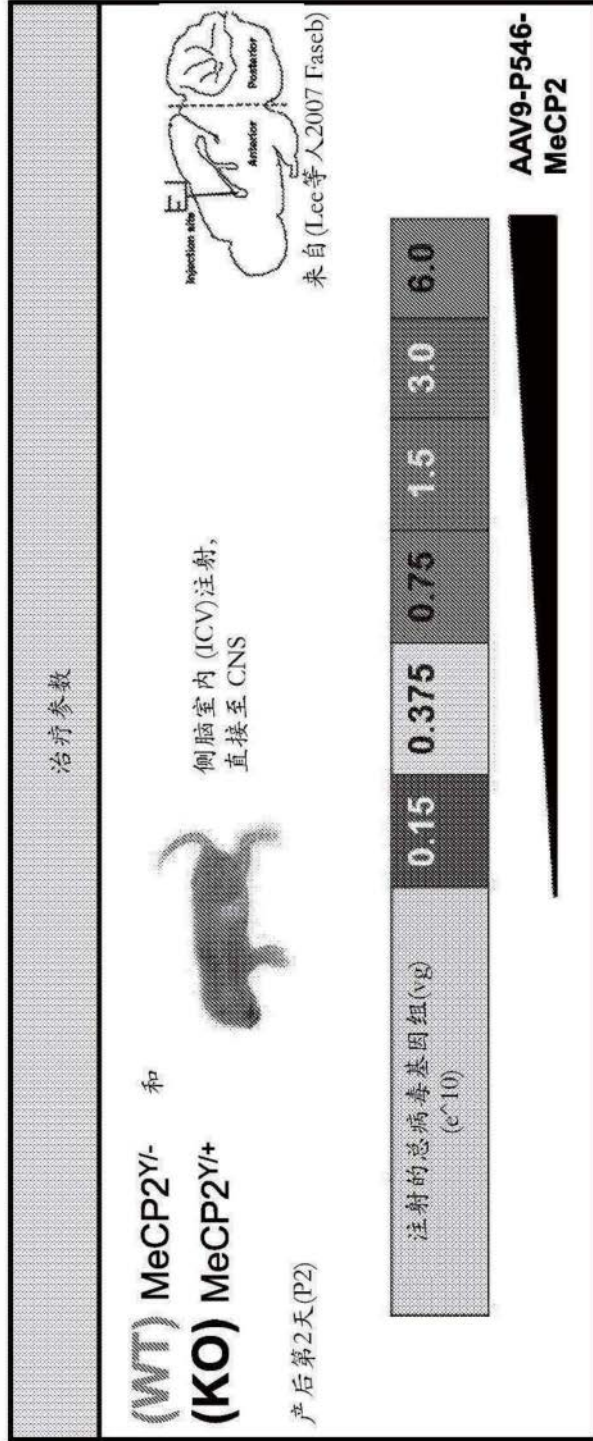
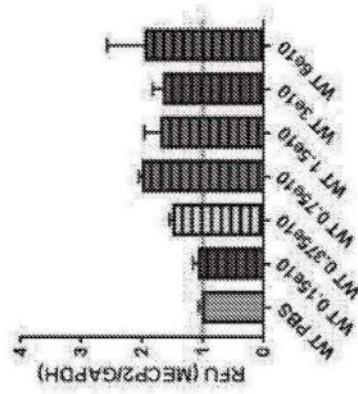


图25

在用AAV9 - P564 - MeCP2注射的野生型小鼠中，MeCP2的表达

在ICV治疗的MeCP2<sup>Y/+</sup>小鼠的半脑中，MeCP2蛋白表达



在小鼠的半脑中，MeCP2蛋白表达

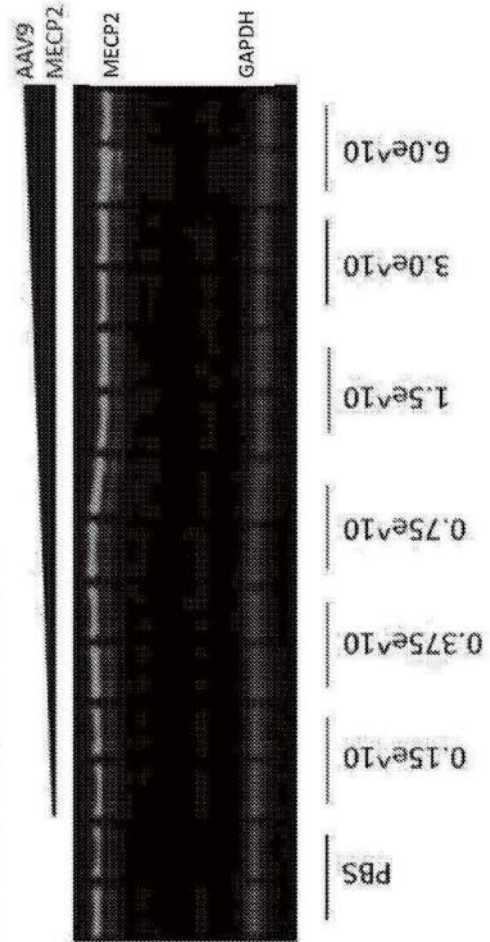


图26

在AAV9 - P546 - MECP2 ICV注射后，  
在MECP2无效小鼠中，MECP2的相对表达

在ICV治疗的MeCP2<sup>+/+</sup>小鼠的小鼠半脑中  
的MeCP2蛋白表达

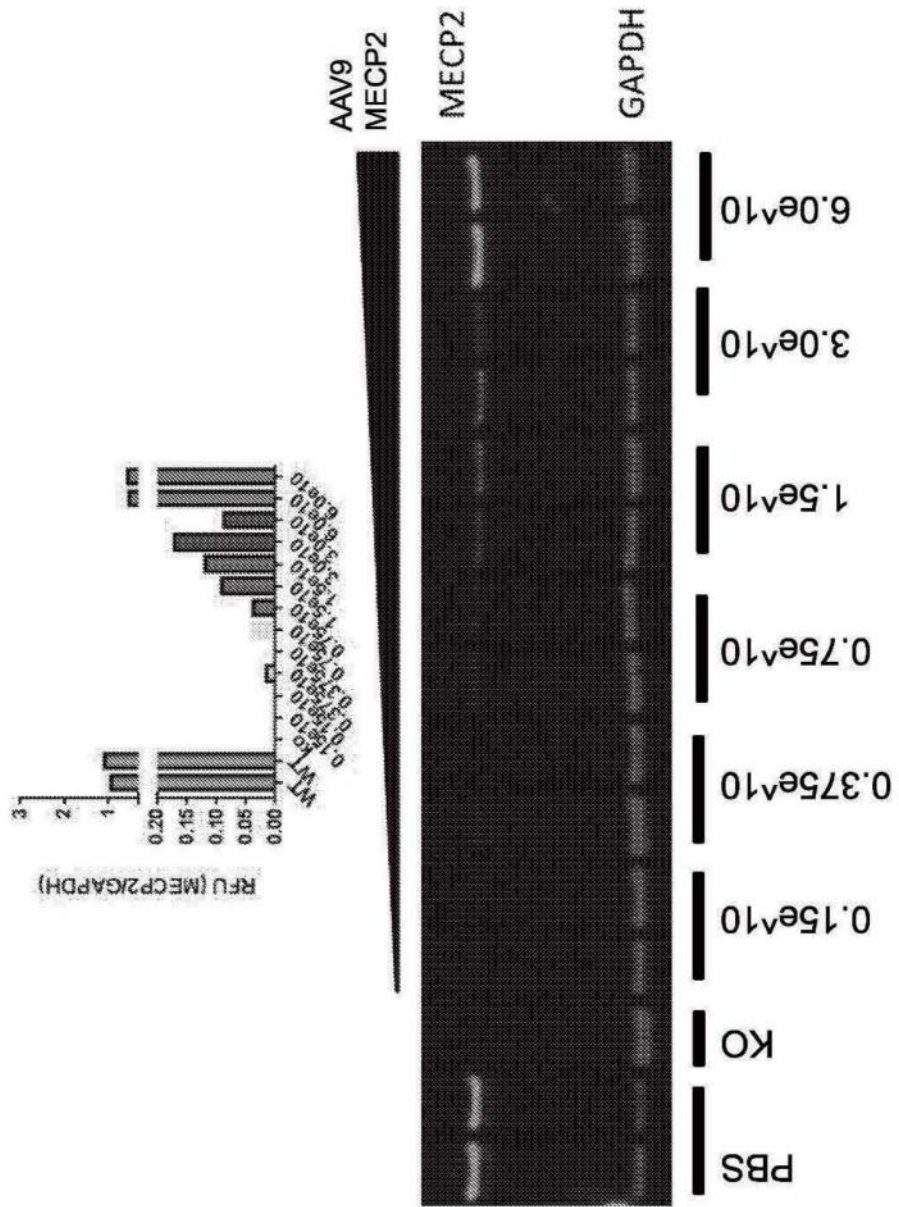


图27

将P546 - MeCP2直接递送至MeCP2<sup>Y/-</sup>小鼠的CNS中对行为评分的影响

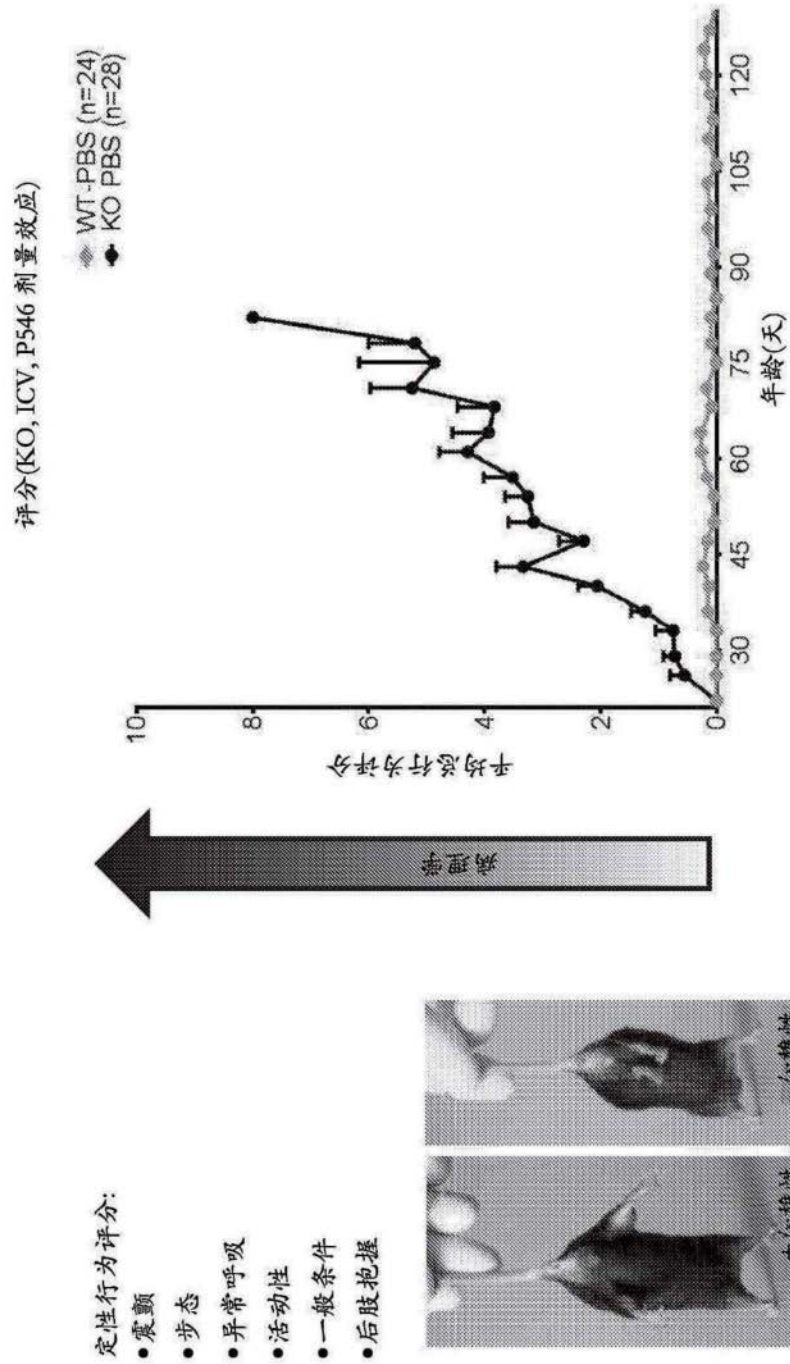
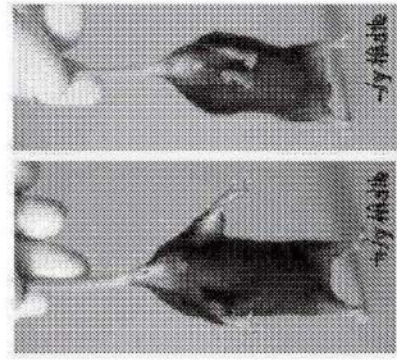
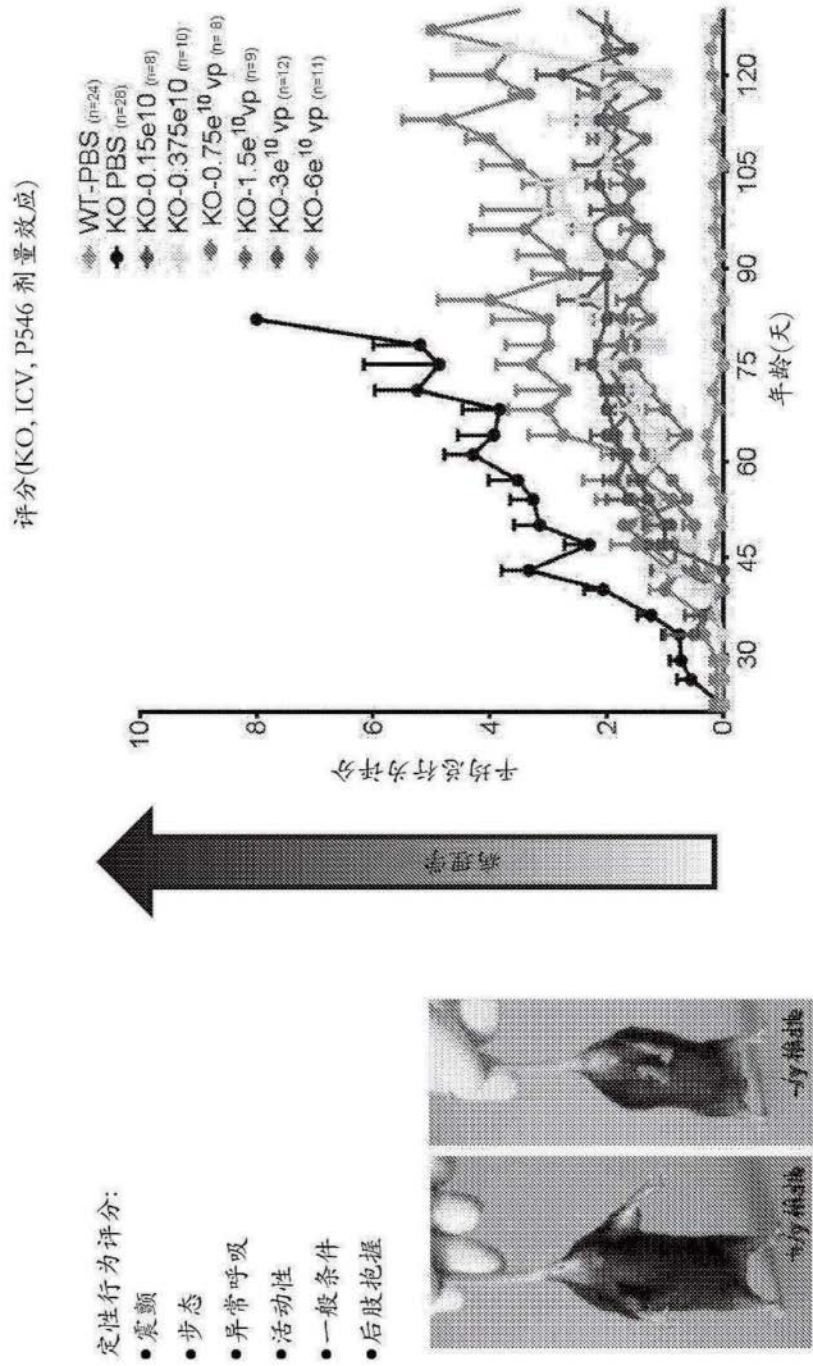


图28A

将P546 - McCP2直接递送至McCP2<sup>Y/-</sup>小鼠的CNS中对行为评分的影响



(Guy等人2007 Nature[自然])

图28B

将P546 - MeCP2直接递送至MeCP2<sup>Y/-</sup>小鼠的CNS中挽救了运动活性

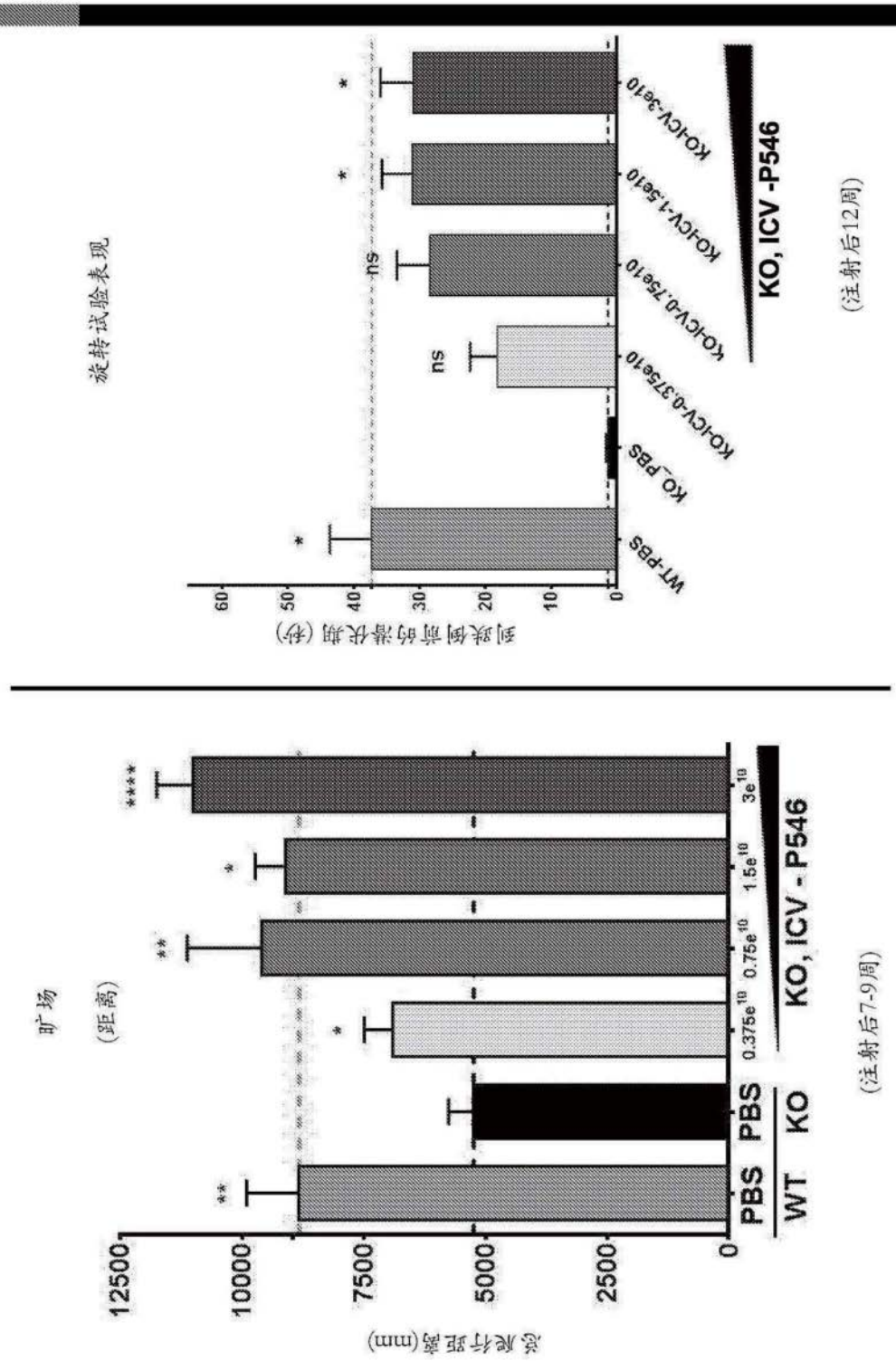


图29

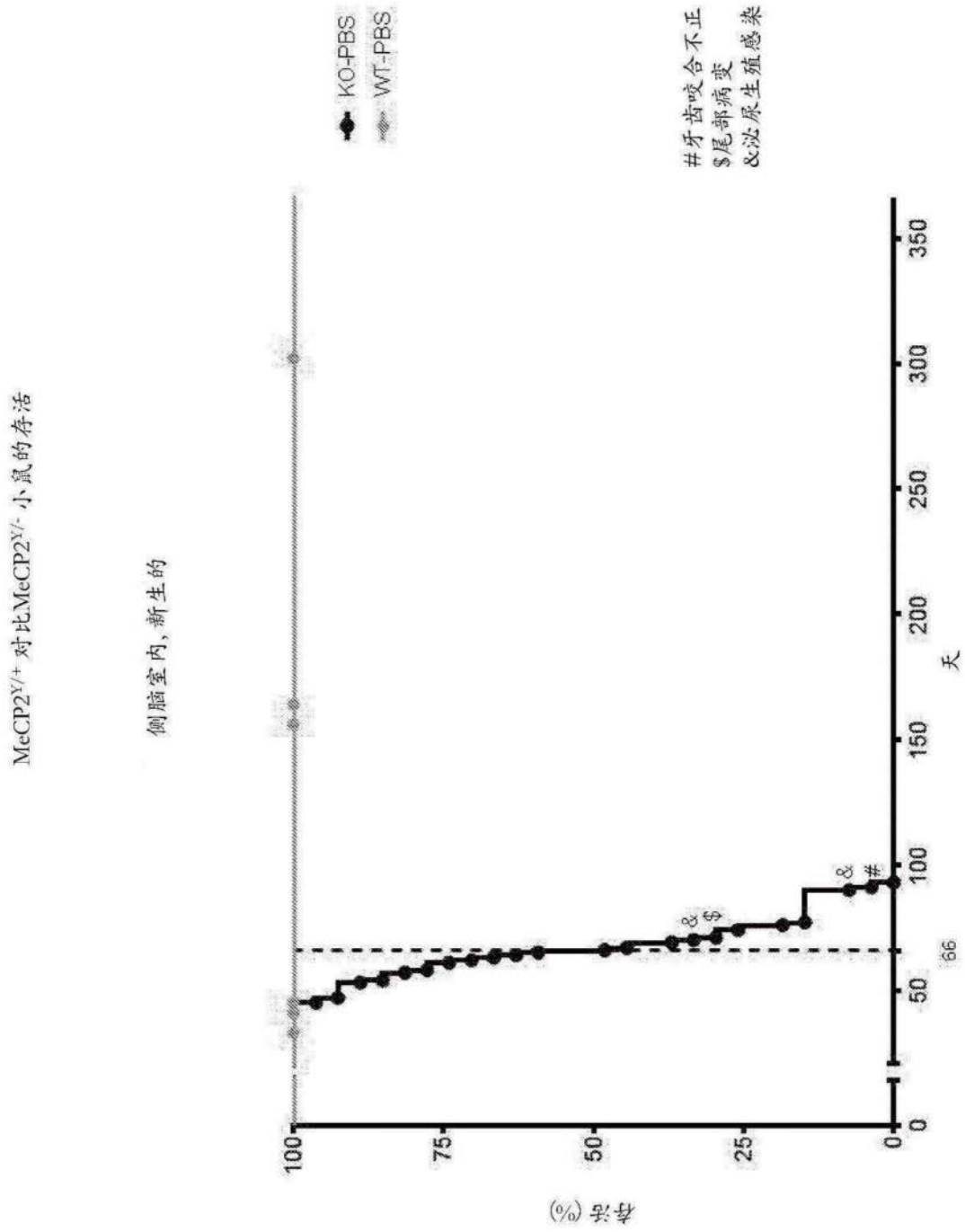
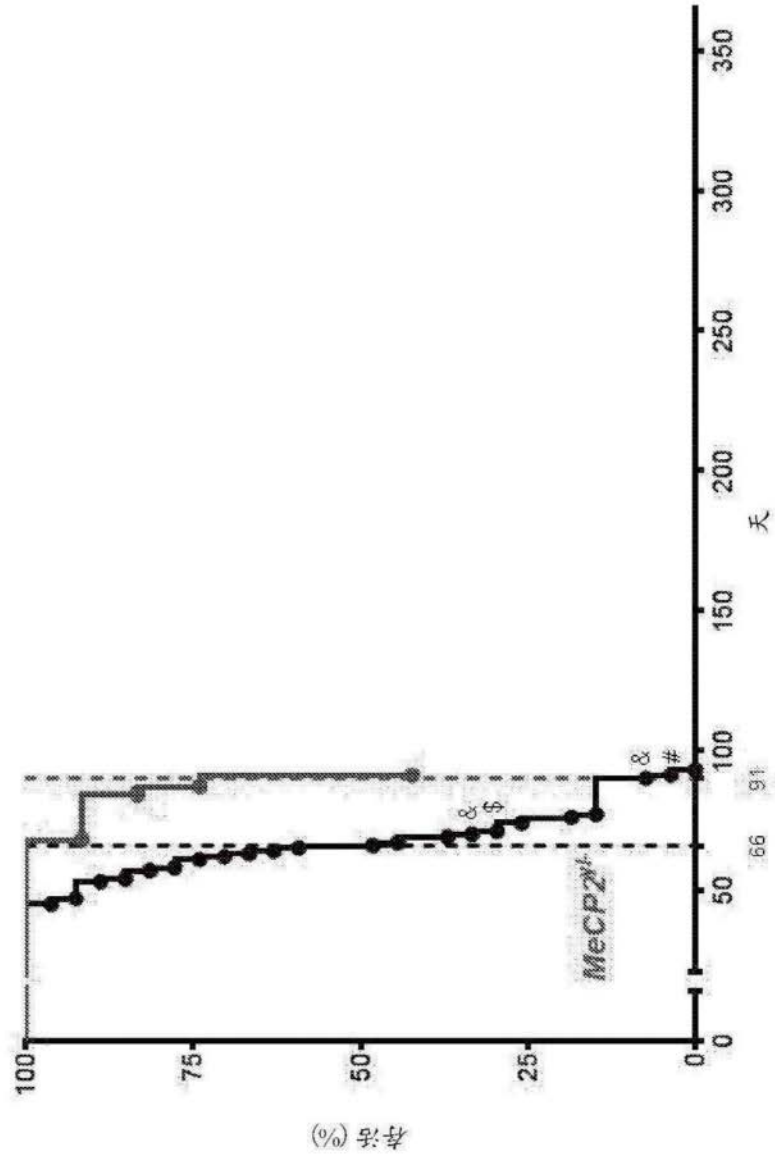


图30A

MeCP2<sup>Y/+</sup> 对比 MeCP2<sup>Y/-</sup> 小鼠的存活

侧脑室内, 新生的

◆ KO-PBS (n=27)  
◆ KO-0.15e<sup>10</sup>vp (n=12)



# 牙齿咬合不正  
\$ 尾部病变  
& 泌尿生殖感染

图30B

MeCP2<sup>Y/+</sup> 对比 MeCP2<sup>Y/-</sup> 小鼠的存活

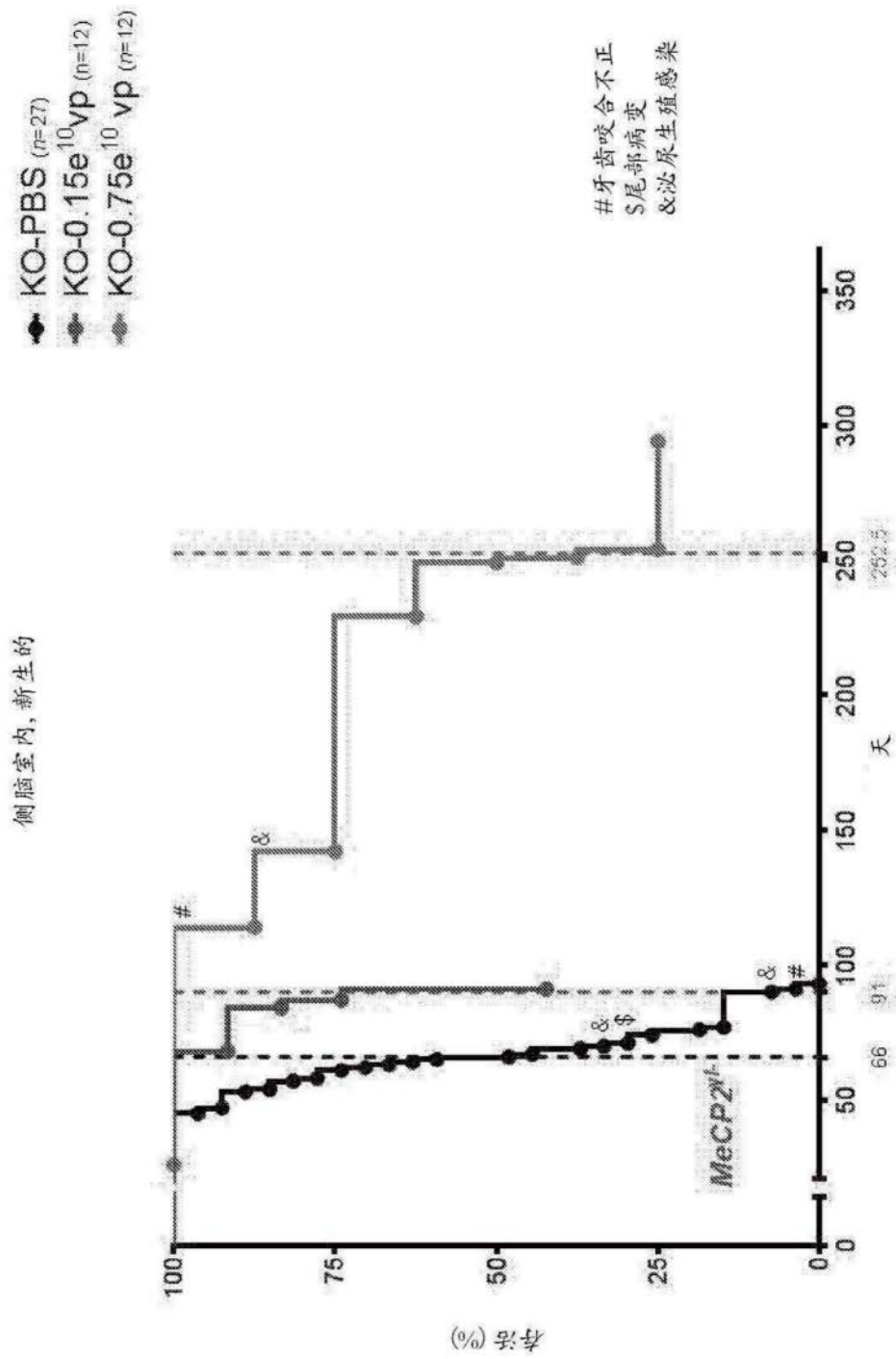


图30C

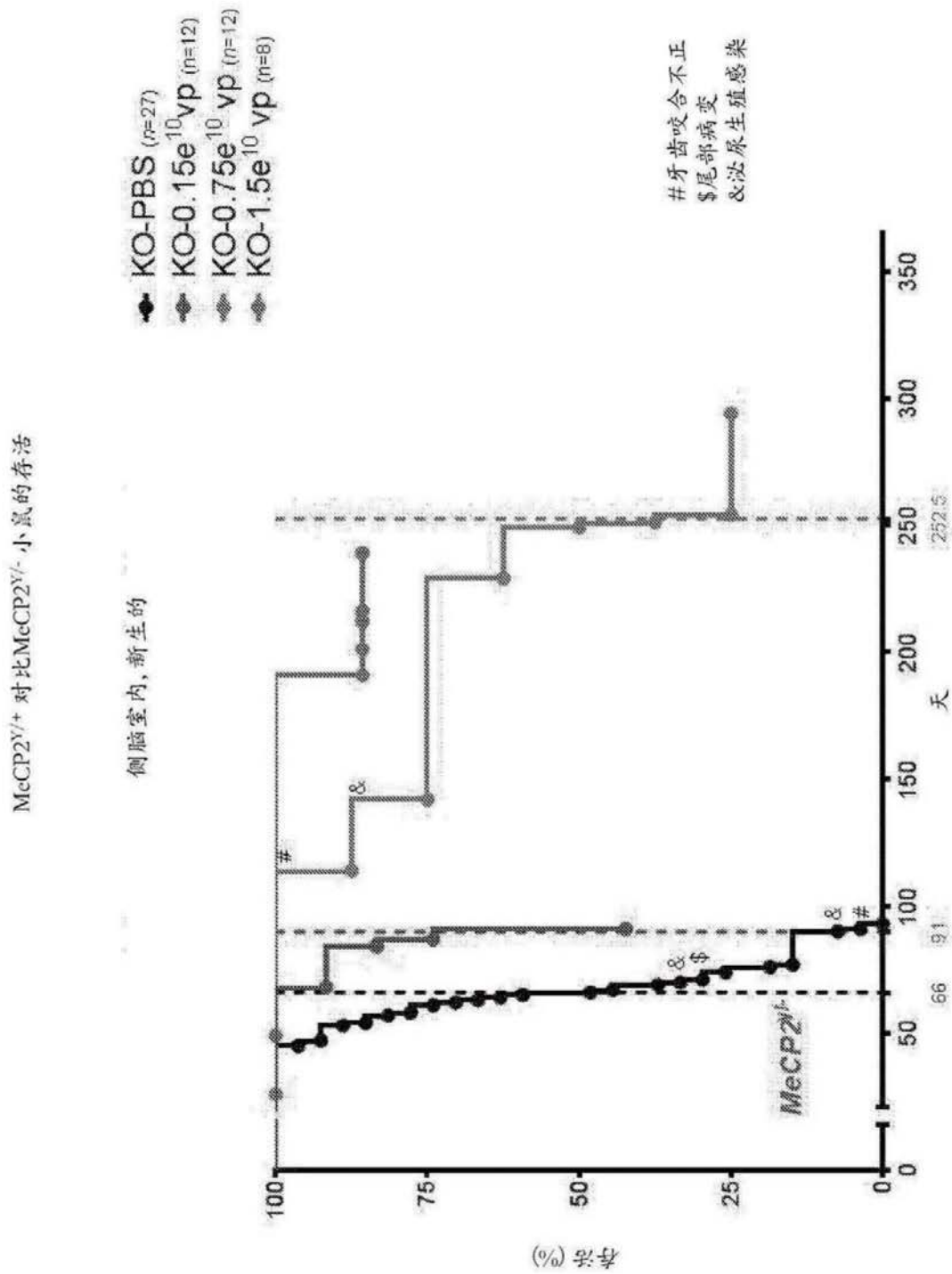


图30D

MeCP2<sup>Y/+</sup> 对比 MeCP2<sup>Y/-</sup> 小鼠的存活

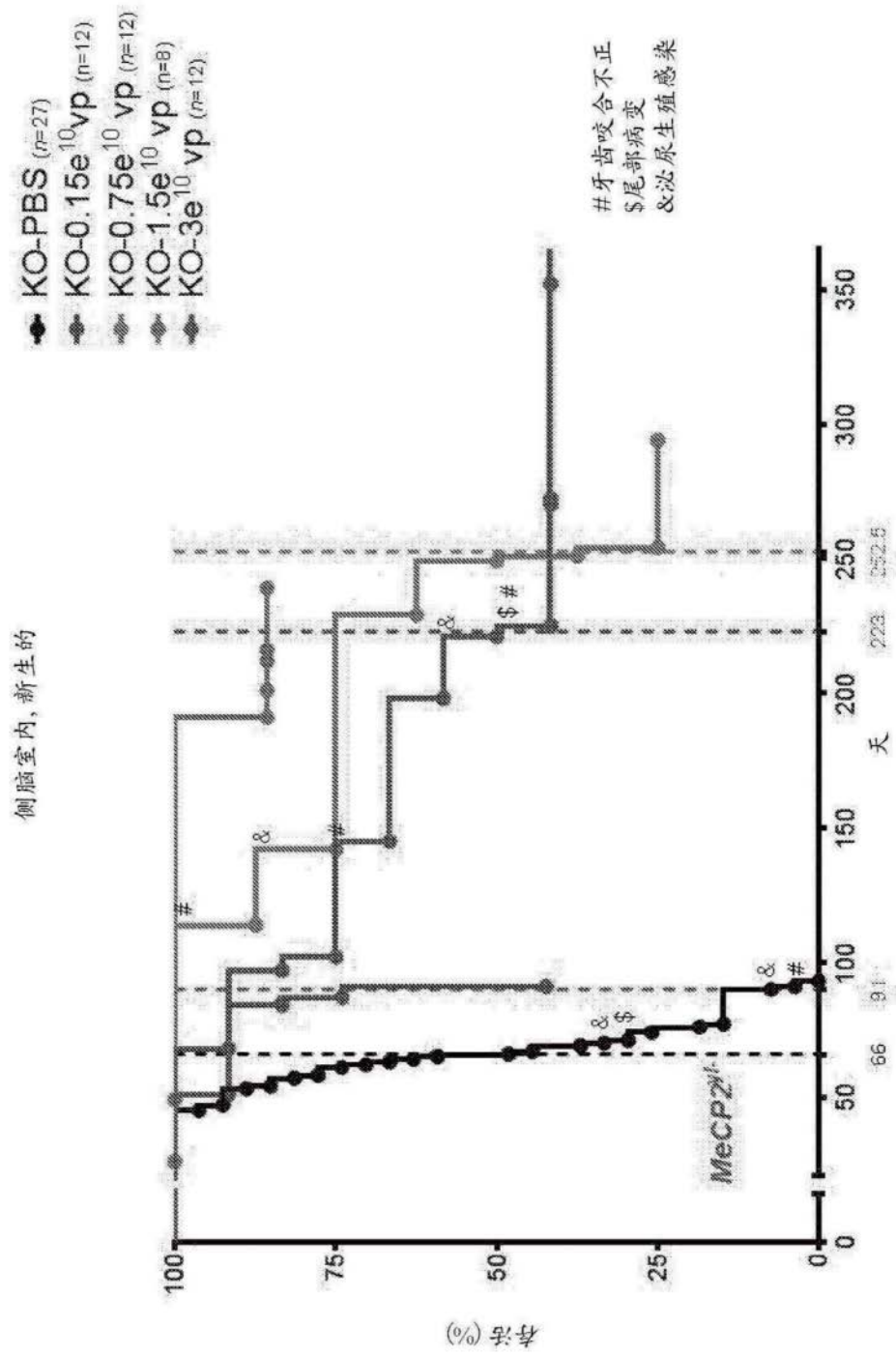


图30E

MeCP2<sup>Y/+</sup> 对比 MeCP2<sup>Y/-</sup> 小鼠的存活

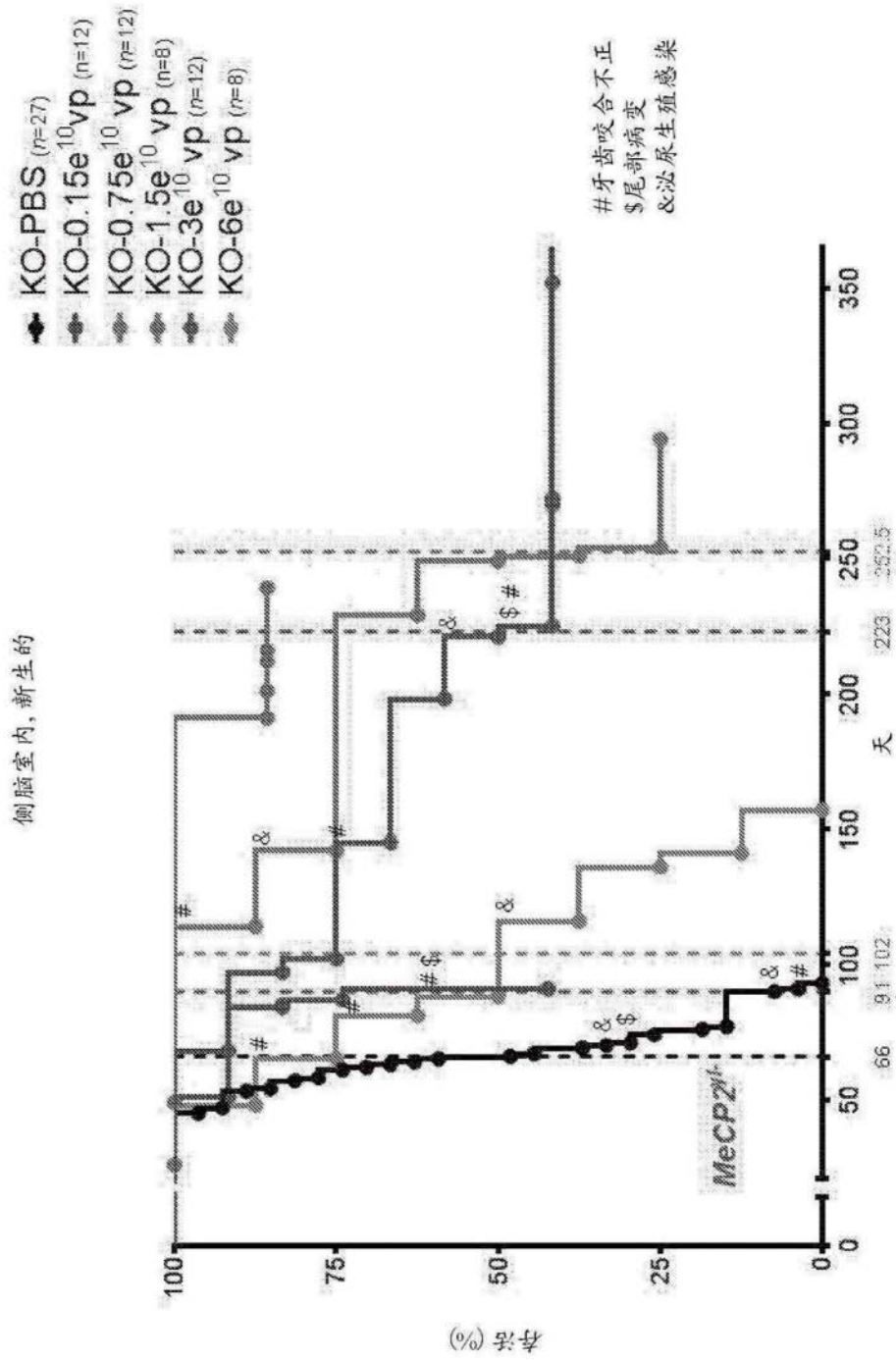


图30F

在食蟹猴中的非人类灵长动物 (NHP) 安全性研究

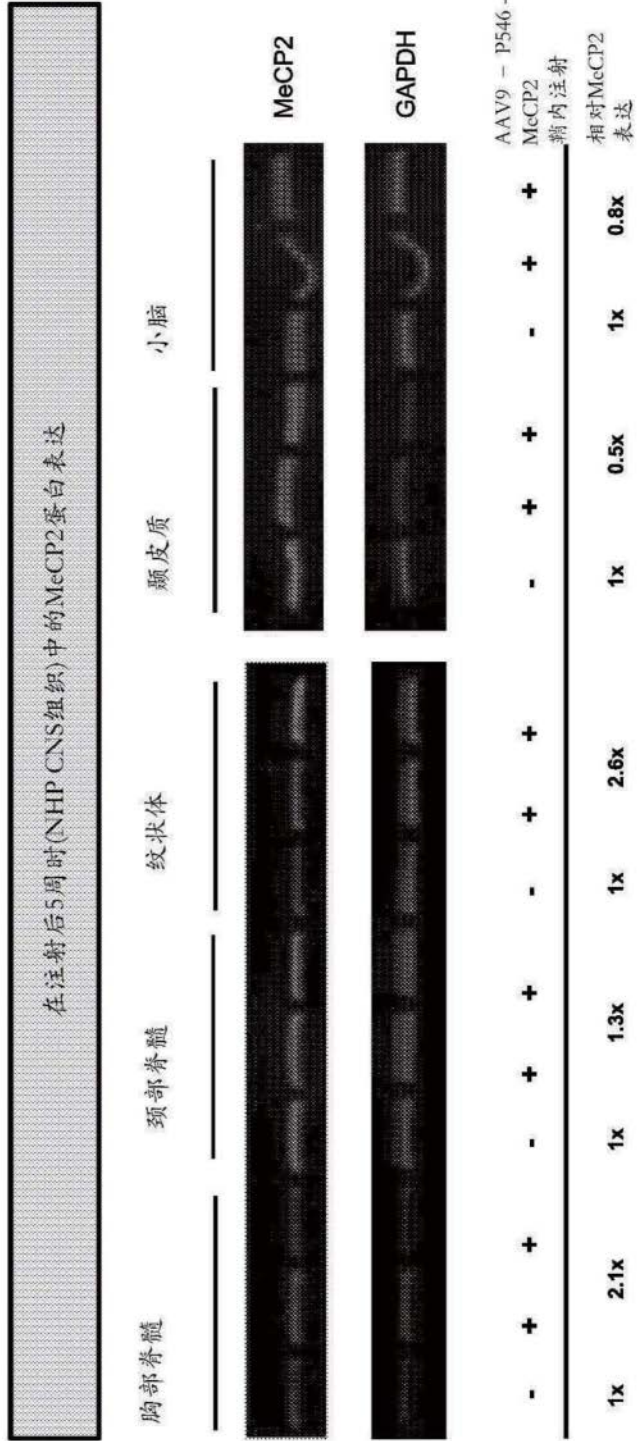


图31A

在食蟹猴中的非人类灵长动物 (NHP) 安全性研究

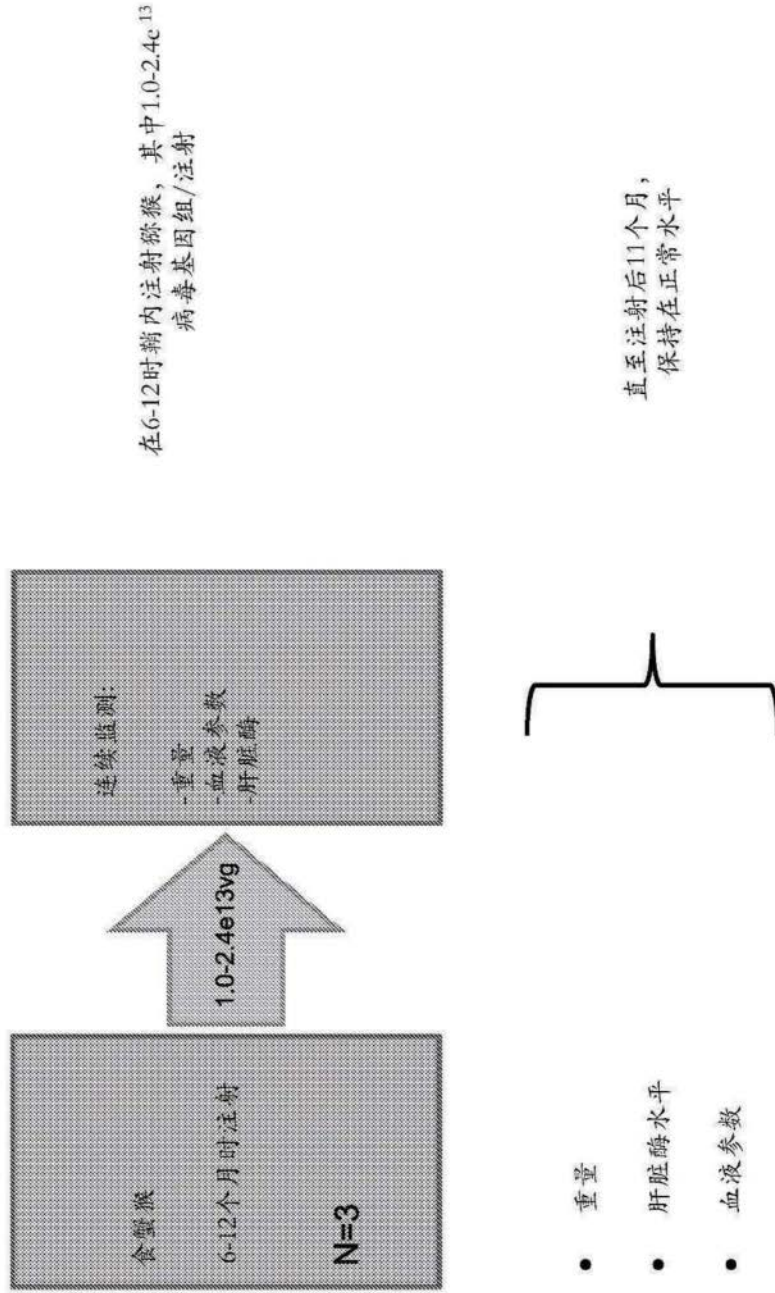


图31B

在AAV9-P546-MeCP2鞘内注射后5周，  
在食蟹猴中的MeCP2相对表达

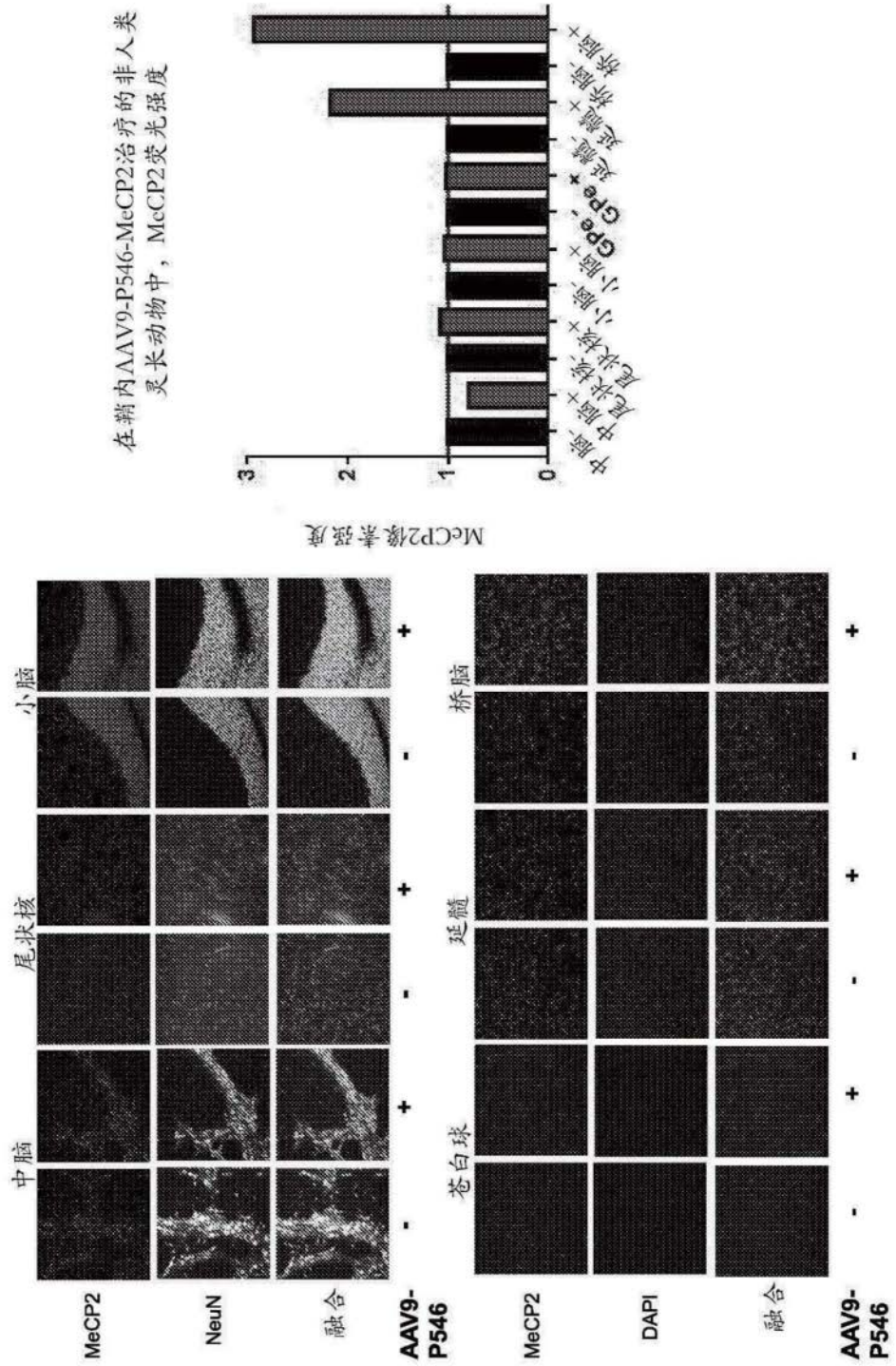


图32

将P546-MECP2直接递送至野生型小鼠的CNS中并不影响存活

侧脑室内, 新生的

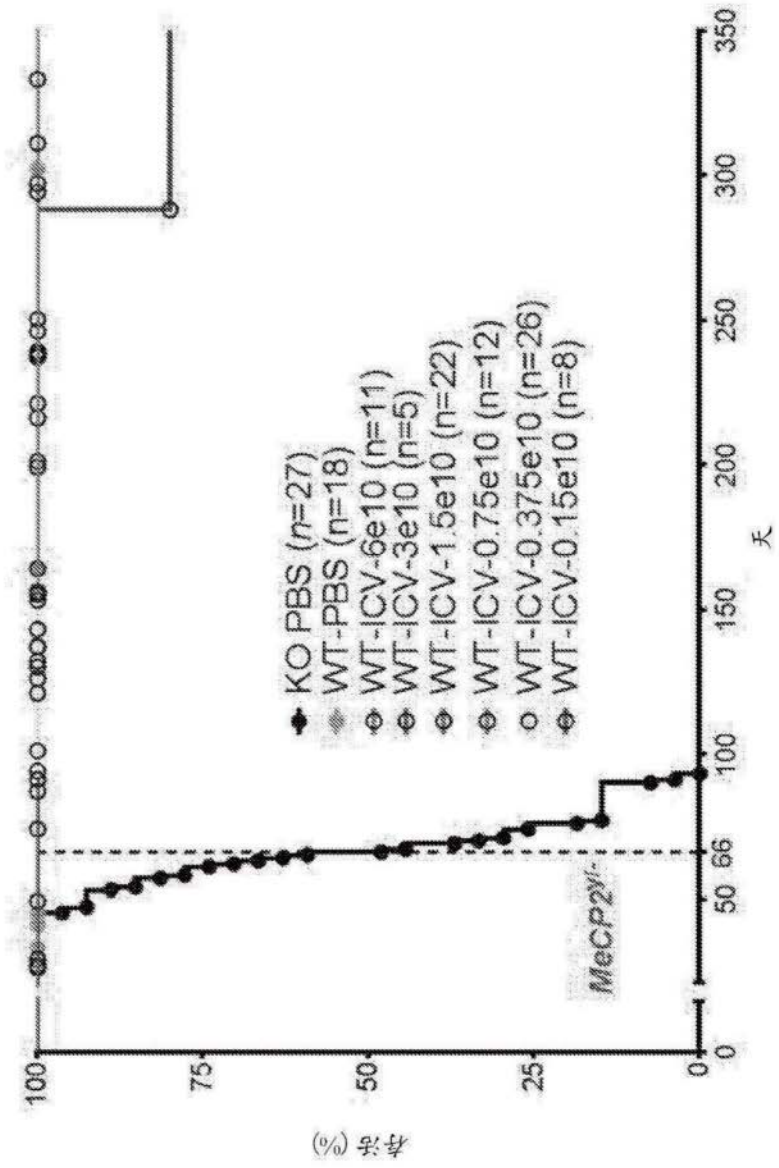


图33

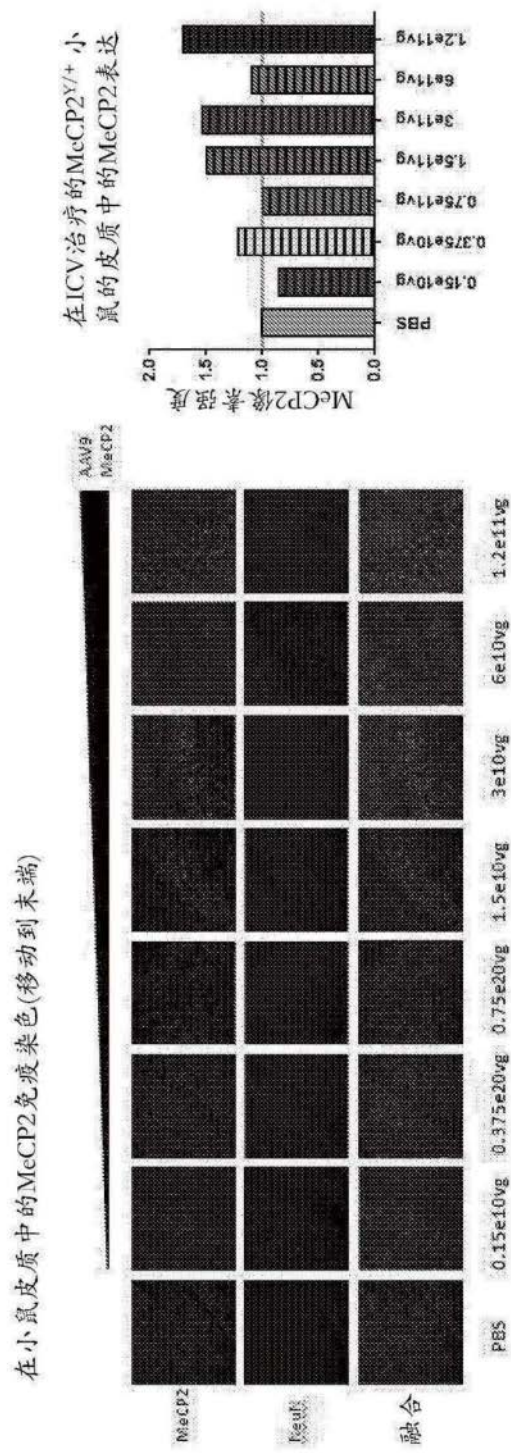


图34

将P546-MECP2直接递送至MECP2<sup>+/+</sup>小鼠的CNS中对行为评分的影响

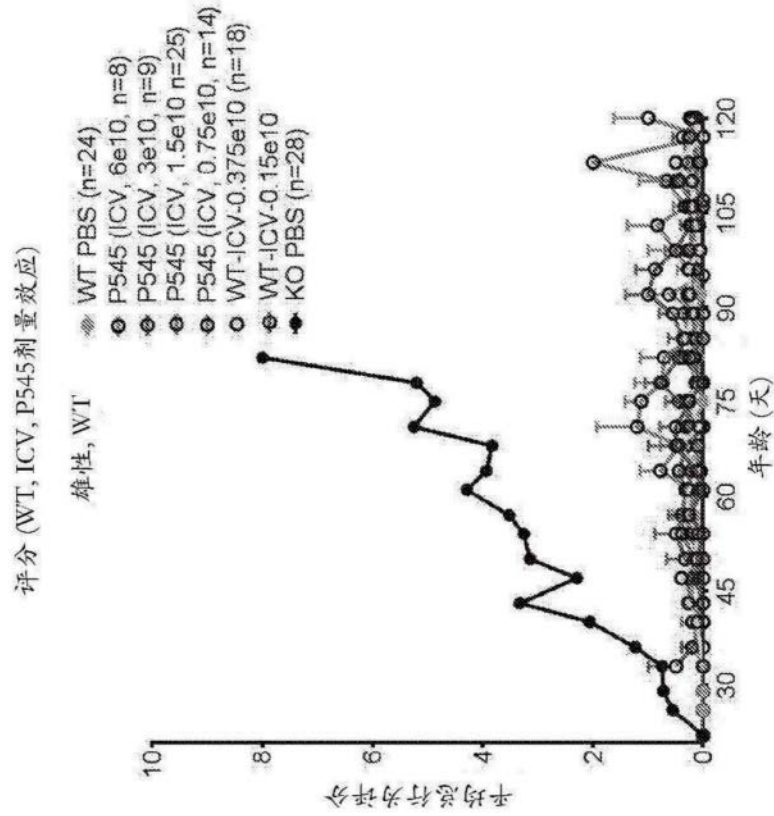


图35

AAV9-P546-McCP2对野生型小鼠旷场速度的影响

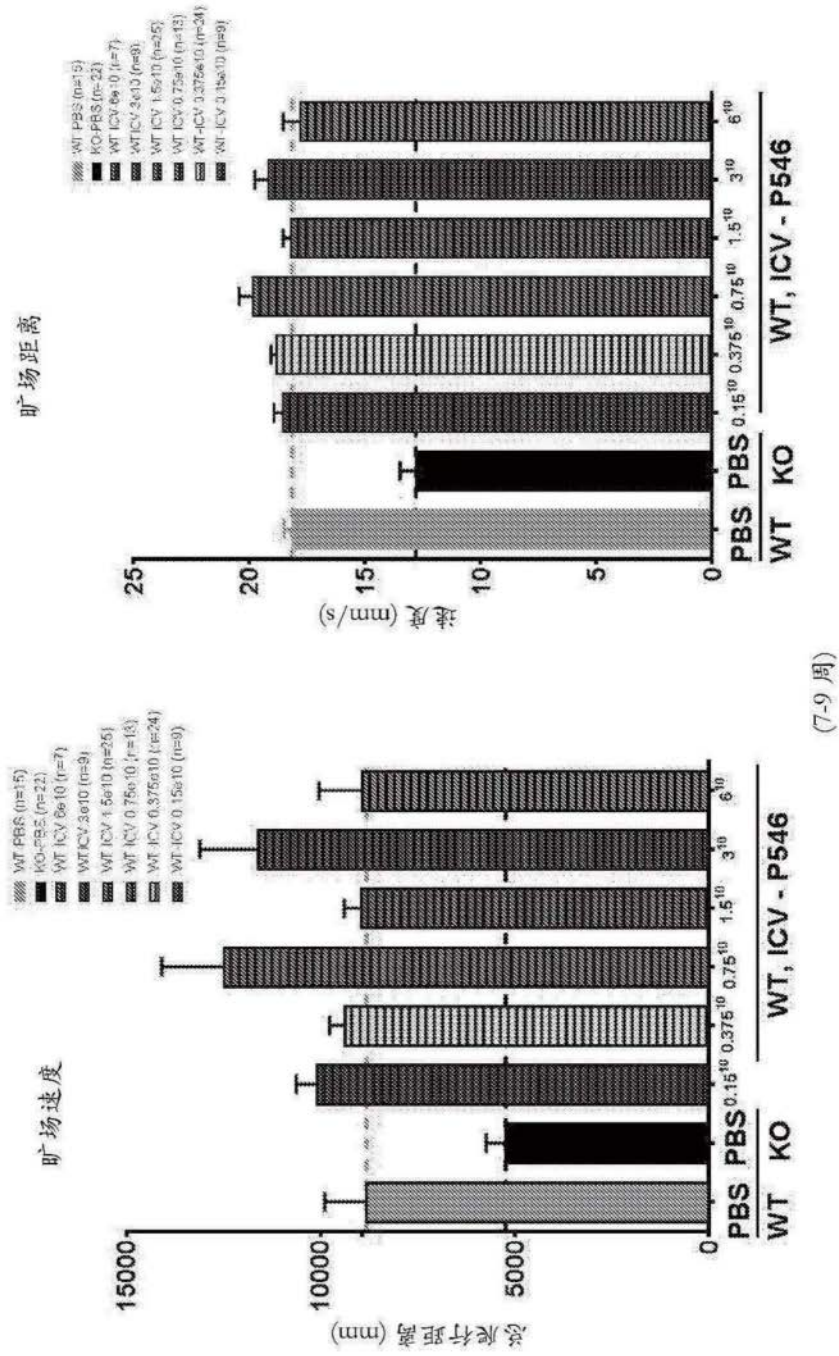


图36

AAV9-P546-MeCP2对野生型小鼠旋转试验表现的影响

ICV 递送野生型

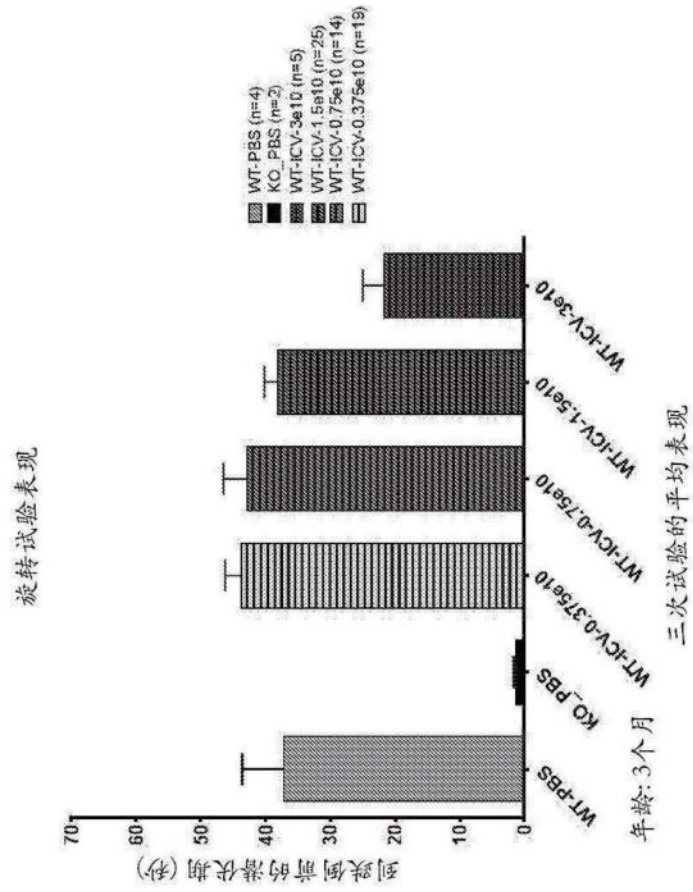


图37

用于RTT基因疗法的Kaspar实验室新病毒载体

J. Neurosci [神经科学杂志], 2013

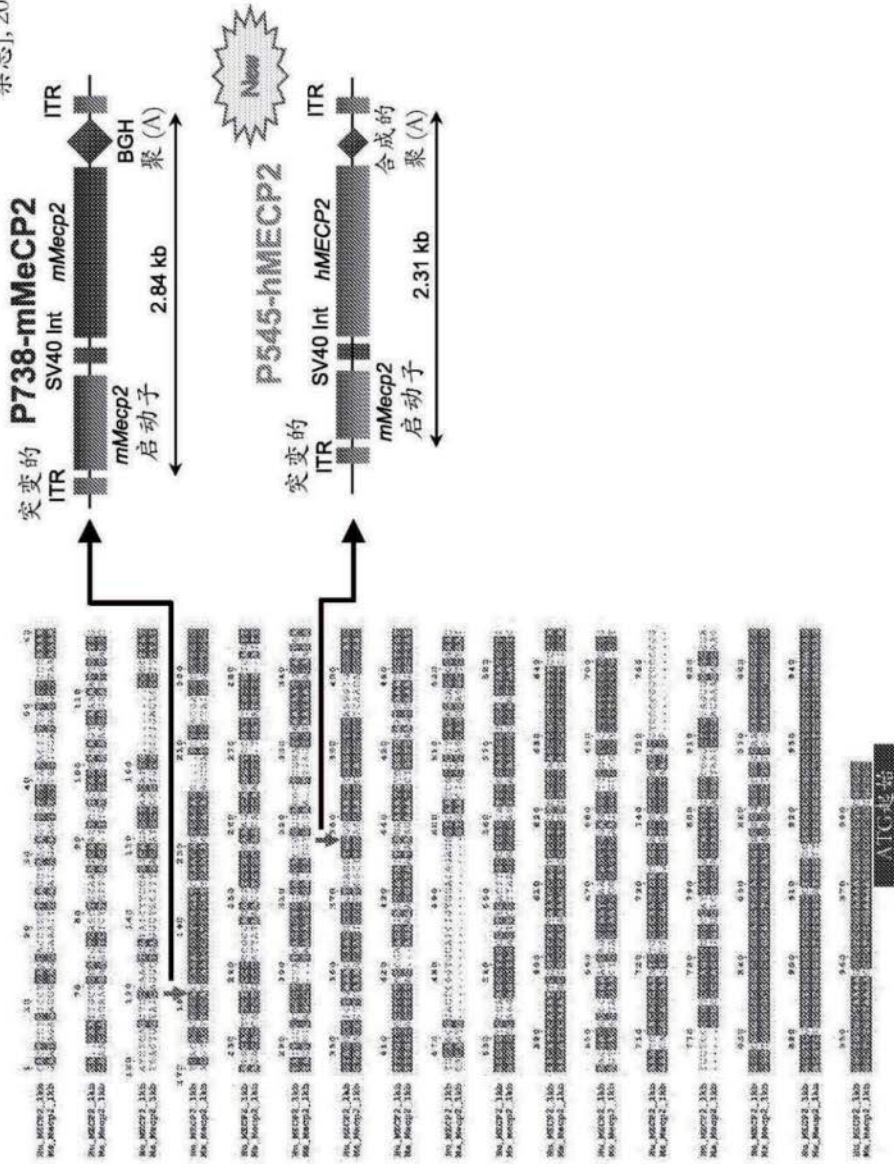


图38

P545-MeCP2导致在星形胶质细胞中稳健表达

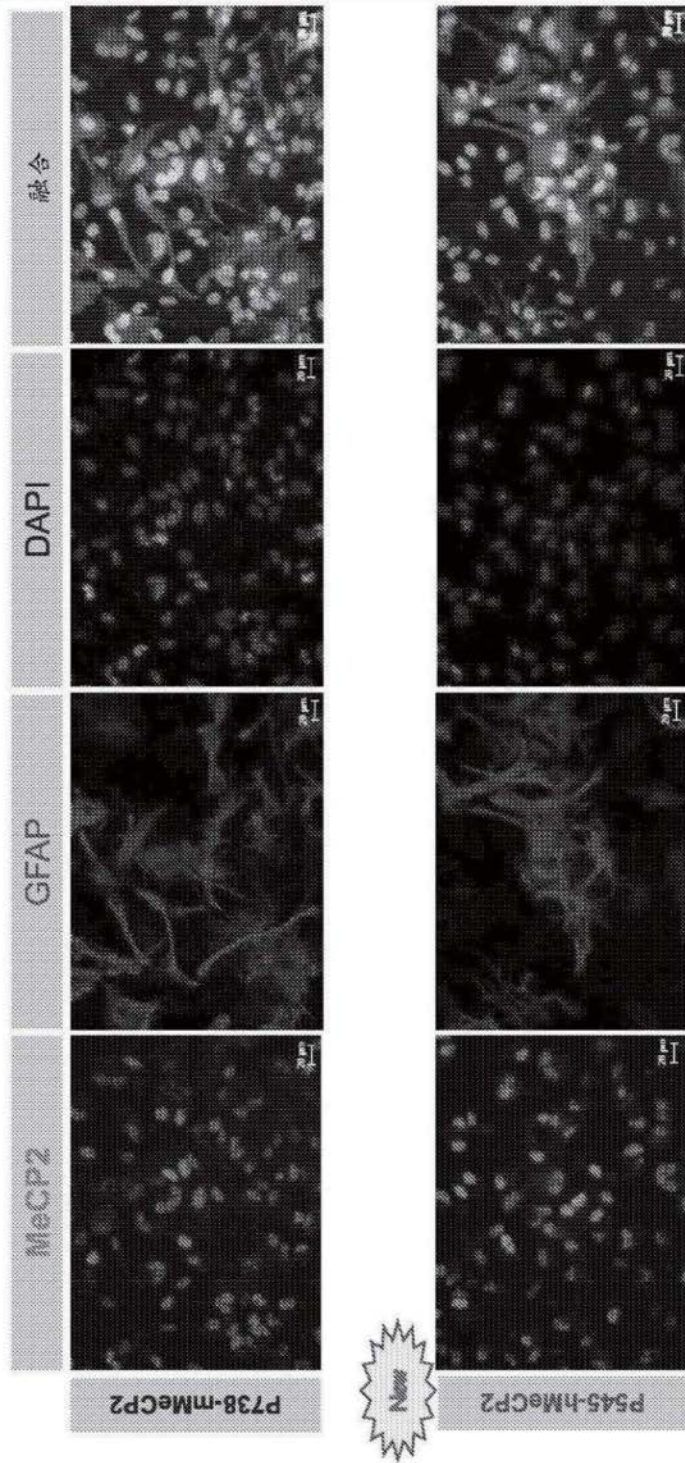


图39

P545-MeCP2导致在神经元中稳健表达

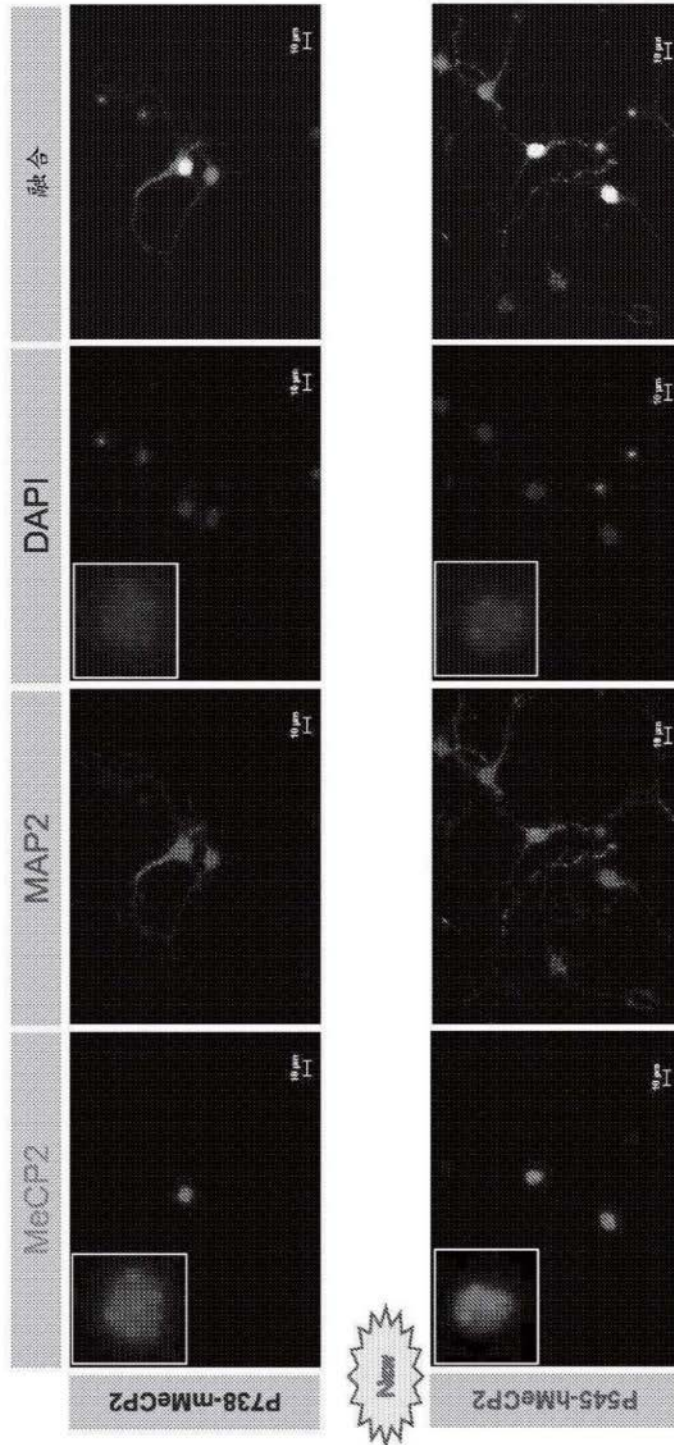


图40

ΔAV9-p545-MECP2允许在小鼠脑中同时治疗神经元和星形胶质细胞

MeCP2<sup>Y/-</sup>

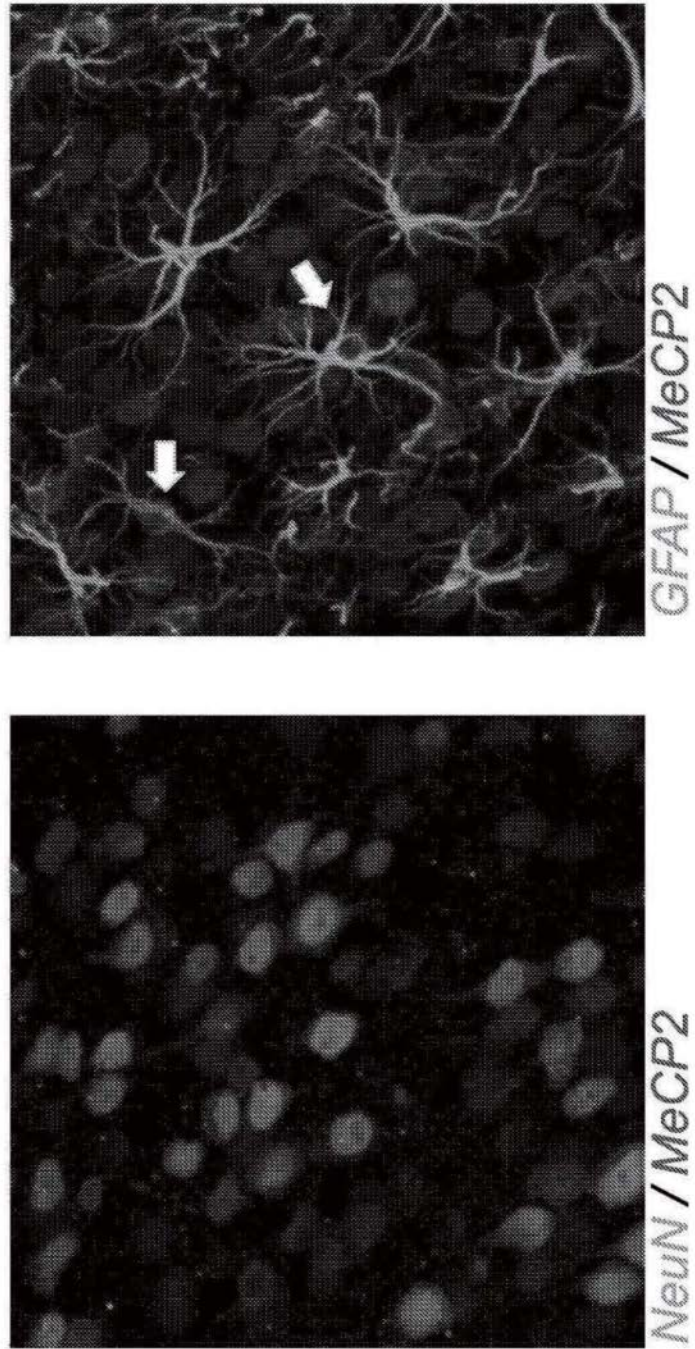
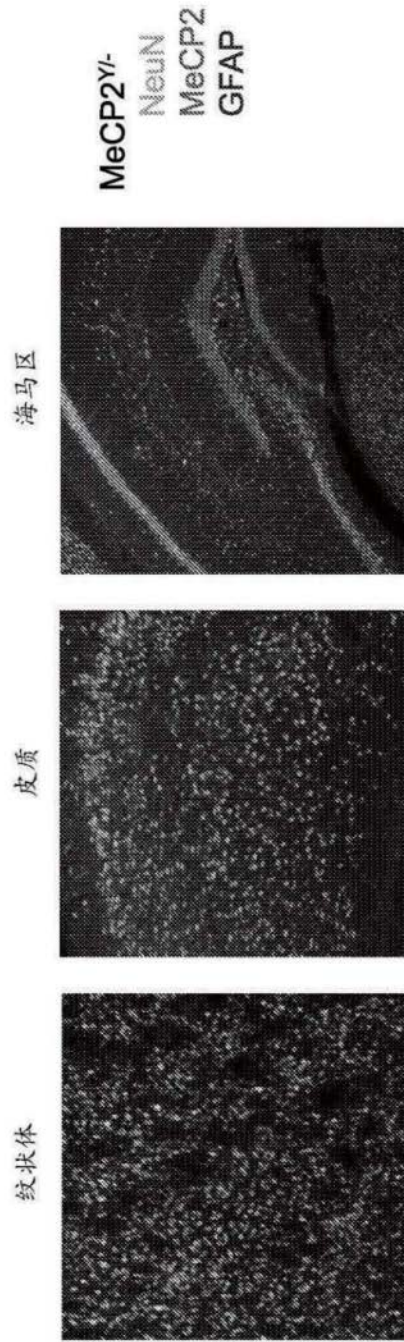


图41

在新生 MeCP2<sup>Y/-</sup>小鼠中ICV注射AAV9-p545\_MECP2  
导致神经元和星形胶质细胞的转导



AAV9-p545\_MECP2 ICV 注射, 88 日龄

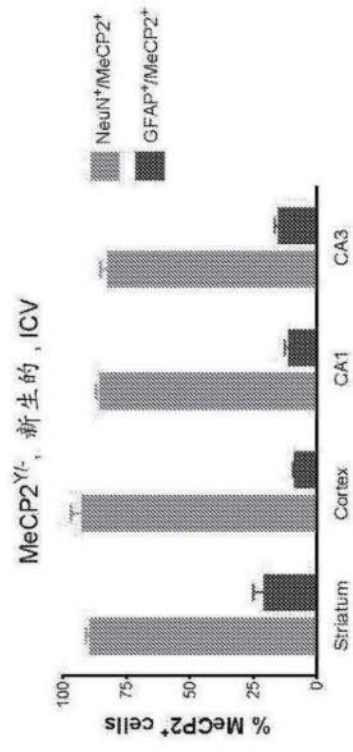


图42

ICV注射AAV9-P545-MECP2大大增加了MeCP2<sup>Y/-</sup>小鼠的寿命

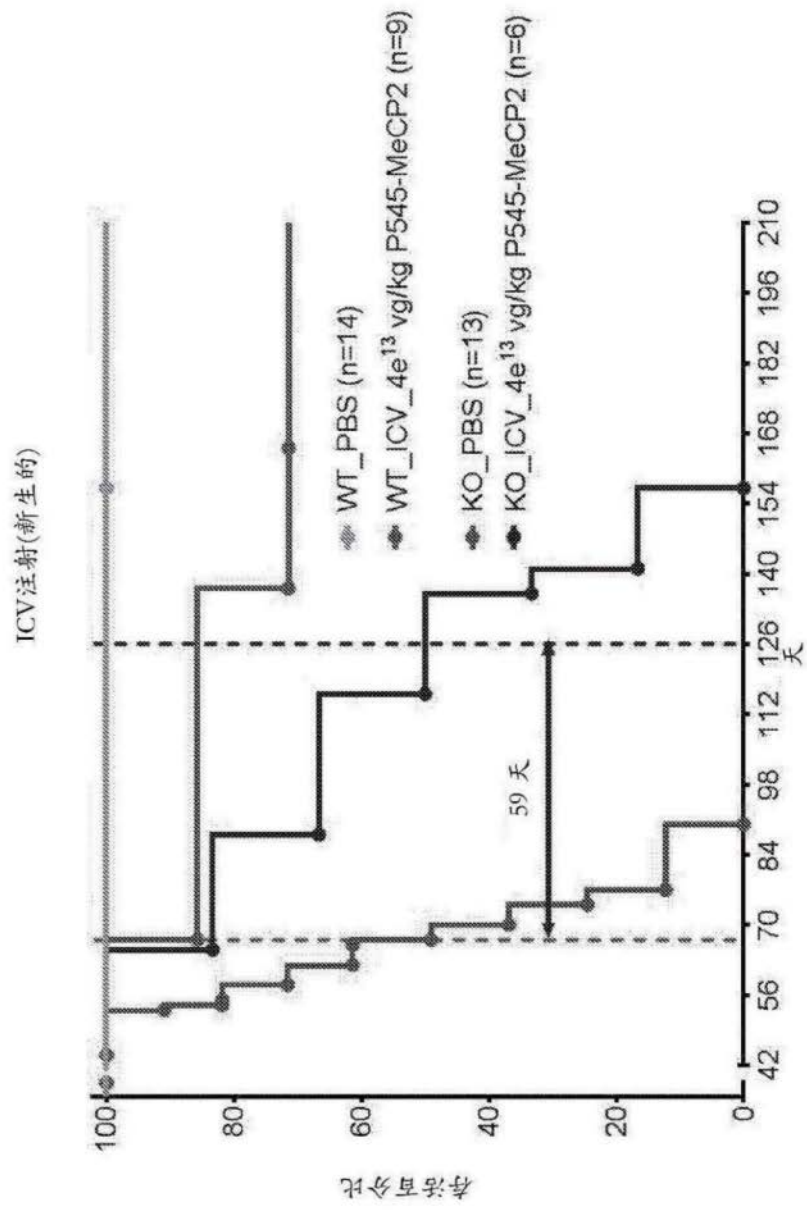


图43

AAV9-P545-MECP2改善了MECP2<sup>fl/fl</sup>小鼠的行为评分并且并不改变治疗的WT小鼠的行为

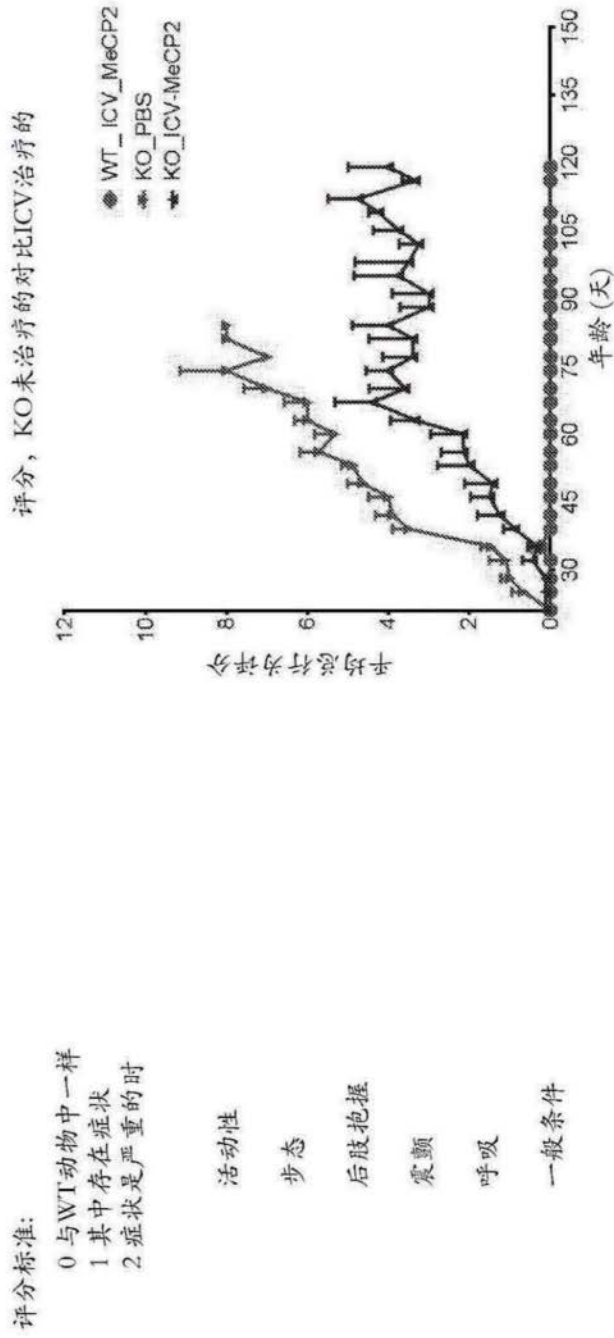


图44

AAV9-P545-MECP2改善了MECP2<sup>-/-</sup>小鼠的表现

旷场分析

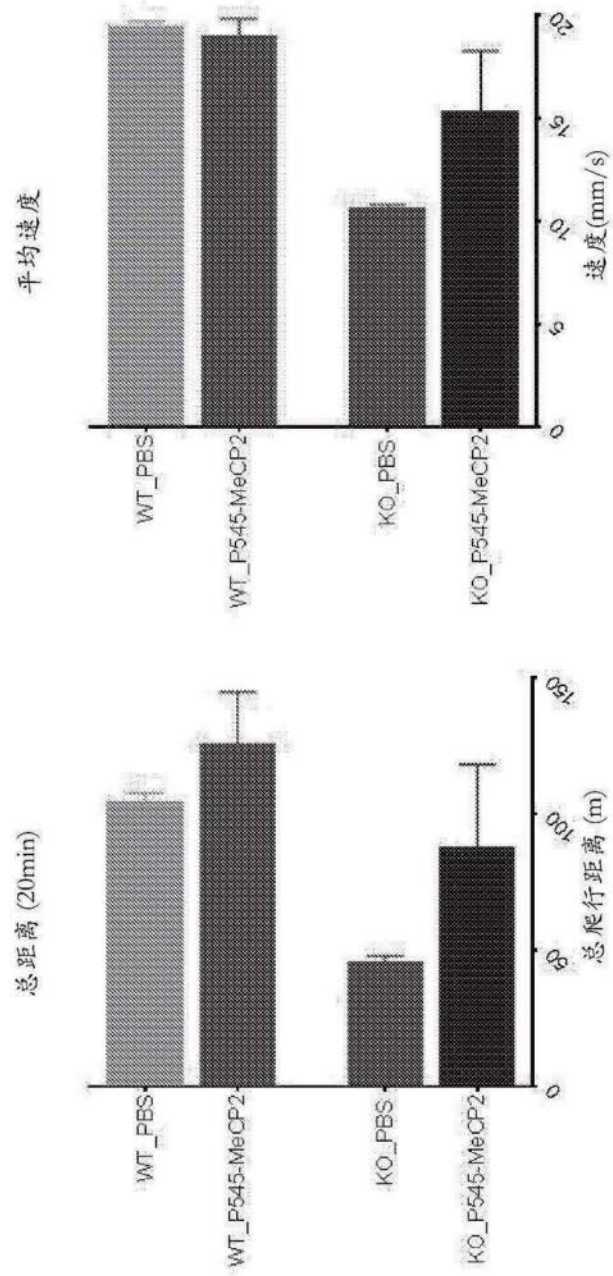


图45

在新生野生型小鼠中ICV注射AAV9-P545\_MeCP2并不导致肝毒性

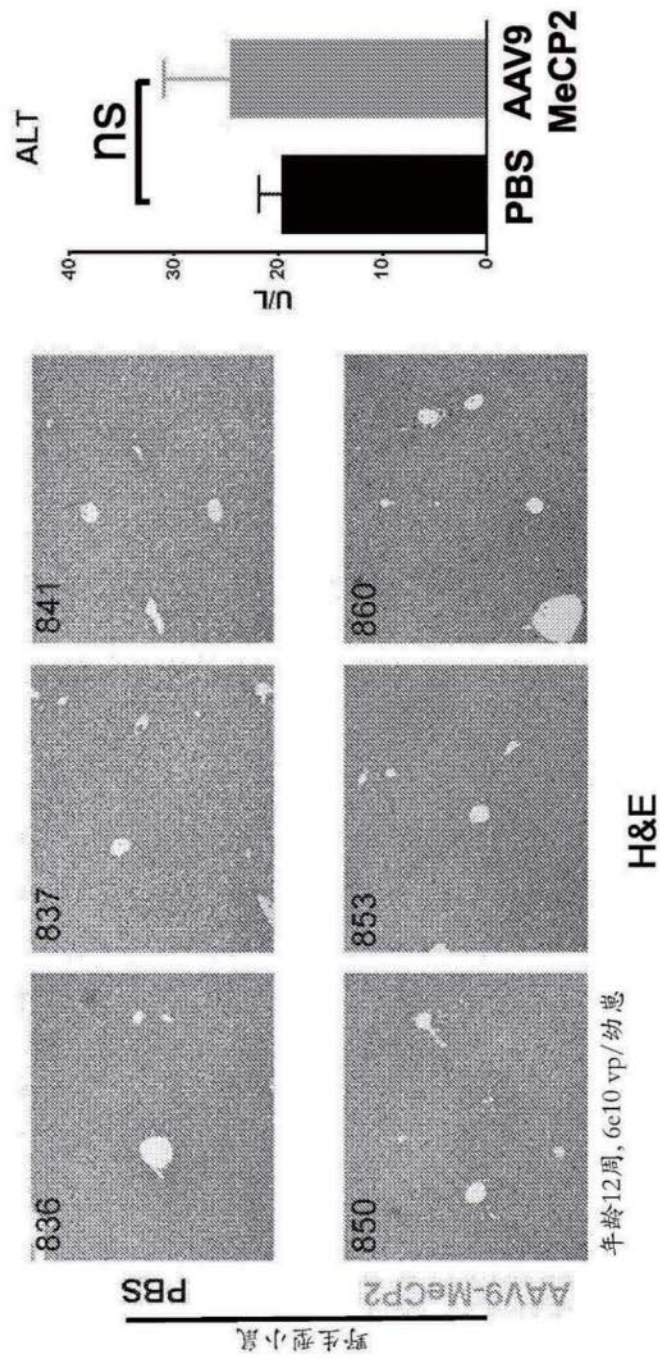


图46