[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680023775.4

[51] Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 7 月 2 日

[11] 公开号 CN 101212988A

[22] 申请日 2006.5.2
[21] 申请号 200680023775.4
[30] 优先权
[32] 2005.5.2 [33] US [31] 60/677,057
[32] 2005.5.31 [33] US [31] 60/685,808
[86] 国际申请 PCT/US2006/017242 2006.5.2
[87] 国际公布 WO2006/119458 英 2006.11.9
[85] 进入国家阶段日期 2007.12.28

[71] 申请人 建新公司
地址 美国马萨诸塞州
[72] 发明人 M·A·帕西尼 J·道奇
G·R·斯图尔特

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 戈 泊

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 18 页

[54] 发明名称

神经代谢疾病的基因治疗

[57] 摘要

本公开涉及用于治疗影响中枢神经系统(CNS)疾病的方法和组合物。这些疾病包括影响中枢神经系统的神经代谢疾病如溶酶体贮积病，例如，Niemann－PickA 疾病。它们还包括如阿尔茨海默氏病的疾病。所公开的方法包括将神经的轴突末梢接触含有高滴定度携带治疗性转基因的 AAV 的组合物，使得 AAV 载体以逆向方式得到轴突运输且转基因产物在给药位点的远侧得到表达。

1．一种方法，包括：在使得所述的被注射的 AAV 载体转导位于中枢神经系统中远侧位点的细胞且所述的编码的生物活性分子得到翻译的条件下，将含有编码生物活性分子的 AAV 载体的组合物给药于哺乳动物疾病损害的中枢神经系统中的位点。

2．权利要求 1 的方法，其中翻译的生物活性分子然后得到表达。

3．权利要求 1 的方法，其中哺乳动物患有溶酶体贮积病或异常胆固醇代谢。

4．权利要求 3 的方法，其中溶酶体贮积病是 Niemann Pick A 疾病。

5．权利要求 1 的方法，其中哺乳动物是人。

6．权利要求 1 的方法，其中该远侧位点在给药位点的对侧。

7．权利要求 1 的方法，其中该给药位点在选自脊髓、脑干、海马体、纹状体、延髓、脑桥、中脑、小脑、丘脑、下丘脑、大脑皮层、枕叶、颞叶、顶叶或额叶的 CNS 区域中。

8．权利要求 1 的方法，其中给药位点在海马体中且远侧位点在选自对侧齿状回、对侧 CA3、内侧中隔或内嗅区皮层的脑区域中。

9．权利要求 1 的方法，其中给药位点在选自纹状体或小脑的脑区域中，且远侧位点在选自黑质或延髓的脑区域中。

10．权利要求 9 的方法，其中给药位点在小脑的深部小脑核中。

11．权利要求 1 的方法，其中 AAV 载体具有 AAV 血清型 1 衣壳。

12．权利要求 3 或 4 的方法，其中 AAV 载体具有 AAV 血清型 1 衣壳。

13．权利要求 10 的方法，其中 AAV 载体具有 AAV 血清型 1 衣壳。

14．权利要求 1 的方法，其中 AAV 载体是 AAV1 或 AAV2/1。

15．权利要求 3 或 4 的方法，其中 AAV 载体是 AAV1 或 AAV2/1。

16．权利要求 10 的方法，其中 AAV 载体是 AVV1 或 AAV2/1。

17．权利要求 1 的方法，进一步包括将组合物给药于哺乳动物 CNS 中的第二个位点，其中组合物包括含有编码生物活性分子产物的多核苷酸的 AAV 载体。

18．权利要求 17 的方法，其中第二个给药位点是在第一个给药位点的对侧。

19．权利要求 2 的方法，其中生物活性分子是溶酶体水解酶。

20．权利要求 19 的方法，其中溶酶体水解酶是表 1 中所列的溶酶体水解酶中的任

何一种。

21．权利要求 20 的方法，其中溶酶体水解酶是酸性神经鞘磷脂酶。

22．权利要求 1 的方法，其中给药位点在深部小脑核中且远侧位点是脊髓。

23．权利要求 1 的方法，其中给药位点和远侧位点之间的距离为至少 2mm。

24．权利要求 1 的方法，其中组合物中 AAV 载体的浓度为至少 5×10^{12}gp/ml。

25．一种方法，包括：在使得所述的被注射的 AAV 载体转导位于中枢神经系统中远侧位点的细胞且所述编码的金属内肽酶得到表达的条件下，将含有编码金属内肽酶分子的 AAV 载体的组合物给药于患有阿尔茨海默氏病哺乳动物的中枢神经系统中的位点。

26．权利要求 25 的方法，其中金属内肽酶选自脑啡肽酶、insulysin 或 thimet 寡肽酶。

27．权利要求 1 或 25 的方法，其中 AAV 载体选自 AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7 或 AAV8。

28．权利要求 25 的方法，其中给药位点和远侧位点之间的距离为至少 2mm。

29．权利要求 25 的方法，其中组合物中 AAV 载体的浓度为至少 5×10^{12}gp/ml。

30．权利要求 29 的方法，其中 AAV 选自 AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7 或 AAV8。

31．权利要求 29 的方法，其中 AAV 是重组 AAV 载体。

32．权利要求 29 的方法，其中重组 AAV 载体选自 AAV2/1、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/7 或 AAV2/8 血清型载体。

神经代谢疾病的基因治疗

依据US的35U.S.C§119（e），本申请享有2005年5月2日申请的U.S.临时申请No.60/677,057和2005年5月31日申请的U.S.临时申请No.60/685,808的优先权。

技术领域

本发明涉及治疗影响中枢神经系统（CNS）特别是脊髓的疾病的组合物和方法。本发明进一步涉及包括病毒载体如腺相关病毒（AAV）载体的组合物及其给药方法。

背景技术

一组称为溶酶体贮积症（LSD）的代谢疾病包括超过四十种的遗传疾病，其中许多涉及各种溶酶体水解酶的遗传缺陷。代表性的溶酶体贮积症和相关的缺陷的酶列于表1中。

表1

溶酶体贮积症	缺陷的酶
天冬氨酰葡糖胺尿症	天冬氨酰氨基葡糖苷酶
Fabry	α-半乳糖苷酶
婴儿Batten病*（CNL1）	棕榈酰蛋白质硫酯酶
典型晚期婴儿Batten病*（CNL2）	三肽基肽酶
少年Batten病*（CNL3）	溶酶体跨膜蛋白
Batten，其他形式*（CNL4-CNL8）	多重基因产物
胱氨酸病（cyctinosis）	半胱氨酸运输子
Farber	酸性神经酰胺酶
岩藻糖储积症	酸性α-L-岩藻糖苷酶
Galactosidosialidosis	保护蛋白/组织蛋白酶A
1，2*和3*型Gaucher	酸性β-葡糖苷酶或葡糖脑苷脂酶
G_{M1}神经节苷脂沉积症	酸性β-半乳糖苷酶
Hunter*	艾杜糖醛酸酯-2-硫酸酯酶
Hurler-Scheie*	α-L-艾杜糖苷酸酶
Krabbe*	半乳糖脑苷脂酶

α-甘露糖苷过多症*	酸性 α-甘露糖苷酶
β-甘露糖苷过多症*	酸性 β-甘露糖苷酶
Maroteaux-Lamy	芳基硫酸酯酶 B
异染性脑白质退化症*	芳基硫酸酯酶 A
Morquio A	N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯硫酸酯酶
Morquio B	酸性 β-半乳糖苷酶
粘脂贮积病 II/III*	N-乙酰葡糖胺-1-磷酸转移酶
Niemann-Pick A*，B	酸性神经鞘磷脂酶
Niemann-Pick C*	NPC-1
Pompe*	酸性 α-葡糖苷酶
Sandhoff*	β-己糖胺酶 B
Sanfilippo A*	类肝素 N-硫酯酶
Sanfilippo B*	α-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶
Sanfilippo C*	乙酰-CoA: α-氨基葡糖苷 N-乙酰基转移酶
Sanfilippo D*	N-乙酰葡糖胺-6-硫酸酯硫酯酶
Schindler 疾病*	α-N-乙酰氨基半乳糖苷酶
Schindler-Kanzaki	α-N-乙酰氨基半乳糖苷酶
唾液酸贮积症	α-Neuramidase
Sly*	β-葡糖苷酸酶
Tay-Sachs*	β-己糖胺酶 A
Wolman*	酸性脂酶

*涉及 CNS

LSD 的标志性特征是溶酶体中代谢物的异常累积，这导致核周体中大量扩张的溶酶体的形成。治疗 LSD（与治疗肝脏特异性酶病相反）的主要挑战是需要逆转多个分开组织中的溶酶体贮积病理。一些 LSD 可以通过静脉内灌输缺少的酶得到有效的治疗，称为酶替代疗法（ERT）。例如，1 型 Gaucher 患者只具有内脏疾病并很好地应答使用重组葡糖脑苷脂酶（Cerezyme®，Genzyme，Corp.）的 ERT。然而，患有影响 CNS 的代谢疾病（例如，2 或 3 型 Gaucher 疾病）的患者不应答静脉内 ERT，因为替代的酶被血脑屏障（BBB）阻止进入大脑。此外，通过直接注射将替代酶引入大脑的尝试已经不成功，部分是由于高局部浓度的酶的细胞毒性（未公开的观察）和大脑中有限的实质扩散速率（Pardridge，Peptide Drug Delivery to the Brain（肽药物至大脑的传送），Raven Press，1991）。

阿尔茨海默氏病（AD）是影响中枢神经系统（CNS）的疾病，特征在于由于降低的 Aβ 分解代谢的淀粉样 β-肽（Aβ）累积。随着 Aβ 累积，其聚合成胞外斑，引起突触功能的损伤和神经元的丧失。病理导致痴呆、丧失协调和死亡。

基因治疗是用于影响 CNS 的疾病的新兴治疗形式，影响 CNS 的疾病包括 LSD 和阿尔茨海默氏病。在该方法中，通过用携带健康形式或修饰形式基因的载体转导受影响的细胞来产生正常代谢途径的恢复和病理的逆转。

通过产生能够有效感染有丝分裂后的神经元的病毒载体来促进 CNS 基因治疗。对于将基因传送至 CNS 的病毒载体的概述，参见 Davidson 等（2003）Nature Rev.，4:353-364。认为腺相关病毒（AAV）载体对于 CNS 基因治疗是最佳的，因为它们具有适当的毒性和免疫原性特征，能够转导神经细胞并能够介导 CNS 中的长期表达（Kaplitt 等（1994）Nat. Genet.，8:148-154；Bartlett 等（1998）Hum.Gene Ther.，9:1181-1186 和 Passini 等（2002）J.Neurosci.，22:6437-6446）。

治疗性转基因产物，例如，酶，可以通过转导的细胞分泌并随后由其他细胞吸收，然后它将在其中缓解病理。将这种方法称为交叉校正（Neufeld 等（1970）Science，169:141-146）。然而，病理如 LSD 范围中贮积病理的校正，由于注射的载体和分泌的转基因产物的有限实质扩散，通常限于注射位点紧靠的附近（Taylor 等（1997）Nat. Med.，3:771-774；Skorupa 等（1999）Exp. Neurol.，160:17-27）。因此，影响多个脑区域的神经病理学需要广泛分布的载体传送，使用多个空间分布的注射，尤其在大的脑中如人脑中注射。这显著增加了脑损伤的风险。此外，一些脑区域是外科手术难以接近的。因此，CNS 内除了扩散以外的其他载体运输方式将是有益的。

在轴突末梢给药时，一些病毒被纳入并沿着轴突逆向运输至核。一个脑区域中的神经元通过轴突与远侧脑区域互相连接，因此提供了用于载体传送的运输系统。使用腺病毒、HSV 和伪狂犬病病毒的研究已经使用这些病毒将基因传送至脑内远侧结构的运输特征（Soudas 等（2001）FASEB J.，15:2283-2285；Breakefield 等（1991）New Biol.，3:203-218 和 deFalco 等（2001）Science，291:2608-2613）。

几组已经报道了通过 AVV 血清型 2（AAV2）的脑转导限于颅内注射位点（Kaplitt 等（1994）Nat. Genet.，8:148-154；Passini 等（2002）J. Neurosci.，22:6437-6446 和 Chamberlin 等（1998）Brain Res.，793:169-175）。一个最近的报道表明 AAV2 的逆向轴突运输也可以在正常大鼠脑的选定回路中发生（Kaspar 等（2002）Mol. Ther.，5:50-56）。然而，不知道是什么特定参数负责观察到的轴突运输，以及处于细胞机能障碍状态的患病神经元是否将产生足量而有效的轴突运输。实际上，已经报道了 LSD 神经元中观察到的损伤影响轴突运输乃至阻断轴突运输（Walkey（1998）Brain Pathol.，8:175-193 的综述），表明疾病损害的神经元不支持 AAV 沿着轴突的运输。

因此，本领域中存在产生用于治疗影响 CNS 的代谢疾病的新治疗方法的需要。

发明内容

本发明提供了用于治疗或预防代谢疾病的方法和组合物，这些疾病如特征在

于 CNS 功能降低的风险或与 CNS 功能降低的风险相关的溶酶体贮积病（LSD）或异常胆固醇贮积功能。

本发明提供了用于治疗或预防影响中枢神经系统（CNS）的疾病的方法和组合物，这些疾病如特征在于 CNS 功能降低的风险或与 CNS 功能降低的风险相关的阿尔茨海默氏病。

本发明进一步提供了将转基因最低程度侵害性的靶向传送至受影响患者脑中选定区域的方法。

本发明的其他优势将部分列于以下的描述中，部分将从说明书中理解，或可以通过本发明的实践得知。

酸性神经鞘磷脂酶（ASM）敲除小鼠，Niemann-Pick A 型疾病的模型，通过单次颅内注射进入脑的一个半球给药携带人 ASM 基因（AAV-ASM）的 AAV2 载体。本发明是部分基于以下的发现和证明：高滴定度 AAV-ASM 注射至患病的脑导致 AAV-ASM 在多个远侧部位内以与神经支配注射位点的投射神经元的形态构造（topographical organization）相符的模式表达。本发明进一步部分基于以下的发现和证明：溶酶体贮积病理在 AAV-ASM 注射位点和运输到达并在其中表达 ASM 的远侧部位的广泛校正。

在另一个方面中，本发明提供了在 ASMKO 小鼠中深部小脑核内单侧或者双侧注射后的校正胆固醇贮积病理和启动功能恢复的方法。

进一步提供的是上述方法，其中在选自 AAV2/1、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/7 或 AAV2/8 血清型的重组 AAV 载体中传送转基因。只为了说明的目的，重组载体在小鼠模型中编码功能性人 ASM 蛋白质。

因此，在一方面中，本发明提供了治疗哺乳动物神经代谢疾病的方法。通过本发明的方法治疗的群体包括，但不限于，具有 LSD 或处于产生 LSD 风险中的患者，如表 1 中所列的疾病，特别地，如果这样的疾病是影响 CNS 的疾病。在说明性的实施方案中，疾病是 Niemann-Pick A 疾病和/或通常与 NPA 相关的继发性胆固醇贮积病理。

在一方面中，公开的方法包括将携带编码治疗产物的转基因的 AVV 病毒载体给予受折磨患者的 CNS 并允许转基因在远离给药位点的 CNS 内以治疗水平表达。此外，载体可以包括编码有效治疗 CNS 疾病的生物活性分子的多核苷酸。这样的生物活性分子可以包括肽，包括但不限于，天然或突变形式的全长蛋白质、天然或突变形式的蛋白片段、合成的多肽、抗体和抗体片段如 Fab’分子。生物活性分子还可以包括核苷酸，包括单链或双链 DNA 多核苷酸和单链或双链 RNA 多核苷酸。对于可以用于在此公开的方法的实践中的示例核苷酸技术的综述，参见 Kurreck，（2003）J.，Eur. J. Biochem. 270，1628-1644[反义技术]；Yu 等（2002）PNAS 99(9)，6047-6052[RNA 干扰技术]和 Elbashir 等（2001）Genes Dev.，15(2):188-200[siRNA 技术]。

在说明性的实施方案中，通过将高滴定度 AAV 载体溶液直接实质内注射至患病的脑中来实现给药。此后以治疗水平在给药位点的远侧、对侧或同侧表达转基因，离开给药位点至少 2、3、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50mm。

在另一个方面中，本发明还提供了体内传送重组 AAV 基因组至疾病损害神经元的核的方法。在一些实施方案中，通过神经元呈现的细胞病理是溶酶体贮积病，如表 1 中所列的疾病。在说明性的实施方案中，疾病是 Niemann-Pick A 疾病。在另一个实施方案中，呈现的细胞病理为阿尔茨海默氏病的。将重组 AAV 基因组传送至疾病损害神经元的核的方法包括将疾病损害的神经元的轴突末梢接触含有 AAV 病毒颗粒的组合物，该 AAV 病毒颗粒含有重组 AAV 基因组，并使病毒颗粒被内吞并沿着轴突逆向胞内运输至神经元的核。组合物中载体的浓度至少为：（a）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times 10^{12}$gp/ml）；（b）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times 10^{9}$tu/ml）；或（c）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times 10^{10}$iu/ml）。在特定的实施方案中，神经元是投射神经元和/或轴突末梢至神经元核的距离至少为 2、3、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50mm。

本发明提供了将转基因传送至患者的脊髓和/或脑干部位的方法和组合物，通过将含有转基因的重组向神经性病毒载体给药至患者脑的深部小脑核（DCN）部位的至少一个部位。病毒传送是在脊髓和/或脑干部位中转基因有利表达的条件下进行。在说明性的实施方案中，疾病是 Niemann-Pick A 疾病。在其他实施方案中，呈现的细胞病理是阿尔茨海默氏病的。

在另一方面中，本发明提供了将转基因传送至患者脊髓的方法和组合物，通过将含有转基因的重组向神经性病毒载体给药至患者脑的运动神经皮层区。病毒载体的传送是在脊髓中转基因有利表达的条件下进行。给药于运动神经皮层区的病毒载体通过运动神经元通过它们的细胞体部分纳入，且转基因得到表达。然后表达的转基因经历顺行运输至运动神经元的轴突末梢部分，其存在于脊髓中。由于运动神经皮层区的性质，给药于该脑部位的病毒载体还可以通过运动神经元的轴突末梢纳入。病毒载体还可以经历沿着运动神经元轴突的逆向运输并在运动神经元的细胞体中得到表达。在说明性的实施方案中，疾病是 Niemann-Pick A 疾病。在其他实施方案中，呈现出的细胞病理是阿尔茨海默氏病的。

在另一个方面中，本发明提供了将治疗性转基因产物传送至受神经代谢疾病例如影响 CNS 的 LSD 折磨的哺乳动物中 CNS 的目标细胞的方法，目标细胞是神经元或神经胶质细胞。该方法包括将神经元的轴突末梢接触含有 AAV 载体的组合物，该载体携带至少部分编码治疗性转基因产物的基因，使病毒得到内吞并沿着轴突胞内逆向运输至神经元的核；使治疗性转基因产物通过神经元表达并分泌，并使得靶细胞吸收该治疗性转基因产物，其中治疗性转基因产物因此减轻目标细胞中的病理。在特定的实施方案中，组合物中载体的浓度至少为：（a）5、6、7、

8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times10^{12}$gp/ml）；（b）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times10^{9}$tu/ml）；或（c）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times10^{10}$iu/ml）。

在本发明的方法中，治疗性转基因编码生物活性分子，其在 CNS 中的表达导致至少部分神经病理的校正。在一些实施方案中，治疗性转基因产物是溶酶体水解酶。在说明性的实施方案中，溶酶体水解酶是 ASM。在其他实施方案中，治疗性转基因是金属内肽酶，例如，脑啡肽酶（neprilysin）。

可以理解前面的概述和以下的详述是示例性的，只是说明性的而不是所要求的本发明的限制。

附图说明

图 1A 描绘了在 2μl 高滴定度（9.3×10^{12}gp/ml）AAV-ASM 注射至海马体后 5 或 15 周，ASMKO 小鼠脑横截面的图。通过垂直线显示注射位点；如通过原位杂交检测的 ASM mRNA 表达是通过较小的圆圈表示；如通过免疫组织化学染色检测的 ASM 蛋白表达是通过较大的划上阴影线的圆圈表示。表达模式导致脑两个半球中海马体和皮层部位中大范围的病理逆转（通过淡阴影表示）。

图 1B 描绘了如图 1A 中所示的高滴定度 AAV 注射至海马体后，AAV 至小鼠脑远侧部位的轴突运输。注射至海马体（10）导致病毒载体通过海马体内的回路轴突运输至对侧海马体（20）并通过 entorhinodentate 回路运输至内嗅区皮层（30）。通过垂直线显示注射位点。

图 1C 是显示了小鼠脑的海马体内和 entorhinodentate 回路连接的示意图。注射至海马体（10）导致位于海马角（cornu ammonis）区域 3（CA3）和齿状回小神经胶质细胞层（G）中的细胞体的感染和转导。此外，注射的 AAV 载体的亚群感染神经支配注射位点的投射神经元的轴突，经历逆向轴突运输，并将转基因传送至海马体（20）对侧部位中的 CA3 区（CA3）和门（H），和同侧的内嗅区皮层（30）中。

图 2A 描绘了如图 1A 中所述的高滴定度 AAV-ASM 海马体内注射后 5 或 15 周，ASMKO 小鼠脑横截面的图。如通过原位杂交检测的 ASM mRNA 表达是通过较小的圆圈表示；如通过免疫组织化学染色检测的 ASM 蛋白表达是通过较大的划上阴影线的圆圈表示。注射导致在隔膜中检测到 ASM mRNA 和蛋白质。这种表达模式导致大范围的病理逆转（通过淡阴影表示）。

图 2B 描绘了如图 1A 中所示的高滴定度注射至海马体后，AAV 至小鼠脑远侧部位的轴突运输。注射至海马体（10）导致病毒载体通过隔海马（septohippocampal）回路从注射位点（通过垂直线表示）轴突运输至中隔（40）。

图 2C 是显示隔海马回路连接的示意图。注射至海马体导致转导至位于 CA3 区域（11）中的细胞体。此外，AAV 载体的亚群感染神经支配注射位点的投射神

经元的轴突末梢，经历逆向轴突运输，并将转基因传送至内侧中隔（40）。

图 3 描绘了高滴定度 AAV 注射至小鼠脑的纹状体（50）后，黑质纹状体回路中的 AAV 轴突运输。AAV 的轴突运输从注射位点（通过垂直线表示）至黑质（60）。

图 4 描绘了高滴定度 AAV-ASM 注射至 ASMKO 小鼠脑的小脑（70）后，延髓小脑（medullocerebellar）回路中的 AAV 轴突运输。AAV2 的轴突运输从注射位点（通过垂直线表示）至延髓（80）。

图 5 描绘了同侧海马体（10）中 AAV7-ASM 高滴定度注射后，海马体内、黑质纹状体和 entorhinodentate 回路中的 AAV 的轴突运输。如通过原位杂交所测定的，检测同侧海马体的 AAV7-ASM 注射后（通过垂直线表示），沿着对侧海马体（90）、内侧中隔（40）和内嗅区皮层（100）的整个吻-尾轴的转导细胞。

图 6A 至 6E 显示了将编码人 ASM 的不同 AAV 血清型载体 [(A)2/1、(B)2/2、(C)2/5、(D)2/7 和(E)2/8] 注射至 ASMKO 小鼠的深部小脑核后，矢状小脑截面中的人 ASM 免疫阳性染色。

图 7A 至 7E 证明了 hASM 从深部小脑核运输至脊髓。在用 AAV2/2-ASM、AAV2/5-ASM、AAV2/7-ASM & AAV2/8-ASM 处理的小鼠中观察到的效果：（A）hASM 10X 放大倍数；（B）hASM 40X 放大倍数；（C）共焦 hASM；（D）共焦 ChAT 和（E）共焦 hASM & ChAT。

图 8 显示了将编码人 ASM 的不同 AAV 血清型载体（2/1、2/2、2/5、2/7 和 2/8）注射至深部小脑核（n=5/组）后的小脑组织匀浆水平。没有通过相同字母连接的组是显著（p<.0001）差异的。

图 9A 至 G 显示了将编码人 ASM 的不同 AAV 血清型载体 [(A)2/1、(B)2/2、(C)2/5、(D)2/7 和(E)2/8] 注射至 ASMKO 小鼠的深部小脑核中后，矢形小脑截面中的钙结合蛋白免疫阳性染色。

图 10A 和 10B 显示了 ASMKO（注射 AAV-βgal 的）、WT 和 AAV-ASM 处理的 ASMKO 小鼠（n=8/组）的加速和摇摆旋转表现（rotarod performance）（在 14 周龄时）。没有通过相同字母连接的组是显著差异的。注射 AAV2/1-ASM 和 AAV2/8-ASM 的小鼠证明了在加速旋转测试中延迟跌倒时间显著长于注射 AAV2/1-βgal 的 ASMKO 小鼠（p<.0009）。对于摇摆旋转测试，注射 AAV2/1-ASM 的小鼠证明了延迟跌倒时间显著长于注射 AAV2/1-βgal 的小鼠（p<.0001）。

图 11A 和 11B 显示了 ASMKO（n=8）、WT（n=8）和两侧 AAV-ASM（n=5/组）处理的小鼠（20 周龄时）的旋转表现。对于加速和摇摆测试，AAV-ASM 处理的小鼠表现显著（p<.001）好于 ASMKO AAV2/1-βgal 处理的小鼠。在加速和摇摆测试中，注射 AAV2/1-ASM 的小鼠的表现与野生型小鼠的是不可区分的。

图 12 显示了两侧注射 AAV1-βgal 或编码 hASM 的 AAV 血清型 1 和 2 的 ASMKO 小鼠（20 周龄时）的脑神经鞘磷脂水平。将脑分成 5 个头尾(rostrocaudal)区（S1=最头端和 S5=最尾端）。星号表示数据点是与 ASMKO 小鼠显著不同的

（$p<0.01$）。

图 13A 说明了深部小脑核区（内侧、中间（interposed）、外侧）和脊髓部分（颈部、胸部、腰部和骶骨部）之间的连接。图 13B 说明了深部小脑核区（内侧、中间（interposed）、外侧）和脑干区（中脑、脑桥、延髓）之间的连接。通过箭头表示连接，其开始于神经元的细胞体部分和结束于神经元的轴突末梢部分。例如，DCN 的三个区各自具有神经元，该神经元带有发送终止于脊髓颈部的轴突的细胞体而脊髓的颈部具有发送终止于 DCN 内侧或中间区的轴突的细胞体。

图 14 说明了编码绿色荧光蛋白（GFP）的 AAV 的 DCN 传送后，脑干或上位运动神经元中的绿色荧光蛋白分布。

图 15 说明了编码绿色荧光蛋白（GFP）的 AAV 的 DCN 传送后，脊髓部位中的绿色荧光蛋白分布。

图 16 显示了表达 GFP 的 AAV1 载体两侧传送至深部小脑核（DCN）后，小鼠脑内的 GFP 分布。除了 DCN，还在嗅球、大脑皮层、丘脑、脑干、小脑皮层和脊髓中观察到 GFP 阳性染色。所有这些区域接受来自 DCN 的投射和/或发送投射至 DCN。

具体实施方式

为了更容易地理解本发明，首先定义特定的术语。在整个详述中列出其他定义。

术语“转基因”指的是引入细胞中并能够在合适条件下得到翻译和/或表达并给予将其引入的细胞所需的特性或另外导致所需治疗结果的多核苷酸。

术语“基因组颗粒（gp）”或“基因组等价物”，当关于病毒滴定度所用时，指的是含有重组 AAV DNA 基因组的病毒粒子的数量，与感染力或功能性无关。可以通过如在此实施例中所述的或例如在 Clark 等（1999）Hum.Gene.Ther.，10:1031-1039；Veldwijk 等（2002）Mol.Ther.6:272-278 中所述的方法来测量特定载体制剂中的基因组颗粒的数量。

术语“感染单位（iu）”、“感染性颗粒”或“复制单位”，当关于病毒滴定度所用时，指的是感染性的并能够复制的重组 AAV 载体颗粒的数量，如通过感染性中心测试（infectious center assay）所测量的，也称为复制性中心测试（replication center assay），如描述于 McLaughlin 等（1988）J. Virol.，62:1963-1973。

术语“转导单位（tu）”，当关于病毒滴定度所用时，指的是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，如在功能性测试中所测量的，如在此的实施例中所述的，或例如，在 Xiao 等，（1997）Exp. Neurobiol.，144:113-124；或在 Fisher 等（1996）J. Virol.，70:520-532（LFU 测试）中所述的。

术语“治疗的”、“治疗有效量”及其同源词指的是导致患者症状的防止或发作延迟或缓解或获得所需生物结果的化合物含量，所需的生物结果如神经病理的

校正，例如，与溶酶体贮积病相关的细胞病理，如在此所述的或 Walkley（1998）Brain Pathol.，8:175-193 中所述的。术语“治疗校正”指的是导致患者症状的防止或发作延迟或缓解的校正程度。可以通过本领域公知的和随后部分中描述的方法来测定有效量。

方法和组合物

ASMKO 小鼠是公认的 A 型和 B 型 Niemann-Pick 疾病的模型（Horinouchi 等（1995）Nat. Genetics，10:288-293；Jin 等（2002）J. Clin. Invest.，109:1183-1191 和 Otterbach（1995）Cell，81:1053-1061）。Niemann-Pick 疾病（NPD）归类为溶酶体贮积病并且是遗传的神经代谢疾病，其特征在于酸性神经鞘磷脂酶（ASM；神经鞘磷脂胆碱磷酸水解酶，EC3.1.3.12）的遗传缺陷。功能性 ASM 蛋白质的缺乏导致整个脑内神经元和胶质细胞的溶酶体内神经鞘磷脂底物的累积。这导致核周体中大量扩张的溶酶体的形成，这是 A 型 NPD 的标志性特征和主要的细胞表型。扩张的溶酶体的存在与正常细胞功能的丧失和导致受影响个体幼年死亡的渐进性神经恶化过程相关（The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases（遗传疾病的代谢和分子基础），编辑 Scriver 等，McGraw-Hill，New York，2001，pp.3589-3610）。继发性细胞表型（例如，另外的代谢异常）也与这种疾病相关，特别是溶酶体细胞器中胆固醇的高水平累积。神经鞘磷脂对胆固醇具有强烈的亲和性，其导致 ASMKO 小鼠和人患者的溶酶体中大量胆固醇的螯合（sequestering）（Leventhal 等（2001）J. Biol. Chem.，276:44976-44983；Slotte（1997）Subcell. Biochem.，28:277-293 和 Viana 等（1990）J. Med. Genet.，27:499-504）。

本发明是部分基于以下的发现和证明：海马体内注射高滴定度 AAV-ASM 至 ASMKO 小鼠的患病脑中导致 ASM mRNA 和蛋白质以与神经支配注射位点的投射神经元的形态构造相一致的模式在远离注射位点表达。除了在注射位点的强烈表达，在同侧（注射的）海马体外的几个远侧部位中，特别地，在对侧海马体齿状回和 CA3，和内侧中隔和内嗅区皮层中也检测到 ASM mRNA 和蛋白质。本发明进一步部分基于以下的发现和证明：远侧部位的溶酶体贮积病理的大范围校正，因此通过较少数量的注射位点获得较大体积的校正。

因此，在一方面中，本发明提供了治疗哺乳动物神经代谢疾病的方法。通过本发明的方法治疗的群体包括但不限于，患有神经代谢疾病或处于产生神经代谢疾病风险中的患者，例如，LSD，如表 1 中所列的疾病，特别地是如果这样的疾病影响 CNS 的疾病。在说明性的实施方案中，疾病是 A 型 Niemann-Pick 疾病。在特定的实施方案中，神经代谢疾病可以排除阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病、Tay Sachs 病、Lesch Nyan 病和克雅(氏)病（Creutzfeldt-Jakob）病。然而，本发明使用金属内肽酶作为治疗转基因的方法，特别用于治疗阿尔茨海默氏病和淀粉状蛋白-相关疾病。

在一些实施方案中，治疗神经代谢疾病的方法包括给药高滴定度的携带治疗性转基因的 AAV 载体，使得转基因产物在 CNS 内远离第一个位点的第二个位点以治疗水平表达。在一些实施方案中，组合物的病毒滴定度是至少：(a) 5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50 ($\times 10^{12}$gp/ml)；(b) 5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50 ($\times 10^{9}$tu/ml)；或 (c) 5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50 ($\times 10^{10}$iu/ml)。在更多的实施方案中，通过直接实质内（intraparenchymal）注射高滴定度 AAV 载体溶液至患病的脑来实现给药，此后转基因以治疗水平在离给药位点至少 2、3、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50mm 的给药位点远侧、对侧或同侧表达。

第一和第二个位点之间的距离定义为给药位点（第一个位点）和远侧位点（第二个位点）可检测转导边缘之间的最小距离区域，如使用本领域已知的或实施例中所述的方法所测量的，例如，原位杂交。较大哺乳动物 CNS 中的一些神经元可以通过它们的轴突投射跨越大的距离。例如，在人类中，一些轴突可以跨越 1000mm 或更长的距离。因此，在本发明的各种方法中，AAV 可以沿着整个轴突长度在这样的距离上轴突运输来达到并转导母体细胞体。

基于所需的神经病理目标部位和所涉及的脑回路的形态来选择 CNS 内的载体给药位点，只要给药位点和目标区域具有轴突连接即可。例如，可以使用 3-D 立体定位坐标来限定目标区域。在一些实施方案中，选择给药位点使得注射载体总量的至少 0.1、0.5、1、5 或 10%在至少 1、200、500 或 1000mm^3 的目标区域得到远侧传送。给药位点可以位于连接脑远侧区域的投射神经元支配的区域内。例如，黑质和 bventral tegmental 区发送密集的投射至尾和壳核（总称为纹状体）。可以靶向黑质和腹侧背盖区内的神经元用于通过注射至纹状体后的 AAV 的逆向运输的转导。作为另一个实施例，海马体收到来自脑其他区域的边界明确（well-defined）的、可预测的轴突投射。其他给药位点可以位于，例如，脊髓、脑干（延髓和脑桥）、中脑、小脑（包括深部小脑核）、间脑（丘脑、下丘脑）、端脑（纹状体、脑皮层，或，皮层内，枕叶、颞叶、顶叶或额叶）或其组合。

对于人脑中结构的鉴定，参见，例如，The Human Brain: Surface，Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI，and Blood Supply（人脑：使用 MRI 的表面三维断层解剖，和供血），第 2 版，编辑 Deuteron 等，Springer Vela，1999；Atlas of the Human Brain（人脑图集），编辑 Mai 等，Academic Press; 1997 和 Co-Planar Sterotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensiaonal Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging（人脑的共面立体定向图集：3-维比例系统：脑成像的方法），编辑 Tamarack 等，Thyme Medical Pub.，1988。对于小鼠脑中结构的鉴定，参见，例如，The Mouse Brain in Sterotaxic Coordinate（立体定位坐标中的小鼠脑），第 2 版，Academic Press，2000。如果需要，可以将人脑结构与另一种哺乳动物脑中的相似结构相关连。例如，大部分哺乳动物，包括人和啮齿动物，显示

出相似的内嗅区-海马体投射的形态构造，侧向和内侧内嗅区皮层的侧部中的神经元投射至海马体的背部或中隔极（septal pole），而至腹侧海马体的投射主要源自内嗅区皮层内侧区的神经元（Principles of Neural Science（神经科学原理），第4版，编辑Kandel等，McGraw-Hill，1991；The Rat Nervous System（大鼠神经系统），第2版，编辑Paxinos，Academic Press，1995）。此外，内嗅区皮层的II层细胞投射至齿状回，且它们终止于齿状回分子层的外侧三分之二。来自III层细胞的轴突双侧投射至海马体的安蒙氏角区CA1和CA3，终止于层多孔分子层。

第二个（目标）位点可以位于含有投射至第一个（注射）位点的神经元的CNS任何区域中，包括脑和脊髓。在一些实施方案中，第二个位点是在选自黑质体、延髓或脊髓的CNS区域中。

为了将载体特异性地传送至中枢神经系统的特定区域，尤其是传送至脑的特定区域，可以通过立体定向微注射来给药。例如，在外科手术的那一天，患者将具有在适当位置固定（旋入颅骨中）的立体定向框架基。使用高分辨率MRI将带有立体定向框架基的脑（具有fiduciary标记的与MRI相容的）成像。然后MRI图像将转移至运行立体定向软件的计算机。将一组冠状、矢形和轴向图像用于测定载体注射的目标部位和轨迹。软件直接将轨迹翻译成适用于立体定向框架的3-维坐标。在进入部位上钻Burr hole并用定位于立体定向装置的针植入给定深度。然后注射药物学上可接受介质中的载体。然后通过直接注射至主要的目标部位来给药AAV载体并通过轴突逆向运输至远侧目标位点。可以使用其他的给药途径，例如，直接观察下的表面皮层应用，或其他非立体定向应用。

通过本领域技术人员基于基因治疗的已知方面来测定待给药物质的总体积，和待给药的载体颗粒的总量。可以在合适的动物模型中测试治疗有效性和安全性。例如，对于LSDs存在多种公认的动物模型，例如，如在此所述的或在Watson等（2001）Methods Mol. Med.，76:383-403或Jeyakumar等（2002）Neuropath. Appl. Neurobiol.，28:343-357中所述的。

在实验小鼠中，注射的AAV溶液的总体积是例如，1至5μl。对于其他哺乳动物，包括人脑，适当衡量体积和传送速率。例如，已经证明了在灵长类脑中可以安全地注射150μl的体积（Janson等（2002）Hum. Gene. Ther.，13:1391-1412）。治疗包括每个注射位点的单次注射，或者如果需要，可以沿着注射道（tract）重复。可以使用多个注射位点。例如，在一些实施方案中，除了第一个给药位点，将含有携带转基因的AAV的组合物给药至另一个位点，其可以在第一个给药位点的对侧或同侧。

在另一个方面中，本发明提供了体内传送重组AAV基因组的方法，通过逆向轴突运输至受疾病损害的神经元的核。在一些实施方案中，神经元呈现的细胞病理是LSD的细胞病理，如表1中所列的（参见，例如，Walkley（1998）Brain Pathol.，8:175-193）。在说明性的实施方案中，疾病是Niemann-Pick A疾病。传送重组AAV

基因组至受疾病损害的神经元的核的方法包括将疾病损害的神经元的轴突末梢接触含有 AAV 病毒颗粒的组合物，该病毒颗粒含有重组 AAV 基因组，并使病毒颗粒被内吞且沿着轴突逆向胞内运输至神经元的核，其中组合物中 AAV 基因组的浓度为至少：（a）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times10^{12}$gp/ml）；（b）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times10^{9}$tu/ml）；或（c）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times10^{10}$iu/ml）。在特定的实施方案中，神经元是投射神经元和/或轴突末梢至神经元核的距离至少为 2、3、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50mm。在各种实施方案中，AAV 基因组沿着轴突的整个长度运输，距离根据轴突长度而改变。在人类中，这些距离可以为 1000mm 或更长。

在另一个方面中，本发明提供了将转基因产物传送至患有疾病例如表 1 中所列 LSD 的哺乳动物的 CNS 的目标细胞的方法，目标细胞是神经元或神经胶质细胞。该方法包括将神经元的轴突末梢接触含有 AAV 载体的组合物，该载体携带至少部分编码治疗性转基因产物的基因；使病毒颗粒被内吞并沿着轴突逆向胞内运输至神经元的核；使转基因产物通过神经元表达和分泌；并使第二个细胞吸收转基因产物，其中转基因产物因此缓解第二个细胞中的病理。在一些实施方案中，组合物中 AAV 载体的浓度为至少：（a）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times10^{12}$gp/ml）；（b）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times10^{9}$tu/ml）；或（c）5、6、7、8、8.4、9、9.3、10、15、20、25 或 50（$\times10^{10}$iu/ml）。例如，可以通过转导的细胞分泌溶酶体水解酶并随后通过甘露糖-6-磷酸受体介导的内吞由另一个细胞吸收，第二个细胞是转导的或非转导的（Sando 等（1977）Cell，12:619-627；Taylor 等（1997）Nat. Med.，3:771-774；Miranda 等（2000）Gene Ther.，7:1768-1776 和 Jin 等（2002）J. Clin. Invest.，109:1183-1191）。

在本发明的方法中，可以使用任何血清型的 AAV，只要载体能够在疾病损害的脑中逆向轴突运输。本发明特定实施方案中使用的病毒载体的血清型选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7 和 AAV8（参见，例如，Gao 等（2002）PNAS，99:11854-11859 和 Viral Vectors for Gene Therapy：Methods and Protocols（用于基因治疗的病毒载体：方法和实验方案），编辑 Machida，Humana Press，2003）。除了在此所列的那些，可以使用其他血清型。此外，假模标本 AAV 载体也可以用于在此公开的方法中。假模标本 AAV 载体是在第二个 AAV 血清型的衣壳中含有一个 AAV 血清型基因组的那些；例如，含有 AAV2 衣壳和 AAV1 基因组的 AAV 载体或含有 AAV5 衣壳和 AAV2 基因组的 AAV 载体。（Auricchio 等（2001）Hum. Mol. Genet.，10(26):3075-81）。然而，AAV5 可以特异性地排除在本发明使用金属内肽酶例如脑啡肽酶作为治疗性转基因的方法之外。

AAV 载体源自对哺乳动物非致病的单链（ss）DNA 细小病毒（Muzyscka（1992）Curr. Top. Microb. Immunol.，158:97-129 中综述）。简而言之，基于 AAV 的载体具

有 rep 和 cap 病毒基因，占所除去的病毒基因组的 96%，留下两侧 145-碱基对（bp）的末端倒置重复序列（ITRs），其用来启动病毒 DNA 复制、包装和整合。在辅助病毒不存在下，野生型 AAV 整合至人宿主细胞基因组中，优选在染色体 19q 13.3 具有位点特异性，或其可以保持为表达的游离基因。单个 AAV 颗粒可以容纳高达 5kb 的 ssDNA，因此留下约 4.5kb 用于转基因和调控元件，这通常足够了。然而，例如在美国专利 No.6,544,785 中所述的反式剪接系统几乎使该极限加倍。

在说明性的实施方案中，AAV 是 AAV2 或 AAV1。许多血清型的腺相关病毒，尤其是 AAV2，已经得到广泛研究并表征为基因治疗载体。本领域技术人员熟悉基于功能性 AAV 的基因治疗载体的制备。很多关于用于给药于人患者的 AAV 生产、纯化和制备的各种方法可以在大量出版文献的主要部分中找到（参见，例如，Viral Vectors for Gene Therapy：Methods and Protocols（用于基因治疗的病毒载体：方法和实验方案），编辑 Machida，Humana Press，2003）。此外，美国专利 No.6,180,613 和 6,503,888 中已经描述了靶向 CNS 细胞的基于 AAV 的基因治疗。

在本发明的特定方法中，载体包括可操作连接启动子的转基因。转基因编码生物活性分子，其在 CNS 中的表达导致神经病理的至少部分校正。在一些实施方案中，转基因编码溶酶体水解酶。在说明性的实施方案中，溶酶体水解酶是 ASM。人 ASM 的基因组和功能性 cDNA 序列已经公开（参见，例如，美国专利 No.5,773,278 和 6,541,218）。其他溶酶体水解酶可以用于合适的疾病，例如，如表 1 中所列的。

本发明进一步提供了治疗哺乳动物包括人的阿尔茨海默氏病的方法。在这样的方法中，转基因编码金属内肽酶。例如，金属内肽酶可以是淀粉状蛋白-β 降解酶脑啡肽酶（EC 3.4.24.11；序列登录号，例如，P08473（SWISS-PROT）），胰岛素降解酶 insulysin（EC 3.4.24.56；序列登录号，例如，P14735（SWISS-PROT）），或 thimet 寡肽酶（EC 3.4.24.15；序列登录号，例如，P52888（SWISS-PROT））。

很大程度上通过转基因表达盒内的转录启动子来决定真核细胞中转基因表达的水平。一些实施方案中使用显示出长期活性并是组织甚至细胞特异性的启动子。启动子的非限制实例包括但不限于，巨细胞病毒（CMV）启动子（Kaplitt 等（1994）Nat. Genet.，8:148-154）、CMV/人 β3-珠蛋白启动子（Mandel 等（1998）J. Neurosci.，18:4271-4284）、GFAP 启动子（Xu 等，（2001）Gene Ther.，8:1323-1332）、1.8-kb 神经元特异性烯醇酶（NSE）启动子（Klein 等（1998）Exp. Neurol.，150:183-194）、鸡 β-肌动蛋白（CBA）启动子（Miyazaki（1989）Gene，79:269-277）和 β-葡糖苷酸酶（GUSB）启动子（Shipley 等（1991）Genetics，10:1009-1018）。为了延长表达，可以将其他调控元件另外可操作地连接转基因，例如，土拨鼠肝炎病毒后-调控元件（WPRE）（Donello 等（1998）J. Virol.，72，5085-5092）或牛生长激素（BGH）多腺苷酸化位点。

对于一些 CNS 基因治疗应用，需要控制转录活性。为此，通过包括各种调控元件和药物应答性启动子来获得用 AAV 载体的基因表达的药物学调控，例如描述

于 Habermaet 等(1998)Gene Ther.,5:1604-16011 和 Ye 等(1995)Science,283:88-91。

可以使用本领域已知的技术来生产高滴定度 AAV 制剂，如美国专利 No.5,658,776 和 Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols（用于基因治疗的病毒载体：方法和实验方案），编辑 Machida，Humana Press，2003 中所述的。

以下的实施例提供了本发明的说明性实施方案。本领域技术人员将认识到可以进行各种改进和改变而没有改变本发明的精神或范围。这样的改进和改变包括于本发明的范围内。实施例不以任何方式来限制本发明。

实施例

重组载体的滴定

根据基因组拷贝数量（每微升的基因组颗粒）来测量 AAV 载体滴定度。基因组颗粒浓度是基于载体 DNA 的 Taqman® PCR，如之前报道的（Clark 等（1999）Hum. Gene Ther.，10:1031-1039；Veldwijk 等（2002）Mol. Ther.，6:272-278）。简而言之，用衣壳消化缓冲液（50mM Tris-HCl pH8.0、1.0mM EDTA、0.5% SDS、1.0mg/ml 蛋白酶 K）在 50℃处理纯化的 AAV-ASM 1 小时来释放载体 DNA。将 DNA 样品完成聚合酶链式反应（PCR），使用与载体 DNA 中的特异性序列如启动子片段、转基因或多 A 序列退火的引物。然后通过实时 Taqman®软件定量 PCR 结果，如 Perkin Elmer-Applied Biosystems（Foster City，CA）Prism 7700 序列检测系统提供的。

可以使用感染力测试来滴定携带可检测标记基因如 β-半乳糖苷酶或绿色荧光蛋白基因（GFP）的载体。用 AAV 转导易感细胞（例如，HeLa，或 COS 细胞），并进行测试来测定基因表达，如用 X-gal（5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-吡喃半乳糖苷）的 β-半乳糖苷酶载体转导的细胞的染色或用于 GFP 转导的细胞的荧光显微镜检测。例如，如下进行测试：将 4×10^4HeLa 细胞涂布于 24-孔培养平板的每个孔中,使用通常的生长培养基。附着后，即大约 24 小时后，用多重性感染（MOI）10 的 5 型 Ad 感染细胞并用连续稀释的包装载体转导并在 37℃孵育。一至三天后，在观察大范围细胞病理效应之前，对细胞进行适当的测试（例如，X-gal 染色或荧光显微镜观察）。如果使用报告基因如 β-半乳糖苷酶，将细胞固定于 2%多聚甲醛、0.5%戊二醛中并使用 X-gal 对 β-半乳糖苷酶活性染色。计数获得很好分离的细胞的载体稀释度。每个阳性细胞表示载体的 1 个转导单位（tu）。

小鼠脑中 LSD 病理的校正

十周龄的 ASMKO 小鼠在中枢神经系统中含有显著的 NPD 病理。通过 PCR 证实纯合子隐性突变的鉴定。用异氟烷将十六只 10 周龄的 ASMKO 小鼠麻醉并安放在立体定向框架上，形成切口来暴露底下的颅骨，在每只小鼠的一个半球上形成单个钻孔。将两微升高滴定度（9.3×10^{12}gp/ml）AAV2-CMV-ASM（Targeted

Genetics，Seattle，WA）注射至海马体中，最终立体定位坐标为前卤点吻端2.0mm、中线右侧1.5mm和软膜表面腹侧2.0mm。该海马体坐标确保了AAV2载体暴露于齿状回和安蒙氏角区3（CA3）的神经元，以及暴露于对侧海马体、内侧中隔和内嗅区皮层的投射神经元的轴突末梢。以0.2μl/分钟的速率进行注射，总的1.86×10^{10}基因组颗粒给药至每个脑中。

使用本领域已知的和Sleat等（2004）J. Neurosci. 24:9117-9126中再现的方法，通过Smartrod（AccuScan）上的加速和摇摆旋转来测试小鼠的运动功能。图10A/B和图11A/B用图表显示了作为运动功能恢复的测量的旋转测试的结果。

然后在注射（pi）后5（n=8）或15（n=8）周时将小鼠处死。分析八个脑（在pi后5和15周，各自n=4）的ASM mRNA和蛋白质分布，以及溶酶体中胆固醇的超生理（supraphysiologic）水平的降低。处理剩余的8个脑（在pi后5和15周，各自n=4）用于组织病理学来分析累积的和扩张的溶酶体的校正，这是测定LSDs的贮积病理逆转的最直接和最精确的方法。

在pi后5和15周，注射（同侧）的海马体中检测到强烈的转导。通过AAV2载体大范围地转导了齿状回的小神经胶质细胞层和门脐以及CA3的锥体细胞和oriens细胞层。这种给人深刻印象的转导模式延伸至同侧海马体的其他部位，如海马下托区（subiculum）和安蒙氏角区1（CA1）和2（CA2）。使用抗人ASM单克隆抗体的免疫荧光证实了许多细胞中ASM蛋白的存在。整体的蛋白模式与mRNA模式相似，并具有一些其他定位分布的蛋白质。

还在两个时间点的同侧海马体外侧区域检测到人ASM mRNA和蛋白质。对侧齿状回和CA3，和内侧中隔和内嗅区皮层对于原位杂交和免疫荧光是阳性的（图1A和2A）。在这些远侧位点的转导模式与神经支配注射位点的投射神经元的形态构造相一致（图1B和2B）。这证明了AAV2经历了ASMKO脑的内海马体、隔海马和entorhinodentate回路中的逆向轴突运输，以及运输至轴突上后病毒载体靶向核（图1C和2C）。转导模式不支持实质扩散，因为AAV2运输至这些远侧位点的原因。如果这样的扩散已经发生，注射和远侧位点之间的结构将已经暴露于迁移中的病毒。但是这些中间结构对于原位杂交是阴性的。例如纹状体，其对于AAV2具有强烈的向性，尽管在海马体和内侧中隔之间的直接通路中，而对于基因转移是阴性的。因此，基因转移至远侧位点必须通过逆向轴突运输引起，这表明受影响的投射神经元可以作为有效的高速运输系统，用于通过患病脑的AAV2移动。

另外研究了ASM逆转ASMKO脑中胆固醇异常的能力。菲律宾菌素是从菲律宾链霉菌（Streptomyces filipinensis）中分离的结合胆固醇复合物的自体荧光分子（Leventhal等（2001）J. Biol. Chem.，276：44976-44983和Sarna等（2001）Eur. J. Neurosci.，13：1-9）。由于这些大量的胆固醇复合物，未注射的ASMKO脑具有高水平的菲律宾菌素染色，而正常的小鼠脑没有产生菲律宾菌素染色。

AAV2-CMV-ASM的注射导致pi后5和15周的ASMKO小鼠在整个同侧和对

侧海马体、中隔和内嗅区皮层中完全失去菲律宾染色（图 1A 和 2A）。这与未注射的年龄相适的 ASMKO 对照完全相反，在对照中这些相同结构中检测到高水平的菲律宾菌素染色。AAV2-注射的脑中菲律宾菌素染色的失去证明校正了 ASM 疾病的继发性细胞表型（例如，代谢缺陷）。这强烈表明了 ASM 蛋白质靶向溶酶体并与神经鞘磷脂-胆固醇复合物相互作用。这种相互作用很可能导致胆固醇从神经鞘磷脂释放出来，随后胆固醇进入其正常的生物途径（如降解或转运至质膜（Leventhal 等（2001）J. Biol. Chem.，276:44976-44983））。

在内海马体、隔海马和 entorhinodentate 回路的所有细胞层和亚区中观察到菲律宾菌素染色的失去。胆固醇校正的区域比 ASM 蛋白质模式大得多且范围更大。这表明 AAV2 的逆向轴突运输后，投射神经元可以作为“酶泵”并将 ASM 蛋白质分泌至周围组织中。重要地，只需要少量 ASM 即可对 ASMKO-影响的细胞内的胆固醇累积具有治疗效果，含量低于免疫荧光方法的检测极限。

还评价了 AAV2-ASM 载体的轴突运输是否导致了 NPD 原发细胞表型的校正。一微米厚的组织病理学脑切片证明了 pi 后 5 周时 AAV2-CMV-ASM 注射的脑中累积的和扩张的溶酶体病理的显著降低（表 2）。导致部分或全部正常细胞构造恢复的病理逆转发生在同侧和对侧海马体半球的所有区域中。内侧中隔和内嗅区皮层也显示出贮积损伤的实质性减轻。与菲律宾菌素数据相似，校正的细胞数量比 ASM 蛋白模式的大且更广泛。病理的逆转在已知投射至海马体的区域内是明显的，包括内海马体、隔海马和 entorhinodentate 回路。总之，校正的体积在对侧海马体中为 30-35mm^3 或更多，在同侧内嗅区皮层中为 5-8mm^3 或更多，对侧内嗅区皮层中为 1-2mm^3 或更多，内侧中隔中为 2-3mm^3 或更多。这进一步支持病毒载体的轴突运输引起了这种治疗效果，因为如果只是通过扩散介导病毒分布，附近的结构（没有参与这些回路）已经应该得到校正（参见，表 2 中的“同侧纹状体”和“对侧纹状体”）。

为了证明病理的逆转是 ASM 特异性的，将另一组 ASMKO 小鼠注射携带报告基因 AAV2-CMV-β-gal 的对照载体（在 pi 后的 5 和 15 周各自 n=2），并处理用于组织病理学。在所有四个脑中，细胞保持被扩张的溶酶体淹没，并含有其他异常，如细胞质肿胀和紊乱的细胞层。

表 2

脑部位	未治疗的	AAV2-ASM 治疗的
同侧海马体		
CA1 区	++++	+
CA3 区	++++	+
齿状回细胞层	++++	+
门	++++	+

对侧海马体	++++	+
CA1 区	++++	+
CA3 区	++++	+
齿状回细胞层		
门	++++	+
同侧内嗅区皮层	++++	++
对侧内嗅区皮层	++++	+++
同侧内侧中隔	++++	++
对侧内侧中隔	++++	++
同侧纹状体	++++	++++
对侧纹状体	++++	++++

++++ 实际上所有细胞中高水平的病理

+++ 许多细胞中的病理，一些细胞中观察到校正

++ 一些细胞中的病理，许多细胞中观察到校正

+ 大部分细胞中很少或没有病理，实际上每个细胞得到校正

因此，根据本发明，单次注射高滴定度 AAV2 载体足以将 ASM 基因转移至支配 ASMKO 影响的海马体的结构。对 AAV2 载体阳性的结构的数量大于正常大鼠海马体中最近研究证明的，其显示了轴突运输只在 entorhinodentate 回路中（Kaspar 等（2002）Mol. Ther.，5:50-56）。在此描述的结果证明了轴突运输可以发生在受贮积病理侵害的投射神经元中，并且这种运输模式导致邻近结构和注射位点远侧的多个区域中贮积病理的清除。我们还证明了轴突运输不限于只有那些与海马体相连的回路。逆向轴突运输发生在黑质纹状体（图 3）和延髓小脑（图 4）回路中。这证明了疾病损害的神经元中 AAV2 的轴突运输是病毒载体的一般特性。

用 1-4×10^{13}gp/ml 浓度的 AAV1-ASM 和 8.4×10^{12}gp/ml 浓度的 AAV7-ASM 进行了相似的研究。尽管 AAV1 没有呈现出可检测的逆向轴突运输，AAV7 经历了逆向轴突运输，与 AAV2 相似，并在远侧区域中产生 LSD 病理的校正（参见图 5）。

注射 AAV 至小脑

用异氟烷麻醉 ASMKO 小鼠并安置于立体定向框架上。定位前囟点作为参照点来测定注射至小脑的深部小脑核区域的钻孔位置。一旦定位，形成切口来暴露底下的颅骨，并在颅骨中形成单个钻孔而没有刺穿脑表面。将汉密尔顿注射器通过孔放在脑中并将 AAV2-CMV-ASM 以 0.5 微升每秒的速率注射至深部小脑核中。对于 1×10^{10} 基因组颗粒的总剂量注射三微升。在注射后 7 周将小鼠处死。评价脑和脊髓的 ASM mRNA 表达、ASM 蛋白表达、菲律宾菌素染色和钙结合蛋白染色。

菲律宾菌素是结合胆固醇复合物的自体荧光分子。由于大量胆固醇复合物，其作为疾病的结果而累积，未治疗的 ASMKO 小鼠具有高水平的菲律宾菌素染色。相反，正常小鼠脑没有呈现菲律宾菌素染色。

钙结合蛋白是浦肯野细胞的标记，其在小脑中找到并涉及协同移动。在 ASMKO 小鼠中，浦肯野细胞随着小鼠的年老而在这些小鼠中相继死亡，导致降低的协同移动行为。在正常小鼠中没有观察到这种浦肯野细胞的失去和协同移动行为的相关丢失。

AAV2 注射至深部小脑核后，小脑对 ASM mRNA、ASM 蛋白质和钙结合蛋白染色是阳性的。这些结果证明了注射至深部小脑核后 AAV2 转导小脑的能力。此外，小脑转导和所得到的 ASM 表达防止浦肯野细胞死亡，如通过治疗过的小鼠中钙结合蛋白染色的存在所证明的。在 AAV-ASM 治疗的小鼠中，还在整个脑干、丘脑和 mescencephalon 观察到 hASM 蛋白的表达。这些区域中的 hASM 蛋白表达与菲律宾菌素/胆固醇染色的清除的区域相重叠。总之，在小脑中，在 ASM 蛋白水平、菲律宾菌素清除和浦肯野细胞存活之间存在正向关系。

还在小脑外侧检测到 ASM mRNA 和 ASM 蛋白。特别地，脊髓对 ASM mRNA 表达是阳性的，如通过原位杂交所证明的。脊髓对 ASM 蛋白也是阳性的，如通过 ASM-特异性免疫荧光所证明的。这些结果表明 AAV 载体远侧注射至深部小脑核后脊髓得到转导。这种转导模式与支配深部小脑核区域的投射神经元的形态构造相一致。这些结果表明远侧脊髓细胞通过吸收 AAV2 载体并对其进行表达。

阿尔茨海默氏病的治疗

阿尔茨海默氏病（AD）是神经退化疾病，特征在于由于降低的 Aβ 分解代谢而导致的淀粉状蛋白 β-肽（Aβ）的累积。随着 Aβ 累积，其聚集成胞外斑，引起突触功能的损伤和神经元的丢失。该病理导致痴呆、失去协调和死亡。

脑啡肽酶是 97KD 膜结合锌金属内肽酶，是 Aβ 正常降解中的限速酶。脑啡肽酶的引入通过在 Aβ 聚集之前除去 Aβ 集合而减缓了疾病的进展。实际上，脑啡肽酶显示出降解 Aβ 的寡聚形式，因此除去 AD 动物模型中存在的斑（Kanemitsu 等（2003）Neurosci. Lett.，350:113-116）。脑啡肽酶敲除小鼠呈现出高水平的 Aβ（Iwata 等（2001）J. Neurosci.，24:991-998）。脑啡肽酶抑制剂，如 thiorphan 和磷酸阿米酮(phosphoramidon)，提高小鼠脑中的 Aβ 水平（Iwata 等（2000）Nat.Med.，

6:143-150）。此外，在人脑的高淀粉状蛋白斑块负荷区域内发现降低的脑啡肽酶mRNA水平，进一步证明了脑啡肽酶和AD之间的连接（Yasojima等（2001）Neurosci. Lett.，297:97-100）。

脑的区域受 AD 影响最大的是海马体、皮层、小脑、纹状体和丘脑（参见，例如，Iwata 等（2001）上文；Yasojima 等（2001）上文）。这些是显示出使用 AAV 的有效逆向轴突运输的相同的脑区域。

因此，通过直接注射和随后病毒通过脑回路运输至我们的目标部位，AAV 可以用于传送治疗性转基因至高斑块负荷的区域。病毒载体介导的脑啡肽酶基因转移在 AD 小鼠模型的治疗中是有效的（Marr 等（2003）J. Neurosci.，23:1992-1996；Marr 等（2004）J. Mol. Neurosci.，22:5-11；Iwata 等（2004）J. Neurosci.，24:991-998）。最近的报道表明 AAV5-脑啡肽酶从脑啡肽酶缺陷小鼠的海马体突触前末端除去Aβ，减缓突触的斑形成（Iwata 等（2004）上文）。在这篇报道中，在对侧海马体中发现脑啡肽酶，但这是归功于病毒的逆向运输或是表达的蛋白质的顺行运输仍然是未知的。

胆固醇贮积病理的校正

以下的实施例，在被单侧注射到深部小脑核后，评价了编码人 ASM（hASM）的重组 AAV2/1、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/7 和 AAV2/8 血清型载体来表达 hASM 蛋白质、校正胆固醇贮积病理、经受运输、拯救浦肯野细胞并启动 ASMKO 小鼠中功能恢复的相对能力。另一组 ASMKO 小鼠接受了双侧注射至 DCN，以便评定增加转基因蛋白质分布/表达是否将提高行为功能性恢复。

从杂合子交配（+/-）繁殖六十六只雄性纯合（-/-）酸性神经鞘磷脂酶敲除（ASMKO）小鼠和十六只雄性野生型同窝出生的对照小鼠。按照 Gal 等（1975）N Engl J Med:293:632-636 中所述的程序通过 PCR 测定小鼠的基因型。将来自最初克隆的小鼠回交 C57/BI6 株系。将动物在 12:12 小时亮:暗周期下饲养并无限制的提供食物和水。所有程序在实验动物管理委员会（Institutional Animal Care and Use Committee）批准的实验方案下进行。

用异氟烷麻醉后，使用以下的 AAV 血清型载体之一单侧注射小鼠（~7 周龄）至深部小脑核中（DCN）（A-P：离前囟点-5.75，M-L：离前囟点-1.8，D-V：离硬脑脊膜（dura）-2.6，门齿杆（incisor bar）：0.0），（n=8/载体）：AAV1-CMV-βgal、AAV1-CMV-ASM、AAV2-CMV-ASM、AAV5-CMV-ASM、AAV7-CMV-ASM 和 AAV8-CMV-ASM。用安置于注射泵上的 10μl 汉密尔顿注射器以 0.5μl/分钟的速率传送载体，用于每个脑总量为 1.86×10^{10} 基因组颗粒。每个载体最终注射的体积是 4μl。外科手术一小时之前和二十四小时之后，给予小鼠酮洛芬（5mg/kg；SC），用于痛觉丧失。注射后 7 周（14 周龄时）将小鼠处死。在处死时，给予小鼠过量 euthasol（150mg/kg；IP）并快速断头（n=5/组）或颈动脉灌注（n=3/组）。快速取

出来自断头小鼠的脑，在液氮中快速冷冻，分成 3 个部分（右大脑半球，左大脑半球，和小脑），匀浆并通过 ELISA 分析 hASM。将来自灌注小鼠的脑和脊髓处理，用于 50μm 震动（vibratone）切片上的人 ASM 蛋白质表达，通过菲律宾菌素染色所检测的胆固醇累积，和使用钙结合蛋白染色的浦肯野细胞存活。

使用相似的实验方案，将 ASMKO 小鼠(~7 周龄)两侧注射 AAV2/1-βgal(n=8)，AAV2/1-ASM（n=5）和 AAV2/2-ASM（n=5）并在 20 周龄时经历旋转测试后处死。将脑在液氮中快速冷冻，在中线切分，然后使用小鼠脑基质（ASI Instruments，Inc，MI）分成 5 个切片（S1、S2、S3、S4 和 S5）。切片 1-4 大约间隔 2mm，S1 为最头端和 S4 为最尾端。切片 5 只含有小脑。右半球用于定量脑髓鞘磷脂水平和剩余的（left）hASM 水平。

在具有 SV40 多腺苷酸化序列和杂交内含子的人巨细胞病毒立即早期（CMV）启动子控制下，将全长人 ASM cDNA 克隆至含有来自 AAV 血清型 2 的 ITRs（AAV2 ITR）的质粒中。Jin 等（2002）J Clin Invest. 109:1183-1191。使用一系列除了 AAV2 型复制基因以外含有血清型特异性衣壳编码结构域的辅助质粒通过三重转染来产生杂交载体。该策略使 AAV2 ITR 载体包装至每个血清型特异性病毒粒子中，Rabinowitz 等（2002）J Virol. 76:791-801。使用该方法，hASM 重组基因组用来产生包括 AAV2/1、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/7 和 AAV2/8 各种血清型的系列 rAAV-hASM 载体。通过离子交换色谱（血清型 2/1、2/2 和 2/5）（O'Riordan 等（2000）J Gene Med 2:444-54）或 CsCl 离心（血清型 2/8 和 2/7）（Rabinowitz 等（2002）J. Urrol. 76:791-801）来纯化重组 AAV 载体。通过 CMV 序列的 TaqMan PCR 测定 AAV-ASM 病毒粒子的最终滴定度（DNAse-抵抗颗粒）。Clark 等（1999）Hum. Gene Therapy 10: 1031-1039。

人 ASM 抗体是人特异性的并且不与小鼠 ASM 交叉反应。将稀释于 50mM 碳酸钠缓冲液（pH9.6）中的单克隆重组人 ASM（rhASM）抗体（2μg/ml）Coster（Corning，NY）包被 9018 平板（100μl/孔），并在 2-8℃孵育过夜。除去过量包被抗体并加入阻断稀释剂（KPL，Inc.，MD）在 37℃孵育 1h。用微量培养板洗涤器（Molecular Devices，CA）将平板洗涤两个循环。吸取双份稀释于标准稀释缓冲液（PBS，0.05%吐温，1%HP-BSA）中的标准、对照和样品并使其在 37℃孵育 1h。如上所述将平板洗涤。将一百微升生物素化的重组人 ASM（rhASM）抗体（稀释 1:20K 于标准稀释缓冲液中）加入每个孔中，使其在 37℃孵育 1h，然后用微量培养板洗涤器除去。然后加入稀释 1:10K 的抗生蛋白链菌素-HRP（Pierce Biotechnology，Inc.，IL）（100μl/孔）并使其在室温孵育 30 分钟。如上所述将平板洗涤，然后用 SureBlue TMB（KPL，Inc.，MD）在 36-38℃孵育 15 分钟。用停止溶液（KPL，Inc.，MD）使反应停止，然后用 Spectra Max 340 平板阅读器在 450nm 阅读吸收值（Molecular Devices，CA）。使用 Softmax Pro 4.3 软件（Molecular Devices，CA）完成数据分析。

用 BCA 蛋白质测试试剂盒（Pierce Biotechnology，Inc.，IL）测定每个样品的蛋白质浓度，使用牛血清白蛋白作为标准。

将小鼠经颈动脉（transcardially）灌注在 pH6.5 的 0.1M 醋酸钠缓冲液中含有 2%多聚甲醛、0.03%戊二醛、0.002%$CaCl_2$的固定剂，接着用 pH8.5 的相同固定剂灌注。切开小鼠脑和脊髓并在 pH8.5 的无戊二醛的固定剂中 4℃后固定过夜。将组织在 pH7.4 的 0.1M 磷酸钾缓冲液中洗涤，包埋于 3.5%的琼脂中并用振动切片机切成 50μm 矢形切片。

以 50μm 的间隔将脑和脊髓用振动切片机切成矢形切片。用抗人 ASM 的一抗（1：200）处理切片，用于免疫荧光。将切片孵育于含有 10%驴血清、0.3%曲通 X-100 的 PBS 中 1 小时，接着用在含有 2%驴血清、0.2%曲通 X-100 的 PBS 中的生物素化小鼠抗-人 ASM 孵育 72 小时。洗涤后，使用 Tyramide 信号扩大试剂盒（PerkinElmer，Boston MA）扩大信号。用 Nikon 荧光显微镜观察人 ASM 蛋白质，并用 SPOT 相机和 Adobe Photoshop 软件捕获图像。

首先将菲律宾菌素复合物（Sigma，St. Louis，MO）稀释于 100%甲醇中，用作 1mg/ml 的储备浓度。储液在-20℃可稳定 4 周。用 PBS 洗涤后，将切片在用 PBS 新鲜制得的含有 10μg/ml 菲律宾菌素溶液中在黑暗中孵育三小时。然后用 PBS 将切片洗涤三次。在荧光显微镜上的紫外线滤镜下观察胆固醇沉积。

使用抗钙结合蛋白（钙结合蛋白）的一抗处理脑，用于免疫荧光。用磷酸钾缓冲液（KPB）洗涤切片，然后用磷酸钾缓冲盐水（KPBS）漂洗。然后将切片在含有 5%驴血清、0.25%曲通 X-100 的 KPBS 中封闭切片高达 3 小时，然后在含有 5%驴血清、0.2%曲通 X-100 和小鼠抗-钙结合蛋白（1：2500，Sigma，St. Louis，MO）的 KPBS 中孵育。在 4℃ 72 小时后，用含有 0.1% 曲通 X-100 的 KPBS 将切片漂洗三次。在 KPBS+0.1%曲通 X-100 中加入二抗：驴抗小鼠 CY3（1：333，Jackson Immunoresearch Laboratories，West Grove，PA），然后与切片室温孵育 90 分钟。用 KPB 将切片洗涤，然后安置于凝胶包被的载玻片上。在落射荧光显微镜（epifluorescence）下观察钙结合蛋白阳性细胞。为了定量小脑的浦肯野细胞，从每个动物选择四个全断面（full-faced）的内侧小脑切片。在荧光显微镜下观察钙结合蛋白免疫阳性浦肯野细胞并在 20X 的放大倍数计数细胞体。将每个叶分开计数。每个叶计数两个分开的焦平面。只计数清晰的细胞来确保没有细胞被计数两次。

如上所述，首先用抗人 ASM 的抗体处理五十（50）μm 震动切片机的切片以用于免疫荧光。然后将切片在 PBS 中洗涤并用以上对于钙结合蛋白概述的实验方案对胆碱乙酰转移酶染色（ChAT；兔多克隆，1：500，Chemicon International，Temecula，CA）。然而，不使用 CY3 二抗以外，而使用驴-抗-兔子 FITC（1：200，Jackson Immunoresearch Laboratories，West Grove，PA）。首先在落射荧光显微镜下观察染色，然后用共焦显微镜获得图像。

如下定量菲律宾菌素染色。使用装备 SPOT 数码相机的 Nikon E600 全视野立

式落射荧光显微镜捕获曝光正确的图像。首先成像 AAV2/1-β-gal 组，并用曝光来获取所有其他图像。每个分析的图像表示通过每半个脑长度的内侧矢形面。用 Matamorph 软件（Universal Imaging Corporation）进行形态测量分析。AAV2/1-β-gal 图像作为阈值；一旦建立，在所有的图像中使用相同的阈值。通过使用者亲自选择以下的区域并分开分析：小脑、脑桥、延髓、中脑、脑皮层、海马体、丘脑、下丘脑和纹状体。在每个区域中测量综合强度，将来自给定组动物的所有测量值（n=3/组）用于产生平均值。然后，在经治疗动物中的胆固醇减少以同敲除β-gal 的注射鼠相比较的整体强度的百分比减少进行计算。

在深部小脑核内单侧注射 AAV-ASM 后在整个小脑（图 6，表 3）、脑桥、延髓和脊髓（图 7）中观察阳性 hASM 免疫染色。

表 3

作为 AAV 血清型函数的阳性 hASM 染色的面积。*表示阳性 hASM 低于检测极限，但是胆固醇病理的校正仍然发生。

结构	AAV1	AAV2	AAV5	AAV7	AAV8
深部小脑核	++++	++	+++	+++	++++
小脑小叶	++++	++	+++	+++	++++
脑桥	++	++	++	++	+
延髓	+	++	++	+++	+
脊髓		+++	+++	++	+
丘脑	*	*	*	*	*
下丘脑	*	*	*	*	*
海马体	*	*	*	*	*
纹状体	*	*	*	*	*
脑皮层	*	*	*	*	*

在小脑内用 AAV2/1-ASM 处理小鼠，并具有最广泛（即，在相同矢形面内的小叶之间分布）水平的 hASM 表达，而用 AAV2/2-ASM 处理的小鼠具有最有限水平的人 ASM 蛋白质表达。用 AAV2/5-ASM、AAV2/7-ASM 和 AAV2/8-ASM 处理小鼠中的人 ASM 蛋白表达在这两个组中间。在用血清型 1&8 处理的小鼠中矢形面之间的内侧-侧面分布最大，而在用血清型 2 注射的小鼠中最小。血清型 5&7 启动的内侧-侧面分布模式在血清型 1 和 2 之间。用每种 AAV 血清型转导小脑的每层（即，分子，浦肯野细胞和小神经胶质细胞）；然而，对于分子层提高的亲和性对于所有血清型是明显的。浦肯野细胞转导在血清型 1 和 5 治疗的小鼠中是最大的。注射血清型 7 的小鼠具有最少数目的转导浦肯野细胞。与血清型 1、2、5&7 相比较时，用血清型 8 处理的小鼠也具有少数转导的浦肯野细胞，但在小神经胶质细

胞层内具有较低的 ASM 表达。用 ASM 转导的浦肯野细胞似乎具有健康的细胞结构。小脑组织匀浆中通过 ELISA 的 AAV 介导的 hASM 蛋白质表达的定量分析支持我们的免疫组织化学发现。与所有其他小鼠比较时，注射血清型 1 和 8 的小鼠证明了显著（p<.0001）高的小脑 hASM 蛋白质水平（图 8）。来自注射血清型 2、5 & 7 小鼠的小脑 hASM 水平没有高于 WT 水平（即，背景）。如所预期的，在野生型小鼠中没有检测到人 ASM—ELISA 中所用的 hASM 抗体是人特异性的。

功能性ASM蛋白的不存在导致神经鞘磷脂的溶酶体累积和随后的继发性代谢缺陷，如异常胆固醇运输。Sarna 等 Eur. J. Neurosci. 13:1873-1880 和 Leventhal 等（2001）J. Biol. Chem. 276:44976-4498。使用菲律宾菌素观察 ASMKO 小鼠脑中的游离胆固醇累积，菲律宾菌素是一种从菲律宾链霉菌中分离的自体荧光分子。野生型小鼠脑对于菲律宾菌素没有阳性染色。在所有 AAV 处理的小鼠（除了 AAV2/1-βgal）中，菲律宾菌素染色的清除区域与 hASM 免疫染色阳性的区域重叠（表 4），表明每种血清型载体能够产生功能性转基因产物。

表 4

小脑内注射编码人 ASM 的不同 AAV 血清型（n=3/血清型；2/1、2/2、2/5、2/7 和 2/8）至 ASMKO 小鼠的深部小脑核后，选定脑区域中与 AAV-βgal 处理的 ASMKO 小鼠相比较的菲律宾菌素（即，胆固醇）清除的百分比降低。

	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8
小脑	96.54±2.14	93.85±1.257	86.75±9.58	96.47±1.93	99.12±.66
中脑	96.72±1.73	53.08±22.89	65.88±24.53	73.39±22.39	91.10±.105
脑桥	91.31±5.80	50.07±21.26	70.96±25.60	93.15±31.20	96.72±1.20
延髓	93.29±6.22	88.46±3.04	81.55±17.31	80.73±14.99	97.40±1.60
丘脑	48.88±25.25	41.21±27.35	34.86±16.67	48.44±28.65	77.03±12.08
下丘脑	82.81±10.14	86.96±12.93	88.46±5.90	82.95±11.46	99.68±.31
皮层	27.60±24.75	73.62±14.9	55.65±28.89	76.97±14.27	98.30±.34

如之前通过（Passini 等（2003）在“Society for Neuroscience” New Orleans，LA）所证明的，在解剖学上与注射位点连接但对 hASM 没有阳性染色的部位中也产生了菲律宾菌素清除。MetaMorph 分析表明菲律宾菌素染色降低发生在整个吻尾（rostral caudal）轴中。在小脑和脑干中，在用 AAV2/1-ASM 和 AAV2/8-ASM 处理的小鼠中菲律宾菌素得到最大降低，而在间脑和大脑皮层中，注射 AAV2/8-ASM 的小鼠具有最全面水平的菲律宾菌素清除（表 4）。尽管如此，这些结果表明校正是 ASMKO 小鼠 CNS 的胆固醇贮积病理需要的 hASM 水平是最小的（即，低于检测的 hASM 免疫荧光极限）。

表 5

组织学研究表明 ASMKO 小鼠小脑经历快速退化。更具体地，浦肯野细胞在 8 至 20 周年龄之间逐渐相继而亡（Sarna 等（2001）Eur. J. Neurosci. 13:1813-1880 和 Stewart 等（2002）在“Society for Neuroscience” Orland，FL 中）。钙结合蛋白是广泛受影响的浦肯野细胞标记。AAV-ASM 处理小鼠中的阳性钙结合蛋白染色将表明 AAV 介导的 hASM 表达是治疗性的。总体上我们的结果表明了小脑中 AAV 介导的 hASM 表达防止了 ASMKO 小鼠中的浦肯野细胞死亡（表 5，图 9）。如所预期的，在小叶 I-III 中没有发生浦肯野细胞存活；在 7 周龄时给小鼠注射，在 8 周之前，这些细胞的大部分已经相继而亡。在血清型 1 治疗小鼠中，小叶 IV/V 中的浦肯野细胞存活最大。在小叶 VI 中，在 AAV 处理的小鼠中没有观察到显著的浦肯野细胞存活。在小叶 VII 中，只有用血清型 5 处理的小鼠显示出显著的浦肯野细胞存活。再在小叶 VIII 中，用血清型 5 以及血清型 2 处理的小鼠显示出显著的浦肯野细胞存活。在小叶 IX 和 X 中，在 WT 和 KO 小鼠（或 AAV 处理的小鼠之间）之间的浦肯野细胞计数不存在显著差异。这是预期的，因为在 14 周龄时（即，处死时），这些小叶中的浦肯野细胞在 ASMKO 小鼠中仍然是活的。跨越所有小叶，浦肯野细胞存活在用血清型 1、2 & 5 处理的小鼠中最大，在用血清型 7 & 8 处理的小鼠中最小。在注射血清型 1 的小鼠中，小脑前叶中的浦肯野细胞存活（基于钙结合蛋白染色）最大。

小脑内注射编码人 ASM 的不同 AAV 血清型（n=3/血清型；2/1、2/2、2/5、2/7 和 2/8）至 ASMKO 小鼠的深部小脑核后，WT 和 ASMKO 小鼠中小脑小叶 I-X 中的浦肯野细胞计数。粗斜体显示的数字是显著不同于 KO 小鼠的（即，用 AAV2/1-βgal 处理的小鼠）p≤.01。

	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8	KO	WT
I/II	7.42±9.80	4.5±10.58	9.40±11.59	12.33±10.58	1±9.16	5.8±11.59	113±10.58
III	12.42±10.32	11.33±11.14	26.80±12.21	15.33±11.14	9.8±12.21	2±9.65	147.50±11.14
IV/V	60.57±17.28	36.5±18.67	27.80±20.45	29.66±18.67	6.8±20.45	8±16.16	220.66±18.67
VI	61.14±11.21	27.5±12.11	72.20±13.26	31.16±12.11	3.8±13.26	68.5±10.48	121.16±12.11
VII	17.42±4.15	37.66±4.49	40.60±4.91	5.33±4.49	.2±4.95	17.37±3.88	7.16±4.49
VIII	44.14±10.75	48.66±11.62	82.80±12.73	11.33±11.62	18.40±12.73	35.12±10.06	103.33±11.62

IX	126.28±19.17	102.66±20.71	136.40±22.68	60.16±20.71	84.40±22.68	108.0±17.93	144±20.71
X	89.85±12.54	76.83±13.55	93.80±14.84	48.16±13.55	64.80±14.84	87±11.73	86.66±13.55

在加速旋转测试时，单侧注射 AAV2/1-ASM 和 AAV2/8-ASM 的小鼠证明了延迟跌倒时间显著（p<.0009）长于注射 AAV2/1-βgal 的 ASMKO 小鼠（图 10)。注射血清型 AA2/1-ASM 的小鼠没有显著不同于野生型小鼠。注射 AAV2/2-ASM 和 AAV2/5-ASM 的小鼠显示出延迟跌倒时间长于注射 AAV2/1-βgal 的 ASMKO 小鼠的趋势；而注射 AAV2/7-ASM 的小鼠没有。对于摇摆旋转测试，只有注射 AA2/1-ASM 的小鼠显示了延迟跌倒时间显著（p<.0001）长于注射 AAV2/1-βgal 的 ASMKO 小鼠。在这种情况中，野生型小鼠表现显著好于注射 AA2/1-ASM 的小鼠（图 10)。对于加速和摇摆测试，接受两侧注射 AAV2/1-ASM 或 AAV2/2-ASM 的 ASMKO 小鼠表现显著（p<.001）好于 ASMKO AAV2/1-βgal 处理的小鼠（图 11)。对于两个测试，两侧注射 AAV2/1-ASM 的小鼠的表现与野生型小鼠相当。

测定 AAV 产生的 hASM 在 ASMKO CNS 内是否功能上活性的一种方式是测定其对胆固醇贮积病理（NPA 疾病的继发性代谢缺陷）的影响。在所有 AAV 处理的小鼠（除了 AAV2/1-βgal）中，胆固醇贮积病理的校正与 hASM 免疫染色阳性的区域重叠，表明每种血清型载体能够产生功能性转基因产物。如之前所证明的，在解剖学上与注射位点相连的区域中，而且在对 hASM 没有阳性染色的区域中，也发生了异常胆固醇代谢的校正，表明胆固醇贮积病理校正需要的 hASM 水平是最小的。与我们的 hASM 组织化学和生化结果相一致，用血清型 1 和 8 处理的小鼠证明了胆固醇贮积病理的显著降低。用血清型 2、5 & 7 处理的小鼠还显示出胆固醇贮积病理的降低，但是没有降至与血清型 1 & 8 处理的小鼠相同的程度。

尽管胆固醇贮积病理改变是说明性的，hASM 酶活性的更直接测量是通过神经鞘磷脂水平的分析，神经鞘磷脂是患有 Niemann-Pick 疾病的哺乳动物组织中累积的主要底物。测定接受两侧注射 AAV 血清型 1 和 2 小鼠脑组织的神经鞘磷脂（SPM）水平（用于测定 SPM 的组织均质的方法与 hASM 的检测不相容）。在血清型 1 和 2 处理的小鼠中观察到小脑中 SPM 组织含量的显著降低（p<0.01）（图 12)。在注射血清型 1 的小鼠中的切片 2、3 和 4（每个切片相互隔开 2mm）中的 SPM 组织含量水平也是显著降低的，但是在注射血清型 2 的小鼠中没有。

接受两侧小脑内注射编码 hASM 的 AAV 血清型 1 和 2 的 ASMKO 小鼠显示出小脑内神经鞘磷脂贮积的显著降低。如用胆固醇贮积累积所观察的，在 AAV1 两侧处理的 ASMKO 小鼠中的小脑外侧区域中也产生了神经鞘磷脂贮积病理的显著降低。

总之，这些结果表明在启动酶表达、校正脑中的贮积病理、防止神经退化（例如，通过防止浦肯野细胞死亡）和提高运动功能结果的相对能力中，相对于血清

型 2、5、7 和 8 优选 AAV1。此外，可以开发 DCN 作为注射位点来最大化在整个 CNS 中的酶表达。

为了评价 AVV 载体注射至 DCN 后转基因表达的分布，将 G93A SOD1（$SOD1^{G93A}$ 突变小鼠，在此称为 SOD1 小鼠）注射编码绿色荧光蛋白（GFP）的重组 AAV 载体。一组小鼠注射编码绿色荧光蛋白的 AAV 血清型 1（AAV1-GFP），而另一组注射编码绿色荧光蛋白的 AAV 血清型 2（AAV2-GFP）。

使用上述那些相似的方法将 AAV 重组载体两侧注射至小鼠 DCN 中。剂量大约为每个位点注射 2.0-10gc/ml（2.0e10 gc/ml）。在出生后约 110 天将小鼠处死，并将它们的脑和脊髓用于 GFP 染色。

编码绿色荧光蛋白（GFP）的 AAV 的 DCN 传送后，在脑干（参见图 14）和脊髓区域（参见图 15）中观察到绿色荧光蛋白分布。还在 DCN 以及嗅球、大脑皮层、丘脑、脑干、小脑皮层和脊髓中观察到 GFP 染色。所有这些区域接受来自 DCN 的投射和/或将投射发送至 DCN（参见图 16）。

根据说明书内引用的参考文献的教导来最彻底地理解说明书。说明书内的实施方案提供了本发明实施方案的说明并不应当认为是限制本发明的范围。本领域技术人员容易认识到本发明包括许多其他实施方案。本公开中引用的所有出版物、专利和生物序列以其整体引入作为参考。对于引入作为参考的材料与本发明相抵触或不一致的程度，本发明说明书将取代任何这样的材料。在此任何参考文献的引用不容许这样的参考文献是本发明的现有技术。

除非另外指出，说明书包括权利要求中所用的表达成分数量、细胞培养物、处理条件等的所有数字理解为通过术语“约”在所有情况中是待改变的。因此，除非另外指出与此相反，数字参数是近似值并可以根据本发明探寻待获得的所需特征而改变。除非另外指出，一系列要素前的术语“至少”理解为表示系列中的每个要素。本领域技术人员使用不超过常规的实验将认识到或者能够确定在此所述的本发明特定实施方案的许多等价物。确定以下的权利要求包括这样的等价物。

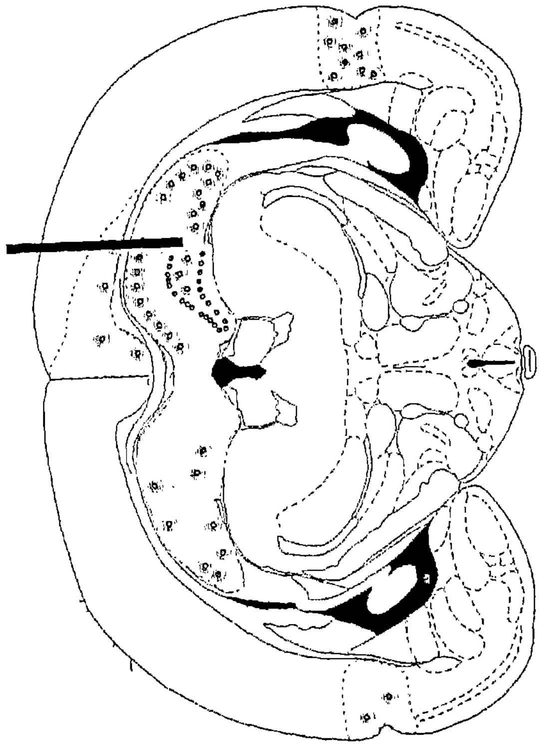


图 1A

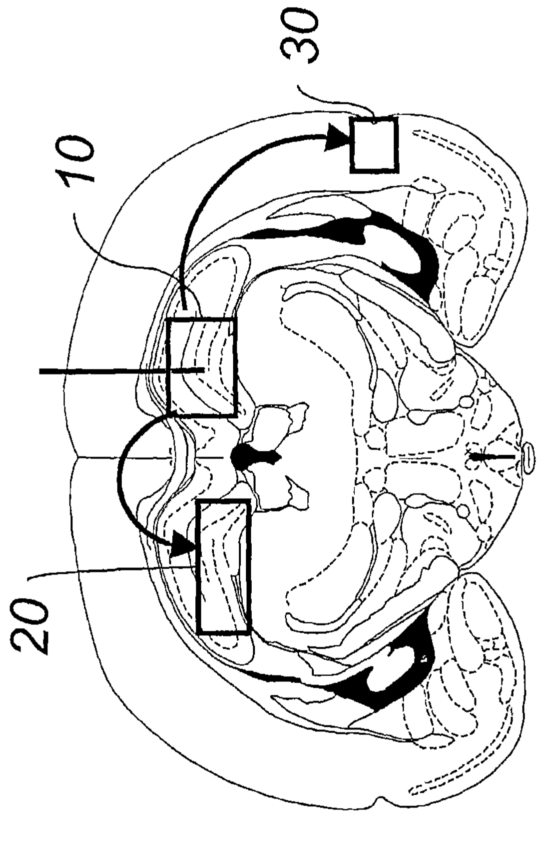


图 1B

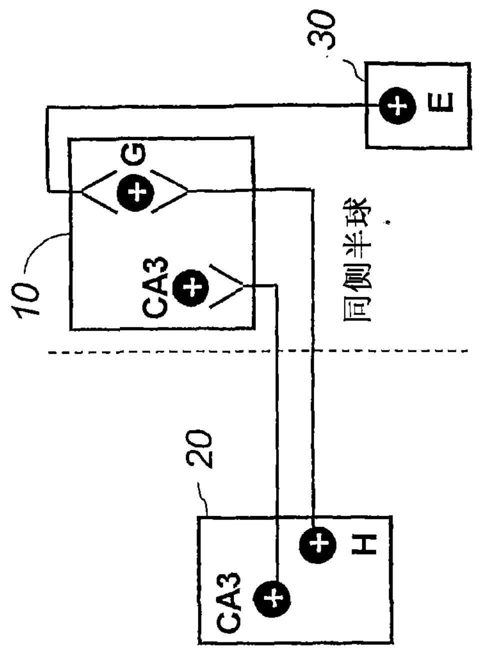


图 1C

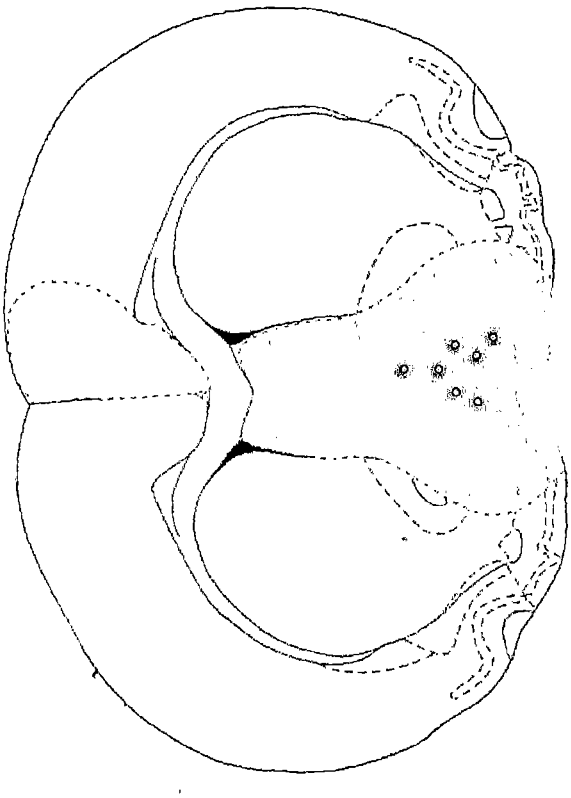


图 2A

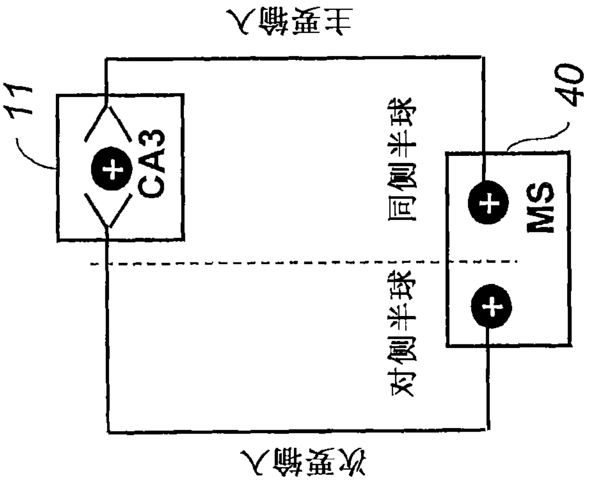


图 2C

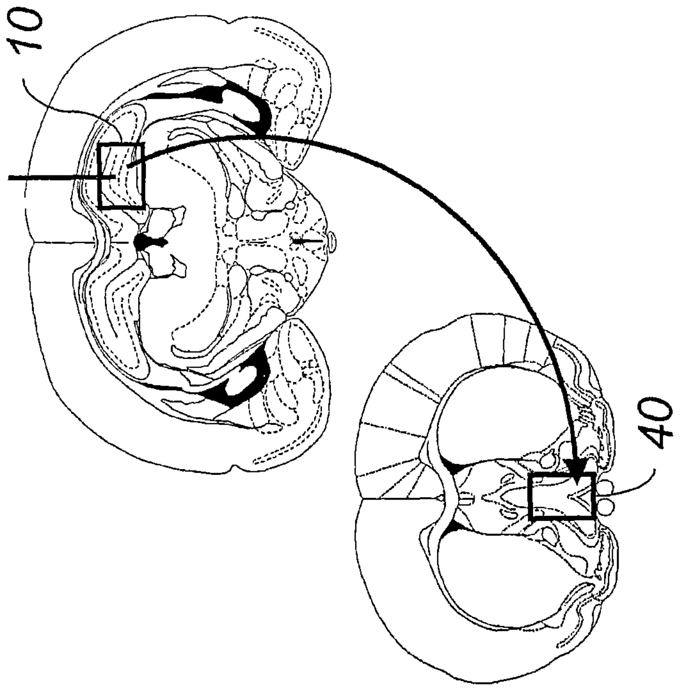


图 2B

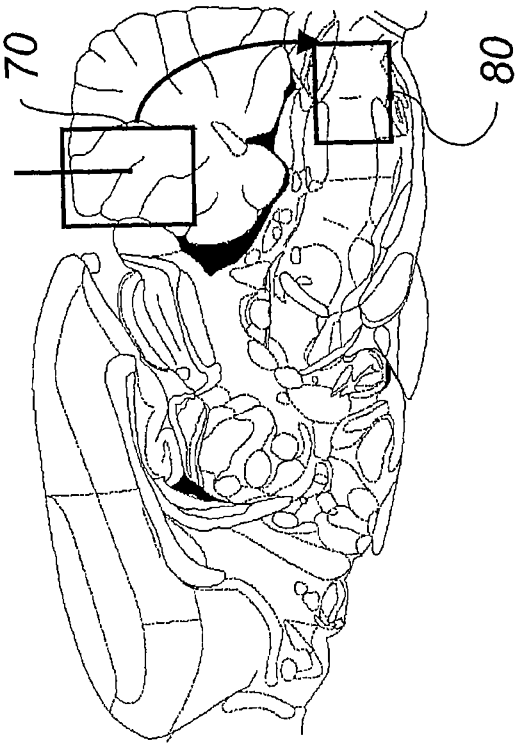


图 4

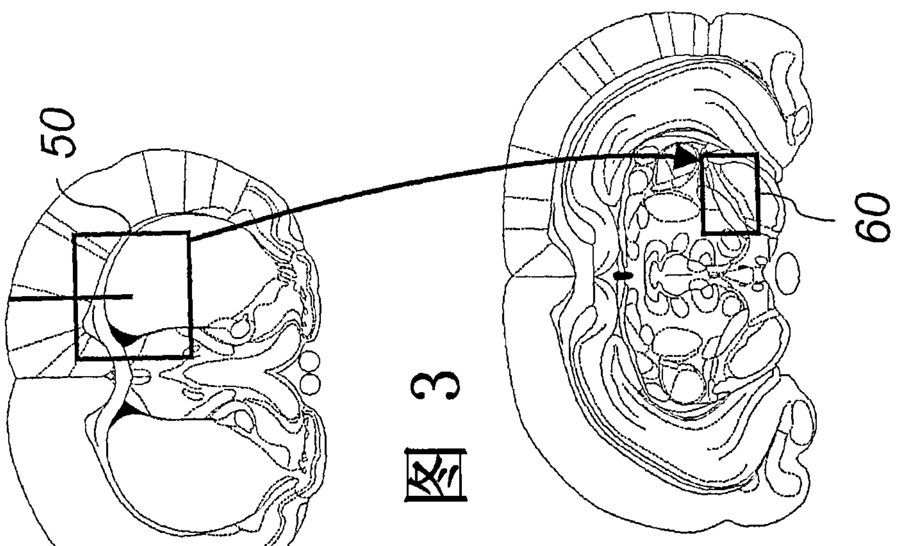


图 3

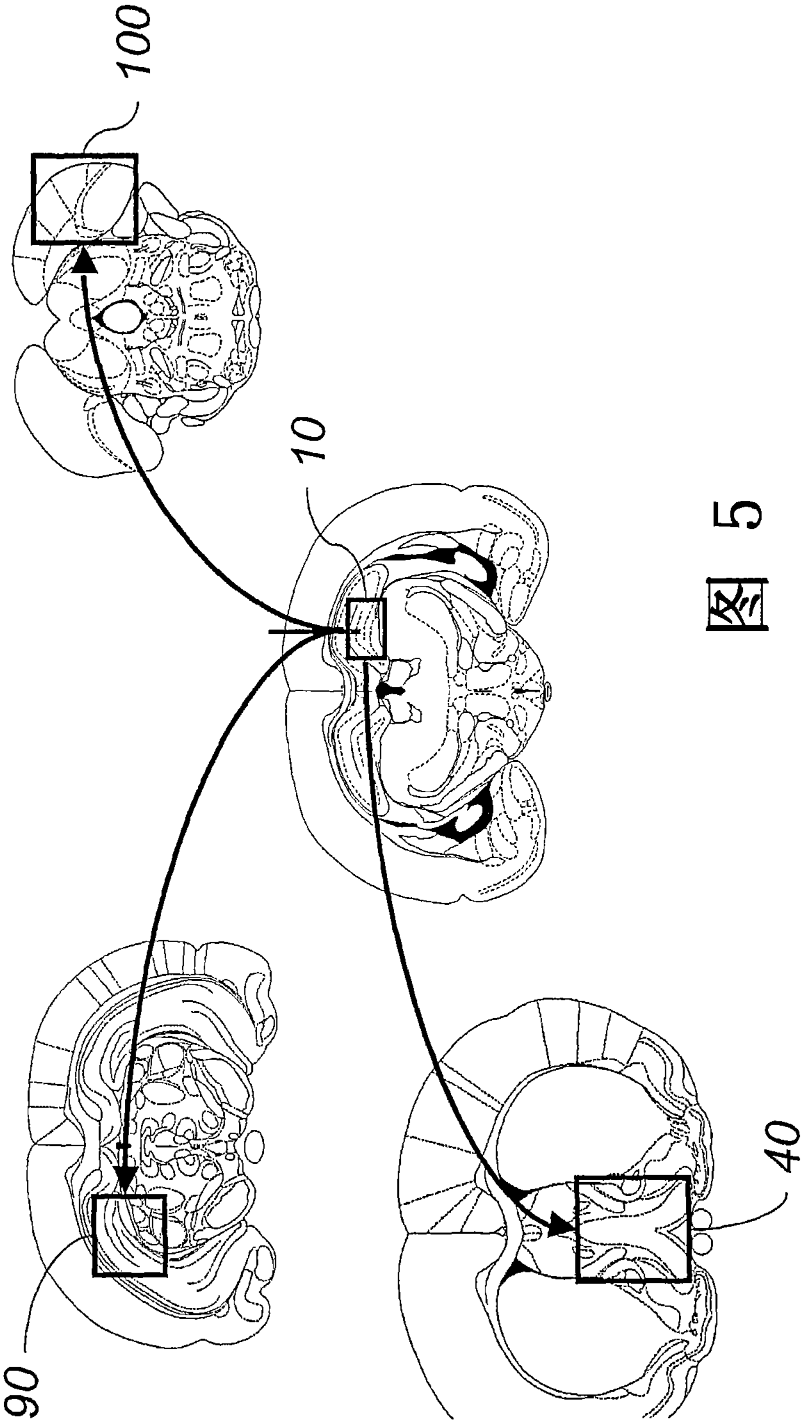


图 5

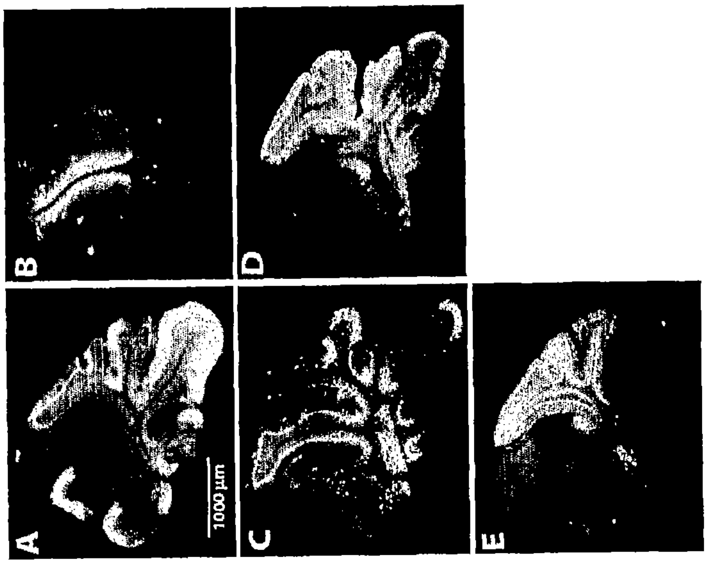


图 6

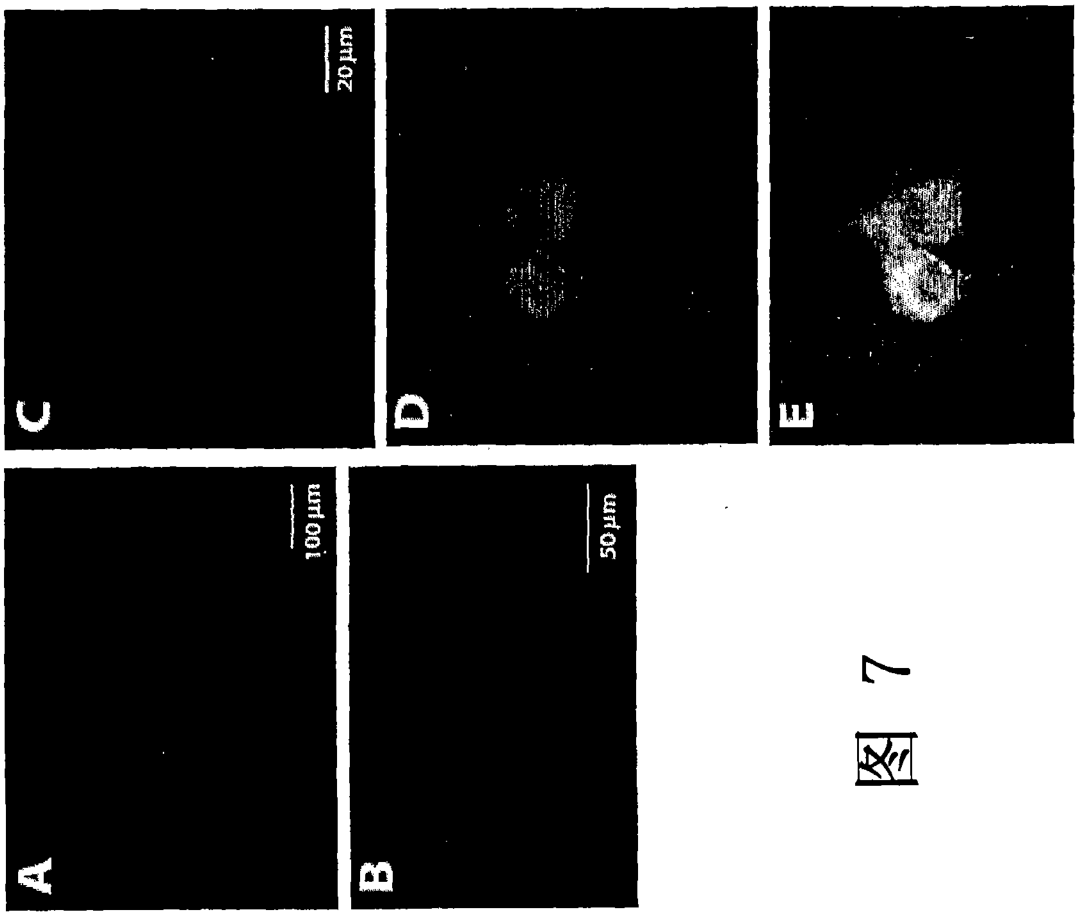
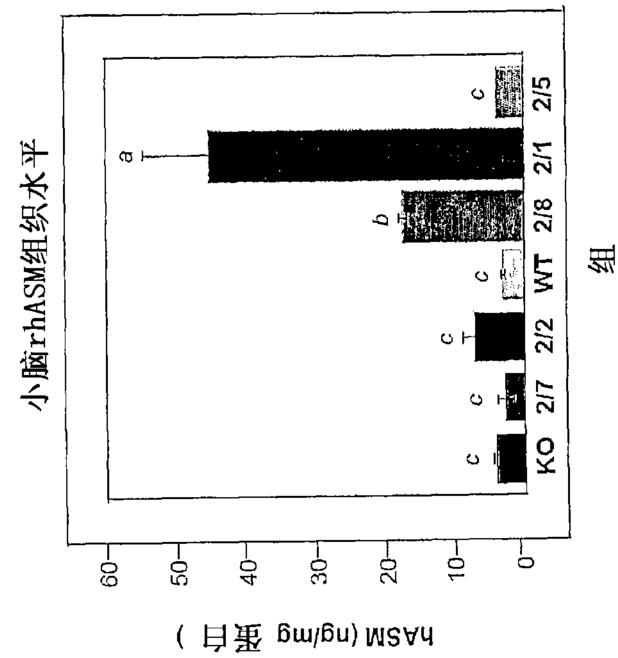


图 7



小脑rhASM组织水平
hASM (ng/mg 蛋白)
0
10
20
30
40
50
60
KO
2/7
2/2
WT
2/8
2/1
2/5
组
c
c
c
c
b
a
c

图 8

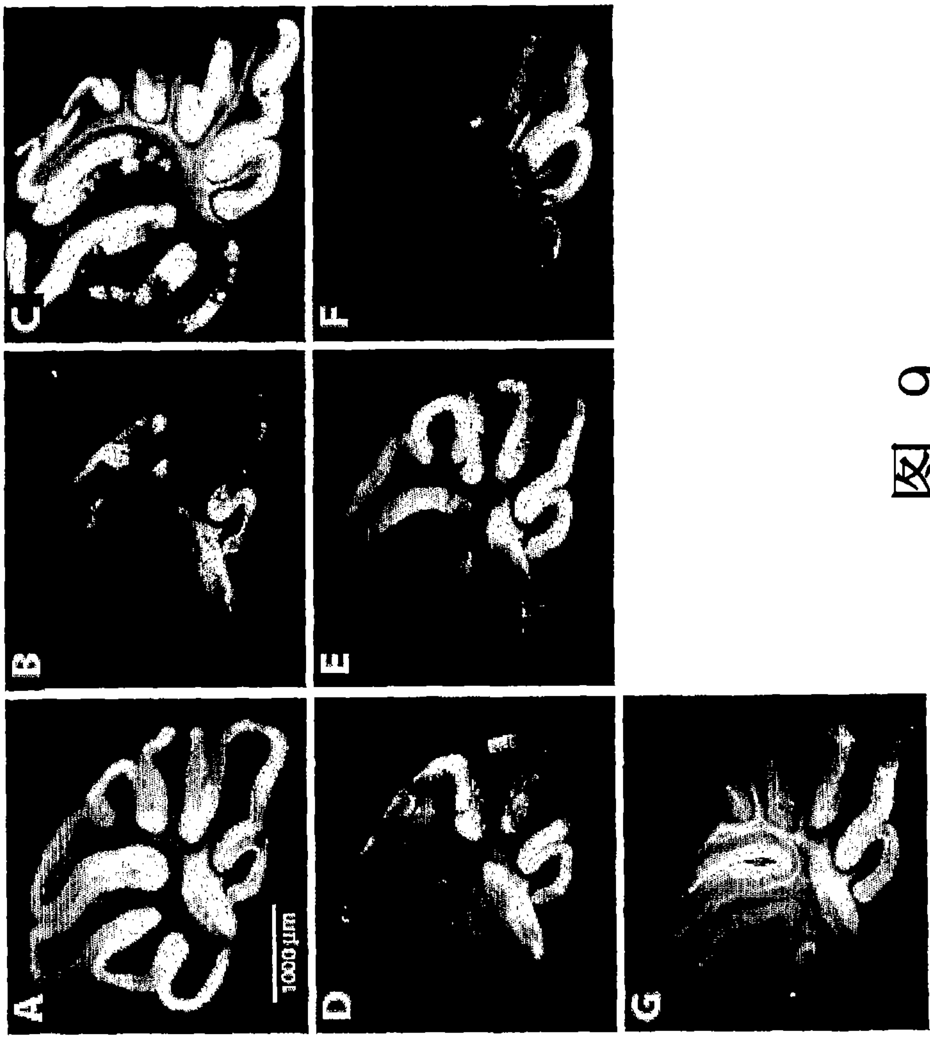


图 9

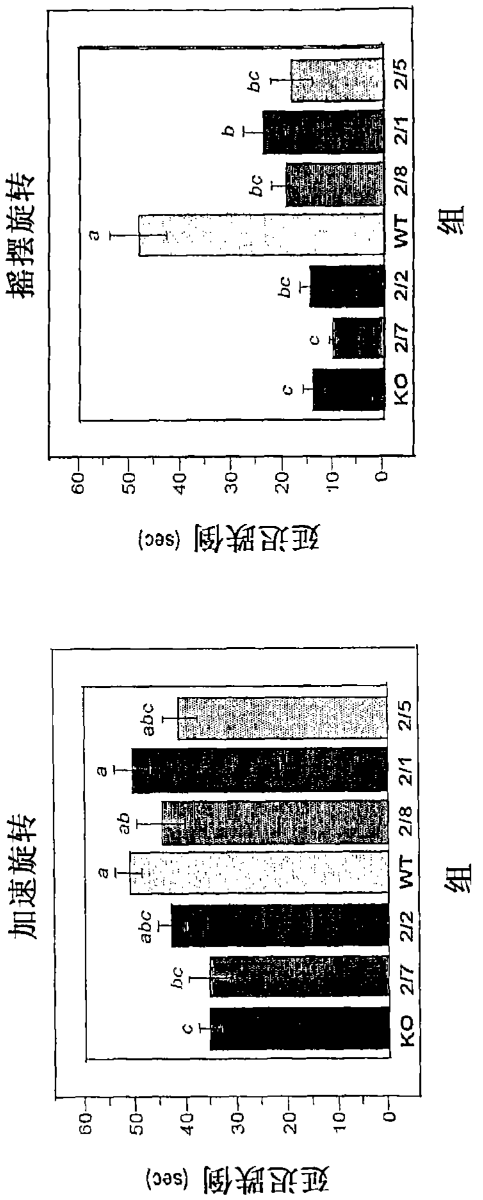

摇摆旋转
延迟跌倒 (sec)
60
50
40
30
20
10
0
c
c
bc
a
bc
b
bc
KO
2/7
2/2
WT
2/8
2/1
2/5
组
加速旋转
延迟跌倒 (sec)
60
50
40
30
20
10
0
c
bc
abc
a
ab
a
abc
KO
2/7
2/2
WT
2/8
2/1
2/5
组

图 10

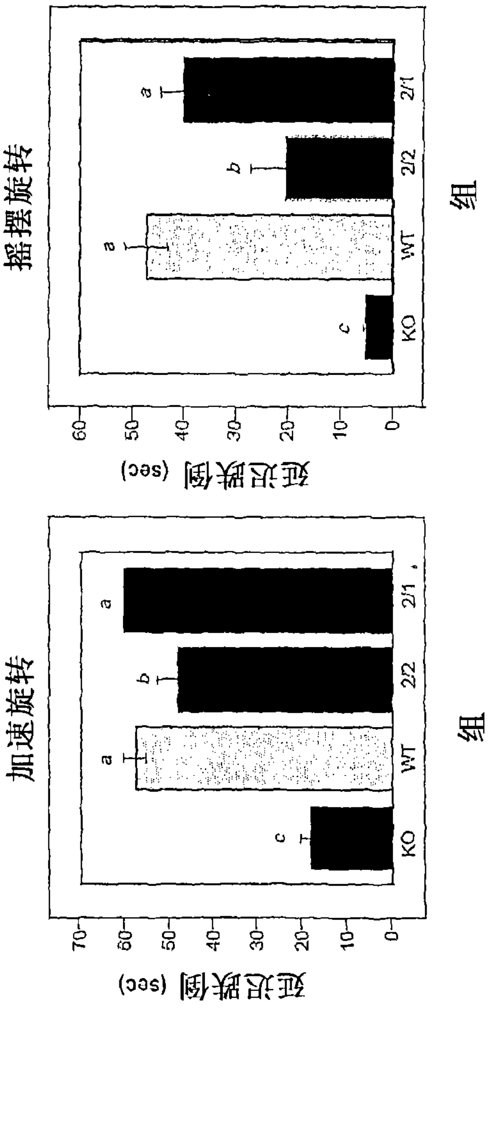


图 11

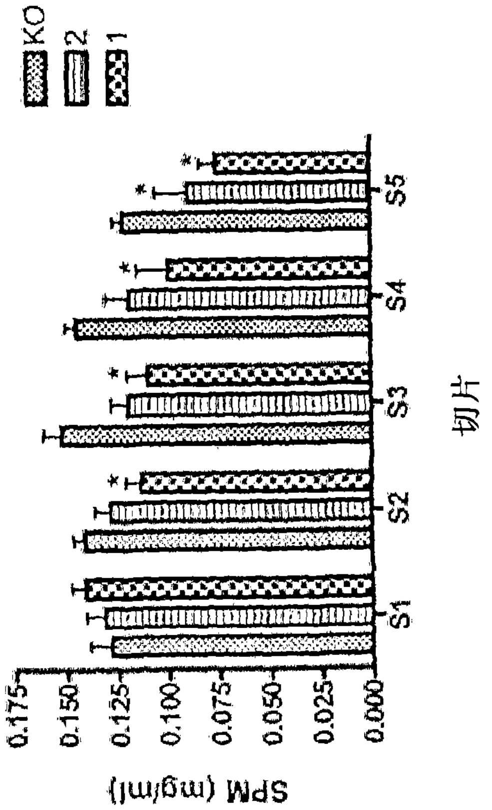

KO
2
1
SPM (mg/ml)
0.175
0.150
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
S1
S2
S3
S4
S5
切片

图 12

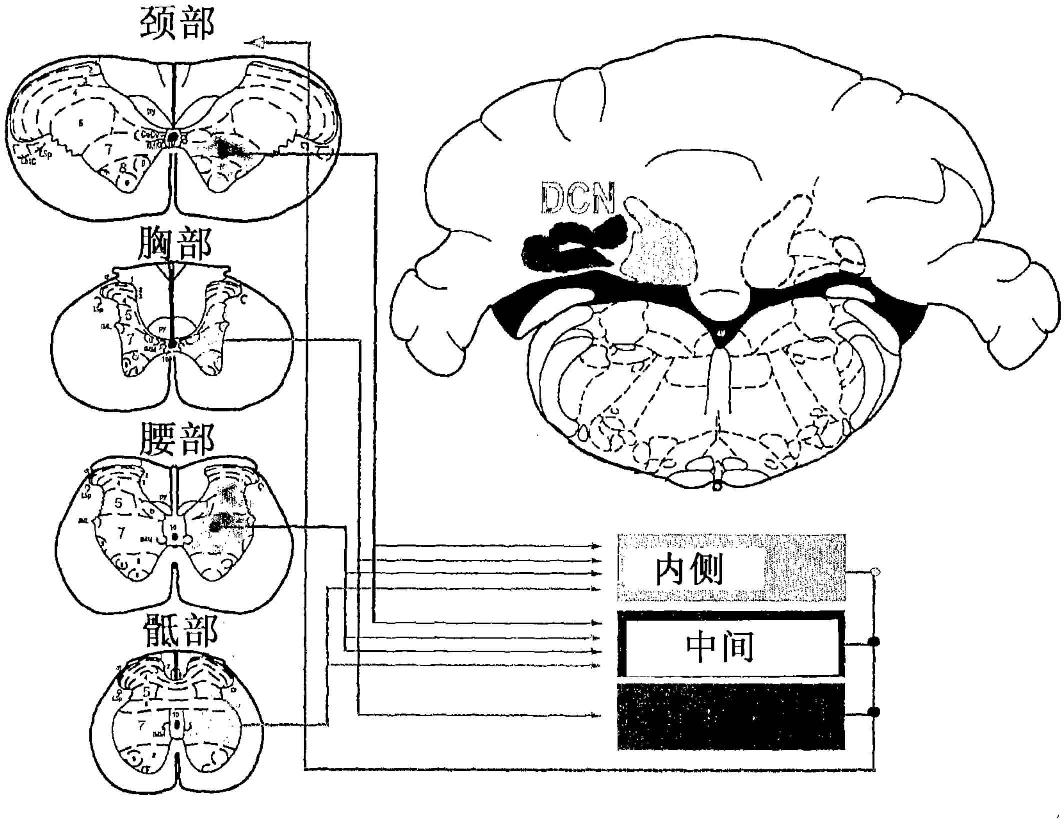


图 13A

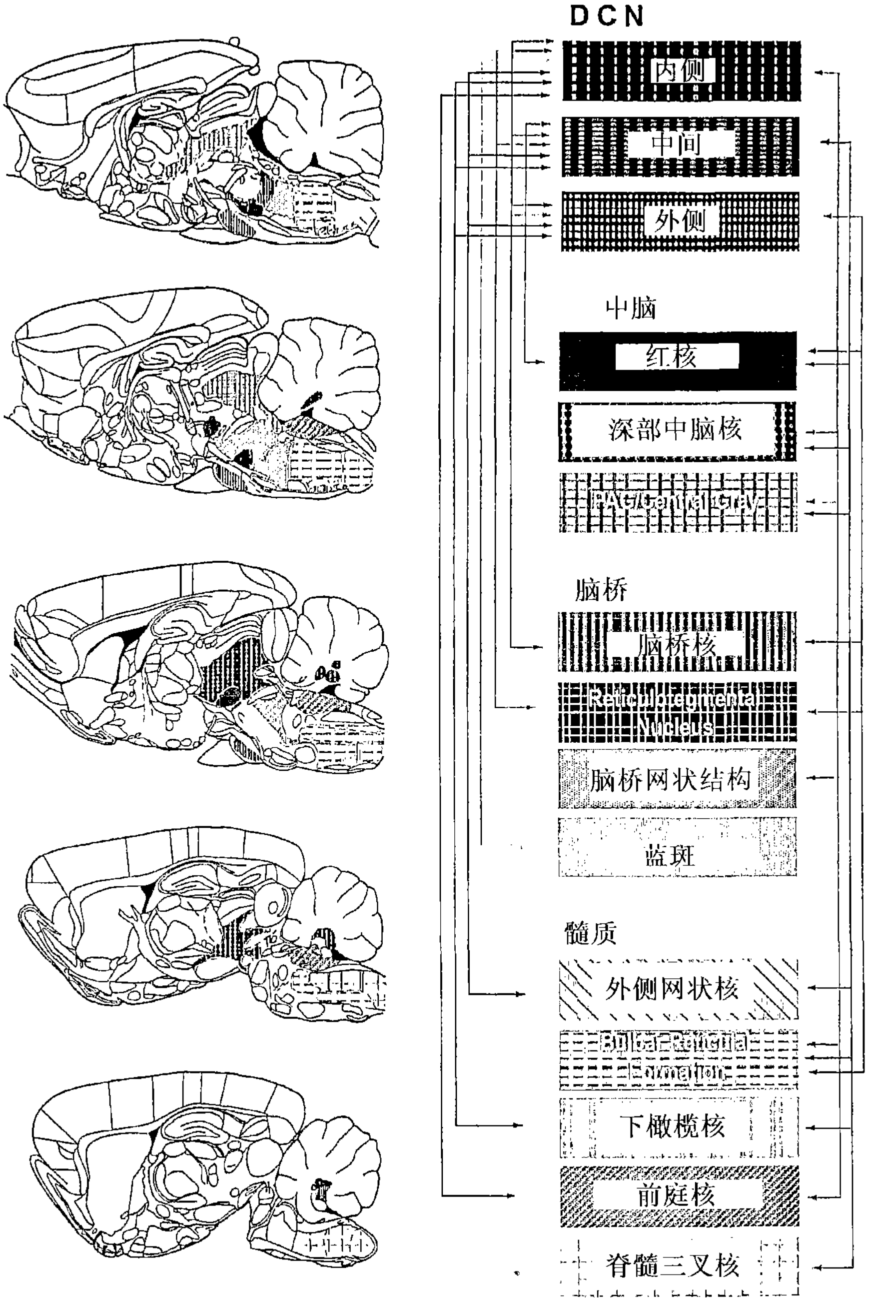

DCN
内侧
中间
外侧
中脑
红核
深部中脑核
脑桥
脑桥核
Reticulotegmental
Nucleus
脑桥网状结构
蓝斑
髓质
外侧网状核
下橄榄核
前庭核
脊髓三叉核

图 13B

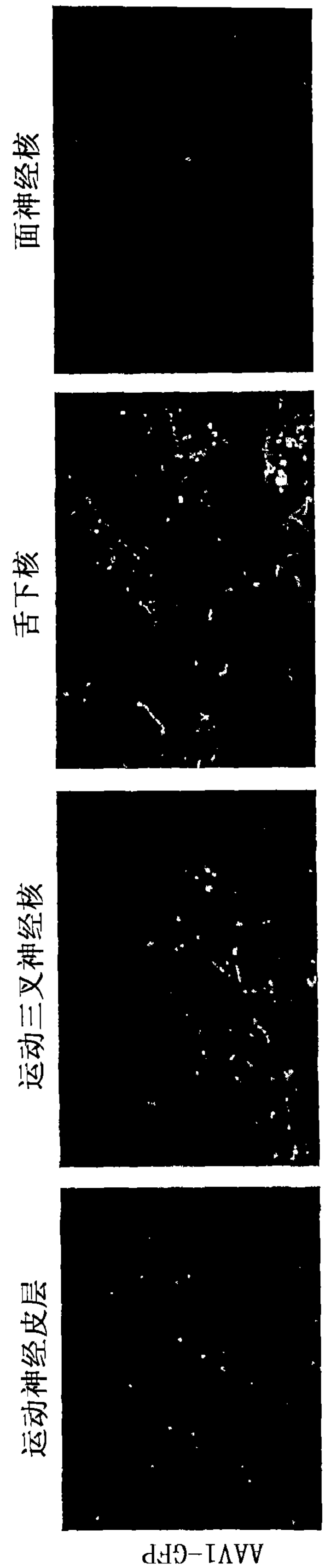


图 14

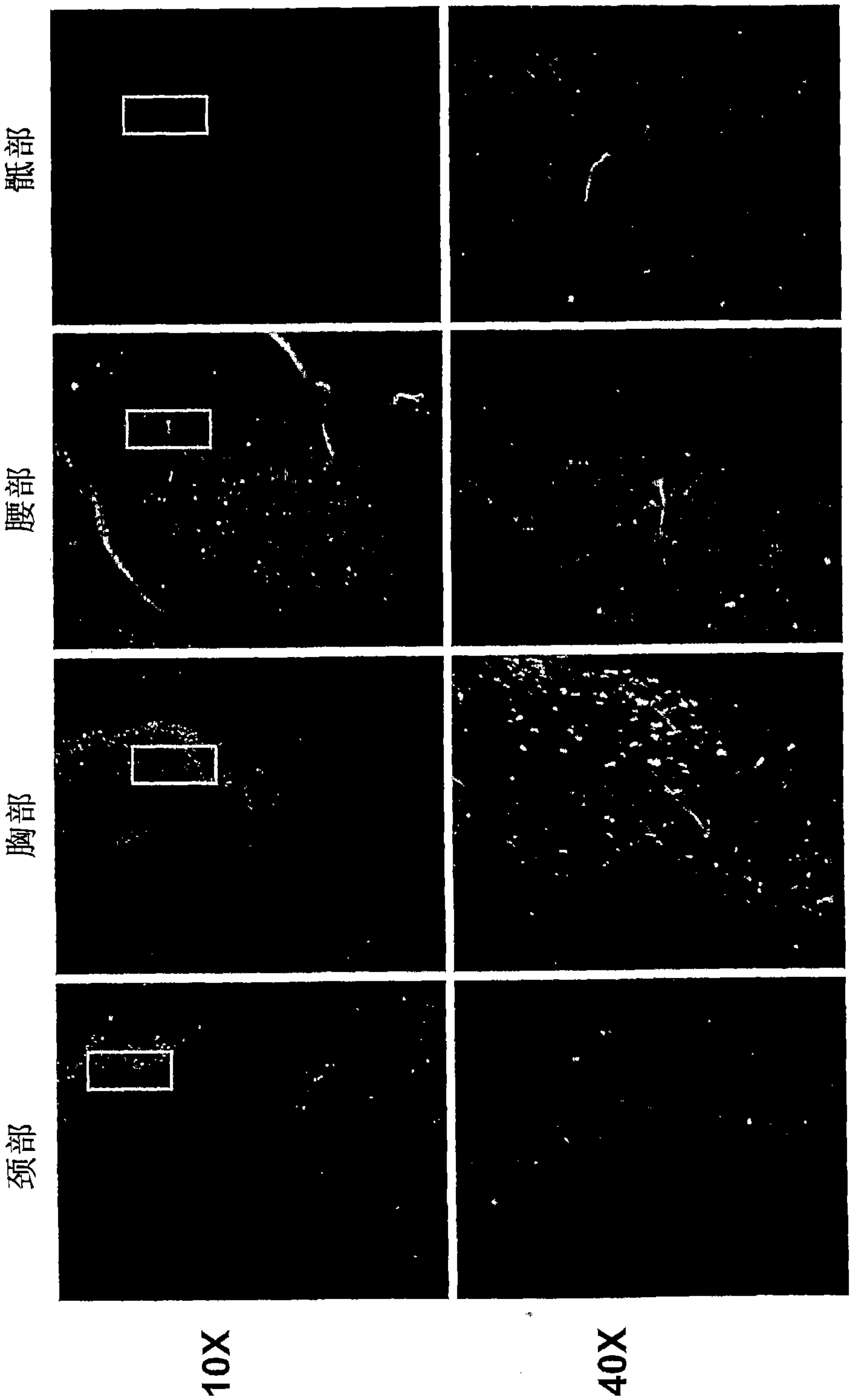


图 15

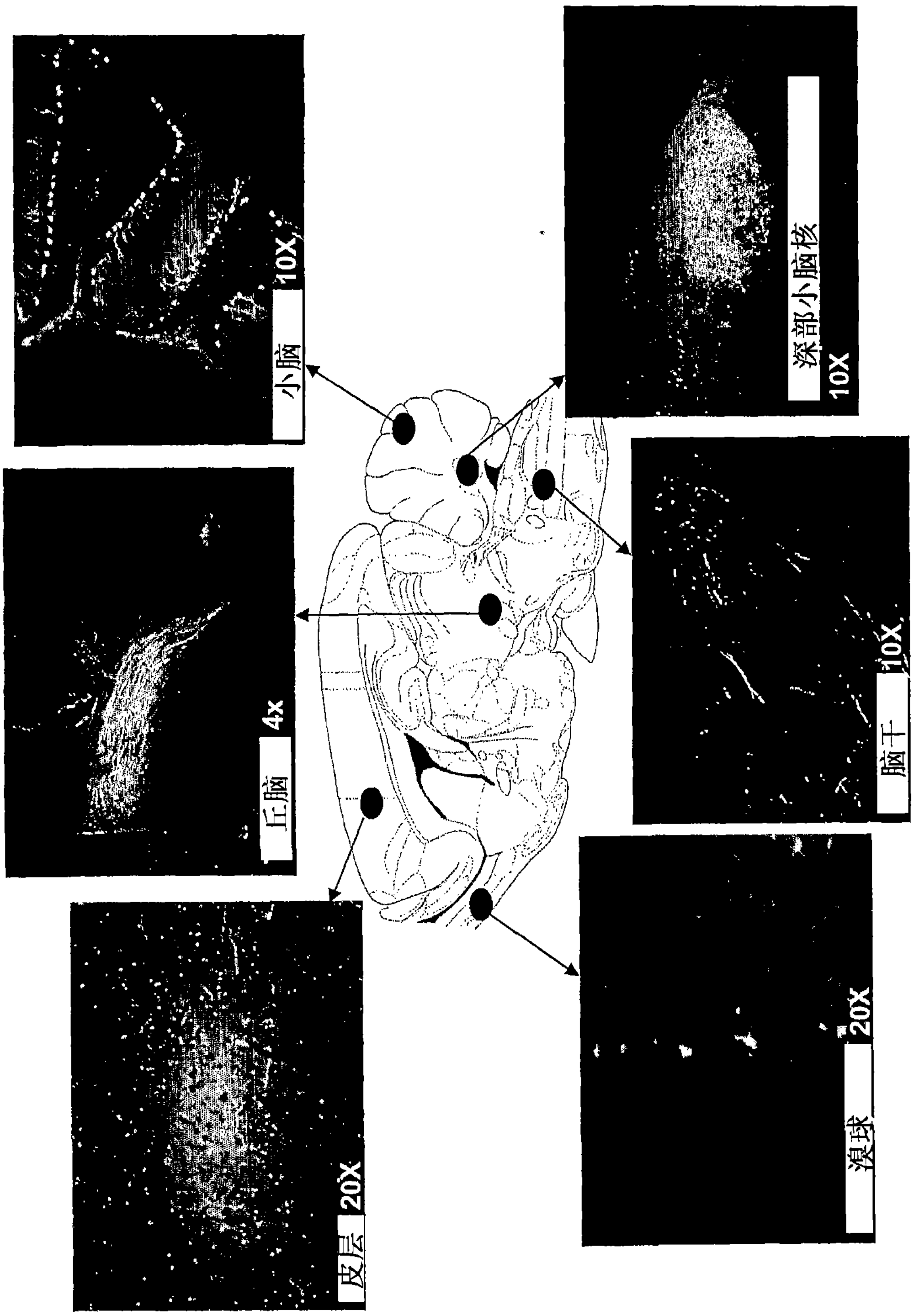


图 16