



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107530447 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680020700.4

(22)申请日 2016.02.09

(30)优先权数据

62/114,544 2015.02.10 US

62/220,997 2015.09.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.10.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/017210 2016.02.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/130591 EN 2016.08.18

(71)申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 L·M·施塔内克 L·史哈卜丁

(74)专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事
务所(特殊普通合伙) 11484

代理人 陈静

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

C12N 15/864(2006.01)

C12N 15/113(2010.01)

A61P 25/00(2006.01)

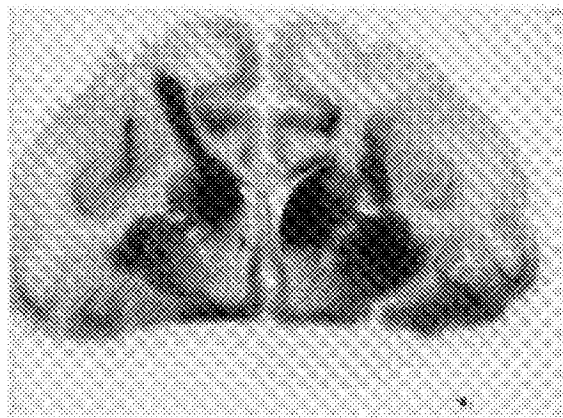
权利要求书12页 说明书55页
序列表1页 附图25页

(54)发明名称

病毒颗粒至纹状体和皮质的增强递送

(57)摘要

本申请提供用于将重组腺相关病毒(rAAV)颗粒递送至哺乳动物(例如,人)的中枢神经系统的新方法。在一些方面,所述方法涉及将含有异源核酸的rAAV颗粒施用至纹状体并引起所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。



1. 一种用于递送重组腺相关病毒 (rAAV) 颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法, 其包括将所述rAAV颗粒施用至纹状体, 其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体, 所述异源核酸至少在所述哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。

2. 一种用于递送rAAV颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法, 其包括施用rAAV颗粒至纹状体, 其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体, 所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达, 且其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型1 (AAV1) 衣壳。

3. 一种用于递送rAAV颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法, 其包括施用rAAV颗粒至纹状体, 其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体, 所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达, 且其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型2 (AAV2) 衣壳。

4. 权利要求1-3任一项的方法, 其中所述哺乳动物是人。

5. 权利要求1-4任一项的方法, 其中将所述rAAV颗粒施用至纹状体的壳核和尾状核。

6. 权利要求5的方法, 其中将所述rAAV颗粒施用至纹状体每半球的壳核和尾状核。

7. 权利要求5或6的方法, 其中将所述rAAV颗粒施用至尾状核中的一处位点和壳核中的两处位点。

8. 权利要求5-7任一项的方法, 其中施用至壳核的rAAV颗粒与施用至尾状核的rAAV颗粒的比例为至少约2:1。

9. 权利要求1-8任一项的方法, 其中所述异源核酸在哺乳动物的额叶皮质、枕叶皮质和/或层IV中表达。

10. 权利要求9的方法, 其中所述异源核酸在前额叶相关皮质区、运动前区皮质、初级躯体感觉皮质区、感觉运动皮质、顶叶皮质、枕叶皮质和/或初级运动皮质中表达。

11. 权利要求1-10任一项的方法, 其中所述rAAV颗粒在大脑皮质中经历逆行或顺行转运。

12. 权利要求1-11任一项的方法, 其中所述异源核酸进一步在丘脑、底丘脑核、苍白球、黑质和/或海马区中表达。

13. 权利要求1或4-12任一项的方法, 其中所述rAAV颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

14. 权利要求13的方法, 其中所述AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10或AAVrh10。

15. 权利要求1-14任一项的方法, 其中所述rAAV载体包含侧翼为一个或多个AAV反向末端重复 (ITR) 序列的异源核酸。

16. 权利要求15的方法, 其中所述异源核酸侧翼为两个AAV ITR。

17. 权利要求15或16的方法, 其中所述AAV ITR为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。

18. 权利要求15-17任一项的方法, 其中所述AAV ITR为AAV2 ITR。

19. 权利要求15或16的方法, 其中所述rAAV颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。

20. 权利要求3-12任一项的方法, 其中所述ITR和所述衣壳源自AAV2。

21. 权利要求15或16的方法,其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。

22. 权利要求2和4-12任一项的方法,其中所述ITR源自AAV2且所述衣壳源自AAV1。

23. 权利要求1-22任一项的方法,其中所述异源核酸可操作地与启动子连接。

24. 权利要求23的方法,其中所述启动子在CNS的细胞中表达所述异源核酸。

25. 权利要求23或24的方法,其中所述启动子在脑细胞中表达所述异源核酸。

26. 权利要求23-25任一项的方法,其中所述启动子在神经元和/或神经胶质细胞中表达所述异源核酸。

27. 权利要求26的方法,其中所述神经元是尾状核的中型多棘神经元(medium spiny neuron)、壳核的中型多棘神经元、皮质层IV的神经元和/或皮质层V的神经元。

28. 权利要求23-27任一项的方法,其中所述启动子是CBA启动子、最小CBA启动子、CMV启动子或GUSB启动子。

29. 权利要求23-27任一项的方法,其中所述启动子是诱导型。

30. 权利要求23-29任一项的方法,其中所述rAAV载体包含一个或多个增强子、剪接供体/剪接受体对、基质衔接位点或多聚腺苷酸化信号。

31. 权利要求1-30任一项的方法,其中所述rAAV载体是自身互补的rAAV载体。

32. 权利要求31的方法,其中所述载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码所述异源核酸的互补物的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与第二核酸序列沿其长度的大部分或全部形成链内碱基对。

33. 权利要求32的方法,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变的AAV ITR连接,其中所述突变的AAV ITR包含D区的缺失且包含末端解析序列的突变。

34. 权利要求1-33任一项的方法,其中所述异源核酸编码治疗多肽或治疗核酸。

35. 权利要求34的方法,其中所述异源核酸编码治疗多肽。

36. 权利要求35的方法,其中所述治疗多肽是酶、神经营养因子、在具有CNS相关病症的个体中缺失或突变的多肽、抗氧化剂、抗细胞凋亡因子、抗血管生成因子和抗炎症因子、 α -突触核蛋白、酸性 β -葡萄糖苷酶(GBA)、 β -半乳糖苷酶-1(GLB1)、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)、半乳糖神经酰胺酶(GALC)、甘露糖苷酶、 α -D-甘露糖苷酶(MAN2B1)、 β -甘露糖苷酶(MANBA)、假芳基硫酸酯酶A(ARSA)、N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶(GNPTAB)、酸性鞘磷脂酶(ASM)、尼曼-匹克C蛋白(Niemann-Pick C protein)(NPC1)、酸性 α -1,4-葡萄糖苷酶(GAA)、己糖胺酶 β 亚基、HEXB、N-硫代葡萄糖胺磺基水解酶(MPS3A)、N- α -乙酰葡萄糖胺酶(NAGLU)、肝素乙酰-CoA、 α -葡萄糖胺酶N-乙酰转移酶(MPS3C)、N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶(GNS)、 α -N-乙酰半乳糖胺酶(NAGA)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUSB)、己糖胺酶 α 亚基(HEXA)、亨廷顿蛋白(huntingtin)(HTT)、溶酶体酸性脂肪酶(LIPA)、天冬氨酰葡萄糖胺酶、 α -半乳糖苷酶A、棕榈酰蛋白硫酯酶、三肽基肽酶、溶酶体跨膜蛋白、半胱氨酸转运蛋白、酸性神经酰胺酶、酸性 α -L-岩藻糖苷酶、组织蛋白酶A、 α -L-艾杜糖醛酸酶、芳基硫酸酯酶B、芳基硫酸酯酶A、N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸、酸性 β -半乳糖苷酶或 α -神经氨酸酶。

37. 权利要求35的方法,其中所述异源核酸编码治疗核酸。

38. 权利要求37的方法,其中所述治疗核酸是siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。

39. 权利要求34-38任一项的方法,其中所述治疗多肽或治疗核酸用于治疗CNS的病症。

40. 权利要求39的方法,其中所述CNS的病症是溶酶体贮积症(LSD)、亨廷顿氏病(Huntington's Disease)、癫痫、帕金森氏病(Parkinson's Disease)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease)、中风、皮质基底节变性(CBD)、皮质基底神经节变性(CBGD)、额颞叶痴呆(FTD)、多系统萎缩(MSA)、进行性核上性麻痹(PSP)或脑癌。

41. 权利要求40的方法,其中所述病症是选自下组的溶酶体贮积症:天冬氨酰葡萄糖胺尿症(Aspartylglucosaminuria)、法布里病(Fabry)、小儿巴滕病(Infantile Batten Disease)(CNL1)、经典晚期小儿巴滕病(Classic Late Infantile Batten Disease)(CNL2)、青少年巴滕病(Juvenile Batten Disease)(CNL3)、Batten形式CNL4、Batten形式CNL5、Batten形式CNL6、Batten形式CNL7、Batten形式CNL8、胱氨酸贮积症(Cystinosis)、法伯氏病(Farber)、岩藻糖苷贮积症(Fucosidosis)、半乳糖苷唾液酸贮积症(Galactosidosis)、戈谢病1型(Gaucher disease type 1)、戈谢病2型(Gaucher disease type 2)、戈谢病3型(Gaucher disease type 3)、GM1神经节苷脂贮积症(GM1gangliosidosis)、亨特病(Hunter Disease)、克拉伯病(Krabbe Disease)、 α 甘露糖苷贮积症(α mannosidosis Disease)、 β 甘露糖苷贮积症(β mannosidosis Disease)、马-拉病(Maroteaux-Lamy)、异染性脑白质营养不良症(metachromatic leukodystrophy Disease)、莫尔丘病A(Morquio A)、莫尔丘病B(Morquio B)、粘脂贮积症II/III病(mucopolysaccharidosis II/III Disease)、尼曼-匹克A病(Niemann-Pick A Disease)、尼曼-匹克B病(Niemann-Pick B Disease)、尼曼-匹克C病(Niemann-Pick C Disease)、蓬佩病(Pompe Disease)、桑德霍夫病(Sandhoff disease)、Sanfillipo A病(Sanfillipo A disease)、Sanfillipo B病(Sanfillipo B disease)、Sanfillipo C病(Sanfillipo C disease)、Sanfillipo D病(Sanfillipo D disease)、辛德勒病(Schindler disease)、Schindler-Kanzaki、唾液酸贮积症(sialidosis)、斯利氏病(Sly Disease)、泰-萨克斯病(Tay-Sachs Disease)和沃尔曼病(Wolman Disease)。

42. 权利要求1-41任一项的方法,其中所述rAAV颗粒在组合物中。

43. 权利要求42的方法,其中所述组合物是包含药理学上可接受的赋形剂的药物组合物。

44. 权利要求1-43任一项的方法,其中所述rAAV颗粒通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染入宿主细胞而产生,其中所述核酸至所述宿主细胞的转染生成能够产生rAAV颗粒的宿主细胞。

45. 权利要求1-43任一项的方法,其中所述rAAV颗粒通过包含一个或多个编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸的生产细胞系产生。

46. 权利要求1-45任一项的方法,其中所述rAAV颗粒通过立体定向递送进行递送。

47. 权利要求1-45任一项的方法,其中所述rAAV颗粒通过对流增强递送进行递送。

48. 权利要求47的方法,其中所述rAAV颗粒使用CED递送系统递送。

49. 权利要求48的方法,其中所述CED系统包含套管和/或泵。

50. 权利要求49的方法,其中所述套管是抗返流套管或阶梯套管。

51. 权利要求50的方法,其中所述泵是手动泵。

52. 权利要求50的方法,其中所述泵是渗透泵。

53. 权利要求50的方法,其中所述泵是输注泵。

54. 一种治疗哺乳动物中CNS病症的方法,其包括通过权利要求1-53任一项的方法将有效量的rAAV颗粒施用至哺乳动物。

55. 一种在哺乳动物中治疗亨廷顿氏病(Huntington's Disease)的方法,其包括施用有效量的rAAV颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物大脑皮质和纹状体中表达。

56. 权利要求55的方法,其中所述rAAV颗粒包含AAV1衣壳或AAV2衣壳。

57. 一种在哺乳动物中治疗帕金森氏病(Parkinson's Disease)的方法,其包括施用有效量的rAAV颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。

58. 权利要求57的方法,其中所述rAAV颗粒包含AAV2衣壳。

59. 权利要求55-58任一项的方法,其中所述哺乳动物是人。

60. 权利要求55-59任一项的方法,其中将所述rAAV颗粒施用至纹状体的壳核和尾状核。

61. 权利要求58的方法,其中将所述rAAV颗粒施用至纹状体每半球的壳核和尾状核。

62. 权利要求60或61的方法,其中将所述rAAV颗粒施用至尾状核中的一处位点或壳核中的两处位点。

63. 权利要求55-62任一项的方法,其中所述施用至壳核的rAAV颗粒与施用至尾状核的rAAV颗粒的比例为至少约2:1。

64. 权利要求55-63任一项的方法,其中所述异源核酸在哺乳动物的额叶皮质、枕叶皮质和/或层IV中表达。

65. 权利要求62的方法,其中所述异源核酸在前额叶相关皮质区、运动前区皮质、初级躯体感觉皮质区、感觉运动皮质、顶叶皮质、枕叶皮质和/或初级运动皮质中表达。

66. 权利要求55-63任一项的方法,其中所述rAAV颗粒在大脑皮质中经历逆行或顺行转运。

67. 权利要求55-66任一项的方法,其中所述异源核酸进一步在丘脑、底丘脑核、苍白球、黑质和/或海马区中表达。

68. 权利要求55或59-65任一项的方法,其中所述rAAV颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

69. 权利要求68的方法,其中所述AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10或AAVrh10。

70. 权利要求55-69任一项的方法,其中所述rAAV载体包含侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列的异源核酸。

71. 权利要求70的方法,其中所述异源核酸侧翼为两个AAV ITR。

72. 权利要求70或71的方法,其中所述AAV ITR为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。

73. 权利要求70-72任一项的方法,其中所述AAV ITR为AAV2 ITR。

74. 权利要求70或71的方法,其中所述rAAV颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。
75. 权利要求74的方法,其中所述ITR和所述衣壳源自AAV2。
76. 权利要求70或71的方法,其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。
77. 权利要求76的方法,其中所述ITR源自AAV2且所述衣壳源自AAV1。
78. 权利要求55-77任一项的方法,其中所述异源核酸可操作地与启动子连接。
79. 权利要求78的方法,其中所述启动子在CNS的细胞中表达所述异源核酸。
80. 权利要求78或79的方法,其中所述启动子在脑细胞中表达所述异源核酸。
81. 权利要求78-80任一项的方法,其中所述启动子在神经元和/或神经胶质细胞中表达所述异源核酸。
82. 权利要求81的方法,其中所述神经元是尾状核的中型多棘神经元、壳核的中型多棘神经元、皮质层IV的神经元和/或皮质层V的神经元。
83. 权利要求78-82任一项的方法,其中所述启动子是CBA启动子、最小CBA启动子、CMV启动子或GUSB启动子。
84. 权利要求78-82任一项的方法,其中所述启动子是诱导型。
85. 权利要求78-84任一项的方法,其中所述rAAV载体包含一个或多个增强子、剪接供体/剪接受体对、基质衔接位点或多聚腺苷酸化信号。
86. 权利要求55-85任一项的方法,其中所述rAAV载体是自身互补的rAAV载体。
87. 权利要求86的方法,其中所述载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码所述异源核酸的互补物的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与第二核酸序列沿其长度的大部分或全部形成链内碱基对。
88. 权利要求87的方法,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变的AAV ITR连接,其中所述突变的AAV ITR包含D区的缺失且包含末端解析序列的突变。
89. 权利要求55-88任一项的方法,其中所述异源核酸编码治疗多肽或治疗核酸。
90. 权利要求55、56或58-88的方法,其中所述异源核酸编码在哺乳动物CNS的细胞中抑制HTT表达或抑制HTT积累的治疗多肽或治疗核酸。
91. 权利要求89或90的方法,其中所述异源核酸编码siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。
92. 权利要求55、56或58-88任一项的方法,其中所述异源核酸编码靶向亨廷顿蛋白的miRNA。
93. 权利要求92的方法,其中所述亨廷顿蛋白包含与亨廷顿氏病相关的突变。
94. 权利要求57-88任一项的方法,其中所述异源核酸编码治疗多肽,其中所述治疗多肽是胶质衍生的生长因子(GDNF)、脑衍生的生长因子(BDNF)、酪氨酸羟化酶(TH)、GTP-环水解酶(GTPCH)和/或氨基酸脱羧酶(AADC)。
95. 权利要求55-94任一项的方法,其中所述rAAV颗粒在组合物中。
96. 权利要求95的方法,其中所述组合物是包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。
97. 权利要求55-96任一项的方法,其中所述rAAV颗粒通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染入宿主细胞而产生,其中所述核酸至所述宿主细胞的转染生成能够产生rAAV颗粒的宿主细胞。

98. 权利要求55-96任一项的方法,其中所述rAAV颗粒通过包含一个或多个编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸的生产细胞系产生。

99. 权利要求55-98任一项的方法,其中所述rAAV颗粒通过立体定向递送进行递送。

100. 权利要求55-99任一项的方法,其中所述rAAV颗粒通过对流增强递送进行递送。

101. 权利要求97的方法,其中所述rAAV颗粒使用CED递送系统递送。

102. 权利要求101的方法,其中所述CED系统包含套管和/或泵。

103. 权利要求102的方法,其中所述套管是抗返流套管或阶梯套管。

104. 权利要求102的方法,其中所述泵是手动泵。

105. 权利要求102的方法,其中所述泵是渗透泵。

106. 权利要求102的方法,其中所述泵是输注泵。

107. 一种用于在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达异源核酸的系统,包含:

a) 含有rAAV颗粒的组合物,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体;和

b) 用于将rAAV颗粒递送至纹状体的装置。

108. 权利要求107的系统,其中所述rAAV颗粒包含AAV1衣壳或AAV2衣壳。

109. 权利要求107或108的系统,其中所述哺乳动物是人。

110. 权利要求107-109任一项的方法,其中将所述rAAV颗粒施用至纹状体的壳核和尾状核。

111. 权利要求110的系统,其中将所述rAAV颗粒施用至纹状体每半球的壳核和尾状核。

112. 权利要求107-111任一项的系统,其中所述异源核酸在哺乳动物的额叶皮质、枕叶皮质和/或层IV中表达。

113. 权利要求112的系统,其中所述异源核酸在前额叶相关皮质区、运动前区皮质、初级躯体感觉皮质区、感觉运动皮质、顶叶皮质、枕叶皮质和/或初级运动皮质中表达。

114. 权利要求107-113任一项的系统,其中所述rAAV颗粒在大脑皮质中经历逆行或顺行转运。

115. 权利要求107-114任一项的系统,其中所述异源核酸进一步在丘脑、底丘脑核、苍白球、黑质和/或海马区中表达。

116. 权利要求107或109-115任一项的系统,其中所述rAAV颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAVV708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

117. 权利要求116的系统,其中所述AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10或AAVrh10。

118. 权利要求107-117任一项的系统,其中所述rAAV载体包含侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列的异源核酸。

119. 权利要求118的系统,其中所述异源核酸侧翼为两个AAV ITR。

120. 权利要求118或119的系统,其中所述AAV ITR为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。

121. 权利要求118-120的系统,其中所述AAV ITR为AAV2 ITR。

122. 权利要求118或119的系统,其中所述rAAV颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。

123. 权利要求122的系统,其中所述ITR和所述衣壳源自AAV2。

124. 权利要求118或119的系统,其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。

125. 权利要求124的系统,其中所述ITR源自AAV2且所述衣壳源自AAV1。

126. 权利要求107-125任一项的系统,其中所述异源核酸可操作地与启动子连接。

127. 权利要求126的系统,其中所述启动子在CNS的细胞中表达所述异源核酸。

128. 权利要求126或127的系统,其中所述启动子在脑细胞中表达所述异源核酸。

129. 权利要求126-128任一项的系统,其中所述启动子在神经元和/或神经胶质细胞中表达所述异源核酸。

130. 权利要求129的系统,其中所述神经元是尾状核的中型多棘神经元、壳核的中型多棘神经元、皮质层IV的神经元和/或皮质层V的神经元。

131. 权利要求126-130任一项的系统,其中所述启动子是CBA启动子、最小CBA启动子、CMV启动子或GUSB启动子。

132. 权利要求126-130任一项的系统,其中所述启动子是诱导型。

133. 权利要求126-132任一项的系统,其中所述rAAV载体包含一个或多个增强子、剪接供体/剪接受体对、基质衔接位点或多聚腺苷酸化信号。

134. 权利要求107-133任一项的系统,其中所述rAAV载体是自身互补的rAAV载体。

135. 权利要求134的系统,其中所述载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码所述异源核酸的互补物的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与第二核酸序列沿其长度的大部分或全部形成链内碱基对。

136. 权利要求135的系统,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变的AAV ITR连接,其中所述突变的AAV ITR包含D区的缺失且包含末端解析序列的突变。

137. 权利要求107-136任一项的系统,其中所述异源核酸编码治疗多肽或治疗核酸。

138. 权利要求137的系统,其中所述异源核酸编码治疗多肽。

139. 权利要求138的系统,其中所述治疗多肽是酶、神经营养因子、在具有CNS相关病症的个体中缺失或突变的多肽、抗氧化剂、抗细胞凋亡因子、抗血管生成因子和抗炎症因子、 α -突触核蛋白、酸性 β -葡萄糖苷酶(GBA)、 β -半乳糖苷酶-1(GLB1)、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)、半乳糖神经酰胺酶(GALC)、甘露糖苷酶、 α -D-甘露糖苷酶(MAN2B1)、 β -甘露糖苷酶(MANBA)、假芳基硫酸酯酶A(ARSA)、N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶(GNPTAB)、酸性鞘磷脂酶(ASM)、尼曼-匹克C蛋白(NPC1)、酸性 α -1,4-葡萄糖苷酶(GAA)、己糖胺酶 β 亚基、HEXB、N-硫代葡萄糖胺磺基水解酶(MPS3A)、N- α -乙酰葡萄糖胺酶(NAGLU)、肝素乙酰-CoA、 α -葡萄糖胺酶N-乙酰转移酶(MPS3C)、N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶(GNS)、 α -N-乙酰半乳糖胺酶(NAGA)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUSB)、己糖胺酶 α 亚基(HEXA)、亨廷顿蛋白(HTT)、溶酶体酸性脂肪酶(LIPA)、天冬氨酰葡萄糖胺酶、 α -半乳糖苷酶A、棕榈酰蛋白硫酯酶、三肽基肽酶、溶酶体跨膜蛋白、半胱氨酸转运蛋白、酸性神经酰胺酶、酸性 α -L-岩藻糖苷酶、组织蛋白酶A、 α -L-艾杜糖醛酸酶、芳基硫酸酯酶B、芳基硫酸酯酶A、N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸、酸性 β -半乳糖苷酶或 α -神经氨酸酶。

140. 权利要求138的系统,其中所述异源核酸编码治疗核酸。

141. 权利要求140的系统,其中所述治疗核酸是siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。

142. 权利要求137-141任一项的系统,其中所述治疗多肽或治疗核酸用于治疗CNS的病症。

143. 权利要求142的系统,其中所述CNS的病症是溶酶体贮积症(LSD)、亨廷顿氏病、癫痫、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、中风、皮质基底节变性(CBD)、皮质基底神经节变性(CBGD)、额颞叶痴呆(FTD)、多系统萎缩(MSA)、进行性核上性麻痹(PSP)或脑癌。

144. 权利要求143的系统,其中所述病症是选自下组的溶酶体贮积症:天冬氨酰葡萄糖胺尿症、法布里病、小儿巴滕病(CNL1)、经典晚期小儿巴滕病(CNL2)、青少年巴滕病(CNL3)、Batten形式CNL4、Batten形式CNL5、Batten形式CNL6、Batten形式CNL7、Batten形式CNL8、胱氨酸贮积症、法伯氏病、岩藻糖苷贮积症、半乳糖苷唾液酸贮积症、戈谢病1型、戈谢病2型、戈谢病3型、GM1神经节苷脂贮积症、亨特病、克拉伯病、 α 甘露糖苷贮积症、 β 甘露糖苷贮积症、马-拉病、异染性脑白质营养不良症、莫尔丘病A、莫尔丘病B、粘脂贮积症II/III病、尼曼-匹克A病、尼曼-匹克B病、尼曼-匹克C病、蓬佩病、桑德霍夫病、Sanfillipo A病、Sanfillipo B病、Sanfillipo C病、Sanfillipo D病、辛德勒病、Schindler-Kanzaki、唾液酸贮积症、斯利氏病、泰-萨克斯病和沃尔曼病。

145. 权利要求107-144任一项的系统,其中所述rAAV颗粒在组合物中。

146. 权利要求145的系统,其中所述组合物是包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

147. 权利要求107-146任一项的系统,其中所述rAAV颗粒通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染入宿主细胞而产生,其中所述核酸至所述宿主细胞的转染生成能够产生rAAV颗粒的宿主细胞。

148. 权利要求107-146任一项的系统,其中所述rAAV颗粒通过包含一个或多个编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸的生产细胞系产生。

149. 权利要求107-148任一项的系统,其中所述rAAV颗粒通过立体定向递送进行递送。

150. 权利要求107-149任一项的系统,其中所述rAAV颗粒通过对流增强递送进行递送。

151. 权利要求150的系统,其中所述rAAV颗粒使用CED递送系统递送。

152. 权利要求151的系统,其中所述CED系统包含套管和/或泵。

153. 权利要求152的系统,其中所述套管是抗返流套管或阶梯套管。

154. 权利要求152的系统,其中所述泵是手动泵。

155. 权利要求152的系统,其中所述泵是渗透泵。

156. 权利要求152的系统,其中所述泵是输注泵。

157. 一种用于权利要求1-106任一项的方法中的包含rAAV颗粒的套盒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。

158. 权利要求157的套盒,其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型1(AAV1)衣壳。

159. 权利要求158的套盒,其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型2(AAV2)衣壳。

160. 一种用于在哺乳动物中治疗亨廷顿氏病的套盒,其包含含有有效量的rAAV颗粒的组合物,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。

161. 权利要求160的套盒,其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型1 (AAV1) 衣壳或AAV血清型2 (AAV2) 衣壳。

162. 一种用于在哺乳动物中治疗帕金森氏病的套盒,其包含含有有效量的rAAV颗粒的组合物,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。

163. 权利要求161的套盒,其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型1 (AAV1) 衣壳或AAV血清型2 (AAV2) 衣壳。

164. 权利要求157-163任一项的套盒,其进一步包含用于将rAAV颗粒递送至纹状体的装置。

165. 权利要求157-164任一项的套盒,其中所述rAAV颗粒在组合物中。

166. 权利要求165的套盒,其中所述组合物包含缓冲剂和/或药学上可接受的赋形剂。

167. 权利要求157-166任一项的套盒,其进一步包含用于将rAAV颗粒的组合物递送至纹状体的说明书。

168. 一种用于权利要求1-106任一项的方法的rAAV颗粒。

169. 一种用于将重组腺相关病毒 (rAAV) 颗粒递送至哺乳动物的中枢神经系统的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。

170. 一种用于将重组腺相关病毒 (rAAV) 颗粒递送至哺乳动物的中枢神经系统的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达且其中所述rAAV颗粒进一步包含AAV血清型1 (AAV1) 衣壳。

171. 一种用于将重组腺相关病毒 (rAAV) 颗粒递送至哺乳动物的中枢神经系统的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达且其中所述rAAV颗粒进一步包含AAV血清型2 (AAV2) 衣壳。

172. 一种用于在哺乳动物中治疗亨廷顿氏病的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。

173. 一种用于在哺乳动物中治疗帕金森氏病的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。

174. 权利要求173的rAAV,其中所述rAAV颗粒包含AAV2衣壳。

175. 权利要求169-174任一项的rAAV颗粒,其中所述哺乳动物是人。

176. 权利要求169-175任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒用于施用至纹状体的壳核和尾状核。

177. 权利要求176的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒用于施用至纹状体每半球的壳核和尾状核。

178. 权利要求169-177任一项的rAAV颗粒,其中所述异源核酸在哺乳动物的额叶皮质、枕叶皮质和/或层IV中表达。

179. 权利要求178的rAAV颗粒,其中所述异源核酸在前额叶相关皮质区、运动前区皮

质、初级躯体感觉皮质区、感觉运动皮质、顶叶皮质、枕叶皮质和/或初级运动皮质中表达。

180. 权利要求169-179任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒在大脑皮质中经历逆行或顺行转运。

181. 权利要求169-180任一项的rAAV颗粒,其中所述异源核酸进一步在丘脑、底丘脑核、苍白球、黑质和/或海马区中表达。

182. 权利要求169、170或175-181任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

183. 权利要求182的rAAV颗粒,其中所述AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10或AAVrh10。

184. 权利要求169-183任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV载体包含侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列的异源核酸。

185. 权利要求184的rAAV颗粒,其中所述异源核酸侧翼为两个AAV ITR。

186. 权利要求184或185的rAAV颗粒,其中所述AAV ITR为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。

187. 权利要求184-186任一项的rAAV颗粒,其中所述AAV ITR为AAV2 ITR。

188. 权利要求184或185的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。

189. 权利要求188的rAAV颗粒,其中所述ITR和所述衣壳源自AAV2。

190. 权利要求184或185的rAAV颗粒,其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。

191. 权利要求190的rAAV颗粒,其中所述ITR源自AAV2且所述衣壳源自AAV1。

192. 权利要求169-171任一项的rAAV颗粒,其中所述异源核酸可操作地与启动子连接。

193. 权利要求192的rAAV颗粒,其中所述启动子在CNS的细胞中表达所述异源核酸。

194. 权利要求192或193的rAAV颗粒,其中所述启动子在脑细胞中表达所述异源核酸。

195. 权利要求191-194任一项的rAAV颗粒,其中所述启动子在神经元或神经胶质细胞中表达所述异源核酸。

196. 权利要求195的rAAV颗粒,其中所述神经元是尾状核的中型多棘神经元、壳核的中型多棘神经元、皮质层IV的神经元和/或皮质层V的神经元。

197. 权利要求192-196任一项的rAAV颗粒,其中所述启动子是CBA启动子、最小CBA启动子、CMV启动子或GUSB启动子。

198. 权利要求192-196任一项的rAAV颗粒,其中所述启动子是诱导型。

199. 权利要求192-198任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV载体包含一个或多个增强子、剪接供体/剪接受体对、基质衔接位点或多聚腺苷酸化信号。

200. 权利要求169-199任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV载体是自身互补的rAAV载体。

201. 权利要求200的rAAV颗粒,其中所述载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码所述异源核酸的互补物的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与第二核酸序列沿其

长度的大部分或全部形成链内碱基对。

202. 权利要求200的rAAV颗粒,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变的AAV ITR连接,其中所述突变的AAV ITR包含D区的缺失且包含末端解析序列的突变。

203. 权利要求169-202任一项的rAAV颗粒,其中所述异源核酸编码治疗多肽或治疗核酸。

204. 权利要求203的rAAV颗粒,其中所述异源核酸编码治疗多肽。

205. 权利要求204的rAAV颗粒,其中所述治疗多肽是酶、神经营养因子、在具有CNS相关病症的个体中缺失或突变的多肽、抗氧化剂、抗细胞凋亡因子、抗血管生成因子和抗炎症因子、 α -突触核蛋白、酸性 β -葡萄糖苷酶(GBA)、 β -半乳糖苷酶-1(GLB1)、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)、半乳糖神经酰胺酶(GALC)、甘露糖苷酶、 α -D-甘露糖苷酶(MAN2B1)、 β -甘露糖苷酶(MANBA)、假芳基硫酸酯酶A(ARSA)、N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶(GNPTAB)、酸性鞘磷脂酶(ASM)、尼曼-匹克C蛋白(NPC1)、酸性 α -1,4-葡萄糖苷酶(GAA)、己糖胺酶 β 亚基、HEXB、N-硫代葡萄糖胺磺基水解酶(MPS3A)、N- α -乙酰葡萄糖胺酶(NAGLU)、肝素乙酰-CoA、 α -葡萄糖胺酶N-乙酰转移酶(MPS3C)、N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶(GNS)、 α -N-乙酰半乳糖胺酶(NAGA)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUSB)、己糖胺酶 α 亚基(HEXA)、亨廷顿蛋白(HTT)、溶酶体酸性脂肪酶(LIPA)、天冬氨酰葡萄糖胺酶、 α -半乳糖苷酶A、棕榈酰蛋白硫酯酶、三肽基肽酶、溶酶体跨膜蛋白、半胱氨酸转运蛋白、酸性神经酰胺酶、酸性 α -L-岩藻糖苷酶、组织蛋白酶A、 α -L-艾杜糖醛酸酶、芳基硫酸酯酶B、芳基硫酸酯酶A、N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸、酸性 β -半乳糖苷酶或 α -神经氨酸酶。

206. 权利要求203的rAAV颗粒,其中所述异源核酸编码治疗核酸。

207. 权利要求206的rAAV颗粒,其中所述治疗核酸是siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。

208. 权利要求203-207任一项的rAAV颗粒,其中所述治疗多肽或治疗核酸用于治疗CNS的病症。

209. 权利要求208的rAAV颗粒,其中所述CNS的病症是溶酶体贮积症(LSD)、亨廷顿氏病、癫痫、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、中风、皮质基底节变性(CBD)、皮质基底神经节变性(CBGD)、额颞叶痴呆(FTD)、多系统萎缩(MSA)、进行性核上性麻痹(PSP)或脑癌。

210. 权利要求209的rAAV颗粒,其中所述病症是选自下组的溶酶体贮积症:天冬氨酰葡萄糖胺尿症、法布里病、小儿巴藤病(CNL1)、经典晚期小儿巴藤病(CNL2)、青少年巴藤病(CNL3)、Batten形式CNL4、Batten形式CNL5、Batten形式CNL6、Batten形式CNL7、Batten形式CNL8、胱氨酸贮积症、法伯氏病、岩藻糖苷贮积症、半乳糖苷唾液酸贮积症、戈谢病1型、戈谢病2型、戈谢病3型、GM1神经节苷脂贮积症、亨特病、克拉伯病、 α 甘露糖苷贮积症、 β 甘露糖苷贮积症、马-拉病、异染性脑白质营养不良症、莫尔丘病A、莫尔丘病B、粘脂贮积症II/III病、尼曼-匹克A病、尼曼-匹克B病、尼曼-匹克C病、蓬佩病、桑德霍夫病、Sanfillipo A病、Sanfillipo B病、Sanfillipo C病、Sanfillipo D病、辛德勒病、Schindler-Kanzaki、唾液酸贮积症、斯利氏病、泰-萨克斯病和沃尔曼病。

211. 权利要求169-210任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒在组合物中。

212. 权利要求211的rAAV颗粒,其中所述组合物是包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

213. 权利要求169-212任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染入宿主细胞而产生,其中所述核酸至所述宿主细胞的转染生成能够产生rAAV颗粒的宿主细胞。

214. 权利要求169-212任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒通过包含一个或多个编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸的生产细胞系产生。

215. 权利要求169-214任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒通过立体定向递送进行递送。

216. 权利要求169-214任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒通过对流增强递送进行递送。

217. 权利要求216的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒使用CED递送系统递送。

218. 权利要求217的rAAV颗粒,其中所述CED系统包含套管和/或泵。

219. 权利要求218的rAAV颗粒,其中所述套管是抗返流套管或阶梯套管。

220. 权利要求218的rAAV颗粒,其中所述泵是手动泵。

221. 权利要求218的rAAV颗粒,其中所述泵是渗透泵。

222. 权利要求218的rAAV颗粒,其中所述泵是输注泵。

病毒颗粒至纹状体和皮质的增强递送

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明要求保护2015年2月10日提交的美国临时申请号62/114,544和2015年9月19日提交的美国临时申请号62/220,997的优先权,其每项的内容出于全部的目的在此处通过提述以其整体并入。

[0003] ASCII文本文件上序列表的提交

[0004] 在ASCII文本文件上提交了下列内容:计算机可读形式(CRF)的序列表(文件名:159792012740SEQLIST.txt,记录日期:2016年2月4日,大小:1KB),其在本文通过提述以其全文并入。

发明领域

[0005] 本发明涉及AAV基因治疗载体向脑部例如纹状体和/或皮质的递送。

[0006] 发明概述

[0007] 基于腺相关病毒(AAV)的载体已成为优选的用于神经系统基因治疗的载体系统,其具有出色的建立在多次临床试验上的安全性记录(Kaplitt等,(2007) Lancet 369:2097-2105;Eberling等,(2008) Neurology 70:1980-1983;Fiandaca等,(2009) Neuroimage 47 Suppl.2:T27-35)。神经系统病症的有效治疗由于AAV载体递送影响细胞种群的问题所阻碍。该递送问题对于涉及大脑皮质病症中特别严重。简单注射不能有效分配AAV载体,依赖于扩散,其仅在1-3mm半径内有效。可替换的方法对流增强递送(CED) (Nguyen等,(2003) J.Neurosurg.98:584-590),已在临床上用于帕金森氏病的基因疗法中使用(Fiandaca等,(2008) Exp.Neurol.209:51-57)。CED的基本原理涉及在足够的压力下泵输注入脑实质以克服组织间液的静水压力,由此迫使输注的颗粒与脑部密集的周围血管系统紧密接触。这些血管的脉动作为泵发挥功能,将所述颗粒在遍布实质的大的距离上进行分配(Hadaczek等,(2006) Hum.Gene Ther.17:291-302)。为增加CED的安全性和效力,可采用抗返流套管(Krauze等,(2009) Methods Enzymol.465:349-362) 伴随具有实时MRI的监测递送。监测的递送允许对异常事件如套管返流和输注泄露入脑室进行量化和控制(Eberling等,(2008) Neurology 70:1980-1983;Fiandaca等,(2009) Neuroimage 47 Suppl.2:T27-35;Saito等,(2011) Journal of Neurosurgery Pediatrics 7:522-526)。然而,对于实现AAV载体在皮质和/或纹状体中广泛表达的改进方法仍存在需求。

[0008] 本发明提供一种用于递送重组腺相关病毒(rAAV)颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法,其包括施用rAAV颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。在一些方面中,本发明提供用于递送rAAV颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达且其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型1(AAV1)衣壳。在一些方面中,本发明提供用于递送rAAV颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达且其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型2

(AAV2) 衣壳。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0009] 将所述rAAV颗粒至少施用至纹状体的壳核和尾状核。在一些实施方案中,将所述rAAV颗粒至少施用至纹状体每半球的壳核和尾状核。在一些实施方案中,将所述rAAV颗粒至少施用至尾状核中的一处位点和壳核中的两处位点。在一些实施方案中,施用至壳核的rAAV颗粒与施用至尾状核的rAAV颗粒的比例为至少约2:1。在一些实施方案中,所述异源核酸至少在哺乳动物的额叶皮质、枕叶皮质和/或层IV中表达。在一些实施方案中,所述异源核酸至少在前额叶相关皮质区、运动前区皮质、初级躯体感觉皮质区、感觉运动皮质、顶叶皮质、枕叶皮质和/或初级运动皮质中表达。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒在大脑皮质中经历逆行或顺行转运。在一些实施方案中,所述异源核酸进一步在丘脑、底丘脑核、苍白球、黑质和/或海马区中表达。在一些实施方案中,将rAAV颗粒以大于1 μ L/分钟至约5 μ L/分钟的速率施用至尾状核和壳核。

[0010] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中,所述AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10或AAVrh10。在一些实施方案中,所述rAAV载体包含侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列的异源核酸。在一些实施方案中,所述异源核酸侧翼为两个AAV ITR。在一些实施方案中,所述AAV ITR为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。在一些实施方案中,所述AAV ITR为AAV2ITR。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中,所述ITR和所述衣壳源自AAV2。在其他实施方案中,所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中,所述ITR源自AAV2且所述衣壳源自AAV1。

[0011] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述异源核酸可操作地与启动子连接。在一些实施方案中,所述启动子在CNS的细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述启动子在脑细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述启动子在神经元和/或神经胶质细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述神经元是尾状核的中型多棘神经元、壳核的中型多棘神经元、皮质层IV的神经元和/或皮质层V的神经元。在一些实施方案中,所述神经胶质细胞是星形胶质细胞。在一些实施方案中,所述启动子是CBA启动子、最小CBA启动子、CMV启动子或GUSB启动子。在其他实施方案中,所述启动子是诱导型。在进一步的实施方案中,所述rAAV载体包含一个或多个增强子、剪接供体/剪接受体对、基质附接位点或多聚腺苷酸化信号。在一些实施方案中,所述rAAV载体是自身互补的rAAV载体。在一些实施方案中,所述载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码所述异源核酸的互补物的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与第二核酸序列沿其长度的大部分或全部形成链内碱基对。在一些实施方案中,所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变的AAV ITR连接,其中所述突变的AAV ITR包含D区的缺失且包含末端解析序列(terminal resolution sequence)的突变。

[0012] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述异源核酸编码治疗多肽或治疗核

酸。在一些实施方案中,所述异源核酸编码治疗多肽。在一些实施方案中,所述治疗多肽是酶、神经营养因子、在具有CNS相关病症的个体中缺失或突变的多肽、抗氧化剂、抗细胞凋亡因子、抗血管生成因子和抗炎因子、 α -突触核蛋白、酸性 β -葡糖苷酶(GBA)、 β -半乳糖苷酶-1(GLB1)、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)、半乳糖神经酰胺酶(GALC)、甘露糖苷酶、 α -D-甘露糖苷酶(MAN2B1)、 β -甘露糖苷酶(MANBA)、假芳基硫酸酯酶A(ARSA)、N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶(GNPTAB)、酸性鞘磷脂酶(ASM)、尼曼-匹克C蛋白(Niemann-Pick C蛋白)(NPC1)、酸性 α -1,4-葡糖苷酶(GAA)、己糖胺酶 β 亚基、HEXB、N-硫代葡萄糖胺磺基水解酶(MPS3A)、N- α -乙酰葡萄糖胺酶(NAGLU)、肝素乙酰-CoA、 α -葡萄糖胺酶N-乙酰转移酶(MPS3C)、N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶(GNS)、 α -N-乙酰半乳糖胺酶(NAGA)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUSB)、己糖胺酶 α 亚基(HEXA)、亨廷顿蛋白(huntingtin)(HTT)、溶酶体酸性脂肪酶(LIPA)、天冬氨酰葡萄糖胺酶、 α -半乳糖苷酶A、棕榈酰蛋白硫酯酶、三肽基肽酶、溶酶体跨膜蛋白、半胱氨酸转运蛋白、酸性神经酰胺酶、酸性 α -L-岩藻糖苷酶、组织蛋白酶A、 α -L-艾杜糖醛酸酶、芳基硫酸酯酶B、芳基硫酸酯酶A、N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸、酸性 β -半乳糖苷酶或 α -神经氨酸酶。在其他实施方案中,所述异源核酸编码治疗核酸。在一些实施方案中,所述治疗核酸是siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。在一些实施方案中,所述治疗多肽或治疗核酸用于治疗CNS的病症。

[0013] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述CNS的病症是溶酶体贮积症(LSD)、亨廷顿氏病(Huntington's Disease)、癫痫、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease)、中风、皮质基底节变性(CBD)、皮质基底神经节变性(CBGD)、额颞叶痴呆(FTD)、多系统萎缩(MSA)、进行性核上性麻痹(PSP)或脑癌。在一些实施方案中,所述病症是选自下组的溶酶体贮积症:天冬氨酰葡萄糖胺尿症(Aspartylglucosaminuria)、法布里病(Fabry)、小儿巴滕病(Infantile Batten Disease)(CNL1)、经典晚期小儿巴滕病(Classic Late Infantile Batten Disease)(CNL2)、青少年巴滕病(Juvenile Batten Disease)(CNL3)、Batten形式CNL4、Batten形式CNL5、Batten形式CNL6、Batten形式CNL7、Batten形式CNL8、胱氨酸贮积症(Cystinosis)、法伯氏病(Farber)、岩藻糖苷贮积症(Fucosidosis)、半乳糖苷唾液酸贮积症(Galactosidosialidosis)、戈谢病1型(Gaucher disease type 1)、戈谢病2型(Gaucher disease type 2)、戈谢病3型(Gaucher disease type 3)、GM1神经节苷脂贮积症(GM1gangliosidosis)、亨特病(Hunter Disease)、克拉伯病(Krabbe Disease)、 α 甘露糖苷贮积症(α mannosidosis Disease)、 β 甘露糖苷贮积症(β mannosidosis Disease)、马-拉病(Maroteaux-Lamy)、异染性脑白质营养不良症(metachromatic leukodystrophy Disease)、莫尔丘病A(Morquio A)、莫尔丘病B(Morquio B)、粘脂贮积症II/III病(mucopolysaccharidosis II/III Disease)、尼曼-匹克A病(Niemann-Pick A Disease)、尼曼-匹克B病(Niemann-Pick B Disease)、尼曼-匹克C病(Niemann-Pick C Disease)、蓬佩病(Pompe Disease)、桑德霍夫病(Sandhoff disease)、Sanfillipo A病(Sanfillipo A disease)、Sanfillipo B病(Sanfillipo B disease)、Sanfillipo C病(Sanfillipo C disease)、Sanfillipo D病(Sanfillipo D disease)、辛德勒病(Schindler disease)、Schindler-Kanzaki、唾液酸贮积症(sialidosis)、斯利氏病(Sly Disease)、泰-萨克斯病(Tay-Sachs Disease)和沃尔曼病(Wolman Disease)。

[0014] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒在组合物中。在进一步

的实施方案中,所述组合物是包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0015] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染入宿主细胞而产生,其中所述核酸至所述宿主细胞的转染生成能够产生rAAV颗粒的宿主细胞。在其他实施方案中,所述rAAV颗粒通过包含一个或多个编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸的生产细胞系产生。

[0016] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒通过立体定向递送进行递送。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒通过对流增强递送进行递送。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒使用CED递送系统递送。在一些实施方案中,所述CED系统包含套管。在一些实施方案中,所述套管是抗返流套管或阶梯套管。在一些实施方案中,所述CED系统包含泵。在一些实施方案中,所述泵是手动泵。在一些实施方案中,所述泵是渗透泵。在一些实施方案中,所述泵是输注泵。

[0017] 在一些方面中,本发明提供用于递送rAAV颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法,其包括通过CED将含有rAAV颗粒的组合物施用至纹状体,其中所述组合物以大于1 μ L/分钟至约5 μ L/分钟的速率施用至纹状体。在一些方面中,本发明提供用于递送rAAV颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法,其包括通过CED将含有rAAV颗粒的组合物施用至纹状体,其中所述组合物包含rAAV颗粒和泊洛沙姆。在一些实施方案中,所述泊洛沙姆是泊洛沙姆188。在一些实施方案中,泊洛沙姆在组合物中的浓度为约0.0001%至约0.01%。在一些实施方案中,泊洛沙姆在组合物中的浓度为约0.001%。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含氯化钠,其中所述组合物中氯化钠的浓度为约100mM至约250mM。在一些实施方案中,所述组合物中氯化钠的浓度为约180mM。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含磷酸钠,其中所述组合物中磷酸钠的浓度为约5mM至约20mM且pH为约7.0至约8.0。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含磷酸钠,其中所述组合物中磷酸钠的浓度为约10mM且pH为约7.5。在一些实施方案中,将所述组合物以大于1 μ L/分钟至约5 μ L/分钟的速率施用至尾状核和壳核。在一些实施方案中,递送至壳核的组合物的量为约递送至尾状核的体积的两倍。在一些实施方案中,将约20 μ L至约50 μ L的组合物施用至每半球的尾状核和约40 μ L至约100 μ L的组合物施用至每半球的壳核。在一些实施方案中,将约30 μ L的组合物施用至每半球的尾状核和约60 μ L的组合物施用至每半球的壳核。

[0018] 在一些实施方案中,本发明提供在哺乳动物中治疗CNS的病症的方法,其包括通过上文所述的方法施用有效量的rAAV颗粒至哺乳动物。

[0019] 在一些方面中,本发明提供在哺乳动物中治疗亨廷顿氏病的方法,其包括施用有效量的rAAV颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含AAV1衣壳或AAV2衣壳。在其他方面中,本发明提供在哺乳动物中治疗帕金森氏病的方法,其包括施用有效量的rAAV颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物大脑皮质和纹状体中表达。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含AAV2衣壳。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0020] 在一些实施方案中,至少将所述rAAV颗粒施用至纹状体的壳核和尾状核。在一些实施方案中,至少将所述rAAV颗粒施用至纹状体每半球的壳核和尾状核。在一些实施方案

中,至少将所述rAAV颗粒施用至尾状核中的一处位点或壳核中的两处位点。在一些实施方案中,施用至壳核的rAAV颗粒与施用至尾状核的rAAV颗粒的比例为至少约2:1。在一些实施方案中,所述异源核酸至少在哺乳动物的额叶皮质、枕叶皮质和/或层IV中表达。在一些实施方案中,所述异源核酸至少在前额叶相关皮质区、运动前区皮质、初级躯体感觉皮质区、感觉运动皮质、顶叶皮质、枕叶皮质和/或初级运动皮质中表达。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒在大脑皮质中经历逆行或顺行转运。在一些实施方案中,所述异源核酸进一步在丘脑、底丘脑核、苍白球、黑质和/或海马区中表达。

[0021] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV、或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中,所述AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10或AAVrh10。在一些实施方案中,所述rAAV载体包含侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列的异源核酸。在一些实施方案中,所述异源核酸侧翼为两个AAV ITR。在一些实施方案中,所述AAV ITR为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。在一些实施方案中,所述AAV ITR为AAV2ITR。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中,所述ITR和所述衣壳源自AAV2。在其他实施方案中,所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中,所述ITR源自AAV2且所述衣壳源自AAV1。

[0022] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述异源核酸可操作地与启动子连接。在一些实施方案中,所述启动子在CNS的细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述启动子在脑细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述启动子在神经元和/或神经胶质细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述神经元是尾状核的中型多棘神经元、壳核的中型多棘神经元、皮质层IV的神经元和/或皮质层V的神经元。在一些实施方案中,所述神经胶质细胞是星形胶质细胞。在一些实施方案中,所述启动子是CBA启动子、最小CBA启动子、CMV启动子或GUSB启动子。在其他实施方案中,所述启动子是诱导型。在进一步的实施方案中,所述rAAV载体包含一个或多个增强子、剪接供体/剪接受体对、基质附接位点或多聚腺苷酸化信号。在一些实施方案中,所述rAAV载体是自身互补的rAAV载体。在一些实施方案中,所述载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码所述异源核酸的互补物的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与第二核酸序列沿其长度的大部分或全部形成链内碱基对。在一些实施方案中,所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变的AAV ITR连接,其中所述突变的AAV ITR包含D区的缺失且包含末端解析序列的突变。

[0023] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述异源核酸编码治疗多肽或治疗核酸。在一些实施方案中,所述治疗多肽或治疗核酸编码在具有亨廷顿氏病的哺乳动物CNS的细胞中抑制HTT的表达或抑制HTT的积累。在一些实施方案中,所述异源核酸编码siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。在一些实施方案中,所述异源核酸编码靶向亨廷顿蛋白的miRNA。在一些实施方案中,所述亨廷顿蛋白包含与亨廷顿氏病相关的突变。

[0024] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述异源核酸编码用于治疗亨廷顿氏

病的治疗多肽或治疗核酸。在一些实施方案中,所述治疗多肽或治疗核酸在具有亨廷顿氏病的哺乳动物的CNS的细胞中抑制HTT的表达或抑制HTT的积累。在一些实施方案中,所述异源核酸编码siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。在一些实施方案中,所述异源核酸编码靶向亨廷顿蛋白的miRNA。在一些实施方案中,所述亨廷顿蛋白包含与亨廷顿氏病相关的突变。

[0025] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述异源核酸编码用于治疗帕金森氏病的治疗多肽或治疗核酸。在一些实施方案中,所述治疗多肽是胶质衍生的生长因子(GDNF)、脑衍生的生长因子(BDNF)、酪氨酸羟化酶(TH)、GTP-环化水解酶(GTPCH)和/或氨基酸脱羧酶(AADC)。

[0026] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒在组合物中。在进一步的实施方案中,所述组合物是包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0027] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染入宿主细胞而产生,其中所述核酸至所述宿主细胞的转染生成能够产生rAAV颗粒的宿主细胞。在其他实施方案中,所述rAAV颗粒通过包含一个或多个编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸的生产细胞系产生。

[0028] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒通过立体定向递送进行递送。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒通过对流增强递送进行递送。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒使用CED递送系统递送。在一些实施方案中,所述CED系统包含套管。在一些实施方案中,所述套管是抗返流套管或阶梯套管。在一些实施方案中,所述CED系统包含泵。在一些实施方案中,所述泵是手动泵。在一些实施方案中,所述泵是渗透泵。在一些实施方案中,所述泵是输注泵。

[0029] 在一些方面中,本发明提供用于在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达异源核酸的系统,其包含:a)含有rAAV颗粒的组合物,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体;和b)用于将rAAV颗粒递送至纹状体的装置。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含AAV1衣壳或AAV2衣壳。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0030] 在本发明的系统的一些实施方案中,将所述rAAV颗粒施用至纹状体的壳核和尾状核。在一些实施方案中,将所述rAAV颗粒至少施用至尾状核中的一处位点和壳核中的两处位点。在一些实施方案中,施用至壳核的rAAV颗粒与施用至尾状核的rAAV颗粒的比例为至少约2:1。在一些实施方案中,异源核酸在哺乳动物的额叶皮质、枕叶皮质和/或层IV中表达。在一些实施方案中,所述异源核酸在前额叶相关皮质区、运动前区皮质、初级躯体感觉皮质区、感觉运动皮质、顶叶皮质、枕叶皮质和/或初级运动皮质中表达。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒在大脑皮质中经历逆行或顺行转运。在一些实施方案中,所述异源核酸进一步在丘脑、底丘脑核、苍白球、黑质和/或海马区中表达。

[0031] 在本发明的系统的一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV、或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中,所述AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10或AAVrh10。在一些实施方

案中,所述rAAV载体包含侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列的异源核酸。在一些实施方案中,所述异源核酸侧翼为两个AAV ITR。在一些实施方案中,所述AAV ITR为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。在一些实施方案中,所述AAV ITR为AAV2ITR。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中,所述ITR和所述衣壳源自AAV2。在其他实施方案中,所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中,所述ITR源自AAV2且所述衣壳源自AAV1。

[0032] 在本发明的系统的一些实施方案中,所述异源核酸可操作地与启动子连接。在一些实施方案中,所述启动子在CNS的细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述启动子在脑细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述启动子在神经元和/或神经胶质细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述神经元是尾状核的中型多棘神经元、壳核的中型多棘神经元、皮质层IV的神经元和/或皮质层V的神经元。在一些实施方案中,所述神经胶质细胞是星形胶质细胞。在一些实施方案中,所述启动子是CBA启动子、最小CBA启动子、CMV启动子或GUSB启动子。在其他实施方案中,所述启动子是诱导型。在进一步的实施方案中,所述rAAV载体包含一个或多个增强子、剪接供体/剪接受体对、基质附接位点或多聚腺苷酸化信号。在一些实施方案中,所述rAAV载体是自身互补的rAAV载体。在一些实施方案中,所述载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码所述异源核酸的互补物的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与第二核酸序列沿其长度的大部分或全部形成链内碱基对。在一些实施方案中,所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变的AAV ITR连接,其中所述突变的AAV ITR包含D区的缺失且包含末端解析序列的突变。

[0033] 在本发明的系统的一些实施方案中,所述异源核酸编码治疗多肽或治疗核酸。在一些实施方案中,所述异源核酸编码治疗多肽。在一些实施方案中,所述治疗多肽是酶、神经营养因子、在具有CNS相关病症的个体中缺失或突变的多肽、抗氧化剂、抗细胞凋亡因子、抗血管生成因子和抗炎症因子、 α -突触核蛋白、酸性 β -葡萄糖苷酶(GBA)、 β -半乳糖苷酶-1(GLB1)、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)、半乳糖神经酰胺酶(GALC)、甘露糖苷酶、 α -D-甘露糖苷酶(MAN2B1)、 β -甘露糖苷酶(MANBA)、假芳基硫酸酯酶A(ARSA)、N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶(GNPTAB)、酸性鞘磷脂酶(ASM)、尼曼-匹克C蛋白(Niemann-Pick C蛋白)(NPC1)、酸性 α -1,4-葡萄糖苷酶(GAA)、己糖胺酶 β 亚基、HEXB、N-硫代葡萄糖胺磺基水解酶(MPS3A)、N- α -乙酰葡萄糖胺酶(NAGLU)、肝素乙酰-CoA、 α -葡萄糖胺酶N-乙酰转移酶(MPS3C)、N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶(GNS)、 α -N-乙酰半乳糖胺酶(NAGA)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUSB)、己糖胺酶 α 亚基(HEXA)、亨廷顿蛋白(huntingtin)(HTT)、溶酶体酸性脂肪酶(LIPA)、天冬氨酰葡萄糖胺酶、 α -半乳糖苷酶A、棕榈酰蛋白硫酯酶、三肽基肽酶、溶酶体跨膜蛋白、半胱氨酸转运蛋白、酸性神经酰胺酶、酸性 α -L-岩藻糖苷酶、组织蛋白酶A、 α -L-艾杜糖醛酸酶、芳基硫酸酯酶B、芳基硫酸酯酶A、N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸、酸性 β -半乳糖苷酶或 α -神经氨酸酶。在其他实施方案中,所述异源核酸编码治疗核酸。在一些实施方案中,所述治疗核酸是siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。在一些实施方案中,所述治疗多肽或治疗核酸用于治疗CNS的病症。

[0034] 在本发明的系统的一些实施方案中,所述CNS的病症是溶酶体贮积症(LSD)、亨廷

顿氏病 (Huntington's Disease)、癫痫、帕金森氏病 (Parkinson's Disease)、阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's Disease)、中风、皮质基底节变性 (CBD)、皮质基底神经节变性 (CBGD)、额颞叶痴呆 (FTD)、多系统萎缩 (MSA)、进行性核上性麻痹 (PSP) 或脑癌。在一些实施方案中, 所述病症是选自下组的溶酶体贮积症: 天冬氨酰葡萄糖胺尿症 (Aspartylglucosaminuria)、法布里病 (Fabry)、小儿巴滕病 (Infantile Batten Disease) (CNL1)、经典晚期小儿巴滕病 (Classic Late Infantile Batten Disease) (CNL2)、青少年巴滕病 (Juvenile Batten Disease) (CNL3)、Batten形式CNL4、Batten形式CNL5、Batten形式CNL6、Batten形式CNL7、Batten形式CNL8、胱氨酸贮积症 (Cystinosis)、法伯氏病 (Farber)、岩藻糖苷贮积症 (Fucosidosis)、半乳糖苷唾液酸贮积症 (Galactosidosialidosis)、戈谢病1型 (Gaucher disease type 1)、戈谢病2型 (Gaucher disease type 2)、戈谢病3型 (Gaucher disease type 3)、GM1神经节苷脂贮积症 (GM1gangliosidosis)、亨特病 (Hunter Disease)、克拉伯病 (Krabbe Disease)、 α 甘露糖苷贮积症 (α mannosidosis Disease)、 β 甘露糖苷贮积症 (β mannosidosis Disease)、马-拉病 (Maroteaux-Lamy)、异染性脑白质营养不良症 (metachromatic leukodystrophy Disease)、莫尔丘病A (Morquio A)、莫尔丘病B (Morquio B)、粘脂贮积症II/III病 (mucopolysaccharidosis II/III Disease)、尼曼-匹克A病 (Niemann-Pick A Disease)、尼曼-匹克B病 (Niemann-Pick B Disease)、尼曼-匹克C病 (Niemann-Pick C Disease)、蓬佩病 (Pompe Disease)、桑德霍夫病 (Sandhoff disease)、Sanfillipo A病 (Sanfillipo A disease)、Sanfillipo B病 (Sanfillipo B disease)、Sanfillipo C病 (Sanfillipo C disease)、Sanfillipo D病 (Sanfillipo D disease)、辛德勒病 (Schindler disease)、Schindler-Kanzaki、唾液酸贮积症 (sialidosis)、斯利氏病 (Sly Disease)、泰-萨克斯病 (Tay-Sachs Disease) 和沃尔曼病 (Wolman Disease)。

[0035] 在一些实施方案中, 本发明的rAAV包含编码用于治疗亨廷顿氏病的治疗多肽或治疗核酸的异源核酸。在一些实施方案中, 所述治疗多肽或治疗核酸在具有亨廷顿氏病的哺乳动物的CNS的细胞中抑制HTT的表达或抑制HTT的积累。在一些实施方案中, 所述异源核酸编码siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。在一些实施方案中, 所述异源核酸编码靶向亨廷顿蛋白的miRNA。在一些实施方案中, 所述亨廷顿蛋白包含与亨廷顿氏病相关的突变。

[0036] 在一些实施方案中, 本发明的rAAV颗粒包含编码用于治疗帕金森氏病的治疗多肽或治疗核酸的异源核酸。在一些实施方案中, 所述治疗多肽是胶质衍生的生长因子 (GDNF)、脑衍生的生长因子 (BDNF)、酪氨酸羟化酶 (TH)、GTP-环化水解酶 (GTPCH) 和/或氨基酸脱羧酶 (AADC)。

[0037] 在本发明的系统的一些实施方案中, 所述rAAV颗粒在组合物中。在进一步的实施方案中, 所述组合物是包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0038] 在本发明的系统的一些实施方案中, 所述rAAV颗粒通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染入宿主细胞而产生, 其中所述核酸至所述宿主细胞的转染生成能够产生rAAV颗粒的宿主细胞。在其他实施方案中, 所述rAAV颗粒通过包含一个或多个编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸的生产细胞系产生。

[0039] 在本发明的系统的一些实施方案中, 所述rAAV颗粒通过立体定向递送进行递送。

在一些实施方案中,所述rAAV颗粒通过对流增强递送进行递送。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒使用CED递送系统递送。在一些实施方案中,所述CED系统包含套管。在一些实施方案中,所述套管是抗返流套管或阶梯套管。在一些实施方案中,所述CED系统包含泵。在一些实施方案中,所述泵是手动泵。在一些实施方案中,所述泵是渗透泵。在一些实施方案中,所述泵是输注泵。

[0040] 在一些方面中,本发明提供用于在上述任何方法中使用的套盒,其中所述套盒包含rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含AAV血清型1(AAV1)衣壳。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含AAV血清型2(AAV2)衣壳。

[0041] 在一些方面中,本发明提供用于在哺乳动物中治疗亨廷顿氏病的套盒,其包含含有有效量的rAAV颗粒的组合物,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。在一些方面中,本发明提供用于在哺乳动物中治疗帕金森氏病的套盒,其包含含有有效量的rAAV颗粒的组合物,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。在一些实施方案中,所述套盒的rAAV颗粒包含AAV血清型1(AAV1)衣壳或AAV血清型2(AAV2)衣壳。在一些实施方案中,所述套盒进一步包含用于将rAAV颗粒递送至纹状体的装置。在一些实施方案中,所述套盒的rAAV颗粒在组合物中。在一些实施方案中,所述组合物包含缓冲剂和/或药学上可接受的赋形剂。在进一步的实施方案中,所述套盒包含用于将rAAV颗粒的组合物递送至纹状体的说明书。

[0042] 在一些方面中,本发明提供用于上述任何方法中使用的rAAV颗粒。在一些方面中,本发明提供用于将重组腺相关病毒(rAAV)颗粒递送至哺乳动物的中枢神经系统的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。在一些方面中,本发明提供用于将重组腺相关病毒(rAAV)颗粒递送至哺乳动物的中枢神经系统的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达,且其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型1(AAV1)衣壳。在一些方面中,本发明提供用于将重组腺相关病毒(rAAV)颗粒递送至哺乳动物的中枢神经系统的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达,且其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型2(AAV2)衣壳。

[0043] 在一些方面中,本发明提供用于在哺乳动物中治疗亨廷顿氏病的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。在一些方面中,本发明提供用于在哺乳动物中治疗帕金森氏病的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含AAV2衣壳。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0044] 在一些实施方案中,将本发明的rAAV颗粒至少施用至纹状体的壳核和尾状核。在一些实施方案中,将所述rAAV颗粒至少施用至纹状体每半球的壳核和尾状核。在一些实施方案中,将所述rAAV颗粒至少施用至尾状核中的一处位点和壳核中的两处位点。在一些实施方案中,施用至壳核的rAAV颗粒与施用至尾状核的rAAV颗粒的比例为至少约2:1。在一些

实施方案中,所述异源核酸在哺乳动物的额叶皮质、枕叶皮质和/或层IV中表达。在一些实施方案中,所述异源核酸在前额叶相关皮质区、运动前区皮质、初级躯体感觉皮质区、感觉运动皮质、顶叶皮质、枕叶皮质和/或初级运动皮质中表达。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒在大脑皮质中经历逆行或顺行转运。在一些实施方案中,所述异源核酸进一步在丘脑、底丘脑核、苍白球、黑质和/或海马区中表达。

[0045] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV、或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中,所述AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10或AAVrh10。在一些实施方案中,所述rAAV载体包含侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列的异源核酸。在一些实施方案中,所述异源核酸侧翼为两个AAV ITR。在一些实施方案中,所述AAV ITR为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。在一些实施方案中,所述AAV ITR为AAV2ITR。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中,所述ITR和所述衣壳源自AAV2。在其他实施方案中,所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中,所述ITR源自AAV2且所述衣壳源自AAV1。

[0046] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述异源核酸可操作地与启动子连接。在一些实施方案中,所述启动子在CNS的细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述启动子在脑细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述启动子在神经元和/或神经胶质细胞中表达所述异源核酸。在一些实施方案中,所述神经元是尾状核的中型多棘神经元、壳核的中型多棘神经元、皮质层IV的神经元和/或皮质层V的神经元。在一些实施方案中,所述神经胶质细胞是星形胶质细胞。在一些实施方案中,所述启动子是CBA启动子、最小CBA启动子、CMV启动子或GUSB启动子。在其他实施方案中,所述启动子是诱导型。在进一步的实施方案中,所述rAAV载体包含一个或多个增强子、剪接供体/剪接受体对、基质附接位点或多聚腺苷酸化信号。在一些实施方案中,所述rAAV载体是自身互补的rAAV载体。在一些实施方案中,所述载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码所述异源核酸的互补物的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与第二核酸序列沿其长度的大部分或全部形成链内碱基对。在一些实施方案中,所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变的AAV ITR连接,其中所述突变的AAV ITR包含D区的缺失且包含末端解析序列的突变。

[0047] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述异源核酸编码治疗多肽或治疗核酸。在一些实施方案中,所述异源核酸编码治疗多肽。在一些实施方案中,所述治疗多肽是酶、神经营养因子、在具有CNS相关病症的个体中缺失或突变的多肽、抗氧化剂、抗细胞凋亡因子、抗血管生成因子和抗炎症因子、 α -突触核蛋白、酸性 β -葡萄糖苷酶(GBA)、 β -半乳糖苷酶-1(GLB1)、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)、半乳糖神经酰胺酶(GALC)、甘露糖苷酶、 α -D-甘露糖苷酶(MAN2B1)、 β -甘露糖苷酶(MANBA)、假芳基硫酸酯酶A(ARSA)、N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶(GNPTAB)、酸性鞘磷脂酶(ASM)、尼曼-匹克C蛋白(Niemann-Pick C蛋白)(NPC1)、酸性 α -1,4-葡萄糖苷酶(GAA)、己糖胺酶 β 亚基、HEXB、N-硫代葡萄糖胺磺基水解酶(MPS3A)、N- α -

乙酰葡萄糖胺酶 (NAGLU)、肝素乙酰-CoA、 α -葡萄糖胺酶N-乙酰转移酶 (MPS3C)、N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶 (GNS)、 α -N-乙酰半乳糖胺酶 (NAGA)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUSB)、己糖胺酶 α 亚基 (HEXA)、亨廷顿蛋白 (huntingtin) (HTT)、溶酶体酸性脂肪酶 (LIPA)、天冬氨酰葡萄糖胺酶、 α -半乳糖苷酶A、棕榈酰蛋白硫酯酶、三肽基肽酶、溶酶体跨膜蛋白、半胱氨酸转运蛋白、酸性神经酰胺酶、酸性 α -L-岩藻糖苷酶、组织蛋白酶A、 α -L-艾杜糖醛酸酶、芳基硫酸酯酶B、芳基硫酸酯酶A、N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸、酸性 β -半乳糖苷酶或 α -神经氨酸酶。在其他实施方案中,所述异源核酸编码治疗核酸。在一些实施方案中,所述治疗核酸是siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。在一些实施方案中,所述治疗多肽或治疗核酸用于治疗CNS的病症。

[0048] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述CNS的病症是溶酶体贮积症 (LSD)、亨廷顿氏病 (Huntington's Disease)、癫痫、帕金森氏病 (Parkinson's Disease)、阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's Disease)、中风、皮质基底节变性 (CBD)、皮质基底神经节变性 (CBGD)、额颞叶痴呆 (FTD)、多系统萎缩 (MSA)、进行性核上性麻痹 (PSP) 或脑癌。在一些实施方案中,所述病症是选自下组的溶酶体贮积症:天冬氨酰葡萄糖胺尿症 (Aspartylglucosaminuria)、法布里病 (Fabry)、小儿巴滕病 (Infantile Batten Disease) (CNL1)、经典晚期小儿巴滕病 (Classic Late Infantile Batten Disease) (CNL2)、青少年巴滕病 (Juvenile Batten Disease) (CNL3)、Batten形式CNL4、Batten形式CNL5、Batten形式CNL6、Batten形式CNL7、Batten形式CNL8、胱氨酸贮积症 (Cystinosis)、法伯氏病 (Farber)、岩藻糖苷贮积症 (Fucosidosis)、半乳糖苷唾液酸贮积症 (Galactosidosis)、戈谢病1型 (Gaucher disease type 1)、戈谢病2型 (Gaucher disease type 2)、戈谢病3型 (Gaucher disease type 3)、GM1神经节苷脂贮积症 (GM1gangliosidosis)、亨特病 (Hunter Disease)、克拉伯病 (Krabbe Disease)、 α 甘露糖苷贮积症 (α mannosidosis Disease)、 β 甘露糖苷贮积症 (β mannosidosis Disease)、马-拉病 (Maroteaux-Lamy)、异染性脑白质营养不良症 (metachromatic leukodystrophy Disease)、莫尔丘病A (Morquio A)、莫尔丘病B (Morquio B)、粘脂贮积症II/III病 (mucopolysaccharidosis II/III Disease)、尼曼-匹克A病 (Niemann-Pick A Disease)、尼曼-匹克B病 (Niemann-Pick B Disease)、尼曼-匹克C病 (Niemann-Pick C Disease)、蓬佩病 (Pompe Disease)、桑德霍夫病 (Sandhoff disease)、Sanfillipo A病 (Sanfillipo A disease)、Sanfillipo B病 (Sanfillipo B disease)、Sanfillipo C病 (Sanfillipo C disease)、Sanfillipo D病 (Sanfillipo D disease)、辛德勒病 (Schindler disease)、Schindler-Kanzaki、唾液酸贮积症 (sialidosis)、斯利氏病 (Sly Disease)、泰-萨克斯病 (Tay-Sachs Disease) 和沃尔曼病 (Wolman Disease)。

[0049] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒在组合物中。在进一步的实施方案中,所述组合物是包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0050] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染入宿主细胞而产生,其中所述核酸至所述宿主细胞的转染生成能够产生rAAV颗粒的宿主细胞。在其他实施方案中,所述rAAV颗粒通过包含一个或多个编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸的生产细胞系产生。

[0051] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述rAAV颗粒通过立体定向递送进行递送。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒通过对流增强递送进行递送。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒使用CED递送系统递送。在一些实施方案中,所述CED系统包含套管。在一些实施方案中,所述套管是抗返流套管或阶梯套管。在一些实施方案中,所述CED系统包含泵。在一些实施方案中,所述泵是手动泵。在一些实施方案中,所述泵是渗透泵。在一些实施方案中,所述泵是输注泵。

[0052] 本文引用的全部参考文献,包括专利和公开,都以其整体通过提述并入。

[0053] 附图简述

[0054] 图1显示恒河猴(Rhesus monkey)体重,即将手术前(黑色)和尸检时(灰色),在施用由三重转染(TT)和生产细胞系(PCL)方法生成的AAV1和AAV2载体的动物中。

[0055] 图2A-2D显示AAV1-GFP(TT)输注入恒河猴尾状核和壳核30天后GFP染色的代表性脑切片。图2A-2D中的切片以前部至尾部方向延伸穿过脑。来自三种代表性动物的切片显示于每个图面中。

[0056] 图3A-3D显示代表性的脑切片,其证明了将AAV1-GFP(TT)输注入恒河猴尾状核和壳核后,两侧星形胶质(图3A&3C)和皮层神经元(图3B&3D)中额叶皮质(图3A&3B)和枕叶皮质(图3C&3D)中GFP的皮质表达。

[0057] 图4A-4D显示将AAV2-GFP(TT)输注入恒河猴尾状核和壳核30天后GFP染色的代表性脑切片。图4A-4D中的切片以前部至尾部方向延伸穿过脑。来自三种代表性动物的切片显示于每个图面中。

[0058] 图5A-5D显示将由生产细胞系(PCL)(图5A&5B)或三重转染(TT)(图5C&5D)方法产生的AAV1-GFP输注入恒河猴尾状核和壳核30天后GFP染色的代表性脑切片。

[0059] 图6A-6D显示将由生产细胞系(PCL)(图6A&6B)或三重转染(TT)(图6C&6D)方法产生的AAV2-GFP输注入恒河猴尾状核和壳核30天后GFP染色的代表性脑切片。

[0060] 图7显示用AAV1-eGFP和AAV2-eGFP输注的非人灵长类(NHP)脑中的GFP分布。将AAV1-eGFP和AAV2-eGFP载体双侧输注入9只恒河猴的纹状体中。手术四周后,处理脑用于针对GFP的免疫组化(IHC)。柱状图显示来自用AAV1-eGFP(三重转染;TT);AAV1-eGFP(生产细胞系;PCL);AAV2-eGFP(TT);AAV2-eGFP(PCL)输注的4个研究组的代表性GFP染色脑切片。代表性切片显示脑的各种冠状面以证明贯穿全脑从额叶皮质、纹状体(输注部位)、中脑、至皮质的枕部部分的GFP表达分布。全部组显示注射位点的(壳核和尾状核)稳固GFP信号以及向皮质区和黑质的广泛转运。基于IHC染色,计算每只猴的靶结构(纹状体)和皮质区两者中GFP表达的覆盖率并总结于表7。

[0061] 图8显示转导的主要区域(PAT)与载体分布(Vd)的比率。纹状体中GFP表达的主要区域在来自GFP染色切片扫描上描绘且其值除以由钆信号的匹配MRI扫描获得的值。比率>1.0指示输注后GFP的表达程度超过了钆信号的边界。来自用AAV载体输注的猴的结果显示AAV1在脑实质中比AAV2扩散得更好(1.21 ± 0.1 对 0.74 ± 0.04 ; $p < 0.007$,以双尾非配对t检验)。

[0062] 图9A-9H显示用AAV1-eGFP和AAV2-eGFP转导的NHP脑中GFP的表达。图9A:受试者1号的用AAV1-eGFP(TT)转导的靶结构尾状核的高倍放大(40X)。通过DAB染色的深棕色GFP+神经元对于阳性神经元纤维的密集染色网络是可见的。在用通过TT和PCL两种方法产生的

AAV1-eGFP载体注射的全部猴中检测到如此稳固的信号。图9B:1号受试者前额叶皮质的片段(图7)证明了载体AAV1-eGFP从注射位点(纹状体)至皮质区的大规模转运。基于GFP+细胞的形态学,在皮质中检测到神经元和星形胶质细胞两者。图9C:图9B中所示的框架的更高倍放大(40X)显示多个表达GFP的皮层神经元。图9D:来自1号受试者皮质的高倍(40X)放大显示星形胶质细胞形态的GFP+细胞。图9E:6号受试者的用AAV2-eGFP(TT)转导的靶结构壳核的高倍放大(40X)。深棕色DAB信号显示神经元中GFP的表达和其密集染色纤维网络。图9F:6号受试者的前额叶皮质片段(图7)证明了载体AAV2-eGFP从纹状体(注射位点)至皮质区的大规模转运。大量GFP阳性细胞具有神经元形态(放大倍数2.5X)。图9G:图9F中所示的框架的更高倍放大(40X)显示多个表达GFP的皮层神经元。图9H:6号受试者内囊(internal capsule)的更高倍放大(20X)显示具有星形胶质细胞形态的GFP+细胞。

[0063] 图10A-10E显示了注射入猴脑的AAV1-eGFP和AAV2-eGFP的细胞嗜性(tropism)。处理猴脑切片用于针对GFP和多种细胞标志物的双重免疫荧光染色以确定注射的载体的细胞嗜性。图10A:来自1号受试者的用针对GFP(对于DyLight™ 488染料为绿色通道;左侧柱形图)和神经元标志物NeuN(对于DyLight™ 549染料为红色通道,中间柱形图)的抗体染色的尾状核(靶结构)的切片。来自两通道的合并的照片(放大倍数20X;右侧柱状图)显示多个表达GFP的神经元,验证了AAV1-eGFP的神经元嗜性。图10B:对于来自1号受试者的前额叶皮质的切片实施了相同染色,显示接收来自纹状体的神经元突起的远端大脑结构中的神经元转导并且是AAV1-eGFP逆向转运的证据。图10C:来自1号受试者的用针对GFP(对于DyLight™ 488染料为绿色通道;左侧柱形图)和星形胶质细胞标志物S-100(对于DyLight™ 549染料为红色通道,中间柱形图)的抗体染色的尾状核(靶结构)的切片。来自两通道的合并的照片(放大倍数20X;右侧柱状图)显示多个表达GFP的神经元,验证了AAV1-eGFP也转导星形胶质细胞。图10D:来自6号受试者的用针对GFP(对于DyLight™ 488染料为绿色通道;左侧柱形图)和神经元标志物NeuN(对于DyLight™ 549染料为红色通道,中间柱形图)的抗体染色的尾状核(靶结构)的切片。来自两通道的合并的照片(放大倍数20X;右侧柱状图)显示多个表达GFP的神经元,验证了AAV2-eGFP的神经嗜性。图10E:来自3号受试者的用针对GFP(对于DyLight™ 488染料为绿色通道;左侧柱形图)的抗体和小神经胶质细胞标志物Iba-1(对于DyLight™ 549染料为红色通道,中间柱形图)染色的尾状核(靶结构)的切片。合并的照片(放大倍数20X;右侧柱状图)中两种标志物共染色的缺乏指示AAV1不转导小神经胶质细胞,且AAV2的情况也是如此(数据未显示)。

[0064] 图11A-11C显示了用AAV1-eGFP和AAV2-eGFP注射的NHP纹状体中神经转导的效率。实施了针对猴脑切片的GFP和神经标志物NeuN的双重免疫荧光染色以计算纹状体(靶结构)和皮质区域内神经元转导的效率。对于纹状体,在GFP转导的主要区域(PAT)计算了转导效率,其中信号稳固,具有密集分布的GFP神经元(图11A)。在GFP转导的主要区域外的区中也检测到了神经元(OPAT;图11C)。计数PAT(内阴影)和OPAT(外阴影)中GFP+神经元的技术方案示于图11B。来自每只猴的个体计数的数据和脑结构示于表8(PAT)和表9(OPAT)。

[0065] 图12A&12B显示载体相关的组织学发现。来自主要转导区域(PAT)冠状切面的苏木精和伊红(H&E)染色的独立评估揭示全部实验组中与套管插入相关的正常胶质细胞增生(gliosis)。H&E染色还揭示了全部动物中的血管周围细胞渗透,无论使用的载体为何。血管周围袖套(perivascular cuff)的发生率和严重性在用AAV1注射的组中增加,特别是当载

体通过TT方法制备时。图12A:来自3号受试者的H&E染色的切片显示用AAV1-eGFP (TT) 转导的左侧壳核中多个血管周围袖套。一条血管在右下角放大(5X)。图12B:来自5号受试者的H&E-染色的切片显示用AAV1-eGFP (PCL) 转导的左侧尾状核中仅几处局部血管周围袖套。几个血管在左下角放大(5X)。

[0066] 图13A&13B显示将AAV1-eGFP注射入恒河猴尾状核和壳核1个月后肝、脾、心、肾和肺样品中eGFP mRNA表达的定量PCR (QPCR) 分析。(图13A)通过三重转染(TT)方法制备的AAV1和AAV2-eGFP载体。(图13B)通过生产细胞系(PCL)方法制备的AAV1和AAV2-eGFP载体。

[0067] 发明详述

[0068] 如本文详述,发明人发现当递送至纹状体时(例如,通过对流增强递送,CED),AAV载体(例如AAV1和AAV2载体)有效靶向恒河猴脑中的纹状体和皮质结构两者。这些研究还评估了两种不同的生产平台,且这些研究证明通过三重转染和生产细胞系生成的AAV靶向恒河猴脑中的纹状体和皮质结构两者。使用两平台产生的rAAV颗粒(例如,AAV1和AAV2载体)的纹状体内递送能够转导定位于距离输注位点(例如,皮质结构)相当远的神经元以及纹状体中的神经元。因此,本发明提供用于通过将rAAV颗粒施用至纹状体而将包含编码异源核酸的rAAV载体的重组腺相关病毒(rAAV)颗粒递送至哺乳动物的中枢神经系统的方法,其中异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体表达。

[0069] 本发明还提供用于通过将编码至少在大脑皮质和纹状体中表达的异源核酸的rAAV颗粒施用至纹状体而治疗哺乳动物中CNS病症(例如亨廷顿氏病)的方法,以及使用本文所述的rAAV颗粒用于在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达异源核酸的系统和套盒。本发明中的方法还可采用用于将rAAV颗粒递送至哺乳动物纹状体的递送装置(例如CED装置)等,本发明的系统和套盒可进一步包含用于将rAAV颗粒递送至哺乳动物纹状体的装置。

[0070] I.一般技术

[0071] 本文描述和引用的技术和方法为本领域的技术人员一般充分理解的且使使用常规方法学所通常采用的,如例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual (Sambrook等,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,2012);Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel等编,2003);the series Methods in Enzymology (Academic Press,Inc.);PCR 2:A Practical Approach (M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编,1995);Antibodies,A Laboratory Manual (Harlow和Lane,编,1988);Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I.Freshney,第6版,J.Wiley and Sons,2010);Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait编,1984);Methods in Molecular Biology, Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook (J.E.Cellis编,Academic Press,1998);Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P.Mather和P.E.Roberts,Plenum Press,1998);Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures (A.Doyle,J.B.Griffiths,和D.G.Newell,编,J.Wiley and Sons,1993-8);Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir和C.C.Blackwell,编,1996);Gene Transfer vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller和M.P.Calos,编,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等编,1994);Current Protocols in Immunology (J.E.Coligan等编,1991);Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel等编,J.Wiley and Sons,

2002); Immunobiology (C.A. Janeway等, 2004); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty. 编, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd和C. Dean, 编, Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow和D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti和J. D. Capra, 编, Harwood Academic Publishers, 1995) 和 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita等编, J. B. Lippincott Company, 2011) 中所述的广泛采用的方法学。

[0072] II. 定义

[0073] 如本文使用的“载体”指包含体外或体内待递送入宿主细胞的重组质粒或病毒。

[0074] 如本文使用的术语“多核苷酸”或“核酸”指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的多聚形式。因此, 该术语包括但不限于单-、双-或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂合体或包含嘌呤和嘧啶碱基的多聚物或其他天然、化学或生物修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基。多核苷酸骨架可包含糖和磷酸基团(如通常在RNA或DNA中所发现), 或修饰或取代的糖或磷酸基团。可替换地, 多核苷酸骨架可包含合成亚基如氨基磷酸酯的多聚物且因此可以是寡脱氧核苷氨基磷酸酯(P-NH₂)或混合氨基磷酸酯-磷酸二酯寡聚物。此外, 双链多核苷酸可从化学合成的单链多核苷酸产物通过合成互补链和在合适的条件下退火该链, 或用合适的引物通过使用DNA聚合酶从头合成互补链而获得。

[0075] 术语“多肽”和“蛋白”可互换使用以指代氨基酸残基的多聚物且不限于最小长度。这种氨基酸残基的多聚物可包含天然或非天然氨基酸残基, 且包括但不限于肽、寡肽、氨基酸残基的二聚体、三聚体和多聚体。定义涵盖全长的蛋白及其片段两者。术语还包括多肽的表达后修饰, 例如, 糖基化、唾液酸化、乙酰化, 磷酸化等。此外, 就本发明而言, “多肽”指包含对天然序列的修饰的蛋白, 如缺失、添加和取代(通常是性质上保守的), 只要蛋白保持预期活性。这些修饰可以是刻意的, 如通过定点诱变, 或可以是意外发生的, 如通过产生蛋白的宿主的突变或由于PCR扩增的错误。

[0076] “重组病毒载体”指包含一个或多个异源序列(即非病毒来源的核酸序列)的重组多核苷酸载体。在重组AAV载体的情况中, 重组核酸侧翼为至少一个反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方案中, 重组核酸侧翼为两个ITR。

[0077] “重组AAV载体(rAAV载体)”指包含一个或多个异源序列(即非AAV来源的核酸序列)的多核苷酸载体, 所属异源序列侧翼为至少一个或两个AAV反向末端重复序列(ITR)。当存在于已用合适的辅助病毒感染(或表达合适的辅助功能)且表达AAV rep和cap基因产物(即AAV Rep和Cap蛋白)的宿主细胞中, 这种rAAV载体可复制并包装入传染性病毒颗粒。当rAAV载体并入更大的多核苷酸(例如在染色体中或另一用于克隆或转染的载体如质粒)时, 则rAAV载体可称作“促载体”, 其在AAV包装功能和合适的辅助功能存在下可通过复制和衣壳化“挽救(rescue)”。rAAV载体可以是任何多种形式的, 包括但不限于质粒、线性人工染色体、与脂质的复合、包囊于脂质体内和衣壳化于病毒颗粒中; 例如AAV颗粒。rAAV载体可包装入AAV病毒衣壳以生成“重组腺相关病毒颗粒(rAAV颗粒)”。

[0078] “异源”意为源自与其所比较的或其所导入或并入的其余实体基因型上独特的实体。例如, 通过基因工程技术导入不同细胞类型的多核苷酸是异源多核苷酸(且, 当表达时, 可编码异源多肽)。相似地, 并入病毒载体的细胞序列(例如基因或其部分)是相对于该载体

的异源核苷酸序列。异源核酸可指源自与其所比较的或其所导入或并入的其余实体基因型上独特的实体的核酸。

[0079] 术语“异源核酸”指导入细胞且能够转录成RNA且任选地翻译和/或在合适条件下表达的多核苷酸。在一些方面中,其赋予所导入的细胞预期的特征,或以其他方式导致预期的治疗或诊断成果。另一方面,其可转录成介导RNA干扰的分子,如miRNA、siRNA或shRNA。

[0080] “鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子”指源自鸡 β -肌动蛋白基因的多核苷酸序列(例如,原鸡(*Gallus gallus*) β 肌动蛋白,由GenBank Entrez基因ID 396526所示)。如本文使用的“鸡 β -肌动蛋白启动子”可指包含巨细胞病毒(CMV)早期增强元件、该启动子和鸡 β -肌动蛋白基因的第一外显子和内含子和兔 β -珠蛋白基因的剪接受体的启动子,如描述于Miyazaki, J.等(1989) *Gene* 79 (2):269-77的序列。如本文使用的术语“CAG启动子”可互换使用。如本文使用的术语“CMV早期增强子/鸡 β 肌动蛋白(CAG)启动子”可互换使用。

[0081] 如提及病毒滴度使用的术语“基因组颗粒(gp)”、“基因组等价物”或“基因组拷贝”指包含重组AAV DNA基因组的病毒颗粒数目,无论感染性或功能性。特定载体制备物的基因组颗粒数目可通过如描述于本文实施例或例如Clark等(1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk等(2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278中的方法测量。

[0082] 如本文使用的术语“载体基因组(vg)”可指包含载体例如病毒载体的多核苷酸序列集合的一个或多个多核苷酸。载体基因组可以在病毒颗粒中衣壳化。取决于特定的病毒载体,载体基因组可包含单链DNA、双链DNA或单链RNA或双链RNA。载体基因组可包含与特定病毒载体相关的内源序列和/或任何通过重组技术插入特定病毒载体的异源序列。例如,重组AAV载体基因组可包含启动子侧翼的至少一个ITR序列、感兴趣的序列(例如异源核酸)和多聚腺苷酸化序列。完整的载体基因组可包含载体多核苷酸序列的完整集合。在一些实施方案中,病毒载体的核酸滴度可以vg/mL计测量。适于测量该滴度的方法为本领域已知(例如定量PCR)。

[0083] 如指代病毒滴度使用的术语“感染单位(iu)”、“感染颗粒”或“复制单位”指如通过感染性中心测定法(也称为复制中心测定法,如例如McLaughlin等(1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973中所述)所测量的感染性和有复制能力的重组AAV载体颗粒的数目。

[0084] 指代病毒滴度所使用的术语“转导单位(tu)”指如本文实施例所述的功能性测定法或例如Xiao等(1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124或Fisher等(1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (LFU试验)中所测量的导致功能性异源核酸产物产生的感染性重组AAV载体颗粒的数目。

[0085] “反向末端重复”或“ITR”序列是本领域熟知的术语且指代在病毒基因组末端发现的处于相反方向的相对短的序列。

[0086] “AAV反向末端重复(ITR)”序列为本领域熟知,是在天然单链AAV基因组两末端都存在的约145个核苷酸的序列。ITR最外侧的125个核苷酸可以可替换的两个方向存在,导致不同AAV基因组之间和单AAV基因组两末端之间的异质性。最外侧的125个核苷酸还包含数个自我互补的较短区(称为A、A'、B、B'、C、C'和D区),允许链内碱基配对以在ITR的该部分内发生。

[0087] “末端解析序列”或“trs”是AAV ITR D区中的序列,其在病毒DNA复制过程中通过AAV rep蛋白裂解。突变的末端解析序列难以通过AAV rep蛋白的裂解。

[0088] “AAV辅助功能”指允许AAV通过宿主细胞复制并包装的功能。AAV辅助功能可以任何多种形式提供,包括但不限于帮助AAV复制和包装的辅助病毒或辅助病毒基因。其他AAV辅助功能为本领域已知如遗传毒性剂。

[0089] AAV的“辅助病毒”指允许AAV(其为有缺陷的细小病毒)通过宿主细胞复制并包装的病毒。辅助病毒提供“辅助功能”,其允许AAV的复制。已确定多种这样的辅助病毒,包括腺病毒、疱疹病毒(herpesvirus)和痘病毒(poxvirus)如牛痘(vaccinia)和杆状病毒(baculovirus)。腺病毒涵盖多种不同的亚群,尽管亚群C的5型腺病毒(Ad5)是最常使用的。人、非人哺乳动物和禽类来源的多种腺病毒为已知且可从保藏机构如ATCC获得。疱疹病毒家族(也可从保藏机构如ATCC获得)包括例如单纯疱疹病毒(herpes simplex virus)(HSV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)(EBV),巨细胞病毒(cytomegalovirus)(CMV)和伪狂犬病病毒(pseudorabies virus)(PRV)。用于AAV复制的腺病毒辅助功能的实例包括E1A功能、E1B功能、E2A功能、VA功能和E4orf6功能。可从保藏机构获得的杆状病毒(Baculovirus)包括苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)。

[0090] 据称,如果感染性AAV颗粒与感染性辅助病毒颗粒的比率至少为约 $10^2:1$ 、至少约 $10^4:1$ 、至少约 $10^6:1$ 或至少约 $10^8:1$ 或更多,则rAAV的制备“基本上无”辅助病毒。在一些实施方案中,制剂还基本上无等量的辅助病毒蛋白(即如果上文所示的辅助病毒颗粒杂质以破坏的形式存在,则蛋白将作为该辅助病毒水平的结果存在)。病毒和/或细胞蛋白污染一般可从考马斯染色条带在SDS凝胶上存在而观察到(例如,除对应于AAV衣壳蛋白VP1、VP2和VP3的那些之外的条带的出现)。

[0091] “AAV辅助功能”指允许AAV复制并通过宿主细胞包装的功能。AAV辅助功能可以多种形式中的任意提供,包括但不限于帮助AAV复制和包装的辅助病毒或辅助病毒基因。其他AAV辅助功能为本领域已知如遗传毒性剂。AAV的“辅助病毒”指允许AAV(其为有缺陷的细小病毒)复制并通过宿主细胞包装的病毒。已鉴别多种这样的辅助病毒,包括腺病毒、疱疹病毒和痘病毒如牛痘。腺病毒涵盖多种不同的亚群,尽管亚群C的5型腺病毒(Ad5)是最常用的。多种人、非人哺乳动物和禽类来源的腺病毒为已知且可从保藏机构如ATCC获得。疱疹病毒家族的病毒也可从保藏机构如ATCC获得,其包括例如单纯疱疹病毒(HSV),EB病毒(EBV),巨细胞病毒(CMV)和伪狂犬病病毒(PRV)。

[0092] 相对于参照多肽或核酸序列的“百分比(%)序列同一性”定义为对齐序列和导入缺口后(如果需要的话)以实现最大百分比序列同一性,且不考虑任何保守取代作为序列同一性的部分,与参照多肽或核酸序列中的氨基酸残基或核苷酸相同的候选序列中的氨基酸残基或核苷酸的百分比。出于确定百分比氨基酸或核酸序列同一性的目的,可以多种本领域已知的方式实现比对,例如,使用公众可获得的计算机软件程序,例如,描述于Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等编,1987),Supp.30,section 7.7.18,表7.7.1的那些,且包括BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。比对程序的实例是ALIGN Plus(Scientific and Educational Software,Pennsylvania)。本领域的技术人员可确定用于测量比对的合适参数,包括任何以实现在所比较的序列全长上实现最大比对所需的算法。就本文而言,给定氨基酸序列A对、与或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(其可替换地可称为具有或包含对、与或针对氨基酸序列B一定%氨基酸序列同一性的

氨基酸序列A) 如下计算:100乘以分数X/Y,其中X是在A和B的程序比对中通过序列比对软件评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,且其中Y是B中氨基酸残基的总数。可以理解的是其中氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不等,A对B的%氨基酸序列同一性将不等于B对A的%氨基酸序列同一性。就本文而言,给定核酸序列C对、与或针对给定核酸序列D的%核酸序列同一性(其可替换地可称为对、与或针对给定核酸序列D具有或包含一定%核酸序列的给定核酸序列C) 如下计算:100乘以分数W/Z,其中W是在C和D的程序比对中通过序列比对软件评分为相同匹配的核苷酸的数目,且其中Z是D中核苷酸的总数。可以理解的是其中核酸序列C的长度不等于核酸序列D的长度,C对D的%核酸序列同一性将不等于D对C的%核酸序列同一性。

[0093] “分离的”分子(例如核酸或蛋白)或细胞意为已鉴定和分离和/或从其天然环境的组分回收。

[0094] “有效量”是足以影响有益的或预期的结果,包括临床结果(例如改善症状、实现临床终点等)的量。有效量可以一次或多次施用。就疾病状态而言,有效量是足以改善、稳定或延迟疾病进展的量。

[0095] 如本文使用的术语“对流增强递送(CED)”可指治疗剂通过以其中流体静力压力导致对流分配的速率向CNS的递送。在一些实施方案中,输注以大于0.5 μ L/分钟的速率完成。然而,可使用任何合适的流动速率进而使颅内压维持在合适的水平从而不损伤脑组织。可例如通过使用合适的导管或套管(例如,步骤设计无反流套管)经由至少在靶CNS组织接近处定位套管的尖端(例如,将尖端插入CNS组织)实现CED。定位套管后,其通过套管尖端与递送治疗剂的泵连接以靶向CNS组织。来自套管尖端的压力梯度可在输注过程中维持。在一些实施方案中,输注可通过可检测的追踪剂由成像方法如术中磁共振(iMRI)或另一实时MRI技术监测和/或通过标准立体注射设备和技术递送(例如来自MRI Interventions, Memphis, TN的ClearPoint®系统)。

[0096] 如本文使用的术语“泊洛沙姆(poloxamer)”可指嵌段共聚物,其由侧翼为两条聚氧乙烯链的聚氧丙烯链生成。泊洛沙姆下可售的商品名包括但不限于PLURONIC® (BASF)、KOLLIPHOR® (BASF)、LUTROL® (BASF) 和 SYNPERONIC® (Croda International)。

[0097] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如,牛、绵羊(sheep)、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴)、兔和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在一些实施方案中,个体或受试者是人。

[0098] 如本文使用的“治疗”是用于获得有益或预期的临床结果的方式。就本发明而言,有益或预期的临床结果包括但不限于症状改善、疾病程度的减少、疾病的稳定化(例如未恶化)状态、疾病传播(例如转移)的防止、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和以及缓解(无论部分或全部),无论是可检测的或不可检测的。“治疗”还可意为与未接受治疗的预期生存率相比延长生存率。

[0099] 如本文使用的术语“预防性治疗”指治疗,其中个体已知或疑似具有或处于具有病症的风险,但未显示或显示最小的病症症状。经历预防性治疗的个体可在症状发生前治疗。

[0100] “亨廷顿氏病(HD)”指进展性脑病症,通常由HTT基因中的突变引起(又名亨廷顿蛋

白,HD或IT15)。其可通过下列症状表征:异常运动(称为舞蹈病)、运动功能逐渐丧失、情绪或精神疾病和渐进性认知障碍。尽管大多症状在30和40岁出现,但已发现疾病的青少年形式。对于HD的进一步描述,参见OMIM Entry No.143100,其在本文以其全文通过提述并入。

[0101] “亨廷顿蛋白(HTT)”可指与大多数亨廷顿氏病情况相关的基因或其多肽产物。亨廷顿蛋白的正常功能尚未完全理解。然而,已知亨廷顿蛋白基因中的突变引起HD。这些突变通常以常染色体显性遗传方式遗传且涉及HTT基因中三核苷酸CAG重复的扩增,导致Htt蛋白中的多聚谷氨酰胺(多聚Q)束。

[0102] 如本文使用的“治疗”剂(例如治疗多肽、核酸、转基因等等)是提供有益或预期临床结果的那些,如上文所述的示例性临床结果。由此,治疗剂可用于如上文所述的治疗。

[0103] 本文值或参数“约”的指代包括(和描述)针对值或参数本身的实施方案。例如,指“约X”的描述包括“X”的描述。

[0104] 除非另外指示,如本文使用的制品的单数形式“一种”、“一个”和“所述”包括复数指称。

[0105] 可以理解的是,本文所述的本发明的方面和实施方案包括“包含”、“由…组成”和/或“基本上由…组成”的方面和实施方案。

[0106] III.用于递送rAAV颗粒的方法

[0107] 在一些方面中,本发明提供了用于递送重组腺相关病毒(rAAV)颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法,其包括施用rAAV颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。另一方面,本发明提供用于递送rAAV颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法,其包括施用rAAV颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达且其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型1(AAV1)衣壳。另一方面,本发明提供用于递送rAAV颗粒至哺乳动物的中枢神经系统的方法,其包括施用所述rAAV颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达且其中所述rAAV颗粒包含AAV血清型2(AAV2)衣壳。另一方面,本发明提供用于治疗哺乳动物中亨廷顿氏病的方法,其包括施用所述rAAV颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0108] 本文的一些方面涉及将rAAV颗粒施用至中枢神经系统(CNS)的一个或多个区域。在一些实施方案中,将rAAV颗粒施用至纹状体。已知纹状体作为脑的一个区域接受来自大脑皮质(术语“皮质”在本文可交换使用)的输入并将输出送至基底节(纹状体还指纹状核和新纹状体)。如上文所述,纹状体控制运动神经运动和情感控制/动力且已牵涉多种神经疾病如亨廷顿氏病。数种感兴趣的细胞类型都位于纹状体,包括但不限于多棘投射神经元(也称为中型多棘神经元)、GABA能中间神经元和胆碱能中间神经元。中型多棘神经元构成大部分的纹状体神经元。这些神经元为GABA能且表达多巴胺受体。脑部的每个半球都包含纹状体。

[0109] 纹状体重要的亚结构包括尾状核和壳核。在一些实施方案中,将rAAV颗粒施用至尾状核(术语“尾状叶”在本文可交换使用)。已知尾状核是背侧纹状体的结构。尾状核已牵涉功能控制如指向性运动、空间工作记忆、记忆、目标指向性行为、情绪、睡眠、语言和学习。

脑部的每个半球都包含尾状核。

[0110] 在一些实施方案中,将rAAV颗粒施用至壳核。连同尾状核,壳核已知是背侧纹状体的结构。壳核包含豆状核的部分且将大脑皮质与黑质和苍白球连接。与许多脑部其他结构高度整合,壳核已牵涉功能的控制如学习、运动学习、运动表现,运动任务和肢体运动。脑部的每个半球都包含壳核。

[0111] 可将rAAV颗粒施用至纹状体的一个或多个位点。在一些实施方案中,将rAAV颗粒施用至纹状体的壳核和尾状核。在一些实施方案中,将rAAV颗粒施用至每个半球纹状体的壳核和尾状核。在一些实施方案中,将rAAV颗粒施用至尾状核中的至少一个位点和壳核中的至少两个位点。

[0112] 在一些实施方案中,将rAAV颗粒施用至脑部的一个半球。在一些实施方案中,将rAAV颗粒施用至脑部的两个半球。例如,在一些实施方案中,将rAAV颗粒施用至每半球纹状体的壳核和尾状核。在一些实施方案中,将包含rAAV颗粒的组合物使用至每半球的纹状体。在其他实施方案中,将包含rAAV颗粒的组合物施用至左半球的纹状体或右半球的纹状体和/或左半球的壳核或右半球的壳核。在一些实施方案中,将包含rAAV颗粒的组合物施用至左半球尾状核、右半球尾状核、左半球壳核和右半球壳核的任何组合。

[0113] 在一些实施方案中,将包含rAAV颗粒的组合物同时或顺序施用于多于一个位置。在一些实施方案中,包含rAAV颗粒的组合物的多次注射为不多于大约任何下列间隔:1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、9小时、12小时或24小时。在一些实施方案中,包含rAAV颗粒的组合物的多次注射间隔多于约24小时。

[0114] 一般地,可递送约1 μ L至约1mL的本发明的组合物(例如约100 μ L至约500 μ L的组合物)。在一些实施方案中,递送至壳核的组合物量多于递送至尾状核的体积。在一些实施方案中,递送至壳核的组合物量为递送至尾状核的体积的约2倍。在其他实施方案中,递送至壳核的组合物量为递送至尾状核的体积的大约下述中的任何:1倍、1.25倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍或10倍(或其中的任何比率)。例如,在一些实施方案中,施用至壳核的rAAV颗粒与施用至尾状核的rAAV颗粒的比率为至少约2:1(例如将约30 μ L的组合物施用至每半球的尾状核和将约60 μ L的组合物施用至每半球的壳核)。在一些实施方案中,将约20 μ L至约50 μ L的组合物(或其间的任何量)施用至每半球的尾状核,且将约40 μ L至约100 μ L的组合物(或其间的任何量)施用至每半球的壳核。在一些实施方案中,施用至每半球尾状核的组合物体积少于大约任何下列体积(μ L):50、45、40、35、30或25。在一些实施方案中,施用至每半球尾状核的组合物体积多于大约任何下列体积(μ L):20、25、30、35、40或45。也就是说,施用至每半球尾状核的组合物体积可以是具有50、45、40、35、30或25的上限和独立选自20、25、30、35、40或45的下限间的任何体积范围,其中所述下限少于所述上限。在一些实施方案中,施用至每半球壳核的组合物体积少于大约任何下列体积(μ L):100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50或45。在一些实施方案中,施用至每半球壳核的组合物体积多于任何下列体积(μ L):40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95。也就是说,施用至每半球壳核的组合物体积可以是具有100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50或45的上限和独立选自40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95的下限间的任何体积范围,其中所述下限少于所述上限。

[0115] 在一些实施方案中,组合物以多于1 μ L/分钟至约5 μ L/分钟的速率施用至纹状体。

在一些实施方案中,组合物以多于1 μ L/分钟至约5 μ L/分钟的速率施用至尾状核和壳核。在一些实施方案中,将组合物以多于大约任何下列的速率施用至纹状体(尾状核和/或壳核):1 μ L/分钟、2 μ L/分钟、3 μ L/分钟、4 μ L/分钟、5 μ L/分钟、6 μ L/分钟、7 μ L/分钟、8 μ L/分钟、9 μ L/分钟或10 μ L/分钟。在一些实施方案中,将组合物以下列的任何速率施用至纹状体(尾状核和/或壳核):约1 μ L/分钟至约10 μ L/分钟、约1 μ L/分钟至约9 μ L/分钟、约1 μ L/分钟至约8 μ L/分钟、约1 μ L/分钟至约7 μ L/分钟、约1 μ L/分钟至约6 μ L/分钟、约1 μ L/分钟至约5 μ L/分钟、约1 μ L/分钟至约4 μ L/分钟、约1 μ L/分钟至约3 μ L/分钟、约1 μ L/分钟至约2 μ L/分钟、约2 μ L/分钟至约10 μ L/分钟、约2 μ L/分钟至约9 μ L/分钟、约2 μ L/分钟至约8 μ L/分钟、约2 μ L/分钟至约7 μ L/分钟、约2 μ L/分钟至约6 μ L/分钟、约2 μ L/分钟至约5 μ L/分钟、约2 μ L/分钟至约4 μ L/分钟、约2 μ L/分钟至约3 μ L/分钟、约3 μ L/分钟至约10 μ L/分钟、约3 μ L/分钟至约9 μ L/分钟、约3 μ L/分钟至约8 μ L/分钟、约3 μ L/分钟至约7 μ L/分钟、约3 μ L/分钟至约6 μ L/分钟、约3 μ L/分钟至约5 μ L/分钟、约3 μ L/分钟至约4 μ L/分钟、约4 μ L/分钟至约10 μ L/分钟、约4 μ L/分钟至约9 μ L/分钟、约4 μ L/分钟至约8 μ L/分钟、约4 μ L/分钟至约7 μ L/分钟、约4 μ L/分钟至约6 μ L/分钟、约4 μ L/分钟至约5 μ L/分钟、约5 μ L/分钟至约10 μ L/分钟、约5 μ L/分钟至约9 μ L/分钟、约5 μ L/分钟至约8 μ L/分钟、约5 μ L/分钟至约7 μ L/分钟、约5 μ L/分钟至约6 μ L/分钟、约6 μ L/分钟至约10 μ L/分钟、约6 μ L/分钟至约9 μ L/分钟、约6 μ L/分钟至约8 μ L/分钟、约6 μ L/分钟至约7 μ L/分钟、约7 μ L/分钟至约10 μ L/分钟、约7 μ L/分钟至约9 μ L/分钟、约7 μ L/分钟至约8 μ L/分钟、约8 μ L/分钟至约10 μ L/分钟、约8 μ L/分钟至约9 μ L/分钟或约9 μ L/分钟至约10 μ L/分钟。在一些实施方案中,在递送的过程中将组合物以逐渐增加的流速(即“步进”)施用。

[0116] 在一些实施方案中,实施一次rAAV颗粒施用。在其他实施方案中,多于一次施用rAAV颗粒的施用。本领域的技术人员可部分基于例如待治疗的病症和/或对治疗响应的患者确定实施多少次rAAV颗粒的施用。

[0117] 在一些实施方案中,所述方法包括施用CNS有效量的重组病毒颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在大脑皮质和纹状体中表达。在一些实施方案中,rAAV颗粒的病毒滴度为至少大约任何下列: 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 10×10^{12} 、 11×10^{12} 、 15×10^{12} 、 20×10^{12} 、 25×10^{12} 、 30×10^{12} 或 50×10^{12} 基因组拷贝/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒的病毒滴度为大约任何下列: 5×10^{12} 至 6×10^{12} 、 6×10^{12} 至 7×10^{12} 、 7×10^{12} 至 8×10^{12} 、 8×10^{12} 至 9×10^{12} 、 9×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 11×10^{12} 、 11×10^{12} 至 15×10^{12} 、 15×10^{12} 至 20×10^{12} 、 20×10^{12} 至 25×10^{12} 、 25×10^{12} 至 30×10^{12} 、 30×10^{12} 至 50×10^{12} 或 50×10^{12} 至 100×10^{12} 基因组拷贝/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒的病毒滴度为大约任何下列: 5×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 25×10^{12} 、或 25×10^{12} 至 50×10^{12} 基因组拷贝/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒的病毒滴度至少为大约任何下列: 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 10×10^9 、 11×10^9 、 15×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 或 50×10^9 转导单位/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒的病毒滴度为大约任何下列: 5×10^9 至 6×10^9 、 6×10^9 至 7×10^9 、 7×10^9 至 8×10^9 、 8×10^9 至 9×10^9 、 9×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 11×10^9 、 11×10^9 至 15×10^9 、 15×10^9 至 20×10^9 、 20×10^9 至 25×10^9 、 25×10^9 至 30×10^9 、 30×10^9 至 50×10^9 或 50×10^9 至 100×10^9 转导单位/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒的病毒滴度为大约任何下列: 5×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 15×10^9 、 15×10^9 至 25×10^9 或 25×10^9 至 50×10^9 转导单位/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒的病毒滴度为至少大约任何下列: 5×10^{10} 、 $6 \times$

10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 10×10^{10} 、 11×10^{10} 、 15×10^{10} 、 20×10^{10} 、 25×10^{10} 、 30×10^{10} 、 40×10^{10} 或 50×10^{10} 感染单位/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒的病毒滴度为至少大约任何下列: 5×10^{10} 至 6×10^{10} 、 6×10^{10} 至 7×10^{10} 、 7×10^{10} 至 8×10^{10} 、 8×10^{10} 至 9×10^{10} 、 9×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 11×10^{10} 、 11×10^{10} 至 15×10^{10} 、 15×10^{10} 至 20×10^{10} 、 20×10^{10} 至 25×10^{10} 、 25×10^{10} 至 30×10^{10} 、 30×10^{10} 至 40×10^{10} 、 40×10^{10} 至 50×10^{10} 或 50×10^{10} 至 100×10^{10} 感染单位/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒的病毒滴度为至少大约任何下列: 5×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 15×10^{10} 、 15×10^{10} 至 25×10^{10} 或 25×10^{10} 至 50×10^{10} 感染单位/mL。

[0118] 在一些实施方案中,所述方法包括施用CNS有效量的重组病毒颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码至少在大脑皮质和纹状体中表达的异源核酸的rAAV载体。在一些实施方案中,施用至个体的病毒颗粒的剂量为至少大约任何 1×10^8 至约 1×10^{13} 基因组拷贝/kg体重。在一些实施方案中,施用至个体的病毒颗粒的剂量为大约 1×10^8 – 1×10^{13} 基因组拷贝/kg体重。

[0119] 在一些实施方案中,所述方法包括向CNS施用有效量的重组病毒颗粒于纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码至少在大脑皮质和纹状体中表达的异源核酸的rAAV载体。在一些实施方案中,施用至个体的病毒颗粒的总量为至少大约 1×10^9 至约 1×10^{14} 基因组拷贝。在一些实施方案中,施用至个体的病毒颗粒的总量为大约 1×10^9 至约 1×10^{14} 基因组拷贝。

[0120] 可单独使用本发明的组合物(例如rAAV颗粒)或与一个或多个额外的治疗剂组合用于治疗任何或全部本文描述的病症。顺序施用之间的时间间隔可以至少(或可替换地少于)数分钟、数小时或数天而言。

[0121] IV. 表达构建体

[0122] 在一些方面中,本发明提供用于通过施用rAAV颗粒至纹状体递送rAAV颗粒至哺乳动物的CNS的方法。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含rAAV载体。rAAV载体可编码异源核酸(例如至少在大脑皮质和纹状体中表达的异源核酸)。rAAV载体将在下文进一步详述。

[0123] 在一些实施方案中,rAAV载体编码异源核酸。在一些实施方案中,异源核酸可编码治疗多肽或治疗核酸。可使用治疗多肽或治疗核酸,例如以改善症状、预防或延迟进展和/或提供病症的治疗(例如本文所述的病症)。在一些实施方案中,将治疗多肽或治疗核酸用于治疗如下文进一步详述的CNS的病症。

[0124] 异源核酸可表达于CNS内一个或多个感兴趣的区域。例如,在一些实施方案中,异源核酸至少表达于大脑皮质和纹状体。异源核酸能够遍在地在整个CNS中表达,或其可表达于CNS细胞中的亚集。

[0125] 在一些实施方案中,异源核酸表达于哺乳动物的额叶皮质、枕叶皮质和/或IV层。已知大脑皮质为哺乳动物脑部外侧,其对于语言、感知、记忆、注意力和意识至关重要。大脑皮质由于其大量的解剖学和复杂的功能细分为数个不同的组分和区域。其可分为左半球和右半球。此外,其包含四个总叶:额叶、顶叶、颞叶、枕叶。额叶皮质可指皮质的额叶且已知提供广泛的与非基于任务记忆、社交交流、做出决策和其他复杂的认知功能相关的神经功能。枕叶皮质可指皮质的枕叶且已知涉及视觉处理。顶叶皮质可指皮质的顶叶且已知涉及语言处理、本体感觉和与触碰相关的感觉输入。颞叶皮质可指皮质的颞叶且已知涉及语言、记忆和感情联系。

[0126] 此外,描述了皮质区域的三种一般类型:感觉、运动和联想。这些可以分为5中功能

性亚类：主要运动皮质（参与肌肉控制）、运动前皮质（命令主要运动区域的高阶运动区）、联合区（例如顶叶-颞叶-枕叶或前额，这些区域参与计划、记忆、注意力和其他更高的认知任务且假定人皮质的大部分）、高阶区域（感觉处理）和初级感觉区（例如听觉、视觉和体感）。在一些实施方案中，异源核酸表达于前额叶关联皮质区、前运动皮质、初级体感皮质区、感觉运动皮质、顶叶皮质、枕叶皮质和/或初级运动皮质。

[0127] 此外，大脑皮质可分为不同皮层（从浅表移动至深），每一层包含神经连通性和细胞类型的特征类型。这些层可分为上颗粒层（层I-III）、内颗粒层（IV）和下皮层（V和VI）。上颗粒层通常投射至其他皮层层次，而下皮层接受来自上颗粒层的输入并将输出送至皮质外的结构（例如运动、感觉和丘脑区域）。层V包含具有与皮层下结构如基底节连接的轴突的锥体神经元。初级运动皮质中的层V神经元还形成对于自发运动控制至关重要的皮质脊髓束。层IV接受来自丘脑的输入并与列的其他部分连接，由此提供与丘脑和皮质的整合相关的重要功能。层IV的特征性细胞包括星状细胞（例如多棘星状细胞）和锥体神经元。

[0128] 在一些实施方案中，rAAV颗粒经历逆行或顺行转运至大脑皮质中。逆行转运指通过其将负载（例如rAAV颗粒）从神经元过程（例如轴突）移至细胞体的现象。顺行转运指从细胞体至细胞膜（例如突触）的移动。认为AAV颗粒的顺行转运经由受体介导的内化在轴突末端发生，随后微管介导运输至核（参见例如Kaspar等，(2002) *Mol. Ther.* 5:50-56; Boulis等，(2003) *Neurobiol. Dis.* 14:535-541; Kaspar等，(2003) *Science* 301:839-842）。已知纹状体包含来自其他脑区域的投射，如皮质区域。逆行和顺行转运允许rAAV颗粒遍及脑部分布，如在皮质和丘脑间（参见例如Kells, A.P.等(2009) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:2407-2411）。因此，不受理论限制，认为将AAV颗粒注入一个脑部区域（例如纹状体、尾状核和/或壳核）可允许AAV颗粒通过逆行转运递送至脑部的其他区域（例如皮质）。

[0129] 在一些实施方案中，异源核酸进一步表达于丘脑、黑质和/或海马区。如上文所述，机制如顺行和/或逆行转运可允许注射入大脑皮质和/或纹状体的rAAV颗粒分布至脑部的其他区域，特别是与皮质连接的那些。丘脑在皮质和中脑间，从皮质下区域传递信号（例如感觉和运动）至皮质，并在警觉性和睡眠中发挥作用。丘脑还与海马区（边缘系统的部分和长期记忆巩固的关键媒介）连接。基底节的部分黑质包含许多多巴胺能神经元且对于运动和奖励至关重要。CNS病症如帕金森氏病与黑质中多巴胺能神经元的丧失相关。其进一步提供多巴胺至纹状体，对于正常的纹状体功能至关重要。

[0130] 在一些方面中，本发明提供rAAV载体在预防和治疗哺乳动物中一个或多个基因缺陷（例如遗传性基因缺陷、体细胞基因改变等）的方法中的用途，如例如，导致受试者中多肽缺陷或多肽过剩的基因缺陷，或用于治疗或减少体现与细胞和组织中这种多肽的缺陷相关联的CNS相关病症受试者中缺陷的严重性或程度。在一些实施方案中，方法涉及以在具有或疑似具有CNS相关病症的受试者中足以治疗所述病症的量和持续时间将药学上可接受的载剂中的编码一种或多种治疗肽、多肽、功能性RNA、抑制性核酸、shRNA、微小RNA、反义核苷酸等的rAAV载体施用于受试者。

[0131] rAAV载体可包含转基因，其为调节或治疗CNS相关病症的蛋白或功能性RNA。下列是与CNS-相关病症有关的非限制性列表：神经凋亡抑制蛋白（NAIP）、神经生长因子（NGF）、神经胶质衍生的生长因子（GDNF）、脑衍生的生长因子（BDNF）、睫状神经营养因子（CNTF）、酪氨酸羟化酶（TH）、GTP-环化水解酶（GTPCH）、天门冬酰基酶（ASPA）、超氧化物歧化酶（SOD1）

和氨基酸脱羧酶(AADC)。例如,在治疗帕金森氏病中有用的转基因编码TH,其是一种在多巴胺合成中的限速酶。编码生成TH辅因子四氢生物蝶呤的GTPCH1的转基因也可用于治疗帕金森氏病。编码GDNF或BDNF或AADC(其促进左旋多巴转换成DA)的转基因也可用于治疗帕金森氏病。对于ALS的治疗,有效的转基因可编码:GDNF、BDNF或CNTF。还对于ALS的治疗,有用的转基因可编码抑制SOD1表达的功能性RNA,例如shRNA、miRNA。对于脑缺血的治疗,有用的转基因可编码NAIP或NGF。编码B-葡糖醛酸糖苷酶(GUS)的转基因对于一些溶酶体贮积症(例如粘多糖贮积症VII型(MPS VII))的治疗有用。编码前体药物激活基因的转基因例如HSV-胸苷激酶(其将更昔洛韦(ganciclovir)转化成破坏DNA合成并导致细胞死亡的毒性核苷酸)可用于治疗一些癌症,例如当与前体药物组合施用。编码内源性阿片如 β -内啡肽的转基因可用于治疗疼痛。可用于本发明的rAAV载体的转基因的其他实例对于本领域的技术人员会是显而易见的(参见例如Costantini LC,等, Gene Therapy (2000) 7, 93-109)。

[0132] 在一些实施方案中,异源核酸可编码治疗核酸。在一些实施方案中,治疗核酸可包括但不限于siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或DNA酶。由此,治疗核酸可编码RNA,当其从载体核酸转录时,通过干扰与本发明病症相关的异常或过剩蛋白的翻译或转录治疗本发明的病症(例如CNS病症)。例如,本发明的核酸可编码RNA,所述RNA通过高度特异性消除或减少编码异常和/或过剩蛋白的mRNA来治疗病症。治疗RNA序列包括RNAi,小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)和/或核酶(如锤头和发夹状核酶),其可通过高度特异性消除或减少编码异常和/或过剩蛋白来治疗病症。

[0133] 在一些实施方案中,异源核酸可编码治疗多肽。治疗多肽可例如补给多肽和/或酶活性,其在细胞或生物体中不存在或以减少的水平存在。可替换地,治疗多肽可补给间接抵消细胞或生物体中失衡的多肽和/或酶活性。例如,用于由代谢酶或活性缺陷引起的代谢物的积聚相关的病症的治疗多肽可补给失去的代谢酶或活性,或其可补给其他导致代谢物减少的酶或活性。治疗多肽还可用于通过充当例如显性负多肽来减少多肽的活性(例如通过获得功能的突变过表达、活化的多肽,或其活性以其他方式误调节的(misregulated)多肽)。

[0134] 在一些实施方案中,治疗多肽或治疗核酸用于治疗CNS的病症。不希望受理论限制,认为治疗多肽或治疗核酸可用于减少和消除其获得功能已与病症相关的多肽的表达和/或活性,或增强多肽的表达和/或活性以补充与病症相关的缺陷(例如其表达显示相似或相关活性的基因中的突变)。可通过本发明的治疗多肽或治疗核酸治疗的本发明CNS病症的非限制性实例(对于每种病症可靶向或补给的示例性基因在括号中提供)包括中风(例如caspase-3、Beclin1、Atg1、PAR1、HIF1 α 、PUMA和/或Fukuda, A.M.和Badaut, J. (2013) Genes (Basel) 4: 435-456中所述的任何基因)、亨廷顿氏病(突变的HTT)、癫痫(例如SCN1A、NMDAR、ADK和/或Boison, D. (2010) Epilepsia 51: 1659-1668中所述的任何基因)、帕金森氏病(α -突触核蛋白)、葛雷克氏症(Lou Gehrig's disease)(也称为肌萎缩性侧索硬化;SOD1)、阿尔茨海默氏病(tau、淀粉样前体蛋白)、皮质基底节变性或CBD(tau)、皮质基底神经节变性或CBGD(tau)、额颞叶痴呆或FTD(tau)、进行性核上麻痹或PSP(tau)、多系统萎缩或MSA(α -突触核蛋白)、脑癌(例如突变或过表达的牵涉脑癌的原癌基因)和溶酶体贮积症(LSD)。本发明的病症可包括涉及皮质大区域的那些,例如皮质的多于一个功能区域,皮质的多于一叶和/或整个皮质。其他可由本发明的治疗多肽或治疗核酸治疗的本发明的疾病的非限制

性实例包括创伤性脑损伤、酶功能障碍病症、精神病症(包括创伤后应激综合征)、神经退行性疾病和认知病症(包括痴呆、自闭症和抑郁)。酶功能障碍病症包括但不限于脑白质营养不良(包括Canavan病(Canavan's Disease))和任何下文所述的溶酶体贮积症。

[0135] 在一些实施方案中,治疗多肽或治疗核酸用于治疗溶酶体贮积症。如本领域公知,溶酶体贮积症是罕见的遗传代谢病症,其特征不在于溶酶体功能的缺陷。这种病症经常由对于正常的粘多糖、糖蛋白和/或脂质代谢所需的酶的缺陷引起,导致溶酶体保存的细胞材料的病理性积累。可由本发明的治疗多肽或治疗核酸治疗的本发明溶酶体贮积症的非限制性实例(对于每种病症可靶向或补给的示例性基因在括号中提供)包括2型或3型戈谢病(Gaucher disease)(酸性 β -葡萄糖苷酶,GBA)、GM1神经节苷脂贮积症(β -半乳糖苷酶-1, GLB1)、亨特病(Hunter Disease)(艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶,IDS)、克拉伯病(Krabbe Disease)(半乳糖神经酰胺酶,GALC)、甘露糖苷贮积症(甘露糖苷酶,如 α -D-甘露糖苷酶, MAN2B1)、 β 甘露糖苷贮积症(β -甘露糖苷酶,MANBA)、异染性脑白质营养不良症(metachromatic leukodystrophy Disease)(假芳基硫酸酯酶A,ARSA)、粘多糖贮积症II/III病(N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶,GNPTAB)、尼曼-匹克A症(Niemann-Pick A Disease)(酸性鞘磷脂酶,ASM)、尼曼-匹克C症(尼曼-匹克C蛋白,NPC1)、蓬佩病(Pompe Disease)(酸性 α -1,4-葡萄糖苷酶,GAA)、桑德霍夫病(Sandhoff Disease)(己糖胺酶 β 亚基,HEXB), Sanfillipo A病(N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶,MPS3A)、Sanfillipo B病(N- α -乙酰葡萄糖胺酶, NAGLU)、Sanfillipo C病(肝素乙酰-CoA: α -葡萄糖胺酶N-乙酰转移酶,MPS3C)、Sanfillipo D病(N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶,GNS)、辛德勒病(Schindler disease)(α -N-乙酰半乳糖胺酶,NAGA)、斯利氏病(β -葡萄糖醛酸糖苷酶,GUSB)、泰-萨克斯病(Tay-Sachs disease)(己糖胺酶 α 亚基,HEXA)和沃尔曼病(Wolman disease)(溶酶体酸性脂肪酶,LIPA)。

[0136] 其他的溶酶体贮积症以及与每种疾病相关的缺陷酶列于下列表1中。在一些实施方案中,列于下表的疾病通过本发明的治疗多肽或治疗核酸治疗,其补足或以其他方式补偿相应地酶缺陷。

[0137] 表1. 溶酶体贮积症和相关的缺陷酶

[0138]

溶酶体贮积症	缺陷酶
天冬氨酰葡萄糖胺尿症	天冬氨酰葡萄糖胺酶
法布里病(Fabry)	α -半乳糖苷酶 A
小儿巴藤病(CNL1)	棕榈酰蛋白硫酸酯酶
经典晚期小儿巴藤病(CNL2)	三肽基肽酶
青少年巴藤病(CNL3)	溶酶体跨膜蛋白
巴藤病, 其他形式(CNL4-CNL8)	多基因产物
胱氨酸贮积症	半胱氨酸转运蛋白
法伯氏病(Farber)	酸性神经酰胺酶
岩藻糖苷贮积症	酸性 α -L-岩藻糖苷酶
半乳糖苷唾液酸贮积症	保护性蛋白/组织蛋白酶 A
戈谢病 1、2 和 3 型	酸性 β -葡萄糖苷酶
GM1 神经节苷脂贮积症	酸性 β -半乳糖苷酶
亨特病	艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶

[0139]

贺勒-施艾氏症(Hurler-Scheie)	α -L-艾杜糖醛酸酶
克拉伯病	半乳糖脑苷脂酶
α -甘露糖苷贮积症	酸性 α -甘露糖苷酶
β -甘露糖苷贮积症	酸性 β -甘露糖苷酶
马-拉病(Maroteaux-Lamy)	芳基硫酸酯酶 B
异染性脑白质营养不良症	芳基硫酸酯酶 A
莫尔丘病 A (Morquio A)	N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸
莫尔丘病 B (Morquio B)	酸性 β -半乳糖苷酶
粘脂贮积症 II/III	N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶
尼曼-匹克 A、B 病	酸性鞘磷脂酶
尼曼-匹克 C 病	NPC-1
蓬佩病	酸性 α -葡糖苷酶
桑德霍夫病	β -氨基己糖苷 B
Sanfilippo A 病	乙酰肝素-N-硫酸酯酶
Sanfilippo B 病	α -N-乙酰葡萄糖胺酶
Sanfilippo C 病	乙酰-CoA: α -葡糖胺 N-乙酰转移酶
Sanfilippo D 病	N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸
辛德勒病	α -N-乙酰半乳糖胺酶
Schindler-Kanzaki	α -N-乙酰半乳糖胺酶
唾液酸贮积症	α -神经氨酸酶
斯利氏病	β -葡糖醛酸糖苷酶
泰-萨克斯病	β -己糖胺酶 A
沃尔曼病	酸性脂肪酶

[0140] 由此,在一些实施方案中,治疗多肽是caspase-3、Beclin1、Ask1、PAR1、HIF1 α 、PUMA、SCN1A、NMDAR、ADK、 α -突触核蛋白、SOD1、 β -葡萄糖苷酸(GBA)、 β -半乳糖苷酶-1(GLB1)、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)、半乳糖神经酰胺酶(GALC)、甘露糖苷酶、 α -D-甘露糖苷酶(MAN2B1)、 β -甘露糖苷酶(MANBA)、假芳基硫酸酯酶A(ARSA)、N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶(GNPTAB)、酸性鞘磷脂酶(ASM)、尼曼-匹克蛋白C(NPC1)、酸性 α -1,4-葡糖苷酶(GAA)、己糖胺酶 β 亚基、HEXB、N-硫代葡萄糖胺磺基水解酶(MPS3A)、N- α -乙酰葡萄糖胺酶(NAGLU)、肝素乙酰-CoA: α -葡糖胺酶N-乙酰转移酶(MPS3C)、N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶(GNS)、 α -N-乙酰半乳糖胺酶(NAGA)、 β -葡糖醛酸糖苷酶(GUSB)、己糖胺酶 α 亚基(HEXA)、亨廷顿蛋白(HTT)或溶酶体酸性脂肪酶(LIPA)。治疗多肽可增加或减少受试者中靶多肽的功能(例如其可补给溶酶体贮积症中丧失的功能,或减少MSA中 α -突触核蛋白的水平,如通过阻断其功能或功能障碍)。在一些实施方案中,治疗核酸是caspase-3、Beclin1、Ask1、PAR1、HIF1 α 、PUMA、SCN1A、NMDAR、ADK、 α -突触核蛋白、SOD1、 β -葡萄糖苷酸(GBA)、 β -半乳糖苷酶-1(GLB1)、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)、半乳糖神经酰胺酶(GALC)、 α -甘露糖苷酶、 α -D-甘露糖苷酶(MAN2B1)、 β -甘露糖苷酶(MANBA)、假芳基硫酸酯酶A(ARSA)、N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶(GNPTAB)、酸性鞘磷脂酶(ASM)、尼曼-匹克蛋白C(NPC1)、酸性 α -1,4-葡糖苷酶(GAA)、己糖

胺酶 β 亚基、HEXB、N-硫代葡萄糖胺磺基水解酶 (MPS3A)、N- α -乙酰葡萄糖胺酶 (NAGLU)、肝素乙酰-CoA、 α -葡萄糖胺酶N-乙酰转移酶 (MPS3C)、N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶 (GNS)、 α -N-乙酰半乳糖胺酶 (NAGA)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUSB)、己糖胺酶 α 亚基 (HEXA) 或溶酶体酸性脂肪酶 (LIPA)。治疗核酸可增加或减少受试者中靶多肽的功能 (例如其可补给溶酶体贮积症中丧失的功能或减少MSA中 α -突触核蛋白的水平,如通过RNAi)。

[0141] 皮质和纹状体中AAV表达可有效的示例性疾病是亨廷顿氏病 (HD)。亨廷顿氏病由CAG重复扩大突变导致,其在突变的亨廷顿蛋白蛋白 (mHTT) 中编码拉长的多聚谷氨酰胺 (多聚Q) 重复。HD是基于DNA和RNA疗法特别引人注目的靶标,这是由于其为由单等位基因上的突变导致的常染色体显性遗传疾病。AAV载体提供理想的递送系统用于核酸治疗且允许这些降低脑中分子的亨廷顿蛋白持久和持续的表达。为实现HD中的最大临床效力,可能需要向纹状体和皮质都递送。HD患者脑部的事后分析揭示了纹状体中广泛的中型多棘神经元的丧失,以及大脑皮质和海马区锥体神经元的丧失。进来使用HD的条件性转基因小鼠模型显示在纹状体和皮质中遗传上降低神经元群体中的mHTT表达相比在单独的各位点降低mHTT提供显著更高的效力 (Wang等, (2014) *Nature medicine* 20:536-541)。总之,该证据表明基因治疗剂递送至纹状体和皮层两区域对于最大治疗效力可能是理想的。

[0142] 使用基因治疗载体以递送生物制剂至牵涉亨廷顿氏病例生成的关键脑区是挑战性的,很大程度上是由于特异性有效递送载体至纹状体和大脑皮质的物理限制。尽管多重直接输注在小动物脑中有效,由于灵长类动物中脑组织的结构和体积,通过单位点输注实现广泛的纹状体和皮质递送变得更加困难。因此,发明人发现的纹状体施用可实现广发的rAAV分布包括皮质和纹状体在治疗亨廷顿氏病中具有功用。

[0143] 因此,本发明的一些方面涉及在哺乳动物中用于治疗亨廷顿氏病的方法,其包括施用rAAV颗粒至纹状体,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。HD通过涉及整体运动和运动控制、认知和心理健康的进行性症状表征。虽然症状的精确特征和程度在个体间不同,症状一般随时间进展。在大多数的情况中,症状在30-40岁开始出现,伴随运动技能、认知和个性的细微中断。随时间这些进展成为不平稳、无法控制的运动和肌肉控制丧失、痴呆和精神疾病如抑郁、侵略、焦虑和强迫行为。死亡通常在症状发病后的10-15年发生。少于10%的HD情况涉及疾病的青少年发病形式,其由更快的疾病进展表征。认为约10,000的美国人中约有1人具有HD。

[0144] HD的大多数情况与HTT基因中的三核苷CAG重复扩展相关。HTT基因中CAG重复的数目与HD的表现强烈相关。例如,具有35或更少重复的个体通常不发展HD,但具有27-35重复的个体具有更高的风险其后代将具有HD。具有36至40-42重复的个体具有不完全显性的HD,而具有多于40-42重复的个体显示完全的显性。青少年发病的HD情况可与60或更多大小的CAG重复相关。

[0145] 由该CAG重复扩大导致的多聚Q-扩大的Htt蛋白与细胞聚集物或包涵体、扰动的蛋白稳态和转录失调相关。尽管这些毒性表型可与机体的数个部分相关,其最常与神经元细胞死亡相关。HD患者经常显示皮质变薄和纹状体神经元惊人的、进行性丧失。纹状体表现为对HD最脆弱的脑部区域 (特别是纹状体中型多棘神经元),在壳核和尾状核中可见早期影响。在HD患者的脑中观察到纹状体多棘神经元中的细胞死亡、增加数目的星形胶质细胞和小神经胶质细胞的激活。HD还可影响海马区、大脑皮质、丘脑、下丘脑和小脑的一些区域。

[0146] HD的动物模型可用于测试潜在的治疗策略,如本公开的组合物和方法。用于HD的小鼠模型为本领域已知。这些包括具有突变的HTT片段的小鼠模型如R6/1和N171-82Q HD小鼠(Harper等,(2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825, Rodriguez-Lebron等,(2005) *Mol. Ther.* 12:618-633, Machida等,(2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197)。本文所述的小鼠HD模型的另一实例是YAC128小鼠模型。该模型具有表达有128CAG重复的突变人HTT基因的酵母人工染色体(YAC),且YAC128在12个月龄小鼠纹状体中显示Htt聚集体的显著和广泛的积累(Slow等,(2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567, Pouladi等,(2012) *Hum. Mol. Genet.* 21:2219-2232)。

[0147] 还可使用用于HD的其他动物模型。例如,已描述了转基因大鼠(von Horsten, S.等(2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:617-24)和恒河猴(Yang, S.H.等(2008) *Nature* 453:921-4)模型。还已知非遗传模型。这些最经常涉及兴奋毒性化合物(如喹啉酸或红藻氨酸)或线粒体毒素(如3-硝基丙酸和丙二酸)的使用以诱导啮齿动物或非人灵长类中的状态神经元细胞死亡(对于更多的描述和参考,参见Ramawamy, S.等(2007) *ILAR J.* 48:356-73)。

[0148] 在一些方面中,本发明提供用于改善HD症状的方法,其包括施用包含编码异源核酸的AAV载体的rAAV颗粒至纹状体,所述异源核酸至少在大脑皮质和纹状体中表达。在一些实施方案中,HD的症状包括但不限于舞蹈病、强直、无法控制的身体运动、肌肉失去控制、缺乏协调、躁动、减缓眼部运动、异常姿态、不稳、共济失调步态、表情异常、言语障碍、咀嚼和/或吞咽困难、睡眠障碍、癫痫、痴呆,认知障碍(例如涉及规划、抽象思维、灵活性、规则获取、人际关系敏感性、自我控制、注意力、学习、记忆的能力减退)、抑郁、焦虑、人格改变、侵略、强迫行为、着迷-强迫行为、性欲亢进、精神病、情感淡漠、烦躁、自杀的念头、体重下降、肌肉萎缩、心衰竭、减少葡萄糖耐受、睾丸萎缩和骨质疏松症。

[0149] 在一些方面中,本发明提供方法以预防或延迟HD的进展。常染色体显性HD是遗传性疾病,其可进行基因分型。例如,HTT中CAG重复的数目可通过基于PCR重复大小确定。该类诊断可在生命的任何阶段通过直接检测青少年或成人(例如伴随临床症状显现)、产前筛查或产前排除测试(例如通过绒毛取样或羊膜穿刺术)或胚胎植入前筛查实施。此外,HD可通过脑部成像、寻找尾状核和/或壳核的收缩和/或脑室扩大来诊断。这些症状与HD家族史和/或临床症状组合可指示HD。

[0150] 用于确定HD症状改善的方式为本领域已知。例如,美国亨廷顿氏病评定量表(UHDRS)可用于评估运动功能、认知功能、行为异常和功能能力(参见例如Huntington Study Group(1996) *Movement Disorders* 11:136-42)。建立该评定量表以提供统一、全面的测试用于疾病病理的多面性,并入来自测试如HD活动和日常生活能力量表(HD Activities and Daily Living Scale)、马斯登和奎因的舞蹈病严重程度量表(Marsden and Quinn's chorea severity scale)、肢体残疾和独立量表(Physical Disability and Independence scales)、HD运动评定量表(HD motor rating scale)(HDMRS)、HD功能能力量表(HD functional capacity scale)(HDFCS)和神经定量检查(QNE)的元素。其他有效用于确定HD症状改善的测试可包括但不限于蒙特利尔认知评估(Montreal Cognitive Assessment)、脑成像(例如MRI)、分类流畅性测验(Category Fluency Test)、连线测验(Trail Making Test)、地图搜索(Map Search)、斯特鲁普字阅读测试(Map Search)、加快拍打任务(Speeded Tapping Task)和符号数字模式测试(Symbol Digit Modalities

Test)。

[0151] 在本发明的一些方面中,使用用于治疗具有HD的人的方法。如上文所述,HD以常染色体显性遗传的方式遗传且由HTT基因中的CAG重复扩展导致。rAAV颗粒可包括例如编码靶向HTT的治疗多肽或核酸的异源核酸。青少年发病的HD最经常从父系遗传。亨廷顿疾病样表型已与其他基因座如HDL1、PRNP、HDL2、HDL3和HDL4相关。认为其他基因座可修饰HD症状的表现,包括GRIN2A、GRIN2B、MSX1、GRIK2和APOE基因中的突变。

[0152] 在一些实施方案中,重组病毒颗粒通过将病毒颗粒注射至纹状体进行。纹状体内施用将重组病毒颗粒递送至脑部区域、纹状体(包括壳核和尾状核),这受HD高度影响。此外,且不希望受理论限制,认为注射入纹状体的重组病毒颗粒(例如rAAV颗粒)还可分散(例如通过逆行转运)至脑部的其他区域,包括但不限于投射区域(例如大脑皮质)。在一些实施方案中,重组病毒颗粒通过对流增强递送递送(例如对流增强递送至纹状体)。

[0153] 在一些实施方案中,转基因(例如本文所述的异源核酸)与启动子可操作地连接。示例性启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)即刻早期启动子、GUSB启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猴病毒40(SV40)启动子和CK6启动子、转甲状腺素启动子(TTR)、TK启动子、四环素反应性启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合体肝脏特异性启动子(LSP)、E2F启动子、端粒酶(hTERT)启动子;巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子(CAG启动子;Niwa等, *Gene*, 1991, 108 (2): 193-9)和延伸因子1- α 启动子(EF1- α)启动子(Kim等, *Gene*, 1990, 91 (2): 217-23和Guo等, *Gene Ther.*, 1996, 3 (9): 802-10)。在一些实施方案中,所述启动子包含人 β -葡糖醛酸糖苷酶启动子或与鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子连接的巨细胞病毒增强子。所述启动子可以是组成型、诱导型或阻遏型启动子。在一些实施方案中,本发明提供重组载体,其包含与CBA启动子可操作连接的编码本发明异源核酸的核酸。在一些实施方案中,启动子是CBA启动子、最小CBA启动子、CMV启动子或GUSB启动子。

[0154] 组成型启动子的实例包括但不限于逆转录病毒劳斯肉瘤病毒(retroviral Rous sarcoma virus) (RSV) LTR启动子(任选地具有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地具有CMV增强子)[参见例如Boshart等, *Cell*, 41: 521-530 (1985)], SV40启动子, 二氢叶酸还原酶启动子、13-肌动蛋白启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子和EFLA启动子[Invitrogen]。

[0155] 诱导型启动子允许调节基因表达且可通过外源补给化合物、环境因素如温度或特定的生理状态(例如急性期、细胞的特定分化状态或仅在复制细胞中)的存在来调节。诱导型启动子和诱导系统可从多种商业来源获得,包括但不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。已描述了许多其他的系统且可由本领域的技术人员容易地选择。通过外源补给启动子调节的诱导型启动子的实例包括锌诱导羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)-诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO 98/10088);蜕皮激素昆虫启动子(No等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3346-3351 (1996))、四环素阻遏系统(Gossen等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5547-5551 (1992))、四环素诱导系统(Gossen等, *Science*, 268: 1766-1769 (1995), see also Harvey等, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2: 512-518 (1998))、RU486-诱导系统(Wang等, *Nat. Biotech.*, 15: 239-243 (1997)和Wang等, *Gene Ther.*, 4: 432-441 (1997))和雷帕霉素-诱导系统(Magari等, *J. Clin. Invest.*, 100: 2865-2872 (1997))。其

他可在该背景中有效的诱导型启动子类型是通过特定生理状态调节的那些,例如温度、急性期、细胞的特定分化状态或仅在复制中的细胞。

[0156] 在另一实施方案中,可使用用于转基因的天然启动子或其片段。当预期表达的转基因应模拟天然表达时,天然启动子可以是优选的。当转基因的表达必须暂时或发展性或以组织特异性的方式或响应特定转录刺激调节时,可以使用天然启动子。在进一步的实施方案中,也可使用其他天然表达控制元件如增强子元件、多聚腺苷酸化位点或Kozak共有序列以模拟天然表达。

[0157] 在一些实施方案中,调节序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况中,组织特异性调节序列结合以组织特异性的方式诱导转录的组织特异性转录因子。这种组织特异性调节序列(例如启动子、增强子等)为本领域熟知。示例性组织特异性调节序列包括但不限于下列组织特异性启动子:神经性如神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen等, *Cell.Mol.Neurobiol.*, 13:503-15 (1993))、神经丝轻链基因启动子(Piccioli等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 88:5611-5 (1991))和神经元特异性vgf基因启动子(Piccioli等, *Neuron*, 15:373-84 (1995))。在一些实施方案中,组织特异性启动子是选自下组的基因启动子:神经元细胞核(NeuN)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、腺瘤性结肠息肉病(APC)和离子钙结合适配分子1(Iba-1)。其他合适的组织特异性启动子对本领域的技术人员将是显而易见的。在一些实施方案中,启动子是鸡 β -肌动蛋白启动子。

[0158] 在一些实施方案中,启动子在CNS的细胞中表达异源核酸。由此,在一些实施方案中,本发明的治疗多肽或治疗核酸可用于治疗CNS病症。在一些实施方案中,启动子在脑细胞中表达异源核酸。脑细胞可指本领域已知的任何脑细胞,包括但不限于神经元(如感觉神经元、运动神经元、中间神经元、多巴胺能神经元、中型多棘神经元、胆碱能神经、GABA能神经元、锥体神经元等)、神经胶质细胞(如小神经胶质细胞(microglia)、大胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞、径向胶质细胞等)、脑实质细胞、小神经胶质细胞(microglial cell)、室管膜细胞和/或浦肯野(Purkinje)细胞。在一些实施方案中,启动子在神经元和/或神经胶质细胞中表达异源核酸。在一些实施方案中,神经元是尾状核的中型多棘神经元、壳核的中型多棘神经元、皮质层IV的神经元和/或皮质层V的神经元。

[0159] 在CNS细胞、脑细胞、神经元和神经胶质细胞中表达转录物(例如异源转基因)的多种启动子为本领域已知且描述于本文。这种启动子可包含与所选基因或异源控制序列相关的控制序列。经常,有效的异源控制序列包括源自编码哺乳动物或病毒基因的序列的那些。实例包括但不限于SV40早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒LTR启动子、腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP)、单纯疱疹病毒(HSV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子如CMV即刻早期启动子区(CMVIE)、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、合成的启动子、杂交启动子等等。此外,也可使用源自非病毒基因如鼠类金属硫蛋白基因的序列。这种启动子序列为商业上可从例如Stratagene(San Diego, CA)得到。可使用CNS-特异性启动子和诱导型启动子。CNS-特异性启动子的实例包括但不限于分离自CNS-特异性基因如髓鞘碱性蛋白(MBP)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)的那些。诱导型启动子的实例包括对于蜕皮激素、四环素、金属硫蛋白、缺氧(hypoxia)等响应的DNA元件。

[0160] 本发明涵盖重组病毒基因组用于将一个或多个编码如本文所述的RNAi的核酸序列导入或包装入AAV病毒颗粒的用途。重组病毒基因组可包括任何元件以建立异源转基因

的表达,例如,启动子、异源核酸、ITR、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择性标记物、内含子、多聚A信号和/或复制起点。在一些实施方案中,rAAV载体包含一个或多个增强子、剪接供体/剪接受体对、基质衔接位点或多聚腺苷酸化信号。

[0161] 在一些实施方案中,包含编码治疗核酸或多肽的载体的rAAV颗粒有效量的施用在或邻近施用位点(例如纹状体和/或皮质)或在施用位点的更远处转导细胞(例如CNS细胞、脑细胞、神经元和/或神经胶质细胞)。在一些实施方案中,转导了多于约下列任何比率 of 的神经元:5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或100%。在一些实施方案中,转导了约5%至约100%、约10%至约50%、约10%至约30%、约25%至约75%、约25%至约50%或约30%至约50%的神经元。鉴别通过表达miRNA的重组病毒颗粒转导的神经元的方法为本领域已知;例如,免疫组化、RNA检测(例如qPCR、Northern印迹、RNA-seq、原位杂交等)或使用共表达标记物如可使用增强的绿色荧光蛋白以检测表达。

[0162] 在一些方面中,本发明提供包含重组自身互补基因组(例如自身互补的rAAV载体)的病毒颗粒。具有自身互补载体基因组的AAV病毒颗粒和自身互补的AAV基因组的使用方法描述于美国专利号6,596,535;7,125,717;7,465,583;7,785,888;7,790,154;7,846,729;8,093,054和8,361,457和Wang Z.,等,(2003) Gene Ther 10:2105-2111,其每一篇以其全文通过提述并入本文。包含自身互补基因组的rAAV将凭借其部分互补序列(例如异源核酸的互补编码和非编码链)迅速形成双链DNA分子。在一些实施方案中,载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码核酸的互补物的第二核酸序列,其中第一核酸序列可与第二核酸序列沿其长度的大部分或全部形成链内碱基对。

[0163] 在一些实施方案中,第一异源核酸序列和第二异源核酸序列通过突变的ITR(例如右侧ITR)连接。在一些实施方案中,ITR包含多核苷酸序列5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:1)。突变的ITR包含含有末端解析序列的D区的缺失。作为结果,在复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR裂解病毒基因组且由此以5'-3'包含下列的重组病毒基因组将包装入病毒衣壳:AAV ITR、包括调节序列的第一异源多核苷酸序列、突变的AAV ITR、与第一异源多核苷酸反向的第二异源多核苷酸和第三AAV ITR。

[0164] V.病毒颗粒和产生病毒颗粒的方法

[0165] rAAV病毒颗粒

[0166] 本发明提供用于施用rAAV颗粒的方法和系统。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含rAAV载体。在一些实施方案中,病毒颗粒是包含含有侧翼为一个或两个AAV反向末端重复(ITR)的异源核酸的核酸的重组AAV颗粒。核酸在AAV颗粒中衣壳化。AAV颗粒还包含衣壳蛋白。在一些实施方案中,核酸包含转录方向的感兴趣的编码序列(例如异源核酸)可操作地连接的元件、包括转录初始和终止序列的控制序列,由此形成表达盒。表达盒在5'和3'末端侧翼为至少一个功能性AAV ITR序列。“功能性AAV ITR序列”意为功能目的在于挽救、复制和包装AAV病毒体的ITR序列。参见Davidson等(2000) PNAS 97:3428-32;Passini等(2003) J. Virol. 77:7034-40;和Pechan等(2009) Gene Ther. 16:10-16,上述所有在本文都以其全文通过提述并入。对于实践本发明的一些方面,所述重组载体包含至少全部用于衣壳化所必需的AAV序列和用于由rAAV感染的物理结构。AAV ITR在本发明载体中的用途不需具有野

生型核苷酸序列(例如,如Kotin Hum.Gene Ther. (1994) 5:793-801中所述),而可由核苷酸的插入、缺失或取代改变,或所述AAV ITR可源自数种AAV血清型中的任一种。已知多于40种的AAV血清型,且新的血清型和存在的血清型的变体被持续鉴定。参见Gao等(2002)PNAS 99:11854-6;Gao等(2003)PNAS 100:6081-6;和Bossis等(2003)J.Virol.77:6799-810。任何AAV血清型的使用都应认为在本发明的保护范围之内。rAAV载体可以是源自任何AAV血清型的载体,包括但不限于AAV ITR为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV等等。在一些实施方案中,AAV ITR中的核酸为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITRs等等。在一些实施方案中,AAV中的核酸包含AAV2ITR。

[0167] 在一些实施方案中,载体可包含填充(stuffer)核酸。在一些实施方案中,填充核酸可编码绿色荧光蛋白。在一些实施方案中,填充核酸可位于启动子和编码RNAi的核酸之间。

[0168] 在进一步的实施方案中,rAAV颗粒包含AAV1衣壳、AAV2衣壳、AAV3衣壳、AAV4衣壳、AAV5衣壳、AAV6衣壳(例如野生型AAV6衣壳或变体AAV6衣壳如ShH10如U.S.PG Pub.2012/0164106中所述)、AAV7衣壳、AAV8衣壳、AAVrh8衣壳、AAVrh8R衣壳、AAV9衣壳(例如野生型AAV9衣壳或U.S.PG Pub.2013/0323226中所述的修饰的AAV9衣壳)、AAV10衣壳、AAVrh10衣壳、AAV11衣壳、AAV12衣壳、酪氨酸衣壳突变体、肝素结合衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVAAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳(例如AAV-DJ/8衣壳、AAV-DJ/9衣壳或U.S.PG Pub.2012/0066783中所述的任何其他衣壳)、AAV2N587A衣壳、AAV2E548A衣壳、AAV2N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1衣壳或美国专利号8,283,151或国际公开号W0/2003/042397中所述的AAV衣壳。在一些实施方案中,突变的衣壳蛋白保持形成AAV衣壳的能力。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV5酪氨酸突变衣壳(Zhong L.等,(2008)Proc Natl Acad Sci U S A 105(22):7827-7832。在进一步的实施方案中,rAAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白(Gao,等,J.Virol.2004,78(12):6381)。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV1衣壳蛋白或其突变体。在其他实施方案中,rAAV颗粒包含AAV2衣壳蛋白或其突变体。在一些实施方案中,AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、或AAVrh10。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV血清型1(AAV1)衣壳。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV血清型2(AAV2)衣壳。

[0169] 使用不同的AAV血清型以优化特定靶细胞的转导或以靶向特定靶组织(例如CNS组织)内的特定细胞类型。rAAV颗粒可包含源自相同血清型和不同血清型(例如混合血清型)的病毒蛋白和病毒核酸。例如,在一些实施方案中,rAAV颗粒可包含AAV1衣壳蛋白和至少一个AAV2ITR或其可包含AAV2衣壳蛋白和至少一个AAV1ITR。本文提供了用于产生rAAV颗粒的AAV血清型的任何组合,如每个组合都在本文明确叙述一般。在一些实施方案中,本发明提供包含本公开的AAV1衣壳和rAAV载体的rAAV颗粒(例如包含异源核酸的表达盒),侧翼为至少一个AAV2ITR。在一些实施方案中,本发明提供包含AAV2衣壳的rAAV颗粒。在一些实施方案中,ITR和衣壳源自AAV2。在一些实施方案中,ITR源自AAV2且衣壳源自AAV1。

[0170] AAV颗粒的产生

[0171] 用于产生rAAV载体的多种方法为本领域已知,包括转染、稳定细胞系产生和感染性杂交病毒产生系统(其包括腺病毒-AAV杂交、疱疹病毒-AAV杂交(Conway, JE等, (1997) J.Virology 71(11):8780-8789)和杆状病毒-AAV杂交)。用于产生rAAV病毒颗粒的rAAV生产培养都需要:1)合适的宿主细胞,包括例如,衍生自人的细胞系如HeLa、A549或293细胞或在杆状病毒产生系统的情况中昆虫衍生细胞系如SF-9;2)合适的辅助病毒功能,由野生型或突变腺病毒(如温度敏感的腺病毒)、疱疹病毒、杆状病毒或提供辅助功能的质粒构建体提供;3)AAV rep和cap基因和基因产物;4)侧翼为至少一个AAV ITR序列的核酸(如治疗核酸);和5)合适的介质或介质组分以支持rAAV产生。在一些实施方案中,AAV rep和cap基因产物可来自任何AAV血清型。一般而言但不是强制性的,AAV rep基因产物为与rAAV载体基因组的ITR相同的血清型,只要rep基因产物可发挥功能以复制和包装rAAV基因组。本领域已知的合适介质可用于产生rAAV载体。该介质包括但不限于Hyclone Laboratories和JRH生成的介质,包括改进的Eagle介质(MEM)、杜贝尔克氏改进的Eagle介质(DMEM),定制配方如描述于美国专利号6,566,118的那些和如美国专利号6,723,551中所述的Sf-900II SFM介质,其每一篇以其全文通过提述并入,特别是关于用于产生重组AAV载体的定制介质配方。在一些实施方案中,AAV辅助功能由腺病毒或HSV提供。在一些实施方案中,AAV辅助功能由杆状病毒提供且宿主细胞是昆虫细胞(例如草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (Sf9)细胞)。

[0172] 在一些实施方案中,rAAV颗粒可通过三重转染的方法产生,如下文提供的示例性三重转染方法。简言之,包含基因和衣壳基因的质粒以及辅助腺病毒质粒可转染(例如使用磷酸钙方法)入细胞系(例如HEK-293细胞),且可收集并纯化病毒。如此,在一些实施方案中,rAAV颗粒可通过编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染入宿主细胞而产生,其中所述核酸转染至宿主细胞生成能够产生rAAV颗粒的细胞。

[0173] 在一些实施方案中,rAAV颗粒可由生产细胞系方法产生,如下文提供的示例性生产细胞系方法(还参见(参照Martin等, (2013) HumanGeneTherapy Methods 24:253-269)。简言之,细胞系(例如HeLa细胞系)可用包含rep基因、衣壳基因和启动子-异源核酸序列的质粒稳定转染。可筛选细胞系以选择先导克隆用于rAAV产生,其随后可扩大至生产生物反应器并用腺病毒(例如野生型腺病毒)作为辅助感染以初始rAAV产生。随后可收获病毒,腺病毒可失活(例如通过加热)和/或去除,且可纯化rAAV颗粒。如此,在一些实施方案中,通过包含一个或多个编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸的生产细胞系产生rAAV颗粒。

[0174] 在一些方面中,提供了用于产生任何如本文所述的rAAV颗粒的方法,其包括(a)在产生rAAV颗粒的条件下培养宿主细胞,其中所述宿主细胞包含(i)一个或多个AAV包装基因,其中每种所述AAV包装基因编码AAV复制和/或衣壳化蛋白;(ii) rAAV促载体,其包含编码如本文所述的侧翼为至少一个AAV ITR的异源核酸的核酸,和(iii) AAV辅助功能;和(b)回收由宿主细胞产生的rAAV颗粒。在一些实施方案中,所述至少一个AAV ITR选自下组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR等等。在一些实施方案中,所述衣壳化蛋白选自下组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、

AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳蛋白或其突变体。在一些实施方案中,衣壳蛋白是AAV5衣壳蛋白,其包括具有酪氨酸衣壳突变的AAV5衣壳蛋白。在一些实施方案中,衣壳蛋白是AAV5衣壳蛋白,其包括具有酪氨酸衣壳突变的AAV5衣壳蛋白且ITR是AAV2ITR。在进一步的实施方案中,rAAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV1衣壳和含有AAV2ITR、突变的AAV2ITR和编码治疗转基因/核酸的核酸的重组基因组。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV2ITR。

[0175] 本发明适当的rAAV生产培养基可以0.5%-20% (v/v或w/v) 的水平补充血清或血清衍生的重组蛋白。可替换地,如本领域已知,rAAV载体可在无血清条件(也称为不具有动物生产物的介质)中产生。本领域的技术人员可以理解的是设计以支持rAAV载体产生的销售或定制的介质还可补充一个或多个本领域已知的细胞培养组分,包括但不限于葡萄糖、维生素、氨基酸和/或生长因子,进而增加培养基中rAAV的滴度。

[0176] rAAV生产培养在多种适于利用的特定宿主细胞的条件下(在广泛的温度范围、持续多种时间长度等)下生长。如本领域已知,rAAV生产培养包括附着-依赖培养,其可在适于附着-依赖的容器如例如滚瓶、空心纤维过滤器、微载体和填充床或流化床生物反应器中培养。rAAV载体产生培养还可包括悬浮适应的宿主细胞如HeLa、293和SF-9细胞,其可以多种方式培养包括例如旋转烧瓶、搅拌釜生物反应器和一次性系统如Wave气囊系统。

[0177] 本发明的rAAV载体颗粒可从rAAV生产培养基通过裂解生产培养的宿主细胞或通过从生产培养用过的介质(假定细胞在本领域已知引起rAAV颗粒从完整细胞释放入介质的条件下培养)收获,如美国专利号6,566,118中更详细的描述。裂解细胞的适当方法为本领域已知且包括例如多次冷冻/融化循环、超声、微流体化和用化学物质的治疗如洗涤剂和/或蛋白酶。

[0178] 在进一步的实施方案中,纯化了rAAV颗粒。本文使用的术语“纯化”包括缺少至少一部分其他组分的rAAV颗粒的制剂,其可存在于rAAV颗粒天然存在处或初始制备处。因此,例如,分离的rAAV颗粒可使用纯化技术制备以从来源混合物如培养裂解物或生产培养上清液将其富集。富集可以多种方式测量,如例如,通过存在于溶液中的DNA酶抗性颗粒(DRP)或基因组拷贝(gc)部分,或通过感染性,或其可相对在来源混合物中存在的第二、潜在干扰物质如污染物(包括生产培养基污染物或进程内污染物,包括辅助病毒、介质组分等)测量。

[0179] 在一些实施方案中,澄清rAAV生产培养收获物以去除宿主细胞碎片。在一些实施方案中,生产培养收获物通过过滤由系列深度过滤器包括例如等级D0HC Millipore Millistak+HC Pod过滤器、等级A1HC Millipore Millistak+HC Pod过滤器和0.2μm Filter Opticap XL10 Millipore Express SHC Hydrophilic Membrane过滤器收获。澄清还可通过多种其他本领域已知的标准技术实现,如通过任何0.2μm或本领域已知的更大孔径的醋酸纤维素过滤器离心或过滤。

[0180] 在一些实施方案中,rAAV生产培养收获物进一步用Benzonase®处理以消化存在于生产培养中的任何高分子量DNA。在一些实施方案中,Benzonase®消化在本领域已知的

标准条件下实施,包括例如1-2.5单位/ml终浓度的 **Benzonase**[®] 在室温至37℃进行30分钟至数小时的时间。

[0181] 可使用一个或多个下列纯化步骤分离或纯化rAAV颗粒:平衡离心;流通阴离子交换过滤;用于浓缩rAAV颗粒的切向流过滤(TFF);通过磷灰石色谱的rAAV捕获;辅助病毒的加热灭活;通过疏水相互作用层析的rAAV捕获;通过大小排阻色谱(SEC)的缓冲交换;纳滤;和通过阴离子交换色谱、阳离子交换色谱或亲和层析的rAAV捕获。这些步骤可单独、在多种组合中或以不同顺序使用。在一些实施方案中,所述方法包括以如下所述的顺序的全部步骤。已发现纯化rAAV颗粒的方法,例如,Xiao等,(1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232;美国专利号6,989,264和8,137,948和WO 2010/148143中。

[0182] 在一些实施方案中,rAAV颗粒在药物组合物中。药物组合物可适于任何本文所述的施用模式。包含编码治疗转基因/核酸的核酸的重组病毒颗粒的药物组合物可导入CNS(例如纹状体和/或大脑皮质)。

[0183] 在一些实施方案中,rAAV颗粒在包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物中。如本领域已知,药学上可接受的赋形剂是相对惰性的物质,其促进药理学上有效物质的施用且可作为液体溶液或悬液、作为乳液或作为使用前适于溶解或悬浮在液体中固体形式补给。例如,赋形剂可给予形式或一致性,或作为稀释剂发挥作用。适当的赋形剂包括但不限于稳定剂、润湿剂和乳化剂、用于不同渗透压的盐、封装剂、pH缓冲物质和缓冲剂。这种赋形剂包括任何适于直接递送至眼部的药物作用剂,其可施用而无过度的毒性。药学上可接受的赋形剂包括但不限于山梨糖醇、多种TWEEN化合物中的任何,和液体如水、盐水、甘油和乙醇。药学上可接受的盐可包括其中,例如,无机酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;和有机酸的盐如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。药物上可接受的赋形剂的彻底讨论可在REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub.Co., N.J. 1991)中得到。

[0184] 在一些实施方案中,施用的化合物包括rAAV颗粒和泊洛沙姆。术语“泊洛沙姆”可涵盖许多化合物,因为不同长度的聚氧化丙烯和聚氧乙烯链可组合使用。例如,泊洛沙姆可具有 $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ 的化学式,其中n(即聚氧乙烯链的长度)具有约60至约150的值,且m(即聚氧丙烯链的长度)具有约25至约60的值。

[0185] 在一些实施方案中,泊洛沙姆是泊洛沙姆188(例如CAS No. 9003-11-6)。泊洛沙姆可通过指代其大约的分子量和聚氧乙烯含量百分比的编号系统描述。这些值经常指代泊洛沙姆组合物中的平均值,而非组合物中每个泊洛沙姆分子的绝对值。在这种方法学下,前两个数字乘以100以给出聚氧丙烯嵌段的近似分子量,且第三个数字乘以10以给出聚氧乙烯嵌段的重量百分数。例如,泊洛沙姆188可指代如上所述式中具有约80的n值和具有约27的m值的泊洛沙姆。泊洛沙姆188可具有约7680至约9510g/mol的平均分子量。

[0186] 在商品名如**PLURONIC**[®]下销售的泊洛沙姆可在不同方法学下命名。可使用字母以表明物理状态(例如F用于固体、P用于膏或L用于液体)。2或3位数字可用于表明化学性质。前一或两位数字可乘以300以给出聚氧丙烯嵌段的近似分子量,且第三数字乘以10以给出聚氧乙烯嵌段的重量百分比。例如,**PLURONIC**[®]或**LUTROL**[®]F68可指如上所述式中具有约80的n值和具有约27的m值的固体泊洛沙姆。因此,在一些实施方案中,泊洛沙姆188可以是**PLURONIC**[®]F68或**LUTROL**[®]F68。

[0187] 在一些实施方案中,泊洛沙姆在组合物中的浓度范围为约0.0001%至约0.01%。在一些实施方案中,泊洛沙姆在组合物中的浓度少于约下列任何百分比:0.01、0.005、0.001或0.0005。在一些实施方案中,泊洛沙姆在组合物中的浓度多于下列任何百分比:0.0001、0.0005、0.001或0.005。也就是说,泊洛沙姆在组合物中各浓度可以是具有0.01、0.005、0.001或0.0005上限和独立选择的下限0.0001、0.0005、0.001或0.005的任何百分比范围,其中所述下限少于所述上限。在一些实施方案中,泊洛沙姆在组合物中的浓度为约0.001%。

[0188] 在一些实施方案中,所述组合物进一步包含氯化钠。在一些实施方案中,组合物中氯化钠的浓度范围为约100mM至约250mM。在一些实施方案中,组合物中氯化钠的浓度少于大约任何下列浓度(mM):250、225、200、175、150或125。在一些实施方案中,组合物中氯化钠的浓度多于大约任何下列浓度(mM):100、125、150、175、200或225。也就是说,组合物中氯化钠的浓度可以是具有250、225、200、175、150或125上限和独立选择的下限100、125、150、175、200或225的任何浓度范围(mM),其中所述下限少于所述上限。在一些实施方案中,组合物中氯化钠的浓度为约180mM。

[0189] 在一些实施方案中,组合物进一步包含磷酸钠。磷酸钠可指任何单一种类的磷酸钠(例如磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸三钠等等),或其可指磷酸钠缓冲剂,即磷酸二氢钠和磷酸氢二钠溶液的混合物。跨一系列pH值的磷酸钠缓冲剂的配方可在多种标准分子生物学方法中获得,如Promega Protocols&Applications Guide,“Buffers for Biochemical Reactions,”附录B的C部分。

[0190] 在一些实施方案中,磷酸钠在组合物中的浓度为约5mM至约20mM。在一些实施方案中,磷酸钠在组合物中的浓度少于大约任何下列浓度(mM):20、15或10。在一些实施方案中,磷酸钠在组合物中的浓度多于大约任何下列浓度(mM):5、10或15。也就是说,磷酸钠在组合物中的浓度可以是具有20、15、或10的上限和独立选择的下限5、10或15的任何浓度范围(mM),其中所述下限少于所述上限。在一些实施方案中,组合物中磷酸钠的浓度为约10mM。

[0191] 在一些实施方案中,组合物中磷酸钠的pH为约7.0至约8.0。例如,在一些实施方案中,磷酸钠在组合物中的pH为约7.0、约7.2、约7.4、约7.5、约7.6、约7.8或约8.0。在一些实施方案中,磷酸钠在组合物中的pH为约7.5。本文所述的磷酸钠的任何pH值可以与上文所述的任何磷酸钠浓度值组合。例如,在一些实施方案中,磷酸钠在组合物中的浓度为约10mM,且pH为约7.5。

[0192] 在一些实施方案中,包含本文所述的rAAV颗粒和药学上可接受的载剂的药物组合物适于施用于人。这种载剂为本领域熟知(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp.1035-1038和1570-1580)。在一些实施方案中,药物组合物进一步包含泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188,如PLURONIC®或LUTROL®F68)。在一些实施方案中,包含本文所述的rAAV和药学上可接受的载剂的药物组合物适于注射入哺乳动物的CNS。

[0193] 这种药学上可接受的载剂可以是无菌液体,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、矿物油等。还可采用盐水溶液和葡萄糖水溶液、聚乙二醇(PEG)和甘油溶液作为液体载剂,特别是用于可注射的溶液。药物组合物可进一步包含其他成分,例如防腐剂、缓冲剂、张力剂、抗氧化剂和稳定剂、非离子型润湿剂或澄清剂、增粘剂

等。本文描述的药物组合物可包装成单一单位剂量或多重剂量形式。所述组合物一般配制为无菌或基本上等渗的溶液。

[0194] VI. 用于rAAV颗粒递送的系统

[0195] 还提供了用于在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达异源核酸的系统,其包含:(a) 含有rAAV颗粒的组合物,其中所述rAAV颗粒包含编码异源核酸的rAAV载体;和(b) 用于递送rAAV颗粒至纹状体的装置。本发明的系统和装置可用于递送本文所述的任何rAAV颗粒至哺乳动物的CNS(例如纹状体)。如上文所述,递送至纹状体的rAAV颗粒可用于导入编码用于在大脑皮质和纹状体中表达的异源核酸的rAAV载体。

[0196] 在一些实施方案中,rAAV颗粒通过对流增强递送(CED)进行递送。CED基于在压力下将输注物(例如包含rAAV颗粒的组合物)泵入CNS,其中克服了组织液的静水压。其将输注物与CNS周围血管接触,如泵一般将其利用以使输注物通过对流分布并增强其递送的程度(参见例如Hadaczek等,(2006) Hum. Gene Ther. 17:291-302;Bankiewicz等,(2000) Exp. Neurol. 164:2-14;Sanftner, LM等,(2005) Exp. Neurol. 194(2):476-483;Forsayeth, JR等,(2006) Mol. Ther. 14(4):571-577;美国专利号6,953,575;美国专利公开号2002/0141980;美国专利公开号2007/0259031;WO 99/61066;和WO 2010/088560)。

[0197] 如本文所述使用CED的优势是贯穿脑部的输注物的增强分布。CED可导致在脑内注射位点的改进的递送(例如纹状体、尾状核和/或壳核)。此外,递送至脑部的其他区域(例如大脑皮质、额叶皮质、前额叶皮质的关联区域、运动前皮质、初级躯体感觉皮质区和/或初级运动皮质)可通过CED实现。不希望收到理论限制,还可认为注射入纹状体的重组病毒颗粒(例如rAAV颗粒)也可分散(例如通过逆行转运)至脑部的其他区域,包括但不限于投射区(例如皮质)。

[0198] 在一些实施方案中,使用CED递送系统递送rAAV颗粒。AAV颗粒可通过CED递送(参见例如WO 99/61066)。如本文所述,CED可使用任何本文所述的系统实现。用于CED(例如用于组合物包括rAAV颗粒的递送)的装置为本领域已知且一般采用泵(例如如下文所述的渗透和/或输注泵)和注射装置(例如导管、套管等)。任选地,可使用成像技术以引导注射装置和/或监测输注物(例如包含rAAV颗粒的组合物)的递送。注射装置可插入受试者中的CNS组织。本领域的技术人员能确定用于在靶CNS组织中放置注射装置的合适坐标。在一些实施方案中,放置通过例如受试者脑部的CT和/或MRI成像获得的解剖图实现以引导注射装置至靶CNS组织。在一些实施方案中,可实施iMRI和/或递送的实时成像。在一些实施方案中,通过本发明的方法将装置用于施用rAAV颗粒至哺乳动物。

[0199] 在一些实施方案中,可实施术中磁共振成像(iMRI)和/或递送的实时成像。在一些实施方案中,通过本发明的方法将装置用于施用rAAV颗粒至哺乳动物。本领域已知iMRI为在患者手术过程中用于基于MRI的成像的技术,其帮助确认成功的手术操作(例如递送rAAV颗粒至CNS)并减少损伤其他组织部分的风险(进一步描述参见例如Fiandaca等,(2009) Neuroimage 47Suppl.2:T27-35)。在一些实施方案中,追踪剂(例如MRI对比增强剂)可与输注物(例如包含rAAV颗粒的组合物)共递送以提供输注物组织分布的实施监测。参见例如Fiandaca等,(2009) Neuroimage 47Suppl.2:T27-35;U.S. PG Pub2007/0259031;和美国专利号7,922,999。追踪剂的使用可报告递送的停止。其他本领域已知的追踪或成像方式也可用于追踪输注物的分布。

[0200] 在一些实施方案中,rAAV颗粒可通过标准立体注射使用本领域已知用于rAAV颗粒递送的装置和方法施用。一般地,这些方法可使用注射装置、用于将靶向用于递送的组织区翻译成坐标系的规划系统(例如沿侧-侧、背-腹和前部-尾部轴的参数),和根据规划的坐标用于立体定位的装置(立体定向装置,任选地包括探头和用于与坐标系统对齐固定头部的结构)。可有效用于MRI-引导的手术和/或立体注射系统的非限制性实例是ClearPoint®系统(MRI Interventions,Memphis,TN)。

[0201] 在一些实施方案中,用于对流增强递送的装置包括泵(例如渗透泵和/或输注泵)。渗透和/或输注泵为商业上可得到的(例如来自ALZET® Corp.,Hamilton Corp.,ALZA Inc.Palo Alto,CA)。泵系统可以是可植入的。已发现示例性泵系统例如美国专利号7,351,239;7,341,577;6,042,579;5,735,815和4,692,147。在一些实施方案中,泵是手动泵。用于CED的示例性装置(包括抗返流和阶梯套管)可发现于WO 99/61066和WO 2006/042090,其在本文通过提述以其全文并入。

[0202] 在一些实施方案中,用于对流增强递送的装置包括抗返流套管(例如无返流步骤设计套管)。可在例如Krauze等,(2009)Methods Enzymol.465:349-362;U.S.PG Pub 2006/0135945;U.S.PG Pub 2007/0088295和PCT/US08/64011中发现进一步描述和示例性抗返流套管。在一些实施方案中,仅使用一个套管。在其他实施方案中,使用多于一个的套管。在一些实施方案中,用于对流增强递送的装置包括与产生足够的压力以引起输注物以受控速率流过套管至靶组织的泵连接的抗返流套管。可使用任何合适的流速由此颅内压以合适的水平维持从而不损伤脑组织。

[0203] 在一些实施方案中,套管是阶梯套管。如例如WO 2006/042090中所述,阶梯套管具有多个阶梯(例如WO 2006/042090的图1中的4个)。最接近套管远端的阶梯是首先进入靶组织的那些,因此,进入靶组织(例如纹状体)的阶梯数目将依赖于所需的穿透的深度以达到受试者中靶标。关于递送至脑,考虑到待治疗的受试者的尺寸和靶向的脑内位置,操作者可轻松确定穿透的合适深度。

[0204] 套管可与泵通过管系统连接。管道通过套管管腔延伸且输注物可通过该管道递送。在包含管道的实施方案中,管道可用套管的远端冲洗。可替换地,管道从套管远端延伸,在这些实施方案中,管道延伸的量可依赖于应用发生变化。一般地,管道将从套管约1mm延伸至约1cm(或其间的任何长度),例如约1至约50mm(或其间的任何长度)或约1mm至约25mm(或其间的任何长度,包括但不限于1mm、2mm、3mm、4mm、5mm、6mm、7mm、8mm、9mm、10mm、11mm、12mm、13mm、14mm、15mm、16mm、17mm、18mm、19mm、20mm、21mm、22mm、23mm、24mm或25mm),如其远端外的10mm。

[0205] 通过套管延伸的管道可具有在一个或多个区具有涂层或周围材料,例如,以保护管道与输注物接触。因此,在一些实施方案中,管道(例如FEP(Teflon)管道)保护熔融石英管道部分延伸至不锈钢套管近端。该熔融石英管道可与注射器通过任何合适的方式连接,包括但不限于Luer压缩接头,且注射器通过注射器泵驱动(手工、电子和/或电脑)。显而易见的是注射器的大小可通过操作者选择以递送合适的量的产物。因此,可使用1mL、2.5mL、5mL或甚至更大的注射器。

[0206] 阶梯套管可由多种生理上可接受的材料制成,包括但不限于不锈钢(例如316SS或304SS)、金属、金属合金、聚合物、有机纤维、无机纤维和/或其组合。

[0207] 任选地,输注接触面(例如管道或涂层)可通过套管的内腔延伸。可使用多种材料用于输注接触面,包括但不限于金属、金属合金、聚合物、有机纤维、无机纤维和/或其组合。在一些实施方案中,产物接触表面不是不锈钢。在这种实施方案中,外部套管仍可由与靶组织生理上兼容的材料制成,但由于不存在产物接触,其不需要与生物活性剂或产品制剂兼容。

[0208] 在一些实施方案中,输注物的穿透进一步通过使用促进剂增强。促进剂能够进一步促进输注物递送至靶组织(例如CNS靶组织)。促进剂的非限制性实例是低分子量肝素(参见例如美国专利号7,922,999)。

[0209] 用于本文所述的药物组合物的合适包装为本领域已知,且包括例如小瓶(如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶、罐、软包装(例如密封的Mylar或塑料袋)等。这些制品可进一步灭菌和/或密封。

[0210] 本文进一步提供了用于治疗哺乳动物中CNS病症的方法,其包括根据本文所述的方法施用rAAV颗粒至哺乳动物。还提供了用于治疗哺乳动物中亨廷顿氏病的方法,其包括根据本文所述的方法使用如本文所述的系统施用rAAV颗粒至哺乳动物。

[0211] 本发明还提供了用于根据本发明的方法施用本文所述的rAAV颗粒至哺乳动物的套盒。所述套盒可包含本发明的任何rAAV颗粒或rAAV颗粒组合物。例如,该套盒可包含具有编码异源核酸的rAAV载体的rAAV颗粒,所述异源核酸至少在哺乳动物的大脑皮质和纹状体中表达。在一些实施方案中,该套盒进一步包含任何上文所述的装置或系统。

[0212] 在一些实施方案中,所述套盒进一步包含用于rAAV颗粒组合物CNS递送(例如递送至哺乳动物的纹状体)的说明。本文所述的套盒可进一步包括其他从市场或使用者的立场理想的材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器和具有用于实施本文所述的任何方法的说明的包装插页。也可包括合适的包装材料,且可以是任何本领域已知的包装材料,包括例如,小瓶(如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶、罐、软包装(例如密封的Mylar或塑料袋)等。这些制品可进一步灭菌和/或密封。在一些实施方案中,所述套盒包含使用任何本文所述的方法和/或rAAV颗粒用于治疗本文所述的CNS病症的说明。套盒可包括适于注射入个体CNS的药理学上可接受的载剂和一个或多个:缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器和具有用于实施注射入哺乳动物纹状体的说明的包装插页。

[0213] 在一些实施方案中,套盒进一步包含一个或多个缓冲剂和/或本文所述的药理学上可接受的赋形剂(例如如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(Mack Pub.Co., N.J.1991中所述)。在一些实施方案中,所述套盒包括一个或多个药理学上可接受的赋形剂、载剂、溶液和/或其他本文所述的成分。本文所述的套盒可以单一单位剂量或多重剂量形式包装。套盒的内容物一般配制成无菌且可冻干或可作为基本上等渗的溶液提供。

实施例

[0214] 通过参照下述实施例更充分地理解本发明。然而,它们不应解释为限制本发明的范围。应该理解的是:本文所述的实施例和实施方案仅出于说明目的,由其启示的不同修饰或改变将建议给本领域的技术人员而且也包括在本申请的精神和范畴及所附权利要求的范围内。

[0215] 实施例1:纹状体AAV1载体递送后广泛地GFP表达

[0216] 当经由对流增强递送 (CED) 进行递送时,评估了AAV1有效靶向恒河猴脑中纹状体和皮质结构的能力。将包含在巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子控制下的GFP cDNA的AAV载体使用CED输注入9只成年雄性恒河猴的尾状核和壳核(参见例如Bankiewicz等,(2000)Exp.Neurol.164:2-14和WO 2010/088560)。

[0217] 方法

[0218] 手术递送

[0219] 将九只成年雄性恒河猴(猕猴 (*Macaca mulatta*);8.9-11.9kg)包括在该研究中。全部动物接受AAV载体通过MRI-导向的CED方式尾状核和壳核的双侧输注(Richardson, R.M.等(2011)Neurosurgery 69:154-163;Richardson, R.M.等(2011)Stereotact.Funct.Neurosurg.89:141-151;Richardson, R.M.等(2011)Mol.Ther.19:1048-1057)。手术即刻前,用盐酸氯胺酮(10mg/kg)麻醉动物,称重、插管并保持在1-5%异氟醚。将头安装在立体框架,并将动物转移至MRI (Siemens 3.0T Trio MR单位)用于T1-加权计划扫描。扫描后,将动物转移至手术室并准备植入手术,且使用具有3-mm阶梯尖的陶瓷定制设计的熔融石英抗返流套管用于输注。临时引导套管使用标准方法双侧植入(每半球一只)。

[0220] 动物接受用2种不同的产生方获得的AAV1-eGFP或AAV2-eGFP载体双侧输注入尾状核和壳核:三重转染(TT)或生产细胞系(PCL)。载体浓度和剂量描述于表5中。如前文所述对动物测试了抗AAV1和抗AAV2中和抗体的存在且如果其给出抗体滴度为<1:32则认为是血清阴性(Bevan, A.K.等(2011)Mol.Ther.19:1971-1980)。全部动物的生存时间为AAV递送后1个月。

[0221] 每只动物接受多至三次微注射每半球以靶向尾状核和壳核(前连合和后连合)区域,如表2所示。为在MRI过程中视觉化输注分布,将Prohance (2mM钆特醇(gadoteridol))添加至病毒。使用对流增强递送(CED)方法将约30 μ l的AAV施用入尾状核60 μ l施用入壳核(即90 μ L每半球)。输注速率上升到最大5 μ L/分钟。

[0222] 表2.每位点实质剂量体积

[0223]

载体制造方法	剂量每半球(vg)	受试者号	靶结构	半球	给药位点数目	剂量体积(μL)
AAV1-eGFP (TT)	1.71×10^{11}	1	壳核	右侧	2	30 + 30
				左侧	2	30 + 30
			尾状核	右侧	1	30
				左侧	1	30
		2	壳核	右侧	2	30 + 30
				左侧	2	30 + 30
			尾状核	右侧	1	30
				左侧	1	30
		3	壳核	右侧	2	30 + 30
				左侧	2	30 + 30
			尾状核	右侧	1	30
				左侧	1	30
AAV2-eGFP (TT)	1.71×10^{11}	6	壳核	右侧	2	30 + 30
				左侧	1	60
			尾状核	右侧	1	30
				左侧	2	15 + 15
		7	壳核	右侧	1	60
				左侧	2	30 + 30
			尾状核	右侧	1	30
				左侧	1	30

[0224]

				左侧	1	30
AAV1-eGFP (PCL)	1.71x10 ¹¹	5	壳核	右侧	1	60
				左侧	1	60
			尾状核	右侧	1	30
				左侧	2	18 + 20
	左侧: 2.4x10 ¹¹ 右侧: 2.8x10 ¹¹	4	壳核	右侧	1	60
				左侧	1	60
			尾状核	右侧	2	56.4 + 31
				左侧	2	33.6 + 31
AAV2-eGFP (PCL)	1.71x10 ¹¹	8	壳核	右侧	1	62
				左侧	1	60
			尾状核	右侧	2	30 + 20
				左侧	1	30
		9	壳核	右侧	2	20 + 35
				左侧	2	42 + 19.6
			尾状核	右侧	1	30
				左侧	1	30

[0225] 第一批动物接受 1.7×10^{11} vg的AAV1-eGFP (TT) (n=3) 或AAV2-eGFP (TT) (n=2) 每半球。第二批动物接受 1.7×10^{11} vg的AAV1-eGFP (PCL) (n=2) 或 1.3×10^{11} vg的AAV2-eGFP (PCL) (n=2)。获得系列MRI以监测每个靶位点内的输注分布并提供实时反馈至团队。脑实质内给药步骤即刻,将动物转移至手术室,移除导向套管,并在解剖层封闭伤口部位。全部实验依照美国国立卫生研究院指导和由机构性动物护理和使用委员会批准的方法实施。手术即刻,将动物转移至MRI套件用于AAV给药步骤。每个受试者关于给药步骤的评论描述于下文表2中。

[0226] 给药步骤-治疗组2 (AAV1-eGFP TT)

[0227] 1号受试者,将约60 μ L的输注每半球经由两条轨迹(30 μ L/沉积物(deposit))施用至每壳核。来自前壳核输注的冠状图像显示了每个靶结构内大量的钆信号。在右侧半球中,在腹侧壳核中看到了轻微的血管周围运输和前连合内的分布。

[0228] 2号受试者,在0.127mL输注入壳核和0.207mL输注入丘脑后获得T1MRI。输注后T1MRI显示了右侧丘脑内过量的输注分布,其测量约1cm前-后方向和1cm背腹方向。冠状T1显示了靶位点内的钆分布,其朝内囊内侧延伸且朝背壳核优先延伸。大量输注包含于壳核边缘内,然而,经由血管周围间隙的运输也存在于内囊和前联合的白质。分析揭示了丘脑和壳核中钆输注体积(Vi)与分布体积(Vd)的比率为1:2。

[0229] 生活中的观察(In-life observation)

[0230] 动物健康和神经症状的详细观察在给药后基于每日实施5天;随后,每周一次实施详细的观察直至研究结束。实施了观察和每日死亡率检查。颅内给药前、收集血液步骤时和在尸检时实施体重评估。手术前的治疗组和实体剖检时之间未观察到体重的显著差异(图1)。收集全血、血清和脑脊液(CSF)用于血液学、血清化学、AAV1和AAV2衣壳抗体测定法和

eGFP mRNA水平分析。

[0231] 生活中血液收集和处理

[0232] 在注射前、约注射后72小时以及尸检时,根据采血时间表(参见下文表3)收集血液(约5mL)。将约0.5-1.0mL的全血收集入EDTA管用于血液学分析。将约2.0mL的全血收集入血清分离管(具有凝胶,BD Microtainer)并处理至血清以获得合适的血清用于化学分析和AAV1和AAV2衣壳抗体分析。

[0233] 表3.采血时间表

[0234]

时间点	血液学	血清化学	AAV1和AAV2抗体分析
注射前	X	X	X
注射后72小时	X	X	N/A
尸检	X	X	X
全血体积	1mL	2mL	2mL
抗凝血剂	EDTA	N/A	N/A

[0235] X=收集样品

[0236] N/A-不适用

[0237] EDTA-乙二胺四乙酸

[0238] CSF收集和处理

[0239] 在两个不同的时间点收集CSF:颅内给药前和尸检时。在麻醉下通过颈椎脊椎穿刺使用置于俯卧位的动物实施CSF收集。测试制品施用前,收集1-2mL的CSF,在干冰上冷冻,并在≤-60℃保存。尸检时(PBS输注前),收集2-4mL的CSF,通过0.8微米注射过滤器过滤入标记的收集管,且一式两份(1mL等分试样用于衣壳抗体分析且2-4mL等分试样用于GFP分析)转移至eppendorf管中,立即在干冰上冷冻并保存在≤-60℃。

[0240] 尸检和组织收集

[0241] 在颅内给药步骤后约30天处死全部动物。使用戊巴比妥钠的静脉施用处死每只动物。处死并收集血液和CSF后,尸体反向用PBS输注(在无RNA酶条件下),随后用PFA输注。夹住下行主动脉以减少周边组织的固定。使用该步骤以收集固定的脑组织以及新鲜的组织样品用于通过QPCR的GFP分析。组织收集表列举了收集的组织(表4)。PBS输注过程中(4%PFA输注初始前),在无RNA酶的条件下用一次性无菌手术刀(对于每个个体的活检使用新手术刀)将所选组织的活检样品(0.5-1.0cm³)(也列举在组织收集表中)收集入无RNA酶的管中,并保存在≤-60℃。

[0242] 表4.组织收集

[0243]

组织收集入 PFA	冷冻的收集组织 (活检穿孔)
脑	心
脊髓	肾
	肝
	肺
	脾
	睾丸
	颈部淋巴结
	股四头肌
	坐骨神经
	视神经
	眼

[0244] 脑和脊髓处理

[0245] 从动物小心移除整个脑部并在比例尺旁边拍照。一旦从颅骨移开,将脑置于脑基质并冠向切成6mm块。将冠状块保存于PFA并处理用于组织学。将包含额叶皮质和中脑区域的相关块切片成自由浮动40微米切片。从动物小心移除完整脊髓。将脊髓区段保存在PFA中用于组织学。来自颈椎、胸椎、腰椎区域的代表性区段切片成自由浮动40微米切片。

[0246] 用PBS-肝素随后4%缓冲多聚甲醛 (PFA) 输注后,使用一次性刀片和猴脑基质将动物脑部切割成6-mm块(冠状面)。将顺序块(11-12脑块每动物)水平置于白板上并用顺序分配的字母拍照。随后将全部脑块在4%缓冲PFA中后-固定24小时。对每个脑块的固定质量进行视觉检测(块内未观察到粉色)。PFA-后固定以后,通过在PBS中冲洗3X并在30%蔗糖(冷冻)浸没而处理成自由浮动的切片,然后切割成40-μm自由浮动切片。

[0247] AAV载体的产生

[0248] 临床评估前,通常经由标准三重转染方法(TT)产生AAV载体,其中HEK293细胞与两种或三种编码对于载体包装所需的顺(载体基因组)和反(AAV rep和cap基因;腺病毒辅助基因E2A、E4和VA)元件的质粒共转染(Hauck等,(2009) Mol. Ther. 17:144-152)。由于质粒DNA的输入可容易地并迅速地修饰,该方法允许基于不同血清型的载体评估并携带多种表达盒。虽然该转染方法具有灵活性和相对快的周转时间,涉及其可扩展性则呈现出挑战性,这限制了该方法用于大量rAAV载体产生用于临床用途的适用性。

[0249] 在目前的时间,临床级rAAV经由无辅助病毒的瞬时转染、重组杆状病毒或单纯疱疹病毒为基础的生产系统或包装/生产细胞系方法大规模产生(Ayuso等,(2010) Curr. Gene Ther. 10:423-436)。腺相关病毒生产细胞系(PCL)是有效的用于大规模产生临床级AAV载体的有效方法。在该系统中,包含三组分(载体序列、AAV rep和cap基因和可选择的标记物基因)的单质粒稳定转染入HeLaS3细胞。然而,理想的是确定衍生自生产细胞系的AAV载体是否与经由其他方法生成的载体在效力上等同,例如,标准顺势转染方法。

[0250] 使用不同的两种生产方法生成AAV病毒载体用于该研究:三重转染(TT)和生产细

胞系 (PCL)。通过 (使用磷酸钙) 三重转染人胚肾癌293细胞 (HEK-293) 产生重组AAV载体 AAV1-GFP (TT) 和AAV2-GFP (TT) (参照Xiao等, (1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232)。简言之,对于通过瞬时转染的AAV载体的产生,使用聚乙烯亚胺 (PEI) 和1:1:1比率的三种质粒 (ITR载体、AAV2rep/cap2或AAV2rep/cap1和pAd辅助质粒) 转染HEK293细胞。ITR载体编码用于巨细胞病毒增强子/鸡β肌动蛋白-杂交启动子 (CBA) 的EGFP下游的cDNA。使用的pAd辅助为pHelper (Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara, CA)。

[0251] 使用AAV生产细胞方法产生重组AAV载体AAV1-GFP (PCL) 和AAV2-GFP (PCL) (参照Thorne等, (2009) *Human Gene Therapy* 20:707-714和Martin等, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269)。简言之,通过用包含来自血清型2的rep基因和来自血清型1或2的衣壳基因、启动子-异源核酸序列、侧翼为AAV2反向末端重复 (ITR) 的载体基因组和嘌呤霉素抗性基因的质粒稳定转染HeLa-S3细胞 (ATCC LLC-2.2) 生成产物特异性生产细胞系。载体基因组携带用于巨细胞病毒增强子/鸡β肌动蛋白-杂交启动子CBA的EGFP下游的cDNA。转染的细胞在嘌呤霉素存在下生长以分离稳定的整合子。筛选生成的细胞系以选择引导克隆。产物特异性细胞克隆随后扩大至生产生物反应器,并用野生型腺病毒作为辅助病毒感染以初始AAV生产。感染72小时后收获病毒,通过加热失活腺病毒并通过阴离子交换法去除。

[0252] 来自两种生产平台的AAV的生产如先前所述实施 (Qu, G. 等 (2007) *J. Virol. Methods* 140:183-192)。所得的全部AAV1和AAV2-GFP载体的滴度示于表5中。在包含180mM氯化钠、10mM磷酸钠 (5mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 5mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 和0.001%泊洛沙姆188 (Lutrol F68), pH 7.5的水中制备全部载体。

[0253] 表5. 研究设计表和测试制品

[0254]

组	动物数目	测试制品	药物浓度	载体剂量每半球 (vg)
1	3	ssAAV2/1-CBA-GFP (TT)	1.90×10^{12} vg/mL	1.7×10^{11}
2	2	ssAAV2/2-CBA-GFP (TT)	1.90×10^{12} vg/mL	1.7×10^{11}
3	2	ssAAV2/1-CBA-GFP (PCL)	2.30×10^{12} vg/mL	1.7×10^{11}
4	2	ssAAV2/2-CBA-GFP (PCL)	1.43×10^{12} vg/mL	1.3×10^{11}

[0255] 免疫组化

[0256] 用针对GFP的抗体 (1:500, AB3080; Chemicon) 的免疫染色在Zamboni固定的覆盖全部额叶皮质并以向后方向延伸至纹状体水平的40-μm冠状切片上实施。GFP免疫阳性神经元的定位参照立体定向坐标中的恒河猴脑 (The Rhesus Monkey Brain in Stereotactic Coordinates) (Paxinos, G.H.X. 和Toga, A.W. (2000) San Diego, CA: Academic Press) 分析以鉴定皮质和纹状体中免疫染色的特定区域。

[0257] 通过3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 的GFP染色: 在PBST中洗涤切片 (3个每6-mm块: 2mm间隔) 3次每次5分钟, 然后用1% H_2O_2 处理20分钟。切片在Sniper封闭液 (可在biocare.net/product/background-sniper/在线获得) 中于室温温育30分钟, 随后与在Da Vinci Green稀释剂 (可在biocare.net/在线获得) 中1:1000稀释的初级抗GFP抗体 (可在www.lifetechnologies.com/在线获得) 过夜温育。在包含0.1% Tween-20 (PBST) PBS中冲洗3次每次5分钟后, 将切片在Mach 2HRP多聚物 (<http://biocare.net/>) 中温育1小时, 随后洗

涤3次并比色法显色(DAB)。免疫染色的切片用甲酚紫复染并固定在载玻片上且用Cytoseal®(可在www.thermoscientific.com/在线获得)密封。

[0258] 非人灵长类(NHP)脑GFP表达的覆盖的计算:来自匹配的IHC-染色的系列切片的GFP染色投射到单独的每只猴脑部相应的MRI扫描上(冠状面中的T1-加权MR成像)。GFP表达的分布/覆盖用OsiriX Imaging软件版本3.1(The OsiriX Foundation, Geneva, Switzerland)实施。

[0259] 用于载体嗜性和神经转导效力的双重免疫荧光:对于具有GFP的不同细胞标记物(NeuN、S-100、Ibal)的双重荧光免疫染色,通过在具有20%的马血清的PBST中在室温温育过夜将初级抗体的组合应用至切片作为初级抗体的混合物(cocktail)。如下使用初级抗体:抗GFP抗体(1:500,如上);抗NeuN(1:500,可在www.emdmillipore.com/在线获得);抗S-100(1:300,可在biocare.net/在线获得)、抗Ibal(1:500,可在biocare.net/在线获得);抗Olig2(1:50,可在www.emdmillipore.com/在线获得)。在PBST中洗涤3次后,初级抗体通过在暗处用合适的二级荧光染料缀合的标记抗体温育2小时可视化:山羊抗小鼠DyLight 549和山羊抗兔DyLight 488(可在www.biocare.net/在线获得)。全部二级抗体在荧光抗体稀释剂(可在biocare.net/在线获得)中1:1,000稀释。此外,为淬灭自发荧光,将切片在0.1%苏丹黑溶液(70%乙醇)中温育。在PBS中最终洗涤后,将切片用Vectashield Hard Set Mounting Medium for Fluorescence(可在www.vectorlabs.com/在线获得)覆盖。对照切片在无初级抗体下处理,且在這些条件下未观察到显著的免疫染色。

[0260] 将配备CCD彩色摄像机和成像分析系统的Zeiss Axioskop荧光显微镜(可在www.zeiss.com/在线获得)(Axiovision Software,可在www.zeiss.com/在线获得)用于确定双重标记的细胞的存在(红色和绿色通道中都为阳性)。用于双重标记切片的显微照片通过重迭来自两个不同通道(红色和绿色;共同定位呈现黄色)的图像获得而不改变切片的位置或聚焦(物镜X 20)。对于GFP/NeuN双重染色,从载体输注位点选择来自每只猴在~4-mm间隔的3个切片。对于靶向的脑部区域(尾状核和壳核)中AAV1-eGFP或AAV2-eGFP载体的神经元转导效力的评估,将5个计数框(700μm x 550μm)随机置于GFP+区域。转导的初级主要区域(PAT)定义为覆盖多于40%靶向结构的GFP-阳性区域("云")。相似地,为评估PAT外(OPAT)神经转导的效率,在超越靶向结构(尾状核和壳核)中或在皮质中GFP-阳性"雾状"的清晰边缘选择来自每切片的5个计数框(700μm x 550μm)(图10C)。为确定GFP/NeuN-阳性细胞比例,每个计数框计数两次,第一次用红色通道计数NeuN+细胞的数目且第二次用组合的红色和绿色通道计数共染色细胞(GFP+和NeuN+)的数目。对于所选3个切片的每个计数至少1,500NeuN+细胞(每切片5个计数框)。最终,确定GFP+/NeuN+与总NeuN+的百分比。对于纹状体的全部计算通过添加来自每只动物两半球的结果并组合来自壳核和尾状核的值进行,因为在每只动物的两结构中平均转导效率相同。

[0261] 实时定量PCR(TaqMan)

[0262] GFP mRNA水平通过实时定量PCR测量。肝、心、肺、肾和脾的样品用于全部RT-PCR分析。使用QIAGEN miRNeasy迷你套盒提取总RNA随后逆转录并根据制造商的说明使用High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems)扩增。实施定量RT-PCR反应并在QuantStudio12K Flex Real-Time PCR系统(Applied Biosystems)上分析。每个样品一式两份运行且相对的基因表达使用标准曲线确定。

[0263] MR成像数据分析

[0264] 半定量分析(数码MRIs Vd/Vi):用OsiriX Imaging软件版本3.1(The OsiriX Foundation,Geneva,Switzerland)实施分布体积(Vd)分析。输注位点、套管轨迹和套管尖以冠状面在T1-加权MR成像上鉴定。界定感兴趣的区域(ROI)以概述T1钆信号和靶位点(即壳核和尾状核)。分析ROI和图像序列的三维体积重建以估测输注的体积分布(Vd)和与输注体积的比率(Vi)。

[0265] 转基因表达的组化分析:为评估转基因表达,处理脑切片用于免疫组化分析(IHC)。用戊巴比妥钠(25mg/kg静脉内)深度麻醉动物并在施用载体后4周处死。移除脑部并冠向切割成6-mm块。将该块在缓冲多聚甲醛(4%)中后-固定24小时,在PBS中快速洗涤并在30%蔗糖/PBS溶液中调整用于冷冻保存。将福尔马林固定的脑块在低温恒温器中切割成40- μ m冠状切片。系列收集跨越全脑的自由浮动的切片并保存在抗冷冻溶液中用于进一步IHC分析。

[0266] 结果

[0267] 如通过免疫组化所视,AAV1-GFP和AAV2-GFP载体驱动来自转导的神经元的GFP的大量表达。将AAV1通过CED输注入尾状核和壳核后,在尾状核和壳核(图2C&D)以及黑质(图2D)检测到大量的GFP免疫染色。除纹状体外,恒河猴脑部的大量皮质区域也被转导(图2A-D)。皮质GFP表达在前额叶皮层的关联区域、初级感觉皮质区、主要运动皮质以及枕叶皮质的广泛区域中最明显(图2A-D)。

[0268] 作为位于皮质层IV中的锥体神经元形态鉴定的皮质内的大量GFP-阳性神经元,其轴突投射到覆层。GFP-阳性神经元的密度在额叶(图3A&B)和枕叶皮质(图3C&D)中特别高,其中转导了大量的神经元(图3B&D)以及星形胶质细胞(图3A&C)。

[0269] 实施例2:纹状体内AAV2载体递送后广泛地GFP表达

[0270] 当经由对流增强递送(CED)进行递送时,评估了AAV2有效靶向恒河猴脑中纹状体和皮质两结构的能力。将包含在巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子控制下的GFP cDNA的AAV载体根据上文实施例1中所述的方法使用CED输注入8只成年恒河猴的尾状核和壳核。

[0271] 通过CED将AAV2输注入纹状体导致注射区域中(尾状核和壳核)(图4C)、黑质(图4D)和恒河猴脑部的大量皮质区域(图4A-D)GFP的表达。当与用AAV1载体的纹状体覆盖比较时,GFP在AAV2注射动物的纹状体中的表达显得稍微更受限制和局部化。GFP在NHP纹状体内的表达是全面的但相对包含在靶向区域的灰质界限内,而无显著的AAV2-GFP载体输注相关的泄漏或回流至相邻的非靶向区域的证据。皮质GFP表达在AAV1所见的相同区明显。前额叶关联皮质区、前运动皮质、初级体感皮质区和主运动皮质,以及枕叶皮质的广泛区域都很好地转导(图4A-D)。

[0272] 实施例3:通过三重转染或生产细胞系方法制成纹状体内AAV1和AAV2载体后GFP表达的可比性

[0273] 至今大量临床前研究利用由三重转染随后使用氯化铯梯度离心或柱层析纯化制成的AAV载体。因此,为评估载体产生对体内生物分布的影响,比较了三重转染(TT)或生产细胞系(PCL)两种载体产生的方法。通过这两种不同制造平台生成的AAV1和AAV2载体经由CED施用,且比较了其在恒河猴脑部中的分布。

[0274] 当与通过生产细胞系方法生成的AAV1-GFP载体相比时,由三重转染生成的AAV1-GFP载体的输注获得等等的GFP分布和覆盖。注射入恒河猴纹状体30天后,GFP分布在AAV1-GFP (TT) (图5C&D) 和AAV1-GFP (PCL) (图5A&B) 载体间是可比较的。

[0275] 用AAV2-GFP载体看到相似的结果。GFP分布相似且在AAV2-GFP (TT) (图6C&D) 和AAV2-GFP (PCL) (图6A&B) 注射的脑之间是可比较的。

[0276] 为测量输注表现,使用90 μ l的每种与钆造影剂(2mM Prohance;Bracco Diagnostics,Inc.) 混合的载体将AAV1-eGFP (TT);AAV2-eGFP (TT);AAV1-eGFP (PCL) 和AAV2-eGFP (PCL) 输注入每个纹状体(60 μ l输注入壳核且30 μ l输注入尾状核)。来自每输注的磁共振图像(MRI) 确认了每套管的定位准确且输注覆盖了靶区域。全部输注良好地包含在靶结构中。在MR成像上由钆信号生成的输注分布的三维重建显示输注的安置和分布在全部动物中非常一致。此外,对于每次递送计算分布体积(Vd) 和输注体积(Vi) 间的比率(Vd/Vi),且数据在全部输注中一致。Vd比Vi大约3倍(范围2.1-4.6) (表6和7)。

[0277] 表6. 转导4周后载体输注和在脑中的分布程度(均值 $\pm$ 标准偏差(st.dev.))。

[0278]	V_d/V_i^a	钆覆盖率 ^b	GFP 表达的皮质覆盖率 ^c
	AAV2-eGFP		
	2.79 ± 0.44	壳核: 29.5 ± 10.9 % 尾状核: 18.3 ± 5.2 %	62.2 ± 19.1 %
	AAV2-eGFP		
	3.29 ± 0.75	壳核: 23.5 ± 9.3% 尾状核: 24.6 ± 8.0%	61.3 ± 14.8 %

[0279] ^a分布体积(Vd) 与输注体积(Vi) 的比率通过由所注射脑实质内载体分布的体积(基于来自MRI扫描的钆信号)除以注射的载体的体积计算(OsiriXImaging软件,v.3.1)。添加来自左侧和右侧半球的值以确定每只动物的平均Vd/Vi。

[0280] ^b通过由Vd除以壳核(600mm³)或尾状核(500mm³)的体积计算靶向结构内钆覆盖率(OsiriX Imaging软件,v.3.1)。

[0281] ^c皮质GFP覆盖率通过将来自匹配IHC-染色切片的GFP信号投射至每只猴的相应地MRI扫描上计算(BrainLab软件)。

[0282] 表7. 转导后四周脑中的分布程度和载体输注(个体值)。

[0283]

NHP 受试者	V_d/V_i^a	钆覆盖率 ^b				皮质 GFP 覆盖率 ^c
AAV1-eGFP						
1 AAV1-eGFP (TT)	壳核: 3.2 尾状核: 2.1	壳核 _L 34.8% 尾状核 _L 14.8 %	壳核 _R 30.2% 尾状核 _R 16.2 %	91%		
2 AAV1-eGFP (TT)	壳核: 3.1 尾状核: 3.2	壳核 _L 35.7% 尾状核 _L 18.2%	壳核 _R 18.3% 尾状核 _R 13.8%	50%		
3 AAV1-eGFP (TT)	壳核: 3.3 尾状核: 2.2	壳核 _L 52.7% 尾状核 _L 19.4%	壳核 _R 37.8% 尾状核 _R 21.2%	41%		
4 AAV1-eGFP	壳核: 3.0 尾状核: 2.3	壳核 _L 23.3% 尾状核 _L 23.8%	壳核 _R 17.7% 尾状核 _R 20.6%	61%		

[0284]

(PCL)						
5 AAV1-eGFP (PCL)	壳核: 2.7 尾状核: 2.8	壳核 _L 22.3% 尾状核 _L 26.8%	壳核 _R 22.2% 尾状核 _R 8.6%			68%
<i>AAV2-eGFP</i>						
6 AAV2-eGFP (TT)	壳核: 2.7 尾状核: 3.7	壳核 _L 22.7% 尾状核 _L 20.0%	壳核 _R 16.2% 尾状核 _R 23.0%			75%
7 AAV2-eGFP (TT)	壳核: 2.9 尾状核: 3.9	壳核 _L 11.3% 尾状核 _L 20.6%	壳核 _R 16.3% 尾状核 _R 15.2%			47%
8 AAV2-eGFP (PCL)	壳核: 2.4 尾状核: 3.4	壳核 _L 36.0% 尾状核 _L 34.0%	壳核 _R 19.8% 尾状核 _R 39.4%			50%
9 AAV2-eGFP (PCL)	壳核: 4.6 尾状核: 2.7	壳核 _L 35.2% 尾状核 _L 21.2%	壳核 _R 30.5% 尾状核 _R 23.4%			73%

[0285] ^a分布体积 (V_d) 与输注体积 (V_i) 的比率通过由所注射脑实质内载体分布的体积 (基于来自MRI扫描的钆信号) 除以注射的载体的体积计算 (OsiriXImaging软件, v.3.1)。添加来自左侧和右侧半球的值以确定每只动物的平均 V_d/V_i 。

[0286] ^b通过由 V_d 除以壳核 (600mm^3) 或尾状核 (500mm^3) 的体积计算靶向结构内钆覆盖率 (OsiriX Imaging软件, v.3.1)。

[0287] ^c皮质GFP覆盖率通过将来自匹配IHC-染色切片的GFP信号投射至每只猴的相应的

MRI扫描上计算(BrainLab软件)。

[0288] AAV1-eGFP和AAV2-eGFP(通过两种产生方法TT和PCL制备)两者双侧注射入NHP的纹状体后,贯穿两靶结构(壳核和尾状核)以及投射区域(外部和内部苍白球-GPe和GPi、黑质-SN、底丘脑核-STN、皮质区域-神经层IV和V)的eGFP稳固表达明显(图7)。

[0289] 为评估钆(Gd)作为载体分布标志物的作用,计算了GFP表达区域(来自组化切片)与相应MR扫描上钆信号的区域的比率。对于用血清型AAV1输注的猴,该比率为 1.21 ± 0.10 ,而对于AAV2为 0.74 ± 0.04 (图8)。1.0的比率表明由MRI确定的GFP表达和载体分布间的完美匹配。该差异表明AAV1载体分布超越Gd信号并实现比AAV2更好的转导的主要区域中的传播。

[0290] 为评估输注的AAV载体在脑内的分布,来自每只动物的代表性的自由浮动脑切片(3切片每块;40- μ m厚)用兔抗GFP抗体(Millipore;目录号3850,1:500稀释)染色。免疫组化评估揭示了注射靶(右侧和左侧壳核和尾状核)以及从注射区域投射的多重区域(皮质区域)内深褐色DAB信号。

[0291] 通过将GFP表达的程度投射至每只猴脑的MRI扫描上,计算皮质区域(HD相关的脑部区域)的覆盖百分比(参见用于总结的表6和用于进一步详述的表7)。在全部猴中,平均转导了24%的纹状体,其导致GFP在皮质中的大量表达(图7)。皮质中GFP表达的程度不与使用的AAV血清型(AAV1对AAV2)或载体产生的方法(TT对PCL)相关。似乎在输注位点(纹状体)内输注物更宽的分布是皮质中转导程度的核心驱动。一只NHP(1号受试者;AAV1-eGFP[TT])显示全脑(额叶和枕叶两者-参见图7)的皮质区域(层IV和V)中特别稳固的GFP表达。其他动物显示与尾状核和壳核内程度和定位的解剖区域中的变化相关的皮质表达的变化性。由于靶向了纹状体的前和连合区域,在额叶和顶叶皮质区检测到更多GFP但在枕叶皮质检测到较少。每只动物的组化分析总结于下文(通过治疗组分组)。

[0292] 治疗组2(ssAAV2/1-CBA-eGFP TT)

[0293] 全脑中eGFP表达的免疫组化评估揭示了靶向位点(壳核和尾状核的核中)和投射结构(苍白球、黑质、丘脑、底丘脑核和皮质区)中的稳固信号。

[0294] 1号受试者。受试者显示GFP表达至全脑(额叶和枕叶)的皮质区域(层4和5)的特别稳固的传播。GFP-阳性细胞的形态学暗示神经元和星形胶质细胞转导,其后来由双重免疫染色得以确认(参见下文)。GFP表达覆盖率的计算显示转导了全部皮质的91%(参见表7)(该计算通过将GFP信号的范围投射至分析的猴脑的MRI扫描上完成)。

[0295] 2号受试者。受试者显示壳核和尾状核中以及两半球苍白球和黑质的稳固转导。GFP表达至皮质在1号受试者中投射不太明显,且主要观察在皮质的额叶区域。尽管GFP信号也在枕叶皮质中检测到,GFP-阳性细胞密度显著更低。皮质GFP表达覆盖率占50%(表7)。与1号受试者相似的是,GFP-阳性细胞具有神经元和星形胶质细胞形态两者,其由双重免疫荧光确认。

[0296] 3号受试者。受试者显示壳核和尾状核以及投射的结构(苍白球、黑质、底丘脑核、丘脑和皮质)中的强GFP表达。尽管GFP信号在皮质的一些区域清楚检测到,但GFP表达仅占其整体皮质覆盖率的41%(全部测试的猴中最低;参见表7)。转导了神经元和星形胶质细胞两者。右侧前放射冠的大部分也显示了GFP-阳性信号,最可能作为套管穿透至纹状体的载体溢出的结果。

[0297] 治疗组3(ssAAV2/2-CBA-eGFP TT)

[0298] 6号受试者.受试者显示两靶向结构(壳核和尾状核)中的强GFP信号。在这两区中检测到稠密散布的阳性细胞。GFP表达还传播至额叶皮质区域、苍白球、黑质、底丘脑核和丘脑的一些部分。皮质中GFP表达覆盖率占75%(表7)。GFP-阳性细胞具有大部分神经元形态,其后来通过双重免疫荧光确认。星形胶质细胞形状的GFP-阳性细胞在内囊以及数个皮质点和清晰可见的输注套管轨迹紧密相邻的白质区域中检测到。

[0299] 7号受试者.受试者在右侧和左侧纹状体(壳核和尾状核两者)内都显示GFP-阳性信号。当与其他输注的猴比较时其分布相当差且模式表现为“点状”而不均匀。所以,全部投射的脑结构中的GFP信号也显得较弱。皮质中GFP表达覆盖率占47%(表7)。GFP-阳性细胞具有大部分神经元形态,其后来通过双重免疫荧光确认。星形胶质细胞形状的GFP-阳性细胞在内囊以及数个皮质点和清晰可见的输注套管轨迹紧密相邻的白质区域中检测到。

[0300] 治疗组4(ssAAV2/1-CBA-eGFP PCL)

[0301] 4号受试者.受试者显示靶向结构壳核和尾状核中非常稳固的GFP表达。GFP-阳性信号也在苍白球、黑质、底丘脑核、丘脑和皮质区中检测到。皮质中GFP表达覆盖率占61%(表7)。放射冠的前部也显示GFP-阳性信号,最可能作为套管穿透至纹状体的载体溢出的结果。阳性细胞具有神经元和星形胶质细胞形态两者,其后来通过双重免疫荧光确认。

[0302] 5号受试者.受试者显示纹状体(壳核和尾状核两者)中稳固的GFP表达。GFP-信号还在投射的结构(苍白球、黑质、底丘脑核、丘脑和皮质区)中检测到。皮质中GFP表达覆盖率占68%(表7)。放射冠的前部也显示GFP-阳性信号,最可能作为套管穿透至纹状体的载体溢出的结果。阳性细胞具有神经元和星形胶质细胞形态两者。

[0303] 治疗组5(ssAAV2/2-CBA-eGFP PCL)

[0304] 9号受试者.受试者在纹状体(壳核和尾状核两者)中显示非常稳固的GFP表达。GFP-信号还在投射的结构(苍白球、黑质、底丘脑核、丘脑和皮质区)中检测到。皮质中GFP表达覆盖率占73%(表7)。GFP-阳性细胞具有大部分神经元形态,尽管星形胶质细胞形状的GFP-阳性细胞也在白质(内囊)和套管轨迹附近检测到。

[0305] 8号受试者.受试者在纹状体和投射的结构(苍白球、黑质、丘脑、底丘脑核和皮质)中显示稳固的GFP表达。皮质中GFP表达覆盖率占50%(表7)。GFP-阳性细胞具有大部分神经元形态,尽管星形胶质细胞形状的GFP+细胞也在白质(内囊、放射冠)内和套管轨迹附近检测到。

[0306] 双重免疫荧光

[0307] 对于用AAV1-eGFP载体(TT和PCL)转导的两组NHP,GFP-阳性细胞的形态表明神经元和星形胶质细胞的转导(图9A-9D)。这通过用针对GFP和NeuN(神经元标记物)或GFP和S-100(星形胶质细胞标志物)的抗体的组合的双重免疫荧光染色确认(图10A-10C)。与之相反,AAV2-eGFP(TT和PCL两者)主要指导神经元转导(图9E-9G和10D)。星形胶质细胞谱系的GFP-阳性细胞也在内囊(图9H)以及其中输注套管轨迹可见的白质的皮质区中检测到。

[0308] 基于双重免疫荧光,对于全部NHP计算了纹状体和皮质区神经元转导的效率(在输注位点的冠状面)。图11A总结了纹状体中的发现。每只动物的单独计算示于下文表8。

[0309] 表8.非人灵长类脑的纹状体转导主要区域(PAT)和皮层内通过AAV1-eGFP和AAV2-eGFP载体的神经元转导效率

[0310]

受试者编号 靶向区域	1 <i>AAV1-eGFP</i> (TT)	2 <i>AAV1-eGFP</i> (TT)	3 <i>AAV1-eGFP</i> (TT)	6 <i>AAV2-eGFP</i> (TT)	7 <i>AAV2-eGFP</i> (TT)
左侧 壳核	57.0±7.75 %	64.4±11.75 %	54.7±11.4 %	36.5±8.8 %	59.6±12.8 %
右侧 壳核	68.0±15.9 %	70.1±14.4 %	66.2±20.0 %	33.1±11.7 %	56.3±7.7 %
左侧 尾状核	70.1±7.4 %	72.6±13.3 %	56.4±6.02 %	33.7±11.4 %	61.4±13.1 %
右侧 尾状核	65.6±7.75 %	65.1±13.9 %	60.1±5.65 %	42.7±10.5 %	49.4±13.5 %
皮质*	24.8±3.04 %	4.04±2.77 %	6.75±3.38 %	8.56±2.81 %	3.36±1.83 %
受试者编号 靶向区域	5 <i>AAV1-eGFP</i> (PCL)	4 <i>AAV1-eGFP</i> (PCL)	9 <i>AAV2-eGFP</i> (PCL)	8 <i>AAV2-eGFP</i> (PCL)	
左侧 壳核	58.6±7.61 %	57.1±10.5%	53.1±12.7%	52.4±11.8%	
右侧 壳核	50.5±9.78 %	73.2±9.88%	52.1±10.6 %	50.1±4.5 %	
左侧 尾状核	57.0±7.13 %	51.8±9.42 %	43.0±14.5 %	43.4±8.5 %	
右侧 尾状核	59.1±9.11 %	70.5±8.38 %	52.1±7.22 %	61.2±12.9 %	
皮质*	16.3±5.09%	16.1±6.59 %	23.0±7.55 %	18.6±5.36%	

[0311] *通过AAV载体的神经元转导也在从纹状体(靶结构)投射的皮质区域检测到。皮质转导的效率在具有注射位点的纹状体平面的冠状切片中计算。

[0312] 通过MRI所示的主要转导区域中纹状体神经元转导范围为50%–65%。在用AAV1-eGFP (TT) 输注的NHP中观察到最高转导效率,具有 $64.2 \pm 5.9\%$ 的平均值;且在AAV2-eGFP (TT) 组中最低,具有 $46.6 \pm 11.7\%$ 的平均值 ($p < 0.05$; 2-向ANOVA)。这表明血清型AAV1在转导神经元中相比AAV2具有~18%更高的效率。通过PCL产生的AAV1-eGFP表明相比AAV2-eGFP ($50.1 \pm 5.8\%$) 朝向转导更多神经元 ($59.7 \pm 8.1\%$) 较弱的趋势 ($p > 0.05$; 2-向ANOVA)。

[0313] 上述计算源自通过MRI定义的强GFP转导区域,(转导-PAT的主要区域)。此外,计算了PAT外区域中神经元纹状体转导的效率以看GFP-阳性细胞是否可以在强GFP信号的清晰边界外检测到(“在转导的主要区域外”-OPAT),表明也许全部测试的载体以相同的方式传播。如何选择这些区域的方案(5个计数框的随机选择)示于图11B。观察到血清型AAV1和AAV2间OPAT中转导效率估计的巨大差异(图11C),其中AAV1相比AAV2转导多许多的神经元 ($8.1 \pm 3.8\%$ 对 $0.74 \pm 0.25\%$ 对于TT组且 $7.2 \pm 3.5\%$ 对 $2.16 \pm 1.8\%$ 对于PCL组;两比较中 $p < 0.05$, 2-向ANOVA;)。每只动物的单独计算示于下文表9。

[0314] 表9. 非人灵长类脑的纹状体内但在转导主要区域外(OPAT)通过AAV1-eGFP和AAV2-eGFP载体的神经元转导效率

[0315]

受试者编号 靶向区域	1 <i>AAV1-eGFP</i> (TT)	2 <i>AAV1-eGFP</i> (TT)	3 <i>AAV1-eGFP</i> (TT)	6 <i>AAV2-eGFP</i> (TT)	7 <i>AAV2-eGFP</i> (TT)
左侧 壳核	14.2±9.49 %	6.88±6.48%	14.2±7.87%	0.57±0.53 %	1.28±0.69 %
右侧 壳核	4.36±2.06 %	4.04±4.36 %	5.35±3.68%	0.51±0.61 %	0.80±0.55 %
左侧 尾状核	10.1±7.42 %	2.01±2.54 %	9.11±5.24 %	0.86±0.95 %	0.71±0.36 %
右侧 尾状核	10.8±6.37 %	6.89±5.62 %	8.76±3.50 %	0.51±0.91 %	0.71±0.93 %
受试者编号 靶向区域	5 <i>AAV1-eGFP</i> (PCL)	4 <i>AAV1-eGFP</i> (PCL)	9 <i>AAV2-eGFP</i> (PCL)	8 <i>AAV2-eGFP</i> (PCL)	
左侧 壳核	2.82±1.99%	12.3±6.27%	1.16±0.87%	1.98±2.20%	
右侧 壳核	3.59±3.01%	9.83±5.64%	1.17±1.18%	2.68±0.90 %	
左侧 尾状核	7.11±4.61%	10.7±5.53 %	0.85±0.63 %	3.61±3.22 %	
右侧 尾状核	6.95±5.82%	4.18±2.94%	1.13±0.65 %	1.99±1.26 %	

[0316] 此外,计算了投射至纹状体的皮质区域中转导的效率。由于皮质覆盖率的程度在动物中有所不同,在具有相邻的GFP-阳性纹状体的切片中计数随机的皮质区域。在动物中观察到明显差异(表8),其与使用的血清型无明显相关性。对于AAV1的平均神经元转导效率为 $13.6 \pm 8.3\%$ 相对于AAV2的 $13.4 \pm 9.0\%$ ($p > 0.97$)。

[0317] 如上文所述,AAV1-eGFP转导比神经元多许多的星形胶质细胞(S-100标记物)。GFP-阳性星形胶质细胞在主要转导位点(纹状体)以及投射至纹状体的皮质中检测到。GFP-转导的星形胶质细胞的实例示于图10C。对于AAV2-eGFP载体,仅零星的GFP+星形胶质细胞可在输注套管轨迹周边检测到。为确定载体是否转导其他脑中的抗原呈递细胞,来自全部猴的代表性脑切片用针对GFP和Iba-1(特异性针对小神经胶质细胞)的抗体共染色。这些动物都未显示双重标记的细胞,排除了这种可能性(图10E)。反过来,在全部测试的猴中,针对Olig-2的染色(用于少突胶质细胞的标记物)显示仅数个细胞对于GFP和Olig-2都为阳性。这些稀少的细胞主要在套管轨迹附近检测到(数据未显示)。

[0318] 脑切片用苏木精-伊红(H&E)染色以确定这些抗体是否触发了神经炎症。切片主要检查了血管周围袖套(即,淋巴细胞或浆细胞在血管周围以密集量积累)的存在。尽管在全部猴中检测到不同程度的这些浸润物,未观察到其他载体/转基因-相关的组化发现。然而,观察到AAV1相比AAV2在转导主要区域内引起巨噬细胞和淋巴细胞的稍微更显著的浸润(图12A和12B)。而且,由三重转染产生的载体相比由生产细胞系方法生成的载体看起来引起更广泛的血管周围袖套。值得注意的是,在转导的投射区(皮质区域)中未检测到浸润物。

[0319] 实施例4:中枢神经系统(CNS)外的外周组织中可检测的GFP表达的缺乏

[0320] 在尸检时收集外周器官组织包括肾、肝、肺、心和脾以评估是否CED施用的AAV-GFP转基因表达可在CNS外检测。

[0321] 结果

[0322] 在任何收集的器官中未检测到GFP的可检测水平。AAV-GFP(TT)(图13A)和AAV-GFP(PCL)(图13B)载体未显示可检测的GFP外周表达。用AAV2/1-GFP(TT)载体注射的小鼠脑组

织用作该试验的阳性对照。

[0323] 结论

[0324] 治疗蛋白向脑部的有效递送对于实现临床效力同时最小化副作用仍为严重的障碍。基因递送的发展已提供了在脑实质中建立生物制剂生产的机会。该进步导致多项临床试验的初始,其中AAV载体已成为优选的用于治疗神经病症的载体系统。尽管特定核的焦点靶向能够可靠地通过立体定向神经外科输注实现,人皮质的广泛的错综复杂布局通过病毒载体的直接输注并不能容易地靶向。安全实现脑中广泛基因表达的难度已阻碍需要皮质递送的神经性疾病的潜在治疗的开发。

[0325] 如上文所述,AAV载体(例如AAV1和AAV2)能够提供向全部灵长类动物纹状体(尾状核和壳核)的广泛递送以及向大脑皮质内显著数量的细胞(包括额叶皮质、枕叶皮质和层IV)、丘脑和海马区的递送。报告蛋白GFP在大脑皮质无已知功能,将其应用于本文讨论的研究中。使用CED递送方法将AAV1和AAV2-GFP输注入尾状核和壳核导致在尾状核和壳核两者以及皮质的数个区域中GFP的高水平表达。额叶皮质中的GFP-阳性神经元位于距AAV-GFP输注位点>20mm,由此证明GFP蛋白和AAV载体的轴突转运。不希望收到理论限制,由于GFP仍在细胞质且其并不是分泌蛋白,认为皮质中GFP的存在指示直接的细胞转导和AAV2载体的主动运输沿单个轴突投射。亨廷顿氏病是示例性疾病,对其纹状体递送AAV(例如CED纹状体递送)可为有用的。亨廷顿氏病影响纹状体和皮质区域且因此靶向两区域的治疗策略是理想的。

[0326] 本文公开的发现强调了递送AAV载体(例如AAV1和AAV2)以转导位于距纹状体输注位点相当距离的神经元的潜力。AAV载体(例如AAV1和AAV2)的纹状体内施用因此在用于治疗需要将治疗分子递送至纹状体和皮质的CNS病症(包括但不限于亨廷顿氏病)中是理想的。此外,由于通过三重转染方法和生产细胞系方法生成的AAV载体显示可比较的转基因表达模式和转导水平,生成AAV载体的三重转染和生产细胞系方法适用于本发明。

序列表

<110> L.M.施塔内克

L.史哈卜丁

<120> 病毒颗粒至纹状体和皮质的增强递送

<130> 159792012740

<140> 尚未指定

<141> 同时附上

<150> US 62/114,544

<151> 2015-02-10

<150> US 62/220,997

<151> 2015-02-19

<160> 1

<170> 用于Windows的FastSEQ 4.0版

<210> 1

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccacgc 60
ccgggctttg cccgggcg 78

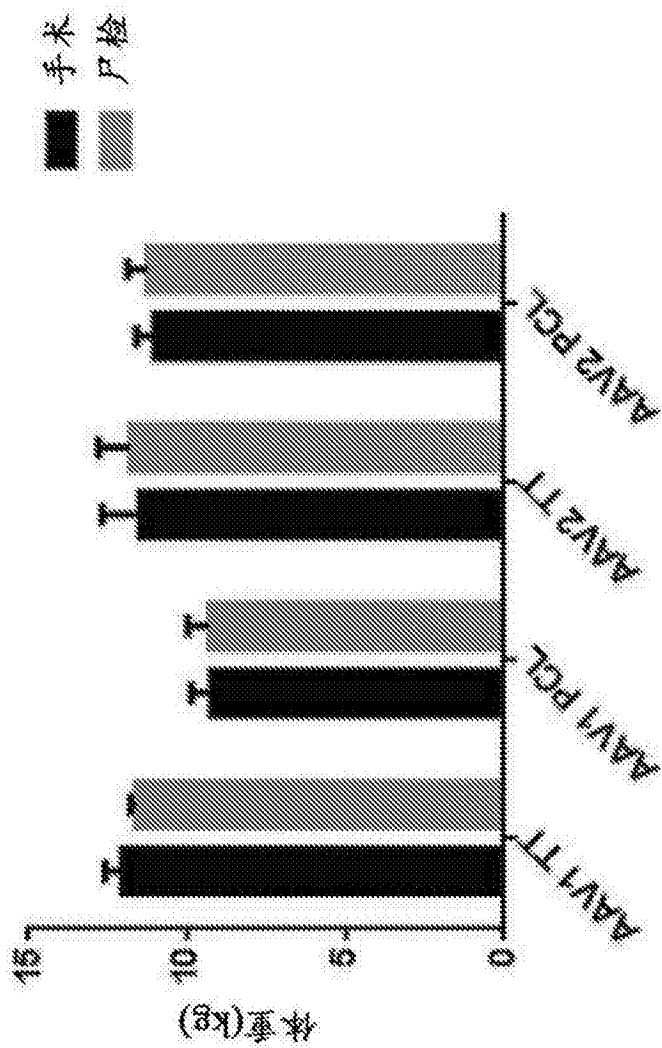


图1

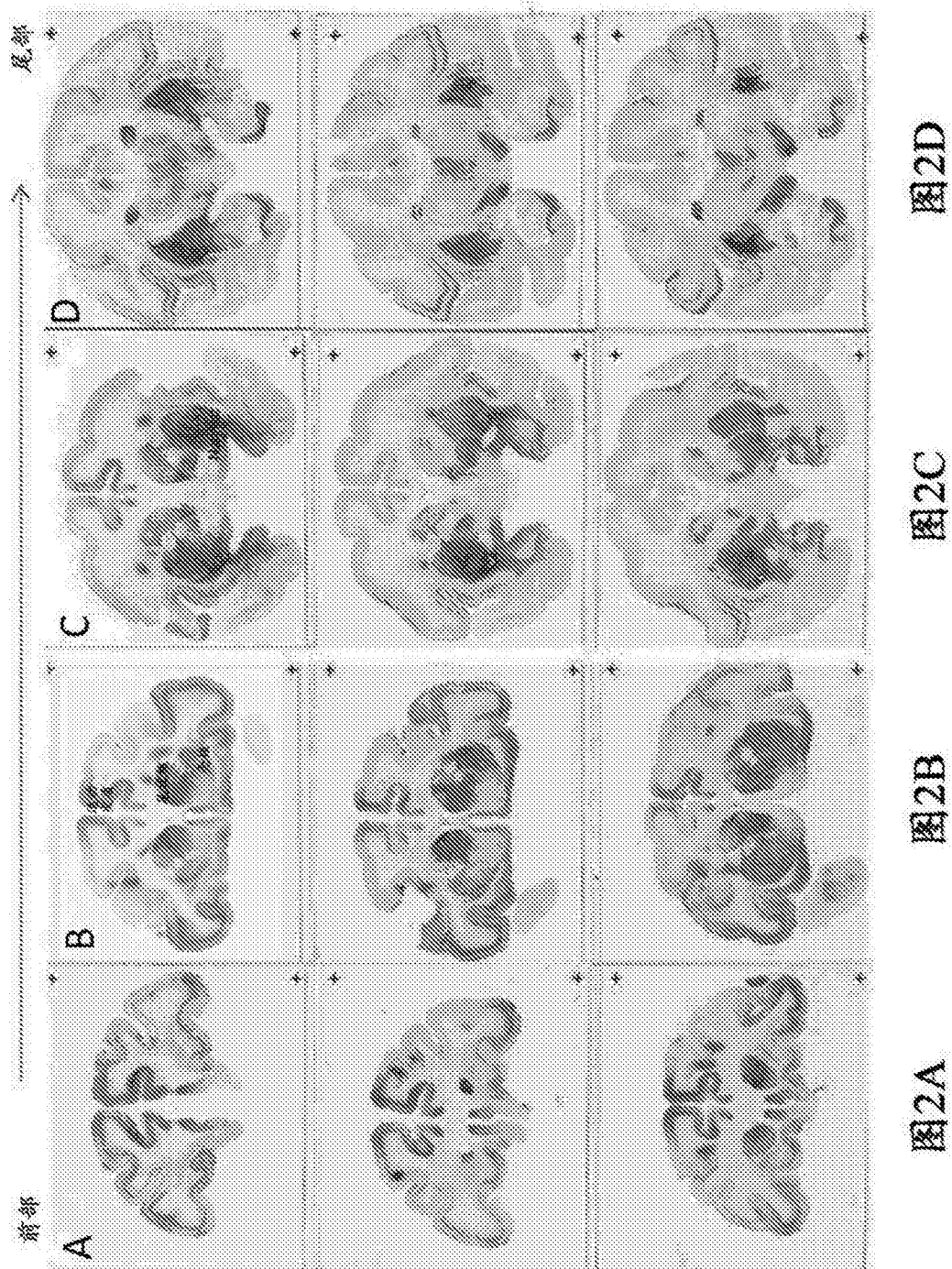


图2A-2D

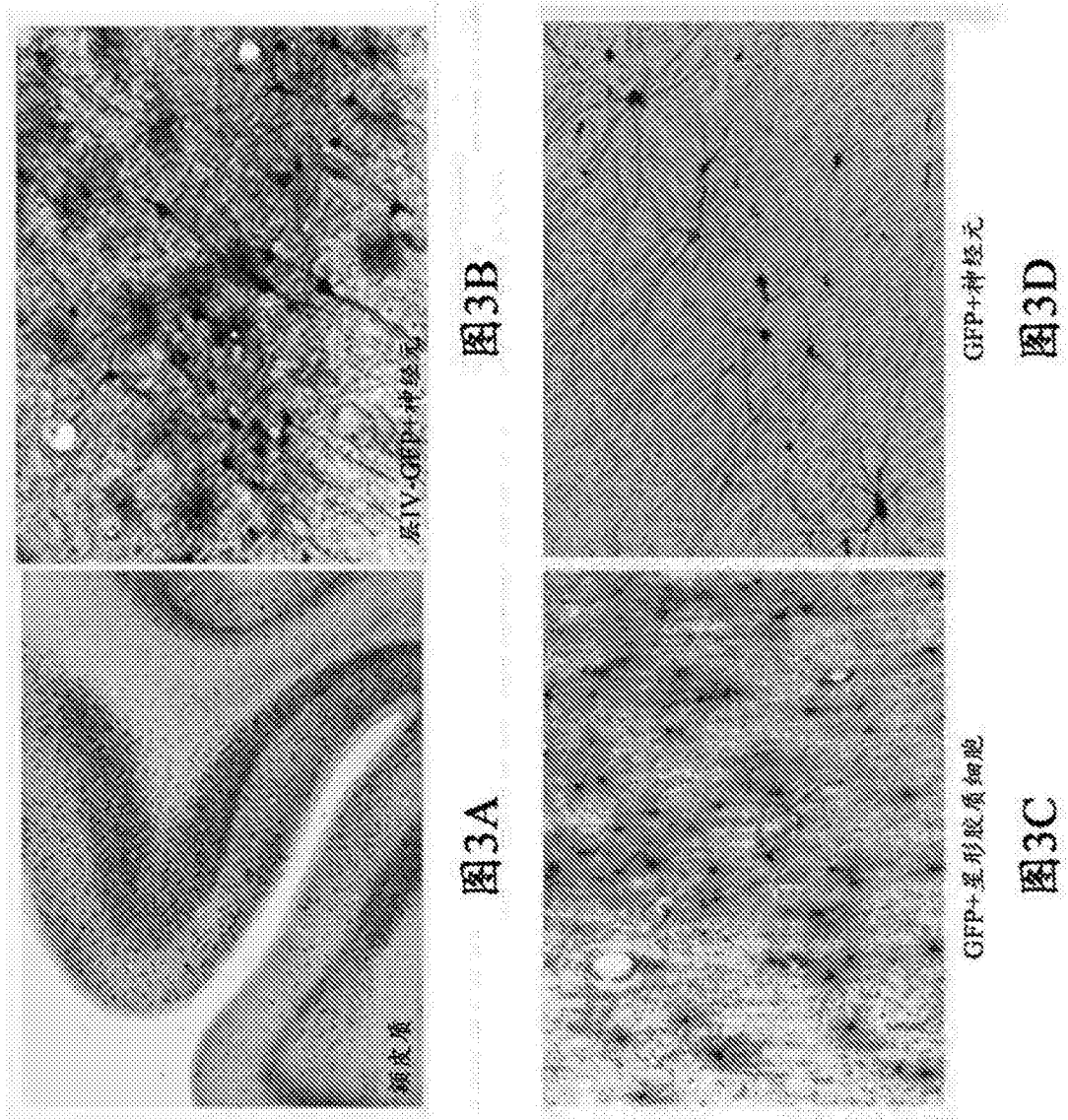


图3A-3D

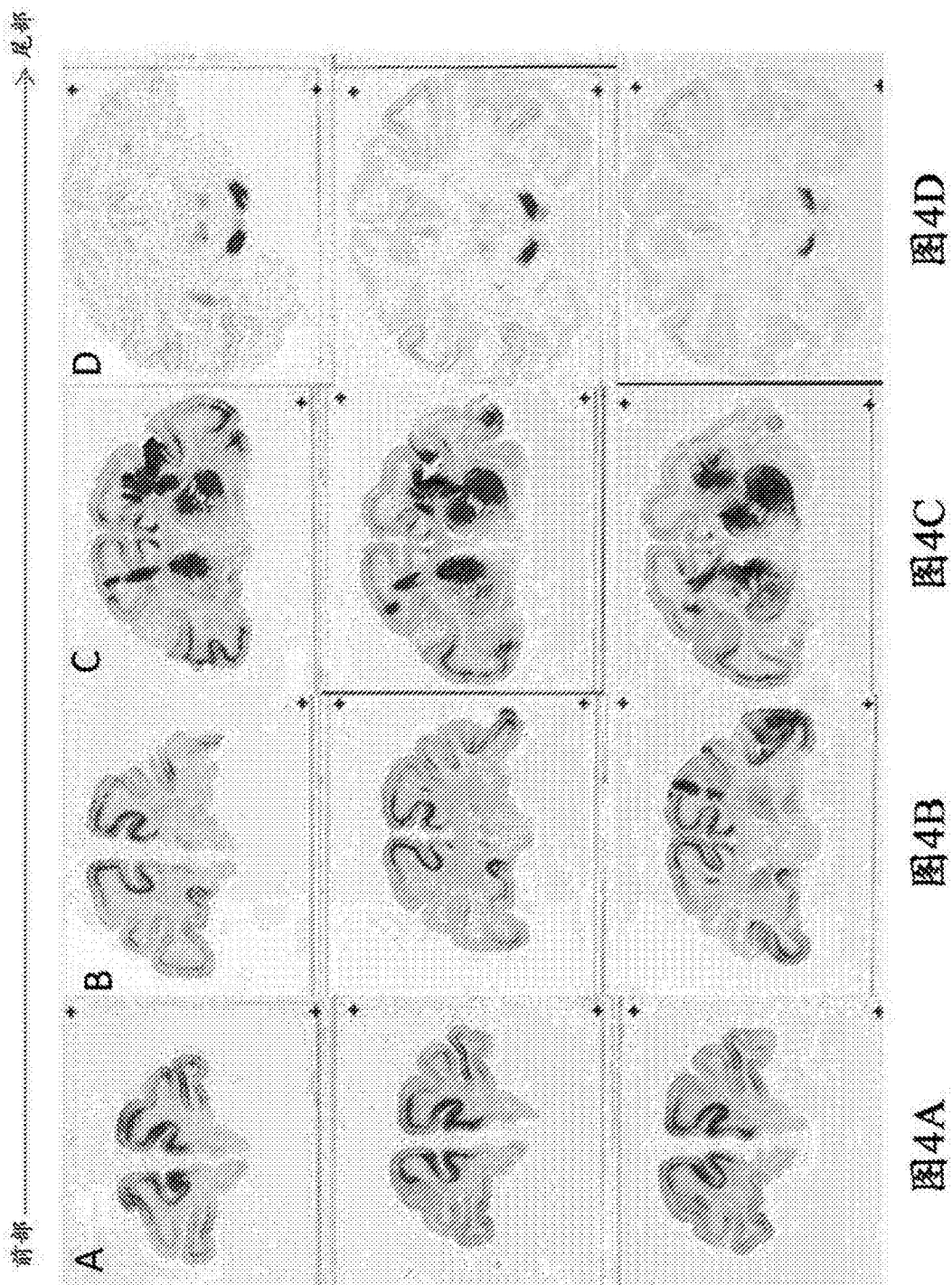


图4A-4D

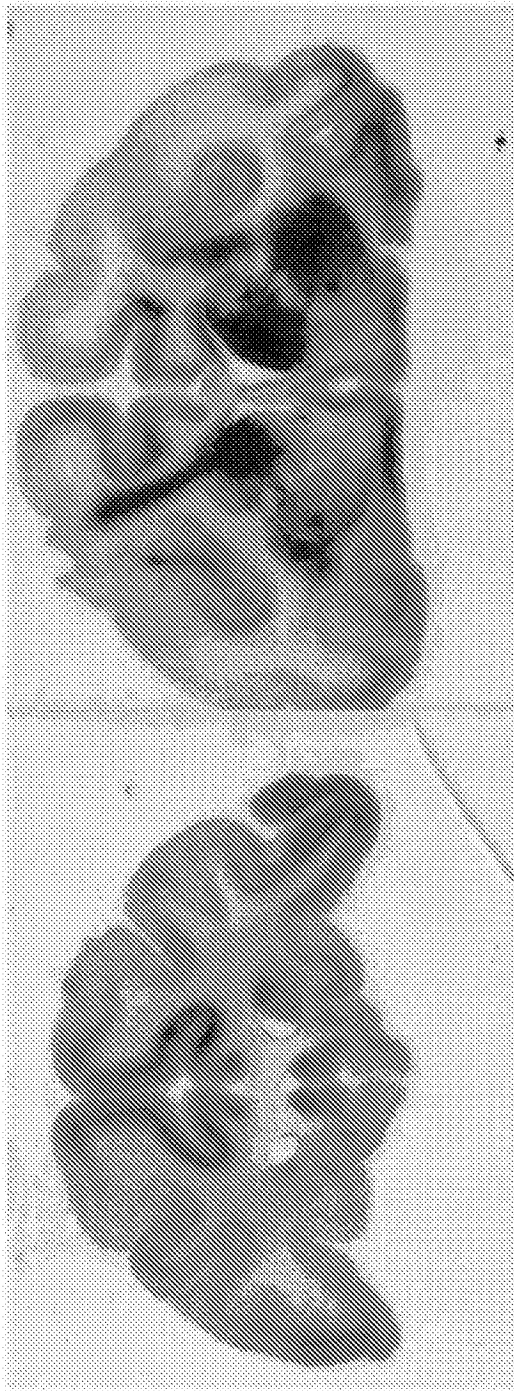


图5A



图5B



图5C

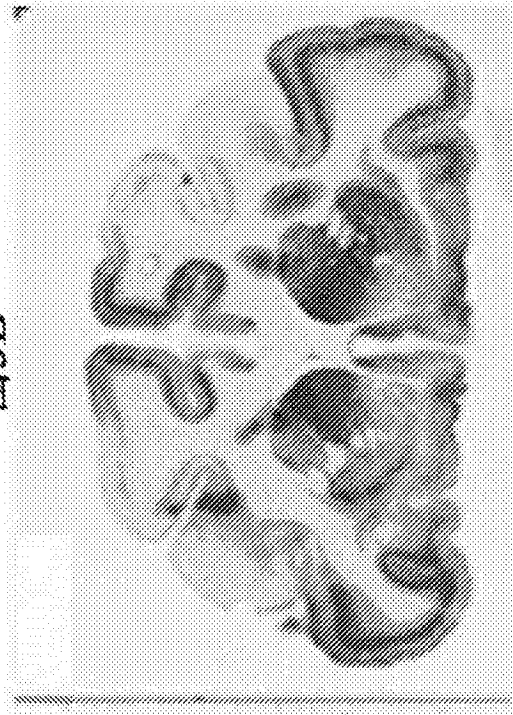


图5D

图5A-5D



图6A



图6B

图6C

图6D

图6A-6D

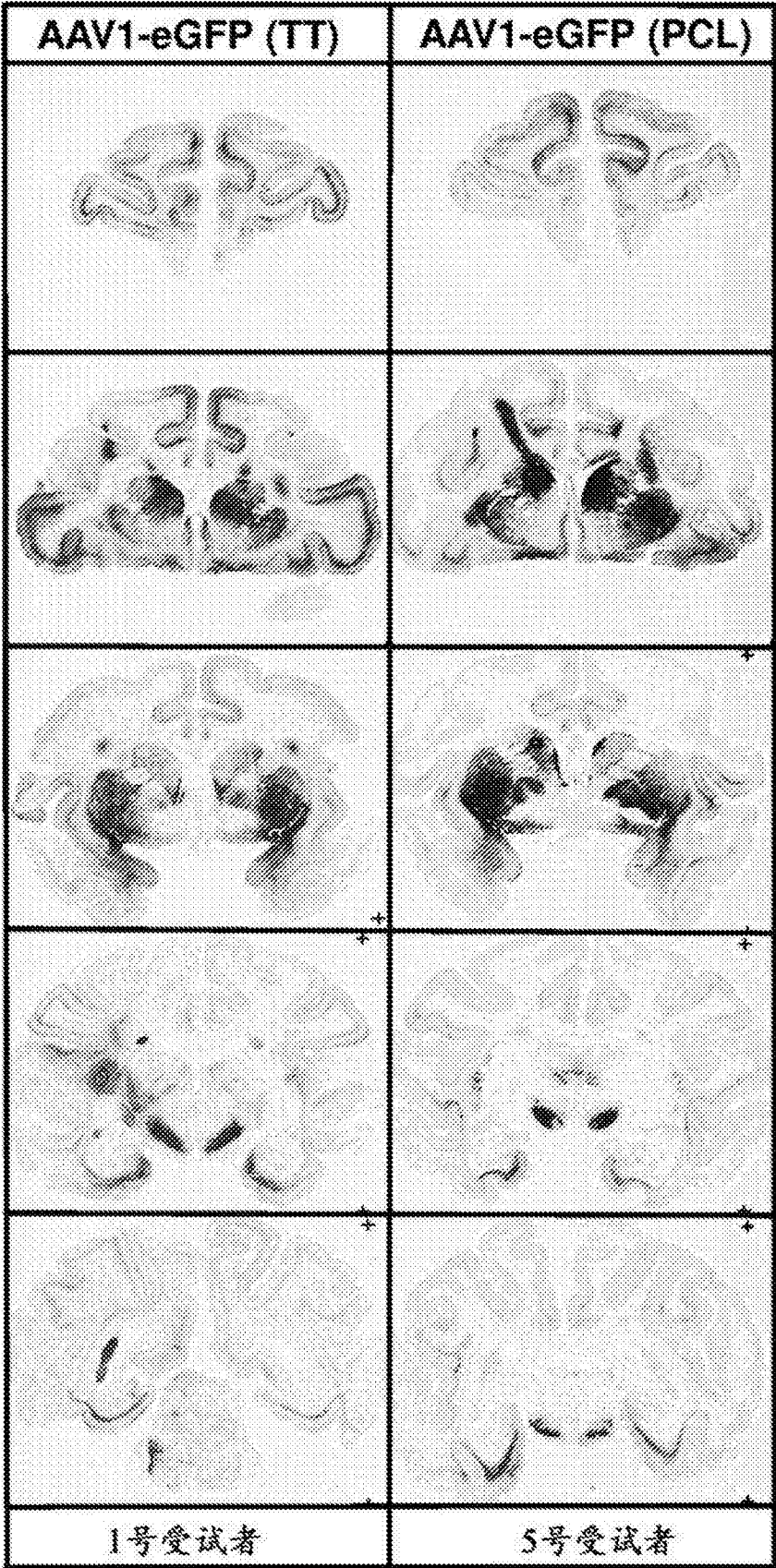


图7

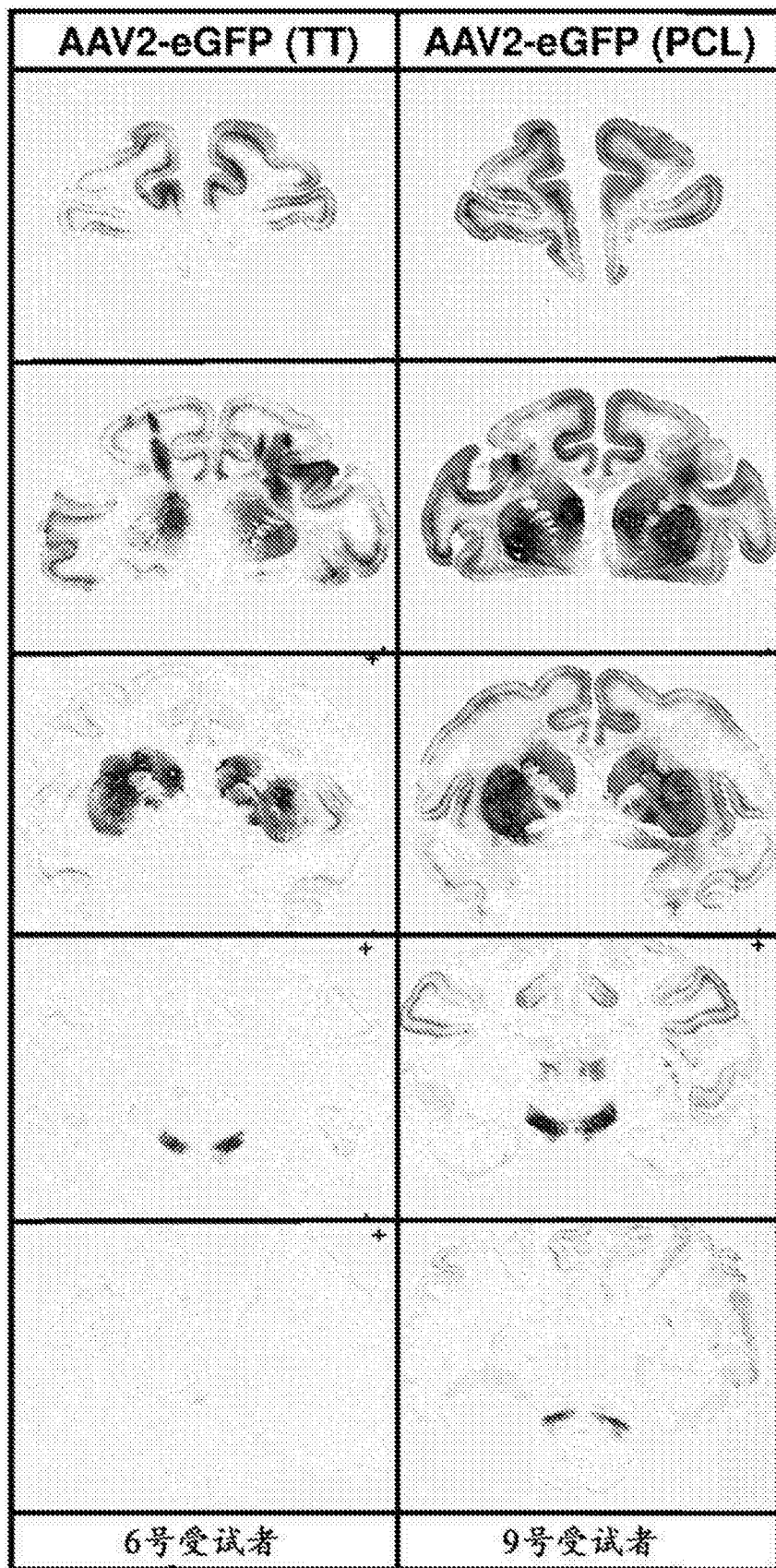


图7(续)

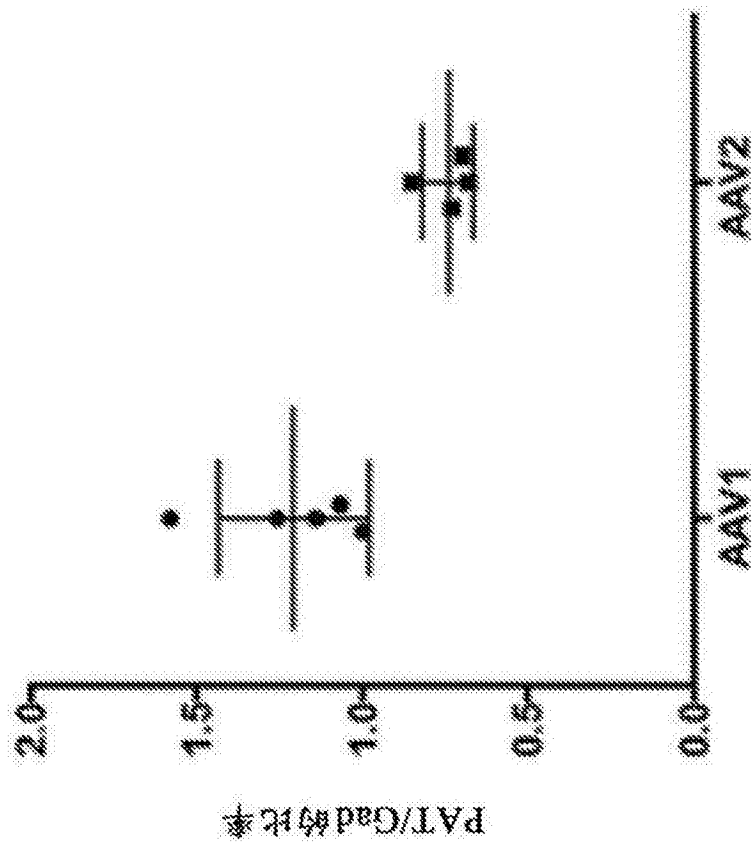


图8

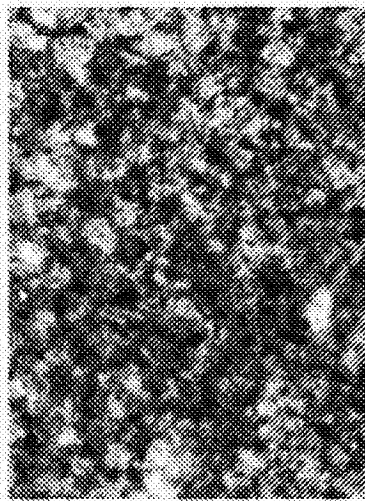


图9A

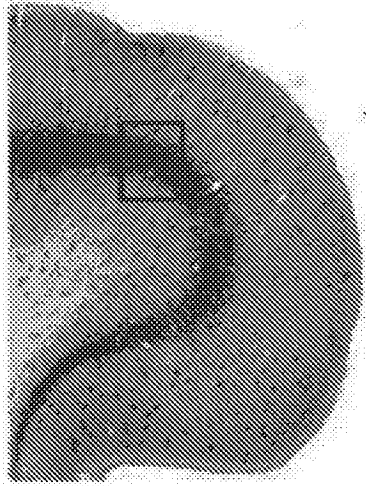


图9B

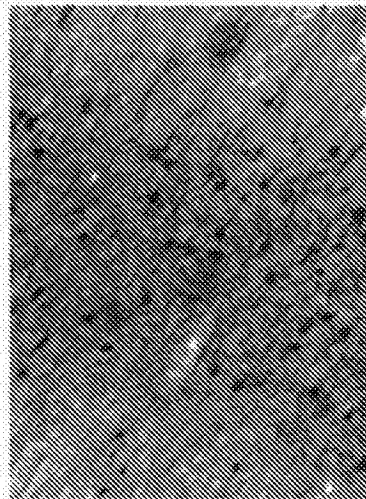


图9C

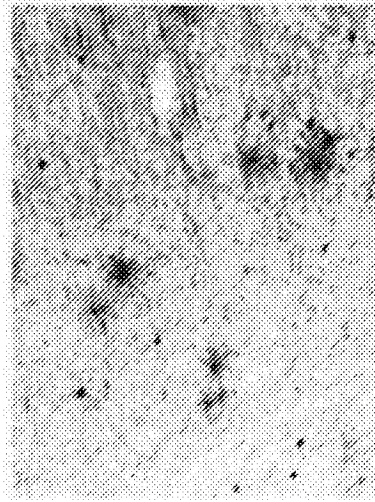


图9D

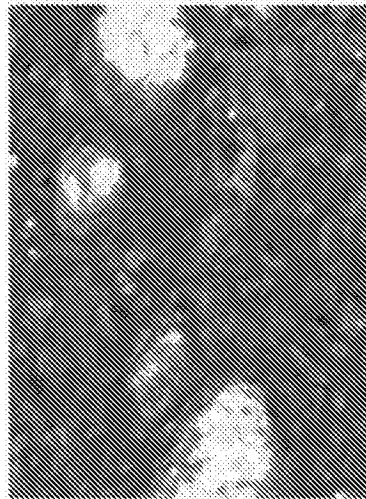


图9E



图9F

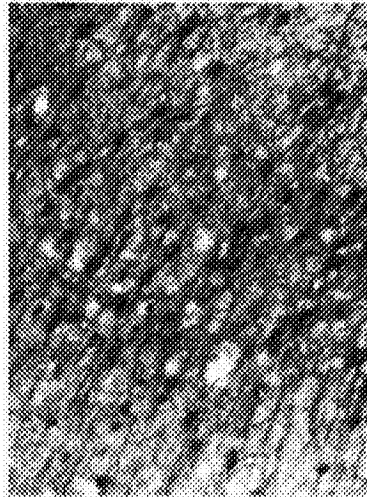


图9G

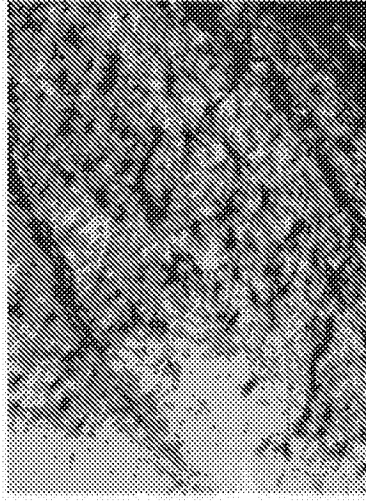


图9H



图10A

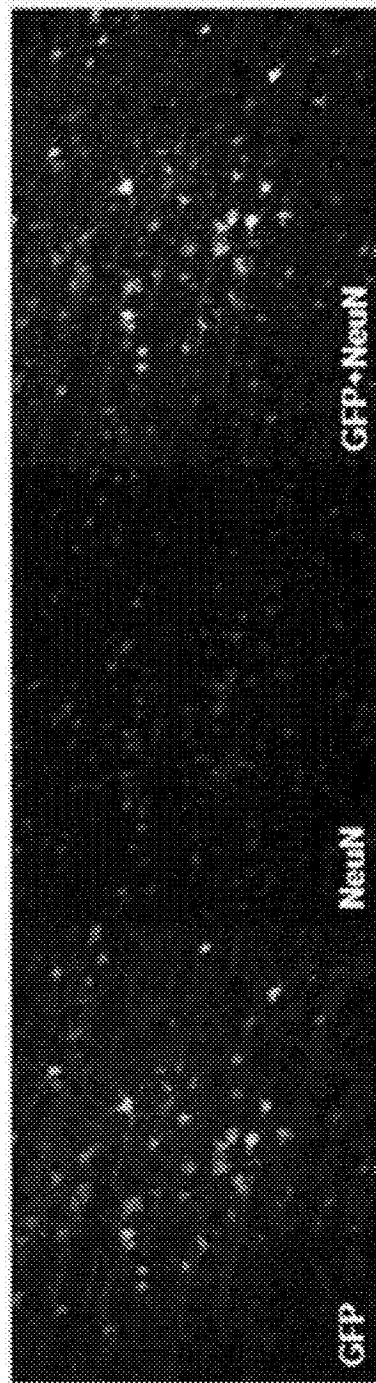


图10B

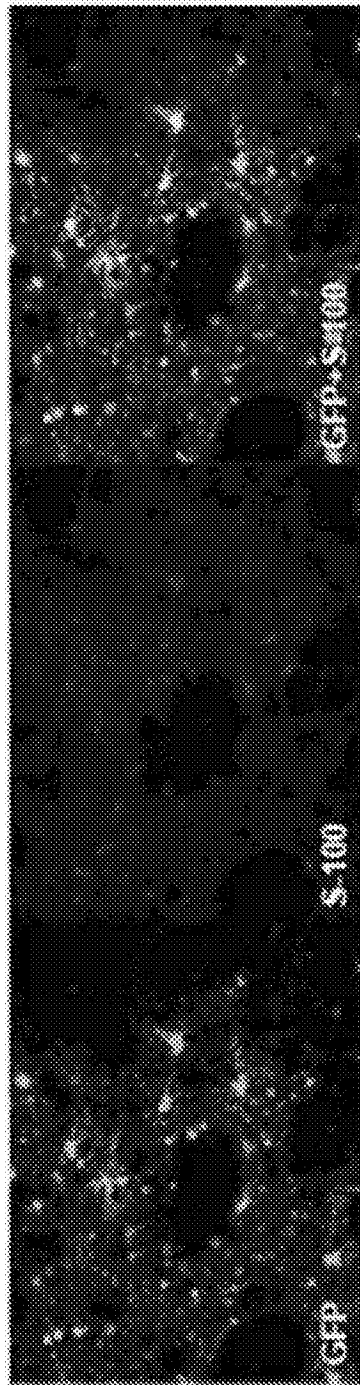


图10C

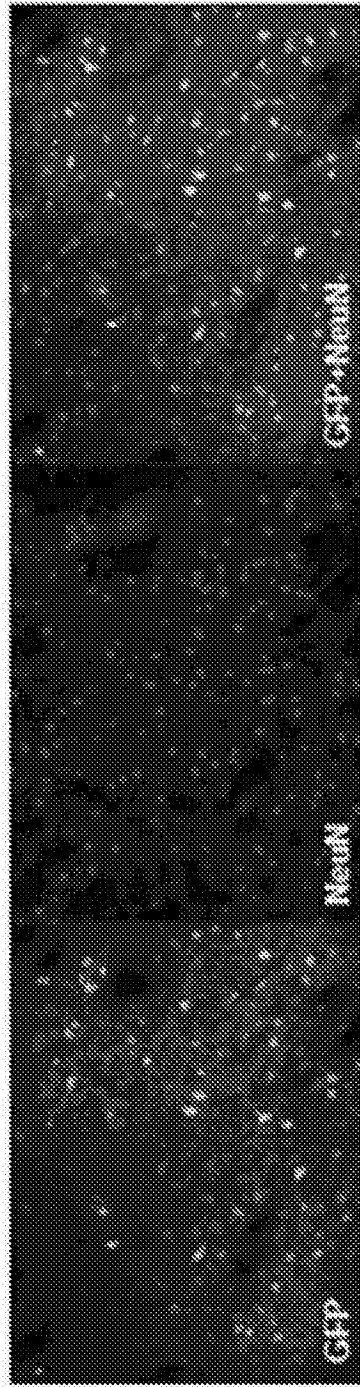


图10D

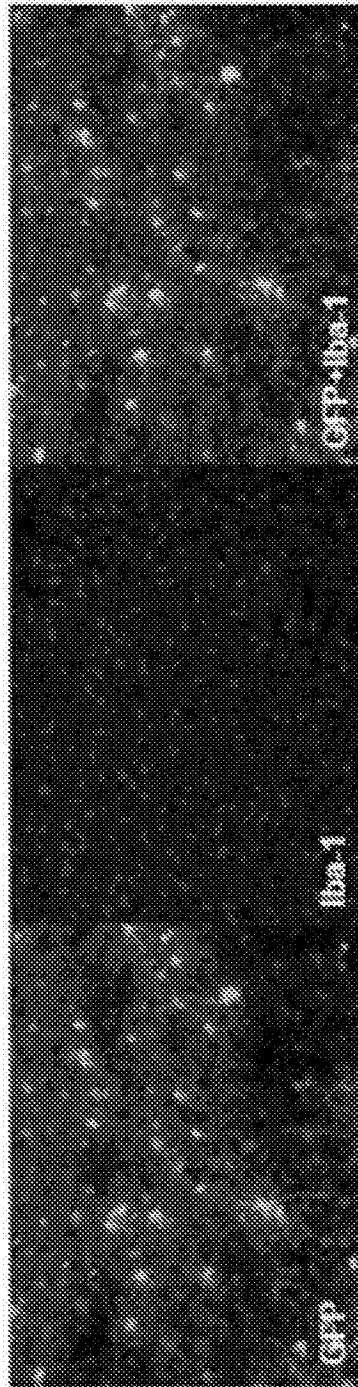


图10E

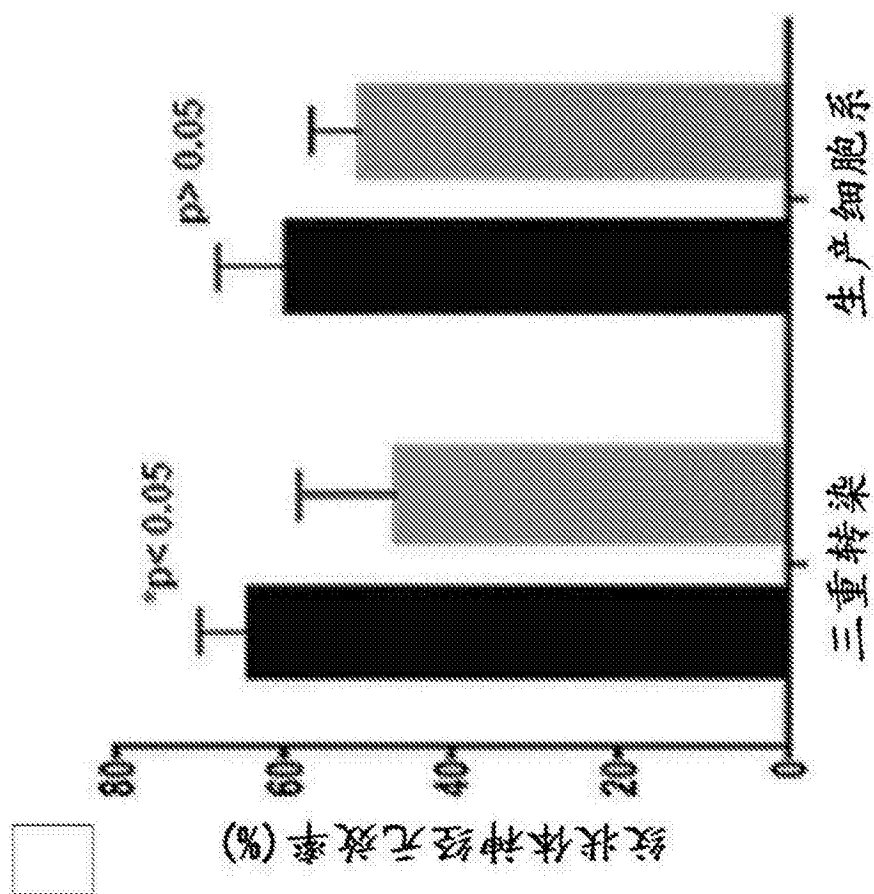


图11A

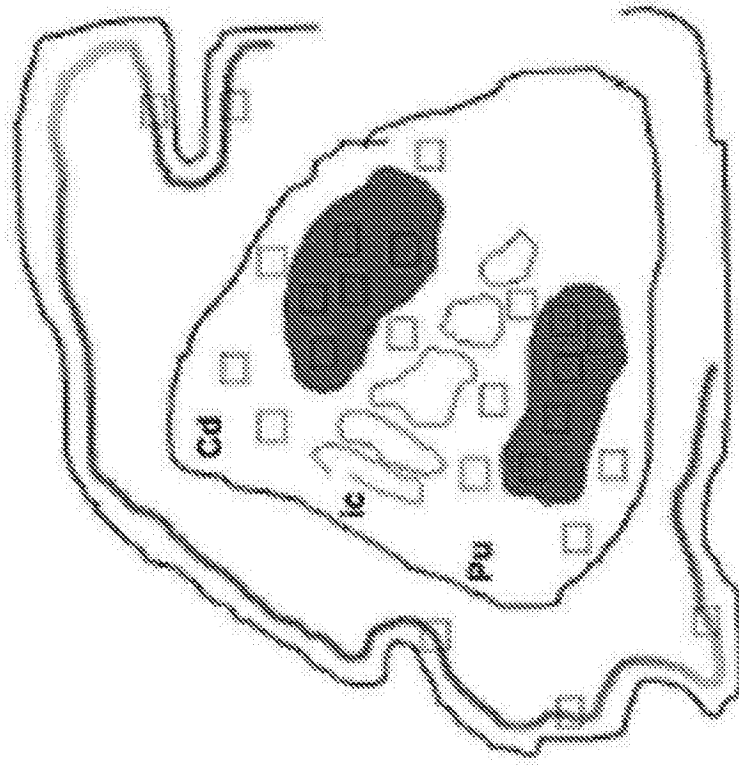


图11B

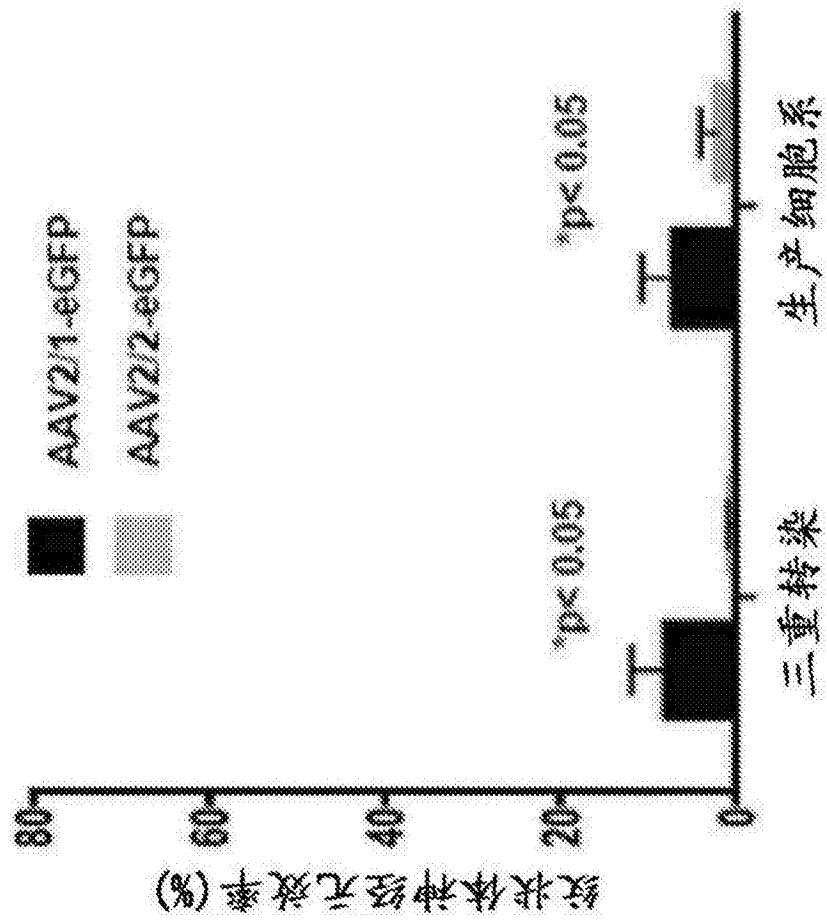


图11C

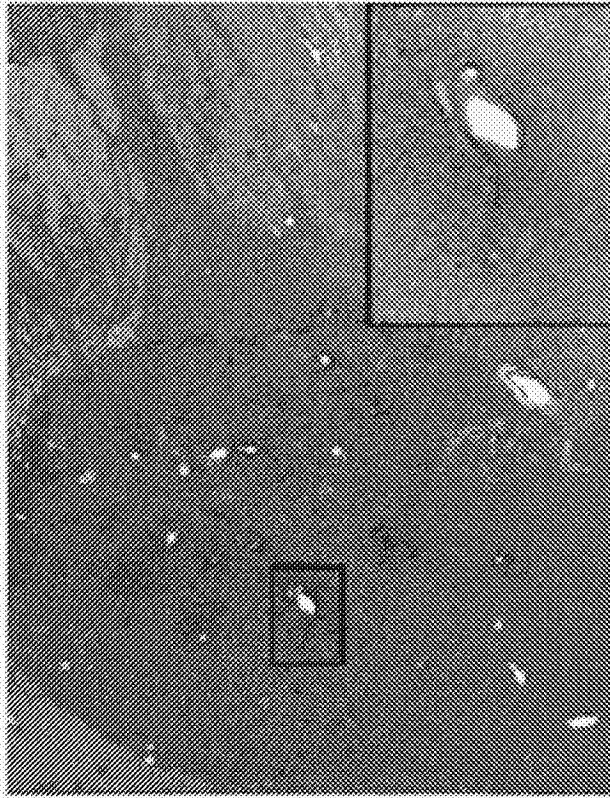


图12A

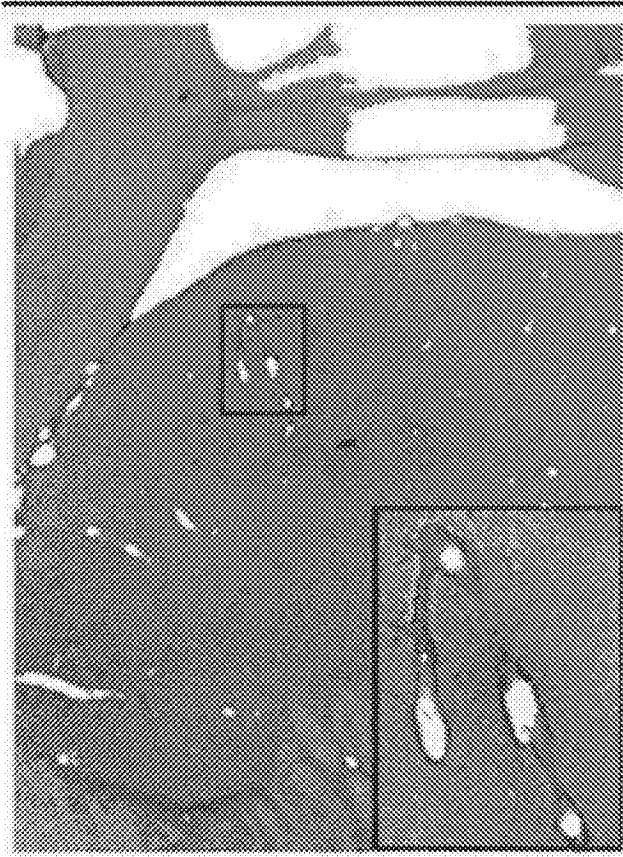


图12B

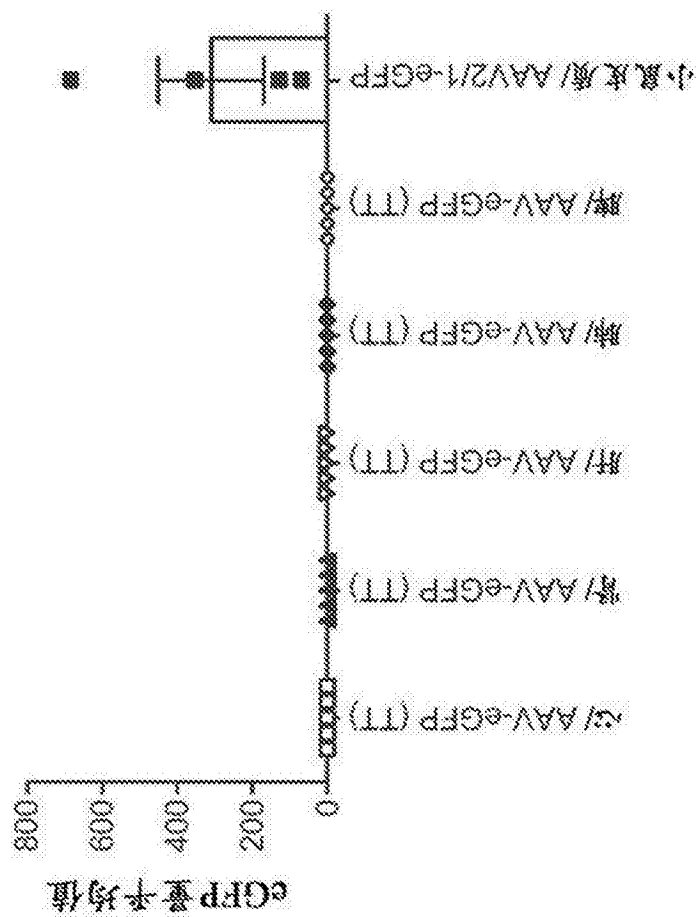


图13A

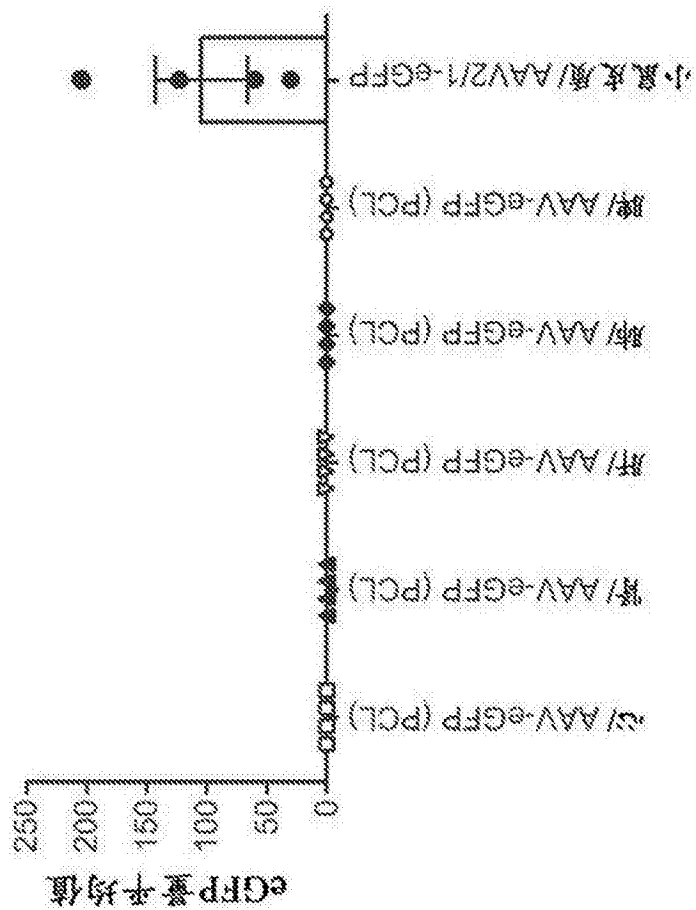


图13B