



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117120619 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 24

(21) 申请号 202180066205.8

S • 贾格塔普

(22) 申请日 2021.07.26

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

(30) 优先权数据

72003

63/057,265 2020.07.27 US

专利代理师 付文川

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2023.03.27

C12N 15/86 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/043216 2021.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/026409 EN 2022.02.03

(71) 申请人 沃雅戈治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G • 穆里达兰 J • 布朗 E • 诺尔

舒颜群 K • 贝尔斯 侯金兆

A • 阿德鲁伊 B • 霍夫曼

权利要求书13页 说明书222页

序列表 (电子公布) 附图12页

(54) 发明名称

用于治疗与葡萄糖神经酰胺酶 β 缺陷相关的神经病症的组合物和方法

(57) 摘要

本公开涉及无论在体外和/或体内用于改变(例如,增强)GCase蛋白表达的组合物和方法。此类组合物包括腺相关病毒(AAV)粒子的递送。本公开的组合物和方法可用于治疗经诊断患有或疑似患有帕金森病或由GBA基因产物的量和/或功能缺陷引起或与GCase蛋白的表达或蛋白水平降低有关的相关疾患的受试者。

1. 一种包含编码 β -葡萄糖脑苷脂酶 (GBA) 蛋白的转基因的经分离 (例如, 重组) 的核酸, 其中编码所述 GBA 蛋白的核苷酸序列包含与 SEQ ID NO: 1773 的核苷酸序列至少 90% 同一的核苷酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的经分离的核酸, 其中编码所述 GBA 蛋白的核苷酸序列包含 SEQ ID NO: 1773 的核苷酸序列, 或与 SEQ ID NO: 1773 至少 95% 同一的核苷酸序列。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的经分离的核酸, 所述核酸还包含编码 miR 结合位点的核苷酸序列, 所述 miR 结合位点降低表达相应 miRNA 的细胞或组织中由所述核酸编码的所述 GBA 蛋白的表达, 任选地其中所述经编码的 miRNA 结合位点与 DRG、肝脏、造血系统或它们的组合的细胞或组织中表达的 miRNA 互补, 例如, 完全互补或部分互补。

4. 一种经分离 (例如, 重组) 的病毒基因组, 所述病毒基因组包含含有编码 GBA 蛋白的转基因的核酸, 并且还包含编码 miR 结合位点的核苷酸序列, 所述 miR 结合位点调节 (例如, 降低) DRG、肝脏、造血谱系或它们的组合的细胞或组织中所述经编码的 GBA 蛋白的表达。

5. 如权利要求 3 所述的经分离的核酸或如权利要求 4 所述的病毒基因组, 其中所述经编码的 miR 结合位点包括 miR183 结合位点、miR122 结合位点、miR-142-3p 或它们的组合, 任选地其中:

(i) 所述经编码的 miR183 结合位点包含 SEQ ID NO: 1847 的核苷酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、92%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的核苷酸序列; 或具有 SEQ ID NO: 1847 的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

(ii) 所述经编码的 miR122 结合位点包含 SEQ ID NO: 1865 的核苷酸序列, 或与其具有至少 85%、90%、92%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的核苷酸序列; 或具有 SEQ ID NO: 1865 的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列; 和/或

(iii) 所述经编码的 miR-142-3p 结合位点包含 SEQ ID NO: 1869 的核苷酸序列, 或与其具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的核苷酸序列; 或具有 SEQ ID NO: 1869 的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列。

6. 如权利要求 1-3 中任一项所述的经分离的核酸, 或如权利要求 4 或 5 所述的病毒基因组, 其中所述核酸进一步编码增强元件, 其中经编码的增强元件包含以下一者、两者或全部:

(a) 鞘脂激活蛋白原多肽、鞘脂激活蛋白 C 多肽或其功能片段或变体, 任选地包含 SEQ ID NO: 1789、1758、1750、1752、1754、1756-1758、1784 或 1785 的氨基酸序列, 相对于 SEQ ID NO: 1789、1758、1750、1752、1754、1756-1758、1784 或 1785 具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代 (例如, 保守取代) 的氨基酸序列; 或与其至少 85% 同一的氨基酸序列;

(b) 细胞穿透肽, 任选地包含 SEQ ID NO: 1794、1796 或 1798 中的任一者的氨基酸序列, 或相对于 SEQ ID NO: 1794、1796 或 1798 具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代 (例如, 保守取代) 的氨基酸序列; 或

(c) 溶酶体靶向序列, 任选地包含 SEQ ID NO: 1800、1802、1804、1806 或 1808 中的任一者

的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1800、1802、1804、1806或1808具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列。

7.一种包含编码GBA蛋白和增强元件的转基因的经分离(例如,重组)的核酸,其中经编码的增强元件包含以下一者、两者或全部:

(a) 鞘脂激活蛋白C多肽或其功能片段或变体,任选地包含SEQ ID NO:1789或1758的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;

(b) 细胞穿透肽,任选地包含SEQ ID NO:1794、1796或1798中的任一者的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1794、1796或1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;或

(c) 溶酶体靶向序列,任选地包含SEQ ID NO:1800、1802、1804、1806或1808中的任一者的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1800、1802、1804、1806或1808具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列。

8.如权利要求6或7所述的经分离的核酸,或如权利要求6所述的病毒基因组,其中:

(i) 所述经编码的增强元件包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1789具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;

(ii) 编码所述增强元件的核苷酸序列包含1787的核苷酸序列,或与其至少85%同一的核苷酸序列或核苷酸序列;

(iii) 所述经编码的增强元件包含1802的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1802具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;

(iv) 编码所述增强元件的核苷酸序列包含1801的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1801具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的核苷酸序列;

(v) 所述经编码的增强元件包含1794的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1794具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;或

(vi) 编码所述增强元件的核苷酸序列包含1793的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1793具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的核苷酸序列。

9.如权利要求7或8所述的经分离的核酸,或如权利要求4-6或8中任一项所述的病毒基因组,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773、1777或1781中的任一者的核苷酸序列,或与其至少90%(例如,至少92%、95%、97%、98%或99%)同一的核苷酸序列。

10.如权利要求6-9中任一项所述的经分离的核酸,或如权利要求6或8-9中任一项所述的病毒基因组,其中所述经编码的增强元件和所述经编码的GBA蛋白直接连接(例如,在无连接子的情况下)或经由经编码的连接子连接。

11.如权利要求10所述的经分离的核酸或病毒基因组,其中:

(i) 所述经编码的连接子包含SEQ ID NO:1854、1855、1843、1845中的任一者的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854、1855、1843、1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;

(ii) 编码所述连接子的核苷酸序列包含表2的核苷酸序列中的任一者,或相对于表2的序列具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的核苷酸序列;

(iii) 编码所述连接子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724、1726、1729或1730中的任一者的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1724、1726、1729或1730具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的核苷酸序列;

(iv) 所述经编码的连接子包含弗林蛋白酶裂解位点;

(v) 所述经编码的连接子包含T2A多肽;

(vi) 所述经编码的连接子包含(Gly4Ser)_n连接子,其中n是1-10,例如,n是3、4或5;和/或

(vii) 所述经编码的连接子包含(Gly4Ser)₃连接子。

12. 如权利要求6-11中任一项所述的经分离的核酸,或如权利要求6或8-11中任一项所述的病毒基因组,其中:

(i) 编码所述增强元件的核苷酸序列位于相对于编码所述GBA蛋白的核苷酸序列的5'处;和/或

(ii) 编码所述增强元件的核苷酸序列位于相对于编码所述GBA蛋白的核苷酸序列的3'处。

13. 如权利要求1-3或5-12中任一项所述的经分离的核酸,或如权利要求4-6或8-12中任一项所述的病毒基因组,其进一步编码信号序列,任选地其中:

(i) 所述经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1853或1857的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;和/或

(ii) 编码所述信号序列的核苷酸序列位于相对于编码所述GBA蛋白的核苷酸序列的5'处;和/或相对于所述经编码的增强元件的5'处。

14. 如权利要求1-3或5-13中任一项所述的经分离的核酸,或如权利要求4-6或8-13中任一项所述的病毒基因组,其中:

(i) 所述核酸按5'至3'的顺序包含:编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850的核苷酸序列,或与其至少85%同一的核苷酸序列;以及编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列,或与其至少85%同一的核苷酸序列;或

(ii) 所述核酸按5'至3'的顺序编码:信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;以及GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列。

15. 如权利要求7-13中任一项所述的经分离的核酸,或如权利要求4-6或8-13中任一项所述的病毒基因组,其中所述核酸按5'到3'的顺序编码:

(i) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1800的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1800具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;

(ii) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1802的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;以及GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;

(iii) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1804的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1804具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;

(iv) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1806的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1806具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;

(v) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;连接子,所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1798的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;

(vi) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;连接子,所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1794的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1794具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;

(vii) 第一信号序列,所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1785的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;

(viii) 第一信号序列,所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ

ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;

(ix) 第一信号序列,所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1758的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;

(x) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;连接子,所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1796的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;

(xi) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1794的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1794具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;连接子,所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;

(xii) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1808的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1808具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;

(xiii) 第一信号序列,所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;第一增强元件,所述第一增强元件包含SEQ ID NO:1802的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两

个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及第二增强元件,所述第二增强元件包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;

(xiv) 第一信号序列,所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;连接子,所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第一增强元件,所述第一增强元件包含SEQ ID NO:1798的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;或

(xv) 第一信号序列,所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;第一增强元件,所述第一增强元件包含SEQ ID NO:1802的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列;连接子,所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第一增强元件,所述第一增强元件包含SEQ ID NO:1798的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或与其至少85%同一的氨基酸序列。

16. 一种经分离(例如,重组)的病毒基因组,所述病毒基因组包含可操作地连接至如权利要求1-3或7-15中任一项所述的核酸的启动子。

17. 如权利要求4-6或7-15所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含可操作地连接至包含编码所述GBA蛋白的所述转基因的所述核酸的启动子,其中所述启动子包含组织特异性启动子或泛在启动子。

18. 如权利要求16或17所述的病毒基因组,其中所述启动子包含:

(i) 鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子和/或其衍生物CAG、EF-1a启动子、CMV立即早期增强子和/或启动子、 β 葡萄糖醛酸苷酶 (GUSB) 启动子、泛素C (UBC) 启动子、神经元特异性烯醇酶 (NSE)、血小板源性生长因子 (PDGF) 启动子、血小板源性生长因子B链 (PDGF- β) 启动子、细胞间粘附分子2 (ICAM-2) 启动子、突触蛋白 (Syn) 启动子、甲基-CpG结合蛋白2 (MeCP2) 启动子、Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II (CaMKII) 启动子、代谢型谷氨酸受体2 (mGluR2) 启动子、神经丝轻 (NFL) 或重 (NFH) 启动子、 β -球蛋白小基因n β 2启动子、前脑啡肽原 (PPE) 启动子、脑啡肽 (Enk) 和兴奋性氨基酸转运子2 (EAAT2)、神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 启动子、髓鞘碱性蛋白 (MBP) 启动子、心血管启动子 (例如, α MHC、cTnT和CMV-MLC2k)、肝脏启动子 (例如, hAAT、TBG)、骨骼肌启动子 (例如, 结蛋白、MCK、C512) 或其片段 (例如, 截短) 或功能变体; 和/或

(ii) SEQ ID NO:1832、1833、1834、1835、1836、1839、1840中的任一者的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

19. 如权利要求16-18中任一项所述的病毒基因组, 其中所述启动子或其功能变体包含:

(i) SEQ ID NO:1834的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 或

(ii) SEQ ID NO:1839或1840的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

20. 如权利要求4-6或8-19中任一项所述的病毒基因组, 所述病毒基因组还包含增强子, 任选地包含SEQ ID NO:1831的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

21. 如权利要求4-6或8-20所述的病毒基因组, 所述病毒基因组包含增强子, 所述增强子包含SEQ ID NO:1831的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 以及启动子, 所述启动子包含SEQ ID NO:1834的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

22. 如权利要求4-6或8-20中任一项所述的病毒基因组, 所述病毒基因组还包含:

(i) 反向末端重复 (ITR) 序列, 任选地其中所述ITR序列位于相对于编码所述GBA蛋白的所述转基因的5'处和/或所述ITR序列位于相对于编码所述GBA蛋白的所述转基因的3'处;

(ii) 聚腺苷酸化 (聚A) 信号区;

(iii) 内含子区;

(iv) 外显子区, 例如, 至少一个、两个或三个外显子区;

(v) Kozak序列。

23. 如权利要求22所述的病毒基因组, 其中:

(i) 所述ITR包含SEQ ID NO:1829或1830的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 或

(ii) 位于相对于包含编码所述GBA蛋白的所述转基因的所述核酸的5'处的所述ITR包含SEQ ID NO:1829的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 和/或位于相对于包含编码所述GBA蛋白的所述转基因的所述核酸的3'处的所述ITR包含SEQ ID NO:1830的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

24. 如权利要求22或23所述的病毒基因组, 其中:

(i) 所述聚腺苷酸化 (聚A) 信号区包含SEQ ID NO:1846的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(ii) 所述内含子包含 β -球蛋白内含子; 和/或

(iii)所述内含子包含SEQ ID NO:1842的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

25.如权利要求3、5-6或8-24中任一项所述的经分离的核酸,或如权利要求4-6或8-24中任一项所述的病毒基因组,其包含:

(i)所述经编码的miR结合位点的至少1-5个拷贝,例如,至少1、2、3、4或5个拷贝;

(ii)经编码的miR结合位点的至少4个拷贝,任选地其中所有四个拷贝包含相同miR结合位点,或所述拷贝中的至少一者、两者、三者或全部包含不同miR结合位点,任选地其中所述经编码的miR结合位点的所述4个拷贝是连续的,例如,不由间隔子隔开;或由间隔子隔开。

26.如权利要求3、5-6或8-25中任一项所述的经分离的核酸,或如权利要求4-6或8-25中任一项所述的病毒基因组,其中所述病毒基因组包含:

(i)第一经编码的miR183结合位点,所述结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或与其具有至少85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

(ii)第一间隔子序列,所述间隔子序列包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;

(iii)第二经编码的miR183结合位点,所述结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或与其具有至少85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

(iv)第二间隔子序列,所述间隔子序列包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;

(v)第三经编码的miR183结合位点,所述结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或与其具有至少85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

(vi)第三间隔子序列,所述间隔子序列包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;以及

(vii)第四经编码的miR183结合位点,所述结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或与其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列。

27.一种经分离(例如,重组)的病毒基因组,所述病毒基因组按5'至3'的顺序包含:

(i)5'腺相关(AAV) ITR,任选地其中所述5'AAV ITR包含SEQ ID NO:1829的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(ii)CMVie增强子,任选地其中所述CMVie增强子包含SEQ ID NO:1831的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(iii)CB启动子或其功能变体,任选地其中所述CB启动子或其功能变体包含SEQ ID

N0:1834的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(iv) 内含子,任选地其中所述内含子包含SEQ ID N0:1842的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(v) 编码信号序列的核苷酸序列,任选地其中编码所述信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID N0:1850的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(vi) 编码GBA蛋白的转基因,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID N0:1773的核苷酸序列,或与SEQ ID N0:1773的核苷酸序列至少88%同一的核苷酸序列;

(vii) 聚A信号区,任选地其中所述聚A信号区包含SEQ ID N0:1846的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;以及

(viii) 3' AAV ITR,任选地其中所述3' AAV ITR包含SEQ ID N0:1830的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

28. 一种经分离(例如,重组)的病毒基因组,所述病毒基因组按5'至3'的顺序包含:

(i) 5'腺相关(AAV) ITR,任选地其中所述5' AAV ITR包含SEQ ID N0:1829的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(ii) CMVie增强子,任选地其中所述CMVie增强子包含SEQ ID N0:1831的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(iii) CB启动子或其功能变体,任选地其中所述CB启动子或其功能变体包含SEQ ID N0:1834的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(iv) 内含子,任选地其中所述内含子包含SEQ ID N0:1842的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(v) 编码信号序列的核苷酸序列,任选地其中编码所述信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID N0:1850的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

(vi) 编码GBA蛋白的转基因,任选地其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID N0:1773的核苷酸序列,或与SEQ ID N0:1773的核苷酸序列至少88%同一的核苷酸序列;

(vii) 经编码的miR183结合位点,任选地其中所述经编码的miR183结合位点包含SEQ ID N0:1847的核苷酸序列,或具有SEQ ID N0:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

(viii) 间隔子序列,任选地其中所述间隔子包含SEQ ID N0:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID N0:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;

(ix) 经编码的miR183结合位点,任选地其中所述经编码的miR183结合位点包含SEQ ID N0:1847的核苷酸序列,或具有SEQ ID N0:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

(x) 间隔子序列,任选地其中所述间隔子包含SEQ ID N0:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID N0:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;

(xi) 经编码的miR183结合位点,任选地其中所述经编码的miR183结合位点包含SEQ ID N0:1847的核苷酸序列,或具有SEQ ID N0:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

(xii) 间隔子序列,任选地其中所述间隔子包含SEQ ID N0:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID N0:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;

(xiii) 经编码的miR183结合位点,任选地其中所述经编码的miR183结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

(xiv) 聚A信号区,任选地其中所述聚A信号区包含SEQ ID NO:1846的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;以及

(xv) 3'AAV ITR,任选地其中所述3'AAV ITR包含SEQ ID NO:1830的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

29. 如权利要求4-6或8-28中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组包含SEQ ID NO:1812、1829、1759-1771、1809-1811、1813-1827或1870的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

30. 如权利要求4-6或8-29中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组:

(i) 是单链的;

(ii) 还包含编码衣壳蛋白,例如结构蛋白的核酸,其中所述衣壳蛋白包含VP1多肽、VP2多肽和/或VP3多肽,任选地其中所述VP1多肽、所述VP2多肽和/或所述VP3多肽由至少一个Cap基因编码;和/或

(iii) 还包含编码Rep蛋白,例如非结构蛋白的核酸,其中所述Rep蛋白包含Rep78蛋白、Rep68、Rep52蛋白和/或Rep40蛋白,任选地其中所述Rep78蛋白、所述Rep68蛋白、所述Rep52蛋白和/或所述Rep40蛋白由至少一个Rep基因编码。

31. 一种经分离(例如,重组)的GBA蛋白,所述GBA蛋白由如权利要求1-3或5-15中任一项所述的经分离的核酸或如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组编码。

32. 一种经分离(例如,重组)的AAV粒子,所述AAV粒子包含:

(i) 衣壳蛋白;以及

(ii) 如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组。

33. 如权利要求32的AAV粒子,其中:

(i) 所述衣壳蛋白包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列,或与其具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;

(ii) 所述衣壳蛋白包含具有SEQ ID NO:138的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的氨基酸序列;

(iii) 所述衣壳蛋白包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或与其具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;

(iv) 所述衣壳蛋白包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的氨基酸序列;

(v) 所述衣壳蛋白包含由SEQ ID NO:137的核苷酸序列或与其具有至少90%序列同一性的序列编码的氨基酸序列;和/或

(vi) 编码所述衣壳蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:137的核苷酸序列,或与其具有至少90%序列同一性的序列。

34. 如权利要求32或33所述的AAV粒子,其中所述衣壳蛋白包含:

(i) 根据SEQ ID NO:138编号在位置K449处的氨基酸取代,例如,K449R取代;

(ii) 包含TLAVPFK(SEQ ID NO:1262)的氨基酸序列的插入物,任选地其中相对于根据

SEQ ID NO:138编号的参考序列,所述插入物紧接在位置588之后存在;

(iii) 根据SEQ ID NO:138编号在位置587处的除“A”以外的氨基酸和/或在位置588处的除“Q”以外的氨基酸;

(iv) 根据SEQ ID NO:138编号的A587D和/或Q588G的氨基酸取代。

35. 如权利要求32-34中任一项所述的AAV粒子,其中:

(i) 所述衣壳蛋白包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或与其具有至少90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;

(ii) 所述衣壳蛋白包含相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列包含至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰,例如取代的氨基酸序列;

(iii) 所述衣壳蛋白包含由SEQ ID NO:2的核苷酸序列或与其具有至少90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列;和/或

(iv) 编码所述衣壳蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列,或与其具有至少90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

36. 一种载体,所述载体包含如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组或如权利要求1-3或5-15中任一项所述的核酸。

37. 一种包含如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组、如权利要求32-35中任一项所述的病毒粒子或如权利要求36所述的载体的细胞,任选地其中所述细胞是哺乳动物细胞,例如HEK293细胞;昆虫细胞,例如Sf9细胞;或细菌细胞。

38. 一种制造经分离(例如,重组)的AAV粒子的方法,所述方法包括

(i) 提供包含如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组的宿主细胞;以及

(ii) 在适合于将所述病毒基因组包裹于衣壳蛋白,例如VOY101衣壳蛋白中的条件下孵育所述宿主细胞;

从而制造所述经分离的AAV粒子。

39. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求32-35中任一项所述的AAV粒子,或包含如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组的AAV粒子,以及药学上可接受的赋形剂。

40. 一种向受试者递送外源GBA蛋白的方法,所述方法包括施用有效量的如权利要求39所述的药物组合物、如权利要求32-35中任一项所述的AAV粒子、包含如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组的AAV粒子,或包含含有如权利要求1-3或5-15中任一项所述的核酸的病毒基因组的AAV粒子,从而向所述受试者递送所述外源GBA蛋白。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述受试者患有、已诊断患有或有风险患有:

(i) 与GBA表达,例如异常或降低的GBA表达,例如GBA基因、GBA mRNA和/或GBA蛋白表达相关的疾病;或

(ii) 神经退化或神经肌肉病症。

42. 一种治疗患有或经诊断患有与GBA表达相关的疾病的受试者的方法,所述方法包括施用有效量的如权利要求39所述的药物组合物、如权利要求32-35中任一项所述的AAV粒子、包含如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组的AAV粒子,或包含含有如权利要求1-3或5-15中任一项所述的核酸的病毒基因组的AAV粒子,从而治疗所述受试者的所述与GBA表达相关的疾病。

43. 一种治疗患有或经诊断患有神经退化或神经肌肉病症的受试者的方法,所述方法包括施用有效量的如权利要求39所述的药物组合物、如权利要求32-35中任一项所述的AAV粒子、包含如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组的AAV粒子,或包含含有如权利要求1-3或5-15中任一项所述的核酸的病毒基因组的AAV粒子,从而治疗所述受试者的所述神经退化或神经肌肉病症。

44. 如权利要求41-43中任一项所述的方法,其中所述与GBA表达相关的疾病或所述神经退化或神经肌肉病症包括帕金森氏病(PD)、路易体痴呆(DLB)、戈谢病(GD)、脊髓性肌萎缩症(SMA)、多系统萎缩症(MSA)或多发性硬化症(MS)。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述PD是:

- (i) 与GBA基因突变相关;
- (ii) 早发型PD(例如,50岁之前)或青少年型PD(例如,20岁之前);
- (iii) 震颤主导、姿势不稳步态困难PD(PIGD);或
- (iv) 散发性PD(例如,与突变无关的PD)。

46. 如权利要求44所述的方法,其中所述GD是:

(i) 神经病性GD(例如,影响CNS的细胞或组织,例如脑和/或脊髓的细胞或组织)、非神经病性GD(例如,不影响CNS的细胞或组织),或它们的组合;或

(ii) I型GD(GD1)、2型GD(GD2)或3型GD(GD3),任选地其中所述GD1是非神经病性GD并且所述GD2是神经病性GD。

47. 如权利要求40-46中任一项所述的方法,其中所述受试者:

- (i) 在GBA基因、GBA mRNA和/或GBA蛋白中具有突变;和/或
- (ii) 是人类,任选地其中所述受试者是青少年(例如,介于6岁至20岁之间)或成人(例如,20岁以上)。

48. 如权利要求40-47中任一项所述的方法,其中静脉内、脑内、经由丘脑内(ITH)施用、肌肉内、鞘内、脑室内、经由实质内施用、经由聚焦式超声波(FUS)例如结合微泡静脉内施用(FUS-MB),或MRI引导的FUS结合静脉内施用,经由大池内注射(ICM),或经由双重ITH与ICM施用,向所述受试者施用所述AAV粒子。

49. 如权利要求40-48中任一项所述的方法,其中经由静脉内施用来施用所述AAV粒子,任选地其中所述静脉内施用是经由聚焦式超声波(FUS)例如结合微泡静脉内施用(FUS-MB),或MRI引导的FUS结合静脉内施用。

50. 如权利要求40-49中任一项所述的方法,其中所述施用使得以下至少一者、两者或全部增加:

(i) 所述受试者的细胞、组织(例如,CNS的细胞或组织,例如皮质、纹状体、丘脑、小脑和/或脑干)和/或流体(例如,CSF和/或血清)中GCase活性的水平,任选地其中与参考水平,例如尚未接受治疗,例如尚未施用所述AAV粒子的受试者相比,所述GCase活性水平增加至少3、4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4或5.5倍;

(ii) 所述受试者的CNS组织(例如,皮质、纹状体、丘脑、小脑、脑干和/或脊髓)中每个细胞的病毒基因组(VG)水平,任选地其中与外周组织相比,每个细胞的VG水平增加50VG以上,其中每个细胞的VG水平比CNS组织中的水平低至少4-10倍,例如,通过如本文所描述的测定所测量;和/或

(iii) 细胞或组织(例如,CNS的细胞或组织,例如皮质、丘脑和/或脑干)中GBA mRNA表达的水平,任选地其中与参考水平,例如尚未接受治疗(例如,尚未施用所述AAV粒子)的受试者或内源GBA mRNA水平相比,所述GBA mRNA水平增加至少100-1300倍,例如,100倍、200倍、500倍、600倍、850倍、900倍、950倍、1000倍、1050倍、1100倍、1150倍、1200倍、1250倍或1300倍,例如,通过如本文所描述的测定所测量。

51. 如权利要求40-50中任一项所述的方法,所述方法还包括施用适合于治疗或预防所述与GBA表达相关的疾病、所述神经退化病症和/或所述神经肌肉病症的额外治疗剂和/或疗法,任选地其中所述额外治疗剂包括酶替代疗法(ERT)(例如,伊米苷酶、维拉苷酶 α 或他利苷酶 α);底物还原疗法(SRT)(例如,依利格鲁司特或美格鲁特)、输血、左旋多巴、卡比多巴、沙芬酰胺、多巴胺激动剂(例如,普拉克索、罗替戈汀或罗匹尼罗)、抗胆碱剂(例如,苯扎托品或苯海索)、胆碱酯酶抑制剂(例如,利凡斯的明、多奈哌齐或加兰他敏)、N-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂(例如,美金刚)或它们的组合。

52. 如权利要求1-3或5-15中任一项所述的经分离的核酸、如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组、如权利要求32-35中任一项所述的AAV粒子或如权利要求39所述的药物组合物,其用于制造药剂。

53. 如权利要求1-3或5-15中任一项所述的经分离的核酸、如权利要求4-6或8-30中任一项所述的病毒基因组、如权利要求32-35中任一项所述的AAV粒子或如权利要求39所述的药物组合物,其用于治疗与GBA表达相关的疾病、神经肌肉和/或神经退化病症。

54. 一种有效量的包含如权利要求4-6或8-30中任一项所述的基因组的AAV粒子、包含含有如权利要求1-3或5-15中任一项所述的核酸的基因组的AAV粒子、如权利要求32-35中任一项所述的AAV粒子或如权利要求39所述的药物组合物的用途,其用于制造用以治疗与GBA表达相关的疾病、神经肌肉和/或神经退化病症的药剂。

用于治疗与葡萄糖神经酰胺酶 β 缺陷相关的神经病症的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2020年7月27日提交的美国临时申请号63/057,265的优先权。前述申请的全部内容特此以引用的方式并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请与电子格式的序列表一起提交。标题为135333-00120_SL.txt的序列表文档创建于2021年7月23日,并且大小为6,773,307字节。序列表的电子格式的信息以全文引用的方式并入本文中。

发明领域

[0005] 本文描述了涉及多核苷酸,例如编码葡萄糖神经酰胺酶 β (GBA) 蛋白和肽的多核苷酸的组合物和方法,所述多核苷酸用于治疗帕金森病 (Parkinson Disease, PD) 和相关病症,包括戈谢病 (Gaucher Disease) 和路易体痴呆 (统称为“GBA相关病症”)。在一些实施方案中,组合物可以在腺相关病毒 (AAV) 载体中递送。在其它实施方案中,本文所描述的组合物可以用于治疗有需要的受试者,诸如经诊断患有GBA相关病症或由GBA蛋白的量和/或功能缺陷引起的其它疾患的人类受试者,或作为研究此种疾病或疾患的细胞或动物模型中的疾病或疾患的研究工具。

背景技术

[0006] 溶酶体酸性葡萄糖神经酰胺酶,通常称为葡萄糖脑苷脂酶或GCase,即D-葡萄糖基-N-酰基鞘胺醇葡萄糖水解酶,是在糖脂代谢中重要的溶酶体膜蛋白。所述酶由葡萄糖神经酰胺酶 β (GBA) 基因 (Ensembl Gene ID编号ENSG00000177628) 编码。这种酶与鞘脂激活蛋白A (Saposin A) 和鞘脂激活蛋白C (Saposin C) 一起催化葡萄糖神经酰胺水解为神经酰胺和葡萄糖。参见Vaccaro, Anna Maria等, Journal of Biological Chemistry 272.27 (1997): 16862-16867,其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0007] 已知GBA中的突变导致人类受试者的疾病。纯合或复合杂合GBA突变导致戈谢病 (“GD”)。参见Sardi, S. Pablo, Jesse M. Cedarbaum和Patrik Brundin. Movement Disorders 33.5 (2018): 684-696,其内容以全文引用的方式并入本文中。戈谢病是最普遍的溶酶体储积症之一,据估计在一般人群中的标准化出生发病率为0.4至5.8个人/100,000人。杂合GBA突变可以导致PD。实际上,GBA突变在7-10%的总PD患者中发生,使得GBA突变成为最重要的PD遗传风险因素。PD-GBA患者的溶酶体酶 β -葡萄糖脑苷脂酶 (GCase) 水平降低,导致糖鞘脂葡萄糖神经酰胺 (GluCer) 的积累增加,进而与 α -突触核蛋白聚集加剧和伴随的神经症状相关联。在一些情况下,戈谢病和PD,以及其它溶酶体储积症,包括路易体病 (诸如路易体痴呆) 和相关疾病在GBA基因中共享共同的病因。参见Sidransky, E. 和Lopez, G. Lancet Neurol. 2012年11月;11 (11): 986-998,其内容以全文引用的方式并入。对于此类疾病存在有限的治疗选项。

[0008] 因此,仍然长期需要开发用于治疗PD和其它GBA相关病症以及改善罹患GBA相关病症的患者的GCase蛋白缺陷的药物组合物和方法。

发明内容

[0009] 本公开通过提供用于治疗患者的GCase缺陷的基于AAV的组合物和方法来解决这些挑战。本文公开了针对基于AAV的GCase基因递送以减轻功能丧失并改善细胞内脂质运输的组合物和方法。所述组合物和方法可用于改善溶酶体糖脂代谢,并且减缓、停止或逆转受试者(例如,具有GBA基因突变的受试者)的PD和GBA相关病症(例如,路易体痴呆(DLB)、戈谢病(GD))的神经退化和其它症状。 β -葡萄糖脑苷脂酶(GBA)蛋白在本文中有时也称作GCase蛋白。

[0010] 因此,在一个方面,本公开提供了一种包含编码GBA蛋白的转基因的经分离(例如,重组)的核酸,其中编码GBA蛋白的核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1773的核苷酸序列至少88%(例如,至少89、90、92、95、96、97、98或99%)同一的核苷酸序列,例如,密码子优化的核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸进一步编码增强元件,例如,本文所描述的增强元件。

[0011] 在另一个方面,本公开提供了一种包含编码GBA蛋白和增强元件的转基因的经分离(例如,重组)的核酸,其中经编码的增强元件包含:鞘脂激活蛋白C多肽或其功能片段或变体,任选地包含SEQ ID NO:1789或1758的氨基酸序列,或与其至少85%(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;细胞穿透肽,任选地包含SEQ ID NO:1794、1796或1798中的任一者的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1794、1796或1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;和/或溶酶体靶向序列,任选地包含SEQ ID NO:1800、1802、1804、1806或1808中的任一者的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1800、1802、1804、1806或1808具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列。

[0012] 在另一个方面,本公开提供了一种经分离(例如,重组)的病毒基因组,所述病毒基因组包含含有编码GBA蛋白的转基因的核酸,并且还包含编码miR结合位点的核苷酸序列,所述miR结合位点调节(例如,降低)DRG、肝脏、造血谱系或它们的组合的细胞或组织中经编码的GBA蛋白的表达。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点包含miR183结合位点。在一些实施方案中,病毒基因组进一步编码增强元件,例如,本文所描述的增强元件。

[0013] 在又一个方面,本公开提供了一种经分离(例如,重组)的病毒基因组,所述病毒基因组包含可操作地连接至包含编码本文所描述的GBA蛋白的转基因的核酸的启动子。在一些实施方案中,病毒基因组包含内部末端重复(ITR)序列(例如,本文所描述的ITR区)、增强子(例如,本文所描述的增强子)、内含子区(例如,本文所描述的内含子区)、Kozak序列(例如,本文所描述的Kozak序列)、外显子区(例如,本文所描述的外显子区)、编码miR结合位点(例如,本文所描述的miR结合位点)的核苷酸序列和/或聚A信号区(例如,本文所描述的聚A信号序列)。在一些实施方案中,病毒基因组包含SEQ ID NO:1812或1826的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。在一些实施方案中,病毒基因组包含SEQ ID NO:1759-1771、1809-1811或1813-1827中的任一者的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0014] 在又一个方面,本公开提供了一种包含衣壳蛋白和病毒基因组的经分离(例如,重

组)的AAV粒子,所述病毒基因组包含可操作地连接至编码本文所描述的GBA蛋白的转基因的启动子(例如,本文所描述的启动子)。在一些实施方案中,衣壳蛋白包括AAV衣壳蛋白。在一些实施方案中,衣壳蛋白包括VOY101衣壳蛋白、AAV9衣壳蛋白或其功能变体。

[0015] 在又一个方面,本公开提供了一种制造本文所描述的病毒基因组的方法。所述方法包括提供编码本文所描述的病毒基因组的核酸和适合于细胞(例如,细菌细胞)中病毒基因组的复制的主链区(例如,其中主链区包含细菌复制起点和可选标记物中的一者或两者),以及从主链区切除病毒,例如,通过使病毒基因组的上游和下游的核酸分子裂解。

[0016] 在又一个方面,本公开提供了一种制造经分离(例如,重组)的AAV粒子的方法。所述方法包括提供包含本文所描述的病毒基因组的宿主细胞,以及在适合于将病毒基因组包裹于AAV粒子,例如VOY101衣壳蛋白中的条件下孵育宿主细胞,从而制造经分离的AAV粒子。

[0017] 在又一个方面,本公开提供了向受试者递送外源GBA蛋白的方法。所述方法包括施用有效量的本文所描述的AAV粒子或多个AAV粒子,所述AAV粒子包含本文所描述的病毒基因组,例如,包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含编码本文所描述的GBA蛋白的转基因。

[0018] 在又一个方面,本公开提供了治疗患有或经诊断患有与GBA表达相关的疾病、神经病症或神经肌肉病症的受试者的方法。所述方法包括施用有效量的本文所描述的AAV粒子或多个AAV粒子,所述AAV粒子包含本文所描述的病毒基因组,例如,包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含编码本文所描述的GBA蛋白的转基因。在一些实施方案中,与GBA表达相关的疾病或神经退化或神经肌肉病症包括帕金森氏病(PD)(例如,与GBA基因突变相关的PD)、路易体痴呆(DLB)、戈谢病(GD)、脊髓性肌萎缩症(SMA)、多系统萎缩症(MSA)或多发性硬化症(MS)。

[0019] 在一些方面,本公开提供了包含至少一个反向末端重复(ITR)和有效载荷区的AAV病毒基因组,其中有效载荷区编码一种或多种GCase蛋白,包括GCase肽。在一些实施方案中,AAV病毒基因组包含5' ITR、启动子、包含编码GCase蛋白的核苷酸序列的有效载荷区和3' ITR。经编码的蛋白质可以是人类(智人)GCase、食蟹猴(长尾猕猴(*Macaca fascicularis*))GCase或恒河猴(恒河猕猴(*Macaca mulatta*))GCase、合成(非天然存在)的GCase或其衍生物,例如,保留野生型GCase蛋白的一种或多种功能的变体。在一些实施方案中,GCase可以至少部分人类化。

[0020] 本公开的GCase可以与鞘脂激活蛋白共表达。在一些实施方案中,编码GCase的转基因包括编码鞘脂激活蛋白的核苷酸序列。在一些实施方案中,鞘脂激活蛋白是鞘脂激活蛋白A(SapA)。在一些实施方案中,鞘脂激活蛋白是鞘脂激活蛋白C(SapC)。

[0021] 病毒基因组可以并入AAV粒子中,其中AAV粒子包含病毒基因组和衣壳。在一些实施方案中,衣壳包含如表1中所示的序列。

[0022] 在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子可以用于药物组合物中。药物组合物可以用于治疗与GCase表达、活性或蛋白质水平降低相关的病症或疾患。在一些实施方案中,病症或疾患是溶酶体脂质储积症。在一些实施方案中,与GCase蛋白水平降低相关的病症或疾患是PD(例如,与GBA基因突变相关的PD)、戈谢病(例如,1型GD(例如,非神经病性GD)、2型(例如,急性神经病性GD)或3型GD),或其它GBA相关病症(例如,路易体痴呆(DLB))。在一些实施方案中,施用AAV粒子可以使靶细胞中的GCase表达增强。

[0023] 在一些方面,本公开提供了使用优化的GBA转基因盒的AAV介导的基因转移来增加

患者中的GCase酶活性的方法。可以优化AAV介导的基因转移以达成广泛CNS分布,从而减少底物糖鞘脂葡萄糖神经酰胺/GluCer水平和 α -突触核蛋白病理,减缓或逆转患有GBA相关病症的患者的疾病发病机制,所述患者包括患有帕金森病(GBA-PD)、戈谢病(例如,2型或3型GD)和路易体病痴呆的GBA患者。在一些实施方案中,所述方法涉及纹状体内(ISTR)或脑池内(ICM)施用包装如本文所描述的优化的GBA基因置换转基因盒的AAV载体,以达成治疗性GCase酶的广泛、细胞自主转导和交叉校正。

[0024] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文所描述的本发明的特定实施方案的许多等效物。此类等效物意图由以下列举的实施方案所涵盖。

[0025] 列举的实施方案

[0026] 1.一种包含编码 β -葡萄糖脑苷脂酶(GBA)蛋白的转基因的经分离(例如,重组)的核酸,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1773的核苷酸序列至少88%(例如,至少89、90、92、95、96、97、98或99%)同一的核苷酸序列,例如,密码子优化的核苷酸序列。

[0027] 2.如实施方案1所述的经分离的核酸,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1773至少90%同一的核苷酸序列。

[0028] 3.如实施方案1或2所述的经分离的核酸,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1773至少95%同一的核苷酸序列。

[0029] 4.如实施方案1-3中任一项所述的经分离的核酸,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列。

[0030] 5.如实施方案1-4中任一项所述的经分离的核酸,所述核酸还包含增强元件。

[0031] 6.一种包含编码 β -葡萄糖脑苷脂酶(GBA)蛋白和增强元件的转基因的经分离(例如,重组)的核酸,其中所述经编码的增强元件包含:

[0032] (a)鞘脂激活蛋白C多肽或其功能片段或变体,任选地包含SEQ ID NO:1789或1758的氨基酸序列,或与其至少85%(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;

[0033] (b)细胞穿透肽,任选地包含SEQ ID NO:1794、1796或1798中的任一者的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1794、1796或1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;和/或

[0034] (c)溶酶体靶向序列,任选地包含SEQ ID NO:1800、1802、1804、1806或1808中的任一者的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1800、1802、1804、1806或1808具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列。

[0035] 7.一种经分离(例如,重组)的病毒基因组,所述病毒基因组包含含有编码 β -葡萄糖脑苷脂酶(GBA)蛋白的转基因的核酸,并且还包含编码miR结合位点的核苷酸序列,所述miR结合位点调节(例如,降低)DRG、肝脏、造血谱系或它们的组合的细胞或组织中所述经编码的GBA蛋白的表达。

[0036] 8.如实施方案7所述的病毒基因组,其中所述核酸进一步编码增强元件。

[0037] 9.如实施方案5或6所述的经分离的核酸,或如实施方案8所述的病毒基因组,其中所述经编码的增强元件包含鞘脂激活蛋白C多肽或其功能片段或变体。

[0038] 10.如实施方案5-6或9所述的经分离的核酸,或如实施方案8或9所述的病毒基因

组,其中:

[0039] (i) 所述经编码的鞘脂激活蛋白C多肽或其功能片段或变体包含SEQ ID NO:1789或1758的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;和/或

[0040] (ii) 编码所述经编码的鞘脂激活蛋白C多肽或其功能片段或变体的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1787或1791的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列。

[0041] 11. 如实施方案5所述的经分离的核酸,或如实施方案8所述的病毒基因组,其中:

[0042] (i) 所述经编码的增强元件包含SEQ ID NO:1750、1752、1754、1756-1758、1784或1785中的任一者的氨基酸序列,相对于SEQ ID NO:1750、1752、1754、1756-1758、1784或1785具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;和/或

[0043] (ii) 编码所述增强元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1751、1753、1755、1858或1859中的任一者的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列。

[0044] 12. 如实施方案5-6或9-11中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案8-11所述的病毒基因组,其中所述经编码的增强元件包含细胞穿透肽。

[0045] 13. 如实施方案6或12所述的经分离的核酸,或如实施方案12所述的病毒基因组,其中:

[0046] (i) 所述细胞穿透肽包含SEQ ID NO:1794、1796或1798中的任一者的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1794、1796或1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;

[0047] (ii) 编码所述细胞穿透肽的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1793、1795或1797中的任一者的核苷酸序列,或与其至少80% (例如,85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列。

[0048] 14. 如实施方案5-6或9-13中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案8-13中任一项所述的病毒基因组,其中所述经编码的增强元件包含溶酶体靶向序列。

[0049] 15. 如实施方案6或14所述的经分离的核酸,或如实施方案14中任一项所述的病毒基因组,其中:

[0050] (i) 所述经编码的溶酶体靶向序列包含SEQ ID NO:1800、1802、1804、1806或1808中的任一者的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1800、1802、1804、1806或1808具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;

[0051] (ii) 编码所述溶酶体靶向序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1799、1801、1803、1805或1807中的任一者的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1799、1801、1803、1805或1807具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的核苷酸序列。

[0052] 16. 如实施方案5-6或9-15中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案8-15中任一项所述的病毒基因组,其中所述核酸编码至少2、3、4个或更多个增强元件。

[0053] 17. 如实施方案5-6或9-16中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案8-16中任

一项所述的病毒基因组,其中所述核酸编码两个增强元件,其中:

[0054] (i) 第一增强元件包含溶酶体靶向序列,任选地其中所述溶酶体靶向序列包含SEQ ID NO:1802的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1802具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;以及

[0055] (ii) 第二增强元件包含鞘脂激活蛋白C多肽或其功能片段或变体,任选地其中所述鞘脂激活蛋白C多肽或其功能片段或变体包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1789具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列。

[0056] 18.如实施方案17所述的经分离的核酸或病毒基因组,其中编码所述第一增强元件和所述第二增强元件的所述核酸包含1801和1787的核苷酸序列,与SEQ ID NO:1801和1787至少85%(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1801和1787具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的核苷酸序列。

[0057] 19.如实施方案5-6或9-17中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案8-18中任一项所述的病毒基因组,其中所述核酸编码第一增强元件和第二增强元件,其中:

[0058] (i) 所述第一增强元件包含细胞穿透肽,任选地其中所述细胞穿透肽包含SEQ ID NO:1798的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;以及

[0059] (ii) 所述第二增强元件包含溶酶体靶向序列,任选地其中所述溶酶体靶向序列包含SEQ ID NO:1802的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1802具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列。

[0060] 20.如实施方案19所述的经分离的核酸或病毒基因组,其中编码所述第一增强元件和所述第二增强元件的所述核酸包含1797和1801的核苷酸序列,与SEQ ID NO:1797和1801至少85%(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1797和1801具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的核苷酸序列。

[0061] 21.如实施方案5-6或9-20中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案8-20中任一项所述的病毒基因组,其中所述核酸编码第一增强元件、第二增强元件和第三增强元件,其中:

[0062] (i) 所述第一增强元件包含溶酶体靶向序列,任选地其中所述溶酶体靶向序列包含SEQ ID NO:1802的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1802具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;

[0063] (ii) 所述第二增强元件包含细胞穿透肽,任选地其中所述细胞穿透肽包含SEQ ID NO:1798的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列;以及

[0064] (iii) 所述第三增强元件包含鞘脂激活蛋白C多肽或其功能片段或变体,任选地其中所述鞘脂激活蛋白C多肽或其功能片段或变体包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1789具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代(例如,保守取代)的氨基酸序列。

[0065] 22. 如实施方案21所述的经分离的核酸或病毒基因组, 其中编码所述第一增强元件、所述第二增强元件和所述第三增强元件的所述核酸包含1801、1797和1787的核苷酸序列, 与SEQ ID NO:1801、1797和1787至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1801、1797和1787具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代 (例如, 保守取代) 的核苷酸序列。

[0066] 23. 如实施方案1-6或9-22中任一项所述的经分离的核酸, 或如实施方案7-22中任一项所述的病毒基因组, 其中所述核酸进一步编码连接子。

[0067] 24. 如实施方案5-6或9-22中任一项所述的经分离的核酸, 或如实施方案8-22中任一项所述的病毒基因组, 其中所述经编码的增强元件和所述经编码的GBA蛋白直接连接, 例如, 在无连接子的情况下。

[0068] 25. 如实施方案5-6或9-23中任一项所述的经分离的核酸, 或如实施方案8-23中任一项所述的病毒基因组, 其中所述经编码的增强元件和所述经编码的GBA蛋白经由所述经编码的连接子连接。

[0069] 26. 如实施方案23或25所述的经分离的核酸或病毒基因组, 其中:

[0070] (i) 所述经编码的连接子包含SEQ ID NO:1854、1855、1843或1845中的任一者的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1854、1855、1843或1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代 (例如, 保守取代) 的氨基酸序列;

[0071] (ii) 编码所述连接子的核苷酸序列包含表2的核苷酸序列中的任一者, 或相对于表2的序列具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代 (例如, 保守取代) 的核苷酸序列;

[0072] (iii) 编码所述连接子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724、1726、1729或1730中的任一者的核苷酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1724、1726、1729或1730具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代 (例如, 保守取代) 的核苷酸序列;

[0073] (iv) 所述经编码的连接子包含弗林蛋白酶裂解位点;

[0074] (v) 所述经编码的连接子包含T2A多肽;

[0075] (vi) 所述经编码的连接子包含(Gly4Ser)_n连接子(SEQ ID NO:1871), 其中n是1-10, 例如, n是3、4或5; 和/或

[0076] (vii) 所述经编码的连接子包含(Gly4Ser)₃连接子(SEQ ID NO:1845)。

[0077] 27. 如实施方案23或25-26中任一项所述的经分离的核酸或病毒基因组, 其中:

[0078] (i) 所述经编码的连接子包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:1855的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1854和/或1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列; 和/或

[0079] (ii) 编码所述连接子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724的核苷酸序列和/或SEQ ID NO:1726的核苷酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1724和/或1726具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的核苷酸序列。

[0080] 28. 如实施方案23或25-27中任一项所述的经分离的核酸, 或如实施方案23或25-26中任一项所述的病毒基因组, 其中:

[0081] (i) 所述经编码的连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列;

[0082] (ii) 编码所述连接子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1730具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的核苷酸序列。

[0083] 29. 如实施方案5-6或9-28中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案8-28中任一项所述的病毒基因组,其中所述经编码的GBA蛋白和所述经编码的增强元件表达为单一多肽。

[0084] 30. 如实施方案5-6或9-28中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案8-28中任一项所述的病毒基因组,其中所述单一多肽包含存在于所述经编码的GBA蛋白与所述经编码的增强元件之间的裂解位点,任选地其中所述裂解位点是T2A和/或弗林蛋白酶裂解位点。

[0085] 31. 如实施方案5-6或9-30中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案8-30中任一项所述的病毒基因组,其中:

[0086] (i) 编码所述增强元件的核苷酸序列位于相对于编码所述GBA蛋白的核苷酸序列的5'处;和/或

[0087] (ii) 编码所述增强元件的核苷酸序列位于相对于编码所述GBA蛋白的核苷酸序列的3'处。

[0088] 32. 如实施方案1-6或9-31中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-31中任一项所述的病毒基因组,其中所述经编码的GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少70% (例如,至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列。

[0089] 33. 如实施方案6或9-32中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-32中任一项所述的病毒基因组,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773、1777或1781中的任一者的核苷酸序列,或与其至少70% (例如,至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列。

[0090] 34. 如实施方案1-6或9-33中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-33中任一项所述的病毒基因组,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列。

[0091] 35. 如实施方案6或9-33中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-33中任一项所述的病毒基因组,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1777的核苷酸序列。

[0092] 36. 如实施方案6或9-33中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-33中任一项所述的病毒基因组,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列。

[0093] 37. 如实施方案1-6或9-36中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-36中任一项所述的病毒基因组,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列经密码子优化。

[0094] 38. 如实施方案1-6或9-37中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-37中任一项所述的病毒基因组,其进一步编码信号序列。

[0095] 39. 如实施方案38所述的经分离的核酸或病毒基因组,其中所述经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列。

[0096] 40. 如实施方案38或39所述的经分离的核酸或病毒基因组,其中所述经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1857的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列。

[0097] 41. 如实施方案38-40中任一项所述的经分离的核酸或病毒基因组,其中编码所述信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850-1852或1856中的任一者的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列。

[0098] 42. 如实施方案38-41中任一项所述的经分离的核酸或病毒基因组,其中编码所述信号序列的核苷酸序列位于:

[0099] (i) 相对于编码所述GBA蛋白的核苷酸序列的5'处;和/或

[0100] (ii) 相对于所述经编码的增强元件的5'处。

[0101] 43. 如实施方案38-42中任一项所述的经分离的核酸或病毒基因组,其中:

[0102] (i) 编码所述信号序列的核苷酸序列包含1850的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列,或与其至少70% (例如,至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0103] (ii) 编码所述信号序列的核苷酸序列包括1851的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包括SEQ ID NO:1777的核苷酸序列,或与其至少70% (例如,至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0104] (iii) 编码所述信号序列的核苷酸序列包括1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列,并且编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包括SEQ ID NO:1781的核苷酸序列或与其至少70% (例如,至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0105] 并且任选地其中编码所述信号序列的核苷酸序列位于相对于编码所述GBA蛋白的核苷酸序列的5'处。

[0106] 44. 如实施方案38-43中任一项所述的经分离的核酸或病毒基因组,其中所述经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;并且所述经编码的GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少70% (例如,至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;

[0107] 并且任选地其中所述经编码的信号序列位于相对于所述经编码的GBA蛋白的N端处。

[0108] 45. 如实施方案38-44中任一项所述的经分离的核酸或病毒基因组,其中:

[0109] (i) 编码所述信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850-1852中的任一者的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且编码所述增强元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1801的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且任选地其中编码所述信号序列的核苷酸序列位于相对于编码所述增强元件的核苷酸序列的5'处;

[0110] (ii) 所述经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%

(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;并且所述经编码的增强元件包含SEQ ID NO:1802的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1802具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;并且任选地其中所述经编码的信号序列位于相对于所述经编码的增强元件的N端处;

[0111] (iii) 编码所述信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且编码所述增强元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1859的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且编码所述增强元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1859的核苷酸序列;并且任选地其中编码所述信号序列的核苷酸序列位于相对于编码所述增强元件的核苷酸序列的5'处;

[0112] (iv) 所述经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1857的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;并且所述经编码的增强元件包含SEQ ID NO:1785的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;并且任选地其中所述经编码的信号序列位于相对于所述经编码的增强元件的N端处;

[0113] (v) 编码所述信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且编码所述增强元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1787的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且编码所述增强元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1787的核苷酸序列;并且任选地其中编码所述信号序列的核苷酸序列位于相对于编码所述增强元件的核苷酸序列的5'处;

[0114] (vi) 所述经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1857的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;并且所述经编码的增强元件包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1789具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;并且任选地其中所述经编码的信号序列位于相对于所述经编码的增强元件的N端处;

[0115] (vii) 编码所述信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且编码所述增强元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1791的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且编码所述增强元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1791的核苷酸序列;并且任选地其中编码所述信号序列的核苷酸序列位于相对于编码所述增强元件的核苷酸序列的5'处;

[0116] (viii) 所述经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1857的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;并且所述经编码的增强元件包含SEQ ID NO:1758的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1758具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;并且任选地其中所述经编码的信号序列位于相对于所述经编码的增强元件的N端处;

[0117] (ix) 编码信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且编码增

强元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1793的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;并且任选地其中编码所述信号序列的核苷酸序列位于相对于编码所述增强元件的核苷酸序列的5'处;和/或

[0118] (x) 所述经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;并且所述经编码的增强元件包含SEQ ID NO:1794的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1794具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;并且任选地其中所述经编码的信号序列位于相对于所述经编码的增强元件的N端处。

[0119] 46. 如实施方案1-6或9-45中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-45中任一项所述的病毒基因组,其中所述核酸按5'至3'的顺序包含:编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列。

[0120] 47. 如实施方案1-6或9-46中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-46中任一项所述的病毒基因组,其中所述核酸按5'至3'的顺序包含:

[0121] (i) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0122] (ii) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1799的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0123] (iii) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1801的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0124] (iv) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1803的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0125] (v) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1805的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0126] (vi) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码连接子的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1797的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0127] (vii) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码连接子的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1793的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0128] (viii) 编码第一信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码弗林蛋白酶裂解位点的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码T2A多肽的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1726的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码第二信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1859的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0129] (ix) 编码第一信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码弗林蛋白酶裂解位点的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724的核苷

酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码T2A多肽的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1726的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码第二信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1787的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0130] (x) 编码第一信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码弗林蛋白酶裂解位点的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码T2A多肽的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1726的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码第二信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1791的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0131] (xi) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码连接子的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1795的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0132] (xii) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1793的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码连接子的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0133] (xiii) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1807的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0134] (xiv) 编码第一信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码第一增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1801的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码弗林蛋白酶裂解位点的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码T2A多肽的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1726的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码第二信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码第二增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1787的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0135] (xv) 编码第一信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码连接子的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码第一增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1797的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码弗林蛋白酶裂解位点的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码T2A多肽的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1726的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码第二信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码第二增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1787的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0136] (xvi) 编码第一信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1852的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码第一增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1801的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码连接子的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列,或与其

至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码第一增强元件的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1797的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码弗林蛋白酶裂解位点的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码T2A多肽的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1726的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码第二信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 以及编码第二增强元件的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1787的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0137] (xvii) 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1851的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 以及编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1777的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0138] (xviii) 编码第一信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1851的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1777的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码弗林蛋白酶裂解位点的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码T2A多肽的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1726的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码第二信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 以及编码增强元件的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1787的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0139] (xix) 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1851的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1777的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码连接子的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 以及编码增强元件的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1797的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0140] (xx) 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1851的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码增强元件的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1801的核苷酸序列, 或

与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 以及编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1777的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0141] (xxi) 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1851的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1777的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 以及编码增强元件的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1805的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0142] (xxii) 编码第一信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码弗林蛋白酶裂解位点的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码T2A多肽的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1726的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码第二信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1856的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 以及编码增强元件的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1787的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0143] (xxiii) 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码连接子的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 以及编码增强元件的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1797的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0144] (xxiv) 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码增强元件的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1801的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 以及编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0145] (xxv) 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1805的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0146] (xxvi) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1851的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1777的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码连接子的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1793的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;

[0147] (xxvii) 编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;编码连接子的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列;以及编码增强元件的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1793的核苷酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列。

[0148] 48. 如实施方案1-6或9-47中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-47中任一项所述的病毒基因组,其中所述核酸按5'至3'的顺序编码:信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;以及GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列。

[0149] 49. 如实施方案1-6或9-48中任一项所述的经分离的核酸,或如实施方案7-48中任一项所述的病毒基因组,其中所述核酸按5'至3'的顺序编码:

[0150] (i) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1800的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1800具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;

[0151] (ii) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1802的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;以及GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;

[0152] (iii) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少

85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列; GBA蛋白, 所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列; 以及增强元件, 所述增强元件包含SEQ ID NO:1804的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1804具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列;

[0153] (iv) 信号序列, 所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列; GBA蛋白, 所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列; 以及增强元件, 所述增强元件包含SEQ ID NO:1806的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1806具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列;

[0154] (v) 信号序列, 所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列; GBA蛋白, 所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列; 连接子, 所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列; 以及增强元件, 所述增强元件包含SEQ ID NO:1798的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列;

[0155] (vi) 信号序列, 所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列; GBA蛋白, 所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列; 连接子, 所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列; 以及增强元件, 所述增强元件包含SEQ ID NO:1794的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1794具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列;

[0156] (vii) 第一信号序列, 所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列; GBA蛋白, 所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列; 弗林蛋白酶裂解位点, 所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列; T2A多肽, 所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列; 第二信号序列, 所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列, 或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的氨基酸序列; 以及增强元件, 所述增强元件包含SEQ ID NO:1785的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;

[0157] (viii) 第一信号序列, 所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;

GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;

[0158] (ix) 第一信号序列,所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1758的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;

[0159] (x) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;连接子,所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1796的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;

[0160] (xi) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1794的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1794具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;连接子,所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;

[0161] (xii) 信号序列,所述信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、

95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1808的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1808具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;

[0162] (xiii) 第一信号序列,所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;第一增强元件,所述第一增强元件包含SEQ ID NO:1802的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及第二增强元件,所述第二增强元件包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;

[0163] (xiv) 第一信号序列,所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;连接子,所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第一增强元件,所述第一增强元件包含SEQ ID NO:1798的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;或

[0164] (xv) 第一信号序列,所述第一信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;第一增强元件,所述第一增强元件包含SEQ ID NO:1802的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;GBA蛋白,所述GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;连接子,所述连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第一增强元件,所述第一增强元件包含SEQ ID NO:1798的氨基酸序列,或相对

于SEQ ID NO:1798具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;弗林蛋白酶裂解位点,所述弗林蛋白酶裂解位点包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;T2A多肽,所述T2A多肽包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;第二信号序列,所述第二信号序列包含SEQ ID NO:1857的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1857具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列;以及增强元件,所述增强元件包含SEQ ID NO:1789的氨基酸序列,或与其至少85% (例如,至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列。

[0165] 50. 一种经分离 (例如,重组) 的病毒基因组,所述病毒基因组包含可操作地连接至如实施方案1-6或9-49中任一项所述的核酸的启动子。

[0166] 51. 如实施方案7-49中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含可操作地连接至包含编码GBA蛋白的转基因的核酸的启动子。

[0167] 52. 如实施方案7-50中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含增强子。

[0168] 53. 如实施方案52所述的病毒基因组,其中所述增强子包括CMVie增强子。

[0169] 54. 如实施方案52或53所述的病毒基因组,其中所述增强子包含SEQ ID NO:1831的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0170] 55. 如实施方案50-54中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含组织特异性启动子或泛在启动子。

[0171] 56. 如实施方案50-55中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含:

[0172] (i) EF-1a启动子、鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子和/或其衍生物CAG、CMV立即早期增强子和/或启动子、 β 葡萄糖醛酸苷酶 (GUSB) 启动子、泛素C (UBC) 启动子、神经元特异性烯醇酶 (NSE)、血小板源性生长因子 (PDGF) 启动子、血小板源性生长因子B链 (PDGF- β) 启动子、细胞间粘附分子2 (ICAM-2) 启动子、突触蛋白 (Syn) 启动子、甲基-CpG结合蛋白2 (MeCP2) 启动子、Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II (CaMKII) 启动子、代谢型谷氨酸受体2 (mGluR2) 启动子、神经丝轻 (NFL) 或重 (NFH) 启动子、 β -球蛋白小基因n β 2启动子、前脑啡肽原 (PPE) 启动子、脑啡肽 (Enk) 和兴奋性氨基酸转运子2 (EAAT2)、神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 启动子、髓鞘碱性蛋白 (MBP) 启动子、心血管启动子 (例如, α MHC、cTnT和CMV-MLC2k)、肝脏启动子 (例如,hAAT、TBG)、骨骼肌启动子 (例如,结蛋白、MCK、C512) 或其片段 (例如,截短) 或功能变体;和/或

[0173] (ii) SEQ ID NO:1832、1833、1834、1835、1836、1839、1840中的任一者的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0174] 57. 如实施方案50-56中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含CB启动子或其功能变体。

[0175] 58. 如实施方案57所述的病毒基因组,其中所述CB启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1834的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0176] 59. 如实施方案50-58中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含CMVie增强子和CB启动子。

[0177] 60. 如实施方案59所述的病毒基因组,其中所述CMVie增强子包含SEQ ID NO:1831

的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;并且所述CB启动子包含SEQ ID NO:1834的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0178] 61.如实施方案50-61中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含EF-1 α 启动子或其功能变体。

[0179] 62.如实施方案61所述的病毒基因组,其中所述EF-1 α 启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1839或1840的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0180] 63.如实施方案61或62所述的病毒基因组,其中所述EF-1 α 启动子或其功能变体包含内含子,例如,包含SEQ ID NO:1839的位置242-1,180的核苷酸序列的内含子或包含SEQ ID NO:1841的核苷酸序列的内含子,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0181] 64.如实施方案61-63中任一项所述的病毒基因组,其中所述EF-1 α 启动子或其功能变体不包含内含子,例如,包含SEQ ID NO:1839的位置242-1,180的核苷酸序列的内含子或包含SEQ ID NO:1841的核苷酸序列的内含子,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0182] 65.如实施方案50-64中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含CBA启动子或其功能变体。

[0183] 66.如实施方案65所述的病毒基因组,其中所述CBA启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1836的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0184] 67.如实施方案50-66中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含CMVie增强子、CBA启动子或其功能变体以及内含子。

[0185] 68.如实施方案67所述的病毒基因组,其中:

[0186] (i)所述CMVie增强子包含SEQ ID NO:1831的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0187] (ii)所述CBA启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1836的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;以及

[0188] (iii)所述内含子包含SEQ ID NO:1837的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0189] 69.如实施方案50-68中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含CAG启动子区。

[0190] 70.如实施方案50-69中任一项所述的病毒基因组,其中所述包含CAG启动子区的启动子包含:

[0191] (i)CMVie增强子、CBA启动子或其功能变体以及内含子;和/或

[0192] (ii)SEQ ID NO:1835的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0193] 71.如实施方案50-70中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含CMV启动子或其功能变体。

[0194] 72.如实施方案71所述的病毒基因组,其中所述CMV启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1832的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0195] 73.如实施方案50-72中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含CMVie增强子和CMV启动子或其功能变体,任选地其中所述CMVie增强子包含SEQ ID NO:1831的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;并且所述CMV启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1832的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

- [0196] 74. 如实施方案50-73中任一项所述的病毒基因组,其中所述启动子包含CMV启动子区。
- [0197] 75. 如实施方案74所述的病毒基因组,其中所述CMV启动子区包含:
- [0198] (i) CMV增强子和CMV启动子或其功能变体;
- [0199] (ii) SEQ ID NO:1833的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。
- [0200] 76. 如实施方案7-76中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含反向末端重复(ITR)序列。
- [0201] 77. 如实施方案76所述的病毒基因组,其中所述ITR序列位于相对于包含编码GBA蛋白的转基因的核酸的5'处。
- [0202] 78. 如实施方案75或76所述的病毒基因组,其中所述ITR序列位于相对于包含编码GBA蛋白的转基因的核酸的3'处。
- [0203] 79. 如实施方案7-78中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组包含位于相对于包含编码GBA蛋白的转基因的核酸的5'处的ITR和位于相对于包含编码GBA蛋白的转基因的核酸的3'处的ITR。
- [0204] 80. 如实施方案76-79中任一项所述的病毒基因组,其中所述ITR包含SEQ ID NO:1829、1830或1862的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。
- [0205] 81. 如实施方案76-80中任一项所述的病毒基因组,其中所述ITR包含SEQ ID NO:1860和/或1861的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1860和/或1861的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。
- [0206] 82. 如实施方案76-81中任一项所述的病毒基因组,其中所述ITR位于相对于包含编码GBA蛋白的转基因的核酸的5'处并且包含SEQ ID NO:1860和/或1861的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1860或1861的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。
- [0207] 83. 如实施方案76-81中任一项所述的病毒基因组,其中所述ITR位于相对于包含编码GBA蛋白的转基因的核酸的3'处并且包含SEQ ID NO:1860或1861的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1860和/或1861的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。
- [0208] 84. 如实施方案76-83中任一项所述的病毒基因组,其中:
- [0209] (i) 位于相对于包含编码GBA蛋白的转基因的核酸的5'处的ITR包含SEQ ID NO:1829的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;和/或
- [0210] (ii) 位于相对于包含编码GBA蛋白的转基因的核酸的3'处的ITR包含SEQ ID NO:1830的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。
- [0211] 85. 如实施方案7-84中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含聚腺苷酸化(聚A)信号区。
- [0212] 86. 如实施方案85所述的病毒基因组,其中所述聚A信号区包含SEQ ID NO:1846的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。
- [0213] 87. 如实施方案7-86中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含内含子区。
- [0214] 88. 如实施方案87所述的病毒基因组,其中所述内含子包含 β -球蛋白内含子。

[0215] 89.如实施方案87或88所述的病毒基因组,其中所述内含子包含SEQ ID NO:1842的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0216] 90.如实施方案7-89中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含外显子区,例如,至少一个、两个或三个外显子区。

[0217] 91.如实施方案7-90中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含Kozak序列。

[0218] 92.如实施方案50-91中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含编码miR结合位点,例如调节(例如,降低)由表达相应miRNA的细胞或组织中的病毒基因组编码的GBA蛋白的表达的miR结合位点的核苷酸序列。

[0219] 93.如实施方案7-92所述的病毒基因组,其中所述经编码的miRNA结合位点与DRG、肝脏、造血系统或它们的组合的细胞或组织中表达的miRNA互补,例如完全互补或部分互补。

[0220] 94.如实施方案50-93中任一项所述的病毒基因组,其中所述经编码的miR结合位点调节(例如,降低)DRG、肝脏、造血谱系或它们的组合的细胞或组织中编码的GBA蛋白的表达。

[0221] 95.如实施方案7-94中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组包含所述经编码的miR结合位点的至少1-5个拷贝,例如,至少1、2、3、4或5个拷贝。

[0222] 96.如实施方案7-95中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组包含经编码的miR结合位点的至少4个拷贝,任选地其中所有四个拷贝包含相同miR结合位点,或至少一个、两个、三个或所有拷贝包含不同miR结合位点。

[0223] 97.如实施方案96所述的病毒基因组,其中所述经编码的miR结合位点的4个拷贝是连续的(例如,不由间隔子隔开),或由间隔子隔开。

[0224] 98.如实施方案97所述的病毒基因组,其中所述间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。

[0225] 99.如实施方案7-98中任一项所述的病毒基因组,其中所述经编码的miR结合位点包括miR183结合位点、miR122结合位点、miR-142-3p或它们的组合,任选地其中:

[0226] (i)所述经编码的miR183结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

[0227] (ii)所述经编码的miR122结合位点包含SEQ ID NO:1865的核苷酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1865的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;和/或

[0228] (iii)所述经编码的miR-142-3p结合位点包含SEQ ID NO:1869的核苷酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1869的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列。

[0229] 100.如实施方案7-99中任一项所述的病毒基因组,其中所述病毒基因组包含经编码的miR183结合位点。

[0230] 101.如实施方案7-100中任一项所述的病毒基因组,其中所述病毒基因组包含miR183结合位点的至少1-5个拷贝,例如4个拷贝,任选地其中每个拷贝是连续的(例如,不由间隔子隔开),或每个拷贝由间隔子隔开。

[0231] 102.如实施方案100或101所述的病毒基因组,所述经编码的miR183结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列。

[0232] 103.如实施方案7-102中任一项所述的病毒基因组,其中所述病毒基因组包含:

[0233] (i) 第一经编码的miR183结合位点,所述结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

[0234] (ii) 第一间隔子序列,所述间隔子序列包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;

[0235] (iii) 第二经编码的miR183结合位点,所述结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

[0236] (iv) 第二间隔子序列,所述间隔子序列包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;

[0237] (v) 第三经编码的miR183结合位点,所述结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

[0238] (vi) 第三间隔子序列,所述间隔子序列包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;以及

[0239] (vii) 第四经编码的miR183结合位点,所述结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列;或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列。

[0240] 104.如实施方案7-103中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组包含miR183结合位点系列,所述系列包含miR183结合位点的四个拷贝,其中所述系列中的miR结合位点的每个拷贝由间隔子隔开。

[0241] 105.如实施方案104所述的病毒基因组,其中所述经编码的miR183结合位点系列包含SEQ ID NO:1849的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0242] 106.如实施方案7-105中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组是自互补的。

[0243] 107.如实施方案7-106中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组是单链的。

[0244] 108.一种经分离(例如,重组)的病毒基因组,所述病毒基因组按5'至3'的顺序包含:

[0245] (i)5'腺相关(AAV)ITR,任选地其中所述5'AAV ITR包含SEQ ID NO:1829的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0246] (ii)CMVie增强子,任选地其中所述CMVie增强子包含SEQ ID NO:1831的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0247] (iii)CB启动子或其功能变体,任选地其中所述CB启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1834的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0248] (iv)内含子,任选地其中所述内含子包含SEQ ID NO:1842的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0249] (v)编码信号序列的核苷酸序列,任选地其中编码所述信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0250] (vi)编码GBA蛋白的转基因,其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:1773的核苷酸序列至少88%(例如,至少89、90、92、95、96、97、98或99%)同一的核苷酸序列;

[0251] (vii)聚A信号区,任选地其中所述聚A信号区包含SEQ ID NO:1846的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;以及

[0252] (viii)3'AAV ITR,任选地其中所述3'AAV ITR包含SEQ ID NO:1830的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0253] 109.一种经分离(例如,重组)的病毒基因组,所述病毒基因组按5'至3'的顺序包含:

[0254] (i)5'腺相关(AAV)ITR,任选地其中所述5'AAV ITR包含SEQ ID NO:1829的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0255] (ii)CMVie增强子,任选地其中所述CMVie增强子包含SEQ ID NO:1831的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0256] (iii)CB启动子或其功能变体,任选地其中所述CB启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1834的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0257] (iv)内含子,任选地其中所述内含子包含SEQ ID NO:1842的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0258] (v)编码信号序列的核苷酸序列,任选地其中编码所述信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0259] (vi)编码GBA蛋白的转基因,任选地其中编码所述GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:1773的核苷酸序列至少88%(例如,至少89、90、92、95、96、97、98或99%)同一的核苷酸序列;

[0260] (vii)经编码的miR183结合位点,任选地其中所述经编码的miR183结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

[0261] (viii)间隔子序列,任选地其中所述间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;

[0262] (ix) 经编码的miR183结合位点,任选地其中所述经编码的miR183结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

[0263] (x) 间隔子序列,任选地其中所述间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;

[0264] (xi) 经编码的miR183结合位点,任选地其中所述经编码的miR183结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

[0265] (xii) 间隔子序列,任选地其中所述间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;

[0266] (xiii) 经编码的miR183结合位点,任选地其中所述经编码的miR183结合位点包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;

[0267] (xiv) 聚A信号区,任选地其中所述聚A信号区包含SEQ ID NO:1846的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;以及

[0268] (xv) 3' AAV ITR,任选地其中所述3' AAV ITR包含SEQ ID NO:1830的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0269] 110. 如实施方案50-109中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组包含SEQ ID NO:1812的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0270] 111. 如实施方案50-110中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组包含SEQ ID NO:1826的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0271] 112. 一种经分离(例如,重组)的病毒基因组,所述病毒基因组按5'至3'的顺序包含:

[0272] (i) 5' 腺相关(AAV) ITR,任选地其中所述5' AAV ITR包含SEQ ID NO:1829的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0273] (ii) CMV_{ie}增强子,任选地其中所述CMV_{ie}增强子包含SEQ ID NO:1831的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0274] (iii) CB启动子或其功能变体,任选地其中所述CB启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1834的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0275] (iv) 内含子,任选地其中所述内含子包含SEQ ID NO:1842的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0276] (v) 如实施方案1-6或9-49中任一项所述的包含编码 β -葡萄糖脑苷脂酶(GBA)蛋白的转基因的核酸;

[0277] (vi) 聚A信号区,任选地其中所述聚A信号区包含SEQ ID NO:1846的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;以及

[0278] (vii) 3' AAV ITR,任选地其中所述3' AAV ITR包含SEQ ID NO:1830的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0279] 113. 一种经分离(例如,重组)的病毒基因组,所述病毒基因组按5'至3'的顺序包含:

[0280] (i) 5'腺相关(AAV) ITR, 任选地其中所述5' AAV ITR包含SEQ ID NO:1829的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0281] (ii) EF-1 α 启动子或其功能变体, 任选地其中所述EF-1 α 启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1839或1840的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0282] (iii) 如实施方案1-6或9-49中任一项所述的包含编码 β -葡萄糖脑苷脂酶(GBA)蛋白的转基因的核酸;

[0283] (iv) 聚A信号区, 任选地其中所述聚A信号区包含SEQ ID NO:1846的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 以及

[0284] (v) 3' AAV ITR, 任选地其中所述3' AAV ITR包含SEQ ID NO:1830的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0285] 114. 一种经分离(例如, 重组)的病毒基因组, 所述病毒基因组按5'至3'的顺序包含:

[0286] (i) 5'腺相关(AAV) ITR, 任选地其中所述5' AAV ITR包含SEQ ID NO:1829的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0287] (ii) CMVie增强子, 任选地其中所述CMVie增强子包含SEQ ID NO:1831的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0288] (iii) CMV启动子或其功能变体, 任选地其中所述CMV启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1832的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0289] (iv) 内含子, 任选地其中所述内含子包含SEQ ID NO:1842的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0290] (v) 如实施方案1-6或9-49中任一项所述的包含编码 β -葡萄糖脑苷脂酶(GBA)蛋白的转基因的核酸;

[0291] (vi) 聚A信号区, 任选地其中所述聚A信号区包含SEQ ID NO:1846的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 以及

[0292] (vii) 3' AAV ITR, 任选地其中所述3' AAV ITR包含SEQ ID NO:1830的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0293] 115. 一种经分离(例如, 重组)的病毒基因组, 所述病毒基因组按5'至3'的顺序包含:

[0294] (i) 5'腺相关(AAV) ITR, 任选地其中所述5' AAV ITR包含SEQ ID NO:1829的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0295] (ii) CAG启动子或其功能变体, 任选地其中所述CAG启动子或其功能变体包含SEQ ID NO:1835的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列;

[0296] (iii) 如实施方案1-6或9-49中任一项所述的包含编码 β -葡萄糖脑苷脂酶(GBA)蛋白的转基因的核酸;

[0297] (iv) 聚A信号区, 任选地其中所述聚A信号区包含SEQ ID NO:1846的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 以及

[0298] (v) 3' AAV ITR, 任选地其中所述3' AAV ITR包含SEQ ID NO:1830的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0299] 116. 如实施方案7-107或112-115中任一项所述的病毒基因组, 所述病毒基因组包

含SEQ ID NO:1759-1771、1809-1811、1813-1827或1870中的任一者的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0300] 117.如实施方案7-116中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含编码衣壳蛋白,例如结构蛋白的核酸,其中所述衣壳蛋白包含VP1多肽、VP2多肽和/或VP3多肽。

[0301] 118.如实施方案117所述的病毒基因组,其中所述VP1多肽、所述VP2多肽和/或所述VP3多肽由至少一个Cap基因编码。

[0302] 119.如实施方案7-118中任一项所述的病毒基因组,所述病毒基因组还包含编码Rep蛋白,例如非结构蛋白的核酸,其中所述Rep蛋白包含Rep78蛋白、Rep68、Rep52蛋白和/或Rep40蛋白。

[0303] 120.如实施方案119所述的病毒基因组,其中所述Rep78蛋白、所述Rep68蛋白、所述Rep52蛋白和/或所述Rep40蛋白由至少一个Rep基因编码。

[0304] 121.一种经分离(例如,重组)的GBA蛋白,所述GBA蛋白由如实施方案1-6或9-49中任一项所述的经分离的核酸或如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组编码。

[0305] 122.一种经分离(例如,重组)的AAV粒子,所述AAV粒子包含:

[0306] (i)衣壳蛋白;以及

[0307] (ii)如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组。

[0308] 123.如实施方案122所述的AAV粒子,其中:

[0309] (i)所述衣壳蛋白包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列,或与其具有至少80%(例如,至少约85、90、95、96、97、98或99%)序列同一性的氨基酸序列;

[0310] (ii)所述衣壳蛋白包含具有SEQ ID NO:138的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的氨基酸序列;

[0311] (iii)所述衣壳蛋白包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或与其具有至少80%(例如,至少约85、90、95、96、97、98或99%)序列同一性的氨基酸序列;

[0312] (iv)所述衣壳蛋白包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的氨基酸序列;

[0313] (v)所述衣壳蛋白包含由SEQ ID NO:137的核苷酸序列,或与其具有至少80%(例如,至少约85、90、95、96、97、98或99%)序列同一性的序列编码的氨基酸序列;和/或

[0314] (vi)编码所述衣壳蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:137的核苷酸序列,或与其具有至少80%(例如,至少约85、90、95、96、97、98或99%)序列同一性的序列。

[0315] 124.如实施方案122或123所述的AAV粒子,其中所述衣壳蛋白包含:

[0316] (i)根据SEQ ID NO:138编号在位置K449处的氨基酸取代,例如,K449R取代;

[0317] (ii)包含TLAVPFFK(SEQ ID NO:1262)的氨基酸序列的插入物,任选地其中相对于根据SEQ ID NO:138编号的参考序列,所述插入物紧接在位置588之后存在;

[0318] (iii)根据SEQ ID NO:138编号在位置587处的除“A”以外的氨基酸和/或在位置588处的除“Q”以外的氨基酸;

[0319] (iv)根据SEQ ID NO:138编号的A587D和/或Q588G的氨基酸取代。

[0320] 125.如实施方案122-124中任一项所述的AAV粒子,其中所述衣壳蛋白包含(i)根据SEQ ID NO:138编号的K449R的氨基酸取代;以及(ii)包含TLAVPFFK(SEQ ID NO:1262)的氨基酸序列的插入物,任选地其中所述插入物紧接在SEQ ID NO:138的位置588之后存在。

[0321] 126. 如实施方案122-124中任一项所述的AAV粒子,其中所述衣壳蛋白包含(i)根据SEQ ID NO:138编号的K449R的氨基酸取代;(ii)包含TLAVPFK (SEQ ID NO:1262)的氨基酸序列的插入物,任选地其中相对于根据SEQ ID NO:138编号的参考序列,所述插入物紧接在位置588之后存在;以及(iii)根据SEQ ID NO:138编号的A587D和Q588G的氨基酸取代。

[0322] 127. 如实施方案122-124中任一项所述的AAV粒子,其中所述衣壳蛋白包含(i)包含TLAVPFK (SEQ ID NO:1262)的氨基酸序列的插入物,任选地其中相对于根据SEQ ID NO:138编号的参考序列,所述插入物紧接在位置588之后存在;以及(ii)根据SEQ ID NO:138编号的A587D和Q588G的氨基酸取代。

[0323] 128. 如实施方案122-127中任一项所述的AAV粒子,其中所述衣壳蛋白包含表1中所列的衣壳蛋白或其功能变体中的任一者。

[0324] 129. 如实施方案122-128中任一项所述的AAV粒子,其中所述衣壳蛋白包含VOY101、VOY201、AAVPHP.N (PHP.N)、AAVPHP.B (PHP.B)、AAVPHP.A (PHP.A)、PHP.B2、PHP.B3、G2B4、G2B5、AAV9、AAVrh10或其功能变体。

[0325] 130. 如实施方案122-129中任一项所述的AAV粒子,其中:

[0326] (i) 所述衣壳蛋白包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或与其大体上同一(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列;

[0327] (ii) 所述衣壳蛋白包含相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列包含至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰,例如取代的氨基酸序列;

[0328] (iii) 所述衣壳蛋白包含由SEQ ID NO:2的核苷酸序列或与其大体上同一(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列编码的氨基酸序列;和/或

[0329] (iv) 编码所述衣壳蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列。

[0330] 131. 如实施方案122-130中任一项所述的AAV粒子,其中所述衣壳蛋白包含:

[0331] (i) VP1多肽、VP2多肽、VP3多肽或它们的组合;

[0332] (ii) 对应于SEQ ID NO:1的位置138-743(例如,VP2)的氨基酸序列,或与其具有至少80%(例如,至少约85、90、92、95、96、97、98或99%)序列同一性的序列;

[0333] (iii) 对应于SEQ ID NO:1的位置203-743(例如,VP3)的氨基酸序列,或与其具有至少80%(例如,至少约85、90、92、95、96、97、98或99%)序列同一性的序列;和/或

[0334] (iv) 对应于SEQ ID NO:1的位置1-743(例如,VP1)的氨基酸序列,或与其具有至少80%(例如,至少约85、90、92、95、96、97、98或99%)序列同一性的序列。

[0335] 132. 如实施方案122-131中任一项所述的AAV粒子,其中编码所述衣壳蛋白的核苷酸序列包含:

[0336] (i) CTG起始密码子;和/或

[0337] (ii) SEQ ID NO:137的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含3-20个突变,例如取代,例如3-15个突变、3-10个突变、3-5个突变、5-20个突变、5-15个突变、5-10个突变、10-20个突变、10-15个突变、15-20个突变、3个突变、5个突变、10个突变、12个突变、15个突变、18个

突变或20个突变。

[0338] 133.一种载体,所述载体包含如实施方案1-6或9-49中任一项所述的经分离的核酸或如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组。

[0339] 134.一种细胞,所述细胞包含如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组、如实施方案122-132中任一项所述的病毒粒子或如实施方案133所述的载体。

[0340] 135.如实施方案134所述的细胞,所述细胞是哺乳动物细胞,例如HEK293细胞;昆虫细胞,例如Sf9细胞;或细菌细胞。

[0341] 136.一种核酸,所述核酸包含如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组,以及适合于细胞(例如,细菌细胞)中病毒基因组的复制的主链区(例如,其中所述主链区包含细菌复制起点和可选标记物中的一者或两者)。

[0342] 137.如实施方案136所述的核酸,其中所述病毒基因组包含SEQ ID NO:1799-1082、1752-1759、1803-1821或1824-1830中的任一者的核苷酸序列。

[0343] 138.一种制造病毒基因组的方法,所述方法包括:

[0344] (i) 提供包含如实施方案136或137所述的病毒基因组的核酸分子,或编码如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组的核酸;以及

[0345] (ii) 从所述主链区切除所述病毒基因组,例如,通过使所述病毒基因组的上游和下游的核酸分子裂解。

[0346] 139.一种制造经分离(例如,重组)的AAV粒子的方法,所述方法包括

[0347] (i) 提供包含如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组或编码如实施方案136或137所述的病毒基因组的核酸的宿主细胞;以及(ii) 在适合于将所述病毒基因组包裹于衣壳蛋白,例如VOY101衣壳蛋白中的条件下孵育所述宿主细胞;

[0348] 从而制造所述经分离的AAV粒子。

[0349] 140.如实施方案139所述的方法,所述方法还包括在步骤(i)之前,将包含所述病毒基因组的第一核酸分子引入所述宿主细胞中。

[0350] 141.如实施方案139或140所述的方法,其中所述宿主细胞包含编码衣壳蛋白,例如VOY101衣壳蛋白的第二核酸。

[0351] 142.如实施方案141所述的方法,所述方法还包括将所述第二核酸引入所述细胞中。

[0352] 143.如实施方案141或142所述的方法,其中在所述第一核酸分子之前、同时或之后将所述第二核酸分子引入所述宿主细胞中。

[0353] 144.如实施方案139-143中任一项所述的方法,其中所述宿主细胞包括哺乳动物细胞,例如HEK293细胞;昆虫细胞,例如Sf9细胞;或细菌细胞。

[0354] 145.一种药物组合物,所述药物组合物包含如实施方案122-132中任一项所述的AAV粒子或包含如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组的AAV粒子,以及药学上可接受的赋形剂。

[0355] 146.一种向受试者递送外源GBA蛋白的方法,所述方法包括施用有效量的如实施方案145所述的药物组合物、如实施方案122-132中任一项所述的AAV粒子、包含如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组的AAV粒子,或包含含有如实施方案1-6或9-49中任一项所述的核酸的病毒基因组的AAV粒子,从而向所述受试者递送所述外源GBA。

[0356] 147.如实施方案146所述的方法,其中所述受试者患有、已诊断患有或有风险患有与GBA表达,例如异常或降低的GBA表达,例如GBA基因、GBA mRNA和/或GBA蛋白表达相关的疾病。

[0357] 148.如实施方案146或147所述的方法,其中所述受试者患有、已诊断患有或有风险患有神经退化或神经肌肉病症。

[0358] 149.一种治疗患有或经诊断患有与GBA表达相关的疾病的受试者的方法,所述方法包括施用有效量的如实施方案145所述的药物组合物、如实施方案122-132中任一项所述的AAV粒子、包含如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组的AAV粒子,或包含含有如实施方案1-6或9-49中任一项所述的核酸的病毒基因组的AAV粒子,从而治疗所述受试者的所述与GBA表达相关的疾病。

[0359] 150.一种治疗患有或经诊断患有神经退化或神经肌肉病症的受试者的方法,所述方法包括施用有效量的如实施方案145所述的药物组合物、如实施方案122-132中任一项所述的AAV粒子、包含如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组的AAV粒子,或包含含有如实施方案1-6或9-49中任一项所述的核酸的病毒基因组的AAV粒子,从而治疗所述受试者的所述神经退化或神经肌肉病症。

[0360] 151.如实施方案147-150中任一项所述的方法,其中所述与GBA表达相关的疾病或所述神经退化或神经肌肉病症包括帕金森氏病(PD)、路易体痴呆(DLB)、戈谢病(GD)、脊髓性肌萎缩症(SMA)、多系统萎缩症(MSA)或多发性硬化症(MS)。

[0361] 152.一种治疗患有或经诊断患有帕金森氏病(PD)(例如,与GBA基因突变相关的PD)的受试者的方法,所述方法包括施用有效量的如实施方案145所述的药物组合物、如实施方案122-132中任一项所述的AAV粒子、包含如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组的AAV粒子,或包含含有如实施方案1-6或9-49中任一项所述的核酸的病毒基因组的AAV粒子,从而治疗所述受试者的PD。

[0362] 153.如实施方案151或152所述的方法,其中所述PD与GBA基因突变相关。

[0363] 154.如实施方案151-153中任一项所述的方法,其中所述PD是早发型PD(例如,50岁之前)或青少年型PD(例如,20岁之前)。

[0364] 155.如实施方案151-154所述的方法,其中所述PD是震颤主导、姿势不稳步态困难PD(PIGD)或散发性PD(例如,与突变无关的PD)。

[0365] 156.一种治疗患有或经诊断患有戈谢病(GD)的受试者的方法,所述方法包括施用有效量的如实施方案145所述的药物组合物、如实施方案122-132中任一项所述的AAV粒子、包含如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组的AAV粒子,或包含含有如实施方案1-6或9-49中任一项所述的核酸的病毒基因组的AAV粒子,从而治疗所述受试者的GD。

[0366] 157.如实施方案151或156所述的方法,其中所述GD是神经病性GD(例如,影响CNS的细胞或组织,例如脑和/或脊髓的细胞或组织)、非神经病性GD(例如,不影响CNS的细胞或组织),或它们的组合。

[0367] 158.如实施方案151或156-157中任一项所述的方法,其中所述GD是I型GD(GD1)、2型GD(GD2)或3型GD(GD3)。

[0368] 159.如实施方案158所述的方法,其中所述GD1是非神经病性GD。

[0369] 160.如实施方案158所述的方法,其中所述GD2是神经病性GD。

[0370] 161.如实施方案146-160中任一项所述的方法,其中当通过测定,例如实施例7中所描述的测定进行测量时,所述受试者具有与参考水平相比降低的GCase活性水平。

[0371] 162.如实施方案161所述的方法,其中所述参考水平包括未患有与GBA表达相关的疾病、神经肌肉和/或神经退化病症的受试者的GCase活性水平。

[0372] 163.如实施方案149-162中任一项所述的方法,其中治疗包括预防所述受试者的疾病进展。

[0373] 164.如实施方案149-163中任一项所述的方法,其中治疗得以改善所述受试者的所述与GBA表达相关的疾病、所述神经退化病症和/或所述神经肌肉病症的至少一种症状。

[0374] 165.如实施方案164所述的方法,其中所述与GBA表达相关的疾病、所述神经退化病症和/或所述神经肌肉病症的所述症状包括GCase活性降低、葡糖脑苷脂和其它糖脂例如在免疫细胞(例如,巨噬细胞)内积聚、突触核蛋白聚集体(例如,路易体)积累、发育迟缓、进行性脑病、进行性痴呆、共济失调、肌阵挛、眼球运动功能障碍、延髓性瘫痪、全身无力、四肢颤抖、抑郁、幻视、认知衰退或它们的组合。

[0375] 166.如实施方案146-165中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类。

[0376] 167.如实施方案146-166中任一项所述的方法,其中所述受试者是青少年,例如,介于6岁至20岁之间。

[0377] 168.如实施方案146-167中任一项所述的方法,其中所述受试者是成人,例如,20岁以上。

[0378] 169.如实施方案146-168中任一项所述的方法,其中所述受试者具有GBA基因、GBA mRNA和/或GBA蛋白的突变。

[0379] 170.如实施方案146-169中任一项所述的方法,其中静脉内、脑内、经由丘脑内(ITH)施用、肌肉内、鞘内、脑室内、经由实质内施用、经由聚焦式超声波(FUS)例如结合微泡静脉内施用(FUS-MB),或MRI引导的FUS结合静脉内施用,或经由大池内注射(ICM),向所述受试者施用所述AAV粒子。

[0380] 171.如实施方案146-170中任一项所述的方法,其中经由双重ITH和ICM施用来施用所述AAV粒子。

[0381] 172.如实施方案146-170中任一项所述的方法,其中经由静脉内注射来施用所述AAV粒子,任选地其中所述静脉内注射是经由聚焦式超声波(FUS)例如结合微泡静脉内施用(FUS-MB),或MRI引导的FUS结合静脉内施用。

[0382] 173.如实施方案146-172中任一项所述的方法,其中向CNS的细胞、组织或区域,例如脑或脊髓的区域,例如实质、皮质、黑质、小脑尾状核、纹状体、胼胝体、小脑、脑干尾状壳核、丘脑、上丘、脊髓或它们的组合施用所述AAV粒子。

[0383] 174.如实施方案146-173中任一项所述的方法,其中向外周的细胞、组织或区域,例如肺细胞或组织、心脏细胞或组织、脾细胞或组织、肝细胞或组织或它们的组合施用所述AAV粒子。

[0384] 175.如实施方案146-174中任一项所述的方法,其中向脑脊髓液、血清或它们的组合施用所述AAV粒子。

[0385] 176.如实施方案146-175中任一项所述的方法,其中向CNS的至少两个组织或区域施用所述AAV粒子,例如,双侧施用。

[0386] 177. 如实施方案146-176中任一项所述的方法, 所述方法还包括进行血液测试、进行成像测试、收集CNS活检样品、收集组织活检体(例如肺、肝或脾的活检体)、收集血液或血清样本, 或收集脑脊髓液活检体。

[0387] 178. 如实施方案146-177中任一项所述的方法, 所述方法还包括评估(例如, 测量)所述受试者中, 例如所述受试者的细胞、组织或流体中GBA表达, 例如GBA基因、GBA mRNA和/或GBA蛋白表达的水平, 任选地其中通过本文所描述的测定, 例如ELISA、免疫印迹法或免疫组织化学测定来测量所述GBA蛋白水平。

[0388] 179. 如实施方案178所述的方法, 其中在用所述AAV粒子治疗之前、期间或之后测量所述GBA表达水平。

[0389] 180. 如实施方案178或179所述的方法, 其中所述细胞或组织是中枢神经系统(例如, 实质)或外周细胞或组织(例如, 肝脏、心脏和/或脾)的细胞或组织。

[0390] 181. 如实施方案146-180中任一项所述的方法, 其中相对于参考水平, 例如尚未接受治疗, 例如尚未施用AAV粒子的受试者, 所述施用使得所述受试者的细胞或组织中GBA蛋白表达的水平增加。

[0391] 182. 如实施方案146-181中任一项所述的方法, 所述方法还包括评估(例如, 测量)所述受试者中, 例如所述受试者的细胞或组织中GCase活性的水平, 任选地其中通过本文所描述的测定, 例如实施例7中所描述的测定来测量所述GCase活性水平。

[0392] 183. 如实施方案146-182中任一项所述的方法, 其中所述施用使得以下至少一者、两者或全部增加:

[0393] (i) 所述受试者的细胞、组织(例如, CNS的细胞或组织, 例如皮质、纹状体、丘脑、小脑和/或脑干)和/或流体(例如, CSF和/或血清)中GCase活性的水平, 任选地其中与参考水平, 例如尚未接受治疗, 例如尚未施用所述AAV粒子的受试者相比, 所述GCase活性水平增加至少3、4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4或5.5倍;

[0394] (ii) 所述受试者的CNS组织(例如, 皮质、纹状体、丘脑、小脑、脑干和/或脊髓)中每个细胞的病毒基因组(VG)水平, 任选地其中与外周组织相比, 每个细胞的VG水平增加50VG以上, 其中每个细胞的VG水平比CNS组织中的水平低至少4-10倍, 例如, 通过如本文所描述的测定所测量; 和/或

[0395] (iii) 细胞或组织(例如, CNS的细胞或组织, 例如皮质、丘脑和/或脑干)中GBA mRNA表达的水平, 任选地其中与参考水平, 例如尚未接受治疗(例如, 尚未施用所述AAV粒子)的受试者或内源GBA mRNA水平相比, 所述GBA mRNA水平增加至少100-1300倍, 例如, 100倍、200倍、500倍、600倍、850倍、900倍、950倍、1000倍、1050倍、1100倍、1150倍、1200倍、1250倍或1300倍, 例如, 通过如本文所描述的测定所测量。

[0396] 184. 如实施方案146-183中任一项所述的方法, 其中还包括施用适合于治疗或预防所述与GBA表达相关的疾病、所述神经退化病症和/或所述神经肌肉病症的额外治疗剂和/或疗法。

[0397] 185. 如实施方案184所述的方法, 其中所述额外治疗剂包括酶替代疗法(ERT)(例如, 伊米苷酶(imiglucerase)、维拉苷酶 α (velaglucerase alfa)或他利苷酶 α (taliglucerase alfa)); 底物还原疗法(SRT)(例如, 依利格鲁司特(eliglustat)或美格鲁特(miglustat)); 输血、左旋多巴(levodopa)、卡比多巴(carbidopa)、沙芬酰胺

(Safinamide)、多巴胺激动剂(例如,普拉克索(pramipexole)、罗替戈汀(rotigotine)或罗匹尼罗(ropinirole))、抗胆碱剂(例如,苯扎托品(benzotropine)或苯海索(trihexyphenidyl))、胆碱酯酶抑制剂(例如,利凡斯的明(rivastigmine)、多奈哌齐(donepezil)或加兰他敏(galantamine))、N-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂(例如,美金刚(memantine))或它们的组合。

[0398] 186.如实施方案1-6或9-49中任一项所述的经分离的核酸、如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组、如实施方案122-132中任一项所述的AAV粒子或如实施方案145所述的药物组合物,其用于制造药剂。

[0399] 187.如实施方案1-6或9-49中任一项所述的经分离的核酸、如实施方案7-120中任一项所述的病毒基因组、如实施方案122-132中任一项所述的AAV粒子或如实施方案145所述的药物组合物,其用于治疗与GBA表达相关的疾病、神经肌肉和/或神经退化病症。

[0400] 188.有效量的包含如实施方案7-120中任一项所述的基因组的AAV粒子、包含含有如实施方案1-6或9-49中任一项所述的核酸的基因组的AAV粒子、如实施方案122-132中任一项所述的AAV粒子或如实施方案145所述的药物组合物的用途,其用于制造用以治疗与GBA表达相关的疾病、神经肌肉和/或神经退化病症的药剂。

[0401] 189.一种腺相关病毒(AAV)载体基因组,所述载体基因组包含选自SEQ ID NO: 1759-1771中的任一者的序列。

[0402] 190.一种AAV粒子,所述AAV粒子包含如权利要求189所述的AAV载体基因组和选自由表1中所列的那些组成的组的衣壳。

[0403] 191.如权利要求190所述的AAV粒子,其中所述衣壳包含AAV2血清型。

[0404] 192.一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求190或权利要求191所述的AAV粒子。

[0405] 193.一种治疗神经或神经肌肉病症的方法,所述方法包括向受试者施用如权利要求192所述的药物组合物。

[0406] 194.如权利要求193所述的方法,其中所述神经或神经肌肉病症是帕金森氏病、戈谢病或路易体痴呆,或相关病症。

[0407] 195.如权利要求194所述的方法,其中所述神经或神经肌肉病症是与GCase蛋白水平降低相关的病症。

[0408] 下文阐述了本公开的各个方面或实施方案的细节。本公开的其它特征、目的和优点将从描述和权利要求书显而易见。在描述中,除非上下文另有明确规定,否则单数形式还包括复数。除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本公开的领域中的本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在冲突的情况下,以本描述为准。

附图说明

[0409] 图1A-1B描绘了LC-MS/MS结果,其定量源自戈谢病患者的成纤维细胞(GD1患者GM04394、GD1患者GM00852和GD2患者GM00877)和健康对照成纤维细胞(CTL GM05758、CTL GM02937和CTL GM08402)的细胞溶解产物中GBA底物葡萄糖鞘胺醇(GlcSph)的水平。数据显示为针对肌动蛋白归一化(图1A)或针对溶酶体蛋白Lamp1归一化(图1B)的GlcSph。图1C描绘了通过LC-MS/MS,与健康对照成纤维细胞(HC)相比,源自戈谢病患者的成纤维细胞(GD1和

GD2) 的溶解产物中检测的GBA蛋白水平。数据显示为GBA蛋白 (ng) 相对于总蛋白 (mg) 的浓度。

[0410] 图2A-2B描绘了在 10^3 的MOI下,用包含病毒基因组构建体的AAV2病毒粒子转导后第7天,GD-II GM00877成纤维细胞团块(图2A)或条件培养基(图2B)中的GCase活性(REU/mL,针对mg蛋白归一化),所述病毒基因组构建体在X轴上从左至右是:GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG9(SEQ ID NO:1767)、GBA_VG10(SEQ ID NO:1768)、GBA_VG11(SEQ ID NO:1769)、GBA_VG6(SEQ ID NO:1764)、GBA_VG7(SEQ ID NO:1765)、GBA_VG12(SEQ ID NO:1770)、GBA_VG3(SEQ ID NO:1761)、GBA_VG4(SEQ ID NO:1762)、GBA_VG5(SEQ ID NO:1763)和GBA_VG13(SEQ ID NO:1771)。虚线指示基线水平(媒介处理)。

[0411] 图3描绘了在用无AAV对照或包含病毒基因组的AAV2载体转导后第7天,从GD-II患者成纤维细胞(GM00877)收集的细胞溶解产物中GBA底物葡萄糖鞘胺醇(GlcSph)的水平(ng/mg Lamp1),所述病毒基因组在X轴上指示(从左至右:GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG9(SEQ ID NO:1767)、GBA_VG6(SEQ ID NO:1764)、GBA_VG7(SEQ ID NO:1765)、GBA_VG3(SEQ ID NO:1761)、GBA_VG4(SEQ ID NO:和GBA_VG5(SEQ ID NO:1763))。

[0412] 图4A描绘了在 $10^{2.5}$ (第一条)、 10^3 (第二条)、 $10^{3.5}$ 和 10^4 (第三条)的MOI下,用包含病毒基因组的AAV2载体转导后第7天,针对GD-II患者成纤维细胞(GD-II GM00877)中的mg蛋白归一化的以RFU/mL测量的GCase活性,所述病毒基因组在X轴上指示(从左至右:GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG14(SEQ ID NO:1809)、GBA_VG15(SEQ ID NO:1810)、GBA_VG16(SEQ ID NO:1811)、GBA_VG17(SEQ ID NO:1812)、GBA_VG18(SEQ ID NO:1813)、GBA_VG19(SEQ ID NO:1814)和GBA_VG20(SEQ ID NO:1815))。图4B描绘了在 $10^{2.5}$ (第一条)、 10^3 (第二条)、 $10^{3.5}$ 和 10^4 (第三条)的MOI下,用包含病毒基因组的AAV2载体转导后第7天,源自GD-II患者的成纤维细胞的细胞溶解产物中GBA底物葡萄糖鞘胺醇的水平(GlcSph,ng/mg Lamp1),所述病毒基因组在X轴上指示(从左至右:GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG14(SEQ ID NO:1809)、GBA_VG15(SEQ ID NO:1810)、GBA_VG16(SEQ ID NO:1811)、GBA_VG17(SEQ ID NO:1812)、GBA_VG18(SEQ ID NO:1813)、GBA_VG19(SEQ ID NO:1814)和GBA_VG20(SEQ ID NO:1815))。

[0413] 图5描绘了编码SEQ ID NO:1773的GBA蛋白的第一密码子优化的核苷酸序列、编码SEQ ID NO:1781的GBA蛋白的第二密码子优化的核苷酸序列和编码SEQ ID NO:1777的GBA蛋白的野生型核苷酸序列的GC含量和分布。

[0414] 图6A-6B比较了由以下AAV2载体化病毒基因组构建体表达的GBA蛋白的活性:GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG17(SEQ ID NO:1812)和GBA_VG21(SEQ ID NO:1816)。图6A描绘了与无AAV对照相比,在 $10^{4.5}$ 的MOI下,用包含病毒基因组构建体的AAV2病毒粒子处理的GD-II患者成纤维细胞中针对mg蛋白归一化的GCase活性(RFU/mL),所述构建体在X轴上指示(GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG17(SEQ ID NO:1812)和GBA_VG21(SEQ ID NO:1816))。图6B描绘了在 10^6 的MOI下,用包含病毒基因组构建体的AAV2病毒粒子或无AAV处理对照处理的GD-II患者成纤维细胞的细胞溶解产物中的葡萄糖鞘胺醇(GlcSph)(ng/mL Lamp1),所述构建体在X轴上指示(从左至右:GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG17(SEQ ID NO:1812)和GBA_VG21(SEQ ID NO:1816))。

[0415] 图7描绘了与无AAV对照相比,在 $10^{3.5}$ 或 $10^{4.5}$ 的MOI下,用包含GBA_VG33(SEQ ID

NO:1828)的AAV2载体或包含GBA_VG17 (SEQ ID NO:1812)的AAV2载体转导的大鼠胚背根神经节 (DRG) 神经元中每mg蛋白的GCase活性 (RFU/mL)。

[0416] 图8描绘了在静脉内注射2e13vg/kg的VOY101.GBA_VG17 (SEQ ID NO:1812) 后一个月,野生型小鼠的皮质、纹状体、丘脑、脑干、小脑和肝脏中的生物分布 (VG/细胞) 对比GCase活性 (RFU/mL,内源GCase活性的倍数,针对mg蛋白归一化)。

具体实施方式

[0417] 综述

[0418] 本文尤其描述了包含经分离 (例如,重组) 的病毒粒子,例如AAV粒子,用于递送,例如载体化递送蛋白质,例如GBA蛋白的组合物,以及其制造和使用方法。腺相关病毒 (AAV) 是细小病毒科的小型无包膜二十面体衣壳病毒,其特征为单链DNA病毒基因组。细小病毒科病毒由两个亚科组成:感染脊椎动物的细小病毒亚科,以及感染无脊椎动物的浓核病毒亚科。细小病毒科包括能够在脊椎动物宿主中复制的依赖病毒属 (包括AAV),所述宿主包括但不限于人类、灵长类动物、牛、狗、马和绵羊物种。

[0419] 细小病毒科的细小病毒和其它成员一般描述于Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication", Fields Virology (第3版1996) 的第69章中,所述文献的内容以全文引用的方式并入。

[0420] 已证明AAV可用作生物工具,这归因于其相对简单的结构,其能够感染大范围的细胞 (包括静止和分裂细胞) 而无需整合至宿主基因组中并且无需复制,以及其相对良性的免疫原性型态。可以操纵病毒的基因组以含有用于组装功能性重组病毒或病毒粒子的最少组件,所述病毒粒子负载有所需有效载荷,或经工程改造以靶向特定组织并且表达或递送所需有效载荷。可以修饰病毒的基因组以含有用于组装功能性重组病毒或病毒粒子的最少组件,所述病毒粒子负载有所需核酸构建体或有效载荷,或经工程改造以表达或递送所需核酸构建体或有效载荷,例如转基因,编码多肽的多核苷酸,例如GBA蛋白,例如GCase、GCase和PSAP、GCase和SapA,或GCase和SapC、GCase和细胞穿透肽 (例如,ApoEIII肽、TAT肽或ApoB肽),或GCase和溶酶体靶向序列 (LTS),可以将其递送至靶细胞、组织或生物体。在一些实施方案中,靶细胞是CNS细胞。在一些实施方案中,靶组织是CNS组织。CNS靶组织可以是脑组织。在一些实施方案中,脑靶包括尾状核、壳核、丘脑、上丘、皮质和胼胝体。

[0421] 基因疗法为PD和共享单基因病因的相关疾病,诸如戈谢病和路易体痴呆以及相关病症提供了一种替代方法。由于具有许多有利特征,AAV通常用于基因治疗方法中。不希望受理论约束,在一些实施方案中,据信表达载体,例如腺相关病毒载体 (AAV) 或AAV粒子,例如本文所描述的AAV粒子,可以用于施用和/或递送GBA蛋白 (例如,GCase和相关蛋白),以达成持续高浓度,从而相对于非AAV疗法实现更持久的功效、更少剂量的治疗、广泛的生物分布和/或更一致的GBA蛋白水平。

[0422] 如下文的实施例中所证明,与先前的酶替代方法相比,本文所描述的组合物和方法提供了改善的特征,包括 (i) 受试者的细胞、组织 (例如,CNS的细胞或组织,例如皮质、纹状体、丘脑、小脑和/或脑干) 和/或流体 (例如,CSF和/或血清) 中的GCase活性增加; (ii) 整个CNS (例如,皮质、纹状体、丘脑、小脑、脑干和/或脊髓) 和外周 (例如,肝脏) 中的生物分布增加,和/或 (iii) 多个脑区域 (例如,皮质、丘脑和脑干) 和外周 (例如,肝脏) 中的有效载荷

表达,例如GBA mRNA表达升高。在一些实施方案中,包含编码GBA蛋白的优化核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:1773)的编码本文所描述的GBA蛋白的AAV病毒基因组促成CNS中的高生物分布;CNS、外周组织和/或流体中增加的GCase活性;以及成功的转基因转录和表达。本文所描述的组合物和方法可以用于治疗与缺乏GBA蛋白和/或GCase活性相关的病症,诸如神经病性(影响CNS)和非神经病性(影响非CNS) 戈谢病(例如,1型GD、2型GD或3型GD)、与GBA基因突变相关的PD以及路易体痴呆(DLB)。

[0423] I. 组合物

[0424] 腺相关病毒(AAV)载体

[0425] AAV具有长度为约5,000个核苷酸的基因组,所述基因组含有编码负责复制的蛋白质(Rep)和衣壳的结构蛋白(Cap)的两个开放阅读框。开放阅读框的两侧为两个反向末端重复(ITR)序列,作为病毒基因组的复制起点。野生型AAV病毒基因组包含两个开放阅读框的核苷酸序列,一个用于四种非结构Rep蛋白(Rep78、Rep68、Rep52、Rep40,由Rep基因编码),并且一个用于三种衣壳或结构蛋白(VP1、VP2、VP3,由衣壳基因或Cap基因编码)。Rep蛋白对于复制和包装是重要的,而衣壳蛋白经组装以形成AAV的蛋白质外壳或AAV衣壳。替代剪接和替代起始密码子和启动子得以从单个开放阅读框产生四种不同的Rep蛋白,并且从单个开放阅读框产生三种衣壳蛋白。尽管因AAV血清型而异,但作为一个非限制性实例,对于AAV9/hu.14(US 7,906,111的SEQ ID NO:123,其内容以全文引用的方式并入本文中),VP1是指氨基酸1-736,VP2是指氨基酸138-736,并且VP3是指氨基酸203-736。作为另一个非限制性实例,VP1是指根据SEQ ID NO:1编号的氨基酸1-743,VP2是指根据SEQ ID NO:1编号的氨基酸138-743,并且VP3是指根据SEQ ID NO:1编号的氨基酸203-743。换句话说,VP1是全长衣壳序列,而VP2和VP3是整体的较短组件。因此,VP3区域中的序列变化也是VP1和VP2的变化,然而,与亲代序列相比的百分比差异对于VP3将是最大的,这是因为其为三个序列中的最短序列。尽管此处描述关于氨基酸序列,但可以类似地描述编码这些蛋白质的核酸序列。三种衣壳蛋白一起组装以形成AAV衣壳蛋白。尽管不希望受理论约束,但AAV衣壳蛋白通常包含1:1:10摩尔比的VP1:VP2:VP3。如本文所用,“AAV血清型”主要由AAV衣壳定义。在一些情况下,ITR也由AAV血清型(例如,AAV2/9)特定地描述。

[0426] AAV载体通常需要共辅助子(例如,腺病毒)以在细胞中经历生产性感染。在不存在此类辅助功能的情况下,AAV病毒体基本上进入宿主细胞,但不整合至细胞的基因组中。

[0427] 由于具有若干独特特征,已研究了AAV载体用于基因治疗剂的递送。特征的非限制性实例包括(i)感染分裂和非分裂细胞的能力;(ii)感染力的广泛宿主范围,包括人类细胞;(iii)野生型AAV与任何疾病无关并且未显示在受感染的细胞中复制;(iv)缺乏针对载体的细胞介导的免疫反应;以及(v)宿主染色体中的非整合性质,从而降低长期遗传变异的潜力。此外,AAV载体感染对改变细胞基因表达的模式具有极小影响(Stilwell和Samulski等,Biotechniques,2003,34,148,其内容以全文引用的方式并入本文中)。

[0428] 通常,用于GCase蛋白递送的AAV载体可以是具有复制缺陷的重组病毒载体,这是因为其在病毒基因组内缺乏编码功能性Rep和Cap蛋白的序列。在一些情况下,缺陷性AAV载体可能缺乏大部分或全部编码序列,并且基本上仅含有一个或两个AAV ITR序列和有效载荷序列。在某些实施方案中,病毒基因组编码GCase蛋白。在一些实施方案中,病毒基因组编码GCase蛋白和SapA蛋白。在一些实施方案中,病毒基因组编码GCase蛋白和SapC蛋白。举例

来说,病毒基因组可以编码人类GCase、人类GCase+SapA或人类GCase+SapC蛋白。

[0429] 在一些实施方案中,病毒基因组可以包含一个或多个溶酶体靶向序列(LTS)。

[0430] 在一些实施方案中,病毒基因组可以包含一个或多个细胞穿透肽序列(CPP)。

[0431] 在一些实施方案中,病毒基因组可以包含一个或多个溶酶体靶向序列和一个或多个细胞穿透序列。

[0432] 在一些实施方案中,可以将本公开的AAV粒子引入哺乳动物细胞中。

[0433] 可以修饰AAV载体以提高递送效率。本公开的此类经修饰的AAV载体可以经有效包装并且可以用于以高频率和最小毒性成功感染靶细胞。

[0434] 在其它实施方案中,本公开的AAV粒子可以用于将GCase蛋白递送至中枢神经系统(参见例如美国专利号6,180,613;其内容以全文引用的方式并入本文中)或CNS的特定组织。

[0435] 如本文所用,术语“AAV载体”或“AAV粒子”包含衣壳和包含有效载荷的病毒基因组。如本文所用,“有效载荷”或“有效载荷区”是指由病毒基因组编码或在病毒基因组内编码的一个或多个多核苷酸或多核苷酸区或者此种多核苷酸或多核苷酸区的表达产物,例如,转基因、编码多肽或多重多肽(例如,GCase蛋白)的多核苷酸。

[0436] 应了解,本文所描述的组合物可以具有额外保守或非必需氨基酸取代,所述取代对其功能无实质性影响。

[0437] AAV血清型

[0438] 本公开的AAV粒子可以包含或来源于任何天然或重组AAV血清型。根据本公开,AAV粒子可以利用或基于血清型或包括选自以下任一者的肽:VOY101、VOY201、AAVPHP.B(PHP.B)、AAVPHP.A(PHP.A)、AAVG2B-26、AAVG2B-13、AAVTH1.1-32、AAVTH1.1-35、AAVPHP.B2(PHP.B2)、AAVPHP.B3(PHP.B3)、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP(3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3(G2A3)、AAVG2B4(G2B4)、AAVG2B5(G2B5)、PHP.S、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、

AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、AAAV、BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhER1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhER1.23、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-前miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV Shuffle 100-1、AAV Shuffle 100-3、AAV Shuffle 100-7、AAV Shuffle 10-2、AAV Shuffle 10-6、AAV Shuffle 10-8、AAVShuffle 100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真型AAV(ttAAV)、UPENN AAV 10、日本AAV 10血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AAV CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6.10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-

6.7、AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAVCHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAVCKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAVCLv-1、AAV CLv1-1、AAV Clv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV Clv1-7、AAV Clv1-8、AAV Clv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAVCLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAVCSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8和/或AAVF9/HSC9及其变体。

[0439] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如美国公布号US 20030138772(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAV1(US20030138772的SEQ ID NO:6和64)、AAV2(US20030138772的SEQ ID NO:7和70)、AAV3(US20030138772的SEQ ID NO:8和71)、AAV4(US20030138772的SEQ ID NO:63)、AAV5(US20030138772的SEQ ID NO:114)、AAV6(US20030138772的SEQ ID NO:65)、AAV7(US20030138772的SEQ ID NO:1-3)、AAV8(US20030138772的SEQ ID NO:4和95)、AAV9(US20030138772的SEQ ID NO:5和100)、AAV10(US20030138772的SEQ ID NO:117)、AAV11(US20030138772的SEQ ID NO:118)、AAV12(US20030138772的SEQ ID NO:119)、AAVrh10(US20030138772的SEQ ID NO:81的氨基酸1至738)、AAV16.3(US20030138772 SEQ ID NO:10)、AAV29.3/bb.1(US20030138772 SEQ ID NO:11)、AAV29.4(US20030138772 SEQ ID NO:12)、AAV29.5/bb.2(US20030138772 SEQ ID NO:13)、AAV1.3(US20030138772 SEQ ID NO:14)、AAV13.3(US20030138772 SEQ ID NO:15)、AAV24.1(US20030138772 SEQ ID NO:16)、AAV27.3(US20030138772 SEQ ID NO:17)、AAV7.2(US20030138772 SEQ ID NO:18)、AAVC1(US20030138772 SEQ ID NO:19)、AAVC3(US20030138772 SEQ ID NO:20)、AAVC5(US20030138772 SEQ ID NO:21)、AAVF1(US20030138772 SEQ ID NO:22)、AAVF3(US20030138772 SEQ ID NO:23)、AAVF5(US20030138772 SEQ ID NO:24)、AAVH6(US20030138772 SEQ ID NO:25)、AAVH2(US20030138772 SEQ ID NO:26)、AAV42-8(US20030138772 SEQ ID NO:27)、AAV42-15(US20030138772 SEQ ID NO:28)、AAV42-5b(US20030138772 SEQ ID NO:29)、AAV42-1b(US20030138772 SEQ ID NO:30)、AAV42-13(US20030138772 SEQ ID NO:31)、AAV42-3a(US20030138772 SEQ ID NO:32)、AAV42-4(US20030138772 SEQ ID NO:33)、AAV42-5a

(US20030138772 SEQ ID NO:34)、AAV42-10 (US20030138772 SEQ ID NO:35)、AAV42-3b (US20030138772 SEQ ID NO:36)、AAV42-11 (US20030138772 SEQ ID NO:37)、AAV42-6b (US20030138772 SEQ ID NO:38)、AAV43-1 (US20030138772 SEQ ID NO:39)、AAV43-5 (US20030138772 SEQ ID NO:40)、AAV43-12 (US20030138772 SEQ ID NO:41)、AAV43-20 (US20030138772 SEQ ID NO:42)、AAV43-21 (US20030138772 SEQ ID NO:43)、AAV43-23 (US20030138772SEQ ID NO:44)、AAV43-25 (US20030138772 SEQ ID NO:45)、AAV44.1 (US20030138772 SEQ ID NO:46)、AAV44.5 (US20030138772 SEQ ID NO:47)、AAV223.1 (US20030138772 SEQ ID NO:48)、AAV223.2 (US20030138772 SEQ ID NO:49)、AAV223.4 (US20030138772 SEQ ID NO:50)、AAV223.5 (US20030138772 SEQ ID NO:51)、AAV223.6 (US20030138772 SEQ ID NO:52)、AAV223.7 (US20030138772 SEQ ID NO:53)、AAVA3.4 (US20030138772 SEQ ID NO:54)、AAVA3.5 (US20030138772 SEQ ID NO:55)、AAVA3.7 (US20030138772 SEQ ID NO:56)、AAVA3.3 (US20030138772 SEQ ID NO:57)、AAV42.12 (US20030138772 SEQ ID NO:58)、AAV44.2 (US20030138772 SEQ ID NO:59)、AAV42-2 (US 20030138772 SEQ ID NO:9)或其变体。

[0440] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如美国公布号US20150159173 (其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAV2 (US20150159173的SEQ ID NO:7和23)、rh20 (US20150159173的SEQ ID NO:1)、rh32/33 (US20150159173的SEQ ID NO:2)、rh39 (US20150159173的SEQ ID NO:3、20和36)、rh46 (US20150159173的SEQ ID NO:4和22)、rh73 (US20150159173的SEQ ID NO:5)、rh74 (US20150159173的SEQ ID NO:6)、AAV6.1 (US20150159173的SEQ ID NO:29)、rh.8 (US20150159173的SEQ ID NO:41)、rh.48.1 (US20150159173的SEQ ID NO:44)、hu.44 (US20150159173的SEQ ID NO:45)、hu.29 (US20150159173的SEQ ID NO:42)、hu.48 (US20150159173的SEQ ID NO:38)、rh54 (US20150159173的SEQ ID NO:49)、AAV2 (US20150159173的SEQ ID NO:7)、cy.5 (US20150159173的SEQ ID NO:8和24)、rh.10 (US20150159173的SEQ ID NO:9和25)、rh.13 (US20150159173的SEQ ID NO:10和26)、AAV1 (US20150159173的SEQ ID NO:11和27)、AAV3 (US20150159173的SEQ ID NO:12和28)、AAV6 (US20150159173的SEQ ID NO:13和29)、AAV7 (US20150159173的SEQ ID NO:14和30)、AAV8 (US20150159173的SEQ ID NO:15和31)、hu.13 (US20150159173的SEQ ID NO:16和32)、hu.26 (US20150159173的SEQ ID NO:17和33)、hu.37 (US20150159173的SEQ ID NO:18和34)、hu.53 (US20150159173的SEQ ID NO:19和35)、rh.43 (US20150159173的SEQ ID NO:21和37)、rh2 (US20150159173的SEQ ID NO:39)、rh.37 (US20150159173的SEQ ID NO:40)、rh.64 (US20150159173的SEQ ID NO:43)、rh.48 (US20150159173的SEQ ID NO:44)、ch.5 (US20150159173的SEQ ID NO 46)、rh.67 (US20150159173的SEQ ID NO:47)、rh.58 (US20150159173的SEQ ID NO:48)或其变体,包括但不限于Cy5R1、Cy5R2、Cy5R3、Cy5R4、rh.13R、rh.37R2、rh.2R、rh.8R、rh.48.1、rh.48.2、rh.48.1.2、hu.44R1、hu.44R2、hu.44R3、hu.29R、ch.5R1、rh64R1、rh64R2、AAV6.2、AAV6.1、AAV6.12、hu.48R1、hu.48R2和hu.48R3。

[0441] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如美国专利号US 7198951 (其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAV9 (US 7198951的SEQ ID NO:1-3)、AAV2 (US 7198951的SEQ ID NO:4)、AAV1 (US 7198951的SEQ ID NO:5)、AAV3 (US

7198951的SEQ ID NO:6)和AAV8(US7198951的SEQ ID NO:7)。

[0442] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如N Pulicherla等(Molecular Therapy 19(6):1070-1078(2011),以全文引用的方式并入本文中)所描述的AAV9序列突变,诸如但不限于AAV9.9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84。

[0443] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如美国专利号US 6156303(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAV3B(US 6156303的SEQ ID NO:1和10)、AAV6(US 6156303的SEQ ID NO:2、7和11)、AAV2(US 6156303的SEQ ID NO:3和8)、AAV3A(US 6156303的SEQ ID NO:4和9)或其衍生物。

[0444] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如美国公布号US20140359799(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAV8(US20140359799的SEQ ID NO:1)、AAVDJ(US20140359799的SEQ ID NO:2和3)或其变体。

[0445] 在一些实施方案中,血清型可以是AAVDJ或其变体,诸如AAVDJ8(或AAV-DJ8),如由Grimm等(Journal of Virology 82(12):5887-5911(2008),以全文引用的方式并入本文中)所描述。AAVDJ8的氨基酸序列可以包含两个或更多个突变以去除肝素结合结构域(HBD)。作为一个非限制性实例,在美国专利号7,588,772(其内容以全文引用的方式并入本文中)中描述为SEQ ID NO:1的AAV-DJ序列可以包含两个突变:(1)R587Q,其中氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)变为谷氨酰胺(Q;Gln),以及(2)R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)变为苏氨酸(T;Thr)。作为另一个非限制性实例,可以包含三个突变:(1)K406R,其中氨基酸406处的赖氨酸(K;Lys)变为精氨酸(R;Arg), (2)R587Q,其中氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)变为谷氨酰胺(Q;Gln),以及(3)R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)变为苏氨酸(T;Thr)。

[0446] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如国际公布号W01998011244(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的AAV4序列,诸如但不限于AAV4(W01998011244的SEQ ID NO:1-20)。

[0447] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有AAV2序列突变以产生AAV2G9,如国际公布号W02014144229中所描述并且以全文引用的方式并入本文中。

[0448] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如国际公布号W02005033321(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAV3-3(W02005033321的SEQ ID NO:217)、AAV1(W02005033321的SEQ ID NO:219和202)、AAV106.1/hu.37(W02005033321的SEQ ID No:10)、AAV114.3/hu.40(W02005033321的SEQ ID No:11)、AAV127.2/hu.41(W02005033321的SEQ ID NO:6和8)、AAV128.3/hu.44(W02005033321的SEQ ID No:81)、AAV130.4/hu.48(W02005033321的SEQ ID NO:78)、AAV145.1/hu.53(W02005033321的SEQ ID No:176和177)、AAV145.6/hu.56(W02005033321的SEQ ID NO:168和192)、AAV16.12/hu.11(W02005033321的SEQ ID NO:153和57)、AAV16.8/hu.10(W02005033321的SEQ ID NO:156和56)、AAV161.10/hu.60(W02005033321的SEQ ID No:170)、AAV161.6/hu.61(W02005033321的SEQ ID No:174)、AAV1-7/rh.48(W02005033321的SEQ ID NO:32)、AAV1-8/rh.49(W02005033321的SEQ ID NO:103和25)、AAV2(W02005033321的SEQ ID NO:211和221)、AAV2-15/rh.62(W02005033321的SEQ ID No:33和114)、AAV2-3/rh.61(W02005033321

的SEQ ID NO:21)、AAV2-4/rh.50(W02005033321的SEQ ID No:23和108)、AAV2-5/rh.51(W02005033321的SEQ ID NO:104和22)、AAV3.1/hu.6(W02005033321的SEQ ID NO:5和84)、AAV3.1/hu.9(W02005033321的SEQ ID NO:155和58)、AAV3-11/rh.53(W02005033321的SEQ ID NO:186和176)、AAV3-3(W02005033321的SEQ ID NO:200)、AAV33.12/hu.17(W02005033321的SEQ ID NO:4)、AAV33.4/hu.15(W02005033321的SEQ ID No:50)、AAV33.8/hu.16(W02005033321的SEQ ID No:51)、AAV3-9/rh.52(W02005033321的SEQ ID NO:96和18)、AAV4-19/rh.55(W02005033321的SEQ ID NO:117)、AAV4-4(W02005033321的SEQ ID NO:201和218)、AAV4-9/rh.54(W02005033321的SEQ ID NO:116)、AAV5(W02005033321的SEQ ID NO:199和216)、AAV52.1/hu.20(W02005033321的SEQ ID NO:63)、AAV52/hu.19(W02005033321的SEQ ID NO:133)、AAV5-22/rh.58(W02005033321的SEQ ID No:27)、AAV5-3/rh.57(W02005033321的SEQ ID NO:105)、AAV5-3/rh.57(W02005033321的SEQ ID No:26)、AAV58.2/hu.25(W02005033321的SEQ ID No:49)、AAV6(W02005033321的SEQ ID NO:203和220)、AAV7(W02005033321的SEQ ID NO:222和213)、AAV7.3/hu.7(W02005033321的SEQ ID No:55)、AAV8(W02005033321的SEQ ID NO:223和214)、AAVH-1/hu.1(W02005033321的SEQ ID No:46)、AAVH-5/hu.3(W02005033321的SEQ ID No:44)、AAVhu.1(W02005033321的SEQ ID NO:144)、AAVhu.10(W02005033321的SEQ ID NO:156)、AAVhu.11(W02005033321的SEQ ID NO:153)、AAVhu.12(W02005033321 SEQ ID NO:59)、AAVhu.13(W02005033321的SEQ ID NO:129)、AAVhu.14/AAV9(W02005033321的SEQ ID NO:123和3)、AAVhu.15(W02005033321的SEQ ID NO:147)、AAVhu.16(W02005033321的SEQ ID NO:148)、AAVhu.17(W02005033321的SEQ ID NO:83)、AAVhu.18(W02005033321的SEQ ID NO:149)、AAVhu.19(W02005033321的SEQ ID NO:133)、AAVhu.2(W02005033321的SEQ ID NO:143)、AAVhu.20(W02005033321的SEQ ID NO:134)、AAVhu.21(W02005033321的SEQ ID NO:135)、AAVhu.22(W02005033321的SEQ ID NO:138)、AAVhu.23.2(W02005033321的SEQ ID NO:137)、AAVhu.24(W02005033321的SEQ ID NO:136)、AAVhu.25(W02005033321的SEQ ID NO:146)、AAVhu.27(W02005033321的SEQ ID NO:140)、AAVhu.29(W02005033321的SEQ ID NO:132)、AAVhu.3(W02005033321的SEQ ID NO:145)、AAVhu.31(W02005033321的SEQ ID NO:121)、AAVhu.32(W02005033321的SEQ ID NO:122)、AAVhu.34(W02005033321的SEQ ID NO:125)、AAVhu.35(W02005033321的SEQ ID NO:164)、AAVhu.37(W02005033321的SEQ ID NO:88)、AAVhu.39(W02005033321的SEQ ID NO:102)、AAVhu.4(W02005033321的SEQ ID NO:141)、AAVhu.40(W02005033321的SEQ ID NO:87)、AAVhu.41(W02005033321的SEQ ID NO:91)、AAVhu.42(W02005033321的SEQ ID NO:85)、AAVhu.43(W02005033321的SEQ ID NO:160)、AAVhu.44(W02005033321的SEQ ID NO:144)、AAVhu.45(W02005033321的SEQ ID NO:127)、AAVhu.46(W02005033321的SEQ ID NO:159)、AAVhu.47(W02005033321的SEQ ID NO:128)、AAVhu.48(W02005033321的SEQ ID NO:157)、AAVhu.49(W02005033321的SEQ ID NO:189)、AAVhu.51(W02005033321的SEQ ID NO:190)、AAVhu.52(W02005033321的SEQ ID NO:191)、AAVhu.53(W02005033321的SEQ ID NO:186)、AAVhu.54(W02005033321的SEQ ID NO:188)、AAVhu.55(W02005033321的SEQ ID NO:187)、AAVhu.56(W02005033321的SEQ ID NO:192)、AAVhu.57(W02005033321的SEQ ID NO:193)、AAVhu.58(W02005033321的SEQ ID NO:194)、AAVhu.6(W02005033321的SEQ ID NO:84)、AAVhu.60(W02005033321的SEQ ID NO:

184)、AAVhu.61(W02005033321的SEQ ID NO:185)、AAVhu.63(W02005033321的SEQ ID NO:195)、AAVhu.64(W02005033321的SEQ ID NO:196)、AAVhu.66(W02005033321的SEQ ID NO:197)、AAVhu.67(W02005033321的SEQ ID NO:198)、AAVhu.7(W02005033321的SEQ ID NO:150)、AAVhu.8(W02005033321 SEQ ID NO:12)、AAVhu.9(W02005033321的SEQ ID NO:155)、AAVLG-10/rh.40(W02005033321的SEQ ID No:14)、AAVLG-4/rh.38(W02005033321的SEQ ID NO:86)、AAVLG-4/rh.38(W02005033321的SEQ ID No:7)、AAVN721-8/rh.43(W02005033321的SEQ ID NO:163)、AAVN721-8/rh.43(W02005033321的SEQ ID No:43)、AAVpi.1(W02005033321 SEQ ID NO:28)、AAVpi.2(W02005033321 SEQ ID NO:30)、AAVpi.3(W02005033321 SEQ ID NO:29)、AAVrh.38(W02005033321的SEQ ID NO:86)、AAVrh.40(W02005033321的SEQ ID NO:92)、AAVrh.43(W02005033321的SEQ ID NO:163)、AAVrh.44(W02005033321 SEQ ID NO:34)、AAVrh.45(W02005033321 SEQ ID NO:41)、AAVrh.47(W02005033321 SEQ ID NO:38)、AAVrh.48(W02005033321的SEQ ID NO:115)、AAVrh.49(W02005033321的SEQ ID NO:103)、AAVrh.50(W02005033321的SEQ ID NO:108)、AAVrh.51(W02005033321的SEQ ID NO:104)、AAVrh.52(W02005033321的SEQ ID NO:96)、AAVrh.53(W02005033321的SEQ ID NO:97)、AAVrh.55(W02005033321 SEQ ID NO:37)、AAVrh.56(W02005033321的SEQ ID NO:152)、AAVrh.57(W02005033321的SEQ ID NO:105)、AAVrh.58(W02005033321的SEQ ID NO:106)、AAVrh.59(W02005033321 SEQ ID NO:42)、AAVrh.60(W02005033321 SEQ ID NO:31)、AAVrh.61(W02005033321的SEQ ID NO:107)、AAVrh.62(W02005033321的SEQ ID NO:114)、AAVrh.64(W02005033321的SEQ ID NO:99)、AAVrh.65(W02005033321 SEQ ID NO:35)、AAVrh.68(W02005033321SEQ ID NO:16)、AAVrh.69(W02005033321 SEQ ID NO:39)、AAVrh.70(W02005033321 SEQ ID NO:20)、AAVrh.72(W02005033321 SEQ ID NO:9)或其变体,包括但不限于AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVcy.6、AAVrh.12、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.25/42 15、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh14。变体的非限制性实例包括W02005033321(其内容以全文引用的方式并入本文中)的SEQ ID NO:13、15、17、19、24、36、40、45、47、48、51-54、60-62、64-77、79、80、82、89、90、93-95、98、100、101、109-113、118-120、124、126、131、139、142、151、154、158、161、162、165-183、202、204-212、215、219、224-236。

[0449] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如国际公布号W02015168666(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAVrh8R(W02015168666的SEQ ID NO:9)、AAVrh8R A586R突变体(W02015168666的SEQ ID NO:10)、AAVrh8R R533A突变体(W02015168666的SEQ ID NO:11)或其变体。

[0450] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如美国专利号US9233131(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAVhE1.1(US9233131的SEQ ID NO:44)、AAVhEr1.5(US9233131的SEQ ID NO:45)、AAVhEr1.14(US9233131的SEQ ID NO:46)、AAVhEr1.8(US9233131的SEQ ID NO:47)、AAVhEr1.16(US9233131的SEQ ID NO:48)、AAVhEr1.18(US9233131的SEQ ID NO:49)、AAVhEr1.35(US9233131的SEQ ID NO:50)、AAVhEr1.7(US9233131的SEQ ID NO:51)、AAVhEr1.36(US9233131的SEQ ID NO:52)、

AAVhEr2.29 (US9233131的SEQ ID NO:53)、AAVhEr2.4 (US9233131的SEQ ID NO:54)、AAVhEr2.16 (US9233131的SEQ ID NO:55)、AAVhEr2.30 (US9233131的SEQ ID NO:56)、AAVhEr2.31 (US9233131的SEQ ID NO:58)、AAVhEr2.36 (US9233131的SEQ ID NO:57)、AAVhEr1.23 (US9233131的SEQ ID NO:53)、AAVhEr3.1 (US9233131的SEQ ID NO:59)、AAV2.5T (US9233131的SEQ ID NO:42) 或其变体。

[0451] 在一些实施方案中, AAV血清型可以是或具有如美国专利公布号US20150376607 (其内容以全文引用的方式并入本文中) 所描述的序列, 诸如但不限于AAV-PAEC (US20150376607的SEQ ID NO:1)、AAV-LK01 (US20150376607的SEQ ID NO:2)、AAV-LK02 (US20150376607的SEQ ID NO:3)、AAV-LK03 (US20150376607的SEQ ID NO:4)、AAV-LK04 (US20150376607的SEQ ID NO:5)、AAV-LK05 (US20150376607的SEQ ID NO:6)、AAV-LK06 (US20150376607的SEQ ID NO:7)、AAV-LK07 (US20150376607的SEQ ID NO:8)、AAV-LK08 (US20150376607的SEQ ID NO:9)、AAV-LK09 (US20150376607的SEQ ID NO:10)、AAV-LK10 (US20150376607的SEQ ID NO:11)、AAV-LK11 (US20150376607的SEQ ID NO:12)、AAV-LK12 (US20150376607的SEQ ID NO:13)、AAV-LK13 (US20150376607的SEQ ID NO:14)、AAV-LK14 (US20150376607的SEQ ID NO:15)、AAV-LK15 (US20150376607的SEQ ID NO:16)、AAV-LK16 (US20150376607的SEQ ID NO:17)、AAV-LK17 (US20150376607的SEQ ID NO:18)、AAV-LK18 (US20150376607的SEQ ID NO:19)、AAV-LK19 (US20150376607的SEQ ID NO:20)、AAV-PAEC2 (US20150376607的SEQ ID NO:21)、AAV-PAEC4 (US20150376607的SEQ ID NO:22)、AAV-PAEC6 (US20150376607的SEQ ID NO:23)、AAV-PAEC7 (US20150376607的SEQ ID NO:24)、AAV-PAEC8 (US20150376607的SEQ ID NO:25)、AAV-PAEC11 (US20150376607的SEQ ID NO:26)、AAV-PAEC12 (US20150376607的SEQ ID NO:27) 或其变体。

[0452] 在一些实施方案中, AAV血清型可以是或具有如美国专利号US9163261 (其内容以全文引用的方式并入本文中) 所描述的序列, 诸如但不限于AAV-2-前miRNA-101 (SEQ ID NO:1US9163261) 或其变体。

[0453] 在一些实施方案中, AAV血清型可以是或具有如美国专利公布号US20150376240 (其内容以全文引用的方式并入本文中) 所描述的序列, 诸如但不限于AAV-8h (US20150376240的SEQ ID NO:6)、AAV-8b (US20150376240的SEQ ID NO:5)、AAV-h (US20150376240的SEQ ID NO:2)、AAV-b (US20150376240的SEQ ID NO:1) 或其变体。

[0454] 在一些实施方案中, AAV血清型可以是或具有如美国专利公布号US20160017295 (其内容以全文引用的方式并入本文中) 所描述的序列, 诸如但不限于AAV SM 10-2 (US20160017295的SEQ ID NO:22)、AAV Shuffle 100-1 (US20160017295的SEQ ID NO:23)、AAV Shuffle 100-3 (US20160017295的SEQ ID NO:24)、AAV Shuffle 100-7 (US20160017295的SEQ ID NO:25)、AAV Shuffle 10-2 (US20160017295的SEQ ID NO:34)、AAV Shuffle 10-6 (US20160017295的SEQ ID NO:35)、AAV Shuffle 10-8 (US20160017295的SEQ ID NO:36)、AAV Shuffle 100-2 (US20160017295的SEQ ID NO:37)、AAV SM 10-1 (US20160017295的SEQ ID NO:38)、AAV SM 10-8 (US20160017295的SEQ ID NO:39)、AAV SM 100-3 (US20160017295的SEQ ID NO:40)、AAV SM 100-10 (US20160017295的SEQ ID NO:41) 或其变体。

[0455] 在一些实施方案中, AAV血清型可以是或具有如美国专利公布号US20150238550

(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于BNP61 AAV(US20150238550的SEQ ID NO:1)、BNP62 AAV(US20150238550的SEQ ID NO:3)、BNP63 AAV(US20150238550的SEQ ID NO:4)或其变体。

[0456] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如美国专利公布号US20150315612(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAVrh.50(US20150315612的SEQ ID NO:108)、AAVrh.43(US20150315612的SEQ ID NO:163)、AAVrh.62(US20150315612的SEQ ID NO:114)、AAVrh.48(US20150315612的SEQ ID NO:115)、AAVhu.19(US20150315612的SEQ ID NO:133)、AAVhu.11(US20150315612的SEQ ID NO:153)、AAVhu.53(US20150315612的SEQ ID NO:186)、AAV4-8/rh.64(US20150315612的SEQ ID No:15)、AAVLG-9/hu.39(US20150315612的SEQ ID No:24)、AAV54.5/hu.23(US20150315612的SEQ ID No:60)、AAV54.2/hu.22(US20150315612的SEQ ID No:67)、AAV54.7/hu.24(US20150315612的SEQ ID No:66)、AAV54.1/hu.21(US20150315612的SEQ ID No:65)、AAV54.4R/hu.27(US20150315612的SEQ ID No:64)、AAV46.2/hu.28(US20150315612的SEQ ID No:68)、AAV46.6/hu.29(US20150315612的SEQ ID No:69)、AAV128.1/hu.43(US20150315612的SEQ ID No:80)或其变体。

[0457] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如国际公布号W02015121501(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于真型AAV(ttAAV)(W02015121501的SEQ ID NO:2)、“UPenn AAV10”(W02015121501的SEQ ID NO:8)、“日本AAV10”(W02015121501的SEQ ID NO:9)或其变体。

[0458] 根据本公开,AAV衣壳血清型的选择或使用可以来自多种物种。在一些实施方案中,AAV可以是禽AAV(AAAV)。AAAV血清型可以是或具有如美国专利号US 9,238,800(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAAV(US 9,238,800的SEQ ID NO:1、2、4、6、8、10、12和14)或其变体。

[0459] 在一些实施方案中,AAV可以是牛AAV(BAAV)。BAAV血清型可以是或具有如美国专利号US 9,193,769(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于BAAV(US 9193769的SEQ ID NO:1和6)或其变体。BAAV血清型可以是或具有如美国专利号US7427396(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于BAAV(US7427396的SEQ ID NO:5和6)或其变体。

[0460] 在一些实施方案中,AAV可以是山羊AAV。山羊AAV血清型可以是或具有如美国专利号US7427396(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于山羊AAV(US7427396的SEQ ID NO:3)或其变体。

[0461] 在其它实施方案中,AAV可以经工程改造为来自两种或更多种亲代血清型的杂交AAV。在一些实施方案中,AAV可以是包含来自AAV2和AAV9的序列的AAV2G9。AAV2G9AAV血清型可以是或具有如美国专利公布号US20160017005(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列。

[0462] 在一些实施方案中,AAV可以由在氨基酸390-627(VP1编号)中具有突变的AAV9衣壳文库产生的血清型,如由Pulicherla等(Molecular Therapy 19(6):1070-1078(2011))所描述,其内容以全文引用的方式并入本文中。血清型以及相应核苷酸和氨基酸取代可以是但不限于AAV9.1(G1594C;D532H)、AAV6.2(T1418A和T1436X;V473D和I479K)、AAV9.3

(T1238A;F413Y)、AAV9.4 (T1250C和A1617T;F417S)、AAV9.5 (A1235G、A1314T、A1642G、C1760T;Q412R、T548A、A587V)、AAV9.6 (T1231A;F411I)、AAV9.9 (G1203A、G1785T;W595C)、AAV9.10 (A1500G、T1676C;M559T)、AAV9.11 (A1425T、A1702C、A1769T;T568P、Q590L)、AAV9.13 (A1369C、A1720T;N457H、T574S)、AAV9.14 (T1340A、T1362C、T1560C、G1713A;L447H)、AAV9.16 (A1775T;Q592L)、AAV9.24 (T1507C、T1521G;W503R)、AAV9.26 (A1337G、A1769C;Y446C、Q590P)、AAV9.33 (A1667C;D556A)、AAV9.34 (A1534G、C1794T;N512D)、AAV9.35 (A1289T、T1450A、C1494T、A1515T、C1794A、G1816A;Q430L、Y484N、N98K、V606I)、AAV9.40 (A1694T、E565V)、AAV9.41 (A1348T、T1362C;T450S)、AAV9.44 (A1684C、A1701T、A1737G;N562H、K567N)、AAV9.45 (A1492T、C1804T;N498Y、L602F)、AAV9.46 (G1441C、T1525C、T1549G;G481R、W509R、L517V)、9.47 (G1241A、G1358A、A1669G、C1745T;S414N、G453D、K557E、T582I)、AAV9.48 (C1445T、A1736T;P482L、Q579L)、AAV9.50 (A1638T、C1683T、T1805A;Q546H、L602H)、AAV9.53 (G1301A、A1405C、C1664T、G1811T;R134Q、S469R、A555V、G604V)、AAV9.54 (C1531A、T1609A;L511I、L537M)、AAV9.55 (T1605A;F535L)、AAV9.58 (C1475T、C1579A;T492I、H527N)、AAV.59 (T1336C;Y446H)、AAV9.61 (A1493T;N498I)、AAV9.64 (C1531A、A1617T;L511I)、AAV9.65 (C1335T、T1530C、C1568A;A523D)、AAV9.68 (C1510A;P504T)、AAV9.80 (G1441A;G481R)、AAV9.83 (C1402A、A1500T;P468T、E500D)、AAV9.87 (T1464C、T1468C;S490P)、AAV9.90 (A1196T;Y399F)、AAV9.91 (T1316G、A1583T、C1782G、T1806C;L439R、K528I)、AAV9.93 (A1273G、A1421G、A1638C、C1712T、G1732A、A1744T、A1832T;S425G、Q474R、Q546H、P571L、G578R、T582S、D611V)、AAV9.94 (A1675T;M559L)和AAV9.95 (T1605A;F535L)。

[0463] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如国际公布号W02016049230(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAVF1/HSC1(W02016049230的SEQ ID NO:2和20)、AAVF2/HSC2(W02016049230的SEQ ID NO:3和21)、AAVF3/HSC3(W02016049230的SEQ ID NO:5和22)、AAVF4/HSC4(W02016049230的SEQ ID NO:6和23)、AAVF5/HSC5(W02016049230的SEQ ID NO:11和25)、AAVF6/HSC6(W02016049230的SEQ ID NO:7和24)、AAVF7/HSC7(W02016049230的SEQ ID NO:8和27)、AAVF8/HSC8(W02016049230的SEQ ID NO:9和28)、AAVF9/HSC9(W02016049230的SEQ ID NO:10和29)、AAVF11/HSC11(W02016049230的SEQ ID NO:4和26)、AAVF12/HSC12(W02016049230的SEQ ID NO:12和30)、AAVF13/HSC13(W02016049230的SEQ ID NO:14和31)、AAVF14/HSC14(W02016049230的SEQ ID NO:15和32)、AAVF15/HSC15(W02016049230的SEQ ID NO:16和33)、AAVF16/HSC16(W02016049230的SEQ ID NO:17和34)、AAVF17/HSC17(W02016049230的SEQ ID NO:13和35)或其变体或衍生物。

[0464] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如美国专利号US 8734809(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于AAV CBr-E1(US8734809的SEQ ID NO:13和87)、AAV CBr-E2(US8734809的SEQ ID NO:14和88)、AAV CBr-E3(US8734809的SEQ ID NO:15和89)、AAV CBr-E4(US8734809的SEQ ID NO:16和90)、AAV CBr-E5(US8734809的SEQ ID NO:17和91)、AAV CBr-e5(US8734809的SEQ ID NO:18和92)、AAV CBr-E6(US8734809的SEQ ID NO:19和93)、AAV CBr-E7(US8734809的SEQ ID NO:20和94)、AAV CBr-E8(US8734809的SEQ ID NO:21和95)、AAV CLv-D1(US8734809的SEQ ID NO:22和

96)、AAV CLv-D2(US8734809的SEQ ID NO:23和97)、AAV CLv-D3(US8734809的SEQ ID NO:24和98)、AAV CLv-D4(US8734809的SEQ ID NO:25和99)、AAV CLv-D5(US8734809的SEQ ID NO:26和100)、AAV CLv-D6(US8734809的SEQ ID NO:27和101)、AAV CLv-D7(US8734809的SEQ ID NO:28和102)、AAV CLv-D8(US8734809的SEQ ID NO:29和103)、AAV CLv-E1(US8734809的SEQ ID NO:13和87)、AAV CLv-R1(US8734809的SEQ ID NO:30和104)、AAV CLv-R2(US8734809的SEQ ID NO:31和105)、AAV CLv-R3(US8734809的SEQ ID NO:32和106)、AAV CLv-R4(US8734809的SEQ ID NO:33和107)、AAV CLv-R5(US8734809的SEQ ID NO:34和108)、AAV CLv-R6(US8734809的SEQ ID NO:35和109)、AAV CLv-R7(US8734809的SEQ ID NO:36和110)、AAV CLv-R8(US8734809的SEQ ID NO:X和X)、AAV CLv-R9(US8734809的SEQ ID NO:X和X)、AAV CLg-F1(US8734809的SEQ ID NO:39和113)、AAV CLg-F2(US8734809的SEQ ID NO:40和114)、AAV CLg-F3(US8734809的SEQ ID NO:41和115)、AAV CLg-F4(US8734809的SEQ ID NO:42和116)、AAV CLg-F5(US8734809的SEQ ID NO:43和117)、AAV CLg-F6(US8734809的SEQ ID NO:43和117)、AAV CLg-F7(US8734809的SEQ ID NO:44和118)、AAV CLg-F8(US8734809的SEQ ID NO:43和117)、AAV CSp-1(US8734809的SEQ ID NO:45和119)、AAV CSp-10(US8734809的SEQ ID NO:46和120)、AAV CSp-11(US8734809的SEQ ID NO:47和121)、AAV CSp-2(US8734809的SEQ ID NO:48和122)、AAV CSp-3(US8734809的SEQ ID NO:49和123)、AAV CSp-4(US8734809的SEQ ID NO:50和124)、AAV CSp-6(US8734809的SEQ ID NO:51和125)、AAV CSp-7(US8734809的SEQ ID NO:52和126)、AAV CSp-8(US8734809的SEQ ID NO:53和127)、AAV CSp-9(US8734809的SEQ ID NO:54和128)、AAV CHt-2(US8734809的SEQ ID NO:55和129)、AAV CHt-3(US8734809的SEQ ID NO:56和130)、AAV CKd-1(US8734809的SEQ ID NO:57和131)、AAV CKd-10(US8734809的SEQ ID NO:58和132)、AAV CKd-2(US8734809的SEQ ID NO:59和133)、AAV CKd-3(US8734809的SEQ ID NO:60和134)、AAV CKd-4(US8734809的SEQ ID NO:61和135)、AAV CKd-6(US8734809的SEQ ID NO:62和136)、AAV CKd-7(US8734809的SEQ ID NO:63和137)、AAV CKd-8(US8734809的SEQ ID NO:64和138)、AAV CLv-1(US8734809的SEQ ID NO:35和139)、AAV CLv-12(US8734809的SEQ ID NO:66和140)、AAV CLv-13(US8734809的SEQ ID NO:67和141)、AAV CLv-2(US8734809的SEQ ID NO:68和142)、AAV CLv-3(US8734809的SEQ ID NO:69和143)、AAV CLv-4(US8734809的SEQ ID NO:70和144)、AAV CLv-6(US8734809的SEQ ID NO:71和145)、AAV CLv-8(US8734809的SEQ ID NO:72和146)、AAV CKd-B 1(US8734809的SEQ ID NO:73和147)、AAV CKd-B2(US8734809的SEQ ID NO:74和148)、AAV CKd-B3(US8734809的SEQ ID NO:75和149)、AAV CKd-B4(US8734809的SEQ ID NO:76和150)、AAV CKd-B5(US8734809的SEQ ID NO:77和151)、AAV CKd-B6(US8734809的SEQ ID NO:78和152)、AAV CKd-B7(US8734809的SEQ ID NO:79和153)、AAV CKd-B8(US8734809的SEQ ID NO:80和154)、AAV CKd-H1(US8734809的SEQ ID NO:81和155)、AAV CKd-H2(US8734809的SEQ ID NO:82和156)、AAV CKd-H3(US8734809的SEQ ID NO:83和157)、AAV CKd-H4(US8734809的SEQ ID NO:84和158)、AAV CKd-H5(US8734809的SEQ ID NO:85和159)、AAV CKd-H6(US8734809的SEQ ID NO:77和151)、AAV CHt-1(US8734809的SEQ ID NO:86和160)、AAV CLv1-1(US8734809的SEQ ID NO:171)、AAV CLv1-2(US8734809的SEQ ID NO:172)、AAV CLv1-3(US8734809的SEQ ID NO:173)、AAV CLv1-4(US8734809的SEQ ID NO:174)、AAV

Clv1-7 (US8734809的SEQ ID NO:175)、AAV Clv1-8 (US8734809的SEQ ID NO:176)、AAV Clv1-9 (US8734809的SEQ ID NO:177)、AAV Clv1-10 (US8734809的SEQ ID NO:178)、AAV.VR-355 (US8734809的SEQ ID NO:181)、AAV.hu.48R3 (US8734809的SEQ ID NO:183) 或其变体或衍生物。

[0465] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如国际公布号W02016065001 (其内容以全文引用的方式并入本文中) 所描述的序列,诸如但不限于AAV CHt-P2 (W02016065001的SEQ ID NO:1和51)、AAV CHt-P5 (W02016065001的SEQ ID NO:2和52)、AAV CHt-P9 (W02016065001的SEQ ID NO:3和53)、AAV CBr-7.1 (W02016065001的SEQ ID NO:4和54)、AAV CBr-7.2 (W02016065001的SEQ ID NO:5和55)、AAV CBr-7.3 (W02016065001的SEQ ID NO:6和56)、AAV CBr-7.4 (W02016065001的SEQ ID NO:7和57)、AAV CBr-7.5 (W02016065001的SEQ ID NO:8和58)、AAV CBr-7.7 (W02016065001的SEQ ID NO:9和59)、AAV CBr-7.8 (W02016065001的SEQ ID NO:10和60)、AAV CBr-7.10 (W02016065001的SEQ ID NO:11和61)、AAV CKd-N3 (W02016065001的SEQ ID NO:12和62)、AAV CKd-N4 (W02016065001的SEQ ID NO:13和63)、AAV CKd-N9 (W02016065001的SEQ ID NO:14和64)、AAV CLv-L4 (W02016065001的SEQ ID NO:15和65)、AAV CLv-L5 (W02016065001的SEQ ID NO:16和66)、AAV CLv-L6 (W02016065001的SEQ ID NO:17和67)、AAV CLv-K1 (W02016065001的SEQ ID NO:18和68)、AAV CLv-K3 (W02016065001的SEQ ID NO:19和69)、AAV CLv-K6 (W02016065001的SEQ ID NO:20和70)、AAV CLv-M1 (W02016065001的SEQ ID NO:21和71)、AAV CLv-M11 (W02016065001的SEQ ID NO:22和72)、AAV CLv-M2 (W02016065001的SEQ ID NO:23和73)、AAV CLv-M5 (W02016065001的SEQ ID NO:24和74)、AAV CLv-M6 (W02016065001的SEQ ID NO:25和75)、AAV CLv-M7 (W02016065001的SEQ ID NO:26和76)、AAV CLv-M8 (W02016065001的SEQ ID NO:27和77)、AAV CLv-M9 (W02016065001的SEQ ID NO:28和78)、AAV CHt-P1 (W02016065001的SEQ ID NO:29和79)、AAV CHt-P6 (W02016065001的SEQ ID NO:30和80)、AAV CHt-P8 (W02016065001的SEQ ID NO:31和81)、AAV CHt-6.1 (W02016065001的SEQ ID NO:32和82)、AAV CHt-6.10 (W02016065001的SEQ ID NO:33和83)、AAV CHt-6.5 (W02016065001的SEQ ID NO:34和84)、AAV CHt-6.6 (W02016065001的SEQ ID NO:35和85)、AAV CHt-6.7 (W02016065001的SEQ ID NO:36和86)、AAV CHt-6.8 (W02016065001的SEQ ID NO:37和87)、AAV CSp-8.10 (W02016065001的SEQ ID NO:38和88)、AAV CSp-8.2 (W02016065001的SEQ ID NO:39和89)、AAV CSp-8.4 (W02016065001的SEQ ID NO:40和90)、AAV CSp-8.5 (W02016065001的SEQ ID NO:41和91)、AAV CSp-8.6 (W02016065001的SEQ ID NO:42和92)、AAV CSp-8.7 (W02016065001的SEQ ID NO:43和93)、AAV CSp-8.8 (W02016065001的SEQ ID NO:44和94)、AAV CSp-8.9 (W02016065001的SEQ ID NO:45和95)、AAV CBr-B7.3 (W02016065001的SEQ ID NO:46和96)、AAV CBr-B7.4 (W02016065001的SEQ ID NO:47和97)、AAV3B (W02016065001的SEQ ID NO:48和98)、AAV4 (W02016065001的SEQ ID NO:49和99)、AAV5 (W02016065001的SEQ ID NO:50和100) 或其变体或衍生物。

[0466] 在一些实施方案中,AAV粒子可以具有或可以是选自表1中所见的那些中的任一者的血清型。

[0467] 在一些实施方案中,AAV衣壳可以包含表1中的序列中的任一者的序列、其片段或变体。

[0468] 在一些实施方案中, AAV衣壳可以由如表1中所描述的序列、片段或变体编码。

[0469] 在本文所提及和/或所描述的DNA和RNA序列中的任一者中, 单字母符号具有以下描述: A代表腺嘌呤; C代表胞嘧啶; G代表鸟嘌呤; T代表胸腺嘧啶; U代表尿嘧啶; W代表弱碱基, 诸如腺嘌呤或胸腺嘧啶; S代表强核苷酸, 诸如胞嘧啶和鸟嘌呤; M代表胺基核苷酸, 诸如腺嘌呤和胞嘧啶; K代表酮基核苷酸, 诸如鸟嘌呤和胸腺嘧啶; R代表嘌呤, 腺嘌呤和鸟嘌呤; Y代表嘧啶, 胞嘧啶和胸腺嘧啶; B代表不是A的任何碱基 (例如, 胞嘧啶、鸟嘌呤和胸腺嘧啶); D代表不是C的任何碱基 (例如, 腺嘌呤、鸟嘌呤和胸腺嘧啶); H代表不是G的任何碱基 (例如, 腺嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶); V代表不是T的任何碱基 (例如, 腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤); N代表任何核苷酸 (不是缺口); 并且Z代表零。

[0470] 在本文所提及和/或所描述的氨基酸序列中的任一者中, 单字母符号具有以下描述: G (Gly) 代表甘氨酸; A (Ala) 代表丙氨酸; L (Leu) 代表亮氨酸; M (Met) 代表甲硫氨酸; F (Phe) 代表苯丙氨酸; W (Trp) 代表色氨酸; K (Lys) 代表赖氨酸; Q (Gln) 代表谷氨酰胺; E (Glu) 代表谷氨酸; S (Ser) 代表丝氨酸; P (Pro) 代表脯氨酸; V (Val) 代表缬氨酸; I (Ile) 代表异亮氨酸; C (Cys) 代表半胱氨酸; Y (Tyr) 代表酪氨酸; H (His) 代表组氨酸; R (Arg) 代表精氨酸; N (Asn) 代表天冬酰胺; D (Asp) 代表天冬氨酸; T (Thr) 代表苏氨酸; B (Asx) 代表天冬氨酸或天冬酰胺; J (Xle) 代表亮氨酸或异亮氨酸; O (Pyl) 代表吡咯赖氨酸; U (Sec) 代表硒代半胱氨酸; X (Xaa) 代表任何氨基酸; 并且Z (Glx) 代表谷氨酰胺或谷氨酸。

[0471] 表1. AAV血清型

[0472]

血清型	SEQ ID NO:	参考信息
VOY101	1	-
VOY101	2	-
VOY201	3	-
PHP.N/PHP.B-DGT	4	WO2017100671 SEQ ID NO: 46
AAVPHP.B 或 G2B-26	5	WO2015038958 SEQ ID NO: 8 和 13
AAVPHP.B	6	WO2015038958 SEQ ID NO: 9
AAVG2B-13	7	WO2015038958 SEQ ID NO: 12
AAVTH1.1-32	8	WO2015038958 SEQ ID NO: 14
AAVTH1.1-35	9	WO2015038958 SEQ ID NO: 15
PHP.S/G2A12	10	WO2017100671 SEQ ID NO: 47
AAV9/hu.14 K449R	11	WO2017100671 SEQ ID NO: 45
AAV1	12	US20150159173 SEQ ID NO: 11、 US20150315612 SEQ ID NO: 202

[0473]

AAV1	13	US20160017295 SEQ ID NO: 1、 US20030138772 SEQ ID NO: 64、 US20150159173 SEQ ID NO: 27、 US20150315612 SEQ ID NO: 219、 US7198951 SEQ ID NO: 5
AAV1	14	US20030138772 SEQ ID NO: 6
AAV1.3	15	US20030138772 SEQ ID NO: 14
AAV10	16	US20030138772 SEQ ID NO: 117
AAV10	17	WO2015121501 SEQ ID NO: 9
AAV10	18	WO2015121501 SEQ ID NO: 8
AAV11	19	US20030138772 SEQ ID NO: 118
AAV12	20	US20030138772 SEQ ID NO: 119
AAV2	21	US20150159173 SEQ ID NO: 7、 US20150315612 SEQ ID NO: 211
AAV2	22	US20030138772 SEQ ID NO: 70、 US20150159173 SEQ ID NO: 23、 US20150315612 SEQ ID NO: 221、 US20160017295 SEQ ID NO: 2、 US6156303 SEQ ID NO: 4、 US7198951 SEQ ID NO: 4、 WO2015121501 SEQ ID NO: 1
AAV2	23	US6156303 SEQ ID NO: 8
AAV2	24	US20030138772 SEQ ID NO: 7
AAV2	25	US6156303 SEQ ID NO: 3
AAV2.5T	26	US9233131 SEQ ID NO: 42
AAV223.10	27	US20030138772 SEQ ID NO: 75
AAV223.2	28	US20030138772 SEQ ID NO: 49
AAV223.2	29	US20030138772 SEQ ID NO: 76
AAV223.4	30	US20030138772 SEQ ID NO: 50
AAV223.4	31	US20030138772 SEQ ID NO: 73
AAV223.5	32	US20030138772 SEQ ID NO: 51
AAV223.5	33	US20030138772 SEQ ID NO: 74
AAV223.6	34	US20030138772 SEQ ID NO: 52
AAV223.6	35	US20030138772 SEQ ID NO: 78
AAV223.7	36	US20030138772 SEQ ID NO: 53
AAV223.7	37	US20030138772 SEQ ID NO: 77
AAV29.3	38	US20030138772 SEQ ID NO: 82
AAV29.4	39	US20030138772 SEQ ID NO: 12
AAV29.5	40	US20030138772 SEQ ID NO: 83
AAV29.5 (AAVbb.2)	41	US20030138772 SEQ ID NO: 13
AAV3	42	US20150159173 SEQ ID NO: 12
AAV3	43	US20030138772 SEQ ID NO: 71、 US20150159173 SEQ ID NO: 28、 US20160017295 SEQ ID NO: 3、 US7198951 SEQ ID NO: 6

[0474]

AAV3	44	US20030138772 SEQ ID NO: 8
AAV3.3b	45	US20030138772 SEQ ID NO: 72
AAV3-3	46	US20150315612 SEQ ID NO: 200
AAV3-3	47	US20150315612 SEQ ID NO: 217
AAV3a	48	US6156303 SEQ ID NO: 5
AAV3a	49	US6156303 SEQ ID NO: 9
AAV3b	50	US6156303 SEQ ID NO: 6
AAV3b	51	US6156303 SEQ ID NO: 10
AAV3b	52	US6156303 SEQ ID NO: 1
AAV4	53	US20140348794 SEQ ID NO: 17
AAV4	54	US20140348794 SEQ ID NO: 5
AAV4	55	US20140348794 SEQ ID NO: 3
AAV4	56	US20140348794 SEQ ID NO: 14
AAV4	57	US20140348794 SEQ ID NO: 15
AAV4	58	US20140348794 SEQ ID NO: 19
AAV4	59	US20140348794 SEQ ID NO: 12
AAV4	60	US20140348794 SEQ ID NO: 13
AAV4	61	US20140348794 SEQ ID NO: 7
AAV4	62	US20140348794 SEQ ID NO: 8
AAV4	63	US20140348794 SEQ ID NO: 9
AAV4	64	US20140348794 SEQ ID NO: 2
AAV4	65	US20140348794 SEQ ID NO: 10
AAV4	66	US20140348794 SEQ ID NO: 11
AAV4	67	US20140348794 SEQ ID NO: 18
AAV4	68	US20030138772 SEQ ID NO: 63、 US20160017295 SEQ ID NO: 4、 US20140348794 SEQ ID NO: 4
AAV4	69	US20140348794 SEQ ID NO: 16
AAV4	70	US20140348794 SEQ ID NO: 20
AAV4	71	US20140348794 SEQ ID NO: 6
AAV4	72	US20140348794 SEQ ID NO: 1
AAV42.2	73	US20030138772 SEQ ID NO: 9
AAV42.2	74	US20030138772 SEQ ID NO: 102
AAV42.3b	75	US20030138772 SEQ ID NO: 36
AAV42.3B	76	US20030138772 SEQ ID NO: 107
AAV42.4	77	US20030138772 SEQ ID NO: 33
AAV42.4	78	US20030138772 SEQ ID NO: 88
AAV42.8	79	US20030138772 SEQ ID NO: 27
AAV42.8	80	US20030138772 SEQ ID NO: 85
AAV43.1	81	US20030138772 SEQ ID NO: 39
AAV43.1	82	US20030138772 SEQ ID NO: 92
AAV43.12	83	US20030138772 SEQ ID NO: 41
AAV43.12	84	US20030138772 SEQ ID NO: 93
AAV43.20	85	US20030138772 SEQ ID NO: 42
AAV43.20	86	US20030138772 SEQ ID NO: 99

[0475]

AAV43.21	87	US20030138772 SEQ ID NO: 43
AAV43.21	88	US20030138772 SEQ ID NO: 96
AAV43.23	89	US20030138772 SEQ ID NO: 44
AAV43.23	90	US20030138772 SEQ ID NO: 98
AAV43.25	91	US20030138772 SEQ ID NO: 45
AAV43.25	92	US20030138772 SEQ ID NO: 97
AAV43.5	93	US20030138772 SEQ ID NO: 40
AAV43.5	94	US20030138772 SEQ ID NO: 94
AAV44	95	US20150315612 SEQ ID NO: 201
AAV44	96	US20150315612 SEQ ID NO: 218
AAV44.1	97	US20030138772 SEQ ID NO: 46
AAV44.1	98	US20030138772 SEQ ID NO: 79
AAV44.5	99	US20030138772 SEQ ID NO: 47
AAV44.5	100	US20030138772 SEQ ID NO: 80
AAV4407	101	US20150315612 SEQ ID NO: 90
AAV5	102	US7427396 SEQ ID NO: 1
AAV5	103	US20030138772 SEQ ID NO: 114
AAV5	104	US20160017295 SEQ ID NO: 5、 US7427396 SEQ ID NO: 2、 US20150315612 SEQ ID NO: 216
AAV5	105	US20150315612 SEQ ID NO: 199
AAV6	106	US20150159173 SEQ ID NO: 13
AAV6	107	US20030138772 SEQ ID NO: 65、 US20150159173 SEQ ID NO: 29、 US20160017295 SEQ ID NO: 6、 US6156303 SEQ ID NO: 7
AAV6	108	US6156303 SEQ ID NO: 11
AAV6	109	US6156303 SEQ ID NO: 2
AAV6	110	US20150315612 SEQ ID NO: 203
AAV6	111	US20150315612 SEQ ID NO: 220
AAV6.1	112	US20150159173
AAV6.12	113	US20150159173
AAV6.2	114	US20150159173
AAV7	115	US20150159173 SEQ ID NO: 14
AAV7	116	US20150315612 SEQ ID NO: 183
AAV7	117	US20030138772 SEQ ID NO: 2、 US20150159173 SEQ ID NO: 30、 US20150315612 SEQ ID NO: 181、 US20160017295 SEQ ID NO: 7
AAV7	118	US20030138772 SEQ ID NO: 3
AAV7	119	US20030138772 SEQ ID NO: 1、 US20150315612 SEQ ID NO: 180
AAV7	120	US20150315612 SEQ ID NO: 213
AAV7	121	US20150315612 SEQ ID NO: 222
AAV8	122	US20150159173 SEQ ID NO: 15

[0476]

AAV8	123	US20150376240 SEQ ID NO: 7
AAV8	124	US20030138772 SEQ ID NO: 4、 US20150315612 SEQ ID NO: 182
AAV8	125	US20030138772 SEQ ID NO: 95、 US20140359799 SEQ ID NO: 1、 US20150159173 SEQ ID NO: 31、 US20160017295 SEQ ID NO: 8、 US7198951 SEQ ID NO: 7、 US20150315612 SEQ ID NO: 223
AAV8	126	US20150376240 SEQ ID NO: 8
AAV8	127	US20150315612 SEQ ID NO: 214
AAV-8b	128	US20150376240 SEQ ID NO: 5
AAV-8b	129	US20150376240 SEQ ID NO: 3
AAV-8h	130	US20150376240 SEQ ID NO: 6
AAV-8h	131	US20150376240 SEQ ID NO: 4
AAV9	132	US20030138772 SEQ ID NO: 5
AAV9	133	US7198951 SEQ ID NO: 1
AAV9	134	US20160017295 SEQ ID NO: 9
AAV9	135	US20030138772 SEQ ID NO: 100、 US7198951 SEQ ID NO: 2
AAV9	136	US7198951 SEQ ID NO: 3
AAV9 (AAVhu.14)	137	US7906111 SEQ ID NO: 3; WO2015038958 SEQ ID NO: 11
AAV9 (AAVhu.14)	138	US7906111 SEQ ID NO: 123; WO2015038958 SEQ ID NO: 2
AAVA3.1	139	US20030138772 SEQ ID NO: 120
AAVA3.3	140	US20030138772 SEQ ID NO: 57
AAVA3.3	141	US20030138772 SEQ ID NO: 66
AAVA3.4	142	US20030138772 SEQ ID NO: 54
AAVA3.4	143	US20030138772 SEQ ID NO: 68
AAVA3.5	144	US20030138772 SEQ ID NO: 55
AAVA3.5	145	US20030138772 SEQ ID NO: 69
AAVA3.7	146	US20030138772 SEQ ID NO: 56
AAVA3.7	147	US20030138772 SEQ ID NO: 67
AAV29.3 (AAVbb.1)	148	US20030138772 SEQ ID NO: 11
AAVC2	149	US20030138772 SEQ ID NO: 61
AAVCh.5	150	US20150159173 SEQ ID NO: 46、 US20150315612 SEQ ID NO: 234
AAVcy.2 (AAV13.3)	151	US20030138772 SEQ ID NO: 15
AAV24.1	152	US20030138772 SEQ ID NO: 101
AAVcy.3 (AAV24.1)	153	US20030138772 SEQ ID NO: 16
AAV27.3	154	US20030138772 SEQ ID NO: 104
AAVcy.4 (AAV27.3)	155	US20030138772 SEQ ID NO: 17
AAVcy.5	156	US20150315612 SEQ ID NO: 227
AAV7.2	157	US20030138772 SEQ ID NO: 103

[0477]

AAVcy.5 (AAV7.2)	158	US20030138772 SEQ ID NO: 18
AAV16.3	159	US20030138772 SEQ ID NO: 105
AAVcy.6 (AAV16.3)	160	US20030138772 SEQ ID NO: 10
AAVcy.5	161	US20150159173 SEQ ID NO: 8
AAVcy.5	162	US20150159173 SEQ ID NO: 24
AAVCy.5R1	163	US20150159173
AAVCy.5R2	164	US20150159173
AAVCy.5R3	165	US20150159173
AAVCy.5R4	166	US20150159173
AAVDJ	167	US20140359799 SEQ ID NO: 3、 US7588772 SEQ ID NO: 2
AAVDJ	168	US20140359799 SEQ ID NO: 2、 US7588772 SEQ ID NO: 1
AAVDJ-8	169	US7588772; Grimm 等 2008
AAVDJ-8	170	US7588772; Grimm 等 2008
AAVF5	171	US20030138772 SEQ ID NO: 110
AAVH2	172	US20030138772 SEQ ID NO: 26
AAVH6	173	US20030138772 SEQ ID NO: 25
AAVhE1.1	174	US9233131 SEQ ID NO: 44
AAVhEr1.14	175	US9233131 SEQ ID NO: 46
AAVhEr1.16	176	US9233131 SEQ ID NO: 48
AAVhEr1.18	177	US9233131 SEQ ID NO: 49
AAVhEr1.23 (AAVhEr2.29)	178	US9233131 SEQ ID NO: 53
AAVhEr1.35	179	US9233131 SEQ ID NO: 50
AAVhEr1.36	180	US9233131 SEQ ID NO: 52
AAVhEr1.5	181	US9233131 SEQ ID NO: 45
AAVhEr1.7	182	US9233131 SEQ ID NO: 51
AAVhEr1.8	183	US9233131 SEQ ID NO: 47
AAVhEr2.16	184	US9233131 SEQ ID NO: 55
AAVhEr2.30	185	US9233131 SEQ ID NO: 56
AAVhEr2.31	186	US9233131 SEQ ID NO: 58
AAVhEr2.36	187	US9233131 SEQ ID NO: 57
AAVhEr2.4	188	US9233131 SEQ ID NO: 54
AAVhEr3.1	189	US9233131 SEQ ID NO: 59
AAVhu.1	190	US20150315612 SEQ ID NO: 46
AAVhu.1	191	US20150315612 SEQ ID NO: 144
AAVhu.10 (AAV16.8)	192	US20150315612 SEQ ID NO: 56
AAVhu.10 (AAV16.8)	193	US20150315612 SEQ ID NO: 156
AAVhu.11 (AAV16.12)	194	US20150315612 SEQ ID NO: 57
AAVhu.11 (AAV16.12)	195	US20150315612 SEQ ID NO: 153
AAVhu.12	196	US20150315612 SEQ ID NO: 59
AAVhu.12	197	US20150315612 SEQ ID NO: 154
AAVhu.13	198	US20150159173 SEQ ID NO: 16、 US20150315612 SEQ ID NO: 71
AAVhu.13	199	US20150159173 SEQ ID NO: 32、

[0478]

		US20150315612 SEQ ID NO: 129
AAVhu.136.1	200	US20150315612 SEQ ID NO: 165
AAVhu.140.1	201	US20150315612 SEQ ID NO: 166
AAVhu.140.2	202	US20150315612 SEQ ID NO: 167
AAVhu.145.6	203	US20150315612 SEQ ID No: 178
AAVhu.15	204	US20150315612 SEQ ID NO: 147
AAVhu.15 (AAV33.4)	205	US20150315612 SEQ ID NO: 50
AAVhu.156.1	206	US20150315612 SEQ ID No: 179
AAVhu.16	207	US20150315612 SEQ ID NO: 148
AAVhu.16 (AAV33.8)	208	US20150315612 SEQ ID NO: 51
AAVhu.17	209	US20150315612 SEQ ID NO: 83
AAVhu.17 (AAV33.12)	210	US20150315612 SEQ ID NO: 4
AAVhu.172.1	211	US20150315612 SEQ ID NO: 171
AAVhu.172.2	212	US20150315612 SEQ ID NO: 172
AAVhu.173.4	213	US20150315612 SEQ ID NO: 173
AAVhu.173.8	214	US20150315612 SEQ ID NO: 175
AAVhu.18	215	US20150315612 SEQ ID NO: 52
AAVhu.18	216	US20150315612 SEQ ID NO: 149
AAVhu.19	217	US20150315612 SEQ ID NO: 62
AAVhu.19	218	US20150315612 SEQ ID NO: 133
AAVhu.2	219	US20150315612 SEQ ID NO: 48
AAVhu.2	220	US20150315612 SEQ ID NO: 143
AAVhu.20	221	US20150315612 SEQ ID NO: 63
AAVhu.20	222	US20150315612 SEQ ID NO: 134
AAVhu.21	223	US20150315612 SEQ ID NO: 65
AAVhu.21	224	US20150315612 SEQ ID NO: 135
AAVhu.22	225	US20150315612 SEQ ID NO: 67
AAVhu.22	226	US20150315612 SEQ ID NO: 138
AAVhu.23	227	US20150315612 SEQ ID NO: 60
AAVhu.23.2	228	US20150315612 SEQ ID NO: 137
AAVhu.24	229	US20150315612 SEQ ID NO: 66
AAVhu.24	230	US20150315612 SEQ ID NO: 136
AAVhu.25	231	US20150315612 SEQ ID NO: 49
AAVhu.25	232	US20150315612 SEQ ID NO: 146
AAVhu.26	233	US20150159173 SEQ ID NO: 17、 US20150315612 SEQ ID NO: 61
AAVhu.26	234	US20150159173 SEQ ID NO: 33、 US20150315612 SEQ ID NO: 139
AAVhu.27	235	US20150315612 SEQ ID NO: 64
AAVhu.27	236	US20150315612 SEQ ID NO: 140
AAVhu.28	237	US20150315612 SEQ ID NO: 68
AAVhu.28	238	US20150315612 SEQ ID NO: 130
AAVhu.29	239	US20150315612 SEQ ID NO: 69
AAVhu.29	240	US20150159173 SEQ ID NO: 42、 US20150315612 SEQ ID NO: 132

[0479]

AAVhu.29	241	US20150315612 SEQ ID NO: 225
AAVhu.29R	242	US20150159173
AAVhu.3	243	US20150315612 SEQ ID NO: 44
AAVhu.3	244	US20150315612 SEQ ID NO: 145
AAVhu.30	245	US20150315612 SEQ ID NO: 70
AAVhu.30	246	US20150315612 SEQ ID NO: 131
AAVhu.31	247	US20150315612 SEQ ID NO: 1
AAVhu.31	248	US20150315612 SEQ ID NO: 121
AAVhu.32	249	US20150315612 SEQ ID NO: 2
AAVhu.32	250	US20150315612 SEQ ID NO: 122
AAVhu.33	251	US20150315612 SEQ ID NO: 75
AAVhu.33	252	US20150315612 SEQ ID NO: 124
AAVhu.34	253	US20150315612 SEQ ID NO: 72
AAVhu.34	254	US20150315612 SEQ ID NO: 125
AAVhu.35	255	US20150315612 SEQ ID NO: 73
AAVhu.35	256	US20150315612 SEQ ID NO: 164
AAVhu.36	257	US20150315612 SEQ ID NO: 74
AAVhu.36	258	US20150315612 SEQ ID NO: 126
AAVhu.37	259	US20150159173 SEQ ID NO: 34、 US20150315612 SEQ ID NO: 88
AAVhu.37 (AAV106.1)	260	US20150315612 SEQ ID NO: 10、 US20150159173 SEQ ID NO: 18
AAVhu.38	261	US20150315612 SEQ ID NO: 161
AAVhu.39	262	US20150315612 SEQ ID NO: 102
AAVhu.39 (AAV1G-9)	263	US20150315612 SEQ ID NO: 24
AAVhu.4	264	US20150315612 SEQ ID NO: 47
AAVhu.4	265	US20150315612 SEQ ID NO: 141
AAVhu.40	266	US20150315612 SEQ ID NO: 87
AAVhu.40 (AAV114.3)	267	US20150315612 SEQ ID No: 11
AAVhu.41	268	US20150315612 SEQ ID NO: 91
AAVhu.41 (AAV127.2)	269	US20150315612 SEQ ID NO: 6
AAVhu.42	270	US20150315612 SEQ ID NO: 85
AAVhu.42 (AAV127.5)	271	US20150315612 SEQ ID NO: 8
AAVhu.43	272	US20150315612 SEQ ID NO: 160
AAVhu.43	273	US20150315612 SEQ ID NO: 236
AAVhu.43 (AAV128.1)	274	US20150315612 SEQ ID NO: 80
AAVhu.44	275	US20150159173 SEQ ID NO: 45、 US20150315612 SEQ ID NO: 158
AAVhu.44 (AAV128.3)	276	US20150315612 SEQ ID NO: 81
AAVhu.44R1	277	US20150159173
AAVhu.44R2	278	US20150159173
AAVhu.44R3	279	US20150159173
AAVhu.45	280	US20150315612 SEQ ID NO: 76
AAVhu.45	281	US20150315612 SEQ ID NO: 127
AAVhu.46	282	US20150315612 SEQ ID NO: 82

[0480]

AAVhu.46	283	US20150315612 SEQ ID NO: 159
AAVhu.46	284	US20150315612 SEQ ID NO: 224
AAVhu.47	285	US20150315612 SEQ ID NO: 77
AAVhu.47	286	US20150315612 SEQ ID NO: 128
AAVhu.48	287	US20150159173 SEQ ID NO: 38
AAVhu.48	288	US20150315612 SEQ ID NO: 157
AAVhu.48 (AAV130.4)	289	US20150315612 SEQ ID NO: 78
AAVhu.48R1	290	US20150159173
AAVhu.48R2	291	US20150159173
AAVhu.48R3	292	US20150159173
AAVhu.49	293	US20150315612 SEQ ID NO: 209
AAVhu.49	294	US20150315612 SEQ ID NO: 189
AAVhu.5	295	US20150315612 SEQ ID NO: 45
AAVhu.5	296	US20150315612 SEQ ID NO: 142
AAVhu.51	297	US20150315612 SEQ ID NO: 208
AAVhu.51	298	US20150315612 SEQ ID NO: 190
AAVhu.52	299	US20150315612 SEQ ID NO: 210
AAVhu.52	300	US20150315612 SEQ ID NO: 191
AAVhu.53	301	US20150159173 SEQ ID NO: 19
AAVhu.53	302	US20150159173 SEQ ID NO: 35
AAVhu.53 (AAV145.1)	303	US20150315612 SEQ ID NO: 176
AAVhu.54	304	US20150315612 SEQ ID NO: 188
AAVhu.54 (AAV145.5)	305	US20150315612 SEQ ID NO: 177
AAVhu.55	306	US20150315612 SEQ ID NO: 187
AAVhu.56	307	US20150315612 SEQ ID NO: 205
AAVhu.56 (AAV145.6)	308	US20150315612 SEQ ID NO: 168
AAVhu.56 (AAV145.6)	309	US20150315612 SEQ ID NO: 192
AAVhu.57	310	US20150315612 SEQ ID NO: 206
AAVhu.57	311	US20150315612 SEQ ID NO: 169
AAVhu.57	312	US20150315612 SEQ ID NO: 193
AAVhu.58	313	US20150315612 SEQ ID NO: 207
AAVhu.58	314	US20150315612 SEQ ID NO: 194
AAVhu.6 (AAV3.1)	315	US20150315612 SEQ ID NO: 5
AAVhu.6 (AAV3.1)	316	US20150315612 SEQ ID NO: 84
AAVhu.60	317	US20150315612 SEQ ID NO: 184
AAVhu.60 (AAV161.10)	318	US20150315612 SEQ ID NO: 170
AAVhu.61	319	US20150315612 SEQ ID NO: 185
AAVhu.61 (AAV161.6)	320	US20150315612 SEQ ID NO: 174
AAVhu.63	321	US20150315612 SEQ ID NO: 204
AAVhu.63	322	US20150315612 SEQ ID NO: 195
AAVhu.64	323	US20150315612 SEQ ID NO: 212
AAVhu.64	324	US20150315612 SEQ ID NO: 196
AAVhu.66	325	US20150315612 SEQ ID NO: 197
AAVhu.67	326	US20150315612 SEQ ID NO: 215
AAVhu.67	327	US20150315612 SEQ ID NO: 198
AAVhu.7	328	US20150315612 SEQ ID NO: 226

[0481]

AAVhu.7	329	US20150315612 SEQ ID NO: 150
AAVhu.7 (AAV7.3)	330	US20150315612 SEQ ID NO: 55
AAVhu.71	331	US20150315612 SEQ ID NO: 79
AAVhu.8	332	US20150315612 SEQ ID NO: 53
AAVhu.8	333	US20150315612 SEQ ID NO: 12
AAVhu.8	334	US20150315612 SEQ ID NO: 151
AAVhu.9 (AAV3.1)	335	US20150315612 SEQ ID NO: 58
AAVhu.9 (AAV3.1)	336	US20150315612 SEQ ID NO: 155
AAV-LK01	337	US20150376607 SEQ ID NO: 2
AAV-LK01	338	US20150376607 SEQ ID NO: 29
AAV-LK02	339	US20150376607 SEQ ID NO: 3
AAV-LK02	340	US20150376607 SEQ ID NO: 30
AAV-LK03	341	US20150376607 SEQ ID NO: 4
AAV-LK03	342	WO2015121501 SEQ ID NO: 12、 US20150376607 SEQ ID NO: 31
AAV-LK04	343	US20150376607 SEQ ID NO: 5
AAV-LK04	344	US20150376607 SEQ ID NO: 32
AAV-LK05	345	US20150376607 SEQ ID NO: 6
AAV-LK05	346	US20150376607 SEQ ID NO: 33
AAV-LK06	347	US20150376607 SEQ ID NO: 7
AAV-LK06	348	US20150376607 SEQ ID NO: 34
AAV-LK07	349	US20150376607 SEQ ID NO: 8
AAV-LK07	350	US20150376607 SEQ ID NO: 35
AAV-LK08	351	US20150376607 SEQ ID NO: 9
AAV-LK08	352	US20150376607 SEQ ID NO: 36
AAV-LK09	353	US20150376607 SEQ ID NO: 10
AAV-LK09	354	US20150376607 SEQ ID NO: 37
AAV-LK10	355	US20150376607 SEQ ID NO: 11
AAV-LK10	356	US20150376607 SEQ ID NO: 38
AAV-LK11	357	US20150376607 SEQ ID NO: 12
AAV-LK11	358	US20150376607 SEQ ID NO: 39
AAV-LK12	359	US20150376607 SEQ ID NO: 13
AAV-LK12	360	US20150376607 SEQ ID NO: 40
AAV-LK13	361	US20150376607 SEQ ID NO: 14
AAV-LK13	362	US20150376607 SEQ ID NO: 41
AAV-LK14	363	US20150376607 SEQ ID NO: 15
AAV-LK14	364	US20150376607 SEQ ID NO: 42
AAV-LK15	365	US20150376607 SEQ ID NO: 16
AAV-LK15	366	US20150376607 SEQ ID NO: 43
AAV-LK16	367	US20150376607 SEQ ID NO: 17
AAV-LK16	368	US20150376607 SEQ ID NO: 44
AAV-LK17	369	US20150376607 SEQ ID NO: 18
AAV-LK17	370	US20150376607 SEQ ID NO: 45
AAV-LK18	371	US20150376607 SEQ ID NO: 19
AAV-LK18	372	US20150376607 SEQ ID NO: 46
AAV-LK19	373	US20150376607 SEQ ID NO: 20

[0482]

AAV-LK19	374	US20150376607 SEQ ID NO: 47
AAV-PAEC	375	US20150376607 SEQ ID NO: 1
AAV-PAEC	376	US20150376607 SEQ ID NO: 48
AAV-PAEC11	377	US20150376607 SEQ ID NO: 26
AAV-PAEC11	378	US20150376607 SEQ ID NO: 54
AAV-PAEC12	379	US20150376607 SEQ ID NO: 27
AAV-PAEC12	380	US20150376607 SEQ ID NO: 51
AAV-PAEC13	381	US20150376607 SEQ ID NO: 28
AAV-PAEC13	382	US20150376607 SEQ ID NO: 49
AAV-PAEC2	383	US20150376607 SEQ ID NO: 21
AAV-PAEC2	384	US20150376607 SEQ ID NO: 56
AAV-PAEC4	385	US20150376607 SEQ ID NO: 22
AAV-PAEC4	386	US20150376607 SEQ ID NO: 55
AAV-PAEC6	387	US20150376607 SEQ ID NO: 23
AAV-PAEC6	388	US20150376607 SEQ ID NO: 52
AAV-PAEC7	389	US20150376607 SEQ ID NO: 24
AAV-PAEC7	390	US20150376607 SEQ ID NO: 53
AAV-PAEC8	391	US20150376607 SEQ ID NO: 25
AAV-PAEC8	392	US20150376607 SEQ ID NO: 50
AAVpi.1	393	US20150315612 SEQ ID NO: 28
AAVpi.1	394	US20150315612 SEQ ID NO: 93
AAVpi.2	395	US20150315612 SEQ ID NO: 30
AAVpi.2	396	US20150315612 SEQ ID NO: 95
AAVpi.3	397	US20150315612 SEQ ID NO: 29
AAVpi.3	398	US20150315612 SEQ ID NO: 94
AAVrh.10	399	US20150159173 SEQ ID NO: 9
AAVrh.10	400	US20150159173 SEQ ID NO: 25
AAV44.2	401	US20030138772 SEQ ID NO: 59
AAVrh.10 (AAV44.2)	402	US20030138772 SEQ ID NO: 81
AAV42.1B	403	US20030138772 SEQ ID NO: 90
AAVrh.12 (AAV42.1b)	404	US20030138772 SEQ ID NO: 30
AAVrh.13	405	US20150159173 SEQ ID NO: 10
AAVrh.13	406	US20150159173 SEQ ID NO: 26
AAVrh.13	407	US20150315612 SEQ ID NO: 228
AAVrh.13R	408	US20150159173
AAV42.3A	409	US20030138772 SEQ ID NO: 87
AAVrh.14 (AAV42.3a)	410	US20030138772 SEQ ID NO: 32
AAV42.5A	411	US20030138772 SEQ ID NO: 89
AAVrh.17 (AAV42.5a)	412	US20030138772 SEQ ID NO: 34
AAV42.5B	413	US20030138772 SEQ ID NO: 91
AAVrh.18 (AAV42.5b)	414	US20030138772 SEQ ID NO: 29
AAV42.6B	415	US20030138772 SEQ ID NO: 112
AAVrh.19 (AAV42.6b)	416	US20030138772 SEQ ID NO: 38
AAVrh.2	417	US20150159173 SEQ ID NO: 39
AAVrh.2	418	US20150315612 SEQ ID NO: 231
AAVrh.20	419	US20150159173 SEQ ID NO: 1

[0483]

AAV42.10	420	US20030138772 SEQ ID NO: 106
AAVrh.21 (AAV42.10)	421	US20030138772 SEQ ID NO: 35
AAV42.11	422	US20030138772 SEQ ID NO: 108
AAVrh.22 (AAV42.11)	423	US20030138772 SEQ ID NO: 37
AAV42.12	424	US20030138772 SEQ ID NO: 113
AAVrh.23 (AAV42.12)	425	US20030138772 SEQ ID NO: 58
AAV42.13	426	US20030138772 SEQ ID NO: 86
AAVrh.24 (AAV42.13)	427	US20030138772 SEQ ID NO: 31
AAV42.15	428	US20030138772 SEQ ID NO: 84
AAVrh.25 (AAV42.15)	429	US20030138772 SEQ ID NO: 28
AAVrh.2R	430	US20150159173
AAVrh.31 (AAV223.1)	431	US20030138772 SEQ ID NO: 48
AAVC1	432	US20030138772 SEQ ID NO: 60
AAVrh.32 (AAVC1)	433	US20030138772 SEQ ID NO: 19
AAVrh.32/33	434	US20150159173 SEQ ID NO: 2
AAVrh.33 (AAVC3)	435	US20030138772 SEQ ID NO: 20
AAVC5	436	US20030138772 SEQ ID NO: 62
AAVrh.34 (AAVC5)	437	US20030138772 SEQ ID NO: 21
AAVF1	438	US20030138772 SEQ ID NO: 109
AAVrh.35 (AAVF1)	439	US20030138772 SEQ ID NO: 22
AAVF3	440	US20030138772 SEQ ID NO: 111
AAVrh.36 (AAVF3)	441	US20030138772 SEQ ID NO: 23
AAVrh.37	442	US20030138772 SEQ ID NO: 24
AAVrh.37	443	US20150159173 SEQ ID NO: 40
AAVrh.37	444	US20150315612 SEQ ID NO: 229
AAVrh.37R2	445	US20150159173
AAVrh.38 (AAVLG-4)	446	US20150315612 SEQ ID NO: 7
AAVrh.38 (AAVLG-4)	447	US20150315612 SEQ ID NO: 86
AAVrh.39	448	US20150159173 SEQ ID NO: 20、 US20150315612 SEQ ID NO: 13
AAVrh.39	449	US20150159173 SEQ ID NO: 3、 US20150159173 SEQ ID NO: 36、 US20150315612 SEQ ID NO: 89
AAVrh.40	450	US20150315612 SEQ ID NO: 92
AAVrh.40 (AAVLG-10)	451	US20150315612 SEQ ID NO: 14
AAVrh.43 (AAVN721-8)	452	US20150315612 SEQ ID NO: 43、 US20150159173 SEQ ID NO: 21
AAVrh.43 (AAVN721-8)	453	US20150315612 SEQ ID NO: 163、 US20150159173 SEQ ID NO: 37
AAVrh.44	454	US20150315612 SEQ ID NO: 34
AAVrh.44	455	US20150315612 SEQ ID NO: 111
AAVrh.45	456	US20150315612 SEQ ID NO: 41
AAVrh.45	457	US20150315612 SEQ ID NO: 109
AAVrh.46	458	US20150159173 SEQ ID NO: 22、 US20150315612 SEQ ID NO: 19

[0484]

AAVrh.46	459	US20150159173 SEQ ID NO: 4、 US20150315612 SEQ ID NO: 101
AAVrh.47	460	US20150315612 SEQ ID NO: 38
AAVrh.47	461	US20150315612 SEQ ID NO: 118
AAVrh.48	462	US20150159173 SEQ ID NO: 44、 US20150315612 SEQ ID NO: 115
AAVrh.48.1	463	US20150159173
AAVrh.48.1.2	464	US20150159173
AAVrh.48.2	465	US20150159173
AAVrh.48 (AAV1-7)	466	US20150315612 SEQ ID NO: 32
AAVrh.49 (AAV1-8)	467	US20150315612 SEQ ID NO: 25
AAVrh.49 (AAV1-8)	468	US20150315612 SEQ ID NO: 103
AAVrh.50 (AAV2-4)	469	US20150315612 SEQ ID NO: 23
AAVrh.50 (AAV2-4)	470	US20150315612 SEQ ID NO: 108
AAVrh.51 (AAV2-5)	471	US20150315612 SEQ ID No: 22
AAVrh.51 (AAV2-5)	472	US20150315612 SEQ ID NO: 104
AAVrh.52 (AAV3-9)	473	US20150315612 SEQ ID NO: 18
AAVrh.52 (AAV3-9)	474	US20150315612 SEQ ID NO: 96
AAVrh.53	475	US20150315612 SEQ ID NO: 97
AAVrh.53 (AAV3-11)	476	US20150315612 SEQ ID NO: 17
AAVrh.53 (AAV3-11)	477	US20150315612 SEQ ID NO: 186
AAVrh.54	478	US20150315612 SEQ ID NO: 40
AAVrh.54	479	US20150159173 SEQ ID NO: 49、 US20150315612 SEQ ID NO: 116
AAVrh.55	480	US20150315612 SEQ ID NO: 37
AAVrh.55 (AAV4-19)	481	US20150315612 SEQ ID NO: 117
AAVrh.56	482	US20150315612 SEQ ID NO: 54
AAVrh.56	483	US20150315612 SEQ ID NO: 152
AAVrh.57	484	US20150315612 SEQ ID NO: 26
AAVrh.57	485	US20150315612 SEQ ID NO: 105
AAVrh.58	486	US20150315612 SEQ ID NO: 27
AAVrh.58	487	US20150159173 SEQ ID NO: 48、 US20150315612 SEQ ID NO: 106
AAVrh.58	488	US20150315612 SEQ ID NO: 232
AAVrh.59	489	US20150315612 SEQ ID NO: 42
AAVrh.59	490	US20150315612 SEQ ID NO: 110
AAVrh.60	491	US20150315612 SEQ ID NO: 31
AAVrh.60	492	US20150315612 SEQ ID NO: 120
AAVrh.61	493	US20150315612 SEQ ID NO: 107
AAVrh.61 (AAV2-3)	494	US20150315612 SEQ ID NO: 21
AAVrh.62 (AAV2-15)	495	US20150315612 SEQ ID No: 33
AAVrh.62 (AAV2-15)	496	US20150315612 SEQ ID NO: 114
AAVrh.64	497	US20150315612 SEQ ID No: 15
AAVrh.64	498	US20150159173 SEQ ID NO: 43、 US20150315612 SEQ ID NO: 99

[0485]

AAVrh.64	499	US20150315612 SEQ ID NO: 233
AAVRh.64R1	500	US20150159173
AAVRh.64R2	501	US20150159173
AAVrh.65	502	US20150315612 SEQ ID NO: 35
AAVrh.65	503	US20150315612 SEQ ID NO: 112
AAVrh.67	504	US20150315612 SEQ ID NO: 36
AAVrh.67	505	US20150315612 SEQ ID NO: 230
AAVrh.67	506	US20150159173 SEQ ID NO: 47、 US20150315612 SEQ ID NO: 113
AAVrh.68	507	US20150315612 SEQ ID NO: 16
AAVrh.68	508	US20150315612 SEQ ID NO: 100
AAVrh.69	509	US20150315612 SEQ ID NO: 39
AAVrh.69	510	US20150315612 SEQ ID NO: 119
AAVrh.70	511	US20150315612 SEQ ID NO: 20
AAVrh.70	512	US20150315612 SEQ ID NO: 98
AAVrh.71	513	US20150315612 SEQ ID NO: 162
AAVrh.72	514	US20150315612 SEQ ID NO: 9
AAVrh.73	515	US20150159173 SEQ ID NO: 5
AAVrh.74	516	US20150159173 SEQ ID NO: 6
AAVrh.8	517	US20150159173 SEQ ID NO: 41
AAVrh.8	518	US20150315612 SEQ ID NO: 235
AAVrh.8R	519	US20150159173、WO2015168666 SEQ ID NO: 9
AAVrh.8R A586R 突变体	520	WO2015168666 SEQ ID NO: 10
AAVrh.8R R533A 突变体	521	WO2015168666 SEQ ID NO: 11
BAAV (牛 AAV)	522	US9193769 SEQ ID NO: 8
BAAV (牛 AAV)	523	US9193769 SEQ ID NO: 10
BAAV (牛 AAV)	524	US9193769 SEQ ID NO: 4
BAAV (牛 AAV)	525	US9193769 SEQ ID NO: 2
BAAV (牛 AAV)	526	US9193769 SEQ ID NO: 6
BAAV (牛 AAV)	527	US9193769 SEQ ID NO: 1
BAAV (牛 AAV)	528	US9193769 SEQ ID NO: 5
BAAV (牛 AAV)	529	US9193769 SEQ ID NO: 3
BAAV (牛 AAV)	530	US9193769 SEQ ID NO: 11
BAAV (牛 AAV)	531	US7427396 SEQ ID NO: 5
BAAV (牛 AAV)	532	US7427396 SEQ ID NO: 6
BAAV (牛 AAV)	533	US9193769 SEQ ID NO: 7
BAAV (牛 AAV)	534	US9193769 SEQ ID NO: 9
BNP61 AAV	535	US20150238550 SEQ ID NO: 1
BNP61 AAV	536	US20150238550 SEQ ID NO: 2
BNP62 AAV	537	US20150238550 SEQ ID NO: 3
BNP63 AAV	538	US20150238550 SEQ ID NO: 4
山羊 AAV	539	US7427396 SEQ ID NO: 3
山羊 AAV	540	US7427396 SEQ ID NO: 4

[0486]

真型 AAV (ttAAV)	541	WO2015121501 SEQ ID NO: 2
AAAV (禽 AAV)	542	US9238800 SEQ ID NO: 12
AAAV (禽 AAV)	543	US9238800 SEQ ID NO: 2
AAAV (禽 AAV)	544	US9238800 SEQ ID NO: 6
AAAV (禽 AAV)	545	US9238800 SEQ ID NO: 4
AAAV (禽 AAV)	546	US9238800 SEQ ID NO: 8
AAAV (禽 AAV)	547	US9238800 SEQ ID NO: 14
AAAV (禽 AAV)	548	US9238800 SEQ ID NO: 10
AAAV (禽 AAV)	549	US9238800 SEQ ID NO: 15
AAAV (禽 AAV)	550	US9238800 SEQ ID NO: 5
AAAV (禽 AAV)	551	US9238800 SEQ ID NO: 9
AAAV (禽 AAV)	552	US9238800 SEQ ID NO: 3
AAAV (禽 AAV)	553	US9238800 SEQ ID NO: 7
AAAV (禽 AAV)	554	US9238800 SEQ ID NO: 11
AAAV (禽 AAV)	555	US9238800 SEQ ID NO: 13
AAAV (禽 AAV)	556	US9238800 SEQ ID NO: 1
AAV Shuffle 100-1	557	US20160017295 SEQ ID NO: 23
AAV Shuffle 100-1	558	US20160017295 SEQ ID NO: 11
AAV Shuffle 100-2	559	US20160017295 SEQ ID NO: 37
AAV Shuffle 100-2	560	US20160017295 SEQ ID NO: 29
AAV Shuffle 100-3	561	US20160017295 SEQ ID NO: 24
AAV Shuffle 100-3	562	US20160017295 SEQ ID NO: 12
AAV Shuffle 100-7	563	US20160017295 SEQ ID NO: 25
AAV Shuffle 100-7	564	US20160017295 SEQ ID NO: 13
AAV Shuffle 10-2	565	US20160017295 SEQ ID NO: 34
AAV Shuffle 10-2	566	US20160017295 SEQ ID NO: 26
AAV Shuffle 10-6	567	US20160017295 SEQ ID NO: 35
AAV Shuffle 10-6	568	US20160017295 SEQ ID NO: 27
AAV Shuffle 10-8	569	US20160017295 SEQ ID NO: 36
AAV Shuffle 10-8	570	US20160017295 SEQ ID NO: 28
AAV SM 100-10	571	US20160017295 SEQ ID NO: 41
AAV SM 100-10	572	US20160017295 SEQ ID NO: 33
AAV SM 100-3	573	US20160017295 SEQ ID NO: 40
AAV SM 100-3	574	US20160017295 SEQ ID NO: 32
AAV SM 10-1	575	US20160017295 SEQ ID NO: 38
AAV SM 10-1	576	US20160017295 SEQ ID NO: 30
AAV SM 10-2	577	US20160017295 SEQ ID NO: 10
AAV SM 10-2	578	US20160017295 SEQ ID NO: 22
AAV SM 10-8	579	US20160017295 SEQ ID NO: 39
AAV SM 10-8	580	US20160017295 SEQ ID NO: 31
AAVF1/HSC1	581	WO2016049230 SEQ ID NO: 20
AAVF2/HSC2	582	WO2016049230 SEQ ID NO: 21
AAVF3/HSC3	583	WO2016049230 SEQ ID NO: 22
AAVF4/HSC4	584	WO2016049230 SEQ ID NO: 23

[0487]

AAVF5/HSC5	585	WO2016049230 SEQ ID NO: 25
AAVF6/HSC6	586	WO2016049230 SEQ ID NO: 24
AAVF7/HSC7	587	WO2016049230 SEQ ID NO: 27
AAVF8/HSC8	588	WO2016049230 SEQ ID NO: 28
AAVF9/HSC9	589	WO2016049230 SEQ ID NO: 29
AAVF11/HSC11	590	WO2016049230 SEQ ID NO: 26
AAVF12/HSC12	591	WO2016049230 SEQ ID NO: 30
AAVF13/HSC13	592	WO2016049230 SEQ ID NO: 31
AAVF14/HSC14	593	WO2016049230 SEQ ID NO: 32
AAVF15/HSC15	594	WO2016049230 SEQ ID NO: 33
AAVF16/HSC16	595	WO2016049230 SEQ ID NO: 34
AAVF17/HSC17	596	WO2016049230 SEQ ID NO: 35
AAVF1/HSC1	597	WO2016049230 SEQ ID NO: 2
AAVF2/HSC2	598	WO2016049230 SEQ ID NO: 3
AAVF3/HSC3	599	WO2016049230 SEQ ID NO: 5
AAVF4/HSC4	600	WO2016049230 SEQ ID NO: 6
AAVF5/HSC5	601	WO2016049230 SEQ ID NO: 11
AAVF6/HSC6	602	WO2016049230 SEQ ID NO: 7
AAVF7/HSC7	603	WO2016049230 SEQ ID NO: 8
AAVF8/HSC8	604	WO2016049230 SEQ ID NO: 9
AAVF9/HSC9	605	WO2016049230 SEQ ID NO: 10
AAVF11/HSC11	606	WO2016049230 SEQ ID NO: 4
AAVF12/HSC12	607	WO2016049230 SEQ ID NO: 12
AAVF13/HSC13	608	WO2016049230 SEQ ID NO: 14
AAVF14/HSC14	609	WO2016049230 SEQ ID NO: 15
AAVF15/HSC15	610	WO2016049230 SEQ ID NO: 16
AAVF16/HSC16	611	WO2016049230 SEQ ID NO: 17
AAVF17/HSC17	612	WO2016049230 SEQ ID NO: 13
AAV CBr-E1	613	US8734809 SEQ ID NO: 13
AAV CBr-E2	614	US8734809 SEQ ID NO: 14
AAV CBr-E3	615	US8734809 SEQ ID NO: 15
AAV CBr-E4	616	US8734809 SEQ ID NO: 16
AAV CBr-E5	617	US8734809 SEQ ID NO: 17
AAV CBr-e5	618	US8734809 SEQ ID NO: 18
AAV CBr-E6	619	US8734809 SEQ ID NO: 19
AAV CBr-E7	620	US8734809 SEQ ID NO: 20
AAV CBr-E8	621	US8734809 SEQ ID NO: 21
AAV CLv-D1	622	US8734809 SEQ ID NO: 22
AAV CLv-D2	623	US8734809 SEQ ID NO: 23
AAV CLv-D3	624	US8734809 SEQ ID NO: 24
AAV CLv-D4	625	US8734809 SEQ ID NO: 25
AAV CLv-D5	626	US8734809 SEQ ID NO: 26
AAV CLv-D6	627	US8734809 SEQ ID NO: 27
AAV CLv-D7	628	US8734809 SEQ ID NO: 28
AAV CLv-D8	629	US8734809 SEQ ID NO: 29
AAV CLv-E1	630	US8734809 SEQ ID NO: 13

[0488]

AAV CLv-R1	631	US8734809 SEQ ID NO: 30
AAV CLv-R2	632	US8734809 SEQ ID NO: 31
AAV CLv-R3	633	US8734809 SEQ ID NO: 32
AAV CLv-R4	634	US8734809 SEQ ID NO: 33
AAV CLv-R5	635	US8734809 SEQ ID NO: 34
AAV CLv-R6	636	US8734809 SEQ ID NO: 35
AAV CLv-R7	637	US8734809 SEQ ID NO: 36
AAV CLv-R8	638	US8734809 SEQ ID NO: 37
AAV CLv-R9	639	US8734809 SEQ ID NO: 38
AAV CLg-F1	640	US8734809 SEQ ID NO: 39
AAV CLg-F2	641	US8734809 SEQ ID NO: 40
AAV CLg-F3	642	US8734809 SEQ ID NO: 41
AAV CLg-F4	643	US8734809 SEQ ID NO: 42
AAV CLg-F5	644	US8734809 SEQ ID NO: 43
AAV CLg-F6	645	US8734809 SEQ ID NO: 43
AAV CLg-F7	646	US8734809 SEQ ID NO: 44
AAV CLg-F8	647	US8734809 SEQ ID NO: 43
AAV CSp-1	648	US8734809 SEQ ID NO: 45
AAV CSp-10	649	US8734809 SEQ ID NO: 46
AAV CSp-11	650	US8734809 SEQ ID NO: 47
AAV CSp-2	651	US8734809 SEQ ID NO: 48
AAV CSp-3	652	US8734809 SEQ ID NO: 49
AAV CSp-4	653	US8734809 SEQ ID NO: 50
AAV CSp-6	654	US8734809 SEQ ID NO: 51
AAV CSp-7	655	US8734809 SEQ ID NO: 52
AAV CSp-8	656	US8734809 SEQ ID NO: 53
AAV CSp-9	657	US8734809 SEQ ID NO: 54
AAV CHt-2	658	US8734809 SEQ ID NO: 55
AAV CHt-3	659	US8734809 SEQ ID NO: 56
AAV CKd-1	660	US8734809 SEQ ID NO: 57
AAV CKd-10	661	US8734809 SEQ ID NO: 58
AAV CKd-2	662	US8734809 SEQ ID NO: 59
AAV CKd-3	663	US8734809 SEQ ID NO: 60
AAV CKd-4	664	US8734809 SEQ ID NO: 61
AAV CKd-6	665	US8734809 SEQ ID NO: 62
AAV CKd-7	666	US8734809 SEQ ID NO: 63
AAV CKd-8	667	US8734809 SEQ ID NO: 64
AAV CLv-1	668	US8734809 SEQ ID NO: 65
AAV CLv-12	669	US8734809 SEQ ID NO: 66
AAV CLv-13	670	US8734809 SEQ ID NO: 67
AAV CLv-2	671	US8734809 SEQ ID NO: 68
AAV CLv-3	672	US8734809 SEQ ID NO: 69
AAV CLv-4	673	US8734809 SEQ ID NO: 70
AAV CLv-6	674	US8734809 SEQ ID NO: 71
AAV CLv-8	675	US8734809 SEQ ID NO: 72
AAV CKd-B1	676	US8734809 SEQ ID NO: 73

[0489]

AAV CKd-B2	677	US8734809 SEQ ID NO: 74
AAV CKd-B3	678	US8734809 SEQ ID NO: 75
AAV CKd-B4	679	US8734809 SEQ ID NO: 76
AAV CKd-B5	680	US8734809 SEQ ID NO: 77
AAV CKd-B6	681	US8734809 SEQ ID NO: 78
AAV CKd-B7	682	US8734809 SEQ ID NO: 79
AAV CKd-B8	683	US8734809 SEQ ID NO: 80
AAV CKd-H1	684	US8734809 SEQ ID NO: 81
AAV CKd-H2	685	US8734809 SEQ ID NO: 82
AAV CKd-H3	686	US8734809 SEQ ID NO: 83
AAV CKd-H4	687	US8734809 SEQ ID NO: 84
AAV CKd-H5	688	US8734809 SEQ ID NO: 85
AAV CKd-H6	689	US8734809 SEQ ID NO: 77
AAV CHt-1	690	US8734809 SEQ ID NO: 86
AAV CLv1-1	691	US8734809 SEQ ID NO: 171
AAV CLv1-2	692	US8734809 SEQ ID NO: 172
AAV CLv1-3	693	US8734809 SEQ ID NO: 173
AAV CLv1-4	694	US8734809 SEQ ID NO: 174
AAV Clv1-7	695	US8734809 SEQ ID NO: 175
AAV Clv1-8	696	US8734809 SEQ ID NO: 176
AAV Clv1-9	697	US8734809 SEQ ID NO: 177
AAV Clv1-10	698	US8734809 SEQ ID NO: 178
AAV.VR-355	699	US8734809 SEQ ID NO: 181
AAV.hu.48R3	700	US8734809 SEQ ID NO: 183
AAV CBr-E1	701	US8734809 SEQ ID NO: 87
AAV CBr-E2	702	US8734809 SEQ ID NO: 88
AAV CBr-E3	703	US8734809 SEQ ID NO: 89
AAV CBr-E4	704	US8734809 SEQ ID NO: 90
AAV CBr-E5	705	US8734809 SEQ ID NO: 91
AAV CBr-e5	706	US8734809 SEQ ID NO: 92
AAV CBr-E6	707	US8734809 SEQ ID NO: 93
AAV CBr-E7	708	US8734809 SEQ ID NO: 94
AAV CBr-E8	709	US8734809 SEQ ID NO: 95
AAV CLv-D1	710	US8734809 SEQ ID NO: 96
AAV CLv-D2	711	US8734809 SEQ ID NO: 97
AAV CLv-D3	712	US8734809 SEQ ID NO: 98
AAV CLv-D4	713	US8734809 SEQ ID NO: 99
AAV CLv-D5	714	US8734809 SEQ ID NO: 100
AAV CLv-D6	715	US8734809 SEQ ID NO: 101
AAV CLv-D7	716	US8734809 SEQ ID NO: 102
AAV CLv-D8	717	US8734809 SEQ ID NO: 103
AAV CLv-E1	718	US8734809 SEQ ID NO: 87
AAV CLv-R1	719	US8734809 SEQ ID NO: 104
AAV CLv-R2	720	US8734809 SEQ ID NO: 105
AAV CLv-R3	721	US8734809 SEQ ID NO: 106
AAV CLv-R4	722	US8734809 SEQ ID NO: 107

[0490]

AAV CLv-R5	723	US8734809 SEQ ID NO: 108
AAV CLv-R6	724	US8734809 SEQ ID NO: 109
AAV CLv-R7	725	US8734809 SEQ ID NO: 110
AAV CLv-R8	726	US8734809 SEQ ID NO: 111
AAV CLv-R9	727	US8734809 SEQ ID NO: 112
AAV CLg-F1	728	US8734809 SEQ ID NO: 113
AAV CLg-F2	729	US8734809 SEQ ID NO: 114
AAV CLg-F3	730	US8734809 SEQ ID NO: 115
AAV CLg-F4	731	US8734809 SEQ ID NO: 116
AAV CLg-F5	732	US8734809 SEQ ID NO: 117
AAV CLg-F6	733	US8734809 SEQ ID NO: 117
AAV CLg-F7	734	US8734809 SEQ ID NO: 118
AAV CLg-F8	735	US8734809 SEQ ID NO: 117
AAV CSp-1	736	US8734809 SEQ ID NO: 119
AAV CSp-10	737	US8734809 SEQ ID NO: 120
AAV CSp-11	738	US8734809 SEQ ID NO: 121
AAV CSp-2	739	US8734809 SEQ ID NO: 122
AAV CSp-3	740	US8734809 SEQ ID NO: 123
AAV CSp-4	741	US8734809 SEQ ID NO: 124
AAV CSp-6	742	US8734809 SEQ ID NO: 125
AAV CSp-7	743	US8734809 SEQ ID NO: 126
AAV CSp-8	744	US8734809 SEQ ID NO: 127
AAV CSp-9	745	US8734809 SEQ ID NO: 128
AAV CHt-2	746	US8734809 SEQ ID NO: 129
AAV CHt-3	747	US8734809 SEQ ID NO: 130
AAV CKd-1	748	US8734809 SEQ ID NO: 131
AAV CKd-10	749	US8734809 SEQ ID NO: 132
AAV CKd-2	750	US8734809 SEQ ID NO: 133
AAV CKd-3	751	US8734809 SEQ ID NO: 134
AAV CKd-4	752	US8734809 SEQ ID NO: 135
AAV CKd-6	753	US8734809 SEQ ID NO: 136
AAV CKd-7	754	US8734809 SEQ ID NO: 137
AAV CKd-8	755	US8734809 SEQ ID NO: 138
AAV CLv-1	756	US8734809 SEQ ID NO: 139
AAV CLv-12	757	US8734809 SEQ ID NO: 140
AAV CLv-13	758	US8734809 SEQ ID NO: 141
AAV CLv-2	759	US8734809 SEQ ID NO: 142
AAV CLv-3	760	US8734809 SEQ ID NO: 143
AAV CLv-4	761	US8734809 SEQ ID NO: 144
AAV CLv-6	762	US8734809 SEQ ID NO: 145
AAV CLv-8	763	US8734809 SEQ ID NO: 146
AAV CKd-B1	764	US8734809 SEQ ID NO: 147
AAV CKd-B2	765	US8734809 SEQ ID NO: 148
AAV CKd-B3	766	US8734809 SEQ ID NO: 149
AAV CKd-B4	767	US8734809 SEQ ID NO: 150
AAV CKd-B5	768	US8734809 SEQ ID NO: 151

[0491]

AAV CKd-B6	769	US8734809 SEQ ID NO: 152
AAV CKd-B7	770	US8734809 SEQ ID NO: 153
AAV CKd-B8	771	US8734809 SEQ ID NO: 154
AAV CKd-H1	772	US8734809 SEQ ID NO: 155
AAV CKd-H2	773	US8734809 SEQ ID NO: 156
AAV CKd-H3	774	US8734809 SEQ ID NO: 157
AAV CKd-H4	775	US8734809 SEQ ID NO: 158
AAV CKd-H5	776	US8734809 SEQ ID NO: 159
AAV CKd-H6	777	US8734809 SEQ ID NO: 151
AAV CHt-1	778	US8734809 SEQ ID NO: 160
AAV CHt-P2	779	WO2016065001 SEQ ID NO: 1
AAV CHt-P5	780	WO2016065001 SEQ ID NO: 2
AAV CHt-P9	781	WO2016065001 SEQ ID NO: 3
AAV CBr-7.1	782	WO2016065001 SEQ ID NO: 4
AAV CBr-7.2	783	WO2016065001 SEQ ID NO: 5
AAV CBr-7.3	784	WO2016065001 SEQ ID NO: 6
AAV CBr-7.4	785	WO2016065001 SEQ ID NO: 7
AAV CBr-7.5	786	WO2016065001 SEQ ID NO: 8
AAV CBr-7.7	787	WO2016065001 SEQ ID NO: 9
AAV CBr-7.8	788	WO2016065001 SEQ ID NO: 10
AAV CBr-7.10	789	WO2016065001 SEQ ID NO: 11
AAV CKd-N3	790	WO2016065001 SEQ ID NO: 12
AAV CKd-N4	791	WO2016065001 SEQ ID NO: 13
AAV CKd-N9	792	WO2016065001 SEQ ID NO: 14
AAV CLv-L4	793	WO2016065001 SEQ ID NO: 15
AAV CLv-L5	794	WO2016065001 SEQ ID NO: 16
AAV CLv-L6	795	WO2016065001 SEQ ID NO: 17
AAV CLv-K1	796	WO2016065001 SEQ ID NO: 18
AAV CLv-K3	797	WO2016065001 SEQ ID NO: 19
AAV CLv-K6	798	WO2016065001 SEQ ID NO: 20
AAV CLv-M1	799	WO2016065001 SEQ ID NO: 21
AAV CLv-M11	800	WO2016065001 SEQ ID NO: 22
AAV CLv-M2	801	WO2016065001 SEQ ID NO: 23
AAV CLv-M5	802	WO2016065001 SEQ ID NO: 24
AAV CLv-M6	803	WO2016065001 SEQ ID NO: 25
AAV CLv-M7	804	WO2016065001 SEQ ID NO: 26
AAV CLv-M8	805	WO2016065001 SEQ ID NO: 27
AAV CLv-M9	806	WO2016065001 SEQ ID NO: 28
AAV CHt-P1	807	WO2016065001 SEQ ID NO: 29
AAV CHt-P6	808	WO2016065001 SEQ ID NO: 30
AAV CHt-P8	809	WO2016065001 SEQ ID NO: 31
AAV CHt-6.1	810	WO2016065001 SEQ ID NO: 32
AAV CHt-6.10	811	WO2016065001 SEQ ID NO: 33
AAV CHt-6.5	812	WO2016065001 SEQ ID NO: 34
AAV CHt-6.6	813	WO2016065001 SEQ ID NO: 35
AAV CHt-6.7	814	WO2016065001 SEQ ID NO: 36

[0492]

AAV CHt-6.8	815	WO2016065001 SEQ ID NO: 37
AAV CSp-8.10	816	WO2016065001 SEQ ID NO: 38
AAV CSp-8.2	817	WO2016065001 SEQ ID NO: 39
AAV CSp-8.4	818	WO2016065001 SEQ ID NO: 40
AAV CSp-8.5	819	WO2016065001 SEQ ID NO: 41
AAV CSp-8.6	820	WO2016065001 SEQ ID NO: 42
AAV CSp-8.7	821	WO2016065001 SEQ ID NO: 43
AAV CSp-8.8	822	WO2016065001 SEQ ID NO: 44
AAV CSp-8.9	823	WO2016065001 SEQ ID NO: 45
AAV CBr-B7.3	824	WO2016065001 SEQ ID NO: 46
AAV CBr-B7.4	825	WO2016065001 SEQ ID NO: 47
AAV3B	826	WO2016065001 SEQ ID NO: 48
AAV4	827	WO2016065001 SEQ ID NO: 49
AAV5	828	WO2016065001 SEQ ID NO: 50
AAV CHt-P2	829	WO2016065001 SEQ ID NO: 51
AAV CHt-P5	830	WO2016065001 SEQ ID NO: 52
AAV CHt-P9	831	WO2016065001 SEQ ID NO: 53
AAV CBr-7.1	832	WO2016065001 SEQ ID NO: 54
AAV CBr-7.2	833	WO2016065001 SEQ ID NO: 55
AAV CBr-7.3	834	WO2016065001 SEQ ID NO: 56
AAV CBr-7.4	835	WO2016065001 SEQ ID NO: 57
AAV CBr-7.5	836	WO2016065001 SEQ ID NO: 58
AAV CBr-7.7	837	WO2016065001 SEQ ID NO: 59
AAV CBr-7.8	838	WO2016065001 SEQ ID NO: 60
AAV CBr-7.10	839	WO2016065001 SEQ ID NO: 61
AAV CKd-N3	840	WO2016065001 SEQ ID NO: 62
AAV CKd-N4	841	WO2016065001 SEQ ID NO: 63
AAV CKd-N9	842	WO2016065001 SEQ ID NO: 64
AAV CLv-L4	843	WO2016065001 SEQ ID NO: 65
AAV CLv-L5	844	WO2016065001 SEQ ID NO: 66
AAV CLv-L6	845	WO2016065001 SEQ ID NO: 67
AAV CLv-K1	846	WO2016065001 SEQ ID NO: 68
AAV CLv-K3	847	WO2016065001 SEQ ID NO: 69
AAV CLv-K6	848	WO2016065001 SEQ ID NO: 70
AAV CLv-M1	849	WO2016065001 SEQ ID NO: 71
AAV CLv-M11	850	WO2016065001 SEQ ID NO: 72
AAV CLv-M2	851	WO2016065001 SEQ ID NO: 73
AAV CLv-M5	852	WO2016065001 SEQ ID NO: 74
AAV CLv-M6	853	WO2016065001 SEQ ID NO: 75
AAV CLv-M7	854	WO2016065001 SEQ ID NO: 76
AAV CLv-M8	855	WO2016065001 SEQ ID NO: 77
AAV CLv-M9	856	WO2016065001 SEQ ID NO: 78
AAV CHt-P1	857	WO2016065001 SEQ ID NO: 79
AAV CHt-P6	858	WO2016065001 SEQ ID NO: 80
AAV CHt-P8	859	WO2016065001 SEQ ID NO: 81
AAV CHt-6.1	860	WO2016065001 SEQ ID NO: 82

[0493]

AAV CHt-6.10	861	WO2016065001 SEQ ID NO: 83
AAV CHt-6.5	862	WO2016065001 SEQ ID NO: 84
AAV CHt-6.6	863	WO2016065001 SEQ ID NO: 85
AAV CHt-6.7	864	WO2016065001 SEQ ID NO: 86
AAV CHt-6.8	865	WO2016065001 SEQ ID NO: 87
AAV CSp-8.10	866	WO2016065001 SEQ ID NO: 88
AAV CSp-8.2	867	WO2016065001 SEQ ID NO: 89
AAV CSp-8.4	868	WO2016065001 SEQ ID NO: 90
AAV CSp-8.5	869	WO2016065001 SEQ ID NO: 91
AAV CSp-8.6	870	WO2016065001 SEQ ID NO: 92
AAV CSp-8.7	871	WO2016065001 SEQ ID NO: 93
AAV CSp-8.8	872	WO2016065001 SEQ ID NO: 94
AAV CSp-8.9	873	WO2016065001 SEQ ID NO: 95
AAV CBr-B7.3	874	WO2016065001 SEQ ID NO: 96
AAV CBr-B7.4	875	WO2016065001 SEQ ID NO: 97
AAV3B	876	WO2016065001 SEQ ID NO: 98
AAV4	877	WO2016065001 SEQ ID NO: 99
AAV5	878	WO2016065001 SEQ ID NO: 100
GPV	879	US9624274B2 SEQ ID NO: 192
B19	880	US9624274B2 SEQ ID NO: 193
MVM	881	US9624274B2 SEQ ID NO: 194
FPV	882	US9624274B2 SEQ ID NO: 195
CPV	883	US9624274B2 SEQ ID NO: 196
AAV6	884	US9546112B2 SEQ ID NO: 5
AAV6	885	US9457103B2 SEQ ID NO: 1
AAV2	886	US9457103B2 SEQ ID NO: 2
ShH10	887	US9457103B2 SEQ ID NO: 3
ShH13	888	US9457103B2 SEQ ID NO: 4
ShH10	889	US9457103B2 SEQ ID NO: 5
ShH10	890	US9457103B2 SEQ ID NO: 6
ShH10	891	US9457103B2 SEQ ID NO: 7
ShH10	892	US9457103B2 SEQ ID NO: 8
ShH10	893	US9457103B2 SEQ ID NO: 9
rh74	894	US9434928B2 SEQ ID NO: 1、 US2015023924A1 SEQ ID NO: 2
rh74	895	US9434928B2 SEQ ID NO: 2、 US2015023924A1 SEQ ID NO: 1
AAV8	896	US9434928B2 SEQ ID NO: 4
rh74	897	US9434928B2 SEQ ID NO: 5
rh74 (RHM4-1)	898	US2015023924A1 SEQ ID NO: 5、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 4
rh74 (RHM15-1)	899	US2015023924A1 SEQ ID NO: 6、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 5
rh74 (RHM15-2)	900	US2015023924A1 SEQ ID NO: 7、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 6

[0494]

rh74 (RHM15-3/RHM15-5)	901	US2015023924A1 SEQ ID NO: 8、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 7
rh74 (RHM15-4)	902	US2015023924A1 SEQ ID NO: 9、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 8
rh74 (RHM15-6)	903	US2015023924A1 SEQ ID NO: 10、 US20160375110A1 SEQ ID NO: 9
rh74 (RHM4-1)	904	US2015023924A1 SEQ ID NO: 11
rh74 (RHM15-1)	905	US2015023924A1 SEQ ID NO: 12
rh74 (RHM15-2)	906	US2015023924A1 SEQ ID NO: 13
rh74 (RHM15-3/RHM15-5)	907	US2015023924A1 SEQ ID NO: 14
rh74 (RHM15-4)	908	US2015023924A1 SEQ ID NO: 15
rh74 (RHM15-6)	909	US2015023924A1 SEQ ID NO: 16
AAV2 (包含肺特异性多肽)	910	US20160175389A1 SEQ ID NO: 9
AAV2 (包含肺特异性多肽)	911	US20160175389A1 SEQ ID NO: 10
Anc80	912	US20170051257A1 SEQ ID NO: 1
Anc80	913	US20170051257A1 SEQ ID NO: 2
Anc81	914	US20170051257A1 SEQ ID NO: 3
Anc80	915	US20170051257A1 SEQ ID NO: 4
Anc82	916	US20170051257A1 SEQ ID NO: 5
Anc82	917	US20170051257A1 SEQ ID NO: 6
Anc83	918	US20170051257A1 SEQ ID NO: 7
Anc83	919	US20170051257A1 SEQ ID NO: 8
Anc84	920	US20170051257A1 SEQ ID NO: 9
Anc84	921	US20170051257A1 SEQ ID NO: 10
Anc94	922	US20170051257A1 SEQ ID NO: 11
Anc94	923	US20170051257A1 SEQ ID NO: 12
Anc113	924	US20170051257A1 SEQ ID NO: 13
Anc113	925	US20170051257A1 SEQ ID NO: 14
Anc126	926	US20170051257A1 SEQ ID NO: 15
Anc126	927	US20170051257A1 SEQ ID NO: 16
Anc127	928	US20170051257A1 SEQ ID NO: 17
Anc127	929	US20170051257A1 SEQ ID NO: 18
Anc80L27	930	US20170051257A1 SEQ ID NO: 19
Anc80L59	931	US20170051257A1 SEQ ID NO: 20
Anc80L60	932	US20170051257A1 SEQ ID NO: 21
Anc80L62	933	US20170051257A1 SEQ ID NO: 22
Anc80L65	934	US20170051257A1 SEQ ID NO: 23
Anc80L33	935	US20170051257A1 SEQ ID NO: 24
Anc80L36	936	US20170051257A1 SEQ ID NO: 25
Anc80L44	937	US20170051257A1 SEQ ID NO: 26
Anc80L1	938	US20170051257A1 SEQ ID NO: 35
Anc80L1	939	US20170051257A1 SEQ ID NO: 36
AAV-X1	940	US8283151B2 SEQ ID NO: 11
AAV-X1b	941	US8283151B2 SEQ ID NO: 12
AAV-X5	942	US8283151B2 SEQ ID NO: 13

[0495]

AAV-X19	943	US8283151B2 SEQ ID NO: 14
AAV-X21	944	US8283151B2 SEQ ID NO: 15
AAV-X22	945	US8283151B2 SEQ ID NO: 16
AAV-X23	946	US8283151B2 SEQ ID NO: 17
AAV-X24	947	US8283151B2 SEQ ID NO: 18
AAV-X25	948	US8283151B2 SEQ ID NO: 19
AAV-X26	949	US8283151B2 SEQ ID NO: 20
AAV-X1	950	US8283151B2 SEQ ID NO: 21
AAV-X1b	951	US8283151B2 SEQ ID NO: 22
AAV-X5	952	US8283151B2 SEQ ID NO: 23
AAV-X19	953	US8283151B2 SEQ ID NO: 24
AAV-X21	954	US8283151B2 SEQ ID NO: 25
AAV-X22	955	US8283151B2 SEQ ID NO: 26
AAV-X23	956	US8283151B2 SEQ ID NO: 27
AAV-X24	957	US8283151B2 SEQ ID NO: 28
AAV-X25	958	US8283151B2 SEQ ID NO: 29
AAV-X26	959	US8283151B2 SEQ ID NO: 30
AAVrh8	960	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 8
AAVrh8VP2FC5	961	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 9
AAVrh8VP2FC44	962	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 10
AAVrh8VP2ApoB100	963	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 11
AAVrh8VP2RVG	964	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 12
AAVrh8VP2Angiopep-2 VP2	965	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 13
AAV9.47VP1.3	966	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 14
AAV9.47VP2ICAMg3	967	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 15
AAV9.47VP2RVG	968	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 16
AAV9.47VP2Angiopep-2	969	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 17
AAV9.47VP2A-串	970	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 18
AAVrh8VP2FC5 VP2	971	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 19
AAVrh8VP2FC44 VP2	972	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 20
AAVrh8VP2ApoB100 VP2	973	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 21
AAVrh8VP2RVG VP2	974	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 22
AAVrh8VP2Angiopep-2 VP2	975	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 23
AAV9.47VP2ICAMg3 VP2	976	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 24
AAV9.47VP2RVG VP2	977	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 25
AAV9.47VP2Angiopep-2 VP2	978	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 26
AAV9.47VP2A-串 VP2	979	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 27
rAAV-B1	980	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 1
rAAV-B2	981	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 2
rAAV-B3	982	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 3
rAAV-B4	983	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 4
rAAV-B1	984	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 5
rAAV-B2	985	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 6
rAAV-B3	986	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 7
rAAV-B4	987	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 8

[0496]

rAAV-L1	988	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 9
rAAV-L2	989	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 10
rAAV-L3	990	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 11
rAAV-L4	991	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 12
rAAV-L1	992	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 13
rAAV-L2	993	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 14
rAAV-L3	994	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 15
rAAV-L4	995	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 16
AAV9	996	WO2016073739A1 SEQ ID NO: 3
rAAV	997	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 1
rAAV	998	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 2
rAAV	999	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 3
rAAV	1000	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 4
rAAV	1001	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 5
rAAV	1002	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 6
rAAV	1003	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 7
rAAV	1004	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 8
rAAV	1005	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 9
rAAV	1006	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 10
rAAV	1007	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 11
rAAV	1008	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 12
rAAV	1009	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 13
rAAV	1010	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 14
rAAV	1011	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 15
rAAV	1012	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 16
rAAV	1013	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 17
rAAV	1014	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 18
rAAV	1015	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 19
rAAV	1016	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 20
rAAV	1017	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 21
rAAV	1018	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 22
rAAV	1019	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 23
rAAV	1020	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 24
rAAV	1021	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 25
rAAV	1022	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 26
rAAV	1023	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 27
rAAV	1024	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 28
rAAV	1025	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 29
rAAV	1026	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 30
rAAV	1027	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 31
rAAV	1028	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 32
rAAV	1029	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 33
rAAV	1030	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 34
rAAV	1031	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 35
rAAV	1032	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 36
rAAV	1033	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 37

[0497]

rAAV	1034	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 38
rAAV	1035	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 39
rAAV	1036	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 40
rAAV	1037	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 41
rAAV	1038	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 42
rAAV	1039	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 43
rAAV	1040	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 44
rAAV	1041	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 45
rAAV	1042	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 46
rAAV	1043	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 47
rAAV	1044	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 48
rAAV	1045	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 49
rAAV	1046	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 50
rAAV	1047	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 51
rAAV	1048	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 52
rAAV	1049	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 53
rAAV	1050	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 54
rAAV	1051	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 55
rAAV	1052	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 56
rAAV	1053	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 57
rAAV	1054	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 58
rAAV	1055	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 59
rAAV	1056	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 60
rAAV	1057	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 61
rAAV	1058	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 62
rAAV	1059	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 63
rAAV	1060	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 64
rAAV	1061	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 65
rAAV	1062	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 66
rAAV	1063	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 67
rAAV	1064	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 68
rAAV	1065	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 69
rAAV	1066	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 70
rAAV	1067	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 71
rAAV	1068	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 72
rAAV	1069	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 73
rAAV	1070	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 74
rAAV	1071	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 75
rAAV	1072	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 76
rAAV	1073	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 77
rAAV	1074	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 78
rAAV	1075	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 79
rAAV	1076	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 80
rAAV	1077	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 81
rAAV	1078	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 82
rAAV	1079	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 83

[0498]

rAAV	1080	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 84
rAAV	1081	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 85
rAAV	1082	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 86
rAAV	1083	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 87
rAAV	1084	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 88
rAAV	1085	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 89
rAAV	1086	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 90
rAAV	1087	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 91
rAAV	1088	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 92
rAAV	1089	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 93
rAAV	1090	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 94
rAAV	1091	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 95
rAAV	1092	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 96
rAAV	1093	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 97
rAAV	1094	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 98
rAAV	1095	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 99
rAAV	1096	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 100
rAAV	1097	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 101
rAAV	1098	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 102
rAAV	1099	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 103
rAAV	1100	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 104
rAAV	1101	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 105
rAAV	1102	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 106
rAAV	1103	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 107
rAAV	1104	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 108
rAAV	1105	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 109
rAAV	1106	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 110
rAAV	1107	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 111
rAAV	1108	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 112
rAAV	1109	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 113
rAAV	1110	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 114
rAAV	1111	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 115
rAAV	1112	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 116
rAAV	1113	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 117
rAAV	1114	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 118
rAAV	1115	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 119
rAAV	1116	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 120
rAAV	1117	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 121
rAAV	1118	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 122
rAAV	1119	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 123
rAAV	1120	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 124
rAAV	1121	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 125
rAAV	1122	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 126
rAAV	1123	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 127
rAAV	1124	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 128
AAV8 E532K	1125	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 133

[0499]

AAV8 E532K	1126	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 134
rAAV4	1127	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 2
rAAV4	1128	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 3
rAAV4	1129	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 4
rAAV4	1130	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 5
rAAV4	1131	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 6
rAAV4	1132	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 7
rAAV4	1133	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 8
rAAV4	1134	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 9
rAAV4	1135	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 10
rAAV4	1136	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 11
rAAV4	1137	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 12
rAAV4	1138	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 13
rAAV4	1139	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 14
rAAV4	1140	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 15
rAAV4	1141	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 16
rAAV4	1142	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 17
rAAV4	1143	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 18
rAAV4	1144	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 19
rAAV4	1145	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 20
rAAV4	1146	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 21
AAV11	1147	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 22
AAV12	1148	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 23
rh32	1149	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 25
rh33	1150	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 26
rh34	1151	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 27
rAAV4	1152	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 28
rAAV4	1153	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 29
rAAV4	1154	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 30
rAAV4	1155	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 31
rAAV4	1156	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 32
rAAV4	1157	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 33
AAV2/8	1158	WO2016131981A1 SEQ ID NO: 47
AAV2/8	1159	WO2016131981A1 SEQ ID NO: 48
祖代 AAV	1160	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 7
祖代 AAV 变体 C4	1161	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 13
祖代 AAV 变体 C7	1162	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 14
祖代 AAV 变体 G4	1163	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 15
祖代 AAV 变体 C4、C7 和 G4 的共通氨基酸序列	1164	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 16
祖代 AAV 变体 C4 和 C7 的共通氨基酸序列	1165	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 17
AAV8 (带有 AAV2 磷脂酶结构域)	1166	WO2016150403A1 SEQ ID NO: 13
AAV VR-942n	1167	US20160289275A1 SEQ ID NO: 10

[0500]

AAV5-A (M569V)	1168	US20160289275A1 SEQ ID NO: 13
AAV5-A (M569V)	1169	US20160289275A1 SEQ ID NO: 14
AAV5-A (Y585V)	1170	US20160289275A1 SEQ ID NO: 16
AAV5-A (Y585V)	1171	US20160289275A1 SEQ ID NO: 17
AAV5-A (L587T)	1172	US20160289275A1 SEQ ID NO: 19
AAV5-A (L587T)	1173	US20160289275A1 SEQ ID NO: 20
AAV5-A (Y585V/L587T)	1174	US20160289275A1 SEQ ID NO: 22
AAV5-A (Y585V/L587T)	1175	US20160289275A1 SEQ ID NO: 23
AAV5-B (D652A)	1176	US20160289275A1 SEQ ID NO: 25
AAV5-B (D652A)	1177	US20160289275A1 SEQ ID NO: 26
AAV5-B (T362M)	1178	US20160289275A1 SEQ ID NO: 28
AAV5-B (T362M)	1179	US20160289275A1 SEQ ID NO: 29
AAV5-B (Q359D)	1180	US20160289275A1 SEQ ID NO: 31
AAV5-B (Q359D)	1181	US20160289275A1 SEQ ID NO: 32
AAV5-B (E350Q)	1182	US20160289275A1 SEQ ID NO: 34
AAV5-B (E350Q)	1183	US20160289275A1 SEQ ID NO: 35
AAV5-B (P533S)	1184	US20160289275A1 SEQ ID NO: 37
AAV5-B (P533S)	1185	US20160289275A1 SEQ ID NO: 38
AAV5-B (P533G)	1186	US20160289275A1 SEQ ID NO: 40
AAV5-B (P533G)	1187	US20160289275A1 SEQ ID NO: 41
环 VII 中的 AAV5 突变	1188	US20160289275A1 SEQ ID NO: 43
环 VII 中的 AAV5 突变	1189	US20160289275A1 SEQ ID NO: 44
AAV8	1190	US20160289275A1 SEQ ID NO: 47
Mut A (LK03/AAV8)	1191	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 1
Mut B (LK03/AAV5)	1192	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 2
Mut C (AAV8/AAV3B)	1193	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 3
Mut D (AAV5/AAV3B)	1194	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 4
Mut E (AAV8/AAV3B)	1195	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 5
Mut F (AAV3B/AAV8)	1196	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 6
AAV44.9	1197	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 4
AAV44.9	1198	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 5
AAVrh8	1199	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 6
AAV44.9 (S470N)	1200	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 9
rh74 VP1	1201	US20160375110A1 SEQ ID NO: 1
AAV-LK03 (L125I)	1202	WO2017015102A1 SEQ ID NO: 5
AAV3B (S663V+T492V)	1203	WO2017015102A1 SEQ ID NO: 6
Anc80	1204	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 1
Anc80	1205	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 2
Anc81	1206	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 3
Anc81	1207	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 4
Anc82	1208	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 5
Anc82	1209	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 6
Anc83	1210	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 7
Anc83	1211	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 8
Anc84	1212	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 9

[0501]

Anc84	1213	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 10
Anc94	1214	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 11
Anc94	1215	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 12
Anc113	1216	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 13
Anc113	1217	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 14
Anc126	1218	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 15
Anc126	1219	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 16
Anc127	1220	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 17
Anc127	1221	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 18
Anc80L27	1222	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 19
Anc80L59	1223	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 20
Anc80L60	1224	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 21
Anc80L62	1225	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 22
Anc80L65	1226	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 23
Anc80L33	1227	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 24
Anc80L36	1228	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 25
Anc80L44	1229	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 26
Anc80L1	1230	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 35
Anc80L1	1231	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 36
AAVrh10	1232	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 41
Anc110	1233	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 42
Anc110	1234	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 43
AAVrh32.33	1235	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 45
AAVrh74	1236	WO2017049031A1 SEQ ID NO: 1
AAV2	1237	WO2017053629A2 SEQ ID NO: 49
AAV2	1238	WO2017053629A2 SEQ ID NO: 50
AAV2	1239	WO2017053629A2 SEQ ID NO: 82
细小样病毒	1240	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 1
细小样病毒	1241	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 2
细小样病毒	1242	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 3
细小样病毒	1243	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 4
细小样病毒	1244	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 5
细小样病毒	1245	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 6
AAVrh.10	1246	WO2017070516A1 SEQ ID NO: 7
AAVrh.10	1247	WO2017070516A1 SEQ ID NO: 14
AAV2tYF	1248	WO2017070491A1 SEQ ID NO: 1
AAV-SPK	1249	WO2017075619A1 SEQ ID NO:28
AAV2.5	1250	US20170128528A1 SEQ ID NO: 13
AAV1.1	1251	US20170128528A1 SEQ ID NO: 15
AAV6.1	1252	US20170128528A1 SEQ ID NO: 17
AAV6.3.1	1253	US20170128528A1 SEQ ID NO: 18
AAV2i8	1254	US20170128528A1 SEQ ID NO: 28
AAV2i8	1255	US20170128528A1 SEQ ID NO: 29
ttAAV	1256	US20170128528A1 SEQ ID NO: 30
ttAAV-S312N	1257	US20170128528A1 SEQ ID NO: 32

[0502]	ttAAV-S312N	1258	US20170128528A1 SEQ ID NO: 33
	AAV6 (Y705、Y731 和 T492)	1259	WO2016134337A1 SEQ ID NO: 24
	AAV2	1260	WO2016134375A1 SEQ ID NO: 9
	AAV2	1261	WO2016134375A1 SEQ ID NO: 10

[0503] 在一些实施方案中, AAV血清型可以是或可以具有如国际专利公布W02015038958 (其内容以全文引用的方式并入本文中) 所描述的序列, 诸如但不限于AAV9 (W02015038958的SEQ ID NO: 2和11, 或本文中分别为SEQ ID NO: 137和138)、PHP.B (W02015038958的SEQ ID NO: 8和9, 在本文中是SEQ ID NO: 5和6)、G2B-13 (W02015038958的SEQ ID NO: 12, 在本文中是SEQ ID NO: 7)、G2B-26 (W02015038958的SEQ ID NO: 13, 在本文中是SEQ ID NO: 5)、TH1.1-32 (W02015038958的SEQ ID NO: 14, 在本文中是SEQ ID NO: 8)、TH1.1-35 (W02015038958的SEQ ID NO: 15, 在本文中是SEQ ID NO: 9) 或其变体。此外, W02015038958中所描述的靶向肽或氨基酸插入物中的任一者可以插入任何亲代AAV血清型中, 诸如但不限于AAV9 (对于DNA序列是SEQ ID NO: 137, 并且对于氨基酸序列是SEQ ID NO: 138)。在另一个实施方案中, 氨基酸插入物插入亲代AAV序列的氨基酸588-589之间。氨基酸插入物可以是但不限于以下氨基酸序列中的任一者: TLAVPFK (在本文中是SEQ ID NO: 1262)、KFPVALT (SEQ ID NO: 1263)、LAVPFK (SEQ ID NO: 1264)、AVPFK (SEQ ID NO: 1265)、VPFK (SEQ ID NO: 1266)、TLAVPF (SEQ ID NO: 1267)、TLAVP (SEQ ID NO: 1268)、TLAV (SEQ ID NO: 1269)、SVSKPFL (SEQ ID NO: 1270)、FTLTTPK (SEQ ID NO: 1271)、MNATKNV (SEQ ID NO: 1272)、QSSQTPR (SEQ ID NO: 1273)、ILGTGTS (SEQ ID NO: 1274)、TRTNPEA (SEQ ID NO: 1275)、NGGTSSS (SEQ ID NO: 1276) 或YTLSQGW (SEQ ID NO: 1277)。可以编码氨基酸插入物的核苷酸序列的非限制性实例包括以下: SEQ ID NO: 1278、SEQ ID NO: 1279、SEQ ID NO: 1280、SEQ ID NO: 1281、SEQ ID NO: 1282、SEQ ID NO: 1283、SEQ ID NO: 1284、SEQ ID NO: 1285、SEQ ID NO: 1286或SEQ ID NO: 1287。

[0504] 在一些实施方案中, AAV血清型可以是或可以具有如国际专利公布号W02017100671 (其内容以全文引用的方式并入本文中) 所描述的序列, 诸如但不限于AAV9 (W02017100671的SEQ ID NO: 45, 在本文中是SEQ ID NO: 11)、PHP.N (W02017100671的SEQ ID NO: 46, 在本文中是SEQ ID NO: 4)、PHP.S (W02017100671的SEQ ID NO: 47, 在本文中是SEQ ID NO: 10) 或其变体。此外, W02017100671中所描述的靶向肽或氨基酸插入物中的任一者可以插入任何亲代AAV血清型中, 诸如但不限于AAV9。在一些实施方案中, 氨基酸插入物插入亲代AAV (例如, AAV9) 的氨基酸586-592之间。在另一个实施方案中, 氨基酸插入物插入亲代AAV序列的氨基酸588-589之间。氨基酸插入物可以是但不限于以下氨基酸序列中的任一者: AQTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1288)、AQSVSKPFLAQ (SEQ ID NO: 1289)、AQFTLTTPKAQ (SEQ ID NO: 1290)、DGTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1291)、ESTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1292)、GGTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1293)、AQTATPFKAQ (SEQ ID NO: 1294)、ATTATPFKAQ (SEQ ID NO: 1295)、DGTATPFKAQ (SEQ ID NO: 1296)、GGTATPFKAQ (SEQ ID NO: 1297)、SGSLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1298)、AQTLAQPFKAQ (SEQ ID NO: 1299)、AQTLQQPFKAQ (SEQ ID NO: 1300)、AQTLSPFKAQ (SEQ ID NO: 1301)、AQTLAVPFSNP (SEQ ID NO: 1302)、QGTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1303)、NQTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1304)、EGSLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1305)、SGNLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1306)、EGTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1307)、DSTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1308)、

AVTLAVPFFKAQ (SEQ ID NO:1309)、AQTLPQPFKAQ (SEQ ID NO:1311)、AQTLSTPFKAQ (SEQ ID NO:1310)、AQTLQLPFKAQ (SEQ ID NO:1313)、AQTLTMPFKAQ (SEQ ID NO:1314)、AQTLTTPFKAQ (SEQ ID NO:1315)、AQYTLSQGWAQ (SEQ ID NO:1316)、AQMNATKNVAQ (SEQ ID NO:1317)、AQVSGGHSAQ (SEQ ID NO:1318)、AQTLTAPFKAQ (SEQ ID NO:1319)、AQTLSPFKAQ (SEQ ID NO:1320)、QAVRTSL (SEQ ID NO:1321)、YTLSQGW (SEQ ID NO:1277)、LAKERLS (SEQ ID NO:1322)、TLAVPFFK (SEQ ID NO:1262)、SVSKPFL (SEQ ID NO:1270)、FTLTTPK (SEQ ID NO:1271)、MNSTKNV (SEQ ID NO:1323)、VSGGHHS (SEQ ID NO:1324)、SAQTLAVPFFKAQAQ (SEQ ID NO:1325)、SXXXLAVPFFKAQAQ (其中X可以是任何氨基酸;SEQ ID NO:1326)、SAQXXXVPFFKAQAQ (其中X可以是任何氨基酸;SEQ ID NO:1327)、SAQTLXXXFKAQAQ (其中X可以是任何氨基酸;SEQ ID NO:1328)、SAQTLAVXXXAQAQ (其中X可以是任何氨基酸;SEQ ID NO:1329)、SAQTLAVPFXXXAQAQ (其中X可以是任何氨基酸;SEQ ID NO:1330)、TNHQSAQ (SEQ ID NO:1331)、AQAQTGW (SEQ ID NO:1332)、DGTLATPFFK (SEQ ID NO:1333)、DGTLATPFFKXX (其中X可以是任何氨基酸;SEQ ID NO:1334)、LAVPFFKAQ (SEQ ID NO:1335)、VPFKAQ (SEQ ID NO:1336)、FKAQ (SEQ ID NO:1337)、AQTLAV (SEQ ID NO:1338)、AQTLAVPF (SEQ ID NO:1339)、QAVR (SEQ ID NO:1340)、AVRT (SEQ ID NO:1341)、VRTS (SEQ ID NO:1342)、RTSL (SEQ ID NO:1343)、QAVRT (SEQ ID NO:1344)、AVRTS (SEQ ID NO:1345)、VRTSL (SEQ ID NO:1346)、QAVRTS (SEQ ID NO:1347) 或 AVRTSL (SEQ ID NO:1348)。可以编码氨基酸插入物的核苷酸序列的非限制性实例包括以下:SEQ ID NO:1349、SEQ ID NO:1350、SEQ ID NO:1351、SEQ ID NO:1352、SEQ ID NO:1353、SEQ ID NO:1354、SEQ ID NO:1355、SEQ ID NO:1356、SEQ ID NO:1357、SEQ ID NO:1358 (其中N可以是A、C、T或G)、SEQ ID NO:1359 (其中N可以是A、C、T或G)、SEQ ID NO:1360 (其中N可以是A、C、T或G)、SEQ ID NO:1361 (其中N可以是A、C、T或G);在本文中是SEQ ID NO:1362 (其中N可以是A、C、T或G)、SEQ ID NO:1279、SEQ ID NO:1280、SEQ ID NO:1281、SEQ ID NO:1287或SEQ ID NO:1363。

[0505] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有如美国专利号US 9624274 (其内容以全文引用的方式并入本文中) 所描述的序列,诸如但不限于AAV1 (US9624274的SEQ ID NO:181)、AAV6 (US9624274的SEQ ID NO:182)、AAV2 (US9624274的SEQ ID NO:183)、AAV3b (US9624274的SEQ ID NO:184)、AAV7 (US9624274的SEQ ID NO:185)、AAV8 (US9624274的SEQ ID NO:186)、AAV10 (US9624274的SEQ ID NO:187)、AAV4 (US9624274的SEQ ID NO:188)、AAV11 (US9624274的SEQ ID NO:189)、bAAV (US9624274的SEQ ID NO:190)、AAV5 (US9624274的SEQ ID NO:191)、GPV (US9624274的SEQ ID NO:192;在本文中是SEQ ID NO:879)、B19 (US9624274的SEQ ID NO:193;在本文中是SEQ ID NO:880)、MVM (US9624274的SEQ ID NO:194;在本文中是SEQ ID NO:881)、FPV (US9624274的SEQ ID NO:195;在本文中是SEQ ID NO:882)、CPV (US9624274的SEQ ID NO:196;在本文中是SEQ ID NO:883) 或其变体。此外,US 9624274中所描述的结构蛋白插入物中的任一者可以插入但不限于任何亲代AAV血清型的I-453和I-587中,所述血清型诸如但不限于AAV2 (US9624274的SEQ ID NO:183)。氨基酸插入物可以是但不限于以下氨基酸序列中的任一者:VNLTWSRASG (SEQ ID NO:1364)、EFCINHRGYWVCGD (SEQ ID NO:1365)、EDGQVMDVDLS (SEQ ID NO:1366)、EKQRNGTLT (SEQ ID NO:1367)、TYQCRVTHPHLPRALMR (SEQ ID NO:1368)、RHSTTQPRKTKGSG (SEQ ID NO:1369)、DSNPRGVSAYLSR (SEQ ID NO:1370)、TITCLWDLAPSK (SEQ ID NO:1371)、KTKGSGFFVF (SEQ ID

NO:1372)、THPHLPRALMRS (SEQ ID NO:1373)、GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK (SEQ ID NO:1374)、LPRALMRS (SEQ ID NO:1375)、INHRGYWV (SEQ ID NO:1376)、CDAGSVRTNAPD (SEQ ID NO:1377)、AKAVSNLTESRSESLQS (SEQ ID NO:1378)、SLTGDEFKKVLET (SEQ ID NO:1379)、REAVAYRFEED (SEQ ID NO:1380)、INPEIITLDG (SEQ ID NO:1381)、DISVTGAPVITATYL (SEQ ID NO:1382)、DISVTGAPVITA (SEQ ID NO:1383)、PKTVSNLTESSESQVS (SEQ ID NO:1384)、SLMGDEFKAVLET (SEQ ID NO:1385)、QHSVAYTFEED (SEQ ID NO:1386)、INPEIITRDG (SEQ ID NO:1387)、DISLTGDPVITASYL (SEQ ID NO:1388)、DISLTGDPVITA (SEQ ID NO:1389)、DQSIDFEIDSA (SEQ ID NO:1390)、KNVSEDLPPTFSPTLLGDS (SEQ ID NO:1391)、KNVSEDLPPT (SEQ ID NO:1392)、CDSGRVRTDAPD (SEQ ID NO:1393)、FPEHLLVDFLQSL (SEQ ID NO:1394)、DAEFRHDSG (SEQ ID NO:1395)、HYAAQWDFGNTMCQL (SEQ ID NO:1396)、YAAQWDFGNTMCQ (SEQ ID NO:1397)、RSQKEGLHYT (SEQ ID NO:1398)、SSRTPSDKPVAVHWANPQAE (SEQ ID NO:1399)、SRTPSDKPVAVHWANP (SEQ ID NO:1400)、SSRTPSDKP (SEQ ID NO:1401)、NADGNVDYHMNSVP (SEQ ID NO:1402)、DGNVDYHMNSV (SEQ ID NO:1403)、RSFKEFLQSSLRALRQ (SEQ ID NO:1404)、FKEFLQSSLRA (SEQ ID NO:1405) 或 QMWAPQWGP (SEQ ID NO:1406)。

[0506] 在一些实施方案中, AAV血清型可以是或可以具有如美国专利号US9475845 (其内容以全文引用的方式并入本文中) 所描述的序列, 诸如但不限于包含在原生AAV2衣壳蛋白的氨基酸位置585至590处包含一个或多个氨基酸的修饰的AAV衣壳蛋白。此外, 修饰可以得到但不限于氨基酸序列RGNRQA (SEQ ID NO:1407)、SSSTDP (SEQ ID NO:1408)、SSNTAP (SEQ ID NO:1409)、SNSNLP (在本文中是SEQ ID NO:1410)、SSTAP (SEQ ID NO:1411)、AANTAA (SEQ ID NO:1412)、QQNTAP (SEQ ID NO:1413)、SAQAQA (SEQ ID NO:1414)、QANTGP (SEQ ID NO:1415)、NATTAP (SEQ ID NO:1416)、SSTAGP (SEQ ID NO:1417)、QQNTAA (SEQ ID NO:1418)、PSTAGP (SEQ ID NO:1419)、NQNTAP (SEQ ID NO:1420)、QAANAP (SEQ ID NO:1421)、SIVGLP (SEQ ID NO:1422)、AASTAA (SEQ ID NO:1423)、SQNTTA (SEQ ID NO:1424)、QQDTAP (SEQ ID NO:1425)、QTNTGP (SEQ ID NO:1426)、QTNGAP (SEQ ID NO:1427)、QQNAAP (SEQ ID NO:1428) 或 AANTQA (SEQ ID NO:1429)。在一些实施方案中, 氨基酸修饰是在原生AAV2衣壳蛋白中的氨基酸位置262至265处或在具有靶向序列的另一个AAV的衣壳蛋白中的相应位置处的取代。靶向序列可以是但不限于以下氨基酸序列中的任一者: NGRAHA (SEQ ID NO:1430)、QPEHSST (SEQ ID NO:1431)、VNTANST (SEQ ID NO:1432)、HGPMQKS (SEQ ID NO:1433)、PHKPPLA (SEQ ID NO:1434)、IKNNEMW (SEQ ID NO:1435)、RNLDTPM (SEQ ID NO:1436)、VDSHRQS (SEQ ID NO:1437)、YDSKTKT (SEQ ID NO:1438)、SQLPHQK (SEQ ID NO:1439)、STMQQNT (SEQ ID NO:1440)、TERYMTQ (SEQ ID NO:1441)、DASLSTS (SEQ ID NO:1442)、DLPNKKT (SEQ ID NO:1443)、DLTAARL (SEQ ID NO:1444)、EPHQFNY (SEQ ID NO:1445)、EPQSNHT (SEQ ID NO:1446)、MSSWPSQ (SEQ ID NO:1447)、NPKHNAT (SEQ ID NO:1448)、PDGMRTT (SEQ ID NO:1449)、PNNKTT (SEQ ID NO:1450)、QSTTHDS (SEQ ID NO:1451)、TGSKQKQ (SEQ ID NO:1452)、SLKHQAL (SEQ ID NO:1453)、SPIDGEQ (SEQ ID NO:1454)、WIFPWIQL (SEQ ID NO:1455)、CDCRGDCFC (SEQ ID NO:1456)、CNGRC (SEQ ID NO:1457)、CPRECES (SEQ ID NO:1458)、CTTHWGFTLC (SEQ ID NO:1459)、CGRRAGGSC (SEQ ID NO:1460)、CKGGRKDC (SEQ ID NO:1461)、CVPELGHEC (SEQ ID NO:1462)、CRRETAWAK (SEQ ID NO:1463)、VSWFSHRYSPFAVS (SEQ ID NO:1464)、GYRDGYAGPILYN (SEQ ID NO:1465)、XXXXXX

(SEQ ID NO:1466)、YXNW(SEQ ID NO:1467)、RPLPPLP(SEQ ID NO:1468)、APPLPPR(SEQ ID NO:1469)、DVFPYPYASGS(SEQ ID NO:1470)、MYWYPY(SEQ ID NO:1471)、DITWDQLWDLMK(SEQ ID NO:1472)、CWDDXWLC(SEQ ID NO:1473)、EWCEYLGGYLRCYA(SEQ ID NO:1474)、YXCXXGPXTWXCXP(SEQ ID NO:1475)、IEGPTLRQWLAARA(SEQ ID NO:1476)、LWXXX(SEQ ID NO:1477)、XFXXYLW(SEQ ID NO:1478)、SSIISHFRWGLCD(SEQ ID NO:1479)、MSRPACPPNDKYE(SEQ ID NO:1480)、CLRSGRGC(SEQ ID NO:1481)、CHWMFSPWC(SEQ ID NO:1482)、WXXF(SEQ ID NO:1483)、CSSRLDAC(SEQ ID NO:1484)、CLPVASC(SEQ ID NO:1485)、CGFECVRQCPERC(SEQ ID NO:1486)、CVALCREACGEGC(SEQ ID NO:1487)、SWCEPGWCR(SEQ ID NO:1488)、YSGKWGW(SEQ ID NO:1489)、GLSGGRS(SEQ ID NO:1490)、LMLPRAD(SEQ ID NO:1491)、CSCFRDVCC(SEQ ID NO:1492)、CRDVVSVIC(SEQ ID NO:1493)、MARSGL(SEQ ID NO:1494)、MARAKE(SEQ ID NO:1495)、MSRTMS(SEQ ID NO:1496)、KCCYSL(SEQ ID NO:1497)、MYWGDSHWLQYWYE(SEQ ID NO:1498)、MQLPLAT(SEQ ID NO:1499)、EWLS(SEQ ID NO:1500)、SNEW(SEQ ID NO:1501)、TNYL(SEQ ID NO:1502)、WDLAWMFRLPVG(SEQ ID NO:1503)、CTVALPGGYVRVC(SEQ ID NO:1504)、CVAYCIEHHCWTC(SEQ ID NO:1505)、CVFAHNYDYLVC(SEQ ID NO:1506)、CVFTSNYAFC(SEQ ID NO:1507)、VHSPNKK(SEQ ID NO:1508)、CRGDGWC(SEQ ID NO:1509)、XRGCDX(SEQ ID NO:1510)、PXXX(SEQ ID NO:1511)、SGKGPRQITAL(SEQ ID NO:1512)、AAAAAAAAAXXXXX(SEQ ID NO:1513)、VYMSPF(SEQ ID NO:1514)、ATWLPPR(SEQ ID NO:1515)、HTMYHHYQHHL(SEQ ID NO:1516)、SEVGCRAGPLQWLCEKYFG(SEQ ID NO:1517)、CGLLPVGRPDRNVWRWLC(SEQ ID NO:1518)、CKGQCDRFKGLPWEC(SEQ ID NO:1519)、SGRSA(SEQ ID NO:1520)、WGFP(SEQ ID NO:1521)、AEPMPHSLNFSQYLWYT(SEQ ID NO:1522)、WAYXSP(SEQ ID NO:1523)、IELLQAR(SEQ ID NO:1524)、AYTKCSRQWRTCMTTH(SEQ ID NO:1525)、PQNSKIPGPTFLDPH(SEQ ID NO:1526)、SMEPALPDWWWKMFK(SEQ ID NO:1527)、ANTPCGPYTHDCPVKR(SEQ ID NO:1528)、TACHQHVRMVRP(SEQ ID NO:1529)、VPWMEPAYQRFL(SEQ ID NO:1530)、DPRATPGS(SEQ ID NO:1531)、FRPNRAQDYNTN(SEQ ID NO:1532)、CTKNSYLMC(SEQ ID NO:1533)、CXXTXXXGXGC(SEQ ID NO:1534)、CPIEDRPMC(SEQ ID NO:1535)、HEWSYLAPYPWF(SEQ ID NO:1536)、MCPKHPLGC(SEQ ID NO:1537)、RMWPSSTVNLSAGR(SEQ ID NO:1538)、SAKTAVSQRVWLPSHRGGEP(SEQ ID NO:1539)、KSREHVNSACPSKRITAAL(SEQ ID NO:1540)、EGFR(SEQ ID NO:1541)、AGLGVR(SEQ ID NO:1542)、GTRQGHTMRLGVSDG(SEQ ID NO:1543)、IAGLATPGWSHWLAL(SEQ ID NO:1544)、SMSIARL(SEQ ID NO:1545)、HTFEPGV(SEQ ID NO:1546)、NTSLKRISNKRIRRK(SEQ ID NO:1547)、LRIKRKRKRKRKTRK(SEQ ID NO:1548)、GGG、GFS、LWS、EGG、LLV、LSP、LBS、AGG、GRR、GGH和GTV。

[0507] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有如美国公布号US 20160369298(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的序列,诸如但不限于位点特异性突变的AAV2衣壳蛋白(US 20160369298的SEQ ID NO:97;在本文中是SEQ ID NO:1549)或其变体,其中特异性位点是选自VP1或其片段的位点R447、G453、S578、N587、N587+1、S662的至少一个位点。

[0508] 此外,US 20160369298中所描述的突变序列中的任一者可以是或可以具有但不限于以下序列中的任一者:SDSGASN(SEQ ID NO:1550)、SPSGASN(SEQ ID NO:1551)、SHSGASN(SEQ ID NO:1552)、SRSGASN(SEQ ID NO:1553)、SKSGASN(SEQ ID NO:1554)、SNSGASN(SEQ

ID NO:1555)、SGSGASN(SEQ ID NO:1556)、SASGASN(SEQ ID NO:1557)、SESGTSN(SEQ ID NO:1558)、STTGGSN(SEQ ID NO:1559)、SSAGSTN(SEQ ID NO:1560)、NNSDQA(SEQ ID NO:1561)、NNRNQA(SEQ ID NO:1562)、NNNKQA(SEQ ID NO:1563)、NAKRQA(SEQ ID NO:1564)、NDEHQA(SEQ ID NO:1565)、NTSQKA(SEQ ID NO:1566)、YYLSRTNTPSGTDTQSRLVFSQAGA(SEQ ID NO:1567)、YYLSRTNTD SG T E T Q S G L D F S Q A G A (S E Q I D N O : 1 5 6 8) 、 Y Y L S R T N T E S G T P T Q S A L E F S Q A G A (S E Q I D N O : 1 5 6 9) 、 Y Y L S R T N T H S G T H T Q S P L H F S Q A G A (S E Q I D N O : 1 5 7 0) 、 Y Y L S R T N T S S G T I T I S H L I F S Q A G A (S E Q I D N O : 1 5 7 1) 、 Y Y L S R T N T R S G I M T K S S L M F S Q A G A (S E Q I D N O : 1 5 7 2) 、 Y Y L S R T N T K S G R K T L S N L S F S Q A G A (S E Q I D N O : 1 5 7 3) 、 Y Y L S R T N D G S G P V T P S K L R F S Q R G A (S E Q I D N O : 1 5 7 4) 、 Y Y L S R T N A A S G H A T H S D L K F S Q P G A (S E Q I D N O : 1 5 7 5) 、 Y Y L S R T N G Q A G S L T M S E L G F S Q V G A (S E Q I D N O : 1 5 7 6) 、 Y Y L S R T N S T G G N Q T T S Q L L F S Q L S A (S E Q I D N O : 1 5 7 7) 、 Y F L S R T N N T G L N T N S T L N F S Q G R A (S E Q I D N O : 1 5 7 8) 、 S K T G A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 7 9) 、 S K T D A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 8 0) 、 S K T E A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 8 1) 、 S K T P A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 8 2) 、 S K T H A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 8 3) 、 S K T Q A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 8 4) 、 S K T I A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 8 5) 、 S K T M A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 8 6) 、 S K T R A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 8 7) 、 S K T N A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 8 8) 、 S K T V G R N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 8 9) 、 S K T A D R N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 5 9 0) 、 S K K L S Q N N N S K Y S W Q G (S E Q I D N O : 1 5 9 1) 、 S K P T T G N N N S D Y S W P G (S E Q I D N O : 1 5 9 2) 、 S T Q K N E N N N S N Y S W P G (S E Q I D N O : 1 5 9 3) 、 H K D D E G K F (S E Q I D N O : 1 5 9 4) 、 H K D D N R K F (S E Q I D N O : 1 5 9 5) 、 H K D D T N K F (S E Q I D N O : 1 5 9 6) 、 H E D S D K N F (S E Q I D N O : 1 5 9 7) 、 H R D G A D S F (S E Q I D N O : 1 5 9 8) 、 H G D N K S R F (S E Q I D N O : 1 5 9 9) 、 K Q G S E K T N V D F E E V (S E Q I D N O : 1 6 0 0) 、 K Q G S E K T N V D S E E V (S E Q I D N O : 1 6 0 1) 、 K Q G S E K T N V D V E E V (S E Q I D N O : 1 6 0 2) 、 K Q G S D K T N V D D A G V (S E Q I D N O : 1 6 0 3) 、 K Q G S S K T N V D P R E V (S E Q I D N O : 1 6 0 4) 、 K Q G S R K T N V D H K Q V (S E Q I D N O : 1 6 0 5) 、 K Q G S K G G N V D T N R V (S E Q I D N O : 1 6 0 6) 、 K Q G S G E A N V D N G D V (S E Q I D N O : 1 6 0 7) 、 K Q D A A D N I D Y D H V (S E Q I D N O : 1 6 0 8) 、 K Q S G T R S N A A S S V (S E Q I D N O : 1 6 0 9) 、 K E N T N T N D T E L T N V (S E Q I D N O : 1 6 1 0) 、 Q R G N N V A A T A D V N T (S E Q I D N O : 1 6 1 1) 、 Q R G N N E A A T A D V N T (S E Q I D N O : 1 6 1 2) 、 Q R G N N P A A T A D V N T (S E Q I D N O : 1 6 1 3) 、 Q R G N N H A A T A D V N T (S E Q I D N O : 1 6 1 4) 、 Q E E N N I A A T P G V N T (S E Q I D N O : 1 6 1 5) 、 Q P P N N M A A T H E V N T (S E Q I D N O : 1 6 1 6) 、 Q H H N N S A A T T I V N T (S E Q I D N O : 1 6 1 7) 、 Q T T N N R A A F N M V E T (S E Q I D N O : 1 6 1 8) 、 Q K K N N A A S K K V A T (S E Q I D N O : 1 6 1 9) 、 Q G G N N K A A D D A V K T (S E Q I D N O : 1 6 2 0) 、 Q A A K G G A A D D A V K T (S E Q I D N O : 1 6 2 1) 、 Q D D R A A A A N E S V D T (S E Q I D N O : 1 6 2 2) 、 Q Q Q H D D A A Y Q R V H T (S E Q I D N O : 1 6 2 3) 、 Q S S S S L A A V S T V Q T (S E Q I D N O : 1 6 2 4) 、 Q N N Q T T A A I R N V T T (S E Q I D N O : 1 6 2 5) 、 N Y N K K S D N V D F T (S E Q I D N O : 1 6 2 6) 、 N Y N K K S E N V D F T (S E Q I D N O : 1 6 2 7) 、 N Y N K K S L N V D F T (S E Q I D N O : 1 6 2 8) 、 N Y N K K S P N V D F T (S E Q I D N O : 1 6 2 9) 、 N Y S K K S H C V D F T (S E Q I D N O : 1 6 3 0) 、 N Y R K T I Y V D F T (S E Q I D N O : 1 6 3 1) 、 N Y K E K K D V H F T (S E Q I D N O : 1 6 3 2) 、 N Y G H R A I V Q F T (S E Q I D N O : 1 6 3 3) 、 N Y A N H Q F V V C T (S E Q I D N O : 1 6 3 4) 、 N Y D D D P T G V L L T (S E Q I D N O : 1 6 3 5) 、 N Y D D P T G V L L T (S E Q I D N O : 1 6 3 6) 、 N F E Q Q N S V E W T (S E Q I D N O : 1 6 3 7) 、 S Q S G A S N (S E Q I D N O : 1 6 3 8) 、 N N G S Q A (S E Q I D N O : 1 6 3 9) 、 Y Y L S R T N T P S G T T T W S R L Q F S Q A G A (S E Q I D N O : 1 6 4 0) 、 S K T S A D N N N S E Y S W T G (S E Q I D N O : 1 6 4 1) 、 H K D D E E K F (S E Q I D N O : 1 6 4 2) 、 K Q G S E K T N V D I E E V (S E Q I D N O : 1 6 4 3) 、 Q R G N N Q A A T A D V N T (S E Q I D N O : 1 6 4 4) 、 N Y N K K S V N V D F T (S E Q I D N O : 1 6 4 5) 、 S Q S G A S N Y N T P S G T T T

QSRLQFSTADNNNSEYSWGATKYH (SEQ ID NO:1646)、SASGASNFNSEGGSLTQSSLGFSTDGENNNSDF
SWGATKYH (SEQ ID NO:1647)、SQSGASNYNTPSGTTTQSRLQFSTDGENNNSDFSWGATKYH (SEQ ID
NO:1648)、SASGASNYNTPSGTTTQSRLQFSTADNNNSEFSWPGATTYH (SEQ ID NO:1649)、SQSGASNF
NSEGGSLTQSSLGFSTDGENNNSDFSWGATKYH (SEQ ID NO:1650)、SASGASNYNTPSGSLTQSSLGFSTD
GENNNSDFSWGATKYH (SEQ ID NO:1651)、SQSGASNYNTPSGTTTQSRLQFSTADNNNSDFSWGATKYH
(SEQ ID NO:1652)、SGAGASNFNSEGGSLTQSSLGFSTDGENNNSDFSWGATKYH (SEQ ID NO:1653)、
SGAGASN (SEQ ID NO:1654)、NSEGGSLTQSSLGFS (SEQ ID NO:1655)、TDGENNNSDFS (SEQ ID
NO:1656)、SEFSWPGATT (SEQ ID NO:1657)、TSADNNNSDFSWT (SEQ ID NO:1658)、SQSGASNY
(SEQ ID NO:1659)、NTPSGTTTQSRLQFS (SEQ ID NO:1660)、TSADNNNSEYSWGATKYH (SEQ ID
NO:1661)、SASGASNF (SEQ ID NO:1662)、TDGENNNSDFSWGATKYH (SEQ ID NO:1663)、
SASGASNY (SEQ ID NO:1664)、TSADNNNSEFSWPGATTYH (SEQ ID NO:1665)、NTPSGSLTQSSLGFS
(SEQ ID NO:1666)、TSADNNNSDFSWGATKYH (SEQ ID NO:1667)、SGAGASNF (SEQ ID NO:
1668)、CTCCAGVVSVVSMRSRVCVNSGCAGCTDHCVSRNSGTCVMSACACAA (SEQ ID NO:1669)、CTCCA
GAGAGGCAACAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAA (SEQ ID NO:1670)、SAAGASN (SEQ ID
NO:1671)、YFLSRTNTESGSTTQSTLRFSQAG (SEQ ID NO:1672)、SKTSADNNNSDFS (SEQ ID NO:
1673)、KQGSEKTDVDIDKV (SEQ ID NO:1674)、STAGASN (SEQ ID NO:1675)、
YFLSRTNTTSGIETQSTLRFSQAG (SEQ ID NO:1676)、SKTDGENNNSDFS (SEQ ID NO:1677)、
KQGAAADDVEIDGV (SEQ ID NO:1678)、SEAGASN (SEQ ID NO:1679)、
YYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAG (SEQ ID NO:1680)、SKTSADNNNSEYS (SEQ ID NO:1681)、
KQGSEKTNVDIEKV (SEQ ID NO:1682)、YFLSRTNDASGSDTKSTLLFSQAG (SEQ ID NO:1683)、
STTPSENNNSEYS (SEQ ID NO:1684)、SAAGATN (SEQ ID NO:1685)、
YFLSRTNGEAGSATLSELRFSQAG (SEQ ID NO:1686)、HGDDADRF (SEQ ID NO:1687)、
KQGAEKSDVEVDRV (SEQ ID NO:1688)、KQDSGGDNIDIDQV (SEQ ID NO:1689)、SDAGASN (SEQ ID
NO:1690)、YFLSRTNTEGGHDTQSTLRFSQAG (SEQ ID NO:1691)、KEDGGGSDVAIDEV (SEQ ID NO:
1692)、SNAGASN (SEQ ID NO:1693)和YFLSRTNGEAGSATLSELRFSQPG (SEQ ID NO:1694)。可以
编码氨基酸突变位点的核苷酸序列的非限制性实例包括以下:SEQ ID NO:1695、SEQ ID
NO:1696、SEQ ID NO:1697、SEQ ID NO:1698、SEQ ID NO:1699、SEQ ID NO:1700、SEQ ID
NO:1701、SEQ ID NO:1702、SEQ ID NO:1703、SEQ ID NO:1704、SEQ ID NO:1705、SEQ ID
NO:1706、SEQ ID NO:1707、SEQ ID NO:1708、SEQ ID NO:1709、SEQ ID NO:1710、
AGCAGGAGCTCCTTGGCCTCAGCGTGCGAG (US20160369298的SEQ ID NO:264;在本文中是SEQ ID
NO:1711)、SEQ ID NO:1712、SEQ ID NO:1713、SEQ ID NO:1714、SEQ ID NO:1715、SEQ ID
NO:1716和SEQ ID NO:1717。

[0509] 在一些实施方案中,AAV血清型可以包含如国际专利公布W02016134375(其内容以
全文引用的方式并入本文中)所描述的眼部细胞靶向肽,诸如但不限于W02016134375的SEQ
ID NO:9和SEQ ID NO:10。此外,W02016134375中所描述的眼部细胞靶向肽或氨基酸中的任
一者可以插入任何亲代AAV血清型中,诸如但不限于AAV2(W02016134375的SEQ ID NO:8;在
本文中是SEQ ID NO:1718)或AAV9(W02016134375的SEQ ID NO:11;在本文中是SEQ ID NO:
1719)。在一些实施方案中,在AAV2蛋白中的P34-A35、T138-A139、A139-P140、G453-T454、
N587-R588和/或R588-Q589处进行修饰,诸如插入。在某些实施方案中,在AAV9的D384、

G385、1560、T561、N562、E563、E564、E565、N704和/或Y705处进行插入。眼部细胞靶向肽可以是但不限于以下氨基酸序列中的任一者：GSTPPPM(W02016134375的SEQ ID NO:1；在本文中是SEQ ID NO:1720)或GETRAPL(W02016134375的SEQ ID NO:4；在本文中是SEQ ID NO:1721)。

[0510] 在一些实施方案中，可以如美国公布US 20170145405(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述来修饰AAV血清型。AAV血清型可以包括经修饰的AAV2(例如，Y444F、Y500F、Y730F和/或S662V处的修饰)、经修饰的AAV3(例如，Y705F、Y731F和/或T492V处的修饰)和经修饰的AAV6(例如，S663V和/或T492V处的修饰)。

[0511] 在一些实施方案中，可以如国际公布W02017083722(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述来修饰AAV血清型。AAV血清型可以包括AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3(Y705+731F)、AAV5、AAV 5(Y436+693+719F)、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)和AAV10(Y733F)。

[0512] 在一些实施方案中，如国际专利公布W02017015102(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述，AAV血清型可以包含含有氨基酸SPAKFA(W02017015102的SEQ ID NO:24；在本文中是SEQ ID NO:1722)或NKDKLN(W02017015102的SEQ ID NO:2；在本文中是SEQ ID NO:1723)的经工程改造的表位。表位可以插入AAV8(W02017015102的SEQ ID NO:3)的VP1衣壳的氨基酸665至670(基于编号)和/或AAV3B(SEQ ID NO:3)的残基664至668的区域中。

[0513] 在一些实施方案中，AAV血清型可以是或可以具有如国际专利公布W02017058892(其内容以全文引用的方式并入本文中)的序列，诸如但不限于具有在以下一者或多者(例如，2、3、4、5、6或7者)处包含取代的衣壳蛋白的AAV变体：任何组合形式的AAV1的氨基酸残基262-268、370-379、451-459、472-473、493-500、528-534、547-552、588-597、709-710、716-722，或AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAVrh32.33、牛AAV或禽AAV中的等效氨基酸残基。氨基酸取代可以是但不限于W02017058892中所描述的氨基酸序列中的任一者。在一些实施方案中，AAV可以在以下残基处包含氨基酸取代：任何组合形式的AAV1(W02017058892的SEQ ID NO:1)的256L、258K、259Q、261S、263A、264S、265T、266G、272H、385S、386Q、S472R、V473D、N500E、547S、709A、710N、716D、717N、718N、720L、A456T、Q457T、N458Q、K459S、T492S、K493A、S586R、S587G、S588N、T589R和/或722T；任何组合形式的AAV5(W02017058892的SEQ ID NO:5)的244N、246Q、248R、249E、250I、251K、252S、253G、254S、255V、256D、263Y、377E、378N、453L、456R、532Q、533P、535N、536P、537G、538T、539T、540A、541T、542Y、543L、546N、653V、654P、656S、697Q、698F、704D、705S、706T、707G、708E、709Y和/或710R；任何组合形式的AAV5(W02017058892的SEQ ID NO:5)的248R、316V、317Q、318D、319S、443N、530N、531S、532Q、533P、534A、535N、540A、541T、542Y、543L、545G、546N、697Q、704D、706T、708E、709Y和/或710R；任何组合形式的AAV6(W02017058892的SEQ ID NO:6)的264S、266G、269N、272H、457Q、588S和/或589I；任何组合形式的AAV8(W02017058892的SEQ ID NO:8)的457T、459N、496G、499N、500N、589Q、590N和/或592A；任何组合形式的AAV9(W02017058892的SEQ ID NO:9)的451I、452N、453G、454S、455G、456Q、457N和/或458Q。

[0514] 在一些实施方案中，如国际公布号W0 2017066764(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述，AAV可以包括在VP1的位置155、156和157处或VP2的位置17、18、19和20处的

氨基酸序列。氨基酸序列可以是但不限于N-S-S、S-X-S、S-S-Y、N-X-S、N-S-Y、S-X-Y及N-X-Y,其中N、X和Y独立地是但不限于非丝氨酸或非苏氨酸氨基酸,其中AAV可以是但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。在一些实施方案中,AAV可以包括在VP1的位置156、157或158处或VP2的位置19、20或21处的至少一个氨基酸的缺失,其中AAV可以是但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。

[0515] 在一些实施方案中,AAV可以通过如Deverman等(Nature Biotechnology 34(2):204-209(2016)) (其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的基于Cre重组的AAV靶向进化(CREATE)产生的血清型。在一些实施方案中,与其它AAV血清型相比,以这种方式产生的AAV血清型具有改善的CNS转导和/或神经元和星状细胞趋向性。作为非限制性实例,AAV血清型可以包括肽,诸如但不限于PHP.B、PHP.B2、PHP.B3、PHP.A、PHP.S、G2A12、G2A15、G2A3、G2B4和G2B5。在一些实施方案中,这些AAV血清型可以是在氨基酸588-589之间具有7-氨基酸插入物的AAV9(SEQ ID NO:11或138)衍生物。这些7-氨基酸插入物的非限制性实例包括TLAVPFK(PHP.B;SEQ ID NO:1262)、SVSKPFL(PHP.B2;SEQ ID NO:1270)、FTLTTPK(PHP.B3;SEQ ID NO:1271)、YTLSQGW(PHP.A;SEQ ID NO:1277)、QAVRTSL(PHP.S;SEQ ID NO:1321)、LAKERLS(G2A3;SEQ ID NO:1322)、MNSTKNV(G2B4;SEQ ID NO:1323)和/或VSGGHHS(G2B5;SEQ ID NO:1324)。

[0516] 在一些实施方案中,AAV血清型可以如Jackson等(Frontiers in Molecular Neuroscience 9:154(2016))所描述,其内容以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,AAV血清型是PHP.B或AAV9。在一些实施方案中,与使用更泛在启动子(例如,CBA或CMV)时相比,AAV血清型与突触蛋白启动子配对以增强神经元转导。

[0517] 在一些实施方案中,AAV血清型是包含AAVPHP.N(PHP.N)肽的血清型或其变体。在一些实施方案中,AAV血清型是包含AAVPHP.B(PHP.B)肽的血清型或其变体。在一些实施方案中,AAV血清型是包含AAVPHP.A(PHP.A)肽的血清型或其变体。在一些实施方案中,AAV血清型是包含PHP.S肽的血清型或其变体。在一些实施方案中,AAV血清型是包含PHP.B2肽的血清型或其变体。在一些实施方案中,AAV血清型是包含PHP.B3肽的血清型或其变体。在一些实施方案中,AAV血清型是包含G2B4肽的血清型或其变体。在一些实施方案中,AAV血清型是包含G2B5肽的血清型或其变体。在一些实施方案中,AAV血清型是VOY101或其变体。在一些实施方案中,AAV血清型是VOY201或其变体。

[0518] 在一些实施方案中,AAV粒子,例如用于本文所描述的GBA蛋白的载体化递送的AAV粒子的AAV血清型,是AAV9或其变体。在一些实施方案中,AAV粒子,例如本文所描述的重组AAV粒子,包含AAV9衣壳蛋白。在一些实施方案中,AAV9衣壳蛋白包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码AAV9衣壳蛋白的核酸序列包含SEQ ID NO:137的核苷酸序列。在一些实施方案中,AAV9衣壳蛋白包含与SEQ ID NO:138至少70%,例如70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码AAV9衣壳蛋白的核酸序列包含与SEQ ID NO:137至少70%,例如70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%同一的核苷酸序列。

[0519] 在一些实施方案中,衣壳蛋白包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或与其大体上相

同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含相对于SEQ ID NO:11的氨基酸序列包含至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰,例如取代的氨基酸序列,任选地前提条件是位置449不包括K,例如,是R。

[0520] 在一些实施方案中,衣壳蛋白包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列包含至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰,例如取代的氨基酸序列。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含由SEQ ID NO:2的核苷酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列编码的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码衣壳蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的序列。

[0521] 在一些实施方案中,衣壳蛋白,例如AAV9衣壳蛋白,包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含相对于SEQ ID NO:138的氨基酸序列包含至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰,例如取代的氨基酸序列。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含由SEQ ID NO:137的核苷酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列编码的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码衣壳蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:137的核苷酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含根据SEQ ID NO:138编号在位置K449处的取代,例如,K449R取代。

[0522] 在一些实施方案中,衣壳蛋白包含含有TLAVPFK (SEQ ID NO:1262) 的氨基酸序列的插入物。在一些实施方案中,相对于根据SEQ ID NO:138编号的参考序列,插入物紧接在位置588之后存在。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含根据SEQ ID NO:138编号的A587D和Q588G的氨基酸取代。

[0523] 在一些实施方案中,衣壳蛋白包含根据SEQ ID NO:138编号的K449R的氨基酸取代;以及包含TLAVPFK (SEQ ID NO:1262) 的氨基酸序列的插入物,其中相对于根据SEQ ID NO:138编号的参考序列,所述插入物紧接在位置588之后存在。

[0524] 在一些实施方案中,衣壳蛋白包含根据SEQ ID NO:138编号的K449R的氨基酸取代;包含TLAVPFK (SEQ ID NO:1262) 的氨基酸序列的插入物,其中相对于根据SEQ ID NO:138编号的参考序列,所述插入物紧接在位置588之后存在;以及根据SEQ ID NO:138编号的A587D和Q588G的氨基酸取代。

[0525] 在一些实施方案中,衣壳蛋白包含含有TLAVPFK (SEQ ID NO:1262) 的氨基酸序列的插入物,其中相对于根据SEQ ID NO:138编号的参考序列,所述插入物紧接在位置588之后存在;以及根据SEQ ID NO:138编号的A587D和Q588G的氨基酸取代。

[0526] 在一些实施方案中,AAV粒子,例如用于本文所描述的抗体分子(例如,抗 β -淀粉样蛋白抗体分子)的载体化递送的AAV粒子的AAV血清型,是AAV9K449R或其变体。在一些实施

方案中, AAV粒子包含AAV9K449衣壳蛋白。在一些实施方案中, AAV9K449R衣壳蛋白包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一些实施方案中, AAV9K449R衣壳蛋白包含与SEQ ID NO:11至少70%, 例如70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%同一的氨基酸序列。

[0527] 在一些实施方案中, AAV粒子, 例如用于本文所描述的GBA蛋白的载体化递送的AAV粒子的AAV衣壳, 允许在静脉内施用后穿透血脑屏障。此类AAV衣壳的非限制性实例包括AAV9、AAV9K449R、VOY101、VOY201或包含肽插入物的AAV衣壳, 诸如但不限于AAVPHP.N (PHP.N)、AAVPHP.B (PHP.B)、PHP.S、G2A3、G2B4、G2B5、G2A12、G2A15、PHP.B2、PHP.B3、AAV2.BR1或AAVPHP.A (PHP.A)。

[0528] 在一些实施方案中, 选择AAV血清型以供使用, 这是归因于其对中枢神经系统的细胞的趋向性。在一些实施方案中, 中枢神经系统的细胞是神经元。在另一个实施方案中, 中枢神经系统的细胞是星状细胞。

[0529] 在一些实施方案中, 选择AAV血清型以供使用, 这是归因于其对肌肉细胞的趋向性。

[0530] 在一些实施方案中, 用于AAV VP1衣壳蛋白翻译的起始密码子可以是CTG、TTG或GTG, 如美国专利号US8163543中所描述, 其内容以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中, 相对于SEQ ID NO:137的核苷酸序列, 编码衣壳蛋白, 例如VP1衣壳蛋白的核苷酸序列包含3-20个突变(例如, 取代), 例如, 3-15个突变、3-10个突变、3-5个突变、5-20个突变、5-15个突变、5-10个突变、10-20个突变、10-15个突变、15-20个突变、3个突变、5个突变、10个突变、12个突变、15个突变、18个突变或20个突变。

[0531] 本公开涉及由衣壳(Cap)基因编码的结构衣壳蛋白(包括VP1、VP2和VP3)。这些衣壳蛋白形成病毒载体(诸如AAV)的外部蛋白结构外壳(即, 衣壳)。由Cap多核苷酸合成的VP衣壳蛋白一般包括甲硫氨酸作为肽序列中的第一个氨基酸(Met1), 其与相应Cap核苷酸序列中的起始密码子(AUG或ATG)相关。然而, 第一个甲硫氨酸(Met1)残基或一般任何第一个氨基酸(AA1)通常在多肽合成之后或期间由蛋白质加工酶, 诸如Met-氨基肽酶裂解去除。这种“Met/AA剪短”过程通常与多肽序列中的第二个氨基酸(例如, 丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸等)的相应乙酰化相关联。Met剪短通常发生在VP1和VP3衣壳蛋白上, 但还可能发生在VP2衣壳蛋白上。

[0532] 在Met/AA剪短不完全的情况下, 可以生产一种或多种(一种、两种或三种)包含病毒衣壳的VP衣壳蛋白的混合物, 其中一些可以包括Met1/AA1氨基酸(Met+/AA+)并且其中一些由于Met/AA剪短(Met-/AA-)而可能缺乏Met1/AA1氨基酸。关于衣壳蛋白中的Met/AA剪短的进一步论述, 参见Jin等, Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins. Hum Gene Ther Methods. 2017年10月28(5):255-267; Hwang等, N-Terminal Acetylation of Cellular Proteins Creates Specific Degradation Signals. Science. 2010年2月19日. 327(5968):973-977; 其内容各自以全文引用的方式并入本文中。

[0533] 根据本公开, 提及衣壳蛋白不限于剪短的(Met-/AA-)或未剪短的(Met+/AA+), 并且在上下文中可以指独立衣壳蛋白, 由衣壳蛋白的混合物组成的病毒衣壳, 和/或编码、描

述、生产或促成本公开的衣壳蛋白的多核苷酸序列(或其片段)。直接提及“衣壳蛋白”或“衣壳多肽”(诸如VP1、VP2或VP2)还可以包括VP衣壳蛋白,其包括Met1/AA1氨基酸(Met+/AA+)以及相应VP衣壳蛋白,所述衣壳蛋白由于Met/AA剪短(Met-/AA-)而缺乏Met1/AA1氨基酸。

[0534] 进一步根据本公开,提及分别包含或编码一种或多种包括Met1/AA1氨基酸(Met+/AA+)的衣壳蛋白的特异性“SEQ ID NO:”(无论是蛋白质还是核酸)应理解为教示缺乏Met1/AA1氨基酸的VP衣壳蛋白,这是因为在检视序列后,仅缺乏第一个所列氨基酸(无论是Met1/AA1与否)的任何序列是显而易见的。

[0535] 作为一个非限制性实例,提及长度为736个氨基酸并且包括由AUG/ATG起始密码子编码的“Met1”氨基酸(Met+)的VP1多肽序列还可以理解为教示长度为735个氨基酸并且不包括736个氨基酸的Met+序列的“Met1”氨基酸(Met-)的VP1多肽序列。作为第二个非限制性实例,提及长度为736个氨基酸并且包括由任何NNN起始密码子编码的“AA1”氨基酸(AA1+)的VP1多肽序列还可以理解为教示长度为735个氨基酸并且不包括736个氨基酸的AA1+序列的“AA1”氨基酸(AA1-)的VP1多肽序列。

[0536] 提及由VP衣壳蛋白形成的病毒衣壳(诸如提及特异性AAV衣壳血清型)可以合并包括Met1/AA1氨基酸(Met+/AA1+)的VP衣壳蛋白、由于Met/AA1剪短(Met-/AA1-)而缺乏Met1/AA1氨基酸的相应VP衣壳蛋白,以及它们的组合(Met+/AA1+和Met-/AA1-)。

[0537] 作为一个非限制性实例,AAV衣壳血清型可以包括VP1(Met+/AA1+)、VP1(Met-/AA1-),或VP1(Met+/AA1+)与VP1(Met-/AA1-)的组合。AAV衣壳血清型还可以包括VP3(Met+/AA1+)、VP3(Met-/AA1-),或VP3(Met+/AA1+)与VP3(Met-/AA1-)的组合;并且还可以包括VP2(Met+/AA1)与VP2(Met-/AA1-)的类似任选的组合。

[0538] AAV病毒基因组

[0539] 在一些方面,本公开的AAV粒子用作包含编码GCase蛋白的病毒基因组的表达载体。病毒基因组可以编码GCase蛋白和增强型,例如,鞘脂激活蛋白原(PSAP)或鞘脂激活蛋白(Sap)多肽或其功能变体(例如,SapA蛋白或SapC蛋白)、细胞穿透肽(例如,ApoEII肽、TAT肽或ApoB肽)、溶酶体靶向序列(LTS)或它们的组合。在一些实施方案中,表达载体不限于AAV并且可以是腺病毒、反转录病毒、慢病毒、质粒、载体或其任何变体。

[0540] 在一些实施方案中,AAV粒子,例如用于本文所描述的GBA蛋白的载体化递送的AAV粒子,包含病毒基因组,例如AAV病毒基因组(例如,载体基因组或AAV载体基因组)。在一些实施方案中,病毒基因组,例如AAV病毒基因组,还包含反向末端重复(ITR)区、增强子、启动子、内含子区、Kozak序列、外显子区、编码在存在或不存在增强元件的情况下编码有效载荷(例如,本文所描述的GBA蛋白)的转基因的核酸、编码miR结合位点(例如,miR183结合位点)的核苷酸序列、聚A信号区或它们的组合。

[0541] 病毒基因组组件:反向末端重复(ITR)

[0542] 在一些实施方案中,病毒基因组可以包含至少一个反向末端重复(ITR)区。本公开的AAV粒子包含具有至少一个ITR区和有效载荷区的病毒基因组。在一些实施方案中,病毒基因组具有两个ITR。这两个ITR在5'和3'端位于有效载荷区两侧。在一些实施方案中,ITR用作包含用于复制的识别位点的复制起点。在一些实施方案中,ITR包含可以互补并且对称排列的序列区。在一些实施方案中,并入本文所描述的病毒基因组中的ITR可以由天然存在的多核苷酸序列或源自重组的多核苷酸序列组成。

[0543] ITR可以来源于与衣壳相同的血清型,选自表1中所列的血清型中的任一者,或其衍生物。ITR可以具有与衣壳不同的血清型。在一些实施方案中,AAV粒子具有多于一个ITR。在一个非限制性实例中,AAV粒子具有包含两个ITR的病毒基因组。在一些实施方案中,ITR彼此具有相同血清型。在另一个实施方案中,ITR具有不同血清型。非限制性实例包括与衣壳具有相同血清型的零个、一个或两个ITR。在一些实施方案中,AAV粒子的病毒基因组的两个ITR都是AAV2ITR。

[0544] 独立地,每个ITR的长度可以为约100至约150个核苷酸。在一些实施方案中,ITR包含100-180个核苷酸的长度,例如,约100-115、约100-120、约100-130、约100-140、约100-150、约100-160、约100-170、约100-180、约110-120、约110-130、约110-140、约110-150、约110-160、约110-170、约110-180、约120-130、约120-140、约120-150、约120-160、约120-170、约120-180、约130-140、约130-150、约130-160、约130-170、约130-180、约140-150、约140-160、约140-170、约140-180、约150-160、约150-170、约150-180、约160-170、约160-180或约170-180个核苷酸的长度。在一些实施方案中,ITR包含约120-140个核苷酸的长度,例如,约130个核苷酸的长度。在一些实施方案中,ITR的长度为140-142个核苷酸,例如,长度为141个核苷酸。在一些实施方案中,ITR包含1205-135个核苷酸的长度,例如,130个核苷酸的长度。ITR长度的非限制性实例为102、130、140、141、142、145个核苷酸的长度,以及与其具有至少95%一致性的那些。

[0545] 在一些实施方案中,每个ITR的长度可以为141个核苷酸。在一些实施方案中,每个ITR的长度可以为130个核苷酸。在一些实施方案中,AAV粒子包含两个ITR,并且一个ITR的长度为141个核苷酸并且另一个ITR的长度为130个核苷酸。

[0546] 在一些实施方案中,ITR包含SEQ ID NO:1829、1830或1862中的任一者的核苷酸序列,或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%同一)的核苷酸序列。在一些实施方案中,ITR包含SEQ ID NO:1860、1861、1863或1864中的任一者的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1860、1861、1863或1864具有一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的核苷酸序列。

[0547] 病毒基因组组件:启动子和表达增强子

[0548] 在一些实施方案中,病毒基因组的有效载荷区包含至少一个增强转基因靶特异性和表达的元件。参见例如Powell等Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy,2015;其内容以全文引用的方式并入本文中。增强转基因靶特异性和表达的元件的非限制性实例包括启动子、内源miRNA、转录后调控元件(PRE)、聚腺苷酸化(聚A)信号序列、上游增强子(USE)、CMV增强子和内含子。

[0549] 在一些实施方案中,靶细胞中多肽的表达可以由特异性启动子驱动,包括但不限于物种特异性、诱导性、组织特异性或细胞周期特异性启动子(Parr等,Nat.Med.3:1145-9(1997);其内容以全文引用的方式并入本文中)。

[0550] 在一些实施方案中,病毒基因组包含足以表达,例如在靶细胞中由转基因编码的有效载荷(例如,GBA蛋白)的基因组。在一些实施方案中,当启动子驱动在AAV粒子的病毒基因组的有效载荷区中编码的多肽的表达时,所述启动子视为有效的。

[0551] 在一些实施方案中,当启动子驱动所靶向的细胞或组织中的表达时,所述启动子

是视为有效的启动子。

[0552] 在一些实施方案中,启动子驱动所靶向的组织中GCase、GCase和SapA,或GCase和SapC蛋白的表达,持续一段时间。由启动子驱动的表达可以持续1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、15天、16天、17天、18天、19天、20天、3周、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或10年以上。表达可以持续1-5小时、1-12小时、1-2天、1-5天、1-2周、1-3周、1-4周、1-2个月、1-4个月、1-6个月、2-6个月、3-6个月、3-9个月、4-8个月、6-12个月、1-2年、1-5年、2-5年、3-6年、3-8年、4-8年或5-10年。

[0553] 在一些实施方案中,启动子驱动多肽(例如,GCase多肽、GCase多肽和鞘脂激活蛋白原(PSAP)多肽、GCase多肽和SapA多肽、GCase多肽和SapC多肽、GCase多肽和细胞穿透肽(例如,ApoEIII肽、TAT肽和/或ApoB肽),或GCase多肽和溶酶体靶向肽)的表达,持续至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50年、55年、60年、65年或65年以上。

[0554] 启动子可以是天然存在的或非天然存在的。启动子的非限制性实例包括病毒启动子、植物启动子和哺乳动物启动子。在一些实施方案中,启动子可以是人类启动子。在一些实施方案中,启动子可以是截短的。

[0555] 在一些实施方案中,病毒基因组包含促成在一个或多个,例如多个细胞和/或组织中表达的启动子,例如,泛在启动子。在一些实施方案中,驱动或促进在大多数哺乳动物组织中表达的启动子包括但不限于人类延伸因子1 α -亚单位(EF1 α)、巨细胞病毒(CMV)立即早期增强子和/或启动子、鸡 β -肌动蛋白(CBA)及其衍生物CAG、 β 葡萄糖醛酸苷酶(GUSB)和泛素C(UBC)。组织特异性表达元件可以用于将表达限于某些细胞类型,诸如但不限于CNS特异性启动子、B细胞启动子、单核细胞启动子、白细胞启动子、巨噬细胞启动子、胰腺腺泡细胞启动子、内皮细胞启动子、肺组织启动子、星状细胞启动子,或可以用于将表达限于例如神经元、星状细胞或少突细胞的各种特异性神经系统细胞或组织类型启动子。

[0556] 在一些实施方案中,病毒基因组包含神经系统特异性启动子,例如,促成在神经元、星状细胞和/或少突细胞中有效载荷的表达的启动子。神经元的组织特异性表达元件的非限制性实例包括神经元特异性烯醇酶(NSE)、血小板源性生长因子(PDGF)、血小板源性生长因子B链(PDGF- β)、突触蛋白(Syn)、突触蛋白1(Syn1)、甲基-CpG结合蛋白2(MeCP2)、Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMKII)、代谢型谷氨酸受体2(mGluR2)、神经丝轻(NFL)或重(NFH)、 β -球蛋白小基因n β 2、前脑啡肽原(PPE)、脑啡肽(Enk)和兴奋性氨基酸转运子2(EAAT2)启动子。星状细胞的组织特异性表达元件的非限制性实例包括神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和EAAT2启动子。少突细胞的组织特异性表达元件的非限制性实例包括髓鞘碱

性蛋白 (MBP) 启动子。朊病毒启动子代表可用于驱动CNS组织中的蛋白质表达的额外组织特异性启动子 (参见Loftus, Stacie K.等, Human molecular genetics 11.24(2002):3107-3114, 其公开内容以全文引用的方式并入)。

[0557] 在一些实施方案中, 启动子可以小于1kb。启动子的长度可以为200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800个或超过800个核苷酸。启动子的长度可以在200-300、200-400、200-500、200-600、200-700、200-800、300-400、300-500、300-600、300-700、300-800、400-500、400-600、400-700、400-800、500-600、500-700、500-800、600-700、600-800或700-800个核苷酸之间。

[0558] 在一些实施方案中, 启动子可以是相同或不同起始或亲代启动子的两个或更多个组件, 诸如但不限于CMV和CBA的组合。每个组件的长度可以为200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800个或超过800个核苷酸。每个组件的长度可以在200-300、200-400、200-500、200-600、200-700、200-800、300-400、300-500、300-600、300-700、300-800、400-500、400-600、400-700、400-800、500-600、500-700、500-800、600-700、600-800或700-800个核苷酸之间。在一些实施方案中, 启动子是382个核苷酸的CMV增强子序列和260个核苷酸的CBA启动子序列的组合。

[0559] 在一些实施方案中, 病毒基因组包含泛在启动子。泛在启动子的非限制性实例包括CMV、CBA (包括衍生物CAG、CB6、CBh等)、EF-1 α 、PGK、UBC、GUSB (hGBp) 和UCOE (HNRPA2B1-CBX3的启动子)。在一些实施方案中, 病毒基因组包含EF-1 α 启动子或EF-1 α 启动子变体。

[0560] 在一些实施方案中, 启动子是泛在启动子, 如Yu等 (Molecular Pain 2011, 7:63)、Soderblom等 (E. Neuro 2015)、Gill等 (Gene Therapy 2001, 第8卷, 1539-1546) 和Husain等 (Gene Therapy 2009) 所描述, 每篇文献以全文引用的方式并入。

[0561] 在一些实施方案中, 启动子不是细胞特异性的。

[0562] 在一些实施方案中, 启动子是泛素c (UBC) 启动子。UBC启动子的大小可以为300-350个核苷酸。作为一个非限制性实例, UBC启动子是332个核苷酸。在一些实施方案中, 启动子是 β -葡萄糖醛酸苷酶 (GUSB) 启动子。GUSB启动子的大小可以为350-400个核苷酸。作为一个非限制性实例, GUSB启动子是378个核苷酸。在一些实施方案中, 启动子是神经丝轻 (NFL) 启动子。NFL启动子的大小可以为600-700个核苷酸。作为一个非限制性实例, NFL启动子是650个核苷酸。在一些实施方案中, 启动子是神经丝重 (NFH) 启动子。NFH启动子的大小可以为900-950个核苷酸。作为一个非限制性实例, NFH启动子是920个核苷酸。在一些实施方案中, 启动子是scn8a启动子。scn8a启动子的大小可以为450-500个核苷酸。作为一个非限制性实例, scn8a启动子是470个核苷酸。

[0563] 在一些实施方案中, 启动子是磷酸甘油酸激酶1 (PGK) 启动子。

[0564] 在一些实施方案中, 启动子是鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子或其功能变体。

[0565] 在一些实施方案中, 启动子是CB6启动子或其功能变体。

[0566] 在一些实施方案中,启动子是CB启动子或其功能变体。在一些实施方案中,启动子是最小CB启动子或其功能变体。

[0567] 在一些实施方案中,启动子是CBA启动子或其功能变体。在一些实施方案中,启动子是最小CBA启动子或其功能变体。

[0568] 在一些实施方案中,启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子或其功能变体。

[0569] 在一些实施方案中,启动子是CAG启动子或其功能变体。

[0570] 在一些实施方案中,启动子是EF1 α 启动子或其功能变体。

[0571] 在一些实施方案中,启动子是GFAP启动子(例如,如Zhang,Min等,Journal of neuroscience research 86.13(2008):2848-2856所描述,其公开内容以全文引用的方式并入)以驱动星状细胞中GCase多肽,或GCase多肽和增强元件的表达(例如,GCase和SapA,或GCase和SapC蛋白表达)。

[0572] 在一些实施方案中,启动子是突触蛋白启动子或其功能变体。

[0573] 在一些实施方案中,启动子是RNA pol III启动子。作为一个非限制性实例,RNA pol III启动子是U6。作为一个非限制性实例,RNA pol III启动子是U1。

[0574] 在一些实施方案中,病毒基因组包含两个启动子。作为一个非限制性实例,启动子是EF1 α 启动子和CMV启动子。

[0575] 在一些实施方案中,病毒基因组包含增强子组件、启动子和/或5'UTR内含子。增强子组件,本文中也称作“增强子”,可以是但不限于CMV增强子;启动子可以是但不限于CMV、CBA、UBC、GUSB、NSE、突触蛋白、MeCP2和GFAP启动子;并且5'UTR/内含子可以是但不限于SV40和CBA-MVM。作为一个非限制性实例,组合使用的增强子、启动子和/或内含子可以是:(1)CMV增强子、CMV启动子、SV405'UTR内含子;(2)CMV增强子、CBA启动子、SV 405'UTR内含子;(3)CMV增强子、CBA启动子、CBA-MVM 5'UTR内含子;(4)UBC启动子;(5)GUSB启动子;(6)NSE启动子;(7)突触蛋白启动子;(8)MeCP2启动子;以及(9)GFAP启动子。

[0576] 在一些实施方案中,病毒基因组包含增强子。在一些实施方案中,增强子包括CMVie增强子。

[0577] 在一些实施方案中,病毒基因组包含CMVie增强子和CB启动子。在一些实施方案中,病毒基因组包含CMVie增强子和CMV启动子(例如,CMV启动子区)。在一些实施方案中,病毒基因组包含CMVie增强子、CBA启动子或其功能变体和内含子(例如,CAG启动子)。

[0578] 在一些实施方案中,病毒基因组包含工程改造的启动子。在另一个实施方案中,病毒基因组包含来自天然表达的蛋白质的启动子。

[0579] 在一些实施方案中,CBA启动子用于本文所描述的AAV粒子的病毒基因组,例如,编码GCase蛋白,或GCase蛋白和增强元件(例如,GCase和SapA蛋白、GCase和SapC蛋白,或GCase蛋白和细胞穿透肽或其变体)的病毒基因组。在一些实施方案中,CBA启动子经工程改造以用于本文所描述的GCase多肽或GCase多肽和增强元件(例如,鞘脂激活蛋白原或其变体;细胞穿透肽或其变体;或溶酶体靶向信号)的最佳表达。

[0580] 病毒基因组组件:内含子

[0581] 在一些实施方案中,载体基因组包含至少一个内含子或其片段或衍生物。在一些实施方案中,至少一个内含子可以增强本文所描述的GCase蛋白和/或增强元件(例如,鞘脂激活蛋白原或SapC蛋白或其变体;细胞穿透肽(例如,ApoEII肽、TAT肽或ApoB肽)或其变体;

和/或溶酶体靶向信号)的表达(参见例如Powell等Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy,2015;其内容以全文引用的方式并入本文中)。内含子的非限制性实例包括MVM(67-97bps)、F.IX截短内含子1(300bps)、 β -球蛋白SD/免疫球蛋白重链剪接受体(250bps)、腺病毒剪接供体/免疫球蛋白剪接受体(500bps)、SV40晚期剪接供体/剪接受体(19S/16S)(180bps)和杂交腺病毒剪接供体/IgG剪接受体(230bps)。

[0582] 在一些实施方案中,内含子的长度可以为100-500个核苷酸。内含子的长度可以为80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490或500个核苷酸。内含子的长度可以在80-100、80-120、80-140、80-160、80-180、80-200、80-250、80-300、80-350、80-400、80-450、80-500、200-300、200-400、200-500、300-400、300-500或400-500个核苷酸之间。

[0583] 在一些实施方案中,AAV载体可以包含SV40内含子或其片段或变体。在一些实施方案中,启动子可以是CMV启动子。在一些实施方案中,启动子可以是CBA。在一些实施方案中,启动子可以是H1。

[0584] 在一些实施方案中,AAV载体可以包含 β -球蛋白内含子或其片段或变体。在一些实施方案中,内含子包含一个或多个人类 β -球蛋白序列(例如,包括其片段/变体)。在一些实施方案中,启动子可以是CB启动子。在一些实施方案中,启动子包含CMV启动子。在一些实施方案中,启动子包含最小CBA启动子。

[0585] 在一些实施方案中,经编码的蛋白质可以位于表达载体中的内含子下游,诸如但不限于SV40内含子或 β 球蛋白内含子或本领域中已知的其它内含子。此外,经编码的GBA蛋白还可以位于表达载体中的聚腺苷酸化序列上游。在一些实施方案中,经编码的蛋白质可以位于表达载体中包含内含子的启动子下游(例如,相对于包含内含子的启动子的3')和/或聚腺苷酸化序列上游(例如,相对于聚腺苷酸化序列的5')的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或超过30个核苷酸内。在一些实施方案中,经编码的GBA蛋白可以位于表达载体中内含子的下游(例如,相对于内含子的3')和/或聚腺苷酸化序列的上游(例如,相对于聚腺苷酸化序列的5')的1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30个核苷酸内。在一些实施方案中,经编码的蛋白质可以位于表达载体中内含子的下游(例如,相对于内含子的3')和/或聚腺苷酸化序列的上游(例如,相对于聚腺苷酸化序列的5')的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或超过25%的核苷酸内。在一些实施方案中,经编码的蛋白质可以位于表达载体中内含子的下游(例如,相对于内含子的3')和/或聚腺苷酸化序列的上游(例如,相对于聚腺苷酸化序列的5')的前1-5%、1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、5-10%、5-15%、5-20%、5-25%、10-15%、10-20%、10-25%、15-20%、15-25%或20-25%的序列内。

[0586] 在某些实施方案中,内含子序列不是增强子序列。在一些实施方案中,内含子序列不是启动子序列的子组件。在一些实施方案中,内含子序列是启动子序列的子组件。

[0587] 病毒基因组组件:非翻译区(UTR)

[0588] 在一些实施方案中,转录但不翻译基因的野生型非翻译区(UTR)。一般来说,5'UTR

在转录起始位点处开始并且在起始密码子处结束,并且3'UTR紧接在终止密码子之后开始并且持续至转录终止信号。

[0589] 通常在特异性靶器官的大量表达的基因中发现的特征可以经工程改造至UTR中以增强稳定性和蛋白质产量。作为一个非限制性实例,来自通常在肝脏中表达的mRNA的5'UTR(例如,白蛋白、血清淀粉样蛋白A、载脂蛋白A/B/E、转铁蛋白、 α 胎蛋白、红血球生成素或因子VIII)可以用于本公开的AAV粒子的病毒基因组中以增强肝细胞系或肝脏中的表达。

[0590] 在一些实施方案中,编码本文所描述的转基因(例如,编码GBA蛋白的转基因)的病毒基因组包含Kozak序列。尽管不希望受理论约束,但野生型5'非翻译区(UTR)包括在翻译起始中起作用的特征。通常已知涉及于核糖体启动许多基因的翻译的过程中的Kozak序列通常包括于5'UTR中。Kozak序列具有共通CCR(A/G)CCAUGG,其中R是起始密码子(ATG)上游的嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤)三碱基,继之以另一个'G'。

[0591] 在一些实施方案中,病毒基因组中的5'UTR包括Kozak序列。

[0592] 在一些实施方案中,病毒基因组中的5'UTR不包括Kozak序列。

[0593] 尽管不希望受理论约束,但已知野生型3'UTR具有嵌入其中的腺苷和尿苷段。这些富AU标识在具有高周转率的基因中特别普遍。基于其序列特征和功能特性,可以将富AU元件(ARE)分为三类(Chen等,1995,其内容以全文引用的方式并入本文中):I类ARE,诸如但不限于c-Myc和MyoD,在富U区域内含有AUUUA基元的若干分散拷贝。II类ARE,诸如但不限于GM-CSF和TNF- α ,具有两个或更多个重叠UUAUUUA(U/A)(U/A)九聚物。III类ARE,诸如但不限于c-Jun和肌细胞生成素,定义不明。这些富U区域不含AUUUA基元。已知大多数结合至ARE的蛋白质使信使去稳定,而ELAV家族的成员,最显著的是HuR,已有记载会增加mRNA的稳定性。HuR结合至所有三类的ARE。将HuR特异性结合位点工程改造至核酸分子的3'UTR中将促成HuR结合,并且因此稳定体内信息。

[0594] 3'UTR富AU元件(ARE)的引入、去除或修饰可以用于调节多核苷酸的稳定性。当对特异性多核苷酸,例如病毒基因组的有效载荷区进行工程改造时,可以引入一个或多个ARE拷贝以使多核苷酸的稳定性降低,从而缩减所得蛋白质的翻译并减少其产量。同样地,可以鉴定和去除ARE或使ARE突变以增加细胞内稳定性,并且因此增加所得蛋白质的翻译和生产。

[0595] 在一些实施方案中,病毒基因组的3'UTR可以包括用于模板化添加聚A尾的寡(dT)序列。

[0596] 来自本领域中已知的任何基因的任何UTR可以并入AAV粒子的病毒基因组中。这些UTR或其部分可以与从其中选择的基因相同的方向放置,并且可以改变其方向或位置。在一些实施方案中,AAV粒子的病毒基因组中所用的UTR可以倒置、缩短、延长,或由本领域中已知的一个或多个其它5'UTR或3'UTR制成。如本文所用,术语“改变”当与UTR相关时,意指UTR相对于参考序列以某种方式改变。举例来说,相对于野生型或原生UTR,3'或5'UTR可以通过如上文所教示的方向或位置的变化而改变,或者可以通过包括额外核苷酸、核苷酸缺失、核苷酸交换或转位而改变。

[0597] 在一些实施方案中,AAV粒子的病毒基因组包含至少一种人工UTR,它不是野生型UTR的变体。

[0598] 在一些实施方案中,AAV粒子的病毒基因组包含选自其蛋白质共享共同功能、结

构、特征或特性的转录物家族的UTR。

[0599] 病毒基因组组件:miR结合位点

[0600] 本发明的AAV病毒粒子的组织或细胞特异性表达可以通过引入组织或细胞特异性调控序列,例如启动子、增强子、微小RNA结合位点,例如脱靶位点而增强。不希望受理论约束,据信经编码的miR结合位点可以基于组织或细胞(例如,非靶向细胞或组织)中相应内源微小RNA(miRNA)或相应受控外源miRNA的表达来调节,例如预防、阻抑或以其它方式抑制本发明的病毒基因组上所关注基因的表达。在一些实施方案中,miR结合位点调节(例如,降低)表达相应mRNA的细胞或组织中由本文所描述的AAV粒子的病毒基因组编码的有效载荷的表达。在一些实施方案中,miR结合位点调节(例如,降低)DRG、肝脏、造血谱系或它们的组合的细胞或组织中编码的GBA蛋白的表达。

[0601] 在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子的病毒基因组包含编码微小RNA结合位点,例如脱靶位点的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子的病毒基因组包含编码miR结合位点、微小RNA结合位点系列(miR BS)或其反向补体的核苷酸序列。

[0602] 在一些实施方案中,编码miR结合位点系列或miR结合位点的核苷酸序列位于病毒基因组的3'-UTR区中(例如,相对于编码有效载荷的核酸序列的3'),例如在聚A序列之前,位于病毒基因组的5'-UTR区中(例如,相对于编码有效载荷的核酸序列的5'),或两者。

[0603] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点系列包含miR结合位点(miR BS)的至少1-5个拷贝,例如,至少1-3、2-4、3-5、1、2、3、4、5个或更多个拷贝。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点系列包含miR结合位点的4个拷贝。在一些实施方案中,所有拷贝都是相同的,例如,包含相同miR结合位点。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点系列内的miR结合位点是连续的并且不由间隔子隔开。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点系列内的miR结合位点由间隔子,例如非编码序列隔开。在一些实施方案中,间隔子的核苷酸长度为约1至6个核苷酸或约5至10个核苷酸,例如,约7-8个核苷酸。在一些实施方案中,间隔子的长度为约8个核苷酸。在一些实施方案中,间隔子序列包含以下一者或多者:(i)GGAT;(ii)CACGTG;(iii)GCATGC;或(i)-(iii)中的一者或多者的重复。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。

[0604] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点系列包含miR结合位点(miR BS)的至少1-5个拷贝,例如,至少1-3、2-4、3-5、1、2、3、4、5个或更多个拷贝。在一些实施方案中,至少1、2、3、4、5个或所有拷贝是不同的,例如,包含不同miR结合位点。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点系列内的miR结合位点是连续的并且不由间隔子隔开。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点系列内的miR结合位点由间隔子,例如非编码序列隔开。在一些实施方案中,间隔子的长度为约1至6个核苷酸或约5至10个核苷酸,例如,约7-8个核苷酸或约8个核苷酸。在一些实施方案中,间隔子序列包含以下一者或多者:(i)GGAT;(ii)CACGTG;(iii)GCATGC;或(i)-(iii)中的一者或多者的重复。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。

[0605] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点与宿主细胞中的miR大体上相同(例如,至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%同一)。在一些实施方案中,经编码的

miR结合位点与宿主细胞中的miR包含至少1、2、3、4或5个错配或不超过6、7、8、9或10个错配。在一些实施方案中,错配的核苷酸是连续的。在一些实施方案中,错配的核苷酸是不连续的。在一些实施方案中,错配的核苷酸出现在miR结合位点的种子区结合序列之外,诸如在miR结合位点的一端或两端。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点与宿主细胞中的miR 100%同一。

[0606] 在一些实施方案中,编码miR结合位点的核苷酸序列与宿主细胞中的miR大体上互补(例如,至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%互补)。在一些实施方案中,与编码miR结合位点的核苷酸序列互补的序列相对于宿主细胞中的相应miR包含至少1、2、3、4或5个错配或不超过6、7、8、9或10个错配。在一些实施方案中,错配的核苷酸是连续的。在一些实施方案中,错配的核苷酸是不连续的。在一些实施方案中,错配的核苷酸出现在miR结合位点的种子区结合序列之外,诸如在miR结合位点的一端或两端。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点与宿主细胞中的miR 100%互补。

[0607] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点或经编码的miR结合位点系列的长度为约10至约125个核苷酸,例如,约10至50个核苷酸、10至100个核苷酸、50至100个核苷酸、50至125个核苷酸,或100至125个核苷酸。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点或经编码的miR结合位点系列的长度为约7至约28个核苷酸,例如,长度为约8-28个核苷酸、7-28个核苷酸、8-18个核苷酸、12-28个核苷酸、20-26个核苷酸、22个核苷酸、24个核苷酸或26个核苷酸,并且任选地包含与miRNA(例如,miR122、miR142、miR183)的种子序列互补(例如,完全互补或部分互补)的至少一个连续区(例如,7或8个核苷酸)。

[0608] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点与肝脏或肝细胞中表达的miR,诸如miR122互补(例如,完全互补或部分互补)。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点或经编码的miR结合位点系列包含miR122结合位点序列。在一些实施方案中,经编码的miR122结合位点包含ACAAACACCATTGTCACACTCCA(SEQ ID NO:1865)的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:1865具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%、至少99%或100%序列同一性,或具有至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列,例如,其中所述修饰可以使得经编码的miR结合位点与相应miRNA之间错配。在一些实施方案中,病毒基因组包含经编码的miR122结合位点的至少3、4或5个拷贝,例如,经编码的miR122结合位点系列,任选地其中经编码的miR122结合位点系列包含以下核苷酸序列:ACAAACACCATTGTCACACTCCACACAAACACCATTGTCACACTCCA(SEQ ID NO:1866),或与SEQ ID NO:1866具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%、至少99%或100%序列同一性,或具有至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列,例如,其中所述修饰可以使得经编码的miR结合位点与相应miRNA之间错配。在一些实施方案中,经编码的miR122结合位点中的至少两者直接连接,例如,在无间隔子的情况下。在其它实施方案中,经编码的miR122结合位点中的至少两者由例如长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸的间隔子隔开,所述间隔子位于两个或更多个连续经编码的miR122结合位点序列之间。在实施方案中,间隔子的长度为约1至6个核苷酸或约5至10个核苷酸,例如,约7-8个核苷酸或约8个核苷酸。在一些实施方案中,间隔子序列包含以下一者或多者:(i) GGAT;(ii) CACGTG;(iii) GCATGC;或(i)-(iii)中的一者或多者的重复。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:

1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。

[0609] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点与造血谱系中表达的miR互补,所述造血谱系包括免疫细胞(例如,抗原呈递细胞或APC,包括树突细胞(DC)、巨噬细胞和B淋巴细胞)。在一些实施方案中,与造血谱系中表达的miR互补(例如,完全互补或部分互补)的经编码的miR结合位点包含例如US 2018/0066279(其内容以全文引用的方式并入本文中)所公开的核苷酸序列。

[0610] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点或经编码的miR结合位点系列包含miR-142-3p结合位点序列。在一些实施方案中,经编码的miR-142-3p结合位点包含TCCATAAAGTAGGAAACACTACA(SEQ ID NO:1869)的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:1842具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%、至少99%或100%序列同一性,或具有至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列,例如,其中所述修饰可以使得经编码的miR结合位点与相应miRNA之间错配。在一些实施方案中,病毒基因组包含经编码的miR-142-3p结合位点的至少3、4或5个拷贝,例如,经编码的miR-142-3p结合位点系列。在一些实施方案中,经编码的miR-142-3p结合位点的至少3、4或5个拷贝(例如,4个拷贝)是连续的(例如,不由间隔子隔开)或由间隔子隔开。在一些实施方案中,间隔子的长度为约1至6个核苷酸或约5至10个核苷酸,例如,约7-8个核苷酸或约8个核苷酸。在一些实施方案中,间隔子序列包含以下一者或多者:(i) GGAT;(ii) CACGTG;(iii) GCATGC;或(i)-(iii)中的一者或多者的重复。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。

[0611] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点与DRG(背根神经节)神经元中表达的miR互补(例如,完全互补或部分互补),例如,miR183、miR182和/或miR96结合位点。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点与DRG神经元中表达的miR互补(例如,完全互补或部分互补)。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点包含例如W02020/132455(其内容以全文引用的方式并入本文中)所公开的核苷酸序列。

[0612] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点或经编码的miR结合位点系列包含miR183结合位点序列。在一些实施方案中,经编码的miR183结合位点包含AGTGAATTCTACCA GTGCCATA(SEQ ID NO:1847)的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:1847具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%、至少99%或100%序列同一性,或具有至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列,例如,其中所述修饰可以使得经编码的miR结合位点与相应miRNA之间错配。在一些实施方案中,与种子序列互补(例如,完全互补或部分互补)的序列对应于经编码的miR-183结合位点序列的双下划线。在一些实施方案中,病毒基因组包含经编码的miR183结合位点的至少3、4或5个拷贝(例如,4个拷贝),例如,经编码的miR183结合位点。在一些实施方案中,病毒基因组包含经编码的miR183结合位点的至少4个拷贝,例如,包含miR183结合位点的4个拷贝的经编码的miR183结合位点。在一些实施方案中,经编码的miR183结合位点的至少3、4或5个拷贝(例如,4个拷贝)是连续的(例如,不由间隔子隔开)或由间隔子隔开。在一些实施方案中,间隔子的长度为约1至6个核苷酸或约5至10个核苷酸,例如,约7-8个核苷酸或约8个核苷

酸。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。在一些实施方案中,经编码的miR183结合位点系列包含SEQ ID NO:1849的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:1849具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%、至少99%或100%序列同一性,或具有至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列。

[0613] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点或经编码的miR结合位点系列包含miR182结合位点序列。在一些实施方案中,经编码的miR182结合位点包含AGTGTGAGTTCTACCAITGCCAAA(SEQ ID NO:1867)的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:1867具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%、至少99%或100%序列同一性,或具有至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列,例如,其中所述修饰可以使得经编码的miR结合位点与相应miRNA之间错配。在一些实施方案中,病毒基因组包含经编码的miR182结合位点的至少3、4或5个拷贝,例如,经编码的miR182结合位点系列。在一些实施方案中,经编码的miR182结合位点的至少3、4或5个拷贝(例如,4个拷贝)是连续的(例如,不由间隔子隔开)或由间隔子隔开。在一些实施方案中,间隔子的长度为约1至6个核苷酸或约5至10个核苷酸,例如,约7-8个核苷酸或约8个核苷酸。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。

[0614] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点或经编码的miR结合位点系列包含miR96结合位点序列。在一些实施方案中,经编码的miR96结合位点包含AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA(SEQ ID NO:1868)的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:1868具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%、至少99%或100%序列同一性,或具有至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的序列,例如,其中所述修饰可以使得经编码的miR结合位点与相应miRNA之间错配。在一些实施方案中,病毒基因组包含经编码的miR96结合位点的至少3、4或5个拷贝,例如,经编码的miR96结合位点系列。在一些实施方案中,经编码的miR96结合位点的至少3、4或5个拷贝(例如,4个拷贝)是连续的(例如,不由间隔子隔开)或由间隔子隔开。在一些实施方案中,间隔子的长度为约1至6个核苷酸或约5至10个核苷酸,例如,约7-8个核苷酸或约8个核苷酸。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。

[0615] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点系列包含miR122结合位点、miR142结合位点、miR183结合位点、miR182结合位点、miR96结合位点或它们的组合。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点系列包含miR122结合位点、miR142结合位点、miR183结合位点、miR182结合位点、miR96结合位点或它们的组合的至少3、4或5个拷贝。在一些实施方案中,经编码的miR结合位点中的至少两者直接连接,例如,在无间隔子的情况下。在其它实施方案中,经编码的miR结合位点中的至少两者由例如长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸的间隔子隔开,所述间隔子位于两个或更多个连续经编码的miR结合位点序列之间。在实施方案中,间隔子的长度为至少约5至10个核苷酸,例如,约7-8个核苷酸或约8个核苷酸。在一些实施方案中,间隔子序列包含以下一者或多者:(i)GGAT;(ii)CACGTG;(iii)GCATGC;或

(i) - (iii)中的一者或多者的重复。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。

[0616] 在一些实施方案中,经编码的miR结合位点系列包含miR122结合位点、miR142结合位点、miR183结合位点、miR182结合位点、miR96结合位点中的至少两者、三者、四者、五者或所有的组合的至少3-5个拷贝(例如,4个拷贝),其中所述系列内miR结合位点中的每一者是连续的(例如,不由间隔子隔开)或由间隔子隔开。在一些实施方案中,间隔子的长度为约1至6个核苷酸或约5至10个核苷酸,例如,约7-8个核苷酸或约8个核苷酸。在一些实施方案中,间隔子序列包含以下一者或多者:(i)GGAT;(ii)CACGTG;(iii)GCATGC;或(i) - (iii)中的一者或多者的重复。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列。

[0617] 病毒基因组组件:聚腺苷酸化序列

[0618] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子的病毒基因组包含至少一个聚腺苷酸化(聚A)序列。AAV粒子的病毒基因组可以在有效载荷编码序列的3'端与3'UTR的5'端之间包含聚腺苷酸化序列。在一些实施方案中,聚A信号区位于相对于包含编码有效载荷(例如,本文所描述的GBA蛋白)的转基因的核酸的3'。

[0619] 在一些实施方案中,聚A信号区包含约100-600个核苷酸的长度,例如,约100-500个核苷酸、约100-400个核苷酸、约100-300个核苷酸、约100-200个核苷酸、约200-600个核苷酸、约200-500个核苷酸、约200-400个核苷酸、约200-300个核苷酸、约300-600个核苷酸、约300-500个核苷酸、约300-400个核苷酸、约400-600个核苷酸、约400-500个核苷酸,或约500-600个核苷酸。在一些实施方案中,聚A信号区包含约100至150个核苷酸的长度,例如,约127个核苷酸。在一些实施方案中,聚A信号区包含约450至500个核苷酸的长度,例如,约477个核苷酸。在一些实施方案中,聚A信号区包含约520至约560个核苷酸的长度,例如,约552个核苷酸。在一些实施方案中,聚A信号区包含约127个核苷酸的长度。

[0620] 在一些实施方案中,病毒基因组包含人类生长激素(hGH)聚A序列。在一些实施方案中,病毒基因组包含如上文所描述的hGH聚A以及编码GCCase蛋白或GCCase和增强元件(例如,鞘脂激活蛋白原、SapA或SapC蛋白或其变体;细胞穿透肽(例如,ApoEH肽、TAT肽或ApoB肽);或溶酶体靶向肽),例如编码如表3和表4中提供的序列或其片段或变体的有效载荷区。

[0621] 病毒基因组组件:填充子序列

[0622] 在一些实施方案中,病毒基因组包含一个或多个填充子序列。填充子序列可以是野生型序列或工程改造的序列。填充子序列可以是野生型序列的变体。在一些实施方案中,填充子序列是人类白蛋白的衍生物。

[0623] 在一些实施方案中,病毒基因组包含一个或多个填充子序列,以使病毒基因组的长度为用于包装的最佳大小。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列以使病毒基因组的长度为约2.3kb。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列以使病毒基因组的长度为约4.6kb。

[0624] 在一些实施方案中,病毒基因组是单链(ss)病毒基因组并且包含一个或多个填充子序列,其独立地或一起具有约0.1kb-3.8kb之间的长度,诸如但不限于0.1kb、0.2kb、0.3kb、0.4kb、0.5kb、0.6kb、0.7kb、0.8kb、0.9kb、1kb、1.1kb、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、

1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2kb、2.1kb、2.2kb、2.3kb、2.4kb、2.5kb、2.6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb或3.8kb。在一些实施方案中,载体基因组中的填充子序列总长度为3.1kb。在一些实施方案中,载体基因组中的填充子序列总长度为2.7kb。在一些实施方案中,载体基因组中的填充子序列总长度为0.8kb。在一些实施方案中,载体基因组中的填充子序列总长度为0.4kb。在一些实施方案中,载体基因组中的每个填充子序列的长度为0.8kb。在一些实施方案中,载体基因组中的每个填充子序列的长度为0.4kb。

[0625] 在一些实施方案中,病毒基因组是自互补(sc)病毒基因组并且包含一个或多个填充子序列,其独立地或一起具有约0.1kb-1.5kb之间的长度,诸如但不限于0.1kb、0.2kb、0.3kb、0.4kb、0.5kb、0.6kb、0.7kb、0.8kb、0.9kb、1kb、1.1kb、1.2kb、1.3kb、1.4kb或1.5kb。在一些实施方案中,载体基因组中的填充子序列总长度为0.8kb。在一些实施方案中,载体基因组中的填充子序列总长度为0.4kb。在一些实施方案中,载体基因组中的每个填充子序列的长度为0.8kb。在一些实施方案中,载体基因组中的每个填充子序列的长度为0.4kb。

[0626] 在一些实施方案中,病毒基因组包含填充子序列的任何部分。病毒基因组可以包括1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的填充子序列。

[0627] 在一些实施方案中,病毒基因组是单链(ss)病毒基因组并且包含一个或多个填充子序列以使病毒基因组的长度为约4.6kb。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列并且填充子序列位于5' ITR序列的3'。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列并且填充子序列位于启动子序列的5'。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列并且填充子序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列并且填充子序列位于3' ITR序列的5'。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列,并且填充子序列位于两个内含子序列之间。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列,并且填充子序列位于内含子序列内。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个填充子序列,并且第一个填充子序列位于5' ITR序列的3',并且第二个填充子序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个填充子序列,并且第一个填充子序列位于启动子序列的5',并且第二个填充子序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个填充子序列,并且第一个填充子序列位于5' ITR序列的3',并且第二个填充子序列位于5' ITR序列的5'。

[0628] 在一些实施方案中,病毒基因组是自互补(ss)病毒基因组并且包含一个或多个填充子序列以使病毒基因组的长度为约2.3kb。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列并且填充子序列位于5' ITR序列的3'。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列并且填充子序列位于启动子序列的5'。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列并且填充子序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列并且填充子序列位于3' ITR序列的5'。在一些实施方案中,病毒基因组包含至少一个填充子序列,并且填充子序列位于两个内含子序列之间。作为一个非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充子序列,并且填充子序列位于内含子序列内。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个填充子序列,并且第一个填充子序列位

于5' ITR序列的3',并且第二个填充子序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个填充子序列,并且第一个填充子序列位于启动子序列的5',并且第二个填充子序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个填充子序列,并且第一个填充子序列位于5' ITR序列的3',并且第二个填充子序列位于5' ITR序列的5'。

[0629] 在一些实施方案中,病毒基因组可以在病毒基因组的一个或多个区域之间包含一个或多个填充子序列。在一些实施方案中,填充子区可以位于以下区域之前:诸如但不限于有效载荷区、反向末端重复(ITR)、启动子区、内含子区、增强子区、聚腺苷酸化信号序列区和/或外显子区。在一些实施方案中,填充子区可以位于以下区域之后:诸如但不限于有效载荷区、反向末端重复(ITR)、启动子区、内含子区、增强子区、聚腺苷酸化信号序列区和/或外显子区。在一些实施方案中,填充子区可以位于以下区域之前及之后:诸如但不限于有效载荷区、反向末端重复(ITR)、启动子区、内含子区、增强子区、聚腺苷酸化信号序列区和/或外显子区。

[0630] 在一些实施方案中,病毒基因组可以包含一个或多个将病毒基因组的至少一个区域分叉的填充子序列。病毒基因组的分叉区可以在填充子序列区的5'包含1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的区域。在一些实施方案中,填充子序列可以将至少一个区域分叉,使得10%的区域位于填充子序列的5'并且90%的区域位于填充子序列的3'。在一些实施方案中,填充子序列可以将至少一个区域分叉,使得20%的区域位于填充子序列的5'并且80%的区域位于填充子序列的3'。在一些实施方案中,填充子序列可以将至少一个区域分叉,使得30%的区域位于填充子序列的5'并且70%的区域位于填充子序列的3'。在一些实施方案中,填充子序列可以将至少一个区域分叉,使得40%的区域位于填充子序列的5'并且60%的区域位于填充子序列的3'。在一些实施方案中,填充子序列可以将至少一个区域分叉,使得50%的区域位于填充子序列的5'并且50%的区域位于填充子序列的3'。在一些实施方案中,填充子序列可以将至少一个区域分叉,使得60%的区域位于填充子序列的5'并且40%的区域位于填充子序列的3'。在一些实施方案中,填充子序列可以将至少一个区域分叉,使得70%的区域位于填充子序列的5'并且30%的区域位于填充子序列的3'。在一些实施方案中,填充子序列可以将至少一个区域分叉,使得80%的区域位于填充子序列的5'并且20%的区域位于填充子序列的3'。在一些实施方案中,填充子序列可以将至少一个区域分叉,使得90%的区域位于填充子序列的5'并且10%的区域位于填充子序列的3'。

[0631] 在一些实施方案中,病毒基因组在5' ITR之后包含填充子序列。

[0632] 在一些实施方案中,病毒基因组在启动子区之后包含填充子序列。在一些实施方案中,病毒基因组在有效载荷区之后包含填充子序列。在一些实施方案中,病毒基因组在内含子区之后包含填充子序列。在一些实施方案中,病毒基因组在增强子区之后包含填充子序列。在一些实施方案中,病毒基因组在聚腺苷酸化信号序列区之后包含填充子序列。在一些实施方案中,病毒基因组在外显子区之后包含填充子序列。

[0633] 在一些实施方案中,病毒基因组在启动子区之前包含填充子序列。在一些实施方案中,病毒基因组在有效载荷区之前包含填充子序列。在一些实施方案中,病毒基因组在内

含子区之前包含填充子序列。在一些实施方案中,病毒基因组在增强子区之前包含填充子序列。在一些实施方案中,病毒基因组在聚腺苷酸化信号序列区之前包含填充子序列。在一些实施方案中,病毒基因组在外显子区之前包含填充子序列。

[0634] 在一些实施方案中,病毒基因组在3' ITR之前包含填充子序列。

[0635] 在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于5' ITR与启动子区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于5' ITR与有效载荷区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于5' ITR与内含子区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于5' ITR与增强子区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于5' ITR与聚腺苷酸化信号序列区之间。

[0636] 在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于5' ITR与外显子区之间。

[0637] 在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于启动子区与有效载荷区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于启动子区与内含子区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于启动子区与增强子区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于启动子区与聚腺苷酸化信号序列区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于启动子区与外显子区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于启动子区与3' ITR之间。

[0638] 在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于有效载荷区与内含子区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于有效载荷区与增强子区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于有效载荷区与聚腺苷酸化信号序列区之间。在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于有效载荷区与外显子区之间。

[0639] 在一些实施方案中,填充子序列可以位于两个区域,诸如但不限于有效载荷区与3' ITR之间。

[0640] 病毒基因组组件:有效载荷

[0641] 在一些实施方案中,AAV粒子,例如用于GBA蛋白,例如本文所描述的GBA蛋白的载体化递送的AAV粒子,包含有效载荷。在一些实施方案中,AAV粒子,例如用于本文所描述的GBA蛋白(例如,GBA蛋白)的载体化递送的AAV粒子,包含编码有效载荷的病毒基因组。在一些实施方案中,病毒基因组包含可操作地连接至包含编码有效载荷的转基因的核酸的启动子。在一些实施方案中,有效载荷包含GBA蛋白。

[0642] 在一些实施方案中,本文的公开内容提供了允许改善由基因疗法载体递送的GCase蛋白的表达的构建体。

[0643] 在一些实施方案中,本公开提供了允许改善由基因疗法载体递送的GCase蛋白的生物分布的构建体。

[0644] 在一些实施方案中,本公开提供了允许改善由基因疗法载体递送的GCase蛋白的亚细胞分布或运输的构建体。

[0645] 在一些实施方案中,本公开提供了允许改善GCase蛋白向由基因疗法载体递送的

溶酶体膜运输的构建体。

[0646] 在一些方面,本公开涉及含有或包含编码GCase蛋白或其功能片段或变体的核酸序列的组合物,以及在体外或体内向疾病,例如与GBA表达相关的疾病的受试者,例如人类和/或动物模型施用所述组合物的方法。

[0647] 本公开的AAV粒子可以包含编码至少一个“有效载荷”的核酸序列。如本文所用,“有效载荷”或“有效载荷区”是指由病毒基因组编码或在病毒基因组内编码的一个或多个多核苷酸或多核苷酸区或者此种多核苷酸或多核苷酸区的表达产物,例如,转基因、编码多肽或多重多肽(例如,GCase蛋白或其片段或变体)的多核苷酸。有效载荷可以包含本领域中已知的任何核酸,其可用于在与携带有效载荷的AAV粒子转导或接触的靶细胞中GCase蛋白的表达(通过使用调节性核酸补充蛋白质产物或进行基因置换)。

[0648] 用于如本文所描述的AAV基因组中的编码GCase的转基因的特定特征包括使用野生型GBA编码序列和增强的GBA编码构建体。在一些情况下,GBA编码序列是如国际公布号W02019040507(其内容以全文引用的方式并入本文中)所描述的重组和/或经修饰的GBA序列。在一些实施方案中,GBA编码序列由NCBI参考序列NCBI参考序列NP_000148.2(国际公布号W02019070893的SEQ ID NO:14,以引用的方式并入本文中)提供。在一些实施方案中,GBA编码序列经密码子优化以用于在包括人类细胞的哺乳动物细胞中表达,诸如W02019070893的SEQ ID NO:15所列的序列。在一些实施方案中,病毒基因组包含编码鞘脂激活蛋白原(PSAP)的序列,所述鞘脂激活蛋白原是鞘脂激活蛋白A、B、C和D的前体(分别为SapA、SapB、SapC和SapD)。编码鞘脂激活蛋白原的序列可以由NCBI参考序列NP_002769.1(W02019070893的SEQ ID NO:16)提供的序列。在一些实施方案中,PSAP编码序列经密码子优化以用于在包括人类细胞的哺乳动物细胞中表达,诸如W02019070893的SEQ ID NO:17所列的序列。在一些实施方案中,GBA编码序列是如国际公布号W02019070894所描述的重组和/或经修饰的GBA序列。

[0649] 如本文所描述和例示的增强的GBA编码序列可以通过在病毒基因组中并入鞘脂激活蛋白原或鞘脂激活蛋白C编码序列来达成GCase酶的催化活性增强。或者,增强的GBA编码序列可以通过并入例如HIV源性TAT肽、人类载脂蛋白B受体结合结构域、人类载脂蛋白E II受体结合结构域或其它细胞穿透增强序列来达成分泌的GCase产物的细胞穿透增强。在一些实施方案中,增强的GBA编码序列可以通过并入以下一者或多者来达成细胞内溶酶体靶向增强:a)RNA酶A源性序列;b)HSC70源性序列;c)血红蛋白源性序列;d)RNA酶A、HSC70和血红蛋白源性溶酶体靶向序列的组合;或e)其它溶酶体靶向增强子序列。在一些实施方案中,如本文所描述的增强的GBA编码序列可以并入增强的催化活性、增强的细胞穿透活性和/或增强的溶酶体靶向特征的组合增强。在一些实施方案中,这些增强的特征的组合对经带有本文所描述的AAV基因组的AAV粒子感染的细胞中的GCase活性或表达具有累加效应。举例来说,在一些实施方案中,本文所描述的AAV基因组包含具有溶酶体靶向序列、GCase编码序列、连接子和PSAP/SapC编码序列的GCase编码核酸序列。在一些实施方案中,这些增强的特征的组合对经带有本文所描述的AAV基因组的AAV粒子感染的细胞中的GCase活性或表达具有协同效应。

[0650] 有效载荷构建体可以包含编码和非编码核酸序列的组合。

[0651] 病毒基因组的任何区段、片段或整体和其中的有效载荷区可以经密码子优化。

[0652] 在一些实施方案中,病毒基因组编码一个以上有效载荷。作为一个非限制性实例,编码一个以上有效载荷的病毒基因组可以经复制并包装至病毒粒子中。经包含多于一个有效载荷的病毒粒子转导的靶细胞可以在单个细胞中表达有效载荷中的每一者。

[0653] 在一些实施方案中,病毒基因组可以编码编码或非编码RNA。在某些实施方案中,腺相关病毒载体粒子还包含至少一个选自由Kozak序列、主链序列和内含子序列组成的组的顺式元件。

[0654] 在一些实施方案中,有效载荷是多肽,所述多肽可以是肽或蛋白质。由有效载荷构建体编码的蛋白质可以包括分泌蛋白、细胞内蛋白、细胞外蛋白和/或膜蛋白。经编码的蛋白质可以是结构性的或功能性的。由病毒基因组编码的蛋白质包括但不限于哺乳动物蛋白质。在某些实施方案中,AAV粒子含有编码GCase蛋白或其片段或变体的病毒基因组。本文所描述的AAV粒子可用于人类疾病、兽医应用和多种体内和体外背景的领域中。

[0655] 在一些实施方案中,有效载荷可以包含用作标记物蛋白以评定细胞转化和表达的多肽、融合蛋白、具有所需生物活性的多肽、可以补充遗传缺陷的基因产物、RNA分子、转录因子以及在调控和/或表达中受关注的其它基因产物。在一些实施方案中,有效载荷可以包含提供所需作用或调控功能的核苷酸序列(例如,转座子、转录因子)。

[0656] 经编码的有效载荷可以包含基因疗法产物。基因疗法产物可以包括但不限于当在靶细胞中表达时提供所需治疗作用的多肽、RNA分子或其它基因产物。在一些实施方案中,基因疗法产物可以包含非功能性基因的替代物,或不存在、表达量不足或突变的基因。在一些实施方案中,基因疗法产物可以包含非功能性蛋白质或多肽的替代物,或不存在、表达量不足、错误折叠、降解过快或突变的蛋白质或多肽。举例来说,基因疗法产物可以包含GCase蛋白或编码GCase蛋白的多核苷酸以治疗GCase缺陷或GBA相关病症。

[0657] 在一些实施方案中,有效载荷编码信使RNA(mRNA)。如本文所用,术语“信使RNA”(mRNA)是指编码所关注的多肽并且能够体外、体内、原位或离体翻译以生产经编码的所关注的多肽的任何多核苷酸。某些实施方案提供了作为编码GCase或其变体的mRNA。

[0658] mRNA的组件包括但不限于编码区、5'-UTR(非翻译区)、3'-UTR、5'帽和聚A尾。在一些实施方案中,AAV基因组的经编码的mRNA或任何部分可以经密码子优化。

[0659] 在一些实施方案中,由编码GCase或其变体的有效载荷构建体编码的蛋白质或多肽的长度在约50与约4500个氨基酸残基之间(在本文中的下文,“长度为X个氨基酸”是指X个氨基酸残基)。在一些实施方案中,经编码的蛋白质或多肽的长度在50-2000个氨基酸之间。在一些实施方案中,经编码的蛋白质或多肽的长度在50-1000个氨基酸之间。在一些实施方案中,经编码的蛋白质或多肽的长度在50-1500个氨基酸之间。在一些实施方案中,经编码的蛋白质或多肽的长度在50-1000个氨基酸之间。在一些实施方案中,经编码的蛋白质或多肽的长度在50-800个氨基酸之间。在一些实施方案中,经编码的蛋白质或多肽的长度在50-600个氨基酸之间。在一些实施方案中,经编码的蛋白质或多肽的长度在50-400个氨基酸之间。在一些实施方案中,经编码的蛋白质或多肽的长度在50-200个氨基酸之间。在一些实施方案中,经编码的蛋白质或多肽的长度在50-100个氨基酸之间。

[0660] 编码有效载荷的有效载荷构建体可以包含或编码可选标记物。可选标记物可以包含基因序列或由宿主细胞中表达的基因序列编码的蛋白质或多肽,其允许鉴定、选择和/或从可能表达或可能不表达可选标记物的细胞群体中纯化宿主细胞。在一些实施方案中,可

选标记物提供抗性以经受住选择过程,否则所述选择过程会杀死宿主细胞,诸如用抗生素处理。在一些实施方案中,抗生素可选标记物可以包含一种或多种抗生素抗性因子,包括但不限于新霉素抗性(例如,neo)、潮霉素抗性、康霉素抗性和/或嘌呤霉素抗性。

[0661] 在一些实施方案中,编码有效载荷的有效载荷构建体可以包含可选标记物,包括但不限于 β -内酰胺酶、荧光素酶、 β -半乳糖苷酶或本领域中所理解的所述术语的任何其它报告基因,包括细胞表面标记物,诸如CD4或截短的神经生长因子(NGFR)(对于GFP,参见WO 96/23810;Heim等,Current Biology 2:178-182(1996);Heim等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1995);或Heim等,Science 373:663-664(1995);对于 β -内酰胺酶,参见WO 96/30540);每篇文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0662] 在一些实施方案中,编码可选标记物的有效载荷构建体可以包含荧光蛋白。如本文所描述的荧光蛋白可以包含任何荧光标记物,包括但不限于绿色、黄色和/或红色荧光蛋白(GFP、YFP和/或RFP)。在一些实施方案中,编码可选标记物的有效载荷构建体可以包含人类流感血球凝集素(HA)标签。

[0663] 在某些实施方案中,用于靶细胞中有效载荷的表达的核酸将并入病毒基因组中并且位于两个ITR序列之间。

[0664] 在一些实施方案中,有效载荷构建体还包含编码肽的核酸序列,所述肽以高亲和力结合至阳离子非依赖性甘露糖6-磷酸(M6P)受体(CI-MPR),如国际专利申请公布号W02019213180A1中所描述,其公开内容以全文引用的方式并入本文中。结合CI-MPR的肽可以是例如IGF2肽或其变体。CI-MPR的结合可以促进由基因疗法载体提供的治疗性蛋白质的细胞摄取或递送和细胞内或亚细胞靶向。

[0665] 有效载荷组件:连接子

[0666] 在一些实施方案中,本文所描述的病毒基因组可以用一个或多个间隔子或连接子区进行工程改造以分隔编码区或非编码区。

[0667] 在一些实施方案中,包含编码有效载荷,例如本文所描述的GBA蛋白的转基因的核酸还包含编码连接子的核酸序列。在一些实施方案中,编码有效载荷的核酸编码两个或更多个连接子。在一些实施方案中,经编码的连接子包含表2或表5中提供的连接子。在一些实施方案中,经编码的连接子包含由表2或表5中提供的核苷酸序列中的任一者编码的氨基酸序列,或与其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码连接子的核酸序列包含表2或表5中提供的核苷酸序列中的任一者,或与其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,连接子包含表2中提供的氨基酸序列中的任一者,或氨基酸序列。

[0668] 在一些实施方案中,连接子可以是肽连接子,所述肽连接子可以用于在表达期间连接由有效载荷区编码的多肽。在一些实施方案中,肽连接子可以在表达后裂解以分离GCCase蛋白结构域,或将GCCase蛋白与本文所描述的增强元件,例如鞘脂激活蛋白原、SapA和/或SapC蛋白或功能变体分离,从而允许表达独立功能性GCCase蛋白和增强元件多肽,例如,鞘脂激活蛋白原、SapA和/或SapC多肽以及其它有效载荷多肽。连接子裂解可以是酶促的。在一些情况下,连接子包含酶促裂解位点以促进细胞内或细胞外裂解。一些有效载荷区编码在从mRNA转录物翻译连接子序列期间中断多肽合成的连接子。此类连接子可以促进从单个转录物翻译单独蛋白质结构域。在一些情况下,两个或更多个连接子由病毒基因组的

有效载荷区编码。

[0669] 表2.连接子

[0670]	连接子ID	描述	长度	SEQ ID NO
	连接子1	弗林蛋白酶	12	1724
	连接子2	弗林蛋白酶	12	1725
	连接子3	T2A	54	1726
	连接子4	F2A	75	1727
	连接子5	P2A	66	1728
	连接子6	G4S	18	1729
	连接子7	G4S3	45	1730
	连接子8	G4S5	75	1731
	连接子9	IRES	609	1732
	连接子10	IRES-2	623	1733
	连接子11	hIgG2铰链	54	1734
	连接子12	hIgG3铰链	108	1735
	连接子13	hIgG3-2铰链	153	1736
	连接子14	hIgG3-3铰链	198	1737
	连接子15	msiGG-1铰链	45	1738
	连接子16	msiGG1铰链	18	1739
	连接子17	G4S3	45	1873

[0671] 在一些实施方案中,GBA蛋白和本文所描述的增强元件可以直接连接,例如,在无连接子的情况下。在一些实施方案中,GBA蛋白和本文所描述的增强元件可以经由连接子连接。在一些实施方案中,连接子是可裂解连接子。在一些实施方案中,连接子未裂解。

[0672] 在一些实施方案中,本文所描述的有效载荷中的任一者可以具有连接GBA蛋白和增强元件,例如细胞穿透肽,例如ApoEIII肽、TAT肽和/或ApoB肽的不同长度的连接子,例如柔性多肽连接子。举例来说,可以使用(Gly4Ser)_n连接子(SEQ ID NO:1872),其中n是0、1、2、3、4、5、6、7或8(例如,SEQ ID NO:1729、1730、1731、1843或1845中的任一者)。在一些实施方案中,连接子包含(Gly4Ser)₃(SEQ ID NO:1845)。在一些实施方案中,编码连接子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1730的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1730具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的核苷酸序列。在一些实施方案中,经编码的连接子包含SEQ ID NO:1845的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1845具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列。

[0673] 在一些实施方案中,经编码的连接子包含酶促裂解位点,例如,用于细胞内和/或细胞外裂解。在一些实施方案中,连接子经裂解以分离GBA蛋白与经编码的增强元件,例如,鞘脂激活蛋白原多肽、SapA多肽、SapC多肽或其功能变体。在一些实施方案中,经编码的连接子包括弗林蛋白酶连接子或功能变体。在一些实施方案中,编码弗林蛋白酶连接子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1724的核苷酸序列,与SEQ ID NO:1724具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1724具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的核苷酸序列。在一些实施方案中,弗林

蛋白酶连接子包含SEQ ID NO:1854的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1854具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列。在一些实施方案中,弗林蛋白酶使碱性氨基酸靶序列(例如,Arg-X-(Arg/Lys)-Arg)下游的蛋白质裂解(例如,如Thomas, G.,2002.Nature Reviews Molecular Cell Biology 3(10):753-66所描述;其内容以全文引用的方式并入本文中)。在一些实施方案中,经编码的连接子包含2A自裂解肽(例如,来源于口蹄疫病毒(F2A)、猪捷申病毒-1(P2A)、明脉扁刺蛾病毒(Thoseaasigna virus,T2A)或马A型鼻炎病毒(E2A)的2A肽)。在一些实施方案中,经编码的连接子包含T2A自裂解肽连接子。在一些实施方案中,编码T2A连接子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1726的核苷酸序列,与SEQ ID NO:1726具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1726具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的核苷酸序列。在一些实施方案中,T2A连接子包含SEQ ID NO:1855的氨基酸序列,或相对于SEQ ID NO:1855具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰,例如取代的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码有效载荷的核酸编码弗林蛋白酶连接子和T2A连接子。

[0674] 在一些实施方案中,包含内部核糖体进入位点(IRES)的经编码的连接子是用在核苷酸序列(例如,mRNA序列)中间启动翻译的核苷酸序列(>500个核苷酸)(Kim,J.H.等,2011.PLoS One 6(4):e18556;其内容以全文引用的方式并入本文中),所述连接子可以用于例如调节一个或多个转基因的表达。在一些实施方案中,编码连接子包含小的并且未分支的富丝氨酸肽连接子,诸如由Huston等在美国专利号US5525491中所描述的那些,其内容以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,包含富丝氨酸连接子的多肽具有增加的溶解度。在一些实施方案中,经编码的连接子包含人工连接子,诸如由Whitlow和Filpula在美国专利号US5856456中以及Ladner等在美国专利号US 4946778中所描述的那些,每篇专利的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0675] 在一些实施方案中,经编码的连接子包含组织蛋白酶、基质金属蛋白酶或豆荚蛋白酶裂解位点,诸如由Cizeau和Macdonald在国际公布号W02008052322中所描述的那些,其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0676] 在一些实施方案中,编码连接子的核苷酸序列包含约10至约700个核苷酸的长度,例如约10至约700个核苷酸,例如约10至约100个,例如约50-200个核苷酸、约150-300个核苷酸、约250-400个核苷酸、约350-500个核苷酸、约450-600个核苷酸、约550-700个核苷酸、约650-700个核苷酸。在一些实施方案中,编码连接子的核苷酸序列包含约5至约20个核苷酸的长度,例如,约12个核苷酸的长度。在一些实施方案中,编码连接子的核苷酸序列包含约40至约60个核苷酸的长度,例如,约54个核苷酸的长度。

[0677] 有效载荷组件:信号序列

[0678] 在一些实施方案中,包含编码有效载荷,例如GBA蛋白、增强元件(例如,鞘脂激活蛋白原、鞘脂激活蛋白C蛋白或其变体;细胞穿透肽(例如,ApoEII肽、TAT肽和/或ApoB蛋白),或溶酶体靶向信号)或GBA蛋白和增强元件的转基因的核酸序列包含编码信号序列(例如,本文的信号序列区)的核酸序列。在一些实施方案中,包含编码有效载荷的转基因的核酸序列包含两个信号序列区。在一些实施方案中,包含编码有效载荷的转基因的核酸序列包含三个或更多个信号序列区。

[0679] 在一些实施方案中,编码信号序列的核苷酸序列位于相对于编码GBA蛋白的核苷

酸序列的5'处。在一些实施方案中,编码信号序列的核苷酸序列位于相对于编码增强元件的核苷酸序列的5'处。在一些实施方案中,经编码的GBA蛋白和/或经编码的增强元件在N端包含信号序列,其中在GBA蛋白和/或增强元件的细胞加工和/或定位期间所述信号序列任选地裂解。

[0680] 在一些实施方案中,信号序列包含表4或表14中提供的信号序列中的任一者的序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性)的序列。在一些实施方案中,经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1853或1857的氨基酸序列,或与其至少85%(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码信号序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1850-1852或1856中的任一者,或与其至少85%(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的核苷酸序列。

[0681] 在一些实施方案中,经编码的信号序列包含SEQ ID NO:1853的氨基酸序列,或与其至少85%(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列;并且经编码的GBA蛋白包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列,或与其至少70%(例如,至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,经编码的信号序列位于相对于经编码的GBA蛋白的N端处。

[0682] 在一些实施方案中,编码信号序列的核苷酸序列包含1850的核苷酸序列,或与其至少85%(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的核苷酸序列;并且编码GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列,或与其至少70%(例如,至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的核苷酸序列。在一些实施方案中,编码信号序列的核苷酸序列包含1851的核苷酸序列,或与其至少85%(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的核苷酸序列;并且编码GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1777的核苷酸序列,或与其至少70%(例如,至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的核苷酸序列。在一些实施方案中,编码信号序列的核苷酸序列包含1852的核苷酸序列,或与其至少85%(例如,至少90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的核苷酸序列;并且编码GBA蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列,或与其至少70%(例如,至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%)同一的核苷酸序列。在一些实施方案中,编码信号序列的核苷酸序列位于相对于编码GBA蛋白的核苷酸序列的5'处。

[0683] 示例性GCase (GBA) 蛋白有效载荷

[0684] 在一些实施方案中,例如本文所描述的病毒基因组的有效载荷是GCase蛋白(例如,野生型GCase蛋白)或其功能变体。在一些实施方案中,功能变体是保留其野生型对应物的一些或全部活性以达成所需治疗作用的变体。举例来说,在一些实施方案中,功能变体有效地用于基因疗法中以治疗病症或疾患,例如,GBA基因产物缺陷、PD或GBA相关病症、神经退化病症和/或神经肌肉病症。除非另有指示,否则如本文所描述的GCase蛋白的变体(例如,在本公开的构建体、载体、基因组、方法、试剂盒、组合物等的情形中)是功能变体。

[0685] 如本文所用,“与GCase蛋白水平降低相关”或“与表达降低相关”意指疾病的一种或多种症状由靶组织中或生物流体(诸如血液)中低于正常的GCase蛋白水平引起。与GCase蛋白水平或表达降低相关的疾病或疾患可以是中枢神经系统病症。本文还特定涵盖帕金森病和由缺陷性GBA基因产物的表达引起的相关病症,例如,与GBA突变相关的PD。此种疾病或

疾患可以是神经肌肉或神经病症或疾患。举例来说,与GCase蛋白水平降低相关的疾病可以是帕金森病或相关病症,或可以是本文所描述的另一种神经或神经肌肉病症,例如,与GBA突变相关的PD、戈谢病 (GD) (例如,1型GD、2型GD或3型GD)、路易体痴呆 (DLB)、戈谢病 (GD)、脊髓性肌萎缩症 (SMA)、多系统萎缩症 (MSA) 或多发性硬化症 (MS)。

[0686] 本公开通过提供由基于AAV的组合物和复合物可递送的GCase蛋白相关治疗以用于治疗GBA相关病症来解决对新技术的需求。

[0687] 尽管递送在AAV的情形中例示,但其它病毒载体、非病毒载体、纳米粒子或脂质体还可以类似地用于递送治疗性GCase蛋白并且包括但不限于AAV血清型或其它病毒递送运载体或慢病毒等中的任一者的病毒基因组。观测和教义扩展至以本文所描述的方式引入CNS中的任何大分子结构,包括经修饰的细胞。

[0688] 表3中给出了可以用于本文所公开的病毒基因组中并且可以构成GCase蛋白有效载荷的GCase蛋白的示例性多核苷酸和多肽序列的序列标识符。还可以使用功能变体,例如,与表3中所示的序列保持至少约90%或至少95%序列同一性的那些。在一些实施方案中,还可以使用编码相同或基本上相同的GCase蛋白氨基酸序列(例如,具有至少约90%氨基酸序列同一性的那些)的密码子优化和其它变体。

[0689] 在一些实施方案中,病毒基因组包含含有编码GBA蛋白或其功能变体的转基因的核酸。在一些实施方案中,经编码的GBA蛋白或其功能变体包含来自本文所描述的GBA蛋白的氨基酸序列(例如,如表3或表15中所描述),或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列。在一些实施方案中,经编码的GBA蛋白或其功能变体包含来自本文所描述的GBA蛋白的氨基酸序列(例如,如表3或表15中所描述),或相对于前述氨基酸序列中的任一者具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,经编码的GBA蛋白或其功能变体包含由编码本文所描述的GBA蛋白的核苷酸序列(例如,如表3或表15中所描述)或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0690] 在一些实施方案中,编码GBA蛋白或其功能变体的核苷酸序列包含编码本文所描述的GBA蛋白的核苷酸序列(例如,如表3或表15中所描述),或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列。在一些实施方案中,编码GBA蛋白或其功能变体的核苷酸序列包含编码本文所描述的GBA蛋白的核苷酸序列(例如,如表3或表15中所描述),或相对于前述核苷酸序列中的任一者具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的核苷酸序列。在一些实施方案中,编码GBA蛋白或其功能变体的核苷酸序列是密码子优化的核苷酸序列。

[0691] 表3. 示例性GCase序列

[0692]

SEQ ID NO:	类型	物种	描述
1740	蛋白质	智人	GBA蛋白NP_000148.2
1741	DNA	智人	GBA mRNA转录变体1NM_000157.4
1742	蛋白质	智人	GBA蛋白NP_001005741.1

1743	DNA	智人	GBA mRNA转录变体2NM_01005741.3
1744	蛋白质	智人	GBA蛋白NP_001005742.1
1745	DNA	智人	GBA mRNA转录变体3NM_001005742.3
1746	蛋白质	智人	GBA蛋白NP_001165282.1
1747	DNA	智人	GBA mRNA转录变体4NM_001171811.2
1748	蛋白质	智人	GBA蛋白NP_001165283.1
1749	DNA	智人	GBA mRNA转录变体5NM_001171812.2

[0693] 表15. 示例性GCase序列

描述	序列	SEQ ID NO:
GBA 变体 1 (信号序列加下划线)-nt	ATGGAATTCTCTAGCCCATCTAGAGAGGAATGTCCTA AGCCTCTGTCAAGAGTGTCCATCATGGCCGGCAGCCT GACAGGCCTGCTGCTGCTGCAGGCCGTGTCCTGGGCC AGTGGAGCCCCGGCCCTGCATCCCTAAGTCCTTCGGCT ATTCTAGCGTGGTCTGCGTGTGTAATGCCACTTACTG CGACAGCTTCGACCCTCCTACCTTCCCCGCCCTTGGA ACATTCAGCAGATACGAGAGCACCAGAAGCGGCAGA AGAATGGAAGTGAAGCATGGGCCCAATCCAGGCCAAC CACACCGGCACCGGCCTGCTGCTGACACTGCAACCT GAGCAGAAGTTCAGAAAGGTGAAGGGATTGAGAGGC GCCATGACCGACGCTGCTGCTCTGAACATCCTGGCCC TCTCCCCACCTGCTCAGAACCTGCTGCTTAAAAGCTA CTTCAGCGAGGAAGGCATCGGCTATAACATCATCAG AGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTCAGCATCAGAAC ATACACCTACGCCGATACACCTGATGACTTCCAACCTG CACAACCTCAGCCTGCCTGAAGAGGACACAAAGCTG AAAATCCCCCTGATCCACCGGGCCCTGCAGCTGGCCC AGAGACCTGTGAGCCTGCTGGCCTCTCCTTGGAACAAG CCCCACCTGGCTGAAGACCAATGGAGCTGTGAACGG CAAGGGCAGCCTGAAGGGCCAGCCCGGCGACATCTA CCACCAAACCTGGGCTCGCTACTTCGTGAAATTCTG GACGCCTACGCTGAGCATAAGCTGCAATTTTGGGCC GTTACAGCCGAGAACGAGCCTTCTGCCGGCCTGCTGT CTGGATATCCTTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGA GCACCAGAGAGACTTTATCGCCAGAGATCTGGGGCC TACCCTGGCTAACAGCACACACCACAACGTGCGGCT GCTGATGCTGGACGATCAGAGGCTGCTGCTCCCCCAC TGGGCCAAGGTGGTGTGCTGACAGATCCGGAGGCCGCC AAATACGTGCACGGCATCGCCGTCCACTGGTACCTG GATTTCTTGGCCCCCTGCCAAGGCCACCCTGGGCGAG ACACATAGACTGTTTCCTAATAACCATGCTGTTTCGCCA GCGAGGCCTGCGTGGGCAGCAAGTTCTGGGAACAGA GCGTGCGGCTGGGCAGCTGGGACAGAGGAATGCAGT ACAGCCACAGCATCATTACCAACCTGCTGTACCACGT GGTGGGCTGGACCGACTGGAACCTGGCCCTGAACCC CGAAGGCGGCCCAACTGGGTGCGGAACCTTCGTGGA CTCTCCTATCATCGTGGATATTACCAAGGATACCTTT TACAAGCAGCCTATGTTCTACCACCTGGGCCACTTCA GCAAGTTCATCCCTGAGGGCTCTCAGCGGGTGGGCCT GGTGGCCTCTCAGAAAAACGACCTGGATGCCGTTGC CCTGATGCACCCCGACGGCAGCGCCGTGGTGGTCGT CCTGAATAGAAGCTCCAAGGACGTGCCTCTGACCAT CAAGGACCCCGCTGTGGGATTTCTGGAAACCATCAG CCCTGGCTACAGCATCCACACCTACCTGTGGCGGCGG CAG	1772
GBA 变体 1 (无信号)	GCCCGGCCCTGCATCCCTAAGTCCTTCGGCTATTCTA GCGTGGTCTGCGTGTGTAATGCCACTTACTGCGACAG CTTCGACCCTCCTACCTTCCCCGCCCTTGGAACATTC	1773

[0694]

[0695]

序列)-nt	AGCAGATACGAGAGCACCAGAAGCGGCAGAAGAAT GGAAGTGAAGCATGGGCCCCAATCCAGGCCAACACAC CGGCACCGGCCTGCTGCTGACACTGCAACCTGAGCA GAAGTTCCAGAAGGTGAAGGGATTTGGAGGCGCCAT GACCGACGCTGCTGCTCTGAACATCCTGGCCCTCTCC CCACCTGCTCAGAACCTGCTGCTTAAAAGCTACTTCA GCGAGGAAGGCATCGGCTATAACATCATCAGAGTGC CCATGGCCAGCTGCGACTTCAGCATCAGAACATACA CCTACGCCGATACACCTGATGACTTCCAAGTGCACAA CTTCAGCCTGCCTGAAGAGGACACAAAGCTGAAAAT CCCCCTGATCCACCGGGCCCTGCAGCTGGCCCAGAG ACCTGTGAGCCTGCTGGCCTCTCCTTGGACAAGCCCC ACCTGGCTGAAGACCAATGGAGCTGTGAACGGCAAG GGCAGCCTGAAGGGCCAGCCCGGCGACATCTACCAC CAAACCTGGGCTCGCTACTTCGTGAAATTCTGGACG CCTACGCTGAGCATAAGCTGCAATTTTGGGCCGTTAC AGCCGAGAACGAGCCTTCTGCCGGCCTGCTGTCTGG ATATCCTTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGAGCAC CAGAGAGACTTTATCGCCAGAGATCTGGGGCCTACC CTGGCTAACAGCACACACCACAACGTGCGGCTGCTG ATGCTGGACGATCAGAGGCTGCTGCTCCCCCACTGG GCCAAGGTGGTGTGACAGATCCGGAGGCCGCCAAA TACGTGCACGGCATCGCCGTCCACTGGTACCTGGATT TCCTGGCCCCCTGCCAAGGCCACCCTGGGCGAGACAC ATAGACTGTTTCCTAATACCATGCTGTTCCGCCAGCGA GGCCTGCGTGGGCAGCAAGTTCTGGGAACAGAGCGT GCGGCTGGGCAGCTGGGACAGAGGAATGCAGTACAG CCACAGCATCATTACCAACCTGCTGTACCACGTGGTG GGCTGGACCGACTGGAACCTGGCCCTGAACCCCGAA GGCGGCCCAACTGGGTGCGGAACCTTCGTGGACTCT CCTATCATCGTGGATATTACCAAGGATACCTTTTACA AGCAGCCTATGTTCTACCACCTGGGCCACTTCAGCAA GTTTCATCCCTGAGGGCTCTCAGCGGGTGGGCCTGGTG GCCTCTCAGAAAAACGACCTGGATGCCGTTGCCCTG ATGCACCCCGACGGCAGCGCCGTGGTGGTCTGCTCCTG AATAGAAGCTCCAAGGACGTGCCTCTGACCATCAAG GACCCCGCTGTGGGATTTCTGGAAACCATCAGCCCTG GCTACAGCATCCACACCTACCTGTGGCGGCGGCAG	
GBA 变体 1 (信号序 列加下划 线)-aa	<u>MEFSSPSREECPKPLSRVSI</u> MAGSLTGLLLLQAVSWASG ARPCIPKSFGYSSVVCVSNATYCDSPPTFPALGTF YESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQK VKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIG YNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDT KLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVN GKGS�KGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFW AVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPT LANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAK YVHGIAVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASE ACVGSKFWEQSVRLGSDRGMQYSHSIITNLLYHVVG WTDWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQP	1774

	MFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHP DGSVVVVLNRSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSIHT YLWRRQ	
GBA 变体 1 (无信号 序列)-aa	ARPCIPKSFYSSVVCV CNATYCDSDPPTFPALGTFSR YESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQK VKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLKSYFSEEGIG YNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDT KLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVN GKGS LKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFW AVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIARDLGPT LANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAK YVHGIAVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASE ACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVG WTDWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQP MFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHP DGSVVVVLNRSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSIHT YLWRRQ	1775
GBA 变体 2 (信号序 列加下划 线)-nt	ATGGAGTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCA <u>AGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGGCAGCC</u> <u>TCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCGTGGGC</u> <u>ATCAGGTGCCCCGCCCTGCATCCCTAAAAGCTTCGGC</u> TACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTGCAATGCCACATACT GTGACTCCTTTGACCCCCGACCTTTCCTGCCCTTGGT ACCTTCAGCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGA CGGATGGAGCTGAGTATGGGGCCCATCCAGGCTAAT CACACGGGCACAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGCCA GAACAGAAGTTCCAGAAAGTGAAGGGATTTGGAGGG GCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCCC TGTCACCCCCTGCCCAAATTTGCTACTTAAATCGTA CTTCTCTGAAGAAGGAATCGGATATAACATCATCCG GGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCCGCACC TACACCTATGCAGACACCCCTGATGATTTCCAGTTGC ACAACCTTCAGCCTCCAGAGGAAGATACCAAGCTCA AGATACCCCTGATTCACCGAGCCCTGCAGTTGGCCCA GCGTCCCGTTTCACTCCTTGCCAGCCCCTGGACATCA CCCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGCGGTGAATGGG AAGGGGTCACTCAAGGGACAGCCCGGAGACATCTAC CACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCTTG ATGCCTATGCTGAGCACAAGTTACAGTTCTGGGCAGT GACAGCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGT GGATACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGAAC ATCAGCGAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGTCCTAC CCTCGCCAACAGTACTCACCACAATGTCCGCCTACTC ATGCTGGATGACCAACGCTTGCTGCTGCCCCACTGGG CAAAGGTGGTACTGACAGACCCAGAAGCAGCTAAAT ATGTTTATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTT TCTGGCTCCAGCCAAAGCCACCCTAGGGGAGACACA CCGCCTGTTCCCCAACACCATGCTCTTTGCCTCAGAG GCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCTGGGAGCAGAGTGTG	1776

[0696]

	CGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGC CACAGCATCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCG GCTGGACCGACTGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAG GAGGACCCAATTGGGTGCGTAACTTTGTGACAGTCC CATCATTGTAGACATCACCAAGGACACGTTTTACAAA CAGCCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTTCAGCAAGT TCATTCTGAGGGCTCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGC CAGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCACTGAT GCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCGTGCTAAAC CGCTCCTCTAAGGATGTGCCTCTTACCATCAAGGATC CTGCTGTGGGCTTCTGAGACAATCTCACCTGGCTA CTCCATTCACACCTACCTGTGGCGTCGCCAG	
GBA 变体 2 (无信号 序列)-nt	GCCCCCCCCTGCATCCCTAAAAGCTTCGGCTACAGCT CGGTGGTGTGTGTCTGCAATGCCACATACTGTGACTC CTTTGACCCCCCGACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCA GCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGG AGCTGAGTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGG GCACAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAGAACAGA AGTTCCAGAAAGTGAAGGGATTTGGAGGGGCCATGA CAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCCCTGTCACC CCCTGCCCAAAATTTGCTACTTAAATCGTACTTCTCT GAAGAAGGAATCGGATATAACATCATCCGGGTACCC ATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCCGCACCTACACCT ATGCAGACACCCCTGATGATTTCCAGTTGCACAACCT CAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATACC CCTGATTACCCGAGCCCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCC GTTTCACCTCCTTGCCAGCCCTGGACATCACCCACTT GGCTCAAGACCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGT CACTCAAGGGACAGCCCGGAGACATCTACCACCAGA CCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTA TGCTGAGCACAAGTTACAGTTCTGGGCAGTGACAGC TGAAGTATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTGGATAC CCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGAACATCAGC GAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGTCCTACCCTCGC CAACAGTACTCACCACAATGTCCGCCTACTCATGCTG GATGACCAACGCTTGCTGCTGCCCCACTGGGCAAAG GTGGTACTGACAGACCCAGAAGCAGCTAAATATGTT CATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTTCTGG CTCCAGCCAAAGCCACCCTAGGGGAGACACACCGCC TGTTCCCCAACACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTG TGTGGGCTCCAAGTTCTGGGAGCAGAGTGTGCGGCT AGGCTCCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGCCACAG CATCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCGGCTGG ACCGACTGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGA CCAATTGGGTGCGTAACTTTGTGACAGTCCCATCA TTGTAGACATCACCAAGGACACGTTTTACAAACAGC CCATGTTCTACCACCTTGGCCACTTCAGCAAGTTCAT TCCTGAGGGCTCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAG TCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCACTGATGCA TCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCGTGCTAAACCGC	1777

[0697]

	TCCTCTAAGGATGTGCCTCTTACCATCAAGGATCCTG CTGTGGGCTTCCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTC CATTACACCTACCTGTGGCGTCGCCAG	
GBA 变体 2 (信号序 列加下划 线)-aa	<u>MEFSSPSREECPKPLSRV SIMAGSLTG LLLLQAVSWASG</u> ARPCIPKSF GYSSVVCV CNATYCD SFD PPTFPALGTFSR YESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQK VKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLSYFSEEGIG YNIIRVPMASCD FSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDT KLKIPLIHRALQLAQRVSLASPWTSPTWLKTNGAVN GKGSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFW AVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIARDLGPT LANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAK YVHGIAVHWYLD FLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASE ACVGSKFWEQSVRLG SWDRGMQYSHSIITNLLYHVVG WTDWNLALNPEG GPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQP MFYHLGHFSKFIPEG SQRVGLVASQKNDLDAVALMHP DGS AVVVVLNRSSKDVPLTIKDPAVG FLETISPGYSIHT YLWRRQ	1778
GBA 变体 2 (无信号 序列)-aa	ARPCIPKSF GYSSVVCV CNATYCD SFD PPTFPALGTFSR YESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQK VKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLSYFSEEGIG YNIIRVPMASCD FSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDT KLKIPLIHRALQLAQRVSLASPWTSPTWLKTNGAVN GKGSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFW AVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIARDLGPT LANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAK YVHGIAVHWYLD FLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASE ACVGSKFWEQSVRLG SWDRGMQYSHSIITNLLYHVVG WTDWNLALNPEG GPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQP MFYHLGHFSKFIPEG SQRVGLVASQKNDLDAVALMHP DGS AVVVVLNRSSKDVPLTIKDPAVG FLETISPGYSIHT YLWRRQ	1779
GBA 变体 3 (信号序 列加下划 线)-nt	<u>atggaattcagcagccccagcagagaggaatgccccagcctctgagccgggtgtca</u> <u>atcatggccggtatctgacaggactgctgctgctcaggccgtgcttggccttctggc</u> <u>gctagacctgcatccccagagcttcggctacagcagcgtcgtgtgctgtgcaatgc</u> <u>cacctactgcgacagcttcgacctcctaccttctgctctggcaccctcagcagatac</u> <u>gagagcaccagatccggcagacggatggaactgagcatgggacccatccaggccaa</u> <u>tcacacaggcactggcctgctgctgacactgcagcctgagcagaaattccagaaagtgc</u> <u>aaaggcttcggcggagccatgacagatgccgctgctgaatatcctggctctgtctcc</u> <u>accagctcagaacctgctgctcaagagctacttcagcgaggaaggcatcggctacaac</u> <u>atcatcagagtgcctatggccagctgcgacttcagcatcaggacctacacctacgccg</u> <u>acacacccgacgattccagctgcacaacttcagcctgctgaagaggacaccaagct</u> <u>gaagatccctctgatccacagagccctgcagctggcacaagacccgtgtcactgctg</u> <u>gcctctccatggacatctcccacctggctgaaaacaaatggcgccgtgaatggcaagg</u> <u>gcagcctgaaaggccaacctggcgacatctaccaccagacctgggccaagatactctgt</u> <u>gaagttcctggacgcctatgccgagcacaagctgcagtttgggcccgtgacagccgag</u> <u>aacgaaccttctgctggactgctgagcgggtaccccttcagtgcctgggctttacccc</u> <u>gagcaccagcgggactttatcgccgtgatctgggacccacactggccaatagcacc</u> <u>accataatgtgcggctgctgatgctggacgaccagagactgcttctgccccactgggct</u>	1780

[0698]

[0699]

	aaagtggctgacagatcctgagggccgcaaacgtgcacggaatcgccgtgact ggatatggactttctggccctgccaaggccacactgggagagacacacagactgtc cccaacaccatgctgttcgccagcgaagcctgtgtgggcagcaagttttgggaacaga gctgtcggctcggcagctgggatagaggcatgcagtacagccacagcatcatcacca acctgctgtaccacgtcgtcggctggaccgactggaatctggccctgaatctgaaggc ggccctaactgggtccgaaactcgtggacagccccatcatcgtggacatcaccaagg acaccttctacaagcagcccatgttctaccacctgggacacttcagcaagttcatccccg agggctctcagcgcgttgactggtggcttccagaagaacgatctggacgccgtggc tctgatgcacctgatggatctgctgtggtggtgctgaaccgcagcagcaaatgtgt gcccctgaccatcaaggatcccgccgtgggattcctggaacaatcagccctggctact ccatccacactacgtgtggcgtagacag	
GBA 变体 3 (无信号 序列)-nt	gctagaccttgcaccccaagacttcggctacagcagcgtcgtgtgcgtgtgcaatgc cacctactgcgacagcttcgacctctacatttctgctctgggcaccttcagcagatac gagagcaccagatccggcagacggatggaactgagcatgggacccatccaggccaa tcacacaggcactggcctgctgtgacactgcagcctgagcagaaattccagaaagt aaaggcttcggcgagccatgacagatgccgccgtctgaatatcctggctctgtctcc accagctcagaacctgctgctcaagagctacttcagcaggaaggcatcggtacaa atcatcagagtgccatggcagctgcgacttcagcatcaggacctacacctacgccg acacacccgacgatttcagctgcacaaactcagcctgcctgaagaggacaccaagct gaagatccctctgatccacagagccctgcagctggcacaagaccgtgtcactgctg gccttccatggacatctcccacctggctgaaaacaatggcgccgtgaatggcaagg gcagcctgaaaggccaacctggcgacatctaccaccagacctgggcccagatactcgt gaagttcctggacgcctatgccgagcacaagctgcagtttgggcccgtgacagccgag aacgaaccttctgctggactgctgagcggctaccccttcagtgcctgggctttacccc gagcaccagcgggactttatcgcccgtgatctgggacccacactggccaatagcacc accataatgtcggctgctgatctggacgaccagagactgcttctgcccactgggct aaagtggctgacagatcctgagggccgcaaacgtgcacggaatcgccgtgact ggatatggactttctggccctgccaaggccacactgggagagacacacagactgtc cccaacaccatgctgttcgccagcgaagcctgtgtgggcagcaagttttgggaacaga gctgtcggctcggcagctgggatagaggcatgcagtacagccacagcatcatcacca acctgctgtaccacgtcgtcggctggaccgactggaatctggccctgaatctgaaggc ggccctaactgggtccgaaactcgtggacagccccatcatcgtggacatcaccaagg acaccttctacaagcagcccatgttctaccacctgggacacttcagcaagttcatccccg agggctctcagcgcgttgactggtggcttccagaagaacgatctggacgccgtggc tctgatgcacctgatggatctgctgtggtggtgctgaaccgcagcagcaaatgtgt gcccctgaccatcaaggatcccgccgtgggattcctggaacaatcagccctggctact ccatccacactacgtgtggcgtagacag	1781
GBA 变体 3 (信号序 列加下划 线)-aa	<u>MEFSSPSREECPKPLSRV</u> <u>SIMAGSLTGLLLLQAVSWASG</u> ARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSR YESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQK VKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLSYFSEEGIG YNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDT KLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVN GKGSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFW AVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRDIFIARDLGPT LANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAK YVHGIAVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASE ACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVG WTDWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQP MFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNLDLDAVALMHP	1782

[0700]

	DGSAVVVVVLNRSSKDVPLTIKDPVGVGFLETISPGYSIHT YLWRRQ	
GBA 变体 3 (无信号 序列)-aa	ARPCIPKSFSGYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSR YESTRSGRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQK VKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIG YNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDT KLKIPLIHRALQLAQRPVSLLASPWTSPWLKTNGAVN GKGSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFW AVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRDIFIARDLGPT LANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAK YVHGIAVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASE ACVGSKFWEQSVRLGSDRGMQYSHSIITNLLYHVVG WTDWNLALNPEGGPWNVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQP MFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHP DGSAVVVVVLNRSSKDVPLTIKDPVGVGFLETISPGYSIHT YLWRRQ	1783

[0701] 在一些实施方案中,经编码的GBA蛋白或其功能变体包含SEQ ID NO:1740、1742、1744、1746、1748、1774、1775、1778、1779、1782或1783中的任一者的氨基酸序列,或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列。在一些实施方案中,经编码的GBA蛋白或其功能变体包含SEQ ID NO:1740、1742、1744、1746、1748、1774、1775、1778、1779、1782或1783中的任一者的氨基酸序列,或相对于前述氨基酸序列中的任一者具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的氨基酸。在一些实施方案中,经编码的GBA蛋白或其功能变体包含SEQ ID NO:1741、1743、1744、1745、1747、1749、1772、1773、1776、1777、1780或1781中的任一者的核苷酸序列,或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0702] 在一些实施方案中,编码GBA蛋白或其功能变体的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1741、1743、1744、1745、1747、1749、1772、1773、1776、1777、1780或1781中的任一者的核苷酸序列,或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列。在一些实施方案中,编码GBA蛋白或其功能变体的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1741、1743、1744、1745、1747、1749、1772、1773、1776、1777、1780或1781中的任一者的核苷酸序列,或相对于前述核苷酸序列中的任一者具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的核苷酸序列。在一些实施方案中,编码GBA蛋白或其功能变体的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1773的核苷酸序列,与SEQ ID NO:1773大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列,或相对于SEQ ID NO:1773具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的核苷酸序列。在一些实施方案中,编码GBA蛋白或其功能变体的核苷酸序列不包含终止密码子。在一些实施方案中,编码GBA蛋白或其功能变体的核苷酸序列是密码子优化的核苷酸序列。

[0703] 在一些实施方案中,编码本文所描述的GBA蛋白的密码子优化的核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:1773)将供体剪接位点,例如包含AGGGTAAGC的序列或根据SEQ ID NO:1776的核苷酸序列编号的117的核苷酸49的核苷酸序列,置换为AGAGTGTCC的核苷酸序

列,例如相对于AGGGTAAGC的核苷酸序列或根据SEQ ID NO:1776的核苷酸序列编号的117的核苷酸49包含至少一个、两个、三个或四个修饰,例如突变的核苷酸序列。在一些实施方案中,编码本文所描述的GBA蛋白的密码子优化的核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:1773)与SEQ ID NO:1776的核苷酸序列相比含有超过121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140个或更多个独特修饰,例如突变。在一些实施方案中,本文所描述的GBA蛋白的密码子优化的核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:1773)包含独特的GC含量型态。不希望受理论约束,在一些实施方案中,据信改变本文所描述的GBA蛋白的核苷酸序列的GC含量增强细胞(例如,人类细胞或神经元细胞)中密码子优化的核苷酸序列的表达。

[0704] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码GCase蛋白的有效载荷区。经编码的GCase蛋白可以来源于任何物种,诸如但不限于人类、非人类灵长类动物或啮齿动物。

[0705] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码人类(智人)GCase蛋白或其变体的有效载荷区。

[0706] 本文公开内容的各种实施方案提供了包含病毒基因组的腺相关病毒(AAV)粒子,所述病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码与如表3中所提供的人类GCase蛋白序列或其片段具有至少90%序列同一性的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,AAV病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码与如表3中所提供的GCase蛋白序列或其片段具有至少95%序列同一性的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,AAV病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码与如表3中所提供的GCase蛋白序列或其片段具有至少98%序列同一性的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,AAV病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码与如表3中所提供的GCase蛋白序列或其片段具有至少99%序列同一性的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,AAV病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码如表3中所提供的GCase蛋白序列或其片段的核酸序列。

[0707] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码重组葡萄糖脑苷脂酶的核酸序列,所述重组葡萄糖脑苷脂酶是根据:伊米苷酶(Cerezyme)(Genzyme Corp.),一种用于治疗戈谢病的重组GCase;维拉苷酶(Vpriv)(Shire Human Genetic Therapies Inc.),一种用于治疗戈谢病的重组GCase;或美国专利号8227230、美国专利号8741620或美国专利号8790641,每篇专利以引用的方式并入本文中,描述他利苷酶 α (Elelyso)(Pfizer Inc.),一种用于治疗戈谢病的重组GCase。

[0708] 在一些实施方案中,GCase蛋白来源于非人类灵长类动物,诸如食蟹猴(长尾猕猴)的GBA蛋白编码序列。某些实施方案提供了呈长尾猕猴序列的人类化型式的GCase蛋白。

[0709] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码食蟹猴或食蟹(长尾)猕猴(长尾猕猴)GCase蛋白或其变体的有效载荷区。

[0710] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码恒河猴(恒河猕猴)GCase蛋白或其变体的有效载荷区。

[0711] 在一些实施方案中,GCase蛋白可以包含与上文所描述和表3所提供的那些中的任一者具有50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0712] 在一些实施方案中,GCCase蛋白可以由与上文所描述和表3所提供的那些中的任一者具有50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核酸序列编码。

[0713] 如本文所描述的GCCase蛋白有效载荷可以编码任何GCCase蛋白,或GCCase蛋白的任何部分或衍生物,并且不限于表3所提供的GCCase蛋白或蛋白编码序列。

[0714] 有效载荷组件:增强元件

[0715] 在一些实施方案中,本文所描述的编码GBA蛋白的病毒基因组包含增强元件或其功能变体。在一些实施方案中,经编码的增强包括鞘脂激活蛋白原 (PSAP) 蛋白、鞘脂激活蛋白C (SapC) 蛋白或其功能变体;细胞穿透肽 (例如,ApoEIII肽、TAT肽和/或ApoB肽) 或其功能变体;或溶酶体靶向信号或其功能变体。

[0716] 在一些实施方案中,病毒基因组包含进一步编码鞘脂激活蛋白原 (PSAP) 蛋白或鞘脂激活蛋白C (SapC) 蛋白或其功能变体的有效载荷区,例如,如本文中,例如表4或表16中所描述。

[0717] 表4. 示例性PSAP和鞘脂激活蛋白序列

[0718]

SEQ ID NO:	类型	物种	描述
1750	蛋白质	智人	鞘脂激活蛋白原同功型 A 前体蛋白, NP_002769.1
1751	DNA	智人	PSAP 转录变体 1, NM_002778.4
1752	蛋白质	智人	鞘脂激活蛋白原同功型 B 前体蛋白, NP_001035930.1
1753	DNA	智人	PSAP 转录变体 2, NM_001042465.3
1754	蛋白质	智人	鞘脂激活蛋白原同功型 C 前体蛋白, NP_001035931.1
1755	DNA	智人	PSAP 转录变体 3, NM_001042466.3
1756	蛋白质	智人	hSapA, SEQ ID NO: 1750 的氨基酸 60 至 140: SLPDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVY LEKTCDWLPKPNMSASCKEIVDSYLPVILDII KGEMSRPGEVCSALNLCS
1757	蛋白质	智人	hSapB, SEQ ID NO: 1750 的氨基酸 195 至 275: GDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQALVE HVKEECDRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQM MMHMQPKEICALVGFCDEVK
1758	蛋白质	智人	hSapC, SEQ ID NO: 1750 的氨基酸 311 至 390: SDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDA FDKMCSKLPKSLSEECQEVVDITYGSSILSILL EEVSPELVCSMLHLCSG
1784	蛋白质	智人	hSapD, SEQ ID NO 1750 的氨基酸 405 至 486: DGGFCEVCKKLVGYLDRNLEKNSTKQEILA ALEKGCsFLPDYQKQCDQFVAEYEPVLIEI LVEVMDPSFVCLKIGACPSAH
1856	DNA	智人	信号序列 atgtacgccctcttctctctgccagcctctctggcgcggtctagcc
1857	蛋白质	智人	信号序列 MYALFLLASLLGAALA

[0719]

表16. 示例性增强元件

描述	序列	SEQ ID NO:
PSAP 或 鞘脂激活 蛋白		
PSAP (信号序列 加下划 线)-nt	atgtacgccctcttctcctggccagcctcctgggcgcggctctagccggcccggtcct tggactgaaagaatgcaccaggggctcggcagtggtgcccagaatgtgaagacgg cgtccgactgcggggcagtgaaagcactgcctgcagaccgttggacaagccaacag tgaaatcccttccctgcgacatatgcaaagacgtgtaccgcagctggtgatatgctga aggacaatgccactgaggaggagatcctgtttacttggaagaagcctgtgactggctt ccgaaaccgaacatgtctgctcatgcaaggagatagtgactcctacccctgtcatc ctggacatcattaaaggagaaatgagccgtcctggggaggtgtgctctgctcctcaacct ctgcgagtgctccagaagcacctagcagagctgaatcaccagaagcagctggagtc caataagatcccagagctggacatgactgaggtggtggcccccttcatggccaacatc cctctcctcctctacccctcaggacggccccgcagcaagcccagccaaaggataat ggggacgttggcaggactgcattcagatggtgactgacatccagactgctgtacgga ccaactccaccttgtccaggccttggaggaaatgtcaaggaggagtgtagccgctg ggccctggcatggccgacatatgcaagaactatatcagccagtattctgaaattgctatc cagatgatgatgcacatgcaaccaaggagatctgtgcgctggttgggttctgtgatga ggtgaaagagatgcccagcagactctggtccccgcaaagtggcctccaagaatgtc atccctgccctggaaactggtggagcccattaaagaagcacgaggtcccagcaaagtctg atgttactgtgaggtgtgtgaattcctggtgaaggaggtgaccaagctgattgacaaca acaagactgagaagaataactgcacgcttggacaaaatgtgctgaagctgccgaa gtccctgtcgggaagagtgcaggaggtggtggacacgtacggcagctccatcctgtc catcctgtcggaggaggtcagccctgagctggtgtgcagcatgctgcacctgtgctctg gcacgcggctgctgcactgaccgttcacgtgactcagccaaagacggtggtctctg cgaagtgtgcaagaagctggtgggttatttgatcgcacactggagaaaaacagcacc aagcaggagatcctggctgctcttgagaaggctgcagcttctgccagacccttacc agaagcagtgatcagtttggcagagtagcagccgtgctgacgagatcctggt ggaggtgatggatccttctcgtgtgcttgaaaattggagcctgccccctggccataa gcccttgttgggaactgagaagtgtatatggggcccaagctactggtgccagaacaca gagacagcagcccagtgcaatgctgtcagcattgcaaacgccatgtgtggaactag	1858
PSAP (无信号序 列)-nt	ggccccgtccttgactgaaagaatgcaccaggggctcggcagtggtgcccagaat gtgaagacggcgtccgactgcggggcagtgaaagcactgcctgcagaccgttggaaac aagccaacagtgaatcccttccctgcgacatatgcaaagacgtgtaccgcagctg gtgatatgctgaaggacaatgccactgaggaggagatcctgtttacttggaagaagacc tgtgactggcttccgaaaccgaacatgtctgctcatgcaaggagatagtgactcctac ctccctgtcatcctggacatcattaaaggagaaatgagccgtcctggggaggtgtgctc tgctcctcaacctctgcgagtgctcctcagaagcacctagcagagctgaatcaccagaag cagctggagtcgaataagatcccagagctggacatgactgaggtggtggcccccttca tggccaacatccctctcctcctctacccctcaggacggccccgcagcaagcccagcc aaaggataatggggacgttggcaggactgcattcagatggtgactgacatccagact gctgtacggaccaactccaccttgtccaggccttgggtgaacatgtcaaggaggagt gtgaccgctgggccctggcatggccgacatatgcaagaactatatcagccagtattct gaaattgctatccagatgatgatgcacatgcaaccaaggagatctgtgcgctggttgg gttctgtgatgaggtgaaagagatgcccagcagactctggccccgcaaagtggcc	1859

[0720]

[0721]

	tccaagaatgtcatccctgccctggaactggtggagcccattaagaagcacgaggtcc cagcaaagtctgatgtttactgtgaggtgtgtgaattcctggtgaaggaggtgaccaag ctgattgacaacaacaagactgagaaagaaatactcgacgcttttgacaaaatgtgtc gaagctgccgaagtccctgtcgggaagagtccaggaggtggtggacacgtacggca gtccatcctgtccatcctgtgaggaggtcagccctgagctggtgtgcagcatgtg cacctctgtctggcacgcggtgcctgcactgaccgttcacgtgactcagccaaagg acggtggcttctgcgaagtgtgcaagaagctggtgggttatttgatcgcaacctggag aaaaacagcaccaagcaggagatcctggctgctcttgagaaaggctgcagcttcctgc cagacccttaccagaagcagtgatcagtttggcagagtacgagcccgtgtgatc gagatcctggtggaggtgatggatccttctctgtgtgcttgaatggagcctgcccc tcggcccataagccctgttgggaactgagaagtgtatatggggcccaagctactggtg ccagaacacagagacagcagcccagtgcaatgctgtcgagcattgcaaagccatgt gtggaactag	
PSAP (信号序列 加下划 线)-aa	MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNV KTASDCGAVKHCLQTVWNKPTVKSLPCDICKDVVTA GDMLKDNAEEEEILVYLEKTCDWLKPKNMSASCKEIV DSYLPVILDIKGEVCSALNLCESLQKHLAELN HQQLESNKIPELDMTEVVAPFMANIPLLLYPQDGPRS KPQPKDNGDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQALVE HVKEECDRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMMMHHMQP KEICALVGFCDEVKEMPMQTLVPAKVASKNVIPALEL VEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEK EILDAFDKMCSKLPKSLSEECQEVVDYTGSSILSILLEEV SPELVCSMLHLCSGTRLPALTVHVTQPKDGGFCEVCK KLVGYLDRNLEKNSTKQEILAALEKGCSFLPDYQKQC DQFVAEYEPVLIEILVEVMDPSFVCLKIGACPSAHKPLL GTEKCIWGPSYWCQNTETAAQCNAVEHCKRHVWN	1750
PSAP (无信号序 列)	GPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCLQTV WNKPTVKSLPCDICKDVVTAAGDMLKDNAEEEEILVY LEKTCDWLKPKNMSASCKEIVDSYLPVILDIKGEVCS ALNLCESLQKHLAELNHQQLESNKIPELDMTE VVAPFMANIPLLLYPQDGPRSKPQPKDNGDVCQDCIQ MVTDIQTAVRTNSTFVQALVEHVKEECDRLGPGMADI CKNYISQYSEIAIQMMMHHMQPKEICALVGFCDEVKEM PMQTLVPAKVASKNVIPALELVEPIKKHEVPAKSDVYC EVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDKMCSKLPKSL SEECQEVVDYTGSSILSILLEEVPELVCSMLHLCSGTR LPALTVHVTQPKDGGFCEVCKKLVGYLDRNLEKNSTK QEILAALEKGCSFLPDYQKQCDQFVAEYEPVLIEILVE VMDPSFVCLKIGACPSAHKPLLGTEKCIWGPSYWCQN TETAAQCNAVEHCKRHVWN	1785
SAPC (信号序列 加下划 线)-nt	atgtacgccctcttctcctggccagcctcctggcgcggtcttagccgtgaaagagat gcccattgcagactctggtccccgcaaagtggcctccaagaatgtcatccctgccctg gaactggtggagcccattaagaagcacgaggtccagcaaagtctgatgtttactgtga ggtgtgtgaattcctggtgaaggaggtgaccaagctgattgacaacaacaagactgag aaagaaatactcgacgcttttgacaaaatgtgtcgaagctgccgaagtccctgtcggga agagtgccaggaggtggtggacacgtacggcagctccatcctgtccatcctgtgga ggaggtcagccctgagctggtgtgcagcatgtgcacctctgctctggc	1786
SAPC	gtgaaagagatgcccattgcagactctggtccccgcaaagtggcctccaagaatgtca	1787

[0722]

(无信号序列)-nt	tcctgccctggaactggtggagccattaagaagcacgaggtcccagcaaagtctgagtgttactgtgaggtgtgtgaattcctggtgaaggaggtgaccaagctgattgacaacaa caagactgagaaagaaatactcgacgcttttgacaaaatgtgctcgaagctgccgaagt ccctgtcggagagtgccaggaggtggtggacacgtacggcagctccatcctgtccat cctgctggaggaggtcagccctgagctggtgtgcagcatgctgcacctctgctctggc	
SAPC (信号序列 加下划 线)-aa	MYALFLLASLLGAALAVKEMPMQTLVPAKVASKNVIP ALELVEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNN KTEKEILDAFDKMCSKLPKSLSEECQEVVDITYGSSILSI LLEEVSPELVCSMLHLCSG	1788
SAPC (无信号序列)-aa	VKEMPMQTLVPAKVASKNVIPALELVEPIKKHEVPAKS DVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDKMCSKLPKSLSEECQEVVDITYGSSILSILLEEVSPELVCSMLHLCS G	1789
SAPCv2 (信号序列 加下划 线)-nt	atgtacgccctcttctcctgcccagcctcctggcgcggtcttagcctctgatgtttact gtgaggtgtgtgaattcctggtgaaggaggtgaccaagctgattgacaacaacaagac tgagaaagaaatactcgacgcttttgacaaaatgtgctcgaagctgccgaagtcctgt cggaagagtgccaggaggtggtggacacgtacggcagctccatcctgtccatcctgct ggaggaggtcagccctgagctggtgtgcagcatgctgcacctctgctctggc	1790
SAPCv2 (无信号序列)-nt	tctgatgtttactgtgaggtgtgtgaattcctggtgaaggaggtgaccaagctgattgac aacaacaagactgagaaagaaatactcgacgcttttgacaaaatgtgctcgaagctgc cgaagtcctgtcggagagtgccaggaggtggtggacacgtacggcagctccatcc tgtccatcctgctggaggaggtcagccctgagctggtgtgcagcatgctgcacctctgc tctggc	1791
SAPCv2 (信号序列 加下划 线)-aa	MYALFLLASLLGAALASDVYCEVCEFLVKEVTKLIDN NKTEKEILDAFDKMCSKLPKSLSEECQEVVDITYGSSILS ILLEEVSPELVCSMLHLCSG	1792
SAPCv2 (无信号序列)-aa	SDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDKMCSK LPKSLSEECQEVVDITYGSSILSILLEEVSPELVCSMLHLCS SG	1758
细胞穿透肽		
TAT - nt	tatggcaggaaaaagcggaggcaaggcgccgccccccag	1793
TAT - aa	YGRKKRRQRRRPPQ	1794
ApoB - nt	tccgtaatcgacgccttacagtataagctggagggaaccaccagattgacaaggaaac gagggttaagcttgctactgcactatccctgagcaataaatt	1795
ApoB - aa	SVIDALQYKLEGTTTLTRKRGLKLATALSLSNKF	1796
ApoEII - nt	ctacggaagctgcggaagcggctactgctgcggaacttcggaacggctactg	1797
ApoEII - aa	LRKLRKRLLLRKLRKRL	1798
溶酶体靶向序列 (LTS)		

[0723]	LTS1 - nt	aagtttgaaagacag	1799
	LTS1 - aa	KFERQ	1800
	LTS2 - nt	atgaaggagaccgctgctgcaaagttcgagagacagcatatggatagctccacaagc gccgca	1801
	LTS2 - aa	MKETAAAKFERQHMDSSTSAA	1802
	LTS3 - nt	cagaaaatcctggat	1803
	LTS3 - aa	QKILD	1804
	LTS4 - nt	cagagattcttcgag	1805
	LTS4 - aa	QRFFE	1806
	LTS5 - nt	aagtttgaaagacagcagaaaatcctggatcagagattcttcgag	1807
	LTS5 - aa	KFERQQKILDQRFFE	1808

[0724] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码SapC蛋白的有效载荷区。经编码的SapC可以来源于任何物种,诸如但不限于人类、非人类灵长类动物或啮齿动物。认为SapC蛋白通过局部改变脂质膜、暴露葡萄糖神经酰胺分子进行水解来协调GBA的GCase活性(参见Alattia, Jean-René等, "Molecular imaging of membrane interfaces reveals mode of β -glucosidase activation by saposin C." Proceedings of the National Academy of Sciences 104.44(2007):17394-17399,其内容以全文引用的方式并入本文中)。

[0725] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码人类(智人)SapC或其变体的有效载荷区。

[0726] 本文公开内容的各种实施方案提供了包含病毒基因组的腺相关病毒(AAV)粒子,所述病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码与如表4中所提供的人类SapC(hSapC)序列或其片段具有至少90%序列同一性的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,AAV病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码与如表4中所提供的鞘脂激活蛋白序列或其片段具有至少95%序列同一性的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,AAV病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码与如表4中所提供的鞘脂激活蛋白序列或其片段具有至少98%序列同一性的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,AAV病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码与如表4中所提供的鞘脂激活蛋白序列或其片段具有至少99%序列同一性的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,AAV病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码如表4中所提供的鞘脂激活蛋白序列或其片段的核酸序列。

[0727] 在一些实施方案中,鞘脂激活蛋白多肽来源于非人类灵长类动物,诸如食蟹猴(长尾猕猴)的鞘脂激活蛋白或PSAP序列(cynoPSAP或cPSAP)。某些实施方案提供了呈长尾猕猴(HcynoSap)序列的人类化型式的鞘脂激活蛋白多肽。

[0728] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码食蟹猴或食蟹(长尾)猕猴(长尾猕猴)PSAP或鞘脂激活蛋白或其变体的有效载荷区。

[0729] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码恒河猴(恒河猕猴)PSAP或鞘脂激活蛋白或其变体的有效载荷区。

[0730] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码鼠类(小鼠)PSAP或鞘脂激活蛋白或其变体的有效载荷区。

[0731] 在一些实施方案中,PSAP或鞘脂激活蛋白多肽可以包含与上文所描述和表4所提供的那些中的任一者具有50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、

61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0732] 在一些实施方案中,PSAP或鞘脂激活蛋白多肽可以由与上文所描述和表4所提供的那些中的任一者具有50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核酸序列编码。

[0733] 在一些实施方案中,病毒基因组包含进一步编码PD相关基因的有效载荷区,所述PD相关基因的表达缺乏引起或导致或促进PD的发展。此种PD相关基因包括GCCase/GBA1、GBA2、鞘脂激活蛋白原、LIMP2/SCARB2(例如,SCARB2基因的基因产物)、颗粒蛋白原、GALC、CTSB、SMPD1、GCH1、RAB7、VPS35、IL-34、TREM2、TMEM106B、任何前述者的组合或其功能片段。

[0734] 因此,在一些实施方案中,病毒基因组包含编码LIMP2/SCARB2,一种调节细胞内容酶体和内体转运的膜蛋白的有效载荷区。在一些实施方案中,SCARB2基因编码由NCBI参考序列NP_005497.1(以引用的方式并入本文中)表示的肽。在一些实施方案中,经分离的核酸包含已密码子优化的SCARB2编码序列。

[0735] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码GBA2蛋白(例如,GBA2基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,GBA2编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,GBA2编码序列编码包含NCBI参考序列NP_065995.1(以引用的方式并入本文中)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0736] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码GALC蛋白(例如,GALC基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,GALC编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,GALC编码序列编码包含NCBI参考序列NP_000144.2(以引用的方式并入本文中)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0737] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码CTSB蛋白(例如,CTSB基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,CTSB编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,CTSB编码序列编码包含NCBI参考序列NP_001899.1(以引用的方式并入)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0738] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码SMPD1蛋白(例如,SMPD1基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,SMPD1编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,SMPD1编码序列编码包含NCBI参考序列NP_000534.3(以引用的方式并入本文中)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0739] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码GCH1蛋白(例如,GCH1基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,GCH1编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,GCH1编码序列编码包含NCBI参考序列NP_000534.3(以引用的方式并入)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0740] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码RAB7L蛋白(例如,RAB7L基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,RAB7L编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子

优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,RAB7L编码包含NCBI参考序列NP_003920.1(以引用的方式并入)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0741] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码VPS35蛋白(例如,VPS35基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,VPS35编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,VPS35编码包含NCBI参考序列NP_060676.2(以引用的方式并入)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0742] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码IL-34蛋白(例如,IL34基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,IL-34编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,IL-34编码序列编码包含NCBI参考序列NP_689669.2(以引用的方式并入)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0743] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码TREM2蛋白(例如,TREM基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,TREM2编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,TREM2编码序列编码包含NCBI参考序列NP_061838.1(以引用的方式并入)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0744] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码TMEM106B蛋白(例如,TMEM106B基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,TMEM106B编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,TMEM106B编码序列编码包含NCBI参考序列NP_060844.2(以引用的方式并入)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0745] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码颗粒蛋白原(例如,PGRN基因的基因产物)的有效载荷区。在一些实施方案中,颗粒蛋白原编码序列已进行密码子优化(例如,经密码子优化以用于在哺乳动物细胞,例如人类细胞中表达)。在一些实施方案中,编码颗粒蛋白原(PGRN)的核酸序列编码包含NCBI参考序列NP_002078.1(以引用的方式并入)所列的氨基酸序列的蛋白质。

[0746] 在某些实施方案中,上述蛋白质,诸如GCase/GBA、GBA2、LIMP2/SCARB2、颗粒蛋白原、GALC、CTSB、SMPD1、GCH1、RAB7、VPS35、IL-34、TREM2、TMEM106B和鞘脂激活蛋白原(诸如SapA-SapD)中的任一者的功能片段可以包含约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约99%的由各自的wt基因或基因区段(诸如SapA-SapD的编码序列)编码的蛋白质。在一些实施方案中,wt序列的功能片段包含50%与99.9%之间(例如,50%与99.9%之间)的由wt序列编码的蛋白质。

[0747] 示例性GCase/SapC有效载荷

[0748] 在一些实施方案中,病毒基因组包含编码GCase蛋白和SapC蛋白(GCase/SapC多肽)的有效载荷区。经编码的GCase/SapC多肽可以来源于任何物种,诸如但不限于人类、非人灵长类动物或啮齿动物的GCase和SapC蛋白序列。

[0749] 本文公开内容的各种实施方案提供了包含病毒基因组的腺相关病毒(AAV)粒子,所述病毒基因组包含至少一个反向末端重复区和编码GCase/SapC多肽的核酸序列,所述GCase/SapC多肽具有与表3中所提供的人类GCase序列或其片段或变体具有至少90%序列同一性的区域和与表4或表16中所提供的人类SapC序列或其片段或变体具有至少90%序列同一性的区域。

[0750] 在一些实施方案中,GCase/SapC多肽可以包含与表3或表15的那些中的任一者具有50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的GCase区域。

[0751] 在一些实施方案中,GCase/SapC多肽可以包含与表4或表16的那些中的任一者具有50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的SapC区域。

[0752] 在一些实施方案中,GCase/SapC多肽可以由具有与表3或表15所描述的那些中的任一者具有50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的GCase区域的核酸序列编码。

[0753] 在一些实施方案中,GCase/SapC多肽可以由具有与表4或表16所描述的那些中的任一者具有50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的SapC区域的核酸序列编码。

[0754] 病毒基因组可以经工程设计以具有一个或多个间隔子或连接子区来分隔编码区或非编码区。在一些实施方案中,AAV粒子的有效载荷区可以任选地编码一个或多个连接子序列。在一些情况下,连接子可以是肽连接子,所述肽连接子可以用于连接由有效载荷区编码的多肽(即,GCase多肽和SapC多肽)。一些肽连接子可以在表达后裂解以分离GCase和SapC多肽,从而允许表达单独功能多肽。连接子裂解可以是酶促的。在一些情况下,连接子包含酶促裂解位点以促进细胞内或细胞外裂解。一些有效载荷区编码在从mRNA转录物翻译连接子序列期间中断多肽合成的连接子。此类连接子可以促进从单个转录物翻译单独蛋白质结构域(例如,GCase和SapC结构域)。在一些情况下,两个或更多个连接子由病毒基因组的有效载荷区编码。表2中给出了可以由AAV粒子病毒基因组的有效载荷区编码的连接子的非限制性实例。

[0755] 在一些实施方案中,GCase和SapC多肽在独立的AAV载体中单独递送。

[0756] 在某些实施方案中,用于表达Gcase和/或鞘脂激活蛋白的病毒基因组可以包含如表5中所描述的序列。

[0757] 在一些实施方案中,本文所描述的AAV病毒基因组包含增强元件,诸如溶酶体靶向肽序列(LTS)、细胞穿透肽(CPP)或两者。举例来说,在一些实施方案中,有效载荷可以具有编码溶酶体靶向肽的序列。编码溶酶体靶向肽的序列可以是来源于GCase的序列。在一些情况下,所述序列是有助于分子向溶酶体的细胞内运输的LIMP-2结合结构域或其变体,其负责经由LIMP-2将GCase向溶酶体细胞内运输(Liou,Benjamin等,Journal of Biological Chemistry 289.43(2014):30063-30074,其内容以全文引用的方式并入本文中)。

[0758] 示例性GBA AAV病毒基因组序列区和ITR至ITR序列

[0759] 在一些实施方案中,本文所描述的病毒基因组,例如AAV病毒基因组或载体基因组,包含可操作地连接至编码GBA蛋白的转基因的启动子。在一些实施方案中,病毒基因组还包含反向末端重复区、增强子、内含子、miR结合位点、聚A区或它们的组合。表5中提供了根据描述的病毒基因组的ITR至ITR序列内的示例性序列区。

[0760] 表5. ITR至ITR构建体中的示例性病毒基因组序列区

[0761]

描述	序列	SEQ ID NO:
ITR (130nt)	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgctcgggcg acctttggtcgcccgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtggcca actccatcactaggggttcct	1829
ITR(130nt)	aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactga ggccgggcgaccaaaggtcgcccacgcccgggctttgccgggcggcctcagt gagcgagcgagcgcgag	1830
ITR 变体 A	TATTAGATCTGATGGCCGC	1860

ITR 变体 B	CTCCATCACTAGGGGTTCCT	1861
ITR 变体 B	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC TGC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA AAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAA	1862
ITR 变体 C	TATTAGATCTGATGGCCGCG	1863
ITR 变体 D	TCCATCACTAGGGGTTCCTG	1864
CMV _{ie} 增强子	GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAA TTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG GCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCA ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACG GTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGAC CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATG	1831
CMV 启动子	gtgatgcggttttggcagtacatcaatggcggtgtagcggttgactcacggggat ttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgg gactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggcggttaggcgt gtacggtgggaggtctatataagcagagctc	1832
CMV 启动子区(CMV 增强子和启动子)	gacattgattattgactagtattataatagtaataacggggtcattagttcatagccca tatatggagttccggttacataacttacggtaaatggccgcctggctgaccgcca acgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagg gactttccattgacgtcaatgggtggagtagttacggtaaatgcccacttggcagtac atcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccc gcctggcattatgcccagtaacatgacattatgggactttctacttggcagtagatctac gtattagtcacgtattaccatggtgatgcggttttggcagtagatcaatgggcgtgga tagcggttgactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttt gttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattga cgcaaatgggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctc	1833
CB 启动子	ccacgttctgcttcaactctccccatctccccccctccccaccccaattttgtatttatt atttttaattattttgtgcagcgatgggggcggggggggggggcgcgccaggcg gggcggggcggggcgaggggcggggcggggcgagggcgagaggtgcggcg gcagccaatcagagcggcgcgtccgaaagtcttctttatggcgagggcgggcg gcggcgccctataaaaagcgaagcgcgcgggcg	1834
CAG 启动子	ctagtattataatagtaataacgtacggggtcattagttcatagcccatatatggagtccg cggtacataactacggtaaatggccgcctggctgaccgccaacgacccccgcc attgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaataggactttccattgacg tcaatgggtggagtagttacggtaaatgcccacttggcagtagatcaagtgtatcatat gccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgcc cagtagatgacattatgggactttctacttggcagtagatctacgtattagtcacgcta ttaccatggtcagagtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccctcc ccaccccaattttgtattatttttttaattattttgtgcagcgatggggcgggggg ggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgagggcgggggcg gggcgagggcgagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgtccgaaag ttcctttatggcgagggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcgaagcgcgcg	1835

[0762]

[0763]

	gcggggcGgagtcgctgcgcgctgccttcgccccgtccccgctccgccgcgc ctcgcgccgccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggc gggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggcttcttctt tctgtggctgcgtgaaagccttgaggggctccgggagggcccttctgctgggggga gcggtcggggggtgcgtgcgtgtgtgtgcgtggggagcgcgcgtgcggctc cgcgtgccggcggtgtgagcgtgcgggcgcggcgcggggcttctgctgcctc cgagtgctgcgcgaggggagcgcggccggggcggtgccccgcgtgcgggg ggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcgggggtgtgtgcgtgggggggtgag cagggggtgtgggcgcgtcggtcgggctgcaacccccctgcacccccctccccg agtgtctgagcacggcccggttcgggtgcggggctccgtacggggcggtggcgcg gggtcgcgtgcccggcgggggggtggcgaggtgggggtgcggggcgggg cggggcccctcggccggggagggctcggggaggggcgcggcgccccg gagcggcggtgtcggagggcgggcgagccgcagccattgcctttatgtaaat cgtgcgagagggcgagggacttcttctgcccgaatctgtgcggagccgaaatctg ggagggcgccgcacccccctctagcgggcgcggggcggaagcggtgcggcgcc ggcaggaaggaaatggcggggagggccttctgctgcgcgcgcgcgcgcgtcc cttctccctctcagcctcggggctgtcccggggggacggctgccttcggggggg acggggcagggcggggtcggcttctggcgtgtgaccggcggtctagagcctctg ctaaccatgttcagccttcttcttctacagctcctgggcaacgtgctggtattgtg ctgtctcatcattttggcaagaattc	
CBA 最小 启动子	catggtcgaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctccccccctccccac ccccatttctatttatttttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggg ggggggcgcgccagggcggggcggggcggggcgaggggcggggcggggc gagggcgagaggtgcggcgccagccaatcagagcggcgcgtccgaaagtctct tttatggcgagggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcgaagcgcgcgccgg gcg	1836
内含子 1	Ggagtcgctgcgcgctgccttcgccccgtccccgctccgccgcgcctcgcgc ccccccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacgg cccttctctcgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggcttcttcttctgtggt gcgtgaaagccttgaggggctccgggagggcccttctgctggggggagcggctcg gggggtgcgtgcgtgtgtgtgcgtggggagcgcgcgtgcggctccgcgtgc ccggcggtgtgagcgtgcgggcgcggcgcggggcttctgctcgcagtg gcgcgaggggagcgcggccggggcggtgccccgcgtgcgggggggggtgc gaggggaacaaaggctgcgtgcgggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggggt gtgggcgcgtcggtcgggtgcacccccctgcacccccctccccgagttgctga gcacggccccggttcgggtgcgggctccgtacggggcggtggcgcggggctcgc cgtgccgggcgggggggtggcgaggtgggggtgccgggcggggcgggggccg cctcggggccggggagggctcgggggaggggcgcggcgcccccgagcgcgcg gcggctgtcagggcgcgggcgagccgcagccattgcctttatgtaaatcgtgcgaga gggcgcagggacttcttctgcccgaatctgtgcggagccgaaatctgggagggc cgccgcacccccctagcgggcgcggggcggaagcggtgcggcgccggcagga ggaaatggcggggagggccttctgctgcgcgcgcgcgcgcgtcccccttctcctc tccagcctcgggctgtccgcggggggacggctgccttcgggggggacggggga gggcgggggtcggcttctggcgtgtgaccggcggtctagagcctctgtaaccatg ttcatgccttcttcttcttctaca	1837
EF-1 α 启动 子变体 1	gcatgcgtga	1838
EF-1 α 启动 子变体 2	gcatgcgtgaggctccgggtcccgtcagtgggcagagcgacatgcccacagtc cccgaagttgggggaggggtggcaattgaaccgggtgcctagagaaggtggc	1839

[0764]

(内含子加下划线)	gcggggtaaacctgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgg gggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgaacgggttg ccgccagaacacaggtgaagtgcctgtgtgttcccgccggcctggcctctttacgg gttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtagctgattcttgatcc cgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccc cttcgcctcgtgcttgagttgagccctggcctgggcgtggggccgccgctgcga atctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtcttctgataagtctctagccatttaaaattt ttgatgacctgctgcgacgttttttctggcaagatagcttctgaaatgcgggccaaga tctgcacactggatttccgtttttggggccggcgccggcgacggggcccgtgcgtc ccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcgg acgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgcctg gtatcggccccccctggcgcaaggctggcccgctcgccaccagtctgcgtgagc ggaaaagtggccgcttccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcgg cgctcgggagagcggcggggtgagtcacccacacaaaggaaaaggccctttcgt cctcagccgtcgttcatgtgactccacggagtaccggcgccgtccaggcacctcg attagtctcgagcttttgagtagctgctctttaggttggggggagggttttatgcgat ggagtttcccacactgagtggtgggagactgaagttagggcagcttggcacttgat gtaattctccttgaatttgccttttgagtttgatcttggttcattctcaagcctcagac agtgttcaaaagttttttcttccatttcaggtgtcgtga	
EF-1 α 启动子变体 3 (内含子加下划线)	ggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgacatcgccacagtccccgagaagtt ggggggagggtgcgcaattgaaccgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaa ctgggaaagtgtatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaacc gtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgaacgggttgcgccagaa cacaggtgaagtgcctgtgtgttcccgccggcctggcctctttacgggtatggccc ttcgctgccttgaattacttccacctggctgcagtagctgattcttgatcccgagcttcg ggttggaaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagcccccttcgctcg tgcctgagttgagggcctggcctgggcgtggggccgcccgctgcgaatctgttggc acctcgcgcctgtctcgtgcttctgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacct gctgcgacgttttttctggcaagatagcttctgaaatgcgggccaagatctgcacact ggtattcggtttttggggccggcgccggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcac atgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggagggggta gtctcaagctggccggcctgctctgtgcttgcctcgcgcgccgtgtatcgcccc ggcctggcgccgaaggctggccccgtcggcaccagtgcgtgagcggaaagatg gccgcttcccgccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcggga gagcggggcggtgagtcacccacacaaaggaaaaggcccttctcgtcctcagccgt cgcttcatgtgactccacggagtaccggcgccgtccaggcacctcgattgtctcg agcttttgagtagctcgtctttaggttggggggagggttttatcgatggagttccc cacactgagtggttggagactgaagttagggcagcttggcacttgatgtaattctctt ggaatttgcctttttgagtttgatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaa gttttttcttccatttcaggtgtcgtga	1840
EF-1 α 内含子 A	gtaagtccgtgtgtgttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgt gccttgaattacttccacctggctgcagtagctgattcttgatcccgagcttcgggttg aagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagcccccttcgcctcgtgcttg agttgaggcctggcctggcgctggggccgccgctgcgaatctggtggcaccttc gcgcctgtctcgtgcttctgataagtctctagccatttaaaattttgatgacctgctgc gacgcttttttctggcaagatagcttctgaaatgcgggccaagatctgcacactggtat ttcggtttttggggccggcgggcgacggggcccgtgcgtccagcgcacatgtt cggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggagggggtagtctc aagctggccggcctgctcgttgcctggcctcgcgcccgctgtatcggccgcct ggcgggcaaggctggccccgtcggcaccagtgcgtgagcggaaagatggccgc	1841

	ttcccgccctgctgcaggagagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcggg ggcggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgctcctcagccgtcgcttc atgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattgtctcgagcttt tggagtacgtcgtcttaggttggggggagggggtttatcgatggagttccccacac tgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattcctctggaat ttgcccttttgagtttgatcttggttcattctcaagcctcagacagtgggtcaaagtttt tcttccatttcag	
人类β球蛋 白内含子 (hGBint)	tcagatgcctggagacgccatccacgctgtttgacctcatagaagacaccggga ccgatccagcctccgcggattcgaatcccgccgggaacggtgcattggaacgcg gattccccgtgccaagagtgcgtaagtaccgcctatagagtcataaggccacaaa aaatgcttctctttaataatactttttgttatcttattctaatactttccctaattctttt caggggcaataatgatacaatgtatcatgctctttgcaccattctaaagaataacagtga taatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgta actgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttt atfttatggttgggataaggctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgtaatca tgttcatactcttatcttctccacagctcctgggcaacgtgctggtctgtgtgctggc ccatcactttggcaaagaatt	1842
弗林蛋白酶 - nt	agaaagaggcga	1724
弗林蛋白酶 - aa	RKRR	1854
T2A - nt	gagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatccggccct	1726
T2A - nt	EGRGSLTTCGDVEENPGP	1855
(G4S) 连接子 - nt	tccggaggcgggcggcagc	1729
(G4S) 连接子 - aa	GGGS	1843
(G4S)3 连接子 - nt	GGAGGGGGGGGGTTCGGGTGGCGGCGGAAGTGGGG GCGGTGGTTCT	1730
(G4S)3 - aa	GGGSGGGSGGGGS	1845
聚A信号序 列	gatcttttccctctgccaaaattatggggacatcatgaagccccttgagcatctgactt ctggctaataaaggaaatttatttcattgcaatagtgtgtggaatttttgtgtctctact cg	1846
miR183 结 合位点	AGTGAATTCTACCAGTGCCATA	1847
间隔子	GATAGTTA	1848
miR183 结 合位点系列	AGTGAATTCTACCAGTGCCATAGATAGTTAAGTGA ATTCTACCAGTGCCATAGATAGTTAAGTGAATTCTA CCAGTGCCATAGATAGTTAAGTGAATTCTACCAGTG CCATA	1849
信号序列 - nt	ATGGAATTCTCTAGCCCATCTAGAGAGGAATGTCCT AAGCCTCTGTCAAGAGTGTCCATCATGGCCGGCAG CCTGACAGGCCTGCTGCTGCTGCAGGCCGTGTCCTG GGCCAGTGGA	1850
信号序列 - nt	ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCC AAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGGCAG CCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCGTG	1851

[0766]	信号序列 - nt	GGCATCAGGT atggaattcagcagccccagcagagaggaatgccccagcctctgagccgggtgtc aatcatggccggatctctgacaggactgctgctcaggccgtgtcttgggcttctg gc	1852
	信号序列 - aa	MEFSSPSREECPKPLSRVSIMAGSLTGLLLLQAVSWAS G	1853

[0767] 在一些实施方案中,病毒基因组包含表5中所提供的反向末端重复序列区(ITR),或与表5的ITR序列中的任一者具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0768] 在一些实施方案中,本公开还提供了由SEQ ID NO:1759-1771或1809-1828中的任一者编码的GBA蛋白,或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列。在一些实施方案中,病毒基因组包含表5中所提供的启动子,或与表5的启动子序列中的任一者具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0769] 在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子的病毒基因组包含例如表18-21或表29-32中所描述的核苷酸序列,例如GBA_VG1至GBA_VG34的核苷酸序列从5' ITR至3' ITR的核苷酸序列,或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子的病毒基因组包含表18-21或表29-32的核苷酸序列中的任一者的核苷酸序列,例如从5' ITR至3' ITR的核苷酸序列,或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子的病毒基因组包含SEQ ID NO:1759-1771、1809-1828或1870的核苷酸序列中的任一者的核苷酸序列,例如从5' ITR至3' ITR的核苷酸序列,或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列。

[0770] 在一些实施方案中,本公开还提供了由SEQ ID NO:1759-1771、1809-1828或1870中的任一者编码的GBA蛋白(例如,GCase蛋白),或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列。

[0771] 在一些实施方案中,编码GBA蛋白的病毒基因组是wtGBA病毒基因组,其中所述病毒基因组包含编码GBA蛋白的转基因(任选地其中编码GBA蛋白的核苷酸序列是密码子优化的核苷酸序列),但不编码增强元件,例如,本文所描述的增强元件。在一些实施方案中,编码GBA蛋白的病毒基因组是enGBA病毒基因组,其中所述病毒基因组包含编码GBA蛋白的转基因(任选地其中编码GBA蛋白的核苷酸序列是密码子优化的核苷酸序列),并且进一步编码增强元件,例如,本文所描述的增强元件。

[0772] 表18. 示例性病毒基因组(ITR至ITR)序列

[0773]

构建体 ID	描述(5'至 3')	SEQ ID NO:	长度
GBA_VG1	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1759	3413
GBA_VG2	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 溶酶体靶向序列 1 (LTS1) (SEQ ID NO: 1799); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1760	3428
GBA_VG3	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信	1761	3476

[0774]

	号序列(SEQ ID NO: 1852); 溶酶体靶向序列 2 (LTS2) (SEQ ID NO: 1801); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)		
GBA_VG4	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 溶酶体靶向序列 3 (LTS3) (SEQ ID NO: 1803); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1762	3428
GBA_VG5	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 溶酶体靶向序列 4 (LTS4) (SEQ ID NO: 1805); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1763	3428
GBA_VG6	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); G4S3 连接子编码序列(SEQ ID NO: 1730); ApoEII 编码序列(SEQ ID NO: 1797); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1764	3512
GBA_VG7	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); G4S3 连接子编码序列(SEQ ID NO: 1730); TAT 编码序列(SEQ ID NO: 1793); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1765	3500
GBA_VG8	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 弗林蛋白酶裂解位点编码序列(SEQ ID NO: 1724); T2A 编码序列(SEQ ID NO: 1726); 信号序列(SEQ ID NO: 1856); 鞘脂激活蛋白原(PSAP)编码序列(SEQ ID NO: 1859); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1766	4463
GBA_VG9	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 溶酶体靶向序列 3 (LTS3) (SEQ ID NO: 1803); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1767	3878

[0775]

	1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 弗林蛋白酶裂解位点编码序列(SEQ ID NO: 1724); T2A 编码序列(SEQ ID NO: 1726); 信号序列(SEQ ID NO: 1856); SAPC 编码序列(SEQ ID NO: 1787); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)		
GBA_VG10	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 弗林蛋白酶裂解位点编码序列(SEQ ID NO: 1724); T2A 编码序列(SEQ ID NO: 1726); 信号序列(SEQ ID NO: 1856); SAPCv2 编码序列(SEQ ID NO: 1791); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1768	3767
GBA_VG11	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); G4S3 连接子编码序列(SEQ ID NO: 1730); ApoB 编码序列(SEQ ID NO: 1795); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1769	3560
GBA_VG12	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); TAT 编码序列(SEQ ID NO: 1793); G4S3 连接子编码序列(SEQ ID NO: 1730); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1770	3500
GBA_VG13	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 溶酶体靶向序列 5 (LTS5) (SEQ ID NO: 1807); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1771	3458
GBA_VG14	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信	1809	3941

[0776]

	号序列(SEQ ID NO: 1852); 溶酶体靶向序列 2 (LTS2) (SEQ ID NO: 1801); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); 弗林蛋白酶裂解位点编码序列(SEQ ID NO: 1724); T2A 编码序列(SEQ ID NO: 1726); 信号序列(SEQ ID NO: 1856); SAPC 编码序列(SEQ ID NO: 1787); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)		
GBA_VG15	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); G4S3 连接子编码序列(SEQ ID NO: 1730); ApoEII 编码序列(SEQ ID NO: 1797); 弗林蛋白酶裂解位点编码序列(SEQ ID NO: 1724); T2A 编码序列(SEQ ID NO: 1726); 信号序列(SEQ ID NO: 1856); SAPC 编码序列(SEQ ID NO: 1787); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1810	3977
GBA_VG16	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1852); 溶酶体靶向序列 2 (LTS2) (SEQ ID NO: 1801); GBA 变体 3 编码序列(SEQ ID NO: 1781); G4S3 连接子编码序列(SEQ ID NO: 1730); ApoEII 编码序列(SEQ ID NO: 1797); 弗林蛋白酶裂解位点编码序列(SEQ ID NO: 1724); T2A 编码序列(SEQ ID NO: 1726); 信号序列(SEQ ID NO: 1856); SAPC 编码序列(SEQ ID NO: 1787); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1811	4040
GBA_VG17	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1850); GBA 变体 1 编码序列(SEQ ID NO: 1773); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1812	3413
GBA_VG18	ITR (SEQ ID NO: 1829); EF-1 α 启动子变体 2 (SEQ ID NO: 1839); 信号序列(SEQ ID NO: 1850); GBA 变体 1 编码序列(SEQ ID NO: 1773); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1813	3375
GBA_VG19	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CMV 启动子(SEQ ID NO: 1832); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信	1814	3360

[0777]

	号序列(SEQ ID NO: 1850); GBA 变体 1 编码序列(SEQ ID NO: 1773); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)		
GBA_VG20	ITR (SEQ ID NO: 1829); CAG 启动子(SEQ ID NO: 1835); 信号序列(SEQ ID NO: 1850); GBA 变体 1 编码序列(SEQ ID NO: 1773); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1815	3901
GBA_VG21	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1851); GBA 变体 2 编码序列(SEQ ID NO: 1777); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1816	3413
GBA_VG22	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1851); GBA 变体 2 编码序列(SEQ ID NO: 1777); 弗林蛋白酶裂解位点编码序列(SEQ ID NO: 1724); T2A 编码序列(SEQ ID NO: 1726); 信号序列(SEQ ID NO: 1856); SAPC 编码序列(SEQ ID NO: 1787); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1817	3878
GBA_VG23	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1851); GBA 变体 2 编码序列(SEQ ID NO: 1777); G4S3 连接子编码序列(SEQ ID NO: 1730); ApoEII 编码序列(SEQ ID NO: 1797); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1818	3512
GBA_VG24	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1851); 溶酶体靶向序列 2 (LTS2) (SEQ ID NO: 1801); GBA 变体 2 编码序列(SEQ ID NO: 1777); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1819	3476
GBA_VG25	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1851); GBA 变体 2 编码序列(SEQ ID NO: 1777); 溶酶体靶向序列 4 (LTS4) (SEQ ID NO: 1805); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1820	3428

[0778]

GBA_VG26	ITR (SEQ ID NO: 1829); EF-1 α 启动子变体 3 (SEQ ID NO: 1840); 信号序列(SEQ ID NO: 1851); GBA 变体 2 编码序列(SEQ ID NO: 1777); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1821	3375
GBA_VG27	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1850); GBA 变体 1 编码序列(SEQ ID NO: 1773); 弗林蛋白酶裂解位点编码序列(SEQ ID NO: 1724); T2A 编码序列(SEQ ID NO: 1726); 信号序列(SEQ ID NO: 1856); SAPC 编码序列(SEQ ID NO: 1787); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1822	3878
GBA_VG28	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1850); GBA 变体 1 编码序列(SEQ ID NO: 1773); G4S3 连接子编码序列(SEQ ID NO: 1730); ApoEII 编码序列(SEQ ID NO: 1797); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1823	3512
GBA_VG29	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1850); 溶酶体靶向序列 2 (LTS2) (SEQ ID NO: 1801); GBA 变体 1 编码序列(SEQ ID NO: 1773); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1824	3476
GBA_VG30	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1850); GBA 变体 1 编码序列(SEQ ID NO: 1773); 溶酶体靶向序列 4 (LTS4) (SEQ ID NO: 1805); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1825	3428
GBA_VG31	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1851); GBA 变体 2 编码序列(SEQ ID NO: 1777); G4S3 连接子编码序列(SEQ ID NO: 1730); TAT 编码序列(SEQ ID NO: 1793); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1826	3500

[0779]

GBA_VG32	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1850); GBA 变体 1 编码序列(SEQ ID NO: 1773); G4S3 连接子编码序列(SEQ ID NO: 1730); TAT 编码序列(SEQ ID NO: 1793); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1827	3500
GBA_VG33	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1850); GBA 变体 1 编码序列(SEQ ID NO: 1773); miR183 结合位点(SEQ ID NO: 1847); 间隔子(SEQ ID NO: 1848); miR183 结合位点(SEQ ID NO: 1847); 间隔子(SEQ ID NO: 1848); miR183 结合位点(SEQ ID NO: 1847); 间隔子(SEQ ID NO: 1848); mir183 结合位点(SEQ ID NO: 1847); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1828	3571
GBA_VG34	ITR (SEQ ID NO: 1829); CMVie (SEQ ID NO: 1831); CB 启动子(SEQ ID NO: 1834); 人类 β 球蛋白内含子(hGBint) (SEQ ID NO: 1842); 信号序列(SEQ ID NO: 1851); GBA 变体 2 编码序列(SEQ ID NO: 1777); miR183 结合位点(SEQ ID NO: 1847); 间隔子(SEQ ID NO: 1848); miR183 结合位点(SEQ ID NO: 1847); 间隔子(SEQ ID NO: 1848); miR183 结合位点(SEQ ID NO: 1847); 间隔子(SEQ ID NO: 1848); mir183 结合位点(SEQ ID NO: 1847); 聚 A 信号区(SEQ ID NO: 1846); ITR (SEQ ID NO: 1830)	1870	3571

[0780] 表19. 编码GBA蛋白的示例性ITR至ITR序列

[0781]

构建体 ID	序列	SEQ ID NO:
GBA_VG17	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtggtgccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctaccagggtaatggggatcctctagaaactatagtagtcGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC CCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG	1812

[0782]

CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCA
AGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
GCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTAT
GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA
GTCATCGCTATTACCATGtcgaggccacgttctgcttctctcccc
atctccccccccctccccaccccaattttgtatttattttttaatttttgcagcg
atggggcgggggggggggggcgcgccaggcgggcgggcgggcgga
ggggcgggcgggggcgaggcgagaggtcgggcggcagccaatcagagcgg
cgcgctccgaaagtcttctttatggcgaggcgggcgggcgggcgccctataaa
aagcgaagcgcggcgggcgggagcaagcttcgttagtaaccgtcagatcg
cctggagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatcc
agcctccgcggttcgaatcccggcggggaacggtgcattggaacgcggattccc
cgtgccaaagagtgcgtaagtaccgcctatagagtctataggcccacaaaaatgc
ttcttctttaatactttttgttatcttatttctaatactttccctaattcttttcttcagg
gcaataatgatacaatgatcatgcctcttgcaccattctaaagaataacagtgataa
ttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaataatttctgcatataaattgtaa
ctgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttt
attttatggttgggataaggctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgctaattc
atgttcataacctcttatcttctcccacagctcctgggcaacgtgctggtctgtgct
ggcccatcactttggcaaagaattgggattcgaaccggtgccgccaccATGG
AATTCTCTAGCCCATCTAGAGAGGAATGTCCTAAG
CCTCTGTCAAGAGTGTCCATCATGGCCGGCAGCCT
GACAGGCCTGCTGCTGCTGCAGGCCGTGTCTTGGG
CCAGTGGAGCCCGGCCCTGCATCCCTAAGTCCTTC
GGCTATTCTAGCGTGGTCTGCGTGTGTAATGCCAC
TTACTGCGACAGCTTCGACCCTCCTACCTTCCCCG
CCCTTGGAACATTCAGCAGATACGAGAGCACCAG
AAGCGGCAGAAGAATGGAAGTGAAGCATGGGCCCCA
ATCCAGGCCAACACACCGGCACCGGCCTGCTGCT
GACACTGCAACCTGAGCAGAAAGTTCCAGAAGGTG
AAGGGATTGAGGCGCCATGACCGACGCTGCTG
CTCTGAACATCCTGGCCCTCTCCCCACCTGCTCAG
AACCTGCTGCTTAAAAGCTACTTCAGCGAGGAAG
GCATCGGCTATAACATCATCAGAGTGCCCATGGCC
AGCTGCGACTTCAGCATCAGAACATACACCTACGC
CGATACACCTGATGACTTCCAAGTGCACAACTTCA
GCCTGCCTGAAGAGGACACAAAGCTGAAAATCCC
CCTGATCCACCGGGCCCTGCAGCTGGCCCAGAGAC
CTGTGAGCCTGCTGGCCTCTCCTTGGACAAGCCCC
ACCTGGCTGAAGACCAATGGAGCTGTGAACGGCA
AGGGCAGCCTGAAGGGCCAGCCCGGCGACATCTA
CCACCAAACCTGGGCTCGCTACTTCGTGAAATTCC
TGGACGCCTACGCTGAGCATAAGCTGCAATTTTGG
GCCGTTACAGCCGAGAACGAGCCTTCTGCCGGCCT
GCTGTCTGGATATCCTTTCCAGTGCCTGGGCTTCA
CCCCTGAGCACCAGAGAGACTTTATCGCCAGAGAT
CTGGGGCCTACCCTGGCTAACAGCACACACCACA
ACGTGCGGCTGCTGATGCTGGACGATCAGAGGCT
GCTGCTCCCCACTGGGCCAAGGTGGTGTGCTGACAG
ATCCGGAGGCCGCCAAATACGTGCACGGCATCGC

[0783]

	CGTCCACTGGTACCTGGATTTCTGGCCCCTGCCA AGGCCACCCTGGGCGAGACACATAGACTGTTTCT AATACCATGCTGTTTCGCCAGCGAGGCCTGCGTGGG CAGCAAGTTCTGGGAACAGAGCGTGCGGCTGGGC AGCTGGGACAGAGGAATGCAGTACAGCCACAGCA TCATTACCAACCTGCTGTACCACGTGGTGGGCTGG ACCGACTGGAACCTGGCCCTGAACCCCGAAGGCG GCCCCAACTGGGTGCGGAACCTTCGTGGACTCTCCT ATCATCGTGGATATTACCAAGGATACCTTTTACAA GCAGCCTATGTTCTACCACCTGGGCCACTTCAGCA AGTTCATCCCTGAGGGCTCTCAGCGGGTGGGCCTG GTGGCCTCTCAGAAAAACGACCTGGATGCCGTTGC CCTGATGCACCCCGACGGCAGCGCCGTGGTGGTCG TCCTGAATAGAAGCTCCAAGGACGTGCCTCTGACC ATCAAGGACCCCGCTGTGGGATTTCTGGAAACCAT CAGCCCTGGCTACAGCATCCACACCTACCTGTGGC GGCGGCA Gtagtaactcaggacggggtgaactacgcctgaggatccgat cttttccctctgcaaaaattatggggacatcatgaagcccttgagcatctgacttc tggctaataaaggaaatttatttcattgcaatagtgtgttgaatttttgtgtctcact cggcctaggtagataagtagcatggcgggttaataactacaaggaacccta gtgatggagtggccactccctctctgcgcgtcgtcgtcactgaggccgggcg accaaaggctgcccgcgcccgggctttgcccgggcgccctcagttagcgagc gagcgcgagc	
GBA_VG18	ctgcgcgtcgtcgtcactgaggccgcccgggcaaagcccgggctcgggc gaccttggctgcccggcctcagttagcgagcgagcgcgagagaggagtg ccaactccatcactagggttccttgtagttaatgattaaccgcatgctacttatcta ccagggtaatggggatcctctagaactatagctagtcgacataacgcgtgcatgcg tgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgacatcgccacagtccccgag aagttggggggagggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcg ggtaaacctgggaaagtgtgtgtgtactggctccgctttttccgagggtggg gagaaccgtatataagtgcagtagtcgctgaacgttcttttcgaacgggttgc cgccagaacacaggttaagtgcctgtgtgttcccgggctggcctttacgg gttatggcccttgcgtgcttgaattactccactggctgcagtacgtgattctgac ccgagcttcgggttgaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgttaaggagc ccctcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggctgggcccgcgcgtg cgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgcttgcgataagtctctagccattta aaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaagatagcttgtaaatgcggg ccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgaggcgagcgagggcc cgtgcgtcccagcgacatgttcggcgaggcgggcctgcgagcgcgggccacc gagaatcgagcgagggttagtctcaagctggcggcctgctctggtgcctggcctc gcgcgcccgtgtatcgcccgcctgggcggaaggctggcccggctcggcacc agttgcgtgagcggaagatggccgcttccggccctgctgcaggagagctcaaaa tggaggacggcgctcgggagagcgggcggtgagtcacccacacaaagga aaaggcccttccgtcctcagccgtcgttcattgtgactccacggagtaccggcg ccgtccaggcacctcgattagttctcagccttttgagtagctcgtctttagggtggg gggagggttttatgcatggagtccccacactgagtggtggagactgaagtt agggcagcttggcacttgatgaattctccttgaatttgcctttttagtttgatctt ggttcattctcaagcctcagacagtgggtcaaaagtttttcttcatttcagggtgctg agggattcgaaccggtgccgccaccATGGAATTCTCTAGCCCAT CTAGAGAGGAATGTCCTAAGCCTCTGTCAAGAGTG	1813

[0784]

TCCATCATGGCCGGCAGCCTGACAGGCCTGCTGCT
 GCTGCAGGCCGTGTCTGGGCCAGTGGAGCCCGG
 CCCTGCATCCCTAAGTCCTTCGGCTATTCTAGCGT
 GGTCTGCGTGTGTAATGCCACTTACTGCGACAGCT
 TCGACCCTCCTACCTTCCCCGCCCTTGGAAACATTC
 AGCAGATACGAGAGCACCAGAAGCGGCAGAAGA
 ATGGAAGTGAAGCATGGGCCCAATCCAGGCCAACC
 ACACCGGCACCGGCCTGCTGCTGACACTGCAACCT
 GAGCAGAAGTTCCAGAAGGTGAAGGGATTTGGAG
 GCGCCATGACCGACGCTGCTGCTCTGAACATCCTG
 GCCCTCTCCCCACCTGCTCAGAACCTGCTGCTTAA
 AAGCTACTTCAGCGAGGAAGGCATCGGCTATAAC
 ATCATCAGAGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTCAG
 CATCAGAACATACACCTACGCCGATACACCTGATG
 ACTTCCAAGTGCACAACTTCAGCCTGCCTGAAGAG
 GACACAAAGCTGAAAATCCCCCTGATCCACCGGG
 CCCTGCAGCTGGCCCAGAGACCTGTGAGCCTGCTG
 GCCTCTCCTTGGACAAGCCCCACCTGGCTGAAGAC
 CAATGGAGCTGTGAACGGCAAGGGCAGCCTGAAG
 GGCCAGCCCGGCGACATCTACCACCAAACCTGGG
 CTCGCTACTTCGTGAAATTCCTGGACGCCTACGCT
 GAGCATAAGCTGCAATTTTGGGCCGTTACAGCCGA
 GAACGAGCCTTCTGCCGGCCTGCTGTCTGGATATC
 CTTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGAGCACCAG
 AGAGACTTTATCGCCAGAGATCTGGGGCCTACCCT
 GGCTAACAGCACACACCACAACGTGCGGCTGCTG
 ATGCTGGACGATCAGAGGCTGCTGCTCCCCACTG
 GGCCAAGGTGGTGTGCTGACAGATCCGGAGGCCGCC
 AAATACGTGCACGGCATCGCCGTCCACTGGTACCT
 GGATTTCTGGCCCCTGCCAAGGCCACCCTGGGCG
 AGACACATAGACTGTTTCCTAATACCATGCTGTTT
 GCCAGCGAGGCCTGCGTGGGCAGCAAGTTCTGGG
 AACAGAGCGTGCGGCTGGGCAGCTGGGACAGAGG
 AATGCAGTACAGCCACAGCATCATTACCAACCTGC
 TGTACCACGTGGTGGGCTGGACCGACTGGAACCTG
 GCCCTGAACCCCGAAGGCGGCCCAACTGGGTGC
 GGAAGTTCGTGGACTCTCCTATCATCGTGGATATT
 ACCAAGGATACCTTTTACAAGCAGCCTATGTTCTA
 CCACCTGGGCCACTTCAGCAAGTTCATCCCTGAGG
 GCTCTCAGCGGGTGGGCCTGGTGGCCTCTCAGAAA
 AACGACCTGGATGCCGTTGCCCTGATGCACCCCGA
 CGGCAGCGCCGTGGTGGTTCGTCCTGAATAGAAGCT
 CCAAGGACGTGCCTCTGACCATCAAGGACCCCGCT
 GTGGGATTTCTGGAAACCATCAGCCCTGGCTACAG
 CATCCACACCTACCTGTGGCGGCGGCA Gtagtaactga
 ggacggggtgaactacgcctgaggatccgatctttccctctgccaaaattatgg
 ggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaatttatttca
 ttgcaatagtgttggaattttgtgtctctcactcggcctaggtagataagtagcat
 ggcggttaatacttaactacaaggaacccctagtgtgaggttgccactccctct
 ctgcgcgctcgtcgtcactgaggccggcgaccaaaggctcgcccgacgcccg

[0785]

	ggctttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag	
GBA_VG27	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgccgggcaaagcccgggctcgggc gacctttggtcgcccgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtg ccaactccatcactaggggtcctTGTAAGTTAATGATTAACCCG CCATGCTACTTATCTACCAGGGTAATGGGGATCCT CTAGAACTATAGCTAGTCGACATTGATTATTGACT AGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC GACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGAC GTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG CCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGTCGAGGccacgttctgttcactctccccatctcc ccccctccccaccccccaatttgtatttatttttaatttttgcagcgatggg ggcggggggggggggcgcgccaggcgggggcgggcgggggcgaggggc ggggcgggggcgaggcgagaggtgcggcggcagccaatcagagcgggcgcg tcgaaagtctctttatggcgaggcgggcgggcgggcgggcgccataaaaagcg aagcgcgggcgggCGGGAGCAAGCTTCGTTTAGTGAAC CGtcagatgcctggagacgccatccacgtgtttgacctccatagaagacacc gggaccgatccagcctccgcggttcgaatcccggcggaacggtgcattgga acgcggtatccccgtgccaagagtacgtaagtaccgcctatagagtctataggcc cacaanaaatgtctctctttaaataactttttgttatcttatttctaactttcccta ctctttcttcagggaataatgatacaatgtatcatgcctctttgacacattctaaaga ataacagtataaattctgggttaaggcaatagcaatattctgcatataaattttctgc atataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagct accattctgcttttattttatggttgggataaggctggattattctgagccaagctagg cccttttgtaatacatgttcataacctcttctctctccacagctctgggcaacgtgc tggtctgtgtctggccatcactttggcaaagaattGGGATTCTGAACCG GTGCCGCCACCATGGAATTCTCTAGCCCATCTAGA GAGGAATGTCCTAAGCCTCTGTCAAGAGTGTCCAT CATGGCCGGCAGCCTGACAGGCCTGCTGCTGCTGC AGGCCGTGTCCTGGGCCAGTGGAGCCCGGCCCTGC ATCCCTAAGTCCTTCGGCTATTCTAGCGTGGTCTG CGTGTGTAATGCCACTTACTGCGACAGCTTCGACC CTCCTACCTTCCCCGCCCTTGGAACATTGAGCAGA TACGAGAGCACCAGAAGCGGCAGAAGAATGGAAC TGAGCATGGGCCCAATCCAGGCCAACCACACCGG CACCGGCCTGCTGCTGACACTGCAACCTGAGCAGA AGTTCCAGAAGGTGAAGGGATTGAGAGGCCCAT GACCGACGCTGCTGCTCTGAACATCCTGGCCCTCT CCCCACCTGCTCAGAACCTGCTGCTTAAAAGCTAC TTCAGCGAGGAAGGCATCGGCTATAACATCATCA GAGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTCAGCATCAGA ACATACACCTACGCCGATACACCTGATGACTTCCA ACTGCACAACCTCAGCCTGCCTGAAGAGGACACA AAGCTGAAAATCCCCCTGATCCACCGGGCCCTGCA	1822

[0786]

	GCTGGCCCAGAGACCTGTGAGCCTGCTGGCCTCTC CTTGGACAAGCCCCACCTGGCTGAAGACCAATGG AGCTGTGAACGGCAAGGGCAGCCTGAAGGGCCAG CCCGGCGACATCTACCACCAAACCTGGGCTCGCTA CTTCGTGAAATTCCTGGACGCCTACGCTGAGCATA AGCTGCAATTTTGGGCCGTTACAGCCGAGAACGA GCCTTCTGCCGGCCTGCTGTCTGGATATCCTTTCCA GTGCCTGGGCTTCACCCCTGAGCACCAGAGAGACT TTATCGCCAGAGATCTGGGGCCTACCCTGGCTAAC AGCACACACCACAACGTGCGGCTGCTGATGCTGG ACGATCAGAGGCTGCTGCTCCCCCACTGGGCCAAG GTGGTGCTGACAGATCCGGAGGCCGCCAAATACG TGCACGGCATCGCCGTCCACTGGTACCTGGATTTC CTGGCCCCTGCCAAGGCCACCCTGGGCGAGACAC ATAGACTGTTTCCTAATAACCATGCTGTTTCGCCAGC GAGGCCTGCGTGGGCAGCAAGTTCTGGGAACAGA GCGTGCGGCTGGGCAGCTGGGACAGAGGAATGCA GTACAGCCACAGCATCATTACCAACCTGCTGTACC ACGTGGTGGGCTGGACCGACTGGAACCTGGCCCT GAACCCCGAAGGCGGCCCCCAACTGGGTGCGGAAC TTCGTGGACTCTCCTATCATCGTGGATATTACCAA GGATACCTTTTACAAGCAGCCTATGTTCTACCACC TGGGCCACTTCAGCAAGTTCATCCCTGAGGGCTCT CAGCGGGTGGGCCTGGTGGCCTCTCAGAAAAACG ACCTGGATGCCGTTGCCCTGATGCACCCCGACGGC AGCGCCGTGGTGGTCGTCCTGAATAGAAGCTCCAA GGACGTGCCTCTGACCATCAAGGACCCCGCTGTGG GATTTCTGGAAACCATCAGCCCTGGCTACAGCATC CACACCTACCTGTGGCGGCGGCAGAgaaagaggcgagag ggcagaggaagtcttctaacaatgcggtgacgtggaggagaatcccgccctAT GTACGCCCTCTTCCTCCTGGCCAGCCTCCTGGGCG CGGCTCTAGCCgtgaaagagatgccatgcagactctggtccccgcaa agtggcctccaagaatgtcatccctgccctggaactggtggagccattaagaagc acgaggtcccagcaaagtctgatgtttactgtgaggtgtgtgaattcctggtgaagg aggtgaccaagctgattgacaacaacaagactgagaagaaatactgacgctttt gacaaaatgtgtcgaagctgccgaagtccctgtcggaagagtgccaggaggtg gtggacacgtacggcagctccatcctgtccatcctgctggaggaggtcagccctga gctggtgtgcagcatgtgcacctctgctctggcTAGTAACTCGAGGA CGGGGTGAACCTACGCCTGAGGATCCgatcttttccctctgcc aaaaattatggggacatcatgaagcccctgagcatctgacttctggctaataaagg aaatttatttcatgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctcactcgGCCTAG GTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACCTA CAaggaaccctagtgtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgtcgcctc actgaggccgggcgaccaaaggctcgccgacgcccgggcttggccgggcggc ctcagtgagcgagcgagcgcgag	
GBA_VG29	ctgcgcgtcgtcgtcactgagggcccgccgggcaagcccgggctcgggc gaccttggctcgccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtg ccaactccatcactaggggttcctTGTAGTTAATGATTAACCCG CCATGCTACTTATCTACCAGGGTAATGGGGATCCT CTAGAACTATAGCTAGTCGACATTGATTATTGACT	1824

[0787]

AGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT
 TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC
 TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC
 GACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGT
 TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGAC
 GTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCAC
 TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC
 GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG
 CCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC
 TTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
 GCTATTACCATGTCTGAGGccacgttctgcttcaactctccccatctcc
 cccccctccccaccccccaattttgtatttatttttttaatttttgcagcgatggg
 ggcgggggggggggggcgcgccaggcgggcgggcgggcgaggggc
 gggcgggggcgaggcgagaggtgcggcgccagccaatcagagcggcgcg
 tccgaaagtttctttatggcgaggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcg
 aagcgcgggcgggCGGGAGCAAGCTTCGTTTAGTGAAC
 CGtcagatcgctggagacgcatccacgctgtttgacctccatagaagacacc
 gggaccgatccagcctccgcggattcgaatcccgccgggaacggtgcattgga
 acgcggttccccgtgccaagagtgcgtaagtaccgcctatagagctatagggc
 caaaaaaatgtttcttcttttaataatactttttgtttatcttatttctaatactttcccta
 ctctttcttcagggaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaaga
 ataacagtataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgc
 atataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagct
 accattctgcttttattttatgggtgggataaggctggattattctgagtcgaagctagg
 cccttttgtaatacatgttcaactcttcttctctccacagctcctgggcaacgtgc
 tgggtgtgtgtggtggccatcaccttggcgaagaattGGGATTCGAACCG
 GTGCCGCCACCATGGAATTCTCTAGCCCATCTAGA
 GAGGAATGTCCTAAGCCTCTGTCAAGAGTGTCCAT
 CATGGCCGGCAGCCTGACAGGCCTGCTGCTGCTGC
 AGGCCGTGTCCTGGGCCAGTGGAatgaaggagaccgctgct
 gcaaagttcgagagacagcatatggatagctccacaagcgccgcaGCCCGG
 CCCTGCATCCCTAAGTCCTTCGGCTATTCTAGCGT
 GGTCTGCGTGTGTAATGCCACTTACTGCGACAGCT
 TCGACCCTCCTACCTTCCCCGCCCTTGGAACATTC
 AGCAGATACGAGAGCACCAGAAGCGGCAGAAGA
 ATGGAAGTGAAGCATGGGCCCAATCCAGGCCAACC
 ACACCGGCACCGGCCTGCTGCTGACACTGCAACCT
 GAGCAGAAGTTCCAGAAGGTGAAGGGATTTGGAG
 GCGCCATGACCGACGCTGCTGCTCTGAACATCCTG
 GCCCTCTCCCCACCTGCTCAGAACCTGCTGCTTAA
 AAGCTACTTCAGCGAGGAAGGCATCGGCTATAAC
 ATCATCAGAGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTCAG
 CATCAGAACATACACCTACGCCGATACACCTGATG
 ACTTCCAAGTGCACAACTTCAGCCTGCCTGAAGAG
 GACACAAAGCTGAAAATCCCCCTGATCCACCGGG
 CCCTGCAGCTGGCCCAGAGACCTGTGAGCCTGCTG
 GCCTCTCCTTGACAAGCCCCACCTGGCTGAAGAC
 CAATGGAGCTGTGAACGGCAAGGGCAGCCTGAAG
 GGCCAGCCCGGCGACATCTACCACCAAACCTGGG
 CTCGCTACTTCGTGAAATTCCTGGACGCCTACGCT

[0788]

	GAGCATAAGCTGCAATTTTGGGCCGTTACAGCCGA GAACGAGCCTTCTGCCGGCCTGCTGTCTGGATATC CTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGAGCACCAG AGAGACTTTATCGCCAGAGATCTGGGGCCTACCCT GGCTAACAGCACACACCACAACGTGCGGCTGCTG ATGCTGGACGATCAGAGGCTGCTGCTCCCCACTG GGCCAAGGTGGTGTGACAGATCCGGAGGCCGCC AAATACGTGCACGGCATCGCCGTCCACTGGTACCT GGATTTCTGGCCCCTGCCAAGGCCACCCTGGGCG AGACACATAGACTGTTTCCTAATACCATGCTGTTT GCCAGCGAGGCCTGCGTGGGCAGCAAGTTCTGGG AACAGAGCGTGC GGCTGGGCAGCTGGGACAGAGG AATGCAGTACAGCCACAGCATCATTACCAACCTGC TGTACCACGTGGTGGGCTGGACCGACTGGAACCTG GCCCTGAACCCCGAAGGCGGCCCAACTGGGTGC GGAAC TTCGTGGACTCTCCTATCATCGTGGATATT ACCAAGGATACCTTTTACAAGCAGCCTATGTTCTA CCACCTGGGCCACTTCAGCAAGTTCATCCCTGAGG GCTCTCAGCGGGTGGGCCTGGTGGCCTCTCAGAAA AACGACCTGGATGCCGTTGCCCTGATGCACCCCGA CGGCAGCGCCGTGGTGGTTCCTGAATAGAAGCT CCAAGGACGTGCCTCTGACCATCAAGGACCCCGCT GTGGGATTTCTGGAAACCATCAGCCCTGGCTACAG CATCCACACCTACCTGTGGCGGCGGCAGTAGTAAC TCGAGGACGGGGTGAAC TACGCCTGAGGATCCgatc ttttccctctgcaaaaattatggggacatcatgaagcccttgagcatctgactct ggctaataaaggaaatttatttcattgcaatagtgtgttgaattttgtgtctctact cgGCCTAGGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATC ATTAAC TACAaggaaccctagtgtgaggttggccactccctctctgcg cgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggctgcccgcagcccgggctt tgcccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag	
GBA_VG32	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccggccgggcaagcccgggcgctggggc gaccttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgg ccaactccatcactaggggttctTG TAGTTAATGATTAACCCG CCATGCTACTTATCTACCAGGGTAATGGGGATCCT CTAGAACTATAGCTAGTCGACATTGATTATTGACT AGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC GACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGAC GTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG CCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGTTCGAGGccacgttctgcttcactctccccatctcc ccccctccccaccccaatttgtatttatttttaattatttgtgcagcgatggg ggcggggggggggggggcgcgccaggcggggcggggcggggcgagggggc ggggcgggggcgaggcgagaggtgcgggcgagccaatcagagcggcgcgc	1827

[0789]

tccgaaagtttcctttatggcgaggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcg
aagcgcgcgggcgggCGGGAGCAAGCTTCGTTTAGTGAAC
CGtcagatcgctggagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagacacc
gggaccgatccagcctccgcggttcgaatccggcggggaacggtgcattgga
acgcggttcctccgtgccaaagagtacgtaagtaccgcctatagagtctataggcc
cacaaaaatgctttctcttttaataatactttttgtttatcttatttctaatactttcccta
ctctttcttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaaga
ataacagtataatcttgggttaaggcaatagcaatattctgcatataaatatttctgc
atataaattgtaactgatgtaagaggttcataattgtaatagcagctacaatccagct
accattctgctttattttatggttgggataaggctggattattctgagtccaagctagg
cccttttgctaatacatgttcatacctcttattctctcccacagctcctgggcaacgtgc
tggtctgtgtgctggcccatcactttggcaaagaattGGGATTCTGAACCG
GTGCCGCCACCATGGAATTCTCTAGCCCATCTAGA
GAGGAATGTCCTAAGCCTCTGTCAAGAGTGTCCAT
CATGGCCGGCAGCCTGACAGGCCTGCTGCTGCTGC
AGGCCGTGTCCTGGGCCAGTGGAGCCCGGCCCTGC
ATCCCTAAGTCCTTCGGCTATTCTAGCGTGGTCTG
CGTGTGTAATGCCACTTACTGCGACAGCTTCGACC
CTCCTACCTTCCCCGCCCTTGGAACATTCAGCAGA
TACGAGAGCACCAGAAGCGGCAGAAGAATGGAAC
TGAGCATGGGCCCAATCCAGGCCAACCACACCGG
CACCGGCCTGCTGCTGACACTGCAACCTGAGCAGA
AGTTCAGAAAGGTGAAGGGATTTGGAGGCGCCAT
GACCGACGCTGCTGCTCTGAACATCCTGGCCCTCT
CCCCACCTGCTCAGAACCTGCTGCTTAAAAGCTAC
TTCAGCGAGGAAGGCATCGGCTATAACATCATCA
GAGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTCAGCATCAGA
ACATACACCTACGCCGATACACCTGATGACTTCCA
ACTGCACAACCTCAGCCTGCCTGAAGAGGACACA
AAGCTGAAAATCCCCCTGATCCACCGGGCCCTGCA
GCTGGCCCAGAGACCTGTGAGCCTGCTGGCCTCTC
CTTGACAAGCCCCACCTGGCTGAAGACCAATGG
AGCTGTGAACGGCAAGGGCAGCCTGAAGGGCCAG
CCCGGCGACATCTACCACCAAACCTGGGCTCGCTA
CTTCGTGAAATTCCTGGACGCCTACGCTGAGCATA
AGCTGCAATTTTGGGCCGTTACAGCCGAGAACGA
GCCTTCTGCCGGCCTGCTGTCTGGATATCCTTTCCA
GTGCCTGGGCTTCACCCCTGAGCACCAGAGAGACT
TTATCGCCAGAGATCTGGGGCCTACCCTGGCTAAC
AGCACACACCACAACGTGCGGCTGCTGATGCTGG
ACGATCAGAGGCTGCTGCTCCCCACTGGGCCAAG
GTGGTGCTGACAGATCCGGAGGCCGCCAAATACG
TGCACGGCATCGCCGTCCACTGGTACCTGGATTTC
CTGGCCCCTGCCAAGGCCACCCTGGGCGAGACAC
ATAGACTGTTTCCTAATAACCATGCTGTTCCGCCAGC
GAGGCCTGCGTGGGCAGCAAGTTCTGGGAACAGA
GCGTGCGGCTGGGCAGCTGGGACAGAGGAATGCA
GTACAGCCACAGCATCATTACCAACCTGCTGTACC
ACGTGGTGGGCTGGACCGACTGGAACCTGGCCCT
GAACCCCGAAGGCGGCCCAACTGGGTGCGGAAC

[0790]

	TTCGTGGACTCTCCTATCATCGTGGATATTACCAA GGATACCTTTTACAAGCAGCCTATGTTCTACCACC TGGGCCACTTCAGCAAGTTCATCCCTGAGGGCTCT CAGCGGGTGGGCTGGTGGCCTCTCAGAAAAACG ACCTGGATGCCGTTGCCCTGATGCACCCCGACGGC AGCGCCGTGGTGGTCGTCTGAATAGAAGCTCCAA GGACGTGCCTCTGACCATCAAGGACCCCGCTGTGG GATTTCTGGAAACCATCAGCCCTGGCTACAGCATC CACACCTACCTGTGGCGGCGGCAGGGAGGGGGGG GTTTCGGGTGGCGGCGGAAGTGGGGGCGGTGGTTC TtatggcaggaaaaagcggaggcaaaggcgccccccagTAGTAA CTCGAGGACGGGGTGAACCTACGCCTGAGGATCCgat cttttccctctgcaaaaattatggggacatcatgaagcccttgagcatctgacttc tggctaataaaggaaattatcttcattgcaatagtgtgttgaattttgtgtctctcact cgGCCTAGGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATC ATTAACCTACAaggaaccctagtgtgaggtggccactccctctctgcg cgctcgctcgctcactgaggccggcgaccaaagtcgcccacgcccgggctt tgcccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagcag	
GBA_VG33	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccggcgctcgggc gacctttggtcgcccgccctcagtgcgagcgagcgcgagagggagtg ccaactccatcactaggggttcctTGTAAGTTAATGATTAACCCG CCATGCTACTTATCTACCAGGGTAATGGGGATCCT CTAGAACTATAGCTAGTCGACATTGATTATTGACT AGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAAC TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC GACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGAC GTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG CCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGTTCGAGGccacgttctgcttactctccccatctc ccccctcccccccccaattttgtatttttttttaatttttgtgcagcgatggg ggcggggggggggggcgcgccaggcgggcgggcgggcgggcgaggggc ggggcgggcgaggcgagaggtgcggcgccagccaatcagagcgcgcg tccgaaagtctctttatggcgaggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcg aagcgcgggcgggCGGGAGCAAGCTTCGTTTAGTGAAC CGtcagatcgctggagacgccatccacgctgtttgacctcatagaagacacc gggaccgatccagctccgcggattcgaatccggcggggaacggtgcattgga acgcggattccccgtccaagagtacgtaagtaccgcctatagagtctataggcc cacaaaaatgcttctcttttaatactttttgtttatcttatttctaatacttcccta ctcttctttcagggaataatgatacaatgtatcatgcctcttgcaccattctaaga ataacagtataattctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgc atataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagct accattctgctttttatggttgggataaggctggattattctgagtccaagctagg cccttttgtaatcatgttcatactcttctctccacagctcctgggcaacgtgc tggctgtgtgtggcccatcactttggcaagaattGGGATTCTGAACCG GTGCCGCCACCATGGAATTCTCTAGCCCATCTAGA	1828

[0791]

GAGGAATGTCCTAAGCCTCTGTCAAGAGTGTCCAT
CATGGCCGGCAGCCTGACAGGCCTGCTGCTGCTGC
AGGCCGTGTCCTGGGCCAGTGGAGCCCGGCCCTGC
ATCCCTAAGTCCTTCGGCTATTCTAGCGTGGTCTG
CGTGTGTAATGCCACTTACTGCGACAGCTTCGACC
CTCCTACCTTCCCCGCCCTTGGAACATTGAGCAGA
TACGAGAGCACCAGAAGCGGCAGAGAAGTGGAACT
TGAGCATGGGCCCAATCCAGGCCAACCACACCGG
CACCGGCCTGCTGCTGACACTGCAACCTGAGCAGA
AGTTCCAGAAGGTGAAGGGATTTGGAGGCGCCAT
GACCGACGCTGCTGCTCTGAACATCCTGGCCCTCT
CCCCACCTGCTCAGAACCTGCTGCTTAAAAGCTAC
TTCAGCGAGGAAGGCATCGGCTATAACATCATCA
GAGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTCAGCATCAGA
ACATACACCTACGCCGATACACCTGATGACTTCCA
ACTGCACAACCTCAGCCTGCCTGAAGAGGACACA
AAGCTGAAAATCCCCCTGATCCACCGGGCCCTGCA
GCTGGCCCAGAGACCTGTGAGCCTGCTGGCCTCTC
CTTGGACAAGCCCCACCTGGCTGAAGACCAATGG
AGCTGTGAACGGCAAGGGCAGCCTGAAGGGCCAG
CCCGGCGACATCTACCACCAAACCTGGGCTCGCTA
CTTCGTGAAATTCCTGGACGCCTACGCTGAGCATA
AGCTGCAATTTTGGGCCGTTACAGCCGAGAACGA
GCCTTCTGCCGGCCTGCTGTCTGGATATCCTTTCCA
GTGCCTGGGCTTCACCCCTGAGCACCAGAGAGACT
TTATCGCCAGAGATCTGGGGCCTACCCTGGCTAAC
AGCACACACCACAACGTGCGGCTGCTGATGCTGG
ACGATCAGAGGCTGCTGCTCCCCCACTGGGCCAAG
GTGGTGCTGACAGATCCGGAGGCCGCCAAATACG
TGCACGGCATCGCCGTCCACTGGTACCTGGATTTC
CTGGCCCCTGCCAAGGCCACCCTGGGCGAGACAC
ATAGACTGTTTCCTAATAACCATGCTGTTCCGCCAGC
GAGGCCTGCGTGGGCAGCAAGTTCTGGGAACAGA
GCGTGCGGCTGGGCAGCTGGGACAGAGGAATGCA
GTACAGCCACAGCATCATTACCAACCTGCTGTACC
ACGTGGTGGGCTGGACCGACTGGAACCTGGCCCT
GAACCCCGAAGGCGGCCCCCAACTGGGTGCGGAAC
TTCGTGGACTCTCCTATCATCGTGGATATTACCAA
GGATACCTTTTACAAGCAGCCTATGTTCTACCACC
TGGGCCACTTCAGCAAGTTCATCCCTGAGGGCTCT
CAGCGGGTGGGCCTGGTGGCCTCTCAGAAAAACG
ACCTGGATGCCGTTGCCCTGATGCACCCCGACGGC
AGCGCCGTGGTGGTCGTCCTGAATAGAAGCTCCAA
GGACGTGCCTCTGACCATCAAGGACCCCGCTGTGG
GATTTCTGGAAACCATCAGCCCTGGCTACAGCATC
CACACCTACCTGTGGCGGCGGCAGTAGTAACCTCG
AGGTACCAGGAGCTCTTCTCCTAGTGAATTCTACC
AGTGCCATAGATAGTTAAGTGAATTCTACCAGTGC
CATAGATAGTTAAGTGAATTCTACCAGTGCCATAG
ATAGTTAAGTGAATTCTACCAGTGCCATACTGCAG

[0792]

TCAGGTCTATACCATCGAGGACGGGGTGAAC TAC GCCTGAGGATCCgattctttccctctgccaaaattatggggacatcatg aagcccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaattatttcattgcaatagt tgttggaattttgtgtctctcactcgGCCTAGGTAGATAAGTAGC ATGGCGGGTTAATCATTAACTACAaggaaccctagtgatg gagttggccactccctctctgcgcgctcgctcactgaggccgggcgaccaa aggtcgcccgacgcccgggcttgcggggcgccctcagtgagcgagcgagcg cgcag	
--	--

[0793] 在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子的病毒基因组包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含例如表20、表21或表29-32中所描述的所有组分或组分的组合,或与前述序列中的任一者具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列。

[0794] 表20. ITR至ITR序列中的序列区

[0795]

序列区	GBA_VG17 (SEQ ID NO: 1812)		
	区域 SEQ ID NO	区域长度	SEQ ID NO: 1812 中的位置
5' ITR	1829	130	1-130
CMVie	1831	380	204-583
CB 启动子	1834	260	590-849
内含子	1842	566	877-1442
信号序列	1850	117	1467-1583
GBA 变体 1 编码序列	1773	1,491	1584-3074
聚 A	1846	127	3114-3240
3' ITR	1830	130	3284-3413

[0796] 在一些实施方案中,AAV粒子包含病毒基因组,所述病毒基因组包含SEQ ID NO: 1812 (GBA_VG17)的核苷酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性)的核苷酸序列。在一些实施方案中,病毒基因组包含SEQ ID NO: 1812的核苷酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性)的序列。在一些实施方案中,包含SEQ ID NO: 1812的核苷酸序列的病毒基因组按5'至3'的顺序包含:5' ITR序列区,所述序列区包含SEQ ID NO: 1829的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;CMVie增强子,所述增强子包含SEQ ID NO: 1831的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;CB启动子,所述启动子包含SEQ ID NO: 1834的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;内含子,所述内含子包含SEQ ID NO: 1842的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;编码信号序列的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1850的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;编码GBA蛋白的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1773的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;聚腺苷酸化序列,所述聚腺苷酸化序列包含SEQ ID NO: 1846的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;以及3' ITR序列区,所述序列区包含SEQ ID NO: 1830的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0797] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO: 1812的核苷酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性)的核苷酸序列的病毒基因

组编码包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性)的氨基酸序列的GBA蛋白。

[0798] 表29. ITR至ITR序列中的序列区

序列区	GBA_VG18 (SEQ ID NO: 1813)		
	区域 SEQ ID NO	区域长度	SEQ ID NO: 1813 中的位置
5' ITR	1829	130	1-130
[0799] EF-1 α 启动子变体 2	1839	1189	216-1404
信号序列	1850	117	1429-1545
GBA 变体 1 编码序列	1773	1,491	1546-3063
聚 A	1846	127	3076-3202
3' ITR	1830	130	3246-3375

[0800] 在一些实施方案中, AAV粒子包含病毒基因组, 所述病毒基因组包含SEQ ID NO: 1813 (GBA_VG18) 的核苷酸序列, 或与其大体上相同(例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性)的核苷酸序列。在一些实施方案中, 病毒基因组包含SEQ ID NO: 1813的核苷酸序列, 或与其大体上相同(例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性)的序列。在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1813的核苷酸序列的病毒基因组按5'至3'的顺序包含: 5' ITR序列区, 所述序列区包含SEQ ID NO: 1829的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; EF-1 α 启动子变体, 所述启动子变体包含SEQ ID NO: 1839的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1850的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1773的核苷酸序列, 或与SEQ ID NO: 1773的核苷酸序列至少88% (例如, 至少89、90、92、95、96、97、98或99%) 同一的核苷酸序列; 聚腺苷酸化序列, 所述聚腺苷酸化序列包含SEQ ID NO: 1846的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 以及3' ITR序列区, 所述序列区包含SEQ ID NO: 1830的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0801] 在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1813的核苷酸序列或与其大体上相同(例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性)的核苷酸序列的病毒基因组编码包含SEQ ID NO: 1775的氨基酸序列或与其大体上相同(例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性)的氨基酸序列的GBA蛋白。

[0802] 表30. ITR至ITR序列中的序列区

序列区	GBA_VG27 (SEQ ID NO: 1822)		
	区域 SEQ ID NO	区域长度	SEQ ID NO: 1822 中的位置
5' ITR	1829	130	1-130
CMVie	1831	380	204-583
CB 启动子	1834	260	590-849

[0804]

内含子	1842	566	877-1442
信号序列	1850	117	1467-1583
GBA 变体 1 编码序列	1773	1,491	1584-3074
弗林蛋白酶裂解位点	1724	12	3075-3086
T2A	1726	54	3087-3140
信号序列	1856	48	3141-3188
SAPC 编码序列	1787	351	3189-3539
聚 A	1846	127	3579-3705
3' ITR	1830	130	3749-3878

[0805] 在一些实施方案中, AAV粒子包含病毒基因组, 所述病毒基因组包含SEQ ID NO: 1822 (GBA_VG27) 的核苷酸序列, 或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性) 的核苷酸序列。在一些实施方案中, 病毒基因组包含SEQ ID NO: 1822的核苷酸序列, 或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的序列。在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1822的核苷酸序列的病毒基因组按5'至3'的顺序包含: 5' ITR序列区, 所述序列区包含SEQ ID NO: 1829的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; CMVie增强子, 所述增强子包含SEQ ID NO: 1831的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; CB启动子, 所述启动子包含SEQ ID NO: 1834的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 内含子, 所述内含子包含SEQ ID NO: 1842的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 编码第一信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1850的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1773的核苷酸序列, 或与其至少88% (例如, 至少89%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码弗林蛋白酶裂解位点的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1724的核苷酸序列, 或相对于SEQ ID NO: 1724具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的核苷酸序列; 编码T2A多肽的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1726的核苷酸序列, 或相对于SEQ ID NO: 1726具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例如取代的核苷酸序列; 编码第二信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1856的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码SAPC多肽的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1787的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 聚腺苷酸化序列, 所述聚腺苷酸化序列包含SEQ ID NO: 1846的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 以及3' ITR序列区, 所述序列区包含SEQ ID NO: 1830的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0806] 在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1822的核苷酸序列或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的核苷酸序列的病毒基因组编码包含SEQ ID NO: 1775的氨基酸序列或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的氨基酸序列的GBA蛋白。在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1822的核苷酸序列或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的核苷酸序列的病毒基因组编码包含SEQ ID NO: 1789

的氨基酸序列或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的氨基酸序列的SAPC蛋白。

[0807] 表31. ITR至ITR序列中的序列区

序列区	GBA_VG29 (SEQ ID NO: 1824)		
	区域 SEQ ID NO	区域长度	SEQ ID NO: 1824 中的位置
5' ITR	1829	130	1-130
CMVie	1831	380	204-583
CB 启动子	1834	260	590-849
内含子	1842	566	877-1442
信号序列	1850	117	1467-1583
溶酶体靶向序列 2 (LTS2)	1801	63	1584-1646
GBA 变体 1 编码序列	1773	1,491	1647-3137
聚 A	1846	127	3177-3303
3' ITR	1830	130	3347-3476

[0810] 在一些实施方案中, AAV粒子包含病毒基因组, 所述病毒基因组包含SEQ ID NO: 1824 (GBA_VG29) 的核苷酸序列, 或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性) 的核苷酸序列。在一些实施方案中, 病毒基因组包含SEQ ID NO: 1824的核苷酸序列, 或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的序列。在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1824的核苷酸序列的病毒基因组按5'至3'的顺序包含: 5' ITR序列区, 所述序列区包含SEQ ID NO: 1829的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; CMVie增强子, 所述增强子包含SEQ ID NO: 1831的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; CB启动子, 所述启动子包含SEQ ID NO: 1834的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 内含子, 所述内含子包含SEQ ID NO: 1842的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1850的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 溶酶体靶向序列2 (LTS2), 所述溶酶体靶向序列2包含SEQ ID NO: 1801的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1773的核苷酸序列, 或与其至少88% (例如, 至少89%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 聚腺苷酸化序列, 所述聚腺苷酸化序列包含SEQ ID NO: 1846的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 以及3' ITR序列区, 所述序列区包含SEQ ID NO: 1830的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0811] 在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1824的核苷酸序列或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的核苷酸序列的病毒基因组编码包含SEQ ID NO: 1775的氨基酸序列或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的氨基酸序列的GBA蛋白。

[0812] 表32. ITR至ITR序列中的序列区

序列区	GBA_VG32 (SEQ ID NO: 1827)		
	区域 SEQ ID NO	区域长度	SEQ ID NO: 1827 中的位置
5' ITR	1829	130	1-130
CMVie	1831	380	204-583
CB 启动子	1834	260	590-849
内含子	1842	566	877-1442
信号序列	1850	117	1467-1583
GBA 变体 1 编码序列	1773	1,491	1584-3074
G4S3 连接子	1730	45	3075-3119
TAT 编码序列	1793	42	3120-3161
聚 A	1846	127	3201-3327
3' ITR	1830	130	3371-3500

[0813] 在一些实施方案中, AAV粒子包含病毒基因组, 所述病毒基因组包含SEQ ID NO: 1827 (GBA_VG32) 的核苷酸序列, 或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性) 的核苷酸序列。在一些实施方案中, 病毒基因组包含SEQ ID NO: 1827的核苷酸序列, 或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的序列。在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1827的核苷酸序列的病毒基因组按5'至3'的顺序包含: 5' ITR序列区, 所述序列区包含SEQ ID NO: 1829的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; CMVie增强子, 所述增强子包含SEQ ID NO: 1831的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; CB启动子, 所述启动子包含SEQ ID NO: 1834的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 内含子, 所述内含子包含SEQ ID NO: 1842的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1850的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1773的核苷酸序列, 或与SEQ ID NO: 1773的核苷酸序列至少88% (例如, 至少89、90、92、95、96、97、98或99%) 同一的核苷酸序列; 编码G4S3连接子的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1730的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 编码TAT肽的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1793的核苷酸序列, 或与其至少85% (例如, 至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%) 同一的核苷酸序列; 聚腺苷酸化序列, 所述聚腺苷酸化序列包含SEQ ID NO: 1846的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 以及3' ITR序列区, 所述序列区包含SEQ ID NO: 1830的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0815] 在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1827的核苷酸序列或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的核苷酸序列的病毒基因组编码包含SEQ ID NO: 1775的氨基酸序列或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的氨基酸序列的GBA蛋白。在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1827的核苷酸序列或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的核苷酸序列的病毒基因组编码包含SEQ ID NO: 1794的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO: 1794具有至少一个、两个或三个但不超过四个修饰, 例

如取代的氨基酸序列的TAT肽。

[0816] 表21. ITR至ITR序列中的序列区

序列区	GBA_VG33 (SEQ ID NO: 1828)		
	区域 SEQ ID NO	区域长度	SEQ ID NO: 1828 中的位置
[0817] 5' ITR	1829	130	1-130
CMVie	1831	380	204-583
CB 启动子	1834	260	590-849
内含子	1842	566	877-1442
信号序列	1850	117	1467-1583
GBA 变体 1 编码序列	1773	1,491	1584-3074
miR183 结合位点	1847	22	3108-3129
间隔子	1848	8	3130-3137
miR183 结合位点	1847	22	3138-3159
[0818] 间隔子	1848	8	3160-3167
miR183 结合位点	1847	22	3168-3189
间隔子	1848	8	3190-3197
miR183 结合位点	1847	22	3198-3219
聚 A	1846	127	3272-3398
3' ITR	1830	130	3442-3751

[0819] 在一些实施方案中, AAV粒子包含病毒基因组, 所述病毒基因组包含SEQ ID NO: 1828 (GBA_VG33) 的核苷酸序列, 或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性) 的核苷酸序列。在一些实施方案中, 病毒基因组包含SEQ ID NO: 1828的核苷酸序列, 或与其大体上相同 (例如, 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性) 的序列。在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO: 1828的核苷酸序列的病毒基因组按5'至3'的顺序包含: 5' ITR序列区, 所述序列区包含SEQ ID NO: 1829的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; CMVie增强子, 所述增强子包含SEQ ID NO: 1831的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; CB启动子, 所述启动子包含SEQ ID NO: 1834的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 内含子, 所述内含子包含SEQ ID NO: 1842的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 编码信号序列的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1850的核苷酸序列, 或与其至少95%同一的核苷酸序列; 编码GBA蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1773的核苷酸序列, 或与SEQ ID NO: 1773的核苷酸序列至少88% (例如, 至少89、90、92、95、96、97、98或99%) 同一的核苷酸序列; 编码miR183结合位点的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1847的核苷酸序列, 或具有SEQ ID NO: 1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列; 间隔子, 所述间隔子包含SEQ ID NO: 1848的核苷酸序列, 或具有SEQ ID NO: 1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列; 编码miR183结合位点的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1847的核苷酸序列, 或具有SEQ ID NO: 1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列; 间隔子, 所述间隔子包含SEQ ID NO: 1848的核苷酸序列, 或具有

SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;编码miR183结合位点的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;间隔子,所述间隔子包含SEQ ID NO:1848的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1848的至少一个、两个或三个修饰但不超过四个修饰的核苷酸序列;编码miR183结合位点的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1847的核苷酸序列,或具有SEQ ID NO:1847的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个修饰但不超过十个修饰的核苷酸序列;聚腺苷酸化序列,所述聚腺苷酸化序列包含SEQ ID NO:1846的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列;以及3' ITR序列区,所述序列区包含SEQ ID NO:1830的核苷酸序列,或与其至少95%同一的核苷酸序列。

[0820] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:1828的核苷酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性)的核苷酸序列的病毒基因组编码包含SEQ ID NO:1775的氨基酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性)的氨基酸序列的GBA蛋白。

[0821] 在一些实施方案中,AAV粒子包含AAV病毒基因组,所述病毒基因组包含本文所描述,例如表18-21或表29-32所描述的病毒基因组中的任一者的核苷酸序列,或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列。在一些实施方案中,AAV病毒基因组还包含编码衣壳蛋白,例如结构蛋白的核酸。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含VP1多肽、VP2多肽和/或VP3多肽。在一些实施方案中,VP1多肽、VP2多肽和/或VP3多肽由至少一个Cap基因编码。在一些实施方案中,AAV病毒基因组还包含编码Rep蛋白,例如非结构蛋白的核酸。在一些实施方案中,Rep蛋白包含Rep78蛋白、Rep68、Rep52蛋白和/或Rep40蛋白。在一些实施方案中,Rep78蛋白、Rep68蛋白、Rep52蛋白和/或Rep40蛋白由至少一个Rep基因编码。

[0822] 在一些实施方案中,包含含有本文所描述,例如表18-21或表29-32所描述的病毒基因组中的任一者的核苷酸序列或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列的病毒的AAV粒子包含具有选自表1的血清型或其功能变体的衣壳蛋白,例如,包装于所述衣壳蛋白中。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含VOY101、VOY201、AAVPHP.N(PHP.N)、AAVPHP.B(PHP.B)、AAVPHP.A(PHP.A)、PHP.B2、PHP.B3、G2B4、G2B5、AAV9、AAVrh10或其功能变体。在一些实施方案中,衣壳蛋白包括VOY101衣壳蛋白或其功能变体。

[0823] 在一些实施方案中,包含含有本文所描述,例如表18-21或表29-32所描述的病毒基因组中的任一者的核苷酸序列或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列的病毒基因组的AAV粒子包含衣壳蛋白,所述衣壳蛋白包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的序列。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含具有SEQ ID NO:138的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,衣壳蛋白由SEQ ID NO:137的核苷酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%)的核苷酸序列编码。在一些实施方案中,衣壳蛋

白包含根据SEQ ID NO:138编号在位置K449处的氨基酸取代,例如,K449R取代。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含含有TLAVPFK(SEQ ID NO:1262)的氨基酸序列的插入物,其中相对于根据SEQ ID NO:138编号的参考序列,所述插入物紧接在位置588之后存在。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含根据SEQ ID NO:138编号在位置587处的除“A”以外的氨基酸和/或在位置588处的除“Q”以外的氨基酸。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含根据SEQ ID NO:138编号的A587D和/或Q588G的氨基酸取代。

[0824] 在一些实施方案中,包含含有本文所描述,例如表18-21或表29-32所描述的病毒基因组中的任一者的核苷酸序列或与前述序列中的任一者大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的核苷酸序列的病毒基因组的AAV粒子包含衣壳蛋白,所述衣壳蛋白包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或与其大体上相同(例如,具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的序列。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰但不超过30个、20个或10个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,衣壳蛋白由SEQ ID NO:2的核苷酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%)的核苷酸序列编码。

[0825] 在一些实施方案中,本公开提供了包含上文所鉴定的病毒基因组的载体、细胞和/或AAV粒子。

[0826] 自互补和单链载体

[0827] 在一些实施方案中,本公开中所用的AAV载体是单链载体(ssAAV)。

[0828] 在一些实施方案中,AAV载体可以是自互补AAV载体(scAAV)。参见例如美国专利号7,465,583。scAAV载体含有粘接在一起形成双链DNA的两个DNA链。通过跳过第二链合成,scAAV允许在细胞中快速表达。

[0829] 在一些实施方案中,本公开中所用的AAV载体是scAAV。

[0830] 生产和/或修饰AAV载体的方法在本领域中公开,诸如假型AAV载体(国际专利公布号W0200028004、W0200123001、W02004112727、W0 2005005610和W0 2005072364,每篇公布的内容以全文引用的方式并入本文中)。

[0831] 病毒基因组大小

[0832] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子的病毒基因组可以是单链或双链的。载体基因组的大小可以是小、中、大或最大尺寸。

[0833] 在一些实施方案中,包含编码本文所描述的GCase蛋白的核酸序列的载体基因组可以是小的单链载体基因组。小的单链载体基因组的大小可以为约2.7kb至约3.5kb,诸如大小为约2.7、约2.8、约2.9、约3.0、约3.1、约3.2、约3.3、约3.4或约3.5kb。在一些实施方案中,小的单链载体基因组的大小可以为3.2kb。

[0834] 在一些实施方案中,包含编码本文所描述的GCase蛋白的核酸序列的载体基因组可以是小的双链载体基因组。小的双链载体基因组的大小可以为约1.3至约1.7kb,诸如大小为约1.3、约1.4、约1.5、约1.6或约1.7kb。在一些实施方案中,小的双链载体基因组的大小可以为1.6kb。

[0835] 在一些实施方案中,包含编码本文所描述的GCase蛋白的核酸序列的载体基因组可以是中等单链载体基因组。中等单链载体基因组的大小可以为约3.6至约4.3kb,诸如大

小为约3.6、约3.7、约3.8、约3.9、约4.0、约4.1、约4.2或约4.3kb。在一些实施方案中,中等单链载体基因组的大小可以为4.0kb。

[0836] 在一些实施方案中,包含编码本文所描述的GCase蛋白的核酸序列的载体基因组可以是中等双链载体基因组。中等双链载体基因组的大小可以为约1.8至约2.1kb,诸如大小为约1.8、约1.9、约2.0或约2.1kb。在一些实施方案中,中等双链载体基因组的大小可以为2.0kb。另外,载体基因组可以包含启动子和聚A尾。

[0837] 在一些实施方案中,包含编码本文所描述的GCase蛋白的核酸序列的载体基因组可以是大的单链载体基因组。大的单链载体基因组的大小可以为4.4至6.0kb,诸如大小为约4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9和6.0kb。作为一个非限制性实例,大的单链载体基因组的大小可以为4.7kb。作为另一个非限制性实例,大的单链载体基因组的大小可以为4.8kb。作为又一个非限制性实例,大的单链载体基因组的大小可以为6.0kb。

[0838] 在一些实施方案中,包含编码本文所描述的GCase蛋白的核酸序列的载体基因组可以是大的双链载体基因组。大的双链载体基因组的大小可以为2.2至3.0kb,诸如大小为约2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9和3.0kb。作为一个非限制性实例,大的双链载体基因组的大小可以为2.4kb。

[0839] 主链

[0840] 在某些实施方案中,将诸如载体主链的顺式元件并入编码例如GBA蛋白或GBA蛋白和本文所描述的增强元件的病毒粒子中。不希望受理论约束,在一些实施方案中,据信主链序列可以有助于GBA蛋白表达的稳定性和/或GBA蛋白的表达水平。

[0841] 在一些实施方案中,本公开还提供了编码病毒基因组,例如包含表18-21或表29-32的病毒基因组中的任一者的核苷酸序列或与其大体上相同(例如,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性)的核苷酸序列的病毒基因组的核酸,适合于在细胞(例如,细菌细胞)中复制病毒基因组的主链区(例如,其中主链区包含细菌复制起点和可选标记物中的一者或两者)。

[0842] II. 病毒生产

[0843] 一般病毒生产过程

[0844] 在一些实施方案中,用于生产AAV(例如,rAAV)粒子的细胞可以包括哺乳动物细胞(诸如HEK293细胞)和/或昆虫细胞(诸如Sf9细胞)。

[0845] 在各种实施方案中,AAV生产包括用于生产AAV粒子和载体的过程和方法,所述AAV粒子和载体可以接触靶细胞以递送有效载荷,例如重组病毒构建体,其包括编码有效载荷分子的核苷酸。在某些实施方案中,病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体,诸如重组腺相关病毒(rAAV)载体。在某些实施方案中,AAV粒子是腺相关病毒(AAV)粒子,诸如重组腺相关病毒(rAAV)粒子。

[0846] 在一些实施方案中,本文公开了包含本公开的病毒基因组的载体。在一些实施方案中,本文公开了包含本公开的病毒基因组的细胞。在一些实施方案中,细胞是细菌细胞、哺乳动物细胞(例如,HEK293细胞)或昆虫细胞(例如,Sf9细胞)。

[0847] 在一些实施方案中,本文公开了一种制造病毒基因组的方法。所述方法包括提供编码本文所描述的病毒基因组的核酸和适合于细胞(例如,细菌细胞)中病毒基因组的复制

的主链区(例如,其中主链区包含细菌复制起点和可选标记物中的一者或两者),以及从主链区切除病毒基因组,例如,通过使病毒基因组的上游和下游的核酸分子裂解。在一些实施方案中,包含可操作地连接至包含编码GBA蛋白(例如,本文所描述的GBA蛋白)的转基因的核酸的启动子的病毒基因组将并入细胞中生产的AAV粒子中。在一些实施方案中,细胞是细菌细胞、哺乳动物细胞(例如,HEK293细胞)或昆虫细胞(例如,Sf9细胞)。

[0848] 在一些实施方案中,本文公开了一种制造本公开的重组AAV粒子的方法,所述方法包括(i)提供包含本文所描述的病毒基因组的宿主细胞,以及在适合于将病毒基因组包裹于衣壳蛋白,例如本文所描述的衣壳蛋白(例如,表1中列出的衣壳蛋白,例如VOY101衣壳蛋白或其功能变体)的条件下孵育宿主细胞,从而制造重组AAV粒子。在一些实施方案中,所述方法包括在步骤(i)之前,将包含病毒基因组的第一核酸引入细胞中。在一些实施方案中,宿主细胞包含编码衣壳蛋白的第二核酸。在一些实施方案中,在第一核酸分子之前、同时或之后将第二核酸引入宿主细胞中。在一些实施方案中,宿主细胞是细菌细胞、哺乳动物细胞(例如,HEK293细胞)或昆虫细胞(例如,Sf9细胞)。

[0849] 在各种实施方案中,本文提供通过以下方式生产AAV粒子或载体的方法:(a)使病毒生产细胞与编码至少一个AAV衣壳蛋白的一个或多个病毒表达构建体和编码有效载荷分子的一个或多个有效载荷构建体接触,所述有效载荷分子可以选自:转基因、编码蛋白质的多核苷酸和调节核酸;(b)在生产至少一个AAV粒子或载体的条件下培养病毒生产细胞,以及(c)从生产流中分离AAV粒子或载体。

[0850] 在这些方法中,病毒表达构建体可以编码至少一个结构蛋白和/或至少一个非结构蛋白。结构蛋白可以包括原生或野生型衣壳蛋白VP1、VP2和/或VP3或其嵌合蛋白中的任一者。非结构蛋白可以包括原生或野生型Rep78、Rep68、Rep52和/或Rep40蛋白或其嵌合蛋白中的任一者。

[0851] 在某些实施方案中,接触经由瞬时转染、病毒转导和/或电穿孔而发生。

[0852] 在某些实施方案中,病毒生产细胞选自哺乳动物细胞和昆虫细胞。在某些实施方案中,昆虫细胞包括草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)昆虫细胞。在某些实施方案中,昆虫细胞包括Sf9昆虫细胞。在某些实施方案中,昆虫细胞包括Sf21昆虫细胞。

[0853] 在各种实施方案中,本公开的有效载荷构建体载体可以包括至少一个反向末端重复(ITR)并且可以包括哺乳动物DNA。

[0854] 还提供了根据本文所描述的方法生产的AAV粒子和病毒载体。

[0855] 在各种实施方案中,本公开的AAV粒子可以与一种或多种可接受的赋形剂配制成药物组合物。

[0856] 在某些实施方案中,AAV粒子或病毒载体可以通过本文所描述的方法生产。

[0857] 在某些实施方案中,AAV粒子可以通过使病毒生产细胞(例如,昆虫细胞或哺乳动物细胞)与编码至少一个衣壳蛋白的至少一个病毒表达构建体和至少一个有效载荷构建体载体接触来生产。病毒生产细胞可以通过瞬时转染、病毒转导和/或电穿孔而接触。有效载荷构建体载体可以包括编码有效载荷分子的有效载荷构建体,所述有效载荷分子诸如但不限于转基因、编码蛋白质的多核苷酸和调节核酸。病毒生产细胞可以在生产、分离(例如,使用温度诱导溶解、机械溶解和/或化学溶解)和/或纯化(例如,使用过滤、层析和/或免疫亲和纯化)至少一个AAV粒子或载体的条件下培养。作为一个非限制性实例,有效载荷构建体

载体可以包括哺乳动物DNA。

[0858] 在某些实施方案中,使用本文所描述的方法在昆虫细胞(例如,草地贪夜蛾(Sf9)细胞)中生产AAV粒子。作为一个非限制性实例,使用病毒转导接触昆虫细胞,所述病毒转导可以包括杆状病毒转导。

[0859] 在某些实施方案中,使用本文所描述的方法在哺乳动物细胞(例如,HEK293细胞)中生产AAV粒子。作为一个非限制性实例,使用病毒转导接触哺乳动物细胞,所述病毒转导可以包括多质粒瞬时转染(诸如三重质粒瞬时转染)。

[0860] 在某些实施方案中,本文所描述的AAV粒子生产方法在病毒生产细胞中生产大于 10^1 、大于 10^2 、大于 10^3 、大于 10^4 或大于 10^5 个AAV粒子。

[0861] 在某些实施方案中,本公开的过程包括使用病毒生产系统在病毒生产细胞中生产病毒粒子,所述系统包括至少一个病毒表达构建体和至少一个有效载荷构建体。可以将至少一个病毒表达构建体和至少一个有效载荷构建体共转染(例如,双重转染、三重转染)至病毒生产细胞中。使用本领域技术人员已知和常规进行的标准分子生物学技术完成转染。病毒生产细胞提供了表达蛋白质所必需的细胞机构和生产AAV粒子所必需的其它生物材料,包括复制有效载荷构建体的Rep蛋白和组装形成包裹复制的有效载荷构建体的衣壳的Cap蛋白。从病毒生产细胞中提取所得AAV粒子并且加工成用于施用的医药制剂。

[0862] 在各种实施方案中,不受理论约束,一旦施用,本文所公开的AAV粒子可以接触靶细胞并进入细胞,例如核内体中。AAV粒子,例如从核内体释放的那些,随后可以接触靶细胞的细胞核以递送有效载荷构建体。有效载荷构建体,例如重组病毒构建体,可以递送至靶细胞的细胞核,其中可以表达由有效载荷构建体编码的有效载荷分子。

[0863] 在某些实施方案中,生产病毒粒子的过程利用病毒生产细胞的种子培养物,所述病毒生产细胞包括一种或多种杆状病毒(例如,杆状病毒表达载体(BEV)或已用病毒表达构建体和有效载荷构建体载体转染的杆状病毒感染的昆虫细胞(BIIC))。在某些实施方案中,收集种子培养物,分成等分试样并冷冻,并且可以在稍后的时间点使用以引发生产细胞的初始群体的感染。

[0864] 在一些实施方案中,AAV粒子的大规模生产利用生物反应器。不受理论约束,使用生物反应器可以允许精确测量和/或控制支持病毒生产细胞的生长和活性的变量,诸如质量、温度、混合条件(叶轮RPM或波振荡)、CO₂浓度、O₂浓度、气体喷射速率和体积、气体覆盖速率和体积、pH、活细胞密度(VCD)、细胞活力、细胞直径和/或光密度(OD)。在某些实施方案中,生物反应器用于批量生产,其中在实验确定的时间点收集整个培养物并且纯化AAV粒子。在一些实施方案中,生物反应器用于连续生产,其中在实验确定的时间点收集培养物的一部分以纯化AAV粒子,并且用额外生长培养基组分更新生物反应器中的剩余培养物。

[0865] 在各种实施方案中,可以在包括细胞溶解、澄清、灭菌和纯化的过程中从病毒生产细胞中提取AAV病毒粒子。细胞溶解包括破坏病毒生产细胞的结构,从而释放AAV粒子的任何过程。在某些实施方案中,细胞溶解可以包括热冲击、化学或机械溶解方法。澄清可以包括溶解的细胞、培养基组分和AAV粒子的混合物的大体纯化。在某些实施方案中,澄清包括离心和/或过滤,包括但不限于深度端、切向流和/或中空纤维过滤。

[0866] 在各种实施方案中,病毒生产的最终结果是纯化的AAV粒子集合,其包括两种组分:(1)有效载荷构建体(例如,重组AAV载体基因组构建体)和(2)病毒衣壳。

[0867] 在某些实施方案中,本公开的病毒生产系统或过程包括使用病毒生产细胞(VPC)和质粒构建体生产杆状病毒感染的昆虫细胞(BIIC)的步骤。将来自细胞库(CB)的病毒生产细胞(VPC)解冻并扩展,以提供目标工作体积和VPC浓度。将所得VPC池拆分为Rep/Cap VPC池和有效载荷VPC池。将一个或多个Rep/Cap质粒构建体(病毒表达构建体)加工成Rep/Cap杆粒多核苷酸并且转染至Rep/Cap VPC池中。将一个或多个有效载荷质粒构建体(有效载荷构建体)加工成有效载荷杆粒多核苷酸并且转染至有效载荷VPC池中。孵育两个VPC池以生产P1 Rep/Cap杆状病毒表达载体(BEV)和P1有效载荷BEV。将两个BEV池扩展为一组斑块,其中选择单个斑块用于克隆斑块(CP)纯化(也称为单斑块扩展)。所述过程可以包括单个CP纯化步骤或可以包括串联或由其它加工步骤分开的多个CP纯化步骤。一个或多个CP纯化步骤提供CP Rep/Cap BEV池和CP有效载荷BEV池。然后可以储存这两个BEV池并且用于未来的生产步骤,或然后可以将其转染至VPC中以生产Rep/Cap BIIC池和有效载荷BIIC池。

[0868] 在某些实施方案中,本公开的病毒生产系统或过程包括使用病毒生产细胞(VPC)和杆状病毒感染的昆虫细胞(BIIC)生产AAV粒子的步骤。将来自细胞库(CB)的病毒生产细胞(VPC)解冻并扩展,以提供目标工作体积和VPC浓度。将病毒生产细胞的工作体积接种至生产生物反应器中,并且可以进一步扩展至200-2000L工作体积并且具有用于BIIC感染的目标VPC浓度。然后,将生产生物反应器中VPC的工作体积与Rep/Cap BIIC和有效载荷BIIC以目标VPC:BIIC比率和目标BIIC:BIIC比率共感染。VCD感染还可以利用BEV。在生产生物反应器中孵育和扩展共感染的VPC,以生产AAV粒子和VPC的大量收集物。

[0869] 病毒表达构建体

[0870] 在各种实施方案中,本公开的病毒生产系统包括一个或多个可以转染/转导至病毒生产细胞中的病毒表达构建体。在某些实施方案中,本公开的病毒表达构建体或有效载荷构建体可以是杆粒,也称为杆状病毒质粒或重组杆状病毒基因组。在某些实施方案中,病毒表达包括用于在病毒生产细胞中表达的蛋白质编码核苷酸序列和至少一个表达控制序列。在某些实施方案中,病毒表达包括可操作地连接至用于在病毒生产细胞中表达的至少一个表达控制序列的蛋白质编码核苷酸序列。在某些实施方案中,病毒表达构建体含有在一个或多个启动子控制下的细小病毒基因。细小病毒基因可以包括编码非结构性AAV复制蛋白的核苷酸序列,诸如编码Rep52、Rep40、Rep68或Rep78蛋白的Rep基因。细小病毒基因可以包括编码结构性AAV蛋白的核苷酸序列,诸如编码VP1、VP2和VP3蛋白的Cap基因。

[0871] 本公开的病毒表达构建体可以包括促进细胞用核酸转化、转染或转导的任何生物或化学化合物或配方。示例性生物病毒表达构建体包括质粒、线性核酸分子和重组病毒,包括杆状病毒。示例性化学载体包括脂质复合物。根据本公开,病毒表达构建体用于将核酸序列并入病毒复制细胞中。(O'Reilly, David R., Lois K. Miller和Verne A. Luckow. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Oxford University Press, 1994.); Maniatis等编, *Molecular Cloning*. CSH Laboratory, NY, N.Y. (1982); 以及 Philoport和Schuber编, *Liposomes as tools in Basic Research and Industry*. CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), 每篇文献与病毒表达构建体及其用途相关的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0872] 在某些实施方案中,病毒表达构建体是AAV表达构建体,其包括一个或多个编码非结构性AAV复制蛋白、结构性AAV衣壳蛋白或它们的组合的核苷酸序列。

[0873] 在某些实施方案中,本公开的病毒表达构建体可以是质粒载体。在某些实施方案中,本公开的病毒表达构建体可以是杆状病毒构建体。

[0874] 本公开不受用于生产AAV粒子或病毒载体的病毒表达构建体的数目所限制。在某些实施方案中,根据本公开,可以使用一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个病毒表达构建体在病毒生产细胞中生产AAV粒子。在本公开的某些实施方案中,病毒表达构建体可以用于在昆虫细胞中生产AAV粒子。在某些实施方案中,可以对衣壳和/或rep基因的野生型AAV序列进行修饰,例如以改善病毒粒子的属性,诸如增加感染力或特异性,或提高产量。

[0875] 在某些实施方案中,病毒表达构建体可以含有包括起始密码子区的核苷酸序列,诸如编码包括一个或多个起始密码子区的AAV衣壳蛋白的序列。在某些实施方案中,起始密码子区可以在表达控制序列内。起始密码子可以是ATG或非ATG密码子(即,次优起始密码子,其中AAV VP1衣壳蛋白的起始密码子是非ATG)。

[0876] 在某些实施方案中,用于AAV生产的病毒表达构建体可以含有编码AAV衣壳蛋白的核苷酸序列,其中AAV VP1衣壳蛋白的起始密码子是非ATG,即,次优起始密码子,从而允许在生产系统中表达比率改变的病毒衣壳蛋白,以改善宿主细胞的感染力。在一个非限制性实例中,病毒构建体载体可以含有包含编码AAV VP1、VP2和VP3衣壳蛋白的核苷酸序列的核酸构建体,其中用于翻译AAV VP1衣壳蛋白的起始密码子是CTG、TTG或GTG,如美国专利号US 8,163,543中所描述,所述专利与AAV衣壳蛋白及其生产相关的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0877] 在某些实施方案中,本公开的病毒表达构建体可以是编码用于在昆虫细胞中表达的细小病毒rep蛋白的质粒载体或杆状病毒构建体。在某些实施方案中,单个编码序列用于Rep78和Rep52蛋白,其中用于翻译Rep78蛋白的起始密码子是选自由ACG、TTG、CTG和GTG组成的组的次优起始密码子,其影响在昆虫细胞中表达后的部分外显子跳跃,如美国专利号8,512,981中所描述,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文中,例如以促进与Rep52相比较少丰度的Rep78表达,这可以促进高载体产率。

[0878] 在某些实施方案中,VP编码区编码特定AAV血清型的一种或多种AAV衣壳蛋白。VP编码区的AAV血清型可以是相同的或不同的。在某些实施方案中,VP编码区可以经密码子优化。在某些实施方案中,VP编码区或核苷酸序列可以针对哺乳动物细胞进行密码子优化。在某些实施方案中,VP编码区或核苷酸序列可以针对昆虫细胞进行密码子优化。在某些实施方案中,VP编码区或核苷酸序列可以针对草地贪夜蛾细胞进行密码子优化。在某些实施方案中,VP编码区或核苷酸序列可以针对Sf9或Sf21细胞系进行密码子优化。

[0879] 在某些实施方案中,可以对编码一种或多种VP衣壳蛋白的核苷酸序列进行密码子优化以与小于100%的参考核苷酸序列具有核苷酸同源性。在某些实施方案中,密码子优化的VP核苷酸序列与参考VP核苷酸序列之间的核苷酸同源性小于100%、小于99%、小于98%、小于97%、小于96%、小于95%、小于94%、小于93%、小于92%、小于91%、小于90%、小于89%、小于88%、小于87%、小于86%、小于85%、小于84%、小于83%、小于82%、小于81%、小于80%、小于78%、小于76%、小于74%、小于72%、小于70%、小于68%、小于66%、小于64%、小于62%、小于60%、小于55%、小于50%和小于40%。

[0880] 在某些实施方案中,本公开的病毒表达构建体或有效载荷构建体可以是杆粒,也称为杆状病毒质粒或重组杆状病毒基因组。在某些实施方案中,本公开的病毒表达构建体

或有效载荷构建体(例如,杆粒)可以包括通过本领域技术人员已知和实施的标准分子生物学技术同源重组(转座子供体/受体系统)至杆粒中所并入的多核苷酸。

[0881] 在某些实施方案中,并入杆粒中的多核苷酸(即,多核苷酸插入物)可以包括可操作地连接至蛋白质编码核苷酸序列的表达控制序列。在某些实施方案中,并入杆粒中的多核苷酸可以包括表达控制序列,其包括启动子,诸如p10或polh,并且其可操作地连接至编码结构性AAV衣壳蛋白(例如,VP1、VP2、VP3或它们的组合)的核苷酸序列。在某些实施方案中,并入杆粒中的多核苷酸可以包括表达控制序列,其包括启动子,诸如p10或polh,并且其可操作地连接至编码非结构性AAV衣壳蛋白(例如,Rep78、Rep52或它们的组合)的核苷酸序列。

[0882] 本公开的方法不受特定表达控制序列的使用所限制。然而,当VP产物达到一定化学计量(对于VP1、VP2和VP3分别接近1:1:10)时以及当Rep52或Rep40(也称为p19 Rep)的水平显著高于Rep78或Rep68(也称为p5 Rep)时,可以获得生产细胞(诸如昆虫细胞)中AAV产率的改善。在某些实施方案中,p5/p19比率低于0.6、低于0.4或低于0.3,但始终至少为0.03。这些比率可以在蛋白质水平上测量,或可以与特定mRNA的相对水平有关。

[0883] 在某些实施方案中,AAV粒子在病毒生产细胞(诸如哺乳动物或昆虫细胞)中生产,其中所有三种VP蛋白以接近、大约或等于以下的化学计量表达:1:1:10(VP1:VP2:VP3);2:2:10(VP1:VP2:VP3);2:0:10(VP1:VP2:VP3);1-2:0-2:10(VP1:VP2:VP3);1-2:1-2:10(VP1:VP2:VP3);2-3:0-3:10(VP1:VP2:VP3);2-3:2-3:10(VP1:VP2:VP3);3:3:10(VP1:VP2:VP3);3-5:0-5:10(VP1:VP2:VP3);或3-5:3-5:10(VP1:VP2:VP3)。

[0884] 在某些实施方案中,表达控制区经工程改造以产生选自由以下组成的组的VP1:VP2:VP3比率:大约或精确为1:0:10;大约或精确为1:1:10;大约或精确为2:1:10;大约或精确为2:2:10;大约或精确为3:0:10;大约或精确为3:1:10;大约或精确为3:2:10;大约或精确为3:3:10;大约或精确为4:0:10;大约或精确为4:1:10;大约或精确为4:2:10;大约或精确为4:3:10;大约或精确为4:4:10;大约或精确为5:5:10;大约或精确为1-2:0-2:10;大约或精确为1-2:1-2:10;大约或精确为1-3:0-3:10;大约或精确为1-3:1-3:10;大约或精确为1-4:0-4:10;大约或精确为1-4:1-4:10;大约或精确为1-5:1-5:10;大约或精确为2-3:0-3:10;大约或精确为2-3:2-3:10;大约或精确为2-4:2-4:10;大约或精确为2-5:2-5:10;大约或精确为3-4:3-4:10;大约或精确为3-5:3-5:10;以及大约或精确为4-5:4-5:10。

[0885] 在本公开的某些实施方案中,Rep52或Rep78从杆状病毒源性多面体启动子(polh)转录。Rep52或Rep78还可以从较弱启动子转录,例如,ie-1启动子的缺失突变体 Δ ie-1启动子具有ie-1启动子的约20%转录活性。可以使用与 Δ ie-1启动子大体上同源的启动子。关于启动子,至少50%、60%、70%、80%、90%或更高同源性视为大体上同源的启动子。

[0886] 哺乳动物细胞

[0887] 本文所公开的本公开的病毒生产描述了生产AAV粒子或病毒载体的过程和方法,所述AAV粒子或病毒载体接触靶细胞以递送有效载荷构建体,例如重组AAV粒子或病毒构建体,其包括编码有效载荷分子的核苷酸。病毒生产细胞可以选自任何生物有机体,包括原核(例如,细菌)细胞和真核细胞,包括昆虫细胞、酵母细胞和哺乳动物细胞。

[0888] 在某些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在包括哺乳动物细胞的病毒生产细胞

中生产。病毒生产细胞可以包括哺乳动物细胞,诸如A549、WEH1、3T3、10T1/2、BHK、MDCK、COS 1、COS 7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、W138、HeLa、HEK293、HEK293T (293T)、Saos、C2C12、L细胞、HT1080、Huh7、HepG2、C127、3T3、CHO、HeLa细胞、KB细胞、BHK和来源于哺乳动物的原代成纤维细胞、肝细胞和成肌细胞。病毒生产细胞可以包括来源于任何哺乳动物物种的细胞,包括但不限于人、猴、小鼠、大鼠、兔和仓鼠或细胞类型,包括但不限于成纤维细胞、肝细胞、肿瘤细胞、细胞系转化的细胞等。

[0889] 通常用于生产重组AAV粒子的AAV病毒生产细胞包括但不限于其它哺乳动物细胞系,如以下文献中所描述:美国专利号6,156,303、5,387,484、5,741,683、5,691,176、6,428,988和5,688,676;美国专利申请2002/0081721;以及国际专利公布号WO 00/47757、WO 00/24916和WO 96/17947,在不与本公开冲突的范围内每篇文献的内容以全文引用的方式并入本文中。在某些实施方案中,AAV病毒生产细胞是提供从复制缺陷型辅助病毒缺失的功能的反式互补包装细胞系,例如,HEK293细胞或其它Ea反式互补细胞。

[0890] 在某些实施方案中,包装细胞系293-10-3 (ATCC登录号PTA-2361) 可以用于生产AAV粒子,如美国专利号US 6,281,010中所描述,所述专利与293-10-3包装细胞系及其用途相关的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0891] 在本公开的某些实施方案中,在磷酸甘油酸激酶(PGK) 启动子控制下编码腺病毒E1a和腺病毒E1b的用于反式互补E1缺失的腺病毒载体的细胞系,诸如HeLa细胞系,可以用于如美国专利号6365394中所描述的AAV粒子生产,所述专利与HeLa细胞系及其用途相关的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0892] 在某些实施方案中,使用多质粒瞬时转染方法(诸如三重质粒瞬时转染)在哺乳动物细胞中生产AAV粒子。在某些实施方案中,多质粒瞬时转染方法包括以下三种不同构建体的转染:(i) 有效载荷构建体,(ii) Rep/Cap构建体(细小病毒Rep和细小病毒Cap),以及(iii) 辅助构建体。在某些实施方案中,AAV粒子生产的三种组分的三重转染方法可以用于生产小批量病毒,用于包括转导效率、靶组织(趋向性) 评估和稳定性的测定。在某些实施方案中,AAV粒子生产的三种组分的三重转染方法可以用于生产大批量材料,用于临床或商业应用。

[0893] 可以通过三重转染或杆状病毒介导的病毒生产,或本领域中已知的任何其它方法来生产待配制的AAV粒子。可以采用本领域中已知的任何适合的容纳细胞或包装细胞来生产载体。在某些实施方案中,使用提供从复制缺陷型辅助病毒缺失的功能的反式互补包装细胞系,例如,293细胞或其它E1a反式互补细胞。

[0894] 基因盒可以含有一些或所有细小病毒(例如,AAV) cap和rep基因。在某些实施方案中,通过将编码衣壳和/或Rep蛋白的包装载体引入细胞中来提供一些或所有cap和rep功能。在某些实施方案中,基因盒不编码衣壳或Rep蛋白。或者,使用稳定转化以表达cap和/或rep基因的包装细胞系。

[0895] 在某些实施方案中,根据US2016/0032254所描述的程序生产重组AAV病毒粒子并且从培养物上清液中纯化,所述文献与重组AAV病毒粒子的生产和加工相关的内容以全文引用的方式并入。生产还可能涉及本领域中已知的方法,包括使用293T细胞、三重转染或任何适合的生产方法的那些。

[0896] 在某些实施方案中,哺乳动物病毒生产细胞(例如,293T细胞) 可以处于粘附/附着

状态(例如,与磷酸钙一起)或悬浮状态(例如,与聚乙烯亚胺(PEI)一起)。用生产AAV所需的质粒(即,AAV rep/cap构建体、腺病毒辅助构建体和/或ITR侧接的有效载荷构建体)转染哺乳动物病毒生产细胞。在某些实施方案中,转染过程可以包括任选的培养基变化(例如,呈粘附形式的细胞的培养基变化,呈悬浮形式的细胞的培养基变化,必要时呈悬浮形式的细胞的培养基变化)。在某些实施方案中,转染过程可以包括转染培养基,诸如DMEM或F17。在某些实施方案中,转染培养基可以包括血清或可以是无血清的(例如,与磷酸钙并且与血清一起呈粘附状态的细胞,与PEI一起并且不与血清一起呈悬浮状态的细胞)。

[0897] 随后可以通过刮取(粘着形式)和/或团化(悬浮形式和刮取的粘着形式)收集细胞并且转移至容器中。必要时可以重复收集步骤以完全收集所生产的细胞。下一步,可以通过连续冻融循环(-80C至37C)、化学溶解(诸如添加清洁剂曲通(triton))、机械溶解或通过使细胞培养物在达到约0%存活力的后降解来达成细胞溶解。通过离心和/或深度过滤去除细胞碎片。通过DNA qPCR进行DNA酶抗性基因组滴定来定量样品的AAV粒子。

[0898] 根据基因组拷贝数(每毫升基因组粒子)测量AAV粒子滴度。基因组粒子浓度是基于载体DNA的DNA qPCR,如先前所报导(Clark等(1999)Hum.Gene Ther.,10:1031-1039; Veldwijk等(2002)Mol.Ther.,6:272-278,所述文献与粒子浓度的测量相关的内容各自以全文引用的方式并入)。

[0899] 昆虫细胞

[0900] 本公开的病毒生产包括生产AAV粒子或病毒载体的过程和方法,所述AAV粒子或病毒载体接触靶细胞以递送有效载荷构建体,例如重组病毒构建体,其包括编码有效载荷分子的核苷酸。在某些实施方案中,本公开的AAV粒子或病毒载体可以在包括昆虫细胞的病毒生产细胞中生产。

[0901] 培养中的昆虫细胞的生长条件和培养中的昆虫细胞中的异源产物的生产在本领域中是众所周知的,参见美国专利号6,204,059,所述专利与病毒生产中昆虫细胞的生长和使用相关的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0902] 根据本公开,可以使用允许细小病毒复制并且可以维持于培养中的任何昆虫细胞。通常用于生产重组AAV粒子的AAV病毒生产细胞包括但不限于草地夜蛾,包括但不限于Sf9或Sf21细胞系、果蝇细胞系或蚊类细胞系,诸如源自白纹伊蚊(Aedes albopictus)的细胞系。昆虫细胞用于表达异源蛋白质的用途已有充分记载,将核酸,诸如载体,例如昆虫细胞相容载体引入此类细胞中的方法和在培养中维持此类细胞的方法也是如此。参见例如Methods in Molecular Biology,Richard编,Humana Press,NJ(1995);O'Reilly等,Baculovirus Expression Vectors,A Laboratory Manual,Oxford Univ Press(1994);Samulski等,J.Vir.63:3822-8(1989);Kajigaya等,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 88:4646-50(1991);Ruffing等,J.Vir.66:6922-30(1992);Kimbauer等,Vir.219:37-44(1996);Zhao等,Vir.272:382-93(2000);以及Samulski等,美国专利号6,204,059,每篇文献与病毒生产中昆虫细胞的使用相关的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0903] 在一些实施方案中,使用W02015/191508中所描述的方法制造AAV粒子,在不与本公开冲突的情况下所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0904] 在某些实施方案中,可以使用昆虫宿主细胞系统与杆状病毒系统的组合(例如,由Luckow等,Bio/Technology 6:47(1988)所描述)。在某些实施方案中,用于制备嵌合肽的表

达系统是粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*) Tn 5B1-4昆虫细胞/杆状病毒系统,所述系统可以用于高水平的蛋白质,如美国专利号6660521中所描述,所述专利与病毒粒子的生产相关的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0905] 昆虫细胞的扩展、培养、转染、感染和储存可以在本领域中已知的任何细胞培养基、细胞转染培养基或储存培养基中进行,包括Hyclone™ SFX-Insect™细胞培养基、表达系统ESF AF™昆虫细胞培养基、ThermoFisher Sf-900II™培养基、ThermoFisher Sf-900III™培养基或ThermoFisher Grace's昆虫培养基。本公开的昆虫细胞混合物还可以包括本公开中所描述的配制添加剂或成分中的任一者,包括(但不限于)盐、酸、碱、缓冲剂、表面活性剂(诸如泊洛沙姆188/普朗尼克F-68(Poloxamer 188/Pluronic F-68))和其它已知的培养基成分。配制添加剂可以逐步并入或作为“外加物”并入(短时间内大量并入)。

[0906] 杆状病毒生产系统

[0907] 在某些实施方案中,本公开的过程可以包括使用病毒表达构建体和有效载荷构建体载体在杆状病毒系统中生产AAV粒子或病毒载体。在某些实施方案中,杆状病毒系统包括杆状病毒表达载体(BEV)和/或杆状病毒感染的昆虫细胞(BIIC)。在某些实施方案中,本公开的病毒表达构建体或有效载荷构建体可以是杆粒,也称为杆状病毒质粒或重组杆状病毒基因组。在某些实施方案中,本公开的病毒表达构建体或有效载荷构建体可以通过本领域技术人员已知和实施的标准分子生物学技术同源重组(转座子供体/受体系统)至杆粒中所并入的多核苷酸。单独病毒复制细胞群体的转染生产两组或更多组(例如,两组、三组)杆状病毒(BEV)、可以包括病毒表达构建体(表达BEV)的一组或多组以及可以包括有效载荷构建体(有效载荷BEV)的一组或多组。杆状病毒可以用于感染病毒生产细胞以生产AAV粒子或病毒载体。

[0908] 在某些实施方案中,所述过程包括转染单个病毒复制细胞群体以生产单个杆状病毒(BEV)组,所述组包括病毒表达构建体和有效载荷构建体。杆状病毒可以用于感染病毒生产细胞以生产AAV粒子或病毒载体。

[0909] 在某些实施方案中,使用杆粒转染剂,诸如Promega**FuGENE®**HD、WFI水或ThermoFisher**Cellfectin®**II试剂生产BEV。在某些实施方案中,在病毒生产细胞,诸如昆虫细胞中生产和扩展BEV。

[0910] 在某些实施方案中,所述方法利用包括一个或多个BEV的病毒生产细胞,包括杆状病毒感染的昆虫细胞(BIIC)的种子培养物。已用包括病毒表达构建体的表达BEV以及包括有效载荷构建体的有效载荷BEV转染/转导/感染种子BIIC。在某些实施方案中,收集种子培养物,分成等分试样并冷冻,并且可以在稍后的时间使用以引发生产细胞的初始群体的转染/转导/感染。在某些实施方案中,将种子BIIC库储存于-80℃下或LN2蒸气中。

[0911] 杆状病毒由对杆状病毒的功能和复制必不可少的若干必需蛋白质,诸如复制蛋白、套膜蛋白和衣壳蛋白组成。因此,杆状病毒基因组包括编码必需蛋白质的若干必需基因核苷酸序列。作为一个非限制性实例,基因组可以包括必需基因区,其包括编码杆状病毒构建体的必需蛋白质的必需基因核苷酸序列。必需蛋白质可以包括:GP64杆状病毒套膜蛋白、VP39杆状病毒衣壳蛋白或杆状病毒构建体的其它类似必需蛋白质。

[0912] 用于在昆虫细胞,包括但不限于草地夜蛾(Sf9)细胞中生产AAV粒子的杆状病毒表达载体(BEV)提供高滴度的病毒载体产物。编码病毒表达构建体和有效载荷构建体的重组

杆状病毒启动病毒载体复制细胞的生产性感染。从初次感染释放的感染性杆状病毒粒子会继续感染培养物中的额外细胞,在随初始感染复数而变的许多感染周期中以指数方式感染整个细胞培养群体,参见Urabe,M.等J Viro1.2006年2月;80(4):1874-85,所述文献与BEV和病毒粒子的生产和使用相关的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0913] 在昆虫细胞系统中用杆状病毒生产AAV粒子可以解决已知的杆状病毒遗传和物理不稳定性。

[0914] 在某些实施方案中,本公开的生产系统通过利用无滴度感染细胞保存和按比例放大系统来解决在多次传代中杆状病毒的不稳定性。用编码AAV粒子的结构性和/或非结构组分的病毒表达构建体转染病毒生产细胞的小规模种子培养物。将杆状病毒感染的病毒生产细胞收集成等分试样,可以在液氮中冷冻保存;等分试样保留感染大规模病毒生产细胞培养物的存活力和感染力。Wasilko DJ等Protein Expr Purif.2009年6月;65(2):122-32,所述文献与BEV和病毒粒子的生产和使用相关的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0915] 遗传稳定的杆状病毒可以用于生产一种或多种组分的来源,以在无脊椎动物细胞中生产AAV粒子。在某些实施方案中,缺陷型杆状病毒表达载体可以在昆虫细胞中以游离基因方式维持。在此类实施方案中,相应杆粒载体经工程改造以具有复制控制元件,包括但不限于启动子、增强子和/或细胞周期调控的复制元件。

[0916] 在某些实施方案中,允许杆状病毒感染的稳定病毒生产细胞经工程改造以具有AAV复制和载体生产所必需的任何组件的至少一个稳定整合拷贝,包括但不限于整个AAV基因组、Rep和Cap基因、Rep基因、Cap基因、作为单独转录盒的每个Rep蛋白、作为单独转录盒的每个VP蛋白、AAP(组装激活蛋白),或具有原生或非原生启动子的杆状病毒辅助基因中的至少一者。

[0917] 在一些实施方案中,可以在昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中生产本公开的AAV粒子。

[0918] 在一些实施方案中,可以使用三重转染生产本公开的AAV粒子。

[0919] 在一些实施方案中,可以在哺乳动物细胞中生产本公开的AAV粒子。

[0920] 在一些实施方案中,可以通过在哺乳动物细胞中进行三重转染来生产本公开的AAV粒子。

[0921] 在一些实施方案中,可以通过在HEK293细胞中进行三重转染来生产本公开的AAV粒子。

[0922] 编码本文所描述的GCase蛋白的AAV病毒基因组可用于人类疾病、兽医应用以及多种体内和体外背景的领域中。本公开的AAV粒子可用于治疗、预防、缓解或改善神经或神经肌肉疾病和/或病症的医学领域中。在一些实施方案中,本公开的AAV粒子用于预防和/或治疗GBA相关病症。

[0923] 本文公开内容的各种实施方案提供了包含本文所描述的AAV粒子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0924] 本文公开内容的各种实施方案提供了一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所描述的药物组合物。

[0925] 所述方法的某些实施方案提供了通过选自由以下组成的组的药物组合物的施用来治疗受试者:静脉内、脑室内、实质内、鞘内、软膜下和肌肉内,或它们的组合。所述方法的某些实施方案提供了治疗受试者的GBA相关病症和/或由GBA基因产物的量或功能缺陷

引起的其它神经病症。在所述方法的一个方面,缓解GBA相关病症或其它神经病症的病理特征,和/或阻止、减缓、改善或逆转GBA相关病症或其它神经病症的进展。

[0926] 本文公开内容的各种实施方案描述了一种提高有需要的受试者的中枢神经系统中的GCase蛋白水平的方法,所述方法包括经由输注向所述受试者施用有效量的本文所描述的药物组合物。

[0927] 本文还描述了用于AAV粒子的设计、制备、制造和/或配制的组合物、方法、过程、试剂盒和装置。在一些实施方案中,有效载荷,诸如但不限于包含GCase蛋白的有效载荷,可以由有效载荷构建体编码或包含于质粒或载体或重组腺相关病毒(AAV)内。

[0928] 本公开还提供了用于治疗或改善GBA相关病症的载体和病毒粒子(例如,AAV粒子)的施用和/或递送方法。此类方法可以涉及基因置换或基因激活。此类结果通过利用本文教示的方法和组合物来达成。

[0929] III. 药物组合物

[0930] 另外,本公开提供了一种用于治疗哺乳动物受试者(包括人类受试者)的GBA相关病症以及与GCase蛋白的功能或表达缺陷相关的病症的方法,所述方法包括向受试者施用本文所描述的AAV多核苷酸或AAV基因组(即,“载体基因组”、“病毒基因组”或“VG”)中的任一者,或向受试者施用包含所述AAV多核苷酸或AAV基因组的粒子,或向受试者施用所描述的组合物(包括药物组合物)中的任一者。

[0931] 如本文所用,术语“组合物”包含AAV多核苷酸或AAV基因组或AAV粒子和至少一种赋形剂。

[0932] 如本文所用,术语“药物组合物”包含AAV多核苷酸或AAV基因组或AAV粒子以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0933] 尽管本文所提供的药物组合物(例如,包含编码待递送的GCase蛋白的有效载荷的AAV)的描述主要针对适合于向人类施用的药物组合物,但技术人员将了解,此类组合物一般适合于向任何其它动物,例如向非人类动物,例如非人类哺乳动物施用。充分了解对适合于向人类施用的药物组合物进行修饰以促使所述组合物适合于向各种动物施用,并且一般熟练的兽医药理学家可以仅使用一般(如果有的话)实验来设计和/或执行此种修饰。预期药物组合物所施用的受试者包括但不限于人类和/或其它灵长类动物;哺乳动物,包括商业相关的哺乳动物,诸如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠;和/或鸟类,包括商业相关的鸟类,诸如家禽、鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0934] 在一些实施方案中,向人类、人类患者或受试者施用组合物。

[0935] 在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子配方可以含有编码至少一个有效载荷的核酸。在一些实施方案中,配方可以含有编码1、2、3、4或5个有效载荷的核酸。在一些实施方案中,配方可以含有编码有效载荷构建体的核酸,所述有效载荷构建体编码选自诸如但不限于以下类别的蛋白质:人类蛋白、兽医学蛋白、细菌蛋白、生物蛋白、抗体、免疫原性蛋白、治疗性肽和蛋白、分泌蛋白、质膜蛋白、细胞质蛋白、细胞主链蛋白、细胞内膜结合蛋白、核蛋白、与人类疾病相关的蛋白和/或与非人类疾病相关的蛋白。在一些实施方案中,配方含有至少三个编码蛋白质的有效载荷构建体。某些实施方案提供了有效载荷中的至少一者是GCase蛋白或其变体。

[0936] 可以成批、作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量来制备、包装和/或出

售根据本公开的药物组合物。如本文所用,“单位剂量”是指包含预定量的活性成分的离散量的药物组合物。活性成分的量一般等于将向受试者施用的活性成分的剂量和/或此种剂量的适宜部分,例如,此种剂量的二分之一或三分之一。

[0937] IV. 配方

[0938] 可以通过药理学领域中已知或此后开发的任何方法来制备本文所描述的AAV药物组合物的配方。一般来说,此类制备方法包括使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其它辅助成分结合,然后必要时和/或需要时将产物分割、定形和/或包装成所需单剂量或多剂量单位的步骤。

[0939] 根据本公开的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何额外成分的相对量将取决于所治疗受试者的身份、体型和/或状况并且进一步取决于将施用组合物的途径而变化。

[0940] 举例来说,组合物可以包含0.1%与99% (w/w) 之间的活性成分。举例来说,组合物可以包含0.1%与100%之间,例如0.5%与50%之间、1-30%之间、5-80%之间或至少80% (w/w) 的活性成分。

[0941] 本公开的AAV粒子可以使用一种或多种赋形剂配制以:(1) 增加稳定性;(2) 增加细胞转染或转导;(3) 允许持续或延迟释放;(4) 改变生物分布(例如,将病毒粒子靶向特定组织或细胞类型);(5) 增加体内经编码蛋白的翻译;(6) 改变体内经编码蛋白的释放型态;和/或(7) 允许有效载荷的可调控表达。

[0942] 本公开的配方可以包括但不限于盐水、类脂质、脂质体、脂质纳米粒子、聚合物、脂质复合物(lipoplex)、核-壳纳米粒子、肽、蛋白质、经病毒载体转染的细胞(例如,用于移植至受试者中)、纳米粒子模拟物和它们的组合。此外,本公开的病毒载体可以使用自组装的核酸纳米粒子来配制。

[0943] 在一些实施方案中,可以配制编码GCa6蛋白的病毒载体以优化比重(baricity)和/或渗透度。在一些实施方案中,可以优化配方的比重和/或渗透度以确保药物在中枢神经系统或中枢神经系统的区域或组成部分中的分布最佳。

[0944] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在PBS中与pH约7.0的0.001% 普朗尼克酸(pluronic acid) (F-68) 一起配制。

[0945] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在PBS中与氧化乙烯/氧化丙烯共聚物(也称为普朗尼克或泊洛沙姆) 组合配制。

[0946] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在PBS中与pH约7.0的0.001% 普朗尼克酸(F-68) (泊洛沙姆188) 一起配制。

[0947] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在PBS中与pH约7.3的0.001% 普朗尼克酸(F-68) (泊洛沙姆188) 一起配制。

[0948] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在PBS中与pH约7.4的0.001% 普朗尼克酸(F-68) (泊洛沙姆188) 一起配制。

[0949] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在包含氯化钠、磷酸钠和氧化乙烯/氧化丙烯共聚物的溶液中配制。

[0950] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在包含氯化钠、磷酸氢二钠、氯化钾、磷酸二氢钾和泊洛沙姆188/普朗尼克酸(F-68) 的溶液中配制。

[0951] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在包含192mM氯化钠、10mM磷酸钠(磷酸氢二钠)、2.7mM氯化钾、2mM磷酸钾(磷酸二氢钾)和0.001%普朗尼克F-68(v/v)的溶液(pH 7.4)中配制。这种配方在本公开中称为配方1。

[0952] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在包含约192mM氯化钠、约10mM磷酸氢二钠和约0.001%泊洛沙姆188的溶液(pH约7.3)中配制。最终溶液中氯化钠的浓度可以为150mM-200mM。作为非限制性实例,最终溶液中氯化钠的浓度可以为150mM、160mM、170mM、180mM、190mM或200mM。最终溶液中磷酸氢二钠的浓度可以为1mM-50mM。作为非限制性实例,最终溶液中磷酸氢二钠的浓度可以为1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、40mM或50mM。泊洛沙姆188(普朗尼克酸(F-68))的浓度可以为0.0001%-1%。作为非限制性实例,泊洛沙姆188(普朗尼克酸(F-68))的浓度可以为0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%或1%。最终溶液可以具有6.8-7.7的pH。最终溶液的pH的非限制性实例包括6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6或7.7的pH。

[0953] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以在包含约1.05%氯化钠、约0.212%磷酸氢二钠七水合物、约0.025%磷酸二氢钠单水合物和0.001%泊洛沙姆188的溶液(pH约7.4)中配制。作为一个非限制性实例,这种配制溶液中AAV粒子的浓度可以为约0.001%。最终溶液中氯化钠的浓度可以为0.1-2.0%,非限制性实例为0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、0.95%、0.96%、0.97%、0.98%、0.99%、1.00%、1.01%、1.02%、1.03%、1.04%、1.05%、1.06%、1.07%、1.08%、1.09%、1.10%、1.25%、1.5%、1.75%或2%。最终溶液中磷酸氢二钠的浓度可以为0.100-0.300%,非限制性实例包括0.100%、0.125%、0.150%、0.175%、0.200%、0.210%、0.211%、0.212%、0.213%、0.214%、0.215%、0.225%、0.250%、0.275%、0.300%。最终溶液中磷酸二氢钠的浓度可以为0.010-0.050%,非限制性实例为0.010%、0.015%、0.020%、0.021%、0.022%、0.023%、0.024%、0.025%、0.026%、0.027%、0.028%、0.029%、0.030%、0.035%、0.040%、0.045%或0.050%。泊洛沙姆188(普朗尼克酸(F-68))的浓度可以为0.0001%-1%。作为非限制性实例,泊洛沙姆188(普朗尼克酸(F-68))的浓度可以为0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%或1%。最终溶液可以具有6.8-7.7的pH。最终溶液的pH的非限制性实例包括6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6或7.7的pH。

[0954] 赋形剂

[0955] 本公开的配方可以包括一种或多种赋形剂,每种赋形剂的量共同增加AAV粒子的稳定性,增加病毒粒子对细胞的转染或转导,增加病毒粒子编码的蛋白质的表达,和/或改变AAV粒子编码的蛋白质的释放型态。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂可以为至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯的。在一些实施方案中,赋形剂经批准用于人类和兽医用途。在一些实施方案中,赋形剂可以由美国食品与药物管理局批准。在一些实施方案中,赋形剂可以是医药级。在一些实施方案中,赋形剂可以满足美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0956] 如本文所用的赋形剂包括但不限于任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体媒剂、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂等,其适合于所需特定剂型。用于配制药组合物物的各种赋形剂和用于制备所述组合物的技术在本领域中是

已知的(参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins, Baltimore, MD, 2006;其内容以全文引用的方式并入本文中)。预期常规赋形剂介质的使用可以在本公开的范围内,例外为任何常规赋形剂介质可能与物质或其衍生物不相容,诸如通过产生任何非所需的生物作用或在其它方面以有害方式与药物组合物的任何其它组分相互作用。

[0957] 非活性成分

[0958] 在一些实施方案中,AAV配方可以包含至少一种为非活性成分的赋形剂。如本文所用,术语“非活性成分”是指对包含于配方中的药物组合物的活性无贡献的一种或多种剂。在一些实施方案中,可以用于本公开的配方中的所有、无一或一些非活性成分可以由美国食品与药物管理局(FDA)批准。

[0959] 本文所公开的AAV粒子的配方可以包括阳离子或阴离子。在一些实施方案中,配方包括金属阳离子,诸如但不限于 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{+} 或它们的组合。在一些实施方案中,配方可以包括与金属阳离子复合的聚合物或多核苷酸(参见例如美国专利号6,265,389和6,555,525,每篇专利的内容以全文引用的方式并入本文中)。

[0960] V.用途和应用

[0961] 本公开的组合物可以向受试者施用或用于制造用以向具有GCase蛋白的量或功能缺陷或患有与GCase蛋白表达降低相关的疾病或病症的受试者施用的药剂。在一些实施方案中,疾病是帕金森病(PD),例如具有GBA基因突变的PD。在某些实施方案中,可以向受试者施用包括GCase蛋白的AAV粒子以治疗帕金森病,例如与GBA基因突变相关的PD。在一些实施方案中,包含编码GCase蛋白的病毒基因组的AAV粒子的施用可以保护中枢神经系统路径免于退化。本文所描述的组合物和方法还可以用于治疗戈谢病(诸如1型或2型GD)和路易体痴呆,以及其它GBA相关病症。

[0962] 在一些实施方案中,如通过CNS细胞中的胆固醇积累所测量(如通过例如菲律宾菌素染色和定量所确定),AAV粒子的递送可以阻止或减缓GBA相关病症的进展。在某些实施方案中,AAV粒子的递送改善GBA相关病症的症状,包括例如GBA相关病症的认知、肌肉、身体和感觉症状。

[0963] 在一些实施方案中,本公开涵盖了医药、预防、诊断或成像组合物与可以改善其生物利用度,降低和/或改变其代谢,和/或改变其在体内的分布的试剂组合递送。

[0964] 在某些实施方案中,本文所描述的组合物用作研究工具,尤其在使用人类细胞系,诸如HEK293T的体外研究以及将在人类临床试验之前进行的非人类灵长类动物中的体内测试中。

[0965] CNS疾病

[0966] 本公开提供了一种治疗哺乳动物受试者(包括人类受试者)的疾病、病症和/或疾患的方法,所述方法包括向受试者施用任何病毒粒子,例如AAV、AAV粒子,或生产本文所描述的GCase蛋白的AAV基因组(即,病毒基因组或“VG”),或向受试者施用包含所述AAV粒子或AAV基因组的粒子,或向受试者施用所描述的组合物(包括药物组合物)中的任一者。

[0967] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子通过递送作为包含GCase蛋白或其变体的治疗产物的功能有效载荷可以调节CNS中基因产物的水平或功能。

[0968] 功能有效载荷可以减轻或减少有需要的受试者中由基因产物的异常水平和/或功

能(例如,蛋白质的缺乏或缺陷)引起的症状或以其它方式赋予有需要的受试者的CNS病症以益处。

[0969] 作为非限制性实例,由本公开的AAV粒子递送的伴侣或组合治疗产物可以包括但不限于生长和营养因子、细胞因子、激素、神经递质、酶、抗凋亡因子、血管生成因子、GCase蛋白质,以及已知在病理病症(诸如GBA相关病症)中发生突变的任何蛋白质。

[0970] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以用于治疗与CNS生长和发育障碍相关的疾病,即,神经发育病症。在一些方面,此类神经发育病症可能由基因突变引起。

[0971] 在一些实施方案中,神经病症可以是具有在CNS中具有神经起源的运动和/或感觉症状的功能性神经病症。作为非限制性实例,功能性神经病症可以是慢性疼痛、癫痫发作、言语问题、不自主运动或睡眠障碍。

[0972] 在一些实施方案中,神经或神经肌肉疾病、病症和/或疾患是GBA相关病症。在一些实施方案中,使用已知的分析方法和GBA相关病症的比较组,AAV粒子的递送可以使GBA相关病症的疾病进展阻止或减缓10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或超过95%。作为一个非限制性实例,如通过CNS细胞中的胆固醇积累所测量(如通过例如菲律宾菌素染色和定量所确定),AAV粒子的递送可以阻止或减缓GBA相关病症的进展。

[0973] 在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子使组织中GCase蛋白的量增加1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或超过100%。在一些实施方案中,编码有效载荷的AAV粒子可以增加组织中GCase蛋白的量以与健康受试者的相应组织中GCase蛋白的量相当(例如,大约相同)。在一些实施方案中,编码有效载荷的AAV粒子可以增加组织中GCase蛋白的量,以有效减少与GCase蛋白表达降低或GCase蛋白的量和/或功能缺陷相关的疾病的一种或多种症状。

[0974] 在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子和AAV载体基因组在向受试者施用或引入靶细胞后,使GBA活性比基线GBA活性增加2-3倍。在具有GBA活性缺陷的受试者或靶细胞的情况下,如在患有GBA相关病症的受试者或带有GBA基因突变的细胞或组织的情况下,本文所描述的AAV粒子和AAV载体基因组使GBA活性恢复至正常水平,如由未罹患GBA相关病症或未带有GBA基因突变的受试者、组织和细胞中的GBA活性水平所定义。在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子和AAV载体基因组有效降低患有GBA相关病症的受试者或带有GBA基因突变的细胞或组织中的 α -突触核蛋白水平。在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子和AAV载体基因组有效防止 α -突触核蛋白介导的病理。

[0975] 治疗应用

[0976] 另外,本公开提供了治疗哺乳动物受试者(包括人类受试者)的非感染性疾病和/或病症的方法,所述方法包括向受试者施用本文所描述的AAV粒子或药物组合物中的任一者。在一些实施方案中,根据本文所描述的方法治疗的非感染性疾病和/或病症包括但不限于帕金森氏病(PD)(例如,与GBA基因突变相关的PD)、路易体痴呆(DLB)、多系统萎缩症(MSA)、肌肉量减少、脊髓性肌萎缩症(SMA)、阿兹海默氏病(Alzheimer's disease, AD)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、亨廷顿氏病(Huntington's Disease, HD)、多发性硬化症(MS)、中风、偏头痛、疼痛、神经病、精神病症(包括精神分裂症、双相障碍和自闭症)、癌症、眼部疾

病、血液、心脏和骨骼的全身性疾病、免疫系统和自体免疫性疾病以及炎性疾病。

[0977] 本公开提供了一种用于向有需要的受试者(包括人类受试者)施用治疗有效量的本发明的AAV粒子以减缓、停止或逆转疾病进展的方法。作为一个非限制性实例,可以通过本领域技术人员已知的测试或诊断工具来测量疾病进展。作为另一个非限制性实例,可以通过受试者的脑、CSF或其它组织的病理特征的变化来测量疾病进展。

[0978] 戈谢病

[0979] 纯合或复合杂合GBA突变导致戈谢病(“GD”)。参见Sardi, S. Pablo, Jesse M. Cedarbaum和Patrik Brundin. *Movement Disorders* 33.5(2018): 684-696, 其内容以全文引用的方式并入。戈谢病是最普遍的溶酶体储积症之一, 据估计在一般人群中的标准化出生发病率为0.4至5.8个人/100,000人。杂合GBA突变可以导致PD。实际上, GBA突变在7-10%的总PD患者中发生, 使得GBA突变成为最重要的PD遗传风险因素。PD-GBA患者的溶酶体酶 β -葡萄糖脑苷脂酶(GCase)水平降低, 导致糖鞘脂葡萄糖神经酰胺(GluCer)的积累增加, 进而与 α -突触核蛋白聚集加剧和伴随的神经症状相关联。在一些情况下, 戈谢病和PD, 以及其它溶酶体储积症, 包括路易体病(诸如路易体痴呆)和相关疾病在GBA基因中共享共同的病因。参见Sidransky, E.和Lopez, G. *Lancet Neurol.* 2012年11月; 11(11): 986-998, 其内容以全文引用的方式并入。

[0980] 戈谢病可以表现为GD1 (1型GD), 其为德系犹太人群中最常见的戈谢病类型。在一些实施方案中, 1型GD是非神经病性GD(例如, 不影响CNS, 例如影响CNS外的细胞和组织, 例如外周细胞或组织, 例如心脏组织、肝组织、脾组织或它们的组合)。德系犹太人群中的携带者频率为12名受试者中约1名。GD2 (2型GD) 的特征为急性神经病性GD(例如, 影响CNS, 例如脑、脊髓或两者的细胞和组织), 并且估计的发病率为150,000名活产儿中有1名。GD2是早发型疾病, 通常在1岁左右出现。内脏受累范围广泛并且严重, 具有CNS疾病的众多属性, 包括眼球运动功能障碍, 以及延髓性瘫痪和全身无力, 以及进行性发育迟缓。GD2进展至严重张力亢进、强直、角弓反张、吞咽困难和癫痫发作, 通常导致2岁前死亡。GD3 (3型GD) 的特征为亚急性神经病性GD, 并且估计的发病率为200,000名活产儿中有1名。GD3通常表现为明显神经系统体征, 包括特征性面具样脸、斜视、核上性凝视麻痹和核上性凝视麻痹。GD2和GD3各自进一步表征为与进行性脑病、发育迟缓、认知障碍、进行性痴呆、共济失调、肌阵挛和各种凝视麻痹相关。另一方面, GD1可以具有可变病因, 伴有内脏肿大、骨髓与骨骼和肺部病变、出血素质和发育迟缓。GD进一步与血液恶性病的发病率增加相关。

[0981] 葡萄糖脑苷脂酶(GCase)缺陷是GD的潜在机制。低GCase活性导致葡萄糖脑苷脂和其它糖脂在巨噬细胞的溶酶体内积累。与对照细胞或无GCase缺陷的受试者相比, 积累可以总计达到高出约20倍至约100倍。巨噬细胞中的病理性脂质积累占<2%的在GD患者的肝和脾中观察到的额外组织质量。器官重量和体积的额外增加归因于炎性和增生细胞反应。

[0982] 对GD的当前治疗包括施用重组酶、伊米苷酶、他利苷酶 α 和维拉苷酶 α 。然而, 这些静脉内酶疗法不跨过血脑屏障(BBB), 并且不适合于治疗伴有帕金森氏病的GD或其它神经病形式的GD。

[0983] 帕金森氏病

[0984] 帕金森氏病(PD)是进行性神经系统疾病, 尤其影响脑黑质。PD由于产生多巴胺的脑细胞损失的结果而发展。PD的典型早期症状包括肢体摇晃或颤抖, 例如, 手、臂、腿、脚和

脸。额外特征性症状是四肢和躯干僵硬、运动缓慢或无法运动、平衡和协调受损、认知变化和精神疾患,例如,抑郁症和幻视。PD具有家族性和特发性两种形式,并且表明与遗传和环境原因有关。PD影响全球超过400万人。在美国,每年鉴定约60,000例病例。一般来说,PD始于50岁或以上。所述疾患的早发形式始于50岁以下,并且幼发型PD始于20岁之前。

[0985] 与PD相关的产生多巴胺的脑细胞的死亡与 α -突触核蛋白的聚集、沉积和功能障碍相关(参见例如Marques和Outeiro,2012,Cell Death Dis.3:e350,Jenner,1989,J Neurol Neurosurg Psychiatry.特别增刊,22-28,以及其中的参考文献)。研究已表明 α -突触核蛋白在突触前信号传导、膜运输和多巴胺释放与转运的调控中起作用。已表明 α -突触核蛋白聚集体,例如寡聚体形式是导致神经元功能障碍和死亡的种类。已在家族形式的PD中鉴定出 α -突触核蛋白基因(SNCA)的突变,但环境因素(例如,神经毒素)也影响 α -突触核蛋白聚集。PD中脑细胞死亡的其它所提议的原因是蛋白酶体和溶酶体系统功能障碍,线粒体活性降低。

[0986] PD与涉及 α -突触核蛋白聚集的其它疾病有关,称为“突触核蛋白病”。此类疾病包括但不限于帕金森氏病痴呆(PDD)、多系统萎缩症(MSA)、路易体痴呆、幼发型全身性神经轴索营养不良(哈勒沃登-施帕茨病(Hallervorden-Spatz disease))、纯自主神经功能衰竭(PAF)、具有脑铁积累1型(NBIA-1)的神经退化和联合阿兹海默氏病与帕金森氏病。

[0987] 迄今为止,尚未鉴定出PD的治愈或预防疗法。多种可用的药物疗法提供症状缓解。对症医学治疗的非限制性实例包括减少僵硬和缓慢运动的卡比多巴与左旋多巴组合,以及减少颤抖和僵硬的抗胆碱剂。其它任选的疗法包括例如深部脑刺激和手术。仍然需要影响潜在病理生理学的疗法。举例来说,靶向 α -突触核蛋白或其它与PD脑细胞死亡相关的蛋白质的抗体可以用于预防和/或治疗PD。

[0988] 在一些实施方案中,本发明的方法可以用于治疗罹患PD(例如,与GBA基因突变相关的PD)和其它突触核蛋白病的受试者。在一些情况下,本发明的方法可以用于治疗疑似发展PD(例如,与GBA基因突变相关的PD)和其它突触核蛋白病的受试者。

[0989] 本文所描述的AAV粒子和使用AAV粒子的方法可以用于预防、管理和/或治疗PD,例如,与GBA基因突变相关的PD。

[0990] 约5%的PD患者携带GBA突变;10%的1型GD患者在80岁之前发展PD,与正常人群中的约3-4%成对比。另外,已显示杂合或纯合GBA突变使PD风险增加20-30倍。

[0991] 路易体痴呆

[0992] 路易体痴呆(DLB),也称为弥漫性路易体病,是一种形式的进行性痴呆,其特征为认知衰退、警觉性和注意力波动、幻视和帕金森运动症状。DLB可以通过常染色体显性模式遗传。DLB在美国影响超过100万人。所述疾患通常在50岁或以上显示出症状。

[0993] DLB由路易体(α -突触核蛋白的聚集体)在控制记忆和运动控制的脑区域的神经元细胞质中异常堆积而引起。这些聚集体的病理生理学与帕金森病中观察到的聚集体极为类似,并且DLB也与阿兹海默氏病具有类似之处。遗传性DLB与GBA中的基因突变相关。

[0994] 迄今为止,不存在DLB的治愈或预防疗法。多种可用的药物疗法旨在管理所述疾患的认知、精神和运动控制症状。对症医学治疗的非限制性实例包括例如乙酰胆碱酯酶抑制剂以减少认知症状,以及左旋多巴以减少僵硬和运动丧失。仍然需要影响潜在病理生理学的疗法。

[0995] 在一些实施方案中,本公开的方法可以用于治疗罹患DLB(例如,与GBA基因突变相关的DLB)的受试者。在一些情况下,所述方法可以用于治疗疑似发展DLB(例如,与GBA基因突变相关的DLB)的受试者。

[0996] 本发明所描述的AAV粒子和使用AAV粒子的方法可以用于预防、管理和/或治疗DLB(例如,与GBA基因突变相关的DLB)。

[0997] VI. 给药和施用

[0998] 施用

[0999] 在一些方面,本公开提供了编码GCase蛋白或其变体的载体和病毒粒子,例如AAV粒子的施用和/或递送方法,用于预防、治疗或改善CNS的疾病或病症。举例来说,AAV粒子的施用预防、治疗或改善GBA相关病症。因此,需要在整个CNS和外周中稳固而广泛的GCase蛋白分布,以实现最大功效。用于施用或递送的特定靶组织包括CNS组织、脑组织,并且更具体地,尾壳核、丘脑、上丘、皮质和胼胝体。特定实施方案提供了将本文所描述的AAV粒子和AAV载体基因组施用和/或递送至尾壳核和/或黑质。其它特定实施方案提供了将本文所描述的AAV粒子和AAV载体基因组施用/递送至丘脑。

[1000] 本公开的AAV粒子可以通过促成治疗有效结果的任何途径施用。这些途径包括但不限于经肠(进入肠道)、胃肠道、硬膜外(进入硬脑膜)、经口(经口腔)、经皮、硬膜外、脑内(进入大脑)、脑室内(进入脑室)、颅内(进入颅骨)、经皮(施用于皮肤上)、皮内(进入皮肤本身)、皮下(在皮肤之下)、鼻内施用(经鼻)、静脉内(进入静脉)、静脉推注、静脉滴注、动脉内(进入动脉)、肌肉内(进入肌肉)、心内(进入心脏)、骨内输注(进入骨髓)、实质内(进入物质)、鞘内(进入椎管)、腹膜内(输注或注射至腹膜)、膀胱内输注、玻璃体内(经眼)、海绵体内注射(进入病理腔)、腔内(进入阴茎根部)、阴道内施用、宫内、羊膜外施用、透皮(经完整皮肤扩散以供全身分布)、经粘膜(经粘膜扩散)、经阴道、吹入(鼻吸)、舌下、唇下、灌肠、滴眼液(至结膜上)、滴耳液、耳部(在耳内或经耳)、经颊(朝向脸颊)、结膜、皮肤、牙(针对一颗或多颗牙齿)、电渗、颈管内、鼻窦内、气管内、体外、血液透析、浸润、间质、腹内、羊膜内、关节内、胆管内、支气管内、滑囊内、软骨内(在软骨内)、尾内(马尾内)、脑池内(大池内)、角膜内(在角膜内)、牙冠内、冠状动脉内(在冠状动脉内)、海绵体内(在阴茎海绵体的可扩张空间内)、椎间盘内(在椎间盘内)、导管内(在腺管内)、十二指肠内(在十二指肠内)、硬膜内(在硬膜内或硬膜下)、表皮内(至表皮)、食管内(至食管)、胃内(在胃内)、龈内(在牙龈内)、回肠内(在小肠远程)、病灶内(在局部病灶内或直接引入局部病灶)、管腔内(在管腔内)、淋巴管内(在淋巴内)、髓内(在骨髓腔内)、脑膜内(在脑膜内)、眼内(在眼内)、卵巢内(在卵巢内)、心包内(在心包内)、胸膜内(在胸膜内)、前列腺内(在前列腺内)、肺内(在肺或其支气管内)、鼻内(在鼻窦或眶周窦内)、脊柱内(在脊柱内)、滑膜内(在关节的滑膜腔内)、腱内(在肌腱内)、睾丸内(在睾丸内)、鞘内(在脑脊髓轴的任何水平的脑脊液内)、胸腔内(在胸腔内)、管内(在器官的小管内)、瘤内(在肿瘤内)、鼓室内(在中耳内)、血管内(在一个或多个血管内)、心室内(在心室内)、离子电渗疗法(借助于电流,其中可溶性盐离子迁移至身体组织中)、冲洗(沐浴或冲洗开放的创口或体腔)、喉部(直接在喉上)、鼻胃(经鼻并进入胃)、闭塞敷料技术(局部途径施用,然后用封闭所述区域的敷料覆盖)、眼部(至外眼)、口咽(直接至口腔和咽部)、肠道外、经皮、关节周、硬膜周、神经周、牙周、直肠、呼吸道(在呼吸道内通过经口或经鼻吸入以达成局部或全身作用)、球后(脑桥后或眼桥后)、软组织、蛛网膜下、

结膜下、粘膜下、软膜下、局部、经胎盘(穿过或跨过胎盘)、经气管(经气管壁)、经鼓膜(跨过或穿过鼓室)、输尿管(至输尿管)、尿道(至尿道)、阴道、骶管阻滞、诊断、神经阻滞、胆道灌注、心脏灌注、光分离术或脊髓。

[1001] 在一些实施方案中,施用本公开的AAV粒子以递送至靶细胞或组织。递送至靶细胞促使GCase蛋白表达。靶细胞可以是认为需要增加GCase蛋白表达水平的任何细胞。靶细胞可以是CNS细胞。此类细胞和/或组织的非限制性实例包括背根神经节和背柱、本体感受性感觉神经元、克拉克柱、纤细和楔形核、小脑齿状核、皮质脊髓束和包含其的细胞、Betz细胞和心脏细胞。

[1002] 在一些实施方案中,组合物可以按允许其跨过血脑屏障、血管屏障或其它上皮屏障的方式施用。

[1003] 在一些实施方案中,由腺相关病毒(AAV)粒子将GCase蛋白递送至中枢神经系统(例如,实质)的细胞包括输注至脑脊液(CSF)中。CSF由包含位于脑室中的脉络丛的特化室管膜细胞产生。脑内产生的CSF循环并围绕中枢神经系统,包括脑和脊髓。CSF在中枢神经系统周围持续循环,包括脑室以及围绕脑和脊髓的蛛网膜下腔,同时维持生成和再吸收至血管系统中的稳态平衡。整个CSF体积约每天更换四至六次或约每四小时更换一次,但受试者的值可能有变化。

[1004] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过全身递送来递送。在一些实施方案中,全身递送可以通过血管内施用。在一些实施方案中,全身递送可以通过静脉内(IV)施用。

[1005] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过静脉内递送来递送。

[1006] 在一些实施方案中,经由聚焦式超声波(FUS)向受试者施用AAV粒子,例如,与微泡的静脉内施用联合(FUS-MB),或MRI引导的FUS联合静脉内施用,例如,Terstappen等(Nat Rev Drug Discovery, <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00139-y> (2021))、Burgess等(Expert Rev Neurother. 15(5):477-491 (2015))和/或Hsu等(PLOS One 8(2):1-8)所描述,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1007] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过注射至CSF路径中来递送。递送至CSF路径的非限制性实例包括鞘内和脑室内施用。

[1008] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过丘脑递送来递送。

[1009] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过脑内递送来递送。

[1010] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过心脏内递送来递送。

[1011] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过颅内递送来递送。

[1012] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过大池内(ICM)递送来递送。

[1013] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过直接(实质内)注射至器官(例如,CNS(脑或脊髓))中来递送。在一些实施方案中,实质内递送可以至脑或CNS的任何区域。

[1014] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过纹状体内注射来递送。

[1015] 在一些实施方案中,AAV粒子可以递送至壳核中。

[1016] 在一些实施方案中,AAV粒子可以递送至脊髓中。

[1017] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以向脑室施用。

[1018] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以通过脑室内递送向脑室施用。

[1019] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以通过肌肉内递送来施用。

[1020] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子通过上文所描述的一种以上途径来施用。作为一个非限制性实例,AAV粒子可以通过静脉内递送和丘脑递送来施用。

[1021] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子通过上文所描述的一种以上途径来施用。作为一个非限制性实例,AAV粒子可以通过静脉内递送和脑内递送来施用。

[1022] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子通过上文所描述的一种以上途径来施用。作为一个非限制性实例,AAV粒子可以通过静脉内递送和颅内递送来施用。

[1023] 在一些实施方案中,本公开的AAV粒子通过上文所描述的一种以上途径来施用。在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以通过鞘内和脑室内施用来递送。

[1024] 在一些实施方案中,可以将AAV粒子递送至受试者以改善和/或校正线粒体功能障碍。

[1025] 在一些实施方案中,可以将AAV粒子递送至受试者以保留神经元。神经元可能是初级和/或次级感觉神经元。在一些实施方案中,AAV粒子递送至背根神经节和/或其神经元。

[1026] 在一些实施方案中,AAV粒子的施用可以保留和/或校正感觉路径中的功能。

[1027] 在一些实施方案中,AAV粒子可以经由静脉内(IV)、脑室内(ICV)、脑实质内和/或鞘内(IT)输注来递送,并且治疗剂还可以经由肌肉内(IM)肢体输注递送至受试者以将治疗剂递送至骨骼肌。通过血管内肢体输注递送AAV由Gruntman和Flotte, Human Gene Therapy Clinical Development, 2015, 26(3), 159-164描述,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1028] 在一些实施方案中,将根据本公开的病毒载体药物组合物递送至中枢神经系统(例如,实质)的细胞包括由下式定义的递送速率: $VG/h = mL/h * VG/mL$,其中VG是病毒基因组,VG/mL是组合物浓度,并且mL/h是输注速度。

[1029] 在一些实施方案中,将根据本公开的AAV粒子药物组合物递送至中枢神经系统(例如,实质)的细胞包括至多1mL的输注。在一些实施方案中,将根据本公开的病毒载体药物组合物递送至中枢神经系统(例如,实质)的细胞可以包括0.0001、0.0002、0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.008、0.010、0.015、0.020、0.025、0.030、0.040、0.050、0.060、0.070、0.080、0.090、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9mL的输注。

[1030] 在一些实施方案中,将根据本公开的AAV粒子药物组合物递送至中枢神经系统(例如,实质)的细胞包括约1mL至约120mL之间的输注。在一些实施方案中,将根据本公开的病毒载体药物组合物递送至中枢神经系统(例如,实质)的细胞可以包括0.1、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119或120mL的输注。在一些实施方案中,将AAV粒子递送至中枢神经系统(例如,实质)的细胞包括至少3mL的输注。在一些实施方案中,将AAV粒子递送至中枢神经系统(例如,实质)的细胞由3mL的输注组成。在一些实施方案中,将AAV粒子递送至中枢神经系统(例如,实质)的细胞包括至少10mL的输注。在一些实施方案中,将AAV粒子递送至中枢神经系统(例如,实质)的细胞由10mL的输注组成。

[1031] 在一些实施方案中,递送至受试者的中枢神经系统(例如,实质)的细胞的AAV粒子药物组合物的体积为2 μ l、20 μ l、50 μ l、80 μ l、100 μ l、200 μ l、300 μ l、400 μ l、500 μ l、600 μ l、700 μ l、800 μ l、900 μ l、1000 μ l、1100 μ l、1200 μ l、1300 μ l、1400 μ l、1500 μ l、1600 μ l、1700 μ l、1800 μ l、1900 μ l、2000 μ l或超过2000 μ l。

[1032] 在一些实施方案中,递送至受试者脑的两个半球中的区域的AAV粒子药物组合物的体积为2 μ l、20 μ l、50 μ l、80 μ l、100 μ l、200 μ l、300 μ l、400 μ l、500 μ l、600 μ l、700 μ l、800 μ l、900 μ l、1000 μ l、1100 μ l、1200 μ l、1300 μ l、1400 μ l、1500 μ l、1600 μ l、1700 μ l、1800 μ l、1900 μ l、2000 μ l或超过2000 μ l。在一些实施方案中,递送至两个半球中的区域的体积为200 μ l。作为另一个非限制性实例,递送至两个半球中的区域的体积为900 μ l。作为又一个非限制性实例,递送至两个半球中的区域的体积为1800 μ l。

[1033] 在某些实施方案中,根据本公开的AAV粒子或病毒载体药物组合物可以按约10至约600 μ l/部位、约50至约500 μ l/部位、约100至约400 μ l/部位、约120至约300 μ l/部位、约140至约200 μ l/部位,或约160 μ l/部位来施用。

[1034] 在一些实施方案中,递送至受试者的总体积可以在一个或多个施用部位之间分配,例如,1、2、3、4、5个或超过5个部位。在一些实施方案中,总体积在向左半球与右半球施用之间分配。

[1035] AAV粒子的递送

[1036] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号8,999,948或国际公布号W02014178863中所描述的治疗疾病的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1037] 在一些实施方案中,可以使用如美国申请号20150126590中所描述的在阿兹海默氏病或其它神经退化疾患中递送基因疗法的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述申请的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1038] 在一些实施方案中,可以使用如美国专利号6,436,708和8,946,152以及国际公布号W02015168666中所描述的递送CNS基因疗法的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1039] 在一些实施方案中,可以使用欧洲专利申请号EP1857552中所描述的递送AAV病毒体的方法来施用或递送本公开的AAV粒子,所述申请的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1040] 在一些实施方案中,可以使用欧洲专利申请号EP2678433中所描述的使用AAV载体递送蛋白质的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述申请的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1041] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号US 5858351中所描述的使用AAV载体递送DNA分子的方法来施用或递送编码GCase蛋白的病毒载体,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1042] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号US 6,211,163中所描述的将DNA递送至血流的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1043] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号US 6325998中所描述的递送AAV病毒体的方法来施用或递送编码GCase蛋白的病毒载体,所述专利的内容以全文引用的方式并入

本文中。

[1044] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号US 6335011中所描述的将DNA递送至肌细胞的方法来施用或递送编码GCase蛋白的病毒载体,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1045] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号US 6610290中所描述的将DNA递送至肌细胞和组织的方法来施用或递送编码GCase蛋白的病毒载体,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1046] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号US 7704492中所描述的将DNA递送至肌细胞的方法来施用或递送编码GCase蛋白的病毒载体,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1047] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号US 7112321中所描述的将有效载荷递送至骨骼肌的方法来施用或递送编码GCase蛋白的病毒载体,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1048] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号US 7,588,757中所描述的将有效载荷递送至中枢神经系统的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1049] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号US 8,283,151中所描述的递送有效载荷的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1050] 在一些实施方案中,可以使用美国专利号US 8318687中所描述的递送有效载荷用于治疗阿兹海默氏病的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1051] 在一些实施方案中,可以使用国际专利公布号W02012144446中所描述的递送有效载荷的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述公布的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1052] 在一些实施方案中,可以使用国际专利公布号W02001089583中所描述的使用谷氨酸脱羧酶(GAD)递送载体递送有效载荷的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述公布的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1053] 在一些实施方案中,可以使用国际专利公布号W02012057363中所描述的将有效载荷递送至神经细胞的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述公布的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1054] 在一些实施方案中,可以使用国际专利公布号W02001096587中所描述的递送有效载荷的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述公布的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1055] 在一些实施方案中,可以使用国际专利公布号W02002014487中所描述的将有效载荷递送至肌肉组织的方法来施用或递送本公开的AAV粒子或药物组合物,所述公布的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1056] 在一些实施方案中,导管可以用于施用AAV粒子。在某些实施方案中,导管或插管可以位于脊柱中的多于一个部位处以用于多部位递送。编码的病毒粒子可以按连续输注

和/或推注来递送。每个部位的递送可以是不同给药方案,或者相同给药方案可以用于每个部位的递送。在一些实施方案中,递送部位可以在颈部和腰部区域中。在一些实施方案中,递送部位可以在颈部区域中。在一些实施方案中,递送部位可以在腰部区域中。

[1057] 在一些实施方案中,可以在递送本文所描述的AAV粒子之前分析受试者的脊柱解剖学和病理学。作为一个非限制性实例,与无脊柱侧弯的受试者相比,患有脊柱侧弯的受试者可以具有不同给药方案和/或导管位置。

[1058] 在一些实施方案中,选择递送方法和持续时间以在脊髓中提供广泛转导。在一些实施方案中,鞘内递送用于提供沿着脊髓的头端-尾端长度的广泛转导。在一些实施方案中,多部位输注提供了沿着脊髓的头端-尾端长度的更均匀转导。

[1059] 递送至细胞

[1060] 在一些方面,本公开提供了一种向细胞或组织递送上述AAV粒子中的任一者的方法,所述方法包括使细胞或组织与所述AAV粒子接触,或使细胞或组织与包含所述AAV粒子的配方接触,或使细胞或组织与所描述的组合物(包括药物组合物)中的任一者接触。将AAV粒子递送至细胞或组织的方法可以在体外、离体或体内完成。

[1061] 递送至受试者

[1062] 在一些方面,本公开另外提供了一种向受试者(包括哺乳动物受试者)递送上述AAV粒子中的任一者的方法,所述方法包括向受试者施用所述AAV粒子,或向受试者施用包含所述AAV粒子的配方,或向受试者施用所描述的组合物(包括药物组合物)中的任一者。

[1063] 在一些实施方案中,可以递送AAV粒子以绕过解剖学阻塞处,诸如但不限于血脑屏障。

[1064] 在一些实施方案中,可以配制AAV粒子并且通过与经口递送相比增加药物作用速度的途径向受试者递送。

[1065] 在一些实施方案中,可以通过提供脊髓和背根神经节(DRG)的均匀转导的方法递送AAV粒子。在一些实施方案中,可以使用鞘内输注来递送AAV粒子。

[1066] 在一些实施方案中,可以使用推注向受试者施用本文所描述的AAV粒子。如本文所用,“推注”意指物质或组合物的单次快速输注。

[1067] 在一些实施方案中,可以按连续输注和/或推注来递送编码GCase蛋白的AAV粒子。每个部位的递送可以是不同给药方案,或者相同给药方案可以用于每个部位的递送。作为一个非限制性实例,递送部位可以在颈部和腰部区域中。作为另一个非限制性实例,递送部位可以在颈部区域中。作为另一个非限制性实例,递送部位可以在腰部区域中。

[1068] 在一些实施方案中,可以经由单一途径施用将AAV粒子递送至受试者。

[1069] 在一些实施方案中,可以经由多部位施用途径将AAV粒子递送至受试者。举例来说,可以在2、3、4、5个或超过5个部位处向受试者施用AAV粒子。

[1070] 在一些实施方案中,可以经数分钟、数小时或数天的时段使用持续递送向受试者施用本文所描述的AAV粒子。可以取决于受试者、分布、配方或本领域技术人员已知的其它递送参数而改变输注速率。

[1071] 在一些实施方案中,如果使用AAV粒子的连续递送(连续输注),那么连续输注可以持续1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小

时、24小时或超过24小时。

[1072] 在一些实施方案中,可以在施用之前评估颅内压。途径、体积、AAV粒子浓度、输注持续时间和/或载体滴度可以基于受试者的颅内压进行优化。

[1073] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过全身递送来递送。在一些实施方案中,全身递送可以通过血管内施用。

[1074] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过注射至CSF路径中来递送。递送至CSF路径的非限制性实例包括鞘内和脑室内施用。

[1075] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过直接(实质内)注射至器官的物质,例如脑部一个或多个区域中来递送。

[1076] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过软膜下递送至脊髓中来递送。举例来说,可以将受试者放置于脊柱固定设备中。可以进行背侧椎板切除术以暴露脊髓。引导管和XYZ操纵器可以用于辅助导管放置。通过从导引管推进导管可以将软膜下导管置于软膜下空间中,并且可以经导管注射AAV粒子(Miyanohara等,Mol Ther Methods Clin Dev.2016;3:16046)。在一些情况下,可以将AAV粒子注射至颈部软膜下空间中。在一些情况下,可以将AAV粒子注射至胸部软膜下空间中。

[1077] 在一些实施方案中,AAV粒子可以通过直接注射至受试者的CNS来递送。在一些实施方案中,直接注射是脑内注射、实质内注射、鞘内注射、大池内注射或它们的任何组合。在一些实施方案中,直接注射至受试者的CNS包括对流增强递送(CED)。在一些实施方案中,施用包括外周注射。在一些实施方案中,外周注射是静脉内注射。

[1078] 在一些实施方案中,可以将AAV粒子递送至受试者以与内源水平相比增加尾壳核、丘脑、上丘、皮质和/或胼胝体中的GCase蛋白水平。与内源水平相比,增幅可以是0.1x至5x、0.5x至5x、1x至5x、2x至5x、3x至5x、4x至5x、0.1x至4x、0.5x至4x、1x至4x、2x至4x、3x至4x、0.1x至3x、0.5x至3x、1x至3x、2x至3x、0.1x至2x、0.5x至2x、0.1x至1x、0.5x至1x、0.1x至0.5x、1x至2x、0.1x、0.2x、0.3x、0.4x、0.5x、0.6x、0.7x、0.8x、0.9x、1.0x、1.1x、1.2x、1.3x、1.4x、1.5x、1.6x、1.7x、1.8x、1.9x、2.0x、2.1x、2.2x、2.3x、2.4x、2.5x、2.6x、2.7x、2.8x、2.9x、3.0x、3.1x、3.2x、3.3x、3.4x、3.5x、3.6x、3.7x、3.8x、3.9x、4.0x、4.1x、4.2x、4.3x、4.4x、4.5x、4.6x、4.7x、4.8x、4.9x或超过5x。

[1079] 在一些实施方案中,可以将AAV粒子递送至受试者以通过在尾、壳核、丘脑、上丘、皮质和/或胼胝体中转导细胞来增加这些CNS区域中的GCase蛋白水平。转导还可以称为GCase蛋白阳性的细胞的量。在这些CNS区域中转导可以大于或等于1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的细胞。

[1080] 在一些实施方案中,将包含编码本文所描述的GCase蛋白的病毒基因组的AAV粒子递送至尾壳核、丘脑、上丘、皮质和/或胼胝体会使得GCase蛋白的表达增加。表达增加可以改善这些CNS区域中各种细胞类型的存活率和功能,并且随后改善GBA相关病症的症状。

[1081] 在特定实施方案中,可以将AAV粒子递送至受试者以通过向受试者的丘脑施用AAV粒子来建立GCase在整个神经系统中的广泛分布。

[1082] 具体地,在一些实施方案中,GCase蛋白的表达增加可以改善步态、感觉能力、运动和力量协调、功能能力、认知和/或生活质量。

[1083] 给药

[1084] 在一些方面,本公开提供了包括向有需要的受试者施用根据本公开的病毒载体及其有效载荷的方法。可以使用有效地对疾病、病症和/或疾患(例如,与GCase蛋白表达降低或GCase蛋白的量和/或功能缺陷相关的疾病、病症和/或疾患)进行预防、治疗、诊断或成像的任何量和任何施用途向受试者施用病毒载体的医药、成像、诊断或预防组合物。在一些实施方案中,疾病、病症和/或疾患是GBA相关病症。所需的确切量将因受试者而异,这取决于受试者的物种、年龄和一般状况、疾病的严重性、特定组合物、其施用模式、其活动模式等。根据本公开的组合物通常以单位剂型配制以便于施用和剂量均匀。然而,应了解,本公开的组合物的每日总用量可以由主治医师在合理医学判断的范围内决定。针对任何特定患者的特定治疗有效、预防有效或适当成像剂量水平将取决于多种因素,所述因素包括所治疗的病症和病症的严重性;所采用的特定化合物的活性;所采用的特定组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;所采用的特定肽的施用时间、施用途和排泄速率;治疗的持续时间;与所采用的特定化合物组合或同时使用的药物;以及医学领域中众所周知的类似因素。

[1085] 在某些实施方案中,根据本公开的AAV粒子药物组合物可以每天一次或多次按足以递送GCase蛋白的剂量水平施用:每天约0.0001mg/kg至约100mg/kg、约0.001mg/kg至约0.05mg/kg、约0.005mg/kg至约0.05mg/kg、约0.001mg/kg至约0.005mg/kg、约0.05mg/kg至约0.5mg/kg、约0.01mg/kg至约50mg/kg、约0.1mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg,或约1mg/kg至约25mg/kg受试者体重,以获得所需治疗、诊断、预防或成像作用。应了解,上述给药浓度可以转换为VG或病毒基因组/公斤或转换为由本领域技术人员施用的总病毒基因组。

[1086] 在某些实施方案中,可以使用多次施用(例如,两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次施用)来递送所需剂量。当采用多次施用时,可以使用分割给药方案,诸如本文所描述的那些。如本文所用,“分割剂量”是将单个单位剂量或总日剂量分成两个或更多个剂量,例如,单个单位剂量的两次或更多次施用。如本文所用,“单个单位剂量”是在一次给药/一个时间/单个途径/单个接触点,即,单个施用事件中施用的任何治疗组合物的剂量。在一些实施方案中,单个单位剂量作为离散剂型(例如,片剂、胶囊、贴片、经负载的注射器、小瓶等)提供。如本文所用,“每日总剂量”是在24小时时段内给予或规定的量。每日总剂量可以作为单个单位剂量施用。病毒粒子可以仅在缓冲液中或在本文所描述的配方中配制。

[1087] 可以将本文所描述的药物组合物配制成本文所描述的剂型,诸如局部、鼻内、肺部、气管内或可注射剂(例如,静脉内、眼内、玻璃体内、肌肉内、心内、腹膜内和/或皮下)。

[1088] 在一些实施方案中,本文所描述的AAV粒子的递送引起由AAV粒子递送所致最小严重不良事件(SAE)。

[1089] 在一些实施方案中,根据本公开的AAV粒子药物组合物向中枢神经系统(例如,实质)的细胞的递送可以包括约 1×10^6 VG/mL与约 1×10^{16} VG/mL之间的总浓度。在一些实施方案中,递送可以包括以下组合物浓度:约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、

8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1.6×10^{11} 、 1.8×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 5.5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 0.8×10^{12} 、 0.83×10^{12} 、 1×10^{12} 、 1.1×10^{12} 、 1.2×10^{12} 、 1.3×10^{12} 、 1.4×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 1.6×10^{12} 、 1.7×10^{12} 、 1.8×10^{12} 、 1.9×10^{12} 、 2×10^{12} 、 2.1×10^{12} 、 2.2×10^{12} 、 2.3×10^{12} 、 2.4×10^{12} 、 2.5×10^{12} 、 2.6×10^{12} 、 2.7×10^{12} 、 2.8×10^{12} 、 2.9×10^{12} 、 3×10^{12} 、 3.1×10^{12} 、 3.2×10^{12} 、 3.3×10^{12} 、 3.4×10^{12} 、 3.5×10^{12} 、 3.6×10^{12} 、 3.7×10^{12} 、 3.8×10^{12} 、 3.9×10^{12} 、 4×10^{12} 、 4.1×10^{12} 、 4.2×10^{12} 、 4.3×10^{12} 、 4.4×10^{12} 、 4.5×10^{12} 、 4.6×10^{12} 、 4.7×10^{12} 、 4.8×10^{12} 、 4.9×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 2.3×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1.9×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 或 1×10^{16} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 1×10^{13} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 1.1×10^{12} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 3.7×10^{12} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 8×10^{11} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 2.6×10^{12} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 4.9×10^{12} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 0.8×10^{12} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 0.83×10^{12} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为小瓶中可容纳的最大最终剂量。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 1.6×10^{11} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 5×10^{11} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 2.3×10^{13} VG/mL。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 1.9×10^{14} VG/mL。

[1090] 在一些实施方案中,根据本公开的AAV粒子药物组合物向中枢神经系统(例如,实质)的细胞的递送可以包括约 1×10^6 VG与约 1×10^{16} VG之间的总浓度。在一些实施方案中,递送可以包括以下组合物浓度:约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1.6×10^{11} 、 2×10^{11} 、 2.1×10^{11} 、 2.2×10^{11} 、 2.3×10^{11} 、 2.4×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 2.6×10^{11} 、 2.7×10^{11} 、 2.8×10^{11} 、 2.9×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 4.6×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 7.1×10^{11} 、 7.2×10^{11} 、 7.3×10^{11} 、 7.4×10^{11} 、 7.5×10^{11} 、 7.6×10^{11} 、 7.7×10^{11} 、 7.8×10^{11} 、 7.9×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1.1×10^{12} 、 1.2×10^{12} 、 1.3×10^{12} 、 1.4×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 1.6×10^{12} 、 1.7×10^{12} 、 1.8×10^{12} 、 1.9×10^{12} 、 2×10^{12} 、 2.3×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 4.1×10^{12} 、 4.2×10^{12} 、 4.3×10^{12} 、 4.4×10^{12} 、 4.5×10^{12} 、 4.6×10^{12} 、 4.7×10^{12} 、 4.8×10^{12} 、 4.9×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 8.1×10^{12} 、 8.2×10^{12} 、 8.3×10^{12} 、 8.4×10^{12} 、 8.5×10^{12} 、 8.6×10^{12} 、 8.7×10^{12} 、 8.8×10^{12} 、 8.9×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 或 1×10^{16} VG/受试者。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 2.3×10^{11} VG/受试者。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 7.2×10^{11} VG/受试者。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 7.5×10^{11} VG/受试者。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 1.4×10^{12} VG/受试者。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 4.8×10^{12} VG/受试

者。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 8.8×10^{12} VG/受试者。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 2.3×10^{12} VG/受试者。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 2×10^{10} VG/受试者。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 1.6×10^{11} VG/受试者。在一些实施方案中,组合物中病毒载体的浓度为 4.6×10^{11} VG/受试者。

[1091] 在一些实施方案中,AAV粒子向中枢神经系统(例如,实质)的细胞的递送可以包括约 1×10^6 VG与约 1×10^{16} VG之间的总剂量。在一些实施方案中,递送可以包括以下总剂量:约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 1.9×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 3.73×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 或 1×10^{16} VG。在一些实施方案中,总剂量为 1×10^{13} VG。在一些实施方案中,总剂量为 3×10^{13} VG。在一些实施方案中,总剂量为 3.73×10^{10} VG。在一些实施方案中,总剂量为 1.9×10^{10} VG。在一些实施方案中,总剂量为 2.5×10^{11} VG。在一些实施方案中,总剂量为 5×10^{11} VG。在一些实施方案中,总剂量为 1×10^{12} VG。在一些实施方案中,总剂量为 5×10^{12} VG。

[1092] 组合

[1093] AAV粒子可以与一种或多种其它治疗剂、预防剂、诊断剂或成像剂组合使用。短语“与……组合”并不意图要求所述剂必须同时施用和/或经配制用于一起递送,尽管这些递送方法在本公开的范围。组合物可以与一种或多种其它所需治疗剂或医学程序同时、在其之前或在其之后施用。一般来说,每种剂将以针对那种剂所确定的剂量和/或时程施用。在一些实施方案中,本公开涵盖了医药、预防、诊断或成像组合物与可以改善其生物利用度,降低和/或改变其代谢,和/或改变其在体内的分布的剂组合递送。

[1094] 治疗剂可以由美国食品与药物管理局批准,或可以处于临床试验中或临床前研究阶段。治疗剂可以利用本领域中已知的任何治疗模态,非限制性实例包括基因沉默或干扰(即,miRNA、siRNA、RNAi、shRNA)、基因编辑(即,TALEN、CRISPR/Cas9系统、锌指核酸酶)和基因、蛋白质或酶替代。

[1095] 表达的测量

[1096] 来自病毒基因组的GCase蛋白的表达可以使用本领域中已知的各种方法确定,诸如但不限于免疫化学(例如,IHC)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、亲和ELISA、ELISPOT、流式细胞术、免疫细胞学、表面等离子体共振分析、动力学排阻测定、液相层析-质谱法(LCMS)、高效液相层析(HPLC)、BCA测定、免疫电泳、免疫印迹法、SDS-PAGE、蛋白质免疫沉淀、PCR和/或原位杂交(ISH)。在一些实施方案中,在不同AAV衣壳中递送的编码GCase蛋白的转基因在不同CNS组织中可以具有不同表达水平。

[1097] 在某些实施方案中,通过免疫印迹法可检测GCase蛋白。

[1098] 检测GBA表达的替代方法是已知的,包括例如使用国际公布号W02019136484中所

描述的方法和化合物,所述公布以全文引用的方式并入本文中。

[1099] VII. 试剂盒和装置

[1100] 试剂盒

[1101] 在一些方面,本公开提供了多种试剂盒以方便和/或有效地实施本公开的方法。通常,试剂盒将包含足够量和/或数目的组分以允许使用者对一名或多名受试者进行多次治疗和/或进行多次实验。

[1102] 本公开的载体、构建体或GCase蛋白中的任一者可以包含于试剂盒中。在一些实施方案中,试剂盒还可以包括用于创建和/或合成本公开的化合物和/或组合物的试剂和/或说明书。在一些实施方案中,试剂盒还可以包括一种或多种缓冲液。在一些实施方案中,本公开的试剂盒可以包括用于制造蛋白质或核酸数组或文库的组分,并且因此可以包括例如固体支撑物。

[1103] 在一些实施方案中,试剂盒组分可以包装于水性介质中或呈冻干形式包装。试剂盒的容器器具一般将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其它容器器具,可以将组分放置于其中并适当地等分。在存在多于一种试剂盒组分(标记试剂和标记可以包装于一起)的情况下,试剂盒一般还可以含有第二、第三或其它额外容器,额外组分可以单独放置于所述容器中。在一些实施方案中,试剂盒还可以包含用于容纳无菌、药学上可接受的缓冲液和/或其它稀释剂的第二容器器具。在一些实施方案中,组分的各种组合可以包含于一个或多个小瓶中。本公开的试剂盒通常还可以包括用于容纳本公开的化合物和/或组合物的器具,例如,严密封闭的蛋白质、核酸和任何其它试剂容器用于商业销售。此类容器可以包括其中保留有所需小瓶的注塑成型或吹塑成型的塑料容器。

[1104] 在一些实施方案中,试剂盒的组分在一种和/或多种液体溶液中提供。在一些实施方案中,液体溶液是水溶液,尤其使用无菌水溶液。在一些实施方案中,试剂盒的组分可以作为干燥粉末提供。当试剂和/或组分作为干粉提供时,此类粉末可以通过添加适合体积的溶剂来重构。在一些实施方案中,设想溶剂还可以在另一容器器具中提供。在一些实施方案中,标记染料作为干燥粉末提供。在一些实施方案中,预期10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900、1000微克或至少或至多那些量的干燥染料在本公开的试剂盒中提供。在此类实施方案中,然后将染料再悬浮于任何适合的溶剂(诸如DMSO)中。

[1105] 在一些实施方案中,试剂盒可以包括采用试剂盒组分以及使用未包括于试剂盒中的任何其它试剂的说明书。说明书可以包括可能实施的变化。

[1106] 装置

[1107] 在一些实施方案中,本公开的化合物和/或组合物可以与装置组合、涂覆至装置上或包埋于装置中。装置可以包括但不限于牙科植入物、支架、骨骼替代物、人工关节、瓣膜、起搏器和/或其它植入式治疗装置。

[1108] 本公开提供了可以并有编码一个或多个GCase蛋白分子的病毒载体的装置。这些装置在稳定配方中含有病毒载体,所述病毒载体可以立即递送至有需要的受试者,诸如人类患者。

[1109] 根据本文教导的单次、多次或分次给药方案,可以采用施用装置来递送编码本公开的GCase蛋白的病毒载体。

[1110] 预期本领域中已知的用于向细胞、器官和组织多次施用的方法和装置与作为本公开的实施方案的本文所公开的方法和组合物联合使用。

[1111] VIII. 定义

[1112] 在本说明书的各处,本公开的化合物的取代物以群组或范围公开。本公开意图特地包括此类群组和范围的成员的每个个别子组合。以下是术语定义的非限制性清单。

[1113] 腺相关病毒:如本文所用,术语“腺相关病毒”或“AAV”是指依赖病毒属的成员或其变体,例如功能变体。在一些实施方案中,AAV是野生型或天然存在的。在一些实施方案中,AAV是重组的。

[1114] AAV粒子:如本文所用,“AAV粒子”是指包含AAV衣壳(例如,AAV衣壳变体)和多核苷酸(例如,病毒基因组或载体基因组)的粒子或病毒体。在一些实施方案中,AAV粒子的病毒基因组包含至少一个有效载荷区和至少一个ITR。在一些实施方案中,本公开的AAV粒子是包含AAV衣壳多肽,例如具有至少一个肽(例如,靶向肽)插入物的亲代衣壳序列的AAV粒子。在一些实施方案中,AAV粒子能够将编码有效载荷的核酸(例如,有效载荷区)递送至细胞,通常是哺乳动物(例如,人类)细胞。在一些实施方案中,本公开的AAV粒子可以重组产生。在一些实施方案中,AAV粒子可以来源于本文所描述或本领域中已知的任何血清型,包括血清型的组合(例如,“假型”AAV),或来源于各种基因组(例如,单链或自互补)。在一些实施方案中,AAV粒子可以是复制缺陷的和/或靶向的。在一些实施方案中,AAV粒子可以包含肽,例如靶向肽,其存在于(例如,插入)衣壳中以增强对所需靶组织的趋向性。应了解,即使未明确叙述,提及本公开的AAV粒子也包括其药物组合物。

[1115] 活性成分:如本文所用,术语“活性成分”是指具有生物活性并且负责产生生物作用的分子或其复合物。药物组合物中的活性成分可以称为活性医药成分。出于本公开的目的,短语“活性成分”一般是指携带有效载荷的病毒粒子或指由如本文所描述的病毒粒子递送的有效载荷(或其基因产物)。相比之下,“非活性成分”是指生物惰性的物质。赋形剂是非活性成分的实例。

[1116] 组合施用:如本文所用,术语“组合施用”或“组合递送”或“以组合形式施用”是指同时或在一定时间间隔内施用的两种或更多种剂(例如,AAV)的暴露,使得受试者在某个时间点暴露于两种剂和/或使得每种剂对患者的作用存在重叠。在一些实施方案中,一种或多种剂的至少一个剂量在一种或多种其它剂的至少一个剂量的约24小时、12小时、6小时、3小时、1小时、30分钟、15分钟、10分钟、5分钟或1分钟内施用。在一些实施方案中,施用以重叠的给药方案进行。如本文所用,术语“给药方案”是指在时间上间隔开的多个剂量。此类剂量可以按规律的时间间隔发生或在施用中可以包括一次或多次中断。在一些实施方案中,如本文所描述的本公开的一种或多种化合物和/或组合物的个别剂量的施用一起足够紧密地间隔,从而达成组合(例如,协同)作用。

[1117] 改善:如本文所用,术语“改善(amelioration/ameliorating)”是指疾患或疾病的至少一个指标的严重性减轻。举例来说,在神经退化病症的情形中,改善包括神经元损失减少或稳定。

[1118] 动物:如本文所用,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中,术语受试者或动物是指处于任何发育阶段的人类。在一些实施方案中,动物是指处于任何发育阶段的非人类动物。在某些实施方案中,非人类动物是哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大

鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物或猪)。在一些实施方案中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼和蠕虫。在一些实施方案中,动物是转基因动物、基因工程改造的动物或克隆体。

[1119] 大约:如本文所用,术语“大约”或“约”适用于一个或多个所关注的值,是指与规定参考值类似的值。在某些实施方案中,除非另有固定或从上下文另外显而易见(除非此数值将超过可能值的100%),否则术语“大约”或“约”是指处于在任一方向上(大于或小于)规定参考值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.1%或小于0.1%以内。

[1120] 生物活性:如本文所用,短语“生物活性”是指在生物系统和/或生物体中或对其具有活性的任何物质(例如,AAV)的特征。举例来说,当向生物体施用时对所述生物体具有生物作用的物质视为具有生物活性。在特定实施方案中,如果甚至本公开的化合物和/或组合物的一部分具有生物活性或模拟视为生物相关的活性,那么所述化合物和/或组合物可以视为具有生物活性。在一些实施方案中,生物活性是指诱导GCase蛋白或其变体的表达。在一些实施方案中,生物活性是指预防和/或治疗与GCase蛋白表达降低或GCase蛋白的量和/或功能缺陷相关的疾病。在一些实施方案中,生物活性是指预防和/或治疗与GBA基因表达降低相关的病症,包括例如帕金森病(PD)和相关病症,包括戈谢病和路易体痴呆(统称为“GBA相关病症”)。

[1121] 生物系统:如本文所用,术语“生物系统”是指一组器官、组织、细胞、细胞内组分、蛋白质、核酸、分子(包括但不限于生物分子),其共同起作用以在细胞膜、细胞区室、细胞、组织、器官、器官系统、多细胞生物体或任何生物实体内执行某种生物任务。在一些实施方案中,生物系统是包含细胞内和/或细胞外细胞信号传导生物分子的细胞信号传导路径。在一些实施方案中,生物系统包含细胞外/细胞基质和/或细胞壁内的生长因子信号传导事件。

[1122] 衣壳:如本文所用,术语“衣壳”是指病毒粒子,例如AAV粒子的外部,例如蛋白质外壳,其大体上为(例如,>50%、>60%、>70%、>80%、>90%、>95%、>99%或100%)蛋白质。在一些实施方案中,衣壳是包含本文所描述的AAV衣壳蛋白的AAV衣壳,例如,VP1、VP2和/或VP3多肽。AAV衣壳蛋白可以是野生型AAV衣壳蛋白或变体,例如,来自野生型或参考衣壳蛋白的结构和/或功能变体,在本文中称为“AAV衣壳变体”。在一些实施方案中,本文所描述的AAV衣壳变体具有包裹(例如,囊封)病毒基因组的能力和/或能够进入细胞,例如哺乳动物细胞中。在一些实施方案中,与野生型AAV衣壳,例如相应野生型衣壳相比,本文所描述的AAV衣壳变体可以具有改变的趋向性。

[1123] 中枢神经系统或CNS:如本文所用,“中枢神经系统”或“CNS”是指神经系统的两个主要分支之一,在脊椎动物中包括脑和脊髓。中枢神经系统协调整个神经系统的活动。

[1124] 颈部区域:如本文所用,“颈部区域”是指包括颈椎C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7和C8的脊髓区域。

[1125] 顺式元件:如本文所用,顺式元件或同义术语“顺式调控元件”是指调控附近基因的转录的非编码DNA区域。拉丁语前缀“顺式”翻译为“在这一侧”。顺式元件在其调控的一个或多个基因附近发现。顺式元件的实例包括Kozak序列、SV40内含子或一部分主链。

[1126] CNS组织:如本文所用,“CNS组织”是指中枢神经系统的组织,其在脊椎动物中包括

脑和脊髓及其子结构。

[1127] CNS结构:如本文所用,“CNS结构”是指中枢神经系统的结构及其子结构。脊髓中结构的非限制性实例可以包括腹角、背角、白质和神经系统路径或其中的核。脑中结构的非限制性实例包括前脑、中脑、后脑、间脑、端脑、延脑、脑后部、脑中部、脑前部、菱脑、皮质、额叶、顶叶、颞叶、枕叶、大脑、丘脑、下丘脑、顶盖、被盖、小脑、脑桥、髓质、杏仁核、海马体、基底神经节、胼胝体、脑垂腺、壳核、纹状体、脑室及其子结构。

[1128] CNS细胞:如本文所用,“CNS细胞”是指中枢神经系统的细胞及其子结构。CNS细胞的非限制性实例包括神经元及其亚型、神经胶质、小神经胶质、少突细胞、室管膜细胞和星状细胞。神经元的非限制性实例包括感觉神经元、运动神经元、中间神经元、单极细胞、双极细胞、多极细胞、假单极细胞、锥体细胞、篮状细胞、星状细胞、浦肯野细胞(Purkinje cell)、贝茨细胞(Betz cell)、无长突细胞、颗粒细胞、卵形细胞、中型多棘神经元和大型多棘神经元。

[1129] 密码子优化:如本文所用,术语“密码子优化”是指改变给定基因的密码子的过程,使得由所述基因编码的多肽序列保持相同,而改变的密码子改善多肽序列的表达过程。举例来说,如果多肽具有人类蛋白序列并且在大肠杆菌中表达,那么在对DNA序列进行密码子优化以将人类密码子更改为更有效地在大肠杆菌中表达的密码子的情况下,表达常常得到改善。

[1130] 保守氨基酸取代:如本文所用,“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基经具有类似侧链的氨基酸残基置换的取代。具有类似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸:碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[1131] 保守:如本文所用,术语“保守”分别是指多核苷酸或多肽序列的核苷酸或氨基酸残基,其为在所比较的两个或更多个序列的相同位置处未改变的那些。相对保守的核苷酸或氨基酸是在比序列中别处出现的核苷酸或氨基酸更相关的序列中保守的那些。

[1132] 在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此100%同一,那么称为“完全保守”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此至少70%同一、至少80%同一、至少90%同一或至少95%同一,那么称为“高度保守”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此约70%同一、约80%同一、约90%同一、约95%、约98%或约99%同一,那么称为“高度保守”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此至少30%同一、至少40%同一、至少50%同一、至少60%同一、至少70%同一、至少80%同一、至少90%同一或至少95%同一,那么称为“保守”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此约30%同一、约40%同一、约50%同一、约60%同一、约70%同一、约80%同一、约90%同一、约95%同一、约98%同一或约99%同一,那么称为“保守”。序列的保守性可以适用于寡核苷酸或多肽的全长或可以适用于其部分、区域或特征。

[1133] 在一些实施方案中,保守序列是不连续的。本领域技术人员能够了解当序列之间存在连续比对中的空位时如何达成比对,以及在尽管存在插入或缺失的情况下比对相应残

基。

[1134] 递送:如本文所用,“递送”是指将细小病毒,例如AAV化合物、物质、实体、部分、货物或有效载荷递送至标靶的行为或方式。此种标靶可以是细胞、组织、器官、生物体或系统(无论是生物的还是生产的)。

[1135] 递送剂:如本文所用,“递送剂”是指至少部分促进一种或多种物质(包括但不限于本公开的化合物和/或组合物,例如病毒粒子或AAV载体)递送至靶向细胞的任何试剂。

[1136] 递送途径:如本文所用,术语“递送途径”和同义术语“施用途径”是指用于向受试者提供治疗剂的不同方法中的任一者。施用途径一般按物质所施加的位置分类,并且还可以基于作用标靶之处分类。实例包括但不限于:静脉内施用、皮下施用、经口施用、肠道外施用、经肠施用、局部施用、舌下施用、吸入施用和注射施用,或本文所描述的其它施用途径。

[1137] 衍生物:如本文所用,术语“衍生物”是指来源于或基于亲代组合物的组合物(例如,序列、化合物、配方等)。亲代组合物的非限制性实例包括野生型或原始氨基酸或核酸序列,或未稀释的配方。在一些实施方案中,衍生物是亲代组合物的变体。衍生物与亲代组合物的差异可以小于约1%、小于约5%、小于约10%、小于约15%、小于约20%、小于约25%、小于约30%、小于约35%、小于约40%、小于约45%或小于约50%。在某些实施方案中,衍生物与亲代组合物的差异可以大于约50%。在某些实施方案中,衍生物与亲代组合物的差异可以大于约75%。在一些实施方案中,衍生物可以是亲代氨基酸或核苷酸序列的片段或截短。作为一个非限制性实例,衍生物可以是与亲代核酸或氨基酸序列相比具有核苷酸或肽插入物的序列(例如,与AAV9相比的AAVPHP.B)。

[1138] 有效量:如本文所用,剂的术语“有效量”是足以实现有益或期望结果的量,例如,在向受试者或细胞施用单剂量或多剂量后,治愈、缓解、减轻或改善病症的一种或多种症状,并且因此“有效量”取决于其应用的情形。举例来说,在施用治疗帕金森病(PD)和相关病症,包括戈谢病和路易体痴呆(统称为“GBA相关疾病”)的剂的情形中,剂的有效量为例如与不施用所述剂所获得的反应相比,足以达成如本文所定义的GBA相关病症的治疗的量。

[1139] 工程改造:如本文所用,当本公开的实施方案经设计以具有与起始点、野生型或原生分子不同的特征或特性(无论是结构的还是化学的)时,所述实施方案“经工程改造”。因此,工程改造的剂或实体是设计和/或生产包括人工行为的那些。

[1140] 表达:如本文所用,核酸序列的“表达”是指以下事件中的一者或多者:(1)从DNA序列产生RNA模板(例如,通过转录);(2)RNA转录物的加工(例如,通过剪接、编辑、5'帽形成和/或3'端加工);(3)将RNA翻译成多肽或蛋白质;(4)多肽或蛋白质的折叠;和/或(5)多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[1141] 赋形剂:如本文所用,术语“赋形剂”是指充当活性医药剂或其它活性物质的媒剂或介质的非活性物质。

[1142] 配方:如本文所用,“配方”包括本公开的至少一种化合物和/或组合物(例如,载体、AAV粒子等)和递送剂。

[1143] 片段:如本文所用,“片段”是指整体的连续部分。举例来说,蛋白质的片段可以包括通过消化从培养细胞分离的全长蛋白质获得的多肽。在一些实施方案中,蛋白质的片段包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250个或更多个氨基酸。片段还可以指蛋白质的

截短(例如,N端和/或C端截短)或核酸的截短(例如,在5'和/或3'末端)。可以通过表达截短的核酸来获得蛋白质片段,使得所述核酸编码全长蛋白质的一部分。

[1144] GBA相关病症:术语“GBA相关病症”、“GBA相关疾病”、“GBA患者”等是指具有GBA基因缺陷的疾病或病症,诸如导致患者细胞中的GCase蛋白表达不足或缺陷的可遗传性,例如常染色体隐性GBA突变。GBA相关病症明确包括但不限于帕金森病(PD)、戈谢病和路易体痴呆;并且可以包括额外路易体病症、溶酶体储积症和相关病症。GBA患者是在GBA基因中具有一个或多个突变的受试者,包括例如双对偶基因突变,使得所述受试者更易患GBA相关病症。

[1145] GCase蛋白:如本文所用,术语“GCase”、“GCase蛋白”、“GCase蛋白质”等是指蛋白质产物或蛋白质产物部分,包括GBA基因的肽(Ensemble基因ID:ENSG00000177628)、其同源物或变体及其异种同源物,包括非人类蛋白及其同源物。GCase蛋白包括GBA基因产物的片段、衍生物和修饰。

[1146] 基因表达:术语“基因表达”是指核酸序列经历成功转录并且在大多数情况下翻译以产生蛋白质或肽的过程。为清楚起见,当提及“基因表达”的测量时,这应理解为意谓测量可以是转录的核酸产物,例如RNA或mRNA,或翻译的氨基酸产物,例如多肽或肽。测量RNA、mRNA、多肽和肽的量或水平的方法在本领域中是众所周知的。

[1147] 同源性:如本文所用,术语“同源性”是指聚合分子之间,例如核酸分子(例如,DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的整体相关性。在一些实施方案中,如果聚合分子的序列为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一或相似,那么所述聚合分子视为“同源”。术语“同源”必然是指至少两个序列(多核苷酸或多肽序列)之间的比较。根据本公开,如果两个多核苷酸序列编码的多肽对于至少约20个氨基酸的至少一段为至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至99%同一,那么所述多核苷酸序列视为同源。在一些实施方案中,同源多核苷酸序列的特征在于能够编码至少4-5个独特指定的氨基酸段。对于长度小于60个核苷酸的多核苷酸序列,同源性通常由编码至少4-5个独特指定的氨基酸段的能力决定。根据本公开,如果两个蛋白质对于至少约20个氨基酸的至少一段为至少约50%、60%、70%、80%或90%同一,那么所述蛋白质序列视为同源。在许多实施方案中,同源蛋白质可以在至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50个或更多个氨基酸的至少一个短段内显示大的整体同源性程度和高度同源性。在许多实施方案中,同源蛋白质共享一个或多个特征序列元件。如本文所用,术语“特征序列元件”是指相关蛋白质中存在的基元。在一些实施方案中,此类基元的存在与特定活性(诸如生物活性)相关。

[1148] 人类化:如本文所用,术语“人类化”是指多核苷酸或多肽的非人序列,所述序列已改变以增加其与相应人类序列的相似性。

[1149] 同一性:如本文所用,术语“同一性”是指聚合分子之间,例如寡核苷酸分子(例如,DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的整体相关性。两个多核苷酸序列的百分比同一性的计算例如可以通过出于最佳比较目的比对两个序列来进行(例如,可以在第一核酸序列与第二核酸序列中的一者或两者中引入空位以用于最佳比对,并且出于比较目的可以忽略不相同的序列)。在某些实施方案中,出于比较目的比对的序列的长度为参考序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%

或100%。然后比较相应核苷酸位置处的核苷酸。当第一序列中的位置由与第二序列中相应位置相同的核苷酸占据时,那么在那个位置处分子是相同的。两个序列之间的百分比同一性是序列共享的相同位置的数目的函数,这将空位的数目和每个空位的长度考虑在内,需要引入所述空位以达成两个序列的最佳比对。序列的比较和两个序列之间的百分比同一性的确定可以使用数学算法来完成。举例来说,两个核苷酸序列之间的百分比同一性可以使用诸如以下文献中所描述的那些方法来确定:Computational Molecular Biology,Lesk, A.M.编,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编,Academic Press,New York,1993;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;Computer Analysis of Sequence Data,Part I,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编,Humana Press,New Jersey,1994;以及Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.编,M Stockton Press,New York,1991;每篇文献以全文引用的方式并入本文中。举例来说,两个核苷酸序列之间的百分比同一性可以例如使用Meyers和Miller(CABIOS,1989,4:11-17)的算法来确定,所述算法已使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4并入ALIGN程序(2.0版)中。或者,两个核苷酸序列之间的百分比同一性可以使用GCG软件包中的GAP程序使用NWSgapdna.CMP矩阵来确定。通常用于确定序列之间的百分比同一性的方法包括但不限于Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM J Applied Math.,48:1073(1988)中所公开的那些;以全文引用的方式并入本文中。用于确定同一性的技术已编入公开可用的计算机程序中。确定两个序列之间的同源性的计算机软件包括但不限于GCG程序包,Devereux,J.等,Nucleic Acids Research,12(1),387(1984)),BLASTP,BLASTN和FASTA Altschul,S.F.等,J.Molecular Biol.,215,403(1990))。

[1150] 经分离:如本文所用,术语“经分离”是指自天然状态改变或去除,例如从天然状态下与其相关的至少一些组分改变或去除的物质或实体。举例来说,天然存在于活体动物中的核酸或肽未“经分离”,但与其天然状态的共存材料部分或完全分离的相同核酸或肽“经分离”。经分离的核酸或蛋白质可以呈大体上纯化的形式存在,或者可以存在于非原生环境,例如宿主细胞中。此类多核苷酸可以是载体的一部分和/或此类多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分,并且仍然是经分离的,这是因为此种载体或组合物不是在自然界中发现其的环境的一部分。在一些实施方案中,经分离的核酸是重组的,例如,并入载体中。

[1151] 腰部区域:如本文所用,术语“腰部区域”是指包括腰椎L1、L2、L3、L4和L5的脊髓区域。

[1152] miR结合位点系列:如本文所用,“miR结合位点系列”或“miR结合位点”包括通过转录AAV载体基因组产生的RNA转录物上的RNA序列。“miR结合位点系列”或“miR结合位点”还包括对应于RNA序列的DNA序列,这是因为其区别仅在于DNA中的T和RNA中的U。此种DNA的反向补体是RNA序列的编码序列。即,在一些实施方案中,在含有DNA正链的表达盒中,miR结合位点序列是其结合的miRNA的反向补体。

[1153] 经修饰:如本文所用,术语“经修饰”是指分子或实体与亲代或参考分子或实体相比改变的状态或结构。分子可以按许多方式进行修饰,包括化学上、结构上及功能上。在一些实施方案中,本公开的化合物和/或组合物通过引入非天然氨基酸或非天然核苷酸来修饰。

[1154] 突变:如本文所用,术语“突变”是指变化和/或变异。在一些实施方案中,突变可以是变化和/或变异为蛋白质(包括肽和多肽)和/或核酸(包括多核酸)。在一些实施方案中,突变包括变化和/或变异为蛋白质和/或核酸序列。此类变化和/或变异可以包括添加、取代和/或缺失一个或多个氨基酸(在蛋白质和/或肽的情况下)和/或核苷酸(在核酸和/或多核酸的情况下)。在突变包括氨基酸和/或核苷酸的添加和/或取代的实施方案中,此类添加和/或取代可以包括1个或多个氨基酸和/或核苷酸残基并且可以包括经修饰的氨基酸和/或核苷酸。一个或多个突变可以产生例如核酸序列或多肽或蛋白质序列的“突变体”、“衍生物”或“变体”。

[1155] 天然存在:如本文所用,“天然存在”或“野生型”是指在无人工辅助或人为参与的情况下存在于自然界中。“天然存在”或“野生型”可以指生物分子、序列或实体的原生形式。

[1156] 非人类脊椎动物:如本文所用,“非人类脊椎动物”包括除智人以外的所有脊椎动物,包括野生和驯化物种。非人类脊椎动物的实例包括但不限于哺乳动物,诸如羊驼、班腾、野牛、骆驼、猫、牛、鹿、狗、驴、大额牛、山羊、天竺鼠、马、骆马、骡、猪、兔、驯鹿、绵羊、水牛和牦牛。

[1157] 核酸:如本文所用,术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”是指由聚脱氧核糖核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖)或聚核糖核苷酸(含有D-核糖)组成的任何核酸聚合物,或任何其它类型的多核苷酸,其为嘌呤或嘧啶碱基或经修饰的嘌呤或嘧啶碱基的N糖苷。术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”之间在长度上不存在有意区别,并且这些术语将可互换使用。这些术语仅指分子的一级结构。因此,这些术语包括双链和单链DNA,以及双链和单链RNA。

[1158] 可操作地连接:如本文所用,短语“可操作地连接”是指两个或更多个分子、构建体、转录物、实体、部分或类似物之间的功能连接。

[1159] 粒子:如本文所用,“粒子”是由至少两种组分组成的病毒,所述两种组分是蛋白质衣壳和包裹于衣壳内的多核苷酸序列。

[1160] 患者:如本文所用,“患者”是指可能寻求治疗或有治疗需要、需要治疗、正接受治疗、将接受治疗的受试者,或由经培训(例如,有执照)专业人员对特定疾病或疾患进行照护的受试者。

[1161] 有效载荷:如本文所用,“有效载荷”或“有效载荷区”是指由病毒基因组编码或在病毒基因组内编码的一个或多个多核苷酸或多核苷酸区或者此种多核苷酸或多核苷酸区的表达产物,例如,转基因、编码多肽的多核苷酸。

[1162] 有效载荷构建体:如本文所用,“有效载荷构建体”是编码或包含在一侧或两侧由反向末端重复(ITR)序列侧接的有效载荷的一个或多个多核苷酸区。有效载荷构建体是在病毒生产细胞中复制以生产病毒基因组的模板。

[1163] 有效载荷构建体载体:如本文所用,“有效载荷构建体载体”是编码或包含有效载荷构建体以及用于在细菌细胞中复制和表达的调控区的载体。有效载荷构建体载体还可以包含用于病毒复制细胞中的病毒表达的组分。

[1164] 肽:如本文所用,术语“肽”是指长度小于或等于约50个氨基酸,例如长度为约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸的氨基酸链。

[1165] 药学上可接受:短语“药学上可接受”在本文中用于指那些化合物、材料、组合物

和/或剂型,其在合理医学判断的范围内,适合用于与人类和动物的组织接触而无过度毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症,与合理效益/风险比相匹配。

[1166] 药学上可接受的赋形剂:如本文所用,术语“药学上可接受的赋形剂”是指除活性剂(例如,如本文所描述)以外的任何成分,其存在于药物组合物中并且在受试者中具有大体上无毒和非炎性的特性。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是能够悬浮和/或溶解活性剂的媒剂。赋形剂可以包括例如:抗粘剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(着色剂)、润肤剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣、调味剂、香料、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂和水合水。赋形剂包括但不限于:丁基化羟基甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(磷酸氢钙)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交联维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露糖醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预糊化淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、羟基乙酸淀粉钠、山梨糖醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C和/或木糖醇。

[1167] 药学上可接受的盐:本文所描述的化合物的药学上可接受的盐是所公开的化合物的形式,其中酸或碱部分呈其盐形式(例如,通过游离碱基团与适合的有机酸反应而产生)。药学上可接受的盐的实例包括但不限于诸如胺的碱性残基的无机或有机酸盐;诸如羧酸的酸性残基的碱金属盐或有机盐;等等。代表性酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、反丁烯二酸盐、葡萄糖庚酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙烷磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟碱酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、丁二酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一碳酸盐、戊酸盐等。代表性碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等,以及无毒铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。药学上可接受的盐包括常规无毒盐,例如,来自无毒无机或有机酸。在一些实施方案中,通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的亲代化合物制备药学上可接受的盐。一般来说,可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的适当碱或酸在水中或有机溶剂中或两者的混合物中反应来制备此类盐;一般来说,使用非水性介质,如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。适合盐的清单见于Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton, Pa.,1985,第1418页,Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,P.H.Stahl和C.G.Wermuth(编),Wiley-VCH,2008,以及Berge等,Journal of Pharmaceutical Science,66,1-19(1977)中,每篇文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[1168] 药物组合物:如本文所用,术语“药物组合物”或“药学上可接受的组合物”包含AAV多核苷酸、AAV基因组或AAV粒子以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、溶剂、佐剂和/或类似物。

[1169] 多肽:如本文所用,术语“多肽”是指由大量在链中键结在一起的氨基酸残基组成的有机聚合物。单体蛋白质分子是多肽。

[1170] 预防:如本文所用,术语“预防”是指部分或完全延迟感染、疾病、病症和/或疾患的发作;部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或疾患的一种或多种症状、特征或临床表现的发作;部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或疾患的一种或多种症状、特征或表现的发作;部分或完全延迟感染、特定疾病、病症和/或疾患的进展;和/或降低发展与感染、疾病、病症和/或疾患相关的病理的风险。

[1171] 启动子:如本文所用,术语“启动子”是指聚合酶将结合以启动转录(DNA至RNA)或反转录(RNA至DNA)的核酸位点。

[1172] 所关注的蛋白质:如本文所用,术语“所关注的蛋白质”或“所需蛋白质”包括本文所提供的那些及其片段、突变体、变体或变异。

[1173] 经纯化:如本文所用,术语“纯化”意指促使大体上纯的或清除一种或多种不合需要的组分、材料杂质、混合物或瑕疵。“经纯化”是指纯的状态。“纯化”是指纯化过程。如本文所用,如果物质大体上不含(大体上分离自)一种或多种组分,例如,在天然环境中发现的一种或多种组分,那么所述物质是“纯的”。

[1174] 区域:如本文所用,术语“区域”是指区或一般区域。在一些实施方案中,当提及蛋白质或蛋白质模块时,区域可以包含沿着蛋白质或蛋白质模块的线性氨基酸序列或可以包含三维区域、表位和/或表位簇。在一些实施方案中,区域包括末端区域。如本文所用,术语“末端区域”是指位于给定剂的末端或终端的区域。当提及蛋白质时,末端区域可以包含N端和/或C端。N端是指包含具有游离胺基的氨基酸的蛋白质末端。C端是指包含具有游离羧基的氨基酸的蛋白质末端。N端和/或C端区域可以包含N端和/或C端以及周围氨基酸。在一些实施方案中,N端和/或C端区域包含约3个氨基酸至约30个氨基酸、约5个氨基酸至约40个氨基酸、约10个氨基酸至约50个氨基酸、约20个氨基酸至约100个氨基酸和/或至少100个氨基酸。在一些实施方案中,N端区域可以包含任何长度的氨基酸,其包括N端,但不包括C端。在一些实施方案中,C端区域可以包含任何长度的氨基酸,其包括C端,但不包含N端。

[1175] 在一些实施方案中,当提及多核苷酸时,区域可以包含沿着多核苷酸的线性核酸序列或可以包含三维区域、二级结构或三级结构。在一些实施方案中,区域包括末端区域。如本文所用,术语“末端区域”是指位于给定剂的末端或终端的区域。当提及多核苷酸时,末端区域可以包含5'和3'端。5'端是指包含具有游离磷酸基的核酸的多核苷酸末端。3'端是指包含具有游离羟基的核酸的多核苷酸末端。5'和3'区域可以在其中包含5'和3'端以及周围核酸。在一些实施方案中,5'和3'端区域包含约9个核酸至约90个核酸、约15个核酸至约120个核酸、约30个核酸至约150个核酸、约60个核酸至约300个核酸和/或至少300个核酸。在一些实施方案中,5'区域可以包含任何长度的核酸,其包括5'端,但不包括3'端。在一些实施方案中,3'区域可以包含任何长度的核酸,其包括3'端,但不包含5'端。

[1176] RNA或RNA分子:如本文所用,术语“RNA”或“RNA分子”或“核糖核酸分子”是指核糖核苷酸的聚合物;术语“DNA”或“DNA分子”或“脱氧核糖核酸分子”是指脱氧核糖核苷酸的聚合物。DNA和RNA可以天然合成,例如,分别通过DNA复制和DNA转录;或化学合成。DNA和RNA可以是单链(即,分别为ssRNA或ssDNA)或多链(例如双链,即,分别为dsRNA和dsDNA)。如本文所用,术语“mRNA”或“信使RNA”是指编码一个或多个多肽链的氨基酸序列的单链RNA。

[1177] 样品:如本文所用,术语“样品”是指取自来源和/或供分析或处理的等分试样或部分。在一些实施方案中,样品来自生物来源,诸如组织、细胞或组成部分(例如体液,包括但不限于血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊液、唾液、羊水、羊膜脐带血、尿液、阴道液和精液)。在一些实施方案中,样品可以是或包含从整个生物体或其组织、细胞或组成部分的子组或其级分或部分制备的匀浆、溶解产物或提取物,包括但不限于例如血浆、血清、脊髓液、淋巴液,皮肤、呼吸道、肠道及泌尿生殖道的外部部分,泪液、唾液、乳汁、血细胞、肿瘤、器官。在一些实施方案中,样品是或包含培养基,诸如营养肉汤或凝胶,所述培养基可以含有细胞组分,诸如蛋白质或核酸分子。在一些实施方案中,“初级”样品是来源的等分试样。在一些实施方案中,对初级样品进行一个或多个处理(例如,分离、纯化等)步骤以制备用于分析或其它用途的样品。

[1178] 血清型:如本文所用,术语“血清型”是指基于表面抗原的AAV衣壳的不同变异,其允许在亚种水平上对AAV进行流行病学分类。

[1179] 信号序列:如本文所用,短语“信号序列”是指可以指导转运或定位的序列。

[1180] 单个单位剂量:如本文所用,“单个单位剂量”是在一次给药/一个时间/单个途径/单个接触点,即,单个施用事件中施用的任何治疗剂的剂量。在一些实施方案中,单个单位剂量作为离散剂型(例如,片剂、胶囊、贴片、经负载的注射器、小瓶等)提供。

[1181] 相似性:如本文所用,术语“相似性”是指聚合分子之间,例如多核苷酸分子(例如,DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的整体相关性。聚合分子彼此之间的百分比相似性的计算可以按与百分比同一性的计算相同的方式进行,例外之处为百分比相似性的计算将本领域中所了解的保守取代考虑在内。

[1182] 间隔子:如本文所用,“间隔子”一般是任何选定的核酸序列,例如,长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸,其位于两个或更多个连续miR结合位点序列之间。

[1183] 经稳定:如本文所用,术语“稳定”、“经稳定”、“经稳定区域”意指促使或变得稳定。在一些实施方案中,相对于绝对值测量稳定性。在一些实施方案中,相对于参考化合物或实体测量稳定性。

[1184] 受试者:如本文所用,术语“受试者”或“患者”是指可以向其施用根据本公开的组合物任何生物体,例如,用于实验、诊断、预防和/或治疗目的。类似地,“受试者”或“患者”是指可能寻求、可能需要、正接受或将接受治疗或由经培训的专业人员对特定疾病或疾患进行照护的生物体。典型受试者包括动物(例如哺乳动物,诸如小鼠、大鼠、兔、非人类灵长类动物和人类)。在某些实施方案中,受试者或患者可能易患或疑似患有GBA相关病症。在某些实施方案中,受试者或患者可能经诊断患有PD、戈谢病或路易体病痴呆。

[1185] 大体上:如本文所用,术语“大体上”是指展现所关注的特征或特性的全部或接近全部范围或程度的定性条件。一般熟习生物技术者将了解,生物和化学现象鲜少(如果有的话)会完成和/或进行至完成或达成或避免绝对结果。因此,术语“大体上”在本文中用于捕获许多生物和化学现象中固有的潜在完整性缺乏。

[1186] 大体上相等:如本文所用,因为涉及剂量之间的时间差,所以这个术语意指加上/减去2%。

[1187] 大体上同时:如本文所用并且因为涉及多个剂量,所以这个术语通常意指在约2秒内。

[1188] 罹患：“罹患”疾病、病症和/或疾患的受试者已诊断患有或显示出疾病、病症和/或疾患的一种或多种症状。

[1189] 易患：“易患”疾病、病症和/或疾患的受试者尚未诊断患有和/或可能未展现疾病、病症和/或疾患的症状,但具有发展疾病或其症状的倾向。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或疾患(例如,癌症)的受试者可以由以下一项或多项表征:(1)与疾病、病症和/或疾患的发展相关的基因突变;(2)与疾病、病症和/或疾患的发展相关的遗传多态性;(3)与疾病、病症和/或疾患相关的蛋白质和/或核酸的表达和/或活性增加和/或降低;(4)与疾病、病症和/或疾患的发展相关的习惯和/或生活方式;(5)疾病、病症和/或疾患的家族史;以及(6)暴露于和/或感染与疾病、病症和/或疾患的发展相关的微生物。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或疾患的受试者将发展疾病、病症和/或疾患。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或疾患的受试者不会发展疾病、病症和/或疾患。

[1190] 合成:术语“合成”是指人工生产、制备和/或制造。本公开的多核苷酸或多肽或其它分子的合成可以是化学的或酶促的。

[1191] 靶向:如本文所用,“靶向”意指将与靶核酸杂交并且诱导所需作用的核酸序列的设计和选择过程。

[1192] 靶向细胞:如本文所用,“靶细胞”或“靶向细胞”是指任何一种或多种所关注的细胞。可以在体外、体内、原位或在生物体的组织或器官中发现细胞。生物体可以是动物、哺乳动物、人类和/或患者。靶细胞可以是CNS细胞或CNS组织中的细胞。

[1193] 治疗剂:术语“治疗剂”是指当向受试者施用时具有治疗、诊断和/或预防作用和/或引发所需生物和/或药理作用的任何剂。

[1194] 治疗有效量:如本文所用,术语“治疗有效量”意指待递送的剂(例如,核酸、药物、治疗剂、诊断剂、预防剂等)的量,当向罹患或易患感染、疾病、病症和/或疾患的受试者施用,所述量足以针对感染、疾病、病症和/或疾患进行治疗、改善症状、诊断、预防和/或延迟发作。在一些实施方案中,以单个剂量提供治疗有效量。在一些实施方案中,以包括多个剂量的剂量方案施用治疗有效量。本领域技术人员将了解,在一些实施方案中,如果单位剂型包含在作为此种剂量方案的一部分施用时有有效的量,那么所述单位剂型可以视为包含治疗有效量的特定剂或实体。

[1195] 治疗有效结果:如本文所用,术语“治疗有效结果”是指在罹患或易患感染、疾病、病症和/或疾患的受试者中,足以针对感染、疾病、病症和/或疾患进行治疗、改善症状、诊断、预防和/或延迟发作的结果。

[1196] 胸部区域:如本文所用,“胸部区域”是指包括胸椎T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11和T12的脊髓区域。

[1197] 治疗:如本文所用,术语“治疗”是指针对特定感染、疾病、病症和/或疾患的一种或多种症状或特征,部分或完全缓解、改善、改进、减轻、逆转、延迟发作、抑制进展、降低严重性和/或降低发病率。可以向未展现疾病、病症和/或疾患的体征的受试者和/或向仅展现疾病、病症和/或疾患的早期体征的受试者施用治疗,用于降低发展与疾病、病症和/或疾患的病变的风险的目的。

[1198] 未修饰:如本文所用,“未修饰”是指在以任何方式改变之前的任何物质、化合物或分子。未修饰可能但不始终指生物分子或实体的野生型或原生形式。分子或实体可以经历

一系列修饰,借此每种经修饰的产物可以作为“未修饰”的起始分子或实体进行后续修饰。

[1199] 载体:如本文所用,“载体”是转运、转导或以其它方式充当异源分子的携带者的任何分子或部分。本公开的载体可以重组产生并且可以基于和/或可以包含腺相关病毒(AAV)亲代或参考序列。此类亲代或参考AAV序列可以作为用于工程改造载体的原始、第二、第三或后续序列。在非限制性实例中,此类亲代或参考AAV序列可以包含以下序列中的任何一者或多者:编码多肽或多重多肽的多核苷酸序列,其具有可以是野生型或从野生型修饰的序列并且所述序列可以编码GCase蛋白及其变体的蛋白质、蛋白质结构域或一个或多个亚单位的全长或部分序列;编码GCase蛋白及其变体的多核苷酸,其具有可以是野生型或从野生型修饰的序列;以及编码GCase蛋白及其变体的转基因,其可能或可能不从野生型序列修饰。

[1200] 病毒构建体载体:如本文所用,“病毒构建体载体”是包含编码或包含Rep和/或Cap蛋白的一个或多个多核苷酸区的载体。病毒构建体载体还可以包含编码或包含用于病毒复制细胞中的病毒表达的组分的一个或多个多核苷酸区。

[1201] 病毒基因组:如本文所用,“病毒基因组”或“载体基因组”是包含至少一个反向末端重复(ITR)和至少一个经编码的有效载荷的多核苷酸。病毒基因组编码有效载荷的至少一个拷贝。

[1202] 野生型:如本文所用,“野生型”是生物分子、序列或实体的原生形式。

[1203] 实例

[1204] 本公开通过以下非限制性实例进一步说明。实例中所描述的实验确立基于AAV的增强型GCase基因疗法治疗优于和/或与基于GCase的野生型治疗相加,以改善GBA相关病症。

[1205] 细胞系、组织和动物模型

[1206] 体外实验:从Coriell获得来自GBA患者(所有3种类型)的人类成纤维细胞。基于显著耗尽的GCase活性(4-6%)以及年龄和种族匹配的健康对照成纤维细胞的可用性来选择以下戈谢病患者成纤维细胞:GM04394-成纤维细胞、GM00852-成纤维细胞、GM00877-成纤维细胞、来自皮肤/腹股沟区域的GM05758-成纤维细胞和来自皮肤/未指明的GM02937-成纤维细胞(全部可获自Coriell)。

[1207] GBA-4L/PS-NA初级神经元可以从来自QPS的怀孕GBA-4L/PS-NA女性产生。从Synthego获得GBA剔除(GBA-KO)成神经细胞瘤细胞系(IMR-32背景,可获自ATCC)。

[1208] 动物模型:GBA-4L/PS-NA小鼠模型(可在QPS获得):4L/PS-NA小鼠表达低水平的鞘脂激活蛋白原和鞘脂激活蛋白C,以及在位置V394L/V394L处具有点突变的GCase。早在5周龄时,内脏器官(如脾、胸腺、肺和肝)中的白细胞和巨噬细胞出现强烈肿大。大多数缺陷和肌肉强度降低伴随皮质中的神经炎症以及随动物年龄增长的海马体增加。葡萄糖神经酰胺和葡萄糖鞘胺醇显著增加。GBA-4L/PS-NA可以存活长达22周。截至8月龄,纯合Prnp-SNCA-A53T(M83)小鼠出现 α -syn聚集体和逐渐严重的运动表型。

[1209] 实例1.载体设计和合成

[1210] 产生表达包含编码人类GBA多肽的多核苷酸的有效载荷区的AAV病毒基因组。病毒基因组包含编码表1中提供的血清型的AAV衣壳的多核苷酸。启动子区调控有效载荷区的表达。通过使用泛在启动子(诸如CBA)达成广泛GBA分布,以在不同CNS细胞类型内达成转导。

[1211] 在AAV2 ITR内包装的泛在CBA启动子下产生单链密码子优化GBA cDNA序列(wtGBA)。产生增强型GBA(enGBA)构建体(参见实例2-5)并且与wtGBA进行比较。并行比较wtGBA和GFP报告载体,以测试体外实验和感染复数。基于载体化体外实验对最终AAV转基因设计作出提名,并且在所提议的体内模型中进行测试,包括用于GLP和耐受性研究的那些模型。

[1212] PD-GBA患者展现出CNS中GCase水平的整体降低。因此,靶向CSF、尾状核、黑质、皮质和小脑中的高GCase水平。尽管疾病病理学主要是神经元的,但预期治疗策略将通过交叉校正效益转导其它CNS细胞类型(例如,星状细胞)而得益。

[1213] 除PD-GBA以外,测试具有GBA突变的患者的继发性疾病适应症的功效,包括戈谢病(包括神经病性戈谢病)和路易体痴呆。

[1214] 测试如上文所描述而设计的转基因的质粒水平表达:所有盒在由侧接有AAV2 ITR的泛在CBA启动子驱动的单链AAV转基因组态中进行工程改造。对以下转基因构建体进行工程改造和合成:1) 密码子优化的GBA cDNA构建体;2) 包含GBA cDNA并且进一步编码同一转基因中的鞘脂激活蛋白原/鞘脂激活蛋白C的增强型GBA构建体(基于质粒水平表达分析选择最佳共激活基因和连接子序列以用于载体化);3) 包含细胞穿透肽的增强型GBA构建体;4) 包含溶酶体靶向肽(LTP)的增强型GBA构建体;以及5) 包含GBA cDNA、鞘脂激活蛋白序列、溶酶体靶向序列和/或细胞穿透肽序列的组组合增强型GBA构建体。

[1215] 以ITR质粒转染作为第一步在细胞培养物中测试这些构建体的表达/GCase活性。具体地,转染后48小时在CHO/HEK-293细胞中测试质粒。评定溶解产物和培养基两者的表达。基于结果,选择GBA转基因ITR盒(wt、enGBA和enGBAcombo构建体)用于在体外疾病模型设置中进行载体化和评估。

[1216] 在质粒水平表达/GCase活性确认后,将选定的AAV ITR盒(wtGBA、enGBA和enGBAcombo)包装至HEK 293小规模AAV6或AAV2制剂中,用于初始体外评估。

[1217] 实例2. SapC的共同施用增强GBA基因疗法

[1218] 还可以设计编码GBA蛋白的病毒基因组以进一步编码增强元件,例如,鞘脂激活蛋白原、鞘脂激活蛋白C蛋白或其功能变体。GCase共激活剂鞘脂激活蛋白C(SapC)是鞘脂激活蛋白前驱蛋白鞘脂激活蛋白原的裂解产物之一。鞘脂激活蛋白C是GCase溶酶体酶的必需激活剂。在PD-GBA和戈谢病的小鼠模型中,GBA和鞘脂激活蛋白C的功能损失的组合导致疾病表型显著恶化。因此,测试GBA(例如,编码GBA蛋白的病毒基因组,例如,包含SEQ ID NO: 1772、1773、1776、1777、1780或1781的核苷酸序列,或其功能变体)和编码鞘脂激活蛋白原蛋白的cDNA(例如,包含SEQ ID NO: 1750或1758的氨基酸序列的鞘脂激活蛋白原蛋白,或其功能变体;或由包含SEQ ID NO: 1858或1859的核苷酸序列编码,或其功能变体)或鞘脂激活蛋白C(SapC)蛋白或其功能变体(例如,包含SEQ ID NO: 1788、1789、1791或1792的氨基酸序列的SapC蛋白或其功能变体;或由SEQ ID NO: 1786、1787、1790或1791的核苷酸序列编码)的AAV介导的共同递送,以通过增强GCase酶的催化活性增加GBA基因疗法的效力。

[1219] 实例3. 细胞穿透肽增强细胞穿透/摄取

[1220] 还可以设计编码GBA蛋白的病毒基因组以进一步编码增强元件,例如,细胞穿透肽或其功能变体。不希望受理论约束,据信添加至本公开的转基因的GCase序列中的细胞穿透肽(CPP)信号使得循环中、脑脊液中和来自AAV转导细胞的间隙液中分泌的GCase产物的细

胞摄取增加;并且这种增强的细胞穿透因此增加分泌的GCase酶的交叉校正潜力。本文所用的示例性CPP包括:HIV源性TAT肽(例如,包含1794的氨基酸序列和/或由SEQ ID NO:1794的核苷酸序列编码)、人类载脂蛋白B受体结合结构域(例如,包含1796的氨基酸序列和/或由SEQ ID NO:1795的核苷酸序列编码),和/或人类载脂蛋白E-II受体结合结构域(例如,包含1798的氨基酸序列和/或由SEQ ID NO:1797的核苷酸序列编码)。

[1221] 实例4.CMA识别序列增强细胞内溶酶体靶向

[1222] 还可以设计编码GBA蛋白的病毒基因组以进一步编码增强元件,例如,溶酶体靶向序列或其功能变体。

[1223] 包括糖基化非依赖性溶酶体靶向肽(其为M-6-P非依赖性溶酶体靶向机制)的伴护蛋白序列已证明能够增强溶酶体酶产物的递送。GBA利用LIMP-2(由SCARB2基因编码)作为溶酶体表面受体(对于溶酶体定位是重要的)。SCARB2与GBA的共同递送提供增强GCase的溶酶体靶向的替代策略。将伴护蛋白介导的自噬信号并入本公开的转基因中以增加GCase酶的溶酶体靶向。分析伴护蛋白介导的自噬(CMA)路径的高度保守的识别序列,以改善GCase酶的溶酶体靶向。此类序列包括例如RNA酶A源性CMA识别序列、HSC70源性CMA识别序列或血红蛋白源性CMA识别序列。

[1224] 溶酶体靶向序列(LTS)还包括于编码本文所描述的GBA蛋白的病毒基因组中。本文所用的示例性LTS肽包括LTS1(例如,包含SEQ ID NO 1800的氨基酸序列和/或由SEQ ID NO:1799的核苷酸序列编码)、LTS2(例如,包含SEQ ID NO 1802的氨基酸序列和/或由SEQ ID NO:1801的核苷酸序列编码)、LTS3(例如,包含SEQ ID NO 1804的氨基酸序列和/或由SEQ ID NO:1803的核苷酸序列编码)、LTS4(例如,包含SEQ ID NO 1806的氨基酸序列和/或由SEQ ID NO:1805的核苷酸序列编码),和/或LTS5(例如,包含SEQ ID NO 1808的氨基酸序列和/或由SEQ ID NO:1807的核苷酸序列编码)。

[1225] 实例5.组合增强

[1226] 针对上述增强元件的组合(实例2-4)测试不同组合在体内相加或协同增加AAV介导的GCase酶递送效力的能力(通过增强的交叉校正、增强的溶酶体靶向、增强的催化活性的各种可能组合)。还将这些组合方法与参考转基因(SEQ ID NO:1759)针对各种上述结果进行比较。不希望受理论约束,据信转基因水平提高可以增加AAV基因疗法的效力并且减少体内评估和临床应用的最小有效剂量。

[1227] 实例6.体外筛选

[1228] 设计早期体外实验以能够通过参考GBA构建体(例如,SEQ ID NO:1759)进行并行比较来验证GBA转基因中获得的功能增强。实验作为AAV载体化转导研究对GBA LOF(患者成纤维细胞或GBA剔除小鼠初级神经元)的体外模型进行操作。确定剂量反应。还可以确定最终GCase产物的翻译后修饰和活性。

[1229] 使用包装wtGBA、enGBA和enGBAcombo的AAV载体对具有GBA突变的患者成纤维细胞和来源于WT和/或4L/PS-NA GBA小鼠模型的初级神经元进行体外评估。在制定所产生的所有AAV.GBA载体的3点剂量反应曲线时,对2个细胞系进行AAV6.CBA.Luciferase报告基因转导测定以验证最佳实验条件,例如,将应用于体外筛选的AAV6载体的感染复数(MOI)。一旦对体外实验进行优化,即可以进行头对头比较,以鉴定最佳enGBA转基因组态用于进一步体内评估。

[1230] AAV-enGBA或AAV-wtGBA构建体(例如,SEQ ID NO:1759-1771或1809-1828中的任一者,例如,如表18-21或29-32中所描述)针对GCase活性的体外剂量反应比较:为了确定GBA转基因增强策略是否在疾病相关体外模型中赋予增加的GCase活性,在3种不同MOI下用包装增强型GBA病毒基因组变体的AAV6载体处理具有和不具有GBA突变的人类成纤维细胞以及WT/GBA突变小鼠初级神经元。在终末时间点,在培养基和细胞溶解产物两者中测量分泌和细胞内GCase的表达和活性。另外,进行基于ddPCR的载体基因组分析,以确保在不同条件下成功进行体外基因转移。

[1231] 用于亚细胞定位的AAV-enGBA构建体的体外比较:确定GBA转基因增强策略是否在健康和疾病相关体外模型中赋予增加的溶酶体定位特性。用包装增强型GBA病毒基因组变体的AAV6载体处理具有/不具有GBA突变的人类成纤维细胞;以及WT/GBA突变小鼠初级神经元。在终末时间点,将细胞固定并且针对HA(AAV转导)和溶酶体标记物(例如,Lamp1)进行共免疫染色。使用Bio-Tek Cytation 5针对所有AAV载体评价溶酶体中的转导效率和%共定位,用于图像分析和定量。

[1232] 用于酶交叉校正的AAV-enGBA构建体的体外比较:除细胞内和分泌的GCase活性以外,评价AAV-GBA转基因增强策略在疾病相关体外条件下的交叉校正特性。用包装增强型GBA病毒基因组的AAV6载体处理非GBA/GBA人类成纤维细胞和GBA突变体/WT小鼠初级神经元。在AAV处理后24、48和72小时收集来自转导细胞的条件培养基。为了概括体内交叉校正,然后将未处理的人类成纤维细胞和小鼠初级神经元用不同条件培养基处理24小时。此时,将一小孔针对HA(交叉校正的GCase蛋白产物的可视化)和溶酶体标记物(例如,Lamp1)进行共免疫染色。使另一小孔溶解并且评估GCase活性。对于所有AAV载体处理,使溶酶体中的交叉校正效率和%共定位可视化并且进行定量。

[1233] 使用AAVwtGBA和AAVenGBA载体的体外GBA MOI剂量反应研究:包装wtGBA和enGBA构建体的最佳AAV衣壳的小规模制备。用wtGBA和enGBA包装AAV进行3点剂量反应感染研究。GBA-KO成神经细胞瘤细胞(wtGBA成神经细胞瘤对照)和戈谢病患者成纤维细胞(健康对照)用于评估。

[1234] 鉴定出选定的wtGBA或enGBA构建体用于体内进一步分析。

[1235] 实施例7.测定发展

[1236] 一种检测GCase活性的方法涉及测量人工底物4-甲基伞形酮基 β -D-半乳糖苷(4-MUG)的周转,如Rogers等,"Discovery,SAR, and biological evaluation of non-inhibitory chaperones of glucocerebrosidase." (2010)中所描述,所述文献以全文引用的方式并入本文中。4-MUG测定用于确定细胞溶解产物中的GCase活性和GCase浓度。

[1237] 另一种检测GCase活性的方法涉及根据制造商的说明书使用Sensolyte Blue葡萄糖脑苷脂酶测定(AnaSpec,Fremont,CA),一种荧光测定。Sensolyte Blue葡萄糖脑苷脂酶测定使用荧光类似物底物检测GCase活性,其中输出是在标准板读取器上在365nm/445nm下的荧光激发/发射。

[1238] 小鼠组织中hGBA的基于荧光的检测和小鼠中hGCase活性的评价可以使用如Morabito,Giuseppe等,"AAV-PHP.B-mediated global-scale expression in the mouse nervous system enables GBA gene therapy for wide protection from synucleinopathy."Molecular Therapy 25.12(2017):2727-2742中所描述的方法确定,

所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。使GCase活性可视化的替代方法描述于例如Chao, Daniela Herrera Moro等, "Visualization of active glucocerebrosidase in rodent brain with high spatial resolution following in situ labeling with fluorescent activity based probes." PLoS One 10.9 (2015) 中, 所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。还参见Witte, Martin D.等, Nature Chemical Biology 6, 907-13 (2010), 所述文献以全文引用的方式并入本文中, 其描述了基于“超敏感”环酚醇 β -氧化物(CBE)的探针, 用于体外和体内高度特异性GBA标记。GCase抑制剂CBE不可逆地结合GBA并且抑制其GCase活性, 已显示跨过血脑屏障, 并且诱导戈谢病的生物化学、临床和组织学表现(Kuo, Chi-Lin等, "In vivo inactivation of glycosidases by conduritol Bepoxide and cyclophellitol as revealed by activity-based protein profiling." The FEBS journal 286.3 (2019) :584-600, 以全文引用的方式并入本文中)。

[1239] 对于这些测定, 确定GCase/GBA蛋白浓度和活性, 并且针对溶解产物中的总蛋白质/活性水平进行归一化。从例如媒剂(PBS)处理的6-8周C57/B16雌性小鼠($n=4$)的海马体和脑干制备阴性对照溶解产物。阳性对照溶解产物来自人类重组GBA感染/表达细胞。抑制剂对照溶解产物来自人类重组GBA+GBA抑制剂感染/表达细胞以测试酶的特异性。用于此类研究的示例性GCase抑制剂是CBE。媒剂/溶剂缓冲液/基质对照仅由溶解缓冲液(Sigma)和底物组成。背景对照仅由底物组成。通过分析溶解产物的额外稀释液来确定观察GCase活性所需的最低蛋白质浓度。

[1240] 验证用于评估AAV施用后在体外GBA疾病模型(戈谢病患者成纤维细胞和GBA-KO成神经细胞瘤细胞)内葡萄糖神经酰胺酶活性和葡萄糖神经酰胺酶蛋白浓度的增加的测定。

[1241] 实例8. 体内筛选

[1242] GBA疾病模型中的体内标靶啮合: 体外筛选后, 证明GBA小鼠模型(GBA-4L/PS-NA)中的标靶啮合。与AAV-wtGBA的并行比较可以用于进一步支持发现并且证明体内功效。体内评估确定了在体外评估期间选择的AAV9-enGBA和AAV9-enGBAcombo候选治疗是否引起与GBA小鼠模型中的AAV9-GBA参考构建体相比可比/显著较高的GCase活性以及GluCer减少和葡萄糖鞘胺醇底物水平降低效益。

[1243] 与使用GBA 4L/PS-NA小鼠模型(可在QPS获得)的GBA参考构建体相比, 测试至多10个具有显著有利属性的顶级enGBA构建体。AAV未处理的非转基因(NT)小鼠用作生物化学分析的对照。GBA-4L/PS-NA小鼠显示人类GBA突变的相关特征, 包括早在出生后5周显著降低的GCase活性以及增加的葡萄糖神经酰胺和葡萄糖鞘胺醇。在这些小鼠中还观察到CTx和海马体中的神经炎症。

[1244] 为了评价GBA疾病模型中的标靶啮合, 经由双侧注射进行三个剂量 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} vg/注射的包装GBA参考构建体和至多10个顶级增强型GBA变异病毒基因组的AAV9载体的纹状体内施用。注射后4周对动物实施安乐死, 收集CNS、外周组织和流体区室(血清和CSF)用于AAV生物分布和转导(GCase活性和GluCer底物水平)分析。成功/先导候选物引起GBA动物模型中的GCase活性适度增加(超过基线约30%)。包括未处理的品系和年龄匹配的WT小鼠以比较健康动物中GCase和GluCer的生理水平。因此, 纹状体内enGBA/enGBAcombo治疗引起GBA突变小鼠的CNS组织和CSF中的GCase酶水平与GBA参考构建体相比等效/优越的生理恢复。伴随地还对用于底物还原的不同处理的葡萄糖神经酰胺或糖基鞘胺醇水平进行

类似比较。已推进至多3种顶级AAV9-enGBA治疗用于功效研究。

[1245] 实例9. 体内功效评估

[1246] 剂量选择: 基于GBA-PD的鼠类疾病模型中的读出, 针对GCase表达、靶啮合和功效来评估实例2-5中鉴定的体内靶啮合选中物。对于确定体内研究的功效, 使用GBA-4L/PS-NA和SNCA-A53T (M83) 小鼠两者; WT动物作为对照进行比较。两种小鼠模型 (GBA-4L/PS-NA和M83), 每组n=6-10只小鼠, 接受 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} vg/注射 (或其它基于研究结果的适当浓度) 的顶级选中物的双侧纹状体内注射。给药后4或8周对小鼠实施安乐死。收集CNS和外周组织以及流体样品, 包括皮质、纹状体、丘脑、脑干、小脑、CSF、血清和肝脏。测量GCase表达和活性以及GluCer底物水平。使用小鼠脑、脊髓和肝脏的Iba1、GFAP和H&E染色进行早期免疫组织化学读出, 以确认各种AAV剂量下的耐受性。

[1247] 功效评估将确定AAV-enGBA候选治疗是否引起脑中GCase活性的有效和持续增加, 从而引起GBA-4L/PS-NA小鼠模型内的GCase底物减少。基于剂量选择研究, 在时间-反应研究中进一步测试耐受性良好并且显示相关CNS组织中GBA蛋白表达增加>30%的AAV载体。简单地说, 使用先导构建体 (基于剂量选择研究确定剂量) 的纹状体内注射来注射GBA-4L/PS-NA小鼠 (n=6-10), 在各个时间点 (例如, 4、8和12周) 收集多个CNS和外周组织以及流体区室 (血清和CSF), 并且定量GCase表达和活性、CNS和外周中的底物减少。使用AAV转导与溶酶体标记物的免疫共定位来确认转导的GCase酶产物的溶酶体定位。

[1248] 进一步评估将评价AAV-enGBA候选治疗是否引起脑中GCase活性的有效和持续增加, 从而引起GBA1/ α -突触核蛋白A53T小鼠模型内的 α -Syn病变减少。基于剂量选择研究, 在SNCA-A53T (M83) 小鼠模型中进一步测试耐受性良好并且显示相关CNS组织中GBA蛋白表达增加>30%的AAV载体。已知M83小鼠在6-7月龄时开始发展 α -syn病变, 伴有渐进性运动缺陷。在约6月龄向M83小鼠 (n=8-12) 注射最有效构建体 (纹状体内; 剂量根据研究结果); 并且评估GCase表达和活性, 以及施用后3个月的 α -syn病变。先前研究已显示AAV-GBA在减少SNCA转基因小鼠模型中的 α -syn聚集体中的治疗效益。在此, 除GCase表达和活性以外, 使用免疫组织化学分析针对A53T (M83) 小鼠中的 α -syn病变减少来评估引起CNS组织和CSF中的GCase酶水平的生理恢复 (>30%) 的AAV-enGBA候选治疗。

[1249] 实例10. 自然史研究

[1250] 与第1阶段筛选工作同时, 对4L/PS-NA、4L对照和野生型小鼠进行表型、生物化学和免疫组织化学分析, 以建立疾病相关功效读出和时间线。

[1251] 通过LC-MS/MS在小鼠的前脑、中脑和后脑切片中确定GBA和鞘脂激活蛋白C表达水平, 并且针对肌动蛋白水平进行归一化。在5、12和18周龄一致地, 在所有脑部区域中, 4L/PS-NA小鼠与野生型小鼠相比具有较低GBA表达水平, 并且具有与4L小鼠类似的GBA表达水平 (表23)。野生型小鼠的脑部一般显示后脑中的GBA表达相对于前脑、中脑增加的趋势 (表23)。另外, 在5周龄与12-18周龄之间的野生型小鼠中观察到前脑和中脑中的GBA水平降低。

[1252] 表23: GBA相关疾病小鼠模型中的平均GBA水平 (GBA/肌动蛋白)

动物模型	5 周			12 周			18 周		
	脑部区域			脑部区域			脑部区域		
	前脑	中脑	后脑	前脑	中脑	后脑	前脑	中脑	后脑
[1253] 4L/PS-NA	473.5	715.2	996.7	591.0	760.5	779.0	801.8	726.6	907.6
4L 对照	687.5	676.8	939.8	614.5	764.9	702.8	512.3	691.8	1094.2
野生型	3463.2	3644.1	5377.4	2616.6	2902.2	4468.3	2551.3	3273.6	5129.8

[1254] 在前脑、中脑和后脑中,4L/PS-NA小鼠中的鞘脂激活蛋白C (SapC) /肌动蛋白水平低于4L或野生型小鼠中所观察的那些(表24)。SapC水平在野生型小鼠的脑中增加,在18周龄时定量最高水平(表24)。

[1255] 表24:GBA相关疾病小鼠模型中的平均SapC水平(SapC/肌动蛋白)

动物模型	5 周			12 周			18 周		
	脑部区域			脑部区域			脑部区域		
	前脑	中脑	后脑	前脑	中脑	后脑	前脑	中脑	后脑
[1256] 4L/PS-NA	232.1	289.6	430.6	315.8	432.1	523.3	227.5	552.8	591.4
4L 对照	748.6	1102.9	1769.3	844.2	1486.5	1506.3	646.5	1123.6	1546.4
野生型	1500.3	2283.3	3087.9	1662.3	1971.0	2968.9	1656.3	2143.9	3253.1

[1257] 在5周、12周和18周龄,在4L/PS-NA(GCase和鞘脂激活蛋白原减少的模型)、4L对照(GCase减少的模型)和野生型(正常GCase和鞘脂激活蛋白原)小鼠的前脑、中脑和后脑组织切片中还测量了GCase活性(表7)。

[1258] 在5周龄,在4L/PS-NA和4L对照小鼠两者中均确认GCase活性降低,与野生型小鼠相比具有显著GCase缺陷。GCase活性在4L/PS-NA与4L对照小鼠之间无显著差异(表7)。

[1259] 表7:GBA相关疾病小鼠模型中的平均GCase活性[RFU/mL]

动物模型	5 周			12 周			18 周		
	脑部区域			脑部区域			脑部区域		
	前脑	中脑	后脑	前脑	中脑	后脑	前脑	中脑	后脑
[1260] 4L/PS-NA	4318.36	6448.92	5581.51	6343.1	6423.7	5386.7	4109.2	6466.4	5981.6
4L 对照	4442.15	5614.69	5598.62	4969.0	4640.2	6798.4	5837.2	5915.6	8310.4
野生型	9531.29	10448.20	10520.70	8379.2	7596.1	9286.1	5488.1	9730.8	8227.2

[1261] 类似地,在12和18周龄小鼠中,在4L/PS-NA和4L对照小鼠两者中均定量GCase活性降低,与野生型小鼠相比具有显著GCase缺陷(表7)。在12和18周龄,GCase活性在4L/PS-NA与4L对照小鼠之间也无显著差异(表7)。

[1262] 此外,在5周、12周和18周龄,通过LC-MS/MS在4L/PS-NA(GCase和鞘脂激活蛋白原减少的模型)、4L对照(GCase减少的模型)和野生型(正常GCase和鞘脂激活蛋白原)小鼠的前脑、中脑和后脑组织切片中测量GBA底物水平,特别是葡萄糖鞘胺醇(GlcSph)和葡萄糖神经酰胺(GlcCer),并且针对肌动蛋白进行归一化。如表25中所示,相对于野生型小鼠,在4L/PS-NA小鼠的脑,继而在4L对照小鼠的脑中观察到GlcSph水平的最大增加。另外,4L/PS-NA小鼠脑和4L对照小鼠脑中的GlcSph水平随着年龄增长而增加,并且与前脑或中脑相比,在后脑中观察到更高水平。如上文所测量,这些数据证明了这些小鼠中的GCase活性降低和GBA水平降低的影响。

[1263] 表25:GBA相关疾病小鼠模型中的平均葡萄糖鞘胺醇水平(GlcSph/肌动蛋白)

动物模型	5 周			12 周			18 周		
	脑部区域			脑部区域			脑部区域		
	前脑	中脑	后脑	前脑	中脑	后脑	前脑	中脑	后脑
[1264] 4L/PS-NA	1086.1	1050.9	1384.0	1792.6	1897.0	2543.6	2571.0	3113.1	5672.8
4L 对照	268.0	317.0	308.7	404.5	435.2	520.1	465.8	453.4	455.1
野生型	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[1265] 如表26中所示,在4L/PS-NA小鼠脑中GlcCer水平提高,并且与前脑和中脑相比,后脑中的水平更高。在18周龄,4L/PS-NA小鼠脑中的GlcCer水平也更高。如上文所测量,这些数据也支持这些小鼠中的GCase活性降低和GBA水平降低的影响。

[1266] 表26:GBA相关疾病小鼠模型中的平均葡萄糖神经酰胺 (GlcCer) 18:1/18:0/肌动蛋白

动物模型	5 周			12 周			18 周		
	脑部区域			脑部区域			脑部区域		
	前脑	中脑	后脑	前脑	中脑	后脑	前脑	中脑	后脑
[1267] 4L/PS-NA	2179.2	1875.6	2247.5	7894.8	6425.0	12123.0	14774.5	15368.6	25601.5
4L 对照	695.8	528.6	454.7	703.2	547.7	488.9	738.6	627.3	545.8
野生型	510.4	361.9	332.2	375.6	359.0	355.7	517.9	439.6	374.2

[1268] 综上所述,这些数据支持使用4L/PS-NA小鼠作为神经性戈谢病模型,并且用于评价编码GBA蛋白的病毒构建体,例如构建体GBA_VG1-GBA_VG34的功效,例如,如上表18-21或表29-32中所描述。

[1269] 实例11:示例性先导鉴定

[1270] A.产生野生型和增强型GBA病毒基因组变体

[1271] 病毒基因组经设计用于GBA蛋白的AAV递送,例如,不另外包含增强元件的野生型GBA蛋白(wtGBA);或还包含本文所描述的增强元件的增强型GBA蛋白(enGBA),例如鞘脂激活蛋白原蛋白、SapC蛋白或其功能变体;细胞穿透肽(例如,ApoEII肽、TAT肽和/或ApoB肽)或其功能变体;溶酶体靶向信号(LTS)或其功能变体;或它们的组合(enGBAcombo)。包含编码带有或不带有增强元件的GBA蛋白的转基因的病毒基因组构建体从5' ITR至3' ITR的核苷酸序列在本文中以GBA_VG1-GBA_VG33提供,分别为SEQ ID NO:1759-1771、1809-1828或1870。这些构建体还概述于表18以及表19-21和表29-32中。

[1272] 这些病毒基因组构建体中的每一者包括包含编码GBA蛋白的转基因的核酸。转基因经设计以包含编码GBA(SEQ ID NO:1777)的野生型核苷酸序列,或编码GBA蛋白的两个不同密码子优化核苷酸序列之一,SEQ ID NO:1773或1781。在设计用于表达GBA的这些病毒基因组构建体中,选择和测试若干启动子(例如,表5中所描述的启动子),包括CMV启动子(SEQ ID NO:1833);CMVie增强子和CMV启动子(分别为SEQ ID NO:1831和1832);CMVie增强子和CBA启动子(分别为SEQ ID NO:1831和1834);或EF-1a启动子变体(SEQ ID NO:1839或1840)。

[1273] 一些病毒基因组构建体还包含SEQ ID NO:1842的内含子区;编码信号序列的核苷酸序列(SEQ ID NO:1850、1851或1852);和/或由间隔子(SEQ ID NO:1848)分隔的miR183结合位点(SEQ ID NO:1847)的4个拷贝,或miR183结合系列(SEQ ID NO:1849)。病毒构建体包含SEQ ID NO:1829的5' ITR;以及SEQ ID NO:1830的3' ITR。聚腺苷酸化序列(SEQ ID NO:1846)在所有设计的病毒基因组构建体中都是相同的。

[1274] 编码GBA蛋白的野生型GBA病毒基因组变体如所描述而制备并且在表18-21或表29-32中概述(例如,GBA_VG1、GBA_VG17-GBA_VG21、GBA_VG26和GBA_VG33;SEQ ID NO:1759、1812-1816、1821和1828)。

[1275] 制备编码GBA蛋白和本文所描述的增强元件(例如,表4或表16的增强元件)的增强型GBA病毒基因组变体并且在表18中概述(GBA_VG2-GBA_VG16、GBA_VG22-GBA_VG25、GBA_VG27-GBA_VG32;SEQ ID NO:1760-1771、1809-1811、1817-1820、1822-1827)。增强型病毒基因组经设计以进一步编码增强元件,所述增强元件包含鞘脂激活蛋白原蛋白(由SEQ ID NO:1859编码);鞘脂激活蛋白C蛋白或功能变体(由SEQ ID NO:1787或1791编码);细胞穿透肽,包括ApoEII肽(由SEQ ID NO:1797编码)、TAT蛋白(由SEQ ID NO:1793编码)或ApoB肽(由SEQ ID NO:1795编码);溶酶体靶向信号(LTS)(由SEQ ID NO:1799、1801、1803、1805或1807中的任一者编码);或它们的组合。一些增强型病毒基因组构建体还包含编码信号序列(例如,SEQ ID NO:1856)的核苷酸序列,和/或连接子(例如,SEQ ID NO:1724、1726或1730)。一些构建体,例如编码鞘脂激活蛋白原蛋白或鞘脂激活蛋白C蛋白的那些,编码可裂解连接子,诸如弗林蛋白酶和/或T2A裂解位点(分别由SEQ ID NO:1724或1726编码)。一些构建体,例如编码细胞穿透肽的那些,编码柔性甘氨酸-丝氨酸连接子(由SEQ ID NO:1730编码)。

[1276] 包含SEQ ID NO:1781的核苷酸序列而不带有额外增强元件(例如,鞘脂激活蛋白、溶酶体靶向序列、细胞穿透序列或它们的组合)的病毒构建体GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)用作参考或基准构建体,例如,在本文所描述的实验中。

[1277] B.有效载荷表达的体外评价

[1278] 在载体化之前,野生型和增强型GBA病毒基因组变体首先用于验证进行先导鉴定研究所必需的工具,诸如但不限于测定和细胞系统。

[1279] 建立LC-MS/MS测定以定量从野生型或增强型GBA病毒基因组变异质粒DNA转染的HEK293细胞收集的溶解产物中的GBA(ng/mg总蛋白)和SapC(ng/mg总蛋白),所述质粒DNA包括GBA_VG1(SEQ ID NO:1759,编码GBA蛋白)、GBA_VG8(SEQ ID NO:1766,编码SEQ ID NO:1785的GBA蛋白和鞘脂激活蛋白原蛋白)、GBA_VG9(SEQ ID NO:1767,编码SEQ ID NO:1789的GBA和鞘脂激活蛋白C蛋白)和GBA_VG10(SEQ ID NO:1768,编码SEQ ID NO:1758的GBA蛋白和鞘脂激活蛋白C蛋白)。还对溶解产物进行免疫印迹法以确认所表达的GBA的存在。

[1280] 这些验证实验证明,如通过LC-MS/MS和免疫印迹法确定,与未转染细胞的溶解产物相比,用野生型或增强型GBA变异构建体DNA转染细胞引起溶解产物中测量的GBA或SapC增加。

[1281] C.体外细胞系统评价和验证

[1282] 额外LC-MS/MS测定用于在源自戈谢病患者的成纤维细胞(GM04394-成纤维细胞(GD1患者)、GM00852-成纤维细胞(GD1患者)、GM00877-成纤维细胞(GD2患者)或健康对照(来自皮肤/腹股沟区域的GM05758-成纤维细胞和来自皮肤/未指明的GM02937-成纤维细胞)中定量GCase活性和/或GBA底物水平(例如,糖鞘脂(GlcSph)在图1A中定量为ng/mg肌动蛋白,或在图1B中定量为ng/mg Lamp 1)。再次,用免疫印迹分析补充这些定量。

[1283] 正如预期,GBA底物水平,特别是糖鞘脂,在图1A中定量为ng/mg肌动蛋白或在图1B中定量为ng/mg Lamp 1,当通过LC-MS/MS测量时,与对照成纤维细胞水平相比,在所有三个

源自戈谢病患者的成纤维细胞样品中都增加(图1A-1B)。与此同时,与健康对照相比,GD患者成纤维细胞中的GBA蛋白检测(测量为细胞溶解产物中的GBA相对于总蛋白的浓度(ng/mg总蛋白))减少(图1C)。

[1284] 从增强型GBA病毒基因组变体转染的源自戈谢病患者的成纤维细胞收集的溶解产物中的GCase活性定量测量为相对荧光单位/ng蛋白质(RFU/ng蛋白质),并且与正常对照的平均值相比,显示降低96.5%、98.4%和99.2%(分别为GM04394-成纤维细胞、GM00852-成纤维细胞、GM00877-成纤维细胞)。数据示于下表8中。

[1285] 表8:源自戈谢病患者的成纤维细胞中的平均GCase活性[RFU/ng蛋白质]

成纤维细胞系	GCase活性
GM04394	465.53
GM00852	221.29
GM00877	109.44
GM05758(对照)	14997.59
GM02937(对照)	11750.07

[1287] 从增强型GBA病毒基因组变体转染的源自戈谢病患者的成纤维细胞收集的溶解产物中的GBA底物定量测量为葡萄糖鞘胺醇/Lamp1(ng/mg Lamp1),并且与对照相比显示出增加。数据示于下表9中。

[1288] 表9:源自戈谢病患者的成纤维细胞中的平均葡萄糖鞘胺醇(ng/mg Lamp1)

成纤维细胞系	葡萄糖鞘胺醇
GM04394	716.33
GM00852	710.67
GM00877	4348.00
GM05758(对照)	146.00
GM02937(对照)	134.5

[1290] D. 体外包装至AAV粒子中以及衣壳选择

[1291] 将野生型和增强型GBA病毒基因组变体(GBA_VG1至GBA_VG13;SEQ ID NO:1759-SEQ ID NO:1771)各自包装至AAV2或AAV6衣壳中。

[1292] 进行体外衣壳选择研究,其中在一系列增加的MOI(1.00E1、1.00E2、1.00E3、1.00E4、1.00E5和1.00E6)下用包含包装于AAV2或AAV6中的增强型GBA病毒基因组变体的AAV粒子转导细胞,并且定量每个细胞的载体基因组。基于转导效率,选择AAV2用于进一步研究。

[1293] E. 体外剂量范围发现研究

[1294] 在剂量范围发现研究中筛选包含参考病毒基因组GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)的AAV粒子,其中在一系列增加的MOI(1.00E1、1.00E2、1.00E3、1.00E4、1.00E5和1.00E6)的MOI下转导细胞的后定量GCase活性。基于这些发现,选择1.00E3的中等范围MOI用于进一步研究。

[1295] F. 戈谢病患者成纤维细胞中的AAV2-GBA转导

[1296] 在MOI 1.00E3下向戈谢病患者成纤维细胞(GM00877-成纤维细胞)施用包含病毒基因组GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG2(SEQ ID NO:1760)、GBA_VG3(SEQ ID NO:

1761)、GBA_VG4 (SEQ ID NO:1762)、GBA_VG5 (SEQ ID NO:1763)、GBA_VG6 (SEQ ID NO:1764)、GBA_VG7 (SEQ ID NO:1765)的AAV2-GBA粒子,并且定量GCase活性并针对mg蛋白质进行归一化。结果示于下表10中。

[1297] 表10. 戈谢病患者成纤维细胞中的GCase活性

构建体 ID	SEQ ID NO:	GCase 活性 [RFU/mL]
GBA_VG1	1759	9814.48
		16616.84
		3686.62
		3478.15
平均值		8399.02
GBA_VG2	1760	6375.98
		3150.89
		7426.56
		-
平均值		5651.14
GBA_VG3	1761	11580.6
		22812.97
		14152.31
		-
平均值		16181.96
GBA_VG4	1762	10963.45
		11695.58
		7980.39
		-
平均值		10213.14
GBA_VG5	1763	17076.48
		8665.12
		16343.61
		-
平均值		14028.40
GBA_VG6	1764	5117.13
		3391.47
		4177.62
		-
平均值		4228.74
GBA_VG7	1765	9842.00
		9366.20
		13187.36
		-
平均值		10798.52

[1300] 免疫印迹分析进一步确认了那些样品中的约70kD成熟GBA蛋白经AAV2增强的GBA粒子转导。在未经AAV2增强的GBA粒子转导的源自戈谢病患者的成纤维细胞样品中GBA可忽

略不计。

[1301] 将包含编码GBA蛋白和诸如鞘脂激活蛋白C蛋白、溶酶体靶向信号(LTS)、细胞穿透肽(CPP)或它们的组合的增强元件的病毒基因组构建体的额外AAV2粒子(例如,如上表18中所概述)载体化用于在 $10^{3.5}$ 的MOI下在源自戈谢病(GD)患者的成纤维细胞(GD-II GM00877)中进行筛选。载体化病毒基因组构建体包括GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG9(SEQ ID NO:1767)、GBA_VG10(SEQ ID NO:1768)、GBA_VG11(SEQ ID NO:1769)、GBA_VG6(SEQ ID NO:1764)、GBA_VG7(SEQ ID NO:1765)、GBA_VG12(SEQ ID NO:1770)、GBA_VG3(SEQ ID NO:1761)、GBA_VG4(SEQ ID NO:1762)、GBA_VG5(SEQ ID NO:1763)和GBA_VG13(SEQ ID NO:1771)。在团化患者细胞(图2A)和相应条件培养基(图2B)中定量GCCase活性,作为相对荧光单位/mg蛋白质(RFU/mg蛋白质)。用载体化病毒基因组构建体中的六者(GBA_VG9、GBA_VG6、GBA_VG7、GBA_VG3、GBA_VG4和GBA_VG5)处理引起在团化GD患者成纤维细胞(图2A)和相应条件培养基(图2B)中测量的GCCase活性增加。

[1302] LC-MS/MS测定然后用于定量来自病毒基因组构建体转导的源自GDII患者的成纤维细胞的细胞溶解物中的GBA底物葡萄糖鞘胺醇水平(GlcSph,ng/mg Lamp1),所述病毒基因组构建体是在AAV2粒子中载体化的GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG9(SEQ ID NO:1767)、GBA_VG6(SEQ ID NO:1764)、GBA_VG7(SEQ ID NO:1765)、GBA_VG3(SEQ ID NO:1761)、GBA_VG4(SEQ ID NO:1762)和GBA_VG5(SEQ ID NO:1763)。如图3中所示,与无AAV对照相比,用AAV2GBA载体转导的源自GD患者的成纤维细胞中GBA底物水平的积累显著降低。数据证明了AAV介导的基因疗法可以有效增加GCCase活性,以治疗与GBA缺陷相关的疾病。

[1303] 实例12:含有增强元件组合的AAV2增强的GBA载体

[1304] 产生额外病毒基因组构建体,其编码GBA蛋白,其中GBA蛋白由SEQ ID NO:1777的野生型核苷酸序列或SEQ ID NO:1773的密码子优化核苷酸序列编码;并且进一步编码增强元件,诸如细胞穿透肽(CPP)(例如,ApoEII)、溶酶体靶向序列(例如,LTS2)、SapC蛋白或它们的组合。这些构建体还包含不同启动子,包括CBA、CMV或CAG启动子。这些示例性GBA病毒基因组构建体包括于表18-20中。

[1305] 在 $10^{2.5}$ (第一条)、 10^3 (第二条)、 $10^{3.5}$ 和 10^4 的MOI下,用包含病毒基因组构建体的AAV2载体转导GD-II患者成纤维细胞(GM00877),所述病毒基因组构建体是:GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG14(SEQ ID NO:1809)、GBA_VG15(SEQ ID NO:1810)、GBA_VG16(SEQ ID NO:1811)、GBA_VG17(SEQ ID NO:1812)、GBA_VG18(SEQ ID NO:1813)、GBA_VG19(SEQ ID NO:1814)和GBA_VG20(SEQ ID NO:1815)。在溶解经处理的患者细胞后在转导后第7天定量GCCase活性(图4A),作为相对荧光单位/mg蛋白质(RFU/mg蛋白质)。如图4A中所示,所测试的所有病毒基因组构建体都引起源自GDII患者的成纤维细胞中的GCCase活性的剂量反应性增加。在 10^4 的MOI下,与包含可操作地连接至编码GBA蛋白的SEQ ID NO:1781的核苷酸序列的CMVie增强子和CBA启动子的GBA_VG1构建体相比,包含可操作地连接至编码AAV2载体中载体化的GBA蛋白的SEQ ID NO:1773的密码子优化核苷酸序列的CAG启动子的GBA_VG20构建体显示显著更高的GCCase活性。

[1306] LC-MS/MS测定然后用于定量来自病毒基因组构建体转导的源自GD II患者的成纤维细胞的细胞溶解物中的GBA底物葡萄糖鞘胺醇水平(GlcSph,ng/mg Lamp1),所述病毒基因组构建体是在AAV2载体中载体化的GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)、GBA_VG14(SEQ ID NO:

1809)、GBA_VG15 (SEQ ID NO:1810)、GBA_VG16 (SEQ ID NO:1811)、GBA_VG17 (SEQ ID NO:1812)、GBA_VG18 (SEQ ID NO:1813)、GBA_VG19 (SEQ ID NO:1814) 和GBA_VG20 (SEQ ID NO:1815)。如图4B中所示,所测试的所有病毒基因组构建体都减少GBA底物的积累,指示GD患者细胞内的靶蛋白合成成功。

[1307] 实例13:编码GBA蛋白的野生型和密码子优化序列的生物信息学分析

[1308] 进行序列水平的生物信息学分析以区分编码GBA蛋白的病毒基因组构建体,其中GBA蛋白由以下编码:SEQ ID NO:1777的野生型核苷酸序列(例如,编码GBA_VG21的GBA蛋白的核苷酸序列,如表18中所示)、SEQ ID NO:1773的第一密码子优化核苷酸序列(例如,编码GBA_VG17的GBA蛋白的核苷酸序列,如表18-20中所示),或SEQ ID NO:1781的第二密码子优化序列(编码GBA_VG1的GBA蛋白的核苷酸序列,如表18中所示)。简单地说,使用基于mRNA的序列分析工具(ReeRNA 2.0,Chang等,2013,BMC Bioinformatics,14,增刊2:S4;miRDB,Chen和Wang,2020,Nucleic Acids Res,48(D1):D127-D131;每篇文献的内容以全文引用的方式并入本文中)评价序列水平区分准则,诸如GC含量、RNA可及性、miRNA结合、转录基元和剪接事件。

[1309] 基于使用miRDB(Chen和Wang,2020,同上)关于miRNA结合的上述分析,在具有编码SEQ ID NO:1773的GBA蛋白的第一密码子优化核苷酸序列(GBA_VG17)的构建体中发现一系列推定识别位点。具体地,SEQ ID NO:1773的这个密码子优化序列具有42个总miRNA结合位点,包括4个高置信度选中物。其中,21个位点与GBA_VG1的SEQ ID NO:1781的第二密码子优化序列不同,并且11个位点是新的并且不存在于GBA_VG21的SEQ ID NO:1777的野生型核苷酸序列中。这概述于表11中。如表28中所示,第二个miRNA分析工具(ReeRNA 2.0,Chang等,2013同上)进一步确认了miRNA结合位点对于所分析的各序列密码子优化序列往往是独特的。

[1310] 表11.miRNA结合的miRDB汇总

	WT (SEQ ID NO: 1777)对比 SEQ ID NO: 1781	WT (SEQ ID NO: 1777)对比 SEQ ID NO: 1773	SEQ ID NO: 1773对比 SEQ ID NO: 1781	“高置信度”miRNA
[1311] SEQ ID NO: 1773 (GBA_VG17) 独特	N/A	30	21	4
野生型(SEQ ID NO: 1777) (GBA_VG21) 独特	42	41	N/A	1
SEQ ID NO: 1781 (GBA_VG1) 独特	27	N/A	17	2
相似	11	12	21	0

[1312] 表28.miRNA结合的RegRNA 2.0汇总

[1313]

	WT (SEQ ID NO: 1777)对比 SEQ ID NO: 1781	WT (SEQ ID NO: 1777)对比 SEQ ID NO: 1773	SEQ ID NO: 1773 对比 SEQ ID NO: 1781
SEQ ID NO: 1781 (GBA_VG1) 独特	3	N/A	3
SEQ ID NO: 1773 (GBA_VG17) 独特	N/A	2	3
WT (SEQ ID NO: 1777) (GBA_VG21) 独特	6	6	N/A
相似	0	1	0

[1314] 关于转录基元的分析,GBA_VG17中的SEQ ID NO:1773的第一密码子优化序列总共具有70个位点;32个位点与GBA_VG1中的SEQ ID NO:1781的第二密码子优化序列不同,并且54个位点是新的并且不存在于GBA_VG21中的SEQ ID NO:1777的野生型序列中(表12)。

[1315] 表12. 调控基元的RegRNA 2.0汇总

[1316]

	WT (SEQ ID NO: 1777)对比 SEQ ID NO: 1781	WT (SEQ ID NO: 1777)对比 SEQ ID NO: 1773	SEQ ID NO: 1773 对比 SEQ ID NO: 1781
SEQ ID NO: 1781 (GBA_VG1) 独特	49	N/A	24
SEQ ID NO: 1773 (GBA_VG17) 独特	N/A	54	32
野生型(SEQ ID NO: 1777) (GBA_VG21) 独特	39	34	N/A
相似	11	16	38

[1317] 关于剪接事件分析,GBA_VG17中的SEQ ID NO:1773的第一密码子优化序列总共具有5个位点;3个位点与GBA_VG1中的SEQ ID NO:1781GBA序列的第二密码子优化序列不同,并且所有3个这些位点都是全新的并且不存在于GBA_VG21中的SEQ ID NO:1777的野生型序列中(表13)。

[1318] 表13.RegRNA 2.0剪接事件的汇总

[1319]

	WT (SEQ ID NO: 1777)对比 SEQ ID NO: 1781	WT (SEQ ID NO: 1777)对比 SEQ ID NO: 1773	SEQ ID NO: 1773 对比 SEQ ID NO: 1781
野生型(SEQ ID NO: 1777) (GBA_VG21) 独特	6	6	N/A
SEQ ID NO: 1773 (GBA_VG17) 独特	N/A	5	3
SEQ ID NO: 1781 (GBA_VG1) 独特	3	N/A	2
相似	1	0	2

[1320] 将第一密码子优化序列 (SEQ ID NO:1773) 的GC含量与第二密码子优化序列 (SEQ ID NO:1781) 和野生型序列 (SEQ ID NO:1777) 进行比较。对于RNA可及性和GC含量,在GBA_VG17的SEQ ID NO:1773的第一密码子优化序列中维持野生型GC生物分布模式(图5)。然而,SEQ ID NO:1781的第二密码子优化序列 (GBA_VG1) 在核苷酸序列的整个长度上具有平衡的GC含量(图5)。

[1321] SEQ ID NO:1781 (GBA_VG1) 和SEQ ID NO:1773 (GBA_VG17) 相对于野生型序列 (SEQ ID NO:1777;GBA_VG21) 的百分比同源性示于表14中。GBA_VG17中的SEQ ID NO:1773的第一密码子优化序列相对于GBA_VG21中的SEQ ID NO:1777的野生型序列在不具有和具有信号序列的情况下分别共享约80.6%和约80.0%的序列同源性。GBA_VG1中的第二密码子优化序列 (SEQ ID NO:1781) 相对于野生型GBA序列在不具有和具有信号序列的情况下分别共享约81.3%和约80.7%的序列同源性。GBA_VG17中的SEQ ID NO:1773的第一密码子优化序列相对于GBA_VG1中的SEQ ID NO:1781的第二密码子优化核苷酸序列在不具有和具有信号序列的情况下分别具有约87.0%和约86.3%的序列同源性。相对于SEQ ID NO:1777的野生型核苷酸序列 (GBA_VG21), 有131个独特突变引入SEQ ID NO:1773的第一密码子优化核苷酸序列 (GBA_VG17) 中。SEQ ID NO:1781的第二密码子优化核苷酸序列 (GBA_VG1) 相对于SEQ ID NO:1777的野生型核苷酸序列 (GBA_VG21) 具有120个独特突变。

[1322] 表14. 密码子优化序列 (SEQ ID NO:1773或1781) 相对于野生型序列 (SEQ IID NO: 1777) 的GC含量和百分比同源性

[1323]

与 WT GBA 的%同源性					
cDNA 来源	不具有信号序列	具有信号序列	仅剪接位点	独特突变	G/C 含量 (WT 55%)
SEQ ID NO: 1773 (GBA_VG17)	80.6%	80.0%	4 bp 突变	131	59%
SEQ ID NO: 1781 (GBA_VG1)	81.3%	80.7%	5 bp 突变	120	58.5%
% SEQ ID NO: 1773 至 SEQ ID NO: 1781 (GBA_VG17/GBA_VG1)	87.0%	86.3%	3 bp 差异	190 (相似)	

[1324] 实例14: 编码GBA蛋白的野生型和密码子优化序列的功能比较

[1325] 比较载体化病毒基因组构建体的GBA蛋白的GBA表达和GCase活性,所述构建体是包含编码GBA蛋白的第一密码子优化序列 (SEQ ID NO:1773) 的GBA_VG17 (SEQ ID NO: 1812)、包含编码GBA蛋白的第二密码子优化序列 (SEQ ID NO:1781) 的GBA_VG1 (SEQ ID NO: 1759), 以及包含编码GBA蛋白的野生型GBA序列 (SEQ ID NO:1777) 的GBA_VG21 (SEQ ID NO: 1816)。

[1326] 在 10^{4-5} MOI下用包含以下构建体的AAV2载体处理GD-II患者成纤维细胞 (GD-II GM00877): GBA_VG17 (AAV2.GBA_VG17)、GBA_VG1 (AAV2.GBA_VG1) 或GBA_VG21 (AAV2.GBA_VG21), 并且将GCase活性定量为RFU/mL并针对mg总蛋白进行归一化。如图6A中所示, 与AAV2.GBA_VG1和AAV2.GBA_VG21处理的细胞相比, AAV2.GBA_VG17产生优越的酶促GCase活性。与无AAV对照相比, GCase活性在AAV2.GBA_VG17处理的GD患者细胞中高52.4倍; 但与无AAV对照相比, 在AAV2.GBA_VG21和AAV2.GB_VG1处理的GD患者细胞中分别仅高30.8倍和

32.9倍。

[1327] 然后在 10^6 MOI下用包含以下构建体的AAV2载体处理GD-II患者成纤维细胞(GD-II GM00877):GBA_VG17(AAV2.GBA_VG17)、GBA_VG1(AAV2.GBA_VG1)或GBA_VG21(AAV2.GBA_VG21),并且通过LC-MS/MS测量葡萄糖胺醇水平(细胞溶解产物中的GlcSph(ng/mg Lamp1))和GBA底物还原活性。如图6B中所示,所测试的所构建体都产生类似葡萄糖胺醇水平和GBA底物还原,其与无AAV对照相比显著降低。通过免疫印迹法确认经编码的GBA蛋白由AAV2.GBA_VG17、AAV2.GBA_VG1和AAV2.GBA_VG17载体处理的这些GD患者细胞表达。

[1328] 综上所述,这些数据证明了与AAV2载体化GBA_VG1和GBA_VG21相比,包含编码GBA蛋白的SEQ ID NO:1773的密码子优化核苷酸序列的AAV2载体化GB_VG17(SEQ ID NO:1812)具有更高的GCase活性、稳定的GBA蛋白表达和显著降低的葡萄糖胺醇水平。

[1329] 实例15.施用途径和生产平台比较研究

[1330] 在本实例中,评价HEK和Sf9产生的AAV9载体,用于野生型大鼠脑中的生物分布和GBA表达。通过大池内(ICM)或丘脑内(ITH)递送的单个施用途径,或包括ICM与ITH递送的组合的双重施用途径,向动物施用载体。

[1331] 将HEK和Sf9细胞中产生的GBA_VG1(SEQ ID NO:1759)包装的AAV9载体(AAV9.GBA_VG1)注射至野生型大鼠中。对于双侧ITH施用,将 7.5×10^9 个AAV9.GBA_VG1病毒基因组注射至各半球的丘脑中,得到 1.5×10^9 个载体基因组的总剂量。对于ICM注射,注射 1.5×10^{10} 个AAV9.GBA_VG1病毒基因组。对于双重ITH与ICM施用,注射 1.5×10^{10} 个AAV9.GBA_VG1病毒基因组用于ICM递送,并且将 7.5×10^9 个AAV9.GBA_VG1病毒基因组注射至各半球的丘脑中用于双侧ITH递送,总剂量为 3×10^{10} 个AAV9.GBA_VG1病毒基因组。注射后四周,测定大鼠脑中病毒基因组的生物分布以及中枢神经系统和外周组织中的GCase活性。

[1332] 首先,所有处理组中的所有动物在手术后始终持续增加体重,直至安乐死的时间(4周生命)。每日临床观察显示正常的健康受试者。因此,在用于单次施用途径的 1.5×10^{10} 和用于组合施用途径的 3×10^{10} 的两个选定剂量下,所有动物都耐受AAV治疗。

[1333] 在野生型大鼠脑中,尤其丘脑、海马纹状体和皮质中,在HEK和Sf9产生的AAV9-GBA载体的丘脑内给药后28天还评价了病毒基因组分布。在丘脑、海马体和纹状体中,与Sf9相比,HEK产生的AAV9载体存在更高平均生物分布趋势(增加约3-6倍VG/细胞)。在皮质中,对于HEK和Sf9产生的AAV9载体观察到类似平均生物分布型态。这些数据显示,在大鼠的丘脑内给药后,与Sf9相比由HEK平台产生的AAV9-GBA载体的生物分布增加。

[1334] 在野生型大鼠脑中,HEK和Sf9产生的AAV9-GBA载体的丘脑内给药后28天还比较了GCase活性。GCase活性一般增加超过基线。然而,GCase活性的平均增加在丘脑(注射部位)中最大(Sf9产生的载体超过内源70%并且HEK载体超过内源20%,并且在丘脑中,对于HEK产生的载体相对于Sf9产生的载体观察到平均GCase活性的适度增加)。在前脑和中脑区域(皮质、纹状体和海马体,超过内源约5-40%)中观察到低等至中等增加。

[1335] 综上所述,这些数据证明了双侧ITH AAV9.GBA_VG1给药促成CNS组织中AAV VG的成功分布和野生型大鼠脑内可检测的GBA过表达(GCase活性增加超过内源GCase活性)。

[1336] 在载体的ICM、ITH或双重ICM与ICM递送后第28天评估给药途径对HEK产生的AAV9.GBA_VG1载体的病毒基因组分布和GCase活性的影响。与ICM或双重ITH与ICM给药相比,在包括丘脑和海马体的深部脑结构中观察到ITH组中显著更高的病毒基因组分布。类似

地,与ICM和双重ITH与ICM给药相比,在ITH组中观察到更高的病毒基因组分布。对于皮质组织,与ITH和ICM给药相比,双重ITH与ICM给药促成显著更高的病毒基因组生物分布。综上所述,与ICM和双重ITH+ICM递送相比,AAV9-GBA载体的ITH递送在深部中脑结构中(尤其海马体和丘脑中)展现更高的病毒基因组(VG)生物分布型态。此外,ITH递送似乎驱动用双重ITH+ICM注射所观察的前脑/中脑中的VG生物分布型态。

[1337] 对于后脑组织,与ICM或双重ITH与ICM给药相比,在ITH组中观察到显著更高的小脑病毒基因组分布。类似地,与ICM和双重ITH与ICM给药相比,对于ITH组在脑中观察到更高病毒基因组生物分布的趋势。因此,类似于前脑和中脑结构,与ICM和双重ITH与ICM递送相比,由HEK细胞产生的AAV9-GBA_VG1载体的ITH递送在后脑结构中展现更高的病毒基因组生物分布型态。

[1338] 对于前脑和中脑组织的GCase活性,在丘脑中的注射部位观察到最高增加(ITH递送后约250%,其次在双重ITH与ICM给药中约207%)。ITH递送后在皮质中观察到适度增加(与媒剂对照相比约123%,并且在双重ITH与ICM给药后约141%)。对于ICM给药,ICM递送后在丘脑(约110%)和皮质(约91%)中观察到GCase活性的最少增加或无增加。组合给药(ICM与ITH)显示皮质中最高的GCase活性(约141%)。总体来说,基于病毒基因组分布结果和GCase结果,ITH给药似乎驱动丘脑和皮质中的GCase活性增加。另外,每个细胞生物分布的AAV基因组在丘脑和皮质中显示GCase活性的类似趋势。

[1339] 对于后脑组织,在小脑中ITH注射后观察到最高增加(约178%),并且在小脑中ICM和双重ICM与ITH递送后均观察到较低增加。组合给药组在小脑内未显示GCase活性读出的更高增加。总体来说,基于病毒基因组分布结果和GCase结果,ITH给药似乎驱动小脑中的GCase活性增加,并且每个细胞生物分布的AAV基因组在小脑中显示GCase活性的类似趋势。

[1340] 在CSF流体中还评估了GCase活性。在不同施用途径下观察到不同水平的CSF GCase活性增加。具体地,在组合给药(ITH与ICM)中观察到GCase活性的最高增加,其次是ITH递送,并且通过ICM递送仅观察到适度增加。这些数据证明了在大鼠中AAV递送的GBA基因转移使得在CSF中分泌活性GCase产物。

[1341] 本实验证明了丘脑内注射和双模式注射促成CNS组织和CSF中AAV-GBA病毒粒子的更有效递送和更高的GCase表达/活性。

[1342] 实例16:包含编码GBA的密码子优化核苷酸序列的载体化病毒基因组的体内评估

[1343] 本实例研究了在野生型C57BL/6小鼠中的VOY101衣壳(VOY101.GBA_VG17)中载体化的包含编码GBA蛋白的密码子优化核苷酸序列(SEQ ID NO:1773)的病毒基因组构建体GB_VG17(SEQ ID NO:1812)的分布和功效。VOY101是在IV注射后能够穿透血脑屏障的衣壳蛋白。

[1344] 向小鼠静脉内注射 2×10^{13} VG/kg的VOY101.GBA_VG17或媒剂对照,至侧尾静脉中。在IV注射后28天,收集各种CNS组织(例如,皮质、纹状体、海马体、丘脑、小脑、脑干和/或脊髓)和外周组织(例如,心脏、肝脏和/或脾脏)以测量病毒基因组(VG)生物分布(VG/细胞)、GCase活性和GBA mRNA表达(转基因特异性和内源性)。所治疗的所有动物都保持健康,并且用VOY101.GBA_VG17处理的小鼠与用媒剂对照处理的小鼠之间体重无显著差异。

[1345] 关于VG生物分布,在前脑和中脑中观察到高水平(约 >50 vg/细胞)的VOY101.GBA_VG17分布。在皮质中,平均定量81.31VG/细胞(范围:约75-85vg/细胞);在纹状体中,平均定

量150.39VG/细胞(范围:约90-330vg/细胞);在海马体中,平均定量152.91VG/细胞(范围:约70-195vg/细胞);并且在丘脑中,平均定量117.94VG/细胞(范围:约70-190vg/细胞)。因此,在前脑和中脑区域中达成成功的VOY101.GBA_VG17基因转移。

[1346] 类似地,在后脑和脊髓(颈部区域)中观察到高水平(约 >50 vg/细胞)的VOY101.GBA_VG17分布。在小脑中,平均定量65.77VG/细胞(范围:约23-105vg/细胞);在脑干中,平均定量159.22VG/细胞(范围:约110-305vg/细胞);并且在脊髓中,平均定量176.29VG/细胞(范围:约95-280vg/细胞)。因此,在后脑和脊髓中也达成成功的VOY101.GBA_VG17基因转移。

[1347] 关于外周组织中的VG生物分布,在心脏、脾脏和肝脏中观察到可检测水平的VOY101.GBA_VG17,但这个水平比CNS组织中所观察的水平约低4-10倍。在心脏中,平均定量11.58VG/细胞(范围:约5-21vg/细胞);在脾脏中,平均定量29.99VG/细胞(范围:约7-82vg/细胞);并且在肝脏中,平均定量18.76VG/细胞(范围:约5-60vg/细胞)。

[1348] 关于GCase活性(测量为RFU/mL,针对mg蛋白质进行归一化),VOY101.GBA_VG17的IV注射后,前脑和中脑展示GCase活性超过基线(媒剂对照)的显著增加。在皮质中观察到最高增加(比媒剂对照高4.86倍)。在纹状体(比媒剂对照高4.6倍)和丘脑(比媒剂对照高4.74倍)中观察到类似增加。因此,在具有高VOY101.GBA_VG17生物分布的前脑和中脑中观察到GCase活性的显著增加。类似地,VOY101.GBA_VG17的IV注射后,后脑结构展示GCase活性超过基线(媒剂对照)的显著增加。小脑显示GCase活性比媒剂对照高4.04倍,并且脑干显示GCase活性比媒剂对照高5.26倍。因此,在具有高VOY101.GBA_VG17生物分布的后脑中还观察到GCase活性的显著增加。总体来说,所测试的所有脑部区域显示GCase活性相对于媒剂对照增加4-5倍,并且VOY101.GBA_VG17的IV递送使得相关CNS组织中的GCase活性成功并均匀增加。

[1349] VOY101.GBA_VG17的IV注射后,在肝脏中还测量了GCase活性(RFU/mL,针对mg蛋白质进行归一化)。肝脏显示GCase活性相对于媒剂对照增加4.12倍,证明了非CNS组织中的GCase活性成功增加。

[1350] 除了在CNS和肝脏两者中定量的细胞和组织GCase活性水平以外,VOY101.GBA_VG17的IV注射后,也在小鼠的流体中,包括脑脊髓液(CSF)和血清中测量GCase活性。与CSF相比,血清中的GCase活性更高。在CSF中观察到GCase活性相对于媒剂处理的对照增加5.9倍,并且在血清中观察到GCase活性相对于媒剂处理的对照增加22.3倍。这些数据证明了在VOY101.GBA_VG17的IV注射后,活性GCase分泌至细胞外区室中。

[1351] 定量GCase活性水平,并且在VOY101.GBA_VG17的IV注射后测量的CNS和外周组织和流体中相对于媒剂的活性的倍数增加概述于表27中。

[1352] 表27. 针对mg蛋白质进行归一化的GCase活性水平(RFU/mL)的汇总

[1353]

针对 mg 蛋白质进行归一化的 GCase 活性 (RFU/mL)		相对于无媒剂对照的 GCase 活性的倍数增加
皮质	媒剂	4.86
62246	12789	
纹状体	媒剂	4.64
32063	6898	
丘脑	媒剂	4.74
40506	9061	
小脑	媒剂	4.04
36082	8926	
脑干	媒剂	5.26
44706	8495	
肝脏	媒剂	4.1
100123	24272	
CSF	媒剂	5.9
3707	627	
血清	媒剂	22.3
6919	310	

[1354] VOY101.GBA_VG17的IV注射后,在皮质、丘脑和脑干中定量内源性和转基因特异性GBA mRNA(有效载荷)表达。GBA mRNA定量为GBA mRNA表达/1,000个转录物,针对几何平均值(GAPDH、HPRT1、PPIA)进行归一化。关于内源GBA mRNA,在整个脑部测量约38-63个拷贝/1000个转录物。更具体地,在皮质、丘脑和脑干中,分别定量63.10个内源GBA mRNA/1,000个转录物、38.81个内源GBA mRNA/1,000个转录物和38.95个内源GBA mRNA/1,000个转录物。关于转基因特异性GBA mRNA,在整个脑部测量约1314-1765个拷贝/1000个转录物。在皮质、丘脑和脑干中,分别定量1314.39个转基因特异性GBA mRNA/1,000个转录物、1547.21个转基因特异性GBA mRNA/1,000个转录物和1764.02个转基因特异性GBA mRNA/1,000个转录物。因此,在皮质、丘脑和脑干中,与媒剂对照相比,转录物特异性GBA mRNA分别增加874倍、1032倍和1244倍。因此,血脑屏障穿透剂VOY101.GBA_VG17载体的IV注射后28天,在脑中达成包含编码GBA蛋白的密码子优化核苷酸序列(SEQ ID NO:1773)的转基因的成功转录。脑中的内源GBA mRNA水平在经VOY101.GBA_VG17处理的组织和经媒剂对照处理的组织中维持类似水平。这些数据证明了在VOY101.GBA_VG17的IV注射后CNS中的GBA有效载荷的成功转基因转录和表达。

[1355] 在肝脏中VOY101.GBA_VG17的IV注射后还定量了内源性和转基因特异性GBA mRNA表达。在肝脏中,定量182.29个内源GBA mRNA/1,000个转录物(范围:约188-240个/1000个转录物),并且在经处理与未处理的小鼠之间的内源GBA mRNA水平无显著差异。在肝脏中定

量约1372.45个转基因特异性GBA mRNA/1,000个转录物,并且与媒剂对照相比,在经处理的小鼠中观察到GBA mRNA增加739倍。这些数据证明了在VOY101.GBA_VG17的IV注射后肝脏中的GBA有效载荷的成功转基因转录和表达。

[1356] 在小鼠的皮质、纹状体、丘脑、脑干、小脑和肝脏中还评估了在VOY101.GBA_VG17的IV注射后生物分布(VG/细胞)与GCase活性(RFU/mL,超过内源GCase活性的倍数,针对mg蛋白质进行归一化)之间的关系。在CNS组织中,观察到GCase活性相比内源GCase活性增加约300-660%倍(图8),并且定量595-1825个转基因特异性GBA mRNA拷贝/1000个转录物。在肝脏中,尽管存在组内变异性,但测得GCase活性相对于内源GCase活性增加180-850%倍,并且定量约330-2450个转基因特异性GBA mRNA拷贝/1000个转录物。肝脏中定量的GCase水平与较低VG/细胞水平下的CNS组织相当(图8)。据预测GCase活性相比内源增加30-50%倍在临床上有效。因此,VOY101.GBA_VG17的静脉内注射能够相对于内源增加各种CNS和外周组织中的GCase活性水平,据信远高于预测倍数增加在临床上有效。

[1357] 上文所论述的这些数据中的一些概述于下表22中。总之,包含编码GBA蛋白的SEQ ID NO:1773的密码子优化核苷酸序列的VOY101.GBA_VG17展示CNS中的高生物分布,CNS和外周组织和流体中增加的GCase活性,以及成功的转基因转录和表达。因此,GBA_VG17可以用于治疗与GBA蛋白和/或GCase活性缺乏相关的病症,诸如神经病性(影响CNS)和非神经病性(影响非CNS) 戈谢病、与GBA基因突变相关的PD以及路易体痴呆。

[1358] 表22:在皮质、丘脑、脑干及肝脏中在2e13vg/kg下VOY101.GBA_VG17的IV注射后28天的VG生物分布、GCase活性和GBA mRNA数据的汇总

[1359]	区域	VG/细胞	GBA mRNA (超过内源 GBA)	GBA mRNA (超过媒剂基线)	GCase 表达(超过 媒剂基线)
	皮质	83.31	20.83	874	4.86
	丘脑	117.94	39.87	1032	4.74
	脑干	159.22	45.29	1244	5.26
	肝脏	18.76	7.29	739	4.12

[1360] 实例17.脱靶背根神经节(DRG)中的GBA表达

[1361] 本实例展示了使用miR183结合位点以降低背根神经节(DRG)神经元中的GBA表达,所述神经元表达相应内源微小RNA,miR183。

[1362] 病毒基因组构建体,GBA_VG33(SEQ ID NO:1828,描述于表18-19和表21中),其包含编码GBA蛋白和miR183结合位点系列(SEQ ID NO:1849)的密码子优化核苷酸序列(SEQ ID NO:1773),所述结合位点系列包含四个miR183结合位点(各自包含SEQ ID NO:1847),每个位点由8个核苷酸间隔子(SEQ ID NO:1848)隔开。还将GBA_VG33构建体载体化至AAV2载体(AAV2.GBA_VG33)中。

[1363] 用GBA_VG33构建体转染HEK293细胞,并且将GBA蛋白表达与经GB_VG17对照构建体(SEQ ID NO:1812)转染的细胞进行比较,所述对照构建体包含编码GBA蛋白的密码子优化核苷酸序列(SEQ ID NO:1773),但不包含miR183结合位点系列。用GBA_VG33构建体和GBA_VG17对照构建体转染后观察到类似GBA蛋白表达水平。还用包含miR183结合位点系列的GBA_VG33构建体或GBA_VG17对照构建体和miR183共转染HEK293细胞,并且测量GBA蛋白表达。与用GBA_VG17对照和miR183共转染的那些细胞相比,在用GBA_VG33构建体和miR183共

转染的HEK293细胞中观察到GBA表达的显著降低。这些数据证明了包含miR183结合位点系列的GBA_VG33构建体能够在相应微小RNA(miR183)存在下降低GBA表达。

[1364] 在大鼠胚胎DRG神经元中还研究了DRG中GBA表达的脱靶。在 $10^{3.5}$ 或 $10^{4.5}$ 的MOI下用AAV2.GBA_VG33(包含miR183结合位点系列)或AAV2.GBA_VG17对照,或无AAV对照转导大鼠胚胎DRG神经元。GCase活性测量为RFU/mL/mg总蛋白。如图7中所示,在所测试的两个MOI下,与用AAV2.GBA_VG17转染的那些相比,用AAV2.GBA_VG33转导的大鼠胚胎DRG神经元中GCase活性显著降低。此外,在两个MOI下用AAV2.GBA_VG33转导的大鼠胚胎DRG神经元中测量的GCase活性水平类似于无AAV对照中测量的GCase水平。

[1365] 综上所述,这些数据证明了用GBA_VG33(SEQ ID NO:1828)达成DRG中的成功GBA表达脱靶,所述GBA_VG33包含编码GBA蛋白和miR183结合位点系列(SEQ ID NO:1849)的密码子优化核苷酸序列(SEQ ID NO:1773)。

[1366] IX. 等效物和范围

[1367] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定根据本文所提供的详细描述 of 特定实施方案的许多等效物。本公开的范围并不意图受限于上述详细描述,而实际上如所附权利要求书中所阐述。

[1368] 在权利要求书中,除非有相反指示或从上下文另外显而易见,诸如“一个”、“一种”和“所述”的冠词可以意指一个或多个/种。除非有相反指示或从上下文另外显而易见,否则如果一个、多个或所有组成员存在于、用于给定的产物或过程中或以其它方式与给定的产物或过程相关,那么在一个或多个组成员之间包括“或”的声明或描述视为得到满足。本公开包括其中恰好一个组成员存在于、用于给定的产物或过程中或以其它方式与给定的产物或过程相关的实施方案。本公开包括其中多于一个或整个组成员存在于、用于给定的产物或过程中或以其它方式与给定的产物或过程相关的实施方案。

[1369] 还应注意,术语“包含”意图是开放式的并且允许但不需要包括额外要素或步骤。当本文中使用时,术语“包含”时,由此还涵盖和公开了术语“由……组成”。

[1370] 在给出范围的情况下,包括端点。此外,应了解,除非另有指示或从上下文和本领域一般技术人员的理解显而易见,否则以范围表示的值可以采用本发明的不同实施方案中的规定范围内的任何特定值或子范围,除非上下文另有明确规定,否则达到范围下限单位的十分之一。

[1371] 另外,应了解,处于现有技术内的本公开的任何特定实施方案可以明确地从权利要求书的任何一项或多项中排除。由于此类实施方案视为一般本领域技术人员所知的,因此即使在本文中未明确阐述排除,也可以排除所述实施方案。本公开的组合物、治疗或活性成分;任何生产方法;任何使用方法;等等)可以出于任何原因从权利要求书的任何一项或多项中排除,无论与现有技术存在相关还是无关。

[1372] 应了解,已使用的词语是描述性而非限制性词语,并且可以在所附权利要求书的范围内作出改变而不脱离本公开在其更广泛方面的真正范围和精神。

[1373] 尽管本公开已关于若干所描述的实施方案相当详细并具体地进行描述,但本公开并不意图受限于任何此类细节或实施方案或任何特定实施方案,而应参考所附权利要求书来解释,以鉴于现有技术提供此类权利要求书的最广泛可能的解释,并且因此有效地涵盖

本公开的预期范围。

[1374] 本文中提及的所有公布、专利申请、专利和其它参考文献都以全文引用的方式并入。在有冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。另外,章节标题、材料、方法和实例仅仅是说明性的并且不意图具有限制性。

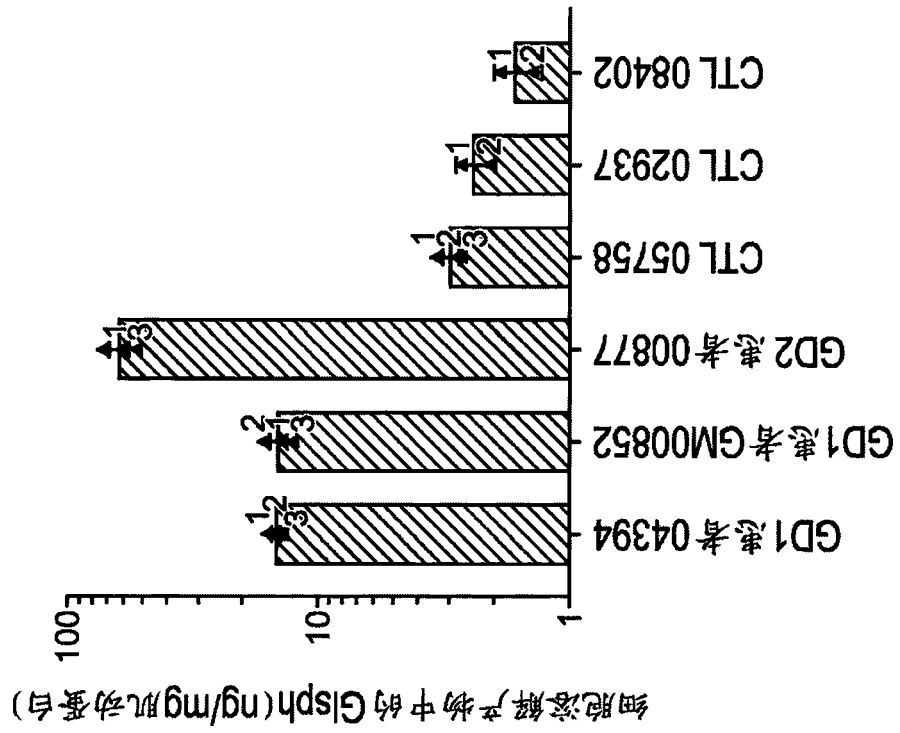


图1A

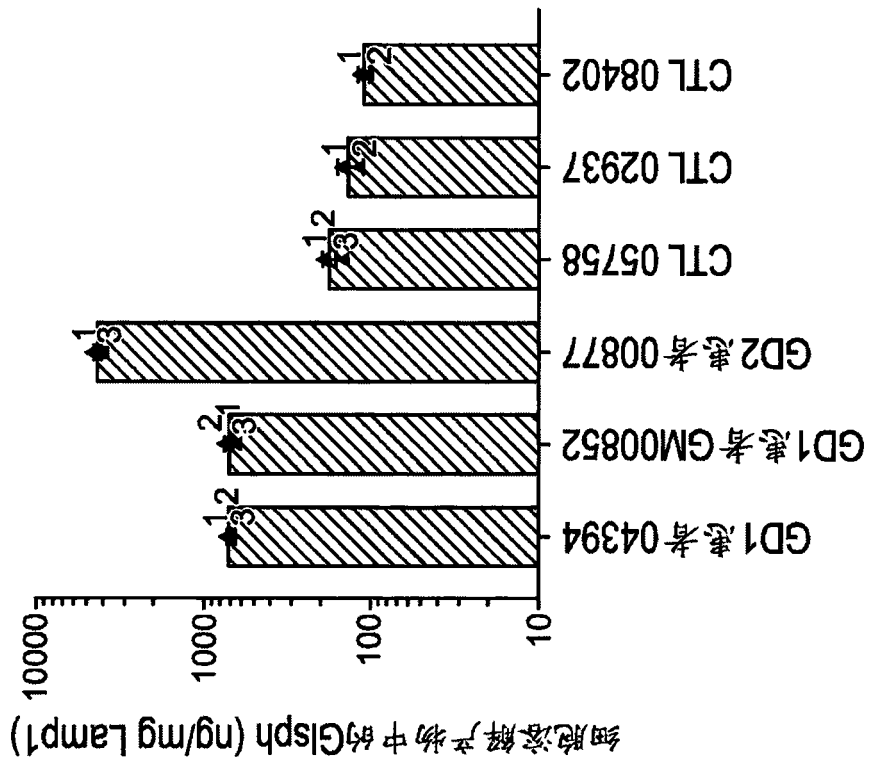


图1B

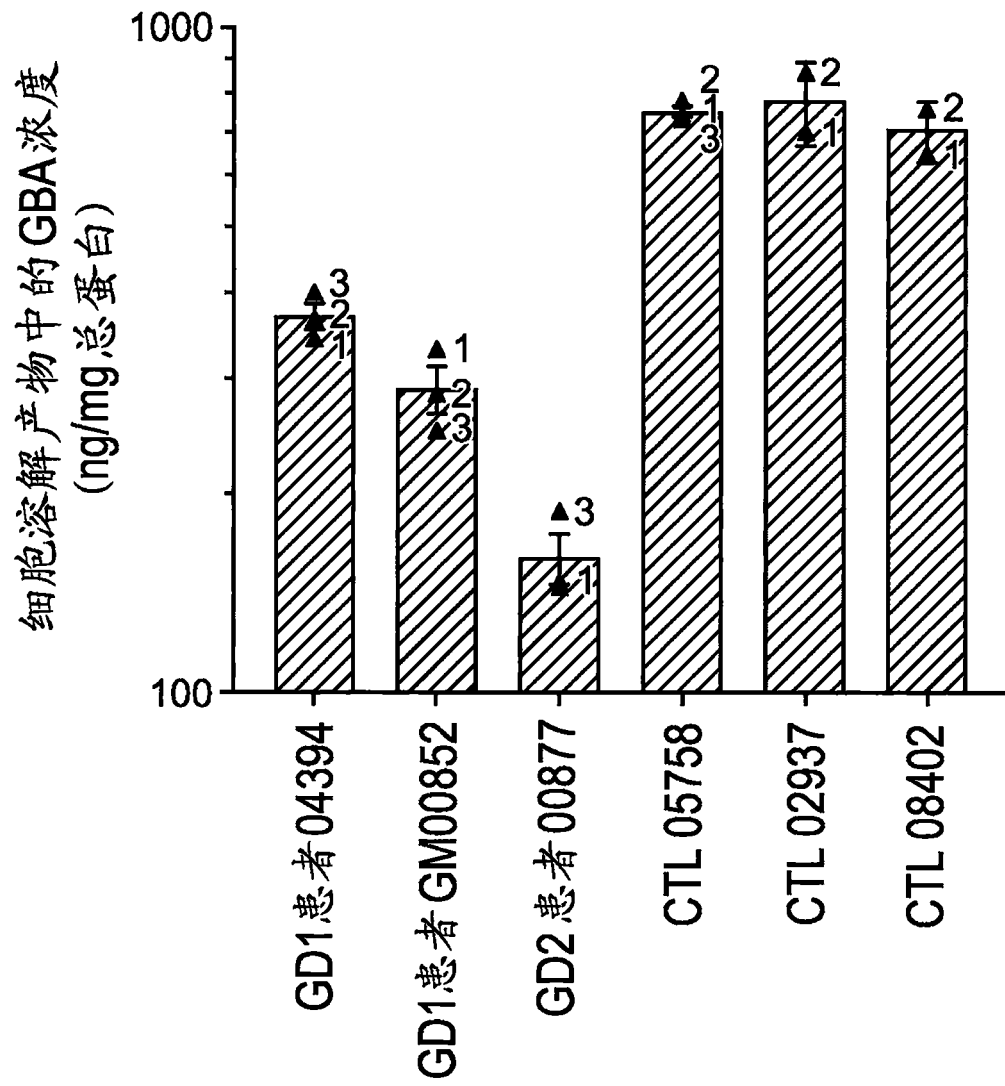


图1C

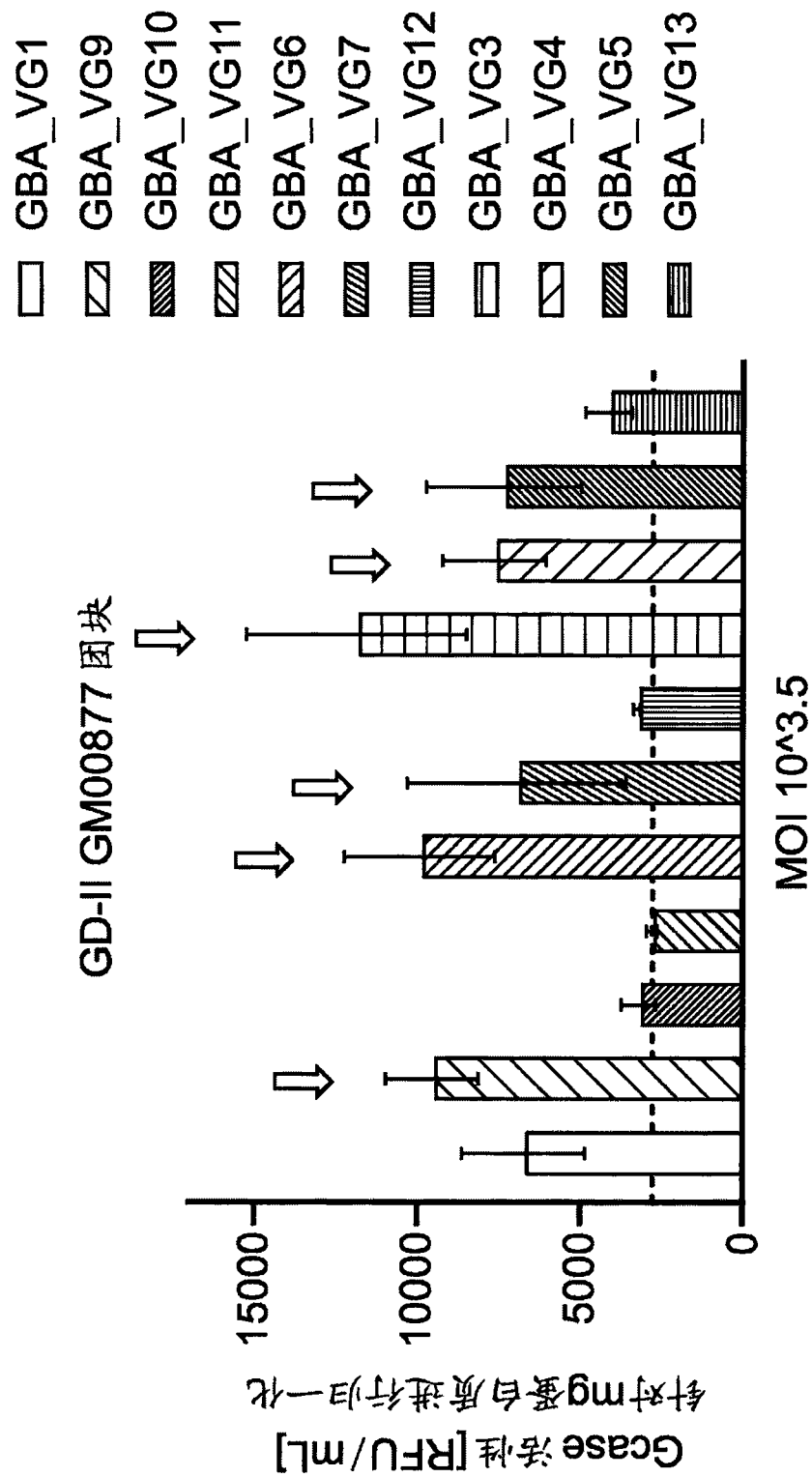


图2A

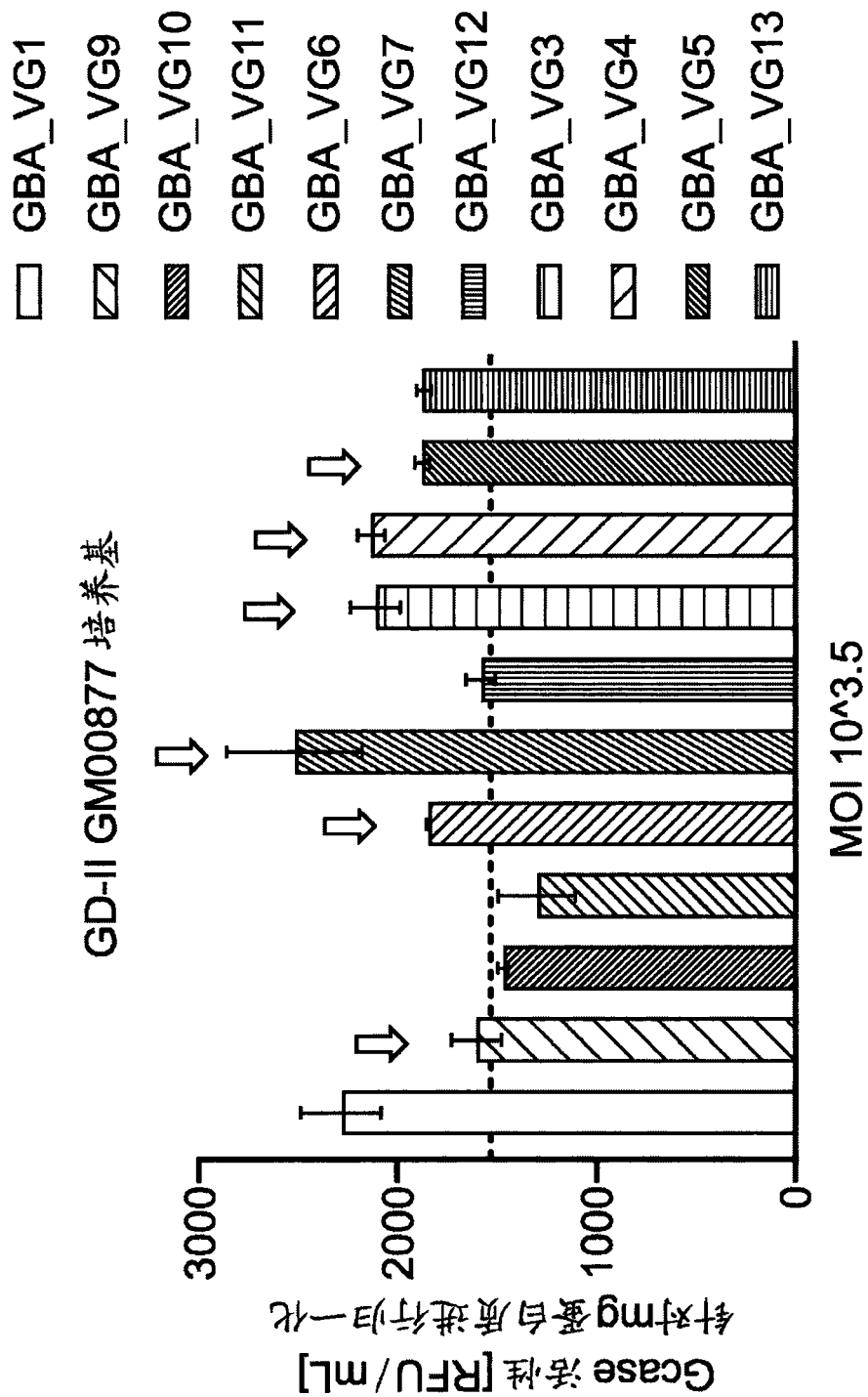


图2B

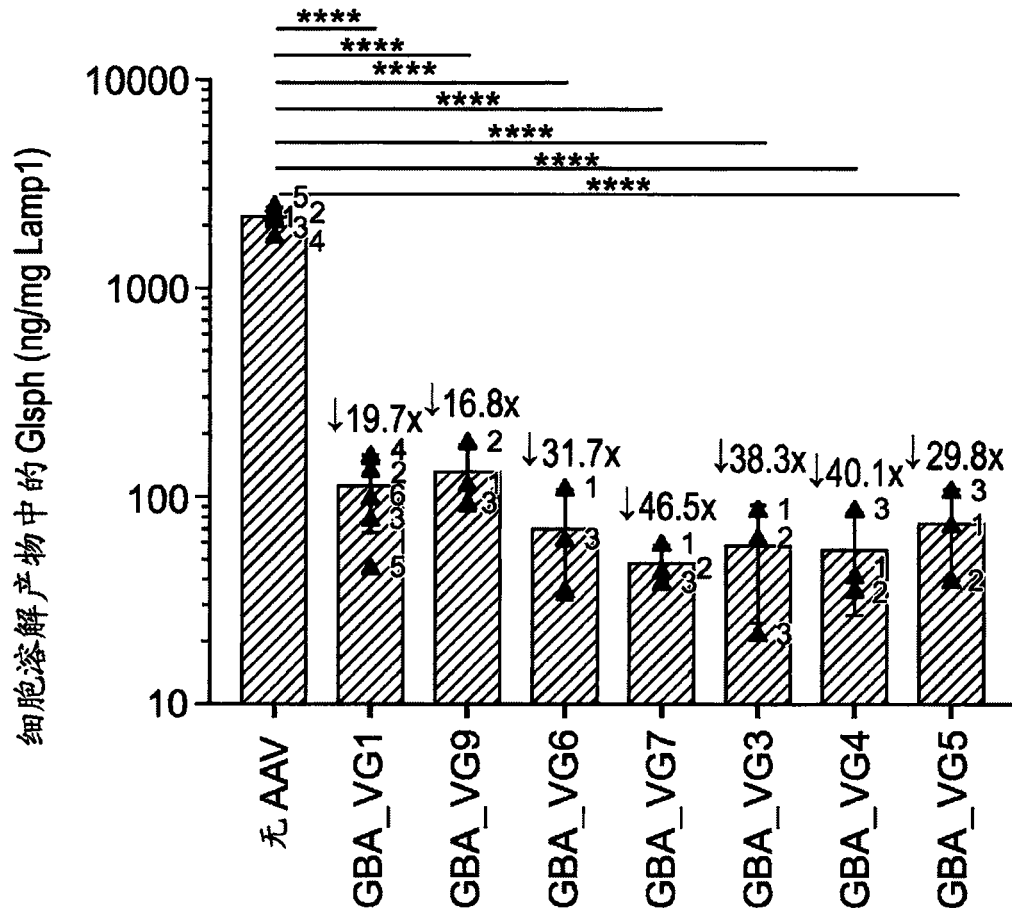


图3

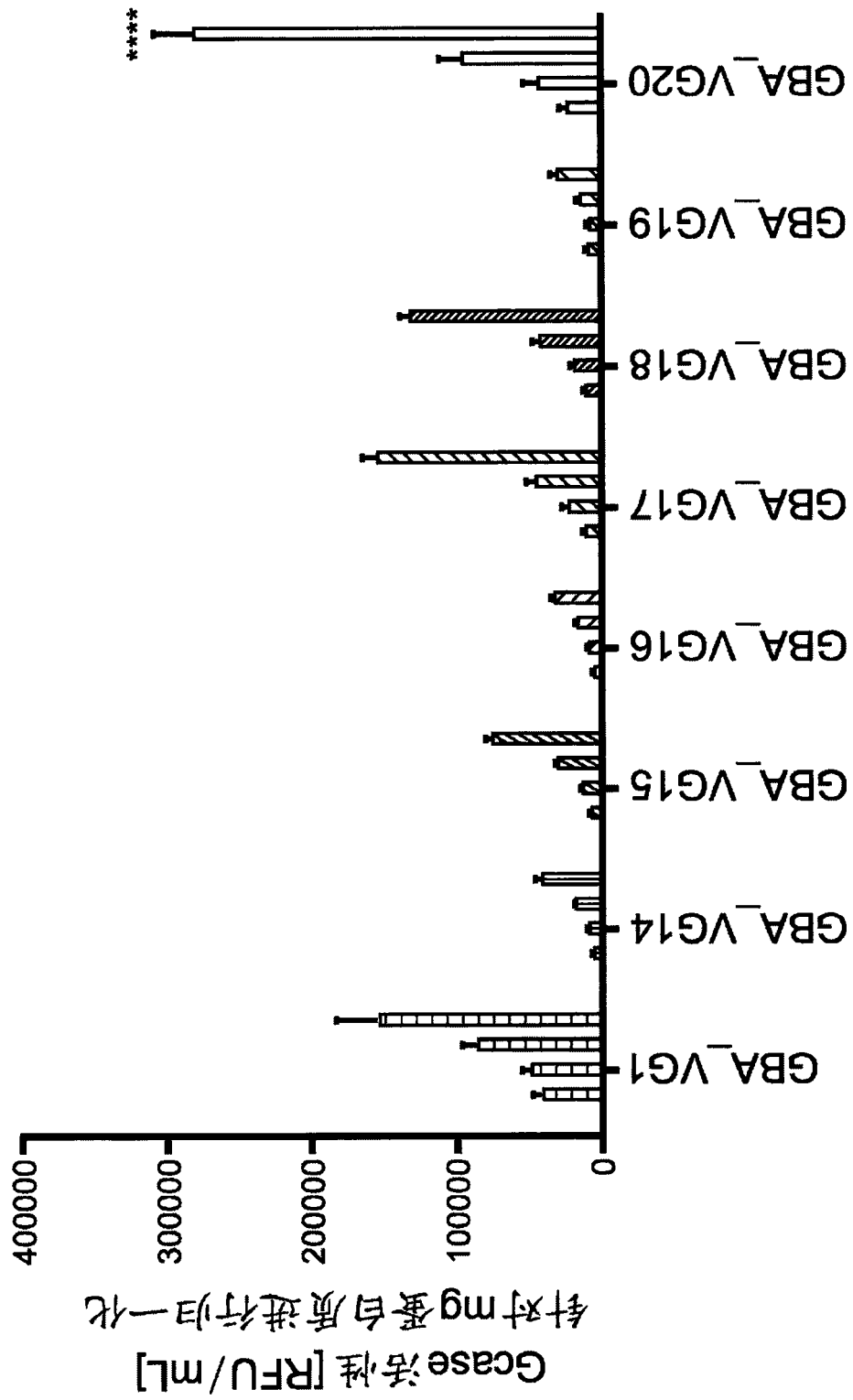


图4A

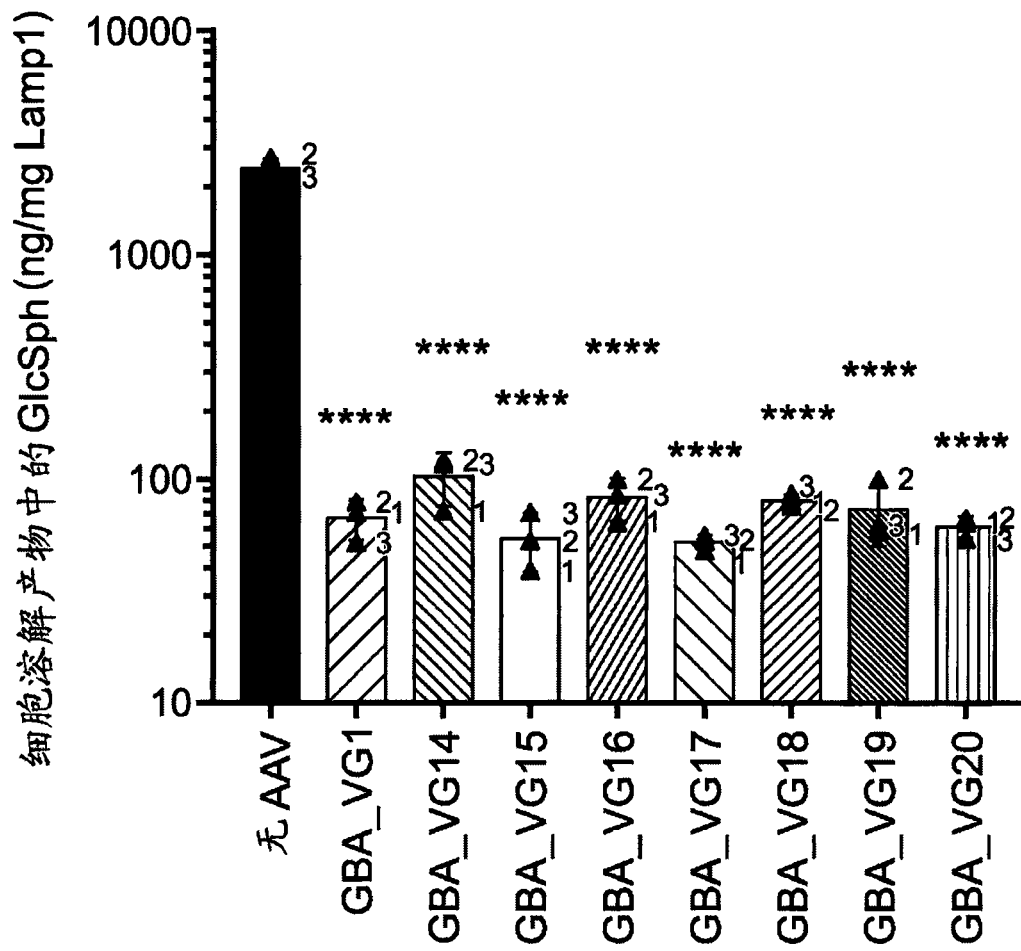


图4B

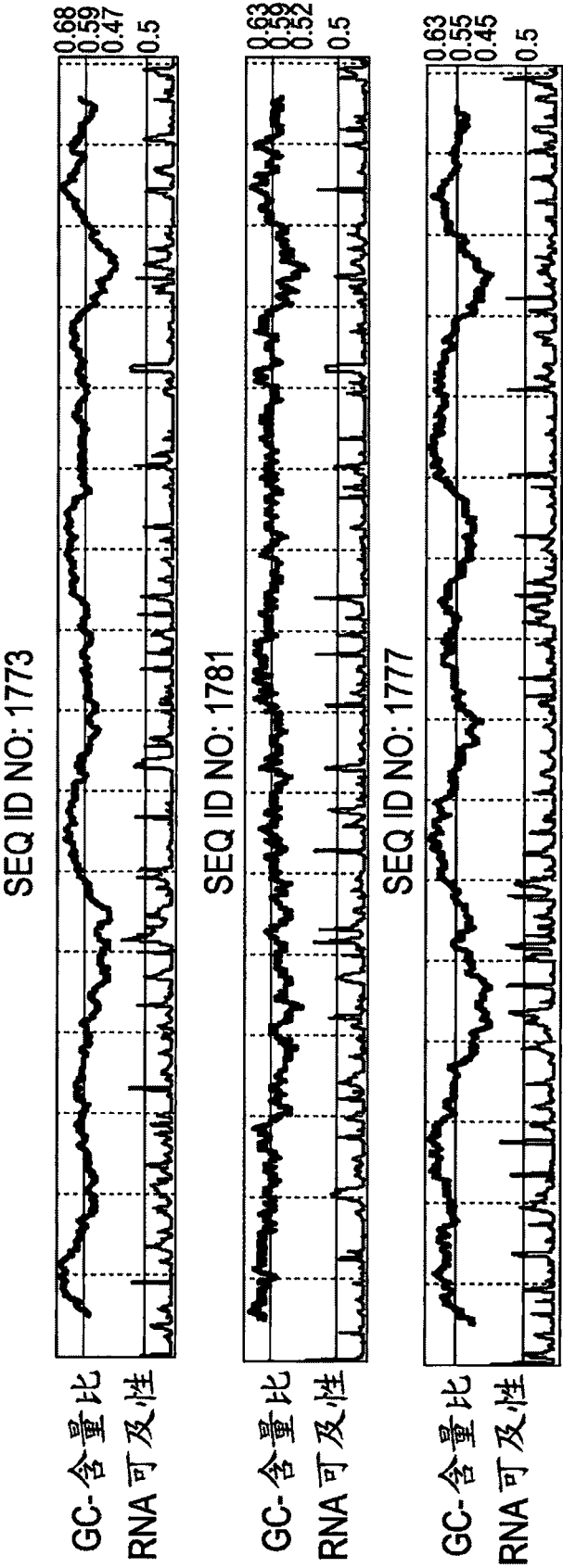


图5

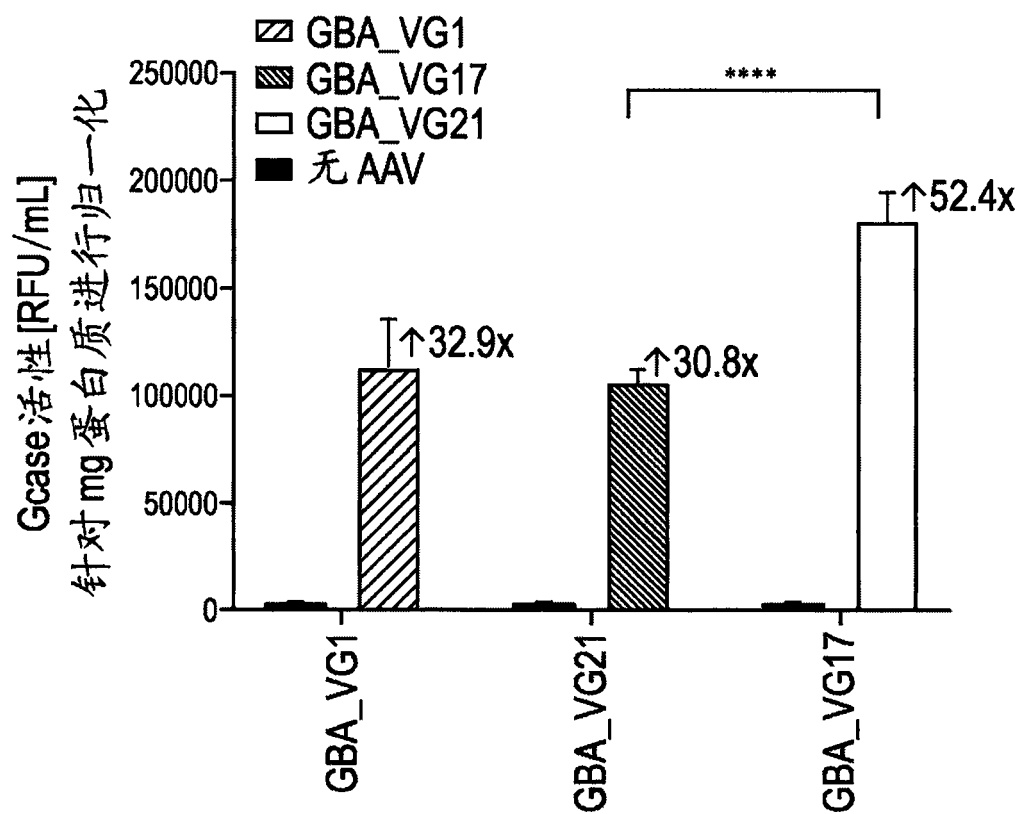


图6A

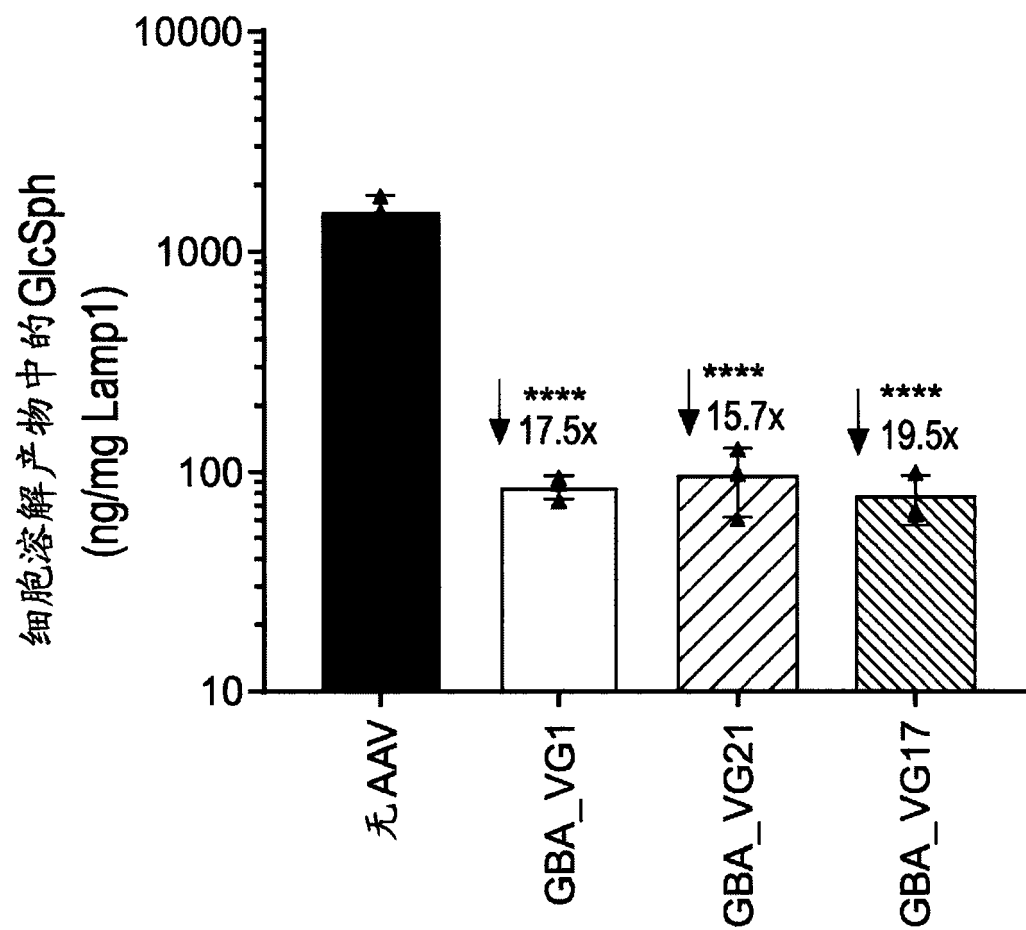


图6B

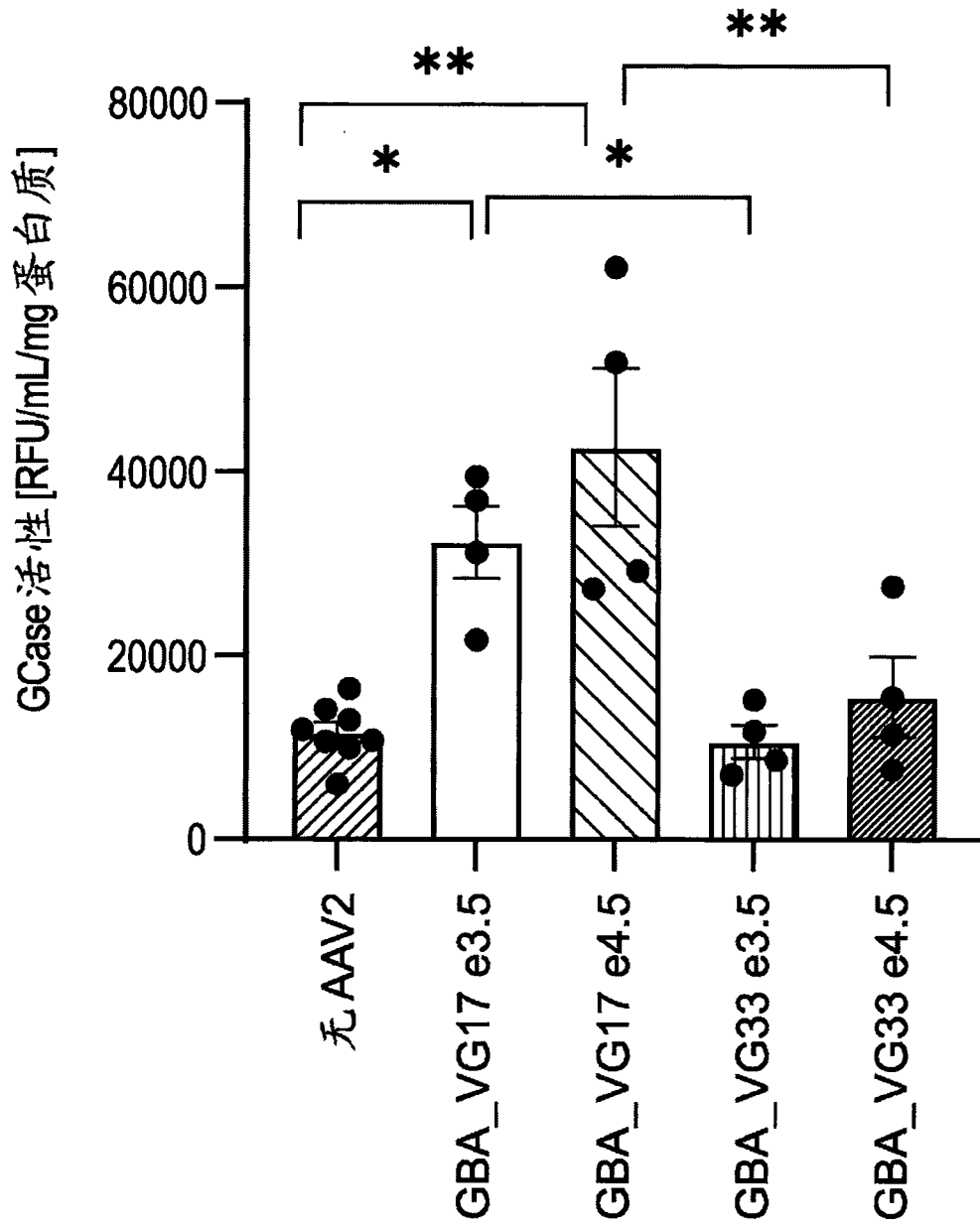


图7

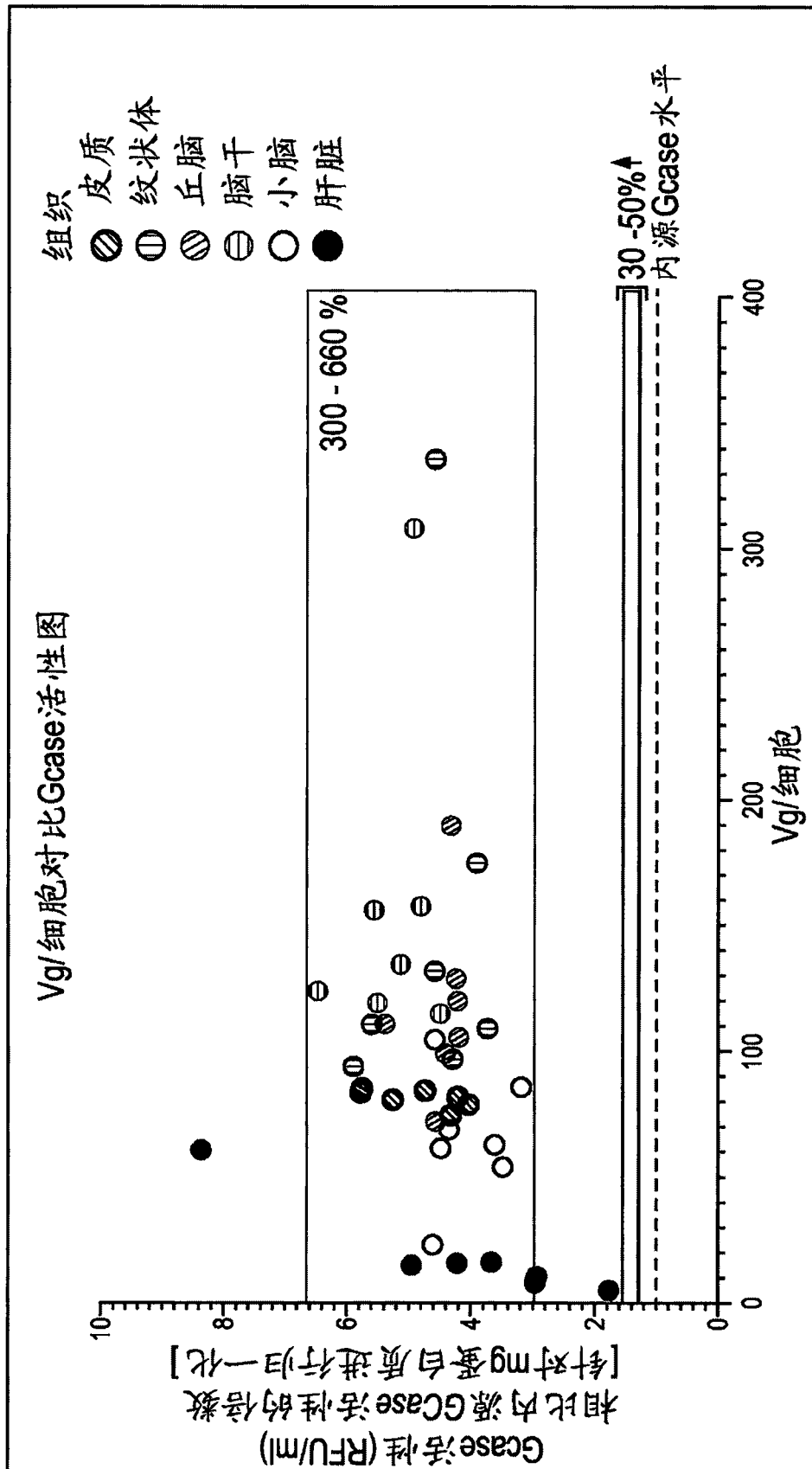


图8