



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110914427 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 09

(21) 申请号 201880042534.7

D·W·Y·沙

(22) 申请日 2018.05.04

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110914427 A

专利代理师 付文川 吴小瑛

(43) 申请公布日 2020.03.24

(51) Int.Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/501,787 2017.05.05 US

62/507,923 2017.05.18 US

62/520,093 2017.06.15 US

(56) 对比文件

WO 2015143078 A1, 2015.09.24

MARIA PIHLMANN ET AL. Adeno-associated virus-delivered polycistronic microRNA-clusters for knockdown of vascular endothelial growth factor in vivo. THE JOURNAL OF GENE MEDICINE. 2012, 第14卷 (第5期), 第329-336页和图1-4.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.25

审查员 刘东川

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/031108 2018.05.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/204797 EN 2018.11.08

(73) 专利权人 沃雅戈治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

权利要求书3页 说明书365页

序列表 (电子公布) 附图2页

(72) 发明人 侯金兆 王鑫 周鹏程 任晓琴

(54) 发明名称

调节性多核苷酸

(57) 摘要

本发明涉及编码至少一种siRNA分子的腺相关病毒 (AAV) 颗粒调节性多核苷酸及其使用方法。



1. 一种腺相关病毒 (AAV) 病毒基因组, 其包含位于2个反向末端重复序列 (ITR) 之间的核酸序列, 其中所述核酸序列从5' 至3' 包括:

(i) (a) 第一5' 侧翼区、第一编码的有义链序列、第一环区域、第一编码的反义链序列和第一3' 侧翼区; 或

(b) 第一5' 侧翼区、第一编码的反义链序列、第一环区域、第一编码的有义链序列和第一3' 侧翼区, 和

(ii) (a) 第二5' 侧翼区、第二编码的有义链序列、第二环区域、第二编码的反义链序列和第二3' 侧翼区; 或

(b) 第二5' 侧翼区、第二编码的反义链序列、第二环区域、第二编码的有义链序列和第二3' 侧翼区;

其中:

第一5' 侧翼区包含SEQ ID NO:1504的核苷酸序列, 第一环区域包含SEQ ID NO:1511的核苷酸序列, 且第一3' 侧翼区包含SEQ ID NO:1518的核苷酸序列; 且第二5' 侧翼区包含SEQ ID NO:1505的核苷酸序列, 第二环区域包含SEQ ID NO:1513的核苷酸序列, 且第二3' 侧翼区包含SEQ ID NO:1520的核苷酸序列; 或

第一5' 侧翼区包含SEQ ID NO:1505的核苷酸序列, 第一环区域包含SEQ ID NO:1513的核苷酸序列, 且第一3' 侧翼区包含SEQ ID NO:1520的核苷酸序列; 且第二5' 侧翼区包含SEQ ID NO:1504的核苷酸序列, 第二环区域包含SEQ ID NO:1511的核苷酸序列, 且第二3' 侧翼区包含SEQ ID NO:1518的核苷酸序列。

2. 权利要求1所述的AAV病毒基因组, 其中第一编码的反义链序列与第一靶基因的mRNA互补。

3. 权利要求2所述的AAV病毒基因组, 其中第二编码的反义链序列与第二靶基因的mRNA互补。

4. 权利要求1所述的AAV病毒基因组, 其中:

(i) 第一5' 侧翼区包含SEQ ID NO:1504的核苷酸序列; 第一环区域包含SEQ ID NO:1511的核苷酸序列; 且第一3' 侧翼区包含SEQ ID NO:1518的核苷酸序列; 且

(ii) 第二5' 侧翼区包含SEQ ID NO:1505的核苷酸序列; 第二环区域包含SEQ ID NO:1513的核苷酸序列; 且第二3' 侧翼区包含SEQ ID NO:1520的核苷酸序列。

5. 权利要求1所述的AAV病毒基因组, 其中:

(i) 第一5' 侧翼区包含SEQ ID NO:1505的核苷酸序列; 第一环区域包含SEQ ID NO:1513的核苷酸序列; 且第一3' 侧翼区包含SEQ ID NO:1520的核苷酸序列; 且

(ii) 第二5' 侧翼区包含SEQ ID NO:1504的核苷酸序列; 第二环区域包含SEQ ID NO:1511的核苷酸序列; 且第二3' 侧翼区包含SEQ ID NO:1518的核苷酸序列。

6. 权利要求3所述的AAV病毒基因组, 其中第一靶基因与第二靶基因相同。

7. 权利要求3所述的AAV病毒基因组, 其中第一靶基因与第二靶基因不同。

8. 权利要求2所述的AAV病毒基因组, 其中第一靶基因是亨廷顿基因 (HTT)。

9. 权利要求3所述的AAV病毒基因组, 其中第二靶基因是HTT。

10. 权利要求2所述的AAV病毒基因组, 其中第一靶基因是SOD1。

11. 权利要求3所述的AAV病毒基因组, 其中第二靶基因是SOD1。

12. 权利要求1所述的AAV病毒基因组,其中每一条有义链和反义链的长度都独立地为19-24个核苷酸或19-21个核苷酸。

13. 权利要求1所述的AAV病毒基因组,其中每一条有义链和反义链的长度都独立地为19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸或22个核苷酸。

14. 权利要求1所述的AAV病毒基因组,其中:

(i) 第一编码的有义链序列和第一编码的反义链序列之一或二者包含至少1个核苷酸或至少2个核苷酸的3' 突出端;和/或

(ii) 第二编码的有义链序列和第二编码的反义链序列之一或二者包含至少1个核苷酸或至少2个核苷酸的3' 突出端。

15. 权利要求1所述的AAV病毒基因组,其进一步包含相对于第一5' 侧翼区位于5' 的第一启动子。

16. 权利要求15所述的AAV病毒基因组,其进一步包含相对于第一5' 侧翼区位于5' 的第一启动子,和相对于第二5' 侧翼区位于5' 的第二启动子。

17. 权利要求16所述的AAV病毒基因组,其中第一启动子是遍在启动子或细胞类型特异性启动子。

18. 权利要求16所述的AAV病毒基因组,其中第二启动子是遍在启动子或细胞类型特异性启动子。

19. 权利要求16所述的AAV病毒基因组,其中第一启动子和/或第二启动子是CBA启动子、CMV启动子、PGK启动子、H1启动子、UBC启动子、GUSB启动子、NSE启动子、突触蛋白启动子、MeCP2启动子或GFAP启动子。

20. 权利要求16所述的AAV病毒基因组,其中第一启动子是H1启动子或CBA启动子。

21. 权利要求16所述的AAV病毒基因组,其中:

(i) 第一启动子是H1启动子且第二启动子是CBA启动子;或

(ii) 第一启动子是CBA启动子且第二启动子是H1启动子。

22. 权利要求1所述的AAV病毒基因组,其进一步包含:

(i) 内含子;

(ii) 填充序列;和/或

(iii) 聚腺苷酸化 (polyA) 序列。

23. 一种重组腺相关病毒 (AAV) 颗粒,其包含权利要求1-22任一项所述的病毒基因组和AAV衣壳蛋白。

24. 权利要求23所述的重组AAV颗粒,其中AAV衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白或其变体或AAV5衣壳蛋白或其变体。

25. 一种细胞,其包含权利要求1-22任一项所述的AAV病毒基因组,其中细胞是哺乳动物细胞、HEK293细胞、昆虫细胞、Sf9细胞、中枢神经系统的细胞、神经元、中型多棘神经元、运动神经元或星形胶质细胞。

26. 一种药物组合物,其包含权利要求23所述的重组AAV颗粒和药学上可接受的赋形剂。

27. 权利要求23所述的重组AAV颗粒在制备用于抑制细胞中的一种或多种靶基因的表达的药物中的用途。

28. 权利要求27所述的用途,其中靶基因在神经细胞、组织或器官中表达。
29. 权利要求27所述的用途,其中细胞是中型多棘神经元、皮层神经元、运动神经元或星形胶质细胞。
30. 权利要求27所述的用途,其中细胞在受试者中。
31. 权利要求30所述的用途,其中受试者患有中枢神经系统的疾病。
32. 权利要求31所述的用途,其中中枢神经系统的疾病为亨廷顿病 (HD) 或肌萎缩性侧索硬化 (ALS)。
33. 权利要求27所述的用途,其中重组AAV颗粒被配制用于静脉内施用、脑池内施用、血管内施用、脑室内施用或其组合。
34. 权利要求23所述的重组AAV颗粒在制备用于治疗中枢神经系统 (CNS) 的疾病的药物中的用途。
35. 权利要求34所述的用途,其中中枢神经系统的疾病是亨廷顿病 (HD) 或肌萎缩性侧索硬化 (ALS)。
36. 权利要求34所述的用途,其中重组AAV颗粒被配制用于静脉内施用、脑池内施用、血管内施用、脑室内施用或其组合。
37. 一种生产重组腺相关病毒 (AAV) 的方法,其包括提供具有包含权利要求1-22任一项所述的病毒基因组的多核苷酸、至少一种编码AAV rep基因的多核苷酸和至少一种编码AAV cap基因的多核苷酸的细胞;并从该细胞收获重组AAV。
38. 权利要求37所述的方法,其中细胞是细菌细胞、哺乳动物细胞或昆虫细胞。

调节性多核苷酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年5月5日提交的美国临时专利申请号62/501,787,2017年5月18日提交的美国临时专利申请号62/507,923和2017年6月15日提交的美国临时专利申请号62/520,093的优先权,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0003] 参考序列表

[0004] 本申请与序列表一起提交,序列表为ASCII文本文件的电子格式。序列表以ASCII文本文件的形式提供,标题为14482_155_228_SEQ_LIST_LISTING.txt,于2018年5月3日创建,大小为6,853,639字节。序列表通过引用整体并入本文。

发明领域

[0005] 本发明涉及用于AAV颗粒的设计、制备、制造、使用和/或配制的组合物、方法和过程,所述AAV颗粒包含调节性多核苷酸,例如编码至少一种靶向至少一种目标基因的小干扰RNA(siRNA)分子的多核苷酸。靶向目标基因可能会干扰基因表达以及由此产生的蛋白生产。可以将包含编码至少一个siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒插入重组腺相关病毒(AAV)载体中。还公开了使用AAV颗粒抑制受试者中目标基因的表达的方法。

[0006] 发明背景

[0007] MicroRNA(或miRNA或miR)是小的非编码单链核糖核酸分子(RNA),其长度通常为19-25个核苷酸。在哺乳动物基因组中已经识别出了超过一千种microRNA。成熟microRNA通过与靶mRNA的互补序列部分或完全配对,主要结合于靶信使RNA(mRNA)的3'非翻译区(3'-UTR),从而在转录后水平上促进目标mRNA的降解,并且在某些情况下抑制翻译的启动。MicroRNA在许多关键的生物学过程中起着至关重要的作用,例如调节细胞周期和生长、凋亡、细胞增殖和组织发育。

[0008] 通常将miRNA基因转录为miRNA的长初级转录物(即pri-miRNA)。将pri-miRNA切割成miRNA的前体(即pre-miRNA),然后对其进行进一步加工以生成成熟的功能性miRNA。

[0009] 尽管许多靶标表达策略采用基于核酸的形式,但仍需要具有更高特异性和更少脱靶效应的改良核酸形式。

[0010] 本发明提供了人工pri-、pre-和成熟microRNA构建体形式的这样的改良形式及其设计方法。这些新颖的构建体可以是合成的独立分子,也可以在质粒或表达载体中被编码以递送至细胞。这样的载体包括但不限于腺相关病毒载体,例如任何AAV血清型的载体基因组或其他病毒递送载体,例如慢病毒等。

发明内容

[0011] 本文描述了用于施用AAV颗粒的方法、过程、组合物、试剂盒和装置,所述AAV颗粒包含编码至少一种用于治疗、预防、缓解和/或改善疾病和/或病症的siRNA分子的调节性多核苷酸。

[0012] 在以下描述中阐述了本发明的各种实施方案的细节。通过说明书和附图以及权利

要求书,本发明的其他特征、目的和优点将变得显而易见。

[0013] 以下阐述的是代表本文描述的主题的非限制性实施方案:

[0014] 1. 一种腺相关病毒 (AAV) 病毒基因组,其包含位于2个反向末端重复序列 (ITR) 之间的核酸序列,其中所述核酸在表达时抑制或阻遏靶基因在细胞中的表达,其中所述核酸序列以5' 至3' 的顺序包括:编码第一有义链序列的第一区域、编码第一反义链序列的第二区域、编码第二有义链的第三区域和编码第二反义链序列的第四区域,其中第一和第二有义链序列包含至少15个连续核苷酸,并且第一和第二反义链序列与靶基因产生的mRNA互补并且包含至少15个连续核苷酸,并且其中所述第一有义链序列和第一反义链序列共有至少4个核苷酸长度的互补区域,并且所述第二有义链序列和第二反义链序列共有至少4个核苷酸长度的互补区域。

[0015] 2. 一种腺相关病毒 (AAV) 病毒基因组,其包含位于2个反向末端重复序列 (ITR) 之间的核酸序列,其中所述核酸在表达时抑制或阻遏第一靶基因和第二靶基因在细胞中的表达,其中所述核酸序列以5' 至3' 的顺序包含:编码第一有义链序列的第一区域、编码第一反义链序列的第二区域、编码第二有义链的第三区域和编码第二反义链序列的第四区域,其中第一和第二有义链序列包含至少15个连续核苷酸,并且第一反义链序列与第一靶基因产生的mRNA互补,并且第二反义链序列与第二靶基因产生的mRNA互补,并且包含至少15个连续核苷酸,并且其中所述第一有义链序列和第一反义链序列共有至少4个核苷酸长度的互补区域,并且所述第二有义链序列和第二反义链序列共有至少4个核苷酸长度的互补区域。

[0016] 3. 实施方案2所述的AAV病毒基因组,其还以5' 至3' 的顺序包含编码第三有义链序列的第五区域和编码第三反义链序列的第六区域,其中第三有义链序列包含至少15个连续核苷酸,并且第三反义链序列与第三靶基因产生的mRNA互补,并且包含至少15个连续核苷酸,并且其中所述第三有义链序列和第三反义链序列共有至少4个核苷酸的互补区域。

[0017] 4. 实施方案3所述的AAV病毒基因组,其还以5' 至3' 的顺序包含编码第四有义链序列的第七区域和编码第四反义链序列的第八区域,其中第四有义链序列包含至少15个连续核苷酸,并且第四反义链序列与第四靶基因产生的mRNA互补,并且包含至少15个连续核苷酸,并且其中所述第四有义链序列和第四反义链序列共有至少4个核苷酸的互补区域。

[0018] 5. 实施方案2所述的AAV病毒基因组,其中第一靶基因与第二靶基因相同。

[0019] 6. 实施方案3所述的AAV病毒基因组,其中第三靶基因与第一靶基因相同。

[0020] 7. 实施方案3所述的AAV病毒基因组,其中第三靶基因与第二靶基因相同。

[0021] 8. 实施方案3所述的AAV病毒基因组,其中第一靶基因、第二靶基因和第三靶基因相同。

[0022] 9. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第一靶基因相同。

[0023] 10. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第二靶基因相同。

[0024] 11. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第三靶基因相同。

[0025] 12. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第一靶基因和第二靶基因相同。

[0026] 13. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第二靶基因和第三靶基因相同。

[0027] 14. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第一靶基因、第二靶基因

和第三靶基因相同。

[0028] 15. 实施方案1-14中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第一靶基因、第二靶基因、第三靶基因和/或第四靶基因是亨廷顿基因。

[0029] 16. 实施方案1-14中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第一靶基因、第二靶基因、第三靶基因和/或第四靶基因是SOD1。

[0030] 17. 实施方案1-14中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第一靶基因、第二靶基因、第三靶基因和/或第四靶基因是亨廷顿基因或SOD1。

[0031] 18. 实施方案1或2所述的AAV病毒基因组,其中第一有义链和第一反义链之间的互补区域的长度为至少12个核苷酸。

[0032] 19. 实施方案18所述的AAV病毒基因组,其中第一有义链和第一反义链之间的互补区域的长度为14至21个核苷酸。

[0033] 20. 实施方案19所述的AAV病毒基因组,其中第一有义链和第一反义链之间的互补区域的长度为19个核苷酸。

[0034] 21. 实施方案1或2所述的AAV病毒基因组,其中第二有义链和第二反义链之间的互补区域的长度为至少12个核苷酸。

[0035] 22. 实施方案21所述的AAV病毒基因组,其中第二有义链和第二反义链之间的互补区域的长度为14至21个核苷酸。

[0036] 23. 实施方案22所述的AAV病毒基因组,其中第二有义链和第二反义链之间的互补区域的长度为19个核苷酸。

[0037] 24. 实施方案3所述的AAV病毒基因组,其中第三有义链和第三反义链之间的互补区域的长度为至少12个核苷酸。

[0038] 25. 实施方案24所述的AAV病毒基因组,其中第三有义链和第三反义链之间的互补区域的长度为14至21个核苷酸。

[0039] 26. 实施方案25所述的AAV病毒基因组,其中第三有义链和第三反义链之间的互补区域的长度为19个核苷酸。

[0040] 27. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第四有义链和第四反义链之间的互补区域的长度为至少12个核苷酸。

[0041] 28. 实施方案27所述的AAV病毒基因组,其中第四有义链和第四反义链之间的互补区域的长度为14至21个核苷酸。

[0042] 29. 实施方案25所述的AAV病毒基因组,其中第四有义链和第四反义链之间的互补区域的长度为19个核苷酸。

[0043] 30. 实施方案1或2所述的AAV病毒基因组,其中第一有义链序列、第二有义链序列、第一反义链序列和第二反义链序列独立地为30个核苷酸或更少。

[0044] 31. 实施方案3所述的AAV病毒基因组,其中第一有义链序列、第二有义链序列、第三有义链序列、第一反义链序列、第二反义链序列和第三反义链序列独立地为30个核苷酸或更少。

[0045] 32. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第一有义链序列、第二有义链序列、第三有义链序列、第四有义链序列、第一反义链序列、第二反义链序列、第三反义链序列和第四反义链序列独立地为30个核苷酸或更少。

[0046] 33. 实施方案1或2所述的AAV病毒基因组,其中第一有义链序列和第一反义链序列或第二有义链序列和第二反义链序列中的至少一个包含至少1个核苷酸的3' 突出端。

[0047] 34. 实施方案1或2所述的AAV病毒基因组,其中第一有义链序列和第一反义链序列或第二有义链序列和第二反义链序列中的至少一个包含至少2个核苷酸的3' 突出端。

[0048] 35. 实施方案3所述的AAV病毒基因组,其中第三有义链序列和第三反义链序列包含至少1个核苷酸的3' 突出端。

[0049] 36. 实施方案3所述的AAV病毒基因组,其中第三有义链序列和第三反义链序列包含至少2个核苷酸的3' 突出端。

[0050] 37. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第四有义链序列和第四反义链序列包含至少1个核苷酸的3' 突出端。

[0051] 38. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第四有义链序列和第四反义链序列包含至少2个核苷酸的3' 突出端。

[0052] 39. 实施方案1-38中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第一区域包含第一有义链序列的启动子5',其后是第一有义链序列,并且第二区域包含第一反义链序列,其后是第一反义链序列的启动子终止子3';或第三区域包含第二有义链序列的启动子5',其后是第二有义链序列,并且第四区域包含第二反义链序列,其后是第二反义链序列的启动子终止子3'。

[0053] 40. 实施方案1-38中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第一区域包含第一有义链序列的启动子5',其后是第一有义链序列,并且第二区域包含第一反义链序列,其后是第一反义链序列的启动子终止子3';并且第三区域包含第二有义链序列的启动子5',其后是第二有义链序列,并且第四区域包含第二反义链序列,其后是第二反义链序列的启动子终止子3'。

[0054] 41. 实施方案3-40中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第五区域包含第三有义链序列的启动子5',其后是第三有义链序列,并且第六区域包含第三反义链序列,其后是第三反义链序列的启动子终止子3'。

[0055] 42. 实施方案4-41中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第七区域包含第四有义链序列的启动子5',其后是第四有义链序列,并且第八区域包含第四反义链序列,其后是第四反义链序列的启动子终止子3'。

[0056] 43. 实施方案3所述的AAV病毒基因组,其中第五区域是第四区域的3'。

[0057] 44. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第七区域是第六区域的3'。

[0058] 45. 实施方案39-44中任一项所述的AAV病毒基因组,其中启动子是Po1 III启动子,并且启动子终止子是Po1 III启动子终止子。

[0059] 46. 实施方案45所述的AAV病毒基因组,其中Po1 III启动子是U3、U6、U7、7SK、H1或MRP、EBER、硒代半胱氨酸tRNA、7SL、腺病毒VA-1或端粒酶基因启动子,并且Po1 III启动子终止子是U3、U6、U7、7SK、H1或MRP、EBER、硒代半胱氨酸tRNA、7SL、腺病毒VA-1或端粒酶基因启动子终止子。

[0060] 47. 实施方案46所述的AAV病毒基因组,其中Po1 III启动子是H1启动子,并且Po1 III启动子终止子是H1启动子终止子。

[0061] 48. 实施方案1-47中任一项所述的AAV病毒基因组,其中AAV病毒基因组是单特异

性多顺反子AAV病毒基因组。

[0062] 49. 实施方案1-47中任一项所述的AAV病毒基因组,其中AAV病毒基因组是双特异性多顺反子AAV病毒基因组。

[0063] 50. 实施方案1或2所述的AAV病毒基因组,其中第一区域和第二区域编码第一siRNA分子,并且第三区域和第四区域编码第二siRNA分子,其中第一和第二siRNA分子靶向不同的靶基因。

[0064] 51. 实施方案3所述的AAV病毒基因组,其中第五区域和第六区域编码第三siRNA分子,其中第一siRNA分子、第二siRNA分子和第三siRNA分子各自靶向不同的靶基因。

[0065] 52. 实施方案4所述的AAV病毒基因组,其中第七区域和第八区域编码第四siRNA分子,其中第一siRNA分子、第二siRNA分子、第三siRNA分子和第四siRNA分子各自靶向不同的靶基因。

[0066] 53. 一种腺相关病毒(AAV)病毒基因组,其包含位于两个反向末端重复序列(ITR)之间的核酸序列,其中所述核酸序列包含第一分子支架区和第二分子支架区,其中所述第一分子支架区包括第一分子支架核酸序列,其编码:

[0067] (a) 第一茎和环以形成第一茎-环结构,所述第一茎-环结构的序列从5'至3'包含:

[0068] i. 第一UG基序,其位于第一茎-环结构的第一5'茎的基部处或附近;

[0069] ii. 第一5'茎臂,其包含第一有义链和任选的第一5'间隔区,其中所述第一5'间隔区当存在时位于所述第一UG基序和所述第一有义链之间;

[0070] iii. 第一环区,其在所述第一环区的5'端包含第一UGUG基序;

[0071] iv. 第一3'茎臂,其包含第一反义链和任选的第一3'间隔区,其中尿苷存在于所述第一反义链的5'端,并且其中所述第一3'间隔区当存在时具有足以形成一个螺旋角的长度;

[0072] (b) 第一5'侧翼区,其位于所述第一茎-环结构的5';和

[0073] (c) 第一3'侧翼区,其位于所述第一茎-环结构的3',所述第一3'侧翼区包含CNNC基序,和第二分子支架区,其包含第二分子支架核酸序列,其编码

[0074] (d) 第二茎和环以形成第二茎-环结构,所述第二茎-环结构的序列从5'至3'包括:

[0075] v. 第二UG基序,其位于第二茎-环结构的第二5'茎的基部或附近;

[0076] vi. 第二5'茎臂,其包含第二有义链和任选的第二5'间隔区,其中所述第二5'间隔区当存在时位于所述第二UG基序和所述第二有义链之间;

[0077] vii. 第二环区,其在所述第二环区的5'端包含第二UGUG基序;

[0078] viii. 第二3'茎臂,其包含第二反义链和任选的第二3'间隔区,其中尿苷存在于所述第二反义链的5'端,并且其中所述第二3'间隔区当存在时具有足以形成一个螺旋角的长度;

[0079] ix. 第二5'侧翼区,其位于所述第二茎-环结构的5';和

[0080] (e) 第二3'侧翼区,其位于所述第二茎-环结构的3',所述第二3'侧翼区包含CNNC基序,并且

[0081] 其中所述第一反义链和所述第一有义链形成第一siRNA双链体,并且所述第二反义链和所述第二有义链形成第二siRNA双链体,其中第一siRNA双链体在表达时抑制或阻遏第一靶基因在细胞中的表达,并且第二siRNA双链体在表达时抑制或阻遏第二靶基因在细

胞中的表达,其中第一和第二有义链序列包含至少15个核苷酸,第一反义链序列与第一靶基因产生的mRNA互补,并且第二反义链序列与第二靶基因产生的mRNA互补,并且其中所述第一有义链序列和第一反义链序列共有至少4个核苷酸长度的互补区域,并且所述第二有义链序列和第二反义链序列共有至少4个核苷酸长度的互补区域。

[0082] 54.一种腺相关病毒(AAV)病毒基因组,其包含位于两个反向末端重复序列(ITR)之间的核酸序列,其中所述核酸序列包含第一分子支架区和第二分子支架区,其中所述第一分子支架区包含第一分子支架核酸序列,其编码:

[0083] (a) 第一茎和环以形成第一茎-环结构,所述第一茎-环结构的序列从5'至3'包含:

[0084] i. 第一UG基序,其位于第一茎-环结构的第一5'茎的基部处或附近;

[0085] ii. 第一5'茎臂,其包含第一反义链和任选的第一5'间隔区,其中所述第一5'间隔区当存在时位于所述第一UG基序和所述第一反义链之间;

[0086] iii. 第一环区,其在所述第一环区的5'端包含第一UGUG基序;

[0087] iv. 第一3'茎臂,其包含第一有义链和任选的第一3'间隔区,其中尿苷存在于所述第一有义链的5'端,并且其中所述第一3'间隔区当存在时具有足以形成一个螺旋转角的长度;

[0088] (b) 第一5'侧翼区,其位于所述第一茎-环结构的5';和

[0089] (c) 第一3'侧翼区,其位于所述第一茎-环结构的3',所述第一3'侧翼区包含CNNC基序,和第二分子支架区,其包含第二分子支架核酸序列,其编码

[0090] (d) 第二茎和环以形成第二茎-环结构,所述第二茎-环结构的序列从5'至3'包括:

[0091] v. 第二UG基序,其位于第二茎-环结构的第二5'茎的基部或附近;

[0092] vi. 第二5'茎臂,其包含第二反义链和任选的第二5'间隔区,其中所述第二5'间隔区当存在时位于所述第二UG基序和所述第二反义链之间;

[0093] vii. 第二环区,其在所述第二环区的5'端包含第二UGUG基序;

[0094] viii. 第二3'茎臂,其包含第二反义链和任选的第二3'间隔区,其中尿苷存在于所述第二反义链的5'端,并且其中所述第二3'间隔区当存在时具有足以形成一个螺旋转角的长度;

[0095] (e) 第二5'侧翼区,其位于所述第二茎-环结构的5';和

[0096] (f) 第二3'侧翼区,其位于所述第二茎-环结构的3',所述第二3'侧翼区包含CNNC基序,并且

[0097] 其中所述第一反义链和所述第一有义链形成第一siRNA双链体,并且所述第二反义链和所述第二有义链形成第二siRNA双链体,其中第一siRNA双链体在表达时抑制或阻遏第一靶基因在细胞中的表达,并且第二siRNA双链体在表达时抑制或阻遏第二靶基因在细胞中的表达,其中第一和第二有义链序列包含至少15个核苷酸,第一反义链序列与第一靶基因产生的mRNA互补,并且第二反义链序列与第二靶基因产生的mRNA互补,并且其中所述第一有义链序列和第一反义链序列共有至少4个核苷酸长度的互补区域,并且所述第二有义链序列和第二反义链序列共有至少4个核苷酸长度的互补区域。

[0098] 55.实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中第一反义链序列或第二反义链序列抑制或阻遏亨廷顿基因的表达。

[0099] 56.实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中第一反义链序列和第二反义序列

链抑制或阻遏亨廷顿基因的表达。

[0100] 57. 实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中第一反义链序列或第二反义链序列抑制或阻遏SOD1的表达。

[0101] 58. 实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中第一反义链序列和第二反义链序列抑制或阻遏SOD1的表达。

[0102] 59. 实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中第一5'侧翼区选自表10中列出的序列。

[0103] 60. 实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中第二5'侧翼区选自表10中列出的序列。

[0104] 61. 实施方案59所述的AAV病毒基因组,其中第二5'侧翼区选自表10中列出的序列。

[0105] 62. 实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中第一环区选自表11中列出的序列。

[0106] 63. 实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中第二环区选自表11中列出的序列。

[0107] 64. 实施方案62所述的AAV病毒基因组,其中第二环区选自表11中列出的序列。

[0108] 65. 实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中第一3'侧翼区选自表12中列出的序列。

[0109] 66. 实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中第二3'侧翼区选自表12中列出的序列。

[0110] 67. 实施方案65所述的AAV病毒基因组,其中第二3'侧翼区选自表12中列出的序列。

[0111] 68. 实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其中核酸序列包含在第一分子支架核酸序列和第二分子支架核酸序列之间的启动子序列。

[0112] 69. 实施方案53或54所述的AAV病毒基因组,其在(b)中还包含第一5'侧翼区的启动子5',其后是第一5'侧翼区,并且在(c)中包含第一3'侧翼区,其后是第一3'侧翼区的启动子终止子3',并且在(d)中包含第二5'侧翼区的启动子5',其后是第二5'侧翼区,并且在(e)中包含第二3'侧翼区,其后是第二3'侧翼区的启动子终止子3'。

[0113] 70. 实施方案69所述的AAV病毒基因组,其中启动子是Po1 III启动子。

[0114] 71. 实施方案70所述的AAV病毒基因组,其中Po1 III启动子序列是U3、U6、U7、7SK、H1或MRP、EBER、硒代半胱氨酸tRNA、7SL、腺病毒VA-1或端粒酶基因启动子。

[0115] 72. 实施方案71所述的AAV病毒基因组,其中Po1 III启动子是H1启动子。

[0116] 73. 实施方案53所述的AAV病毒基因组,其中所述核酸序列还包含第三分子支架区,所述第三分子支架区包含第三分子支架核酸序列,其编码:

[0117] (g) 第三茎和环以形成第三茎-环结构,所述第三茎-环结构的序列从5'到3'包含:

[0118] ix. 第三UG基序,其位于第三茎-环结构的第三5'茎的基部处或附近;

[0119] x. 第三5'茎臂,其包含第三有义链和任选的第三5'间隔区,其中所述第三5'间隔区当存在时位于所述第三UG基序和所述第三有义链之间;

[0120] xi. 第三环区,其在所述第三环区的5'端包含第三UGUG基序;

[0121] xii. 第三3' 茎臂,其包括第三反义链和任选的第三3' 间隔区,其中尿苷存在于所述第三反义链的5' 端,并且其中所述第三3' 间隔区当存在时具有足以形成一个螺旋转角的长度;

[0122] (h) 第三5' 侧翼区,其位于所述第三茎-环结构的5' ;和

[0123] (i) 第三3' 侧翼区,其位于所述第三茎-环结构的3' ,所述第三3' 侧翼区包含CNNC基序,并且

[0124] 其中所述第三反义链和所述第三有义链形成第三siRNA双链体,其中所述第三siRNA双链体在表达时抑制或阻遏第三靶基因在细胞中的表达,其中第三有义链序列包含至少15个核苷酸,第三反义链序列与第三靶基因产生的mRNA互补,并且其中所述第三有义链序列和第三反义链序列共有至少4个核苷酸长度的互补区域。

[0125] 74. 实施方案73所述的AAV病毒基因组,其在(h)中还包含第三5' 侧翼区的启动子5' ,其后是第三5' 侧翼区,并且在(i)中包含第三3' 侧翼区,其后是第三3' 侧翼区的启动子终止子3' 。

[0126] 75. 实施方案74所述的AAV病毒基因组,其中启动子是Po1 III启动子。

[0127] 76. 实施方案75所述的AAV病毒基因组,其中Po1 III启动子序列是U3、U6、U7、7SK、H1或MRP、EBER、硒代半胱氨酸tRNA、7SL、腺病毒VA-1或端粒酶基因启动子。

[0128] 77. 实施方案76所述的AAV病毒基因组,其中Po1 III启动子是H1启动子。

[0129] 78. 实施方案73所述的AAV病毒基因组,其中核酸序列还包含第四分子支架区,所述第四分子支架区包含第四分子支架核酸序列,其编码

[0130] (j) 第四茎和环以形成第四茎-环结构,所述第四茎-环结构的序列从5' 到3' 包含:

[0131] xiii. 第四UG基序,其位于第四茎-环结构的第四5' 茎的基部处或附近;

[0132] xiv. 第四5' 茎臂,其包含第四有义链和任选的第四5' 间隔区,其中所述第四5' 间隔区当存在时位于所述第四UG基序和所述第四有义链之间;

[0133] xv. 第四环区,其在所述第四环区的5' 端包含第四UGUG基序;

[0134] xvi. 第四3' 茎臂,其包含第四反义链和任选的第四3' 间隔区,其中尿苷存在于所述第四反义链的5' 端,并且其中所述第四3' 间隔区当存在时具有足以形成一个螺旋转角的长度;

[0135] (k) 第四5' 侧翼区,其位于所述第四茎-环结构的5' ;和

[0136] (l) 第四3' 侧翼区,其位于所述第四茎-环结构的3' ,所述第四3' 侧翼区包含CNNC基序,并且

[0137] 其中所述第四反义链和所述第四有义链形成第四siRNA双链体,其中第4个siRNA双链体在表达时抑制或阻遏第四靶基因在细胞中的表达,其中第四有义链序列包含至少15个核苷酸,第四反义链序列与第四靶基因产生的mRNA互补,并且其中所述第四有义链序列和第四反义链序列共有至少4个核苷酸长度的互补区域。

[0138] 79. 实施方案78所述的AAV病毒基因组,其在(k)中还包含第四5' 侧翼区的启动子5' ,其后是第四5' 侧翼区,并且在(l)中包含第四3' 侧翼区,其后是第四3' 侧翼区的启动子终止子3' 。

[0139] 80. 实施方案79所述的AAV病毒基因组,其中启动子是Po1 III启动子。

[0140] 81. 实施方案80所述的AAV病毒基因组,其中Po1 III启动子序列是U3、U6、U7、7SK、

H1或MRP、EBER、硒代半胱氨酸tRNA、7SL、腺病毒VA-1或端粒酶基因启动子。

- [0141] 82. 实施方案81所述的AAV病毒基因组,其中Po1 III启动子是H1启动子。
- [0142] 83. 实施方案53-82中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第一靶基因与第二靶基因相同。
- [0143] 84. 实施方案53-82中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第三靶基因与第一靶基因相同。
- [0144] 85. 实施方案53-82中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第三靶基因与第二靶基因相同。
- [0145] 86. 实施方案53-82中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第一靶基因、第二靶基因和第三靶基因相同。
- [0146] 87. 实施方案53-82中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第一靶基因相同。
- [0147] 88. 实施方案53-82中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第二靶基因相同。
- [0148] 89. 实施方案53-82中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第三靶基因相同。
- [0149] 90. 实施方案53-82中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第一靶基因和第二靶基因相同。
- [0150] 91. 实施方案53-82所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第二靶基因和第三靶基因相同。
- [0151] 92. 实施方案53-82所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第一靶基因和第三靶基因相同。
- [0152] 93. 实施方案53-82中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第四靶基因与第一靶基因、第二靶基因和第三靶基因相同。
- [0153] 94. 实施方案53-93中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第一靶基因、第二靶基因、第三靶基因和/或第四靶基因是亨廷顿基因。
- [0154] 95. 实施方案53-93中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第一靶基因、第二靶基因、第三靶基因和/或第四靶基因是SOD1。
- [0155] 96. 实施方案53-93中任一项所述的AAV病毒基因组,其中第一靶基因、第二靶基因、第三靶基因和/或第四靶基因是亨廷顿基因或SOD1。
- [0156] 97. 一种抑制靶基因在细胞中的基因表达的方法,该方法包括向细胞施用包含实施方案1-96中任一项所述的AAV病毒基因组的组合物。
- [0157] 98. 实施方案97所述的方法,其中细胞是哺乳动物细胞。
- [0158] 99. 实施方案98所述的方法,其中哺乳动物细胞是中型多棘神经元(medium spiny neuron)。
- [0159] 100. 实施方案98所述的方法,其中哺乳动物细胞是皮质神经元。
- [0160] 101. 实施方案98所述的方法,其中哺乳动物细胞是运动神经元。
- [0161] 102. 实施方案98所述的方法,其中哺乳动物细胞是星形胶质细胞。
- [0162] 103. 一种在有此需要的受试者中治疗疾病和/或病症的方法,该方法包括向受试

者施用治疗有效量的包含实施方案1-96中任一项所述的AAV病毒基因组的组合物。

[0163] 104. 实施方案103所述的方法, 其中靶基因的表达被抑制或阻遏。

[0164] 105. 实施方案104所述的方法, 其中目标靶基因的表达被抑制或阻遏了约30%至约70%。

[0165] 106. 实施方案104所述的方法, 其中靶基因的表达被抑制或阻遏了约50%至约90%。

[0166] 107. 一种抑制靶基因在细胞中的表达的方法, 其中靶基因导致获得细胞内功能作用, 所述方法包括向细胞施用包含实施方案1-96中任一项所述的AAV病毒基因组的组合物。

[0167] 108. 实施方案107所述的方法, 其中细胞是哺乳动物细胞。

[0168] 109. 实施方案108所述的方法, 其中哺乳动物细胞是中型多棘神经元。

[0169] 110. 实施方案108所述的方法, 其中哺乳动物细胞是皮质神经元。

[0170] 111. 实施方案108所述的方法, 其中哺乳动物细胞是运动神经元。

[0171] 112. 实施方案108所述的方法, 其中哺乳动物细胞是星形胶质细胞。

[0172] 附图简要说明

[0173] 根据以下本发明的特定实施方案的描述, 前述和其他目的、特征和优点将是显而易见的, 如附图中所示。附图不必然按比例绘制, 而是将重点放在说明本发明的各种实施方案的原理上。

[0174] 图1是本发明的病毒基因组的示意图。

[0175] 图2是本发明的病毒基因组的示意图。

[0176] 图3是本发明的病毒基因组的示意图。

[0177] 图4是本发明的病毒基因组的示意图。

[0178] 图5是本发明的病毒基因组的示意图。

[0179] 图6是本发明的病毒基因组的示意图。

[0180] 图7是本发明的病毒基因组的示意图。

[0181] 图8是本发明的病毒基因组的示意图。

[0182] 图9是本发明的病毒基因组的示意图。

[0183] 本发明的一个或多个实施方案的细节在以下所附描述中阐明。尽管与本文描述的那些材料或方法相似或等同的任何材料和方法都可以用于本发明的实践或测试中, 但是现在描述优选的材料和方法。通过描述, 本发明的其他特征、目的和优点将是显而易见的。在说明书中, 单数形式也包括复数, 除非上下文另外明确指出。除非另有定义, 否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的不同含义。在有冲突的情况下, 以本说明书为准。

[0184] 发明详述

[0185] I. 本发明的组成

[0186] 根据本发明, 提供了用于通过腺相关病毒 (AAV) 递送调节性多核苷酸和/或基于调节性多核苷酸的组合物的组合物。可通过几种途径中的任一种向细胞、组织、器官或生物体体内、离体或体外施用提供本发明的AAV颗粒。

[0187] 如本文所用, “AAV颗粒” 是包含具有至少一个有效载荷区和至少一个反向末端重复序列 (ITR) 区的病毒基因组的病毒。

[0188] 如本文所用,“病毒基因组”或“载体基因组”或“病毒载体”是指包覆在AAV颗粒中的核酸序列。病毒基因组包含至少一个编码多肽或其片段的有效载荷区。

[0189] 如本文所用,“有效载荷”或“有效载荷区”是编码本发明的一种或多种多肽的任何核酸分子。有效载荷区至少包含编码有义和反义序列的核酸序列(一种基于siRNA的组合物)或其片段,但也可任选包含一种或多种功能性或调节性元件,以促进转录表达和/或多肽翻译。

[0190] 可以对本文公开的核酸序列和多肽进行工程化,以使其包含组装的实现本发明的调节性多核苷酸和/或基于调节性多核苷酸的组合物的表达的模块元件和/或序列基序。在一些实施方案中,包含有效载荷区的核酸序列可包含启动子区、内含子、Kozak序列、增强子或聚腺苷酸化序列中的一种或多种。本发明的有效载荷区通常编码至少一个有义和反义序列(一种基于siRNA的组合物)或前述彼此结合或与其他多肽部分结合的片段。

[0191] 本发明的有效载荷区可以在AAV颗粒的病毒基因组内递送至一个或多个靶细胞、组织、器官或生物体。

[0192] 腺相关病毒(AAV)和AAV颗粒

[0193] 细小病毒科的病毒是小的非包膜二十面体衣壳病毒,其特征是单链DNA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(Parvovirinae)和感染无脊椎动物的浓核病毒亚科(Densovirinae)。由于其结构相对简单,使用标准分子生物学技术易于操作,因此该病毒科可用作生物学工具。可以修饰病毒的基因组以使其包含用于组装功能性重组病毒或病毒颗粒的最少组分,所述重组病毒或病毒颗粒装载有或工程化以表达或递送所需的有效载荷,该有效载荷可以递送至靶细胞、组织、器官或生物体。

[0194] 细小病毒和细小病毒科的其他成员通常描述在Kenneth I. Berns的“Parvoviridae: The Viruses and Their Replication”(FIELDS VIROLOGY)(第3版,1996年)第69章中进行了描述,其内容通过引用整体并入。

[0195] 细小病毒科包括依赖病毒属,其包括能够在脊椎动物宿主中复制的腺相关病毒(AAV),宿主包括但不限于人类、灵长类、牛、犬、马和羊。

[0196] AAV病毒基因组是线性单链DNA(ssDNA)分子,长度约为5,000个核苷酸(nt)。AAV病毒基因组可包含有效载荷区和至少一个反向末端重复序列(ITR)或ITR区。传统上,ITR位于非结构蛋白(由Rep基因编码)和结构蛋白(由衣壳基因或Cap基因编码)的编码核苷酸序列的侧翼。尽管不希望受到理论的束缚,但AAV病毒基因组通常包含两个ITR序列。AAV病毒基因组包含特征性T形发夹结构,其由形成能量稳定双链区的ssDNA的5'和3'端的自互补末端145nt限定。双链发夹结构包含多种功能,包括但不限于通过充当宿主病毒复制细胞的内源性DNA聚合酶复合物的引物来用作DNA复制的起点。

[0197] 除编码的异源有效载荷外,AAV载体还可全部或部分包含任何天然存在的和/或重组的AAV血清型核苷酸序列或变体的病毒基因组。AAV变体可在核酸(基因组或衣壳)和氨基酸水平(衣壳)上具有显著同源性的序列,以产生通常为物理和功能等同物的构建体,通过相似的机制复制,并通过相似的机制组装。Chiorini等人,J.Vir.71:6823-33(1997);Srivastava等人,J.Vir.45:555-64(1983);Chiorini等人,J.Vir.73:1309-1319(1999);Rutledge等人,J.Vir.72:309-319(1998);和Wu等人,J.Vir.74:8635-47(2000),其各自内容通过引用整体并入本文。

[0198] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒是复制缺陷的重组AAV载体,在其病毒基因组中缺乏编码功能性Rep和Cap蛋白的序列。这些缺陷AAV载体可能缺乏大多数或全部亲本编码序列,并且基本上仅携带一个或两个AAV ITR序列和用于递送至细胞、组织、器官或生物体的目标核酸。

[0199] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的病毒基因组包含至少一种控制元件,该控制元件提供了其中编码的编码序列的复制、转录和翻译。并非总是需要存在所有的控制元件,只要编码序列能够在适当的宿主细胞中复制、转录和/或翻译。表达控制元件的非限制性实例包括用于转录起始和/或终止的序列、启动子和/或增强子序列、有效的RNA加工信号(例如剪接和聚腺苷酸化信号)、稳定细胞质mRNA的序列、增强翻译效率的序列(例如,Kozak共有序列)、增强蛋白稳定性的序列和/或增强蛋白加工和/或分泌的序列。

[0200] 根据本发明,用于治疗 and/或诊断的AAV颗粒包含已被提取(distill)或减少至转导目标核酸有效载荷或货物所需的最小组分的病毒。以这种方式,AAV颗粒被工程化为用于特异性递送的载体,同时缺少在野生型病毒中发现的有害复制和/或整合特征。

[0201] 本发明的AAV载体可以重组产生,并且可以基于腺相关病毒(AAV)的亲本或参考序列。如本文所用,“载体”是转运、转导或以其他方式充当异源分子(例如本文所述的核酸)的载体的任何分子或实体。

[0202] 除了单链AAV病毒基因组(例如ssAAV)之外,本发明还提供了自互补AAV(scAAV)病毒基因组。scAAV病毒基因组包含DNA链,它们退火在一起形成双链DNA。通过跳过第二链合成,scAAV可在细胞中快速表达。

[0203] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒是scAAV。

[0204] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒是ssAAV。

[0205] 本领域公开了产生和/或修饰AAV颗粒的方法,例如假型AAV载体(PCT专利公开号W0200028004;W0200123001;W02004112727;WO 2005005610和WO 2005072364,其各自内容通过引用整体并入本文)。

[0206] 可以修饰AAV颗粒以增强递送效率。这样的修饰AAV颗粒可以被有效地包装,并被用于以高频率和最小毒性成功地感染靶细胞。在一些实施方案中,根据美国公开号US 20130195801中描述的方法工程化AAV颗粒的衣壳,其内容通过引用整体并入本文。

[0207] 在一个实施方案中,可以将包含编码本发明的多肽的有效载荷区的AAV颗粒引入哺乳动物细胞中。

[0208] AAV血清型

[0209] 本发明的AAV颗粒可以包含或衍生自任何天然或重组AAV血清型。根据本发明,AAV颗粒可以利用或基于选自以下任一种的血清型: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.t19、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、绵羊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-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV改组100-1、AAV改组100-3、AAV改组100-7、AAV改组10-2、AAV改组10-6、AAV改组10-8、AAV改组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、AAV CHt-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、AAV CKd-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、AAV CLv-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、AAV CLv-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、AAV CSp-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、AAVF9/HSC9、AAV-PHP.B(PHP.B)、AAV-PHP.A(PHP.A)、G2B-26、G2B-13、TH1.1-32、TH1.1-35、AAVPHP.B2、AAVPHP.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、AAVG2B4、AAVG2B5及其变体。

[0210] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国公开号US20030138772中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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(US20030138772SEQ 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(US20030138772SEQ 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(US20030138772SEQ ID NO:41)、AAV43-20(US20030138772 SEQ ID NO:42)、AAV43-21(US20030138772 SEQ ID NO:43)、AAV43-23(US20030138772 SEQ ID NO:44)、AAV43-25(US20030138772 SEQ ID NO:45)、AAV44.1(US20030138772SEQ 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(US20030138772SEQ 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(US20030138772SEQ 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(US20030138772 SEQ ID NO:9)或其变体。

[0211] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国公开号US20150159173中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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。

[0212] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利号US 7198951中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV9 (SEQ (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)。

[0213] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如N Pulicherla等人 (Molecular Therapy 19(6):1070-1078 (2011),通过引用整体并入本文)所述的AAV9序列中的突变)),例如但不限于AAV9.9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84。

[0214] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利号US 6156303中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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。

[0215] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国公开号US20140359799中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV8 (US20140359799的SEQ ID NO:1)、AAVDJ (US20140359799的SEQ ID NO:2和3)或其变体。

[0216] 在一些实施方案中,血清型可以是AAVDJ (AAV-DJ) 或其变体,例如AAVDJ8 (或AAV-DJ8),如Grimm等人 (Journal of Virology 82(12):5887-5911 (2008),通过引用整体并入本文)所述。AAVDJ8的氨基酸序列可以包含两个或更多个突变,以去除肝素结合域(HBD)。作为非限制性实例,在美国专利号7,588,772中(其内容通过引用整体并入本文)被描述为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)和(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,可包含3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)和(3)R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)变为苏氨酸(T;Thr)。

[0217] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如国际公开号W01998011244中所述的AAV4序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV4 (W01998011244的SEQ ID NO:1-20)。

[0218] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有AAV2序列中的突变以产生AAV2G9,如国际公开号W02014144229中所述,其通过引用整体并入本文。

[0219] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有国际公开号W02005033321中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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 (W02005033321SEQ 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 (W02005033321SEQ 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 (W02005033321SEQ ID NO:28)、AAVpi.2 (W02005033321SEQ ID NO:30)、AAVpi.3 (W02005033321SEQ 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 (W02005033321SEQ ID NO:34)、AAVrh.45 (W02005033321SEQ ID NO:41)、AAVrh.47 (W02005033321SEQ 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 (W02005033321SEQ 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 (W02005033321SEQ ID NO:42)、AAVrh.60 (W02005033321SEQ 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 (W02005033321SEQ ID NO:35)、AAVrh.68 (W02005033321SEQ ID NO:16)、AAVrh.69 (W02005033321 SEQ ID NO:39)、AAVrh.70 (W02005033321SEQ ID NO:20)、AAVrh.72 (W02005033321SEQ ID NO:9),或其变体,其包括但不限于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,其内容通过引用整体并入本文。

[0220] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有国际公开号W02015168666中描述的

序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAVrh8R(WO2015168666的SEQ ID NO:9)、AAVrh8R A586R突变体(WO2015168666的SEQ ID NO:10)、AAVrh8R R533A突变体(WO2015168666的SEQ ID NO:11)或其变体。

[0221] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利号US9233131中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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。

[0222] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利公开号US20150376607中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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。

[0223] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利号US9163261中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV-2-pre-miRNA-101(US9163261SEQ ID NO:1)。

[0224] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利公开号US20150376240中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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。

[0225] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利公开号US20160017295中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV SM 10-2(US20160017295的

SEQ ID NO:22)、AAV改组100-1(US20160017295的SEQ ID NO:23)、AAV改组100-3(US20160017295的SEQ ID NO:24)、AAV改组100-7(US20160017295的SEQ ID NO:25)、AAV改组10-2(US20160017295的SEQ ID NO:34)、AAV改组10-6(US20160017295的SEQ ID NO:35)、AAV改组10-8(US20160017295的SEQ ID NO:36)、AAV改组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。

[0226] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利公开号US20150238550中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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。

[0227] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有美国专利公开号US20150315612中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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。

[0228] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有国际公开号WO2015121501中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于真型AAV(ttAAV)(WO2015121501的SEQ ID NO:2)、“UPenn AAV10”(WO2015121501的SEQ ID NO:8)、“日本AAV10”(WO2015121501的SEQ ID NO:9)或其变体。

[0229] 根据本发明,AAV衣壳血清型的选择或使用可以来自多种物种。在一个实施方案中,AAV可以是禽类AAV(AAAV)。AAAV血清型可以是或具有美国专利号US 9,238,800中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAAV(US 9,238,800的SEQ ID NO:1、2、4、6、8、10、12和14)或其变体。

[0230] 在一个实施方案中,AAV可以是牛AAV(BAAV)。BAAV血清型可以是或具有美国专利号US 9,193,769中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于BAAV(US 9193769的SEQ ID NO:1和6)或其变体。BAAV血清型可以是或具有美国专利号US7427396中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于BAAV(US7427396的SEQ ID NO:5和6)或其变体。

[0231] 在一个实施方案中,AAV可以是山羊AAV。山羊AAV血清型可以是或具有美国专利号US7427396中描述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于山羊AAV(US7427396的SEQ ID NO:3)或其变体。

[0232] 在其他实施方案中,可以将AAV工程化为来自两种或更多种亲本血清型的杂种AAV。在一个实施方案中,AAV可以是AAV2G9,其包含来自AAV2和AAV9的序列。AAV2G9 AAV血清型可以是或具有美国专利公开号US20160017005中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文。

[0233] 在一个实施方案中,AAV可以是如Pulicherla等人(Molecular Therapy 19(6): 1070-1078(2011))所述的由AAV9衣壳文库产生的具有390-627位氨基酸中突变(VP1编号)的血清型,其内容通过引用整体并入本文。血清型以及相应的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)。

[0234] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有国际公开号W02016049230中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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。

[0235] 在一些实施方案中, AAV血清型可以是或具有美国专利号US 8734809中所述的序列, 其内容通过引用整体并入本文, 例如但不限于, 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:37和111)、AAV CLv-R9 (US8734809的SEQ ID NO:38和112)、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-B1 (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。

[0236] 在一些实施方案中, AAV血清型可以是或具有国际公开号W02016065001中描述的序列, 其内容通过引用整体并入本文, 例如但不限于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(WO2016065001的SEQ ID NO:45和95)、AAV CBr-B7.3(WO2016065001的SEQ ID NO:46和96)、AAV CBr-B7.4(WO2016065001的SEQ ID NO:47和97)、AAV3B(WO2016065001的SEQ ID NO:48和98)、AAV4(WO2016065001的SEQ ID NO:49和99)、AAV5(WO2016065001的SEQ ID NO:50和100)或其变体或衍生物。

[0237] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国公开号US 20160361439中所述的修饰,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于野生型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12及其杂交体的Y252F、Y272F、Y444F、Y500F、Y700F、Y704F、Y730F、Y275F、Y281F、Y508F、Y576F、Y612G、Y673F和Y720F。

[0238] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国专利号US 9546112中所述的突变,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于至少两个,但不全部是AAV6(US 9546112的SEQ ID NO:4)、AAV1(US 9546112的SEQ ID NO:6)、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7、AAV9、AAV10或AAV11或其衍生物的序列中的F129L、D418E、K531E、L584F、V598A和H642N突变。在又一个实施方案中,AAV血清型可以是或具有包含K531E突变的AAV6序列(US 9546112的SEQ ID NO:5)。

[0239] 在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有美国公开号US 20130224836中所述的AAV1序列中的突变,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于,优选地在AAV1(US 20130224836的SEQ ID NO:2)的252、273、445、701、705和731位上的至少一个表面暴露的酪氨酸残基被另一个氨基酸取代,优选被苯丙氨酸残基取代。在一个实施方案中,AAV血清型可以是或具有AAV9序列中的突变,例如但不限于,优选地在AAV2(US 20130224836的SEQ ID NO:4)的252、272、444、500、700、704和730位上的至少一个表面暴露的酪氨酸残基被另一个氨基酸取代,优选被苯丙氨酸残基取代。在一个实施方案中,在AAV9(US 20130224836的SEQ ID NO:6)的446位上的酪氨酸残基被苯丙氨酸残基取代。

[0240] 在一些实施方案中,血清型可以是国际公开号WO2016130589中所述的AAV2或其变体,其通过引用整体并入本文。AAV2的氨基酸序列可以包含N587A、E548A或N708A突变。在一个实施方案中,任何AAV的氨基酸序列可包含V708K突变。

[0241] 在一个实施方案中,AAV可以是选自存在于表1中的任何血清型的血清型。

[0242] 在一个实施方案中,AAV可包含表1中序列中的序列、片段或变体。

[0243] 在一个实施方案中,AAV可以由表1中所述的序列、片段或变体编码。

[0244] 表1.AAV血清型

[0245]

血清型	SEQ ID NO	参考信息
AAV1	1	US20150159173 SEQ ID NO: 11、US20150315612 SEQ ID NO: 202
AAV1	2	US20160017295 SEQ ID NO: 1US20030138772 SEQ ID NO: 64、US20150159173 SEQ ID NO: 27、US20150315612 SEQ ID NO: 219、US7198951 SEQ ID NO: 5
AAV1	3	US20030138772 SEQ ID NO: 6
AAV1.3	4	US20030138772 SEQ ID NO: 14
AAV10	5	US20030138772 SEQ ID NO: 117
AAV10	6	WO2015121501 SEQ ID NO: 9

[0246]

AAV10	7	WO2015121501 SEQ ID NO: 8
AAV11	8	US20030138772 SEQ ID NO: 118
AAV12	9	US20030138772 SEQ ID NO: 119
AAV2	10	US20150159173 SEQ ID NO: 7、US20150315612 SEQ ID NO: 211
AAV2	11	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	12	US6156303 SEQ ID NO: 8
AAV2	13	US20030138772 SEQ ID NO: 7
AAV2	14	US6156303 SEQ ID NO: 3
AAV2.5T	15	US9233131 SEQ ID NO: 42
AAV223.10	16	US20030138772 SEQ ID NO: 75
AAV223.2	17	US20030138772 SEQ ID NO: 49
AAV223.2	18	US20030138772 SEQ ID NO: 76
AAV223.4	19	US20030138772 SEQ ID NO: 50
AAV223.4	20	US20030138772 SEQ ID NO: 73
AAV223.5	21	US20030138772 SEQ ID NO: 51
AAV223.5	22	US20030138772 SEQ ID NO: 74
AAV223.6	23	US20030138772 SEQ ID NO: 52
AAV223.6	24	US20030138772 SEQ ID NO: 78
AAV223.7	25	US20030138772 SEQ ID NO: 53
AAV223.7	26	US20030138772 SEQ ID NO: 77
AAV29.3	27	US20030138772 SEQ ID NO: 82
AAV29.4	28	US20030138772 SEQ ID NO: 12
AAV29.5	29	US20030138772 SEQ ID NO: 83
AAV29.5 (AAVbb.2)	30	US20030138772 SEQ ID NO: 13
AAV3	31	US20150159173 SEQ ID NO: 12

[0247]

AAV3	32	US20030138772 SEQ ID NO: 71 、 US20150159173 SEQ ID NO: 28 、 US20160017295 SEQ ID NO: 3、 US7198951 SEQ ID NO: 6
AAV3	33	US20030138772 SEQ ID NO: 8
AAV3.3b	34	US20030138772 SEQ ID NO: 72
AAV3-3	35	US20150315612 SEQ ID NO: 200
AAV3-3	36	US20150315612 SEQ ID NO: 217
AAV3a	37	US6156303 SEQ ID NO: 5
AAV3a	38	US6156303 SEQ ID NO: 9
AAV3b	39	US6156303 SEQ ID NO: 6
AAV3b	40	US6156303 SEQ ID NO: 10
AAV3b	41	US6156303 SEQ ID NO: 1
AAV4	42	US20140348794 SEQ ID NO: 17
AAV4	43	US20140348794 SEQ ID NO: 5
AAV4	44	US20140348794 SEQ ID NO: 3
AAV4	45	US20140348794 SEQ ID NO: 14
AAV4	46	US20140348794 SEQ ID NO: 15
AAV4	47	US20140348794 SEQ ID NO: 19
AAV4	48	US20140348794 SEQ ID NO: 12
AAV4	49	US20140348794 SEQ ID NO: 13
AAV4	50	US20140348794 SEQ ID NO: 7
AAV4	51	US20140348794 SEQ ID NO: 8
AAV4	52	US20140348794 SEQ ID NO: 9
AAV4	53	US20140348794 SEQ ID NO: 2
AAV4	54	US20140348794 SEQ ID NO: 10
AAV4	55	US20140348794 SEQ ID NO: 11
AAV4	56	US20140348794 SEQ ID NO: 18
AAV4	57	US20030138772 SEQ ID NO: 63 、 US20160017295 SEQ ID NO: 4 、 US20140348794 SEQ ID NO: 4
AAV4	58	US20140348794 SEQ ID NO: 16

[0248]

AAV4	59	US20140348794 SEQ ID NO: 20
AAV4	60	US20140348794 SEQ ID NO: 6
AAV4	61	US20140348794 SEQ ID NO: 1
AAV42.2	62	US20030138772 SEQ ID NO: 9
AAV42.2	63	US20030138772 SEQ ID NO: 102
AAV42.3b	64	US20030138772 SEQ ID NO: 36
AAV42.3B	65	US20030138772 SEQ ID NO: 107
AAV42.4	66	US20030138772 SEQ ID NO: 33
AAV42.4	67	US20030138772 SEQ ID NO: 88
AAV42.8	68	US20030138772 SEQ ID NO: 27
AAV42.8	69	US20030138772 SEQ ID NO: 85
AAV43.1	70	US20030138772 SEQ ID NO: 39
AAV43.1	71	US20030138772 SEQ ID NO: 92
AAV43.12	72	US20030138772 SEQ ID NO: 41
AAV43.12	73	US20030138772 SEQ ID NO: 93
AAV43.20	74	US20030138772 SEQ ID NO: 42
AAV43.20	75	US20030138772 SEQ ID NO: 99
AAV43.21	76	US20030138772 SEQ ID NO: 43
AAV43.21	77	US20030138772 SEQ ID NO: 96
AAV43.23	78	US20030138772 SEQ ID NO: 44
AAV43.23	79	US20030138772 SEQ ID NO: 98
AAV43.25	80	US20030138772 SEQ ID NO: 45
AAV43.25	81	US20030138772 SEQ ID NO: 97
AAV43.5	82	US20030138772 SEQ ID NO: 40
AAV43.5	83	US20030138772 SEQ ID NO: 94
AAV4-4	84	US20150315612 SEQ ID NO: 201
AAV4-4	85	US20150315612 SEQ ID NO: 218
AAV44.1	86	US20030138772 SEQ ID NO: 46
AAV44.1	87	US20030138772 SEQ ID NO: 79

[0249]

AAV44.5	88	US20030138772 SEQ ID NO: 47
AAV44.5	89	US20030138772 SEQ ID NO: 80
AAV4407	90	US20150315612 SEQ ID NO: 90
AAV5	91	US7427396 SEQ ID NO: 1
AAV5	92	US20030138772 SEQ ID NO: 114
AAV5	93	US20160017295 SEQ ID NO: 5、US7427396 SEQ ID NO: 2、US20150315612 SEQ ID NO: 216
AAV5	94	US20150315612 SEQ ID NO: 199
AAV6	95	US20150159173 SEQ ID NO: 13
AAV6	96	US20030138772 SEQ ID NO: 65、US20150159173 SEQ ID NO: 29、US20160017295 SEQ ID NO: 6、US6156303 SEQ ID NO: 7
AAV6	97	US6156303 SEQ ID NO: 11
AAV6	98	US6156303 SEQ ID NO: 2
AAV6	99	US20150315612 SEQ ID NO: 203
AAV6	100	US20150315612 SEQ ID NO: 220
AAV6.1	101	US20150159173
AAV6.12	102	US20150159173
AAV6.2	103	US20150159173
AAV7	104	US20150159173 SEQ ID NO: 14
AAV7	105	US20150315612 SEQ ID NO: 183
AAV7	106	US20030138772 SEQ ID NO: 2、US20150159173 SEQ ID NO: 30、US20150315612 SEQ ID NO: 181、US20160017295 SEQ ID NO: 7
AAV7	107	US20030138772 SEQ ID NO: 3
AAV7	108	US20030138772 SEQ ID NO: 1、US20150315612 SEQ ID NO: 180
AAV7	109	US20150315612 SEQ ID NO: 213
AAV7	110	US20150315612 SEQ ID NO: 222
AAV8	111	US20150159173 SEQ ID NO: 15
AAV8	112	US20150376240 SEQ ID NO: 7
AAV8	113	US20030138772 SEQ ID NO: 4、US20150315612 SEQ ID NO: 182

[0250]

AAV8	114	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	115	US20150376240 SEQ ID NO: 8
AAV8	116	US20150315612 SEQ ID NO: 214
AAV-8b	117	US20150376240 SEQ ID NO: 5
AAV-8b	118	US20150376240 SEQ ID NO: 3
AAV-8h	119	US20150376240 SEQ ID NO: 6
AAV-8h	120	US20150376240 SEQ ID NO: 4
AAV9	121	US20030138772 SEQ ID NO: 5
AAV9	122	US7198951 SEQ ID NO: 1
AAV9	123	US20160017295 SEQ ID NO: 9
AAV9	124	US20030138772 SEQ ID NO: 100、US7198951 SEQ ID NO: 2
AAV9	125	US7198951 SEQ ID NO: 3
AAV9 (AAVhu.14)	126	US7906111 SEQ ID NO: 3; WO2015038958 SEQ ID NO: 11
AAV9 (AAVhu.14)	127	US7906111 SEQ ID NO: 123; WO2015038958 SEQ ID NO: 2
AAVA3.1	128	US20030138772 SEQ ID NO: 120
AAVA3.3	129	US20030138772 SEQ ID NO: 57
AAVA3.3	130	US20030138772 SEQ ID NO: 66
AAVA3.4	131	US20030138772 SEQ ID NO: 54
AAVA3.4	132	US20030138772 SEQ ID NO: 68
AAVA3.5	133	US20030138772 SEQ ID NO: 55
AAVA3.5	134	US20030138772 SEQ ID NO: 69
AAVA3.7	135	US20030138772 SEQ ID NO: 56
AAVA3.7	136	US20030138772 SEQ ID NO: 67
AAV29.3 (AAVbb.1)	137	US20030138772 SEQ ID NO: 11

[0251]

AAVC2	138	US20030138772 SEQ ID NO: 61
AAVCh.5	139	US20150159173 SEQ ID NO: 46、US20150315612 SEQ ID NO: 234
AAVcy.2 (AAV13.3)	140	US20030138772 SEQ ID NO: 15
AAV24.1	141	US20030138772 SEQ ID NO: 101
AAVcy.3 (AAV24.1)	142	US20030138772 SEQ ID NO: 16
AAV27.3	143	US20030138772 SEQ ID NO: 104
AAVcy.4 (AAV27.3)	144	US20030138772 SEQ ID NO: 17
AAVcy.5	145	US20150315612 SEQ ID NO: 227
AAV7.2	146	US20030138772 SEQ ID NO: 103
AAVcy.5 (AAV7.2)	147	US20030138772 SEQ ID NO: 18
AAV16.3	148	US20030138772 SEQ ID NO: 105
AAVcy.6 (AAV16.3)	149	US20030138772 SEQ ID NO: 10
AAVcy.5	150	US20150159173 SEQ ID NO: 8
AAVcy.5	151	US20150159173 SEQ ID NO: 24
AAVCy.5R1	152	US20150159173
AAVCy.5R2	153	US20150159173
AAVCy.5R3	154	US20150159173
AAVCy.5R4	155	US20150159173
AAVDJ	156	US20140359799 SEQ ID NO: 3、US7588772 SEQ ID NO: 2
AAVDJ	157	US20140359799 SEQ ID NO: 2、US7588772 SEQ ID NO: 1
AAVDJ-8	158	US7588772; Grimm 等人 2008
AAVDJ-8	159	US7588772; Grimm 等人 2008
AAVF5	160	US20030138772 SEQ ID NO: 110
AAVH2	161	US20030138772 SEQ ID NO: 26

[0252]

AAVH6	162	US20030138772 SEQ ID NO: 25
AAVhE1.1	163	US9233131 SEQ ID NO: 44
AAVhEr1.14	164	US9233131 SEQ ID NO: 46
AAVhEr1.16	165	US9233131 SEQ ID NO: 48
AAVhEr1.18	166	US9233131 SEQ ID NO: 49
AAVhEr1.23 (AAVhEr2.29)	167	US9233131 SEQ ID NO: 53
AAVhEr1.35	168	US9233131 SEQ ID NO: 50
AAVhEr1.36	169	US9233131 SEQ ID NO: 52
AAVhEr1.5	170	US9233131 SEQ ID NO: 45
AAVhEr1.7	171	US9233131 SEQ ID NO: 51
AAVhEr1.8	172	US9233131 SEQ ID NO: 47
AAVhEr2.16	173	US9233131 SEQ ID NO: 55
AAVhEr2.30	174	US9233131 SEQ ID NO: 56
AAVhEr2.31	175	US9233131 SEQ ID NO: 58
AAVhEr2.36	176	US9233131 SEQ ID NO: 57
AAVhEr2.4	177	US9233131 SEQ ID NO: 54
AAVhEr3.1	178	US9233131 SEQ ID NO: 59
AAVhu.1	179	US20150315612 SEQ ID NO: 46
AAVhu.1	180	US20150315612 SEQ ID NO: 144
AAVhu.10 (AAV16.8)	181	US20150315612 SEQ ID NO: 56
AAVhu.10 (AAV16.8)	182	US20150315612 SEQ ID NO: 156
AAVhu.11 (AAV16.12)	183	US20150315612 SEQ ID NO: 57
AAVhu.11 (AAV16.12)	184	US20150315612 SEQ ID NO: 153
AAVhu.12	185	US20150315612 SEQ ID NO: 59

[0253]

AAVhu.12	186	US20150315612 SEQ ID NO: 154
AAVhu.13	187	US20150159173 SEQ ID NO: 16、US20150315612 SEQ ID NO: 71
AAVhu.13	188	US20150159173 SEQ ID NO: 32、US20150315612 SEQ ID NO: 129
AAVhu.136.1	189	US20150315612 SEQ ID NO: 165
AAVhu.140.1	190	US20150315612 SEQ ID NO: 166
AAVhu.140.2	191	US20150315612 SEQ ID NO: 167
AAVhu.145.6	192	US20150315612 SEQ ID No: 178
AAVhu.15	193	US20150315612 SEQ ID NO: 147
AAVhu.15 (AAV33.4)	194	US20150315612 SEQ ID NO: 50
AAVhu.156.1	195	US20150315612 SEQ ID No: 179
AAVhu.16	196	US20150315612 SEQ ID NO: 148
AAVhu.16 (AAV33.8)	197	US20150315612 SEQ ID NO: 51
AAVhu.17	198	US20150315612 SEQ ID NO: 83
AAVhu.17 (AAV33.12)	199	US20150315612 SEQ ID NO: 4
AAVhu.172.1	200	US20150315612 SEQ ID NO: 171
AAVhu.172.2	201	US20150315612 SEQ ID NO: 172
AAVhu.173.4	202	US20150315612 SEQ ID NO: 173
AAVhu.173.8	203	US20150315612 SEQ ID NO: 175
AAVhu.18	204	US20150315612 SEQ ID NO: 52
AAVhu.18	205	US20150315612 SEQ ID NO: 149
AAVhu.19	206	US20150315612 SEQ ID NO: 62
AAVhu.19	207	US20150315612 SEQ ID NO: 133
AAVhu.2	208	US20150315612 SEQ ID NO: 48
AAVhu.2	209	US20150315612 SEQ ID NO: 143
AAVhu.20	210	US20150315612 SEQ ID NO: 63
AAVhu.20	211	US20150315612 SEQ ID NO: 134

[0254]

AAVhu.21	212	US20150315612 SEQ ID NO: 65
AAVhu.21	213	US20150315612 SEQ ID NO: 135
AAVhu.22	214	US20150315612 SEQ ID NO: 67
AAVhu.22	215	US20150315612 SEQ ID NO: 138
AAVhu.23	216	US20150315612 SEQ ID NO: 60
AAVhu.23.2	217	US20150315612 SEQ ID NO: 137
AAVhu.24	218	US20150315612 SEQ ID NO: 66
AAVhu.24	219	US20150315612 SEQ ID NO: 136
AAVhu.25	220	US20150315612 SEQ ID NO: 49
AAVhu.25	221	US20150315612 SEQ ID NO: 146
AAVhu.26	222	US20150159173 SEQ ID NO: 17、US20150315612 SEQ ID NO: 61
AAVhu.26	223	US20150159173 SEQ ID NO: 33、US20150315612 SEQ ID NO: 139
AAVhu.27	224	US20150315612 SEQ ID NO: 64
AAVhu.27	225	US20150315612 SEQ ID NO: 140
AAVhu.28	226	US20150315612 SEQ ID NO: 68
AAVhu.28	227	US20150315612 SEQ ID NO: 130
AAVhu.29	228	US20150315612 SEQ ID NO: 69
AAVhu.29	229	US20150159173 SEQ ID NO: 42、US20150315612 SEQ ID NO: 132
AAVhu.29	230	US20150315612 SEQ ID NO: 225
AAVhu.29R	231	US20150159173
AAVhu.3	232	US20150315612 SEQ ID NO: 44
AAVhu.3	233	US20150315612 SEQ ID NO: 145
AAVhu.30	234	US20150315612 SEQ ID NO: 70
AAVhu.30	235	US20150315612 SEQ ID NO: 131
AAVhu.31	236	US20150315612 SEQ ID NO: 1
AAVhu.31	237	US20150315612 SEQ ID NO: 121
AAVhu.32	238	US20150315612 SEQ ID NO: 2
AAVhu.32	239	US20150315612 SEQ ID NO: 122
AAVhu.33	240	US20150315612 SEQ ID NO: 75

[0255]

AAVhu.33	241	US20150315612 SEQ ID NO: 124
AAVhu.34	242	US20150315612 SEQ ID NO: 72
AAVhu.34	243	US20150315612 SEQ ID NO: 125
AAVhu.35	244	US20150315612 SEQ ID NO: 73
AAVhu.35	245	US20150315612 SEQ ID NO: 164
AAVhu.36	246	US20150315612 SEQ ID NO: 74
AAVhu.36	247	US20150315612 SEQ ID NO: 126
AAVhu.37	248	US20150159173 SEQ ID NO: 34、US20150315612 SEQ ID NO: 88
AAVhu.37 (AAV106.1)	249	US20150315612 SEQ ID NO: 10、US20150159173 SEQ ID NO: 18
AAVhu.38	250	US20150315612 SEQ ID NO: 161
AAVhu.39	251	US20150315612 SEQ ID NO: 102
AAVhu.39 (AAVLG-9)	252	US20150315612 SEQ ID NO: 24
AAVhu.4	253	US20150315612 SEQ ID NO: 47
AAVhu.4	254	US20150315612 SEQ ID NO: 141
AAVhu.40	255	US20150315612 SEQ ID NO: 87
AAVhu.40 (AAV114.3)	256	US20150315612 SEQ ID No: 11
AAVhu.41	257	US20150315612 SEQ ID NO: 91
AAVhu.41 (AAV127.2)	258	US20150315612 SEQ ID NO: 6
AAVhu.42	259	US20150315612 SEQ ID NO: 85
AAVhu.42 (AAV127.5)	260	US20150315612 SEQ ID NO: 8
AAVhu.43	261	US20150315612 SEQ ID NO: 160
AAVhu.43	262	US20150315612 SEQ ID NO: 236
AAVhu.43 (AAV128.1)	263	US20150315612 SEQ ID NO: 80

[0256]

AAVhu.44	264	US20150159173 SEQ ID NO: 45、US20150315612 SEQ ID NO: 158
AAVhu.44 (AAV128.3)	265	US20150315612 SEQ ID NO: 81
AAVhu.44R1	266	US20150159173
AAVhu.44R2	267	US20150159173
AAVhu.44R3	268	US20150159173
AAVhu.45	269	US20150315612 SEQ ID NO: 76
AAVhu.45	270	US20150315612 SEQ ID NO: 127
AAVhu.46	271	US20150315612 SEQ ID NO: 82
AAVhu.46	272	US20150315612 SEQ ID NO: 159
AAVhu.46	273	US20150315612 SEQ ID NO: 224
AAVhu.47	274	US20150315612 SEQ ID NO: 77
AAVhu.47	275	US20150315612 SEQ ID NO: 128
AAVhu.48	276	US20150159173 SEQ ID NO: 38
AAVhu.48	277	US20150315612 SEQ ID NO: 157
AAVhu.48 (AAV130.4)	278	US20150315612 SEQ ID NO: 78
AAVhu.48R1	279	US20150159173
AAVhu.48R2	280	US20150159173
AAVhu.48R3	281	US20150159173
AAVhu.49	282	US20150315612 SEQ ID NO: 209
AAVhu.49	283	US20150315612 SEQ ID NO: 189
AAVhu.5	284	US20150315612 SEQ ID NO: 45
AAVhu.5	285	US20150315612 SEQ ID NO: 142
AAVhu.51	286	US20150315612 SEQ ID NO: 208
AAVhu.51	287	US20150315612 SEQ ID NO: 190
AAVhu.52	288	US20150315612 SEQ ID NO: 210
AAVhu.52	289	US20150315612 SEQ ID NO: 191
AAVhu.53	290	US20150159173 SEQ ID NO: 19

[0257]

AAVhu.53	291	US20150159173 SEQ ID NO: 35
AAVhu.53 (AAV145.1)	292	US20150315612 SEQ ID NO: 176
AAVhu.54	293	US20150315612 SEQ ID NO: 188
AAVhu.54 (AAV145.5)	294	US20150315612 SEQ ID No: 177
AAVhu.55	295	US20150315612 SEQ ID NO: 187
AAVhu.56	296	US20150315612 SEQ ID NO: 205
AAVhu.56 (AAV145.6)	297	US20150315612 SEQ ID NO: 168
AAVhu.56 (AAV145.6)	298	US20150315612 SEQ ID NO: 192
AAVhu.57	299	US20150315612 SEQ ID NO: 206
AAVhu.57	300	US20150315612 SEQ ID NO: 169
AAVhu.57	301	US20150315612 SEQ ID NO: 193
AAVhu.58	302	US20150315612 SEQ ID NO: 207
AAVhu.58	303	US20150315612 SEQ ID NO: 194
AAVhu.6 (AAV3.1)	304	US20150315612 SEQ ID NO: 5
AAVhu.6 (AAV3.1)	305	US20150315612 SEQ ID NO: 84
AAVhu.60	306	US20150315612 SEQ ID NO: 184
AAVhu.60 (AAV161.10)	307	US20150315612 SEQ ID NO: 170
AAVhu.61	308	US20150315612 SEQ ID NO: 185
AAVhu.61 (AAV161.6)	309	US20150315612 SEQ ID NO: 174
AAVhu.63	310	US20150315612 SEQ ID NO: 204
AAVhu.63	311	US20150315612 SEQ ID NO: 195

[0258]

AAVhu.64	312	US20150315612 SEQ ID NO: 212
AAVhu.64	313	US20150315612 SEQ ID NO: 196
AAVhu.66	314	US20150315612 SEQ ID NO: 197
AAVhu.67	315	US20150315612 SEQ ID NO: 215
AAVhu.67	316	US20150315612 SEQ ID NO: 198
AAVhu.7	317	US20150315612 SEQ ID NO: 226
AAVhu.7	318	US20150315612 SEQ ID NO: 150
AAVhu.7 (AAV7.3)	319	US20150315612 SEQ ID NO: 55
AAVhu.71	320	US20150315612 SEQ ID NO: 79
AAVhu.8	321	US20150315612 SEQ ID NO: 53
AAVhu.8	322	US20150315612 SEQ ID NO: 12
AAVhu.8	323	US20150315612 SEQ ID NO: 151
AAVhu.9 (AAV3.1)	324	US20150315612 SEQ ID NO: 58
AAVhu.9 (AAV3.1)	325	US20150315612 SEQ ID NO: 155
AAV-LK01	326	US20150376607 SEQ ID NO: 2
AAV-LK01	327	US20150376607 SEQ ID NO: 29
AAV-LK02	328	US20150376607 SEQ ID NO: 3
AAV-LK02	329	US20150376607 SEQ ID NO: 30
AAV-LK03	330	US20150376607 SEQ ID NO: 4
AAV-LK03	331	WO2015121501 SEQ ID NO: 12、US20150376607 SEQ ID NO: 31
AAV-LK04	332	US20150376607 SEQ ID NO: 5
AAV-LK04	333	US20150376607 SEQ ID NO: 32
AAV-LK05	334	US20150376607 SEQ ID NO: 6
AAV-LK05	335	US20150376607 SEQ ID NO: 33
AAV-LK06	336	US20150376607 SEQ ID NO: 7
AAV-LK06	337	US20150376607 SEQ ID NO: 34

[0259]

AAV-LK07	338	US20150376607 SEQ ID NO: 8
AAV-LK07	339	US20150376607 SEQ ID NO: 35
AAV-LK08	340	US20150376607 SEQ ID NO: 9
AAV-LK08	341	US20150376607 SEQ ID NO: 36
AAV-LK09	342	US20150376607 SEQ ID NO: 10
AAV-LK09	343	US20150376607 SEQ ID NO: 37
AAV-LK10	344	US20150376607 SEQ ID NO: 11
AAV-LK10	345	US20150376607 SEQ ID NO: 38
AAV-LK11	346	US20150376607 SEQ ID NO: 12
AAV-LK11	347	US20150376607 SEQ ID NO: 39
AAV-LK12	348	US20150376607 SEQ ID NO: 13
AAV-LK12	349	US20150376607 SEQ ID NO: 40
AAV-LK13	350	US20150376607 SEQ ID NO: 14
AAV-LK13	351	US20150376607 SEQ ID NO: 41
AAV-LK14	352	US20150376607 SEQ ID NO: 15
AAV-LK14	353	US20150376607 SEQ ID NO: 42
AAV-LK15	354	US20150376607 SEQ ID NO: 16
AAV-LK15	355	US20150376607 SEQ ID NO: 43
AAV-LK16	356	US20150376607 SEQ ID NO: 17
AAV-LK16	357	US20150376607 SEQ ID NO: 44
AAV-LK17	358	US20150376607 SEQ ID NO: 18
AAV-LK17	359	US20150376607 SEQ ID NO: 45
AAV-LK18	360	US20150376607 SEQ ID NO: 19
AAV-LK18	361	US20150376607 SEQ ID NO: 46
AAV-LK19	362	US20150376607 SEQ ID NO: 20
AAV-LK19	363	US20150376607 SEQ ID NO: 47
AAV-PAEC	364	US20150376607 SEQ ID NO: 1
AAV-PAEC	365	US20150376607 SEQ ID NO: 48
AAV-PAEC11	366	US20150376607 SEQ ID NO: 26

[0260]

AAV-PAEC11	367	US20150376607 SEQ ID NO: 54
AAV-PAEC12	368	US20150376607 SEQ ID NO: 27
AAV-PAEC12	369	US20150376607 SEQ ID NO: 51
AAV-PAEC13	370	US20150376607 SEQ ID NO: 28
AAV-PAEC13	371	US20150376607 SEQ ID NO: 49
AAV-PAEC2	372	US20150376607 SEQ ID NO: 21
AAV-PAEC2	373	US20150376607 SEQ ID NO: 56
AAV-PAEC4	374	US20150376607 SEQ ID NO: 22
AAV-PAEC4	375	US20150376607 SEQ ID NO: 55
AAV-PAEC6	376	US20150376607 SEQ ID NO: 23
AAV-PAEC6	377	US20150376607 SEQ ID NO: 52
AAV-PAEC7	378	US20150376607 SEQ ID NO: 24
AAV-PAEC7	379	US20150376607 SEQ ID NO: 53
AAV-PAEC8	380	US20150376607 SEQ ID NO: 25
AAV-PAEC8	381	US20150376607 SEQ ID NO: 50
AAVpi.1	382	US20150315612 SEQ ID NO: 28
AAVpi.1	383	US20150315612 SEQ ID NO: 93
AAVpi.2	384	US20150315612 SEQ ID NO: 30
AAVpi.2	385	US20150315612 SEQ ID NO: 95
AAVpi.3	386	US20150315612 SEQ ID NO: 29
AAVpi.3	387	US20150315612 SEQ ID NO: 94
AAVrh.10	388	US20150159173 SEQ ID NO: 9
AAVrh.10	389	US20150159173 SEQ ID NO: 25
AAV44.2	390	US20030138772 SEQ ID NO: 59
AAVrh.10 (AAV44.2)	391	US20030138772 SEQ ID NO: 81
AAV42.1B	392	US20030138772 SEQ ID NO: 90
AAVrh.12 (AAV42.1b)	393	US20030138772 SEQ ID NO: 30

[0261]

AAVrh.13	394	US20150159173 SEQ ID NO: 10
AAVrh.13	395	US20150159173 SEQ ID NO: 26
AAVrh.13	396	US20150315612 SEQ ID NO: 228
AAVrh.13R	397	US20150159173
AAV42.3A	398	US20030138772 SEQ ID NO: 87
AAVrh.14 (AAV42.3a)	399	US20030138772 SEQ ID NO: 32
AAV42.5A	400	US20030138772 SEQ ID NO: 89
AAVrh.17 (AAV42.5a)	401	US20030138772 SEQ ID NO: 34
AAV42.5B	402	US20030138772 SEQ ID NO: 91
AAVrh.18 (AAV42.5b)	403	US20030138772 SEQ ID NO: 29
AAV42.6B	404	US20030138772 SEQ ID NO: 112
AAVrh.19 (AAV42.6b)	405	US20030138772 SEQ ID NO: 38
AAVrh.2	406	US20150159173 SEQ ID NO: 39
AAVrh.2	407	US20150315612 SEQ ID NO: 231
AAVrh.20	408	US20150159173 SEQ ID NO: 1
AAV42.10	409	US20030138772 SEQ ID NO: 106
AAVrh.21 (AAV42.10)	410	US20030138772 SEQ ID NO: 35
AAV42.11	411	US20030138772 SEQ ID NO: 108
AAVrh.22 (AAV42.11)	412	US20030138772 SEQ ID NO: 37
AAV42.12	413	US20030138772 SEQ ID NO: 113
AAVrh.23 (AAV42.12)	414	US20030138772 SEQ ID NO: 58
AAV42.13	415	US20030138772 SEQ ID NO: 86

[0262]

AAVrh.24 (AAV42.13)	416	US20030138772 SEQ ID NO: 31
AAV42.15	417	US20030138772 SEQ ID NO: 84
AAVrh.25 (AAV42.15)	418	US20030138772 SEQ ID NO: 28
AAVrh.2R	419	US20150159173
AAVrh.31 (AAV223.1)	420	US20030138772 SEQ ID NO: 48
AAVC1	421	US20030138772 SEQ ID NO: 60
AAVrh.32 (AAVC1)	422	US20030138772 SEQ ID NO: 19
AAVrh.32/33	423	US20150159173 SEQ ID NO: 2
AAVrh.33 (AAVC3)	424	US20030138772 SEQ ID NO: 20
AAVC5	425	US20030138772 SEQ ID NO: 62
AAVrh.34 (AAVC5)	426	US20030138772 SEQ ID NO: 21
AAVF1	427	US20030138772 SEQ ID NO: 109
AAVrh.35 (AAVF1)	428	US20030138772 SEQ ID NO: 22
AAVF3	429	US20030138772 SEQ ID NO: 111
AAVrh.36 (AAVF3)	430	US20030138772 SEQ ID NO: 23
AAVrh.37	431	US20030138772 SEQ ID NO: 24
AAVrh.37	432	US20150159173 SEQ ID NO: 40
AAVrh.37	433	US20150315612 SEQ ID NO: 229
AAVrh.37R2	434	US20150159173
AAVrh.38 (AAVLG-4)	435	US20150315612 SEQ ID NO: 7

[0263]

AAVrh.38 (AAVLG-4)	436	US20150315612 SEQ ID NO: 86
AAVrh.39	437	US20150159173 SEQ ID NO: 20、US20150315612 SEQ ID NO: 13
AAVrh.39	438	US20150159173 SEQ ID NO: 3、US20150159173 SEQ ID NO: 36、 US20150315612 SEQ ID NO: 89
AAVrh.40	439	US20150315612 SEQ ID NO: 92
AAVrh.40 (AAVLG-10)	440	US20150315612 SEQ ID No: 14
AAVrh.43 (AAVN721-8)	441	US20150315612 SEQ ID NO: 43、US20150159173 SEQ ID NO: 21
AAVrh.43 (AAVN721-8)	442	US20150315612 SEQ ID NO: 163、US20150159173 SEQ ID NO: 37
AAVrh.44	443	US20150315612 SEQ ID NO: 34
AAVrh.44	444	US20150315612 SEQ ID NO: 111
AAVrh.45	445	US20150315612 SEQ ID NO: 41
AAVrh.45	446	US20150315612 SEQ ID NO: 109
AAVrh.46	447	US20150159173 SEQ ID NO: 22、US20150315612 SEQ ID NO: 19
AAVrh.46	448	US20150159173 SEQ ID NO: 4、US20150315612 SEQ ID NO: 101
AAVrh.47	449	US20150315612 SEQ ID NO: 38
AAVrh.47	450	US20150315612 SEQ ID NO: 118
AAVrh.48	451	US20150159173 SEQ ID NO: 44、US20150315612 SEQ ID NO: 115
AAVrh.48.1	452	US20150159173
AAVrh.48.1.2	453	US20150159173
AAVrh.48.2	454	US20150159173
AAVrh.48 (AAV1-7)	455	US20150315612 SEQ ID NO: 32
AAVrh.49 (AAV1-8)	456	US20150315612 SEQ ID NO: 25

[0264]

AAVrh.49 (AAV1-8)	457	US20150315612 SEQ ID NO: 103
AAVrh.50 (AAV2-4)	458	US20150315612 SEQ ID NO: 23
AAVrh.50 (AAV2-4)	459	US20150315612 SEQ ID NO: 108
AAVrh.51 (AAV2-5)	460	US20150315612 SEQ ID No: 22
AAVrh.51 (AAV2-5)	461	US20150315612 SEQ ID NO: 104
AAVrh.52 (AAV3-9)	462	US20150315612 SEQ ID NO: 18
AAVrh.52 (AAV3-9)	463	US20150315612 SEQ ID NO: 96
AAVrh.53	464	US20150315612 SEQ ID NO: 97
AAVrh.53 (AAV3-11)	465	US20150315612 SEQ ID NO: 17
AAVrh.53 (AAV3-11)	466	US20150315612 SEQ ID NO: 186
AAVrh.54	467	US20150315612 SEQ ID NO: 40
AAVrh.54	468	US20150159173 SEQ ID NO: 49、US20150315612 SEQ ID NO: 116
AAVrh.55	469	US20150315612 SEQ ID NO: 37
AAVrh.55 (AAV4-19)	470	US20150315612 SEQ ID NO: 117
AAVrh.56	471	US20150315612 SEQ ID NO: 54
AAVrh.56	472	US20150315612 SEQ ID NO: 152
AAVrh.57	473	US20150315612 SEQ ID NO: 26
AAVrh.57	474	US20150315612 SEQ ID NO: 105
AAVrh.58	475	US20150315612 SEQ ID NO: 27

[0265]

AAVrh.58	476	US20150159173 SEQ ID NO: 48、US20150315612 SEQ ID NO: 106
AAVrh.58	477	US20150315612 SEQ ID NO: 232
AAVrh.59	478	US20150315612 SEQ ID NO: 42
AAVrh.59	479	US20150315612 SEQ ID NO: 110
AAVrh.60	480	US20150315612 SEQ ID NO: 31
AAVrh.60	481	US20150315612 SEQ ID NO: 120
AAVrh.61	482	US20150315612 SEQ ID NO: 107
AAVrh.61 (AAV2-3)	483	US20150315612 SEQ ID NO: 21
AAVrh.62 (AAV2-15)	484	US20150315612 SEQ ID No: 33
AAVrh.62 (AAV2-15)	485	US20150315612 SEQ ID NO: 114
AAVrh.64	486	US20150315612 SEQ ID No: 15
AAVrh.64	487	US20150159173 SEQ ID NO: 43、US20150315612 SEQ ID NO: 99
AAVrh.64	488	US20150315612 SEQ ID NO: 233
AAVRh.64R1	489	US20150159173
AAVRh.64R2	490	US20150159173
AAVrh.65	491	US20150315612 SEQ ID NO: 35
AAVrh.65	492	US20150315612 SEQ ID NO: 112
AAVrh.67	493	US20150315612 SEQ ID NO: 36
AAVrh.67	494	US20150315612 SEQ ID NO: 230
AAVrh.67	495	US20150159173 SEQ ID NO: 47、US20150315612 SEQ ID NO: 113
AAVrh.68	496	US20150315612 SEQ ID NO: 16
AAVrh.68	497	US20150315612 SEQ ID NO: 100
AAVrh.69	498	US20150315612 SEQ ID NO: 39
AAVrh.69	499	US20150315612 SEQ ID NO: 119
AAVrh.70	500	US20150315612 SEQ ID NO: 20
AAVrh.70	501	US20150315612 SEQ ID NO: 98

[0266]

AAVrh.71	502	US20150315612 SEQ ID NO: 162
AAVrh.72	503	US20150315612 SEQ ID NO: 9
AAVrh.73	504	US20150159173 SEQ ID NO: 5
AAVrh.74	505	US20150159173 SEQ ID NO: 6
AAVrh.8	506	US20150159173 SEQ ID NO: 41
AAVrh.8	507	US20150315612 SEQ ID NO: 235
AAVrh.8R	508	US20150159173、WO2015168666 SEQ ID NO: 9
AAVrh.8R A586R 突变体	509	WO2015168666 SEQ ID NO: 10
AAVrh.8R R533A 突变体	510	WO2015168666 SEQ ID NO: 11
BAAV (牛 AAV)	511	US9193769 SEQ ID NO: 8
BAAV (牛 AAV)	512	US9193769 SEQ ID NO: 10
BAAV (牛 AAV)	513	US9193769 SEQ ID NO: 4
BAAV (牛 AAV)	514	US9193769 SEQ ID NO: 2
BAAV (牛 AAV)	515	US9193769 SEQ ID NO: 6
BAAV (牛 AAV)	516	US9193769 SEQ ID NO: 1
BAAV (牛 AAV)	517	US9193769 SEQ ID NO: 5
BAAV (牛 AAV)	518	US9193769 SEQ ID NO: 3
BAAV (牛 AAV)	519	US9193769 SEQ ID NO: 11
BAAV (牛 AAV)	520	US7427396 SEQ ID NO: 5
BAAV (牛 AAV)	521	US7427396 SEQ ID NO: 6
BAAV (牛 AAV)	522	US9193769 SEQ ID NO: 7
BAAV (牛 AAV)	523	US9193769 SEQ ID NO: 9
BNP61 AAV	524	US20150238550 SEQ ID NO: 1
BNP61 AAV	525	US20150238550 SEQ ID NO: 2
BNP62 AAV	526	US20150238550 SEQ ID NO: 3
BNP63 AAV	527	US20150238550 SEQ ID NO: 4
山羊 AAV	528	US7427396 SEQ ID NO: 3

[0267]

山羊 AAV	529	US7427396 SEQ ID NO: 4
真 型 AAV (ttAAV)	530	WO2015121501 SEQ ID NO: 2
AAAV(禽 AAV)	531	US9238800 SEQ ID NO: 12
AAAV(禽 AAV)	532	US9238800 SEQ ID NO: 2
AAAV(禽 AAV)	533	US9238800 SEQ ID NO: 6
AAAV(禽 AAV)	534	US9238800 SEQ ID NO: 4
AAAV(禽 AAV)	535	US9238800 SEQ ID NO: 8
AAAV(禽 AAV)	536	US9238800 SEQ ID NO: 14
AAAV(禽 AAV)	537	US9238800 SEQ ID NO: 10
AAAV(禽 AAV)	538	US9238800 SEQ ID NO: 15
AAAV(禽 AAV)	539	US9238800 SEQ ID NO: 5
AAAV(禽 AAV)	540	US9238800 SEQ ID NO: 9
AAAV(禽 AAV)	541	US9238800 SEQ ID NO: 3
AAAV(禽 AAV)	542	US9238800 SEQ ID NO: 7
AAAV(禽 AAV)	543	US9238800 SEQ ID NO: 11
AAAV(禽 AAV)	544	US9238800 SEQ ID NO: 13
AAAV(禽 AAV)	545	US9238800 SEQ ID NO: 1
AAV 改组 100-1	546	US20160017295 SEQ ID NO: 23
AAV 改组 100-1	547	US20160017295 SEQ ID NO: 11
AAV 改组 100-2	548	US20160017295 SEQ ID NO: 37
AAV 改组 100-2	549	US20160017295 SEQ ID NO: 29
AAV 改组 100-3	550	US20160017295 SEQ ID NO: 24
AAV 改组 100-3	551	US20160017295 SEQ ID NO: 12
AAV 改组 100-7	552	US20160017295 SEQ ID NO: 25
AAV 改组 100-7	553	US20160017295 SEQ ID NO: 13
AAV 改组 10-2	554	US20160017295 SEQ ID NO: 34
AAV 改组 10-2	555	US20160017295 SEQ ID NO: 26
AAV 改组 10-6	556	US20160017295 SEQ ID NO: 35

[0268]

AAV 改组 10-6	557	US20160017295 SEQ ID NO: 27
AAV 改组 10-8	558	US20160017295 SEQ ID NO: 36
AAV 改组 10-8	559	US20160017295 SEQ ID NO: 28
AAV SM 100-10	560	US20160017295 SEQ ID NO: 41
AAV SM 100-10	561	US20160017295 SEQ ID NO: 33
AAV SM 100-3	562	US20160017295 SEQ ID NO: 40
AAV SM 100-3	563	US20160017295 SEQ ID NO: 32
AAV SM 10-1	564	US20160017295 SEQ ID NO: 38
AAV SM 10-1	565	US20160017295 SEQ ID NO: 30
AAV SM 10-2	566	US20160017295 SEQ ID NO: 10
AAV SM 10-2	567	US20160017295 SEQ ID NO: 22
AAV SM 10-8	568	US20160017295 SEQ ID NO: 39
AAV SM 10-8	569	US20160017295 SEQ ID NO: 31
AAV SM 100-10	560	US20160017295 SEQ ID NO: 41
AAV SM 100-10	561	US20160017295 SEQ ID NO: 33
AAV SM 100-3	562	US20160017295 SEQ ID NO: 40
AAV SM 100-3	563	US20160017295 SEQ ID NO: 32
AAV SM 10-1	564	US20160017295 SEQ ID NO: 38
AAV SM 10-1	565	US20160017295 SEQ ID NO: 30
AAV SM 10-2	566	US20160017295 SEQ ID NO: 10
AAV SM 10-2	567	US20160017295 SEQ ID NO: 22
AAV SM 10-8	568	US20160017295 SEQ ID NO: 39
AAV SM 10-8	569	US20160017295 SEQ ID NO: 31
AAVF1/HSC1	570	WO2016049230 SEQ ID NO: 20
AAVF2/HSC2	571	WO2016049230 SEQ ID NO: 21
AAVF3/HSC3	572	WO2016049230 SEQ ID NO: 22
AAVF4/HSC4	573	WO2016049230 SEQ ID NO: 23
AAVF5/HSC5	574	WO2016049230 SEQ ID NO: 25
AAVF6/HSC6	575	WO2016049230 SEQ ID NO: 24

[0269]

AAVF7/HSC7	576	WO2016049230 SEQ ID NO: 27
AAVF8/HSC8	577	WO2016049230 SEQ ID NO: 28
AAVF9/HSC9	578	WO2016049230 SEQ ID NO: 29
AAVF11/HSC11	579	WO2016049230 SEQ ID NO: 26
AAVF12/HSC12	580	WO2016049230 SEQ ID NO: 30
AAVF13/HSC13	581	WO2016049230 SEQ ID NO: 31
AAVF14/HSC14	582	WO2016049230 SEQ ID NO: 32
AAVF15/HSC15	583	WO2016049230 SEQ ID NO: 33
AAVF16/HSC16	584	WO2016049230 SEQ ID NO: 34
AAVF17/HSC17	585	WO2016049230 SEQ ID NO: 35
AAVF1/HSC1	586	WO2016049230 SEQ ID NO: 2
AAVF2/HSC2	587	WO2016049230 SEQ ID NO: 3
AAVF3/HSC3	588	WO2016049230 SEQ ID NO: 5
AAVF4/HSC4	589	WO2016049230 SEQ ID NO: 6
AAVF5/HSC5	590	WO2016049230 SEQ ID NO: 11
AAVF6/HSC6	591	WO2016049230 SEQ ID NO: 7
AAVF7/HSC7	592	WO2016049230 SEQ ID NO: 8
AAVF8/HSC8	593	WO2016049230 SEQ ID NO: 9
AAVF9/HSC9	594	WO2016049230 SEQ ID NO: 10
AAVF11/HSC11	595	WO2016049230 SEQ ID NO: 4
AAVF12/HSC12	596	WO2016049230 SEQ ID NO: 12
AAVF13/HSC13	597	WO2016049230 SEQ ID NO: 14
AAVF14/HSC14	598	WO2016049230 SEQ ID NO: 15
AAVF15/HSC15	599	WO2016049230 SEQ ID NO: 16
AAVF16/HSC16	600	WO2016049230 SEQ ID NO: 17
AAVF17/HSC17	601	WO2016049230 SEQ ID NO: 13
AAV CBr-E1	602	US8734809 SEQ ID NO: 13
AAV CBr-E2	603	US8734809 SEQ ID NO: 14
AAV CBr-E3	604	US8734809 SEQ ID NO: 15

[0270]

AAV CBr-E4	605	US8734809 SEQ ID NO: 16
AAV CBr-E5	606	US8734809 SEQ ID NO: 17
AAV CBr-e5	607	US8734809 SEQ ID NO: 18
AAV CBr-E6	608	US8734809 SEQ ID NO: 19
AAV CBr-E7	609	US8734809 SEQ ID NO: 20
AAV CBr-E8	610	US8734809 SEQ ID NO: 21
AAV CLv-D1	611	US8734809 SEQ ID NO: 22
AAV CLv-D2	612	US8734809 SEQ ID NO: 23
AAV CLv-D3	613	US8734809 SEQ ID NO: 24
AAV CLv-D4	614	US8734809 SEQ ID NO: 25
AAV CLv-D5	615	US8734809 SEQ ID NO: 26
AAV CLv-D6	616	US8734809 SEQ ID NO: 27
AAV CLv-D7	617	US8734809 SEQ ID NO: 28
AAV CLv-D8	618	US8734809 SEQ ID NO: 29
AAV CLv-E1	619	US8734809 SEQ ID NO: 13
AAV CLv-R1	620	US8734809 SEQ ID NO: 30
AAV CLv-R2	621	US8734809 SEQ ID NO: 31
AAV CLv-R3	622	US8734809 SEQ ID NO: 32
AAV CLv-R4	623	US8734809 SEQ ID NO: 33
AAV CLv-R5	624	US8734809 SEQ ID NO: 34
AAV CLv-R6	625	US8734809 SEQ ID NO: 35
AAV CLv-R7	626	US8734809 SEQ ID NO: 36
AAV CLv-R8	627	US8734809 SEQ ID NO: 37
AAV CLv-R9	628	US8734809 SEQ ID NO: 38
AAV CLg-F1	629	US8734809 SEQ ID NO: 39
AAV CLg-F2	630	US8734809 SEQ ID NO: 40
AAV CLg-F3	631	US8734809 SEQ ID NO: 41
AAV CLg-F4	632	US8734809 SEQ ID NO: 42
AAV CLg-F5	633	US8734809 SEQ ID NO: 43

[0271]

AAV CLg-F6	634	US8734809 SEQ ID NO: 43
AAV CLg-F7	635	US8734809 SEQ ID NO: 44
AAV CLg-F8	636	US8734809 SEQ ID NO: 43
AAV CSp-1	637	US8734809 SEQ ID NO: 45
AAV CSp-10	638	US8734809 SEQ ID NO: 46
AAV CSp-11	639	US8734809 SEQ ID NO: 47
AAV CSp-2	640	US8734809 SEQ ID NO: 48
AAV CSp-3	641	US8734809 SEQ ID NO: 49
AAV CSp-4	642	US8734809 SEQ ID NO: 50
AAV CSp-6	643	US8734809 SEQ ID NO: 51
AAV CSp-7	644	US8734809 SEQ ID NO: 52
AAV CSp-8	645	US8734809 SEQ ID NO: 53
AAV CSp-9	646	US8734809 SEQ ID NO: 54
AAV CHt-2	647	US8734809 SEQ ID NO: 55
AAV CHt-3	648	US8734809 SEQ ID NO: 56
AAV CKd-1	649	US8734809 SEQ ID NO: 57
AAV CKd-10	650	US8734809 SEQ ID NO: 58
AAV CKd-2	651	US8734809 SEQ ID NO: 59
AAV CKd-3	652	US8734809 SEQ ID NO: 60
AAV CKd-4	653	US8734809 SEQ ID NO: 61
AAV CKd-6	654	US8734809 SEQ ID NO: 62
AAV CKd-7	655	US8734809 SEQ ID NO: 63
AAV CKd-8	656	US8734809 SEQ ID NO: 64
AAV CLv-1	657	US8734809 SEQ ID NO: 65
AAV CLv-12	658	US8734809 SEQ ID NO: 66
AAV CLv-13	659	US8734809 SEQ ID NO: 67
AAV CLv-2	660	US8734809 SEQ ID NO: 68
AAV CLv-3	661	US8734809 SEQ ID NO: 69
AAV CLv-4	662	US8734809 SEQ ID NO: 70

[0272]

AAV CLv-6	663	US8734809 SEQ ID NO: 71
AAV CLv-8	664	US8734809 SEQ ID NO: 72
AAV CKd-B1	665	US8734809 SEQ ID NO: 73
AAV CKd-B2	666	US8734809 SEQ ID NO: 74
AAV CKd-B3	667	US8734809 SEQ ID NO: 75
AAV CKd-B4	668	US8734809 SEQ ID NO: 76
AAV CKd-B5	669	US8734809 SEQ ID NO: 77
AAV CKd-B6	670	US8734809 SEQ ID NO: 78
AAV CKd-B7	671	US8734809 SEQ ID NO: 79
AAV CKd-B8	672	US8734809 SEQ ID NO: 80
AAV CKd-H1	673	US8734809 SEQ ID NO: 81
AAV CKd-H2	674	US8734809 SEQ ID NO: 82
AAV CKd-H3	675	US8734809 SEQ ID NO: 83
AAV CKd-H4	676	US8734809 SEQ ID NO: 84
AAV CKd-H5	677	US8734809 SEQ ID NO: 85
AAV CKd-H6	678	US8734809 SEQ ID NO: 77
AAV CHt-1	679	US8734809 SEQ ID NO: 86
AAV CLv1-1	680	US8734809 SEQ ID NO: 171
AAV CLv1-2	681	US8734809 SEQ ID NO: 172
AAV CLv1-3	682	US8734809 SEQ ID NO: 173
AAV CLv1-4	683	US8734809 SEQ ID NO: 174
AAV Clv1-7	684	US8734809 SEQ ID NO: 175
AAV Clv1-8	685	US8734809 SEQ ID NO: 176
AAV Clv1-9	686	US8734809 SEQ ID NO: 177
AAV Clv1-10	687	US8734809 SEQ ID NO: 178
AAV.VR-355	688	US8734809 SEQ ID NO: 181
AAV.hu.48R3	689	US8734809 SEQ ID NO: 183
AAV CBr-E1	690	US8734809 SEQ ID NO: 87
AAV CBr-E2	691	US8734809 SEQ ID NO: 88

[0273]

AAV CBr-E3	692	US8734809 SEQ ID NO: 89
AAV CBr-E4	693	US8734809 SEQ ID NO: 90
AAV CBr-E5	694	US8734809 SEQ ID NO: 91
AAV CBr-e5	695	US8734809 SEQ ID NO: 92
AAV CBr-E6	696	US8734809 SEQ ID NO: 93
AAV CBr-E7	697	US8734809 SEQ ID NO: 94
AAV CBr-E8	698	US8734809 SEQ ID NO: 95
AAV CLv-D1	699	US8734809 SEQ ID NO: 96
AAV CLv-D2	700	US8734809 SEQ ID NO: 97
AAV CLv-D3	701	US8734809 SEQ ID NO: 98
AAV CLv-D4	702	US8734809 SEQ ID NO: 99
AAV CLv-D5	703	US8734809 SEQ ID NO: 100
AAV CLv-D6	704	US8734809 SEQ ID NO: 101
AAV CLv-D7	705	US8734809 SEQ ID NO: 102
AAV CLv-D8	706	US8734809 SEQ ID NO: 103
AAV CLv-E1	707	US8734809 SEQ ID NO: 87
AAV CLv-R1	708	US8734809 SEQ ID NO: 104
AAV CLv-R2	709	US8734809 SEQ ID NO: 105
AAV CLv-R3	710	US8734809 SEQ ID NO: 106
AAV CLv-R4	711	US8734809 SEQ ID NO: 107
AAV CLv-R5	712	US8734809 SEQ ID NO: 108
AAV CLv-R6	713	US8734809 SEQ ID NO: 109
AAV CLv-R7	714	US8734809 SEQ ID NO: 110
AAV CLv-R8	715	US8734809 SEQ ID NO: 111
AAV CLv-R9	716	US8734809 SEQ ID NO: 112
AAV CLg-F1	717	US8734809 SEQ ID NO: 113
AAV CLg-F2	718	US8734809 SEQ ID NO: 114
AAV CLg-F3	719	US8734809 SEQ ID NO: 115
AAV CLg-F4	720	US8734809 SEQ ID NO: 116

[0274]

AAV CLg-F5	721	US8734809 SEQ ID NO: 117
AAV CLg-F6	722	US8734809 SEQ ID NO: 117
AAV CLg-F7	723	US8734809 SEQ ID NO: 118
AAV CLg-F8	724	US8734809 SEQ ID NO: 117
AAV CSp-1	725	US8734809 SEQ ID NO: 119
AAV CSp-10	726	US8734809 SEQ ID NO: 120
AAV CSp-11	727	US8734809 SEQ ID NO: 121
AAV CSp-2	728	US8734809 SEQ ID NO: 122
AAV CSp-3	729	US8734809 SEQ ID NO: 123
AAV CSp-4	730	US8734809 SEQ ID NO: 124
AAV CSp-6	731	US8734809 SEQ ID NO: 125
AAV CSp-7	732	US8734809 SEQ ID NO: 126
AAV CSp-8	733	US8734809 SEQ ID NO: 127
AAV CSp-9	734	US8734809 SEQ ID NO: 128
AAV CHt-2	735	US8734809 SEQ ID NO: 129
AAV CHt-3	736	US8734809 SEQ ID NO: 130
AAV CKd-1	737	US8734809 SEQ ID NO: 131
AAV CKd-10	738	US8734809 SEQ ID NO: 132
AAV CKd-2	739	US8734809 SEQ ID NO: 133
AAV CKd-3	740	US8734809 SEQ ID NO: 134
AAV CKd-4	741	US8734809 SEQ ID NO: 135
AAV CKd-6	742	US8734809 SEQ ID NO: 136
AAV CKd-7	743	US8734809 SEQ ID NO: 137
AAV CKd-8	744	US8734809 SEQ ID NO: 138
AAV CLv-1	745	US8734809 SEQ ID NO: 139
AAV CLv-12	746	US8734809 SEQ ID NO: 140
AAV CLv-13	747	US8734809 SEQ ID NO: 141
AAV CLv-2	748	US8734809 SEQ ID NO: 142
AAV CLv-3	749	US8734809 SEQ ID NO: 143

[0275]

AAV CLv-4	750	US8734809 SEQ ID NO: 144
AAV CLv-6	751	US8734809 SEQ ID NO: 145
AAV CLv-8	752	US8734809 SEQ ID NO: 146
AAV CKd-B1	753	US8734809 SEQ ID NO: 147
AAV CKd-B2	754	US8734809 SEQ ID NO: 148
AAV CKd-B3	755	US8734809 SEQ ID NO: 149
AAV CKd-B4	756	US8734809 SEQ ID NO: 150
AAV CKd-B5	757	US8734809 SEQ ID NO: 151
AAV CKd-B6	758	US8734809 SEQ ID NO: 152
AAV CKd-B7	759	US8734809 SEQ ID NO: 153
AAV CKd-B8	760	US8734809 SEQ ID NO: 154
AAV CKd-H1	761	US8734809 SEQ ID NO: 155
AAV CKd-H2	762	US8734809 SEQ ID NO: 156
AAV CKd-H3	763	US8734809 SEQ ID NO: 157
AAV CKd-H4	764	US8734809 SEQ ID NO: 158
AAV CKd-H5	765	US8734809 SEQ ID NO: 159
AAV CKd-H6	766	US8734809 SEQ ID NO: 151
AAV CHt-1	767	US8734809 SEQ ID NO: 160
AAV CHt-P2	768	WO2016065001 SEQ ID NO: 1
AAV CHt-P5	769	WO2016065001 SEQ ID NO: 2
AAV CHt-P9	770	WO2016065001 SEQ ID NO: 3
AAV CBr-7.1	771	WO2016065001 SEQ ID NO: 4
AAV CBr-7.2	772	WO2016065001 SEQ ID NO: 5
AAV CBr-7.3	773	WO2016065001 SEQ ID NO: 6
AAV CBr-7.4	774	WO2016065001 SEQ ID NO: 7
AAV CBr-7.5	775	WO2016065001 SEQ ID NO: 8
AAV CBr-7.7	776	WO2016065001 SEQ ID NO: 9
AAV CBr-7.8	777	WO2016065001 SEQ ID NO: 10
AAV CBr-7.10	778	WO2016065001 SEQ ID NO: 11

[0276]

AAV CKd-N3	779	WO2016065001 SEQ ID NO: 12
AAV CKd-N4	780	WO2016065001 SEQ ID NO: 13
AAV CKd-N9	781	WO2016065001 SEQ ID NO: 14
AAV CLv-L4	782	WO2016065001 SEQ ID NO: 15
AAV CLv-L5	783	WO2016065001 SEQ ID NO: 16
AAV CLv-L6	784	WO2016065001 SEQ ID NO: 17
AAV CLv-K1	785	WO2016065001 SEQ ID NO: 18
AAV CLv-K3	786	WO2016065001 SEQ ID NO: 19
AAV CLv-K6	787	WO2016065001 SEQ ID NO: 20
AAV CLv-M1	788	WO2016065001 SEQ ID NO: 21
AAV CLv-M11	789	WO2016065001 SEQ ID NO: 22
AAV CLv-M2	790	WO2016065001 SEQ ID NO: 23
AAV CLv-M5	791	WO2016065001 SEQ ID NO: 24
AAV CLv-M6	792	WO2016065001 SEQ ID NO: 25
AAV CLv-M7	793	WO2016065001 SEQ ID NO: 26
AAV CLv-M8	794	WO2016065001 SEQ ID NO: 27
AAV CLv-M9	795	WO2016065001 SEQ ID NO: 28
AAV CHt-P1	796	WO2016065001 SEQ ID NO: 29
AAV CHt-P6	797	WO2016065001 SEQ ID NO: 30
AAV CHt-P8	798	WO2016065001 SEQ ID NO: 31
AAV CHt-6.1	799	WO2016065001 SEQ ID NO: 32
AAV CHt-6.10	800	WO2016065001 SEQ ID NO: 33
AAV CHt-6.5	801	WO2016065001 SEQ ID NO: 34
AAV CHt-6.6	802	WO2016065001 SEQ ID NO: 35
AAV CHt-6.7	803	WO2016065001 SEQ ID NO: 36
AAV CHt-6.8	804	WO2016065001 SEQ ID NO: 37
AAV CSp-8.10	805	WO2016065001 SEQ ID NO: 38
AAV CSp-8.2	806	WO2016065001 SEQ ID NO: 39
AAV CSp-8.4	807	WO2016065001 SEQ ID NO: 40

[0277]

AAV CSp-8.5	808	WO2016065001 SEQ ID NO: 41
AAV CSp-8.6	809	WO2016065001 SEQ ID NO: 42
AAV CSp-8.7	810	WO2016065001 SEQ ID NO: 43
AAV CSp-8.8	811	WO2016065001 SEQ ID NO: 44
AAV CSp-8.9	812	WO2016065001 SEQ ID NO: 45
AAV CBr-B7.3	813	WO2016065001 SEQ ID NO: 46
AAV CBr-B7.4	814	WO2016065001 SEQ ID NO: 47
AAV3B	815	WO2016065001 SEQ ID NO: 48
AAV4	816	WO2016065001 SEQ ID NO: 49
AAV5	817	WO2016065001 SEQ ID NO: 50
AAV CHt-P2	818	WO2016065001 SEQ ID NO: 51
AAV CHt-P5	819	WO2016065001 SEQ ID NO: 52
AAV CHt-P9	820	WO2016065001 SEQ ID NO: 53
AAV CBr-7.1	821	WO2016065001 SEQ ID NO: 54
AAV CBr-7.2	822	WO2016065001 SEQ ID NO: 55
AAV CBr-7.3	823	WO2016065001 SEQ ID NO: 56
AAV CBr-7.4	824	WO2016065001 SEQ ID NO: 57
AAV CBr-7.5	825	WO2016065001 SEQ ID NO: 58
AAV CBr-7.7	826	WO2016065001 SEQ ID NO: 59
AAV CBr-7.8	827	WO2016065001 SEQ ID NO: 60
AAV CBr-7.10	828	WO2016065001 SEQ ID NO: 61
AAV CKd-N3	829	WO2016065001 SEQ ID NO: 62
AAV CKd-N4	830	WO2016065001 SEQ ID NO: 63
AAV CKd-N9	831	WO2016065001 SEQ ID NO: 64
AAV CLv-L4	832	WO2016065001 SEQ ID NO: 65
AAV CLv-L5	833	WO2016065001 SEQ ID NO: 66
AAV CLv-L6	834	WO2016065001 SEQ ID NO: 67
AAV CLv-K1	835	WO2016065001 SEQ ID NO: 68
AAV CLv-K3	836	WO2016065001 SEQ ID NO: 69

[0278]

AAV CLv-K6	837	WO2016065001 SEQ ID NO: 70
AAV CLv-M1	838	WO2016065001 SEQ ID NO: 71
AAV CLv-M11	839	WO2016065001 SEQ ID NO: 72
AAV CLv-M2	840	WO2016065001 SEQ ID NO: 73
AAV CLv-M5	841	WO2016065001 SEQ ID NO: 74
AAV CLv-M6	842	WO2016065001 SEQ ID NO: 75
AAV CLv-M7	843	WO2016065001 SEQ ID NO: 76
AAV CLv-M8	844	WO2016065001 SEQ ID NO: 77
AAV CLv-M9	845	WO2016065001 SEQ ID NO: 78
AAV CHt-P1	846	WO2016065001 SEQ ID NO: 79
AAV CHt-P6	847	WO2016065001 SEQ ID NO: 80
AAV CHt-P8	848	WO2016065001 SEQ ID NO: 81
AAV CHt-6.1	849	WO2016065001 SEQ ID NO: 82
AAV CHt-6.10	850	WO2016065001 SEQ ID NO: 83
AAV CHt-6.5	851	WO2016065001 SEQ ID NO: 84
AAV CHt-6.6	852	WO2016065001 SEQ ID NO: 85
AAV CHt-6.7	853	WO2016065001 SEQ ID NO: 86
AAV CHt-6.8	854	WO2016065001 SEQ ID NO: 87
AAV CSp-8.10	855	WO2016065001 SEQ ID NO: 88
AAV CSp-8.2	856	WO2016065001 SEQ ID NO: 89
AAV CSp-8.4	857	WO2016065001 SEQ ID NO: 90
AAV CSp-8.5	858	WO2016065001 SEQ ID NO: 91
AAV CSp-8.6	859	WO2016065001 SEQ ID NO: 92
AAV CSp-8.7	860	WO2016065001 SEQ ID NO: 93
AAV CSp-8.8	861	WO2016065001 SEQ ID NO: 94
AAV CSp-8.9	862	WO2016065001 SEQ ID NO: 95
AAV CBr-B7.3	863	WO2016065001 SEQ ID NO: 96
AAV CBr-B7.4	864	WO2016065001 SEQ ID NO: 97
AAV3B	865	WO2016065001 SEQ ID NO: 98

[0279]

AAV4	866	WO2016065001 SEQ ID NO: 99
AAV5	867	WO2016065001 SEQ ID NO: 100
AAVPHP.B 或 G2B-26	868	WO2015038958 SEQ ID NO: 8 和 13; GenBankALU85156.1
AAVPHP.B	869	WO2015038958 SEQ ID NO: 9
AAVG2B-13	870	WO2015038958 SEQ ID NO: 12
AAVTH1.1-32	871	WO2015038958 SEQ ID NO: 14
AAVTH1.1-35	872	WO2015038958 SEQ ID NO: 15
PHP.N/PHP.B-D GT	1859	WO2017100671 SEQ ID NO: 46
PHP.S/G2A12	1860	WO2017100671 SEQ ID NO: 47
AAV9/hu.14 K449R	1861	WO2017100671 SEQ ID NO: 45
GPV	1862	US9624274B2 SEQ ID NO: 192
B19	1863	US9624274B2 SEQ ID NO: 193
MVM	1864	US9624274B2 SEQ ID NO: 194
FPV	1865	US9624274B2 SEQ ID NO: 195
CPV	1866	US9624274B2 SEQ ID NO: 196
AAV6	1867	US9546112B2 SEQ ID NO: 5
AAV6	1868	US9457103B2 SEQ ID NO: 1
AAV2	1869	US9457103B2 SEQ ID NO: 2
ShH10	1870	US9457103B2 SEQ ID NO: 3
ShH13	1871	US9457103B2 SEQ ID NO: 4
ShH10	1872	US9457103B2 SEQ ID NO: 5
ShH10	1873	US9457103B2 SEQ ID NO: 6
ShH10	1874	US9457103B2 SEQ ID NO: 7
ShH10	1875	US9457103B2 SEQ ID NO: 8
ShH10	1876	US9457103B2 SEQ ID NO: 9
rh74	1877	US9434928B2 SEQ ID NO: 1、US2015023924A1 SEQ ID NO: 2

[0280]

rh74	1878	US9434928B2 SEQ ID NO: 2、US2015023924A1 SEQ ID NO: 1
AAV8	1879	US9434928B2 SEQ ID NO: 4
rh74	1880	US9434928B2 SEQ ID NO: 5
rh74 (RHM4-1)	1881	US2015023924A1 SEQ ID NO: 5、US20160375110A1 SEQ ID NO: 4
rh74 (RHM15-1)	1882	US2015023924A1 SEQ ID NO: 6、US20160375110A1 SEQ ID NO: 5
rh74 (RHM15-2)	1883	US2015023924A1 SEQ ID NO: 7、US20160375110A1 SEQ ID NO: 6
rh74 (RHM15-3/RH M15-5)	1884	US2015023924A1 SEQ ID NO: 8、US20160375110A1 SEQ ID NO: 7
rh74 (RHM15-4)	1885	US2015023924A1 SEQ ID NO: 9、US20160375110A1 SEQ ID NO: 8
rh74 (RHM15-6)	1886	US2015023924A1 SEQ ID NO: 10、US20160375110A1 SEQ ID NO: 9
rh74 (RHM4-1)	1887	US2015023924A1 SEQ ID NO: 11
rh74 (RHM15-1)	1888	US2015023924A1 SEQ ID NO: 12
rh74 (RHM15-2)	1889	US2015023924A1 SEQ ID NO: 13
rh74 (RHM15-3/RH M15-5)	1890	US2015023924A1 SEQ ID NO: 14
rh74 (RHM15-4)	1891	US2015023924A1 SEQ ID NO: 15
rh74 (RHM15-6)	1892	US2015023924A1 SEQ ID NO: 16
AAV2(包含肺特 异性多肽)	1893	US20160175389A1 SEQ ID NO: 9
AAV2(包含肺特 异性多肽)	1894	US20160175389A1 SEQ ID NO: 10
Anc80	1895	US20170051257A1 SEQ ID NO: 1
Anc80	1896	US20170051257A1 SEQ ID NO: 2
Anc81	1897	US20170051257A1 SEQ ID NO: 3
Anc80	1898	US20170051257A1 SEQ ID NO: 4
Anc82	1899	US20170051257A1 SEQ ID NO: 5
Anc82	1900	US20170051257A1 SEQ ID NO: 6

[0281]

Anc83	1901	US20170051257A1 SEQ ID NO: 7
Anc83	1902	US20170051257A1 SEQ ID NO: 8
Anc84	1903	US20170051257A1 SEQ ID NO: 9
Anc84	1904	US20170051257A1 SEQ ID NO: 10
Anc94	1905	US20170051257A1 SEQ ID NO: 11
Anc94	1906	US20170051257A1 SEQ ID NO: 12
Anc113	1907	US20170051257A1 SEQ ID NO: 13
Anc113	1908	US20170051257A1 SEQ ID NO: 14
Anc126	1909	US20170051257A1 SEQ ID NO: 15
Anc126	1910	US20170051257A1 SEQ ID NO: 16
Anc127	1911	US20170051257A1 SEQ ID NO: 17
Anc127	1912	US20170051257A1 SEQ ID NO: 18
Anc80L27	1913	US20170051257A1 SEQ ID NO: 19
Anc80L59	1914	US20170051257A1 SEQ ID NO: 20
Anc80L60	1915	US20170051257A1 SEQ ID NO: 21
Anc80L62	1916	US20170051257A1 SEQ ID NO: 22
Anc80L65	1917	US20170051257A1 SEQ ID NO: 23
Anc80L33	1918	US20170051257A1 SEQ ID NO: 24
Anc80L36	1919	US20170051257A1 SEQ ID NO: 25
Anc80L44	1920	US20170051257A1 SEQ ID NO: 26
Anc80L1	1921	US20170051257A1 SEQ ID NO: 35
Anc80L1	1922	US20170051257A1 SEQ ID NO: 36
AAV-X1	1923	US8283151B2 SEQ ID NO: 11
AAV-X1b	1924	US8283151B2 SEQ ID NO: 12
AAV-X5	1925	US8283151B2 SEQ ID NO: 13
AAV-X19	1926	US8283151B2 SEQ ID NO: 14
AAV-X21	1927	US8283151B2 SEQ ID NO: 15
AAV-X22	1928	US8283151B2 SEQ ID NO: 16
AAV-X23	1929	US8283151B2 SEQ ID NO: 17

[0282]

AAV-X24	1930	US8283151B2 SEQ ID NO: 18
AAV-X25	1931	US8283151B2 SEQ ID NO: 19
AAV-X26	1932	US8283151B2 SEQ ID NO: 20
AAV-X1	1933	US8283151B2 SEQ ID NO: 21
AAV-X1b	1934	US8283151B2 SEQ ID NO: 22
AAV-X5	1935	US8283151B2 SEQ ID NO: 23
AAV-X19	1936	US8283151B2 SEQ ID NO: 24
AAV-X21	1937	US8283151B2 SEQ ID NO: 25
AAV-X22	1938	US8283151B2 SEQ ID NO: 26
AAV-X23	1939	US8283151B2 SEQ ID NO: 27
AAV-X24	1940	US8283151B2 SEQ ID NO: 28
AAV-X25	1941	US8283151B2 SEQ ID NO: 29
AAV-X26	1942	US8283151B2 SEQ ID NO: 30
AAVrh8	1943	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 8
AAVrh8VP2FC5	1944	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 9
AAVrh8VP2FC4 4	1945	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 10
AAVrh8VP2Apo B100	1946	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 11
AAVrh8VP2RV G	1947	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 12
AAVrh8VP2Ang iopep-2 VP2	1948	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 13
AAV9.47VP1.3	1949	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 14
AAV9.47VP2IC AMg3	1950	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 15
AAV9.47VP2RV G	1951	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 16

[0283]

AAV9.47VP2An giopep-2	1952	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 17
AAV9.47VP2A- 串 (String)	1953	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 18
AAVrh8VP2FC5 VP2	1954	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 19
AAVrh8VP2FC4 4 VP2	1955	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 20
AAVrh8VP2Apo B100 VP2	1956	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 21
AAVrh8VP2RV G VP2	1957	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 22
AAVrh8VP2Ang iopep-2 VP2	1958	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 23
AAV9.47VP2IC AMg3 VP2	1959	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 24
AAV9.47VP2RV G VP2	1960	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 25
AAV9.47VP2An giopep-2 VP2	1961	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 26
AAV9.47VP2A- 串 VP2	1962	WO2016054554A1 SEQ ID NO: 27
rAAV-B1	1963	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 1
rAAV-B2	1964	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 2
rAAV-B3	1965	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 3
rAAV-B4	1966	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 4
rAAV-B1	1967	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 5
rAAV-B2	1968	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 6
rAAV-B3	1969	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 7

[0284]

rAAV-B4	1970	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 8
rAAV-L1	1971	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 9
rAAV-L2	1972	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 10
rAAV-L3	1973	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 11
rAAV-L4	1974	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 12
rAAV-L1	1975	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 13
rAAV-L2	1976	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 14
rAAV-L3	1977	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 15
rAAV-L4	1978	WO2016054557A1 SEQ ID NO: 16
AAV9	1979	WO2016073739A1 SEQ ID NO: 3
rAAV	1980	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 1
rAAV	1981	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 2
rAAV	1982	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 3
rAAV	1983	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 4
rAAV	1984	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 5
rAAV	1985	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 6
rAAV	1986	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 7
rAAV	1987	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 8
rAAV	1988	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 9
rAAV	1989	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 10
rAAV	1990	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 11
rAAV	1991	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 12
rAAV	1992	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 13
rAAV	1993	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 14
rAAV	1994	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 15
rAAV	1995	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 16
rAAV	1996	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 17
rAAV	1997	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 18
rAAV	1998	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 19

[0285]

rAAV	1999	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 20
rAAV	2000	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 21
rAAV	2001	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 22
rAAV	2002	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 23
rAAV	2003	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 24
rAAV	2004	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 25
rAAV	2005	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 26
rAAV	2006	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 27
rAAV	2007	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 28
rAAV	2008	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 29
rAAV	2009	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 30
rAAV	2010	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 31
rAAV	2011	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 32
rAAV	2012	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 33
rAAV	2013	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 34
rAAV	2014	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 35
rAAV	2015	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 36
rAAV	2016	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 37
rAAV	2017	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 38
rAAV	2018	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 39
rAAV	2019	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 40
rAAV	2020	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 41
rAAV	2021	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 42
rAAV	2022	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 43
rAAV	2023	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 44
rAAV	2024	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 45
rAAV	2025	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 46
rAAV	2026	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 47
rAAV	2027	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 48

[0286]

rAAV	2028	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 49
rAAV	2029	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 50
rAAV	2030	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 51
rAAV	2031	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 52
rAAV	2032	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 53
rAAV	2033	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 54
rAAV	2034	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 55
rAAV	2035	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 56
rAAV	2036	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 57
rAAV	2037	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 58
rAAV	2038	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 59
rAAV	2039	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 60
rAAV	2040	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 61
rAAV	2041	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 62
rAAV	2042	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 63
rAAV	2043	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 64
rAAV	2044	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 65
rAAV	2045	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 66
rAAV	2046	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 67
rAAV	2047	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 68
rAAV	2048	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 69
rAAV	2049	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 70
rAAV	2050	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 71
rAAV	2051	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 72
rAAV	2052	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 73
rAAV	2053	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 74
rAAV	2054	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 75
rAAV	2055	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 76
rAAV	2056	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 77

[0287]

rAAV	2057	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 78
rAAV	2058	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 79
rAAV	2059	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 80
rAAV	2060	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 81
rAAV	2061	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 82
rAAV	2062	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 83
rAAV	2063	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 84
rAAV	2064	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 85
rAAV	2065	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 86
rAAV	2066	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 87
rAAV	2067	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 88
rAAV	2068	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 89
rAAV	2069	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 90
rAAV	2070	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 91
rAAV	2071	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 92
rAAV	2072	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 93
rAAV	2073	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 94
rAAV	2074	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 95
rAAV	2075	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 96
rAAV	2076	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 97
rAAV	2077	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 98
rAAV	2078	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 99
rAAV	2079	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 100
rAAV	2080	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 101
rAAV	2081	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 102
rAAV	2082	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 103
rAAV	2083	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 104
rAAV	2084	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 105
rAAV	2085	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 106

[0288]

rAAV	2086	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 107
rAAV	2087	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 108
rAAV	2088	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 109
rAAV	2089	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 110
rAAV	2090	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 111
rAAV	2091	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 112
rAAV	2092	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 113
rAAV	2093	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 114
rAAV	2094	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 115
rAAV	2095	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 116
rAAV	2096	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 117
rAAV	2097	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 118
rAAV	2098	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 119
rAAV	2099	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 120
rAAV	2100	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 121
rAAV	2101	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 122
rAAV	2102	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 123
rAAV	2103	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 124
rAAV	2104	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 125
rAAV	2105	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 126
rAAV	2106	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 127
rAAV	2107	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 128
AAV8 E532K	2108	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 133
AAV8 E532K	2109	WO2016081811A1 SEQ ID NO: 134
rAAV4	2110	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 2
rAAV4	2111	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 3
rAAV4	2112	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 4
rAAV4	2113	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 5
rAAV4	2114	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 6

[0289]

rAAV4	2115	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 7
rAAV4	2116	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 8
rAAV4	2117	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 9
rAAV4	2118	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 10
rAAV4	2119	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 11
rAAV4	2120	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 12
rAAV4	2121	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 13
rAAV4	2122	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 14
rAAV4	2123	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 15
rAAV4	2124	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 16
rAAV4	2125	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 17
rAAV4	2126	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 18
rAAV4	2127	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 19
rAAV4	2128	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 20
rAAV4	2129	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 21
AAV11	2130	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 22
AAV12	2131	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 23
rh32	2132	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 25
rh33	2133	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 26
rh34	2134	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 27
rAAV4	2135	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 28
rAAV4	2136	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 29
rAAV4	2137	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 30
rAAV4	2138	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 31
rAAV4	2139	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 32
rAAV4	2140	WO2016115382A1 SEQ ID NO: 33
AAV2/8	2141	WO2016131981A1 SEQ ID NO: 47
AAV2/8	2142	WO2016131981A1 SEQ ID NO: 48
祖先 AAV	2143	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 7

[0290]

祖先 AAV 变体 C4	2144	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 13
祖先 AAV 变体 C7	2145	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 14
祖先 AAV 变体 G4	2146	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 15
祖先 AAV 变体、 C4、C7 和 G4 的 共有氨基酸序列	2147	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 16
祖先 AAV 变体、 C4 和 C7 的共有 氨基酸序列	2148	WO2016154344A1 SEQ ID NO: 17
AAV8 (具有 AAV2 磷脂酶结 构域)	2149	WO2016150403A1 SEQ ID NO: 13
AAV VR-942n	2150	US20160289275A1 SEQ ID NO: 10
AAV5-A (M569V)	2151	US20160289275A1 SEQ ID NO: 13
AAV5-A (M569V)	2152	US20160289275A1 SEQ ID NO: 14
AAV5-A (Y585V)	2153	US20160289275A1 SEQ ID NO: 16
AAV5-A (Y585V)	2154	US20160289275A1 SEQ ID NO: 17
AAV5-A (L587T)	2155	US20160289275A1 SEQ ID NO: 19
AAV5-A (L587T)	2156	US20160289275A1 SEQ ID NO: 20

[0291]

AAV5-A (Y585V/L587T)	2157	US20160289275A1 SEQ ID NO: 22
AAV5-A (Y585V/L587T)	2158	US20160289275A1 SEQ ID NO: 23
AAV5-B (D652A)	2159	US20160289275A1 SEQ ID NO: 25
AAV5-B (D652A)	2160	US20160289275A1 SEQ ID NO: 26
AAV5-B (T362M)	2161	US20160289275A1 SEQ ID NO: 28
AAV5-B (T362M)	2162	US20160289275A1 SEQ ID NO: 29
AAV5-B (Q359D)	2163	US20160289275A1 SEQ ID NO: 31
AAV5-B (Q359D)	2164	US20160289275A1 SEQ ID NO: 32
AAV5-B (E350Q)	2165	US20160289275A1 SEQ ID NO: 34
AAV5-B (E350Q)	2166	US20160289275A1 SEQ ID NO: 35
AAV5-B (P533S)	2167	US20160289275A1 SEQ ID NO: 37
AAV5-B (P533S)	2168	US20160289275A1 SEQ ID NO: 38
AAV5-B (P533G)	2169	US20160289275A1 SEQ ID NO: 40

[0292]

AAV5-B (P533G)	2170	US20160289275A1 SEQ ID NO: 41
AAV5-环 VII 中的突变	2171	US20160289275A1 SEQ ID NO: 43
AAV5-环 VII 中的突变	2172	US20160289275A1 SEQ ID NO: 44
AAV8	2173	US20160289275A1 SEQ ID NO: 47
Mut A (LK03/AAV8)	2174	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 1
Mut B (LK03/AAV5)	2175	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 2
Mut C (AAV8/AAV3B)	2176	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 3
Mut D (AAV5/AAV3B)	2177	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 4
Mut E (AAV8/AAV3B)	2178	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 5
Mut F (AAV3B/AAV8)	2179	WO2016181123A1 SEQ ID NO: 6
AAV44.9	2180	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 4
AAV44.9	2181	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 5
AAVrh8	2182	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 6
AAV44.9 (S470N)	2183	WO2016183297A1 SEQ ID NO: 9
rh74 VP1	2184	US20160375110A1 SEQ ID NO: 1

[0293]

AAV-LK03 (L125I)	2185	WO2017015102A1 SEQ ID NO: 5
AAV3B (S663V+T492 V)	2186	WO2017015102A1 SEQ ID NO: 6
Anc80	2187	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 1
Anc80	2188	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 2
Anc81	2189	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 3
Anc81	2190	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 4
Anc82	2191	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 5
Anc82	2192	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 6
Anc83	2193	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 7
Anc83	2194	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 8
Anc84	2195	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 9
Anc84	2196	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 10
Anc94	2197	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 11
Anc94	2198	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 12
Anc113	2199	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 13
Anc113	2200	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 14
Anc126	2201	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 15
Anc126	2202	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 16
Anc127	2203	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 17
Anc127	2204	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 18
Anc80L27	2205	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 19
Anc80L59	2206	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 20
Anc80L60	2207	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 21
Anc80L62	2208	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 22
Anc80L65	2209	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 23
Anc80L33	2210	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 24

[0294]

Anc80L36	2211	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 25
Anc80L44	2212	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 26
Anc80L1	2213	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 35
Anc80L1	2214	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 36
AAVrh10	2215	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 41
Anc110	2216	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 42
Anc110	2217	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 43
AAVrh32.33	2218	WO2017019994A2 SEQ ID NO: 45
AAVrh74	2219	WO2017049031A1 SEQ ID NO: 1
AAV2	2220	WO2017053629A2 SEQ ID NO: 49
AAV2	2221	WO2017053629A2 SEQ ID NO: 50
AAV2	2222	WO2017053629A2 SEQ ID NO: 82
细小病毒样病毒 (Parvo-like virus)	2223	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 1
细小病毒样病毒	2224	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 2
细小病毒样病毒	2225	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 3
细小病毒样病毒	2226	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 4
细小病毒样病毒	2227	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 5
细小病毒样病毒	2228	WO2017070476A2 SEQ ID NO: 6
AAVrh.10	2229	WO2017070516A1 SEQ ID NO: 7
AAVrh.10	2230	WO2017070516A1 SEQ ID NO: 14
AAV2tYF	2231	WO2017070491A1 SEQ ID NO: 1
AAV-SPK	2232	WO2017075619A1 SEQ ID NO:28
AAV2.5	2233	US20170128528A1 SEQ ID NO: 13
AAV1.1	2234	US20170128528A1 SEQ ID NO: 15
AAV6.1	2235	US20170128528A1 SEQ ID NO: 17
AAV6.3.1	2236	US20170128528A1 SEQ ID NO: 18
AAV2i8	2237	US20170128528A1 SEQ ID NO: 28

[0295]

AAV2i8	2238	US20170128528A1 SEQ ID NO: 29
ttAAV	2239	US20170128528A1 SEQ ID NO: 30
ttAAV-S312N	2240	US20170128528A1 SEQ ID NO: 32
ttAAV-S312N	2241	US20170128528A1 SEQ ID NO: 33
AAV6 (Y705、 Y731 和 T492)	2242	WO2016134337A1 SEQ ID NO: 24
AAV2	2243	WO2016134375A1 SEQ ID NO: 9
AAV2	2244	WO2016134375A1 SEQ ID NO: 10

[0296] 表1中列出的每个专利、申请和/或出版物均通过引用整体并入本文。

[0297] 在一个实施方案中, AAV血清型可以是或可以具有国际专利公开W02015038958中所述的序列, 其内容通过引用整体并入本文, 例如但不限于AAV9 (W02015038958的SEQ ID NO: 2和11或本文中分别为SEQ ID NO: 127和126)、PHP.B (W02015038958的SEQ ID NO: 8和9, 本文的SEQ ID NO: 868和869)、G2B-13 (W02015038958的SEQ ID NO: 12, 本文的SEQ ID NO: 870)、G2B-26 (W02015038958的SEQ ID NO: 13, 本文的SEQ ID NO: 868和869)、TH1.1-32 (W02015038958的SEQ ID NO: 14, 本文的SEQ ID NO: 871)、TH1.1-35 (W02015038958的SEQ ID NO: 15, 本文的SEQ ID NO: 872) 或其变体。此外, W02015038958中描述的任何靶向肽或氨基酸插入物均可插入到任何亲本AAV血清型, 例如但不限于AAV9 (DNA序列为SEQ ID NO: 126, 氨基酸序列为SEQ ID NO: 127)。在一个实施方案中, 将氨基酸插入物插入到亲本AAV (例如, AAV9) 的氨基酸586-592之间。在另一个实施方案中, 氨基酸插入物插入到亲本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任何氨基酸序列TLAVPFK (W02015038958的SEQ ID NO: 1; 本文的SEQ ID NO: 873)、KFPVALT (W02015038958的SEQ ID NO: 3; 本文的SEQ ID NO: 874)、LAVPFK (W02015038958的SEQ ID NO: 31; 本文的SEQ ID NO: 875)、AVPFK (W02015038958的SEQ ID NO: 32; 本文的SEQ ID NO: 876)、VPFK (W02015038958的SEQ ID NO: 33; 本文的SEQ ID NO: 877)、TLAVPF (W02015038958的SEQ ID NO: 34; 本文的SEQ ID NO: 878)、TLAVP (W02015038958的SEQ ID NO: 35; 本文的SEQ ID NO: 879)、TLAV (W02015038958的SEQ ID NO: 36; 本文的SEQ ID NO: 880)、SVSKPFL (W02015038958的SEQ ID NO: 28; 本文的SEQ ID NO: 881)、FTLTTPK (W02015038958的SEQ ID NO: 29; 本文的SEQ ID NO: 882)、MNATKNV (W02015038958的SEQ ID NO: 30; 本文的SEQ ID NO: 883)、QSSQTPR (W02015038958的SEQ ID NO: 54; 本文的SEQ ID NO: 884)、ILGTGTS (W02015038958的SEQ ID NO: 55; 本文的SEQ ID NO: 885)、TRTNPEA (W02015038958的SEQ ID NO: 56; 本文的SEQ ID NO: 886)、NGGTSSS (W02015038958的SEQ ID NO: 58; 本文的SEQ ID NO: 887) 或YTLSQGW (W02015038958的SEQ ID NO: 60; 本文的SEQ ID NO: 888)。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: AAGTTTCCTGTGGCGTTGACT (对于W02015038958的SEQ ID NO: 3; 本文的SEQ ID NO: 889)、ACTTTGGCGGTGCCTTTTAAG (W02015038958的SEQ ID NO: 24和49; 本文的SEQ ID NO: 890)、AGTGTGAGTAAGCCTTTTTTG (W02015038958的SEQ ID NO: 25; 本文的SEQ ID NO: 891)、TTTACGTTGACGACGCCTAAG (W02015038958的SEQ ID NO: 26; 本文的SEQ ID NO: 892)、ATGAATGCTACGAAGAATGTG (W02015038958的SEQ ID NO: 27; 本文的SEQ ID NO: 893)、CAGTCGTCGCAGACGCCTAGG (W02015038958的SEQ ID NO: 48; 本文的SEQ ID NO: 894)、

ATTCTGGGGACTGGTACTTCG (W02015038958的SEQ ID NO:50和52;本文的SEQ ID NO:895)、ACGCGGACTAATCCTGAGGCT (W02015038958的SEQ ID NO:51;本文的SEQ ID NO:896)、AATGGGGGGACTAGTAGTTCT (W02015038958的SEQ ID NO:53;本文的SEQ ID NO:897)或TATACTTTGTCGCAGGGTTGG (W02015038958的SEQ ID NO:59;本文的SEQ ID NO:898)。

[0298] 在一个实施方案中,可以将AAV血清型工程化以包含用于AAV2的至少一种AAV衣壳CD8+T细胞表位,例如但不限于SADNNSEY (SEQ ID NO:899)、LIDQYLYYL (SEQ ID NO:900)、VPQYGYLTL (SEQ ID NO:901)、TTSTRWAL (SEQ ID NO:902)、YHLNGRDSL (SEQ ID NO:903)、SQA VGRSSF (SEQ ID NO:904)、VPANPSTTF (SEQ ID NO:905)、FPQSGVLIF (SEQ ID NO:906)、YDFNRFHCHFSPRD (SEQ ID NO:907)、VGNSSGNWHCDSTWM (SEQ ID NO:908)、QFSQAGASDIRDQSR (SEQ ID NO:909)、GASDIRQSRNWL (SEQ ID NO:910)和GNRQAATADVNTQGV (SEQ ID NO:911)。

[0299] 在一个实施方案中,可以将AAV血清型工程化以包含至少一个用于AAV1的AAV衣壳CD8+T细胞表位,例如但不限于LDRLMNPLI (SEQ ID NO:912)、TTSTRWAL (SEQ ID NO:902)和QPAKKRLNF (SEQ ID NO:913)。

[0300] 在一个实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有国际专利公开W02017100671中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于AAV9 (W02017100671的SEQ ID NO:45,本文的SEQ ID NO:1861)、PHP.N (W02017100671的SEQ ID NO:46,本文的SEQ ID NO:1859)、PHP.S (W02017100671的SEQ ID NO:47,本文的SEQ ID NO:1860)或其变体。此外,在W02017100671中描述的任何靶向肽或氨基酸插入物可以插入到任何亲本AAV血清型,例如但不限于AAV9 (SEQ ID NO:127或SEQ ID NO:1861)。在一个实施方案中,将氨基酸插入物插入亲本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本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任何氨基酸序列AQTLAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:1;本文的SEQ ID NO:2245)、AQSVSKPFLAQ (W02017100671的SEQ ID NO:2;本文的SEQ ID NO:2246)、AQFTLTTPKAQ (W02017100671的序列列表中的SEQ ID NO:3;本文的SEQ ID NO:2247)、DGT LAVPFKAQ (W02017100671的序列列表中的SEQ ID NO:4;本文的SEQ ID NO:2248)、ESTLAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:5;本文的SEQ ID NO:2249)、GGT LAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:6;本文的SEQ ID NO:2250)、AQTLATPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:7和33;本文的SEQ ID NO:2251)、ATTLATPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:8;本文的SEQ ID NO:2252)、DGT LATPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:9;本文的SEQ ID NO:2253)、GGT LATPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:10;本文的SEQ ID NO:2254)、SGSLAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:11;本文的SEQ ID NO:2255)、AQTLAQPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:12;本文的SEQ ID NO:2256)、AQTLQQPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:13;本文的SEQ ID NO:2257)、AQTL SNPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:14;本文的SEQ ID NO:2258)、AQTLAVPFSNP (W02017100671的SEQ ID NO:15;本文的SEQ ID NO:2259)、QGTLAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:16;本文的SEQ ID NO:2260)、NQTLAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:17;本文的SEQ ID NO:2261)、EGSLAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:18;本文的SEQ ID NO:2262)、SGNLAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:19;本文的SEQ ID NO:2263)、EGTLAVPFKAQ (W02017100671的SEQ ID NO:20;本文的SEQ ID NO:2264)、DSTLAVPFKAQ (W02017100671的表1中的SEQ ID NO:21;本文的SEQ ID NO:2265)、AVTLAVPFKAQ

(WO2017100671的SEQ ID NO:22;本文的SEQ ID NO:2266)、AQLSTPFKAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:23;本文的SEQ ID NO:2267)、AQTLPQPFKAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:24和32;本文的SEQ ID NO:2268)、AQTLSQPFKAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:25;本文的SEQ ID NO:2269)、AQLQLPFKAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:26;本文的SEQ ID NO:2270)、AQLTMPFKAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:27和34和WO2017100671的序列列表中的SEQ ID NO:35;本文的SEQ ID NO:2271)、AQLTTPFKAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:28;本文的SEQ ID NO:2272)、AQYTLSQGWAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:29;本文的SEQ ID NO:2273)、AQMNAKNAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:30;本文的SEQ ID NO:2274)、AQVSGGHSAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:31;本文的SEQ ID NO:2275)、AQLTAPFKAQ(WO2017100671的表1中的SEQ ID NO:35;本文的SEQ ID NO:2276)、AQTLSPFKAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:36;本文的SEQ ID NO:2277)、QAVRTSL(WO2017100671的SEQ ID NO:37;本文的SEQ ID NO:2278)、YTLSQGW(WO2017100671的SEQ ID NO:38;本文的SEQ ID NO:888)、LAKERLS(WO2017100671的SEQ ID NO:39;本文的SEQ ID NO:2279)、TLAVPFK(WO2017100671的序列列表中的SEQ ID NO:40;本文的SEQ ID NO:873)、SVSKPFL(WO2017100671的SEQ ID NO:41;本文的SEQ ID NO:881)、FTLTPK(WO2017100671的SEQ ID NO:42;本文的SEQ ID NO:882)、MNSTKNV(WO2017100671的SEQ ID NO:43;本文的SEQ ID NO:2280)、VSGGHS(WO2017100671的SEQ ID NO:44;本文的SEQ ID NO:2281)、SAQTLAVPFKAQAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:48;本文的SEQ ID NO:2282)、SXXXLAVPFKAQAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:49,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:2283)、SAQXXXVPFKAQAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:50,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:2284)、SAQTLXXXFKQAQAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:51,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:2285)、SAQTLAVXXXAQAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:52,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:2286)、SAQTLAVPFXXXAQAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:53,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:2287)、TNHQSAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:65;本文的SEQ ID NO:2288)、AQAQTGW(WO2017100671的SEQ ID NO:66;本文的SEQ ID NO:2289)、DGLATPFK(WO2017100671的SEQ ID NO:67;本文的SEQ ID NO:2290)、DGLATPFKXX(WO2017100671的SEQ ID NO:68,其中X可以是任何氨基酸;本文的SEQ ID NO:2291)、LAVPFKAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:80;本文的SEQ ID NO:2292)、VPFKAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:81;本文的SEQ ID NO:2293)、FKAQ(WO2017100671的SEQ ID NO:82;本文的SEQ ID NO:2294)、AQLAV(WO2017100671的SEQ ID NO:83;本文的SEQ ID NO:2295)、AQLAVPF(WO2017100671的SEQ ID NO:84;本文的SEQ ID NO:2296)、QAVR(WO2017100671的SEQ ID NO:85;本文的SEQ ID NO:2297)、AVRT(WO2017100671的SEQ ID NO:86;本文的SEQ ID NO:2298)、VRTS(WO2017100671的SEQ ID NO:87;本文的SEQ ID NO:2299)、RTSL(WO2017100671的SEQ ID NO:88;本文的SEQ ID NO:2300)、QAVRT(WO2017100671的SEQ ID NO:89;本文的SEQ ID NO:2301)、AVRTS(WO2017100671的SEQ ID NO:90;本文的SEQ ID NO:2302)、VRTSL(WO2017100671的SEQ ID NO:91;本文的SEQ ID NO:2303)、QAVRTS(WO2017100671的SEQ ID NO:92;本文的SEQ ID NO:2304)或AVRTSL(WO2017100671的SEQ ID NO:93;本文的SEQ ID NO:2305)。

[0301] 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:GATGGGACTTTGGCGGTGCCTTTTAAGGCACAG(WO2017100671的SEQ ID NO:54;本文的SEQ ID NO:2306)、GATGGG

ACGTTGGCGGTGCCTTTTAAGGCACAG (W02017100671的SEQ ID NO:55;本文的SEQ ID NO:2307)、CAGGCGGTTAGGACGTCTTTG (W02017100671的SEQ ID NO:56;本文的SEQ ID NO:2308)、CAGGTCTTCACGGACTCAGACTATCAG (W02017100671的SEQ ID NO:57和78;本文的SEQ ID NO:2309)、CAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCG (W02017100671的SEQ ID NO:58;本文的SEQ ID NO:2310)、ACTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCTAGAAC (W02017100671的SEQ ID NO:59;本文的SEQ ID NO:2311)、GGAAGTATTCCTTGGTTTTGAACCCA (W02017100671的SEQ ID NO:60;本文的SEQ ID NO:2312)、GGTCGCGGTTCTGTTTGTGGAT (W02017100671的SEQ ID NO:61;本文的SEQ ID NO:2313)、CGACCTGAAGCGCATGAACTCCT (W02017100671的SEQ ID NO:62;本文的SEQ ID NO:2314)、GTATTCCTTGGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCCTGTGCMNMMNMMNMMNMMNMMNNTTGGGCACTCTGGTGGTTTGTG (W02017100671的SEQ ID NO:63,其中N可以是A、C、T或G;本文的SEQ ID NO:2315)、GTATTCCTTGGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCMNMMNMMNAAAAGGCACCGCCAAAGTTT (W02017100671的SEQ ID NO:69,其中N可以是A、C、T或G;本文的SEQ ID NO:2316)、GTATTCCTTGGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCCTGTGCMNMMNMMNCACCGCCAAAGTTTGGGCACT (W02017100671的SEQ ID NO:70,其中N可以是A、C、T或G;本文的SEQ ID NO:2317)、GTATTCCTTGGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCCTGTGCCTTAAAMNMMNMMNCAAAGTTTGGGCACTCTGGTGG (W02017100671的SEQ ID NO:71,其中N可以是A、C、T或G;本文的SEQ ID NO:2318)、GTATTCCTTGGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCCTGTGCCTTAAAAGGCACMNMNMMNNTTGGGCACTCTGGTGGTTTGTG (W02017100671的SEQ ID NO:72,其中N可以是A、C、T或G;本文的SEQ ID NO:2319)、ACTTTGGCGGTGCCTTTTAAG (W02017100671的SEQ ID NO:74;本文的SEQ ID NO:890)、AGTGTGAGTAAGCCTTTTTT (W02017100671的SEQ ID NO:75;本文的SEQ ID NO:891)、TTTACGTTGACGACGCTAAG (W02017100671的SEQ ID NO:76;本文的SEQ ID NO:892)、TATACTTTGTCGAGGGTTGG (W02017100671的SEQ ID NO:77;本文的SEQ ID NO:898)或CTTGCGAAGGAGCGGCTTTCG (W02017100671的SEQ ID NO:79;本文的SEQ ID NO:2320)。

[0302] 在一个实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有美国专利号US 9624274中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于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;本文的SEQ ID NO:1862)、B19 (US9624274的SEQ ID NO:193;本文的SEQ ID NO:1863)、MVM (US9624274的SEQ ID NO:194;本文的SEQ ID NO:1864)、FPV (US9624274的SEQ ID NO:195;本文的SEQ ID NO:1865)、CPV (US9624274的SEQ ID NO:196;本文的SEQ ID NO:1866)或其变体。此外,US 9624274中描述的任何结构蛋白插入物都可以插入但不限于任何亲本AAV血清型的I-453和I-587,例如但不限于AAV2 (US9624274的SEQ ID NO:183)。氨基酸插入物可以是但不限于任何以下氨基酸序列:VNLTWSRASG (US9624274的SEQ ID NO:50;本文的SEQ ID NO:2321)、EFCINHRGYWVCGD (US9624274的SEQ ID NO:55;本文的SEQ ID NO:2322)、EDGQVMDVDLS (US9624274的SEQ ID NO:85;本文的SEQ ID NO:2323)、EKQRNGTLT (US9624274的SEQ ID NO:86;本文的SEQ ID NO:2324)、TYQCRVTHPHLPRALMR (US9624274的SEQ ID NO:87;本文的SEQ ID NO:2325)、

RHSTTQPRKTKGSG (US9624274的SEQ ID NO:88;本文的SEQ ID NO:2326)、DSNPRGV SAYLSR (US9624274的SEQ ID NO:89;本文的SEQ ID NO:2327)、TITCLWDLAPSK (US9624274的SEQ ID NO:90;本文的SEQ ID NO:2328)、KTKGSGFFVF (US9624274的SEQ ID NO:91;本文的SEQ ID NO:2329)、THPHLPRALMRS (US9624274的SEQ ID NO:92;本文的SEQ ID NO:2330)、GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK (US9624274的SEQ ID NO:93;本文的SEQ ID NO:2331)、LPRALMRS (US9624274的SEQ ID NO:94;本文的SEQ ID NO:2332)、INHRYWV (US9624274的SEQ ID NO:95;本文的SEQ ID NO:2333)、CDAGSVRTNAPD (US9624274的SEQ ID NO:60;本文的SEQ ID NO:2334)、AKAVSNLTESRSESLQS (US9624274的SEQ ID NO:96;本文的SEQ ID NO:2335)、SLTGDEFKAVLET (US9624274的SEQ ID NO:97;本文的SEQ ID NO:2336)、REAVAYRFEED (US9624274的SEQ ID NO:98;本文的SEQ ID NO:2337)、INPEIITLDG (US9624274的SEQ ID NO:99;本文的SEQ ID NO:2338)、DISVTGAPVITATYL (US9624274的SEQ ID NO:100;本文的SEQ ID NO:2339)、DISVTGAPVITA (US9624274的SEQ ID NO:101;本文的SEQ ID NO:2340)、PKTVSNLTESSES SVQS (US9624274的SEQ ID NO:102;本文的SEQ ID NO:2341)、SLMGDEFKAVLET (US9624274的SEQ ID NO:103;本文的SEQ ID NO:2342)、QHSVAYTFEED (US9624274的SEQ ID NO:104;本文的SEQ ID NO:2343)、INPEIITRDG (US9624274的SEQ ID NO:105;本文的SEQ ID NO:2344)、DISLTGDPVITASYL (US9624274的SEQ ID NO:106;本文的SEQ ID NO:2345)、DISLTGDPVITA (US9624274的SEQ ID NO:107;本文的SEQ ID NO:2346)、DQSIDFEIDSA (US9624274的SEQ ID NO:108;本文的SEQ ID NO:2347)、KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS (US9624274的SEQ ID NO:109;本文的SEQ ID NO:2348)、KNVSEDLPLPT (US9624274的SEQ ID NO:110;本文的SEQ ID NO:2349)、CDSGRVRTDAPD (US9624274的SEQ ID NO:111;本文的SEQ ID NO:2350)、FPEHLLVDFLQSL (US9624274的SEQ ID NO:112;本文的SEQ ID NO:2351)、DAEFRHDSG (US9624274的SEQ ID NO:65;本文的SEQ ID NO:2352)、HYAAAQWDFGNTMCQL (US9624274的SEQ ID NO:113;本文的SEQ ID NO:2353)、YAAQWDFGNTMCQ (US9624274的SEQ ID NO:114;本文的SEQ ID NO:2354)、RSQKEGLHYT (US9624274的SEQ ID NO:115;本文的SEQ ID NO:2355)、SSRTPSDKPVAHWANPQAE (US9624274的SEQ ID NO:116;本文的SEQ ID NO:2356)、SRTPSDKPVAHWANP (US9624274的SEQ ID NO:117;本文的SEQ ID NO:2357)、SSRTPSDKP (US9624274的SEQ ID NO:118;本文的SEQ ID NO:2358)、NADGNVDYHMNSVP (US9624274的SEQ ID NO:119;本文的SEQ ID NO:2359)、DGNVDYHMNSV (US9624274的SEQ ID NO:120;本文的SEQ ID NO:2360)、RSFKEFLQSSLRALRQ (US9624274的SEQ ID NO:121;本文的SEQ ID NO:2361)、FKEFLQSSLRA (US9624274的SEQ ID NO:122;本文的SEQ ID NO:2362) 或 QMWAPQWGP (US9624274的SEQ ID NO:123;本文的SEQ ID NO:2363)。

[0303] 在一个实施方案中, AAV血清型可以是或可以具有美国专利号US9475845中描述的序列, 其内容通过引用整体并入本文, 例如但不限于AAV衣壳蛋白, 其包含在天然AAV2衣壳蛋白的氨基酸位置585至590的一个或多个氨基酸修饰。进一步的修饰可以产生但不限于氨基酸序列RGNRQA (US9475845的SEQ ID NO:3;本文的SEQ ID NO:2364)、SSSTDP (US9475845的SEQ ID NO:4;本文的SEQ ID NO:2365)、SSNTAP (US9475845的SEQ ID NO:5;本文的SEQ ID NO:2366)、SNSNLP (US9475845的SEQ ID NO:6;本文的SEQ ID NO:2367)、SSTAP (US9475845的SEQ ID NO:7;本文的SEQ ID NO:2368)、AANTAA (US9475845的SEQ ID NO:8;

本文的SEQ ID NO:2369)、QQNTAP (US9475845的SEQ ID NO:9;本文的SEQ ID NO:2370)、SAQAQA (US9475845的SEQ ID NO:10;本文的SEQ ID NO:2371)、QANTGP (US9475845的SEQ ID NO:11;本文的SEQ ID NO:2372)、NATTAP (US9475845的SEQ ID NO:12;本文的SEQ ID NO:2373)、SSTAGP (US9475845的SEQ ID NO:13和20;本文的SEQ ID NO:2374)、QQNTAA (US9475845的SEQ ID NO:14;本文的SEQ ID NO:2375)、PSTAGP (US9475845的SEQ ID NO:15;本文的SEQ ID NO:2376)、NQNTAP (US9475845的SEQ ID NO:16;本文的SEQ ID NO:2377)、QAANAP (US9475845的SEQ ID NO:17;本文的SEQ ID NO:2378)、SIVGLP (US9475845的SEQ ID NO:18;本文的SEQ ID NO:2379)、AASTAA (US9475845的SEQ ID NO:19和27;本文的SEQ ID NO:2380)、SQNTTA (US9475845的SEQ ID NO:21;本文的SEQ ID NO:2381)、QQDTAP (US9475845的SEQ ID NO:22;本文的SEQ ID NO:2382)、QTNTGP (US9475845的SEQ ID NO:23;本文的SEQ ID NO:2383)、QTNGAP (US9475845的SEQ ID NO:24;本文的SEQ ID NO:2384)、QQNAAP (US9475845的SEQ ID NO:25;本文的SEQ ID NO:2385) 或AANTQA (US9475845的SEQ ID NO:26;本文的SEQ ID NO:2386)。在一个实施方案中,氨基酸修饰是在天然AAV2衣壳蛋白中的氨基酸位置262至265或另一AAV的衣壳蛋白中的相应位置处用靶向序列取代。靶向序列可以是但不限于下述任何氨基酸序列:NGRAHA (US9475845的SEQ ID NO:38;本文的SEQ ID NO:2387)、QPEHSST (US9475845的SEQ ID NO:39和50;本文的SEQ ID NO:2388)、VNTANST (US9475845的SEQ ID NO:40;本文的SEQ ID NO:2389)、HGPMQKS (US9475845的SEQ ID NO:41;本文的SEQ ID NO:2390)、PHKPPLA (US9475845的SEQ ID NO:42;本文的SEQ ID NO:2391)、IKNNEMW (US9475845的SEQ ID NO:43;本文的SEQ ID NO:2392)、RNLDTPM (US9475845的SEQ ID NO:44;本文的SEQ ID NO:2393)、VDSHRQS (US9475845的SEQ ID NO:45;本文的SEQ ID NO:2394)、YDSKTKT (US9475845的SEQ ID NO:46;本文的SEQ ID NO:2395)、SQLPHQK (US9475845的SEQ ID NO:47;本文的SEQ ID NO:2396)、STMQQNT (US9475845的SEQ ID NO:48;本文的SEQ ID NO:2397)、TERYMTQ (US9475845的SEQ ID NO:49;本文的SEQ ID NO:2398)、DASLSTS (US9475845的SEQ ID NO:51;本文的SEQ ID NO:2399)、DLPNKKT (US9475845的SEQ ID NO:52;本文的SEQ ID NO:2400)、DLTAARL (US9475845的SEQ ID NO:53;本文的SEQ ID NO:2401)、EPHQFNY (US9475845的SEQ ID NO:54;本文的SEQ ID NO:2402)、EPQSNHT (US9475845的SEQ ID NO:55;本文的SEQ ID NO:2403)、MSSWPSQ (US9475845的SEQ ID NO:56;本文的SEQ ID NO:2404)、NPKHNAT (US9475845的SEQ ID NO:57;本文的SEQ ID NO:2405)、PDGMRTT (US9475845的SEQ ID NO:58;本文的SEQ ID NO:2406)、PNNKTT (US9475845的SEQ ID NO:59;本文的SEQ ID NO:2407)、QSTTHDS (US9475845的SEQ ID NO:60;本文的SEQ ID NO:2408)、TGSKQKQ (US9475845的SEQ ID NO:61;本文的SEQ ID NO:2409)、SLKHQAL (US9475845的SEQ ID NO:62;本文的SEQ ID NO:2410)、SPIDGEQ (US9475845的SEQ ID NO:63;本文的SEQ ID NO:2411)、WIFPWIQL (US9475845的SEQ ID NO:64和112;本文的SEQ ID NO:2412)、CDCRGDCFC (US9475845的SEQ ID NO:65;本文的SEQ ID NO:2413)、CNGRC (US9475845的SEQ ID NO:66;本文的SEQ ID NO:2414)、CPRECES (US9475845的SEQ ID NO:67;本文的SEQ ID NO:2415)、CTTHWGFTLC (US9475845的SEQ ID NO:68和123;本文的SEQ ID NO:2416)、CGRRAGGSC (US9475845的SEQ ID NO:69;本文的SEQ ID NO:2417)、CKGGRKDC (US9475845的SEQ ID NO:70;本文的SEQ ID NO:2418)、CVPELGHEC (US9475845的SEQ ID NO:71和115;本文的SEQ ID NO:2419)、CRRETAWAK (US9475845的SEQ ID NO:72;本文的SEQ

ID NO:2420)、VSWFSHRYSPFAVS (US9475845的SEQ ID NO:73;本文的SEQ ID NO:2421)、GYRDGYAGPILYN (US9475845的SEQ ID NO:74;本文的SEQ ID NO:2422)、XXXYYXX (US9475845的SEQ ID NO:75;本文的SEQ ID NO:2423)、YXNW (US9475845的SEQ ID NO:76;本文的SEQ ID NO:2424)、RPLPPLP (US9475845的SEQ ID NO:77;本文的SEQ ID NO:2425)、APPLPPR (US9475845的SEQ ID NO:78;本文的SEQ ID NO:2426)、DVFYPYPYASGS (US9475845的SEQ ID NO:79;本文的SEQ ID NO:2427)、MYWYPY (US9475845的SEQ ID NO:80;本文的SEQ ID NO:2428)、DITWDQLWDLMK (US9475845的SEQ ID NO:81;本文的SEQ ID NO:2429)、CWDDXWLC (US9475845的SEQ ID NO:82;本文的SEQ ID NO:2430)、EWCEYLGGYLRCYA (US9475845的SEQ ID NO:83;本文的SEQ ID NO:2431)、YXCXXGPXTWXCXP (US9475845的SEQ ID NO:84;本文的SEQ ID NO:2432)、IEGPTLRQWLAARA (US9475845的SEQ ID NO:85;本文的SEQ ID NO:2433)、LWXXX (US9475845的SEQ ID NO:86;本文的SEQ ID NO:2434)、XFXXYLW (US9475845的SEQ ID NO:87;本文的SEQ ID NO:2435)、SSIISHFRWGLCD (US9475845的SEQ ID NO:88;本文的SEQ ID NO:2436)、MSRPACPPNDKYE (US9475845的SEQ ID NO:89;本文的SEQ ID NO:2437)、CLRSGRGC (US9475845的SEQ ID NO:90;本文的SEQ ID NO:2438)、CHWMFSPWC (US9475845的SEQ ID NO:91;本文的SEQ ID NO:2439)、WXXF (US9475845的SEQ ID NO:92;本文的SEQ ID NO:2440)、CSSRLDAC (US9475845的SEQ ID NO:93;本文的SEQ ID NO:2441)、CLPVASC (US9475845的SEQ ID NO:94;本文的SEQ ID NO:2442)、CGFECVRQCPERC (US9475845的SEQ ID NO:95;本文的SEQ ID NO:2443)、CVALCREACGEGC (US9475845的SEQ ID NO:96;本文的SEQ ID NO:2444)、SWCEPGWCR (US9475845的SEQ ID NO:97;本文的SEQ ID NO:2445)、YSGKWW (US9475845的SEQ ID NO:98;本文的SEQ ID NO:2446)、GLSGGRS (US9475845的SEQ ID NO:99;本文的SEQ ID NO:2447)、LMLPRAD (US9475845的SEQ ID NO:100;本文的SEQ ID NO:2448)、CSCFRDVCC (US9475845的SEQ ID NO:101;本文的SEQ ID NO:2449)、CRDVVSVIC (US9475845的SEQ ID NO:102;本文的SEQ ID NO:2450)、MARSGL (US9475845的SEQ ID NO:103;本文的SEQ ID NO:2451)、MARAKE (US9475845的SEQ ID NO:104;本文的SEQ ID NO:2452)、MSRTMS (US9475845的SEQ ID NO:105;本文的SEQ ID NO:2453)、KCCYSL (US9475845的SEQ ID NO:106;本文的SEQ ID NO:2454)、MYWGDSHWLQYWYE (US9475845的SEQ ID NO:107;本文的SEQ ID NO:2455)、MQLPLAT (US9475845的SEQ ID NO:108;本文的SEQ ID NO:2456)、EWLS (US9475845的SEQ ID NO:109;本文的SEQ ID NO:2457)、SNEW (US9475845的SEQ ID NO:110;本文的SEQ ID NO:2458)、TNYL (US9475845的SEQ ID NO:111;本文的SEQ ID NO:2459)、WDLAWMFRLPVG (US9475845的SEQ ID NO:113;本文的SEQ ID NO:2460)、CTVALPGGYVRVC (US9475845的SEQ ID NO:114;本文的SEQ ID NO:2461)、CVAYCIEHHCWTC (US9475845的SEQ ID NO:116;本文的SEQ ID NO:2462)、CVFAHNYDYLVLC (US9475845的SEQ ID NO:117;本文的SEQ ID NO:2463)、CVFTSNYAFC (US9475845的SEQ ID NO:118;本文的SEQ ID NO:2464)、VHSPNKK (US9475845的SEQ ID NO:119;本文的SEQ ID NO:2465)、CRGDGWC (US9475845的SEQ ID NO:120;本文的SEQ ID NO:2466)、XRGCDX (US9475845的SEQ ID NO:121;本文的SEQ ID NO:2467)、PXXX (US9475845的SEQ ID NO:122;本文的SEQ ID NO:2468)、SGKGPRQITAL (US9475845的SEQ ID NO:124;本文的SEQ ID NO:2469)、AAAAAAAAAXXXX (US9475845的SEQ ID NO:125;本文的SEQ ID NO:2470)、VYMSPF (US9475845的SEQ ID NO:126;本文的SEQ ID NO:2471)、ATWLPPR (US9475845的SEQ ID NO:

127;本文的SEQ ID NO:2472)、HTMYHYHQQHHL(US9475845的SEQ ID NO:128;本文的SEQ ID NO:2473)、SEVGCRAGPLQWLCEKYFG(US9475845的SEQ ID NO:129;本文的SEQ ID NO:2474)、CGLLPVGRPDRNVWRWLC(US9475845的SEQ ID NO:130;本文的SEQ ID NO:2475)、CKGQCDRFKGLPWEC(US9475845的SEQ ID NO:131;本文的SEQ ID NO:2476)、SGRSA(US9475845的SEQ ID NO:132;本文的SEQ ID NO:2477)、WGFP(US9475845的SEQ ID NO:133;本文的SEQ ID NO:2478)、AEPMPHSLNFSQYLWYT(US9475845的SEQ ID NO:134;本文的SEQ ID NO:2479)、WAYXSP(US9475845的SEQ ID NO:135;本文的SEQ ID NO:2480)、IELLQAR(US9475845的SEQ ID NO:136;本文的SEQ ID NO:2481)、AYTKCSRQWRTCMTH(US9475845的SEQ ID NO:137;本文的SEQ ID NO:2482)、PQNSKIPGPTFLDPH(US9475845的SEQ ID NO:138;本文的SEQ ID NO:2483)、SMEPALPDWWWKMKF(US9475845的SEQ ID NO:139;本文的SEQ ID NO:2484)、ANTPCGPYTHDCPVKR(US9475845的SEQ ID NO:140;本文的SEQ ID NO:2485)、TACHQHVRMVRP(US9475845的SEQ ID NO:141;本文的SEQ ID NO:2486)、VPWMEPAYQRFL(US9475845的SEQ ID NO:142;本文的SEQ ID NO:2487)、DPRATPGS(US9475845的SEQ ID NO:143;本文的SEQ ID NO:2488)、FRPNRAQDYNTN(US9475845的SEQ ID NO:144;本文的SEQ ID NO:2489)、CTKNSYLMC(US9475845的SEQ ID NO:145;本文的SEQ ID NO:2490)、CXXTXXGXGC(US9475845的SEQ ID NO:146;本文的SEQ ID NO:2491)、CPIEDRPMC(US9475845的SEQ ID NO:147;本文的SEQ ID NO:2492)、HEWSYLAPYPWF(US9475845的SEQ ID NO:148;本文的SEQ ID NO:2493)、MCPKHPLGC(US9475845的SEQ ID NO:149;本文的SEQ ID NO:2494)、RMWPSSTVNLSAGR(US9475845的SEQ ID NO:150;本文的SEQ ID NO:2495)、SAKTAVSQRVWLPSHRGGEP(US9475845的SEQ ID NO:151;本文的SEQ ID NO:2496)、KSREHVNSACPSKRITAAL(US9475845的SEQ ID NO:152;本文的SEQ ID NO:2497)、EGFR(US9475845的SEQ ID NO:153;本文的SEQ ID NO:2498)、AGLGVR(US9475845的SEQ ID NO:154;本文的SEQ ID NO:2499)、GTRQGHTMRLGVSDG(US9475845的SEQ ID NO:155;本文的SEQ ID NO:2500)、IAGLATPGWSHWLAL(US9475845的SEQ ID NO:156;本文的SEQ ID NO:2501)、SMSIARL(US9475845的SEQ ID NO:157;本文的SEQ ID NO:2502)、HTFEPGV(US9475845的SEQ ID NO:158;本文的SEQ ID NO:2503)、NTSLKRISNKRIRRK(US9475845的SEQ ID NO:159;本文的SEQ ID NO:2504)、LRIKRKRKRKTRK(US9475845的SEQ ID NO:160;本文的SEQ ID NO:2505)、GGG、GFS、LWS、EGG、LLV、LSP、LBS、AGG、GRR、GGH和GTV。

[0304] 在一个实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有美国公开号US 20160369298中所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于,AAV2的位点特异性突变衣壳蛋白(US 20160369298的SEQ ID NO:97;本文的SEQ ID NO:2506)或其变体,其中所述特异性位点是选自VP1或其片段的位点R447、G453、S578、N587、N587+1、S662的至少一个位点。

[0305] 此外,US 20160369298中描述的任何突变序列可以是或可以具有但不限于任何以下序列:SDSGASN(US20160369298的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:231;本文的SEQ ID NO:2507)、SPSGASN(US20160369298的SEQ ID NO:2;本文的SEQ ID NO:2508)、SHSGASN(US20160369298的SEQ ID NO:3;本文的SEQ ID NO:2509)、SRSGASN(US20160369298的SEQ ID NO:4;本文的SEQ ID NO:2510)、SKSGASN(US20160369298的SEQ ID NO:5;本文的SEQ ID NO:2511)、SNSGASN(US20160369298的SEQ ID NO:6;本文的SEQ ID NO:2512)、SGSGASN(US20160369298的SEQ ID NO:7;本文的SEQ ID NO:2513)、SASGASN(US20160369298的SEQ

ID NO:8、175和221;本文的SEQ ID NO:2514)、SESGTSN(US20160369298的SEQ ID NO:9;本文的SEQ ID NO:2515)、STTGGSN(US20160369298的SEQ ID NO:10;本文的SEQ ID NO:2516)、SSAGSTN(US20160369298的SEQ ID NO:11;本文的SEQ ID NO:2517)、NNDSQA(US20160369298的SEQ ID NO:12;本文的SEQ ID NO:2518)、NNRNQA(US20160369298的SEQ ID NO:13;本文的SEQ ID NO:2519)、NNNKQA(US20160369298的SEQ ID NO:14;本文的SEQ ID NO:2520)、NAKRQA(US20160369298的SEQ ID NO:15;本文的SEQ ID NO:2521)、NDEHQA(US20160369298的SEQ ID NO:16;本文的SEQ ID NO:2522)、NTSQKA(US20160369298的SEQ ID NO:17;本文的SEQ ID NO:2523)、YYLSRTNTPSGTDTQSRLVFSQAGA(US20160369298的SEQ ID NO:18;本文的SEQ ID NO:2524)、YYLSRTNTDSGTETQSGLDFSQAGA(US20160369298的SEQ ID NO:19;本文的SEQ ID NO:2525)、YYLSRTNTESGTPTQSALEFSQAGA(US20160369298的SEQ ID NO:20;本文的SEQ ID NO:2526)、YYLSRTNTHSGTHTQSPLHFSQAGA(US20160369298的SEQ ID NO:21;本文的SEQ ID NO:2527)、YYLSRTNTSSGTITISHLIFSQAGA(US20160369298的SEQ ID NO:22;本文的SEQ ID NO:2528)、YYLSRTNTRSGIMTKSSLMFSQAGA(US20160369298的SEQ ID NO:23;本文的SEQ ID NO:2529)、YYLSRTNTKSGRKTLSNLSFSQAGA(US20160369298的SEQ ID NO:24;本文的SEQ ID NO:2530)、YYLSRTNDGSGPVTSPKLRFSQRGA(US20160369298的SEQ ID NO:25;本文的SEQ ID NO:2531)、YYLSRTNAASGHATHSDLKFSQPGA(US20160369298的SEQ ID NO:26;本文的SEQ ID NO:2532)、YYLSRTNGQAGSLTMSSELGFSQVGA(US20160369298的SEQ ID NO:27;本文的SEQ ID NO:2533)、YYLSRTNSTGGNQTTSQLLFSQLSA(US20160369298的SEQ ID NO:28;本文的SEQ ID NO:2534)、YFLSRTNNNTGLNTNSTLNFSQGRA(US20160369298的SEQ ID NO:29;本文的SEQ ID NO:2535)、SKTGADNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:30;本文的SEQ ID NO:2536)、SKTDADNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:31;本文的SEQ ID NO:2537)、SKTEADNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:32;本文的SEQ ID NO:2538)、SKTPADNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:33;本文的SEQ ID NO:2539)、SKTHADNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:34;本文的SEQ ID NO:2540)、SKTQADNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:35;本文的SEQ ID NO:2541)、SKTIADNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:36;本文的SEQ ID NO:2542)、SKTMADNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:37;本文的SEQ ID NO:2543)、SKTRADNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:38;本文的SEQ ID NO:2544)、SKTNADNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:39;本文的SEQ ID NO:2545)、SKTVGRNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:40;本文的SEQ ID NO:2546)、SKTADRNNNSEYSWTG(US20160369298的SEQ ID NO:41;本文的SEQ ID NO:2547)、SKKLSQNNNSKYSWQG(US20160369298的SEQ ID NO:42;本文的SEQ ID NO:2548)、SKPTTGNNNSDYSWPG(US20160369298的SEQ ID NO:43;本文的SEQ ID NO:2549)、STQKNENNSNYSWPG(US20160369298的SEQ ID NO:44;本文的SEQ ID NO:2550)、HKDDEGKF(US20160369298的SEQ ID NO:45;本文的SEQ ID NO:2551)、HKDDNRKF(US20160369298的SEQ ID NO:46;本文的SEQ ID NO:2552)、HKDDTNKF(US20160369298的SEQ ID NO:47;本文的SEQ ID NO:2553)、HEDSDKNF(US20160369298的SEQ ID NO:48;本文的SEQ ID NO:2554)、HRDGADSF(US20160369298的SEQ ID NO:49;本文的SEQ ID NO:2555)、HGDNKSRLF(US20160369298的SEQ ID NO:50;本文的SEQ ID NO:2556)、KQGSEKTNVDFEEV

(US20160369298的SEQ ID NO:51;本文的SEQ ID NO:2557)、KQGSEKTNVDSEEV
(US20160369298的SEQ ID NO:52;本文的SEQ ID NO:2558)、KQGSEKTNVDVEEV
(US20160369298的SEQ ID NO:53;本文的SEQ ID NO:2559)、KQGSCKTNVDDAGV
(US20160369298的SEQ ID NO:54;本文的SEQ ID NO:2560)、KQGSCKTNVDPREV
(US20160369298的SEQ ID NO:55;本文的SEQ ID NO:2561)、KQGSRKTNVDHKQV
(US20160369298的SEQ ID NO:56;本文的SEQ ID NO:2562)、KQGSKGGNVDTRV
(US20160369298的SEQ ID NO:57;本文的SEQ ID NO:2563)、KQGSGEANVDNGDV
(US20160369298的SEQ ID NO:58;本文的SEQ ID NO:2564)、KQDAAADNIDYDHV
(US20160369298的SEQ ID NO:59;本文的SEQ ID NO:2565)、KQSGTRSNAASSV
(US20160369298的SEQ ID NO:60;本文的SEQ ID NO:2566)、KENTNTNDELTV
(US20160369298的SEQ ID NO:61;本文的SEQ ID NO:2567)、QRGNNVAATADVNT
(US20160369298的SEQ ID NO:62;本文的SEQ ID NO:2568)、QRGNNEAATADVNT
(US20160369298的SEQ ID NO:63;本文的SEQ ID NO:2569)、QRGNNPAATADVNT
(US20160369298的SEQ ID NO:64;本文的SEQ ID NO:2570)、QRGNNHAATADVNT
(US20160369298的SEQ ID NO:65;本文的SEQ ID NO:2571)、QEENNAATPGVNT
(US20160369298的SEQ ID NO:66;本文的SEQ ID NO:2572)、QPPNMAATHEVNT
(US20160369298的SEQ ID NO:67;本文的SEQ ID NO:2573)、QHHNNSAATTIVNT
(US20160369298的SEQ ID NO:68;本文的SEQ ID NO:2574)、QTTNRAAFNMVET
(US20160369298的SEQ ID NO:69;本文的SEQ ID NO:2575)、QKKNNAASKKVAT
(US20160369298的SEQ ID NO:70;本文的SEQ ID NO:2576)、QGGNKAADDAVKT
(US20160369298的SEQ ID NO:71;本文的SEQ ID NO:2577)、QAAKGGAADDAVKT
(US20160369298的SEQ ID NO:72;本文的SEQ ID NO:2578)、QDDRAAAANESVDT
(US20160369298的SEQ ID NO:73;本文的SEQ ID NO:2579)、QQQHDDAAYQRVHT
(US20160369298的SEQ ID NO:74;本文的SEQ ID NO:2580)、QSSSSLAAVSTVQT
(US20160369298的SEQ ID NO:75;本文的SEQ ID NO:2581)、QNNQTAAIRNVTT
(US20160369298的SEQ ID NO:76;本文的SEQ ID NO:2582)、NYNKSDNVDF (US20160369298
的SEQ ID NO:77;本文的SEQ ID NO:2583)、NYNKSENVDF (US20160369298的SEQ ID NO:
78;本文的SEQ ID NO:2584)、NYNKSLNVDF (US20160369298的SEQ ID NO:79;本文的SEQ
ID NO:2585)、NYNKSPNVDF (US20160369298的SEQ ID NO:80;本文的SEQ ID NO:2586)、
NYSKSHCVDF (US20160369298的SEQ ID NO:81;本文的SEQ ID NO:2587)、NYRKTIVDF
(US20160369298的SEQ ID NO:82;本文的SEQ ID NO:2588)、NYKEKDVHFT (US20160369298
的SEQ ID NO:83;本文的SEQ ID NO:2589)、NYGHRAIVQFT (US20160369298的SEQ ID NO:84;
本文的SEQ ID NO:2590)、NYANHQFVCT (US20160369298的SEQ ID NO:85;本文的SEQ ID
NO:2591)、NYDDPTGVLLT (US20160369298的SEQ ID NO:86;本文的SEQ ID NO:2592)、
NYDDPTGVLLT (US20160369298的SEQ ID NO:87;本文的SEQ ID NO:2593)、NFEQQNSVEWT
(US20160369298的SEQ ID NO:88;本文的SEQ ID NO:2594)、SQSGASN (US20160369298的SEQ
ID NO:89和SEQ ID NO:241;本文的SEQ ID NO:2595)、NNGSQA (US20160369298的SEQ ID
NO:90;本文的SEQ ID NO:2596)、YYLSRTNTPSGTTWSRLQFSQAGA (US20160369298的SEQ ID
NO:91;本文的SEQ ID NO:2597)、SKTSADNNSEYSWTG (US20160369298的SEQ ID NO:92;本文

的SEQ ID NO:2598)、HKDDEEKF (US20160369298的SEQ ID NO:93、209、214、219、224、234、239和244;本文的SEQ ID NO:2599)、KQGSEKTNVDIEEV (US20160369298的SEQ ID NO:94;本文的SEQ ID NO:2600)、QRGNQAATADVNT (US20160369298的SEQ ID NO:95;本文的SEQ ID NO:2601)、NYNKKSVDFT (US20160369298的SEQ ID NO:96;本文的SEQ ID NO:2602)、SQSGASNYNTPSGTTTQSRQLQFSTADNNNSEYSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:106;本文的SEQ ID NO:2603)、SASGASNFNSEGGSLTQSSLGFSTDGENNNSDFSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:107;本文的SEQ ID NO:2604)、SQSGASNYNTPSGTTTQSRQLQFSTDGENNNSDFSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:108;本文的SEQ ID NO:2605)、SASGASNYNTPSGTTTQSRQLQFSTADNNNSEFSWP GATTYH (US20160369298的SEQ ID NO:109;本文的SEQ ID NO:2606)、SQSGASNFNSEGGSLTQSSLGFSTDGENNNSDFSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:110;本文的SEQ ID NO:2607)、SASGASNYNTPSGSLTQSSLGFSTDGENNNSDFSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:111;本文的SEQ ID NO:2608)、SQSGASNYNTPSGTTTQSRQLQFSTADNNNSDFSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:112;本文的SEQ ID NO:2609)、SGAGASNFNSEGGSLTQSSLGFSTDGENNNSDFSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:113;本文的SEQ ID NO:2610)、SGAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:176;本文的SEQ ID NO:2611)、NSEGGSLTQSSLGFS (US20160369298的SEQ ID NO:177、185、193和202;本文的SEQ ID NO:2612)、TDGENNNSDFS (US20160369298的SEQ ID NO:178;本文的SEQ ID NO:2613)、SEFSWP GATT (US20160369298的SEQ ID NO:179;本文的SEQ ID NO:2614)、TSADNNNSDFSWT (US20160369298的SEQ ID NO:180;本文的SEQ ID NO:2615)、SQSGASNY (US20160369298的SEQ ID NO:181、187和198;本文的SEQ ID NO:2616)、NTPSGTTTQSRQLQFS (US20160369298的SEQ ID NO:182、188、191和199;本文的SEQ ID NO:2617)、TSADNNNSEYSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:183;本文的SEQ ID NO:2618)、SASGASNF (US20160369298的SEQ ID NO:184;本文的SEQ ID NO:2619)、TDGENNNSDFSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:186、189、194、197和203;本文的SEQ ID NO:2620)、SASGASNY (US20160369298的SEQ ID NO:190和SEQ ID NO:195;本文的SEQ ID NO:2621)、TSADNNNSEFSWP GATTYH (US20160369298的SEQ ID NO:192;本文的SEQ ID NO:2622)、NTPSGSLTQSSLGFS (US20160369298的SEQ ID NO:196;本文的SEQ ID NO:2623)、TSADNNNSDFSWTGATKYH (US20160369298的SEQ ID NO:200;本文的SEQ ID NO:2624)、SGAGASNF (US20160369298的SEQ ID NO:201;本文的SEQ ID NO:2625)、CTCCAGVSVVSMRSRVCVNSGCAGCTDHCVSRNSGTCVMSACACAA (US20160369298的SEQ ID NO:204;本文的SEQ ID NO:2626)、CTCCAGAGAGGCAACAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAA (US20160369298的SEQ ID NO:205;本文的SEQ ID NO:2627)、SAAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:206;本文的SEQ ID NO:2628)、YFLSRTNTESGSTTQSTLRF SQAG (US20160369298的SEQ ID NO:207;本文的SEQ ID NO:2629)、SKTSADNNNSDFS (US20160369298的SEQ ID NO:208、228和253;本文的SEQ ID NO:2630)、KQGSEKTDVDIDKV (US20160369298的SEQ ID NO:210;本文的SEQ ID NO:2631)、STAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:211;本文的SEQ ID NO:2632)、YFLSRTNTTSGIETQSTLRF SQAG (US20160369298的SEQ ID NO:212和SEQ ID NO:247;本文的SEQ ID NO:2633)、SKTDGENNNSDFS (US20160369298的SEQ ID NO:213和SEQ ID NO:248;本文的SEQ ID NO:2634)、KQGAAADDVEIDGV (US20160369298的SEQ ID NO:215和SEQ ID NO:250;本文的SEQ ID NO:2635)、SEAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:216;本文的SEQ ID

NO:2636)、YYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAG (US20160369298的SEQ ID NO:217、232和242;本文的SEQ ID NO:2637)、SKTSADNNNSEYS (US20160369298的SEQ ID NO:218、233、238和243;本文的SEQ ID NO:2638)、KQGSEKTNVDIEKV (US20160369298的SEQ ID NO:220、225和245;本文的SEQ ID NO:2639)、YFLSRTNDASGSDTKSTLLFSQAG (US20160369298的SEQ ID NO:222;本文的SEQ ID NO:2640)、STTPSENNNSEYS (US20160369298的SEQ ID NO:223;本文的SEQ ID NO:2641)、SAAGATN (US20160369298的SEQ ID NO:226和SEQ ID NO:251;本文的SEQ ID NO:2642)、YFLSRTNGEAGSATLSELRFSQAG (US20160369298的SEQ ID NO:227;本文的SEQ ID NO:2643)、HGDDADRF (US20160369298的SEQ ID NO:229和SEQ ID NO:254;本文的SEQ ID NO:2644)、KQGAEKSDVEVDRV (US20160369298的SEQ ID NO:230和SEQ ID NO:255;本文的SEQ ID NO:2645)、KQDSGGDNIDIDQV (US20160369298的SEQ ID NO:235;本文的SEQ ID NO:2646)、SDAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:236;本文的SEQ ID NO:2647)、YFLSRTNTEGGHDTQSTLRFSQAG (US20160369298的SEQ ID NO:237;本文的SEQ ID NO:2648)、KEDGGSDVAIDEV (US20160369298的SEQ ID NO:240;本文的SEQ ID NO:2649)、SNAGASN (US20160369298的SEQ ID NO:246;本文的SEQ ID NO:2650)和YFLSRTNGEAGSATLSELRFSQPG (US20160369298的SEQ ID NO:252;本文的SEQ ID NO:2651)。可以编码氨基酸突变位点的核苷酸序列包括以下:AGCVVMDCAGGARSCASCAAC (US20160369298的SEQ ID NO:97;本文的SEQ ID NO:2652)、AACRACRRSMRSMAGGCA (US20160369298的SEQ ID NO:98;本文的SEQ ID NO:2653)、CACRRGGACRRCRMSRRSARSTTT (US20160369298的SEQ ID NO:99;本文的SEQ ID NO:2654)、TATTTCTTGAGCAGAACAAACRVCVVSRCGAMNCVHSACGMHSTCAVVSCTTVDSTTTTCTCAGSBCRGS GCG (US20160369298的SEQ ID NO:100;本文的SEQ ID NO:2655)、TCAAMAMMAVNSRVCS RSAACAACAACAGTRASTTCTCGTGGMMAGGA (US20160369298的SEQ ID NO:101;本文的SEQ ID NO:2656)、AAGSAARRCRSCRVS RVARVCRATRYCGMSNHCRMVRS GTC (US20160369298的SEQ ID NO:102;本文的SEQ ID NO:2657)、CAGVVS VVSMRSRVCVNSGCAGCTDHC VVSRNSGTCVMSACA (US20160369298的SEQ ID NO:103;本文的SEQ ID NO:2658)、AACTWCRVSVASMVS VHSDDTGTG SWSTKSACT (US20160369298的SEQ ID NO:104;本文的SEQ ID NO:2659)、TTGTTGAACATCACCACGTGACGCACGTTT (US20160369298的SEQ ID NO:256;本文的SEQ ID NO:2660)、TCCCCGTGGTTCTACTACATAATGTGGCCG (US20160369298的SEQ ID NO:257;本文的SEQ ID NO:2661)、TTCCACACTCCGTTTTGGATAATGTTGAAC (US20160369298的SEQ ID NO:258;本文的SEQ ID NO:2662)、AGGGACATCCCCAGCTCCATGCTGTGGTCG (US20160369298的SEQ ID NO:259;本文的SEQ ID NO:2663)、AGGGACAACCCCTCCGACTCGCCCTAATCC (US20160369298的SEQ ID NO:260;本文的SEQ ID NO:2664)、TCCTAGTAGAAGACACCCTCTCACTGCCCCG (US20160369298的SEQ ID NO:261;本文的SEQ ID NO:2665)、AGTACCATGTACACCCACTCTCCCAGTGCC (US20160369298的SEQ ID NO:262;本文的SEQ ID NO:2666)、ATATGGACGTTTCATGCTGATCACCATACCG (US20160369298的SEQ ID NO:263;本文的SEQ ID NO:2667)、AGCAGGAGCTCCTTGGCCTCAGCGTGCAG (US20160369298的SEQ ID NO:264;本文的SEQ ID NO:2668)、ACAAGCAGTTCACTATGACAACCACTGAC (US20160369298的SEQ ID NO:265;本文的SEQ ID NO:2669)、CAGCCTAGGA ACTGGCTTCTGGACCCTGTTACCGCCAGCAGAGAGTCTCAAMAMMAV NSRVCS RSAACAACAACAGTRASTTCTCCTGGMMAGGAGCTACCAAGTACCACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGT GAATCCCGGACCAGCTATGGCAAGCCACRRGGACRRCRMSRRSARSTTTTTTCTCAGAGCGGGTTCTCATCTTT

GGGAAGSAARRCRSCRVSRRVARVCRA TRYCGMSNHCRVMVRS GTCATGATTACAGACGAAGAGGAGATCTGGAC (US20160369298的SEQ ID NO:266;本文的SEQ ID NO:2670)、TGGGACAATGGCGGTCGTCTCTCA GAGTTKTKKT (US20160369298的SEQ ID NO:267;本文的SEQ ID NO:2671)、AGAGGACCKKTCCT CGATGGTTCATGGTGGAGTTA (US20160369298的SEQ ID NO:268;本文的SEQ ID NO:2672)、 CCACTTAGGGCCTGGTCGATACCGTTCGGTG (US20160369298的SEQ ID NO:269;本文的SEQ ID NO: 2673)和TCTCGCCCCAAGAGTAGAAACCCTTCSTTYG (US20160369298的SEQ ID NO:270;本文的 SEQ ID NO:2674)。

[0306] 在一些实施方案中,AAV血清型可以包含国际专利公开W02016134375中所述的眼 细胞靶向肽,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于W02016134375的SEQ ID NO:9和 SEQ ID NO:10。此外,可以将W02016134375中描述的任何眼细胞靶向肽或氨基酸插入任何 亲本AAV血清型,例如但不限于AAV2 (W02016134375的SEQ ID NO:8;本文的SEQ ID NO: 2675)或AAV9 (W02016134375的SEQ ID NO:11;本文的SEQ ID NO:2676)。在一些实施方案 中,在AAV2蛋白P34-A35、T138-A139、A139-P140、G453-T454、N587-R588和/或R588-Q589处 进行修饰,例如插入。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。眼细胞靶向肽可以是但不限于以下任何氨基酸序 列:GSTPPPM (W02016134375的SEQ ID NO:1;本文的SEQ ID NO:2677)或GETRAPL (W02016134375的SEQ ID NO:4;本文的SEQ ID NO:2678)。

[0307] 在一些实施方案中,可以如美国公开号US 20170145405中所述修饰AAV血清型,其 内容通过引用整体并入本文。AAV血清型可包括修饰的AAV2 (例如,在Y444F、Y500F、Y730F 和/或S662V处的修饰)、修饰的AAV3 (例如,在Y705F、Y731F和/或T492V处的修饰)和修饰的 AAV6 (例如,在S663V和/或T492V处的修饰)。

[0308] 在一些实施方案中,AAV血清型可以如国际公开W02017083722所述地修饰,其内容 通过引用整体并入本文。AAV血清型可能包括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)。

[0309] 在一些实施方案中,AAV血清型可包含如国际专利公开W02017015102中所述的工 程化表位,其内容通过引用整体并入本文,所述工程化表位包含氨基酸SPAKFA (W02017015102的SEQ ID NO:24;本文为SEQ ID NO:2679)或NKDKLN (W02017015102的SEQ ID NO:2;本文为SEQ ID NO:2680)。可以将表位插入基于AAV8的VP1衣壳的编号 (W02017015102的SEQ ID NO:3)的氨基酸665至670和/或AAV3B的残基664至668 (SEQ ID NO:3)的区域中。

[0310] 在一个实施方案中,AAV血清型可以是或可以具有国际专利公开W02017058892中 所述的序列,其内容通过引用整体并入本文,例如但不限于具有衣壳蛋白的AAV变体,其可 包含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的一个或多个 (例如2、3、4、5、6或7)处 (以任意组合)或AAV2、 AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、 AAVrh32.33、牛AAV或禽AAV的等同氨基酸残基处的取代。氨基酸取代可以是但不限于 W02017058892中描述的任何氨基酸序列。在一个实施方案中,AAV可包含在以下残基处的氨 基酸取代: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(以任意组合);AAV5(WO2017058892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(以任意组合);AAV5(WO2017058892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(以任意组合);AAV6(SEQ ID NO:6WO2017058892)的264S、266G、269N、272H、457Q、588S和/或589I(以任意组合);AAV8(SEQ ID NO:8WO2017058892)的457T、459N、496G、499N、500N、589Q、590N和/或592A(以任意组合);AAV9(SEQ ID NO:9WO2017058892)的451I、452N、453G、454S、455G、456Q、457N和/或458Q(以任意组合)。

[0311] 在一些实施方案中,AAV可包含国际公开号WO 2017066764中所述的VP1的155、156和157位或VP2的17、18、19和20位的氨基酸序列,其内容为本文通过引用整体并入。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和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可包含在VP1的156、157或158位或VP2的19、20或21位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。

[0312] 在一个实施方案中,可以使用Hui等人(Molecular Therapy-Methods&Clinical Development(2015)2,15029doi:10.1038/mtm.2015.29;其内容通过引用整体并入本文)描述的方法识别包含在AAV血清型中的肽。作为非限制性实例,该方法包括分离人脾细胞,使用跨越(spanning)AAV衣壳蛋白的氨基酸序列的个体肽体外再刺激脾细胞,使用用于体外再刺激的个体肽的IFN- γ ELISpot,用于确定由IFN- γ ELISpot识别的15-mer的HLA限制的生物信息学分析,给定HLA等位基因的候选反应性9-mer表位的识别,合成候选9-mer,对携带预期识别的AAV表位与之结合的HLA等位基因的受试者的脾细胞进行第二次IFN- γ ELISpot筛选,确定AAV衣壳反应性CD8⁺ T细胞表位,并确定受试者对给定AAV表位反应的频率。

[0313] 在一个实施方案中,AAV可以是由Deverman等人(Nature Biotechnology 342):204-209(2016))描述的基于Cre重组的AAV靶向进化(CREATE)产生的血清型,其内容通过引用整体并入本文。在一个实施方案中,与其他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/或神经元和星形胶质细胞嗜性。作为非限制性实例,AAV血清型可以是PHP.B、PHP.B2、PHP.B3、PHP.A、G2A12、G2A15。在一个实施方案中,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:126和127)衍生物。这些7氨基酸插入物的非限制性实例包括LAVPFK(SEQ ID NO:873)、SVSKPFL(SEQ ID NO:1249)、FTLTTPK(SEQ ID NO:882)、YTLSQGW(SEQ ID NO:888)、QAVRTSL(SEQ ID NO:914)和/或LAKERLS(SEQ ID NO:915)。

[0314] 在一个实施方案中,AAV血清型可以如Jackson等(Frontiers in Molecular Neuroscience 9:154(2016))中所述,其内容通过引用整体并入本文。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,与使用更普遍的启动子(即,CBA或CMV)相比,AAV血清型与突触蛋白启动子配对以增强神经元转导。

[0315] 在一个实施方案中,可以通过以下识别包含在AAV血清型中的肽:分离人脾细胞,使用跨越(spanning) AAV衣壳蛋白的氨基酸序列的个体肽体外再刺激脾细胞,使用用于体外再刺激的个体肽的IFN- γ ELISpot,用于确定由IFN- γ ELISpot识别的15-mer的给定等位基因限制的生物信息学分析,给定等位基因的候选反应性9-mer表位的识别,合成候选9-mer,对携带预期识别的AAV表位与之结合的特异性等位基因的受试者的脾细胞进行第二次IFN- γ ELISpot筛选,确定AAV衣壳反应性CD8+T细胞表位,并确定受试者对给定AAV表位反应的频率。

[0316] 包含编码siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒可以制备或衍生自多种AAV血清型,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8和AAV-DJ。在某些情况下,可以将不同血清型的AAV混合在一起或与其他类型的病毒混合,以产生嵌合AAV颗粒。作为非限制性实例,AAV颗粒衍生自AAV9血清型。

[0317] 病毒基因组

[0318] 在一个实施方案中,如所示,AAV颗粒包含具有有效载荷区的病毒基因组。

[0319] 在一个实施方案中,病毒基因组可包含如图1所示的组分。有效载荷区110位于病毒基因组100内。在病毒基因组100的5'和/或3'端可以存在至少一个反向末端重复序列(ITR)120。在5' ITR 120和有效载荷区110之间,可以存在启动子区130。在一个实施方案中,有效载荷区可包含至少一个调节性多核苷酸。

[0320] 在一个实施方案中,病毒基因组100可包含如图2所示的组分。有效载荷区110位于病毒基因组100内。在病毒基因组100的5'和/或3'端可以存在至少一个反向末端重复序列(ITR)120。在5' ITR 120和有效载荷区110之间,可以存在启动子区130。在启动子区130和有效载荷区110之间,可以存在内含子区140。在一个实施方案中,有效载荷区可包含至少一个调节性多核苷酸。

[0321] 在一个实施方案中,病毒基因组100可包含如图3所示的组分。在病毒基因组100的5'和/或3'端可以存在至少一个反向末端重复序列(ITR)120。在病毒基因组100中,可以存在一个增强子区150、一个启动子区130、一个内含子区140和一个有效载荷区110。在一个实施方案中,有效载荷区可包含至少一个调节性多核苷酸。

[0322] 在一个实施方案中,病毒基因组100可包含如图4所示的组分。在病毒基因组100的5'和/或3'端可以存在至少有一个反向末端重复序列(ITR)120。在病毒基因组100中,可以存在一个增强子区150、一个启动子区130、一个内含子区140、一个有效载荷区110和一个聚腺苷酸化信号序列区160。在一个实施方案中,有效载荷区可包含至少一个调节性多核苷酸。

[0323] 在一个实施方案中,病毒基因组100可包含如图5所示的组分。在病毒基因组100的5'和/或3'端,可以存在至少一个反向末端重复序列(ITR)120。在病毒基因组100中,可以存在至少一个MCS区170、一个增强子区150、一个启动子区130、一个内含子区140、一个有效载荷区110和一个聚腺苷酸化信号序列区160。在一个实施方案中,有效载荷区可包含至少一个调节性多核苷酸。

[0324] 在一个实施方案中,病毒基因组100可包含如图6所示的组分。在病毒基因组100的5'和/或3'端,可以存在至少一个反向末端重复序列(ITR)120。在病毒基因组100内,可以存在至少一个MCS区170、一个增强子区150、一个启动子区130、至少一个外显子区域180、至少一个内含子区140、一个有效载荷区110和一个聚腺苷酸化信号序列地区160。在一个实施方案中,有效载荷区可包含至少一个调节性多核苷酸。

[0325] 在一个实施方案中,病毒基因组100可包含如图7和8所示的组分。在病毒基因组100中,可以存在至少一个启动子区130和一个有效载荷区110。一个实施方案中,有效载荷区可包含至少一个调节性多核苷酸。

[0326] 在一个实施方案中,病毒基因组100可包含如图9所示的组分。在病毒基因组100中,可以存在至少一个启动子区130、一个有效载荷区110和一个聚腺苷酸化信号序列区160。在一个实施方案中,有效载荷区可包含至少一个调节性多核苷酸。

[0327] 病毒基因组大小

[0328] 在一个实施方案中,包含本文描述的有效载荷的病毒基因组可以是单链或双链病毒基因组。病毒基因组的大小可以是小、中等、大或最大大小。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0329] 在一个实施方案中,包含本文描述的有效载荷的病毒基因组可以是小单链病毒基因组。小单链病毒基因组的大小可以是2.7至3.5kb,例如约2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4和3.5kb。作为非限制性实例,小单链病毒基因组的大小可以是3.2kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0330] 在一个实施方案中,包含本文描述的有效载荷的病毒基因组可以是小双链病毒基因组。小双链病毒基因组的大可以是1.3到1.7kb,例如约1.3、1.4、1.5、1.6和1.7kb。作为非限制性实例,小双链病毒基因组的大小可以是1.6kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0331] 在一个实施方案中,包含本文描述的有效载荷的病毒基因组可以是中等单链病毒基因组。中等单链病毒基因组的大小可以是3.6至4.3kb,例如约3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2和4.3kb。作为非限制性实例,中等单链病毒基因组的大小可以是4.0kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0332] 在一个实施方案中,包含本文描述的有效载荷的病毒基因组可以是中等双链病毒基因组。中等双链病毒基因组的大小可以是1.8至2.1kb,例如约1.8、1.9、2.0和2.1kb。作为非限制性实例,中等双链病毒基因组的大小可以是2.0kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0333] 在一个实施方案中,包含本文描述的有效载荷的病毒基因组可以是单链病毒基因组。大单链病毒基因组的大小可能为4.4至6.0kb,例如约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。作为非限制性实例,大单链病毒基因组的大小可以是4.7kb。作为另一个非限制性实例,大单链病毒基因组的大小可以是4.8kb。作为又一个非限制性实例,大单链病毒基因组的大小可以是6.0kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0334] 在一个实施方案中,包含本文描述的有效载荷的病毒基因组可以是双链病毒基因组。大双链病毒基因组的大小可以是2.2至3.0kb,例如约2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、

2.8、2.9和3.0kb。作为非限制性实例,大双链病毒基因组的大小可以是2.4kb。另外,病毒基因组可包含启动子和polyA尾。

[0335] 病毒基因组组分:反向末端重复序列(ITR)

[0336] 本发明的AAV颗粒包含具有至少一个ITR区和一个有效载荷区的病毒基因组。在一个实施方案中,病毒基因组具有两个ITR。这两个ITR位于有效载荷区的侧翼,在5'和3'端。ITR用作包含复制识别位点的复制的起点。ITR包含可以互补和对称排列的序列区。掺入本发明的病毒基因组中的ITR可以由天然存在的多核苷酸序列或重组衍生的多核苷酸序列组成。

[0337] ITR可以衍生自与衣壳相同的血清型,选自表1中列出的任何血清型或其衍生物。ITR可以具有与衣壳不同的血清型。在一个实施方案中,AAV颗粒具有多于一个ITR。在非限制性实例中,AAV颗粒具有包含两个ITR的病毒基因组。在一个实施方案中,ITR具有彼此相同的血清型。在另一个实施方案中,ITR具有不同的血清型。非限制性实例包括具有与衣壳相同血清型的零个、一个或两个ITR。在一个实施方案中,AAV颗粒的病毒基因组的两个ITR均为AAV2 ITR。

[0338] 独立地,每个ITR可以具有约100-150个核苷酸长度。ITR可以具有约100-105个核苷酸长度、106-110个核苷酸长度、111-115个核苷酸长度、116-120个核苷酸长度、121-125个核苷酸长度、126-130个核苷酸长度、131-135个核苷酸长度、136-140个核苷酸长度、141-145个核苷酸长度或146-150个核苷酸长度。在一个实施方案中,ITR具有140-142个核苷酸长度。ITR长度的非限制性实例是102、140、141、142、145个核苷酸长度,以及与其具有至少95%同一性的核苷酸。

[0339] 在一个实施方案中,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该siRNA分子可以位于表达载体中flip ITR的5'端附近。在另一个实施方案中,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该核酸序列可以位于表达载体中flip ITR的3'端附近。在又一个实施方案中,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该核酸序列可以位于表达载体中flop ITR的5'端附近。在又一个实施方案中,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该核酸序列可以位于表达载体中flop ITR的3'端附近。在一个实施方案中,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该核酸序列可以位于表达载体中flip ITR的5'端和flop ITR的3'端之间。在一个实施方案中,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该核酸序列可以位于表达载体中flip ITR的3'端和flop ITR的5'端之间(例如,在flip ITR的5'端与flop ITR的3'端或在flop ITR的3'端和flip ITR的5'端之间的中间)。作为非限制性实例,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该核酸序列可位于表达载体中ITR(例如Flip或Flop ITR)的5'或3'端下游的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或多于30个核苷酸内。作为非限制性实例,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该核酸序列可位于表达载体中ITR(例如Flip或Flop ITR)的5'或3'端上游的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或多于30个核苷酸内。作为另一个非限制性实例,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该核酸序列可以位于表达载体中ITR(例如Flip或Flop ITR)的5'或3'端下游的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。作为另一个非限制性实例,AAV颗粒包含编码siRNA分

子的核酸序列,该核酸序列可以位于表达载体中ITR(例如Flip或Flop ITR)的5'或3'端上游的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。作为非限制性实例,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该核酸序列可位于表达载体中ITR(例如Flip或Flop ITR)的5'或3'端上游的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或大于25%的核苷酸内。作为另一个非限制性实例,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,该核酸序列可位于表达载体中ITR(例如Flip或Flop ITR)的5'或3'端下游的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或大于25%的核苷酸内。

[0340] 病毒基因组组分:启动子

[0341] 在一个实施方案中,病毒基因组的有效载荷区包含至少一种增强转基因靶特异性和表达的元件(参见例如Powell等人,Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy,2015;其内容通过引用整体并入本文)。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、内源性miRNA、转录后调控元件(PRE)、聚腺苷酸化(PolyA)信号序列和上游增强子(USE)、CMV增强子和内含子。

[0342] 本领域技术人员可以认识到,本发明的多肽在靶细胞中的表达可能需要特异性启动子,包括但不限于物种特异性、诱导型、组织特异性或细胞周期特异性的启动子。(Parr等人,Nat.Med.3:1145-9(1997);其内容通过引用整体并入本文)。

[0343] 在一个实施方案中,当启动子驱动在AAV颗粒的病毒基因组的有效载荷区中编码的多肽的表达时,该启动子被认为是有效的。

[0344] 在一个实施方案中,启动子是被认为有效驱动调节性多核苷酸表达的启动子。

[0345] 在一个实施方案中,启动子是当其在待靶向的细胞中驱动表达时被认为有效的启动子。

[0346] 在一个实施方案中,启动子驱动有效载荷在靶组织中表达一段时间。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个星期、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2个星期、15天、16天、17天、18天、19天、20天、3个星期、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年或多于10年。表达可以持续1-5小时、1-12小时、1-2天、1-5天、1-2个星期、1-3个星期、1-4个星期、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。

[0347] 在一个实施方案中,启动子驱动有效负载的表达持续至少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

或多于65年。

[0348] 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,启动子可以是人启动子。在一些实施方案中,启动子可以被截短。

[0349] 在大多数组织中驱动或启动表达的启动子包括但不限于人延伸因子1 α 亚基(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 葡萄糖醛酸苷酸酶(GUSB)或泛素C(UBC)。组织特异性表达元件可用于将表达限制于某些细胞类型,例如但不限于肌肉特异性启动子、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、星形胶质细胞启动子或神经系统启动子,其可用于将表达限制于神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞。

[0350] 肌肉特异性启动子的非限制性实例包括哺乳动物肌肉肌酸激酶(MCK)启动子、哺乳动物结蛋白(DES)启动子、哺乳动物肌钙蛋白I(TNNI2)启动子和哺乳动物骨骼 α -肌动蛋白(ASKA)启动子(参见例如美国专利公开US 20110212529,其内容通过引用整体并入本文)。

[0351] 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化酶(NSE)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血小板衍生生长因子B链(PDGF- β)、突触蛋白(Syn)、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)、神经丝轻肽(neurofilament light,NFL)或神经丝重肽(neurofilament heavy,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蛋白2(EAAT2)启动子。星形胶质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原纤维酸性蛋白(GFAP)和EAAT2启动子。少突胶质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。

[0352] 在一个实施方案中,启动子可以小于1kb。启动子的长度可以是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或更多于800个核苷酸。启动子的长度可以是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。

[0353] 在一个实施方案中,启动子可以是相同或不同的起始或亲本启动子的两个或更多个组分的组合,例如但不限于CMV和CBA。每个组分的长度可以是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或更多于800。每个组分的长度可以是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。在一个实施方案中,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。

[0354] 在一个实施方案中,病毒基因组包含遍在启动子。遍在启动子的非限制性实例包括CMV、CBA(包括衍生物CAG、CBh等)、EF-1 α 、PGK、UBC、GUSB(hGBp)和UCOE(HNRPA2B1-CBX3的启动子)。

[0355] Yu等人(Molecular Pain 2011,7:63;其内容通过引用整体并入本文)使用慢病毒载体评估了eGFP在大鼠DRG细胞和原代DRG细胞中在CAG、EF1 α 、PGK和UBC启动子下的表达,发现UBC显示出比其他3种启动子更弱的表达,并且所有启动子仅观察到10-12%的神经胶质表达。Soderblom等人(E. Neuro 2015;其内容通过引用整体并入本文)评价了在运动皮质注射后,eGFP在具有CMV和UBC启动子的AAV8中和在具有CMV启动子的AAV2中的表达。鼻内施用含有UBC或EF1 α 启动子的质粒显示比用CMV启动子表达更强的持续气道表达(参见,例如,Gill等人, Gene Therapy 2001,第8卷,1539-1546;其内容为通过引用整体并入本文)。Husain等人(Gene Therapy 2009;其内容通过引用整体并入本文)评估了具有hGUSB启动子、HSV-1LAT启动子和NSE启动子的H β H构建体,并且发现H β H构建体在小鼠脑中显示出比NSE弱的表达。Passini和Wolfe(J. Virol. 2001,12382-12392,其内容通过引用整体并入本文)评估了在新生小鼠脑室内注射后H β H载体的长期作用,并发现其持续表达至少一年。Xu等人(Gene Therapy 2001,8,1323-1332;其内容通过引用整体并入本文)发现,与CMV-lacZ、CMV-luc、EF、GFAP、hENK、nAChR、PPE、PPE+wpre、NSE(0.3kb)、NSE(1.8kb)和NSE(1.8kb+wpre)相比,当使用NFL和NFH启动子时,在所有脑区域中表达低。Xu等人发现启动子活性按照降序是NSE(1.8kb)、EF、NSE(0.3kb)、GFAP、CMV、hENK、PPE、NFL和NFH。NFL是一个650个核苷酸的启动子,而NFH是一个920个核苷酸的启动子,它们在肝脏中都不存在,但是NFH在感觉本体感受神经元、大脑和脊髓中含量丰富,并且NFH存在于心脏中。Scn8a是一个470个核苷酸的启动子,可在整个DRG、脊髓和脑中表达,并在海马神经元和小脑浦肯野细胞、皮质、丘脑和下丘脑中表现出特别高的表达(参见例如Drews等人, Identification of evolutionary conserved, functional noncoding elements in the promoter region of the sodium channel gene SCN8A, Mamm Genome (2007) 18:723-731;和Raymond等人, Expression of Alternatively Spliced Sodium Channel α -subunit genes, Journal of Biological Chemistry (2004) 279(44) 46234-46241;其全部内容通过引用整体并入本文)。

[0356] 由前述Yu、Soderblom、Gill、Husain、Passini、Xu、Drews或Raymond教导的任何启动子都可以用于本发明。

[0357] 在一个实施方案中,启动子不是细胞特异性的。

[0358] 在一个实施方案中,该启动子是泛素c(UBC)启动子。UBC启动子可以具有300-350个核苷酸的大小。作为非限制性实例,UBC启动子是332个核苷酸。

[0359] 在一个实施方案中,启动子是 β -葡糖醛酸糖苷酶(GUSB)启动子。GUSB启动子的大小可以是350-400个核苷酸。作为非限制性实例,GUSB启动子是378个核苷酸。

[0360] 在一个实施方案中,启动子是神经丝轻肽(NFL)启动子。NFL启动子可以具有600-700个核苷酸的大小。作为非限制性实例,NFL启动子是650个核苷酸。作为非限制性实例,构建体可以是AAV-启动子-CMV/球蛋白内含子-调节性多核苷酸-RBG,其中AAV可以是自互补的,而AAV可以是DJ血清型。

[0361] 在一个实施方案中,启动子是神经丝重肽(FH)启动子。NFH启动子可以具有900-950个核苷酸的大小。作为非限制性实例,NFH启动子为920个核苷酸。作为非限制性实例,构

建体可以是AAV-启动子-CMV/球蛋白内含子-调节性多核苷酸-RBG,其中AAV可以是自互补的并且AAV可以是DJ血清型。

[0362] 在一个实施方案中,启动子是scn8a启动子。scn8a启动子的大小可以是450-500个核苷酸。作为非限制性实例,scn8a启动子为470个核苷酸。作为非限制性实例,构建体可以是AAV-启动子-CMV/球蛋白内含子调节性多核苷酸-RBG,其中AAV可以是自我互补的,而AAV可以是DJ血清型。

[0363] 在一个实施方案中,病毒基因组包含Po1 III启动子。

[0364] 在一个实施方案中,病毒基因组包含P1启动子。

[0365] 在一个实施方案中,病毒基因组包含FXN启动子。

[0366] 在一个实施方案中,启动子是磷酸甘油酸激酶1 (PGK) 启动子。

[0367] 在一个实施方案中,启动子是鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子。

[0368] 在一个实施方案中,启动子是CAG启动子,其是包含与鸡 β -肌动蛋白 (CBA) 启动子融合的巨细胞病毒 (CMV) 增强子的构建体。

[0369] 在一个实施方案中,启动子是巨细胞病毒 (CMV) 启动子。

[0370] 在一个实施方案中,病毒基因组包含Po1 III启动子,例如Po1 III 3型启动子。

[0371] 在一个实施方案中,病毒基因组包含U3、U6、U7、7SK、H1或MRP、EBER、硒代半胱氨酸 tRNA、7SL、腺病毒VA-1或端粒酶基因启动子。

[0372] 在一个实施方案中,病毒基因组包含H1启动子。

[0373] 在一个实施方案中,病毒基因组包含U6启动子。

[0374] 在一个实施方案中,启动子是肝脏或骨骼肌启动子。肝启动子的非限制性实例包括人 α -1-抗胰蛋白酶 (hAAT) 和甲状腺素结合球蛋白 (TBG)。骨骼肌启动子的非限制性实例包括结蛋白、MCK或合成C5-12。

[0375] 在一个实施方案中,启动子是RNA po1 III启动子。作为非限制性实例,RNA po1 III启动子是U6。作为非限制性实例,RNA po1 III启动子是H1。

[0376] 在一个实施方案中,启动子是RNA Po1 II启动子,包括例如截短的RNA Po1 II启动子。

[0377] 在一个实施方案中,病毒基因组包含两个启动子。作为非限制性实例,启动子是EF1 α 启动子和CMV启动子。

[0378] 在一个实施方案中,病毒基因组包含增强子元件、启动子和/或5' UTR内含子。增强子元件,在本文中也称为“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、SV40 5' UTR内含子;(2) CMV增强子、CBA启动子、SV 40 5' 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发起人;(7) 突触蛋白启动子;(8) MeCP2启动子、(9) GFAP启动子、(10) H1启动子;和(11) U6启动子。

[0379] 在一个实施方案中,病毒基因组包含工程化启动子。

[0380] 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的启动子。

[0381] 病毒基因组组分:非翻译区 (UTR)

[0382] 根据定义,基因的野生型未翻译区(UTR)被转录但未翻译。通常,5' UTR在转录起始位点开始并在起始密码子处终止,3' UTR在终止密码子后立即开始,并一直持续到转录终止信号为止。

[0383] 通常在特定靶器官的大量表达基因中发现的特征可以被工程化为UTR,以增强稳定性和蛋白产生。作为非限制性实例,来自正常在肝脏中表达的mRNA(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 甲胎蛋白、促红细胞生成素或因子VIII)的5' UTR可以用在本发明的AAV颗粒的病毒基因组中,以增强在肝细胞系或肝脏中的表达。

[0384] 不希望受到理论的束缚,野生型5' 非翻译区(UTR)包括在翻译起始中起作用的特征。通常已知参与核糖体启动许多基因翻译的过程的Kozak序列通常包含在5' UTR中。Kozak序列具有共有CCR(A/G)CCAUGG,其中R是起始密码子(ATG)上游3个碱基的嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤),其后是另一个'G'。

[0385] 在一个实施方案中,病毒基因组中的5' UTR包括Kozak序列。

[0386] 在一个实施方案中,病毒基因组中的5' UTR不包括Kozak序列。

[0387] 不希望受到理论的束缚,已知野生型3' UTR具有嵌入其中的一段腺苷和尿苷。这些富含AU的特征在高周转率的基因中特别普遍。基于它们的序列特征和功能特性,富含AU的元件(ARE)可以分为三类(Chen等人,1995,其内容通过引用整体并入本文):I类ARE,例如但不限于c-Myc和MyoD,在富含U的区域内包含数个AUUUA基序的分散拷贝。II类ARE,例如但不限于GM-CSF和TNF- α ,具有两个或多个重叠的UUAUUUA(U/A)(U/A)九聚体。III类ARE的定义不太明确,例如但不限于c-Jun和生肌蛋白(myogenin)。这些富含U的区域不包含AUUUA基序。已知大多数与ARE结合的蛋白都会使信使不稳定,而ELAV家族的成员(最值得注意的是HuR)已被证明可以增加mRNA的稳定性。HuR绑定到所有三类的ARE。将HuR特异性结合位点工程化到核酸分子的3' UTR中将导致HuR结合,并且从而使体内信息稳定。

[0388] 可以使用3' UTR富含AU的元件(ARE)的引入、去除或修饰来调节多核苷酸的稳定性。当工程化特定多核苷酸,例如病毒基因组的有效载荷区时,可以引入一个或多个ARE拷贝,以使多核苷酸的稳定性降低,从而减少翻译并降低所得蛋白的生产。同样,可以识别并去除或突变ARE,以增加细胞内稳定性,并且从而增加所得蛋白的翻译和生产。

[0389] 在一个实施方案中,病毒基因组的3' UTR可以包括寡聚(dT)序列,用于模板化添加poly-A尾。

[0390] 在一个实施方案中,病毒基因组可以包括至少一个miRNA种子、结合位点或完整序列。microRNA(或miRNA或miR)是19-25个核苷酸的非编码RNA,可与核酸靶位点结合并通过降低核酸分子的稳定性或抑制翻译来下调基因表达。microRNA序列包含“种子”区域,即成熟microRNA的2-8位区域中的序列,该序列与核酸的miRNA靶序列具有完美的Watson-Crick互补性。

[0391] 在一个实施方案中,可以对病毒基因工程化以包含、改变或去除至少一个miRNA结合位点、序列或种子区域。

[0392] 可将来自本领域已知的任何基因的任何UTR引入AAV颗粒的病毒基因组中。这些UTR或其部分可以以与在选择它们的基因中相同的方向放置,或者可以改变方向或位置。在一个实施方案中,可以将AAV颗粒的病毒基因组中使用的UTR反转、缩短、延长、用本领域已知的一种或多种其他5' UTR或3' UTR制成。如本文所使用的,术语“改变”在涉及UTR时,表示

相对于参考序列已经以某种方式改变了UTR。例如,可以通过如上所述的方向或位置的改变来相对于野生型或天然UTR改变3' 或5' UTR,或者可以通过包含额外的核苷酸、核苷酸的缺失、核苷酸的交换或转座来改变3' 或5' UTR。

[0393] 在一个实施方案中,AAV颗粒的病毒基因组包含至少一种人工UTR,其不是野生型UTR的变体。

[0394] 在一个实施方案中,AAV颗粒的病毒基因组包含UTR,该UTR选自其蛋白具有共同功能、结构、特征或特性的转录物家族。

[0395] 病毒基因组组分:聚腺苷酸化序列

[0396] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒的病毒基因组包含至少一个聚腺苷酸化序列。AAV颗粒的病毒基因组可以在有效载荷编码序列的3' 端与3' ITR的5' 端之间包含聚腺苷酸化序列。

[0397] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列或“polyA序列”的长度范围可以从不存在到约500个核苷酸。聚腺苷酸化序列的长度可以是但不限于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、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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499和500个核苷酸。

[0398] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是50-100个核苷酸。

- [0399] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是50-150个核苷酸。
- [0400] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是50-160个核苷酸。
- [0401] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是50-200个核苷酸。
- [0402] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是60-100个核苷酸。
- [0403] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是60-150个核苷酸。
- [0404] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是60-160个核苷酸。
- [0405] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是60-200个核苷酸。
- [0406] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是70-100个核苷酸。
- [0407] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是70-150个核苷酸。
- [0408] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是70-160个核苷酸。
- [0409] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是70-200个核苷酸。
- [0410] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是80-100个核苷酸。
- [0411] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是80-150个核苷酸。
- [0412] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是80-160个核苷酸。
- [0413] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是80-200个核苷酸。
- [0414] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是90-100个核苷酸。
- [0415] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是90-150个核苷酸。
- [0416] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是90-160个核苷酸。
- [0417] 在一个实施方案中,聚腺苷酸化序列的长度是90-200个核苷酸。
- [0418] 在一个实施方案中,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,其在表达载体中可位于聚腺苷酸化序列的上游。此外,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,其在表达载体中可位于启动子(例如但不限于CMV、U6、CAG、CBA或具有SV40内含子或人 β 球蛋白内含子的CBA启动子)的下游。作为非限制性实例,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,其在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的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或多于30个核苷酸内。作为另一个非限制性实例,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,其在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的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。作为非限制性实例,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,其在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或多于25%的核苷酸内。作为另一个非限制性实例,AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,其在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的前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%的核苷酸内。
- [0419] 在一个实施方案中,AAV颗粒包含兔球蛋白聚腺苷酸化(poly A)信号序列。
- [0420] 在一个实施方案中,AAV颗粒包含人生长激素聚腺苷酸化(poly A)信号序列。
- [0421] 病毒基因组组分:内含子
- [0422] 在一个实施方案中,有效载荷区包括至少一个增强表达的元件,例如一个或多个内含子或其部分。内含子的非限制性实例包括MVM(67-97bp)、F.IX截短内含子1(300bp)、 β -

球蛋白SD/免疫球蛋白重链剪接受体(250bp)、腺病毒剪接供体/免疫球蛋白剪接受体(500bp)、SV40晚期剪接供体/剪接受体(19S/16S)(180bp)和杂种腺病毒剪接供体/IgG剪接受体(230bp)。

[0423] 在一个实施方案中,内含子或内含子部分的长度可以是100-500个核苷酸。内含子的长度可以是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。内含子的长度可以是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。

[0424] 在一个实施方案中,AAV病毒基因组可包含启动子,例如但不限于CMV或U6。作为非限制性实例,包含本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV的启动子是CMV启动子。作为另一个非限制性实例,包含本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV的启动子是U6启动子。

[0425] 在一个实施方案中,AAV病毒基因组可包含CMV启动子。

[0426] 在一个实施方案中,AAV病毒基因组可以包含U6启动子。

[0427] 在一个实施方案中,AAV病毒基因组可包含CMV和U6启动子。

[0428] 在一个实施方案中,AAV病毒基因组可以包含Pol III启动子。

[0429] 在一个实施方案中,AAV病毒基因组可以包含Pol III 3型启动子。

[0430] 在一个实施方案中,AAV病毒基因组可包含H1启动子。

[0431] 在一个实施方案中,AAV病毒基因组可以包含U6启动子。

[0432] 在一个实施方案中,AAV病毒基因组可包含CBA启动子。

[0433] 在一个实施方案中,编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子的下游,该启动子例如但不限于CMV、U6、H1、CBA、CAG或具有内含子(例如SV40或本领域已知的其他内含子)的CBA启动子。此外,编码的siRNA分子在表达载体中还可位于聚腺苷酸化序列的上游。作为非限制性实例,编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的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或多于30个氨基酸内。作为非限制性实例,编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的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。作为非限制性实例,编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或多于25%的核苷酸内。作为非限制性实例,编码的siRNA分子在表达载体中可位于启动子下游和/或聚腺苷酸化序列上游的前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%的核苷酸内。

[0434] 病毒基因组组分:填充序列

[0435] 在一个实施方案中,病毒基因组包含一个或多个填充序列。

[0436] 在一个实施方案中,病毒基因组包含一个或多个填充序列,以使病毒基因组的长度为用于包装的最佳大小。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,以使病毒基因组的长度约为2.3kb。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,以使病毒基因组的长度约为4.6kb。

[0437] 在一个实施方案中,病毒基因组包含一个或多个填充序列,以减少在表达/或包装过程中载体基因组的发夹结构(例如本文所述的调节性多核苷酸)可以被读作反向末端重复序列(ITR)的可能性。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,以使病毒基因组的长度为约2.3kb。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列以使病毒基因组的长度为约4.6kb。

[0438] 在一个实施方案中,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序列,其长度为约0.1kb-3.8kb,例如但不限于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。作为非限制性实例,载体基因组中的全长填充序列为3.1kb。作为非限制性实例,载体基因组中的全长填充序列为2.7kb。作为非限制性实例,载体基因组中的全长填充序列为0.8kb。作为非限制性实例,载体基因组中的全长填充序列为0.4kb。作为非限制性实例,载体基因组中每个填充序列的长度为0.8kb。作为非限制性实例,载体基因组中每个填充序列的长度为0.4kb。

[0439] 在一个实施方案中,病毒基因组是自我互补(sc)病毒基因组,并包含一个或多个填充序列,其长度为约0.1kb-1.5kb,例如但不限于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。作为非限制性实例,载体基因组中的全长填充序列为0.8kb。作为非限制性实例,载体基因组中的全长填充序列为0.4kb。作为非限制性实例,载体基因组中每个填充序列的长度为0.8kb。作为非限制性实例,载体基因组中每个填充序列的长度为0.4kb。

[0440] 在一个实施方案中,病毒基因组包含填充序列的任何部分。病毒基因组可包含填充序列的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%。

[0441] 在一个实施方案中,病毒基因组是单链(ss)病毒基因组,并包含一个或多个填充序列,以使病毒基因组的长度为约4.6kb。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,且该填充序列位于5' ITR序列的3'端。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,并且该填充序列位于启动子序列的5'端。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,并且该填充序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'端。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,并且该填充序列位于3' ITR序列的5'端。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,并且该填充序列位于两个内含子序列之间。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,并且该填充序列位于内含子序列内。作为非限制性实例,病毒基因组包含两个填充序列,并且第一填充序列位于5' ITR序列的3'端,第二填充序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'端。作为非限制性实例,病毒基因组包含两个填充序列,并且第一填充序列位于启动子序列的5'端,第二填充序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'端。作为非限制性实例,病毒基因组包含两个填充序列,并且第一填充序列位于5' ITR序列的3'端,第二填充序列位于5' ITR序列的5'端。

[0442] 在一个实施方案中,病毒基因组是一种自我互补(sc)病毒基因组,并包含一个或多个填充序列,以使病毒基因组的长度为约2.3kb。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,且该填充序列位于5' ITR序列的3'端。作为非限制性实例,病毒基因组包

含至少一个填充序列,并且该填充序列位于启动子序列的5'端。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,并且该填充序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'端。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,并且该填充序列位于3' ITR序列的5'端。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,并且该填充序列位于两个内含子序列之间。作为非限制性实例,病毒基因组包含至少一个填充序列,并且该填充序列位于内含子序列内。作为非限制性实例,病毒基因组包含两个填充序列,并且第一填充序列位于5' ITR序列的3'端,第二填充序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'端。作为非限制性实例,病毒基因组包含两个填充序列,并且第一填充序列位于启动子序列的5'端,第二填充序列位于聚腺苷酸化信号序列的3'。作为非限制性实例,病毒基因组包含两个填充序列,并且第一填充序列位于5' ITR序列的3'端,第二填充序列位于5' ITR序列的5'端。

[0443] 在一个实施方案中,病毒基因组可在病毒基因组的多个区域之一之间包含一个或多个填充序列。在一个实施方案中,填充区域可以位于诸如但不限于有效载荷区、反向末端重复序列(ITR)、启动子区、内含子区、增强子区、聚腺苷酸化信号序列区、多克隆位点(MCS)区和/或外显子区的区域之前。在一个实施方案中,填充区域可以位于诸如但不限于有效载荷区、反向末端重复序列(ITR)、启动子区、内含子区、增强子区、聚腺苷酸化信号序列区、多克隆位点(MCS)区和/或外显子区的区域之后。在一个实施方案中,填充区域可以位于诸如但不限于有效载荷区、反向末端重复序列(ITR)、启动子区、内含子区、增强子区、聚腺苷酸化信号序列区、多克隆位点(MCS)区和/或外显子区之前和之后。

[0444] 在一个实施方案中,病毒基因组可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序列。病毒基因组的分叉区域可包含该区域到填充序列区的5'端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%。作为非限制性实例,填充序列可将至少一个区域分叉,以使该区域的10%位于填充序列的5'端,该区域的90%位于填充序列的3'端。作为非限制性实例,填充序列可将至少一个区域分叉,以使该区域的20%位于填充序列的5'端,该区域的80%位于填充序列的3'端。作为非限制性实例,填充序列可将至少一个区域分叉,以使该区域的30%位于填充序列的5'端,该区域的70%位于填充序列的3'端。作为非限制性实例,填充序列可将至少一个区域分叉,以使该区域的40%位于填充序列的5'端,该区域的60%位于填充序列的3'端。作为非限制性实例,填充序列可将至少一个区域分叉,以使该区域的50%位于填充序列的5'端,该区域的50%位于填充序列的3'端。作为非限制性实例,填充序列可将至少一个区域分叉,以使该区域的60%位于填充序列的5'端,该区域的40%位于填充序列的3'端。作为非限制性实例,填充序列可将至少一个区域分叉,以使该区域的70%位于填充序列的5'端,该区域的30%位于填充序列的3'端。作为非限制性实例,填充序列可将至少一个区域分叉,以使该区域的80%位于填充序列的5'端,该区域的20%位于填充序列的3'端。作为非限制性实例,填充序列可将至少一个区域分叉,以使该区域的90%位于填充序列的5'端,该区域的10%位于填充序列的3'端。

[0445] 在一个实施方案中,病毒基因组在5' ITR之后包含填充序列。

[0446] 在一个实施方案中,病毒基因组在启动子区之后包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在有效载荷区之后包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在内含子区之后包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在增强子区之后包含填充序列。在一

个实施方案中,病毒基因组在聚腺苷酸化信号序列区之后包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在MCS区之后包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在外显子区域之后包含填充序列。

[0447] 在一个实施方案中,病毒基因组在启动子区之前包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在有效载荷区之前包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在内含子区之前包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在增强子区之前包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在聚腺苷酸化信号序列区之前包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在MCS区之前包含填充序列。在一个实施方案中,病毒基因组在外显子区域之前包含填充序列。

[0448] 在一个实施方案中,病毒基因组在3' ITR之前包含填充序列。

[0449] 在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于5' ITR和启动子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于5' ITR和有效载荷区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于5' ITR和内含子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于5' ITR和增强子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于5' ITR和聚腺苷酸化信号序列区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于5' ITR和MCS区。

[0450] 在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于5' ITR和外显子区。

[0451] 在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于启动子区和有效载荷区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于启动子区和内含子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于启动子区和增强子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于启动子区和聚腺苷酸化信号序列区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于启动子区和MCS区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于启动子区和外显子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于启动子区和3' ITR。

[0452] 在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于有效载荷区和内含子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于有效载荷区和增强子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于有效载荷区和聚腺苷酸化信号序列区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于有效载荷区和MCS区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于有效载荷区和外显子区。

[0453] 在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于有效载荷区和3' ITR。

[0454] 在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于内含子区和增强子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于内含子区和聚腺苷酸化信号序列区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于内含子区和MCS区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于

内含子区和外显子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于内含子区和3' ITR。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于增强子区和聚腺苷酸化信号序列区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于增强子区和MCS区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于增强子区和外显子区域。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于增强子区和3' ITR。

[0455] 在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于聚腺苷酸化信号序列区和MCS区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于聚腺苷酸化信号序列区和外显子区域。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于聚腺苷酸化信号序列区和3' ITR。

[0456] 在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于MCS区和外显子区。在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于MCS区和3' ITR。

[0457] 在一个实施方案中,填充序列可以位于两个区域之间,例如但不限于外显子区和3' ITR。

[0458] 在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于启动子区和有效载荷区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于启动子区和内含子区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于启动子区和增强子区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于启动子区和聚腺苷酸化信号序列区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于启动子区和MCS区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于启动子区和外显子区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于启动子区和3' ITR之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于有效载荷区和内含子区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于有效载荷区和增强子区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于有效载荷区和MCS区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于有效载荷区和外显子区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于有效载荷区和3' ITR之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于5' ITR和启动子区之间,第二填充序列可以位于内含子区和增强子区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序

聚腺苷酸化信号序列区和MCS区之间,第二填充序列可以位于MCS区和外显子区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于聚腺苷酸化信号序列区和MCS区之间,第二填充序列可以位于MCS区和3' ITR之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于聚腺苷酸化信号序列区和MCS区之间,第二填充序列可以位于外显子区和3' ITR之间。

[0488] 在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于聚腺苷酸化信号序列区和外显子区之间,第二填充序列可以位于MCS区和外显子区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于聚腺苷酸化信号序列区和外显子区之间,第二填充序列可以位于MCS区和3' ITR之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于聚腺苷酸化信号序列区和外显子区之间,第二填充序列可以位于外显子区和3' ITR之间。

[0489] 在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于聚腺苷酸化信号序列区和3' ITR之间,第二填充序列可以位于MCS区和外显子区之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于聚腺苷酸化信号序列区和3' ITR之间,第二填充序列可以位于MCS区和3' ITR之间。在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于聚腺苷酸化信号序列区和3' ITR之间,第二填充序列可以位于外显子区和3' ITR之间。

[0490] 在一个实施方案中,病毒基因组可以包含两个填充序列,第一填充序列可以位于MCS区和外显子区之间,第二填充序列可以位于外显子区和3' ITR之间。

[0491] 本发明的有效载荷

[0492] 本公开的AAV颗粒包括至少一个有效载荷区。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其中的一个或多个多核苷酸或多核苷酸区,这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(multi-polypeptide)的多核苷酸,或调节性核酸(modulatory nucleic acid)或调控核酸(regulatory nucleic acid)。本发明的有效载荷通常编码调节性多核苷酸或其片段或变体。

[0493] 有效载荷区可以构建成反映与mRNA的天然组织相似或镜像的区域。

[0494] 有效载荷区可以包含编码和非编码核酸序列的组合。

[0495] 在一些实施方案中,AAV有效载荷区可以编码编码RNA或非编码RNA。

[0496] 在一个实施方案中,AAV颗粒包含具有有效载荷区的病毒基因组,该有效载荷区包含编码siRNA、miRNA或其他RNAi物质的核酸序列。在这样的实施方案中,可以复制编码多于一个多肽的病毒基因组,并将其包装到病毒颗粒中。用病毒颗粒转导的靶细胞可以在单个细胞内表达编码的siRNA、miRNA或其他RNAi物质。

[0497] 调节性多核苷酸

[0498] 在一个实施方案中,可将调节性多核苷酸(如RNA或DNA分子)用于治疗至少一种神经退行性疾病。如本文所用,“调节性多核苷酸”是起到调节(增加或降低)靶基因的水平或量(例如mRNA或蛋白水平)的作用的任何核酸序列。

[0499] 在一个实施方案中,调节性多核苷酸可包含至少一种编码至少一种siRNA分子的核酸序列。如果有多于一个,则核酸可以独立地编码1、2、3、4、5、6、7、8、9或多于9个的siRNA分子。

[0500] 在一个实施方案中,分子支架可以位于CMV启动子、其片段或变体的下游。

[0501] 在一个实施方案中,分子支架可以位于CBA启动子、其片段或变体的下游。

[0502] 在一个实施方案中,分子支架可以是位于CMV启动子下游的天然pri-miRNA支架。作为非限制性实例,天然pri-miRNA支架来自人miR155支架。

[0503] 在一个实施方案中,分子支架可以是位于CBA启动子下游的天然pri-miRNA支架。

[0504] 在一个实施方案中,分子支架和调节性多核苷酸的选择是通过比较pri-miRNA中调节性多核苷酸的方法来确定的(例如,参见Miniarikova等人,Design, Characterization, and Lead Selection of Therapeutic miRNAs Targeting Huntingtin for Development of Gene Therapy for Huntington's Disease. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* (2016) 5, e297和国际公开号W02016102664描述的方法;其各自内容通过引用整体并入本文)。为了评估调节性多核苷酸的活性,可以使用的分子支架是人pri-miRNA支架(例如,miR155支架),并且启动子可以是CMV。可以使用HEK293T细胞和报道分子(例如,荧光素酶)在体外确定活性。

[0505] 为了评估调节性多核苷酸的最佳分子支架,将调节性多核苷酸用于具有CAG启动子的pri-miRNA支架中。将构建体与报道分子(例如,荧光素酶报道分子)以50ng共转染。在50ng共转染时具有大于80%敲低的构建体被认为是有效的。一方面,优选具有强引导链活性的构建体。分子支架可以通过NGS在HEK293T细胞中进行处理,以确定引导-过客链比以及处理的变异性。

[0506] 在一个实施方案中,待治疗的疾病是HD,并且调节性多核苷酸可以是但不限于靶向外显子1、CAG重复、外显子50中的SNP rs362331和/或外显子67中的SNP rs362307。对于外显子1靶向,如果敲低为80%或更高,则确定调节性多核苷酸在HTT敲低时是有效的。对于CAG靶向,如果敲低至少60%,则确定调节性多核苷酸在HTT敲低时是有效的。对于SNP靶向,如果敲低至少60%,则确定调节性多核苷酸在HTT敲低时是有效的。对于针对CAG重复或SNP靶向的等位基因选择性,调节性多核苷酸可包含至少1个取代,以提高等位基因选择性。作为非限制性实例,取代可以是G或C被T或相应的U和A取代,以及T/U被C取代。

[0507] 为了在体内评估分子支架和调节性多核苷酸,将包含调节性多核苷酸的分子支架包装在AAV中(例如,血清型可以是AAV5(参见例如W02015060722中描述的方法和构建体,其内容通过引用整体并入本文))并施用于体内模型(例如,对于HD,可以使用Hu128/21HD小鼠),引导-过客链比、5'和3'端加工、引导和过客链反转和敲低可以在模型的不同区域确定。

[0508] 在一个实施方案中,分子支架和调节性多核苷酸的选择通过比较天然pri-miRNA和合成pri-miRNA中的调节性多核苷酸的方法来确定。调节性多核苷酸可以是但不限于靶向除外显子1以外的外显子。为了评估调节性多核苷酸的活性,分子支架与CBA启动子一起使用。一方面,可以使用HEK293T细胞、HeLa细胞和报道分子(例如,荧光素酶)在体外测定活性,并且敲低有效调节性多核苷酸显示在所测试的细胞中敲低了至少80%的目标基因。另外,被认为是最有效的调节性多核苷酸显示出低至无显著的过客链(p链)活性。在另一方面,通过使用HEK293T细胞、HeLa细胞和报道基因在体外转染来评估目标内源性基因的敲低效率。有效的调节性多核苷酸显示出超过50%的目标内源性基因敲低。在另一方面,通过感染(例如AAV2)在不同细胞类型(例如,HEK293、HeLa、原代星形胶质细胞、U251星形胶质细

胞、SH-SY5Y神经元细胞和来自患有待治疗疾病的受试者的成纤维细胞)中评估目标内源性基因敲低的功效。有效的调节性多核苷酸显示出超过60%的目标内源性基因敲低。

[0509] 为了在体内评估分子支架和调节性多核苷酸,将包含调节性多核苷酸的分子支架包装在AAV中并施用于体内模型(例如,对于治疗HD,可以使用YAC128 HD小鼠模型),并且引导-过客链比、5'和3'端加工、引导与过客链的比和敲低可以在模型的不同区域(例如组织区域)中确定。分子支架可以通过NGS从体内样品中处理出来,以确定引导-过客链比以及处理的变异性。

[0510] 在一个实施方案中,使用以下特性中的至少一种来设计调节性多核苷酸:环变体、种子错配/凸起/摆动变体、茎错配、环变体和附生茎错配变体(vassal stem mismatch variant)、种子错配和基茎错配变体(basal stem mismatch variant)、茎错配和基茎错配变体、种子摆动和基茎摆动变体或茎序列变体。

[0511] siRNA分子

[0512] 本发明涉及用于治疗神经变性疾病的RNA干扰(RNAi)诱导的基因表达抑制。本文提供了靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA(本文统称为“siRNA分子”)。此类siRNA双链体或编码的dsRNA可减少或沉默细胞(例如但不限于中型多棘神经元、皮质神经元和/或星形胶质细胞)中的基因表达。

[0513] RNAi(也称为转录后基因沉默(PTGS)、压抑或共抑制)是转录后基因沉默的过程,其中RNA分子以序列特异性方式抑制基因表达,通常是通过导致破坏特异性的mRNA分子。RNAi的活性组分是短/小双链RNA(dsRNA),称为小干扰RNA(siRNA),其通常包含15-30个核苷酸(例如19至25、19至24或19-21个核苷酸)和2个核苷酸的3'突出端,且其与靶基因的核酸序列匹配。这些短RNA物质可能是由Dicer介导的较大dsRNA的裂解在体内自然产生的,并且它们在哺乳动物细胞中具有功能。

[0514] 天然表达的小RNA分子,称为microRNA(miRNA),通过调节mRNA的表达引起基因沉默。包含RNA诱导沉默复合物(RISC)的miRNA靶向与在miRNA的5'区(称为种子区)和其他具有3'区的碱基对呈完美序列互补性的mRNA。miRNA介导的基因表达下调可能是由靶标mRNA的切割、靶标mRNA的翻译抑制或mRNA降解引起的。miRNA靶向序列通常位于靶mRNA的3'-UTR中。单个miRNA可以靶向来自多种基因的超过100个转录物,而一个mRNA可以被不同的miRNA靶向。

[0515] 可以设计和合成靶向特定mRNA的siRNA双链体或dsRNA,并在体外合成并引入细胞中以激活RNAi过程。Elbashir等人证明了21个核苷酸的siRNA双链体(称为小干扰RNA)能够在不诱导哺乳动物细胞的免疫应答的情况下有效地强烈且特异性地敲低基因(Elbashir SM等人,Nature,2001,411,494-498)。自从这份初步报告以来,通过siRNA进行转录后基因沉默迅速成为哺乳动物细胞遗传分析的有力工具,并具有产生新疗法的潜力。

[0516] 设计为靶向于编码引起多谷氨酰胺扩增疾病(例如亨廷顿病)的聚谷氨酰胺重复蛋白的核酸序列的RNAi分子描述于美国专利号9,169,483和9,181,544和国际专利公开号W02015179525,其全部内容通过引用整体并入本文。美国专利号9,169,483和9,181,544和国际专利公开号W02015179525各自提供了分离的RNA双链体,其包含RNA的第一链(例如15个连续核苷酸)和RNA的第二链(例如与第一链的至少12个连续核苷酸互补),其中RNA双链体的长度约为15至30个碱基对。RNA的第一链和RNA的第二链可以通过RNA环(4至50个核

苷酸)有效地连接以形成发夹结构,该发夹结构可以插入表达盒中。环部分的非限制性实例包括美国专利号9,169,483的SEQ ID NO:9-14,其内容通过引用整体并入本文。可使用完整序列或序列部分以形成RNA双链体的RNA链的非限制性实例包括美国专利号9,169,483的SEQ ID NO:1-8和美国专利号9,181,544的SEQ ID NO:1-11、33-59、208-210、213-215和218-221,其各自内容通过引用整体并入本文。RNAi分子的非限制性实例包括美国专利号9,169,483的SEQ ID NO:1-8、美国专利号9,181,544的SEQ ID NO:1-11、33-59、208-210、213-215和218-221和国际专利公开号W02015179525的SEQ ID NO:1、6、7和35-38,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0517] 可以将体外合成的siRNA分子引入细胞中以激活RNAi。与内源性dsRNA相似,当将外源性siRNA双链体引入细胞时,其可以组装形成RNA诱导沉默复合物(RISC),这是一种与RNA序列相互作用的多单位复合物,其与siRNA双链体的两条链之一互补(即反义链)。在此过程中,siRNA的有义链(或过客链)从复合物中丢失,而siRNA的反义链(或引导链)与其互补RNA匹配。尤其是,包含RISC复合物的siRNA的靶标是呈现完美序列互补性的mRNA。然后,通过切割、释放和降解靶标,发生siRNA介导的基因沉默。

[0518] siRNA双链体由与靶mRNA同源的有义链和与靶mRNA互补的反义链组成,其与单链(ss)-siRNA(例如反义链RNA或反义寡核苷酸)的使用相比,在破坏靶RNA的效率方面,siRNA双链体具有更多优势。在许多情况下,需要更高浓度的ss-siRNA才能实现对应双链体的有效基因沉默效力。

[0519] 任何前述分子可以由病毒基因组编码。

[0520] 靶向目标基因的siRNA双链体的设计和序列

[0521] 本发明提供了靶向mRNA以干扰基因表达和/或蛋白产生的小干扰RNA(siRNA)双链体(和编码它们的调节性多核苷酸)。

[0522] 本发明的编码的siRNA双链体含有杂交在一起形成双链体结构的反义链和有义链,其中反义链与靶基因的核酸序列互补,并且其中有义链与靶基因的核酸序列同源。在一些方面,反义链的5'端具有5'磷酸基团,而有义链的3'端包含3'羟基。在其他方面,在每条链的3'端没有、有一个或有两个核苷酸突出端。

[0523] 在本领域中已经提出了一些设计siRNA的指南。这些指南通常建议生成19个核苷酸的双链体区、对称的2-3个核苷酸的3'突出端、5'-磷酸基团和3'-羟基,靶向待沉默的基因中的区域。其他可能影响siRNA序列偏好的规则包括但不限于:(i)反义链5'端的A/U;(ii)有义链5'端的G/C;(iii)在反义链的5'端三分之一的至少五个A/U残基;和(iv)不存在长度超过9个核苷酸的任何GC片段。根据这样的考虑以及靶基因的特定序列,可以容易地设计阻遏哺乳动物靶基因表达所必需的高效siRNA分子。

[0524] 根据本发明,设计了靶向目标基因的siRNA分子(例如,siRNA双链体或编码的dsRNA)。这样的siRNA分子可以特异性地阻遏基因表达和蛋白产生。在某些方面,siRNA分子被设计并用于选择性“敲除”细胞中的基因变体,即突变的转录物。在一些方面,siRNA分子被设计并用于选择性“敲低”细胞中的基因变体。在其他方面,siRNA分子能够抑制或阻遏目标基因的野生型和突变型。

[0525] 在一个实施方案中,本发明的siRNA分子包含有义链和互补反义链,其中两条链杂交在一起形成双链体结构。反义链与靶mRNA序列具有足够的互补性以引导靶特异性RNAi,

即siRNA分子具有足以触发通过RNAi机制或过程破坏靶mRNA的序列。

[0526] 在一个实施方案中,本发明的siRNA分子包含有义链和互补反义链,其中两条链杂交在一起形成双链体结构,并且其中与mRNA杂交的起始位点在mRNA序列的核苷酸10至7000之间。作为非限制性实例,起始位点可以在靶mRNA序列上的核苷酸10-20、20-30、30-40、40-50、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、800-850、850-900、900-950、950-1000、1000-1050、1050-1100、1100-1150、1150-1200、1200-1250、1250-1300、1300-1350、1350-1400、1400-1450、1450-1500、1500-1550、1550-1600、1600-1650、1650-1700、1700-1750、1750-1800、1800-1850、1850-1900、1900-1950、1950-2000、2000-2050、2050-2100、2100-2150、2150-2200、2200-2250、2250-2300、2300-2350、2350-2400、2400-2450、2450-2500、2500-2550、2550-2600、2600-2650、2650-2700、2700-2750、2750-2800、2800-2850、2850-2900、2900-2950、2950-3000、3000-3050、3050-3100、3100-3150、3150-3200、3200-3250、3250-3300、3300-3350、3350-3400、3400-3450、3450-3500、3500-3550、3550-3600、3600-3650、3650-3700、3700-3750、3750-3800、3800-3850、3850-3900、3900-3950、3950-4000、4000-4050、4050-4100、4100-4150、4150-4200、4200-4250、4250-4300、4300-4350、4350-4400、4400-4450、4450-4500、4500-4550、4550-4600、4600-4650、4650-4700、4700-4750、4750-4800、4800-4850、4850-4900、4900-4950、4950-5000、5000-5050、5050-5100、5100-5150、5150-5200、5200-5250、5250-5300、5300-5350、5350-5400、5400-5450、5450-5500、5500-5550、5550-5600、5600-5650、5650-5700、5700-5750、5750-5800、5800-5850、5850-5900、5900-5950、5950-6000、6000-6050、6050-6100、6100-6150、6150-6200、6200-6250、6250-6300、6300-6350、6350-6400、6400-6450、6450-6500、6500-6550、6550-6600、6600-6650、6650-6700、6700-6750、6750-6800、6800-6850、6850-6900、6900-6950、6950-7000、7000-7050、7050-7100、7100-7150、7150-7200、7200-7250、7250-7300、7300-7350、7350-7400、7400-7450、7450-7500、7500-7550、7550-7600、7600-7650、7650-7700、7700-7750、7750-7800、7800-7850、7850-7900、7900-7950、7950-8000、8000-8050、8050-8100、8100-8150、8150-8200、8200-8250、8250-8300、8300-8350、8350-8400、8400-8450、8450-8500、8500-8550、8550-8600、8600-8650、8650-8700、8700-8750、8750-8800、8800-8850、8850-8900、8900-8950、8950-9000、9000-9050、9050-9100、9100-9150、9150-9200、9200-9250、9250-9300、9300-9350、9350-9400、9400-9450、9450-9500、9500-9550、9550-9600、9600-9650、9650-9700、9700-9750、9750-9800、9800-9850、9850-9900、9900-9950、9950-10000、10000-10050、10050-10100、10100-10150、10150-10200、10200-10250、10250-10300、10300-10350、10350-10400、10400-10450、10450-10500、10500-10550、10550-10600、10600-10650、10650-10700、10700-10750、10750-10800、10800-10850、10850-10900、10900-10950、10950-11000、11050-11100、11100-11150、11150-11200、11200-11250、11250-11300、11300-11350、11350-11400、11400-11450、11450-11500、11500-11550、11550-11600、11600-11650、11650-11700、11700-11750、11750-11800、11800-11850、11850-11900、11900-11950、11950-12000、12000-12050、12050-12100、12100-12150、12150-12200、12200-12250、12250-12300、12300-12350、12350-12400、12400-12450、12450-12500、12500-12550、12550-12600、12600-12650、12650-

12700、12700-12750、12750-12800、12800-12850、12850-12900、12900-12950、12950-13000、13050-13100、13100-13150、13150-13200、13200-13250、13250-13300、13300-13350、13350-13400、13400-13450和13450-13500之间。作为又一非限制性实例,起始位点可以是靶mRNA序列上的核苷酸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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、662、663、664、665、666、667、668、669、670、671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、

710、711、712、713、714、715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、733、734、735、736、737、738、739、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、779、780、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、793、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、901、902、903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、925、926、927、928、929、930、931、932、933、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999、1000、1375、1376、1377、1378、1379、1380、1381、1382、1383、1384、1385、1386、1387、1388、1389、1390、1391、1392、1393、1394、1395、1396、1397、1398、1399、1400、1401、1402、1403、1404、1405、1406、1407、1408、1409、1410、1411、1412、1413、1414、1415、1416、1417、1418、1419、1420、1421、1422、1423、1424、1425、1426、1427、1428、1429、1430、1431、1432、1433、1434、1435、1436、1437、1438、1439、1440、1441、1442、1443、1444、1445、1446、1447、1448、1449、1450、1660、1661、1662、1663、1664、1665、1666、1667、1668、1669、1670、1671、1672、1673、1674、1675、2050、2051、2052、2053、2054、2055、2056、2057、2058、2059、2060、2061、2062、2063、2064、2065、2066、2067、2068、2069、2070、2071、2072、2073、2074、2075、2076、2077、2078、2079、2080、2081、2082、2083、2084、2085、2086、2087、2088、2089、2090、2091、2092、2093、2094、2095、2096、2097、2098、2099、2100、2580、2581、2582、2583、2584、2585、2586、2587、2588、2589、2590、2591、2592、2593、2594、2595、2596、2597、2598、2599、2600、2601、2602、2603、2604、2605、4525、4526、4527、4528、4529、4530、4531、4532、4533、4534、4535、4536、4537、4538、4539、4540、4541、4542、4543、4544、4545、4546、4547、4548、4549、4550、4575、4576、4577、4578、4579、4580、4581、4582、4583、4584、4585、4586、4587、4588、4589、4590、4591、4592、4593、4594、4595、4596、4597、4598、4599、4600、4850、4851、4852、4853、4854、4855、4856、4857、4858、4859、4860、4861、4862、4863、4864、4865、4866、4867、4868、4869、4870、4871、4872、4873、4874、4875、4876、4877、4878、4879、4880、4881、4882、4883、4884、4885、4886、4887、4888、4889、4890、4891、4892、4893、4894、4895、4896、4897、4898、4899、4900、5460、5461、5462、5463、5464、5465、5466、5467、5468、5469、5470、5471、5472、5473、5474、5475、5476、5477、5478、5479、5480、6175、6176、6177、6178、6179、6180、6181、6182、6183、6184、6185、6186、6187、6188、6189、6190、6191、6192、6193、6194、6195、6196、6197、6198、6199、6200、6315、6316、6317、6318、6319、6320、6321、6322、6323、6324、6325、6326、6327、6328、6329、6330、6331、6332、6333、6334、6335、6336、6337、6338、6339、6340、6341、6342、6343、6344、6345、6600、6601、6602、6603、6604、

6605、6606、6607、6608、6609、6610、6611、6612、6613、6614、6615、6725、6726、6727、6728、6729、6730、6731、6732、6733、6734、6735、6736、6737、6738、6739、6740、6741、6742、6743、6744、6745、6746、6747、6748、6749、6750、6751、6752、6753、6754、6755、6756、6757、6758、6759、6760、6761、6762、6763、6764、6765、6766、6767、6768、6769、6770、6771、6772、6773、6774、6775、7655、7656、7657、7658、7659、7660、7661、7662、7663、7664、7665、7666、7667、7668、7669、7670、7671、7672、8510、8511、8512、8513、8514、8515、8516、8715、8716、8717、8718、8719、8720、8721、8722、8723、8724、8725、8726、8727、8728、8729、8730、8731、8732、8733、8734、8735、8736、8737、8738、8739、8740、8741、8742、8743、8744、8745、9250、9251、9252、9253、9254、9255、9256、9257、9258、9259、9260、9261、9262、9263、9264、9265、9266、9267、9268、9269、9270、9480、9481、9482、9483、9484、9485、9486、9487、9488、9489、9490、9491、9492、9493、9494、9495、9496、9497、9498、9499、9500、9575、9576、9577、9578、9579、9580、9581、9582、9583、9584、9585、9586、9587、9588、9589、9590、10525、10526、10527、10528、10529、10530、10531、10532、10533、10534、10535、10536、10537、10538、10539、10540、11545、11546、11547、11548、11549、11550、11551、11552、11553、11554、11555、11556、11557、11558、11559、11560、11875、11876、11877、11878、11879、11880、11881、11882、11883、11884、11885、11886、11887、11888、11889、11890、11891、11892、11893、11894、11895、11896、11897、11898、11899、11900、11915、11916、11917、11918、11919、11920、11921、11922、11923、11924、11925、11926、11927、11928、11929、11930、11931、11932、11933、11934、11935、11936、11937、11938、11939、11940、13375、13376、13377、13378、13379、13380、13381、13382、13383、13384、13385、13386、13387、13388、13389和13390。

[0527] 在一些实施方案中，反义链和靶mRNA序列具有100%的互补性。反义链可以与靶mRNA序列的任何部分互补。

[0528] 在其他实施方案中，反义链和靶mRNA序列包含至少一个错配。作为非限制性实例，反义链和靶mRNA序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%，或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%的互补性。

[0529] 在一个实施方案中，siRNA或dsRNA包括至少两条彼此互补的序列。

[0530] 根据本发明，siRNA分子的长度为约10-50个或更多个核苷酸，即每条链包含10-50个核苷酸(或核苷酸类似物)。优选地，siRNA分子的长度为每条链约15-30个核苷酸，例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸，其中一条链与靶区域充分互补。在一个实施方案中，siRNA分子的每条链的长度为约19至25、19至24或19至21个核苷酸。在一个实施方案中，siRNA分子的至少一条链的长度为19个核苷酸。在一个实施方案中，siRNA分子的至少一条链的长度为20个核苷酸。在一个实施方案中，siRNA分子的至少一条链的长度为21个核苷酸。在一个实施方案中，siRNA分子的至少一条链的长度为22个核苷酸。

酸。在一个实施方案中, siRNA分子的至少一条链的长度为23个核苷酸。在一个实施方案中, siRNA分子的至少一条链的长度为24个核苷酸。在一个实施方案中, siRNA分子的至少一条链的长度为25个核苷酸。

[0531] 在一些实施方案中, 本发明的siRNA分子可以是合成的RNA双链体, 其包含约19个核苷酸至约25个核苷酸, 以及在3'端的两个突出核苷酸。在一些方面, siRNA分子可以是未修饰的RNA分子。在其他方面, siRNA分子可包含至少一个修饰的核苷酸, 例如碱基、糖或主链修饰。

[0532] 在一个实施方案中, 本发明的siRNA分子可以包含反义序列和有义序列, 或其片段或变体。作为非限制性实例, 反义序列和有义序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%, 或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%的互补性。

[0533] 在其他实施方案中, 本发明的siRNA分子可以在用于递送至细胞的质粒载体、AAV颗粒、病毒基因组或其他核酸表达载体中编码。

[0534] DNA表达质粒可用于在细胞中稳定表达本发明的siRNA双链体或dsRNA, 并实现对靶基因表达的长期抑制。一方面, siRNA双链体的有义和反义链通常通过短间隔序列连接, 所述短间隔序列引起称为短发夹RNA (shRNA) 的茎-环结构的表达。发夹被Dicer识别并切割, 从而生成成熟的siRNA分子。

[0535] 根据本发明, 产生包含编码靶向mRNA的siRNA分子的核酸的AAV颗粒, AAV血清型可以是表1中列出的任何血清型。AAV血清型的非限制性实例包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAV-PHP.A和/或AAV-PHP.B、AAVPHP.B2、AAVPHP.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、AAVG2B4、AAVG2B5及其变体。

[0536] 在一些实施方案中, 本发明的siRNA双链体或编码的dsRNA阻遏(或降解)靶mRNA。因此, siRNA双链体或编码的dsRNA可用于基本上抑制细胞(例如神经元)中的基因表达。在一些方面, 基因表达的抑制是指抑制了至少约20%, 优选抑制了至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%, 或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-

80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此,靶基因的蛋白产物可被抑制至少约20%,优选至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[0537] 在一个实施方案中,siRNA分子包含与位于引导链中的靶标匹配的miRNA种子。在另一个实施方案中,siRNA分子包含与位于过客链中的靶标匹配的miRNA种子。在又一个实施方案中,靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA不包含与位于引导链或过客链中的靶标匹配的种子。

[0538] 在一个实施方案中,靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对引导链几乎没有显著的全长脱靶效应。在另一个实施方案中,靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对过客链几乎没有显著的全长脱靶效应。靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对过客链具有少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全长脱靶效应。在又一个实施方案中,靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对引导链或过客链几乎没有显著的全长脱靶效应。靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对引导链或过客链具有少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全长脱靶效应。

[0539] 在一个实施方案中,靶向目标基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可以在体外具有高活性。在另一个实施方案中,siRNA分子可以在体外具有低活性。在又一个实施方案中,靶向目标基因的siRNA双链体或dsRNA在体外可具有高引导链活性和低过客链活性。

[0540] 在一个实施方案中,siRNA分子在体外具有高引导链活性和低过客链活性。引导链的目标敲低(KD)可以是至少40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%或100%。引导链的目标敲低可以是40-50%、45-50%、50-55%、50-60%、60-65%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、60-99%、60-99.5%、60-100%、65-70%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、65-99%、65-99.5%、65-100%、70-75%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、70-99%、70-99.5%、70-100%、75-80%、75-85%、75-90%、75-95%、75-99%、75-99.5%、75-100%、80-85%、80-90%、80-95%、80-99%、80-99.5%、80-100%、85-90%、85-95%、85-99%、85-99.5%、85-100%、90-95%、90-99%、90-99.5%、90-100%、95-99%、95-99.5%、95-100%、99-99.5%、99-100%或99.5-100%。作为非限制性实例,引导链的目标敲低(KD)大于70%。作为非限制性

实例,引导链的目标敲低(KD)大于60%。

[0541] 在一个实施方案中,对siRNA双链体进行了设计,以不存在与非目标基因序列的有义或反义序列匹配的miRNA种子。

[0542] 在一个实施方案中,最接近脱靶的引导链的 IC_{50} 大于100乘以中靶基因的引导链的 IC_{50} 。作为非限制性实例,如果最接近脱靶的引导链的 IC_{50} 大于100乘以靶引导链的 IC_{50} ,则认为siRNA分子具有体外抑制目标基因的高引导链选择性。

[0543] 在一个实施方案中,引导链的5'加工在体外或体内至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体外至少99%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体内至少99%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体外至少90%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体内至少90%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体外至少85%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体内至少85%的时间内在5'端正确开始(n)。

[0544] 在一个实施方案中,在体外或体内,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)为1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1;1:2:10、2:9、2:8、2:7、2:6、2:5、2:4、2:3、2:2、2:1、3:10、3:9、3:8、3:7、3:6、3:5、3:4、3:3、3:2、3:1、4:10、4:9、4:8、4:7、4:6、4:5、4:4、4:3、4:2、4:1、5:10、5:9、5:8、5:7、5:6、5:5、5:4、5:3、5:2、5:1、6:10、6:9、6:8、6:7、6:6、6:5、6:4、6:3、6:2、6:1、7:10、7:9、7:8、7:7、7:6、7:5、7:4、7:3、7:2、7:1、8:10、8:9、8:8、8:7、8:6、8:5、8:4、8:3、8:2、8:1、9:10、9:9、9:8、9:7、9:6、9:5、9:4、9:3、9:2、9:1、10:10、10:9、10:8、10:7、10:6、10:5、10:4、10:3、10:2、10:1、1:99、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5或99:1。引导链与过客链的比是指在pri-microRNA的细胞内加工后引导链与过客链的比。例如,80:20的引导链与过客链的比为从前体加工的每2条过客链将有8条引导链。作为非限制性实例,体外引导链与过客链的比为8:2。作为非限制性实例,体内引导链与过客链的比为8:2。作为非限制性实例,体外引导链与过客链的比为9:1。作为非限制性实例,体内引导链与过客链的比为9:1。

[0545] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)大于1。

[0546] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)大于2。

[0547] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)大于5。

[0548] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)大于10。

[0549] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)大于20。

[0550] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)大于20。

比)大于50。

[0551] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)为至少3:1。

[0552] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)为至少5:1。

[0553] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)为至少10:1。

[0554] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)为至少20:1。

[0555] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链的比(G:P)(也称为反义链与有义链的比)为至少50:1。

[0556] 在一个实施方案中,在体外或体内,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)为1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:10、2:9、2:8、2:7、2:6、2:5、2:4、2:3、2:2、2:1、3:10、3:9、3:8、3:7、3:6、3:5、3:4、3:3、3:2、3:1、4:10、4:9、4:8、4:7、4:6、4:5、4:4、4:3、4:2、4:1、5:10、5:9、5:8、5:7、5:6、5:5、5:4、5:3、5:2、5:1、6:10、6:9、6:8、6:7、6:6、6:5、6:4、6:3、6:2、6:1、7:10、7:9、7:8、7:7、7:6、7:5、7:4、7:3、7:2、7:1、8:10、8:9、8:8、8:7、8:6、8:5、8:4、8:3、8:2、8:1、9:10、9:9、9:8、9:7、9:6、9:5、9:4、9:3、9:2、9:1、10:10、10:9、10:8、10:7、10:6、10:5、10:4、10:3、10:2、10:1、1:99、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5或99:1。过客链与引导链的比是指在pri-microRNA的细胞内加工后过客链与引导链的比。例如,80:20的过客链与引导链的比为从前体加工的每2条引导链将有8条过客链。作为非限制性实例,体外过客链与引导链的比为80:20。作为非限制性实例,体内过客链与引导链的比为80:20。作为非限制性实例,体外过客链与引导链的比为8:2。作为非限制性实例,体内过客链与引导链的比为8:2。作为非限制性实例,体外过客链与引导链的比为9:1。作为非限制性实例,体内过客链与引导链的比为9:1。

[0557] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)大于1。

[0558] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)大于2。

[0559] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)大于5。

[0560] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)大于10。

[0561] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)大于20。

[0562] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)大于50。

[0563] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)为至少3:1。

[0564] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)为至少5:1。

[0565] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)为至少10:1。

[0566] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)为至少20:1。

[0567] 在一个实施方案中,表达的过客链与引导链的比(P:G)(也称为有义链与反义链的比)为至少50:1。

[0568] 在一个实施方案中,当pri-或pre-microRNA通过本领域已知的和本文描述的方法证明比测量加工时的引导链与过客链的比大2倍时,过客链-引导链双链体被认为是有效的。作为非限制性实例,pri-或pre-microRNA证明比测量加工时的引导链与过客链的比大2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍,或2至5倍、2至10倍、2至15倍、3至5倍、3至10倍、3至15倍、4至5倍、4至10倍、4至15倍、5至10倍、5至15倍、6至10倍、6至15倍、7至10倍、7至15倍、8至10倍、8至15倍、9至10倍、9至15倍、10至15倍、11至15倍、12至15倍、13至15倍或14至15倍。

[0569] 在一个实施方案中,编码dsRNA的载体基因组包含为构建体全长的至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或多于99%的序列。作为非限制性实例,载体基因组包含为构建体全长序列的至少80%的序列。

[0570] 在一个实施方案中,可通过靶向目标基因序列上的至少一个外显子,将siRNA分子用于沉默目标基因的野生型或突变形式。外显子可以是外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7、外显子8、外显子9、外显子10、外显子11、外显子12、外显子13、外显子14、外显子15、外显子16、外显子17、外显子18、外显子19、外显子20、外显子21、外显子22、外显子23、外显子24、外显子25、外显子26、外显子27、外显子28、外显子29、外显子30、外显子31、外显子32、外显子33、外显子34、外显子35、外显子36、外显子37、外显子38、外显子39、外显子40、外显子41、外显子42、外显子43、外显子44、外显子45、外显子46、外显子47、外显子48、外显子49、外显子50、外显子51、外显子52、外显子53、外显子54、外显子55、外显子56、外显子57、外显子58、外显子59、外显子60、外显子61、外显子62、外显子63、外显子64、外显子65、外显子66和/或外显子67。

[0571] 靶向HTT基因的siRNA双链体的设计与序列

[0572] 本发明提供了靶向HTT mRNA以干扰HTT基因表达和/或HTT蛋白产生的小干扰RNA(siRNA)双链体(和编码它们的调节性多核苷酸)。

[0573] 本发明的编码的siRNA双链体包含杂交在一起形成双链体结构的反义链和有义链,其中所述反义链与靶HTT基因的核酸序列互补,并且其中有义链与靶HTT基因的核酸序列同源。在一些方面,反义链的5'端具有5'磷酸基团,而有义链的3'端包含3'羟基。在其他方面,在每条链的3'端没有、有一个或有两个核苷酸突出端。

[0574] 在本领域中已经提出了一些设计siRNA的指南。这些指南通常建议生成19个核苷酸的双链体区、对称的2-3个核苷酸的3'突出端、5'-磷酸基团和3'-羟基,靶向待沉默的基因中的区域。其他可能影响siRNA序列偏好的规则包括但不限于:(i)反义链5'端的A/U;(ii)有义链5'端的G/C;(iii)在反义链的5'端三分之一的至少五个A/U残基;和(iv)不存在

长度超过9个核苷酸的任何GC片段。根据这样的考虑以及靶基因的特异性序列,可以容易地设计阻遏Htt基因表达所必需的高效siRNA分子。

[0575] 根据本发明,设计了靶向HTT基因的siRNA分子(例如,siRNA双链体或编码的dsRNA)。这样的siRNA分子可以特异性地阻遏HTT基因表达和蛋白产生。在一些方面,siRNA分子被设计用于选择性“敲除”细胞中的HTT基因变体,即在HD疾病患者中识别出的突变的HTT转录物。在一些方面,siRNA分子被设计用于选择性“敲低”细胞中的HTT基因变体。在其他方面,siRNA分子能够抑制或阻遏野生型和突变的HTT基因。

[0576] 在一个实施方案中,本发明的siRNA分子包含有义链和互补反义链,其中两条链杂交在一起形成双链体结构。反义链与HTT mRNA序列具有足够的互补性以引导靶特异性RNAi,即,siRNA分子具有足以触发通过RNAi机制或过程破坏靶mRNA的序列。

[0577] 在一个实施方案中,本发明的siRNA分子包含有义链和互补反义链,其中两条链杂交在一起形成双链体结构,并且与HTT mRNA杂交的起始位点在HTT mRNA序列的核苷酸100至7000之间。作为非限制性实例,起始位点可以在HTT mRNA序列上的核苷酸100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、800-850、850-900、900-950、950-1000、1000-1050、1050-1100、1100-1150、1150-1200、1200-1250、1250-1300、1300-1350、1350-1400、1400-1450、1450-1500、1500-1550、1550-1600、1600-1650、1650-1700、1700-1750、1750-1800、1800-1850、1850-1900、1900-1950、1950-2000、2000-2050、2050-2100、2100-2150、2150-2200、2200-2250、2250-2300、2300-2350、2350-2400、2400-2450、2450-2500、2500-2550、2550-2600、2600-2650、2650-2700、2700-2750、2750-2800、2800-2850、2850-2900、2900-2950、2950-3000、3000-3050、3050-3100、3100-3150、3150-3200、3200-3250、3250-3300、3300-3350、3350-3400、3400-3450、3450-3500、3500-3550、3550-3600、3600-3650、3650-3700、3700-3750、3750-3800、3800-3850、3850-3900、3900-3950、3950-4000、4000-4050、4050-4100、4100-4150、4150-4200、4200-4250、4250-4300、4300-4350、4350-4400、4400-4450、4450-4500、4500-4550、4550-4600、4600-4650、4650-4700、4700-4750、4750-4800、4800-4850、4850-4900、4900-4950、4950-5000、5000-5050、5050-5100、5100-5150、5150-5200、5200-5250、5250-5300、5300-5350、5350-5400、5400-5450、5450-5500、5500-5550、5550-5600、5600-5650、5650-5700、5700-5750、5750-5800、5800-5850、5850-5900、5900-5950、5950-6000、6000-6050、6050-6100、6100-6150、6150-6200、6200-6250、6250-6300、6300-6350、6350-6400、6400-6450、6450-6500、6500-6550、6550-6600、6600-6650、6650-6700、6700-6750、6750-6800、6800-6850、6850-6900、6900-6950、6950-7000、7000-7050、7050-7100、7100-7150、7150-7200、7200-7250、7250-7300、7300-7350、7350-7400、7400-7450、7450-7500、7500-7550、7550-7600、7600-7650、7650-7700、7700-7750、7750-7800、7800-7850、7850-7900、7900-7950、7950-8000、8000-8050、8050-8100、8100-8150、8150-8200、8200-8250、8250-8300、8300-8350、8350-8400、8400-8450、8450-8500、8500-8550、8550-8600、8600-8650、8650-8700、8700-8750、8750-8800、8800-8850、8850-8900、8900-8950、8950-9000、9000-9050、9050-9100、9100-9150、9150-9200、9200-9250、9250-9300、9300-9350、9350-9400、9400-9450、9450-9500、9500-9550、9550-9600、9600-9650、9650-9700、9700-9750、9750-9800、9800-9850、9850-9900、9900-9950、9950-10000、10000-10050、10050-

10100、10100-10150、10150-10200、10200-10250、10250-10300、10300-10350、10350-10400、10400-10450、10450-10500、10500-10550、10550-10600、10600-10650、10650-10700、10700-10750、10750-10800、10800-10850、10850-10900、10900-10950、10950-11000、11050-11100、11100-11150、11150-11200、11200-11250、11250-11300、11300-11350、11350-11400、11400-11450、11450-11500、11500-11550、11550-11600、11600-11650、11650-11700、11700-11750、11750-11800、11800-11850、11850-11900、11900-11950、11950-12000、12000-12050、12050-12100、12100-12150、12150-12200、12200-12250、12250-12300、12300-12350、12350-12400、12400-12450、12450-12500、12500-12550、12550-12600、12600-12650、12650-12700、12700-12750、12750-12800、12800-12850、12850-12900、12900-12950、12950-13000、13050-13100、13100-13150、13150-13200、13200-13250、13250-13300、13300-13350、13350-13400、13400-13450和13450-13500之间。作为另一个非限制性实例，起始位点可以是HTT mRNA序列上的核苷酸315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725、875、876、877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、1375、1376、1377、1378、1379、1380、1381、1382、1383、1384、1385、1386、1387、1388、1389、1390、1391、1392、1393、1394、1395、1396、1397、1398、1399、1400、1401、1402、1403、1404、1405、1406、1407、1408、1409、1410、1411、1412、1413、1414、1415、1416、1417、1418、1419、1420、1421、1422、1423、1424、1425、1426、1427、1428、1429、1430、1431、1432、1433、1434、1435、1436、1437、1438、1439、1440、1441、1442、1443、1444、1445、1446、1447、1448、1449、1450、1660、1661、1662、1663、1664、1665、1666、1667、1668、1669、1670、1671、1672、1673、1674、1675、2050、2051、2052、2053、2054、2055、2056、2057、2058、2059、2060、2061、2062、2063、2064、2065、2066、2067、2068、2069、2070、2071、2072、2073、2074、2075、2076、2077、2078、2079、2080、2081、2082、2083、2084、2085、2086、2087、2088、2089、2090、2091、2092、2093、2094、2095、2096、2097、2098、2099、2100、2580、2581、2582、2583、2584、2585、2586、2587、2588、2589、2590、2591、2592、2593、2594、2595、2596、2597、2598、2599、2600、2601、2602、2603、2604、2605、4525、4526、4527、4528、4529、4530、4531、4532、4533、4534、4535、4536、4537、4538、4539、4540、4541、4542、4543、4544、4545、4546、4547、4548、4549、4550、4575、4576、4577、4578、4579、4580、4581、4582、4583、4584、4585、4586、4587、4588、4589、4590、4591、4592、4593、4594、4595、4596、4597、4598、4599、4600、4850、4851、4852、4853、4854、4855、4856、4857、4858、4859、4860、4861、4862、4863、4864、4865、4866、4867、4868、4869、4870、4871、4872、4873、4874、4875、4876、4877、4878、4879、4880、4881、4882、4883、4884、4885、4886、4887、4888、4889、4890、4891、4892、4893、4894、4895、4896、4897、4898、4899、4900、5460、5461、5462、5463、5464、5465、5466、5467、5468、5469、5470、5471、5472、5473、5474、5475、5476、5477、5478、5479、5480、6175、6176、6177、6178、6179、6180、6181、6182、6183、6184、6185、6186、6187、6188、6189、6190、6191、6192、6193、6194、6195、6196、6197、6198、6199、6200、6315、6316、6317、6318、6319、

6320、6321、6322、6323、6324、6325、6326、6327、6328、6329、6330、6331、6332、6333、6334、6335、6336、6337、6338、6339、6340、6341、6342、6343、6344、6345、6600、6601、6602、6603、6604、6605、6606、6607、6608、6609、6610、6611、6612、6613、6614、6615、6725、6726、6727、6728、6729、6730、6731、6732、6733、6734、6735、6736、6737、6738、6739、6740、6741、6742、6743、6744、6745、6746、6747、6748、6749、6750、6751、6752、6753、6754、6755、6756、6757、6758、6759、6760、6761、6762、6763、6764、6765、6766、6767、6768、6769、6770、6771、6772、6773、6774、6775、7655、7656、7657、7658、7659、7660、7661、7662、7663、7664、7665、7666、7667、7668、7669、7670、7671、7672、8510、8511、8512、8513、8514、8515、8516、8715、8716、8717、8718、8719、8720、8721、8722、8723、8724、8725、8726、8727、8728、8729、8730、8731、8732、8733、8734、8735、8736、8737、8738、8739、8740、8741、8742、8743、8744、8745、9250、9251、9252、9253、9254、9255、9256、9257、9258、9259、9260、9261、9262、9263、9264、9265、9266、9267、9268、9269、9270、9480、9481、9482、9483、9484、9485、9486、9487、9488、9489、9490、9491、9492、9493、9494、9495、9496、9497、9498、9499、9500、9575、9576、9577、9578、9579、9580、9581、9582、9583、9584、9585、9586、9587、9588、9589、9590、10525、10526、10527、10528、10529、10530、10531、10532、10533、10534、10535、10536、10537、10538、10539、10540、11545、11546、11547、11548、11549、11550、11551、11552、11553、11554、11555、11556、11557、11558、11559、11560、11875、11876、11877、11878、11879、11880、11881、11882、11883、11884、11885、11886、11887、11888、11889、11890、11891、11892、11893、11894、11895、11896、11897、11898、11899、11900、11915、11916、11917、11918、11919、11920、11921、11922、11923、11924、11925、11926、11927、11928、11929、11930、11931、11932、11933、11934、11935、11936、11937、11938、11939、11940、13375、13376、13377、13378、13379、13380、13381、13382、13383、13384、13385、13386、13387、13388、13389和13390。

[0578] 在一些实施方案中,反义链和靶Htt mRNA序列具有100%的互补性。反义链可以与靶Htt mRNA序列的任何部分互补。

[0579] 在其他实施方案中,反义链和靶Htt mRNA序列包含至少一个错配。作为非限制性实例,反义链和靶Htt mRNA序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%的互补性。

[0580] 在一个实施方案中,靶向Htt的siRNA或dsRNA包括至少两条彼此互补的序列。

[0581] 根据本发明,靶向Htt的siRNA分子的长度为约10-50个或更多个核苷酸,即每条链包含10-50个核苷酸(或核苷酸类似物)。优选地,siRNA分子的长度为每条链约15-30个核苷酸,例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸,其中一条链与靶区域充分互补。在一个实施方案中,siRNA分子的每条链的长度为约19至25、19至24或19

至21个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为19个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为20个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为21个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为22个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为23个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为24个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为25个核苷酸。

[0582] 在一些实施方案中,靶向Htt的本发明的siRNA分子可以是合成的RNA双链体,其包含约19个核苷酸至约25个核苷酸,以及在3'端的两个突出核苷酸。在一些方面,siRNA分子可以是未修饰的RNA分子。在其他方面,siRNA分子可包含至少一个修饰的核苷酸,例如碱基、糖或主链修饰。

[0583] 在一个实施方案中,靶向Htt的本发明的siRNA分子可以包含核苷酸序列,例如但不限于表2中的反义(引导)序列或其片段或变体。作为非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的反义序列是表2中核苷酸序列的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%。作为另一个非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的反义序列包含表2中核苷酸序列的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或多于21个连续核苷酸。作为另一个非限制性实例,用于本发明的siRNA分子的反义序列包含表2中序列的核苷酸1至22、1至21、1至20、1至19、1至18、1至17、1至16、1至15、1至14、1至13、1至12、1至11、1至10、1至9、1至8、2至22、2至21、2至20、2至19、2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、3至22、3至21、3至20、3至19、3至18、3至17、3至16、3至15、3至14、3至13、3至12、3至11、3至10、3至9、3至8、4至22、4至21、4至20、4至19、4至18、4至17、4至16、4至15、4至14、4至13、4至12、4至11、4至10、4至9、4至8、5至22、5至21、5至20、5至19、5至18、5至17、5至16、5至15、5至14、5至13、5至12、5至11、5至10、5至9、5至8、6至22、6至21、6至20、6至19、6至18、6至17、6至16、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、7至22、7至21、7至20、7至19、7至18、7至17、7至16、7至15、7至14、7至13、7至12、8至22、8至21、8至20、8至19、8至18、8至17、8至16、8至15、8至14、8至13、8至12、9至22、9至21、9至20、9至19、9至18、9至17、9至16、9至15、9至14、10至22、10至21、10至20、10至19、10至18、10至17、10至16、10至15、10至14、11至22、11至21、11至20、11至19、11至18、11至17、11至16、11至15、11至14、12至22、12至21、12至20、12至19、12至18、12至17、12至16、13至22、13至21、13至20、13至19、13至18、13至17、13至16、14至22、14至21、14至20、14至19、14至18、14至17、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、16至22、16至21、16至20、17至22、17至21或18至22。

[0584] 表2.反义序列

[0585]

反义 ID	序列	SEQ ID NO
A-2000	UUAACGUCAGUUCAUAAACUU	916
A-2000dt	UUAACGUCAGUUCAUAAACdTdT	917

[0586]

A-2001	UGUCGGUACCGUCUAAACACUU	918
A-2001dt	UGUCGGUACCGUCUAAACACdTdT	919
A-2002	UAAGCAUGGAGCUAGCAGGUU	920
A-2002dt	UAAGCAUGGAGCUAGCAGGdTdT	921
A-2003	UACAACGAGACUGAAUUGCUU	922
A-2003dt	UACAACGAGACUGAAUUGCdTdT	923
A-2004	UUCAGUUCAUAAACCUGGAUU	924
A-2004dt	UUCAGUUCAUAAACCUGGAdTdT	925
A-2005	UAACGUCAGUUCAUAAACCUU	926
A-2005dt	UAACGUCAGUUCAUAAACCCdTdT	927
A-2006	UCCGGUCACAACAUUGUGGUU	928
A-2006dt	UCCGGUCACAACAUUGUGGdTdT	929
A-2007	UUGCACGGUUCUUUGUGACUU	930
A-2007dt	UUGCACGGUUCUUUGUGACdTdT	931
A-2008	UUUUUAACAAGAGGUUCAUU	932
A-2008dt	UUUUUAACAAGAGGUUCAdTdT	933
A-2009	UCCAAAUACUGGUUGUCGGUU	934
A-2009dt	UCCAAAUACUGGUUGUCGGdTdT	935
A-2010	UAUUUUAGGAAUCCAAUGUU	936
A-2010dt	UAUUUUAGGAAUCCAAUGdTdT	937
A-2011	UUUAGGAAUCCAAUGAUCUU	938
A-2011dt	UUUAGGAAUCCAAUGAUCdTdT	939
A-2012dt	UUAAUCUCUUUACUGAUAUdTdT	940
A-2013dt	GAUUUUAGGAAUCCAAUGdTdT	941
A-2014	UAAGCAUGGAGCUAGCAGGCUU	942
A-2015	UAAGCAUGGAGCUAGCAGGGU	943
A-2016	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGU	944
A-2017	AAGGACUUGAGGGACUCGAAG	945
A-2018	AAGGACUUGAGGGACUCGA	946

[0587]

A-2019	AGGACUUGAGGGACUCGAAGU	947
A-2020	GAGGACUUGAGGGACUCGAAGU	948
A-2021	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGU	949
A-2022	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGUU	950
A-2023	AAGGACUUGAGGGACUCGAAG	951
A-2024	AAGGACUUGAGGGACUCGA	952
A-2025	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGG	953
A-2026	AAGGACUUGAGGGACUCGAAU	954
A-2027	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGA	955
A-2028	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGG	956
A-2029	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGU	957
A-2030	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGA	958
A-2031	AAGGACUUGAGGGACUCGAAG	959
A-2032	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGU	960
A-2033	AAGGACUUGAGGGACUCGA	961
A-2034	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGA	962
A-2035	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGG	963
A-2036	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGAU	964
A-2037	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGAUU	965
A-2038	AAGGACUUGAGGGACUCGAAG	966
A-2039	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGAA	967
A-2040	GAUGAAGUGCACACAUUGGAUGA	968
A-2041	GAUGAACUGCACACAUUGGAUG	969
A-2042	GAUGAAUUGCACACAGUAGAUGA	970
A-2043	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGUU	971
A-2044	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGUUU	972
A-2045	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGU	973
A-2046	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGUUUU	974
A-2047	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGUUUUU	975

[0588]

A-2048	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGG	976
A-2049	UAAGGACUUGAGGGACUCGAAG	977
A-2050	AAGGACUUGAGGGACUCGAAG	978
A-2051	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGU	979
A-2052	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGACGAGUCCC	980
A-2053	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGACGAGUCCCA	981
A-2054	AAGGACUUGAGGGACUCGAAGACGAGUCCCU	982
A-2055	GAUGAAGUGCACACAUUGGAUAC	983
A-2056	GAUGAAGUGCACACAUUGGAUACA	984
A-2057	GAUGAAGUGCACACAUUGGAUACAAUGUGU	985
A-2058	GAUGAAGUGCACACAUUGGAU	986
A-2059	GAUGAAGUGCACACAUUGGAUA	987
A-2060	GAUGAAUUGCACACAGUAGAUAU	988
A-2061	GAUGAAUUGCACACAGUAGAUAUAC	989
A-2062	GAUGAAUUGCACACAGUAGAUAUACUGUGU	990
A-2063	GAUGAAUUGCACACAGUAGAUUA	991
A-2064	AUGAAUUGCACACAGUAGAUAUAC	992
A-2065	GAUGAAUUGCACACAGUAGAU	993
A-2066	GAUGAAUUGCACACAGUAGAUAUACUGUGU	994
A-2067	UACAACGAGACUGAAUUGCU	995
A-2068	ACAACGAGACUGAAUUGCUU	996
A-2069	UCCGGUCACAACAUUGUGGUUC	997
A-2070	UCCGGUCACAACAUUGUGGU	998
A-2071	UCCGGUCACAACAUUGUG	999
A-2072	CCGGUCACAACAUUGUGGUU	1000
A-2073	UUUUAUAACAAGAGGUUCAU	1001
A-2074	UUUUAUAACAAGAGGUUCAU	1002
A-2075	UAAGCAUGGAGCUAGCAGGU	1003
A-2076	AAGCAUGGAGCUAGCAGGUU	1004

A-2077	CCAAAUACUGGUUGUCGGUU	1005
A-2078	UACAACGAGACUGAAUUGCUUU	1006
A-2079	UAACGUCAGUUCAUAAACCUUU	1007
A-2080	GUCCGGUCACAACAUUGUGGUU	1008
A-2081	UCCGGUCACAACAUUGUGGUUUG	1009
[0589] A-2082	UCCGGUCACAACAUUGUGGUUU	1010
A-2083	UCCGGUCACAACAUUGUGG	1011
A-2084	UAAGCAUGGAGCUAGCAGGUUU	1012
A-2085	AAGCAUGGAGCUAGCAGGUUU	1013
A-2086	UCCAAAUACUGGUUGUCGGUUU	1014
A-2087	CCAAAUACUGGUUGUCGGUUU	1015

[0590] 在一个实施方案中,靶向Htt的本发明的siRNA分子可以包含核苷酸序列,例如但不限于表3中的有义(过客链)序列或其片段或变体。作为非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的有义序列是表3中核苷酸序列的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%。作为另一个非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的有义序列包含表3中核苷酸序列的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或多于21个连续核苷酸。作为另一个非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的有义序列包含表3中序列的核苷酸1至22、1至21、1至20、1至19、1至18、1至17、1至16、1至15、1至14、1至13、1至12、1至11、1至10、1至9、1至8、2至22、2至21、2至20、2至19、2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、3至22、3至21、3至20、3至19、3至18、3至17、3至16、3至15、3至14、3至13、3至12、3至11、3至10、3至9、3至8、4至22、4至21、4至20、4至19、4至18、4至17、4至16、4至15、4至14、4至13、4至12、4至11、4至10、4至9、4至8、5至22、5至21、5至20、5至19、5至18、5至17、5至16、5至15、5至14、5至13、5至12、5至11、5至10、5至9、5至8、6至22、6至21、6至20、6至19、6至18、6至17、6至16、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、7至22、7至21、7至20、7至19、7至18、7至17、7至16、7至15、7至14、7至13、7至12、8至22、8至21、8至20、8至19、8至18、8至17、8至16、8至15、8至14、8至13、8至12、9至22、9至21、9至20、9至19、9至18、9至17、9至16、9至15、9至14、10至22、10至21、10至20、10至19、10至18、10至17、10至16、10至15、10至14、11至22、11至21、11至20、11至19、11至18、11至17、11至16、11至15、11至14、12至22、12至21、12至20、12至19、12至18、12至17、12至16、13至22、13至21、13至20、13至19、13至18、13至17、13至16、14至22、14至21、14至20、14至19、14至18、14至17、15至22、15至21、

15至20、15至19、15至18、16至22、16至21、16至20、17至22、17至21或18至22。

[0591] 表3. 有义序列

[0592]

有义 ID	序列	SEQ ID NO
S-1000	GUUUAUGAACUGAUCUUACCC	1016
S-1001	GUGUUAGACGGUACUGAUCCC	1017
S-1002	CCUGCUAGCUCCAUGCUUCCC	1018
S-1003	GUUUAUGAACUGAUCUUAGCC	1019
S-1004	GUGUUAGACGGUACUGAUGCC	1020
S-1005	CCUGCUAGCUCCAUGCUUGCC	1021
S-1006	GUUUAUGAAGUGAUCUUAACC	1022
S-1007	GUGUUAGACCGUACUGAUACC	1023

[0593]

S-1008	CCUGCUAGCACCAUGCUUACC	1024
S-1009	GUUUAUGAACUGAUCUUAACC	1025
S-1010	GUGUUAGACGGUACUGAUACC	1026
S-1011	CCUGCUAGCUCCAUGCUUACC	1027
S-1011dt	CCUGCUAGCUCCAUGCUUAdTdT	1028
S-1012	GUUUAUGAACUGAUCUUGCCC	1029
S-1013	GUUUAUGAACUGAUCUUGGCC	1030
S-1014	GUUUAUGAACUGAUCUUGACC	1031
S-1015	GCAAUUCAGUCUCGUUGUCCC	1032
S-1016	UCCAGGUUUAUGAACUGACCC	1033
S-1017	GGUUUAUGAACUGACGUUCCC	1034
S-1018	CCACAAUGUUGUGACUGGCC	1035
S-1019	GUCACAAAGAACCGUGUACCC	1036
S-1020	UGAACCUCUUGUUAUAAACC	1037
S-1021	CCGACAACCAGUAUUUGGCC	1038
S-1022	GCAAUUCAGUCUCGUUGUGCC	1039
S-1023	UCCAGGUUUAUGAACUGAGCC	1040
S-1024	GGUUUAUGAACUGACGUUGCC	1041
S-1025	CCACAAUGUUGUGACUGGGCC	1042
S-1026	GUCACAAAGAACCGUGUAGCC	1043
S-1027	UGAACCUCUUGUUAUAAAGCC	1044
S-1028	CCGACAACCAGUAUUUGGGCC	1045
S-1029	GCAAUUCAGUCUCGUUGUACC	1046
S-1029dt	GCAAUUCAGUCUCGUUGUAdTdT	1047
S-1030	UCCAGGUUUAUGAACUGAACC	1048
S-1030dt	UCCAGGUUUAUGAACUGAAAdTdT	1049
S-1031	GGUUUAUGAACUGACGUUACC	1050
S-1032	CCACAAUGUUGUGACUGGACC	1051
S-1033	GUCACAAAGAACCGUGUAACC	1052

[0594]

S-1034	UGAACCUCUUGUUAUAAAACC	1053
S-1034dt	UGAACCUCUUGUUAUAAAAdTdT	1054
S-1035	CCGACAACCAGUAUUUGGACC	1055
S-1035dt	CCGACAACCAGUAUUUGGAdTdT	1056
S-1036	GCAAUUCAGACUCGUUGUACC	1057
S-1037	UCCAGGUUUUUGAACUGAACC	1058
S-1038	GGUUUAUGAUCUGACGUUACC	1059
S-1039	CCACAAUGUAGUGACUGGACC	1060
S-1040	GUCACAAAGUACCGUGUAACC	1061
S-1041	UGAACCUCUAGUUAUAAAACC	1062
S-1042	CCGACAACCUGUAUUUGGACC	1063
S-1043	CAUUGGAAUCCUAAAAUCC	1064
S-1044	GAUCAUUGGAAUCCUAAUCC	1065
S-1045	CAUUGGAAUCCUAAAAUGCC	1066
S-1046	GAUCAUUGGAAUCCUAAGCC	1067
S-1047	CAUUGGAAUCCUAAAAUACC	1068
S-1047dt	CAUUGGAAUCCUAAAAUAdTdT	1069
S-1048	GAUCAUUGGAAUCCUAAACC	1070
S-1048dt	GAUCAUUGGAAUCCUAAAAdTdT	1071
S-1049	CAUUGGAAUACCUAAAAUACC	1072
S-1050	GAUCAUUGGUAUCCUAAACC	1073
S-1051dt	GUUUAUGAACUGACGUUAAAdTdT	1074
S-1052dt	GUGUUAGACGGUACCGACAdTdT	1075
S-1053dt	AUAUCAGUAAAGAGAUUAAAdTdT	1076
S-1054dt	GGUUUAUGAACUGACGUUAdTdT	1077
S-1055dt	CCACAAUGUUGUGACCGGAdTdT	1078
S-1056dt	GUCACAAAGAACCGUGCAAdTdT	1079
S-1057dt	CAUUGGAAUCCUAAAAUCdTdT	1080
S-1058	CCUGCUAGCUCCAUGCUUGCU	1081

[0595]

S-1059	CCUGCUAGCUCCAUGCUUGAU	1082
S-1060	CCUGCUAGCUCCAUGCUUAUU	1083
S-1061	CCUGCUAGCUCCAUGCUUGUU	1084
S-1062	UUCGAGUCCCUCAAGUAGCU	1085
S-1063	UUCGAGUCCCUCAAGUAGCUUU	1086
S-1064	UCGAGUCCCUCAAGUCCAUUCU	1087
S-1065	UUCGAGUCCAUCUAAAGUCAAUU	1088
S-1066	UUCGAGUCUAAAAGUCCUUGG	1089
S-1067	UUCGAGUCUAAAAGUCCUUGGC	1090
S-1068	CUUCGAGUCUAAAAGUCCUUGG	1091
S-1069	UUCGAGUCUAAAAGUCCUUGGU	1092
S-1070	UUCGAGUCUAAAAGUCCUUGGCU	1093
S-1071	UCCAAUGUGAAACUUCAUCGGCU	1094
S-1072	UCCAAUGUGAAACUUCAUCGGC	1095
S-1073	AUCCAAUGUGAAACUUCAUCGU	1096
S-1074	AUCCAAUGUGAAACUUCAUCGGU	1097
S-1075	UCCAAUGUGAAACUUCAUCGGU	1098
S-1076	UCCAAUGUGAAACUUCAUCGGCUU	1099
S-1077	AUCUACUGUGAAAAUUCAUCGG	1100
S-1078	UCUACUGUGAAAAUUCAUCGG	1101
S-1079	UCUACUGUGAAAAUUCAUCGGC	1102
S-1080	AUCUACUGUGAAAAUUCAUCGGU	1103
S-1081	UCUACUGUGAAAAUUCAUCGGU	1104
S-1082	UCUACUGUGAAAAUUCAUCGGCU	1105
S-1083	CCUUCGGUCCUCAAGUCCUUCA	1106
S-1084	UUCGAGUCCAUCUAAAUCCUAUAGU	1107
S-1085	UACAAUGUGUGCACUUCAUAU	1108
S-1086	UAUACUGUGUGCAAUUCAUUUCU	1109
S-1087	GCAAUUCAGUCUCGUUGUCC	1110

[0596]

S-1088	GCAAUUCAGUCUCGUUGUC	1111
S-1089	CAAUUCAGUCUCGUUGUCCC	1112
S-1090	CAAUUCAGUCUCGUUGUCC	1113
S-1091	GCAAUUCAGUCUCGUUGUGC	1114
S-1092	CAAUUCAGUCUCGUUGUGCC	1115
S-1093	CCACAAUGUUGUGACUGGGCCU	1116
S-1094	CCACAAUGUUGUGACUGGGC	1117
S-1095	CACAAUGUUGUGACUGGGCC	1118
S-1096	UGAACCUCUUGUUAUAAAGCCU	1119
S-1097	UGAACCUCUUGUUAUAAAGC	1120
S-1098	GAACCUCUUGUUAUAAAGCC	1121
S-1099	CCUGCUAGCUCCAUGCUUGCCU	1122
S-1100	CCUGCUAGCUCCAUGCUUGC	1123
S-1101	CCUGCUAGCUCCAUGCUUG	1124
S-1102	CUGCUAGCUCCAUGCUUGCC	1125
S-1103	CCGACAACCAGUAUUUGGGCCU	1126
S-1104	CCGACAACCAGUAUUUGGGC	1127
S-1105	CCGACAACCAGUAUUUGGG	1128
S-1106	CGACAACCAGUAUUUGGGCC	1129
S-1107	CGACAACCAGUAUUUGGGC	1130
S-1108	GCAAUUCAGUCUCGUUGUACCU	1131
S-1109	GCAAUUCAGUCUCGUUGUAC	1132
S-1110	GCAAUUCAGUCUCGUUGUA	1133
S-1111	CAAUUCAGUCUCGUUGUACC	1134
S-1112	GCAAUUCAGACUCGUUGUACCU	1135
S-1113	GCAAUUCAGACUCGUUGUAC	1136
S-1114	GCAAUUCAGACUCGUUGUA	1137
S-1115	CAAUUCAGACUCGUUGUACC	1138
S-1116	AGCAAUUCAGUCUCGUUGUACC	1139

	S-1117	AGCAAUUCAGUCUCGUUGUAC	1140
	S-1118	AGGUUUAUGAACUGACGUUAC	1141
	S-1119	AGGUUUAUGAACUGACGUUACC	1142
	S-1120	ACCACAAUGUUGUGACUGGAC	1143
	S-1121	ACCACAAUGUUGUGACUGGACC	1144
	S-1122	CCACAAUGUUGUGACUGGACCGU	1145
	S-1123	CCACAAUGUUGUGACUGGACCG	1146
	S-1124	CCACAAUGUUGUGACUGGAC	1147
	S-1125	CACAAUGUUGUGACUGGACC	1148
	S-1126	ACCUGCUAGCUCCAUGCUUCCC	1149
	S-1127	ACCUGCUAGCUCCAUGCUUCC	1150
[0597]	S-1128	ACCUGCUAGCUCCAUGCUUC	1151
	S-1129	CCUGCUAGCUCCAUGCUUCC	1152
	S-1130	CCUGCUAGCUCCAUGCUUC	1153
	S-1131	CUGCUAGCUCCAUGCUUCCC	1154
	S-1132	CUGCUAGCUCCAUGCUUCC	1155
	S-1133	ACCGACAACCAGUAUUUGGACC	1156
	S-1134	ACCGACAACCAGUAUUUGGAC	1157
	S-1135	CCGACAACCAGUAUUUGGACCGU	1158
	S-1136	CCGACAACCAGUAUUUGGACCGU	1159
	S-1137	CCGACAACCAGUAUUUGGAC	1160
	S-1138	CGACAACCAGUAUUUGGACC	1161
	S-1139	CCUGCUAGCACCGUGCUUACC	1162

[0598] 在一个实施方案中,靶向Htt的本发明的siRNA分子可以包含来自表2的反义序列和来自表3的有义序列,或其片段或变体。作为非限制性实例,反义序列和有义序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-

95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%的互补性。

[0599] 在一个实施方案中,靶向Htt的本发明的siRNA分子可以包含表4-6中所述的有义和反义siRNA双链体。作为非限制性实例,可以测试这些siRNA双链体对内源性HTT基因表达的体外抑制活性。将有义和反义序列的起始位点与来自NCBI的称为NM_002111.7 (SEQ ID NO:1163)的HTT基因序列进行比较。

[0600] 表4.HTT dsRNA的有义链和反义链序列

[0601]

siRNA 双链体 ID	SS ID	起始 SS	有义链序列 (5' -3')	SS SEQ ID	AS ID	起始 AS	反义链序列 (5'-3')	AS SEQ ID
D-3566	S-10 58	6751	CCUGCUAGCUCCA UGCUUGCU	1081	A-2002	6751	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGUU	920
D-3567	S-10 58	6751	CCUGCUAGCUCCA UGCUUGCU	1081	A-2014	6748	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGCUU	942
D-3568	S-10 59	6751	CCUGCUAGCUCCA UGCUUGAU	1082	A-2002	6751	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGUU	920
D-3569	S-10 60	6751	CCUGCUAGCUCCA UGCUUAUU	1083	A-2015	6751	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGGU	943
D-3570	S-10 61	6751	CCUGCUAGCUCCA UGCUUGUU	1084	A-2002	6751	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGUU	920
D-3500	S-10 16	1386	UCCAGGUUUAUG AACUGACCC	1033	A-2004	1386	UUCAGUUCAUAA ACCUUGAUU	924

[0602]

D-3501	S-10 23	1386	UCCAGGUUUUAUG AACUGAGCC	1040	A-2004	1386	UUCAGUUCAUAA ACCUGGAUU	924
D-3502	S-10 30	1386	UCCAGGUUUUAUG AACUGAACC	1048	A-2004	1386	UUCAGUUCAUAA ACCUGGAUU	924
D-3503	S-10 37	1386	UCCAGGUUUUUUG AACUGAACC	1058	A-2004	1386	UUCAGUUCAUAA ACCUGGAUU	924
D-3504	S-10 30	1386	UCCAGGUUUUAUG AACUGAACC	1048	A-2001	2066	UGUCGGUACCGU CUAACACUU	918
D-3505	S-10 17	1390	GGUUUAUGAACU GACGUUCCC	1034	A-2005	1389	UAACGUCAGUUC AUA AACCUU	926
D-3506	S-10 24	1390	GGUUUAUGAACU GACGUUGCC	1041	A-2005	1389	UAACGUCAGUUC AUA AACCUU	926
D-3507	S-10 31	1390	GGUUUAUGAACU GACGUUACC	1050	A-2005	1389	UAACGUCAGUUC AUA AACCUU	926
D-3508	S-10 38	1390	GGUUUAUGAUCU GACGUUACC	1059	A-2005	1389	UAACGUCAGUUC AUA AACCUU	926
D-3509	S-10 00	1391	GUUUUAUGAACUG AUCUUACCC	1016	A-2000	1391	UUAACGUCAGUU CAUA AACCUU	916
D-3510	S-10 03	1391	GUUUUAUGAACUG AUCUUAGCC	1019	A-2000	1391	UUAACGUCAGUU CAUA AACCUU	916
D-3511	S-10 06	1391	GUUUUAUGAAGUG AUCUUAACC	1022	A-2000	1391	UUAACGUCAGUU CAUA AACCUU	916
D-3512	S-10 09	1391	GUUUUAUGAACUG AUCUUAACC	1025	A-2000	1391	UUAACGUCAGUU CAUA AACCUU	916
D-3513	S-10 12	1391	GUUUUAUGAACUG AUCUUGCCC	1029	A-2000	1391	UUAACGUCAGUU CAUA AACCUU	916
D-3514	S-10 13	1391	GUUUUAUGAACUG AUCUUGGCC	1030	A-2000	1391	UUAACGUCAGUU CAUA AACCUU	916

[0603]

D-3515	S-10 14	1391	GUUUAUGAACUG AUCUUGACC	1031	A-2000	1391	UUAACGUCAGUU CAUAAACUU	916
D-3516	S-10 18	1429	CCACAAUGUUGU GACUGGCC	1035	A-2006	1428	UCCGGUCACAACA UUGUGGUU	928
D-3517	S-10 25	1429	CCACAAUGUUGU GACUGGGCC	1042	A-2006	1428	UCCGGUCACAACA UUGUGGUU	928
D-3518	S-10 32	1429	CCACAAUGUUGU GACUGGACC	1051	A-2006	1428	UCCGGUCACAACA UUGUGGUU	928
D-3519	S-10 39	1429	CCACAAUGUAGU GACUGGACC	1060	A-2006	1428	UCCGGUCACAACA UUGUGGUU	928
D-3520	S-10 01	2066	GUGUUAGACGGU ACUGAUCCC	1017	A-2001	2066	UGUCGGUACCGU CUAACACUU	918
D-3521	S-10 04	2066	GUGUUAGACGGU ACUGAUGCC	1020	A-2001	2066	UGUCGGUACCGU CUAACACUU	918
D-3522	S-10 07	2066	GUGUUAGACCGU ACUGAUACC	1023	A-2001	2066	UGUCGGUACCGU CUAACACUU	918
D-3523	S-10 10	2066	GUGUUAGACGGU ACUGAUACC	1026	A-2001	2066	UGUCGGUACCGU CUAACACUU	918
D-3524	S-10 21	2079	CCGACAACCAGUA UUUGGCC	1038	A-2009	2078	UCCAAAUACUGG UUGUCGGUU	934
D-3525	S-10 28	2079	CCGACAACCAGUA UUUGGGCC	1045	A-2009	2078	UCCAAAUACUGG UUGUCGGUU	934
D-3526	S-10 35	2079	CCGACAACCAGUA UUUGGACC	1055	A-2009	2078	UCCAAAUACUGG UUGUCGGUU	934
D-3527	S-10 42	2079	CCGACAACCUGUA UUUGGACC	1063	A-2009	2078	UCCAAAUACUGG UUGUCGGUU	934
D-3528	S-10 19	4544	GUCACAAAGAACC GUGUACCC	1036	A-2007	4544	UUGCACGGUUCU UUGUGACUU	930

[0604]

D-3529	S-10 26	4544	GUCACAAAGAACC GUGUAGCC	1043	A-2007	4544	UUGCACGGUUCU UUGUGACUU	930
D-3530	S-10 33	4544	GUCACAAAGAACC GUGUAACC	1052	A-2007	4544	UUGCACGGUUCU UUGUGACUU	930
D-3531	S-10 40	4544	GUCACAAAGUACC GUGUAACC	1061	A-2007	4544	UUGCACGGUUCU UUGUGACUU	930
D-3532	S-10 20	4597	UGAACCCUCUUGU UAUAAAACC	1037	A-2008	4597	UUUUUAACAAG AGGUUCAUU	932
D-3533	S-10 27	4597	UGAACCCUCUUGU UAUAAAGCC	1044	A-2008	4597	UUUUUAACAAG AGGUUCAUU	932
D-3534	S-10 34	4597	UGAACCCUCUUGU UAUAAAACC	1053	A-2008	4597	UUUUUAACAAG AGGUUCAUU	932
D-3535	S-10 41	4597	UGAACCCUCUAGU UAUAAAACC	1062	A-2008	4597	UUUUUAACAAG AGGUUCAUU	932
D-3536	S-10 44	4861	GAUCAUUGGAAU UCCUAAUCC	1065	A-2011	4860	UUUAGGAAUUC AAUGAUCUU	938
D-3537	S-10 46	4861	GAUCAUUGGAAU UCCUAGCC	1067	A-2011	4860	UUUAGGAAUUC AAUGAUCUU	938
D-3538	S-10 48	4861	GAUCAUUGGAAU UCCUAAACC	1070	A-2011	4860	UUUAGGAAUUC AAUGAUCUU	938
D-3539	S-10 50	4861	GAUCAUUGGUU UCCUAAACC	1073	A-2011	4860	UUUAGGAAUUC AAUGAUCUU	938
D-3540	S-10 43	4864	CAUUGGAAUUC UAAAAUUC	1064	A-2010	4864	UAUUUUAGGAAU UCCAUGUU	936
D-3541	S-10 45	4864	CAUUGGAAUUC UAAAAUGCC	1066	A-2010	4864	UAUUUUAGGAAU UCCAUGUU	936
D-3542	S-10 47	4864	CAUUGGAAUUC UAAAAUACC	1068	A-2010	4864	UAUUUUAGGAAU UCCAUGUU	936

[0605]

D-3543	S-10 49	4864	CAUUGGAUACC UAAAAUACC	1072	A-2010	4864	UAUUUUAGGAU UCCAUGUU	936
D-3544	S-10 15	6188	GCAAUUCAGUCU CGUUGUCCC	1032	A-2003	6188	UACAACGAGACU GAAUUGCUU	922
D-3545	S-10 22	6188	GCAAUUCAGUCU CGUUGUGCC	1039	A-2003	6188	UACAACGAGACU GAAUUGCUU	922
D-3546	S-10 29	6188	GCAAUUCAGUCU CGUUGUACC	1046	A-2003	6188	UACAACGAGACU GAAUUGCUU	922
D-3547	S-10 36	6188	GCAAUUCAGACU CGUUGUACC	1057	A-2003	6188	UACAACGAGACU GAAUUGCUU	922
D-3548	S-10 02	6751	CCUGCUAGCUCCA UGCUUCCC	1018	A-2002	6751	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGUU	920
D-3549	S-10 05	6751	CCUGCUAGCUCCA UGCUUGCC	1021	A-2002	6751	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGUU	920
D-3550	S-10 08	6751	CCUGCUAGCACCA UGCUUACC	1024	A-2002	6751	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGUU	920
D-3551	S-10 11	6751	CCUGCUAGCUCCA UGCUUACC	1027	A-2002	6751	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGUU	920

[0606] 表5.HTT dsRNA的有义和反义链序列

[0607]

siRNA 双链体 ID	SS ID	起始 SS	有义链序列(5'-3')	SS SEQ ID	AS ID	起始 AS	反义链序列 (5'-3')	AS SEQ ID
D-3552	S-1051dt	1391	GUUUAUGAACUGAC GUUAAdTdT	107 4	A-2000 dt	1391	UUAACGUCAGUUC AUAAACdTdT	917
D-3553	S-1052dt	2066	GUGUUAGACGGUA CCGACAdTdT	107 5	A-2001 dt	2066	UGUCGGUACCGUC UAACACdTdT	919
D-3554	S-1011dt	6751	CCUGCUAGCUCCAU GCUUAdTdT	102 8	A-2002 dt	6751	UAAGCAUGGAGCU AGCAGGdTdT	921

[0608]

D-3555	S-1053dt	1032 2	AUAUCAGUAAAGAG AUUAAdTdT	107 6	A-2012 dt	1032 2	UUAAUCUCUUUAC UGAUAUdTdT	940
D-3556	S-1030dt	1386	UCCAGGUUUUAUGAA CUGAAdTdT	104 9	A-2004 dt	1386	UUCAGUUCAUAAA CCUGGAdTdT	925
D-3557	S-1054dt	1390	GGUUUAUGAACUG ACGUUAdTdT	107 7	A-2005 dt	1390	UAACGUCAGUUCA UAAACcdTdT	927
D-3558	S-1055dt	1429	CCACAAUGUUGUGA CCGGAdTdT	107 8	A-2006 dt	1429	UCCGGUCACAACA UUGUGGdTdT	929
D-3559	S-1035dt	2079	CCGACAACCAGUAU UUGGAdTdT	105 6	A-2009 dt	2079	UCCAAAUACUGGU UGUCGGdTdT	935
D-3560	S-1056dt	4544	GUCACAAAGAACCG UGCAAdTdT	107 9	A-2007 dt	4544	UUGCACGGUUCUU UGUGACdTdT	931
D-3561	S-1034dt	4597	UGAACCUUCUUGUUA UAAAAdTdT	105 4	A-2008 dt	4597	UUUUUAACAAGA GGUUCAdTdT	933
D-3562	S-1029dt	6188	GCAAUUCAGUCUCG UUGUAdTdT	104 7	A-2003 dt	6188	UACAACGAGACUG AAUUGCdTdT	923
D-3563	S-1047dt	4864	CAUUGGAAUUCUA AAAUAdTdT	106 9	A-2010 dt	4864	UAUUUUAGGAAUU CCAAUGdTdT	937
D-3564	S-1048dt	4861	GAUCAUUGGAAUUC CUAAAdTdT	107 1	A-2011 dt	4861	UUUAGGAAUCCA AUGAUCdTdT	939
D-3565	S-1057dt	4864	CAUUGGAAUUCUA AAAUCdTdT	108 0	A-2013 dt	4864	GAUUUUAGGAAU UCCAUGdTdT	941

[0609] 表6.HTT dsRNA的反义和有义链序列

[0610]

siRNA 双链体 ID	AS ID	起 始 AS	反义链序列 (5'-3')	AS SEQ ID	SS ID	起 始 SS	有义链序列 (5'-3')	SS SEQ ID
D-3569	S-10 60	675 1	CCUGCUAGCUCCA UGCUUAUU	1083	A-201 5	6751	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGGU	943

[0611]

D-3570	S-10 61	675 1	CCUGCUAGCUCCA UGCUUGUU	1084	A-200 2	6751	UAAGCAUGGAGC UAGCAGGUU	920
--------	------------	----------	---------------------------	------	------------	------	---------------------------	-----

[0612] 在其他实施方案中,靶向Htt的本发明的siRNA分子可以在用于递送至细胞的质粒载体、AAV颗粒、病毒基因组或其他核酸表达载体中编码。

[0613] DNA表达质粒可用于在细胞中稳定表达靶向Htt的本发明的siRNA双链体或dsRNA,并实现对靶基因表达的长期抑制。一方面,siRNA双链体的有义和反义链通常通过短间隔序列连接,所述短间隔序列引起称为短发夹RNA(shRNA)的茎-环结构的表达。发夹被Dicer识别并切割,从而生成成熟的siRNA分子。

[0614] 根据本发明,产生了包含编码靶向Htt mRNA的siRNA分子的核酸的AAV颗粒,所述AAV血清型可以是表1中列出的任何血清型。AAV血清型的非限制性实例包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAV-PHP.A和/或AAV-PHP.B,及其变体。

[0615] 在一些实施方案中,本发明的siRNA双链体或编码的dsRNA阻遏(或降解)HTT mRNA。因此,siRNA双链体或编码的dsRNA可用于基本上抑制细胞(例如神经元)中的HTT基因表达。在一些方面,HTT基因表达的抑制是指抑制了至少约20%,优选抑制了至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此,靶基因的蛋白产物可被抑制至少约20%,优选至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[0616] 根据本发明,设计并测试了siRNA分子降低培养细胞中HTT mRNA水平的能力。此类siRNA分子可以形成双链体,例如但不限于包括表4、表5或表6中列出的双链体。作为非限制性实例,siRNA双链体可以是siRNA双链体ID:D-3500至D-3570。

[0617] 在一个实施方案中,siRNA分子包含位于引导链中的与HTT匹配的miRNA种子。在另一个实施方案中,siRNA分子包含位于过客链中的与HTT匹配的miRNA种子。在又一个实施方案中,靶向HTT基因的siRNA双链体或编码的dsRNA不包含位于引导链或过客链中的与HTT匹配的种子。

[0618] 在一个实施方案中,靶向HTT基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对引导链几乎没有显著的全长脱靶效应。在另一个实施方案中,靶向HTT基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对过客链几乎没有显著的全长脱靶效应。靶向HTT基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对过客链具有少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全长脱靶效应。在又一个实施方案中,靶向HTT基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对于引导链或过客链几乎没有显著的全长脱靶效应。靶向HTT基因的siRNA双链

体或编码的dsRNA可对引导链或过客链具有少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全长脱靶效应。

[0619] 在一个实施方案中,靶向HTT基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可以在体外具有高活性。在另一个实施方案中,siRNA分子可以在体外具有低活性。在又一个实施方案中,靶向HTT基因的siRNA双链体或dsRNA在体外可以具有高引导链活性和低过客链活性。

[0620] 在一个实施方案中,靶向HTT的siRNA分子在体外具有高引导链活性和低过客链活性。引导链的目标敲低(KD)可以是至少40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%或100%。引导链的目标敲低可以是40-50%、45-50%、50-55%、50-60%、60-65%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、60-99%、60-99.5%、60-100%、65-70%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、65-99%、65-99.5%、65-100%、70-75%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、70-99%、70-99.5%、70-100%、75-80%、75-85%、75-90%、75-95%、75-99%、75-99.5%、75-100%、80-85%、80-90%、80-95%、80-99%、80-99.5%、80-100%、85-90%、85-95%、85-99%、85-99.5%、85-100%、90-95%、90-99%、90-99.5%、90-100%、95-99%、95-99.5%、95-100%、99-99.5%、99-100%或99.5-100%。作为非限制性实例,引导链的目标敲低(KD)大于70%。作为非限制性实例,引导链的目标敲低(KD)大于60%。

[0621] 在一个实施方案中,对siRNA双链体靶HTT进行了设计,以不存在与非Htt基因序列的有义或反义序列匹配的miRNA种子。

[0622] 在一个实施方案中,最接近脱靶的靶向HTT的siRNA双链体中引导链的 IC_{50} 大于100乘以中靶基因Htt的引导链的 IC_{50} 。作为非限制性实例,如果最接近脱靶的引导链的 IC_{50} 大于100乘以靶引导链的 IC_{50} ,则认为siRNA分子具有体外抑制Htt的高引导链选择性。

[0623] 在一个实施方案中,靶向HTT的siRNA双链体的引导链的5'加工在体外或体内至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体外至少99%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体内至少99%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体外至少90%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体内至少90%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体外至少85%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体内至少85%的时间内在5'端正确开始(n)。

[0624] 在一个实施方案中,当pri-或pre-microRNA通过本领域已知的和本文描述的方法证明比测量加工时的引导链与过客链的比大2倍时,HTT的过客链-引导链双链体被认为是有效的。作为非限制性实例,pri-或pre-microRNA证明比测量加工时的引导链与过客链的比大2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍,或2至5倍、2至10倍、2至15倍、3至5倍、3至10倍、3至15倍、4至5倍、4至10倍、4至15倍、5至10倍、5至15倍、6至10倍、6至15倍、7至10倍、7至15倍、8至10倍、8至15倍、9至10倍、9至15倍、10至15倍、11至

15倍、12至15倍、13至15倍或14至15倍。

[0625] 在一个实施方案中,可通过靶向htt序列上的至少一个外显子,将siRNA分子用于沉默野生型或突变型HTT。外显子可以是外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7、外显子8、外显子9、外显子10、外显子11、外显子12、外显子13、外显子14、外显子15、外显子16、外显子17、外显子18、外显子19、外显子20、外显子21、外显子22、外显子23、外显子24、外显子25、外显子26、外显子27、外显子28、外显子29、外显子30、外显子31、外显子32、外显子33、外显子34、外显子35、外显子36、外显子37、外显子38、外显子39、外显子40、外显子41、外显子42、外显子43、外显子44、外显子45、外显子46、外显子47、外显子48、外显子49、外显子50、外显子51、外显子52、外显子53、外显子54、外显子55、外显子56、外显子57、外显子58、外显子59、外显子60、外显子61、外显子62、外显子63、外显子64、外显子65、外显子66和/或外显子67。作为非限制性实例,可通过靶向外显子1,将siRNA分子用于沉默野生型或突变型HTT。作为另一个非限制性实例,可通过靶向除外显子1以外的外显子,将siRNA分子用于沉默野生型或突变型HTT。作为另一个非限制性实例,可通过靶向外显子50,将siRNA分子用于沉默野生型或突变型HTT。作为另一个非限制性实例,可通过靶向外显子67,将siRNA分子用于沉默野生型或突变型HTT。

[0626] 在一个实施方案中,可通过靶向htt序列上的至少一个外显子,将siRNA分子用于沉默野生型和/或突变型HTT。外显子可以是外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7、外显子8、外显子9、外显子10、外显子11、外显子12、外显子13、外显子14、外显子15、外显子16、外显子17、外显子18、外显子19、外显子20、外显子21、外显子22、外显子23、外显子24、外显子25、外显子26、外显子27、外显子28、外显子29、外显子30、外显子31、外显子32、外显子33、外显子34、外显子35、外显子36、外显子37、外显子38、外显子39、外显子40、外显子41、外显子42、外显子43、外显子44、外显子45、外显子46、外显子47、外显子48、外显子49、外显子50、外显子51、外显子52、外显子53、外显子54、外显子55、外显子56、外显子57、外显子58、外显子59、外显子60、外显子61、外显子62、外显子63、外显子64、外显子65、外显子66和/或外显子67。作为非限制性实例,可通过靶向外显子1,将siRNA分子用于沉默野生型和/或突变型HTT。作为另一个非限制性实例,可通过靶向除外显子1以外的外显子,将siRNA分子用于沉默野生型和/或突变型HTT。作为另一个非限制性实例,可通过靶向外显子50,将siRNA分子用于沉默野生型和/或突变型HTT。作为另一个非限制性实例,可通过靶向外显子67,将siRNA分子用于沉默野生型和/或突变型HTT。

[0627] 靶向SOD1基因的siRNA双链体的设计与序列

[0628] 本发明提供了靶向SOD1 mRNA以干扰SOD1基因表达和/或SOD1蛋白产生的小干扰RNA (siRNA) 双链体 (和编码它们的调节性多核苷酸)。

[0629] 本发明的编码的siRNA双链体包含杂交在一起形成双链体结构的反义链和有义链,其中所述反义链与靶SOD1基因的核酸序列互补,并且其中有义链与靶SOD1基因的核酸序列同源。在一些方面,反义链的5'端具有5'磷酸基团,而有义链的3'端包含3'羟基。在其他方面,在每条链的3'端没有、有一个或有两个核苷酸突出端。

[0630] 在本领域中已经提出了一些设计siRNA的指南。这些指南通常建议生成19个核苷酸的双链体区、对称的2-3个核苷酸的3'突出端、5'-磷酸基团和3'-羟基,靶向待沉默的基因中的区域。其他可能影响siRNA序列偏好的规则包括但不限于:(i)反义链5'端的A/U;

(ii) 有义链5'端的G/C; (iii) 在反义链的5'端三分之一的至少五个A/U残基; 和(iv) 不存在长度超过9个核苷酸的任何GC片段。根据这样的考虑以及靶基因的特定序列, 可以容易地设计阻遏SOD1基因表达所必需的高效siRNA分子。

[0631] 根据本发明, 设计了靶向SOD1基因的siRNA分子(例如, siRNA双链体或编码的dsRNA)。这样的siRNA分子可以特异性地阻遏SOD1基因表达和蛋白产生。在一些方面, siRNA分子被设计用于选择性“敲除”细胞中的SOD1基因变体, 即在ALS疾病患者中识别出的突变的SOD1转录物。在一些方面, siRNA分子被设计用于选择性“敲低”细胞中的SOD1基因变体。在其他方面, siRNA分子能够抑制或阻遏野生型和突变的SOD1基因。

[0632] 在一个实施方案中, 本发明的siRNA分子包含有义链和互补反义链, 其中两条链杂交在一起形成双链体结构。反义链与SOD1 mRNA序列具有足够的互补性以引导靶特异性RNAi, 即, siRNA分子具有足以触发通过RNAi机制或过程破坏靶mRNA的序列。

[0633] 在一个实施方案中, 本发明的siRNA分子包含有义链和互补反义链, 其中两条链杂交在一起形成双链体结构, 并且与SOD1 mRNA杂交的起始位点在SOD1 mRNA序列的核苷酸100至1000之间。作为非限制性实例, 起始位点可以在SOD1 mRNA序列上的核苷酸15-25、15-50、15-75、15-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-70、750-800、800-850、850-900、900-950和950-1000之间。作为另一个非限制性实例, 起始位点可以是SOD1 mRNA序列上的核苷酸26、27、28、29、30、32、33、34、35、36、37、74、76、77、78、149、153、157、160、177、192、193、195、196、197、198、199、206、209、210、239、241、261、263、264、268、269、276、278、281、284、290、291、295、296、316、317、329、330、337、350、351、352、354、357、358、364、375、378、383、384、390、392、395、404、406、417、418、469、470、475、476、480、487、494、496、497、501、504、515、518、522、523、524、552、554、555、562、576、577、578、579、581、583、584、585、587、588、589、593、594、595、596、597、598、599、602、607、608、609、610、611、612、613、616、621、633、635、636、639、640、641、642、643、644、645、654、660、661、666、667、668、669、673、677、692、698、699、700、701、706、749、770、772、775、781、800、804、819、829、832、833、851、854、855、857、858、859、861、869、891、892、906、907、912、913、934、944和947。

[0634] 在一些实施方案中, 反义链和靶SOD1 mRNA序列具有100%的互补性。反义链可以与靶SOD1 mRNA序列的任何部分互补。

[0635] 在其他实施方案中, 反义链和靶SOD1 mRNA序列包含至少一个错配。作为非限制性实例, 反义链和靶SOD1 mRNA序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%的互补性。

[0636] 在一个实施方案中, 靶向SOD1的siRNA或dsRNA包括至少两条彼此互补的序列。

[0637] 根据本发明, 靶向SOD1的siRNA分子的长度为约10-50个或更多个核苷酸, 即每条

链包含10-50个核苷酸(或核苷酸类似物)。优选地,siRNA分子的长度为每条链约15-30个核苷酸,例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸,其中一条链与靶区域充分互补。在一个实施方案中,siRNA分子的每条链的长度为约19至25、19至24或19至21个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为19个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为20个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为21个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为22个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为23个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为24个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链的长度为25个核苷酸。

[0638] 在一些实施方案中,靶向SOD1的本发明的siRNA分子可以是合成的RNA双链体,其包含约19个核苷酸至约25个核苷酸,以及在3'端的两个突出核苷酸。在一些方面,siRNA分子可以是未修饰的RNA分子。在其他方面,siRNA分子可包含至少一个修饰的核苷酸,例如碱基、糖或主链修饰。

[0639] 在一个实施方案中,靶向SOD1的本发明的siRNA分子可以包含核苷酸序列,例如但不限于表7中的反义(引导)序列或其片段或变体。作为非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的反义序列是表7中核苷酸序列的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%。作为另一个非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的反义序列包含表7中核苷酸序列的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或多于21个连续核苷酸。作为另一个非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的反义序列包含表7中序列的核苷酸1至22、1至21、1至20、1至19、1至18、1至17、1至16、1至15、1至14、1至13、1至12、1至11、1至10、1至9、1至8、2至22、2至21、2至20、2至19、2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、3至22、3至21、3至20、3至19、3至18、3至17、3至16、3至15、3至14、3至13、3至12、3至11、3至10、3至9、3至8、4至22、4至21、4至20、4至19、4至18、4至17、4至16、4至15、4至14、4至13、4至12、4至11、4至10、4至9、4至8、5至22、5至21、5至20、5至19、5至18、5至17、5至16、5至15、5至14、5至13、5至12、5至11、5至10、5至9、5至8、6至22、6至21、6至20、6至19、6至18、6至17、6至16、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、7至22、7至21、7至20、7至19、7至18、7至17、7至16、7至15、7至14、7至13、7至12、8至22、8至21、8至20、8至19、8至18、8至17、8至16、8至15、8至14、8至13、8至12、9至22、9至21、9至20、9至19、9至18、9至17、9至16、9至15、9至14、10至22、10至21、10至20、10至19、10至18、10至17、10至16、10至15、10至14、11至22、11至21、11至20、11至19、11至18、11至17、11至16、11至15、11至14、12至22、12至21、12至20、12至19、12至18、12至17、12至16、13至22、13至21、13至20、13至19、13至18、13至17、13至16、14至22、14至21、14至20、14至19、14至18、14至17、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、16至22、16至21、16至20、17至22、17至21或18至22。

[0640] 表7.反义序列

反义 ID	序列	SEQ ID NO
A-3000	UUUAUAGGCCAGACCUCCGdTdT	1164
A-3001	UUUUUAUAGGCCAGACCUCCdTdT	1165
A-3002	UCUUUAUAGGCCAGACCUCdTdT	1166
A-3003	UACUUUAUAGGCCAGACCUdTdT	1167
A-3004	UUACUUUAUAGGCCAGACCDdTdT	1168
A-3005	UACUACUUUAUAGGCCAGAdTdT	1169
A-3006	UGACUACUUUAUAGGCCAGdTdT	1170
A-3007	UCGACUACUUUAUAGGCCAdTdT	1171
[0641] A-3008	UGCGACUACUUUAUAGGCCdTdT	1172
A-3009	UCGCGACUACUUUAUAGGCdTdT	1173
A-3010	UCCGCGACUACUUUAUAGGdTdT	1174
A-3011	UGCUGCAGGAGACUACGACdTdT	1175
A-3012	UACGCUGCAGGAGACUACGdTdT	1176
A-3013	UGACGCUGCAGGAGACUACdTdT	1177
A-3014	UAGACGCUGCAGGAGACUAdTdT	1178
A-3015	UCACGGCCUUCGUCGCCAUdTdT	1179
A-3016	UCGCACACGGCCUUCGUCGdTdT	1180
A-3017	UAGCACGCACACGGCCUUCdTdT	1181

[0642]

A-3018	UUUCAGCACGCACACGGCCdTdT	1182
A-3019	UGCACUGGGCCGUCGCCCUdTdT	1183
A-3020	UAAUUGAUGAUGCCCUGCAdTdT	1184
A-3021	UAAAUUGAUGAUGCCCUGCdTdT	1185
A-3022	UCGAAAUUGAUGAUGCCCUDdTdT	1186
A-3023	UUCGAAAUUGAUGAUGCCCdTdT	1187
A-3024	UCUCGAAAUUGAUGAUGCCdTdT	1188
A-3025	UGCUCGAAAUUGAUGAUGCdTdT	1189
A-3026	UUGCUCGAAAUUGAUGAUGdTdT	1190
A-3027	UUUCCUUCUGCUCGAAAUUdTdT	1191
A-3028	UACUUCCUUCUGCUCGAAAdTdT	1192
A-3029	UUACUUCCUUCUGCUCGAdTdT	1193
A-3030	UAAUGCUUCCCCACACCUdTdT	1194
A-3031	UUUAAUGCUUCCCCACCCdTdT	1195
A-3032	UGCAGGCCUUCAGUCAGUCdTdT	1196
A-3033	UAUGCAGGCCUUCAGUCAGdTdT	1197
A-3034	UCAUGCAGGCCUUCAGUCAdTdT	1198
A-3035	UAAUCCAUGCAGGCCUUCAdTdT	1199
A-3036	UGAAUCCAUGCAGGCCUUCdTdT	1200
A-3037	UGAACAUGGAAUCCAUGCAdTdT	1201
A-3038	UAUGAACAUGGAAUCCAUGdTdT	1202
A-3039	UCUCAUGAACAUGGAAUCCdTdT	1203
A-3040	UAAACUCAUGAACAUGGAAAdTdT	1204
A-3041	UAUCUCCAAACUCAUGAACdTdT	1205
A-3042	UUAUCUCCAAACUCAUGAAAdTdT	1206
A-3043	UGUAUUAUCUCCAAACUCAdTdT	1207
A-3044	UUGUAUUAUCUCCAAACUCdTdT	1208
A-3045	UCCUGCACUGGUACAGCCUdTdT	1209
A-3046	UACCUGCACUGGUACAGCCdTdT	1210

[0643]

A-3047	UAUUAAGUGAGGACCUGCdTdT	1211
A-3048	UGAUUAAGUGAGGACCUGdTdT	1212
A-3049	UGAUAGAGGAUUAAGUGAdTdT	1213
A-3050	UACCGUGUUUUCUGGAUAGdTdT	1214
A-3051	UCACCGUGUUUUCUGGAUAdTdT	1215
A-3052	UCCACCGUGUUUUCUGGAUdTdT	1216
A-3053	UGCCCACCGUGUUUUCUGGdTdT	1217
A-3054	UUUGGCCACCGUGUUUUCdTdT	1218
A-3055	UUUUGGCCACCGUGUUUdTdT	1219
A-3056	UUCAUCCUUUGGCCACCGdTdT	1220
A-3057	UCAUGCCUCUCUCAUCCdTdT	1221
A-3058	UCAACAUGCCUCUCUCAUdTdT	1222
A-3059	UGUCUCCAACAUGCCUCUCdTdT	1223
A-3060	UAGUCUCCAACAUGCCUCdTdT	1224
A-3061	UUGCCCAAGUCUCCAACAdTdT	1225
A-3062	UAUUGCCCAAGUCUCCAACdTdT	1226
A-3063	UCACAUUGCCCAAGUCUCCdTdT	1227
A-3064	UGUCAGCAGUCACAUUGCCdTdT	1228
A-3065	UUUGUCAGCAGUCACAUUGdTdT	1229
A-3066	UCCACACCAUCUUUGUCAGdTdT	1230
A-3067	UGCCACACCAUCUUUGUCAdTdT	1231
A-3068	UAUGCAAUGGUCUCCUGAGdTdT	1232
A-3069	UGAUGCAAUGGUCUCCUGAdTdT	1233
A-3070	UCCAAUGAUGCAAUGGUCUdTdT	1234
A-3071	UGCCAAUGAUGCAAUGGUCdTdT	1235
A-3072	UUGCGGCCAAUGAUGCAAUdTdT	1236
A-3073	UACCAGUGUGCGGCCAAUGdTdT	1237
A-3074	UAUGGACCACCAGUGUGCGdTdT	1238
A-3075	UUCAUGGACCACCAGUGUGdTdT	1239

[0644]

A-3076	UUUCAUGGACCACCAGUGUdTdT	1240
A-3077	UCUUUUUCAUGGACCACCAdTdT	1241
A-3078	UCUGCUUUUCAUGGACCAdTdT	1242
A-3079	UGCCCAAGUCAUCUGCUUdTdT	1243
A-3080	UUUUGCCCAAGUCAUCUGCdTdT	1244
A-3081	UCACCUUUGCCCAAGUCAUdTdT	1245
A-3082	UCCACCUUUGCCCAAGUCAdTdT	1246
A-3083	UUCCACCUUUGCCCAAGUCdTdT	1247
A-3084	UCGUUCCUGUCUUUGUACdTdT	1248
A-3085	UAGCGUUUCCUGUCUUUGUdTdT	1249
A-3086	UCAGCGUUUCCUGUCUUUGdTdT	1250
A-3087	UCGACUCCAGCGUUUCCUdTdT	1251
A-3088	UCACCACAAGCCAAACGACdTdT	1252
A-3089	UACACCACAAGCCAAACGAdTdT	1253
A-3090	UUACACCACAAGCCAAACGdTdT	1254
A-3091	UUUACACCACAAGCCAAACdTdT	1255
A-3092	UAAUUACACCACAAGCCAAAdTdT	1256
A-3093	UCCAAUUACACCACAAGCCdTdT	1257
A-3094	UCCCAUUACACCACAAGCdTdT	1258
A-3095	UUCCCAUUACACCACAAGdTdT	1259
A-3096	UGAUCCCAUUACACCACAdTdT	1260
A-3097	UCGAUCCCAUUACACCACdTdT	1261
A-3098	UGCGAUCCCAUUACACCAdTdT	1262
A-3099	UUUGGGCGAUCCCAUUACdTdT	1263
A-3100	UAUUGGGCGAUCCCAUUAdTdT	1264
A-3101	UUAUUGGGCGAUCCCAUUdTdT	1265
A-3102	UUUAUUGGGCGAUCCCAUdTdT	1266
A-3103	UUUUAUUGGGCGAUCCCAAdTdT	1267
A-3104	UGUUUAUUGGGCGAUCCCAdTdT	1268

[0645]

A-3105	UUGUUUAUUGGGCGAUCCCdTdT	1269
A-3106	UGAAUGUUUAUUGGGCGAUdTdT	1270
A-3107	UCAAGGGAAUGUUUAUUGGdTdT	1271
A-3108	UCCAAGGGAAUGUUUAUUGdTdT	1272
A-3109	UCCAAGGGAAUGUUUAUdTdT	1273
A-3110	UAUCCAAGGGAAUGUUUAUdTdT	1274
A-3111	UCAUCCAAGGGAAUGUUUAdTdT	1275
A-3112	UACAUCCAAGGGAAUGUUdTdT	1276
A-3113	UUACAUCCAAGGGAAUGUUdTdT	1277
A-3114	UGACUACAUCCAAGGGAAUdTdT	1278
A-3115	UCCUCAGACUACAUCCAAGdTdT	1279
A-3116	UUGAGUUAAGGGGCCUCAGdTdT	1280
A-3117	UGAUGAGUUAAGGGGCCUCdTdT	1281
A-3118	UAGAUGAGUUAAGGGGCCUdTdT	1282
A-3119	UACAGAUAGAGUUAAGGGGdTdT	1283
A-3120	UUAACAGAUAGAGUUAAGGGdTdT	1284
A-3121	UAUAACAGAUAGAGUUAAGGdTdT	1285
A-3122	UGAUAACAGAUAGAGUUAAGdTdT	1286
A-3123	UGGAUAACAGAUAGAGUUAAdTdT	1287
A-3124	UAGGAUAACAGAUAGAGUUAdTdT	1288
A-3125	UCAGGAUAACAGAUAGAGUUDdTdT	1289
A-3126	UUACAGCUAGCAGGAUAACdTdT	1290
A-3127	UCAUUUCUACAGCUAGCAGdTdT	1291
A-3128	UACAUUUCUACAGCUAGCAdTdT	1292
A-3129	UAGGAUACAUUUCUACAGCdTdT	1293
A-3130	UCAGGAUACAUUUCUACAGdTdT	1294
A-3131	UUCAGGAUACAUUUCUACAdTdT	1295
A-3132	UAUCAGGAUACAUUUCUACdTdT	1296
A-3133	UGUUUAUCAGGAUACAUUUDdTdT	1297

[0646]

A-3134	UUAAUGUUUAUCAGGAUACdTdT	1298
A-3135	UUAAGAUUACAGUGUUUAAdTdT	1299
A-3136	UCACUUUUUAAGAUUACAGUdTdT	1300
A-3137	UACACUUUUUAAGAUUACAGdTdT	1301
A-3138	UUACACUUUUUAAGAUUACAdTdT	1302
A-3139	UUUACACUUUUUAAGAUUACdTdT	1303
A-3140	UCACAAUUACACUUUUAAAGdTdT	1304
A-3141	UAGUUUCUCACUACAGGUAdTdT	1305
A-3142	UUCUCCAAGUGAUCAUAAAdTdT	1306
A-3143	UAAUCUCCAAGUGAUCAUdTdT	1307
A-3144	UACAAAUCUCCAAGUGAUdTdT	1308
A-3145	UACUAUACAAAUCUCCAdTdT	1309
A-3146	UUUUUAAACUGAGUUUUAUAdTdT	1310
A-3147	UGACAUUUUAAACUGAGUUUdTdT	1311
A-3148	UCAGGUCAUUGAAACAGACdTdT	1312
A-3149	UUGGCAAAAUACAGGUCAUdTdT	1313
A-3150	UGUCUGGCAAAAUACAGGUdTdT	1314
A-3151	UAGUCUGGCAAAAUACAGGdTdT	1315
A-3152	UAUACCCAUCUGUGAUUUAdTdT	1316
A-3153	UUUAAUACCCAUCUGUGAUdTdT	1317
A-3154	UUUUAAUACCCAUCUGUGAdTdT	1318
A-3155	UAGUUUAAUACCCAUCUGUdTdT	1319
A-3156	UAAGUUUAAUACCCAUCUGdTdT	1320
A-3157	UCAAGUUUAAUACCCAUCUdTdT	1321
A-3158	UGACAAGUUUAAUACCCAUdTdT	1322
A-3159	UGAAAUUCUGACAAGUUUAdTdT	1323
A-3160	UAUUCACAGGCUUGAAUGAdTdT	1324
A-3161	UUAUUCACAGGCUUGAAUGdTdT	1325
A-3162	UCCAUCAGGGUUUUUAUUdTdT	1326

[0647]	A-3163	UGCCAUAACAGGGUUUUUAUdTdT	1327
	A-3164	UUAAGUGCCAUAACAGGGUdTdT	1328
	A-3165	UAUAAGUGCCAUAACAGGGUdTdT	1329
	A-3166	UGAUUCUUUUAAUAGCCUCdTdT	1330
	A-3167	UUUUGAAUUUGGAUUCUUdTdT	1331
	A-3168	UUAGUUUGAAUUUGGAUUCdTdT	1332

[0648] 在一个实施方案中,靶向SOD1的本发明的siRNA分子可以包含核苷酸序列,例如但不限于表8中的有义(过客链)序列或其片段或变体。作为非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的有义序列是表8中核苷酸序列的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%。作为另一个非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的有义序列包含表8中核苷酸序列的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或多于21个连续核苷酸。作为另一个非限制性实例,用于本发明的siRNA分子中的有义序列包含表8中序列的核苷酸1至22、1至21、1至20、1至19、1至18、1至17、1至16、1至15、1至14、1至13、1至12、1至11、1至10、1至9、1至8、2至22、2至21、2至20、2至19、2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、3至22、3至21、3至20、3至19、3至18、3至17、3至16、3至15、3至14、3至13、3至12、3至11、3至10、3至9、3至8、4至22、4至21、4至20、4至19、4至18、4至17、4至16、4至15、4至14、4至13、4至12、4至11、4至10、4至9、4至8、5至22、5至21、5至20、5至19、5至18、5至17、5至16、5至15、5至14、5至13、5至12、5至11、5至10、5至9、5至8、6至22、6至21、6至20、6至19、6至18、6至17、6至16、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、7至22、7至21、7至20、7至19、7至18、7至17、7至16、7至15、7至14、7至13、7至12、8至22、8至21、8至20、8至19、8至18、8至17、8至16、8至15、8至14、8至13、8至12、9至22、9至21、9至20、9至19、9至18、9至17、9至16、9至15、9至14、10至22、10至21、10至20、10至19、10至18、10至17、10至16、10至15、10至14、11至22、11至21、11至20、11至19、11至18、11至17、11至16、11至15、11至14、12至22、12至21、12至20、12至19、12至18、12至17、12至16、13至22、13至21、13至20、13至19、13至18、13至17、13至16、14至22、14至21、14至20、14至19、14至18、14至17、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、16至22、16至21、16至20、17至22、17至21或18至22。

[0649] 表8.有义序列

[0650]

有义 ID	序列	SEQ ID NO
S-3000	CGGAGGUCUGGCCUAUAACdTdT	1333
S-3001	GGAGGUCUGGCCUAUAAACdTdT	1334
S-3002	GAGGUCUGGCCUAUAAAGCdTdT	1335
S-3003	AGGUCUGGCCUAUAAAGUCdTdT	1336
S-3004	GGUCUGGCCUAUAAAGUACdTdT	1337
S-3005	UCUGGCCUAUAAAGUAGUCdTdT	1338
S-3006	CUGGCCUAUAAAGUAGUCCdTdT	1339
S-3007	UGGCCUAUAAAGUAGUCGCdTdT	1340
S-3008	GGCCUAUAAAGUAGUCGCCdTdT	1341
S-3009	GCCUAUAAAGUAGUCGCGCdTdT	1342
S-3010	CCUAUAAAGUAGUCGCGGCdTdT	1343
S-3011	GUCGUAGUCUCCUGCAGCCdTdT	1344
S-3012	CGUAGUCUCCUGCAGCGUCdTdT	1345
S-3013	GUAGUCUCCUGCAGCGUCCdTdT	1346

[0651]

S-3014	UAGUCUCCUGCAGCGUCUCdTdT	1347
S-3015	AUGGCGACGAAGGCCGUGCdTdT	1348
S-3016	CGACGAAGGCCGUGUGCGCdTdT	1349
S-3017	GAAGGCCGUGUGCGUGCUCdTdT	1350
S-3018	GGCCGUGUGCGUGCUGAACdTdT	1351
S-3019	AGGGCGACGGCCCAGUGCCdTdT	1352
S-3020	UGCAGGGCAUCAUCAAUUCdTdT	1353
S-3021	GCAGGGCAUCAUCAAUUCdTdT	1354
S-3022	AGGGCAUCAUCAAUUCGCDdTdT	1355
S-3023	GGGCAUCAUCAAUUCGACdTdT	1356
S-3024	GGCAUCAUCAAUUCGAGCdTdT	1357
S-3025	GCAUCAUCAAUUCGAGCCdTdT	1358
S-3026	CAUCAUCAAUUCGAGCACdTdT	1359
S-3027	AAUUCGAGCAGAAGGAACdTdT	1360
S-3028	UUCGAGCAGAAGGAAAGUCdTdT	1361
S-3029	UCGAGCAGAAGGAAAGUACdTdT	1362
S-3030	AAGGUGUGGGGAAGCAUUCdTdT	1363
S-3031	GGUGUGGGGAAGCAUUAACdTdT	1364
S-3032	GACUGACUGAAGGCCUGCCdTdT	1365
S-3033	CUGACUGAAGGCCUGCAUCdTdT	1366
S-3034	UGACUGAAGGCCUGCAUGCdTdT	1367
S-3035	UGAAGGCCUGCAUGGAUUCdTdT	1368
S-3036	GAAGGCCUGCAUGGAUUCdTdT	1369
S-3037	UGCAUGGAUCCAUGUUCdTdT	1370
S-3038	CAUGGAUCCAUGUUCAUCdTdT	1371
S-3039	GGAUCCAUGUUCAUGAGCdTdT	1372
S-3040	UCCAUGUUCAUGAGUUUCdTdT	1373
S-3041	GUUCAUGAGUUUGGAGAUCdTdT	1374
S-3042	UUCAUGAGUUUGGAGAUACdTdT	1375

[0652]

S-3043	UGAGUUUGGAGAUAAUACCDtT	1376
S-3044	GAGUUUGGAGAUAAUACACDdT	1377
S-3045	AGGCUGUACCAGUGCAGGCdT	1378
S-3046	GGCUGUACCAGUGCAGGUCdT	1379
S-3047	GCAGGUCCUCACUUUAAUCdT	1380
S-3048	CAGGUCCUCACUUUAAUCCdT	1381
S-3049	UCACUUUAAUCCUCUAUCCdT	1382
S-3050	CUAUCCAGAAAACACGGUCdT	1383
S-3051	UAUCCAGAAAACACGGUGCdT	1384
S-3052	AUCCAGAAAACACGGUGGCdT	1385
S-3053	CCAGAAAACACGGUGGGCCdT	1386
S-3054	GAAAACACGGUGGGCCAACdT	1387
S-3055	AAAACACGGUGGGCCAAACdT	1388
S-3056	CGGUGGGCCAAAGGAUGACdT	1389
S-3057	AGGAUGAAGAGAGGCAUGCdT	1390
S-3058	AUGAAGAGAGGCAUGUUGCdT	1391
S-3059	GAGAGGCAUGUUGGAGACCdT	1392
S-3060	AGAGGCAUGUUGGAGACUCdT	1393
S-3061	AUGUUGGAGACUUGGGCACdT	1394
S-3062	GUUGGAGACUUGGGCAAUCdT	1395
S-3063	GGAGACUUGGGCAAUGUGCdT	1396
S-3064	GGCAAUGUGACUGCUGACCdT	1397
S-3065	CAAUGUGACUGCUGACAACdT	1398
S-3066	CUGACAAAGAUGGUGUGGCdT	1399
S-3067	UGACAAAGAUGGUGUGGCCdT	1400
S-3068	CUCAGGAGACCAUUGCAUCdT	1401
S-3069	UCAGGAGACCAUUGCAUCCdT	1402
S-3070	AGACCAUUGCAUCAUUGGCdT	1403
S-3071	GACCAUUGCAUCAUUGGCCdT	1404

[0653]

S-3072	AUUGCAUCAUUGGCCGCACdTdT	1405
S-3073	CAUUGGCCGCACACUGGUCdTdT	1406
S-3074	CGCACACUGGUGGUCCAUCdTdT	1407
S-3075	CACACUGGUGGUCCAUGACdTdT	1408
S-3076	ACACUGGUGGUCCAUGAACdTdT	1409
S-3077	UGGUGGUCCAUGAAAAAGCdTdT	1410
S-3078	UGGUCCAUGAAAAAGCAGCdTdT	1411
S-3079	AAAGCAGAUGACUUGGGCCdTdT	1412
S-3080	GCAGAUGACUUGGGCAAACdTdT	1413
S-3081	AUGACUUGGGCAAAGGUGCdTdT	1414
S-3082	UGACUUGGGCAAAGGUGCdTdT	1415
S-3083	GACUUGGGCAAAGGUGGACdTdT	1416
S-3084	GUACAAAGACAGGAAACGCdTdT	1417
S-3085	ACAAAGACAGGAAACGCUCdTdT	1418
S-3086	CAAAGACAGGAAACGCUGCdTdT	1419
S-3087	AGGAAACGCUGGAAGUCGCdTdT	1420
S-3088	GUCGUUUGGCUUGUGGUGCdTdT	1421
S-3089	UCGUUUGGCUUGUGGUGUCdTdT	1422
S-3090	CGUUUGGCUUGUGGUGUACdTdT	1423
S-3091	GUUUGGCUUGUGGUGUAAACdTdT	1424
S-3092	UUGGCUUGUGGUGUAAUUCdTdT	1425
S-3093	GGCUUGUGGUGUAAUUGGCdTdT	1426
S-3094	GCUUGUGGUGUAAUUGGGCdTdT	1427
S-3095	CUUGUGGUGUAAUUGGGACdTdT	1428
S-3096	UGUGGUGUAAUUGGGAUCCdTdT	1429
S-3097	GUGGUGUAAUUGGGAUCGCdTdT	1430
S-3098	UGGUGUAAUUGGGAUCGCCdTdT	1431
S-3099	GUAAUUGGGAUCGCCCAACdTdT	1432
S-3100	UAAUUGGGAUCGCCCAAUCdTdT	1433

[0654]

S-3101	AAUUGGGAUCGCCCAAUACdTdT	1434
S-3102	AUUGGGAUCGCCCAAUAACdTdT	1435
S-3103	UUGGGAUCGCCCAAUAAACdTdT	1436
S-3104	UGGGAUCGCCCAAUAAACCdTdT	1437
S-3105	GGGAUCGCCCAAUAAACACdTdT	1438
S-3106	AUCGCCCAAUAAACAUUCCdTdT	1439
S-3107	CCAAUAAACAUUCCCUUGCdTdT	1440
S-3108	CAAUAAACAUUCCCUUGGCdTdT	1441
S-3109	AAUAAACAUUCCCUUGGACdTdT	1442
S-3110	AUAAACAUUCCCUUGGAUCdTdT	1443
S-3111	UAAACAUUCCCUUGGAUGCdTdT	1444
S-3112	AAACAUUCCCUUGGAUGUCdTdT	1445
S-3113	AACAUUCCCUUGGAUGUACdTdT	1446
S-3114	AUUCCCUUGGAUGUAGUCCdTdT	1447
S-3115	CUUGGAUGUAGUCUGAGGCdTdT	1448
S-3116	CUGAGGCCCCUUAACUCACdTdT	1449
S-3117	GAGGCCCCUUAACUCAUCCdTdT	1450
S-3118	AGGCCCCUUAACUCAUCUCdTdT	1451
S-3119	CCCCUUAACUCAUCUGUUCdTdT	1452
S-3120	CCCUUAACUCAUCUGUUACdTdT	1453
S-3121	CCUUAACUCAUCUGUUAUCdTdT	1454
S-3122	CUUAACUCAUCUGUUAUCCdTdT	1455
S-3123	UUAACUCAUCUGUUAUCCdTdT	1456
S-3124	UAACUCAUCUGUUAUCCUCdTdT	1457
S-3125	AACUCAUCUGUUAUCCUGCdTdT	1458
S-3126	GUUAUCCUGCUAGCUGUACdTdT	1459
S-3127	CUGCUAGCUGUAGAAAUGCdTdT	1460
S-3128	UGCUGCUAGUAGAAAUGUCdTdT	1461
S-3129	GCUGUAGAAAUGUAUCCUCdTdT	1462

[0655]

S-3130	CUGUAGAAAUGUAUCCUGCdTdT	1463
S-3131	UGUAGAAAUGUAUCCUGACdTdT	1464
S-3132	GUAGAAAUGUAUCCUGAUCdTdT	1465
S-3133	AAAUGUAUCCUGAUAAACCDdT	1466
S-3134	GUAUCCUGAUAAACAUUACdTdT	1467
S-3135	UUAAACACUGUAAAUCUUACdTdT	1468
S-3136	ACUGUAAUCUAAAAAGUGCdTdT	1469
S-3137	CUGUAAUCUAAAAAGUGUCdTdT	1470
S-3138	UGUAAUCUAAAAAGUGUACdTdT	1471
S-3139	GUAAUCUAAAAAGUGUAACdTdT	1472
S-3140	CUUAAAAAGUGUAAUUGUGCdTdT	1473
S-3141	UACCUGUAGUGAGAAACUCdTdT	1474
S-3142	UUAUGAUCACUUGGAAGACdTdT	1475
S-3143	AUGAUCACUUGGAAGAUUCdTdT	1476
S-3144	AUCACUUGGAAGAUUUGUCdTdT	1477
S-3145	UGGAAGAUUUGUAUAGUUCdTdT	1478
S-3146	UAUAAAAACUCAGUAAAAACdTdT	1479
S-3147	AAACUCAGUAAAAAUGUCCdTdT	1480
S-3148	GUCUGUUUCA AUGACCUGCdTdT	1481
S-3149	AUGACCUGUAUUUUGCCACdTdT	1482
S-3150	ACCUGUAUUUUGCCAGACCdTdT	1483
S-3151	CCUGUAUUUUGCCAGACUCdTdT	1484
S-3152	UAAAUCACAGAUGGGUAUCdTdT	1485
S-3153	AUCACAGAUGGGUAUUAACdTdT	1486
S-3154	UCACAGAUGGGUAUUAACdTdT	1487
S-3155	ACAGAUGGGUAUUAACUCdTdT	1488
S-3156	CAGAUGGGUAUUAACUUCdTdT	1489
S-3157	AGAUGGGUAUUAACUUGCdTdT	1490
S-3158	AUGGGUAUUAACUUGUCCdTdT	1491

[0656]

S-3159	UAAACUUGUCAGAAUUUCCdTdT	1492
S-3160	UCAUUCAAGCCUGUGAAUCdTdT	1493
S-3161	CAUUCAAGCCUGUGAAUACdTdT	1494
S-3162	AAUAAAAACCCUGUAUGGCdTdT	1495
S-3163	AUAAAAACCCUGUAUGGCCdTdT	1496
S-3164	AACCCUGUAUGGCACUUACdTdT	1497
S-3165	ACCCUGUAUGGCACUUAUCdTdT	1498
S-3166	GAGGCUAUUAAAAGAAUCCdTdT	1499
S-3167	AAAGAAUCCAAAUCAAACdTdT	1500
S-3168	GAAUCCAAAUCAAACUACdTdT	1501

[0657] 在一个实施方案中,靶向SOD1的本发明的siRNA分子可以包含来自表7的反义序列和来自表8的有义序列,或其片段或变体。作为非限制性实例,反义序列和有义序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%的互补性。

[0658] 在一个实施方案中,靶向SOD1的本发明的siRNA分子可以包含表9中所述的有义和反义siRNA双链体。作为非限制性实例,可以测试这些siRNA双链体对内源性SOD1基因表达的体外抑制活性。将有义和反义序列的起始位点与来自NCBI的称为NM_000454.4 (SEQ ID NO: 1502)的SOD1基因序列进行比较。

[0659] 表9.SOD1 dsRNA的有义链和反义链序列

[0660]

siRNA 双链 体 ID	SS ID	有义链序列(5'-3')	SS SEQ ID	AS ID	反义链序列 (5'-3')	AS SEQ ID
D-2741	S-3000	CGGAGGUCUGGCCU AUAACdTdT	1333	A-3000	UUUAUAGGCCAGA CCUCCGdTdT	1164
D-2742	S-3001	GGAGGUCUGGCCUA UAAACdTdT	1334	A-3001	UUUUUAGGCCAG ACCUCCdTdT	1165
D-2743	S-3002	GAGGUCUGGCCUAU AAAGCdTdT	1335	A-3002	UCUUUAGGCCA GACCUCdTdT	1166
D-2744	S-3003	AGGUCUGGCCUAUA AAGUCdTdT	1336	A-3003	UACUUUAGGCC AGACCUdTdT	1167
D-2745	S-3004	GGUCUGGCCUAUAA AGUACdTdT	1337	A-3004	UUACUUUAGGC CAGACCdTdT	1168
D-2746	S-3005	UCUGGCCUAUAAAG UAGUCdTdT	1338	A-3005	UACUACUUUAG GCCAGdTdT	1169
D-2747	S-3006	CUGGCCUAUAAAGU AGUCCdTdT	1339	A-3006	UGACUACUUUA GGCCAGdTdT	1170
D-2748	S-3007	UGGCCUAUAAAGUA GUCGCdTdT	1340	A-3007	UCGACUACUUUA AGGCCdTdT	1171
D-2749	S-3008	GGCCUAUAAAGUAG UCGCCdTdT	1341	A-3008	UGCGACUACUU UAGGCCdTdT	1172
D-2750	S-3009	GCCUAUAAAGUAGU CGCGCdTdT	1342	A-3009	UCGCGACUACUU AUAGGCdTdT	1173
D-2751	S-3010	CCUAUAAAGUAGUC GCGGCdTdT	1343	A-3010	UCCGCGACUACU UAUAGGdTdT	1174
D-2752	S-3011	GUCGUAGUCUCCUG CAGCCdTdT	1344	A-3011	UGCUGCAGGAGAC UACGACdTdT	1175
D-2753	S-3012	CGUAGUCUCCUGCA GCGUCdTdT	1345	A-3012	UACGUCAGGAG ACUACGdTdT	1176

[0661]

D-2754	S-3013	GUAGUCUCCUGCAG CGUCCdTdT	1346	A-3013	UGACGCUGCAGGA GACUACdTdT	1177
D-2755	S-3014	UAGUCUCCUGCAGC GUCUCdTdT	1347	A-3014	UAGACGCUGCAGG AGACUAdTdT	1178
D-2756	S-3015	AUGGCGACGAAGGC CGUGCdTdT	1348	A-3015	UCACGGCCUUCGU CGCCAUdTdT	1179
D-2757	S-3016	CGACGAAGGCCGUG UGCGCdTdT	1349	A-3016	UCGCACACGGCCU UCGUCGdTdT	1180
D-2758	S-3017	GAAGGCCGUGUGCG UGCUCdTdT	1350	A-3017	UAGCACGCACACG GCCUUCdTdT	1181
D-2759	S-3018	GGCCGUGUGCGUG CUGAACdTdT	1351	A-3018	UUUCAGCACGCAC ACGGCCdTdT	1182
D-2760	S-3019	AGGGCGACGGCCCA GUGCCdTdT	1352	A-3019	UGCACUGGGCCGU CGCCCUdTdT	1183
D-2761	S-3020	UGCAGGGCAUCAUC AAUUCdTdT	1353	A-3020	UAAUUGAUGAUGC CCUGCAdTdT	1184
D-2762	S-3021	GCAGGGCAUCAUCA AUUUCdTdT	1354	A-3021	UAAAAUGAUGAUG CCCUGCdTdT	1185
D-2763	S-3022	AGGGCAUCAUCAAU UUCGCdTdT	1355	A-3022	UCGAAAUUGAUGA UGCCCUdTdT	1186
D-2764	S-3023	GGGCAUCAUCAAUU UCGACdTdT	1356	A-3023	UUCGAAAUUGAUG AUGCCCdTdT	1187
D-2765	S-3024	GGCAUCAUCAAUUU CGAGCdTdT	1357	A-3024	UCUCGAAAUUGAU GAUGCCdTdT	1188
D-2766	S-3025	GCAUCAUCAAUUUC GAGCCdTdT	1358	A-3025	UGCUCGAAAUUGA UGAUGCdTdT	1189
D-2767	S-3026	CAUCAUCAAUUUCG AGCACdTdT	1359	A-3026	UUGCUCGAAAUUG AUGAUGdTdT	1190

[0662]

D-2768	S-3027	AAUUUCGAGCAGAA GGAACdTdT	1360	A-3027	UUUCCUUCUGCUC GAAAUUdTdT	1191
D-2769	S-3028	UUCGAGCAGAAGGA AAGUCdTdT	1361	A-3028	UACUUUCCUUCUG CUCGAAdTdT	1192
D-2770	S-3029	UCGAGCAGAAGGAA AGUACdTdT	1362	A-3029	UUACUUUCCUUCU GCUCGAdTdT	1193
D-2771	S-3030	AAGGUGUGGGGAA GCAUUCdTdT	1363	A-3030	UAAUGCUUCCCCA CACCUUdTdT	1194
D-2772	S-3031	GGUGUGGGGAAGC AUUAACdTdT	1364	A-3031	UUUAAUGCUUCCC CACACcdTdT	1195
D-2773	S-3032	GACUGACUGAAGGC CUGCCdTdT	1365	A-3032	UGCAGGCCUUCAG UCAGUCdTdT	1196
D-2774	S-3033	CUGACUGAAGGCCU GCAUCdTdT	1366	A-3033	UAUGCAGGCCUUC AGUCAGdTdT	1197
D-2775	S-3034	UGACUGAAGGCCUG CAUGCdTdT	1367	A-3034	UCAUGCAGGCCUU CAGUCAdTdT	1198
D-2776	S-3035	UGAAGGCCUGCAUG GAUUCdTdT	1368	A-3035	UAAUCCAUGCAGG CCUUCAdTdT	1199
D-2777	S-3036	GAAGGCCUGCAUGG AUUCCdTdT	1369	A-3036	UGAAUCCAUGCAG GCCUUCdTdT	1200
D-2778	S-3037	UGCAUGGAUCCA GUUCCdTdT	1370	A-3037	UGAACAUGGAAUC CAUGCAdTdT	1201
D-2779	S-3038	CAUGGAUCCAUGU UCAUCdTdT	1371	A-3038	UAUGAACAUGGAA UCCAUGdTdT	1202
D-2780	S-3039	GGAUCCAUGUUCA UGAGCdTdT	1372	A-3039	UCUCAUGAACAUG GAAUCCdTdT	1203
D-2781	S-3040	UUCCAUGUUCAUGA GUUUCdTdT	1373	A-3040	UAAACUCAUGAAC AUGGAAdTdT	1204

[0663]

D-2782	S-3041	GUUCAUGAGUUUG GAGAUCdTdT	1374	A-3041	UAUCUCCAAACUC AUGAACdTdT	1205
D-2783	S-3042	UUCAUGAGUUUGG AGAUACdTdT	1375	A-3042	UUAUCUCCAAACU CAUGAAAdTdT	1206
D-2784	S-3043	UGAGUUUGGAGAU AAUACCdTdT	1376	A-3043	UGUAUUAUCUCCA AACUCAdTdT	1207
D-2785	S-3044	GAGUUUGGAGAU AUACACdTdT	1377	A-3044	UUGUAUUAUCUCC AAACUCdTdT	1208
D-2786	S-3045	AGGCUGUACCAGUG CAGGCdTdT	1378	A-3045	UCCUGCACUGGUA CAGCCUdTdT	1209
D-2787	S-3046	GGCUGUACCAGUGC AGGUCdTdT	1379	A-3046	UACCUGCACUGGU ACAGCCdTdT	1210
D-2788	S-3047	GCAGGUCCUCACUU UAAUCdTdT	1380	A-3047	UAUAAAAGUGAGG ACCUGCdTdT	1211
D-2789	S-3048	CAGGUCCUCACUUU AAUCCdTdT	1381	A-3048	UGAUUAAAAGUGAG GACCUGdTdT	1212
D-2790	S-3049	UCACUUUAAUCCUC UAUCCdTdT	1382	A-3049	UGAUAGAGGAUUA AAGUGAdTdT	1213
D-2791	S-3050	CUAUCCAGAAAACA CGGUCdTdT	1383	A-3050	UACCGUGUUUUCU GGAUAGdTdT	1214
D-2792	S-3051	UAUCCAGAAAACAC GGUGCdTdT	1384	A-3051	UCACCGUGUUUUC UGGAUAdTdT	1215
D-2793	S-3052	AUCCAGAAAACACG GUGGCdTdT	1385	A-3052	UCCACCGUGUUUU CUGGAUdTdT	1216
D-2794	S-3053	CCAGAAAACACGGU GGGCCdTdT	1386	A-3053	UGCCCACCGUGUU UUCUGGdTdT	1217
D-2795	S-3054	GAAAACACGGUGGG CCAACdTdT	1387	A-3054	UUUGGCCACCGU GUUUUCdTdT	1218

D-2796	S-3055	AAAACACGGUGGGC CAAACdTdT	1388	A-3055	UUUUGGCCACCG UGUUUdTdT	1219
D-2797	S-3056	CGGUGGGCCAAAGG AUGACdTdT	1389	A-3056	UUCAUCCUUUGGC CCACCGdTdT	1220

[0664]

D-2798	S-3057	AGGAUGAAGAGAG GCAUGCdTdT	1390	A-3057	UCAUGCCUCUCUU CAUCCUdTdT	1221
D-2799	S-3058	AUGAAGAGAGGCAU GUUGCdTdT	1391	A-3058	UCAACAUGCCUCU CUUCAUdTdT	1222
D-2800	S-3059	GAGAGGCAUGUUG GAGACCdTdT	1392	A-3059	UGUCUCCAACAUG CCUCUCdTdT	1223
D-2801	S-3060	AGAGGCAUGUUGG AGACUCdTdT	1393	A-3060	UAGUCUCCAACAU GCCUCUdTdT	1224
D-2802	S-3061	AUGUUGGAGACUU GGGCACdTdT	1394	A-3061	UUGCCAAGUCUC CAACAUdTdT	1225
D-2803	S-3062	GUUGGAGACUUGG GCAAUCdTdT	1395	A-3062	UAUUGCCAAGUC UCCAACdTdT	1226
D-2804	S-3063	GGAGACUUGGGCAA UGUGCdTdT	1396	A-3063	UCACAUUGCCCAA GUCUCCdTdT	1227
D-2805	S-3064	GGCAAUGUGACUGC UGACCdTdT	1397	A-3064	UGUCAGCAGUCAC AUUGCCdTdT	1228
D-2806	S-3065	CAAUGUGACUGCUG ACAACdTdT	1398	A-3065	UUUGUCAGCAGUC ACAUUGdTdT	1229
D-2807	S-3066	CUGACAAAGAUGGU GUGGCdTdT	1399	A-3066	UCCACACCAUCUU UGUCAGdTdT	1230
D-2808	S-3067	UGACAAAGAUGGUG UGGCCdTdT	1400	A-3067	UGCCACACCAUCU UUGUCAdTdT	1231
D-2809	S-3068	CUCAGGAGACCAUU GCAUCdTdT	1401	A-3068	UAUGCAAUGGUCU CCUGAGdTdT	1232

[0665]

D-2810	S-3069	UCAGGAGACCAUUG CAUCCdTdT	1402	A-3069	UGAUGCAAUGGUC UCCUGAdTdT	1233
D-2811	S-3070	AGACCAUUGCAUCA UUGGCdTdT	1403	A-3070	UCCAAUGAUGCAA UGGUCUdTdT	1234
D-2812	S-3071	GACCAUUGCAUCAU UGGCCdTdT	1404	A-3071	UGCCAAUGAUGCA AUGGUCdTdT	1235
D-2813	S-3072	AUUGCAUCAUUGGC CGCACdTdT	1405	A-3072	UUGCGGCCAAUGA UGCAAUdTdT	1236
D-2814	S-3073	CAUUGGCCGCACAC UGGUCdTdT	1406	A-3073	UACCAGUGUGCGG CCA AUGdTdT	1237
D-2815	S-3074	CGCACACUGGUGGU CCAUCdTdT	1407	A-3074	UAUGGACCACCAG UGUGCGdTdT	1238
D-2816	S-3075	CACACUGGUGGUCC AUGACdTdT	1408	A-3075	UUCAUGGACCACC AGUGUGdTdT	1239
D-2817	S-3076	ACACUGGUGGUCCA UGAACdTdT	1409	A-3076	UUUCAUGGACCAC CAGUGUdTdT	1240
D-2818	S-3077	UGGUGGUCCAUGAA AAAGCdTdT	1410	A-3077	UCUUUUUCAUGGA CCACCAdTdT	1241
D-2819	S-3078	UGGUCCAUGAAAA GCAGCdTdT	1411	A-3078	UCUGCUUUUCAU GGACCAdTdT	1242
D-2820	S-3079	AAAGCAGAUGACUU GGGCCdTdT	1412	A-3079	UGCCCAAGUCAUC UGCUUUdTdT	1243
D-2821	S-3080	GCAGAUGACUUGG GCAAACdTdT	1413	A-3080	UUUUGCCCAAGUC AUCUGCdTdT	1244
D-2822	S-3081	AUGACUUGGGCAAA GGUGCdTdT	1414	A-3081	UCACCUUUGCCCA AGUCAUdTdT	1245
D-2823	S-3082	UGACUUGGGCAAAG GUGGCdTdT	1415	A-3082	UCCACCUUUGCCC AAGUCAdTdT	1246

[0666]

D-2824	S-3083	GACUUGGGCAAAGG UGGACdTdT	1416	A-3083	UUCCACCUUUGCC CAAGUCdTdT	1247
D-2825	S-3084	GUACAAAGACAGGA AACGCdTdT	1417	A-3084	UCGUUUCUGUCU UUGUACdTdT	1248
D-2826	S-3085	ACAAAGACAGGAAA CGCUCdTdT	1418	A-3085	UAGCGUUUCCUGU CUUUGUdTdT	1249
D-2827	S-3086	CAAAGACAGGAAAC GCUGCdTdT	1419	A-3086	UCAGCGUUUCCUG UCUUUGdTdT	1250
D-2828	S-3087	AGGAAACGCUGGAA GUCGCdTdT	1420	A-3087	UCGACUCCAGCG UUUCCUdTdT	1251
D-2829	S-3088	GUCGUUUGGCUUG UGGUGCdTdT	1421	A-3088	UCACCACAAGCCAA ACGACdTdT	1252
D-2830	S-3089	UCGUUUGGCUUGU GGUGUCdTdT	1422	A-3089	UACACCACAAGCCA AACGAdTdT	1253
D-2831	S-3090	CGUUUGGCUUGUG GUGUACdTdT	1423	A-3090	UUACACCACAAGC CAAACGdTdT	1254
D-2832	S-3091	GUUUGGCUUGUGG UGUAACdTdT	1424	A-3091	UUUACACCACAAG CCAAACdTdT	1255
D-2833	S-3092	UUGGCUUGUGGUG UAAUUCdTdT	1425	A-3092	UAAUACACCACA AGCCAAAdTdT	1256
D-2834	S-3093	GGCUUGUGGUGUA AUUGGCdTdT	1426	A-3093	UCCAAUACACCA CAAGCCdTdT	1257
D-2835	S-3094	GCUUGUGGUGUAA UUGGGCdTdT	1427	A-3094	UCCCAAUACACC ACAAGCdTdT	1258
D-2836	S-3095	CUUGUGGUGUAAU UGGGACdTdT	1428	A-3095	UUCCAAUACAC CACAAGdTdT	1259
D-2837	S-3096	UGUGGUGUAAUUG GGAUCCdTdT	1429	A-3096	UGAUCCCAAUAC ACCACAdTdT	1260

[0667]

D-2838	S-3097	GUGGUGUAAUUGG GAUCGCdTdT	1430	A-3097	UCGAUCCCAAUUA CACCACdTdT	1261
D-2839	S-3098	UGGUGUAAUUGGG AUCGCCdTdT	1431	A-3098	UGCGAUCCCAAUU ACACCAdTdT	1262
D-2840	S-3099	GUAUUUGGGAUCG CCCAACdTdT	1432	A-3099	UUUGGGCGAUCCC AAUUACdTdT	1263
D-2841	S-3100	UAAUUGGGAUCGCC CAAUCdTdT	1433	A-3100	UAUUGGGCGAUCC CAAUUAdTdT	1264
D-2842	S-3101	AAUUGGGAUCGCCC AAUACdTdT	1434	A-3101	UUAUUGGGCGAUC CCAAUudTdT	1265
D-2843	S-3102	AUUGGGAUCGCCCA AUAACdTdT	1435	A-3102	UUUAUUGGGCGA UCCCAAudTdT	1266
D-2844	S-3103	UUGGGAUCGCCCAA UAAACdTdT	1436	A-3103	UUUUUUGGGCG AUCCCAAdTdT	1267
D-2845	S-3104	UGGGAUCGCCCAAU AAACCdTdT	1437	A-3104	UGUUUUGGGC GAUCCAdTdT	1268
D-2846	S-3105	GGGAUCGCCCAAUA AACACdTdT	1438	A-3105	UUGUUUUGGG CGAUCCdTdT	1269
D-2847	S-3106	AUCGCCCAAUAAC AUUCCdTdT	1439	A-3106	UGAAUGUUUAUU GGGCGAUdTdT	1270
D-2848	S-3107	CCAAUAAACAUUCC CUUGCdTdT	1440	A-3107	UCAAGGGAAUGUU UAUUGGdTdT	1271
D-2849	S-3108	CAAUAAACAUUCCC UUGGCdTdT	1441	A-3108	UCCAAGGGAAUGU UUUUGdTdT	1272
D-2850	S-3109	AAUAAACAUUCCCU UGGACdTdT	1442	A-3109	UUCCAAGGGAAUG UUUUAUdTdT	1273
D-2851	S-3110	AUAAACAUUCCCUU GGAUCdTdT	1443	A-3110	UAUCCAAGGGAAU GUUUAUdTdT	1274

[0668]

D-2852	S-3111	UAAACAUUCCCUUG GAUGCdTdT	1444	A-3111	UCAUCCAAGGGAA UGUUUAdTdT	1275
D-2853	S-3112	AAACAUUCCCUUGG AUGUCdTdT	1445	A-3112	UACAUCCAAGGGA AUGUUUdTdT	1276
D-2854	S-3113	AACAUUCCCUUGGA UGUACdTdT	1446	A-3113	UUACAUCCAAGGG AAUGUUdTdT	1277
D-2855	S-3114	AUUCCCUUGGAUGU AGUCCdTdT	1447	A-3114	UGACUACAUCCAA GGGAUdTdT	1278
D-2856	S-3115	CUUGGAUGUAGUC UGAGGCdTdT	1448	A-3115	UCCUCAGACUACA UCCAAGdTdT	1279
D-2857	S-3116	CUGAGGCCCUUAA CUCACdTdT	1449	A-3116	UUGAGUUAAGGG GCCUCAGdTdT	1280
D-2858	S-3117	GAGGCCCUUAACU CAUCCdTdT	1450	A-3117	UGAUGAGUUAAGG GGCCUCdTdT	1281
D-2859	S-3118	AGGCCCUUAACUC AUCUCdTdT	1451	A-3118	UAGAUGAGUUAAG GGCCUdTdT	1282
D-2860	S-3119	CCCUUAACUCAUC UGUUCdTdT	1452	A-3119	UACAGAUGAGUU AAGGGdTdT	1283
D-2861	S-3120	CCCUUAACUCAUCU GUUACdTdT	1453	A-3120	UUAACAGAUGAGU UAAGGGdTdT	1284
D-2862	S-3121	CCUUAACUCAUCUG UUAUCdTdT	1454	A-3121	UAUAACAGAUGAG UUAAGGdTdT	1285
D-2863	S-3122	CUUAACUCAUCUGU UAUCCdTdT	1455	A-3122	UGAUACAGAUGA GUUAAGdTdT	1286
D-2864	S-3123	UUAACUCAUCUGUU AUCCdTdT	1456	A-3123	UGGAUAACAGAUG AGUUAdTdT	1287
D-2865	S-3124	UAACUCAUCUGUUA UCCUCdTdT	1457	A-3124	UAGGAUAACAGAU GAGUUAdTdT	1288

[0669]

D-2866	S-3125	AACUCAUCUGUUUAU CCUGCdTdT	1458	A-3125	UCAGGAUAACAGA UGAGUUdTdT	1289
D-2867	S-3126	GUUAUCCUGCUAGC UGUACdTdT	1459	A-3126	UUACAGCUAGCAG GAUAACdTdT	1290
D-2868	S-3127	CUGCUAGCUGUAGA AAUGCdTdT	1460	A-3127	UCAUUUCUACAGC UAGCAGdTdT	1291
D-2869	S-3128	UGCUAGCUGUAGAA AUGUCdTdT	1461	A-3128	UACAUUUCUACAG CUAGCAdTdT	1292
D-2870	S-3129	GCUGUAGAAAUGUA UCCUCdTdT	1462	A-3129	UAGGAUACAUUUC UACAGCdTdT	1293
D-2871	S-3130	CUGUAGAAAUGUAU CCUGCdTdT	1463	A-3130	UCAGGAUACAUUU CUACAGdTdT	1294
D-2872	S-3131	UGUAGAAAUGUAUC CUGACdTdT	1464	A-3131	UUCAGGAUACAUU UCUACAdTdT	1295
D-2873	S-3132	GUAGAAAUGUAUCC UGAUCdTdT	1465	A-3132	UAUCAGGAUACAU UUCUACdTdT	1296
D-2874	S-3133	AAAUGUAUCCUGAU AAACcdTdT	1466	A-3133	UGUUUAUCAGGAU ACAUUUdTdT	1297
D-2875	S-3134	GUAUCCUGAUAAAC AUUACdTdT	1467	A-3134	UUA AUGUUUAUCA GGAUACdTdT	1298
D-2876	S-3135	UUAACACUGUAAU CUUACdTdT	1468	A-3135	UUAAGAUUACAGU GUUUAAdTdT	1299
D-2877	S-3136	ACUGUAAUCUAAAA AGUGCdTdT	1469	A-3136	UCACUUUUAAAGAU UACAGUdTdT	1300
D-2878	S-3137	CUGUAAUCUAAAA GUGUCdTdT	1470	A-3137	UACACUUUUAAAGA UUACAGdTdT	1301
D-2879	S-3138	UGUAAUCUAAAAAG UGUACdTdT	1471	A-3138	UUACACUUUUAAAG AUUACAdTdT	1302

[0670]

D-2880	S-3139	GUAAUCUUAAAAGU GUAACdTdT	1472	A-3139	UUUACACUUUUAA GAUUACdTdT	1303
D-2881	S-3140	CUUAAAAGUGUAAU UGUGCdTdT	1473	A-3140	UCACAAUUCACU UUUAAGdTdT	1304
D-2882	S-3141	UACCUGUAGUGAGA AACUCdTdT	1474	A-3141	UAGUUUCUCACUA CAGGUAdTdT	1305
D-2883	S-3142	UUAUGAUCACUUG GAAGACdTdT	1475	A-3142	UUCUCCAAGUGA UCAUAAdTdT	1306
D-2884	S-3143	AUGAUCACUUGGAA GAUUCdTdT	1476	A-3143	UAAUCUCCAAGU GAUCAUdTdT	1307
D-2885	S-3144	AUCACUUGGAAGAU UUGUCdTdT	1477	A-3144	UACAAUUCUCCA AGUGAUdTdT	1308
D-2886	S-3145	UGGAAGAUUUGUA UAGUUCdTdT	1478	A-3145	UAACUUAACAAU CUUCCAdTdT	1309
D-2887	S-3146	UAUAAAACUCAGUU AAAACdTdT	1479	A-3146	UUUUUAAACUGAG UUUUUAUAdTdT	1310
D-2888	S-3147	AAACUCAGUAAAA UGUCCdTdT	1480	A-3147	UGACAUUUUAACU GAGUUUdTdT	1311
D-2889	S-3148	GUCUGUUUCAUG ACCUGCdTdT	1481	A-3148	UCAGGUCAUUGAA ACAGACdTdT	1312
D-2890	S-3149	AUGACCUGUAUUU UGCCACdTdT	1482	A-3149	UUGGCAAAUACA GGUCAUdTdT	1313
D-2891	S-3150	ACCUGUUUUUUGCC AGACcdTdT	1483	A-3150	UGUCUGGCAAAU ACAGGUdTdT	1314
D-2892	S-3151	CCUGUAUUUUUGCCA GACUCdTdT	1484	A-3151	UAGUCUGGCAAAA UACAGGdTdT	1315
D-2893	S-3152	UAAUCACAGAUGG GUAUCdTdT	1485	A-3152	UAUACCAUCUGU GAUUUAdTdT	1316

[0671]

D-2894	S-3153	AUCACAGAUGGGUA UUAACdTdT	1486	A-3153	UUUAAUACCCAUC UGUGAUdTdT	1317
D-2895	S-3154	UCACAGAUGGGUAAU UAAACdTdT	1487	A-3154	UUUUAAUACCCAUC CUGUGAdTdT	1318
D-2896	S-3155	ACAGAUGGGUAAUU AAACUCdTdT	1488	A-3155	UAGUUUAAUACCC AUCUGUdTdT	1319
D-2897	S-3156	CAGAUGGGUAAUAAA ACUUCdTdT	1489	A-3156	UAAGUUUAAUACC CAUCUGdTdT	1320
D-2898	S-3157	AGAUGGGUAAUAAA ACUUGCdTdT	1490	A-3157	UCAAGUUUAAUAC CCAUCUdTdT	1321
D-2899	S-3158	AUGGGUAAUAAAAC UUGUCCdTdT	1491	A-3158	UGACAAGUUUAAU ACCCAUdTdT	1322
D-2900	S-3159	UAAACUUGUCAGAA UUUCCdTdT	1492	A-3159	UGAAAUUCUGACA AGUUUAdTdT	1323
D-2901	S-3160	UCAUUCAAGCCUGU GAAUCdTdT	1493	A-3160	UAUUCACAGGCUU GAAUGAdTdT	1324
D-2902	S-3161	CAUUCAAGCCUGUG AAUACdTdT	1494	A-3161	UUAUUCACAGGCU UGAAUGdTdT	1325
D-2903	S-3162	AAUAAAACCCUGU AUGGCdTdT	1495	A-3162	UCCAUCAGGGUU UUUAAUdTdT	1326
D-2904	S-3163	AUAAAACCCUGUA UGGCCdTdT	1496	A-3163	UGCCAUCAGGGU UUUUAAUdTdT	1327
D-2905	S-3164	AACCCUGUAUGGCA CUUACdTdT	1497	A-3164	UUAAGUGCCAUA AGGGUUdTdT	1328
D-2906	S-3165	ACCCUGUAUGGCAC UUAUCdTdT	1498	A-3165	UAUAAGUGCCAUA CAGGGUdTdT	1329
D-2907	S-3166	GAGGCUAAUAAAAG AAUCCdTdT	1499	A-3166	UGAUUCUUUAAU AGCCUCdTdT	1330

[0672]	D-2908	S-3167	AAAGAAUCCAAAUU CAAACdTdT	1500	A-3167	UUUUGAAUUUGG AUUCUUUdTdT	1331
	D-2909	S-3168	GAAUCCAAAUUCA ACUACdTdT	1501	A-3168	UUAGUUUGAAUU UGGAUUCdTdT	1332

[0673] 在其他实施方案中,靶向SOD1的本发明的siRNA分子可以在用于递送至细胞的质粒载体、AAV颗粒、病毒基因组或其他核酸表达载体中编码。

[0674] DNA表达质粒可用于在细胞中稳定表达靶向SOD1的本发明的siRNA双链体或dsRNA,并实现对靶基因表达的长期抑制。一方面,siRNA双链体的有义和反义链通常通过短间隔序列连接,所述短间隔序列引起称为短发夹RNA(shRNA)的茎-环结构的表达。发夹被Dicer识别并切割,从而生成成熟的siRNA分子。

[0675] 根据本发明,产生了包含编码靶向SOD1 mRNA的siRNA分子的核酸的AAV颗粒,所述AAV血清型可以是表1中列出的任何血清型。AAV血清型的非限制性实例包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAV-PHP.A、AAV-PHP.B、AAVPHP.B2、AAVPHP.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、AAVG2B4、AAVG2B5及其变体。

[0676] 在一些实施方案中,本发明的siRNA双链体或编码的dsRNA阻遏(或降解)SOD1 mRNA。因此,siRNA双链体或编码的dsRNA可用于基本上抑制细胞中的SOD1基因表达。在一些方面,SOD1基因表达的抑制是指抑制了至少约20%,优选抑制了至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此,靶基因的蛋白产物可被抑制至少约20%,优选至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[0677] 根据本发明,设计并测试了siRNA分子降低培养细胞中SOD1 mRNA水平的能力。此类siRNA分子可以形成双链体,例如但不限于包括表9中列出的双链体。作为非限制性实例,

siRNA双链体可以是siRNA双链体ID:D-2741至D-2909。

[0678] 在一个实施方案中,siRNA分子包含位于引导链中的与SOD1匹配的miRNA种子。在另一个实施方案中,siRNA分子包含位于过客链中的与SOD1匹配的miRNA种子。在又一个实施方案中,靶向SOD1基因的siRNA双链体或编码的dsRNA不包含位于引导链或过客链中的与SOD1匹配的种子。

[0679] 在一个实施方案中,靶向SOD1基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对引导链几乎没有显著的全长脱靶效应。在另一个实施方案中,靶向SOD1基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对过客链几乎没有显著的全长脱靶效应。靶向SOD1基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对过客链具有少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全长脱靶效应。在又一个实施方案中,靶向SOD1基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对于引导链或过客链几乎没有显著的全长脱靶效应。靶向SOD1基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可对引导链或过客链具有少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全长脱靶效应。

[0680] 在一个实施方案中,靶向SOD1基因的siRNA双链体或编码的dsRNA可以在体外具有高活性。在另一个实施方案中,siRNA分子可以在体外具有低活性。在又一个实施方案中,靶向SOD1基因的siRNA双链体或dsRNA在体外可以具有高引导链活性和低过客链活性。

[0681] 在一个实施方案中,靶向SOD1的siRNA分子在体外具有高引导链活性和低过客链活性。引导链的目标敲低(KD)可以是至少40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%或100%。引导链的目标敲低可以是40-50%、45-50%、50-55%、50-60%、60-65%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、60-99%、60-99.5%、60-100%、65-70%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、65-99%、65-99.5%、65-100%、70-75%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、70-99%、70-99.5%、70-100%、75-80%、75-85%、75-90%、75-95%、75-99%、75-99.5%、75-100%、80-85%、80-90%、80-95%、80-99%、80-99.5%、80-100%、85-90%、85-95%、85-99%、85-99.5%、85-100%、90-95%、90-99%、90-99.5%、90-100%、95-99%、95-99.5%、95-100%、99-99.5%、99-100%或99.5-100%。作为非限制性实例,引导链的目标敲低(KD)大于70%。作为非限制性实例,引导链的目标敲低(KD)大于60%。

[0682] 在一个实施方案中,对siRNA双链体靶SOD1进行了设计,以不存在与非SOD1基因序列的有义或反义序列匹配的miRNA种子。

[0683] 在一个实施方案中,最接近脱靶的靶向SOD1的siRNA双链体中引导链的 IC_{50} 大于100乘以中靶基因SOD1的引导链的 IC_{50} 。作为非限制性实例,如果最接近脱靶的引导链的 IC_{50} 大于100乘以靶引导链的 IC_{50} ,则认为siRNA分子具有体外抑制SOD1的高引导链选择性。

[0684] 在一个实施方案中,靶向SOD1的siRNA双链体的引导链的5'加工在体外或体内至

少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体外至少99%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体内至少99%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体外至少90%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体内至少90%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体外至少85%的时间内在5'端正确开始(n)。作为非限制性实例,引导链的5'加工是精确的,并且在体内至少85%的时间内在5'端正确开始(n)。

[0685] 在一个实施方案中,当pri-或pre-microRNA通过本领域已知的和本文描述的方法证明比测量加工时的引导链与过客链的比大2倍时,SOD1的过客链-引导链双链体被认为是有效的。作为非限制性实例,pri-或pre-microRNA证明比测量加工时的引导链与过客链的比大2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍,或2至5倍、2至10倍、2至15倍、3至5倍、3至10倍、3至15倍、4至5倍、4至10倍、4至15倍、5至10倍、5至15倍、6至10倍、6至15倍、7至10倍、7至15倍、8至10倍、8至15倍、9至10倍、9至15倍、10至15倍、11至15倍、12至15倍、13至15倍或14至15倍。

[0686] 在一个实施方案中,可通过靶向SOD1序列上的至少一个外显子,将siRNA分子用于沉默野生型或突变型SOD1。外显子可以是外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7、外显子8、外显子9、外显子10、外显子11、外显子12、外显子13、外显子14、外显子15、外显子16、外显子17、外显子18、外显子19、外显子20、外显子21、外显子22、外显子23、外显子24、外显子25、外显子26、外显子27、外显子28、外显子29、外显子30、外显子31、外显子32、外显子33、外显子34、外显子35、外显子36、外显子37、外显子38、外显子39、外显子40、外显子41、外显子42、外显子43、外显子44、外显子45、外显子46、外显子47、外显子48、外显子49、外显子50、外显子51、外显子52、外显子53、外显子54、外显子55、外显子56、外显子57、外显子58、外显子59、外显子60、外显子61、外显子62、外显子63、外显子64、外显子65、外显子66和/或外显子67。

[0687] siRNA修饰

[0688] 在一些实施方案中,本发明的siRNA分子当不作为前体或DNA递送时,可以被化学修饰以调节RNA分子的一些特征,例如但不限于增加体内siRNA的稳定性。化学修饰的siRNA分子可用于人类治疗应用,并且在不损害siRNA分子的RNAi活性的情况下得到提高。作为非限制性实例,siRNA分子在有义链和反义链的3'和5'端均被修饰。

[0689] 在一些方面,本发明的siRNA双链体可包含一个或多个修饰的核苷酸,例如但不限于糖修饰的核苷酸、核碱基修饰和/或主链修饰。在一些方面,siRNA分子可包含组合的修饰,例如组合的核碱基和主链修饰。

[0690] 在一个实施方案中,修饰的核苷酸可以是糖修饰的核苷酸。糖修饰的核苷酸包括但不限于2'-氟、2'-氨基和2'-硫代修饰的核糖核苷酸,例如2'-氟修饰的核糖核苷酸。修饰的核苷酸可以在糖部分以及具有不是核糖基的糖或其类似物的核苷酸上被修饰。例如,糖部分可以是或基于甘露糖、阿拉伯糖、吡喃葡萄糖、吡喃半乳糖,4'-硫代核糖和其他糖、杂环或碳环。

[0691] 在一个实施方案中,修饰的核苷酸可以是核碱基修饰的核苷酸。

[0692] 在一个实施方案中,修饰的核苷酸可以是主链修饰的核苷酸。在一些实施方案中,本发明的siRNA双链体还可以在主链上包含其他修饰。本文所用的正常“主链”是指DNA或RNA分子中重复的交替糖-磷酸序列。脱氧核糖/核糖在3'-羟基和5'-羟基处均与酯键中的磷酸基团连接,也称为“磷酸二酯”键/接头(P0键)。P0主链可被修饰为“硫代磷酸酯主链(PS键)”。在某些情况下,天然磷酸二酯键可以被酰胺键取代,但两个糖单元之间仍保留4个原子。此类酰胺修饰可促进寡核苷酸的固相合成,并增加与siRNA互补物形成的双链体的热力学稳定性。参见例如Mesmaeker等人,Pure&Appl.Chem.,1997,3,437-440;其内容通过引用整体并入本文。

[0693] 修饰的碱基是指已经通过取代或添加一个或多个原子或基团修饰的核苷酸碱基,例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黄嘌呤、肌苷和Q苷。核碱基部分的修饰的一些实例包括但不限于单独地或组合的烷基化、卤化、硫醇化、胺化、酰胺化或乙酰化的碱基。更具体的实例包括例如5-丙炔基尿苷、5-丙炔基胞苷、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、N,N,-二甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、2-氨基腺嘌呤、1-甲基肌苷、3-甲基尿苷、5-甲基胞苷、5-甲基尿苷和在5位具有修饰的其他核苷酸、5-(2-氨基)丙基尿苷、5-卤代胞苷、5-卤代尿苷、4-乙酰基胞苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、3-甲基胞苷、6-甲基尿苷、2-甲基鸟苷、7-甲基鸟苷、2,2-二甲基鸟苷、5-甲基氨基乙基尿苷、5-甲氧基尿苷、脱氮核苷酸(例如7-脱氮-腺苷)、6-偶氮尿苷、6-偶氮胞苷、6-偶氮胸苷、5-甲基-2-硫代尿苷、其他硫代碱基(例如2-硫代尿苷和4-硫代尿苷和2-硫代胞苷)、二氢尿苷、假尿苷、Q苷、古嘌呤、萘基和取代的萘基、任何O-和N-烷基化的嘌呤和嘧啶(例如N6-甲基腺苷)、5-甲基羰基甲基尿苷、尿苷5-氧乙酸、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基和修饰的苯基(例如氨基苯酚或2,4,6-三甲氧基苯)、充当G钳位核苷酸(G-clamp nucleotide)的修饰的胞嘧啶、8位取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-取代的尿嘧啶和胸腺嘧啶、氮杂嘧啶、羧基羟烷基核苷酸、羧基烷基氨基烷基核苷酸和烷基羰基烷基化核苷酸。

[0694] 在一个实施方案中,修饰的核苷酸可以仅在有义链上。

[0695] 在另一个实施方案中,修饰的核苷酸可以仅在反义链上。

[0696] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸可以在有义链和反义链中。

[0697] 在一些实施方案中,化学修饰的核苷酸不影响反义链与靶mRNA序列配对的能力。

[0698] 在一个实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以编码作为多顺反子分子的siRNA分子。siRNA分子可在siRNA分子的区域之间另外包含一个或多个接头。

[0699] 分子支架

[0700] 在一个实施方案中,可以在还包含分子支架的调节性多核苷酸中编码siRNA分子。如本文所用,“分子支架”是框架或起始分子,其形成设计或制备后续分子所依据的序列或结构基础。

[0701] 在一个实施方案中,分子支架包含至少一个5'侧翼区。作为非限制性实例,5'侧翼区可以包含5'侧翼序列,其可以具有任何长度,并且可以全部或部分源自野生型microRNA序列,或者是完全人工的序列。

[0702] 在一个实施方案中,分子支架包含至少一个3'侧翼区。作为非限制性实例,3'侧翼区可以包含3'侧翼序列,其可以具有任何长度,并且可以全部或部分源自野生型microRNA

序列,或者是完全人工的序列。

[0703] 在一个实施方案中,分子支架包含至少一个环基序区。作为非限制性实例,环基序区可以包含可以具有任何长度的序列。

[0704] 在一个实施方案中,分子支架包含5'侧翼区、环基序区和/或3'侧翼区。

[0705] 在一个实施方案中,本文所述的至少一个siRNA、miRNA或其他RNAi物质可以由调节性多核苷酸编码,所述调节性多核苷酸也可以包含至少一种分子支架。分子支架可以包含5'侧翼序列,其可以具有任何长度,并且可以全部或部分源自野生型microRNA序列或是完全人工的。3'侧翼序列可以在大小和来源上镜像5'侧翼序列和/或3'侧翼序列。任一序列都可能不存在。3'侧翼序列可任选地包含一个或多个CNMC基序,其中“N”代表任何核苷酸。

[0706] 形成茎环结构的茎至少是编码本文所述的至少一种siRNA、miRNA或其他RNAi物质的调节性多核苷酸的最低要求。在一些实施方案中,本文所述的siRNA、miRNA或其他RNAi物质包含至少一个与靶序列部分互补或将其杂交的核酸序列。在一些实施方案中,有效载荷是siRNA分子或siRNA分子的片段。

[0707] 在一些实施方案中,调节性多核苷酸的茎环结构的5'臂包含编码有义序列的核酸序列。表3和表8描述了可以由调节性多核苷酸编码的有义序列或其片段或变体的非限制性实例。

[0708] 在一些实施方案中,调节性多核苷酸的茎环的3'臂包含编码反义序列的核酸序列。在某些情况下,反义序列在最5'端包含一个“G”核苷酸。表2和表7描述了可以由调节性多核苷酸编码的反义序列或其片段或变体的非限制性实例。

[0709] 在其他实施方案中,有义序列可以位于调节性多核苷酸的茎环结构的茎的3'臂上,而反义序列位于5'臂上。可以由调节性多核苷酸编码的有义和反义序列的非限制性实例在表2、3、7和8中描述。

[0710] 在一个实施方案中,有义和反义序列可以在其长度的大部分上完全互补。在其他实施方案中,有义序列和反义序列可以独立地在其长度的至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%上具有至少70%、80%、90%、95%或99%的互补性。

[0711] 有义序列的同一性或反义序列的同源性都不需要与靶序列具有100%的互补性。

[0712] 在一个实施方案中,将调节性多核苷酸的茎环结构的有义和反义序列分开的是环序列(也称为环基序、接头或接头基序)。环序列可以具有任何长度,在4-30个核苷酸之间、在4-20个核苷酸之间、在4-15个核苷酸之间、在5-15个核苷酸之间、在6-12个核苷酸之间、6个核苷酸、7个核苷酸、8个核苷酸、9个核苷酸、10个核苷酸、11个核苷酸、12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸和/或15个核苷酸。

[0713] 在一些实施方案中,环序列包含编码至少一个UGUG基序的核酸序列。在一些实施方案中,编码UGUG基序的核酸序列位于环序列的5'末端。

[0714] 在一个实施方案中,间隔区可以存在于调节性多核苷酸中以将一个或多个模块(例如5'侧翼区、环基序区、3'侧翼区、有义序列、反义序列)彼此分开。可以存在一个或多个这样的间隔区。

[0715] 在一个实施方案中,在有义序列和侧翼区序列之间可以存在8-20个(即8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个)核苷酸的间隔区。

[0716] 在一个实施方案中,间隔区的长度为13个核苷酸,并且位于有义序列的5'末端和

侧翼序列的3'末端之间。在一个实施方案中,间隔子具有足以形成序列的大约一个螺旋角的长度。

[0717] 在一个实施方案中,在反义序列和侧翼区序列之间可以存在8-20个(即8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个)核苷酸的间隔区。

[0718] 在一个实施方案中,间隔序列的长度为10-13个(即10、11、12或13个)核苷酸,并且位于反义序列的3'末端和侧翼序列的5'末端之间。在一个实施方案中,间隔子具有足以形成序列的大约一个螺旋角的长度。

[0719] 在一个实施方案中,调节性多核苷酸的分子支架在5'至3'方向上包含5'侧翼序列、5'臂、环基序、3'臂和3'侧翼序列。作为非限制性实例,5'臂可包含编码有义序列的核酸序列,3'臂可包含编码反义序列的核酸序列。在另一个非限制性实例中,5'臂包含编码反义序列的核酸序列,而3'臂包含编码有义序列的核酸序列。

[0720] 在一个实施方案中,可以改变5'臂、有义和/或反义序列、环基序和/或3'臂序列(例如,取代1个或多个核苷酸、添加核苷酸和/或删除核苷酸)。该改变可引起构建体功能的有益变化(例如,增加靶序列的敲低、减少构建体的降解、降低靶效应、增加有效载荷的效率并减少有效载荷的降解)。

[0721] 在一个实施方案中,将调节性多核苷酸的分子支架进行比对,以使引导链(在本文中也称为反义链)的切除率大于过客链(也称为有义链)的切除率。引导或过客链的切除率可以独立地为1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或超过99%。作为非限制性实例,引导链的切除率为至少80%。作为另一个非限制性实例,引导链的切除率为至少90%。

[0722] 在一个实施方案中,引导链的切除率大于过客链的切除率。一方面,引导链的切除率可以比过客链高至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或大于99%。

[0723] 在一个实施方案中,引导链的切除效率为至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或大于99%。作为非限制性示例,引导链的切除效率大于80%。

[0724] 在一个实施方案中,从分子支架上切除引导链的效率大于切除过客链的效率。从分子支架切除引导链可以比切除过客链的效率高2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10倍。

[0725] 在一个实施方案中,分子支架包含双重功能的靶向调节性多核苷酸。如本文所用,“双功能靶向”调节性多核苷酸是其中引导链和过客链均敲低相同靶或引导链和过客链敲低不同靶的多核苷酸。

[0726] 在一个实施方案中,本文所述的调节性多核苷酸的分子支架可包含5'侧翼区、环基序区和3'侧翼区。在本文所述的调节性多核苷酸中可使用或使用其片段的5'侧翼区、环基序区域(也可称为接头区)和3'侧翼区的序列的非限制性实例如表10-12所示。

[0727] 表10. 分子支架的5'侧翼区

5'侧翼区名称	5'侧翼区序列	5'侧翼区 SEQ ID
5F3	GTGCTGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCTCCCG CAGAACACCATGCGCTCCACGGAA	1503
5F1	GTGCTGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCTCCCG CAGAACACCATGCGCTCTTCGGAA	1504
5F2	GAAGCAAAGAAGGGGCAGAGGGAGCCCGT GAGCTGAGTGGGCCAGGGACTGGGAGAAG GAGTGAGGAGGCAGGGCCGGCATGCCTCTG CTGCTGGCCAGA	1505
[0728] 5F4	GGGCCCTCCCGCAGAACACCATGCGCTCCA CGGAA	1506
5F5	CTCCCGCAGAACACCATGCGCTCCACGGAA	1507
5F6	GTGCTGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCTCCCG CAGAACACCATGCGCTCCACGGAAG	1508
5F7	GTGCTGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCTCCCG CAGAACACCATGCGCTCCTCGGAA	1509
5F8	TTTATGCCTCATCTCTGAGTGCTGAAGGCT TGCTGTAGGCTGTATGCTG	1692
5F9	GTGCTGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCTCCCG CAGAACACCATGCGCTCTTCGGGA	1782

[0729] 表11.分子支架的环基序区

环基序区名称	环基序区序列	环基序区 SEQ ID
[0730] L5	GTGGCCACTGAGAAG	1510

[0731]	L1	TGTGACCTGG	1511
	L2	TGTGATTTGG	1512
	L3	GTCTGCACCTGTCACTAG	1513
	L4	GTGACCCAAG	1514
	L6	GTGACCCAAT	1515
	L7	GTGACCCAAC	1516
	L8	GTGGCCACTGAGAAA	1517
	L9	TATAATTTGG	1693
	L10	CCTGACCCAGT	1694

[0732] 表12.分子支架的3' 侧翼区

[0733]	3'侧翼区名称	3'侧翼区序列	3'侧翼区 SEQ ID
	3F1	CTGAGGAGCGCCTTGACAGCAGCCATGGGA GGGCCGCCCCCTACCTCAGTGA	1518
	3F2	CTGTGGAGCGCCTTGACAGCAGCCATGGGA GGGCCGCCCCCTACCTCAGTGA	1519
	3F3	TGGCCGTGTAGTGCTACCCAGCGCTGGCTG CCTCCTCAGCATTGCAATTCCTCTCCCATCT GGGCACCAGTCAGCTACCCTGGTGGGAATC TGGGTAGCC	1520
	3F4	CTGAGGAGCGCCTTGACAGCAGCCATGGGA GGGCC	1521
	3F5	CTGCGGAGCGCCTTGACAGCAGCCATGGGA GGGCCGCCCCCTACCTCAGTGA	1522
	3F6	AGTGTATGATGCCTGTTACTAGCATTACAT GGAACAAATTGCTGCCGTG	1695
	3F7	TCCTGAGGAGCGCCTTGACAGCAGCCATGG GAGGGCCGCCCCCTACCTCAGTGA	1783

[0734] 在一个实施方案中,分子支架可包含表10中列出的至少一个5' 侧翼区,其片段或

变体。作为非限制性实例,5'侧翼区可以是5F1、5F2、5F3、5F4、5F5、5F6、5F7、5F8或5F9。

[0735] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F1侧翼区。

[0736] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F2侧翼区。

[0737] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3侧翼区。

[0738] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F4侧翼区。

[0739] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F5侧翼区。

[0740] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F6侧翼区。

[0741] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F7侧翼区。

[0742] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F8侧翼区。

[0743] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F9侧翼区。

[0744] 在一个实施方案中,分子支架可包含表11中列出的至少一个环基序区、其片段或变体。作为非限制性实例,环基序区域可以是L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9或L10。

[0745] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L1环基序区。

[0746] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L2环基序区。

[0747] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L3环基序区。

[0748] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L4环基序区。

[0749] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L5环基序区。

[0750] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L6环基序区。

[0751] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L7环基序区。

[0752] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L8环基序区。

[0753] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L9环基序区。

[0754] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L10环基序区。

[0755] 在一个实施方案中,分子支架可包含表12中所列的至少一个3'侧翼区、其片段或变体。作为非限制性实例,3'侧翼区可以是3F1、3F2、3F3、3F4、3F5、3F6或3F7。

[0756] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个3F1侧翼区。

[0757] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个3F2侧翼区。

[0758] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个3F3侧翼区。

[0759] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个3F4侧翼区。

[0760] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个3F5侧翼区。

[0761] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个3F6侧翼区。

[0762] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个3F7侧翼区。

[0763] 在一个实施方案中,分子支架可包含表10和11中所述的至少一个5'侧翼区、其片段或变体,以及至少一个环基序区、其片段或变体。作为非限制性实例,5'侧翼区和环基序区可以是5F1和L1、5F1和L2、5F1和L3、5F1和L4、5F1和L5、5F1和L6、5F1和L7、5F1和L8、5F1和L9、5F1和L10、5F2和L1、5F2和L2、5F2和L3、5F2和L4、5F2和L5、5F2和L6、5F2和L7、5F2和L8、5F2和L9、5F2和L10、5F3和L1、5F3和L2、5F3和L3、5F3和L4、5F3和L5、5F3和L6、5F3和L7、5F3和L8、5F3和L9、5F3和L10、5F4和L1、5F4和L2、5F4和L3、5F4和L4、5F4和L5、5F4和L6、5F4和L7、5F4和L8、5F4和L9、5F4和L10、5F5和L1、5F5和L2、5F5和L3、5F5和L4、5F5和L5、5F5和L6、5F5和L7、5F5和L8、5F5和L9、5F5和L10、5F6和L1、5F6和L2、5F6和L3、5F6和L4、5F6和L5、5F6

和L6、5F6和L7、5F6和L8、5F6和L9、5F6和L10、5F7和L1、5F7和L2、5F7和L3、5F7和L4、5F7和L5、5F7和L6、5F7和L7、5F7和L8、5F7和L9、5F7和L10、5F8和L1、5F8和L2、5F8和L3、5F8和L4、5F8和L5、5F8和L6、5F8和L7、5F8和L8、5F8和L9、5F8和L10、5F9和L1、5F9和L2、5F9和L3、5F9和L4、5F9和L5、5F9和L6、5F9和L7、5F9和L8、5F9和L9,以及5F9和L10。

- [0764] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F2侧翼区和至少一个L1环基序区。
- [0765] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F1侧翼区和至少一个L4环基序区。
- [0766] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F7侧翼区和至少一个L8环基序区。
- [0767] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3侧翼区和至少一个L4环基序区。
- [0768] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3侧翼区和至少一个L5环基序区。
- [0769] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F4侧翼区和至少一个L4环基序区。
- [0770] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3侧翼区和至少一个L7环基序区。
- [0771] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F5侧翼区和至少一个L4环基序区。
- [0772] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F6侧翼区和至少一个L4环基序区。
- [0773] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3侧翼区和至少一个L6环基序区。
- [0774] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F7侧翼区和至少一个L4环基序区。
- [0775] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F2侧翼区和至少一个L2环基序区。
- [0776] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F1侧翼区和至少一个L1环基序区。
- [0777] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F1侧翼区和至少一个L2环基序区。
- [0778] 在一个实施方案中,分子支架可包含如表11和12所述的至少一个3'侧翼区、其片段或变体,和至少一个基序区、其片段或变体。作为非限制性实例,3'侧翼区和环基序区可以是3F1和L1、3F1和L2、3F1和L3、3F1和L4、3F1和L5、3F1和L6、3F1和L7、3F1和L8、3F1和L9、3F1和L10、3F2和L1、3F2和L2、3F2和L3、3F2和L4、3F2和L5、3F2和L6、3F2和L7、3F2和L8、3F2和L9、3F2和L10、3F3和L1、3F3和L2、3F3和L3、3F3和L4、3F3和L5、3F3和L6、3F3和L7、3F3和L8、3F3和L9、3F3和L10、3F4和L1、3F4和L2、3F4和L3、3F4和L4、3F4和L5、3F4和L6、3F4和L7、3F4和L8、3F4和L9、3F4和L10、3F5和L1、3F5和L2、3F5和L3、3F5和L4、3F5和L5、3F5和L6、3F5和L7、3F5和L8、3F5和L9、3F5和L10、3F6和L1、3F6和L2、3F6和L3、3F6和L4、3F6和L5、3F6和L6、3F6和L7、3F6和L8、3F6和L9、3F6和L10、3F7和L1、3F7和L2、3F7和L3、3F7和L4、3F7和L5、3F7和L6、3F7和L7、3F7和L8、3F7和L9,以及3F7和L10。
- [0779] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L1环基序区和至少一个3F2侧翼区。
- [0780] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L4环基序区和至少一个3F1侧翼区。
- [0781] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L8环基序区和至少一个3F5侧翼区。
- [0782] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L5环基序区和至少一个3F1侧翼区。
- [0783] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L4环基序区和至少一个3F4侧翼区。
- [0784] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L7环基序区和至少一个3F1侧翼区。
- [0785] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L6环基序区和至少一个3F1侧翼区。
- [0786] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L4环基序区和至少一个3F5侧翼区。
- [0787] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L2环基序区和至少一个3F2侧翼区。
- [0788] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L1环基序区和至少一个3F3侧翼区。
- [0789] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L5环基序区和至少一个3F4侧翼区。

- [0790] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L1环基序区和至少一个3F1侧翼区。
- [0791] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个L2环基序区和至少一个3F1侧翼区。
- [0792] 在一个实施方案中,分子支架可包含如表10和12所述的至少一个5'侧翼区、其片段或变体和至少一个3'侧翼区、其片段或变体。作为非限制性实例,侧翼区可以是5F1和3F1、5F1和3F2、5F1和3F3、5F1和3F4、5F1和3F5、5F1和3F6、5F1和3F7、5F2和3F1、5F2和3F2、5F2和3F3、5F2和3F4、5F2和3F5、5F2和3F6、5F2和3F7、5F3和3F1、5F3和3F2、5F3和3F3、5F3和3F4、5F3和3F5、5F3和3F6、5F3和3F7、5F4和3F1、5F4和3F2、5F4和3F3、5F4和3F4、5F4和3F5、5F4和3F6、5F4和3F7、5F5和3F1、5F5和3F2、5F5和3F3、5F5和3F4、5F5和3F5、5F5和3F6、5F5和3F7、5F6和3F1、5F6和3F2、5F6和3F3、5F6和3F4、5F6和3F5、5F6和3F6、5F6和3F7、5F7和3F1、5F7和3F2、5F7和3F3、5F7和3F4、5F7和3F5、5F7和3F6、5F7和3F7、5F8和3F1、5F8和3F2、5F8和3F3、5F8和3F4、5F8和3F5、5F8和3F6,以及5F8和3F7、5F9和3F1、5F9和3F2、5F9和3F3、5F9和3F4、5F9和3F5、5F9和3F6,以及5F9和3F7。
- [0793] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F2 5'侧翼区和至少一个3F2 3'侧翼区。
- [0794] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F1 5'侧翼区和至少一个3F1 3'侧翼区。
- [0795] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F7 5'侧翼区和至少一个3F5 3'侧翼区。
- [0796] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3 5'侧翼区和至少一个3F1 3'侧翼区。
- [0797] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F4 5'侧翼区和至少一个3F4 3'侧翼区。
- [0798] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F5 5'侧翼区和至少一个3F4 3'侧翼区。
- [0799] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F6 5'侧翼区和至少一个3F1 3'侧翼区。
- [0800] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F2 5'侧翼区和至少一个3F3 3'侧翼区。
- [0801] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3 5'侧翼区和至少一个3F4 3'侧翼区。
- [0802] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F1 5'侧翼区和至少一个3F2 3'侧翼区。
- [0803] 在一个实施方案中,分子支架可包含如表10-12所述的至少一个5'侧翼区、其片段或变体,至少一个环基序区、其片段或变体,和至少一个3'侧翼区。作为非限制性实例,侧翼区和环基序区可以是5F1、L1和3F1;5F1、L1和3F2;5F1、L1和3F3;5F1、L1和3F4;5F1、L1和3F5;5F1、L1和3F6;5F1、L1和3F7;5F2、L1和3F1;5F2、L1和3F2;5F2、L1和3F3;5F2、L1和3F4;5F2、L1和3F5;5F2、L1和3F6;5F2、L1和3F7;5F3、L1和3F1;5F3、L1和3F2;5F3、L1和3F3;5F3、L1和3F4;5F3、L1和3F5;5F3、L1和3F6;5F3、L1和3F7;5F4、L1和3F1;5F4、L1和3F2;5F4、L1和3F3;5F4、L1和3F4;5F4、L1和3F5;5F4、L1和3F6;5F4、L1和3F7;5F5、L1和3F1;5F5、L1和3F2;

5F3、L9和3F7;5F4、L9和3F1;5F4、L9和3F2;5F4、L9和3F3;5F4、L9和3F4;5F4、L9和3F5;5F4、L9和3F6;5F4、L9和3F7;5F5、L9和3F1;5F5、L9和3F2;5F5、L9和3F3;5F5、L9和3F4;5F5、L9和3F5;5F5、L9和3F6;5F5、L9和3F7;5F6、L9和3F1;5F6、L9和3F2;5F6、L9和3F3;5F6、L9和3F4;5F6、L9和3F5;5F6、L9和3F6;5F6、L9和3F7;5F7、L9和3F1;5F7、L9和3F2;5F7、L9和3F3;5F7、L9和3F4;5F7、L9和3F5;5F7、L9和3F6;5F7、L9和3F7;5F8、L9和3F1;5F8、L9和3F2;5F8、L9和3F3;5F8、L9和3F4;5F8、L9和3F5;5F8、L9和3F6;5F8、L9和3F7;5F9、L9和3F1;5F9、L9和3F2;5F9、L9和3F3;5F9、L9和3F4;5F9、L9和3F5;5F9、L9和3F6;5F9、L9和3F7;5F1、L10和3F1;5F1、L10和3F2;5F1、L10和3F3;5F1、L10和3F4;5F1、L10和3F5;5F1、L10和3F6;5F1、L10和3F7;5F2、L10和3F1;5F2、L10和3F2;5F2、L10和3F3;5F2、L10和3F4;5F2、L10和3F5;5F2、L10和3F6;5F2、L10和3F7;5F3、L10和3F1;5F3、L10和3F2;5F3、L10和3F3;5F3、L10和3F4;5F3、L10和3F5;5F3、L10和3F6;5F3、L10和3F7;5F4、L10和3F1;5F4、L10和3F2;5F4、L10和3F3;5F4、L10和3F4;5F4、L10和3F5;5F4、L10和3F6;5F4、L10和3F7;5F5、L10和3F1;5F5、L10和3F2;5F5、L10和3F3;5F5、L10和3F4;5F5、L10和3F5;5F5、L10和3F6;5F5、L10和3F7;5F6、L10和3F1;5F6、L10和3F2;5F6、L10和3F3;5F6、L10和3F4;5F6、L10和3F5;5F6、L10和3F6;5F6、L10和3F7;5F7、L10和3F1;5F7、L10和3F2;5F7、L10和3F3;5F7、L10和3F4;5F7、L10和3F5;5F7、L10和3F6;5F7、L10和3F7;5F8、L10和3F1;5F8、L10和3F2;5F8、L10和3F3;5F8、L10和3F4;5F8、L10和3F5;5F8、L10和3F6;5F8、L10和3F7;5F9、L10和3F1;5F9、L10和3F2;5F9、L10和3F3;5F9、L10和3F4;5F9、L10和3F5;5F9、L10和3F6;以及5F9、L10和3F7。

[0804] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F2 5'侧翼区、至少一个L1环基序区和至少一个3F2 3'侧翼区。

[0805] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F1 5'侧翼区、至少一个L4环基序区和至少一个3F1 3'侧翼区。

[0806] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F7 5'侧翼区、至少一个L8环基序区和至少一个3F5 3'侧翼区。

[0807] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3 5'侧翼区、至少一个L4环基序区和至少一个3F1 3'侧翼区。

[0808] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3 5'侧翼区、至少一个L5环基序区和至少一个3F1 3'侧翼区。

[0809] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F4 5'侧翼区、至少一个L4环基序区和至少一个3F4 3'侧翼区。

[0810] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3 5'侧翼区、至少一个L7环基序区和至少一个3F1 3'侧翼区。

[0811] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F5 5'侧翼区、至少一个L4环基序区和至少一个3F4 3'侧翼区。

[0812] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F6 5'侧翼区、至少一个L4环基序区和至少一个3F1 3'侧翼区。

[0813] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3 5'侧翼区、至少一个L6环基序区和至少一个3F1 3'侧翼区。

[0814] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F7 5'侧翼区、至少一个L4环基序

区和至少一个3F5 3'侧翼区。

[0815] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F2 5'侧翼区、至少一个L2环基序区和至少一个3F2 3'侧翼区。

[0816] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F2 5'侧翼区、至少一个L1环基序区和至少一个3F3 3'侧翼区。

[0817] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F3 5'侧翼区、至少一个L5环基序区和至少一个3F4 3'侧翼区。

[0818] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F1 5'侧翼区、至少一个L1环基序区和至少一个3F1 3'侧翼区。

[0819] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F1 5'侧翼区、至少一个L2环基序区和至少一个3F1 3'侧翼区。

[0820] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F1 5'侧翼区、至少一个L1环基序区和至少一个3F2 3'侧翼区。

[0821] 在一个实施方案中,分子支架可包含至少一个5F2 5'侧翼区、至少一个L3环基序区和至少一个3F3 3'侧翼区。

[0822] 在一个实施方案中,分子支架可以是天然的前体pri-miRNA支架。作为非限制性实例,分子支架可以是衍生自人miR155支架的支架。

[0823] 在一个实施方案中,分子支架可包含一种或多种本领域已知的接头。接头可以将区域或一个分子支架与另一个区域或分子支架分开。作为非限制性实例,分子支架可以是多顺反子。

[0824] 包含分子支架和靶向HTT的siRNA分子的调节性多核苷酸

[0825] 在一个实施方案中,调节性多核苷酸可包含表13和14中所述的5'和3'侧翼区、环基序区和编码有义序列和反义序列的核酸序列。在表13和14中,描述了过客链和引导链的DNA序列标识符,以及5'和3'侧翼区和环区(也称为接头区)。在表13和表14中,序列名称的“miR”组分不一定与miRNA基因的序列编号相对应(例如VOYHTmiR-102是序列的名称,并不意味着miR-102是序列的一部分)。

[0826] 表13. HTT调节性多核苷酸序列区(5'至3')

调节性多核苷酸构建 体名称	5'侧翼至3' 侧翼 SEQ ID NO	5'侧翼SEQ ID NO	过客链 SEQ ID NO	环SEQ ID NO	引导链 SEQ ID NO	3'侧翼SEQ ID NO
VOYHTmiR-102.214	1523	1504	1636	1511	1677	1518
VOYHTmiR-104.214	1524	1504	1643	1511	1677	1518

[0827]

[0828]

VOYHTmiR-109.214	1525	1504	1650	1512	1677	1518
VOYHTmiR-114.214	1526	1504	1657	1511	1677	1519
VOYHTmiR-116.214	1527	1504	1650	1511	1677	1519
VOYHTmiR-127.214	1528	1505	1650	1513	1674	1520
VOYHTmiR-102.218	1529	1504	1637	1511	1678	1518
VOYHTmiR-104.218	1530	1504	1644	1511	1678	1518
VOYHTmiR-109.218	1531	1504	1651	1512	1678	1518
VOYHTmiR-114.218	1532	1504	1658	1511	1678	1519
VOYHTmiR-116.218	1533	1504	1651	1511	1678	1519
VOYHTmiR-127.218	1534	1505	1651	1513	1678	1520
VOYHTmiR-102.219.o	1535	1504	1620	1511	1673	1518
VOYHTmiR-104.219.o	1536	1504	1623	1511	1673	1518
VOYHTmiR-109.219.o	1537	1504	1620	1512	1673	1518
VOYHTmiR-114.219	1538	1504	1626	1511	1673	1519
VOYHTmiR-116.219.o	1539	1504	1629	1511	1673	1519
VOYHTmiR-127.219.o	1540	1505	1620	1513	1673	1520
VOYHTmiR-102.219.n	1541	1504	1632	1511	1673	1518
VOYHTmiR-104.219.n	1542	1504	1633	1511	1673	1518
VOYHTmiR-109.219.n	1543	1504	1632	1512	1673	1518
VOYHTmiR-116.219.n	1544	1504	1634	1511	1673	1519
VOYHTmiR-127.219.n	1545	1505	1632	1513	1673	1520
VOYHTmiR-102.257	1546	1504	1638	1511	1679	1518
VOYHTmiR-104.257	1547	1504	1645	1511	1679	1518
VOYHTmiR-109.257	1548	1504	1652	1512	1679	1518
VOYHTmiR-114.257	1549	1504	1659	1511	1679	1519
VOYHTmiR-116.257	1550	1504	1652	1511	1679	1519
VOYHTmiR-127.257	1551	1505	1652	1513	1679	1520
VOYHTmiR-102.894	1552	1504	1621	1511	1674	1518
VOYHTmiR-104.894	1553	1504	1624	1511	1674	1518

[0829]

VOYHTmiR-109.894	1554	1504	1621	1512	1674	1518
VOYHTmiR-114.894	1555	1504	1627	1511	1674	1519
VOYHTmiR-116.894	1556	1504	1630	1511	1674	1519
VOYHTmiR-127.894	1557	1505	1621	1513	1674	1520
VOYHTmiR-102.907	1558	1504	1641	1511	1682	1518
VOYHTmiR-104.907	1559	1504	1648	1511	1682	1518
VOYHTmiR-109.907	1560	1504	1655	1512	1682	1518
VOYHTmiR-114.907	1561	1504	1662	1511	1682	1519
VOYHTmiR-116.907	1562	1504	1655	1511	1682	1519
VOYHTmiR-127.907	1563	1505	1655	1513	1682	1520
VOYHTmiR-102.372	1564	1504	1639	1511	1680	1518
VOYHTmiR-104.372	1565	1504	1646	1511	1680	1518
VOYHTmiR-109.372	1566	1504	1653	1512	1680	1518
VOYHTmiR-114.372	1567	1504	1660	1511	1680	1519
VOYHTmiR-116.372	1568	1504	1653	1511	1680	1519
VOYHTmiR-127.372	1569	1505	1653	1513	1680	1520
VOYHTmiR-102.425	1570	1504	1640	1511	1681	1518
VOYHTmiR-104.425	1571	1504	1647	1511	1681	1518
VOYHTmiR-109.425	1572	1504	1654	1512	1681	1518
VOYHTmiR-114.425	1573	1504	1661	1511	1681	1519
VOYHTmiR-116.425	1574	1504	1654	1511	1681	1519
VOYHTmiR-127.425	1575	1505	1654	1513	1681	1520
VOYHTmiR-102.032	1576	1504	1664	1511	1684	1518
VOYHTmiR-104.032	1577	1504	1666	1511	1684	1518
VOYHTmiR-109.032	1578	1504	1668	1512	1684	1518
VOYHTmiR-114.032	1579	1504	1670	1511	1684	1519
VOYHTmiR-116.032	1580	1504	1668	1511	1684	1519
VOYHTmiR-127.032	1581	1505	1668	1513	1684	1520
VOYHTmiR-102.020	1582	1504	1663	1511	1683	1518

[0830]

VOYHTmiR-104.020	1583	1504	1665	1511	1683	1518
VOYHTmiR-109.020	1584	1504	1667	1512	1683	1518
VOYHTmiR-114.020	1585	1504	1669	1511	1683	1519
VOYHTmiR-116.020	1586	1504	1667	1511	1683	1519
VOYHTmiR-127.020	1587	1505	1667	1513	1683	1520
VOYHTmiR-102.016	1588	1504	1635	1511	1676	1518
VOYHTmiR-104.016	1589	1504	1642	1511	1676	1518
VOYHTmiR-109.016	1590	1504	1649	1512	1676	1518
VOYHTmiR-114.016	1591	1504	1656	1511	1676	1519
VOYHTmiR-116.016	1592	1504	1649	1511	1676	1519
VOYHTmiR-127.016	1593	1505	1649	1513	1676	1520
VOYHTmiR-102.579	1594	1504	1622	1511	1675	1518
VOYHTmiR-104.579	1595	1504	1625	1511	1675	1518
VOYHTmiR-109.579	1596	1504	1622	1512	1675	1518
VOYHTmiR-114.579	1597	1504	1628	1511	1675	1519
VOYHTmiR-116.579	1598	1504	1631	1511	1675	1519
VOYHTmiR-127.579	1599	1505	1622	1513	1675	1520
VOYHTmiR-104.579.1	1600	1504	1671	1514	1675	1518
VOYHTmiR-104.579.2	1601	1503	1671	1514	1675	1518
VOYHTmiR-104.579.3	1602	1503	1671	1510	1675	1518
VOYHTmiR-104.579.4	1603	1506	1671	1514	1675	1521
VOYHTmiR-104.579.6	1604	1507	1671	1514	1675	1521
VOYHTmiR-104.579.7	1605	1508	1671	1514	1685	1518
VOYHTmiR-104.579.8	1606	1503	1672	1515	1675	1518
VOYHTmiR-104.579.9	1607	1509	1671	1514	1675	1522
VOYHTmiR-102.020	1608	1504	1663	1511	1683	1518
VOYHTmiR-102.032	1609	1504	1664	1511	1684	1518
VOYHTmiR-104.020	1610	1504	1665	1511	1683	1518
VOYHTmiR-104.032	1611	1504	1666	1511	1684	1518

[0831]	VOYHTmiR-109.020	1612	1504	1667	1512	1683	1518
	VOYHTmiR-109.032	1613	1504	1668	1512	1684	1518
	VOYHTmiR-114.020	1614	1504	1669	1511	1683	1519
	VOYHTmiR-114.032	1615	1504	1670	1511	1684	1519
	VOYHTmiR-116.020	1616	1504	1667	1511	1683	1519
	VOYHTmiR-116.032	1617	1504	1668	1511	1684	1519
	VOYHTmiR-127.020	1618	1505	1667	1513	1683	1520
	VOYHTmiR-127.032	1619	1505	1668	1513	1684	1520

[0832] 表14.HTT调节性多核苷酸序列区(5'至3')

名称	5'侧翼至 3'侧翼 SEQ ID NO	5'侧翼 SEQ ID NO	过客链 SEQ ID NO	环SEQ ID NO	引导链 SEQ ID NO	3'侧翼 SEQ ID NO
[0833] VOYHTmiR-104.57 9.5	1686	1503	1688	1516	1690	1518
VOYHTmiR-104.57 9.10	1687	1509	1689	1517	1691	1532

[0834] 包含分子支架和靶向SOD1的siRNA分子的调节性多核苷酸

[0835] 在一个实施方案中,调节性多核苷酸可包含表15和16中所述的5'和3'侧翼区、环基序区和编码有义序列和反义序列的核酸序列。在表15和16中,描述了过客链和引导链的DNA序列标识符,以及5'和3'侧翼区和环区(也称为接头区)。在表15和表16中,序列名称的“miR”组分不一定与miRNA基因的序列编号相对应(例如VOYSOD1miR-102是序列的名称,并不一定意味着miR-102是序列的一部分)。

[0836] 表15.SOD1调节性多核苷酸序列区(5'至3')

调节性多核苷酸构建体	5'侧翼至3'	5'侧翼SEQ	过客链	环SEQ ID	引导链	3'侧翼SEQ
------------	---------	---------	-----	---------	-----	---------

[0838]

名称	侧翼 SEQ ID NO	ID NO	SEQ ID NO	NO	SEQ ID NO	ID NO
VOYSOD1miR-101	1696	1692	1746	1510	1747	1695
VOYSOD1miR-102	1697	1503	1746	1510	1747	1518
VOYSOD1miR-103	1698	1503	1748	1510	1747	1518
VOYSOD1miR-104	1699	1503	1749	1510	1747	1518
VOYSOD1miR-105	1700	1503	1750	1510	1747	1518
VOYSOD1miR-106	1701	1503	1751	1510	1747	1518
VOYSOD1miR-107	1702	1503	1752	1510	1747	1518
VOYSOD1miR-108	1703	1503	1754	1510	1747	1518
VOYSOD1miR-109	1704	1503	1746	1511	1747	1518
VOYSOD1miR-110	1705	1503	1746	1693	1747	1518
VOYSOD1miR-111	1706	1503	1753	1694	1747	1518
VOYSOD1miR-112	1707	1503	1746	1510	1747	1519
VOYSOD1miR-113	1708	1503	1748	1510	1747	1519
VOYSOD1miR-114	1709	1503	1751	1510	1747	1519
VOYSOD1miR-115	1710	1503	1753	1694	1747	1519
VOYSOD1miR-116	1711	1503	1749	1510	1747	1519
VOYSOD1miR-117	1712	1503	1755	1510	1756	1518
VOYSOD1miR-118	1713	1503	1757	1510	1758	1518
VOYSOD1miR-119	1714	1503	1759	1510	1760	1518
VOYSOD1miR-127	1715	1504	1746	1512	1747	1520
VOYSOD1miR-102.860	1716	1503	1761	1510	1762	1518
VOYSOD1miR-102.861	1717	1503	1763	1510	1764	1518
VOYSOD1miR-102.866	1718	1503	1765	1510	1760	1518
VOYSOD1miR-102.870	1719	1503	1766	1510	1767	1518
VOYSOD1miR-102.823	1720	1503	1768	1510	1758	1518
VOYSOD1miR-104.860	1721	1503	1769	1510	1762	1518
VOYSOD1miR-104.861	1722	1503	1770	1510	1764	1518

	VOYSOD1miR-104.866	1723	1503	1771	1510	1760	1518
	VOYSOD1miR-104.870	1724	1503	1772	1510	1767	1518
	VOYSOD1miR-104.823	1725	1503	1773	1510	1758	1518
	VOYSOD1miR-109.860	1726	1503	1761	1511	1762	1518
	VOYSOD1miR-104.861	1727	1503	1763	1511	1764	1518
	VOYSOD1miR-104.866	1728	1503	1765	1511	1760	1518
	VOYSOD1miR-109.870	1729	1503	1766	1511	1767	1518
	VOYSOD1miR-109.823	1730	1503	1768	1511	1758	1518
	VOYSOD1miR-114.860	1731	1503	1774	1510	1762	1519
	VOYSOD1miR-114.861	1732	1503	1775	1510	1764	1519
	VOYSOD1miR-114.866	1733	1503	1776	1510	1760	1519
[0839]	VOYSOD1miR-114.870	1734	1503	1777	1510	1767	1519
	VOYSOD1miR-114.823	1735	1503	1778	1510	1758	1519
	VOYSOD1miR-116.860	1736	1503	1769	1510	1762	1519
	VOYSOD1miR-116.861	1737	1503	1770	1510	1764	1519
	VOYSOD1miR-116.866	1738	1503	1779	1510	1760	1519
	VOYSOD1miR-116.870	1739	1503	1772	1510	1767	1519
	VOYSOD1miR-116.823	1740	1503	1773	1510	1758	1519
	VOYSOD1miR-127.860	1741	1504	1780	1512	1762	1520
	VOYSOD1miR-127.861	1742	1504	1763	1512	1764	1520
	VOYSOD1miR-127.866	1743	1504	1765	1512	1760	1520
	VOYSOD1miR-127.870	1744	1504	1766	1512	1767	1520
	VOYSOD1miR-127.823	1745	1504	1781	1512	1758	1520

[0840] 表16.SOD1调节性多核苷酸序列区(5'至3')

名称	5'侧翼至 3'侧翼 SEQ ID NO	5'侧翼 SEQ ID NO	过客链 SEQ ID NO	环SEQ ID NO	引导SEQ ID NO	3'侧翼 SEQ ID NO
----	-------------------------------	----------------------	---------------------	---------------	----------------	-------------------

[0842]	VOYSOD1miR-120	1784	1782	1785	1511	1786	1783
--------	----------------	------	------	------	------	------	------

[0843] 包含调节性多核苷酸的AAV颗粒

[0844] 在一个实施方案中,AAV颗粒包含病毒基因组,其具有包含调节性多核苷酸序列的有效载荷区。在这样的实施方案中,可以复制编码多于一种多肽的病毒基因组,并将其包装到病毒颗粒中。用包含调节性多核苷酸的病毒颗粒转导的靶细胞可以在单个细胞中表达编

码的有义和/或反义序列。

[0845] 在一些实施方案中,AAV颗粒在医学领域中可用于治疗、预防、缓解或改善神经学疾病和/或病症。

[0846] 在一个实施方案中,可以将包含调节性多核苷酸序列的AAV颗粒引入哺乳动物细胞,所述调节性多核苷酸序列包含编码至少一个siRNA分子的核酸序列。

[0847] AAV颗粒有效载荷区包含调节性多核苷酸时,调节性多核苷酸可包含有义和/或反义序列以敲低靶基因。编码本文所述的调节性多核苷酸的AAV病毒基因组可用于人类疾病、病毒、感染、兽医应用以及各种体内和体外环境的领域。

[0848] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组可包含至少一个反向末端重复(ITR)区。一个或多个ITR区的长度可以独立地为例如但不限于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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174和175个核苷酸。病毒基因组的ITR区的长度可以是75-80、75-85、75-100、80-85、80-90、80-105、85-90、85-95、85-110、90-95、90-100、90-115、95-100、95-105、95-120、100-105、100-110、100-125、105-110、105-115、105-130、110-115、110-120、110-135、115-120、115-125、115-140、120-125、120-130、120-145、125-130、125-135、125-150、130-135、130-140、130-155、135-140、135-145、135-160、140-145、140-150、140-165、145-150、145-155、145-170、150-155、150-160、150-175、155-160、155-165、160-165、160-170、165-170、165-175和170-175个核苷酸。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约105个核苷酸的ITR。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约141个核苷酸的ITR。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约130个核苷酸的ITR。

[0849] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组可包含两个反向末端重复(ITR)区。每个ITR区的长度可以独立是例如但不限于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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174和175个氨基酸。病毒基因组的ITR区的长度可以是75-80、75-85、75-100、80-85、80-90、80-105、85-90、85-95、85-110、90-95、90-100、90-115、95-100、95-105、95-120、100-105、100-110、100-125、105-110、105-115、105-130、110-115、110-120、110-135、115-120、115-125、115-140、120-125、120-130、120-145、125-130、125-135、125-150、130-135、130-140、130-155、135-140、135-145、135-160、140-145、140-150、140-165、145-150、145-155、145-170、150-155、150-160、150-175、155-160、155-165、160-165、160-170、165-170、165-175和170-175个核苷酸。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约105个核苷酸和长度为约141个核苷酸的ITR。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约105个核苷酸和长度为约130个核苷酸的ITR。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约130个核苷酸和长度为141个核苷酸的ITR。

[0850] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组可包含至少一个如表17-24中所述的序列区。这些区域可以位于本文所述的任何其他序列区域之前或之后。

[0851] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含至少一个反向末端重复 (ITR) 序列区。表17中描述了ITR序列区的非限制性实例。

[0852] 表17. 反向末端重复 (ITR) 序列区

序列区名称	SEQ ID NO
ITR1	1787
ITR2	1788
ITR3	1789
ITR4	1790

[0854] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含两个ITR序列区。在一个实施方案中, ITR序列区是ITR1序列区和ITR3序列区。在一个实施方案中, ITR序列区是ITR1序列区和ITR4序列区。在一个实施方案中, ITR序列区是ITR2序列区和ITR3序列区。在一个实施方案中, ITR序列区是ITR2序列区和ITR4序列区。

[0855] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组可包含至少一个多克隆位点 (MCS) 序列区。MCS区的长度可以独立地为例如但不限于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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149和150个核苷酸。病毒基因组的MCS区的长度可以是2-10、5-10、5-15、10-20、10-30、10-40、15-20、15-25、20-30、20-40、20-50、25-30、25-35、30-40、30-50、30-60、35-40、35-45、40-50、40-60、40-70、45-50、45-55、50-60、50-70、50-80、55-60、55-65、60-70、60-80、60-90、65-70、65-75、70-80、70-90、70-100、75-80、75-85、80-90、80-100、80-110、85-90、85-95、90-100、90-110、90-120、95-100、95-105、100-110、100-120、100-130、105-110、105-115、110-120、110-130、110-140、115-120、115-125、120-130、120-140、120-150、125-130、125-135、130-140、130-150、135-140、135-145、140-150和145-150个核苷酸。作为非限制性实例, 病毒基因组包含长度为约5个核苷酸的MCS区。作为非限制性实例, 病毒基因组包含长度为约10个核苷酸的MCS区。作为非限制性实例, 病毒基因组包含长度为约14个核苷酸的MCS区。作为非限制性实例, 病毒基因组包含长度为约18个核苷酸的MCS区。作为非限制性实例, 病毒基因组包含长度为约73个核苷酸的MCS区。作为非限制性实例, 病毒基因组包含长度为约121个核苷酸的MCS区。

[0856] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含至少一个多克隆位点 (MCS) 序列区。表18描述了MCS序列区的非限制性实例。

[0857] 表18. 多克隆位点 (MCS) 序列区

序列区名称	SEQ ID NO或序列
MCS1	1791

MCS2	1792
MCS3	1793
MCS4	1794
MCS5	TCGAG
MCS6	1795

[0859] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含一个MCS序列区。在一个实施方案中, MCS序列区是MCS1序列区。在一个实施方案中, MCS序列区是MCS2序列区。在一个实施方案中, MCS序列区是MCS3序列区。在一个实施方案中, MCS序列区是MCS4序列区。在一个实施方案中, MCS序列区是MCS5序列区。在一个实施方案中, MCS序列区是MCS6序列区。

[0860] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含两个MCS序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS1序列区和MCS2序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS1序列区和MCS3序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS1序列区和MCS4序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS1序列区和MCS5序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS1序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS2序列区和MCS3序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS2序列区和MCS4序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS2序列区和MCS5序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS2序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS3序列区和MCS4序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS3序列区和MCS5序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS3序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS4序列区和MCS5序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS4序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 两个MCS序列区是MCS5序列区和MCS6序列区。

[0861] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含两个或更多个MCS序列区。

[0862] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含3个MCS序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS1序列区、MCS2序列区和MCS3序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS1序列区、MCS2序列区和MCS4序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS1序列区、MCS2序列区和MCS5序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS1序列区、MCS2序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS1序列区、MCS3序列区和MCS4序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS1序列区、MCS3序列区和MCS5序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS1序列区、MCS3序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS1序列区、MCS4序列区和MCS5序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS1序列区、MCS4序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS1序列区、MCS5序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS2序列区、MCS3序列区和MCS4序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS2序列区、MCS3序列区和MCS5序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS2序列区、MCS3序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS2序列区、MCS4序列区和MCS5序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS2序列区、MCS4序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS2序列区、MCS5序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS3序列区、MCS4序列区和MCS5序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS3序列区、MCS4序列区和MCS6序列区。在一个实施方案中, 3个MCS序列区是MCS3序列区、MCS5序列区和MCS6序列区。在一

个实施方案中,3个MCS序列区是MCS4序列区、MCS5序列区和MCS6序列区。

[0863] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组可包含至少一个多重填充序列区(multiple filler sequence)。填充序列区的长度可以独立地是例如但不限于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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、662、663、664、665、666、667、668、669、670、671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、714、715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、733、734、735、736、737、738、739、740、741、742、743、744、745、746、747、

748、749、750、751、752、753、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、779、780、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、793、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、901、902、903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、925、926、927、928、929、930、931、932、933、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999、1000、1001、1002、1003、1004、1005、1006、1007、1008、1009、1010、1011、1012、1013、1014、1015、1016、1017、1018、1019、1020、1021、1022、1023、1024、1025、1026、1027、1028、1029、1030、1031、1032、1033、1034、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1044、1045、1046、1047、1048、1049、1050、1051、1052、1053、1054、1055、1056、1057、1058、1059、1060、1061、1062、1063、1064、1065、1066、1067、1068、1069、1070、1071、1072、1073、1074、1075、1076、1077、1078、1079、1080、1081、1082、1083、1084、1085、1086、1087、1088、1089、1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1106、1107、1108、1109、1110、1111、1112、1113、1114、1115、1116、1117、1118、1119、1120、1121、1122、1123、1124、1125、1126、1127、1128、1129、1130、1131、1132、1133、1134、1135、1136、1137、1138、1139、1140、1141、1142、1143、1144、1145、1146、1147、1148、1149、1150、1151、1152、1153、1154、1155、1156、1157、1158、1159、1160、1161、1162、1163、1164、1165、1166、1167、1168、1169、1170、1171、1172、1173、1174、1175、1176、1177、1178、1179、1180、1181、1182、1183、1184、1185、1186、1187、1188、1189、1190、1191、1192、1193、1194、1195、1196、1197、1198、1199、1200、1201、1202、1203、1204、1205、1206、1207、1208、1209、1210、1211、1212、1213、1214、1215、1216、1217、1218、1219、1220、1221、1222、1223、1224、1225、1226、1227、1228、1229、1230、1231、1232、1233、1234、1235、1236、1237、1238、1239、1240、1241、1242、1243、1244、1245、1246、1247、1248、1249、1250、1251、1252、1253、1254、1255、1256、1257、1258、1259、1260、1261、1262、1263、1264、1265、1266、1267、1268、1269、1270、1271、1272、1273、1274、1275、1276、1277、1278、1279、1280、1281、1282、1283、1284、1285、1286、1287、1288、1289、1290、1291、1292、1293、1294、1295、1296、1297、1298、1299、1300、1301、1302、1303、1304、1305、1306、1307、1308、1309、1310、1311、1312、1313、1314、1315、1316、1317、1318、1319、1320、1321、1322、1323、1324、1325、1326、1327、1328、1329、1330、1331、1332、1333、1334、1335、1336、1337、1338、1339、1340、1341、1342、1343、1344、1345、1346、1347、1348、1349、1350、1351、1352、1353、1354、1355、1356、1357、1358、1359、1360、1361、1362、1363、1364、1365、1366、1367、1368、1369、1370、1371、1372、1373、1374、1375、1376、1377、1378、1379、1380、1381、1382、1383、1384、1385、

1386、1387、1388、1389、1390、1391、1392、1393、1394、1395、1396、1397、1398、1399、1400、
1401、1402、1403、1404、1405、1406、1407、1408、1409、1410、1411、1412、1413、1414、1415、
1416、1417、1418、1419、1420、1421、1422、1423、1424、1425、1426、1427、1428、1429、1430、
1431、1432、1433、1434、1435、1436、1437、1438、1439、1440、1441、1442、1443、1444、1445、
1446、1447、1448、1449、1450、1451、1452、1453、1454、1455、1456、1457、1458、1459、1460、
1461、1462、1463、1464、1465、1466、1467、1468、1469、1470、1471、1472、1473、1474、1475、
1476、1477、1478、1479、1480、1481、1482、1483、1484、1485、1486、1487、1488、1489、1490、
1491、1492、1493、1494、1495、1496、1497、1498、1499、1500、1501、1502、1503、1504、1505、
1506、1507、1508、1509、1510、1511、1512、1513、1514、1515、1516、1517、1518、1519、1520、
1521、1522、1523、1524、1525、1526、1527、1528、1529、1530、1531、1532、1533、1534、1535、
1536、1537、1538、1539、1540、1541、1542、1543、1544、1545、1546、1547、1548、1549、1550、
1551、1552、1553、1554、1555、1556、1557、1558、1559、1560、1561、1562、1563、1564、1565、
1566、1567、1568、1569、1570、1571、1572、1573、1574、1575、1576、1577、1578、1579、1580、
1581、1582、1583、1584、1585、1586、1587、1588、1589、1590、1591、1592、1593、1594、1595、
1596、1597、1598、1599、1600、1601、1602、1603、1604、1605、1606、1607、1608、1609、1610、
1611、1612、1613、1614、1615、1616、1617、1618、1619、1620、1621、1622、1623、1624、1625、
1626、1627、1628、1629、1630、1631、1632、1633、1634、1635、1636、1637、1638、1639、1640、
1641、1642、1643、1644、1645、1646、1647、1648、1649、1650、1651、1652、1653、1654、1655、
1656、1657、1658、1659、1660、1661、1662、1663、1664、1665、1666、1667、1668、1669、1670、
1671、1672、1673、1674、1675、1676、1677、1678、1679、1680、1681、1682、1683、1684、1685、
1686、1687、1688、1689、1690、1691、1692、1693、1694、1695、1696、1697、1698、1699、1700、
1701、1702、1703、1704、1705、1706、1707、1708、1709、1710、1711、1712、1713、1714、1715、
1716、1717、1718、1719、1720、1721、1722、1723、1724、1725、1726、1727、1728、1729、1730、
1731、1732、1733、1734、1735、1736、1737、1738、1739、1740、1741、1742、1743、1744、1745、
1746、1747、1748、1749、1750、1751、1752、1753、1754、1755、1756、1757、1758、1759、1760、
1761、1762、1763、1764、1765、1766、1767、1768、1769、1770、1771、1772、1773、1774、1775、
1776、1777、1778、1779、1780、1781、1782、1783、1784、1785、1786、1787、1788、1789、1790、
1791、1792、1793、1794、1795、1796、1797、1798、1799、1800、1801、1802、1803、1804、1805、
1806、1807、1808、1809、1810、1811、1812、1813、1814、1815、1816、1817、1818、1819、1820、
1821、1822、1823、1824、1825、1826、1827、1828、1829、1830、1831、1832、1833、1834、1835、
1836、1837、1838、1839、1840、1841、1842、1843、1844、1845、1846、1847、1848、1849、1850、
1851、1852、1853、1854、1855、1856、1857、1858、1859、1860、1861、1862、1863、1864、1865、
1866、1867、1868、1869、1870、1871、1872、1873、1874、1875、1876、1877、1878、1879、1880、
1881、1882、1883、1884、1885、1886、1887、1888、1889、1890、1891、1892、1893、1894、1895、
1896、1897、1898、1899、1900、1901、1902、1903、1904、1905、1906、1907、1908、1909、1910、
1911、1912、1913、1914、1915、1916、1917、1918、1919、1920、1921、1922、1923、1924、1925、
1926、1927、1928、1929、1930、1931、1932、1933、1934、1935、1936、1937、1938、1939、1940、
1941、1942、1943、1944、1945、1946、1947、1948、1949、1950、1951、1952、1953、1954、1955、
1956、1957、1958、1959、1960、1961、1962、1963、1964、1965、1966、1967、1968、1969、1970、

2556、2557、2558、2559、2560、2561、2562、2563、2564、2565、2566、2567、2568、2569、2570、
2571、2572、2573、2574、2575、2576、2577、2578、2579、2580、2581、2582、2583、2584、2585、
2586、2587、2588、2589、2590、2591、2592、2593、2594、2595、2596、2597、2598、2599、2600、
2601、2602、2603、2604、2605、2606、2607、2608、2609、2610、2611、2612、2613、2614、2615、
2616、2617、2618、2619、2620、2621、2622、2623、2624、2625、2626、2627、2628、2629、2630、
2631、2632、2633、2634、2635、2636、2637、2638、2639、2640、2641、2642、2643、2644、2645、
2646、2647、2648、2649、2650、2651、2652、2653、2654、2655、2656、2657、2658、2659、2660、
2661、2662、2663、2664、2665、2666、2667、2668、2669、2670、2671、2672、2673、2674、2675、
2676、2677、2678、2679、2680、2681、2682、2683、2684、2685、2686、2687、2688、2689、2690、
2691、2692、2693、2694、2695、2696、2697、2698、2699、2700、2701、2702、2703、2704、2705、
2706、2707、2708、2709、2710、2711、2712、2713、2714、2715、2716、2717、2718、2719、2720、
2721、2722、2723、2724、2725、2726、2727、2728、2729、2730、2731、2732、2733、2734、2735、
2736、2737、2738、2739、2740、2741、2742、2743、2744、2745、2746、2747、2748、2749、2750、
2751、2752、2753、2754、2755、2756、2757、2758、2759、2760、2761、2762、2763、2764、2765、
2766、2767、2768、2769、2770、2771、2772、2773、2774、2775、2776、2777、2778、2779、2780、
2781、2782、2783、2784、2785、2786、2787、2788、2789、2790、2791、2792、2793、2794、2795、
2796、2797、2798、2799、2800、2801、2802、2803、2804、2805、2806、2807、2808、2809、2810、
2811、2812、2813、2814、2815、2816、2817、2818、2819、2820、2821、2822、2823、2824、2825、
2826、2827、2828、2829、2830、2831、2832、2833、2834、2835、2836、2837、2838、2839、2840、
2841、2842、2843、2844、2845、2846、2847、2848、2849、2850、2851、2852、2853、2854、2855、
2856、2857、2858、2859、2860、2861、2862、2863、2864、2865、2866、2867、2868、2869、2870、
2871、2872、2873、2874、2875、2876、2877、2878、2879、2880、2881、2882、2883、2884、2885、
2886、2887、2888、2889、2890、2891、2892、2893、2894、2895、2896、2897、2898、2899、2900、
2901、2902、2903、2904、2905、2906、2907、2908、2909、2910、2911、2912、2913、2914、2915、
2916、2917、2918、2919、2920、2921、2922、2923、2924、2925、2926、2927、2928、2929、2930、
2931、2932、2933、2934、2935、2936、2937、2938、2939、2940、2941、2942、2943、2944、2945、
2946、2947、2948、2949、2950、2951、2952、2953、2954、2955、2956、2957、2958、2959、2960、
2961、2962、2963、2964、2965、2966、2967、2968、2969、2970、2971、2972、2973、2974、2975、
2976、2977、2978、2979、2980、2981、2982、2983、2984、2985、2986、2987、2988、2989、2990、
2991、2992、2993、2994、2995、2996、2997、2998、2999、3000、3001、3002、3003、3004、3005、
3006、3007、3008、3009、3010、3011、3012、3013、3014、3015、3016、3017、3018、3019、3020、
3021、3022、3023、3024、3025、3026、3027、3028、3029、3030、3031、3032、3033、3034、3035、
3036、3037、3038、3039、3040、3041、3042、3043、3044、3045、3046、3047、3048、3049、3050、
3051、3052、3053、3054、3055、3056、3057、3058、3059、3060、3061、3062、3063、3064、3065、
3066、3067、3068、3069、3070、3071、3072、3073、3074、3075、3076、3077、3078、3079、3080、
3081、3082、3083、3084、3085、3086、3087、3088、3089、3090、3091、3092、3093、3094、3095、
3096、3097、3098、3099、3100、3101、3102、3103、3104、3105、3106、3107、3108、3109、3110、
3111、3112、3113、3114、3115、3116、3117、3118、3119、3120、3121、3122、3123、3124、3125、
3126、3127、3128、3129、3130、3131、3132、3133、3134、3135、3136、3137、3138、3139、3140、

3141、3142、3143、3144、3145、3146、3147、3148、3149、3150、3151、3152、3153、3154、3155、3156、3157、3158、3159、3160、3161、3162、3163、3164、3165、3166、3167、3168、3169、3170、3171、3172、3173、3174、3175、3176、3177、3178、3179、3180、3181、3182、3183、3184、3185、3186、3187、3188、3189、3190、3191、3192、3193、3194、3195、3196、3197、3198、3199、3200、3201、3202、3203、3204、3205、3206、3207、3208、3209、3210、3211、3212、3213、3214、3215、3216、3217、3218、3219、3220、3221、3222、3223、3224、3225、3226、3227、3228、3229、3230、3231、3232、3233、3234、3235、3236、3237、3238、3239、3240、3241、3242、3243、3244、3245、3246、3247、3248、3249和3250个核苷酸。病毒基因组的任何填充区的长度可以是50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、800-850、850-900、900-950、950-1000、1000-1050、1050-1100、1100-1150、1150-1200、1200-1250、1250-1300、1300-1350、1350-1400、1400-1450、1450-1500、1500-1550、1550-1600、1600-1650、1650-1700、1700-1750、1750-1800、1800-1850、1850-1900、1900-1950、1950-2000、2000-2050、2050-2100、2100-2150、2150-2200、2200-2250、2250-2300、2300-2350、2350-2400、2400-2450、2450-2500、2500-2550、2550-2600、2600-2650、2650-2700、2700-2750、2750-2800、2800-2850、2850-2900、2900-2950、2950-3000、3000-3050、3050-3100、3100-3150、3150-3200和3200-3250个核苷酸。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约55个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约56个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约97个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约103个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约105个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约357个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约363个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约712个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约714个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约1203个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约1209个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约1512个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约1519个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约2395个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约2403个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约2405个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约3013个核苷酸的填充区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约3021个核苷酸的填充区。

[0864] 在一个实施方案中，AAV颗粒病毒基因组可包含至少一个多重填充序列区。填充区的长度可以独立地为例如但不限于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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、

187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、662、663、664、665、666、667、668、669、670、671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、714、715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、733、734、735、736、737、738、739、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、779、780、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、793、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、901、902、903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、925、926、927、

928、929、930、931、932、933、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999、1000、1001、1002、1003、1004、1005、1006、1007、1008、1009、1010、1011、1012、1013、1014、1015、1016、1017、1018、1019、1020、1021、1022、1023、1024、1025、1026、1027、1028、1029、1030、1031、1032、1033、1034、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1044、1045、1046、1047、1048、1049、1050、1051、1052、1053、1054、1055、1056、1057、1058、1059、1060、1061、1062、1063、1064、1065、1066、1067、1068、1069、1070、1071、1072、1073、1074、1075、1076、1077、1078、1079、1080、1081、1082、1083、1084、1085、1086、1087、1088、1089、1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1106、1107、1108、1109、1110、1111、1112、1113、1114、1115、1116、1117、1118、1119、1120、1121、1122、1123、1124、1125、1126、1127、1128、1129、1130、1131、1132、1133、1134、1135、1136、1137、1138、1139、1140、1141、1142、1143、1144、1145、1146、1147、1148、1149、1150、1151、1152、1153、1154、1155、1156、1157、1158、1159、1160、1161、1162、1163、1164、1165、1166、1167、1168、1169、1170、1171、1172、1173、1174、1175、1176、1177、1178、1179、1180、1181、1182、1183、1184、1185、1186、1187、1188、1189、1190、1191、1192、1193、1194、1195、1196、1197、1198、1199、1200、1201、1202、1203、1204、1205、1206、1207、1208、1209、1210、1211、1212、1213、1214、1215、1216、1217、1218、1219、1220、1221、1222、1223、1224、1225、1226、1227、1228、1229、1230、1231、1232、1233、1234、1235、1236、1237、1238、1239、1240、1241、1242、1243、1244、1245、1246、1247、1248、1249、1250、1251、1252、1253、1254、1255、1256、1257、1258、1259、1260、1261、1262、1263、1264、1265、1266、1267、1268、1269、1270、1271、1272、1273、1274、1275、1276、1277、1278、1279、1280、1281、1282、1283、1284、1285、1286、1287、1288、1289、1290、1291、1292、1293、1294、1295、1296、1297、1298、1299、1300、1301、1302、1303、1304、1305、1306、1307、1308、1309、1310、1311、1312、1313、1314、1315、1316、1317、1318、1319、1320、1321、1322、1323、1324、1325、1326、1327、1328、1329、1330、1331、1332、1333、1334、1335、1336、1337、1338、1339、1340、1341、1342、1343、1344、1345、1346、1347、1348、1349、1350、1351、1352、1353、1354、1355、1356、1357、1358、1359、1360、1361、1362、1363、1364、1365、1366、1367、1368、1369、1370、1371、1372、1373、1374、1375、1376、1377、1378、1379、1380、1381、1382、1383、1384、1385、1386、1387、1388、1389、1390、1391、1392、1393、1394、1395、1396、1397、1398、1399、1400、1401、1402、1403、1404、1405、1406、1407、1408、1409、1410、1411、1412、1413、1414、1415、1416、1417、1418、1419、1420、1421、1422、1423、1424、1425、1426、1427、1428、1429、1430、1431、1432、1433、1434、1435、1436、1437、1438、1439、1440、1441、1442、1443、1444、1445、1446、1447、1448、1449、1450、1451、1452、1453、1454、1455、1456、1457、1458、1459、1460、1461、1462、1463、1464、1465、1466、1467、1468、1469、1470、1471、1472、1473、1474、1475、1476、1477、1478、1479、1480、1481、1482、1483、1484、1485、1486、1487、1488、1489、1490、1491、1492、1493、1494、1495、1496、1497、1498、1499、1500、1501、1502、1503、1504、1505、1506、1507、1508、1509、1510、1511、1512、1513、1514、1515、1516、1517、1518、1519、1520、1521、1522、1523、1524、1525、1526、1527、

1528、1529、1530、1531、1532、1533、1534、1535、1536、1537、1538、1539、1540、1541、1542、
1543、1544、1545、1546、1547、1548、1549、1550、1551、1552、1553、1554、1555、1556、1557、
1558、1559、1560、1561、1562、1563、1564、1565、1566、1567、1568、1569、1570、1571、1572、
1573、1574、1575、1576、1577、1578、1579、1580、1581、1582、1583、1584、1585、1586、1587、
1588、1589、1590、1591、1592、1593、1594、1595、1596、1597、1598、1599、1600、1601、1602、
1603、1604、1605、1606、1607、1608、1609、1610、1611、1612、1613、1614、1615、1616、1617、
1618、1619、1620、1621、1622、1623、1624、1625、1626、1627、1628、1629、1630、1631、1632、
1633、1634、1635、1636、1637、1638、1639、1640、1641、1642、1643、1644、1645、1646、1647、
1648、1649、1650、1651、1652、1653、1654、1655、1656、1657、1658、1659、1660、1661、1662、
1663、1664、1665、1666、1667、1668、1669、1670、1671、1672、1673、1674、1675、1676、1677、
1678、1679、1680、1681、1682、1683、1684、1685、1686、1687、1688、1689、1690、1691、1692、
1693、1694、1695、1696、1697、1698、1699、1700、1701、1702、1703、1704、1705、1706、1707、
1708、1709、1710、1711、1712、1713、1714、1715、1716、1717、1718、1719、1720、1721、1722、
1723、1724、1725、1726、1727、1728、1729、1730、1731、1732、1733、1734、1735、1736、1737、
1738、1739、1740、1741、1742、1743、1744、1745、1746、1747、1748、1749、1750、1751、1752、
1753、1754、1755、1756、1757、1758、1759、1760、1761、1762、1763、1764、1765、1766、1767、
1768、1769、1770、1771、1772、1773、1774、1775、1776、1777、1778、1779、1780、1781、1782、
1783、1784、1785、1786、1787、1788、1789、1790、1791、1792、1793、1794、1795、1796、1797、
1798、1799、1800、1801、1802、1803、1804、1805、1806、1807、1808、1809、1810、1811、1812、
1813、1814、1815、1816、1817、1818、1819、1820、1821、1822、1823、1824、1825、1826、1827、
1828、1829、1830、1831、1832、1833、1834、1835、1836、1837、1838、1839、1840、1841、1842、
1843、1844、1845、1846、1847、1848、1849、1850、1851、1852、1853、1854、1855、1856、1857、
1858、1859、1860、1861、1862、1863、1864、1865、1866、1867、1868、1869、1870、1871、1872、
1873、1874、1875、1876、1877、1878、1879、1880、1881、1882、1883、1884、1885、1886、1887、
1888、1889、1890、1891、1892、1893、1894、1895、1896、1897、1898、1899、1900、1901、1902、
1903、1904、1905、1906、1907、1908、1909、1910、1911、1912、1913、1914、1915、1916、1917、
1918、1919、1920、1921、1922、1923、1924、1925、1926、1927、1928、1929、1930、1931、1932、
1933、1934、1935、1936、1937、1938、1939、1940、1941、1942、1943、1944、1945、1946、1947、
1948、1949、1950、1951、1952、1953、1954、1955、1956、1957、1958、1959、1960、1961、1962、
1963、1964、1965、1966、1967、1968、1969、1970、1971、1972、1973、1974、1975、1976、1977、
1978、1979、1980、1981、1982、1983、1984、1985、1986、1987、1988、1989、1990、1991、1992、
1993、1994、1995、1996、1997、1998、1999、2000、2001、2002、2003、2004、2005、2006、2007、
2008、2009、2010、2011、2012、2013、2014、2015、2016、2017、2018、2019、2020、2021、2022、
2023、2024、2025、2026、2027、2028、2029、2030、2031、2032、2033、2034、2035、2036、2037、
2038、2039、2040、2041、2042、2043、2044、2045、2046、2047、2048、2049、2050、2051、2052、
2053、2054、2055、2056、2057、2058、2059、2060、2061、2062、2063、2064、2065、2066、2067、
2068、2069、2070、2071、2072、2073、2074、2075、2076、2077、2078、2079、2080、2081、2082、
2083、2084、2085、2086、2087、2088、2089、2090、2091、2092、2093、2094、2095、2096、2097、
2098、2099、2100、2101、2102、2103、2104、2105、2106、2107、2108、2109、2110、2111、2112、

2113、2114、2115、2116、2117、2118、2119、2120、2121、2122、2123、2124、2125、2126、2127、
2128、2129、2130、2131、2132、2133、2134、2135、2136、2137、2138、2139、2140、2141、2142、
2143、2144、2145、2146、2147、2148、2149、2150、2151、2152、2153、2154、2155、2156、2157、
2158、2159、2160、2161、2162、2163、2164、2165、2166、2167、2168、2169、2170、2171、2172、
2173、2174、2175、2176、2177、2178、2179、2180、2181、2182、2183、2184、2185、2186、2187、
2188、2189、2190、2191、2192、2193、2194、2195、2196、2197、2198、2199、2200、2201、2202、
2203、2204、2205、2206、2207、2208、2209、2210、2211、2212、2213、2214、2215、2216、2217、
2218、2219、2220、2221、2222、2223、2224、2225、2226、2227、2228、2229、2230、2231、2232、
2233、2234、2235、2236、2237、2238、2239、2240、2241、2242、2243、2244、2245、2246、2247、
2248、2249、2250、2251、2252、2253、2254、2255、2256、2257、2258、2259、2260、2261、2262、
2263、2264、2265、2266、2267、2268、2269、2270、2271、2272、2273、2274、2275、2276、2277、
2278、2279、2280、2281、2282、2283、2284、2285、2286、2287、2288、2289、2290、2291、2292、
2293、2294、2295、2296、2297、2298、2299、2300、2301、2302、2303、2304、2305、2306、2307、
2308、2309、2310、2311、2312、2313、2314、2315、2316、2317、2318、2319、2320、2321、2322、
2323、2324、2325、2326、2327、2328、2329、2330、2331、2332、2333、2334、2335、2336、2337、
2338、2339、2340、2341、2342、2343、2344、2345、2346、2347、2348、2349、2350、2351、2352、
2353、2354、2355、2356、2357、2358、2359、2360、2361、2362、2363、2364、2365、2366、2367、
2368、2369、2370、2371、2372、2373、2374、2375、2376、2377、2378、2379、2380、2381、2382、
2383、2384、2385、2386、2387、2388、2389、2390、2391、2392、2393、2394、2395、2396、2397、
2398、2399、2400、2401、2402、2403、2404、2405、2406、2407、2408、2409、2410、2411、2412、
2413、2414、2415、2416、2417、2418、2419、2420、2421、2422、2423、2424、2425、2426、2427、
2428、2429、2430、2431、2432、2433、2434、2435、2436、2437、2438、2439、2440、2441、2442、
2443、2444、2445、2446、2447、2448、2449、2450、2451、2452、2453、2454、2455、2456、2457、
2458、2459、2460、2461、2462、2463、2464、2465、2466、2467、2468、2469、2470、2471、2472、
2473、2474、2475、2476、2477、2478、2479、2480、2481、2482、2483、2484、2485、2486、2487、
2488、2489、2490、2491、2492、2493、2494、2495、2496、2497、2498、2499、2500、2501、2502、
2503、2504、2505、2506、2507、2508、2509、2510、2511、2512、2513、2514、2515、2516、2517、
2518、2519、2520、2521、2522、2523、2524、2525、2526、2527、2528、2529、2530、2531、2532、
2533、2534、2535、2536、2537、2538、2539、2540、2541、2542、2543、2544、2545、2546、2547、
2548、2549、2550、2551、2552、2553、2554、2555、2556、2557、2558、2559、2560、2561、2562、
2563、2564、2565、2566、2567、2568、2569、2570、2571、2572、2573、2574、2575、2576、2577、
2578、2579、2580、2581、2582、2583、2584、2585、2586、2587、2588、2589、2590、2591、2592、
2593、2594、2595、2596、2597、2598、2599、2600、2601、2602、2603、2604、2605、2606、2607、
2608、2609、2610、2611、2612、2613、2614、2615、2616、2617、2618、2619、2620、2621、2622、
2623、2624、2625、2626、2627、2628、2629、2630、2631、2632、2633、2634、2635、2636、2637、
2638、2639、2640、2641、2642、2643、2644、2645、2646、2647、2648、2649、2650、2651、2652、
2653、2654、2655、2656、2657、2658、2659、2660、2661、2662、2663、2664、2665、2666、2667、
2668、2669、2670、2671、2672、2673、2674、2675、2676、2677、2678、2679、2680、2681、2682、
2683、2684、2685、2686、2687、2688、2689、2690、2691、2692、2693、2694、2695、2696、2697、

2698、2699、2700、2701、2702、2703、2704、2705、2706、2707、2708、2709、2710、2711、2712、2713、2714、2715、2716、2717、2718、2719、2720、2721、2722、2723、2724、2725、2726、2727、2728、2729、2730、2731、2732、2733、2734、2735、2736、2737、2738、2739、2740、2741、2742、2743、2744、2745、2746、2747、2748、2749、2750、2751、2752、2753、2754、2755、2756、2757、2758、2759、2760、2761、2762、2763、2764、2765、2766、2767、2768、2769、2770、2771、2772、2773、2774、2775、2776、2777、2778、2779、2780、2781、2782、2783、2784、2785、2786、2787、2788、2789、2790、2791、2792、2793、2794、2795、2796、2797、2798、2799、2800、2801、2802、2803、2804、2805、2806、2807、2808、2809、2810、2811、2812、2813、2814、2815、2816、2817、2818、2819、2820、2821、2822、2823、2824、2825、2826、2827、2828、2829、2830、2831、2832、2833、2834、2835、2836、2837、2838、2839、2840、2841、2842、2843、2844、2845、2846、2847、2848、2849、2850、2851、2852、2853、2854、2855、2856、2857、2858、2859、2860、2861、2862、2863、2864、2865、2866、2867、2868、2869、2870、2871、2872、2873、2874、2875、2876、2877、2878、2879、2880、2881、2882、2883、2884、2885、2886、2887、2888、2889、2890、2891、2892、2893、2894、2895、2896、2897、2898、2899、2900、2901、2902、2903、2904、2905、2906、2907、2908、2909、2910、2911、2912、2913、2914、2915、2916、2917、2918、2919、2920、2921、2922、2923、2924、2925、2926、2927、2928、2929、2930、2931、2932、2933、2934、2935、2936、2937、2938、2939、2940、2941、2942、2943、2944、2945、2946、2947、2948、2949、2950、2951、2952、2953、2954、2955、2956、2957、2958、2959、2960、2961、2962、2963、2964、2965、2966、2967、2968、2969、2970、2971、2972、2973、2974、2975、2976、2977、2978、2979、2980、2981、2982、2983、2984、2985、2986、2987、2988、2989、2990、2991、2992、2993、2994、2995、2996、2997、2998、2999、3000、3001、3002、3003、3004、3005、3006、3007、3008、3009、3010、3011、3012、3013、3014、3015、3016、3017、3018、3019、3020、3021、3022、3023、3024、3025、3026、3027、3028、3029、3030、3031、3032、3033、3034、3035、3036、3037、3038、3039、3040、3041、3042、3043、3044、3045、3046、3047、3048、3049、3050、3051、3052、3053、3054、3055、3056、3057、3058、3059、3060、3061、3062、3063、3064、3065、3066、3067、3068、3069、3070、3071、3072、3073、3074、3075、3076、3077、3078、3079、3080、3081、3082、3083、3084、3085、3086、3087、3088、3089、3090、3091、3092、3093、3094、3095、3096、3097、3098、3099、3100、3101、3102、3103、3104、3105、3106、3107、3108、3109、3110、3111、3112、3113、3114、3115、3116、3117、3118、3119、3120、3121、3122、3123、3124、3125、3126、3127、3128、3129、3130、3131、3132、3133、3134、3135、3136、3137、3138、3139、3140、3141、3142、3143、3144、3145、3146、3147、3148、3149、3150、3151、3152、3153、3154、3155、3156、3157、3158、3159、3160、3161、3162、3163、3164、3165、3166、3167、3168、3169、3170、3171、3172、3173、3174、3175、3176、3177、3178、3179、3180、3181、3182、3183、3184、3185、3186、3187、3188、3189、3190、3191、3192、3193、3194、3195、3196、3197、3198、3199、3200、3201、3202、3203、3204、3205、3206、3207、3208、3209、3210、3211、3212、3213、3214、3215、3216、3217、3218、3219、3220、3221、3222、3223、3224、3225、3226、3227、3228、3229、3230、3231、3232、3233、3234、3235、3236、3237、3238、3239、3240、3241、3242、3243、3244、3245、3246、3247、3248、3249和3250个核苷酸。病毒基因组的任何填充区的长度可以是50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、

800-850、850-900、900-950、950-1000、1000-1050、1050-1100、1100-1150、1150-1200、1200-1250、1250-1300、1300-1350、1350-1400、1400-1450、1450-1500、1500-1550、1550-1600、1600-1650、1650-1700、1700-1750、1750-1800、1800-1850、1850-1900、1900-1950、1950-2000、2000-2050、2050-2100、2100-2150、2150-2200、2200-2250、2250-2300、2300-2350、2350-2400、2400-2450、2450-2500、2500-2550、2550-2600、2600-2650、2650-2700、2700-2750、2750-2800、2800-2850、2850-2900、2900-2950、2950-3000、3000-3050、3050-3100、3100-3150、3150-3200和3200-3250个核苷酸。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约55个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约56个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约97个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约103个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约105个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约357个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约363个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约712个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约714个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约1203个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约1209个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约1512个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约1519个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约2395个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约2403个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约2405个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约3013个核苷酸的填充区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约3021个核苷酸的填充区。

[0865] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组包含至少一个填充序列区。表19中描述了填充序列区的非限制性实例。

[0866] 表19. 填充序列区

序列区命名	SEQ ID NO
FILL1	1796
FILL2	1797
FILL3	1798
FILL4	1799
FILL5	1800
FILL6	1801
FILL7	1802
FILL8	1803
FILL9	1804
FILL10	1805
FILL11	1806
FILL12	1807
FILL13	1808
FILL14	1809
FILL15	1810
FILL16	1811
FILL17	1812
FILL18	1813

[0867] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含一个填充序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL1序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL2序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL3序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL4序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL5序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL6序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL7序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL8序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL9序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL10序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL11序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL12序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL13序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL14序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL15序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL16序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL17序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是FILL18序列区。

[0870] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含两个填充序列区。在一个实施方案中, 两个填充序列区是FILL1序列区和FILL2序列区。在一个实施方案中, 填充序列区是

一个实施方案中,填充序列区是FILL14序列区、FILL16序列区和FILL18序列区。在一个实施方案中,填充序列区是FILL14序列区、FILL17序列区和FILL18序列区。在一个实施方案中,填充序列区是FILL15序列区、FILL16序列区和FILL17序列区。在一个实施方案中,填充序列区是FILL15序列区、FILL16序列区和FILL18序列区。在一个实施方案中,填充序列区是FILL15序列区、FILL17序列区和FILL18序列区。在一个实施方案中,填充序列区是FILL16序列区、FILL17序列区和FILL18序列区。

[0872] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组可包含至少一个增强子序列区。增强子序列区的长度可以独立地是例如但不限于300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399和400个核苷酸。病毒基因组的增强子区的长度可以是300-310、300-325、305-315、310-320、315-325、320-330、325-335、325-350、330-340、335-345、340-350、345-355、350-360、350-375、355-365、360-370、365-375、370-380、375-385、375-400、380-390、385-395和390-400个核苷酸。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约303个核苷酸的增强子区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约382个核苷酸的增强子区。

[0873] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组包含至少一个增强子序列区。表20中描述了增强子序列区的非限制性实例。

[0874] 表20. 增强子序列区

[0875]	序列区名称	SEQ ID NO
	增强子1	1814
	增强子2	1815

[0876] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组包含一个增强子序列区。在一个实施方案中,增强子序列区是增强子1序列区。在一个实施方案中,增强子序列区是增强子2序列区。

[0877] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组包含两个增强子序列区。在一个实施方案中,增强子序列区是增强子1序列区和增强子2序列区。

[0878] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组可包含至少一个启动子序列区。启动子序列区的长度可以独立地是例如但不限于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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、

210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599和600个核苷酸。病毒基因组的启动子区的长度可以是4-10、10-20、10-50、20-30、30-40、40-50、50-60、50-100、60-70、70-80、80-90、90-100、100-110、100-150、110-120、120-130、130-140、140-150、150-160、150-200、160-170、170-180、180-190、190-200、200-210、200-250、210-220、220-230、230-240、240-250、250-260、250-300、260-270、270-280、280-290、290-300、300-310、300-350、310-320、320-330、330-340、340-350、350-360、350-400、360-370、370-380、380-390、390-400、400-410、400-450、410-420、420-430、430-440、440-450、450-460、450-500、460-470、470-480、480-490、490-500、500-510、500-550、510-520、520-530、530-540、540-550、550-560、550-600、560-570、570-580、580-590和590-600个核苷酸。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约4个核苷酸的启动子区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约17个核苷酸的启动子区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约204个核苷酸的启动子区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约219个核苷酸的启动子区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约260个核苷酸的启动子区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约303个核苷酸的启动子区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约382个核苷酸的启动子区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约588个核苷酸的启动子区。

[0879] 在一个实施方案中，AAV颗粒病毒基因组包含至少一个启动子序列区。表21中描述了启动子序列区的非限制性实例。

[0880] 表21. 启动子序列区

[0881]	序列区名称	SEQ ID NO 或
		序列
	启动子 1	1816
	启动子 2	1817
[0882]	启动子 3	GTTG
	启动子 4	1818
	启动子 5	1819
	启动子 6	1820

[0883] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含一个启动子序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子1。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子2。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子3。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子4。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子5。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子6。

[0884] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含两个启动子序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子1序列区和启动子2序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子1序列区和启动子3序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子1序列区和启动子4序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子1序列区和启动子5序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子1序列区和启动子6序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子2序列区和启动子3序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子2序列区和启动子4序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子2序列区和启动子5序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子2序列区和启动子6序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子3序列区和启动子4序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子3序列区和启动子5序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子3序列区和启动子6序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子4序列区和启动子5序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子4序列区和启动子6序列区。在一个实施方案中, 启动子序列区是启动子5序列区和启动子6序列区。

[0885] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组可包含至少一个外显子序列区。外显子区的长度可以独立地是例如但不限于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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149和150个核苷酸。病毒基因组的外显子区域的长度可以是2-10、5-10、5-15、10-20、10-30、10-40、15-20、15-25、20-30、20-40、20-50、25-30、25-35、30-40、30-50、30-60、35-40、35-45、40-50、40-60、

40-70、45-50、45-55、50-60、50-70、50-80、55-60、55-65、60-70、60-80、60-90、65-70、65-75、70-80、70-90、70-100、75-80、75-85、80-90、80-100、80-110、85-90、85-95、90-100、90-110、90-120、95-100、95-105、100-110、100-120、100-130、105-110、105-115、110-120、110-130、110-140、115-120、115-125、120-130、120-140、120-150、125-130、125-135、130-140、130-150、135-140、135-145、140-150和145-150个核苷酸。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约53个核苷酸的外显子区域。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约134个核苷酸的外显子区域。

[0886] 在一个实施方案中，AAV颗粒病毒基因组包含至少一个外显子序列区。表22中描述了外显子序列区的非限制性实例。

[0887] 表22. 外显子序列区

[0888]	序列区名称	SEQ ID NO
	外显子1	1821
	外显子2	1822

[0889] 在一个实施方案中，AAV颗粒病毒基因组包含一个外显子序列区。在一个实施方案中，外显子序列区是外显子1序列区。在一个实施方案中，外显子序列区是外显子2序列区。

[0890] 在一个实施方案中，AAV颗粒病毒基因组包含两个外显子序列区。在一个实施方案中，外显子序列区是外显子1序列区和外显子2序列区。

[0891] 在一个实施方案中，AAV颗粒病毒基因组可包含至少一个内含子序列区。内含子区的长度可以独立地是例如但不限于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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349和350个核苷酸。病毒基因组的内含子区的长度可以是25-35、25-50、35-45、45-55、50-75、55-65、65-75、75-85、75-100、85-95、95-105、100-125、105-115、115-125、125-135、125-150、135-145、145-155、150-175、155-165、165-175、175-185、175-200、185-195、195-205、200-225、205-215、215-225、225-235、225-250、235-245、245-255、250-275、255-265、265-275、275-285、275-300、285-295、295-305、

300-325、305-315、315-325、325-335、325-350和335-345个核苷酸。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约32个核苷酸的内含子区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约172个核苷酸的内含子区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约201个核苷酸的内含子区。作为非限制性实例,病毒基因组包含长度为约347个核苷酸的内含子区。

[0892] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组包含至少一个内含子序列区。表23中描述了内含子序列区的非限制性实例。

[0893] 表23. 内含子序列区

序列区名称	SEQ ID NO
内含子1	1823
内含子2	1824
内含子3	1825
内含子4	1826

[0895] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组包含一个内含子序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子1序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子2序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子3序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子4序列区。

[0896] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组包含两个内含子序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子1序列区和内含子2序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子1序列区和内含子3序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子1序列区和内含子4序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子2序列区和内含子3序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子2序列区和内含子4序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子3序列区和内含子4序列区。

[0897] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组包含3个内含子序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子1序列区、内含子2序列区和内含子3序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子1序列区、内含子2序列区和内含子4序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子1序列区、内含子3序列区和内含子4序列区。在一个实施方案中,内含子序列区是内含子2序列区、内含子3序列区和内含子4序列区。

[0898] 在一个实施方案中,AAV颗粒病毒基因组可包含至少一个聚腺苷酸化信号序列区。聚腺苷酸化信号区序列区的长度可以独立地是例如但不限于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、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、

225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599和600个核苷酸。病毒基因组的聚腺苷酸化信号序列区可以是4-10、10-20、10-50、20-30、30-40、40-50、50-60、50-100、60-70、70-80、80-90、90-100、100-110、100-150、110-120、120-130、130-140、140-150、150-160、150-200、160-170、170-180、180-190、190-200、200-210、200-250、210-220、220-230、230-240、240-250、250-260、250-300、260-270、270-280、280-290、290-300、300-310、300-350、310-320、320-330、330-340、340-350、350-360、350-400、360-370、370-380、380-390、390-400、400-410、400-450、410-420、420-430、430-440、440-450、450-460、450-500、460-470、470-480、480-490、490-500、500-510、500-550、510-520、520-530、530-540、540-550、550-560、550-600、560-570、570-580、580-590和590-600个核苷酸。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约127个核苷酸的聚腺苷酸化信号序列区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约225个核苷酸的聚腺苷酸化信号序列区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约476个核苷酸的聚腺苷酸化信号序列区。作为非限制性实例，病毒基因组包含长度为约477个核苷酸的聚腺苷酸化信号序列区。

[0899] 在一个实施方案中，AAV颗粒病毒基因组包含至少一个聚腺苷酸化 (polyA) 信号序列区。表24中描述了polyA信号序列区的非限制性实例。

[0900] 表24. PolyA信号序列区

[0901]

序列区名称	SEQ ID NO
PolyA1	1827
PolyA2	1828
PolyA3	1829

PolyA4	1830
--------	------

[0902] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含一个polyA信号序列区。在一个实施方案中, polyA信号序列区是PolyA1序列区。在一个实施方案中, polyA信号序列区是PolyA2序列区。在一个实施方案中, polyA信号序列区是PolyA3序列区。在一个实施方案中, polyA信号序列区是PolyA4序列区。

[0903] 在一个实施方案中, AAV颗粒病毒基因组包含多于一个polyA信号序列区。

[0904] 可以修饰AAV颗粒以增强递送效率。这样的包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的修饰的AAV颗粒可以被有效地包装, 并且可以被用于以高频率和最小的毒性成功地感染靶细胞。

[0905] 在一些实施方案中, 包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以是人血清型AAV颗粒。这样的人AAV颗粒可以源自任何已知的血清型, 例如源自血清型AAV1-AAV11中的任何一种。作为非限制性实例, AAV颗粒可以是在AAV1衍生的衣壳中包含AAV1衍生的基因组的载体; 在AAV2衍生的衣壳中包含AAV2衍生的基因组的载体; 在AAV4衍生的衣壳中包含AAV4衍生的基因组的载体; 在AAV6衍生的衣壳中包含AAV6衍生的基因组的载体或在AAV9衍生的衣壳中包含AAV9衍生的基因组的载体。

[0906] 在其他实施方案中, 包含用于编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以是假型杂交或嵌合AAV颗粒, 其包含源自至少两个不同的AAV血清型的序列和/或组分。假型AAV颗粒可以是包含衍生自一种AAV血清型的AAV基因组和至少部分衍生自不同AAV血清型的衣壳蛋白的载体。作为非限制性实例, 此类假型AAV颗粒可以是在AAV1衍生的衣壳中包含AAV2衍生的基因组的载体; 或在AAV6衍生的衣壳中包含AAV2衍生的基因组的载体; 或在AAV4衍生的衣壳中包含AAV2衍生的基因组的载体; 或在AAV9衍生衣壳中包含AAV2衍生的基因组的载体。以类似的方式, 本发明涵盖任何杂交或嵌合AAV颗粒。

[0907] 在其他实施方案中, 包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以用于将siRNA分子递送至中枢神经系统(例如, 美国专利号6, 180, 613; 其内容通过引用整体并入本文)。

[0908] 在一些方面, 包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以进一步包含修饰的衣壳, 其包括来自非病毒来源的肽。在其他方面, AAV颗粒可以包含CNS特异性嵌合衣壳, 以促进将编码的siRNA双链体递送至脑和脊髓。例如, 可以构建来自显示CNS嗜性的AAV变体的cap核苷酸序列的比对, 以识别可变区(VR)序列和结构。

[0909] 包含调节性多核苷酸的多顺反子AAV颗粒

[0910] 在一个实施方案中, AAV载体包含编码多于一种调节性多核苷酸的核酸序列。在一个实施方案中, AAV载体包含编码多于一个siRNA分子的核酸序列。AAV载体可以包含编码2、3、4、5、6、7、8、9或多于9个调节性多核苷酸的核酸序列。AAV载体可以包含编码2、3、4、5、6、7、8、9或多于9个siRNA分子的核酸序列。

[0911] 当AAV载体包含至少一个编码多于一种调节性多核苷酸(例如siRNA分子)的核酸序列时, AAV载体可以被称为多顺反子。当AAV载体的核酸序列编码靶向单个靶的调节性多核苷酸分子(例如siRNA分子)时, 则AAV载体可以被称为“单特异性多顺反子”AAV载体。当AAV载体的核酸序列编码靶向多于一个靶标的调节性多核苷酸分子(例如siRNA分子)时, 则AAV载体可称为“多特异性多顺反子”AAV载体。当AAV载体的核酸序列编码靶向两个靶标的

siRNA分子时,则AAV载体可以被称为“双特异性多顺反子”AAV载体。

[0912] 在一个实施方案中,AAV载体包含至少一个编码靶向单个靶基因的调节性多核苷酸(例如siRNA分子)的核酸序列。AAV载体可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或多于9个编码靶向单个靶基因的单个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)的核酸序列。作为非限制性实例,靶基因是HTT。作为另一个非限制性实例,靶基因是SOD1。

[0913] 在一个实施方案中,AAV载体是单特异性多顺反子AAV载体,并包含编码靶向靶基因的两个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)的核酸序列。一方面,调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含相同的有义链。在另一方面,调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含不同的有义链。一方面,调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含与靶基因序列上的相同区域具有至少80%互补性(例如80%、85%、90%、95%、99%或多于99%、80-85%、80-90%、85-90%、85-95%、90-95%、90-100%)的不同有义链。一方面,调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含与靶基因序列的不同区域具有互补性的不同有义链。作为非限制性实例,靶基因是HTT。作为另一个非限制性实例,靶基因是SOD1。

[0914] 在一个实施方案中,AAV载体是单特异性多顺反子AAV载体,并包含编码靶向靶基因的3个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)的核酸序列。一方面,调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含相同的有义链。另一方面,每个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含不同的有义链。另一方面,两个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含相同的有义链,第3个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含不同的有义链。一方面,每个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含与靶基因序列上的相同区域具有至少80%互补性(例如80%、85%、90%、95%、99%或多于99%、80-85%、80-90%、85-90%、85-95%、90-95%、90-100%)的不同的有义链。一方面,调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含不同的有义链,它们具有与靶基因序列不同区域的互补性。作为非限制性实例,靶基因是HTT。作为另一个非限制性实例,靶基因是SOD1。

[0915] 在一个实施方案中,AAV载体是单特异性多顺反子AAV载体,并包含编码靶向靶基因的4个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)的核酸序列。一方面,调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含相同的有义链。另一方面,每个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含不同的有义链。另一方面,两个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含第一有义链序列,其他两个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含第二有义链序列。另一方面,3个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含第一有义链序列,另外的调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含第二条有义链序列。一方面,每个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含与靶基因序列上的相同区域具有至少80%互补性(例如80%、85%、90%、95%、99%或多于99%、80-85%、80-90%、85-90%、85-95%、90-95%、90-100%)的不同的有义链。一方面,两个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含与靶基因序列上的相同区域具有至少80%互补性(例如80%、85%、90%、95%、99%或多于99%、80-85%、80-90%、85-90%、85-95%、90-95%、90-100%)的不同的有义链。一方面,调节性多核苷酸(例如siRNA分子)包含与靶基因序列的不同区域具有互补性的不同的有义链。作为非限制性实例,靶基因是HTT。作为另一个非限制性实例,靶基因是SOD1。

[0916] 在一个实施方案中,AAV颗粒是双特异性多顺反子AAV颗粒,并且包含编码两个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)的核酸序列。一个方面,一个调节性多核苷酸(例如siRNA分

子)靶向第一靶基因,而另一个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)靶向第二靶基因,并且可以减少蛋白和/或mRNA在中枢神经系统的至少一个区域中的表达,以治疗中枢神经系统疾病或病症。作为非限制性实例,靶基因是HTT和SOD1,疾病是HD和ALS。

[0917] 在一个实施方案中,AAV颗粒是多特异性多顺反子AAV颗粒,并且包含编码两个或更多个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)的核酸序列。一方面,一个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)靶向第一靶基因,其他调节性多核苷酸(例如siRNA分子)靶向第二靶基因,并且可以减少蛋白和/或mRNA在中枢神经系统的至少一个区域中的表达,以治疗中枢神经系统的疾病或病症。一方面,每个调节性多核苷酸(例如siRNA分子)靶向不同的mRNA以减少蛋白和/或mRNA在中枢神经系统的至少一个区域中的表达,从而治疗中枢神经的疾病或病症。作为非限制性实例,靶基因是HTT和SOD1,疾病是HD和ALS。

[0918] 在一个实施方案中,AAV颗粒可包含调节性多核苷酸,其包含多于一个分子支架序列。AAV颗粒可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或多于9个分子支架序列。

[0919] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含至少一个反向末端重复(ITR)序列区、至少一个增强子序列区、至少一个启动子序列区、两个调节性多核苷酸区和至少一个聚腺苷酸化信号序列区。

[0920] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。表25中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的ITR至ITR序列的非限制性实例。在表25中,描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及ITR至ITR序列(例如VOYPC1(SEQ ID NO:1831))的名称和序列标识符。

[0921] 表25. ITR至ITR序列中的序列区

[0922]

序列区	VOYPC1 (SEQ ID NO: 1831)	
	区域 SEQ ID NO	区域长度
5' ITR	1788	105
CMV 增强子	1814	382
CBA 启动子	1816	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.579)	1595	158
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.579)	1595	158
兔球蛋白 PolyA 信号	1827	127
3' ITR	1790	130

[0923] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1831(VOYPC1),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。

[0924] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含至少一个反向末端重复(ITR)序列区、至少一个增强子序列区、至少一个启动子序列区、至少一个内含子序列区、两个调节性多核苷酸区和至少一个聚腺苷酸化信号序列区。

[0925] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、SV40内含子序列区、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。表26和27中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的ITR至ITR序列的非限制性实例。在表26和27中,描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及ITR至ITR序列(例如VOYPC2(SEQ ID NO:1832))的名称和序列标识符。

[0926] 表26. ITR至ITR序列中的序列区

[0927]

序列区	VOYPC2 (SEQ ID NO: 1832)		VOYPC3 (SEQ ID NO: 1833)		VOYPC4 (SEQ ID NO: 1834)		VOYPC5 (SEQ ID NO: 1835)	
	区域 SEQ ID NO	区域长度						
	5' ITR	1788	105	1788	105	1788	105	1788
CMV 增强子	1814	382	1814	382	1814	382	1814	382
CBA 启动子	1816	260	1816	260	1816	260	1816	260
SV40 内含子	1823	172	1823	172	1823	172	1823	172
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	-	-	1589	158	-	-
调节性多核苷酸	-	-	1599	260	-	-	1599	260

[0928]

(VOYHTmi R-127.579)								
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	1589	158	-	-	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	-	-	-	-	1599	260	1599	260
兔球蛋白 PolyA 信号	1827	127	1827	127	1827	127	1827	127
3' ITR	1790	130	1790	130	1790	130	1790	130

[0929] 表27. ITR至ITR序列中的序列区

[0930]

序列区	VOYPC6 (SEQ ID NO: 1836)		VOYPC7 (SEQ ID NO: 1837)		VOYPC8 (SEQ ID NO: 1838)	
	区域 SEQ ID NO	区域长度	区域 SEQ ID NO	区域长度	区域 SEQ ID NO	区域长度
	5' ITR	1788	105	1788	105	1788
CMV 增强子	1814	382	1814	382	1814	382
CBA 启动子	1816	260	1816	260	1816	260
SV40 内含子	1826	201	1826	201	1826	201
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.016)	1593	260	-	-	1593	260
调节性多核苷酸	-	-	1595	158	-	-

[0931]

调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.579)						
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.016)	1593	260	1593	260	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.579)	-	-	-	-	1595	158
兔球蛋白 PolyA 信号	1827	127	1827	127	1827	127
3' ITR	1790	130	1790	130	1790	130

[0932] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO: 1832 (VOYPC2),

其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、SV40内含子序列区、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。

[0933] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1833 (VOYPC3), 其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、SV40内含子序列区、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。

[0934] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1834 (VOYPC4), 其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、SV40内含子序列区、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。

[0935] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1835 (VOYPC5), 其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、SV40内含子序列区、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。

[0936] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1836 (VOYPC6), 其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、SV40内含子序列区、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。

[0937] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1837 (VOYPC7), 其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、SV40内含子序列区、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。

[0938] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1838 (VOYPC8), 其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、SV40内含子序列区、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。

[0939] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含至少一个反向末端重复 (ITR) 序列区、至少一个启动子序列区、两个调节性多核苷酸区和至少一个聚腺苷酸化信号序列区。

[0940] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含至少一个反向末端重复 (ITR) 序列区、至少一个启动子序列区和两个调节性多核苷酸区。

[0941] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、CBA启动子序列区、H1启动子序列区和两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸序列区。表28中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的ITR至ITR序列的非限制性实例。在表28中,描述了序列区的序列标识符或序列 (区域SEQ ID NO) 以及序列区的长度 (区域长度), 以及ITR至ITR序列 (例如VOYPC1 (SEQ ID NO:1831)) 的名称和序列标识符。

[0942] 表28. ITR至ITR序列中的序列区

[0943]	序列区	VOYPC9 (SEQ ID NO: 1839)	VOYPC10 (SEQ ID NO: 1840)	VOYPC11 (SEQ ID NO: 1841)	VOYPC12 (SEQ ID NO: 1842)				
		区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长 度
	5' ITR	1788	105	1788	105	1788	105	1788	105
	CBA 启动子	1819	219	1819	219	1819	219	1819	219
	调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	-	-	-	-	1589	158
[0944]	调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	-	-	1599	260	1599	260	-	-
	H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219	1819	219
	调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	-	-	1589	158	-	-
	调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	-	-	1599	260	-	-	1599	260
	3' ITR	1790	130	1790	130	1790	130	1790	130

[0945] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含Po1 III启动子。在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含3型Po1 III启动子。在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含H1启动子。在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含U6启动子。在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含U3启动子。在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含U7启动子。在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含7SK启动子。在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含MRP启动子。在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含Po1 II启动子。在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含截短的Po1 II启动子。

[0946] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1839(VOYPC9),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CBA启动子序列区、H1启动子序列区和两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[0947] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1840(VOYPC10),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CBA启动子序列区、H1启动子序列区和两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[0948] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1841(VOYPC11),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CBA启动子序列区、H1启动子序列区和两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[0949] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1842(VOYPC12),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CBA启动子序列区、H1启动子序列区和两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[0950] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、两个H1启动子序列区、两个靶向相同目标基因的调节性多核苷酸序列区和两个H1终止子序列,其中每个调节性多核苷酸序列区由其自身Pol III启动子(例如3型Pol III启动子,例如H1启动子),其后是其自身启动子终止子序列,例如H1终止子序列驱动。表29中描述了在具有这些序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的ITR至ITR序列的非限制性实例。在表29中,描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及ITR至ITR序列(例如VOYPC59(SEQ ID NO:2682))的名称和序列标识符。

[0951] 表29. ITR至ITR序列中的序列区

[0952]

序列区	VOYPC59 (SEQ ID NO: 2682)		VOYPC60 (SEQ ID NO: 2683)		VOYPC61 (SEQ ID NO: 2684)		VOYPC62 (SEQ ID NO: 2685)	
	区域 SEQ ID NO	区域长度						
5' ITR	1788	105	1788	105	1788	105	1788	105
H1 启动子	1819	219	1819	219				
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	1589	158				
H1 终止子	2681	5	2681	5				
H1 启动子			1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)			1599	260	1599	260	1599	260
H1 终止子			2681	5	2681	5	2681	5
H1 启动子	1819	219			1819	219		
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158			1589	158		
H1 终止子	2681	5			2681	5		
H1 启动子							1819	219

[0953]

调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)							1599	260
H1 终止子							2681	5
3' ITR	1790	130	1790	130	1790	130	1790	130

[0954] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:2682 (VOYPC59),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、两个H1启动子序列区、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和两个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[0955] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:2683 (VOYPC60),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、两个H1启动子序列区、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和两个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[0956] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:2684 (VOYPC61),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、两个H1启动子序列区、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和两个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[0957] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:2685 (VOYPC62),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、两个H1启动子序列区、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和两个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[0958] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含两个启动子序列区、两个调节性多核苷酸区和至少一个聚腺苷酸化序列区。

[0959] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区和聚腺苷酸化序列区。表30和31中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的序列的非限制性实例。在表30和31中,描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及序列(例如VOYPC13)的名称。

[0960] 表30. 序列区

[0961]

序列区	VOYPC13(SEQ ID NO: 2686)		VOYPC14 (SEQ ID NO: 2687)		VOYPC15 (SEQ ID NO: 2688)		VOYPC16(SEQ ID NO: 2689)	
	区域 SEQ ID NO	区域长度	区域 SEQ ID NO	区域长度	区域 SEQ ID NO	区域长度	区域 SEQ ID NO	区域长度
	CMV 启动子	1817	588	1817	588	1817	588	1817
T7 引物结合位点	1820	17	1820	17	1820	17	1820	17
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	-	-	1589	158	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	-	-	1599	260	1599	260	1599	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	1589	158	-	-	-	-
调节性多核苷酸	-	-	-	-	-	-	1599	260

[0962]

(VOYHTmi R-127.579)								
PolyA	1828	225	1828	225	1828	225	1828	225

[0963] 表31.序列区

序列区	VOYPC17		VOYPC18		VOYPC19		VOYPC20	
	区域	区域长	区域	区域长	区域	区域长	区域	区域长
	SEQ ID	度						
	NO		NO		NO		NO	
CMV 启动子	1817	588	1817	588	1817	588	1817	588
T7 引物结合位点	1820	17	1820	17	1820	17	1820	17
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.579)	1595	158	-	-	1595	158	-	-
[0964] 调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.016)	-	-	1593	260	1593	260	1593	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.579)	1595	158	-	-	-	-	1595	158
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.016)	-	-	1593	260	-	-	-	-
PolyA	1828	225	1828	225	1828	225	1828	225

[0965] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC13中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[0966] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC14中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[0967] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC15中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[0968] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC16中描述的序列,其

包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[0969] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC17中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[0970] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC18中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[0971] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC19中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[0972] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC20中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[0973] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点和两个靶向不同目标基因 (HTT和SOD1) 的调节性多核苷酸序列区和聚腺苷酸化序列区。表32中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的序列的非限制性实例。在表32中,描述了序列区的序列标识符或序列 (区域SEQ ID NO) 以及序列区的长度 (区域长度),以及序列 (例如VOYPC25) 的名称。

[0974] 表32. 序列区

序列区	VOYPC25		VOYPC26	
	区域	区域长度	区域	区域长度
	SEQ ID NO		SEQ ID NO	
CMV 启动子	1817	588	1817	588
T7 引物结合位点	1820	17	1820	17
[0975] 调节性多核苷酸 (VOYSOD1miR-104)	1699	158	1599	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)	1599	260	-	-
调节性多核苷酸 (VOYSOD1miR-104)	-	-	1699	158
PolyA	1828	225	1828	225

[0976] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC25中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向两个不同目标基因 (HTT和SOD1) 的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[0977] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC26中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、两个靶向两个不同目标基因(HTT和SOD1)的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[0978] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含3个启动子序列区、两个调节性多核苷酸区和至少一个聚腺苷酸化序列区。

[0979] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含GTTG区、两个H1启动子序列区和两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区。表33中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的序列的非限制性实例。在表33中,描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及序列(例如VOYPC21)的名称。

[0980] 表33. 序列区

[0981]

序列区	VOYPC21		VOYPC22		VOYPC23		VOYPC24	
	区域 SEQ ID NO	区域长 度						
GTTG	---	4	---	4	---	4	---	4
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	1599	260	-	-	-	-
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	-	-	1589	158	1589	158
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	-	-	1599	260	-	-
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	1589	158	-	-	1589	158

[0982] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC21中描述的序列,其包含GTTG区、两个H1启动子序列区和两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[0983] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC22中描述的序列,其包含GTTG区、两个H1启动子序列区和两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[0984] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC23中描述的序列,其包含GTTG区、两个H1启动子序列区和两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[0985] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC24中描述的序列,其包含GTTG区、两个H1启动子序列区和两个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[0986] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含至少一个反向末端重复(ITR)序列区、至少一个增强子序列区、至少一个启动子序列区、至少一个内含子序列区、3个调节性多核苷酸区和至少一个聚腺苷酸化信号序列区。

[0987] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、GTTG区、SV40内含子序列区、3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。表34中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的ITR至ITR序列的非限制性实例。在表34中,描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及ITR至ITR序列(例如VOYPC27(SEQ ID NO:1843))的名称和序列标识符。

[0988] 表34. ITR至ITR序列中的序列区

序列区	VOYPC27 (SEQ ID NO: 1843)		VOYPC28 (SEQ ID NO: 1844)	
	区域 SEQ ID NO	区域长度	区域 SEQ ID NO	区域长度
5' ITR	1788	105	1788	105
CMV 增强子	1814	382	1814	382
CBA 启动子	1816	260	1816	260

[0989]

	SV40 内含子	1826	201	1826	201
	调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)	1599	260	1599	260
	调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.016)	1589	158	1589	158
[0990]	调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.016)	1589	158	-	-
	调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)	-	-	1599	260
	兔球蛋白 PolyA 信号	1827	127	1827	127
	3' ITR	1790	130	1790	130

[0991] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1843 (VOYPC27),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、SV40内含子序列区、3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。

[0992] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1844 (VOYPC28),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、CBA启动子序列区、SV40内含子序列区、3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和兔球蛋白聚腺苷酸化信号序列区。

[0993] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含至少一个反向末端重复(ITR)序列区、至少一个启动子序列区和3个调节性多核苷酸区。

[0994] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、3个H1启动子序列区和3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区。表35和36中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的ITR至ITR序列的非限制性实例。在表35和36中,描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及ITR至ITR序列(例如VOYPC29(SEQ ID NO:1845)的名称和序列标识符。

[0995] 表35. ITR至ITR序列中的序列区

[0996]

序列区	VOYPC29 (SEQ ID NO: 1845)		VOYPC31 (SEQ ID NO: 1847)		VOYPC32 (SEQ ID NO: 1848)	
	区域	区域长度	区域	区域长度	区域	区域长度
	SEQ ID NO		SEQ ID NO	度	SEQ ID NO	度
5' ITR	1788	105	1788	105	1788	105
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)	1599	260	1599	260	1599	260
H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.016)	1589	158	-	-	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)	-	-	1599	260	1599	260
H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)	1599	260	1599	260	-	-
调节性多核苷酸	-	-	-		1589	158

[0997]

(VOYHTmiR-104.016)						
H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
3' ITR	1790	130	1790	130	1790	130

[0998]

表36. ITR至ITR序列中的序列区

[0999]

序列区	VOYPC30 (SEQ ID NO: 1846)		VOYPC33 (SEQ ID NO: 1849)		VOYPC34 (SEQ ID NO: 1850)	
	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域 长度
5' ITR	1788	105	1788	105	1788	105
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.016)	1589	158	1589	158	1589	158
H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)	1599	260	-	-	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.016)	-	-	1589	158	1589	158
H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)			-	-	1599	260

[1000]	调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-1 04.016)	1589	158	1589	158		
	H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
	3' ITR	1790	130	1790	130	1790	130

[1001] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1845 (VOYPC29),其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、3个H1启动子序列区、3个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和3个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1002] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1846 (VOYPC30),其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、3个H1启动子序列区、3个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和3个H1终止子序列区和3个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1003] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1847 (VOYPC31),其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、3个H1启动子序列区、3个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和3个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1004] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1848 (VOYPC32),其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、3个H1启动子序列区、3个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和3个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1005] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1849 (VOYPC33),其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、3个H1启动子序列区、3个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和3个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1006] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1850 (VOYPC34),其包含5' 反向末端重复 (ITR) 序列区和3' ITR序列区、3个H1启动子序列区、3个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸区和3个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1007] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含两个启动子序列区、3个调节性多核苷酸区和至少一个聚腺苷酸化序列区。

[1008] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、3个靶向相同目标基因 (HTT) 的调节性多核苷酸序列区和聚腺苷酸化序列区。表37中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的序列的非限制性实例。在表37中,描述了序列区的序列标识符或序列 (区域SEQ ID NO) 以及序列区的长度 (区域长度),以及序列 (例如VOYPC35) 的名称。

[1009] 表37. 序列区

序列区	VOYPC35		VOYPC36	
	区域	区域长	区域	区域长
	SEQ ID NO	度	SEQ ID NO	度
CMV 启动子	1817	588	1817	588
T7 引物结合位点	1820	17	1820	17
[1010] 调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	1599	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	1589	158
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	-	-
[1011] 调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	-	-	1599	260
PolyA	1828	225	1828	225

[1012] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC35中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点、3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[1013] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含3个启动子序列区和3个调节性多核苷酸区。

[1014] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含GTTG区、两个H1启动子序列区和3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区。表38和39中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的序列的非限制性实例。在表38和39中,

描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及序列(例如VOYPC37)的名称。

[1015] 表38.序列区

[1016]

序列区	VOYPC37		VOYPC38		VOYPC41	
	区域	区域长	区域	区域长	区域	区域长
	SEQ ID NO	度	SEQ ID NO	度	SEQ ID NO	度
GTTG	---	4	---	4	---	4
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219

[1017]

调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	1599	260	1599	260
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	1599	260	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	-	-	1589	158
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	-	-	1599	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	1589	158	-	-

[1018] 表39.序列区

[1019]	序列区	VOYPC39		VOYPC40		VOYPC42	
		区域	区域长	区域	区域长	区域	区域长
		SEQ ID NO	度	SEQ ID NO	度	SEQ ID NO	度
	GTTG	---	4	---	4	---	4
[1020]	H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
	调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	1589	158	1589	158
	H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
	调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	1589	158	-	-
	调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	-	-	-	-	1599	260
	H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
	调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	-	-	1599	260	-	-
	调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	-	-	1589	158

[1021] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC37中描述的序列,其包含GTTG区、3个H1启动子序列区和3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1022] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC38中描述的序列,其包含GTTG区、3个H1启动子序列区和3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1023] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC39中描述的序列,其包含GTTG、3个H1启动子序列区和3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1024] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC40中描述的序列,其包含GTTG区、3个H1启动子序列区和3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1025] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC41中描述的序列,其包含GTTG区、3个H1启动子序列区和3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1026] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC42中描述的序列,其包含GTTG区、3个H1启动子序列区和3个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1027] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含至少一个反向末端重复(ITR)序列区、至少一个启动子序列区和4个调节性多核苷酸区。

[1028] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、4个H1启动子序列区、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区和4个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1029] 表40和41中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的ITR至ITR序列的非限制性实例。在表40和41中,描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及ITR至ITR序列(例如VOYPC43(SEQ ID NO: 1851))的名称和序列标识符。

[1030] 表40. ITR至ITR序列中的序列区

[1031]	序列区	VOYPC43(SEQ ID NO: 1851)	VOYPC44 (SEQ ID NO: 1852)	VOYPC45 (SEQ ID NO: 1853)
--------	-----	--------------------------	---------------------------	---------------------------

[1032]

	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长度
5' ITR	1788	105	1788	105	1788	105
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	1599	260	1599	260
H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	-	-	-	-
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	1589	158	1589	158
H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	1599	260	-	-
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	-	-	1589	158

[1033]	H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
	H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
	调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	-	-	1599	260
	调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	1589	158	-	-
	H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
	3' ITR	1790	130	1790	130	1790	130

[1034] 表41. ITR至ITR序列中的序列区

序列区	VOYPC46(SEQ ID NO: 1854)		VOYPC47 (SEQ ID NO: 1855)		VOYPC48 (SEQ ID NO: 1856)		
	区域 SEQ ID NO	区域长度	区域 SEQ ID NO	区域长度	区域 SEQ ID NO	区域长度	
[1035]	5' ITR	1788	105	1788	105	1788	105
	H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
	调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	1589	158	1589	158
	H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
	H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219

[1036]

调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	-	-	1599	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	1589	158	-	-
H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	-	-	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	1589	158	1589	158
H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	-	-	-	-	1599	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	1589	158	-	-
H1 终止子	2681	5	2681	5	2681	5

[1037]

3' ITR	1790	130	1790	130	1790	130
--------	------	-----	------	-----	------	-----

[1038] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1851 (VOYPC43),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、4个H1启动子序列区、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和4个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1039] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1852 (VOYPC44),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、4个H1启动子序列区、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和4个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1040] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1853 (VOYPC45),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、4个H1启动子序列区、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和4个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1041] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1854 (VOYPC46),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、4个H1启动子序列区、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和4个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1042] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1855 (VOYPC47),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、4个H1启动子序列区、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和4个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1043] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1856 (VOYPC48),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、4个H1启动子序列区、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和4个H1终止子序列区,其中每个调节性多核苷酸区由其自身H1启动子,其后是其自身H1终止子驱动。

[1044] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含至少一个反向末端重复(ITR)序列区、至少一个增强子序列区、至少一个内含子序列区、至少一个启动子序列区和4个调节性多核苷酸区。

[1045] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CMV增强子序列区、4个H1启动子序列区和4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区。表42中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的ITR至ITR序列的非限制性实例。在表42中,描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及ITR至ITR序列(例如VOYPC49(SEQ ID NO:1857))的名称和序列标识符。

[1046] 表42. ITR至ITR序列中的序列区

[1047]

序列区	VOYPC49(SEQ ID NO: 1857)		VOYPC50 (SEQ ID NO: 1858)	
	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长 度
5' ITR	1788	105	1788	105
CMV 增强子	1814	382	1814	382
CBA 启动子	1816	260	1816	260
SV40 内含子	1826	201	1826	201
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	1599	260

[1048]

调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	1589	158
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	1589	158
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	-	-	1599	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	-	-
PolyA	1827	127	1827	127
3' ITR	1790	130	1790	130

[1049] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1857 (VOYPC49),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CMV增强子、SV40内含子、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[1050] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含SEQ ID NO:1858 (VOYPC50),其包含5'反向末端重复(ITR)序列区和3' ITR序列区、CMV增强子、SV40内含子、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[1051] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含两个启动子序列区、4个调节性多核苷酸区和至少一个聚腺苷酸化序列区。

[1052] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点区、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区和聚腺苷酸化序列区。

表43中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的序列的非限制性实例。在表43中,描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及序列(例如VOYPC51)的名称。

[1053] 表43. 序列区

序列区	VOYPC51		VOYPC52	
	区域	区域长度	区域	区域长度
	SEQ ID NO		SEQ ID NO	
CMV 启动子	1817	588	1817	588
T7 引物结合位点	1820	17	1820	17
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)	1599	260	1599	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.016)	1589	158	1589	158
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.016)	-	-	1589	158
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)	1599	260	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.016)	1589	158	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-127.579)	-	-	1599	260
PolyA	1828	225	1828	225

[1055] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC51中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点区、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[1056] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC52中描述的序列,其包含CMV启动子序列区、T7引物结合位点区、4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区和聚腺苷酸化序列区。

[1057] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含五个启动子序列区和4个调节性多核苷酸区。

[1058] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含GTTG区、4个H1启动子序列区和4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸序列区。表44和45中描述了在具有上述所有序列模块的本发明的多顺反子AAV颗粒中使用的序列的非限制性实例。在表44和45中,

描述了序列区的序列标识符或序列(区域SEQ ID NO)以及序列区的长度(区域长度),以及序列(例如VOYPC53)的名称。

[1059] 表44.序列区

[1060]

序列区	VOYPC53		VOYPC54		VOYPC55	
	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长 度
GTTG	---	4	---	4	---	4
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	1599	260	1599	260
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219

[1061]

调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	-	-	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	1589	158	1589	158
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	1599	260	-	-
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	-	-	1589	158
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	-	-	1599	260
调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	1589	158	-	-

[1062] 表45.序列区

[1063]

序列区	VOYPC56	VOYPC57	VOYPC58
-----	---------	---------	---------

[1064]

	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长 度	区域 SEQ ID NO	区域长 度
GTTG	---	4	---	4	---	4
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	1589	158	1589	158
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	1599	260	-	-
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	-	-	1589	158
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-127.579)	-	-	1599	260	-	-
调节性多核 苷 酸 (VOYHTmi R-104.016)	1589	158	-	-	1589	158
H1 启动子	1819	219	1819	219	1819	219

[1065]	调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-127.579)	1599	260	-	-	-	-
	调节性多核苷酸 (VOYHTmi R-104.016)	-	-	1589	158	1589	158

[1066] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC53中描述的序列,其包含GTTG区、4个H1启动子序列区和4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1067] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC54中描述的序列,其包含GTTG区、4个H1启动子序列区和4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1068] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC55中描述的序列,其包含GTTG区、4个H1启动子序列区和4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1069] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC56中描述的序列,其包含GTTG区、4个H1启动子序列区和4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1070] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC57中描述的序列,其包含GTTG区、4个H1启动子序列区和4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1071] 在一个实施方案中,多顺反子AAV颗粒病毒基因组包含VOYPC58中描述的序列,其包含GTTG区、4个H1启动子序列区和4个靶向相同目标基因(HTT)的调节性多核苷酸区。

[1072] 病毒生产

[1073] 本公开提供了通过在病毒复制细胞中进行病毒基因组复制来生产细小病毒颗粒(例如AAV颗粒)的方法,包括使病毒复制细胞与AAV多核苷酸或AAV基因组接触。

[1074] 本公开提供了一种生产具有增强的(增加的、提高的)转导效率的AAV颗粒的方法,该方法包括以下步骤:1)用杆粒载体和病毒构建载体和/或AAV有效载荷构建体载体共转染感受态细菌细胞,2)分离所得的病毒构建体表达载体和AAV有效载荷构建体表达载体,并分别转染病毒复制细胞,3)分离并纯化所得的有效载荷和包含病毒构建体表达载体或AAV有效载荷构建体表达载体的病毒构建体颗粒;4)用AAV有效载荷和包含病毒构建体表达载体或AAV有效载荷构建体表达载体的病毒构建体颗粒共同感染病毒复制细胞,5)收获并纯化包含细小病毒基因组的病毒颗粒。

[1075] 在一个实施方案中,本发明提供了一种生产AAV颗粒的方法,其包括以下步骤:1)同时用有效载荷区、表达rep和cap基因的构建体和辅助构建体共转染哺乳动物细胞(例如但不限于HEK293细胞),2)收获并纯化包含病毒基因组的AAV颗粒。

[1076] 细胞

[1077] 本公开提供了包含AAV多核苷酸和/或AAV基因组的细胞。

[1078] 本文公开的病毒生产描述了用于产生与靶细胞接触以递送有效载荷构建体(例如

重组病毒构建体)的过程和方法,有效载荷构建体包含编码有效载荷分子的多核苷酸序列。

[1079] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以在病毒复制细胞(包括昆虫细胞)中产生。

[1080] 培养中昆虫细胞的生长条件以及培养中异源产物在昆虫细胞中的生产是本领域众所周知的,参见美国专利号6,204,059,其内容通过引用整体并入本文。

[1081] 根据本发明,可以使用允许细小病毒复制并且可以在培养物中维持的任何昆虫细胞。可以使用来自草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的细胞系(包括但不限于Sf9或Sf21)、果蝇细胞系或蚊子细胞系(例如白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)衍生的细胞系)。昆虫细胞表达异源蛋白质的用途已得到充分证明,将核酸(例如载体,例如昆虫细胞相容性载体)引入此类细胞的方法以及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, ed. Richard, Humana Press, NJ (1995); O'Reilly等人, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, Oxford Univ. Press (1994); Samulski等人, J. Vir. 63:3822-8 (1989); Kajigaya等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:4646-50 (1991); Ruffing等人, J. Vir. 66:6922-30 (1992); Kimbauer等人, Vir. 219:37-44 (1996); Zhao等人, Vir. 272:382-93 (2000); 和Samulski等人, 美国专利号6,204,059,其各自内容通过引用整体并入本文。

[1082] 病毒复制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)。病毒复制细胞可包含哺乳动物细胞,例如A549、WEHI、3T3、10T1/2、BHK、MDCK、COS 1、COS 7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO.W138、HeLa、HEK293、Saos、C2C12、L细胞、HT1080、HepG2和衍生自哺乳动物的原代成纤维细胞、肝细胞和成肌细胞。病毒复制细胞包含衍生自哺乳动物物种(包括但不限于人、猴、小鼠、大鼠、兔和仓鼠)的细胞,或细胞类型,包括但不限于成纤维细胞、肝细胞、肿瘤细胞、细胞系转化细胞等。

[1083] 小批量AAV颗粒生产

[1084] 本文公开的病毒生产描述了用于生产与靶细胞接触以递送有效载荷(例如重组病毒构建体)的AAV颗粒的过程和方法,有效载荷包含编码有效载荷的多核苷酸序列。

[1085] 在一个实施方案中,可以在包括哺乳动物细胞的病毒复制细胞中生产AAV颗粒。

[1086] 通常用于生产重组AAV颗粒的病毒复制细胞包括但不限于293细胞、COS细胞、HeLa细胞、KB细胞和如以下中描述的其他哺乳动物细胞系:美国专利6,156,303、5,387,484、5,741,683、5,691,176和5,688,676;美国专利申请2002/0081721和国际专利申请WO 00/47757、WO 00/24916和WO 96/17947,其各自内容通过引用整体并入本文。

[1087] 在一个实施方案中,在哺乳动物细胞中生产AAV颗粒,其中所有三种VP蛋白均以接近1:1:10 (VP1:VP2:VP3)的化学计量表达。允许这种受控表达水平的调节机制包括产生通过差异剪接产生的两种mRNA,一种用于VP1,另一种用于VP2和VP3。

[1088] 在另一个实施方案中,使用三重转染方法在哺乳动物细胞中生产AAV颗粒,其中有效载荷构建体、细小病毒Rep和细小病毒cap以及辅助构建体包含在3个不同的构建体中。AAV颗粒生产的3个组分的三重转染方法可用于生产少量病毒,用于包括转导效率、靶组织(嗜性)评估和稳定性的测定。

[1089] 杆状病毒

[1090] 本文公开的颗粒生产描述了用于生产与靶细胞接触以递送有效载荷构建体的AAV

颗粒的过程和方法,所述有效载荷构建体包括编码有效载荷的多核苷酸序列。

[1091] 简而言之,通过本领域技术人员已知和执行的分子生物学技术,通过转座子供体/受体系统将病毒构建体载体和AAV有效载荷构建体载体各自并入杆粒(bacmid),也称为杆状病毒质粒。分别的病毒复制细胞群的转染产生两种杆状病毒,一种包含病毒构建体表达载体,另一种包含AAV有效载荷构建体表达载体。两种杆状病毒可用于感染单个病毒复制细胞群以生产AAV颗粒。

[1092] 用于在昆虫细胞(包括但不限于草地贪夜蛾(Sf9)细胞)中生产病毒颗粒的杆状病毒表达载体可提供高滴度的病毒颗粒产物。编码病毒构建体表达载体和AAV有效载荷构建体表达载体的重组杆状病毒引发了病毒复制细胞的生产性感染。从初次感染中释放出的感染性杆状病毒颗粒会二次感染培养物中的其他细胞,并在多个感染周期中指数性地感染整个细胞培养群体,其是感染初始多重性的函数,参见Urabe, M.等人, *J Virol.* 2006年2月; 80(4):1874-85,其内容通过引用整体并入本文。

[1093] 用杆状病毒在昆虫细胞系统中生产AAV颗粒可解决已知的杆状病毒的遗传和物理不稳定性。在一个实施方案中,该生产系统通过利用无滴度的感染细胞保存和放大系统来解决杆状病毒多次传代后的不稳定性。用编码病毒颗粒的结构、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接种培养物。将感染杆状病毒的病毒生产细胞收获为等分试样,其可以冷冻保存在液氮中;等分试样保留了感染大规模病毒生产细胞培养物的活力和感染性,Wasilko DJ等人, *Protein Expr Purif.* 2009年6月; 65(2):122-32,其内容通过引用整体并入本文。

[1094] 遗传稳定的杆状病毒可用于生产一种或多种用于在无脊椎动物细胞中生产AAV颗粒的组分的来源。在一个实施方案中,缺陷型杆状病毒表达载体可以在昆虫细胞中游离地维持。在这样的实施方案中,杆粒载体用复制控制元件工程化,复制控制元件包括但不限于启动子、增强子和/或细胞周期调节的复制元件。

[1095] 在一个实施方案中,杆状病毒可以用(非)选择性标记物工程化以重组成几丁质酶/组织蛋白酶基因座。*chia/v-cath*基因座对于在组织培养中传播杆状病毒不是必需的,而V-cath(EC 3.4.22.50)是半胱氨酸内切蛋白酶,其对含Arg-Arg二肽的底物最有活性。浓核病毒和细小病毒衣壳结构蛋白中存在Arg-Arg二肽,但在依赖病毒VP1中不常出现。

[1096] 在一个实施方案中,允许杆状病毒感染的稳定病毒复制细胞用AAV复制和病毒颗粒生产所必需的元件的至少一个稳定的整合拷贝进行工程化,所述元件包括但不限于整个AAV基因组、Rep和Cap基因、Rep基因、Cap基因、作为一个单独的转录盒的各Rep蛋白、作为一个单独的转录盒的各VP蛋白、AAP(装配激活蛋白)或至少一个带有天然或非天然启动子的杆状病毒辅助基因。

[1097] 大规模生产

[1098] 在一些实施方案中,可以修改AAV颗粒生产以增加生产规模。根据本公开的大规模病毒生产方法可以包括任何以下文献教导的那些:美国专利号5,756,283、6,258,595、6,261,551、6,270,996、6,281,010、6,365,394、6,475,769、6,482,634、6,485,966、6,943,019、6,953,690、7,022,519、7,238,526、7,291,498和7,491,508,或国际公开号W01996039530、W01998010088、W01999014354、W01999015685、W01999047691、W02000055342、W02000075353和W02001023597,其各自内容通过引用整体并入本文。增加病

毒颗粒生产规模的方法通常包括增加病毒复制细胞的数量。在一些实施方案中,病毒复制细胞包含贴壁细胞。为了增加贴壁的病毒复制细胞生产的病毒颗粒的规模,需要更大的细胞培养表面。在某些情况下,大规模生产方法包括使用滚瓶来增加细胞培养表面。具有增加的表面积的其他细胞培养衬底是本领域已知的。具有增加的表面积的其他贴壁细胞培养产物的实例包括但不限于CellSTACK[®]、CellCube[®] (Corning Corp., Corning, NY) 和Nunc[™] Cell Factory[™] (Thermo Scientific, Waltham, MA.)。在某些情况下,大规模的贴壁细胞表面可以占约1,000cm²至约100,000cm²。在某些情况下,大规模贴壁细胞培养物可包含约10⁷至约10⁹个细胞、约10⁸至约10¹⁰个细胞、约10⁹至约10¹²个细胞或至少10¹²个细胞。在某些情况下,大规模贴壁培养物可产生约10⁹至约10¹²、约10¹⁰至约10¹³、约10¹¹至约10¹⁴、约10¹²至约10¹⁵或至少10¹⁵个病毒颗粒。

[1099] 在一些实施方案中,本公开的大规模病毒生产方法可包括使用悬浮细胞培养物。悬浮细胞培养可以显著增加细胞数量。通常,可以在约10-50cm²的表面积上生长的贴壁细胞的数量可以在悬浮液中以约1cm³的体积生长。

[1100] 可以按照本领域已知的任何方法进行大规模培养形式的复制细胞的转染。对于大规模贴壁细胞培养,转染方法可包括但不限于使用无机化合物(例如磷酸钙)、有机化合物[例如聚乙烯亚胺(PEI)]或使用非化学方法(例如电穿孔)。随着细胞在悬浮液中生长,转染方法可包括但不限于使用磷酸钙和PEI。在某些情况下,可以根据Feng, L.等人, 2008. *Biotechnol Appl. Biochem.* 50:121-32所述的题为“Transfection Procedure”的部分进行大规模悬浮培养物的转染,其内容通过引用整体并入本文。根据这样的实施方案,可以形成PEI-DNA复合物用于引入待转染的质粒。在某些情况下,用PEI-DNA复合物转染的细胞在转染前可能会被“休克(shocked)”。这包括将细胞培养温度降低至4℃约1小时。在某些情况下,细胞培养物可能会休克约10分钟至约5小时。在某些情况下,细胞培养物可在约0℃至约20℃的温度下休克。

[1101] 在某些情况下,转染可包括一种或多种用于表达RNA效应分子以减少从一种或多种AAV有效载荷构建体的核酸表达的载体。这样的方法可以通过减少浪费在表达有效载荷构建体上的细胞资源来增强病毒颗粒的产生。在某些情况下,可以根据美国公开号US2014/0099666中教导的方法来实施这样的方法,其内容通过引用整体并入本文。

[1102] 生物反应器

[1103] 在某些实施方案中,细胞培养生物反应器可用于大规模病毒生产。在某些情况下,生物反应器包括搅拌釜反应器。这类反应器通常包括具有搅拌器(例如叶轮)的通常为圆柱形的容器。在某些实施方案中,可以将这样的生物反应器容器放置在水套内以控制容器温度和/或使环境温度变化的影响最小化。生物反应器容器体积的大小范围可以从约500ml至约2L、从约1L至约5L、从约2.5L至约20L、从约10L至约50L、从约25L至约100L、从约75L至约500L、从约250L至约2,000L、从约1,000L至约10,000L、从约5,000L至约50,000L或至少50,000L。容器底部可以是圆形或扁平的。在某些情况下,动物细胞培养物可维持在具有圆形容器的生物反应器中。

[1104] 在某些情况下,可通过使用热循环器来加热生物反应器容器。热循环器将加热的水泵送到水套周围。在某些情况下,可将加热的水泵送通过生物反应器容器内存在的管道(例如盘管)。在某些情况下,热空气可以在生物反应器周围循环,包括但不限于培养基正上

方的空气空间。另外,可以维持pH和CO₂水平以优化细胞活力。

[1105] 在某些情况下,生物反应器可以包括中空纤维反应器。中空纤维生物反应器可以支持锚定依赖性和锚定非依赖性细胞的培养。其他生物反应器可包括但不限于填充床或固定床生物反应器。这类生物反应器可以包括带有玻璃珠的容器,用于贴壁细胞贴壁。另外的填充床反应器可以包含陶瓷珠。

[1106] 在某些情况下,病毒颗粒是通过使用一次性生物反应器生产的。在一些实施方案中,此类生物反应器可包括Wave™一次性生物反应器。

[1107] 在一些实施方案中,可以根据美国专利号5,064764、6,194,191、6,566,118、8,137,948或美国专利申请号US2011/0229971中教导的方法进行动物细胞生物反应器培养物中AAV颗粒的生产,其每个内容通过引用整体并入本文。

[1108] 细胞裂解

[1109] 本发明的细胞(包括但不限于病毒生产细胞)可以根据本领域已知的任何方法进行细胞裂解。可以进行细胞裂解以获得存在于本发明的任何细胞内的一种或多种试剂(例如病毒颗粒)。在一些实施方案中,可以根据以下中列出的任何方法进行细胞裂解:美国专利号7,326,555、7,579,181、7,048,920、6,410,300、6,436,394、7,732,129、7,510,875、7,445,930、6,726,907、6,194,191、7,125,706、6,995,006、6,676,935、7,968,333、5,756,283、6,258,595、6,261,551、6,270,996、6,281,010、6,365,394、6,475,769、6,482,634、6,485,966、6,943,019、6,953,690、7,022,519、7,238,526、7,291,498和7,491,508或国际公开号W01996039530、W01998010088、W01999014354、W01999015685、W01999047691、W02000055342、W02000075353和W02001023597,其各自内容通过引用整体并入本文。细胞裂解方法可以是化学的或机械的。化学细胞裂解通常包括使一种或多种细胞与一种或多种裂解剂接触。机械裂解通常包括使一种或多种细胞经受一种或多种裂解条件和/或一种或多种裂解力。

[1110] 在一些实施方案中,化学裂解可用于裂解细胞。如本文所用,术语“裂解剂”是指可帮助破坏细胞的任何试剂。在某些情况下,将裂解剂引入溶液中,称为裂解溶液或裂解缓冲液。如本文所用,术语“裂解溶液”是指包含一种或多种裂解剂的溶液(通常为水溶液)。除裂解剂外,裂解溶液可包括一种或多种缓冲剂、增溶剂、表面活性剂、防腐剂、防冻剂、酶、酶抑制剂和/或螯合剂。裂解缓冲液是包含一种或多种缓冲剂的裂解溶液。裂解溶液的其他组分可包括一种或多种增溶剂。本文所用的术语“增溶剂”是指增强溶液的一种或多种组分的溶解度和/或溶液所应用于的一个或多个实体的溶解度。在某些情况下,增溶剂会增加蛋白质的溶解度。在一些情况下,基于增溶剂在增强蛋白质溶解度同时保持蛋白质构象和/或活性的能力来选择增溶剂。

[1111] 示例性裂解剂可包括以下中描述的任何裂解剂:美国专利号8,685,734、7,901,921、7,732,129、7,223,585、7,125,706、8,236,495、8,110,351、7,419,956、7,300,797、6,699,706和6,143,567,其各自内容通过引用整体并入本文。在某些情况下,裂解剂可以选自裂解盐、两性试剂、阳离子试剂、离子去污剂和非离子去污剂。裂解盐可包括但不限于氯化钠(NaCl)和氯化钾(KCl)。其他的裂解盐可包括以下中描述的任何裂解盐:美国专利号8,614,101、7,326,555、7,579,181、7,048,920、6,410,300、6,436,394、7,732,129、7,510,875、7,445,930、6,726,907、6,194,191、7,125,706、6,995,006、6,676,935和7,968,333,其

各自内容通过引用整体并入本文。盐的浓度可以增加或减少以获得用于细胞膜破裂的有效浓度。如本文所指,两性试剂是能够作为酸或碱反应的化合物。两性试剂可包括但不限于溶血磷脂酰胆碱、3-(3-氯酰氨基丙基)二甲基铵-1-丙烷磺酸盐(CHAPS)、**ZWITTERGENT®**等。阳离子试剂可包括但不限于十六烷基三甲基溴化铵(C(16)TAB)和苯扎氯铵。包含去污剂的裂解剂可以包括离子去污剂或非离子去污剂。清洁剂可以起到分解或溶解细胞结构的作用,包括但不限于细胞膜、细胞壁、脂质、碳水化合物、脂蛋白和糖蛋白。示例性的离子型去污剂包括美国专利号7,625,570和6,593,123或美国公开号US2014/0087361中教导的任何一种,其各自内容通过引用整体并入本文。一些离子型去污剂可包括但不限于十二烷基硫酸钠(SDS)、胆酸盐和脱氧胆酸盐。在某些情况下,裂解溶液中可能包含离子型去污剂作为增溶剂。非离子型去污剂可包括但不限于辛基葡萄糖苷、毛地黄皂苷、芦布若尔、C12E8、**TWEEN®-20**、**TWEEN®-80**、Triton X-100和Nonidet P-40。非离子型去污剂通常是较弱的裂解剂,但可以作为增溶剂包括在内,以增溶细胞和/或病毒蛋白。其他裂解剂可包括酶和尿素。在某些情况下,可以将一种或多种裂解剂组合在裂解溶液中,以增强细胞裂解和蛋白质溶解度中的一种或多种。在某些情况下,裂解溶液中可包含酶抑制剂,以防止可能因细胞膜破裂而触发的蛋白水解。

[1112] 在一些实施方案中,进行机械细胞裂解。机械细胞裂解方法可包括使用一种或多种裂解条件和/或一种或多种裂解力。如本文所用,术语“裂解条件”是指促进细胞破坏的状态或环境。裂解条件可包括某些温度、压力、渗透纯度、盐度等。在某些情况下,裂解条件包括增加或减少温度。根据一些实施方案,裂解条件包括温度变化以促进细胞破坏。根据这样的实施方案进行的细胞裂解可以包括冻融裂解。如本文所用,术语“冻融裂解”是指细胞裂解,其中细胞溶液经历一个或多个冻融循环。根据冻融裂解法,溶液中的细胞被冷冻以诱导由冰晶的形成和膨胀引起的细胞膜的机械破坏。根据冻融裂解方法使用的细胞溶液还可以包含一种或多种裂解剂、增溶剂、缓冲剂、防冻剂、表面活性剂、防腐剂、酶、酶抑制剂和/或螯合剂。一旦将要冷冻的细胞溶液融化,这些组分就可以提高所需细胞产物的回收率。在某些情况下,经历冻融裂解的细胞溶液中包含一种或多种防冻剂。本文所用的术语“防冻剂”是指用于保护一种或多种物质免于因冷冻而损坏的试剂。防冻剂可以包括美国公开号US2013/0323302或美国专利号6,503,888、6,180,613、7,888,096、7,091,030中教导的任何防冻剂,其各自内容通过引用整体并入本文。在某些情况下,防冻剂可包括但不限于二甲基亚砜、1,2-丙二醇、2,3-丁二醇、甲酰胺、甘油、乙二醇、1,3-丙二醇和正二甲基甲酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、羟乙基淀粉、琼脂糖、右旋糖酐、肌醇、葡萄糖、羟乙基淀粉、乳糖、山梨糖醇、甲基葡萄糖、蔗糖和尿素。在一些实施方案中,可根据美国专利号7,704,721中描述的任何方法进行冻融裂解,其内容通过引用整体并入本文。

[1113] 如本文所用,术语“裂解力”是指用于破坏细胞的物理活动。裂解力可包括但不限于机械力、声力、重力、光学力、电力等。通过机械力进行的细胞裂解在本文中称为“机械裂解”。可以根据机械裂解作用使用的机械力可包括高剪切流体力。根据这类机械裂解方法,可以使用微流化器。微流化器通常包括入口池,可在其中施加细胞溶液。然后通过泵(例如高压泵)以高速和/或高压将细胞溶液泵入相互作用室以产生剪切流体力。然后,可以将得到的裂解物收集在一个或多个输出容器中。可以调节泵的速度和/或压力以调节细胞裂解并增强产物(例如病毒颗粒)的回收。其他机械裂解方法可能包括通过刮擦对细胞进行

物理破坏。

[1114] 可以基于要裂解的细胞的细胞培养形式来选择细胞裂解方法。例如,对于贴壁细胞培养,可以使用一些化学和机械裂解方法。此类机械裂解方法可包括冻融裂解或刮擦。在另一个实例中,贴壁细胞培养物的化学裂解可通过与包含表面活性剂的裂解溶液如 Triton-X-100 一起温育来进行。在某些情况下,可以用一种或多种核酸酶处理从贴壁细胞培养物中产生的细胞裂解物,以降低由释放的DNA引起的裂解物的粘度。

[1115] 在一个实施方案中,一种无需裂解即可收集AAV颗粒的方法可用于有效且可扩展的AAV颗粒生产。在非限制性实例中,可以通过以下生产AAV颗粒:培养缺乏肝素结合位点的AAV颗粒,从而使AAV颗粒进入细胞培养物中的上清液中,从培养物中收集上清液;并从上清液中分离AAV颗粒,如美国专利申请20090275107中所述,其内容通过引用整体并入本文。

[1116] 澄清

[1117] 可以对包含病毒颗粒的细胞裂解物进行澄清。澄清是指从细胞裂解物中纯化病毒颗粒时采取的初始步骤。澄清的作用是通过除去较大的不溶性碎片来制备用于进一步纯化的裂解物。澄清步骤可包括但不限于离心和过滤。在澄清期间,离心可以低速进行,以仅除去较大的碎片。类似地,可以使用具有较大孔径的过滤器进行过滤,从而仅除去较大的碎片。在某些情况下,可以在澄清过程中使用切向流过滤。病毒澄清的目标包括细胞裂解物的高通量处理和优化最终病毒回收。包括澄清步骤的优点包括用于处理较大体积的裂解物的可扩展性。在一些实施方案中,可以根据以下提出的任何方法进行澄清:美国专利号8,524,446、5,756,283、6,258,595、6,261,551、6,270,996、6,281,010、6,365,394、6,475,769、6,482,634、6,485,966、6,943,019、6,953,690、7,022,519、7,238,526、7,291,498、7,491,508、美国公开号US2013/0045186、US2011/0263027、US2011/0151434、US2003/0138772和国际公开号W02002012455、W01996039530、W01998010088、W01999014354、W01999015685、W01999047691、W02000055342、W02000075353和W02001023597,其各自内容通过引用整体并入本文。

[1118] 通过过滤澄清细胞裂解物的方法在本领域中是众所周知的,并且可以根据多种可用方法进行,包括但不限于被动过滤和流动过滤。所使用的过滤器可包括多种材料和孔径。例如,细胞裂解物过滤器可包含约1 μ M至约5 μ M、约0.5 μ M至约2 μ M、约0.1 μ M至约1 μ M、约0.05 μ M至约0.05 μ M和约0.001 μ M至约0.1 μ M的孔径。细胞裂解物过滤器的示例性孔径可包括但不限于2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.95、0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15、0.1、0.05、0.22、0.21、0.20、0.19、0.18、0.17、0.16、0.15、0.14、0.13、0.12、0.11、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01、0.02、0.019、0.018、0.017、0.016、0.015、0.014、0.013、0.012、0.011、0.01、0.009、0.008、0.007、0.006、0.005、0.004、0.003、0.002、0.001和0.001 μ M。在一个实施方案中,澄清可包括通过具有2.0 μ M孔径的过滤器过滤以去除大的碎片,然后通过具有0.45 μ M孔径的过滤器以去除完整的细胞。

[1119] 过滤器材料可以由多种材料组成。这样的材料可以包括但不限于聚合物材料和金属材料(例如,烧结金属和多孔铝)。示例性材料可以包括但不限于尼龙、纤维素材料(例如乙酸纤维素)、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚醚砜、聚酰胺、聚砜、聚丙烯和聚对苯二甲酸乙二酯。在某些情况下,用于澄清细胞裂解物的过滤器可能包括但不限于ULTIPLEAT PROFILE™过滤

器(Pall Corporation,Port Washington,NY)、SUPOR™膜过滤器(Pall Corporation,Port Washington,NY)。

[1120] 在某些情况下,可以进行流动过滤以提高过滤速度和/或效率。在某些情况下,流动过滤可以包括真空过滤。根据这样的方法,在过滤器的与要过滤的细胞裂解物相反的一侧上形成真空。在某些情况下,细胞裂解物可能会在离心力的作用下通过过滤器。在某些情况下,使用泵迫使细胞裂解物通过澄清过滤器。细胞裂解物通过一个或多个过滤器的流速可以通过调节通道大小和/或流体压力之一来调节。

[1121] 根据一些实施方案,可以通过离心澄清细胞裂解物。离心可用于使裂解物中的不溶性颗粒沉淀。在澄清期间,离心强度[以重力单位(g)表示,其代表标准重力的倍数]可能低于随后的纯化步骤。在某些情况下,可以约200g至约800g、约500g至约1500g、约1000g至约5000g、约1200g至约10000g或约8000g至约15000g对细胞裂解物进行离心。在一些实施方案中,细胞裂解物离心以8000g进行15分钟。在某些情况下,可以进行密度梯度离心,以通过沉降速率分配细胞裂解物中的颗粒。根据本公开的方法使用的梯度可以包括但不限于氯化铯梯度和碘克沙醇分级梯度。

[1122] 纯化:色谱

[1123] 在某些情况下,可以通过一种或多种色谱方法从澄清的细胞裂解物纯化AAV颗粒。色谱法是指本领域已知的用于从混合物分离出一种或多种成分的许多方法。这样的方法可以包括但不限于离子交换色谱法(例如阳离子交换色谱法和阴离子交换色谱法)、免疫亲和色谱法和尺寸排阻色谱法。在一些实施方案中,病毒色谱方法可以包括以下中教导的任何方法:美国专利号5,756,283、6,258,595、6,261,551、6,270,996、6,281,010、6,365,394、6,475,769、6,482,634、6,485,966、6,943,019、6,953,690、7,022,519、7,238,526、7,291,498和7,491,508,或国际公开号W01996039530、W01998010088、W01999014354、W01999015685、W01999047691、W02000055342、W02000075353和W02001023597,其各自内容通过引用整体并入本文。

[1124] 在一些实施方案中,离子交换色谱法可用于分离病毒颗粒。基于衣壳蛋白与固定相上存在的带电荷位点之间的电荷-电荷相互作用,离子交换色谱法用于结合病毒颗粒,所述固定相通常是病毒制备物(例如澄清的裂解物)通过的柱子。应用病毒制备物后,然后可通过应用洗脱溶液破坏电荷-电荷相互作用来洗脱结合的病毒颗粒。洗脱溶液可通过调节盐浓度和/或pH值以增强结合的病毒颗粒的回收来优化。依赖于分离的病毒衣壳的电荷,可以选择阳离子或阴离子交换色谱法。离子交换色谱方法可以包括但不限于以下中教导的任何方法:美国专利号7,419,817、6,143,548、7,094,604、6,593,123、7,015,026和8,137,948,其各自内容通过引用整体并入本文。

[1125] 在一些实施方案中,可以使用免疫亲和色谱法。免疫亲和色谱法是利用一种或多种免疫化合物(例如抗体或抗体相关结构)保留病毒颗粒的色谱法形式。免疫化合物可以特异性结合病毒颗粒表面上的一种或多种结构,包括但不限于一种或多种病毒外壳蛋白。在某些情况下,免疫化合物可能对特定的病毒变体具有特异性。在某些情况下,免疫化合物可能会结合多种病毒变体。在一些实施方案中,免疫化合物可包括重组单链抗体。这样的重组单链抗体可以包括Smith,R.H.等人,2009.Mol.Ther.17(11):1888-96中描述的那些,其内容通过引用整体并入本文。这样的免疫化合物能够结合几种AAV衣壳变体,包括但不限于

AAV1、AAV2、AAV6和AAV8。

[1126] 在一些实施方案中,可以使用尺寸排阻色谱法(SEC)。SEC可包括使用凝胶以根据尺寸分离颗粒。在病毒颗粒纯化中,SEC过滤有时称为“精细纯化(polishing)”。在某些情况下,可能会进行SEC以生成接近均质的最终产品。在某些情况下,此类最终产品可能会用于临床前研究和/或临床研究(Kotin,R.M.2011.Human Molecular Genetics.20(1):R2-R6,其内容通过引用整体并入本文)。在某些情况下,SEC可以根据以下美国专利中教导的任何方法进行:美国专利号6,143,548、7,015,026、8,476,418、6,410,300、8,476,418、7,419,817、7,094,604、6,593,123和8,137,948,其各自内容通过引用整体并入本文。

[1127] 在一个实施方案中,包含至少一种AAV颗粒的组合物可以使用美国专利号US 6146874中描述的方法分离或纯化,其内容通过引用整体并入本文。

[1128] 在一个实施方案中,包含至少一种AAV颗粒的组合物可以使用美国专利号US 6660514中描述的方法分离或纯化,其内容通过引用整体并入本文。

[1129] 在一个实施方案中,包含至少一种AAV颗粒的组合物可以使用美国专利号US 8283151中描述的方法分离或纯化,其内容通过引用整体并入本文。

[1130] 在一个实施方案中,包含至少一种AAV颗粒的组合物可以使用美国专利号US 8524446中描述的方法分离或纯化,其内容通过引用整体并入本文。

[1131] II. 制剂和递送

[1132] 药物组合物和制剂

[1133] 除了药物组合物(包含编码siRNA分子的调节性多核苷酸序列的AAV颗粒)以外,本文还提供的是适合于施用于人的药物组合物,本领域技术人员应理解,此类组合物通常适合于施用于任何其他动物,例如非人类动物,例如非人类哺乳动物。修饰适合于施用于人的药物组合物以使组合物适合于施用于各种动物是众所周知的,并且本领域的兽医药理师可以仅通过普通的实验(如果有)设计和/或进行这种修饰。预期施用药物组合物的受试者包括但不限于人和/或其他灵长类;哺乳动物,包括与商业有关的哺乳动物,例如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠;和/或禽类,包括与商业相关的禽类,例如家禽、鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[1134] 在一些实施方案中,将组合物施用于人、人类患者或受试者。为了本公开的目的,短语“活性成分”通常是指合成的siRNA双链体、编码siRNA双链体的调节性多核苷酸或包含编码本文所述的siRNA双链体的调节性多核苷酸的AAV颗粒。

[1135] 本文描述的药物组合物的制剂可以通过药理学领域中已知的或以后开发的任何方法来制备。通常,这样的制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分结合,然后如果必要和/或期望的话,将产品分开、成形和/或包装成所需的单剂量或多剂量单位。

[1136] 根据本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何其他成分的相对量将依赖于待治疗的受试者的本性、大小和/或状况而变化,并进一步取决于组合物待施用的途径。

[1137] 可以使用一种或多种赋形剂配制包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸序列的AAV颗粒,以:(1)增加稳定性;(2)增加细胞转染或转导;(3)允许持续释放或延迟释放;或(4)改变生物分布(例如,将AAV颗粒靶向特定的组织或细胞类型,例如脑和神经元)。

[1138] 本发明的制剂可以包括但不限于盐水、类脂质、脂质体、脂质纳米颗粒、聚合物、脂质复合物、核-壳纳米颗粒、肽、蛋白质、用AAV颗粒转染的细胞(例如,用于移植到受试者中)、纳米颗粒模拟物及其组合。此外,可以使用自组装核酸纳米颗粒来配制本发明的AAV颗粒。

[1139] 通过药理学领域中已知的或此后开发的任意方法,可以制备本文描述的药物组合物的制剂。一般而言,这样的制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其它辅助成分结合。

[1140] 根据本公开的药物组合物可以散装、作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量制备、包装和/或销售。本文中使用的“单位剂量”表示包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将要施用给受试者的活性成分的剂量,和/或这样的剂量的合宜分数,如这样的剂量的二分之一或三分之一。

[1141] 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可以变化,这取决于正在治疗的受试者的本性、大小和/或状况,并且还取决于要施用所述组合物的途径。例如,组合物可以包含0.1%至99% (w/w) 的活性成分。作为例子,组合物可以包含0.1%至100%、例如0.5至50%、1-30%、5-80%、至少80% (w/w) 的活性成分。

[1142] 在某些实施方案中,药学上可接受的赋形剂可以是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯的。在某些实施方案中,赋形剂被批准用于人类和用于兽医学应用。在某些实施方案中,赋形剂可以被美国食品和药品管理局批准。在某些实施方案中,赋形剂可以属于药用级。在某些实施方案中,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。

[1143] 本文中使用的赋形剂包括但不限于溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂等的任意种和所有,只要它们适合于所希望的特定剂型。用于配制药剂组合物的各种赋形剂和用于制备组合物的技术是本领域已知的(参见Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, A.R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; 通过引用整体并入本文)。在本公开的范围内可以预见到常规赋形剂介质的应用,但是除了任何常规赋形剂介质可能与物质或它的衍生物不相容以外,诸如通过产生任何不希望的生物学效应或另外以有害方式与药物组合物的任意其它组分相互作用。

[1144] 示例性的稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干燥的淀粉、玉米淀粉、糖粉等,和/或它们的组合。

[1145] 在某些实施方案中,所述制剂可以包含至少一种无活性成分。本文使用的术语“无活性成分”表示在制剂中包括的一种或多种无活性试剂。在某些实施方案中,在本发明的制剂中可以使用的全部、没有或一些无活性成分可以被美国食品和药品管理局(FDA)批准。

[1146] 包含本发明的siRNA分子的核酸序列的载体的制剂可以包括阳离子或阴离子。在一个实施方案中,所述制剂包括金属阳离子,例如,但不限于,Zn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Mg⁺和它们的组合。

[1147] 本文中使用的“药学上可接受的盐”表示公开的化合物的衍生物,其中通过将现有

的酸或碱部分转化成其盐形式(例如,通过使游离碱基团与合适的有机酸反应)来修饰母体化合物。药学上可接受的盐的例子包括但不限于碱性残基如胺的无机酸盐或有机酸盐;酸性残基如羧酸的碱盐或有机盐;等。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、乙酸、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯磺酸、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、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚糖酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等,以及无毒的铵、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。本公开的药学上可接受的盐包括形成的母体化合物的常规无毒盐,例如,从无毒的无机或有机酸形成。本公开的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常,通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的量的适当的碱或酸在水或有机溶剂或这两者的混合物中反应,可以制备这样的盐;通常,非水性介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。合适的盐的列表可在以下文献中找到: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等人, Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977); 它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[1148] 本文中使用的术语“药学上可接受的溶剂合物”是指这样的本发明的化合物,其中合适的溶剂的分子掺入晶格中。合适的溶剂在施用的剂量是生理学上可耐受的。例如,通过从包括有机溶剂、水或其混合物的溶液结晶、重结晶或沉淀,可以制备溶剂合物。合适的溶剂的例子是乙醇、水(例如,一水合物、二水合物和三水合物)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲亚砜(DMSO)、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N'-二甲基乙酰胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苯甲醇、2-吡咯烷酮、苯甲酸苄酯等。当水是溶剂时,溶剂合物被称作“水合物”。

[1149] 根据本发明,可以配制包含编码siRNA分子的调节性多核苷酸序列的AAV颗粒用于CNS递送。可以使用穿过血脑屏障的物质。例如,可以将siRNA分子靶向血脑屏障内皮的一些细胞穿透肽可用于配制靶向目标基因的siRNA双链体。

[1150] 无活性成分

[1151] 在一些实施方案中,所述制剂可以包含至少一种为无活性成分的赋形剂。本文使用的术语“无活性成分”表示在制剂中包括的一种或多种无活性试剂。在某些实施方案中,在本公开的制剂中可以使用的全部、没有或一些无活性成分可以被美国食品和药品管理局(FDA)批准。

[1152] 本文所述的AAV颗粒的制剂可包括阳离子或阴离子。在一个实施方案中,所述制剂包含金属阳离子,例如但不限于 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{+} 及其组合。作为非限制性实例,制剂可包括与金属阳离子络合的本文所述的聚合物和组合物(参见例如美国专利号6,265,389和

6,555,525,各自通过引用整体并入本文)。

[1153] 递送

[1154] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒可以使用欧洲专利申请号EP1857552中描述的用于递送AAV病毒体的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[1155] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒可以使用欧洲专利申请号EP2678433中描述的使用AAV颗粒递送蛋白的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[1156] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒可以使用美国专利号US5,858,351中描述的使用AAV颗粒递送DNA分子的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[1157] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒可以使用美国专利号US6,211,163中描述的用于将DNA递送至血流的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[1158] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒可以使用美国专利号US6,325,998中所述的用于递送AAV病毒体的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[1159] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒可以使用美国专利号US7,588,757中描述的用于将有效载荷递送至中枢神经系统的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[1160] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒可以使用美国专利号US8283151中描述的用于递送有效载荷的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[1161] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒可以使用国际专利公开号W02001089583中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,其内容通过引用整体并入本文。

[1162] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒可以使用国际专利公开号W02012057363中描述的用于将有效载荷递送至神经细胞的方法来施用或递送,其内容通过引用整体并入本文。

[1163] 递送至细胞

[1164] 本公开提供了将任何上述AAV多核苷酸或AAV基因组递送至细胞或组织的方法,其包括使细胞或组织与所述AAV多核苷酸或AAV基因组接触或使细胞或组织与包含所述AAV多核苷酸或AAV基因组的颗粒接触,或使细胞或组织与任何上述组合物(包括药物组合物)接触。将AAV多核苷酸或AAV基因组递送至细胞或组织的方法可以在体外、离体或体内完成。

[1165] 引入细胞-合成的dsRNA

[1166] 为了确保siRNA分子(例如,siRNA双链体和dsRNA)的化学和生物稳定性,重要的是,将siRNA分子递送到靶细胞内。在某些实施方案中,所述细胞可以包括但不限于哺乳动物起源的细胞、人起源的细胞、胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、神经干细胞和神经祖细胞。

[1167] 核酸(包括siRNA)在正常生理条件下在糖-磷酸主链上携带净负电荷。为了进入细胞,siRNA分子必须与细胞膜的脂质双层发生接触,所述脂质双层的头部基团也是带负电荷的。

[1168] siRNA双链体可以与允许它们穿过细胞膜的载体(诸如包装颗粒)形成复合物以促进siRNA的细胞摄取。所述包装颗粒可以包括但不限于脂质体、纳米颗粒、阳离子脂质、聚乙烯亚胺衍生物、树枝状聚合物、碳纳米管以及碳制成的纳米颗粒与树枝状聚合物的组合。脂质可以是阳离子脂质和/或中性脂质。除了充分确立的siRNA分子和阳离子载体之间的亲脂

复合物以外,还可以将siRNA分子缀合至疏水部分,诸如胆固醇(例如,美国专利公开号20110110937;其内容通过引用整体并入本文)。该递送方法具有改善siRNA分子的体外细胞摄取和体内药理学性能的潜力。本发明的siRNA分子还可以共价地或非共价地缀合至某些阳离子的细胞穿透肽(CPP),诸如MPG、transportan或penetratin(例如,美国专利公开号20110086425;其内容通过引用整体并入本文)。

[1169] 引入细胞-AAV颗粒

[1170] 本发明的siRNA分子(例如,siRNA双链体)可以使用多种方法中的任何一种引入细胞中,例如但不限于AAV颗粒。对这些AAV颗粒进行了工程化和优化,以促进siRNA分子进入不易被转染修饰的细胞。而且,一些合成的AAV粒子具有将shRNA整合到细胞基因组中的能力,从而导致稳定的siRNA表达和靶基因的长期敲低。以这种方式,将AAV颗粒工程化为用于特定递送的载体,同时缺乏在野生型病毒中发现的有害复制和/或整合特征。

[1171] 在一些实施方案中,通过使细胞与包含编码siRNA分子的调节性多核苷酸序列的AAV颗粒和亲脂性载体接触,将本发明的siRNA分子引入细胞。在其他实施方案中,通过用AAV颗粒转染或感染细胞来将siRNA分子引入细胞,所述AAV颗粒包含当在细胞中转录时能够产生siRNA分子的核酸序列。在一些实施方案中,通过将包含当在细胞中转录时能够产生siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒注射到细胞中来将siRNA分子引入细胞。

[1172] 在一些实施方案中,在转染之前,可以将包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒转染到细胞中。

[1173] 在其他实施方案中,可以通过电穿孔将包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒递送到细胞中(例如,美国专利公开号20050014264;其内容通过引用整体并入本文)。

[1174] 引入包含编码本文所述的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒的其他方法可包括如美国专利公开号20120264807中所述的光化学内在化,其内容通过引用整体并入本文。

[1175] 在一些实施方案中,本文所述的制剂可包含至少一种AAV颗粒,其包含编码本文所述的siRNA分子的核酸序列。在一个实施方案中,siRNA分子可在一个靶位点靶向目标基因。在另一个实施方案中,制剂包含多种AAV颗粒,每种AAV颗粒包含编码siRNA分子的核酸序列,siRNA分子在不同靶位点靶向目标基因。可以在2、3、4、5或多于5个位点靶向目标基因。

[1176] 在一个实施方案中,可以将来自任何相关物种(例如但不限于人、狗、小鼠、大鼠或猴)的AAV颗粒引入细胞中。

[1177] 在一个实施方案中,可以将AAV颗粒引入与待治疗的疾病相关的细胞中。作为非限制性实例,该疾病是HD,并且靶细胞是神经元和星形胶质细胞。作为另一个非限制性实例,该疾病是HD,并且靶细胞是中型多棘神经元、皮质神经元和星形胶质细胞。

[1178] 在一个实施方案中,可以将AAV颗粒引入与待治疗的疾病相关的细胞中。作为非限制性实例,该疾病是ALS,并且靶细胞是神经元和星形胶质细胞。作为另一个非限制性实例,该疾病是ALS,并且靶细胞是中型多棘神经元、皮层神经元和星形胶质细胞。

[1179] 在一个实施方案中,可以将AAV颗粒引入具有高水平靶序列内源性表达的细胞中。

[1180] 在另一个实施方案中,可以将AAV颗粒引入具有低水平靶序列内源性表达的细胞中。

[1181] 在一个实施方案中,细胞可以是具有高AAV转导效率的细胞。

[1182] 递送至受试者

[1183] 本公开另外提供了向受试者(包括哺乳动物受试者)递送任何上述AAV多核苷酸或AAV基因组的方法,该方法包括向受试者施用所述AAV多核苷酸或AAV基因组,或向受试者施用包含所述AAV多核苷酸或AAV基因组的颗粒,或向受试者施用任何所述组合物,包括药物组合物。

[1184] 本文所述的AAV颗粒的药物组合物可以通过生物利用度、治疗窗和/或分布体积中的一种或多种来表征。

[1185] III. 施用和给药

[1186] 施用

[1187] 通过导致治疗上有效结果的任意途径,可以施用AAV颗粒,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。这些包括但不限于器官的实质内,例如但不限于脑(例如实质内)、纹状体(纹状体内)、肠内(进入肠)、胃肠内、硬膜外、口服(通过口腔)、透皮、硬膜外、大脑内(进入大脑)、脑室内(进入脑室)、软膜下(软膜下方,under the pia)、表皮(应用在皮肤上)、真皮内(进入皮肤本身)、皮下(在皮肤下)、鼻施用(通过鼻)、静脉内(进入静脉)、静脉内快速浓注、静脉内滴注、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)、鞘内(进入椎管)、神经节内(进入神经节)、腹膜内(输注或注射进腹膜)、膀胱内输注、玻璃体内(通过眼)、海绵窦内注射(进入病理性腔体)、腔内(进入阴茎的基底)、阴道内施用、子宫内、羊膜外施用、透皮(穿过完整皮肤扩散用于全身分布)、透粘膜(穿过粘膜扩散)、经阴道、吹入法(嗅吸法)、舌下、唇下、灌肠、滴眼(在结膜上)、滴耳、耳(在耳朵中或通过耳朵)、含服(朝向脸颊)、结膜、皮肤、牙(至一个或多个牙)、电渗透、宫颈内、窦内(endosinusial)、气管内、体外、血液透析、渗入、间质、腹部内、羊膜内、关节内、胆内、支气管内、囊内、软骨内(在软骨内)、脊尾内(在马尾内)、脑池内(在小脑延髓池内)、角膜内(在角膜内)、牙冠内(dental intracornal)、冠状动脉内(在冠状动脉内)、阴茎海绵体内(intracorporus cavernosum)(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(在腺的导管内)、十二指肠内(在十二指肠内)、硬膜内(在硬膜内或下)、表皮内(至表皮)、食管内(至食管)、胃内(在胃内)、牙龈内(在牙龈内)、回肠内(在小肠的远侧部分内)、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(在淋巴管内)、骨髓内(在骨的骨髓腔内)、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(在肺或它的支气管内)、窦内(在鼻或眼窝窦内)、椎管内(在脊柱内)、滑膜内(在关节的滑液腔内)、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在脑脊液内)、胸腔内(在胸腔内)、小管内(在器官的管内)、肿瘤内(在肿瘤内)、鼓室内(在aurus介质内)、血管内(在一个或多个血管内)、心室内(在心室内)、离子透入法(借助于电流,其中可溶性盐的离子迁移进身体的组织中)、冲洗(浸泡或冲洗开放性创伤或体腔)、喉头(直接在喉上)、鼻胃(穿过鼻并进入胃)、封闭敷裹技术(局部途径施用,其然后被封闭该区域的敷料覆盖)、眼(至外眼)、口咽(直接至口和咽)、胃肠外、经皮、关节周、硬膜外、神经周、牙周、直肠、呼吸(在呼吸道内,为了局部或全身效应通过口或鼻吸入)、眼球后(脑桥后或眼球后)、软组织、蛛网膜下、结膜下、粘膜下、局部、经胎盘(通过或穿过胎盘)、经气管(穿过气管壁)、经鼓膜(穿过或通过鼓室)、输尿管(至输尿管)、尿道(至尿道)、阴道、骶管阻滞、诊断、神经传导阻滞、胆灌注、心脏

灌注、体外光化学疗法或脊柱。

[1188] 在具体实施方案中,可以以促进载体或siRNA分子进入中枢神经系统和透入中型多棘神经元和/或皮质神经元和/或星形胶质细胞的方式施用包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体的组合物。

[1189] 在某些实施方案中,通过肌肉内注射可以施用包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体。

[1190] 在一个实施方案中,通过实质内注射可以施用包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体。

[1191] 在一个实施方案中,通过实质内注射和鞘内注射可以施用包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体。

[1192] 在一个实施方案中,通过纹状体内注射可以施用包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体。

[1193] 在一个实施方案中,通过纹状体内注射和本文描述的另一途径可以施用包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体。

[1194] 在某些实施方案中,通过外周注射(例如静脉内)和/或鼻内递送,可以给受试者施用表达本发明的siRNA双链体的AAV颗粒。在本领域中公开了,siRNA双链体的AAV颗粒的外周施用可以运输至中枢神经系统,例如,运输至神经元(例如,美国专利公开号20100240739和20100130594;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文)。

[1195] 在其它实施方案中,通过颅内递送(参见,例如,美国专利号8,119,611;其内容通过引用整体并入本文)可以给受试者施用组合物,其包含至少一种包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒。

[1196] 可以以任意适合形式(作为液体溶液或混悬液,作为适合用于液体溶液或在液体溶液中的混悬液的固体形式)施用包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒。可以用任意适当的和药理学上可接受的赋形剂配制siRNA双链体。

[1197] 可以以“治疗上有效的”量施用包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒,所述“治疗上有效的”量即这样的量:其足以减轻和/或预防至少一种与疾病有关的症状,或提供受试者的病症的改善。

[1198] 在一个实施方案中,可以以治疗有效量将AAV颗粒施用给CNS,以改善患有亨廷顿病(HD)的受试者的功能和/或存活。作为一个非限制性实施例,可以通过直接输注到纹状体施用所述载体。

[1199] 在一个实施方案中,可以以治疗有效量的siRNA双链体或dsRNA将AAV颗粒施用给受试者(例如,通过鞘内施用而施用至受试者的CNS),以靶向中型多棘神经元、皮质神经元和/或星形胶质细胞。作为非限制性实例,siRNA双链体或dsRNA可靶向HTT并降低HTT蛋白或mRNA的表达。作为另一个非限制性实例,siRNA双链体或dsRNA靶向HTT并且可以阻遏HTT并降低HTT介导的毒性。HTT蛋白和/或mRNA的减少以及HTT介导的毒性几乎可以在没有增强炎症的情况下完成。

[1200] 在一个实施方案中,可以以治疗有效量将AAV颗粒施用于受试者(例如,施用于受试者的CNS),以减慢受试者的功能衰退(例如,使用已知的评估方法例如统一的亨廷顿病分级量表(UHDRS)来确定)。作为非限制性实例,可以通过实质内注射施用载体。

[1201] 在一个实施方案中,可以以治疗有效量将AAV颗粒施用至小脑延髓池,以转导脊髓中型多棘神经元、皮质神经元和/或星形胶质细胞。作为一个非限制性实施例,可以鞘内施用所述载体。

[1202] 在一个实施方案中,使用鞘内输注可以以治疗有效量施用所述AAV颗粒,以转导中型多棘神经元、皮质神经元和/或星形胶质细胞。作为一个非限制性实施例,可以鞘内施用所述载体。

[1203] 在一个实施方案中,可以以治疗有效量将AAV颗粒施用至小脑延髓池,以转导中型多棘神经元、皮质神经元和/或星形胶质细胞。作为非限制性实例,可以通过实质内注射来施用载体。

[1204] 在一个实施方案中,可以配制包含调节性多核苷酸的AAV颗粒。作为一个非限制性实施例,可以优化制剂的比重(baricity)和/或渗透压以确保在中枢神经系统或者中枢神经系统的区域或组分中的最佳药物分布。

[1205] 在一个实施方案中,通过单途径施用可以将包含调节性多核苷酸的AAV颗粒递送给受试者。

[1206] 在一个实施方案中,通过多位点施用途径可以将包含调节性多核苷酸的AAV颗粒递送给受试者。可以在2、3、4、5或超过5个部位给受试者施用包含调节性多核苷酸的AAV颗粒。

[1207] 在一个实施方案中,使用快速浓注可以给受试者施用包含本文描述的调节性多核苷酸的AAV颗粒。

[1208] 在一个实施方案中,使用在数分钟、数小时或数天的时间段内的持久递送可以给受试者施用包含本文描述的调节性多核苷酸的AAV颗粒。根据受试者、分布、制剂或另一种递送参数,可以改变输注速率。

[1209] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒是通过壳核和尾(caudate)输注来施用。作为非限制性实例,双重输注提供宽的纹状体分布以及额叶和颞皮质分布。

[1210] 在一个实施方案中,AAV颗粒是AAV-DJ8,其通过单侧壳核输注施用。作为非限制性实例,所施用的AAV-DJ8的分布类似于经由单侧壳核输注递送的AAV1的分布。

[1211] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒通过鞘内(IT)在C1处输注来施用。输注可以持续1、2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或多于15小时。

[1212] 在一个实施方案中,可以使用血管周间隙(PVS,其也称为Virchow-Robin间隙)成像来评估施用本文所述的AAV颗粒的受试者的选择和/或剂量、施用途径和/或施用体积的有效性。当它们穿透脑实质时,PVS围绕着小动脉和小静脉,并充有脑脊液(CSF)/间质液。PVS常见于中脑、基底神经节和半卵圆中心。尽管不希望受到理论的束缚,PVS可能在代谢物的正常清除中起作用,并且与认知能力下降和包括帕金森氏病在内的多种疾病相关。PVS的大小通常是正常的,但在许多疾病状态下它们的大小可能会增加。Potter等人(Cerebrovasc Dis.2015Jan;39(4):224-231;其内容通过引用整体并入本文)开发了一种分级方法,在该方法中,他们研究了全范围的PVS和分级(rated)的基底神经节、半卵圆中心和中脑PVS。他们使用了Mac和Lullich等人(J Neurol Neurosurg Psychiatry.2004Nov;75(11):1519-23;其内容通过引用整体并入本文)使用的PVS的频率和范围,并且Potter等人对基底神经节和半卵圆中心PVS给予5个等级:0(无)、1(1-10)、2(11-20)、3(21-40)和4(>

40),并对中脑PVS给与2个等级:0(不可见)或1(可见)。Potter等人的评级系统用户指南可以在以下网址找到:www.sbirc.ed.ac.uk/documents/epvs-rating-scale-user-guide.pdf。

[1213] 给药

[1214] 通过使用有效地减轻、预防和/或治疗疾病和/或病症的任何量,可以将本发明的药物组合物施用给受试者。所要求的确切量将在受试者之间变化,这取决于受试者的物种、年龄和总体状况、疾病的严重程度、具体组合物、它的施用模式、它的活性模式等。

[1215] 通常以易于施用和剂量均匀的单位剂型配制本发明的组合物。然而,应当理解,本发明的组合物的每日总用量可以由主治医师在合理的医学判断范围内决定。对于任何特定患者的具体治疗有效性将取决于多种因素,包括正在治疗的障碍和障碍的严重程度;使用的具体化合物的活性;所用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;采用的siRNA双链体的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗的持续时间;与所用的具体化合物组合或同时使用的药物;和医学领域中众所周知的类似因素。

[1216] 在一个实施方案中,受试者的年龄和性别可以用于确定本发明的组合物的剂量。作为一个非限制性实施例,较老的受试者可以接受与较年轻的受试者相比更大剂量(例如,多5-10%、10-20%、15-30%、20-50%、25-50%或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或超过90%)的组合物。作为另一个非限制性实施例,较年轻的受试者可以接受与较老的受试者相比更大剂量(例如,多5-10%、10-20%、15-30%、20-50%、25-50%或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或超过90%)的组合物。作为另一个非限制性实施例,女性受试者可以接受与男性受试者相比更大剂量(例如,多5-10%、10-20%、15-30%、20-50%、25-50%或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或超过90%)的组合物。作为另一个非限制性实施例,男性受试者可以接受与女性受试者相比更大剂量(例如,多5-10%、10-20%、15-30%、20-50%、25-50%或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或超过90%)的组合物。

[1217] 在某些具体实施方案中,根据疾病状况、受试者和治疗策略可以改变用于递送本发明的siRNA双链体的AAV颗粒的剂量。

[1218] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物向细胞的递送包含由 $[VG/\text{小时} = \text{mL}/\text{小时} * VG/\text{mL}]$ 定义的递送速度,其中VG是病毒基因组,VG/mL是组合物浓度,且mL/小时是延长的递送速度。

[1219] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物向细胞的递送可以包含约 1×10^6 VG至约 1×10^{16} VG/受试者之间的总浓度。在某些实施方案中,递送可以包含约 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} 、 1.1×10^{11} 、 1.2×10^{11} 、 1.3×10^{11} 、 1.4×10^{11} 、 1.5×10^{11} 、 1.6×10^{11} 、 1.7×10^{11} 、 1.8×10^{11} 、 1.9×10^{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} 、 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} 、 2.1×10^{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} 、 6.1×10^{12} 、 6.2×10^{12} 、 6.3×10^{12} 、 6.4×10^{12} 、 6.5×10^{12} 、 6.6×10^{12} 、 6.7×10^{12} 、 6.8×10^{12} 、 6.9×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1.1×10^{13} 、 1.2×10^{13} 、 1.3×10^{13} 、 1.4×10^{13} 、 1.5×10^{13} 、 1.6×10^{13} 、 1.7×10^{13} 、 1.8×10^{13} 、 1.9×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 6.7×10^{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/mL的组合物浓度。

[1223] 在某些实施方案中,通过使用多次施用(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多次施用),可以递送期望的siRNA双链体剂量。当采用多次施用时,可以使用分次定量施用方案,诸如本文描述的那些。本文中使用的“分次剂量”是将单一单位剂量或总每日剂量分成两个或更多个剂量,例如,单一单位剂量的两次或更多次施用。本文中使用的“单一单位剂量”是在一个剂量/在一个时间/单个途径/单个接触点(即,单个施用事件)中施用的任何调节性多核苷酸治疗剂的剂量。本文中使用的“总每日剂量”是在24小时时间段中给出或开处方的量。它可以作为单一单位剂量施用。在一个实施方案中,将包含本发明的调节性多核苷酸的AAV颗粒在分次剂量中施用给受试者。可以在仅缓冲液中或在本文描述的制剂中配制它们。

[1224] 在一个实施方案中,本文描述的组合物剂量、浓度和/或体积可根据施用后尾或壳核对皮质和皮质下分布的贡献来调节。施用可以是脑室内、壳核内、丘脑内、实质内、软膜下和/或鞘内施用。

[1225] 在一个实施方案中,本文描述的组合物剂量、浓度和/或体积可根据脑室内、壳核内、丘脑内、实质内、软膜下和/或鞘内施用后皮质和神经轴分布来调节。

[1226] IV. 本发明组合物的方法和用途

[1227] 亨廷顿病(HD)

[1228] 亨廷顿病(HD)是一种单基因致命性神经退行性疾病,其特征为进行性舞蹈病、神经精神和认知功能障碍。已知亨廷顿病是由亨廷顿基因(HTT)基因中的常染色体显性三联体(CAG)重复扩增引起的,该基因在HTT蛋白的N端编码聚谷氨酰胺。这种重复扩展导致HTT功能的毒性增加,并最终导致纹状体神经变性,进而发展为广泛性脑萎缩。在HD中,纹状体的中型多棘神经元似乎特别脆弱,损失高达95%,而中间神经元则大为幸免。

[1229] 亨廷顿病对生活质量产生深远影响。症状通常出现在35-44岁之间,发病后的预期寿命是10-25年。在少数HD人群(-6%)中,疾病发作发生在21岁之前,并伴有运动不能-强直综合征。这些病例的进展往往快于后期发病变体的进程,并被分类为青少年或Westphal变体HD。据估计,在美国和欧洲,目前约有35,000-70,000患者患有HD。当前,仅症状缓解和支持性疗法可用于HD的治疗,尚未找到治愈的方法。最终,患有HD的个体会经受不住肺炎、心力衰竭或其他并发症,例如跌倒造成的身体伤害。

[1230] 尽管不希望受到理论的束缚,但是野生型HTT蛋白的功能可以用作协调其他蛋白的复合物的支架。HTT是一种非常大的蛋白质(67个外显子,3144个氨基酸,~350kDa),其

经过广泛的翻译后修饰,并具有许多与其他蛋白相互作用的位点,尤其是在其N末端(巧合的是,这是在HD中带有重复序列的区域)。HTT主要定位于细胞质,但已显示出穿梭进入细胞核,在此其可调节基因转录。还已经提出,HTT在囊泡转运和调节RNA运输中起作用。

[1231] 作为非限制性实例,HTT核酸序列是SEQ ID NO:1163(NCBI NM_002111.7)。

[1232] CAG扩展的HTT破坏正常HTT功能并导致神经毒性的机制最初被认为是单倍剂量不足疾病,当人类中HTT基因的末端缺失未导致HD的发展,表明完全表达的HTT蛋白对存活并不重要时,这一理论就不成立了。但是,小鼠中条件性敲除HTT导致神经退行性变,表明一定量的HTT对于细胞存活是必需的。亨廷顿蛋白在所有细胞中都有表达,尽管其浓度在大脑中最高,在此发现在神经元核中存在大型异常HTT聚集体。在HD患者的大脑中,HTT聚集成异常的核包涵体。现在认为,正是这种错误折叠和聚集过程以及相关的蛋白中间体(即可溶性物质和有毒的N-末端片段)导致了神经毒性。实际上,HD属于另外9种人类遗传疾病的家族,所有这些疾病均以CAG扩增基因和所得的聚谷氨酰胺(poly-Q)蛋白产物为特征,并随后形成神经细胞内聚集体。有趣的是,在所有这些疾病中,扩增的长度与发病年龄和疾病进展速度相关,扩增越长与疾病的严重程度越高相关。

[1233] 关于CAG扩增的HTT及其所产生的聚集体的神经毒性潜在的分子机制的假说范围广泛,但包括caspase激活、转录途径失调、活性氧产生增加、线粒体功能障碍、轴突运输破坏和/或细胞内蛋白降解系统的抑制。CAG扩增的HTT可能不仅具有毒性功能获得,而且还可以通过干扰其他细胞蛋白和过程的正常功能发挥主要的负面作用。HTT还牵涉非细胞自主神经毒性,借此携带(hosting)HTT的细胞可将HTT传播至附近的其他神经元。

[1234] 在一个实施方案中,受试者具有完全外显性(penetrant)HD,其中HTT基因具有41个或更多个CAG重复(例如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或多于90个CAG重复)。

[1235] 在一个实施方案中,受试者具有不完全外显性,其中HTT基因具有36至40个CAG重复(例如36、37、38、39和40个CAG重复)。

[1236] HD的症状可能包括归因于CNS变性的特征,例如但不限于舞蹈症、肌张力障碍、运动迟缓、不协调、易怒和沮丧、解决问题的困难、人在正常日常生活中功能的能力下降、言语减弱、吞咽困难,以及非归因于CNS变性的特征,例如但不限于体重减轻、肌肉消瘦、代谢功能障碍和内分泌失调。

[1237] 可与本文所述调节性多核苷酸和AAV颗粒一起使用的用于研究亨廷顿病的模型系统包括但不限于细胞模型(例如,原代神经元和诱导多能干细胞)、无脊椎动物模型(例如,果蝇(*drosophila*)或秀丽新小杆线虫(*caenorhabditis elegans*))、小鼠模型(例如,YAC128小鼠模型;R6/2小鼠模型;BAC、YAC和敲入小鼠模型)、大鼠模型(例如,BAC)和大型哺乳动物模型(例如,猪、羊或猴)。

[1238] 例如,对HD动物模型的研究表明,在调节表达模型中在基因关闭后,表型逆转是可行的。在允许关闭94-聚谷氨酰胺重复HTT蛋白表达的小鼠模型中,不仅临床综合征被逆转,而且细胞内聚集体也被消解。此外,测试了HTT沉默的动物模型显示出有希望的结果,治疗既耐受良好又显示出潜在的治疗益处。

[1239] 这种siRNA介导的HTT表达抑制可用于治疗HD。根据本发明,治疗和/或缓解患者HD

的方法包括向患者施用有效量的AAV颗粒到细胞中,该颗粒包含编码本发明siRNA分子的核酸序列。施用包含这类核酸序列的AAV颗粒将编码引起HTT基因表达的抑制/沉默的siRNA分子。

[1240] 在一个实施方案中,本文所述的AAV颗粒可以用于在有需求的受试者中降低HTT的量,从而提供如本文所述的治疗益处。

[1241] 在某些方面,HD的症状包括行为困难和症状,例如但不限于冷漠或缺乏主动性、烦躁不安、烦躁、激动或焦虑、自我护理差、判断力差、僵硬、去抑制、抑郁、自杀意念欣快感、攻击性、妄想、强迫症、性欲亢进、幻觉、语言恶化、言语不清、吞咽困难、体重减轻、损害执行功能的认知功能障碍(例如,组织、计划、检查或调整替代方案以及延迟获得新运动技能)、不稳定步态和不自主运动(舞蹈症)。在其它方面,本发明的组合物应用于脑和脊髓中的一种或两种。在一个实施方案中,通过治疗本文所述的任何HD症状来延长受试者的生存。

[1242] 本发明公开了在需要治疗的受试者中治疗与HTT蛋白相关的亨廷顿病(HD)的方法。所述方法任选地包括向受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物至少包含AAV颗粒,所述AAV颗粒包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。作为非限制性实例,siRNA分子可沉默HTT基因表达、抑制HTT蛋白产生并减轻受试者中HD的一种或多种症状,从而治疗性治疗HD。

[1243] 亨廷顿病的治疗方法

[1244] 本发明提供了包含编码靶向HTT基因的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒及其设计和制备方法。尽管不希望受单一可操作性理论的束缚,但本发明提供了干扰HTT表达(包括HTT突变体和/或野生型HTT基因表达)的调节性多核苷酸,包括siRNA。特别地,本发明使用病毒基因组,例如腺相关病毒(AAV)病毒基因组,其包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸序列。包含编码本发明siRNA分子的调节性多核苷酸序列的AAV颗粒可以增加活性剂向目标神经元的递送,例如纹状体的中型多棘神经元和皮质神经元。靶向HTT基因的siRNA双链体或编码dsRNA可能能够显著抑制细胞内HTT基因表达(例如,mRNA水平);因此,减轻了HTT表达诱导的细胞内应激(stress),如蛋白的聚集和包涵体的形成、增加的自由基、线粒体功能障碍和RNA代谢。

[1245] 本发明提供了用于将包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸序列的AAV颗粒引入细胞的方法,该方法包括以足以使得靶HTT mRNA发生降解的量向所述细胞中引入任何AAV颗粒,从而激活细胞中的靶特异性RNAi。在一些方面,细胞可以是干细胞、神经元如中型多棘或皮质神经元、肌细胞和胶质细胞如星形胶质细胞。

[1246] 在一些实施方案中,本发明提供了通过向有此需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的质粒或AAV颗粒治疗或缓解亨廷顿病(HD)的方法。

[1247] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒可以用于治疗和/或改善HD。

[1248] 在一个实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒可用于降低HD受试者的认知和/或运动衰退,其中由标准评价系统确定衰退量,例如但不限于统一的亨廷顿病评定量表(UHDRS)、子分数以及认知测试。

[1249] 在一个实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒可用于降低功能能力和日常生活活动的衰退,如通过标准评价系统所测量的,例如但不限于

总功能能力(TFC)量表。

[1250] 在一些实施方案中,本发明提供了在需要治疗的受试者中治疗或改善与HTT基因和/或HTT蛋白相关的亨廷顿病的方法,该方法包括向受试者施用有效量的包含编码至少一种siRNA双链体的调节性多核苷酸的AAV颗粒,该siRNA双链体靶向HTT基因、抑制HTT基因表达和蛋白生产,并改善受试者的HD症状。

[1251] 在一个实施方案中,本发明的AAV颗粒可在需要治疗的受试者中用作治疗亨廷顿病的方法。本领域已知的用于定义需要治疗的受试者的任何方法均可用于识别所述受试者。受试者可能有亨廷顿病的临床诊断或可能是症状前的。可以使用任何已知的用于诊断HD的方法,包括但不限于认知评价和/或神经学或神经精神病学检查、运动测试、感觉测试、精神病学评价、脑成像、家族史和/或基因测试。

[1252] 在一个实施方案中,使用亨廷顿病的预后指数或其衍生物来确定HD受试者的选择(Long JD等人,Movement Disorders,2017,32(2),256-263,其内容通过引用整体并入本文)。该预后指数使用四种组分来预测运动诊断的概率:(1)来自统一亨廷顿病评定量表(UHDRS)的总运动评分(TMS),(2)符号数字模式测试(SDMT),(3)基线年龄和(4)胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)扩增。

[1253] 在一个实施方案中,用以下公式计算亨廷顿病的预后指数: $PI_{HD} = 51 \times TMS + (-34) \times SDMT + 7 \times \text{年龄} \times (CAG - 34)$,其中 PI_{HD} 值越大表示诊断或症状发作的风险越大。

[1254] 在另一个实施方案中,用以下归一化公式计算亨廷顿病的预后指数,该公式给出了在50%的10年生存背景下待解释的标准偏差单位: $PIN_{HD} = (PI_{HD} - 883) / 1044$,其中 $PIN_{HD} < 0$ 表示10年生存大于50%,而 $PIN_{HD} > 0$ 表示10年生存低于50%。

[1255] 在一个实施方案中,预后指数可用于识别将在几年内发展出HD症状但尚未具有临床可诊断症状的受试者。此外,可以在无症状期间使用本发明的AAV颗粒和组合物选择这些无症状患者并接受治疗。

[1256] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以施用于已经历生物标志物评价的受试者。血液中用于HD显现前(premanifest)和早期进展的潜在生物标志物包括但不限于8-OHdG氧化应激标志物、代谢标志物(例如,肌酸激酶、支链氨基酸)、胆固醇代谢物(例如,24-OH胆固醇)、免疫和炎症蛋白(例如,簇蛋白、补体组分、白细胞介素6和8)、基因表达变化(例如,转录组标志物)、内分泌标志物(例如,皮质醇、胃饥饿素和瘦蛋白)、BDNF、腺苷2A受体。用于HD显现前和早期进展的脑成像的潜在生物标志物包括但不限于纹状体体积、皮质下白质体积、皮质厚度、全脑和室容积、功能性成像(例如,功能性MRI)、PET(例如,用氟脱氧葡萄糖)和磁共振光谱法(例如,乳酸盐)。用于HD的显现前和早期进展的定量临床工具的潜在生物标志物包括但不限于定量运动评价、运动生理评价(例如,经颅磁刺激)和定量眼运动测量。定量临床生物标志物评价的非限制性实例包括舌力变异性、节拍器引导的拍击、握力、眼运动评价和认知测试。多中心观察研究的非限制性实例包括PREDICT-HD和TRACK-HD。受试者可具有HD的症状,被诊断为HD或可能无HD症状。

[1257] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以施用于已经使用神经成像进行生物标志物评价的受试者。受试者可具有HD的症状,被诊断为HD或可能无HD症状。

[1258] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以施用于无HD症状的受试者。受试者可能是无症状的,但可能已经历预测性基因检测或生物标志物评价,以确定他们是否有HD风险和/或受试

者可能有已被诊断患有HD的家庭成员(例如,母亲、父亲、兄弟、姐妹、阿姨、舅舅、祖父母)。

[1259] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以施用于处于HD早期阶段的受试者。在早期阶段,在协调、一些不自主运动(舞蹈症)、情绪变化如烦躁和抑郁、解决问题困难、人们在正常日常生活中运作能力降低方面,受试者存在微妙的变化。

[1260] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以施用于处于HD中期的受试者。在中期,受试者的运动障碍增加、言语减少、吞咽困难并且普通活动将变得更难。在这个阶段,受试者可能有职业和物理治疗师帮助维持对自主运动的控制,并且受试者可能有语言病理学家。

[1261] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以施用于处于HD晚期的受试者。在晚期阶段,HD受试者几乎完全或完全依赖他人进行护理,因为受试者不再能走路而且无法说话。受试者通常仍能理解语言,并且知道家人和朋友,但是窒息是主要关注的问题。

[1262] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以用于治疗具有青少年形式HD的受试者,其HD发作为在20岁之前,甚至早至2岁。

[1263] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以用于治疗具有完全外显性HD的HD受试者,其中HTT基因具有41或更多个CAG重复(例如,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或多于90个CAG重复)。

[1264] 一个实施方案中,AAV颗粒可用于治疗具有不完全外显性的HD受试者,其中HTT基因具有36至40个CAG重复(例如,36、37、38、39和40个CAG重复)。

[1265] 在某些实施方案中,将包含AAV颗粒的组合物施用于受试者的中枢神经系统,所述AAV颗粒包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸。在其他实施方案中,将包含AAV颗粒的组合物施用于受试者的组织(例如,受试者的脑),所述AAV颗粒包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸。

[1266] 在一个实施方案中,可以将包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒递送到特定类型的靶细胞中,所述靶细胞包括但不限于神经元,包括中型多棘或皮质神经元;和胶质细胞,包括少突胶质细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞;和/或其他围绕神经元的细胞,例如T细胞。

[1267] 在一个实施方案中,可以将包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒递送至纹状体中的神经元和/或皮质的神经元。

[1268] 在某些实施方案中,通过静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、实质内、软膜下、鞘内和/或室内,将用于治疗HD的本发明组合物施用至有需求的受试者,从而允许siRNA分子或包含siRNA分子的载体通过血脑屏障和血液脊髓屏障的一个或两个、或直接进入脑和/或脊髓。在一些方面,方法包括(使用例如输注泵和/或递送支架)直接向受试者的中枢神经系统(CNS)施用(例如,实质内施用、软膜下施用、室内施用和/或鞘内施用)治疗有效量的组合物,所述组合物包含编码本发明siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒。载体可用于沉默或阻遏HTT基因表达和/或减少受试者中HD的一种或多种症状,使得治疗性治疗HD。

[1269] 在某些实施方案中,siRNA分子或包含这类siRNA分子的AAV颗粒可以直接引入受试者的中枢神经系统,例如通过输注到受试者的白质。虽然不希望受到理论的束缚,通过直接白质输注的分布可能与可能会在亨廷顿病的受试者中受损的轴突运输机制无关,这意味着白质输注可能允许转运更多的AAV颗粒。

[1270] 在一个实施方案中,通过实质内注射,将包含AAV颗粒的组合物施用至受试者的中枢神经系统,所述AAV颗粒包含编码本发明siRNA分子的调节性多核苷酸。

[1271] 在一个实施方案中,通过实质内注射和鞘内注射,将包含编码本发明siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒组合物施用至受试者的中枢神经系统。

[1272] 在一个实施方案中,通过实质内注射和室内注射,将包含编码本发明siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒组合物施用至受试者的中枢神经系统。

[1273] 在某些实施方案中,通过实质内施用,将用于治疗HD的本发明的组合物施用于需要的受试者。

[1274] 在一些实施方案中,例如通过输注到壳核中,可以将包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒组合物直接引入受试者的中枢神经系统中。

[1275] 在一些实施方案中,例如,通过输注至受试者的丘脑,可以将包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒组合物直接引入受试者的中枢神经系统。尽管不希望受到理论的束缚,丘脑是在亨廷顿病患者中相对不受影响(spared)的大脑的一个区域,这意味着它可能允许通过AAV颗粒的轴突运输进行更广泛的皮质转导。

[1276] 在一些实施方案中,例如通过静脉施用内,可以将包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒组合物间接地引入受试者的中枢神经系统。

[1277] 调节HTT表达

[1278] 在一个实施方案中,向受试者施用AAV颗粒将降低受试者中HTT的表达,并且降低HTT的表达将降低HD在受试者中的影响。

[1279] 在一个实施方案中,例如当通过本文所述的方法测定时,编码的dsRNA一旦表达并与表达HTT蛋白的细胞接触,则HTT蛋白的表达被抑制至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%或至少40%或更多。

[1280] 在一个实施方案中,向受试者施用包含编码本发明的siRNA的调节性多核苷酸序列的AAV颗粒可以在受试者中降低HTT(例如,突变型HTT、野生型HTT和/或突变型和野生型HTT)。在一个实施方案中,向受试者施用AAV颗粒可以在受试者中降低野生型HTT。在另一个实施方案中,向受试者施用AAV颗粒可以在受试者中降低突变型HTT和野生型HTT。在受试者中,例如但不限于受试者的CNS、CNS的区域或CNS的特定细胞中,突变型和/或野生型HTT可降低约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。在受试者中,例如但不限于受试者的CNS、CNS的区域或CNS的特定细胞中,突变型HTT可降低约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-

100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。在受试者中,例如但不限于受试者的CNS、CNS的区域或CNS的特定细胞中,野生型HTT可降低约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。在受试者中,例如但不限于受试者的CNS、CNS的区域或CNS的特定细胞中,突变型和野生型HTT可以降低约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使中型多棘神经元中的HTT表达降低至少50%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使中型多棘神经元中的HTT表达降低至少40%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使壳核的中型多棘神经元中的HTT表达降低至少40%。作为非限制性实例,AAV颗粒可以使壳核的中型多棘神经元中的HTT表达降低至少30%。作为又一个非限制性实例,AAV颗粒可以使壳核和皮质中HTT的表达降低至少40%。作为另一个非限制性实例,AAV颗粒可以使壳核和皮质中HTT的表达降低至少30%。作为又一个非限制性实例,AAV颗粒可以使壳核中HTT的表达降低至少30%。作为又一个非限制性实例,AAV颗粒可以使壳核中HTT的表达降低至少30%,并使皮质中HTT的表达降低至少15%。

[1281] 在一个实施方案中,AAV颗粒可用于将HTT蛋白的表达降低至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-60%、55-70%、55-80%、55-90%、55-95%、55-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,HTT蛋白表达的表达可以降低50-90%。作为非限制性实例,HTT蛋白表达的表达可降低30-70%。

[1282] 在一个实施方案中,siRNA双链体或编码的dsRNA可用于将HTT mRNA的表达降低至少约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%、85%、90%、95%和100%，或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-60%、55-70%、55-80%、55-90%、55-95%、55-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例，HTT mRNA的表达可以降低50-90%。

[1283] 在一个实施方案中，AAV颗粒可用于减少受试者的HTT蛋白。减少可以独立地为5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。作为非限制性实例，受试者的HTT蛋白可以降低50%。作为非限制性实例，受试者中，HTT蛋白可减少70%，野生型HTT蛋白可减少10%。作为非限制性实例，壳核的中型多棘神经元中HTT的减少可为约40%。作为非限制性实例，壳核和皮质中HTT的减少可以是约40%。作为非限制性实例，壳核的中型多棘状神经元中HTT的减少可以在40%-70%之间。作为非限制性实例，壳核和皮质中HTT的减少可以在40%-70%之间。

[1284] 在一个实施方案中，AAV颗粒可用于减少受试者中野生型HTT蛋白。减少可以独立地为5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、

20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。作为非限制性实例,受试者的野生型HTT蛋白减少50%。作为非限制性实例,壳核的中型多棘神经元中野生型HTT的减少可为约40%。作为非限制性实例,核壳和皮质中野生型HTT的减少可以是约40%。作为非限制性实例,壳核的中型多棘神经元中野生型HTT的减少可以在40%-70%之间。作为非限制性实例,核壳和皮质中野生型HTT的减少可以在40%-70%之间。

[1285] 在一个实施方案中,AAV颗粒可以用于减少受试者中的突变型HTT蛋白。减少可以独立地为5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。作为非限制性实例,受试者的突变型HTT蛋白减少50%。作为非限制性实例,壳核的中型多棘神经元中突变型HTT的减少可为约40%。作为非限制性实例,壳核和皮质中突变型HTT的减少可以是约40%。作为非限制性实例,壳核的中型多棘神经元中突变型HTT的减少可以在40%-70%之间。作为非限制性实例,在壳核和皮质中突变型HTT的减少可以在40%-70%之间。

[1286] 在一些实施方案中,本发明提供了抑制/沉默细胞中HTT基因表达的方法。因此,

siRNA双链体或编码的dsRNA可用于基本上抑制细胞(特别是神经元)中HTT基因表达。在一些方面,对HTT基因表达的抑制是指抑制至少约20%,例如至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-60%、55-70%、55-80%、55-90%、55-95%、55-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此,靶基因的蛋白产物可以被抑制至少约20%,优选地被抑制至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[1287] 在一些实施方案中,本发明提供了抑制/沉默细胞(特别是中型多棘神经元)中HTT基因表达的方法。在一些方面,对HTT基因表达的抑制是指抑制至少约20%,例如抑制至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-60%、55-70%、55-80%、55-90%、55-95%、55-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此,靶基因的蛋白质产物可以被抑制至少约20%,优选地被抑制至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-

60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-60%、55-70%、55-80%、55-90%、55-95%、55-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[1288] 在一些实施方案中,本发明提供了抑制/沉默细胞(特别是星形胶质细胞)中HTT基因表达的方法。在一些方面,对HTT基因表达的抑制是指抑制至少约20%,例如抑制至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-60%、55-70%、55-80%、55-90%、55-95%、55-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此,靶基因的蛋白质产物可以被抑制至少约20%,优选地被抑制至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-60%、55-70%、55-80%、55-90%、55-95%、55-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[1289] 在一个实施方案中,siRNA双链体或编码的dsRNA可用于减少CNS的至少一个区域(例如但不限于中脑)中HTT蛋白和/或mRNA的表达。在CNS的至少一个区域中,HTT蛋白和/或mRNA的表达降低至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-60%、55-70%、55-80%、55-90%、55-95%、55-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-90%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA

的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了30-70%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-70%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-70%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了51%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了52%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了53%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了54%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了55%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了56%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了57%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了58%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了59%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了60%。

[1290] 在一个实施方案中, siRNA双链体或编码的dsRNA可用于减少CNS的至少一个区域(例如但不限于前脑)中HTT蛋白和/或mRNA的表达。在CNS的至少一个区域中, HTT蛋白和/或mRNA的表达降低至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-60%、55-70%、55-80%、55-90%、55-95%、55-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-90%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了30-70%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-70%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-70%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-60%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了51%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了52%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了53%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了54%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了55%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了56%。作为

非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了57%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了58%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了59%。作为非限制性实例,纹状体和/或皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了60%。

[1291] 在一个实施方案中,siRNA双链体或编码的dsRNA可用于减少纹状体中HTT蛋白和/或mRNA的表达。HTT蛋白和/或mRNA的表达降低至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了30-70%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了至少30%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-70%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-70%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-60%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了51%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了52%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了53%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了54%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了55%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了56%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了57%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了58%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了59%。作为非限制性实例,纹状体中HTT蛋白和mRNA的表达降低了60%。

[1292] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒可以用于阻遏纹状体和/或皮质的神经元和/或星形胶质细胞中的HTT蛋白。作为非限制性实例,HTT蛋白的阻遏是在纹状体的中型多棘状神经元和/或皮质的神经元中。

[1293] 在一些实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的调节性多核苷酸的AAV颗粒可以用于阻遏纹状体和/或皮质的神经元和/或星形胶质细胞中HTT蛋白并降低相关的神经元毒性。在纹状体和/或皮质的神经元和/或星形胶质细胞中HTT蛋白的阻遏可以独立地被阻遏5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%,5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、

15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。相关神经元毒性的降低可以是5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%，5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、5-35%、5-40%、5-45%、5-50%、5-55%、5-60%、5-65%、5-70%、5-75%、5-80%、5-85%、5-90%、5-95%、10-20%、10-25%、10-30%、10-35%、10-40%、10-45%、10-50%、10-55%、10-60%、10-65%、10-70%、10-75%、10-80%、10-85%、10-90%、10-95%、15-25%、15-30%、15-35%、15-40%、15-45%、15-50%、15-55%、15-60%、15-65%、15-70%、15-75%、15-80%、15-85%、15-90%、15-95%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、20-50%、20-55%、20-60%、20-65%、20-70%、20-75%、20-80%、20-85%、20-90%、20-95%、25-35%、25-40%、25-45%、25-50%、25-55%、25-60%、25-65%、25-70%、25-75%、25-80%、25-85%、25-90%、25-95%、30-40%、30-45%、30-50%、30-55%、30-60%、30-65%、30-70%、30-75%、30-80%、30-85%、30-90%、30-95%、35-45%、35-50%、35-55%、35-60%、35-65%、35-70%、35-75%、35-80%、35-85%、35-90%、35-95%、40-50%、40-55%、40-60%、40-65%、40-70%、40-75%、40-80%、40-85%、40-90%、40-95%、45-55%、45-60%、45-65%、45-70%、45-75%、45-80%、45-85%、45-90%、45-95%、50-60%、50-65%、50-70%、50-75%、50-80%、50-85%、50-90%、50-95%、55-65%、55-70%、55-75%、55-80%、55-85%、55-90%、55-95%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、75-85%、75-90%、75-95%、80-90%、80-95%或90-95%。

[1294] 在一个实施方案中，siRNA双链体或编码的dsRNA可用于减少皮质中HTT蛋白和/或mRNA的表达。HTT蛋白和/或mRNA的表达降低至少约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%、85%、90%、95%和100%，或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-

95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了30-70%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了至少30%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-70%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-70%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-60%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了51%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了52%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了53%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了54%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了55%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了56%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了57%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了58%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了59%。作为非限制性实例,皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了60%。

[1295] 在一个实施方案中,siRNA双链体或编码的dsRNA可用于降低运动皮质中HTT蛋白和/或mRNA的表达。HTT蛋白和/或mRNA的表达降低至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了30-70%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了至少30%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-70%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-70%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-60%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了51%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了52%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了53%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了54%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了55%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了56%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了57%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了58%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了59%。作为非限制性实例,运动皮质中HTT蛋白和mRNA

的表达降低了60%。

[1296] 在一个实施方案中, siRNA双链体或编码的dsRNA可用于减少体感皮质中HTT蛋白和/或mRNA的表达。HTT蛋白和/或mRNA的表达降低至少约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%、85%、90%、95%和100%, 或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了30-70%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了至少30%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-70%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-70%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-60%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了51%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了52%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了53%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了54%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了55%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了56%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了57%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了58%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了59%。作为非限制性实例, 体感皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了60%。

[1297] 在一个实施方案中, siRNA双链体或编码的dsRNA可用于减少颞叶皮质中HTT蛋白和/或mRNA的表达。HTT蛋白和/或mRNA的表达降低至少约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%、85%、90%、95%和100%, 或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例, 颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例, 颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了30-70%。作为非限制性实例, 颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了至少30%。作为非限制性实

例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-70%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-70%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-60%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了51%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了52%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了53%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了54%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了55%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了56%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了57%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了58%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了59%。作为非限制性实例,颞叶皮质中HTT蛋白和mRNA的表达降低了60%。

[1298] 在一个实施方案中,siRNA双链体或编码的dsRNA可用于减少壳核中HTT蛋白和/或mRNA的表达。在CNS的至少一个区域中,HTT蛋白和/或mRNA的表达降低至少约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%、85%、90%、95%和100%,或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-60%、55-70%、55-80%、55-90%、55-95%、55-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-70%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了40-50%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-70%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50-60%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了50%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了51%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了52%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了53%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了54%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了55%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了56%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了57%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了58%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了59%。作为非限制性实例,壳核中HTT蛋白和mRNA的表达降低了60%。

[1299] 单独和联合疗法

[1300] 在一些实施方案中,作为用于治疗HD的单独治疗剂或组合治疗剂来施用本组合物。

[1301] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物用作单独疗法。在其他实施方案中,本发明的药物组合物用于联合疗法。联合疗法可以与一种或多种神经保护剂(例如小分子化合

物、生长因子和激素)组合使用,这些物质已经过测试,对神经元退化有神经保护作用。

[1302] 编码靶向HTT基因的siRNA双链体的AAV颗粒可以与一种或多种其它治疗剂组合使用。“与……组合”并不意味着试剂必须同时施用和/或一起配制用于递送,尽管这些递送方法落入本公开的范围。组合物可以与一种或多种其它所需治疗剂或医疗程序同时、在其之前或之后施用。通常,将以针对该药剂确定的剂量和/或按时间表施用每种试剂。

[1303] 可以与编码本发明siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒组合使用的治疗剂可以是小分子化合物,其是抗氧化剂、抗炎剂、抗凋亡剂、钙调节剂、抗谷氨酸能试剂、结构蛋白抑制剂、参与肌肉功能的化合物以及参与金属离子调节的化合物。

[1304] 可以与本文所述载体组合使用的用于治疗HD的测试化合物包括但不限于多巴胺消耗剂(例如,用于舞蹈症的丁苯那嗪)、苯并二氮杂卓(例如,用于肌阵挛、舞蹈症、肌张力障碍、僵直和/或痉挛状态的氯硝西洋)、抗惊厥药(例如,用于肌阵挛的丙戊酸钠和左乙拉西坦)、多巴胺的氨基酸前体(例如,用于僵直的左旋多巴,上述僵直尤其与青少年HD或年轻成人发病的帕金森病表型相关)、骨骼肌松弛剂(例如,用于僵直和/或痉挛状态的巴氯芬、替扎尼定)、用于乙酰胆碱在神经肌肉接头处释放以引起肌肉麻痹的抑制剂(例如,用于磨牙症和/或肌张力障碍的肉毒杆菌毒素)、非典型神经松弛剂(例如,用于精神病和/或易怒的奥氮平和喹硫平;利培酮、舒必利、和用于精神病、舞蹈症和/或易怒的氟哌啶醇;用于治疗耐受性精神病的氯氮平;用于伴有明显阴性症状的精神病的阿立哌唑)、增加ATP/细胞能的药物(例如,肌酸)、选择性血清素再摄取抑制剂(SSRI)(例如,用于抑郁症、焦虑症、强迫性行为 and/或易怒的西酞普兰、氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、米氮平、文拉法辛)、催眠药(例如,改变睡眠-觉醒周期的佐匹克隆和/或唑吡坦)、抗惊厥药(例如,用于躁狂或轻度躁狂的丙戊酸钠和卡马西平)和情绪稳定剂(例如,用于躁狂或轻度躁狂的锂)。

[1305] 神经营养因子可以与编码本发明siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒组合使用来用于治疗HD。通常,神经营养因子被定义为促进神经元的生存、生长、分化、增殖和/或成熟,或刺激神经元活性增加的物质。在一些实施方案中,本方法还包括将一种或多种营养因子递送到有治疗需求的受试者中。营养因子可包括但不限于IGF-I、GDNF、BDNF、CTNF、VEGF、Colivelin、扎利罗登(Xaliproden)、促甲状腺激素释放激素和ADNF及其变体。

[1306] 在一个方面,编码靶向HTT基因的siRNA双链体的调节性多核苷酸的AAV颗粒可以与表达神经营养因子的AAV颗粒共同施用,例如AAV-IGF-I(参见例如Vincent等人, *Neuromolecular medicine*, 2004, 6, 79-85;其内容通过引用整体并入本文)和AAV-GDNF(参见例如Wang等人, *J Neurosci.*, 2002, 22, 6920-6928;其内容通过引用整体并入本文)。

[1307] 肌萎缩性侧索硬化(ALS)

[1308] 肌萎缩性侧索硬化(ALS)

[1309] 肌萎缩性侧索硬化(ALS)(一种成年发作的神经变性障碍)是一种以运动皮质、脑干和脊髓中的运动神经元的选择性死亡为特征的进行性的和致命的疾病。ALS的发病率是约1.9/100,000。被诊断出ALS的患者发生以痉挛状态、反射亢进或反射减弱、肌束震颤、肌肉萎缩和麻痹为特征的进行性肌肉表型。这些运动病损由肌肉的去神经支配(由于运动神经元的损失)造成。ALS的主要病理学特征包括:皮质脊髓束的变性以及下运动神经元(LMN)或前角细胞的广泛损失(Ghatak等人, *J Neuropathol Exp Neurol.*, 1986, 45, 385-395), 初级运动皮质中的Betz细胞和其它锥体细胞的变性和损失(Udaka等人, *Acta Neuropathol*,

1986,70,289-295;Maekawa等人,Brain,2004,127,1237-1251),和运动皮质和脊髓中的反应性神经胶质增生(Kawamata等人,Am J Pathol.,1992,140,691-707;和Schiffer等人,J Neurol Sci.,1996,139,27-33)。由于呼吸缺陷和/或炎症,ALS经常在诊断以后3-5年内是致命的(Rowland LP和Shneibder NA,N Engl.J.Med.,2001,344,1688-1700)。

[1310] ALS的一种细胞标志是蛋白性的、泛素化的、胞质包涵体在退化运动神经元和周围细胞(例如,星形胶质细胞)中的存在。泛素化的包涵体(即,路易小体样包涵体或Skein样包涵体)是ALS中的包涵体的最常见的和特异性的类型,且见于脊髓和脑干的LMN中以及皮质脊髓的上运动神经元(UMN)中(Matsumoto等人,J Neurol Sci.,1993,115,208-213;和Sasak和Maruyama,Acta Neuropathol.,1994,87,578-585)。已经将几种蛋白鉴别为包涵体的组分,包括泛素、Cu/Zn超氧化物歧化酶1(SOD1)、外周蛋白和Dorfin。神经丝性包涵体常见于ALS中的脊髓运动神经元内的透明簇生包涵体(HCI)和轴突‘球状体’中。其它类型和更低特异性的包涵体包括在皮质的上层中的布尼纳小体(含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的包涵体)和新月形包涵体(SCI)。在ALS中看到的其它神经病理学特征包括高尔基体的片段化、线粒体空泡形成和突触末梢的超微结构异常(Fujita等人,Acta Neuropathol.2002,103,243-247)。

[1311] 另外,在额颞叶痴呆ALS(FTD-ALS)中,也观察到皮质萎缩(包括额叶和颞叶),其可以在FTD-ALS患者中造成认知损害。

[1312] ALS是一种复杂的和多因素的疾病,并且多种机制被假定为ALS发病机制的原因,包括但不限于蛋白降解的功能障碍、谷氨酸盐兴奋性中毒、线粒体功能障碍、细胞凋亡、氧化性应激、炎症、蛋白错误折叠和聚集、异常的RNA代谢和改变的基因表达。

[1313] 约10%-15%的ALS病例具有该疾病的家族史,并且这些患者被称作家族性ALS(fALS)或遗传患者,通常具有孟德尔显性的遗传模式和高外显率。剩余者(大约85%-95%)被归类为散发性ALS(sALS),因为它们与记录的家族史无关,但是相反被认为是归因于其它风险因素,包括但不限于环境因素、遗传多态性、体细胞突变和可能的基因-环境相互作用。在大多数情况下,家族性(或遗传性)ALS作为常染色体显性的疾病而遗传,但是存在具有常染色体隐性的和X-连锁的遗传和不完全外显率的系谱。散发性和家族性形式是临床上不能辨别的,从而提示共同的发病机制。ALS中的运动神经元的选择性死亡的精确原因仍然是难以捉摸的。理解fALS中的遗传因素的进展可能为该疾病的两种形式带来曙光。

[1314] 近年来,对ALS的遗传原因的探究已经发现了已知造成fALS的超过10个不同基因中的突变。最常见的突变见于编码Cu/Zn超氧化物歧化酶1(SOD1;~20%)的基因(Rosen DR等人,Nature,1993,362,59-62),在肉瘤中融合/在脂肪肉瘤中翻译(FUS/TLS;1-5%)和TDP-43(TARDBP;1-5%)。近年来,将C9orf72基因中的六核苷酸重复序列扩增(GGGGCC)_n鉴别为西方人群中的fALS的最常见原因(~40%)(Renton等人,Nat.Neurosci.,2014,17,17-23的综述)。在ALS中突变的其它基因包括alsin(ALS2)、senataxin(SETX)、囊泡相关的膜蛋白(VAPB)和血管生成素(ANG)。fALS基因控制不同的细胞机制,从而提示,ALS的发病机制是复杂的,且可能与几个最终导致运动神经元变性的不同过程相关。

[1315] SOD1是在哺乳动物中鉴别和表征的三种人超氧化物歧化酶之一:铜-锌超氧化物歧化酶(Cu/ZnSOD或SOD1)、锰超氧化物歧化酶(MnSOD或SOD2)和细胞外超氧化物歧化酶(ECSOD或SOD3)。SOD1是153残基多肽的32kDa同源二聚体,每个亚基具有一个铜结合位点和

一个锌结合位点,其由人染色体21上的SOD1基因(GeneBank登记号:NM_000454.4;SEQ ID NO:1502)编码。SOD1催化在结合的铜离子处超氧化物阴离子($O_2^{\cdot-}$)向分子氧(O_2)和过氧化氢(H_2O_2)的反应。细胞内SOD1浓度是高的(范围为10-100 μ M),占中枢神经系统(CNS)中的总蛋白质含量的1%。该蛋白不仅定位在细胞质中,而且定位在真核细胞的细胞核、溶酶体、过氧化物酶体和线粒体膜间隙中(Lindenau J等人,Glia,2000,29,25-34)。

[1316] fALS患者中的15-20%和所有ALS病例中的1-2%携带SOD1基因中的突变。目前,已经发现分布在153个氨基酸的SOD1多肽中的至少170个不同突变会造成ALS,且更新列表可以在ALS在线遗传性数据库(ALSOD)中找到(Wroe R等人,Amyotroph Lateral Scler., 2008,9,249-250)。表46列出了ALS中的SOD1的突变的一些例子。这些突变主要是单个氨基酸置换(即错义突变),尽管缺失、插入和C-末端截短也会发生。不同的SOD1突变表现出不同的地理分布模式。例如,具有由SOD1基因突变造成的ALS的所有美国人中的40-50%具有特定突变Ala4Val(或A4V)。A4V突变通常与更严重的征象和症状有关,且存活期通常是2-3年。I113T突变是迄今在英国最常见的突变。在欧洲最流行的突变是D90A置换,且存活期经常大于10年。

[1317] 表46. ALS中SOD1突变的实例

位置	突变
外显子 1(220bp)	Q22L; E21K,G; F20C;N19S; G16A,S; V14M,S; G12R; G10G,V,R; L8Q,V; V7E; C6G,F; V5L; A4T,V,S
外显子 2 (97bp)	T54R; E49K; H48R,Q; V47F,A; H46R; F45C; H43R; G41S,D; G37R; V29,insA
外显子 3 (70bp)	D76Y,V; G72S,C; L67R; P66A; N65S; S59I,S
外显子 4(118bp)	D124G,V; V118L,InsAAAAC; L117V; T116T; R115G; G114A; I113T,F; I112M,T; G108V; L106V,F; S106L,delTCACTC; I104F; D101G,Y,H,N; E100G,K; I99V; V97L,M; D96N,V; A95T,V; G93S,V,A, C,R,D;

[1318]

		D90V,A; A89T,V; T88delACTGCTGAC; V87A,M; N86I,S,D,K; G85R,S; L84V,F; H80R
[1319]	外显子 5(461bp)	I151T,S; I149T; V148I,G; G147D,R; C146R, 终止; A145T,G; L144F,S; G141E, 终止; A140A,G; N139D,K,H,N; G138E; T137R; S134N; E133V,delGAA,insTT; E132insTT ; G127R,InsTGGG ; L126S,delITTT,终止; D126,delTT

[1320] 为了研究与SOD1基因缺陷有关的神元死亡的机制,本领域开发了SOD1有关的ALS的几种啮齿动物模型,它们表达具有不同突变(包括错义突变、小缺失或插入)的人SOD1基因。ALS小鼠模型的非限制性例子包括SOD1^{G93A}、SOD1^{A4V}、SOD1^{G37R}、SOD1^{G85R}、SOD1^{D90A}、SOD1^{L84V}、SOD1^{I113T}、SOD1^{H36R/H48Q}、SOD1^{G127X}、SOD1^{L126X}和SOD1^{L126delTT}。存在两种携带两种不同人SOD1突变的转基因大鼠模型:SOD1^{H46R}和SOD1^{G93R}。这些啮齿动物ALS模型可以发生与人ALS患者类似的肌无力和反映人疾病的几个特征的其它病原性特征,具体地是脊柱运动神经元的选择性死亡、蛋白包涵体在运动神经元中的聚集和小神经胶质活化。本领域众所周知,转基因的啮齿类动物是人SOD1相关的ALS疾病的良好模型,并提供用于研究疾病发病机制和开发疾病治疗的模型。

[1321] 在动物和细胞模型中的研究表明,SOD1病原性变体通过功能的获得而造成ALS。也就是说,当被SOD1突变改变时,超氧化物歧化酶获得新的但是有害的性质。例如,在ALS中的一些SOD1突变的变体通过破坏氧化还原循环而增加氧化性应激(例如,增加的有毒超氧化物残余物的积累)。其它研究也表明,ALS中的一些SOD1突变的变体可能获得独立于它的正常生理功能的有毒性质(诸如错误折叠的SOD1变体的异常聚集)。在异常的氧化还原化学模型中,突变体SOD1是不稳定的且通过与非常规底物的异常化学相互作用造成活性氧(ROS)的过度产生。在蛋白毒性模型中,不稳定的、错误折叠的SOD1聚集成细胞质包涵体,从而隔离对于细胞过程而言关键性的蛋白。这两种假设并不相互排斥。已经证实,结合活性部位中的金属的选定组氨酸残基的氧化会介导SOD1聚集。

[1322] 聚集的突变体SOD1蛋白还可能诱导线粒体功能障碍(Vehvilainen P等人,Front Cell Neurosci.,2014,8,126)、轴突运输的病损、异常的RNA代谢、神经胶质细胞病理学和谷氨酸盐兴奋性中毒。在某些散发性ALS病例中,错误折叠的野生型SOD1蛋白见于患病的运动神经元中,其形成与家族性ALS相关的SOD1变体看到的那些类似的“有毒构象”(Rotunno MS和Bosco DA,Front Cell Neurosci.,2013,16,7,253)。这样的证据提示,ALS是一种与其它神经变性疾病(诸如阿尔茨海默氏病和帕金森病)类似的蛋白折叠疾病。

[1323] 目前,没有治愈性治疗可用于遭受ALS的患者。唯一的FDA批准的药物利鲁唑(谷氨酸盐释放的抑制剂)对ALS具有中度作用,仅使存活延长2-3个月(如果施用18个月)。不幸的

是,施用利鲁唑的患者不会经历疾病进展的任何减慢或肌肉功能的改善。因此,利鲁唑不代表治愈性的或甚至有效的治疗。研究人员继续寻找更好的治疗剂。

[1324] 以前已经试验了可能阻止或改善SOD1聚集的治疗方案。例如,阿莫氯醇(arimoclomol,一种羟胺衍生物)是靶向热激蛋白的药物,其是针对这些聚集体的细胞防御机制。研究证实,阿莫氯醇治疗会改善SOD1小鼠模型中的肌肉功能。靶向ALS中的一种或多种细胞缺陷的其它药物可以包括:诸如他仑帕奈的AMPA拮抗剂, β -内酰胺抗生素,其可以减少谷氨酸盐诱导的运动神经元兴奋性中毒;溴隐亭,其可以抑制氧化诱导的运动神经元死亡(例如美国专利公开号20110105517;其内容通过引用整体并入本文);1,3-二苯基脲衍生物或多重激酶抑制剂,其可以减少SOD1基因表达(例如,美国专利公开号20130225642;其内容通过引用整体并入本文);多巴胺激动剂普拉克索和它的对映异构体dexpramipexole,其可以改善线粒体中的氧化应答;尼美舒利,其抑制环加氧酶(例如,美国专利公开号20060041022;其内容通过引用整体并入本文);充当自由基清除剂的药物(例如美国专利号:6,933,310和PCT专利公开号:W02006075434;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文)。

[1325] 抑制异常的SOD1蛋白聚集的另一个方案是沉默/抑制ALS中的SOD1基因表达。已经报道,用于突变的等位基因的特异性基因沉默的小干扰RNA对于fALS的治疗而言是治疗上有益的(例如,Ralgh GS等人,Nat.Medicine,2005,11(4),429-433;和Raoul C等人,Nat.Medicine,2005,11(4),423-428;和Maxwell MM等人,PNAS,2004,101(9),3178-3183;和Ding H等人,Chinese Medical J.,2011,124(1),106-110;和Scharz DS等人,Plos Genet.,2006,2(9),e140;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文)。

[1326] 在本领域中教导了靶向SOD1基因并调节ALS中的SOD1表达的许多其它RNA治疗剂。这样的基于RNA的药剂包括反义寡核苷酸和双链小干扰RNA。参见,例如,Wang H等人,J Biol.Chem.,2008,283(23),15845-15852;美国专利号7,498,316、7,632,938、7,678,895、7,951,784、7,977,314、8,183,219、8,309,533和8,586,554;和美国专利公开号2006/0229268和2011/0263680;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[1327] 本发明提供了包含调节性多核苷酸的AAV颗粒及其设计和制造方法,该调节性多核苷酸包含编码靶向SOD1基因的siRNA分子的序列。包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒可以增加活性剂向运动神经元中的递送。靶向SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA能够在细胞内显著地抑制SOD1基因表达(例如,mRNA水平);因此,改善细胞内SOD1表达诱导的应激,诸如蛋白的聚集和包涵体的形成、增加的自由基、线粒体功能障碍和RNA代谢。

[1328] 这种siRNA介导的SOD1表达抑制可用于治疗ALS。根据本发明,用于治疗和/或改善患者的ALS的方法包括向患者施用有效量的包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV颗粒到细胞中。包含这种核酸序列的AAV颗粒的施用将编码引起SOD1基因表达的抑制/沉默的siRNA分子。

[1329] 在一个实施方案中,包含调节性多核苷酸的AAV颗粒降低了受试者中突变体SOD1的表达。突变体SOD1的减少还可以减少有毒聚集体的形成,这些聚集体可以引起毒性机制,例如但不限于氧化应激、线粒体功能障碍、轴突运输受损、RNA代谢异常、神经胶质细胞病理和/或谷氨酸兴奋性毒性。

[1330] 在一个实施方案中,载体(例如AAV颗粒)减少了需要其的受试者中SOD1的量,因此提供了本文所述的治疗益处。

[1331] ALS的治疗方法

[1332] 在本发明中提供了向细胞中引入包含调节性多核苷酸(其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)的AAV颗粒的方法,所述方法包括:向所述细胞中引入足以使靶SOD1 mRNA的降解发生的量的任何载体,由此激活细胞中的靶特异性RNAi。在某些方面,所述细胞可以是干细胞,诸如运动神经元的神经元,肌细胞和诸如星形胶质细胞的胶质细胞。

[1333] 在本发明中公开了在需要治疗的受试者中治疗与异常的SOD1功能有关的ALS的方法。所述方法任选地包括向所述受试者施用治疗有效量的至少包含AAV颗粒的组合物,该AAV颗粒包含调节性多核苷酸,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。作为一个非限制性实施例,所述siRNA分子可以沉默SOD1基因表达,抑制SOD1蛋白生产,和减轻受试者中的ALS的一种或多种症状,从而治疗性治疗ALS。

[1334] 在一些实施方案中,向受试者的中枢神经系统施用包含AAV颗粒的组合物,该AAV颗粒包含调节性多核苷酸,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。在其它实施方案中,向受试者的肌肉施用包含AAV颗粒的组合物,该AAV颗粒包含调节性多核苷酸,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。

[1335] 具体地,可以将包含调节性多核苷酸(其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)的AAV颗粒递送进特定类型的靶向的细胞,包括运动神经元;胶质细胞,包括少突神经胶质细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞;和/或包围神经元的其它细胞,诸如T细胞。在人ALS患者和动物SOD1 ALS模型中的研究暗示胶质细胞在运动神经元的功能障碍和死亡中起早期作用。在周围的保护性胶质细胞中的正常SOD1可以阻止运动神经元死亡,即使突变体SOD1存在于运动神经元中(例如,Philips和Rothstein,Exp.Neurol.,2014年5月22日.pii:S0014-4886(14)00157-5的综述;其内容通过引用整体并入本文)。

[1336] 在一些具体实施方案中,包含调节性多核苷酸(其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)的AAV颗粒可以用作ALS的疗法。

[1337] 在一些实施方案中,将本发明的组合物作为用于治疗ALS的单独治疗剂或组合治疗剂施用。

[1338] 包含调节性多核苷酸(其包含编码靶向SOD1基因的siRNA分子的核酸序列)的AAV颗粒可以与一种或多种其它治疗剂组合使用。“与……组合”并不意味着试剂必须同时施用和/或一起配制用于递送,尽管这些递送方法落入本公开的范围。组合物可以与一种或多种其它所需治疗剂或医疗程序同时、在其之前或之后施用。通常,将以针对该药剂确定的剂量和/或按时间表施用每种试剂。

[1339] 可以与包含调节性多核苷酸(其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)的AAV颗粒组合使用的治疗剂可以是小分子化合物,其是抗氧化剂、抗炎剂、抗凋亡剂、钙调节剂、抗谷氨酸能试剂、结构蛋白抑制剂、参与肌肉功能的化合物、以及参与金属离子调节的化合物。

[1340] 可以与本文描述的载体组合使用的、针对治疗ALS试验过的化合物包括但不限于抗谷氨酸能剂:利鲁唑、托吡酯、他仑帕奈、拉莫三嗪、右美沙芬、加巴喷丁和AMPA拮抗剂;抗细胞凋亡剂:米诺环素、苯基丁酸钠和阿莫氯醇;抗炎剂:神经节苷脂、塞来考昔、环孢菌素、

硫唑嘌呤、环磷酰胺、血浆去除术(Plasmaphoresis)、醋酸格拉替雷和沙利度胺;头孢曲松(Berry等人,Plos One,2013,8(4)); β -内酰胺抗生素;普拉克索(一种多巴胺激动剂)(Wang等人,Amyotrophic Lateral Scler.,2008,9(1),50-58);在美国专利公开号20060074991中的尼美舒利;在美国专利公开号20130143873中公开的二氮嗪;在美国专利公开号20080161378中公开的吡唑酮衍生物;抑制氧化性应激诱导的细胞死亡的自由基清除剂,诸如溴隐亭(美国专利公开号20110105517);在PCT专利公开号2013100571中讨论的氨基甲酸苯酯化合物;在美国专利号6,933,310和8,399,514和美国专利公开号20110237907和20140038927中公开的神经保护性化合物;和在美国专利公开号20070185012中教导的糖肽;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[1341] 可以与包含调节性多核苷酸(其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)的AAV颗粒一起用在联合疗法中的治疗剂可以是可保护神经元损失的激素或变体,诸如促肾上腺皮质激素(ACTH)或其片段(例如,美国专利公开号20130259875);雌激素(例如,美国专利号6,334,998和6,592,845);它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[1342] 神经营养因子可以与包含调节性多核苷酸(其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)的AAV颗粒一起用在联合疗法中用于治疗ALS。通常,将神经营养因子定义为促进神经元的存活、生长、分化、增殖和/或成熟或者刺激增加的神经元活性的物质。在某些实施方案中,本发明的方法还包括向需要治疗的受试者递送一种或多种营养因子。营养因子可以包括但不限于IGF-I、GDNF、BDNF、CTNF、VEGF、Colivelin、扎利罗登、促甲状腺素释放激素和ADNF、及其变体。

[1343] 在一个方面,所述载体(例如,AAV颗粒,其编码至少一种靶向SOD1基因的siRNA双链体的核酸序列)可以与诸如AAV-IGF-I(Vincent等人,Neuromolecular medicine,2004,6,79-85;其内容通过引用整体并入本文)和AAV-GDNF(Wang等人,J Neurosci.,2002,22,6920-6928;其内容通过引用整体并入本文)的表达神经营养因子的AAV颗粒共同施用。

[1344] 在一些实施方案中,将用于治疗ALS的本发明的组合物静脉内地、肌肉内地、皮下地、腹膜内地、鞘内地和/或心室内地施用给有需要的受试者,从而允许siRNA分子或包含siRNA分子的载体穿过血脑屏障和血液脊髓屏障中的一个或两个。在某些方面,所述方法包括(使用例如输液泵和/或递送支架)向受试者的中枢神经系统(CNS)直接施用(例如,心室内地施用和/或鞘内地施用)治疗有效量的包含AAV颗粒的组合物,该AAV颗粒包含调节性多核苷酸,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。所述载体可以用于沉默或抑制SOD1基因表达,和/或减轻受试者中的ALS的一种或多种症状,从而在治疗上治疗ALS。

[1345] 在某些方面,在治疗的受试者中改善ALS的症状,包括但不限于运动神经元变性、肌无力、肌肉萎缩、肌肉僵硬、呼吸困难、言语不清、肌束震颤发生、额颞叶痴呆和/或早产儿死亡。在其它方面,将本发明的组合物应用于脑和脊髓中的一个或两个。在其它方面,改善肌肉协调和肌肉功能中的一个或两个。在其它方面,延长受试者的存活。

[1346] 在一个实施方案中,包含调节性多核苷酸(其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)的AAV颗粒向受试者的施用可降低受试者的CNS中的突变体SOD1。在另一个实施方案中,所述AAV颗粒向受试者的施用可降低受试者的CNS中的野生型SOD1。在另一个实施方案中,所述AAV颗粒向受试者的施用可降低受试者的CNS中的突变体SOD1和野生型SOD1。可以使CNS、CNS的一个区域或受试者的CNS的特定细胞中的突变体和/或野生型SOD1降低约

30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%，或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为一个非限制性实施例，AAV颗粒可使运动神经元（例如，腹角运动神经元）和/或星形胶质细胞中的野生型SOD1的表达降低至少50%。作为另一个非限制性实施例，AAV颗粒可使运动神经元（例如，腹角运动神经元）和/或星形胶质细胞中的突变体SOD1的表达降低至少50%。作为另一个非限制性实施例，AAV颗粒可使运动神经元（例如，腹角运动神经元）和/或星形胶质细胞中的野生型SOD1和突变体SOD1的表达降低至少50%。

[1347] 在一个实施方案中，AAV颗粒向受试者的施用将减少脊髓中的突变体和/或野生型SOD1的表达，且突变体和/或野生型SOD1的表达的减少将减少受试者中的ALS的效应。

[1348] 在一个实施方案中，可以将AAV颗粒施用给处于ALS的早期阶段的受试者。早期阶段症状包括但不限于无力的和软的或僵硬的、紧的和痉挛的肌肉，肌肉的抽筋和颤搐（肌束震颤），肌肉大小的损失（萎缩），疲劳，差的平衡，言语不清，抓握无力，和/或行走时绊倒。所述症状可以限于单个身体区域，或轻度症状可以影响超过一个区域。作为一个非限制性实施例，AAV颗粒的施用可以减轻ALS的严重程度和/或症状的发生。

[1349] 在一个实施方案中，可以将AAV颗粒施用给处于ALS的中期阶段的受试者。ALS的中期阶段包括但不限于与早期阶段相比更普遍的肌肉症状，一些肌肉是麻痹的，而其它肌肉是虚弱的或未受影响的，持续的肌肉颤搐（肌束震颤）、不使用的肌肉可能造成挛缩，此时关节变硬、疼痛且有时变形，吞咽肌的虚弱可能造成噎塞和较大困难的进食和控制唾液，呼吸肌的虚弱可以造成呼吸功能不全（其当躺下时可以是显著的），和/或受试者可能具有失控的和不适当的笑或哭的发作（假延髓病侵袭）。作为一个非限制性实施例，AAV颗粒的施用可以减轻ALS的严重程度和/或症状的发生。

[1350] 在一个实施方案中，可以将AAV颗粒施用给处于ALS的晚期阶段的受试者。ALS的晚期阶段包括但不限于大部分麻痹的随意肌，帮助移动空气进出肺的肌肉被严重损伤，活动性非常受限，差的呼吸可以造成疲劳、模糊思维、头痛和对感染或疾病（例如，肺炎）的易感性，言语困难，并且用嘴吃或喝可能是不可能的。

[1351] 在一个实施方案中，AAV颗粒可以用于治疗患有ALS的受试者，所述受试者具有C9orf72突变。

[1352] 在一个实施方案中，AAV颗粒可以用于治疗患有ALS的受试者，所述受试者具有TDP-43突变。

[1353] 在一个实施方案中，AAV颗粒可以用于治疗患有ALS的受试者，所述受试者具有FUS突变。

[1354] 在一个实施方案中，本发明的AAV颗粒包含AAVrh10衣壳和自我互补AAV病毒基因组，其包含H1启动子、源自pLKO.1慢病毒的填充序列和SOD1靶向有效载荷。

[1355] 在一个实施方案中，本发明的AAV颗粒包含AAV2衣壳和自我互补AAV病毒基因组。

[1356] 在一个实施方案中，本发明的AAV颗粒包含AAV2衣壳和自我互补AAV病毒基因组，

其包含H1启动子、源自pLK0.1慢病毒载体的填充序列和SOD1靶向有效载荷。

[1357] V. 定义

[1358] 除非另外说明,否则以下术语和短语具有下面描述的含义。所述定义无意在性质上成为限制性的,且用于提供本发明的某些方面的更清楚理解。

[1359] 本文使用的术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”表示由多脱氧核糖核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖)或多核糖核苷酸(含有D-核糖)或任意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)组成的任意核酸聚合物。在术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”之间无意区分长度,且这些术语将互换使用。这些术语仅表示分子的一级结构。因而,这些术语包括双链和单链DNA,以及双链和单链RNA。

[1360] 本文使用的术语“RNA”或“RNA分子”或“核糖核酸分子”表示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”表示脱氧核糖核苷酸的聚合物。可以天然地合成(例如,分别通过DNA复制和DNA的转录)或化学地合成DNA和RNA。DNA和RNA可以是单链的(即,分别是ssRNA或ssDNA)或多链的(例如,双链的,即,分别是dsRNA和dsDNA)。本文中使用的术语“mRNA”或“信使RNA”表示编码一个或多个多肽链的氨基酸序列的单链RNA。

[1361] 本文使用的术语“RNA干扰”或“RNAi”表示由RNA分子介导的序列特异性的调节机制,其导致对应的蛋白编码基因的表达的抑制或干扰或“沉默”。RNAi已经在许多类型的生物中观察到,包括植物、动物和真菌。RNAi天然地发生在细胞中以除去外来RNA(例如,病毒RNA)。天然RNAi通过从游离dsRNA切割的片段进行,其将降解机制引导至其它类似的RNA序列。RNAi由RNA诱导的沉默复合物(RISC)控制,且由细胞质中的短/小dsRNA分子起始,其中它们与催化性的RISC组分argonaute相互作用。可以将dsRNA分子外源地引入细胞中。外源dsRNA通过激活核糖核酸酶蛋白Dicer而起始RNAi,所述Dicer结合和切割dsRNA以产生21-25个碱基对的双链片段,其在每个末端上具有几个未配对的突出端碱基。这些短双链片段被称作小干扰RNA(siRNA)。

[1362] 本文使用的术语“短干扰RNA”、“小干扰RNA”或“siRNA”表示能够指导或介导RNAi的包含约5-60个核苷酸(或核苷酸类似物)的RNA分子(或RNA类似物)。优选地,siRNA分子包含约15-30个核苷酸或核苷酸类似物,诸如约16-25个核苷酸(或核苷酸类似物),约18-23个核苷酸(或核苷酸类似物),约19-22个核苷酸(或核苷酸类似物)(例如,19、20、21或22个核苷酸或核苷酸类似物),约19-25个核苷酸(或核苷酸类似物),和约19-24个核苷酸(或核苷酸类似物)。术语“短”siRNA表示包含5-23个核苷酸、优选21个核苷酸(或核苷酸类似物)(例如,19、20、21或22个核苷酸)的siRNA。术语“长”siRNA表示包含24-60个核苷酸、优选约24-25个核苷酸(例如,23、24、25或26个核苷酸)的siRNA。在某些情况下,短siRNA可以包括少于19个核苷酸,例如,16、17或18个核苷酸,或少至5个核苷酸,前提条件是,较短的siRNA保留介导RNAi的能力。同样地,在某些情况下,长siRNA可以包括超过26个核苷酸,例如,27、28、29、30、35、40、45、50、55或甚至60个核苷酸,前提条件是,较长的siRNA保留介导RNAi或翻译抑制的能力,无需进一步加工(例如,酶促加工)成短siRNA。siRNA可以是单链RNA分子(ss-siRNA)或包含有义链和反义链的双链RNA分子(ds-siRNA),所述有义链和反义链杂交以形成被称作siRNA双链体的双链体结构。

[1363] 本文使用的术语siRNA分子的“反义链”或“第一链”或“引导链”表示这样的链:其与为了沉默而靶向的基因的mRNA的约10-50个核苷酸(例如,约15-30、16-25、18-23或19-22

个核苷酸)的段基本上互补。所述反义链或第一链具有与期望的靶mRNA序列足够互补的序列以指导靶标特异性的沉默,例如,足以触发RNAi机制或过程对期望的靶mRNA的破坏的互补性。

[1364] 本文使用的术语siRNA分子的“有义链”或“第二条链”或“过客链”表示与反义链或第一链互补的链。siRNA分子的反义链和有义链发生杂交以形成双链体结构。本文中使用的“siRNA双链体”包括与为了沉默而靶向的基因的mRNA的约10-50个核苷酸的段具有足够互补性的siRNA链和与所述siRNA链具有足够互补性以形成双链体的siRNA链。

[1365] 本文使用的术语“互补的”表示多核苷酸彼此形成碱基对的能力。碱基对通常由反向平行的多核苷酸链中的核苷酸单元之间的氢键形成。互补的多核苷酸链可以以沃森-克里克方式(例如,A至T,A至U,C至G)或以允许形成双链体的任意其它方式形成碱基对。本领域技术人员知晓,当使用RNA而不是DNA时,尿嘧啶(而不是胸腺嘧啶)是被认为与腺苷互补的碱基。但是,当在本发明的上下文中提及U时,暗示置换T的能力,除非另有说明。完美互补性或100%互补性表示这样的情形:其中一个多核苷酸链的每个核苷酸单元都可以与第二个多核苷酸链的核苷酸单元形成氢键。小于完美互补性表示这样的情形:其中两个链的一些(但是并非全部)核苷酸单元可以彼此形成氢键。例如,对于两个20-聚体,如果在每个链上的仅两个碱基对可以彼此形成氢键,那么所述多核苷酸链表现出10%互补性。在相同的例子中,如果在每个链上的18个碱基对可以彼此形成氢键,那么所述多核苷酸链表现出90%互补性。

[1366] 本文使用的术语“基本上互补的”是指,所述siRNA具有足以结合期望的靶mRNA和触发靶mRNA的RNA沉默的序列(例如,在反义链中)。

[1367] 本文中使用的“靶向”是指设计和选择核酸序列的过程,所述核酸序列将与靶核酸杂交并诱导期望的效应。

[1368] 术语“基因表达”表示这样的过程:核酸序列通过该过程发生成功转录和(在大多数情况下)翻译以生产蛋白或肽。为了清楚起见,当提及“基因表达”的测量时,这应当被理解为是指,可以测量转录的核酸产物(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是本领域众所周知的。

[1369] 本文使用的术语“突变”表示基因的结构的变化,其导致可以传递至后代的变体(也称为“突变体”)形式。基因中的突变可以由DNA中的单个碱基的改变造成,或者由基因或染色体的更大段的缺失、插入或重排造成。

[1370] 本文使用的术语“载体”是指运输、转导异源分子(诸如本发明的siRNA分子)或以其它方式充当异源分子(诸如本发明的siRNA分子)的载体的任何分子或部分。“病毒基因组”或“载体基因组”或“病毒载体”是指包含一个或多个多核苷酸区域的序列,所述多核苷酸区域编码或包含目标分子,例如,转基因,编码一个多肽或多个多肽的多核苷酸,或调节性核酸诸如小干扰RNA(siRNA)。病毒基因组通常用于将遗传物质递送进细胞中。经常为了特定应用修饰病毒基因组。病毒基因组的类型包括逆转录病毒基因组序列、慢病毒基因组序列、腺病毒基因组序列和腺相关病毒基因组序列。

[1371] 本文中使用的术语“腺相关病毒”或“AAV”表示包含或源自腺相关载体的组分并且适合用于感染哺乳动物细胞、优选人细胞的任何载体。术语AAV载体通常表示AAV型病毒颗粒或病毒体,其包含有效载荷。所述AAV载体可以源自不同血清型,包括血清型的组合(即,

“假型的”AAV),或源自不同基因组(例如,单链的或自互补的)。另外,所述AAV载体可以是复制缺陷的和/或靶向的。

[1372] 本文中使用的短语“抑制基因的表达”是指造成基因的表达产物的量的减少。所述表达产物可以是基因转录的RNA分子(例如mRNA)或从基因转录的mRNA所翻译成的多肽。通常,mRNA水平的降低会导致从其翻译的多肽的水平降低。通过使用用于测量mRNA或蛋白的标准技术,可以确定表达的水平。

[1373] 本文使用的术语“体外”表示在人工环境中,例如在试管或反应容器中、在细胞培养物中、在培养皿等中,发生的事件,而不是在生物(例如,动物、植物或微生物)内发生的事件。

[1374] 本文使用的术语“体内”表示在生物(例如,动物、植物或微生物或其细胞或组织)内发生的事件。

[1375] 本文使用的术语“修饰的”表示本发明的分子的改变的状态或结构。可以以许多方式修饰分子,所述方式包括在化学上、在结构上和在功能上。

[1376] 本文使用的术语“合成的”是指通过人手生产、制备和/或制造。本发明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。

[1377] 本文使用的术语“转染”表示将外源核酸引入细胞中的方法。转染的方法包括但不限于化学方法、物理处理和阳离子脂质或混合物。可以转染进细胞中的药剂的列表较大,且包括但不限于siRNA、有义序列和/或反义序列、编码一个或多个基因并被组织进表达质粒中的DNA、蛋白、蛋白片段和更多。

[1378] 本文中使用的“脱靶”表示对任意一种或多种靶标、基因和/或细胞转录物的任何非目的效果。

[1379] 本文中使用的短语“药学上可接受的”在本文中用于表示这样的化合物、物质、组合物和/或剂型:在合理的医学判断范围内,其适用于接触人类和动物的组织,而没有过度的毒性、刺激、变应性应答或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。

[1380] 本文使用的术语药剂的“有效量”是这样的量:所述量足以实现有益的或期望的结果,例如,临床结果,且这样,“有效量”取决于它所应用的上下文。例如,在施用治疗HD的药剂的上下文中,与不施用该药剂获得的应答相比,该药剂的有效量例如是足以实现如本文所定义的HD的治疗的量。例如,在施用治疗ALS的药剂的上下文中,药剂的有效量是例如这样的量:与在不施用所述药剂的情况下得到的应答相比,所述量足以实现如本文中定义的ALS的治疗。

[1381] 本文使用的术语“治疗有效量”是指要递送的药剂(例如,核酸、药物、治疗剂、诊断剂、预防剂等)的量,当施用给遭受或易患感染、疾病、障碍和/或病症的受试者时,所述量足以治疗、诊断、预防所述感染、疾病、障碍和/或病症,改善其症状,和/或延迟其发作。

[1382] 本文使用的术语“受试者”或“患者”表示可以给其施用根据本发明的组合物的任何生物,例如,为了实验、诊断、预防和/或治疗目的。典型受试者包括动物(例如,哺乳动物诸如小鼠、大鼠、兔、诸如黑猩猩和其它猿类和猴物种的非人灵长类动物和人类)和/或植物。

[1383] 本文使用的术语“预防”表示延迟或领先于病症或疾病的发作、发展或进展一段时间,包括数周、数月或数年。

[1384] 本文中使用的术语“治疗”表示用于治愈或改善疾病的一个或多个具体操作的应用。在某些实施方案中,具体操作是一种或多种药学试剂的施用。在本发明的上下文中,具体操作是一种或多种siRNA分子的施用。

[1385] 本文使用的术语“改善”表示减轻病症或疾病的至少一种指标的严重程度。例如,在神经变性障碍的上下文中,改善包括神经元损失的减少。

[1386] 本文使用的术语“施用”表示给受试者提供药学试剂或组合物。

[1387] 本文使用的术语“神经变性”表示导致神经细胞死亡的病理性状态。大数目的神经学障碍共享神经变性作为一种共同的病理学状态。例如,阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病和肌萎缩性侧索硬化(ALS)都造成慢性神经变性,其以在数年的时间段内缓慢的进行性神经细胞死亡为特征,而急性神经变性以神经细胞死亡的突然发作为特征,所述突然发作是因为缺血(诸如中风)或创伤(诸如创伤性脑损伤),或者是因为由脱髓鞘或创伤(例如由脊髓损伤或多发性硬化造成)导致的轴突横断。在某些神经学障碍中,主要一类神经元细胞是变性的,例如,在早期HD中的中型多棘神经元变性。

[1388] VI. 等同方案和范围

[1389] 本领域技术人员会认识到或使用不超过例行实验能够确定根据本文描述的发明的具体实施方案的许多等同方案。本发明的范围无意限于上面的描述,而是如所附权利要求所述。

[1390] 在权利要求中,诸如“一个”、“一种”和“所述”的冠词可以是指一个/种或超过一个/种,除非指示相反情形或以其它方式从上下文显而易见。如果群体成员中的一个、超过一个或所有成员存在于指定的产品或过程中、在指定的产品或过程中使用或以其它方式与指定的产品或过程相关,则认为满足在一组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述,除非指示相反情形或以其它方式从上下文显而易见。本发明包括这样的实施方案,其中所述组的刚好一个成员存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或者以其它方式与给定产品或方法相关。本发明包括这样的实施方案,其中所述组成员中的超过一个或全部都存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或者以其它方式与给定产品或方法相关。

[1391] 还应当指出,术语“包含”意图是开放式的,并且允许但不要求包括额外的要素或步骤。因此,当在本文中使用术语“包含”时,还包括和公开术语“由……组成”。

[1392] 在给出范围的情况下,包括端点。此外,应当理解,除非另外指示或以其它方式从上下文和本领域普通技术人员的理解显而易见,以范围表述的数值在本发明的不同实施方案中可呈现处于所述范围内的任何具体数值或子范围,其精确至该范围的下限单位的十分之一,除非上下文另外清楚地指明。

[1393] 另外,应当理解,可以从任意一项或多项权利要求中明确地排除落在现有技术内的本发明的任何特定实施方案。因为这样的实施方案被视为本领域普通技术人员已知的,所以可以排除它们,即使所述排除并未在本文中明确地阐明。可以因为任何原因从任意一项或多项权利要求排除本发明的组合物的任何特定实施方案(例如,任何抗生素、治疗剂或活性成分;任何生产方法;任何使用方法等),无论是否与现有技术存在相关。

[1394] 应当理解,已经使用的词语是描述而不是限制的词语,并且可以在所附权利要求的范围内做出变化,而不背离在它的更宽方面的本发明的真实范围和精神。

[1395] 尽管已经就几个描述的实施方案而言相当详尽地且相当特定地描述了本发明,但是无意将本发明限于任何这样的细节或实施方案或任何具体实施方案,而是应当参考所附权利要求来解释本发明,从而考虑到现有技术提供这类权利要求的最广泛的可能解释,并因此有效地包括本发明的预期范围。

[1396] VII. 实施例

[1397] 实施例1. AAV-miRNA表达载体

[1398] 将包含含有靶向HTT的引导链和过客链的pri-miRNA盒的构建体工程化为AAV-miRNA表达载体(ss或sc)。从ITR到ITR的AAV-miRNA表达载体构建体(从5'到3'陈述)包含ITR(突变型或野生型),包含CMV(其包括SV40内含子)、U6、H1、CBA(其包含CMVie增强子、CB启动子和SV40内含子)或CAG启动子(其包含CMVie增强子、CB启动子和兔 β 球蛋白内含子)的启动子,pri-miRNA盒,兔球蛋白polyA或人生长激素和野生型ITR。进行体外和体内研究以评估AAV-miRNA表达载体的药理学活性。

[1399] 实施例2. AAV-miRNA的体内研究

[1400] A. 体内功效研究

[1401] 基于YAC128小鼠中的HTT阻遏、引导链与过客链的比和5'端加工精度,将选择的AAV-miRNA表达载体与CBA启动子包装在AAV1中(以ss或sc)(AAV1.CBA.iHtt),将其配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,并施用于YAC128小鼠以评估功效。通过双侧纹状体内输注,以5 μ L大约1E10至3E10 vg的剂量将AAV1载体施用于7-12周龄的YAC128小鼠,每半球10分钟。对照组用媒介物(含0.001%F-68的PBS)处理。在施用测试物品之后,以预定的时间间隔进行包括轮转仪和Porsolt游泳测试的行为测试,以评估功效。在给药后的预定日,处死动物,并收集纹状体组织钻孔物(punch)并速冻。将组织样品匀浆并纯化总RNA。HTT的相对表达通过qRT-PCR确定。用于归一化的管家基因包括小鼠XPNPEP1。将HTT归一化为管家基因表达,然后进一步归一化为媒介物组。样品还用于定量HTT蛋白。

[1402] B. HTT阻遏、引导链与过客链的比和5'端加工精度的NHP的体内研究

[1403] 基于YAC128小鼠中的HTT阻遏、引导链与过客链的比和5'端加工精度,将选择的AAV-miRNA表达载体与CBA启动子包装在AAV1中(以ss或sc)(AAV1.CBA.iHtt),将其配制在含0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,并通过实质内脑输注施用于非人类灵长类动物。对照组用媒介物(含0.001%F-68的PBS)处理。在给药后的预定时间确定各种组织样品中HTT mRNA的相对表达、引导链与过客链的比和5'端加工精度。

[1404] 实施例3. 多顺反子构建体在HEK293T和HeLa细胞中的活性

[1405] 将编码VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)和VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的多顺反子miRNA表达载体包装在AAV2中,并感染HEK293T细胞和HeLa细胞。对于HEK293T,将细胞接种到96孔板中(以100 μ L细胞培养基,2.5E4个细胞/孔),并用多顺反子miRNA表达载体感染。将HeLa细胞接种到96孔板中(以100 μ L细胞培养基,1E4个细胞/孔)。感染后24小时,收获细胞以立即裂解细胞,并测量荧光素酶活性或分离RNA进行qRT-PCR。

[1406] A. 多顺反子构建体的活性(125pM和250pM)

[1407] 对于HEK293T和HeLa细胞,以125pM和250pM转染48小时后,多顺反子构建体的相对活性(相对荧光素酶)通过荧光素酶活性来确定。如通过双荧光素酶测定所测定的,通过将海肾荧光素酶水平相对于内部对照萤火虫荧光素酶水平归一化,来确定相对活性。

[1408] 表47显示了多顺反子构建体的RLU和测试构建体的说明。在表47中,在每个载体中测试了两个调节性多核苷酸,并且调节性多核苷酸是串联的。在表中,载体在B调节性多核苷酸之前编码A调节性多核苷酸。

[1409] 对于HEK293T细胞,对照的RLU在125pM时为1,在250pM时为1.11。以125pM转染的编码一个VOYHTmiR-104.016调节性多核苷酸(SEQ ID NO:1589)的构建体提供的RLU为0.13,250pM时提供的RLU为0.14。以125pM转染的编码VOYHTmiR-127.579调节性多核苷酸(SEQ ID NO:1599)的构建体提供的RLU为0.14,250pM时提供的RLU为0.14。当各自编码两个调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)和VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599))之一的两个载体各自以125pM同时转染,观察到RLU为0.06。

[1410] 对于HeLa细胞,对照的RLU在125pM时为1,在250pM时为0.99。以125pM转染的编码VOYHTmiR-104.016调节性多核苷酸(SEQ ID NO:1589)的构建体提供的RLU为0.26,在250pM提供的RLU为0.27。以125pM转染的编码VOYHTmiR-127.579调节性多核苷酸(SEQ ID NO:1599)的构建体提供的RLU为0.20,以250pM提供的RLU为0.12。当各自编码两个调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)和VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599))之一的两个载体各自以125pM同时转染,观察到RLU为0.22。

[1411] 表47.多顺反子活性

[1412]

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	RLU			
			HEK293T		HeLa	
			125pM	250pM	125pM	250pM
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC13	0.13	0.17	0.23	0.26
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC14	0.05	0.06	0.08	0.09
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1599	VOYPC15	0.05	0.06	0.16	0.17
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1599	VOYPC16	0.13	0.14	0.18	0.17

[1413] 与对照相比,同时编码VOYHTmiR-104.016和VOYHTmiR-127.579的载体显示出最佳活性。

[1414] B. 多顺反子构建体 (62.5pM和125pM) 的活性和载体长度

[1415] 通过对HeLa细胞的双荧光素酶测定确定在62.5pM和125pM转染40小时后有或没有填充DNA (以使每种条件下的总DNA含量相同) 的多顺反子构建体的相对活性 (相对荧光素酶)。如通过双荧光素酶测定所测定的,通过将海肾荧光素酶水平相对于内部对照萤火虫荧光素酶水平归一化,来确定相对活性。表48显示了多顺反子构建体的RLU和测试构建体的说明。在表48中,在每个构建体中测试了两个调节性多核苷酸,并且调节性多核苷酸是串联的。在表中,构建体在B调节性多核苷酸之前编码A调节性多核苷酸。

[1416] 对于具有填充DNA的构建体,对照在62.5pM和125pM的RLU为1。以62.5pM转染的编码VOYHTmiR-104.016调节性多核苷酸 (SEQ ID NO:1589) 的构建体提供的RLU为0.45,125pM时提供的RLU为0.31。以62.5pM转染的编码VOYHTmiR-127.579调节性多核苷酸 (SEQ ID NO:1599) 的构建体提供的RLU为0.25,而125pM时提供的RLU为0.20。当各自编码两个调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589) 和VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599)) 之一的两个构建体各自以62.5pM同时转染,观察到RLU为0.26。

[1417] 对于没有填充DNA的构建体,对照在62.5pM和125pM的RLU为1。以62.5pM转染的编码VOYHTmiR-104.016调节性多核苷酸(SEQ ID NO:1589)的构建体提供的RLU为0.31,125pM时提供的RLU为0.24。以62.5pM转染的编码VOYHTmiR-127.579调节性多核苷酸(SEQ ID NO:1599)的构建体提供的RLU为0.29,而125pM时提供的RLU为0.24。当各自编码两个调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)和VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599))之一的两个构建体各自以62.5pM同时转染,观察到RLU为0.23。

[1418] 表48.多顺反子活性

	调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	RLU			
				具有填充 DNA		没有填充 DNA	
				62.5pM	125pM	62.5pM	125pM
[1419]	A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC13	0.41	0.38	0.36	0.37
	A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC14	0.17	0.15	0.16	0.15
[1420]	A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1599	VOYPC15	0.36	0.24	0.35	0.23
	A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1599	VOYPC16	0.30	0.23	0.29	0.23

[1421] 具有和没有填充DNA时,高剂量和低剂量的构建体均显示相似的表达。带有串联的VOYHTmiR-127.579和VOYHTmiR-104.016调节性多核苷酸的构建体对于两种转染条件均显示最低的RLU。

[1422] C.多顺反子构建体转染后的HTT阻遏

[1423] 对于HeLa细胞,以125pM和250pM转染48小时后,HTT mRNA的相对表达通过qRT-PCR来确定。如通过qRT-PCR所测定的,通过将HTT mRNA水平相对于管家基因mRNA水平归一化,来获得相对HTT mRNA表达;然后,相对于对照处理的细胞中的归一化HTT mRNA水平表示该

归一化HTT mRNA水平。表49显示了多顺反子构建体的结果和测试构建体的说明。在表49中，在每个构建体中测试了两个调节性多核苷酸，并且调节性多核苷酸是串联的。在表中，构建体在B调节性多核苷酸之前编码A调节性多核苷酸。

[1424] 以125pM转染的编码VOYHTmiR-104.016调节性多核苷酸(SEQ ID NO:1589)的构建体提供的相对Htt mRNA水平(相对于对照归一化)为50%，250pM时提供的相对Htt mRNA水平(相对于对照归一化)为61%。以125pM转染的编码VOYHTmiR-127.579调节性多核苷酸(SEQ ID NO:1599)的构建体提供的相对Htt mRNA水平(相对于对照归一化)为52%，250pM时提供的相对Htt mRNA水平(相对于对照归一化)为56%。当各自编码两个调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)和VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599))之一的两个构建体各自以125pM同时转染，观察到相对Htt mRNA水平为49%。

[1425] 表49.HTT的敲低

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	相对 HTT mRNA 水平 (%) (相对于对照归一化)	
			HeLa	
			125pM	250pM
[1426] A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589	VOYPC13	43	50
	B: 1589			
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599	VOYPC14	43	36
	B: 1589			
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1589	VOYPC15	49	50
	B: 1599			
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1599	VOYPC16	55	50
	B: 1599			

[1427] 与两种转染条件下的对照相比，串联编码VOYHTmiR-104.016和VOYHTmiR-127.579的构建体显示出最佳活性。

[1428] D. 以1E4和1E5vg/细胞的MOI感染后的HTT阻遏

[1429] 对于HEK293T和HeLa细胞，以1E4或1E5 vg/细胞的MOI感染24小时后，HTT mRNA的相对表达通过qRT-PCR来确定。如通过qRT-PCR所测定的，通过将HTT mRNA水平相对于管家基因mRNA水平归一化，来获得相对HTT mRNA表达；然后，相对于mCherry处理的细胞中的归一化HTT mRNA水平表示该归一化HTT mRNA水平。结果示于表50和51。

[1430] 表50.HTT的敲低

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	相对 HTT mRNA 水平 (%) (相对于对照归一化)			
		HEK293T		HeLa	
		1E4	1E5	1E4	1E5
[1431] VOYHTmiR-104.016	1589	42	28	75	47
VOYHTmiR-127.579	1599	44	29	67	45
构建体 1: VOYHTmiR-104.016 构建体 2: VOYHTmiR-127.579	构建体 1: 1589 构建体 2: 1599	35	27	67	46
未处理	-	86	91	67	96

[1432] 表51.HTT的敲低

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	相对 HTT mRNA 水平 (%) (相对于对照归一化)			
			HEK293T		HeLa	
			1E4	1E5	1E4	1E5
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC13	48	27	47	46
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC14	32	22	46	28
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1599	VOYPC15	30	23	60	26
A:	A: 1599	VOYPC16	39	28	67	34

[1434]	VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579	B: 1599					
--------	--	---------	--	--	--	--	--

[1435] 与两种细胞中两种感染水平的对照相比,编码串联的VOYHTmiR-104.016和VOYHTmiR-127.579的载体显示出最佳活性。

[1436] E. 多顺反子构建体的活性 (62.5pM和125pM)

[1437] 对于HEK293T和HeLa细胞,以62.5pM和125pM转染48小时后,多顺反子构建体的相对活性(相对荧光素酶)通过双荧光素酶测定来确定。如通过双荧光素酶测定所测定的,通过将海肾荧光素酶水平相对于内部对照萤火虫荧光素酶水平归一化,来确定相对活性。表52-53显示了多顺反子构建体的RLU和测试构建体的说明。在表53中,在每个载体中测试了两个、3个或4个调节性多核苷酸,并且调节性多核苷酸是串联的。例如,如果存在两个调节性多核苷酸,则该构建体在B调节性多核苷酸之前编码A调节性多核苷酸。

[1438] 表52.HTT的敲低

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	RLU			
		HEK293T		HEK293T	
		62.5pM	62.5pM	62.5pM	62.5pM
VOYHTmiR-104.016	1589	0.24	0.2	0.59	0.3
VOYHTmiR-127.579	1599	0.31	0.23	0.84	0.27
构建体 1: VOYHTmiR-104.016	构建体 1: 1589	0.1	0.11	0.25	0.2
构建体 2: VOYHTmiR-127.579	构建体 2: 1599				
未处理	-	0.24	0.2	0.59	0.3

[1439] 表53.多顺反子活性

[1441]

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	RLU			
			293T		HeLa	
			62.5pM	125pM	62.5pM	125pM
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC14	0.11	0.09	0.26	0.11
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016 C: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589 C: 1589	VOYPC35	0.11	0.11	0.28	0.28
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016 C: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1589 C: 1599	VOYPC36	0.07	0.07	0.16	0.10
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016 C: VOYHTmiR-127.579 D: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589 C: 1599 D: 1589	VOYPC51	0.08	0.07	0.18	0.12
A: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1589	VOYPC52	0.07	0.07	0.16	0.10

[1442]	B:	C: 1589				
	VOYHTmiR-104.016	D: 1599				
	C:					
	VOYHTmiR-104.016					
	D:					
	VOYHTmiR-127.579					

[1443] 对于两种细胞类型中的两种转染条件,编码多于两个调节性多核苷酸的构建体均给出了最低的RLU值。

[1444] 实施例4.多顺反子构建体在HEK293T和HeLa细胞中的活性

[1445] 将编码VOYHTmiR-104.579 (SEQ ID NO:1595) 和VOYHTmiR-127.016 (SEQ ID NO:1593) 的多顺反子miRNA表达构建体包装在scAAV2中,并感染HEK293T细胞和HeLa细胞。对于HEK293T,将细胞接种到96孔板中(以100u1细胞培养基,2.5E4个细胞/孔),并用多顺反子miRNA表达载体感染。将HeLa细胞接种到96孔板中(以100u1细胞培养基,1E4个细胞/孔)。感染后24小时,收获细胞以立即裂解细胞,并测量荧光素酶活性,或分离进行qRT-PCR。

[1446] A.多顺反子构建体的活性(62.5pM和125pM)

[1447] 对于HEK293T和HeLa细胞,以62.5pM和125pM转染48小时后,多顺反子构建体的相对活性(相对荧光素酶)通过qRT-PCR测定来确定。如通过双荧光素酶测定所测定的,通过将海肾荧光素酶水平相对于内部对照萤火虫荧光素酶水平归一化,来确定相对活性。表54-55显示了多顺反子构建体的RLU和测试构建体的说明。在表55中,在每个载体中测试了两个调节性多核苷酸,并且调节性多核苷酸是串联的。在表中,构建体在B调节性多核苷酸之前编码A调节性多核苷酸。

[1448] 表54.HTT的敲低

[1449]	调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸	RLU		
		SEQ ID	HEK293T	HeLa	

			62.5pM	125pM	62.5pM	125pM
	VOYHTmiR-104.579	1595	0.24	0.13	0.51	0.25
	VOYHTmiR-127.016	1593	0.33	0.16	0.23	0.22
[1450]	构建体 1: VOYHTmiR-104.579	构建体 1: 1595	0.07	0.06	0.08	0.12
	构建体 2: VOYHTmiR-127.016	构建体 2: 1593				

[1451] 表55.多顺反子活性

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	RLU			
			HEK293T		HeLa	
			62.5pM	125pM	62.5pM	125pM
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC14	0.12	0.09	0.19	0.27
A: VOYHTmiR-104.579 B: VOYHTmiR-104.579	A: 1595 B: 1595	VOYPC17	0.33	0.18	0.55	0.93
A: VOYHTmiR-127.016 B: VOYHTmiR-127.016	A: 1593 B: 1593	VOYPC18	0.21	0.15	0.16	0.21
A: VOYHTmiR-104.579 B: VOYHTmiR-127.016	A: 1595 B: 1593	VOYPC19	0.09	0.05	0.10	0.07
A:	A: 1593	VOYPC20	0.07	0.04	0.09	0.09
[1452] VOYHTmiR-127.016 B: VOYHTmiR-104.579	B: 1595					

[1454] 对于两种转染条件,具有以任何顺序串联的VOYHTmiR-127.016和VOYHTmiR-104.579调节性多核苷酸的构建体均显示出最低的RLU。

[1455] B. 在HeLa中在48和72小时多顺反子构建体的活性 (62.5pM和125pM)

[1456] 对于HeLa细胞,以62.5pM和125pM转染48和72小时后,HTT mRNA的相对表达通过qRT-PCR来确定。如通过qRT-PCR所测定的,通过将HTT mRNA水平相对于管家基因mRNA水平归一化,来获得相对HTT mRNA表达;然后,相对于mCherry处理的细胞中的归一化HTT mRNA水平表示该归一化HTT mRNA水平。表56-57显示了测试构建体的结果和说明。在表57中,在每个载体中测试了两个调节性多核苷酸,并且调节性多核苷酸是串联的。在表中,载体在B调节性多核苷酸之前编码A调节性多核苷酸。

[1457] 表56.HTT的敲低

[1458]	调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	相对 HTT mRNA 水平 (%) (相对于对照归一化)	
			48 小时	
			62.5pM	125pM
	VOYHTmiR-104.579	1595	73	91
	VOYHTmiR-127.016	1593	52	51
	构建体 1: VOYHTmiR-104.579 构建体 2: VOYHTmiR-127.016	构建体 1: 1595 构建体 2: 1593	43	23

[1459] 表57.HTT的敲低

[1460]	调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	多顺反子 miRNA 表达载	相对 HTT mRNA 水平 (%) (相对于对照归一化)

		体 SEQ ID	62.5pM	
			48 小时	72 小时
A: VOYHTmiR-104.579 B: VOYHTmiR-104.579	A: 1595	VOYPC17	97	88
	B: 1595			
A: VOYHTmiR-127.016 B: VOYHTmiR-127.016	A: 1593	VOYPC18	36	39
	B: 1593			
A: VOYHTmiR-104.579 B: VOYHTmiR-127.016	A: 1595	VOYPC19	37	37
	B: 1593			
A: VOYHTmiR-127.016 B: VOYHTmiR-104.579	A: 1593	VOYPC20	49	51
	B: 1595			

[1462] 对于两个时间点,具有以任何顺序串联的VOYHTmiR-127.016和VOYHTmiR-104.579调节性多核苷酸的构建体均显示出最低相对Htt mRNA水平。

[1463] 实施例5.多顺反子构建体在HEK293T细胞中的活性

[1464] 为了确定抑制靶基因的相对活性,构建了单独或以包含两个、3个或4个调节性多核苷酸的多种串联组合编码VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)和/或VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的miRNA表达载体,并将其作为质粒转染到HEK293T细胞中,或包装在AAV2中并感染HEK293T细胞,然后测量靶基因mRNA的水平。

[1465] A.质粒转染后具有至多2个调节性多核苷酸的多顺反子构建体的活性

[1466] 将HEK293T细胞接种到96孔板中(以100ul细胞培养基,2.5E4个细胞/孔),并用miRNA表达质粒(62.5或125pM)和含有用于归一化转染效率的萤火虫荧光素酶基因和克隆在海肾荧光素酶基因终止密码子下游的亨廷顿(HTT)基因的VOYHTmiR-104.016和VOYHTmiR-127.579靶区域的双荧光素酶质粒共转染。转染后24或36小时,通过使用Dual-GloTM荧光素酶测定系统测量海肾和萤火虫荧光素酶活性,并相对于内部对照萤火虫荧光素酶活性将海肾荧光素酶活性归一化,确定了抑制HTT靶mRNA的多顺反子构建体的相对活性。然后,在用相同浓度的对照质粒(pcDNA)转染的HEK293T细胞中,相对于归一化海肾荧光素

酶活性(平均设置为1)表示这些归一化海肾荧光素酶活性(RLU,相对光单位)。

[1467] 表58中显示了转染后24小时和36小时的多种构建体的相对RLU(平均值±标准偏差)和测试构建体的描述。两个构建体(各自编码单个调节性多核苷酸-VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)或VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599))作为4个构建体的对照,每个构建体各自编码串联的两个调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)和/或VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)),其中每个多核苷酸均由其自身的H1启动子驱动,其后是其自身的H1终止子。在表58中,构建体在B调节性多核苷酸之前编码A调节性多核苷酸。N/A表示不适用。

[1468] 表58.HEK293T细胞转染后的多顺反子活性

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	24 小时的相对 RLU		36 小时的相对 RLU	
			62.5pM	125pM	62.5pM	125pM
[1469] 构建体 1: VOYHTmiR-104.016	1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2691)	N/A	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00

[1470]

构建体 2: VOYHTmiR-127.579	1599 (ITR 至 ITR 序列 : SEQ ID NO: 2690)	N/A	0.15 ±0.02	0.14 ±0.01	0.08 ±0.00	0.07 ±0.00
构建体 1: VOYHTmiR-104.016 构建体 2: VOYHTmiR-127.579	构建体 1: 1589 构建体 2: 1599	N/A	0.11 ±0.01	0.09 ±0.01	0.03 ±0.00	0.03 ±0.00
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC59	0.08 ±0.02	0.10 ±0.03	0.03 ±0.00	0.03 ±0.00
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC61	0.08 ±0.02	0.08 ±0.02	0.03 ±0.00	0.03 ±0.00
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1599	VOYPC60	0.09 ±0.02	0.10 ±0.02	0.03 ±0.00	0.03 ±0.00
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1599	VOYPC62	0.15 ±0.03	0.13 ±0.02	0.07 ±0.00	0.07 ±0.00

[1471] 这些结果证明了序列VOYPC59、VOYPC60和VOYPC61(各自含有串联的两个调节性多核苷酸(两个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)或一个拷贝VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)和一个拷贝VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的组合))提供了比含有单个调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)或VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599))的构建体更多的靶降低。

[1472] B. 用AAV感染后具有至多4个调节性多核苷酸的多顺反子构建体的活性

[1473] 将HEK293T细胞接种到96孔板中(以100u1细胞培养基,2.5E4个细胞/孔),并以1x10³个载体基因组/细胞的MOI用包装在AAV2中的miRNA表达质粒转染,同时用含有用于归一

化转染效率的萤火虫荧光素酶基因和克隆在海肾荧光素酶基因终止密码子下游的亨廷顿 (HTT) 基因的VOYHTmiR-104.016和VOYHTmiR-127.579靶区域的双荧光素酶质粒转染。感染后48小时,通过使用Dual-Glo™荧光素酶测定系统测量海肾和萤火虫荧光素酶活性,并相对于内部对照萤火虫荧光素酶活性将海肾荧光素酶活性归一化。然后,在用相同MOI的对照质粒 (AAV2.mCherry) 感染的HEK293T细胞或未感染的HEK293T细胞中,相对于归一化海肾荧光素酶活性 (平均设置为1) 表示这些归一化海肾荧光素酶活性 (RLU, 相对光单位)。

[1474] 表59中显示了多种构建体的相对RLU (平均值±标准偏差) 和测试构建体的描述。两个AAV载体 (各自编码单个调节性多核苷酸-VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589) 或VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599)) 作为十六个AAV载体的对照,十六个AAV载体含有编码的2个、3个或4个调节性多核苷酸 (VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589) 和/或VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599)), 其中每个多核苷酸均由其自身的Pol III H1启动子驱动,其后是其自身的H1终止子。在表59中,构建体编码A调节性多核苷酸,之后编码B调节性多核苷酸,之后编码C调节性多核苷酸,之后编码D调节性多核苷酸。N/A表示不适用。

[1475] 表59.AAV感染HEK293T细胞后的多顺反子活性

[1476]

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	RLU (相对于未感染)
mCherry	N/A	N/A	0.99 ± 0.02
未感染	N/A	N/A	1.00 ± 0.03

[1477]

VOYHTmiR-104.016	1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2691)	N/A	0.25 ± 0.01
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC59	0.25 ± 0.01
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016 C: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589 C: 1589	VOYPC33	0.21 ± 0.01
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016 C: VOYHTmiR-104.016 D: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589 C: 1589 D: 1589	VOYPC47	0.19 ± 0.01
VOYHTmiR-127.579	1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2690)	N/A	0.48 ± 0.01
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1599	VOYPC62	0.42 ± 0.01
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579 C: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1599 C: 1599	VOYPC31	0.34 ± 0.03
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579 C: VOYHTmiR-127.579 D: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1599 C: 1599 D: 1599	VOYPC43	0.32 ± 0.02
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1599	VOYPC60	0.27 ± 0.01
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC61	0.24 ± 0.03

[1478]

A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016 C: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1589 C: 1599	VOYPC29	0.28 ± 0.01
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016 C: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1589 C: 1599	VOYPC34	0.20 ± 0.00
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579 C: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1599 C: 1589	VOYPC30	0.26 ± 0.03
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579 C: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1599 C: 1589	VOYPC32	0.23 ± 0.01
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016 C: VOYHTmiR-127.579 D: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589 C: 1599 D: 1589	VOYPC44	0.17 ± 0.01
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579 C: VOYHTmiR-104.016 D: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1599 C: 1589 D: 1599	VOYPC48	0.20 ± 0.01
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579 C: VOYHTmiR-127.579 D: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1599 C: 1599 D: 1589	VOYPC46	0.19 ± 0.01
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016 C: VOYHTmiR-104.016 D: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1589 C: 1589 D: 1599	VOYPC45	0.21 ± 0.01

[1479] 结果表明,与包含3个串联的相同调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589))的VOYPC33相比,包含4个串联的相同调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589))的序列VOYPC47提供了更多的靶降低。这些结果还表明,与包含2个串联的相同调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589))的VOYPC59相比,包含3个串联的相同调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589))的VOYPC33提供了更多的靶降

低。

[1480] 结果表明,与包含3个串联的相同调节性多核苷酸(VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599))的VOYPC31相比,包含4个串联的相同调节性多核苷酸(VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599))的序列VOYPC43提供了更多的靶降低。这些结果还表明,与包含2个串联的相同调节性多核苷酸(VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599))的VOYPC62相比,包含3个串联的相同调节性多核苷酸(VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599))的VOYPC33提供了更多的靶降低。

[1481] 综上所述,VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589)和VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599)的这些结果证明,4个串联的相同调节性多核苷酸比3个串联的相同调节性多核苷酸提供了更高的抑制剂活性(靶降低),3个串联的相同调节性多核苷酸进而比2个串联的相同调节性多核苷酸提供更高的抑制剂活性(靶降低)。

[1482] 结果显示序列VOYPC34(其包含两个拷贝的VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589),其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599))提供了比VOYPC30更高的抑制活性(降低靶标)。这两个序列都包含两个拷贝的VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589)和一个拷贝的VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599),但是这些调节性多核苷酸的顺序是不同的;VOYPC34包含两个拷贝的VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589),其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599),而VOYPC30包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589),其后是一个拷贝的VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589)。

[1483] 结果显示,在包含4个调节性多核苷酸的序列(其包含两个不同的调节性多核苷酸)中,序列VOYPC44比VOYPC48、VOYPC46或VOYPC45提供更高的抑制活性(靶降低)。

[1484] 实施例6.在HEK293T细胞中多顺反子构建体的Pri-miRNA加工

[1485] 为了确定pri-miRNA加工的精度和效率,构建了单独或以包含两个调节性多核苷酸的多种串联组合编码VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589)和/或VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599)的miRNA表达载体,将其包装在带有一个CMV启动子或两个H1启动子的AAV2中,并感染HEK293T细胞,然后通过深度测序评估pri-miRNA加工的精度和效率。

[1486] 将HEK293T细胞接种到6孔板中(以2mL细胞培养基,2E6细胞/板),并以 1×10^4 个载体基因组/细胞的MOI用包装在AAV2中的miRNA表达质粒感染,重复两次(Rep1,Rep2);参见表60-65。感染后48小时,通过深度测序评估用于pri-miRNA加工的细胞培养物,以评估引导链相对于miRNA总内源库的丰度(表60-61)、引导链:过客链的比(表62-63),以及引导链5'端的加工精度(表64-65)。在表60-65中,构建体在B调节性多核苷酸之前编码A调节性多核苷酸。N/A表示不适用。

[1487] 使用CMV启动子(表60),AAV基因组中第二调节性多核苷酸的存在影响了VOYHTmiR-104.016的引导链丰度。包含两个拷贝的VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC13,相对于总内源性miRNA库为0.26和0.27%)的引导链丰度低于包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(相对于总内源性miRNA库为0.49%和0.43%)的引导链丰度。然而,对于含有第二种不同调节性多核苷酸VOYHTmiR-127.579的AAV基因组,VOYHTmiR-104.016的引导链丰度更高。相对于总内源性miRNA库,VOYPC14的引导链丰度为1.69和1.52%,相对于总内源性miRNA库,VOYPC15的引导链丰度为2.17和2.11%,这与单个调节性多核苷酸(VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589))的引导链

丰度不同,相对于总内源性miRNA库,其为0.49和0.43%。利用CMV启动子的序列用与CMV启动子3'串联的调节性多核苷酸配置,以使调节性多核苷酸的转录受到单个CMV启动子的控制。使用CMV启动子获得的结果显示在表60中。

[1488] 表60.AAV感染(CMV启动子)后HEK293T培养物中的Pri-miRNA加工-引导链丰富度

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	相对于总内源性 miRNA 库的引导链丰度 (%)			
			127.579		104.016	
			Rep1	Rep2	Rep1	Rep2
VOYHTmiR-127.579	1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2692)	N/A	1.92	0.85	N/A	N/A
VOYHTmiR-104.016	1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2693)	N/A	N/A	N/A	0.49	0.43
构建体 1: VOYHTmiR-104.016 构建体 2: VOYHTmiR-127.579	构建体 1: 1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2693) 构建体 2: 构建体 2: 1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2692)	N/A	0.98	0.72	0.24	0.23

[1489]

[1490]

A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC13	N/A	N/A	0.26	0.27
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC14	0.26	0.24	1.69	1.52
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1599	VOYPC15	0.31	0.28	2.17	2.11
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1599	VOYPC16	0.93	0.72	N/A	N/A

[1491] 利用Po1 III启动子H1的序列用各个受其自身的H1启动子的控制的调节性多核苷酸配置。如表61中所示,对于H1启动子,引导链丰度与AAV基因组中相应的调节性多核苷酸的数量成正比。包含两个拷贝的VOYHTmiR-104.016的AAV基因组(VOYPC59,相对于总内源性miRNA库为3.81和3.84%)的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的引导链丰度比包含单个拷贝的VOYHTmiR-104.016的AAV基因组(相对于总内源性miRNA库为2.19和2.13%)高1.77倍。无论AAV基因组中是否存在一个拷贝的不同调节性多核苷酸VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599),VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的引导链丰度与包含一个拷贝VOYHTmiR-104.016的AAV基因组都是相似的。对于包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组、包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC60)和包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC61),相对于VOYHTmiR-104.016的总内源性miRNA库,引导链丰度分别为2.19%和2.13%、2.61和2.52%、2.21%和2.3%。

[1492] 相似地,对于H1启动子(表61),针对另一调节性多核苷酸,包含两个拷贝的VOYHTmiR-127.579(VOYPC62,相对于总内源性miRNA库为2.05和1.74%)的AAV基因组的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的引导链丰度比包含单个拷贝的VOYHTmiR-127.579的AAV基因组(相对于总内源性miRNA库为0.75和0.67%)高2.67倍。无论AAV基因组中是否存在一个拷贝的不同调节性多核苷酸VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589),VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的引导链丰度与含有一个拷贝的VOYHTmiR-127.579的AAV基因

组都是相似的。对于包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599)的AAV基因组、包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589) 其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599)的AAV基因组 (VOYPC60) 和包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579 (SEQ ID NO:1599) 其后是一个拷贝的VOYHTmiR-104.016 (SEQ ID NO:1589)的AAV基因组 (VOYPC61), 相对于总内源性miRNA库,VOYHTmiR-127.579的引导链丰度分别为0.75和0.67%、1.0和1.05%以及0.97和0.99%。

[1493] 表61.AAV感染(H1启动子)后HEK293T培养物中Pri-miRNA加工-引导链丰度

[1494]	调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 核 苷 酸 SEQ ID	序列名称	相对于内源性 miRNA 库的引导链丰度 (%)			
				127.579		104.016	
				Rep1	Rep2	Rep1	Rep2

[1495]

VOYHTmiR-127.579	1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2690)	N/A	0.75	0.67	N/A	N/A
VOYHTmiR-104.016	1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2691)	N/A	N/A	N/A	2.19	2.13
构建体 1: VOYHTmiR-104.016 构建体 2: VOYHTmiR-127.579	构建体 1: 1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2691) 构建体 2: 1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2690)	N/A	0.32	0.29	1.54	1.56
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC59	N/A	N/A	3.81	3.84
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC61	0.97	0.99	2.21	2.3

[1496]	A: VOYHTmiR-104.016	A: 1589	VOYPC60	1	1.05	2.61	2.52
	B: VOYHTmiR-127.579	B: 1599					
[1497]	A: VOYHTmiR-127.579	A: 1599	VOYPC62	2.05	1.74	N/A	N/A
	B: VOYHTmiR-127.579	B: 1599					

[1497] 对于CMV启动子(表62),对于包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC15),和包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC14),VOYHTmiR-104.016的引导链/客链比分别为114.2和121.6,以及99.2和105.8,相比之下,仅包含单个拷贝的VOYHTmiR-104.016的AAV基因组为71.1和83。

[1498] 表62.AAV感染(CMV启动子)后HEK293T培养物中Pri-miRNA加工-引导链丰度

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	引导链/过客链比			
			127.579		104.016	
			Rep1	Rep2	Rep1	Rep2
[1499] VOYHTmiR-127.579	1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2692)	N/A	16.6	4.6	N/A	N/A

[1500]

VOYHTmiR-104.016	1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2693)	N/A	N/A	N/A	71.1	83
构建体 1: VOYHTmiR-104.016 构建体 2: VOYHTmiR-127.579	构建体 1: 1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2693 构建体 2: 1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2692)	N/A	9.4	6	45.2	66.9
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC13	N/A	N/A	45.8	126.3
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC14	6.8	6.7	99.2	105.8
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1599	VOYPC15	6.7	6.7	114.2	121.6

[1501]	A: VOYHTmiR-127.579	A: 1599	VOYPC16	7.8	6.6	N/A	N/A
	B: VOYHTmiR-127.579	B: 1599					

[1502] 当利用Po1 III H1启动子(表63)时,AAV基因组中第二调节性多核苷酸的存在不影响VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的引导链/过客链比。对于包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组、包含两个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC59)、包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC60)以及包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC61),VOYHTmiR-104.016的引导链/过客链分别为16.9和20.2、14.3和18.6、16.3和16.3,以及17.7和17.8。

[1503] 相似地,当利用Po1 III H1启动子(表63)时,AAV基因组中第二调节性多核苷酸的存在不影响VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的引导链/过客链比。对于包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组、包含两个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC62)、包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC60)以及包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC61),VOYHTmiR-127.579的引导链/过客链比分别为6.4和5.9、5.7和6.4、5.6和6.2、6.2和5.8。

[1504] 这些结果表明,对于Po1 III H1启动子(表63),无论是否存在第二调节性多核苷酸,引导链/过客链比都相同。

[1505] 表63.AAV感染(H1启动子)后HEK293T培养物中Pri-miRNA加工-引导链/过客链比

[1506]

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	引导链/过客链比			
			127.579		104.016	
			Rep1	Rep2	Rep1	Rep2
VOYHTmiR-127.579	1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2690)	N/A	6.4	5.9	N/A	N/A
VOYHTmiR-104.016	1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2691)	N/A	N/A	N/A	16.9	20.2
构建体 1: VOYHTmiR-104.016 构建体 2: VOYHTmiR-127.579	构建体 1: 1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2691) 构建体 2: 1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2690)	N/A	6.3	6	17.6	19.5
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC59	N/A	N/A	14.3	18.6

[1507]	A: VOYHTmiR-127.579	A: 1599	VOYPC61	6.2	5.8	17.7	17.8
	B: VOYHTmiR-104.016	B: 1589					
	A: VOYHTmiR-104.016	A: 1589					
	B: VOYHTmiR-127.579	B: 1599	VOYPC60	5.6	6.2	16.3	16.3
	A: VOYHTmiR-127.579	A: 1599	VOYPC62	5.7	6.4	N/A	N/A
	B: VOYHTmiR-127.579	B: 1599					

[1508] 对于CMV启动子(表64),无论AAV基因组中是否存在第二调节性多核苷酸,在引导链5'端的加工精度是相同的。对于CMV启动子,对于包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组、包含两个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC13)、包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC15)以及包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC14),VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的引导链5'端的加工精度分别为95.5和95%、94.9和95.4%、95.7和95.7%以及95.6和95.3%。对于CMV启动子,包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组、包含两个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC16)、包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC15)以及包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC14),VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的引导链5'端的加工精度分别为59和59.8%、60.1和60.8%、59.9和61.5%,以及61和61.2%。

[1509] 表64.AAV感染(CMV启动子)后HEK293T培养物中的Pri-miRNA加工-引导链5'端的加工精度

[1510]

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	% N (引导链)			
			127.579		104.016	
			Rep1	Rep2	Rep1	Rep2
VOYHTmiR-127.579	1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2692)	N/A	59	59.8	N/A	N/A
VOYHTmiR-104.016	1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2693)	N/A	N/A	N/A	95.5	95
构建体 1: VOYHTmiR-104.016 构建体 2: VOYHTmiR-127.579	构建体 1: 1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2693) 构建体 2: 构建体 2: 1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2692)	N/A	58.9	60	95.3	94.6

[1511]

A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC13	N/A	N/A	94.9	95.4
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC14	61	61.2	95.6	95.3
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1599	VOYPC15	59.9	61.5	95.7	95.7
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1599	VOYPC16	60.1	60.8	N/A	N/A

[1512] 对于H1启动子(表65),无论AAV基因组中是否存在第二调节性多核苷酸,在引导链5'端的加工精度是相同的。对于H1启动子,对于包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组、包含两个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC59)、包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC60)以及包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC61),VOYHTmiR-104.016的引导链5'端的加工精度分别为92.6和92.6%、92.6和92.1%、92.1和91.8%,和93和92.9%。对于H1启动子,包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组、包含两个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC62)、包含一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的AAV基因组(VOYPC60)以及包含一个拷贝的VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)其后是一个拷贝的VOYHTmiR-104.016(SEQ ID NO:1589)的AAV基因组(VOYPC61),VOYHTmiR-127.579(SEQ ID NO:1599)的引导链5'端的加工精度分别为59.5和59.6%、58.5和59.3%、59和59.8%,58.5和58.7%。

[1513] 这些结果证明,对于CMV(表64)或H1(表65)启动子,无论是否存在第二调节性多核苷酸,在引导链5'端的加工精度是相同的。

[1514] 表65.AAV感染(H1启动子)后HEK293T培养物中Pri-miRNA加工-引导链5'端的加工

精度

[1515]

调节性多核苷酸名称	调节性多核苷酸 SEQ ID	序列名称	% N (引导)			
			127.579		104.016	
			Rep1	Rep2	Rep1	Rep2
VOYHTmiR-127.579	1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2690)	N/A	59.5	59.6	N/A	N/A
VOYHTmiR-104.016	1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2691)	N/A	N/A	N/A	92.6	92.6
构建体 1: VOYHTmiR-104.016 构建体 2: VOYHTmiR-127.579	构建体 1: 1589 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2691) 构建体 2:	N/A	59.5	60	92.6	92.4

	1599 (ITR 至 ITR 序列: SEQ ID NO: 2690)					
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1589 B: 1589	VOYPC59	N/A	N/A	92.6	92.1
[1516] A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-104.016	A: 1599 B: 1589	VOYPC61	58.5	58.7	93	92.9
A: VOYHTmiR-104.016 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1589 B: 1599	VOYPC60	59	59.8	92.1	91.8
A: VOYHTmiR-127.579 B: VOYHTmiR-127.579	A: 1599 B: 1599	VOYPC62	58.5	59.3	N/A	N/A

[1517] 尽管已经结合若干所述实施方案以一定的范围和某些特定性,对本发明进行了描述,但是并不意图将本发明限制于任何这样的细节或实施方案或任何特定实施方案,而是应当将其解释为参考所附权利要求,以便根据现有技术提供对这些权利要求尽可能广泛的解释,并因此有效地包含本发明的预期范围。

[1518] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用整体并入本文。如果发生冲突,以本说明书(包括定义)为准。另外,章节标题、材料、方法和实施例仅是说明性的,而非意图限制。

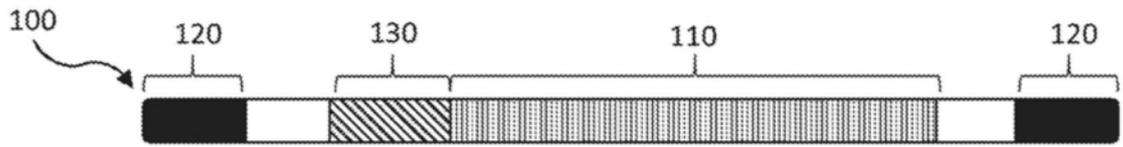


图1

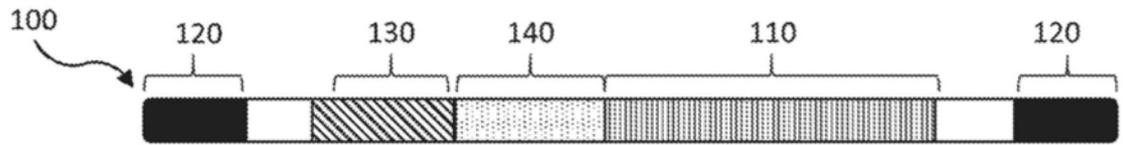


图2

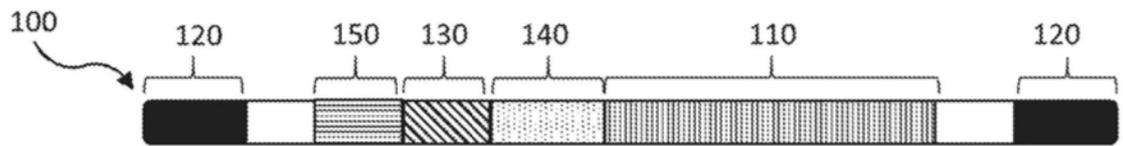


图3

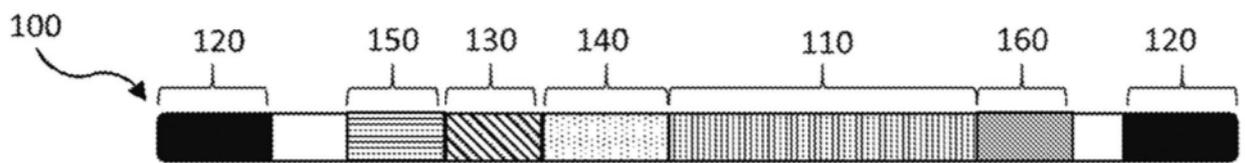


图4

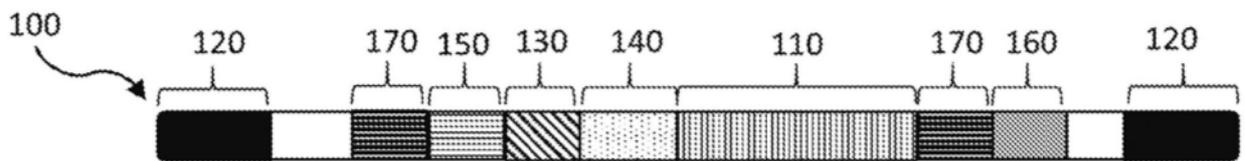


图5

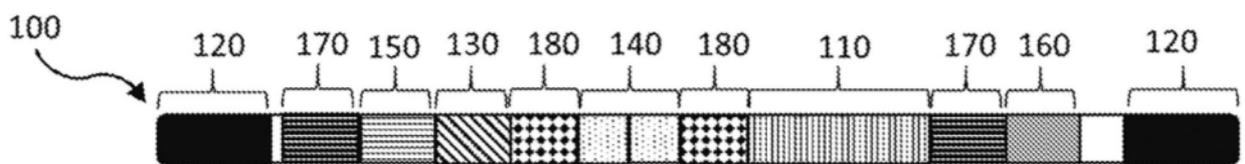


图6

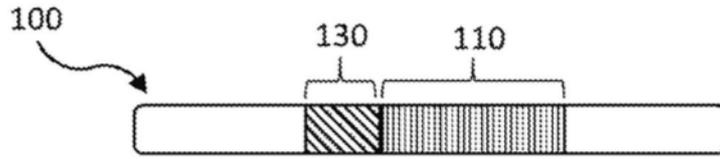


图7

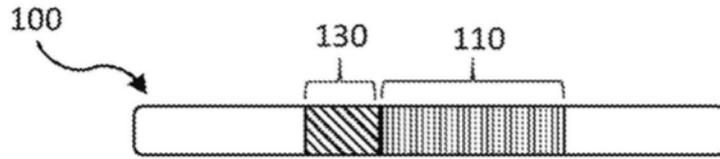


图8

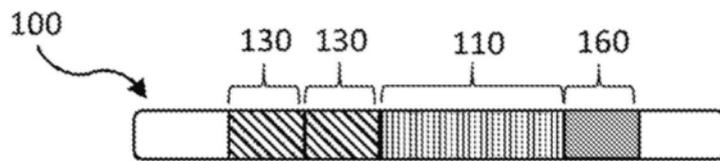


图9