



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117752822 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 26

(21) 申请号 202311261068.0

A61K 38/44 (2006.01)

(22) 申请日 2018.11.15

A61P 27/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/864 (2006.01)

62/586624 2017.11.15 US

C12N 15/53 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201880086649.6 2018.11.15

(71) 申请人 密歇根大学董事会

地址 美国密歇根州

(72) 发明人 D.A.汤普森 R.R.阿利

A.J.史密斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

专利代理师 罗文锋 彭昶

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书19页

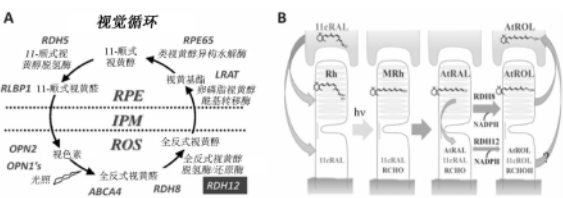
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

包括RDH12编码区的病毒载体和治疗视网膜营养不良的方法

(57) 摘要

本发明涉及包括RDH12编码区的病毒载体和治疗视网膜营养不良的方法。提供了用于通过施用有效量的包括人RDH12的可表达编码区的腺相关病毒AAV2、血清型5(AAV 2/5)或AAV-5治疗如莱伯氏先天性黑蒙等眼科病状的材料、方法和用途。



1. 包括核酸的腺相关病毒载体在制备用于治疗患有由于对视黄醇脱氢酶12 (RDH12) 蛋白进行编码的基因中的一个或多个功能缺失突变而引起的眼科病状的人类受试者的药物中的用途, 所述治疗包括向所述受试者的至少一只眼睛施用所述腺相关病毒载体, 其中所述核酸包括人RDH12 DNA, 并且其中所述人RDH12 DNA对包含SEQ ID NO:2的蛋白质进行编码, 其中所述腺相关病毒载体是AAV2/5, 其中所述眼科病状是早发性严重视网膜营养不良 (EOSRD), 以及其中所述RDH12 DNA在人视紫红质激酶1 (hGRK1) 启动子的表达控制下。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述hGRK1启动子包括SEQ ID NO:3。

3. 根据权利要求1所述的用途, 所述治疗包括以 $2 \times 10^{10}$ 病毒基因组每毫升 (vg/mL) 的滴度到 $2 \times 10^{12}$  vg/mL的滴度施用所述核酸。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述核酸被施用到视网膜下空间中。

5. 根据权利要求4所述的用途, 其中微注射套管插入到所述视网膜下空间中。

6. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述hGRK1启动子由SEQ ID NO:3组成。

7. 一种腺相关病毒载体, 其包含对人RDH12 DNA进行编码的核酸, 其中所述人RDH12 DNA对包含SEQ ID NO:2的蛋白质进行编码, 其中所述RDH12 DNA在人视紫红质激酶1 (hGRK1) 启动子的控制下, 并且其中所述腺相关病毒载体是AAV2/5。

8. 根据权利要求7所述的腺相关病毒载体, 其中所述hGRK1启动子包括SEQ ID NO:3。

9. 根据权利要求7-8中任一项所述的腺相关病毒载体, 其中所述hGRK1启动子由SEQ ID NO:3组成。

10. 根据权利要求7到9中任一项所述的腺相关病毒载体, 其用于治疗患有由于对视黄醇脱氢酶12 (RDH12) 蛋白进行编码的基因中的一个或多个功能缺失突变而引起的眼科病状的人类受试者, 其中所述眼科病状是早发性严重视网膜营养不良 (EOSRD)。

11. 一种分离的宿主细胞, 其包括根据权利要求7到10中任一项所述的腺相关病毒载体。

12. 根据权利要求11所述的分离的宿主细胞, 其中所述细胞表达人RDH12蛋白。

## 包括RDH12编码区的病毒载体和治疗视网膜营养不良的方法

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2018年11月15日,申请号为201880086649.6(PCT/US2018/061319),发明名称为“包括RDH12编码区的病毒载体和治疗视网膜营养不良的方法”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2017年11月15日提交的临时美国专利申请第62/586,624号的优先权,该申请通过引用并入本文。

[0004] 通过引用并入通过电子方式提交的材料

[0005] 作为本公开的独立部分,本申请包含计算机可读形式的序列表(文件名称:51914A\_Seqlisting.txt,创建于2018年11月9日(5,230字节,ASCII文本文件)),其全部内容通过引用并入本文。

### 技术领域

[0006] 本公开涉及医学治疗方法,例如用于治疗患有由于对视黄醇脱氢酶12蛋白(RDH12)进行编码的基因中的至少一个功能缺失突变而引起的眼科病状(例如,莱伯氏先天性黑蒙)的人类受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的核酸,所述核酸包括腺相关病毒载体,所述腺相关病毒载体包括人RDH12互补DNA(cDNA)。

### 背景技术

[0007] 遗传性视网膜疾病(IRD)是儿童法定失明(legal blindness)的主要原因。莱伯氏先天性黑蒙(LCA)和早发性严重视网膜营养不良(EOSRD)导致从出生到几岁发生严重视力障碍,两者加在一起占有IRD的5%或更多(Koenekoop等人,2004)。LCA/EOSRD与常染色体显性和常染色体隐性遗传模式相关,涉及视网膜色素上皮和视杆光感受器及视锥光感受器作为主要靶(Weleber等人,2013)。大约10%的LCA/EOSRD是由对RDH12进行编码的基因的突变引起的(Kumaran等人,2017)。鉴于RDH12在为感光细胞提供发色团的视觉循环中的作用(Haeseleer等人,2002;Chen等,2012),以及RDH12构成了一个重要的治疗靶点,RDH12是最重要的LCA基因之一。

[0008] 尽管如遗传性视网膜疾病的眼科病状在人类和非人类哺乳动物中普遍存在,并且对对视黄醇脱氢酶进行编码的基因以及这些基因中的一些突变的影响有所了解,但是对于由RDH12中的一个或多个突变引起的LCA还没有已知的治疗方法。因此,在本领域中继续需要用于治疗如LCA的视网膜营养不良的材料和方法,以及用于纠正可能导致这种营养不良的遗传异常的材料和方法。

### 发明内容

[0009] 本发明提供了一种腺相关病毒(AAV)载体,其包括对视黄醇脱氢酶进行编码的基因RDH12的基因产物的编码区。包含RDH12的AAV载体可用于治疗视网膜营养不良病症(例如莱伯氏先天性黑蒙(LCA)),其通过提供RDH12编码区置于可调节或可控制的启动子(如异源

启动子)的控制下的重组构建体来向缺乏野生型水平(如由RDH12中的突变造成)的RDH12活性的受试者提供互补视黄醇脱氢酶。尽管具有相对较小的基因组大小、相对较低的整合入宿主DNA的趋势和相对较低的免疫原性特征的优点,但令人惊讶的发现是,一些AAV血清型组合或假型产生了编码的RDH12产物的表达水平,其治疗视网膜营养不良的受试者给药的情况下不是治疗有效的和/或表现出不希望的毒性。与这一发现相一致的是,发现某些假类型(如AAV2/5假类型)表现出与治疗视网膜营养不良症的治疗用途相一致的意想不到的和令人惊讶的有效表达水平和毒性特征。可以用本发明方法治疗的受试者可以包含通过光学相干断层扫描(OCT)确定视觉功能丧失(例如,视网膜电图(ERG)测试反应受损)但是保留了一些感光细胞的受试者。因此,在一个方面,本发明提供了一种治疗患有由于对视黄醇脱氢酶12(RDH12)蛋白的进行编码的基因中的一个或多个功能丧失突变引起的眼科病状(如莱伯氏先天性黑蒙或LCA,或另一种临床定义的眼科病状)的人类受试者的方法。具体地,本公开的一个方面提供了一种治疗患有由于对视黄醇脱氢酶12(RDH12)蛋白的进行编码的基因中的一个或多个功能缺失突变引起的眼科病状的人类受试者的方法,所述方法包括向所述受试者的至少一只眼睛施用包括核酸的腺相关病毒载体,其中所述核酸包括人RDH12 DNA(例如人RDH12 cDNA),并且其中所述RDH12 DNA(例如人RDH12 DNA)对与SEQ ID NO:2的全长至少70%、80%、90%、95%或99%相同的蛋白质进行编码。在上述一些实施例中,所述眼科病状是莱伯氏先天性黑蒙(LCA)。在上面提到的一些实施例中,所述眼科病状是莱伯氏先天性黑蒙(LCA)。在一些实施例中,RDH12 DNA(例如RDH12 cDNA)在人视紫红质激酶1(hGRK1)启动子的表达控制下,如其中hGRK1启动子包括SEQ ID NO:3或基本上由SEQ ID NO:3组成。在一些实施例中,所述腺相关病毒载体是AAV-2、血清型-5(AAV2/5)或AAV-5。在一些实施例中,RDH12 DNA(例如RDH12 cDNA)包括与SEQ ID NO:1至少60%或70%相同的序列。在一些实施例中,所述核酸以约 $2 \times 10^{10}$ 病毒基因组每毫升(vg/mL)到约 $2 \times 10^{12}$ vg/mL的滴度施用,例如,约 $2 \times 10^{10}$ 病毒基因组每毫升(vg/mL)到约 $2 \times 10^{12}$ vg/mL的滴度,如约 $2 \times 10^{11}$ vg/mL或约 $2 \times 10^{12}$ vg/mL。在一些实施例中,所述核酸被施用到视网膜下空间,例如,其中微注射套管插入到所述视网膜下空间中。

[0010] 本公开的另一个方面涉及对人RDH12 DNA进行编码的核酸(例如人RDH12 cDNA),其中RDH12 DNA(例如人RDH12 DNA(如cDNA))对与SEQ ID NO:2的全长至少70%、80%、90%、95%或99%相同的蛋白质进行编码,其中RDH12 DNA在人视紫红质激酶1(hGRK1)启动子的控制下。在一些实施例中,所述hGRK1启动子包括SEQ ID NO:3或基本上由SEQ ID NO:3组成。在一些实施例中,所述人RDH12 DNA(例如人RDH12 cDNA)对包括SEQ ID NO:2的蛋白质进行编码。在一些实施例中,所述人RDH12 DNA(例如人RDH12cDNA)与SEQ ID NO:1的全长至少60%或70%相同。

[0011] 本公开的又另一个方面是本文公开的用于治疗由于对视黄醇脱氢酶12(RDH12)蛋白进行编码的基因中的一个或多个功能缺失突变而患有眼科病状的人类受试者的核酸。在上述一些实施例中,所述眼科病状是莱伯氏先天性黑蒙(LCA)。

[0012] 本公开的又另一方面是一种病毒载体,其包括对本文所公开的RDH12进行编码的核酸。在一些实施例中,所述病毒载体是腺相关病毒载体。在一些实施例中,所述腺相关病毒载体是AAV-2、血清型-5(AAV2/5)或AAV-5。

[0013] 本公开的又另一个方面是本文公开的用于治疗由于对视黄醇脱氢酶12(RDH12)蛋

白进行编码的基因中的一个或多个功能缺失突变而患有眼科病状的人类受试者的病毒载体。在上述一些实施例中,所述眼科病状是莱伯氏先天性黑蒙(LCA)。

[0014] 本公开的另一方面涉及分离的宿主细胞,其包括本文公开的病毒载体或本文公开的核酸。在一些实施例中,分离的宿主细胞表达人RDH12蛋白。

[0015] 除非另外限定,否则本文中所使用的所有技术和科技术语具有本发明所属领域的技术人员通常所理解的相同含义。本文描述了用于本发明的方法和材料;也可以使用本领域已知的其它合适的方法和材料。材料、方法和实例仅是说明性的,而不是限制性的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其它参考文献均通过引用整体并入本文。在发生冲突的情况下,应以本说明书(包含定义)为准。

[0016] 从下面的详细描述和附图以及权利要求中,本发明的其它特征和优点将变得清楚。

## 附图说明

[0017] 图1:视觉循环和感光细胞中的RDH活性。(A)视觉循环将维生素A转化为11-顺式视黄醛(即视觉色素的发色团),并回收漂白后释放的全反式视黄醛。(B)所示为RPE-感光细胞对的类视黄醇流。外段中的RDH8可减少全反式视黄醛。内段的RDH12可以减少全反式视黄醛、11-顺式视黄醛和其它有毒的短链醛类。缩写:11cRAL—11-顺式视黄醛;11cROL—11-顺式视黄醇;AtRAL—全反式视黄醛;AtROL—全反式视黄醇;RCHO—短链醛;RCHOH—短链醇;Rh—视紫红质;MRh—变视紫红质。

[0018] 图2:重组RDH12在注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12小鼠中的表达和定位。(A)AAV2/5-hGRK1p.hRDH12基因疗法构建体的示意图,其中在源自AAV2基因组的反向末端重复序列之间,在人视紫红质激酶启动子的下游克隆人RDH12cDNA。(B、C)在视网膜下注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12( $1.3 \times 10^9$  vg)或PBS后6周,人RDH12蛋白在小鼠视网膜中的表达,使用针对小鼠Rdh12或人RDH12的特异性抗体对其进行了评估。(B)对C57BL/6J小鼠、注射了PBS的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠和注射了AAV2/5-hGRK1p.hRDH12的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠的视网膜裂解物进行蛋白质分析(western analysis)。(C)免疫组化分析显示,在C57BL/6J小鼠中,天然小鼠Rdh12(深灰色)定位于视网膜的IS、ONL和OPL,但在Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠中没有定位,而注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12产生的重组人RDH12(浅灰色)显示出C57BL/6J和Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠的相似定位。相位对比图像(左)。缩写:ITR—末端倒置重复序列;hGRK1—人视紫红质激酶启动子;SD/SA—猴病毒40剪接供体/剪接受体位点;hRDH12—人RDH12 cDNA;polyA—猿猴病毒40多聚腺苷酸化信号;RPE—视网膜色素上皮;OS—外段;IS—内段;ONL—外核层;OPL—外丛状层;INL—内核层;IPL—内丛状层;GCL—神经节细胞层。

[0019] 图3:AAV2/5-hGRK1p.hRDH12基因替代疗法恢复RDH12缺陷小鼠的RDH12功能。(A)用HPLC分析注射了或未注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12( $1.3 \times 10^9$  vg)或PBS的C57BL/6J和Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠视网膜中的视黄醛还原酶活性。注射后6周,全反式视黄醇的形成在以全反式视黄醛为底物的测定中被定量。每个数据点代表至少5个独立实验的平均±标准误差,其中汇集3至5只小鼠的视网膜,并一式三份进行测定。●C57BL/6J;△Rdh12<sup>-/-</sup>;◇注射了PBS的Rdh12<sup>-/-</sup>;■注射了AAV的Rdh12<sup>-/-</sup>; (B)重组RDH12在注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12后16周评估的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠全视网膜切片中表达的免疫组织化学。人RDH12(浅灰色)定位于视网膜注射

区域的IS、ONL和OPL (图像的右侧)。

[0020] 图4: AAV2/5-hGRK1p.hRDH12基因替代疗法减少白化Rdh12缺陷小鼠的光损伤。在暴露于5,000勒克司2小时前一周和暴露于5,000勒克司2小时后一周对一只眼睛注射了AAV2/5-hGRK1p.hRDH12且对侧眼睛未注射的小鼠进行视了ERG分析。对10-13只小鼠的组进行暗视(视杆分离和组合视杆-视锥)反应的量化,并计算光损伤后剩余的初始ERG反应的百分比。示出了具有标准误差的平均结果,以及使用双尾配对t检验分析计算的注射眼和未注射眼之间差异的显著性。

[0021] 图5: AAV2/5-hGRK1p.hRDH12不会显著影响视网膜中11-顺式视黄醛的稳态水平。小鼠通过视网膜下注射接受AAV2/5-hGRK1p.hRDH12( $1.3 \times 10^9$ vg)或PBS,或者未注射。暗适应过夜后,在暗红光下提取类视黄醇,并通过HPLC分析进行定量。(A) 每个处理条件的代表性色谱图;显示了顺-11-顺式视黄醛肟、反-11-顺式视黄醛肟和顺-全反式视黄醛肟的峰。每个处理条件 $\pm$ 标准误差的(B) 11-顺式视黄醛和(C) 全反式视黄醛的总视黄醛水平(■未注射C57BL/6J;■未注射Rdh12<sup>-/-</sup>;▨注射了AAV的Rdh12<sup>-/-</sup>;□注射了PBS的Rdh12<sup>-/-</sup>)。

[0022] 图6: 视网膜功能不受AAV2/5-hGRK1p.hRDH12的不利影响。未注射C57BL/6J;未注射Rdh12<sup>-/-</sup>;注射了AAV2/5-hGRK1p.hRDH12的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠(高达 $2 \times 10^9$ vg)处理后6周记录的暗视(视杆分离和组合视杆-视锥)和明视(视锥介导)视网膜电图(ERG)反应。显示了在注射后6周测量的每个处理组中代表性动物的ERG。

[0023] 图7: 视觉色素定位不受AAV2/5-hGRK1p.hRDH12干扰。在处理16周评估未注射和注射( $1.3 \times 10^9$ vg)Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠中视紫红质和视锥视蛋白的免疫组织化学定位。人RDH12蛋白在IS和ONL(浅灰色)中的表达。注射了AAV2/5-hGRK1p.hRDH12的眼睛中的视紫红质和红/绿视蛋白(深灰色)。缩写与针对图2描述的缩写一样。

[0024] 图8: 视网膜结构不会因长期表达AAV2/5-hGRK1p.hRDH12而受损。在注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12(高达 $2 \times 10^9$ vg)后54周,对C57BL/6J和Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠的眼睛进行光学相干断层扫描(OCT)分析。

[0025] 图9: 浸润性CD68+巨噬细胞和RDH12在注射了AAV2/8-hGRK1p.hRDH12的视网膜中的表达。视网膜下注射AAV2/8-hGRK1p.hRDH12( $2 \times 10^9$ vg)后8周通过免疫组织化学分析对Rdh12<sup>-/-</sup>和C57BL/6J小鼠进行了评估。人RDH12在IS、ONL和OPL的表达(浅灰色)和巨噬细胞CD68标记(白色)。缩写与针对图2描述的缩写一样。

## 具体实施方式

[0026] 遗传性视网膜变性是严重视力丧失的罕见原因,这是当前开发靶向基因疗法的研究重点。病毒载体介导的体细胞基因疗法在处理人类视网膜变性疾病的动物模型方面显示出巨大的前景。迄今为止,已经有许多成功的研究使用腺相关病毒(AAV)介导的基因递送来拯救小动物模型(Alì等人,2000;Pang等人,2012;Pawlyk等人,2010;Pawlyk等人,2005;Tan等人,2009)和大型动物模型(Acland等人,2001;Alexander等人,2007;Beltran等人,2012;Komaromy等人,2010;Lheriteau等人,2009)中的感光细胞变性。在这些情况下,视网膜色素上皮(RPE)或光感受器是转基因表达的主要靶。此外,涉及针对RPE以及最近的脉络膜炎(Maclaren等人,2014)的莱伯氏先天性黑蒙(LCA)患者的基因疗法(Bainbridge等,2008;Cideciyan等人,2008;Maguire等人,2008)的I期临床试验已经取得了一些成功。目前还没

有临床试验使用AAV介导的基因替代疗法来治疗由RDH12突变引起的遗传性视网膜变性患者。

[0027] 为了开发AAV介导的基因疗法来治疗RDH12突变的个体,我们制备了携带人RDH12 cDNA的腺相关病毒载体,其中表达在视紫红质激酶启动子的控制下。在所公开的对具有来源于AAV血清型5或AAV血清型8的衣壳的载体的研究中,我们已经显示了AAV2/5-hGRK1p.RDH12的视网膜下递送在Rdh12缺陷(Rdh12<sup>-/-</sup>)小鼠中的Rdh12导致重组人RDH12的表达,所述重组人RDH12稳定、正确定位、重建视黄醛还原酶活性、降低光损伤易感性,并且不引起用AAV2/8-hGRK1p.hRDH12所见的视网膜毒性。AAV2/5-hGRK1p.RDH12构建体提供了RDH12基因替代疗法的产物。

#### [0028] RDH12

[0029] 对视黄醇脱氢酶12 (RDH12) 进行编码的基因突变导致严重的早发性视网膜变性,通常诊断为莱伯氏先天性黑蒙 (LCA) 或早发性严重视网膜营养不良 (EOSRD)。作为短链脱氢酶/还原酶家族的一员,RDH12对于还原视细胞光响应中不可或缺的维生素A视觉循环活性所产生的视黄醛至关重要。当包含11-顺式视网膜发色团的视觉色素吸收光子时,11-顺式视黄醛被异构化为全反式视黄醛,从而启动调节突触信号的信号转导级联。视觉色素失活包括全反式视黄醛的释放以及其针对11-顺式视黄醛发色团的再生(图1A)而还原为全反式视黄醇并返回到视网膜色素上皮(RPE)。当这些再循环反应例如由于老化或遗传疾病无效或被破坏时,视黄醛和视黄醛缩合产物在光感受器和视网膜色素上皮中积累,导致外视网膜发生严重损伤(Ben-Shabat等人,2001;Thompson等人,2003;Sparrow,2010;Chen等,2012)。

[0030] 为了防止毒性,在视网膜中表达了许多类视黄醇结合蛋白和酶。RDH12是短链脱氢酶/还原酶家族的一员,这一家族使用NADPH来还原多种底物,包含顺式和反式视黄醛(Haeseleer等人,2002)、由脂质光氧化产生的C9醛(Belyaeva等人,2005;Lee等人,2008;Marchette等人,2010)以及类固醇底物(Keller等人,2007)。RDH12基因功能缺失突变的个体表现出严重的视网膜变性表型,通常诊断为莱伯氏先天性黑蒙(LCA)(Janecke等人,2004;Thompson等人,2005;Perrault等人,2004;den Hollander等人,2008;Mackay等人,2011),目前还没有治疗方法。RDH12定位于视杆和视锥光感受器细胞的内段(Haeseleer等人,2002;Maeda等人,2006),其中它保护免受至少部分由活性视黄醛引起的光诱导损伤(Maeda等人,2006)。曝光后产生的全反式视黄醛已被证明从光感受器外段泄漏到内段,其从光感受器细胞的有效清除需要外段中存在的RDH8和内段中存在的RDH12的活性(Chen等人,2012)(图1B)。因此,RDH12也有在减少11-顺式视黄醛中发挥重要作用的潜力,所述视黄醛的存在超过视蛋白生物合成所需的量,所述视蛋白生物合成可从视网膜下空间进入内段(Chen等人,2012)。

[0031] 为了研究由于RDH12突变导致的LCA/EOSRD的基因替代疗法的潜力,我们制备了携带人RDH12 cDNA的腺相关病毒载体,其中表达在视紫红质激酶启动子控制下,所述启动子指导光感受器细胞特异性表达(Khani等人,2007;Sun等人,2010年;Young等人,2003年)。所述DNA构建体用来自AAV血清型8的介导光感受器细胞的有效和强有力的转导的衣壳包装,(Allocca等人,2007;Natkunarajah等人,2008;Vandenberghe等人,2011年;Vandenberghe等人,2013),或用介导光感受器转导的血清型5衣壳包装,但所述衣壳与血清型8衣壳相比

具有较慢的动力学和较不稳定的表达 (Yang等人, 2002; Lotery等人, 2003; Allocca等人, 2007; Leberherz等人, 2008)。

[0032] 在对Rh12缺乏小鼠模型 (Rdh12<sup>-/-</sup>) 进行的比较研究中 (Kurth等人, 2007年), 我们的工作表明, 两种载体具有显著不同的安全性特征, 其中AAV2/5-hGRK1p.hRDH12显示出意想不到的有效表达水平和毒性特征, 与治疗视网膜营养不良的治疗用途相一致。

[0033] 人RDH12序列

[0034] 由相对于转译起始位点的-10到+980个核苷酸组成的对所有七个转译的RDH12外显子 (GenBank#NM\_152443) 进行编码的示例性人RDH12 cDNA的序列在SEQ ID NO:1中提供。

[0035] 全长人RDH12蛋白序列在SEQ ID NO:2中提供。

[0036] 视紫红质激酶启动子 (hGRK1p)

[0037] 在本文所述方法的一些实施方案中, 使用替换基因构建体, 其中本文所述的人RDH12 cDNA置于人视紫红质激酶 (hGRK1) 启动子的控制下。在一些实施方案中, hGRK1启动子的长度约为200个碱基对 (bp), 包含源于视紫红质激酶 (RK) hGRK1基因的短启动子, 所述启动子已被证明驱动视杆细胞和视锥细胞中的细胞特异性表达 (Khani等人, 2007; Sun等人, 2010; Young等人, 2003)。示例性的hGRK1启动子序列包含SEQ ID NO:3的核苷酸-112到+87 (Khani等人, 2007)。

[0038] 病毒递送载体

[0039] 如上所述, 将缩写的人RDH12 cDNA包装到递送载体中, 例如AAV5或AAV2/5载体。

[0040] 替换基因 (cDNA) 可以在任何有效载体中施用, 例如, 任何能够将组分基因有效递送至体内细胞的制剂或组合物。方法包含将基因插入非致病性、非复制性病毒载体, 包含重组逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和单纯疱疹病毒-1, 或重组细菌或真核质粒。病毒载体直接转染细胞; 质粒DNA可以裸递送或借助于例如阳离子脂质体 (脂质体) 或衍生化的 (例如抗体缀合)、多聚赖氨酸缀合物、格兰霉素S、人工病毒包膜或其它此类细胞内载体以及基因构建体的直接注射或体内进行的Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>沉淀递送。

[0041] 将核酸体内导入细胞的优选方法是使用含有核酸 (例如, cDNA) 的病毒载体。用病毒载体感染细胞的优点是大部分靶细胞可以接收核酸。此外, 病毒载体中编码的分子 (例如由病毒载体中包含的cDNA编码的分子) 在吸收了病毒载体核酸的细胞中有效表达。逆转录病毒载体和腺病毒衍生的载体可以用作重组基因递送系统, 用于在体内 (特别是在人类中) 在许多细胞类型中转移外源性基因。然而, 这些载体不能以足以使其对本申请有用的效率转换感光细胞。

[0042] 又另一种用于递送核酸的病毒载体系统是腺相关病毒 (AAV)。腺相关病毒是一种天然存在的需要另一种病毒 (如腺病毒或疱疹病毒) 作为有效复制和产生生命周期的辅助病毒的缺陷型病毒 (Muzyczka等人, 1992)。腺相关病毒也是少数几个可以将其DNA整合到非分裂细胞中并且表现出高频率的稳定整合的病毒之一 (例如, 参见Flotte等人, 1992; Samulski等人, 1989年; 和McLaughlin等人, 1988)。含有少至300个AAV碱基对的载体可以被包装和整合。外源性DNA的空间被限制在4.5kb左右。可以使用AAV载体 (如在Tratschin等人 (1985) 中描述的) 将DNA导入细胞。已经使用AAV载体将多种核酸引入不同的细胞类型 (参见, 例如, Hermonat等人, 1984; Tratschin等人, 1984a; Tratschin等人, 1984b; Wondisford等人, 1988年; 和Flotte等人, 1993年)。



[0043] 在优选实施例中,病毒递送载体是重组AAV2/5病毒。在施用之前,可以对最终产物实施一系列超纯化步骤来满足临床等级标准。

#### [0044] 受试者选择

[0045] 作为本治疗方法候选对象的受试者包含诊断为由对RDH12进行编码的基因的突变引起的LCA的受试者。患有由对RDH12进行编码的基因的突变引起的其它眼科临床定义病状的受试者(例如早发性色素性视网膜炎)也可以使用本文所述的方法进行治疗。可以使用本领域已知的方法来诊断由对RDH12进行编码的基因突变引起的LCA或其它眼科病状。

[0046] 本文描述的方法可以包含:识别患有由对RDH12进行编码的基因中的一个或多个突变引起的LCA或另一种眼科病状的受试者(例如儿童、青少年或年轻成年受试者)或者被怀疑患有由对RDH12进行编码的基因中的一个或多个突变引起的LCA或另一种眼科病状的受试者(例如,基于疾病症状的存在而没有其它明显原因);从所述受试者获得包括基因组DNA的样品;使用已知的分子生物学方法检测RDH12中突变的存在;并选择在导致LCA或另一种病状的RDH12等位基因中均有突变的患者。这一病状的症状包含黄斑萎缩、视网膜中央凹变薄和层状结构破坏,导致早期中心视力丧失和进展为LP视力。在测量的最早年龄,视野受到限制,在成年早期,ERG反应变得不可恢复。检测RDH12中的突变可以包含对受试者中的全部或部分RDH12基因进行测序,并将所述序列与参考序列(例如,GenBank保藏号NG\_008321.1)进行比较以检测突变。移码突变、截短突变、改变保守氨基酸的突变、影响转录剪接的突变或影响调节区(例如启动子)的突变被视为可导致本文所述的LCA或另一种眼科病状的突变;功能的改变可以通过在体外(例如,在培养的细胞中)表达突变体并测定例如酶功能来证实。纯合状态的示例性突变包含:Glu127X、Gln189X、Tyr226Cys、Ala269GlyfsX1和Leu274Pro(所有位置参考均指SEQ ID NO:2的RDH12蛋白序列)。化合物杂合状态的典型突变包含:Thr49Met/Arg62X;Arg65X/Ala269GlyfsX1;His151D/Thr155Ile;His151D/Arg269GlyfsX1(Janecke等人,2004;Schuster等人,2007)(位置指SEQ ID NO:2的蛋白质序列)。

[0047] 患有由于至少一种RDH12突变而引起的LCA或其它眼科病状的患者可使用本文所述的方法进行治疗,优选保留一些光感受器和例如通过标准视觉功能或现场测试和/或光学相干断层扫描(OCT,例如,光谱域-OCT(SD-OCT))测量的视觉功能。本文所述的方法可包含识别被诊断患有由于至少一个RDH12突变而引起的LCA或另一种眼科病状的受试者和在RDH12中具有至少一个导致其病状的已确认突变的受试者,并测试其视觉能力和检测剩余中枢光感受器的存在。

#### [0048] 实例

[0049] 在以下实例中进一步描述了所公开和要求保护的主体,这些实例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

#### [0050] 材料和方法

[0051] 以下材料和方法被用于下面列出的实例中公开的实验中。

#### [0052] 动物

[0053] 先前已对Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠的产生和分析进行了描述(Kurth等人,2007)。本研究使用的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠是在我们的机构动物设施中饲养的未受精卵雄性和雌性之间通过同胞交配繁殖的。研究中使用的WT小鼠是来自杰克逊实验室(The Jackson Laboratory)(威尔明

顿,马萨诸塞州)的C57BL/6。

[0054] 以下基因型的转基因小鼠用于本文公开的研究:C57BL/6J背景下Rpe65-Met450 (M/M) 变体纯合的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠 (Kurth,2007),和BALB/c背景下Rpe65-Leu450 (L/L) 变体纯合的白化Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠 (Chrispell,2009),其通过育种获得。小鼠以12小时(光照)/12小时(黑暗)的周期饲养,并通过吸入CO<sub>2</sub>和随后发生的双侧气胸实施安乐死。

[0055] 重组AAV2/5和AAV2/8的质粒构建和产生

[0056] 如前所述,使用设计成包含整个RDH12编码区的引物通过PCR从人视网膜的cDNA中扩增人RDH12 cDNA,并对其进行克隆并测序以验证保真度 (Janecke等人,2004)。为了构建AAV载体,在亲本pAAV-hGRK1-hrGFP载体的多克隆位点中插入了RDH12 cDNA。将得到的pAAV-hGRK1-Rdh12载体包装入AAV。通过二分转染产生了AAV2/5和AAV2/8假型载体:(1)对所关注基因进行编码的AAV载体质粒,(2)对来自血清型2的AAV Rep蛋白和来自血清型5或血清型8的Cap蛋白以及进入293T细胞中的腺病毒辅助功能进行编码的AAV辅助质粒。转染和纯化使用公布的方案进行 (Nishiguchi等人,2015)。转染后两天,通过反复冷冻和解冻循环裂解细胞。在最初清除细胞碎片后,通过苯并酶处理去除病毒产生细胞的核酸成分。通过使用AVB基质的亲和层析对重组AAV载体颗粒进行了纯化,并在1x PBS中洗涤,并使用Vivaspin 4 (10kDa) 浓缩器浓缩至100-150ml的体积。通过qPCR扩增对载体进行了滴定。

[0057] 视网膜下注射

[0058] 通过腹膜内注射氯胺酮 (90mg/kg)/木聚糖啉 (9mg/kg) 将大约4周大的一组小鼠在全身麻醉下放置。将0.5%的丙胺卡因溶液应用于角膜作为局部麻醉剂。通过局部应用托吡卡胺 (0.5%) 扩张了瞳孔。在眼科手术显微镜下,用30号针头在角膜缘附近切开了一个小切口。将安装在Hamilton注射器上的34号钝针穿过晶状体后的切口,并穿过视网膜。所有注射都是在视网膜鼻象限内的视网膜下位置进行的。每只眼睛在接受高达 $2 \times 10^9$  vg AAV2/5-(hGRK1)-hRDH12,体积高达2 $\mu$ L。向接受处理的每只小鼠的一只眼睛分别施用了RDH12编码载体,并且未对对侧眼睛进行注射。注射后的眼底检查发现大多数情况下超过30%的视网膜脱离,证实视网膜下分娩成功。

[0059] 抗体

[0060] 所用的初级抗体是:对小鼠蛋白具有特异性的兔抗Rdh12多克隆抗体 (CSP) (针对252SPFFKSTSQGAQ263,SEQ ID NO:4),和对人蛋白具有特异性的小鼠抗RDH12单克隆抗体 (2C9) (针对C-284DCKRTWVSPRARNNKT299;SEQ ID NO:5) (Kurth等人,2007);小鼠抗RHO单克隆抗体 (1D4) (MacKenzie等人,1984);针对变性蛋白产生的兔抗RHO多克隆抗体;和兔抗红/绿视锥视蛋白多克隆抗体 (Millipore (密理博) 目录号AB5405)。

[0061] 免疫印迹分析

[0062] 用SDS-PAGE分离视网膜匀浆中的蛋白质,将其转移到硝酸纤维素膜上,然后将膜封闭,将蛋白质用初级抗体孵育过夜,洗涤,用碱性磷酸酶缀合的次级抗体孵育,并用5-溴-4-氯-3'-吡啶基磷酸对甲苯胺和硝基四氮唑鎓氯化物显影。

[0063] 组织学和免疫荧光

[0064] 小鼠被安乐死,对眼睛进行定向评分,然后去核。对于冷冻切片,去除晶状体和前段,用4%多聚甲醛短暂固定眼睛,用PBS洗涤,转换到蔗糖/OCT,快速冷冻,并在10 $\mu$ m的厚度下切片。对于冷冻替代制备,将整只眼睛在干冰冷却的异戊烷中快速冷冻30秒,然后转移到

含有3%冰醋酸的干冰冷却的甲醇中。将眼睛在80℃孵育48小时,然后在-20℃过夜,包埋在石蜡中,以6 $\mu$ m的厚度切片。将石蜡切片去石蜡化,在免疫标记前,通过在90℃下在1mM EDTA (0.05%吐温20, pH8.0) 孵育30分钟回收抗原,如下所述。简而言之,用PBS冲洗视网膜横截面,并用PBS-T(0.3%Triton X-100)渗透;用1%牛血清白蛋白、10%正常山羊血清和0.3% Triton X-100封闭;并与初级抗体在4℃孵育过夜,洗涤,然后与荧光团缀合的次级抗体在室温孵育1小时。使用含有4',6-二氨基-2-苯基吡啶 (DAPI; Invitrogen) 的ProLong Gold凝胶支架覆盖切片,并使用徕卡DM6000荧光显微镜成像。

#### [0065] ERG记录

[0066] 使用Espion e2记录系统(Diagnosys公司,洛厄尔,马萨诸塞州)如先前所述(Thompson, 2012年)进行ERG。简而言之,对小鼠进行了暗适应过夜,并通过腹膜内注射氯胺酮(93mg/kg)和齐拉西坦(8mg/kg)进行麻醉。用局部用托吡卡胺(0.5%)扩张了瞳孔。用加热垫将体温保持在37℃。使用金线环用0.5%丁卡因局部麻醉和2%甲基纤维素滴眼液进行角膜水化,从两只眼睛记录角膜ERG。放在口中的金线环用作参考,接地电极在尾部。ERG方案包括记录对短暂白光的暗适应(暗视)反应(对于视杆隔离的B波为 $-2.31 \log \text{ cd} \cdot \text{sm}^{-2}$ ;对于视杆-视锥组合的A波和B波为 $1.09 \log \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ )。响应 $1.09 \log \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ 强度闪光(针对视锥分离的B波),在适应白色 $32 \text{ cd} \cdot \text{m}^{-2}$ 视杆抑制背景10分钟后,记录光适应(明视)ERG。响应以1.25到1000Hz的1,000倍增益放大,并以2000Hz的速率数字化。使用陷波滤波器来消除60Hz线路噪声。根据刺激强度,以3秒到60秒的间隔对反应进行计算机平均和记录。为了进行统计分析,使用配对t检验来确定经处理眼和未处理眼的ERG振幅是否有显著差异。

#### [0067] 光致损伤分析

[0068] 在白化Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠的一只眼睛中注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12( $1.3 \times 10^9 \text{ vg}$ )或等体积的PBS,并且不对对侧眼睛进行注射。注射后6周,如上所述进行ERG分析并定量暗视反应。一周后,对小鼠进行了暗适应过夜,将其瞳孔用托吡卡胺(0.5%)扩张,然后将其放在单独的透明托盘中的灯箱中。将小鼠暴露于5,000勒克斯的环境中2小时,然后将其放回饲养室(12小时黑暗/12小时光照(<20勒克斯))中7天,之后重复进行ERG分析。计算每只眼睛在光损伤后剩余的原始ERG反应的百分比,绘制了平均值,并且显示出了标准误差。使用了双尾配对t检验来确定经过处理的眼睛的ERG振幅是否与未经处理的眼睛有显著差异。

#### [0069] 光学相干层析成像

[0070] 麻醉小鼠,并用0.5%托吡卡胺扩张了瞳孔。将光谱域光学相干断层扫描(OCT)系统(Bioptigen Envisu R2200 SD-OCT系统(达勒姆,北卡罗来纳州,美国))(体积分析尺寸为 $1.4 \times 1.4 \text{ mm}$ )置于视神经头的中心。在整个成像过程中使用了Systane (Alcon) 润滑液滴。

#### [0071] 类视黄醇含量分析

[0072] 使用先前描述的方法(Bligh和Dyer, 1959)的改进方法提取小鼠眼中的全反式视黄醛和11-顺式视黄醛。六周,对注射后的小鼠进行了暗适应过夜,然后在暗红色的光线下通过过量的CO<sub>2</sub>实施安乐死,并且将眼睛摘除并在液体N<sub>2</sub>中冷冻。在暗红光和冰上,将每只眼睛在1mL氯仿:甲醇:羟胺(2M) (3:6:1)中匀浆,并在室温下孵育2分钟。接下来,加入200 $\mu$ L氯仿和240 $\mu$ L水,将每个样品涡旋并以14,000rpm的速度离心5分钟。收集下层相,在氮气下蒸发溶剂,并将样品溶解在己烷中。使用Waters Alliance分离模块和光电二极管阵列检测器通过高效液相色谱(HPLC)分析来识别和定量提取物中的类维生素A,其中Supelcosil LC-

31色谱柱(25cm×4.6mm×3μm)通过5%1,4-二噁烷/己烷显影。通过比较标准化化合物的保留时间和评估波长最大值来进行峰识别。通过比较顺-和反-11-顺式视黄醛在347和351nm处的峰面积以及顺-和反-全反式视黄醛在357和361nm处的峰面积进行了定量分析(Kurth等人,2007)。

#### [0073] 视黄醛还原酶活性测定

[0074] 注射后6周,对小鼠视网膜匀浆的视黄醛还原酶活性进行了测定。对适应光的小鼠实施安乐死,并将每个视网膜分别在125μL 0.25M蔗糖、25mM三羟基甲甲烷醋酸盐(pH 7)、1mM二硫苏糖醇中匀浆。将匀浆液以1000×g离心5分钟以除去未破碎的细胞,然后将上清液用微尖端探针在冰上超声处理(30次,每次1秒)。通过修改Lowry程序(Peterson等,1977)确定了蛋白质浓度,并通过蛋白质印迹评估了RDH12的水平。将相似的样品合并,在含有200μM全反式视黄醛和200μM NADPH/HEPES缓冲液(pH 8)中对每种合并的裂解物的20μg(一式三份)进行了测定;将反应在37℃水浴中孵育0-45分钟(该反应温度使类视黄醇底物的热异构化以及酶失活最小化)。使用正相HPLC分析对全反式视黄醇的形成进行定量,并与已知标准进行比较(Chrispell等,2009)。

#### [0075] 实例1

#### [0076] AAV介导的人RDH12的表达

[0077] 开发并测试了用于RDH12替代疗法的多种载体。图2A中示出了最佳RDH12载体构建体。所述构建体包含受人视紫红质激酶(GRK1)启动子片段控制的人RDH12 cDNA。所述构建体包装在AAV2/5血清型中。已经证明AAV血清型5衣壳介导光感受器转导,但是与AAV8衣壳相比,具有较慢的动力学和较不稳定的表达(Yang等人,2002;Lotery等人,2003;Allocca等人,2007;Lebherz等人,2008)。在亚视网膜注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12( $1.3 \times 10^9$ vg)后6周,使用对小鼠RDH12或人Rdh12蛋白有特异性的抗体评估了小鼠视网膜中人RDH12蛋白的表达。类RDH12的载体递送的水平似乎与小鼠Rdh12的量大致相当(图2B)。使用物种特异性抗体通过对视网膜切片进行间接免疫荧光成像对天然小鼠Rdh12和重组人RDH12进行了评估。内源性和重组RDH12的定位似乎是相同的,表明蛋白质正在正常加工(图2C)。

[0078] 与野生型小鼠相比,Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠的视网膜减少外源性视黄醛的能力显著降低(Chrispell等人,2009)。视网膜下向Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠注射 $1.3 \times 10^9$ vg AAV2/5-hGRK1p.hRDH126周后,对视网膜匀浆的体外视黄醛还原酶活性进行了测定。用正相HPLC分析对全反式视黄醇的形成进行了定量。每个数据点代表至少5个独立实验的平均±标准误差,其中汇集3至5只小鼠的视网膜,并一式三份进行测定。未注射Rdh12<sup>-/-</sup>和C57BL/6J小鼠的视网膜中全反式视黄醇形成的初始速率分别为0.013pmol分钟<sup>-1</sup>μg蛋白<sup>-1</sup>和0.071pmol分钟<sup>-1</sup>μg蛋白<sup>-1</sup>(图3A)。Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠中存在的残留活性反映能够减少全反式视黄醛的其它RDH亚型的存在(Rattner等人,2000;Haeseleer等人,2002)。在注射了AAV2/5-hGRK1p.hRDH12的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠中,全反式视黄醇形成率(0.046pmol分钟<sup>-1</sup>μg蛋白<sup>-1</sup>)显著高于注射了PBS的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠的全反式视黄醇形成率(0.016pmol分钟<sup>-1</sup>μg蛋白<sup>-1</sup>)。视黄醛还原酶活性的恢复(约50%)与视网膜的部分转导(约30%)一致,并显示了载体在转导的光感受器中恢复了正常的活性水平。转基因表达超过12个月(检测到的最长时间点)。免疫荧光标记显示了在注射后16周评估的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠视网膜转导和重组RDH12表达的程度—覆盖了视网膜表面的大约三分之一(图3B)。

[0079] 在一只眼中注射了 $1.3 \times 10^9$ vg或等体积的PBS并且在对侧眼中没有接受处理的白化Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠中评估了AAV2/5-hGRK1p.hRDH12对光诱导损伤易感性的影响。暗视视网膜活性的ERG分析(视杆分离和组合视杆-视锥)在向小鼠施加在白化动物中引起显著的视网膜损伤的光照水平(5,000勒克斯持续2小时)之前1周和之后1周进行。载体处理的眼睛中剩余的视网膜活性百分比明显大于未处理的眼睛中剩余的视网膜活性百分比(p≤0.0168)(图4)。相反,在注射了PBS的对照动物中,未注射的眼睛中剩余的暗视视网膜活性的百分比并不显著大于未处理的眼睛的剩余暗视视网膜活性的百分比(p≥0.2255)。这些发现与针对与RDH12缺乏相关的光诱导损伤的易感性增加的AAV2/5-hGRK1p.hRDH12介导的保护作用相一致。

[0080] 通过人RDH12活性对类视黄醇代谢的直接影响对载体的毒性进行了评估,并且对于对视网膜结构和视网膜功能的间接影响,如下所述。

[0081] RDH12广泛的底物特异性使得11-顺式视网膜和全反式视网膜均减少,这为重组蛋白的过度表达或错误定位创造了可能性,从而对视觉循环功能产生负面影响。使用视黄醇含量的HPLC分析评估了注射了AAV2/5-hGRK1p.hRDH12的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠、或注射了PBS的小鼠、或未注射的C57BL/6J对照的眼睛中的视觉循环活性。在向Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠视网膜下注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12( $1.3 \times 10^9$ vg)后6周对类视黄醇的分析显示,hRDH12表达未对视网膜中稳定状态的11-顺式视黄醛水平产生显著影响(图5A)。代表性色谱图显示了各种对照,并且标明了各种类视黄醇的洗脱时间。11-顺式视黄醛和全反式视黄醛的总视黄醛水平代表至少5个独立实验的平均值±标准误差(图5B、5C)。在接受了 $1.3 \times 10^9$ vg的AAV2/5-hGRK1p.hRDH12并保持在饲养室中(12小时黑暗/12小时光照(<20勒克斯))的C57BL/6J和Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠中测量了视网膜活性的ERG反应。注射后6周测量的每个处理组中代表性动物的暗视(视杆分离-2.3logcd.s.m<sup>-2</sup>刺激)、组合视杆-视锥(1.09log cd.s.m<sup>-2</sup>刺激)和明视(视锥介导反应,1.09log cd.s.m<sup>-2</sup>刺激)ERG显示人RDH12表达对视网膜功能没有显著影响(图6)。

[0082] 视紫红质和视锥视蛋白的错误定位是光感受器细胞生存力下降的一个很好的表征指标(Adamian等人,2006;Turney等人,2007;Brunner等人,2010;Lopes等人,2010)。在未注射Rdh12<sup>-/-</sup>或注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12( $1.3 \times 10^9$ vg)的小鼠中评估了视紫红质和红/绿视蛋白的免疫组织化学定位。在表现出强转基因表达的小鼠中,在处理16周没有观察到视蛋白表达水平的降低或视锥视蛋白和视杆视蛋白定位错误的证据;注射后54周视网膜结构保持完整(图7)。

[0083] 在注射AAV2/5-hGRK1p.hRDH12( $2 \times 10^9$ vg)后54周,对C57BL/6J和Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠进行了光学相干断层扫描(OCT)分析,结果显示,在包含视神经两侧在内的大面积区域内,视网膜分层无明显变化。与未注射的对侧眼相比,注射后至少一年内视网膜结构是稳定的(图8)。

[0084] 实例2AAV2/8引起的视网膜损伤

[0085] 注射了AAV2/8-hGRK1p.hRDH12的小鼠的视网膜损伤。

[0086] 一种来源于AAV血清型8的衣壳已被证明能介导感光细胞的有效和强有力的转导(Allocca等人,2007;Natkunarajah等人,2008;Vandenberghe等人,2011;Vandenberghe等人,2013)。用携带上述载体构建体的AAV2/8血清型进行了初步研究。以 $10^8$ - $10^9$ 个病毒基因

组(vg)的剂量通过视网膜下注射AAV2/8-hGRK1p.hRDH12处理的Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠使得重组人RDH12蛋白稳健表达。然而,注射的眼睛在注射后3周就开始出现明显的视网膜损伤,并且在几乎所有情况下在注射后6周出现。通过CD68<sup>+</sup>细胞的存在在大多数情况下观察到了巨噬细胞浸润(图9)。从断奶到处死,向Rdh12<sup>-/-</sup>小鼠持续全身给药环孢菌素(Borel等人,1976)未能减轻视网膜损伤,这表明针对载体或转基因的免疫反应不是损伤的原因。这一观点与注射对人RDH12(AAV2/8-hGRK1p.hRDH12)或小鼠Rdh12(AAV2/8-hGRK1p.mRdh12)进行编码的构建体的野生型C57BL/6J小鼠所获得的结果一致,其中注射后6周也发生了显著的视网膜变薄和巨噬细胞浸润。

[0087] 参考文献

[0088] ADAMIAN M、PAWLYKBS、HONG DH、BERSON EL (2006) ,“视杆和视锥视蛋白在来自RPGR基因中具有Gly436Asp突变的X连锁视网膜色素变性的携带者的尸检眼睛中的错误定位(Rod and cone opsin mislocalization in an autopsy eye from a carrier of X-linked retinitis pigmentosa with a Gly436Asp mutation in the RPGR gene)”,《美国眼科学杂志(Am J Ophthalmol)》(142),515-8。

[0089] ACLAND GM、AGUIRRE GD、RAYJ、ZHANG Q等人(2001) ,“基因疗法恢复幼年失明犬模型的视力(Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness)”,《自然遗传(Nat Genet)》(28),92-5。

[0090] ALEXANDER JJ、UMINO Y、EVERHART D、CHANG B等人(2007) ,“色盲小鼠模型视锥视觉的恢复(Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia)”,《自然医学(Nat Med)》(13),685-7。

[0091] ALI RR、SARRAGM、STEPHENS C、ALWIS MD等(2000) ,“基因疗法对视网膜变性缓慢小鼠光感受器超微结构和功能的恢复(Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy)”,《自然遗传》(25),306-10。

[0092] ALLOCCA M、MUSSOLINO C、GARCIA-HOYOS M、SANGESD等人(2007) ,“新型腺相关病毒血清型有效转导鼠光感受器(Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors)”,《病毒学杂志(JVirol)》(81),11372-80。

[0093] BAIN BRIDGE JW、SMITH AJ、BARKER SS、ROBBIE S等人(2008) ,“基因疗法对莱伯氏先天性黑蒙患者视功能的影响(Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis)”,《新英格兰医学杂志(N Engl JMed)》(358),2231-9。

[0094] BELTRAN WA、CIDECIYANAV、LEWINAS、IWABE S等人(2012) ,“基因疗法挽救了狗的光感受器失明,并为治疗人类X连锁视网膜色素变性铺平了道路(Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa)”,《美国科学院院报(Proc Natl Acad Sci U S A)》(109),2132-7。

[0095] BEN-SHABAT S、PARISH CA、HASHIMOTO M、LIU J等人(2001) ,“视网膜色素上皮的荧光色素和年龄相关性黄斑变性(Fluorescent pigments of the retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration)”,《生物有机化学与医药化学通讯(Bioorg Med Chem Lett)》(11),1533-40。

[0096] BELYAEVA OV、KORKINAOV、STETSENKOAV、KIM T等人(2005) ,“纯化的人视黄醇脱氢

酶12 (RDH12) 的生化特性:对类视黄醇和C9醛的催化效率以及细胞视黄醇结合蛋白I型 (CRBPI) 和细胞视黄醇结合蛋白 (CRALBP) 对类视黄醇氧化和还原的影响 (Biochemical properties of purified human retinol dehydrogenase 12 (RDH12): catalytic efficiency toward retinoids and C9 aldehydes and effects of cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) and cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) on the oxidation and reduction of retinoids)”,《生物化学 (Biochemistry)》(44), 7035-47。

[0097] BLIGH EG、DYERWJ (1959), “一种快速提取和纯化总脂的方法 (A rapid method of total lipid extraction and purification)”,《生理学和生物化学杂志 (Can J Biochem Physiol)》(37), 911-7。

[0098] BOREL JF、FEURER C、GUBLER HU、STÄHELIN H (1976), “环孢素A的生物学效应:一种新的抗淋巴细胞制剂 (Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent)”,《药剂与作用 (Agents Actions)》(6), 468-75。

[0099] BRUNNER S、SKOSYRSKI S、KIRSCHNER-SCHWABE R、KNOBELOCH KP 等人 (2010), “由不同遗传背景引起的突变RpgR小鼠的视锥与视杆疾病 (Cone versus rod disease in a mutant RpgR mouse caused by different genetic backgrounds)”,《眼科研究与视光学 (Invest Ophthalmol Vis Sci)》, 51, 1106-15。

[0100] CARLSON NB、KURTZ D、HEATH DA、HINES C., 见:“眼科检查的临床程序 (Clinical Procedures for Ocular Examination)”,《Appleton & Lange (儿科学)》(第3版, Norwalk, CT); 1990: 63-77。

[0101] CHEN C、THOMPSON DA、KOUTALOS Y (2012), “脊椎动物视杆光感受器中全反式-视黄醛的减少需要RDH8和RDH12的联合作用 (Reduction of all-trans-retinal in vertebrate rod photoreceptors requires the combined action of RDH8 and RDH12)”,《生物化学杂志 (J Biol Chem)》, 287, 24662-70。

[0102] CHEN Y、OKANO K、MAEDA T、CHAUHAN V 等人 (2012), “全反式视黄醛毒性机制与斯特格氏病和年龄相关性黄斑变性的关系 (Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for Stargardt disease and age-related macular degeneration)”,《生物化学杂志》(287), 5059-69。

[0103] CHRISPELL JD、FEATHERS KL、KANE MA、KIM、CY 等人 (2009), “Rdh12活性及其对小鼠视网膜中类视黄醇加工的影响 (Rdh12 activity and effects on retinoid processing in the murine retina)”,《生物化学杂志》(284), 21468-77。

[0104] CIDECIYANAV、ALEMAN TS、BOYE SL、SCHWARTZ SB 等人 (2008), “RPE65异构酶缺乏症的人类基因疗法激活类视黄醇的视觉循环,但具有缓慢的视杆动力学 (Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics)”,《美国科学院院报》(105), 15112-7。

[0105] DEN HOLLANDER AI、ROEPMAN R、KOENENKOOOP RK、CREMERS FP (2008), “莱伯氏先天性黑蒙:基因机制、蛋白质机制和疾病机制 (Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms)”,《视网膜与眼科研究进展 (Prog Retin Eye Res)》(27), 391-419。

[0106] FLOTTE TR、SOLOW R、OWENS RA、AFIONE S等人(1992)，“腺相关病毒载体在气道上皮细胞中的基因表达(Gene expression from adeno-associated virus vectors in airway epithelial cells)”，《美国呼吸系统细胞和分子生物学杂志(Am J Respir Cell Mol Biol)》(7)，349-56。

[0107] FLOTTE TR、AFIONE SA、SOLOW R、DRUMM ML等人(1993)，“新型腺相关病毒启动子中的囊性纤维化跨膜传导调节因子的表达(Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter)”，《生物化学杂志》(268)，3781-90。

[0108] HAESELEER F、JANG GF、IMANISHI Y、DRIESSEN CA等人(2002)，“脊椎动物视网膜的双底物特异性短链视黄醇脱氢酶(Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina)”，《J Biol Chem》(277)，45537-46。

[0109] HERMONAT PL、MUZYCZKA N(1984)，“将腺相关病毒用作哺乳动物DNA克隆载体：将新霉素抗性转导到哺乳动物组织培养细胞中(Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector:transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells)”，《美国科学院学报》(81)，6466-70。

[0110] JANECKEAR、THOMPSON DA、UTERMANN G、BECKER C等人(2004)，“对感光细胞视黄醇脱氢酶进行编码的RDH12突变导致儿童期发作的严重视网膜营养不良(Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy)”，《自然遗传》(36)，850-854。

[0111] JOHNSON DD，《耳聋和视力病症：解剖学和生理学、评估程序、眼部异常和教育意义(Deafness and Vision Disorders:Anatomy and Physiology,Assessment Procedures, Ocular Anomalies,and Educational Implications)》，查尔斯·托马斯出版社(Charles C.Thomas Publisher)；1999。

[0112] KELLER B、ADAMSKI J(2007)，“RDH12——一种可导致莱伯氏先天性黑蒙的视黄醇脱氢酶——也参与类固醇代谢(RDH12,a retinol dehydrogenase causing Leber's congenital amaurosis,is also involved in steroid metabolism)”，《类固醇生化学与分子生物学杂志(J Steroid BiochemMol Biol)》(104)，190-4。

[0113] KHANI SC、PAWLYKBS、BULGAKOV OV、KASPEREK E等人(2007)，“AAV介导的人视紫红质激酶启动子靶向视杆和视锥光感受器的表达(AAV-mediated expression targeting of rod and cone photoreceptors with a human rhodopsin kinase promoter)”，《眼科研究与视光学》(48)，3954-61。

[0114] KOENEKOOP RK(2004)，“莱伯氏先天性黑蒙症概述：了解人类视网膜发育的模型(An overview of Leber congenital amaurosis:a model to understand human retinal development.)”，《眼科调查(Surv Ophthalmol)》(49)，379-98。

[0115] KOMAROMY AM、ALEXANDER JJ、ROWLAN JS、GARCIA MM等人(2010)，“基因疗法挽救先天性色盲的视锥功能(Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia)”，《人类分子遗传学(Hum Mol Genet)》(19)，2581-93。

[0116] KUMARAN N、MOOREAT、WELEBERRG、MICHAELIDES M(2017)，“莱伯氏先天性黑蒙/早发性严重视网膜营养不良：临床特征、分子遗传学和治疗干预(Leber congenital



amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy:clinical features,molecular genetics andtherapeutic interventions)”,《英国眼科学杂志(Br J Ophthalmol)》(101),1147-1154。

[0117] KURTH I、THOMPSON DA、RÜTHER K、FEATHERS KL等人(2007)，“鼠视网膜脱氢酶基因Rdh12的靶向破坏并不限制视觉循环功能(Targeted disruption of the murine retinal dehydrogenase gene Rdh12 does not limit visual cycle function)”,《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》(27),1370-9。

[0118] LEBHERZ C、MAGUIREA、TANG W、BENNETT J等人(2008)，“用于改善眼部基因转移的新型AAV血清型(NovelAAV serotypes for improved ocular gene transfer)”,《基因医学杂志(J Gene Med)》(10),375-82。

[0119] LEE SA、BELYAEVAOV、KEDISHVILI NY(2008)，“脂质过氧化产物对人视黄醇脱氢酶12(RDH12)活性和类视黄醇代谢的影响(Effect of lipid peroxidation products on the activity of human retinol dehydrogenase 12(RDH12) and retinoid metabolism)”,《生物化学与生物物理学报(Biochim BiophysActa)》(1782),421-5。

[0120] LHERITEAU E、LIBEAU L、STIEGERK、DESCHAMPS JY等人(2009)，“RPGRIP 1缺陷犬——一种有希望的基因疗法模型(The RPGRIP 1-deficient dog, a promising canine model for gene therapy)”,《分子视界(Mol Vis)》(15),349-61。

[0121] LOPES VS、JIMENO D、KHANOBDEE K、SONG X等人(2010)，“视杆细胞异三聚体驱动蛋白-2的功能障碍和视蛋白定位错误在细胞快速死亡中的作用(Dysfunction of heterotrimeric kinesin-2 in rod photoreceptor cells and the role of opsin mislocalization in rapid cell death)”,《分子细胞生物学(Mol Biol Cell)》(21),4076-88。

[0122] LOTERYAJ、YANG GS、MULLINS RF、RUSSELL SR等人(2003)，“腺相关病毒5型:灵长类视网膜的转导效率和细胞类型特异性(Adeno-associated virus type 5:transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina)”,《人类基因治疗(Hum Gene Ther)》(14),1663-71。

[0123] MACKAY DS、DEV BORMAN A、MORADIP、HENDERSON RH等人(2011)，“RDH12视网膜病:新型突变和表型描述(RDH12 retinopathy: novel mutations and phenotypic description)”,《分子视界(Mol Vis)》(17),2706-16。

[0124] MAEDA A、MAEDA T、IMANISHI Y、SUN W等人，“视黄醇脱氢酶(RDH12)保护光感受器免受光诱导的小鼠变性(Retinol dehydrogenase(RDH12) protects photoreceptors from light-induced degeneration in mice)”,《生物化学杂志》(281),37697-704。

[0125] MAGUIREAM、SIMONELLI F、PIERCE EA、PUGH EN、JR等人(2008)，“基因转移治疗莱伯氏先天性黑蒙症的安全性和有效性(Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis)”,《新英格兰医学杂志》(358),2240-8。

[0126] MARCHETTE LD、THOMPSON DA、KRAVTSOVAM、NGANSOP TN等人(2010)，“视黄醇脱氢酶12对感光细胞中的4-羟基壬烯醛解毒(Retinol dehydrogenase 12 detoxifies 4-hydroxynonenal in photoreceptor cells)”,《自由基生物学与医学(Free Radic Biol Med)》(48),16-25。

- [0127] MCLAUGHLIN SK、COLLIS P、HERMONAT PL、MUZYCZKAN (1988)，“腺相关病毒通用转导载体：前病毒结构分析 (Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures)”，《病毒学杂志》(62)，1963-73。
- [0128] MACKENZIE D、ARENDT A、HARGRAVE P、MCDOWELL JH等人 (1984)，“利用合成肽定位羧基末端特异性抗视紫红质单克隆抗体的结合位点 (Localization of binding sites for carboxyl terminal specific anti-rhodopsin monoclonal antibodies using synthetic peptides)”，《生物化学 (Biochemistry)》(23)，6544-9。
- [0129] MACLAREN RE、GROPPE M、BARNARD AR、COTTRILL CL等人 (2014)，“视网膜基因疗法用于治疗脉络膜患者：1/2期临床试验的初步发现 (Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial)”，《柳叶刀 (Lancet)》(383)，1129-37。
- [0130] MUZYCZKA N (1992)，“将腺相关病毒用作哺乳动物细胞通用转导载体 (Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells)”，《微生物学和免疫学当前论题 (Curr Top Microbiol Immunol)》(158)，97-129。
- [0131] NATKUNARAJAH M、TRITTIBACH P、MCINTOSH J、DURAN Y等人 (2008)，“使用单链和自互补重组腺相关病毒血清型 2/8 评估眼部转导 (Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8)”，《基因疗法 (Gene Ther)》(15)，463-7。
- [0132] NISHIGUCHI KM、CARVALHO LS、RIZZI M、POWELL K等人 (2015)，“基因疗法在去除 Gpr179 中的混杂突变后恢复 rd1 小鼠的视力 (Gene therapy restores vision in rd1 mice after removal of a confounding mutation in Gpr179)”，《自然通讯 (Nat Commun)》(6)，6006。
- PANG JJ、LEI L、DAI X、SHI W 等人 (2012)，“AAV 介导的基因疗法在小鼠隐性视网膜变性模型中的应用 (AAV-mediated gene therapy in mouse models of recessive retinal degeneration)”，《现代分子医学 (Curr Mol Med)》(12)，316-30。
- [0133] PAWLYK BS、SMITHAJ、BUCH PK、ADAMIAN M 等人 (2005)，“基因替代疗法挽救了缺少 RPGRIP 的莱伯氏先天性黑蒙小鼠模型中的光感受器变性 (Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP)”，《眼科研究与视光学》(46)，3039-45。
- [0134] PAWLYK BS、BULGAKOV OV、LIU X、XU X 等人 (2010)，“使用人 RPGRIP1 序列的替代基因疗法减缓莱伯氏先天性黑蒙鼠模型中的光感受器变性 (Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis)”，《人类基因治疗》(21)，993-1004。
- [0135] PERRAULT I、HANEIN S、GERBER S、BARBET F 等人 (2004)，“莱伯氏先天性黑蒙的视网膜脱氢酶 12 (RDH12) 突变 (Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis)”，《美国人类遗传学杂志 (Am J Hum Genet)》(75)，639-46。
- [0136] PETERSON GL (1977)，“Lowry 等人的蛋白质测定方法的简化方法—该方法更普遍适用 (A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable)”，《分析生物化学 (Anal Biochem)》(83)，346-56。
- [0137] RATTNER A、SMALLWOOD PM、NATHANS J (2000)，“将全反式视黄醛还原为全反式视

黄醇的视觉循环酶—光感受器外段全反式视黄醇脱氢酶的识别和表征 (Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol)”,《生物化学杂志》(275), 11034-43。

[0138] SAMULSKI RJ、CHANG LS、SHENKT(1989),“重组腺相关病毒的无辅助储备:正常整合不需要病毒基因表达 (Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses:normal integration does not require viral gene expression)”,《病毒学杂志》(63), 3822-8。

[0139] SCHUSTER A、JANECKEAR、WILKE R、SCHMID E等人(2007),“RDH12突变人群中早发性视网膜变性的表型(The phenotype of early-onset retinal degeneration in persons with RDH12 mutations)”,《眼科研究与视光学》(48), 1824-31。

[0140] SPARROW JR(2010),“RPE脂褐素的双视黄醇:年龄相关性黄斑变性中补体激活的触发因素(Bisretinoids of RPE lipofuscin:trigger for complement activation in age-related macular degeneration)”,《实验医学与生物学进展(Adv Exp Med Biol)》(703), 63-74。

[0141] SUN X、PAWLYKB、XU X、LIU X等人(2010),“使用以视杆细胞和视锥细胞为靶点的启动子进行的基因疗法挽救由AIPL1突变引起的视网膜变性 (Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations)”,《基因疗法》(17), 117-31。

[0142] TAN MH、SMITH AJ、PAWLYK B、XU X等人(2009),“针对AIPL1缺陷引起的视网膜色素变性和莱伯氏先天性黑蒙的基因疗法:使用AAV2/2和AAV2/8载体有效挽救部分和完全Aipl1缺陷的小鼠模型 (Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1:effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors)”,《人类分子遗传学(Hum Mol Genet.)》。

[0143] THOMPSON DA、GALA(2003),“视网膜色素上皮的维生素A代谢:基因、突变和疾病 (Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium:genes,mutations,and diseases)”,《视网膜与眼科研究进展(Prog Retin Eye Res)》(22), 683-703。

[0144] THOMPSON DA、JANECKEAR、LANGE J、FEATHERS KL等人(2005),“与RDH12突变相关的视网膜变性是由于视觉周期中断导致的11-顺式视黄醛合成减少造成的 (Retinal degeneration associated with RDH12 mutations results from decreased 11-cis retinal synthesis due to disruption of the visual cycle)”,《人类分子遗传学(Hum Mol Genet)》(14), 3865-75。

[0145] THOMPSON DA、KHAN NW、OTHMAN MI、CHANG B等人(2012),“Rd9是一种由RPGR-ORF15突变引起的常见视网膜色素变性的天然小鼠模型 (Rd9 is a naturally occurring mouse model of a common form of retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR-ORF15)”,《PLoS One(美国科学公共图书馆)》(7), e35865。

[0146] TRATSCHIN JD、WEST MH、SANDBANKT、CARTERBJ(1984a),“一种人细小病毒,腺相关病毒,作为真核载体:氯霉素乙酰转移酶原核基因的瞬时表达和包被 (A human parvovirus,

adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase)”, 《分子细胞生物学》(4), 2072-81。

[0147] TRATSCHIN JD、MILLER IL、CARTER BJ(1984b), “腺相关病毒的遗传分析: 体外构建的缺失突变体的特性和腺相关病毒复制功能的证据 (Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function)”, 《病毒学杂志》(51), 611-9。

[0148] TRATSCHIN JD、MILLER IL、SMITH MG、CARTER BJ(1985), “用于哺乳动物细胞中基因的高频整合、表达和拯救的腺相关病毒载体 (Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells)”, 《分子细胞生物学》(5), 3251-60。

[0149] TURNEY C、CHONG NH、ALEXANDER RA、HOGG CR 等人 (2007), “小型长毛腊肠犬视锥-视杆营养不良的病理和电生理特征 (Pathological and electrophysiological features of a canine cone-rod dystrophy in the miniature longhaired dachshund)”, 《眼科研究与视光学》(48), 4240-9。

[0150] VANDENBERGHE LH、BELL P、MAGUIRE AM、CEARLEY CN 等人 (2011), “AAV2 和 AAV8 光感受器基因疗法用于猴的剂量阈值 (Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey)”, 《科学·转化医学 (Sci Transl Med)》(3), 88ra54。

[0151] VANDENBERGHE LH、BELL P、MAGUIRE AM、XIAO R 等人 (2013), “AAV9 靶向非人灵长类动物视网膜中的视锥光感受器 (AAV9 targets cone photoreceptors in the nonhuman primate retina)”, 《美国科学公共图书馆 (PLoS One)》(8), e53463。

[0152] XIAO X、LI J、SAMULSKI RJ(1998), “在没有辅助腺病毒的情况下产生高滴度重组腺相关病毒载体 (Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus)”, 《J Virol》(72), 2224-32。

[0153] YANG GS、SCHMIDT M、YAN Z、LINDBLOOM JD 等人 (2002), “腺相关病毒介导的小鼠视网膜转导: 病毒衣壳和基因组大小的影响 (Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size)”, 《病毒学杂志》(76), 7651-60。

[0154] YOUNG JE、VOGT T、GROSS KW、KHANI SC(2003), “人视紫红质激酶基因上游的一个短的高活性光感受器特异性增强子/启动子区 (A short, highly active photoreceptor-specific enhancer/promoter region upstream of the human rhodopsin kinase gene)”, 《眼科研究与视光学》(44), 4076-85。

[0155] WELEBER RG、FRANCIS PJ、TRZUPEK KM、BEATTIE C(2004), “莱伯氏先天性黑蒙 (Leber Congenital Amaurosis)”, 见 [互联网]: 《基因评论 (GeneReviews)》(PAGON RA、ADAM MP、ARDINGER HH、WALLACE SE 等人), 西雅图 (WA): 华盛顿大学, 西雅图; 1993-2017。[更新于2013年5月2日]。

[0156] WONDISFORD FE、USALA SJ、DECHERNEY GS、CASTREN M 等人 (1988), “人促甲状腺素

$\beta$ 亚基基因的克隆及基因转染后生物活性人促甲状腺素的瞬时表达 (Cloning of the human thyrotropin beta-subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection)”,《分子内分泌学 (Mol Endocrinol)》(2), 32-9。

[0157] 本文引用的每一篇参考文献在此通过全文或相关部分引入并入本文,这从引用的上下文中是显而易见的。

[0158] 应当理解,虽然已经结合其详细描述描述了所要求保护的主体,但是前面的描述旨在说明而不是限制所要求保护的主体范围,所要求保护的主体范围由所附权利要求的范围限定。其它方面、优点和修改都在以下权利要求的范围内。

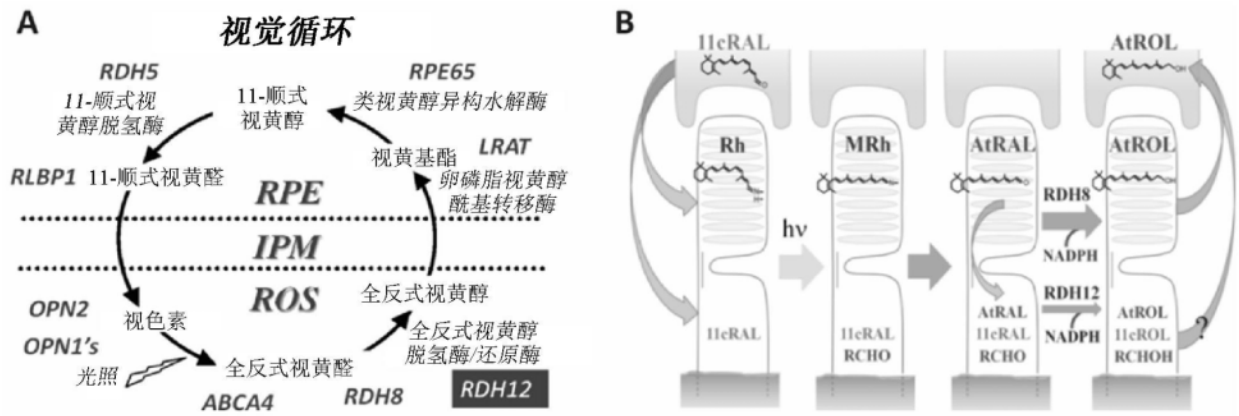


图1

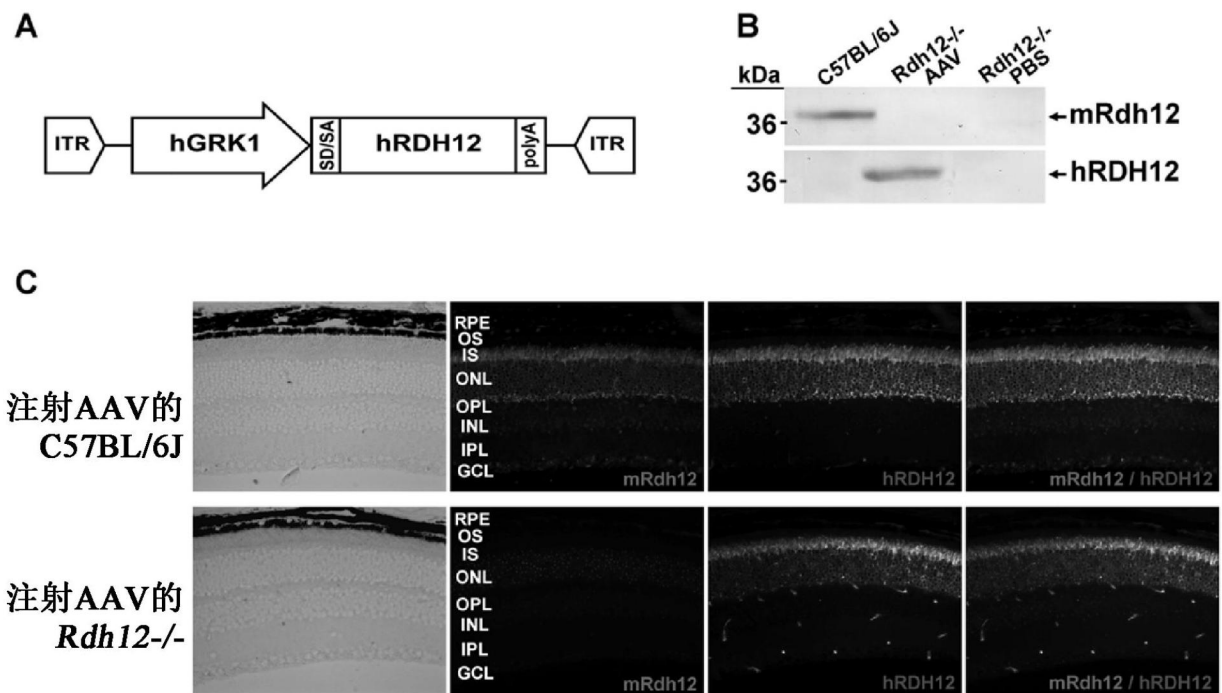


图2

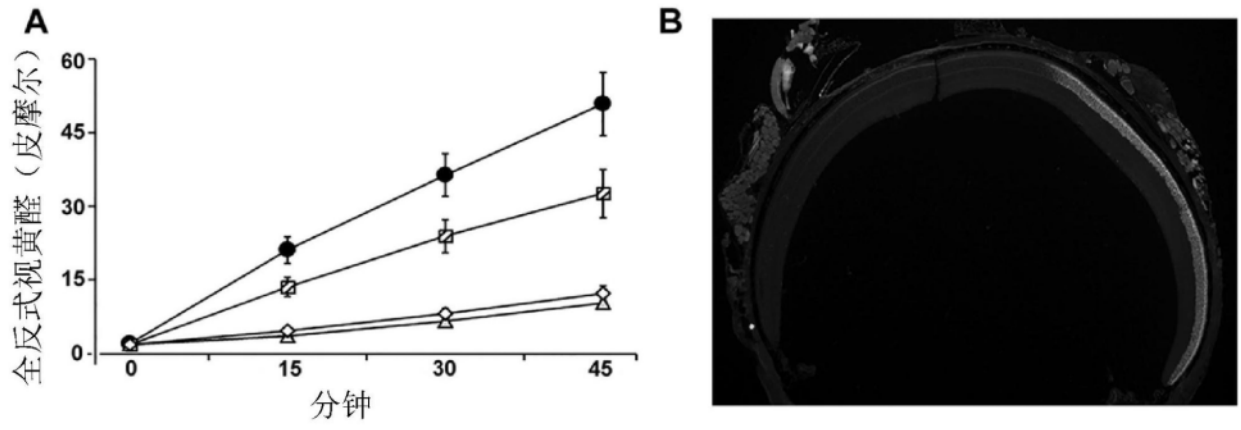


图3

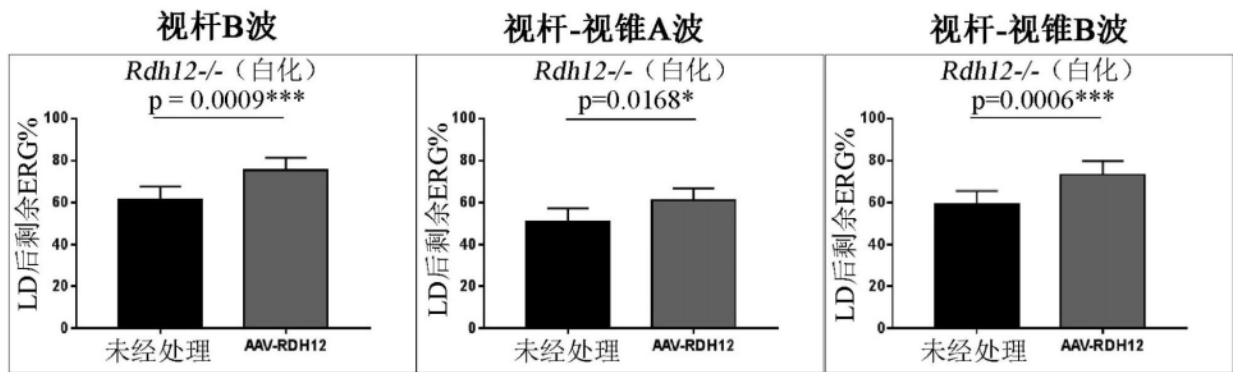


图4

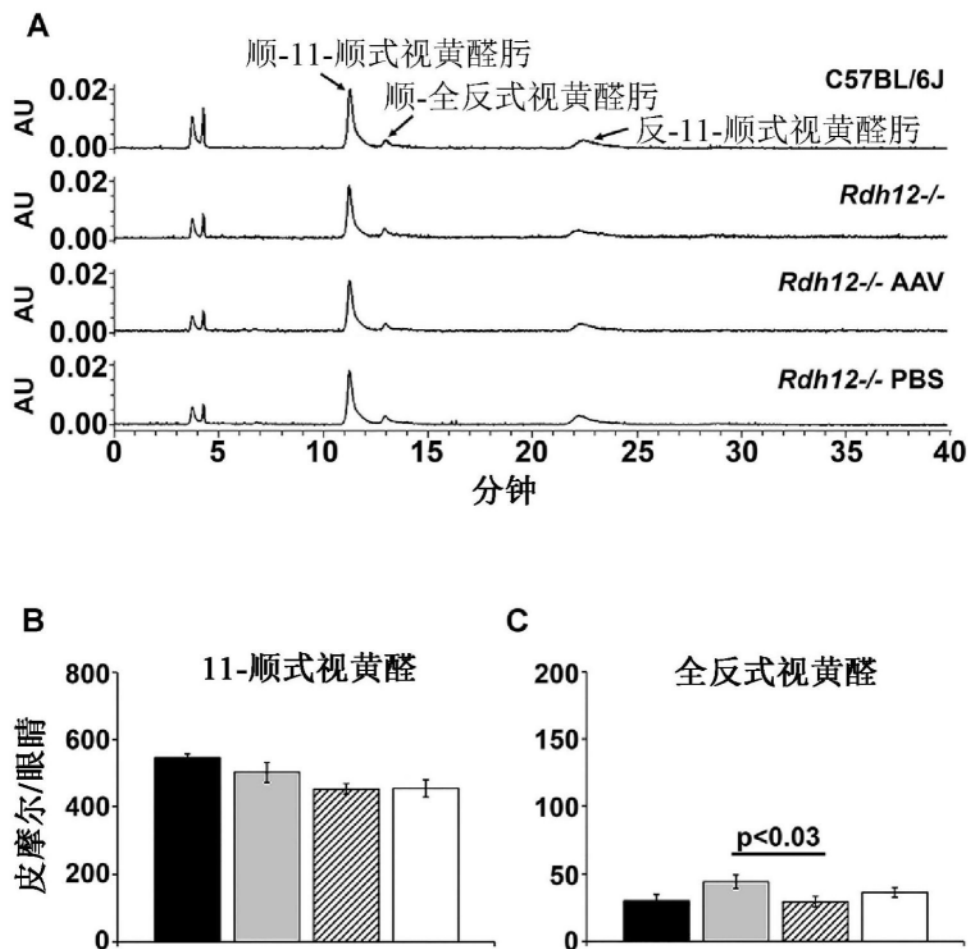


图5

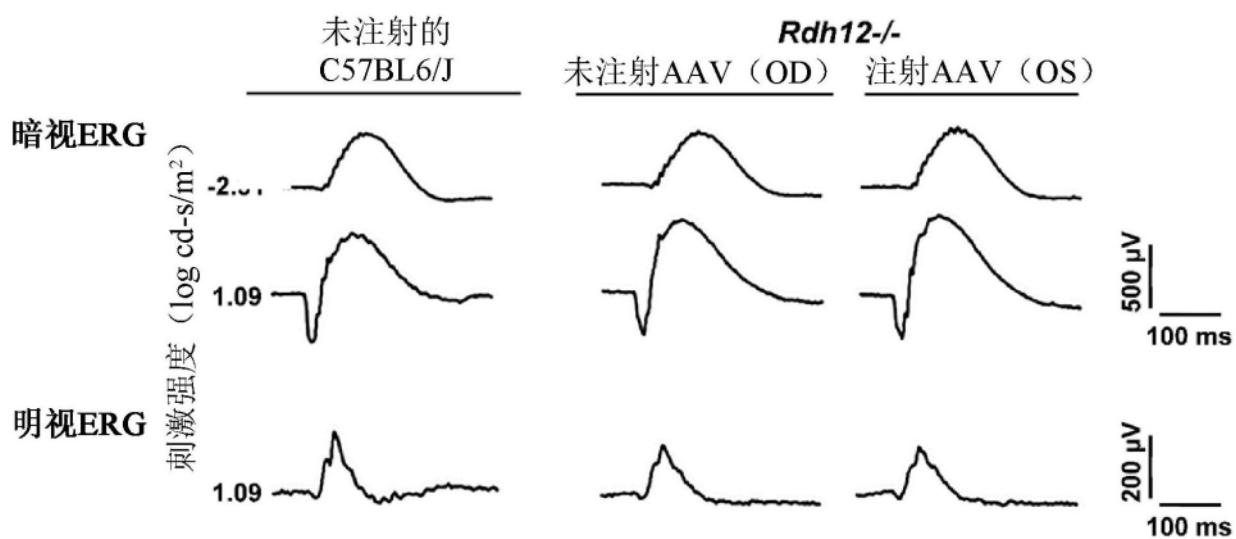


图6



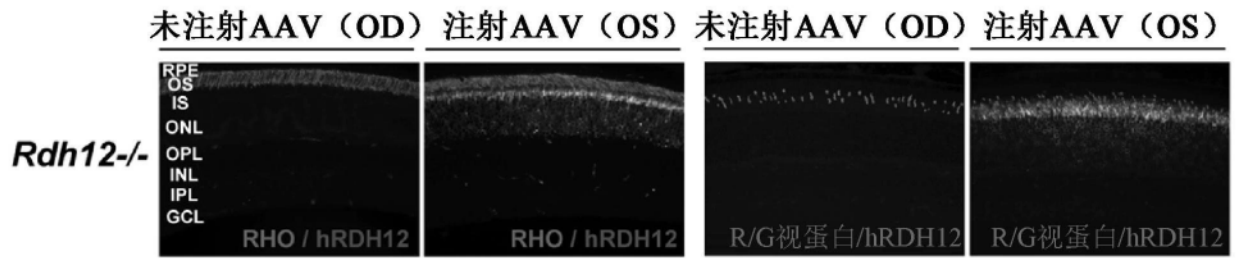


图7

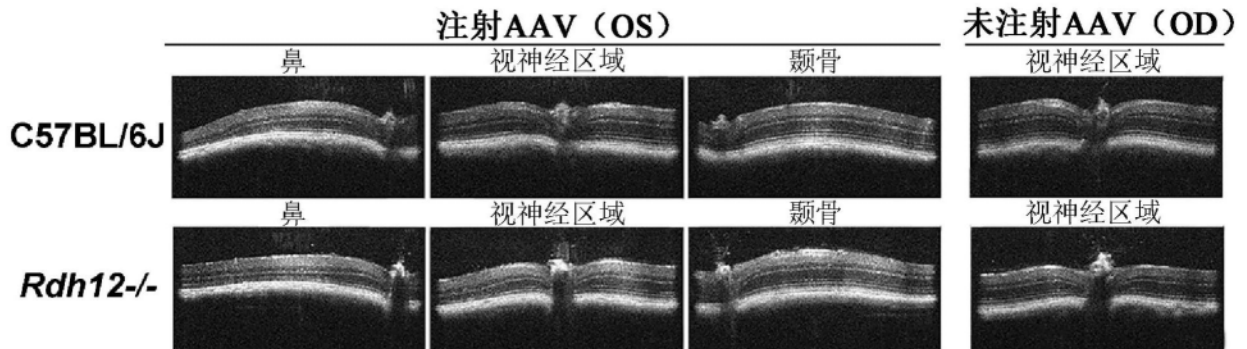
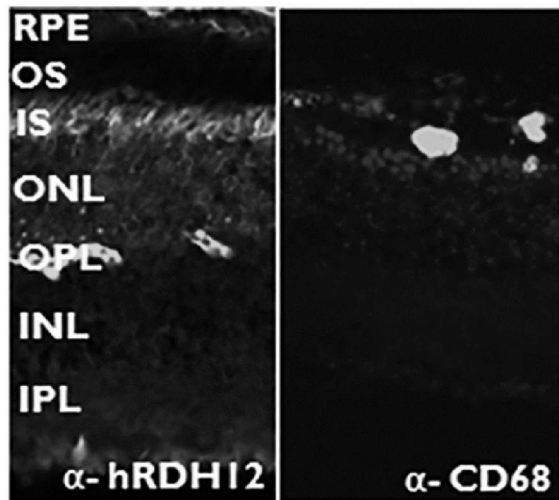


图8

A

注射AAV的*Rdh12*<sup>-/-</sup>

B

注射AAV的C57BL/6J

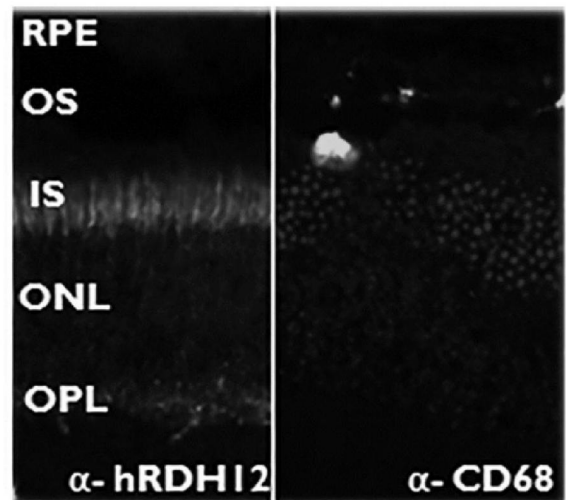


图9