(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119979612 A
(43)申请公布日 2025.05.13

(21)申请号 202410173021.7
(22)申请日 2017.08.29
(30)优先权数据
62/380,871 2016.08.29 US
(62)分案原申请数据
201780060143.3 2017.08.29
(71)申请人 韦恩州立大学
地址 美国密歇根州
(72)发明人 Z-H·潘
(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 陶家蓉 杨昀
(51)Int.Cl.
C12N 15/861(2006.01)
C07K 14/405(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 38/16(2006.01)
A61P 27/10(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
C12N 5/079(2010.01)

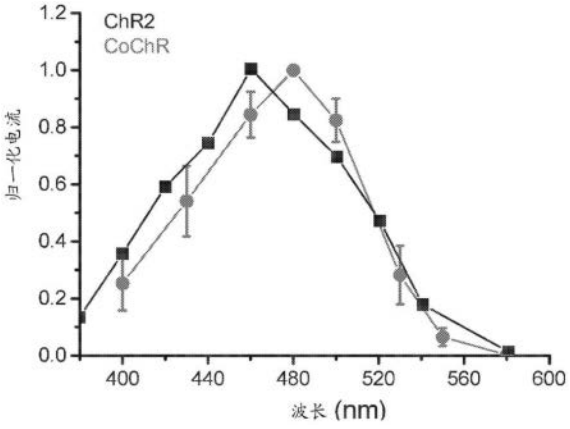
权利要求书2页 说明书28页
序列表（电子公布） 附图10页

(54)发明名称

在具有改善光敏感性的通道视蛋白变体中突变的识别及其使用方法

(57)摘要

本发明提供包含编码突变体CoChop蛋白的至少一种核酸或多肽分子的组合物和试剂盒。本发明的方法包括向受试者施用包含突变体CoChop的组合物以保护、改善或恢复光转导。优选地，向患有视觉受损的受试者提供本发明的组合物和方法，从而使视力恢复至正常水平。



CN 119979612 A

1.一种腺相关病毒(AAV)或重组腺相关病毒(rAAV)表达载体,其包含与启动子序列可操作连接的转基因,其中所述转基因编码一种光活化离子通道多肽,其包含与SEQ ID NO:8、9或10任一具有大于90%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其在对应于SEQ ID NO:2的112的位置包含半胱氨酸,且在对应于SEQ ID NO:2的139的位置包含半胱氨酸或在对应于SEQ ID NO:2的94的位点位置谷氨酸盐(酯),其中所述光活化离子通道多肽当在细胞膜上表达并与活化光接触时具有以下至少一种:与SEQ ID NO:2的光活化离子通道多肽相比更大水平的离子流和更大水平的质子流。

2.如权利要求1所述的AAV或rAAV表达载体,其中所述转基因还包含在对应于SEQ ID NO:2的264位的位置的苏氨酸。

3.如权利要求1或2所述的AAV或rAAV表达载体,其中所述转基因编码光活化离子通道多肽,所述离子通道多肽包含SEQ ID NO:8、9或10中任一项的氨基酸序列,或与其具有大于95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

4.一种重组腺相关病毒(rAAV)表达载体,其包含与启动子序列可操作连接的转基因,其中所述转基因编码光活化离子通道多肽,所述光活化离子通道多肽包含SEQ ID NO:8、9或10中任一项的氨基酸序列。

5.权利要求3所述的AAV或rAAV表达载体,其中所述转基因编码包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的光活化离子通道多肽。

6.一种重组腺相关病毒(rAAV),其包含与启动子序列可操作连接的转基因,其中所述转基因编码光活化离子通道多肽,所述光活化离子通路多肽包含SEQ ID NO:8、9或10中任一项的氨基酸序列。

7.权利要求1-5中任一项的AAV或rAAV表达载体,或权利要求6的rAAV,其中所述AAV或rAAV表达载体或rAAV是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或AAV12表达载体或病毒。

8.权利要求1-5中任一项所述的AAV或rAAV表达载体,或权利要求6的rAAV,其中所述AAV或rAAV表达载体或rAAV是AAV2表达载体或病毒。

9.权利要求1-5任一项所述的AAV或rAAV表达载体,或权利要求6-8任一项所述的rAAV,其中所述启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子、Rous肉瘤病毒(RSV)启动子,MMT启动子、EF-1α启动子、UB6启动子、鸡β-肌动蛋白启动子、CAG启动子、RPE65启动子或视蛋白启动子。

10.一种药物组合物,其包含权利要求1-5和7-9中任一项所述的AAV或rAAV表达载体。

11.一种药物组合物,其包含权利要求6-9中任一项所述的rAAV。

12.权利要求1-5和7-9中任一项所述的AAV或rAAV表达载体或权利要求10或11的药物组合物在制备用于改善或恢复罹患疾病或病状的受试者的视力的药物,所述疾病或病状选自损伤、脑损伤、脊髓损伤、癫痫、代谢紊乱、心脏功能障碍、视觉丧失、失明、耳聋、听力损失或神经学病状。

13.权利要求1-5和7-9中任一项的AAV或rAAV表达载体或权利要求10或11的药物组合物在制备用于改善或恢复视力的药物中的用途。

14.如权利要求12或13所述的用途,其中所述改善或恢复视力包括以下任何一项:增加光敏感度,降低引发光电流所需的阈值光强度;以及增加视觉皮质中的视觉诱发电位。

15.权利要求1-5和7-9中任一项的AAV或rAAV表达载体或权利要求10或11的药物组合

物在制备用于治疗眼部疾病的药物中的用途。

16.如权利要求15所述的用途,其中所述眼部疾病是视网膜色素变性或年龄相关性黄斑变性。

17.权利要求1-5和7-9中任一项的AAV或rAAV表达载体或权利要求10或11的药物组合物在制备用于治疗色素性视网膜炎或年龄相关性黄斑变性的药物中的用途。

18.如权利要求12-17中任一项的用途,其中所述AAV或rAAV表达载体或所述药物组合物适于通过玻璃体内或视网膜下注射给予。

在具有改善光敏感性的通道视蛋白变体中突变的识别及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.119(c)要求2016年8月29日提交的美国临时申请序列号62/380,871的优先权,该申请的内容通过引用以其整体结合在本文中。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明根据国立卫生研究院/国立眼科研究院授权号NIH EY 17130在美国政府支持下完成。美国政府对本发明具有一定的权利。

[0005] 以电子方式提交的文本文件的描述

[0006] 与本文一起以电子方式提交的文本文件的内容通过引用整体结合在本文中:序列表的计算机可读形式副本(文件名:RTRO-707/001WO_SeqList_ST25.txt,记录日期,2017年8月29日),文件大小24kb。

技术领域

[0007] 本发明涉及分子生物学领域。鉴别通道视蛋白变体基因(CoChop)中的突变。在治疗方法中使用包含突变体CoChop基因的组合物。例如,包含突变体CoChop基因的组合物改善并恢复视力丧失。

发明背景

[0009] 视网膜由光感受器(或光感受器细胞、视杆细胞和视锥细胞)组成。光感受器是高度专业化的神经元,其负责光转导或将光转换(呈电磁辐射形式)成在视觉系统内传播一系列事件的电信号和化学信号,最终生成我们世界的景象。

[0010] 光感受器损失或退化严重影响(如果不是完全抑制的话)视网膜内视觉信息的光转导。光感受器细胞的损失和/或光感受器细胞功能的损失为视敏度减弱、光敏性减弱和失明的主要原因。在本领域长期需要使经历视力丧失的受试者的视网膜的光敏性恢复的组合物和方法。

发明内容

[0011] 本发明提供一种分离的光活化离子通道多肽,该多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2和一种或多种氨基酸修饰。本文所公开的CoChR突变体(例如,突变体CoChop)的优点为这些突变体多肽需要的光少于用于活化的野生型CoChR(SEQ ID NO:2)。因此,在相同光强度下,在突变体CoChR多肽中比在野生型中观察到更大离子流和/或质子流水平。在一些实施方案中,当在细胞膜中表达并与活化光接触时,光活化离子通道多肽具有以下中的至少一种:与光活化离子通道多肽SEQ ID NO:2相比更大离子流水平和更大质子流水平(例如,超过活化阈值)。光活化离子通道多肽具有SEQ ID NO:3-10中任一种的氨基酸序列。任选地,多肽进一步包含一个或多个氨基酸修饰,诸如取代、缺失或插入。

[0012] 在另一方面,本发明提供一种分离的核酸分子,该核酸分子编码本发明的多肽。任

选地,核酸序列可操作地连接至启动子序列。本发明还包括含有根据本发明的核酸的载体。

[0013] 本发明还包括含有根据本发明的多肽或核酸的细胞。该细胞例如是光感受器、双极细胞、视杆双极细胞、ON型视锥双极细胞、视网膜神经节细胞、光敏感性视网膜神经节细胞、水平细胞、无长突细胞或AII型无长突细胞。该细胞为体外、离体或体内的。

[0014] 在其他方面,本发明提供一种改变膜的传导性的方法,该方法通过在宿主膜中表达本发明的多肽并将该多肽与光在适合条件下接触,以改变宿主膜的传导性。宿主膜为细胞膜,诸如神经元细胞、神经系统细胞、心肌细胞、循环细胞、视觉系统细胞或听觉系统细胞的细胞膜。

[0015] 在另一方面,本发明提供治疗受试者中的疾病或病状的方法,这些方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的核酸或多肽。该疾病或病状例如是损伤、脑损伤、脊髓损伤、癫痫、代谢性病症、心脏功能障碍、视觉丧失、失明、耳聋、听力损失或神经学病状。

[0016] 在另一方面,本发明涉及一种改善或恢复视力的方法,该方法通过向受试者施用根据本发明的核酸或多肽。该受试者罹患眼部疾病诸如黄斑变性或色素性视网膜炎。

[0017] 改善或恢复视力包括例如增加光敏感性;降低引发光电流所需的阈值光强度;增加视觉皮质中的视觉诱发电位;以及降低阈值光强度以引发视觉引导行为,诸如视动反应。

[0018] 在另一方面,本发明提供治疗色素性视网膜炎或年龄相关性黄斑变性的方法,这些方法包括向有需要的受试者施用根据本发明的核酸或多肽。该组合物通过玻璃体内或视网膜下注射而施用。

[0019] 本发明的其他特征和优点根据以下详细描述和权利要求书将是清楚的并且由该详细描述和权利要求书所涵盖。

附图说明

[0020] 图1:HEK细胞记录中CoChR和ChR2的光谱曲线比较。CoChR的峰值光谱是~480nm,该光谱比ChR2的光谱略微更红移。

[0021] 图2:CoChR和ChR2的光诱发电流在HEK细胞记录中的样品记录。A-D为wt-ChR2(A)及其三种突变体ChR2-L132C(B)、ChR2-L132C/T159C(C)和ChR2-L132C/T159C(D)的光诱发电流。使用中性密度(ND)滤波器以ND=0、2.5、3.0以及4.0通过递增光强度诱发电流。红色迹线由460nm的光以2.5中性密度(ND)($4.1x10^{15}$个光子/cm^2s)引发。E和F为wt-CoChR(E)及其突变体CoChR-L112C(F)的光诱发电流。红色迹线由480nm的光以2.5中性密度(ND)($4.8x10^{15}$个光子/cm^2s)引发。

[0022] 图3:wt-CoChR及其光更敏感突变体CoChR-L112C(SEQ ID NO:3)、CoChR-T139C(SEQ ID NO:5)、CoChR-L112C/T139C(SEQ ID NO:8)、CoChR-T145A/S146A(SEQ ID NO:6)、CoChR-L112C/H94E(SEQ ID NO:9)、以及CoChR-L112C/H94E/K264T(SEQ ID NO:10)在HEK细胞记录中的电流幅度比较。电流由480nm的光以ND=2.5($4.8x10^{15}$个光子/cm^2s)诱发,并且将其归一化至wt-CoChR。数据被示出为平均值±SD。

[0023] 图4:wt-CoChR及其更光敏感突变体CoChR-L112C、CoChR-T139C、CoChR-L112C/T139C、CoChR-T145A/S146A、CoChR-L112C/H94E、以及CoChR-L112C/H94E/K264T在HEK细胞记录中的衰变时间常数(解离速率)的比较。由10ms的光脉冲以ND=0($1.2x10^{18}$个光子/

cm^2s)诱发电流。数据被示出为平均值±SD。

[0024] 图5:wt-CoChR及其更光敏感突变体CoChR-L112C、CoChR-L112C/T139C、CoChR-L112C/H94E以及CoChR-L112C/H94E/K264T在HEK细胞记录中的光诱发电流幅度与衰变时间常数(或解离速率)之间的关系。

[0025] 图6:ChR2-L132C/T159C、wt-CoChR和CoChR-L112C在视网膜神经节细胞中的光敏感性与多电极阵列记录的比较。光强度以中性密度(ND)和光子数/cm^2s示出。

[0026] 图7:用于比较ChR2-L132C/T159S与CoChR-L112C病毒载体注射小鼠之间恢复的视动反应的光敏感性的视动行为测试。诱发ChR2-L132C/T159S和CoChR-L112C的视动反应所需的光谱频率与阈值光强度的关系。使用盲小鼠品系进行实验。在国产视动测定系统中进行视动测试。通过具有波长~470nm的蓝色LED生成光刺激。诱发CoChR-L112C表达小鼠的视动反应的阈值光强度为大约$2-3x10^{13}$个光子/cm^2s,并且诱发ChR2-L132C/T159S表达小鼠的视动反应的阈值光强度为大约$1-2x10^{14}$个光子/cm^2s。数据被示出为平均值±SD。

[0027] 图8:基于视动行为测试的CoChR-L112C病毒载体注射小鼠的对比敏感度曲线。使用盲小鼠品系进行实验。在视动系统(OptoMotry;CerebralMechanics,Lethbridge,AB,Canada)中进行视动测试。平台内的照度为~150勒克斯。数据被示出为平均值±SD。

[0028] 图9:wt-CoChR和CoChR-L112C在通过AAV载体递送介导的视网膜神经元中的长期稳定表达。A和B,荧光图像显示在病毒注射之后一个月wt-CoChR及其突变体CoChR-L112C在C57BL/6J小鼠的视网膜神经节细胞中的表达。C和D,荧光图像显示在病毒注射之后六个月wt-CoChR及其突变体CoChR-L112C在rd1小鼠的视网膜神经节细胞中的表达。E-G,荧光图像显示在病毒注射之后九个月CoChR-L112C在盲小鼠品系的视网膜中的表达,以低分辨率(E)和高分辨率(F)在全组织标本包埋中查看并且在视网膜垂直切片(G)中查看。

具体实施方式

[0029] 本发明部分基于以下意外发现:来自绿藻、Chloromonas oogama、CoChop的通道视蛋白变体中的突变导致光敏感性增加。根据本发明的CoChop突变体氨基酸和核酸序列在本文中称为mCoChop。野生型CoChop描述于例如WO2015/161308中,该专利的内容通过引用整体结合。根据本发明的mCoChop氨基酸和核酸序列适用于其中需要活化离子通道的任何应用。

[0030] 在具体实施方案中,本发明涉及用于治疗视网膜变性疾病,诸如色素性视网膜炎或年龄相关性黄斑变性的组合物和方法。另外,还通过本发明的方法治疗为视网膜变性疾病的直接结果的其他疾病和病症。例如,晚期色素性视网膜炎和其他视网膜变性病状导致黄斑变性。

[0031] 通道视蛋白变体CoChop首先通过重新测序127海藻转录物组来鉴别。通过合成并筛选HEK293细胞中的光电流来鉴别CoChop。(参见WO2015/161308以及Klapoetke等人.Nature Methods第11卷,第3期2014,这些文献各自的内容通过引用整体并入。)

[0032] 如本文所提及,“CoChop”是指编码通道视蛋白的基因,该通道视蛋白一旦结合至视网膜就形成通道视紫红质(CoChR)。本发明的基因构建体主要是指CoChop(即,不具有视黄醛),并且本文所公开的全部CoChop突变体(mCoChop)形成功能通道视紫红质(ChR)。本文所公开的方法可包括将mCoChop递送至具有或不具有外源视黄醛的细胞。应理解当在细胞

(即,视网膜神经元)中表达mCoChop时,内源性可用视黄醛结合至本发明的mCoChop蛋白以形成功能性光门控通道。这样,如本文所提及的Chop蛋白也可以是与ChR同义的。

[0033] 以下序列提供野生型CoChop突变体CoChop蛋白以及编码本发明的所述WT和突变体Chop蛋白并形成本发明的WT和突变体ChR的多核苷酸的非限制性实例。

[0034]

野生型 CoChR 核酸序列(SEQ ID NO:1)
ATGCTGGGAAACGGCAGCGCCATTGTGCCTATCGACCAGTGCTTTTGCCTGGCTTGGACCGACAGCC TGGGAAGCGATACAGAGCAGCTGGTGGCCAACATCCTCCAGTGGTTCGCCTTCGGCTTCAGCATCCT GATCCTGATGTTCTACGCCTACCAGACTTGGAGAGCCACTTGCGGTTGGGAGGAGGTCTACGTCTGT TGCGTCGAGCTGACCAAGGTCATCATCGAGTTCTTCCACGAGTTCGACGACCCCAGCATGCTGTACC TGGCTAACGGACACCGAGTCCAGTGGCTGAGATACGCAGAGTGGCTGCTGACTTGTCCCGTCATCCT GATCCACCTGAGCAACCTGACAGGCCTGAAGGACGACTACAGCAAGCGGACCATGAGGCTGCTGGTG

[0035]

TCAGACGTGGGAACCATCGTGTGGGGAGCTACAAGCGCCATGAGCACAGGCTACGTCAAGGTCATCT TCTTCGTGCTGGGTTGCATCTACGGCGCCAACACCTTCTTCCACGCCGCCAAGGTGTATATCGAGAG CTACCACGTGGTGCCAAAGGGCAGACCTAGAACCGTCGTGCGGATCATGGCTTGGCTGTTCTTCCTG TCTTGGGGCATGTTCCCCGTGCTGTTCGTCGTGGGACCAGAAGGATTCGACGCCATCAGCGTGTACG GCTCTACCATTGGCCACACCATCATCGACCTCATGAGCAAGAATTGTTGGGGCCTGCTGGGACACTA TCTGAGAGTGCTGATCCACCAGCACATCATCATCTACGGCGACATCCGCAAGAAGACCAAGATCAAC GTGGCCGGCGAGGAGATGGAAGTGGAGACCATGGTGGACCAGGAGGACGAGGAGACAGTG

[0036]

野生型 CoChR 氨基酸序列(SEQ ID NO:2)
MLGNGSAIVPIDQCFCLAWTDSLGSDTEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQTWRATCGWEEVYVC CVELTKVIIEFFHEFDDPSMLYLANGHRVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLV SDVGTIVWGATSAMSTGYVKVIFFVLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFL SWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIIYGDIRKKTKIN VAGEEMEVETMVDQEDEETV

[0037]

突变体 CoChR 氨基酸序列(SEQ ID NO:3) L112C
MLGNGSAIVPIDQCFCLAWTDSLGSDTEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQTWRATCGWEEVYVC CVELTKVIIEFFHEFDDPSMLYLANGHRVQWLRYAEWLLTCPVI**C**IHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLV SDVGTIVWGATSAMSTGYVKVIFFVLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFL SWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIIYGDIRKKTKIN VAGEEMEVETMVDQEDEETV

[0038]

突变体 CoChR 氨基酸序列(SEQ ID NO:4) C68S/V69I
MLGNGSAIVPIDQCFCLAWTDSLGSDTEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQTWRATCGWEEVYVC **SI**ELTKVIIEFFHEFDDPSMLYLANGHRVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLV SDVGTIVWGATSAMSTGYVKVIFFVLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFL SWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIIYGDIRKKTKIN VAGEEMEVETMVDQEDEETV

[0039]

突变体 CoChR 氨基酸序列(SEQ ID NO:5) T139C
MLGNGSAIVPIDQCFCLAWTDSLGSDTEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQTWRATCGWEEVYVC CVELTKVIIEFFHEFDDPSMLYLANGHRVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLV SDVG**C**IVWGATSAMSTGYVKVIFFVLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFL SWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIIYGDIRKKTKIN VAGEEMEVETMVDQEDEETV

[0040]

突变体CoChR氨基酸序列(SEQ ID NO:6) T145A/S146A
MLGNGSAIVPIDQCFCLAWTDSLGSDTEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQTWRATCGWEEVYVC CVELTKVIIEFFHEFDDPSMLYLANGHRVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLV SDVGTIVWGA**AA**AMSTGYVKVIFFVLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFL SWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIIYGDIRKKTKIN VAGEEMEVETMVDQEDEETV

[0041]

突变体CoChR氨基酸序列(SEQ ID NO:7) C68T/V69L
MLGNGSAIVPIDQCFCLAWTDSLGSDTEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQTWRATCGWEEVYVC **TL**ELTKVIIEFFHEFDDPSMLYLANGHRVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLV SDVGTIVWGATSAMSTGYVKVIFFVLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFL SWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIIYGDIRKKTKIN VAGEEMEVETMVDQEDEETV

[0042]

突变体CoChR氨基酸序列(SEQ ID NO:8) L112C/T139C
MLGNGSAIVPIDQCFCLAWTDSLGSDTEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQTWRATCGW EEVYVCCVELTKVIIEFFHEFDDPSMLYLANGHRVQWLRYAEWLLTCPVICIHLSNLTGLKD DYSKRTMRLLVSDVGCIVWGATSAMSTGYVKVIFFVLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVP KGRPRTVVRIMAWLFFLSWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGH YLRVLIHQHIIIYGDIRKKTKINVAGEEMEVETMVDQEDEETV

[0043]

突变体CoChR氨基酸序列(SEQ ID NO:9) L112C/H94E
MLGNGSAIVPIDQCFCLAWTDSLGSDTEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQTWRATCGW EEVYVCCVELTKVIIEFFHEFDDPSMLYLANGERVQWLRYAEWLLTCPVICIHLSNLTGLKD DYSKRTMRLLVSDVGTIVWGATSAMSTGYVKVIFFVLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVP KGRPRTVVRIMAWLFFLSWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGH YLRVLIHQHIIIYGDIRKKTKINVAGEEMEVETMVDQEDEETV

[0044]

突变体CoChR氨基酸序列(SEQ ID NO:10) L112C/H94E/K264T
MLGNGSAIVPIDQCFCLAWTDSLGSDTEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQTWRATCGW EEVYVCCVELTKVIIEFFHEFDDPSMLYLANGERVQWLRYAEWLLTCPVICIHLSNLTGLKD DYSKRTMRLLVSDVGTIVWGATSAMSTGYVKVIFFVLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVP KGRPRTVVRIMAWLFFLSWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGH YLRVLIHQHIIIYGDIRKTTKINVAGEEMEVETMVDQEDEETV

[0045] 本发明还涵盖CoChop蛋白和编码CoChop的生物活性片段或保守性氨基酸取代或其他突变的变体的核酸。野生型CoChop的更小片段也可适用于本发明中,在该片段中至少一个氨基酸被突变或保守性取代。在其他实施方案中,本发明的CoChop多肽和核酸可以多至或约275个氨基酸长度、250个氨基酸长度225个氨基酸长度200个氨基酸长度175个氨基酸长度或160个氨基酸长度。

[0046] 在一些实施方案中,本公开提供本文所公开的一种或多种CoChop多肽的衍生物、变体或突变体。在一些实施方案中,该衍生物、变体或突变体与天然多肽的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2)相比含有一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,取代一至20个氨基酸。在一些实施方案中,该衍生物、变体或突变体与天然治疗性肽药剂的氨基酸序列相比含有约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、或约10个氨基酸取代。在一些实施方案中,该衍生物、变体或突变体与天然多肽的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2)相比含有一个或多个氨基酸缺失。在一些实施方案中,与天然多肽的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2)相比,缺失一至20个氨基酸。在一些实施方案中,该衍生物、变体或突变体与天然多肽的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2)相比具有约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、或约10个氨基酸缺失。在一些实施方案中,与天然多肽的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2)相比,在任一端处缺

失一至十个氨基酸。在一些实施方案中,与天然多肽的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2)相比,在两端处缺失一至十个氨基酸。在一些实施方案中,该衍生物、变体或突变体的氨基酸序列与天然多肽的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2)至少约70%一致。在一些实施方案中,该衍生物、变体或突变体的氨基酸序列与天然多肽的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2)约70%、约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、或约99%一致。

[0047] 本发明的突变体CoChop蛋白也证明较慢的通道动力学。发现较高光敏感性与较低通道动力学相关,这指示光敏感性与通道动力学之间的权衡。可形成本发明的ChR蛋白的mCoChop蛋白也可包含可改善通道动力学或增加失活速率的额外突变或修饰。特别优选的CoChop突变体平衡了光敏感性的阈值与通道动力学。

[0048] 例如,本发明的突变体ChR蛋白通过延长通道打开状态来实现更大的光敏感性。因此,每个突变体ChR通道当通过相同光强度活化时传导比野生型ChR通道更大的光电流。因此,突变体通道通过低于野生型ChR通道的活化所需的那些强度的光强度来活化。数量上,表达突变体ChR蛋白的视网膜神经节细胞的可检测波峰活性可通过光强度引发,该光强度比由表达野生型ChR的视网膜神经节细胞引发波峰活性所需的光强度低1.5-2log个单位。因此,活化突变体ChR蛋白所需的光强度接近于或落入正常户外照明条件下。

[0049] 核酸、载体和重组病毒

[0050] 在本发明的一些方面,本公开的组合物和方法提供编码mCoChop(突变体CoChop)至有需要的受试者或患者中的细胞中的递送。在一些情况下,核酸的递送可称为基因疗法。

[0051] 本公开的组合物和方法提供用于递送mCoChop核酸的任何适合方法。在一些情况下,核酸的递送可使用任何适合“载体”(有时也称为“基因递送”或“基因转移”媒介物)执行。载体、递送媒介物、基因递送媒介物或基因转移媒介物可能是指任何适合的大分子或包含递送至靶细胞的多核苷酸的分子的复合物。在一些情况下,靶细胞可以是递送核酸或基因的任何细胞。待递送的多核苷酸可以包含基因疗法中感兴趣的编码序列,诸如mCoChop基因。

[0052] 例如,适合载体可包括但不限于病毒载体诸如腺病毒、腺相关病毒(AAV)和逆转录病毒、脂质体、其他含脂质复合物、以及能够介导多核苷酸至靶细胞的递送的其他大分子复合物。

[0053] 在一些情况下,载体可以是有机或无机分子。在一些情况下,载体可以是小分子(即<5kD)或大分子(即>5kD)。例如,载体可包括但不限于惰性非生物活性分子,诸如金属颗粒。在一些情况下,载体可以是金颗粒。

[0054] 在一些方面,载体可以包含结合一个或多个核酸的重组病毒载体。如本文所述,核酸可以是指多核苷酸。核酸和多核苷酸可以互换使用。在一些情况下,核酸可以包含DNA或RNA。在一些方面,核酸可包括用于表达mCoChop的DNA或RNA。在一些方面,RNA核酸可以包括但不限于感兴趣基因的转录物(例如mCoChop)、内含子、非翻译区域、终止序列等。在其他情况下,DNA核酸可包括但不限于以下序列,诸如杂合启动子基因序列、强组成型启动子序列、感兴趣基因(例如mCoChop)、非翻译区、终止序列等。在一些情况下,可以使用DNA和RNA的组合。

[0055] 如本文中的公开内容所述,术语“表达构建体”意指包括含有编码基因产物的核酸或多核苷酸的任何类型的遗传构建体,其中核酸编码序列的一部分或全部能够被转录。转

录物可以翻译成蛋白质。在一些方面,其可部分翻译或不翻译。在某些方面,表达包括基因的转录和mRNA到基因产物的翻译。在其他方面,表达仅包括编码感兴趣基因的核酸的转录。

[0056] 在一个方面,本公开提供一种重组病毒,诸如腺相关病毒(rAAV)作为载体以介导mCoChop的表达。

[0057] 在一些情况下,本公开的病毒载体可被测量为pfu(空斑形成单位)。在一些情况下,本公开的组合物和方法的重组病毒或病毒载体的pfu可以是约10^8至约$5x10^{10}$pfu。在一些情况下,本公开的重组病毒为至少约$1x10^8$、$2x10^8$、$3x10^8$、$4x10^8$、$5x10^8$、$6x10^8$、$7x10^8$、$8x10^8$、$9x10^8$、$1x10^9$、$2x10^9$、$3x10^9$、$4x10^9$、$5x10^9$、$6x10^9$、$7x10^9$、$8x10^9$、$9x10^9$、$1x10^{10}$、$2x10^{10}$、$3x10^{10}$、$4x10^{10}$、以及$5x10^{10}$pfu。在一些情况下,本公开的重组病毒为至多约$1x10^8$、$2x10^8$、$3x10^8$、$4x10^8$、$5x10^8$、$6x10^8$、$7x10^8$、$8x10^8$、$9x10^8$、$1x10^9$、$2x10^9$、$3x10^9$、$4x10^9$、$5x10^9$、$6x10^9$、$7x10^9$、$8x10^9$、$9x10^9$、$1x10^{10}$、$2x10^{10}$、$3x10^{10}$、$4x10^{10}$、以及$5x10^{10}$pfu。

[0058] 在一些情况下,本公开的病毒载体可被测量为载体基因组。在一些情况下,本公开的重组病毒是$1x10^{10}$至$3x10^{12}$个载体基因组。在一些情况下,本公开的重组病毒是$1x10^9$至$3x10^{13}$个载体基因组。在一些情况下,本公开的重组病毒是$1x10^8$至$3x10^{14}$个载体基因组。在一些情况下,本公开的重组病毒为至少约$1x10^1$、$1x10^2$、$1x10^3$、$1x10^4$、$1x10^5$、$1x10^6$、$1x10^7$、$1x10^8$、$1x10^9$、$1x10^{10}$、$1x10^{11}$、$1x10^{12}$、$1x10^{13}$、$1x10^{14}$、$1x10^{15}$、$1x10^{16}$、$1x10^{17}$、以及$1x10^{18}$个载体基因组。

[0059] 在一些情况下,本公开的病毒载体可被测量为感染复数(MOI)。在一些情况下,MOI可以是指载体或病毒基因组与可递送核酸的细胞的比率或复数。在某些情况下,MOI可以是$1x10^6$。在某些情况下,MOI可以是$1x10^5$-$1x10^7$。在某些情况下,MOI可以是$1x10^4$-$1x10^8$。在一些情况下,本公开的重组病毒为至少约$1x10^1$、$1x10^2$、$1x10^3$、$1x10^4$、$1x10^5$、$1x10^6$、$1x10^7$、$1x10^8$、$1x10^9$、$1x10^{10}$、$1x10^{11}$、$1x10^{12}$、$1x10^{13}$、$1x10^{14}$、$1x10^{15}$、$1x10^{16}$、$1x10^{17}$、以及$1x10^{18}$MOI。在一些情况下,本公开的重组病毒是$1x10^8$至$3x10^{14}$MOI。

[0060] 在一些方面,核酸可以在不使用病毒(即,使用非病毒载体)的情况下递送,并且可以测量为核酸的数量。通常,任何适合量的核酸可以用于本公开的组合物和方法中。在一些情况下,核酸可以是至少约1pg、10pg、100pg、1pg、10pg、100pg、200pg、300pg、400pg、500pg、600pg、700pg、800pg、900pg、1μg、10μg、100μg、200μg、300μg、400μg、500μg、600μg、700μg、800μg、900μg、1ng、10ng、100ng、200ng、300ng、400ng、500ng、600ng、700ng、800ng、900ng、1mg、10mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg1g、2g、3g、4g、或5g。在一些情况下,核酸可以是至多约1pg、10pg、100pg、1pg、10pg、100pg、200pg、300pg、400pg、500pg、600pg、700pg、800pg、900pg、1μg、10μg、100μg、200μg、300μg、400μg、500μg、600μg、700μg、800μg、900μg、1ng、10ng、100ng、200ng、300ng、400ng、500ng、600ng、700ng、800ng、900ng、1mg、10mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg1g、2g、3g、4g、或5g。在一些方面,可以使用自身互补载体(sc)。使用自身互补AAV载体可以绕开对病毒第二链DNA合成的需要并且可导致更大的转基因蛋白表达率,如由Wu,Hum Gene Ther.2007,18(2):171-82所提供的,该文献通过引用结合在本文中。

[0061] 本公开的组合物和方法提供任何适合的病毒核酸递送系统,包括但不限于使用以下至少一种:腺相关病毒(AAV)、腺病毒、辅助依赖性腺病毒、逆转录病毒、单纯性疱疹病毒、慢病毒、痘病毒、日本脂质体(HVJ)复合物的血凝病毒、莫洛尼鼠白血病病毒以及基于HIV的

病毒。优选地,病毒载体包含可操作连接至多核苷酸的强真核启动子。

[0062] 通常,任何适合病毒载体可以被工程化以优化用于本公开的组合物和方法中。例如,可以使用源自腺病毒(Ad)或腺相关病毒(AAV)的病毒载体。可以使用人类和非人类病毒载体并且可以改变重组病毒载体,使得其可能在人类中有复制缺陷。当载体是腺病毒时,载体可包含具有可操作连接至编码mCoChop蛋白的基因的启动子的多核苷酸并且在人类中有复制缺陷。

[0063] 为了将两种病毒载体系统的有利特性组合,杂合病毒载体可以用于将编码mCoChop蛋白的核酸递送至靶细胞或组织。用于构建杂合载体的标准技术为本领域技术人员所熟知的。此类技术可见于例如Sambrook等人,In Molecular Cloning:Alaboratory manual.Cold Spring Harbor,N.Y.或讨论重组DNA技术的任何数目的实验室手册。含有AAV和腺病毒ITR的组合的腺病毒衣壳中的双链AAV基因组可以用于转导细胞。在另一个变型中,AAV载体可以置于“无病毒基因”、“辅助依赖性”或“高容量”腺病毒载体中。腺病毒/AAV杂合载体讨论于Lieber等人,J.Virol.73:9314-9324,1999。逆转录病毒/腺病毒杂合载体讨论于Zheng等人,Nature Biotechnol.18:176-186,2000。

[0064] 腺病毒内所含有的逆转录病毒基因组可以整合在靶细胞基因组内并且实现稳定的基因表达。

[0065] 复制缺陷型重组腺病毒载体可以根据已知的技术产生。参见Quantin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:2581-2584(1992);Stratford-Perricadet等人,J.Clin.Invest.,90:626-630(1992)以及Rosenfeld等人,Cell,68:143-155(1992)。

[0066] 另外优选的载体可包括但不限于病毒载体、融合蛋白和化学缀合物。逆转录病毒载体包括莫洛尼鼠白血病病毒和基于HIV的病毒。在一些情况下,可以使用基于HIV的病毒载体,其中该基于HIV的病毒载体包含至少两种载体,其中gag和pol基因来自HIV基因组并且env基因来自另一种病毒。可以使用DNA病毒载体。这些载体包括痘病毒载体,诸如天花或禽痘病毒载体,疱疹病毒载体,诸如单纯性疱疹I病毒(HSV)载体[Geller,A.I.等人,J.Neurochem,64:487(1995);Lim,F.等人,in DNA Cloning:Mammalian Systems,D.Glover,Ed.(Oxford Univ.Press,Oxford England)(1995);Geller,A.I.等人,Proc Natl.Acad.Sci.:U.S.A.:907603(1993);Geller,A.I.等人,Proc Nat1.Acad.Sci.USA:87:1149(1990)],腺病毒载体[LeGal LaSalle等人,Science,259:988(1993);Davidson等人,Nat.Genet.3:219(1993);Yang等人,J.Virol.69:2004(1995)],以及腺相关病毒载体[Kaplitt,M.G.等人,Nat.Genet.8:148(1994)],这些文献通过引用结合在本文中。

[0067] 可以根据本公开使用的其他病毒载体包括基于单纯性疱疹病毒(HSV)的载体。缺失一个或多个即时早期基因(IE)的HSV载体是有利的,因为它们通常是无细胞毒性,以类似于靶细胞中的潜伏的状态持续,并且提供有效的靶细胞转导。重组HSV载体可结合大约30kb异源核酸。

[0068] 在本公开中还可以使用逆转录病毒,诸如C型逆转录病毒和慢病毒。例如,逆转录病毒载体可以是基于鼠白血病病毒(MLV),如通过Hu和Pathak,Pharmacol.Rev.52:493511,2000和Fong等人,Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.17:1-60,2000提供的,这些文献通过引用结合在本文中。基于MLV的载体可以含有多至8kb异源(治疗性)DNA代替病毒基因。可以使用另外的逆转录病毒载体,包括但不限于基于复制缺陷型慢病毒的载体,包括基于人

类免疫缺陷病毒(HIV)的载体,如通过Vigna和Naldini,J.Gene Med.5:308-316,2000以及Miyoshi等人,J.Virol.72:8150-8157,1998提供的,这些文献通过引用结合在本文中。慢病毒载体的有利之处可在于,它们能够感染活动分裂细胞和非分裂细胞。它们还可以高度有效于转导人类上皮细胞。

[0069] 用于本公开中的慢病毒载体可以源自人类和非人类(包括SIV)慢病毒。慢病毒载体的实例包括载体传播所需的核酸序列以及可操作连接至mCoChop基因的组织特异性启动子。核酸序列可包括病毒LTR、引物结合位点、多嘌呤序列、att位点以及衣壳化位点。

[0070] 慢病毒载体可以被包封到任何适合的慢病毒衣壳中。用来自不同病毒的另一种蛋白取代一种颗粒蛋白被称为“假型化”。载体衣壳可含有来自其他病毒的病毒包膜蛋白,包括鼠白血病病毒(MLV)或水疱性口炎病毒(VSV)。使用VSV G-蛋白产生高载体滴度并产生更大的载体病毒颗粒的稳定性。

[0071] 在本公开中还可以使用基于甲病毒的载体,诸如由塞姆利基森林病毒(SFV)和辛德毕斯病毒(SIN)制成的那些载体。甲病毒的使用描述于Lundstrom,K.,Intervirology 43:247-257,2000以及Perri等人,Journal ofVirology 74:9802-9807,2000,这些文献通过引用结合在本文中。

[0072] 重组的复制缺陷型甲病毒载体可为有利的,因为它们能够进行高水平异源(治疗性)基因表达,并且可感染广泛靶基因范围。甲病毒复制子可通过在其病毒体表面上展示将允许选择性结合至表达关联性结合配偶体的靶细胞的功能异源型配体或结合结构域来靶向特定细胞类型。甲病毒复制子可具有潜伏期,并且因此在靶细胞中进行长期异源核酸表达。复制子也可以在靶细胞中展现瞬时异源核酸表达。

[0073] 痘病毒载体可将基因引入到细胞质中。禽痘病毒载体可仅产生基因或核酸的短期表达。腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯性疱疹病毒(HSV)载体可以用于本公开的组合物和方法中。在一些方面中,腺病毒载体可以产生比腺相关病毒更短期的表达(例如,小于约一个月),并且可以展示更长期的表达。所选择的特定载体可取决于靶细胞和正在治疗的病状。

[0074] 腺相关病毒(AAV)是小的非包膜单链DNA病毒。它们是非病原性人类细小病毒并且可以依赖于用于复制的辅助病毒,包括腺病毒、单纯性疱疹病毒、牛痘病毒和CMV。暴露于野生型(wt)AAV与引起任何人类病理学不相关或者已知引起这些病理学,并且在一般群体中常见,通常发生于十岁前,与腺病毒感染相关。

[0075] 如本文所述,“AAV”是指腺相关病毒,“rAAV”是指重组腺相关病毒。

[0076] 在一些情况下,野生型AAV编码rep和cap基因。rep基因为病毒复制所需的并且cap基因为衣壳蛋白的合成所需的。通过替代性翻译起始位点和剪接位点的组合,小基因组可能够表达四种rep基因产物和三种cap基因产物。rep基因产物和末端反向重复中的序列(145bp ITR,其侧接基因组)在此过程中可能是至关重要的。迄今为止,已分离AAV的11种血清型。本公开的组合物和方法提供了任何适合AAV血清型的使用。在一些方面中,AAV选自下组,该组由以下各项组成:AAV1、AAV2、AAV2.5、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、rh10以及其杂合物。AAV2可以用于本公开的组合物和方法中。

[0077] AAV2为大部分表征的。rAAV2已显示能够介导许多动物种类的眼睛中的长期转基因表达。在大鼠中,rAAV介导的报告基因(绿色荧光蛋白)在注射之后仍存在18个月。在猴

中,同一报告基因在注射之后存在17个月。

[0078] 载体可包含进一步调控基因递送和/或基因表达或另外向靶基因提供有利特性的组分或功能。此类其他组分包括例如影响与细胞的结合或靶向的组分(包括介导细胞类型或组织特异性结合的组分);影响细胞对载体核酸的摄取的组分;影响在摄取之后多核苷酸在细胞内的定位的组分(诸如介导核定位的药剂);以及影响多核苷酸的表达的组分。此类组分还可包括可用于检测或选择已吸收并且正表达由载体递送的核酸的细胞的标记,诸如可检测和/或可选择标记。此类组分可以作为载体的天然特性提供(诸如使用具有介导结合和摄取的组分或功能的某些病毒载体),或者载体可以被修饰以提供此类功能。

[0079] 可选择标记可以是阳性、阴性或双功能性的。阳性可选择标记允许选择携带标记的细胞,而阴性可选择标记允许选择性去除携带标记的细胞。已描述多种此类标记基因,包括双功能性(即,阳性/阴性)标记(参见例如,Lupton,S.,WO 92/08796,1992年5月29日公布;以及Lupton,S.,WO 94/28143,1994年12月8日公布)。阴性可选择标记的实例可包括包含抗生素(诸如氨苄青霉素或卡那霉素)的抗性基因。此类标记基因可提供增加的控制测量,其可能在基因疗法背景中是有利的。大量此类载体是本领域已知的并且通常可用。

[0080] 在与本公开的方法相容的许多病毒载体中,在载体中可包含一个或多个启动子以允许多于一个异源基因被载体表达。此外,载体可包含编码信号肽或促进mCoChop蛋白从靶细胞表达的其他部分的序列。

[0081] 编码基因产物的核酸可以处于启动子的转录控制下。如本文所提供的,“启动子”是指开始基因转录所需的适合DNA序列。短语“处于转录控制下”意指,启动子处于相对于核酸正确的位置和取向中,以控制RNA聚合物启动和基因表达。在一些情况下,启动子可包括“强”或组成型活性启动子。例如,可以使用CMV启动子,如本领域已知的组成型活性启动子。在一些情况下,CMV启动子可以包含用于促进表达的额外调控元件。

[0082] 在一些情况下,启动子可以是指“弱”启动子或产生比强启动子低的水平的mCoChop蛋白的序列。在一些情况下,可以使用启动子,使得启动子驱动mCoChop的选择性表达。在一些情况下,与如本文所述的其他序列组合使用的启动子或其他调控元件可以用于驱动mCoChop在眼睛细胞或眼睛组织中选择性表达。

[0083] 另外,“启动子”也可以在本文中可互换使用,是指可以在RNA聚合酶的起始位点周围存在的任何额外适合的转录控制模块。本公开的组合物和方法可使用任何适合启动子和用于表达转基因的转录控制模块。额外转录控制模块可包括但不限于元件诸如HSV胸苷激酶(tk)和SV40早期转录单元。通常,启动子可以由离散的功能模块组成,每个功能模块由大约7-20bp的DNA或20-5000bp的DNA组成,并且启动子含有转录激活因子或阻遏子蛋白的一个或多个识别位点。本公开的组合物和方法提供任何适合的调控序列或其组合。在一些情况下,这些转录控制模块序列可以被称为或被识别为增强子或阻遏子序列。

[0084] 每个启动子中的至少一个模块用于定位RNA合成的起始位点。一个实例是TATA框。其他实例可包括缺乏TATA框的一些启动子,诸如用于哺乳动物末端脱氧核苷酸基转移酶基因的启动子和用于SV40晚期基因的启动子,叠加于起始位点上的离散元件本身有助于固定起始位置。

[0085] 额外启动子元件调控转录起始频率。通常,这些位于起始位点上游的区域30-110bp中,尽管许多启动子也可以含有起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔可

经常是柔性的,使得当元件相对于彼此倒置或移动时保留启动子功能。例如,在tk启动子中,启动子元件之间的间隔可以在活性开始下降之前增加至50bp间隔。根据启动子,个别元件可以定位成共操作或独立地起作用以启动转录。

[0086] 本公开的组合物和方法提供用于控制感兴趣核酸序列在靶细胞中的表达的任何适合序列。因此,当靶向人类细胞时,核酸编码区域可以被工程化以与能够在人类细胞中表达的启动子相邻并且在该启动子的控制下。通常,此启动子可以包括人类或病毒启动子。

[0087] 在本公开的各个方面中,人类巨细胞病毒(CMV)即时早期(IE)增强子、鸡β-肌动蛋白启动子、鸡β-肌动蛋白外显子1、杂合鸡β-肌动蛋白和兔β-球蛋白内含子、猿猴病毒40多腺苷酸化信号可用于获得感兴趣编码序列(例如mCoChop)的高水平表达。

[0088] 还涵盖本领域已熟知实现感兴趣编码序列的表达的其他病毒或哺乳动物细胞或细菌噬菌体启动子的使用,只要表达水平对于给定目的而言为足够的。在一些方面中,原核调控序列可以存在于载体中,诸如T7 RNA聚合酶启动子序列。在其他方面中,载体不含此类调控序列。通过采用具有已知特性的启动子,可以优化在转染或转化之后蛋白质表达的水平和模式。

[0089] 响应于特定生理学或合成信号而调控的启动子的选择可以允许诱导型表达基因产物。例如,在当利用多顺反子载体时一种或多种转基因的表达对其中产生载体的细胞有毒的情况下,可能希望抑制或减少一种或多种转基因的表达。可能对生产细胞系有毒的转基因的实例是促细胞凋亡和细胞因子基因。若干诱导型启动子系统可用于产生转基因产物可能有毒的病毒载体。本公开的组合物和方法提供启动子序列、调控序列和转基因的任何适合组合。在一些情况下,序列的组合可能未对细胞产生毒性。在一些情况下,序列的组合可能对细胞产生高毒性。在一些情况下,序列的组合可能对细胞产生中度水平的毒性。

[0090] 在一些情况下,可能希望调控基因疗法载体中的转基因的表达。例如,根据所需表达水平,可以利用具有不同活性强度的不同病毒启动子。在哺乳动物细胞中,CMV即时早期启动子可以用于提供强转录活化。当希望转基因的表达水平减小时,还已使用较低效的CMV启动子的修饰版本。当希望转基因在造血细胞中表达时,通常逆转录病毒启动子,诸如使用来自MLV或MMTV的LTR(长末端重复)。可以根据所需作用使用的其他病毒启动子包括SV40、RSV LTR、HIV-1和HIV-2LTR、腺病毒启动子(诸如来自E1A、E2A或MLP区域)、AAV LTR、花椰菜花叶病毒、HSV-TK以及禽肉瘤病毒。

[0091] 在一些情况下,启动子或调控序列元件可以用于指导眼睛细胞或眼睛组织中的选择性表达。例如,特定眼睛细胞类型诸如视网膜色素上皮细胞中可见的启动子、序列元件或调控序列可以用于适合的表达构建体中(例如,RPE65或VMD2启动子)。

[0092] 可以容易完成适当启动子的选择。在一些情况下,可以使用高表达或强启动子。

[0093] 还可以包括可增强表达的其他元件,诸如导致高水平表达的增强子或系统,诸如tat基因和tar元件。然后可以将此盒插入到包含例如大肠杆菌复制起点的载体,例如质粒载体,诸如pUC19、pUC118、pBR322或其他已知的质粒载体中。参见Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory press,(1989)。下文讨论了启动子。质粒载体还可以包含可选择标记,诸如氨苄青霉素抗性的β内酰胺酶基因,只要该标记多肽不会不利地影响正在治疗的生物体的代谢。该盒也可以结合至合成递送系统中的核酸结合部分,该系统诸如WO 95/22618中所公开的系统,该专利通过引用结合在本文

中。通常,启动子序列和/或任何相关调控序列可以包含约至少150bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1000bp、2000bp、3000bp、4000bp、5000bp或10000bp。启动子序列和任何相关调控序列可以包含约至多150bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1000bp、2000bp、3000bp、4000bp、5000bp或10000bp。

[0094] 在一些方面,重组载体或质粒包含选自以下各项的启动子:巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯氏肉瘤病毒(RSV)启动子和MMT启动子、EF-1α启动子、UB6启动子、鸡β肌动蛋白启动子、CAG启动子、RPE65启动子和视蛋白启动子。

[0095] 在一些方面,在用于产生重组病毒的过程中使用抗生素标记。抗生素抗性标记可以用于识别重组病毒生成中的阳性转基因细胞。例如,赋予抗性的标记可以包括但不限于卡那霉素、庆大霉素、氨苄青霉素、氯霉素、四环素、强力霉素或潮霉素。在一些方面,抗生素抗性基因为非β内酰胺抗生素抗性基因,诸如卡那霉素。

[0096] 在一些方面,重组病毒和/或用于生成重组病毒的质粒包含编码复制起点序列的序列,诸如本文所提供的那些序列。复制起点序列通常提供适用于传播质粒的序列。

[0097] 在一些方面,重组病毒和/或用于生成重组病毒的质粒包含增强子,诸如本文所提供的那些增强子。优选地,增强子是CMV即时早期增强子。

[0098] 在一些方面,重组病毒和/或用于生成重组病毒的质粒包含poly A(多腺苷酸化)序列,诸如本文所提供的那些序列(例如SV40 poly A序列)。通常,任何适合的polyA序列可以用于转基因的所需表达(即mCoChop)。例如,在一些情况下,本公开提供包含SV40 polyA序列或SV40 polyA序列的一部分的序列。在一些情况下,本公开提供包含一个或多个polyA序列或序列元件的组合的polyA序列。在一些情况下,不使用polyA序列。在一些情况下,一个或多个polyA序列可以被称为非翻译区域(UTR)、3′UTR或终止序列。优选地,使用SV40polyA序列。

[0099] polyA序列可以包含1-10bp、10-20bp、20-50bp、50-100bp、100-500bp、500bp-1Kb、1Kb-2Kb、2Kb-3Kb、3Kb-4Kb、4Kb-5Kb、5Kb-6Kb、6Kb-7Kb、7Kb-8Kb、8Kb-9Kb和9Kb-10Kb的长度。polyA序列可以包含至少1bp、2bp、3bp、4bp、5bp、6bp、7bp、8bp、9bp、10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1Kb、2Kb、3Kb、4Kb、5Kb、6Kb、7Kb、8Kb、9Kb和10Kb的长度。polyA序列可以包含至多1bp、2bp、3bp、4bp、5bp、6bp、7bp、8bp、9bp、10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1Kb、2Kb、3Kb、4Kb、5Kb、6Kb、7Kb、8Kb、9Kb和10Kb的长度。

[0100] 在一些情况下,可以针对影响蛋白质表达的各种参数优化polyA序列,这些参数包括但不限于细胞中的转基因的mRNA半衰期、转基因的mRNA的稳定性或转录调控。例如,可以改变polyA序列以增加转基因的mRNA转录物,这可以导致蛋白质表达增加。在一些情况下,可以改变polyA序列以减小转基因的mRNA转录物的半衰期,这可以导致蛋白质表达减少。

[0101] 在本公开的某些方面中,内部核糖体进入位点(IRES)或口蹄疫病毒(FMDV)元件的使用可以用于形成多基因或多顺反子的信息。IRES元件能够绕开5′甲基化Cap依赖性翻译的核糖体扫描模式并且在内部位点开始翻译。已描述来自小核糖核酸病毒家族的两个成员(脊髓灰质炎病毒和脑心肌炎)的IRES元件,也描述来自哺乳动物信息的IRES。IRES元件可以连接至异源开放阅读框。多个开放阅读框可以一起转录,各自被IRES分开,从而形成多顺

反子信息。凭借IRES元件,每个开放阅读框可以易接近于核糖体以用于有效翻译。多个基因可以使用单个启动子/增强子有效表达以转录单一信息。在基因疗法递送载体中用于共表达两种蛋白质的替代性系统是FMDV 2A系统。FMDV 2A系统采用逆转录病毒质粒载体,其中两种基因可以连接至编码来自小核糖核酸病毒口蹄疫病毒的2A序列的核苷酸序列。转录和翻译产生双顺反子mRNA和两种独立的蛋白质产物。

[0102] 任何异源开放阅读框可以连接至IRES元件。这可以包括分泌蛋白、多亚基蛋白(由独立基因编码)、细胞内或膜结合蛋白以及可选择标记的基因。以这种方式,若干蛋白质的表达可以使用单一构建体和单一可选择标记同时工程化到细胞中。

[0103] 在一些方面,重组病毒和/或用于生成重组病毒的质粒包含编码人类mCoChop蛋白或其功能片段的多核苷酸。

[0104] 在一些方面,重组病毒和/或用于生成重组病毒的质粒包含能够指导mCoChop蛋白在眼睛细胞中选择性表达的调控核酸片段。

[0105] 在一些方面,重组病毒和/或用于生成重组病毒的质粒可包含一个或多个非翻译区域(UTR)或序列。通常,任何适合的UTR序列可以用于转基因的所需最佳表达(即mCoChop)。例如,在一些情况下,UTR区域或序列可以包含天然序列。在一些情况下,UTR序列可以是如人类CoChop基因的上游(5′UTR)或下游(3′UTR)可见的、如人类基因组序列或其部分中可见的序列。在其他情况下,UTR序列可以包含非天然序列,诸如除mCoChop之外的基因的上游或下游可见的,或者包含还包含一个或多个UTR序列元件的序列,如本文进一步描述。在一些情况下,仅使用5′UTR序列。在一些情况下,仅使用3′UTR序列。在一些情况下,不使用UTR序列。

[0106] UTR序列可以包含1-10bp、10-20bp、20-50bp、50-100bp、100-500bp、500bp-1Kb、1Kb-2Kb、2Kb-3Kb、3Kb-4Kb、4Kb-5Kb、5Kb-6Kb、6Kb-7Kb、7Kb-8Kb、8Kb-9Kb和9Kb-10Kb的长度。UTR序列可以包含至少1bp、2bp、3bp、4bp、5bp、6bp、7bp、8bp、9bp、10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1Kb、2Kb、3Kb、4Kb、5Kb、6Kb、7Kb、8Kb、9Kb和10Kb的长度。UTR序列可以包含至多1bp、2bp、3bp、4bp、5bp、6bp、7bp、8bp、9bp、10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1Kb、2Kb、3Kb、4Kb、5Kb、6Kb、7Kb、8Kb、9Kb和10Kb的长度。

[0107] 在一些情况下,可以针对蛋白质表达的所需水平优化5′UTR和/或3′UTR的变型。在一些情况下,可以针对影响蛋白质表达的各种参数优化3′UTR序列,这些参数包括但不限于细胞中的转基因的mRNA半衰期、转基因的mRNA的稳定性或二级结构或条件调控(例如,调节翻译的各种因子的结合)。例如,可以改变3′UTR序列以增加转基因的mRNA转录物的半衰期,这可以导致蛋白质表达增加。在一些情况下,可以改变3′UTR序列以减小转基因的mRNA转录物的半衰期,这可以导致蛋白质表达减少。

[0108] 通常,3′UTR序列可包含各种序列元件。本公开提供3′UTR序列,这些序列可以包括但不限于序列元件,诸如一个或多个多腺苷酸化信号、接头序列、间隔序列、SECIS元件、富含AU或ARE序列或者miRNA或RNAi结合序列、转录终止序列、3′终止序列或其变体和/或组合。

[0109] 在一些情况下,可以针对影响蛋白质表达的各种参数优化5′UTR序列,这些参数包

括但不限于细胞中的转基因的mRNA半衰期、转基因的mRNA的稳定性或二级结构或转录调控。例如,可以改变5′UTR序列以增加转基因的mRNA转录物的翻译效率,这可以导致蛋白质表达增加。在一些情况下,可以改变5′UTR序列以减小转基因的mRNA转录物的翻译效率,这可以导致蛋白质表达减少。

[0110] 通常,5′UTR序列可包含各种序列元件。本公开提供5′UTR序列,这些序列可以包括但不限于序列元件,诸如一个或多个核糖体结合位点(RBS)、接头序列、间隔序列、调控序列、调控反应序列、核糖开关、促进或抑制翻译开始的序列、用于mRNA转运的调控序列或其变体和/或组合。

[0111] 在一些方面,重组病毒和/或用于生成重组病毒的质粒包含一个或多个接头或间隔序列。如本文所述,接头序列或间隔序列可以可互换使用。通常,接头序列或间隔序列可以是用于在至少两个序列元件之间形成不连续序列的任何适合序列。通常,任何适合的接头或间隔序列可以用于形成不连续序列。例如,在一些情况下,接头序列可以是随机生成的序列。在一些情况下,接头序列可以是被优化以防止可不利地影响蛋白质表达的二级结构或分子内相互作用的形成的非特异性序列。在一些情况下,接头序列可以包含任何额外功能序列元件,包括但不限于内含子、调控序列、增强子或类似序列。接头序列中的功能元件可以用于病毒的所需最佳产生和/或转基因表达的表达。在一些情况下,接头序列是克隆位点、现有克隆位点的残留物或其他不显著序列,并且此类接头在任何两个序列元件之间的插入是任选的。

[0112] 接头序列可以包含1-10bp、10-20bp、20-50bp、50-100bp、100-500bp、500bp-1Kb、1Kb-2Kb、2Kb-3Kb、3Kb-4Kb、4Kb-5Kb、5Kb-6Kb、6Kb-7Kb、7Kb-8Kb、8Kb-9Kb和9Kb-10Kb的长度。接头序列可以包含至少1bp、2bp、3bp、4bp、5bp、6bp、7bp、8bp、9bp、10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1Kb、2Kb、3Kb、4Kb、5Kb、6Kb、7Kb、8Kb、9Kb和10Kb的长度。接头序列可以包含至多1bp、2bp、3bp、4bp、5bp、6bp、7bp、8bp、9bp、10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1Kb、2Kb、3Kb、4Kb、5Kb、6Kb、7Kb、8Kb、9Kb和10Kb的长度。

[0113] 在一些方面,重组病毒包含用于将重组基因表达盒包装到病毒载体的病毒体中的反向末端重复(ITR)序列。在一些情况下,ITR是来自腺相关病毒(AAV)。在一些情况下,ITR是来自AAV血清型2。

[0114] 在一些方面中,重组病毒和/或用于生成重组病毒的质粒包含以下顺序的核酸元件:a)第一ITR序列;b)增强子序列;c)启动子序列;d)第一外显子序列;e)内含子序列;f)第二外显子序列;g)编码mCoChop的序列;h)poly A序列;以及i)第二ITR序列。在重组病毒和/或用于生成重组病毒的质粒的一些方面,启动子序列包含启动子/增强子序列。在一些方面,编码mCoChop的序列包含编码人类mCoChop蛋白或其功能片段的序列。在其他方面,用于生成重组病毒的质粒还包含复制起点序列。在一些方面,质粒还包含抗生素抗性基因的序列。

[0115] 药物组合物

[0116] 药物组合物是含有一种或多种活性成分以及一种或多种赋形剂、载剂、稳定剂或填充剂的制剂,该制剂适用于施用人类患者以实现所需诊断结果或治疗性或预防性作用。

为了储存稳定性和便于处理,药物组合物可以被配制为冻干(即冷冻干燥)或真空干燥的粉末,其可以在施用患者之前用生理盐水或水重构。或者,药物组合物可以被配制为含水溶液。药物组合物可以含有蛋白质活性成分。已以不同成功程度使用各种赋形剂诸如白蛋白和凝胶,以干燥并稳定存在于药物组合物中的蛋白质活性成分。另外,已使用冷冻保护剂诸如醇来减少在冻干的冷冻条件下的蛋白质变性。

[0117] 适用于内部使用的药物组合物包括无菌含水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。为了静脉内施用,适合载剂包括生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,该组合物必须为无菌的并且应为容易注射的程度的流体。它在制造和储存条件下必须稳定,并且必须防止诸如细菌和真菌等微生物的污染作用。该载体可以是含有以下物质的溶剂或分散介质:例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及其适合的混合物。适当流动性可以例如通过使用包衣诸如卵磷脂,通过在分散液的情况下维持所需颗粒尺寸并且通过使用表面活性剂来维持,这些表面活性剂诸如聚山梨醇酯(Tween.TM.)、十二烷基硫酸钠(月桂醇硫酸钠)、月桂基二甲氧化胺、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、聚乙氧基化醇、聚氧乙烯基山梨聚糖、辛苯昔醇(Triton X100.TM.)、N,N-二甲基十二烷胺-N-氧化物、十六烷基三甲基溴化铵(HTAB)、聚乙二醇10月桂醚、Brij 721.TM.、胆汁盐(脱氧胆酸钠、胆酸钠)、普朗尼克酸(F-68、F-127)、聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor.TM.)、乙氧基化壬基酚(Tergitol.TM.)、环糊精以及乙基苯乙基氯化铵(Hyamine.TM.)可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)两者来实现对微生物作用的预防。在许多情况下,将优选的是在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)、氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现内部组合物的吸收延长。

[0118] 可以通过以下各项来制备无菌溶液:将活性化合物以所需的量,根据需要,与一种以上列举的成分或这些成分的组合并入适当的溶剂中,然后进行过滤灭菌。总体上,通过将有效化合物掺入无菌载体来制备分散体,该无菌载体含有基础分散介质以及来自以上列举的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,这些方法产生活性成分的粉末以及来自其先前无菌过滤的溶液的任何另外的所需成分。

[0119] 在一方面,使用将防止化合物从体内快速消除的载剂制备活性化合物,诸如控制释放制剂,包括植入物和微封装递送系统。可以使用生物可降解的生物相容性聚合物,诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的方法将是本领域技术人员所清楚的。这些材料也可以商购获得。脂质体悬浮液(包括用病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体)也可以用作药学上可接受的载剂。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备,例如,如美国专利号4,522,811中所述的,该专利通过引用结合在本文中。

[0120] 药物组合物可以连同给药说明书一起包括于容器、包装或分配器中。

[0121] 本公开的药物组合物包括但不限于溶液、乳液和含脂质体制剂。这些组合物可以由各种组分生成,这些组分包括但不限于预成型液体、自身乳化的固体和自身乳化的半固体。

[0122] 本公开的某些组合物还在制剂中并入载剂化合物。如本文所用,“载剂化合物”或

“载剂”可以是指核酸或其类似物,其为惰性的(即,本身不具有生物活性),但通过体内过程识别为核酸,这些体内过程通过例如降解生物活性核酸或促进其从循环中去除来减小具有生物活性的核酸的生物利用度。核酸和载剂化合物(通常后一种物质过量)的共同施用可导致肝脏、肾脏或其他额外循环储器中恢复的核酸量显著减少,假设这是由于载剂化合物与核酸之间竞争共同受体。例如,当部分硫代磷酸酯寡核苷酸与聚肌酸、硫酸右旋糖酐、聚胞啶酸或4-乙酰胺基-4′异硫氰酸-二苯基乙烯-2,2′二磺酸共同施用时,肝脏组织中该部分硫代磷酸酯寡核苷酸的恢复可能减少(Miyao等人,Antisense Res.Dev.,1995,5,115-121;Takakura等人,Antisense&Nucl.Acid Drug Dev.,1996,6,177-183)。

[0123] 载体或重组病毒(病毒体)可以结合到药物组合物中以用于施用哺乳动物患者,特别是人类。载体或病毒体可以无毒、毒性、药学上可接受的含水载剂配制,优选地pH范围为从3至8,更优选地范围从6至8,最优选地范围从6.8至7.2。此类无菌组合物将包含含有编码治疗性分子的核酸的载体或病毒体,此类组合物在重构时溶解于具有可接受的pH的含水缓冲液中。

[0124] 在一些方面,本文所提供的药物组合物包含治疗有效量的载体或病毒体与药学上可接受的载剂和/或赋形剂例如盐水、磷酸盐缓冲盐水、磷酸盐和氨基酸、聚合物、多元醇、糖、缓冲液、防腐剂和其他蛋白质的混合物。示例性氨基酸、聚合物和糖等是辛基苯氧基聚乙氧基乙醇化合物、聚乙二醇单硬脂酸酯化合物、聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯、蔗糖、果糖、右旋糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露醇、葡聚糖、山梨醇、肌醇、半乳糖醇、木糖醇、乳糖、海藻糖、牛或人类血清白蛋白、柠檬酸盐、乙酸盐、林格氏和汉克氏溶液、半胱氨酸、精氨酸、肉毒碱、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯和乙二醇。优选地,此制剂在-60℃下稳定至少14个月。

[0125] 在一些方面,本文所提供的药物组合物包含缓冲液,诸如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或磷酸钠/硫酸钠、tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、无菌水和本领域普通技术人员已知的其他缓冲液,诸如Good等人.(1966)Biochemistry 5:467所述的那些。优选的药物组合物含有磷酸钠、氯化钠和山梨醇。最优选的药物组合物含有10mM磷酸钠、350mM氯化钠和5%(v/v)山梨醇。其中药物组合物包含腺病毒载体递送系统中所含有的mCoChop的缓冲液的pH可以是在以下范围内:6.5至7.75、6.5至7.5、6.8至7.4或6.8至7.2。

[0126] 在一些方面,本文所提供的药物组合物包含增加悬浮液的粘度的物质,诸如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖,其量为约1-10%,诸如1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%(v/v)。优选地,山梨醇为约3-6%(v/v),最优选地山梨醇为约5%.(v/v)。

[0127] 在施用之前,药物组合物不含有在生产期间所使用的组分,例如培养组分、宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、质粒DNA并且基本上不含支原体、内毒素和微生物污染。优选地,药物组合物具有小于10、5、3、2或1CFU/擦拭。最优选地,组合物具有0CFU/擦拭。药物组合物中的内毒素水平小于20EU/mL、小于10EU/mL或小于5EU/mL。

[0128] 药物组合物必须在施用之前具有完全充满的壳体。药物组合物具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或更大充满的壳体。

[0129] 试剂盒

[0130] 适用于本公开的组合物和试剂可以包装在试剂盒中以有利于本公开的应用。在一些方面,本发明方法提供一种试剂盒,该试剂盒包含本公开的重组核酸。在一些方面,本发

明方法提供一种试剂盒,该试剂盒包含本公开的重组病毒。说明书可以呈任何希望的形式,包括但不限于印刷在试剂盒插页上、印刷在一个或多个容器上以及提供于电子存储介质诸如计算机可读存储介质上的电子保存的说明书。还任选地在计算机可读存储介质上包括软件包装,该软件包装允许使用者整合信息并且计算对照剂量。

[0131] 在另一方面,本公开提供一种试剂盒,该试剂盒包含本文所提供的药物组合物。在又一个方面,本公开提供治疗疾病的试剂盒。

[0132] 在一方面,试剂盒包含:(a)本文所提供的重组病毒以及(b)向细胞或个体施用治疗有效量的重组病毒的说明书。在一些方面,试剂盒可包含用于施用重组病毒的药学上可接受的盐或溶液。任选地,试剂盒还可以包含呈标签或单独插页形式的适合操作参数的说明书。例如,试剂盒可以具有通知医生或实验室技术人员制备一个剂量的重组病毒的标准说明书。

[0133] 任选地,试剂盒可以还包含标准或对照信息,使得患者样品可以与对照信息标准相比较,以确定重组病毒的测试量是否是治疗量。任选地,试剂盒可以还包含用于施用的装置,诸如注射器、过滤针、伸长管、插管和视网膜下注射器。

[0134] 重组病毒可以通过任何适合的方式生成。本公开的方法和组合物提供通过各种方式生成重组病毒,这些方式包括使用转基因细胞,其可包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、动物细胞或真菌细胞。

[0135] 例如,在一些方面,重组病毒可以通过经由重组杆状病毒转染昆虫细胞来生成。在一些情况下,重组杆状病毒可以作为中间体生成,因此杆状病毒可以含有用于生成其他病毒诸如AAV或rAAV2病毒所需的序列。在一些情况下,一种或多种杆状病毒可以用于生成用于本公开的治疗组合物和方法中的重组病毒。在一些情况下,可以使用昆虫细胞,诸如Sf9、High-Five或Sf21细胞系。在一些情况下,细胞系可以使用瞬时方法生成(即,用不稳定整合的转基因感染)。在其他情况下,细胞系可以通过生成稳定细胞系来生成(即,用稳定整合到宿主细胞基因组中的转基因感染)。在其他方面,本文所提供的药物组合物使用粘附性人类胚肾293(HEK293)细胞来制造。在一个替代性方面,本文所提供的药物组合物使用适应悬浮的HEK293细胞来制造。在另一个方面,本文所提供的药物组合物使用昆虫细胞中的杆状病毒表达系统(BYES)来制造。在一些方面,载体使用疱疹辅助病毒来产生。在一些方面,载体使用生产克隆方法来产生。在一些方面,载体使用Ad-AAV来产生。

[0136] 通常,任何适合的方法可以用于对重组病毒进行生物化学纯化以用于如本文所述的药物组合物中。重组病毒可以直接从细胞收获或者从宿主细胞周围的培养基中收获。病毒可以使用各种生物化学方式诸如凝胶过滤、过滤、色谱、亲和纯化、梯度超离心或尺寸排除方法来纯化。重组病毒可以在配制成药物组合物之前使用任何适合方式测试含量(即,一致性)、纯度或功效(即,活性)。方法可以包括但不限于免疫测定、ELISA、SDS-PAGE、蛋白质印迹、RNA印迹、DNA印迹或PCR、HUVEC测定等。

[0137] 治疗方法

[0138] 本发明mCoChop蛋白和核酸以及所得ChR蛋白预期并可用于改善一种或多种视力参数的眼部病症包括但不限于影响眼睛的前段和后段的发育异常。前段病症包括青光眼、白内障、角膜营养不良、圆锥角膜。后段病症包括由光感受器故障造成的失明病症和/或由视网膜营养不良和变性造成的死亡。视网膜病症包括先天性静止性夜盲症、黄斑变性诸如

年龄相关性黄斑变性、先天性锥体营养不良和一大群色素性视网膜炎(RP)相关病症。这些病症包括视网膜中的光感受器细胞、视杆细胞和视锥细胞的遗传性预设死亡,发生于各个年龄。这些是随着年龄发展并在童年和成年早期造成失明的严重视网膜病,诸如RP本身的亚型,以及在童年期间、早至一岁时频繁导致视力丧失的RP相关性疾病,诸如LCA的遗传亚型。后一类病症通常特征在于光感受器、视杆细胞和视锥细胞的严重减少,并且通常为完全丧失。(Trabulsi,EI编辑,Genetic Diseases of the Eye,Oxford University Press,NY,1998)。

[0139] 具体而言,本发明的mCoChop和ChR蛋白适用于治疗和/或恢复由于眼部病症诸如RPE相关性视网膜病而视力丧失的受试者的至少部分视力,这些眼部病症特征在于眼部组织结构尽管功能丧失但仍长期保留,并且特征在于功能丧失与受试者眼部细胞中正常基因的缺失或不存在之间的相关性。各种此类眼部病症为已知的,诸如儿童发作失明疾病、色素性视网膜炎、黄斑变性、糖尿病视网膜病变以及本领域已知的眼部失明疾病。预期这些其他病症以及目前原因未知且随后特征在于与以上相同的描述的失明病症也可以通过本发明的CoChop和ChR蛋白成功治疗。因此,通过本发明治疗的特定眼部病症可以包括以上所述的病症和尚未表征的许多疾病。

[0140] 在特定实施方案中,本公开提供一种治疗视网膜变性疾病的方法,该方法包括向需要此治疗的受试者施用药物有效量的本文所提供的药物组合物。优选地,视网膜变性疾病是色素性视网膜炎或年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD、干性AMD。另外,还通过本发明的方法治疗为视网膜变性疾病的直接结果的其他疾病和病症。

[0141] 在一些实施方案中,可以治疗干性AMD。在一些情况下,干性AMD可以称为中央地图状萎缩,其特征在于在视网膜后下方的视网膜色素上皮的萎缩和随后在眼睛中央部分中的光感受器丧失。本公开的组合物和方法提供了任何和全部形式的AMD的治疗。

[0142] 在特定实施例中,本公开提供一种用于治疗如本文所述的AMD或色素性视网膜炎的方法,该方法包括向需要此治疗的人类受试者施用药物有效量的本文所提供的药物组合物。本公开可以用于治疗处于发展AMD的风险下或呈现该疾病的早期症状的患者。本公开可以用于治疗处于发展MD的风险下或呈现该疾病的早期症状的患者,诸如患有视网膜变性疾病的那些个体。这可以包括同时或依次治疗眼睛。同时治疗可以意味着在同一时间向每只眼睛施用治疗或者在同一次访问治疗医生或其他医疗护理提供者期间治疗两只眼睛。已记录患者在呈现AMD症状的眼睛的健康对侧眼睛中或者在具有发展AMD的遗传倾向的患者中具有发展AMD的较高风险。本公开可以用作预防对侧眼睛中的AMD的预防性治疗。

[0143] 在一些实施方案中,向患者施用本文所公开的突变体CoChop组合物(例如,核苷酸、多肽、表达所述多肽或含有所述核苷酸的细胞、药物组合物等)。在一些实施方案中,使用这些方法形成的突变体CoChop组合物改善疾病或病症或者延迟该疾病或病症的发作。在一些实施方案中,该疾病或病症为变性疾病或病症。在一些实施方案中,该疾病或病症为眼部病症。在一些实施方案中,眼部病症为AMD、黄斑变性或色素性视网膜炎。在一些实施方案中,该疾病或病症是损伤、脑损伤、脊髓损伤、癫痫、代谢性病症、心脏功能障碍、视觉丧失、失明、耳聋、听力损失或神经学病状。在一些实施方案中,向患者施用本文所公开的突变体CoChop组合物以恢复视力丧失。在一些实施方案中,向患者施用本文所公开的突变体CoChop组合物以预防、延迟或减轻视力丧失。

[0144] 在一些实施方案中,向患者施用一次本文所公开的突变体CoChop组合物。在一些实施方案中,向患者施用本文所公开的载体、核酸或细胞约2次、约3次、约4次、约5次、约6次、约7次、约8次、约9次、约10次、约20次、约40次或更多次。施用本文所公开的突变体CoChop组合物,直到疾病或病症症状改善。

[0145] 在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中与未治疗的患者或治疗之前的同一患者相比改善、预防、延迟或减轻了视力丧失。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中在第1天与第10年之间改善、预防、延迟或减轻了视力丧失。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗的患者或治疗之前的患者的同一患者中的视力丧失相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年改善、预防、延迟或减轻了视力丧失。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的视力丧失相比改善、预防、延迟或减轻了视力丧失约1天、约1周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0146] 在一些实施方案中,视力丧失与对照或用其他组合物治疗的患者相比减少了约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约100%。在一些实施方案中,突变体CoChop组合物的施用与对照或用其他组合物治疗的患者相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年改善、预防、延迟或减轻了视力丧失约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约100%。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与对照或用其他方法治疗的患者相比改善、预防、延迟或减轻了视力丧失约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、或约100%,持续约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0147] 在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中与未治疗的患者或治疗之前的同一患者相比增加了光敏感性。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中在第1天与第10年之间增加了光敏感性。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗的患者或治疗之前的患者的同一患者的光敏感性相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年增加了光敏感性。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的光敏感性相比增加了光敏感性约1天、约1周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1

年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0148] 在一些实施方案中，光敏感性与对照或用其他组合物治疗的患者相比增加了约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约100％。在一些实施方案中，突变体CoChop组合物的施用与对照或用其他组合物治疗的患者相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年增加了光敏感性约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约100％。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与对照或用其他方法治疗的患者相比增加了光敏感性约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、或约100％，持续约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0149] 在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中与未治疗的患者或治疗之前的同一患者相比减小了引发光电流所需的光强度。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中在第1天与第10年之间减小了引发光电流所需的光强度。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗的患者或治疗之前的患者的同一患者的光强度相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年减小了引发光电流所需的光强度。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中引发光电流所需的光强度相比减小了引发光电流所需的光强度约1天、约1周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0150] 在一些实施方案中，引发光电流所需的光强度与对照或用其他组合物治疗的患者相比减少了约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约100％。在一些实施方案中，突变体CoChop组合物的施用与对照或用其他组合物治疗的患者相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年减小了引发光电流所需的光强度约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约100％。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与对照或用其他方法治疗的患者相比减小了引发光电流所需的光强度约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、或约100％，持续约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0151] 在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中与

未治疗的患者或治疗之前的同一患者相比增加了离子流和/或质子流。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中在第1天与第10年之间增加了离子流和/或质子流。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗的患者或治疗之前的患者的同一患者的离子流和/或质子流相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年增加了离子流和/或质子流。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的离子流和/或质子流相比增加了离子流和/或质子流约1天、约1周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0152] 在一些实施方案中，离子流和/或质子流与对照或用其他组合物治疗的患者相比增加了约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约100％。在一些实施方案中，突变体CoChop组合物的施用与对照或用其他组合物治疗的患者相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年增加了离子流和/或质子流约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约100％。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与对照或用其他方法治疗的患者相比增加了离子流和/或质子流约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、或约100％，持续约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0153] 在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中与未治疗的患者或治疗之前的同一患者相比增加了视觉皮质中的视觉诱发电位。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中在第1天与第10年之间增加了视觉皮质中的视觉诱发电位。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗的患者或治疗之前的患者的同一患者的视觉皮质中的视觉诱发电位相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年增加了视觉皮质中的视觉诱发电位。在一些实施方案中，本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的视觉皮质中的视觉诱发电位相比增加了视觉皮质中的视觉诱发电位约1天、约1周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0154] 在一些实施方案中，视觉皮质中的视觉诱发电位与对照或用其他组合物治疗的患者相比增加了约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约100％。在一些实施方案中，突变体CoChop组合物的施用与对照或用其他

组合物治疗的患者相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年增加了视觉皮质中的视觉诱发电位约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约100％。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与对照或用其他方法治疗的患者相比增加了视觉皮质中的视觉诱发电位约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、或约100％,持续约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0155] 在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中与未治疗的患者或治疗之前的同一患者相比减少了疾病或病症症状。在一些实施方案中,在治疗的患者中在第1天与第10年之间测量这些疾病或病症症状。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗的患者或治疗之前的患者的同一患者的疾病或病症症状相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年减少了疾病或病症症状。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的疾病或病症症状相比减少了疾病或病症症状约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0156] 在一些实施方案中,疾病或病症症状与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的疾病或病症症状相比减少了约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约100％。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的疾病或病症症状相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年减少了疾病或病症症状约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约100％。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的疾病或病症症状相比减少了疾病或病症症状约1％、约5％、约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、或约100％,持续约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0157] 在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用在治疗的患者中与未治疗的患者或治疗之前的同一患者相比减少了AMD的症状。在一些实施方案中,症状是视力模糊、视敏度减小、视力部分丧失和/或在暗光下看不见东西。在一些实施方案中,在治疗

的患者中在第1天与第10年之间测量这些AMD症状。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗的患者或治疗之前的患者的同一患者的AMD症状相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年减少了AMD症状。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的AMD症状相比减少了AMD症状约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0158] 在一些实施方案中,AMD症状与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的AMD症状相比减少了约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约100%。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的AMD症状相比在约第1天、约第2天、约第3天、约第4天、约第5天、约第6天、约第1周、约第2周、约第3周、约第4周、约第5周、约第6周、约第7周、约第8周、约第9周、约第10周、约第20周、约第30周、约第40周、约第50周、约第60周、约第70周、约第80周、约第90周、约第100周、约第1年、约第2年或约第3年减少了AMD症状约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约100%。在一些实施方案中,本文所公开的突变体CoChop组合物的施用与未治疗患者或治疗之前的同一患者中的AMD症状相比减少了AMD症状约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、或约100%,持续约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约5年或约10年或更长时间。

[0159] 如本文所用的术语“受试者”、或“个体”或“患者”参考患有疾病或病症的个体或疑似患有疾病或病症的个体等。受试者、个体或患者可以在本公开中可互换使用并且涵盖哺乳动物和非哺乳动物。哺乳动物的实例包括但不限于哺乳动物属类的任何成员:人类、非人类灵长类诸如黑猩猩以及其他猿和猴种类;农场动物,诸如牛、马、绵羊、山羊、猪;牲畜,诸如兔、狗和猫;实验室动物,包括啮齿类动物,诸如大鼠、小鼠和豚鼠,等。非哺乳动物的实例包括但不限于鸟、鱼等。在本文所提供的方法和组合物的一些方面中,哺乳动物是人类。

[0160] 治疗的功效将例如通过评价每只眼睛的最佳矫正的视敏度来建立。视敏度测试使用电子视敏度(EVA)ETDRS(糖尿病视网膜病变的早期治疗研究)方法或者手部运动和光感知的低视力评估来执行。

[0161] 如本文所用的术语“视力”被定义为生物体有用地检测作为区别或运动的刺激的光的能力。视力旨在涵盖以下各项:

[0162] 1.光检测或感知-辨别光是否存在的能力;

[0163] 2.光投射-辨别光刺激所进入的方向的能力;

[0164] 3.分辨率-检测光栅或字母靶标中的不同亮度级(即,对比)的能力;以及

[0165] 4.识别-通过参考靶标内的不同对比水平来识别视觉靶标的形状的能力。

[0166] 因此,“视力”包括简单检测光的存在的能力。本公开的多肽和编码突变体CoChop的多核苷酸可以用于改善或恢复视力,其中视力的改善或恢复包括例如光检测或感知的增

加、响应于光刺激的光敏感性或光敏性的增加、辨别光刺激所进入的方向的能力的增加、检测不同亮度级的能力的增加、识别视觉靶标的形状的能力的增加、以及从视网膜到皮质的视觉诱发电位或传递的增加。这样,视力的改善或恢复可以或可以不包括视力的完全恢复,即其中用本发明治疗的患者的视力恢复至未受累个体的视力的程度。在下文所述的动物研究中所述的视力恢复在人类方面而言可以通过增加视力的一个方面(即,光敏感性或视觉诱发电位)而不恢复全视来使得个人处于视力功能的低端。然而,处于此水平将是显著有利的,因为这些个体可以在运动以及潜在地低位分辨任务中训练,这些任务为他们提供与总体失明相比极大地改善的视觉独立性水平。甚至视觉受损个体可以使用基本光感知,这些个体的视力使用本发明组合物和方法来改善,以完成特定每日任务并改善一般运动、能力和生活质量。

[0167] 视力恢复程度可以在施用包含例如编码CoChop的DNA的载体之前以及优选地在此之后通过测量视力来确定。视力可以使用本领域熟知的许多方法或尚未确定的方法中的任一种来测量。如通过本发明改善或恢复的视力可以通过以下视觉反应中的任一种来测量:

[0168] 1.在暴露于光刺激之后由受试者进行的光检测反应-其中寻求当打开光时受试者个体在一般光方向中指示或移动的可靠反应的证据;

[0169] 2.在暴露于光刺激之后由受试者进行的光投射反应-其中寻求当打开光时个体在特定光方向中指示或移动的可靠反应的证据;

[0170] 3.受试者对光对比暗模式视觉刺激的光分辨,其测量受试者分辨光对比暗模式视觉刺激的能力,如由以下各项证明的:

[0171] a.证明可靠的视动产生的眼球震颤样眼睛移动和/或相关头部或身体移动的存在,这证明靶标的追踪(参见上文),和/或

[0172] b.分辨模式视觉刺激并通过言语或非言语方式指示此类分辨的可靠能力的存在,这些方式包括例如指向或压下杆或按钮;或者

[0173] 4.对光闪烁刺激或模式视觉刺激的视觉皮质反应的电记录,这是从恢复的视网膜到视觉皮质的电传递的端点,也称为视觉诱发电位(VEP)。测量可以通过在视觉皮质的区域处的头皮表面上、在皮层表面上的电记录和/或视觉皮质的细胞内的记录来进行。

[0174] 因此,根据本发明的视力改善或恢复可以包括但不限于:响应于视网膜细胞中的光刺激的光电流或电反应的振幅或动力学的增加、视网膜细胞的光敏感性的增加(即,降低响应于光刺激而开始光电流或电反应所需的阈值光强度,从而需要更少或更低的光来诱发光电流)、光诱发剧升或急剧激励的数目或振幅的增加、光对视网膜皮质的反应的增加,这可包括从视网膜或视网膜细胞传递至视觉皮质或大脑的视觉诱发电位的增加。

[0175] 可以使用评定本发明的各种参数的体外和体内研究,包括失明人类眼部病症的公认动物模型。人类视网膜病变的大型动物模型(例如儿童失明)是有用的。本文所提供的实例允许本领域技术人员容易预期此方法可以类似地用于治疗一个范围的视网膜疾病。

[0176] 虽然其他人的早期研究已证实视网膜病变可以通过基因疗法技术延缓,但是本发明证实功能的确切生理恢复,预期这生成或改善视力的各种参数,包括行为参数。

[0177] 可以使用已知的动物模型和测试来获得行为测量,例如在水迷宫中的表现,其中视力被保存或恢复到不同程度的受试者将向光游动(Hayes,JM等人,1993,Behav Genet23:395-403)。

[0178] 在成人期间诱导失明或者先天性失明发展足够缓慢使得个体在视力丧失之前存在视力的模型中,可以在各种测试中对受试者进行训练。通过这种方式,当在视力丧失后重新施用这些测试以测试本发明组合物和方法对其视力恢复效果的功效时,动物在失明状态时不必重新学习任务。其他行为测试不需要学习并且依赖于某些行为的本能性。实例为视动眼球震颤测试(Balkema GW等人,1984,Invest Ophthalmol Vis Sci.25:795-800;Mitchiner JC等人,1976,Vision Res.16:1169-71)。

[0179] 本发明也可以与本领域已知改善或恢复视力的其他形式的视力疗法组合使用。例如,使用视觉假体,包括视网膜植入物、皮质植入物、外侧膝状体核植入物或视神经植入物。因此,除了使用本发明方法对存活的视网膜神经元进行遗传修饰之外,在采用分子方法之前、同时或之后可以向正在治疗的受试者提供视觉假体。通过训练个体可以改善视觉假体的有效性,因此增强如本文所涵盖的患者细胞的CoChop转化的潜在影响。训练方法,诸如习惯循环,其特征在于训练受试者认识到(i)改变光和/或模式刺激的水平、和/或(ii)来自同一光影或物体的环境刺激,如本领域技术人员将理解的;以及取向和运动训练,其特征在于,训练受试者检测目视局部物体并比未训练时更有效地在所述物体内移动。实际上,低视力复原领域中通常使用的任何视觉刺激技术在此为适用的。

[0180] 在一些实施方案中,使用不同视蛋白基因与本发明的突变体CoChop蛋白和靶向基因表达可以进一步增加光敏感性或改善视力。视觉信息通过视网膜通过两种路径处理:发送光打开的信息的ON通道和发送光关闭的信息的OFF通道。ON通道和OFF通道的存在对于对比敏感性是重要的。ON通道中的视觉信号从ON-视锥双极细胞转播至ON-神经节细胞。打开-视锥双极细胞和打开-神经节细胞响应于光而去极化。在另一方面,OFF通道中的视觉信号从OFF-视锥双极细胞携带至OFF-神经节细胞。关闭-视锥双极细胞和关闭-神经节细胞响应于光而低极化(hypopolarized)。视杆双极细胞负责在暗光下查看东西的能力(暗视觉),其为ON双极细胞(响应于光而去极化)。视杆双极细胞通过AII型无长突细胞(ON型视网膜细胞)将视力信号转播至OFF视锥双极细胞。

[0181] 因此,可以使用双重视紫红质系统来概括整合至视觉处理和视敏度的ON和OFF路径。简言之,本发明的CoChop蛋白可以特异性靶向ON型视网膜神经元(即,ON型神经节细胞和/或ON型双极细胞),同时低极化光传感器(即盐细菌视紫红质或本领域已知的其他氯化物泵)可以靶向OFF型视网膜神经元(即OFF型神经节细胞和/或OFF型双极细胞)以产生ON和OFF路径。特异性靶向优选的细胞亚群可以通过使用不同的细胞类型特异性启动子来实现。例如,CoGhop表达可由mGluR6启动子驱动以用于在ON型视网膜神经元(即,ON型神经节细胞和/或ON型双极细胞)中靶向表达,而低极化通道(诸如盐细菌视紫红质)表达由NK-3启动子驱动以用于在OFF型视网膜神经元(即,OFF型神经节细胞和/或OFF型双极细胞)中靶向表达。

[0182] 恢复视网膜中的ON通道和OFF通道的替代性方法通过向视杆双极细胞或AII型无长突细胞表达去极化光传感器来实现。在此方法中,视杆双极细胞或AII型无长突细胞的去极化可以在视锥双极细胞和下游视网膜神经节细胞的水平下引起ON和OFF反应。因此,维持视网膜中固有的ON通道和OFF通道。

[0183] 递送方法

[0184] 在一些方面中,通过本领域已知的任何方法而施用药物组合物以治疗或预防特定

疾病或病症。在优选的实施方案中,当治疗眼部病症时,使用任何方向方法向玻璃体内位点施用药物组合物。在一些情况下,递送方法可以是通过注射,诸如美国专利公布号2010008170所述的那些,该专利通过引用整体结合在本文中。在一些情况下,直接施用至玻璃体包括经由注射器注射液体药物组合物。在另一个实例中,直接施用可涉及经由插管或用于递送载体或重组病毒的其他适合仪器进行注射。在其他实例中,直接施用可以包括植入物,其还包含用于递送转基因诸如mCoChop的适合载体。在一些情况下,植入物可以直接植入在视网膜中或视网膜附近。

[0185] 通常,载体可以眼内(玻璃体内)注射的悬浮液的形式递送。确切地说,载体通过玻璃体平坦部来跨巩膜注射。

[0186] 定义

[0187] 除非另外指示,否则如本文所述的本公开的组合物和方法可以采用常规技术和分子生物学(包括重组技术)、细胞生物学、生物化学、免疫化学和眼科技术的描述,这些均处于实践此技术的技术人员技能内。此类常规技术包括用于观察和分析受试者中的视网膜或视力的方法、重组病毒的克隆和传播、药物组合物的配制、以及生物化学纯化和免疫化学。适合技术的特定说明可以通过参考本文中的实例来进行。然而,当然也可以使用等效常规程序。此类常规技术和描述可见于标准实验室手册,诸如Green等人编辑,Genome Analysis:A Laboratory Manual Series(第I-IV卷)(1999);Weiner等人编辑,Genetic Variation:A Laboratory Manual(2007);Dieffenbach,Dveksler编辑,PCR Primer:A Laboratory Manual(2003);Bowtell和Sambrook,DNA Microarrays:A Molecular Cloning Manual(2003);Mount,Bioinformatics:Sequence and Genome Analysis(2004);Sambrook和Russell,Condensed Protocols from Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2006);以及Sambrook和Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2002)(全部来自Cold Spring Harbor Laboratory Press);Stryer,L.,Biochemistry(第4版)W.H.Freeman,N.Y.(1995);Gait,"Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach"IRL Press,London(1984);Nelson和Cox,Lehninger,Principles of Biochemistry,第3版,W.H.Freeman Pub.,New York(2000);以及Berg等人,Biochemistry,第5版,W.H.Freeman Pub.,New York(2002),所有这些文献出于所有目的通过引用整体结合在本文中。

[0188] 除非上下文另外清楚地指示,否则如本文所用的单数形式“一个/种(a/an)”和“该”旨在也包括复数个形式。另外,在术语“包括(including)”、“包括了(includes)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“带有(with)”或其变体在详细描述和/或权利要求书中使用的程度上,此类术语旨在以类似于术语“包含(comprising)”的方式包含。

[0189] 范围可以在本文中表示为从“约”一个特定值和/或至“约”另一个特定值。当表示此范围时,另一种情况包括从一个特定值和/或到另一个特定值。类似地,当值表示为近似值时,通过使用先行词“约”,将理解的是该特定值形成另一种情况。还将理解的是,每个范围的端点无论是与另一个端点的相关性还是独立于另一个端点均是有效的。如本文所用的术语“约”是指在特定用途的背景下从所述数值加上或减去15%的范围。例如,约10将包括范围从8.5至11.5。术语“约”还说明测量值的典型误差或不精确度。

[0190] 术语“视网膜变性疾病”涵盖与光感受器变性相关的全部疾病。视网膜变性疾病包

括但不限于色素性视网膜炎、年龄相关性黄斑变性、巴特-比德尔(Bardet-Biedel)综合征、巴森-科恩茨威格(Bassen-Komzweig)综合征、贝斯特(Best)病、无脉络膜病、旋转萎缩回旋形萎缩、莱伯先天性黑蒙、雷夫孙(Refsun)综合征、斯塔加特(Stargardt)病或亚舍(Usher)综合征。

[0191] 在本发明的背景下,如本文所用的术语“治疗(treating/treatment)”意指逆转、减轻、抑制此类术语所适用的病症或病状的进展或者预防该病症或病症或此类病症或病状的一种或多种症状(例如,视网膜变性疾病)。

[0192] 根据本发明,术语“患者”或“有需要的患者”旨在用于罹患或可能罹患视网膜变性疾病的人类或非人类哺乳动物。

[0193] 如本文所预期,表达“分离的核酸”是指任何类型的分离的核酸,其可值得注意地为天然或合成的单链或双链DNA或RNA。具体而言,在核酸为合成的时,其可包含碱基或键的非天然修饰,特别是用于增加对核酸降解的抗性。在核酸为RNA时,这些修饰值得注意地涵盖将其端部加帽或修饰核糖主链的2′位置以便例如通过抑制羟基部分(以产生2′-脱氧核糖或2′-脱氧核糖-2′-氟核糖)或者用烷基基团诸如甲基基团取代羟基部分(以产生2′-O-甲基-核糖)来降低羟基部分的反应性。

[0194] 术语“通道视紫红质”是指用作光门控离子通道的亚视黄基蛋白(视紫红质)的子家族。一些通道视紫红质充当单细胞绿藻中的感官光受体,控制趋光性:响应于光而移动。在其他生物体的细胞中表达,它们使得光能够控制电兴奋性、细胞内酸性、钙流入和其他细胞过程。它们大于许多其他通道视紫红质,具有7跨膜(7TM)区域和长C-端延长。在绿藻中,它们用作引导藻类朝向光源或远离光源并找到对于光合生长最佳的光条件的视觉蛋白。7TM区域显示与充当光驱动泵(菌视紫红质、古紫质和盐细菌视紫红质)或传感器的其他微生物(原核生物)视紫红质的一些同源性。术语还包括于通道视紫红质同源的多肽。

[0195] 当大于80%、优选大于85%、优选大于90%的氨基酸或核酸序列相同或大于约90%、优选大于95%类似(在功能上相同)时,两个氨基酸序列或核酸序列是“基本上同源的”或“基本上类似的”。为了确定两个氨基酸序列或两个核酸的一致性百分比,出于最佳比较目的比对这些序列(例如,空位可以引入到第一氨基酸或核酸序列的序列中以用于与第二氨基酸或核酸序列最佳比对)。然后比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。第一序列中的位置被第二序列中相应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置相同。两个序列之间的同一性百分比随着由序列共用的相同位置的数目而变化。在一个实施方案中,两个序列具有相同长度。两个序列之间的一致性百分比可以使用数学算法来完成。优选地,类似或同源序列通过使用例如GCG(遗传学计算机组,GCG包的程序手册,第7版,Madison,Wis.)pileup程序或任何序列比较算法诸如BLAST、FASTA等比对来确定。

[0196] 如本文所用,术语“载体”是指能够转运它所连接的另一个核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,该质粒是指一种环状双链DNA环,其可以连接至另外的DNA区段。另一种类型的载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可以连接至病毒基因组。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞后被整合到宿主细胞的基因组中,并且因此随着宿主基因组一起复制。此外,某些载体、表达载体能够引导它们可操

作地连接的基因的表达。

[0197] 其他实施方案

[0198] 虽然本发明已结合其详细描述来描述,但是前述描述旨在说明并且不限制本发明的范围,该范围由所附权利要求书的范围限定。其他方面、优点和修饰处于以下权利要求书的范围内。

[0199] 本文所提及的专利和技术文献建立了本领域技术人员可用的知识。本文所引用的所有美国专利和公布或未公布美国专利申请通过引用整体结合在本文中。本文引用的所有公布国外专利和专利申请通过引用整体结合在本文中。本文引用的所有其他公布的参考文献、文件、手稿和科学文献通过引用整体结合在本文中。

[0200] 虽然本发明已具体地结合其优选实施方案示出和描述,本领域技术人员将理解的是,在不背离所附权利要求书所涵盖的本发明的范围的情况下可以做出形式和细节的各种改变。

[0201] 本公开通过以下非限制性实例进一步说明。

[0202] 实施例

[0203] 实施例1-突变体CoChop多肽的形成和分析

[0204] 通道视紫红质(ChR)诸如ChR2是用于视力恢复的有前景的光遗传学光传感器。使用ChR2进行视力恢复的主要障碍为其低光敏感性。我们先前通过经由定点诱变优化其动力学来制成光更敏感的ChR2,包括光最敏感的ChR2突变体ChR2-L132C/T159S。最近,通过对藻类进行重新转录物组测序报告许多ChR变体(Klapoetke等人,2014Nat.Methods 11(3):338-46)。我们发现一种变体CoChR展示大光电流。在本发明中,我们通过经由定点诱变优化其动力学来制成若干高光敏感性CoChR突变体(即突变体CoChop)。这些突变体包括CoCh R-L112C(SEQ ID NO:3)、CoChR-T139C(SEQ ID NO:5)、C68S/V69I(SEQ ID NO:4)、C68T/V69I(SEQ ID NO:7)、CoChR-T145A/S146A(SEQ ID NO:6)、CoChR-L112C/T139C(SEQ ID NO:8)、CoChR-L112C/H94E(SEQ ID NO:9)以及CoChR-L112C/H94E/K264T(SEQ ID NO:10)。CoChR及其突变体展示比具有480nm峰值光谱的ChR2略微红移的光谱曲线(图1)。基于HEK细胞中的电生理记录(图2-5)和来自视网膜神经元的多电极阵列记录(图6)和来自失明小鼠体内的视动行为测试(图7),CoChR突变体的光敏感性(如对于CoChR-L112C所示出)远高于光最敏感的ChR2突变体ChR2-L132C/T159S。另外,在环境光条件下观察到表达CoChR-L112C的小鼠的视动反应(图8)。另外,在视网膜神经元中观察到CoChR-L112C突变体的长期稳定表达(图9)。

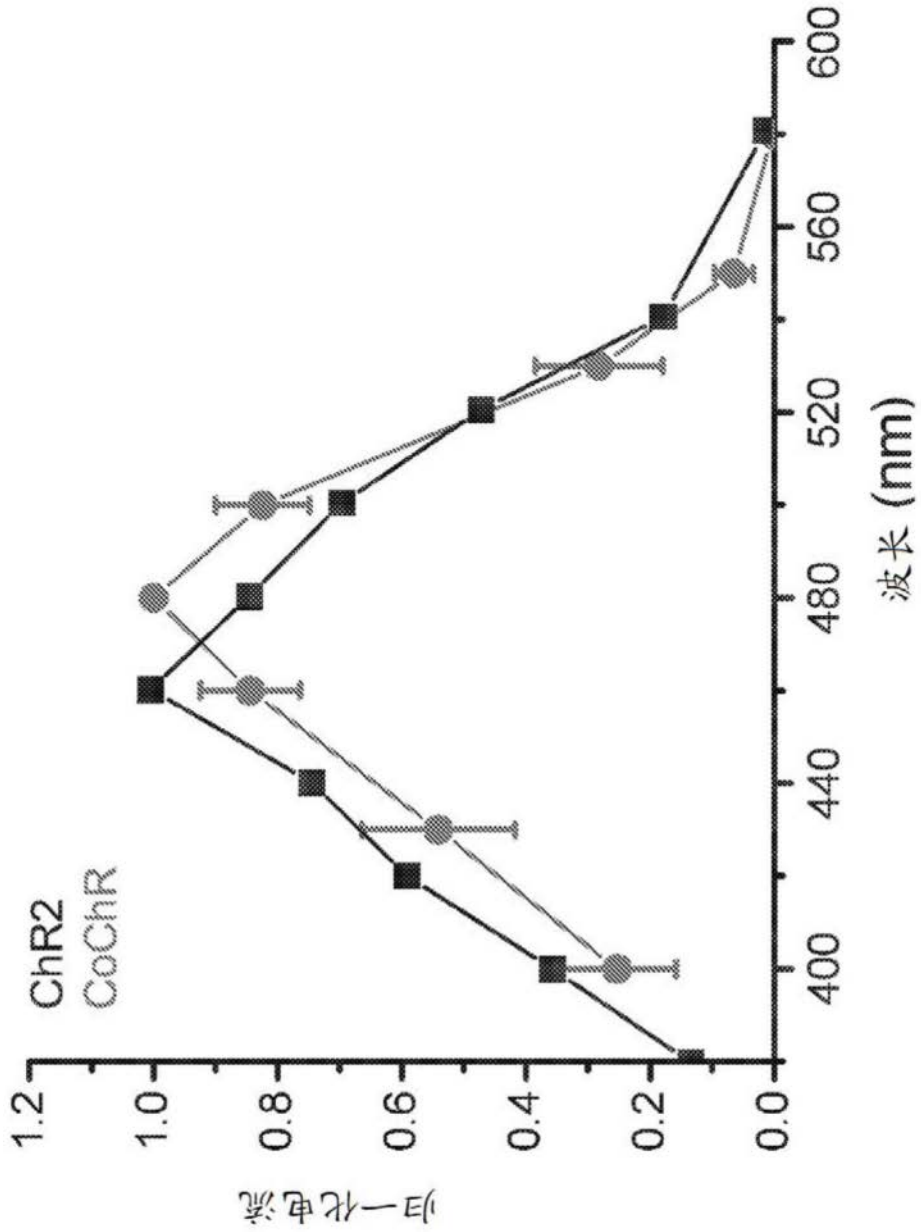

ChR2
CoChR
归一化电流
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
400
440
480
520
560
600
波长 (nm)

图1

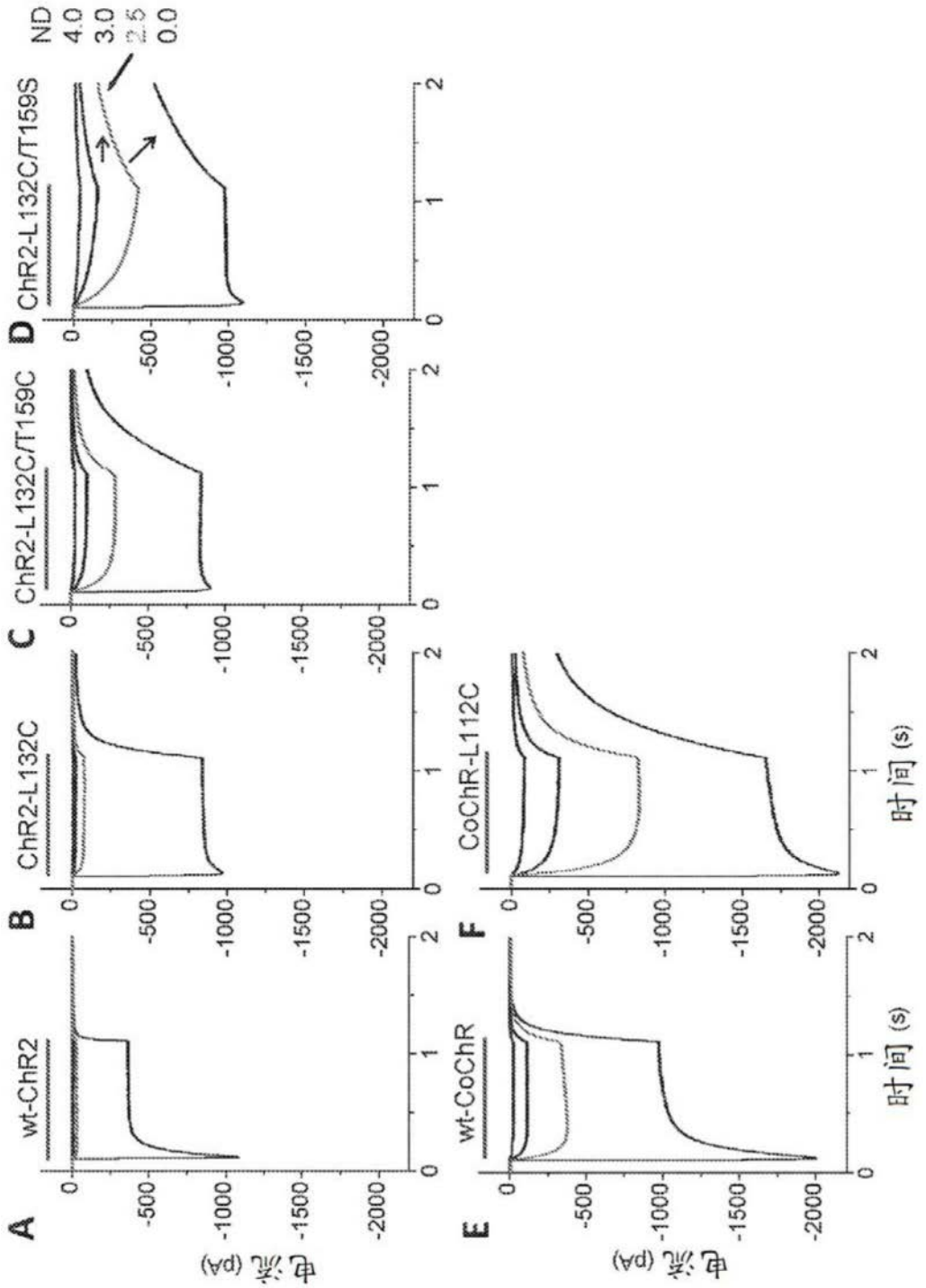

A
wt-ChR2
B
ChR2-L132C
C
ChR2-L132C/T159C
D
ChR2-L132C/T159S
ND
4.0
3.0
2.5
0.0
E
wt-CoChR
F
CoChR-L112C
电流 (pA)
时间 (s)

图2

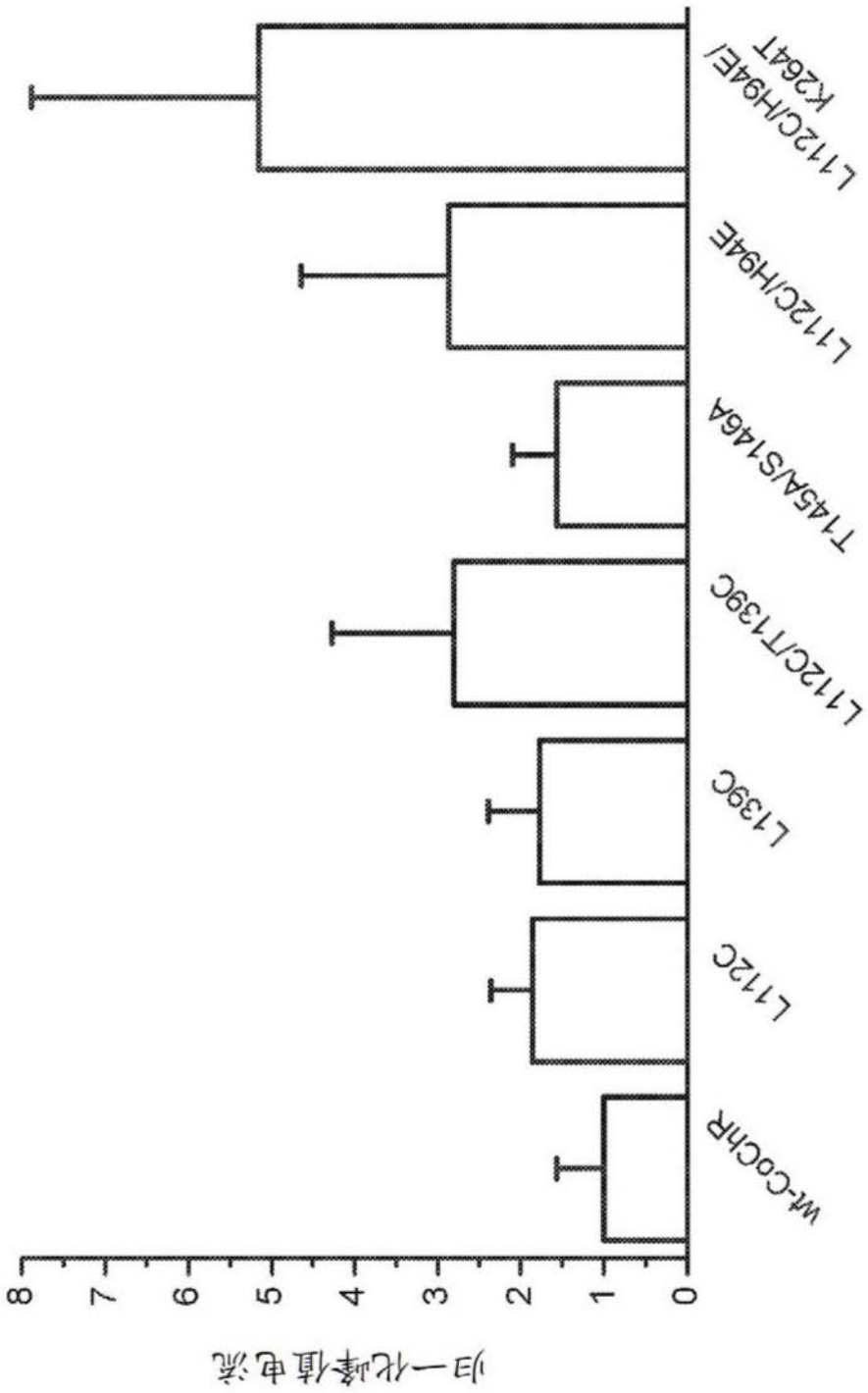

归一化峰值电流
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Wt-CoCHR
L112C
L139C
L112C/T139C
T145A/S146A
L112C/H94E
L112C/H94E/K264T

图3

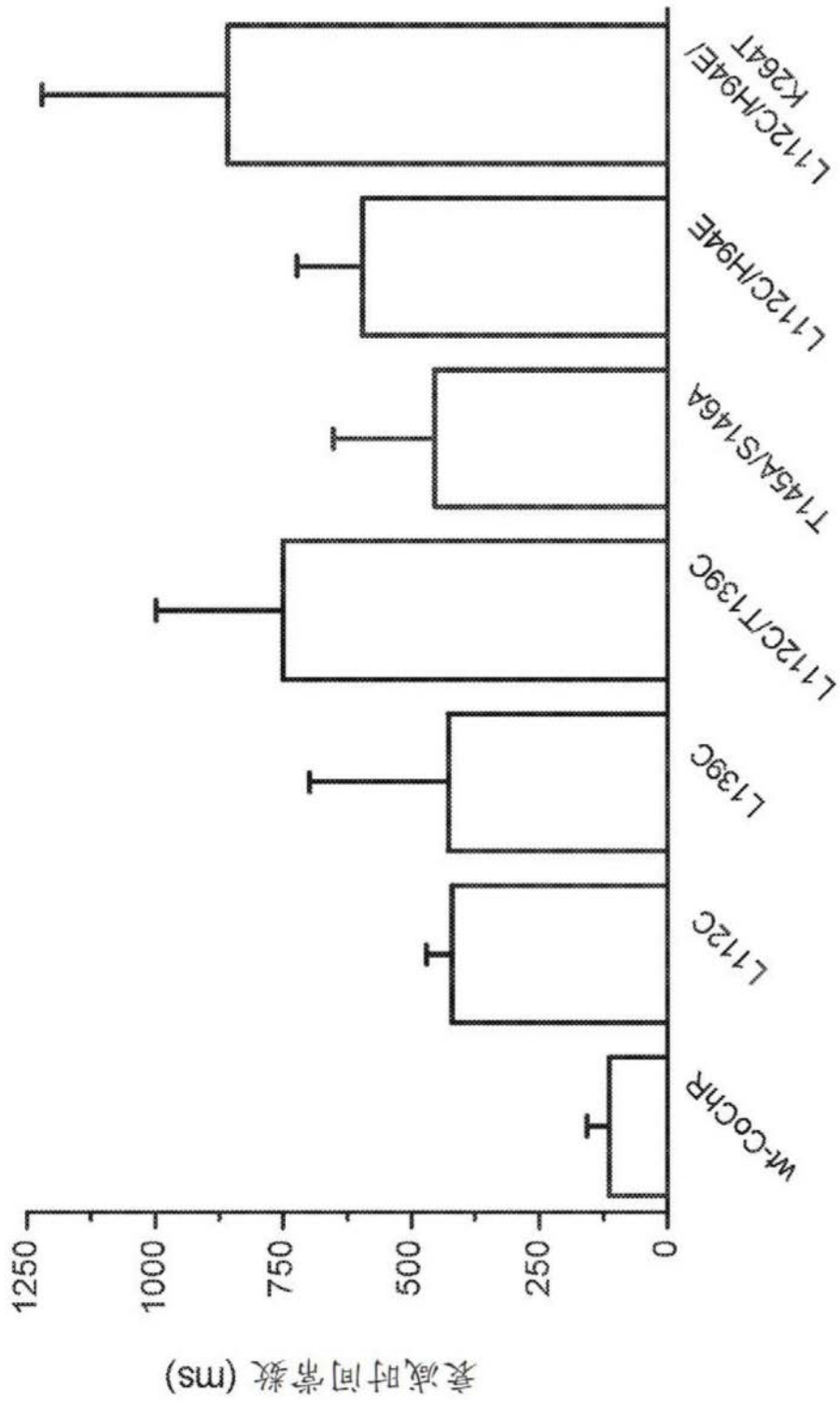

衰减时间常数 (ms)
1250
1000
750
500
250
0
Wt-CoChR
L112C
L139C
L112C/T139C
T145A/S146A
L112C/H94E
L112C/H94E/K264T

图4

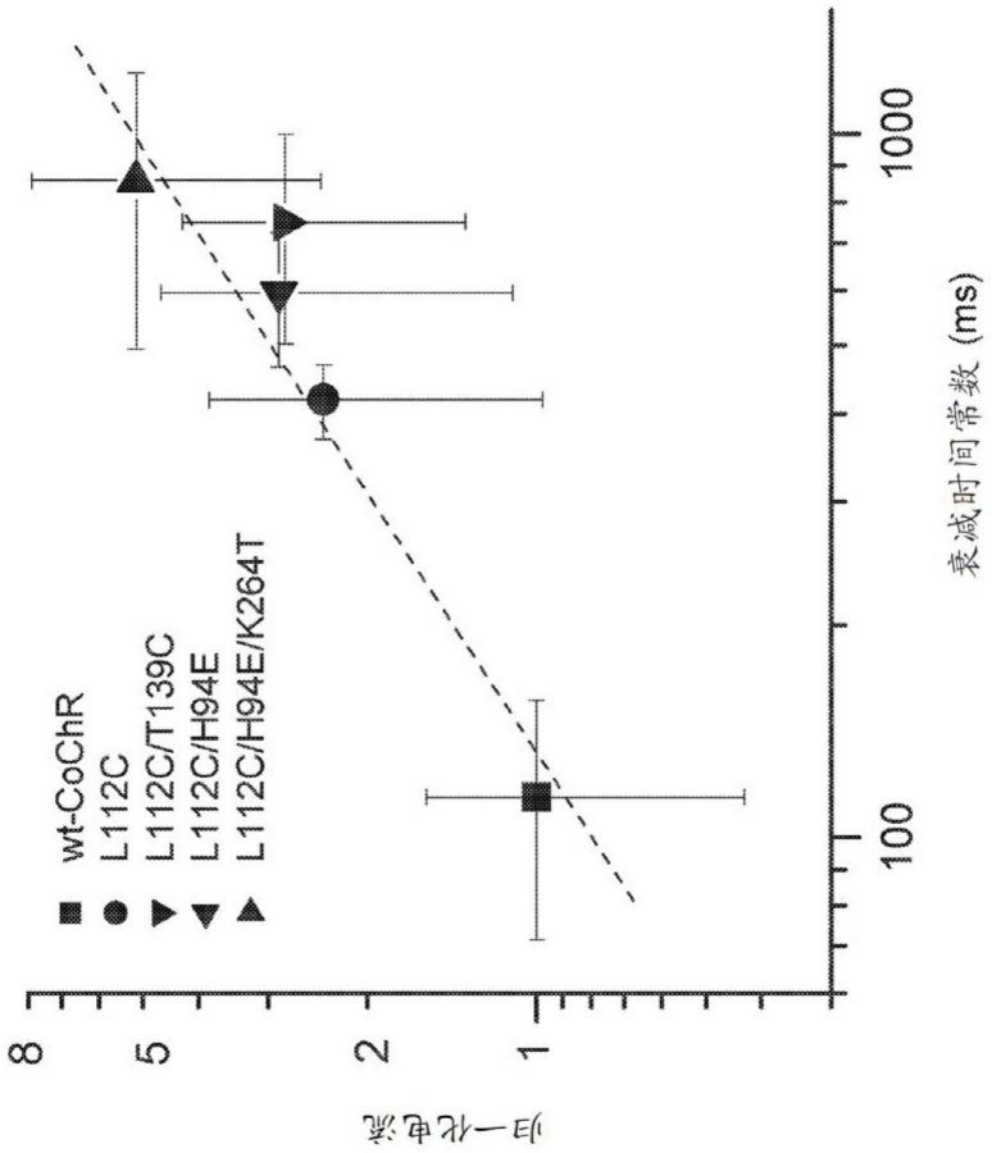

wt-CoChR
L112C
L112C/T139C
L112C/H94E
L112C/H94E/K264T
8
5
2
1
归一化电流
100
1000
衰减时间常数 (ms)

图5

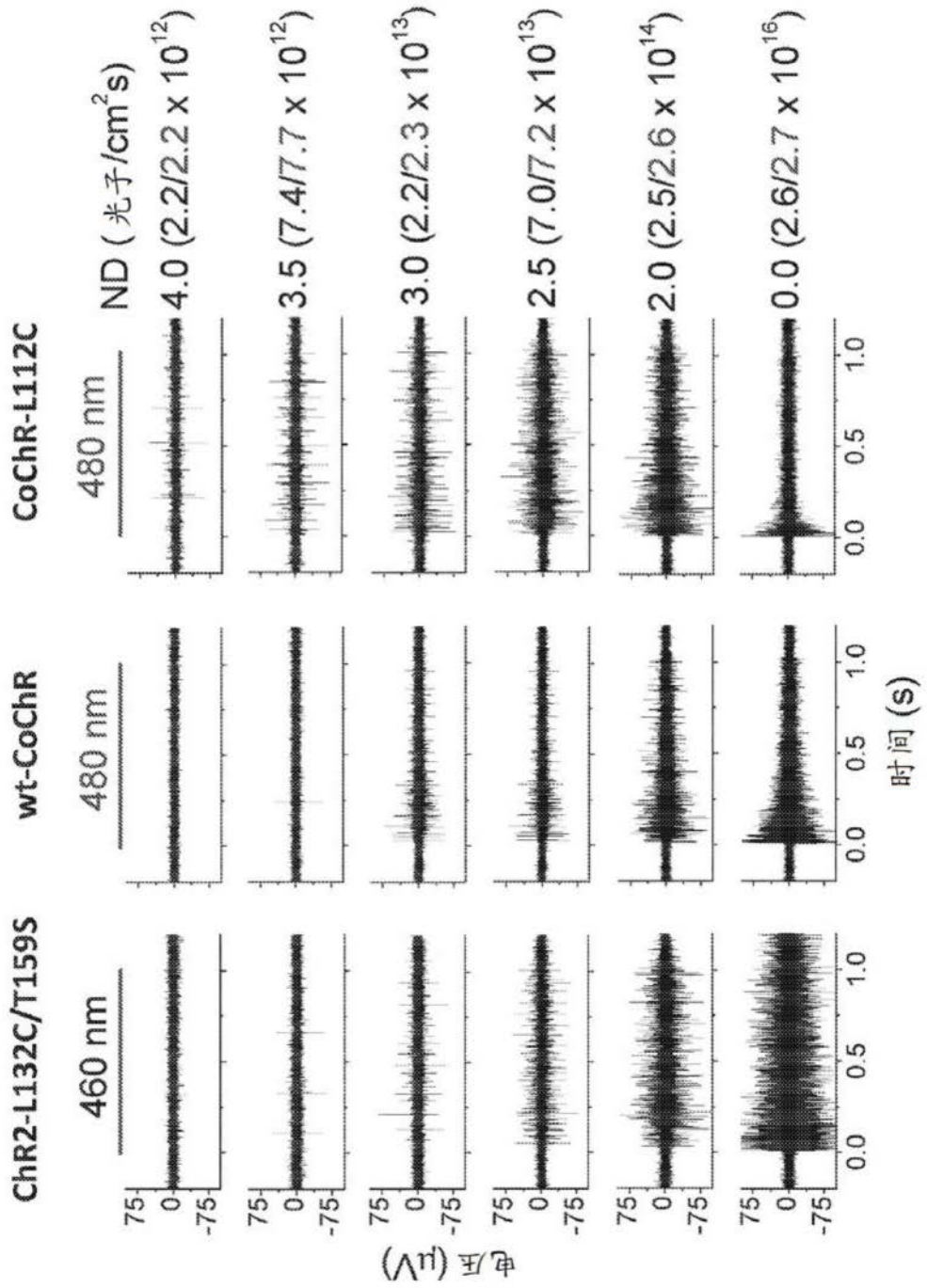

ChR2-L132C/T159S
wt-CoChR
CoChR-L112C
460 nm
480 nm
480 nm
ND (光子/cm²s)
4.0 (2.2/2.2 x 10¹²)
3.5 (7.4/7.7 x 10¹²)
3.0 (2.2/2.3 x 10¹³)
2.5 (7.0/7.2 x 10¹³)
2.0 (2.5/2.6 x 10¹⁴)
0.0 (2.6/2.7 x 10¹⁶)
75
0
-75
0.0
0.5
1.0
电压 (μV)
时间 (s)

图6

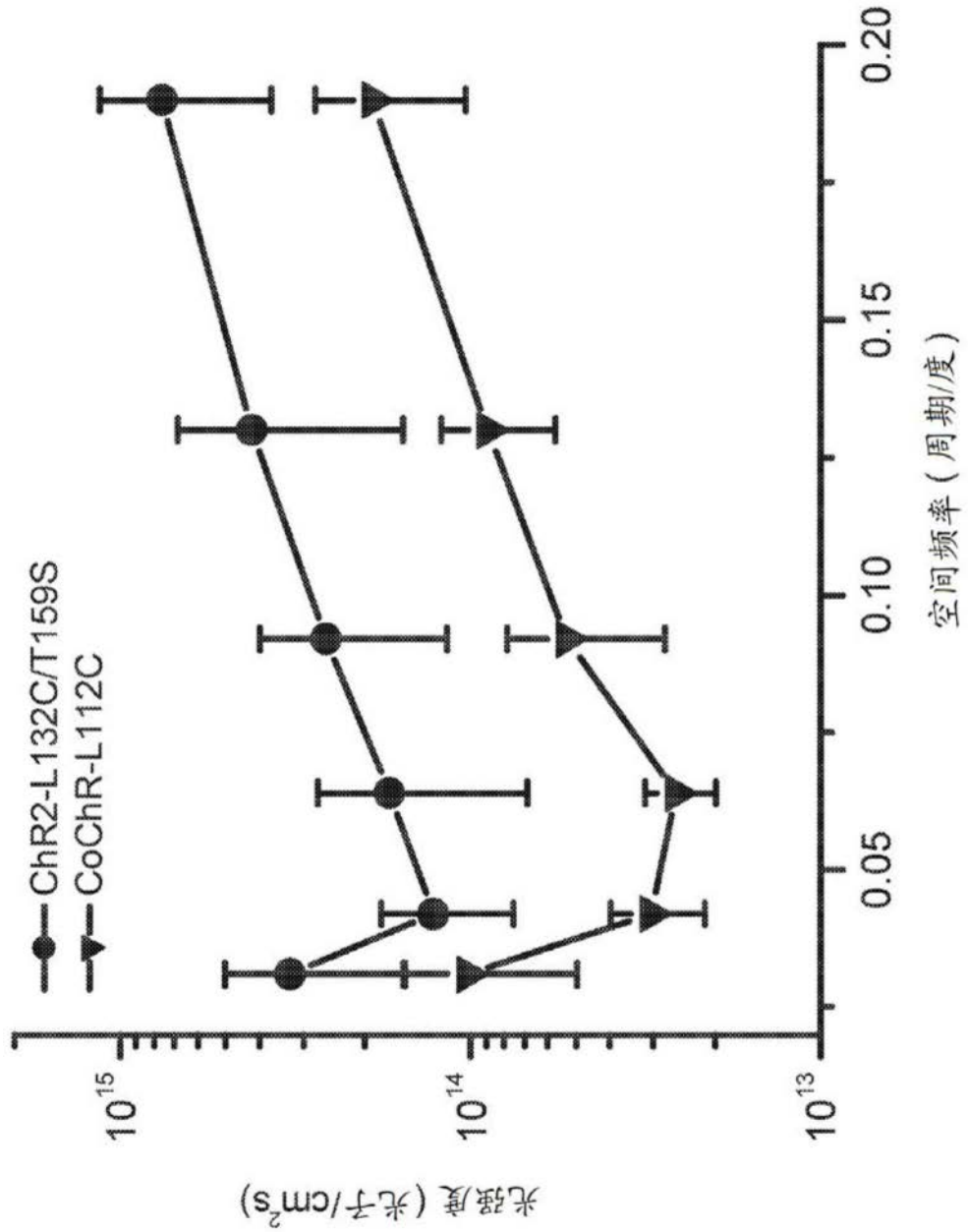

ChR2-L132C/T159S
CoChR-L112C
10^{15}
10^{14}
10^{13}
光强度（光子/cm²s）
0.05
0.10
0.15
0.20
空间频率（周期/度）

图7

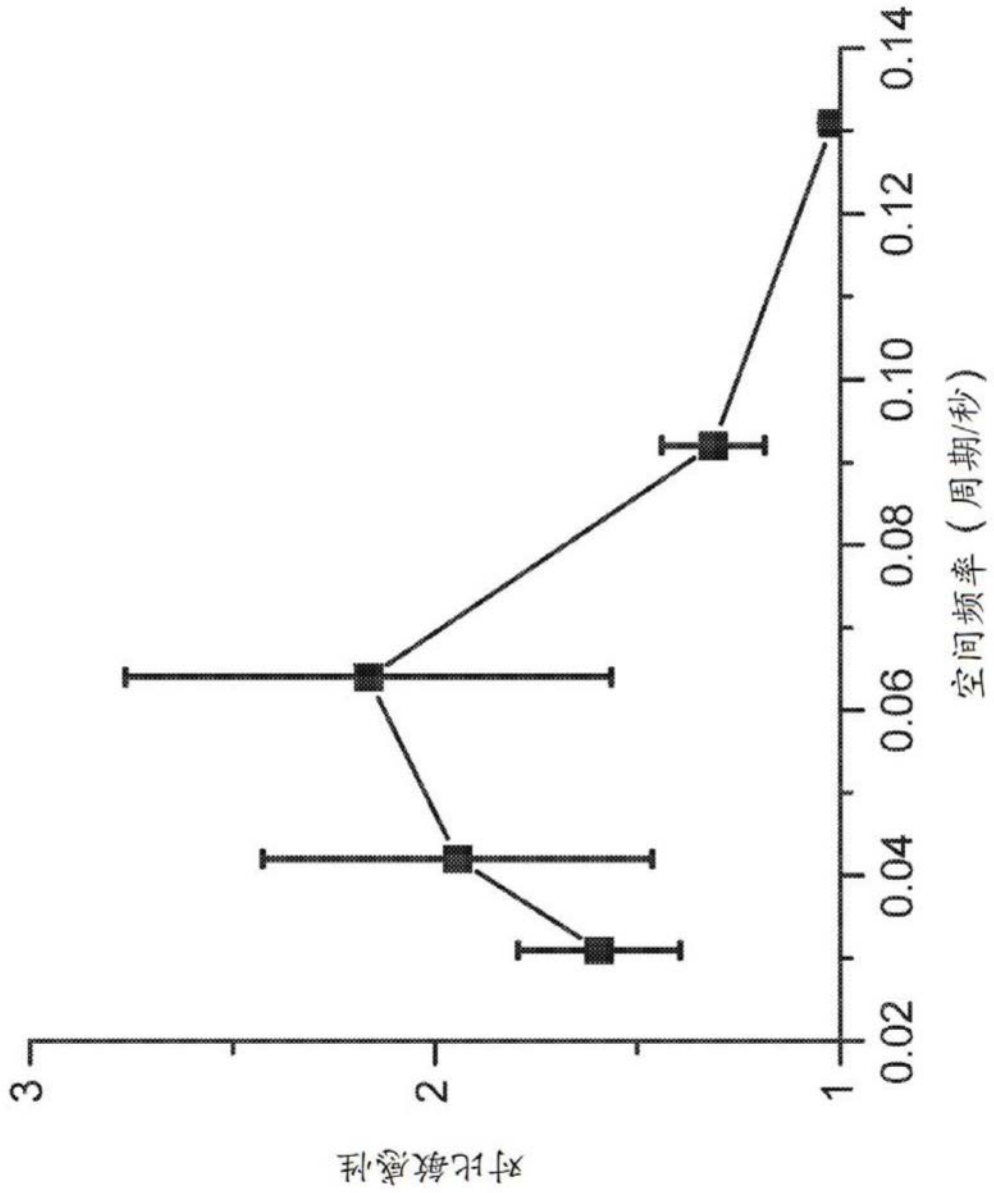


图8

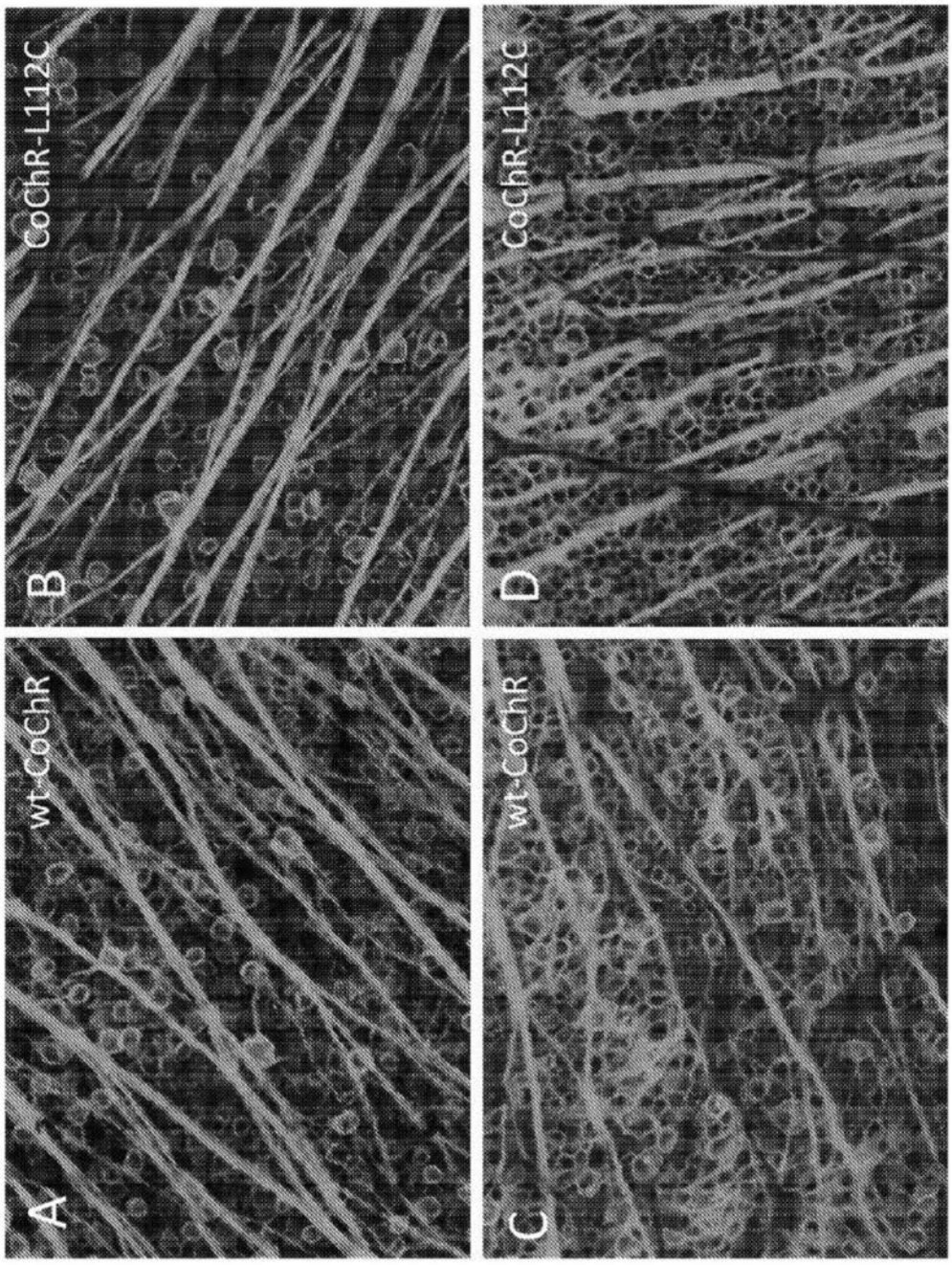

A
wt-CoChR
B
CoChR-L112C
C
wt-CoChR
D
CoChR-L112C
C57BL/6J 小鼠
rd1 小鼠

图9A-D

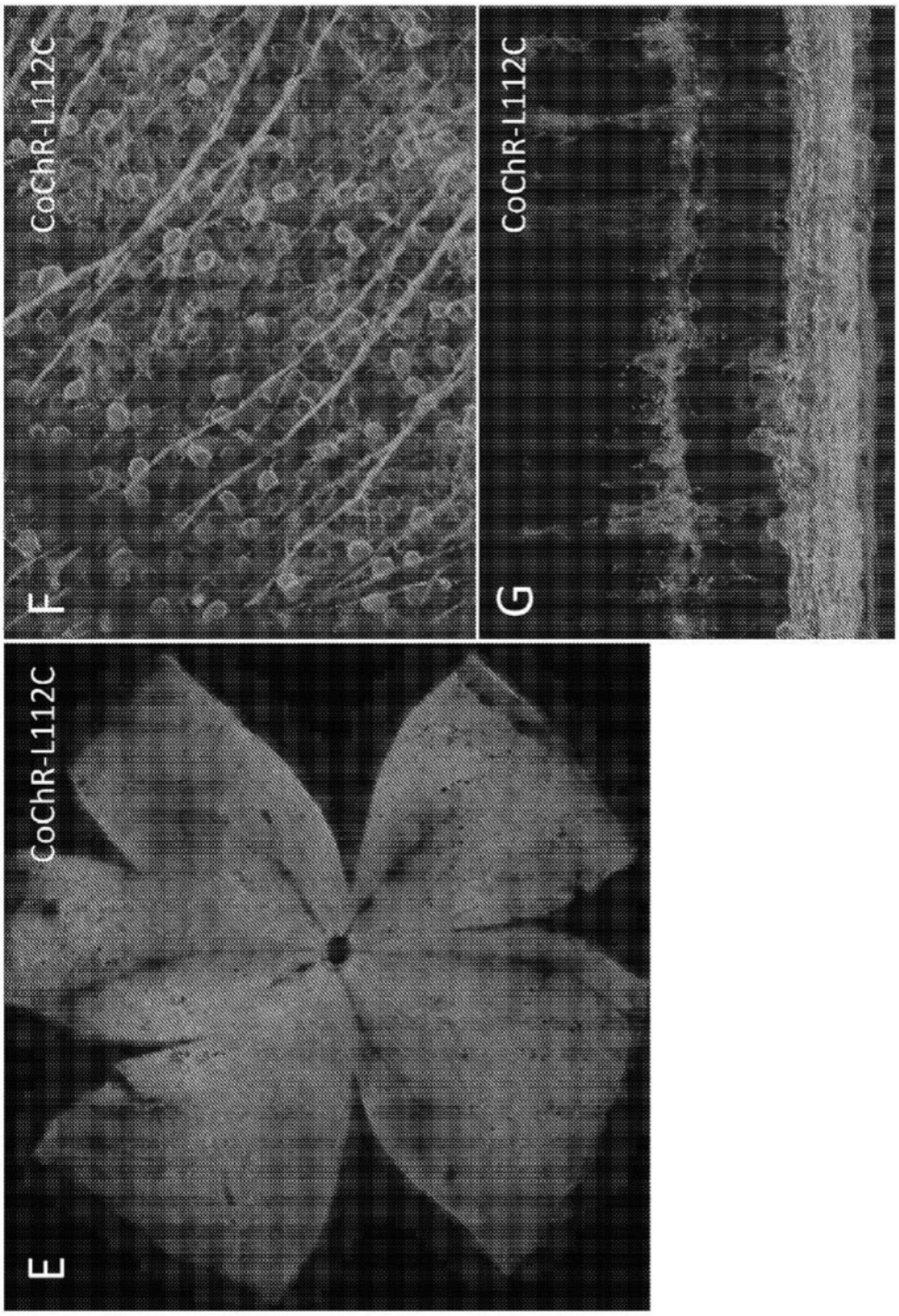


图9E-G