(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118480544 A
(43)申请公布日 2024.08.13

(21)申请号 202410254122.7
(22)申请日 2019.06.03
(30)优先权数据
62/679,585 2018.06.01 US
62/809,539 2019.02.22 US
(62)分案原申请数据
201980036506.9 2019.06.03
(71)申请人 佛罗里达大学研究基金会有限公司
地址 美国
申请人 宾夕法尼亚大学托管会
(72)发明人 阿尔弗雷德·S·莱温
威廉·W·豪斯维特
迈克尔·T·马森吉尔
威廉·贝尔特兰
古斯塔沃·D·阿吉雷
阿图尔·西代西扬
塞缪尔·雅各布森
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 刘振佳
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2010.01)
C12N 15/86(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)

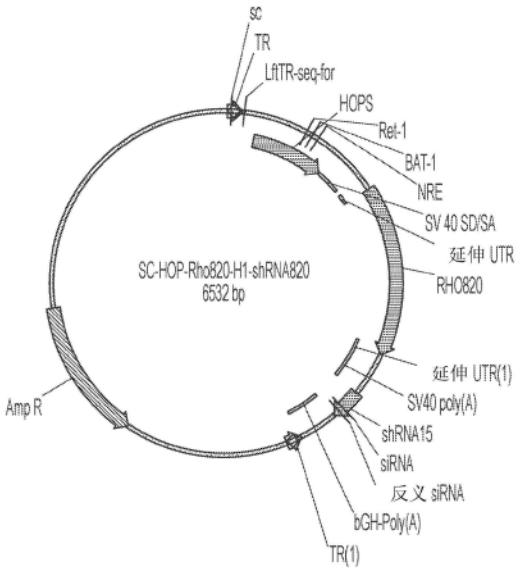
权利要求书2页 说明书50页
序列表（电子公布） 附图43页

(54)发明名称

用于治疗显性视网膜色素变性的组合物和方法

(57)摘要

用于治疗显性视网膜色素变性的组合物和方法。本公开内容的一些方面涉及可用于治疗视网膜色素变性的方法和组合物。在一些方面，本公开内容提供了用于向对象递送干扰RNA以降低对象中内源RHO基因的一个或两个等位基因(例如与视网膜色素变性相关的突变rho等位基因)的表达的组合物和方法。在一些实施方案中，还向所述对象递送对所述干扰RNA具有抗性的替代RHO编码序列。



CN 118480544 A

1.短发夹RNA(shRNA),其包含:

a)包含核苷酸序列GUGGCAUUCUACAUCUUCA(SEQ ID NO:1)的有义链,

b)包含核苷酸序列UGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:2)的反义链,以及

包含核苷酸序列UUCAAGAGA(SEQ ID NO:3)的环。

2.权利要求1所述的shRNA,其包含核苷酸序列:

GUGGCAUUCUACAUCUUCAUUCAAGAGAUGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:4)。

3.载体,其编码权利要求1或2所述的shRNA。

4.权利要求3所述的载体,其还包含重组RHO编码序列,所述重组RHO编码序列不包含被所述shRNA靶向的序列。

5.权利要求4所述的载体,其中所述重组RHO编码序列对于在人细胞中的表达进行了密码子优化。

6.权利要求4或5所述的载体,其中所述重组RHO编码序列包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少90%同一性的核苷酸序列。

7.权利要求6所述的载体,其中所述重组RHO编码序列包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列。

8.载体,其包含与SEQ ID NO:6的核苷酸序列具有至少90%同一性的核苷酸序列。

9.权利要求8所述的载体,其中所述载体包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列。

10.权利要求3至9中任一项所述的载体,其中所述载体是质粒。

11.权利要求3至9中任一项所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

12.权利要求11所述的载体,其中所述病毒载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。

13.权利要求12所述的载体,其中所述rAAV载体是自身互补的。

14.重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,其包含权利要求12或13所述的rAAV载体。

15.权利要求14所述的rAAV颗粒,其中所述rAAV病毒颗粒是AAV血清型5(AAV5)病毒颗粒。

16.组合物,其包含权利要求1或2所述的shRNA、权利要求3至13中任一项所述的载体、或者权利要求14或15所述的rAAV颗粒,以及可药用载体。

17.在对象中调节RHO表达的方法,所述方法包括向所述对象施用权利要求16所述的组合物。

18.在对象中治疗视网膜色素变性的方法,所述方法包括向所述对象施用权利要求16所述的组合物。

19.权利要求17或18所述的方法,其中所述对象是人对象。

20.权利要求16所述的组合物,其用于治疗视网膜色素变性。

21.权利要求16所述的组合物,其用于制造治疗视网膜色素变性的药物。

22.权利要求16所述的组合物在治疗视网膜色素变性中的用途。

23.权利要求16所述的组合物在制造治疗视网膜色素变性的药物中的用途。

24.短发夹核酸(shRNA)分子,其包含:

a)包含以下序列组之一的有义及反义链:

i)包含核苷酸序列CUGCCUACAUGUUUCUGCU(SEQ ID NO:21)的有义链和包含核苷酸序列AGCAGAAACAUGUAGGCAG(SEQ ID NO:22)的反义链,

ii)包含核苷酸序列CCUACAUGUUUCUGCUGAU(SEQ ID NO:23)的有义链和包含核苷酸序

列AUCAGCAGAAACAUGUAGG(SEQ ID NO:24)的反义链,

iii)包含核苷酸序列GCAUGGUCAUCAUCAUGGU(SEQ ID NO:25)的有义链和包含核苷酸序列ACCAUGAUGAUGACCAUGC(SEQ ID NO:26)的反义链,或

iv)包含核苷酸序列UGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:1)的有义链和包含核苷酸序列UGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:2)的反义链;以及

b)包含核苷酸序列UUCAAGAGA(SEQ ID NO:3)的环。

25.载体,其编码权利要求24所述的shRNA。

26.权利要求25所述的载体,其还包含重组RHO编码序列,所述重组RHO编码序列不包含被所述shRNA靶向的序列。

27.权利要求26所述的载体,其中所述重组RHO编码序列对于在人细胞中的表达进行了密码子优化。

28.权利要求26或27所述的载体,其中所述重组RHO编码序列包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少90%同一性的核苷酸序列。

29.权利要求28所述的载体,其中所述重组RHO编码序列包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列。

30.权利要求25至29中任一项所述的载体,其中所述载体是质粒。

31.权利要求25至29中任一项所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

32.权利要求31所述的载体,其中所述病毒载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。

33.权利要求32所述的载体,其中所述rAAV载体是自身互补的。

34.重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,其包含权利要求32或33所述的rAAV载体。

35.权利要求34所述的rAAV颗粒,其中所述rAAV病毒颗粒是AAV血清型5(AAV5)病毒颗粒。

36.组合物,其包含权利要求24所述的shRNA、权利要求25至33中任一项所述的载体、或者权利要求34或35所述的rAAV颗粒,以及可药用载体。

37.在对象中调节RHO表达的方法,所述方法包括向所述对象施用权利要求36所述的组合物。

38.在对象中治疗视网膜色素变性的方法,所述方法包括向所述对象施用权利要求36所述的组合物。

39.权利要求37或38所述的方法,其中所述对象是人对象。

40.权利要求36所述的组合物,其用于治疗视网膜色素变性。

41.权利要求36所述的组合物,其用于制造治疗视网膜色素变性的药物。

42.权利要求36所述的组合物在治疗视网膜色素变性中的用途。

43.权利要求36所述的组合物在制造治疗视网膜色素变性的药物中的用途。

用于治疗显性视网膜色素变性的组合物和方法

[0001] 本申请是申请号为201980036506.9、发明名称为“用于治疗显性视网膜色素变性的组合物和方法”的中国专利申请的分案申请,该母案申请是2019年06月03日提交的PCT国际专利申请PCT/US2019/035159进入中国国家阶段的申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2018年6月1日提交的美国临时申请No.62/679,585和2019年2月22日提交的美国临时申请No.62/809,539的申请日的权益,其各自的全部内容通过引用并入。

技术领域

[0004] 本公开内容的一些方面涉及用于在对象(例如,人)中治疗视网膜色素变性(例如,显性视网膜色素变性)的组合物和方法。

背景技术

[0005] 常染色体显性视网膜色素变性(autosomal dominant retinitis pigmentosa,adRP)是一种致盲性疾病,其在12,000人中影响1人。这些个体中有相当一部分在视紫红质基因(RHO)中携带突变,该基因是视网膜中感光细胞的捕光色素蛋白(light harvesting pigment protein)。该疾病是显性的,因为从任一亲本遗传该突变基因都导致视网膜变性和最终失明。在RHO中鉴定出的超过100种不同突变导致失明。目前尚无用于adRP的经批准药物或基因疗法治疗。因此,需要涉及adRP和相关病症的任何和所有原因的有效治疗选择。

发明内容

[0006] 本公开内容的一些方面涉及用于在对象(例如,人)中治疗视网膜色素变性(例如,显性视网膜色素变性)的组合物和方法。在一些实施方案中,通过向对象(例如,向患有视网膜色素变性的对象,例如向患有显性视网膜色素变性的人)施用短发夹RNA(short hairpin RNA,shRNA)分子来使对象(例如,人)的视紫红质基因(RHO基因)的一个或两个等位基因沉默。在一些实施方案中,还向对象施用替代RHO编码序列以提供功能性RHO蛋白,例如以恢复对象的光感受器功能。在一些实施方案中,替代RHO编码序列相对于内源基因等位基因具有一个或更多个核苷酸替换,这使得替代基因对干扰RNA的作用具有抗性。在一些实施方案中,替代RHO编码序列是包含一个或更多个(例如1、2、3、4、5或更多个)替换以使基因对由shRNA介导的降解具有抗性(也称为“硬化”)的人RHO编码序列(例如,野生型人RHO编码序列)。

[0007] 在一些方面,本公开内容提供了短发夹RNA(shRNA),其包含:包含核苷酸序列GUGGCAUUCUACAUCUUCA(SEQ ID NO:1)的有义链、包含核苷酸序列UGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:2)的反义链、以及包含核苷酸序列UUCAAGAGA(SEQ ID NO:3)的环。

[0008] 在一些方面,本公开内容提供了短发夹RNA(shRNA),其包含:包含核苷酸序列GUGGCAUUCUACAUCUUCA(SEQ ID NO:1)的有义链、包含核苷酸序列UGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:2)的反义链、以及环。环可以由九个核苷酸组成。

[0009] 在一些实施方案中,shRNA包含核苷酸序列:

[0010] GUGGCAUUCUACAUCUUCAUUCAAGAGAUGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,shRNA由核苷酸序列

[0011] GUGGCAUUCUACAUCUUCAUUCAAGAGAUGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:4)组成。在一些实施方案中,shRNA包含核苷酸序列:

[0012] GUGGCAUUCUACAUCUUCAUUCAAGAGAUGAAGAUGUAGAAUGCCACUU(SEQ ID NO:36)。在一些实施方案中,shRNA由核苷酸序列

[0013] GUGGCAUUCUACAUCUUCAUUCAAGAGAUGAAGAUGUAGAAUGCCACUU(SEQ ID NO:36)组成。

[0014] 在一些方面,本公开内容提供了短发夹RNA(shRNA)分子,其包含:a)包含以下序列组之一的有义及反义链:i)包含核苷酸序列CUGCCUACAUGUUUCUGCU(SEQ ID NO:21)的有义链和包含核苷酸序列AGCAGAAACAUGUAGGCAG(SEQ ID NO:22)的反义链;ii)包含核苷酸序列CCUACAUGUUUCUGCUGAU(SEQ ID NO:23)的有义链和包含核苷酸序列AUCAGCAGAAACAUGUAGG(SEQ ID NO:24)的反义链;iii)包含核苷酸序列GCAUGGUCAUCAUCAUGGU(SEQ ID NO:25)的有义链和包含核苷酸序列ACCAUGAUGAUGACCAUGC(SEQ ID NO:26)的反义链;或iv)包含核苷酸序列GUGGCAUUCUACAUCUUCA(SEQ ID NO:1)的有义链和包含核苷酸序列UGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:2)的反义链;以及b)包含核苷酸序列UUCAAGAGA(SEQ ID NO:3)的环。

[0015] 在一些方面,本公开内容提供了短发夹RNA(shRNA)分子,其包含:a)包含以下序列组之一的有义及反义链:i)包含核苷酸序列CUGCCUACAUGUUUCUGCU(SEQ ID NO:21)的有义链和包含核苷酸序列AGCAGAAACAUGUAGGCAG(SEQ ID NO:22)的反义链;ii)包含核苷酸序列CCUACAUGUUUCUGCUGAU(SEQ ID NO:23)的有义链和包含核苷酸序列AUCAGCAGAAACAUGUAGG(SEQ ID NO:24)的反义链;iii)包含核苷酸序列GCAUGGUCAUCAUCAUGGU(SEQ ID NO:25)的有义链和包含核苷酸序列ACCAUGAUGAUGACCAUGC(SEQ ID NO:26)的反义链;或iv)包含核苷酸序列GUGGCAUUCUACAUCUUCA(SEQ ID NO:1)的有义链和包含核苷酸序列UGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:2)的反义链;以及b)由九个核苷酸组成的环。

[0016] 在一些实施方案中,短发夹RNA(shRNA)分子包含以下核苷酸序列之一或由其组成:

[0017] CUGCCUACAUGUUUCUGCUUUCAAGAGA AGCAGAAACAUGUAGGCAG(SEQ ID NO:27);

[0018] CCUACAUGUUUCUGCUGAUU UCAAGAGAAUCAGCAGAAACAUGUAGG(SEQ ID NO:28);GCAUGGUCAUCAUCAUGGUUUCAAGAGAACCAUGAUGAUGACCAUGC(SEQ ID NO:29);或

[0019] GUGGCAUUCUACAUCUUCAUUCAAGAGAUGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,短发夹核酸(shRNA)分子包含以下核苷酸序列之一或由其组成:

[0020] CUGCCUACAUGUUUCUGCUUUCAAGAGAAGCAGAAACAUGUAGGCAGUU(SEQ ID NO:37);

[0021] CCUACAUGUUUCUGCUGAUUUCAAGAGAAUCAGCAGAAACAUGUAGGUU(SEQ ID NO:38);

[0022] GCAUGGUCAUCAUCAUGGUUUCAAGAGAACCAUGAUGAUGACCAUGCUU(SEQ ID NO:39);或

[0023] GUGGCAUUCUACAUCUUCAUUCAAGAGAUGAAGAUGUAGAAUGCCACUU(SEQ ID NO:36)。

[0024] 在另一些方面,本公开内容提供了编码上述实施方案中任一个或如本文在其他地方所述的shRNA的载体。在一些实施方案中,shRNA编码序列可操作地连接至启动子,例如人H1 RNA启动子。

[0025] 在一些实施方案中,载体还包含重组RHO编码序列,所述重组RHO编码序列不包含被shRNA靶向的序列。在一些实施方案中,重组RHO编码序列对于在人细胞中的表达进行了密码子优化。在一些实施方案中,重组RHO编码序列包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少90%(例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%)同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,重组RHO编码序列包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有1、2、3、4、5、或5至10个不同核苷酸的核苷酸序列。在一些实施方案中,重组RHO编码序列包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列。在一些实施方案中,重组RHO编码序列可操作地连接至启动子,例如人视蛋白近端启动子。在一些实施方案中,载体是质粒。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。在一些实施方案中,rAAV载体是自身互补的。

[0026] 在另一些方面,本公开内容提供了载体,其包含与SEQ ID NO:6的核苷酸序列具有至少90%(例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%)同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,重组RHO编码序列包含与SEQ ID NO:6的核苷酸序列具有1、2、3、4、5、或5至10个不同核苷酸的核苷酸序列。在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列。在一些实施方案中,载体是质粒。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。在一些实施方案中,rAAV载体是自身互补的。

[0027] 在另一些方面,本公开内容提供了重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,其包含上述或如本文其他地方所述的任一种rAAV载体。在一些实施方案中,rAAV颗粒是rAAV血清型5(rAAV5)颗粒。

[0028] 在另一些方面,本公开内容提供了组合物,其包含上述或如本文其他地方所述的任一种shRNA、载体或rAAV颗粒,以及可药用载体。在一些实施方案中,本公开内容提供了在对象(例如,人对象)中调节RHO表达的方法,所述方法包括向所述对象施用所述组合物。在一些实施方案中,本公开内容提供了在对象(例如,人对象)中治疗视网膜色素变性的方法,所述方法包括向所述对象施用所述组合物。在一些实施方案中,对象是哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是啮齿动物或狗。在一些实施方案中,哺乳动物是人(例如,患有或已知患有、例如被诊断为患有视网膜色素变性、例如显性视网膜色素变性的人)。在一些实施方案中,所述组合物用于治疗视网膜色素变性。在一些实施方案中,所述组合物用于制造治疗视网膜色素变性的药物。

[0029] 在以下附图、实施例和权利要求书中描述了这些和其他方面。

附图说明

[0030] 以下附图构成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本公开内容的某些方面,其可以通过参考这些附图中的一个或更多个并结合本文给出的具体实施方案的详细描述更好地理解。应当理解,附图中示出的数据绝不限制本公开内容的范围。

[0031] 图1A-1H示出了人视紫红质(RHO)的野生型(WT)、P23H、T17M和shRNA820抗性(RHO_{820})变体的shRNA介导的敲低。用表达WT、P23H、T17M或shRNA820抗性(RHO_{820})的具有C端turboGFP标签的人RHO(RHO-tGFP)的质粒以及编码空DNA(无shRNA)、对照shRNA、$shRNA_{131}$、$shRNA_{134}$或$shRNA_{820}$的rAAV2质粒(用泳道标记表示)转染HEK293T细胞。还包括无DNA转染对

照。(图1A、1C、1E、1G)针对turboGFP标签和作为上样对照的β-微管蛋白探测的从经转染的HEK293T细胞分离的蛋白质样品的免疫印迹。(图1B、1D、1F、1H)RHO-GFP的单体形式(上排)以及RHO-GFP的单体形式和聚集形式(下排)的相对定量。每个western印迹的第一个泳道包含来自Li-Cor的Chameleon Duo预染蛋白质梯。棒表示三个技术重复的平均值,误差条表示SEM。ns.=不显著,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

[0032] 图2A-2H示出了$shRNA_{820}$在野生型(WT)视网膜中对视紫红质的抑制。(图2A-2C)与未注射对照(图2A)相比,在用1×10^{11}(图2B)和5×10^{11}vg/mL(图2C)滴度的scAAV2/5-H1-$shRNA_{820}$注射之后7-8周来自代表性WT眼的体内成像结果。示出的是OCT扫描(左)、经归一化的内段/外段(inner/outer segment,IS/OS)强度地形图(中间)和外核层(outer nuclear layer,ONL)厚度地形图(右)。点线,注射泡边界。箭头,显示在左侧的OCT的位置。(图2D、2E)在用一系列滴度注射的十只眼中注射泡(水平线阴影圆圈,上图)和未注射对照位置(斜线阴影圆圈,下图)中取样的经归一化IS/OS强度(图2D)和ONL厚度(图2E)。符号代表33至95个样品的组平均值(±SD)(参见图12)。虚线表示在未注射的对照眼中相同视网膜位置处取样的相应参数的第99百分位数界限。下拉箭头估计了对应于向可检测效果转变的滴度。(图2F)苏木精/伊红染色的(上排)和视紫红质(RHO)免疫标记的视网膜冰冻切片的显微照片,显示了注射之后7-8周经处理(Tx;1-10×10^{11}vg/mL滴度范围)和未经处理(UnTx)区域中ONL和外段(OS)的形态。(图2G)用1-50×10^{11}vg/mL滴度处理的WT狗的视网膜的示意图,显示了在注射之后7-8周用于定量视紫红质(RNA和蛋白质)表达的神经视网膜穿孔物的位置。虚线,泡边界;斑点区域:毯区。(图2H)以不同载体滴度注射的眼的作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中内源犬RHO RNA剩余水平的定量。以不同载体滴度注射的眼的代表性免疫印迹和作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中内源犬RHO蛋白剩余水平的定量。标记例如N282-OD是指动物和眼;OSasOD标示是指为了可比较性而显示为右眼的左眼。

[0033] 图3A-3D示出了$shRNA_{820}$在RHO突变视网膜中对视紫红质的抑制。(图3A)用1-$10x10^{11}$vg/mL滴度的scAAV2/5-H1-$shRNA_{820}$注射的四只RHO突变狗眼的眼底的示意图,显示了在注射之后8-10周用于定量视紫红质(RNA和蛋白质)表达的神经视网膜穿孔物的位置。虚线,泡边界;斑点区域:毯区。(图3B)以不同滴度注射的眼的作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中内源犬RHO RNA剩余水平的定量。以1-50×10^{11}vg/mL滴度注射的眼的代表性免疫印迹和作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中内源犬RHO蛋白剩余水平的定量。(图3C)以1-10×10^{11}vg/mL滴度处理的四只RHO突变狗眼中在光暴露之后两周(注射之后8-10周)的外核层(ONL)厚度地形图。点线,泡边界;虚线,ONL营救边界。插图,显著性图,显示了ONL厚度(左)和IS/OS强度(右)值与未注射对照的第99百分位数置信区间进行逐点比较的视网膜区域。(图3D)H&E染色(上排)和视紫红质(RHO)/人视锥拘留蛋白(human cone arrestin,hCA)共免疫标记的视网膜冰冻切片的显微照片,显示了(图3C)中显示的同一眼的经处理(Tx;1-10×10^{11}vg/mL滴度范围)和未经处理(UnTx)区域中在光暴露之后两周(注射之后8-10周)的ONL和外段(OS)的形态。

[0034] 图4A-4G显示了用单载体抑制和替代视紫红质阻止了RHO突变视网膜中的视网膜变性。(图4A-4B)用5×10^{11}vg/mL滴度的scAAV2/5-hOP-RHO_{820}-H1-$shRNA_{820}$注射的两只RHO突变眼中在注射之后/光暴露之前(注射之后)和在光暴露之后两周(LE之后)的外核层(ONL)

厚度地形图。点线,泡边界;虚线,ONL营救边界。插图,图3A-3D中描述的显著性图。(图4C-4D)视紫红质(RHO)/人视锥拘留蛋白(hCA)共免疫标记的视网膜冰冻切片,显示了(图4A-4B)中显示的同一眼的经处理和未经处理(UnTx)区域中ONL和外段(OS)的形态。(图4E)以5×10^{11}vg/mL滴度注射的四只RHO突变狗眼的眼底的示意图,显示了用于定量视紫红质(RNA和蛋白质)表达的神经视网膜穿孔物的位置。虚线,泡边界;斑点区域:毯区。(图4F)经注射眼的作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中内源犬RHO RNA剩余水平的定量。(图4G)经注射眼的作为未经处理区域中测量的内源犬RHO的生理水平的百分比的经处理视网膜区域中存在的外源人RHO RNA(RHO_{820})的水平的定量。经注射眼的代表性免疫印迹和作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中总(内源犬和RHO_{820})RHO蛋白剩余水平的定量。

[0035] 图5A-5D显示了用组合了对视紫红质的抑制和替代的单载体处理的RHO突变视网膜中视网膜结构和功能的长至5周的保护。(图5A)上图,时间线,显示了在两只RHO突变狗的一只眼中注射scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$(5×10^{11}vg/mL滴度)(对侧眼注射BSS)、光暴露(LE1-LE4)、OCT成像和ERG时段的时间点。下图,用scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$注射的眼在注射之前、注射之后11周(临LE1前)、LE1之后1.5周和LE4之后2.1周的代表性外核层(ONL)厚度图。虚线,ONL营救边界。视神经头(黑色圆圈)和大血管(黑色实线)、毯边界(灰色实线)和中央凹样区域(椭圆)重叠(中间排)。插图,图3A-3D中描述的显著性图。(图5B)示意图(左)显示了用scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$注射的两只RHO突变眼的经处理区域中为了定量ONL厚度和IS/OS强度而取样的视网膜位置。与未经注射的对照相比,经注射的眼中ONL厚度(中)和IS/OS强度(右)的平均值(±SD)差异的纵向定量。水平虚线表示WT变异性的界限(+/-3SD)。(图5C)在一只眼中注射scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$(实线)并且在对侧眼中注射BSS(虚线)的RHO突变狗中在四次光暴露时段中每一次之后约2周时经过暗适应而记录的视杆(-1.7log cd.s.m^{-2})、混合视杆-视锥(0.51log cd.s.m^{-2})以及经过光适应而记录的对单次刺激(0.51log cd.s.m^{-2})或29-Hz视锥闪烁(0.26logcd.s.m^{-2})的视锥响应的代表性ERG迹线。(图5D)在与(图5C)中显示的类似时间点的在一只眼中注射scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$(水平线阴影)并且在对侧眼中注射BSS(斜线阴影)的两只RHO突变狗中混合视杆-视锥a波和b波(上图)以及视锥1Hz和29Hz闪烁响应(下图)的最大振幅的纵向定量。

[0036] 图6显示了转基因质粒AAV-$shRNA_{820}$-RHO_{820}的图。

[0037] 图7显示了人视紫红质的氨基酸序列,示出了已知突变和缺失的位点(基于Athanasiou et al.(15)的综述)以及在本发明研究中评价的shRNA和核酶敲低试剂的靶位点。

[0038] 图8显示了锤头状核酶525(Rz525)对人视紫红质mRNA的消化。在用表达Rz525的质粒共转染的HEK293细胞中通过萤光素酶测定测量的野生型(白色条)或抗性/硬化(斜线阴影条)RHO转录物的水平。结果相对于用缺少核酶的质粒共转染之后测量的相同融合转录物(黑色条)进行归一化。误差条表示平均值的标准误差。*=通过Student t检验,抗性/硬化RHO相对于野生型RHO的P<0.05。

[0039] 图9A-9C显示了Rz525在WT犬视网膜中对RHO表达的抑制。(图9A)用20或50×10^{11}vg/mL滴度的AAV2/5-Rz525视网膜下注射的RHO WT狗的视网膜的示意图,其显示了用于定量犬视紫红质(RNA和蛋白质)表达的神经视网膜穿孔物的位置。虚线,泡边界;斑点区域:

毯区。(图9B)作为未经处理(UnTx)区域中测量水平的百分比的经处理(Tx)视网膜区域(以50×10^{11}vg/mL滴度注射)中内源犬RHO RNA剩余水平的定量。(图9C)以20或50×10^{11}vg/mL滴度注射的眼的代表性免疫印迹(上)和作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中内源犬RHO蛋白剩余水平的定量(下)。OSasOD标示是指为了可比较性而显示为右眼的左眼。

[0040] 图10A-10E示出了Rz525在RHO突变犬视网膜中对RHO表达的抑制。(图10A)用BSS或20或100×10^{11}vg/mL滴度的AAV2/5-Rz525注射的RHO突变狗的视网膜的示意图,其显示了用于定量犬视紫红质(RNA和蛋白质)表达的神经视网膜穿孔物的位置。虚线,泡边界;斑点区域:毯区。(图10B)用BSS或20或100×10^{11}vg/mL滴度的AAV2/5-Rz525注射的眼的作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中内源犬RHO RNA剩余水平的定量。(图10C)用BSS或20或100×10^{11}vg/mL滴度的AAV2/5-Rz525注射的眼的代表性免疫印迹(上)和作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中内源犬RHO蛋白剩余水平的定量(下)。(图10D)提前8周用20或100×10^{11}vg/mL滴度的AAV2/5-Rz525注射的两只RHO突变狗眼中在光暴露之后(LE之后)两周的ONL厚度地形图。点线,泡边界;虚线,ONL营救边界。(图10E)提前8周用100×10^{11}vg/mL的AAV2/5-Rz525处理的RHO突变狗的两个视网膜中通过NIR cSLO成像(左上图和左下图)可见的多灶性深色病灶(白色箭头)在OCT B扫描(右上图)上对应于位于视网膜下空间和RPE/脉络膜的反射率提高的局灶性结节(白色箭头),并且通过组织学(右下图)对应于局灶性炎性细胞浸润。在OCT B扫描上可见视网膜分离(白色箭头)。虚线,泡边界;点线表示OCT B扫描的位置。OSasOD标示是指为了可比较性而显示为右眼的左眼。

[0041] 图11A-11C示出了$shRNA_{131}$在WT犬视网膜中对RHO表达的无效抑制。(图11A)用10或50×10^{11}vg/mL滴度的scAAV2/5-$shRNA_{131}$注射的RHO WT狗眼的眼底的示意图,其显示了在注射之后8周时用于定量犬视紫红质(RNA和蛋白质)表达的神经视网膜穿孔物的位置。虚线,泡边界;斑点区域:毯区。(图11B)用10或50×10^{11}vg/mL滴度注射的眼的作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中内源犬RHO RNA剩余水平的定量。(图11C)用10或50×10^{11}vg/mL滴度注射的眼的代表性免疫印迹和作为未经处理区域中测量水平的百分比的经处理视网膜区域中内源犬RHO蛋白剩余水平的定量。OSasOD标示是指为了可比较性而显示为右眼的左眼。

[0042] 图12显示了用$1\times$至50×10^{11}vg/mL滴度范围的scAAV2/5-$shRNA_{820}$注射的所有10只RHO WT眼的单独地形图结果。ONL厚度(左)、经归一化IS/OS强度(中)和在泡之中(带有点状包围线的右侧方形)和外部(左侧方形)选择用于定量的位点(右)。2194-OD和类似标记表示单独的动物和眼。所有的眼都显示为等同的右眼,以便于更易比较。OSasOD标示是指为了可比较性而显示为右眼的左眼。

[0043] 图13A-13G示出了用两种单独的载体对视紫红质进行的抑制和替代:RHO突变眼中视杆的不完全保护和视网膜毒性。(图13A-13C)在用5×10^{11}vg/mL的scAAV2/5-$shRNA_{820}$和5×10^{11}vg/mL的scAAV2/5-RHO_{820}共注射(处理1:1)的RHO突变眼中的OCT成像和针对光暴露(LE)的视网膜保护的组织学分析。(图13A)注射之后7周/光暴露之前(注射之后)和光暴露之后(LE之后)4周的ONL厚度地形图。点线,泡边界;白色箭头,下图中显示的OCT B扫描的位置。(图13B)视紫红质(Rho)/人视锥拘留蛋白(hCA)共免疫标记的视网膜冰冻切片,显示了

(图13A)中所示同一眼的经处理和未经处理(UnTx)区域中外核层(ONL)和外段(OS)的形态。(图13C)在经处理区域中拍摄的H&E染色的视网膜显微照片,显示了最大的营救效果。(图13D-13F)用5×10^{11}vg/mL的scAAV2/5-$shRNA_{820}$和10×10^{11}vg/mL的scAAV2/5-RHO_{820}共注射(处理1:2)的RHO突变眼中进行的与(图13A-13C)中类似的分析。(图13D)ONL厚度地形图。点线,泡边界;虚线,ONL营救边界;白色箭头对应于下图中显示的OCT B扫描的位置;OCT B扫描上的白色箭头显示了提高的血管周增厚和反射率。(图13E)双荧光IHC(视紫红质;人视锥拘留蛋白)。(图13F)在经处理区域中拍摄的H&E染色的视网膜显微照片,显示了有限ONL营救和血管周细胞浸润的严重病灶(箭头)。(图13G)用5×10^{11}vg/mL的scAAV2/5-$shRNA_{820}$和10×10^{11}vg/mL的scAAV2/5-RHO_{820}共注射(处理1:2)但是未暴露于光的RHO突变眼中在注射之后11周的OCT成像。点线,泡边界;灰色和白色箭头显示了单次OCT B扫描的位置(右图)。OSasOD标示是指为了可比较性而显示为右眼的左眼。

[0044] 图14A-14D显示了用单载体抑制和替代视紫红质阻止了RHO突变视网膜中的视网膜变性(图4A-4G的附加数据)。(图14A-14B)用5×10^{11}vg/mL滴度的scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$注射的两只RHO突变狗眼中在注射之后/光暴露之前(注射之后)和光暴露之后两周(LE之后)的ONL厚度地形图。点线,泡边界;虚线,ONL营救边界。插图,显著性图,显示了ONL厚度(上)和IS/OS强度(下)值与未注射对照的第99百分位数置信区间进行逐点比较的视网膜区域。(图14C-14D)视紫红质(Rho)/人视锥拘留蛋白(hCA)共免疫标记的视网膜冷冻切片,显示了(图14A-14B)中显示的同一眼的经处理和未经处理(UnTx)区域中外核层(ONL)和外段(OS)的形态。OSasOD标示是指为了可比较性而显示为右眼的左眼。

[0045] 图15A-15C显示了在不同环境照明条件下圈养的RHO突变($RHO^{T4R/+}$)狗的自然疾病史。(图15A、15B)在循环暗红色光(图15A)或循环标准白色犬舍照明(图15B)下圈养的代表性狗的伪色ONL地形图。所有眼都显示为等同的右眼。视神经头(黑色圆圈)和大血管(白色线)、毯边界(灰色线)和中央凹样区域(椭圆)重叠。(图15C)示意图:在五个视网膜区域中选择用于定量ONL厚度的位点。C,中央;ST,颞上;SN,鼻上;IT,颞下;和IN,鼻下。所有取样的单个位点的作为年龄的函数的ONL厚度的图,作为与相同位置的平均正常值的差异示出。虚线界定了正常变异性的第99百分位数。

[0046] 图16A-16E示出了研究中使用的重组AAV2/5载体构建体。(图16A)携带驱动被设计为切割鼠、犬和人RHO mRNA的锤头状核酶(Rz525)表达的小鼠视蛋白近端启动子(mOP)的单链AAV。(图16B)携带驱动被设计为切割犬和人RHO mRNA的短发夹RNA($shRNA_{131}$)表达的H1 RNA聚合酶III启动子(H1)的自身互补AAV。(图16C)携带驱动被设计为切割犬和人RHO mRNA的短发夹RNA($shRNA_{820}$)表达的H1 RNA聚合酶III启动子(H1)的自身互补AAV。(图16D)携带驱动被设计为对$shRNA_{820}$的抑制具有抗性的替代人RHO mRNA(RHO_{820})表达的人视蛋白启动子的自身互补AAV。(图16E)携带敲低试剂$shRNA_{820}$和人抗性替代RHO_{820}二者的自身互补AAV。TR:AAV2反向末端重复;mTR:突变TR;wtTR:野生型TR;SV40 SD/SA:源自猿猴病毒40的剪接供体/受体元件;hp Rz:发夹状核酶;SV40 pA:SV40来源多腺苷酸化末端信号;HSV TK pro:人单纯疱疹病毒来源胸苷激酶启动子;Neo R:新霉素抗性基因。bGH pA:牛生长激素多腺苷酸化末端信号;hGFP:人源化GFP。

[0047] 图17是对狗中AAV疗法的长期研究的实验设计的图示。评价了scAAV2/5-hOP-RHO820-H1-shRNA820在四只RHO突变狗中赋予光感受器针对反复LE事件的稳定结构(通过

OCT和IHC评估)和功能(通过ERG评估)保护的能力,所述事件在未经处理的$RHO^{T4R/+}$狗视网膜中造成急性视网膜变性。向每只狗的右眼(OD)视网膜下注射150μL的5×10^{11}vg/mL滴度的AAV构建体,而向对侧左眼(OS)视网膜下注射类似体积的平衡盐溶液(BSS)。PI:注射之后;LE:光暴露;OCT:光学相干断层扫描;ERG:视网膜电描记术;IHC:免疫组织化学。

[0048] 图18A-18D示出了在一只眼中注射scAAV2/5-hOP-RHO820-H1-shRNA820(点线)并且在对侧眼中注射BSS(实线)的RHO突变狗中在四次光暴露时段中每一次之后约2周时经过暗适应而记录的视杆(-1.7logcd.s.m^{-2},图18A)、混合视杆-视锥(0.51log cd.s.m^{-2},图18B)以及经过光适应而记录的针对单刺激(0.51log cd.s.m^{-2},图18C)或29-Hz视锥闪烁(0.26log cd.s.m^{-2},图18D)的视锥响应的代表性ERG迹线。

[0049] 图19A-19C示出了在与18A-18D中显示的类似时间点的在一只眼中注射scAAV2/5-RHO820-shRNA820(水平线阴影)并且在对侧眼中注射BSS(斜线阴影)的四只RHO突变狗中视杆b波(图19A)、混合视杆-视锥a波和b波(图19B)以及视锥1Hz和29Hz闪烁响应(图19C)的最大振幅的纵向定量。AAV:scAAV2/5-RHO820-shRNA820。

[0050] 图20A-20D示出了在注射之前(pre-inj.)、注射之后12周(第一次光暴露事件之前)和注射之后50周(第四次光暴露事件之后2周),四只RHO突变狗中每一只的外核层(ONL)厚度图和内段-外段(IS/OS)强度图。

[0051] 图21示出了来自RHO突变狗的视紫红质(RHO)/人视锥拘留蛋白(hCA)共免疫标记的视网膜冷冻切片,其示出了同一只眼的未经处理和经处理区域中外核层(ONL)和外段(OS)的形态。ONL厚度图(下图)显示了上图中显示的视网膜未经处理和经处理区域的大致位置(星号)。

[0052] 图22示出了用scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$或AAV2/5-GFP处理的小鼠中外核层(ONL)厚度的OCT测量结果。用AAV2/5-GFP或scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$在一只眼中处理P23H RHO C57Bl/6小鼠,并且以不同的时间间隔分析ONL厚度:a)处理之前("Pre"),b)注射之后1个月,c)注射之后2个月,或d)注射之后3个月。

[0053] 图23示出了在一只眼中注射scAAV2/5-RHO820-shRNA820(圆圈和虚线)或AAV2/5-GFP(方形和实线)的P23H RHO小鼠中视杆和混合视杆-视锥a波和b波的最大振幅的纵向定量。这两组小鼠经受了不同强度(-20分贝(dB)、-10dB和0dB)的短暂闪光。在注射之后1个月、2个月和3个月时分析这些小鼠的电响应。

[0054] 图24显示了经过尺寸分级之后的在用scAAV2/5-RHO820-shRNA820转染之后HEK293细胞中表达的最频繁短mRNA的序列。

[0055] 图25示出了在转染的HEK293细胞中表达的短mRNA的最高"命中"的共有序列。如箭头所示,52%的RNA分子在3'端具有2个额外的尿苷。73%的RNA分子中指导链5'端的序列(UAG)与所预测的等同。

具体实施方式

[0056] 本申请的一些方面提供了可用于在对象中(例如,在患有显性视网膜色素变性的对象,例如患有显性视网膜色素变性的人对象中)治疗视网膜色素变性的方法和组合物。

[0057] 在一些实施方案中,提供靶向人、狗和/或小鼠视紫红质(RHO)mRNA的短发夹RNA(shRNA)。在一些实施方案中,shRNA包含:包含核苷酸序列GUGGCAUUCUACAUCUUCA(SEQ ID

NO:1)的有义链、包含核苷酸序列UGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:2)的反义链,以及环序列。在一些实施方案中,shRNA包含:包含与SEQ ID NO:1的序列具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列的有义链,以及包含与SEQ ID NO:2的序列具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列的反义链。在一些实施方案中,环包含长度为5至10个核苷酸的序列。在某些实施方案中,环包含长度为9个核苷酸的序列。在一些实施方案中,环包含UUCAAGAGA(SEQ ID NO:3)。在某些实施方案中,环是SEQ ID NO:3。在某些实施方案中,环包含与SEQ ID NO:3的序列具有1或2个不同核苷酸的核苷酸序列。

[0058] 在一些实施方案中,shRNA包含:包含核苷酸序列GUGGCAUUCUACAUCUUCA(SEQ ID NO:1)的有义链、包含核苷酸序列UGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:2)的反义链,以及包含核苷酸序列UUCAAGAGA(SEQ ID NO:3)的环。在一些实施方案中,shRNA包含:包含核苷酸序列GUGGCAUUCUACAUCUUCA(SEQ ID NO:1)的有义链、包含核苷酸序列UGAAGAUGUAGAAUGCCACUU(SEQ ID NO:10)的反义链,以及包含核苷酸序列UUCAAGAGA(SEQ ID NO:3)的环。在一些实施方案中,shRNA包含:包含与SEQ ID NO:1的序列具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列的有义链,包含与SEQ ID NO:10的序列具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列的反义链,以及包含与SEQ ID NO:3的序列具有1或2个不同核苷酸的核苷酸序列的环。

[0059] 在一些实施方案中,shRNA包含以下所示的SEQ ID NO:4的序列或由其组成。

[0060] shRNA820序列:

[0061] GUGGCAUUCUACAUCUUCAUUCAAGAGAUGAAGAUGUAGAAUGCCAC(SEQ ID NO:4)

[0062] 在一些实施方案中,shRNA包含与SEQ ID NO:4的序列具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列。

[0063] 在某些实施方案中,shRNA包含含有以下序列组之一的有义及反义链:i)包含核苷酸序列CUGCCUACAUGUUUCUGCU(SEQ ID NO:21)的有义链和包含核苷酸序列AGCAGAAACAUGUAGGCAG(SEQ ID NO:22)的反义链;ii)包含核苷酸序列CCUACAUGUUUCUGCUGAU(SEQ ID NO:23)的有义链和包含核苷酸序列AUCAGCAGAAACAUGUAGG(SEQ ID NO:24)的反义链;iii)包含核苷酸序列GCAUGGUCAUCAUCAUGGU(SEQ ID NO:25)的有义链和包含核苷酸序列ACCAUGAUGAUGACCAUGC(SEQ ID NO:26)的反义链。

[0064] 在另一些实施方案中,shRNA包含:i)包含与SEQ ID NO:21具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列的有义链,以及包含与SEQ ID NO:22具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列的反义链;ii)包含与SEQ ID NO:23具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列的有义链,以及包含与SEQ ID NO:24具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列的反义链;或iii)包含与SEQ ID NO:25具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列的有义链,以及包含与SEQ ID NO:26具有1、2或3个不同核苷酸的核苷酸序列的反义链。

[0065] 在一些实施方案中,可以使用载体将shRNA作为由启动子(例如人H1 RNA启动子)驱动的shRNA来递送。在一些实施方案中,载体是质粒。在一些实施方案中,载体是病毒载体,例如腺相关病毒(AAV)载体。在一些实施方案中,编码shRNA的载体序列包含序列GTGGCATTCTACATCTTCATTCAAGAGATGAAGATGTAGAATGCCAC(SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,驱动shRNA表达的启动子包含与以下序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的序列:

[0066] TAAAACGACGGCCAGTGAATTCATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTCGGATCC(SEQ ID NO:8).

[0067] 在一些实施方案中,同一载体包含编码正常(例如,野生型)视紫红质蛋白但对由该载体表达的shRNA的作用具有抗性的编码序列。

[0068] 在一些实施方案中,如本文所述针对shRNA硬化的正常(例如,野生型)视紫红质(RHO)编码序列可具有基于人RHO基因的序列(例如,具有登录号NG_009115.1中所示的序列)。在一些实施方案中,对正常RHO编码序列进行修饰以包含一个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)突变,其使得由该编码序列表达的mRNA对如本文所述的shRNA具有抗性。在一些实施方案中,RHO编码序列包含序列GTGGCTTTTTATATATTCA(SEQ ID NO:11),其可以对如本文所述的shRNA具有抗性。在一些实施方案中,RHO编码序列包含与以下SEQ ID NO:5具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的序列:RHO820序列:

[0069] CCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGAGCTCAGGCCTTCGCAGCATTCTTGGGTGGGA
GCAGCCACGGGTCAGCCACAAGGGCCACAGCCATGAATGGCACAGAAGGCCCTA
ACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGGTACGCAGCCCCTTCGAGTA
CCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCCTACATG
TTTCTGCTGATCGTGCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTCACGCTCTACGTCACCGT
CCAGCACAAGAAGCTGCGCACGCCTCTCAACTACATCCTGCTCAACCTAGCCGTG
GCTGACCTCTTCATGGTCCTAGGTGGCTTCACCAGCACCCTCTACACCTCTCTGCA
TGGATACTTCGTCTTCGGGCCCACAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGCCACC
CTGGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCCTTGGTGGTCCTGGCCATCGAGCGGTACG
TGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCAT
GGGCGTTGCCTTCACCTGGGTCATGGCGCTGGCCTGCGCCGCACCCCCACTCGCC
GGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGCTCGTGTGGAATCGACTACT
ACACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTCATCTACATGTTCGTGGT
CCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTTCTGCTATGGGCAGCTCGTCTTCA
CCGTCAAGGAGGCCGCTGCCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCA
GAGAAGGAGGTCACCCGCATGGTCATCATCATGGTCATCGCTTTCCTGATCTGCT
GGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCTTTTTATATATTCACCCACCAGGGCTCCAACTT
CGGTCCCATCTTCATGACCATCCCAGCGTTCTTTGCCAAGAGCGCCGCCATCTAC
AACCCTGTCATCTTATCATGATGAACAAGCAGTTCCGGAACTGCATGCTCACCAC

CATCTGCTGCGGCAAGAACCCACTGGGTGACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCC
AAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTAAGACCTGCCTAGGACTCTGTGG
CCGACTATAGGCGTCTCCCATCCCCTACACCTTCCCCCAGCCACAGCCATCCCAC
CAG (SEQ ID NO: 5)

[0070] 在一些实施方案中,RHO编码序列由启动子(例如人视蛋白近端启动子)驱动。在一些实施方案中,启动子包含与以下SEQ ID NO:7具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%

或100%同一性的序列。

[0071] 人视蛋白近端启动子序列：

CCTCATGGAGCTCCTCCTGTCAGAGGAGTGTGGGGACTGGATGACTCCAGAGGT
AACTTGTGGGGGAACGAACAGGTAAGGGGCTGTGTGACGAGATGAGAGACTGG
GAGAATAAACCAGAAAGTCTCTAGCTGTCCAGAGGACATAGCACAGAGGCCCAT
GGTCCCTATTTCAAACCCAGGCCACCAGACTGAGCTGGGACCTTGGGACAGACA
AGTCATGCAGAAGTTAGGGGACCTTCTCCTCCCTTTTCCTGGATCCTGAGTACCTC

[0072] TCCTCCCTGACCTCAGGCTTCCTCCTAGTGTCACCTTGGCCCCTCTTAGAAGCCAA
TTAGGCCCTCAGTTTCTGCAGCGGGGATTAATATGATTATGAACACCCCCAATCT
CCCAGATGCTGATTCAGCCAGGAGCTTAGGAGGGGGAGGTCACTTTATAAGGGT
CTGGGGGGGTCAGAACCCAGAGTCATCCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGAGCTC
AGGCCTTCGCAGCATTCTTGGGTGGGAGCAGCCACGGGTCAGCCACA (SEQ ID
NO: 7)

[0073] 在一些实施方案中,如本文所述的载体包含与以下SEQ ID NO:6具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的序列。

[0074] scAAV2/5-hOP-RHO820-H1-shRNA820构建体序列：

CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTT

[0075] TGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTC
CATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGT
AGCCATGCTCTAGGATCTGAATTCGGTACCCCTCATGGAGCTCCTCCTGTCAGAG

[0076]

GAGTGTGGGGACTGGATGACTCCAGAGGTAACTTGTGGGGGAACGAACAGGTAA
GGGGCTGTGTGACGAGATGAGAGACTGGGAGAATAAACCAGAAAGTCTCTAGCT
GTCCAGAGGACATAGCACAGAGGCCCATGGTCCCTATTTCAAACCCAGGCCACC
AGACTGAGCTGGGACCTTGGGACAGACAAGTCATGCAGAAGTTAGGGGACCTTC
TCCTCCCTTTTCCTGGATCCTGAGTACCTCTCCTCCCTGACCTCAGGCTTCCTCCT
AGTGTCACCTTGGCCCCTCTTAGAAGCCAATTAGGCCCTCAGTTTCTGCAGCGGG
GATTAATATGATTATGAACACCCCCAATCTCCCAGATGCTGATTCAGCCAGGAGC
TTAGGAGGGGGAGGTCACTTTATAAGGGTCTGGGGGGGTCAGAACCCAGAGTCA
TCCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGAGCTCAGGCCTTCGCAGCATTCTTGGGTGGG
AGCAGCCACGGGTCAGCCACATCTAGAGGATCCGGTACTCGAGGAACTGAAAAA
CCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATC
CGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTA
GGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGC
CGCCCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGAGCTCAGGCCTTCGCAGCATTCTTGGGTG
GGAGCAGCCACGGGTCAGCCACAAGGGCCACAGCCATGAATGGCACAGAAGGC
CCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGGTACGCAGCCCCTTCG
AGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCCTA
CATGTTTCTGCTGATCGTGCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTCACGCTCTACGTCA
CCGTCCAGCACAAGAAGCTGCGCACGCCTCTCAACTACATCCTGCTCAACCTAGC
CGTGGCTGACCTCTTCATGGTCCTAGGTGGCTTCACCAGCACCCTCTACACCTCTC
TGCATGGATACTTCGTCTTCGGGCCCACAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGC
CACCCTGGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCCTTGGTGGTCCTGGCCATCGAGCGG
TACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCA
TCATGGGCGTTGCCTTCACCTGGGTCATGGCGCTGGCCTGCGCCGCACCCCCACT
CGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGCTCGTGTGGAATCGA
CTACTACACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTCATCTACATGTTC
GTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTTCTGCTATGGGCAGCTCGT
CTTCACCGTCAAGGAGGCCGCTGCCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAA
GGCAGAGAAGGAGGTCACCCGCATGGTCATCATCATGGTCATCGCTTTCCTGATC
TGCTGGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCTTTTTATATATTCACCCACCAGGGCTCCA
ACTTCGGTCCCATCTTCATGACCATCCCAGCGTTCTTTGCCAAGAGCGCCGCCAT
CTACAACCCTGTCATCTATATCATGATGAACAAGCAGTTCCGGAACTGCATGCTC
ACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCACTGGGTGACGATGAGGCCTCTGCTACC
GTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTAAGACCTGCCTAGGACT

[0077]

CTGTGGCCGACTATAGGCGTCTCCCATCCCCTACACCTTCCCCCAGCCACAGCCA
TCCCACCAGGCGGCCGCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTG
GACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTG
ATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAA
CAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAGT
CGACTAAAACGACGGCCAGTGAATTCATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGA
AATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATG
AGACCACTCGGATCCGTGGCATTCTACATCTTCATTCAAGAGATGAAGATGTAGA
ATGCCACTTTTTAAGCTTTTTGGCGTAATCATGGTCGACATTGGATCGGATCCCG
GGCCCGTCGACTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC
CATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
ACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTC
ATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG
ACAATAGCAGGAACCCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG
GCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGA
GCGAGCGCGCAGCTGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGT
TTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGT
TCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCAC
AGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGG
CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCC
TGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG
ACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTT
CCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGG
CGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCC
AAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCG
GTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC
AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTT
CTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGC
GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCG
CAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT
CAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
ATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTA
TATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTAT

[0078]

CTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGA
TAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCG
AGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAG
GGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAAT
TGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTG
TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAA
AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGT
GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCG
TAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG
TATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCA
CATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAA
CTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAC
CCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC
AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAA
TACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTC
ATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCG
CGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGA
CATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGG
TGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTG
TCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGT
TGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAG
AGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCG
CATCAGGAAATCCAACATCCAATAAATCATACAGGCAAGGCAAAGAATTAGCAA
AATTAAGCAATAAAGCCTCAGAGCATAAAGCTAAATCGGTTGTACCAAAAACAT
TATGACCCTGTAATACTTTTGCGGGAGAAGCCTTTATTTCAACGCAAGGATAAAA
ATTTTTAGAACCCTCATATATTTTAAATGCAATGCCTGAGTAATGTGTAGGTAAA
GATTCAAACGGGTGAGAAAGGCCGGAGACAGTCAAATCACCATCAATATGATAT
TCAACCGTTCTAGCTGATAAATTCATGCCGGAGAGGGTAGCTATTTTTGAGAGGT
CTCTACAAAGGCTATCAGGTCATTGCCTGAGAGTCTGGAGCAAACAAGAGAATC
GATGAACGGTAATCGTAAAACTAGCATGTCAATCATATGTACCCCGGTTGATAAT
CAGAAAAGCCCCAAAAACAGGAAGATTGTATAAGCAAATATTTAAATTGTAAAC
GTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAA
CCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGAT

AGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGAC
TCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAA
CCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGA
ACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGG
CGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGT
GTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTAC
AGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGAGCACGTATAACGTGCTTTCCTCGTTAG

[0079] AATCAGAGCGGGAGCTAAACAGGAGGCCGATTAAAGGGATTTTAGACAGGAAC
GGTACGCCAGAATCCTGAGAAGTGTTTTTATAATCAGTGAGGCCACCGAGTAAA
AGAGTCTGTCCATCACGCAAATTAACCGTTGTCGCAATACTTCTTTGATTAGTAA
TAACATCACTTGCCTGAGTAGAAGAACTCAAACTATCGGCCTTGCTGGTAATATC
CAGAACAATATTACCGCCAGCCATTGCAACAGGAAAAACGCTCATGGAAATACC
TACATTTTGACGCTCAATCGTCTGGAAATCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACT
GTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCG (SEQ
ID NO: 6)

[0080] 本公开内容的一些方面涉及用于将如本文所述的rAAV载体(例如,编码shRNA和/或替代RHO)递送至多种组织、器官和/或细胞中的重组腺相关病毒(rAAV)颗粒。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含如本文所述的衣壳蛋白,例如AAV5衣壳蛋白。在一些实施方案中,包含在rAAV颗粒中的载体编码目的RNA(例如,包含SEQ ID NO:4的序列的shRNA)并且包含替代RHO编码序列(例如,包含SEQ ID NO:5的序列)。

[0081] 包含在rAAV颗粒中的重组AAV(rAAV)载体可至少包含(a)一个或更多个异源核酸区域(例如,编码shRNA和/或RHO蛋白)和(b)在所述一个或更多个异源核酸区域侧翼的一个或更多个包含反向末端重复(ITR)序列(例如,野生型ITR序列或经改造ITR序列)的区域。在一些实施方案中,异源核酸区域编码目的RNA(例如,包含SEQ ID NO:4的序列的shRNA),并且包含替代RHO编码序列(例如,包含SEQ ID NO:5的序列)。在一些实施方案中,rAAV载体的大小为4kb至5kb(例如,大小为4.2至4.7kb)。该rAAV载体可以被病毒衣壳(例如AAV5衣壳)衣壳化。在一些实施方案中,rAAV载体是单链的。在一些实施方案中,rAAV载体是双链的。在一些实施方案中,双链rAAV载体可以是例如自身互补载体,其包含与该载体的一个区域互补的另一载体区域,从而引起该载体的双链性的形成。

[0082] rAAV颗粒可以是任何AAV血清型,包括任何衍生物或假型(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、2/1、2/5、2/8或2/9)。如本文所用,rAAV颗粒的血清型是指衣壳蛋白的血清型。在一些实施方案中,rAAV颗粒是AAV5。衍生物和假型的非限制性实例包括rAAV2/1、rAAV2/5、rAAV2/8、rAAV2/9、AAV2-AAV3杂合体、AAVrh.10、AAVhu.14、AAV3a/3b、AAVrh32.33、AAV-HSC15、AAV-HSC17、AAVhu.37、AAVrh.8、CHt-P6、AAV2.5、AAV6.2、AAV2i8、AAV-HSC15/17、AAVM41、AAV9.45、AAV6(Y445F/Y731F)、AAV2.5T、AAV-HAE1/2、AAV克隆32/83、AAVShH10、AAV2(Y->F)、AAV8(Y733F)、AAV2.15、AAV2.4、AAVM41和AAVr3.45。这样的AAV血清型和衍生物/假型以及产生这样的衍生物/假型的方法是本领域中已知的(参见,例如Mol Ther.2012 Apr;20(4):699-708.doi:10.1038/mt.2011.287.Epub 2012 Jan 24.The AAV vector

toolkit:poised at the clinical crossroads.Asokan A1,Schaffer DV,Samulski RJ.)。在一些实施方案中,rAAV颗粒是假型化rAAV颗粒,其包含:(a)来自一种血清型(例如,AAV2)的包含ITR的核酸载体,和(b)包含源自另一种血清型(例如,AAV5)的衣壳蛋白的衣壳。产生和使用假型化rAAV载体的方法是本领域中已知的(参见,例如Duan et al.,J.Virol.,75:7662-7671,2001;Halbert et al.,J.Virol.,74:1524-1532,2000;Zolotukhin et al.,Methods,28:158-167,2002;以及Auricchio et al.,Hum.Molec.Genet.,10:3075-3081,2001)。

[0083] 产生rAAV颗粒和rAAV载体的方法也是本领域中已知的并且是市售的(参见,例如Zolotukhin et al.Production and purification of serotype 1,2,and 5recombinant adeno-associated viral vectors.Methods 28(2002)158-167;以及美国专利公开号US 2007/0015238和US20120322861,其通过引用并入本文;以及可从ATCC和Cell Biolabs,Inc.获得的质粒和试剂盒)。例如,可以将包含rAAV载体的质粒与一种或更多种辅助质粒(例如包含rep基因(例如编码Rep78、Rep68、Rep52和Rep40)和cap基因(例如,编码VP1、VP2和VP3,包括如本文所述的经修饰的VP3区域))组合并转染到生产细胞系中,使得rAAV颗粒可以包装并随后纯化。

[0084] 在一些实施方案中,一种或更多种辅助质粒包括包含rep基因和cap基因(例如,编码如本文所述的rAAV衣壳蛋白)的第一辅助质粒和包含E1a基因、E1b基因、E4基因、E2a基因和VA基因的第二辅助质粒。在一些实施方案中,rep基因是源自AAV2或AAV5的rep基因,并且cap基因源自AAV2或AAV5且可以包含对该基因的修饰以产生如本文所述的经修饰的衣壳蛋白。辅助质粒和制备这样的质粒的方法是本领域中已知的并且是市售的(参见,例如来自PlasmidFactory,Bielefeld,Germany的pDM、pDG、pDP1rs、pDP2rs、pDP3rs、pDP4rs、pDP5rs、pDP6rs、pDG(R484E/R585E)和pDP8.ape质粒;其他产品和服务,其可获自Vector Biolabs,Philadelphia,PA;Cellbiolabs,San Diego,CA;Agilent Technologies,Santa Clara,Ca;和Addgene,Cambridge,MA;pxx6;Grimm et al.(1998),Novel Tools for Production and Purification of Recombinant Adenoassociated Virus Vectors,Human Gene Therapy,Vol.9,2745-2760;Kern,A.et al.(2003),Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2Capsids,Journal of Virology,Vol.77,11072-11081.;Grimm et al.(2003),Helper Virus-Free,Optically Controllable,and Two-Plasmid-Based Production of Adeno-associated Virus Vectors of Serotypes 1to 6,Molecular Therapy,Vol.7,839-850;Kronenberg et al.(2005),A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini,Journal of Virology,Vol.79,5296-5303;以及Moullier,P.and Snyder,R.O.(2008),International efforts for recombinant adeno-associated viral vector reference standards,Molecular Therapy,Vol.16,1185-1188)。

[0085] 接下来描述一种示例性的非限制性rAAV颗粒产生方法。产生或获得一种或更多种辅助质粒,其包含期望AAV血清型的rep和cap ORF以及在其天然启动子的转录控制下的腺病毒VA、E2A(DBP)和E4基因。cap ORF还可包含一个或更多个修饰以产生如本文所述的经修饰的衣壳蛋白。利用辅助质粒和包含本文所述核酸载体的质粒,通过CaPO4介导的转染、脂质或聚合物分子如聚乙烯亚胺(PEI)转染HEK293细胞(可获自ATCC®)。然后将HEK293细

胞孵育至少60小时以允许rAAV颗粒产生。作为替代地,在另一个实例中,用包含核酸载体的单一重组杆状病毒感染基于Sf9的稳定生产细胞系。作为另一替代方案,在另一个实例中,用包含核酸载体的HSV和任选地包含如本文所述的rep和cap ORF以及在其天然启动子的转录控制下的腺病毒VA、E2A(DBP)和E4基因的一种或更多种辅助HSV感染HEK293或BHK细胞系。然后将HEK293、BHK或Sf9细胞孵育至少60小时以允许rAAV颗粒产生。然后可以使用本领域中已知或本文所述的任何方法、例如通过碘克沙醇逐步梯度、CsCl梯度、色谱或聚乙二醇(PEG)沉淀来纯化rAAV颗粒。

[0086] 本公开内容还考虑了包含如本文所述的shRNA、载体或rAAV颗粒的宿主细胞。这样的宿主细胞包括哺乳动物宿主细胞,其中人宿主细胞是优选的,并且可以是分离的,例如在细胞或组织培养物中。在一些实施方案中,宿主细胞是眼细胞。

[0087] 本公开内容还考虑了以下宿主细胞,其包含shRNA、载体、rAAV颗粒,以及在宿主细胞被本文所述的rAAV颗粒感染或被本文所述的构建体转染之后表达的mRNA。在某些实施方案中,本文提供的宿主细胞包含与天然存在的那些不同的短mRNA序列。在某些实施方案中,宿主细胞包含与SEQ ID NO:40-46中任一个具有至少95%或99.5%序列同一性的短mRNA序列。宿主细胞可包含含有SEQ ID NO:40-46中任一个的序列的短mRNA序列。这样的宿主细胞包括哺乳动物宿主细胞,其中人宿主细胞是优选的,并且可以是分离的,例如在细胞或组织培养物中。在一些实施方案中,宿主细胞是眼细胞。

[0088] 示例性的哺乳动物细胞包括人细胞、啮齿动物细胞和犬细胞。在一些实施方案中,哺乳动物细胞来源于人(例如,患有或已知患有、例如被诊断为患有视网膜色素变性、例如显性视网膜色素变性的人)。

[0089] 在一些实施方案中,提供了组合物,其包含如本文所述的shRNA、载体或rAAV颗粒,以及任选地可药用载体。在一些实施方案中,可以将本文所述的组合物施用于需要治疗的对象。在一些实施方案中,对象患有或被怀疑患有脑和/或眼的一种或更多种病症、疾病或障碍(例如,视网膜色素变性,例如显性视网膜色素变性)。在一些实施方案中,对象患有或被怀疑患有本文公开的一种或更多种病症、疾病和障碍(例如,视网膜色素变性,例如显性视网膜色素变性)。在一些实施方案中,对象具有一个或更多个内源突变rho等位基因(例如,与眼或视网膜的疾病或障碍相关或其造成该疾病或障碍)。在一些实施方案中,对象具有至少一个显性突变rho等位基因(例如,其引起显性视网膜色素变性)。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,对象是非人灵长类。非人灵长类对象的非限制性实例包括猕猴(例如食蟹猴或恒河猴)、狨猴、绢毛猴、蜘蛛猴、枭猴、长尾黑颚猴(vervet monkey)、松鼠猴、狒狒、大猩猩、黑猩猩和猩猩。其他示例性对象包括家养动物,例如狗和猫;家畜,例如马、牛、猪、绵羊、山羊和鸡;以及其他动物,例如小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。

[0090] 在一些实施方案中,向细胞或对象施用的rAAV颗粒的剂量可以为约10^6至10^{14}个颗粒/mL或10^3至10^{15}个颗粒/mL,或在其任一范围之间的任何值,例如,约10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}或10^{14}个颗粒/mL。在一个实施方案中,施用高于10^{13}个颗粒/mL的rAAV颗粒。在一些实施方案中,向对象施用的rAAV颗粒的剂量可以为约10^6至10^{14}载体基因组(vg)/mL、或10^3至10^{15}vg/mL,或在其任一范围之间的任何值,例如约10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}或10^{14}vg/mL。在一个实施方案中,施用高于10^{13}vg/mL的rAAV颗粒。根据实现所治疗的特定疾病或障碍的治疗可需要的,rAAV颗粒可以以单剂量施用或者分为两次或更多次施

用。在一些实施方案中,将0.0001mL至10mL(例如0.0001mL、0.001mL、0.01mL、0.1mL、1mL、10mL)以一个剂量递送于对象。

[0091] 在一些实施方案中,rAAV颗粒滴度为1×10^{10}至5×10^{13}vg/ml。在一些实施方案中,rAAV颗粒滴度可以为1×10^{10}、2.5×10^{10}、5×10^{10}、1×10^{11}、2.5×10^{11}、5×10^{11}、1×10^{12}、2.5×10^{12}、5×10^{12}、1×10^{13}、2.5×10^{13}、或5×10^{13}vg/mL。在一些实施方案中,颗粒滴度小于1×10^{10}vg/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒滴度大于1×10^{15}vg/mL。在一个实施方案中,rAAV颗粒滴度大于5×10^{13}vg/mL。在一些实施方案中,通过本文进一步描述的方法(例如,视网膜下或玻璃体内)施用rAAV颗粒。

[0092] 根据实现所治疗的特定疾病或障碍的治疗可需要的,rAAV颗粒可以以单剂量施用或者分为两次或更多次施用。在一些实施方案中,在数天或数周的时间内施用rAAV颗粒。在一些实施方案中,将1至500微升的本申请中所述的组合物(例如,其包含rAAV颗粒)施用于对象的一只或两只眼。例如,在一些实施方案中,可以向每只眼施用约1、约10、约50、约100、约200、约300、约400或约500微升。然而,应当理解,在一些实施方案中可以施用更小或更大的体积。

[0093] 在一些实施方案中,在单次施用于眼之后,本文公开的rAAV颗粒、组合物和治疗方法保持了对象中视杆光感受器的结构完整性,保持了ONL厚度和/或赋予对象中视网膜结构和功能至少约12周、至少约18周、至少约24周、至少约30周、至少约36周、至少约42周、至少约48周、至少约54周或至少约60周的变性保护。

[0094] 在一些实施方案中,本公开内容提供了本文公开的一种或更多种基于rAAV的组合物在可药用溶液中的制剂用于单独地或与一种或更多种其他治疗模式组合施用于细胞或动物,并且特别是用于人细胞、组织和影响人的疾病的治疗。

[0095] 如果需要,rAAV颗粒或核酸载体也可以与其他药剂例如蛋白质或多肽或多种药物活性剂组合施用,包括治疗性多肽、生物活性片段、或其变体的一个或更多个全身或局部施用。实际上,对于也可以包含的其他组分几乎没有限制,只要该另外药剂在与靶细胞或宿主组织接触时不会引起明显的不利影响即可。因此,在特定情况下,rAAV颗粒可以根据需要与多种其他药剂一起递送。这样的组合物可以从宿主细胞或其他生物学来源中纯化,或作为替代,可以如本文所述化学合成。

[0096] 可药用赋形剂和载体溶液的配制是本领域技术人员公知的,开发用于在多种治疗方案(包括例如经口、肠胃外、静脉内、鼻内、关节内和肌内施用和制剂)中使用本文所述的特定组合物的合适的给药和治疗方案也是本领域技术人员公知的。

[0097] 通常来说,这些制剂可以包含至少约0.1%的治疗剂(例如rAAV颗粒)或更多,但是活性成分的百分比当然可以变化并且可以方便地为总制剂的重量或体积的约1%或2%至约70%或80%或更多。自然地,可以以在化合物的任何给定单位剂量中将获得合适剂量的方式来制备每种治疗上有用组合物中治疗剂(例如,rAAV颗粒)的量。制备这样的药物制剂领域的技术人员将考虑诸如溶解度、生物利用度、生物学半衰期、施用途径、产品保存期以及其他药理学考虑的因素,并且因此多种剂量和治疗方案可以是期望的。

[0098] 在某些情况下,期望皮下、眼内、玻璃体内、肠胃外、皮下、静脉内、脑室内、肌内、鞘内、经口、腹膜内、通过经口或鼻吸入、或通过经由直接注射而直接注射到一种或更多种细胞、组织或器官中来在本文中公开的适当配制的药物组合物中递送如本文所述的shRNA、载

体或rAAV颗粒。

[0099] 适用于注射用途(例如,包含如本文所述的shRNA、载体或rAAV颗粒)的组合物的药物形式包括无菌水溶液或分散体。在一些实施方案中,该形式是无菌的并且在存在容易可注射性的程度上是流体。在一些实施方案中,该形式在制造和储存条件下是稳定的,并且被保存以抵抗微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、盐水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物、和/或植物油。可以维持适当的流动性,例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、通过在分散体的情况下维持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来进行。

[0100] 术语“载体”是指与本文所述的shRNA、载体或rAAV颗粒一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载剂。这样的药用载体可以是无菌液体,例如水和油,包括以下那些:石油,例如矿物油;植物油,例如花生油、大豆油和芝麻油;动物油;或合成来源的油。盐水溶液以及葡萄糖和甘油水溶液也可以用作液体载体。

[0101] 本公开内容的组合物可以通过多种途径递送至眼。其可以眼内、通过表面施用于眼或通过眼内注射到例如玻璃体(玻璃体内注射)或视网膜下(视网膜下注射)光感受器间空间来递送。在一些实施方案中,其被递送至视杆感光细胞。作为替代,其可以通过插入或注射到眼周围的组织中而局部递送。其可以通过经口途径或通过皮下、静脉内或肌内注射全身递送。作为替代,其可以通过导管或通过植入物递送,其中这样的植入物由多孔、无孔或凝胶材料(包括膜,例如硅橡胶膜或纤维、可生物降解的聚合物或蛋白质性材料)制成。其可以在病症发作之前施用以防止其发生,例如在对眼进行手术期间,或在病理病症发作之后立即或在急性或长期病症发生期间施用。

[0102] 对于可注射水溶液的施用,例如,如果需要的话,可以将溶液适当地缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等张。这些特定的水溶液特别适合于静脉内、肌内、玻璃体内、皮下和腹膜内施用。在这方面,根据本公开内容,本领域技术人员将知道可以使用的无菌水性介质。例如,可以将一个剂量溶解在1ml等张NaCl溶液中,然后添加到1000ml皮下灌注流体中或注射在建议的输注部位(参见例如"Remington'sPharmaceutical Sciences"第15版,第1035-1038和1570-1580页)。根据所治疗对象的状况,必然发生剂量的一些变化。在任何情况下,负责施用的人员决定用于个体对象的合适剂量。此外,对于人施用,制剂应符合例如FDA生物学标准所所要求的无菌性、热原性以及一般安全性和纯度标准。

[0103] 无菌可注射溶液可通过将所需量的如本文所述的shRNA、载体或rAAV颗粒引入合适的溶剂(其根据需要具有上文列举的数种其他成分)中然后过滤灭菌来制备。通常来说,通过将多种经灭菌的活性成分引入无菌载剂中来制备分散体,所述无菌载剂包含基础分散介质和需要的来自以上列举的那些的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,该技术由其经预先无菌过滤溶液产生活性成分加上任何另外期望成分的粉末。

[0104] 组合物(例如,包含如本文所述的shRNA、载体或rAAV颗粒)的量和施用这样的组合物的时间将在受益于本教导的技术人员的范围内。然而,很可能可以通过单次施用实现治疗有效量的所公开组合物的施用,例如单次注射足够数量的rAAV颗粒以为接受这种治疗的患者提供治疗益处。作为替代,在一些情况下,可期望在相对较短或相对延长的时间段内提

供组合物的多次或连续施用,这可以由监督这样的组合物的施用的医疗人员决定。

[0105] 在一些实施方案中,在使细胞视紫红质基因表达沉默之后视杆细胞保持结构完整和/或存活。在一些实施方案中,其中使细胞视紫红质基因表达沉默的视杆细胞的在正常情况下包含视紫红质的外段缩短。在一些实施方案中,使用表达对使用本申请中描述的组合物进行的沉默具有抗性的外源添加(硬化)视紫红质基因,可以维持或恢复(例如,部分地或完全地)外段的长度。在一些实施方案中,向患有视网膜色素变性(例如,显性视网膜色素变性)的对象施用本文所述的组合物在对象中保持视杆光感受器的结构完整性,保持ONL厚度和/或赋予对象中视网膜结构和功能至少约12周、至少约18周、至少约24周、至少约30周、至少约36周、至少约42周或至少约48周、至少约54周或至少约60周的变性保护。

[0106] "治疗"疾病如该术语在本文所用是指降低对象经历的疾病或障碍(例如视网膜色素变性)的至少一种体征或症状的频率或严重程度。通常将上述组合物以有效量(即能够产生期望结果的量)施用于对象。期望结果将取决于所施用的活性剂。例如,rAAV颗粒的有效量可以是能够将异源核酸转移至宿主器官、组织或细胞的颗粒量。

[0107] 可以通过标准药学方法使用培养物中的细胞或实验动物确定LD50(将该群体的50%致死的剂量)来确定本公开内容方法中使用的组合物的毒性和效力。毒性和效力之间的剂量比是治疗指数,并且其可以表示为比例LD50/ED50。表现出大治疗指数的那些组合物是优选的。虽然可以使用表现出毒性副作用的那些,但应注意设计使这样的副作用的潜在损害最小化的递送系统。本文所述的组合物的剂量通常在包括ED50且具有很少或没有毒性的范围内。根据所采用的剂型和所使用的施用途径,剂量可以在此范围内变化。

[0108] 无需进一步阐述,认为本领域技术人员可以基于以上描述最大程度地利用本公开内容。因此,以下具体实施方案应被解释为仅是举例说明性的,而无论任何不以任何方式限制本公开内容的其余部分。本文中引用的所有出版物出于本文中引用的目的或主题通过引用并入。

[0109] 实施例

[0110] 实施例1

[0111] 遗传性视网膜变性是由影响感光细胞或视网膜色素上皮并导致视力损失的>250个基因中突变引起的。对于常染色体隐性和X连锁型视网膜变性,在基因治疗领域已取得了显著进展,如通过临床试验的数量不断增加以及最近针对先天性失明形式的第一基因治疗的商业化证明的。然而,尽管作出了巨大的努力来开发用于由>150个视紫红质(RHO)基因中突变引起的最常见形式的常染色体显性视网膜色素变性(adRP)的治疗,但是向临床的转化一直停滞不前。在此,首次鉴定了高度有效的新型短发夹RNA(shRNA),其以不依赖于突变的方式靶向人(和犬)RHO。在单腺相关病毒(AAV)载体中,将此shRNA与制成对RNA干扰具有抗性的人RHO替代cDNA组合,并且在RHO-adRP的天然存在的犬模型中测试了这种构建体(以下称为"scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$",参见图6)。视网膜下载体注射导致内源犬RHO RNA被几乎完全抑制,而人RHO替代cDNA产生正常RHO蛋白水平的高至30%。非侵入性视网膜成像显示经处理区域中光感受器被完全保护免于视网膜变性。组织病理学证实保留了正常光感受器结构和视杆外段中的RHO表达。通过视网膜成像和视网膜电描记术的长期(>8个月)随访指示了稳定的结构和功能保存。这种基因治疗在临床相关的大型动物模型中的效力为治疗患有RHO-adRP的患者铺平了道路。

[0112] 在过去的二十年中,已经看到进入临床试验的基因疗法的数量急剧增加(1,2),并且近年来,其中的少数已经获得了中国、欧洲和美国监管机构的入市批准。(3)这些试验中的绝大多数针对癌症、心血管疾病和遗传性单基因疾病。(1)用于遗传性单基因疾病的策略必须基于疾病的机理。对于绝大多数的功能丧失型突变,策略是基因增强。(4)对于引起显性负效应的突变,基因增强也可以通过稀释突变产物的有害作用而提供一些治疗益处。(5,6)然而,在赋予毒性功能获得的突变的情况下,正在研究的策略包括基因消融或DNA水平的缺陷校正(例如CRISPR/Cas9基因编辑)、转录抑制和RNA敲低/抑制。(7,8)

[0113] 已知超过250种基因中的突变引起遗传性视网膜疾病(sph.uth.edu/retnet/),并且由于视网膜的可及性,基因治疗方法已取得了相当大的进步。目前正在进行用于至少六种常染色体隐性、三种X连锁型和一种母体遗传性线粒体视网膜疾病的基因增强的临床试验。(9)没有用于常染色体显性视网膜疾病的试验,所述疾病中最常见的是由视紫红质(RHO)基因中突变引起的常染色体显性视网膜色素变性(adRP)。(10-14)对于超过150种已鉴定的RHO突变,已经提出了数种主要基于体外发现的推定的致病机制(综述参见15,16),但是RHO-adRP患者表型的详细表征符合两个主要类别。(17-19)A类突变体患者从早期生命起具有严重视杆损失,并且因此切实可行的治疗方法应旨在延长视锥存活。另一方面,具有B类突变体的患者可以在一些视网膜区域或整个视网膜中具有存活数十年直至成年后期生命的视杆,并且可受益于旨在挽救其余视杆并防止继发性视锥细胞损失的基因治疗。(20)

[0114] 在过去的20年中,用于RHO-adRP的基因治疗的工作集中于降低特定突变等位基因的表达(21-28),或开发不依赖于突变的策略。后一种策略组合了敲低突变和野生型(WT)RHO蛋白二者的表达(29-39),同时提供了编码WT蛋白的抗性RHO cDNA作为替代。(40-43)抗性通过在靶位点中的简并/摆动核苷酸处进行密码子修饰来赋予,这防止与敲低试剂的杂交。这种不依赖于突变的“敲低和替代”策略旨在解决RHO-adRP中的高等位基因异质性,同时规避了针对单个RHO突变开发多种基因疗法所固有的技术和财务挑战。不同的研究小组已在转基因小鼠中探索了使用两种单独的(42)或单一AAV载体(41,43)的两种组分的视网膜共递送。然而,仍未实现对正在进行的视杆变性的完全防止或阻止。

[0115] 在此,鉴定了高度有效的短发夹RNA,$shRNA_{820}$,其以不依赖于突变的方式靶向人RHO。当与人RHO的抗性形式组合并共包装在单重组腺相关病毒(AAV)颗粒中时,这种具有敲低和替代双重功能的构建体在RHO-adRP的天然存在犬模型中提供了针对视网膜变性的长期保护。

[0116] 结果

[0117] $shRNA_{820}$对野生型视紫红质的最佳抑制

[0118] 最初使用体外测定筛选了靶向犬和人RHO的不同同源区域(图7)的四种敲低试剂,包括先前鉴定的(33)锤头状核酶(Rz525)和三种新shRNA($shRNA_{131}$、$shRNA_{134}$、$shRNA_{820}$)。在体外(图8)以及在WT(图9A-9C;表1,组C)和RHO突变犬眼(图10A-10C;表1,组F)中,Rz525均非常有效地使RHO表达沉默。然而,由于与实现RHO表达的几乎完全抑制所需的高病毒滴度的AAV2/5-Rz525(结果在下文和图10D-10E)相关的严重视网膜并发症,Rz525的进一步开发被中断。shRNA的体外筛选表明,$shRNA_{131}$导致WT人RHO蛋白的仅约50%降低(图1A、1B),并且不能抑制突变体人RHO P23H(图1C、1D)和T17M(图1E、1F)。此外,在经注射的犬WT眼中RHO表达的抑制有限(结果在下文,图11A-11C,表1,组B)。

[0119] 在体外抑制WT和突变(P23H和T17M)人RHO蛋白二者表达的最有效shRNA是$shRNA_{820}$(图1A-1F)。平行地,证实了人RHO的经密码子修饰形式RHO_{820}(其在$shRNA_{820}$的靶位点中的简并/摆动位置包含四个改变的核苷酸)对$shRNA_{820}$抑制具有抗性(图1G、1H)。一旦证实$shRNA_{820}$以不依赖于突变的方式靶向RHO,就将其选为先导敲低试剂,以用于在WT和RHO突变狗中进一步评价。

[0120] 首先在WT狗中进行$shRNA_{820}$的验证,以确定滴度,在该滴度下,可以大幅降低RHO表达并且预期变化仅发生在其中RHO是主要的信号传导和结构蛋白的外段中,而没有视杆光感受器的其余细胞隔室的大应力或变性。在十只WT犬眼中利用$1\times$至50×10^{11}vg/mL的AAV-shRNA820滴度进行视网膜下注射(表1,A组)。在注射之后7-8周时通过视网膜结构的活体谱域光学相干断层扫描(OCT)成像评价经处理的眼,并与未经注射的对照眼进行比较。在代表性的未经注射的WT眼中,利用OCT在视网膜上的横断面成像揭示了对应于不同的视网膜层的低散射层和超散射层(图2A,左)。(44)这项研究主要关注光感受器核所在的外核层(ONL)的厚度以及源于内段-外段(IS/OS)接合部附近的反向散射强度(图2A,左)。预期IS/OS强度对外段长度、排列和空间密度的变化敏感,并且因此可以用作外段健康状况的非侵入性替代度量。未经注射的WT的经归一化的IS/OS强度地形图趋于均匀(图2A,中间列)。未经注射的WT眼中的ONL厚度地形图也相对均匀,在中央视网膜颞上至视神经头(ONH)值逐渐增大,而在视网膜上和下的非毯区,值逐渐减小(图2A,右列)。由注射有1×10^{11}vg/mL(图2B)或5×10^{11}vg/mL(图2C)的载体的眼代表的低和中等滴度注射没有显示出经注射区域和附近未注射区域之间的定性结构变化。

[0121] 为了限定RHO敲低的结构后果可检测但是温和的最佳滴度,对视网膜位置进行了系统性取样(图12)。在IS/OS强度和ONL厚度方面,对于两个最低滴度($1\times$和2.5×10^{11}vg/mL),大部分经注射位置与未经注射的对照眼相当。(图2D、2E,上图)。相比之下,对于两个最高滴度(10×10^{11}和50×10^{11}vg/mL),大部分经注射位置显示出从RHO敲低所预期的降低的IS/OS强度(图2D)和表明光感受器应力的一些ONL增厚(图2E)。在5×10^{11}至8×10^{11}vg/mL之间发生向可检测变化的过渡(图2D、2E,箭头),表明潜在最佳滴度的范围。在所有滴度下,在经处理眼中未经注射部位的大多数位点与从未经注射眼预期的结果一致,证实了RHO敲低的作用定位在视网膜下注射区域(图2D、2E下图)。

[0122] 在注射之后7至8周时对动物进行人道安乐死,并且对已经用$1\times$至10×10^{11}vg/mL滴度处理的四只眼进行处理用于组织学和视紫红质免疫组织化学(图2F)。在每只眼的经处理区域和未经处理区域之间未观察到ONL厚度的明显定性变化,表明在高病毒滴度下通过OCT成像看到的ONL增厚可能是细胞间或细胞内肿胀(在组织固定之后不可检测)而不是细胞增殖的结果。在用10×10^{11}vg/mL滴度载体处理的区域中观察到与视杆视蛋白免疫标记显著降低有关的外段结构损失。在5×10^{11}vg/mL,与同一只眼的未经处理区域相比,在经处理区域中发现了外段的一些缩短和视杆视蛋白免疫标记的降低。在两个最低滴度($1\times$和2.5×10^{11}vg/mL)下,外段被保持,并且在经处理区域和未经处理区域之间视杆视蛋白免疫标记相当。以1×10^{11}至50×10^{11}vg/mL滴度注射的其余六只眼(图2G)用于在RNA和蛋白质水平上评估$AAV\text{-}shRNA_{820}$降低内源犬RHO表达的效率。绝对RNA定量(图2H)显示在以从50×10^{11}至低至5×10^{11}vg/mL滴度注射的眼的经处理区域中RHO转录物水平非常低(见于未经处理区域中的0-3%)。在较低滴度(1×10^{11}至2.5×10^{11}vg/mL)下,敲低效率降低,在经处理区域中依然

保留正常RHO RNA水平的22％至74％。在免疫印迹上对持续存在于经处理区域中的RHO蛋白进行定量揭示了剂量依赖性效应(图2H):在用两种最高滴度(50×10^{11}和10×10^{11}vg/mL)处理的眼中具有不可检测的水平,在用5×10^{11}vg/mL处理的眼中为15％,并且在两个最低滴度下为>47％。

[0123] 这些研究表明,$shRNA_{820}$的视网膜下AAV载体递送可以实现WT犬RHO的非常有效的沉默,并且表明5×10^{11}vg/mL滴度可以提供视杆光感受器中高表达结构蛋白的敲低与不会引起大的光感受器应力或变性之间的最佳平衡。

[0124] 表1:在狗中进行的实验程序的总结

[0125]

研究/组	狗 ID- 眼	性别	处理	滴度 (vg/mL)	体积 (μL)
正常眼中单独RHO敲低					
A	2194-OD	F	shRNA820	50x10^{11}	200 (*50 IVit*)
	2194-OS	F	shRNA820	10x10^{11}	300 (*250 IVit*)
	BR442-OD	F	shRNA820	10x10^{11}	200 (*50 IVit*)
	BR442-OS	F	shRNA820	10x10^{11}	150
	GSR2-OD	F	shRNA820	5x10^{11}	300 (*150 IVit*)
	GSR2-OS	F	shRNA820	5x10^{11}	150 (*40 IVit*)

[0126]

	P1474-OD	M	shRNA820	$2.5x10^{11}$	200 (*50 IVit*)
	P1474-OS	M	shRNA820	$2.5x10^{11}$	150
	N282-OD	M	shRNA820	$1x10^{11}$	150
	N282-OS	M	shRNA820	$1x10^{11}$	160
B	2190-OD	M	shRNA131	$50x10^{11}$	150
	2190-OS	M	shRNA131	$10x10^{11}$	150
C	D345-OD	F	Rz525	$50x10^{11}$	150
	AS355-OS	F	Rz525	$20x10^{11}$	150
	AS357-OS	F	Rz525	$20x10^{11}$	150
RHO$^{T4R/+}$ 突变眼中单独RHO敲低					
D	EM408-OD	F	shRNA820	$10x10^{11}$	200 (*50 IVit*)
	EM409-OD	F	shRNA820	$10x10^{11}$	150
	EM411-OD	F	shRNA820	$5x10^{11}$	160
	EM413-OD	F	shRNA820	$2.5x10^{11}$	150
	EM412-OD	F	shRNA820	$1x10^{11}$	220 (*70 IVit*)
E	EM408-OS	F	shRNA820	$10x10^{11}$	150
	EM409-OS	F	shRNA820	$10x10^{11}$	150
	EM411-OS	F	shRNA820	$5x10^{11}$	150
	EM413-OS	F	shRNA820	$2.5x10^{11}$	150
	EM412-OS	F	shRNA820	$1x10^{11}$	150
F	EM396-OD	M	Rz525	$100x10^{11}$	150
	EM375-OD	M	Rz525	$20x10^{11}$	300 (*150 IVit*)
	EM400-OD	F	Rz525	$20x10^{11}$	150 (*40 subRPE*)
	EM400-OS	F	BSS	/	150
	EM396-OS	M	Rz525	$100x10^{11}$	150
	EM375-OS	M	Rz525	$20x10^{11}$	450 (300 *IVit*)
RHO 敲低和替代：RHO$^{T4R/+}$ 突变眼中的双载体策略					
G	EM422-OD	M	(shRNA820) + (RHO820)	$5x10^{11}$ + $5x10^{11}$	150
	EM423-OD	M	(shRNA820) + (RHO820)	$5x10^{11}$ + $10x10^{11}$	150
	EM422-OS	M	(shRNA820) + (RHO820)	$5x10^{11}$ + $5x10^{11}$	150
	EM423-OS	M	(shRNA820) + (RHO820)	$5x10^{11}$ + $10x10^{11}$	150
RHO 敲低和替代：RHO$^{T4R/+}$ 突变眼中的单载体策略					
H	EM418-OD	M	(shRNA820 + RHO820)	$5x10^{11}$	150
	EM420-OD	F	(shRNA820 + RHO820)	$5x10^{11}$	150
	EM424-OD	M	(shRNA820 + RHO820)	$5x10^{11}$	150

[0127]

	EM425-OD	M	(shRNA820 + RHO820)	$5x10^{11}$	150
	EM418-OS	M	(shRNA820 + RHO820)	$5x10^{11}$	150
	EM420-OS	F	(shRNA820 + RHO820)	$5x10^{11}$	150
	EM424-OS	M	(shRNA820 + RHO820)	$5x10^{11}$	150
	EM425-OS	M	(shRNA820 + RHO820)	$5x10^{11}$	150
RHO 敲低和替代： **RHO**$^{T4R/+}$ 突变眼中的单载体策略（多次LD暴露之后长期随访）					
I	EM426-OD	M	(shRNA820 + RHO820)	$5x10^{11}$	150
	EM428-OD	F	(shRNA820 + RHO820)	$5x10^{11}$	150
	EM426-OS	M	BSS	/	150
	EM428-OS	F	BSS	/	150
RHO$^{T4R/+}$ 突变眼中的自然史（未经注射的眼或注射之前时间点）					
J	EM414-OD	M	无	/	/
	EM392-OD	M	无	/	/
	EM392-OS	M	无	/	/
	EM393-OD	F	无	/	/
	EM393-OS	F	无	/	/
	EM354-OD	F	无	/	/
	EM191-OD	M	无	/	/
	EM191-OS	M	无	/	/
WT 对照眼					
K	CGBCAN-OD	M	无	/	/
	CGBCDI-OD	M	无	/	/
	CGBCGS-OD	M	无	/	/
	N292-OS	M	无	/	/
	N293-OS	F	无	/	/
	N294-OS	F	无	/	/

[0128] 表1(续)

[0129]

研究/组	剂量 (vg/眼)	光	LE	分析	附图

[0130]

正常眼中单独RHO敲低					
A	$100x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 2A-2H; 12
	$30x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 2A-2H; 12
	$20x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT;H&E/IHC	图 2A-2H; 12
	$15x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 2A-2H; 12
	$15x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT;H&E/IHC	图 2A-2H; 12
	$7.5x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 2A-2H; 12
	$5x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 2A-2H; 12
	$3.7x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT;H&E/IHC	图 2A-2H; 12
	$1.5x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT;H&E/IHC	图 2A-2H; 12
	$1.6x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 2A-2H; 12
		白色			
B	$75x10^{10}$	白色	否	RNA/ 蛋白质	图 11A-11C
	$15x10^{10}$	白色	否	RNA/ 蛋白质	图 11A-11C
		白色			
C	$75x10^{10}$	白色	否	RNA/ 蛋白质	图 9A-9C
	$30x10^{10}$	白色	否	RNA/ 蛋白质	图 9A-9C
	$30x10^{10}$	白色	否	RNA/ 蛋白质	图 9A-9C
$RHO^{T4R/+}$突变眼中单独RHO敲低					
D	$20x10^{10}$	红色	否	cSLO/OCT	
	$15x10^{10}$	红色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 3A-3D
	$8x10^{10}$	红色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 3A-3D
	$3.7x10^{10}$	红色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 3A-3D
	$2.2x10^{10}$	红色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 3A-3D
E	$15x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT	图 15A-15C
	$15x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT;H&E/IHC	图 3A-3D; 15A-15C
	$7.5x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT;H&E/IHC	图 3A-3D; 15A-15C
	$3.7x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT;H&E/IHC	图 3A-3D; 15A-15C
	$1.5x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT;H&E/IHC	图 3A-3D; 15A-15C
F	$150x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 10A-10E
	$60x10^{10}$	白色	否	cSLO/OCT; RNA/ 蛋白质	图 10A-10E
	$30x10^{10}$	白色	否	RNA/ 蛋白质	图 10A-10E
	/	白色	否	RNA/ 蛋白质	图 10A-10E
	$150x10^{10}$	白色	是	cSLO/OCT; H&E	图 10A-10E
	$90x10^{10}$	白色	是	cSLO/OCT	
RHO 敲低和替代：$RHO^{T4R/+}$ 突变眼中的双载体策略					
G	$15x10^{10}$	红色	否	cSLO/OCT	
	$22.5x10^{10}$	红色	否	cSLO/OCT	图 13A-13G

[0131]

	$15x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT; H&E/IHC	图 13A-13G; 15A-15C
	$22.5x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT; H&E/IHC	图 13A-13G
RHO 敲低和替代：$RHO^{T4R/+}$ 突变眼中的单载体策略					
H	$7.5x10^{10}$	红色	否	RNA/ 蛋白质	图 4A-4G
	$7.5x10^{10}$	红色	否	RNA/ 蛋白质	图 4A-4G
	$7.5x10^{10}$	红色	否	RNA/ 蛋白质	图 4A-4G
	$7.5x10^{10}$	红色	否	RNA/ 蛋白质	图 4A-4G
	$7.5x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT; IHC	图 4A-4G; 15A-15C
	$7.5x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT; IHC	图 14A-14D; 15A-15C
	$7.5x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT; IHC	图 14A-14D; 15A-15C
	$7.5x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT; IHC	图 4A-4G
RHO 敲低和替代：$RHO^{T4R/+}$ 突变眼中的单载体策略（多次LD暴露之后长期随访）					
I	$7.5x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT; ERG	图 5A-5D
	$7.5x10^{10}$	红色	是	cSLO/OCT; ERG	图 5A-5D
	/	红色	是	ERG	图 5A-5D
	/	红色	是	ERG	图 5A-5D
$RHO^{T4R/+}$ 突变眼中的自然史（未经注射的眼或注射之前时间点）					
J	/	红色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
WT 对照眼					
K	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C
	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C

[0132]

	/	白色	否	cSLO/OCT	图 15A-15C

[0133] 光:循环环境(打开12小时,关闭12小时)暗红色或白色照明;LE:光暴露方案;OD:

右眼;OS:左眼;F:雌性;M:雄性;IVit:玻璃体内;subRPE:视网膜色素上皮下;cSLO:共聚焦扫描激光检眼镜检查;OCT:光学相干断层扫描;RNA/蛋白质:视紫红质RNA和蛋白质水平的定量;ERG:视网膜电描记术;H&E:苏木精和伊红染色的组织学;IHC:免疫组织化学。

[0134] $shRNA_{820}$对突变RHO的抑制

[0135] 为了验证$shRNA_{820}$在表达WT和突变RHO等位基因二者的杂合突变视网膜中的效率,在十只RHO-突变眼中以一系列滴度(1×10^{11}至10×10^{11}vg/mL)进行AAV-shRNA820的视网膜下注射,在注射之后对眼随访8至10周(表1,组D、E)。由于RHO-突变狗视网膜对光高度敏感(45-48),因此从出生直至到研究结束,将动物在暗红色光下圈养,并且在红外照射下进行手术干预(49)。使用四只眼用于在RNA和蛋白质水平上RHO敲低效率的定量(图3A;表1,组D)。如在WT动物中,以10×10^{11}vg/mL的滴度,在经处理区域中RHO RNA和蛋白质表达完全沉默(图3B)。用较低(5×10^{11}vg/mL)滴度达到了类似的RHO表达缺失。然而,该结果的解释与OCT成像混淆,OCT成像揭示ONL厚度的部分损失局限于该眼中的经处理区域。用较低(1×10^{11}和2.5×10^{11}vg/mL)滴度观察到RHO持续表达。

[0136] 接下来,评价了仅敲低是否可阻止光感受器变性。另一个四只RHO-突变眼的组(表1,组E)也注射了相同滴度范围的AAV-$shRNA_{820}$,但在注射之后6至8周时,将它们暴露于已知在该犬模型中引起急性视网膜变性的中等强度白光一分钟(46-48)。在光暴露之后两周,注射有10×10^{11}和5×10^{11}vg/mL滴度的眼显示出对应于处理区域的明显ONL保留区域(图3C)。在处理区域之外,存在严重的视网膜变性,表明通过仅敲低实现了对光感受器的显著挽救。预计RHO敲低导致IS/OS强度异常。此外,注射有最高(10×10^{11}vg/mL)滴度的眼显示出一些ONL增厚,暗示温和光感受器应力。注射了两个最低滴度(2.5×10^{11}vg/mL和1×10^{11}vg/mL)的眼在经处理区域中具有有限至没有ONL保留(图3C)。这些眼的组织学分析(图3D)证实了体内视网膜成像的结果。在注射两个最高滴度之后,存在ONL保留但内段缩短、外段结构损失、以及视杆视蛋白免疫标记降低。在2.5×10^{11}vg/mL滴度下,除ONL保留的小岛之外在经处理区域中发现了严重的ONL变薄。最低(1×10^{11}vg/mL)滴度未赋予任何针对光暴露的保护。在这只眼中,在经处理区域中的ONL与未经处理区域的ONL相似;其限于单排视锥体细胞,伴有极少的残留视杆体细胞和视杆视蛋白阳性碎片。

[0137] 综上所述,这些发现证实,$shRNA_{820}$在体内可抑制WT和T4R等位基因二者,并且AAV2/5-$shRNA_{820}$在5×10^{11}至10×10^{11}vg/mL范围的滴度在RHO-突变视网膜中赋予感光细胞(但不是其外段)免受视网膜变性的保护。这种部分保护作用可能是由有效的RHO抑制导致的,其导致视杆外段的解构,同时保持内段和视杆感光细胞体完整。保护视网膜免受突变RHO驱动的变性同时保留感光外段保持的功能性视杆的需要导致探索是否可用被制成对$shRHA_{820}$具有抗性的人RHO cDNA(RHO_{820})的表达来补充对内源性犬RHO(WT和突变体)的抑制。

[0138] 组合抑制和替代

[0139] 双载体-双功能策略

[0140] 最初,通过将上述使用的AAV-$shRNA_{820}$与携带在人视蛋白启动子控制下的抗性人RHO cDNA(RHO_{820})的类似AAV2/5血清型(AAV-RHO_{820})共注射测试双载体策略。将两只RHO-突变眼用类似滴度(5×10^{11}vg/mL)的两种载体共注射(1:1处理),并且将另外的两只突变眼用5×10^{11}vg/mL的AAV-$shRNA_{820}$和10×10^{11}vg/mL的AAV-RHO_{820}共注射(1:2处理)(表1,组G)。在

注射之后7周,使来自每个处理组的一只眼暴露于光暴露方案,并且在4周之后通过OCT对所有四只眼进行成像。在接受1:1处理的光暴露眼中,有一些ONL保留,但在大多数经处理区域中其未达到正常厚度(图13A)。在具有最大ONL保留的区域中,有一些视杆外段保持,这表明通过用RHO_{820}替代赋予了有益结果(图13B、13C)。部分ONL保护也发生在接受1:2处理的光暴露眼中;然而,在经处理区域中观察到内视网膜的厚度异常提高(图13D),这是由单个核炎性细胞的严重的血管周和内视网膜浸润而导致的(图13F)。此外,存在视杆外段破坏(图13E)。通过OCT在对侧遮蔽眼中观察到类似的发现(1:2处理),其包括局灶性视网膜脱离,以及血管周和视网膜下细胞浸润的迹象(图13G)。该双载体策略的结果指向敲低和替代功能的组合的有益效果。尽管如此,视杆保护不完全,并且处理导致严重的视网膜并发症。为了规避这些局限性,开发了将敲低元件($shRNA_{820}$)和抗性替代元件(RHO_{820})组合的单AAV载体。假定该替代策略可确保在较低的病毒载量下对光感受器进行共转导,并且由此实现更好的视网膜变性保护和提高安全性。

[0141] 单载体-双功能策略

[0142] 在八只RHO-突变眼中以预先确定的最佳滴度5×10^{11}vg/mL进行视网膜下注射AAV-$shRNA_{820}$-RHO_{820}(表1,组H)。在注射之后7周(n=2只眼)或在注射之后13周(n=2只眼)对经处理的动物进行光暴露方案,以确定单载体方法在预防急性视网膜变性中的效力。在所有四只眼中,在光暴露之后两周,ONL厚度有显著性保留(图4A、4B;图14A、14B)。最重要地,所有四只眼在经处理区域中均具有可检测的IS/OS信号。通过IHC对光感受器进行的结构分析(图4C、4D;图14C、14D)证实了体内结果:在经处理区域中,正常数量的感光细胞体保留在ONL中,并且检测到视杆外段。长视杆外段的保持与视锥内段和外段的形态改善相关。在类似的时间点(注射之后9和13周)收集已注射了类似剂量的AAV-$shRNA_{820}$-RHO_{820}但未光暴露的四只对侧眼,并对其进行处理用于经处理和未经处理区域中RHO RNA和蛋白质定量(图4E)。如所预期的,在注射之后9周,在两只眼的经处理区域中犬RHO RNA(图4F)显著降低(见于未经处理区域中的15%至16%)。在注射之后13周处理的两只眼中,剩余犬RHO RNA的水平进一步降低(未经处理区域的1%至2%)。在注射之后9周收集的两只眼中人RHO_{820}转基因转录物水平(图4G)为在未经处理区域中测量的犬RHO水平的5%至9%。在较晚的时间点,即注射之后13周,人RHO_{820} RNA的水平显著更高(在未经处理区域中测量的犬RHO水平的118%至132%)。在蛋白质水平上(图4G),总(内源性犬和人)RHO蛋白的测量显示出类似的时间趋势,其中在注射之后13周时RHO蛋白水平(未经处理区域中犬RHO水平的31%至33%)高于注射之后9周(18%至19%)。综上所述,这些结果证实了结合RHO敲低和RHO替代功能二者的单病毒载体可有效地保持视杆光感受器的全部结构(包括其内段和外段)的完整性,并且在递送该载体之后数周,抗性RHO转基因的表达水平持续上升。

[0143] 在单载体处理下视网膜结构和功能的37周保持

[0144] 为了评估单载体策略的长期稳定性及其保护RHO-突变眼免受变性的能力,将两只RHO-突变狗在一只眼中以预先确定的最佳滴度5×10^{11}vg/mL视网膜下注射AAV-$shRNA_{820}$-RHO_{820},同时使对侧眼接受类似体积的平衡盐溶液(BSS)(表1,组I)。在注射之后11、15、25和35周,将所有四只眼重复进行光暴露。OCT成像是在注射之前,以及紧接每次光暴露之前,和每次光暴露之后约2周进行的(图5A,上排,时间线)。在第一次光暴露之后,在经处理区域中光感受器完全保持,并且这种显著的处理效果在注射之后37周即使在另外的三次光暴露之

后仍持续存在(图5A,下排)。从两只经AAV-shRNA$_{820}$-RHO$_{820}$注射的眼的经处理区域采样的视网膜位置中进行的定量分析(图5B,左)显示,在注射之后ONL厚度有小的提高,其在约12周达到峰值,然后在37周逐渐回到正常水平(图5B,中)。在所有时间点在经处理区域中保持着可检测的IS/OS信号。IS/OS强度有轻微的降低,其也在约12周达到峰值,随后在注射之后37周逐渐回到正常水平(图5B,右)。

[0145] 在每次光暴露之后2.1至2.4周进行视网膜电描记术(ERG)测量,以评估视网膜功能(图5A,上排,时间线)。定性地,ERG显示与RHO-突变狗的对侧经BSS注射眼(图5C,虚线迹线)相比,在经AAV-shRNA$_{820}$-RHO$_{820}$处理的眼(图5C,实线迹线)中视杆和视锥介导的功能一致地更好;在经载体处理的眼和经BSS处理的眼之间存在显著的ERG不对称性,并且在每次光暴露之后该不对称性增加(图5C)。定量地,视杆支配的ERG迹线的振幅在经AAV注射的眼和经BSS注射的眼二者中均显示出随时间降低的趋势,这可能是由于在处理区域之外的外周视网膜中发生了持续的光感受器变性(图5D,上图)。在间插有四次光暴露的整个37周注射后时间段中,视锥功能显示总体上更加稳定(图5D,下图)。重要地,在每个时间点,在经处理的眼中视杆和视锥响应显著更大。

[0146] 这些结果表明,AAV-shRNA$_{820}$-RHO$_{820}$保持了视杆光感受器的整体结构的完整性,并且赋予视网膜结构和功能长达37周的变性保护,否则在未经处理的RHO-突变眼中迅速发生变性。

[0147] Rz525对犬RHO的抑制

[0148] 将在体外测定(图8)中显示降低WT人RHO表达的锤头状核酶(Rz525)包装在AAV2/5载体中,并以20和50×10^{11}vg/mL滴度在三只WT犬眼中进行视网膜下注射(图9A)。仅在注射了最高滴度(50×10^{11}vg/mL)的眼中测量AAV2/5-Rz525在RNA水平上降低内源性犬RHO表达的效率。在经处理区域中,在RNA水平上RHO表达完全沉默(图9B),而RHO蛋白水平降低至约30%(图9C)。注射了20×10^{11}vg/ml的两只眼在经处理区域中具有较高(47%和64%)的内源性犬RHO蛋白剩余水平(图9C)。

[0149] 随后在五只杂合RHO-突变眼中测试Rz525(表1,组F),这些眼以20×10^{11}(3只眼)或100×10^{11}vg/mL(2只眼)视网膜下注射AAV2/5-Rz525。向另外的突变眼注射BSS,并作为阴性对照。在注射之后8周,观察到在最高滴度(100×10^{11}vg/mL)下在EM396-OD的经处理区域中,在RNA(13%剩余)和蛋白质(0.1%剩余)水平二者上RHO表达均显著沉默(图10A至10C)。然而,该处理与通过OCT成像检测到的视网膜脱离和视网膜下空间中细胞浸润的迹象相关(图10E,上排),并且通过注射了类似滴度的对眼(EM396-OS)的组织学证实(图10E,下排)。注射了较低20×10^{11}vg/mL滴度的两只眼在经处理区域中在RNA(39%和66%)和蛋白质(36%和67%)水平二者上都具有更多的内源性犬RHO剩余(图10A至10C)。为了评价这些RHO抑制水平是否足以赋予保护以免受光诱导的视网膜变性,将注射了20和100×10^{11}vg/mL的AAV2/5-Rz525的两只突变RHO眼在注射之后6周暴露于光,并且通过OCT成像。在光暴露之后两周,注射了100×10^{11}vg/mL滴度的眼在经处理区域中具有一些ONL保留区域;然而,在注射了较低(20×10^{11}vg/mL)滴度的眼中未观察到这样的挽救(图10D)。

[0150] 这些结果表明,在RHO-adRP犬模型中,用Rz525可实现近乎完全的RHO敲低,并且RHO蛋白表达的降低与一定程度的针对光诱导的视网膜变性的保护相关。然而,只有当注射高病毒载量时才能实现保护,所述高病毒载量与视网膜炎/脉络膜视网膜炎的严重体征相

关。

[0151] 表2:在WT RHO的靶位点处和在hRHO820的经密码子修饰的抗性位点处的密码子频率(每千)(基于密码子使用数据库,kazusa.orjp/codon/)

[0152]

物种	WTRHO	抗性$hRHO_{820}$
	GCA	GCU
狗	13.7	17.2
人	15.8	18.4
	UUC	UUU
狗	17.1	24.4
人	17.6	20.3
	UAC	UAU
狗	17.5	11.5
人	15.3	12.2
	AUC	AUA
狗	25.7	7.2
人	20.8	7.5
	GCA+UUC+UAC+AUC	GCU+UUU+UAU+AUA
狗	74	60.3
人	69.5	58.4

[0153] $shRNA_{131}$对WT犬RHO的有限抑制

[0154] 将已显示在细胞培养物中降低WT人RHO表达(图1A-1H)的敲低试剂($shRNA_{131}$)包装在AAV2/5载体中,并以10和50×10^{11}vg/mL滴度在两只WT犬眼中进行视网膜下注射(图11A;表1,组B)。$AAV2/5\text{-}shRNA_{131}$在RNA和蛋白质水平二者上降低内源性犬RHO表达的效率受到限制。即使用最高滴度(50×10^{11}vg/mL),在注射之后8周在经处理区域中仍有正常水平的50%的内源性犬RHO RNA(图11B)和70%内源性犬RHO蛋白(图11C)剩余。作为结果,没有在狗中进行关于使用$shRNA_{131}$作为RHO抑制的潜在候选物的进一步研究。

[0155] $AAV2/5\text{-}RHO_{820}\text{-}shRNA_{820}$在RHO-adRP的犬T4R模型中防止来自重复光暴露的视网膜变性的发生的长期效力

[0156] 在突变$RHO^{T4R/+}$犬中评价了AAV2/5载体在五十周时间内的效力。载体在未经处理的$RHO^{T4R/+}$狗视网膜中赋予光感受器针对光诱导的视网膜变性的稳定保护的能力在结构上通过OCT和IHC评价,并且在功能上通过ERG评价。在注射之后12、24、36和48周,使这些狗的视网膜通过急性光暴露事件进行挑战。在研究进程期间进行了OCT和ERG检查。在实验终止时(注射之后50周),对视网膜组织处理用于IHC。实验设计的图示在图17中示出。

[0157] ERG测量结果显示,在经AAV处理的眼中视杆和视锥介导的功能显著好于在经BSS处理的眼中。图18A至18D示出了在一只眼中注射了$scAAV2/5\text{-}hOP\text{-}RHO_{820}\text{-}H1\text{-}shRNA_{820}$(虚

线)并且在对侧眼中注射了BSS(实线)的狗中在每次光暴露事件之后约2周经过暗适应而记录的视杆(-1.7log cd.s.m^{-2})、混合视杆-视锥(0.51log cd.s.m^{-2})以及经过光适应而记录的针对单刺激(0.51log cd.s.m^{-2})或29-Hz视锥闪烁(0.26log cd.s.m^{-2})的视锥响应的代表性ERG迹线。

[0158] 在所示的类似时间点将四只RHO-突变狗的一只眼中注射scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$(水平线阴影)并且在对侧眼中注射BSS(斜线阴影)。视杆b-波、混合视杆-视锥a-和b-波、以及视锥1Hz和29Hz闪烁响应的最大振幅的纵向定量显示在图19A至19C中。来自光感受器的电响应被称为a-波,并且来自视网膜的双极细胞的电响应被称为b-波。

[0159] OCT分析显示在经AAV处理的区域中外核层(ONL)厚度保持,而在经处理区域之外以及在经BSS处理的区域中均未观察到保护。体内结果通过组织学/IHC得到证实,其显示ONL以及视杆和视锥内段和外段保持。在图20A至20D中示出了对于每只RHO-突变狗,在注射之前(pre-inj.)、注射之后12周(第一次光暴露事件之前)和注射之后50周(第四次光暴露事件之后2周)的ONL厚度图和内段-外段(IS/OS)强度图。

[0160] 来自RHO突变狗的视紫红质(RHO)/人视锥拘留蛋白(hCA)共免疫标记的视网膜冷冻切片示出了同一只眼的未经处理和经处理区域中外核层(ONL)和外段(OS)的形态(参见图21)。在图21下图中的ONL厚度图示出了在上图中示出的未经处理和经处理视网膜区域的大致位置(星号)。示出了眼的经处理和未经处理区域之间的过渡区用于参考。

[0161] 结果显示,在RHO-adRP犬模型中,AAV2/5-hOP-RHO_{820}-H1-$shRNA_{820}$构建体赋予了光感受器长达注射之后50周的针对光诱导的视网膜变性的稳定结构保护。结果还显示,在RHO-adRP犬模型中,AAV2/5-hOP-RHO_{820}-H1-$shRNA_{820}$构建体赋予了光感受器长达注射之后50周的针对光诱导的视网膜变性的稳定功能(视网膜电描记术)保护。这些结果表明上述保护稳定性延长了13周,并且证实了在经处理区域中视杆和视锥的结构保持。

[0162] 讨论

[0163] 尽管在开发针对常染色体显性疾病的基因治疗方面做出了相当大的努力(50),但只有涉及反义技术(ASO,siRNA)的两种已达到临床试验阶段,并且这些是用于没有视网膜表型的系统性疾病(NCT01041222;NCT02363946)。已经探索了不依赖于突变的基因敲低和替代方法的开发用于治疗由毒性功能获得型突变导致的显性遗传性系统性和视网膜疾病和/或用来规避高突变异质性。(40-43,51,52)一项可能推迟临床治疗的开发的重大挑战是需要在提供足够的抗性替代时成功地微调突变体和WT内源性蛋白二者的降低水平。(53)在此,在RHO-adRP的天然存在形式中并且在大动物模型中显示该双功能策略可有效地提供长期的光感受器挽救。此外,显示当敲低和替代组分二者在同一病毒载体中共递送时,他们与分开递送时相比提供了提高的效力和更好的安全性谱。

[0164] 在RHO-adRP的天然存在大动物模型中的基因治疗效力的迅速评估

[0165] 迄今为止,仅在RHO-adRP的转基因动物模型中测试了遗传方法,其包括基因增强、突变依赖性RHO抑制以及不依赖于突变的RHO敲低和替代。这些包括hP23H小鼠(5,41,43)、hP347S小鼠(36,38,42,54)和mP23H(1和3系)大鼠(22,23,25,26,33)。突变转基因与内源性RHO拷贝数之比不同的动物模型的使用使在这些研究之间对光感受器挽救结果进行比较复杂化,并且无法估计其在人RHO-adRP视网膜中的潜在效力。最近,产生了表达等同水平的鼠P23H和WT RHO的P23H视蛋白敲入小鼠。(55)然而,该模型在本研究中并没有用处,因为犬和

人RHO RNA中shRNA820的靶位点在小鼠中不保守。

[0166] 为了提高这些研究在未来人临床试验的背景下的预测价值,使用了RHO T4R突变狗,其是唯一天然存在的RHO-adRP模型(56)。除了其对人尺寸眼的转化价值以及其与B类患者的表型相似性(56)之外,$RHO^{T4R/+}$狗还表达等同量的突变体和WT RHO蛋白(57)。在生命的前两年内,两种形式在正常情况下均运输到视杆外段(57),并维持正常的视网膜结构和功能,直到在颞下(图15A至15C)和中央视网膜(56)中检测到渐进性的光感受器损失区域。在犬RHO T4R模型中已充分表征了对光的敏感性,其在RHO-adRP的其他模型中已经认识到(47)并怀疑在B类患者中(19,45,58-60)。(45)先前开发了利用这种光敏感性的光暴露方案,以实验方式触发光感受器的迅速且同步化的损失,并加速自然疾病进程。(46)RHO-突变(而非WT)狗在使用在临床患者环境中所遇到的强度水平进行急性(1分钟)光暴露之后两周内遭受了在视网膜中央至中周部中视杆的完全损失。(47,48)在此,该"疾病加速"方法用于获得基因治疗干预对预防RHO-突变体中视杆变性的作用的迅速读出。

[0167] RHO抑制:强效敲低组分的需要

[0168] 来自数种动物模型研究的证据表明,毒性功能获得机制与许多RHO突变相关,包括P23H(55,61,62)T17M(63,64)和T4R/T4K(45,64)。在包括RHO-突变狗在内的许多RHO-adRP模型中,在暴露于光之后可加剧这种毒性(47)。因此,假定在正常环境照明下,T4R突变产生一旦漂白(bleach)即具有高毒性但与发色团结合时则稳定的蛋白质(57),并且对视杆的有效保护将需要突变体转录物的显著敲低。这项研究检测了包括三种shRNA和锤头状核酶在内的数种RHO敲低试剂的效率,目的是鉴定能够抑制RHO表达的最强效试剂。在RHO-突变狗中测试的Rz525产生内源性犬RHO蛋白的64%降低,这不足以赋予保护以免受光诱导的视网膜变性(图10C至10D)。这证实了天然突变体T4R蛋白的高毒性,因为低至RHO生理水平的18%的剩余量足以在杂合突变视网膜中引起疾病,并证明有必要实现更有效的抑制。当用Rz525获得RHO蛋白的完全抑制时,观察到一些ONL挽救,但是对高病毒滴度(10^{13}vg/mL)的需要与严重的视网膜炎症相关(图10C至10E)。根据这些结果,仅仅将在体外以及在WT狗中筛选和测试之后鉴定出的最有效shRNA($shRNA_{820}$)随后在突变体中进行评价。结果证实了最佳挽救仅发生在实现了RHO蛋白表达的完全抑制时,而86%的RHO敲低提供了仅部分保护(图3C至3D)。迄今为止报道的一些最有效敲低试剂已实现了对人RHO RNA的90%至95%抑制,但这些结果是在经FACS分选的转导视杆上获得的。(36,41)在此,剩余RHO RNA和蛋白质水平有意地由在经处理区域中收集的神经视网膜的活检穿孔物而不是从经转导视杆的富集群体进行测量。结果显示在RHO-突变视网膜中RHO信使和产物完全敲低(图3B至3C),这不仅表明$shRNA_{820}$是极强效的,而且视杆转导效率非常高。重要地,这是在AAV2/5滴度低至5×10^{11}vg/mL下实现的,其先前已显示在狗视网膜中耐受良好滴度的范围内(44,65,66)。WT和RHO-突变狗中RHO蛋白表达的近乎完全抑制与OS的损失相关,类似于其他人报道的视杆外段结构的崩溃。(36,54)重要的是要注意RHO抑制与ONL厚度的任何降低均不相关,这表明视杆在施用$shRNA_{820}$之后可存活至少10周。该间隔为抗性RHO替代组分的伴随表达提供了窗口,以产生足够的蛋白质来阻止外段解构或启动外段再生。

[0169] RHO替代:多少足够/太多?

[0170] 已显示低至23%的视紫红质过表达在转基因小鼠中引起视网膜毒性,(67,68)因此需要严格调节RHO基因补充策略。然而,当在hP23H $RHO^{+/-}$、$mRHO^{+/+}$转基因小鼠中在出生后

递送RHO基因增强时未观察到视网膜变性。这种遗传结构导致RHO RNA提高两倍而RHO蛋白提高58％,并导致在治疗之后持续长达6个月的结构性和功能性视杆。(5)这些明显矛盾的结果表明,成熟的视杆可比发育中光感受器耐受更高水平的RHO过表达。在本研究中,由于T4R突变的高毒性功能获得,在RHO-突变狗中未考虑基因增强,此外还因为该策略当在携带一个突变(hP23H)和一个WT(mRHO)等位基因的hP23H RHO$^{+/-}$、mRHO$^{+/-}$转基因小鼠中进行测试时未能赋予保护。(43)作为代替,与shRNA$_{820}$介导的RHO抑制一起评价了抗性RHO cDNA(RHO$_{820}$)的替代。在提前9周注射了AAV2/5-shRNA$_{820}$-RHO$_{820}$的突变视网膜的经处理区域中,低至见于未经处理区域中18％的总RHO蛋白水平(图4G)就足以保持视杆外段结构(图4C,图14C)。当在4周之后(注射之后13周)对来自另外的两只经注射眼的视网膜进行处理时,测得更高的蛋白质量(高达未经处理区域的33％)(图4G),这也维持了外段的形成(图4D,14D)。这些发现表明,RHO替代的动力学比抑制慢,并且RHO表达的最大水平直到处理之后数周才可达到。

[0171] 相对于双载体方法在单载体中结合敲低和替代实现了最佳效率并且提高了安全性

[0172] 先前将敲低和替代试剂共包装在同一病毒载体中的努力提供了短期(注射之后10天)ONL厚度保持,但无法在hP23H RHO$^{+/-}$、mRHO$^{+/-}$转基因小鼠中挽救视杆外段结构。(41)这导致考虑双载体方法,由此分开包装敲低和替代试剂,使得能够以两种载体的不同比例共施用来更好地控制RHO抑制和替代的水平。该策略在hP347S RHO$^{+/-}$、mRHO$^{+/-}$转基因小鼠中实现了ONL厚度、视杆外段结构和ERG功能的保持,但效果未持续。(42)在本研究中,AAV-shRNA$_{820}$和AAV-RHO$_{820}$的共注射导致一定程度的针对光暴露的保护,但观察到严重视网膜炎症的迹象,可能是由于施用了组合的更高病毒剂量(图13A至13G)。该发现导致了对先前在小鼠模型中成功评价的单载体双功能策略的追求。(43)将分别由人H1 RNA和人视蛋白近端启动子驱动的shRNA$_{820}$和RHO$_{820}$在重组AAV盒的载物容量界限内成功包装。该构建体的效率仍然很高,在注射之后13周实现了约98.5％的内源性犬RHO RNA抑制和水平与正常相当的人RHO$_{820}$表达。然而,在蛋白质水平上,替代导致了仅正常水平的约三分之一。RNA和蛋白质水平之间的这种不一致可通过数个因素来解释,包括在摆动/简并位点处引入同义密码子修饰以产生抗性RHO$_{820}$ cDNA影响了其翻译效率的可能性。对shRNA$_{820}$的RHO靶位点处四种经修饰密码子的密码子频率的分析显示,对于狗和人二者,两种密码子的频率提高,另外两种的频率降低,并且当所有四种密码子组合时总体上降低(表2)。由于已经发现密码子使用和相对tRNA丰度之间的相关性,特别是对于组织特异性的高表达基因(69),以较低频率引入两种密码子可导致RHO$_{820}$翻译率降低。(70)因此,通过降低替代基因中修饰的数量来提高视紫红质表达也许是可能的。如果siRNA与mRNA之间的错配发生在RISC介导的切割位点附近,则单个该错配可足以阻断RNA沉默。(71)另一种与密码子偏倚不相关的可能解释可能是RHO抑制的动力学快于RHO替代。认为载体中使用的H1 RNA聚合酶III启动子比更强效的U6启动子安全,其导致非常高水平的shRNA表达,并潜在地导致内源性miRNA的加工系统饱和。然而,H1 RNA大量表达,并且此处使用的启动子在所有测试的细胞类型中都发挥作用。(72,73)这可解释为什么在注射之后9周时内源性RHO RNA水平已经显著降低(约84％),而RHO$_{820}$ RNA水平仅达到正常的5％至9％(图4F至4G)。尽管免疫组织化学分析显示在结构上保持的OS中存在RHO蛋白,但IS/OS强度(IS/OS完整性的新的替代标志物)的视网膜OCT成像显示该

信号虽然可检测到但在注射之后9和13周降低(图4A至4B,图14A至14B)。在对用AAV-shRNA$_{820}$-RHO$_{820}$处理的两只RHO-突变狗进行四次急性光暴露事件中的纵向分析显示出类似的IS/OS强度下降,其在注射之后约12周达到峰值,随后逐渐恢复且在37周近乎完全恢复。持续进行的旨在在注射之后的较早和较晚时间点检测视网膜结构的研究将提供关于以下的信息:视杆外段是否会首先遭受解构,然后用由抗性RHO$_{820}$蛋白构成的盘状材料逐步重建,或者是否尽早产生足够水平的RHO$_{820}$来阻止外段缩短。

[0173] 功能评估

[0174] 在突变体中单次视网膜下注射AAV-shRNA$_{820}$-RHO$_{820}$之后实现了长期(50周/11.5个月)对视杆成功且完全的保护,所述突变体重复进行急性光暴露,这在仅单次事件之后造成在视网膜中央至中周部中视杆的完全损失。在所有时间点,在经AAV处理的眼中始终观察到显著改善的ERG响应。虽然视锥介导的ERG响应是稳定的,但注意到视杆支配的ERG功能略有降低。在其他研究中(74,75)在注射了AAV介导的基因治疗的狗中观察到的略微ONL厚度增加也在此处经处理区域中观察到,并且可能反映了由于轻度的视网膜应力而引起的胞内或胞间肿胀。暂时性和轻度ONL增厚可能与载体相关,因为无论是在光暴露之前的经BSS注射眼还是在标准或暗红色循环照明下圈养的未经注射RHO-突变狗的自然史均未显示出ONL异常增厚的证据(图15A至15C)。ONL厚度恢复到正常注射前值排除了以下假设:观察到的ERG降低与经处理区域中光感受器损失相关。作为代替,功能下降可通过在累积光暴露之后位于未经处理外周视网膜中视杆的另外损失来解释,并且该假设与在对侧经BSS注射眼中发现的视杆支配的ERG振幅的类似下降是一致的。

[0175] 总之,已经开发了具有RHO敲低和替代双重功能的新的单载体,其针对在RHO-adRP的天然存在大动物模型中鉴定出的具有毒性功能获得的B类RHO突变为视杆提供了完全且长期的保护。这种高度有效的不依赖于突变的策略引起了希望,即对所有具有B类突变的RHO-adRP患者的通用基因治疗将是可实现的目标。

[0176] 实施例2:构建体可保护小鼠免受视网膜变性

[0177] AAV-shRNA$_{820}$-RHO$_{820}$构建体在RHO-adRP小鼠模型中提供了针对视网膜变性的长期保护。

[0178] 针对人P23H RHO转基因的C57Bl/6小鼠经受由于存在突变视紫红质基因而引起的视网膜变性,即使在存在暗红色光照而未暴露于亮光的情况下也会如此(33,34,43)。在1月龄时,将该基因型的小鼠用AAV2/5-GFP或scAAV2/5-RHO$_{820}$-shRNA$_{820}$视网膜下注射进一只眼中处理。以不同的间隔对两组小鼠进行分析:a)处理之前,b)注射之后1个月,c)注射之后2个月,和d)注射之后3个月。视网膜下注射诱导了暂时性视网膜脱离,其最终消退。未对对侧眼进行处理。

[0179] 在P23H RHO小鼠中以每月为间隔进行OCT分析持续三个月以确定载体处理对外核层(ONL)厚度的作用。相对于处理之前,在注射之后2个月和3个月,ONL厚度显著降低。此外,在所有注射之后间隔下,相对于AAV2/5-GFP处理,用scAAV2/5-RHO$_{820}$-shRNA$_{820}$处理导致ONL厚度的统计学上显著的保持(参见图22)。

[0180] 总体而言,用scAAV2/5-RHO$_{820}$-shRNA$_{820}$成功处理了30只P23H小鼠,而用AAV2/5-GFP成功处理了26只小鼠。如下表3中所示的Tukey多重比较检验中确定的,相对于AAV2/5-GFP处理,scAAV2/5-RHO$_{820}$-shRNA$_{820}$处理在P23H RHO小鼠中导致对视网膜结构的统计学上

显著程度的保护。

[0181] 对同一P23H RHO小鼠处理组以每月为间隔进行暗适应性视网膜电描记术分析持续三个月。使用角膜电极测量了这些小鼠对不同强度的短暂闪光(-20分贝、-10分贝和0分贝)的角膜电响应。在每个时间间隔下视杆a-和b-波(响应于-20dB和-10dB闪光)以及混合视杆和视锥a-和b-波(响应于0dB闪光)的最大振幅的纵向定量显示在图23中。

[0182] 如下表4中所示的student t检验中确定的,相对于AAV2/5-GFP处理,scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$处理导致P23H RHO小鼠中在注射之后三个月视网膜功能的保护程度在统计学上显著("ns"=不显著)。

[0183] 这些结果表明,AAV2/5-hOP-RHO_{820}-H1-$shRNA_{820}$构建体在RHO-adRP小鼠模型中赋予光感受器针对视网膜变性的稳定结构保护。结果还表明,该构建体在该小鼠模型中赋予光感受器针对视网膜变性的稳定功能(视网膜电描记术)保护。

[0184] 表3:

[0185]

Tukey 多重比较检验	均值差	95.00% 置信区间差	显著?	总结	经调整p值
shRNA820 Pre vs. GFP Pre	-0.3341	-4.624 至 3.956	否	ns	>0.9999
shRNA820 Pre vs. shRNA820 1 mo	12.68	8.551 至 16.82	是	****	<0.0001
shRNA820 1 mo vs. GFP 1 mo	14.99	10.77 至 19.21	是	****	<0.0001
shRNA820 Pre vs. shRNA820 1 mo	12.68	8.551 至 16.82	是	****	<0.0001
shRNA820 2mo vs. GFP 2 mo	13.96	9.060 至 18.86	是	****	<0.0001
shRNA820 Pre vs. shRNA820 2mo	17.04	12.70 至 21.38	是	****	<0.0001
shRNA820 3 mo vs. GFP3 mo	13.15	7.966 至 18.33	是	****	<0.0001
shRNA820 Pre vs. shRNA820 3 mo	22.78	18.22 至 27.34	是	****	<0.0001

[0186] 表4:p值

[0187]

	1个月 , N=24			2个月 , N=20			3个月 , N=20		
	-20 dB	-10 dB	0 dB	-20 dB	-10 dB	0 dB	-20 dB	-10 dB	0 dB
a-波	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.01	0.003
b-波	ns	0.005	<0.001	0.05	ns	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

[0188] 实施例3:由载体构建体表达的mRNA序列的分析

[0189] 为了确定来源于AAV构建体的短mRNA序列的类型,用scAAV2/5-RHO_{820}-$shRNA_{820}$构建体转染HEK293T细胞。48小时之后,提取总RNA。将提取的RNA进行尺寸分级,并对短RNA序列进行RNA测序。对具有来源于$shRNA_{820}$的序列的RNA分子进行分析以确定它们的尺寸以及5'和3'端(参见图24)。

[0190] 测序读序的总结显示在图25中。73% RNA分子中指导链5'端的序列(UAG)等同于预期序列。13%的分子在5'端缩短了一个核苷酸。52%在3'端具有2个额外的尿苷,而10%在3'端具有1个额外的尿苷。13%的分子在3'端具有一个额外的UUA密码子。提供SEQ ID NO:40至46作为来源于$shRNA_{820}$的最频繁短RNA的序列(来自两条链的最高命中)。

[0191] 大多数shRNA均在5'端按预期进行处理,但在3'端存在一些额外的核苷酸。

[0192] 意义

[0193] 许多基因增强策略正在进入临床试验用于治疗遗传性视网膜性失明。对常染色体显性疾病的基因治疗面临重大障碍,其包括等位基因异质性和使突变基因沉默的潜在需求。在此,显示将致病基因的敲低与通过抗性野生型拷贝对其进行替代组合的单基因治疗载体可在常染色体显性视网膜色素变性的犬和小鼠模型中阻止感光细胞死亡和视力损失。

[0194] 材料和方法

[0195] 使用在HEK293T(ATCC,Manassas,VA)细胞中进行的体外测定(33)筛选锤头状核酶(Rz525)和三种短发夹RNA(shRNA$_{131}$、shRNA$_{134}$和shRNA$_{820}$)在抑制WT和突变体(P23H、T17M)人RHO表达方面的效率。(76)通过三重质粒DNA转染将自身互补(77)和非自身互补AAV载体包装在血清型5(78)中,并根据先前公开的方法进行纯化。(79,80)相对于标准通过实时PCR测量DNA酶抗性载体基因组的滴度;通过银染色的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳验证纯度,确认无菌性和无内毒素,并在使用之前将等分试样储存在-80℃。使用WT和RHO突变狗(45,56)评价对视网膜下注射AAV2/5载体的响应,所述AAV2/5载体携带最强效的敲低试剂,其单独(Rz525,shRNA820)或与经密码子修饰的抗性人RHO cDNA(RHO$_{820}$)组合(shRNA820)(图16A至16E)。RHO抑制和替代的作用的评估通过面向和横截面体内视网膜成像、视网膜电描记术、RHO蛋白和RNA水平的定量、以及对视网膜组织切片的形态学评价进行。(74,81-83)使用光暴露范例(46-48)加速RHO突变狗中疾病的自然进程,并迅速评估视网膜下递送的AAV构建体是否阻止了视网膜变性的发生。所有的狗均在宾夕法尼亚大学视网膜疾病研究系(University of Pennsylvania Retinal Disease Studies Facility,RDSF)繁殖和维持。该研究严格依照国立卫生研究院(National Institutes of Health)的实验动物护理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)中的建议以及USDA动物福利法(Animal Welfare Act)和动物福利条例(Animal Welfare Regulations)进行,并遵从ARVO对眼科和视力研究中动物使用的声明。方案已由机构动物护理和使用委员会批准。方法的细节在下面提供。

[0196] 核酶切割测定

[0197] 用双萤光素酶质粒psiCHECK™-2(Promega,Madison,Wi)转染HEK293T细胞(CRL-11268,ATCC,Manassas,VA),所述质粒表达与通过SV40启动子表达的海肾萤光素酶连接的野生型或抗性(硬化)人RHO cDNA的100个核苷酸的靶区域。通过萤光素酶测定以6个重复测量RHO转录物水平。将萤光素酶质粒与从tRNAval启动子表达Rz525的质粒共转染。将结果相对于与缺少核酶的质粒共转染之后测量的相同融合转录物归一化。

[0198] 表达RHO-tGFP和RHO$_{820}$-tGFP的质粒的产生

[0199] 使用包含CMV启动子、具有C端turboGFP标签的人WT-RHO开放阅读框(ORF)以及BGH-PolyA信号(还编码氨苄青霉素抗性和新霉素抗性基因)的质粒体外表达RHO。除了在此描述的PCR参数之外,使用Q5®定点诱变试剂盒(New England Biosciences,Ipswich,MA.,USA)根据制造商的说明产生CMV-hRHO-turboGFP-BGH-PolyA质粒的P23H RHO、T17M RHO和RHO$_{820}$版本。为了产生P23H RHO版本,使用以下引物将CMV-hRHO-turboGFP-BGH-PolyA质粒的hRHO ORF的第23个密码子从CCC改变为CAC:正向-CACACCCGTCGCATTGGA(SEQ ID NO:30),以及反向-GTACGCAGCCACTTCGAGTAC(SEQ ID NO:31)。为了产生RHO$_{820}$版本,使用以下引物将CMV-hRHO-turboGFP-BGH-PolyA质粒中hRHO ORF的第816至825位核苷酸从ATTCTACATC(SEQ ID NO:32)改变为TTTTTATATA(SEQ ID NO:33):正向:

[0200] ATATATTCACCCACCAGGGCTCCAAC(SEQ ID NO:34),以及反向:AAAAAGCCACGCTGGCGTAGGGC(SEQ ID NO:35)。PCR反应参数如下:在98℃下初始变性30秒,25个变性循环(98℃持续10秒,退火30秒,在72℃下延伸5分钟),最后在72℃下延伸2分钟。用于P23H RHO和RHO_{820}PCR反应的退火温度分别为68℃和72℃。使用25μg的CMV-hRHO-turboGFP-BGH-PolyA质粒作为每个反应的模板。AAV-T17M-GFP由Marina Gorbatyuk博士惠赠。(76)

[0201] shRNA介导的RHO敲低的体外筛选

[0202] 将HEK293T细胞(ATCC)接种在12孔板中,并在第二天当细胞达到70%至90%汇合时进行转染。在每个孔中,将500ng表达野生型人RHO、人P23H RHO、人T17M RHO或RHO_{820}(通过四种沉默密码子修饰而制成对$shRNA_{820}$降解具有抗性的人RHO)的CMV-hRHO-turboGFP-BGH-PolyA质粒与包含反义GFP填充序列以及对照H1-shRNA盒、靶上(131、134或820)H1-shRNA盒或无(空)H1-shRNA盒的1μg自身互补rAAV2质粒瞬时共转染。每种共转染条件重复进行三次。使用DNA与聚乙烯亚胺(PEI为1mg/mL;Polysciences Inc,Warrington,PA.,USA)之比为1μg:3μL,以使得每个孔接受4.5μL PEI。将细胞于5%CO_2下在37℃下孵育48小时。孵育之后,吸出培养基,将细胞在磷酸缓冲盐水(phosphate buffered saline,PBS)中重悬,并通过3,000×g离心沉淀。然后除去PBS,将细胞在150μL的0.23M PBS中蔗糖中重悬并进行声处理。将50μL上样缓冲液(200mM Tris-Cl pH 6.8+400mM DTT+8%SDS+40%甘油+溴酚蓝)添加至每个样品并通过移液混合。将样品在室温下孵育30分钟,之后使其通过28号胰岛素注射器以剪切共提取的DNA。使用Pierce™660nm蛋白质测定试剂和Pierce离子洗涤剂相容试剂(Thermo Fisher,Waltham,MA.,USA)测量每个样品的总蛋白质浓度。在每个实验中,向每个孔上样的总蛋白质的量(15至20μg)是恒定的。样品与Li-COR Chameleon梯(Li-Cor,Lincoln,NE,USA)相邻在10% Mini-PROTEAN® TGX™预制蛋白质凝胶(Biorad,Hercules,CA.,USA)上运行,并使用Invitrogen的iBlot系统(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)根据制造商的说明转移至iBlot PVDF转移堆。将膜用甲醇孵育5分钟,用diH_2O洗涤3次,并用Odyssey封闭缓冲液(Li-Cor,Lincoln,NE,USA)在室温下封闭1小时。然后将膜用小鼠抗TurboGFP(1:2000;Origene,Rockville,MD,USA)和兔抗β-微管蛋白(1:5000;Millipore,Burlington,MA,USA)在封闭缓冲液中在4℃下孵育过夜,并用PBS中0.1%Tween 20洗涤3次,之后在室温下用IRDye 800CW驴抗兔和IRDye 680RD山羊抗小鼠(两者均为1:5,000;Li-Cor,Lincoln,NE,USA)孵育45分钟。将膜用PBS中0.1%Tween 20洗涤3次,并用Odyssey CLx系统(Li-Cor,Lincoln,NE,USA)成像。用ImageJ软件测量条带强度。为了测量RHO-GFP的预测单体形式的条带强度,在出现在约65kDa的显著条带周围绘制一个框,而使用从最高分子量标记(260kDa)到刚低于50kDa的可见条带绘制的框测量聚集形式。通过测量并除以β-微管蛋白的条带强度对上样RHO条带强度进行校正。值以相对强度报告,其作为每个样品的经校正条带强度除以对照shRNA条件的平均经校正条带强度计算。统计学显著性通过单向ANOVA随后通过Tukey多重比较检验确定。

[0203] AAV载体制备

[0204] 如Zolotukhin et al.(2002)所述,将具有2型末端重复(TR)的腺相关病毒(AAV)载体包装在血清型5衣壳中。(79)在视网膜下注射之后,AAV5衣壳允许感光细胞的有效转导。(78)

[0205] 设计为敲低人和犬视紫红质而无替代的载体包含小鼠Rho基因(GenBank

M55171.2)的488bp区域(第916至1396位)以及以相反方向克隆的人源化GFP基因。该方向用于提供间隔区,用于有效包装AAV而不会过表达GFP。对于在RNA替代载体中的RHO表达,使用来自人RHO基因(GenBank登录号NG_009115.1)的536bp区域(第4547至5083位)作为人视紫红质近端启动子(hOP)。在该启动子之后是来自SV40的163合成内含子(SD/SA),该内含子位于来自RHO 5'UTR(人RHO cDNA(1046nt)或制成对$shRNA_{820}$具有抗性的经密码子修饰版本(RHO_{820}))的125个碱基对之前(参见下文)。在此之后是来自SV40的多腺苷酸化信号。

[0206]

名称	靶序列	抗性序列
shRNA131	CUGCCUACAUGUUUCUGCU (SEQ ID NO: 12)	N/A
shRNA134	CCUACAUGUUUCUGCUGAU (SEQ ID NO: 13)	N/A
shRNA820	GUGGCAUUCUACAUCUUCA (SEQ ID NO: 14)	GUGGCUUUUUAUAUAUUCA (SEQ ID NO: 15)
Rz525	GGUGGUCCUGGC (SEQ ID NO: 16)	N/A

[0207] 下面示出了shRNA有义和反义序列,其在每个情况中用环序列UUCAAGAGA(SEQ ID NO:3)连接。

[0208]

SEQ ID NO:	名称	RNA 序列
21	RHO131-有义	CUGCCUACAUGUUUCUGCU
22	RHO131-反义	AGCAGAAACAUGUAGGCAG
23	RHO134-有义	CCUACAUGUUUCUGCUGAU
24	RHO134-反义	AUCAGCAGAAACAUGUAGG
25	RHO765-有义	GCAUGGUCAUCAUCAUGGU
26	RHO765-反义	ACCAUGAUGAUGACCAUGC
1	RHO820-有义	GUGGCAUUCUACAUCUUCA
2	RHO820-反义	UGAAGAUGUAGAAUGCCAC

[0209] 将用于shRNA表达的AAV2/5载体包装为自身互补AAV(77),并通过人H1 RNA启动子

(GenBank X16612.1;核苷酸276至378)指导shRNA的表达。shRNA包含通过9个核苷酸的环(UUCAAGAGA,由序列TTCAAGAGA编码)连接的19bp双链序列。对于旨在递送shRNA而不替代视紫红质的载体,有效包装需要在AAV的末端重复序列之间维持至少2.2kb的DNA。在这些载体中,将人源化GFP序列(80)以相反方向插入到小鼠视蛋白近端启动子或人视蛋白近端启动子后面(参见上文)。用于表达锤头状核酶Rz525的载体pMOPS500NewHpRz525使用小鼠近端视紫红质启动子来驱动核酶盒的表达。其通过Gorbatyuk et al.2007描述。(33)

[0210] 将$shRNA_{820}$和通过在靶序列中引入沉默突变而制成对$shRNA_{820}$具有抗性的人视紫红质cDNA(RHO_{820})二者包装在一起作为自身互补AAV2/5。选择自身互补构建体来加速RHO替代(用RHO_{820})速率,以在高度有效KD试剂($shRNA_{820}$)的情况下保持或迅速地重新形成视杆外段结构。

[0211] 动物

[0212] 所有的狗均在宾夕法尼亚大学视网膜疾病研究系(RDSF)繁殖和维持。该研究严格依照国立卫生研究院的实验动物护理和使用指南中的建议以及USDA动物福利法和动物福利条例进行,并遵从ARVO对眼科和视力研究中动物使用的声明。方案已由宾夕法尼亚大学机构动物护理和使用委员会批准。

[0213] 所有正常的(WT狗)都在标准犬舍循环(开启12小时,关闭12小时)白光照射(175至350lux,在“标准”狗眼的水平下)下圈养。研究的所有RHO突变狗对于T4R突变等位基因都是杂合的,并且在文中被称为RHO突变体,以及在表1中和附图中被称为$RHO^{T4R/+}$以强调杂合性。从出生到终止,除了3只之外所有突变RHO狗都在循环暗红色照明(9至20lux,在“标准”狗眼的水平下)下圈养,以防止由环境白光触发的任何视网膜变性加速。如前所述,所有的视网膜电描记术和非侵入性成像操作以及视网膜下注射均在全身麻醉下进行。(44,74,81)在用静脉内注射安乐死溶液(Euthasol;Virbac)实施安乐死之后收集眼组织,并尽一切努力改善动物福利并使不适最小化。包括来自14只正常(WT)狗的21只眼和来自21只突变RHO狗的40只眼(表1)。

[0214] 视网膜下注射

[0215] 如先前报道的(65),BSS或载体的视网膜下注射是在使用视网膜下套管通过手术显微镜(Zeiss OPMI 6;Carl Zeiss Inc,Oberkochen,德国)和接触式玻璃体切割术镜进行直接可视化下进行的。在RHO突变狗的情况下,如前所述,在手术室中设置暗红色照明,并在使用放置在手术显微镜光路上的红外带通滤波器(RT-830;Hoya Optics,Inc,Fremont,California)和安置在两个显微镜目镜上的单眼红外图像增强器(Owl Nitemare第三代:BE Meyers&Co,Inc,Redmond,Washington)在近红外光下进行视网膜下注射。(49)该夜视系统允许医生在光敏感RHO突变狗中进行视网膜下注射而不引起任何手术光诱导的视网膜变性。(49)成功的视网膜下注射约150μL体积产生了覆盖约15%视网膜表面的泡。在每次注射之后立即记录视网膜下泡的位置。这在正常狗中是通过眼底摄影术(Retcam Shuttle,Clarity Medical Systems,Pleasanton,CA)进行的,而在RHO-突变狗中是通过在注射之前捕获的近红外cSLO复合图像上绘制泡(bleb)进行的。

[0216] 通过光暴露的视网膜疾病的实验性加速

[0217] 如先前所述(46-48),使用急性光暴露方案评估病毒载体构建体在预防光敏感RHO-突变狗中视网膜变性方面的效率。(45)该操作的所有步骤在暗红色光照明下进行。用

1％托吡卡胺和1％苯肾上腺素扩张瞳孔(两只眼中均3次,相隔30分钟),并用丙泊酚(4mg/kg)IV诱导全身麻醉,并用吸入麻醉剂(异氟烷)维持。为防止由全身麻醉诱导的眼球的腹侧旋转,进行眼球后盐水注射(5至10ml)以使眼重新位于主要凝视位置的中心。使用来自ERG系统(Espion,Diagnosys LLC)的单眼Ganzfeld刺激器(ColorBurst;Diagnosys LLC,Lowell,MA,USA)以1mW/cm^{2}的角膜辐照度(用光度计测量,IL1700;International Light Technologies,Peabody,MA,USA)进行1分钟白(6500K)光暴露。未暴露的眼在对侧眼中进行光暴露操作期间保持用黑色摄影布遮蔽。

[0218] 体内光学相干断层扫描(OCT)成像和分析

[0219] 如上所述,对狗在全身吸入麻醉下进行面向和视网膜横截面成像。使用直径为30°和55°的透镜获得了近红外照明(820nm)下反射率的重叠面向图像(Spectralis HRA+OCT,Heidelberg,德国)来描绘眼底特征,例如视神经、视网膜血管、注射泡的边界、视网膜切开术位点和其他局部改变。使用定制程序(MatLab 7.5;The MathWorks,Natick,MA)将单独的图像数字化拼接成全视网膜全景图。使用两种方法将注射泡覆盖到全景图像上。在WT眼中,记录在手术时获取的泡的图像,并转移泡边界。在RHO-突变眼中,将手术时绘制的泡的草图转移到全景图像上。

[0220] 用线性和光栅扫描(Spectralis HRA+OCT,Heidelberg,德国)进行谱域光学相干断层扫描(spectral-domain optical coherence tomography,SD-OCT)。记录了覆盖视网膜大区域的重叠(30°×20°)光栅扫描。用定制程序(MatLab 7.5;The MathWorks,Natick,MA)进行OCT数据的获取后处理。对于全视网膜地形分析,使用每次光栅扫描的积分反向散射强度来确定其相对于全视网膜全景图上可见的视网膜特征的精确位置和方向。将形成所有记录的光栅扫描的单独纵向反射率谱(longitudinal reflectivity profile,LRP)分配给以视神经为中心的直角坐标系中的规则间隔仓(1°×1°);将每个仓中的LRP进行比对并计算均值。对沿每个LRP的反向散射信号的强度和斜率信息进行人工评价以分割限定ONL的两个边界。一个边界是外网层(outer plexiform layer,OPL)峰的远端过渡。另一个边界是外界膜(external limiting membrane,ELM)峰。在具有严重视网膜变性而没有可检测ELM峰的位置,将第二ONL边界放置在RPE峰的最近端过渡处。此外,通过从巩膜至ELM边界的5个轴向样品的平均反向散射强度减去玻璃体至OPL边界的5个轴向样品的平均反向散射强度计算经归一化的IS/OS反向散射强度;前者包括IS/OS峰。(44,74)IS/OS强度仅在内段和外段长度保留的区域中绘制,因为后者的受损使得无法将IS/OS信号与RPE/毯信号区分开。来自未经注射的对照眼的地形结果由ONH的中心和犬中央凹记录(83),并生成对照变异性图,限定了第99百分位数置信区间。将经注射的眼逐个位点与对照置信区间进行比较以生成显著性变化的图。

[0221] 视网膜电描记术(ERG)记录和分析

[0222] 将狗用皮下注射阿托品和乙酰丙嗪进行预用药,并用阿托品(1％)、托吡卡胺(1％)和苯肾上腺素(10％)扩张其瞳孔。在用静脉内丙泊酚诱导之后,将狗维持在全身吸入麻醉下(异氟烷),并在整个操作期间监测其脉搏率、氧饱和度和温度的恒定性。如先前所述(44,74),使用装有ColorDome刺激器(Diagnosys LLC,Lowell,MA)的LED刺激的定制Ganzfeld圆顶对两只眼进行全视野闪光视网膜电描记术。在暗适应20分钟之后,记录了视杆以及混合视杆-视锥介导的针对强度递增的单4ms白色闪光刺激(从-3.74到0.51log

cd.s.m^{-2})的响应(平均4次)。在白光适应(1.53log cd.m^{-2})5分钟之后,记录视锥介导的针对以下的信号(平均10次):一系列单闪光(从-2.74到0.51log cd.s.m^{-2})以及29.4-Hz闪烁(平均20次;从-2.74到0.26log cd.s.m^{-2})刺激。如有必要,用数字低通(50Hz)滤波器处理波形以降低记录噪声。测量了暗视混合视杆-视锥ERG的a-和b-波的振幅,以及明视单闪光和29.4Hz视锥闪烁的峰-峰振幅。

[0223] 视网膜组织学和免疫组织化学

[0224] 如先前所报道的(81),在安乐死和摘出之后,将眼球在4%多聚甲醛(PFA)中固定3小时,随后在2% PFA中固定24小时,进行修剪,在15%至30%蔗糖/PBS溶液中冷冻保护,并包埋入最佳切割温度介质中。在低温恒温器(Microm HM550;Thermo Fisher Scientific,Kalamazoo,MI)上切出十微米厚的连续切片,其包括未经处理的、边界以及经处理的/泡区域。如先前所报道的,将通过H&E染色鉴定的血管界标用于确定视网膜冷冻切片在面向cSLO图像的血管图案上的精确位置。(44,74,81)对顺序切片用一抗和细胞特异性标志物:视杆视蛋白(cat#MAB5316;1:200稀释;EMD Millipore,Billerica,MA)、山羊抗人视锥拘留蛋白(W.Beltran,宾夕法尼亚大学;1:100)进行免疫标记。用经荧光染料标记的二抗(Alexa Fluor,1:200;Molecular Probes,Kalamazoo,MI)对抗原-抗体复合物进行可视化,并使用Hoechst 33342核染色剂(Molecular Probes)标记细胞核。通过宽视野显微术(Axioplan;Carl Zeiss Meditec,Dublin,CA)检查经H&E染色的切片,并数字捕获图像(Spot 4.0相机;Diagnostic Instruments,Sterling Heights,MI),并导入图形程序(Illustrator;Adobe,San Jose,CA)用于显示。通过共聚焦显微术(Leica TCS SP5;Leica Microsystems,Buffalo Grove,IL)检查针对荧光免疫组织化学而标记的切片,并获取数字图像,使用Leica应用套件程序进行处理,并导入图形程序(Illustrator;Adobe)。

[0225] 用于RHO RNA和蛋白质定量的视网膜组织取样

[0226] 对视杯后部进行摘出和分离之后,立即将来自经处理和未经处理的神经视网膜区域的3mm活检穿孔物单独收集在冻存管中,在液氮中冷冻并在-80℃储存。对于RHO突变狗,在暗红色照明下进行视网膜取样。

[0227] RNA提取和cDNA合成

[0228] 使用Direct-zol RNA小提试剂盒(Zymo Research,Irvine,CA)从神经视网膜的穿孔物提取总RNA。使用高容量RNA-cDNA试剂盒(Applied Biosystems,Foster City,CA)遵循制造商的建议由总RNA制备cDNA。视网膜中犬和人RHO转录物的绝对定量

[0229] 为了有效地确定同一视网膜样品中内源性犬和外源性人RHO转录物之间的比率,已设计了特异性引物对:犬(正向:5'-ACAAGACGGGTGTGGTGCGC(SEQ ID NO:17);反向:5'-TCATGGGCGTCGCCTTCACC(SEQ ID NO:18))和人RHO(正向:5'-CCATCAACTTCCTCACGCTCTA(SEQ JD NO:19);反向:5'-TAGGTTGAGCAGGATGTAGTTGAGA(SEQ ID NO:20)))。SYBR green平台用于使用引物浓度为0.15μM进行分析。在Applied Biosystems 7500实时PCR系统上在96孔微孔板中以25μL的总体积进行实时PCR。所有PCR使用由0.1ng经DNA酶处理的RNA产生的cDNA进行。RT-PCR产物用于构建用于代表犬和人RHO的单独扩增子的绝对标准曲线。如前所述计算模板的拷贝数。(82)校准曲线的动态范围介于10^3至10^7个分子之间。用7500软件2.0.1版(Applied Biosystems)分析扩增数据。

[0230] 视紫红质蛋白的定量:

[0231] 由从经处理和未经处理的神经视网膜区域收集(对于RHO突变狗,在暗红色照明下)的3mm活检穿孔物制备蛋白质视网膜提取物。在含有0.23M蔗糖、2mM EDTA、5mM TrisHCl(pH 7.4)和蛋白酶抑制剂(Halt蛋白酶抑制剂混合物,目录号87786,Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA.)的缓冲液中进行声处理之后,将样品离心并通过Bradford方法测量上清液中的总蛋白质浓度。将来自每个样品的1μg总蛋白质在8%至16%Tris甘氨酸凝胶(Invitrogen,Carlsbad,CA)上解析,转移到硝酸纤维素膜(iBLOT,Invitrogen)上,并使用抗视紫红质抗体(MAB5316,1:1000稀释,EMD Millipore,Billerica,MA)和抗组蛋白H3抗体(ab1791,1:3000稀释,Abcam,Cambridge,MA)进行免疫印迹。在用经红外标记的二抗(IRDye 680和IRDye 800,Licor)孵育之后,在数字成像系统(Odyssey Fc,Licor,Lincoln,NE)上对蛋白质条带进行可视化。用Licor Image Studio v4.0软件使用组蛋白H3条带用于归一化对视紫红质蛋白的量进行定量。

[0232] 参考文献

[0233] 1.Ginn SL,Alexander IE,Edelstein ML,Abedi MR,&Wixon J(2013)Gene therapy clinical trials worldwide to 2012-an update.J Gene Med 15(2):65-77.

[0234] 2.Dunbar CE, et al.(2018)Gene therapy comes of age.Science 359(6372).

[0235] 3.Ferrua F&Aiuti A(2017)Twenty-Five Years of Gene Therapy for ADA-SCID:From Bubble Babies to an Approved Drug.Hum Gene Ther 28(11):972-981.

[0236] 4.Kumar SR,Markusic DM,Biswas M,High KA,&Herzog RW(2016)Clinical development of gene therapy:results and lessons from recent successes.Molecular therapy.Methods&clinical development 3:16034.

[0237] 5.Mao H,et al.(2011)AAV Delivery of Wild-Type Rhodopsin Preserves Retinal Function in a Mouse Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa.Hum Gene Ther 22(5):567-575.

[0238] 6.Stanton CM,et al.(2017)Novel pathogenic mutations in C 1QTNF5 support a dominant negative disease mechanismin late-onset retinal degeneration.Scientific reports 7(1):12147.

[0239] 7.Lewin AS,Glazer PM,&Milstone LM(2005)Gene therapy for autosomal dominant disorders of keratin.The journal of investigative dermatology.Symposium proceedings 10(1):47-61.

[0240] 8.Miller TM,et al.(2013)An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis:a phase 1,randomised,first-in-man study.The Lancet.Neurology 12(5):435-442.

[0241] 9.Bennett J(2017)Taking Stock of Retinal Gene Therapy:Looking Back and Moving Forward.Mol Ther 25(5):1076-1094.

[0242] 10.Hartong DT,Berson EL,&Dryja TP(2006)Retinitis pigmentosa.Lancet 368(9549):1795-1809.

[0243] 11.Sung CH,et al.(1991)Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa.Proc Natl Acad Sci USA 88(15):6481-6485.

[0244] 12.Inglehearn CF,et al.(1992)A completed screen for mutations of the rhodopsin gene in a panel of patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa.Hum Mol Genet 1(1):41-45.

[0245] 13.Sullivan LS,et al.(2006)Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa :a screen of known genes in 200 families.Invest Ophthalmol Vis Sci 47(7):3052-3064.

[0246] 14.Sullivan LS,et al.(2013)Prevalence of Mutations in eyeGENE Probands With a Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa.Invest Ophthalmol Vis Sci 54(9):6255-6261.

[0247] 15.Athanasiou D,et al.(201 8)The molecular and cellular basis of rhodopsin retinitis pigmentosa reveals potential strategies for therapy.Prog Retin Eye Res 62:1-23.

[0248] 16.Sung CH,Davenport CM,&Nathans J(1993)Rhodopsin mutations responsible for auto-somal dominant retinitis pigmentosa.Clustering of functional classes along the polypeptide chain.J Biol Chem 268(35):26645-26649.

[0249] 17.Jacobson SG,Kemp CM,Sung CH,&Nathans J(1991)Retinal function and rhodopsin levels in autosomal dominant retinitis pigmentosa with rhodopsin mutations.Am J Ophthalmol 112(3):256-271.

[0250] 18.Jacobson SG,et al.(1994)Phenotypes of stop codon and splice site rhodopsin mutations causing retinitis pigmentosa.Invest Ophthalmol Vis Sci 35(5):2521-2534.

[0251] 19.Cideciyan AV,et al.(1998)Disease sequence from mutant rhodopsin allele to rod and cone photoreceptor degeneration in man.Proc Natl Acad Sci USA 95(12):7103-7108.

[0252] 20.Jacobson SG,et al.(2016)Complexity of the Class B Phenotype in Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Due to Rhodopsin Mutations.Invest Ophthalmol Vis Sci 57(11):4847-4858.

[0253] 21.Drenser KA,Timmers AM,Hauswirth WW,&Lewin AS(1998)Ribozyme-targeted destruction of RNA associated with autosomal-dominant retinitis pigmentosa.Invest Ophthalmol Vis Sci 39(5):681-689.

[0254] 22.Lewin AS,et al.(1998)Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa.Nat Med 4(8):967-971.

[0255] 23.LaVail MM,et al.(2000)Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats:long-term survival and late-stage therapy.Proc Natl Acad Sci USA 97(21):11488-11493.

[0256] 24.Shaw LC,et al.(2001)An allele-specific hammerhead ribozyme gene therapy for a porcine model of autosomal dominant retinitis pigmentosa.Mol

Vis 7:6-13.

[0257] 25.Tessitore A,et al.(2006)Preferential silencing of a common dominant rhodopsin mutation does not inhibit retinal degeneration in a transgenic model.Mol Ther 14(5):692-699.

[0258] 26.Murray SF,et al.(201 5)Allele-Specific Inhibition of Rhodopsin With an Antisense Oligonucleotide Slows Photoreceptor Cell Degeneration.Invest Ophthalmol Vis Sci 56(11):6362-6375.

[0259] 27.Bakondi B,et al.(2016)In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa.Mol Ther 24(3):556-563.

[0260] 28.Bumight ER,et al.(2017)Using CRISPR-Cas9 to Generate Gene-Corrected Autologous iPSCs for the Treatment of Inhe rited Retinal Degeneration.Mol Ther 25(9):1999-2013.

[0261] 29.Millington-Ward S,et al.(1997)Strategems in vitro for gene therapies directed to dominant mutations.Hum Mol Genet 6(9):1415-1426.

[0262] 30.O'Neill B,et al.(2000)Ribozyme-based therapeutic approaches for autosomal dominant retinitis pigmentosa.Invest Ophthalmol Vis Sci 41(10):2863-2869.

[0263] 31.Sullivan JM,Pietras KM,Shin BJ,&Misasi JN(2002)Hammerhead ribozymes designed to cleave all human rod opsin mRNAs which cause autosomal dominant retinitis pigmentosa.Mol Vis 8:102-113.

[0264] 32.Gorbatyuk MS,Pang JJ,Thomas J,Jr.,Hauswirth WW,&Lewin AS(2005)Knockdown of wild-type mouse rhodopsin using an AAV vectored ribozyme as part of an RNA replacement approach.Mol Vis 11:648-656.

[0265] 33.Gorbatyuk M,Justilien V,Liu J,Hauswirth WW,&Lewin AS(2007)Preservation of photoreceptor morphology and function in P23H rats using an allele independent ribozyme.Exp Eye Res 84(1):44-52.

[0266] 34.Gorbatyuk M,Justilien V,Liu J,Hauswirth WW,&Lewin AS(2007)Suppression of mouse rhodopsin expression in vivo by AAV mediated siRNA delivery.Vision Res 47(9):1202-1208.

[0267] 35.O'Reilly M,et al.(2008)A transgenic mouse model for gene therapy of rhodopsin-linked Retinitis Pigmentosa.Vision Res 48(3):386-391.

[0268] 36.Chadderton N,et al.(2009)Improved Retinal Function in a Mouse Model of Dominant Retinitis Pigmentosa Following AAV-delivered Gene Therapy.Mol Ther 17(4):593-599.

[0269] 37.Abdelmaksoud HE,Yau EH,Zuker M,&Sullivan JM(2009)Developmeny of lead hammer-head ribozyme candidates against human rod opsin mRNA for retinal degeneration therapy.Exp Eye Res 88(5):859-879.

[0270] 38.Mussolino C,et al.(2011)Zinc-finger-based transcriptional

repression of rhodopsin in a model of dominant retinitis pigmentosa.EMBO molecular medicine 3(3):118-128.

[0271] 39.Latella MC,et al.(2016)In vivo Editing of the Human Mutant Rhodopsin Gene by Electroporation of Plasmid-baxed CRISPR/Cas9 in the Mouse Retina.Molecular therapy.Nucleic acids 5(11):e389.

[0272] 40.Kiang AS,et al.(2005)Toward a gene therapy for dominant disease: validation of an RNA interference-based mutation-independent approach.Mol Ther 12(3):555-561.

[0273] 41.O'Reilly M,et al.(2007)RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo.Am J Hum Genet 81(1):127-135.

[0274] 42.Millington-Ward S,et al.(2011)Suppression and Replacement Gene Therapy for Autosomal Dominant Disease in a Murine Model of Dominant Retinitis Pigmentosa.Mol Ther 19(4):642-649.

[0275] 43.Mao H,Gorbatyuk MS,Rossmiller B,Hauswirth WW,&Lewin AS(2012)Long-term rescue of retinal stmcture and function by rhodopsin RN A rePlacement with a single adeno-associated viral vector in P23H RHO transgenic mice.Hum Gene Ther 23(4):356-366.

[0276] 44.Beltran WA,et al.(2017)Optimization of Retinal Gene Therapy for X-Linked Retinitis Pigmentosa Due to RPGR Mutations.Mol Ther 25(8):1866-1880.

[0277] 45.Cideciyan AV,et al.(2005)In vivo dynamics of retinal i njury and repair in the rhodopsin mutant dog model of human retinitis pigmentosa.Proe Natl Acad Sci USA 102(14):5233-5238.

[0278] 46.Marsili S,et al.(201 5)Exelusion of the Unfolded Protein Response in Light-Induced Retinal Degeneration in the Canine T4R RHO Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa.PLoS ONE 10(2):e0115723.

[0279] 47.Iwabe S,Ying GS,Aguirre GD,&Beltran WA(2016)Assessment of visual function and retinal structure following acute light exPosure in the light sensitive T4R rhodopsin mutant dog.Exp Eye Res 146:341-353.

[0280] 48.Sudharsan R,Simone KM,Anderson NP,Aguirre GD,&Beltran WA(2017) Acute and Protracted Cell Death in Light-Induced Retinal Degeneration in the Canine Model of Rhodopsin Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa.Invest Ophthalmol Vis Sci 58(1):270-281.

[0281] 49.Komaromy AM,AcIand GM,&Aguirre GD(2008)Operating in the dark:a night-vision system for surgery in retinas susceptible to light damage.Arch Ophthalmol 126(5):714-717.

[0282] 50.Pelletier R,Caron SO,&Puymirat J(2006)RNA based gene therapy for dominantly inherited diseases.Curr Gene Ther 6(1):131-146.

[0283] 51.Palfi A,et al.(2006)RNAi-based suppression and replacement of rds-peripherin in retinal organotypic culture.Hum Mutat 27(3):260-268.

[0284] 52.Mueller C,et al.(2012)Sustained miRNA-mediated knockdown of mutant AAT with simultaneous augmentation of wild-type AAT has minimal effect on global liver miRNA profiles.Mol Ther 20(3):590-600.

[0285] 53.Conley SM&Naash MI(2014)Gene therapy for PRPH2-associated ocular disease:challenges and prospects.Cold Spring Harbor perspectives in medicine 4(11):a017376.

[0286] 54.Botta S,et al.(2016)Rhodopsin targeted transcriptional silencing by DNA-binding.eLife 5:e12242.

[0287] 55.Sakami S,et al.(2011)Probing mechanisms of photoreceptor degeneration in a new mouse model of the common form of autosomal dominant retinitis pigmentosa due to P23H opsin mutations.J Biol Chem 286(12):10551-10567.

[0288] 56.Kijas JW,et al.(2002)Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa.Proc Natl Acad Sci USA 99(9):6328-6333.

[0289] 57.Zhu L,et al.(2004)A naturally occurring mutation of the opsin gene (T4R)in dogs affects glycosylation and stability of the G protein-coupled receptor.J Biol Chem 279(51):53828-53839.

[0290] 58.Heckenlively JR,Rodriguez JA,&Daiger SP(1991)Autosomal dominant sectoral retinitis pigmentosa.Two families with transversion mutation in codon 23 of rhodopsin.Arch Ophthalmol 109(1):84-91.

[0291] 59.Iannaccone A,et al.(2006)Retinitis pigmentosa associated with rhodopsin mutations:Correlation between phenotypic variability and molecular effects.Vision Res.46(27):4556-4567.

[0292] 60.Paskowitz DM,LaVail MM,&Duncan JL(2006)Light and inherited retinal degeneration.Br J Ophthalmol 90(8):1060-1 066.

[0293] 61.Sakami S,Kolesnikov AV,Kefalov VJ,&Palczewski K(2014)P23H opsin knock-in mice reveal a novel step in retinal rod disc morphogenesis.Hum Mol Genet 23(7):1723-1741.

[0294] 62.Haeri M&Knox BE(2012)Rhodopsin mutant P23H destabilizes rod photoreceptor disk membranes.PLoS ONE 7(1):e30101.

[0295] 63.White DA,Fritz JJ,Hauswirth WW,Kaushal S,&Lewin AS(2007)Increased sensitivity to light-induced damage in a mouse model of autosomal dominant retinal disease.Invest Ophthalmol Vis Sci 48(5):1942-1951.

[0296] 64.Tam BM&Moritz OL(2009)The rolc of rhodopsin glycosylation in protein folding,trafficking,and light-sensitive retinal degeneration.J Neurosci 29(48):15145-15154.

[0297] 65.Beltran WA,et al.(2010)rAAV2/5 gene-targeting to rods:dose-dependent efficiency and complications associated with different

promoters.Gene Ther 17(9):1162-1174.

[0298] 66.Komaromy AM,et al.(2013)Transient photoreceptor deconstruction by CNTF enhances rAAV-mediated cone functional rescue in late stage CNGB3-achromatopsia.Mol Ther 21(6):1131-1141.

[0299] 67.Olsson JE,et al.(1992)Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His):a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa.Neuron 9 (5):815-830.

[0300] 6S.Tan E,et al.(2001)The relationship between opsin overexpression and photoreceptor degeneration.Invest Ophthalmol Vis Sci 42(3):589-600.

[0301] 69.Dittmar KA,Goodenbour JM,&Pan T(2006)Tissue-specific differences in human transfer RNA expression.PLoS genetics 2(12):e221.

[0302] 70.Gardin J,et al.(2014)Measurement of average decoding rates of the 61 sense codons in vivo.eLife 3.

[0303] 71.TrochetD,Prudhon B,Vassilopoulos S,&Bitoun M(2015)Therapy for dominant inherited diseases by allele-specific RNA interference:successes and pitfalls.Curr Gene Ther 15(5):503-510.

[0304] 72.Myslinski E,Ame JC,Krol A,&Carbon P(2001)An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transc ription of the human H1RNA gene.Nucleic acids research 29(12):2502-2509.

[0305] 73.Wu MT,et al.(2005)Simple and efficient DNA vector-based RNAi systems in mammalian cells.Biochem Biophys Res Commun 330(1):53-59.

[0306] 74.Beltran WA,et al.(2015)Successful arrest of photoreceptor and vision loss expands the therapeutic window of retinal gene therapy to later stages of disease.Proc Natl Acad Sci USA 112(43):E5844-5853.

[0307] 75.Guziewicz KE,et al.(2018)BEST1 genetherapy corrects a diffuse retina-wide micro-detachrnent modulated by light exposure.Proc Natl Acad Sci USA In Press:DOI 10.107-3/pnas.1720662115.

[0308] 76.Kunte MM,et al.(2012)ER Stress Is Involved in T17M Rhodopsin-Induced Retinal Degeneration.Invest Ophthalmol Vis Sci 53(7):3792-3800.

[0309] 77.McCarty DM,Monahan PE,&Samulski RJ(2001)Self-complementary recombinant adeno-associated virus(scAAV)vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis.Gene Ther 8(16):1248-1254.

[0310] 78.Auricchio A,et al.(2001)Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics:the retina as a model.Hum Mol Genet 10(26):3075-3081.

[0311] 79.Zolotukhin S,et al.(2002)Production and purification of serotype 1,2,and 5 recombinant adeno-associated viral vectors.Methods 28(2):158-167.

[0312] 80.Zolotukhin S,Potter M,Hauswirth WW,Guy J,&Muzyczka N(1996)A ″humanized″green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in

mammalian cells.J Virol 70(7):4646-4654.

[0313] 81.Beltran WA,et al.(2012)Gene therapy rescues X-linked photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating RPGR form of human retinitis pigmgntosa.Proc Natl Acad Sci USA 109(6):2132-2137.

[0314] 82.Kuznetsova T,Zangerl B,Goldstein O,Acland GM,&Aguirre GD(2011) Structural organization and expression pattern of the canine RPGRIP1 isoforms in retinal tissue.Invest.Ophthalmol.Vis Sci.52(6):2989-2998.

[0315] 83.Beltran W A,et al.(2014)Canine retina has a primate fovea-like bouquet of cone photoreceptors which is affected by inherited macular degenerations.PLoS ONE 9(3):e90390.

[0316] 其他实施方案

[0317] 本说明书中公开的所有特征可以以任意组合进行组合。本说明书中公开的每个特征可由具有相同、等同或相似目的的替代特征代替。因此,除非另外明确指出,否则所公开的每个特征仅是一系列等同或相似上位特征的一个实例。

[0318] 根据以上描述,本领域技术人员可容易地确定本公开内容的基本特征,并且在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下,可对本公开内容进行多种改变和修改以使其适应多个用途和情况。因此,其他实施方案也在权利要求书之内。

[0319] 等同方案

[0320] 虽然本文中已对数个本发明实施方案进行了描述和说明,但是本领域普通技术人员将容易想到多种其他方法和/或结构来实现本文中所述功能和/或获得本文中所述结果和/或一个或更多个优点,并且认为这样的变化和/或修改中的每一个均在本文中所述的本发明实施方案的范围内。更一般地,本领域技术人员将容易理解,本文中所述的所有参数、尺寸、材料和构造均意在为示例性的,并且实际参数、尺寸、材料和/或构造将取决于使用本发明教导的具体应用。本领域技术人员将认识到或者能够仅使用常规实验就确定本文中所述的具体本发明实施方案的许多等同方案。因此,应理解,前述实施方案仅作为实例示出,并且在所附权利要求书及其等同文件的范围内,本发明实施方案可以以不同于具体描述和要求保护的方式实施。本公开内容的本发明实施方案涉及本文中所描述的每一个单独的特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法。另外,如果这样的特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法并非互相不一致,则两个或更多个这样的特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法的任意组合也包括在本公开内容的发明范围内。

[0321] 本文中定义和使用的所有定义应理解为优先于字典定义、通过引用并入的文献中的定义和/或所定义术语的一般含义。

[0322] 本文中公开的所有参考文献、专利和专利申请均关于其各自被引用的主题通过引用并入,在一些情况下,其可涵盖文件的全部内容。

[0323] 除非明确指出相反,否则本文中在说明书和权利要求书中使用的没有数量词修饰的名词应理解为意指“至少一个/种”。

[0324] 如本文在说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应理解为意指如此连接要素,即在一些情况下联合存在而在另一些情况下不联合存在的要素中的“任一个或二者”。用“和/或”列举的多个要素应以相同方式理解,即这样连接的要素中的“一个或更多个”。除

了由“和/或”子句具体指明的要素之外,其他要素也可以任选地存在,无论与具体指明的那些要素相关还是无关。因此,作为一个非限制性实例,当与开放式语言例如“包含/包括”结合使用时,对“A和/或B”的提及可在一个实施方案中仅指A(任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中,仅指B(任选地包括除A之外的要素);在又一个实施方案中,指A和B二者(任选地包括其他要素);等等。

[0325] 如本文在说明书和权利要求书中使用的,“或/或者”应理解为具有与如上所定义的“和/或”相同的含义。例如,当分离列表中的项目时,“或/或者”或“和/或”应被解释为包括性的,即包括多个要素或要素列表中的至少一个,但也包括多于一个,并且任选地包括另外的未列出项目。仅明确指出相反的术语,例如“仅之一”或“恰好之一”,或者当用于权利要求书中时“由.....组成”,是指包括多个要素或要素列表中的恰好一个要素。一般而言,当之前有排他性术语(例如“任一”、“之一”、“仅之一”或“恰好之一”)时,本文中使用的术语“或/或者”应仅被解释为表示排他性的替代方案(即“一个或另一个,而非二者”)。“基本上由.....组成”当在权利要求书中使用时应具有其在专利法领域中所使用的一般含义。

[0326] 如本文中在说明书和权利要求书中所使用的,短语“至少一个/种”在提及一个或更多个要素的列表时应理解为意指从要素列表中的任意一个或更多个要素中选择的至少一个要素,但并不一定包括要素列表内具体列举的各个和每个要素的至少一个,并且也不排除要素列表中要素的任意组合。该定义还允许可以任选地存在要素列表中除短语“至少一个/种”所提及的具体指出的要素之外的要素,无论与具体指出的那些要素相关还是无关。因此,作为一个非限制性实例,“A和B中的至少一个”(或等同地,“A或B中的至少一个”,或等同地,“A和/或B中的至少一个”)可在一个实施方案中指至少一个A,任选地包括多于一个A,但不存在B(并且任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中,指至少一个B,任选地包括多于一个B,但不存在A(并且任选地包括除A之外的要素);在又一个实施方案中,指至少一个A,任选地包括多于一个A,和至少一个B,任选地包括多于一个B(并且任选地包括其他要素);等等。

[0327] 还应理解,除非明确相反指示,否则在本文要求保护的包括多于一个步骤或动作的任何方法中,方法的步骤或动作的顺序不一定限于列举该方法的步骤或动作的顺序。

[0328] 在权利要求书中以及上述说明书中,所有连接词例如“包含”、“包括”、“携有”、“具有”、“含有”、“涉及”、“持有”、“由.....构成”等都应理解为开放式的,即,意指包括但不限于。如美国专利局专利审查程序手册(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures)第2111.03节中所述,仅连接词“由.....组成”和“基本上由.....组成”应分别为封闭式或半封闭式的连接词。应当理解,在本文件中使用开放式连接词(例如,“包含/包括”)描述的实施方案在一些替代实施方案中也考虑为“由通过开放式连接词描述的特征组成”和“基本上由通过开放式连接词描述的特征组成”。例如,如果公开内容描述“包含A和B的组合物”,则公开内容还考虑以下替代实施方案:“由A和B组成的组合物”和“基本上由A和B组成的组合物”。

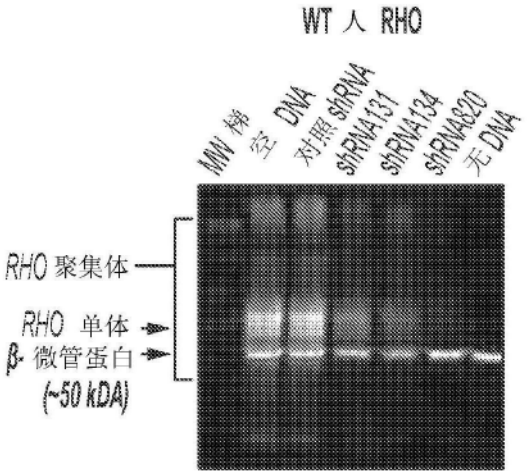

WT 人 RHO
MW 梯
空 DNA
对照 shRNA
shRNA131
shRNA134
shRNA820
无 DNA
RHO 聚集体
RHO 单体
β- 微管蛋白
(~50 kDA)

图1A

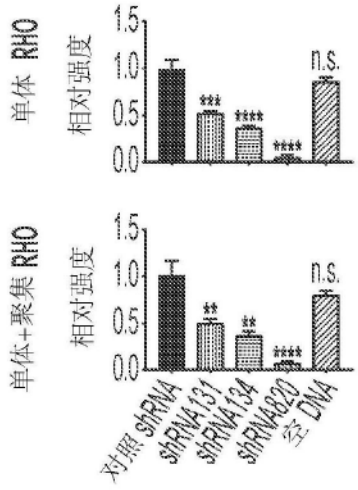

单体 RHO
相对强度
1.5
1.0
0.5
0.0
***
****
****
n.s.
单体+聚集 RHO
相对强度
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
****
n.s.
对照 shRNA
shRNA131
shRNA134
shRNA820
空 DNA

图1B

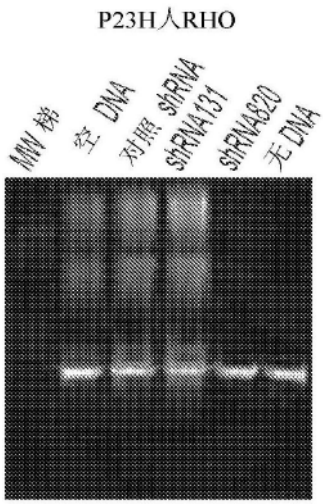

P23H人RHO
MW 梯
空 DNA
对照 shRNA
shRNA131
shRNA820
无 DNA

图1C

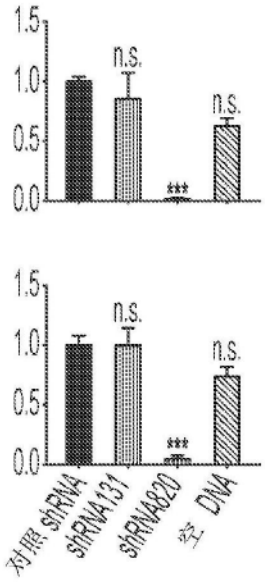

1.5
1.0
0.5
0.0
n.s.
n.s.
***
1.5
1.0
0.5
0.0
n.s.
n.s.
***
对照 shRNA
shRNA131
shRNA820
空 DNA

图1D

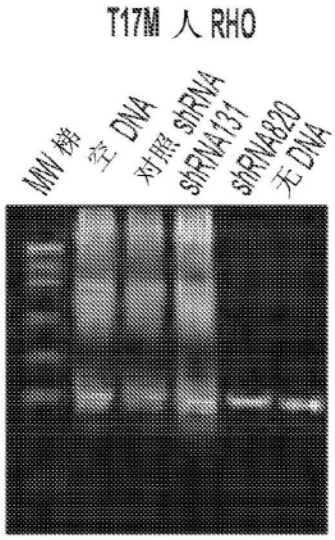

T17M 人 RHO
MW 梯
空 DNA
对照 shRNA
shRNA131
shRNA820
无 DNA

图1E

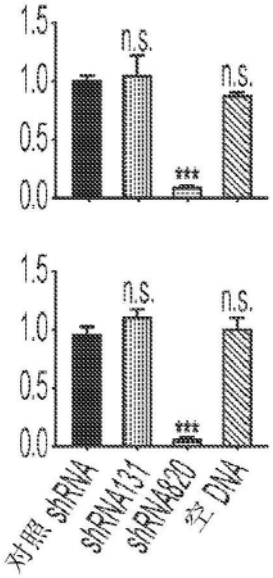

1.5
1.0
0.5
0.0
n.s.
n.s.
***
对照 shRNA
shRNA131
shRNA820
空 DNA

图1F

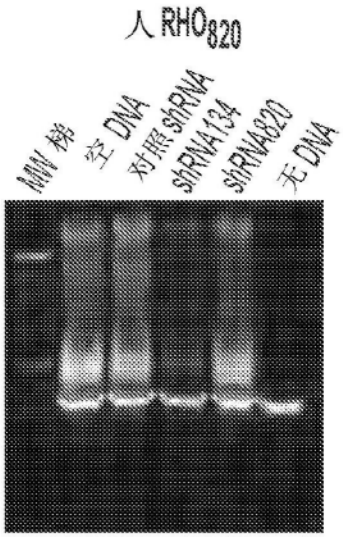

人 RHO820
MW 梯
空 DNA
对照 shRNA
shRNA134
shRNA820
无 DNA

图1G

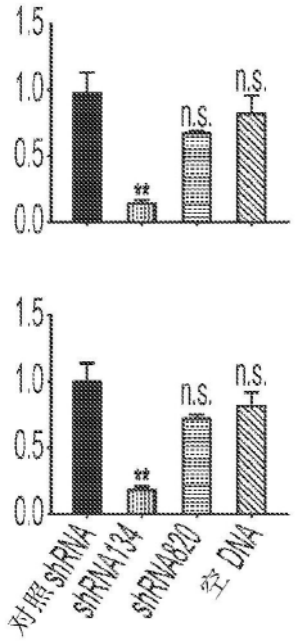

1.5
1.0
0.5
0.0
n.s.
n.s.
**
对照 shRNA
shRNA134
shRNA820
空 DNA

图1H

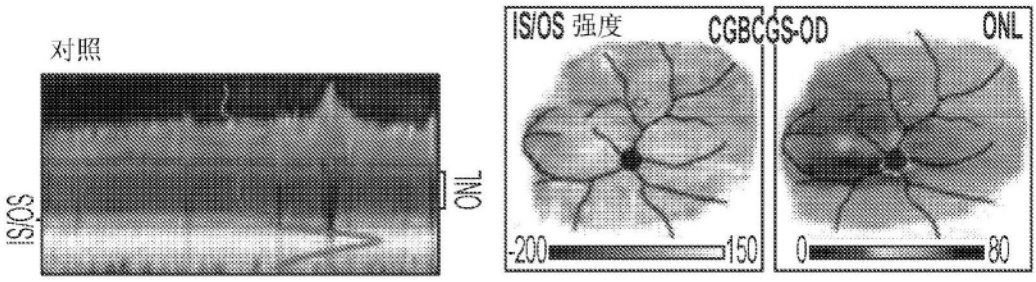

对照
IS/OS
ONL
IS/OS 强度
CGBCGS-OD
ONL
-200
150
0
80

图2A

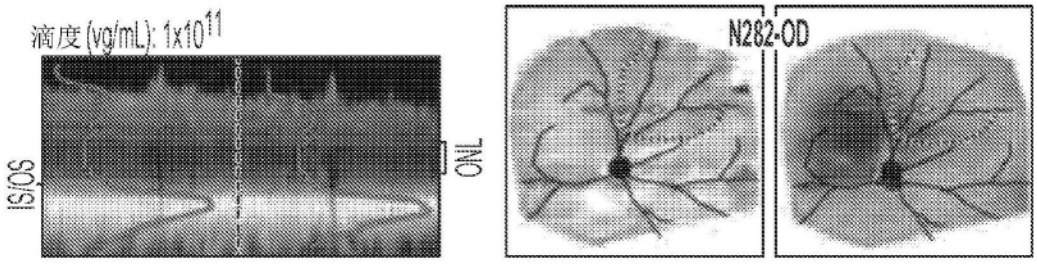

滴度(vg/mL): 1x10^11
IS/OS
ONL
N282-OD

图2B

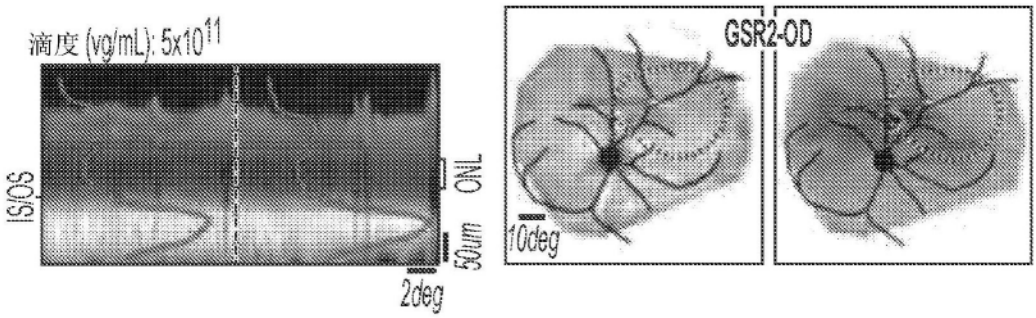

滴度(vg/mL): 5x10^11
IS/OS
ONL
50μm
2deg
GSR2-OD
10deg

图2C

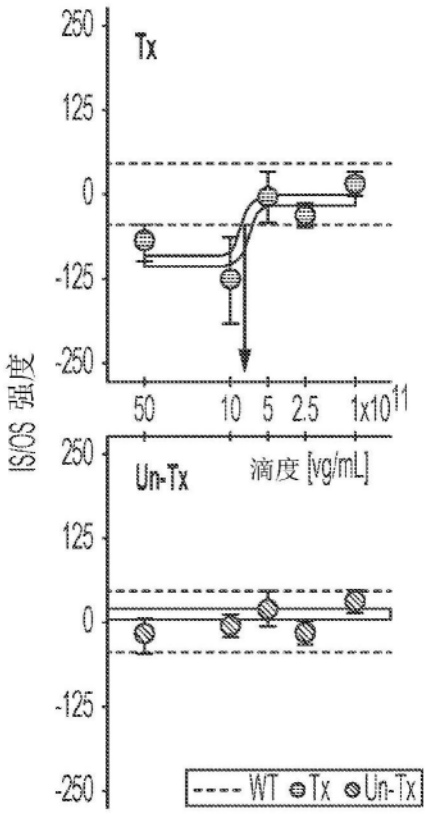

Tx
Un-Tx
IS/OS 强度
250
125
0
-125
-250
50
10
5
2.5
1x10^11
滴度 [vg/mL]
WT
Tx
Un-Tx

图2D

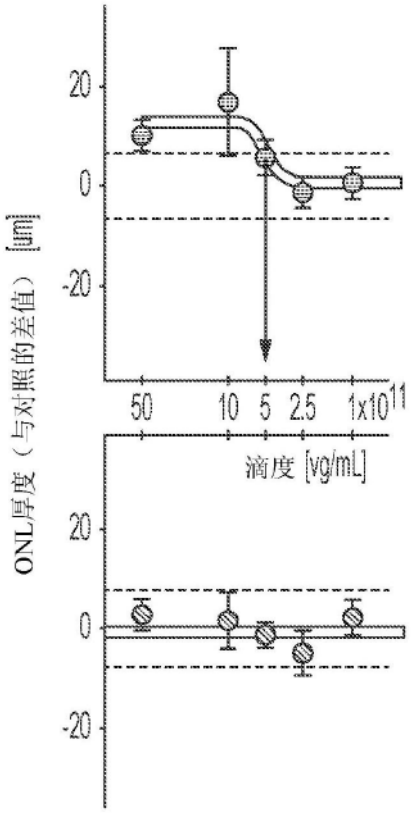

20
0
-20
50
10
5
2.5
1x10^11
滴度 [vg/mL]
ONL厚度（与对照的差值）[μm]
20
0
-20

图2E

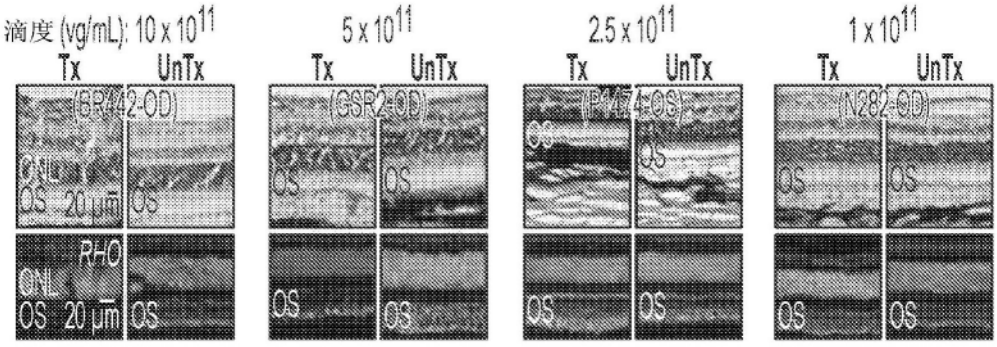

滴度 (vg/mL): 10 x 10^11
5 x 10^11
2.5 x 10^11
1 x 10^11
Tx
UnTx
(BR442-OD)
(GSR2-OD)
(P1474-OS)
(N282-OD)
ONL
OS
20 μm
RHO
OS

图2F

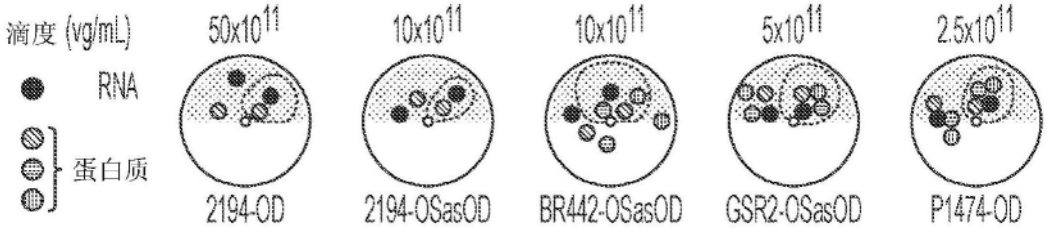

滴度 (vg/mL)
RNA
蛋白质
50x10^11
10x10^11
10x10^11
5x10^11
2.5x10^11
2194-OD
2194-OSasOD
BR442-OSasOD
GSR2-OSasOD
P1474-OD

图2G

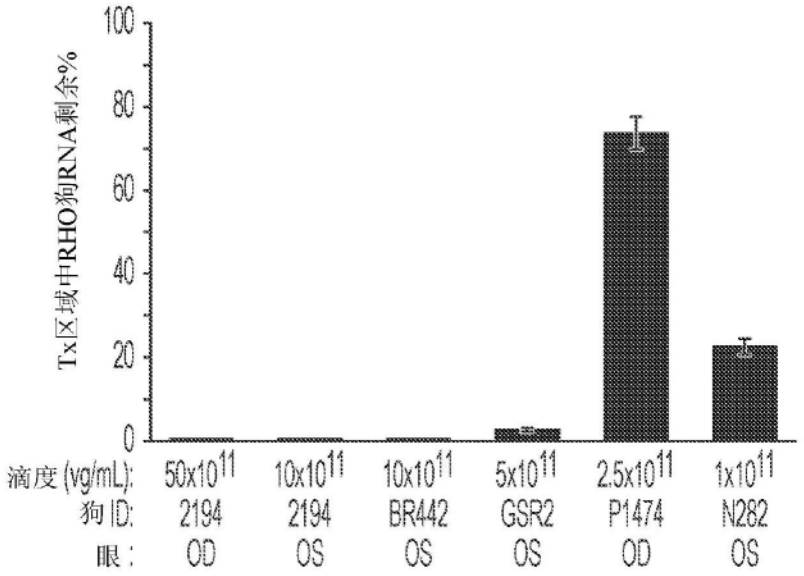

Tx区域中RHO狗RNA剩余%
100
80
60
40
20
0
滴度 (vg/mL): 50x10^11 10x10^11 10x10^11 5x10^11 2.5x10^11 1x10^11
狗 ID: 2194 2194 BR442 GSR2 P1474 N282
眼： OD OS OS OS OD OS

图2H

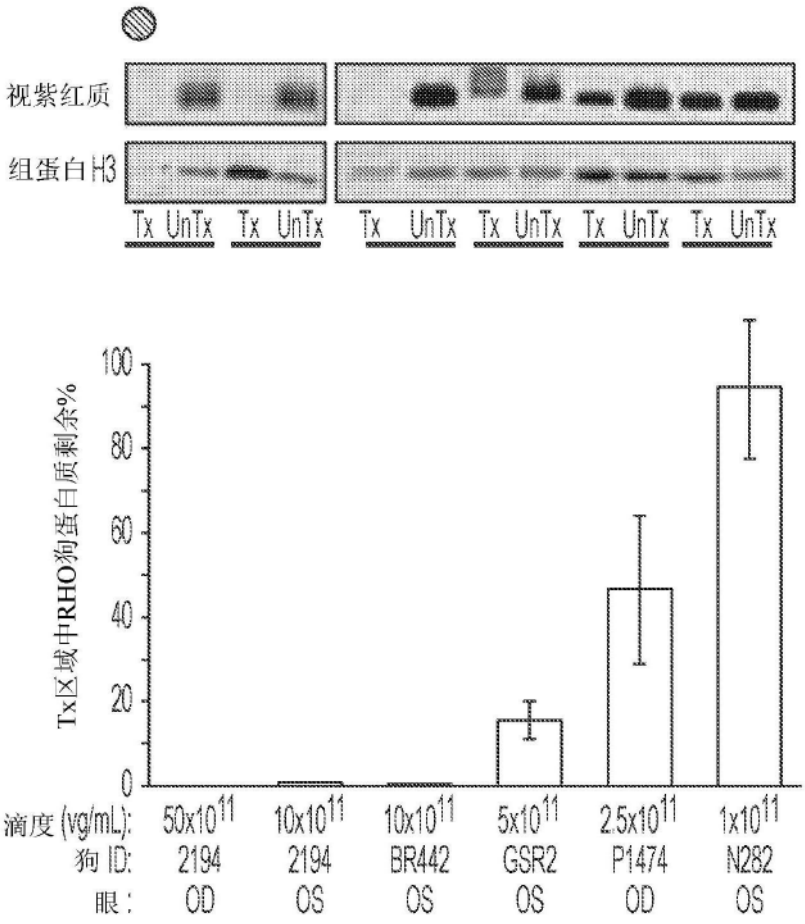

视紫红质
组蛋白 H3
Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx
Tx区域中RHO狗蛋白质剩余%
100
80
60
40
20
0
滴度 (vg/mL): 50x10^11 10x10^11 10x10^11 5x10^11 2.5x10^11 1x10^11
狗 ID: 2194 2194 BR442 GSR2 P1474 N282
眼： OD OS OS OS OD OS

图2H(续)

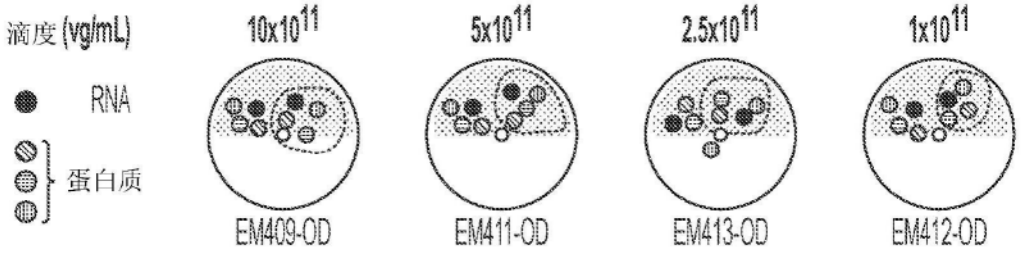

滴度 (vg/mL)
RNA
蛋白质
10x10^11
5x10^11
2.5x10^11
1x10^11
EM409-OD
EM411-OD
EM413-OD
EM412-OD

图3A

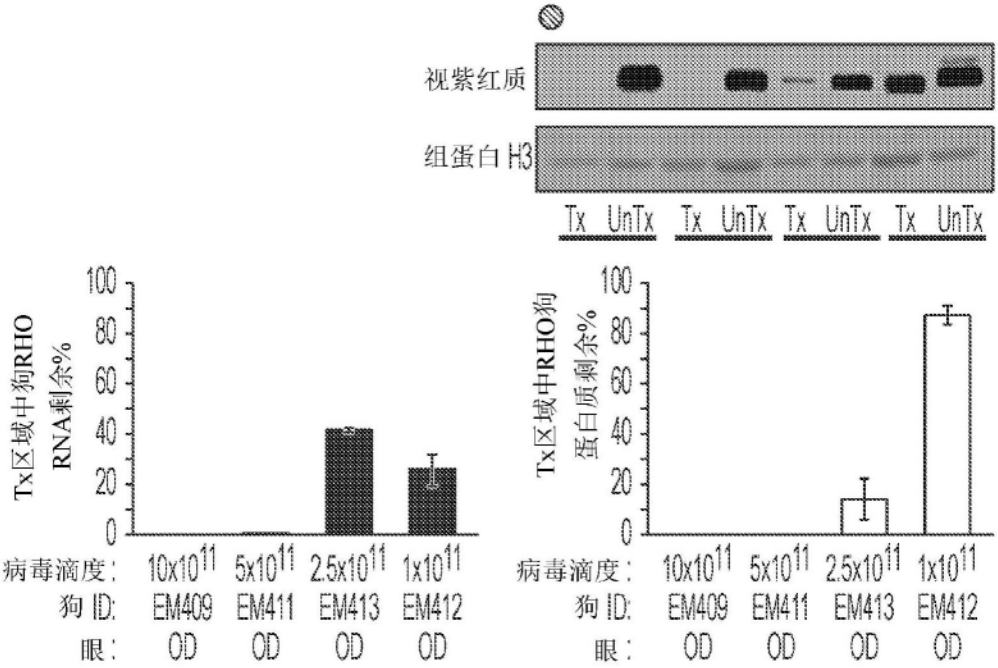

视紫红质
组蛋白 H3
Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx
Tx区域中狗RHO RNA剩余%
Tx区域中RHO狗 蛋白质剩余%
100
80
60
40
20
0
病毒滴度: 10x10^11 5x10^11 2.5x10^11 1x10^11
狗 ID: EM409 EM411 EM413 EM412
眼: OD OD OD OD

图3B

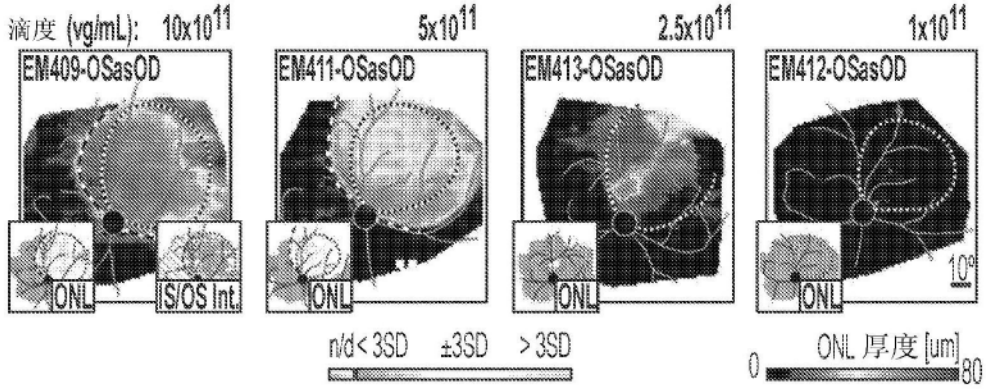

滴度 (vg/mL): 10x10^11
5x10^11
2.5x10^11
1x10^11
EM409-OSasOD
EM411-OSasOD
EM413-OSasOD
EM412-OSasOD
ONL
IS/OS Int.
10°
n/d < 3SD ±3SD > 3SD
0 ONL 厚度 [um] 80

图3C

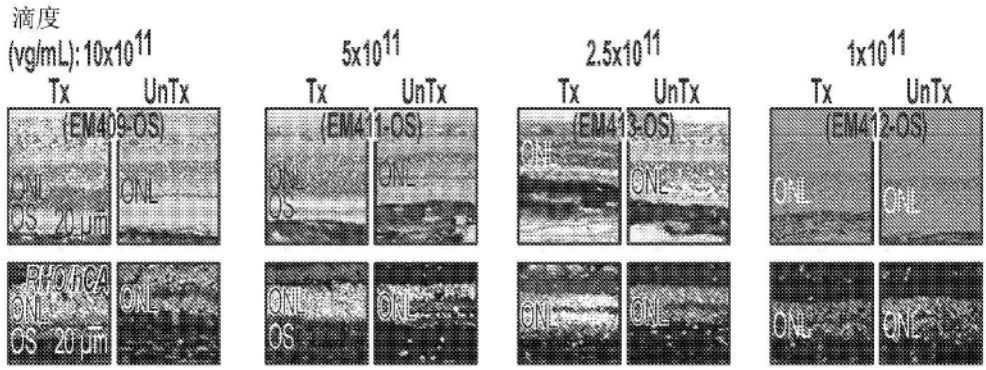

滴度
(vg/mL): 10x10^11
5x10^11
2.5x10^11
1x10^11
Tx
UnTx
(EM409-OS)
(EM411-OS)
(EM413-OS)
(EM412-OS)
ONL
OS
20 µm
RHO/rCA

图3D

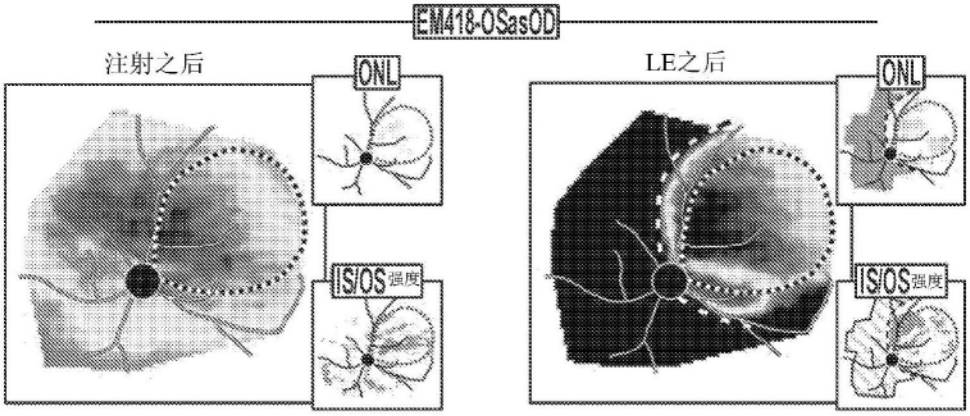

EM418-OSasOD
注射之后
LE之后
ONL
IS/OS强度

图4A

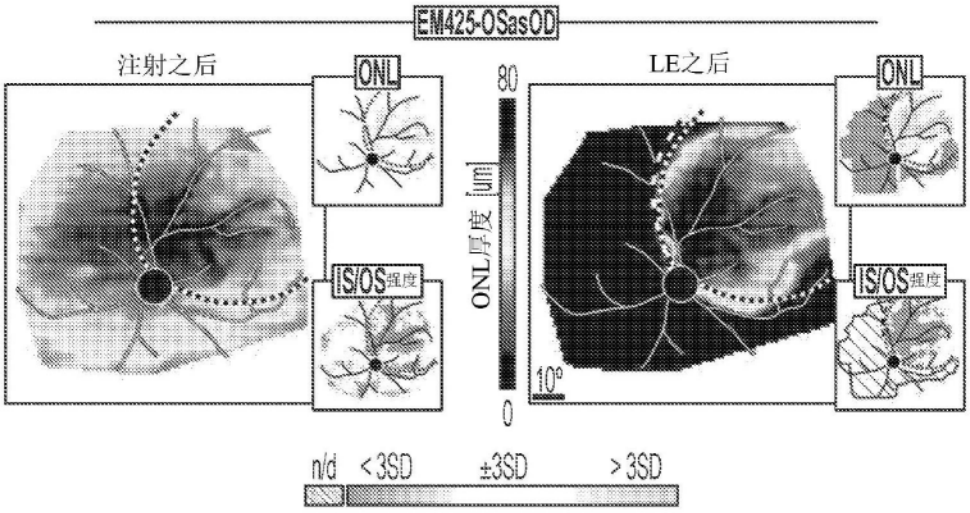

EM425-OSasOD
注射之后
LE之后
ONL
IS/OS强度
80
ONL厚度 [um]
0
10°
n/d
<3SD
±3SD
>3SD

图4B

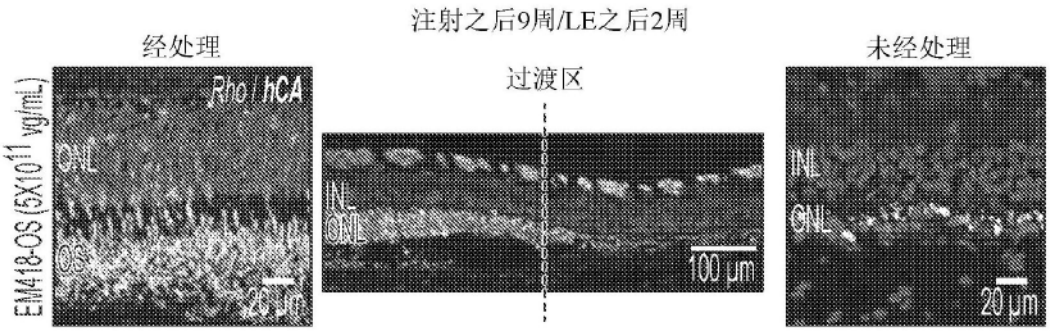

注射之后9周/LE之后2周
经处理
过渡区
未经处理
EM418-OS (5x10^11 vg/mL)
Rho / hCA
ONL
OS
25 µm
INL
ONL
100 µm
INL
ONL
20 µm

图4C

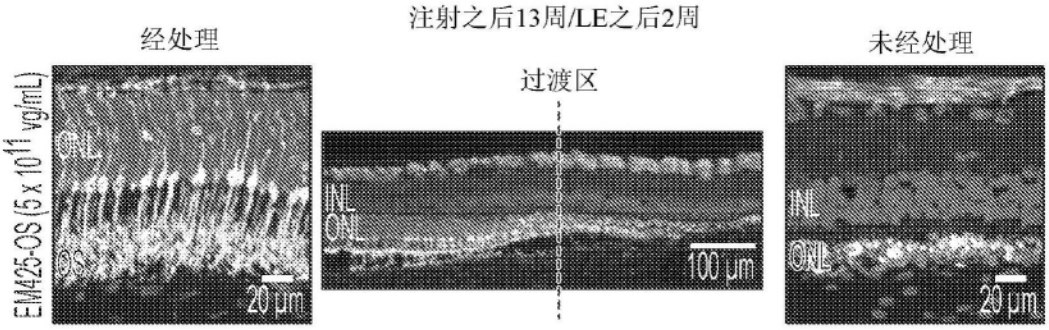

注射之后13周/LE之后2周
经处理
过渡区
未经处理
EM425-OS (5 x 10^11 vg/mL)
ONL
OS
20 µm
INL
ONL
100 µm
INL
ONL
20 µm

图4D

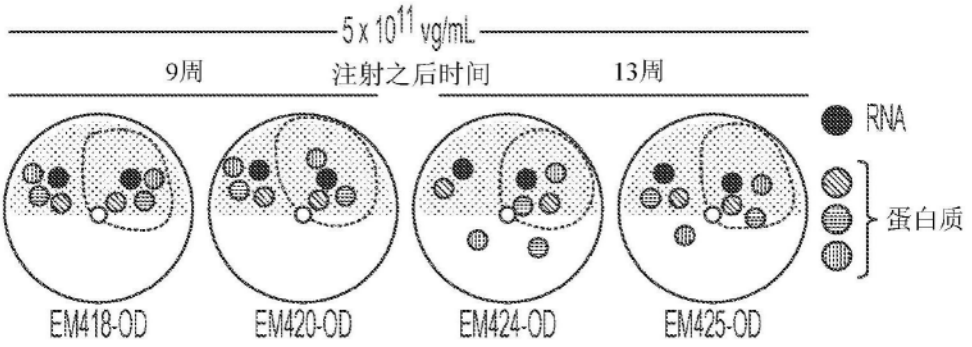

5 x 10^11 vg/mL
9周
注射之后时间
13周
RNA
蛋白质
EM418-OD
EM420-OD
EM424-OD
EM425-OD

图4E

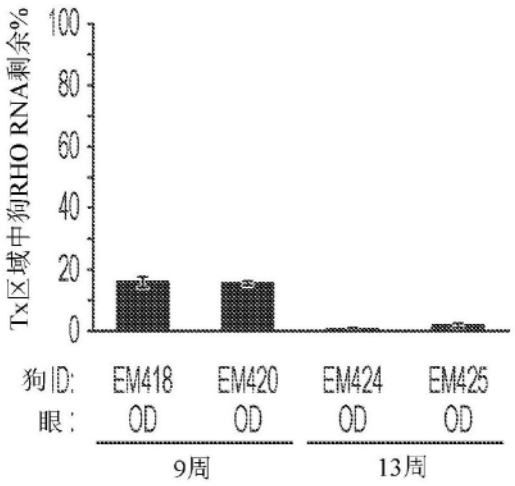

Tx区域中狗RHO RNA剩余%
100
80
60
40
20
0
狗ID: EM418 EM420 EM424 EM425
眼: OD OD OD OD
9周
13周

图4F

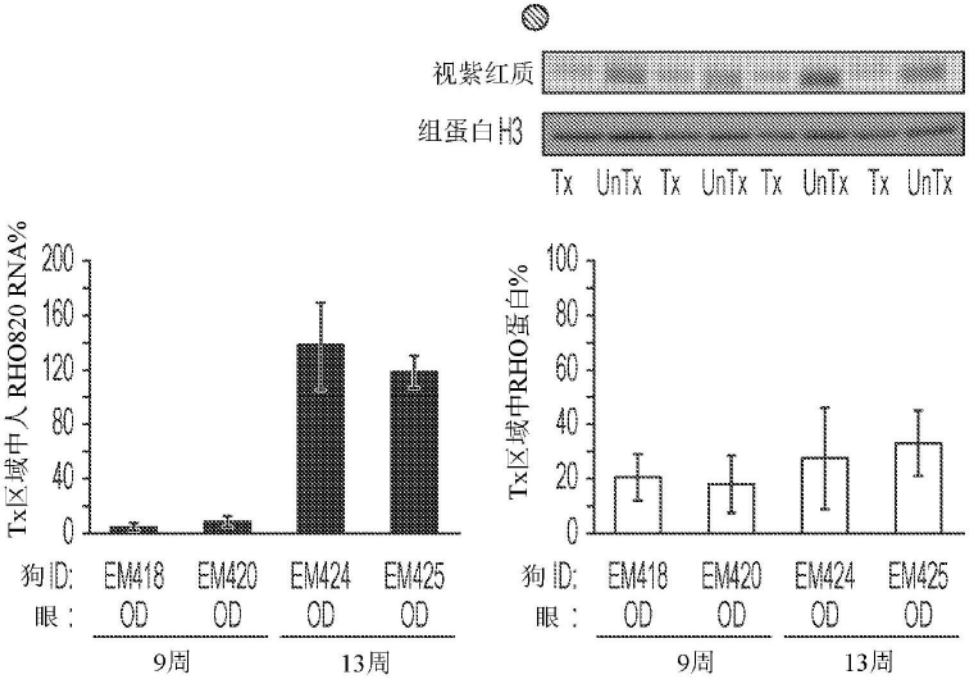

视紫红质
组蛋白H3
Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx
Tx区域中人 RHO820 RNA%
200
160
120
80
40
0
狗ID: EM418 EM420 EM424 EM425
眼: OD OD OD OD
9周
13周
Tx区域中RHO蛋白%
100
80
60
40
20
0
狗ID: EM418 EM420 EM424 EM425
眼: OD OD OD OD
9周
13周

图4G

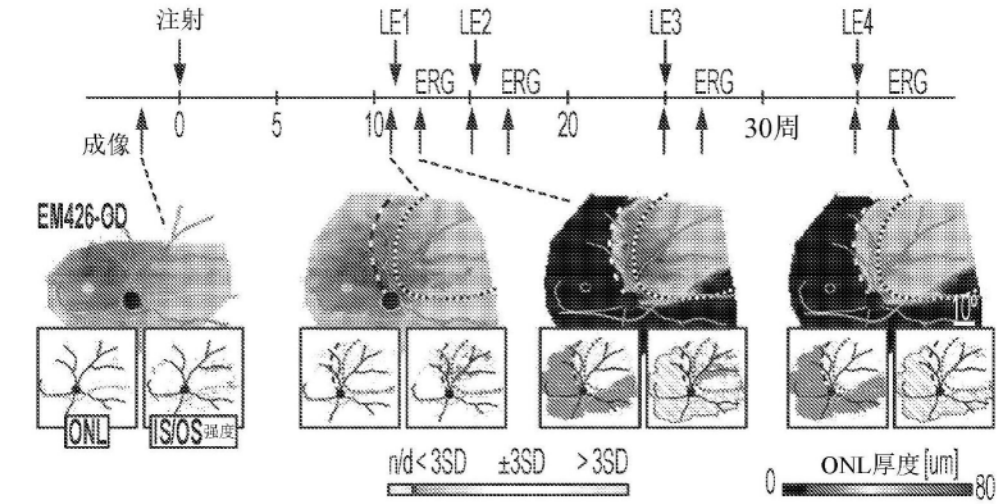

注射
LE1
LE2
LE3
LE4
ERG
ERG
ERG
ERG
成像
0
5
10
20
30周
EM426-OD
ONL
IS/OS强度
n/d<3SD
±3SD
>3SD
ONL厚度[um]
0
80

图5A

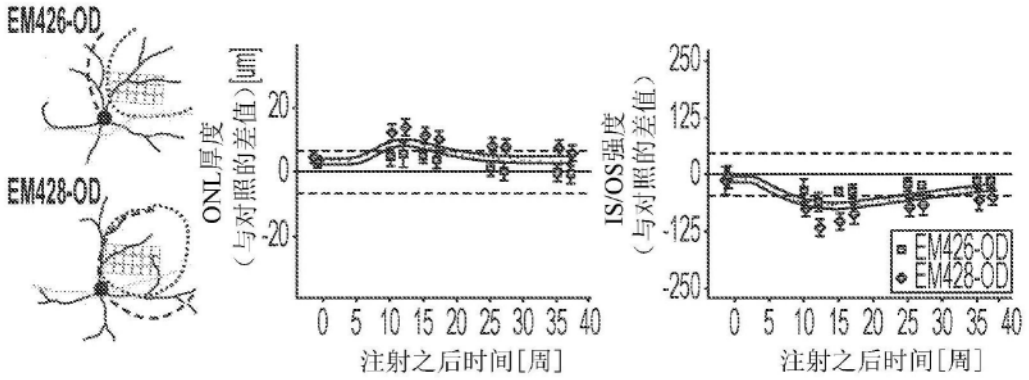

EM426-OD
EM428-OD
ONL厚度
（与对照的差值）[um]
20
0
-20
0 5 10 15 20 25 30 35 40
注射之后时间[周]
IS/OS强度
（与对照的差值）
250
125
0
-125
-250
EM426-OD
EM428-OD
0 5 10 15 20 25 30 35 40
注射之后时间[周]

图5B

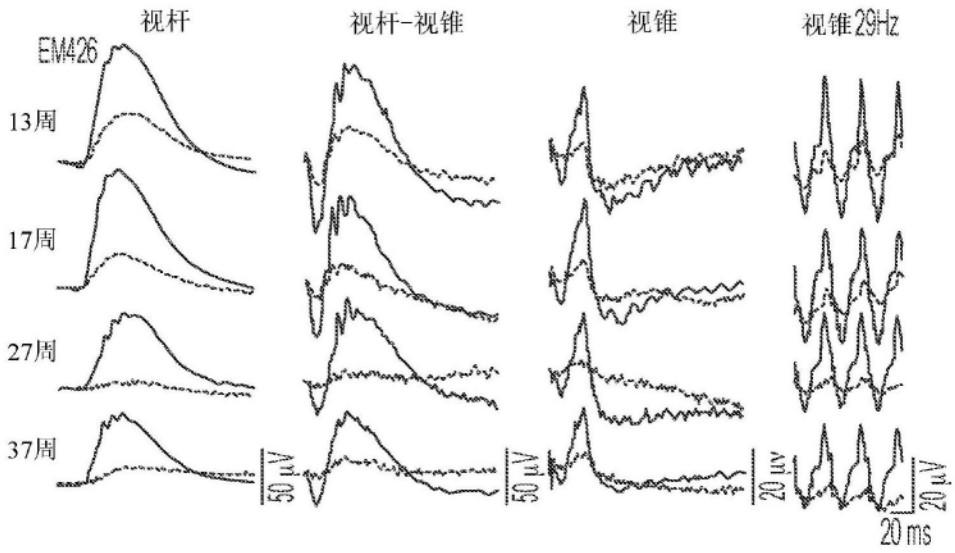

视杆
视杆-视锥
视锥
视锥29Hz
EM426
13周
17周
27周
37周
50 μV
50 μV
20 uv
20 μV
20 ms

图5C

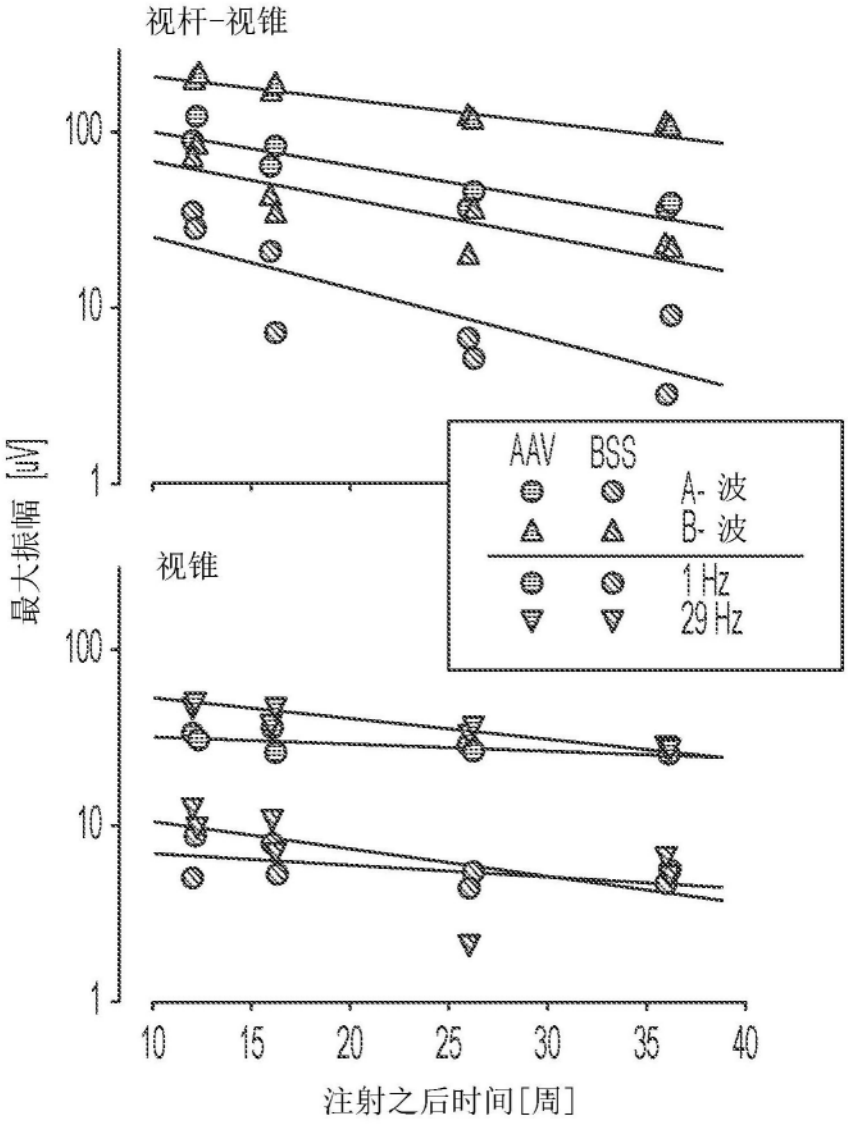

视杆-视锥
100
10
1
最大振幅 [uV]
视锥
AAV
BSS
A- 波
B- 波
1 Hz
29 Hz
100
10
1
10
15
20
25
30
35
40
注射之后时间[周]

图5D

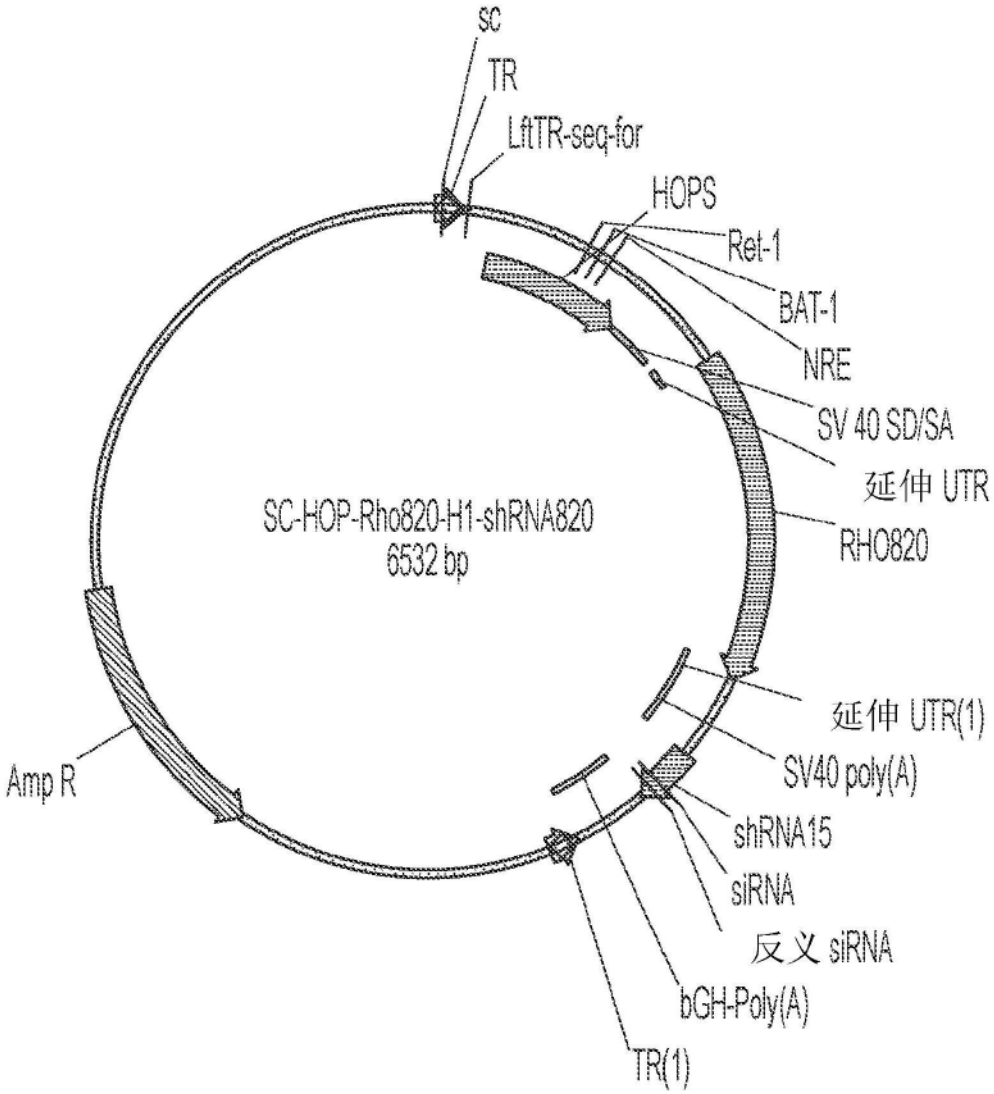

SC
TR
LftTR-seq-for
HOPS
Rel-1
BAT-1
NRE
SV 40 SD/SA
延伸 UTR
RHO820
SC-HOP-Rho820-H1-shRNA820
6532 bp
延伸 UTR(1)
SV40 poly(A)
shRNA15
siRNA
反义 siRNA
bGH-Poly(A)
TR(1)
Amp R

图6

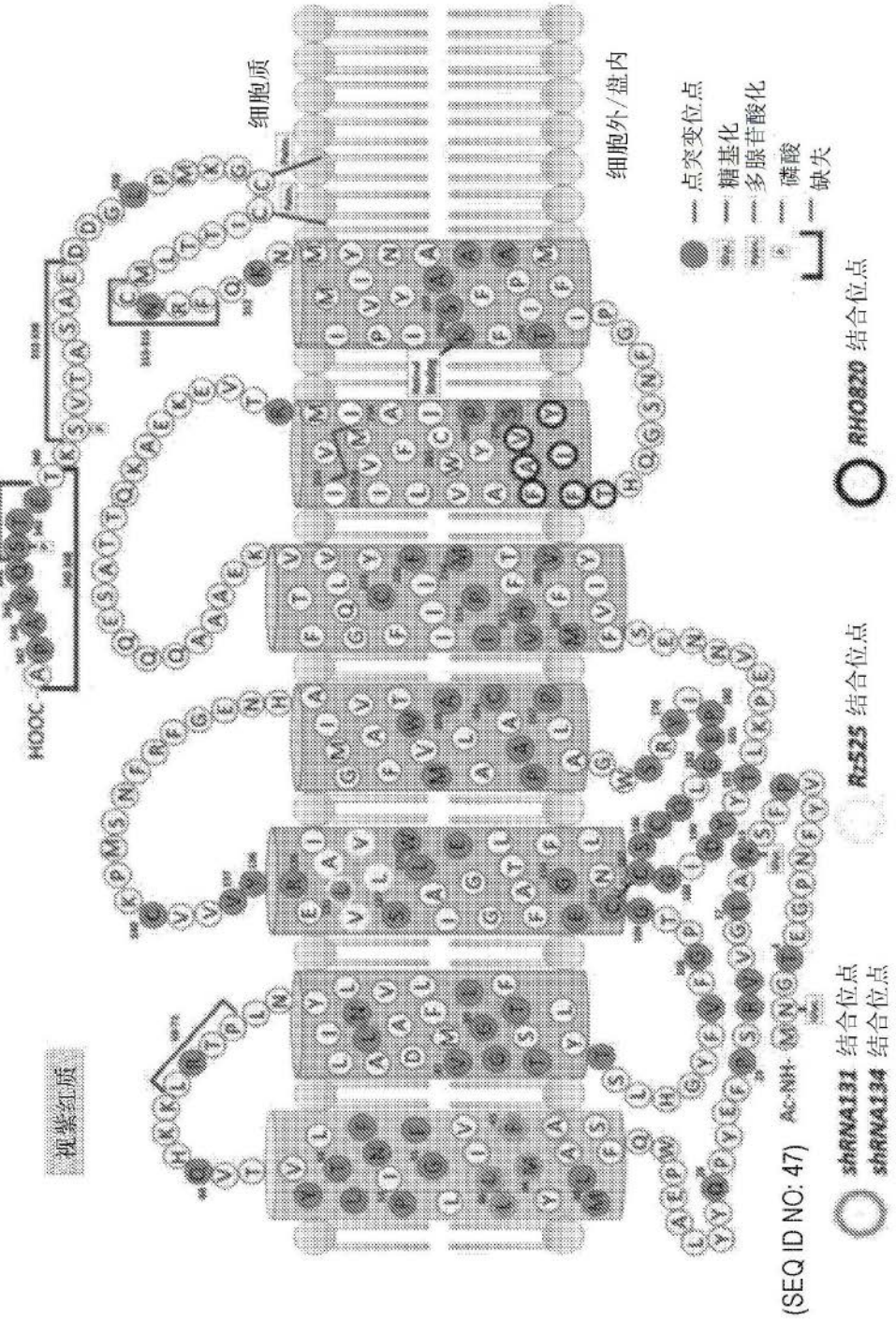

细胞质
细胞外/盘内
视紫红质
点突变位点
糖基化
多腺苷酸化
磷酸
缺失
RHO820 结合位点
R:S25 结合位点
shRNA131 结合位点
shRNA134 结合位点
(SEQ ID NO: 47)

图7

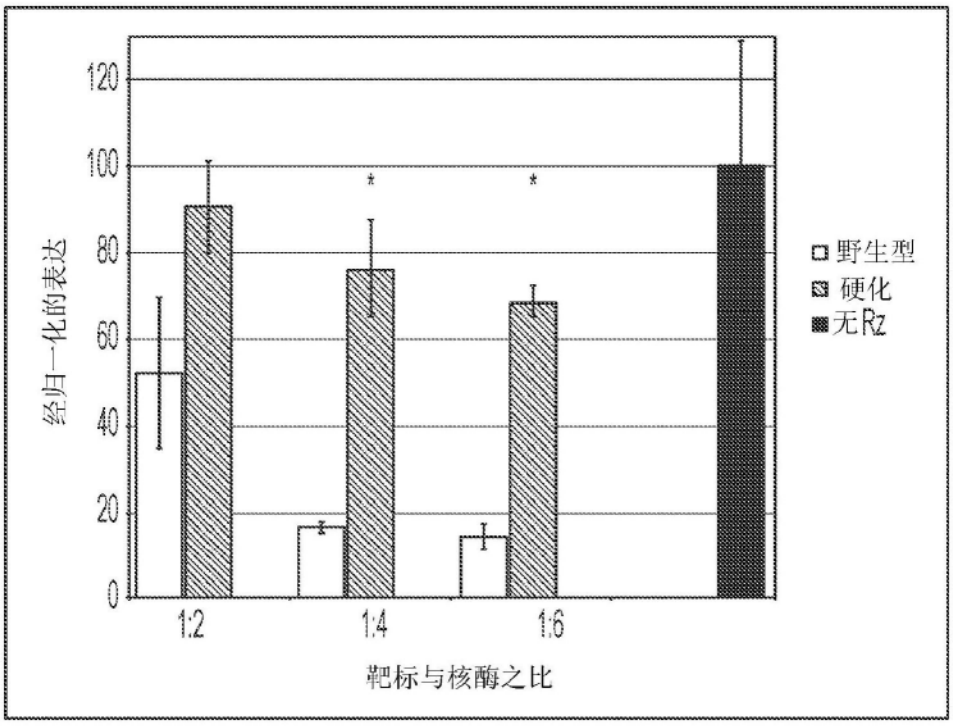

经归一化的表达
120
100
80
60
40
20
0
*
*
1:2
1:4
1:6
靶标与核酶之比
野生型
硬化
无Rz

图8

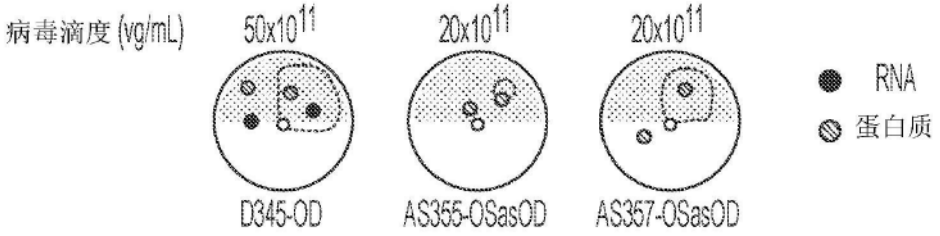

病毒滴度 (vg/mL)
50x10^11
20x10^11
20x10^11
D345-OD
AS355-OSasOD
AS357-OSasOD
RNA
蛋白质

图9A

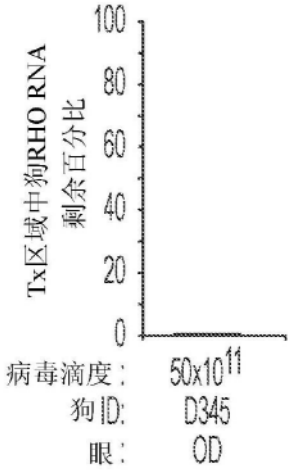

Tx区域中狗RHO RNA
剩余百分比
100
80
60
40
20
0
病毒滴度：
50x10^11
狗ID:
D345
眼：
OD

图9B

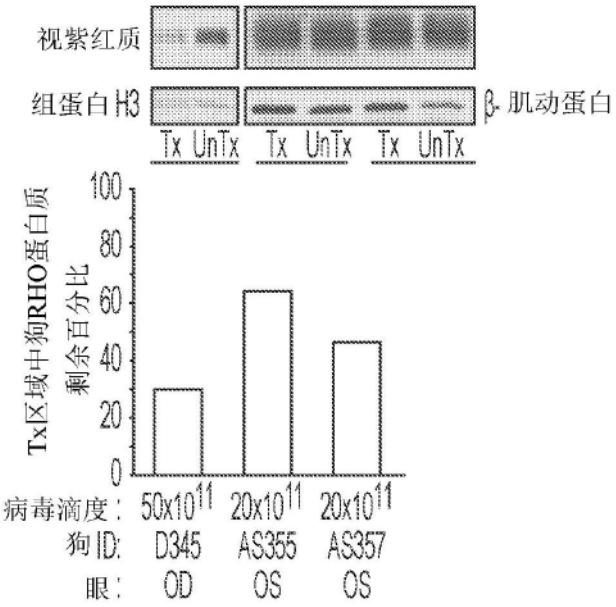

视紫红质
组蛋白H3
β-肌动蛋白
Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx
Tx区域中狗RHO蛋白质
剩余百分比
100
80
60
40
20
0
病毒滴度：
50x10^11
20x10^11
20x10^11
狗ID:
D345
AS355
AS357
眼：
OD
OS
OS

图9C

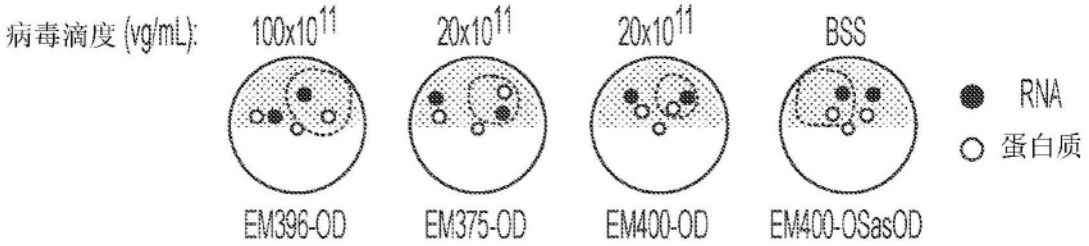

病毒滴度 (vg/mL):
100x10^11
20x10^11
20x10^11
BSS
RNA
蛋白质
EM396-OD
EM375-OD
EM400-OD
EM400-OSasOD

图10A

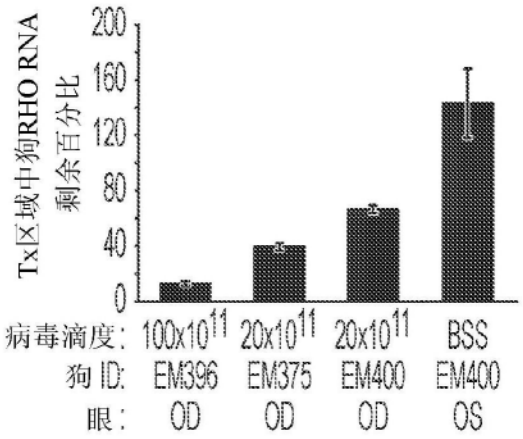

Tx区域中狗RHO RNA
剩余百分比
200
160
120
80
40
0
病毒滴度: 100x10^11 20x10^11 20x10^11 BSS
狗 ID: EM396 EM375 EM400 EM400
眼: OD OD OD OS

图10B

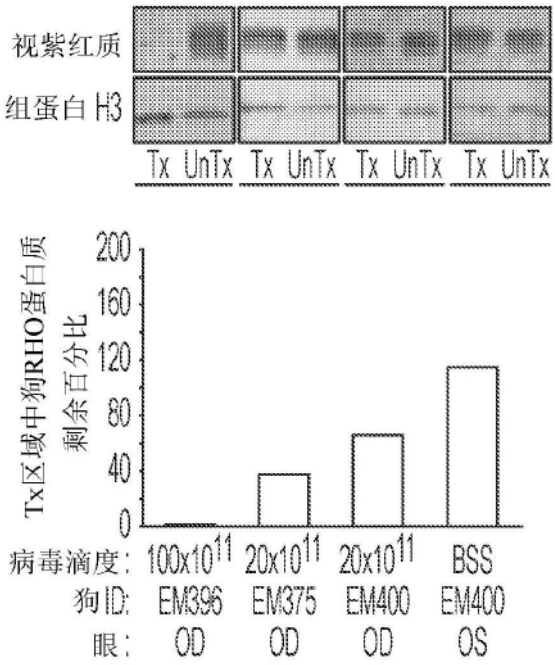

视紫红质
组蛋白 H3
Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx Tx UnTx
Tx区域中狗RHO蛋白质
剩余百分比
200
160
120
80
40
0
病毒滴度: 100x10^11 20x10^11 20x10^11 BSS
狗 ID: EM396 EM375 EM400 EM400
眼: OD OD OD OS

图10C

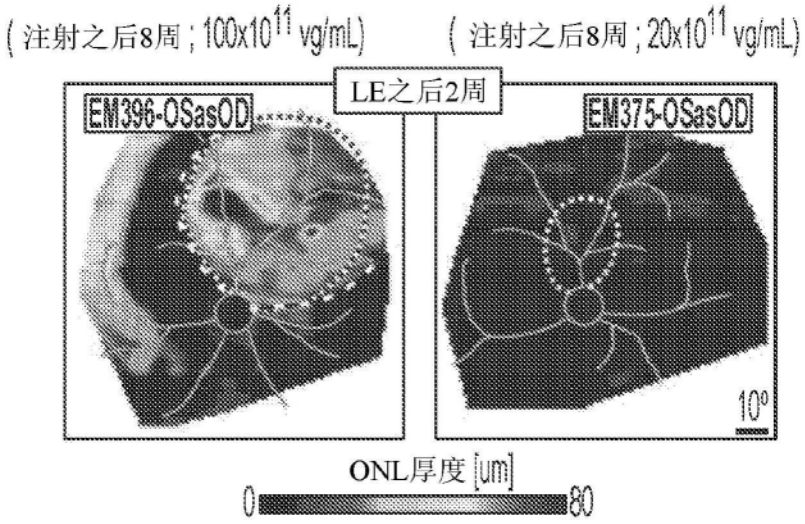

(注射之后8周；100x10^11 vg/mL)
(注射之后8周；20x10^11 vg/mL)
LE之后2周
EM396-OSasOD
EM375-OSasOD
10°
ONL厚度 [um]
0
80

图10D

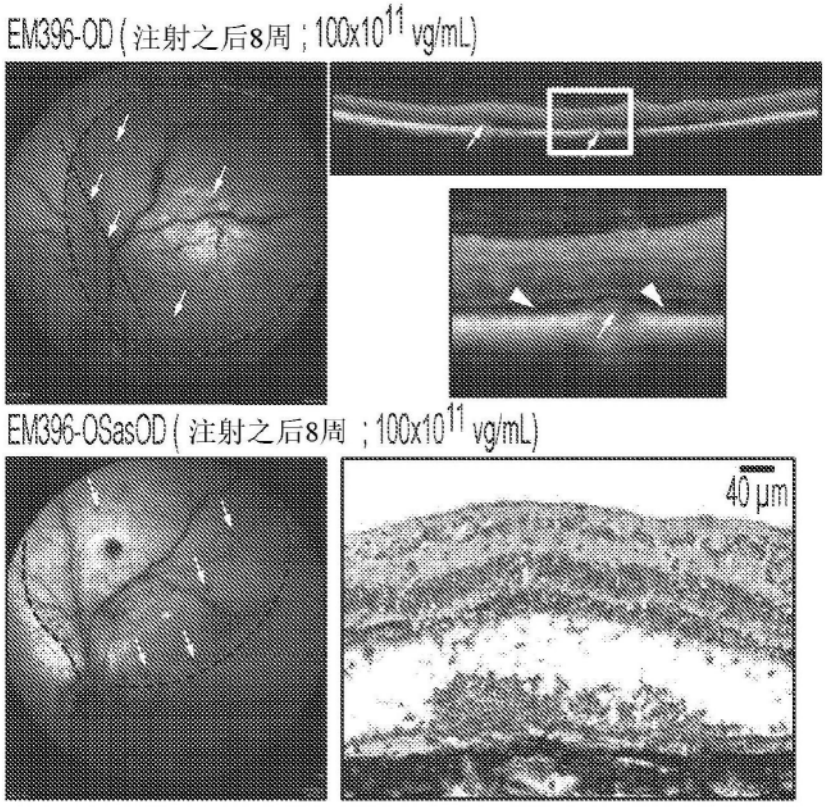

EM396-OD (注射之后8周；100x10^11 vg/mL)
EM396-OSasOD (注射之后8周；100x10^11 vg/mL)
40 µm

图10E

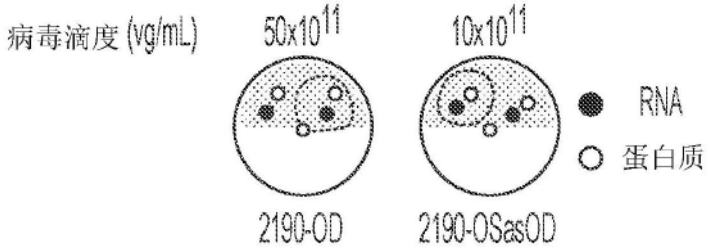

病毒滴度 (vg/mL)
50x10^11
10x10^11
RNA
蛋白质
2190-OD
2190-OSasOD

图11A

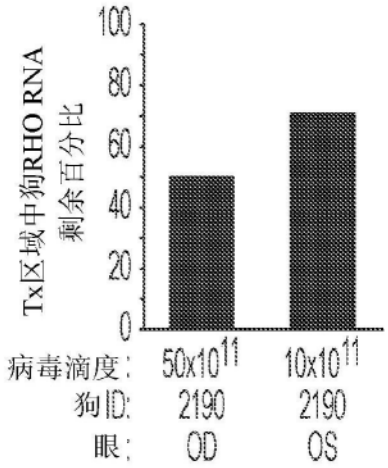

Tx区域中狗RHO RNA
剩余百分比
100
80
60
40
20
0
病毒滴度:
50x10^11
10x10^11
狗ID:
2190
2190
眼:
OD
OS

图11B

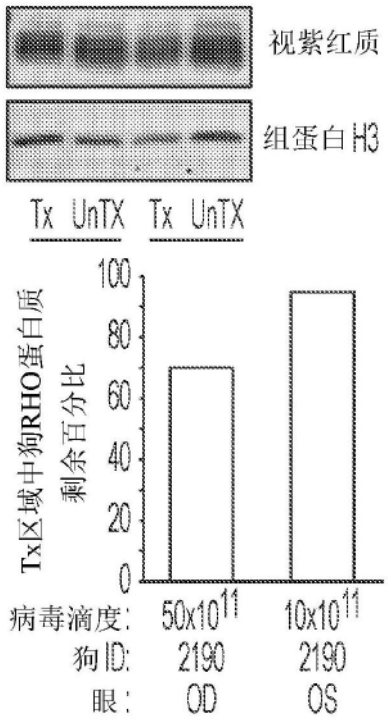

视紫红质
组蛋白H3
Tx UnTX Tx UnTX
Tx区域中狗RHO蛋白质
剩余百分比
100
80
60
40
20
0
病毒滴度:
50x10^11
10x10^11
狗ID:
2190
2190
眼:
OD
OS

图11C

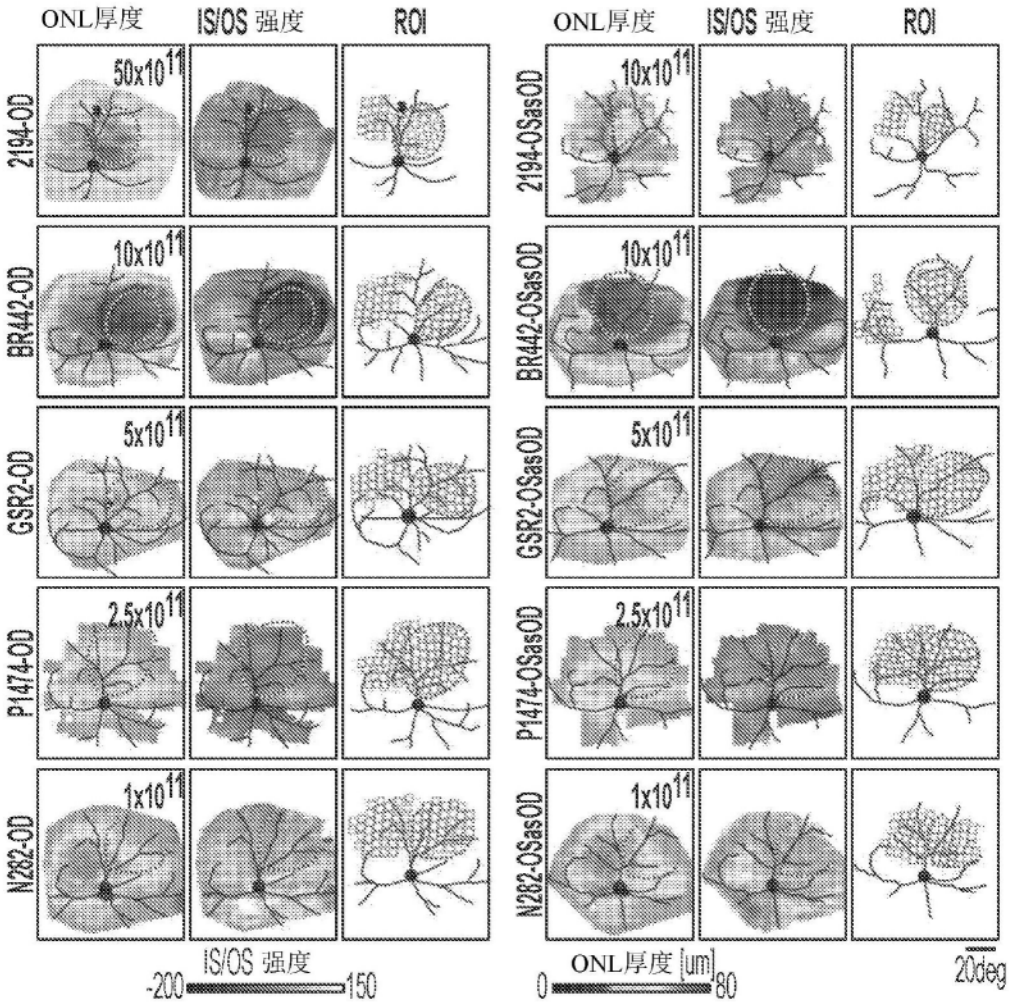

ONL厚度
IS/OS 强度
ROI
2194-OD
BR442-OD
GSR2-OD
P1474-OD
N282-OD
50x10^11
10x10^11
5x10^11
2.5x10^11
1x10^11
2194-OSasOD
BR442-OSasOD
GSR2-OSasOD
P1474-OSasOD
N282-OSasOD
IS/OS 强度
-200
150
ONL厚度 [um]
0
80
20deg

图12

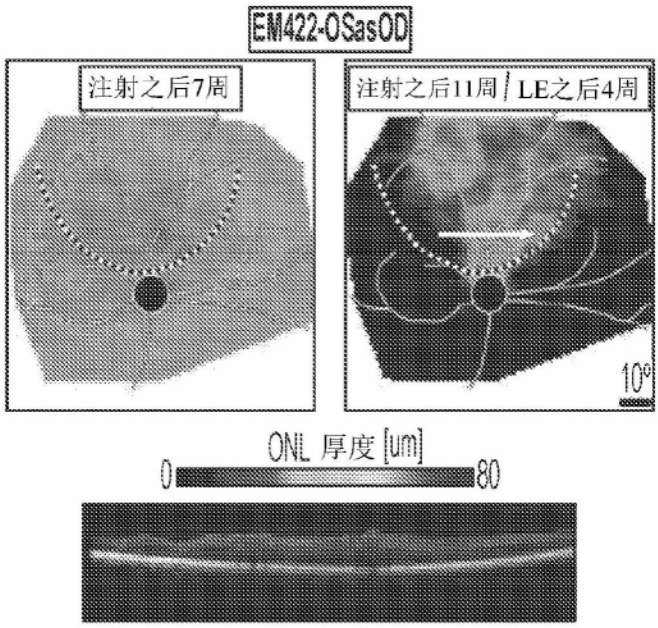


图13A

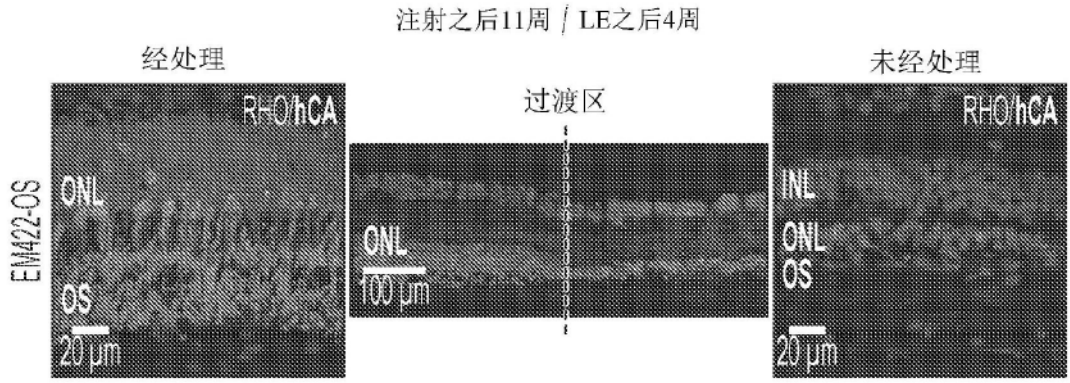


图13B

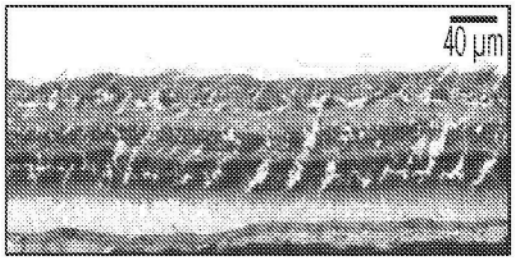


图13C

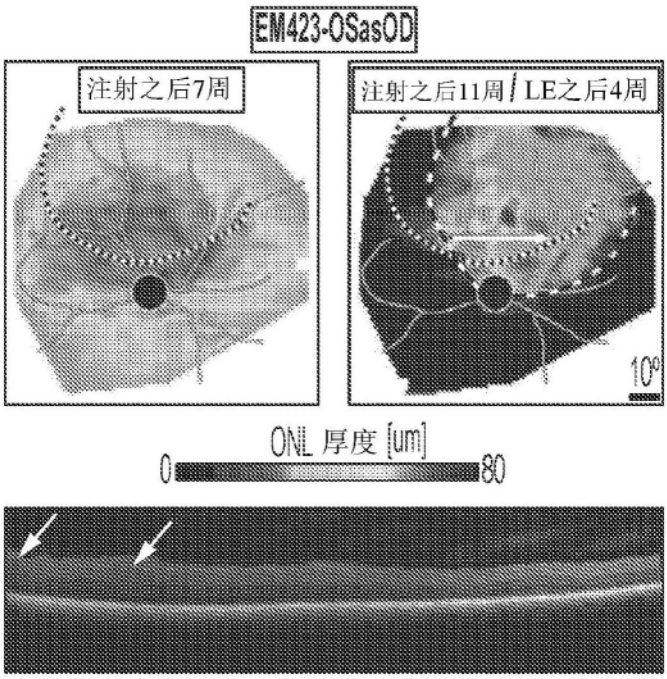


图13D

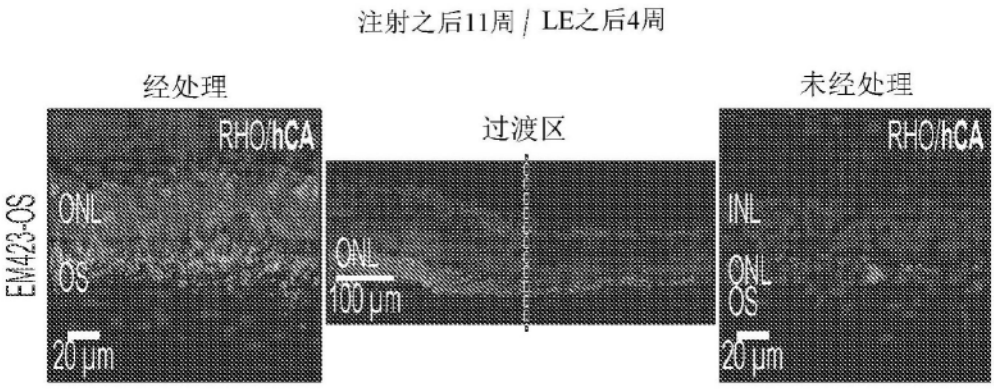


图13E

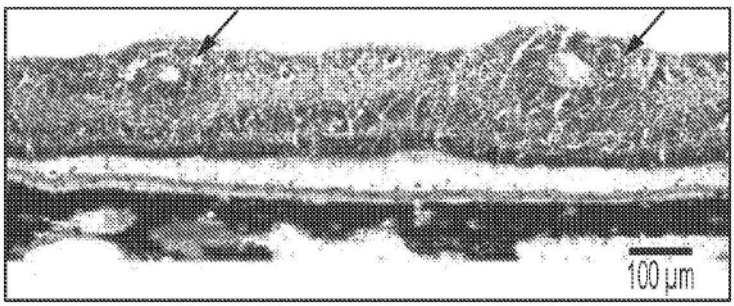


图13F

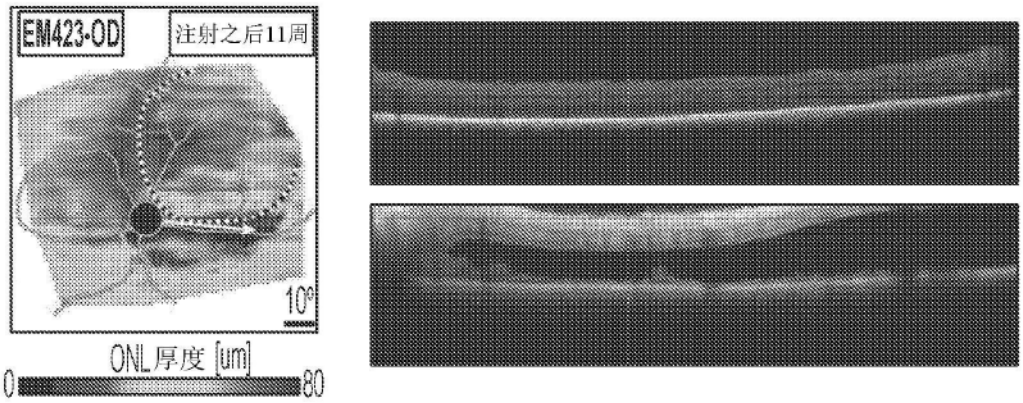

EM423-OD
注射之后11周
10°
ONL厚度 [um]
0
80

图13G

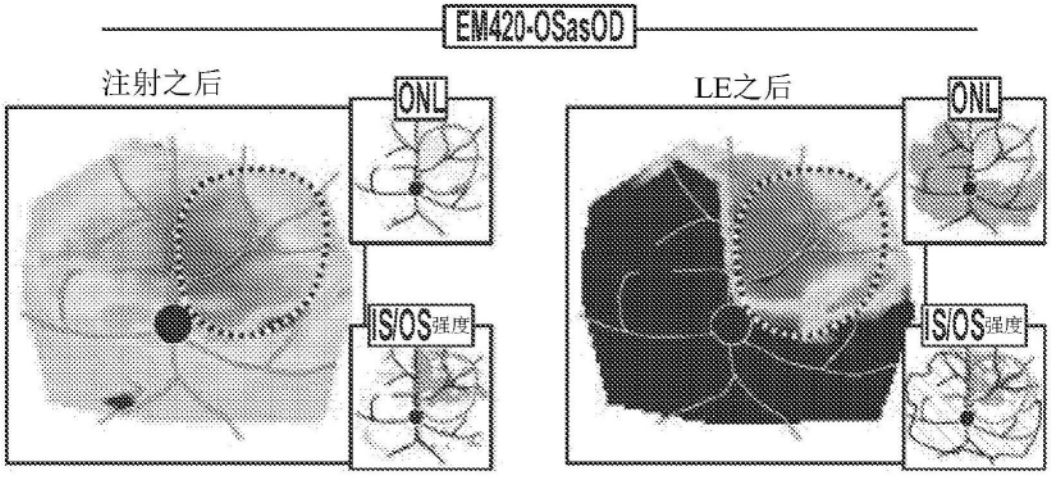

EM420-OSasOD
注射之后
ONL
IS/OS强度
LE之后
ONL
IS/OS强度

图14A

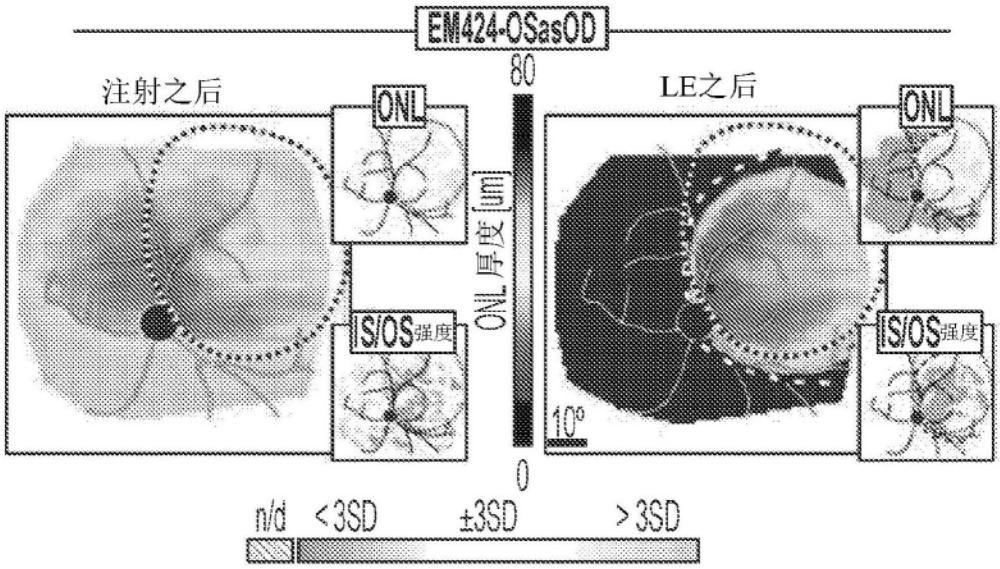


图14B

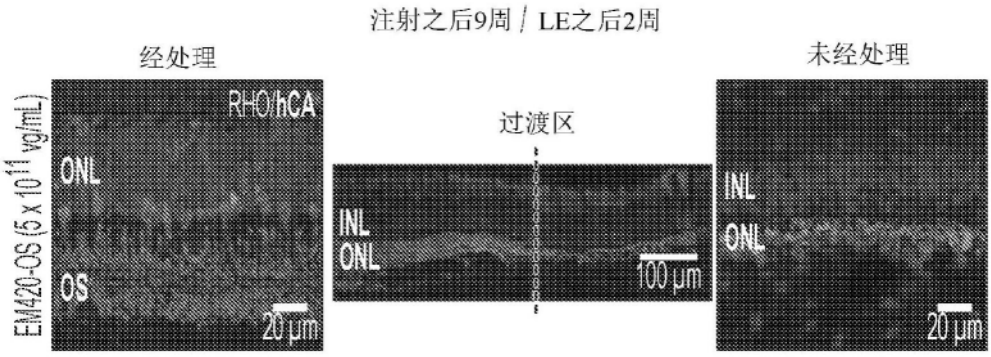


图14C

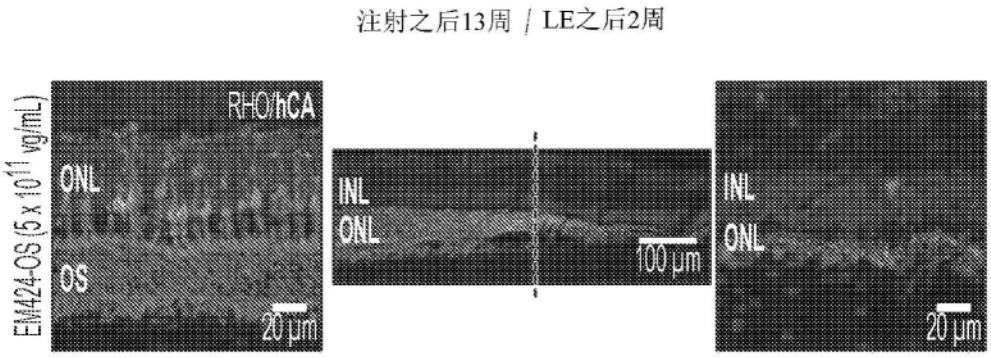


图14D

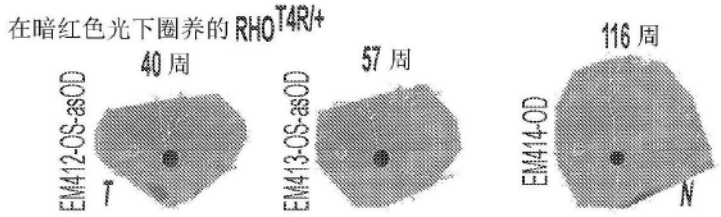


图15A

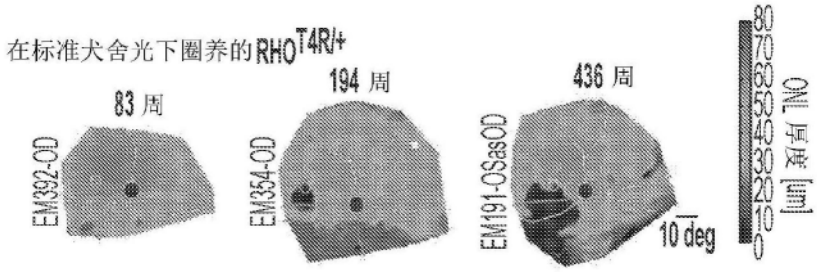


图15B

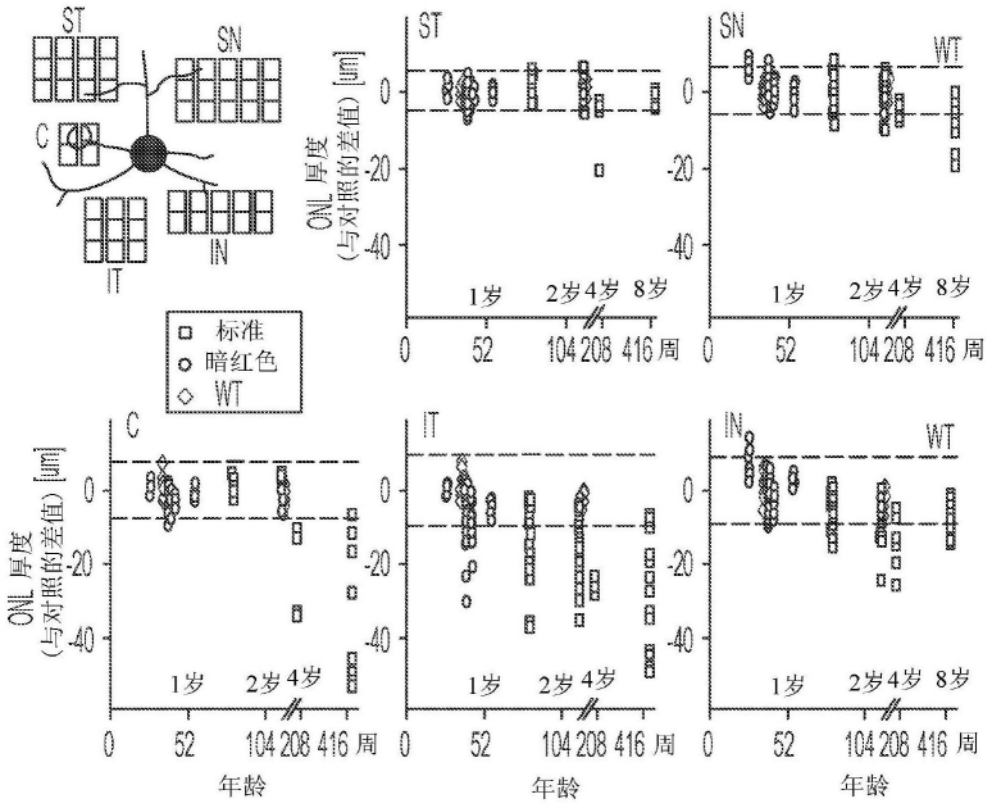


图15C

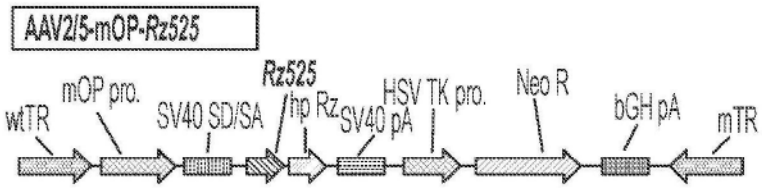


图16A

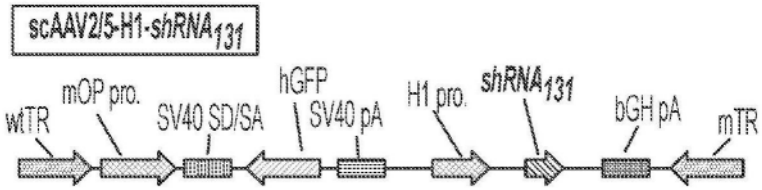


图16B

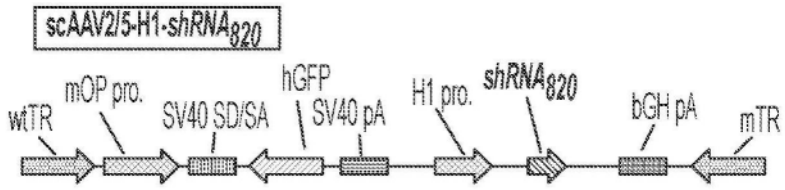


图16C

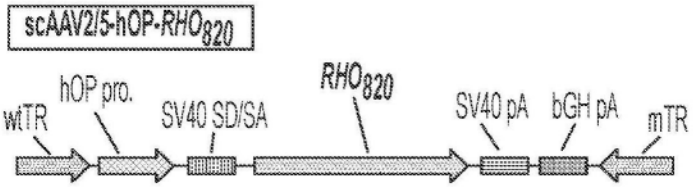


图16D

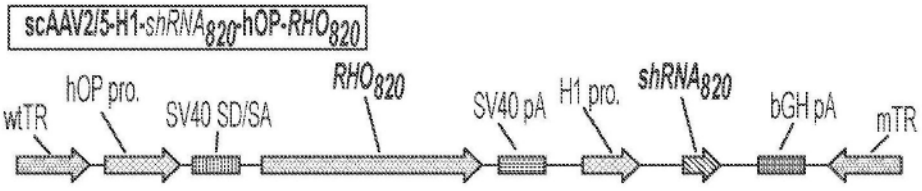


图16E

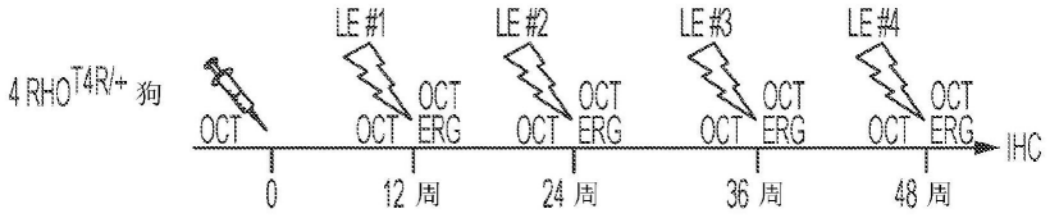

4 RHO$^{T4R/+}$ 狗
OCT
LE #1
OCT
OCT ERG
LE #2
OCT
OCT ERG
LE #3
OCT
OCT ERG
LE #4
OCT
OCT ERG
IHC
0
12 周
24 周
36 周
48 周

图17

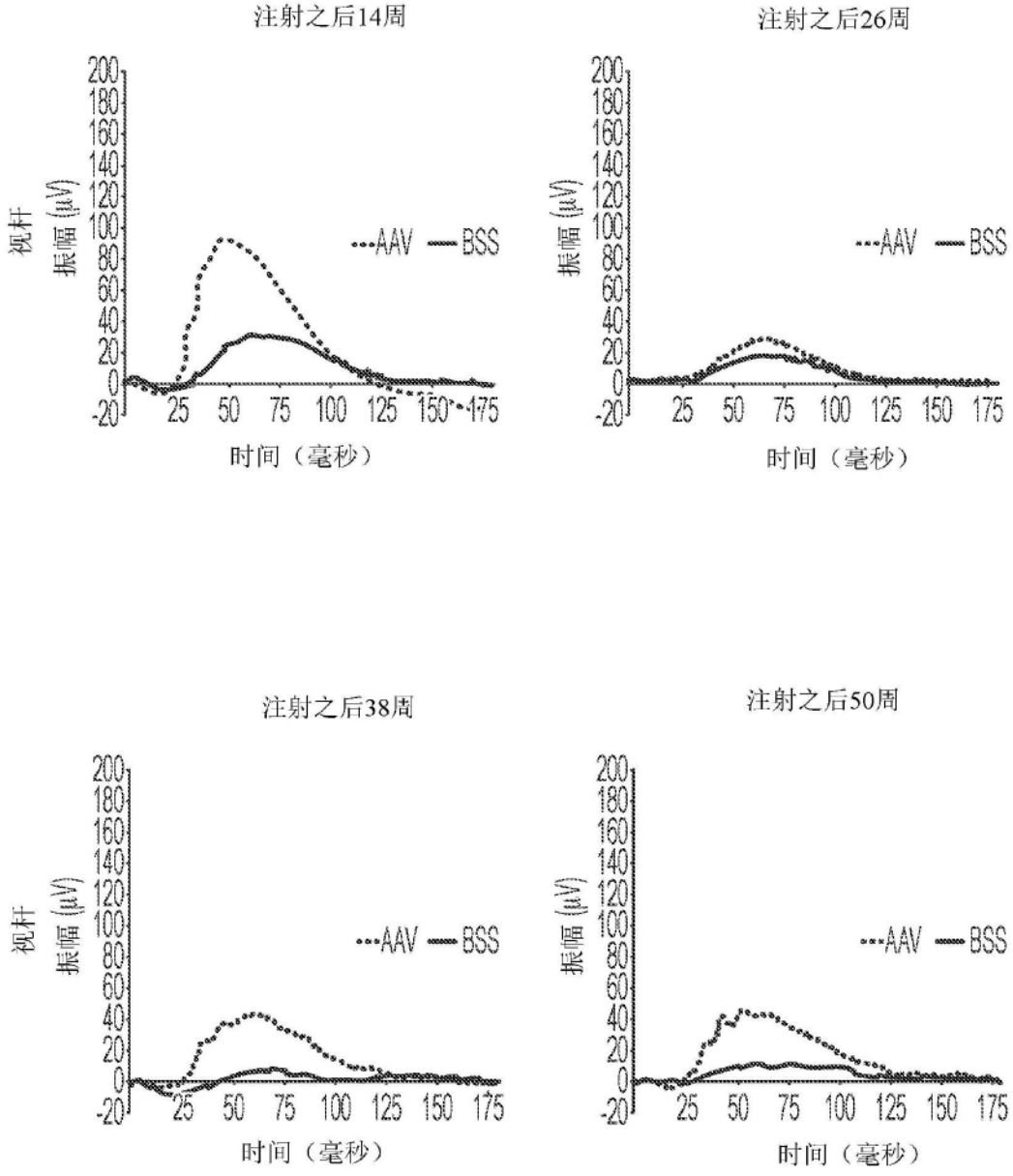

注射之后14周
注射之后26周
注射之后38周
注射之后50周
视杆
振幅 (μV)
---AAV —BSS
时间（毫秒）
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
25
50
75
100
125
150
175

图18A

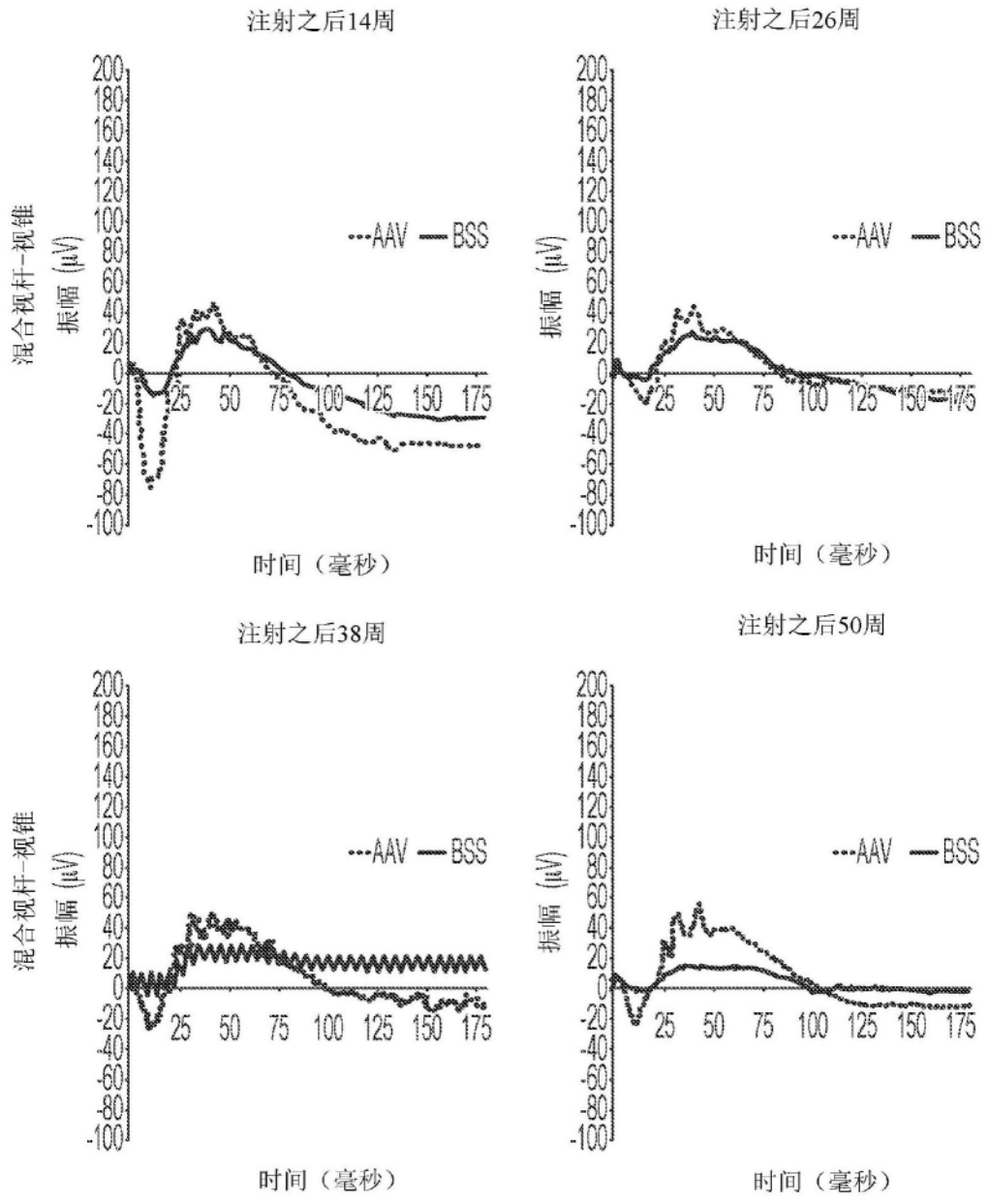

注射之后14周
注射之后26周
注射之后38周
注射之后50周
混合视杆-视锥
振幅 (μV)
---AAV —BSS
时间（毫秒）
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
25
50
75
100
125
150
175

图18B

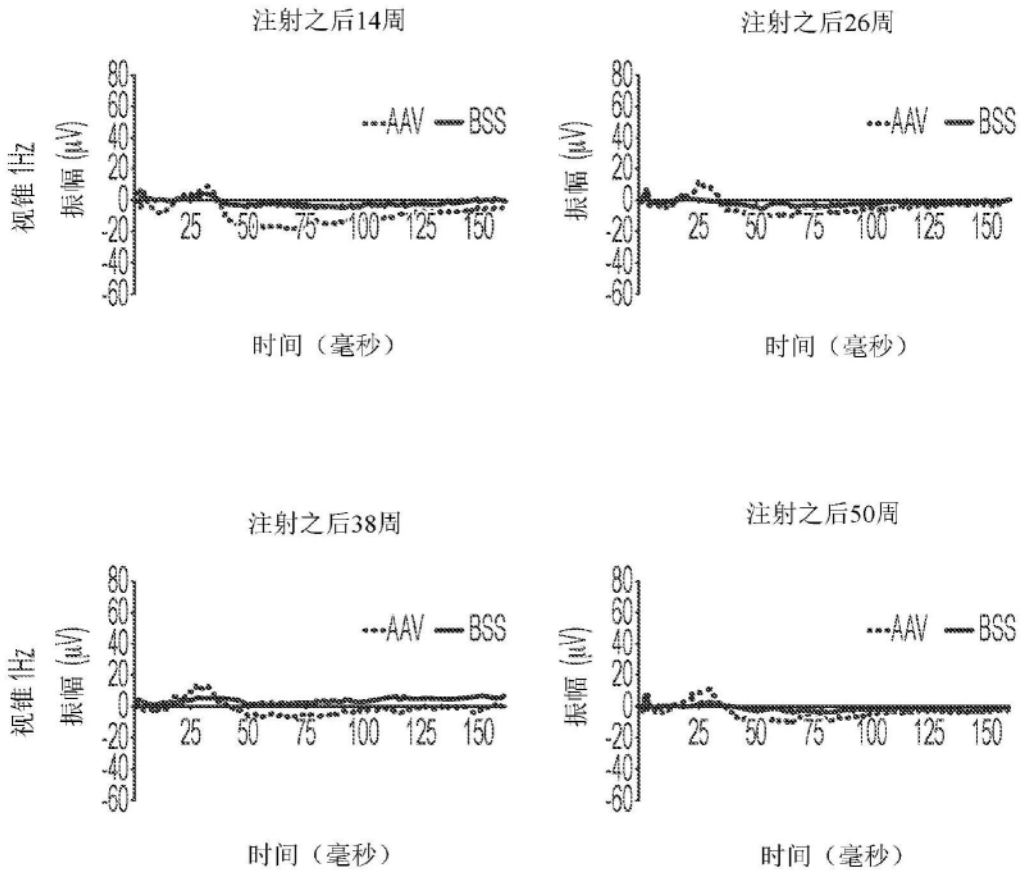

注射之后14周
注射之后26周
注射之后38周
注射之后50周
视锥 1Hz
振幅 (μV)
---AAV —BSS
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
25
50
75
100
125
150
时间（毫秒）

图18C

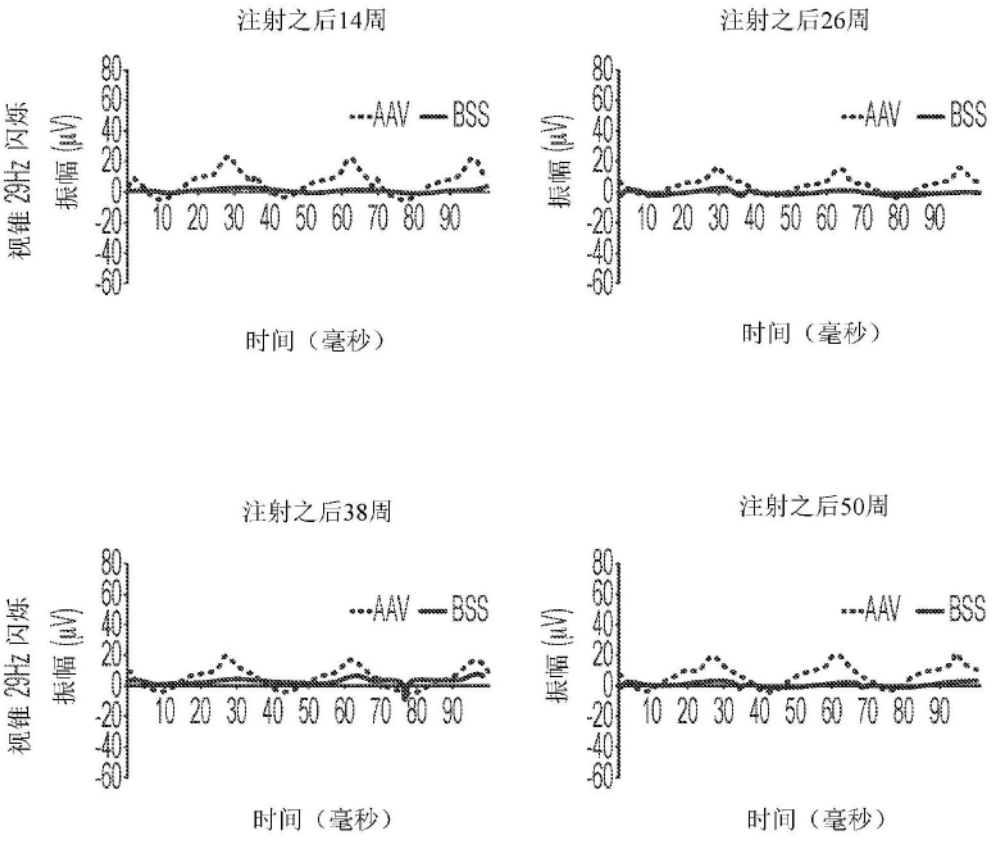

注射之后14周
注射之后26周
注射之后38周
注射之后50周
视锥 29Hz 闪烁
振幅 (μV)
---AAV —BSS
时间（毫秒）

图18D


NS: 不显著
* p<0.05
** p<0.001

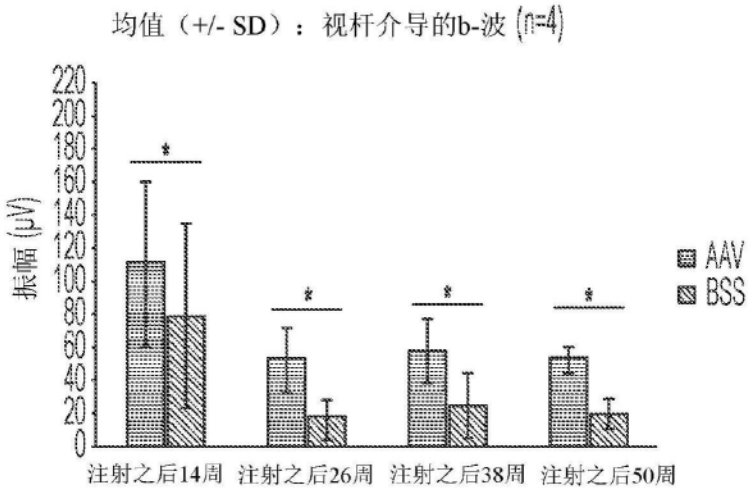
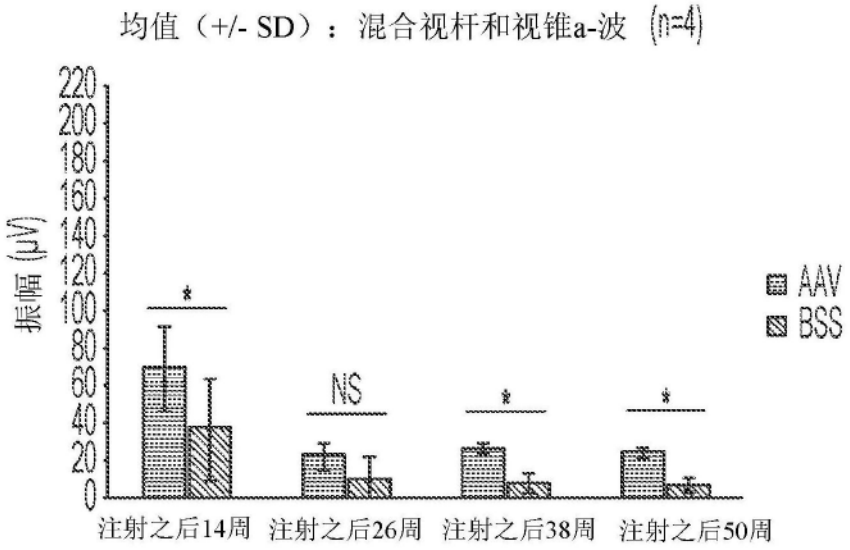

均值（+/- SD）：视杆介导的b-波 (n=4)
振幅 (μV)
AAV
BSS
注射之后14周
注射之后26周
注射之后38周
注射之后50周

图19A


NS: 不显著
* p<0.05
** p<0.001


均值（+/- SD）：混合视杆和视锥a-波 (n=4)
振幅 (μV)
AAV
BSS
NS
注射之后14周
注射之后26周
注射之后38周
注射之后50周

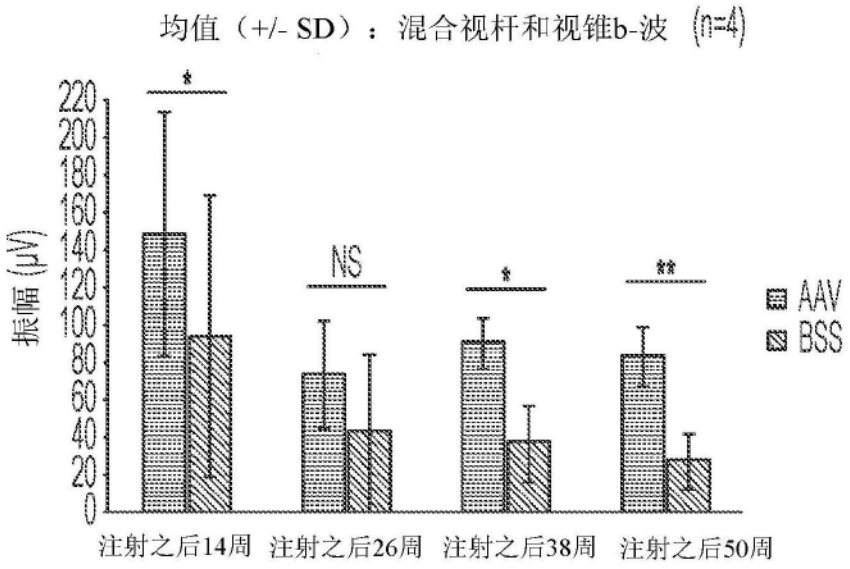

均值（+/- SD）：混合视杆和视锥b-波 (n=4)
振幅 (μV)
AAV
BSS
NS
注射之后14周
注射之后26周
注射之后38周
注射之后50周

图19B

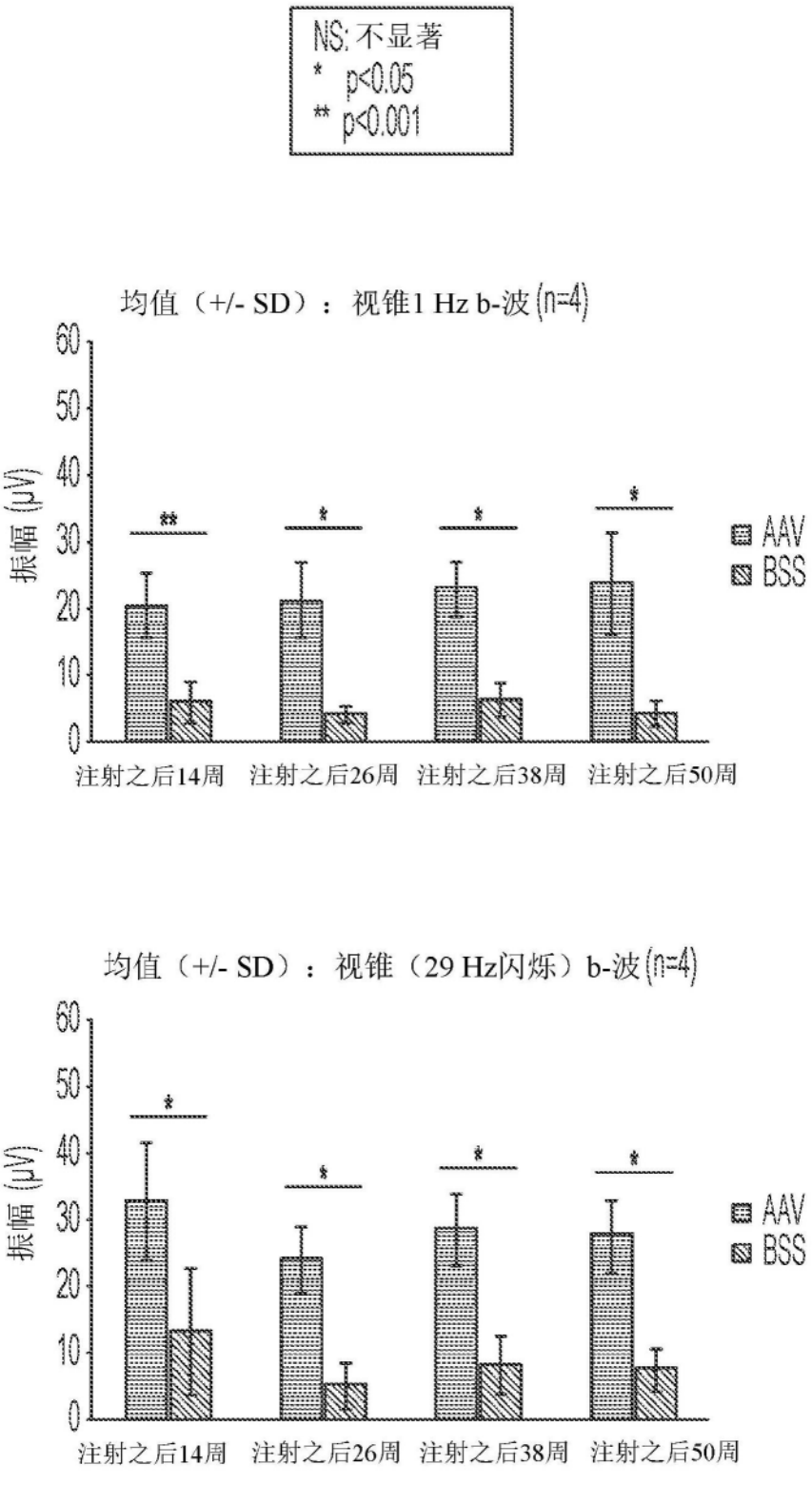

NS: 不显著
* p<0.05
** p<0.001
均值（+/- SD）：视锥1 Hz b-波 (n=4)
振幅 (μV)
60
50
40
30
20
10
0
**
*
*
*
AAV
BSS
注射之后14周
注射之后26周
注射之后38周
注射之后50周
均值（+/- SD）：视锥（29 Hz闪烁）b-波 (n=4)
振幅 (μV)
60
50
40
30
20
10
0
*
*
*
*
AAV
BSS
注射之后14周
注射之后26周
注射之后38周
注射之后50周

图19C

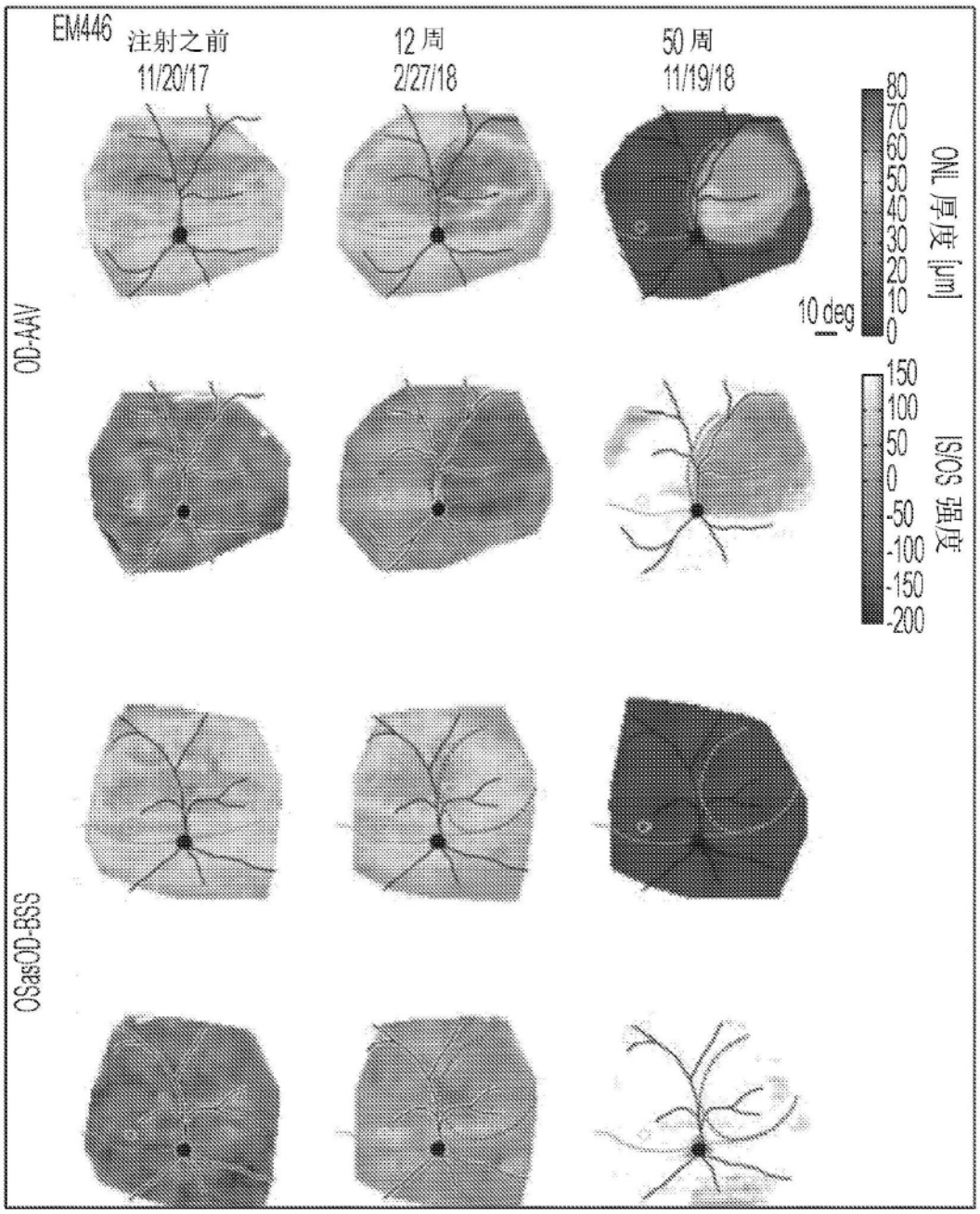

EM446
注射之前
11/20/17
12 周
2/27/18
50 周
11/19/18
ONL 厚度 [μm]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10 deg
OD-AAV
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
IS/OS 强度
OSasOD-BSS

图20A

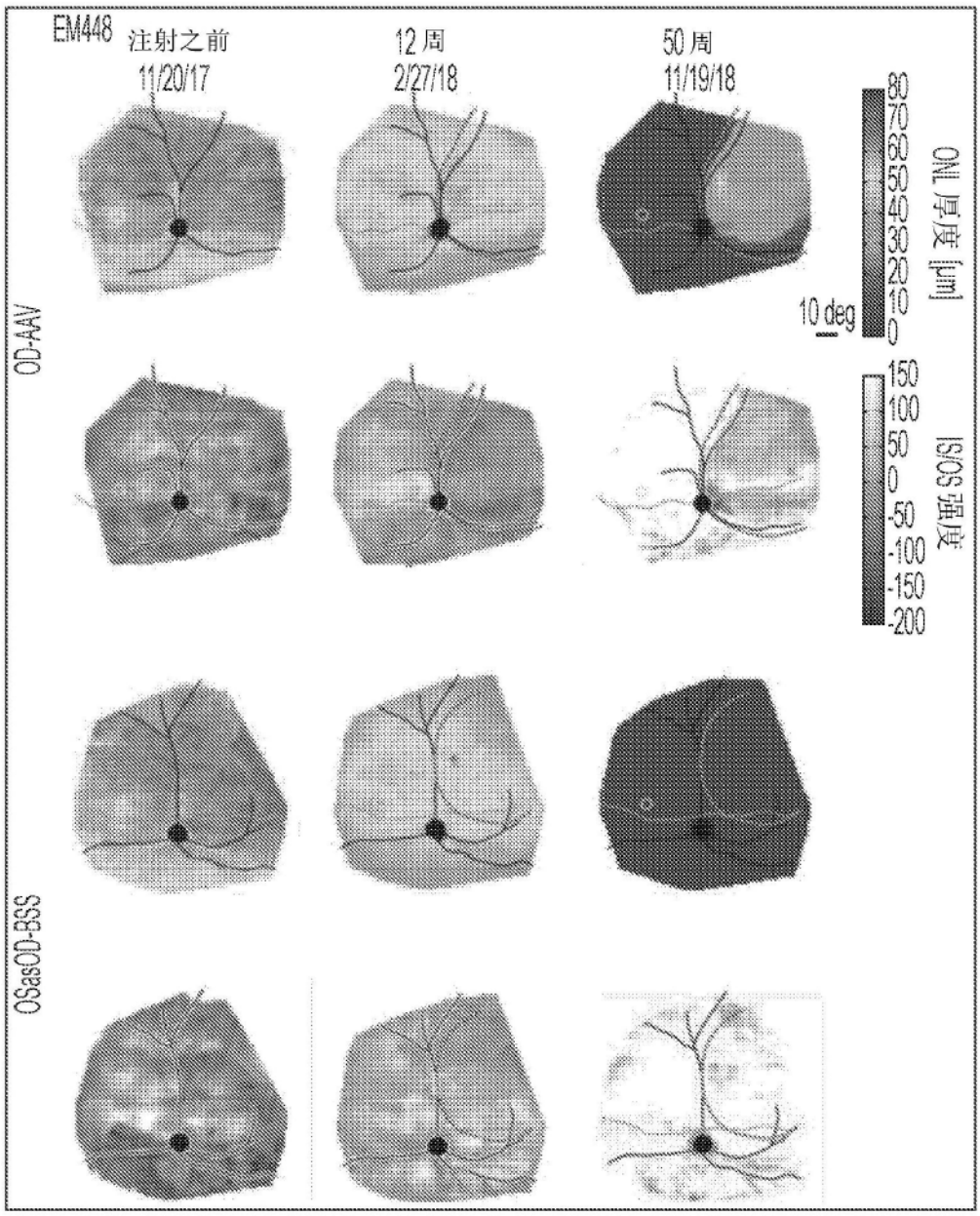

EM448
注射之前
11/20/17
12 周
2/27/18
50 周
11/19/18
ONL 厚度 [μm]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10 deg
IS/OS 强度
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
OD-AAV
OSasOD-BSS

图20B

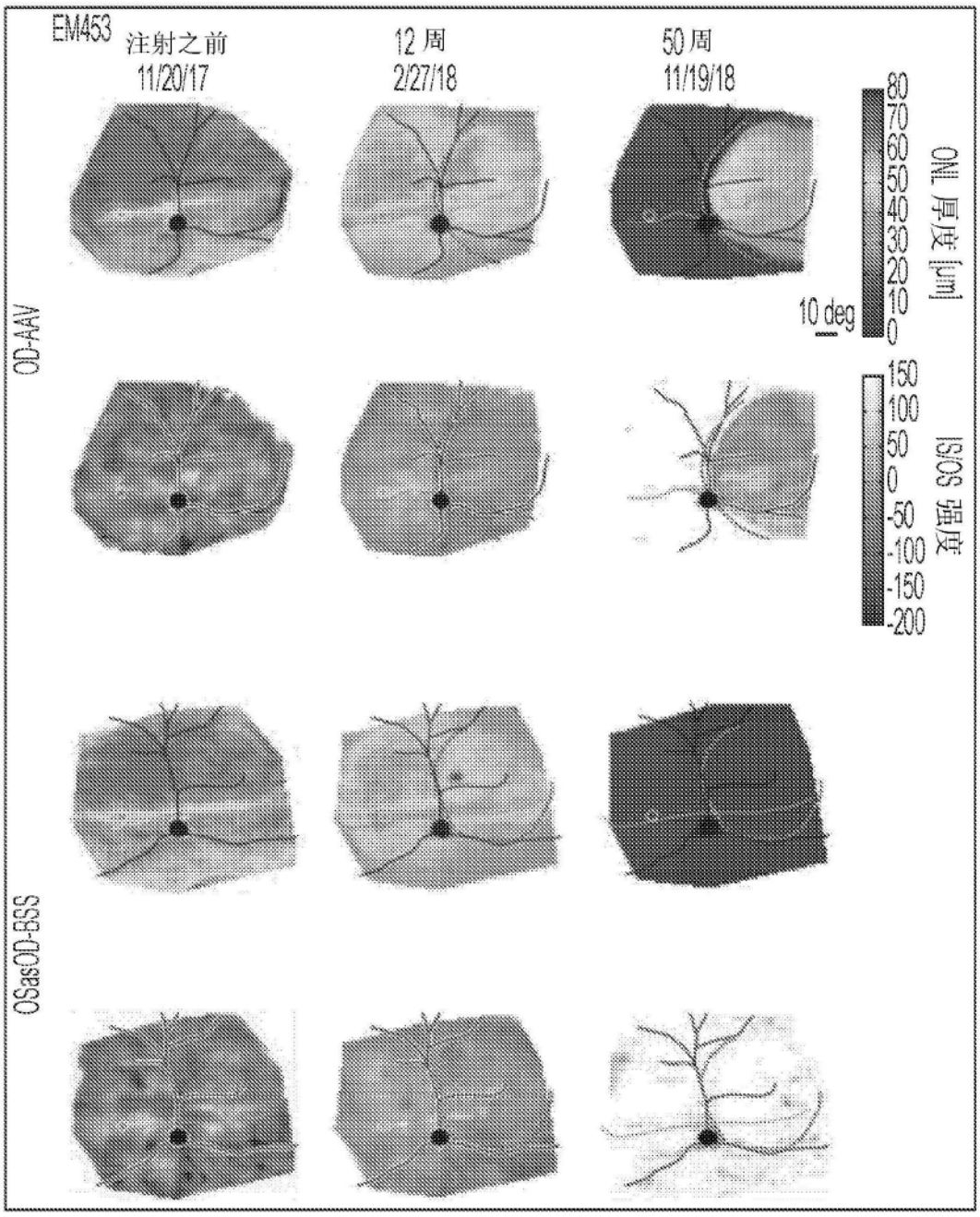

EM453
注射之前
11/20/17
12 周
2/27/18
50 周
11/19/18
ONL 厚度 [μm]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10 deg
IS/OS 强度
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
OD-AAV
OSasOD-BSS

图20C

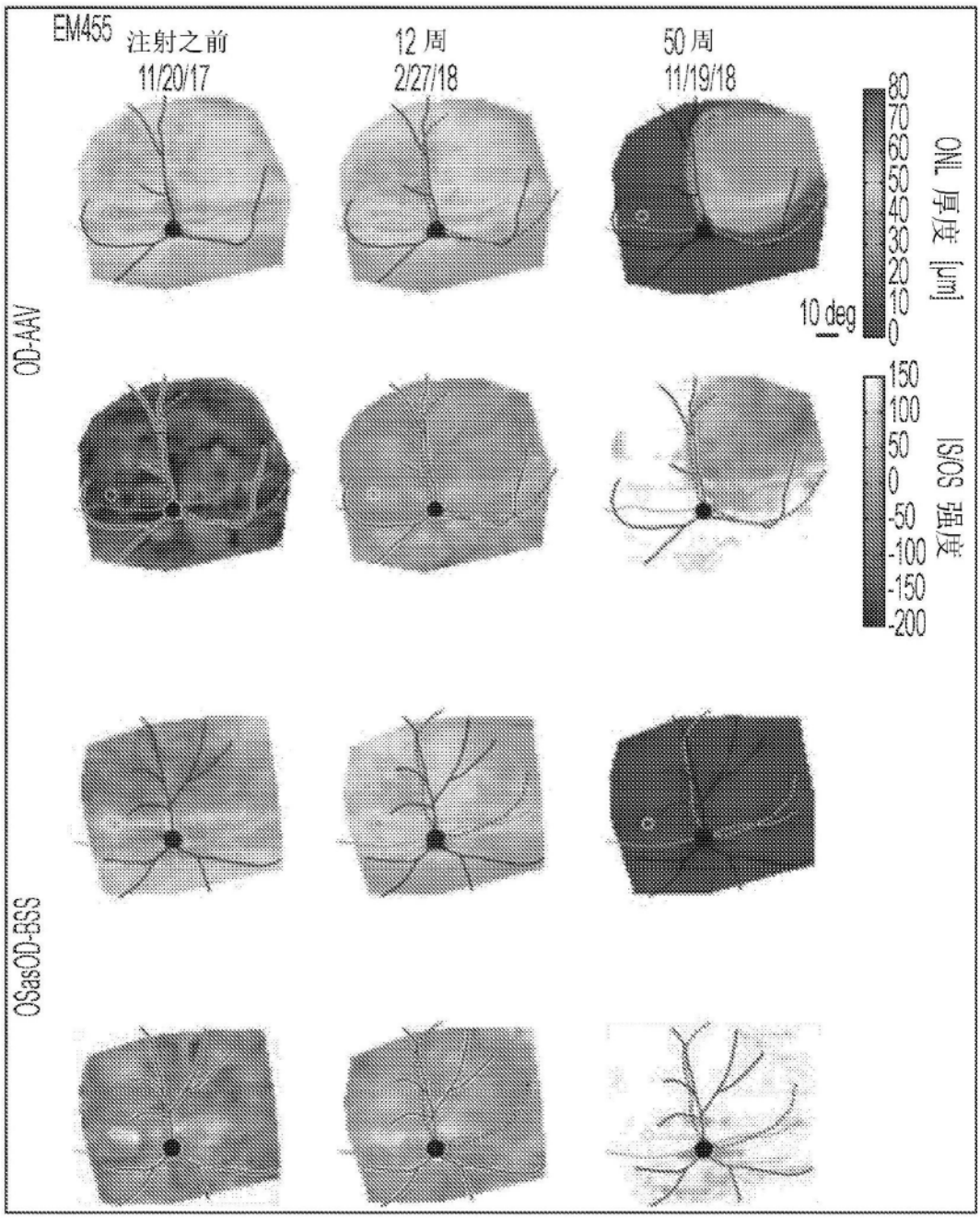

EM455
注射之前
11/20/17
12 周
2/27/18
50 周
11/19/18
ONL 厚度 [μm]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10 deg
IS/OS 强度
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
OD-AAV
OSasOD-BSS

图20D

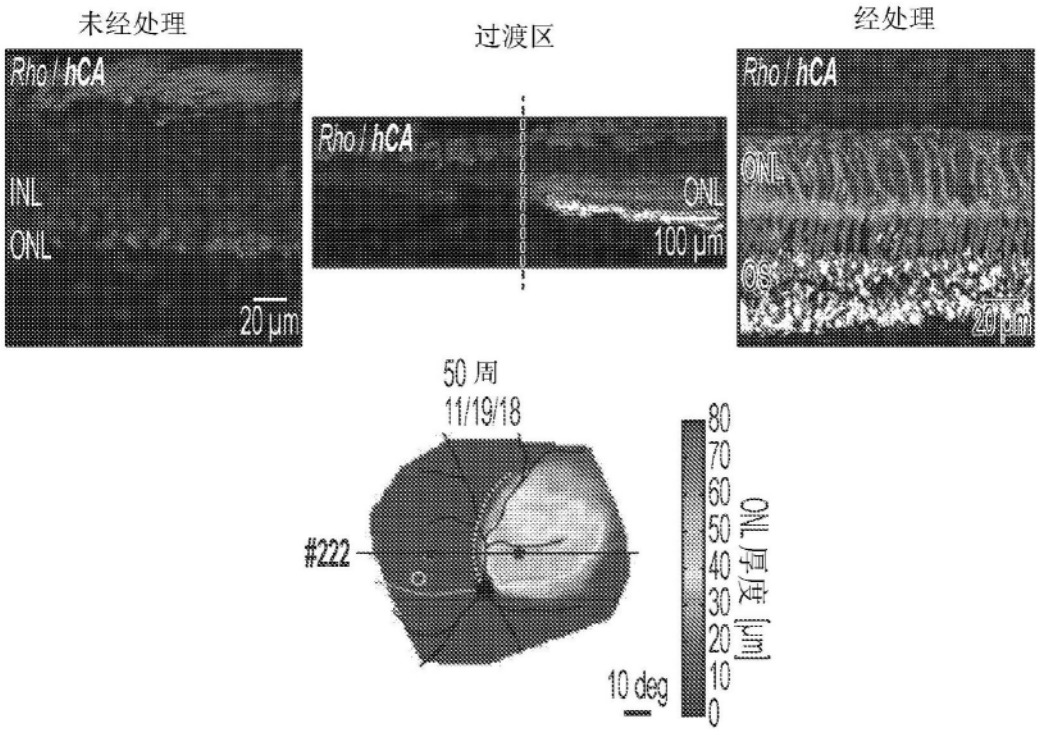

未经处理
过渡区
经处理
Rho / hCA
INL
ONL
20 µm
Rho / hCA
ONL
100 µm
Rho / hCA
ONL
OS
20 µm
50 周
11/19/18
#222
10 deg
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ONL 厚度 [µm]

图21

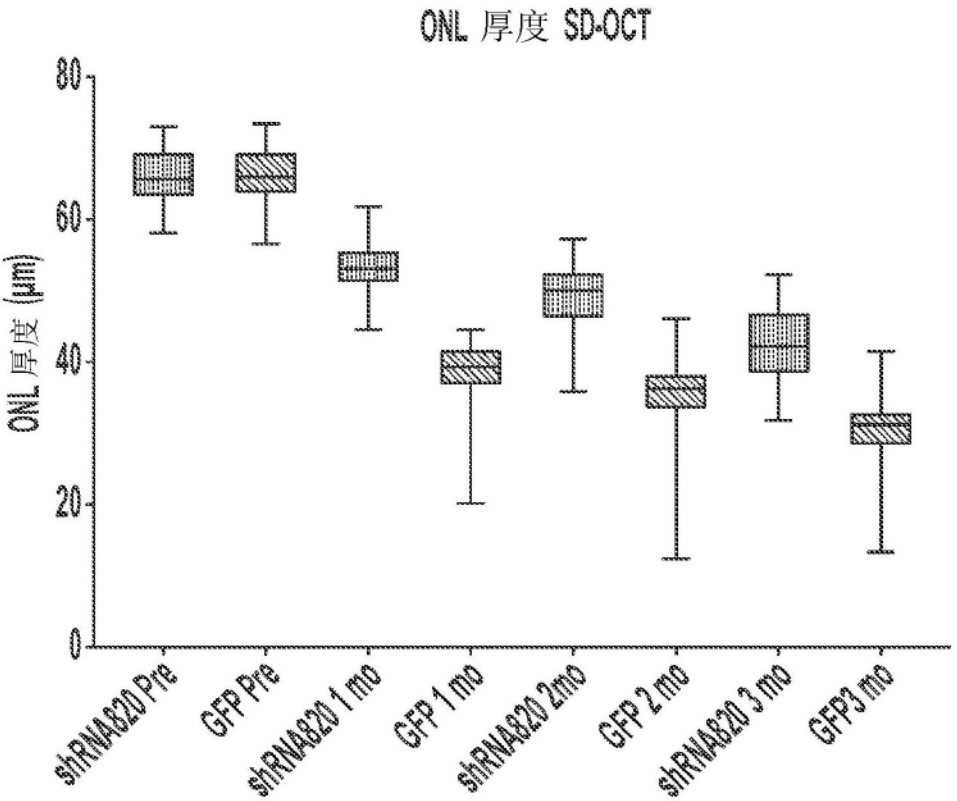

ONL 厚度 SD-OCT
ONL 厚度 (μm)
0
20
40
60
80
shRNA820 Pre
GFP Pre
shRNA820 1 mo
GFP 1 mo
shRNA820 2mo
GFP 2 mo
shRNA820 3 mo
GFP3 mo
处理组

图22

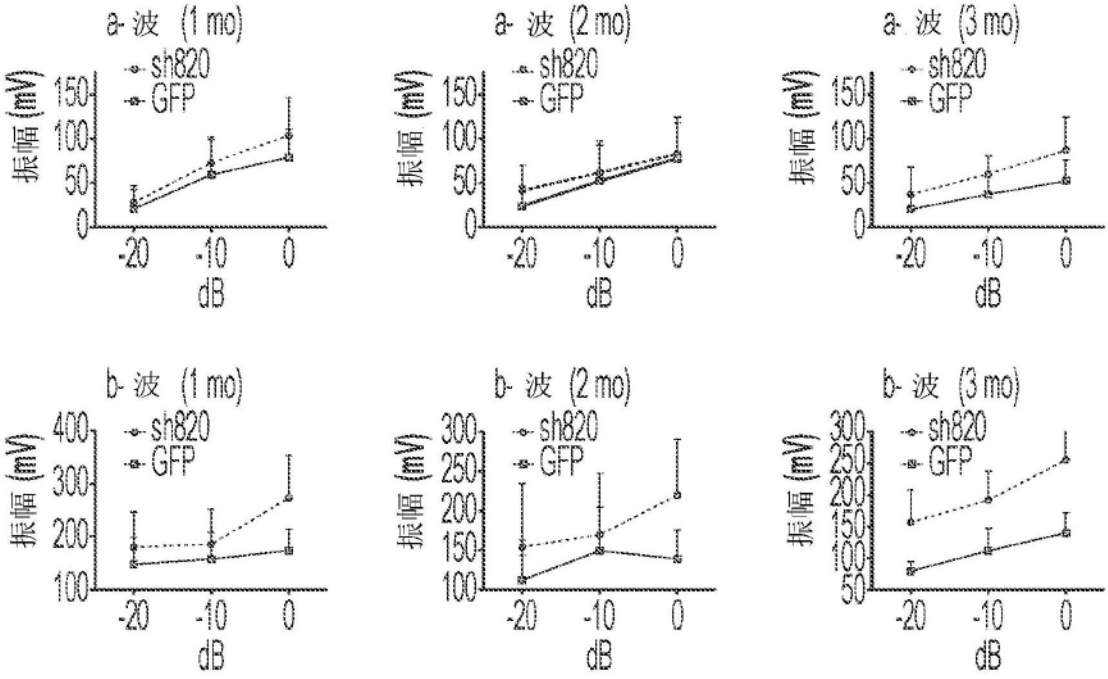

a- 波 (1 mo)
a- 波 (2 mo)
a- 波 (3 mo)
b- 波 (1 mo)
b- 波 (2 mo)
b- 波 (3 mo)
sh820
GFP
振幅 (mV)
dB
-20
-10
0

图23

长度	# 读序	% 读序	序列
• 有义链：			种子匹配
2480	2502 22	68731	29.40% CCGTGGCATTCTACATCTTCAT (SEQ ID NO: 40)
2480	2503 23	28642	12.25% CCCTGGCATTCTACATCTTCATA (SEQ ID NO: 41)
2481	2503 22	79959	34.21% CGCGGCATTCTACATCTTCATT (SEQ ID NO: 42)
• 指导链：			种子序列
2510	2531 21	65312	10.07% TGAAGATGTAGAATGCCACTT (SEQ ID NO: 43)
2510	2532 22	337157	51.97% TGAAGATGTAGAATGCCACTTT (SEQ ID NO: 44)
2510	2533 23	82623	12.74% TGAAGATGTAGAATGCCACTTTA (SEQ ID NO: 45)

图24

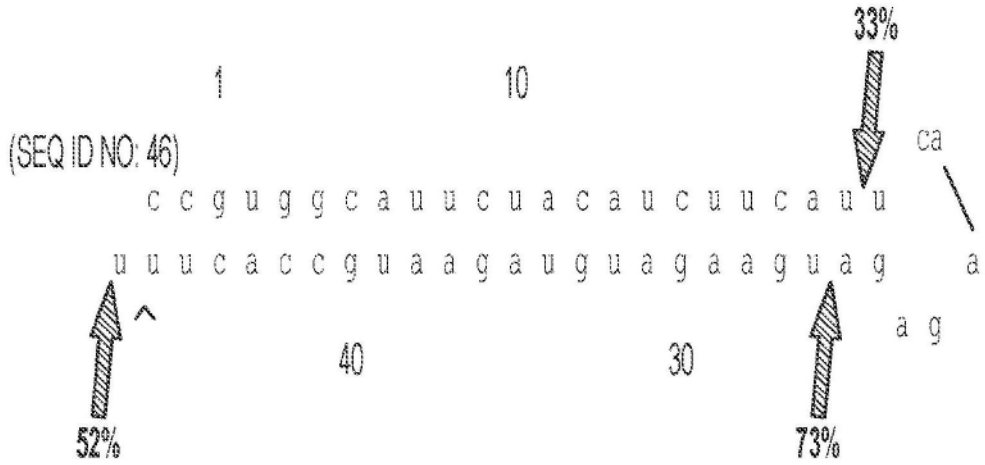


图25