



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112839682 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 02

(21) 申请号 201980067514.X

布里安纳·M·扬

(22) 申请日 2019.08.30

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

(65) 同一申请的已公布的文献号

公司 11227

申请公布号 CN 112839682 A

专利代理师 郑斌 韩晓帆

(43) 申请公布日 2021.05.25

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

A61K 48/00 (2006.01)

62/726,184 2018.08.31 US

G12N 15/11 (2006.01)

62/749,622 2018.10.23 US

G12N 15/00 (2006.01)

62/754,530 2018.11.01 US

G07H 21/04 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2021.04.13

US 2007031844 A1, 2007.02.08

(86) PCT国际申请的申请数据

刘婧姝等. Best卵黄样黄斑营养不良临床特点及BEST1基因突变研究进展.《国际眼科杂志》.2015,第15卷(第4期),第621-624页.

PCT/US2019/049163 2019.08.30

(87) PCT国际申请的公布数据

Richard Pelletier等. RNA based gene therapy for dominantly inherited diseases.《Current Gene Therapy》.2006,第6卷(第1期),第131、136-142页.

W02020/047476 EN 2020.03.05

(73) 专利权人 佛罗里达大学研究基金会有限公司

NCBI.NM\_004183.3.《GenBank》.2017,第1-4页.

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 威廉·W·豪斯维特

审查员 孙洪亮

阿尔弗雷德·S·莱温

权利要求书2页 说明书39页

克里斯蒂安·J·伊尔德方索

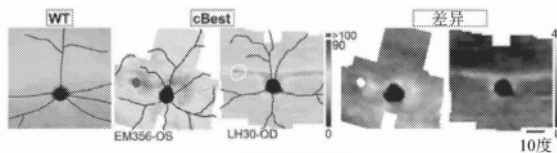
序列表6页 附图23页

(54) 发明名称

用于治疗卵黄状黄斑变性的腺相关病毒载体

(57) 摘要

本公开内容的一些方面涉及可用于治疗卵黄样黄斑营养不良(例如卵黄状黄斑变性)的方法和组合物。



1. 短发夹RNA (shRNA), 其由以下组成:
  - a) 由核苷酸序列CGUCAAGCUUCACAGUGU (SEQ ID NO:2) 组成的有义链和由核苷酸序列ACACUGUGAAGCUUUGACG (SEQ ID NO:3) 组成的反义链; 以及
  - b) 由核苷酸序列UUCAAGAGA (SEQ ID NO:7) 组成的环, 其中所述环位于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3之间。
2. 短发夹RNA (shRNA), 其由核苷酸序列CCGUCAAAGCUUCACAGUGUUUCAAGAGAACACUGUGAAGCUUUGACG (SEQ ID NO:1) 组成。
3. 载体, 其编码权利要求1或2中任一项所述的shRNA。
4. 权利要求3所述的载体, 其还包含重组斑菱蛋白1 (BEST1) 编码序列, 所述重组BEST1编码序列不含有被所述shRNA靶向的序列, 其中所述重组BEST1编码序列包含使所述重组BEST1编码序列对所述shRNA的降解脱靶的脱靶序列, 其中所述脱靶序列是SEQ ID NO:11的核苷酸序列, 其中所述脱靶序列包含一个或多个沉默突变。
5. 载体, 其包含编码所述shRNA序列的SEQ ID NO:20的核苷酸序列。
6. 权利要求5所述的载体, 其中编码所述shRNA的所述核苷酸序列如SEQ ID NO:18所示。
7. 权利要求3所述的载体, 其中所述载体是质粒。
8. 权利要求3所述的载体, 其中所述载体是病毒载体。
9. 权利要求8所述的载体, 其中所述病毒载体是重组腺相关病毒 (rAAV) 载体。
10. 权利要求9所述的载体, 其中所述rAAV载体是自身互补的。
11. 重组腺相关病毒 (rAAV) 颗粒, 其包含权利要求9所述的rAAV载体。
12. 权利要求11所述的rAAV颗粒, 其中所述rAAV颗粒是重组AAV血清型2 (AAV2) 颗粒。
13. 组合物, 其包含权利要求3所述的载体、或者权利要求11或12所述的rAAV颗粒, 以及可药用载体。
14. 权利要求13所述的组合物, 其用于在对象中调节BEST1表达的方法, 所述方法包括向所述对象施用所述组合物。
15. 权利要求13所述的组合物, 其用于方法, 所述方法包括向患有卵黄状黄斑变性的对象施用所述组合物。
16. 权利要求14或15所述的组合物, 其中所述对象是人对象。
17. 权利要求13所述的组合物, 其用于治疗卵黄状黄斑变性。
18. 权利要求13所述的组合物, 其用于制造治疗卵黄状黄斑变性的药物。
19. 权利要求13所述的组合物, 其用于方法, 所述方法包括向患有常染色体隐性卵黄样黄斑营养不良 (ARB) 的对象施用所述组合物。
20. 权利要求19所述的组合物, 其中所述对象是人对象。
21. 权利要求13所述的组合物, 其用于治疗ARB。
22. 权利要求13所述的组合物, 其用于制造治疗ARB的药物。
23. 权利要求13所述的组合物在制造用于在患有卵黄状黄斑变性的对象中调节BEST1表达的药物中的用途。
24. 权利要求13所述的组合物在制造用于治疗卵黄状黄斑变性的药物中的用途。
25. 权利要求13所述的组合物在制造用于在患有ARB的对象中调节BEST1表达的药物中

的用途。

26. 权利要求13所述的组合物在制造用于治疗ARB的药物中的用途。

## 用于治疗卵黄状黄斑变性的腺相关病毒载体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年8月31日提交的美国临时申请No.62/726,184、2018年10月23日提交的美国临时申请No.62/749,622和2018年11月1日提交的美国临时申请No.62/754,530的申请日的权益,其各自的全部内容通过引用并入。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明是在由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的资助No.EY021721的政府支持下完成的。政府在本发明中享有一定的权利。

### 背景技术

[0005] BEST1基因(也称为VMD2)的突变导致数种形式的视网膜变性,包括Best卵黄样黄斑营养不良(Best vitelliform macular dystrophy),也称为卵黄状黄斑变性(Best Disease,其还可被称为Best黄斑营养不良(Best macular dystrophy)、卵黄营养不良(vitelline dystrophy)以及卵黄样黄斑营养不良(vitelliform macular dystrophy))。卵黄样黄斑营养不良(bestrophinopathy)由人BEST1基因的多于200种不同的突变引起,所述人BEST1基因编码作为与视网膜色素上皮的基底外侧膜相关的钙依赖性氯离子通道而发挥功能的蛋白质(斑菱蛋白(bestrophin)或BEST1)。在卵黄样黄斑营养不良中,RPE上的缺陷性流体转运损伤了RPE与光感受器(photoreceptor)细胞之间的相互作用。这种损伤导致视网膜从其支撑层剥离,并在RPE和视网膜下腔内积累氧化的蛋白脂质(脂褐素)。最终,在主要负责中央视觉的黄斑区(macular region)的光感受器失去活性。在人中,BEST1突变通常是常染色体显性的,这意味着一个缺陷型拷贝就导致疾病,而无论从另一亲本遗传的正常(野生型)基因是否存在。然而,还报道了常染色体隐性卵黄样黄斑营养不良(autosomal recessive bestrophinopathy,ARB)。

[0006] 卵黄状黄斑变性作为一种罕见疾病,是通常在儿童时期并且有时在青少年晚期发作的缓慢进展的黄斑营养不良。受影响的个体最初具有正常的视力,随后中央视觉敏锐度下降并且视物变形。个体保持正常的外周视力和暗适应力。个体在黄斑上形成类似于卵黄的团块。该团块最终破裂并在整个黄斑上扩散,导致中央视力下降。卵黄状黄斑变性可基于家族史或眼科检查(例如,眼底表现或眼电图(EOG))进行诊断。

[0007] 遗传性视网膜变性(inherited retinal degeneration,IRD)涵盖了一大组具有分子异质性和病理生理学上不同的致盲病症。遗传缺陷通常主要作用于视杆或视锥光感受器(PR),或二者,并且特定的缺陷可涉及光转导、纤毛输送、形态发生、神经传递或其他。较少见的是涉及视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium,RPE)的原发性缺陷,尽管它们已由于引人注目的临床试验受到越来越多的关注。

[0008] 由原发性RPE缺陷引起的最常见的IRD是由编码与RPE的基底外侧部分相关的跨膜蛋白的BEST1的突变引起的。BEST1(斑菱蛋白)是负责介导跨上皮离子转运、调节胞内钙信号传导和RPE细胞容量以及调节视网膜下腔中的稳态环境的多功能通道蛋白。在真核细胞中,BEST1通过四个跨膜螺旋、胞质的N和C端以及对氯离子渗透的钙依赖性控制敏感连续

中心孔形成稳定的均五聚体。

[0009] 在人中,BEST1突变导致多种广泛的IRD,共同归组为通常涉及特殊黄斑病灶的卵黄样黄斑营养不良。尽管在EOG中存在全视网膜电生理缺陷,但远离病灶的视网膜区域倾向于显示非常正常,这反映了眼的静息电位(standing potential)的异常。犬BEST1基因(canine BEST1,cBEST1)中天然存在的双等位基因突变导致犬IRD与人卵黄样黄斑营养不良的显性和隐性形式二者均具有明显的表型相似性,包括视网膜下病灶对犬的中央凹样区域(fovea-like area)的明显偏好。

[0010] 正确的解剖并置以及RPE顶端微绒毛(microvilli,MV)与PR外段(outer segment,OS)之间的持续相互作用被认为对正常视力是至关重要的。视网膜下腔的离子组成和容量调节二者对于维持该复合体的精确分子接近性和RPE-PR界面的稳态是必不可少的。长期以来体外和离体研究表明,遗传突变、代谢扰动以及光刺激改变了视网膜下腔的离子组成和RPE和/或PR的生理响应。最近,处于健康和患病中的外视网膜的显微解剖及其对光的响应的体内研究随着现代视网膜成像模式已变得越来越信息化。

[0011] 由于相邻视网膜色素上皮(RPE)细胞的原发性通道病,BEST1基因的突变导致视网膜剥离和光感受器(PR)细胞变性。视网膜剥离形成之前RPE和PR细胞之间相互作用的病理生理学仍未被充分理解。

## 发明内容

[0012] 本公开内容的一些方面涉及用于在对象中(例如,在人中)治疗卵黄样黄斑营养不良(例如,Best卵黄样黄斑营养不良)的组合物。设计本公开内容的一些方面以抑制内源性BEST1 mRNA(例如,突变和正常拷贝二者)的表达。在一些实施方案中,使用RNA干扰抑制表达。在一些实施方案中,内源性BEST1 mRNA同时被正常BEST1 mRNA替代以仅产生正常蛋白质。在一些实施方案中,使用腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)来递送BEST1基因的无内含子拷贝加上小发夹RNA(shRNA)基因,这导致产生小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA)。

[0013] 在一些实施方案中,通过向对象(例如,向患有卵黄状黄斑变性的对象,例如向患有卵黄状黄斑变性的人)施用短发夹RNA(short hairpin RNA,shRNA)分子来使对象(例如,人)的BEST1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BEST1编码序列以提供功能性斑蛋白的蛋白质,例如以恢复对象的光感受器功能。在一些实施方案中,替代BEST1编码序列相对于一个或多个内源性基因等位基因具有一个或多个核苷酸替换,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BEST1编码序列是人BEST1编码序列(例如,野生型人BEST1编码序列),其包含一个或多个(例如,1、2、3、4、5或多个)替换以使基因对shRNA介导的降解具有抗性。在一些实施方案中,替代BEST1编码序列在靶位点中包含一个或多个沉默突变(密码子第三位置的碱基改变)以使基因对shRNA介导的降解“脱靶”。

[0014] 在一些方面中,本公开内容提供了短发夹RNA(shRNA),其包含含有核苷酸序列CGUCAAGCUUCACAGUGU(SEQ ID NO:2)的有义链、含有核苷酸序列ACACUGUGAAGCUUUGACG(SEQ ID NO:3)的反义链以及环。在一些实施方案中,所述环包含核苷酸序列UUCAAGAGA(SEQ ID NO:7)。

[0015] 在一些方面中,本公开内容提供了短发夹RNA (shRNA),其包含含有核苷酸序列 G C U G C U A U A U G G C G A G U U C U U (SEQ ID NO:6) 的有义链、包含核苷酸序列 A A G A A C U C G C C A U A U A G C A G C (SEQ ID NO:5) 的反义链以及环。在一些实施方案中,所述环包含核苷酸序列 C U C G A G (SEQ ID NO:8)。

[0016] 在一些实施方案中,本公开内容提供了短发夹RNA (shRNA),其包含含有核苷酸序列 A C A C U G U G A A G C U U U G A C G (SEQ ID NO:3) 的反义链。

[0017] 在一些方面中,本公开内容提供了载体,其包含编码前述段落中描述的shRNA的遗传序列。

[0018] 在一些方面中,本公开内容提供了还包含重组功能性(例如,野生型)BEST1编码序列的载体,所述BEST1编码序列不包含被shRNA靶向的序列。在一些方面中,载体还包含对于在人细胞中的表达进行了密码子优化的重组功能性BEST1编码序列。

[0019] 在一些方面中,本公开内容提供了包含重组BEST1编码序列的载体,所述重组BEST1编码序列包含与SEQ ID NO:9的核苷酸序列具有至少90%同一性的核苷酸序列。在一些方面中,本公开内容提供了包含重组BEST1编码序列的载体,所述BEST1编码序列包含与SEQ ID NO:10的核苷酸序列具有至少90%同一性的核苷酸序列。

[0020] 在一些方面中,本公开内容提供了载体,其是质粒或病毒载体。在一些方面中,病毒载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。在一些方面中,rAAV载体是自身互补的。

[0021] 在一些方面中,本公开内容提供了rAAV病毒颗粒,其是AAV血清型2病毒颗粒。

[0022] 在一些方面中,本公开内容提供了包含载体或rAAV颗粒和可药用载体的组合物。

[0023] 在一些方面中,本公开内容提供了在对象中调节BEST1表达的方法,所述方法包括向对象(例如人对象)施用包含载体或rAAV颗粒和可药用载体的组合物。在一些方面中,本公开内容提供了在对象中治疗卵黄样黄斑营养不良(例如,卵黄状黄斑变性和ARB)的方法,所述方法包括施用组合物。

[0024] 在一些实施方案中,提供了编码功能性BEST1序列的载体以补充或校正(例如,至少部分地补充或校正)细胞BEST1功能,而不敲低内源性BEST1基因表达。在一些实施方案中,BEST1序列是经密码子优化的。

[0025] 在一些实施方案中,提供了编码功能性BEST1序列的载体以补充或校正(例如,至少部分地补充或校正)细胞BEST1功能,并且提供了shRNA序列以敲低内源性BEST1基因表达。在一些实施方案中,使用shRNA敲低内源性Best1表达。在一些实施方案中,BEST1序列是经密码子优化的。在一些实施方案中,对BEST1序列进行修饰以对shRNA具有抗性。在一些实施方案中,BEST1和shRNA序列被编码在同一AAV载体上。

[0026] 在一些方面中,本公开内容提供了用于治疗卵黄状黄斑变性的组合物和用于制造治疗卵黄状黄斑变性的药物的组合物。在一些方面中,本公开内容提供了用于治疗ARB的包含载体或rAAV颗粒的组合物(其中所述载体编码功能性BEST1序列)以及用于制造治疗ARB的药物的组合物。

[0027] 在以下附图、实施例和所附权利要求书中描述了这些和其他方面。

## 附图说明

[0028] 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,其可通过参考这些附图中的一个或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。

[0029] 图1A至1D示出了与犬中BEST1突变相关的RPE顶端微绒毛投影的全视网膜病理学。图1A和1B示出了举例说明与野生型(图1A)(42周)相比cBest(R25\*/R25\*;89周)(图1B)的分子病理学的共聚焦图像。视网膜冷冻切片用抗EZRIN和人视锥拘留蛋白进行免疫标记,并与花生凝集素植物凝集素和DAPI标记组合。图1C示出了用抗BEST1和抗SLC16A1免疫标记的6周龄犬野生型和cBest突变体(R25\*/P463fs)视网膜的代表性显微照片。白色箭头指向视锥-MV的亚群。图1D示出了在cBest突变体和年龄匹配的对照眼之间在视网膜上的视锥-MV数目的定量。y轴代表对于所检查的每种颜色编码的视网膜区域的平均视锥-MV数目/平方毫米。缩写:H&E,苏木精&伊红染色;PRL,光感受器IS/OS层;i,下;N,鼻侧;S,上;T,颞侧。

[0030] 图2A至2F示出了在野生型和cBest(R25\*/P463fs)突变体中光介导的外视网膜结构的变化。图2A示出了在15周龄正常(WT)狗和在更少和更多光适应(light adaptation, LA)情况下的11周龄cBest(R25\*/P463fs)中沿水平子午线穿过中心区域中央(中央凹样区域)的横截面成像。细的白色箭头指示OCT的上颞位置。图2B示出了与在更少和更多LA情况下的cBest经处理的狗(6只眼,11周龄)相比,WT狗(12只眼,15至17周龄)中自中央凹样区域(T,颞侧视网膜)和视神经头的鼻侧边缘(N,鼻侧视网膜)在鼻侧3°处的纵向反射率谱(longitudinal reflectivity profile,LRP)(平均85个单LRP)。箭头指示IS/OS和RPE/T峰;单箭头和双箭头标记cBest中的另外的低反射层。图2C示出了在WT和两种LA条件下的cBest眼中IS/OS与RPE/T峰之间的距离。带有误差棒的符号表示每组眼在两个位置处的平均距离( $\pm 2SD$ )。图2D是对暗适应和光适应方案的示意性描述。使动物暗适应(D/A)过夜并进行OCT成像。然后,使用五个提高的光暴露(L1至L5)。图2D还示出了在过夜暗适应之后(左)和最大光暴露之后(右)在具有重叠LRP的cBest中的OCT扫描的放大视图。图2E示出了在cBest眼( $n=3$ ;彩色迹线)的不同亚群中使用仅涉及L4和L5暴露的简化方案的结果。图2F示出了与两只代表性的cBest眼相比,平均WT中的IS/OS至RPE/T的距离的空间地形图[组;EM356-OS:297周龄cmr1/cmr3(R25\*/P463fs);LH30-OD:12周龄cmr3(P463fs/P463fs)]。

[0031] 图3A至3D示出了在cBest突变体中BEST1基因增强治疗导致中央凹黄斑病灶的持续逆转和RPE-PR界面结构的恢复。图3A示出了在三个时间点在cBest狗(EM356-OD;R25\*/P463fs)的右眼中通过体内成像记录的中央视网膜下剥离的自然史。插图示出了自发荧光和OCT图像。图3B示出了在图3A中所示的眼中进行视网膜下注射AAV2-cBEST1( $1.5 \times 10^{10}$ vg/mL)之前(52周龄时)和之后拍摄的眼底图像。视网膜下泡区域由虚线圆圈表示。注射之后第43和245周获取的图像记录了中央病灶的持续逆转和处理区域内完全重新附着的视网膜。中间和右侧插图示出了自发荧光和OCT图像。图3C和3D示出了与对照相比,在cBest(R25\*/R25\*)模型中AAV-hBEST1处理之后RPE-光感受器界面结构的恢复。泡边界由虚线圆圈标记;在注射之前刺穿视网膜下病灶或穿过注射后映射的匹配位置的相应OCT扫描的位置由水平线标记;视网膜切开术位点由箭头指示。

[0032] 图4A至4F示出了在视网膜下注射BSS或AAV-hBEST1的cBest突变体狗[cmr1(R25\*/R25\*)、cmr1/cmr3(R25\*/P463fs)或cmr3(P463fs/P463fs)]中进行视网膜下基因治疗之后视网膜区域上微剥离的逆转。图4A示出了视网膜下注射BSS或AAV-hBEST1的cBest突变体狗[cmr1(R25\*/R25\*)、cmr1/cmr3(R25\*/P463fs)或cmr3(P463fs/P463fs)]中IS/OS-RPE/T距

离地形图的图。处理边界基于注射时所拍摄的泡的眼底照片(虚线)并且如果可见的话则基于成像时明显的分界(虚线)。所有眼均作为等效的右眼显示,其具有视神经和大血管(黑色)、反光色素层边界(白色)和中央凹样区域(白色椭圆)重叠以易于比较。图4B示出了在经处理的泡(Tx;实心符号)和未经处理的外部泡(对照;空心符号)区域内在cBest眼中的上和下视网膜位置处与WT的IS/OS-RPE/T距离差。虚线界定了正常变异性的第95个百分位。在处理之前(左)和处理之后(右)显示IS/OS-RPE/T距离的地形图。图4C和4E描绘了每只cBest眼和平均WT对照之间的差异的灰度图。白色代表严重的视网膜剥离。图4D和4F分别示出了针对图4C和4E中所示的眼对WT与cBest处理之前(PreTx)和处理之后(Tx)之间的IS/OS-RPE/T距离的共定位差的测量值。

[0033] 图5A至5G示出了在患有ARB的两名人对象中的视网膜定位表型。图5A示出了在利用天然RPE荧光团脂褐素用短波长降低照度自发荧光成像(short-wavelength reduced-illuminance autofluorescence imaging, SW-RAFI)进行成像的两名ARB患者P1和P2的整个视网膜上的RPE健康。白色箭头示出周边轮廓和OCT扫描的位置;矩形示出了在其他图中显示的目的区域;且黑色箭头界定了鼻侧中间外周视网膜中的疾病向健康过渡。图5B示出了在整个水平子午线上测量的暗适应眼中的视杆(上)和光适应眼中的视锥(下)的周边光灵敏度。灰色区域代表除对应于视神经(OH)的生理盲点之外的正常灵敏度。图5C示出了沿水平子午线横穿中央凹用OCT的视网膜横截面。图5D和5E示出了与正常患者相比在瞳孔旁(parapapillary)视网膜(图5D)和中间外周鼻侧视网膜(图5E)的两个目的区域处患者中的外视网膜层压的细节。颜色指示邻近COS尖端的界面和邻近ROS尖端以及RPE顶端突起的界面,并且砖形物指示邻近RPE和Bruch膜的界面。图5F和5G示出了在P1中在瞳孔旁部位处(图5F)和在P2中在鼻侧中间外周部位处(图5G)测量的暗适应动力学。时间为0是指适应光结束。

[0034] 图6A至6D示出了在CNGB3相关的全色盲(ACHM3)犬模型中的RPE-PR交错结合区。图6A和6B示出了6周龄CNGB3-D262N-突变体(图6A)和CNGB3-空(图6B; CNGB3<sup>-/-</sup>)视网膜的代表性荧光显微术图像,表明BEST1的正常表达受RPE细胞的基底外侧质膜和SLC16A1(标记RPE顶端突起的标志物)的限制。箭头指向视锥相关的RPE顶端微绒毛(c-MV)的亚群。图6A和6B还示出了抗CNGB3和抗EZRIN共标记,其中示出了年龄匹配的野生型视网膜用于参考。图6C和6D示出了对来自85周龄(图6C)和57周龄(图6D)受影响的狗的CNGB3突变体视网膜中的RPE-PR界面的免疫组织化学评价。RPE顶端面及其微绒毛延伸用EZRIN免疫标记,并且c-MV的亚群由箭头表示。缩写:ACHM3, 3型全色盲; cCNGB3, 犬CNGB3基因; c-MV, 视锥相关的RPE顶端微绒毛; CNGB3, 环状核苷酸门控通道 $\beta$ 3蛋白; hCAR, 人视锥拘留蛋白; SLC16A1, 溶质载体家族16成员1。

[0035] 图7示出了光介导的微剥离的恢复。使两只cBest受影响(R25\*/P463fs)的眼[43(右)和52(左)周龄]暗适应过夜,并与图2A中所示的结果类似进行成像。

[0036] 图8A至8B示出了在cBest眼中在具有微剥离的视网膜区域处的超厚ONL以及其在基因治疗下的校正。图8A示出了未注射的cBest眼(在图2A至2F和图4A至4F中作为IS/OS-RPE/T厚度图显示)表现出对应于视网膜微剥离的大区域的超厚ONL,以及在严重病灶之上和邻近中央凹样区域的ONL的局部变薄。图8B示出了经处理的cBest眼(在图4A至4F中作为IS/OS-RPE/T厚度图显示)在未处理区域内被超厚、正常或变薄的ONL包围的经

AAV处理区域中表现出正常的ONL厚度。OD,右眼;OS,左眼。

[0037] 图9A至9F示出了在cBest受影响的(R25\*/P463fs)狗(EM356-OS)中局灶性黄斑病灶的演变。图9A示出了光感受器层与下面RPE的离散分离进展为面向明显形成较大的视网膜下宏观剥离(卵黄样病灶),并且图9B示出了在23周龄时的对应OCT扫描。图9C示出了在8周之后观察到视网膜下病灶内积累超自发荧光物质的最初迹象(31周;早期假性积液病灶)。图9D示出了在66周龄时,记录了典型的假性积液外观,随后是在172周龄和297周龄时的卵黄破裂样病灶以及自发荧光物质的分散(插图,特写)。图9E和9F示出了ONL的显著变薄通过OCT扫描变得明显。深色线界定了对应SD-OCT扫描的位置。

[0038] 图10示出了在三种cBest模型[cmr1(R25\*/R25\*)、cmr1/cmr3(R25\*/P463fs)和cmr3(P463fs/P463fs)]中与野生型对照和cBest未经处理的眼相比,AAV-hBEST1处理之后的视网膜保护。

[0039] 图11A至11D示出了在cBest(R25\*/P463fs)视网膜中BEST1转基因表达对RPE细胞骨架挽救的剂量-响应作用。图11A示出了从手术泡区域(左),穿过相邻的半影区域(中间),并朝着注射区域之外的连续范围(右)的横截面概观。图11B示出了RPE顶端投影在具有增强BEST1的经处理区域内的显著延伸;图11C示出了在与BEST1的斑状分布(单个RPE细胞内的微弱信号)和RPE-PR微剥离相关的泡半影中存在残留的微绒毛和视杆-MV;图11D示出了在处理区域之外,在不存在BEST1表达和RPE顶端突起二者的情况下视网膜下病灶的形成。

[0040] 图12A至12B示出了视杆和视锥功能ARB患者P1(图12A)和P2(图12B)的眼间对称性。两名患有ARB的患者的两只眼的视杆灵敏度丧失(RSL)和视锥灵敏度丧失(cone sensitivity loss,CSL)图。

[0041] 图13示出了6262bp质粒pTR-VMD2-hBest人斑菱蛋白的图。

[0042] 图14示出了6222bp质粒pTR-VMD2-cBest犬斑菱蛋白的图。

[0043] 图15示出了6209bp质粒pTR-SB-VMD2-HBest1-shRNA05的图,所述质粒包含抗性Best1。

[0044] 图16示出了6145bp质粒pTR-SB-VMD2-DTBest1-shRNA744的图,所述质粒包含脱靶的Best1。

[0045] 图17示出了VMD2启动子在细胞培养物中运作良好。使用鸡 $\beta$ 肌动蛋白(Chicken beta actin,CBA)启动子或VMD2启动子,用表达GFP或Best1的质粒转染HEK293T细胞。在聚丙烯酰胺凝胶上分离蛋白裂解物,并通过Western印迹检测斑菱蛋白(Best1)的表达并针对 $\beta$ -微管蛋白的表达进行归一化以显示均匀的凝胶上样量。

[0046] 图18A至18B示出了Best1特异性siRNA是功能性的。Western印迹(图18A)中显示并以柱状图量化的条带强度(图18B)表明,稳定表达BEST1的HEK293T的转染导致斑菱蛋白(Best1)蛋白降低了75%。

[0047] 图19A至19B示出了Best1 shRNA是有活性的:HEK293T-BEST1细胞用4 $\mu$ g指定质粒转染。

[0048] 图20示出了Best1的脱靶。沉默突变(密码子第三位置的碱基改变)被用于从Best1 mRNA去除siRNA靶位点。所公开的实施例是针对shRNA744的。SEQ ID NO:15至17对应于从顶部到底部的序列:野生型BEST1靶位点;(互补序列)shRNA744靶位点和脱靶的DTBEST1 siRNA靶位点。

## 具体实施方式

[0049] 本申请的一些方面提供了可用于在对象中(例如,在患有卵黄状黄斑变性的人对象中)治疗卵黄状黄斑变性的方法和组合物。

[0050] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于将功能性斑萎蛋白蛋白质递送至具有一个或多个突变BEST1基因的对象的方法和组合物。在一些实施方案中,在病毒载体(例如,rAAV载体)中提供重组BEST1基因(例如,编码序列,例如cDNA或开放阅读框)。在一些实施方案中,内源性BEST1基因的一个或多个等位基因的表达也被敲低。例如,在一些实施方案中,siRNA(例如,shRNA)与重组BEST1基因一起递送至对象。在一些实施方案中,病毒载体(例如,rAAV载体)编码重组BEST1基因和靶向内源性BEST1基因的一种或更多种siRNA二者。在一些实施方案中,重组BEST1基因被修饰以包含一个或多个核苷酸替换,使其对一种或更多种siRNA的靶向具有抗性。在一些实施方案中,重组BEST1基因是经密码子优化的(例如,用于在对象中(例如在人对象中)表达)。

[0051] 在一些实施方案中,本公开内容提供了短发夹RNA(shRNA),其包含含有核苷酸序列CGUCAAGCUUCACAGUGU(SEQ ID NO:2)的有义链、含有核苷酸序列ACACUGUGAAGCUUUGACG(SEQ ID NO:3)的反义链,以及环。在一些实施方案中,所述环包含核苷酸序列UUCAAGAGA(SEQ ID NO:7)。

[0052] 在另一些实施方案中,本公开内容提供了短发夹RNA(shRNA),其包含含有核苷酸序列GCUGCUAUAUGGCGAGUUCUU(SEQ ID NO:6)的有义链、含有核苷酸序列AAGAACUCGCCAUUAGCAGC(SEQ ID NO:5)的反义链,以及环。在一些实施方案中,所述环包含核苷酸序列CUCGAG(SEQ ID NO:8)。

[0053] 在一些实施方案中,本公开内容提供了短发夹RNA(shRNA),其包含含有核苷酸序列ACACUGUGAAGCUUUGACG(SEQ ID NO:3)的反义链。

[0054] 在一些实施方案中,可使用载体将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,载体是双链的或自身互补的AAV载体。在一些实施方案中,编码shRNA的载体序列包含BEST1序列。

[0055] 因此,在一些实施方案中,shRNA可由具有CCGTCAAAGCTTCACAGTGTTTCAAGAGAACAC TGTGAAGCTTTGACG(SEQ ID NO:18)序列的核酸编码在DNA载体(例如,病毒载体)上,其中环序列带下划线。在一些实施方案中,不同的环序列替换了SEQ ID NO:7中所示的环序列。

[0056] 另外,在一些实施方案中,shRNA可由具有GCTGCTATATGGCGAGTCTCTCGAGAAGAAC TCGCCATATAGCAGC(SEQ ID NO:19)序列的核酸编码在DNA载体(例如,病毒载体)上,其中环序列带下划线。在一些实施方案中,不同的环序列替换了SEQ ID NO:8中所示的环序列。

[0057] 在一些实施方案中,相同的载体包含编码正常(例如,野生型)Best1蛋白但对由该载体表达的shRNA的作用具有抗性的编码序列。

[0058] 在一些实施方案中,BEST1编码序列包含与SEQ ID NO:9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。

[0059] 在一些实施方案中,BEST1编码序列包含与SEQ ID NO:10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。在一些实施方案中,BEST1编码序列包含与SEQ ID NO:11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。

[0060] 在一些实施方案中,BEST1编码序列包含与SEQ ID NO:15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。

[0061] 1757-bp野生型BEST1序列定义如下(SEQ ID NO:9):

```

ATGACCATCACTTACACAAGCCAAGTGGCTAATGCCCCGCTTAGGCTCCTTCTCCC
GCCTGCTGCTGTGCTGGCGGGGCAGCATCTACAAGCTGCTATATGGCGAGTTCTT
AATCTTCCTGCTCTGCTACTACATCATCCGCTTTATTTATAGGCTGGCCCTCACGG
AAGAACAACAGCTGATGTTTGAGAAACTGACTCTGTATTGCGACAGNTACATCC
AGCTCATCCCCATTTCTTCGTGCTGGGCTTCTACGTGACGCTGGTCGTGACCCCG
TGGTGGAACCAGTACGAGAACCTGCCGTGGCCCGACCGCCTCATGAGCCTGGTG
TCGGGCTTCGTCTGAAGGCAAGGACGAGCAAGGCCGGCTGCTGCGGCGCACGCTC
ATCCGCTACGCCAACCTGGGCAACGTGCTCATCCTGCGCAGCGTCAGCACCGCA
GTCTACAAGCGCTTCCCCAGCGCCAGCACCTGGTGCAAGCAGGCTTTATGACTC
CGGCAGAACACAAGCAGTTGGAGAACTGAGCCTACCACACAACATGTTCTGGG
TGCCCTGGGTGTGGTTTGCCAACCTGTCAATGAAGGCGTGGCTTGGAGGTCTGAAT
CCGGGACCCTATCCTGCTCCAGAGCCTGCTGAACGAGATGAACACCTTGCGTACT
CAGTGTGGACACCTGTATGCCTACGACTGGATTAGTATCCCACTGGTGTATACAC
AGGTGGTGACTGTGGCGGTGTACAGCTTCTTCTGACTTGTCTAGTTGGGCGGCA
GTTTCTGAACCCAGCCAAGGCCTACCCTGGCCATGAGCTGGACCTCGTTGTGCC
GTCTTACGTTTCTGCAGTTCTTCTTCTATGTTGGCTGGCTGAAGGTGGCAGAGCA
GCTCATCAACCCCTTTGGAGAGGATGATGATGATTTTGAGACCAACTGGATTGTC
[0062] GACAGGAATTTGCAGGTGTCCCTGTTGGCTGTGGATGAGATGCACCAGGACCTGC
CTCGGATGGAGCCGGACATGTACTGGAATAAGCCCGAGCCACAGCCCCCTACA
CAGCTGCTTCCGCCAGTTCCGTCGAGCCTCCTTTATGGGCTCCACCTTCAACATC
AGCCTGAACAAAGAGGAGATGGAGTTCCAGCCCAATCAGGAGGACGAGGAGGA
TGCTCACGCTGGCATCATTGGCCGCTTCTAGGCCTGCAGTCCCATGATCACCAT
CCTCCCAGGGCAAACCTCAAGGACCAAACACTGTGGCCCAAGAGGGAATCCCTT
CTCCACGAGGGCCTGCCCAAAAACCACAAGGCAGCCAAACAGAACGTTAGGGGC
CAGGAAGACAACAAGGCCTGGAAGCTTAAGGCTGTGGACGCCTTCAAGTCTGCC
CCACTGTATCAGAGGCCAGGCTACTACAGTGCCCCACAGACNCCCCTCAGCCCC
ACTCCCATGTTCTTCCCCCTAGAACCATCAGCGCCGTCAAAGCTTACAGTGTCA
CAGGCATAGACACCAAAGACAAAAGCTTAAAGACTGTGAGTTCTGGGGCCAAGA
AAAGTTTTGAATTGCTCTCAGAGAGCGATGGGGCCTTGATGGAGCACCCAGAAG
TATCTCAAGTGAGGAGGAAAACCTGTGGAGTTTAACTGACGGATATGCCAGAGA
TCCCCGAAAATCACCTCAAAGAACCTTTGGAACAATCACCACCAACATACACA
CTACTCAAAGATCACATGGATCCTTATTGGGCCTTGAAAACAGGGATGAAG
CACATTCCTAA

```

[0063] 在一些实施方案中,BEST1编码序列包含包括与野生型BEST1基因的区域相对应的短脱靶序列。可与编码shRNA744序列的载体序列一起使用的示例性脱靶序列定义如下 (SEQ ID NO:10):CTACTGTACGGAGAATTTCT。

[0064] 可进行其他核苷酸替换以使BEST1序列脱靶。例如,在一些实施方案中,脱靶序列位于BEST1编码序列上的不同位置,并且对应于野生型BEST1基因的不同区域。可与编码shRNA05序列的载体序列一起使用的示例性脱靶序列且定义如下 (SEQ ID NO:11):CCAGCAAGCTGCACAGCGT。

[0065] 在一些实施方案中,由包含SEQ ID NO:1的序列(和/或其互补序列)的核酸编码的shRNA(例如,shRNA05)在经载体处理的宿主细胞中(例如,在对象中,例如在人对象中)转录。在一些实施方案中,两种或更多种不同的shRNA(例如,具有不同的起始位点和/或终止位点,例如与shRNA05相差一个或两个另外的或更少的核苷酸)在宿主细胞中转录。

[0066] 在一些实施方案中,BEST1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:12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。

[0067] 在一些实施方案中,驱动shRNA表达的启动子包含与以下SEQ ID NO:13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。在一些实施方案中,驱动shRNA表达的启动子包含与以下SEQ ID NO:14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。

[0068] 示例性启动子的序列如下:

[0069] VMD2启动子,623bp片段 (SEQ ID NO:12)

```
AATTCTGTCATTTTACTAGGGTGATGAAATCCCAAGCAACACCATCCTTTTCAG
ATAAGGGCACTGAGGCTGAGAGAGGAGCTGAAACCTACCCGGCGTCACCACACA
CAGGTGGCAAGGCTGGGACCAGAAACCAGGACTGTTGACTGCAGCCCGGTATTC
ATTCTTTCCATAGCCCACAGGGCTGTCAAAGACCCCAGGGCCTAGTCAGAGGCTC
CTCCTTCCTGGAGAGTTCTGGCACAGAAGTTGAAGCTCAGCACAGCCCCCTAAC
CCCCAACTCTCTCTGCAAGGCCTCAGGGGTCAGAACACTGGTGGAGCAGATCCTT
TAGCCTCTGGATTTTAGGGCCATGGTAGAGGGGGTGTGGCCCTAAATCCAGCCC
TGGTCTCAGCCCAACACCCTCCAAGAAGAAATTAGAGGGGCCATGGCCAGGCTG
TGCTAGCCGTTGCTTCTGAGCAGATTACAAGAAGGGACCAAGACAAGGACTCCT
TTGTGGAGGTCCTGGCTTAGGGAGTCAAGTGACGGCGGCTCAGCACTCACGTGG
GCAGTGCCAGCCTCTAAGAGTGGGCAGGGGCACTGGCCACAGAGTCCCAGGGAG
TCCCACCAGCCTAGTCGCCAGACC
```

[0071] H1启动子 (SEQ ID NO:13)

```
TAAAACGACGGCCAGTGAATTCATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATC
```

[0072] ACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGAC  
CACT

[0073] U6启动子 (SEQ ID NO:14)

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTA  
GAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATA

[0074] CGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTT

AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTT  
ATATATCTTGTGGAAAGGAC

[0075] 在一些实施方案中, BEST1编码序列在载体例如AAV载体或质粒中。

[0076] 在一些实施方案中, 本文中所述的载体包含与脱靶的BEST1序列SEQ ID NO:10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。

[0077] 在一些实施方案中, 提供了编码功能性BEST1序列的载体以补充或校正(例如, 至少部分地补充或校正) 细胞BEST1功能, 而不敲低内源性BEST1基因表达。在一些实施方案中, BEST1序列是经密码子优化的。

[0078] 在一些实施方案中, 提供了编码功能性BEST1序列和shRNA序列的载体以补充或校正(例如, 至少部分地补充或校正) 细胞BEST1功能并敲低内源性BEST1基因表达。在一些实施方案中, 使用shRNA敲低内源性Best1表达。在一些实施方案中, BEST1序列是经密码子优化的。在一些实施方案中, BEST1序列被修饰以对shRNA具有抗性。在一些实施方案中, BEST1和shRNA序列被编码在同一AAV载体上。

[0079] 在一些实施方案中, 本公开内容提供了在对象中调节BEST1表达的方法, 所述方法包括向对象(例如人对象) 施用包含载体或rAAV颗粒和可药用载体的组合物。在一些方面中, 本公开内容提供了在对象中治疗卵黄样黄斑营养不良(例如, 卵黄状黄斑变性和ARB) 的方法, 所述方法包括施用组合物。

[0080] 在一些实施方案中, 本公开内容提供了用于治疗卵黄状黄斑变性的组合物和用于制造治疗卵黄状黄斑变性的药物的组合物。在一些方面中, 本公开内容提供了包含用于治疗ARB的包含载体或rAAV颗粒的组合物(其中载体编码功能性BEST1序列) 和用于制造治疗ARB的药物的组合物。

[0081] 本公开内容的一些方面涉及用于将如本文中所述的rAAV载体(例如, 编码shRNA和/或替代BEST1) 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颗粒包含如本文中所述的衣壳蛋白, 例如AAV2衣壳蛋白。在一些实施方案中, 包含在rAAV颗粒内的载体编码目的RNA(例如, 包含SEQ ID NO:1的序列的shRNA) 并且包含替代BEST1编码序列(例如, 包含SEQ ID NO:10的序列)。

[0082] 包含在rAAV颗粒内的重组AAV(rAAV) 载体可至少包含(a) 一个或多个异源核酸区域(例如, 编码shRNA和/或Best1蛋白) 和(b) 所述一个或多个异源核酸区域侧翼的包含反向末端重复(inverted terminal repeat, ITR) 序列(例如, 野生型ITR序列或经改造ITR序列)(或转基因) 的一个或多个区域。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:3的序列的shRNA) 并且包含替代BEST1编码序列(例如, 包含SEQ ID NO:10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载体可被病毒衣壳(例如AAV2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个载体区域,从而引起该载体的双链性的形成。

[0083] 如本文中所公开的,对具有靶向突变的Best1结构的分析表明,视网膜色素上皮顶端微绒毛的丧失以及由此引起的视网膜的微剥离代表了犬卵黄样黄斑营养不良的最早特征。视网膜光暴露扩大微剥离,并且暗适应缩小微剥离。基于视网膜下腺相关病毒的基因治疗校正了卵黄样病灶和光调制的微剥离二者。

[0084] 在犬BEST1疾病模型中的分子病理学研究揭示了在RPE-PR界面处与RPE微绒毛入鞘(ensheathment)的缺陷和视锥PR相关的不溶性光感受器间基质相关的全视网膜异常。体内成像表明了全视网膜RPE-PR微剥离,其随暗适应收缩,并在暴露于中等强度的光之后延伸。使用腺相关病毒2的视网膜下BEST1基因增强治疗不仅逆转了临床上可检测的视网膜下病灶,而且还逆转了弥漫性微剥离。免疫组织化学分析示出了在具有BEST1转基因表达的区域中在RPE-PR界面处对结构改变的校正。在三种不同的犬BEST1基因型中证明了成功的治疗作用,其中载体滴度在 $0.1 \times 10^{11}$ 至 $5 \times 10^{11}$ 个载体基因组/毫升的范围内。具有双等位基因BEST1突变的患者表现出大区域的视网膜层压缺陷、严重的PR灵敏度丧失和类视黄醇循环减慢。通过恢复RPE-PR界面处的细胞结构,犬BEST1基因治疗的人转化成功逆转了宏观剥离和微剥离,具有导致改善视觉功能并预防患有卵黄样黄斑营养不良的患者的疾病进展的前景。

[0085] 如本文中进一步公开的,发现腺相关病毒(AAV) 2介导的BEST1基因增强校正了这种主要的亚临床缺陷以及疾病。

[0086] 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)。如本文中使用的,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AAV2。衍生物和假型的一些非限制性实例包括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.2012Apr;20(4):699-708.doi:10.1038/mt.2011.287.Epub 2012年1月24日.The AAV vector toolkit:poised at the clinical crossroads.Asokan AI,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)。

[0087] 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No.US 2007/0015238和US 2012/0322861,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,包括如本文中所述的经修饰的VP3区域))组合并转染到生产细胞系中,使得rAAV颗粒可包装并随后纯化。

[0088] 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,编码如本文中所述的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基因是来源于AAV2的rep基因,并且cap基因来源于AAV2且可包含对该基因的修饰以产生如本文中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; Cell Biolabs, 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, 第9卷, 2745-2760; Kern, A. et al. (2003), Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids, Journal of Virology, 第77卷, 11072-11081; Grimm et al. (2003), Helper Virus-Free, Optically Controllable, and Two-Plasmid-Based Production of Adeno-associated Virus Vectors of Serotypes 1 to 6, Molecular Therapy, 第7卷, 839-850; Kronenberg et al. (2005), A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1N Termini, Journal of Virology, 第79卷, 5296-5303; 以及Moullier, P. and Snyder, R.O. (2008), International efforts for recombinant adeno-associated viral vector reference standards, Molecular Therapy, 第16卷, 1185-1188)。

[0089] 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中所述的经修饰的衣壳蛋白。用一种或更多种辅助质粒和包含本文中所述异源核酸载体的质粒(例如包含含有如图13、14、15或16中所示的野生型或突变体cBEST1或hBEST1基因的异源核酸的质粒),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中所述的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。

[0090] 本公开内容还考虑了包含如本文中所述的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。

[0091] 在一些方面中,本公开内容提供了本文中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者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。

[0092] 因此,在一些实施方案中,提供了组合物,其包含如本文中所述的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,本文中所述的组合物可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,卵黄状黄斑变性)。在一些实施方案中,对象患有或怀疑患有本文中公开的一种或更多种病症、疾病和障碍(例如,卵黄状黄斑变性)。在一些实施方案中,对象具有一个或更多个内源性突变BEST1等位基因(例如,与眼或视网膜的疾病或障碍相关或者引起眼或视网膜的疾病或障碍)。在一些实施方案中,对象具有至少一个常染色体显性突变BEST1等位基因(例如,其引起卵黄状黄斑变性)。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。非人灵长类对象的一些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、梟猴、长尾黑颞猴(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。

[0093] 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,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,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。根据实现对所治疗的特定疾病或障碍的治疗可能需要的,rAAV颗粒可作为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。

[0094] 在一些实施方案中,rAAV颗粒滴度为 $1 \times 10^{10}$ 至 $5 \times 10^{13}$ vg/ml。在一些实施方案中,rAAV颗粒滴度可为约 $1 \times 10^{10}$ 、 $2.5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $2.5 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $2.5 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $2.5 \times 10^{13}$ 、或 $5 \times 10^{13}$ vg/mL。在一些实施方案中,颗粒滴度小于 $1 \times 10^{10}$ vg/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒滴度大于 $1 \times 10^{15}$ vg/mL。在一些实施方案中,rAAV颗粒滴度大于 $5 \times 10^{13}$ vg/mL。在一些具体实施方案中,rAAV颗粒滴度为约 $2 \times 10^{11}$ 或 $2.5 \times 10^{11}$ 。在一些实施方案中,rAAV颗粒通过本文中进一步描述的方法(例如,视网膜下或玻璃体内)施用。

[0095] 根据实现所治疗的特定疾病或障碍的治疗可能需要的,rAAV颗粒可作为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施用更小或更大的体积。

[0096] 如果需要,rAAV颗粒或核酸载体也可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表面施用。事实上,对于也可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颗粒可根据需要与多种其他药剂一起递送。这样的组合物可从宿主细胞或其他生物学来源中纯化,或者作为替代,可如本文所述化学合成。

[0097] 在另一些方面中,本公开内容提供了编码如本文中公开的shRNA的一种或更多种质粒在可药用溶液中的制剂用于单独地或者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。本公开内容还提供了施用编码如本文中公开的shRNA的质粒的方法。示例性方法包括向哺乳动物(例如,人)施用质粒的方法。

[0098] 在一些实施方案中,用于向哺乳动物(例如,人)施用的公开的质粒制剂包含磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline,PBS)中的DNA质粒载体。载体的浓度可为1mg/ml至3mg/ml。在某些实施方案中,浓度为约2mg/ml。在另一些实施方案中,浓度为约1.6mg/ml、约1.7mg/ml、约1.75mg/ml、约1.8mg/ml、约1.85mg/ml、约1.9mg/ml、约1.95mg/ml、约2.05mg/ml、约2.1mg/ml或约2.15mg/ml。

[0099] 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)中使用本文中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。

[0100] 通常来说,这些制剂可包含至少约0.1%的治疗剂(例如,rAAV颗粒或质粒)或更多,但是一种或更多种活性成分的百分比当然可变化并且可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,可以在化合物的任何给定单位剂量中获得合适剂量的方式来制备每种治疗上有效组合物中一种或更多种治疗剂(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例如溶解度、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。

[0101] 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中所述的shRNA、载体或rAAV颗粒。

[0102] 适用于可注射用途的组合物(例如,包含如本文所述的shRNA、载体或rAAV颗粒)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。

[0103] 术语“载体”是指与本文中所述的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用作液体载体。

[0104] 本公开内容的组合物可通过多种途径递送至眼。其可眼内、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,其可通过插入或注射到眼周围的组织中而局部递送。其可通过经口途径或通过皮下、静脉内或肌肉内注射全身递送。作为替代,其可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。

[0105] 对于可注射水溶液的施用,例如,如果需要的话,可将溶液适当地缓冲,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、肌肉内、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使用的无菌水性介质。例如,可将一个剂量溶解在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’s Pharmaceutical 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生物学标准办公室所要求的无菌性、热原性以及一般安全性和纯度标准。

[0106] 无菌可注射溶液可通过将所需量的如本文中所述的shRNA、载体或rAAV颗粒并入合适的溶剂(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。

[0107] 组合物(例如,包含如本文中所述的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,这可由监督这样的组合物的施用的医疗人员决定。

[0108] 在一些实施方案中,在使细胞BEST1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BEST1基因表达沉默的视杆细胞可具有通常包含BEST1的缩短外段。在一些实施方案中,外段的长度可使用外源添加(硬化)BEST1基因来维持或恢复(例如,部分地或完全地),所述BEST1基因的表达对使用本申请中描述的组合物进行的沉默具有抗性。

[0109] “治疗”疾病如该术语在本文所用意指降低对象经历的疾病或障碍(例如,卵黄状黄斑变性)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。

[0110] 可通过标准药理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

化的递送体系。本文中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,剂量可在此范围内变化。

[0111] 无需进一步阐述,认为本领域技术人员可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,而无论如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。

[0112] 实施例

[0113] 实施例1

[0114] RPE-PR界面处的早期全视网膜病理学。

[0115] 为了了解RPE-PR相互作用受损背后的病理生理学,对具有临床明显疾病的cBest视网膜进行了评价。通过针对EZRIN(形成RPE顶端MV所必需的膜-细胞骨架连接蛋白)的免疫组织化学(IHC)检查了负责与PR OS直接相互作用的RPE顶端膜的关键特征,并与人视锥拘留蛋白(hCAR)和花生凝集素植物凝集素(PNA)标记组合来区分视锥PR基质特异性界面。共聚焦显微术和对来自野生型(WT)视网膜的3D重构图像的分析暴露了RPE顶端膜的两个固有组成视锥和视杆相关的MV的复杂片样结构。视锥-MV(也称为RPE顶端锥鞘)比视杆-MV更明显,并形成了将单个视锥外段(cone outer segment, COS)束缚在RPE顶端表面的高度组织化的包裹(图1A)。在视网膜下腔中,该胞间复合体进一步被通过PNA植物凝集素的选择性结合检测到的同等复杂的视锥特异性不溶性胞外基质鞘(视锥-IPM)包住(图1A)。然而,在患病的cBest视网膜中, COS的这样的复杂胞外区室化消失,并且微绒毛入鞘的缺乏伴随着脂质脂褐素颗粒超负荷并且不溶性视锥IPM受损的肥大RPE细胞(图1B)。这些观察在疾病发作之后(45至270周龄)在22只眼中的视网膜反光色素层和非反光色素层部分二者上检查的三种不同的cBEST1基因型(R25\*/R25\*、P463fs/P463fs和R25\*/P463fs)中被证实。

[0116] 为了评价视锥-MV结构异常继发于视锥功能障碍和疾病的可能性,检查了不同犬IRD模型中的RPE-COS相互作用:原发性视锥光感受器通道病, CNGB3相关的全色盲。首先在6周龄时检查RPE-COS复合体;带有错义突变或基因座缺失突变的CNGB3突变体视网膜没有在RPE-PR界面处显示出明显的不规则性,并且RPE顶端标志物的正确定位与特定的抗BEST1标记相关(图6A和6B)。双重免疫染色表明了EZRIN沿与hCAR阳性但CNGB3阴性的COS交错结合的视锥-MV的特异性分布。由于经历了逐渐视锥PR变性的老化(57和85周龄)突变视网膜中CNGB3通道亚单位功能障碍,发现RPE顶端域的微绒毛入鞘仍保持大部分完整(图6C和6D)。

[0117] 在CNGB3突变体视网膜中的发现表明, cBest中与视锥-MV入鞘相关的结构改变不是继发于视锥缺陷,而是对由BEST1突变触发的RPE通道病具有特异性。这些实验的重点是恰好在狗临床疾病发作之前和邻近出生后视网膜分化结束时的6周时间点(图1C和1D)。与年龄匹配的WT对照相反, cBest RPE中缺乏特定的基底外侧BEST1免疫标记与相当光滑的顶端表面和明显发育不足(残留)的顶端微绒毛相关(图1C, 箭头)。在四个视网膜位置处的去卷积3D Z堆栈投射图像上对视锥-MV的空间密度以及视锥-MV和视杆-MV的长度进行定量(图1D)。在所检查的每个视网膜区域中,在cBest与WT之间发现了视锥-MV平均数的显著差异( $P < 0.0001$ )。尽管视锥光感受器数目与对照组相当,但cBest中的视锥-MV的数目要少得多且分布稀疏,并且无论地形位置如何始终出现的比对照中的那些更短并且精细得多。在对照(WT)眼中,反光色素层上颞象限中的视锥-MV的平均长度为 $17.4 (\pm 0.25) \mu\text{m}$ ,并且下非

反光色素层视网膜中为 $12.3(\pm 0.23)\mu\text{m}$ ,而视网膜的反光色素层和非反光色素层部分中视杆-MV的长度分别为 $6.7(\pm 0.11)\mu\text{m}$ 和 $5.3(\pm 0.27)\mu\text{m}$ 。然而,在cBest中,确定的罕见视锥-MV延伸的平均长度显著降低(在中央反光色素层和非反光色素层下部分别为 $6.0\pm 0.31$ 和 $6.5\pm 0.74\mu\text{m}$ )。对cBest中微小的视杆-MV的定量评估超出了光学分辨率的限制。

[0118] cBEST1-突变体眼具有随光暴露而延伸的全视网膜微剥离。

[0119] 为了确定通过IHC检测到的早期RPE-PR界面异常的体内相关性,在远早于可检测到用检眼镜检查的病灶之前使用光学相干断层扫描术(optical coherence tomography, OCT)的无损成像来评价年轻时的cBest眼。定性地,所有评价的眼的中央视网膜均在位于外核层(outer nuclear layer, ONL)远侧的外视网膜中显示出另外的低散射层,这在WT眼中是检测不到的(图2A,箭头和双箭头)。出乎意料的是,在单个实验过程内低散射层随同一只眼中的重复记录可变化。进一步分析发现,由于用明亮的短波长光进行的介入式自发荧光成像,当视网膜将暴露于更大的视网膜辐照度时,在成像过程结束时获得的扫描中低散射层的宽度更大(图2A,双箭头,更多LA)。在进行自发荧光成像之前,在成像过程早期获得的扫描中低散射层的宽度更小(图2A,箭头,更少LA)。

[0120] 通过获得纵向反射率谱并在鼻侧和颞侧视网膜二者位置进行测量来进行定量研究。WT眼( $n=12$ 只,15至17周龄)示出了在外网层(outer plexiform layer, OPL)和外界膜(external limiting membrane, ELM)处的外视网膜超散射峰,其将介入式低散射层定义为ONL(图2B)。ELM的远端是与光感受器的内段与外段(IS/OS)之间的交界处相对应的高散射峰,其是起源于RPE-反光色素层界面(RPE/T)附近的主峰和与光感受器OS尖端相对应的介入式小超散射峰,这通常难以解决(图2B)。在cBest眼( $n=6$ 只,11周龄)中,可用更少的光暴露检测到异常的低散射层(图2B,箭头)。随着光暴露更大,低散射层变得更深和更明显(图2B,双箭头);鼻侧和颞侧视网膜位置二者均显示相同的作用。测量了IS/OS和RPE/T峰之间的距离(图2A和2B,箭头)。在WT眼中,距离为 $41.3(\pm 4.5)\mu\text{m}$ ,而在cBest眼中,鼻侧和颞侧视网膜区域的该距离分别在 $46.8(\pm 6.7)\mu\text{m}$ 和 $45.2(\pm 6.8)\mu\text{m}$ (更少的光暴露)和 $55.8(\pm 10.5)\mu\text{m}$ 和 $53.5(\pm 6.3)\mu\text{m}$ (更多的光暴露)处显著更大( $P<0.001$ )(图2C)。

[0121] 进行两种类型的实验以更好地理解作为光暴露函数的低散射层的厚度。在主要实验(WT,  $n=12$ 只,15至17周龄;cBest,  $n=3$ 只,13周龄)中,使眼暗适应过夜并随后在黑暗中在2小时周期内进行连续成像,并进行由标准临床眼科装置产生的范围从非常暗淡的光到中等的光的五次强度越来越大的介入式短暂的488nm光暴露(图2D)。在较短的实验方案中,在不同的眼中仅使用了最高的两次光暴露(cBest,  $n=3$ 只,13周龄)。在过夜暗适应之后,WT眼中的IS/OS-RPE/T距离为 $40.0(\pm 4.5)\mu\text{m}$ ,而在cBest中其为 $47.1(\pm 4.8)\mu\text{m}$ (图2E);差异具有统计学显著性( $P<0.001$ )。越来越亮的光暴露导致在cBest眼中IS/OS-RPE/T距离的单调递增,达到为 $59.4(\pm 8.7)\mu\text{m}$ 的明显平稳期(图2E)。在WT眼中,光暴露的作用可忽略不计或很小,且IS/OS-RPE/T距离达到 $40.9(\pm 4.3)\mu\text{m}$ 的平稳期。因此,在任何可检测到的用检眼镜检查的结果之前的年龄的数分钟内,暴露于光显示在cBest眼中引起多至 $18.4(\pm 8.7)\mu\text{m}$ 的急性视网膜微剥离。光介导的微剥离在小于24小时的时间跨度内消失(图7)。

[0122] 在准备进行局部基因治疗时,在完全光适应的cBest和WT眼中评价光驱动微剥离的视网膜定位分布(图2F)。WT眼( $n=4$ 只,104周龄)中的平均IS/OS-RPE/T距离在整个上和下视网膜区域中相对均匀,其中清晰的边界对应于反光色素层和色素(非反光色素层)视网

膜之间的过渡。WT眼的反光色素层视网膜中的较大距离很可能是由于高散射峰(反光色素层视网膜中的反光色素层与色素RPE)的主要贡献者的差异。在297周龄的cBest眼(R25\*/P463fs)中,除在中央凹样区域处非常明显的视网膜剥离之外还存在相对弥散的全视网膜微剥离(图2F,用较深的颜色界定)。在12周龄的更年轻的cBest眼(P463fs/P463fs)中,尽管用检眼镜检查的异常不明显,但沿视觉超高速扫描(visual streak)和视神经头周围仍存在更大微剥离的明显条带。突变体眼和平均WT之间的差异图证明了微剥离程度的空间分布(图2F,右)。

[0123] 为了评估对光感受器的潜在不利后果,将ONL厚度形态化映射到具有微剥离的视网膜区域中(图8A和8B)。微剥离没有导致由光感受器变性所预期的ONL变薄。相反,cBest中的ONL倾向于比WT均匀地更厚;超厚区域通常包括中央-上反光色素层视网膜,但也可延伸到下非反光色素层视网膜中(图8A)。重要的是,当显微镜检查时,ONL的超厚区域具有与对照相当的PR核数。这表明核间距的延伸作为通过成像观察到的超厚ONL的可能原因。

[0124] 犬卵黄样黄斑营养不良的自然史。

[0125] 作为评估基因治疗结局的先决条件,从18只狗的组[12公(M)和6母(F);年龄范围为6至297周]中确定了cBest的自然史(表1)。通过检眼镜检查和无损成像连续监测cBest狗,以检测最早疾病的发作并了解疾病进展。基于系统的体内成像,早在11周龄(平均15周龄)就检测到了为犬中央凹样区域的细微局灶性视网膜隆凸(elevation)的首个疾病征兆(图9A)。光感受器层与下面的RPE的这种离散分离在23周龄时进展以形成较大的视网膜下宏观剥离(卵黄样病灶),其在面向和相应的OCT扫描上明显(图9B)。横截面成像上的这种离散RPE-PR剥离(但在面向成像上不明显)被发现在所检查的cBest眼(n=34只)中是一致的,而与基因型无关。从亚临床阶段开始,疾病进展以形成局限在犬中央凹处并被微剥离所包围的宏观剥离(卵黄样阶段)(图3A,左图)。原发性病灶逐渐演变为作为包含中央凹样区域的中央区域内的特征性大疱性剥离表现(图3A,中间图和右图以及图9B至9D)。存在的独特超自发荧光在病灶下部分中是明显的(图3A,中间插图;假性积液阶段)。晚期疾病阶段涉及中央病灶内超自发荧光物质的部分重吸收和分散,这与ONL的显著变薄相关(图9E和9F)。

[0126] 在随后进行连续成像的每种情况下(表1),尽管进展速率可变但cBest双向表现并且几乎总是呈现出显著的对称性(图3A和图9A至9F)。在两只眼中用检眼镜检查的可视化的严重的视网膜剥离仍局限于中央视网膜,或变得更加广泛,其中中央外病灶散布于各处,仍然强烈偏向中央视锥-丰富的区域,并与超厚的ONL相关。

[0127] 表1. 本研究中使用的经AAV-BEST1处理眼和对照眼的总结。

[0128]

狗 ID	性别	cBEST1 状态	眼	处理	年龄, 周	注射 AAV滴度, vg/mL	注射 体积, μL	上次检查, 注射后周数	结局
EM356	M	R25*/ P463fs	OD	AAV- <i>cBEST1</i>	52	1.5E+10	50	245	逆转
			OS	UnTx				245	进展
EM385	M	R25*/ R25*	OD	BSS	39		50	105	进展
			OS	AAV- <i>cBEST1</i>	39	1.5E+11	60	105	逆转
EMC1	F	R25*/ R25*	OD	AAV- <i>hBEST1</i>	27	2.0E+11	110	156	逆转
			OS	BSS	27		110	156	进展
EMC3	F	R25*/ R25*	OD	BSS	27		110	103	进展
			OS	AAV- <i>hBEST1</i>	27	2.0E+11	120	103	逆转
EML4	M	R25*/ P463fs	OD	BSS	58		150	79	进展
			OS	AAV- <i>hBEST1</i>	58	2.5E+11	95	79	逆转
EML6	F	R25*/ P463fs	OD	AAV- <i>hBEST1</i>	43	2.0E+11	100	51	逆转
			OS	BSS	43		110	51	进展

狗 ID	性别	cBEST1 状态	眼	处理	年龄, 周	注射 AAV 滴度, vg/mL	注射 体积, $\mu$ L	上次检查, 注射后周数	结局
EML9	M	R25*/P463fs	OD	AAV-hBEST 1	69	5.0E+11	65	54	逆转
			OS	BSS	69		70	54	进展
EML13	F	R25*/P463fs	OD	UnTx				52	进展
			OS	AAV-hBEST 1	45	1.5E+11	100	52	逆转
EML22		R25*/P463fs	OD	AAV-hBEST 1	27	3.5E+11	100	39	逆转
			OS	AAV-hBEST 1	27	3.5E+11	100	39	逆转
LH15		P463fs / P463fs	OD	AAV-hBEST 1	65	2.5E+11	180	207	逆转
			OS	AAV-hBEST 1	65	2.5E+11	50	207	逆转
LH21		P463fs / P463fs	OD	BSS	27		50	207	进展
			OS	AAV-hBEST 1	27	2.5E+11	50	207	逆转
LH30		P463fs / P463fs	OD	AAV-hBEST 1	31	2.5E+11	110	13	逆转
			OS	AAV-hBEST 1	31	2.5E+11	110	13	逆转
AS277	M	WT	OU	UnTx 对照	6				
EML24	M	R25*/P463fs	OU	UnTx 对照	6				
EML21	M	R25*/P463fs	OU	UnTx 对照	13				
EML23	F	R25*/P463fs	OU	UnTx 对照	13				
N306	M	WT	OU	UnTx 对照	15				
N307	F	WT	OU	UnTx 对照	15				
N308	F	WT	OU	UnTx	15				

[0129]

[0130]

狗ID	性别	cBEST1 状态	眼	处理	年龄, 周	注射 AAV滴度, vg/mL	注射 体积, μL	上次检查, 注射后周数	结局
				对照					
N300	M	WT	OU	UnTx 对照	17				
N301	M	WT	OU	UnTx 对照	17				
N302	F	WT	OU	UnTx 对照	17				
CCAN	M	WT	OU	UnTx 对照	37				
CCGS	M	WT	OU	UnTx 对照	37				
LH14	M	WT	OU	UnTx 对照	42				
EML31	M	R25*/ P463fs	OD	UnTx 对照	43				
EML27	M	R25*/ P463fs	OD	UnTx 对照	52				
EM346	M	R25*/ R25*	OS	UnTx 对照	89				
N284	F	WT	OS	UnTx 对照	145				
N269	F	WT	OS	UnTx 对照	199				

[0131] 关键字: BSS, 平衡盐溶液; cBEST1, 犬转基因; hBEST1, 人转基因; Inj., 注射; OD, 右眼; OS, 左眼; OU, 双侧的; p. i., 注射后; UnTx, 未经处理; vg, 载体基因组; WT, 野生型。cBEST1 突变: R25\*/R25\*, p.Arg25Ter-纯合子; P463fs/P463fs, p.Pro463fs-纯合子; R25\*/P463fs, p.Arg25Ter/p.Pro463fs-复合杂合子。

[0132] 视网膜下BEST1基因增强治疗稳定地校正疾病。

[0133] 为了评价AAV2介导的视网膜下基因增强治疗的概念验证, 在第27至69周时对22只cBest眼注射由人VMD2启动子驱动的犬(cBEST1)或人(hBEST1)转基因[载体滴度范围为 $0.1$ 至 $5 \times 10^{11}$ 载体基因组(vg)/毫升或平衡盐溶液(balanced salt solution, BSS)对照](表1)。包含用于制备所公开的rAAV颗粒的hBEST1和cBEST1异源核酸的示例性AAV载体的图分别在图13和14中示出。对表现出不同阶段的局灶性或多灶性视网膜剥离的cBest狗单侧注射AAV(使对侧眼未被注射)或一只眼注射AAV并且在对侧眼中进行对照(BSS)注射; 对三例表现出多灶性疾病的病例双侧注射AAV靶向上颞象限, 而手术泡之外的视网膜区域用作内部对照(表1)。

[0134] 在右眼(EM356-OD)中表现出晚期中央视网膜剥离的复合杂合子(R25\*/P463fs)狗表现出代表性结果(图3A), 所述右眼在第52周龄时接受视网膜下注射cBEST1(图3B, 左图), 而对侧眼(EM356-OS)未注射(图9A至9F)。临床上和通过体内成像对两只眼进行监测。在注射后(p. i.) 4周在经注射的眼中疾病逆转首次明显, 并保持长期持续作用, 如p. i. 第43和245周时所举例说明的(图3B)。在这种和患有在视网膜下宏观剥离内表现出自发荧光物质的大量积累的晚期疾病的其他病例中( $n=13$ 只眼), AAV注射后数月仍可检测到超自发荧光信号, 但随时间逐渐衰弱(图3B, 插图)。基于无损成像, AAV-BEST1处理区域内的局灶性病灶以及中央外病灶二者均能在p. i. 4至12周消退, 并且此后局部视网膜重新附着保持稳定(表

1)。在经AAV处理的任何眼中均没有炎性响应的证据,并且纵向体内评价并没有揭示对RPE或神经视网膜的不利影响。

[0135] AAV介导的用hBEST1的处理还导致病灶逆转和长期疾病校正(n=13只眼)。来自cBest狗(R25\*/R25\*)的代表性体内成像结果和IHC评价(图3C和3D)显示,处理之前存在的早期双侧病灶在用AAV-hBEST1( $2 \times 10^{11}$ vg/mL)对研究眼(EMC3-OS)进行处理之后消失(图3D),而在用BSS注射的对侧对照眼(EMC3-OD)中的病灶继续扩大(图3C)。基于眼底镜检查,在举例说明的实施例中以及在所有其他情况下,与载体或BSS递送相关的短暂性视网膜剥离在p.i.24至48小时内消退;然而,注射了BSS的视网膜病灶早在p.i.1周时就重新出现,并且沿自然疾病进程进展(图3C)。这与经AAV处理的眼形成鲜明对比,其中早期以及较晚期的病灶在hBEST1基因治疗之后的前6周内消退,并且其后处理的区域保持不患病(图3D)。使用RPE和PR特异性标志物进行的眼科检查和IHC评估显示,直至p.i.207周对视网膜都没有不利影响(图3、10和11)。特别重要的是,对p.i.视网膜保护的评估揭示了RPE-PR界面处的视网膜结构的显著恢复,包括视锥-MV的延伸和肌动蛋白细胞骨架挽救,对应于具有犬或人BEST1转基因的经载体处理的泡区域(图3C和3D,下图,以及图10和11)。在临床表现或对AAV-BEST1处理的响应方面,没有观察到性别之间的差异。

[0136] 与野生型对照和cBest未处理的眼相比,在三种cBest模型[cmr1(R25\*/R25\*)、cmr1/cmr3(R25\*/P463fs)和cmr3(P463fs/P463fs)]中,在AAV-hBEST1处理之后视网膜被保护。cBest眼在27周龄(cmr1)、45周龄(cmr1/cmr3)或63周龄(cmr3)时注射AAV-hBEST1( $2 \times 10^{11}$ vg/mL),并分别在p.i.103周、51周、或207周时通过IHC进行评价(图10)。直至p.i.207周在处理区域内都未检测到明显异常。注意,在所有经处理的眼中RPE顶端延伸投射到视网膜下腔中(EZRIN)。未经处理的cBest对照(最右图)显示RPE顶端微绒毛缺乏、RPE肥大(EZRIN、RPE65)以及RPE单层内脂褐素颗粒的积累以及视网膜下腔中自发荧光沉积。

[0137] 代表性的共聚焦显微照片在图11A中示出,其描绘了AAV-hBEST1注射( $2.5 \times 10^{11}$ vg/mL)后79周并用BEST1(RPE,较深的颜色)和SLC16A1(RPE,较浅的颜色)双重标记的cBest(R25\*/P463fs)视网膜。在图11B至11D中示出了从手术泡区域(图11B),通过相邻的半影区域(图11C),并且朝向注射区域外部的连续范围(图11D)的横截面概观。如在放大图像中突出显示的,观察到RPE-PR界面结构的恢复程度与BEST1转基因表达之间的直接相关性。观察到RPE顶端投影在具有增强的BEST1的处理区域内的显著延伸(图11B);在与BEST1的斑状分布(单个RPE细胞内的弱红色信号)与RPE-PR微剥离相关的泡半影中存在残留的微绒毛[c-MV(较亮的箭头)和视杆-MV(较暗的箭头)](图11C);在处理区域之外,在不存在BEST1表达和RPE顶端突起二者的情况下,视网膜下病灶的形成(图11D)。扇形和概略的RPE顶端表面以及大量胞内沉积物在cBest突变体RPE内作为颗粒状聚集体出现(图11A,上图,未注射;图11D,特写)。在剥离区中,混入视网膜下腔中的细胞碎片(星号)对应于Muller胶质细胞,并反映了响应于应激的视网膜重塑。[比例尺为100 $\mu$ m(上)和10 $\mu$ m(图11A至11D)]。

[0138] 用基因治疗校正光调节的微剥离。

[0139] 为了了解BEST1基因增强治疗对用检眼镜检查检测不到的视网膜剥离的视网膜区域的后果,对视网膜下泡内和泡外的IS/OS-RPE/T距离进行了形态化测量,其中在69周龄时对cBest(R25\*/P463fs)狗进行对照视网膜下BSS注射的代表性结果显示在87周龄时均匀的微剥离覆盖了所有成像的视网膜(图4A)。上视网膜中的平均微剥离程度(从WT眼中进行的

共定位测量中减去注射BSS的突变体狗的IS/OS-RPE/T距离)为11.6 $\mu\text{m}$ 并且在下视网膜中为16.7 $\mu\text{m}$ (图4B),与未注射cBest的眼一致。在另一方面,视网膜下AAV基因治疗导致处理区域中的IS/OS-RPE/T距离显著降低。EMC3-OS、EML4-OS和LH21-OS证明了用使用人BEST1转基因的基因治疗处理的三种基因型的结果,其中滴度为约 $2 \times 10^{11}$ vg/mL(图4A和表1)。在每种情况下,在经处理的泡中IS/OS-RPE/T距离均显著降低。值得注意的是,仅在处理区域之外可检测到严重的视网膜剥离(较暗的颜色)(图4A)。定量测量示出了微剥离的完全改善,其中在用视网膜下基因治疗处理的上视网膜和下视网膜区域二者中,IS/OS-RPE/T距离均恢复至WT水平(图4B,实心符号),但在远离处理泡的视网膜区域中没有恢复至WT水平(图4B,未填充符号)。

[0140] 通常显示视网膜下基因治疗的效力区域延伸超过手术时形成的泡以包括半影区域。在基因治疗成功的cBest狗中,也存在半影区,但其显示在质量上比以前通常遇到的更大(图4A)。在一些最极端的实施例中,发现全视网膜微剥离的预处理图对于证明半影延伸的程度是必要的。例如,29周龄时的EML9-0D显示沿视觉超高速扫描的全视网膜微剥离最明显,并且包括数个具有严重视网膜剥离的区域(图4C)。基因治疗在第69周时进行。在第87周时,在整个成像的视网膜上的微剥离以及大部分严重的视网膜剥离消失(图4C),并且定量测量显示了上和下视网膜位置处的正常或较薄的IS/OS-RPE/T距离(图4D)。重要的是,IS/OS-RPE/T距离在与注射时形成的泡相对应的视网膜位置以及同一只眼的鼻侧视网膜对照区域中显示出显著改善。这种半影延伸的明显实例可由以下解释:载体通过cBest眼中的微剥离更大地扩散导致RPE在比初始泡显著更远的位点处转导。为了进行比较举例说明了具有界定的半影延伸的更典型的实例。第37周龄时的EML13-0S显示出全视网膜微剥离,其在颞侧视网膜中和沿视觉超高速扫描尤为突出;沿视觉超高速扫描也存在数个严重的视网膜剥离(图4E)。基因治疗在第45周时进行。在第81周龄时,视神经颞侧的上和下视网膜二者均缺乏微剥离和宏观剥离,而未经处理的鼻侧视网膜保留了微剥离而且形成了大量的宏观剥离(图4E)。定量结果证实了治疗作用(图4F),其没有到达鼻侧视网膜,与EML9-0D不同。

[0141] 为了了解基因治疗对视网膜变性的潜在后果,将ONL厚度映射在经处理的眼上(图8B)。显示出微剥离消失的经处理的视网膜区域也倾向于与正常的ONL厚度相对应,而保持微剥离的未经处理的区域倾向于显示超厚的或正常的ONL,或者在一些区域中显示变薄的ONL(图8B)。总之,AAV介导的基因增强治疗在犬卵黄样黄斑营养不良中显示出促进严重视网膜剥离的持续逆转、RPE与PR之间的紧密接触的重新建立以及ONL厚度恢复至正常值。

[0142] 人常染色体隐性卵黄样黄斑营养不良:结构和功能。

[0143] 为了促进成功的基因治疗在BEST1突变狗中的临床转化,进行了一些研究以更好地了解常染色体隐性卵黄样黄斑营养不良(ARB)的人病理生理学,并深入了解全视网膜疾病在先前所述的用检眼镜检查可检测到的严重病灶之外的分布。示出了来自两名患者的数据(图5A至5G):P1是39岁的女性,其最佳校正视觉敏锐度为20/100,携带双等位基因BEST1突变(c.341T>C/c.400C>G),而P2是36岁的男性,敏锐度为20/60,也携带在BEST1中的双等位基因突变(c.95T>C/c.102C>T)。在这两名患者中,突变等位基因与临床上未受影响的父母隔离。利用它们所包含的脂褐素颗粒的天然自发荧光对RPE健康状况进行的超宽成像显示出广泛和大量的异常,所述异常包括相对高自发荧光或低自发荧光和局部异质性的区域。值得注意的是,在鼻侧中间外周视网膜中存在明显的过渡区(图5A,箭头),其界定了较

健康的鼻侧外周视网膜。

[0144] 沿水平子午线以高密度对视杆和视锥功能进行采样,以更好地了解视力丧失的地形图及其与视网膜结构异常的对应关系。两名患者在长期暗适应的眼中集中显示视杆介导的灵敏度的严重(deep)丧失( $>3\log$ );在两名患者的颞侧视野(鼻侧视网膜)和一名患者的瞳孔旁区域中存在视杆功能的相对保护(图5B,上图)。出乎意料地,视锥介导的功能在光适应的眼中仅显示中等丧失( $<1\log$ )或者正常或接近正常的结果(图5B,下图)。在整个视野范围内取样的视杆和视锥功能证实并延伸了这些发现,并显示出强烈的眼间对称性(图12A和12B)。两名ARB患者的两只眼的视杆灵敏度丧失(RSL)和视锥灵敏度丧失(CSL)图。严重RSL的大而对称的中心区域被颞侧场中相对保留的功能所包围。在整个视野内,视锥功能受影响相对较小并且CSL相对均匀。在颞侧场中,生理盲点在 $12^\circ$ 处作为黑色正方形显示。

[0145] 进行具有OCT的横截面成像来评价沿水平子午线穿过中央凹的视网膜层压异常(图5C)。在OCT成像时没有一致的光暴露史。两名患者在通过大部分中央视网膜的外视网膜中均显示出显著的ONL丧失和光感受器IS/OS水平异常。另外,P2显示出视网膜内囊性空间和中央视网膜从RPE的剥离,这很可能是由于视网膜下液(subretinal fluid)的积累。视网膜层压在瞳孔旁区域中(图5C,深色矩形)和在鼻侧中间外周过渡之外(图5C,浅色矩形)显示出相对正常化。对两个目的区域的分析显示,在两名患者中可检测到异常变薄的ONL,并且可检测到IS/OS和视锥外段尖端(cone outer segment tip,COST)具有低峰信号(图5D和5E)。在P1中,从ELM至IS/OS和从IS/OS至COST的距离与正常相当。COST远端显示存在低散射层,且RPE显示超厚(图5D,中间图)。在P2中,显示ELM至IS/OS比正常的更短,而IS/OS至COST的距离与正常的相当。显示COST至RPE/RPE的距离比正常的更大,中间为不明显的低散射层;显示RPE在厚度方面与正常的相当(图5D,右图)。在P1中对鼻侧中间外周区域中的外视网膜进行的分析显示,ELM至IS/OS、IS/OS至COST和COST至RPE/RPE的距离大于正常的,并且RPE厚度与正常的相当(图5E,中间图)。P2的特征为P1与正常之间出现的中间体(图5E,右图)。

[0146] 为了了解外视网膜和RPE水平上的结构异常对这些细胞层之间的类视黄醇转移动力学的影响,进行了暗适应测试。在图5D中所示的瞳孔旁位置处,P1的暗适应阈值是视杆介导的,但升高了 $1.3\log$ 单位(图5F)。到光暴露之后22.5分钟时,P1结果在平稳期上仍保持是视锥介导的,而正常的已在最终暗适应阈值的 $1\log$ 单位内。到50分钟时,P1视杆结果仍升高 $1\log$ ,而正常的恢复已完成(图5F)。在图5E中所示的中间外周鼻侧视网膜位置处,与正常相比,P2的暗适应阈值是视杆介导的并且升高约 $0.5\log$ 单位(图5G)。到光暴露之后14.5分钟,首次表明视杆功能仅比正常中11分钟的视锥-视杆断裂越来越慢。视杆回收率与正常类似(图5G)。总之,P1在瞳孔旁部位处的视杆暗适应动力学显示出极慢的时间进程,而P2在中间外周部位处的视杆功能暗适应动力学更接近于正常(图5F和5G)。

[0147] RPE在维持视网膜下腔的代谢活动环境中具有关键作用。由于与邻近视网膜层的动态关系,RPE特异性基因的突变通常对相邻的感觉神经元产生不利影响,从而导致视觉功能丧失和PR变性。已知BEST1的突变破坏响应于胞内钙的异常水平的跨上皮离子和液体转运。还认为异常的RPE钙信号传导通过改变 $\text{Ca}^{2+}$ 敏感性蛋白的表达和相互作用而导致其他途径的功能障碍。基于cBest中的发现,一种这样的蛋白质是EZRIN,其是对RPE顶端MV的形成和正确成熟所必需的膜-细胞骨架接头。已证明,EZRIN膜-F-肌动蛋白交联功能的激活响应

于Ca<sup>2+</sup>瞬变而直接发生,并且显示埃兹蛋白(Ezrin)-KO小鼠在RPE MV的加工的显著降低。在BEST1突变RPE中发现的RPE顶端MV的明显发育不足与这些发现一致。此外,与其他IRD模型进行的比较性IHC评估表明,这些与微绒毛入鞘相关的主要结构改变对由BEST1突变触发的原发性RPE通道病具有特异性,而不继发于视锥功能障碍和变性。

[0148] RPE顶端突起的结构组分与非动性肠微绒毛的结构组分非常不同。RPE顶端微绒毛中收缩蛋白(例如肌球蛋白)以及通常在细胞附着位点处发现的分子的存在,表明RPE活跃地黏附于神经视网膜并对其施加张力。在cBest中RPE-PR界面处缺乏适当的微绒毛入鞘,并且因此不存在这些投影对PROS的物理和静电支持,预期这将弱化黏附力并导致RPE-PR复合体全视网膜的分离。在疾病的早期阶段,在cBest中发现的PR层与下面的RPE的微剥离将与该过程一致。此外,在RPE顶端投影中收缩元件的存在以及它们已从发生色素迁移的细胞进化而来的事实表明MV能够在与PR OS交错结合的同时主动收缩,并注定促进昼夜吞噬活性。单个RPE细胞可容纳大约30至50个PR,这取决于视网膜位置和填充密度;细密的微绒毛网络允许每个RPE细胞每天处理如此高的代谢负荷。蛋白质组分析的见解支持这一论点。具有沿RPE顶端MV表达的类视黄醇加工蛋白的富集级分,以及许多通道蛋白和转运蛋白(例如,Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATP酶),其对RPE与PR OS之间的水、离子和代谢物的有效转运极为重要。考虑到RPE细胞尺寸的地形图差异,并考虑到本研究中定量的MV的密度和长度,MV延伸将单个RPE细胞的功能性表面在中央视网膜中扩大了20至30倍,这与早期的估计一致。该数目对于黄斑区域中的小RPE细胞甚至更高(约50倍),所述小RPE细胞在面对最密集包装的PR时适应更高的脱落POS周转率。在BEST1突变RPE中这样的总顶端表面积急剧降低将导致代谢物加工的长期延迟,并阻止RPE在视网膜下腔中维持适当细胞体积以及化学组成和生理pH水平二者的能力。由于这些因素对于视网膜黏附至关重要,因此RPE转运体系中的任何限制都将改变静水压力的平衡,并导致降低RPE-PR复合体的渗透特性,以及后续与神经视网膜的分离。事实上,人和犬卵黄样黄斑营养不良的原发性浆液性剥离首先在中央凹(代谢活性最高的中央区域)中表明。不存在高度延伸的RPE顶端突起(其在结构完整的视网膜中将COS紧紧包裹在椭圆体上)将解释这种富含视锥的结构在卵黄样黄斑营养不良中对其原发性剥离的偏好。存在几乎完全依赖于与MV的摩擦相互作用。这与cBest中的观察一致,其记录了在犬中央区域的中央凹样区域内局灶性前卵黄样病灶的形成,以及其他中央富含视锥区域(如视觉超高速扫描)对视网膜下剥离的易感性。

[0149] 在暴露于暗淡和中等光强度之后,cBest中微剥离的主要延伸是出乎意料的结果。已知在正常眼中光暴露改变视网膜下腔的分子组成。也有证据表明可测量的结构变化发生在光暴露下的正常外视网膜中,例如外段长度、视网膜下腔的水合作用、沿RPE顶端MV的肌动蛋白染色提高以及外段向光性的变化。然而,所有正常变化均显著小于cBest中测量的那些。例如,与cBest中由光驱动的视网膜下腔的约18 $\mu$ m的延伸相比,正常的人眼显示在外视网膜中的变化为约1 $\mu$ m,且正常的小鼠眼显示在外视网膜中的变化为约4 $\mu$ m。人ARB直到最近才被认识到并且有关最早疾病阶段的文献有限。隐性c卵黄状黄斑变性显示与人的显性和隐性卵黄样黄斑营养不良二者均具有表型类似性。在患有卵黄状黄斑变性(BVMD)的患者中,关于卵黄样或晚期病灶周围的视网膜区域或疾病的前卵黄样阶段中的视网膜的结构特征存在一些争议。一些研究表明了RPE-PR界面水平上的较小异常,而来自其他研究的结果不支持可检测的结构缺陷。引起该争议的可能是基因型,所使用的不同方法学方法的分辨

率或成像前的光史。事实上,光依赖性的外视网膜变化已使用例如本文中公开的方法在BVMD中进行了描述;尽管如此,患者中的变化幅度比cBest中的更小(约 $2\mu\text{m}$ )。然而,一般来说,受影响的视网膜对光刺激的异常响应可能与眼电位图中明显降低的光峰/暗谷比相关,这一发现在所有,甚至症状前卵黄状黄斑变性患者中是一致的。

[0150] 重要的是,cBest中的微剥离和宏观剥离二者均对光感受器健康状况具有不利影响:微剥离的区域倾向于对应于超厚ONL,而具有严重宏观剥离的大病灶显示ONL变薄。具有宏观剥离的较小病灶不能用于在此使用的采样方法进行评估。ONL包含所有视杆和视锥的核,并且在动物模型和人眼供体中的经典研究通常显示ONL随疾病进展而变薄。鲜为人知的是视网膜疾病的显示为ONL增厚的一些最早期阶段,其仅随着体内成像方法的进步变得可测量。人研究先前已证明这样的ONL在视网膜疾病的早期阶段增厚。在动物研究中也有证据表明与视网膜应激相关的ONL增厚。当显微镜检查时,cBest中映射的ONL的超厚区域显示PR核的数目与对照相当,表明ONL内的核间距更大,可能对应于低于凋亡阈值的视网膜应激水平。在另一方面,严重的视网膜剥离可导致更大的视网膜应激和进行性变性。

[0151] 为了预防与BEST1突变相关的光感受器和视力丧失,进行了针对具有宏观剥离和微剥离的视网膜区域的视网膜下基因增强治疗。结果显示AAV介导的BEST1基因增强是安全的,逆转了临床上明显的病灶、改善了弥散性微剥离,并导致超厚ONL的正常化。此外,基因治疗在三种具有局灶性和多灶性表现二者的不同的BEST1基因型中均是成功的,并证实了治疗作用的长期持久性。在分子水平上,证实了犬以及人BEST1转基因校正RPE-PR复合体的位置并恢复该关键界面的细胞结构的能力。该研究表明,常染色体隐性疾病的早期以及更晚期阶段适用于用这种治疗的方法。利用来源于携带常染色体Best1突变的患者的人可诱导的多能干细胞(human inducible pluripotent stem cell,hiPSC)来源的RPE模型的进一步研究将确定基因增强方法是否也将对BVMD患者有益。

[0152] 为了促进成功基因增强治疗的临床转化,对ARB患者进行研究以深入了解其全视网膜疾病。与大多数(但不是全部)先前的描述一致,ARB患者中的视网膜疾病延伸远超过黄斑进入中间外周。面向和横截面成像以及视杆和视锥功能的视网膜定位映射表明,在中间外周视网膜中存在从疾病到健康的明显转变,这是以前没有强调的特征。在患病区域内,视网膜结构内的严重异常与视杆功能的严重丧失相关;出乎意料的是,视锥功能相对保留。中央视网膜内的视杆功能障碍也与类视黄醇循环的极度减慢相关,而更健康的外周显示出类视黄醇接近正常的循环。存在至少两个为光感受器色素提供11-顺-视网膜发色团的类视黄醇循环。典型的类视黄醇循环在RPE中发挥功能以产生视杆和视锥PR的发色团。在另一方面,认为视网膜类视黄醇循环在视网膜内再产生发色团用于视锥的特定用途。卵黄状黄斑变性中异常的RPE-PR界面将最有可能影响来自典型RPE类视黄醇循环中的发色团递送;视网膜类视黄醇循环可能相对不受影响,因此解释了视锥功能的更大保留。

[0153] 总之,如本文中所公开的,出乎意料地发现了新的针对RPE-PR界面处的卵黄样黄斑营养不良的病理生理学的分子贡献者。发现了疾病的最早表达-通过光暴露加强的弥散性微剥离,其可通过体内成像易于检测。AAV介导的BEST1增强基因治疗逆转了非常明显的病灶和微剥离二者,并恢复了RPE-PR界面的细胞结构。对ARB患者的评价显示,视网膜定位分布以及结构和功能缺陷的特性超出了PR变性的预期。这样的视觉功能障碍可期望在成功地将BEST1基因增强治疗应用于受卵黄样黄斑营养不良影响的患者之后得到改善。

[0154] 实施例2

[0155] 将实施例2的载体技术设计为使用RNA干扰来抑制内源性BEST1mRNA (突变和正常拷贝二者)的表达。这些载体同时用正常的BEST1mRNA替代内源性BEST1 mRNA以仅产生正常蛋白质。该技术使用腺相关病毒来递送BEST1基因的无内含子拷贝加上小发夹RNA (shRNA)的基因,从而导致产生小干扰RNA (siRNA)。由于BEST1基因阅读框中的沉默突变,致使其对siRNA具有抗性。设计了两个shRNA,并由此设计了两个经修饰的人BEST1基因。两个BEST1基因均由623bp片段的人VMD2启动子驱动。BEST1 cDNA之前是一个合成的内含子并随后是一个聚腺苷酸化序列,二者均来源于SV40病毒。在一种情况下,shRNA05由RNA聚合酶III (pol III)H1启动子驱动,而在另一种情况下,shRNA744由pol III U6启动子驱动。将六个胸苷的序列用作每个shRNA的终止序列。为了鉴定这些活性shRNA,筛选了九种潜在的siRNA或shRNA序列。

[0156] 编码shRNA的遗传序列如下:

**shRNA05 (SEQ ID NO: 1)**

CGUCAAGCUUCACAGUGU UUCAAGAGA

ACACUGUGAAGCUUUGACG

shRNA05 有义链

环

shRNA05 反义链

(SEQ ID NO: 2)

(SEQ ID NO: 7)

(SEQ ID NO: 3)

[0157]

**shRNA744 (SEQ ID NO: 4)**

AAGAACUCGCCAUUAUAGCAGC CUCGAG

GCUGCUAUAUGGCGAGUUCUU

shRNA744 反义链

环

shRNA744 有义链

(SEQ ID NO: 5)

(SEQ ID NO: 8)

(SEQ ID NO: 6)

[0158] 图15和16中分别示出了示例性AAV载体的图,其包含编码shRNA05和shRNA744的异源核酸以及包含脱靶序列(例如,SEQ ID NO:10或11中之一)的hBEST1基因,其用于产生所公开的rAAV颗粒。两种序列均由VMD2启动子驱动。

[0159] 在一些实施方案中,本公开内容提供了shRNA05有义链,其包含:含有SEQ ID NO:2的核苷酸序列的有义链,加上紧接在该序列的第一胞嘧啶之前的另外的核苷酸。在某些实施方案中,该另外的核苷酸包含胞嘧啶(C)。

[0160] 在一些实施方案中,本公开内容提供了shRNA05,其包含含有SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反义链。

[0161] 与编码pol III H1启动子的载体区域、shRNA05和终止序列相对应的示例性遗传序列如下:

TAAAACGACGGCCAGTGAATTCATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATC

ACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGAC

[0162]

CACTcgatccCGTCAAAGCTTCACAGTGTTTCAAGAGAACACTGTGAAGCTTTGAC

GTTTTTT

[0163] (SEQ ID NO:20)。该序列还包括BamHI核酸内切酶位点(ggatcc),以促进筛选并确

保shRNA05的起始位点将位于H1启动子TATA盒(TATAA)下游25个核苷酸处。因此,在一些实施方案中,由包含该序列(和/或其互补序列)的核酸编码的shRNA(例如,shRNA05)在宿主细胞中(例如,在用载体处理的对象中,例如在人对象中)转录。在一些实施方案中,两个或更多个不同的shRNA(例如,具有不同的起始位点和/或终止位点,例如与shRNA05相差一个或两个另外的或者更少的核苷酸)在宿主细胞中转录。

[0164] 图17示出了VMD2启动子在细胞培养物中运作良好。使用鸡 $\beta$ -肌动蛋白启动子(CBA)或VMD2启动子,用表达GFP或Best1的质粒转染HEK293T细胞。在聚丙烯酰胺凝胶上分离蛋白裂解物,并通过Western印迹检测斑菱蛋白(Best1)的表达并针对 $\beta$ -微管蛋白的表达进行归一化以显示均匀的凝胶上样。图18A和18B显示出Best1特异性siRNA是功能性的。转染稳定表达BEST1的HEK293T导致斑菱蛋白(Best1)蛋白降低了75%。在转染之后48小时,可使用20nM siRNA进行细胞分析。Western印迹(图18A),通过标准化Best1与微管蛋白(Best1/微管蛋白)之间的条带强度来比较BEST1的敲低(图18B)。图19A和19B显示Best1shRNA是具有活性的:HEK293T-BEST1细胞用4 $\mu$ g指定质粒转染。在转染之后48小时收获细胞。通过Western印迹确定BEST1的表达(图19A)。通过标准化Best1与微管蛋白(Best1/微管蛋白)之间的条带强度来比较BEST1的敲低(图19B)。图20示出了Best1的脱靶。沉默突变(密码子第三位置的碱基改变)用于从Best1 mRNA去除siRNA靶位点。公开的实施例是针对shRNA744的。SEQ ID NO:15至17对应于从顶部到底部的序列。

[0165] 材料和方法

[0166] 犬BEST1模型和体内视网膜成像。

[0167] 包括两种性别(12M和6F)的cBest突变体狗(n=18),其携带纯合子(c.73C>T)(p.R25\*/R25\*)或(c.1388delC)(p.P463fs/P463fs)或者cBEST1(GB\*NM\_001097545)的双等位基因突变(c.73C>T/1388delC)(p.R25\*/P463fs)。为了易于对多组图形进行注释,将这三种基因型分别称为cmr1、cmr3和cmr1/cmr3。该研究与对照杂交犬(n=12;7M和5F)比较进行(表1)。所有动物均在视网膜疾病研究系(Retinal Disease Studies Facility,RDSF)繁殖和维持。该研究严格按照NIH实验动物的护理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)中的建议进行,并遵守视觉和眼科学研究协会关于在眼科和视觉研究中使用动物的声明(Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)。该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(IACUC no.804956和803422)。如前所述,对狗在全身麻醉下进行面向和视网膜横截面成像。

[0168] 人对象。

[0169] 在整个中央视野中,以2°的间隔(沿水平和垂直经络为中央60°)和在整个视野中以12°的间隔测量光适应和双色暗适应功能。暗适应条件下的光感受器介导由500nm和650nm刺激之间的灵敏度差异确定。使用基于LED的暗适应计(Roland Consult)和来自临床短波长自发荧光成像设备(25%激光输出;Spectralis HRA;Heidelberg Engineering)的短持续时间(30秒)中等光暴露,与先前所述技术(92-94)类似对暗适应动力学进行评价。光学相干断层扫描术(OCT)用于分析整个视网膜上的层状结构。用光谱域(spectral-domain,SD)OCT系统(RTVue-100;Optovue)记录视网膜横截面。采集后数据分析用定制程序(MATLAB 7.5;MathWorks)进行。记录和分析技术已在前面进行了描述(30、31、94)。纵向反射率谱

(LRP) 用于鉴定视网膜特征。共聚焦激光扫描检眼镜 (Spectralis HRA; Heidelberg Engineering) 用于记录面向图像并用如前所述 (95) 的短波长降低照度自发荧光成像 (SW-RAFI) 评估RPE健康状况。所有图像均以高速模式 ( $30^{\circ} \times 30^{\circ}$  正方形场或  $50^{\circ}$  圆形场) 获取。

[0170] 犬BEST1模型和体内视网膜成像。

[0171] 用直径为  $30^{\circ}$  和  $55^{\circ}$  的透镜获得近红外照明 (820nm) 下反射率的重叠面向图像 (Spectralis HRA+OCT) 来描绘眼底特征, 例如视神经、视网膜血管、注射泡的边界、视网膜切开术部位和其他局部变化。使用定制程序 (MATLAB 7.5; MathWorks) 将单独的图像数字化拼接成全视网膜全景图。短波长自发荧光和反射成像用于勾画反光色素层和色素RPE的边界。用在视网膜的大区域上的重叠 ( $30^{\circ} \times 25^{\circ}$ ) 光栅扫描进行谱域光学相干断层扫描术 (spectral domain optical coherence tomography, SD-OCT)。用定制程序 (MATLAB 7.5) 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定位其相对于由近红外反射 (NIR) 图像形成的全视网膜拼接图 (mosaic) 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LRP分配给以视神经为中心的直角坐标系中的规则间隔仓 (bin) ( $1^{\circ} \times 1^{\circ}$ ); 将每个仓中的LRP进行比对并平均化。使用沿每个LRP的反向散射信号的强度和斜率信息二者对与OPL、ELM、IS/OS和RPE/T相对应的视网膜内峰和边界进行分割。ONL厚度的地形图由OPL至ELM的距离生成, 并且IS/OS至RPE/T厚度的图由这些峰之间的距离生成。对于所有地形图结果, 血管、视神经头、泡、反光色素层和中央凹样区域 (24) 的位置均被覆盖以供参考。首先, 通过视神经头中央来记录来自WT狗的图并进行旋转以使中央凹样区域一致, 并导出平均WT地形图。cBest突变体狗的中央凹样区域是通过将WT模板通过对齐视神经头、主要上血管和反光色素层边界叠加在突变体眼上来确定的。接下来, 通过视神经的中心和估计的中央凹样区域将cBEST1突变体图记录在WT图上, 并导出差异图。对每只眼的处理泡内和处理泡外的差异图进行取样。通过两种方法评价光暴露与外视网膜结构变化之间的关系。在眼的亚群中, 在每个实验过程早期进行横截面OCT成像, 随后首先用明亮的短波长光进行自发荧光成像, 随后接着进行进一步的OCT成像。与后期获得的记录相比, 在这样的过程早期获得的OCT记录被认为是来自暴露于较少的光的视网膜, 尽管不能对确切的光暴露进行定量。在另一个八只眼的亚群中, OCT记录是在过夜暗适应之后, 随后在来自cSLO的短波长光暴露的短间隔后在暗室中连续进行。在三只眼中, 使用了五种越来越强的光暴露: L1: 激光, 20%; 持续时间60秒; L2: 激光, 25%; 持续时间30秒; L3: 激光, 50%; 持续时间30秒; L4: 激光, 100%; 持续时间30秒; L5: 激光, 100%; 持续时间300秒。在三只眼中, 仅使用了L4和L5。在另外两只眼中, 仅L5用于追踪光介导的微剥离在24小时时期内的恢复。估计标准 (100%) 激光设置以对应于488nm波长下为  $330 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$  的人视网膜辐照度 (98)。在两种方法中, 选择进行分析的区域均基于研究开始前用cSLO对眼底进行的近红外成像, 并且排除了明显的临床上可见宏观剥离所在的区域。

[0172] 视网膜下注射和术后程序。

[0173] 在人VMD2启动子对照下递送cBEST1或hBEST1转基因的重组AAV2/2的视网膜下注射 (46) 按照先前公布的程序 (46、82、97) 在全身麻醉下进行。载体产生和验证已在前面进行了详细说明 (46)。将注射体积为50至  $180 \mu\text{L}$  的病毒载体溶液 (滴度范围为  $0.1$  至  $5 \times 10^{11} \text{vg/mL}$ ) (表1) 使用定制修改的RetinaJect视网膜下注射器 (SurModics) (97) 在手术显微镜的直接观察下通过经玻璃体的方法视网膜下递送而无需玻璃体切除。在注射之后立即进行前室

穿刺术,以防止眼内压升高。在注射之后立即通过眼底照相术(RetCam Shuttle;Clarity Medical Systems)记录视网膜下泡的形成。在所有情况下,手术泡变平并在p.i.24至48小时内视网膜重新附着。在整个注射-端点评价时间间隔中,定期(p.i.24小时、48小时和5天,并随后在前2个月每周一次,其后接着是每月一次眼检查)进行眼科检查,包括生物显微镜检查、间接检眼镜检查和眼底照相术。如前所述进行术后管理(46)。

[0174] 组织学和免疫组织化学评价。

[0175] 如前所述收集用于离体分析的眼组织(24、99)。尽一切努力改善动物福利并使不适最小化。对于所有离体评估,将cBest和对照(WT)眼固定在4%多聚甲醛中,包埋在最佳切割温度介质中,并如前报道进行处理(99)。使用标准的苏木精/伊红(H&E)染色进行组织学评估,并按照确定的方案在10 $\mu$ m厚的冷冻切片上进行所有免疫组织化学实验(46、99)。简言之,将视网膜冷冻切片用1 $\times$ PBS/0.25%Triton X-100渗透化,在室温下封闭1小时,并用一抗(表2)过夜孵育。对于多色标记,将一抗与Alexa Fluor 488鬼笔环肽(Thermo Fisher Scientific)或PNA-AF647(L32460;Molecular Probes)组合,随后用相应的二抗(Alexa Fluor)孵育1小时。通过落射荧光或透射光显微术(Axioplan;Carl Zeiss Meditec)检查载玻片,并用Spot 4.0相机(Diagnostic Instruments)收集数字图像。

[0176] 表2.用于免疫组织化学评估的一抗列表。

	抗体	稀释度	来源
	小鼠单克隆抗 BEST1	1:400	Ab2182; Abcam
	小鼠单克隆抗 EZRIN	1:400	Ab4069; Abcam
[0177]	小鼠单克隆抗 RPE65	1:500	NB100-355; Novus Biologicals
	小鼠单克隆抗 BEST1	1:1,000	MAB5316; Millipore
	兔多克隆抗 hCAR	1:10,000	Courtesy of C. M. Craft, 南加州大学, 洛杉矶
	兔多克隆抗 RED/GREEN OPSIN	1:100	AB5405; Millipore
	兔多克隆抗 BLUE OPSIN	1:5,000	AB5407; Millipore
[0178]	兔多克隆抗 SLC16A1	1:500	Courtesy of N. J. Philp, 托马斯杰佛逊大学, 费城
	鸡多克隆抗 CNGB3	1:500	密歇根州立大学

[0179] 共聚焦显微术和图像分析。

[0180] 在TCS-SP5共聚焦显微镜体系(Leica Microsystems)或A1R激光扫描共聚焦显微镜(Nikon Instruments)上获取共聚焦图像。为了获得视锥相关MV(视锥-MV)的计数,在来自6周龄的cBest(R25\*/P463fs)和年龄匹配的WT对照的两只眼中,在每个视网膜象限(颞侧、上、下和鼻侧)(n=80ROI/只眼)10个视网膜切片中,距视神经头4mm对每个目的区域(ROI)长155 $\mu$ m的两个相邻场进行成像。以0.25- $\mu$ m的Z步获取图像堆栈,并用惠更斯反卷积软件17.04版(Scientific Volume Imaging)去卷积。所有去卷积的图像均在Leica LAS X 3D渲染模块中渲染,其中手动计数视锥-MV。在Leica LAS X软件内根据最大投影图像评估视锥-和视杆-MV的长度。在Microsoft Excel中分析数据,并使用Prism软件版本7(GraphPad)进行定量。

## [0181] 参考文献

[0182] 1. Bramall AN, Wright AF, Jacobson SG, McInnes RR (2010) The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. *Annu Rev Neurosci* 33:441-472.

[0183] 2. Veleri S, et al. (2015) Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: Insights from mouse models. *Dis Model Mech* 8:109-129.

[0184] 3. Cideciyan AV (2010) Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 29:398-427.

[0185] 4. Ghazi NG, et al. (2016) Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: Results of a phase I trial. *Hum Genet* 135:327-343.

[0186] 5. Russell S, et al. (2017) Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 390:849-860.

[0187] 6. Best F (1905) Über eine hereditäre Maculaaffektion. *Z Augenheilkd* 13:199-212.

[0188] 7. Petrukhin K, et al. (1998) Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet* 19:241-247.

[0189] 8. Boon CJ, et al. (2009) The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. *Prog Retin Eye Res* 28:187-205.

[0190] 9. Marmorstein AD, et al. (2000) Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12758-12763.

[0191] 10. Sun H, Tsunenari T, Yau KW, Nathans J (2002) The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4008-4013.

[0192] 11. Neussert R, Müller C, Milenkovic VM, Strauss O (2010) The presence of bestrophin1 modulates the Ca<sup>2+</sup> recruitment from Ca<sup>2+</sup> stores in the ER. *Pflugers Arch* 460:163-175.

[0193] 12. Hartzell HC, Qu Z, Yu K, Xiao Q, Chien LT (2008) Molecular physiology of bestrophins: Multifunctional membrane proteins linked to Best disease and other retinopathies. *Physiol Rev* 88:639-672.

[0194] 13. Strauß O, Müller C, Reichhart N, Tamm ER, Gomez NM (2014) The role of bestrophin1 in intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Adv Exp Med Biol* 801:113-119.

[0195] 14. Fischmeister R, Hartzell HC (2005) Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels. *J Physiol* 562:477-491.

[0196] 15. Milenkovic A, et al. (2015) Bestrophin 1 is indispensable for volume

regulation in human retinal pigment epithelium cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:E2630-E2639.

[0197] 16. Mullins RF, Kuehn MH, Faidley EA, Syed NA, Stone EM (2007) Differential macular and peripheral expression of bestrophin in human eyes and its implication for Best disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:3372-3380.

[0198] 17. Guziewicz KE, et al. (2017) Bestrophinopathy: An RPE-photoreceptor interface disease. *Prog Retin Eye Res* 58:70-88.

[0199] 18. Kane Dickson V, Pedi L, Long SB (2014) Structure and insights into the function of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel. *Nature* 516:213-218.

[0200] 19. Yang T, et al. (2014) Structure and selectivity in bestrophin ion channels. *Sciencg* 346:355-359.

[0201] 20. Vaisey G, Miller AN, Long SB (2016) Distinct regions that control ion selectivity and calcium-dependent activation in the bestrophin ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E7399-E7408.

[0202] 21. Deutman AF (1969) Electro-oculography in families with vitelliform dystrophy of the fovea. Detection of the carrier state. *Arch Ophthalmol* 81:305-316.

[0203] 22. Arden GB, Constable PA (2006) The electro-oculogram. *Prog Retin Eye Res* 25:207-248.

[0204] 23. Guziewicz KE, et al. (2007) Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: A novel animal model for best disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:1959-1967.

[0205] 24. Beltran WA, et al. (2014) Canine retina has a primate fovea-like bouquet of cone photoreceptors which is affected by inherited macular degenerations. *PLoS One* 9:e90390.

[0206] 25. Hageman GS, Johnson LV (1991) The photoreceptor-retinal pigment epithelium interface. *Principles and Practise of Clinical Electrophysiology of Vision*, eds Heckenlively JR, ArdeB GB (Mosby-Year Book, St. Louis), pp 53-68.

[0207] 26. Strauss O (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845-881.

[0208] 27. Huang B, Karwoski CJ (1992) Light-evoked expansion of subretinal space volume in the retina of the frog. *J Neurosci* 12:4243-4252.

[0209] 28. Putting BJ, Zweyphenning RC, Vrensen GF, Oosterhuis JA, van Best JA (1992) Bloodretinal barrier dysfunction at the pigment epithelium induced by blue light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:3385-3393.

[0210] 29. Li JD, Govardovskii VI, Steinberg RH (1994) Light-dependent hydration of the space surrounding photoreceptors in the cat retina. *Vis Neurosci* 11:743-752.

[0211] 30. Huang Y, et al. (1998) Relation of optical coherence tomography to

microanatomy in normal and rd chickens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2405-2416.

[0212] 31. Pianta MJ, et al. (2003) In vivo micropathology of Best macular dystrophy with optical coherence tomography. *Exp Eye Res* 76:203-211.

[0213] 32. Cideciyan AV, et al. (2005) In vivo dynamics of retinal injury and repair in the rhodopsin mutant dog model of human retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5233-5238.

[0214] 33. Bizheva K, et al. (2006) Optophysiology: Depth-resolved probing of retinal physiology with functional ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5066-5071.

[0215] 34. Kay CN, et al. (2012) Three-dimensional distribution of the vitelliform lesion, photoreceptors, and retinal pigment epithelium in the macula of patients with best vitelliform macular dystrophy. *Arch Ophthalmol* 130:357-364.

[0216] 35. Bissig D, Berkowitz BA (2012) Light-dependent changes in outer retinal water diffusion in rats in vivo. *Mol Vis* 18:2561.

[0217] 36. Abramoff MD, et al. (2013) Human photoreceptor outer segments shorten during light adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:3721-3728.

[0218] 37. Li Y, Fariss RN, Qian JW, Cohen ED, Qian H (2016) Light-induced thickening of photoreceptor outer segment layer detected by ultra-high resolution OCT imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:OCT105-OCT111.

[0219] 38. Lu Y, Wang B, Pepperberg DR, Yao X (2016) Stimulus-evoked outer segment changes occur before the hyperpolarization of retinal photoreceptors. *Biomed Opt Express* 8:38-47.

[0220] 39. Zhang P, et al. (2017) In vivo optophysiology reveals that G-protein activation triggers osmotic swelling and increased light scattering of rod photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:E2937-E2946.

[0221] 40. Lu CD, et al. (2017) Photoreceptor layer thickness changes during dark adaptation observed with ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58:4632-4643.

[0222] 41. Steinberg RH (1985) Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol* 60:327-346.

[0223] 42. Mieziowska K (1996) The interphotoreceptor matrix, a space in sight. *Microsc Res Tech* 35:463-471.

[0224] 43. Sidjanin DJ, et al. (2002) Canine CNGB3 mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus ACHM3. *Hum Mol Genet* 11:1823-1833.

[0225] 44. Komáromy AM, et al. (2013) Transient photoreceptor deconstruction by CNTF enhances rAAV-mediated cone functional rescue in late stage CNGB3-

achromatopsia. *Mol Ther* 21:1131-1141.

[0226] 45. Acland GM, Aguirre GD (1987) Retinal degenerations in the dog: IV. Early retinal degeneration (erd) in Norwegian elkhounds. *Exp Eye Res* 44:491-521.

[0227] 46. Guziewicz KE, et al. (2013) Recombinant AAV-mediated BEST1 transfer to the retinal pigment epithelium: Analysis of serotype-dependent retinal effects. *PLoS One* 8:e75666.

[0228] 47. Bruewer AR, et al. (2013) Evaluation of lateral spread of transgene expression following subretinal AAV-mediated gene delivery in dogs. *PLoS One* 8:e60218.

[0229] 48. Beltran WA, et al. (2017) Optimization of retinal gene therapy for X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR mutations. *Mol Ther* 25:1866-1880.

[0230] 49. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP (2010) The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 10:802-823.

[0231] 50. Jacobson SG, et al. (2008) Photoreceptor layer topography in children with Leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:4573-4577.

[0232] 51. Charbel Issa P, et al. (2009) Characterisation of severe rod-cone dystrophy in a consanguineous

[0233] family with a splice site mutation in the MERTK gene. *Br J Ophthalmol* 93:920-925.

[0234] 52. Meunier I, et al. (2016) A dominant mutation in MAPKAPK3, an actor of p38 signaling pathway, causes a new retinal dystrophy involving Bruch's membrane and retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* 25:916-926.

[0235] 53. Singh R, et al. (2013) iPS cell modeling of Best disease: Insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum Mol Genet* 22:593-607.

[0236] 54. Bonilha VL, Finnemann SC, Rodriguez-Boulan E (1999) Ezrin promotes morphogenesis of apical microvilli and basal infoldings in retinal pigment epithelium. *J Cell Biol* 147:1533-1548.

[0237] 55. Koltzsch M, Neumann C, König S, Gerke V (2003) Ca<sup>2+</sup>-dependent binding and activation of dormant Ezrin by dimeric S 100P. *Mol Biol Cell* 14:2372-2384.

[0238] 56. Bonilha VL, et al. (2006) The retinal pigment epithelium apical microvilli and retinal function. *Adv Exp Med Biol* 572:519-524.

[0239] 57. Bonilha VL, Rayborn ME, Saotome I, McClatchey AI, Hollyfield JG (2006) Microvilli defects in retinas of ezrin knockout mice. *Exp Eye Res* 82:720-729.

[0240] 58. Philp NJ, Nachmias VT (1985) Components of the cytoskeleton in the retinal pigmented epithelium of the chick. *J Cell Biol* 101:358-362.

[0241] 59. Bonilha VL, et al. (2004) Proteomic characterization of isolated

- retinal pigment epithelium microvilli. *Mol Cell Proteomics* 3:1119-1127.
- [0242] 60. Gao H, Hollyfield JG (1992) Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:1-17.
- [0243] 61. Kiser PD, Golczak M, Palczewski K (2014) Chemistry of the retinoid (visual) cycle. *Chem Rev* 114:194-232.
- [0244] 62. Miller SS, Steinberg RH (1977) Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J Membr Biol* 36:337-372.
- [0245] 63. Volland S, Esteve-Rudd J, Hoo J, Yee C, Williams DS (2015) A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula. *PLoS One* 10:e0125631.
- [0246] 64. Cuenca N, Ortuño-Lizarán I, Pinilla I (October 13, 2017) Cellular characterization of optical coherence tomography and outer retinal bands using specific immunohistochemistry markers and clinical implications. *Ophthalmology*, 10.1016/j.ophtha.2017.09.016.
- [0247] 65. Uehara F, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM (1990) Light-evoked changes in the interphotoreceptor matrix. *Science* 248:1633-1636.
- [0248] 66. Jonnal RS, Kocaoglu OP, Wang Q, Lee S, Miller DT (2012) Phase-sensitive imaging of the outer retina using optical coherence tomography and adaptive optics. *Biomed Opt Express* 3:104-124.
- [0249] 67. Hillmann D, et al. (2016) In vivo optical imaging of physiological responses to photostimulation in human photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:13138-13143.
- [0250] 68. Bialek S, Miller SS (1994) K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport mechanisms in bovine pigment epithelium that could modulate subretinal space volume and composition. *J Physiol* 475:401-417.
- [0251] 69. Lu R, Levy AM, Zhang Q, Pittler SJ, Yao X (2013) Dynamic near-infrared imaging reveals transient phototropic change in retinal rod photoreceptors. *J Biomed Opt* 18:106013.70. Querques G, et al. (2011) The spectrum of subclinical Best vitelliform macular dystrophy in subjects with mutations in BEST1 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:4678-4684.
- [0252] 71. Qian CX, et al. (2017) Optical coherence tomography examination of the retinal pigment epithelium in Best vitelliform macular dystrophy. *Ophthalmology* 124:456-463.
- [0253] 72. Kay DB, et al. (2013) Outer retinal structure in best vitelliform macular dystrophy. *JAMA Ophthalmol* 131:1207-1215.
- [0254] 73. Arora R, et al. (2016) Unilateral BEST1-associated retinopathy. *Am J Ophthalmol* 169:24-32.
- [0255] 74. Scoles D, et al. (2017) Photoreceptor inner segment morphology in

Best vitelliform macular dystrophy. *Retina* 37:741-748.

[0256] 75. Abramoff MD, Mullins RF, Stone EM (2014) Outer segment length in different Best disease genotypes. *JAMA Ophthalmol* 132:1152-1153.

[0257] 76. Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM (1990) Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347:83-86.

[0258] 77. Milam AH, Li ZY, Fariss RN (1998) Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 17:175-205.

[0259] 78. Jacobson SG, et al. (2006) Remodeling of the human retina in choroideremia: Rab escort protein 1 (REP-1) mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4113-4120.

[0260] 79. Jacobson SG, Cideciyan AV (2010) Treatment possibilities for retinitis pigmentosa. *N Engl J Med* 363:1669-1671.

[0261] 80. Cideciyan AV, et al. (2011) Cone photoreceptors are the main targets for gene therapy of NPHP5 (IQCB1) or NPHP6 (CEP290) blindness: Generation of an all-cone Nphp6

[0262] hypomorph mouse that mimics the human retinal ciliopathy. *Hum Mol Genet* 20:1411-1423. 81. Sadigh S, et al. (2013) Abnormal thickening as well as thinning of the photoreceptor layer in intermediate age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:1603-1612. 82. 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:E5844-E5853.

[0263] 83. Johnson AA, et al. (2017) Bestrophin 1 and retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 58:45-69.

[0264] 84. Schatz P, Klar J, Andréasson S, Ponjavic V, Dahl N (2006) Variant phenotype of Best vitelliform macular dystrophy associated with compound heterozygous mutations in VMD2. *Ophthalmic Genet* 27:51-56.

[0265] 85. Burgess R, et al. (2008) Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. *Am J Hum Genet* 82:19-31.

[0266] 86. Kinnick TR, et al. (2011) Autosomal recessive vitelliform macular dystrophy in a large cohort of vitelliform macular dystrophy patients. *Retina* 31:581-595.

[0267] 87. Bitner H, et al. (2011) A homozygous frameshift mutation in BEST1 causes the classical form of Best disease in an autosomal recessive mode. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:5332-5338.

[0268] 88. Boon CJ, et al. (2013) Autosomal recessive bestrophinopathy: Differential diagnosis and treatment options. *Ophthalmology* 120:809-820.

[0269] 89. Lamb TD, Pugh EN, Jr (2004) Dark adaptation and the retinoid cycle of

vision.Prog Retin Eye Res 23:307-380.

[0270] 90.Wang JS,Kefalov VJ(2011)The cone-specific visual cycle.Prog Retin Eye Res 30:115-128.

[0271] 91.Kaylor JJ,et al.(2013)Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Müller glial cells of the retina.Nat Chem Biol 9:30-36.

[0272] 92.Cideciyan AV,Pugh EN,Jr,Lamb TD,Huang Y,Jacobson SG(1997)Rod plateau during dark adaptation in Sorsby's fundus dystrophy and vitamin A deficiency.Invest Ophthalmol Vis Sci 38:1786-1794.

[0273] 93.Cideciyan AV,et al.(2000)Rod and cone visual cycle consequences of a null mutation in the 11-cis-retinol dehydrogenase gene in man.Vis Neurosci 17:667-678.

[0274] 94.Cideciyan AV,et al.(2013)Human cone visual pigment deletions spare sufficient photoreceptors to warrant gene therapy.Hum Gene Ther 24:993-1006.

[0275] 95.Cideciyan AV,et al.(2007)Reduced-illumination autofluorescence imaging in ABCA4-associated retinal degenerations.J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis 24:1457-1467.

[0276] 96.National Research Council(2011)Guide for the Care and Use of Laboratory Animals(Natl Acad Press,Washington,DC),8th Ed.

[0277] 97.Komáromy AM,Varner SE,de Juan E,Acland GM,Aguirre GD(2006)Application of a new subretinal injection device in the dog.Cell Transplant 15:511-519.

[0278] 98.Delori F,et al.(2011)Quantitative measurements of autofluorescence with the scanning laser ophthalmoscope.Invest Ophthalmol Vis Sci 52:9379-9390.

[0279] 99.Beltran WA,Hammond P,Acland GM,Aguirre GD(2006)A frameshift mutation in RPGR exon ORF15 causes photoreceptor degeneration and inner retina remodeling in a model of X-linked retinitis pigmentosa.Invest Ophthalmol Vis Sci 47:1669-1681.

[0280] 其他实施方案

[0281] 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。

[0282] 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。

[0283] 等同方案

[0284] 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。

[0285] 本文中定义和使用的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。

[0286] 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。

[0287] 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”。

[0288] 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。

[0289] 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。

[0290] 如本文中在说明书和权利要求书所使用的,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。

[0291] 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。

[0292] 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”。

		序列表	
[0001]			
[0002]	<110>	佛罗里达大学研究基金会有限公司	
[0003]	<120>	用于治疗卵黄状黄斑变性的腺相关病毒载体	
[0004]	<130>	U1197.70139W000	
[0005]	<140>	尚未分配	
[0006]	<141>	与此同时	
[0007]	<150>	US 62/754,530	
[0008]	<151>	2018-11-01	
[0009]	<150>	US 62/749,622	
[0010]	<151>	2018-10-23	
[0011]	<150>	US 62/726,184	
[0012]	<151>	2018-08-31	
[0013]	<160>	20	
[0014]	<170>	PatentIn version 3.5	
[0015]	<210>	1	
[0016]	<211>	48	
[0017]	<212>	RNA	
[0018]	<213>	人工序列	
[0019]	<220>		
[0020]	<223>	合成的多核苷酸	
[0021]	<400>	1	
[0022]		ccgucaaagc uucacagugu uucaagagaa cacugugaag cuuugacg	48
[0023]	<210>	2	
[0024]	<211>	19	
[0025]	<212>	RNA	
[0026]	<213>	人工序列	
[0027]	<220>		
[0028]	<223>	合成的多核苷酸	
[0029]	<400>	2	
[0030]		cgucaaagc uucacagugu	19
[0031]	<210>	3	
[0032]	<211>	19	
[0033]	<212>	RNA	
[0034]	<213>	人工序列	
[0035]	<220>		
[0036]	<223>	合成的多核苷酸	
[0037]	<400>	3	
[0038]		acacugugaa gcuuugacg	19
[0039]	<210>	4	
[0040]	<211>	48	
[0041]	<212>	RNA	

[0042]	<213>	人工序列	
[0043]	<220>		
[0044]	<223>	合成的多核苷酸	
[0045]	<400>	4	
[0046]		aagaacucgc cauauagcag ccucgaggcu gcuauauggc gaguucuu	48
[0047]	<210>	5	
[0048]	<211>	21	
[0049]	<212>	RNA	
[0050]	<213>	人工序列	
[0051]	<220>		
[0052]	<223>	合成的多核苷酸	
[0053]	<400>	5	
[0054]		aagaacucgc cauauagcag c	21
[0055]	<210>	6	
[0056]	<211>	21	
[0057]	<212>	RNA	
[0058]	<213>	人工序列	
[0059]	<220>		
[0060]	<223>	合成的多核苷酸	
[0061]	<400>	6	
[0062]		gcugcuauau ggcgaguucu u	21
[0063]	<210>	7	
[0064]	<211>	9	
[0065]	<212>	RNA	
[0066]	<213>	人工序列	
[0067]	<220>		
[0068]	<223>	合成的多核苷酸	
[0069]	<400>	7	
[0070]		uucaagaga	9
[0071]	<210>	8	
[0072]	<211>	6	
[0073]	<212>	RNA	
[0074]	<213>	人工序列	
[0075]	<220>		
[0076]	<223>	合成的多核苷酸	
[0077]	<400>	8	
[0078]		cucgag	6
[0079]	<210>	9	
[0080]	<211>	1758	
[0081]	<212>	DNA	
[0082]	<213>	智人	
[0083]	<220>		

[0084]	<221>	misc_feature	
[0085]	<222>	(213)..(213)	
[0086]	<223>	n 为 a、c、g或 t	
[0087]	<220>		
[0088]	<221>	misc_feature	
[0089]	<222>	(1410)..(1410)	
[0090]	<223>	n 为 a、c、g或t	
[0091]	<400>	9	
[0092]		atgaccatca cttacacaag ccaagtggct aatgcccgt taggctcctt ctcccgcctg	60
[0093]		ctgctgtgct ggcgggcag catctacaag ctgctatatg gcgagttctt aatcttctg	120
[0094]		ctctgctact acatcatccg ctttatttat aggctggccc tcacggaaga acaacagctg	180
[0095]		atgtttgaga aactgactct gtattgcgac agntacatcc agctcatccc catttcttc	240
[0096]		gtgctgggct tctacgtgac gctggtctg acccgctgg ggaaccagta cgagaacctg	300
[0097]		ccgtggccc accgcctcat gagcctggtg tcgggcttcg tcgaaggcaa ggacgagcaa	360
[0098]		ggccggctgc tgcggcgac gctcatccgc tacgccaacc tgggcaactg gctcatcctg	420
[0099]		cgcagcgtca gcaccgact ctacaagcgc ttccccagcg cccagcacct ggtgcaagca	480
[0100]		ggctttatga ctccggcaga acacaagcag ttggagaaac tgagcctacc acacaacatg	540
[0101]		ttctgggtgc cctgggtgtg gtttgcaac ctgtcaatga aggcgtggct tggaggtcga	600
[0102]		atccgggacc ctatcctgct ccagagcctg ctgaacgaga tgaacacctt gcgtactcag	660
[0103]		tgtggacacc tgtatgccta cgactggatt agtatccac tgggtgatac acaggtggtg	720
[0104]		actgtggcgg tgtacagctt cttcctgact tgtctagtgt ggcggcagtt tctgaacca	780
[0105]		gccaaggcct accctggcca tgagctggac ctggttgtgc ccgtcttcac gttcctgcag	840
[0106]		ttctcttct atgttgctg gctgaagggtg gcagagcagc tcatcaacc ctttggagag	900
[0107]		gatgatgatg attttgagac caactggatt gtcgacagga atttgcaggt gtcctgttg	960
[0108]		gctgtggatg agatgcacca ggacctgct cggatggagc cggacatgta ctggaataag	1020
[0109]		cccagccac agcccccta cacagctgct tccgccagc tccgtcgagc ctcttttatg	1080
[0110]		ggctccacct tcaacatcag cctgaacaaa gaggagatgg agttccagcc caatcaggag	1140
[0111]		gacgaggagg atgctcacgc tggcatcatt ggccgcttc taggcctgca gtcccatgat	1200
[0112]		caccatctc ccagggcaaa ctcaaggacc aaactactgt ggcccaagag ggaatcctt	1260
[0113]		ctccacgagg gctgccc aaaccacaag gcagccaaac agaacgtag gggccaggaa	1320
[0114]		gacaacaagg cctggaagct taaggctgtg gacgcttca agtctgcccc actgtatcag	1380
[0115]		aggccaggct actacagtgc cccacagacn cccctcagcc ccaactccat gttcttccc	1440
[0116]		ctagaacat cagcgcgctc aaagcttcac agtgtcacag gcatagacac caaagacaaa	1500
[0117]		agcttaaaga ctgtgagttc tggggccaag aaaagtttg aattgctctc agagagcgt	1560
[0118]		ggggccttga tggagacccc agaagtatct caagtgagga ggaaaactgt ggagtttaac	1620
[0119]		ctgacggata tgccagagat cccgaaaat cacctcaaag aacctttgga acaatcacca	1680
[0120]		accaacatac aactacact caaagatcac atggatcctt attggcctt ggaaaacagg	1740
[0121]		gatgaagcac attcctaa	1758
[0122]	<210>	10	
[0123]	<211>	20	
[0124]	<212>	DNA	
[0125]	<213>	人工序列	

[0126]	<220>	
[0127]	<223>	合成的多核苷酸
[0128]	<400>	10
[0129]	ctactgtacg gagaatttct	20
[0130]	<210>	11
[0131]	<211>	19
[0132]	<212>	DNA
[0133]	<213>	人工序列
[0134]	<220>	
[0135]	<223>	合成的多核苷酸
[0136]	<400>	11
[0137]	ccagcaagct gcacagcgt	19
[0138]	<210>	12
[0139]	<211>	623
[0140]	<212>	DNA
[0141]	<213>	人工序列
[0142]	<220>	
[0143]	<223>	合成的多核苷酸
[0144]	<400>	12
[0145]	aattctgtca ttttactagg gtgatgaaat tccaagcaa caccatcctt ttcagataag	60
[0146]	ggcactgagg ctgagagagg agctgaaacc taccggcgt caccacacac aggtggcaag	120
[0147]	gctgggacca gaaaccagga ctgttgactg cagccccgta ttcattcttt ccatagccca	180
[0148]	cagggtgtgc aaagaccca gggcctagtc agaggctcct cttcctgga gagttcctgg	240
[0149]	cacagaagtt gaagctcagc acagccccct aacccccaac tctctctgca aggcctcagg	300
[0150]	ggtcagaaca ctggtggagc agatccttta gcctctggat tttagggcca tggtagaggg	360
[0151]	ggtgttgecc taaattccag ccctggctc agcccaacac cctccaagaa gaaattagag	420
[0152]	gggccatggc caggctgtgc tagccgttgc ttctgagcag attacaagaa gggaccaaga	480
[0153]	caaggactcc tttgtggagg tcctggctta gggagtcaag tgacggcggc tcagcactca	540
[0154]	cgtgggcagt gccagcctct aagagtgggc aggggcaactg gccacagagt cccagggagt	600
[0155]	cccaccagcc tagtcgccag acc	623
[0156]	<210>	13
[0157]	<211>	114
[0158]	<212>	DNA
[0159]	<213>	人工序列
[0160]	<220>	
[0161]	<223>	合成的多核苷酸
[0162]	<400>	13
[0163]	taaaacgacg gccagtgaat tcatatttgc atgtcgetat gtgttctggg aaatcacat	60
[0164]	aaacgtgaaa tgtctttgga tttgggaatc ttataagttc tgtatgagac cact	114
[0165]	<210>	14
[0166]	<211>	241
[0167]	<212>	DNA

[0168]	<213> 人工序列	
[0169]	<220>	
[0170]	<223> 合成的多核苷酸	
[0171]	<400> 14	
[0172]	gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgttagagag	60
[0173]	ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaatac gtgacgtaga	120
[0174]	aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat	180
[0175]	atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggtt tatatatctt gtggaaagga	240
[0176]	c	241
[0177]	<210> 15	
[0178]	<211> 24	
[0179]	<212> DNA	
[0180]	<213> 智人	
[0181]	<400> 15	
[0182]	aagctgctat atggcgagtt ctt	24
[0183]	<210> 16	
[0184]	<211> 21	
[0185]	<212> DNA	
[0186]	<213> 人工序列	
[0187]	<220>	
[0188]	<223> 合成的多核苷酸	
[0189]	<400> 16	
[0190]	cgacgatata ccgctcaaga a	21
[0191]	<210> 17	
[0192]	<211> 24	
[0193]	<212> DNA	
[0194]	<213> 人工序列	
[0195]	<220>	
[0196]	<223> 合成的多核苷酸	
[0197]	<400> 17	
[0198]	aagctgctgt acggcgagtt cctg	24
[0199]	<210> 18	
[0200]	<211> 48	
[0201]	<212> DNA	
[0202]	<213> 人工序列	
[0203]	<220>	
[0204]	<223> 合成的多核苷酸	
[0205]	<400> 18	
[0206]	ccgtcaaagc ttcacagtgt ttcaagagaa cactgtgaag ctttgacg	48
[0207]	<210> 19	
[0208]	<211> 48	
[0209]	<212> DNA	

[0210]	<213>	人工序列	
[0211]	<220>		
[0212]	<223>	合成的多核苷酸	
[0213]	<400>	19	
[0214]		gctgctatat ggcgagttct tctcgagaag aactcgccat atagcagc	48
[0215]	<210>	20	
[0216]	<211>	174	
[0217]	<212>	DNA	
[0218]	<213>	人工序列	
[0219]	<220>		
[0220]	<223>	合成的多核苷酸	
[0221]	<400>	20	
[0222]		taaaacgacg gccagtgaat tcatatttgc atgtcgctat gtgttctggg aaatcacat	60
[0223]		aaacgtgaaa tgtctttgga tttgggaatc ttataagttc tgtatgagac cactcggatc	120
[0224]		ccgtcaaagc ttcacagtgt ttcaagagaa cactgtgaag ctttgacgtt tttt	174

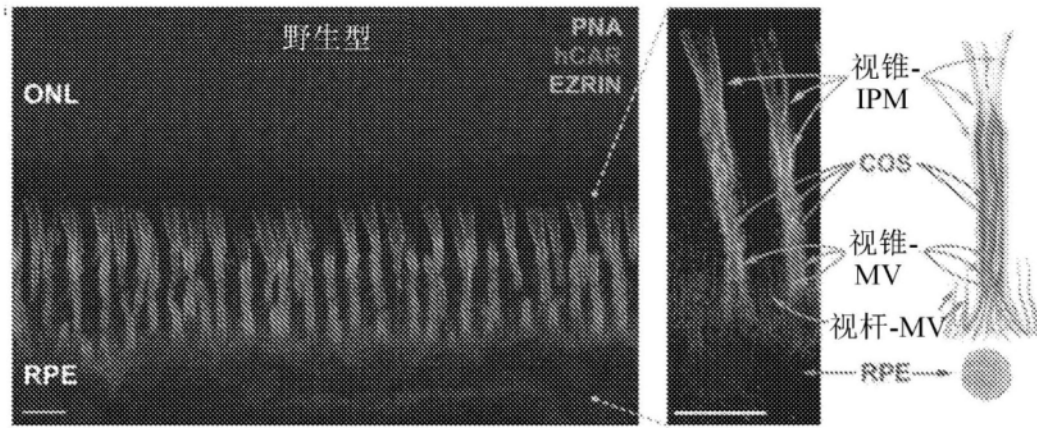


图1A

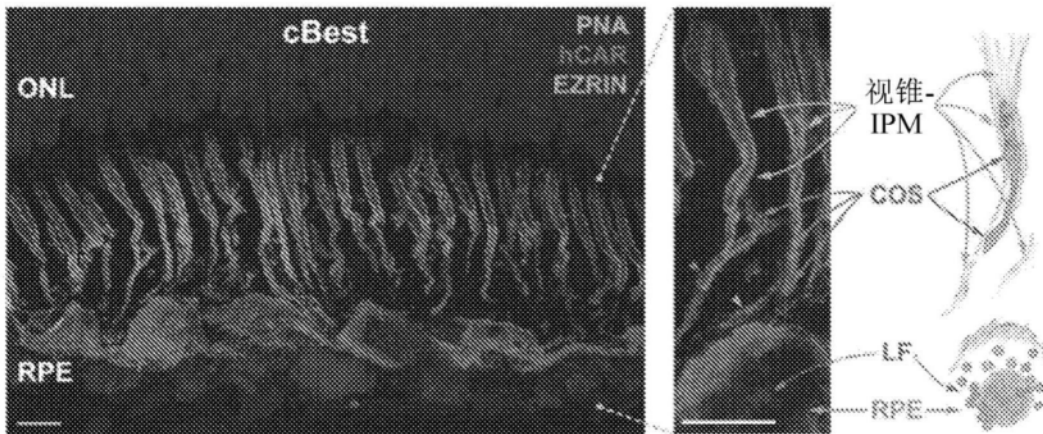


图1B

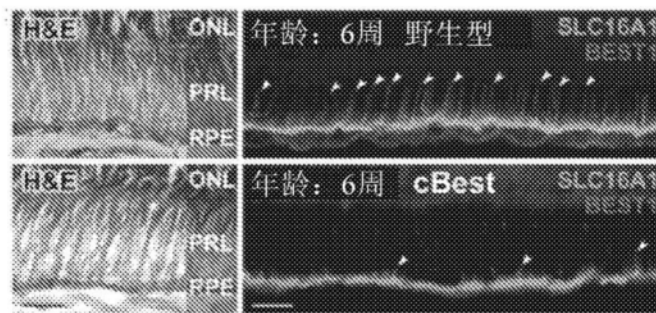


图1C

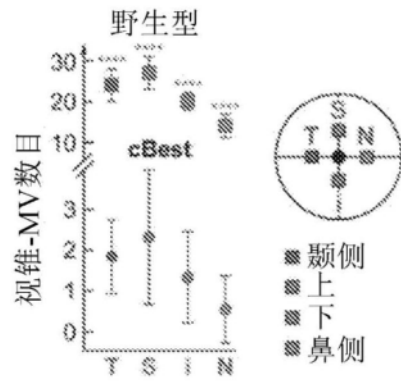


图1D

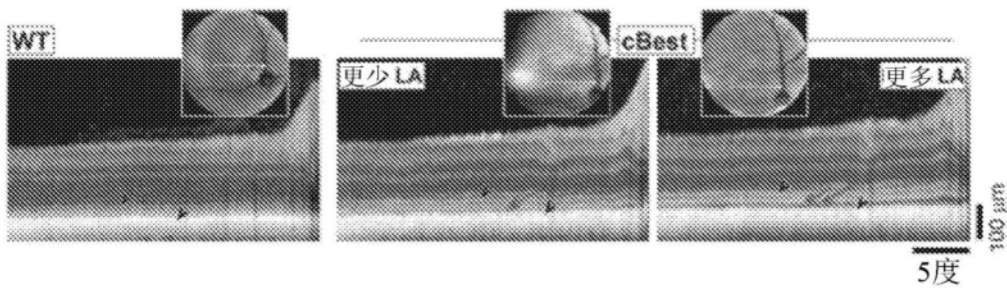


图2A

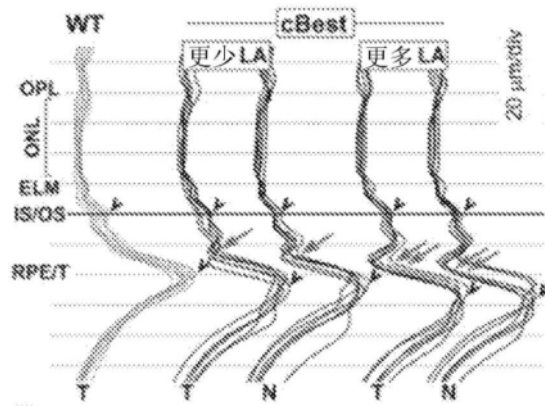


图2B

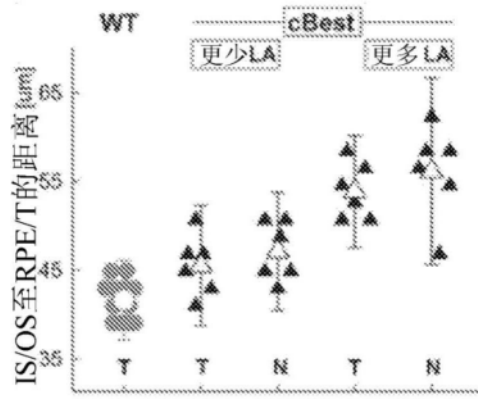


图2C

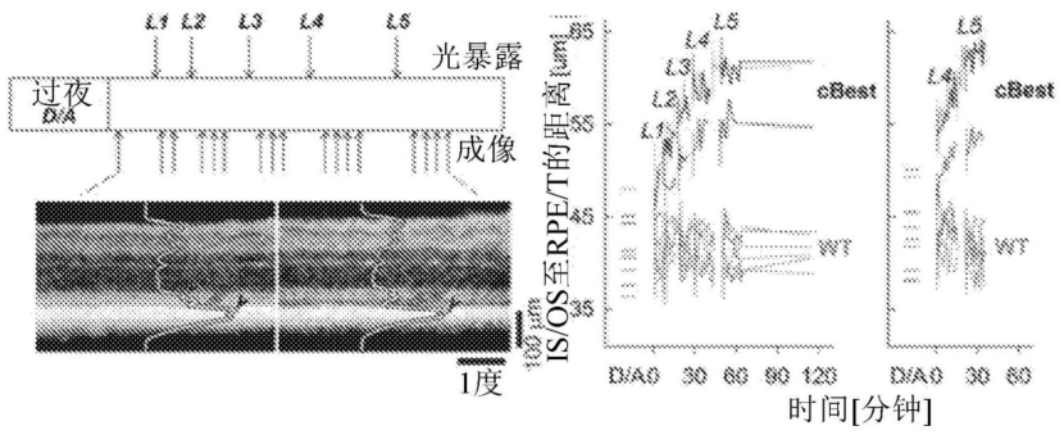


图2D

图2E

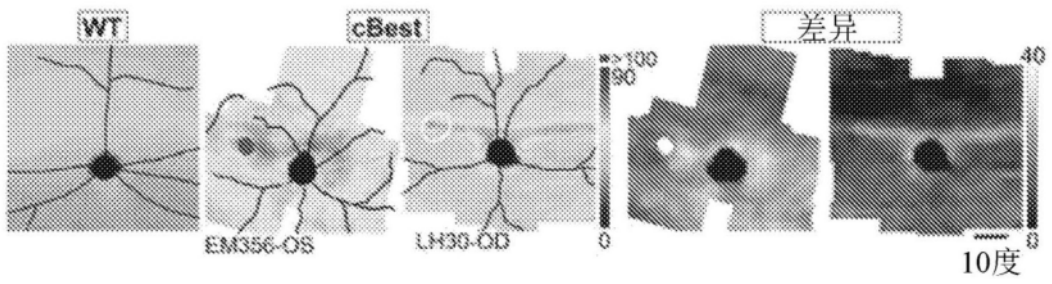


图2F

卵黄样营养不良病变的自然史

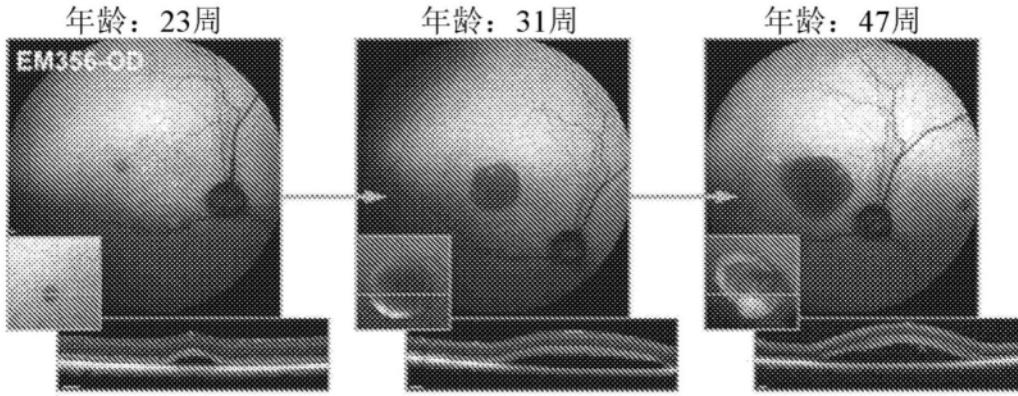


图3A

病变处视网膜下基因增强

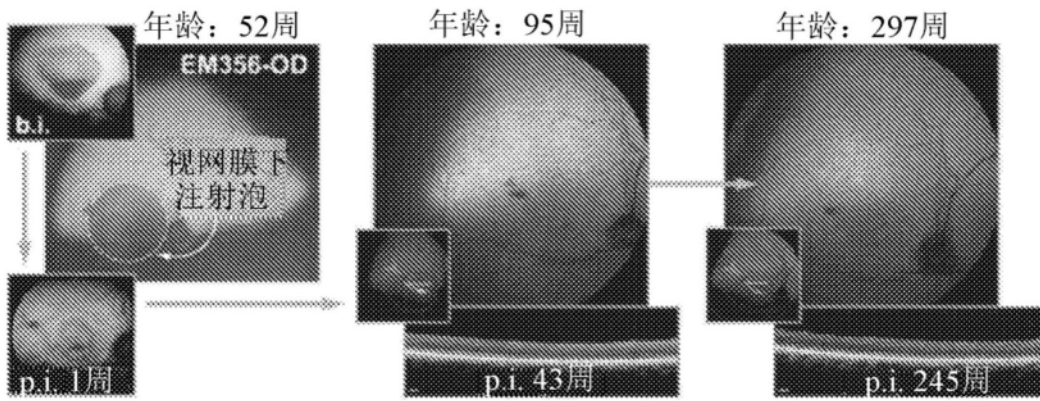


图3B

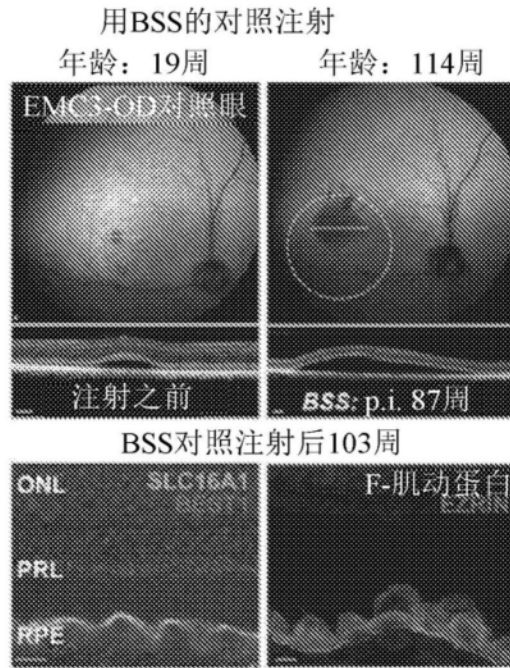


图3C

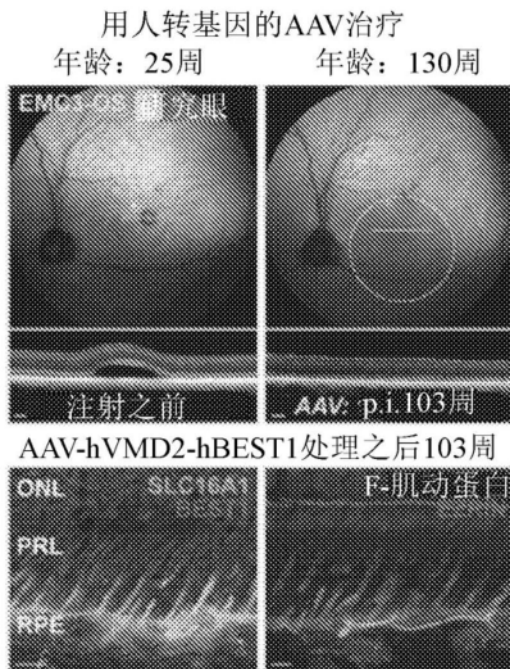


图3D

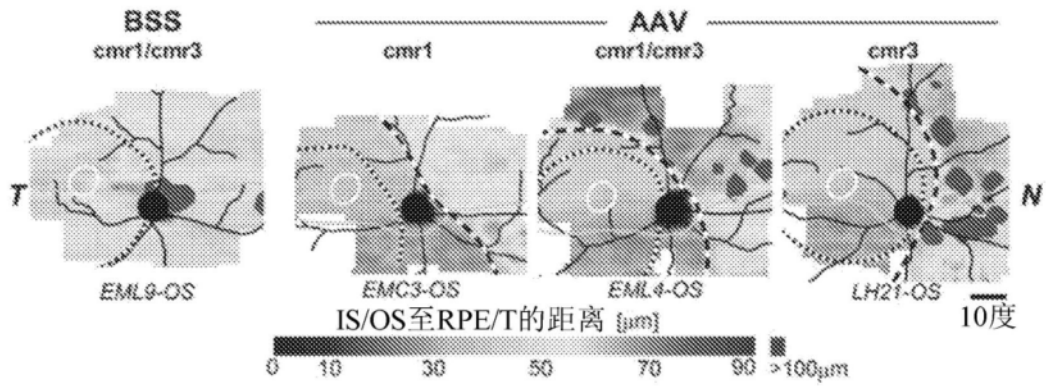


图4A

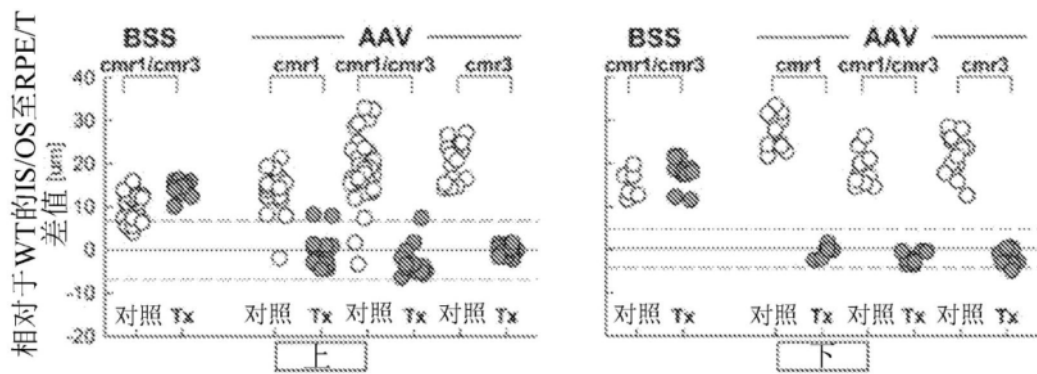


图4B

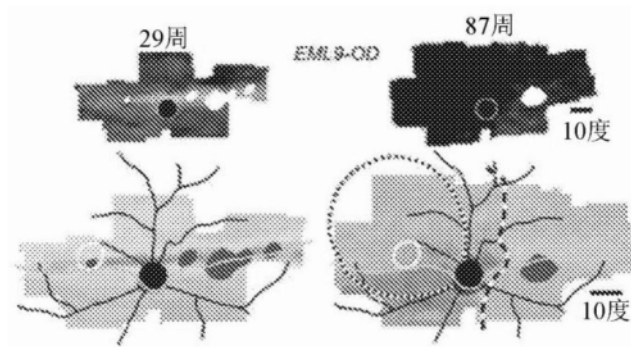


图4C

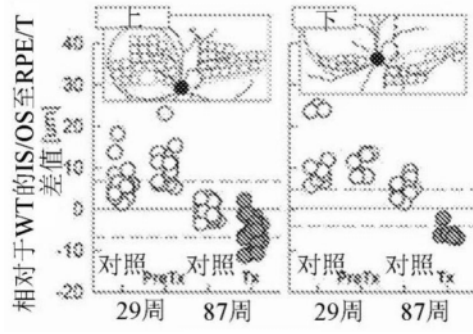


图4D

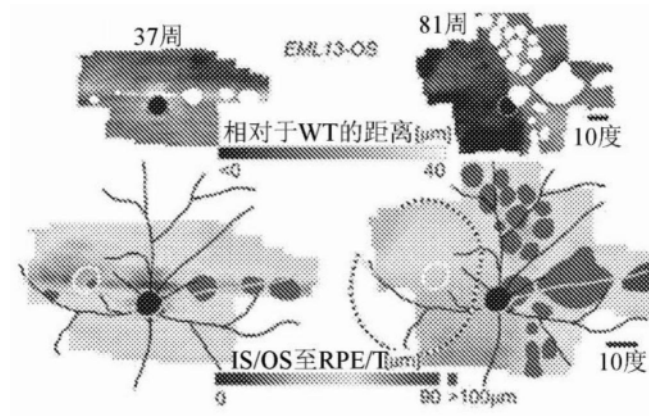


图4E

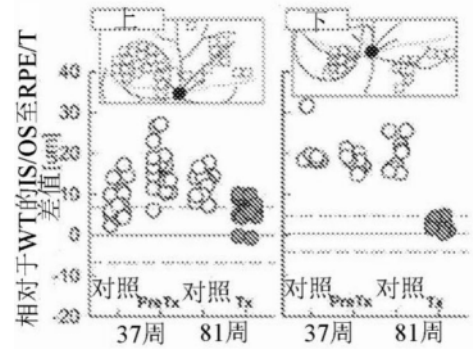


图4F

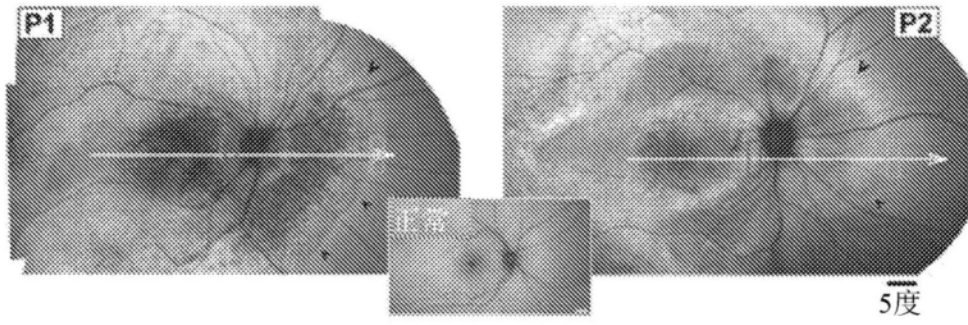


图5A

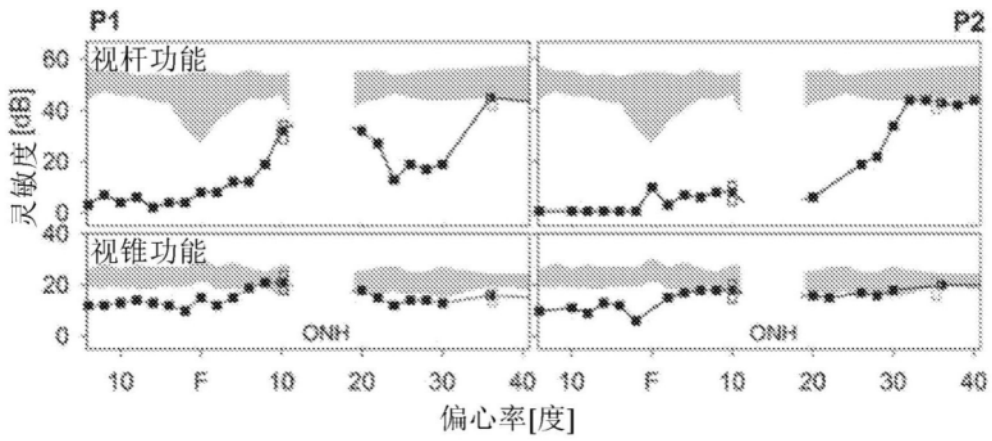


图5B

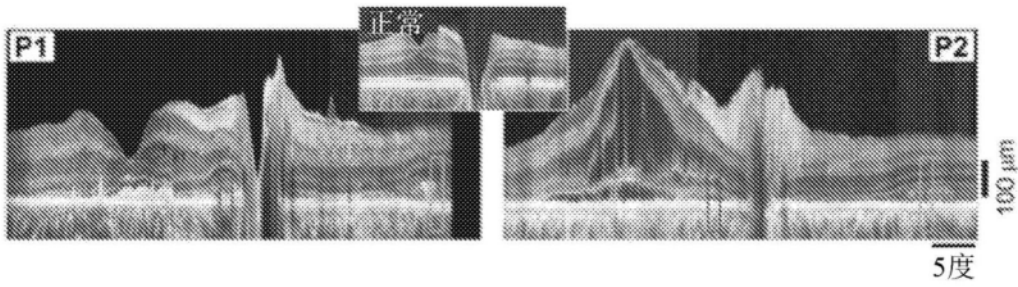


图5C

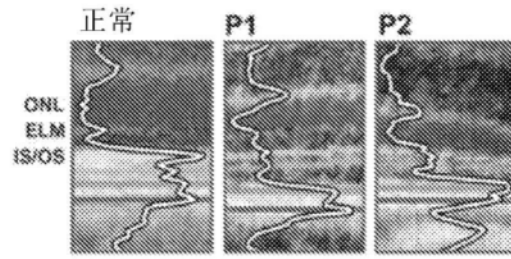


图5D

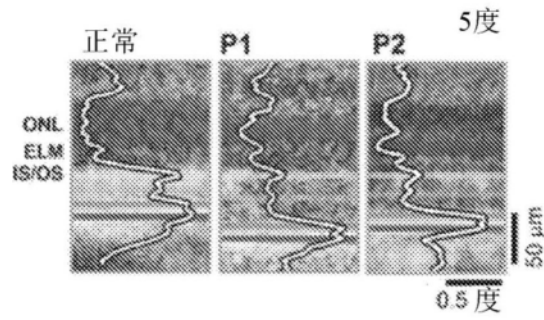


图5E

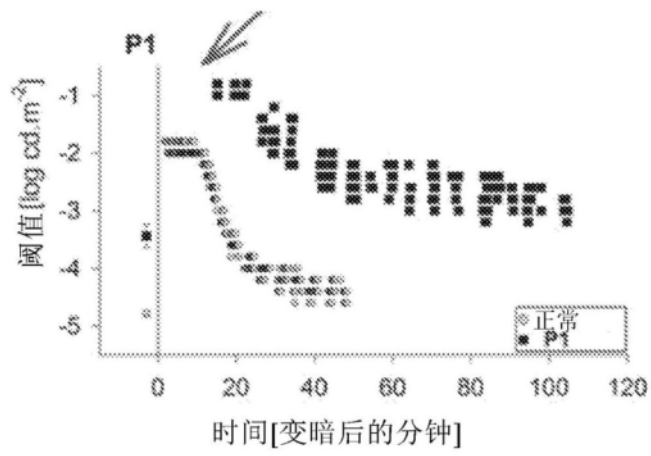


图5F

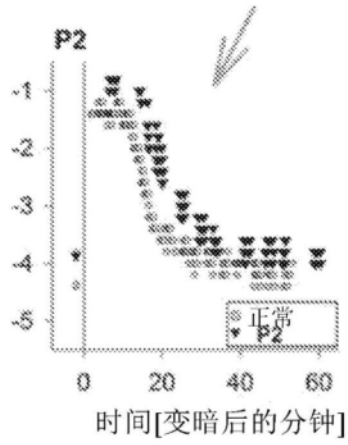


图5G

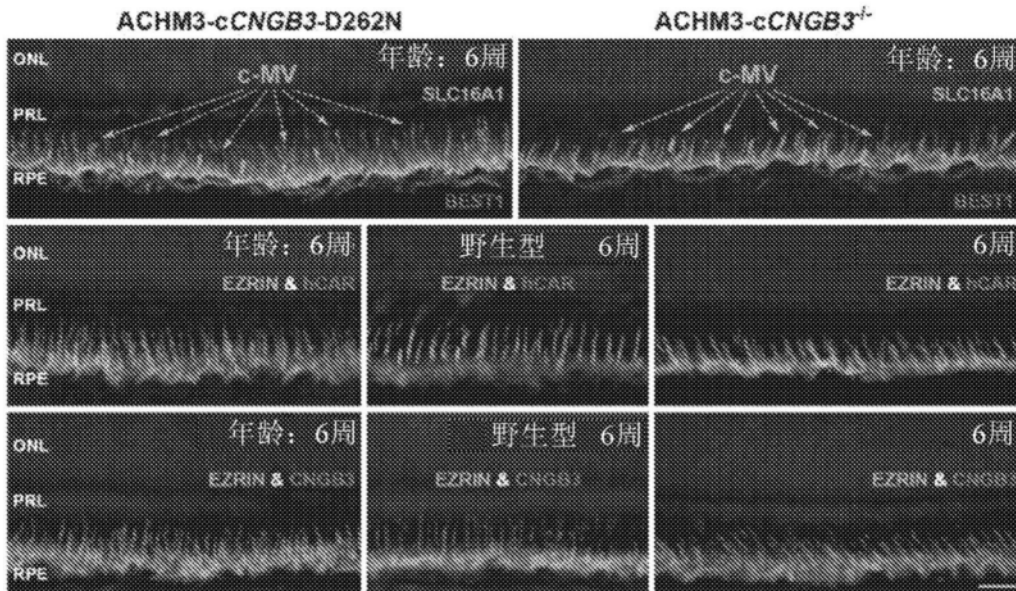


图6A

图6B

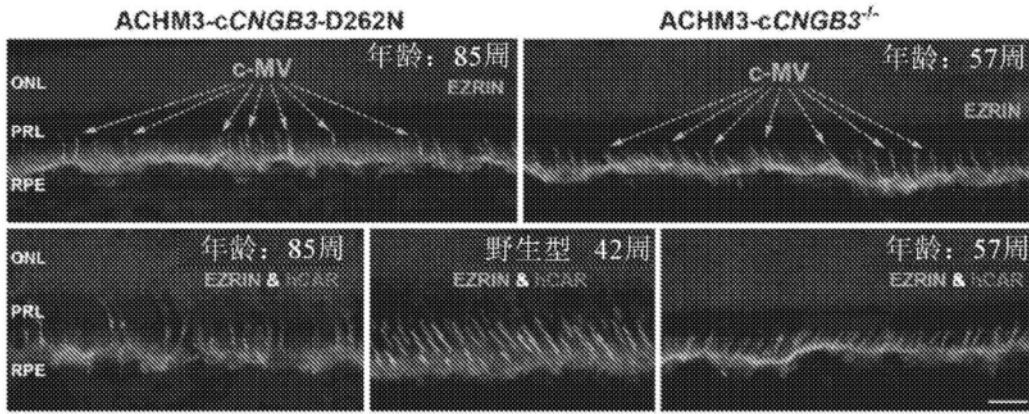


图6C

图6D

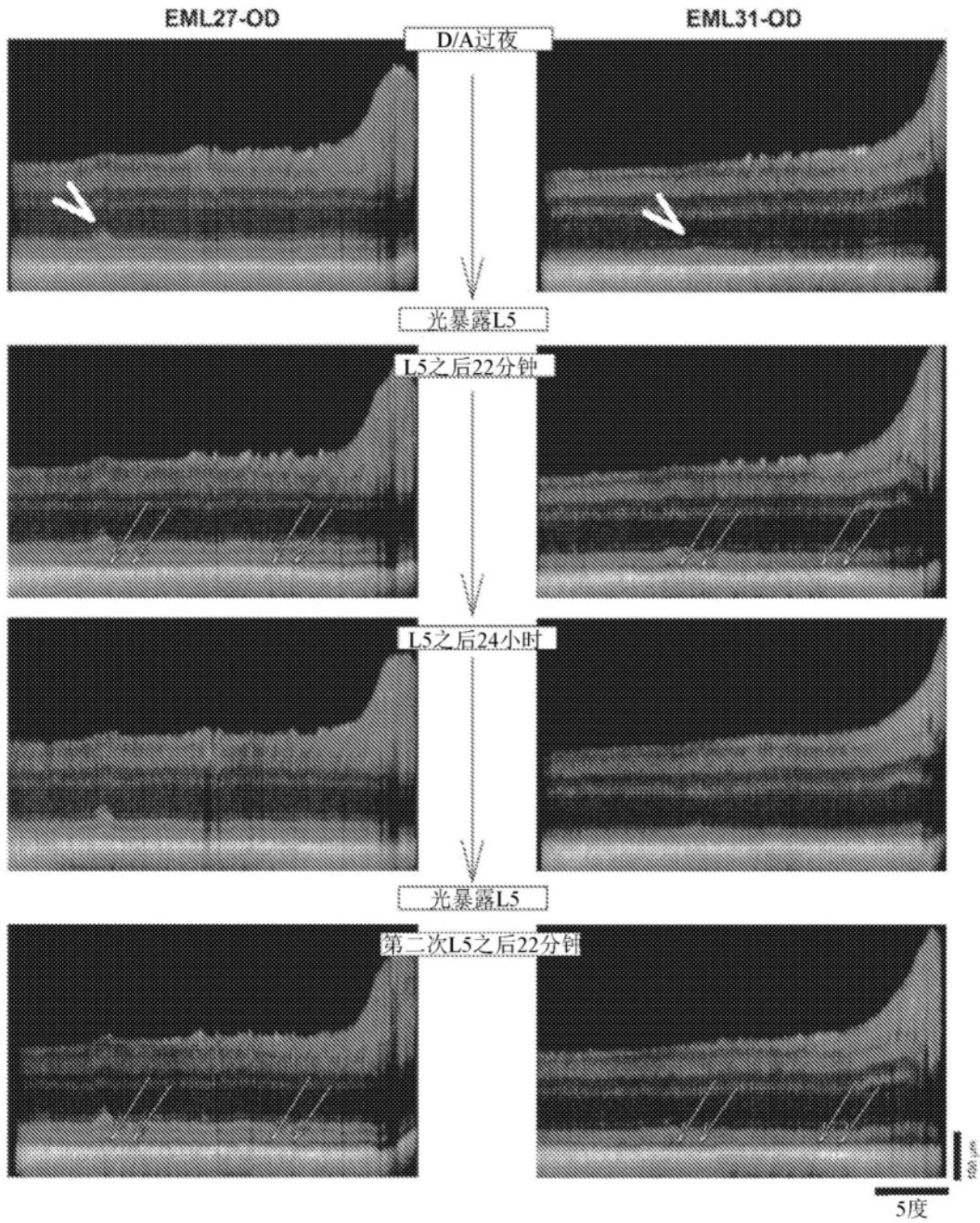


图7

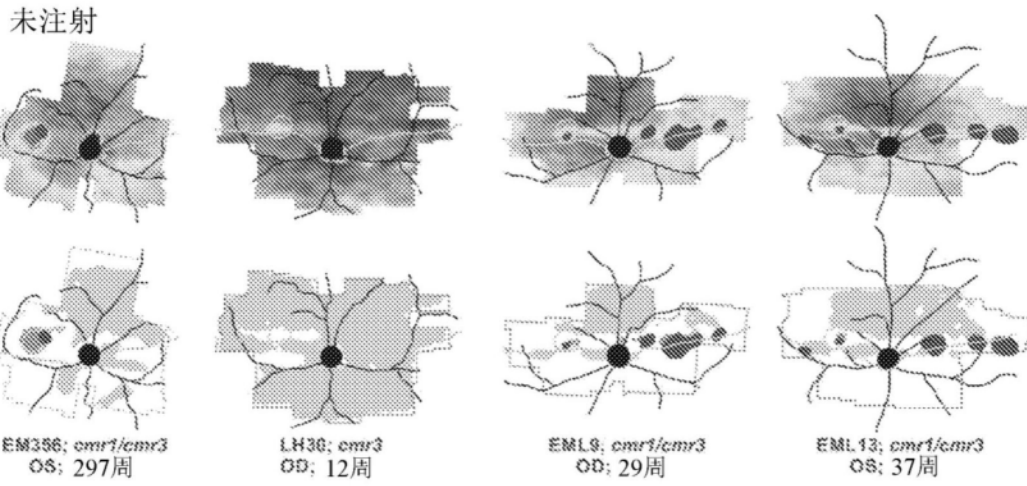


图8A

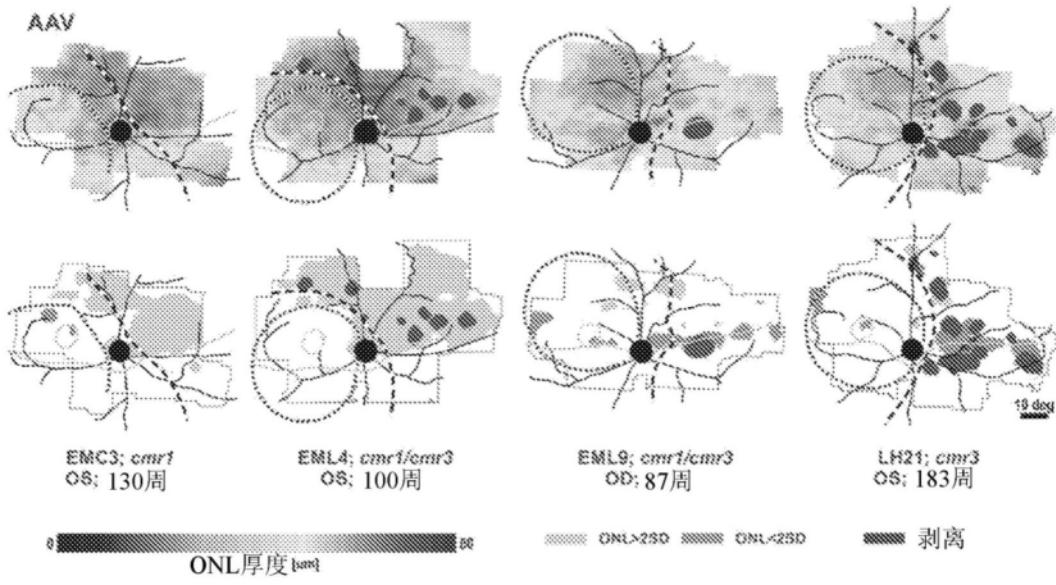


图8B

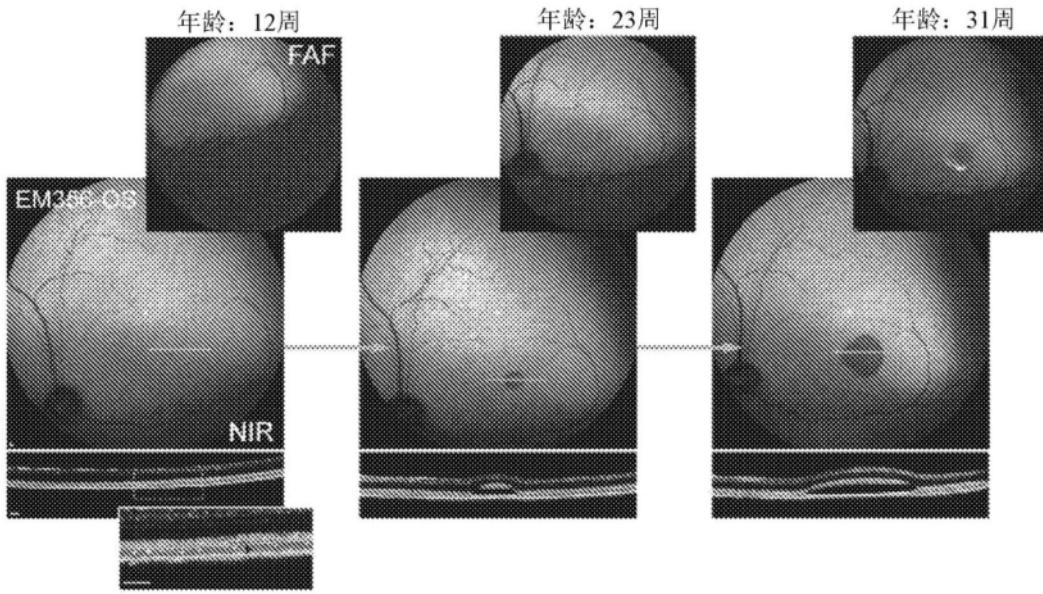


图9A

图9B

图9C

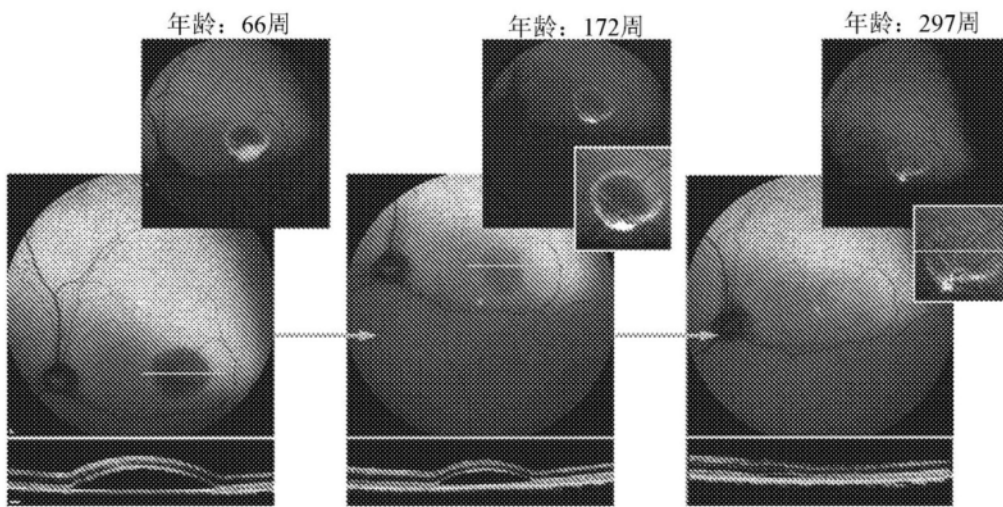


图9D

图9E

图9F

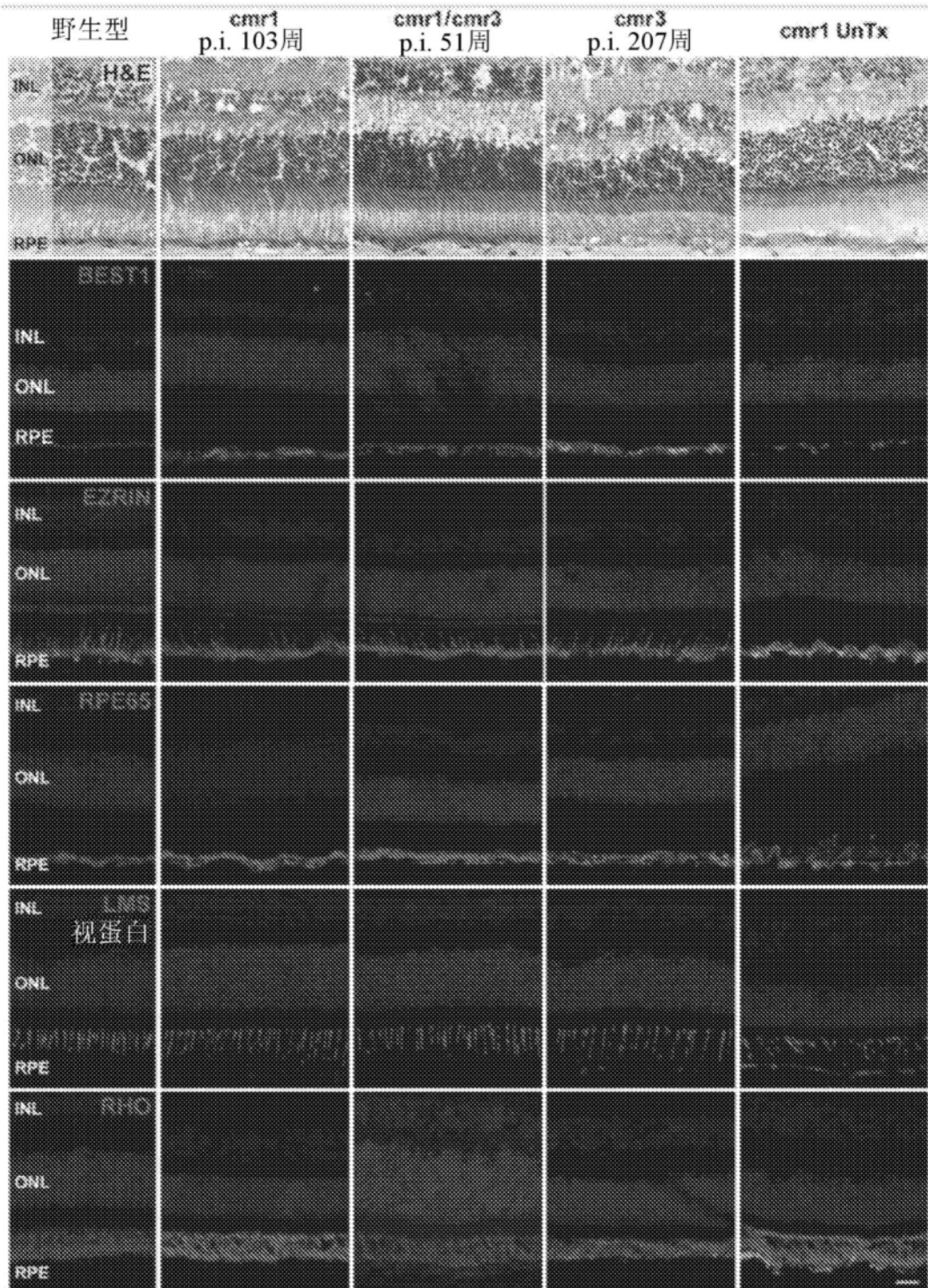


图10

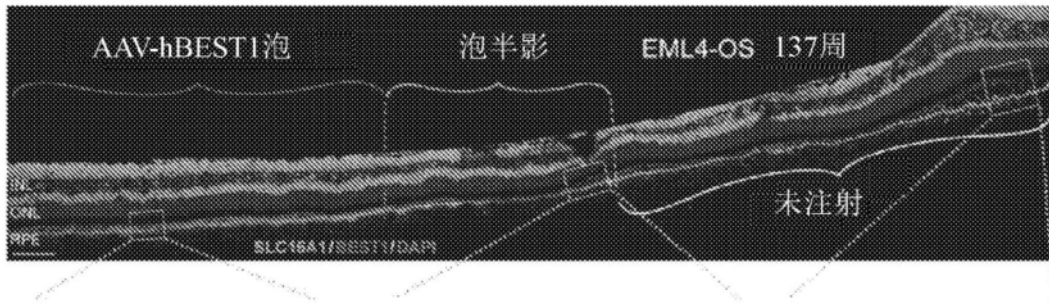


图11A

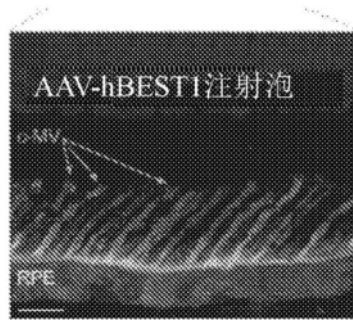


图11B

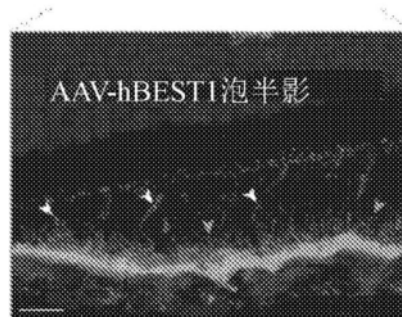


图11C

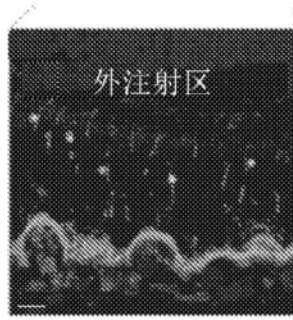


图11D

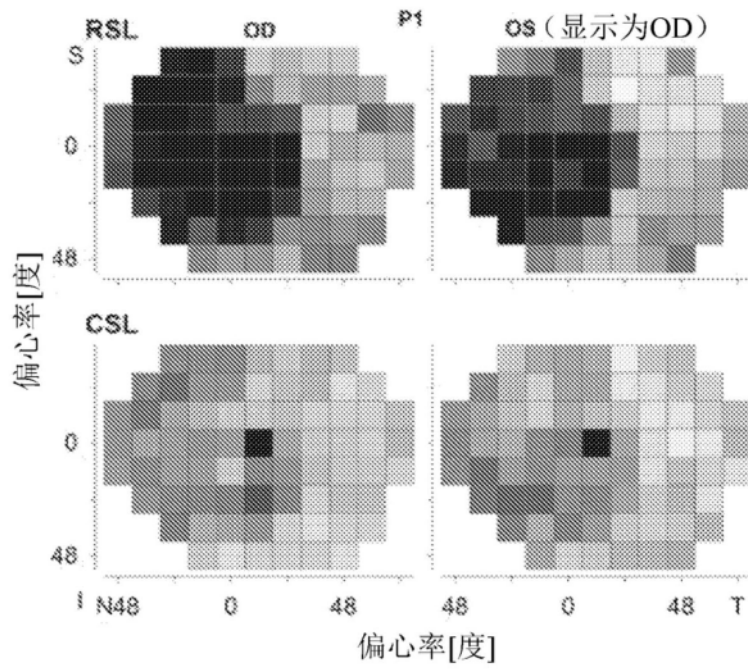


图12A

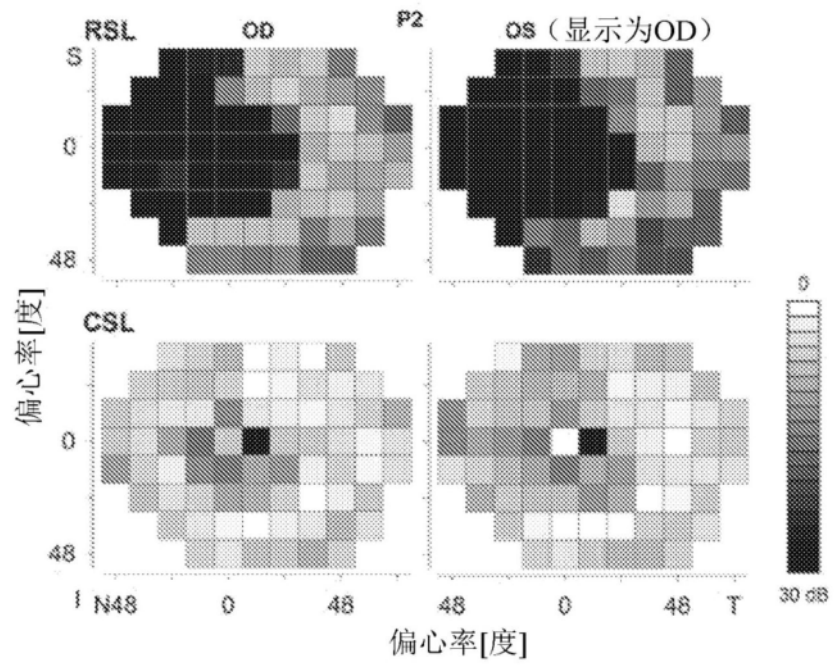


图12B

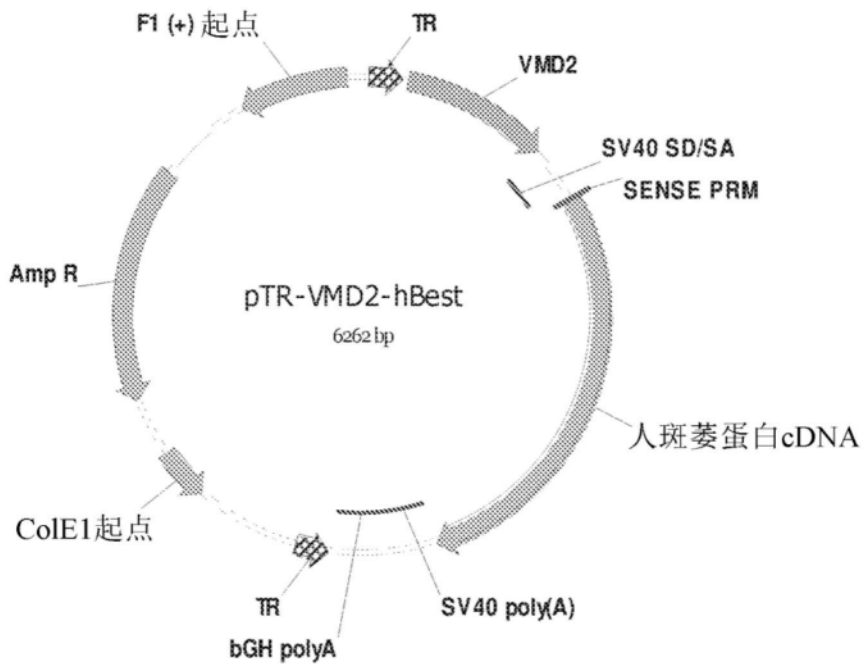


图13

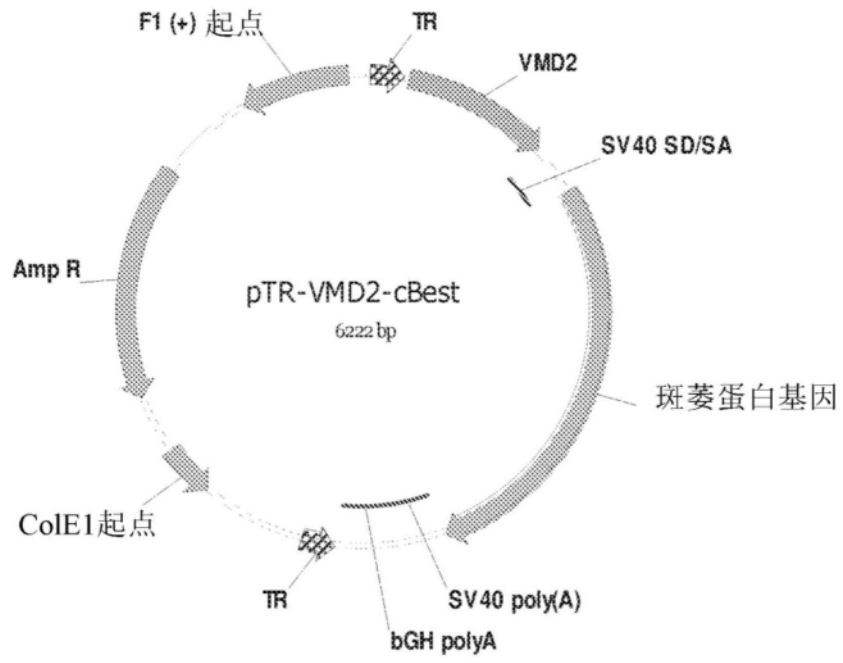


图14

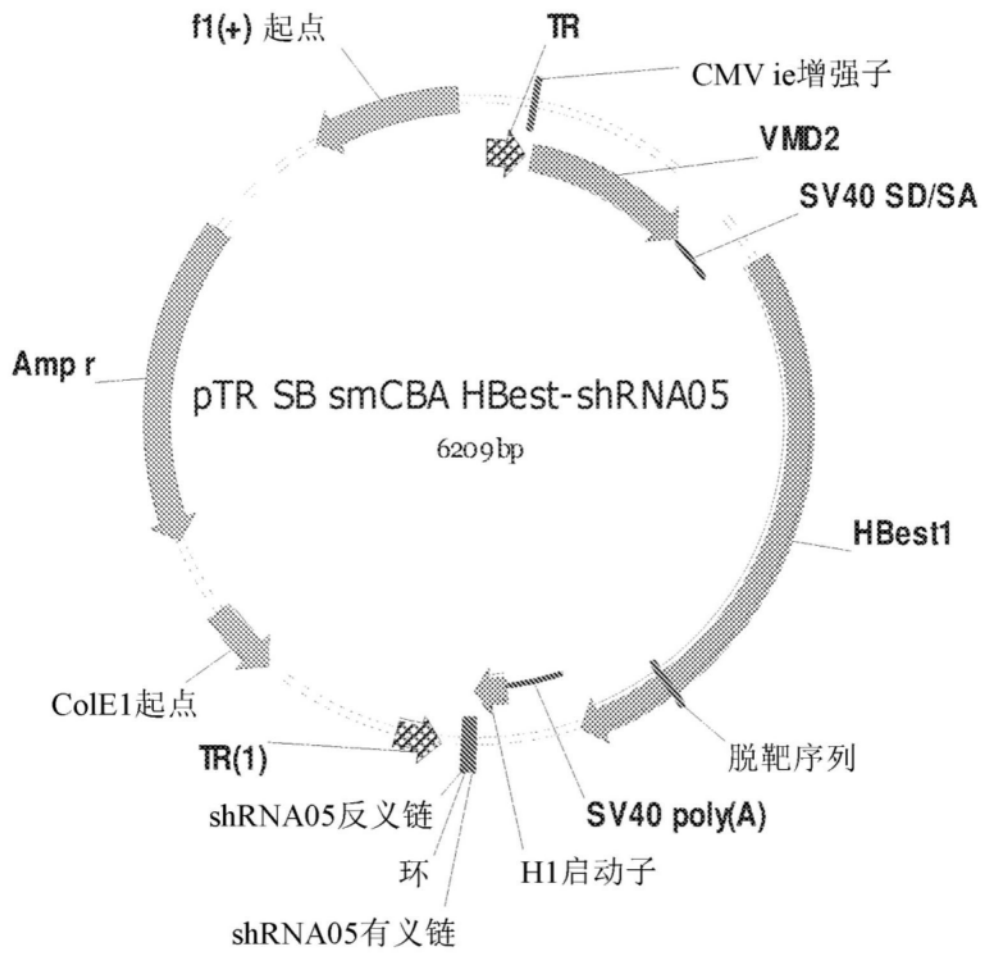


图15

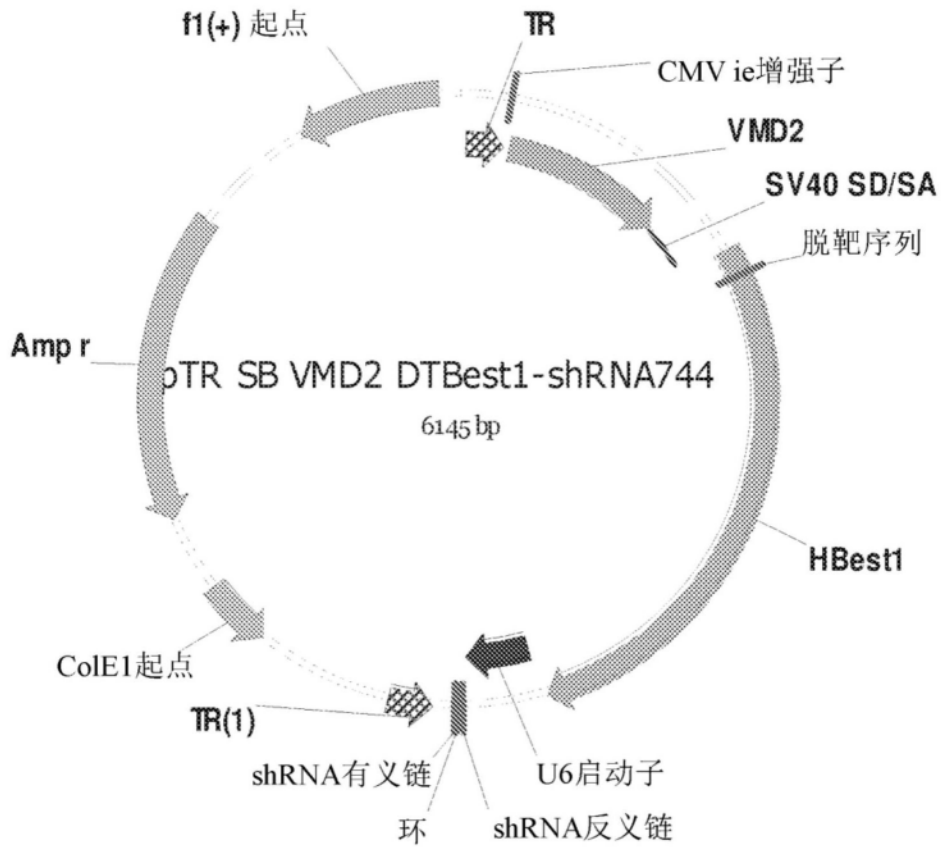


图16

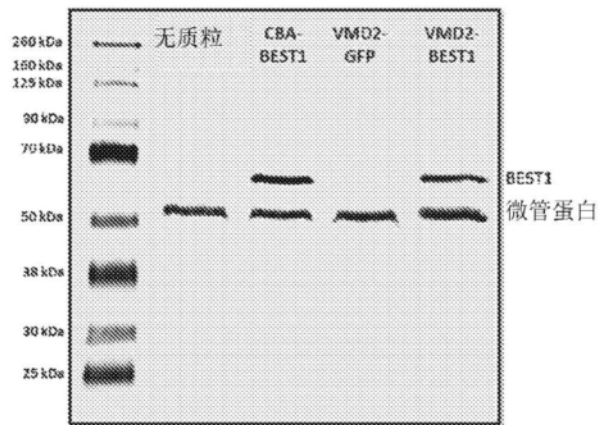


图17

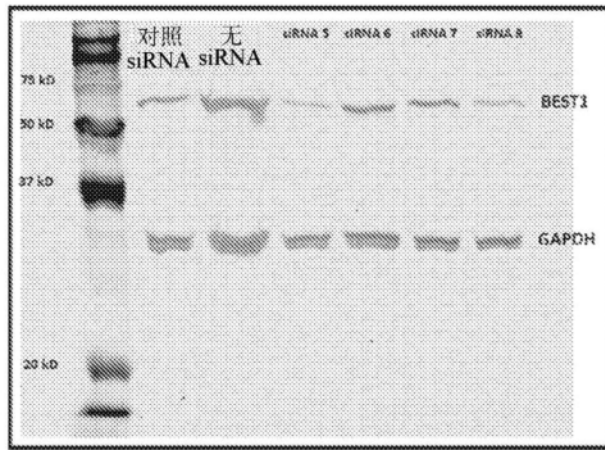


图18A

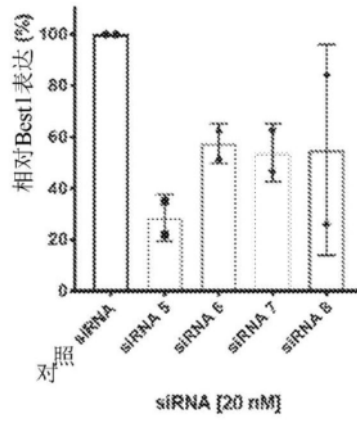


图18B

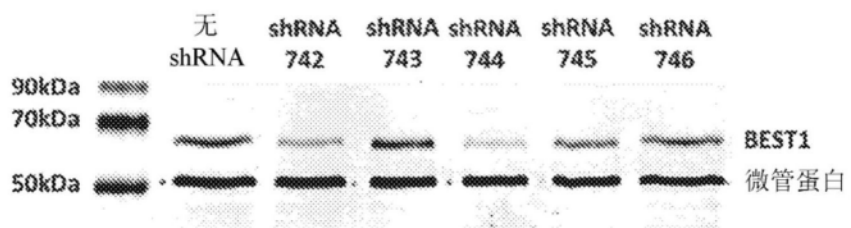


图19A

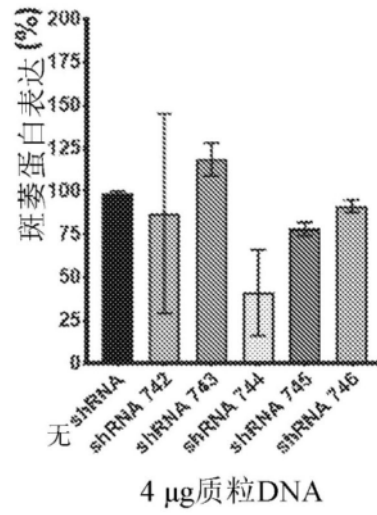


图19B

BEST1的脱靶

氨基酸		K	L	L	Y	G	E	F	L																		
WT BEST1	5'...	A	A	G	C	T	G	C	T	A	T	A	T	G	G	C	G	A	G	T	T	C	T	T	A	...3'	
shRNA 744	3'																										5'
DT BEST1 (Jcat)	5'...	A	A	G	C	T	G	C	T	G	T	A	C	G	G	C	G	A	G	T	T	C	C	T	G	...3'	

图20