



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112703016 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 22

(21) 申请号 201980042739.X

C12Q 1/6897 (2006.01)

(22) 申请日 2019.04.26

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112703016 A

WO 2017100791 A1, 2017.06.15
Skarnes, W.C. 等. ACCESSION: JN953192.1,

(43) 申请公布日 2021.04.23

Mus musculus targeted KO-first,
conditional ready, lacZ-tagged mutant
allele Myo15:tmla (EUCOMM) Wtsi

(30) 优先权数据

62/663679 2018.04.27 US

transgenic.《GenBank》.2011, Features 和
Origin 部分.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.24

Skarnes, W.C. 等. ACCESSION: JN953192.1,
Mus musculus targeted KO-first,

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/029366 2019.04.26

conditional ready, lacZ-tagged mutant
allele Myo15:tmla (EUCOMM) Wtsi

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/210181 EN 2019.10.31

transgenic.《GenBank》.2011, Features 和
Origin 部分.

(73) 专利权人 分贝治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

Elisa Caberlotto 等. Usher type 1G
protein sans is a critical component of
the tip-link complex, a structure
controlling actin polymerization in
stereocilia.《PNAS》.2011, 第108卷(第14期),
摘要, 第5825页左栏第1段至第5830页左栏第3
段, 补充材料第1页图S1至第8页图S8.

(72) 发明人 J·伯恩斯 K·埃利斯

A·帕勒莫 M·施万德 J·怀顿

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

专利代理师 罗文锋 彭昶

审查员 周耕民

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书33页

C12Q 1/6883 (2006.01)

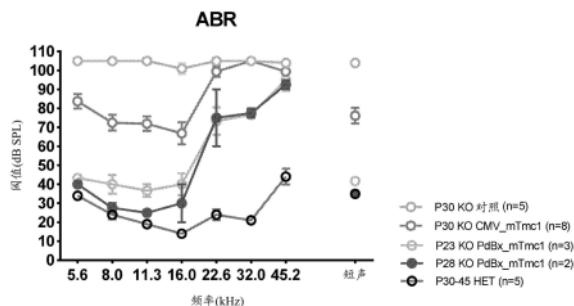
序列表9页 附图5页

(54) 发明名称

肌球蛋白15启动子及其用途

(57) 摘要

本公开提供了包含肌球蛋白15(Myo15)启动子的区域的多核苷酸, 以及包含所述多核苷酸的载体, 所述多核苷酸可以用于促进转基因在毛细胞中的特异性表达。本文所述的多核苷酸可以可操作地连接至转基因, 诸如编码治疗性蛋白质的转基因, 以促进所述转基因的毛细胞特异性表达。本文所述的多核苷酸可以可操作地连接至治疗性转基因, 并用于治疗患有听力损失或前庭功能障碍或有此风险的受试者。



1. 由SEQ ID NO:13的核苷酸序列表示的多核苷酸。
2. 一种核酸载体,其包含如权利要求1所述的多核苷酸。
3. 如权利要求2所述的核酸载体,其中所述多核苷酸可操作地连接至转基因。
4. 如权利要求3所述的核酸载体,其中所述转基因包含编码治疗性蛋白质的核酸序列。
5. 如权利要求4所述的核酸载体,其中所述转基因选自由以下组成的组:ACTG1、FSCN2、RDX、POU4F3、TRIOBP、TPRN、XIRP2、ATOH1、GFI1、CHRNA9、CIB3、CDH23、PCDH15、KNCN、DFNB59、OTOF、MKRN2OS、LHX3、TMC1、MYO15、MYO7A、MYO6、MYO3A、MYO3B、GRXCR1、PTPRQ、LCE6A、LOXHD1、ART1、ATP2B2、CIB2、CACNA2D4、CABP2、EPS8、EPS8L2、ESPN、ESPNL、PRPH2、STRC、SLC8A2、ZCCHC12、LRTOMT2、LRTOMT1、USH1C、ELFN1、TTC24、DYTN、KCP、CCER2、LRTM2、KCNA10、NT3、CLRN1、CLRN2、SKOR1、TCTEX1D1、FCRLB、SLC17A8、GRXCR2、BDNF、SERPINE3、NHLH1、HSP70、HSP90、ATF6、PERK、IRE1和BIP。
6. 如权利要求2-5中任一项所述的核酸载体,其中所述核酸载体是质粒、粘粒、人工染色体或病毒载体。
7. 如权利要求6所述的核酸载体,其中所述核酸载体是选自由腺相关病毒(AAV)、腺病毒和慢病毒组成的组的病毒载体。
8. 如权利要求7所述的核酸载体,其中所述病毒载体是AAV载体。
9. 如权利要求8所述的核酸载体,其中所述AAV载体的血清型选自由以下组成的组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、rh10、rh39、rh43、rh74、Anc80、Anc80L65、DJ/8、DJ/9、7m8、PHP.B、PHP.eb和PHP.S。
10. 一种组合物,其包含如权利要求2-5中任一项所述的核酸载体。
11. 如权利要求10所述的组合物,其还包含药学上可接受的赋形剂。
12. 一种试剂盒,其包含如权利要求2-5中任一项所述的核酸载体或如权利要求10所述的组合物。

肌球蛋白15启动子及其用途

技术领域

[0001] 本文描述了包含肌球蛋白15 (Myo15) 启动子的区域的多核苷酸,以及包含所述多核苷酸的载体,所述多核苷酸可以用于促进转基因在毛细胞(例如,耳蜗毛细胞,诸如内毛细胞和外毛细胞,和/或前庭毛细胞)中的表达。还公开了使用本发明的多核苷酸和载体实现转基因在毛细胞中的表达以治疗听力损失和/或前庭功能障碍的方法。

背景技术

[0002] 听力损失是一个重大的公共卫生问题,估计将影响近15%的学龄儿童和三分之一65岁的人。听力损失最常见的类型是感觉神经性听力损失,这是一类由内耳细胞(诸如耳蜗毛细胞)或从内耳伸出到脑部的神经通路的缺陷引起的听力损失。感觉神经性听力损失通常是获得性的,其原因多种多样,包括声创伤、疾病或感染、头部创伤、耳毒性药物和衰老。感觉神经性听力损失也有遗传原因,诸如参与内耳发育和功能的基因的突变。已经鉴定出超过90种此类基因的突变,包括以常染色体隐性、常染色体显性和X连锁模式遗传的突变。

[0003] 破坏耳蜗毛细胞的发育、存活或完整性的因素,诸如基因突变、疾病或感染、耳毒性药物、头部创伤和衰老,可同样影响前庭毛细胞,并且因此也与前庭功能障碍(包括眩晕、头晕和失衡)有关。的确,携带破坏毛细胞发育或功能的突变的患者可以同时出现听力损失和前庭功能障碍,或单独出现任一病症。近年来,治疗听力损失的努力越来越多地集中在作为可能解决方案的基因疗法上;然而,仍存在很少特异性地靶向毛细胞的方法,而毛细胞通常与听力损失和前庭功能障碍有关。需要靶向毛细胞以治疗感觉神经性听力损失或前庭功能障碍的新疗法。

发明内容

[0004] 本发明提供了用于促进目标基因,诸如促进或改善毛细胞功能或存活的基因在特定细胞类型中的表达的组合物和方法。本文所述的组合物和方法涉及刺激转基因在内耳的毛细胞(例如,耳蜗毛细胞和前庭毛细胞)中的转录的多核苷酸。本文所述的多核苷酸可以可操作地连接至治疗性转基因,并且可施用给患者以治疗或预防听力损失(例如,感觉神经性听力损失)和/或前庭功能障碍(例如,眩晕、头晕或失衡)。

[0005] 在第一方面,本发明提供一种多核苷酸,其包含连接(例如,可操作地连接)至与SEQ ID NO:2或包含SEQ ID NO:8和/或SEQ ID NO:9的序列的其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域的与SEQ ID NO:1或包含SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4的序列的其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域,任选地包含处于第一区域与第二区域之间的包括1至100个核苷酸(例如,1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、1-35、1-40、1-45、1-50、1-60、1-70、1-80、1-90、10-20、10-30、10-40、10-50、10-60、10-70、10-80、10-90、10-100、20-30、20-40、20-50、20-60、20-70、20-80、20-90或20-100个核苷酸)的接头。

[0006] 在一些实施方案中,第一区域包含SEQ ID NO:1的序列或由其组成。

[0007] 在一些实施方案中,第二区域包含SEQ ID NO:2的序列或由其组成。

[0008] 在一些实施方案中,多核苷酸包含SEQ ID NO:13的序列或由其组成。

[0009] 在另一方面,本发明提供一种多核苷酸,其包含连接(例如,可操作地连接)至与SEQ ID NO:2或包含SEQ ID NO:8和/或SEQ ID NO:9的序列的其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域的与SEQ ID NO:1或包含SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4的序列的其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域,任选地包含处于第一区域与第二区域之间的包括1至100个核苷酸(例如,1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、1-35、1-40、1-45、1-50、1-60、1-70、1-80、1-90、10-20、10-30、10-40、10-50、10-60、10-70、10-80、10-90、10-100、20-30、20-40、20-50、20-60、20-70、20-80、20-90或20-100个核苷酸)的接头。

[0010] 在一些实施方案中,第一区域包含SEQ ID NO:2的序列或由其组成。

[0011] 在一些实施方案中,第二区域包含SEQ ID NO:1的序列或由其组成。

[0012] 在一些实施方案中,多核苷酸包含SEQ ID NO:14的序列或由其组成。

[0013] 在另一方面,本发明提供一种多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:1或包括SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4的序列的其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的区域。

[0014] 在一些实施方案中,所述区域包含SEQ ID NO:1的序列或由其组成。

[0015] 在另一方面,本发明提供一种多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:2或包括SEQ ID NO:8和/或SEQ ID NO:9的序列的其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的区域。

[0016] 在一些实施方案中,所述区域包含SEQ ID NO:2的序列或由其组成。

[0017] 在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:1的功能部分包含SEQ ID NO:3的序列。在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:1的功能部分包含SEQ ID NO:4的序列。在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:1的功能部分包含SEQ ID NO:3的序列和SEQ ID NO:4的序列。在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:1的功能部分包含SEQ ID NO:5的序列。在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:1的功能部分包含SEQ ID NO:6的序列。在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:1的功能部分包含SEQ ID NO:7的序列。

[0018] 在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:2的功能部分包含SEQ ID NO:8的序列。在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:2的功能部分包含SEQ ID NO:9的序列。在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:2的功能部分包含SEQ ID NO:8的序列和SEQ ID NO:9的序列。在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:2的功能部分包含SEQ ID NO:10的序列。在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:2的功能部分包含SEQ ID NO:11的序列。在任何前述方面的一些实施方案中,SEQ ID NO:2的功能部分包含SEQ ID NO:12的序列。

[0019] 在任何前述方面的一些实施方案中,当可操作地连接至转基因并引入毛细胞中时,多核苷酸诱导转基因表达。

[0020] 在另一方面,本发明提供一种包含本发明的多核苷酸的核酸载体。在一些实施方案中,多核苷酸可操作地连接至转基因。在一些实施方案中,转基因包含编码治疗性蛋白质的核酸序列。在一些实施方案中,多核苷酸能够在哺乳动物毛细胞中指导核酸序列进行治疗性蛋白质的毛细胞特异性表达。在一些实施方案中,毛细胞是耳蜗毛细胞。在一些实施方案中,耳蜗毛细胞是内毛细胞。在一些实施方案中,耳蜗毛细胞是外毛细胞。在一些实施方案中,毛细胞是前庭毛细胞。

[0021] 在一些实施方案中,治疗性蛋白质选自包含以下的组:ACTG1、FSCN2、RDX、POU4F3、TRIOBP、TPRN、XIRP2、ATOH1、GFI1、CHRNA9、CIB3、CDH23、PCDH15、KNCN、DFNB59、OTOF、MKRN20S、LHX3、TMC1、MYO15、MYO7A、MYO6、MYO3A、MYO3B、GRXCR1、PTPRQ、LCE6A、LOXHD1、ART1、ATP2B2、CIB2、CACNA2D4、CABP2、EPS8、EPS8L2、ESPN、ESPNL、PRPH2、STRC、SLC8A2、ZCCHC12、LRTOMT2、LRTOMT1、USH1C、ELFN1、TTC24、DYTN、KCP、CCER2、LRTM2、KCNA10、NT3、CLRN1、CLRN2、SKOR1、TCTEX1D1、FCRLB、SLC17A8、GRXCR2、BDNF、SERPINE3、NHLH1、HSP70、HSP90、ATF6、PERK、IRE1和BIP。

[0022] 在一些实施方案中,核酸载体是质粒、粘粒、人工染色体或病毒载体。在一些实施方案中,核酸载体是选自由腺相关病毒(AAV)、腺病毒和慢病毒组成的组的病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是AAV载体。在一些实施方案中,AAV载体的血清型选自包含以下的组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、rh10、rh39、rh43、rh74、Anc80、Anc80L65、DJ/8、DJ/9、7m8、PHP.B、PHP.eb和PHP.S。在一些实施方案中,AAV载体的血清型是AAV1。在一些实施方案中,AAV载体的血清型是AAV9。在一些实施方案中,AAV载体的血清型是AAV6。在一些实施方案中,AAV载体的血清型是Anc80。在一些实施方案中,AAV载体的血清型是Anc80L65。在一些实施方案中,AAV载体的血清型是DJ/9。在一些实施方案中,AAV载体的血清型是7m8。在一些实施方案中,AAV载体的血清型是AAV2。在一些实施方案中,AAV载体的血清型是PHP.B。在一些实施方案中,AAV载体的血清型是AAV8。

[0023] 在另一方面,本发明提供一种包含本发明的核酸载体的组合物。在一些实施方案中,所述组合物还包括药学上可接受的赋形剂。

[0024] 在另一方面,本发明提供一种增加治疗性蛋白质在哺乳动物毛细胞中的表达的方法,其通过使哺乳动物毛细胞与本发明的核酸载体或本发明的组合物接触来实现。在一些实施方案中,治疗性蛋白质的表达在毛细胞中特异性增加。

[0025] 在一些实施方案中,哺乳动物毛细胞是人毛细胞。

[0026] 在一些实施方案中,哺乳动物毛细胞是耳蜗毛细胞。在一些实施方案中,耳蜗毛细胞是内毛细胞。在一些实施方案中,耳蜗毛细胞是外毛细胞。

[0027] 在一些实施方案中,哺乳动物毛细胞是前庭毛细胞。

[0028] 在一些实施方案中,治疗性蛋白质的表达在不是毛细胞的内耳细胞中基本上没有增加。

[0029] 在另一方面,本发明提供一种治疗患有听力损失(例如,感觉神经性听力损失)或有此风险的受试者的方法,其通过向受试者施用有效量的本发明的核酸载体或本发明的组合物来实现。

[0030] 在一些实施方案中,听力损失是遗传性听力损失。在一些实施方案中,遗传性听力损失是常染色体显性听力损失、常染色体隐性听力损失或X连锁性听力损失。

[0031] 在一些实施方案中,听力损失是获得性听力损失。在一些实施方案中,获得性听力损失是噪声引起的听力损失、年龄相关的听力损失、疾病或感染相关的听力损失、头部创伤相关的听力损失,或耳毒性药物引起的听力损失。在一些实施方案中,获得性听力损失是年龄相关的听力损失。在一些实施方案中,听力损失是噪声引起的听力损失。在一些实施方案中,听力损失是耳毒性药物引起的听力损失。

[0032] 在另一方面,本发明提供一种治疗患有前庭功能障碍或有此风险的受试者的方法,其通过向受试者施用有效量的本发明的核酸载体或本发明的组合物来实现。在一些实施方案中,前庭功能障碍是眩晕、头晕或失衡。

[0033] 在另一方面,本发明提供一种促进有需要的受试者的毛细胞再生的方法,其通过向受试者施用有效量的本发明的核酸载体或本发明的组合物来实现。在一些实施方案中,毛细胞是耳蜗毛细胞。在一些实施方案中,毛细胞是前庭毛细胞。

[0034] 在另一方面,本发明提供一种预防或减少耳毒性药物引起的毛细胞损伤或死亡的方法,其通过向受试者施用有效量的本发明的核酸载体或本发明的组合物来实现。在一些实施方案中,耳毒性药物选自包括以下的组:氨基糖苷类(例如,庆大霉素、新霉素、链霉素、妥布霉素、卡那霉素、万古霉素和阿米卡星)、抗肿瘤药(例如,含铂化疗剂,诸如顺铂、卡铂和奥沙利铂)、依他尼酸、速尿灵(furosemide)、水杨酸盐类(例如,阿司匹林,特别是在高剂量下)和奎宁。在一些实施方案中,毛细胞是耳蜗毛细胞。在一些实施方案中,毛细胞是前庭毛细胞。

[0035] 在另一方面,本发明提供一种治疗患有耳鸣的受试者的方法,其通过向受试者施用有效量的本发明的核酸载体或本发明的组合物来实现。

[0036] 在任何前述方面的一些实施方案中,听力损失、前庭功能障碍或耳鸣与毛细胞(例如,耳蜗和/或前庭毛细胞)的损失相关。

[0037] 在另一方面,本发明提供一种预防或减少有需要的受试者的毛细胞损伤或死亡的方法,其通过向受试者施用有效量的本发明的核酸载体或本发明的组合物来实现。在一些实施方案中,毛细胞是耳蜗毛细胞。在一些实施方案中,毛细胞是前庭毛细胞。

[0038] 在另一方面,本发明提供一种增加有需要的受试者的毛细胞存活的方法,其通过向受试者施用有效量的本发明的核酸载体或本发明的组合物来实现。在一些实施方案中,毛细胞是耳蜗毛细胞。在一些实施方案中,毛细胞是前庭毛细胞。

[0039] 在任何前述方面的一些实施方案中,毛细胞是耳蜗毛细胞。在任何前述方面的一些实施方案中,耳蜗毛细胞是内毛细胞。在任何前述方面的一些实施方案中,耳蜗毛细胞是外毛细胞。在任何前述方面的一些实施方案中,哺乳动物毛细胞是前庭毛细胞。

[0040] 在任何前述方面的一些实施方案中,所述方法还包括在施用核酸载体或组合物之前评估受试者的听力的步骤(例如,使用标准测试评估听力,所述标准测试诸如听力测验法(audiometry)、听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)、耳蜗电图描记法(electrochocleography, ECOG)或耳声发射)。

[0041] 在任何前述方面的一些实施方案中,所述方法还包括在施用核酸载体或组合物之后评估受试者的听力的步骤(例如,使用标准测试评估听力,所述标准测试诸如听力测验法、ABR、ECOG或耳声发射)。

[0042] 在任何前述方面的一些实施方案中,所述方法还包括在施用核酸载体或组合物之

前评估受试者的前庭功能的步骤(例如,使用标准测试评估前庭功能,所述标准测试诸如眼震电图(electronystagmogram,ENG)或视频眼震图(videonystagmogram,VNG)、姿势描记术(posturography)、转椅测试(rotary-chair testing)、ECOG、前庭诱发的肌源性电位(vestibular evoked myogenic potentials,VEMP)或专科临床平衡测试(specialized clinical balance test))。

[0043] 在任何前述方面的一些实施方案中,所述方法还包括在施用核酸载体或组合物之前评估受试者的前庭功能的步骤(例如,使用标准测试评估前庭功能,所述标准测试诸如ENG或VNG、姿势描记术、转椅测试、ECOG、VEMP或专科临床平衡测试)。

[0044] 在任何前述方面的一些实施方案中,核酸载体或组合物局部施用(例如,施用至内耳,例如,施用到外淋巴或内淋巴中,诸如通过卵圆窗、圆窗或水平半规管)。

[0045] 在任何前述方面的一些实施方案中,核酸载体或组合物以一定的量施用,所述量足以预防或减少听力损失、预防或减少前庭功能障碍、预防或减少耳鸣、延迟听力损失的发展、延迟前庭功能障碍的发展、减慢听力损失的进展、减慢前庭功能障碍的进展、改善听力、改善前庭功能、改善毛细胞功能、预防或减少毛细胞损伤、预防或减少毛细胞死亡,或增加毛细胞数量。

[0046] 在任何前述方面的一些实施方案中,受试者是人。

[0047] 在另一方面,本发明提供一种试剂盒,其包含本发明的核酸载体或本发明的组合物。

[0048] 定义

[0049] 如本文所用,术语“约”是指在所述值的上下10%以内的值。

[0050] 如本文所用,“施用”是指通过任何有效途径向受试者提供或给予治疗剂(例如,包含可操作地连接至转基因的肌球蛋白15(Myo15)启动子的核酸载体)。示例性的施用途径在下文描述。

[0051] 如本文所用,术语“细胞类型”是指共享基于基因表达数据在统计学上可分离的表型的一组细胞。例如,常见细胞类型的细胞可共享相似的结构和/或功能特征,诸如相似的基因激活模式和抗原呈递特征谱。常见细胞类型的细胞可包括从常见组织(例如,上皮组织、神经组织、结缔组织或肌肉组织)分离的那些和/或从常见器官、组织系统、血管或生物体的其他结构和/或区域分离的那些。

[0052] 如本文所用,术语“耳蜗毛细胞”是指内耳中参与感测声音的一组特化细胞。耳蜗毛细胞有两种类型:内毛细胞和外毛细胞。耳蜗毛细胞的损伤和破坏耳蜗毛细胞功能的基因突变与听力损失和耳聋有关。

[0053] 如本文所用,术语“保守突变”、“保守取代”和“保守氨基酸取代”是指一个或多个氨基酸取代成表现出相似物理化学特性(诸如极性、静电荷和空间体积)的一个或多个不同的氨基酸。下表1中汇总了20种天然存在的氨基酸中的每一种的这些特性。

[0054] 表1.天然存在的氨基酸的代表性物理化学特性

氨基酸	3 字母 代码	1 字母 代码	侧链极 性	生理 pH (7.4)下的 静电特征	空间体积 [†]
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	小
精氨酸	Arg	R	极性	阳离子	大
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	中等
天冬氨酸	Asp	D	极性	阴离子	中等
半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性	中等
谷氨酸	Glu	E	极性	阴离子	中等
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	中等
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	小
[0055] 组氨酸	His	H	极性	在 pH 7.4 下为平衡 的中性和阳离子形 式	大
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	大
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	大
赖氨酸	Lys	K	极性	阳离子	大
甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性	大
苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性	大
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	中等
丝氨酸	Ser	S	极性	中性	小
苏氨酸	Thr	T	极性	中性	中等
色氨酸	Trp	W	非极性	中性	超大(bulky)
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	大
缬氨酸	Val	V	非极性	中性	中等
[0056]	[†] 基于体积，以 Å ³ 计 [†] 50-100 是小的，100-150 是中等的， 150-200 是大的，并且>200 是超大的				

[0057] 由此表应认识到，保守氨基酸家族包括 (i) G、A、V、L 和 I；(ii) D 和 E；(iii) C、S 和 T；(iv) H、K 和 R；(v) N 和 Q；以及 (vi) F、Y 和 W。因此，保守突变或取代是一个氨基酸取代成同一氨基酸家族的成员的一种突变或取代（例如，Ser 取代成 Thr 或 Lys 取代成 Arg）。

[0058] 如本文所用，术语本文所述的组合物、载体构建体或病毒载体的“有效量”、“治疗有效量”和“足够量”是指当施用给包括哺乳动物（例如人）的有需要的受试者时足以实现有益或期望结果（包括临床结果）的量，并且因此，“有效量”或其同义词取决于其所应用的背景。例如，在治疗感觉神经性听力损失或前庭功能障碍的背景中，它是与不施用组合物、载体构建体或病毒载体的情况下获得的响应相比，足以实现治疗响应的组合物、载体构建体或病毒载体的量。将与这样的量相对应的本文所述的给定组合物的量将根据各种因素而变化，诸如给定的剂、药物制剂、施用途径、疾病或病症的类型、所治疗的受试者（例如年龄、性别、体重）或宿主的身份等，但是仍然可由本领域技术人员常规确定。同样，如本文所用，本公开的组合物、载体构建体或病毒载体的“治疗有效量”是与对照相比，在受试者中产生有益或期望结果的量。应注意，当施用活性成分的组合时，所述组合的有效量可包括或不包括在单独施用时将有效的每种成分的量。如本文所定义，本公开的组合物、载体构建体或病

毒载体的治疗有效量可由普通技术人员通过本领域已知的常规方法容易地确定。可调整剂量方案以提供最佳治疗响应。

[0059] 如本文所用,术语“内源性”描述天然存在于特定生物体(例如,人)中或生物体内的特定位置(例如,器官、组织或细胞,诸如人细胞,例如人毛细胞)中的分子(例如,多肽、核酸或辅因子)。

[0060] 如本文所用,术语“表达”是指以下事件中的一个或多个:(1)从DNA序列产生RNA模板(例如,通过转录);(2)RNA转录物的加工(例如,通过剪接、编辑、5'帽形成和/或3'端加工);(3)将RNA翻译成多肽或蛋白质;以及(4)多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[0061] 如本文所用,术语“外源性”描述不天然存在于特定生物体(例如,人)中或生物体内的特定位置(例如,器官、组织或细胞,诸如人细胞,例如人毛细胞)中的分子(例如,多肽、核酸或辅因子)。外源性材料包括由外部来源提供至生物体或提供至培养物质(从其中提取)的那些材料。

[0062] 如本文所用,术语“毛细胞特异性表达”是指与内耳的其他细胞类型(例如,螺旋神经节神经元、神经胶质或其他内耳细胞类型)相比,RNA转录物或多肽主要在毛细胞(例如,耳蜗毛细胞和/或前庭毛细胞)内产生。转基因的毛细胞特异性表达可以通过使用任何标准技术(例如,定量RT-PCR、免疫组织化学、蛋白质印迹分析,或可操作地连接至启动子的报告基因(例如,GFP)的荧光的测量)在内耳的各种细胞类型(例如,毛细胞相对于非毛细胞)之间比较转基因表达(例如,RNA或蛋白质表达)来确认。毛细胞特异性启动子所诱导的与其可操作地连接的转基因的表达(例如,RNA或蛋白质表达)在毛细胞中比在至少3种(例如,3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种)以下内耳细胞类型中大至少50%(例如,大50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%或更多):边界细胞、内指细胞、内柱细胞、外柱细胞、第一排Deiter细胞、第二排Deiter细胞、第三排Deiter细胞、汉森细胞、克劳迪厄斯氏(Claudius)细胞、内沟细胞、外沟细胞、螺旋突细胞、根细胞、齿间细胞、血管纹的基底细胞、血管纹的中间细胞、血管纹的边缘细胞、螺旋神经节神经元、施旺(Schwann)细胞。

[0063] 如本文所用,术语“增加”和“减少”是指相对于参考分别产生更大或更少量的功能、表达或活性的调节。例如,在以本文所述的方法施用组合物之后,如本文所述的度量(例如,转基因表达)的标志物的量可相对于施用之前的标志物的量在受试者中增加或减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%或更多。通常,在施用后,在施用已达到所述效果的时间,例如,在治疗方案开始之后至少一周、一个月、3个月或6个月测量所述度量。

[0064] 如本文所用,术语“内含子”是指基因的编码区内其核苷酸序列不翻译成相应蛋白质的氨基酸序列的区域。术语内含子还指从基因转录的RNA的相应区域。内含子被转录成前体mRNA,但在加工过程中去除,不包括在成熟mRNA中。

[0065] 如本文所用,术语“接头”是指连接多核苷酸的两个不同区域的一系列核苷酸。接头不破坏其连接的多核苷酸的两个区域的功能。

[0066] 如本文所用,“局部”或“局部施用”是指在身体的特定部位上旨在局部作用而不是全身作用的施用。局部施用的实例是表皮、吸入、关节内、鞘内、阴道内、玻璃体内、子宫内、病灶内施用、淋巴结施用、肿瘤内施用、向内耳施用和向受试者的粘膜施用,其中施用旨在产生局部而非全身作用。

[0067] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指第一分子可以连结至第二分子,其中所述分子的布置使得第一分子影响第二分子的功能。术语“可操作地连接”包括两个或更多个部件(例如,启动子和另一个序列元件)的并置,使得两个部件均正常发挥作用,并允许至少一个部件可以介导施加于其他部件中的至少一个上的功能的可能性。两个分子可以是或可以不是单个邻接分子的一部分并且可以或可以不是相邻的。例如,如果启动子调节目标可转录多核苷酸分子在细胞中的转录,那么启动子可操作地连接至可转录多核苷酸分子。在另外的实施方案中,如果转录调控元件的两个部分相互连接,使得一部分的转录激活功能不受另一部分的存在的不利影响,那么所述两个部分彼此可操作地连接。两个转录调控元件可借助接头核酸(例如,居间的非编码核酸)彼此可操作地连接或可在不存在居间核苷酸的情况下彼此可操作地连接。

[0068] 如本文所用,术语“质粒”是指另外的DNA区段可连接到其中的染色体外环状双链DNA分子。质粒是一种载体,是能够转运已与其连接的另一核酸的核酸分子。某些质粒能够在其被引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌质粒和附加型哺乳动物质粒)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。某些质粒能够指导它们可操作地连接的基因的表达。

[0069] 如本文所用,在本文可互换使用的术语“核酸”和“多核苷酸”是指任何长度的核苷的聚合形式。通常,多核苷酸由通过磷酸二酯键连接的天然存在于DNA或RNA中的核苷(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)构成。该术语涵盖包含含有化学或生物学修饰的碱基、修饰的骨架等的核苷或核苷类似物的分子,无论是否存在于天然存在的核酸中,并且此类分子对于某些应用可以是优选的。当本申请涉及多核苷酸时,应理解,提供了DNA、RNA,并且在每种情况下都提供了单链和双链形式(以及每个单链分子的互补物)。如本文所用,“多核苷酸序列”可以指多核苷酸材料本身和/或生物化学表征特定核酸的序列信息(即,用作碱基缩写的一连串字母)。除非另外指明,否则本文给出的多核苷酸序列以5'至3'方向给出。

[0070] 如本文所用,术语核酸的“互补(complementarity)”或“互补(complementary)”是指核酸的一条链中的核苷酸序列由于其核碱基基团的取向而与相反的核酸链上的另一序列形成氢键。DNA中的互补碱基通常是A与T和C与G。在RNA中,它们通常是C与G和U与A。互补可以是完全或基本/充分互补。两个核酸之间完全互补是指这两个核酸可以形成双链体,其中双链体中的每个碱基都通过Watson-Crick配对与互补碱基结合。“基本”或“充分”互补是指一条链中的序列与相反链中的序列不全部和/或完全互补,但是在一组杂交条件(例如,盐浓度和温度)下,在两条链上的碱基之间发生充分的键合以形成稳定的杂交复合物。可以通过使用序列和标准数学计算预测杂交链的 T_m (解链温度),或通过使用常规方法凭经验确定 T_m 来预测此类条件。 T_m 包括在两条核酸链之间形成的杂交复合物群体50%变性(即,双链核酸分子群体一半解离成单链)的温度。在低于 T_m 的温度下,有利于杂交复合物的形成,而在高于 T_m 的温度下,有利于杂交复合物中的链的解链或分离。可通过使用例如 $T_m = 81.5 + 0.41 (\%G+C)$ 估计在1M NaCl水溶液中具有已知G+C含量的核酸的 T_m ,尽管其他已知的 T_m 计算考虑了核酸结构特征。

[0071] 如本文所用,术语“启动子”是指DNA上由RNA聚合酶结合的识别位点。聚合酶驱动

转基因的转录。

[0072] 相对于参考多核苷酸或多肽序列而言的“序列同一性百分比(%)”定义为在将序列比对并且在需要时引入空位以实现最大序列同一性百分比之后,在候选序列中与参考多核苷酸或多肽序列中的核酸或氨基酸相同的核酸或氨基酸的百分比。用于确定核酸或氨基酸序列同一性百分比的比对可以以在本领域技术人员能力范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2或Megalign软件。本领域的技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在正在比较的序列全长上实现最大比对所需的任何算法。例如,可使用序列比较计算机程序BLAST生成序列同一性百分比值。作为说明,给定核酸或氨基酸序列A对于、与或针对给定核酸或氨基酸序列B的序列同一性百分比(其可以替代地措词为给定核酸或氨基酸序列A具有对于、与或针对给定核酸或氨基酸序列B的某一序列同一性百分比)计算如下:

[0073] $100 \times (\text{分数} X/Y)$

[0074] 其中X是通过序列比对程序(例如,BLAST)在所述程序的A和B的比对中评分为相同匹配的核苷酸或氨基酸的数目,并且其中Y是B中核酸的总数。应当理解,在核酸或氨基酸序列A的长度不等于核酸或氨基酸序列B的长度的情况下,A对于B的序列同一性百分比将不等于B对于A的序列同一性百分比。

[0075] 如本文所用,术语“衍生物”是指与相应的全长野生型核酸、肽或蛋白质相比包含一个或多个突变和/或化学修饰的核酸、肽或蛋白质或其变体或类似物。涉及核酸的化学修饰的非限制性实例包括,例如,对碱基部分、糖部分、磷酸酯部分、磷酸酯-糖骨架或其组合的修饰。

[0076] 如本文所用,术语“药物组合物”是指包含任选地与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂和/或载剂组合的治疗剂,待施用给受试者(诸如哺乳动物,例如人)以便预防、治疗或控制影响或可能影响受试者的特定疾病或病状的混合物。

[0077] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指适于与受试者,诸如哺乳动物(例如,人)的组织接触,而没有过度的毒性、刺激、过敏反应和其他问题并发症的与合理效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。优选地,术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的监管机构批准或在美国药典或其他普遍认可的药典中列出可用于哺乳动物且更具体地是人。

[0078] 如本文所用,术语“样品”是指从受试者中分离的样本(例如,血液、血液组分(例如,血清或血浆)、尿液、唾液、羊水、脑脊液、组织(例如,胎盘或真皮组织)、胰液、绒毛膜和细胞)。

[0079] 如本文所用,术语“转录调控元件”是指至少部分地控制目标基因的转录的核酸。转录调控元件可包括启动子、增强子以及控制或帮助控制基因转录的其他核酸(例如,聚腺苷酸化信号)。转录调控元件的实例描述于,例如,Lorence, Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Humana Press, New York, NY, 2012)。

[0080] 如本文所用,术语“转染”是指常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞中的广泛多种技术中的任一种,例如电穿孔、脂质转染、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染、核转染、挤压-穿孔(squeeze-poration)、声致穿孔、光学转染(optical transfection)、磁转染、穿刺转染(impalefection)等。

[0081] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”是指动物(例如,哺乳动物,诸如人)、兽医动物(例如,猫、狗、牛、马、绵羊、猪等)以及疾病的实验动物模型(例如,小鼠、大鼠)。待根据本文所述的方法治疗的受试者可以是已被诊断为患有听力损失(例如,感觉神经性听力损失)或前庭功能障碍(例如,头晕、眩晕或失衡)的受试者或有发展这些病状的风险的受试者。可通过本领域已知的任何方法或技术进行诊断。本领域技术人员将理解,待根据本公开治疗的受试者可能已经接受了标准测试,或可能由于存在一种或多种与疾病或病状相关的风险因素而未经检查就被鉴定为有风险的受试者。

[0082] 如本文所用,术语“转导(transduction和transduce)”是指将载体构建体或其部分引入细胞中的方法。其中载体构建体包含在病毒载体例如AAV载体中,转导是指细胞的病毒感染以及随后载体构建体或其部分转移和整合到细胞基因组中。

[0083] 如本文所用,状态、病症或病状的“治疗(treatment和treating)”可以包括:(1)预防、延迟或减少在可能患有或易患所述状态、病症或病状但尚未经历或表现出所述状态、病症或病状的临床或亚临床症状的受试者中发展的状态、病症或病状的至少一种临床或亚临床症状的发病率和/或出现的可能性;或(2)抑制所述状态、病症或病状,即阻止、减少或延迟疾病或其复发或至少一种其临床或亚临床症状的发展;或(3)减轻疾病,即导致状态、病症或病状或至少一种其临床或亚临床症状的消退。对于待治疗的受试者的益处从统计学上是显著的,或对于患者或医师至少是可察觉的。

[0084] 如本文所用,术语“载体”包括核酸载体,例如,DNA载体,诸如质粒、粘粒或人工染色体、RNA载体、病毒或任何其他合适的复制子(例如,病毒载体)。已开发出多种载体,以用于将编码外源蛋白质的多核苷酸递送到原核或真核细胞中。此类表达载体的实例描述于,例如,Gellissen, Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems (John Wiley & Sons, Marblehead, MA, 2006)。适于与本文所述的组合物和方法一起使用的表达载体包含多核苷酸序列,以及例如,用于表达蛋白质和/或将这些多核苷酸序列整合到哺乳动物细胞的基因组中的另外的序列元件。可以用于表达如本文所述的转基因的某些载体包括包含指导基因转录的调控序列(诸如启动子和增强子区域)的载体。用于表达转基因的其他可用载体包含提高转基因的翻译速率或改善由基因转录产生的mRNA的稳定性或核输出的多核苷酸序列。这些序列元件包括,例如,5'和3'非翻译区和聚腺苷酸化信号位点,以便指导表达载体上携带的基因的有效转录。适于与本文所述的组合物和方法一起使用的表达载体还可包含编码用于选择包含所述载体的细胞的标志物的多核苷酸。合适的标志物的实例包括编码对抗生素,诸如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素或诺尔斯菌素的抗性的基因。

[0085] 如本文所用,术语“前庭毛细胞”是指内耳中参与感测移动并且有助于平衡和空间取向的感测的一组特化细胞。前庭毛细胞位于内耳的半规管和耳石中。前庭毛细胞的损伤和破坏前庭毛细胞功能的基因突变与前庭功能障碍(诸如眩晕和失衡症)有关。

[0086] 如本文所用,术语“野生型”是指在给定生物体中对于特定基因具有最高频率的基因型。

附图说明

[0087] 图1A-1B是用于在巨细胞病毒(CMV)启动子的控制下表达GFP的腺相关病毒(AAV)载

体(图1A)或在Myo15启动子(SEQ ID NO:13,图1B)的控制下表达GFP的AAV载体转导的小鼠耳蜗的一系列荧光图像。AAV-Myo15-GFP病毒通过后半规管输注给6-8周龄的C57B1/6J雄性小鼠。使小鼠从手术中恢复并将其安乐死,在10天后用10%的正常缓冲福尔马林灌注。收获内耳颞骨并在8%EDTA中脱钙3天。从脱钙的颞骨上切下耳蜗并将其固定在载玻片上以进行共聚焦成像。使用遍在启动子,AAV-CMV-GFP在耳蜗内的许多细胞类型中诱导GFP表达,包括内毛细胞、外毛细胞、螺旋神经节神经元、间充质细胞和神经胶质(图1A)。使用毛细胞特异性启动子,AAV-Myo15-GFP仅在内毛细胞和外毛细胞中诱导表达(图1B)。

[0088] 图2是用在Myo15启动子(SEQ ID NO:13,图2)的控制下表达GFP的AAV载体转导的小鼠前庭系统区域(椭圆囊、球囊、后嵴(posterior crista,PC)、前嵴(anterior crista,AC)和水平嵴(horizontal crista,HC))的荧光图像。AAV-Myo15-GFP病毒通过后半规管输注给6-8周龄的C57B1/6J雄性小鼠。使小鼠从手术中恢复并将其安乐死,在10天后用10%的正常缓冲福尔马林灌注。收获内耳颞骨并在8%EDTA中脱钙3天。从脱钙的颞骨上切下前庭器官并将其固定在载玻片上以进行成像。使用毛细胞特异性启动子,AAV-Myo15-GFP仅在前庭毛细胞中诱导表达(图2)。

[0089] 图3是非人灵长类动物耳蜗的一系列荧光图像,其示出Myo15启动子将GFP表达局限于非人灵长类动物耳蜗的毛细胞。图3A是来自通过圆窗膜接受AAV1-CMV-GFP的局部注射的非人灵长类动物的耳蜗的共聚焦图像。注射后28天收获组织。显示出天然GFP荧光。在整个器官的广泛多种细胞类型中检测到GFP表达。图3B是来自注射了AAV1-Myo15-GFP的非人灵长类动物并且以与图3A中的耳蜗相同的方式进行处理的耳蜗的共聚焦图像。GFP表达局限于毛细胞。图3C是图3B所示的方框区域中的毛细胞的放大视图。

[0090] 图4是示出与遍在CMV启动子相比,1.6kb Myo15启动子(SEQ ID NO:13)增强AAV-小鼠TMC1载体在Tmc1敲除(KO)小鼠中的生物学功效的图。在出生后第2天(P2)对Tmc1 KO小鼠进行注射,并在指定的年龄评估听性脑干反应(ABR)。将ABR阈值绘图初始纯合(具有空心圆圈的浅灰色线)和杂合(穿过黑色圆圈的深灰色线)Tmc1KO小鼠以及注射AAV-CMV-小鼠TMC1(CMV_mTmc1;具有空心圆圈的深灰色线)或AAV-Myo15-小鼠TMC1(PdBx_mTmc1;P23,穿过浅灰色圆圈的浅灰色线;P28,具有实心圆圈的深灰色线)的纯合Tmc1 KO小鼠的刺激频率的函数。与AAV-CMV-小鼠TMC1相比,注射AAV-Myo15-小鼠TMC1的纯合Tmc1 KO小鼠中ABR阈值的恢复大大改善。

具体实施方式

[0091] 本文描述了用于在毛细胞(例如,耳蜗和/或前庭毛细胞)中特异性地诱导转基因表达的组合物和方法。本发明的特征在于包含肌球蛋白15(Myo15)启动子的区域的多核苷酸,其能够在耳蜗毛细胞中特异性地表达转基因。本发明的特征还在于包含可操作地连接至编码多肽的多核苷酸的这些启动子的核酸载体。本文所述的组合物和方法可以用于在耳蜗和前庭毛细胞中特异性地表达编码毛细胞蛋白的多核苷酸,并且因此,可以将本文所述的组合物施用给受试者(诸如哺乳动物受试者,例如人),以治疗由毛细胞的功能障碍引起的病症,诸如听力损失或前庭功能障碍。

[0092] 毛细胞

[0093] 毛细胞是驻留在内耳中的听觉和前庭系统的感觉细胞。耳蜗毛细胞是听觉系统的

感觉细胞,并且由两种主要细胞类型组成:负责感测声音的内毛细胞和被认为放大低音量声音的外毛细胞。前庭毛细胞位于内耳的半规管和耳石器官中,并参与移动的感觉,这有助于平衡和空间取向的感测。毛细胞以从细胞顶表面突出形成毛细胞束的静纤毛命名。静纤毛的偏转(例如,通过耳蜗毛细胞中的声波,或通过前庭毛细胞中的旋转或线性加速度)导致机械门控的离子通道打开,从而允许毛细胞释放神经递质以激活神经,从而将机械声音或运动信号转换成可以传输到脑部的电信号。耳蜗毛细胞对于正常听力必不可少,并且耳蜗毛细胞的损伤和破坏耳蜗毛细胞功能的基因突变与听力损失和耳聋有关。前庭毛细胞的损伤和破坏前庭毛细胞功能的基因突变与前庭功能障碍(诸如失去平衡和眩晕(例如,头晕))有关。基因疗法最近已成为治疗听力损失和前庭功能障碍的一种颇具吸引力的治疗方法;然而,本领域缺乏用于使基因疗法中使用的核酸载体特异性地靶向毛细胞的方法。

[0094] 肌球蛋白15

[0095] Myo15是调控静纤毛发育的非常规的基于肌动蛋白的分子马达。已发现在Myo15中携带突变的小鼠具有短静纤毛和严重的听力损失和前庭功能障碍,并且人直系同源物Myo15A中的突变导致非综合征常染色体隐性耳聋DFNB3。已观察到Myo15定位于静纤毛并且对于静纤毛的发育和维持是必不可少的。定位模式表明Myo15可在毛细胞中特异性表达。然而,Myo15启动子先前尚未得到分离和表征。我们在直系同源基因组序列中鉴定了可构成启动子的调控元件的进化保守的嵌段,并发现它们位于翻译起始位点上游超过7200个碱基对(bp)的位置。此基因组区域太大而无法与最大包装容量为4.7kb的腺相关病毒(AAV)载体结合使用以递送用于基因疗法的目标转基因。

[0096] 本发明部分地基于Myo15翻译起始位点上游区域的发现,所述区域可以用于促进转基因在毛细胞(例如,耳蜗和/或前庭毛细胞)中的特异性表达。因此,本文所述的组合物和方法可以用于在毛细胞中表达目标基因(例如,与毛细胞发育、功能、细胞命运决定、再生、存活或维持有关的基因,或已知在患有听力损失或前庭功能障碍的受试者中被破坏(例如突变)的基因),以治疗患有听力损失(例如,感觉神经性听力损失)和/或前庭功能障碍(例如,眩晕、头晕或失去平衡)或有此风险的受试者。

[0097] 本文所述的组合物和方法的多核苷酸包括来自Myo15基因座的能够在毛细胞中特异性地表达转基因的区域的核酸序列,或其变体,诸如与Myo15基因座的能够在毛细胞中特异性地表达转基因的区域具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的核酸序列。这些区域包括紧接在Myo15翻译起始位点前面的核酸序列和被定位距离Myo15翻译起始位点超过5kb的上游调控元件。本文所述的组合物和方法的多核苷酸可以任选地包括可操作地连接Myo15基因座的能够在毛细胞中特异性地表达转基因的区域的接头,或Myo15基因座的所述区域可以在没有居间接头的情况下直接连接。

[0098] 在一些实施方案中,本文所述的多核苷酸包含连接(例如,可操作地连接)至第二区域的第一区域(上游调控元件),所述第一区域与包含Myo15基因的第一非编码外显子的区域(相对于Myo15翻译起始位点从-6755至-7209的核酸,其序列在SEQ ID NO:1中示出)或其功能部分或衍生物具有至少85%的序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性),所述第二区域与紧接在Myo15的翻译起始位点前面的核酸序列(相对于Myo15翻译起始位点从-1至-1157的核酸,其序列在SEQ ID NO:2中示出)或

其功能部分或衍生物具有至少85%的序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。SEQ ID NO:1的功能部分可具有相对于Myo15翻译起始位点从-7166至-7091的核酸序列(在SEQ ID NO:3中示出)和/或相对于Myo15翻译起始位点从-7077至-6983的核酸序列(在SEQ ID NO:4中示出)。第一区域可包含不使用居间核酸融合至SEQ ID NO:4的核酸序列的SEQ ID NO:3的核酸序列,如SEQ ID NO:5中所示,或第一区域可包含不使用居间核酸融合至SEQ ID NO:3的核酸序列的SEQ ID NO:4的核酸序列,如SEQ ID NO:6中所示。可替代地,第一区域可包含通过内源性居间核酸序列(例如,第一区域可具有相对于Myo15翻译起始位点从-7166至-6983的核酸序列,如SEQ ID NO:7中所示)或核酸接头连接的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的序列。在其中第一区域包含SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4两者的多核苷酸中,两个序列可以以任何顺序被包括在内(例如,SEQ ID NO:3可连接至(例如,在其前面)SEQ ID NO:4,或SEQ ID NO:4可连接至(例如,在其前面)SEQ ID NO:3)。SEQ ID NO:2的功能部分可具有相对于Myo15翻译起始位点从-590至-509的核酸序列(在SEQ ID NO:8中示出)和/或相对于Myo15翻译起始位点从-266至-161的核酸序列(在SEQ ID NO:9中示出)。第二区域可包含不使用居间核酸融合至SEQ ID NO:9的核酸序列的SEQ ID NO:8的核酸序列,如SEQ ID NO:10中所示,或第二区域可包含不使用居间核酸融合至SEQ ID NO:8的核酸序列的SEQ ID NO:9的核酸序列,如SEQ ID NO:11中所示。可替代地,第二区域可包含通过内源性居间核酸序列(例如,第二区域可具有相对于Myo15翻译起始位点从-590至-161的核酸序列,如SEQ ID NO:12中所示)或核酸接头连接的SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的序列。在其中第二区域包含SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9两者的多核苷酸中,两个序列可以以任何顺序被包括在内(例如,SEQ ID NO:8可连接至(例如,在其前面)SEQ ID NO:9,或SEQ ID NO:9可连接至(例如,在其前面)SEQ ID NO:8)。

[0099] 多核苷酸的第一区域和第二区域可以直接连接或可以通过核酸接头连接。例如,多核苷酸可以包含不使用居间核酸融合至SEQ ID NO:2的序列或其功能部分或衍生物(例如,SEQ ID NO:8-12中的任何一个或多个,例如SEQ ID NO 8和9)的SEQ ID NO:1的序列或其功能部分或衍生物(例如,SEQ ID NO:3-7中的任何一个或多个,例如SEQ ID NO 3和4)。例如,由SEQ ID NO:1直接融合至SEQ ID NO:2产生的多核苷酸的核酸序列在SEQ ID NO:13中示出。可替代地,可以使用接头将SEQ ID NO:1的序列或其功能部分或衍生物(例如,SEQ ID NO:3-7中的任何一个或多个,例如SEQ ID NO 3和4)连接至SEQ ID NO:2的序列或其功能部分或衍生物(例如,SEQ ID NO:8-12中的任何一个或多个,例如SEQ ID NO 8和9)。

[0100] 用于在本文所述的多核苷酸中使用的核酸接头的长度可以为约5kb或更少(例如,约5kb、4.5kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、900bp、800bp、700bp、600bp、500bp、450bp、400bp、350bp、300bp、250bp、200bp、150bp、100bp、90bp、80bp、70bp、60bp、50bp、40bp、30bp、25bp、20bp、15bp、10bp、5bp、4bp、3bp、2bp或更少)。可以在本文所述的多核苷酸中使用的核酸接头不破坏本发明的多核苷酸在毛细胞中诱导转基因表达的能力。

[0101] 在一些实施方案中,将SEQ ID NO:1的序列或其功能部分或衍生物(例如,SEQ ID NO:3-7中的任何一个或多个,例如SEQ ID NO 3和4)连接(例如,可操作地连接)至SEQ ID NO:2的序列或其功能部分或衍生物(例如,SEQ ID NO:8-12中的任何一个或多个,例如SEQ ID NO 8和9),并且,在一些实施方案中,将所述区域的顺序颠倒(例如,将SEQ ID NO:2的序列或其功能部分或衍生物(例如,SEQ ID NO:8-12中的任何一个或多个,例如SEQ ID NO 8

和9)连接(例如,可操作地连接)至SEQ ID NO:1的序列或其功能部分或衍生物(例如,SEQ ID NO:3-7中的任何一个或多个,例如SEQ ID NO 3和4))。例如,由SEQ ID NO:2直接融合至SEQ ID NO:1产生的多核苷酸的核酸序列在SEQ ID NO:14中示出。不考虑顺序,如上所述,可以通过直接融合或核酸接头将SEQ ID NO:1的序列或其功能部分或衍生物和SEQ ID NO:2的序列或其功能部分或衍生物连接。

[0102] 在一些实施方案中,本文所述的多核苷酸包含与包含Myo15基因的第一非编码外显子的区域(相对于Myo15翻译起始位点从-6755至-7209的核酸,其序列在SEQ ID NO:1中示出)或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的区域。SEQ ID NO:1的功能部分可具有相对于Myo15翻译起始位点从-7166至-7091的核酸序列(在SEQ ID NO:3中示出)和/或相对于Myo15翻译起始位点从-7077至-6983的核酸序列(在SEQ ID NO:4中示出)。所述多核苷酸可包含不使用居间核酸融合至SEQ ID NO:4的核酸序列的SEQ ID NO:3的核酸序列,如SEQ ID NO:5中所示,或所述多核苷酸可包含不使用居间核酸融合至SEQ ID NO:3的核酸的SEQ ID NO:4的核酸序列,如SEQ ID NO:6中所示。可替代地,所述多核苷酸可包含通过内源性居间核酸序列(例如,第一区域可具有相对于Myo15翻译起始位点从-7166至-6983的核酸序列,如SEQ ID NO:7中所示)或核酸接头连接的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的序列。在包含SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4两者的多核苷酸中,两个序列可以以任何顺序被包括在内(例如,SEQ ID NO:3可连接至(例如,在其前面)SEQ ID NO:4,或SEQ ID NO:4可连接至(例如,在其前面)SEQ ID NO:3)。

[0103] 在一些实施方案中,本文所述的多核苷酸包含与紧接在Myo15翻译起始位点上游的核酸序列(相对于Myo15翻译起始位点从-1至-1157的核酸,其序列在SEQ ID NO:2中示出)或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的区域。SEQ ID NO:2的功能部分可具有相对于Myo15翻译起始位点从-590至-509的核酸序列(在SEQ ID NO:8中示出)和/或相对于Myo15翻译起始位点从-266至-161的核酸序列(在SEQ ID NO:9中示出)。所述多核苷酸可包含不使用居间核酸融合至SEQ ID NO:9的核酸序列的SEQ ID NO:8的核酸序列,如SEQ ID NO:10中所示,或所述多核苷酸可包含不使用居间核酸融合至SEQ ID NO:8的核酸序列的SEQ ID NO:9的核酸序列,如SEQ ID NO:11中所示。可替代地,所述多核苷酸可包含通过内源性居间核酸序列(例如,第二区域可具有相对于Myo15翻译起始位点从-590至-161的核酸序列,如SEQ ID NO:12中所示)或核酸接头连接的SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的序列。在包含SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9两者的多核苷酸中,两个序列可以以任何顺序被包括在内(例如,SEQ ID NO:8可连接至(例如,在其前面)SEQ ID NO:9,或SEQ ID NO:9可连接至(例如,在其前面)SEQ ID NO:8)。

[0104] 下表2中汇总了前述核酸序列。

[0105] 表2:用于在本文所述的多核苷酸中使用的示例性核苷酸序列

SEQ ID NO.	核酸序列的说明	核酸序列
1	包含 Myo15 的非编码外显子 1 的区域 (-6755 至-7209)	CTGCAGCTCAGCCTACTACTTGCTTTCCA GGCTGTTCCCTAGTTCCCATGTCAGCTGCTT GTGCTTTCCAGAGACAAAACAGGAATAA TAGATGTCATTAAATATACATTGGGCCCC AGGCGGTCAATGTGGCAGCCTGAGCCTCC TTTCCATCTCTGTGGAGGCAGACATAGGA CCCCCAACAAACAGCATGCAGGTTGGGA GCCAGCCACAGGACCCAGGTAAGGGGCC CTGGGTCCCTTAAGCTTCTGCCACTGGCTC CGGCATTGCAGAGAGAAGAGAAGGGGCG GCAGAGCTGAACCTTAGCCTTGCCTTCCT GGGTACCCTTCTGAGCCTCACTGTCTTCT GTGAGATGGGCAAAGTGCGGGTGTGACT CCTTGGCAACGGTGTTACACCAGGGCAGG TAAAGTTGTAGTTATTTGTGGGGTACACC AGGACTGTAAAGGTGTAACAT
2	紧接在 Myo15 的翻译起始位点前面的区域 (-1 至-1157)	GGTCTCACCCAGCATTTTCACTTCTAATA AGTTCAAATGTGATACGGCACCTTTCTAA AAATTAGTTTTTCAGGGAAATAGGGTTCAA AACTGGTAGTGGTAGGGTCCATTCTCACG ACCCCCAGGCCTGCTAACCTGACCAAGC TACCTATTACTTACCCTCCTCTTTCTCCTC CTCCTCTTTCTCCTTCTCCTGCTTCCCCTCT TCCTTCTCCCTCCCTTCCTCTCCCTCCTCC CCCTCCTTGGCTGTGATCAGATCCAGAGC CTGAATGAGCCTCCTGACCCACACCCCC ACTAGCATGGGCCTGCAAGTGCCCAGAA GTCCCTCCTGCCTCCTAAACTGCCAGCC GATCCATTAGCTCTTCCTTCTTCCCAGTGA AAGAAGCAGGCACAGCCTGTCCCTCCCGT TCTACAGAAAGGAAGCTACAGCACAGGG AGGGCCAAAGGCCTTCCTGGGACTAGAC AGTTGATCAACAGCAGGACTGGAGAGCT GGGCTCCATTTTTGTTTCTTGGTGCCCTGC CCCTCCCCATGACCTGCAGAGACATTGAG CCTGCCAGGCTTTATGAGGTGGGAGCTGG GCTCTCCCTGATGTATTATTCAGCTCCCTG GAGTTGGCCAGCTCCTGTTACACTGGCCA CAGCCCTGGGCATCCGCTTCTCACTTCTA GTTTCCCCTCCAAGGTAATGTGGTGGGTC ATGATCATTCTATCCTGGCTTCAGGGACC TGACTCCACTTTGGGGCCATTCGAGGGGT CTAGGGTAGATGATGTCCCCCTGTGGGGA TTAATGTCTGCTCTGTAAACTGAGCTA

[0106]

[0107]

SEQ ID NO.	核酸序列的说明	核酸序列
		GCTGAGATCCAGGAGGGCTTGGCCAGAG ACAGCAAGTTGTTGCCATGGTGACTTTAA AGCCAGGTTGCTGCCCCAGCACAGGCCTC CCAGTCTACCCTCACTAGAAAACAACACC CAGGCACTTTCCACCACCTCTCAAAGGTG AAACCCAAGGCTGGTCTAGAGAATGAAT TATGGATCCTCGCTGTCCGTGCCACCCAG CTAGTCCCAGCGGCTCAGACACTGAGGA GAGACTGTAGGTTTCACTACAAGCAAAA AGACCTAGCTGGTCTCCAAGCAGTGTCTC CAAGTCCCTGAACCTGTGACACCTGCCCC AGGCATCATCAGGCACAGAGGGCCACC
3	SEQ ID NO: 1 的部分 (-7166 至-7091)	CCCATGTCAGCTGCTTGTGCTTTCCAGAG ACAAAACAGGAATAATAGATGTCATTAA ATATACATTGGGCCCCAGG
4	SEQ ID NO: 1 的部分 (-7077 至-6983)	AGCCTGAGCCTCCTTTCCATCTCTGTGGA GGCAGACATAGGACCCCCAACAAACAGC ATGCAGGTTGGGAGCCAGCCACAGGACC CAGGTAAGGG
5	SEQ ID NO: 1 的部分 (融合至 SEQ ID NO: 4 的 SEQ ID NO: 3)	CCCATGTCAGCTGCTTGTGCTTTCCAGAG ACAAAACAGGAATAATAGATGTCATTAA ATATACATTGGGCCCCAGGAGCCTGAGCC TCCTTTCCATCTCTGTGGAGGCAGACATA GGACCCCCAACAAACAGCATGCAGGTTG GGAGCCAGCCACAGGACCCAGGTAAGGG
6	SEQ ID NO: 1 的部分 (融合至 SEQ ID NO: 3 的 SEQ ID NO: 4)	AGCCTGAGCCTCCTTTCCATCTCTGTGGA GGCAGACATAGGACCCCCAACAAACAGC ATGCAGGTTGGGAGCCAGCCACAGGACC CAGGTAAGGGCCCATGTCAGCTGCTTGTG CTTTCCAGAGACAAAACAGGAATAATAG ATGTCATTAAATATACATTGGGCCCCAGG
7	SEQ ID NO: 1 的部分 (-7166 至-6983)	CCCATGTCAGCTGCTTGTGCTTTCCAGAG ACAAAACAGGAATAATAGATGTCATTAA ATATACATTGGGCCCCAGGCGGTCAATGT GGCAGCCTGAGCCTCCTTTCCATCTCTGT GGAGGCAGACATAGGACCCCCAACAAAC AGCATGCAGGTTGGGAGCCAGCCACAGG ACCCAGGTAAGGG
8	SEQ ID NO: 2 的部分 (-590 至-509)	TGAGGTGGGAGCTGGGCTCTCCCTGATGT ATTATTCAGCTCCCTGGAGTTGGCCAGCT CCTGTTACACTGGCCACAGCCCTG
9	SEQ ID NO: 2 的部分 (-266 至-161)	CACAGGCCTCCCAGTCTACCCTCACTAGA AAACAACACCCAGGCACTTTCCACCACCT CTCAAAGGTGAAACCCAAGGCTGGTCTA GAGAATGAATTATGGATCCT
10	SEQ ID NO: 2 的部分	TGAGGTGGGAGCTGGGCTCTCCCTGATGT ATTATTCAGCTCCCTGGAGTTGGCCAGCT

[0108]

SEQ ID NO.	核酸序列的说明	核酸序列
	(融合至 SEQ ID NO: 9 的 SEQ ID NO: 8)	CCTGTTACACTGGCCACAGCCCTG CACAGGCCTCCCAGTCTACCCTCACTAGA AAACAACACCCAGGCACTTTCCACCACCT CTCAAAGGTGAAACCCAAGGCTGGTCTA GAGAATGAATTATGGATCCT
11	SEQ ID NO: 2 的部分 (融合至 SEQ ID NO: 8 的 SEQ ID NO: 9)	CACAGGCCTCCCAGTCTACCCTCACTAGA AAACAACACCCAGGCACTTTCCACCACCT CTCAAAGGTGAAACCCAAGGCTGGTCTA GAGAATGAATTATGGATCCTTGAGGTGGG AGCTGGGCTCTCCCTGATGTATTATTGAG CTCCCTGGAGTTGGCCAGCTCCTGTTACA CTGGCCACAGCCCTG
12	SEQ ID NO: 2 的部分 (-590 至 -161)	TGAGGTGGGAGCTGGGCTCTCCCTGATGT ATTATTCAGCTCCCTGGAGTTGGCCAGCT CCTGTTACACTGGCCACAGCCCTGGGCAT CCGCTTCTCACTTCTAGTTTCCCCTCCAAG GTAATGTGGTGGGTCATGATCATTCTATC CTGGCTTCAGGGACCTGACTCCACTTTGG GGCCATTTCGAGGGGTCTAGGGTAGATGAT GTCCCCCTGTGGGGATTAATGTCCTGCTC TGTAAACTGAGCTAGCTGAGATCCAGG AGGGCTTGGCCAGAGACAGCAAGTTGTT GCCATGGTGACTTTAAAGCCAGGTTGCTG CCCCAGCACAGGCCTCCCAGTCTACCCTC ACTAGAAAACAACACCCAGGCACTTTCCA CCACCTCTCAAAGGTGAAACCCAAGGCTG GTCTAGAGAATGAATTATGGATCCT
13	融合至 SEQ ID NO: 2 的 SEQ ID NO: 1	CTGCAGCTCAGCCTACTACTTGCTTTCCA GGCTGTTCTAGTTCCCATGTCAGCTGCTT GTGCTTTCCAGAGACAAAACAGGAATAA TAGATGTCATTAAATATACATTGGGCCCC AGGCGGTCAATGTGGCAGCCTGAGCCTCC TTCCATCTCTGTGGAGGCAGACATAGGA CCCCAACAAACAGCATGCAGGTTGGGA GCCAGCCACAGGACCCAGGTAAGGGGCC CTGGGTCTTAAGCTTCTGCCACTGGCTC CGGCATTGCAGAGAGAAGAGAAGGGGCG GCAGAGCTGAACCTTAGCCTTGCCCTTCT GGGTACCCTTCTGAGCCTCACTGTCTTCT GTGAGATGGGCAAAGTGCGGGTGTGACT CCTTGGCAACGGTGTTACACCAGGGCAGG TAAAGTTGTAGTTATTTGTGGGGTACACC AGGACTGTAAAGGTGTAAGTATGGTCTC ACCCAGCATTTTCACTTCTAATAAGTTCA AATGTGATACGGCACCTTTCTAAAAATTA GTTTTAGGGAAATAGGGTTCAAACTGG TAGTGGTAGGGTCCATTCTCACGACCCCC

[0109]

SEQ ID NO.	核酸序列的说明	核酸序列
		AGGCCTGCTAACCCTGACCAAGCTACCTA TACTTACCCTCCTCTTTCTCCTCCTCCTC TTTCTCCTTCTCCTGCTTCCCCTCTTCCTTC TCCCTCCCTTCCTCTCCCTCCTCCCCCTCC TTGGCTGTGATCAGATCCAGAGCCTGAAT GAGCCTCCTGACCCACACCCCCACTAGC ATGGGCCTGCAAGTGCCCAGAAGTCCCTC CTGCCTCCTAAACTGCCCAGCCGATCCAT TAGCTCTTCCTTCTTCCCAGTGAAAGAAG CAGGCACAGCCTGTCCCTCCCGTTCTACA GAAAGGAAGCTACAGCACAGGGAGGGCC AAAGGCCTTCCTGGGACTAGACAGTTGAT CAACAGCAGGACTGGAGAGCTGGGCTCC ATTTTGTTCCTTGGTGCCCTGCCCTCCC CATGACCTGCAGAGACATTCAGCCTGCCA GGCTTTATGAGGTGGGAGCTGGGCTCTCC CTGATGTATTATTCAGCTCCCTGGAGTTG GCCAGCTCCTGTTACACTGGCCACAGCCC TGGGCATCCGCTTCTCACTTCTAGTTTCCC CTCCAAGGTAATGTGGTGGGTCATGATCA TTCTATCCTGGCTTCAGGGACCTGACTCC ACTTTGGGGCCATTTCGAGGGGTCTAGGGT AGATGATGTCCCCCTGTGGGGATTAATGT CCTGCTCTGTAAAACTGAGCTAGCTGAGA TCCAGGAGGGCTTGGCCAGAGACAGCAA GTTGTTGCCATGGTGACTTTAAAGCCAGG TTGCTGCCCCAGCACAGGCCTCCCAGTCT ACCCTCACTAGAAAACAACACCCAGGCA CTTTCCACCACCTCTCAAAGGTGAAACCC AAGGCTGGTCTAGAGAATGAATTATGGAT CCTCGCTGTCCGTGCCACCCAGCTAGTCC CAGCGGCTCAGACACTGAGGAGAGACTG TAGGTTCACTACAAGCAAAAAGACCTA GCTGGTCTCCAAGCAGTGTCTCCAAGTCC CTGAACCTGTGACACCTGCCCCAGGCATC ATCAGGCACAGAGGGCCACC
14	融合至 SEQ ID NO: 1 的 SEQ ID NO: 2	GGTCTCACCCAGCATTTTCACTTCTAATA AGTTCAAATGTGATACGGCACCTTTCTAA AAATTAGTTTTAGGGAAATAGGGTTCAA AACTGGTAGTGGTAGGGTCCATTCTCACG ACCCCCAGGCCTGCTAACCCTGACCAAGC TACCTATTACTTACCCTCCTCTTTCTCCTC CTCCTCTTTCTCCTTCTCCTGCTTCCCCTCT TCCTTCTCCCTCCCTTCTCCTCCTCCTCC CCCTCCTTGGCTGTGATCAGATCCAGAGC CTGAATGAGCCTCCTGACCCACACCCCC ACTAGCATGGGCCTGCAAGTGCCCAGAA

[0110]

SEQ ID NO.	核酸序列的说明	核酸序列
		GTCCCTCCTGCCTCCTAAACTGCCAGCC GATCCATTAGCTCTTCCTTCTTCCCAGTGA AAGAAGCAGGCACAGCCTGTCCCTCCCGT TCTACAGAAAGGAAGCTACAGCACAGGG AGGGCCAAAGGCCTTCCTGGGACTAGAC AGTTGATCAACAGCAGGACTGGAGAGCT GGGCTCCATTTTTGTTTCCTTGGTGCCCTGC CCCTCCCCATGACCTGCAGAGACATTCAG CCTGCCAGGCTTTATGAGGTGGGAGCTGG GCTCTCCCTGATGTATTATTCAGCTCCCTG GAGTTGGCCAGCTCCTGTTACACTGGCCA CAGCCCTGGGCATCCGCTTCTCACTTCTA GTTTCCTCCCAAGGTAATGTGGTGGGTC ATGATCATTCTATCCTGGCTTCAGGGACC TGACTCCACTTTGGGGCCATTCGAGGGGT CTAGGGTAGATGATGTCCCCCTGTGGGGA TTAATGTCCTGCTCTGTAAACTGAGCTA GCTGAGATCCAGGAGGGCTTGGCCAGAG ACAGCAAGTTGTTGCCATGGTGACTTTAA AGCCAGGTTGCTGCCCCAGCACAGGCCTC CCAGTCTACCCTCACTAGAAAACAACACC CAGGCACTTTCCACCACCTCTCAAAGGTG AAACCCAAGGCTGGTCTAGAGAATGAAT TATGGATCCTCGCTGTCCGTGCCACCCAG CTAGTCCCAGCGGCTCAGACACTGAGGA GAGACTGTAGGTTGAGCTACAAGCAAAA AGACCTAGCTGGTCTCCAAGCAGTGTCTC CAAGTCCCTGAACCTGTGACACCTGCCCC AGGCATCATCAGGCACAGAGGGGCCACCC TGCAGCTCAGCCTACTACTTGCTTTCCAG GCTGTTTCCTAGTTCCCATGTCAGCTGCTTG TGCTTTCCAGAGACAAAACAGGAATAAT AGATGTCATTAAATATACATTGGGCCCA GGCGGTCAATGTGGCAGCCTGAGCCTCCT TTCCATCTCTGTGGAGGCAGACATAGGAC CCCCACAAACAGCATGCAGGTTGGGAG CCAGCCACAGGACCCAGGTAAGGGGCC TGGGTCCTTAAGCTTCTGCCACTGGCTCC GGCATTGCAGAGAGAAGAGAAGGGGCGG CAGAGCTGAACCTTAGCCTTGCCCTTCTG GGTACCCTTCTGAGCCTCACTGTCTTCTGT GAGATGGGCAAAGTGCGGGTGTGACTCC TTGGCAACGGTGTTACACCAGGGCAGGTA AAGTTGTAGTTATTTGTGGGGTACACCAG GACTGTTAAAGGTGTAACAT

[0111] 可与本文所述的组合物和方法结合使用的另外的多核苷酸包括与表2中列出的核酸序列以及表2中列出的核酸序列的功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如, 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的核酸分子。

[0112] 前述多核苷酸可以包括在核酸载体中并且可操作地连接至转基因以在毛细胞(例

如,耳蜗毛细胞和/或前庭毛细胞)中特异性地表达转基因。在一些实施方案中,转基因编码与毛细胞功能、毛细胞发育、毛细胞命运决定、毛细胞再生、毛细胞存活或毛细胞维持有关的蛋白质,或转基因是已发现在患有听力损失、耳聋、听神经病、耳鸣或前庭功能障碍(例如,眩晕、头晕或失去平衡)的受试者中发生突变的基因的野生型形式。根据本文所述的方法,可以向受试者施用包含一种或多种前述多核苷酸(例如,表2中列出的一种或多种多核苷酸)的组合物,所述多核苷酸可操作地连接至编码用于治疗听力损失和/或前庭功能障碍的治疗性蛋白质的转基因。在一些实施方案中,转基因编码选自以下组成的组的蛋白质:肌动蛋白 γ 1(ACTG1)、Fascin肌动蛋白集束蛋白2、视黄醛(FSCN2)、根蛋白(RDX)、POU 4类同源框3(POU4F3)、TRIO和F-肌动蛋白结合蛋白(TRIOBP)、Taperin(TPRN)、Xin Actin Binding Repeat Containing 2(XIRP2)、Atonal BHLH转录因子1(ATOH1)、生长因子非依赖性1转录阻遏蛋白(GFI1)、胆碱能受体烟酸 α 9亚基(CHRNA9)、钙和整联蛋白结合家族成员3(CIB3)、钙粘素23(CDH23)、原钙粘附蛋白15(PCDH15)、Kinocilin(KNCN)、Pejvakin(DFNB59)、耳畸蛋白(Otoferlin)(OTOF)、MKRN2相反链(MKRN2OS)、LIM同源框蛋白3(LHX3)、跨膜通道样蛋白1(TMC1)、肌球蛋白15(MYO15)、肌球蛋白7A(MYO7A)、肌球蛋白6(MYO6)、肌球蛋白IIIA(MYO3A)、肌球蛋白IIIB(MYO3B)、含有谷氧还蛋白结构域的半胱氨酸富集蛋白1(GRXCR1)、蛋白酪氨酸磷酸酶受体型Q(PTPRQ)、晚期角质化包膜蛋白6A(LCE6A)、含脂氧合酶同源结构域蛋白1(LOXHD1)、ADP-核糖转移酶1(ART1)、ATP酶质膜Ca²⁺转运2(ATP2B2)、钙和整联蛋白结合家族成员2(CIB2)、钙电压门控通道辅助亚基 α 2 δ 4(CACNA2D4)、钙结合蛋白2(CABP2)、表皮生长因子受体途径底物8(EPS8)、EPS8样蛋白2(EPS8L2)、Espin(ESPN)、Espin样蛋白(ESP NL)、外周蛋白2(PRPH2)、硬纤毛蛋白(STRC)、溶质载体家族8成员A2(SLC8A2)、含CCHC型锌指的蛋白12(ZCCHC12)、含亮氨酸富集跨膜和O-甲基转移酶结构域的蛋白质(LRTOMT2、LRTOMT1)、USH1蛋白网络组分Harmonin(USH1C)、含有细胞外亮氨酸富集重复和纤连蛋白III型结构域的蛋白质1(ELFN1)、四三辅肽重复蛋白24(TTC24)、Dystrotelin(DYTN)、Kielin/腱蛋白样蛋白(KCP)、卷曲螺旋谷氨酸酯富集蛋白2(Coiled-coil Glutamate Rich Protein 2,CCER2)、含有亮氨酸富集重复和跨膜结构域的蛋白质2(Leucine-rich Repeat and Transmembrane Domain-containing protein 2,LRTM2)、钾电压门控通道亚家族A成员10(KCNA10)、神经营养蛋白3(NT3)、Clarín 1(CLRN1)、Clarín 2(CLRN2)、SKI家族转录辅阻遏物1(SKOR1)、含Tctex1结构域蛋白1(TCTEX1D1)、Fc受体样B(FCRLB)、溶质载体家族17成员8(SLC17A8)、含有谷氧还蛋白结构域的半胱氨酸富集蛋白2(GRXCR2)、脑源性神经营养因子(BDNF)、丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serpin)家族E成员3(SERPINE3)、无义螺旋环螺旋1(Nescient Helix-loop Helix 1,NHLH1)、热激蛋白70(HSP70)、热激蛋白90(HSP90)、转录激活因子6(ATF6)、真核翻译起始因子2 α 激酶3(PERK)、丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶/内切核糖核酸酶IRE1(IRE1)以及结合免疫球蛋白(Binding Immunoglobulin Protein,BIP)。

[0113] 外源核酸在哺乳动物细胞中的表达

[0114] 多种基因(诸如MYO7A、POU4F3、SLC17A8和TMC1)的突变已与感觉神经性听力损失相关联,并且这些突变中的一些(诸如MYO7A的突变)还与前庭功能障碍相关。本文所述的组合物和方法可以用于诱导或增加由目标基因(例如,与听力损失和/或前庭功能障碍有关的基因的野生型形式,或参与毛细胞发育、功能、细胞命运决定、再生、存活或维持的基因)编

码的蛋白质在毛细胞(例如,耳蜗和/或前庭毛细胞)中的特异性表达,这通过施用核酸载体来实现,所述核酸载体包含可操作地连接至编码目标蛋白质的核酸序列的Myo15启动子(例如,多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:1或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域和/或与SEQ ID NO:2或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域,任选地包含连接第一区域和第二区域的接头)。已经建立了广泛的方法将蛋白质递送至哺乳动物细胞并用于在哺乳动物细胞中稳定表达编码蛋白质的基因。

[0115] 可以结合本文所述的组合物表达(例如,当编码蛋白质的转基因可操作地连接至多核苷酸时,所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:1或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域和/或与SEQ ID NO:2或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域)的蛋白质是在健康毛细胞中表达的蛋白质(例如,在耳蜗和/或前庭毛细胞中,例如在毛细胞发育、功能、再生、细胞命运决定、存活或维持中起作用的蛋白质,或在患有感觉神经性听力损失或前庭功能障碍的受试者中缺乏的蛋白质)或其他目标治疗性蛋白质。使用本文所述的组合物和方法可以在毛细胞中表达的蛋白质包括ACTG1、FSCN2、RDX、POU4F3、TRIOBP、TPRN、XIRP2、ATOH1、GFI1、CHRNA9、CIB3、CDH23、PCDH15、KNCN、DFNB59、OTOF、MKRN2OS、LHX3、TMC1、MYO15、MYO7A、MYO6、MYO3A、MYO3B、GRXCR1、PTPRQ、LCE6A、LOXHD1、ART1、ATP2B2、CIB2、CACNA2D4、CABP2、EPS8、EPS8L2、ESPN、ESP NL、PRPH2、STRC、SLC8A2、ZCCHC12、LRTOMT2、LRTOMT1、USH1C、ELFN1、TTC24、DYTN、KCP、CCER2、LRTM2、KCNA10、NT3、CLRN1、CLRN2、SKOR1、TCTEX1D1、FCRLB、SLC17A8、GRXCR2、BDNF、SERPINE3、NHLH1、HSP70、HSP90、ATF6、PERK、IRE1和BIP。

[0116] 编码目标蛋白质的多核苷酸

[0117] 可以用于在哺乳动物细胞中实现治疗有效的细胞内目标蛋白质浓度的一种平台是通过编码目标蛋白质的基因的稳定表达(例如,通过整合到哺乳动物细胞的核或线粒体基因组中,或通过哺乳动物细胞的核中形成附加型串联体(concatemer))。该基因是编码相应蛋白质的一级氨基酸序列的多核苷酸。为了将外源基因引入哺乳动物细胞中,可以将基因掺入载体中。可以通过多种方法将载体引入细胞中,包括转化、转染、转导、直接摄取、弹丸轰击(projectile bombardment)以及通过将载体包封在脂质体中。转染或转化细胞的合适方法的实例包括磷酸钙沉淀、电穿孔、显微注射、感染、脂质转染和直接摄取。此类方法更详细地描述于例如Green等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第四版(Cold Spring Harbor University Press,New York 2014);以及Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,New York 2015)中,其中每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0118] 还可以通过将包含编码目标蛋白质的基因的载体靶向细胞膜磷脂来将目标蛋白质引入哺乳动物细胞中。例如,通过将载体分子连接至VSV-G蛋白(对所有细胞膜磷脂具有亲和力的病毒蛋白),可以将载体靶向细胞膜的细胞外表面上的磷脂。可以使用本领域技术人员众所周知的方法产生这样的构建体。

[0119] 哺乳动物RNA聚合酶对编码目标蛋白质的多核苷酸的识别和结合对于基因表达很

重要。因此,可在多核苷酸内包括对募集RNA聚合酶并促进转录复合物在转录起始位点的组装的转录因子表现出高亲和力的序列元件。此类序列元件包括,例如,哺乳动物启动子,其序列可以被特异性转录起始因子和最终的RNA聚合酶识别并结合。哺乳动物启动子的实例已经描述于在线公布的Smith等,Mol.Sys.Biol.,3:73中,其公开内容通过引用并入本文。本文所述的方法和组合物中使用的启动子是包含与SEQ ID NO:1或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域和/或与SEQ ID NO:2或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域的多核苷酸,其任选地包含处于第一区域与第二区域之间的接头。

[0120] 一旦将编码目标蛋白质的多核苷酸掺入哺乳动物细胞的核DNA中,就可以通过本领域已知的方法诱导此多核苷酸的转录。例如,可以通过将哺乳动物细胞暴露于外部化学试剂,诸如调节转录因子和/或RNA聚合酶与哺乳动物启动子的结合并因此调控基因表达的剂来诱导表达。化学试剂可以用于促进RNA聚合酶和/或转录因子与哺乳动物启动子的结合,例如通过除去已结合启动子的阻遏蛋白。可替代地,化学试剂可以用于增强哺乳动物启动子对RNA聚合酶和/或转录因子的亲和力,使得在化学试剂的存在下,位于启动子下游的基因的转录速率增加。通过以上机制增强多核苷酸转录的化学试剂的实例包括四环素和强力霉素。这些试剂是可商购获得的(Life Technologies,Carlsbad,CA),并且可以根据建立的方案施用于哺乳动物细胞以便促进基因表达。

[0121] 可包括在用于在本文所述的组合物和方法中使用的多核苷酸中的其他DNA序列元件包括增强子序列。增强子代表另一类调控元件,其诱导包含目标基因的多核苷酸的构象变化,使得DNA采用有利于转录因子和RNA聚合酶在转录起始位点处结合的三维取向。因此,用于在本文所述的组合物和方法中使用的多核苷酸包括编码目标蛋白质的那些,并且另外包括哺乳动物增强子序列。现在已知许多来自哺乳动物基因的增强子序列,并且实例包括来自编码哺乳动物珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素的基因的增强子。用于在本文所述的组合物和方法中使用的增强子还包括衍生自能够感染真核细胞的病毒的遗传物质的那些。实例包括复制起点后侧(bp100-270)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点后侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子。诱导真核基因转录的激活的另外增强子序列包括CMV增强子和RSV增强子。可将增强子剪接到包含编码目标蛋白质的多核苷酸的载体中,例如在该基因的5'或3'位置。在优选取向上,增强子位于启动子的5'侧,其继而相对于编码目标蛋白质的多核苷酸位于5'。

[0122] 包含本文所述的Myo15启动子的核酸载体可包括Woodchuck转录后调控元件(WPRE)。WPRE通过促进转录物的核输出和/或通过增加新生转录物的聚腺苷酸化效率而在转录水平上发挥作用,从而增加细胞中的总mRNA量。将WPRE添加到载体中可以导致体外和体内由几种不同的启动子造成的转基因表达的水平显著改善。

[0123] 在一些实施方案中,包含本文所述的Myo15启动子的核酸载体包括报告基因序列,其可以用于验证可操作地连接至Myo15启动子的基因的表达,例如在细胞和组织中(例如,在毛细胞中,诸如耳蜗和/或前庭毛细胞)。可在转基因中提供的报告基因序列包括编码 β -内酰胺酶、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶以及本领域众所周知的其他物质的DNA序列。当与驱动其表达的调

控元件(诸如Myo15启动子)相关联时,报告基因序列提供通过常规手段可检测的信号,所述手段包括酶促、射线照相、比色、荧光或其他光谱测定、荧光激活细胞分选测定和免疫测定,包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和免疫组织化学。例如,在标志物序列是LacZ基因的情况下,通过针对 β -半乳糖苷酶活性的测定检测携带信号的载体的存在。在转基因是绿色荧光蛋白或荧光素酶的情况下,可在光度计中通过颜色或光产生来目测携带信号的载体。

[0124] 用于将外源核酸递送至靶细胞的方法

[0125] 可以用于将转基因(诸如可操作连接至本文所述的Myo15启动子的转基因)引入靶细胞(例如,哺乳动物细胞)中的技术是本领域众所周知的。例如,可以使用电穿孔,通过将静电势施加至目标细胞而对哺乳动物细胞(例如,人靶细胞)进行透化。以此方式经受外部电场的哺乳动物细胞(诸如人细胞)随后易于摄取外源核酸。哺乳动物细胞的电穿孔详细描述于例如Chu等,Nucleic Acids Research 15:1311(1987)中,其公开内容通过引用并入本文。类似技术NucleofectionTM利用施加的电场,以刺激外源多核苷酸摄取到真核细胞的核中。NucleofectionTM和可用于进行此技术的方案详细描述于,例如,Distler等,Experimental Dermatology 14:315(2005)以及US 2010/0317114中,其中每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0126] 可用于转染靶细胞的另外的技术包括挤压-穿孔法。此技术诱导细胞的快速机械变形,以刺激通过响应于所施加的应力而形成的膜孔摄取外源DNA。此技术的优点在于,载体不是将核酸递送到细胞(诸如人靶细胞)中所必需的。挤压-穿孔详细描述于,例如,Sharei等,Journal of Visualized Experiments 81:e50980(2013)中,其公开内容通过引用并入本文。

[0127] 脂质转染代表可用于转染靶细胞的另一技术。此方法包括将核酸装载到脂质体中,所述脂质体通常具有朝向脂质体外部的阳离子型官能团,诸如季胺或质子化胺。这由于细胞膜的阴离子性质而促进脂质体与细胞之间的静电相互作用,最终引起外源核酸的摄取,例如通过脂质体与细胞膜的直接融合或通过复合物的内吞作用。脂质转染详细描述于,例如,美国专利7,442,386中,其公开内容通过引用并入本文。利用与细胞膜的离子相互作用来引起外来核酸的摄取的类似技术包括使细胞与阳离子聚合物-核酸复合物接触。与多核苷酸缔合以赋予有利于与细胞膜相互作用的正电荷的示例性阳离子型分子包括活化的树枝状化合物(dendrimer)(描述于,例如,Dennig,Topics in Current Chemistry 228:227(2003)中,其公开内容通过引用并入本文)、聚乙烯亚胺和二乙基氨基乙基(DEAE)-葡聚糖,其作为转染剂的使用详细描述于,例如,Gulick等,Current Protocols in Molecular Biology 40:1:9.2:9.2.1(1997)中,其公开内容通过引用并入本文。磁珠是可以用于以温和且有效的方式转染靶细胞的另一工具,因为此方法利用施加的磁场来指导核酸的摄取。此技术详细描述于例如US 2010/0227406中,其公开内容通过引用并入本文。

[0128] 用于诱导靶细胞对外源核酸的摄取的另一可用工具是激光转染(laserfection),也称为光学转染,一种包括将细胞暴露于特定波长的电磁辐射以温和地对细胞透化并允许多核苷酸穿透细胞膜的技术。此技术的生物活性类似于且在一些情况下被发现优于电穿孔。

[0129] 穿刺转染是可以用于将遗传物质递送至靶细胞的另一技术。它依赖于纳米材料的

使用,诸如碳纳米纤维、碳纳米管和纳米线。垂直于基底表面合成针状纳米结构。包含旨在进行细胞内递送的基因的DNA连接至纳米结构表面。然后将具有这些针的阵列的芯片压贴在细胞或组织上。被纳米结构刺穿的细胞可以表达一种或多种递送的基因。此技术的实例描述于Shalek等,PNAS 107:1870(2010)中,其公开内容通过引用并入本文。

[0130] 磁转染也可以用于将核酸递送至靶细胞。磁转染原理是使核酸与阳离子型磁性纳米颗粒缔合。磁性纳米颗粒由完全可生物降解的氧化铁制成,并涂有根据应用而变化的特定阳离子型专有分子。它们与基因载体(DNA、siRNA、病毒载体等)的缔合是通过盐诱导的胶体聚集和静电相互作用实现的。然后,磁性颗粒受到磁体产生的外部磁场的影响而集中在靶细胞上。此技术详细描述于Scherer等,Gene Therapy 9:102(2002)中,其公开内容通过引用并入本文。

[0131] 用于诱导靶细胞对外源核酸的摄取的另一可用工具是声致穿孔,一种包括使用声音(通常是超声频率)改变细胞质膜的通透性,从而使细胞透化并允许多核苷酸穿透细胞膜的技术。此技术详细描述于,例如,Rhodes等,Methods in Cell Biology 82:309(2007)中,其公开内容通过引用并入本文。

[0132] 微囊泡代表可以用于根据本文所述的方法修饰靶细胞的基因组的另一潜在媒介物。例如,可以使用通过糖蛋白VSV-G与例如基因组修饰蛋白(诸如核酸酶)的共过表达引起的微囊泡将蛋白质有效地递送到细胞中,其随后催化内源多核苷酸序列的位点特异性裂解,以制备用于共价掺入目标多核苷酸(诸如基因或调控序列)的细胞的基因组。此类囊泡(也称为纳米囊泡(Gesicle))在真核细胞的遗传修饰中的使用详细描述于,例如,Quinn等,Genetic Modification of Target Cells by Direct Delivery of Active Protein[摘要].在:Methylation changes in early embryonic genes in cancer[摘要]中,在:美国基因与细胞治疗学会第18届年会记录(Proceedings of the 18th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy);2015年5月13日,摘要编号122中。

[0133] 用于将外源核酸递送至靶细胞的载体

[0134] 除了实现高的转录和翻译速率外,外源基因在哺乳动物细胞中的稳定表达可以通过将包含该基因的多核苷酸整合到哺乳动物细胞的核基因组中来实现。已开发出用于将编码外源蛋白质的多核苷酸递送并整合到哺乳动物细胞的核DNA中的多种载体。表达载体的实例描述于,例如,Gellissen,Production of Recombinant Proteins:Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems(John Wiley&Sons,Marblehead,MA,2006)中。用于在本文所述的组合物和方法中使用的表达载体包含可操作地连接至编码目标蛋白质的多核苷酸序列的Myo15启动子(例如,包含与SEQ ID NO:1或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域和/或与SEQ ID NO:2或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域的多核苷酸,其任选地包含处于第一区域与第二区域之间的接头),以及,例如,用于表达这些剂和/或将这些多核苷酸序列整合到哺乳动物细胞的基因组中的另外的序列元件。可以包含可操作地连接至编码目标蛋白质的转基因的Myo15启动子的载体包括质粒(例如,可以在细胞内部自主复制的环状DNA分子)、粘粒(例如,pWE或sCos载体)、人工染色体(例如,人的人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC),或P1衍生的人工染色体(PAC))以及病毒载体。

可以用于表达目标蛋白质的某些载体包括包含指导基因转录的调控序列(诸如增强子区域)的质粒。用于表达目标蛋白质的其他可用载体包含提高这些基因的翻译速率或改善由基因转录产生的mRNA的稳定性或核输出的多核苷酸序列。这些序列元件包括,例如,5'和3'非翻译区、内部核糖体进入位点(IRES)和聚腺苷酸化信号位点,以便指导表达载体上携带的基因的有效转录。适于与本文所述的组合物和方法一起使用的表达载体还可包含编码用于选择包含所述载体的细胞的标志物的多核苷酸。合适的标志物的实例包括编码对抗生素,诸如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素或诺尔斯菌素的抗性的基因。

[0135] 用于核酸递送的病毒载体

[0136] 病毒基因组提供可以用于将目标基因有效递送到靶细胞(例如,哺乳动物细胞,诸如人细胞)的基因组中的丰富载体源。病毒基因组是尤其可用于基因递送的载体,因为此类基因组内包含的多核苷酸通常通过一般化或特殊化转导掺入哺乳动物细胞的核基因组中。这些过程作为天然病毒复制周期的一部分发生,并且不需要添加蛋白质或试剂来诱导基因整合。病毒载体的实例包括逆转录病毒(例如,逆转录病毒科病毒载体)、腺病毒(例如,Ad5、Ad26、Ad34、Ad35和Ad48)、细小病毒(例如,腺相关病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒诸如正粘病毒(例如,流感病毒)、棒状病毒(例如,狂犬病毒和水疱性口炎病毒)、副粘病毒(例如麻疹病毒和仙台病毒)、正链RNA病毒(诸如细小核糖核酸病毒和甲病毒)以及双链DNA病毒,包括腺病毒、疱疹病毒(例如,1型和2型单纯疱疹病毒、EB病毒、巨细胞病毒)和痘病毒(例如,牛痘、改良安卡拉痘苗(modified vaccinia Ankara,MVA)、鸡痘和金丝雀痘)。其他病毒包括例如诺沃克(Norwalk)病毒、囊膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多空病毒、嗜肝DNA病毒、人乳头瘤病毒、人泡沫病毒和肝炎病毒。反转录病毒的实例包括:禽白血病-肉瘤、禽C型病毒、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、致癌逆转录病毒(oncoretrovirus)、HTLV-BLV组、慢病毒、 α 逆转录病毒、 γ 逆转录病毒、泡沫病毒(Coffin,J.M.,Retroviridae:The viruses and their replication,Virology,第三版(Lippincott-Raven,Philadelphia,1996))。其他实例包括鼠白血病病毒、鼠肉瘤病毒、小鼠乳腺肿瘤病毒、牛白血病病毒、猫白血病病毒、猫肉瘤病毒、禽白血病病毒、人T细胞白血病病毒、狒狒内源病毒、长臂猿白血病病毒、梅森-辉瑞(Mason Pfizer)猴病毒、猿猴免疫缺陷病毒、猿猴肉瘤病毒、劳斯肉瘤病毒和慢病毒。载体的其他实例描述于例如美国专利5,801,030中,其涉及用于在基因疗法中使用的病毒载体的公开内容以引用方式并入本文。

[0137] 用于核酸递送的AAV载体

[0138] 在一些实施方案中,将本文所述的组合物和方法的多核苷酸掺入rAAV载体和/或病毒体中,以便有利于将其引入细胞中。可用于本文所述的组合物和方法的rAAV载体是重组核酸构建体,其包括:(1)本文所述的Myo15启动子(例如,包含与SEQ ID NO:1或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域和/或与SEQ ID NO:2或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域的多核苷酸,其任选地包含处于第一区域与第二区域之间的接头),(2)待表达的异源序列,以及(3)促进异源基因的稳定性和表达的病毒序列。病毒序列可包括AAV的将DNA顺式复制和包装(例如,功能性ITR)到病毒体中所需的那些序列。在典型的应用中,转基因编码可以促进毛细胞发育、毛细胞功能、毛细胞再生、毛细胞命运决定、毛细胞存活或毛细胞维持的

治疗性蛋白质,或在具有遗传性听力损失或前庭功能障碍形式的受试者中发生突变的毛细血管蛋白的野生型形式,其可用于改善携带与听力损失、耳聋或前庭功能障碍(例如,头晕、眩晕或失衡)相关的突变的受试者的听力或前庭功能。此类rAAV载体还可包含标志物或报告基因。可用的rAAV载体具有一个或多个整体或部分缺失但仍保留功能性侧接ITR序列的AAV WT基因。AAV ITR可具有适于特定应用的任一血清型。为了用于本文所述的方法和组合物,ITR可以是AAV2 ITR。使用rAAV载体的方法描述于,例如,Tal等,J.Biomed.Sci.7:279(2000)以及Monahan和Samulski,Gene Delivery 7:24(2000)中,其中每一个涉及用于基因递送的AAV载体的公开内容以引用方式并入本文。

[0139] 可以将本文所述的多核苷酸和载体(例如,可操作地连接至编码目标蛋白质的转基因的Myo15启动子)掺入rAAV病毒体中,以便有利于将多核苷酸或载体引入细胞中。AAV的衣壳蛋白构成病毒体的外部非核酸部分并且由AAV cap基因编码。cap基因编码病毒体组装所需的三种病毒外壳蛋白VP1、VP2和VP3。rAAV病毒体的构建已描述于,例如,US 5,173,414;US 5,139,941;US 5,863,541;US 5,869,305;US 6,057,152;和US 6,376,237;以及Rabinowitz等,J.Virol.76:791(2002)和Bowles等,J.Virol.77:423(2003)中,其中每一个涉及用于基因递送的AAV载体的公开内容以引用方式并入本文。

[0140] 可与本文所述的组合物和方法结合使用的rAAV病毒体包括衍生自多种AAV血清型的那些,包括AAV 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、rh10、rh39、rh43、rh74、Anc80、Anc80L65、DJ/8、DJ/9、7m8、PHP.B、PHP.eb和PHP.S。对于靶向毛细胞,AAV1、AAV2、AAV6、AAV9、Anc80、Anc80L65、DJ/9、7m8和PHP.B可特别有用。为转导视网膜而进化形成的血清型也可用于本文所述的方法和组合物中。不同血清型的AAV载体和AAV蛋白的构建和使用描述于,例如,Chao等,Mol.Ther.2:619(2000);Davidson等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:3428(2000);Xiao等,J.Virol.72:2224(1998);Halbert等,J.Virol.74:1524(2000);Halbert等,J.Virol.75:6615(2001);以及Auricchio等,Hum.Molec.Genet.10:3075(2001)中,其中每一个涉及用于基因递送的AAV载体的公开内容以引用方式并入本文。

[0141] 还可与本文所述的组合物和方法结合使用的是假型化rAAV载体。假型化载体包括给定血清型(例如,AAV9)的AAV载体,其被衍生自除给定血清型之外的血清型(例如,AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8等)的衣壳基因假型化。涉及假型化rAAV病毒体的构建和使用的技术是本领域已知的并且描述于,例如,Duan等,J.Virol.75:7662(2001);Halbert等,J.Virol.74:1524(2000);Zolotukhin等,Methods,28:158(2002);以及Auricchio等,Hum.Molec.Genet.10:3075(2001)中。

[0142] 可使用在病毒体衣壳内具有突变的AAV病毒体,以比非突变衣壳病毒体更有效地感染特定细胞类型。例如,合适的AAV突变体可具有用于促进AAV对特定细胞类型的靶向的配体插入突变。AAV衣壳突变体(包括插入突变体、丙氨酸筛选突变体和表位标签突变体)的构建和表征描述于Wu等,J.Virol.74:8635(2000)中。可以在本文所述的方法中使用的其他rAAV病毒体包括通过病毒的分子育种以及通过外显子改组生成的那些衣壳杂合体。参见,例如,Soong等,Nat.Genet.,25:436(2000)以及Kolman和Stemmer,Nat.Biotechnol.19:423(2001)。

[0143] 药物组合物

[0144] 本文所述的多核苷酸(例如,包含与SEQ ID NO:1或其功能部分或衍生物具有至少

85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域和/或与SEQ ID NO:2或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域的多核苷酸,其任选地包含处于第一区域与第二区域之间的接头)可以可操作地连接至转基因(例如,编码目标蛋白质的转基因)并且掺入媒介物中以施用于患者,诸如罹患感觉神经性听力损失和/或前庭功能障碍的人患者。包含含有可操作地连接至治疗性转基因的本文所述的多核苷酸的载体(诸如病毒载体)的药物组合物可以使用本领域已知的方法制备。例如,此类组合物可以使用,例如,生理上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(Remington:The Science and Practice of Pharmacology第22版,Allen,L.编(2013);以引用方式并入本文)并且以期望形式,例如以冻干制剂或水溶液的形式来制备。

[0145] 包含可操作地连接至治疗性转基因的本文所述的多核苷酸(例如,包含与SEQ ID NO:1或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域和/或与SEQ ID NO:2或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域的多核苷酸,其任选地包含处于第一区域与第二区域之间的接头)的核酸载体(例如,病毒载体)的混合物可在适宜与一种或多种赋形剂、载剂或稀释剂混合的水中制备。分散液也可在甘油、液体聚乙二醇和它们的混合物以及在油中制备。在正常储存和使用条件下,这些制剂可包含防腐剂以防止微生物生长。适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末(描述于US 5,466,468中,其公开内容以引用方式并入本文)。在任一情况下,制剂可以是无菌的并且可具有易于注射的流动性。制剂在制造和储存条件下可以是稳定的并且可在防止微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用的条件下保存。载剂可以是溶剂或分散介质,其包含,例如,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。可例如通过使用包衣诸如卵磷脂、通过在分散液的情况下维持所需要的粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟苯甲酸酯、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞等)来防止微生物的作用。在许多情况下,将优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收的剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的吸收延长。

[0146] 例如,如果需要,可将包含本文所述的药物组合物的溶液适当地缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定水溶液尤其适于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。就此而言,本领域技术人员根据本公开将知道可以采用的无菌含水介质。例如,可将一个剂量溶解于1ml等渗NaCl溶液中并且添加到1000ml皮下输液流体中或在建议的输注部位注射。根据所治疗受试者的病状,将必要地出现一定的剂量变化。为了向内耳局部施用,可将组合物配制成包含合成外淋巴液。示例性合成外淋巴液包括20-200mM NaCl、1-5mM KCl、0.1-10mM CaCl₂、1-10mM葡萄糖和2-50mM HEPE,具有介于约6与9之间的pH以及约300mOsm/kg的渗透度。在任何事件中,负责施用的人员将确定用于个体受试者的适当剂量。此外,对于人施用,制剂应满足FDA生物学标准办公室(FDA Office of Biologics standards)所要求的无菌性、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0147] 治疗方法

[0148] 本文所述的组合物可通过多种途径施用给患有感觉神经性听力损失和/或前庭功能障碍的受试者,诸如对内耳局部施用(例如,例如通过卵圆窗、圆窗或半规管(例如,水平半规管)施用到外淋巴或内淋巴中,例如施用至耳蜗或前庭毛细胞)、静脉内、肠胃外、皮内、透皮、肌内、鼻内、皮下、经皮、气管内、腹膜内、动脉内、血管内、吸入、灌注、灌洗和口服施用。在任何给定情况下,最合适的施用途径将取决于所施用的特定组合物、患者、药物配制方法、施用方法(例如,施用时间和施用途径)、患者的年龄、体重、性别、所治疗的疾病的严重程度、患者的饮食和患者的排泄率。组合物可施用一次或多于一次(例如,一年一次、一年两次、一年三次、两月一次或一月一次)。

[0149] 可如本文所述进行治疗的受试者是患有感觉神经性听力损失和/或前庭功能障碍或有此风险的受试者(例如,患有听力损失、前庭功能障碍或两者或有此风险的受试者)。本文所述的组合物和方法可以用于治疗具有耳蜗毛细胞损伤(例如,与声创伤、疾病或感染、头部创伤、耳毒性药物或衰老相关的损伤)或有此风险的受试者、具有前庭毛细胞损伤(例如,与疾病或感染、头部创伤、耳毒性药物或衰老相关的损伤)或有此风险的受试者、患有感觉神经性听力损失、耳聋或听神经病或有此风险的受试者、患有前庭功能障碍(例如,头晕、眩晕或失衡)或有此风险的受试者、患有耳鸣(例如,仅耳鸣,或与感觉神经性听力损失或前庭功能障碍相关的耳鸣)或有此风险的受试者、具有与听力损失和/或前庭功能障碍相关的基因突变的受试者,或具有遗传性听力损失、耳聋、听神经病、耳鸣或前庭功能障碍家族史的受试者。在一些实施方案中,受试者患有与毛细胞(例如,耳蜗或前庭毛细胞)的损失相关或由其引起的听力损失和/或前庭功能障碍。本文所述的方法可包括在用本文所述的组合物治疗或施用之前,针对已知与听力损失或前庭功能障碍相关的基因中的突变筛选受试者的步骤。可以使用本领域技术人员已知的标准方法(例如,基因测试)针对基因突变筛选受试者。本文所述的方法还可包括在用本文所述的组合物治疗或施用之前评估受试者的听力和/或前庭功能的步骤。可以使用标准测试评估听力,诸如听力测验法、听性脑干反应(ABR)、耳蜗电图描记法(ECOG)和耳声发射。可使用标准测试评估前庭功能,诸如眼动测试(例如,眼震电图(ENG)或视频眼震图(VNG))、姿势描记术、转椅测试、ECOG、前庭诱发的肌源性电位(VEMP)和专科临床平衡测试,诸如Mancini和Horak, Eur J Phys Rehabil Med, 46: 239 (2010) 中描述的那些。本文所述的组合物和方法还可作为预防性治疗施用给有发展听力损失和/或前庭功能障碍风险的患者,例如,具有听力损失或前庭功能障碍家族史(例如,遗传性听力损失或前庭功能障碍)的患者、携带与听力损失或前庭功能障碍相关的基因突变但尚未表现出听力障碍或前庭功能障碍的患者,或暴露于获得性听力损失(例如,疾病或感染、头部创伤、耳毒性药物或衰老)或前庭功能障碍(例如,声创伤、疾病或感染、头部创伤、耳毒性药物或衰老)的风险因素的患者。

[0150] 本文所述的组合物和方法可以用于促进或诱导受试者的毛细胞再生(例如,耳蜗和/或前庭毛细胞再生)。可受益于促进或诱导毛细胞再生的组合物的受试者包括因毛细胞损失(例如,与创伤(例如,声创伤或头部创伤)、疾病或感染、耳毒性药物或衰老相关的毛细胞损失)而导致患有听力损失或前庭功能障碍的受试者,以及毛细胞异常(例如,与正常毛细胞相比不正常发挥作用的毛细胞)、毛细胞损伤(例如,与创伤(例如,声创伤或头部创伤)、疾病或感染、耳毒性药物或衰老相关的毛细胞损伤)或由基因突变或先天性异常导致的毛细胞数量减少的受试者。本文所述的组合物和方法还可以用于促进或增加毛细胞存活

(例如,增加损伤毛细胞的存活,促进损伤毛细胞的修复,或在有毛细胞损失(例如,由于年龄、暴露于嘈杂的噪音、疾病或感染、头部创伤或耳毒性药物引起的毛细胞损失)风险的受试者中保存毛细胞)。

[0151] 本文所述的组合物和方法还可以用于在接受过耳毒性药物治疗或正在接受或即将开始接受耳毒性药物治疗的受试者中预防或减少耳毒性药物引起的毛细胞损伤或死亡(例如,耳蜗和/或前庭毛细胞损伤或死亡)。耳毒性药物对内耳的细胞有毒,并且可以引起感觉神经性听力损失、前庭功能障碍(例如,眩晕、头晕或失衡)、耳鸣或这些症状的组合。已发现具有耳毒性的药物包括氨基糖苷抗生素(例如,庆大霉素、新霉素、链霉素、妥布霉素、卡那霉素、万古霉素和阿米卡星)、紫霉素、抗肿瘤药(例如,含铂化疗剂,诸如顺铂、卡铂和奥沙利铂)、髓袢利尿剂(例如,依他尼酸和速尿灵)、水杨酸盐类(例如,阿司匹林,特别是在高剂量下)和奎宁。在一些实施方案中,本文所述的方法预防或减少与声创伤、疾病或感染、头部创伤或衰老相关的毛细胞损伤或死亡。

[0152] 用于治疗如本文所述的受试者的可操作地连接至Myo15启动子(例如,包含与SEQ ID NO:1或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域和/或与SEQ ID NO:2或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域的多核苷酸)的转基因可以是编码在健康毛细胞中表达的蛋白质(例如,在耳蜗和/或前庭毛细胞中,例如,在毛细胞发育、功能、细胞命运决定、再生、存活或维持中起作用的蛋白质,或在患有感觉神经性听力损失和/或前庭功能障碍的受试者中缺乏的蛋白质)或另一目标治疗性蛋白质的转基因。可基于受试者的听力损失或前庭功能障碍的原因(例如,如果受试者的听力损失或前庭功能障碍与特定基因突变相关,那么转基因可以是在受试者中发生突变的该基因的野生型形式,或如果受试者患有与毛细胞损失相关的听力损失,那么转基因可以编码促进毛细胞再生的蛋白质)、受试者听力损失或前庭功能障碍的严重程度、受试者的毛细胞的健康状况、受试者的年龄、受试者的听力损失或前庭功能障碍家族史或其他因素选择转基因。可由可操作地连接至Myo15启动子的转基因表达以治疗如本文所述的受试者的蛋白质包括ACTG1、FSCN2、RDX、POU4F3、TRIOBP、TPRN、XIRP2、ATOH1、GFI1、CHRNA9、CIB3、CDH23、PCDH15、KNCN、DFNB59、OTOF、MKRN20S、LHX3、TMC1、MYO15、MYO7A、MYO6、MYO3A、MYO3B、GRXCR1、PTPRQ、LCE6A、LOXHD1、ART1、ATP2B2、CIB2、CACNA2D4、CABP2、EPS8、EPS8L2、ESPN、ESPNL、PRPH2、STRC、SLC8A2、ZCCHC12、LRTOMT2、LRTOMT1、USH1C、ELFN1、TTC24、DYTN、KCP、CCER2、LRTM2、KCNA10、NT3、CLRN1、CLRN2、SKOR1、TCTEX1D1、FCRLB、SLC17A8、GRXCR2、BDNF、SERPINE3、NHLH1、HSP70、HSP90、ATF6、PERK、IRE1和BIP。

[0153] 治疗可包括以各种单位剂量施用包含含有本文所述的Myo15启动子的核酸载体(例如,AAV病毒载体)的组合物。每个单位剂量通常将包含预定量的治疗性组合物。待施用的量以及具体施用途径和制剂在临床领域技术人员的技能范围内。单位剂量不必须作为单次注射施用,但可包含经设定时间段的连续输注。可使用注射泵进行给药以控制输注速率,以便使对内耳(例如,耳蜗)的损伤最小化。在核酸载体是AAV载体(例如,AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、rh10、rh39、rh43、rh74、Anc80、Anc80L65、DJ/8、DJ/9、7m8、PHP.B、PHP.eb或PHP.S载体)的情况下,病毒载体可以例如约 1×10^{10} 个载体基因组(VG)至 1×10^{15} VG(例如, 1×10^{10} VG、 2×10^{10} VG、 3×10^{10} VG、 4×10^{10} VG、 5×10^{10} VG、 6×10^{10} VG、

7×10^{10} VG、 8×10^{10} VG、 9×10^{10} VG、 1×10^{11} VG、 2×10^{11} VG、 3×10^{11} VG、 4×10^{11} VG、 5×10^{11} VG、 6×10^{11} VG、 7×10^{11} VG、 8×10^{11} VG、 9×10^{11} VG、 1×10^{12} VG、 2×10^{12} VG、 3×10^{12} VG、 4×10^{12} VG、 5×10^{12} VG、 6×10^{12} VG、 7×10^{12} VG、 8×10^{12} VG、 9×10^{12} VG、 1×10^{13} VG、 2×10^{13} VG、 3×10^{13} VG、 4×10^{13} VG、 5×10^{13} VG、 6×10^{13} VG、 7×10^{13} VG、 8×10^{13} VG、 9×10^{13} VG、 1×10^{14} VG、 2×10^{14} VG、 3×10^{14} VG、 4×10^{14} VG、 5×10^{14} VG、 6×10^{14} VG、 7×10^{14} VG、 8×10^{14} VG、 9×10^{14} VG、 1×10^{15} VG) 的剂量,以 $1\mu\text{L}$ 至 $200\mu\text{L}$ (例如,1、2、3、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或 $200\mu\text{L}$)的体积施用给患者。

[0154] 本文所述的组合物以足以改善听力、改善前庭功能(例如,改善平衡或减少头晕或眩晕)、减少耳鸣、增加由转基因编码的治疗性蛋白质的表达、增加由转基因编码的治疗性蛋白质的功能、预防或减少毛细胞损伤、预防或减少毛细胞死亡(例如,耳毒性药物引起的毛细胞死亡、年龄相关的毛细胞死亡,或噪声(例如,声创伤)相关的毛细胞死亡)、促进或增加毛细胞发育、增加毛细胞数量(例如,促进或诱导毛细胞再生)、增加或促进毛细胞存活,或改善毛细胞功能的量施用。听力可使用标准听力测试(例如,听力测验法、ABR、耳蜗电图描记法(ECOG)和耳声发射)进行评估,并且与治疗前获得的听力测量结果相比可改善5%或更多(例如,5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更多)。前庭功能可使用平衡和眩晕的标准测试(例如,眼动测试(例如,ENG或VNG)、姿势描记术、转椅测试、ECOG、VEMP和专科临床平衡测试)进行评估,并且与治疗前获得的测量结果相比可改善5%或更多(例如,5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更多)。在一些实施方案中,以足以改善受试者理解对话的能力的量施用组合物。本文所述的组合物也可以足以减慢或防止感觉神经性听力损失和/或前庭功能障碍的发展或进展的量施用(例如,在携带与听力损失或前庭功能障碍相关的基因突变,具有听力损失或前庭功能障碍的家族史(例如,遗传性听力损失或前庭功能障碍),或已暴露于与听力损失或前庭功能障碍相关的风险因素(例如,耳毒性药物、头部创伤、声创伤或感染),但不表现出听力障碍或前庭功能障碍(例如,眩晕、头晕或失衡)的受试者中,或在表现出轻度至中度听力损失或前庭功能障碍的受试者中)。施用给受试者的核酸载体中由可操作地连接至Myo15启动子的转基因编码的治疗性蛋白质的表达可使用免疫组织化学、蛋白质印迹分析、定量实时PCR或本领域已知的用于检测蛋白质或mRNA的其他方法进行评估,并且与施用本文所述的组合物之前的表达相比,可增加5%或更多(例如,5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更多)。毛细胞数量、毛细胞功能或由施用给受试者的核酸载体编码的治疗性蛋白质的功能可基于听力测试或前庭功能测试间接评估,并且与施用本文所述的组合物之前的毛细胞数量、毛细胞功能或治疗性蛋白质的功能相比,可增加5%或更多(例如,5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更多)。与在未治疗的受试者中通常观察到的毛细胞损伤和死亡相比,毛细胞损伤或死亡可减少5%或更多(例如,5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更多)。这些效果可发生在,例如,施用本文所述的组合物之后的1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、15周、20周、25周或更长时间内。取决于用于治疗的施用剂量和途径,可在施用组合物之后1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或更长时间对患者进行评估。根据评估结果,患者可能接受另外的治疗。

[0155] 试剂盒

[0156] 本文所述的组合物可以提供于用于治疗感觉神经性听力损失或前庭功能障碍的试剂盒中。组合物可包括本文所述的多核苷酸(例如,包含与SEQ ID NO:1或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第一区域和/或与SEQ ID NO:2或其功能部分或衍生物具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的第二区域的多核苷酸,其任选地包含处于第一区域与第二区域之间的接头)、包含此类多核苷酸的核酸载体,以及包含可操作地连接至编码目标蛋白质(例如,可以在毛细胞中表达以治疗听力损失和/或前庭功能障碍的蛋白质)的转基因的本文所述的多核苷酸的核酸载体。可将核酸载体包装在AAV病毒衣壳(例如,AAV1、AAV2、AAV6、AAV9、Anc80、Anc80L65、DJ/9、7m8或PHP.B)中。试剂盒还可以包括包装说明书,其指示试剂盒的用户(诸如医师)执行本文所述的方法。试剂盒可任选地包括注射器或用于施用组合物的其他装置。

[0157] 实施例

[0158] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供本文所述的组合物和方法可如何使用、制备和评价的描述,并且旨在纯粹是对本发明的举例说明且并不旨在限制发明人所认定的发明范围。

[0159] 实施例1. Myo15启动子的产生

[0160] 首先使用UCSC Genome Browser(genome.ucsc.edu)鉴定脊椎动物Myo15启动子中的进化保守区域。合成紧接在Myo15翻译起始位点上游的区域(-1至-1157, SEQ ID NO:1)和包含Myo15基因的非编码外显子1的上游区域(-6755至-7209, SEQ ID NO:2)并且通过从头(de novo)基因合成连接在一起成为单个DNA片段(SEQ ID NO:13)。截短的Myo15启动子的总大小为1611bp,而整个基因组区域的总大小超过7000bp。

[0161] 在耳蜗中,相对于巨细胞病毒(CMV)启动子评估由Myo15启动子实现的转基因表达的趋性(细胞类型靶向)以及程度和持续时间的实验得到的结果是Myo15启动子,而不是CMV启动子,在耳蜗毛细胞中产生选择性表达。产生利用Myo15驱动墨绿多管水母(*Aequorea coerulescens*)绿色荧光蛋白(AcGFP)表达的AAV构建体,以相对于具有CMV的相匹配的标准AAV构建体分析基因表达的进展。在其中将病毒递送至新生小鼠、成年小鼠的小鼠耳蜗中以及离体的耳蜗外植体中的实验中评估转基因表达。

[0162] 为了评估转基因表达,将AAV-Myo15-GFP病毒通过后半规管输注给6-8周龄的C57B1/6J雄性小鼠。使小鼠从手术中恢复并将其安乐死,在10天后用10%的正常缓冲福尔马林灌注。收获内耳颞骨并在8%EDTA中脱钙3天。从脱钙的颞骨上切下耳蜗或前庭系统并将其固定在载玻片上以进行成像。使用遍在启动子,AAV-CMV-GFP在耳蜗内的许多细胞类型中诱导GFP表达,包括内毛细胞、外毛细胞、螺旋神经节神经元、间充质细胞和神经胶质(图1A)。使用毛细胞特异性启动子,AAV-Myo15-GFP仅在内毛细胞和外毛细胞中诱导表达(图1B)。在前庭系统中,AAV-Myo15-GFP仅在前庭毛细胞中诱导表达(图2)。

[0163] 实施例2. 最小Myo15启动子的产生

[0164] 产生一系列启动子,并将其置于荧光报告基因(例如,GFP、AcGFP或荧光素酶)的上游。产生的启动子包括:

[0165] 1) 融合至SEQ ID NO:2的SEQ ID NO:3;

- [0166] 2) 融合至SEQ ID NO:2的SEQ ID NO:4;
- [0167] 3) 融合至SEQ ID NO:2的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的融合体(例如,SEQ ID NO:5、6或7);
- [0168] 4) 融合至SEQ ID NO:9的SEQ ID NO:8(例如,SEQ ID NO:10、11或12);
- [0169] 5) 融合至SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的融合体(例如,SEQ ID NO:10、11或12)的SEQ ID NO:1;
- [0170] 6) 融合至SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的融合体(例如,SEQ ID NO:10、11或12)的SEQ ID NO:3;
- [0171] 7) 融合至SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的融合体(例如,SEQ ID NO:10、11或12)的SEQ ID NO:4;
- [0172] 8) 融合至SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的融合体(例如,SEQ ID NO:10、11或12)的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的融合体(例如,SEQ ID NO:5、6或7);
- [0173] 9) SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的融合体(例如,SEQ ID NO:5、6或7);
- [0174] 11) SEQ ID NO:1;以及
- [0175] 12) SEQ ID NO:2。
- [0176] 将启动子构建体包装到能够转导毛细胞的AAV血清型(例如,AAV1、AAV2、AAV6、AAV9、Anc80或Anc80L65)中。
- [0177] 病毒启动子构建体用于感染器官型耳蜗外植体。与病毒一起孵育48小时后,对外植体进行成像并使用报告基因的荧光强度进行分析,以评测毛细胞特异性表达。
- [0178] 实施例3.将包含含有Myo15启动子的核酸载体的组合物施用给患有感觉神经性听力损失的受试者
- [0179] 根据本文公开的方法,本领域的熟练医师可以治疗具有感觉神经性听力损失的患者,诸如人患者,以改善或恢复听力。为此,本领域的熟练医师可以向人患者施用包含含有多核苷酸的AAV载体(例如,AAV1、AAV2、AAV6、AAV9、Anc80、Anc80L65、DJ/9、7m8或PHP.B)的组合物,所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:1或其功能部分或衍生物(例如,SEQ ID NO:3-7中的任何一个或多个,例如SEQ ID NO 3和4)具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性)的第一区域和/或与SEQ ID NO:2或其功能部分或衍生物(例如,SEQ ID NO:8-12中的任何一个或多个,例如SEQ ID NO 8和9)具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性)的第二区域,任选地包含处于第一区域与第二区域之间的接头,可操作地连接至编码治疗性蛋白质的转基因。例如,可操作地连接至编码治疗性蛋白质的转基因的多核苷酸可以是SEQ ID NO:13。包含AAV载体的组合物可以,例如,通过局部施用于内耳(例如,注射到外淋巴中)而施用给患者,以治疗感觉神经性听力损失。
- [0180] 在将组合物施用给患者后,本领域的熟练从业人员可以通过多种方法监测由转基因编码的治疗性蛋白质的表达,以及响应于疗法的患者的改善。例如,医师可以在施用组合物之后通过执行标准测试(诸如听力测验法、ABR、耳蜗电图描记法(ECOG)和耳声发射)来监测患者的听力。与施用组合物之前的听力测试结果相比,发现在施用组合物之后患者在一种或多种测试中表现出听力的改善,这表明患者对治疗有良好的响应。可以按需确定和施用后续剂量。

[0181] 实施例4.非人灵长类动物中的Myo15启动子特异性

[0182] 在非人灵长类动物中测试Myo15启动子特异性。通过圆窗膜以15 μ l/min将30微升的AAV1-CMV-GFP或AAV1-Myo15-GFP注射到耳蜗中。AAV注射后4周将动物处死,并且收获耳蜗并作为表面制剂进行处理以检查没有抗体增强情况下的转基因表达。AAV1具有高感染性。在遍在CMV启动子下,GFP在恒河猴耳蜗的侧壁中的毛细胞、支持细胞和纤维细胞中表达(图3A)。相比之下,1.6kb Myo15启动子将GFP转基因表达局限于食蟹猴耳蜗的毛细胞(图3B-3C)。

[0183] 实施例5.与遍在启动子相比,Myo15启动子增强AAV-小鼠Tmc1在Tmc1敲除小鼠中的生物学功效。

[0184] 将Tmc1敲除(KO)小鼠用异氟烷麻醉,剃掉毛发,并且将聚维酮碘施涂在皮肤上。在左耳下方从颊肌上方至耳后切开一个切口。分离皮肤,取下肌肉并清理,以暴露后半规管。使用钻头在半规管中开一个小孔,并用细棉签使骨头保持干燥。将聚酰胺/聚乙烯管插入孔中并用骨胶密封。使用具有Hamilton注射器的微型泵将具有0.05 μ l的台盼蓝的1 μ l载体(AAV-CMV1-小鼠TMC1或AAV-Myo15(SEQ ID NO:13)-小鼠TMC1)以100nl/min速率递送到IL空间中。递送1 μ l后,经过5分钟,以使流体到达耳蜗的顶端,并防止回流和泄漏。将管弯曲并在骨头附近切断。肌肉被拉回原位并且皮肤粘在一起。给予小鼠0.01cc的美洛昔康(Meloxicam),然后使其在加热灯下恢复。术后持续5天检查动物是否有疼痛或感染的迹象。术后21至28天,用氯胺酮和甲苯噻嗪将动物麻醉,并测量听性脑干反应(ABR)。如图4所示,与AAV-CMV-小鼠TMC1相比,注射AAV-Myo15-小鼠TMC1的纯合Tmc1 KO小鼠中ABR阈值的恢复大大改善。

[0185] 其他实施方案

[0186] 所描述的本发明的各种修改和变化对于本领域技术人员将显而易见,而不背离本发明的范围和精神。尽管已结合具体实施方案对本发明进行了描述,但是应当理解的是,所要求保护的发明不应当过度限定于此类具体实施方案。实际上,对于本领域技术人员而言明显的用于进行本发明的所述方式的各种修改旨在包含在本发明的范围内。其他实施方案在权利要求中。

序列表

<110>	分贝治疗公司 (Decibel Therapeutics, Inc.)	
<120>	肌球蛋白 15 启动子及其用途	
<130>	51124-038W02	
<150>	US 62/663,679	
<151>	2018-04-27	
<160>	14	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	454	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠 (Mus musculus)	
<400>	1	
[0001]	ctgcagctca gcctactact tgctttccag gctgttecta gttcccatgt cagctgcttg	60
	tgctttccag agacaaaaca ggaataatag atgtcattaa atatacattg ggccccaggc	120
	ggtcaatgtg gcagcctgag cctcctttcc atctctgttg aggcagacat aggaccccca	180
	acaaacagca tgcaggttgg gagccagcca caggaccag gtaaggggcc ctgggtcctt	240
	aagcttctgc cactggctcc ggcattgcag agagaagaga aggggcggca gagctgaacc	300
	ttagccttgc cttcctgggt acccttctga gcctcactgt cttctgtgag atgggcaaag	360
	tgcgggtgtg actccttggc aacggtgtta caccaggga ggtaaagttg tagttatttg	420
	tggggtacac caggactgtt aaaggtgtaa ctat	454
<210>	2	
<211>	1157	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠 (Mus musculus)	
<400>	2	

	ggtctcacc agcattttca cttctaataa gttcaaagt gatacggcac ctttctaaaa	60
	attagttttc agggaaatag ggttcaaac tggtagtggt aggggtccatt ctcacgaccc	120
	ccaggcctgc taaccctgac caagctacct attacttacc ctcctctttc tctcctcct	180
	ctttctcctt ctcctgcttc cctctttcct tctccctccc ttcctctccc tctcctccct	240
	ccttggctgt gatcagatcc agagcctgaa tgagcctcct gacccacac cccactagc	300
	atgggcctgc aagtgtccag aagtccctcc tgctcctaa actgtcccagc cgatccatta	360
	gctcttcctt cttcccagtg aaagaagcag gcacagcctg tccctcccgt tctacagaaa	420
	ggaagctaca gcacaggag ggccaaaggc cttcctggga ctagacagtt gatcaacagc	480
	aggactggag agctgggctc catTTTTgtt ccttgggtgcc ctgccccctc ccatgacctg	540
	cagagacatt cagcctgcca ggctttatga ggtgggagct gggctctccc tgatgtatta	600
	ttcagctccc tggagttggc cagctcctgt tacactggcc acagccctgg gcatccgctt	660
[0002]	ctcacttcta gtttcccctc caaggtaatg tggtaggtca tgatcattct atcctggctt	720
	cagggacctg actccacttt ggggccattc gaggggtcta gggtagatga tgtccccctg	780
	tggggattaa tgtcctgctc tgtaaaactg agctagctga gatccaggag ggcttggcca	840
	gagacagcaa gttgttgcca tggtagcttt aaagccaggt tgctgcccc gcacaggcct	900
	cccagtctac cctcactaga aaacaacacc caggcacttt ccaccacctc tcaaaggatga	960
	aaccaaggc tggctctagag aatgaattat ggatcctcgc tgtccgtgcc acccagctag	1020
	tcccagcggc tcagacactg aggagagact gtaggttcag ctacaagcaa aaagacctag	1080
	ctggtctcca agcagtgtct ccaagtcct gaacctgtga cacctgcccc aggeatcatc	1140
	aggcacagag ggccacc	1157
	<210> 3	
	<211> 76	
	<212> DNA	

[0003]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
	<400> 3	
	cccatgtcag ctgcttgtgc ttccagaga caaacagga ataatagatg tcattaaata	60
	tacattgggc cccagg	76
	<210> 4	
	<211> 95	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
	<400> 4	
	agcctgagcc tcctttccat ctctgtggag gcagacatag gacccccaac aaacagcatg	60
	caggttggga gccagccaca ggaccagggt aaggg	95
	<210> 5	
	<211> 171	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 5	
	cccatgtcag ctgcttgtgc ttccagaga caaacagga ataatagatg tcattaaata	60
	tacattgggc cccaggagcc tgagcctcct ttccatctct gtggaggcag acataggacc	120
	cccaacaaac agcatgcagg ttgggagcca gccacaggac ccaggtaagg g	171
	<210> 6	
	<211> 171	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 6	

agcctgagcc tcctttccat ctctgtggag gcagacatag gacccccaac aaacagcatg	60
caggttggga gccagccaca ggacccaggt aagggcccat gtcagctgct tgtgctttcc	120
agagacaaaa caggaataat agatgtcatt aaatatacat tgggccccag g	171
<210> 7	
<211> 184	
<212> DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400> 7	
cccatgtcag ctgcttgtgc tticcagaga caaaacagga ataatagatg tcattaaata	60
tacattgggc ccagggcggc caatgtggca gcctgagcct cctttccatc tctgtggagg	120
cagacatagg acccccaaca aacagcatgc aggttgggag ccagccacag gacccaggta	180
aggg	184
[0004]	
<210> 8	
<211> 82	
<212> DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400> 8	
tgaggtagga gctgggctct ccctgatgta ttattcagct ccctggagtt ggccagctcc	60
tgttacactg gccacagccc tg	82
<210> 9	
<211> 106	
<212> DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400> 9	
cacaggcctc ccagtctacc ctactagaa aacaacaccc aggcactttc caccacctct	60
caaaggtaga acccaaggct ggtctagaga atgaattatg gatacct	106

	<210>	10	
	<211>	188	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	10	
	tgagggtggga gctgggctct cctgatgta ttattcagct cctggagtt ggccagctcc	60	
	tgttacactg gccacagccc tgcacaggcc tccagtccta ccctcactag aaaacaacac	120	
	ccaggcactt tccaccacct ctcaaagggtg aaaccaagg ctggtctaga gaatgaatta	180	
	tggatcct	188	
	<210>	11	
	<211>	188	
	<212>	DNA	
[0005]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	11	
	cacaggcctc ccagtctacc ctactagaa aacaacaccc aggcactttc caccacctct	60	
	caaagggtgaa acccaaggct ggtctagaga atgaattatg gatccttgag gtgggagctg	120	
	ggctctccct gatgtattat tcagctccct ggagttggcc agctcctggtt aactggcca	180	
	cagccctg	188	
	<210>	12	
	<211>	430	
	<212>	DNA	
	<213>	小家鼠(Mus musculus)	
	<400>	12	
	tgagggtggga gctgggctct cctgatgta ttattcagct cctggagtt ggccagctcc	60	

	tgttacactg gccacagccc tgggcatccg cttctcactt ctagtttccc ctccaaggta	120
	atgtgggtggg tcatgatcat tctatcctgg cttcaggac ctgactccac ttggggcca	180
	ttcgaggggt ctagggtaga tgatgtcccc ctgtggggat taatgtcctg ctctgtaaaa	240
	ctgagctagc tgagatccag gagggcttgg ccagagacag caagttgttg ccatggtgac	300
	tttaaagcca ggttgctgcc ccagcacagg cctcccagtc taccctcact agaaaacaac	360
	accaggcac ttccaccac ctctcaaagg tgaaacccaa ggctgggtcta gagaatgaat	420
	tatggatcct	430
	<210> 13	
	<211> 1611	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
[0006]	<223> 合成构建体	
	<400> 13	
	ctgcagctca gcctactact tgctttccag gctgttccta gttcccatgt cagctgcttg	60
	tgctttccag agacaaaaca ggaataatag atgtcattaa atatacattg ggccccaggc	120
	ggatcaatgtg gcagcctgag cctcctttcc atctctgttg aggcagacat aggaccccca	180
	acaaacagca tgcaggttgg gagccagcca caggaccag gtaaggggcc ctgggtcctt	240
	aagcttctgc cactggctcc ggcatcgcag agagaagaga aggggcggca gagctgaacc	300
	ttagccttgc cttcctgggt acccttctga gcctcactgt cttctgtgag atgggcaaag	360
	tgcggtgtg actccttggc aacggtgtta caccaggga ggtaaagttg tagttatttg	420
	tgggttacac caggactgtt aaagtgtaa ctatggtctc acccagcatt ttcatttcta	480
	ataagttcaa atgtgatacg gcacctttct aaaaattagt ttccaggga atagggttca	540
	aaactggtag tggtagggtc cattctcacg acccccaggc ctgctaacc tgaccaagct	600

	acctattact taccctcctc tttctcctcc tcctctttct cttctcctg ctteccctct	660
	tccttctccc tcccttcctc tccctcctcc cctccttgg ctgtgatcag atccagagcc	720
	tgaatgagcc tectgacccc acacccccac tagcatgggc ctgcaagtgc ccagaagtcc	780
	ctcctgcctc ctaaactgcc cagccgatcc attagctctt cttcttccc agtgaaagaa	840
	gcaggcacag cctgtccctc ccgttctaca gaaaggaagc tacagcacag ggagggccaa	900
	aggccttcct gggactagac agttgatcaa cagcaggact ggagagctgg gctccatitt	960
	tgttccttgg tgccctgccc ctcccataga cctgcagaga cattcagcct gccaggcttt	1020
	atgagggtggg agctgggctc tccctgaigt attattcagc tccctggagt tggccagctc	1080
	ctgttacact ggccacagcc ctgggcatcc gcttctcact tctagtittc cctccaaggt	1140
	aatgtggtgg gtcatgatca ttctatcctg gcttcaggga cctgactcca ctttggggcc	1200
	attcgagggg tctagggtag atgatgtccc cctgtgggga ttaatgtcct gctctgtaaa	1260
[0007]	actgagctag ctgagatcca ggagggcttg gccagagaca gcaagttgtt gccatggtga	1320
	ctttaagcc aggttgctgc cccagcacag gcctccagt ctaccctcac tagaaaacaa	1380
	caccaggca ctttcacca cctctcaaag gtgaaacca aggctggtct agagaatgaa	1440
	ttatggatcc tcgtgtccg tgccaccag ctagtccag cggtcagac actgaggaga	1500
	gactgtaggt tcagctacaa gcaaaaagac ctagctggtc tccaagcagt gtctccaagt	1560
	ccctgaacct gtgacacctg cccaggcat catcaggcac agaggccac c	1611

<210> 14

<211> 1611

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

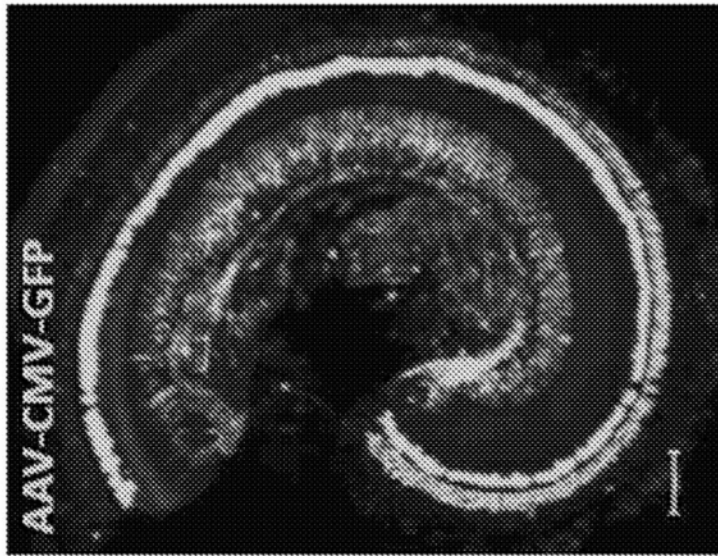
<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

	ggtctcacc agcattttca cttctaataa gttcaaagt gatacggcac ctttctaaaa	60
	attagttttc agggaaatag ggttcaaac tggtagtggg agggteccatt ctcacgaccc	120
	ccaggcctgc taacctgac caagctacct attacttacc ctctcttttc tctctctct	180
	ctttctctt ctctctctt cctctctctt tctctctctt tctctctctt tctctctctt	240
	ccttggtgt gatcagatcc agagcctgaa tgagcctcct gacccacac cccactagc	300
	atgggcctgc aagtgccag aagtcctcc tgctctctaa actgccagc cgatccatta	360
	gctcttctt ctctccagt aaagaagcag gcacagcctg tccctccctg tctacagaaa	420
	ggaagctaca gcacaggag ggccaaaggc ctctctggga ctagacagtt gatcaacagc	480
	aggactggag agctgggctc ctttttggt ccttggtgcc ctgccccctc ccatgacctg	540
	cagagacatt cagcctgcca ggctttatga ggtgggagct gggctctccc tgatgtatta	600
	ttcagctccc tggagttggc cagctcctgt tacactggcc acagccctgg gcatccgctt	660
[0008]	ctcacttcta gtttccctc caaggtaatg tggtaggtca tgatcattct atcctggctt	720
	cagggacctg actccactt ggggccattc gaggggtcta gggtagatga tgtccccctg	780
	tggggattaa tgcctgctc tgtaaaactg agctagctga gatccaggag ggcttgcca	840
	gagacagcaa gttgttgcca tggtagctt aaagccaggt tgctgcccc gcacaggcct	900
	cccagtctac cctcactaga aaacaacacc caggcacctt ccaccacctc tcaaaggatga	960
	aaccaaggc tggcttagag aatgaattat ggatcctcgc tgctccgtgc acccagctag	1020
	tcccagcggc tcagacactg aggagagact gtaggttcag ctacaagcaa aaagacctag	1080
	ctggtctcca agcagtgtct ccaagtcct gaacctgtga cacctgcccc aggcacatc	1140
	aggcacagag ggccacctg cagctcagcc tactacttgc tttccaggct gttctagtt	1200
	cccatgtcag ctgcttgtgc tttccagaga caaacagga ataatagatg tcattaaata	1260
	tacattgggc cccaggcggc caatgtggca gcctgagcct ctttccatc tctgtggagg	1320

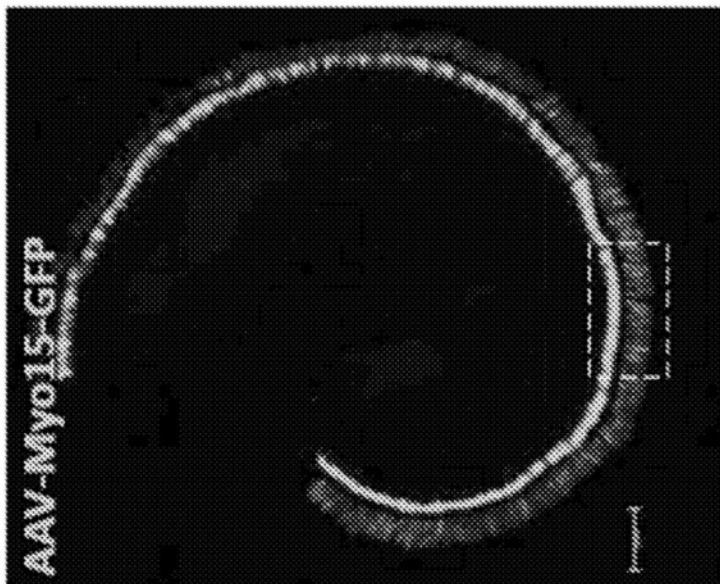
	cagacatagg accccaaca aacagcatgc aggttgggag ccagccacag gaccaggtta	1380
	aggggccctg ggtcettaag cttctgccac tggtccggc attgcagaga gaagagaagg	1440
[0009]	ggcggcagag ctgaacctta gccttgcctt cctgggtacc cttctgagcc tcaactgtctt	1500
	ctgtgagatg ggcaaagtgc ggggtgtgact ccttggcaac ggtgttacac cagggcaggt	1560
	aaagttgtag ttatttgtgg ggtacaccag gactgttaaa ggtgtaacta t	1611



具有遍在启动子的AAV:

· 在内毛细胞、
一些外毛细胞和许多
非感觉细胞类型中的表达。

图1A



具有毛细胞特异性启动子的AAV:

· 表达仅局限于内毛细胞
和外毛细胞。

图1B

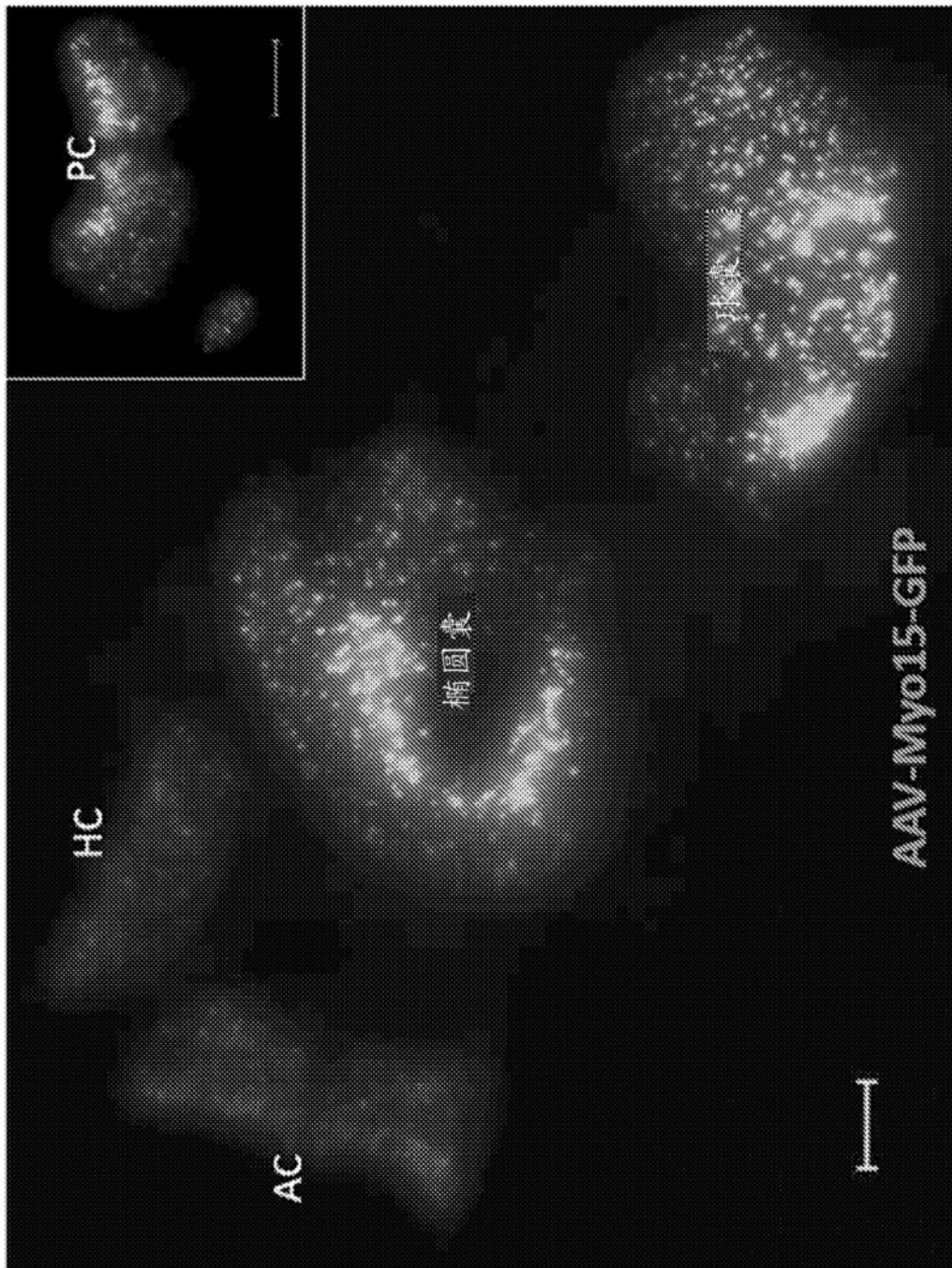


图2

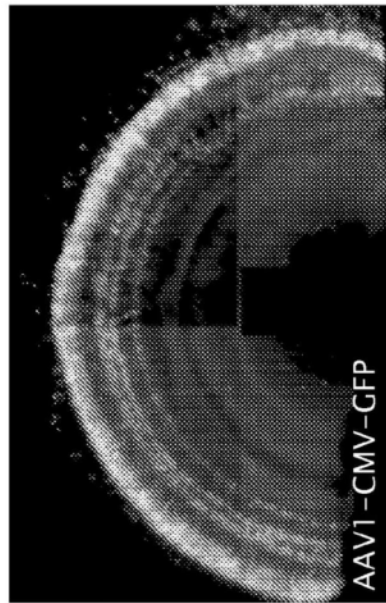


图3A

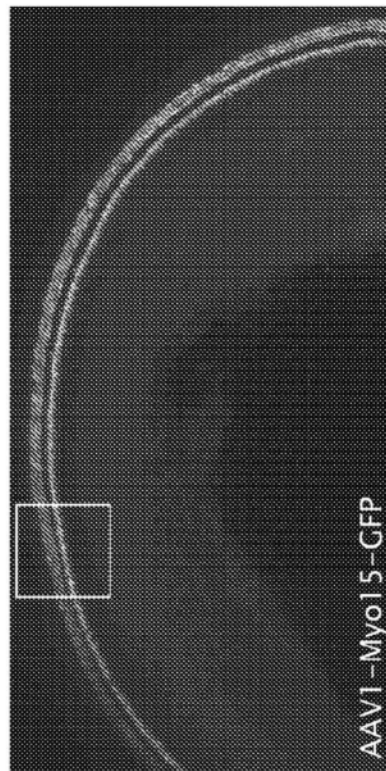


图3B

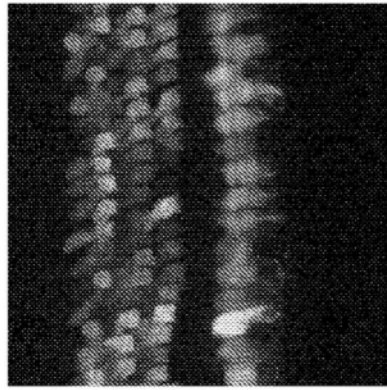


图3C

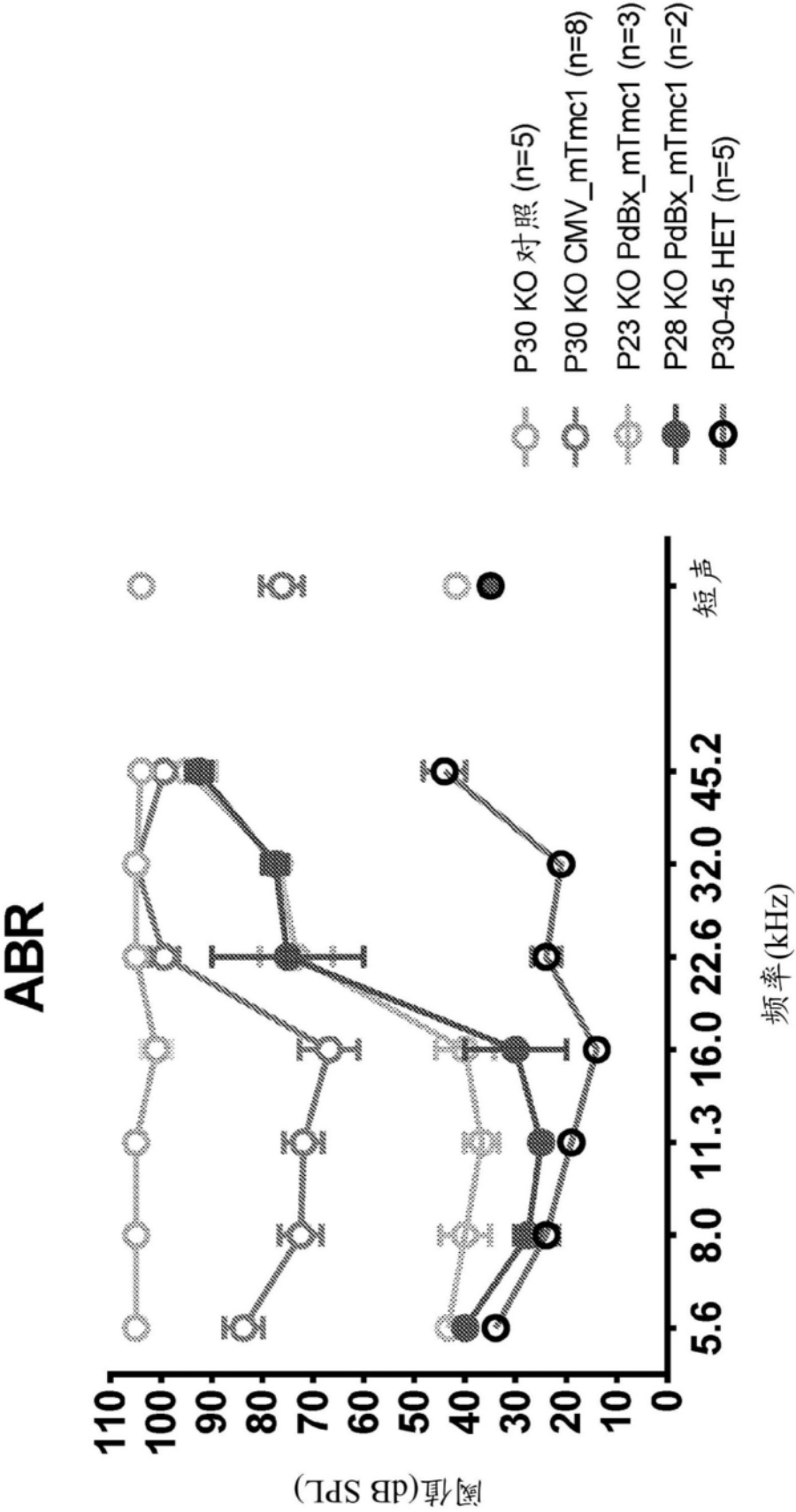


图4