



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104321069 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201280064474. 1

A61P 27/02 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 10. 26

(30) 优先权数据

61/552, 155 2011. 10. 27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/062106 2012. 10. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/063383 EN 2013. 05. 02

(71) 申请人 威尔斯达眼科制剂公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 罗天赐

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

11127

代理人 丁香兰 庞东成

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

A61P 9/10 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书31页

序列表9页 附图9页

(54) 发明名称

编码视杆细胞来源的视锥细胞活力因子的载体

(57) 摘要

本发明涉及编码和能够表达视杆细胞来源的视锥细胞活力因子 (RdCVF) 的核酸和含有这些核酸的病毒载体。本发明还涉及包含这些核酸或载体的组合物和药物制剂, 生产或分泌 RdCVF 的方法以及治疗方法。

1. 一种核酸,所述核酸包含编码 RdCVF 蛋白的编码序列的核苷酸序列,其中 RdCVF 编码序列包含重编码核苷酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的核酸,其中,所述 RdCVF 蛋白是 RdCVF1 蛋白。

3. 如权利要求 1 所述的核酸,其中,所述 RdCVF 蛋白是 RdCVF2 蛋白。

4. 如上述权利要求中任一项所述的核酸,其中,所述 RdCVF 蛋白是短版本的 RdCVF 蛋白。

5. 如权利要求 1~3 中任一项所述的核酸,其中,所述 RdCVF 蛋白是长版本的 RdCVF 蛋白。

6. 如上述权利要求中任一项所述的核酸,其中,所述 RdCVF 蛋白是人 RdCVF 蛋白。

7. 如上述权利要求中任一项所述的核酸,其中,所述重编码核苷酸序列缺少起始甲硫氨酸密码子。

8. 如权利要求 1 所述的核酸,其中,所述 RdCVF 蛋白的编码序列包含 SEQ ID NO:1 的 106~741 位核苷酸、SEQ ID NO:1 的 106~429 位核苷酸、SEQ ID NO:3 的 106~432 位核苷酸或 SEQ ID NO:3 的 106~744 位核苷酸。

9. 如上述权利要求中任一项所述的核酸,其中,所述核酸还包含与所述 RdCVF 蛋白的编码序列可操作地连接的 N 末端信号序列的第二编码区。

10. 如权利要求 9 所述的核酸,其中,所述信号序列选自 Igk 信号序列、人生长激素 (HGH)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、胰岛素生长因子 1 (IGF-1) 和 β -葡糖醛酸糖苷酶 (GUSB) 组成的组。

11. 如权利要求 9 所述的核酸,其中,所述信号序列包含 SEQ ID NO:1 的 1~105 位核苷酸。

12. 如权利要求 9 所述的核酸,其中,所述信号序列编码包含 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:2 的 2~34 位氨基酸或 SEQ ID NO:2 的 7~21 位氨基酸的氨基酸序列。

13. 如权利要求 1 所述的核酸,其中,所述核苷酸序列包含 SEQ ID NO:1 或 3。

14. 如权利要求 1 所述的核酸,其中,所述重编码核苷酸序列的至少 40% 的密码子经重编码。

15. 如权利要求 1 所述的核酸,其中,所述重编码核苷酸序列与相应的天然核苷酸序列相比有至少 15% 的核苷酸不同。

16. 如权利要求 1 所述的核酸,其中,所述重编码核苷酸序列与相应的天然核苷酸序列具有小于 90% 的同一性。

17. 如权利要求 1~7 和 9~16 中任一项所述的核酸,其中,所述重编码核苷酸序列具有选自以下特征组成的组中的一个或多个特征:无原核生物 (procarya) 抑制性基序、无共有剪接供体位点、无隐蔽剪接供体位点以及 GC 含量为 60%~65%。

18. 如上述权利要求中任一项所述的核酸,其中,启动子序列与所述 RdCVF 蛋白的编码序列可操作地连接。

19. 如权利要求 18 所述的核酸,其中,所述启动子是巨细胞病毒 (CMV) 启动子。

20. 如权利要求 19 所述的核酸,其中,所述 CMV 启动子包含 SEQ ID NO:11 的 150~812 位。

21. 如上述权利要求中任一项所述的核酸,其中,内含子序列与所述 RdCVF 蛋白的编码

序列可操作地连接。

22. 如权利要求 21 所述的核酸,其中,所述内含子序列是 β -珠蛋白内含子序列。

23. 如权利要求 21 所述的核酸,其中,所述内含子序列包含 SEQ ID NO:11 的 820 ~ 1312 位核苷酸。

24. 如权利要求 1 所述的核酸,其中,所述核酸包含 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:11 的 150 ~ 2080 位核苷酸序列或者 SEQ ID NO:11 的 150 ~ 812、820 ~ 1312 和 1340 ~ 2080 位核苷酸序列。

25. 一种病毒载体,所述病毒载体包含上述权利要求中任一项所述的核酸。

26. 如权利要求 25 所述的病毒载体,其中,所述病毒载体是腺相关病毒 (AAV) 载体。

27. 如权利要求 26 所述的病毒载体,其中,所述 AAV 载体基于 AAV 血清型 2。

28. 如权利要求 26 所述的病毒载体,其中,所述 AAV 载体基于 AAV 血清型 8。

29. 如权利要求 25 所述的病毒载体,其中,所述病毒载体不是牛免疫缺陷病毒载体。

30. 如权利要求 25 所述的病毒载体,其中,所述病毒载体不是病毒载体。

31. 如权利要求 25 所述的病毒载体,其中,所述病毒载体选自自由 DNA 病毒载体、无包膜病毒载体和腺病毒载体组成的组。

32. 一种分离的细胞,所述分离的细胞包含权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的核酸,其中所述细胞分泌所述 RdCVF 蛋白。

33. 由权利要求 32 所述的细胞产生的 RdCVF 蛋白,其中,所述蛋白不是天然存在的蛋白。

34. 一种药物制剂,所述药物制剂包含 (i) 药学上可接受的载剂和 (ii) 权利要求 1 ~ 24 中任一项所述的核酸、权利要求 25 ~ 31 中任一项所述的病毒载体、权利要求 33 所述的 RdCVF 蛋白或它们的组合。

35. 一种生产 RdCVF 蛋白的方法,所述方法包括在允许所述 RdCVF 蛋白表达和分泌的条件下培养权利要求 32 所述的细胞,和从所述细胞的培养物中分离所述 RdCVF 蛋白。

36. 如权利要求 35 所述的方法,所述方法还包括从所述细胞的培养物上清液中纯化所述 RdCVF 蛋白。

37. 由权利要求 35 或 36 所述的方法产生的 RdCVF 蛋白,其中,所述蛋白不是天然存在的蛋白。

38. 一种保护哺乳动物眼睛中的眼视杆细胞的方法,所述方法包括以对保护眼视杆细胞有效的量对所述哺乳动物的眼睛施用权利要求 1 ~ 24 中任一项所述的核酸、权利要求 25 ~ 31 中任一项所述的病毒载体、权利要求 33 或 37 所述的 RdCVF 蛋白、权利要求 33 所述的药物组合物或它们的组合。

39. 如权利要求 38 所述的方法,其中,通过视网膜下注射施用所述病毒载体或所述核酸。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其中,通过玻璃体内注射、注射到眼睛的前房内、结膜下注射或眼球囊下注射。

41. 如权利要求 38 ~ 40 中任一项所述的方法,其中,所述哺乳动物是人。

42. 如权利要求 38 ~ 41 中任一项所述的方法,其中,所述哺乳动物罹患选自以下疾病组成的组中的眼部疾病:视网膜营养不良、斯塔加特氏病、视网膜色素变性、干性年龄相

关性黄斑变性（干性 AMD）、地图样萎缩（干性 AMD 的晚期）、湿性年龄相关性黄斑变性（湿性 AMD）、青光眼 / 高眼压症、糖尿病性视网膜病变、巴尔得 - 别德尔综合征、巴 - 科综合征、卵黄状黄斑变性、脉络膜瘤、回旋形萎缩、先天性黑朦、雷夫叙姆综合征、乌谢尔综合征、甲状腺相关眼病、格雷夫斯氏病、与视网膜色素上皮细胞相关的疾病、眼前节疾病、晶状体疾病 / 白内障、眼杯障碍或葡萄膜炎。

43. 如权利要求 38 ~ 42 中任一项所述的方法，其中，在所述施用之前所保护的眼视杆细胞不含有权利要求 1 ~ 24 中任一项所述的核酸，并且未经所述病毒载体转导。

44. 一种保护哺乳动物眼睛中的眼视杆细胞的方法，所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用权利要求 1 ~ 24 中任一项所述的核酸或权利要求 25 ~ 30 中任一项所述的病毒载体，其中所述核酸或所述病毒载体通过视网膜下注射施用，并且在离视网膜下注射位置至少 1mm 的位置处保护所述视杆细胞。

45. 如权利要求 44 所述的方法，其中，在离视网膜下注射位置至少 2mm 的位置处保护所述视杆细胞。

46. 一种由细胞分泌 RdCVF 蛋白的方法，所述方法包括在允许由权利要求 9 ~ 13 和 24 中任一项所述的核酸或权利要求 25 ~ 31 中任一项所述的病毒载体编码的 RdCVF 表达和分泌的条件下对所述细胞施用权利要求 9 ~ 13 和 24 中任一项所述的核酸或权利要求 25 ~ 31 中任一项所述的病毒载体。

47. 如权利要求 46 所述的方法，其中，所述细胞是哺乳动物细胞。

48. 如权利要求 46 所述的方法，其中，所述细胞是人细胞。

49. 如权利要求 46 ~ 48 中任一项所述的方法，其中，所述细胞是眼部细胞。

50. 如权利要求 49 所述的方法，其中，所述细胞选自以下细胞组成的组：视网膜色素上皮（RPE）细胞、视杆细胞、视锥细胞、双极细胞、水平细胞、无长突细胞、神经节细胞和 ARPE-19 细胞。

51. 如权利要求 46 ~ 50 中任一项所述的方法，其中，所述细胞是体外细胞。

52. 如权利要求 46 ~ 50 中任一项所述的方法，其中，所述细胞是体内细胞。

53. 如权利要求 46 ~ 50 中任一项所述的方法，其中，所述细胞是离体细胞。

54. 如权利要求 47 和 51 ~ 52 中任一项所述的方法，其中，所述细胞选自以下细胞组成的组：293 细胞、CHO 细胞、PerC6 细胞、Vero 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞、MDCK 细胞、3T3 细胞和 WI38。

55. 如权利要求 46 ~ 54 中任一项所述的方法，其中，将所述细胞包封。

56. 一种治疗疾病的方法，所述方法包括对哺乳动物施用权利要求 1 ~ 24 中任一项所述的核酸或权利要求 25 ~ 31 中任一项所述的病毒载体、权利要求 33 所述的 RdCVF 蛋白、权利要求 34 所述的药物制剂或它们的组合，其中所述疾病选自以下疾病组成的组：阿尔茨海默氏病、亨廷顿病、帕金森病和嗅觉疾病。

57. 如权利要求 56 所述的方法，其中，所述哺乳动物是人。

编码视杆细胞来源的视锥细胞活力因子的载体

[0001] 授权信息

[0002] 在美国国家健康研究院的健康与公共服务部资助的 SBIR Grant 号 EY016262 之下借助政府支持完成本发明。政府可拥有本发明的某些权利。

背景技术

[0003] RdCVF 是由视网膜内的视杆感光细胞特异性表达的硫氧还蛋白样蛋白 (Léveillard 等 (2004) *Nature Genetics* 36 :755-759 和增补信息)。在人中发现两种不同的 RdCVF 基因,它们命名为 RdCVF1 和 RdCVF2。两种 RdCVF 基因都通过选择性剪接编码两种产物:全长蛋白和 C 末端转录后截短蛋白,分别称为长 RdCVF 和短 RdCVF。

[0004] 短 RdCVF 据描述为用于促进视锥细胞存活分泌的营养因子,长 RdCVF 据描述为与胞内蛋白相互作用的具有氧化还原活性的酶 (Léveillard 等 (2010) *Sci Transl Med.* 2(26):26ps16)。例如,tau 据描述为 RdCVF-L 的结合伴侣,并且 tau 是只在细胞内的 (Fridlich 等 (2009) *Molecular&Cellular Proteomics* 8(6):1206-18)。

[0005] 发现罹患某些视网膜营养不良的个体眼中的 RdCVF 蛋白水平低于未患有视网膜营养不良的个体 (PCT 公开 W002/081513)。

[0006] 已经证明不同形式的 RdCVF 蛋白可以促进体外和体内的视锥感光细胞存活。例如,短形式的人 RdCVF1 (RdCVF1S) 蛋白的眼内注射不仅挽救视锥细胞免于退化,还在遗传性视网膜退化的动物模型中保护其功能 (Yang 等 (2009) *Mol Therapy* 17:787-795)。但是,该蛋白对体内视锥细胞的保护效果的证明需要使用多次眼内注射。

[0007] 从基因治疗载体大规模地表达显著水平的 RdCVF 是一直存在的挑战,例如参见美国专利公开第 20110034546 号,第 [0004] 段。

[0008] 本文参考文献的引用或讨论不应解释为承认它们对本发明是现有技术。

发明内容

[0009] 本发明部分上涉及编码 RdCVF 的核酸、RdCVF 表达构建体、RdCVF 载体、表达 RdCVF 的方法、减缓、预防或抑制感光细胞 (例如视锥细胞和 / 或视杆细胞) 死亡的方法、治疗诸如视网膜营养不良等眼部疾病的方法以及治疗诸如阿尔茨海默氏病和亨廷顿病、帕金森病或嗅觉疾病等神经退行性疾病。

[0010] 本发明提供组合物和用于从细胞表达 RdCVF 蛋白的方法以及治疗方法。

[0011] 本发明的一些实施方式提供核酸,所述核酸包含编码 RdCVF 蛋白的编码序列的核苷酸序列,其中所述 RdCVF 编码序列包含重编码核苷酸序列。

[0012] 本发明还提供病毒载体,所述病毒载体包含核酸,其中所述核酸包含编码 RdCVF 蛋白的编码序列的核苷酸序列,其中所述 RdCVF 编码序列包含重编码核苷酸序列。

[0013] 本发明的一些实施方式涉及分离的细胞,所述分离的细胞包含本发明的核酸。

[0014] 本发明的其它实施方式涉及由本发明的细胞或本发明的核酸产生的 RdCVF 蛋白。在一些实施方式中,RdCVF 蛋白不是天然存在的 RdCVF 氨基酸序列。

[0015] 包括在本发明中的还有药物制剂,所述药物制剂包含(i)药学上可接受的载剂和(ii)本发明的核酸、本发明的病毒载体、本发明的 RdCVF 蛋白或其组合。

[0016] 还提供用于生产 RdCVF 蛋白的方法,所述方法包括在允许所述 RdCVF 蛋白表达和分泌的条件下培养本发明的细胞,和从所述细胞的培养物中分离所述 RdCVF 蛋白。

[0017] 本发明的一些实施方式涉及保护眼视杆细胞(ocular rod cell)的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用本发明的核酸、本发明的病毒载体、本发明的 RdCVF 蛋白或它们的组合。

[0018] 本发明还提供治疗疾病的方法,所述疾病例如:视网膜营养不良、斯塔加特氏病(Stargardt's disease)、视网膜色素变性、干性年龄相关性黄斑变性(干性 AMD)、地图样萎缩(干性 AMD 的晚期)、湿性年龄相关性黄斑变性(湿性 AMD)、具有或不具有高眼压的青光眼、糖尿病性视网膜病变、巴尔得-别德尔综合征(Bardet-Biedel syndrome)、巴-科综合征(Bassen-Kornzweig syndrome)、卵黄状黄斑变性(Best disease)、脉络膜瘤(choroidema)、回旋形萎缩(gyrate atrophy)、先天性黑朦、雷夫叙姆综合征(refsum syndrome)、乌谢尔综合征、甲状腺相关眼病、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、与视网膜色素上皮细胞相关的疾病、眼前节疾病(anterior segment disease)、晶状体疾病/白内障、眼杯障碍(eye cup disorder)、葡萄膜炎、阿尔茨海默氏病、亨廷顿病、帕金森病或嗅觉疾病。

[0019] 本发明的一些实施方式涉及保护眼视杆细胞的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用本发明的核酸和/或病毒载体,其中所述核酸和/或病毒载体通过视网膜下注射进行施用,并且在与视网膜下注射的位置不同的位置处保护所述视杆细胞。

[0020] 本发明的一些实施方式涉及保护眼视锥细胞的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用本发明的核酸和/或病毒载体,其中所述核酸和/或病毒载体通过视网膜下注射进行施用,并且在与视网膜下注射的位置不同的位置处保护所述视锥细胞。

[0021] 本发明还涉及从细胞中分泌 RdCVF 蛋白的方法,所述方法包括对所述细胞施用本发明的核酸或病毒载体。

[0022] RdCVF 蛋白可以为 RdCVF1 或 RdCVF2 蛋白或者长版本或短版本。

[0023] 据推测本文所述的任何方法或组合物可以相对于本文所述的任何其它方法或组合物执行。当在权利要求和/或说明书中与术语“包含”一起使用时,单词“一种(a)”或“一个(an)”等的使用可以表示一种(个),但其可以与“一种(个)或多种(个)”、“至少一种(个)”和“一种(个)或多于一种(个)”的意思一致。在与列表一起使用时术语/词组“和/或”表示可以使用所列举项目中的一种或多种,例如,其不限于所述要素中的一个或全部。

[0024] 该发明内容不必描述本发明的所有特征或必需特征。本发明还可以在于所述特征的亚组合。

附图说明

[0025] 为了说明本发明的目的,在图中描述了本发明的某些实施方式。但是,本发明不限于附图中所示实施方式的精确排列和手段。

[0026] 图 1 显示纯化重组 AAV-RdCVF1L 和 AAV-GFP 载体颗粒的 SDS-PAGE 分析。通过

SDS-PAGE 分离 rAAV-GFP 制剂（泳道 1）和两种 rAAV-RdCVF1L 制剂（泳道 2 和 3）的蛋白，并且通过银染色分析而可视化。

[0027] 图 2 显示在经 rAAV-RdCVF1L 载体转导的 ARPE-19 细胞中 RdCVF1L 表达的蛋白印迹分析。通过 SDS-PAGE 分离 rAAV 转导的 ARPE-19 细胞的细胞裂解物（图 2A）和上清液（图 2B），并再次对 RdCVF1L 蛋白进行蛋白印迹。泳道 1 显示用于对照的未经转导的 ARPE-19 细胞裂解物（图 2A）和上清液（图 2B），泳道 2 和泳道 3 分别显示经 rAAV-GFP 和 rAAV-RdCVF1L 转导的 ARPE-19 细胞的细胞裂解物（图 2A）和上清液（图 2B）。

[0028] 图 3 显示注射载体 6 周后通过蛋白印迹确认正常 Balb/C 小鼠的经 rAAV-RdCVF1L 注射的眼睛与 rAAV-GFP 注射的眼睛和未处理眼睛相比 RdCVF 的表达增加。使用来自经 rAAV-RdCVF1L 转导的 ARPE-19 细胞的蛋白提取物作为阳性对照（泳道 14 和 17），而使用未转导的细胞提取物作为阴性对照（泳道 15）。在经 rAAV-RdCVF1L 注射的眼睛中检测出 RdCVF 蛋白（泳道 6、8、10 和 12），而在相同动物的未经处理的对侧眼睛（泳道 7、9、11 和 13）中以及在经 rAAV-GFP 注射的眼睛中未观察到或仅观察到微弱的对应于 RdCVF 的条带。泳道 1 是蛋白标准标志物。泳道 16 是来自野生型正常小鼠眼睛的蛋白提取物。

[0029] 图 4 显示在 RPE- 脉络膜 - 巩膜平置片 (choroid-scleral flatmounts) 的 RPE 细胞中 RdCVF 的免疫组织化学染色。在载体注射 6 周后的正常 Balb/C 小鼠的经 rAAV-RdCVF1L 注射的眼睛中观察到强健的 RdCVF 表达（图 4A），但在未经注射的对侧眼睛中未观察到（图 4B）。在未经一抗处理的样品中未看到免疫反应性（图 4C）。用 DAPI 对平置片 (flatmount) 进行复染色从而以蓝色显示细胞核。

[0030] 图 5 显示神经视网膜平置片的 RdCVF1L 的免疫组织化学染色。在载体注射 6 周后在正常 Balb/C 小鼠的经 rAAV-RdCVF1L 注射的眼睛中的感光细胞中观察到强健的 RdCVF 表达（图 5A）。大多数染色位于感光细胞的外节中。相反，在未经注射的对侧眼睛中的感光细胞中仅看到背景染色（图 5B）。在未经一抗处理的样品中未观察到免疫反应性（图 5C）。

[0031] 图 6 显示证明在 rd10 小鼠中视网膜下注射 AAV-RdCVF1L 后 5 周在 RPE 和感光细胞中的 RdCVF1L 表达的研究的结果。在经 rAAV-RdCVF1L 载体注射的眼睛 (A) 的约一半的 RPE- 脉络膜 - 巩膜平置片中看到表达 RdCVF 的 RPE 细胞，而在未注射的对侧眼睛 (B) 中未看到。感光细胞 (C) 也被转导因为，因为在相同眼睛的平置 (flat-mounted) 视网膜中观察到表达 RdCVF 的区段。相反，在未经注射的对侧眼睛中未发现 RdCVF 表达 (D)。(D) 中的暗绿色细胞可能是附着至视网膜的自体荧光巨噬细胞。保持典型的六角形形态的转导 RPE 细胞 (E) 和表达 RdCVF 的感光区段 (F) 的高倍放大视图。

[0032] 图 7 显示在 rd10 小鼠中通过视网膜下注射 AAV-RdCVF1L 而挽救的感光体。来自 2 只小鼠的代表性视网膜切片的光学显微照片，所述小鼠中，右眼在出生后第 3 天接受 rAAV-RdCVF1L (A 和 C)，左眼 (B 和 D) 充当未处理对照。5 周大时将 rd10 小鼠处死。请注意经处理的眼睛（双头箭头）和未经处理的眼睛（单头箭头）之间的外核层 (ONL) 厚度的差异。在经 AAV-RdCVF 处理的眼睛 (A 和 C) 中存在 2 ~ 4 行，在未经处理的眼睛 (B 和 D) 中存在 1 行。受保护的视网膜的一些区域中保留了感光体内节和外节 (E)。IS, 内节 ; OS, 外节 ; ONL, 外核层。

[0033] 图 8 显示了来自代表性 5 周龄 rd10 小鼠的眼杯的光学显微照片，所述小鼠的 1 只眼睛接受视网膜下注射 rAAV-RdCVF1L (小图 A, 图 8)，而对侧眼睛不接受处理 (小图 B, 图

8)。如所显示的,在经处理的眼睛中保护了更多的感光细胞。

[0034] 图 9 显示了 rAAV-RdCVF1L 的有注释的核苷酸序列。

[0035] 图 10A :rAAV-RdCVF1L 递送改善 rd10 小鼠中的视网膜功能。在注射 rAAV-RdCVF1L 约 5 周后进行 ERG。对来自所测试的所有 8 只小鼠的 ERG 响应进行的测定显示,来自经处理眼睛的平均 b 波振幅比未经处理的同组眼 (fellow eye) 大出约 3 倍,这具有统计学显著性 ($p = 0.025$)。

[0036] 图 10B :rAAV-RdCVF1L 递送改善 rd10 小鼠中的视网膜功能。在注射 rAAV-RdCVF1L 后约 5 周进行 ERG。右图 :这些是来自经处理眼睛 (黑线, $n = 8$) 和未经处理同组眼 (红线, $n = 8$) 的 8 个波形的平均值,所述波形在黑暗背景下在 25cd. s/m^2 的强度的单灯闪下进行记录。显然,经处理眼睛具有比同组眼高得多的响应。左图 :对来自所测试的所有 8 只小鼠的 ERG 响应进行的测定显示,来自经处理眼睛的平均 b 波振幅比未经处理的同组眼大出约 3 倍,这具有统计学显著性 ($p = 0.025$)。

[0037] 图 11A 和 11B :在 rd10 小鼠中通过视网膜下注射 rAAV-RdCVF1L 而进行的感光体保护。来自小鼠的代表性视网膜切片的光学显微照片,所述小鼠中,右眼在出生后第 3 天接受 rAAV-RdCVF1L (A),左眼 (B) 充当未处理对照。请注意在经处理和未经处理眼睛之间 ONL 厚度的差异。在经处理眼睛 (A) 中存在约 4 行,而在未经处理的眼睛 (B) 存在 1 行。感光体外节在受保护视网膜的一些区域中得到保留 ;onl 表示外核层。

[0038] 图 12. 在 rd10 小鼠中在经 rAAV-RdCVF1L 处理和未经处理的眼睛中外核层 (ONL) 的厚度的比较。在经处理眼睛 (红条) 中 ONL 的平均厚度显著高于 ($P = 0.006$) 未处理眼睛中的 ONL (黑条)。数值表示平均值 $\pm$ SD。

具体实施方式

[0039] 如本文所用,连接术语“包含”是开放式的。使用该术语的权利要求可以包含除了该权利要求中引用要素之外的要素。因此,例如,读起来关于方法的权利要求也包括其中未特别列举的其它步骤,只要存在所列举的要素或它们的等效物。

[0040] 当在比较两个序列 (例如核苷酸或氨基酸序列) 的情况下使用时术语“同一性”和“同一的”,是指对两个序列进行比对的序列的百分比。百分比同一性可以通过本领域技术人员常用的算法确定。例如,百分比同一性可以使用从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 的网站上可获得的工具和程序来确定。可以例如使用 NCBI/BLAST/blastn 套件确定两个核苷酸序列的百分比同一性。可以以以下参数组使用 Blastn :期望阈值 = 10 ;搜索词大小 = 28 ;查询区域最多匹配数 = 0 ;匹配 / 错配分数 = 1, -2 ;空位罚分 = 存在空位罚 5 分,每个延伸罚 2 分。

[0041] PCT 公开 W02002/081513、W02008/148860 和 W02009/146183 描述了关于 RdCVF 的各种组合物和方法。在一些情况下,可以使用涉及 PCT 公开 W02002/081513、W02008/148860 和 W02009/146183 描述的组合物和方法的 RdCVF,例如通过将编码 RdCVF 的核酸、载体或蛋白用本发明的那些 (例如,包含野生型 RdCVF 编码序列的核酸和载体) 替换。

[0042] 本发明的一些实施方式提供 RdCVF 前蛋白氨基酸序列。例如 SEQ ID NO :2 和 4。本发明还提供编码 RdCVF 前蛋白的核苷酸序列,例如 SEQ ID NO :1、3 和 11。

[0043] 本发明还提供治疗受试对象中的疾病的方法,其中通过对受试对象使用治疗有效

量的编码 RDCVF1 或 RdCVF2 蛋白的核酸或载体或其相关蛋白或片段或部分,所述疾病受 RdCVF1 或 RdCVF2 基因表达的变化(例如,在眼睛中在存在 RDCVF1 或 RDCVF2 多肽时下降)介导或与该变化相关。

[0044] 在另一方面,本发明的 RdCVF 蛋白、核酸、载体或组合物可用于制造例如用于治疗本文列举的疾病的药物。

[0045] 本发明的产品、组合物、工艺和方法可特别用于研究、生物、临床或治疗目的。

[0046] RdCVF

[0047] 已经证明 RdCVF 蛋白可以促进体外和体内的视锥感光细胞存活。例如,在遗传性视网膜变性的动物模型中人 RdCVF1 的短形式(RdCVF1S)的眼内注射不仅挽救视锥细胞免于降解,还保护其功能。(Yang 等(Mol Therapy(2009)17:787-795 和增补材料)。RdCVF 由数种细胞类型表达,包括视网膜中的视杆感光细胞(Léveillard 等(2004)Nature Genetics36:755-759)。

[0048] 在人和其它哺乳动物中发现两种不同的 RdCVF 基因,将它们命名为 RdCVF1 和 RdCVF2。两种 RdCVF 基因都通过选择性剪接编码两种产物。全长蛋白和 C 末端截短蛋白,分别称为长 RdCVF 和短 RdCVF。

[0049] 在一些实施方式中,本发明包括重编码 RdCVF 编码序列。重编码 RdCVF 编码序列可以编码包括本文描述的任一种 RdCVF 蛋白在内的任何 RdCVF 蛋白。各种 RdCVF 蛋白的序列可在 PCT 公开号 W02002081513 和 W02010029130;Chalmel 等(BMC Molecular Biology(2007)8:74pp1-12 和增补信息);Léveillard 等(Nature Genetics(2004)36:755-759 和增补信息);Yang 等(Mol Therapy(2009)17:787-795 和增补信息)和 GenBank Accession Nos. NP_612463, AAH14127, Q96CM4, EAW84608, CAD67528, Q5VZ03, NP_001155097, NP_660326, CAM24748, CAM14247, AAH22521and CAD67531 中发现。(清楚起见,本文讨论的所有这些 GenBank 序列以及所有其它专利和非专利文献,通过参考并入它们的全部内容)。

[0050] 在一些实施方式中,RdCVF 蛋白是保留对视锥细胞和/或视杆细胞的存活活性或保护效果的 RdCVF 蛋白的片段或类似物。用于测定这些活性或效果的方法是本领域已知的。例如,Léveillard 等(Nature Genetics(2004)36:755-759 和增补信息)描述了相关的小鼠模型和用于测定 RdCVF 活性的体外方法。由核酸编码的 RdCVF 蛋白或 RdCVF,可以具有除了天然存在的氨基酸序列之外的氨基酸序列。例如,非天然存在的 RdCVF 蛋白可以含有天然存在的 RdCVF 蛋白中发现的氨基酸之外的氨基酸(例如在氨基或羧基末端),和/或与天然存在的 RdCVF 氨基酸序列相比可以含有单个或多个氨基酸取代(例如保守性或非保守性氨基酸取代)。保守性氨基酸取代通常应该不实质上改变亲本序列的结构特性(例如,取代的氨基酸不倾向于破坏亲本序列中存在的螺旋,或干扰表征亲本序列的其它类型的二级结构)。本领域公认的多肽二级结构和三级结构的实例描述于 Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York(1984)); Introduction to Protein Structure(C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); 和 Thornton 等 Nature354:105(1991)。保守性取代包括但不限于来自以下组中的取代:酸性残基 Asp(D) 和 Glu(E);碱性残基 Lys(K)、Arg(R) 和 His(H);亲水性不带电残基 Ser(S)、Thr(T)、Asn(N) 和 Gln(Q);脂肪族不带电残基 Gly(G)、Ala(A)、Val(V)、Leu(L) 和 Ile(I);非极性不带电残基 Cys(C)、

Met (M) 和 Pro (P) ;芳香族残基 Phe (F) 、Tyr (Y) 和 Trp (W) ;含醇基团残基 S 和 T ;脂肪族残基 I、L、V 和 M ;环烯烃相关残基 F、H、W 和 Y ;疏水性残基 A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W 和 Y ;带负电残基 D 和 E ;极性残基 C、D、E、H、K、N、Q、R、S 和 T ;带正电残基 H、K 和 R ;小残基 A、C、D、G、N、P、S、T 和 V ;非常小的残基 A、G 和 S ;参与转角形成的残基 A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P 和 T ;和柔性残基 Q、T、K、S、G、P、D、E 和 R。在本发明的一些实施方式中,非天然存在的 RdCVF 蛋白在氨基末端具有额外的氨基酸,例如来自异源信号肽的额外氨基酸。在一些实施方式中,本发明的 RdCVF 蛋白从具有信号肽的核苷酸编码序列开始翻译,并且在一些情况下,信号肽的所有或部分氨基酸保留在本发明的所表达和 / 或所分泌的 RdCVF 蛋白。

[0051] 重编码 RdCVF 编码序列

[0052] 术语“重编码”或“重编码核苷酸序列”是指至少一个天然密码子改变为与天然密码子编码相同的氨基酸的不同密码子。在一些实施方式中,重编码 RdCVF 的编码区具有重编码的密码子的至少 2.5%、至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少或至少 95%。在一些实施方式中,约 20-50%、35-45%、38-42%或 39-41%的密码子被重编码。在一些实施方式中,重编码的密码子被人中更普遍使用的密码子替换。在一些实施方式中,至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%或至少 55%的密码子已经被人中更普遍使用的密码子替换。

[0053] 在一些实施方式中,重编码序列与相应的天然编码序列具有约 70-90%、约 75-85%、约 80-85%或约 82-85%的同一性。在一些实施方式中,重编码核苷酸序列与相应的天然核苷酸序列相比至少 15%的核苷酸不同。在一些实施方式中,重编码核苷酸序列与相应的天然核苷酸序列具有小于 90%的同一性。

[0054] 还可以使用重编码来改变 DNA 和 / 或 RNA 编码序列的化学组成,例如鸟嘌呤 / 胞嘧啶 (GC) 百分比。在一些实施方式中,RdCVF 编码区的重编码将 GC 含量提高至至少 60%。在一些实施方式中,重编码 RdCVF 的编码区具有 60-64%或 60.4% -63.5%的 GC 百分比。

[0055] 使用重编码来改变 mRNA 的二级结构。还可以使用重编码来从编码序列或核酸分子除去特定的基序,或向编码序列或核酸分子添加特定的基序,例如原核生物 (procarya) 抑制性基序、共有剪接供体位点、隐蔽剪接供体位点或它们的组合。在一些实施方式中,重编码 RdCVF 编码序列具有比天然序列更少的原核生物抑制性基序、共有剪接供体位点、隐蔽剪接供体位点或它们的组合。在一些实施方式中,重编码 RdCVF 编码序列不含有原核生物抑制性基序、共有剪接供体位点和 / 或隐蔽剪接供体位点。

[0056] Hoover 等 (Nucleic Acids Res. (2002) 30 :e43, pp1-7) ;Fath 等 (PLoS ONE (2011) 6 :e17596pp1-14) ;Graf 等 (J Virol (2000) 74 :10822-10826 ;Raab 等 Syst Synth Biol (2010) 4 :215-225 ;和美国专利申请 20070141557 描述了重编码编码区。

[0057] 在本发明的一些实施方式中,重编码的 RdCVF 编码序列不含有起始 RdCVF ATG 密码子和 / 或 RdCVF 终止密码子 (例如 TAG)。例如, RdCVF 重编码编码序列可以 5' 或 3' 可操作地连接于另一编码序列,产生包含分别位于 RdCVF 氨基酸序列的 N 末端和 / 或 C- 末端的异源氨基酸序列的蛋白。在一些这些实施方式中,起始 RdCVF ATG 密码子和 / 或 RdCVF

终止密码子可以缺失或存在于 RdCVF 编码区中。例如,参见 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3。如果另一编码序列在 RdCVF 编码区的 3' 末端处框内融合,则天然 RdCVF 终止密码子通常不会存在于 RdCVF 编码序列的末端。

[0058] 在一些实施方式中,重编码 RdCVF 编码区包含 SEQ ID NO:1 的 106 ~ 741 位核苷酸、SEQ ID NO:1 的 106 ~ 429 位核苷酸、SEQ ID NO:3 的 106 ~ 432 位核苷酸或 SEQ ID NO:3 的 106 ~ 744 位核苷酸。

[0059] 在一些实施方式中,重编码 RdCVF 编码区包含编码 SEQ ID NO:2 的 36 ~ 246 位氨基酸的重编码序列。

[0060] 在一些实施方式中,本发明的编码序列编码含有信号序列的蛋白。

[0061] 信号肽 / 分泌信号

[0062] 信号序列框内翻译成通常与所选多肽的氨基末端相连的肽。分泌性信号序列会通过宿主细胞的机制相互作用而引起细胞分泌所述多肽。作为分泌过程的一部分,该分泌性信号序列通常会被切下或至少部分被切下。术语“信号序列”也称为编码信号肽的核酸序列。在一些实施方式中,信号序列与特定 RdCVF 相比是异源的。

[0063] 典型的信号肽的结构可以包括三个不同的区域:(i) 含有许多带正电的氨基酸(例如赖氨酸和精氨酸)的 N 末端区域;(ii) 中心疏水性核心区域(h-区);(iii) 含有被信号肽酶识别的序列基序的亲水性切割区(c-区)。(例如参见 von Heijne, G. (1983) Eur. J. Biochem., 133:17-21; von Heijne, G. (1985) J. Mol. Biol., 184:99-105; von Heijne, G. (1997) Protein Engineering(10):1-6)。可用于本发明的具有信号肽的蛋白的实例包括,但不限于:人生长激素(HGH)、骨形成蛋白 7(BMP7)、骨形成蛋白 2(BMP2)、睫状神经营养因子(CNTF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、胰岛素生长因子 1(IGF-1)、 β -葡糖醛酸糖苷酶(GUSB)、胶质细胞源神经营养因子(GDNF)、肝细胞生长因子(HGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、白血病抑制因子(LIF)、免疫球蛋白、牛生长激素、牛前白蛋白、人前胰岛素、人干扰素 γ 、人 α 纤维蛋白原、人 IgG 重链、大鼠淀粉酶、鼠类 α 胎蛋白、鸡溶菌酶、人胎盘碱性磷酸酶和玉米支配蛋白(Zea mays rein protein)22.1。根据本发明可以使用这些信号肽。在一些实施方式中,根据本发明使用的信号肽选自 HGH、BDNF、IGF-1 和 GUSB 组成的组。在一些实施方式中,信号肽来自诸如 IgK 等免疫球蛋白。

[0064] 信号序列可以哺乳动物、鼠类或人信号序列。在一些实施方式中,本发明的核酸或载体包含 SEQ ID NO:1 的 1 ~ 105 位核苷酸或 SEQ ID NO:1 的 4-105 位核苷酸。在一些实施方式中,信号序列编码包含 SEQ ID NO:2 的 2 ~ 34 位氨基酸的氨基酸序列或者包含 SEQ ID NO:15。编码信号肽的核苷酸序列可以是野生型序列或者其可以是重编码序列。

[0065] 在本发明的一些实施方式中,信号肽序列编码 RdCVF 的 N 末端或 C 末端。在一些实施方式中,信号肽指导蛋白运送到分泌途径,例如运送至内质网(ER)。在一些实施方式中,信号肽促进蛋白从细胞质运输到细胞外的目的地。信号肽序列可以选自天然存在的信号肽序列、其衍生物或合成设计的序列。在一些实施方式中,设计出的信号肽序列的非限制参数包括 3 ~ 40 残基的序列,其包含 3- ~ 20- 位残基的疏水性核心,并侧接数个相对亲水的残基。

[0066] 在一些实施方式中,信号肽序列缺乏疏水性核心。可用于本发明的缺乏典型的疏水性信号序列的哺乳动物分泌性蛋白的非限制性实例包括,但不限于:人 IL-1 α 、IL1 α 、

bFGF、aFGF、PDEGF、抗凝血蛋白、凝集素 L-14、ATL 源因子、因子 XIIIa、锚连蛋白 CII、脂蛋白质 I、旁胸腺素、 α -前胸腺素和啮齿动物转谷氨酰胺酶、旁胸腺素和 MDGI。

[0067] 核酸

[0068] 本发明包括包含编码 RdCVF 的核苷酸序列的核酸, 以及包括包含这些核酸的载体。

[0069] 为了确保局部和 / 或长期表达目的核酸, 本发明的一些实施方式计划用编码 RdCVF 的核酸或载体对细胞进行转导。本发明不应解释为限于任何具体核酸递送方法, 并且使用体内或体外核酸递送策略的任何可利用的核酸递送载体、或操纵细胞的使用 (例如 the technology of Neurotech, Lincoln, RI, 例如参见美国专利第 6, 231, 879、6, 262, 034、6, 264, 941、6, 303, 136、6, 322, 804、6, 436, 427、6, 878, 544 号) 以及编码 RdCVF 的本发明的核酸本身 (例如“裸 DNA”), 都可用于本发明的实施。可以与本发明一起使用各种递送载剂, 例如载体。例如, 病毒载体、两性脂质、诸如聚乙烯亚胺 (PEI) 和聚赖氨酸等阳离子聚合物、诸如梳状分子和星芒状分子等树状高分子、非离子脂质、阴离子脂质、囊泡、脂质体和基因递送的其它合成核酸手段 (例如参见美国专利第 6, 958, 325 和 7, 098, 030 号; Langer, Science249:1527-1533(1990); Treat 等, in “Liposomes” in “The Therapy of Infectious Disease and Cancer”; 和 Lopez-Berestein&Fidler(eds.), Liss, New York, 第 317-327 和 353-365 页 (1989); “裸”核酸等可以用于本发明的实施。

[0070] 在一些实施方式中, 使用下述核酸分子, 所述核酸分子中 RdCVF 编码序列和任何其它所需序列侧接在基因组的所需位点促进同源重组的区域, 由此提供 RdCVF 核酸的染色体表达 (Koller 等, (1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA86:8932-8935; Zijlstra 等 (1989)Nature342:435-438)。将核酸递送至患者中可以是直接的, 在该情况下患者直接暴露于核酸或携带核酸的载体; 或可以是间接的, 在该情况下首先将细胞用核酸体外转化, 然后将其移植到患者中。

[0071] 载体是通过其将目的核酸 (例如治疗性核酸, 例如能够编码治疗性蛋白的治疗性核酸) 引入目的靶细胞的手段。用于获得或构建目的载体的方法包括, 但不限于, 本领域已知的标准基因操纵技术、测序反应、限制性酶消化、聚合酶反应、PCR、PCRSOE、连接、重组酶反应 (例如 Invitrogen's GATEWAY® 技术)、作用在核酸上的其它酶活性剂、细菌和病毒增殖材料和方法、化学品和试剂和定点诱变策略等, 参见例如 Maniatis 等的教科书, “Molecular Cloning”。

[0072] 本发明的核酸通常会包含与 RdCVF 编码序列可操作地连接的启动子序列。启动子可以例如是组织特异性启动子、细胞特异性启动子、诱导性启动子、阻抑启动子、组成性启动子、合成启动子或杂交启动子。用于本发明的构建体的启动子的实例包括, 但不限于, 可用在本发明的构建体中的启动子的实例包括但不限于噬菌体 λ (PL) 启动子; SV40 早期启动子; 单纯疱疹病毒 (HSV) 启动子; 如人 CMV 即早期启动子等巨细胞病毒 (CMV) 启动子; 具有 CMV 增强子和鸡 β 肌动蛋白启动子的杂交启动子; 受四环素控制的反式激活应答的启动子 (tet) 体系; 如 MoMLV LTR、BIV LTR 或 HIV LTR 等长末端重复序列 (LTR) 启动子; 莫洛尼鼠类肉瘤病毒 (Moloney murine sarcoma virus) 的 U3 区启动子; 粒酶 A (Granzyme A) 启动子; 金属硫蛋白基因的调节序列; CD34 启动子; CD8 启动子; 胸苷激酶 (TK) 启动子; B19 细小病毒启动子; PGK 启动子; 糖皮质激素启动子; 如 HSP65 和 HSP70 启动子等热休克

蛋白 (HSP) 启动子 ; 免疫球蛋白启动子 ; MMTV 启动子 ; 劳氏肉瘤病毒 (RSV) 启动子 ; lac 启动子 ; CaMV35S 启动子 ; 和胭脂氨酸合成酶启动子。在一些实施方式中, 启动子是 MND 启动子 (Robbins 等, 1997, J. Virol. 71 :9466-9474), 或 MNC 启动子, 其是其中 LTR 增强子与最小 CMV 启动子组合的 MND 启动子的衍生物 (Haberman 等, J. Virol. 74(18) :8732-8739, 2000)。在一些实施方式中, RdCVF 编码序列与包含 SEQ ID NO :11 的 150 ~ 812 核苷酸序列的启动子序列可操作地连接。

[0073] 在一些实施方式中, 本发明的载体或核酸包含与 RdCVF 蛋白的编码序列可操作地连接的内含子。内含子可以来自 RdCVF 基因或异源内含子。异源内含子是已知的, 并且非限制性实例包括人 β -珠蛋白基因内含子和 β -肌动蛋白内含子。在一些实施方式中, 内含子序列是人 β -珠蛋白基因内含子基因。在一些实施方式中, 内含子序列包含 SEQ ID NO :11 的 820 ~ 1312 位核苷酸或 SEQ ID NO :11 的 908 ~ 1307 位核苷酸。

[0074] 在一些实施方式中, 本发明的核酸包含编码 RdCVF 蛋白的编码序列的核苷酸序列, 其中所述 RdCVF 编码序列包含重编码核苷酸序列。核酸可以编码 RdCVF1 蛋白和 / 或 RdCVF2 蛋白。在一些实施方式中, RdCVF 蛋白是短版本的 RdCVF 蛋白。在一些实施方式中, RdCVF 蛋白是长版本的 RdCVF 蛋白。清楚起见, RdCVF 蛋白可以是短 RdCVF1、长 RdCVF1、短 RdCVF2 或长 RdCVF2。在一些实施方式中, RdCVF 蛋白是人 RdCVF 蛋白。

[0075] 通常哺乳动物的核苷酸编码区以核苷酸序列 ATG (起始甲硫氨酸密码子) 开始, 例如人 RdCVF 编码区中所发现的。如本文所讨论的, 本发明的一些实施方式提供重编码的 RdCVF 编码区, 并且在一些进一步的实施方式中, 编码区与诸如信号序列的编码序列等第二编码区框内融合。在一些这些情况下, ATG 核苷酸序列不必在 RdCVF 编码区的起始点, 例如 RdCVF 编码区以编码特定 RdCVF 蛋白的第二个氨基酸开始。但是, 即使当 RdCVF 编码区与 RdCVF 编码区的 5' 的另一编码区可操作地连接时, ATG 核苷酸序列也可以在 RdCVF 编码区的起始点。

[0076] 在一些实施方式中, 本发明的核酸包含 SEQ ID NO :1、3 或 11。在一些实施方式中, 本发明的核酸包含 SEQ ID NO :11 的 150 ~ 812、820 ~ 1312 和 1340 ~ 2080 位核苷酸。在一些实施方式中, 本发明的核酸包含 SEQ ID NO :11 的 150 ~ 812、908 ~ 1307 和 1340 ~ 2080 位核苷酸。在一些实施方式中, 核酸还包含 SEQ ID NO :11 的 2130 ~ 2608 位核苷酸。

[0077] 在一些实施方式中, 本发明的核酸包含 RdCVF 的编码区, 其中所述 RdCVF 编码序列经过重编码。

[0078] 在本发明的一些实施方式中, 本发明的核酸位于诸如病毒载体等载体中。

[0079] 病毒载体

[0080] 本发明包括包含本发明的 RdCVF 编码区的病毒载体。用于本发明的病毒载体的实例描述于 PCT 公开第 W008/106644 号和美国专利公开第 US20100120665 号中。在一些实施方式中, 本发明不限于特定的病毒载体。病毒载体包括, 但不限于, 逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体 (参见例如美国专利第 7, 045, 344 号)、AAV 载体 (例如参见美国专利第 7, 105, 345 号)、疱疹病毒载体 (例如参见美国专利第 5, 830, 727 和 6, 040, 172 号)、肝炎 (例如丁型肝炎) 病毒载体 (例如参见美国专利第 5, 225, 347 号)、SV40 载体、EBV 载体 (例如参见美国专利第 6, 521, 449 号) 和新城疫病毒载体 (例如参见美国专利第 6, 146, 642、7, 442, 379、7, 332, 169 和 6, 719, 979 号)。在一些实施方式中, 慢病毒载体是 HIV、EIAV、

SIV、FIV 或 BIV 载体。在一些实施方式中,载体选自 AAV 载体或腺病毒载体。本发明还提供产生本发明的病毒载体的细胞。

[0081] 本发明的载体可以体内或体外施用至细胞(例如哺乳动物细胞)。可将载体(病毒性或非病毒性的)用于转导或转化细胞,所述细胞包括但不限于,未分化细胞、分化细胞、体细胞、原始细胞和/或干细胞。在一些实施方式中,意图将干细胞用于对人施用而不用于移植到适当假孕的女性中以便分化和发育为婴儿。

[0082] 在一些实施方式中,本发明的病毒载体包含衰变加速因子(DAF)。例如,有包膜的病毒载体在病毒膜上包含 DAF。在一些实施方式中,DAF 是野生型 DAF。在一些实施方式中,DAF 是具有包膜蛋白的融合蛋白的一部分,例如参见 Guibinga 等 *Mol Ther.* 200511(4): 645-51。

[0083] 腺病毒是无包膜的核 DNA 病毒,具有通常为约 36kb 的基因组。将人腺病毒分成多种血清型(约 47 种,由此进行编号并分类成 6 组:A、B、C、D、E 和 F)。

[0084] 重组腺病毒载体具有对分裂细胞和非分裂细胞的趋向性、最小的致病潜力、复制到高滴度以制备载体原液的能力和携带相对大的核苷酸序列插入物的潜力(Berkner, (1992) *Curr. Top. Micro. Immunol.* 158:39-66; Jolly, (1994) *Cancer Gene Therapy* 1:51-64)。已经将具有各种腺病毒基因序列的缺失的腺病毒载体设计为用于将核酸递送至细胞的合适载剂。在一些实施方式中,本发明的腺病毒载体是依赖于辅助物的或是“无肠”腺病毒。可以使用缺失以下基因中的一个或多个的腺病毒载体:E1a、E1b、E2a、E2b 和 E3。用于进行基于腺病毒的核酸递送的方法描述于例如美国专利第 5,824,544; 5,868,040; 5,871,722; 5,880,102; 5,882,877; 5,885,808; 5,932,210; 5,981,225; 5,994,106; 5,994,132; 5,994,134; 和 6,001,557 号。

[0085] AAV 载体源自单链(ss)DNA 细小病毒。单个 AAV 颗粒可以容纳至多 5kb 的 ssDNA,为转基因和调控元件留出约 4.5kb。例如美国专利第 6,544,785 号中描述的反式剪接系统可以接近两倍于该上限,并且这些类型的载体还可以与本发明一起使用。对于本发明,可以使用基本上任何血清型的 AAV。在本发明的一些实施方式中,可以使用 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8 或 AAV9 血清型(例如参见美国专利第 5,173,414、5,252,479、5,552,311、5,658,776、5,658,785、5,763,416、5,773,289、5,843,742、5,869,040、5,942,496、5,948,675、6,001,650 和 7,790,449 号;PCT 公开第 W02009134681 号;Kassim 等, *PLoS ONE* (2010) 5(10):e13424:1-10;Kotin, *Hum Mol Genet* (2011) 20(R1):R2-6),尽管本发明不限于这些血清型(参见例如 Gao 等 (2002) *PNAS* 99:11854-11859;和 *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003)。

[0086] 本发明的 AAV 载体还可以是假型的。假型 AAV 载体含有在第二 AAV 血清型的衣壳中的一种 AAV 血清型的基因组。本发明的 AAV 载体可以含有突变的衣壳,和/或是重新靶向的。例如,参见 Grieger 等 (*Adv Biochem Eng Biotechnol.* (2005) 99:119-45); Gonçalves 等 (*Mol Ther.* (2006) 13(5):976-86); 和 Warrington 等 (*J Virol.* (2004) 78(12): 6595-609)。

[0087] 在本发明的一些实施方式中,使 AAV 载体包被有诸如反应性聚合物等聚合物,以减少天然趋向性或 AAV 载体的天然结合;以使 AAV 载体重新靶向和/或提供对中和抗血清的抗性。例如,参见 Carlisle 等 (*J Gene Med.* (2008) 10(4):400-11)。

[0088] 逆转录病毒是 RNA 病毒,其中病毒基因组是 RNA。当宿主细胞被逆转录病毒感染时,基因组 RNA 逆转录到 DNA 中间体中,该 DNA 中间体被有效地整合至感染细胞的染色体 DNA 中。慢病毒含有具有调控功能或结构功能的其它基因。用于基因递送的逆转录病毒载体的用途描述于例如美国专利第 6,013,516 和号美国专利第 5,994,136 号中。BIV 系统的实例例如描述于 Matukonis 等,2002Hum. Gene Ther. 13,1293-1303;Molina 等,2002Virology. 304,10-23;Molina 等,2004Hum. Gene Ther.,15,65-877;美国专利第 6,864,085,7,125,712,7,153,512 号;PCT 公开第 W008/106644 号和美国专利公开第 US20100120665 号中。

[0089] DNA 病毒载体是基于或源自具有 DNA 类基因组的病毒的病毒载体。无包膜病毒病毒载体是基于或源自缺乏脂质双层膜的病毒的病毒载体。

[0090] 在一些实施方式中,本发明的病毒载体是 AAV 载体。在一些实施方式中,本发明的病毒载体不是牛免疫缺陷性病毒载体或其不是慢病毒载体。在一些实施方式中,病毒载体选自自由 DNA 病毒载体、无包膜病毒载体和腺病毒载体组成的组。

[0091] RdCVF 的细胞递送,包括包封细胞

[0092] 基因治疗或蛋白递送的另一途径包括将基因转移至体外或离体细胞,然后对哺乳动物或患者施用所述细胞。将核酸转移至细胞可以通过任何方法进行,例如转染、显微注射、电穿孔、细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移、原生质球融合、脂质体转染、微粒轰击、磷酸钙介导的转染、病毒载体或噬菌体转导等。可选的是,也可以将可选择性标记引入细胞中。如果采用可选择性标记,则可以将细胞置于选择下,以便例如增强表达和 / 或分离 / 选择可表达所转移的编码区的那些细胞(参见例如,Loeffler&Behr,Meth. Enzymol. 217 :599-618(1993);Cohen 等,Meth. Enzymol. 217 :618-644(1993);和 Cline,Pharmac. Ther. 29 :69-92(1985))。然后可将这细胞直接或在包封后递送至患者。

[0093] 在一些实施方式中,将核酸引入细胞中,然后在体内施用所得到的重组细胞。在一些实施方式中,技术可以对细胞提供稳定的核酸转移,从而使核酸可以被细胞表达,并且一些情况下可以被其细胞子代遗传和表达。可以通过各种方法对患者递送重组细胞。在一些实施方式中,经由可调节、可诱导和 / 或阻遏性启动子从细胞表达 RdCVF 蛋白。

[0094] 在一些实施方式中,使用的细胞对患者而言是自体同源的、同种异体的或异源的。在一些实施方式中,可以对自体同源细胞进行操作以使它们含有允许细胞产生或分泌 RdCVF 蛋白的本发明的核酸,并且将细胞引回患者中。

[0095] 在一些实施方式中,局部(例如关节、玻璃体内、视网膜内、颅内等)或全身(例如静脉内)施用细胞。

[0096] 在一些实施方式中,可以静脉内施用重组血细胞(例如造血干细胞和 / 或祖细胞)。在一些实施方式中,可以将眼睛细胞和 / 或多潜能细胞直接注射入眼睛中。

[0097] 根据本发明的一些实施方式,可以使用能够分离并体外保存的干细胞和 / 或祖细胞。此类干细胞包括但不限于造血干细胞(HSC)、诸如皮肤和内脏内衬等上皮组织的干细胞、胚胎心肌细胞、肝干细胞(参见例如 W094/08598)和神经干细胞(例如 Stemple and Anderson(1992)Cell 71 :973-985)。在一些实施方式中,所施用的细胞是包含本发明的核酸并且能够表达和分泌 RdCVF 的干细胞。

[0098] 包封细胞可以允许控制和 / 或连续体内递送蛋白,例如 RdCVF。在一些实施方式中,将包含本发明的核酸并且表达和 / 或分泌 RdCVF 的细胞包封。在一些实施方式中,将细胞包封在半透膜内,该半透膜允许 RdCVF 扩散通过该膜。关于包封细胞和包封细胞植入物的更多信息可在 Sieving 等 (Proc Natl Acad Sci USA, (2006) 103(10) :3896-901) ;美国专利第 7,115,257 和 7,820,195 号 ;和 PCT 公开第 W02011044216 号中发现。在本发明的一些实施方式中,对动物递送表达 RdCVF 蛋白的包封细胞。

[0099] 在一些实施方式中,将包封细胞植入哺乳动物中,例如植入眼睛、脑或嗅区。在一些实施方式中,包封细胞是视网膜色素上皮细胞,例如 ARPE-19 (获自 ATCC, Manassas, VA)。在一些实施方式中,使用包封细胞来向眼睛,例如眼睛的后部递送 RdCVF。

[0100] 在一些实施方式中,本发明的包封细胞植入物由包封在半透性中空纤维膜的节段 (section) 中的细胞组成,并且所述细胞经过遗传改性以产生 RdCVF。在一些实施方式中,包封细胞植入物在一端具有缝合环 (suture loop) 以将其锚接至眼睛内部的玻璃体视网膜体中的巩膜上。在一些实施方式中,包封细胞植入物的长度为 3、4、5、6、7、8、9 或 10mm。

[0101] RdCVF 蛋白分泌和生产

[0102] 可以使用本发明的核酸和病毒载体来从细胞表达、生产和 / 或分泌 RdCVF。该表达、生产和 / 或分泌可以在体外、体内或离体发生。

[0103] 本发明的一些实施方式提供从细胞分泌 RdCVF 蛋白的方法,所述方法包括对所述细胞施用本发明的核酸和 / 或病毒载体。在一些实施方式中,所述细胞可以是哺乳动物细胞、人细胞、眼部细胞 (ocular cell)、视网膜色素上皮 (RPE) 细胞、视杆细胞或视锥细胞。

[0104] 本发明的一些实施方式利用脊椎动物或哺乳动物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例为由 SV40 转化的猴肾 CVI 系 (例如, COS-7, ATCC CRL1651) ;人胚胎肾细胞系 (例如,包括经亚克隆从而可在悬浮培养物中生长的 293 或 293T 细胞系的 293 或 293T 细胞, Graham 等, J. Gen Virol. 36 :59(1977), 如 293Freestyle (Invitrogen, Carlsbad, CA) 等) 或 293FT ;幼仓鼠肾细胞 (例如, BHK, ATCC CCL10) ;中国仓鼠卵巢细胞 ;中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (例如, CHO, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216(1980)) ;小鼠支持细胞 (例如, TM4, Mather, Biol. Reprod. 23 :243-251(1980)) ;猴肾细胞 (例如, CVI ATCC CCL70) ;非洲绿猴肾细胞 (例如, VERO-76, ATCC CRL-1587) ;人类宫颈癌细胞 (例如, HELA, ATCC CCL2) ;犬肾细胞 (例如, MOCK, ATCC CCL34) ;CF2TH 细胞 ;布法罗大鼠肝细胞 (例如, BRL3A, ATCC CRL1442) ;人类肺细胞 (例如, W138, ATCC CCL75) ;人类肝细胞 (例如, Hep G2, HB8065) ;小鼠乳腺肿瘤 (例如, MMT060562, ATCC CCL51) ;TRI 细胞 (Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci. 383 :44-68(1983)) ;MRC5 细胞 ;ARPE-19 细胞 (ATCC) 和 FS4 细胞。

[0105] 在一些实施方式中,细胞选自 293 细胞、CHO 细胞、PerC6 细胞、Vero 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞、MDCK 细胞、3T3 细胞或 WI38 组成的组。

[0106] 本发明的一些实施方式提供分离的细胞,所述分离的细胞包含本发明的核酸。在一些实施方式中,核酸被整合至细胞基因组 /DNA 中。

[0107] 本发明还包括用于生产 RdCVF 蛋白的方法,所述方法包括在允许 RdCVF 蛋白表达和分泌的条件下培养细胞和从细胞培养基分离 RdCVF 蛋白,其中所述细胞包含本发明的核酸,所述核酸编码并允许表达 RdCVF 蛋白,例如分泌 RdCVF 蛋白。在一些实施方式中,所述核酸包含含有 RdCVF 蛋白的编码序列的核苷酸序列,其中所述 RdCVF 编码序列包含重编码

序列。RdCVF 蛋白可以是 RdCVF1 或 2 蛋白,或可以是长或短形式。在一些实施方式中,这些方法还包含对来自细胞和 / 或培养上清液的 RdCVF 蛋白进行纯化。

[0108] 本发明还包括来自本发明的核酸的通过细胞表达的 RdCVF 蛋白。本发明还提供本发明的 RdCVF 蛋白的分泌形式和包含本发明的分泌 RdCVF 蛋白的组合物。

[0109] 在一些实施方式中,将由细胞表达的 RdCVF 蛋白纯化至相对于总蛋白的至少 90%、至少 93%、至少 95%、至少 98%、至少 99.5% 或至少 99.9% 纯度。

[0110] 组合物、制品和制剂

[0111] 本发明的一些实施方式提供含有本发明的核酸、本发明的载体、本发明的 RdCVF 蛋白或它们的任意组合的组合物、制品和制剂,例如药物组合物。

[0112] 制品(例如用于注射)通常,但不必须是活性成分的生物相容性溶液,例如包含汉克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或磷酸盐缓冲盐水。在一些实施方式中,制品或药物组合物包含以下成分中的一种或多种:柠檬酸盐、NaCl、氯化钾(KCl)、二水氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、六水氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、三水乙酸钠($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、二水柠檬酸钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)(例如 0.17%)、蔗糖、氢氧化钠和 / 或盐酸(以调整 pH)和水。之前的列表包括作为特定水合物(例如二水合物、三水合物、六水合物等)列出的一些分子。应该理解的是,本发明中可使用这些化合物的各种水合物,并且本发明不限于所列出分子的这些具体水合物形式。在一些实施方式中,制品或药物组合物包含选自组氨酸、 MgCl_2 、海藻糖、聚山梨醇酯、聚山梨醇酯 20、NaCl、蔗糖、精氨酸和脯氨酸组成的一种或多种成分。在一些实施方式中,制品包含以下成分中的一种或多种:组氨酸、无水 α , α -海藻糖、 MgCl_2 、诸如聚山梨醇酯 20 等聚山梨醇酯和 NaCl。在一些实施方式中,制品或药物组合物包含以下成分中的一种或多种:磷酸盐缓冲盐水(PBS)和 pluronic F-68。在一些实施方式中,pluronic F-68 浓度可以为 0.0001%、0.001%、0.005%、0.01% 或 0.1%。

[0113] 用于所期望施用模式的合适的制品和配制方法的实例可以在 Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition, Mack Publishing Co., Easton, PA 和美国专利第 7,208,577 号中发现。

[0114] 在一些实施方式中,用于体内使用的组合物含有“载剂”或药学上可接受的“载剂”。术语“载剂”是指与本发明的核酸、载体或蛋白一起施用的稀释剂、佐剂、赋性剂或运载剂。术语“载剂”包括但不限于包括但不限于固体材料或液体材料,所述固体材料或液体材料可以是无机物或有机物并且可以源自合成或天然,将所述固体材料或液体材料与组合物的活性成分混合或配制以便促进对受试对象的施用。在配制药物中习惯采用的任何其它材料可能是合适的。药物载剂可以不同于典型溶液和悬浮液,其差异在于药物载剂特别为体内使用而制备,从而排除可能对施用以所述组合物的宿主害的物质(例如,除去细菌毒素)。

[0115] 合适的液体载剂的实例包括水和含有含氧有机化合物(例如乙醇)的水性溶液。也可以存在如调味剂和悬浮剂等通常存在于药物制剂中的缓冲液和其它材料。通常,合适的油、盐水、水性右旋糖(葡萄糖)和相关的糖溶液以及诸如丙二醇或乙二醇等二醇通常是合适的胃肠外溶液用载剂。在一些实施方式中,胃肠外施用用溶液含有活性成分的水溶性盐、合适的稳定化剂和需要或必须时的缓冲物质。单独或组合的诸如亚硫酸氢钠、亚硫酸钠

或抗坏血酸等抗氧化剂可以用作稳定剂。另外使用的是柠檬酸和其盐以及乙二胺四乙酸钠。此外,胃肠外溶液可以含有防腐剂,例如苯扎氯铵、尼泊金甲酯或尼泊金丙酯以及氯丁醇。

[0116] 载剂可以包括糖类,例如海藻糖、甘露糖、谷胱甘肽、木糖醇、蔗糖、乳糖和山梨糖醇。用于制品的其它成分可以包括,例如 DPPC(1, 2- 二癸酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸胆碱)、DOPE(1, 2- 二油酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸乙醇胺)、DSPC(1, 2- 二硬脂酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸胆碱、1, 2- 二硬脂酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸胆碱)和 DOPC(1, 2- 二油酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸胆碱)。可以使用天然或合成的表面活性剂。可以使用聚乙二醇(甚至除了它在衍生化蛋白中的使用外)。可以使用右旋糖苷,例如环糊精。在一些实施方式中,可以使用环糊精、叔胺和/或 β -环糊精。可以使用胆汁盐和其它相关增强剂。可以使用纤维素和纤维素衍生物。可以使用氨基酸,例如将其用于缓冲制剂中。另外,考虑使用脂质体、微囊剂或微球体、包涵复合物或其它类型的载剂。

[0117] 如果需要,组合物还可以含有湿润剂和/或润滑剂,和/或 pH 缓冲剂。如果需要,组合物还可以包括增溶剂和/或局部麻醉剂(例如利诺卡因),以缓解注射位点的疼痛。

[0118] 在一些实施方式中,本发明的药物制剂或组合物包含(i)药学上可接受的载体和(ii)本发明的核酸、本发明的病毒载体、本发明的 RdCVF 蛋白或它们的任意组合。

[0119] 施用、递送和治疗

[0120] 应该理解的是,当讨论引入或施用编码 RdCVF 蛋白的核酸或载体时,本发明还设想引入或施用 RdCVF 蛋白自身。应该理解的是,当讨论引入 RdCVF 蛋白时,本发明还设想引入编码 RdCVF 蛋白的核酸或载体。

[0121] 在一些实施方式中,本发明的组合物可以局部或全身施用。施用的可用途径描述于本发明,并且是本领域已知的。引入或施用的方法包括但不限于:皮内、肌肉、腹腔内、静脉内、皮下、鼻内、气管内、局部(topical)、吸入、透皮、直肠、胃肠外途径、硬膜外、颅内、脑内、脑室内(intraventricular)、硬膜下、关节内、鞘内、心内、冠状动脉内、玻璃体内、视网膜下、眼前房内、角膜上局部、结膜下、眼球囊下注射、通过施加滴眼液、口服途径、经气囊导管、经支架或其任何组合。全身施用可以但不限于通过静脉内或动脉内注射或通过透粘膜、皮下、透皮和/或腹膜内递送。

[0122] 在一些实施方式中,例如包括施用至眼睛的实施方式中,约每周、每月、每 2 个月、每 3 个月、每 6 个月、每 9 个月、每 1 年、每 18 个月、每 2 年、每 30 个月、每 3 年、每 5 年或每 10 年或按需要施用一次本发明的编码 RdCVF 的载体或核酸。在一些实施方式中,例如包括施用至眼睛的实施方式中,约每 1~4 周、约每 4~8 周、约每 1~4 个月、约每 3~6 个月、约每 4~8 个月、约每 6~12 个月、约每 9~15 个月、约每 12~18 个月、约每 15~21 个月、约每 18~24 个月、约每 1~2 年、约每 1.5~3 年、约每 2~4 年、约每 3~5 年、约每 5~7 年、约每 7~10 年或约每 10~20 年施用本发明的编码 RdCVF 的载体或核酸。预期编码 RdCVF 蛋白的载体的施用的频率小于 RdCVF 蛋白自身的施用。在本发明的一些实施方式中,药物制剂包含编码本发明的 RdCVF 蛋白的载体,并且将所述药物制剂对患者施用仅一次。

[0123] 在一些实施方式中,通过玻璃体内或视网膜下注射对人类眼睛施用本发明的 RdCVF 蛋白。在一些实施方式中,通过玻璃体内或视网膜下注射对人类眼睛施用约 15 μ g~

约 5mg、约 15 μ g ~ 约 500 μ g、约 100 μ g ~ 约 900 μ g、约 300 μ g ~ 约 700 μ g、约 500 μ g ~ 约 1mg、约 1mg ~ 约 5mg、约 1mg 或约 500 μ g 的 RdCVF 蛋白。

[0124] 在一些实施方式中,通过视网膜下注射或玻璃体内注射编码 RdCVF 的 AAV 载体而施用 RdCVF 蛋白。在一些实施方式中,通过视网膜下注射来施用约 5×10^8 ~ 约 1×10^9 、约 5×10^8 ~ 约 7.5×10^8 、约 7.5×10^8 ~ 约 1×10^9 、约 6×10^8 ~ 约 9×10^8 、约 7×10^8 ~ 约 8×10^8 、约 5×10^8 、约 6×10^8 、约 7×10^8 、约 8×10^8 、约 9×10^8 或约 1×10^9 载体基因组拷贝 (GC) 数的 AAV 载体。在一些实施方式中,通过玻璃体内注射来施用约 5×10^8 ~ 约 1×10^{10} 、约 5×10^8 ~ 约 5×10^9 、约 5×10^8 ~ 约 2×10^9 、约 2×10^9 ~ 约 5×10^9 、约 5×10^9 ~ 约 1×10^{10} 、约 5×10^8 ~ 约 1×10^9 、约 1×10^9 ~ 约 3×10^9 、约 3×10^9 ~ 约 6×10^9 、约 6×10^9 ~ 约 1×10^{10} 、约 1×10^9 ~ 约 1×10^{10} 、约 1×10^{10} ~ 约 1×10^{11} 或 1×10^{11} ~ 约 1×10^{12} 个 GC 数的 AAV 载体。应该理解的是,AAV 载体的数量有时以转导单位或以 GC 数测定。GC 数通常是当同一 AAV 载体样品用转导单位测定时的 25 ~ 300 倍。

[0125] 在一些实施方式中,可以将消炎剂与本发明的 RdCVF 蛋白、载体或核酸组合递送。可以在施用本发明的分子或载体之前、同时和 / 或之后递送消炎剂。在一些实施方式中,可以在与本发明的 RdCVF 蛋白、核酸或载体相同的溶液和 / 或相同的注射器中施用消炎剂。在一些实施方式中,对眼睛共施用本发明的 RdCVF 蛋白、核酸或载体和消炎剂。

[0126] 许多消炎药是本领域已知的,并且包括但不限于:地塞米松、地塞米松间磺基苯甲酸钠、地塞米松磷酸钠、氟米龙、溴芬酸、普拉洛芬、环孢菌素眼用乳剂 (例如 RESTASISTM)、萘普生、糖皮质激素、酮洛酸、布洛芬、托美汀、非甾体消炎药、甾体消炎药、双氯芬酸、氟比洛芬、吲哚美辛和舒洛芬。

[0127] 本发明的一些实施方式包括既施用 RdCVF 蛋白和又施用编码其的载体。可以在施用本发明的载体之前、同时和 / 或之后递送 RdCVF 蛋白。在一些实施方式中,可以在与本发明的载体相同的溶液和 / 或相同的注射器中施用 RdCVF 蛋白。在一些实施方式中,可以对眼睛共施用本发明的载体和 RdCVF 蛋白。

[0128] 在本发明的一些实施方式中,基因递送系统可以导致 RdCVF 蛋白的基因或编码区转导和 / 或稳定整合到靶细胞中。在一些实施方式中,靶细胞是哺乳动物细胞,例如灵长类细胞和人细胞。在一些实施方式中,靶细胞可以是眼睛的细胞,例如视网膜色素上皮细胞、视杆感光细胞、视锥感光细胞、双极细胞、水平细胞、无长突细胞、神经节细胞、视网膜细胞或多潜能细胞。靶细胞可以体外的、离体的或体内的。在一些实施方式中,靶细胞是干细胞。干细胞包括但不限于多潜能干细胞、全能干细胞、造血干细胞、癌干细胞和胚胎干细胞。在一些实施方式中,本文考虑的多潜能干细胞不是用于从受精卵或卵裂球繁殖有生命个体的那些细胞。本发明还设想将部分未分化细胞用于在需要治疗的患者的眼内的植入例如以便使眼细胞再生。

[0129] 本发明还提供治疗方法。在一些实施方式中,本发明提供保护眼视杆细胞 (ocular rod cell) 的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用本发明的核酸、本发明的病毒载体、本发明的 RdCVF 蛋白、本发明的药物组合物或它们的组合。在一些实施方式中,通过视网膜下注射、玻璃体内注射、注射到眼睛的前房内、结膜下注射 (subconjunctival injection) 或眼球囊下注射 (subtenon injection) 或它们的组合施用本发明的病毒载体和 / 或核酸。在一些实施方式中,对人进行治疗。在一些实施方式中,要治疗的哺乳动

物罹患选自自由以下组成的组中的眼部疾病：视网膜营养不良、斯塔加特氏病 (Stargardt's disease)、视网膜色素变性、干性年龄相关性黄斑变性 (干性 AMD)、地图样萎缩 (干性 AMD 的高级阶段)、湿性年龄相关性黄斑变性 (湿性 AMD)、青光眼 / 高眼压、糖尿病性视网膜病变、巴尔得 - 别德尔综合征、巴 - 科综合征、卵黄状黄斑变性、脉络膜瘤、回旋形萎缩、先天性黑朦、雷夫叙姆综合征、乌谢尔综合征、甲状腺相关眼病、格雷夫斯病、与视网膜色素上皮细胞相关的疾病、眼前节疾病、晶状体疾病 / 白内障、眼杯障碍或葡萄膜炎。在一些实施方式中,受保护的眼视杆细胞不含有本发明的核酸和 / 或病毒载体。例如,受保护的眼细胞不通过该受保护的眼细胞本身的转导而得到保护。

[0130] 本发明的一些实施方式,提供保护眼视杆细胞的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用本发明的核酸和 / 或病毒载体,其中通过视网膜下注射而施用所述核酸和 / 或病毒载体,并且在离视网膜下注射位置至少 1mm、至少 2mm、至少 3mm、至少 5mm、至少 7mm、至少 10mm、至少 15mm、至少 20mm 或至少 25mm 的位置处的视杆细胞和 / 或视锥细胞得到保护。例如但不希望受理论限制,在视网膜下注射位置用核酸或病毒载体转导的细胞表达和 / 或分泌长 RdCVF 和 / 或短 RdCVF 蛋白,所述蛋白能够在远离转导细胞或注射位置的位置提供保护眼视杆和 / 或视锥的效果。

[0131] 除了 RdCVF 蛋白在眼睛中的表达之外, RdCVF 蛋白还在其它组织中天然表达。使用蛋白组方法,发现 90 种蛋白与包含微管 - 结合蛋白 tau 的 RdCVFL 相互作用 (Fridlich 等 Mol Cell Proteomics(2009)8(6):1206 - 1218)。Fridlich 等证明了 TAU 的磷酸化水平在 $Nxn11^{-/-}$ (RdCVF1 $^{-/-}$) 小鼠的视网膜中增加,因为其在罹患阿尔茨海默氏病的患者脑中超磷酸化,据推测在某些情况下通过氧化胁迫而超磷酸化。Fridlich 等还指出 RdCVFL 抑制 TAU 磷酸化。Cronin 等 (Cell Death and Differentiation(2010)17:1199 - 1210) 发现 $Nxn11^{-/-}$ (RdCVF1 $^{-/-}$) 视网膜含有聚集的 TAU 蛋白,如同在罹患阿尔茨海默氏病的患者脑中发现的那样。

[0132] 缺乏 RdCVF2 的小鼠的视力和嗅觉受损。正常小鼠在嗅上皮中表达 RdCVF2。Jaillard 等 (ARVO meeting(2009)program#/poster#491/D636) 报道发现当在存在 RdCVF2 下进行培养时嗅神经的存活率更高。Jaillard 等还通过进行嗅觉辨别学习试验而比较了 RdCVF2 $^{-/-}$ 和对照小鼠。一直到 12 个月龄, RdCVF2 $^{-/-}$ 小鼠未能对刺激物正确响应。

[0133] RdCVF 蛋白具有神经保护活性,并且不仅是视锥细胞和 / 或视杆细胞的存活因子,还是通用的神经元存活因子。

[0134] 因此综上所述,本发明的编码 RdCVF 的核酸或病毒载体或者 RdCVF 蛋白可用于治疗或缓解阿尔茨海默氏病、亨廷顿病、帕金森病和嗅觉疾病。

[0135] 本发明包括治疗疾病的方法,所述方法包括对哺乳动物施用本发明的核酸、本发明的病毒载体、本发明的 RdCVF 蛋白、本发明药物组合物或它们的组合,其中所述疾病选自自由阿尔茨海默氏病、亨廷顿病、帕金森病和嗅觉疾病组成的组。在一些实施方式中,本发明的病毒载体是 AAV 载体。

[0136] 实施例

[0137] 现在参考以下实施例描述本发明。这些实施例仅出于说明目的提供,本发明决不应该解释为限于这些实施例,而是应该解释为包含因本文提供的教导结果而明显的任何变体和所有变体。

[0138] 然而,本文已经出于说明目的描述本发明的具体实施方式,本领域技术人员会意识到的是,无需背离如所附权利要求描述的发明即可进行许多细节的变化。

[0139] 在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请在此通过引用将其全部内容并入说明书中,其程度如同每一篇出版物、专利或专利申请被特别和单独地通过引用并入本文中一样。与任何上述出版物、专利和专利申请一起公布的任何增补信息,也通过参考并入。例如,某些期刊论文与通常可在线获得的增补信息一起公布。

[0140] 实施例 1-RdCVF1 长形式和短形式的重编码编码序列。

[0141] 设计了重编码人 RdCVF1S 和 RdCVF1L 的核苷酸编码区(例如 SEQ ID NO:1 的 106-741 位核苷酸、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:3 的 106-744 位核苷酸)。GENEART® (Regensburg, 德国)合成了特别是含有 RdCVF1S 和 RdCVF1L 的密码子经过优化的核苷酸编码序列的核酸序列。这些编码序列还经重编码以使原核生物抑制性基序、共有剪接供体位点和隐蔽剪接供体位点等基序最少化。

[0142] 人 RdCVF1L 编码序列的重编码还提供了重编码 RdCVF1S 编码区,即在 3'端具有终止密码子的 SEQ ID NO:12 的 1-327 位核苷酸。

[0143] 天然 RdCVF1L 编码区与重编码编码区的比对

[0144]

[0145]

CCGGCGGTTCGTGGTGCTCAAGCCGGACGGGGACGTGCTCACTCGCGACGGCGCCGACGAG 420

| |

CCCGCCGTGGTGGTGCTGAAGCCTGATGGCGACGTGCTGACCAGAGATGGCGCCGACGAG 420

ATCCAGCGCCTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCGGCCGAGGTGCTGGAC 480

| |

ATCCAGAGACTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCCTGGAC 480

CGCAACTTCCAGCTGCCAGAGGACCTGGAGGACCAGGAGCCACGGAGCCTCACCGAGTGC 540

| |

AGAAACTTCCAGCTGCCCGAGGATCTGGAGGATCAGGAGCCCAGATCCCTGACCGAGTGC 540

CTGCGCCGCCACAAGTACCGCGTGGAAGGGCGGCGGAGGCGGGCGCGACCCCGGGGGA 600

| |

CTGAGGCGGCACAAGTACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCGGCAGAGACCCTGGCGGC 600

GGGGGTGGGGAGGAGGGCGGGGCCGGGGGGCTGTTCTGA 639 (SEQ ID NO: 7)

| |

GGAGGAGGAGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCTGA 639 (SEQ ID NO: 12)

[0146] 天然 RdCVF1L 编码序列被重编码成 SEQ ID NO :12, 除去了 2 个原核生物抑制性基序、1 个共有剪接供体位点和 3 个隐蔽剪接供体位点, 使得这些元件均未留在重编码序列中 (SEQ ID NO :12)。重编码还将平均 GC 含量从 65% 改变为 63%。

[0147] SEQ ID NO :12 的 1-327 位核苷酸还提供不具有诸如 TGA 等终止密码子的 RdCVF1S 的重编码编码序列。

[0148] 天然 RdCVF1S 编码区与重编码编码区的比对

[0149]

同一性= 278/330 (84.2%)

43/110 密码子不同 (39.1%)

ATGGCCTCCCTGTTCTCTGGCCGCATCCTGATCCGCAACAATAGCGACCAGGACGAGCTG 60

| |

ATGGCCAGCCTGTTTCAGCGGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGACGAGCTG 60

[0150]

```
GATACGGAGGCTGAGGTCAGTCGCAGGCTGGAGAACCGGCTGGTGCTGCTGTTCTTTGGT 120
|| || ||||| || || || | ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GACACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTTGGC 120

GCTGGGGCTTGTCACAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTCAAGGACTTCTTCGTGCGG 180
|| || || || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GCCGGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTCTTTGTGCGG 180

CTCACAGATGAGTTCTATGTACTGCGGGCGGCTCAGCTGGCCCTGGTGTACGTGTCCCAG 240
|| || || ||||| || || || | || || ||||| ||||| ||| |||
CTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAG 240

GACTCCACGGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTCAAGGACATGCCAAAGAAATGGCTTTTC 300
||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||
GACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTGAAGGACATGCCAAGAAGTGGCTGTTC 300

CTGCCCTTTGAGGATGATCTGAGGAGGTGA 330 (SEQ ID NO: 13)
||||||| ||||| || ||| ||||| |||

CTGCCCTTCGAGGACGACCTGCGGAGATGA 330 (SEQ ID NO: 14)
```

[0151] 天然 RdCVF1S 编码序列被重编码成 SEQ ID NO :14, 除去了 1 个原核生物抑制性基序、1 个共有剪接供体位点和 2 个隐蔽剪接供体位点, 使得这些元件均未留在重编码序列中 (SEQ ID NO :14)。重编码还将平均 GC 含量从 58% 改变为 61%。

[0152] 实施例 2- 由腺相关病毒载体介导的长形式的视杆细胞来源的视锥细胞活力因子的体外表达

[0153] 质粒克隆

[0154] 通过 PCR 从 GENEART® 合成的核酸扩增短形式的 RdCVF 蛋白的 cDNA, 并且将其克隆至 pSecTag2A 质粒 (Invitrogen, Catalog No. V900-20) 中, 所述质粒引入了小鼠 Igk 信号肽序列, 从而使 Igk 信号肽 DNA 序列 5 开端 (prime) 定向到 RdCVFS 编码序列。所得到的质粒称为 pAVTrRd034。使用限制性酶消化确认 pAVTrRd034 的大小和取向。通过 PCR 从 pAVTrRd034 扩增 Igk-RdCVFS 序列, 并插入腺相关病毒载体质粒 pAAV-MCS (Cell Biolabs, San Diego, CA) 中, 形成质粒 pAAV-SRd269 (SEQ ID NO :8)。将密码子经过优化的长形式的 RdCVF 通过 PCR 扩增, 并插入内部 (in-house) 克隆质粒 pAVT001 中, 形成质粒 pAVTLrRd055 (SEQ ID NO :9)。对质粒 pAVTLrRd055 和 pAAV-SRd269 用 Bgl II 和 Stu I 进行二重消化。将来自 pAAV-SRd269 的 4.8kb 带和来自 pAVTLrRd055 的 540bp 带连接, 形成

含有长 RdCVF 的重编码编码序列的 pAAV-LRd268 (SEQ ID NO :10)。使用限制性酶消化确认 pAAV-LRd268 的大小和取向。

[0155] 由于短形式和长形式的 RdCVF 蛋白的 N 末端序列是同一的, 将 pAVTrRd034 的短 RdCVF DNA 序列的末端更换为来自质粒 pAVTLrRdCVF055 的经密码子优化的长 RdCVF DNA 序列的末端, 由此产生 rAAV 质粒 pAAV-LRd268, 其含有在 AAV-ITR 之间的以下特征:

[0156] CMV 启动子— β -珠蛋白内含子—Igk-RdCVF1L—多聚 A

[0157] 重组 AAV-RdCVF1L 和 AAV-GFP 载体的产生和纯化

[0158] 将质粒 pAAV-LRd268、pHELPER (Cell BioLabs, Catalog No. 340202) 和 pRC2 (Cell BioLabs, Catalog No. 340201) 转化到 DH10B 感受态细菌细胞 (Invitrogen, Catalog No. 18297-010) 中, 并使用 Qiagen EndoFree Plasmid Maxi 试剂盒或 EndoFree Plasmid Mega 试剂盒根据制造商说明书使其扩增。使用 Beckman DU-600 分光光度计确定质粒浓度。通过限制性消化和分析确定各个质粒的身份。

[0159] 为了生产 rAAV-RdCVF1L 载体, 将 293AAV 细胞 (Cell BioLabs, Catalog No. AAV-100) 以每 15cm 培养皿 4000000 个细胞接种在 cDMEM (补充有 10% FBS、1% 谷氨酰胺、1% 非必须氨基酸和 1% 青霉素 / 链霉素的 DMEM) 中。翌日将培养基更换为 25mL 新鲜 cDMEM。2 小时后进行转染。将水 (57.4mL) 与 1.3mg pHELPER、650 μ g pRC2、650 μ g pAAV-LRd268 和 8.1mL 2M CaCl_2 混合 (水 / 质粒 / CaCl_2 混合物)。将 12.5mL 体积的 2xHBS (Lonza, Sku :RR07005) 转移到 5 个 50mL 锥形管中的每一个。涡旋的同时, 将 12.5mL 的水 / 质粒 / CaCl_2 混合物缓慢添加至每个含有 2xHBS 的锥形管中。温育 5 分钟后, 将 2.5mL 的悬浮液添加至每个含有 293AAV 细胞的细胞培养皿。

[0160] 翌日将培养基更换为每个培养皿 25mL 新鲜 cDMEM 培养基。两天后使用细胞铲收获细胞, 将细胞 / 培养基混合物转移至 250mL 锥形管中。将样品于 4°C 在 3,000rpm 下离心 15 分钟, 丢弃上清液, 并使细胞球团重悬浮于 110mL DMEM 中。重悬浮的细胞样品等分 (30mL) 到 50mL 锥形管中, 并且使用乙醇 / 干冰浴和 37°C 水浴进行冷冻 / 解冻 / 冷冻步骤。将管贮存在 -80°C, 直到对材料进行进一步加工。使用相同的方法来产生 rAAV-GFP, 不同之处在于用质粒 pAAV-GFP (Cell BioLabs Catalog No. AAV-400) 代替 pAAV-LRd268。

[0161] 为了纯化 rAAV-RdCVF1L 载体, 在 37°C 于水浴中将来自冷冻 / 解冻 / 冷冻步骤的含有载体的 4 个 50mL 锥形管解冻。向各个管添加 40 微升的 **BENZONASE®** (Sigma, Catalog No. E8263-25kU), 然后在 37°C 温育 30 分钟。将管在 3,000rpm 下离心 10 分钟, 并将上清液转移至 500mL 瓶中。添加 60 毫升的 10% 脱氧胆酸钠 (8.2g, 在 82mL 水中)。将样品短暂地合, 并在 37°C 温育 30 分钟。将悬浮液施用 5 μ m 过滤器过滤。随后, 使用 0.8 μ m 过滤器进行另一过滤步骤。准备肝素琼脂糖柱 (8mL) (Sigma, Catalog No. H6508-25mL), 并将该柱用 48mL 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (Invitrogen, Catalog No. 10010-049) 平衡。将滤出的细胞裂解物加载至该柱上, 并用 40mL 洗涤缓冲液 (20mL 5M NaCl, 980mL PBS) 进行洗涤。将载体用 15mL 洗脱缓冲液 (80mL 5M NaCl, 920mL PBS) 洗脱, 并收集在新的 50mL 锥形管中。

[0162] 载体通过离心过滤来浓缩。将 Amicon Ultra-15 离心过滤器 (Millipore, Catalog No. UFC910024) 用 PBS 冲洗 1 次, 并将洗脱的样品添加至该装置。在 Beckman Allegro6KR 离心机中以 2,200rpm, 22°C 进行离心, 直到样品浓缩至 1mL ~ 2mL 体积。添加 15mL 体积的 PBS, 重复进行离心, 直到样品体积 $\leq$ 1mL。收集所纯化的载体, 并用 100 μ L 的 PBS 冲洗过滤

器壁。将样品混合,并将载体的 30 μ L 等分试样于 -80°C 贮存在 600 μ L 锥形管中,直到使用。

[0163] 重复该过程从而纯化 rAAV-GFP 载体。

[0164] 图 9 和 SEQ ID NO :11 显示 rAAV-RdCVF1L 载体的核酸序列。

[0165] 经纯化重组 AAV 载体的基因组滴度检验

[0166] 为了测定经纯化的 rAAV-RdCVF1L 和 rAAV-GFP 载体的基因组滴度,将 5 μ L 的合适载体与 5 μ L 10X DNA 酶缓冲液,1 μ L DNA 酶 I (Roche, Catalog No. 04716728001) 和水混合,总体积为 50 μ L。在 37°C 温育 30 分钟后,通过在 65°C 温育 10 分钟而使酶失活。添加蛋白酶 K (0.5 μ L) (Roche, Catalog No. 03115887001)。将样品短暂地混合,并在 50°C 温育 60 分钟。通过 95°C 持续 20 分钟使蛋白酶 K 失活。平行地,使用掺入对照 (spike control),该对照中在反应中添加 5 μ L 掺入标准物 (spike standard) (2×10^9 来自 pAAV-GFP 的单链 DNA)。在 BioRad PCR 热循环仪中使用 8 联平盖条 (8-flat cap strip),在不带有盖的 0.2ml 的 8 联管条 (Biorad, Catalog No. TBS-0201) 中进行这些反应。

[0167] 建立了用于 qPCR 的主混合液 (master mix),其含有 825 μ L 水、1.875 μ L iQ SYBR Green Supermix (BioRad, Catalog No. 170-8882) 和 337.5 μ L 各引物 (QPCR CMV1 (SEQ ID NO :5) 和 QPCR CMV2 (SEQ ID NO :6))。向 96 孔 PCR 板的每孔中添加 45 μ L 体积的所述混合液,并添加 5 μ L 的经消化载体、掺入经消化载体 (spike digested vector)、未经消化载体 (5 μ L 经纯化载体以及 40 μ L 水和 5 μ L DNA 酶缓冲液)、未经消化掺入载体 (undigested spiked vector) (5 μ L 经纯化载体以及 35 μ L 水、5 μ L DNA 酶缓冲液和 5 μ L 掺入标准物) 中的任一种并进行混合。进行 PCR 过程,并且使用来自第 3 个循环的样品来进行熔融曲线分析。

[0168] 通过如上所述的定量 PCR 对这些单链 DNA 基因组的浓度进行分析。rAAV-RdCVF1L 载体颗粒的浓度确定为每毫升 2×10^{11} 个载体基因组拷贝 (GC/mL, 并且 rAAV-GFP 载体颗粒的浓度确定为 2×10^{11} GC/mL。

[0169] 经纯化重组 AAV 载体的银染色

[0170] 为了检查经纯化 rAAV-RdCVF1L 和 rAAV-GFP 载体的纯度,以银染色分析对载体裂解物进行 SDS-PAGE。具体而言,向 20 μ L 各经纯化的重组 AAV 载体添加 20 μ L 裂解缓冲液 (8.4mL water, 500 μ L 1M Tris (pH8.0)、1mL 甘油、300 μ L 5M NaCl、50 μ L NP-40、40 μ L EDTA、100 μ L PMSF、1 片蛋白酶抑制剂 (Roche, Catalog No. 11836170001)), 并保持在冰上 20 分钟。在台式离心机中以 13,000rpm 于 4°C 将反应液离心 2 分钟。将上清液转移至新管中,添加 10 μ L 的 5x 还原样品缓冲液 (Pierce, Catalog No. 39000), 并将样品在 95°C 温育 10 分钟。

[0171] 根据制造商说明书进行电泳。将 4 ~ 15% SDS-PAGE 凝胶用水冲洗,并放入凝胶室中。向上和下缓冲室添加运行缓冲液 (通过用水稀释 10X Tris/甘氨酸/SDS 运行缓冲液 (BioRad, Catalog No. 161-0732) 而制成的 1X Tris/甘氨酸/SDS)。将孔用 200 μ L 运行缓冲液冲洗两次,加载样品。作为对照,向外部孔添加 1 μ L 体积的 BENCHMARK™ 蛋白梯度物 (Invitrogen, Catalog No. 10747-012)。通过基因组滴度分析而确定,加载相同浓度的载体。在 200V 跑凝胶,直到染料到达凝胶底部。将凝胶固定,并根据制造商说明书进行银染色 (Biorad Silver Stain Plus, Catalog No. 161-0449)。

[0172] 仅能看到三种 AAV 病毒蛋白 VP1 (90kDa)、VP2 (72kDa) 和 VP3 (60kDa) (图 1)。由于在银染色分析中不能看到其它蛋白,从而确认载体制备产生了高纯度的载体颗粒。

[0173] ARPE-19 细胞的由 AAV 载体转导介导的 RdCVF1L 的体外表达

[0174] 为了检查由 rAAV-RdCVF1L 载体介导的 RdCVF1L 表达和分泌,在 6 孔板的每孔 3mL 的 cDMEM 中接种 200,000 个 ARPE-19 人视网膜色素上皮细胞 (ATCC, Manassas, VA)。对于在 AAV 感染后的转基因表达,限时步骤是单链 DNA 基因组的第二链合成,其可花费数周时间,例如见 Ferrari 等 (1996). J Virol. 70 :3227-3234。但是,可以在转导之前使用照射以促进细胞培养物中 rAAV 载体转导后的蛋白表达,例如参见 Alexander 等 (1994) J Virol. 68 : 8282-8287。

[0175] 用 24 小时后,用 Shepherd&Associate 的型号为 Mark I-68 自屏蔽照射器以 175Gy 的 ^{137}Cs 对细胞进行照射。2 小时后,将培养基更换为 1.5mL 的新鲜 cDMEM,并添加 3 μL 的经纯化重组 AAV 载体。一个板未经转导 (无 AAV) 作为对照,一个板用 rAAV-GFP 载体转导,一个板用 rAAV-RdCVF1L 载体转导。

[0176] 转导后 2 天,收获来自经转导和未经转导细胞的上清液,并通过 0.45 μm 过滤器对其进行过滤。添加相等体积的裂解缓冲液 (9.4mL 水、200 μL 1M Tris (pH8.0)、40 μL 0.5M EDTA、300 μL 5M NaCl、100 μL NP-40、100 μL PMSF、1 片蛋白酶抑制剂),并于 -80°C 贮存直到使用。将来自各板的细胞用 PBS 洗涤,使用细胞铲刮下,汇集并转移到 15mL 锥形管中。在 Beckman Coulter Allegra6KR 离心机中将细胞在 1,200rpm 下于 4°C 离心 4 分钟,弃去上清液。将细胞团再悬浮于 1mL 裂解缓冲液 (参见上述) 中,转移至 1.5mL 管中,在冰上温育 10 分钟。在台式离心机中以 13,000rpm 于 4°C 将细胞裂解物离心 2 分钟。在 1.5mL 管中将清澈的细胞裂解物等分成 200 μL 体积,于 -80°C 贮存直到使用。

[0177] 对于 RdCVF1L 表达的经转导细胞上清液和细胞裂解物的蛋白印迹分析

[0178] 通过标准技术,利用 4-20% SDS-PAGE 凝胶通过蛋白印迹分析检测 RdCVF1L 表达。作为对照,向外部孔添加 5 μL 体积的 MAGICMARK™ XP 标准品 (Invitrogen, Catalog No. LC5602)。在 200V 跑凝胶,直到染料到达凝胶底部。使用 Vector Laboratories 的 Vectastain ABC-Amp 蛋白印迹分析试剂盒根据制造商说明的改良版本进行蛋白印迹分析。将 SDS-PAGE 在转移缓冲液中平衡 20 分钟,利用 Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell 在 20V 将通过 SDS-PAGE 分离的蛋白转印到硝酸纤维素膜上 40 分钟。一旦完成转印,在摇臂平台上随着轻度振荡将膜在 200mL 的 1X 酪蛋白溶液中封闭,对于上清液在室温 (RT) 封闭至少 2 小时,对于细胞裂解物则在 4°C 温育过夜,再加上在室温温育 1 小时。随着轻度振荡,将膜与 50mL 在 1X 酪蛋白缓冲液中稀释 1:2,000 (上清液) 或 1:10,000 (细胞裂解物) 的兔抗-RdCVF 蛋白特异性单克隆抗体 (一抗,由 Covance (Denver, PA) 利用在大肠杆菌中制造的经纯化的 His-Tag RdCVF1L 蛋白 (Protein One, Rockville, MD)) 一起分别于 4°C 温育过夜,或于室温温育 2 小时。在室温于温和振荡下将所述膜在 30mL 的 1X 酪蛋白溶液中洗涤 4 次,每次 5 分钟。随着轻度振荡,将膜与 30mL 的在 1X 酪蛋白缓冲液中稀释 1:24,000 的生物素化羊抗兔 IgG (二抗) 在室温一起温育 1 小时。在室温于温和搅拌下将所述膜在 30mL 的 1X 酪蛋白溶液中洗涤 3 次,每次 5 分钟。将膜在 50mL 含有 100 μL 的试剂 A 和 100 μL 的试剂 B 的 1X 酪蛋白中于 Vectastain ABC-Amp 内温育 45 分钟。在室温于温和搅拌下将所述膜在 30mL 的 1X 酪蛋白溶液中洗涤 3 次,每次 5 分钟。

[0179] 将膜在 pH9.5 的 Tris 中温育。使用 6mL 的 Duolox Substrate(Vector Laboratories, Catalog No. SK6605) 并将膜暴露至胶卷盒中的 Kodak BioMax MS X 射线膜(Kodak Carestream Health, Catalog No. 8572786) 10 秒钟~ 5 分钟, 然后使用柯达显影液和柯达定影液(Kodak GBX, Catalog No. 1900984) 进行显影, 从而获得化学发光信号。

[0180] 细胞裂解物(图 2A) 中 RdCVF1L 蛋白的表达水平显示 rAAV-RdCVF1L 载体有效地转导 ARPE 细胞。更重要的是, RdCVF1L 蛋白有效地分泌到载体转导细胞的细胞培养基中(图 2B)。但是, 在 rAAV-RdCVF1L 载体转导的细胞裂解物样品中观察到具有预期分子量的两条 RdCVF1L 蛋白阳性带(图 2A, 泳道 3), 在细胞上清液样品中检测到三条此类带(图 2B, 泳道 3)。不希望受理论限制, 与细胞裂解物中分子量相同的细胞上清液(图 2B, 泳道 3) 中的两条较低分子量的带可能由培养物中某些死细胞释放。上清液中具有稍高分子量的第三条带可能表示 RdCVF1L 的分泌形式, 其在细胞裂解物中不存在。该数据还暗示三种形式的 RdCVF1L, 包括 RdCVF1L 的分泌形式, 可能经过翻译后修饰。

[0181] 总结

[0182] 通过蛋白印迹检测, RdCVF1L AAV 载体能够有效地转导人视网膜色素上皮(ARPE-19) 细胞, 引起长 RdCVF 蛋白的表达和分泌。除了较大的带之外, 在经 rAAV-RdCVF1L 载体转导的细胞裂解物样品中观察到两条不同的 RdCVFL 蛋白带。在载体转导细胞上清液中检测到三条 RdCVFL 蛋白带。其中与细胞裂解物中所看到的具有相同分子量的两条可能来自细胞培养物中的死细胞。具有稍高分子量的第三条带可能代表 RdCVF1L 的分泌形式。这些数据还暗示 RdCVF1L, 包括 RdCVF1L 的分泌形式, 可能经过翻译后修饰。

[0183] 实施例 3- 小鼠眼睛中由 AAV 载体体内表达 RdCVF1&GFP

[0184] 该研究的目的在于确定视网膜下施用 rAAV-RdCVF1L 是否能够增加小鼠眼睛的视网膜中的 RdCVF 水平。如实施例 2 中所述制备重组 AAV 血清型 2 载体 rAAV-RdCVF1L 和对照载体 rAAV-GFP。

[0185] 雌性 BALB/C 小鼠为 5~6 周龄, 购自 The Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME), 并用于本研究。在用于研究之前使动物适应最少 1 周。将它们饲养在笼中, 12 小时明-暗周期循环, 光强度 <50lux。食物和水可随意获取。实验设计列于表 1:

[0186] 表 1: 实验设计

[0187]

小鼠(BALB/c)	眼睛	视网膜下注射	评价
N=7	右眼(OD)	rAAV-RdCVF1L	蛋白印迹免疫组织化学分析
	左眼(OS)	无	
N=7	双眼(OU)	rAAV-GFP	

[0188] 在麻醉下进行视网膜下注射。用腹膜内注射 25 μ g/g ~ 30 μ g/g 氯胺酮和 5 μ g/g ~ 6 μ g/g 甲苯噻嗪的组合对动物进行麻醉。调整麻醉剂量以实现深层面的麻醉。对眼睛用局部施用 0.5% 的盐酸丙美卡因(Bausch&Lomb Inc. Rochester, NY) 处理以局部麻醉, 并用 0.3% AK-Tob(Bausch&Lomb Inc.) 处理以在即将进行程序之前消毒。用 1% 托吡卡胺(Akorn, Inc., Buffalo Grove, IL) 使瞳孔扩大。

[0189] 简言之, 将经麻醉小鼠定位在 Zeiss 操作显微镜下, 使待注射眼睛处于视野中(约

10X 放大率)。用珠宝钳对眼皮轻微施加压力,以使整个眼球向前脱出 (globe prolapse forward)。仔细剖开颞上结膜 (superior temporal conjunctiva) 以暴露巩膜。在约 11 点 (右眼) 和 1 点 (左眼) 处在角膜缘后 0.5mm 位置使用规格为 30 号的针来进行巩膜、脉络膜和视网膜的搁置穿刺。对角膜滴加 Gonak (2.5%, Akorn, Inc) 滴剂,并在角膜表面轻轻放上盖玻片,以帮助观察眼底。将连接至 5 mL 汉密尔顿注射器的规格为 33 号的钝针通过巩膜切开术沿着朝向后极的切线方向插入,而不接触放置在视网膜内表面上的透镜和针头。对视网膜穿孔,并将 1 μ L 载体注入视网膜下空间。注射后,小心撤回针,并将结膜再定位。通过评价眼底的视网膜脱落指征而确认每次注射的成功。排除显示视网膜下或玻璃体内出血的任何眼睛,以及不显示视网膜脱落 (或者起泡) 的眼睛。在温暖的毯子中使动物从麻醉中恢复的同时,对角膜施加新霉素和硫酸多链丝霉素 B 以及杆菌肽锌眼膏 (Bausch&Lomb Inc.), 以使该组织的干燥最小化。

[0190] 蛋白印迹分析

[0191] 用来自在施用 rAAV-RdCVF1L 载体后 6 周获得的经 rAAV-RdCVF1L 载体注射的眼睛和对侧未经注射的对照眼睛的蛋白提取物进行蛋白印迹。简言之,将眼球摘出,并除去眼外组织和前节。将残留的后节迅速用液氮冷冻。将这些样品于 -80°C 贮存直到用于蛋白提取。对于各眼杯,添加 200 μ L 具有蛋白酶抑制剂混合物 (Roche Diagnostics, Cat. No. 11836170001) 的冰冻的 T-PER 组织蛋白提取试剂 (Pierce, Cat. No. 78510)。对样品用 Sonic dismembrator (Fisher Scientific Model 100, Pittsburgh, PA) 在冰上超声处理 5 秒钟。将经超声处理样品保持在冰上 15 分钟,并在 4°C 以 10,000g 离心 5 分钟,以除去细胞碎片。收集上清液,并使用 Bradford 蛋白检验确定蛋白浓度。对于 RdCVFL 对照,经 rAAV-RdCVF1L 转导的 ARPE-19 细胞裂解物充当阳性对照,未经转导的细胞裂解物充当阴性对照。通过凝胶电泳分离蛋白。对于各泳道,将 36 μ g 的总蛋白加载到 4%~20% Criterion™ TGX™ Precast Gel (Bio-Rad, Cat. No. 567-1094) 上,在 200 伏进行电泳 70 分钟。使用 Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell 将蛋白电印迹到 0.2 μ m 硝酸纤维素印迹膜。使用 1X 酪蛋白溶液 (Vector Laboratories, Cat. No. SP-5020) 在室温下将印迹物封闭 2 小时,并与经 1:2,000 稀释的兔抗-RdCVFL 一抗 (Covance Research Products, Denver, PA) 或者经 1:500 稀释的兔抗视蛋白红色/绿色多克隆抗体 (Millipore, Temecula, CA) 一起温育。用 1X 酪蛋白溶液洗涤三次后,将每个印迹与 1:3,000 稀释的碱性磷酸酶山羊抗兔 IgG 抗体 (Vector Laboratories, Cat. No. AP-1000) 一起温育。使用化学发光底物检测试剂盒使蛋白带可视化。使用 β -微管蛋白 (50-kD) 作为等量蛋白加载对照。用 Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Cat. No. 46430) 将印迹物剥下,并用在 1X 酪蛋白溶液中经 1:500 稀释的抗 β -微管蛋白单克隆抗体 (Sigma-Aldrich, Cat. No. T4026) 再探测,继之以经 1:3,000 稀释的碱性磷酸酶-缀合的马抗鼠 IgG 抗体 (Vector Laboratories, Cat. No. AP-2000) 再探测。

[0192] 使用用 Kodak Imaging Station 进行的放射自显影的蛋白密度测定来将所扫描的蛋白带定量,将其相对于同一印迹中的 β -微管蛋白标准化。

[0193] RdCVF1L 蛋白的存在在接受 rAAV-RdCVF1L 注射的眼睛中被清楚地检测为分子尺寸为约 30kDa 的明显的两条免疫反应性带 (图 3)。充当阳性对照的来自用 rAAV-RdCVF1L 转导的 ARPE-19 细胞的细胞裂解物的蛋白印迹,也产生了相同尺寸的 2 条单独的蛋白

带。来自未接受视网膜下注射的对侧眼睛或来自用 rAAV-GFP 注射的眼睛的蛋白提取物,都没有产生与由抗-RdCVFL 抗体所检测类似的蛋白带(图 3)。两条免疫反应性带与在由 rAAV-RdCVF1L 转导的 ARPE-19 细胞中体外观察到的两条带类似。第三条带(可能是 RdCVF1L 的分泌形式)不存在的原因是这些体内样品是来自视网膜细胞的蛋白提取物。

[0194] 免疫组织化学分析

[0195] 在神经视网膜和 RPE-脉络膜-巩膜的整装制片中进行 RdCVF1L 免疫染色。将动物定时麻醉,并将眼睛摘出,立即在 4℃ 固定于在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 7.4 (1X) 液 (Gibco, Cat. No. 10010-031) 的 4% 多聚甲醛中。在摘出之前将各小鼠眼睛用印度墨在角膜的下象限进行标记。通过在莱卡解剖显微镜下除去前节而制备眼杯。在下象限制制造小切口以用于定向。从 RPE 仔细剖下视神经视网膜,在视神经处切断。用 1X PBS 将整装制片冲洗 3 次,在室温用在 2% Triton X-100 的 PBS 溶液中的 5% 驴血清封闭 2 小时。在除去封闭液后,将整装制片与在封闭液中 1:1,000 的一抗即兔抗-RdCVF 于 4℃ 一起温育过夜,然后与二抗即在 2% Triton X-100 的 PBS 溶液中的 1:1,000 的 ALEXA FLUOR® 488 驴抗兔在室温下一起温育 2 小时。用 PBS 最后冲洗后,将各整装制片用平铺在载玻片上,对于视神经视网膜而言感光体朝上,对于 RPE-脉络膜-巩膜而言 RPE 朝上。然后用配备有数码相机 (Spot RT Color 2.2.1, Diagnostic Instruments, Inc) 和荧光显微镜的奥林巴斯 BX51 显微镜对平置片进行检查。

[0196] 免疫组织化学确认了在经 rAAV-RdCVF1L 载体注射的眼睛中的 RdCVF1L 蛋白的表达增加。在经 rAAV-RdCVF 注射的眼睛中的 RPE 细胞中观察到强健的 RdCVF1L 免疫染色(图 4A),但在未经注射的对侧眼睛中未观察到(图 4)。仅在聚焦区域看到 RdCVF1L 的表达增加,覆盖率约每个眼睛的四分之一,表明表达仅限于来自视网膜下注射的起泡区。未被一抗染色的样品不显示任何免疫反应性(图 4C)。该蛋白的表达的显著增加也在经 rAAV-RdCVF1L 注射眼睛的感光细胞(图 5A)中观察到。在平置片固定的视神经视网膜的感光体外节中看到强烈的 RdCVF1L 染色。阳性染色再次仅位于视网膜的聚焦区,覆盖率约视网膜的 10%~30%。在未经注射的对侧眼睛中仅存在背景染色(图 5B)。在未经一抗处理的样品中未发现免疫反应性(图 5C)。

[0197] 小鼠眼睛中的 GFP 表达

[0198] 为了确定所测试 AAV 载体是否能够有效地转导小鼠眼睛中的 RPE 和感光细胞,将一组小鼠 ($n = 7$) 用 rAAV-GFP 视网膜下注射,并在 6 周后处死。分离 RPE-脉络膜-巩膜和视神经视网膜,并在载玻片上平置。荧光显微镜揭示了 RPE 和感光层中的强健的 GFP 表达(数据未示出)。表达 GFP 的 RPE 细胞铺展到平置片的 1-2 个象限,在注射位置存在具有最大数量和最强健的 GFP 表达细胞。所转导的 RPE 细胞似乎是健康的,因为它们保持了它们的六角形外观。在平铺的视神经视网膜中,在感光体外节中鉴定出 GFP 表达。偶尔内部视网膜细胞,例如神经节细胞,是 GFP 阳性的,可能是由于在视网膜下注射后载体泄漏到玻璃体中。

[0199] 总结

[0200] 该研究证明了在成功的视网膜下注射后 rAAV-RdCVF1L 载体对 RPE 和感光细胞的有效转导。由该载体递送的 RdCVF1L 表达构建体引起小鼠眼睛中 RdCVF1L 蛋白的水平显著增加。

[0201] 实施例 4- 腺相关病毒载体介导的长形式 RdCVF 的表达对 rd10 小鼠眼睛中的感光体存活的影响

[0202] 该研究的目的在于确定编码 RdCVF1L 的基于 AAV 的基因治疗载体的视网膜下施用是否能够促进 rd10 小鼠中的感光体存活,所述 rd10 小鼠为人遗传视网膜变性的天然存在的动物模型。rd10 小鼠为天然存在的用于常染色体隐性视网膜色素变性 (RP) 的动物模型。Rd10 小鼠在视杆细胞 cGMP 磷酸二酯酶基因中具有错义点突变,导致感光细胞的凋亡 (Chang 等 (2007) Vision Res47 :624-633)。视杆感光细胞在 18 天龄时开始变性,峰值感光体死亡出现在 P25 (Gargini 等 (2007) J Comp Neurol 500 :222-238)。到 5 周大多数感光细胞已经变性 (Chang 等 (2002) Vision Res42 :517-525 ;Chang 等 (2007) Vision Res47 :624-633 ;Gargini 等 (2007) J Comp Neurol500 :222-238)。令人感兴趣的是,已经发现在黑暗中饲养 rd10 小鼠延缓了感光体变性,最长达 4 周 (Chang 等 (2007) Vision Res47 :624-633),表明光照射可以促进感光体死亡。另一方面,通过将这些小鼠保持在黑暗中而延迟的感光体变性能够将载体需要的治疗性时间窗延长至治疗性转基因表达的时间,例如来自 AAV 的足够转基因表达通常需要约 3 周。

[0203] 饲养的成对的 4 ~ 5 周龄的同源近交系的 rd10 小鼠,购自 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME),并且在动物设施中饲养。将它们圈养在笼子中,12 小时光 - 暗周期,光强度 <50lux。食物和水随意获取。如下所述的手术后,将幼鼠及其母亲保持在黑暗中,知道它们在 3 周龄时断奶。然后将所有动物转移回到之前的 12 小时光 - 暗周期的房间。实验设计为表 2。

[0204] 表 2 :实验设计

[0205]

小鼠(rd10)	眼睛	视网膜下注射	评价
N=12	OD	rAAV-RdCVF1L	视网膜组织 视锥细胞形态/数量
	OS	无	

[0206] 通过降低体温将动物 (在出生后第 3 天) 麻醉。对于新生小鼠和至多 5 天龄的大鼠而言该麻醉方法已经良好地建立,并且对于在这些动物中的时间短的小手术过程 (5 分钟 ~ 15 分钟) 是合适的。将幼鼠放置在碎冰上 3 ~ 4 分钟。在该时间期间,幼鼠的颜色从粉红色改变为苍白色。在该类型的麻醉下进行视网膜下注射。

[0207] 将经麻醉小鼠定位在 Zeiss 操作显微镜下,使待注射眼睛位于观察下 (约 10X 放大率)。用 5% 聚烯吡酮碘对眼睑和相邻区域消毒。通过使用虹膜剪将睑裂分离而暴露眼睛。用珠宝钳对眼皮轻微施加压力,以使眼球向前脱出。提供 0.3% 托普霉素 (Bausch&Lomb Inc.) 的滴剂用于消毒。在约 11 点 (右眼) 位置在角膜缘后约 0.5mm 使用规格为 30 号的针来进行巩膜、脉络膜和视网膜的搁置穿刺。将连接至 5 μ L 汉密尔顿注射器的规格为 33 号的钝针通过巩膜切开术沿着朝向后极的切线方向插入。将针尖放在视网膜下空间中,将 1 μ L 的 AAV 载体注入视网膜下空间中。注射后,将针缓慢撤回。从研究中排除显示视网膜下或玻璃体内出血的任何眼睛。对角膜施加新霉素和硫酸多链丝霉素 B 以及杆菌肽锌眼膏 (Bausch&Lomb Inc.),以防止感染和使该组织的死亡最小化。在温暖的热垫上使动物恢复。

[0208] 视网膜组织学

[0209] 将小鼠深度麻醉,并将它们的眼睛在上象限用红色组织染料标记以便定向。然后

将它们处死,并立即摘出眼睛并在室温固定于 Davidson 氏固定剂中约 24 小时。在乙醇和 Clear-rite 中连续脱水后,将眼睛包埋在石蜡中 (Fisher Sci., Houston, TX)。沿着中央经线切成 $5\mu\text{m}$ 厚度的视网膜切片,以允许检查上下视网膜。将切片用苏木精和曙红染色,并在光学显微镜 (Olympus BX51) 下观察。外核层 (ONL) 厚度通过对中央和外周视网膜中的核的行数进行计数而进行评价。还检查了感光体形态。

[0210] 在第 5 周龄时评估经处理的 rd10 小鼠眼睛的结构挽救的程度。光学显微镜显示了与未经处理的对侧眼睛相比,在经 AAV-RdCVF1L 处理的眼睛中外核层 (ONL) 明显保存。通常,经 RdCVF1L 载体处理的视网膜在上和 / 或下区域中拥有 2 行至 5 行的感光体核,在相同位置在未经处理的对侧眼睛中拥有 1 行至 2 行 (图 7)。挽救不限于所注射区域上象限,因为在下象限也观察到该保护。形态测定分析显示,在经载体处理的眼睛中约 75% 的视网膜得到保护,而在未经处理的眼睛中约 34% 得到保护。一些受保护的感光体甚至拥有内节和外节 (图 7E)。值得注意的是,所挽救的感光体既含有视杆细胞也含有视锥细胞。

[0211] 视锥细胞感光体染色和计数

[0212] 使用花生凝集素 (PNA) (一种视锥细胞特异性标记物) 来将视网膜的整装制片 (wholemout preparation) 染色。在摘出之前将小鼠眼睛在角膜的上象限用印度墨标记,并在颞侧象限 (temporal quadrant) 处用红色染料染色。立即将它们于 4°C 在 4% 多聚甲醛中固定至少过夜。通过在莱卡解剖显微镜下除去前节而制备眼杯。在上方象限 (superior quadrant) 制备小切口以用于定向。沿着外周进行 4 次径切后,将整个视神经视网膜仔细地从前节下。用 1X PBS 将视网膜冲洗 3 次,用具有 0.2% Triton-X100 的 PBS (Gibco, Cat. No. 10010-031) 中的 6% 的胎牛血清 (BSA) 溶液在室温封闭 30 分钟。除去封闭液后,使视网膜与凝集素 PNA 缀合物 Alexa Fluor594 (在 PBS 中 1:250, Invitrogen Corp, Chicago, IL) 一起于 4°C 温育过夜。用 PBS 最后冲洗后,将各视网膜平铺在载玻片上,感光体朝上。然后用配备有数码相机 (Spot RT Color2.2.1, Diagnostic Instruments, Inc) 和荧光显微镜的奥林巴斯 BX51 显微镜对视网膜整装制片进行检查。

[0213] 为了评估视网膜整装制片中的视锥细胞密度,在分别距离视神经头边缘 1mm 和 2mm 处从各视网膜象限用 60X 物镜拍摄 2 副照片。用 Image Pro Plus 软件 (Media Cybernetics, Inc. Bethesda, MD) 对各图像 ($390\times 293\mu\text{m}$) 中呈现的视锥的数量进行计数。

[0214] 对于一些眼睛,用莱卡低温切片 (Leica Microsystems, Model CM1850, Leica, Bannockburn, IL) 切割视网膜冷冻切片 ($12\mu\text{m}$ 厚度),并用 PNA 染色,用前述荧光显微镜进行检查。

[0215] 在平铺的视神经视网膜中通过 PNA 标记鉴定视锥感光细胞,该 PNA 标记选择性地对视锥细胞内节和外节染色。荧光显微镜显示,在未经处理的眼睛中,特别是在后中央视网膜,例如视神经头周围有视锥细胞的严重变性。视锥细胞丧失外节,并且它们的内节是短、钝和无规则的。与之相反,经载体处理的眼睛具有更大的视锥密度,少得多的紊乱视锥节以及更加均匀的视锥染色 (数据未示出)。在更高放大率下,对 PNA 阳性视锥细胞在距离视神经头 1mm 和 2mm 位置处在所有 4 个象限进行计数。经载体处理的眼睛的视锥密度定量与未经处理的对侧眼睛相比显示出显著更高数量的视锥感光体: $181\pm 46.4\text{v. s. }50\pm 25.2$ 个视锥/ 0.114mm^2 , $p = 0.001$ 。

[0216] RdCVF 免疫组织化学

[0217] 在神经视网膜和 RPE- 脉络膜 - 巩膜的整装制片中进行 RdCVF 免疫染色。用 1XPBS 将整装制片冲洗 3 次, 在室温用在 PBS 溶液中 5% 驴血清和 2% Triton X-100 封闭 2 小时。在除去封闭液后, 将整装制片与在封闭液中 1:1,000 的一抗即兔抗 -RdCVF 于 4℃ 一起温育过夜, 并连续与在 PBS 中二抗即 1:1,000 的 Alexa Fluor® 488 驴抗兔和 2% Triton X-100 在室温下一同温育 2 小时。用 PBS 最后冲洗后, 将各整装制片用平铺在载玻片上, 对于视神经视网膜而言感光体朝上, 对于 RPE- 脉络膜 - 巩膜而言 RPE 朝上。然后用配备有数码相机 (Spot RT Color2.2.1, Diagnostic Instruments, Inc) 和荧光显微镜的奥林巴斯 BX51 显微镜对平置片进行检查。

[0218] 在 6 只经 rAAV-RdCVF1L 注射的眼睛中的 5 只的 RPE 细胞中观察到强健的 RdCVF 免疫反应性 (来自 1 只眼睛的代表性实例参见图 6A), 但在未经处理的对侧眼睛中未看到 (图 6B)。接受 rAAV-RdCVF1L 注射的一只眼睛由于是小眼球而从分析中排除。在聚焦区中看到 RdCVF1L 的有效表达, 扩展到每只眼睛的约 1.5 ~ 3 个象限。表达 RdCVF1L 的 RPE 细胞保持了典型的六角形形态 (图 6E), 表明载体施用或 RdCVF1L 表达对 RPE 没有明显的负面影响。与 RdCVF1L 的 RPE 表达类似, 该蛋白的免疫反应性的有效表达还在经 rAAV-RdCVF1L 注射的眼睛的神经视网膜中观察到 (图 6C)。在未经注射的对侧眼睛中无染色 (图 6D)。在 5 只眼睛中的 3 只, 特别在内 / 外节的感光细胞中清楚地看到强烈的 RdCVF1L 染色 (图 6F)。在其它 2 只眼睛中缺乏 RdCVF 免疫反应性可能归因于感光体变性。同样, 阳性染色仅局部位位于视网膜的聚焦区。在未经处理的对侧眼睛中不能观察到可检测的 RdCVF1L 表达, 表明内源性 RdCVF1L 的水平可能低于免疫组织化学染色的检出限。

[0219] 总结

[0220] 该研究证明在 rd10 小鼠眼睛中 rAAV-RdCVF1L 载体的视网膜下注射引起 RPE 和感光细胞的有效转导以及强健的 RdCVF1L 蛋白表达。更重要的是, 在视网膜色素变性 (RP) 的该临床相关动物模型中该载体增加了视杆和视锥感光体存活, 并改善了视锥形态。

[0221] 实施例 5 rAAV-RdCVF1L 的视网膜下注射在 rd10 小鼠中保护远离注射位置的感光细胞

[0222] 为了检查 rAAV-RdCVF1L 挽救感光细胞是否能够延伸至远离注射位置的区域, 在出生后 3 天将 rAAV-RdCVF1L (1 μ L, 2×10^8 GC) 视网膜下注射到 rd10 小鼠右眼的上象限中, 使用未注射对侧眼睛作为对照。在 5 周时将小鼠处死。检查整个眼杯的视网膜组织学。图 8 显示了来自代表性 5 周大 rd10 小鼠的眼杯的光学显微照片, 所述小鼠在 1 只眼睛接受视网膜下注射 rAAV-RdCVF1L (小图 A, 图 8), 而对侧眼睛不接受处理 (小图 B, 图 8)。请注意在经处理和未经处理眼睛之间 ONL 厚度的差异。在经 rAAV-RdCVF1L 处理的眼睛的整个视网膜中清楚地观察到感光体保护 (小图 A, 图 8)。对上视网膜的注射位点进行标记。与之相反, 在未经处理的对侧眼睛中大多数感光细胞丢失, 除了在下部外周视网膜中之外 (小图 B, 图 8)。

[0223] 实施例 6 rAAV-RdCVF1L 的视网膜下注射保护视杆感光细胞

[0224] 为了检查 rAAV-RdCVF1L 是否可以挽救视杆感光细胞 (除了视锥感光细胞之外), 在出生后第 3 天对 rd10 小鼠的右眼视网膜下注射 rAAV-RdCVF1L (1 μ L, 2×10^8 GC), 以未经注射的对侧眼睛作为对照。在 5 周时将小鼠处死。对视网膜组织进行视紫质免疫组织化学染色。用 DAPI (二脒基 -2- 苯基吡啶, 蓝色) 对切片进行复染色, 以帮助鉴定视网膜层。

[0225] 在经 rAAV-RdCVF1L 处理的眼睛中感光细胞的节层和核层中都观察到视紫质的强健的表达（数据未示出）。但是，在未经处理的细胞中仅少量细胞显示了视紫质染色（数据未示出）。

[0226] 实施例 7 - 在 Rd10 小鼠中由腺相关病毒载体介导的 RdCVFL 对感光体的功能挽救

[0227] 该研究的目的在于评估在 rd10 小鼠中通过 AAV 载体递送的 RdCVF 对视网膜功能和结构的保护性效果。对 3 或 4 天龄的新生 rd10 小鼠在一只眼睛中视网膜下注射 rAAV-RdCVFL 载体，而对侧眼睛不处理。视网膜下注射 5 周后，用视网膜电图（ERG）测试小鼠来评价视网膜功能。ERG 后，将小鼠处死，对它们的眼睛进行处理以用于视网膜的组织学评估。

[0228] 如实施例 2 中所述制备重组 AAV 血清型 2 载体 rAAV-RdCVF1L 和对照载体 rAAV-GFP。

[0229] 饲养的成对的 4 ~ 5 周龄的同源近交系的 rd10 小鼠，购自 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)，并且在发明人的动物设施中饲养。将它们圈养在笼中，12 小时光 - 暗周期，光强度 <50lux。食物和水随意获取。手术后，将幼鼠及其母亲保持在黑暗中，直至它们在 3 周龄时断奶。然后将所有动物转移回到之前的 12 小时光 - 暗周期的房间。实验设计列于表 3。

[0230] 表 3

[0231]

小鼠(rd10)	眼睛	视网膜下注射	评价
N=13	OD	rAAV-RdCVF1L	ERG 视网膜组织学
	OS	无	

[0232] 将动物麻醉，并如上实施例 4 中所述进行视网膜下注射。

[0233] 实验前使小鼠适应黑暗过夜（至少 14 小时），并将它们的瞳孔用 0.5% 托吡卡胺（Alkorn）的滴眼剂扩大。通过腹膜内注射氯胺酮和甲苯噻嗪诱导麻醉。银针电极充当参照（额部）和接地（尾），DTL 环电极充当活性电极。施加 Gonesol 以确保良好的电接触，并且在整个过程中保持眼睛含水。记录建立特征为 Espion E3 视网膜电图系统的 Ganzfeld 碗、DC 放大器和基于计算机的控制以及记录单元（Diagnosys LLC, Lowell, MA）。在将小鼠放置在 Ganzfeld 碗中后，从两只眼睛同时记录 ERG。在黑暗适应（适暗）和光适应（适光）条件下获得单次闪光和闪烁记录。随着强度从 10^{-2} cdfs/m² 增加达到 25 cdfs/m²，给出单次闪光记录刺激。对 5 次响应取平均，刺激间的间隔为 5 或 17 秒。闪烁刺激的强度为 3 cdfs/m²，频率为 2、5、10、15 和 30 Hz。使用提供的背景发光为 30 cdfs/m² 进行光适应 10 分钟，以达到稳定水平的适光响应。为了比较平均振幅，使用学生配对 t 检验。

[0234] 将小鼠深度麻醉，并将它们的眼睛在上象限用红色组织染料标记以定向。然后将它们处死，并立即摘出眼睛并在室温固定于 Davidson 氏固定剂中约 24 小时。在乙醇和 Clear-rite 中连续脱水后，将眼睛包埋在石蜡中（Fisher Sci., Houston, TX）。沿着中央经线切成 5 μ m 厚度的视网膜切片，以允许检查上下视网膜。将切片用苏木精和曙红染色，并在光学显微镜（Olympus BX51）下观察。外核层（ONL）厚度通过对中央和外周视网膜中的核的行数进行计数而进行评价。还检查了感光体形态。

[0235] 结果**[0236] 经 rAAV-RdCVF1L 处理的眼睛中视网膜功能的挽救**

[0237] 如所预期的,在 5 周龄时,与年龄匹配的野生型 C57BL/6 小鼠相比,rd10 小鼠在 ERG 记录中显示暗适应 (scotopic) 和光适应 (photopic) 响应的显著减少。但是,在 rd10 小鼠 ($n = 8$) 中,在暗适应背景下在闪光强度为 25cd 时,与未经处理的同组眼相比 ($11.5 \pm 8.4 \mu V$),用 rAAV-RdCVF1L 处理的眼睛显示了 b-波振幅增加约 3 倍 ($33.6 \pm 14 \mu V$) (图 10A 和 10B)。在该条件下,记录了视杆细胞和视锥细胞响应。统计分析显示在经 rAAV-RdCVF1L 处理的眼睛和对照眼睛中 ERG 振幅的显著差异 ($p = 0.025$)。由于可能在新生阶段的眼内手术导致的角膜混浊、白内障或小眼球,将一些动物 ($n = 5$) 从 ERG 测试中排除 (在 ERG 测试前排除)。

[0238] 经 rAAV-RdCVF1L 处理的眼睛中感光体的结构保护

[0239] 为了确定在 rd10 小鼠中经 rAAV-RdCVF1L 处理的眼睛中 ERG 响应的增加是否与感光体细胞的结构保护相关,在进行 ERG 后立即将动物处死。对它们的眼睛进行组织学评价。光学显微镜显示了与未经处理的对侧眼睛相比,在经 AAV-RdCVFL 处理的眼睛中外核层 (ONL) 明显保存。通常,经 RdCVF1L 载体处理的视网膜在上和 / 或下区域中拥有 2 行~4 行的感光核,而在未经处理的对侧眼睛中拥有 1 行~2 行 (图 11A 和 11B)。感光体保护不限于所注射区域上象限,因为在下象限也观察到该保护。一些受保护的感光体甚至拥有内节和外节。形态学分析显示,与对照眼睛 (1.2 ± 0.2) 相比,在经处理眼睛中的 ONL 行数显著增加 (2.5 ± 1.0) ($p = 0.006$) (图 12)。

[0240] 总结

[0241] ERG 证明了与未经处理的同组眼 ($11.5 \pm 8.4 \mu V$) 相比,在经 rAAV-RdCVF1L 处理的眼睛中 b 波振幅显著增加 ($33.6 \pm 14 \mu V$)。ERG 振幅的增加与视网膜结构的改善相关。该研究证明了在 Rd10 小鼠中视网膜下注射 rAAV-RdCVF1L 载体显著地改善了视网膜功能并延迟了感光体变性。

序列表SEQ ID NO: 1 - Igk 信号肽序列和重编码的 rdCVF1L 编码序列 (-ATG)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCGGCCAG
CCGGCCAGGCGCGCCGTACGAAGCTTGGTACCCGCCAGCCTGTTACGCGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGA
CCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTTGGCGCCG
GAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTCTTTGTGAGGCTGACCGACGAGTTCTACGTG
CTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAGGACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTGAAGGA
CATGCCAAGAAGTGGCTGTTCTGCCCTTCGAGGACGACCTGAGAAGAGACCTGGGCAGGCAGTTCAGCGTGGAGA
GACTGCCCCGCGTGGTGGTGTGAAGCCTGATGGCGACGTGCTGACCAGAGATGGCGCCGACGAGATCCAGAGACTG
GGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCTGGACAGAACTTCCAGCTGCCCCAGGATCTGGA
GGATCAGGAGCCCAGATCCCTGACCGAGTGCCTGAGGCGGCACAAGTACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCGGCA
GAGACCCTGGCGGCGGAGGAGGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCTGA

SEQ ID NO:2 - 重编码的 RdCVF1L, 具有 Igk 信号肽序列 (-Met)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRAVRSLVPASLFSGRILIRNSDQDELDTEAEVSRRLLENRLVLLF
FGAGACPQCQAFVPIKDFVRLTDEFYVLRAAQLALVYVSQDSTEEQQDLFLKDMPKKWLFLPFEDDLRRDLGRQF
SVERLPAVVVLKPDGDLTRDGADEIQRLGTACFANWQEAAEVLDRNFQLPEDLEDQEPRSLTECLRRHKYRVEKAA
RGGRDPGGGGGEEGGAGGLF

SEQ ID NO:3 - Igk 信号肽序列和重编码的 RdCVF1L 编码序列 (+ATG)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCGGCCAG
CCGGCCAGGCGCGCCGTACGAAGCTTGGTACCCATGGCCAGCCTGTTACGCGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAG
CGACCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTTGGCG
CCGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTCTTTGTGAGGCTGACCGACGAGTTCTAC
GTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAGGACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTGAA
GGACATGCCAAGAAGTGGCTGTTCTGCCCTTCGAGGACGACCTGAGAAGAGACCTGGGCAGGCAGTTCAGCGTGG
AGAGACTGCCCCGCGTGGTGGTGTGAAGCCTGATGGCGACGTGCTGACCAGAGATGGCGCCGACGAGATCCAGAGA
CTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCTGGACAGAACTTCCAGCTGCCCCAGGATCT
GGAGGATCAGGAGCCCAGATCCCTGACCGAGTGCCTGAGGCGGCACAAGTACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCG
GCAGAGACCCTGGCGGCGGAGGAGGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCTGA

SEQ ID NO:4 - 重编码的 RdCVF1L, 具有 Igk 信号肽序列 (+Met)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRAVRSLVPMASLFSGRILIRNSDQDELDTEAEVSRRLLENRLVLL
FFGAGACPQCQAFVPIKDFVRLTDEFYVLRAAQLALVYVSQDSTEEQQDLFLKDMPKKWLFLPFEDDLRRDLGRQ
FSVERLPAVVVLKPDGDLTRDGADEIQRLGTACFANWQEAAEVLDRNFQLPEDLEDQEPRSLTECLRRHKYRVEKA
ARGGRDPGGGGGEEGGAGGLF

SEQ ID NO:5 - QPCR CMV 引物GGCGGAGTTGTTACGACATSEQ ID NO:6 - QPCR CMV 引物GGGACTTTCCTACTTGGA

SEQ ID NO:7 - 天然 RdCVFL 编码区

ATGGCCTCCCTGTTCTCTGGCCGCATCCTGATCCGCAACAATAGCGACCAGGACGAGCTGGATACGGAGGCT
GAGGTCAGTCGCAGGCTGGAGAACC GGCTGGTGCTGCTGTTCTTTGGTGCTGGGGCTTGTCACAGTGCCAGGCCTT
CGTGCCCATCCTCAAGGACTTCTTCGTGCGGCTCACAGATGAGTTCTATGTACTGCGGGCGGCTCAGCTGGCCCTGG
TGTACGTGTCCCAGGACTCCACGGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCCCTCAAGGACATGCCAAAGAAATGGCTTTTCCTG
CCCTTTGAGGATGATCTGAGGAGGGACCTCGGGCGCCAGTTCTCAGTGAGCGCCTGCCGGCGGTGCTGGTGCTCAA
GCCGGACGGGGACGTGCTCACTCGCGACGGCGCCGACGAGATCCAGCGCCTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGC
AGGAGGCGGGCGAGGTGCTGGACCGCAACTTCCAGCTGCCAGAGGACCTGGAGGACCAGGAGCCACGGAGCCTCACC
GAGTGCTGCGCCGCCACAAGTACCGCTGGA AAAAGGCGGCGGAGGCGGGCGGACCCCGGGGAGGGGGTGGGGA
GGAGGGCGGGGCCGGGGGGCTGTTCTGA

SEQ ID NO:8 - pAAV-SRd269

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTGCGGCCG
ACGCGTGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTAC
ATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT
CCATAGTAACGTCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTA
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCA
GTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGT
TTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAAT
GGGAGTTTGTGGTGGACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCATTGACGCAATGGGC
GGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC
ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGATTCTGAATCCCGGCCGGGAACGGTGC
ATTGGAACGCGGATTCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAAATGCTTT
CTTCTTTTAATATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTACGGGCAATAATGATA
CAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTTCTAAAGAAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCT
GCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTGTGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCT
ACCATTTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATG
TTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGA
ATTGGGATTCTGAACATCGATTGAATTCGAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGG
GTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCGGCCAGCCGGCCAGGCGCGCCGTACGAAGCTTGGTACCCGCCAGCCTGTTTCCAG
CGGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGA
ACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTTGGCGCCGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTT
TTTGTGCGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAGGACAGCAC
CGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTGAAGGACATGCCCAAGAAGTGGCTGTTCTTCCCTTCGAGGACGACCTGCGGA
GATGACGAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGT
GCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGT
GGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGC
TGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCC
CGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTTACCA

TATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAG
GCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCTTCTGATTTTGTAGGTAACCACGTGCGGACCGAGCGGCCGAGGAACCC
CTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACG
CCCCGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTC
TCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTA
GCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCGCTCCTTTCGCTTTC
TTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATT
TAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAAATTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA
CGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAAC
CCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTA
ACAAAAATTTAACGGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTG
ATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCA
TCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCACTACCGAAACGCGC
GAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTG
GCACTTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATG
AGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCT
TATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAG
ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAA
GAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGA
GCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG
ATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACA
ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGA
ACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCA
AACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCA
GGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG
CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA
CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTT
TACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAA
TCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTT
CTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTG
CCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCT
AGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC
CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAG
CGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA
GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAA
CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGA
CTTGAGCGTCGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
GTTCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT

SEQ ID NO:9 - pAVTLrRd055

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCA
ATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGA
ACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTA
CGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCC
CCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTA
GGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCG
TCCCATTGCGCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGC
GAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG
CCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTGT
GGATCCCCCGGGATCCCGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACG
TATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTT
GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATT
ATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTG
ATGCGGTTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGA
CGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGC
AAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAACCATATCTTCACTCTGTACTTCAGCTCGTGTAGCTCA
TTAGCTCCGAGCTCCCCAACCTACAGCCTGAGAGGCACTGGCTCGGTTGGGTAGCCAGCCTTTCCGGTAATAAAGGC
TTGTTGGCATTGCGCATCTACCCGTGCCTCCTGTCTTGTCTTACTCGAGCGAACCACAACTCCGTCTGTGCTGAGCT
CACAGCTCGCGGGGCGGTGAAGAACACCCAAACAGTTGGCGCCCAACGTGGGGCTGAGTAAGAGAGACTCGGCTCGAG
TAAAAGAAGACCCAGCTCGAACGAGAAGACTCCGGACAGGTGAGTAGTTGCGTGTGTTTTCCCGGGGTGAAGAGAAGG
GAGTTAGAAAAGAAGCTTCGTAAGGTTAGGGTGACACCCCAACAGGATAAATATTATACTATAGGGAATCTTCAATG
GGCCATTAGAATCACGTGATGCATCGATAAAATAAAAAAGAGGGGGAATAGGGGGCCATACACCATATGAAATATAC
CTAGAATCAGAACATACCAAAATACCAAGACCAACTAGAACAAACAATTTTCAAAACAAAAAATTGAAAAGTGGTGTTA
CGTAAGGAACAGAAGAAAGGAATGGAAAGGACCCTACAAAGTGTGTGGGACGGAGACGGGGCAGCAGTAATAGAGG
AGAATTGCTGGATTCTTGTAAGGTCCCCAGCTATGGGTTTGTGGTAGTAAATGACACAGATACACCACCATCCCTC
CGCATCCGAAAGCCTCGAGCAGTCGGACTAGCAATATTCCTGCTTGTGCTGGCTATCATGGCCATCACATCCTCCTT
GGTGGCAGCTACAACGCTCGTGAACCAGCACACGACGGCTAAGGTTGTGGAGAGGGTTGTGCAAAATGTGTATATA
TTGCTCAAACCCAGGACCAATTCACCCACCTGTTTCAAGGAATATAAACAAACAGATTAAATGTCCTACACCATAGAGTT
TCATACTTGGAGTGTACACTTAATGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGGATCAAGGTTAGGAA
CAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAG
TTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGAT
GGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAA
ATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTC
TATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAG
ACACCGACTCTAGAGGATCCACCGGTGCGCACTTAAGGCCTGCAGCTAGCGCCACCATGGCCAGCCTGTTTACGCGGC
CGGATCCTGATTGCGAACAAACAGCGACCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAGGTGTCCAGGAGACTGGAGAACAG
GCTGGTGCTGCTGTTCTTTGGCGCCGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTCTTTG
TGAGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAGGACAGCACCGAG

GAGCAGCAGGACCTGTTCTGAAGGACATGCCCAAGAAGTGGCTGTTCTGCCCTTCGAGGACGACCTGAGAAGAGA
CCTGGGCAGGCAGTTCAGCGTGGAGAGACTGCCCGCCGTGGTGGTGCTGAAGCCTGATGGCGACGTGCTGACCAGAG
ATGGCGCCGACGAGATCCAGAGACTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCCTGGACAGA
AACTTCCAGCTGCCCCGAGGATCTGGAGGATCAGGAGCCCAGATCCCTGACCGAGTGCCTGAGGCGGCACAAGTACAG
AGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCGGCAGAGACCTGGCGGCGGAGGAGGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCT
GATGAGCTAGCACCGTTGTACAAGTCAAGCGGCCAACCCCTCCCTAGATCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAAT
TTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGT
ATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAG
TTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGC
CACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCCTGCC
TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAGCTGACGTCCTTT
CCATGGCTGCTCGCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCC
AGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTC
GGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGTTTCGCCTTCTAGGAACTCCTTTGGGACATCTTCCGCCACGCTCCT
ATTTTAACTTAAAGGGTGGACTGTGGGGCAGGGTGGGACCTCAGGACAACAGCAGCCCCCGGACTTCCCATATGT
GTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAATCTGTACTTCAGCTCGTGTAGCTCATTAGCTCCGAG
CTCCCCAACCTACAGCCTGAGAGGCACTGGCTCGGTTGGGTAGCCAGCCTTTCGGGTAATAAAGGCTTGTGTCATT
CGGCATCTACCCGTGCCTCCTGTCTTGCTTACTCGAGCGAACCCACAACCTCCGTCTGCTGAGCTCACAGCTCGCG
GGGCGGTGAAGAACACCCAACAGATATATACTGTCAACATCCCATTTGGTAGCTTATGTTCTAGACAAGATTCTCAA
CAAATTCTTCCCCCTGAATGTTTATTTAAAAAACAACCTACTAGGGCTCTGTGCATATGTAAGTGAGATCCT
TATTAGCAGGAGAACAGCAATAAGATATTATTACATTACAATATTAATCCTAGGGTATTATAATGCAAGGCCATTA
TCACATACTTGGCTAACAGGGTCCATACTGTTGTAATGTATTAAAACCAGACTGAGTAATAAAATTGACAACAATAT
AATCATCATCTTTGTTATAGGTGGGGGCATTTTTCAGATGAGGTCTCAGAGCACCTGCCAAGCATGGACCTCGAGGG
GGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT
CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGGAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGC
CTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGC
TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGAC
TCGCTGCGCTCGGTGCTTGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATC
AGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGG
CGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA
GGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGG
ATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT
AGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCCACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT
CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG
GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCT
GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGC
GGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC
GGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT
AGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAA

TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTA
GATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACGGGCTC
CAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATC
CAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGC
TACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTA
CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCA
GTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGAC
TGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGG
ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGG
ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCAC
CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAA
TACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA
TGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

SEQ ID NO:10 – pAAV-LRd268

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
GTGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCG
ACGCGTGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTAC
ATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT
CCATAGTAACGTCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGCGAGTA
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCA
GTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGT
TTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAAT
GGGAGTTTGTGTTTGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAATGGGC
GGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC
ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGATTTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTGC
ATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAAATGCTTT
CTTCTTTTAATATACTTTTTTGTGTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTACGGGCAATAATGATA
CAATGTATCATGCCTCTTTGCACCAATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCT
GCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCT
ACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATG
TTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGA
ATTGGGATTTCGAACATCGATTGAATTCGAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGG
GTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCGGCCAGCCGGCCAGGCGCGCGTACGAAGCTTGGTACCCGCCAGCCTGTTTCAG
CGGCCGATCCTGATCAGGAACAACAGCGACCGAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGA
ACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTTGGCGCCGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTT
TTTGTGAGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAGGACAGCAC
CGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTGAAGGACATGCCCAAGAAGTGGCTGTTCTGCCCCTTCGAGGACGACCTGAGAA
GAGACCTGGGCAGGCAGTTTCAGCGTGAGAGACTGCCCGCCGTGGTGGTGTGAAGCCTGATGGCGACGTGCTGACC
AGAGATGGCGCCGACGAGATCCAGAGACTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCCTGGA

CAGAAACTTCCAGCTGCCCCGAGGATCTGGAGGATCAGGAGCCCAGATCCCTGACCGAGTGCCTGAGGCGGCACAAGT
ACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCGGCAGAGACCCCTGGCGGCGGAGGAGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTG
TTCTGATGAGCTAGCACC GGTTGTACAAGTCAAGCGGCCAACCCCTCCCTAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCC
CTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCTTAATAAAATTAAGTTGCA
TCATTTTGTCTGACTAGGTGTCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGG
AAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAAT
CTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGC
TCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCTAATCTCAG
GTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCTTCTGAT
TTTGTAGGTAACACGTGCGGACCGAGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC
TCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGC
GAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATA
CGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC
GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCC
CCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTG
ATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTT
TTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGAT
TTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAA
CGTTTACAATTTTATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCA
ACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAG
CTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTAT
AGGTAAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATT
TGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTG
AAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTT
TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTG
GATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT
GCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATG
ACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC
ATAACCATGAGTGATAAACA CTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT
GCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGC
GTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCC
CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTG
GTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCA
TTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGT
TCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGC
TTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGT
AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGATGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA ACT

CTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT
ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCC
CAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
GCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT

SEQ ID NO: 11 - rAAV-RdCVF1L 载体基因组 DNA 序列

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
GTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCG
ACGCGTGGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTAC
ATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT
CCATAGTAACGTCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCA
GTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGT
TTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCTCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAAT
GGGAGTTTGTGGTGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGC
GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC
ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCCTCCGCGGATTTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTGC
ATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAAATGCTTT
CTTCTTTTAATATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTTCAGGGCAATAATGATA
CAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCT
GCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAACCTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCT
ACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATG
TTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGA
ATTGGGATTTCGAACATCGATTGAATTCGAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGG
GTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCGGCCAGCCGGCCAGGCGCGCCGTACGAAGCTTGGTACCCGCCAGCCTGTTTTCAG
CGGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGA
ACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTTGGCGCCGGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTT
TTTGTGAGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAGGACAGCAC
CGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTGAAGGACATGCCCAAGAAGTGGCTGTTCTGCCCCTTCGAGGACGACCTGAGAA
GAGACCTGGGCAGGCAGTTACGCGTGAGAGACTGCCCGCCGTGGTGGTGTGAAGCCTGATGGCGACGTGCTGACC
AGAGATGGCGCCGACGAGATCCAGAGACTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCCTGGA
CAGAACTTCCAGCTGCCCCAGGATCTGGAGGATCAGGAGCCCAGATCCCTGACCGAGTGCCTGAGGCGGCACAAGT
ACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCGGCAGAGACCCTGGCGGCGGAGGAGGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTG
TTCTGATGAGCTAGCACC GTTGACAAGTCAAGCGGCCAACCTCCCTAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCC
CTCCCCAGTGCTCTCTCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCTTAATAAAATTAAGTTGCA
TCATTTTGTCTGACTAGGTGTCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGG
AAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAAT
CTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGC

TCAGCTAATTTTGTGTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCTAATCTCAG
GTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCTTCTGAT
TTTGTAGGTAACCACGTGCGGACCGAGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC
TCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAAGGTCGCCCAGCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGC
GAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

SEQ ID NO:12 - 重编码的 RdCVF1L 编码区域(实施例 1)

ATGGCCAGCCTGTTTACGCGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCC
GAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTTGGCGCCGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTT
CGTGCCCATCCTGAAGGATTTCTTTGTGAGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGG
TGTATGTGAGCCAGGACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCCCTGAAGGACATGCCCAAGAAGTGGCTGTTCTGT
CCCTTCGAGGACGACCTGAGAAGAGACCTGGGCAGGCAGTTCAGCGTGGAGAGACTGCCCGCCGTGGTGGTGCTGAA
GCCTGATGGCGACGTGCTGACCAGAGATGGCGCCGACGAGATCCAGAGACTGGGCAACGCCTGCTTCGCCAACTGGC
AGGAGGCCGCCGAGGTCCTGGACAGAACTTCCAGCTGCCCGAGGATCTGGAGGATCAGGAGCCAGATCCCTGACC
GAGTGCCTGAGGCGGCACAAGTACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCGGCAGAGACCCTGGCGGCGGAGGAGGAGA
GGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCTGA

SEQ ID NO: 13 天然 RdCVF1S 编码序列

ATGGCCTCCCTGTTCTCTGGCCGCATCCTGATCCGCAACAATAGCGACCAGGACGAGCTGGATACGGAGGC
TGAGGTCACTCGCAGGCTGGAGAACCGGCTGGTGCTGCTGTTCTTTGGTGCTGGGGCTTGTCCACAGTGCCAGGCC
TTCGTGCCCATCCTCAAGGACTTCTTCGTGCGGCTCACAGATGAGTTCTATGTACTGCGGGCGGCTCAGCTGGCCC
TGGTGATCGTGTCACGAGACTCCACGGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCCCTCAAGGACATGCCAAAGAAATGGCTTTT
CCTGCCCTTTGAGGATGATCTGAGGAGGTGA

SEQ ID NO: 14 - 重编码的 RdCVF1S 编码区域 (实施例 1)

ATGGCCAGCCTGTTTACGCGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGACGAGCTGGACACCGAGGC
CGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTTGGCGCCGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCC
TTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTCTTTGTGCGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCC
TGGTGATGTGAGCCAGGACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCCCTGAAGGACATGCCCAAGAAGTGGCTGTT
CCTGCCCTTCGAGGACGACCTGCGGAGATGA

SEQ ID NO: 15 - 人 Igκ 链序列

LLWVLLLWVPGSTGD

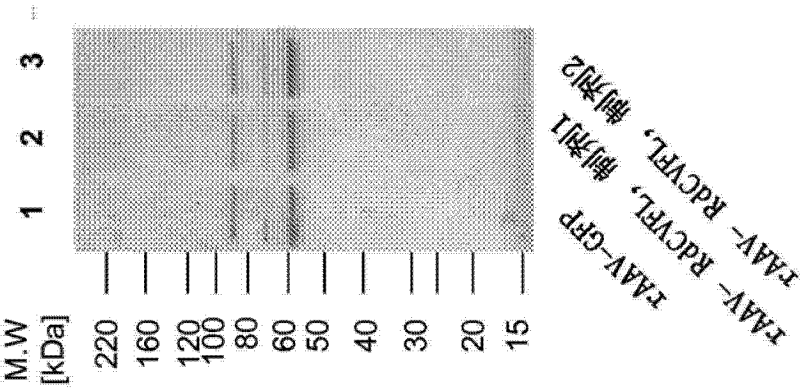


图 1

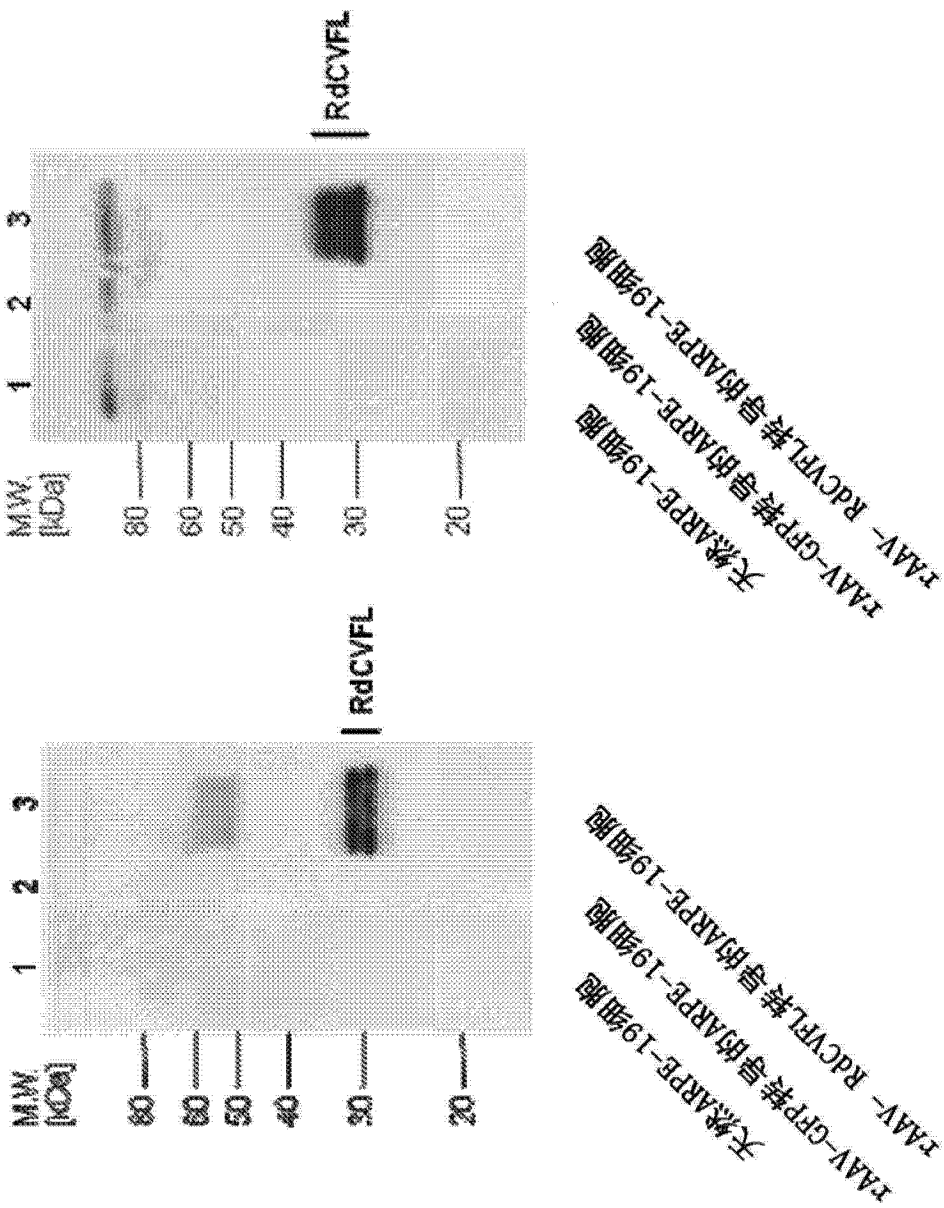


图2B

图2A

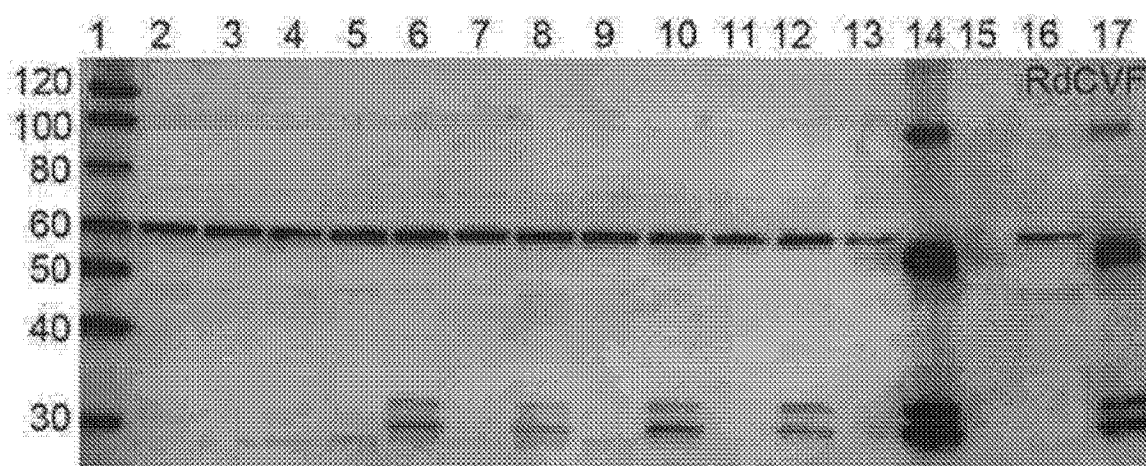


图 3

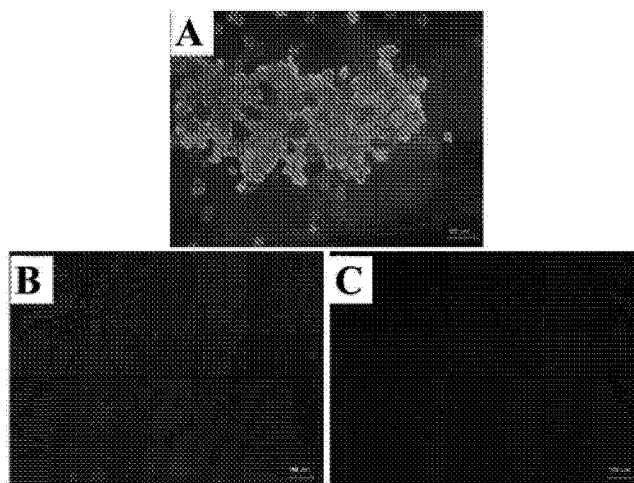


图 4

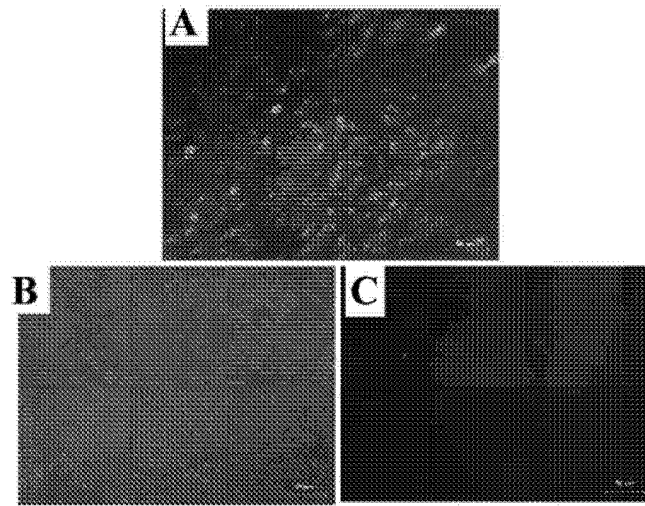


图 5

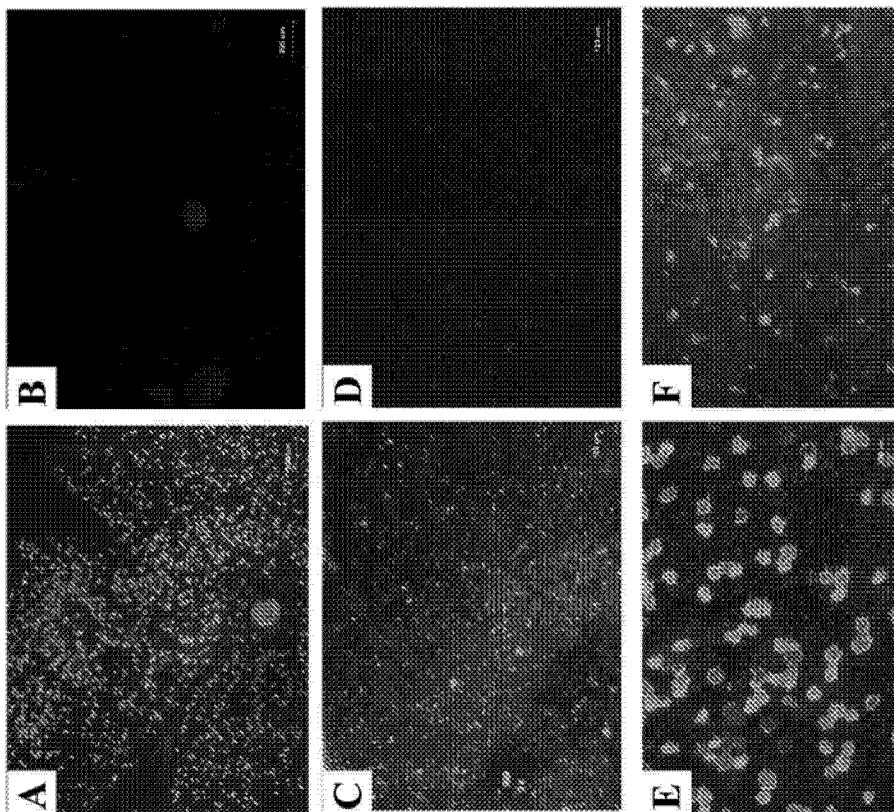


图 6

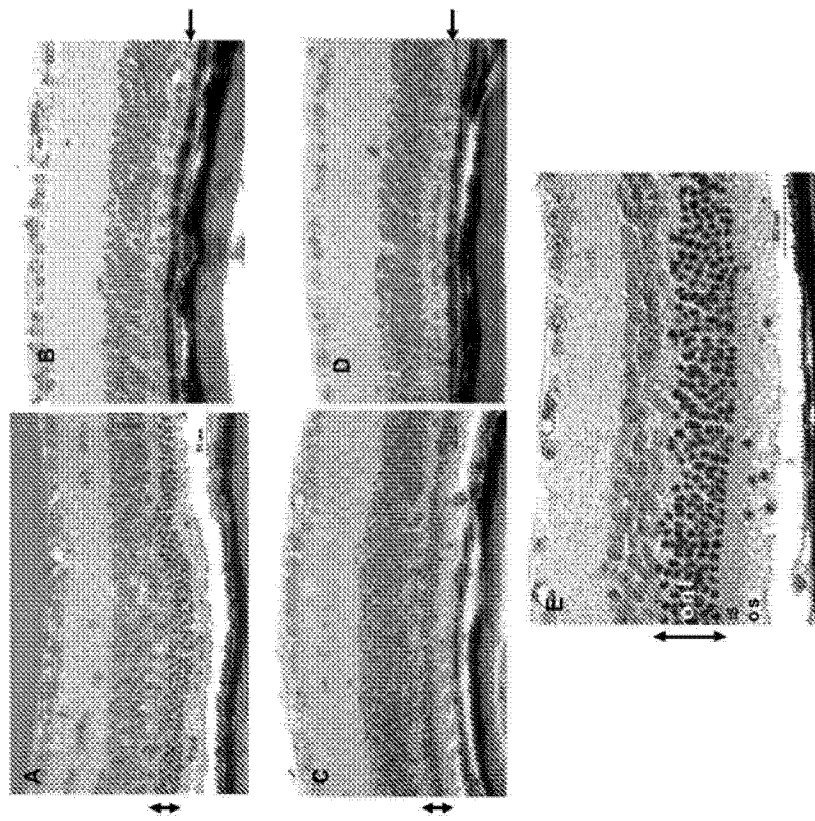


图 7

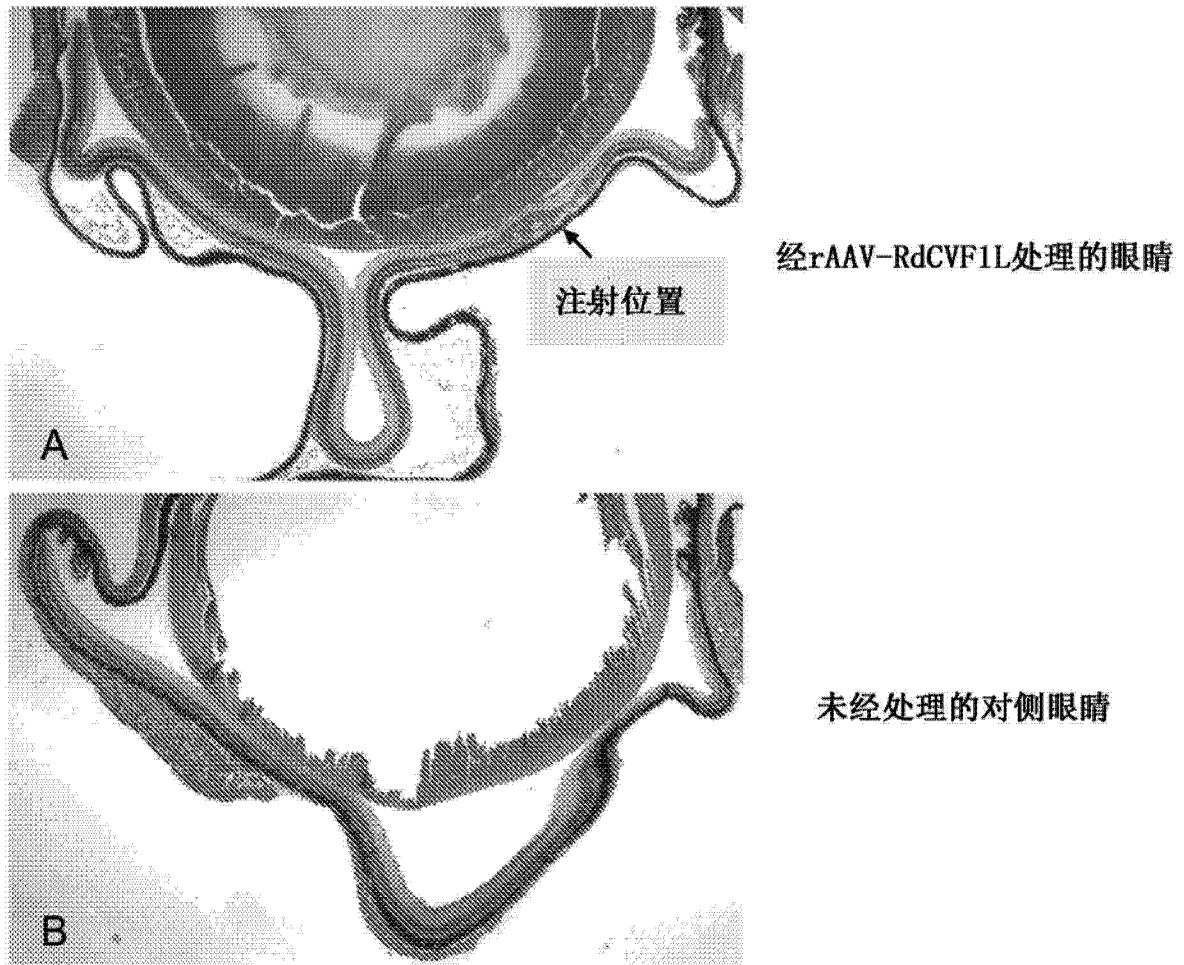


图 8

rAAV-RdCVF1L 2788 bp DNA 线性

参考 1 (碱基 1 到 2788)

特征 位置/限定符

misc_feature 1..141
/基因="ITR"
/产物 ="AAV 左 ITR"
/SECDrawAs=" 区域 "

CDS 150..812
/基因="CMV 启动子 "
/产物 ="CMV 启动子 "
/SECDrawAs=" 基因 "

CDS 820..1312
/基因="内含子 "
/产物 ="人β珠蛋白内含子 "
/SECDrawAs=" 基因 "

misc_feature 1319..1326
/基因="MCS"
/产物 ="多克隆位点"
/SECDrawAs=" 区域 "

CDS 1340..2080
/基因="IgG-k RdCVFL"
/产物 ="IgG-k 加 RdCVFL"
/SECDrawAs=" 基因 "

misc_feature 2085..2129
/基因="MCS"
/产物 ="多克隆位点"
/SECDrawAs=" 区域 "

misc_feature 2130..2608
/基因="多聚A"
/产物 ="多聚A"
/SECDrawAs=" 区域 "

misc_feature 2648..2788
/基因="ITR"
/产物 ="AAV 右 ITR"
/SECDrawAs=" 区域 "

起点

1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag ccggggcgctc
61 gggcgacett tggtcgccc gectcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca
121 actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgtggagc tagttattaa tagtaatcaa
181 ttacgggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa
241 atggcccgcg tggtgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg
301 ttcccatagt aacgtcaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tattttacggt
361 aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg

图 9

```
421 tcaatgacgg taaatggccc gectggcatt atgccagta catgacctta tgggactttc
481 ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggtttttggc
541 agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca
601 ttgacgtcaa tgggagtttg ttttgcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa
661 caactccgcc ccattgacgc aaatgggagg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag
721 cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct
781 ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcggattc gaatcccggc cgggaacggg
841 gcattggaac gcggattccc cgtgccaaaga gtgacgtaag taccgcctat agagtctata
901 ggcccacaaa aaatgctttc ttcttttaat ataacttttt gtttatctta tttctaatac
961 tttccctaatt ctctttcttt cagggaata atgatacaat gtatcatgcc tctttgcacc
1021 attctaaaga ataacagtga taatttctgg gttaaggcaa tagcaatatt tctgcatata
1081 aatatttctg catataaatt gtaactgatg taagagggtt catattgcta atagcagcta
1141 caatccagct accattctgc ttttatttta tgggtgggat aaggctggat tattctgagt
1201 ccaagctagg cccttttgct aatcatgttc atacctctta tcttctccc acagctcctg
1261 ggcaacgtgc tggctgtgt gctggcccat cactttggca aagaattggg attcgaacat
1321 cgattgaatt cgagccacca tgggacaga cacactctg ctatgggtac tgctgctctg
1381 ggttccaggt tccactgggt acgcggccca gccggccagg cgcgcgtac gaagcttggg
1441 acccgccagc ctgttcagcg gccggatcct gatcaggaac aacagcgacc aggacgagct
1501 ggacaccgag gccgaagtga gcaggaggct ggagaacaga ctggtgctgc tgttctttgg
1561 cgccggagcc tgcctcagt gccaggcctt cgtgcccatc ctgaaggatt tctttgtgag
1621 gctgaccgac gagttctacg tgctgagagc cgcccagctg gccctggtgt atgtgagcca
1681 ggacagcacc gaggagcagc aggacctgtt cctgaaggac atgcccaaga agtggtgtt
1741 cctgcccttc gaggacgacc tgagaagaga cctgggcagg cagttcagcg tggagagact
1801 gcccgccgtg gtggtgctga agcctgatgg cgacgtgctg accagagatg gcgcgacga
1861 gatccagaga ctgggcaccg cctgcttcgc caactggcag gaggccgccg aggtcctgga
1921 cagaaacttc cagctgcccg aggatctgga ggatcaggag ccagatccc tgaccgagtg
1981 cctgaggcgg cacaagtaca gagtggagaa ggccgccaga ggccgagag accctggcgg
2041 cggaggagga gaggaggcgg gagccggcgg actgttctga tgagctagca ccggttgtac
2101 aagtcaagcg gccaacctc cctagatcta cgggtggcat ccctgtgacc cctccccagt
2161 gcctctcctg gccctggaag ttgccactcc agtgcccacc agccttgtcc taataaaatt
2221 aagttgcac attttgtctg actaggtgtc cttctataat attatggggg ggaggggggt
2281 ggtatggagc aaggggcaag ttgggaagac aacctgtagg gcctgcgggg tctattggga
2341 accaagctgg agtgcagtgg cacaatcttg gctcactgca atctccgct cctgggttca
2401 agcgattctc ctgcctcagc ctcccgagtt gttgggattc caggcatgca tgaccaggct
2461 cagctaattt ttgttttttt ggtagagacg gggtttcacc atattggcca ggctggtctc
2521 caactcctaa tctcaggtga tctaccacc ttggcctccc aaattgctgg gattacaggc
2581 gtgaaccact gctcccttcc ctgtccttct gatthttgtag gtaaccacgt gcggaccgag
2641 cgccgcgagg aacctctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc
2701 actgaggccg ggcgacccaa ggtcgcccga cgcccgggct ttgcccgggc gccctcagtg
2761 agcgagcgag cgcgcagctg cctgcagg (SEQ ID NO:11)
```

//

图9(续)

用AAV-RdCVFL处理的5周龄Rd10小鼠的ERG响应

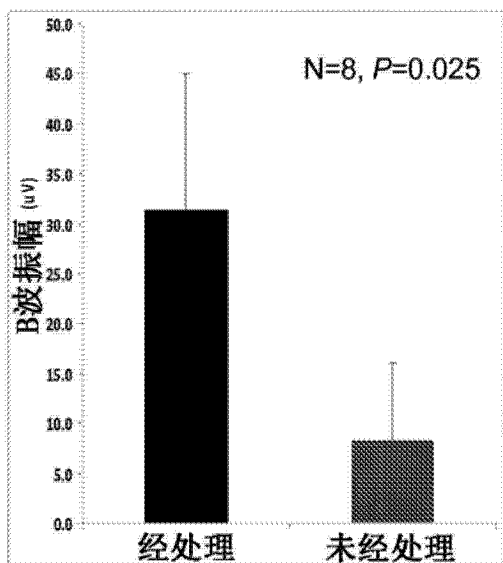


图10A

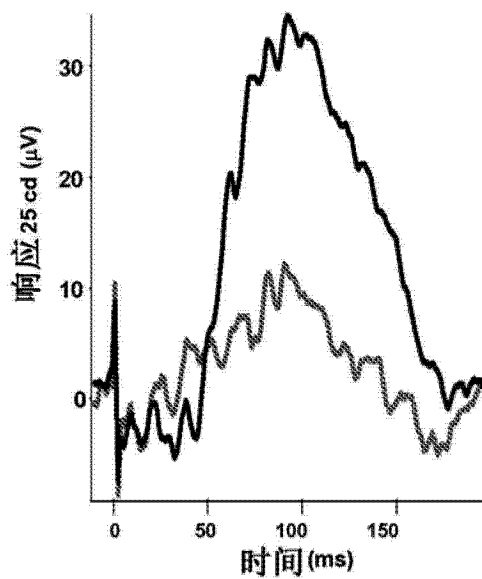


图10B

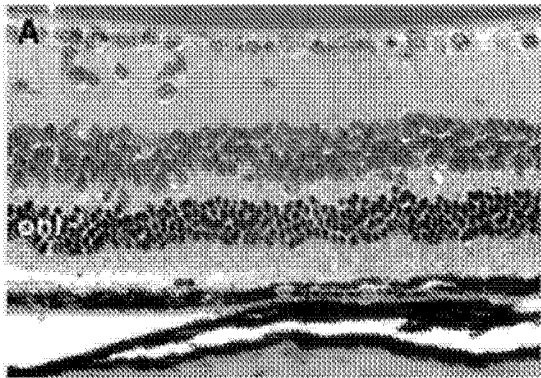


图 11A

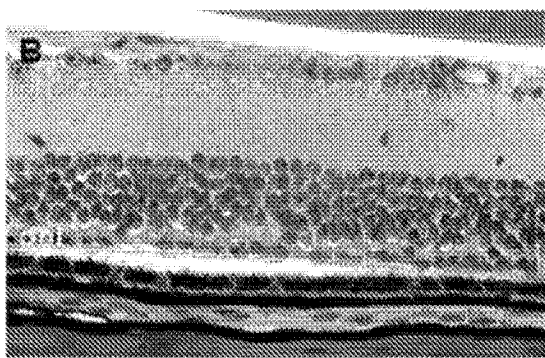


图 11B

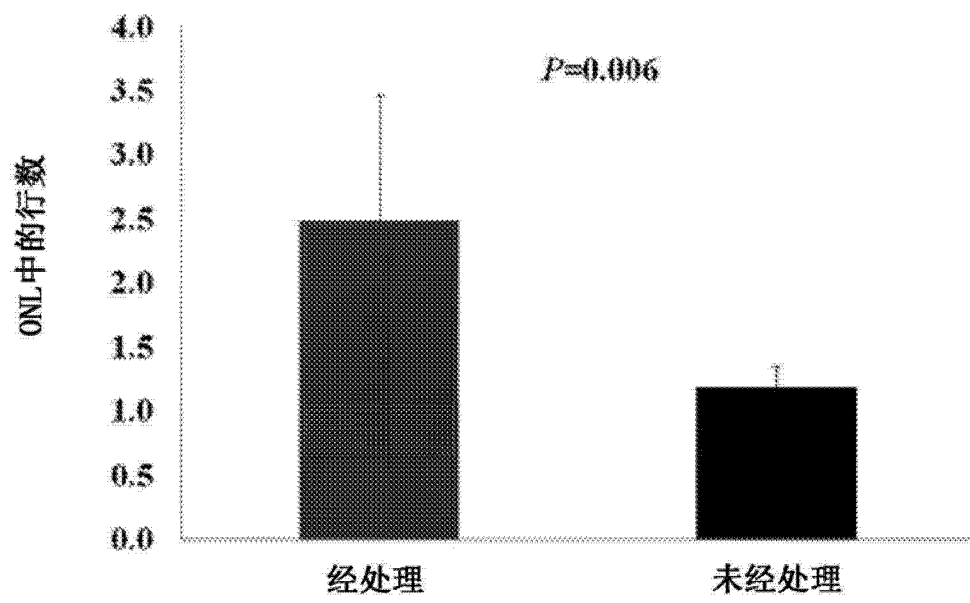


图 12