



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119585299 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 07

(21) 申请号 202180039494.2

(22) 申请日 2021.10.18

(30) 优先权数据

2016463.8 2020.10.16 GB

2104148.8 2021.03.24 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2021/052689 2021.10.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/079453 EN 2022.04.21

(71) 申请人 吉尔奥科普治疗有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 J·乔伊 J·埃斯特韦-鲁德

L·塔姆 S·埃利斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 黄革生 隋晓平

(51) Int.Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书3页 说明书89页 附图20页

(54) 发明名称

编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核酸及其用于年龄相关性黄斑变性的治疗的用途

(57) 摘要

本发明涉及一种产品,其包含(i)抗VEGF实体;和(ii)补体负调节剂,或编码其的核苷酸序列,作为组合制剂,用于同时、分别或依次在治疗中使用。

1. 分离的多核苷酸,其包含编码(i)抗VEGF实体和(ii)补体负调节剂的核苷酸序列。
2. 根据权利要求1所述的分离的多核苷酸,其中所述抗VEGF实体选自Ig融合蛋白、抗体、多肽、肽、非抗体支架、反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、CRISPR向导链和适体。
3. 根据权利要求2所述的分离的多核苷酸,其中所述抗VEGF实体选自阿柏西普、雷珠单抗、贝伐珠单抗、布洛赛珠单抗和哌加他尼。
4. 根据权利要求3所述的分离的多核苷酸,其中所述抗VEGF实体是阿柏西普,例如其中阿柏西普由包含SEQ ID NO:3至11中任一个的多核苷酸序列编码。
5. 根据前述任一权利要求所述的分离的多核苷酸,其中所述补体负调节剂选自补体因子I (CFI)、补体因子H样蛋白1 (FHL1)、补体因子H (CFH)。补体受体1型 (CR1)、膜辅蛋白 (MCP)、补体衰变加速因子 (DAF)、MAC-抑制蛋白 (MAC-IP)、C1-抑制物、过敏蛋白抑制物、C4b结合蛋白 (C4BP)、聚集素、玻连蛋白或其变体或片段。
6. 根据权利要求5的分离的多核苷酸,其中所述补体负调节剂选自CFI和FHL1或其变体或片段。
7. 根据权利要求3至6中任何一项所述的分离的多核苷酸,其中编码阿柏西普的核苷酸序列与SEQ ID NO:11具有至少75%的序列同一性。
8. 根据权利要求6或7所述的分离的多核苷酸,其中编码CFI的核苷酸序列与SEQ ID NO:35或36具有至少75%的序列同一性,或者编码FHL-1的核苷酸序列与SEQ ID NO:41具有至少75%的序列同一性。
9. 根据权利要求3至8中任一项所述的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:45至54的核苷酸序列,或与之具有至少75%序列同一性的核苷酸序列。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸小于或等于4.7kb。
11. 载体,其包含权利要求1至10中任一项的分离的多核苷酸。
12. 权利要求11的载体,其中所述载体是腺相关病毒 (AAV) 载体,任选地其是病毒载体颗粒的形式,优选地其是包含AAV2基因组和AAV2或AAV8衣壳蛋白的AAV载体颗粒。
13. 药物组合物,其包含权利要求1至12中任一项的分离的多核苷酸或载体与药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂相结合。
14. 权利要求1至13中任一项的分离的多核苷酸、载体或药物组合物用于治疗。
15. 权利要求1至14中任一项的分离的多核苷酸、载体或药物组合物,用于治疗或预防眼睛的补体介导的病症,例如年龄相关性黄斑变性 (AMD)、糖尿病视网膜病变、青光眼、Stargardt病、中心性浆液性脉络膜病变、色素性视网膜炎、息肉样脉络膜血管病变、糖尿病黄斑水肿、视网膜分支静脉阻塞或葡萄膜炎,优选AMD。
16. 根据权利要求15所述的分离的多核苷酸、载体或药物组合物用于治疗或预防,其中所述AMD是湿式AMD和/或干式AMD。
17. 根据权利要求15所述的分离的多核苷酸、载体或药物组合物用于治疗或预防,其中 i) AMD是湿性AMD,且所述使用进一步防止和/或治疗受试者中干性AMD的发病,或ii) AMD是干性AMD,且所述使用进一步防止和/或治疗受试者中湿性AMD的发病,或iii) 所述使用同时防止和/或治疗干性AMD和湿性AMD。
18. 根据权利要求17的分离的多核苷酸、载体或药物组合物用于治疗或预防,其中AMD

是湿性AMD,并且所述使用进一步防止和/或治疗受试者中干性AMD的发病。

19. 根据权利要求15至18中任一项的分离的多核苷酸、载体或药物组合物用于治疗或预防,其中:

(i) 地理萎缩的形成被防止或减少,和/或地理萎缩的总量被减少,或其中地理萎缩的进展被延缓;

(ii) 相对于同期未治疗的眼睛,在对受试者的被治疗眼给药后的12个月内,地理萎缩面积的增加至少减少10%;或

(iii) 施用所述分离的多核苷酸、载体或药物组合物增加受试者中或受试者的眼睛中(诸如视网膜色素上皮细胞(RPE)中)的C3b灭活和iC3b降解活性水平,任选地增加到超过受试者或其眼睛或RPE中的正常水平。

20. 根据权利要求15至19中的任一项的分离的多核苷酸、载体或药物组合物用于治疗或预防,其中i) 新生血管被防止或减少,ii) 血管渗漏被防止或减少和/或iii) 视网膜水肿被防止或减少。

21. 根据权利要求15至20中任何一项的分离的多核苷酸、载体或药物组合物用于治疗或预防,其中所述多核苷酸、载体、细胞或药物组合物通过眼内给药,例如通过视网膜下、直接视网膜、脉络膜上或玻璃体内注射。

22. 一种产品,其包含(i) 抗VEGF实体;和(ii) 补体负调节剂,或编码其的核苷酸序列,作为组合制剂用于i) 同时、分别或依次用于治疗湿性AMD中,且其中所述使用进一步防止和/或治疗受试者中干性AMD的发病;或ii) 同时、分别或依次用于治疗干性AMD中,且其中所述使用进一步防止和/或治疗受试者中湿性AMD的发病,或iii) 同时、分别或依次用于同时治疗和/或预防干性AMD和湿性AMD。

23. 根据权利要求22所述的产品用于治疗用于同时、分别或依次用于治疗湿性AMD中,其中所述使用进一步防止和/或治疗受试者中干性AMD的发病。

24. 根据权利要求22或23所述的产品用于治疗,其中抗VEGF实体选自Ig融合蛋白、抗体、多肽、肽、非抗体支架、反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、CRISPR向导链和适体,优选地其中抗VEGF实体选自阿柏西普、雷珠单抗、贝伐珠单抗、布洛赛珠单抗和哌加他尼。

25. 根据权利要求22至24中任一项的产品用于治疗,其中所述补体负调节剂选自补体因子I(CFI)、补体因子H样蛋白1(FHL1)、补体因子H(CFH)。补体受体1型(CR1)、膜辅蛋白(MCP)、补体衰变加速因子(DAF)、MAC-抑制蛋白(MAC-IP)、C1-抑制物、过敏蛋白抑制物、C4b结合蛋白(C4BP)、聚集素、玻连蛋白或其变体或片段,优选地,其中补体负调节剂选自CFI或FHL1或其变体或片段。

26. 产品,其包含(i) 抗VEGF实体;和(ii) 因子I,或编码其的核苷酸序列的产品,作为组合制剂用于同时、分别或依次作为药物使用。

27. 根据权利要求26所述的产品用于用作药物,用于治疗或预防补体介导的眼部病症,如年龄相关性黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变、青光眼、Stargardt病、中心性浆液性脉络膜病变、色素性视网膜炎、息肉样脉络膜血管病变、糖尿病黄斑水肿、视网膜分支静脉阻塞或葡萄膜炎,优选AMD。

28. 根据权利要求22至27中任一项所述的产品用于所述用途,其中:

(i) 地理萎缩的形成被防止或减少,和/或地理萎缩的总量被减少,或其中地理萎缩的

进展被延缓；

(ii) 相对于同期未治疗的眼睛,在对受试者的被治疗眼给药后的12个月内,地理萎缩面积的增加至少减少10%；或

(iii) 施用所述分离的多核苷酸、载体或药物组合物增加受试者中或受试者的眼睛中(诸如视网膜色素上皮细胞(RPE)中)的C3b灭活和iC3b降解活性水平,任选地增加到超过受试者或其眼睛或RPE中的正常水平。

29. 根据权利要求22至28中任一项所述的产品用于所述用途,其中i) 新生血管被防止或减少,ii) 血管渗漏被防止或减少和/或iii) 视网膜水肿被防止或减少。

编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核酸及其用于年龄相关性 黄斑变性的治疗的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及用于基因治疗的药剂。特别是,本发明涉及抗VEGF实体和补体负调节剂(negative complement regulator)的组合,或编码其的核苷酸序列,以及它们在治疗或预防补体介导的和补体相关的病症中的用途,包含补体介导的眼病,诸如年龄相关性黄斑变性(AMD)。

[0002] 发明背景

[0003] 黄斑是眼睛视网膜上的一个小区域,尺寸约为3至5毫米,与视神经相邻。它是视网膜上最敏感的区域,并且包含中央凹,后者是低陷的区域,提供了高视觉灵敏度,并包含密集的视锥细胞,即负责色觉的光感受器。

[0004] 年龄相关性黄斑变性(AMD)是发达国家50岁以上人群功能性失明的最常见原因(Seddon, J.M., Epidemiology of age-related macular degeneration. 在Ogden, T.E.等编辑, Ryan S.J., 主编的Retina第二卷, 第三版, St. Louis, Mo: Mosby; 2001: 1039-1050中)。湿性AMD与起源自脉络膜血管系统并延伸到视网膜下空间的新生血管形成有关。此外, AMD的特征是视网膜、视网膜色素上皮(RPE)和底层脉络膜(underlying choroid, 位于RPE下方、在视网膜和巩膜之间的高度血管化组织)逐渐变性。

[0005] 各种因素, 包含氧化压力、可能有自身免疫成分的炎症、遗传背景(如突变)以及环境或行为因素诸如吸烟和饮食, 都可能促进AMD的发病机制。

[0006] 根据黄斑部的变化, AMD的临床进展表征为多个阶段。早期AMD的特点是出现玻璃膜疣, 这是视网膜下细胞外碎片的堆积, 在临床检查中和在眼底照片上显示为视网膜上的黄色斑点。玻璃膜疣按大小可分为小(<63微米)、中(63-124微米)和大(>124微米)。根据眼底检查时它们的边缘的外观, 它们也会被视为是硬性的或软性的。硬性红斑具有清晰分明的边缘, 而软性红斑则有不太明确的、流动的边缘。年龄相关性眼病研究(AREDS)眼底照相严重性量表是用于这种病情的主要分类系统之一。

[0007] AMD被分为“干性”和“湿性”(渗出性或新生血管性)两种形式。干性AMD的典型特征是RPE层的细胞、上覆的光感受器细胞、以及经常也有脉络膜毛细血管层的底层细胞的逐步凋亡。RPE细胞死亡的密集区域伴随着上覆光感受器的萎缩, 被称为地理萎缩, 这代表了干性AMD的晚期阶段。患有这种形式的AMD的患者, 其中央视力会出现缓慢和渐进的恶化。

[0008] 湿性AMD的特点是从RPE下面的脉络膜血管(脉络膜毛细血管层)生长到黄斑部的视网膜下空间的异常血管出血和/或漏液, 这可能是导致视力突然丧失的原因。据估计, 患者的大部分视力损失是由于这种脉络膜新生血管(CNV)及其继发性并发症造成的。新生血管性AMD的一个亚型被称为视网膜血管瘤性增生(RAP)。这里, 血管瘤性增生起源于视网膜, 并向后延伸到视网膜下间隙, 最终在某些情况下与脉络膜新血管相通。也已知息肉样脉络膜血管病变(PCV)会发生。

[0009] 目前湿性AMD的治疗方案主要是一些针对血管内皮生长因子(VEGF)途径的疗法。这种VEGF靶向疗法的实例包含适体派加他尼(N Engl J Med (2004) 351:2805-2816)和抗

体,如雷珠单抗(N Engl J Med(2006) 355:1432-1444)、阿柏西普(aflibercept, BMJ (2014) 98:i17-i21)和贝伐珠单抗(BMJ(2010) 340:c2459)。然而,并不是所有的患者都对抗VEGF抗体的治疗有响应,他们要么没有恢复视力,要么进展到登记失明。也有报道称,每月治疗所取得的视敏度(visual acuity, VA)收益会增量式下降(Singer等;Ophthalmology; 2012;119(6);1175-83)。

[0010] 此外,有证据支持抗VEGF疗法与地理萎缩的进展之间存在关联(Gemenetza等; Eye; 2017;31;1-9, Enslow等;Ophthalmology and Eye Diseases; 2016;8;21-32&Sadda等; Ophthalmology; 2020;127(5);648-659)。

[0011] 还需要一种治疗策略,以减少病人的药物负担,解决依从性和/或用药不足的问题。

[0012] 因此,本领域对治疗眼疾(诸如AMD)的新方法有重大需求。

[0013] 发明概述

[0014] 在不希望受到理论约束的情况下,本发明——至少部分地——基于这样的见解,即在靶向通常与“湿性”AMD相关的潜在机制的同时,靶向通常与“干性”AMD相关的机制可能是有利的。此外,本发明至少部分地基于考虑到针对一种AMD形式的治疗可能会影响到另一种。

[0015] 在第一方面,本发明提供了一种产品,包含(i)一种抗VEGF实体;和(ii)一种补体负调节剂,或编码其的核苷酸序列,作为组合制剂,同时、单独或顺序地用于治疗。

[0016] 在一个实施方案中,所述产品可以是一种或多种多核苷酸,它们之中编码(i)抗VEGF实体;和(ii)补体负调节剂。

[0017] 因此在一个优选的实施方案中,提供了编码抗VEGF实体和补体负调节剂的多核苷酸。

[0018] 优选地,所述多核苷酸是编码抗VEGF实体和补体负调节剂的双顺反子多核苷酸。

[0019] 具体地,申请人已经提供了可用于向病人递送抗VEGF实体和补体负调节剂两者的载体。具体地,申请人已经成功地设计了功能性AAV载体,其可以良好的滴度生产,并包含编码抗VEGF实体和补体负调节剂两者的核苷酸序列。

[0020] 所述抗VEGF实体可选自Ig融合蛋白、抗体、适体(aptamer)、多肽、肽、多核苷酸(例如靶向VEGF基因序列或其mRNA的序列的反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、CRISPRi引导链,其序列针对VEGF基因序列)和非抗体支架。适当地,抗VEGF实体选自阿柏西普(aflibercept)、雷珠单抗(ranibizumab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、布洛赛珠单抗(brolucizumab)和哌加他尼(pegaptanib)或其片段或变体。

[0021] 补体负调节剂可选自补体因子I(CFI)、补体因子H样蛋白1(FHL1)、补体因子H(CFH)、补体受体1型(CR1)、膜辅因子蛋白(MCP)。补体衰变加速因子(DAF)和MAC抑制蛋白(MAC-IP)、C1抑制物、过敏毒素抑制物、C4b结合蛋白(C4BP)、聚集素(clusterin)、玻连蛋白(vitronectin)或其片段或变体。

[0022] 在一些实施方案中,所述多核苷酸进一步包含编码CMV启动子或鸡 β -肌动蛋白启动子的核苷酸序列。优选地,CMV或CAG启动子位于编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的上游。鸡 β -肌动蛋白启动子可与CMV早期增强子结合提供(即作为CAG启动子)。

[0023] 在一些实施方案中,所述多核苷酸进一步包含编码WPRE调节元件的核苷酸序列。

优选地,WPRE调节元件位于编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的下游。

[0024] 在一些实施方案中,所述多核苷酸进一步包含编码poly-A信号的核苷酸序列。优选地,其中poly-A信号在编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的下游。

[0025] 在一些实施方案中,所述多核苷酸进一步包含编码牛生长激素poly-A信号的核苷酸序列。优选地,其中牛生长激素poly-A信号在编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的下游。

[0026] 在一些实施例中,所述多核苷酸进一步包含编码以下的核苷酸序列:

[0027] (a) CMV启动子或CAG启动子,其中CMV启动子或CAG启动子位于编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的上游;和

[0028] (b) 牛生长激素poly-A信号,其中牛生长激素poly-A信号在编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的下游。

[0029] 在其他实施方案中,所述多核苷酸进一步包含编码以下的核苷酸序列:

[0030] (a) CMV启动子或CAG启动子,其中CMV启动子或CAG启动子位于编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的上游;

[0031] (b) WPRE调节元件,其中WPRE调节元件位于编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的下游;以及

[0032] (c) 牛生长激素poly-A信号,其中牛生长激素poly-A信号在编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的下游。

[0033] WPRE调节元件可以是WPRE3调节元件。

[0034] 编码抗VEGF实体的核苷酸序列可以在编码补体负调节剂的核苷酸序列的上游。

[0035] 在一些实施方案中,编码抗VEGF实体的核苷酸序列位于编码补体负调节剂的核苷酸序列的上游,其中抗VEGF实体选自阿柏西普、雷珠单抗、贝伐珠单抗、布洛赛珠单抗和哌加他尼或其片段或变体。在一些实施方案中,编码抗VEGF实体的核苷酸序列在编码补体负调节剂的核苷酸序列的上游,其中抗VEGF实体是阿柏西普或其片段或变体。在一些实施方案中,编码抗VEGF实体的核苷酸序列在编码补体负调节剂的核苷酸序列的上游,其中补体负调节剂是CFI或其变体或片段。在一些实施方案中,编码抗VEGF实体的核苷酸序列在编码补体负调节剂的核苷酸序列的上游,其中补体负调节剂是FHL1或其变体或片段。

[0036] 在一些实施方案中,编码抗VEGF实体的核苷酸序列位于编码补体负调节剂的核苷酸序列的上游,其中抗VEGF实体是阿柏西普或其片段或变体,补体负调节剂是CFI或其变体或片段。

[0037] 在一些实施方案中,编码抗VEGF实体的核苷酸序列位于编码补体负调节剂的核苷酸序列的上游,其中抗VEGF实体是阿柏西普或其片段或变体,补体负调节剂是FHL1或其变体或片段。

[0038] 编码补体负调节剂的核苷酸序列可以位于编码抗VEGF实体的核苷酸序列的上游。

[0039] 在一些实施方案中,编码补体负调节剂的核苷酸序列位于编码抗VEGF实体的核苷酸序列的上游,其中抗VEGF实体选自阿柏西普、雷珠单抗、贝伐珠单抗、布洛赛珠单抗和哌加他尼或其片段或变体。在一些实施方案中,编码补体负调节剂的核苷酸序列位于编码抗VEGF实体的核苷酸序列的上游,其中抗VEGF实体是阿柏西普或其片段或变体。在一些实施方案中,编码补体负调节剂的核苷酸序列在编码抗VEGF实体的核苷酸序列的上游,其中补

体负调节剂是CFI或其变体或片段。在一些实施方案中,编码补体负调节剂的核苷酸序列在编码抗血管内皮细胞实体的核苷酸序列的上游,其中补体负调节剂是FHL1或其变体或片段。

[0040] 在一些实施方案中,编码补体负调节剂的核苷酸序列位于编码抗VEGF实体的核苷酸序列的上游,其中抗VEGF实体是阿柏西普或其片段或变体,补体负调节剂是CFI或其变体或片段。

[0041] 在一些实施方案中,编码补体负调节剂的核苷酸序列位于编码抗VEGF实体的核苷酸序列的上游,其中抗VEGF实体是阿柏西普或其片段或变体,补体负调节剂是FHL1或其变体或片段。

[0042] 在一些实施方案中,编码抗VEGF实体的核苷酸序列和补体负调节剂通过接头可操作地连接。在一些实施方案中,所述接头是Furin、GSG、11a1D和F2A接头。在优选的实施方案中,所述接头包含一个自剪切的2A肽序列,例如P2A或包含或由Furin裂解位点、GSG、11a1D和F2A序列限定的序列。

[0043] 在一些实施方案中,所述多核苷酸进一步包含一个或多个腺相关病毒(AAV)末端反向重复序列(ITR)。在优选的实施方案中,所述多核苷酸进一步包含两个AAV ITR。

[0044] 在一些实施方案中,所述多核苷酸在其5'端包含一个AAV ITR,在其3'端包含一个AAV ITR。

[0045] 在一些实施例中,所述多核苷酸包含:

[0046] (a) 5' AAV ITR。

[0047] (b) CMV启动子或CAG启动子。

[0048] (c) 编码抗VEGF实体的核苷酸序列。

[0049] (d) 接头,可选地其中所述接头包含一个Furin裂解位点、GSG、11a1D和一个F2A序列。

[0050] (e) 编码补体负调节剂的核苷酸序列。

[0051] (f) poly-A信号,优选地牛生长激素poly-A信号;以及

[0052] (g) 3' AAV ITR。

[0053] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含:

[0054] (a) 5' AAV ITR。

[0055] (b) CMV启动子或CAG启动子。

[0056] (c) 编码抗VEGF实体的核苷酸序列。

[0057] (d) 接头,可选地其中所述接头包含一个Furin裂解位点、GSG、11a1D和一个F2A序列。

[0058] (e) 编码补体负调节剂的核苷酸序列。

[0059] (f) WPRE调节元件,可选地中WPRE调节元件是WPRE3调节元件。

[0060] (g) poly-A信号,优选地牛生长激素poly-A信号;以及

[0061] (h) 3' AAV ITR。

[0062] 适当地,(c)和(e)所定义的多核苷酸可以在多核苷酸中处于相互对应(reciprocal)的位置。

[0063] 具体地,在一些实施方案中,所述多核苷酸包含:

- [0064] (a) 5' AAV ITR。
- [0065] (b) CMV启动子或CAG启动子。
- [0066] (c) 编码补体负调节剂的核苷酸序列。
- [0067] (d) 接头, 可选地其中所述接头包含一个Furin裂解位点、GSG、11a1D和一个F2A序列。
- [0068] (e) 编码抗VEGF实体的核苷酸序列。
- [0069] (f) poly-A信号, 优选地牛生长激素poly-A信号; 以及
- [0070] (g) 3' AAV ITR。
- [0071] 在一些实施方案中, 所述多核苷酸包含:
- [0072] (a) 5' AAV ITR。
- [0073] (b) CMV启动子或CAG启动子。
- [0074] (c) 编码补体负调节剂的核苷酸序列。
- [0075] (d) 接头, 可选地其中所述接头包含一个Furin裂解位点、GSG、11a1D和一个F2A序列。
- [0076] (e) 编码抗VEGF实体的核苷酸序列。
- [0077] (f) WPRE调节元件, 可选地中WPRE调节元件是WPRE3调节元件。
- [0078] (g) poly-A信号, 优选地牛生长激素poly-A信号; 以及
- [0079] (h) 3' AAV ITR。
- [0080] 适当地, 在其中 (b) 包含CAG启动子的实施方案中; (f) 可以是WPRE3调节元件。
- [0081] 所述多核苷酸可从5'到3'由 (a) - (g) 或 (a) - (h) 依次组成。
- [0082] 在一些实施方案中, AAV ITR是AAV2或AAV8 ITR。在优选的实施方案中, AAV ITR是AAV2 ITR。
- [0083] 在一些实施方案中, 编码抗VEGF实体和/或补体负调节剂的核苷酸序列是经密码子优化的。在一些实施方案中, 编码抗VEGF实体的核苷酸序列是经密码子优化的。在一些实施方案中, 编码补体负调节剂的核苷酸序列是经密码子优化的。在优选的实施方案中, 编码阿柏西普和CFI、FHL1或CFH的核苷酸序列是经密码子优化的。
- [0084] 在一些实施方案中, 编码阿柏西普的核苷酸序列与SEQ ID NO:11具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。
- [0085] 在优选的实施方案中, 编码阿柏西普的核苷酸序列是SEQ ID NO:11。
- [0086] 在一些实施方案中, 编码CFI的核苷酸序列与SEQ ID NO:35或36具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。
- [0087] 在优选的实施方案中, 编码CFI的核苷酸序列是SEQ ID NO:35或36。
- [0088] 在一些实施方案中, 编码阿柏西普的核苷酸序列是SEQ ID NO:11, 并且编码CFI的核苷酸序列是SEQ ID NO:35或36。
- [0089] 在一些实施方案中, 编码FHL1的核苷酸序列与SEQ ID NO:41具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0090] 在优选的实施方案中,编码FHL1的核苷酸序列是SEQ ID NO:41。

[0091] 在一些实施方案中,编码阿柏西普的核苷酸序列是SEQ ID NO:11,编码FHL1的核苷酸序列是SEQ ID NO:41。

[0092] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:45的核苷酸序列,或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0093] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:46的核苷酸序列,或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0094] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:47的核苷酸序列,或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0095] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:48的核苷酸序列,或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0096] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:49的核苷酸序列,或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0097] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:50的核苷酸序列,或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0098] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:51的核苷酸序列,或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0099] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:52的核苷酸序列,或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0100] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:53的核苷酸序列,或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0101] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:54的核苷酸序列,或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0102] 在一些实施方案中,所述多核苷酸小于或等于5.2、5.1、5.0、4.9、4.8或4.7kb。在优选的实施方案中,所述多核苷酸小于或等于4.7kb。

[0103] 在另一个方面,本发明提供了一种包含本发明的多核苷酸的载体。因此根据一个方面,本发明提供了一种载体,其包含(i) 编码抗VEGF实体的多核苷酸和(ii) 编码补体负调节剂的多核苷酸。优选地,所述抗VEGF实体和补体负调节剂在同一条多核苷酸上提供,所述多核苷酸优选地是双顺反子多核苷酸。

[0104] 适当地,本文所用的双顺反子多核苷酸可指包含至少两个蛋白质编码区的多核苷酸,每个编码区可操作地连接到同一启动子区。适当地,双区多肽可以包含两个蛋白质编码区,每个编码区可操作地连接到同一启动子区。

[0105] 适当地,本发明还提供一个以上(例如两个)载体,它们之间包含(i)编码抗VEGF实体的多核苷酸和(ii)编码补体负调节剂的多核苷酸。

[0106] 在一些实施方案中,所述载体是腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒、慢病毒或腺病毒载体。

[0107] 在优选的实施方案中,所述载体是AAV载体。

[0108] 在一些实施方案中,所述载体是病毒载体颗粒的形式。

[0109] 在一些实施方案中,AAV载体颗粒包含AAV2或AAV8基因组,优选地AAV2基因组。

[0110] 在一些实施方案中,AAV载体颗粒包含AAV2或AAV8衣壳蛋白。

[0111] 在一些实施方案中,AAV载体颗粒包含AAV2基因组和AAV2衣壳蛋白(AAV2/2)。在优选的实施方案中,AAV载体颗粒包含AAV2基因组和AAV8衣壳蛋白(AAV2/8)。

[0112] 在另一个方面,本发明提供了包含本发明的多核苷酸的细胞。

[0113] 在另一个方面,本发明提供了用本发明的载体转导的细胞。

[0114] 在另一个方面,本发明提供一种药物组合物,其包含本发明的多核苷酸、载体或细胞与药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂相组合。

[0115] 在优选的实施方案中,所述药物组合物用于眼内给药。

[0116] 在另一个方面,本发明提供了本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物用于治疗。

[0117] 在另一个方面,本发明提供了本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物用于治疗或预防眼部疾病。

[0118] 在另一个方面,本发明提供了本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物,用于治疗或预防眼睛的补体介导的疾病。

[0119] 在另一个方面,本发明提供了一种治疗或预防眼睛的补体介导的疾病的方法,包括将本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物施用于需要的受试者。

[0120] 在另一个方面,本发明提供了一种向受试者提供抗VEGF实体和补体负调节剂的方法,包括将本发明的产品、多核苷酸、载体或细胞递送到受试者的眼睛。

[0121] 在具体的实施方案中,本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物用于治疗补体介导的病症,特别是慢性炎症,甚至更特别地是那些与补体C3b反馈循环的过度活性有关的疾病。

[0122] 在一些实施方案中,所述病症与补体C3b反馈循环的过度活性和/或C3b裂解循环的活性不足有关(见图5)。

[0123] 在一些实施方案中,所述病症是年龄相关性黄斑变性(AMD)或糖尿病视网膜病变。在其他实施方案中,所述病症是青光眼、Stargardt病、中心性浆液性脉络膜病、色素性视网膜炎、息肉样脉络膜血管病变、糖尿病黄斑水肿、视网膜分支静脉阻塞或葡萄膜炎。

[0124] 在优选的实施方案中,所述病症是AMD。

[0125] 在一些实施方案中,所述病症是湿性AMD和/或干性AMD。在一些实施方案中,所述产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物同时被用于治疗 and/或预防湿性AMD和干性AMD。

[0126] 在一些实施方案中,AMD是湿性AMD,且根据本发明的用途进一步防止和/或治疗干性AMD在所述受试者中发病。在一些实施方案中,AMD是干性AMD,且根据本发明的用途进一步防止和/或治疗湿性AMD在所述受试者中发病。

[0127] 在一些实施方案中,受试者已被诊断出患有AMD或处于获得AMD的风险中。

[0128] 在一些实施方案中,所述用途是用于治疗或预防下列受试者中的疾病:

[0129] (a) 在眼睛和/或血清中具有低于正常的补体因子I活性或浓度,优选地具有血清中0-30、0-20或0-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度或与其相当的活性;和/或

[0130] (b) 对于年龄相关性黄斑变性(AMD)相关的SNP(优选罕见的补体因子I和/或补体因子H变体)是杂合子或纯合子。

[0131] 在一些实施方案中,所述用途是用于治疗或预防以下受试者中的病症:

[0132] (a) 在眼睛和/或血清中具有正常水平的补体因子I活性或浓度,优选地血清中至少30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,诸如30-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$;和/或

[0133] (b) 不携带罕见的补体因子I变体等位基因。

[0134] 在另一个方面,本发明提供本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物,用于治疗或预防糖尿病视网膜病变。

[0135] 在一些实施方案中,地理萎缩的形成被防止或减少,和/或地理萎缩的总量被减少。

[0136] 在一些实施方案中,地理萎缩的进展被延缓。

[0137] 在一些实施方案中,相对于同期未治疗的眼睛,在对受试者的被治疗眼给药后的12个月内,地理萎缩面积的增加至少减少10%。在其他实施方案中,相对于同期未治疗的眼睛,在对受试者的被治疗眼给药后的12个月内,地理萎缩面积的增加至少减少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0138] 在一些实施方案中,施用所述产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物增加受试者中或受试者的眼睛中(诸如视网膜色素上皮细胞(RPE)水液和/或玻璃体液中)的C3b灭活和iC3b降解活性水平,任选地增加到超过受试者或其眼睛或RPE中的正常水平。

[0139] 在另一个方面,本发明提供了本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物,用于改善或恢复视力或视敏度,例如在患有眼部病症诸如本文所公开的眼部病症的受试者中。在另一个方面,本发明提供了本发明的产品、多核苷酸、载体或细胞,用于减轻视力或视敏度的丧失,例如与眼部病症诸如本文所公开的眼部病症相关的视力或视敏度的丧失。

[0140] 在另一个方面,本发明提供了本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物,用于改善或恢复受试者的阅读速度,例如在患有眼部病症诸如本文所公开的眼部病症的受试者中。在另一个方面,本发明提供了本发明的产品、多核苷酸、载体或细胞,用于减轻受试者阅读速度的降低,例如与眼部病症诸如本文所公开的眼部病症相关的视力或视敏度的丧失。

[0141] 在另一个方面,本发明提供了本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物,用于减少或防止光感受器和/或视网膜色素上皮(RPE)的损失,例如与眼部病症诸如本文所公开的眼部病症相关的光感受器和/或RPE的损失。

[0142] 在另一个方面,本发明提供了本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物,用于减少或预防具有眼部病症诸如本文所公开的眼部病症的新生血管、血管渗漏或视网膜

水肿。

[0143] 在一些实施方案中,所述产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物通过眼内给药。

[0144] 在一些实施方案中,所述产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物通过视网膜下、直接视网膜、脉络膜上或玻璃体内注射施用给受试者的眼睛。

[0145] 在一些实施方案中,所述产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物通过视网膜下注射施用给受试者的眼睛。

[0146] 在一些实施方案中,本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物不是全身给药。在其他实施方案中,本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物不是静脉注射给药。

附图说明

[0147] 图1-描绘了说明性单顺反子阿柏西普载体的设计和AAV基因组大小(ITR-ITR)的示意图。

[0148] 图2-不同密码子优化的AAV2-载体之间的阿柏西普表达比较。数据显示两个独立的实验。图3-在(A)非还原和(B)还原条件下进行的Western印迹的代表性图像,说明阿柏西普蛋白在诱导后72小时的培养上清液中的表达。(C)来自两个独立实验中非还原和还原条件下阿柏西普表达的密度分析。

[0149] 图4-说明表达补体负调节剂和阿柏西普的说明性双顺反子载体的设计的示意图。

[0150] 图5-脊椎动物补体替代途径的C3b反馈(放大)和裂解(下调)的循环("I"=补体因子I;"H"=补体因子H;"B"=补体因子B;且"D"=补体因子D)。

[0151] 图6-在小鼠CNV模型中施用表达CFI(GT005)或FHL1(RC001)的单顺反子载体。

[0152] 图7-HEK293细胞中双顺反子载体表达的比较。以下各项的代表性表达水平:(A) AAV8双顺反子表达阿柏西普和CFI;(B) AAV2双顺反子表达阿柏西普(左手条)和CFI(右手条),MOI为 $5e3$ (C) AAV8双顺反子表达阿柏西普和FHL-1;和(D) AAV2双顺反子表达阿柏西普(左手条)和FHL-1(右手条),MOI为 $5e3$;(E) AAV8双顺反子表达阿柏西普和CFI;(F) AAV8双顺反子表达阿柏西普和FHL-1。

[0153] 图8-在非还原条件下Western印迹分析显示双顺反子载体的蛋白质表达。

[0154] 图9-阿柏西普的结合亲和力。由单顺反子和双顺反子载体表达的阿柏西普对VEGFA的亲和力,如通过使用结合测定来确定的,所述结合测定测量固定浓度的人VEGFA与不同浓度的载体衍生的阿柏西普孵育后的未结合VEGFA。从Kd曲线得出的Eylea®的IC50值=2.3nM

[0155] 图10-阿柏西普的抑制特性。在固定浓度的VEGFA存在下,使用不同浓度的载体衍生的阿柏西普抑制VEGFA诱导的HUVEC细胞的增殖。

[0156] 图11-CFI和FHL1的C3b裂解实验表明,由双顺反子载体表达的CFI和FHL1具有功能性,可以促进C3b裂解为iC3b。

[0157] 图12-阿柏西普mRNA的表达-单顺反子的阿柏西普(小鼠)。将表达抗VEGF(阿柏西普)的AAV8(单顺反子)载体经视网膜下施用到9周龄雄性小鼠的右眼。通过逆转录和qRT-PCR对转基因产生的mRNA进行定量。

[0158] 图13-阿柏西普蛋白的表达-单顺反子的阿柏西普(小鼠)。将表达抗VEGF(阿柏西普)的AAV8(单顺反子)载体经视网膜下施用到9周龄雄性小鼠的右眼。通过Western印迹分析显示阿柏西普蛋白的表达。

普)的AAV8(单顺反子)载体经视网膜下施用到9周龄雄性小鼠的右眼。使用定量夹心型ELISA法测量眼内液中未结合的阿柏西普。

[0159] 图14-阿柏西普mRNA的表达-双顺反子候选(小鼠)。将共同表达抗VEGF(阿柏西普)和补体调节剂(hCFI或FHL-1)的双顺反子AAV载体经视网膜下施用到10周龄雄性小鼠的右眼(OD)中。通过逆转录和qRT-PCR对转基因产生的mRNA进行定量。

[0160] 图15-阿柏西普、CFI和FHL-1蛋白的表达(双顺反子载体)。将共同表达抗VEGF(阿柏西普)和补体调节剂(hCFI或FHL-1)的双顺反子AAV载体经视网膜下施用到10周龄雄性小鼠的右眼(OD)中。使用定量夹心型ELISA法测量眼液中未结合的阿柏西普。使用MSD的电化学发光检测技术对眼液中的人类CFI和FHL-1进行定量。

[0161] 图16-在小鼠激光诱导的脉络膜新生血管模型中的体内疗效。五组小鼠接受不同AAV载体的单侧(右眼)的视网膜下注射。载体给药4周后,通过激光光凝诱导CNV。在激光照射后的第四天和第七天对小鼠进行成像,然后处死。对(A)CNV渗漏面积和(B)CNV病变大小进行了定量。

[0162] 发明详述

[0163] 本文使用的术语“包含/包括(comprising)”、“包含/包括(comprise)”和“由……组成(comprised of)”与“包含(including)”或“包含(include)”；或“含有/容纳(containing)”或“含有/容纳(contain)”同义,并且是包容性的或开放式的,并且不排除额外的、未列举的成员、元素或步骤。术语“包含/包括(comprising)”、“包含/包括(comprise)”和“由……组成(comprised of)”也包含术语“由……组成(consisting of)”。

[0164] VEGF

[0165] 血管内皮生长因子(VEGF)是一种由细胞产生的强有力的血管生成蛋白,其刺激血管的形成。VEGF是生长因子的一个亚家族,即胱氨酸结生长因子的血小板源性生长因子家族的。它们既参与血管发生(胚胎循环系统的从头形成),也参与血管生成(从预先存在的脉管系统中生长出血管)。

[0166] 在哺乳动物中,VEGF家族包含五个成员:VEGF-A、胎盘生长因子(PGF)、VEGF-B、VEGF-C和VEGF-D。

[0167] 适当地,本文提到的VEGF可以是VEGF-A。

[0168] VEGF-A有多种亚型,是由单一的8个外显子的VEGFA基因的mRNA可变剪接而成。这些被分为两组,根据其末端外显子(外显子8)的剪接位点:近端剪接位点(表示为VEGF_{xxx})或远端剪接位点(VEGF_{xxx}b)。此外,第6和第7外显子的可变剪接改变了其肝素结合的亲和力和氨基酸数量(在人类中:VEGF₁₂₁、VEGF₁₂₁b、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF₁₆₅b、VEGF₁₈₉、VEGF₂₀₆;这些蛋白的啮齿类同源序列含有少一个氨基酸)。这些结构域对VEGF剪接变体有重要的功能影响,因为末端(外显子8)剪接位点决定了这些蛋白是促血管生成的(近端剪接位点,在血管生成过程中表达,VEGF_{xxx})还是抗血管生成的(远端剪接位点,在正常组织中表达,VEGF_{xxx}b)。此外,纳入或排除第6和第7个外显子介导与细胞表面的硫酸肝素蛋白多糖(HSPG)和神经鞘蛋白共同受体的相互作用,增强其结合和激活VEGF受体(VEGFR)的能力。

[0169] VEGF与3个受体酪氨酸激酶家族相互作用。VEGFR1(VEGF受体1)、VEGFR2和VEGFR3。VEGFA和VEGFB与VEGFR1结合,VEGFA与VEGFR2结合,VEGFC和VEGFD与VEGFR2和VEGFR3两者结合。胎盘生长因子(PGF)主要与VEGFR1相互作用。VEGFR在各种细胞类型上都有。VEGFR1,也

叫Flt-1 (fms样酪氨酸激酶1),存在于血管内皮细胞、造血干细胞、单核细胞和巨噬细胞。VEGFR2,也叫KDR (激酶插入域) 或Flk-1 (胎肝激酶1),在血管和淋巴内皮细胞上表达; VEGFR3 (也叫Flt-4) 仅限于淋巴内皮细胞。在配体结合时,VEGFRs通过各种媒介转导细胞内信号。就VEGFR2而言,其特征最明显,包含磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/Akt、丝裂原活化的激酶、非受体酪氨酸激酶Src以及PLC γ (磷脂酶C γ)/PKC(蛋白激酶C),它们促进血管生成、淋巴管生成、血管通透性和血管稳态。

[0170] VEGF-A在糖尿病视网膜病变(DR)的病因学中很重要。糖尿病患者视网膜上的微循环问题可导致视网膜缺血,从而导致VEGF-A的释放,以及促血管生成的VEGF亚型与正常表达的抗血管生成的VEGF亚型的平衡转换。促进血管生成的VEGF可能导致在视网膜和眼睛其他地方产生新的血管,预示着可能影响视力的变化。

[0171] VEGF-A在湿性年龄相关性黄斑变性(AMD)的疾病病理中也很重要,AMD是工业化世界中老年人失明的主要原因。AMD的血管病理与糖尿病视网膜病变有某些相似之处,尽管这两种疾病之间的病因和新生血管的典型来源不同。

[0172] 如本文所用,抗VEGF实体可指任何能够减少VEGF的表达和/或活性的实体。

[0173] 显而易见,抗VEGF实体将能够减少一种或多种VEGF的促血管生成亚型,特别是VEGF-A的表达和/或活性。

[0174] 适当地,VEGF可以是VEGFA、VEGFB和/或PGF。

[0175] 适当地,VEGF可以是VEGFA、VEGFB和PGF。

[0176] 抗VEGF实体可选自以下一种或多种:抗体、Ig融合蛋白、多肽、肽、多核苷酸(如反义寡核苷酸、siRNA、shRNA)、小分子、非抗体支架、适体或其组合。

[0177] 本文所使用的抗体旨在包含完整的抗体和其抗体片段。适当的抗体包含但不限于单克隆和多克隆抗体,工程化抗体,包含嵌合抗体,CDR嫁接抗体和人源化抗体,单链抗体,抗体片段和使用噬菌体展示或替代技术生产的人工选择的抗体。

[0178] 能够与选定靶标结合的合适的抗体片段包含Fv、ScFv、F(ab')和F(ab')₂。此外,经典抗体的替代品也可用于本发明中,例如“avibody”、“avimer”、“anticalin”、“纳米抗体”和“DARPin”。

[0179] 本文提到的“scFv”或“单链可变片段”包含抗体的可变重链(VH)和可变轻链(VL)经由柔性寡肽连接的分子。因此scFv是至少一个可变重链和至少一个可变轻链之间的融合。

[0180] 显而易见,在抗VEGF实体和补体负调节剂作为分离的多核苷酸提供的实施方案中,抗VEGF实体将是可由多核苷酸编码的实体。例如,抗VEGF实体可以是Ig融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多肽、肽、多核苷酸(例如反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、CRISPRi向导链,其序列针对VEGF基因序列或其mRNA的序列)、非抗体支架或适体。

[0181] 抗VEGF实体可以通过与一个或多个VEGF和/或一个或多个VEGF受体结合而发挥作用。

[0182] 抗VEGF实体可能能够减少VEGF的促增殖和/或促血管生成的活性。

[0183] 举例而言,抗VEGF实体可能能够减少依赖VEGF的细胞系的增殖。合适的细胞系包含但不限于内皮细胞,如人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和Wentink等人描述的Ba/F3-VEGFR2细胞系(Br J Cancer;2016;115(8);940-948)。

[0184] 抗VEGF实体可使依赖VEGF的细胞系的增殖相对于没有抗VEGF实体时的增殖减少至少1倍(适当地,至少1.5倍,至少2倍,至少2.5倍,至少3倍,至少4倍或至少5倍)。抗VEGF实体可以使依赖VEGF的细胞系的增殖相对于没有抗VEGF实体时的增殖减少至少10%(适当地,至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少100%,至少150%或至少200%)。

[0185] 抗VEGF实体可以选自阿柏西普、雷珠单抗、贝伐珠单抗和哌加他尼或其片段或变体。

[0186] 抗VEGF实体可以选自阿柏西普、雷珠单抗和哌加他尼或其片段或变体。

[0187] 抗VEGF实体可以选自阿柏西普和雷珠单抗或其片段或变体。

[0188] 抗VEGF实体可以是阿柏西普或其片段或变体。

[0189] 抗VEGF实体可以是雷珠单抗或其片段或变体。

[0190] 抗VEGF实体可以是贝伐珠单抗或其片段或变体。

[0191] 抗VEGF实体可能是哌加他尼或其片段或变体。

[0192] 抗VEGF的实体可能是阿柏西普。阿柏西普与循环中的VEGF结合,并作为一个“VEGF陷阱”发挥作用。它因而抑制了VEGF亚型VEGF-A和VEGF-B以及PGF的活性。阿柏西普是一种重组蛋白,由VEGFR1和VEGFR2的结合域与人免疫球蛋白 γ 1(IgG1)的Fc区融合而成。从结构上看,阿柏西普是一种二聚体糖蛋白,蛋白分子量为96.9kDa。

[0193] 一个说明性的阿柏西普氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0194] SEQ ID NO:1

```
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDS
RKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKL
VLNCTARTELVNGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQ
GLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
N
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG
```

[0196] 阿柏西普的氨基酸序列可以包含SEQ ID NO:1所示的序列。所述变体与SEQ ID NO:1具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。优选地,一个片段或变体基本上保留了SEQ ID NO:1所示的蛋白质的功能活性。

[0197] 阿柏西普的氨基酸序列可由SEQ ID NO:2-11所示的多核苷酸序列编码。

[0198] SEQ ID NO:2

[0199] AGTGATACAGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAA TCATAGATGTCGTTCTGAGTCCGTCTCATGGAATTGAACTATCTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACAGCAAGAAGCTGAACTAAATGTGGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCC TTCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTTGAGCACCTTAACTATAGATGGTGTAAACCCGGAGTGACCAAG GATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACATTTGTCA GGGTCCATGAAAAAGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTG GGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTTGA

[0200] 在一些实施方案中,本发明中使用的编码阿柏西普(或任何其他抗VEGF实体)的核苷酸序列是经过密码子优化的。不同的细胞在使用特定的密码子方面有所不同。这种密码子的偏倚对应于细胞类型中特定tRNA的相对丰度的偏差。通过改变序列中的密码子,使其与相应tRNA的相对丰度相匹配,就有可能提高表达量。出于同样原因,通过刻意选择已知相应tRNA在特定细胞类型中罕见的密码子,可以减少表达。因此,还有一种程度的翻译控制可用。

[0201] 编码阿柏西普的说明性密码子优化核苷酸序列显示为SEQ ID NO:3-11。

[0202] SEQ ID NO:3

TCTGATACCGGCAGACCCTTCGTGGAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCCTGCAGAGTGACAAGCCCCAACATCACCGTGACTCTGAAGAAGTTCCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGAGAATCATCTGGGACAGCCGGAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAAGAGATCGGCCTGCTGACCTGTGAAGCCACCGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACACACAGACAGACCAA

CACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCTAGCCACGGCATTGAACTGTCTGTGGGCGAGA
 AGCTGGTGCTGAACTGTACCGCCAGAACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGG
 GAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAAGAACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACCC
 AGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTGAGCACCCCTGACCATCGACGGCGTGACCAGA
 TCTGACCAGGGCCTGTACACATGTGCCGCCAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAG
 CACCTTCGTGCGGGTGCACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCTGCTC
 CAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCCTGTTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGA
 TGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCC
 [0204] GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGC
 CTAGAGAGGAACAGTACAATAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCAC
 CAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGC
 TCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACA
 CACTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTC
 AAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAAC
 AACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCCTGTACAGCAAG
 CTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGTGCAGCGTGATGC
 ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCTAA

[0205] SEQ ID NO: 4

TCTGATACCGGCAGACCCTTCGTGGAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATTACATG
 ACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCCTGCCGAGTGACAAGCCCCAACATCACCGTGAC
 TCTGAAGAAATTCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGAGAATCATTTGGGACA
 GCCGGAAGGGCTTCATCATTAGCAACGCCACCTACAAAGAGATCGGCCTGCTCACCTGTG
 AAGCCACCGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACACACAGACAGACCAAC
 ACCATCATTGACGTGGTCCTGAGCCCTAGCCACGGCATTGAACTGTCTGTGGGCGAGAAG
 CTGGTGTGAACTGTACCGCCAGAACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGA
 GTACCCAGCTCCAAGCACCAGCACAAAGAACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACCCAG
 AGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTGAGCACCCCTGACCATCGACGGCGTGACCAGATC
 TGACCAGGGCCTGTACACATGTGCCGCTAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCA

[0206] CCTTCGTGCGGGTGCACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCTGCTCCC
 GAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCCTGTTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATG
 ATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTCTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGA
 AGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTA
 GAGAGGAACAGTACAATAGCACCTACAGAGTGGTCTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
 GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCC
 TATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACAC
 TGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAG
 GGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAAT
 TACAAGACAACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTTCTGTACTCCAAGCTG
 ACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAAGGCAACGTGTTACAGTGCAGCGTGATGCACG
 [0207] AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCTAA

[0208] SEQ ID NO:5

[0209] AGCGACACCGGCAGACCCTTCGTGGAGATGTA
 ACTCCGAGATCCCTGAGATCATCCACATG
 ACCGAGGGCAGGGAGCTGGTCATCCCATGCCGCGTGACATCCCCAACATCACCGTGAC
 ACTGAAGAAGTTCCCTCTGGACACCCTGATCCAGATGGCAAGCGGATCATCTGGGACTC
 TAGAAAGGGCTTTATCAGCAATGCCACATATAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCGA
 GGCCACAGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAATTATCTGACACACAGACAGACCAACA
 CAATCATCGATGTGGTGCTGTCCCCATCTCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGC
 TGGTGCTGAATTGTACCGCCAGGACAGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAATTGGGAG
 TACCCAGCTCCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAACAGGGATCTGAAGACCCAGA
 GCGGCTCCGAGATGAAGAAGTTTCTGTCTACCCTGACAATCGACGGAGTGACCCGCAGC
 GATCAGGGACTGTATACATGCGCCGCTCTAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAGCAC
 CTTCGTGCGGGTGCACGAGAAGGACAAGACCCACACATGCCACCTTGTCCAGCACCAG
 AGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATG
 ATCTCTCGCACCCCGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGA
 GGTGAAGTTAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTC
 GGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATAGAGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAG
 GATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGCCTGCCCC
 AATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCAAAGGGACAGCCCAGGGAGCCTCAGGTGTACACAC
 TGCCTCCATCCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAG
 GGCTTCTATCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCAGAGAACAAT
 TACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCTCTTTCTTTCTGTATTCCAAGCTGA
 CCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCTTTGTAGCGTGATGCACGAGG
 CCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCTGA

[0210] SEQ ID NO:6

AGCGACACCGGCAGACCCTTCGTGGAGATGTA
 ACTCCGAGATCCCTGAGATCATTACATG
 ACCGAGGGCAGGGAGCTGGTCATCCCATGCCGCGTGACATCCCCAACATCACCGTGAC
 ACTGAAGAAATTCCTCTGGACACCCTGATCCAGATGGCAAGCGGATCATTTGGGACTC
 TAGAAAGGGCTTTATCATTAGCAATGCCACATATAAGGAGATCGGCCTGCTCACCTGCGA
 GGCCACAGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAATTATCTGACACACAGACAGACCAACA
 CAATCATTGATGTGGTCTGTCCCCATCTCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGC
 TGGTGCTGAATTGTACCGCCAGGACAGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAATTGGGAG
 TACCCAGCTCCAAGCACCAGCACAAGAACTGGTGAACAGGGATCTGAAGACCCAGA
 GCGGCTCCGAGATGAAGAAATTTCTGTCTACCCTGACAATCGACGGAGTGACCCGCAGC
 GATCAGGGACTGTATACATGCGCCGCTTCTAGCGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACC
 TTCGTGCGGGTGCACGAGAAGGACAAGACCCACACATGCCACCTTGTCCAGCACCAGA
 GCTGCTCGGAGGCCCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGAT
 CTCTCGCACCCCGAGGTGACATGCGTGGTCTGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGG
 TGAAGTTAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTCGG
 GAGGAACAGTACAACAGCACCTATAGAGTGGTCTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGA
 TTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGCCTGCCCCAAT
 CGAGAAGACCATCTCTAAGGCAAAGGGACAGCCCAGGGAGCCTCAGGTGTACACACTGC
 CTCCATCCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGC
 TTCTATCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCAGAGAACAATTAC
 AAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCTCTTTCTTTCTGTATTCCAAGCTGACC
 GTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAAGGCAACGTGTTTCTTTGTTCGTGATGCACGAGGCC
 CTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCTGA

[0213] SEQ ID NO: 7

TCCGACACCGGCAGACCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATTACATG
 ACCGAGGGCAGAGAGCTCGTGATCCCTTGTAGAGTGACCTCCCCAACATCACCGTGAC
 ACTGAAGAAGTTTCCTCTGGATACCCTCATCCCCGACGGCAAGAGGATTATTTGGGACTC
 TAGAAAGGGCTTCATCATTAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGACTGCTGACATGCGA
 GGCCACCGTGAACGGCCACCTCTACAAGACCAACTATCTGACCCATAGACAGACCAATAC
 CATCATCGACGTGGTGCTCTCCCCTAGCCACGGAATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAAC
 TGGTGCTCAATTGCACCGCTAGAACAGAGCTCAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAA
 TACCCCTCCTCCAAGCACCAACACAAGAAGCTCGTGAATAGAGATCTGAAGACCCAAAG
 CGGCAGCGAGATGAAGAAGTTTCTGAGCACACTGACAATTGACGGCGTCACAAGAAGC
 GACCAAGGCCTCTATACATGCGCCGCCAGCAGCGGACTGATGACCAAGAAGAAGCAGCAC
 CTTCGTGAGAGTGCACGAGAAAGATAAGACCCACACATGTCCCCCTTGCCCCGCCCCCG

[0214]

AGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTCTTTCTGTTCCCTCCTAAGCCCAAGGACACACTGATGA
 TCTCCAGAACCCCCGAGGTGACATGCGTGGTTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCCGAG
 GTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAG
 AGAGGAGCAGTACAACCTCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTCCATCAAG
 ACTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTCCCCGCCCC
 TATCGAGAAGACCATTTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCCCAAGTGTATACACT
 GCCTCCAGCAGAGACGAGCTCACCAAAAACCAAGTGTCCCTCACATGTCTGGTCAAAG
 GCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC
 TACAAGACAACCCCTCCCCTGCTCGACAGCGACGGAAGCTTCTTTCTGTACAGCAAGCT
 GACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAAGGCAATGTCTTTAGCTGCAGCGTGTGACG
 AGGCTCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCTCTGAGCCCCGGCTGA

[0215] SEQ ID NO:8

TCCGACACCGGCAGACCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATTACATG
 ACCGAGGGCAGAGAGCTCGTGATCCCTTGTGAGTGACCTCCCCAACATCACCGTGAC
 ACTGAAGAAATTTCTCTGGATACCCTCATCCCCGACGGCAAGAGGATTATCTGGGACTC
 TAGAAAGGGCTTCATCATTAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGACTGCTTACATGCGA

[0216]

GGCCACCGTGAACGGCCACCTCTACAAGACCAACTATCTGACCCATAGACAGACCAATAC
 CATCATTGACGTGGTTCTCTCCCCTTCTCACGGAATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAACT
 GGTGCTCAATTGCACCGCTAGAACAGAGCTCAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAAT
 ACCCTCCTCTAAGCACCAACACAAGAACTCGTGAATAGAGATCTGAAGACCCAAAGC
 GGCAGCGAGATGAAGAATTTCTGAGCACACTGACAATTGACGGCGTCACAAGAAGCGA

CCAAGGCCTCTATACATGCGCCGCTAGCAGTGGACTGATGACCAAGAAAAACAGCACCT
TCGTGAGAGTGCACGAGAAAGATAAGACCCACACATGTCCCCCTGCCCCGCCCCGAG
CTGCTTGGAGGTCTTAGCGTCTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACACTGATGATC
TCCAGAACCCCCGAGGTGACATGCGTGGTTCGTGGACGTGTCCACGAGGACCCCCGAGGT
GAAGTTCAATTGGTATGTTGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGAG
AGGAACAGTACAACCTCACCTACAGAGTGGTTTCCGTGCTGACCGTGCTCCATCAAGACT
[0217] GGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGAGCAACAAGGCCCTCCCCGCCCTATC
GAGAAGACCATTTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCCCAAGTGTATACTGCC
TCCCAGCAGAGACGAGCTACCAAAAACCAAGTGTCCCTCACATGTCTGGTCAAAGGCT
TCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACAATTAC
AAGACAACCCCTCCCGTGCTCGACAGCGACGGAAGCTTCTTTCTGTACTCCAAGCTGAC
CGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAAGGCAATGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGG
CTCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCTCTGAGCCCCGGCTGA

[0218] SEQ ID NO: 9

TCCGACACCGGGAGACCGTTTGTAGAAATGTA CTCTGAAATTCCAGAAATTATTCACATG
ACTGAAGGACGAGAACTCGTAATCCCGTGCCGGGTAACATCACCGAACATTACCGTTACT
CTCAAGAAGTTCCCGTTGGACACTCTGATTCCAGACGGCAAGCGGATTATATGGGATTCA
CGAAAAGGCTTTATCAGCAACGCTACATATAAGGAGATAGGCCTCCTCACCTGCGAG
GCCACAGTGAACGGACACCTTTACAAGACAACTACCTCACGCATCGCCAGACTAACAC
TATTATAGACGTTGTA CTCTCAGCCCTTCCCACGGAATAGAGCTCTCTGTTGGGGAAAAGCTT
GTTCTGAACTGCACGGCACGAACCGAACTCAACGTTGGTATTGATTCAACTGGGAATAC
CCCTCTTCAAAGCACCAACATAAGAAGCTCGTGAACAGGGACCTGAAGACGCAGAGTG
GATCCGAAATGAAGAAATTTCTTTCAACTCTCACAATCGACGGCGTTACCAGGAGCGATC
AGGGGCTTTATACTTGC GCGGCTTCTTCTGGACTCATGACAAAGAAAAACAGTACTTTCG
[0219] TTCGCGTCCATGAGAAAGATAAGACCCATACGTGCCACCTTGTCCAGCTCCGGAAC TTT
TGGGCGGACCCAGCGTATTTCTTTTCTCCCAAGCCGAAAGACACACTGATGATATCAA
GAACTCCTGAAGTTACATGTGTTGTTGTTGACGTTAGTCATGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTATGTTGATGGAGTAGAGGTT CATAACGCGAAGACGAAGCCACGAGAAGAA
CAGTACAACAGCACGTATAGGGTGGTCAGTGTACTTACGGTACTCCACCAAGATTGGCTT
AACGGTAAGGAATACAAGTGTAAGTATCTAATAAGGCATTGCCGGCTCCGATTGAAAAG
ACAATCTTAAGGCAAAAGGCCAGCCGCGGAGCCGCAAGTATATACATTGCCTCCCTCA
AGAGATGAGCTTACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACATGCCTTGTCAAAGGATTCTACCCT
AGCGACATAGCCGTCGAATGGGAATCAAACGGTCAACCAGAGAACAATTATAAAACCAC
CCCCCGGTGCTTGATAGTGATGGCTCCTTTTTTCTGTATTCTAAGTTGACGGTGGATAAG
AGTCGGTGGCAACAGGGGAATGATTTAGTTGCAGTGTGATGCACGAGGCTCTTCATAAC
CACTACACACAAAAATCTTTGAGCTTGTCTCCAGGTTGA

[0220] SEQ ID NO:10

TCCGACACCGGGAGACCGTTTGTAGAAATGTA CTCTGAAATTCCAGAAATTATCCACATG
[0221] ACTGAAGGACGAGAACTCGTAATCCCGTGCCGGGTAACATCACCGAACATTACCGTTACT
CTCAAGAAATTCCCGTTGGACACTCTGATTCCAGACGGCAAGCGGATTATATGGGATTCA

CGAAAAGGCTTTATCATTAGCAACGCTACATATAAGGAGATAGGCCTCCTGACCTGCGAG
 GCCACAGTGAACGGACACCTTTACAAGACAACTACCTCACGCATCGCCAGACTAACAC
 TATTATAGACGTTGTAICTCAGCCCTTCCCACGGAATAGAGCTCTCTGTTGGGGAAAAGCTT
 GTTCTGAACTGCACGGCACGAACCGAACTCAACGTTGGTATTGATTTCAACTGGGAATAC
 CCCTCTTCAAAGCACCAACATAAGAACTCGTGAACAGGGACCTGAAGACGCAGAGTG
 GATCCGAAATGAAGAAATTTCTTTCAACTCTACAATCGACGGCGTTACCAGGAGCGATC
 AGGGGCTTTATACTTGC GCGGCTTCTTCCGACTCATGACAAAGAAAAACAGTACTTTTCG
 TTCGCGTCCATGAGAAAGATAAGACCCATACGTGCCACCTTGTCCAGCTCCGGAACCTT
 TGGGCGGACCCAGCGTATTTCTTTTTCTCCCAAGCCGAAAGACACACTGATGATATCAA
 GAACTCCTGAAGTTACATGTGTGTGGTTGACGTCAGTCATGAAGACCCTGAGGTCAAGT
 TCAACTGGTATGTTGATGGAGTAGAGGTTTATAACGCGAAGACGAAGCCACGAGAAGAG
 CAGTACAACAGCACGTATAGGGTGGTCAGTGTACTTACGGTACTCCACCAAGATTGGCTT
 AACGGAAAGGAATACAAGTGTAAGTATCTAATAAGGCATTGCCGGCTCCGATTGAAAAG
 ACAATCTTAAGGCAAAGGCCAGCCGCGGAGCCGCAAGTATATACATTGCCCTCCCTCA
 AGAGATGAGCTTACCAAGAACCAGGTTTCTCTGACATGCCTTGTCAAAGGATTCTACCCT
 AGCGACATAGCCGTCGAATGGGAATCAAACGGTCAACCAGAGAACAATTATAAAACCAC
 ACCCCCGGTGCTTGATAGTGATGGCTCCTTTTTCTGTATTCTAAGTTGACGGTGGATAAG
 AGTCGGTGGCAACAGGGGAATGATTTAGTTGCAGTGTGATGCACGAGGCTCTTCATAAC
 CACTACACACAAAAATCTTTGAGCTTGTCTCCAGGTTGA

[0222] SEQ ID NO: 11

AGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATG
 ACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGAC
 CCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACA
 GCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGC
 GAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAA
 CACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGA
 AGCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGG
 GAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCC
 AGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCG
 AGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACA
 GCACCTTCGTGCGCGTGACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCC
 CCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCC AAGCCCAAGGACACCCT
 GATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACC
 CCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA
 GCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGTGCTGC
 ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCC
 CGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGT
 ACACCCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTG
 GTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCC
 AGAACA ACTACAAGACCACCCCCCGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTAC
 AGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTT CAGCTGCAGCG
 TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGC
 TAA

[0225] 优选地, 编码阿柏西普多肽的多核苷酸是SEQ ID NO:11或其变体。

[0226] 在一些实施方案中, 编码阿柏西普的核苷酸序列与SEQ ID NO:2-11中的任何一

个,优选SEQ ID NO:11具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,所述核苷酸序列编码的蛋白质基本上保留了SEQ ID NO:1所代表蛋白质的功能活性。

[0228] 雷珠单抗是一种针对VEGFA的单克隆抗体片段(Fab)。适当地,雷珠单抗多肽可以包含重链和轻链可变序列,分别如SEQ ID NO:12和13所示。每个序列中的互补性决定区(CDR)都以下划线表示。

[0229] SEQ ID NO:12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGVWINTYTGPEPT
 [0230] YAADFKRRTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWVGQGLV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL

[0231] SEQ ID NO:13

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSG
 [0232] SGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQOYSTVPTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0233] 雷珠单抗重链和轻链的可变序列可以包含SEQ ID NO:12或13所示的多肽。这些变体可以与SEQ ID NO:12或13具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。优选地,所述片段或变体基本上保留了SEQ ID NO:12和13所示的重链和轻链可变序列的功能活性。

[0234] 雷珠单抗重链和轻链多肽可由任何合适的多核苷酸序列编码。编码重链和轻链的多核苷酸序列可以在一个分离的多核苷酸中可操作地连接。例如,编码重链和轻链的多核苷酸序列可以与同一个启动子可操作地连接,并通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自裂解多肽的多核苷酸序列彼此分开。

[0235] 编码雷珠单抗重链和轻链多肽的多核苷酸序列的实例;分别如SEQ ID NO:14和15所示。

[0236] SEQ ID NO: 14

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGCGCC
 TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTACGACTTCACCACTACGGCATGAACTGGGTGCGCCAG
 GCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCCAC
 [0237] CTACGCCGCCGACTTCAAGCGCCGCTTACCTTACGCTGGACACCAGCAAGAGCACC
 CCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAG
 TACCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCCCTG
 GTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAG
 CAAGAGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCG
 AGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCC
 [0238] GCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAG
 CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
 TGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACCTG

[0239] SEQ ID NO:15

GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGCGTGA
 CCATCACCTGCAGCGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAG
 CCCGGCAAGGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTTCACCAGCAGCCTGCACAGCGGCGTGCC
 CAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGC
 AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCCTGGACCTTC
 [0240] GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGCACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTT
 CCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC
 AACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCG
 GCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAG
 CAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAG
 GTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGCGGCGAGTGC

[0241] 例如, W02019/164854提供了编码雷珠单抗的分离多核苷酸和AAV载体的实例。

[0242] 贝伐珠单抗是一种针对VEGFA的单克隆抗体。适当地, 贝伐珠单抗多肽序列可以包含分别如SEQ ID NO:16和17所示的重链和轻链序列。每个序列中的互补性决定区(CDR)都以下划线表示。

[0243] SEQ ID NO:16

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGPTY
AADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 [0244] FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0245] SEQ ID NO:17

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFS
 GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 [0246] GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0247] 贝伐珠单抗重链和轻链序列可包含SEQ ID NO:16或17所示的多肽。这些变体与SEQ ID NO:16或17具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。优选地, 所述片段或变体基本上保留了如SEQ ID NO:16和17所示的重链和轻链序列的功能活性。

[0248] 编码贝伐珠单抗重链和轻链多肽的多核苷酸序列的实例; 分别如SEQ ID NO:18和19所示。

[0249] SEQ ID NO: 18

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCCCTGGTGCAGCCGGCGGCAGCCTGCGCC
 TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTACGGCATGAACTGGGTGCGCCAG
 GCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCTGGATCAACACCTACACGGCGAGCCCAC
 CTACGCCCGGACTTCAAGCGCCGCTTCACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCG
 CCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAG
 TACCCCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCCCT
 GGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCAGCA
 GCAAGAGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
 GAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC
 CGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCA
 GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG
 GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCC
 CCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCAAGGAC
 ACCCTGATGATCAGCCGCACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGA
 GGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGT
 GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCC
 CTGCCCCCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCA
 GGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGCGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT
 GCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG
 CCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCT
 GTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAAGCTGC
 AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCC
 CGGCAAG

[0251] SEQ ID NO:19

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGCGTGAC
 CATCACCTGCAGCGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGC
 CCGGCAAGGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTTCACCAGCAGCCTGCACAGCGGCGTGCCC
 AGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCA
 GCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCCTGGACCTTCG
 GCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGCACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTC
 CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACA
 ACTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG
 CAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGC
 AGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGG
 TGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGCGGCGAGTGC

[0253] 贝伐珠单抗重链和轻链多肽可由任何合适的多核苷酸序列编码。编码重链和轻链的多核苷酸序列可以在一个分离的多核苷酸中可操作地连接。例如，编码重链和轻链的多核苷酸序列可以与同一个启动子可操作地连接，并通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自裂多肽的多核苷酸序列彼此分开。

[0254] 哌加他尼是一种对VEGF₍₁₆₅₎亚型特异的RNA适体。pegataniib的RNA序列显示为SEQ IDNO:20。

[0255] SEQ ID NO: 20

[0256] GCGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCCGC

[0257] 所述哌加他尼多核苷酸序列可包含如SEQ ID NO:20所示的序列。所述变体可与SEQ ID NO:20具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,所述片段或变体基本上保留了显示为SEQ ID NO:20的多核苷酸的功能活性。

[0258] 编码哌加他尼的多核苷酸序列的实例显示为SEQ ID NO:21。

[0259] SEQ ID NO: 21

[0260] **CGCCTTAGTCACTTACGAATATGTAGGCG**

[0261] 信号肽

[0262] 编码抗VEGF实体的多核苷酸序列可进一步包含编码信号肽的多核苷酸序列,以使抗VEGF实体从细胞中分泌出来。

[0263] 信号肽是一种短肽,通常有5-30个氨基酸长,通常存在于大多数新合成的预定进入分泌途径蛋白质的N端。这些蛋白质包含那些定位于某些细胞器(如内质网、高尔基体或内体)内、从细胞中分泌出来的蛋白质,以及跨膜蛋白质。

[0264] 信号肽通常包含一个核心序列,这是一段长的疏水氨基酸,有形成单一 α 螺旋的趋势。信号肽可能以一段短的带正电的氨基酸开始,这有助于在转运过程中加强多肽的正确拓扑结构。在信号肽的末端,通常有一段被信号肽酶识别和裂解的氨基酸。信号肽酶可以在易位过程中或在易位完成后进行裂解,产生一个自由信号肽和一个成熟的蛋白质。然后游离的信号肽被特定的蛋白酶所消化。

[0265] 信号肽通常位于分子的氨基末端,尽管也有一些已知的羧基末端的信号肽。

[0266] 信号序列通常有一个三方结构,由疏水核心区(h-区域)、两侧是n-和c-区域组成。后者包含信号肽酶(SPase)的共同裂解位点。通常情况下,信号序列是以co-translational的方式裂解掉的,由此产生的裂解信号序列被称为信号肽。

[0267] 信号序列可以用软件技术进行检测或预测(例如见<http://www.predisi.de/>)。大量的信号序列是已知的,并且可以在数据库中找到。例如,<http://www.signalpeptide.de>在其数据库中列出了2109个确认的哺乳动物信号肽。

[0268] 适当地,所述信号肽可以是CFH信号肽。

[0269] 编码CFH信号肽的说明性多核苷酸序列显示为SEQ ID NO:22-31。

SEQ ID NO: 22 - ATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGCA

[0270] SEQ ID NO: 23 - ATGAGACTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCC

SEQ ID NO: 24 - ATGAGACTGCTCGCCAAGATCATTTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCC

SEQ ID NO: 25 - ATGCGGCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCA

SEQ ID NO: 26 - ATGCGGCTGCTCGCCAAGATCATTTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCA

SEQ ID NO: 27 - ATGAGACTGCTCGCCAAGATCATCTGTCTGATGCTGTGGGCTATCTGTGTCGCT

[0271] SEQ ID NO: 28 - ATGAGACTGCTCGCCAAGATCATTTGTCTGATGCTGTGGGCTATCTGTGTCGCT

SEQ ID NO: 29 - ATGCGCTTGCTGGCGAAGATAATCTGCCTGATGTTGTGGGCCATATGCGTAGCC

SEQ ID NO: 30 - ATGCGCTTGCTGGCGAAGATAATCTGCCTGATGTTGTGGGCCATATGCGTAGCC

SEQ ID NO: 31 - ATGCGCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCC

[0272] 补体系统

[0273] 补体系统是体液免疫系统的组成部分,参与了组织炎症、细胞调理和细胞溶解。它提供对微生物的保护,并介导宿主组织中外源性和内源性细胞碎片的清除。

[0274] 补体系统级联是由三个激活途径组成的。所有的途径最终都以C3因子的中心裂解和产生其活性片段C3a和C3b为终点。C3a是过敏毒素,引发一系列趋化和促炎症反应,如招募炎症细胞和增加微血管通透性,而C3b则负责与C3b共价连接的异物表面的调理作用。通过活化的C3片段(C3b和iC3b)的调理作用实现三个主要功能:(i)由吞噬细胞(如巨噬细胞或小胶质细胞)消除细胞碎片,刺激适应性免疫系统(B和T细胞);(ii)通过形成表面结合的C3转化酶放大补体的激活;以及(iii)组装C5转化酶。

[0275] C5转化酶的组装负责C5的裂解,从而形成能够在细胞膜上产生穿孔的细胞溶解膜攻击复合物(MAC),从而促进细胞裂解和消除不必要的细胞。通过所有这些活性,先天补体级联支持和促进免疫系统下游机制的功能,保护宿主组织的完整性。总的来说,补体系统途径的激活导致了促炎症反应,包含MAC的产生,其介导细胞裂解,释放趋化因子以吸引炎症细胞到损伤部位,以及增强毛细血管的渗透性以促进浸润白细胞的外渗。在生理条件下,补体的激活被可溶性和膜相关的补体调节分子(CRM)的协调作用有效控制。可溶性补体调节剂,如C1-抑制物、过敏毒素抑制物、C4b结合蛋白(C4BP)、补体因子H(CFH)、补体因子I(CFI)、聚集素和玻连蛋白,限制级联反应的补体在人体组织中多个部位的作用。此外,每个细胞都受到表面蛋白的保护,如补体受体1(CR1,CD35)、膜辅蛋白(MCP,CD46)和糖基磷脂酰肌醇锚定的蛋白,如衰变加速因子(CD55)或CD59分子,以防止同源补体的攻击。值得注意的是,对补体攻击保护不足的宿主细胞和组织可能会受到旁观者的细胞裂解。

[0276] 在一些实施方案中,本发明涉及治疗或预防补体介导的眼部的病症。例如,补体介导的病症可能是与替代途径调节的缺陷有关的病症,尤其是与补体C3b反馈循环的过度活动和/或C3b裂解循环的活动不足有关。

[0277] 本发明包含补体负调节剂的使用。补体负调节剂可指在级联反应的一个或多个部位限制补体作用的实体。举例来说,补体负调节剂可以是C1-抑制剂、过敏毒素抑制剂、C4b结合蛋白(C4BP)、补体因子H(CFH)、因子H样蛋白1(FHL1)、补体因子I(CFI)、聚集素或玻连蛋白。补体负调节剂也可以是一种表面蛋白,其能够保护细胞免受同源补体的攻击;例如补体受体1(CR1,CD35)、膜辅蛋白(CD46)和糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白,如衰变加速因子(CD55)或CD59分子。

[0278] 适当地,补体负调节剂可以是补体激活级联的一个组成部分的抑制剂,例如补体C3b反馈循环的抑制剂。

[0279] 补体负调节剂可选自CFI、FHL1、CFH、CR1和MCP或其变体或片段。

[0280] 补体负调节剂可选自CFI、FHL1和CFH或其变体或片段。

[0281] 补体负调节剂可以是CFI或其变体或片段。

[0282] 补体负调节剂可以是FHL1或其变体或片段。

[0283] 补体负调节剂可以是CFH或其变体或片段。

[0284] 补体负调节剂可以是CR1或其变体或片段。

[0285] 补体负调节剂可以是MCP或其变体或片段。

[0286] 适当地,所述产品可包含一个或多个补体负调节剂。

[0287] 适当地,所述多核苷酸可以编码一个或多个补体负调节剂。

[0288] 在一些实施方案中,在施用本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物之前,受试者具有低水平(例如低于正常水平)的补体因子I活性,例如眼内补体因子I活性的

低水平和/或补体因子I活性的低血清水平。补体因子I活性低于正常水平可能是由于正常功能的补体因子I的表达低于正常水平,或至少部分(如杂合)表达(正常或低于正常水平)补体因子I的非或亚功能变体(这样的受试者可能携带一个或多个AMD相关SNP的拷贝,例如受试者可能是下面进一步讨论的罕见补体因子I变体之一的同型或杂合)。因此,受试者的眼睛和/或血清中的补体因子I的浓度可能较低(例如低于正常浓度)。对于人类受试者来说,正常水平的补体因子I活性(C3b灭活和iC3b降解活性)可能相当于受试者血清中30-40 μ g/mL的补体因子I所提供的。因此,在补体因子I活性低的受试者中,血清中的补体因子I活性可能相当于小于30 μ g/mL和大于0 μ g/mL的补体因子I,如0-20或0-10 μ g/mL(这些是补体因子I血清浓度的范围,可能包含具有低补体因子I浓度的受试者)。

[0289] 因此,本发明要治疗的对象可能患有补体介导的眼部病症,诸如AMD,或可能出于发生此类病症的风险。AMD可以是湿性AMD和/或干性AMD。例如,受试者可能对一个或多个与补体介导的病症有关的SNPs具有同型或异型的易感性。

[0290] 在一些实施方案中,受试者有发生AMD的风险。例如,受试者可能是对一个或多个与AMD相关的SNP的同型或异型易感,例如与晚期AMD相关的补体因子I的罕见突变,通常导致血清补体因子I水平降低(Kavanagh等人(2015)Hum Mol Genet 24:3861-3870)。特别是受试者可能携带一种或多种下列罕见的补体因子I变体的一个或两个拷贝:rs144082872(编码P50A);4:110687847(编码P64L);rs141853578(编码G119R);4:110685721(编码V152M);4:110682846(编码G162D);4:110682801(编码N177I);rs146444258(编码A240G);rs182078921(编码G287R);rs41278047(编码K441R);和rs121964913(编码R474)。

[0291] 本发明可进一步包含确定受试者是否有患补体介导的疾病(例如AMD)的风险,例如通过确定受试者是否为与补体介导的疾病相关的一个或多个SNP的同型或异型易感者(例如,通过确定受试者是否为上述与AMD相关的一个或多个罕见补体因子I变异的同型或异型)。

[0292] 或者,受试者可能具有正常水平的内源性补体因子I活性或浓度,例如在眼睛和/或血清中和/或可能不携带罕见的变异补体因子I等位基因。

[0293] 在一些实施方案中,施用本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物,从而增加受试者眼睛中的C3b灭活和iC3b降解活性的水平。在其他实施方案中,施用本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物从而使受试者眼内的C3b灭活和iC3b降解活性水平增加到超过眼内正常水平的水平。更特别地,C3b灭活和iC3b降解活性的水平在眼睛的RPE中增加。

[0294] 可以理解的是,在提供本发明的产品和/或由本发明的多核苷酸或载体表达补体因子I和补体因子H样蛋白1后,受试者体内的C3b灭活和iC3b降解活性可以包含来自受试者内源性补体因子I的C3b灭活和iC3b降解活性(即受试者的补体因子I未由本发明的产品提供或由多核苷酸或载体表达产生)。本发明的多核苷酸或载体的表达所产生的,以及本发明的产品所提供的或本发明的多核苷酸或载体的表达所产生的C3b灭活和iC3b降解活性,从而使受试者体内C3b灭活和iC3b降解活性的总水平超过正常水平。

[0295] 在一些实施方案中,受试者体内的C3b灭活和iC3b降解活性水平,例如在眼睛里,增加到比正常水平至少高5%、10%、15%、20%或25%。

[0296] 在其他实施方案中,受试者体内的C3b灭活和iC3b降解活性水平,例如在眼睛中,

增加到正常水平的两倍,或高于正常水平的80%、60%、40%或20%。

[0297] 例如,受试者体内,例如眼内的C3b灭活和iC3b降解活性的水平可以提高到5-100%、5-80%、5-60%、5-40%、5-20%、10-100%、10-80%、10-60%、10-40%、10-20%、15-100%、15-80%、15-60%、15-40%、15-20%、20-100%、20-80%、20-60%、20-40%、25-100%、25-80%、25-60%或25-40%高于正常水平。

[0298] 在一些实施方案中,施用本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物不会可检测地提高受试者血浆/血清中的C3b灭活和iC3b降解活性水平。在其他实施方案中,施用本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物不会可检测地将受试者血浆/血清中C3b灭活和iC3b降解活性的水平提高到大于正常水平。

[0299] 在前述部分,除明显不适用外,提及补体因子I和C3b灭活和iC3b降解活性可替换为补体因子H或补体因子H样蛋白1,以及分别作为补体因子I介导的C3b裂解的辅助因子和增加C3转化酶和C5转化酶解离率的能力。在一些实施方案中,在施用本发明的产品、多核苷酸、载体、细胞或药物组合物之前,受试者的补体因子H水平较低(例如低于正常水平),例如眼睛中的补体因子H水平较低和/或血清中的补体因子H水平较低。对于人类受试者来说,补体因子H的正常水平可能是受试者血清中的约200-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此,在补体因子H水平低的受试者中,血清中的水平可能低于200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,大于0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,如0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另外,受试者可以有正常水平的内源性补体因子H,例如在眼睛和/或血清中。

[0300] 补体因子I(CFI)

[0301] 补体因子I(Factor I,CFI),也被称为C3b/C4b灭活剂,是一种在人类中由CFI基因编码的蛋白质。

[0302] 补体因子I是一种丝氨酸蛋白酶,以类似酶原的状态循环(Roversi等(2011)PNAS 108:12839-12844),浓度约为35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Nilsson等(2011)Mol Immunol 48:1611-1620)。补体因子I蛋白是一个重度N-糖基化的异二聚体,由两条多肽链组成,通过一个二硫键连接。重链(50kDa)包含一个N端区域;一个FI膜攻击复合物(FIMAC)结构域;一个CD5样结构域或富含半胱氨酸结构域的清道夫受体(SRCR);两个低密度脂蛋白受体(LDLr)结构域;以及一个功能未知的C端区域,该区域是不同物种间序列变化的位点(Roversi等(2011)PNAS 108:12839-12844)。轻链(38kDa)含有丝氨酸蛋白酶(SP)结构域和保守的催化残基(Goldberger等(1987)J Biol Chem 262:10065-10071)。

[0303] 补体因子I通过将C3b裂解为iC3b、C3d和C3dg来灭活C3b,并以类似的方式将C4b裂解为C4c和C4d。为了正常发挥其功能,补体因子I需要辅助因子蛋白的存在,如C4b结合蛋白(C4BP)、补体因子H(CFH)、补体受体1(CR1/CD35)和膜辅蛋白(MCP/CD46)(Degn等人(2011)Am J Hum Genet 88:689-705)。

[0304] iC3b不能与因子B结合,因此不能使补体级联的扩增或通过替代途径的激活得以延续。因此,一旦C3b被裂解为iC3b,替代性途径的启动和终末补体级联的激活都不会发生。

[0305] iC3b能够通过多形核白细胞(主要是中性粒细胞)、NK细胞和单核吞噬细胞(如巨噬细胞)上的补体受体3(CR3)(CD11b/CD18)结合并将其激活而提供促炎症作用。

[0306] 补体因子I能够通过需要辅助因子CR1的蛋白酶活性将iC3b加工成C3dg。C3d,g不能与CR3结合。由于iC3b与补体受体CR3反应是补体激活引起炎症的主要机制,iC3b分解为C3dg对于减少补体诱导的炎症至关重要(Lachmann(2009)Adv. Immunol. 104:115-149)。

[0307] 补体因子I具有独特的能力,既能促进C3b裂解为iC3b,又能加速iC3b的分解--再加上其在人体血清中的浓度相对较低,对治疗效果所需的输送量有影响--使其成为特别有利的目标。

[0308] 在一些实施方案中,补体因子I多肽能够将C3b裂解为无活性的降解产物。例如,补体因子I多肽可以将C3b裂解为iC3b。

[0309] 在一些实施方案中,补体因子I多肽能够将iC3b加工成无活性的降解产物。例如,补体因子I多肽可以将iC3b加工成C3dg。

[0310] 在优选的实施方案中,补体因子I多肽能够将C3b裂解成iC3b并将iC3b加工成C3dg。

[0311] 适当地,补体因子I的片段或变体可以保留天然补体因子I的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的C3b灭活和iC3b降解活性。

[0312] 补体因子I或其片段或衍生物的C3b灭活和iC3b降解活性可以用技术人员已知的任何合适的方法来测定。例如,补体因子I的蛋白质溶解活性的测量在Hsiung等人(Biochem.J. (1982) 203:293-298)中描述。在Handbook of Experimental Immunology 3rd edition Ed DM Weir Blackwells Scientific Publications Chapter 5A p17中的Lachmann PJ&Hobart MJ(1978)“Complement Technology”描述了CFI活性的溶血性和凝集性测定。在“Weir’s Handbook of Experimental Immunology”第五版Eds;Herzenberg Leonore A’Weir DM,Herzenberg Leonard A&Blackwell CBlackwells Scientific Publications第75章36-37中的Harrison RA(1996)给出了更详细的描述,还包含蛋白水解测定。凝集试验(conglutinating assay)是高度敏感的,可用于检测将固定的C3b转化为iC3b并获得胶固素反应性的第一(双重)段;以及检测从固定的iC3b开始到C3dg的最终段,并寻找与胶固素的反应性的丢失。溶血试验用于检测C3b向iC3b的转化,而蛋白水解试验则检测所有段。

[0313] 在一些实施方案中,补体因子I是人补体因子I。

[0314] 一个人补体因子I蛋白的实例是具有UniProtKB登录号P05156的人补体因子I蛋白。这个实例的序列长度为583个氨基酸(公开为SEQ ID NO:32),其中1至18个氨基酸形成一个信号序列。

[0315] 在一些实施方案中,补体因子I的氨基酸序列是SEQ ID NO:32。在其他实施方案中,补体因子I的氨基酸序列是公开为SEQ ID NO:32的第19至583位的序列。优选地,变体或片段基本上保留了SEQ ID NO:32所代表的蛋白质的功能活性。

MKLLHVLLFLLCFHLRFCKVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTC
VCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGTKFLNNGTCTAEGKFSVSLKH
GNTDSEGIVEVKLVDQDKTMFICKSSWSMREANVACL DLGFQQGADTQRRFKLSDSL SIN
STECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYI
[0316] SQMKACDGINDCGDQSDDELCKACQKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVD CITGEDEVGC
AGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSL LPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDL PW
QVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTA AHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDR
IIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPR SIPACVPWSPYLFQPNDCIVSGWGR
EKDNERV FSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFY EKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCM
DANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV
(SEQ ID NO: 32)

[0317] 在一些实施方案中,补体因子I的氨基酸序列是SEQ ID NO:33,它对应于NCBI登录号NP_000195。在其他实施方案中,补体因子I的氨基酸序列是公开为SEQ ID NO:33的第19至583位的序列。

MKLLHVLLFLLCFHLRFCKVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTC
VCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGTKFLNNGTCTAEGKFSVSLKH
GNTDSEGIVEVKLVDQDKTMFICKSSWSMREANVACL DLGFQQGADTQRRFKLSDSL SIN
STECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYI
[0318] SQMKACDGINDCGDQSDDELCKACQKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVD CITGEDEVGC
AGFASVAQEETEILTADMDAERRRIKSL LPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDL PW
QVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTA AHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDR
IIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPR SIPACVPWSPYLFQPNDCIVSGWGR
EKDNERV FSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFY EKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCM
DANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV
(SEQ ID NO: 33)

[0319] 编码补体因子I的野生型核苷酸序列是具有NCBI登录号NM_000204的核苷酸序列,在此公开为SEQ ID NO:34。

ATGAAGCTTCTTCATGTTTTCTGTTATTTCTGTGCTTCCACTTAAGGTTTTGCAAGGT
CACTTATACATCTCAAGAGGATCTGGTGGAGAAAAAGTGCTTAGCAAAAAATATACT
[0320] CACCTCTCCTGCGATAAAGTCTTCTGCCAGCCATGGCAGAGATGCATTGAGGGCACCT
GTGTTTGTA AACTACCGTATCAGTGCCCAAAGAATGGCACTGCAGTGTGTGCAACTAA
CAGGAGAAGCTTCCCAACATACTGTCAACAAAAGAGTTTGG AATGTCTTCATCCAGG
GACAAAGTTTTTAAATAACGGAACATGCACAGCCGAAGGAAAGTTTAGTGTTCCTT

[0321] GAAGCATGGAAATACAGATTCAGAGGGAATAGTTGAAGTAAAACCTGTGGACCAAGA
 TAAGACAATGTTTCATATGCAAAAGCAGCTGGAGCATGAGGGAAGCCAACGTGGCCTG
 CCTTGACCTTGGGTTTCAACAAGGTGCTGATACTCAAAGAAGGTTTAAAGTTGTCTGAT
 CTCTCTATAAATCCACTGAATGTCTACATGTGCATTGCCGAGGATTAGAGACCAGTTT
 GGCTGAATGTACTTTTACTAAGAGAAGAAGTATGGGTTACCAGGATTCGCTGATGTG
 GTTTGTTATACACAGAAAGCAGATTCTCCAATGGATGACTTCTTTCAGTGTGTGAATG
 GGAAATACATTTCTCAGATGAAAGCCTGTGATGGTATCAATGATTGTGGAGACCAAAG
 TGATGAACTGTGTTGTAAAGCATGCCAAGGCAAAGGCTTCCATTGCAAATCGGGTGTT
 TGCATTCCAAGCCAGTATCAATGCAATGGTGAGGTGGACTGCATTACAGGGGAAGATG
 AAGTTGGCTGTGCAGGCTTTGCATCTGTGGCTCAAGAAGAAACAGAAATTTGACTG
 CTGACATGGATGCAGAAAGAAGACGGATAAAATCATTATTACCTAAACTATCTTGTGG
 AGTAAAAACAGAATGCACATTCGAAGGAAACGAATTGTGGGAGGAAAGCGAGCAC
 AACTGGGAGACCTCCCATGGCAGGTGGCAATTAAGGATGCCAGTGGAAATCACCTGTG
 GGGGAATTTATATTGGTGGCTGTTGGATTCTGACTGCTGCACATTGTCTCAGAGCCAGT
 AAAACTCATCGTTACCAAATATGGACAACAGTAGTAGACTGGATACACCCCGACCTTA
 AACGTATAGTAATTGAATACGTGGATAGAATTATTTCCATGAAAACATAATGCAGGC
 ACTTACCAAATGACATCGCTTTGATTGAAATGAAAAAAGACGGAAACAAAAAAGAT
 TGTGAGCTGCCTCGTTCCATCCCTGCCTGTGTCCCCTGGTCTCCTTACCTATTCCAACC
 TAATGATACATGCATCGTTTCTGGCTGGGGACGAGAAAAGATAACGAAAGAGTCTTT
 TCACTTCAGTGGGGTGAAGTTAAACTAATAAGCAACTGCTCTAAGTTTTACGGAAATC
 GTTCTATGAAAAAGAAATGGAATGTGCAGGTACATATGATGGTTCCATCGATGCCTGT
 AAAGGGGACTCTGGAGGCCCTTAGTCTGTATGGATGCCAACAATGTGACTTATGTCT
 GGGGTGTTGTGAGTTGGGGGAAAACACTGTGGAAAACCAGAGTTCCAGGTGTTTACA
 CCAAAGTGGCCAATTATTTGACTGGATTAGCTACCATGTAGGAAGGCCTTTTATTCT
 CAGTACAATGTATAA

(SEQ ID NO: 34)

[0322] 在一些实施方案中,本发明中使用的补体因子I的核苷酸序列是经过密码子优化的。

[0323] 编码补体因子I的优选核苷酸序列是SEQ ID NO:35所示的核苷酸序列。

[0324] ATGAAACTGCTGCATGTCTTCCTCCTCTTCCTGTGCTTCCACCTCCGTTTCTGTAAAGT
 CACCTACACTAGCCAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAATGCCTGGCCAAGAAGTATAC
 CCACCTGAGCTGCGACAAAGTGTCTGCCAGCCCTGGCAACGCTGCATTGAAGGTAC
 TTGTGTGTGCAAGCTGCCCTACCAGTGCCCAAGAACGGCACGGCCGTGTGTGCCAC
 CAACAGGAGGAGCTTCCCCACCTACTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAATGCCTCCACCC
 TGGCACCAAGTTTCTGAACAACGGGACCTGCACAGCCGAGGGGAAATTCAGCGTCTC
 CCTCAAGCACGGCAATACAGACTCCGAGGGCATTGTGGAAGTGAAGCTGGTGGACCA
 GGACAAGACCATGTTTCATCTGCAAAAGCAGCTGGTCCATGCGGGAGGCCAATGTCGC
 CTGCCTGGACCTGGGCTTCCAGCAGGGCGCTGATACACAGCGCCGCTTTAAACTCAG
 TGACCTCAGCATCAACAGCACTGAGTGTCTGCACGTGCACTGCCGGGGCCTGGAGAC
 CAGCCTGGCTGAGTGCACCTTACCAAGCGCAGGACCATGGGCTACCAGGATTTTGC
 AGATGTGGTCTGCTACACCCAGAAGGCAGACAGCCCCATGGATGACTTCTTCCAGTGT

[0325] GTCAATGGCAAGTACATTTCCCAGATGAAGGCTTGTGACGGGATCAATGATTGCGGGG
 ATCAGAGCGATGAGCTCTGCTGCAAGGCCTGCCAAGGGAAGGGCTTTCCTGTAAGT
 CTGGGGTGTGCATCCCTTCTCAGTATCAGTGCAACGGAGAGGTGGACTGCATCACTGG
 GGAGGACGAGGTGGGCTGTGCTGGCTTCGCCTCTGTGGCCCAGGAGGAGACAGAGA
 TCCTCACAGCTGACATGGATGCAGAGCGGCGGCATCAAGAGTCTGCTCCCAAAGC
 TCTCCTGCGGCGTTAAGAATCGCATGCACATCCGGAGGAAGCGGATCGTTGGAGGCA
 AACGGGCTCAGCTGGGGGACTTGCCGTGGCAGGTGGCCATCAAAGATGCCTCCGGAA
 TCACCTGTGGTGGCATCTACATCGGCGGCTGCTGGATCCTGACCGCCGCCACTGCCT
 TCGGGCCAGCAAGACTCACCGCTACCAGATCTGGACCACCGTGGTGGATTGGATTCA
 CCCCAGCTGAAGAGGATTGTCATTGAGTATGTCGACCGCATCATCTTCCATGAAAAC
 TACAATGCCGGGACGTATCAGAACGACATCGCCCTCATCGAGATGAAGAAGGATGGG
 AACAAGAAGGACTGTGAGCTGCCTCGCTCCATCCCCGCTGTGTACCATGGTCTCCGT
 ACCTGTTCCAGCCAAATGACACATGCATCGTGAGCGGCTGGGGCCGCGAGAAAGACA
 ACGAGAGGGTCTTCTCCCTGCAGTGGGGTGAAGTCAAGCTGATCAGCAACTGCTCCA
 AGTTCTACGGCAACCGCTTCTATGAGAAGGAGATGGAGTGCGCCGGCACCTATGACG
 GCAGCATTGACGCGTGCAAGGGAGACAGTGGGGGCCCCCTGGTCTGCATGGACGCC
 AACAATGTGACCTACGTGTGGGGAGTTGTGTCCTGGGGCGAGAAGTGTGGCAAGCCT
 GAGTTCCCGGGCGTGTACACAAAGGTGGCAAACCTATTTTGACTGGATCTCCTATCACG
 TTGGCAGGCCCTTCATTTACAGTACAACGTA
 (SEQ ID NO: 35)

[0326] 另一个编码补体因子I的密码子优化核苷酸序列的实例是SEQ ID NO:36。

[0327] ATGAAGCTGCTGCATGTCTTTCTGCTGTTTCTGTGCTTCCATCTGCGGTTCTGTAAAGT
 GACCTATACTAGCCAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAGTGTCTGGCCAAGAAGTACAC
 ACACCTGAGCTGCGACAAGGTGTTCTGTGTCAGCCTTGGCAGCGGTGCATCGAGGGCAC
 CTGCGTGTGCAAGCTGCCTTACCAGTGCCCAAAGAACGGCACCGCCGTGTGCGCCAC
 AAATCGGAGATCTTTTCCAACATATTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAGTGTCTGCACCCC
 GGCACCAAGTTCCTGAACAATGGCACCTGCACAGCCGAGGGCAAGTTTTCTGTGAGC
 CTGAAGCACGGCAACACAGATAGCGAGGGCATCGTGGAGGTGAAGCTGGTGGACCA
 GGATAAGACCATGTTTCATCTGTAAGAGCTCCTGGTCCATGAGGGAGGCAAACGTGGC
 ATGCCTGGATCTGGGATTCCAGCAGGGAGCAGACACACAGAGGCGCTTTAAGCTGTC
 CGACCTGTCTATCAATAGCACCGAGTGCCTGCACGTGCACTGTAGGGGCCTGGAGAC
 ATCCCTGGCAGAGTGCACCTTCACAAAGCGGAGAACCATGGGCTACCAGGACTTTGC
 CGACGTGGTGTGCTATACCCAGAAGGCCGATAGCCCCATGGACGATTTCTTTCAAGTGC
 GTGAACGGCAAGTATATCTCCAGATGAAGGCCTGCGACGGCATCAATGACTGTGGC
 GATCAGTCTGACGAGCTGTGCTGTAAGGCCTGTCAGGGCAAGGGCTTCCACTGCAAG
 AGCGGCGTGTGCATCCCTTCCAGTACCAGTGCACGGCGAGGTGGATTGTATACA
 GGAGAGGACGAAGTGGGATGCGCAGGATTTGCATCTGTGGCACAGGAGGAGACAGA
 GATCCTGACAGCCGACATGGATGCCGAGAGGCGCCGGATCAAGTCTCTGCTGCCTAA
 GCTGAGCTGTGGCGTGAAGAATCGGATGCACATCAGAAGGAAGCGCATCGTGGGAG
 GCAAGAGGGCACAGCTGGGCGATCTGCCATGGCAGGTGGCCATCAAGGACGCCTCTG

GCATCACCTGCGGCGGCATCTACATCGGAGGATGTTGGATCCTGACCGCAGCACACTG
 CCTGAGAGCAAGCAAGACACACAGGTATCAGATCTGGACCACAGTGGTGGATTGGAT
 CCACCCAGACCTGAAGAGAATCGTGATCGAGTACGTGGATAGGATCATCTTTCACGAG
 AACTACAATGCCGGCACATATCAGAACGACATCGCCCTGATCGAGATGAAGAAGGAT
 GGCAATAAGAAGGACTGTGAGCTGCCAGATCCATCCCTGCATGCGTGCCATGGAGC
 CCCTATCTGTTCCAGCCCAACGATACCTGCATCGTGTCCGGATGGGGAAGGGAGAAG
 [0328] GACAATGAGCGGGTGTCTTCTCTGCAAGTGGGGCGAGGTGAAGCTGATCTCCAAGTGT
 TCTAAGTTCTACGGCAATAGGTTTTATGAGAAGGAGATGGAGTGCGCCGGCACCTACG
 ATGGCAGCATCGACGCCTGTAAGGGCGATTCCGGAGGACCACTGGTGTGCATGGACG
 CAAACAATGTGACATACGTGTGGGGAGTGGTGTCTGGGGAGAGAACTGCGGCAAG
 CCAGAGTTCCCCGGCGTATATACCAAGGTGGCCAATTATTTTGATTGGATTCCTACCA
 CGTCCGGCAGGCCCTTATTTCCAGTATAATGTCTAA
 (SEQ ID NO: 36)

[0329] 在一些实施方案中,编码补体因子I的核苷酸序列与SEQ ID NO:34、35或36,优选SEQ IDNO:35,具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,所述核苷酸序列编码的蛋白质基本上保留了SEQ ID NO:34、35或36代表的蛋白质的功能活性。

[0330] 在其他实施方案中,编码补体因子I的核苷酸序列是SEQ ID NO:34、35或36,优选SEQ IDNO:35。

[0331] 在其他实施方案中,编码补体因子I的核苷酸序列与SEQ ID NO:34、35或36,优选SEQ IDNO:35的第55至1752位具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,所述核苷酸序列编码的蛋白质基本上保留了SEQ ID NO:32或33所代表的蛋白质的功能活性。

[0332] 在其他实施方案中,编码补体因子I的核苷酸序列是SEQ ID NO:34、35或36,优选SEQ IDNO:35的第55至1752位。

[0333] 在其他实施方案中,编码补体因子I的核苷酸序列编码的氨基酸序列与SEQ ID NO:32或33具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,其中所述氨基酸序列基本上保留了SEQ ID NO:32或33所代表的蛋白质的功能活性。

[0334] 在其他实施方案中,编码补体因子I的核苷酸序列编码氨基酸序列SEQ ID NO:32或33。

[0335] 在另一个实施方案中,编码补体因子I的核苷酸序列编码的氨基酸序列与SEQ ID NO:32或33的第19至583位具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性。优选地,其中所述氨基酸序列基本上保留了SEQ ID NO:32或33所代表的蛋白质的功能活性。

[0336] 在其他实施方案中,编码补体因子I的核苷酸序列编码SEQ ID NO:32或33的19至583位的氨基酸序列。

[0337] 本发明的一个优点是,补体因子I特别难以以纯化蛋白的形式制备。因此,发明人设计了一种调节补体系统的方法,例如,通过以包含补体因子I的编码核苷酸序列的AAV载体的形式施用补体因子I,以实现与年龄相关性黄斑变性(AMD)的治疗。所述AAV载体可被施用于目的部位,例如眼睛,以实现补体因子I多肽的原位翻译。

[0338] 补体因子H(CFH)

[0339] 补体因子H(Factor H,CFH)是一种补体控制蛋白。

[0340] 补体因子H是一种大的(155kDa)、可溶性糖蛋白,在人类血浆中的典型浓度为200-300 μ g/mL(Hakobyan等(2008)49(5)。1983-90)。补体因子H的主要功能是调节补体系统的替代途径。

[0341] 补体因子H为补体因子I介导的C3b的裂解提供辅助因子活性。补体因子H还能增加C3bBb复合物(C3转化酶)和(C3b)NBB复合物(C5转化酶)的解离率,从而降低替代补体途径的活性。

[0342] 补体因子H由20个补体控制蛋白(CCP)模块(也被称为短共有重复或sushi结构域)组成,这些模块通过短接头(3到8个氨基酸残基之间)相互连接,并以头尾相连的方式排列。每个CCP模块由大约60个氨基酸组成,四个半胱氨酸残基以1-3 2-4的排列方式进行二硫键连接,还有一个围绕几乎不变的色氨酸残基的疏水核心。CCP模块从1-20编号(从蛋白质的N端开始)。CCP 1-4和CCP 19-20与C3b接合,而CCP 7和CCP 19-20与GAG和唾液酸结合(Schmidt等(2008)Journal of Immunology 181:2610-2619)。

[0343] 已有研究表明,使用补体因子H的基因治疗可以改善小鼠中诱发的AMD样病变(Cashman等人(2015)J.Gene Med.17:229-243)。小鼠在视网膜下共同注射了:(i)表达补体成分C3的腺病毒载体,其先前已被证明可再现人类AMD的许多病理特征;和(ii)表达补体因子H的腺病毒载体。相对于接受GFP而不是补体因子H的对照动物,补体因子H转导的小鼠显示内皮细胞增殖减少91%,RPE萎缩减少69%。视网膜电图显示,接受补体因子H的小鼠视网膜功能得到改善,而视紫红质和RPE65的免疫细胞化学反应与此类动物的光感受器和RPE的拯救一致。

[0344] 在一些实施方案中,补体因子H多肽或其片段或变体能够作为补体因子I介导的C3b裂解的辅助因子。在一些实施方案中,补体因子H多肽或其片段或变体能够增加C3转化酶和C5转化酶的解离率。

[0345] 在优选的实施方案中,补体因子H多肽或其片段或变体能够作为补体因子I介导的C3b裂解的辅助因子,并增加C3转化酶和C5转化酶的解离率。

[0346] 补体因子H或其片段或衍生物的辅助因子活性和解离加速活性可以用技术人员已知的任何合适的方法来测定。例如,补体因子H的辅助因子活性的测定在Sánchez-Corral, P.等人,2002中描述。The American Journal of Human Genetics,71(6),pp.1285-1295和补体因子H的解离加速活性的测量描述于Wong,E.K.等人,2014,Journal of the American Society of Nephrology,25(11),pp.2425-2433中。

[0347] 在一些实施方案中,补体因子H是人补体因子H。

[0348] 一个人补体因子H蛋白的实例是具有UniProtKB登录号P08603的人补体因子H蛋白。这个实例的序列长度为1231个氨基酸(公开为SEQ ID NO:37),其中1至18个氨基酸形成一个信号序列。

[0349] 在一些实施方案中,补体因子H的氨基酸序列是SEQ ID NO:37,在其他实施方案中,补体因子H的氨基酸序列是SEQ ID NO:37的第19至1231位。优选地,变体或片段基本上保留了SEQ ID NO:37代表的蛋白质的功能活性

MRL LAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLG
 NVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDTDFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGY
 QLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVC
 NSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIYKENERFQYKCN
 MGYEYSERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGF
 YPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYYC
 DEHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGKSIDVAC
 HPGYALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSKSSIDIENGFISESQYTYALKEKAKYQC
 KLGVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTWFKLNDTLDYEC
 HDGYESNTGSTTGSIVCGYNGWSDLPICYERECELPKIDVHLVPDRKKDQYKVGVLKF
 SCKPGFTIVGPNVQCYHFGLSPDLPICKEQVQSCGPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVV
 EYYCNPFLMKGPNKIQCVDGEWTTLPVCIVEESTCGDIPELEHGWAQLSSPPYYGDSV
 EFNCSESF TMIGHRSITCIHGVWTQLPQCV AIDK LKKCKSSNLIILEHLKNKKEFDHNSNI
 RYRCRGKEGWIH TVCINGRWDPEVNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNM TTTLN YRDGEKVS
 VLCQENYLIQEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRSSQESYAHGTKLS
 YTCEGGFRISEENETTCYMGKWSSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEEVTYK
 CFEGFGIDGPAIAKCLGEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAIPMGEKKDVYKAGEQVTTYTC
 ATYYKMDGASNVTCINSRWTGRPTCRDTSCVNPPTVQNAYIVSRQMSKYPSGERVRYQC
 RSPYEMFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQ
 CONLYQLEGNKRITCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAQKLYSRTGESV
 EFVCKRGYRLSSRSHLRTTCWDGKLEYPTCAKR
 (SEQ ID NO: 37)

[0351] 编码补体因子H的核苷酸序列的实例是具有NCBI登录号NM_000186的核苷酸序列。

[0352] 在一些实施方案中,编码补体因子H的核苷酸序列是SEQ ID NO:38。

ATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGA
 TTGCAATGAACTTCCTCCAAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCTGGTCTGAC
 CAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTATCTATAAATGCCGCCCTGGATATAGATCTCT
 TGGAAATGTAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGGGTTGCTCTTAATCCATTAAGG
 AAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCCTGGAGATACTCCTTTTGGTACTTTTACCC
 TTACAGGAGGAAATGTGTTTGAATATGGTGTAAGCTGTGTATACATGTAATGAGGG
 GTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCGTGAATGTGACACAGATGGATGGACCAAT
 GATATTCCTATATGTGAAGTTGTGAAGTGT TACCAGTGACAGCACCAGAGAATGGAA
 AAATTGTCAGTAGTGAATGGAACCAGATCGGGAATACCATTTTGGACAAGCAGTACG
 GTTTGTATGTA ACTCAGGCTACAAGATTGAAGGAGATGAAGAAATGCATTGTT CAGAC
 GATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAAACCAAAGTGTGTGGAAATTT CATGCAAATCCCCA
 GATGTTATAAATGGATCTCCTATATCTCAGAAGATTATTTATAAGGAGAATGAACGATTT
 CAATATAAATGTAACATGGGTTATGAATACAGTGAAAGAGGAGATGCTGTATGCACTG
 AATCTGGATGGCGTCCGTTGCCTTCATGTGAAGAAAATCATGTGATAATCCTTATATT

[0354]

CCAAATGGTGACTACTCACCTTTAAGGATTAACACAGAAGCTGGAGATGAAATCACGT
ACCAGTGTAGAAATGGTTTTTATCCTGCAACCCGGGAAATACAGCAAATGCACAA
GTAAGTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACCTTGAAACCTTGTGATTATCCAGACATT
AAACATGGAGGTCTATATCATGAGAATATGCGTAGACCATACTTCCAGTAGCTGTAGG
AAAATATTACTCCTATTACTGTGATGAACATTTTGAGACTCCGTCAGGAAGTTACTGGG
ATCACATTCATTGCACACAAGATGGATGGTCGCCAGCAGTACCATGCCTCAGAAAATG
TTATTTTCCTTATTTGGAAAATGGATATAATCAAATCATGGAAGAAAGTTTGTACAGG
GTAAATCTATAGACGTTGCCTGCCATCCTGGCTACGCTCTTCCAAAAGCGCAGACCAC
AGTTACATGTATGGAGAATGGCTGGTCTCCTACTCCCAGATGCATCCGTGTCAAACA
TGTTCCAAATCAAGTATAGATATTGAGAATGGGTTTATTTCTGAATCTCAGTATACATAT
GCCTTAAAAGAAAAGCGAAATATCAATGCAAAGTACTAGGATATGTAACAGCAGATGGT
GAAACATCAGGATCAATTACATGTGGGAAAGATGGATGGTCAGCTCAACCCACGTGC
ATTAAATCTTGTGATATCCCAGTATTTATGAATGCCAGAACTAAAATGACTTCACATG
GTTTAAGCTGAATGACACATTGGACTATGAATGCCATGATGGTTATGAAAGCAATACTG
GAAGCACCCTGGTTCCATAGTGTGTGGTTACAATGGTTGGTCTGATTTACCCATATGT
TATGAAAGAGAATGCGAACTTCCTAAAATAGATGTACACTTAGTTCCTGATCGCAAGA
AAGACCAGTATAAAGTTGGAGAGGTGTTGAAATTCTCCTGCAAACCAGGATTTACAAT
AGTTGGACCTAATCCGTTTCAGTGCTACCCTTTGGATTGTCTCCTGACCTCCCAATAT
GTAAAGAGCAAGTACAATCATGTGGTCCACCTCCTGAACTCCTCAATGGGAATGTTAA
GGAAAAACGAAAGAAGAATATGGACACAGTGAAGTGGTGGAAATATTATTGCAATCC
TAGATTTCTAATGAAGGGACCTAATAAAATTCATGTGTTGATGGAGAGTGGACAACCT
TTACCAGTGTGTATTGTGGAGGAGAGTACCTGTGGAGATATACCTGAACTTGAACATG
GCTGGGCCCAGCTTTCTTCCCCTCCTTATTACTATGGAGATTCAGTGGAAATTCATATGC
TCAGAATCATTTACAATGATTGGACACAGATCAATTACGTGTATTTCATGGAGTATGGAC
CCAACCTCCCCAGTGTGTGGCAATAGATAAACTTAAGAAGTGCAAATCATCAAATTTA
ATTATACTTGAGGAACATTTAAAAACAAGAAGGAATTCGATCATAATTCTAACATAAG
GTACAGATGTAGAGGAAAAGAAGGATGGATACACACAGTCTGCATAAATGGAAGATG
GGATCCAGAAGTGAAGTCTCAATGGCACAAATACAATTATGCCACCTCCACCTCAG
ATTCCCAATTCTCACAATATGACAACCACACTGAATTATCGGGATGGAGAAAAAGTAT
CTGTTCTTTGCCAAGAAAATTATCTAATTCAGGAAGGAGAAGAAATTACATGCAAAGA
TGGAAGATGGCAGTCAATACCACTCTGTGTTGAAAAAATTCATGTTTACAACCACCT
CAGATAGAACACGGAACCATTAATTCATCCAGGTCTTACAAGAAAGTTATGCACATG
GGACTAAATTGAGTTATACTTGTGAGGGTGGTTTCAGGATATCTGAAGAAAATGAAAC
AACATGCTACATGGGAAAATGGAGTTCTCCACCTCAGTGTGAAGGCCTTCTTGTA
TCTCCACCTGAGATTTCTCATGGTGTGTAGCTCACATGTCAGACAGTTATCAGTATGG
AGAAGAAGTTACGTACAAATGTTTTGAAGGTTTTGGAATTGATGGGCCTGCAATTGCA
AAATGCTTAGGAGAAAAATGGTCTCACCTCCATCATGCATAAAAACAGATTGTCTCA
GTTTACCTAGCTTTGAAAATGCCATACCCATGGGAGAGAAGAAGGATGTGTATAAGGC
GGGTGAGCAAGTGAAGTACTTACACTTGTGCAACATATTACAAAATGGATGGAGCCAGTAA
GTAACATGCATTAATAGCAGATGGACAGGAAGGCCAACATGCAGAGACACCTCCTGT

GTGAATCCGCCACAGTACAAAATGCTTATATAGTGTGCGAGACAGATGAGTAAATATCC
ATCTGGTGAGAGAGTACGTTATCAATGTAGGAGCCCTTATGAAATGTTTGGGGATGAA
GAAGTGATGTGTTTAAATGGAACTGGACGGAACACCTCAATGCAAAGATTCTACA
GGAAAATGTGGGCCCCCTCCACCTATTGACAATGGGGACATTACTTCATTCCCCTGTG
CAGTATATGCTCCAGCTTCATCAGTTGAGTACCAATGCCAGA ACTTGTATCAACTTGAG
[0355] GGTAACAAGCGAATAACATGTAGAAATGGACAATGGTCAGAACCACCAAATGCTTA
CATCCGTGTGTAATATCCCGAGAAATTATGGAAAATTATAACATAGCATTAAGGTGGAC
AGCCAAACAGAAGCTTTATTTCGAGAACAGGTGAATCAGTTGAATTTGTGTGTAAACG
GGGATATCGTCTTTCATCACGTTCTCACACATTGCGAACAACATGTTGGGGATGGGAAA
CTGGAGTATCCA ACTTGTGCAAAAAGATAG
(SEQ ID NO: 38)

[0356] 在一些实施方案中,编码补体因子H的核苷酸序列与SEQ ID NO:38具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,其中核苷酸序列编码的蛋白质基本上保留了SEQ ID NO:37所代表的蛋白质的功能活性。

[0357] 在其他实施方案中,编码补体因子H的核苷酸序列是SEQ ID NO:38。

[0358] 在其他实施方案中,编码补体因子H的核苷酸序列与SEQ ID NO:38的第55至3696位具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,其中核苷酸序列编码的蛋白质基本上保留了SEQ ID NO:37代表的蛋白质的功能活性。

[0359] 在其他实施方案中,编码补体因子H的核苷酸序列是SEQ ID NO:38的第55至3696位。

[0360] 在其他实施方案中,编码补体因子H的核苷酸序列编码的氨基酸序列与SEQ ID NO:37具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,其中所述氨基酸序列基本上保留了SEQ ID NO:37所代表的蛋白质的功能活性。

[0361] 在其他实施方案中,编码补体因子H的核苷酸序列编码氨基酸序列SEQ ID NO:37。

[0362] 在另一个实施方案中,编码补体因子H的核苷酸序列编码的氨基酸序列与SEQ ID NO:37的第19至1231位具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性。优选地,其中所述氨基酸序列基本上保留了SEQ ID NO:37所代表蛋白质的功能活性。

[0363] 在其他实施方案中,编码补体因子H的核苷酸序列编码SEQ ID NO:37的第19至1231位的氨基酸序列。

[0364] 补体因子H样蛋白1 (FHL1)

[0365] 补体因子H样蛋白1 (FHL1) 是补体因子H的一个剪接变体,含有补体因子H的前7个CCP,后有一个4个氨基酸的羧基末端(Clark, S.J.等人(2015) J Clin Med 4:18-31)。FHL1的调节活性已被证明与补体因子H相当(Mannes, M.,等人2020. Frontiers in Immunology, 11;596415)。

[0366] 在一些实施方案中,FHL1多肽或其片段或变体能够作为补体因子I介导的C3b裂解的辅助因子发挥作用。在一些实施方案中,FHL1多肽或其片段或变体能够增加C3转化酶和C5转化酶的解离率。

[0367] 在优选的实施方案中,FHL1多肽或其片段或变体能够作为补体因子I介导的C3b裂解的辅助因子,增加C3转化酶和C5转化酶的解离率。

[0368] FHL1多肽或其片段或衍生物的辅助因子活性和解离加速活性可使用技术人员已

知的任何合适的方法来确定。例如,上面描述的那些关于补体因子H的检测方法或Mannes, M.等人,2020.Frontiers in Immunology,11;596415中描述的任何检测方法。

[0369] 在一些实施方案中,FHL1是人FHL1。

[0370] 在一些实施方案中,FHL1的氨基酸序列是SEQ ID NO:39。优选地,变体或片段基本上保留了SEQ ID NO:39所代表的蛋白质的功能活性。适当地,FHL1的片段或变体可以保留SEQ IDNO:39所代表的蛋白质的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的辅助因子活性和/或解离加速活性。

MRLLAIIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLG
 NIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQ
 LLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCN
 SGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNM
 [0371] GYEYSERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIYPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFY
 PATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYICDE
 HFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYPYLENGYNQNYGRKFVQKSIDVACHP
 GYALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVSFTL
 (SEQ ID NO: 39)

[0372] 编码FHL1的核苷酸序列的一个实例是。

ATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGA
 TTGCAATGAACTTCCTCCAAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCTGGTCTGAC
 CAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTATCTATAAATGCCGCCCTGGATATAGATCTCT
 TGGAAATATAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGGGTTGCTCTTAATCCATTAAGG
 AAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCCTGGAGATACTCCTTTTGGTACTTTTACCC
 TTACAGGAGGAAATGTGTTTGAATATGGTGTAAGCTGTGTATACATGTAATGAGGG
 GTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCGTGAATGTGACACAGATGGATGGACCAAT
 GATATTCCTATATGTGAAGTTGTGAAGTGTACCAGTGACAGCACCAGAGAATGGAA
 AAATTGTCAGTAGTGCAATGGAACAGATCGGGAATACCATTTGGACAAGCAGTACG
 GTTTGTATGTAACCTCAGGCTACAAGATTGAAGGAGATGAAGAAATGCATTGTTGAGAC
 [0373] GATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAAACCAAAGTGTGTGGAAATTTTCATGCAAATCCCA
 GATGTTATAAATGGATCTCCTATATCTCAGAAGATTATTTATAAGGAGAATGAACGATTT
 CAATATAAATGTAACATGGGTTATGAATACAGTGAAAGAGGAGATGCTGTATGCACTG
 AATCTGGATGGCGTCCGTTGCCTTCATGTGAAGAAAATCATGTGATAATCCTTATATT
 CCAAATGGTGACTACTCACCTTTAAGGATTAACACAGAACTGGAGATGAAATCACGT
 ACCAGTGTAGAAATGGTTTTTATCCTGCAACCCGGGAAATACAGCaAAATGCACAAG
 TACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACCTTGAAACCTTGTGATTATCCAGACATTA
 AACATGGAGGTCTATATCATGAGAATATGCGTAGACCATACTTTCCAGTAGCTGTAGGA
 AAATATTACTCCTATTACTGTGATGAACATTTGAGACTCCGTCAGGAAGTTACTGGGA
 TCACATTCATTGCACACAAGATGGATGGTCGCCAGCAGTACCATGCCTCAGAAAATGT
 TATTTTCCTTATTTGGAAAATGGATATAATCAAATTTATGGAAGAAAGTTTGTACAGGG
 TAAATCTATAGACGTTGCCTGCCATCCTGGCTACGCTCTTCCAAAAGCGCAGACCACA
 GTTACATGTATGGAGAATGGCTGGTCTCCTACTCCCAGATGCATCCGTGTCAGCTTTAC
 [0374] CCTCTGA
 (SEQ ID NO: 40)

[0375] 本发明中使用的FHL1的核苷酸序列优选地经过密码子优化。

[0376] 编码FHL1的优选核苷酸序列是SEQ ID NO:41。

ATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCTGAGG
 ACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAGGGAGCTGGTCT
 GACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGGCCGGGCTACAGG
 AGCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAAAGGGCGAATGGGTGGCCCTCAACCCC
 CTGAGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCCGGGGACACACCCTTCGGGAC
 CTTACCCCTGACCGGCGGCAATGTGTTTGAGTACGGCGTGAAGGCTGTCTACACATGC
 AACGAGGGGTACCAGCTGCTGGGCGAGATTA ACTACCGGGAGTGTGACACCGATGGG
 TGGACCAACGACATTCCCATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTCCCCGTGACAGCCCCA
 GAAAATGGCAAATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCGCGAATATCACTTTGGG
 CAGGCCGTGAGGTTTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGAAGGTGATGAGGAGATG
 CACTGCAGCGATGATGGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCCAAATGTGTGGAGATCTCC
 TGCAAGTCTCCCGACGTGATCAACGGCAGCCCAATCAGCCAGAAGATTATTTACAAA
 GAGAACGAGCGCTTCCAGTACAAGTGTAACATGGGCTATGAGTATTCAGAGAGGGGA
 GATGCCGTCTGCACTGAGAGCGGCTGGAGACCACTGCCTAGCTGCGAGGAAAAGAG
 TTGTGACAACCCTTACATCCCAAATGGCGACTACTCCCCTCTGCGGATCAAACACCGG
 ACCGGGGATGAAATCACCTATCAGTGCCGCAATGGATTCTACCCGGCCACCCGCGGCA
 ACACCGCCAAATGCACCAGCACAGGCTGGATCCCCGCCCCCGCTGTACGCTGAAGC
 CTTGCGACTATCCAGACATCAAGCACGGAGGCCTGTACCACGAAAACATGCGGCGGC
 CTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTACTACAGCTACTACTGCGACGAGCACTTCGA
 GACCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCACATCCACTGCACACAGGACGGCTGGTCTCC
 AGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTACTTCCCCTACCTGGAGAACGGATAACAACA
 GAACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGCAAGAGCATCGATGTGGCCTGCCACCTGG
 CTACGCCCTGCCAAGGCCAGACA ACTGTGACCTGCATGGAGAATGGTTGGAGCCC
 CACCCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTCACGCTC
 (SEQ ID NO: 41)

[0378] 在一些实施方案中,编码FHL1的核苷酸序列与SEQ ID NO:40或41,优选SEQ ID NO:41具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,所述核苷酸序列所编码的蛋白质基本上保留了SEQ ID NO:39所代表的蛋白质的功能活性。

[0379] 在其他实施方案中,编码FHL1的核苷酸序列是SEQ ID NO:40或41,优选SEQ ID NO:41。

[0380] 补体受体1 (CR1)

[0381] 补体受体1 (CR1) 介导细胞与具有激活补体的颗粒和免疫复合物的结合。

[0382] 在一些实施方案中,CR1是人CR1。

[0383] 在一些实施方案中,CR1的氨基酸序列是SEQ ID NO:42。优选地,变体或片段基本上保留了SEQ ID NO:42所代表的蛋白质的功能活性。

MGASSPRSPEVGPAPGLPFCCGSSLAVVLLALPVAWGQCNAPEWLPFARPTNLTDEFEF
 PIGTYLNYECPGYSGRPFISIICLNKNSVWTGAKDRRCRRKSCRNPPDPVNGMVHVIKGIQFGS
 QIKYSCTKGYRLIGSSSATCIISGDTVIWDNETPICDRIPCGLPPTITNGDFISTNRENFHYGSV
 TYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSPAPQCIIPNKCTPPNVENGILVSDNRSL
 FSLNEVVEFRCQPGFVMKGP RRVKCQALNKWEPELPSCSRVCQPPDVLHAERTQRDKDNF
 SPGQEVFYSCEPGYDLRGAASMRCTPQGDWSPAAPTCEVKSCDDFMGQLLN GRVLFVFNLQ
 LGAKVDFVCDEGFQLKGSSASYCVLAGMESLWNSVVPVCEQIFCPSPPVIPNGRHTGKPLEV
 FPFGKTVNYTCDPHPDRGTSFDLIGESTIRCTSDPQNGVWSSPAPRCGILGHCQAPDHFLFA
 KLKTQTNASDFPIGTSKLYECPPEYYGRPFISITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDPVNGM
 VHVIDIQVGSRINYSCTTGHRLIGHSAECILSGNAAHWSTKPPICQRIPCGLPPTIANGDFIST
 NRENFHYGSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSPAPQCIIPNKCTPPNV
 ENGILVSDNRSLFSLNEVVEFRCQPGFVMKGP RRVKCQALNKWEPELPSCSRVCQPPDVLH
 AERTQRDKDNFSPGQEVFYSCEPGYDLRGAASMRCTPQGDWSPAAPTCEVKSCDDFMGQL
 LN GRVLFVFNLQLGAKVDFVCDEGFQLKGSSASYCVLAGMESLWNSVVPVCEQIFCPSPPVI
 PNGRHTGKPLEVFPFGKAVNYTCDPHPDRGTSFDLIGESTIRCTSDPQNGVWSSPAPRCGIL
 GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSKLYECPPEYYGRPFISITCLDNLVWSSPKDVCKRK
 SCKTPDPVNGMVHVIDIQVGSRINYSCTTGHRLIGHSSAECILSGNTAHWSTKPPICQRIPC
 GLPPTIANGDFISTNRENFHYGSVVTYRCNLGSRGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSP
 PQCIIPNKCTPPNVENGILVSDNRSLFSLNEVVEFRCQPGFVMKGP RRVKCQALNKWEPELPS
 CSRVCQPPPEILHGEHTPSHQDNFSPGQEVFYSCEPGYDLRGAASLHCTPQGDWSPEAPRCA
 VKSCDDFLGQLPHGRVLFPLNLQLGAKVSFVCDEGFRLKGSSVSHCVLVGM RSLWNSVVPV
 CEHIFCPNPPAILNGRHTGTPSGDIPYGKEISYTCDDPHPDRGMTFNLIGESTIRCTSDPHGNGV
 WSSPAPRCELSVRAGHCKTPEQPFASPTIPINDFEFPVGTSLNYECPGYSFGKMFISLENL
 VWSSVEDNCRKSCGPPPEPFNGMVHINTDTQFGSTVNYSCNEGFRLIGSPSTTCLVSGNNV
 TWDKKAPICEIISCEPPPTISNGDFYSNNRTSFHNGTVVTYQCHTGPDGEQLFELVGERSIYCT
 SKDDQVGVWSSPPRCISTNKCTAPEVENAIRVPGNRSFFSLTEIIRFCQPGFVMVGSHTVQC
 QTNGRWGPKLPHCSRVCQPPPEILHGEHTLSHQDNFSPGQEVFYSCEPSYDLRGAASLHCTP
 QGDWSPEAPRCTVKSCDDFLGQLPHGRVLLPLNLQLGAKVSFVCDEGFRLKGRSASHCVLA
 GMKALWNSVVPVCEQIFCPNPPAILNGRHTGTPFGDIPYGKEISYACDTHPDRGMTFNLIGES
 SIRCTSDPQNGVWSSPAPRCELSVPAACPHPPKIQNGHYIGGHVSLYLPGMTISYICDPGYLL
 VGKGFIFCTDQGIWSQLDHYCKEVNCSFPLFMNGISKELEMKKVYHYGDYVTLKCEDGYTL
 EGSPWSQCQADDRWDPLAKCTSRTHDALIVGTLSGTIFFILLIIFLSWILKHRKGNNAHENP
 KEVAIHLHSQGGSSVHPRTLQTNEENSRLP

(SEQ ID NO: 42)

[0385] 膜辅蛋白 (MCP)

[0386] MCP作为CFI的一个辅助因子。

[0387] 在一些实施方案中, MCP是人MCP。

[0388] 在一些实施方案中, MCP的氨基酸序列是SEQ ID NO: 43或其变体或片段。优选地, 变体或片段基本上保留了SEQ ID NO: 43所代表的蛋白质的功能活性。

MEPPGRRECPFPSWRFPGLLLAAMVLLLYSFSDACEEPTFEAMELIGKPKPYEIGERVDYK
 CKKGYFYIPPLATHTICDRNHTWLPVSDDACYRETCPYIRDPLNGQAVPANGTYEFGYQMHF
 ICNEGYYLIGEEILYCELKGSVAIWSGKPPICEKVLCPTPPKIKNGKHTFSEVEVFEYLDVAVTY
 [0389] SCDPAPGPDPFSLIGESTIYCGDNSVWSRAAPECKVVKCRFPVVENGKQISGFGKKFYKAT
 VMFECDKGFYLDGSDTIVCDSNSTWDPPVPKCLKVLPPSSTKPPALSHSVSTSSSTTKSPASSA
 SGPRTYKPPVSNYPGYPKPEEGILDSDLVWVIAVIVIAIVVGVAVICVVPYRYLQRRKKKGT
 YLTDETHREVKFTSL
 (SEQ ID NO: 43)

[0390] 接头

[0391] 在优选的实施方案中,编码抗VEGF实体的核苷酸序列在编码补体负调节剂的核苷酸序列的上游。在其他实施方案中,编码补体负调节剂的核苷酸序列在编码抗VEGF实体的核苷酸序列的上游。

[0392] 在这里,“上游”和“下游”都是指DNA或RNA的相对位置。DNA或RNA的每条链都有一个5'端和一个3'端,按照惯例,“上游”和“下游”分别与RNA转录发生的5'至3'方向有关。例如,当考虑双链DNA时,“上游”是朝向编码链的5'端,下游是朝向编码链的3'端。

[0393] 在一些实施方案中,编码抗VEGF实体的核苷酸序列和补体负调节剂通过接头可操作地连接。在一些实施方案中,接头包含自裂解2A肽序列,诸如包含或由Furin裂解位点、GSG、11a1D和F2A序列限定的序列。

[0394] 在一些实施方案中,所述接头是SEQ ID NO:44。

CGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCCGG
 TGAAACAGACTTTGAATTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACC
 [0395] CTGGGCCC
 (SEQ ID NO: 44)

[0396] 在其他实施方案中,所述接头与SEQ ID NO:44具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,优选地,所述接头基本上保留了SEQ ID NO:44的功能活性。

[0397] 所谓“可操作地连接”,应理解为各个部件以一种使它们能够基本不受阻碍地执行其功能的方式连接在一起。

[0398] 产品

[0399] 例如,本发明的产品可以是一种组合物(例如药物组合物),其包含(i)抗VEGF实体;和(ii)补体负调节剂,或其编码的核苷酸序列,混合在一起。或者,所述产品可以是试剂盒,包含(i)抗VEGF实体;和(ii)补体负调节剂,或其编码的核苷酸序列的制剂,以及,任选地向有需要的受试者同时、连续或单独施用制剂的说明。

[0400] 蛋白质转导

[0401] 作为向细胞递送多核苷酸的替代方法,本发明的产品和制剂可以通过蛋白质转导递送到细胞。

[0402] 蛋白质转导可以经由载体传递(Cai, Y. 等人(2014) *Elife* 3:e01911; Maetzig, T. 等人(2012) *Curr. Gene Ther.* 12:389-409)。载体递送涉及病毒颗粒(如慢病毒颗粒)的工程化,以包含要递送到细胞中的蛋白质。因此,当工程化病毒颗粒作为其自然生命周期的一部分进入细胞时,颗粒中包含的蛋白质被带入细胞。

[0403] 蛋白质转导可能是通过蛋白质递送 (Gaj, T. 等人 (2012) Nat. Methods 9:805-7)。例如,可以通过利用载体 (如脂质体) 或甚至通过将蛋白质本身直接施用到细胞中来实现蛋白质递送。

[0404] 多核苷酸

[0405] 本发明的多核苷酸可以包含DNA或RNA, 优选DNA。它们可以是单链的或双链的。技术人员可以理解, 由于遗传密码的简并性, 许多不同的多核苷酸可以编码同一多肽。此外, 应当理解的是, 技术人员可以利用常规技术进行不影响本发明多核苷酸编码的多肽序列的核苷酸替换, 以反映本发明多肽将在其中表达的任何特定宿主生物体的密码子用法。

[0406] 本文公开的本发明的核苷酸序列在其3'端可以包含或缺乏终止密码子, 例如取决于它们在双顺反子载体中的位置。因此, 本发明公开的内容包含有或没有终止密码子的本文公开的SEQ ID NO。

[0407] 多核苷酸可以通过本领域现有的任何方法进行修饰。为了提高本发明的多核苷酸的体内活性或寿命, 可以进行此类修饰。

[0408] 多核苷酸如DNA多核苷酸可通过重组、合成或本领域技术人员可利用的任何手段产生。它们也可以通过标准技术进行克隆。

[0409] 较长的多核苷酸通常用重组方法产生, 例如使用聚合酶链反应 (PCR) 克隆技术。这包含制作一对引物 (例如大约15至30个核苷酸), 在希望克隆的目标序列的两侧, 使引物与从动物或人类细胞中获得的mRNA或cDNA接触, 在使所需区域扩增的条件下进行聚合酶链反应, 分离扩增的片段 (例如通过琼脂糖凝胶纯化反应混合物) 并回收扩增后的DNA。引物可以被设计成含有合适的限制性内切酶识别位点, 以便将扩增的DNA克隆到合适的载体中。

[0410] 多核苷酸可以通过质粒转染或电穿孔递送给细胞; 例如作为非病毒载体, 如裸露的DNA质粒、细菌人工染色体、迷你环技术。这些实体也可以包装比AAV载体更大的转基因, 但可能在稳定性、生物利用度和目标特异性方面略显不足。例如, Eyeevensys公司使用裸露的DNA电穿孔平台, 将治疗性转基因传递到肌肉/眼睛等。

[0411] 在一些实施方案中, 所述多核苷酸包含SEQ ID NO: 45的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列, 或由其组成。

```
CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGT
TCTTGGCGCGCCGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACC
[0412] GCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG
CCTGGCATTATGCCAAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTA
```

[0413]

TTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT
GGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAACAACCTCCGCCCATGACGCAA
ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTGAACCGT
CAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTAGTG
CCACCATGAACTGCTGCATGTCTTCCTCCTCTTCCTGTGCTTCCACCTCCGTTTCTGTAA
AGTCACCTACACTAGCCAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAATGCCTGGCCAAGAAGTATA
CCCACCTGAGCTGCGACAAAAGTGTCTGCCAGCCCTGGCAACGCTGCATTGAAGGTACT
TGTGTGTGCAAGCTGCCCTACCAGTGCCCAAGAACGGCACGGCCGTGTGTGCCACCAA
CAGGAGGAGCTTCCCCACCTACTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAATGCCTCCACCTGGCA
CCAAGTTTCTGAACAACGGGACCTGCACAGCCGAGGGGAAATTCAGCGTCTCCCTCAAG
CACGGCAATACAGACTCCGAGGGCATTGTGGAAGTGAAGCTGGTGGACCAGGACAAGA
CCATGTTTCATCTGCAAAGCAGCTGGTCCATGCGGGAGGCCAATGTCGCCTGCCTGGACC
TGGGCTTCCAGCAGGGCGCTGATACACAGCGCCGCTTTAAACTCAGTGACCTCAGCATCA
ACAGCACTGAGTGTCTGCACGTGCACTGCCGGGGCCTGGAGACCAGCCTGGCTGAGTGC
ACCTTACCAAGCGCAGGACCATGGGCTACCAGGATTTTGCAGATGTGGTCTGCTACACC
CAGAAGGCAGACAGCCCCATGGATGACTTCTTCCAGTGTGTCAATGGCAAGTACATTTCC
CAGATGAAGGCTTGTGACGGGATCAATGATTGCGGGGATCAGAGCGATGAGCTCTGCTGC
AAGGCCTGCCAAGGGAAGGGCTTTCAGTGTAAAGTCTGGGGTGTGCATCCCTTCTCAGTAT
CAGTGCAACGGAGAGGTGGACTGCATCACTGGGGAGGACGAGGTGGGCTGTGCTGGCT
TCGCCTCTGTGGCCCAGGAGGAGACAGAGATCCTCACAGCTGACATGGATGCAGAGCGG
CGGCGCATCAAGAGTCTGCTCCCAAAGCTCTCCTGCGGCGTTAAGAATCGCATGCACATC
CGGAGGAAGCGGATCGTTGGAGGCAAACGGGCTCAGCTGGGGGACTTGCCGTGGCAGG
TGCCATCAAAGATGCCTCCGGAATCACCTGTGGTGGCATCTACATCGGCGGCTGCTGGA
TCCTGACCGCCGCCACTGCCTTCGGGCCAGCAAGACTCACCGCTACCAGATCTGGACC
ACCGTGGTGGATTGGATTACCCCCGACCTGAAGAGGATTGTCATTGAGTATGTCGACCGC
ATCATCTTCCATGAAAATACAATGCCGGGACGTATCAGAACGACATCGCCCTCATCGAG
ATGAAGAAGGATGGGAACAAGAAGGACTGTGAGCTGCCTCGCTCCATCCCCGCCTGTGT
ACCATGGTCTCCGTACCTGTTCCAGCCAAATGACACATGCATCGTGAGCGGCTGGGGCCG
CGAGAAAGACAACGAGAGGGTCTTCTCCCTGCAGTGGGGTGAAGTCAAGCTGATCAGC
AACTGCTCCAAGTTCTACGGCAACCGCTTCTATGAGAAGGAGATGGAGTGCGCCGGCAC
CTATGACGGCAGCATTGACGCGTGCAAGGGAGACAGTGGGGGCCCCCTGGTCTGCATGG
ACGCCAACAATGTGACCTACGTGTGGGGAGTTGTGTCTGGGGCGAGAAGTGTGGCAAG
CCTGAGTTCCCGGGCGTGTACACAAAGGTGGCAAACTATTTTACTGGATCTCCTATCAC
GTTGGCAGGCCCTTCATTTACAGTACAACGTACGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGC
CAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTGACCTTCTCA
AGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATC
TGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATG
TACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTGC
CGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGAT

CCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCA
 CCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAG
 ACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAG
 CCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCGCACCG
 AGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAA
 GAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCTG
 AGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCAGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGC
 CAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTTCGTGCGCGTGCACGAGAAGGAC
 AAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTT
 CCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGA
 CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACC
 TACCGCGTGGTGGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA
 CAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAG
 GCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCT
 [0414] GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCG
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCGT
 GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCGTGACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCT
 GGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC
 ACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAA
 AATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACG
 CTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGT
 ATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTG
 GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCA
 TCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCC
 TTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGG
 GGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT
 GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACT
 CCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGACGCC
 GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
 (SEQ ID NO: 45)

[0415] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含或由SEQ ID NO:46的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列组成。

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTTCGC
 CCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG
 GGGTTCCTGGCGCGCCGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGG
 [0416] CTGACCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCC
 ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC

[0417]

GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG
GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACAT
CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGAC
GTCAATGGGAGTTTGTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA
ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAG
CAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGAC
CTCCATAGAAGACACCGACTAGTGCCACCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCT
GATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTA
CAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTG
CCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCT
GATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAA
CGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCT
GTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCT
GAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCA
CCGCCCCGACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCA
AGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGA
GATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGACGCGACCAGG
GCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTTCG
TGCGCGTGACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCGCCCCGAG
CTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG
ATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCC
CGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCA
AGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTG
CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGC
CCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGC
CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC
CTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AACGGCCAGCCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGG
CAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAA
CGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGAG
CCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACA
AACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGG
CGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCATGAAACTGCTGCATGTCTTCCTCCTCTT
CCTGTGCTTCCACCTCCGTTTCTGTAAAGTCACCTACACTAGCCAGGAGGATCTGGTG
GAGAAGAAATGCCTGGCCAAGAAGTATACCCACCTGAGCTGCGACAAAGTGTTCTGC
CAGCCCTGGCAACGCTGCATTGAAGGTAAGTGTGTGTGCAAGCTGCCCTACCAGTGC
CCCAAGAACGGCACGGCCGTGTGTGCCACCAACAGGAGGAGCTTCCCCACCTACTGC
CAGCAGAAGAGCCTGGAATGCCTCCACCCTGGCACCAAGTTTCTGAACAACGGGACC
TGCACAGCCGAGGGGAAATTCAGCGTCTCCCTCAAGCACGGCAATACAGACTCCGAG
GGCATTGTGGAAGTGAAGCTGGTGGACCAGGACAAGACCATGTTTCATCTGCAAAAAGC

AGCTGGTCCATGCGGGAGGCCAATGTCGCCTGCCTGGACCTGGGCTTCCAGCAGGGC
GCTGATACACAGCGCCGCTTTAAACTCAGTGACCTCAGCATCAACAGCACTGAGTGT
CTGCACGTGCACTGCCGGGCCTGGAGACCAGCCTGGCTGAGTGCACCTTACCAAG
CGCAGGACCATGGGCTACCAGGATTTTGCAGATGTGGTCTGCTACACCCAGAAGGCA
GACAGCCCCATGGATGACTTCTTCCAGTGTGTCAATGGCAAGTACATTTCCAGATGA
AGGCTTGTGACGGGATCAATGATTGCGGGGATCAGAGCGATGAGCTCTGCTGCAAGG
CCTGCCAAGGGAAGGGCTTTCAGTGTAAAGTCTGGGGTGTGCATCCCTTCTCAGTATCA
GTGCAACGGAGAGGTGGACTGCATCACTGGGGAGGACGAGGTGGGCTGTGCTGGCT
TCGCCTCTGTGGCCCAGGAGGAGACAGAGATCCTCACAGCTGACATGGATGCAGAGC
GGCGGCATCAAGAGTCTGCTCCCAAAGCTCTCCTGCGGCGTTAAGAATCGCATGC
ACATCCGGAGGAAGCGGATCGTTGGAGGCAAACGGGCTCAGCTGGGGGACTTGCCG
TGGCAGGTGGCCATCAAAGATGCCTCCGGAATCACCTGTGGTGGCATCTACATCGGCG
GCTGCTGGATCCTGACCGCCGCCACTGCCTTCGGGCCAGCAAGACTCACCGCTACC
AGATCTGGACCACCGTGGTGGATTGGATTCACCCCGACCTGAAGAGGATTGTCATTGA
GTATGTCGACCGCATCATCTTCCATGAAAATAACAATGCCGGGACGTATCAGAACGAC
ATCGCCCTCATCGAGATGAAGAAGGATGGGAACAAGAAGGACTGTGAGCTGCCTCGC
TCCATCCCCGCCTGTGTACCATGGTCTCCGTACCTGTTCCAGCCAAATGACACATGCAT
[0418] CGTGAGCGGCTGGGGCCGCGAGAAAGACAACGAGAGGGTCTTCTCCCTGCAGTGGG
GTGAAGTCAAGCTGATCAGCAACTGCTCCAAGTTCTACGGCAACCGCTTCTATGAGA
AGGAGATGGAGTGCGCCGGCACCTATGACGGCAGCATTGACGCGTGAAGGGAGAC
AGTGGGGGCCCCCTGGTCTGCATGGACGCCAACAATGTGACCTACGTGTGGGGAGTT
GTGTCCTGGGGCGAGAAGTGTGGCAAGCCTGAGTTCCCGGGCGTGTACACAAAGGTG
GCAAATAATTTGACTGGATCTCCTATCACGTTGGCAGGCCCTTCATTTACAGTACAA
CGTACTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA
ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTAIGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTAT
TGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCAC
GGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG
CACTGACAATTCCGTGGTGTGCCCTTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCC
CGTGCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAG
GAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGC
AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTG
GGCTCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCG
CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGGGCTTTCG
CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 46)

[0419] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含或由SEQ ID NO:47的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0420] CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCCCC

[0421]

GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGT
TCCTGGCGCGCCGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACC
GCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG
CCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTA
TTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT
GGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAA
ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGT
CAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTAGTG
CCACCATGAAACTGCTGCATGTCTTCCTCCTCTCCTGTGCTTCCACCTCCGTTTCTGTAA
AGTCACCTACACTAGCCAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAATGCCTGGCCAAGAAGTATA
CCCACCTGAGCTGCGACAAAGTGTCTGCCAGCCCTGGCAACGCTGCATTGAAGGTACT
TGTGTGTGCAAGCTGCCCTACCAGTCCCCAAGAACGGCACGGCCGTGTGTGCCACCAA
CAGGAGGAGCTTCCCCACCTACTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAATGCCTCCACCTGGCA
CCAAGTTTCTGAACAACGGGACCTGCACAGCCGAGGGGAAATTCAGCGTCTCCCTCAAG
CACGGCAATACAGACTCCGAGGGCATTGTGGAAGTGAAGCTGGTGGACCAGGACAAGA
CCATGTTTCATCTGCAAAGCAGCTGGTCCATGCGGGAGGCCAATGTCGCCTGCCTGGACC
TGGGCTTCCAGCAGGGCGCTGATACACAGCGCCGCTTTAAACTCAGTGACCTCAGCATCA
ACAGCACTGAGTGTCTGCACGTGCACTGCCGGGGCCTGGAGACCAGCCTGGCTGAGTGC
ACCTTACCAAGCGCAGGACCATGGGCTACCAGGATTTTGCAGATGTGGTCTGCTACACC
CAGAAGGCAGACAGCCCCATGGATGACTTCTTCCAGTGTGTCAATGGCAAGTACATTTCC
CAGATGAAGGCTTGTGACGGGATCAATGATTGCGGGGATCAGAGCGATGAGCTCTGCTGC
AAGGCCTGCCAAGGGGAAGGGCTTTCCTACTGTAAGTCTGGGGTGTGCATCCCTTCTCAGTAT
CAGTGCAACGGAGAGGTGGACTGCATCACTGGGGAGGACGAGGTGGGCTGTGCTGGCT
TCGCCTCTGTGGCCCAGGAGGAGACAGAGATCCTCACAGCTGACATGGATGCAGAGCGG
CGGCGCATCAAGAGTCTGCTCCCAAAGCTCTCCTGCGGCGTTAAGAATCGCATGCACATC
CGGAGGAAGCGGATCGTTGGAGGCAAACGGGCTCAGCTGGGGGACTTGGCCGTGGCAGG
TGCCCATCAAAGATGCCTCCGGAATCACCTGTGGTGGCATCTACATCGGCGGCTGCTGGA
TCTGACCGCCGCCACTGCCTTCGGGCCAGCAAGACTCACCGCTACCAGATCTGGACC
ACCGTGGTGGATTGGATTCACCCCGACCTGAAGAGGATTGTCATTGAGTATGTCGACCGC
ATCATCTTCATGAAAATAACAATGCCGGGACGTATCAGAACGACATCGCCCTCATCGAG
ATGAAGAAGGATGGGAACAAGAAGGACTGTGAGCTGCCTCGCTCCATCCCCGCCTGTGT
ACCATGGTCTCCGTACCTGTTCCAGCCAAATGACACATGCATCGTGAGCGGCTGGGGCCG
CGAGAAAGACAACGAGAGGGTCTTCTCCCTGCAGTGGGGTGAAGTCAAGCTGATCAGC
AACTGCTCCAAGTTCTACGGCAACCGCTTCTATGAGAAGGAGATGGAGTGCGCCGGCAC
CTATGACGGCAGCATTGACGCGTGCAAGGGAGACAGTGGGGGCCCCCTGGTCTGCATGG
ACGCCAACAATGTGACCTACGTGTGGGAGTTGTGTCTGGGGCGAGAAGTGTGGCAAG
CCTGAGTTCCCGGGCGTGTACACAAAGGTGGCAAACCTATTTGACTGGATCTCCTATCAC

GTTGGCAGGCCCTTCATTTACAGTACAACGTACGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGC
 CAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTGACCTTCTCA
 AGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATC
 TGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATG
 TACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTGC
 CGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGAT
 CCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCA
 CCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAG
 ACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAG
 CCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCGCACCG
 AGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAA
 GAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCTG
 AGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCAGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGC
 CAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTTCGTGCGCGTGCACGAGAAGGAC
 AAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTT
 CCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCCCGAGGTGACCT
 [0422] GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGA
 CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACC
 TACCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA
 CAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAG
 GCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCT
 GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCG
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCCCGT
 GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCT
 GGCAGCAGGGCAAACGTGTTAGCTGCAGCGTGTGACGAGGCCCCTGCACAACCACTAC
 ACCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACTCGAGGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
 ATCTGTTGTTTCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTC
 CTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGG
 GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGC
 TGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC
 TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGACGCC
 CGGGCTTTGCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
 (SEQ ID NO: 47)

[0423] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含或由SEQ ID NO:48的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0424] CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTTCG
 CCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAG
 GGGTTCTGGCGCGCCGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGG
 CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA

[0425]

ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC
ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC
GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTG
GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACAT
CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGAC
GTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA
ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAG
CAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGAC
CTCCATAGAAGACACCGACTAGTGCCACCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCT
GATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTA
CAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTG
CCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCT
GATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAA
CGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCT
GTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCT
GAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCA
CCGCCCCGACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCA
AGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGA
GATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGACGCGACCAGG
GCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTTCG
TGCGCGTGCACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAG
CTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAGCCCAAGGACACCCTGATG
ATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGACCC
CGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCA
AGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGTG
CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGC
CCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGC
CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC
CTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AACGGCCAGCCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGG
CAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAA
CGTGTTACAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAG
CCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACA
AACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTGACCTTCTCAAGTTGG
CGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCATGAAACTGCTGCATGTCTTCTCCTCTT
CCTGTGCTTCCACCTCCGTTTCTGTAAAGTCACCTACACTAGCCAGGAGGATCTGGTG
GAGAAGAAATGCCTGGCCAAGAAGTATACCCACCTGAGCTGCGACAAAGTGTTCTGC
CAGCCCTGGCAACGCTGCATTGAAGGTACTTGTGTGTGCAAGCTGCCCTACCAGTGC
CCCAAGAACGGCACGGCCGTGTGTGCCACCAACAGGAGGAGCTTCCCCACCTACTGC
CAGCAGAAGAGCCTGGAATGCCTCCACCCTGGCACCAAGTTTCTGAACAACGGGACC

TGCACAGCCGAGGGGAAATTCAGCGTCTCCCTCAAGCACGGCAATACAGACTCCGAG
 GGCATTGTGGAAGTGAAGCTGGTGGACCAGGACAAGACCATGTTTCATCTGCAAAAGC
 AGCTGGTCCATGCGGGAGGCCAATGTCGCCTGCCTGGACCTGGGCTTCCAGCAGGGC
 GCTGATACACAGCGCCGCTTTAAACTCAGTGACCTCAGCATCAACAGCACTGAGTGT
 CTGCACGTGCACTGCCGGGGCCTGGAGACCAGCCTGGCTGAGTGCACCTTCACCAAG
 CGCAGGACCATGGGCTACCAGGATTTGTCAGATGTGGTCTGCTACACCCAGAAGGCA
 GACAGCCCCATGGATGACTTCTTCCAGTGTGTCAATGGCAAGTACATTTCCAGATGA
 AGGCTTGTGACGGGATCAATGATTGCGGGGATCAGAGCGATGAGCTCTGCTGCAAGG
 CCTGCCAAGGGAAGGGCTTTCAGTGTAAAGTCTGGGGTGTGCATCCCTTCTCAGTATCA
 GTGCAACGGAGAGGTGGACTGCATCACTGGGGAGGACGAGGTGGGCTGTGCTGGCT
 TCGCCTCTGTGGCCCAGGAGGAGACAGAGATCCTCACAGCTGACATGGATGCAGAGC
 GCGGCGCATCAAGAGTCTGCTCCCAAAGCTCTCCTGCGGCGTTAAGAATCGCATGC
 ACATCCGGAGGAAGCGGATCGTTGGAGGCAAACGGGCTCAGCTGGGGGACTTGCCG
 TGGCAGGTGGCCATCAAAGATGCCTCCGGAATCACCTGTGGTGGCATCTACATCGGCG
 GCTGCTGGATCCTGACCGCCGCCACTGCCTTCGGGCCAGCAAGACTCACCGCTACC
 AGATCTGGACCACCGTGGTGGATTGGATTCACCCCGACCTGAAGAGGATTGTCATTGA
 GTATGTCGACCGCATCATCTTCCATGAAAATAACAATGCCGGGACGTATCAGAACGAC
 ATCGCCCTCATCGAGATGAAGAAGGATGGGAACAAGAAGGACTGTGAGCTGCCTCGC
 TCCATCCCCGCCTGTGTACCATGGTCTCCGTACCTGTTCCAGCCAAATGACACATGCAT
 CGTGAGCGGCTGGGGCCGCGAGAAAGACAACGAGAGGGTCTTCTCCCTGCAGTGGG
 GTGAAGTCAAGCTGATCAGCAACTGCTCCAAGTTCTACGGCAACCGCTTCTATGAGA
 AGGAGATGGAGTGCGCCGGCACCTATGACGGCAGCATTGACGCGTCAAGGGAGAC
 AGTGGGGGCCCCCTGGTCTGCATGGACGCCAACAATGTGACCTACGTGTGGGGAGTT
 GTGTCCTGGGGCGAGAAGTGTGGCAAGCCTGAGTTCCCGGGCGTGTACACAAAGGTG
 GCAAATAATTTGACTGGATCTCCTATCACGTTGGCAGGCCCTTCATTTACAGTACAA
 CGTACTCGAGGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCT
 CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGC
 ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC
 AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATG
 GCGGCCGCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT
 CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG
 GCCTCAGTGAGCGAGCG (SEQ ID NO: 48)

[0426] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含或由SEQ ID NO: 49的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列组成。

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC
 GGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT
 TCCTGGCGCGCCGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACC
 GCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
 GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTA

[0429]

CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG
 CCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTA
 TTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
 GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT
 GGCACCAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAA
 ATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGT
 CAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTAGTG
 CCACCATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCTG
 AGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAGGGAGCTGGTC
 TGACCAGACCTACCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGGCCGGGCTACAGGA
 GCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAAAAGGGCGAATGGGTGGCCCTCAACCCCTG
 AGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCCGGGGACACACCCTTCGGGACCTTCAC
 CCTGACCGGCGGCAATGTGTTTGTAGTACGGCGTGAAGGCTGTCTACACATGCAACGAGG
 GGTACCAGCTGCTGGGCGAGATTAACCTACCGGGAGTGTGACACCGATGGGTGGACCAAC
 GACATTCCCATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTCCCCGTGACAGCCCCAGAAAATGGCAA
 AATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCGCGAATATCACTTTGGGCAGGCCGTGAGGT
 TTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGAAGGTGATGAGGAGATGCACTGCAGCGATGAT
 GGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCAAATGTGTGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGACGT
 GATCAACGGCAGCCCAATCAGCCAGAAGATTATTTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCAGT
 ACAAGTGTAACATGGGCTATGAGTATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAGC
 GGCTGGAGACCACTGCCTAGCTGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAA
 TGCGGACTACTCCCTCTGCGGATCAAACACCGGACCCGGGGATGAAATCACCTATCAGTG
 CCGCAATGGATTCTACCCGGCCACCCGCGGCAACACCGCCAATGCACCAGCACAGGCT
 GGATCCCCGCCCCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGGCGACTATCCAGACATCAAGCACGGAG
 GCCTGTACCACGAAAACATGCGGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTACTACA
 GCTACTACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCACATCCACT
 GCACACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTACTTCCCTACC
 TGAGAACGGATAACAACAGAACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGCAAGAGCATCGAT
 GTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCAAGGCCAGACAACTGTGACCTGCATGGA
 GAATGGTTGGAGCCCCACCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTACGCTCCGAAGGAAAC
 GAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACTTT
 GAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCATGCGCCT
 GCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCGGCCG
 CCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGA
 GCTGGTGATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCC
 CCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTC
 ATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAA
 CGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACG
 TGGTGTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAAC
 TGCACCGCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAG

CAAGCACCAGCACAAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAG
 ATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGACGCGACCAGGGCCT
 GTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAGCACCTTCGTGCGCG
 TGCACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGC
 GGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACC
 CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCA
 ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAGCA
 GTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCCCCCCATCGAGAA
 GACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCA
 GCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTAC
 CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATAACAAGA
 CCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG
 GACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC
 TGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACTCGAGAATCAA
 CCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAATACTATGTTGCTCCTTTTAC
 GCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCAT
 TTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCCGTTGTCA
 GGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATT
 GCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGG
 AACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGAC
 AATCCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCCTTCCCTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCA
 CCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACC
 TTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTCCGCGTCTTCGCTTCGCCCTCA
 GACGAGTCGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCCGCATCGATAACCGTCGACTCGCTGATCA
 GCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACC
 CTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC
 TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGAT
 TGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGAGGAA
 CCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG
 CGACCAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 49)

[0431] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含或由SEQ ID NO:50的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列组成。

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTTCG
 CCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAG
 GGGTTCCTGGCGCGCCGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGG
 CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCC

[0433]

ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC
GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG
GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACAT
CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGAC
GTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACA
ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAG
CAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGAC
CTCCATAGAAGACACCGACTAGTGCCACCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCT
GATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTA
CAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTG
CCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCT
GATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAA
CGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCT
GTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCT
GAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCA
CCGCCCCGACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCA
AGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGA
GATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCGAGCGACCAGG
GCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTTCG
TGCGCGTGCACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCGCCCCCGAG
CTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG
ATCAGCCGCACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCC
CGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCA
AGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGAAGCGTGCTGACCGTG
CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGC
CCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGC
CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC
CTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGG
CAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAA
CGTGTTACAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACCCAGAAAGAG
CCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACA
AACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTGACCTTCTCAAGTTGG
CGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCC
TCATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCTGAGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGA
ACACAGAGATCCTGACAGGGAGCTGGTCTGACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAG
GCGATCTACAAGTGCCGGCCGGGCTACAGGAGCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGT
AGAAAGGGCGAATGGGTGGCCCTCAACCCCTGAGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTG
TGGCCACCCGGGGACACACCCTTCGGGACCTTACCCTGACCGGCGGCAATGTGTT
TGAGTACGGCGTGAAGGCTGTCTACACATGCAACGAGGGGTACCAGCTGCTGGGCGA

GATTAACTACCGGGAGTGTGACACCGATGGGTGGACCAACGACATTCCCATCTGTGA
 GGTGGTCAAGTGTCTCCCCGTGACAGCCCCAGAAAATGGCAAATCGTGAGCAGCGC
 CATGGAGCCTGACCGCGAATATCACTTTGGGCAGGCCGTGAGGTTTGTGTGCAACTCG
 GGCTACAAAATTGAAGGTGATGAGGAGATGCACTGCAGCGATGATGGCTTCTGGTCC
 AAGGAGAAGCCCAAATGTGTGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGACGTGATCAACGGC
 AGCCCAATCAGCCAGAAGATTATTTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCAGTACAAGTGT
 AACATGGGCTATGAGTATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAGCGGCTGG
 AGACCACTGCCTAGCTGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAAATGGC
 GACTACTCCCCTCTGCGGATCAAACACCGGACCGGGGATGAAATCACCTATCAGTGCC
 GCAATGGATTCTACCCGGCCACCCGCGGCAACACCGCCAAATGCACCAGCACAGGCT
 GGATCCCCGCCCCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGCGACTATCCAGACATCAAGCACGG
 AGGCCTGTACCACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTA
 CTACAGCTACTACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCAC
 ATCCACTGCACACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTAC
 TCCCCTACCTGGAGAACGGATACAACCAGAACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGC
 AAGAGCATCGATGTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCAAGGCCAGACAAC
 GTGACCTGCATGGAGAATGGTTGGAGCCCCACCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTC
 [0434] ACGCTCCTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTC
 TTAATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG
 CTATGCTTCCCGIATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTCT
 TTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCT
 GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTT
 TCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTG
 CTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATC
 ATCGTCTTTTCTTGGCTGCTCGCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCC
 TTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCCTGCTGC
 CGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCT
 TTGGGCCGCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTCGCTGATCAGCCTGTGCCTTCTAGTT
 GCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCAC
 TCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTC
 ATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAC
 AATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAG
 TGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAC
 CAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
 (SEQ ID NO: 50)

[0435] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含或由SEQ ID NO:51的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0436] CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCCG

[0437]

CCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAG
 GGGTTCCTGGCGCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCA
 ATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
 CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA
 TGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTA
 CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCA
 CTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTAATTATT
 TTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGG
 CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGA
 GCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTATA
 AAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCC
 CGTCCGCCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCA
 CAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAAT
 GACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCC
 CTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGG
 GGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTC
 TGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTA
 TTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTGGATCCACTAGTGCCACCATGCGCCTCC
 TGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCTGAGGACTGCAATGA
 GCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAGGGAGCTGGTCTGACCAGACCT
 ACCCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGGCCGGGCTACAGGAGCCTGGGG
 AACATCATCATGGTGTGTAGAAAGGGCGAATGGGTGGCCCTCAACCCCTGAGGAAG
 TGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCCGGGGACACACCCTTCGGGACCTTCACCCTG
 ACCGGCGCAATGTGTTTGTAGTACGGCGTGAAGGCTGTCTACACATGCAACGAGGGG
 TACCAGCTGCTGGGCGAGATTAACCTACCGGGAGTGTGACACCGATGGGTGGACCAAC
 GACATTCCCATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTCCCCGTGACAGCCCCAGAAAATGGC
 AAAATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCGCGAATATCACTTTGGGCAGGCCGTG
 AGGTTTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGAAGGTGATGAGGAGATGCACTGCAGC
 GATGATGGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCCAATGTGTGGAGATCTCCTGCAAGTCT
 CCCGACGTGATCAACGGCAGCCCAATCAGCCAGAAGATTATTTACAAGAGAACGAG
 CGTTCCAGTACAAGTGTAACATGGGCTATGAGTATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCT
 GCACTGAGAGCGGCTGGAGACCACTGCCTAGCTGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAAC
 CCTTACATCCCAAATGGCGACTACTCCCCTCTGCGGATCAAACACCGGACCGGGGATG
 AAATCACCTATCAGTGCCGCAATGGATTCTACCCGGCCACCCGCGGCAACACCGCCAA
 ATGCACCAGCACAGGCTGGATCCCCGCCCCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGC GACTAT
 CCAGACATCAAGCACGGAGGCCTGTACCACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCT
 GTGGCAGTGGGGAAGTACTACAGCTACTACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCTCT
 GGCTCCTACTGGGACCACATCCACTGCACACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCC
 TGCCTGAGGAAATGCTACTTCCCCTACCTGGAGAACGGATAACAACCAGAACTATGGCC
 GCAAGTTCGTGCAGGGCAAGAGCATCGATGTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGC

CCAAGGCCAGACAACACTGTGACCTGCATGGAGAATGGTTGGAGCCCCACCCCGCGCT
 GCATCCGGGTGTCCTTCACGCTCCGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACAC
 AACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTG
 GCGGGAGACGTTCGAGTCCAACCCTGGGCCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGC
 CTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATG
 TACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCC
 TGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACC
 CTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGC
 AACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCA
 CCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGT
 GCTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACT
 GCACCGCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCA
 GCAAGCACCAGCACAAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGC
 GAGATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCAGCGACCA
 GGGCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTT
 CGTGCGCGTGCACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCGCCCCCG
 AGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGA
 TGATCAGCCGCACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGAC
 CCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGAC
 CAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGTGACCG
 TGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAG
 GCCCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGA
 GCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGA
 GCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCCGTGCTGGACAGCGAC
 GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGC
 AACGTGTTTACGCTGCAGCGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG
 AGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTG
 AAAGATTGACTGGTATTCTTAATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCT
 TAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTCTCCTCCTGTATAA
 ATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCCCGCTGCTGG
 ACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
 ATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCT
 GTCCTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCAATCTAT
 TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
 GGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGA
 GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT
 CGCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
 (SEQ ID NO: 51)

[0438] CAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGTGACCG
 TGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAG
 GCCCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGA
 GCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGA
 GCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCCGTGCTGGACAGCGAC
 GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGC
 AACGTGTTTACGCTGCAGCGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG
 AGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTG
 AAAGATTGACTGGTATTCTTAATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCT
 TAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTCTCCTCCTGTATAA
 ATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCCCGCTGCTGG
 ACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
 ATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCT
 GTCCTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCAATCTAT
 TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
 GGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGA
 GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT
 CGCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

[0439] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含或由SEQ ID NO:52的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0440]

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT
TCC TGGCGCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG
CATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
CATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCC
CCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATATTTTGTGCAGCGATGGGGGCG
GGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGG
GCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTT
TATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGA
GTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCCGCCTCGCGCCGCCCGCCC
CGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCC
GGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC
CTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGG
GGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCTGGCTTCTGGCGTGTGA
CCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCT
GGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATATTTGGCAAAGAATTGGATCCACTAGTG
CCACCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCA
GCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGA
CCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACC
CTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAG
CCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCG
AGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAAC
ACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAA
GCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGG
AGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCA
GAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCA
GCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAG
CACCTTCGTGCGCGTGACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCC
CCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCACAAGCCAAGGACACCCTG
ATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCC
CGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAG
CCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGTGCA
CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCC
GCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTA
CACCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGG
TGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGA

GAACA ACTACAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACA
GCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGT
GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCT
AACGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGG
TGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTTCGAGTCCAACCCCT
GGGCCATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCT
GAGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAGGGAGCTGGT
CTGACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGGCCGGGCTACAGG
AGCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAAAGGGCGAATGGGTGGCCCTCAACCCCT
GAGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCGGGGACACACCCTTCGGGACCTTC
ACCCTGACCGGCGGCAATGTGTTTGTAGTACGGCGTGAAGGCTGTCTACACATGCAACGA
GGGGTACCAGCTGCTGGGCGAGATTA ACTACCGGGAGTGTGACACCGATGGGTGGACCA
ACGACATTCCCATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTCCCCGTGACAGCCCCAGAAAATGGC
AAAATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCGCGAATATCACTTTGGGCAGGCCGTGAG
GTTTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGAAGGTGATGAGGAGATGCACTGCAGCGATG
ATGGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCAAATGTGTGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGAC
GTGATCAACGGCAGCCCAATCAGCCAGAAGATTATTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCA
GTACAAGTGTAACATGGGCTATGAGTATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAG
CGGCTGGAGACCACTGCCTAGCTGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAA
[0441] ATGGCGACTACTCCCCTCTGCGGATCAACACCGGACCGGGGATGAAATCACCTATCAGT
GCCGCAATGGATTCTACCCGGCCACCCGCGGCAACACCGCCAAATGCACCAGCACAGGC
TGGATCCCCGCCCCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGC GACTATCCAGACATCAAGCACGGA
GGCCTGTACCACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTACTAC
AGCTACTACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCACATCCAC
TGCACACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTACTTCCCCTAC
CTGGAGAACGGATAACAACCAGA ACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGCAAGAGCATCGA
TGTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCCAAGGCCAGACA ACTGTGACCTGCATGG
AGAATGGTTGGAGCCCCACCCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTACGCTCCTCGAGAATC
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTT
ACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTC
ATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCT
GCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGC
CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGG
TGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG
TGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA
CAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAGT
GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA
AGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
(SEQ ID NO: 52)

[0442] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含或由SEQ ID NO:53的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0443]

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT
TCCTGGCGCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG
CATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
CATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCC
CCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATATTTTGTGCAGCGATGGGGGCG
GGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGG
GCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTT
TATGGCGAGGCGGCGGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCGGGA
GTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCGTGCCCCGCTCCGCCCGCCTCGCGCCGCCCGCCC
CGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCC
GGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC
CTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGG
GGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGA
CCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCT
GGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTGTTGGCAAAGAATTGGATCCACTAGTG
CCACCATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCTG
AGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAGGGAGCTGGTC
TGACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGGCCGGGCTACAGGA
GCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAAAAGGGCGAATGGGTGGCCCTCAACCCCTG
AGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCCGGGACACACCCTTCGGGACCTTCAC
CCTGACCGGCGGCAATGTGTTGAGTACGGCGTGAAGGCTGTCTACACATGCAACGAGG
GGTACCAGCTGCTGGGCGAGATTAACCTACCGGGAGTGTGACACCGATGGGTGGACCAAC
GACATTCCTATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTCCCCGTGACAGCCCCAGAAAATGGCAA
AATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCGCAATATCACTTTGGGCAGGCCGTGAGGT
TTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGAAGGTGATGAGGAGATGCACTGCAGCGATGAT
GGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCCAATGTGTGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGACGT
GATCAACGGCAGCCCAATCAGCCAGAAGATTATTTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCAGT
ACAAGTGTAACATGGGCTATGAGTATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAGC
GGCTGGAGACCACTGCCTAGCTGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAA
TGGCGACTACTCCCTCTGCGGATCAAACACCGGACCGGGGATGAAATCACCTATCAGTG
CCGCAATGGATTCTACCCGGCCACCCGCGGCAACACCGCCAATGCACCAGCACAGGCT
GGATCCCCGCCCCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGCGACTATCCAGACATCAAGCACGGAG
GCCTGTACCACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTACTACA
GCTACTACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCACATCCACT
GCACACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTACTTCCCCTACC

TGGAGAACGGATAACAACCAGAACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGCAAGAGCATCGAT
 GTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCCAAGGCCAGACAACCTGTGACCTGCATGGA
 GAATGGTTGGAGCCCCACCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTACGCTCCGAAGGAAAC
 GAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCAGGTAACAGACTTT
 GAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCATGCGCCT
 GCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCCGGCCG
 CCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGA
 GCTGGTGATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCC
 CCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTC
 ATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAA
 CGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACG
 TGGTGCTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAAC
 TGCACCGCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCCAGCAG
 CAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAG
 ATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCAGCGACCAGGGCCT
 GTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGCCCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTTCGTGCGCG
 TGCACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGC
 [0444] GGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACC
 CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCA
 ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAGCA
 GTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCATCGAGAA
 GACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCA
 GCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTAC
 CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGA
 CCACCCCCCGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG
 GACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC
 TGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACTCGAGGTGCCT
 TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTG
 CCACTCCCCTGTCTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG
 TCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACA
 ATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGAT
 GGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
 TCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 53)

[0445] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含或由SEQ ID NO:54的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0446] CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCCCC
 GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT

[0447]

TCCTGGCGCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCA
AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG
CATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
CATCGCTATTACCATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCC
CCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCG
GGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGG
GCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTT
TATGGCGAGGCGGCGGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGA
GTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCC
CGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCTCC
GGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC
CTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGG
GGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGA
CCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCT
GGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATATTTTGGCAAAGAATTGGATCCACTAGTG
CCACCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCA
GCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGA
CCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTGCCGCTGACCAGCCCCAACATACCGTGACC
CTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAG
CCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCG
AGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAAC
ACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAA
GCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCCGACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGG
AGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCA
GAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCA
GCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAG
CACCTTCGTGCGCGTGACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCC
CCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCACAAGCCAAAGGACACCCTG
ATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGTTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCC
CGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAG
CCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCA
CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCC
GCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTA
CACCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGG
TGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGA
GAACAATAACAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACA
GCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCAGCGT
GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCT
AACGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGG

TGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTTCGAGTCCAACCCT
 GGGCCCATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCT
 GAGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAGGGAGCTGGT
 CTGACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGGCCGGGCTACAGG
 AGCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAAAGGGCGAATGGGTGGCCCTCAACCCCT
 GAGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCGGGGACACACCCTTCGGGACCTTC
 ACCCTGACCGGCGGCAATGTGTTTGTAGTACGGCGTGAAGGCTGTCTACACATGCAACGA
 GGGGTACCAGCTGCTGGGCGAGATTAACCTACCGGGAGTGTGACACCGATGGGTGGACCA
 ACGACATTCCCATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTCCCCGTGACAGCCCCAGAAAATGGC
 AAAATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCGCGAATATCACTTTGGGCAGGCCGTGAG
 GTTTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGAAGGTGATGAGGAGATGCACTGCAGCGATG
 ATGGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCCAAATGTGTGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGAC
 GTGATCAACGGCAGCCCAATCAGCCAGAAGATTATTTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCA
 GTACAAGTGTAACATGGGCTATGAGTATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAG
 CGGCTGGAGACCACTGCCTAGCTGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAA
 [0448] ATGGCGACTACTCCCCTCTGCGGATCAAACACCGGACCGGGGATGAAATCACCTATCAGT
 GCCGCAATGGATTCTACCCGGCCACCCGCGCAACACCGCCAAATGCACCAGCACAGGC
 TGGATCCCCGCCCCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGCAGTATCCAGACATCAAGCACGGA
 GGCCTGTACCACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTACTAC
 AGCTACTACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCACATCCAC
 TGCACACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTACTTCCCCTAC
 CTGGAGAACGGATACAACCAGAACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGCAAGAGCATCGA
 TGTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCAAGGCCAGACAACCTGTGACCTGCATGG
 AGAATGGTTGGAGCCCCACCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTACGCTCCTCGAGGTGC
 CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGG
 TGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG
 TGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA
 CAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGCAGGAACCCCTAGT
 GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA
 AGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 54)

[0449] 眼睛的结构

[0450] 本文所公开的药物可被递送到哺乳动物,优选人类的眼睛,用于治疗或预防眼病,如年龄相关黄斑变性(AMD)。

[0451] 眼部疾病治疗的技术人员将对眼睛的结构有详细和透彻的了解。然而,以下与本发明特别相关的结构将被描述。

[0452] 视网膜

[0453] 视网膜是多层组织,它排列在眼睛的内后房,并感知视觉世界的图像,其经由视神经传达给大脑。以从眼睛内部到外部的顺序,视网膜包含神经感觉视网膜和视网膜色素上皮层,脉络膜位于视网膜色素上皮层的远端。

[0454] 神经感受性视网膜和光感受器细胞

[0455] 神经感受性视网膜内有直接感受光线的光感受器细胞。它包含以下几层:内界膜(ILM);神经纤维层;神经节细胞层;内丛状层;内核层;外丛状层;外核层(光感受器的细胞

核);外界膜(ELM);以及视杆和视锥的内部和外部部分。

[0456] 技术人员将对感光细胞有详细的了解。简而言之,感光细胞是位于视网膜上的特化神经元,其将光转化为生物信号。光感受器细胞包含视杆和视锥细胞,它们以不同的方式分布在整个视网膜上。

[0457] 视杆细胞主要分布在视网膜的周边部分。它们高度敏感,在低光下提供视觉。正常人的视网膜中平均有大约1.25亿个视杆细胞。

[0458] 视锥细胞遍布整个视网膜,但特别高度集中在小凹(神经感觉视网膜上的一个洼,负责中央高分辨率的视觉)。视锥细胞比视杆细胞敏感度低,负责色觉。正常人的视网膜中平均约有600-700万个锥体细胞。

[0459] 视网膜色素上皮

[0460] 视网膜色素上皮(RPE)是紧靠神经感觉视网膜外侧的一个细胞色素层,与光感受器外节相邻。RPE将神经感受性视网膜与脉络膜脉管分开,具有诸如回收感光体外节的视觉色素等功能。RPE履行大量功能,包括将营养物质和其他物质运送到光感受器细胞,以及吸收散射光以改善视力。

[0461] 脉络膜

[0462] 脉络膜是位于RPE和眼睛外巩膜之间的血管层。脉络膜的血管能够为视网膜提供氧气和营养物质。

[0463] 年龄相关性黄斑变性(AMD)

[0464] 根据黄斑部的变化,年龄相关性黄斑变性(AMD)的临床进展表征为多个阶段。早期AMD的特点是出现玻璃膜疣,这是视网膜下细胞外碎片的堆积,在临床检查中和在眼底照片上显示为视网膜上的黄色斑点。玻璃膜疣按大小可分为小(<63微米)、中(63-124微米)和大(>124微米)。根据眼底检查时它们的边缘的外观,它们也会被视为是硬性的或软性的。硬性红斑具有清晰分明的边缘,而软性红斑则有不太明确的、流动的边缘。年龄相关性眼病研究(AREDS)眼底照相严重性量表是用于这种病情的主要分类系统之一。

[0465] AMD被分为“干性”和“湿性”(渗出性或新生血管性)两种形式。干性AMD的典型特征是RPE层的细胞、上覆的光感受器细胞、以及经常也有脉络膜毛细血管层的底层细胞丧失。RPE细胞死亡的密集区域伴随着上覆光感受器的萎缩,被称为地理萎缩(GA)。患有这种形式的AMD的患者,其中央视力会出现缓慢和渐进的恶化。

[0466] 湿性AMD的特点是从RPE和黄斑部下面的脉络膜血管(脉络膜毛细管层)生长的异常血管出血和/或漏液,这可能是导致视力突然丧失的原因。据估计,患者的大部分视力损失是由于这种脉络膜新生血管(CNV)及其继发性并发症造成的。

[0467] 本文所述的AMD的治疗或预防可以减少或防止上述AMD表型的出现。优选地,AMD的治疗能够维持或改善视觉功能。

[0468] 在一些实施方案中,治疗或预防AMD的结果是预防或减少地理性萎缩的形成。在其他实施方案中,治疗或预防AMD的结果是减缓地理性萎缩的进展。例如,在施用给受试者被治疗的眼睛后的12个月内,相对于同期未治疗的眼睛,它导致GA面积的增加至少减少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在其他实施方案中,治疗或预防AMD的结果是治疗地理性萎缩,例如减少地理性萎缩的数量。

[0469] 在一些实施方案中,治疗或预防AMD的结果是防止或减少了玻璃膜疣的形成。在其

他实施方案中,治疗或预防AMD的结果是减少现有的玻璃膜疣,例如减少现有玻璃膜疣的大小和/或数量。

[0470] 在一些实施方案中,治疗或预防AMD的结果是预防或减少补体沉积。在其他实施方案中,治疗或预防AMD的结果是减少现有的补体沉积。

[0471] 在一些实施方案中,治疗或预防AMD的结果是改善或恢复视力或视敏度。在其他实施方案中,治疗或预防AMD减轻了视力或视敏度的损失。

[0472] 在一些实施方案中,治疗或预防AMD的结果是改善或恢复受试者的阅读速度。在其他实施方案中,AMD的治疗或预防减轻了受试者阅读速度的降低。

[0473] 在一些实施方案中,治疗或预防AMD的结果是减少或防止光感受器和/或视网膜色素上皮(RPE)的损失。

[0474] 糖尿病视网膜病变

[0475] 糖尿病视网膜病变是一种以视网膜血管损伤为特征的疾病,它是由与糖尿病相关的高血糖水平引起的。如果不加以治疗,糖尿病视网膜病变可能导致失明。

[0476] 尽管患有轻度糖尿病视网膜病变的受试者可能有良好的视力,但某些类型的糖尿病视网膜病变,即糖尿病黄斑水肿(DMO)和增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)可能威胁到受试者的视力。

[0477] 糖尿病黄斑水肿的特征是液体从眼睛后面受损的血管渗出。渗漏的液体积聚在黄斑部,导致肿胀和视力模糊。这最终会导致中央视力不佳,无法阅读或驾驶。侧面视力通常保持正常。

[0478] 增殖性糖尿病视网膜病变的特点是视网膜血管关闭,导致视网膜表面生长出异常的、脆弱的血管。这可能导致因出血进入眼睛、结疤和视网膜脱离而永久丧失视力。非增殖性视网膜病变是糖尿病视网膜病变的早期阶段,如果不加以治疗,可能导致增殖性视网膜病变。因此,要考虑对所有阶段和类型的糖尿病视网膜病变进行治疗。

[0479] 载体

[0480] 载体是一种工具,允许或促进实体从一个环境转移到另一个环境。

[0481] 腺相关病毒(AAV)载体

[0482] 在一个方面,本发明提供一种包含本发明多核苷酸的AAV载体。

[0483] 优选地,AAV载体是AAV载体颗粒的形式。

[0484] 制备和修饰病毒载体和病毒载体颗粒诸如那些来自AAV的病毒载体的方法,在本领域是公知的。

[0485] AAV载体可包含AAV基因组或其片段或衍生物。

[0486] 包含编码(i)抗VEGF实体和(ii)本发明提供的补体负调节剂的核苷酸的多核苷酸可适于包装在AAV中。已知AAV能够包装大小为5.2kb的基因组(Dong, J. -Y. 等人(1996) Human Gene Therapy 7:2101-2112)。

[0487] 因此,可以选择编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列,使所述组合适合在AAV中包装。在某些实施方案中,可使用抗VEGF实体和/或补体负调节剂(如本文所述)的功能片段,以确保多核苷酸适合在AAV中包装。

[0488] 在一些实施例中,所述多核苷酸小于或等于5.2、5.1、5.0、4.9、4.8或4.7kb。在优选的实施方案中,所述多核苷酸小于或等于4.7kb。

[0489] AAV基因组是一个多核苷酸序列,它可以编码生产AAV颗粒所需的功能。这些功能包括AAV在宿主细胞中的复制和包装循环,包括将AAV基因组包裹到AAV颗粒中。自然存在的AAV是复制缺陷的,依赖于提供反式的辅助功能来完成复制和包装循环。因此,本发明的AAV载体的AAV基因组通常是复制缺陷的。

[0490] AAV基因组可以是单链形式,可以是正义或负义,也可以是双链形式。

[0491] AAV基因组可以来自任何天然衍生的AAV血清型、分离物或分支。因此,AAV基因组可以是自然存在的AAV的完整基因组。正如技术人员所知,自然界中出现的AAV可以根据各种生物系统进行分类。

[0492] 通常情况下,AAVs是以其血清型来称呼的。血清型相当于AAV的一个变异亚种,由于它的衣壳蛋白表面抗原的表达谱,具有独特的反应性,可用于将其与其他变异亚种区分开来。一般来说,具有特定AAV血清型的病毒不会与任何其他AAV血清型的特异性中和抗体发生有效的交叉反应。

[0493] AAV血清型包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10和AAV11,还有重组血清型,如Rec2和Rec3,最近从灵长类大脑中发现。这些AAV血清型中的任何一种都可用于本发明。

[0494] 在一些实施方案中,AAV载体颗粒是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rec2、Rec3、Rh10、DJ或Anc65 AAV载体颗粒。

[0495] 在一些实施方案中,AAV载体颗粒可包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10或AAV11衣壳蛋白。

[0496] 在一些实施方案中,AAV可以是AAV1、AAV2、AAV5、AAV7或AAV8血清型。

[0497] 在一些实施方案中,AAV可以是AAV2或AAV8血清型。

[0498] 在一些实施例中,AAV可以是AAV2血清型。在其他优选的实施方案中,AAV可以是AAV8血清型。

[0499] 所述衣壳蛋白可以是突变的衣壳蛋白,如公开在WO 2008/124724中的,其在此通过引用并入。

[0500] 在一些实施方案中,AAV载体包含具有Y733F突变的AAV8衣壳蛋白。

[0501] 关于AAV血清型的评论可以在Choi等人(2005)Curr. Gene Ther. 5:299-310和Wu等人(2006)Molecular Therapy 14:316-27中找到。用于本发明的AAV基因组或AAV基因组的元件(包含ITR序列、Rep或Cap基因)的序列可以从以下AAV全基因组序列的登录号中获得:腺相关病毒1NC_002077,AF063497;腺相关病毒2NC_001401;腺相关病毒3NC_001729;腺相关病毒3BNC_001863;腺相关病毒4NC_001829;腺相关病毒5Y18065,AF085716;腺相关病毒6NC_001862;禽类AAV ATCC VR-865AY186198,AY629583,NC_004828;禽类AAV株DA-1NC_006263,AY629583;牛类AAV NC_005889,AY388617。

[0502] AAV也可以用分支或克隆来指代。这是指自然衍生的AAVs的系统发育关系,通常是指可以追溯到一个共同祖先的AAVs的系统发育组,包含其所有的后代。此外,AAVs可以用特定的分离物来表示,即在自然界发现的特定AAV的遗传分离物。术语遗传分离物描述了一个AAV群体,其与其他自然发生的AAV进行了有限的遗传混合,从而在遗传水平上定义了一个可识别的独特群体。

[0503] 技术人员可以根据他们的常识选择适当的血清型、分支、克隆或分离的AAV用于本

发明。例如,AAV5衣壳已被证明可以有效地转导灵长类动物的视锥光受体,成功地纠正了遗传性的色觉缺陷(Mancuso等人(2009)Nature 461:784-7)。

[0504] AAV的血清型决定了AAV感染的组织特异性(或嗜性)。因此,用于按照本发明给病人施用的AAV的优选AAV血清型是那些对眼睛内的靶细胞有天然嗜性或较高的感染效率的AAV。在一些实施方案中,用于本发明的AAV血清型是那些能转导神经感觉视网膜、视网膜色素上皮和/或脉络膜的细胞的血清型。

[0505] 通常情况下,自然衍生的AAV血清型、分离物或分支的AAV基因组包含至少一个末端反向重复序列(ITR)。ITR序列的作用是顺式地提供一个功能性的复制原点,并允许载体从细胞的基因组中整合和切除。在优选的实施方案中,一个或多个ITR序列在编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的侧翼。AAV基因组通常还包含包装基因,如编码AAV颗粒包装功能的rep和/或cap基因。rep基因编码Rep78、Rep68、Rep52和Rep40或其变体中的一种或多种蛋白质。cap基因编码一种或多种衣壳蛋白,如VP1、VP2和VP3或其变体。这些蛋白构成了AAV颗粒的衣壳。下面将讨论衣壳的变体。

[0506] 启动子将与每个包装基因可操作地连接。这种启动子的具体实例包括p5、p19和p40启动子(Laughlin等人(1979)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:5567-5571)。例如,p5和p19启动子一般用于表达rep基因,而p40启动子一般用于表达cap基因。

[0507] 如上所述,本发明的AAV载体中使用的AAV基因组因此可以是自然发生的AAV的完整基因组。例如,它们之间包含一个完整的AAV基因组的载体可用于在体外制备AAV载体或载体颗粒。然而,虽然这样的载体原则上可以施用给病人,但在实践中很少会这样做。优选地,AAV基因组将出于给病人施用的目的而被衍生化。这种衍生化是本领域的标准,本发明包含AAV基因组的任何已知衍生品的使用,以及通过应用本领域已知技术产生的衍生品。AAV基因组和AAV衣壳的衍生化在Coura and Nardi(2007)Virology Journal 4:99和上面提到的Choi等人 and Wu等人中有综述。

[0508] AAV基因组的衍生物包含AAV基因组的任何截断或修饰形式,它允许本发明的AAV载体在体内表达转基因。通常情况下,可以将AAV基因组大幅截断,以包含最小的病毒序列,但保留上述功能。出于安全因素,这样是优选的,以减少载体与野生型病毒重组的风险,同时也避免因病毒基因蛋白在目标细胞中的存在而引发细胞免疫反应。

[0509] 通常,一个衍生物将包含至少一个末端反向重复序列(ITR),优选一个以上的ITR,如两个或更多的ITR。一个或多个ITR可以来自具有不同血清型的AAV基因组,也可以是一个嵌合体或突变体ITR。一个优选的突变体ITR是一个具有trs(末端解析位点)缺失的ITR。这种缺失允许基因组继续复制,产生一个单链的基因组,其中包含编码和互补序列,即一个自体互补的AAV基因组。这允许绕过目标细胞中的DNA复制,因此能够加速转基因的表达。

[0510] 一个或多个ITR优选在编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列的侧翼。纳入一个或多个ITR是优选的,以辅助为了帮助本发明的载体在宿主细胞的细胞核中形成多联体,例如在宿主细胞DNA聚合酶的作用下将单链载体DNA转化为双链DNA之后。这种附加多联体(episomal concatamer)的形成在宿主细胞的生命过程中保护了载体构建体,从而允许转基因在体内长时间的表达。

[0511] 在优选的实施方案中,ITR元件将是衍生品中唯一保留的来自原生AAV基因组的序列。因此,衍生物优选地不包含原生基因组的rep和/或cap基因以及原生基因组的任何其他

序列。出于上述原因,这是优选的,并且是为了减少载体整合到宿主细胞基因组的可能性。此外,减少AAV基因组的大小,可以增加在载体内除转基因外加入其他序列元件(如调节元件)的灵活性。

[0512] 因此,在本发明的衍生物中可以去除以下部分:复制(rep)和衣壳(cap)基因。然而,在一些实施方案中,衍生物可以额外包含一个或多个Rep和/或Cap基因或AAV基因组的其他病毒序列。自然发生的AAV在人类19号染色体的一个特定位点上以高频率整合,并显示出可忽略不计的随机整合频率,因此在治疗环境中可以容忍载体中的整合能力的保留。

[0513] 当衍生物包含衣壳蛋白即VP1、VP2和/或VP3时,所述衍生物可以是一个或多个自然发生的AAV的嵌合、穿梭型或衣壳修饰的衍生物。特别是,本发明包含在同一载体(即假型载体)中提供来自不同血清型、分支、克隆或分离株的AAV的衣壳蛋白序列。

[0514] 嵌合的、穿梭型或衣壳修饰的衍生物通常会被选择来为AAV载体提供一种或多种所需的功能。因此,这些衍生物与包含自然发生的AAV基因组的AAV载体相比,如AAV2或AAV8的基因组,可以显示出更高的基因递送效率,降低免疫原性(体液或细胞),改变的嗜性范围和/或改进的对特定细胞类型的靶向。基因递送效率的提高可以通过改善细胞表面的受体或共受体结合、改善内化、改善细胞内和到细胞核内的转运、改善病毒颗粒的脱壳和改善单链基因组向双链形式的转化来实现。效率的提高也可能与改变的滋养范围或针对特定细胞群有关,这样载体的剂量就不会因为施用到不需要的组织中而被稀释。

[0515] 嵌合型衣壳蛋白包含那些通过自然发生的AAV血清型的两个或多个衣壳编码序列之间的重组产生的蛋白。例如可以通过标记拯救的方法来进行,其中一个血清型的非感染性的衣壳序列与不同血清型的衣壳序列共同转染,并使用定向选择来选择具有所需特性的衣壳序列。不同血清型的衣壳序列可以通过细胞内的同源重组而改变,以产生新的嵌合衣壳蛋白。

[0516] 嵌合衣壳蛋白还包含那些通过对衣壳蛋白序列进行工程化,在两个或多个衣壳蛋白之间,例如在不同血清型的两个或多个衣壳蛋白之间转移特定的衣壳蛋白结构域、表面环或特定的氨基酸残基而产生的衣壳蛋白。

[0517] 穿梭或嵌合的衣壳蛋白也可通过DNA穿梭或通过易错PCR产生。杂合AAV衣壳基因可以通过随机片段化相关AAV基因的序列来产生,例如编码多个不同血清型的衣壳蛋白的基因,然后在自激聚合酶反应中重新组合这些片段,这也可能导致序列同源区域的交叉。以这种方式将几个血清型的衣壳蛋白基因进行穿梭而产生的混合AAV基因库可以被筛选,以确定具有所需功能的病毒克隆。类似地,易错PCR可以用来随机突变AAV的外壳基因,以创建一个多样化的变体库,然后可以根据所需的特性进行选择。

[0518] 衣壳基因的序列也可以进行遗传修饰,以引入相对于天然野生型序列的特定缺失、取代或添加。特别是,可以通过在衣壳编码序列的开放阅读框内,或在衣壳编码序列的N端和/或C端插入无关的蛋白质或肽的序列来修改衣壳基因。例如,可以这样做,以赋予或改变对特定细胞受体的趋向性。

[0519] 不相关的蛋白质或肽可以是有利地作为特定细胞类型的配体的蛋白质或肽,从而赋予改进的与目标细胞的结合或改善载体对特定细胞群的靶向性的特异性。一个实例可能包含使用RGD肽来阻止视网膜色素上皮细胞的吸收,从而提高周围视网膜组织的转导(Cronin等人(2008) ARVO Abstract:D1048)。不相关的蛋白质也可以是作为生产过程的一

部分,协助病毒颗粒的纯化,即表位或亲和标签。插入的位置通常是为了不干扰病毒颗粒的其他功能,例如病毒颗粒的内化和运输。技术人员可以根据他们的常识来确定合适的插入部位。上面提到的Choi等人(Dalkara等人(Science, Translational Medicine, 2013; 5 (189))公开了特定的部位。

[0520] 本发明还涵盖以与原生AAV基因组不同的顺序和结构提供AAV基因组的序列。本发明还涵盖用另一种病毒的序列或由一种以上病毒的序列组成的嵌合基因替换一个或多个AAV序列或基因。这种嵌合基因可以由来自不同病毒种类的两个或多个相关病毒蛋白的序列组成。

[0521] 本发明的AAV载体可以采取包含AAV基因组或其衍生物和编码抗VEGF实体和补体负调节剂转基因或其衍生物的序列的核苷酸序列的形式。

[0522] 本发明的AAV颗粒包含转衣壳(transcapsidated)形式,其中具有一种血清型的ITR的AAV基因组或衍生物被包装在不同血清型的衣壳中。本发明的AAV颗粒还包含镶嵌形式,其中来自两个或多个不同血清型的未修改的衣壳蛋白的混合物构成了病毒衣壳。AAV颗粒还包含化学修饰的形式,带有吸附在衣壳表面的配体。例如,这种配体可以包含用于靶向特定细胞表面受体的抗体。

[0523] 因此,例如,本发明的AAV颗粒包含那些具有AAV2基因组和AAV2衣壳蛋白的颗粒(AAV2/2),具有AAV2基因组和AAV5衣壳蛋白的颗粒(AAV2/5)和具有AAV2基因组和AAV8衣壳蛋白的颗粒(AAV2/8),以及那些具有AAV2基因组和一个以上血清型衣壳蛋白的颗粒。

[0524] AAV载体可以包含本文提到的核苷酸序列的多个拷贝(如2、3个等)。

[0525] 在一些实施方案中,所述多核苷酸进一步包含一个或多个AAV ITR。在优选的实施方案中,所述多核苷酸进一步包含两个AAV ITRs。在一些实施方案中,所述多核苷酸在其5'端包含一个AAV ITR并在其3'端包含一个AAV ITR。在一些实施方案中,所述AAV ITR是AAV2或AAV8ITR。在优选的实施方案中,所述AAV ITR是AAV2 ITR。

[0526] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含具有SEQ ID NO:55的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列的5' AAV ITR。

[0527] CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGTTCG
CCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAG
GGGTTTCCT
SEQ ID NO: 55

[0528] 在一些实施方案中,所述多核苷酸进一步包含SEQ ID NO:56的核苷酸序列,或与其具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同的核苷酸序列,紧邻5' ITR的3'端。

[0529] TGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGTACC
SEQ ID NO: 56

[0530] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含具有SEQ ID NO:65的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列的5' AAV ITR。

aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcactgaggccggcgcaagccccggcgctcggcg
 [0531] acctttggtcgccccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgccaa
 SEQ ID NO: 65

[0532] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含具有SEQ ID NO:57的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列的3' AAV ITR。

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA
 [0533] GGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGA
 GCGAGCG
 SEQ ID NO: 57

[0534] 在一些实施方案中,所述多核苷酸进一步包含SEQ ID NO:58的核苷酸序列,或与其具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列,紧邻3' ITR的5'端。

CTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGACTAGAGCATGGCTACGTAGATAAG
 [0535] TAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACA
 SEQ ID NO: 58

[0536] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含具有SEQ ID NO:66的核苷酸序列或与之具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同的核苷酸序列的3' AAV ITR。

aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcactgaggccggcgaccaaggtcgcccgagcccc
 [0537] ggctttgccccggcgcgctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgccaa
 SEQ ID NO: 66

[0538] 启动子和调节序列

[0539] 本发明的多核苷酸或载体还可包含允许在体外或体内表达抗VEGF实体和/或补体负调节剂转基因的元件。这些可以被称为表达控制序列。因此,多核苷酸或载体通常包含与编码转基因的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列(例如,包含启动子序列)。

[0540] 在一些实施方案中,所述多核苷酸或载体包含编码以下的核苷酸序列:(a) CMV启动子或CAG启动子,任选地其中CMV或CAG启动子在编码抗VEGF实体和/或补体负调节剂的核苷酸序列的上游;(b) WPRE调节元件,任选地其中WPRE调节元件在编码抗VEGF实体和/或补体负调节剂的核苷酸序列的下游;和/或(c) 一个poly-A信号,如牛生长激素poly-A信号,任选地其中poly-A信号在编码抗VEGF实体和/或补体负调节剂的核苷酸序列下游。

[0541] 在一些实施方案中,所述多核苷酸或载体包含:

[0542] (a) 5' AAV ITR;

[0543] (b) 启动子,任选地CMV启动子;

[0544] (c) 编码补体负调节剂的核苷酸序列;

[0545] (d) 接头,任选地其中所述接头包含或由Furin裂解位点、GSG、11a1D和F2A序列限定;

[0546] (e) 核苷酸序列,其编码抗VEGF实体,优选阿柏西普;

[0547] (f) 任选地WPRE调节元件,任选地WPRE3调节元件;

[0548] (g) 一个poly-A信号,任选地一个牛生长激素poly-A信号;以及

- [0549] (h) 3' AAV ITR。
- [0550] 补体负调节剂可选自CFI和FHL-1。
- [0551] 元件(c)和(e)可以处于相互对应(reciprocal)的位置。
- [0552] 因此,在一些实施方案中,所述多核苷酸或载体包含:
- [0553] (a) 5' AAV ITR;
- [0554] (b) 启动子,任选地CMV启动子;
- [0555] (c) 核苷酸序列,其编码抗VEGF实体,优选阿柏西普;
- [0556] (d) 接头,任选地其中所述接头包含或由Furin裂解位点、GSG、11a1D和F2A序列限定;
- [0557] (e) 编码补体负调节剂的核苷酸序列;
- [0558] (f) 任选地WPRE调节元件,任选地WPRE3调节元件;
- [0559] (g) 一个poly-A信号,任选地一个牛生长激素poly-A信号;以及
- [0560] (h) 3' AAV ITR。
- [0561] 在一些实施方案中,所述多核苷酸或载体包含:
- [0562] (a) 5' AAV ITR;
- [0563] (b) 启动子,任选地CAG启动子;
- [0564] (c) 核苷酸序列,其编码补体负调节剂,优选FHL-1;
- [0565] (d) 接头,任选地其中所述接头包含或由Furin裂解位点、GSG、11a1D和F2A序列限定;
- [0566] (e) 核苷酸序列,其编码抗VEGF实体,优选阿柏西普;
- [0567] (f) 任选地WPRE调节元件,任选地WPRE3调节元件;
- [0568] (g) 一个poly-A信号,任选地一个牛生长激素poly-A信号;以及
- [0569] (h) 3' AAV ITR。
- [0570] 元件(c)和(e)可以处于相互对应(reciprocal)的位置。
- [0571] 因此,在一些实施方案中,所述多核苷酸或载体包含:
- [0572] (a) 5' AAV ITR;
- [0573] (b) 启动子,任选地CAG启动子;
- [0574] (c) 核苷酸序列,其编码抗VEGF实体,优选阿柏西普;
- [0575] (d) 接头,任选地其中所述接头包含或由Furin裂解位点、GSG、11a1D和F2A序列限定;
- [0576] (e) 核苷酸序列,其编码补体负调节剂,优选FHL-1;
- [0577] (f) 任选地WPRE调节元件,任选地WPRE3调节元件;
- [0578] (g) 一个poly-A信号,任选地一个牛生长激素poly-A信号;以及
- [0579] (h) 3' AAV ITR。
- [0580] 多核苷酸可从5'到3'由(a)-(h)依次组成。适当地,(a)在多核苷酸的5'端,且(h)在多核苷酸的3'端。适当地,(b)在(c)-(g)的上游。适当地,(f)在(b)-(e)的下游。适当地,(g)在(b)-(f)的下游。适当地,(c)在(d)的上游,且(e)在(d)的下游。
- [0581] 可以使用任何合适的启动子,技术人员可以很容易地进行选择。启动子序列可以是组成型活性的(即在任何宿主细胞背景下都可以运作),或者只在特定的宿主细胞环境下

有活性,从而允许转基因在特定的细胞类型中定向表达(如组织特异性启动子)。启动子可以显示出响应于另一因素(例如,存在于宿主细胞中的一个因素)的存在的诱导性表达。在任何情况下,当载体被用于治疗时,优选启动子应当在靶标细胞背景中具有功能性。

[0582] 在一些实施方案中,优选启动子显示出视网膜细胞特异性表达,以使转基因只在视网膜细胞群中表达。因此,启动子的表达可以是视网膜细胞特异性的,例如仅局限于神经感觉视网膜和视网膜色素上皮的细胞。启动子也可以在神经节细胞、Mueller细胞、光感受器细胞、视网膜色素上皮细胞和/或内皮细胞中启动表达,尤其是组织或细胞特异性表达,。

[0583] 非视网膜细胞特异性的优选启动子包括鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子,任选地与巨细胞病毒(CMV)增强子元件组合使用。用于本发明的一个实例是CAG启动子,例如用于rAVE表达盒(GeneDetect.com)中的启动子。

[0584] 在优选的实施方案中,所述多核苷酸或载体包含CMV启动子。

[0585] CMV启动子序列的一个实例是。

[0586] GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGAC
CCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAA
GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTG
GCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT
AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT
[0587] TTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACG
CAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGA
ACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCG
(SEQ ID NO: 59)

[0588] 在一些实施方案中,所述多核苷酸或载体包含启动子,其核苷酸序列与SEQ ID NO:59具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,其中所述核苷酸序列基本上保留了SEQ ID NO:59所代表的启动子的功能活性。

[0589] 在其他实施方案中,所述多核苷酸或载体包含具有SEQ ID NO:60核苷酸序列的启动子。

[0590] CAG启动子序列的一个实例是。

CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTG
 ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTAT
 CATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATT
 TGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA
 TCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCC
 CCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGG
 GCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGCGGG
 GCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAA
 [0591] GTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCG
 GCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCGCCGCTC
 GCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGA
 CGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTCCTTTT
 TGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGC
 GGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGACGGGGCAGGGCGG
 GGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTATGC
 CTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATT
 TGGCAAAGAATTGGATCC (SEQ ID NO: 60)

[0592] 在一些实施方案中,所述多核苷酸或载体包含启动子,其核苷酸序列与SEQ ID NO:60具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,其中所述核苷酸序列基本上保留了SEQ ID NO:60代表的启动子的功能活性。

[0593] 在其他实施方案中,所述多核苷酸或载体包含具有SEQ ID NO:60核苷酸序列的启动子。

[0594] 基于人类序列的启动子将诱导视网膜特异性基因表达的实例包含用于视杆和视锥的视紫红质激酶 (Allocca等 (2007) *J. Virol.* 81:11372-80), 仅用于视锥的PR2.1 (Mancuso等人 (2009) *Nature* 461:784-7) 和/或用于视网膜色素上皮细胞的RPE65 (Bainbridge等人 (2008) *N. Engl. J. Med.* 358:2231-9) 或VMD2 (Esumi等人 (2004) *J. Biol. Chem.* 279:19064-73)。

[0595] 本发明的多核苷酸或载体还可以包含一个或多个额外的调控序列,这些序列可以在转录前或转录后发挥作用。调节序列可以是天然转基因基因座的一部分,也可以是异源的调节序列。本发明的多核苷酸或载体可包含来自天然转基因转录物的5'-UTR或3'-UTR的部分。

[0596] 调控序列是促进转基因表达的任何序列,即起到增加转录本的表达、改善mRNA的出核运输或提高其稳定性的作用。这样的调控序列包含例如增强子元件、转录后调控元件和多腺苷酸化位点。

[0597] 一个优选的多腺苷酸化位点是牛生长激素poly-A (bGHPoly-A) 信号。

[0598] 牛生长激素poly-A (bGH poly-A) 信号的一个实例是:

GTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCCCTCCCCCGTGCTTCCTTGACCCT
 GGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGT
 [0599] CTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG
 GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
 (SEQ ID NO: 61)

[0600] 牛生长激素poly-A (bGH poly-A) 信号的另一个实例是：

TCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCC
CCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGA
GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG
[0601] CAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGT
GGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGG
(SEQ ID NO: 62)

[0602] 在一些实施方案中,所述多核苷酸或载体包含多腺苷酸化信号,其核苷酸序列与SEQ IDNO:61或62具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,其中所述核苷酸序列基本上保留了SEQ ID NO:61或62所代表的多腺苷酸化信号的功能活性。

[0603] 在其他实施方案中,所述多核苷酸或载体包含具有SEQ ID NO:61或62的核苷酸序列的多腺苷酸化信号。

[0604] 在本发明的多核苷酸或载体的背景下,这种调控序列将是顺式作用的。然而,本发明也涵盖位于其他遗传结构上的反式作用的调控序列的使用。

[0605] 用于本发明的AAV载体的优选的转录后调控元件是土拨鼠肝炎转录后调控元件(WPRE)或其变体。

[0606] 一个WPRE的实例是。

ATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCT
CCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGT
ATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTG
TGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCC
[0607] ACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTTTCGCTTTCCTCC
TCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGC
TCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCT
TGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCC
CTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCC
TCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCC
[0608] CCGC
(SEQ ID NO: 63)

[0609] WPRE是一个含有按给定的顺序排列的 γ 、 α 和 β 元件的三方元件。在本发明中也可以使用WPRE的缩短版本,其只含有最小的 γ 和 α 元件(称为WPRE3;Choi, J.-H.等人(2014)Molecular Brain7:17)。

[0610] WPRE3序列的一个实例是。

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGC
TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCG
TATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACT
[0611] CATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAA
TTCCGTGGT
(SEQ ID NO: 64)

[0612] 在一些实施方案中,所述多核苷酸或载体包含转录后调节元件,其核苷酸序列与

SEQ IDNO:63或64具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。优选地,其中所述核苷酸序列基本上保留了SEQ ID NO:63或64所代表的转录后调控元件的功能活性。

[0613] WPRE可以来自于野生型或修饰的的土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)序列

[0614] 在其他实施方案中,所述多核苷酸或载体包含具有SEQ ID NO:63或64的核苷酸序列的转录后调节元件。

[0615] 在本发明的多核苷酸或载体中可使用的另一个调控序列是支架附着区(scaffold-attachment region,SAR)。技术人员可以很容易地选择其他调节序列。

[0616] 给药方法

[0617] 本发明的产品、多核苷酸或载体可以全身给药(例如通过外周静脉输注),也可以局部或区域给药(例如通过鞘内注射到中枢神经系统)。在优选的实施方案中,所述产品、多核苷酸或载体在眼内给药。

[0618] 术语“眼内”是指眼睛的内部,因此眼内给药是指在受试者的眼睛内部给药。

[0619] 在一些实施方案中,所述产品、多核苷酸或载体通过视网膜下、直接视网膜、脉络膜上或玻璃体内注射给受试者的眼睛。在一些实施方案中,所述给药是由机器人进行的。

[0620] 注射的药物组合物的体积例如可以是约10-500 μ L,例如约50-500、100-500、200-500、300-500、400-500、50-250、100-250、200-250或50-150 μ L。例如,所述体积可以是约10、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500 μ L。优选地,注射的药物组合物的体积为100 μ L。

[0621] 技术人员将熟悉并能良好地进行个体视网膜下、直接视网膜、脉络膜上或玻璃体内的注射。

[0622] 优选地,所述产品、多核苷酸或载体通过网膜下注射给药。

[0623] 在一些实施方案中,所述产品、多核苷酸、载体或包含相同内容的药物组合物在受试者的一生中被给予不超过一次或不超过两次。

[0624] 视网膜下注射

[0625] 视网膜下注射是注射到视网膜下空间,即在神经感觉视网膜下方。在视网膜下注射过程中,注射的材料被引导到光感受器细胞和视网膜色素上皮(RPE)层之间,并在两者之间形成一个空间。

[0626] 当通过一个小的视网膜切口进行注射时,可能会产生一个视网膜脱离。由注射材料产生的视网膜脱离、凸起层被称为“水泡(bleb)”。

[0627] 由视网膜下注射产生的孔必须足够小,以便注射的溶液在给药后不会明显回流到玻璃体腔内。当注射药物时,这种回流将是特别有问题的,因为药物的作用将被引向远离目标区。优选地,注射在神经感觉视网膜中形成一个自我密封的入口,即一旦注射针头被移除,由针头形成的孔就会重新密封,这样就会有非常少的或基本上没有的注射材料通过该孔释放出来。

[0628] 为了促进这一过程,市场上有专业的视网膜下注射针头(如DORC 41G Teflon视网膜下注射针头,Dutch Ophthalmic Research Center International BV,Zuidland,The Netherlands)。这些都是为进行视网膜下注射而设计的针头。

[0629] 除非在注射过程中发生对视网膜的损伤,而且只要使用足够小的针头,基本上所

有的注射物都会保持在局部视网膜剥离部位的神经感受性视网膜和RPE之间(即不会回流到玻璃体内)。事实上,典型的出血点在短时间内持续存在,表明注射的物质通常很少逃到玻璃体内。随着注射的材料被吸收,斑点可能会在较长的时间内消散。

[0630] 眼睛的可视化,特别是视网膜,例如使用光学相干断层扫描,可以在操作前进行。

[0631] 注射的药物组合物的体积例如可以是约10-500 μ L,例如约50-500、100-500、200-500、300-500、400-500、50-250、100-250、200-250或50-150 μ L。例如,所述体积可以是约10、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500 μ L。优选地,注射的药物组合物的体积为100 μ L。较大的体积可能会增加拉伸视网膜的风险,而较小的体积可能就很难看到。

[0632] 两步式视网膜下注射

[0633] 本发明的产品、多核苷酸或载体可以通过使用两步法来递送并提高准确性和安全性,其中通过在视网膜下注射第一种溶液来形成局部视网膜脱离。第一溶液不包含产品、多核苷酸或载体。然后使用第二次视网膜下注射,将包含产品、多核苷酸或载体的药物送入第一次视网膜下注射产生的水泡的视网膜下液体中。因为输送药物的注射液不是用来分离视网膜的,所以在这第二步中可以注射特定体积的溶液。

[0634] 在一些实施例中,所述载体的视网膜下注射包含以下步骤。

[0635] (a) 通过视网膜下注射给受试者施用一种溶液,其量可有效地使视网膜至少部分脱离以形成视网膜下水泡,其中该溶液不包含产品、多核苷酸或载体;和

[0636] (b) 向步骤(a)形成的水泡中通过视网膜下注射施用药物组合物,其中所述药物包含产品、多核苷酸或载体。

[0637] 在步骤(a)中注入的至少部分脱离视网膜的溶液体积可以是,例如,约10-1000 μ L,例如约50-1000,100-1000,250-1000,500-1000,10-500,50-500,100-500,250-500 μ L。体积可以是,例如,约10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000 μ L。

[0638] 在步骤(b)中注射的药物组合物的体积可以是,例如,约10-500 μ L,例如约50-500、100-500、200-500、300-500、400-500、50-250、100-250、200-250或50-150 μ L。该体积可以是,例如,约10、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500 μ L。优选地,在步骤(b)中注射的药物组合物的体积是100 μ L。较大的体积可能会增加拉伸视网膜的风险,而较小的体积可能难以看到。

[0639] 不包含药物的溶液(即步骤(a)的“溶液”)可以与包含药物的溶液类似地配制,如下所述。优选的不含药物的溶液是平衡盐水(BSS)或与视网膜下空间的pH值和渗透压相匹配的类似缓冲溶液。

[0640] 手术中视网膜的可视化

[0641] 在某些情况下,例如在末期视网膜变性时,识别视网膜是很困难的,因为它很薄,很透明,在它所处的被破坏和严重色素沉着的上皮中很难看到。使用蓝色的活染料(例如 Brilliant Peel[®], Geuder; MembraneBlue-Dual[®], Dorc)可以方便识别为视网膜脱离步骤而开的视网膜孔(即本发明两步式视网膜下注射方法中的步骤(a)),这样就可以通过同一孔给药,而没有回流到玻璃体腔的风险。

[0642] 使用蓝色活染料还可以识别视网膜上有增厚的内界膜或视网膜外膜的任何区域,因为通过这些结构中的任何一个进行注射都会阻碍干净利落地进入视网膜下空间。此外,这些结构中的任何一个在术后立即收缩,都可能导致视网膜入口孔的拉伸,这可能导致药

物反流到玻璃体腔。

[0643] 脉络膜上注射

[0644] 本发明的产品、多核苷酸或载体可以通过使用微导管的ab externo方法递送到脉络膜上层空间(例如,见Peden等人(2011) PLoS One 6(2):e17140)。在这种方法中,先进行角膜结膜切开术以暴露裸露的巩膜,然后再进行硬膜切开术以暴露裸露的脉络膜。将微导管(如iScience Interventional公司的iTrack 250A,任选地连接到照明系统,如基于iLumin激光二极管的微照明系统(iScience Interventional公司))引入脉络膜上层空间,并向后方视盘推进。在操纵微导管尖端到所需位置后,注射产品、多核苷酸或载体在视网膜和脉络膜内形成一个水泡。

[0645] 因此,在一些实施方案中,所述产品、多核苷酸或载体通过一种方法在脉络膜上递送,所述方法包括(i)将微导管引入脉络膜上空间;(ii)在所述空间内推进微导管,直到尖端处于视网膜受影响区域附近;以及(iii)从微导管尖端注射所述产品、多核苷酸或载体以形成一个水泡。

[0646] 在一些实施方案中,上述管理程序是由机器人直接执行的。

[0647] 药品组合物和注射液

[0648] 本发明的药剂,例如产品、多核苷酸或载体,可以配制成药物组合物。这些组合物除了药物外,还可以包含药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂、缓冲剂、稳定剂或其他本领域已知的材料。这些材料应当是无毒的,并且不应当干扰活性成分的功效。载体或其他材料的确切性质可由技术人员根据给药途径确定,例如,视网膜下、直接视网膜、脉络膜上或玻璃体内注射。

[0649] 所述药物组合物通常为液体形式。液体药物组合物一般包含液体载体,如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。可以包含生理盐水溶液、氯化镁、葡萄糖或其他糖类溶液,或乙二醇、丙二醇或聚乙二醇等乙二醇。在某些情况下,可以使用表面活性剂,如0.001%的普拉尼克酸(pluronic acid,PF68)。

[0650] 为了在患病部位进行注射,活性成分可以采用不含热原的水溶液形式,并具有适当的pH值、等渗性和稳定性。技术人员能够很好地使用例如等渗载体,如氯化钠注射液、林格氏注射液或乳酸林格氏注射液制备合适的溶液。防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂可根据需要加入。

[0651] 对于延迟释放,药物可以包含在为缓释而配制的药物组合物中,例如根据本领域已知的方法,在由生物相容性聚合物形成的微胶囊或脂质体载体系统中。

[0652] 治疗方法

[0653] 应当理解的是,这里提到的所有治疗包含治愈性、姑息性和预防性治疗;尽管在本发明的背景下,提到预防更多的是与预防性治疗相关。治疗也可以包含阻止疾病的严重程度的发展。

[0654] 哺乳动物,特别是人类的治疗是首选。然而,人类和兽类的治疗都在本发明的范围内。

[0655] 本文所用的术语“组合”,或术语“联合”、“组合使用”或“联合制备”可指同时、依次或分别地联合施用两种或多种药剂。

[0656] 本文所用的术语“同时”是指同时给药,即在同一时间。

[0657] 本文所用的术语“依次”是指药剂是一个接一个地施用的。

[0658] 此处使用的术语“分别”是指药剂的施用是相互独立的,但在一定的时间间隔内,使得药剂显示出联合的、优选协同的效果。因此,“分别”给药可以允许一种药剂在另一种药剂之后1分钟、5分钟或10分钟内给药。

[0659] 变体、衍生物、类似物、同源物和片段

[0660] 除了本文提到的特定蛋白质和核苷酸外,本发明还涵盖其变体、衍生物、类似物、同源物和片段的用途。

[0661] 在本发明的背景下,任何给定序列的变体是这样一个序列,其中特定的残基序列(无论是氨基酸还是核酸残基)以这样一种方式被修饰,即有关的多肽或多核苷酸基本上保留了其功能。变体序列可以通过增加、删除、取代、修改、替换和/或改变自然存在的蛋白质中的至少一个残基来获得。

[0662] 本文所用的术语“衍生物”,就本发明的蛋白质或多肽而言,包含对序列中一个(或多个)氨基酸残基的任何取代、变化、修饰、替代、删除和/或添加,只要所产生的蛋白质或多肽基本上保留其至少一个内源功能。

[0663] 本文所用的术语“类似物”,就多肽或多核苷酸而言,包含任何模仿物,即拥有其模仿的多肽或多核苷酸的至少一种内源功能的化学化合物。

[0664] 通常情况下,可以进行氨基酸取代,例如从1、2或3到10或20个取代,只要修改后的序列基本上保留了所需的活性或能力。氨基酸的取代可以包含使用非天然存在的类似物。

[0665] 本发明中使用的蛋白质也可以有氨基酸残基的缺失、添加或取代,产生无声的变化,并产生功能上等同的蛋白质。只要保留内源性功能,就可以根据极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或残基的两性性质的相似性进行故意的氨基酸取代。例如,带负电荷的氨基酸包含天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包含赖氨酸和精氨酸;具有类似亲水性值的无电荷极性头基团的氨基酸包含天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

[0666] 可以进行保守性取代,例如按照下表进行替换。第二列中同一区块的氨基酸,优选第三列中同一行的氨基酸可以相互取代。

[0667]	脂族	非极性	G A P
			I L V
		极性 - 不带电	C S T M
	芳族	极性 - 带电	N Q
			D E
			K R H
		F W Y	

[0668] 本文所用的术语“同源物”是指与野生型氨基酸序列和野生型核苷酸序列具有一定同源性的实体。术语“同源性”可以等同于“同一性”。

[0669] 同源序列可以包含一个氨基酸序列,它可以与主体序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%相同,优选至少95%或97%或99%相同。通常情况下,同源物将包含与主体氨基酸序列相同的活性位点等。尽管同源性也可以从相似性(即具有类似化学性质/功能的氨基酸残基)的角度来考虑,但在本发明的背景下,优选以序列同

一性来表达同源性。

[0670] 同源序列可以包含一个核苷酸序列,它可以与主体序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%的相同性,最好是具有至少95%或97%或99%的相同性。尽管同源性也可以用相似性来考虑,但在本发明的背景下,最好用序列的同一性来表达同源性。

[0671] 优选地,提及与本文详述的任何一个SEQ ID NO具有百分比同一性的序列是指在提及的SEQ ID NO的整个长度上具有所述百分比同一性的序列。

[0672] 同源性比较可以通过肉眼,或更多地借助于现成的序列比较程序。这些市售的计算机程序可以计算出两个或多个序列之间的同源性或同一性百分比。

[0673] 同源性百分比可以在连续的序列上计算,即一个序列与另一个序列比对,一个序列中的每个氨基酸与另一个序列中的相应氨基酸直接比较,一次一个残基。这被称为“非空位(ungapped)”比对。通常情况下,这种非空位的比对只在相对较少数量的残基上进行。

[0674] 尽管这是一个非常简单和一致的方法,但它没有考虑到,例如,在一对完全相同的序列中,核苷酸序列中的一个插入或缺失可能会导致随后的密码子不被对齐,从而有可能导致在进行全局比对时同源性百分比的大幅降低。因此,大多数序列比较方法被设计为产生最佳的比对,其考虑到可能的插入和缺时,而不对总体同源性得分造成不适当的惩罚。这是通过在序列比对中插入“空位”来实现的,以尽量提高局部同源性。

[0675] 然而,这些更复杂的方法对排列中出现的每个空隙进行“空位惩罚”,因此,对于相同数量的相同氨基酸,具有尽可能少的空隙的序列比对,反映了两个被比较的序列之间更高的关联性,将比具有许多空隙的序列取得更高的分数。通常使用的是“Affine gap cost”,对空位的存在计取相对较高的成本,对空位中的每个后续残基计取较小的惩罚。这是最常用的空位评分系统。高的空位罚分当然会产生具有较少空位的优化比对。大多数比对程序允许修改空位罚分。然而,在使用这种软件进行序列比较时,最好使用默认值。例如,当使用GCG Wisconsin Bestfit软件包时,氨基酸序列的默认空位罚分是空位为-12,每个延伸为-4。

[0676] 因此,计算最大的同源性百分比首先需要制作一个最佳的比对,同时考虑到差距的惩罚。进行这种比对的合适的计算机程序是GCG威斯康星州的Bestfit软件包(美国威斯康星大学;Devereux等人(1984)Nucleic Acids Res.12:387)。其他可以进行序列比较的软件的实例包含,但不限于BLAST包(见Ausubel等(1999)同上-第18章),FASTA(Atschul等(1990)J.Mol.Biol.403-410)和GENEWORKS比较工具套装。BLAST和FASTA都可用于离线和在线检索(见Ausubel等人(1999)同上,第7-58至7-60页)。然而,对于某些应用来说,优选使用GCG Bestfit程序。另一个工具,称为BLAST 2Sequences,也可用于比较蛋白质和核苷酸序列(见FEMS Microbiol.Lett.(1999)174:247-50;FEMS Microbiol.Lett.(1999)177:187-8)。

[0677] 尽管最终的同源性百分比可以用同一性来衡量,但比对过程本身通常不是基于全或无的配对比较。取而代之的是,通常使用一个按比例排列的相似性分数矩阵,根据化学相似性或进化距离为每一对比较分配分数。通常使用的这种矩阵的一个实例是BLOSUM62矩阵--BLAST程序的默认矩阵。GCG Wisconsin程序通常使用公共默认值或自定义符号比较表(如果提供的话)(进一步的细节见用户手册)。对于某些应用,最好使用GCG软件包的公共默

认值,或者在其他软件的情况下,使用默认矩阵,如BLOSUM62。

[0678] 一旦软件产生了一个最佳比对,就可以计算出同源性百分比,最好是序列同一性百分比。该软件通常将此作为序列比对的一部分并产生一个数字结果。

[0679] “片段”也是变体,该术语通常指的是多肽或多核苷酸的选定区域,该区域在功能上或例如在检测中具有意义。因此,“片段”是指作为全长多肽或多核苷酸的一部分的氨基酸或核酸序列。

[0680] 此类变体可以用标准的重组DNA技术,如定点突变技术来制备。在需要插入的地方,可以制作编码插入子的合成DNA,以及插入点两侧与天然存在的序列相对应的5'和3'侧翼区域。侧翼区域将包含与天然存在的序列中的位点相对应的方便的限制性位点,以便用适当的酶切割该序列,并将合成DNA连接到切割处。然后根据本发明对DNA进行表达,制成编码的蛋白质。

[0681] 这些方法只是说明了本领域中已知的许多操纵DNA序列的标准技术,并且其他已知的技术也可以使用。

[0682] 本发明的各方面

[0683] 本发明的各方面在以下编号的段落(段)中定义。

[0684] 1.一种产品,其包含(i)抗VEGF实体;和(ii)补体负调节剂,或编码其的核苷酸序列,作为组合制剂同时、分别或依次地用于治疗中。

[0685] 2.根据第1段的产品用于治疗,其中要治疗或预防的疾病是一种眼部病症(ocular disorder)。

[0686] 3.根据第2段的产品用于治疗,其中所述眼部病症是一种补体介导的眼睛的病症。

[0687] 4.根据第3段的产品用于治疗,其中补体介导的病症是年龄相关性黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变、青光眼、Stargardt病、中心性浆液性脉络膜病变、色素性视网膜炎、息肉样脉络膜血管病变、糖尿病黄斑水肿、视网膜分支静脉阻塞或葡萄膜炎,优选AMD。

[0688] 5.根据第4段的产品用于治疗,其中,AMD是湿式AMD和/或干式AMD。

[0689] 6.根据第4段的产品用于治疗,其中AMD是湿性AMD,并且所述使用进一步防止和/或治疗所述对象中干性AMD的发病。

[0690] 7.根据第1至6段中的任何一段的产品用于治疗,其中所述产品包含一个多核苷酸,所述多核苷酸包含编码(i)抗VEGF实体和(ii)补体负调节剂的核苷酸序列。

[0691] 8.一种分离的多核苷酸,包含编码(i)抗VEGF实体和(ii)补体负调节剂的核苷酸序列。

[0692] 9.根据第7段的产品用于治疗或根据第8段分离的多核苷酸,其中抗VEGF实体选自Ig融合蛋白、抗体、多肽、肽、非抗体支架、反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、CRISPR向导链和适体。

[0693] 10.根据第9段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中所述抗VEGF实体选自阿柏西普、雷珠单抗、贝伐珠单抗和哌加他尼。

[0694] 11.根据第10段的分离的多核苷酸,其中所述抗VEGF实体是阿柏西普,例如其中阿柏西普由包含SEQ ID NO:3至11中任一个的多核苷酸序列编码。

[0695] 12.根据前述任何一段产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中补体负调节剂选自补体因子I(CFI)、补体因子H样蛋白1(FHL1)、补体因子H(CFH)。补体受体1型(CR1)、膜辅蛋

白(MCP)、补体衰变加速因子(DAF)、MAC-抑制蛋白(MAC-IP)、C1-抑制物、过敏蛋白抑制物、C4b结合蛋白(C4BP)、聚集素、玻连蛋白或其变体或片段。

[0696] 13. 根据第12段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中补体负调节剂选自CFI和FHL1或其变体或片段。

[0697] 14. 根据第7至13段中任一段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸进一步包含编码以下的核苷酸序列:

[0698] (a) CMV或CAG启动子,任选地其中CMV或CAG启动子在编码(i)和(ii)的核苷酸序列的上游。

[0699] (b) WPRE调节元件,任选地其中WPRE调节元件位于编码(i)和(ii)的核苷酸序列的下游;和/或

[0700] (c) poly-A信号,任选地牛生长激素poly-A信号,其中所述poly-A信号任选地在编码(i)和(ii)的核苷酸序列的下游。

[0701] 15. 根据第7至14段中任一段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸进一步包含一个或多个腺相关病毒(AAV)末端反向重复(ITR)。

[0702] 16. 根据第7至15段中任一段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸在其5'端包含一个AAV ITR,在其3'端包含一个AAV ITR。

[0703] 17. 根据第7至16段中任一段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含:

[0704] (a) 5' AAV ITR;

[0705] (b) CMV或CAG启动子;

[0706] (c) 核苷酸序列,其编码抗VEGF实体;

[0707] (d) 接头,任选地其中所述接头包含或由Furin裂解位点、GSG、11a1D和F2A序列限定;

[0708] (e) 核苷酸序列,其编码补体负调节剂;

[0709] (f) 任选地WPRE调节元件,进一步任选地其中所述WPRE调节元件是WPRE3调节元件;

[0710] (g) 牛生长激素poly-A信号;以及

[0711] (h) 3' AAV ITR。

[0712] 18. 根据第7至17段中任一段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中AAV ITR是AAV2 ITR。

[0713] 19. 根据第7至18段中任一段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中编码抗VEGF实体和补体负调节剂的核苷酸序列是经密码子优化的。

[0714] 20. 根据第7至19段中任一段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中编码阿柏西普的核苷酸序列与SEQ ID NO:11具有至少75%的序列同一性。

[0715] 21. 根据第7至20段中任一段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中编码CFI的核苷酸序列与SEQ ID NO:35或36具有至少75%的序列同一性,或编码FHL-1的核苷酸序列与SEQ ID NO:41具有至少75%的序列同一性。

[0716] 22. 根据第7至20段中任一段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:45至54的核苷酸序列,或与之有至少75%序列同一性的核苷酸序列。

- [0717] 23. 根据第7至22段中任一段的产品用于治疗或分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸小于或等于4.7kb。
- [0718] 24. 载体,其包含第8-23段中任一段的多核苷酸。
- [0719] 25. 第24段的载体,其中所述载体是一种腺相关病毒(AAV)载体。
- [0720] 26. 第24或25段的载体,其中所述载体是病毒载体颗粒的形式。
- [0721] 27. 第26段的载体,其中所述AAV载体颗粒包含AAV2或AAV8基因组,以及AAV2或AAV8衣壳蛋白。
- [0722] 28. 细胞,其包含第7至22段中任何一段的多核苷酸。
- [0723] 29. 用第24-27段中任何一段的载体转导的细胞。
- [0724] 30. 药物组合物,其包含第8-29段中任何一段的分离的多核苷酸、载体或细胞与药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂相结合。
- [0725] 31. 第8-29段中任何一段的分离的多核苷酸、载体或细胞用于治疗。
- [0726] 32. 第8-29段中任何一段的分离的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防眼睛的补体介导的病症。
- [0727] 33. 根据第32段分离的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防,其中所述补体介导的病症是年龄相关性黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变、青光眼、Stargardt病、中心性浆液性脉络膜病变、色素性视网膜炎、息肉样脉络膜血管病变、糖尿病黄斑水肿、视网膜分支静脉阻塞或葡萄膜炎,优选AMD。
- [0728] 34. 根据第32段分离的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防,其中所述AMD是湿式AMD和/或干式AMD。
- [0729] 35. 根据第33段分离的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防,其中所述AMD是湿性AMD,并且所述使用进一步防止和/或治疗所述对象中干性AMD的发病。
- [0730] 36. 根据第32-35中任一段的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防,其中地理萎缩的形成被防止或减少,和/或地理萎缩的总量被减少。
- [0731] 37. 根据第32-36段中任何一段的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防,其中地理萎缩的进展被延缓。
- [0732] 38. 根据第32-37段中任一段的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防,其中相对于同期未治疗的眼睛,在对受试者的被治疗眼给药后的12个月内,地理萎缩面积的增加至少减少10%。
- [0733] 39. 根据第32-38段中任一段的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防,其中给予所述多核苷酸、载体或细胞可增加受试者中或受试者的眼睛中(诸如视网膜色素上皮细胞(RPE)水液和/或玻璃体液中)的C3b灭活和iC3b降解活性水平,任选地增加到超过受试者或其眼睛或RPE中的正常水平。
- [0734] 40. 根据第32-39段中任何一段的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防,其中所述多核苷酸、载体或细胞通过眼内给药。
- [0735] 41. 根据第32-40段中任何一段的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防,其中所述多核苷酸、载体或细胞通过视网膜下、直接视网膜、脉络膜上或玻璃体内注射施用给受试者的眼睛。
- [0736] 42. 根据第32-41段中任何一段的多核苷酸、载体或细胞用于治疗或预防,其中所

述多核苷酸、载体或细胞是通过视网膜下注射施用给受试者的眼睛。

[0737] 43. 一种治疗或预防眼睛的补体介导的疾病的方法,包括将第8-29段中任一段的分离的多核苷酸、载体或细胞施用于有需要的受试者。

[0738] 44. 一种向受试者提供 (i) 抗VEGF实体;和 (ii) 补体负调节剂的方法,包含将第8-29段中任何一段的分离的多核苷酸、载体或细胞递送给受试者的眼睛。

[0739] 45. 抗VEGF实体用于治疗或预防疾病,其中所述抗VEGF实体与补体负调节剂联合使用。

[0740] 46. 补体负调节剂用于治疗或预防疾病,其中所述补体负调节剂与抗VEGF实体联合使用。

[0741] 47. 根据第45段的抗VEGF实体用于治疗或预防或根据第46段的补体负调节剂用于治疗或预防,其中,所述疾病是第2至6段中任何一段所列举的疾病。

[0742] 48. 根据第45或47段的抗VEGF实体用于治疗或预防,其中抗VEGF实体是如第9至11段中任何一段定义的实体。

[0743] 49. 根据第46或47段的补体负调节剂用于治疗或预防,其中所述补体负调节剂是如第12或13段定义的实体。

[0744] 技术人将明白,他们可以在不偏离本发明所公开的范围的情况下,结合本发明的所有特征。

[0745] 现在将通过非限制性实例来描述本发明的优选特征和实施方案。

[0746] 除非另有说明,本发明的实践将采用化学、生物化学、分子生物学、微生物学和免疫学的常规技术,这些技术属于本领域普通技术人员的能力范围。此类技术在文献中已有解释。例如,参见 Sambrook, J., Fritsch, E.F. 和 Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. 等人 (1995 and periodic supplements) *Current Protocols in Molecular Biology*, 第9, 13 和 16 章, John Wiley & Sons; Roe, B., Crabtree, J. 和 Kahn, A. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; Polak, J.M. 和 McGee, J.O'D. (1990) *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; Gait, M.J. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; 以及 Lilley, D.M. 和 Dahlberg, J.E. (1992) *Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Academic Press。这些总体的文本都通过参考而纳入本文。

实施例

[0747] 实施例1--阿柏西普序列的密码子优化

[0748] 首先从 www.drugbank.ca 获得阿柏西普的蛋白序列 (见 SEQ ID NO:1)。

[0749] 来自 'Drugbank' 的蛋白质序列被回译成 DNA 序列,然后与人 VEGF 受体和人 IgG 蛋白质序列进行比对,并指示为“野生型”阿柏西普序列。野生型阿柏西普的 DNA 序列被导出并亚克隆到 GT005 骨架上,指示为 RC288。在野生型阿柏西普序列的上游添加了一个天然的 FHL-1 信号肽,以允许从细胞中分泌。五个在线工具被用来生成“基础”序列 (GeneArt, Genscript, Genewiz, IDT & JCat)。然后对每个基本序列进行手动优化,以去除隐性剪接位点、miRNA 结合

位点和串联重复密码子。这些优化的序列被指定为“手动”。合成每个密码子优化的序列并通过Genewiz克隆到GT005骨架中(表1和图1)。

[0750] 表1:列举了密码子优化的阿柏西普构建体的变化和在线密码子优化工具的参考链接的表格

变体编号 #	质粒代码	密码子优化工具	参考链接
野生型	RC288	原始的 "野生型"	阿柏西普序列来自drugbank.ca
1	RC290	GeneArt 基础	https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html
2	RC291	GeneArt 手动	
[0751] 3	RC292	Genscript 基础	https://www.genscript.com/
4	RC293	Genscript 手动	
5	RC294	GeneWiz 基础	https://www.genewiz.com/en-GB/
6	RC295	Genewiz 手动	
7	RC296	IDT 基础	https://eu.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool?returnurl=%2FCodonOpt
8	RC297	IDT 手动	
9	RC298	JCat 基础	http://www.jcat.de/
10	RC299	JCat 手动	

[0752] 总体上,单顺反子的阿柏西普载体由以下部分组成:

[0753] • 末端反向重复 (ITR)。

[0754] • CMV早期增强子/鸡 β -肌动蛋白 (CAG) 启动子

[0755] • 天然或密码子优化的FHL1分泌信号肽

[0756] • 阿柏西普是由血管内皮生长因子受体VEGFR-1的第二结合域和VEGFR-2的第三结合域的序列与人IgG的FC片段的序列融合而成 (WT = 野生型; co阿柏西普 = 密码子优化的阿柏西普序列。)

[0757] • 土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件 (WPRE)

[0758] • 牛生长激素多腺苷酸化信号 (bGHpA)

[0759] 实施例2--载体化阿柏西普在体外表达的比较

[0760] 所有经过密码子优化的阿柏西普载体用三重转染法被包装成AAV2。然后用qPCR滴定所有载体,并以1E4的MOI转导到HEK293。通过ELISA方法测量转导后72小时培养上清液中阿柏西普的表达水平。实验重复两次。如图2所示,所有密码子优化的阿柏西普载体都显示出不同的表达水平。

[0761] 具体地,RC298 (Jcat基础) 和RC299 (Jcat手动) 与含有非密码子优化的野生型序列的对照RC288载体相比,显示出最高的阿柏西普表达水平。

[0762] 还进行了Western blot分析以确认AAV2载体所表达的阿柏西普蛋白的完整性。所有的载体都显示阿柏西普蛋白的表达达到了预期的分子量115kDa (在非还原条件下),这与重组阿柏西普蛋白相当 (图3A和B)。密度分析显示,RC298表达的阿柏西普水平最高 (图3C),与图2中的ELISA数据一致。特别是,RC299显示出异常的蛋白带型,因此被排除在选择之外。

[0763] 总之,RC298被选为最理想的密码子优化的阿柏西普序列,可以带入双顺反子载体。

[0764] 实施例3--构建共同表达补体负调节剂和阿柏西普的双顺反子载体

[0765] 生成的双顺反子载体包含一个 (CAG或CMV) 启动子,驱动通过furin F2A接头连接与密码子优化的阿柏西普 (来自RC298) 连接的密码子优化的CFI或密码子优化的FHL1的表达。如图4和表2所示,补体负调节剂和阿柏西普的位置在不同的配置中互换。

[0766] 一般来说,双顺反子阿柏西普载体包含以下部分:

[0767] • 末端反向重复 (ITR)

[0768] • 巨细胞病毒 (CMV) 启动子或CMV早期增强子/鸡 β -肌动蛋白 (CAG) 启动子

[0769] • 密码子优化的补体因子I (CFI) 或密码子优化的FHL1

[0770] • Furin F2A裂解肽

[0771] • 阿柏西普-由血管内皮生长因子受体VEGFR-1的第二结合域和VEGFR-2的第三结合域的序列与人IgG的FC片段序列融合组成 (WT=野生型;co阿柏西普=密码子优化的阿柏西普序列)。

[0772] • 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件 (WPRE) 或仅含有最小的 γ 和 α 元件的缩短版 WPRE (WPRE3)。

[0773] • 牛生长激素多腺苷酸化信号 (bGHpA)

[0774] 表2:列举了双顺反子载体和相应的配置的表

[0775]

质粒代 码	补体负调节剂	抗VEGF	包装基因组的描述	SEQ ID NO
RC313	CFI (密码子优化的)	来自RC298的密码子优化的阿柏西普序列	ITR-CMV-coCFI-F2A-co阿柏西普-WPRE3-bGHpA-ITR	45
RC289	CFI (密码子优化的)	来自RC298的密码子优化的阿柏西普序列	ITR-CMV-co阿柏西普-F2A-coCFI-WPRE3-bGHpA-ITR	46
RC322	CFI (密码子优化的)	来自RC298的密码子优化的阿柏西普序列	ITR-CMV-coCFI-F2A-co阿柏西普-bGHpA-ITR	47
RC323	CFI (密码子优化的)	来自RC298的密码子优化的阿柏西普序列	ITR-CMV-co阿柏西普-F2A-coCFI-bGHpA-ITR	48
RC304	FHL1 (密码子优化)	来自RC298的密码子优化的阿柏西普序列	ITR-CMV-coFHL1-F2A-co阿柏西普-WPRE-bGHpA-ITR	49
RC312	FHL1 (密码子优化)	来自RC298的密码子优化的阿柏西普序列	ITR-CMV-co阿柏西普-F2A-coFHL1-WPRE-bGHpA-ITR	50
RC318	FHL1 (密码子优化)	来自RC298的密码子优化的阿柏西普序列	ITR-CAG-coFHL1-F2A-co阿柏西普-WPRE3-bGHpA-ITR	51
RC319	FHL1 (密码子优化)	来自RC298的密码子优化的阿柏西普序列	ITR-CAG-co阿柏西普-F2A-coFHL1-WPRE3-bGHpA-ITR	52
RC324	FHL1 (密码子优化)	来自RC298的密码子优化的阿柏西普序列	ITR-CAG-coFHL1-F2A-co阿柏西普-bGHpA-ITR	53
RC325	FHL1 (密码子优化)	来自RC298的密码子优化的阿柏西普序列	ITR-CAG-co阿柏西普-F2A-coFHL1-bGHpA-ITR	54

[0776]

		柏西普序列		
--	--	-------	--	--

[0777] 密码子优化的CFI序列是SEQ ID NO:35。

[0778] 密码子优化的FHL1序列是SEQ ID NO:41。

[0779] 密码子优化后的阿柏西普序列为SEQ ID NO:11。

[0780] 5' ITR是SEQ ID NO:55。

[0781] CMV启动子为SEQ ID NO:59

[0782] CAG启动子是SEQ ID NO:60。

[0783] WPRE的序列是SEQ ID NO:63。

[0784] WPRE3的序列是SEQ ID NO:64。

[0785] bGHpA的序列是SEQ ID NO:61。

[0786] 3' ITR是SEQ ID NO:57。

[0787] 实施例4--共同表达补体负调节剂和阿柏西普的双顺反子载体的功能特征分析

[0788] 通过体外转导实施双顺反子载体表达的比较,以对比来自图4中所列的双顺反子载体的阿柏西普、CFI和FHL1与单顺反子对应物的表达。

[0789] 对双顺反子载体的阿柏西普进行了功能分析,以确定抗VEGF的结合和抗增殖能力。

[0790] 所有的双顺反子性载体都使用三重转染法被包装成AAV8或AAV2。在HEK293细胞中以不同的MOI进行体外转导,以比较表2中所列的双顺反子载体各自的转基因的表达。使用ELISA定量阿柏西普、CFI和FHL1从各个双顺反子载体中的表达水平。同时,将其表达量与单顺反子的对应物进行比较。AAV8和AAV2双顺反子载体(RC289和RC313)在转导后显示出可测量的CFI和阿柏西普的表达水平,并且RC289包装成AAV8和AAV2载体的表达水平与单顺反子对应物相当(图7A和B)。相反,与RC289和相应的单顺反子载体相比,RC313显示较低的表达水平。类似地,AAV8和AAV2双顺反子载体(RC304和RC312)显示了可量化的FHL-1和阿柏西普的表达水平,其表达水平与相应的单顺反子载体(RC146-单顺反子FHL1,RC298-单顺反子阿柏西普)相当(图7C和D)。

[0791] 在进一步的实验中,用三重转染法将双顺反子载体RC313、RC289、RC304和RC312包装到AAV8中。纯化的载体在HEK293中以3个MOI转导,一式三份。取上清并通过阿柏西普、CFI和FHL-1ELISA进行定量。对于CFI-阿柏西普双顺反子载体(RC313和RC289),阿柏西普的表达在两个载体之间相似,RC289比RC313显示出更高的CFI表达(图7E)。对于FHL-1-阿柏西普双顺反子载体,阿柏西普的表达在两个载体之间也是相似的,并且RC304在1E4的MOI下比RC312的FHL-1表达量高(图7F)。使用表达研究中相同的细胞培养上清液样本,进行Western blot分析以评估所有双顺反子载体的蛋白表达。在非还原条件下,所有的细胞培养上清液都显示CFI、FHL-1和阿柏西普蛋白的表达,所有的双顺反子载体都表达了与重组蛋白对照组相似的预期蛋白大小(见图8)。

[0792] 这些结果表明,所有测试的双顺反子载体都能实现双转基因的表达,一些候选载体的表达水平与单顺反子载体相似。所有的双顺反子载体都表达了正确大小的蛋白质。

[0793] VEGF结合试验

[0794] 为了确定双顺反子载体表达的阿柏西普对VEGFA的结合亲和力,我们进行了平衡结合测定。用表达阿柏西普(RC298)的单顺反子载体和共同表达CFI或FHL1和阿柏西普的双顺反子载体转导HEK293细胞。转导后72小时,提取培养上清液中分泌的阿柏西普并通过

ELISA进行定量。通过使用特异和敏感的ELISA检测阿柏西普(在一定的浓度范围内)与人类VEGFA的经过一个固定时间段的孵育的混合物中的游离(未结合)人类VEGFA,测量来自载体的分泌物和重组阿柏西普(Eylea®)的结合亲和力。如图9所示,发现来自单顺反子和双顺反子载体的阿柏西普对于VEGFA的结合平衡(kD) [IC50]与Eylea®相似。

[0795] 这些数据表明,所设计的双顺反子载体能够表达阿柏西普,其具有与Eylea®相似能力的功能。

[0796] VEGF诱导的增殖试验

[0797] 为了确定AAV载体衍生的阿柏西普是否能有效结合VEGFA并有效阻断VEGF诱导细胞增殖的能力,用设定浓度的人VEGFA和不同浓度的阿柏西普(来自上述AAV转导HEK293细胞后的培养上清液)或Eylea®(阳性对照)对人脐带血管内皮细胞进行挑战。处理后72小时,通过添加[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺酸苯基)-2H-四唑鎓([3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)],并在450/570nm处进行分光光度分析,测量VEGF诱导的HUVEC细胞的增殖抑制情况。如图10所示,来自单顺反子和双顺反子载体的阿柏西普在这些细胞的5天生长试验中阻断了VEGF诱导的增殖,观察到的抗增殖特性与Eylea®相似。

[0798] 这些数据表明,所设计的双顺反子载体能够表达阿柏西普,其具有与Eylea®相似能力的功能。

[0799] C3b裂解测定

[0800] 为了分析转导细胞分泌的CFI或FHL1的功能活性,条件性的用以下转导的HEK293细胞的上清液:表达CFI的AAV2(GT005);表达FHL1的AAV2(RC146);共表达CFI和阿柏西普的AAV2(RC289或RC313),或共表达FHL1和阿柏西普的AAV2(RC312或RC304),在C3b裂解测定中进行测试(图11)。该试验的原理是基于CFI在FHL1存在的情况下,将C3b裂解为iC3b的能力。ELISA定量C3b裂解产物iC3b的总量。

[0801] 将1 μ g C3b与重组FHL1(GTP Tech)和用CFI表达载体(GT005、RC289和RC313)转导的细胞上清液以FHL1:CFI为4:1的摩尔比进行孵育,进行C3b裂解实验。用Opti-MEM™减血清培养基使反应体积达到20 μ l,反应在37度下孵育20分钟。用FHL1载体(RC146、RC312或RC304)转导的细胞的上清液与重组CFI(Complement Technology, Inc, A138)、1 μ g C3b(Complement Technology, Inc, A113)和Opti-MEM™无血清培养基以FHL1:CFI为4:1的摩尔比在37度下孵育20分钟,总体积为20 μ l。

[0802] 结果样品被稀释为1:100和1:400,并上样到iC3b ELISA,使用包被抗体:小鼠抗人活化C3(Hycult, HM2168),检测抗体:大鼠抗C3dg(Hycult, HM2199),和二抗:小鼠抗大鼠(Southern Biotech, 3061-05)。iC3b浓度(ng/mL)是根据使用iC3b纯化的人蛋白(Complement Technology, Inc)产生的标准曲线计算。

[0803] 与重组CFI和FHL1一起孵育的C3b作为阳性对照(图11,左手条)。只有C3b的阴性对照表明,C3b的分解需要CFI和FHL1的存在,因为C3b在没有其他成分时是稳定的。用未转染的细胞(UTD)的条件上清液孵育的C3b也作为阴性对照。iC3b ELISA的结果表明,所有双顺反子载体表达的CFI和FHL1是有功能的,可以促进C3b分解为iC3b(见图11)。

[0804] 体内研究

[0805] 进行体内双顺反子表达和功效研究,以确定补体负调节剂和阿柏西普在啮齿动物中从双顺反子载体表达。还进行了研究,以证明双核苷酸载体在激光CNV小鼠模型中的功效。

[0806] 实施例5--在CNV的小鼠模型中使用表达CFI或FHL1的单顺反子载体

[0807] 首先将AAV载体通过视网膜下地递送入小鼠眼内并放置4周。在第0天,所有预先注射的眼睛都接受激光诱导的CNV病变,通过激光烧灼Bruch's膜。阿柏西普(Eylea®)也通过玻璃体内注射进入CNV病变的眼睛作为阳性对照组。在第0天和第4天,使用光学相干断层扫描和荧光素血管造影分别对视网膜结构和CNV病变区域进行成像。在激光烧灼后的第7天,淘汰所有小鼠,并测量CNV面积(由isolectin染色确定)、CNV渗漏面积和CNV评分(分级)作为主要和次要终点(见图6)。

[0808] 实施例6--体内表达研究

[0809] 单顺反子表达数据

[0810] 将表达抗VEGF(阿柏西普)的AAV8(单顺反子)载体在9周大的C57BL/6JRj雄性小鼠(按以下分组)右眼视网膜下给药。使用谱域光学相干断层扫描(SD-OCT)来验证视网膜下给药成功。

[0811] 第一组:AAV8 RC298,剂量 5×10^7 vg/眼(n=9)。

[0812] 第二组:AAV8 RC298,剂量 2×10^8 vg/眼(n=10)。

[0813] 第三组:AAV8 RC298,剂量 5×10^8 vg/眼(n=10)。

[0814] 第四组:AAV8 RC298,剂量 2×10^9 vg/眼(n=10)。

[0815] 第五组:AAV8 RC298,剂量 5×10^9 vg/眼(n=10)。

[0816] 第六组:AAV8 RC298,剂量 1×10^{10} vg/眼(n=9)。

[0817] 每只动物的对侧眼作为未注射的对照。注射后五周,处死所有的动物。剖开注射和对侧未注射的双眼,将眼液收集在40 μ l的PBS(含蛋白酶抑制剂)中,装在螺旋盖的管子里,并快速冷冻,直到蛋白质分析。将后眼杯(posterior eyecup)放入含有50微升RNAlater溶液的新管中,用解剖剪刀进一步分解。然后将解剖好的眼杯在液氮中速冻30秒,并加入50 μ l含 β -巯基乙醇的RLT缓冲液,然后用均质器进一步均质2分钟。眼杯匀浆加入200 μ l含 β -巯基乙醇的RLT缓冲液,并通过反复吹打混合。所有眼杯匀浆在提取RNA前在-80 $^{\circ}$ C储存至少24小时。

[0818] RNA提取和定量RT-PCR

[0819] 按照制造商的说明书,使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)从大鼠后眼杯组织中分离RNA。冰冻的眼杯匀浆在冰上解冻,使用QIAshredder进行机械切碎。切碎后,向匀浆中加入70%的EtOH,然后将混合物转移到RNeasy柱中。离心该柱子,并用RW1缓冲液进行清洗。然后用DNase I处理柱膜,在室温下孵育15分钟,然后用RW1和RPE缓冲液进一步清洗。然后用无RNase的水洗脱RNA,最终体积为50 μ L。然后用NeoDot纳米光谱仪(Generon)测量每个样品的RNA浓度。

[0820] 使用SuperScript III逆转录酶试剂盒(Invitrogen)进行逆转录。对于小鼠样本,通过使用以下针对bGHpA序列的引物对转基因来源的mRNA进行定量:bGHpA FR 5' -CATCGCATTGTCTGAGTAGGT-3' 和bGHpA Rv 5' -AGCATGCCTGCTATTGTCTT-3'。所有的qRT-PCR都是使用CFX96 Touch Real-Time PCR检测系统(BioRad)和SYBR Green化学试剂进行。作为

标准,使用稀释到已知浓度的线性化转基因质粒。SYBR Green的应用如下:在95℃下初始变性3分钟,然后是95℃下10秒和56℃下30秒的40个循环。

[0821] 图12显示了第1至6组的阿柏西普mRNA表达。

[0822] 阿柏西普表达的定量

[0823] 按照制造商的说明书(ImmunoGuide),使用夹心式ELISA定量法测量眼液中未结合的阿柏西普。简而言之,将稀释的阿柏西普标准品和眼液样品在包被有重组人血管内皮生长因子-A(rhVEGF-A)的微滴定板中孵育。孵育后,洗净孔,加入辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗人IgG单克隆抗体,与孔表面被rhVEGF-A预先捕获的阿柏西普的Fc部分结合。孵育后,洗净孔,并通过加入发色剂底物检测结合的酶活性。显色与样品或标准品中阿柏西普的量成正比,用光度计在450纳米处测量光密度(OD620纳米的参考值是可选的)。

[0824] 图13显示了第1至6组的阿柏西普蛋白表达。

[0825] 双顺反子表达数据

[0826] 将共同表达抗VEGF(阿柏西普)和补体调节剂(hCFI或FHL-1)的双顺反子AAV载体在10周大的C57BL/6雄性小鼠的右眼(OD)中进行视网膜下注射给药。使用谱域光学相干断层扫描(SD-OCT)验证了成功的视网膜下给药。每只动物的对侧眼作为未注射的对照。四周后,小鼠被处死,并收集眼液和后眼杯。

[0827] 该研究由八个治疗组组成:

[0828] 第1组:AAV8-RC313, 5×10^7 vg/眼 (n=10只小鼠)。

[0829] 第2组:AAV8-RC313, 5×10^8 vg/眼 (n=10)。

[0830] 第3组:AAV8-RC289, 5×10^7 vg/眼 (n=10)。

[0831] 第4组:AAV8-RC289, 5×10^8 vg/眼 (n=10)。

[0832] 第5组:AAV8-RC304, 5×10^7 vg/眼 (n=9)。

[0833] 第6组:AAV8-RC304, 5×10^8 vg/眼 (n=10)。

[0834] 第7组:AAV8-RC312, 5×10^7 vg/眼 (n=9)。

[0835] 第8组:AAV8-RC312, 5×10^8 vg/眼 (n=10)。

[0836] RNA提取和定量RT-PCR

[0837] 将后眼杯放入含有50微升RNAlater溶液的新管中,用解剖剪刀进一步分解。然后将解剖好的眼杯在液氮中速冻30秒,并加入50uL含 β -巯基乙醇的RLT缓冲液,然后用均质器进一步均质2分钟。眼杯匀浆加入200uL含 β -巯基乙醇的RLT缓冲液,并通过反复吹打混合。所有眼杯匀浆在提取RNA前在-80℃储存至少24小时。

[0838] 按照制造商的说明书,使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)从大鼠后眼杯组织中分离RNA。冰冻的眼杯匀浆在冰上解冻,使用QIAshredder进行机械切碎。切碎后,向匀浆中加入70%的EtOH,然后将混合物转移到RNeasy柱中。离心该柱子,并用RW1缓冲液进行清洗。然后用DNaseI处理柱膜,在室温下孵育15分钟,然后用RW1和RPE缓冲液进一步清洗。然后用无RNase的水洗脱RNA,最终体积为50 μ L。然后用NeoDot纳米光谱仪(Generon)测量每个样品的RNA浓度。

[0839] 使用SuperScript III逆转录酶试剂盒(Invitrogen)进行逆转录。对于小鼠样本,通过使用以下针对bGHpA序列的引物对转基因来源的mRNA进行定量:bGHpAFR 5' - CATCGCATTGTCTGAGTAGGT - 3' 和bGHpARv 5' - AGCATGCCTGCTATTGTCTT - 3'。所有的qRT-PCR都

是使用CFX96 Touch Real-Time PCR检测系统(BioRad)和SYBR Green化学试剂进行。作为标准,使用稀释到已知浓度的线性化转基因质粒。SYBR Green的应用如下:在95°C下初始变性3分钟,然后是95°C下10秒和56°C下30秒的40个循环。

[0840] 图14显示了来自在双顺反子载体的阿柏西普mRNA的表达情况

[0841] 阿柏西普和补体表达的定量分析

[0842] 阿柏西普

[0843] 按照制造商的说明书(ImmunoGuide),使用夹心式ELISA定量法测量眼液中未结合的阿柏西普。简而言之,将稀释的阿柏西普标准品和眼液样品在包被有重组人血管内皮生长因子-A(rhVEGF-A)的微滴定板中孵育。孵育后,洗净孔,加入辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗人IgG单克隆抗体,与孔表面被rhVEGF-A预先捕获的阿柏西普的Fc部分结合。孵育后,洗净孔,并通过加入发色剂底物检测结合的酶活性。显色与样品或标准品中阿柏西普的量成正比,用光度计在450纳米处测量光密度(OD620纳米的参考值是可选的)。

[0844] CFI蛋白在眼液中的表达

[0845] 使用MSD的电化学发光检测技术对眼液中的人CFI进行了定量。在MSD Gold 96孔小斑点链霉菌素板上包被有生物素化的抗CFI抗体,在室温下摇动(850RPM)1小时。对CFI标准品(Complement Technology)和样品进行相应的稀释。用PBS-Tween 0.05%洗板,然后加入25uL标准品、对照品和样品。密封平板并在室温下摇动(850RPM)孵育1小时。然后如之前的方式洗板,在孔中加入25uL抗FI(抗FI,A231)检测抗体,并在室温下摇动(850RPM)孵育1小时。孵育后,如前所述洗板,向每个孔中加入150ul 2X Read Buffer T,然后在MSD读数器上读数。

[0846] FHL-1蛋白在眼液中的表达

[0847] 使用MSD的电化学发光检测技术对眼液中的人FHL-1进行了定量。在MSD Gold 96孔小斑点链霉菌素板上包被有生物素化的抗FHL-1抗体,在室温下摇动(850RPM)1小时。对FHL-1标准品和样品进行相应的稀释。用PBS-Tween 0.05%洗板,然后加入25uL标准品、对照品和样品。密封平板并在室温下摇动(850RPM)孵育1小时。然后如之前的方式洗板,在孔中加入25uL抗FH(抗FH,MA170057,Invitrogen)检测抗体,并在室温下摇动(850RPM)孵育1小时。孵育后,如前所述洗板,向每个孔中加入150ul 2X Read Buffer T,然后在MSD读数器上读数。

[0848] 图15显示了阿柏西普、CFI和FHL1蛋白在双顺反子载体上的表达。

[0849] 实施例7--在小鼠激光诱导的脉络膜新生血管模型中的体内疗效

[0850] 五组小鼠接受了单侧(右眼)的不同AAV载体的视网膜下注射。在AAV给药后立即使用谱域光学相干断层扫描(SD-OCT)确认视网膜下治疗成功。施用载体4周后,通过激光光凝诱导CNV。简而言之,麻醉后的动物接受一滴0.5%的托吡卡胺(Oftan Tropicamid,Santen Oy)散大瞳孔。在眼睛上滴一滴Viscotears(Dr.Gerhard Mann Chem.-Pharm.,Germany)并用盖玻片平展角膜。使用532纳米的二极管激光器(光斑大小:100微米;功率:130毫瓦;时间:120毫秒。Oculight TX.Iridex Corp.,USA)在单边的右眼视神经头周围进行三次激光损伤。通过使用SD-OCT和荧光素血管造影(FA)确认成功产生了CNV病变。在CNV诱导后,另一组小鼠立即接受玻璃体内注射阿柏西普。在激光治疗后的第4天和第7天,用SD-OCT和FA再次对小鼠进行成像,然后处死。

[0851] 激光照射的眼睛被去核和切开。准备脉络膜平片,用荧光素标记的Griffonia simplicifolia Lectin I(GSLI) isolectin B4(FL-1201,Vector Laboratories,USA)染色以评估新生血管。简而言之,用Tris-缓冲盐水(TBS)清洗平片,用10%普通山羊血清(NGS)和TBS pH 7.4中的0.5% Triton X-100(TBST)在室温下封闭1小时。用TBS清洗样品,并在+4°C下在稀释在0.1%TBST中的1%NGS中与荧光素标记的Isolectin GS-IB4(1:200,Vector Laboratories)孵育过夜。然后,用稀释在0.1%TBST中的1%NGS清洗样品3x 10分钟,用DAPI反染色,用Fluoroshield™安装介质(Sigma-Aldrich)安装在显微镜载玻片上。使用DMi8 THUNDER 3D显微镜(Leica Microsystems,德国)对脉络膜样本进行成像。使用图像处理软件FIJI对染色区域进行勾勒,并测量染色面积。(Schindelin等人,2012)。

[0852] 第一组:在第28天RC268,空,5E8,并且CNV诱导;

[0853] 第二组:在第28天RC289,5E7,并且CNV诱导;

[0854] 第三组:在第28天RC289,5E8,并且CNV诱导;

[0855] 第四组:在第28天RC304,5E7,并且CNV诱导;

[0856] 第五组:在第28天RC304,5E8,并且CNV诱导;

[0857] 第六组:在第0天阿柏西普(80μg/眼)处理,CNV诱导。

[0858] CNV渗漏面积和CNV病变大小的定量分析

[0859] 荧光素血管造影(FA):使用Heidelberg Spectralis HRA系统(Heidelberg Engineering,Germany)检查脉络膜水平的血管渗漏。简而言之,在麻醉小鼠的角膜上滴一滴0.5%的托吡卡胺(Oftan Tropicamid.Santen Oy),以散大瞳孔,并将小鼠放在小鼠支架上。使用红外反射照相机在视网膜水平对准视神经头后,皮下注射施用2.5%的荧光素钠(Sigma-Aldrich,芬兰)溶液(30μl/10g)。在荧光素给药后的5分钟内,每隔60秒从视网膜和脉络膜焦点水平拍摄连续的荧光图像(灵敏度:45;ART平均值:5帧)。

[0860] 谱域光学相干断层扫描(SD-OCT)。在CNV诱导之前和之后,以及CNV诱导之后的第4天和第7天,进行SD-OCT来验证视网膜下的给药情况。在FA成像之后,立即使用SD-OCT系统Envisu R2200(Bioptigen Inc./Leica Microsystems,USA)对小鼠进行检查。扫描区域覆盖以视神经为中心的1.4x 1.4mm²的视网膜。每次扫描包含100个B扫描,每个扫描包含1000个A扫描。

[0861] 通过FA眼底成像和随后的AI图像分析评估CNV渗漏面积。FA扫描通过一个专有的算法进行分析,该算法采用了为语义分割设计的卷积神经网络(CNN)和传统的计算机视觉算法的组合。该神经网络被训练为使用转移学习方法识别和量化CNV病变。该模型的结果由一名对治疗盲的科学家进行审查并在必要时进行调整。

[0862] 根据FA扫描和SD-OCT扫描的结果,对激光照射的区域进行定性分级为渗漏或无渗漏。

[0863] 数据分析

[0864] 定量数据被绘制成图表,分析并以平均值±标准差(SD)表示。统计分析使用GraphPad Prism软件(v8.0.1GraphPad Software,USA)进行。在P<0.05的水平上,差异被认为具有统计学意义。

[0865] 结果显示在图16中。

[0866] 上述说明书中提到的所有出版物通过参考并入本文。在不偏离本发明的范围和精

神的情况下,本发明所公开的药剂、组合物、用途和方法的各种修改和变化对技术人员来说是显而易见的。尽管本发明已经结合具体的优选实施方案进行了公开,但应当理解,所要求的本发明不应当被不适当地限制在这些具体的实施方案中。事实上,对所公开的实施方案的模式进行的各种修改,对技术人员来说是显而易见的,其目的是在以下权利要求的范围内。

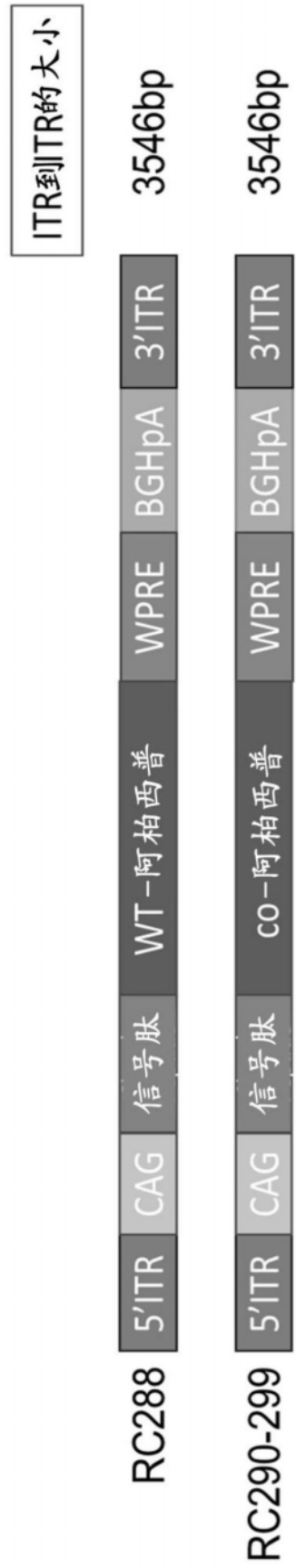


图1

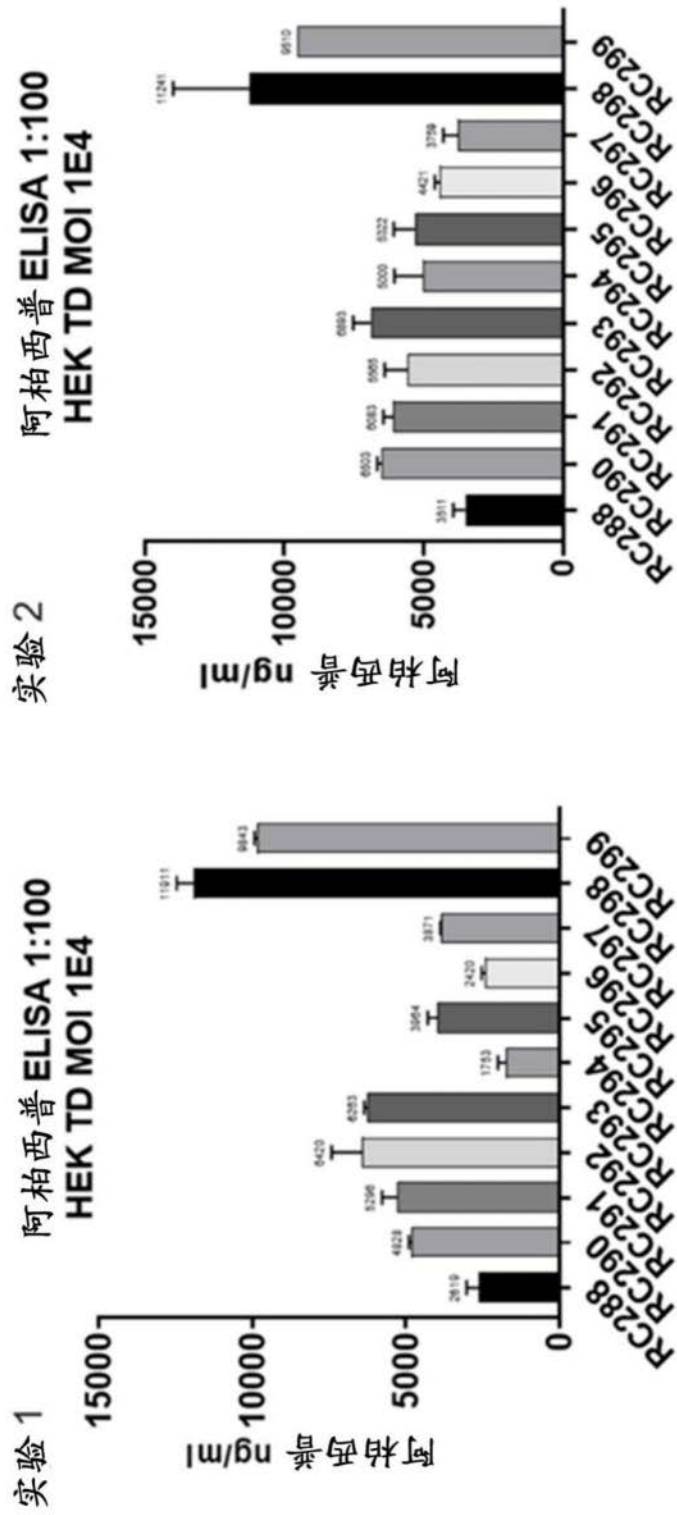


图2

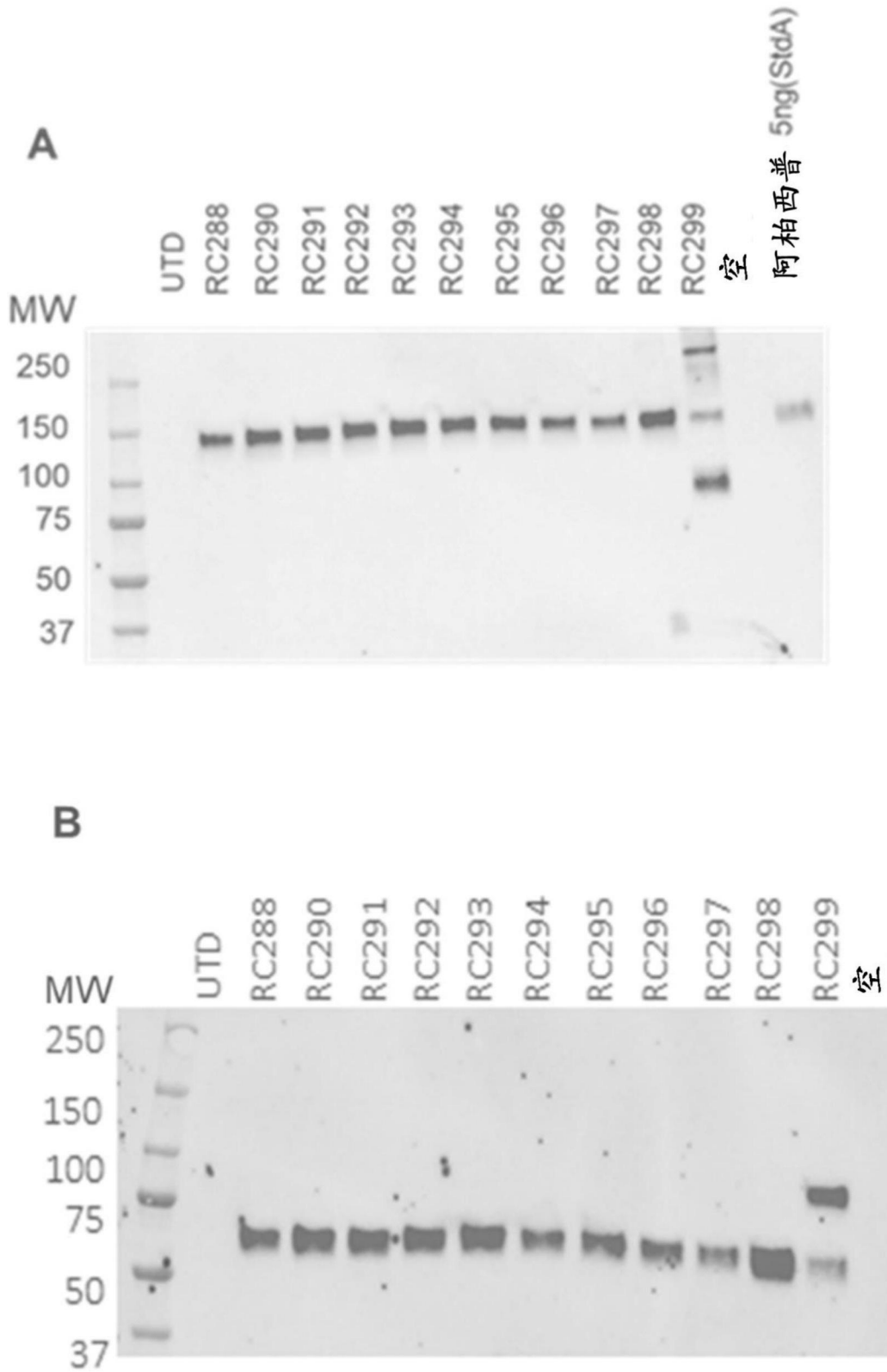


图3

相比于RC288 (野生型) 的
相对量倍数变化

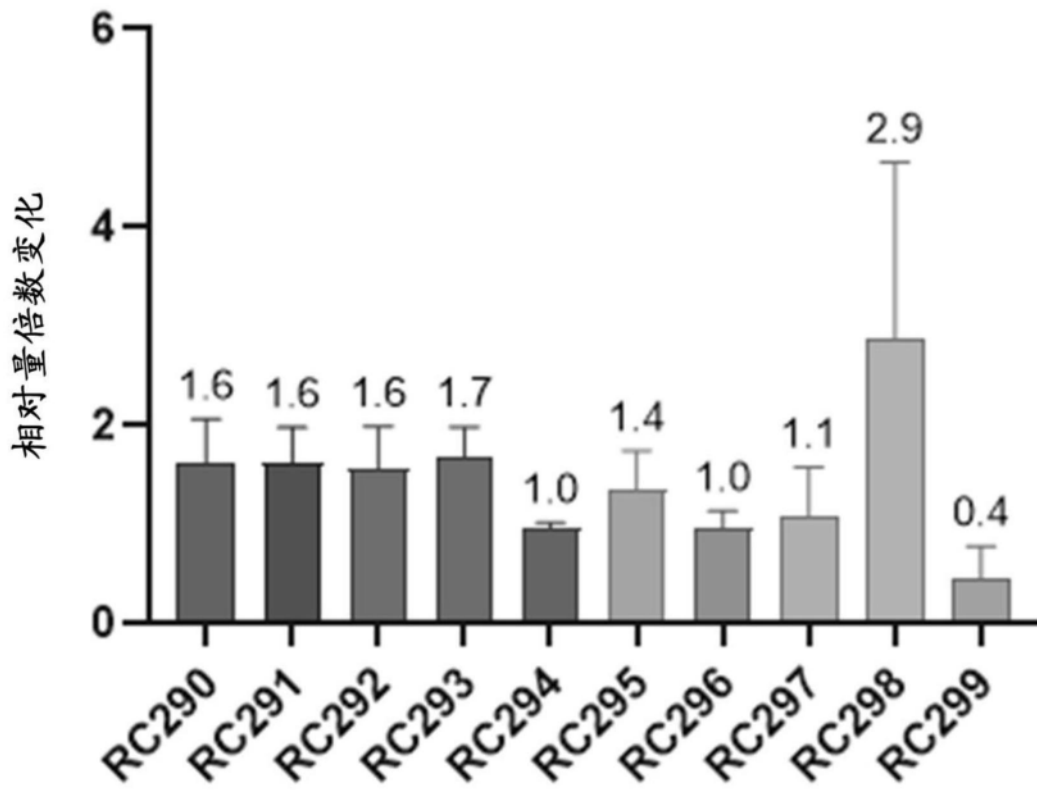


图3续

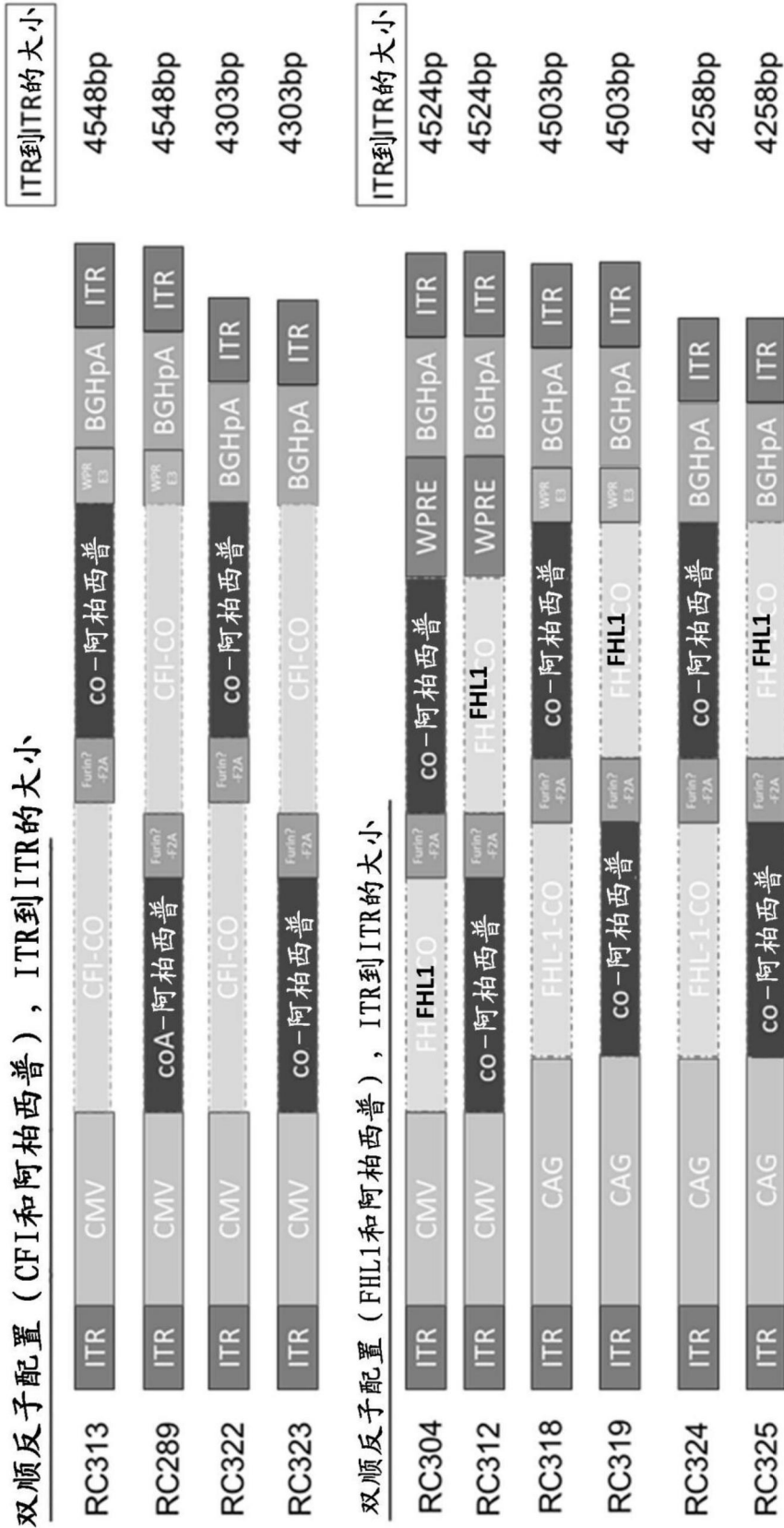


图4

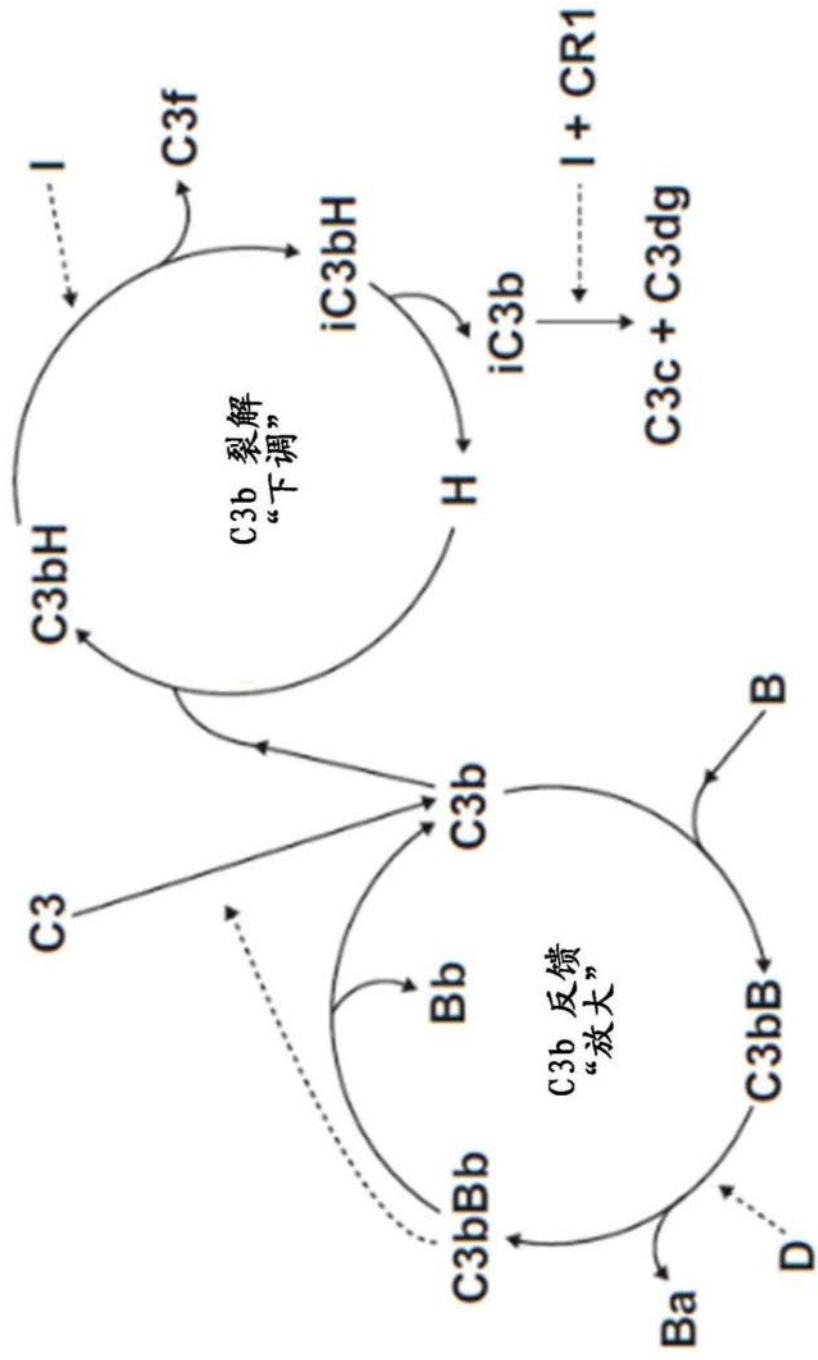


图5

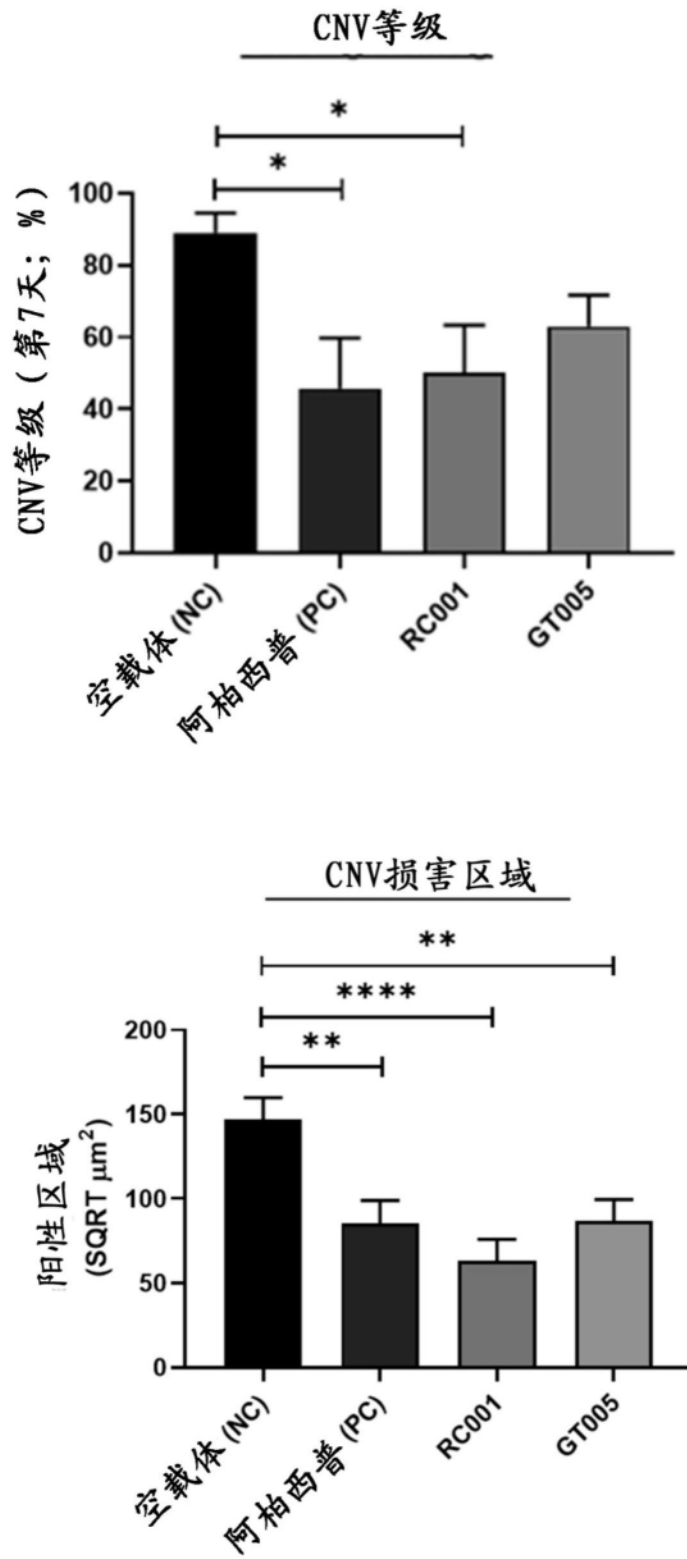


图6

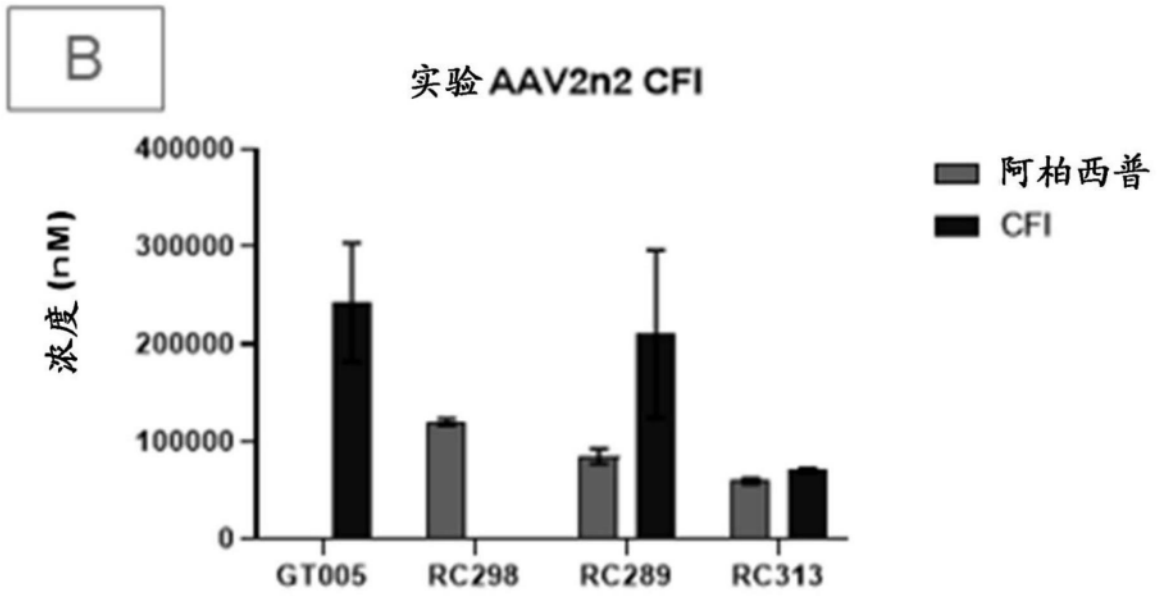
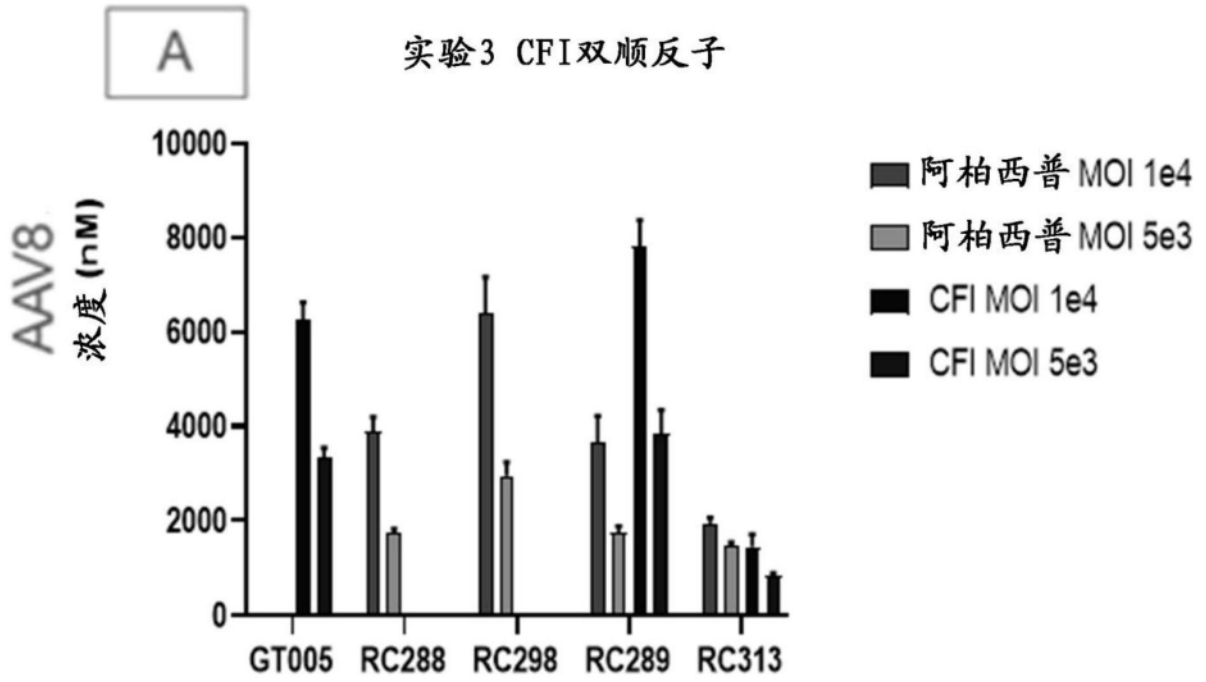


图7

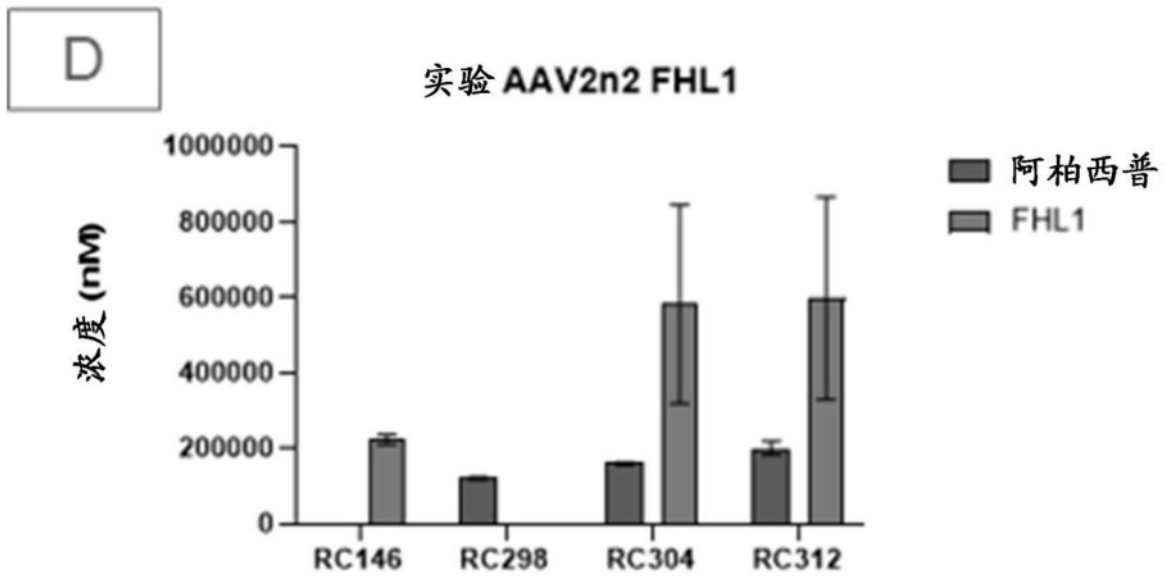
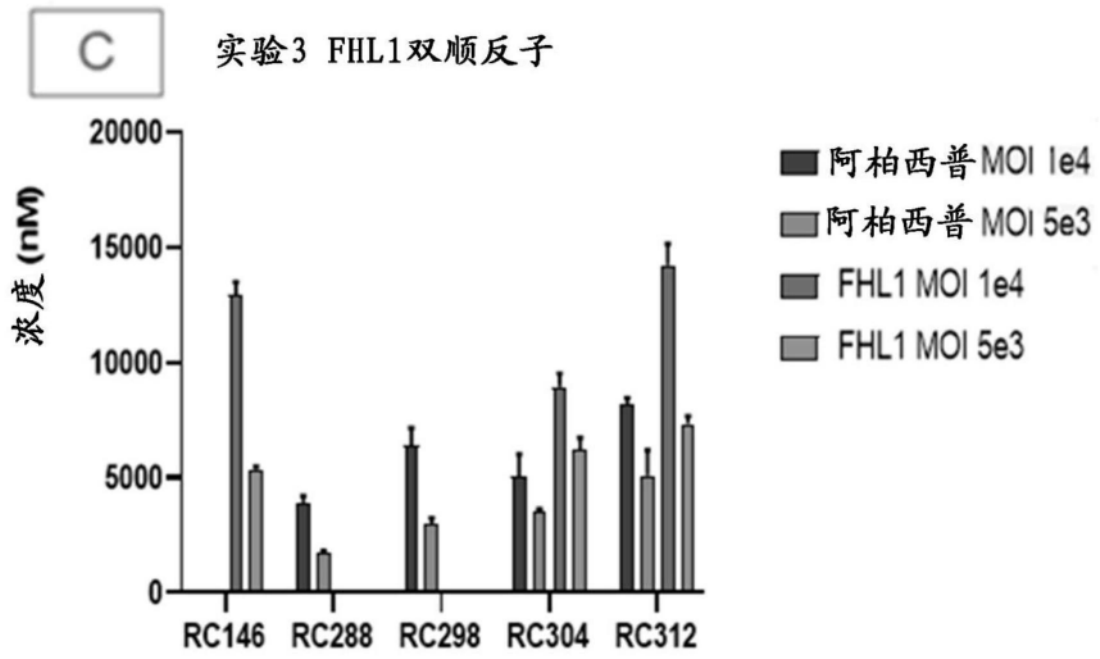
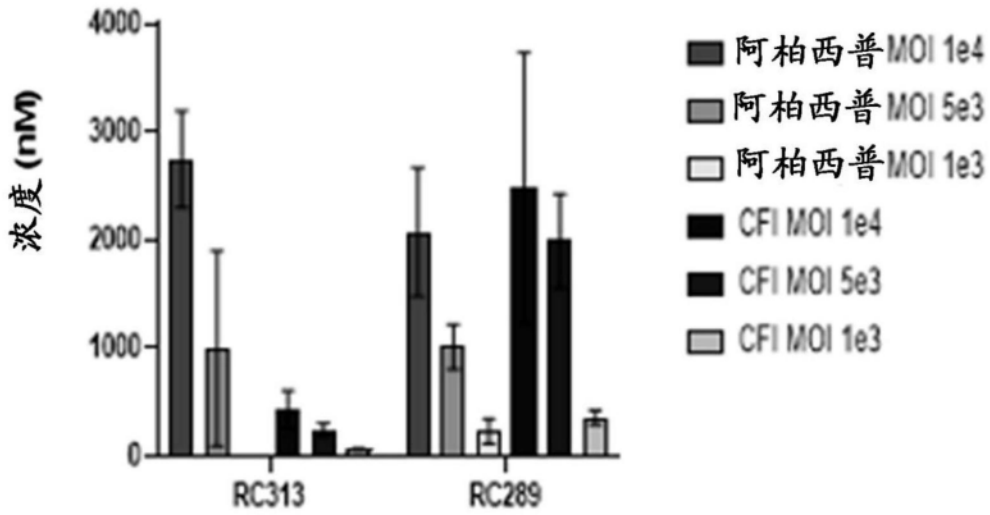


图7续

E

阿柏西普-CFI 载体



F

阿柏西普-FHL1 载体

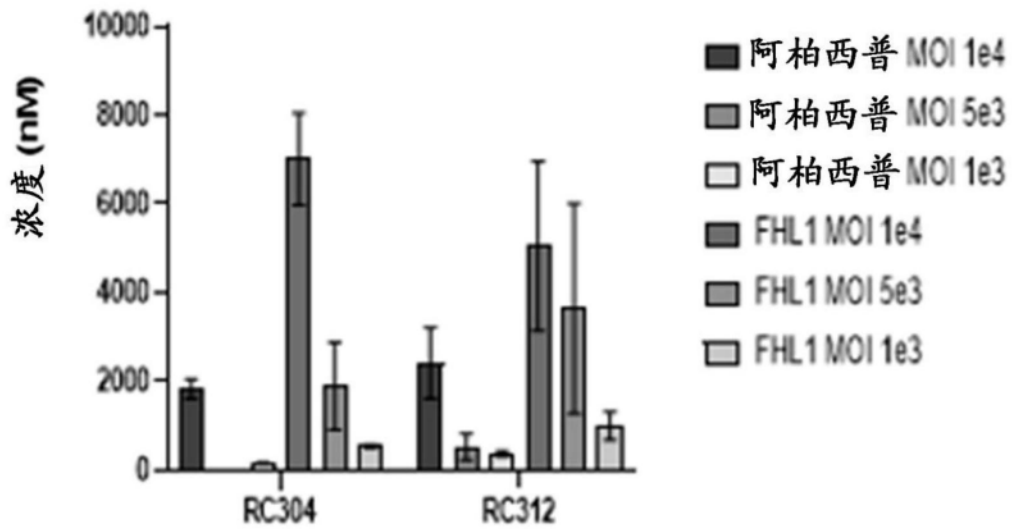


图7续

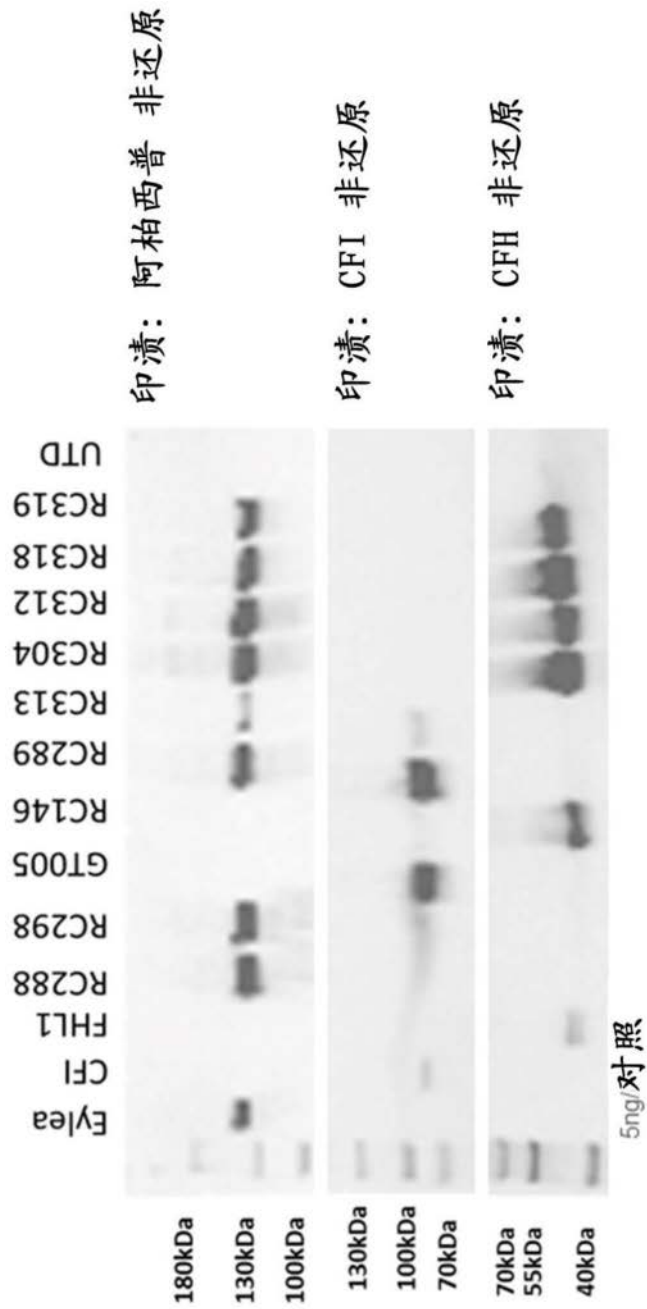


图8

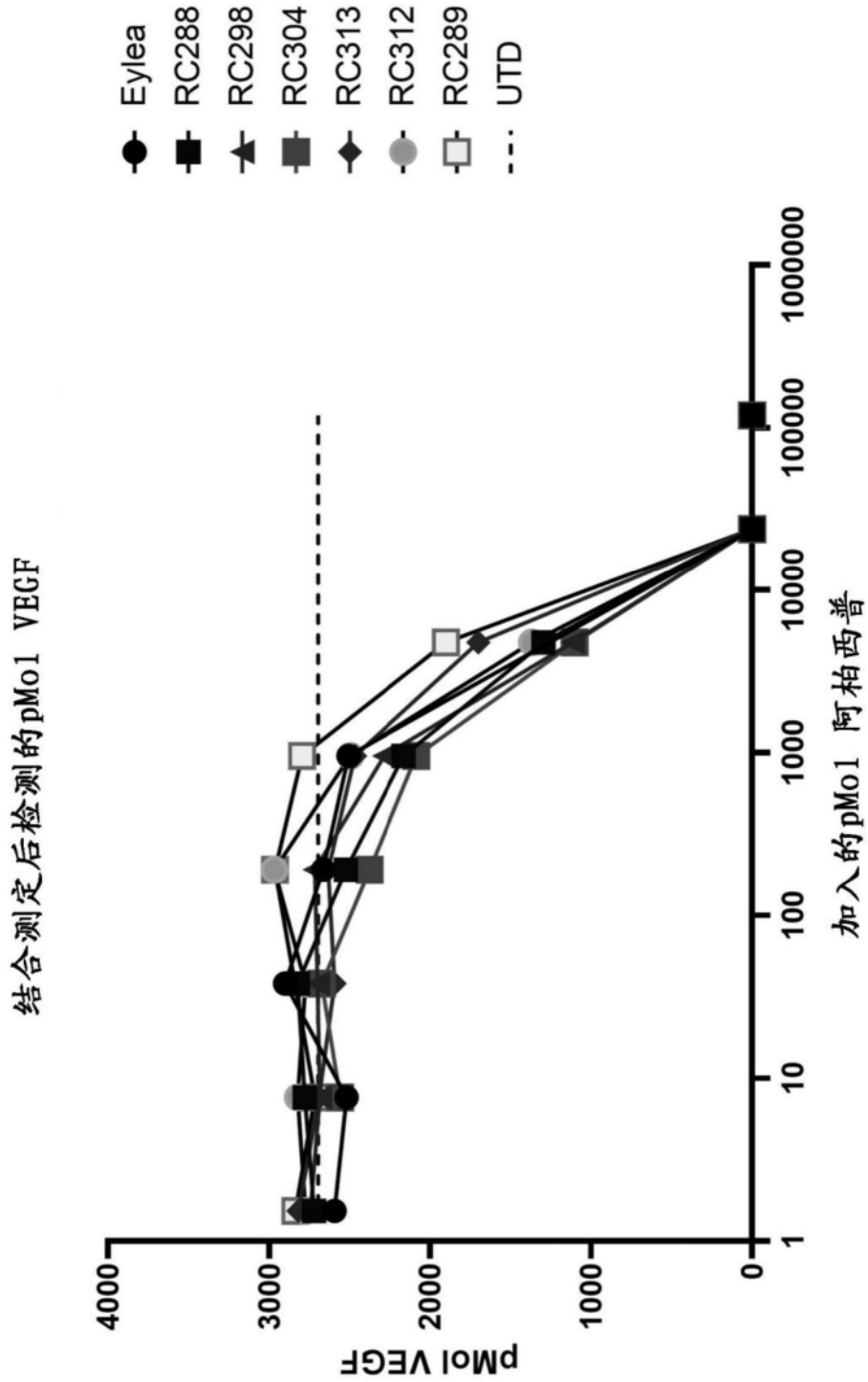


图9

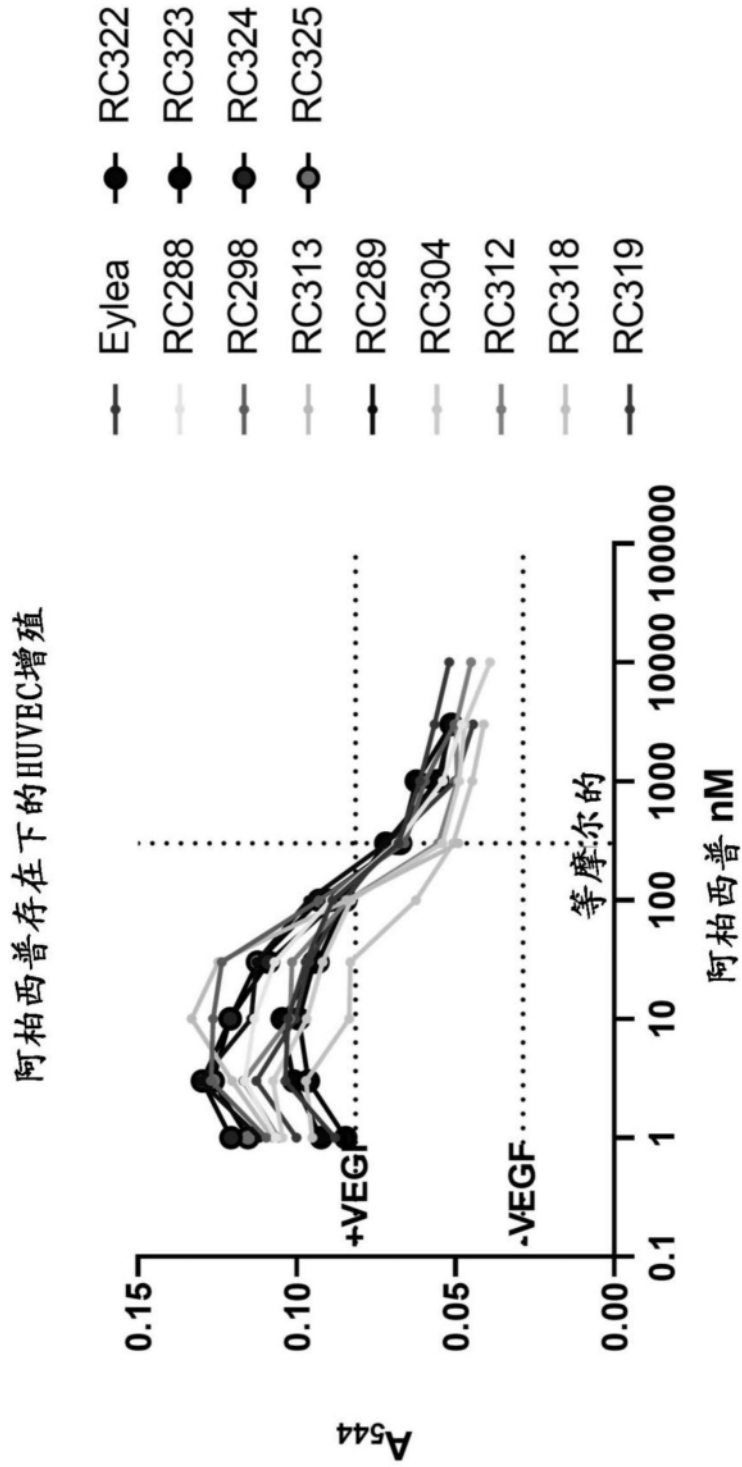
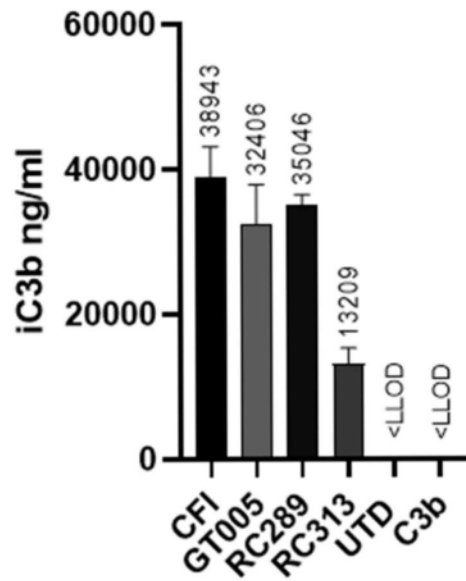


图10

C3b裂解测定之后的iC3b水平
CFI载体



C3b裂解测定之后的iC3b水平
FHL1载体

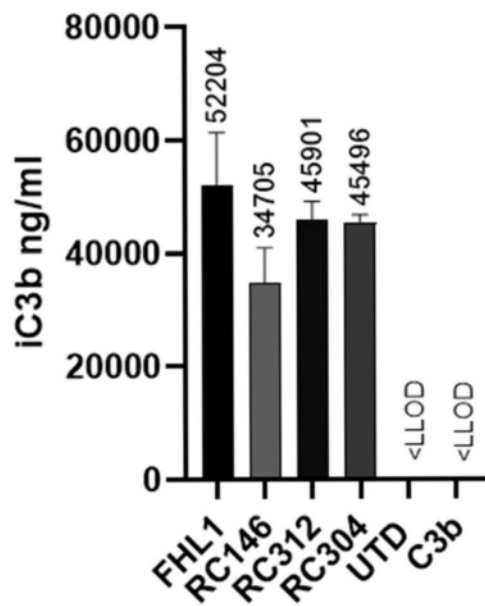


图11

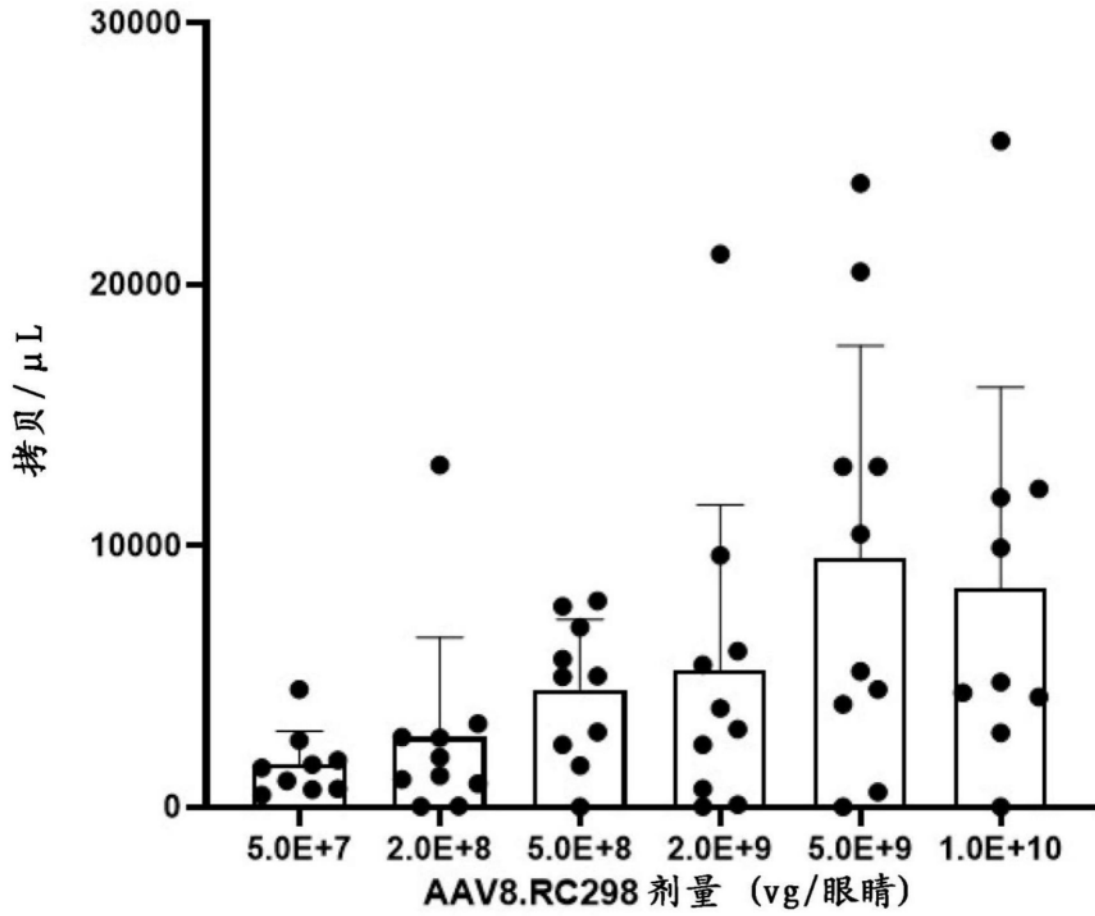
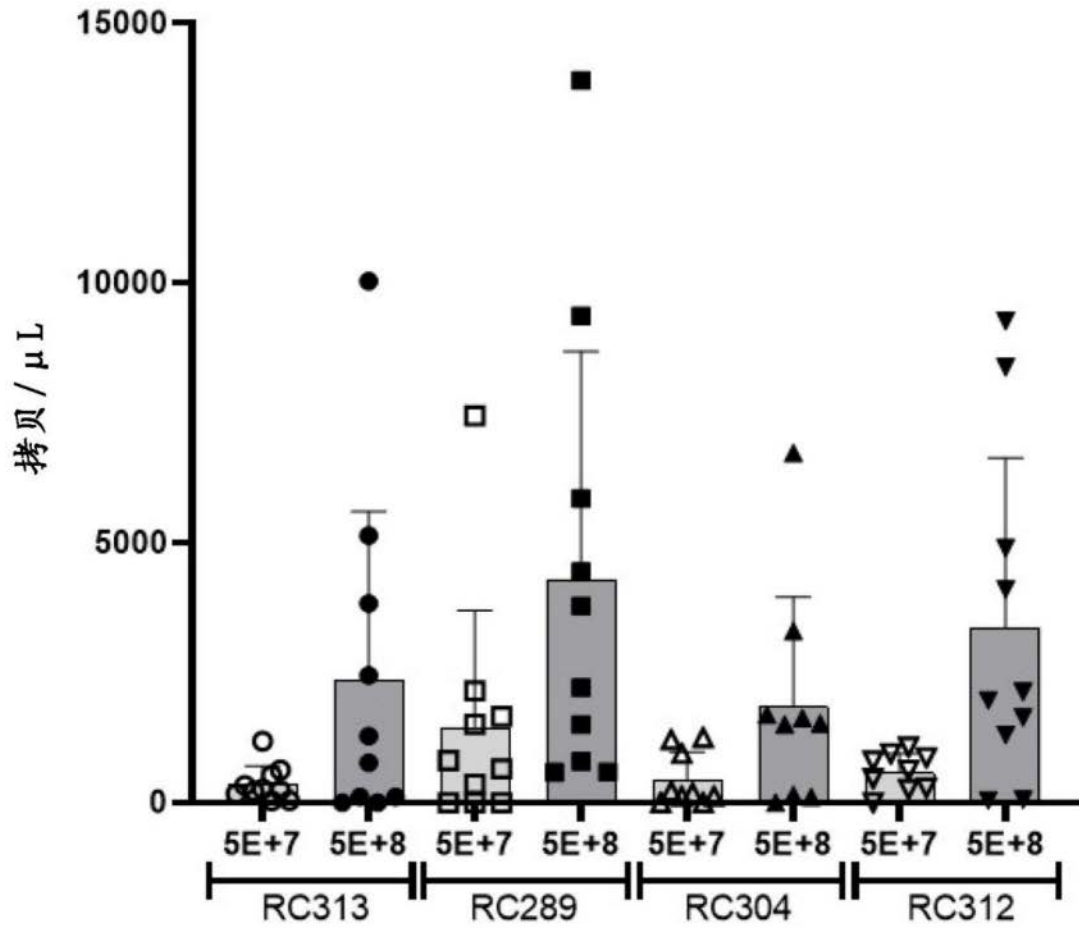


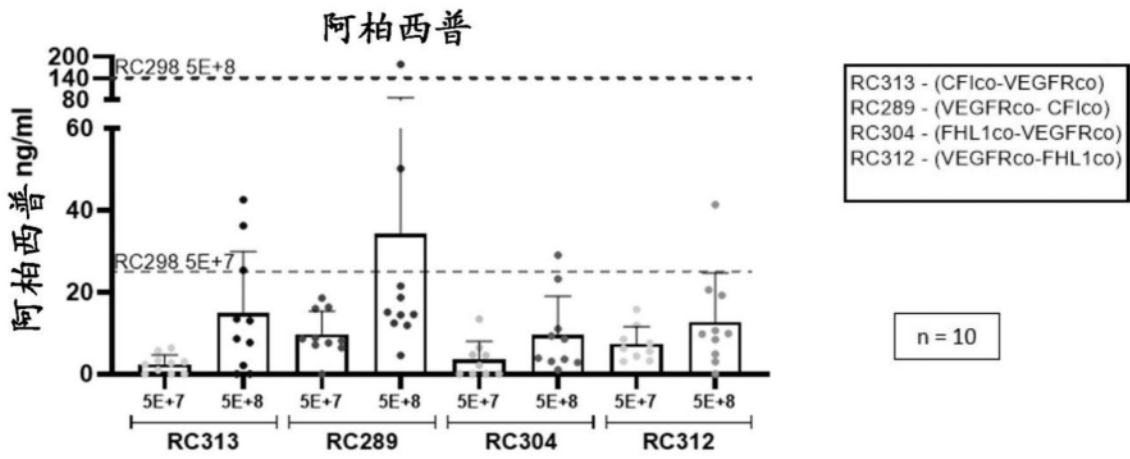
图12



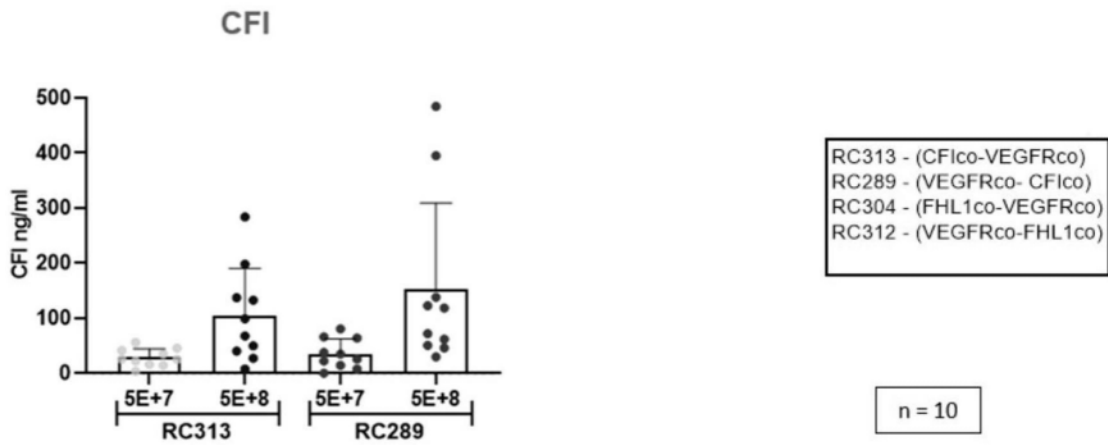
RC313 - (CFIco-VEGFRco)
RC289 - (VEGFRco- CFIco)
RC304 - (FHL1co-VEGFRco)
RC312 - (VEGFRco-FHL1co)

图14

A



B



C

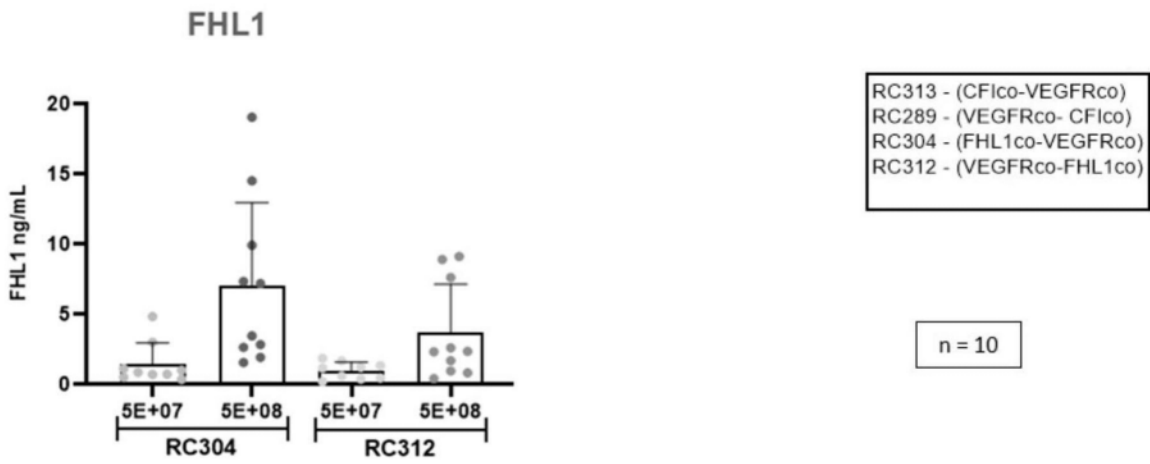
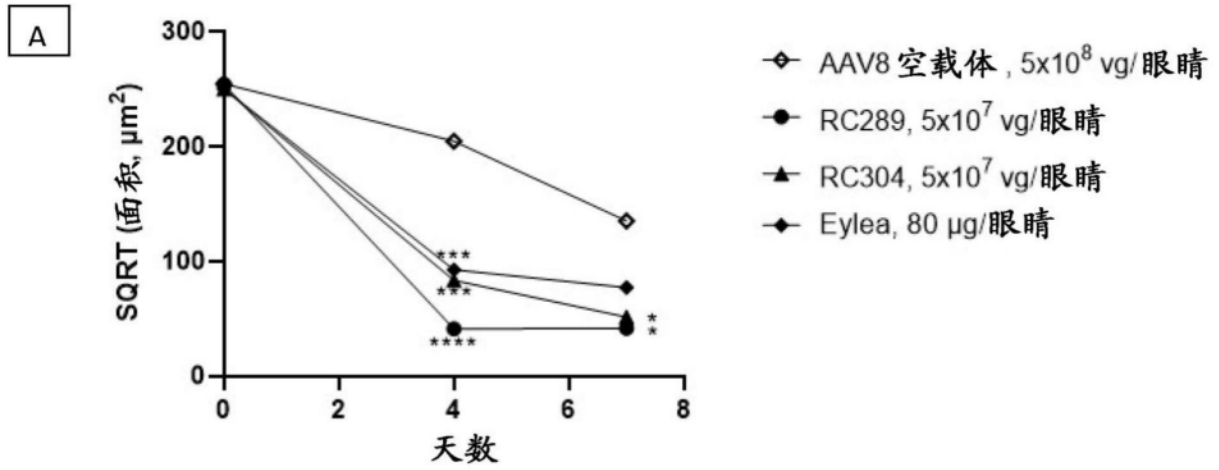


图15



使用Dunnett's 多重比较检验的混合效应分析

第4天	概要	P值
AAV8 空白 vs. RC289	****	<0.0001
AAV8 空白 vs. RC304	***	0.0003
AAV8 空白 vs. Eylea	***	0.0008
第7天		
AAV8 空白 vs. RC289	*	0.0106
AAV8 空白 vs. RC304	*	0.0273
AAV8 空白 vs. Eylea	ns	0.2291

图16

FIGURE 16 – CONTD.

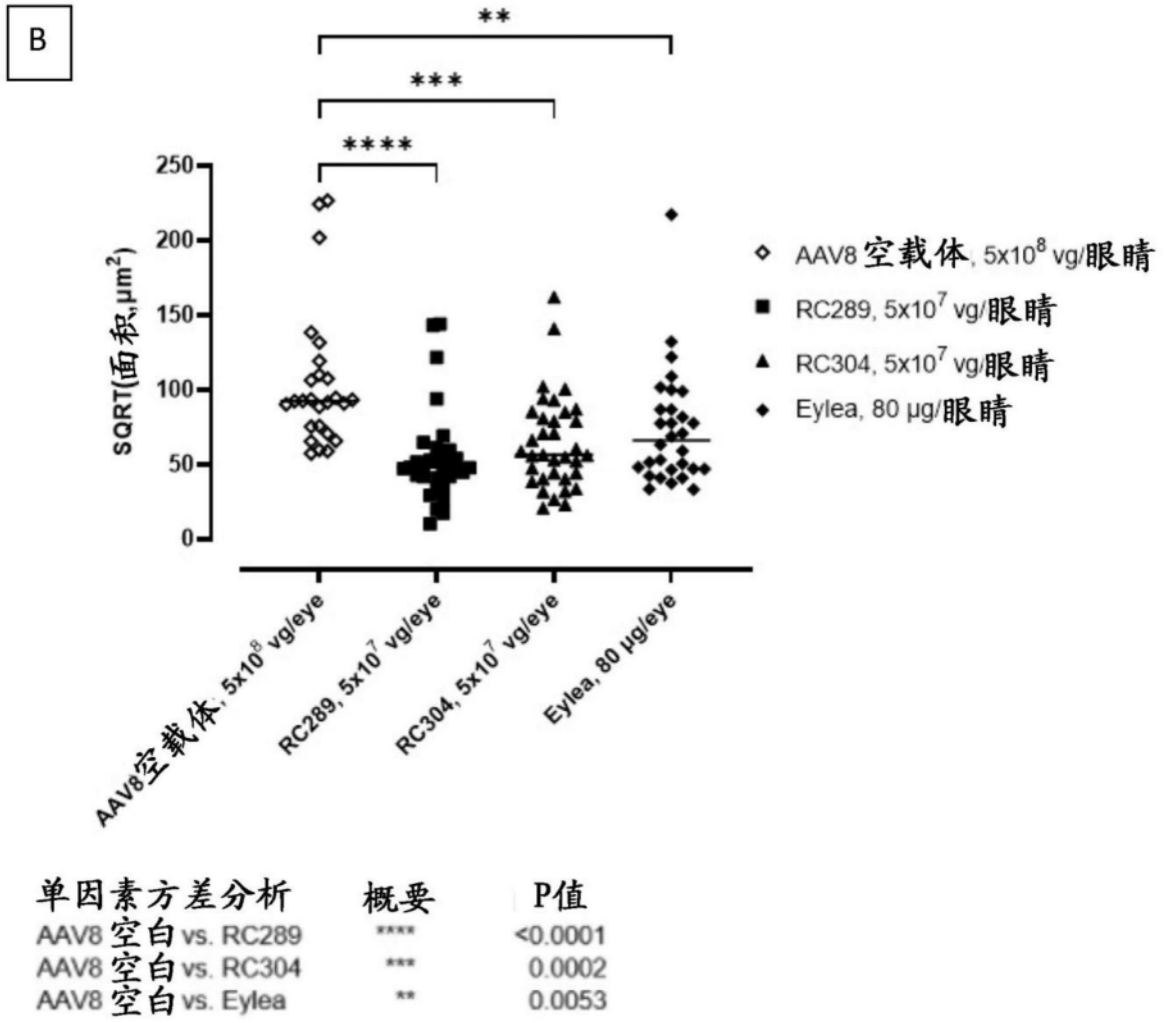


图16续