

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113952472 A

(43) 申请公布日 2022.01.21

(21) 申请号 202010705069.X

C12N 15/864 (2006.01)

(22) 申请日 2020.07.21

(71) 申请人 英斯培瑞有限公司

地址 中国香港金钟

(72) 发明人 赵巍 施中东

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 武晶晶

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

C12N 15/35 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

权利要求书2页 说明书26页

(54) 发明名称

用于治疗眼部疾病的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于治疗X连锁性视网膜色素变性的系统，以及使用所述系统治疗X连锁性视网膜色素变性的方法。

1. 一种组合物，其包含：

(i) 第一多核苷酸，其中所述第一核苷酸包含与第一启动子可操作连接的第一序列和与第二启动子可操作连接的第二序列，所述第一序列编码腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白，所述第二序列编码AAV rep蛋白，所述第一启动子和所述第二启动子适于在昆虫细胞中表达，以及

(ii) 第二多核苷酸，其中所述第二多核苷酸包含与CMV、CAG、MNDU3、PGK、EF1a启动子或眼部特异性启动子可操作连接的第三序列，所述第三序列编码视网膜色素变性GTP酶调节剂 (Retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR) 多肽。

2. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第三序列编码RPGR ORF15多肽。

3. 如权利要求1或2所述的组合物，其中所述第三序列是密码子优化的。

4. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第三序列包含与SEQ ID NO.2具有至少90%的同一性的序列。

5. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第三序列包含与SEQ ID NO.3具有至少90%的同一性的序列。

6. 如权利要求1所述的组合物，其中所述昆虫细胞是Sf9细胞。

7. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第一启动子或第二启动子是p10启动子。

8. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第一启动子或第二启动子是Po1H启动子。

9. 如权利要求1所述的组合物，其中所述眼部特异性启动子选自RPE 65基因启动子、人类视黄醛结合蛋白 (CRALBP) 基因启动子、鼠类11-顺式视黄醇脱氢酶 (RDH) 基因启动子、视紫红质启动子，视紫红质激酶启动子 (Rhodopsin kinase promoter)、金属蛋白酶3的组织抑制剂 (Timp3) 启动子、感光素类视黄醇结合蛋白启动子和玻璃体黄斑营养不良 2 (vitelliform macular dystrophy 2) 启动子、光受体间类视色素结合蛋白 (Interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP) 启动子。

10. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第一序列在3'末端进一步包含多聚A序列。

11. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第二序列在3'末端进一步包含多聚A序列。

12. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第一序列和所述第二序列由编码接头的序列连接。

13. 如权利要求12所述的组合物，其中所述接头是可裂解接头。

14. 如权利要求12所述的组合物，其中所述接头包含2A肽的序列。

15. 如权利要求12所述的组合物，其中所述编码接头的序列进一步包含启动子。

16. 如权利要求15所述的组合物，其中所述启动子为FMDV启动子。

17. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第三序列在3'末端进一步包含多聚A序列。

18. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第二多核苷酸进一步包含填充序列。

19. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第二多核苷酸进一步包含反向末端重复 (ITR) 序列。

20. 如权利要求1所述的组合物，其中所述第二多核苷酸进一步包含编码其他治疗性蛋白的第四序列。

21. 如权利要求20所述的组合物，其中所述其他治疗性蛋白选自下组：RPGRIP1、RPGRIP1L、SMC1、SMC3、Whirlin、PDE δ 和RAB8。

22. 如权利要求20所述的组合物,其中所述第三序列和所述第四序列由编码接头的序列连接。
23. 如权利要求22所述的组合物,其中所述接头是可裂解接头。
24. 如权利要求22所述的组合物,其中所述接头包含2A肽的序列。
25. 一种重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,其通过将权利要求1-24任一项的组合物转染至昆虫细胞制备。
26. 如权利要求25所述的rAAV颗粒,其中所述昆虫细胞为Sf9细胞。
27. 一种在有需要的受试者中治疗X连锁性视网膜色素变性的系统,其包括将权利要求25-26任一项的rAAV颗粒和药学上可接受的载体。
28. 一种在有需要的受试者中用于治疗X连锁性视网膜色素变性的方法,其包括将治疗上有效量的权利要求27的系统施用至所述受试者。
29. 一种试剂盒,其包含权利要求27的系统和说明书。

用于治疗眼部疾病的组合物和方法

背景技术

[0001] 色素性视网膜病变 (Retinitis pigmentosa, RP) 是一种可导致视力丧失的遗传性眼病, 其症状包括夜视困难和周围视力下降(侧视)。其通常出现在儿童时期, 且症状逐渐恶化。

[0002] X染色体连锁视网膜色素变性(X-linked retinitis pigmentosa, XLRP) 是一种由位于X染色体上的视网膜色素变性GTP酶调节剂 (Retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR) 基因突变引起的遗传性色素性视网膜病变, 其始于夜盲症, 且随后患者视野逐渐缩小, 并最终导致失明。

发明内容

[0003] 目前, 本领域对开发能够有效治疗XLRP的药物和方法存在需求。本发明所提供的组合物、系统和方法解决了上述需求。

[0004] 一方面, 本发明提供一种组合物, 其包含: (i) 第一多核苷酸, 其中所述第一核苷酸包含与第一启动子可操作连接的第一序列和与第二启动子可操作连接的第二序列, 所述第一序列编码腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白, 所述第二序列编码AAV rep蛋白, 所述第一启动子 和所述第二启动子适于在昆虫细胞中表达, 以及(ii) 第二多核苷酸, 其中所述第二多核苷酸包含与CMV、CAG、MNDU3、PGK、EF1a启动子或眼部特异性启动子可操作连接的第三序列, 所述第三序列编码 视网膜色素变性GTP酶调节剂 (Retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR) 多肽。

[0005] 在一些实施方案中, 所述第三序列编码RPGR ORF15多肽。在一些实施方案中, 所述第三序列是密码子优化的。在一些实施方案中, 所述第三序列包含与SEQ ID NO.2具有至少90%的同一性的序列。在一些实施方案中, 所述第三序列包含与SEQ ID NO.3具有至少90%的同一性的序列。

[0006] 在一些实施方案中, 所述昆虫细胞是Sf9细胞。在一些实施方案中, 所述第一启动子或第二启动子是p10启动子。在一些实施方案中, 所述第一启动子或第二启动子是PolH启动子。在一些实施方案中, 所述眼部特异性启动子选自RPE 65基因启动子、人类视黄醛结合蛋白(CRALBP)基因启动子、鼠类11-顺式视黄醇脱氢酶(RDH)基因启动子、视紫红质启动子、视紫红质激酶启动子(Rhodopsin kinase promoter)、金属蛋白酶3的组织抑制剂(Timp3)启动子、感光素类视黄醇结合蛋白启动子和玻璃体黄斑营养不良2(vitelliform macular dystrophy 2)启动子、光受体间类视色素结合蛋白(Interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP)启动子。

[0007] 在一些实施方案中, 所述第一序列在3'末端进一步包含多聚A 序列。在一些实施方案中, 所述第二序列在3'末端进一步包含多聚A 序列。

[0008] 在一些实施方案中, 所述第一序列和所述第二序列由编码接头 的序列连接。在一些实施方案中, 所述接头是可裂解接头。在一些实施方案中, 所述接头包含2A肽的序列。在一些实施方案中, 所述编码接头的序列进一步包含启动子。在一些实施方案中, 所述启动

子为 FMDV启动子。

[0009] 在一些实施方案中,所述第三序列在3'末端进一步包含多聚A 序列。在一些实施方案中,所述第二多核苷酸进一步包含填充序列在 一些实施方案中,所述第二多核苷酸进一步包含反向末端重复 (ITR) 序列。

[0010] 在一些实施方案中,所述第二多核苷酸进一步包含编码其他治疗性蛋白的第四序列。在一些实施方案中,所述其他治疗性蛋白选自 下组:RPGRIP1、RPGRIP1L、SMC1、SMC3、Whirlin、PDE8和RAB8。

[0011] 在一些实施方案中,所述第三序列和所述第四序列由编码接头 的序列连接。在一些实施方案中,所述接头是可裂解接头。在一些实 施方案中,所述接头包含2A肽的序列。

[0012] 另一方面,本发明提供一种重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,其通 过将本文所述的组合物转染至昆虫细胞制备。在一些实施方案中,所 述昆虫细胞为Sf9细胞。

[0013] 另一方面,本发明提供一种在有需要的受试者中治疗X连锁性 视网膜色素变性的系统,其包括本文所述的rAAV颗粒和药学上可接 受的载体。

[0014] 另一方面,本发明提供一种在有需要的受试者中用于治疗X连 锁性视网膜色素变性的方法,其包括将治疗上有效量的本发明的系统 施用至所述受试者。

发明详述

[0015] 虽然本文已经显示和描述了本发明的各种实施方案,但是对于 本领域技术人员显而易见的是,这些实施方案仅以示例性的方式提 供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员可以想到许多变化、改变和替换。应该理解,可以采用本文所述的本发明实施方案的各种 替代方案。

[0016] 除非另有说明,本文公开的一些实施方案的实践采用免疫学、生物化学、化学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、基因组学和 重组DNA的常规技术。参见例如Sambrook and Green, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 4th Edition (2012); the series Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel, et al.ed.s.); the series Methods In Enzymology (Academic Press, Inc.), PC 2:A Practical Approach (M.J.MacPherson, B.D.Hames and G.R.Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies,A Laboratory Manual, and Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6th Edition (R.I.Freshney, ed. (2010))。

定义

[0017] 如说明书和权利要求书中所用,单数形式“一”,“一个”和 “所述”包括复数指代,除非上下文另有明确说明。例如,术语“rAAV 颗粒”包括一个或多个rAAV颗粒。

[0018] 术语“约”或“近似”指在本领域普通技术人员确定的特定值 的可接受误差范围内,这将部分取决于如何测量或确定该值,即,测 量系统的局限性。例如,根据本领域的实践,“约”可以表示在1或 大于1的标准偏差内。或者,“约”可表示给定值的最多20%,最多 10%,最多5%或最多1%的范围。或者,特别是对于生物系统或过 程,该术语可以表示数值的一个数量级,优选地在5倍内,更优选地 在2倍内。在申请和权利要求中描述了特定值的情况下,除非另有说 明,否则应当假定术语“约”意味着在特定值的可接受误差范围内。

[0019] 如本文中所使用的,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本 文中可互换使用,以指任

何长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是直链、环状或支链的，它可以包含修饰的氨基酸，并且可以被非氨基酸中断。该术语还包括已经被修饰的氨基酸聚合物，该修饰例如是通过硫酸化、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化、碘化、甲基化、氧化、蛋白水解处理、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、转移RNA介导的氨基酸向蛋白质的添加(如精氨酸化)、遍在蛋白化，或其它任何操作，如与标记组分的缀合。如本文所用的，术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸，包括甘氨酸和D或L光学异构体，以及氨基酸类似物和拟肽。由指定蛋白质“衍生”的多肽或氨基酸序列是指多肽的起源。优选地，多肽具有与序列中编码的多肽的氨基酸序列基本相同的氨基酸序列，或其部分，其中该部分由至少10-20个氨基酸或至少20-30氨基酸或至少30-50个氨基酸组成，或者其可用序列中编码的多肽免疫学地标识。该术语还包括从指定核酸序列表达的多肽。如本文中所使用的，术语“结构域”是指蛋白质的一部分，它在物理上或功能上与该蛋白质或肽的其它部分区分开。物理上定义的结构域包括极具疏水性或亲水性的氨基酸序列，如那些膜结合的或细胞质结合的序列。结构域还可以通过例如由基因复制引起的内部同源性来定义。功能上定义的结构域具有不同的生物学功能。例如，抗原结合域是指抗原结合单元或抗体中与抗原结合的部分。功能上定义的结构域不需要由连续的氨基酸序列编码，且功能上定义的结构域可以含有一个或多个物理上定义的结构域。

[0020] 如本文中所使用的，术语“氨基酸”是指天然的和/或非天然的或合成的氨基酸，包括但不限于D或L旋光异构体，以及氨基酸类似物和拟肽。标准的单字母或三字母代码用来指称氨基酸。在本文中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用A或Ala表示。

[0021] 如本文中所使用的，在多肽的情况下，“序列”是多肽中的氨基酸在从氨基末端到羧基末端方向上的顺序，其中该序列中彼此相邻的残基在该多肽的一级结构中是连续的。序列也可以是已知在一个或两个方向上包含额外残基的多肽的一部分的线性序列。

[0022] 如本文中所使用的，“同一性”、“同源性”或“序列同一性”是指在两个或更多个多核苷酸序列之间或在两个或更多个多肽序列之间的序列相似性或可互换性。当使用诸如Emboss Needle或BestFit等程序确定两个不同氨基酸序列之间的序列同一性、相似性或同源性时，可以使用默认设置，或者可以选择适当的打分矩阵，例如blosum45或blosum80，来优化同一性、相似性或同源性得分。优选地，同源的多核苷酸是那些在如本文所定义的严格条件下杂交并且与这些序列相比具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、更优选95%、更优选97%、更优选98%并且甚至更优选99%的序列同一性的多核苷酸。当对可比长度的序列进行最佳比对时，同源的多肽优选具有至少80%，或至少90%，或至少95%，或至少97%，或至少98%的序列同一性，或具有至少99%的序列同一性。

[0023] 就本文所确定的抗原结合单元而言，“序列同一性百分比(%)”被定义为在比对序列并在必要情况下引入缺口以获得最大序列同一性百分比后，并且不把任何保守置换视为序列同一性的一部分，查询序列中与第二、参考多肽序列或其部分的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可以以本领域技术内的各种方式，例如使用可公开获得的计算机软件，如BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE或Megaalign(DNASTAR)软件，来实现旨在确定氨基酸序列同一性百分比的比对。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适的参数，包括在所比较的序列的全长上获得最大比对所需的任何算法。同一性百分比可以在整个定

义的多肽序列的长度上进行测量,或者可以在较短的 长度上,例如,在从较大的、定义的多肽序列取得的片段的长度上进 行测量,该片段例如是至少5、至少10、至少15、至少20、至少50、至少100或至少200个连续残基的片段。这些长度只是示例性的,并 且应该理解,由本文的表格或序列表中所示的序列支持的任何片段长 度可以用来描述在其上可以测量同一性百分比的长度。

[0024] 本文所述的蛋白可具有相对于参考序列的一个或多个修饰。所 述修饰可以是缺失、插入或添加,或氨基酸残基的取代或置换。“缺 失”是指由于缺少一个或多个氨基酸残基而导致的氨基酸序列变化。“插入”或“添加”是指导致与参考序列相比添加一个或多个氨基酸 残基的氨基酸序列变化。“取代”或“置换”是指一个或多个氨基酸 被不同的氨基酸所取代。在本文中,可以通过将抗原结合单元与参考 序列进行比较来确定抗原结合单元相对于参考序列的突变。用于比较 的序列的最佳比对可以根据本领域的任何已知方法进行。

[0025] 如本文中所使用的,术语“分离的”是指与细胞的和其它方面 的成分分离的,其中在自然界中,多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗 体或其片段在正常情况下与之相关联。本领域技术人员知晓,非天然 存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离” 来与其天然存在的对应物区分开来。另外,“浓缩的”、“分离的” 或“稀释的”多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段与其天然 存在的对应物是可区分的,因为每单位体积的分子浓 度或数目大于 (“浓缩的”)或小于从其天然存在的对应物 (“分离的”)。富集可基 于绝对量来测量,例如每单位体积的溶液的重量,或者其可相对于来 源混合物中存在的第二、可能干扰性的物质来测量。

[0026] 术语“多核苷酸”、“核酸”、“核苷酸”和“寡核苷酸”可 互换使用。它们是指任何长 度的核苷酸(无论是脱氧核糖核苷酸还是 核糖核苷酸)或其类似物的聚合形式。多核苷酸可具有任何三维结构, 并且可以执行任何已知或未知的功能。以下是多核苷酸的非限制性实 例:基因或基因片段的编码区或非编码区、从连锁分析确定的基因座、外显子、内含子、信使RNA (mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核 酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任意序列 的分离的DNA、任意序列的分离的RNA、核酸探针、引物、寡核苷 酸或合成的DNA。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,如甲基化核苷 酸和核苷酸类似物。如果存在的话, 对核苷酸结构的修饰可以在聚合 物装配之前或之后赋予。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多 核苷酸可以在聚合后进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。

[0027] 当应用于多核苷酸时,“重组的”意味着该多核苷酸是克隆、限制酶切消化和/或 连接步骤以及产生与自然界中发现的多核苷酸不 同的构建体的其它程序的各种组合的产物。

[0028] 术语“基因”或“基因片段”在本文中可互换使用。它们是指 含有至少一个开放阅读框的多核苷酸,该开放阅读框能够在转录和翻 译后编码特定蛋白质。基因或基因片段可以是基因组的、cDNA或合 成的,只要该多核苷酸含有至少一个开放阅读框,该开放阅读框可以 覆盖整个编码区或其区段。

[0029] 术语“可操作地连接”或“有效连接”指并置,其中这样描述 的组件所处的关系允 许它们以其预期方式发挥作用。例如,如果启动 子序列促进编码序列的转录,则该启动子 序列与该编码序列可操作地 连接。

[0030] 如本文所用的,“表达”是指多核苷酸被转录为mRNA的过程, 和/或转录的mRNA (也

称为“转录物”)随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。转录物和被编码的多肽统称为基因产物。如果多核苷酸衍生自基因组DNA，则表达可以包括真核细胞中mRNA的剪接。

[0031] 如本文中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如λ噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

[0032] 如本文使用的术语“密码子优化”指利用遗传密码中的冗余来改变核苷酸序列同时保持其所编码的蛋白质序列相同。在一些情况下，进行密码子优化可促进编码的蛋白质的表达增加或降低，这是通过针对特定细胞类型对密码子使用的偏好如tRNA在细胞类型中的相对丰度，使核苷酸序列中的密码子适应该偏好来实现的。在一些情况下，也可以通过选择已知在特定细胞类型中罕见的tRNA的密码子来减少表达。在一些情况下，通过密码子优化还能够增加序列复制的保真度，即在多核苷酸复制循环期间如克隆过程中较少发生突变。

[0033] 如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO细胞，COS细胞，NSO细胞，HeLa细胞，BHK细胞，HEK293细胞或人细胞等的动物细胞。

[0034] 如本文中使用的“有效量”指至少实现特定病症的可测量改善或预防所需要的最小量。本文中的有效量可以随患者的疾病状态、年龄、性别和体重等因素变化。有效量也是治疗有益效果超过治疗的任何毒性或不利效果的量。在癌症或肿瘤的治疗中，药物的有效量可以具有以下效果：减少癌细胞的数目、降低肿瘤大小、抑制癌细胞浸润入外周器官、抑制肿瘤转移、在一定程度上抑制肿瘤生长和/或在一定程度上减轻一种或多种与病症有关的症状。可以在一次或多次施用中施用有效量。

[0035] 如本文中所使用的，术语“接受者”、“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用，并且是指希望对其进行诊断、处理或治疗的任何哺乳动物受试者，特别是人类。

[0036] 如本文中所使用的，术语“治疗”、“处理”指获得所需的药理学和/或生理学效果。该效果就完全或部分防止疾病或其症状而言可以是预防性的，和/或就部分或完全稳定或治愈疾病和/或归因于该疾病的不良反应而言可以是治疗性的。如本文所用的“治疗”涵盖在哺乳动物中对疾病的任何治疗，该哺乳动物例如是小鼠、大鼠、兔、猪、灵长类动物，包括人类和其它猿类，特别是人，并且该术语包括：(a) 防止疾病或症状在可能易患该疾病或症状但尚未发生诊断的受试者中发生；(b) 抑制疾病症状；(c) 阻止疾病的发展；(d) 缓解疾病症状；(e) 引起疾病或症状消退；或其任意组合。如本文所用的术语“试剂盒”是指经包

装以共同使用或市售的组合。例如,本公开的试剂盒可包含 本公开的组合物,以及使用组合物或试剂盒的说明。术语“说明书”指治疗产品的商业化包装中通常含有的说明性插页,其含有关于适应 症、使用、剂量、施用、组合疗法、禁忌症的信息和/或关于使用这类 治疗产品的警告。

X染色体连锁视网膜色素变性(XLRP)

[0037] X染色体连锁视网膜色素变性(X-linked Retinitis Pigmentosa, XLRP)是网膜色素变性中最严重的形式之一。其表现为在生命的前 十年即出现疾病的早发和迅速发展。由于该疾病是X染色体连锁 的,因此该疾病主要影响雄性,在雌性中发生几率较少。但在某些情 况下,其也影响杂合子雌性,并可能表现为多种形式的视网膜退化。

[0038] 视网膜色素变性GTP酶调节因子(Retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR)是一种GTP酶(GTPase)结合蛋白,其在人中由RPGR 基因编码,长度为815个氨基酸。尽管对该蛋白的功能尚不了解,但研究表明,它在细胞的纤毛结构中起重要作用。纤毛是微小的,手 指状的突起,从许多类型的细胞表面伸出,并参与细胞运动和许多不 同的化学信号通路。纤毛对于听觉,嗅觉和视觉的感知是必需的。RPGR基因能够产生几种不同的RPGR同种型,其中之一被称为RPGR ORF15。RPGR ORF15主要在视网膜特别是感光细胞中表达,其可能 通过调节纤毛的功能进而参与感光过程。RPGR的功能性缺陷构成了 70%以上的XLRP患者。

重组AAV载体

[0039] 腺相关病毒(Adeno-associated virus, AAV)属于细小病毒科,是一 种单链DNA(ssDNA)病毒。AAV的基因组全长约为4.7千个碱基, 包含位于DNA链两端的反向末端重复(ITR)以及被称为rep和cap的 两个开放阅读框(ORF)。

[0040] “AAV反向末端重复(ITR)”序列是在天然单链AAV基因组两 末端存在的约145个核苷酸的序列。ITR是腺相关病毒基因组中用于 有效复制的对称核酸序列,其可用作病毒DNA合成的复制起点,并 且是重组AAV载体所必需的结构组分。

[0041] “rep”包含编码AAV生命周期所需的四个rep蛋白rep78、rep68、rep52和rep40的 多核苷酸序列。“cap”则包含编码AAV衣 壳蛋白VP1、VP2和VP3的多核苷酸序列,其中AAV的 衣壳蛋白 VP1、VP2和VP3能够相互作用以形成二十四面对称的AAV衣壳。

[0042] AAV能够有效感染分裂的以及非分裂的人类细胞,其基因组可 整合到宿主细胞基因组中的单一染色体位点。最为重要的是,尽管 AAV存在于许多人的体内,但目前的研究认为AAV并不与任何疾病 相关。基于其安全性高、免疫原性低、宿主范围广、能介导外源基因 在动物体内长期稳定表达等特点,AAV已成为基因治疗中最具前景 的载体系统。

[0043] 迄今为止,根据AAV血清型或感染的组织或细胞不同,已鉴定 出13种不同的AAV, 分别为AAV1-AAV13。并且,如下表2所示, 不同AAV已开发为针对特定细胞类型转染的有利 的载体系统。在众 多AAV血清型中,血清型2(AAV2)是被研究和使用最为广泛的一种, 其能够感染视网膜上皮、感光细胞、骨骼肌、中枢神经和肝细胞等, 已作为载体被用于多项临床研究中。

表2 AAV血清型及其在基因治疗中作为载体用于递送的组织

AAV血清型	递送组织
AAV1,AAV2,AAV4,AAV5,AAV8,AAV9	中枢神经

AAV1 ,AAV8 ,AAV9	心脏
AAV2	肾脏
AAV7 ,AAV8 ,AAV9	肝脏
AAV4 ,AAV5 ,AAV6 ,AAV9	肺
AAV8	胰腺
AAV2 ,AAV5 ,AAV8	感光细胞
AAV1 ,AAV2 ,AAV4 ,AAV5 ,AAV8	视网膜上皮
AAV1 ,AAV6 ,AAV7 ,AAV8 ,AAV9	骨骼肌

[0044] 如本文使用的术语“重组AAV载体(rAAV载体)”指含有一个 或多个异源序列(即非AAV来源的核酸序列)的多核苷酸载体,其侧 翼为两个AAV反向末端重复序列(ITS)。当存在于表达AAV rep和 Cap蛋白的宿主细胞中时,该rAAV载体可复制并包装入AAV病毒 颗粒中。

[0045] “重组AAV(rAAV)病毒”或“rAAV病毒颗粒”指由至少一种 AAV衣壳蛋白包封rAAV载体所组成的AAV病毒颗粒。目前用于 rAAV病毒颗粒生产的宿主细胞均是来自哺乳动物的细胞类型,如293 细胞、COS细胞、HeLa细胞、KB细胞和其他哺乳动物细胞系。通过 提供rAAV质粒在所述哺乳动物细胞培养系统中可产生rAAV病毒颗粒。然而,大多数的上述哺乳动物细胞培养系统的产量均难以达到临 床试验和商业规模生产所需。为此,最近开发了使用昆虫细胞如Sf9 细胞的rAAV病毒颗粒生产系统。然而,在昆虫细胞中产生AAV, 必须进行一些修饰以获得AAV衣壳蛋白的正确化学计量比。

[0046] 杆状病毒(baculovirus)属于杆状病毒科,是双链环状DNA病毒, 其基因组大小在 90kb-230kb之间。杆状病毒专一性寄生于节肢动物 体内,已知可感染600多种昆虫。1983 年,Smith等人利用苜蓿银纹 夜蛾核型多角体病毒(Autographa californica Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus,AcMNPV)在草地贪夜蛾细胞系Sf9中成功表达了 人β-干扰素,首创了杆状病毒表达系统(Mol Cell Biol,1983,3:2156-2165)。此后,杆状病毒表达系统被不断完善和发展, 已经成为应用非常广泛的一种真核表达系统。2002 年,Urabe等人证 实了感染杆状病毒的Sf9昆虫细胞可以支持AAV的复制,其利用分 别携带有AAV的rep基因、Cap基因以及ITS核心表达元件的三种 重组杆状病毒共同感染Sf9细胞并成功制备了rAAV病毒颗粒。在此 基础上,研究者相继开发出了更适合大规模制备rAAV病毒 颗粒的系 统。

[0047] 目前利用杆状病毒表达系统大规模制备rAAV病毒颗粒的方法 主要有以下两种:两杆状病毒系统(Two Bac system) 和依赖包装细胞 系的一杆状病毒系统(One Bac system)。使用两杆状病毒系统制备 rAAV病毒颗粒的主要流程是,将AAV的rep基因和Cap基因整合在 一个杆状病毒基因组中,将ITS核心表达元件和感兴趣的目的基因整 合到另外 一个杆状病毒基因组中,然后使用上述两种重组杆状病毒共 同感染宿主细胞,产生出携带目的基因的rAAV病毒颗粒。使用依赖 包装细胞系的一杆状病毒系统制备rAAV病毒颗粒的主要流程是,先 建立诱导表达rep基因和Cap基因的包装细胞系,这种包装细胞系整 合了 rep基因和Cap基因表达元件,其中rep基因和Cap基因分别置 于杆状病毒晚期基因表达强启动子PH调控下,在PH启动子的上游 进一步加入hr2增强子序列和AAV的rep蛋白结合序 列。在感染包含AAV ITS和目的基因的重组杆状病毒后,包装细胞系中的rep基因和 Cap基 因被诱导表达,进而产生整合了目的基因的rAAV病毒颗粒。

[0048] 在一些实施方案中, rAAV病毒颗粒中用于携带目的基因的 rAAV载体还可包括一个或多个“表达调控元件”。如本文使用的术语“表达调控元件”指影响可操作地连接的多核苷酸的表达的核酸序列, 包括促进异源多核苷酸转录和翻译的多核苷酸序列。可用于本发明中的表达调控元件包括但不限于启动子、增强子、内含子剪接信号、多聚A(polyA)、反向末端重复序列(ITS)等。

[0049] “启动子”是位于编码目标产物的异源多核苷酸序列相邻处的 DNA序列, 其通常可操作地连接在相邻的序列例如异源多核苷酸上。与不存在启动子的情况下所表达的量相比较, 启动子通常增加异源多核苷酸所表达的量。

[0050] “增强子”是一段增强启动子活性的序列。与启动子不同的是, 增强子并不具有启动子活性, 并且通常可不依赖于其相对启动子的位置(即启动子的上游或下游)而起作用。可用于本发明的增强子元件(或其部分)的非限制性实例包括杆状病毒增强子和在昆虫细胞中发现的增强子元件。

[0051] “填充序列”是指包含在较大核酸分子(诸如载体)中的核苷酸序列, 通常用于在两个核酸特征之间(诸如在启动子和编码序列之间)产生所需间隔, 或延伸核酸分子以使其具有期望长度。填充序列不含蛋白质编码信息, 并且可以具有未知/合成来源和/或与较大核酸分子内的其他核酸序列不相关。

组合物

[0052] 一方面, 本发明提供一种组合物, 其包含第一多核苷酸和第二多核苷酸, 其中所述第一多核苷酸包含与第一启动子可操作连接的第一序列和与第二启动子可操作连接的第二序列。

[0053] 在一些实施方案中, 所述第一序列编码腺相关病毒(AAV)cap蛋白。所述cap蛋白可以是本领域已知的任何能够形成功能性AAV衣壳(即能够包装DNA并感染靶细胞)的结构蛋白。在一些实施方案中, 所述cap蛋白包括VP1、VP2和VP3。在一些实施方案中, 所述cap蛋白无需包括VP1、VP2、VP3中的全部, 只要其能够产生功能性AAV衣壳。在一些实施方案中, 所述cap蛋白包括VP1和VP2。在一些实施方案中, 所述cap蛋白包括VP1和VP3。在一些实施方案中, 所述cap蛋白包括VP2和VP3。在一些实施方案中, 所述cap蛋白包括VP1。在一些实施方案中, 所述cap蛋白包括VP2。在一些实施方案中, 所述cap蛋白包括VP3。

[0054] 所述VP1、VP2、VP3可衍生自任何AAV血清型。在一些实施方案中, 所述VP1可衍生自AAV血清型1(AAV1)、AAV血清型2(AAV2)、AAV血清型3(AAV3, 包括血清型3A和3B)、AAV血清型4(AAV4)、AAV血清型5(AAV5)、AAV血清型6(AAV6)、AAV血清型7(AAV7)、AAV血清型8(AAV8)、AAV血清型9(AAV9)、AAV血清型10(AAV10)、AAV血清型11(AAV11)、AAV血清型12(AAV12)、AAV血清型13(AAV13)、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8和已知的任何其他AAV。在一些实施方案中, 所述VP1与源自AAV1、AAV2、AAV3, (包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型VP1具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。在一些实施方案中, 所述VP1相比源自AAV1、AAV2、AAV3, (包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型VP1具有一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加。

[0055] 在一些实施方案中, 所述VP2可衍生自AAV1、AAV2、AAV3, (包括AAV3A和3B)、AAV4、

AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8 和已知的任何其他AAV。在一些实施方案中,所述VP2与源自AAV1、AAV2、AAV3, (包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型VP2具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。在一些实施方案中,所述VP2相比源自AAV1、AAV2、AAV3, (包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型VP2具有一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加。

[0056] 所述VP3可衍生自AAV1、AAV2、AAV3, (包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8和已知的任何其他AAV。在一些实施方案中,所述VP3与源自AAV1、AAV2、AAV3, (包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型VP3具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。在一些实施方案中,所述VP3相比源自AAV1、AAV2、AAV3, (包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型VP3具有一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加。

[0057] 在一些实施方案中,所述cap包含衍生自相同血清型的AAV的VP1、VP2和/或VP3,例如,所述cap可以包含衍生自AAV2的VP1、VP2和/或VP3。在一些实施方案中,所述cap包含衍生自不同血清型的AAV的VP1、VP2和/或VP3,例如所述cap可以包含衍生自AAV1、AAV2、AAV3, (包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8中任何一种或多种的VP1、VP2和/或VP3。、

[0058] 在一些实施方案中,编码所述cap第一序列与第一启动子可操作连接。所述第一启动子可以是本领域已知的任何能够驱动所述cap表达的适当的启动子。在一些实施方案中,所述第一启动子可以是组织特异性启动子、组成型启动子、可调控启动子。在一些实施方案中,所述第一启动子可以选自不同来源,例如所述第一启动子可以是病毒启动子、植物启动子和哺乳动物启动子。

[0059] 所述第一启动子的实例包括但不限于,人巨细胞病毒(CMV)即刻早期增强子/启动子、SV40早期增强子/启动子、JC多瘤病毒启动子、髓磷脂碱性蛋白(MBP)或神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子、单纯疱疹病毒(HSV-1)潜伏期相关启动子(LAP)、劳斯肉瘤病毒(RSV)长末端重复序列(LTR)启动子、神经元特异性启动子(NSE)、血小板源性生长因子(PDGF)启动子、hSYN、黑色素聚集激素(MCH)启动子、CBA、基质金属蛋白质启动子(MPP)、鸡β-肌动蛋白启动子、CAG、MNDU3、PGK和EF1a启动子。

[0060] 在一些实施方案中,所述第一启动子是适于在昆虫细胞中表达的启动子。在一些实施方案中,所述适于在昆虫细胞中表达的启动子包括但不限于Po1H启动子、p10启动子、碱性启动子、诱导型启动子、E1启动子或Δ E1启动子。在一些实施方案中,所述第一启动子是Po1H启动子。在一些实施方案中,所述第一启动子是p10启动子。

[0061] 在一些实施方案中,所述第一序列的3'末端进一步包含聚腺苷酸化序列或“多聚A序列”。在一些实施方案中,所述聚腺苷酸化序列或“多聚A序列”的长度范围可以为约1-500bp。在一些实施方案中,所述聚腺苷酸化序列或“多聚A序列”的长度可以是但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50、10、200或500个核苷酸。

[0062] 在一些实施方案中,所述第二序列编码AAV rep蛋白,其中所述rep蛋白可以是任何rAAV载体复制和包装成rAAV病毒颗粒所必需的复制蛋白。在一些实施方案中,所述rep蛋白包括rep78、rep68、rep52和rep40。在一些实施方案中,所述rep蛋白无需包括rep78、rep68、rep52和rep40中的全部,只要其能够允许rAAV载体复制和包装成rAAV病毒颗粒。在一些实施方案中,所述rep蛋白包括rep78、rep68、rep52和rep40中的任意三种。在一些实施方案中,所述rep蛋白包括rep78、rep68、rep52和rep40中的任意两种。在一些实施方案中,所述rep蛋白包括rep78、rep68、rep52和rep40中的任意一种。在一些实施方案中,所述rep蛋白包括rep78和rep52。在一些实施方案中,所述rep蛋白包括rep78和rep40。在一些实施方案中,所述rep蛋白包括rep68和rep52。在一些实施方案中,所述rep蛋白包括rep68和rep40。

[0063] 所述rep78、rep68、rep52和rep40可以衍生自任何AAV血清型。在一些实施方案中,所述rep78可衍生自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8和已知的任何其他AAV。在一些实施方案中,所述rep78与源自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型rep78具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。在一些实施方案中,所述rep78相比源自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型rep78具有一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加。

[0064] 在一些实施方案中,所述rep68可衍生自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8和已知的任何其他AAV。在一些实施方案中,所述rep68与源自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型rep68具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。在一些实施方案中,所述rep68相比源自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型rep68具有一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加。

[0065] 在一些实施方案中,所述rep52可衍生自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8和已知的任何其他AAV。在一些实施方案中,所述rep52与源自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型rep52具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。在一些实施方案中,所述rep52相比源自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型rep52具有一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加。

[0066] 在一些实施方案中,所述rep40可衍生自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8和已知的任何其他AAV。在一些实施方案中,所述rep40与源自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-

Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型rep52具有至少75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。在一些实施方案中,所述 rep40相比源自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74或AAV-2i8中的野生型rep52具有一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加。

[0067] 在一些实施方案中,所述rep包含衍生自相同血清型的AAV的 rep78、rep68、rep52和/或rep40,例如,所述rep可以包含衍生自AAV2 的rep78、rep68、rep52和/或rep40。在一些实施方案中,所述rep包 含衍生自不同血清型的AAV的rep78、rep68、rep52和/或rep40,例 如所述rep可以包含衍生自AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A 和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8和已 知的任何其他AAV中任何一种或多种的rep78、rep68、rep52和/或 rep40。

[0068] 在一些实施方案中,编码所述rep蛋白的第二序列与第二启动 子可操作连接。所述第二启动子可以是本领域已知的任何能够驱动所 述cap表达的适当的启动子。在一些实 施方案中,所述第二启动子可 以是组织特异性启动子、组成型启动子、可调控启动子。在一些实施 方案中,所述第二启动子可以选自不同来源,例如所述第二启动子可 以是病毒启 动子、植物启动子和哺乳动物启动子。

[0069] 所述第二启动子的实例包括但不限于,人巨细胞病毒(CMV)即 刻早期增强子/启动子、SV40早期增强子/启动子、JC多瘤病毒启动 子、髓磷脂碱性蛋白(MBP)或神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动 子、单纯疱疹病毒(HSV-1)潜伏期相关启动子(LAP)、劳斯肉瘤病 毒(RSV)长末端重复序列(LTR)启动子、神经元特异性启动子(NSE)、血 小板源性生长因子(PDGF)启动子、hSYN、黑色素聚集激素(MCH)启 动子、CBA、基质金属蛋白质启动子(MPP)、鸡 β -肌动蛋白启动子、CAG、MNDU3、PGK和EF1a启动子。

[0070] 在一些实施方案中,所述第二启动子是适于在昆虫细胞中表达 的启动子。在一些 实施方案中,所述适于在昆虫细胞中表达的启动子 包括但不限于Po1H启动子、p10启动子、碱性启动子、诱导型启动子、E1启动子或 Δ E1启动子。在一些实施方案中,所述第二启动子 是Po1H 启动子。在一些实施方案中,所述第二启动子是p10启动子。

[0071] 在一些实施方案中,所述第二序列的3' 末端进一步包含聚腺苷 酸化序列或“多聚 A序列”。在一些实施方案中,所述聚腺苷酸化序 列或“多聚A序列”的长度范围可以为约1-500bp。在一些实施方案 中,所述聚腺苷酸化序列或“多聚A序列”的长度可以是但不限于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50、10、200或500个核昔 酸。

[0072] 在一些实施方案中,所述cap和所述rep可以衍生自相同的AAV 血清型。例如,所述 cap和rep可以衍生自相同的AAV1、AAV2、AAV3,(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8或已知的任何其他AAV。举例来说,在一些实 施方案中,所述cap可以衍生自AAV2,而所述rep则衍生自AAV5。

[0074] 在一些实施方案中,所述第一启动子和第二启动子可以是相同 的启动子。例如,

所述第一启动子和第二启动子均为选自PolH启动子、p10启动子、碱性启动子、诱导型启动子、E1启动子或 Δ E1启动子中的任何一种。举例而言，在一些实施方案中，所述所述第一启动子和第二启动子均为PolH启动子。在一些实施方案中，所述所述第一启动子和第二启动子均为p10启动子。

[0075] 在一些实施方案中，所述第一启动子和第二启动子可以是不同的启动子。例如，所述第一启动子和第二启动子可以是分别选自PolH启动子、p10启动子、碱性启动子、诱导型启动子、E1启动子或 Δ E1启动子中的任何二种启动子。举例而言，在一些实施方案中，所述所述第一启动子为PolH启动子，而所述第二启动子为p10启动子。在一些实施方案中，所述所述第一启动子为p10启动子，而所述第二启动子为PolH启动子。

[0076] 在一些实施方案中，所述第一序列与所述第二序列通过编码接头的序列连接。在一些实施方案中，所述接头为可裂解接头。在一些实施方案中，所述可裂解接头为包含2A肽的序列。在一些实施方案中，所述2A肽可以是选自源自口疮病毒属或心病毒属的2A肽，例如源自口蹄疫病毒(FMDV)、马鼻炎A病毒(ERAV)、Thosea asigna病毒(TaV)或猪捷申病毒(PTV-1)的2A肽。在一些实施方案中，所述编码接头的序列进一步包含启动子序列。在一些实施方案中，所述启动子为FMDV启动子。

[0077] 在一些实施方案中，本发明所述的组合物中的第二多核苷酸包含与CMV、CAG、MNDU3、PGK、EF1a启动子或眼部特异性启动子可操作连接的第三序列，其中所述第三序列编码RPGR多肽。

[0078] 本文所述的RPGR多肽可以是源自任何哺乳动物的RPGR及其变体。在一些实施方案中，所述哺乳动物包括但不限于如灵长类动物(例如人)、牛、狗、猫、啮齿动物(例如，豚鼠、大鼠或小鼠)。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽是源自人的RPGR或其变体。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽是源自人的RPGR ORF15或其变体。

[0079] 在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR具有至少85%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR具有至少96%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR具有至少97%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR相比具有一个或多个氨基酸的突变、取代、缺失或添加的序列。

[0080] 在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR ORF15具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR ORF15具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR ORF15具有至少85%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR ORF15具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR ORF15具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR ORF15

具有至少96%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR ORF15具有至少97%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR ORF15 具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR 多肽包含与人RPGR ORF15具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中，本文所述的RPGR多肽包含与人RPGR ORF15相比具有一个或多个氨基酸的突变、取代、缺失或添加的序列。

[0081] 在一些实施方案中，所述RPGR ORF15多肽包含SEQ ID No.1 的序列。在一些实施方案中，所述RPGR ORF15多肽包含与SEQ ID No. 1具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中，所述RPGR ORF15 多肽包含与SEQ ID No.1具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中，所述RPGR ORF15多肽包含与SEQ ID No.1具有至少85%同一性的序列。在一些实施方案中，所述RPGR ORF15多肽包含与SEQ ID No.1具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中，所述RPGR ORF15多肽包含与SEQ ID No.1具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中，所述RPGR ORF15多肽包含与SEQ ID No.1具有至少96%同一性的序列。在一些实施方案中，所述RPGR ORF15多肽 包含与SEQ ID No.1具有至少97%同一性的序列。在一些实施方案 中，所述RPGR ORF15多肽包含与SEQ ID No.1具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中，所述RPGR ORF15多肽包含与SEQ ID No.1具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中，所述RPGR ORF15多肽包含与SEQ ID No.1相比具有一个或多个氨基酸的突变、取代、缺失或添加的序列。

[0082] 在一些实施方案中，所述第三序列包含编码人RPGR ORF15多 肽的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID NO.2 具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包含 与SEQ ID NO.2具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID NO.2具有至少85%同一性的序列。在 一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID NO.2具有至少90% 同一性的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID NO. 2具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包 含与SEQ ID NO.2具有至少96%同一性的序列。在一些实施方案中， 所述第三序列包含与SEQ ID NO.2具有至少97%同一性的序列。在 一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID NO.2具有至少98% 同一性的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID NO. 2具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包 含与SEQ ID NO.2的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包含 与SEQ ID NO.2相比具有一个或多个核苷酸突变、取代、缺失或添加 的序列。

[0083] 在一些实施方案中，所述第三序列包含编码人RPGR ORF15多 肽的序列，且是密码子优化的。在一些实施方案中，所述第三序列包 含与SEQ ID NO.3具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中， 所述第三序列包含与SEQ ID NO.3具有至少80%同一性的序列。在 一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID NO.3具有至少85% 同一性的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID NO. 3具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包 含与SEQ ID NO.3具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中， 所述第三序列包含与SEQ ID NO.3具有至少96%同一性的序列。在 一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID NO.3具有至少97% 同一性的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID NO. 3具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包 含与SEQ ID NO.3具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中， 所述第三序

列包含与SEQ ID NO.3的序列。在一些实施方案中，所述第三序列包含与SEQ ID No.3相比具有一个或多个核苷酸突变、取代、缺失或添加的序列。

[0084] 在一些实施方案中，所述第三序列与CMV、CAG、MNDU3、PGK、EF1a启动子或眼部特异性启动子可操作连接。在一些实施方案中，所述眼部特异性启动子为视网膜色素上皮(RPE)细胞特异性启动子。所述RPE细胞特异性启动子的包括但不限于RPE 65基因启动子、人类视黄醛结合蛋白(CRALBP)基因启动子、鼠类11-顺式视黄醇脱氢酶(RDH)基因启动子、视紫红质启动子、视紫红质激酶启动子(Rhodopsin kinase promoter)、金属蛋白酶3的组织抑制剂(Timp3)启动子、感光素类视黄醇结合蛋白启动子和玻璃体黄斑营养不良2(vitelliform macular dystrophy 2)启动子、光受体间类视色素结合蛋白(Interphotoreceptor retinoid-binding protein,IRBP)启动子。

[0085] 在一些实施方案中，所述第二多核苷酸进一步包含其他调控序列，所述调控序列包括但不限于反向末端重复序列(ITR)、增强子、剪接信号、聚腺苷酸化信号、填充序列、终止子、蛋白降解信号、内部核糖体进入元件(IRES)、2A序列等。

[0086] 在一些实施方案中，所述第二多核苷酸进一步包含增强子区。在一些实施方案中，所述增强子区包括SV40增强子、即刻早期巨细胞病毒增强子、IRBP增强子、源于免疫球蛋白基因的增强子。在一些实施方案中，所述增强子区位于所述CMV、CAG、MNDU3、PGK、EF1a启动子的上游。在一些实施方案中，所述增强子位于所述眼部特异性启动子的上游。在一些实施方案中，所述增强子区位于所述CMV、CAG、MNDU3、PGK、EF1a启动子的下游。在一些实施方案中，所述增强子位于所述眼部特异性启动子的下游。

[0087] 在一些实施方案中，所述所述第二多核苷酸进一步包含反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方案中，所述所述第二多核苷酸包含至少一个反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方案中，所述所述第二多核苷酸包含两个反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方案中，所述两个ITR是彼此相同的。在一些实施方案中，所述两个ITR是彼此不同的。在一些实施方案中，所述反向末端重复序列(ITR)是源自AAV的ITR。在一些实施方案中，所述ITR可以源自AAV1、AAV2、AAV3，(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8和已知的任何其他AAV的ITR。在一些实施方案中，所述ITR相比源自AAV1、AAV2、AAV3，(包括AAV3A和3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8和已知的任何其他AAV的野生型ITR具有一个或多个碱基的突变、插入或缺失，只要其保留所期望的末端重复序列功能，如目的基因的复制、病毒颗粒的包装和/或整合等。

[0088] 在一些实施方案中，所述第二多核苷酸进一步包含一个或多个填充序列。在一些实施方案中，所述填充序列位于CMV、CAG、MNDU3、PGK、EF1a启动子序列的上游。在一些实施方案中，所述填充序列位于CMV、CAG、MNDU3、PGK、EF1a启动子序列的下游。在一些实施方案中，所述填充序列位于所述眼部特异性启动子的上游。在一些实施方案中，所述填充序列位于所述眼部特异性启动子的下游。在一些实施方案中，所述填充序列位于所述5' ITR序列的5'端。在一些实施方案中，所述填充序列位于所述5' ITR序列的3'端。在一些实施方案中，所述填充序列位于所述5' ITR序列的5'端。在一些实施方案中，所述填充序列位于所述3' ITR序列的5'端。在一些实施方案中，所述填充序列位于所述3' ITR序列的3'端。

[0089] 在一些实施方案中，所述填充序列的长度可以为约0.1kb-5kb，例如但不限于

0.1kb、0.2kb、0.3kb、0.4kb、0.5kb、0.6kb、0.7kb、0.8kb、0.9kb、1kb、1.1kb、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2kb、2.1kb、2.2kb、2.3kb、2.4kb、2.5kb、2.6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb、3.8kb、3.9kb、4.0kb、4.1kb、4.2kb、4.3kb、4.4kb、4.5kb、4.6kb、4.7kb、4.8kb、4.9kb或5.0kb。

[0090] 在一些实施方案中,所述所述第二多核苷酸进一步包含编码另一治疗性蛋白的第四序列。在一些实施方案中,所述治疗性蛋白选自下组:RPGR相互作用蛋白1(RPGR Interacting Protein 1, RPGRIP1)、RPGR 相互作用蛋白1样蛋白(RPGRIP1 Like, RPGRIP1L)、染色体的结构维持蛋白1(Structural maintenance of chromosomes protein 1, SMC1)、染色体 的结构维持蛋白3(Structural maintenance of chromosomes protein 3, SMC3)、Whirlin、磷酸二酯酶δ(Phosphodiesteraseδ, PDEδ) 和脑部Ras 相关蛋白质8(Ras-related proteins in brain8, RAB8)。

[0091] 在一些实施方案中,所述第四序列与所述第三序列通过编码接头 的序列连接。在一些实施方案中,所述接头为可裂解接头。在一些实施方案中,所述可裂解接头包含2A肽的序列。在一些实施方案中,所述2A肽可以是选自源自口疮病毒属或心病毒属的2A肽,例如源自口蹄疫病毒(FMDV)、马鼻炎A病毒(ERAV)、Thosea asigna 病毒(TaV) 或猪捷申病毒(PTV-1)的2A肽。

重组AAV病毒颗粒

[0092] 另一方面,本发明提供一种重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,其通过 将本发明上述的组合物转染至昆虫细胞制备。在一些实施方案中,所述 昆虫细胞为Sf9细胞。

[0093] 在一些实施方案中,本发明的组合物可通过本领域任何已知的方法递送入所述昆虫细胞。在一些实施方案中,所述方法包括但不限于 电穿孔、磷酸钙沉淀、脂质体介导等。在一些实施方案中,所述组合 物被稳定转染入所述昆虫细胞。在一些实施方案中,所述组合物被瞬 时转染入所述昆虫细胞中。在一些实施方案中,所述昆虫细胞用于生 产所述 rAAV病毒颗粒。

[0094] 如果有需要,可根据本领域技术人员已知的常规方法从所述昆虫 细胞分离并纯化所述rAAV病毒颗粒。例如,可使用离心、HPLC、疏水相互作用色谱(HIC)、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、尺寸 排阻色谱、超滤、凝胶电泳、亲和色谱、和/或其他纯化技术纯化所述 rAAV病毒颗粒。

系统

[0095] 另一方面,本发明提供一种用于在有需要的受试者中治疗XLRP 的系统,其包含本发明所述的rAAV颗粒和药物上可接受的载体或赋 形剂。

[0096] 如本文所用的,“药学上或治疗上可接受的载体或赋形剂”是指 不干扰活性成分的生物活性的有效性并且对宿主或患者无毒的载体 介质。药物制剂中使用的载体类型将取决于施用该治疗性化合物的方 法。制备用于多种给药途径的药物组合物的许多方法是本领域公知 的。“药学上可接受的眼用载体”是指可用于将本发明的rAAV病毒 颗粒直接或间接递送至眼睛、眼睛上或眼睛附近的药学上可接受的载 体或赋形剂。

[0097] 在本发明的一些实施方案中,通过将本发明的rAAV病毒颗粒溶 解在适当的溶剂中来制备所述系统。适当的溶剂包括但不限于水、盐 溶液(例如,NaCl)、缓冲溶液、软膏、凝胶或其他溶剂。在某些实施 方案中,该溶剂为无菌的。

[0098] 在制备滴眼剂中使用的用于悬浮液的水溶液和稀释剂可包括蒸馏水、生理盐水等。多种添加剂可根据需要被包含在滴眼剂、眼用凝胶和/或眼用软膏中。这些添加剂可包括适于接触眼或在眼周围使用而没有过度毒性、不相容性、不稳定性、刺激性、变态反应等的附加成分、添加剂或载体。可在适当情况下向制剂中加入添加剂如溶剂、基质、助溶剂、悬浮剂、增稠剂、乳化剂、稳定剂、缓冲剂、等渗性调节剂、pH调节剂、螯合剂、舒缓剂、防腐剂、矫味剂、调味剂、着色剂、赋形剂、粘合剂、润滑剂、表面活性剂、吸收促进剂、分散剂、防腐剂、增溶剂等。

[0099] 例如,可通过将rAAV病毒颗粒溶解在溶有表面活性剂的无菌水中并任选地添加适当的药物添加剂如防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和粘度改善剂来配制滴眼剂。

[0100] 例如,添加缓冲剂以保持pH恒定,并且该缓冲剂可包括药学上可接受的缓冲剂,如硼酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、酒石酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液(包含三(羟甲基)氨基甲烷和HCl)。

[0101] 除了缓冲液之外,还可以向滴眼剂中添加等渗剂以制备与泪液等渗的制剂。等渗剂包括但不限于糖类,如右旋糖、葡萄糖、蔗糖和果糖;糖醇,如甘露糖醇和山梨糖醇;多元醇,如甘油、聚乙二醇和丙二醇;以及盐,如氯化钠、柠檬酸钠、苯扎氯铵、盐酸麻黄碱(phedrine chloride)、氯化钾、盐酸普鲁卡因(procaine chloride)、氯霉素(chloramphenicol)和琥珀酸钠。以使滴眼剂的渗透压等于泪液渗透压的量添加等渗剂。

[0102] 可以添加防腐剂以维持滴眼剂和/或眼用软膏的完整性。防腐剂的实例包括但不限于山梨酸、苯扎氯铵、苯十二烷基二甲基溴化物(benzododecinium bromide)、对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯醇、苯乙醇、依地酸二钠、山梨酸、聚季铵盐-1或本领域技术人员已知的其他试剂。

[0103] 在一些实施方案中,使用增稠剂来增加眼用制剂如滴眼剂、眼用凝胶和/或眼用软膏的粘度。可以使用的增稠剂包括但不限于甘油、聚乙二醇、羧甲基纤维素和羧基乙烯基聚合物。

[0104] 除了上述物质以外,在一些实施方案中,还期望使用附加的试剂,包括但不限于稳定剂,如亚硫酸钠、碳酸钠和丙二醇;抗氧化剂,如抗坏血酸、抗坏血酸钠、丁羟甲苯(BHT)、丁羟茴醚(BHA)、生育酚、硫代硫酸钠;和/或螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇-双-(2-氨基乙基)-N,N,N,N-四乙酸(EGTA)和柠檬酸钠。

[0105] 滴眼剂、眼用凝胶和/或眼用软膏可通过无菌操作来制备,或者可替代地在制备的合适阶段进行灭菌。例如,无菌药物组合物可以通过无菌地混合无菌成分来制备。或者,该无菌药物组合物可通过先将成分混合随后将最终制剂灭菌来制备。灭菌方法可包括但不限于热灭菌、辐射和过滤。

[0106] 眼用软膏(眼膏)可通过将活性成分混合至用于制备眼膏的基质中,随后采用本领域已知的任何方法配制成药物制剂来无菌制备。用于眼膏的典型基质的示例为凡士林、jelene 50、plastibase以及聚乙二醇。此外,可以添加表面活性剂以增加亲水性。

[0107] 可使用多种用于活性剂的控制释放的有效方法。参见,例如,Wagh V.D., Inamdar B., Samanta M.K., Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems. Asian J Pharm 2, 2008, 12-17以及其中引用的参考文献,其内容通过引用并入本文。特别考虑使用聚合物(例如,纤维素衍生物,如羟丙基甲基纤维素(HPMC)和羟丙基纤

维素 (HPC)、聚(丙烯酸) (PAA)、聚丙烯酸酯、环糊精和天然树胶、聚原酸 酯 (POE) 以及粘膜粘附聚合物);半固体,如凝胶、膜和其他插入物;树脂,如离子交换树脂;离子电渗递送;以及胶粒,如微球和纳米颗粒。

[0108] 本发明的rAAV病毒颗粒还可以与其他治疗剂联合提供。在一些实施方案中,本发明的化合物可以与其他活性剂共同配制,该活性 剂包括但不限于抗感染剂、抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂、抗原生动物剂、消炎药、抗过敏剂(包括抗组胺药)、人工泪液血管收缩剂、血管扩张剂、局部麻醉剂、镇痛剂、眼压降低剂、免疫调节剂、抗氧化 剂、维生素和矿物质、酶抑制剂或可替代的蛋白酶和肽酶、细胞因子 抑制剂等。

[0109] 在多个实施方案中,本发明的化合物还可以与眼部治疗剂联合 提供,该眼部治疗剂选自安贺拉 (Acular) (酮咯酸氨丁三醇眼用溶液) 0.5%、Acuvail (酮咯酸氨丁三醇)、AK-Con-A (蔡甲唑啉眼药)、Akten (盐酸利多卡因)、Alamast、Alphagan (溴莫尼定)、Alrex、Astupro (盐酸氮卓斯汀鼻喷雾剂)、AzaSite (阿奇霉素)、Bepreve (苯磺酸贝他 斯汀眼用溶液)、Besivance (贝西沙星眼用悬浮液)、Betaxon、BSS无 菌灌洗液、Cosopt、Durezol (二氟泼尼酯)、Eylea (阿柏西普)、Lotemax、Lucentis (雷珠单抗)、Lumigan (比马前列素眼用溶液)、Macugen (哌加 他尼)、Ocuflox (氧氟沙星眼用溶液) 0.3%、OcuHist、Ozurdex (地塞米 松)、Quixin (左氧氟沙星)、Rescula (乌诺前列酮异丙基眼用溶液) 0.15%、Restasis (环孢菌素眼用乳液)、Salagen片剂、Travatan (曲 伏前列素眼用溶液)、Valcyte (盐酸缬更昔洛韦)、三氟胸苷 (Viroptic)、Vistide (西多福韦)、Visudyne (注射用维替泊芬)、Vitrasert植入物、福 米韦生注射剂、ZADITOR、Zioptan (他氟前列素眼用溶液)、Zirgan (更昔洛韦眼用凝胶)、Zymaxid (加替沙星眼用溶液)、阿托品、氟比洛芬、毒扁豆碱 (Physostigmine)、派立明 (Azopt)、庆大霉素、匹鲁卡品 (Proparacaine)、杆菌肽、羟丙甲纤维素眼液 (Goniosol)、多粘菌素B、聚维酮碘 (Betadine)、短杆菌肽、泼尼松龙、倍他洛尔、Humorsol、丙 美卡因、倍他洛尔眼液 (Betoptic)、Hylartin、Propine、布林佐胺、高 渗 NaCl、Puralube、BSS、吲哚菁绿 (Indocyanine Green)、玫瑰红 (Rose Bengal)、卡巴胆碱、伊曲康唑、透明质酸钠、头孢唑啉、拉坦前列素、舒洛芬、潇莱威 (Celluvisc)、甘露糖醇、土霉素、氯霉素、醋甲唑胺、噻吗洛尔、Ciloxan、咪康唑、妥布霉素、环丙沙星、Miostat、曲安西 龙、Cosopt、Muro 128、三氟尿苷、Demecarium、新霉素、托吡卡胺、地塞米松、甲醋唑胺 (Neptazane)、Trusopt、地匹福林、Ocuflox、阿 糖腺苷、多佐胺、氧氟沙星、Vira-A、肾上腺素、氧四环素、三氟胸 苷、荧光素、苯肾上腺素和适利达 (Xalatan)。

[0110] 药物的实例可以包括抗血管发生剂诸如制管张素 (angiostatin)、醋酸阿奈可他、血小板反应蛋白、VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂和抗 血管内皮生长因子 (抗VEGF) 药物诸如兰尼单抗 (ranibizumab) 和贝伐 单抗 (bevacizumab)、哌加他尼 (pegaptanib)、舒尼替尼 (sunitinib) 和索拉 非尼 (sorafenib) 和任何多种已知的具有抗血管发生作用的小分子和转 录抑制剂;各类的已知眼科药物,包括:青光眼药剂,诸如肾上腺素 能拮抗剂,包括例如,β-阻断剂诸如醋丁洛尔 (acetbutolol)、阿替洛 尔 (atenolol)、比索洛尔 (bisoprolol)、卡维地洛 (carvedilol)、艾司洛尔 (asmolol)、拉贝洛尔 (labetalol)、纳多洛尔 (nadolol)、喷布洛尔 (penbutolol)、吲哚洛尔 (pindolol)、普萘洛尔 (propranolol)、美替洛尔 (metipranolol)、倍他洛尔 (betaxolol)、卡替洛尔 (carteolol)、左倍他洛 尔 (levobetaxolol)、左布诺洛尔 (levobunolol) 和噻吗洛尔 (timolol);肾上 腺素能激动剂

或者拟交感神经药诸如肾上腺素、地匹福林(dipivefrin)、可乐定(clonidine)、阿可乐定(aparclonidine)、和溴莫尼定(brimonidine)；拟副交感神经药或胆碱能受体激动剂诸如匹鲁卡品(pilocarpine)、卡巴胆碱(carbachol)、碘化磷酰胆碱(phospholine iodine)、和毒扁豆碱(physostigmine)、水杨酸、氯化乙酰胆碱、依色林(eserine)、二异丙基氟磷酸、地美溴铵(demecariumbromide)；毒蕈碱类；碳酸酐酶抑制剂药剂，包括局表和/或全身用药剂，例如乙酰唑胺(acetozolamide)、布林唑胺(brinzolamide)、多佐胺(dorzolamide)和甲醋唑胺(methazolamide)、依索唑胺(ethoxzolamide)、乙酰唑胺(diamox)、和双氯非那胺(dichlorphenamide)；睫状肌麻痹扩瞳药(mydriatic-cycloplegic agent)诸如阿托品、环喷托酯(cyclopentolate)、琥珀胆碱(succinylcholine)、后马托品(homatropine)、去氧肾上腺素(phenylephrine)、东莨菪碱(scopolamine)和托吡卡胺(tropicamide)；前列腺素类诸如前列腺素F2 α 、抗前列腺素、前列腺素前体、或前列腺素类似物药剂诸如比马前列素、拉坦前列素、曲伏前列素和乌诺前列酮。

[0111] 另外的药物实例还可包括抗炎药，包括例如糖皮质激素和皮质类固醇，诸如倍他米松、可的松、地塞米松、地塞米松21-磷酸盐、甲基泼尼松龙、泼尼松龙21-磷酸盐、醋酸泼尼松龙、泼尼松龙、氟米龙、氯替泼诺、甲羟松、醋酸氟轻松、曲安奈德、曲安西龙、醋酸曲安西龙、倍氯米松、布地奈德、氟尼缩松、氟米龙、氟替卡松、氟氢可的松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、氯替泼诺、利美索龙和非类固醇抗炎药包括例如阿司匹林、双氯酚酸(diclofenac)、氟比洛芬、布洛芬、溴芬酸(bromfenac)、奈帕芬胺、和酮洛酸、水杨酸盐、吲哚美辛、萘普生(naxopren)、吡罗昔康和萘丁美酮二氟尼柳(nabumetone diflunisal)、依托度酸、非诺洛芬、氟比洛芬、吲哚美辛、酮洛酚(ketoprofen)、甲氯灭酸盐、甲芬那酸、美洛昔康、萘丁美酮、奥沙普嗪(oxaprozin)、吡罗昔康、双水杨酯、舒林酸和托美丁；COX-2抑制剂如塞来考西(celecoxib)、罗非考西(rofecoxib)和伐地考昔(valdecoxib)；抗感染药或抗微生物剂诸如抗生素包括例如四环素、金霉素、杆菌肽、新霉素、多粘菌素、短杆菌肽、头孢氨苄、土霉素、氯霉素、利福平、环丙沙星、妥布霉素、庆大霉素、红霉素、青霉素、磺胺类药、磺胺嘧啶、磺胺醋酰、磺胺甲噁二唑、磺胺异唑、呋喃西林(nitrofurazone)、丙酸钠、氨基糖苷类诸如庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星和链霉素；氟喹诺酮类诸如环丙沙星、加替沙星、左氧氟沙星、莫西沙星、诺氟沙星、氧氟沙星；杆菌肽、红霉素、夫西地酸、新霉素、多粘菌素B、短杆菌肽、甲氧苄啶和磺胺醋酰；抗真菌剂诸如两性霉素B、卡泊芬净、克霉唑、氟康唑、伊曲康唑、酮康唑、伏立康唑、特比萘芬、制霉菌素和咪康唑；抗疟疾剂诸如氯喹、阿托伐醌、甲氟喹、伯氨喹、奎尼丁和奎宁；抗分枝杆菌剂诸如乙胺丁醇、异烟肼、呲嗪酰胺、利福平和利福布汀；抗寄生虫剂诸如阿苯哒唑、甲苯哒唑、硫苯哒唑、双唑泰栓、噻嘧啶、阿托伐醌、双碘喹啉(iodoquinol)、伊维菌素、巴龙霉素、呲喹酮、和三甲曲沙(trimatrexate)。

方法

[0112] 另一方面，本申请提供用于治疗X连锁性色素性视网膜炎(XLRP)的方法，其包括将治疗上有效量的本发明的系统施用至有需要的受试者。

[0113] 在一些实施方案中，所述系统可以通过本领域已知的任何适当的方法施用至所述受试者。在一些实施方案中，可将所述系统局部施用于眼，例如，结膜下、眼球后、眼周、

视网膜下、脉络膜上或眼内 施用。

[0114] 在一些实施方案中,包含所述rAAV病毒颗粒的系统以治疗上 有效的量提供,该治疗有效量在医学上可接受的毒性水平下达到所需 的生物效果。该剂量可根据给药途径和疾病的严重程度而变化。该剂 量还可根据待治疗的每个患者的体重、年龄、性别和/或症状程度而调 整。精确的剂量和给药途径将最终由经治医生或兽医来决定。可以理 解,可能需要根据患者的年龄和体重以及待治疗的状况的严重程度对 剂量作出常规改变。

[0115] 在一些实施方案中,所述治疗有效量一般约为 1×10^5 - 1×10^{13} rAAV病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗有效量一般约为 1×10^6 - 1×10^{12} rAAV病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗有效量一般约 为 1×10^7 - 1×10^{12} rAAV病毒颗粒。在一些实施方案中,所述 治疗有效量一般约为 1×10^8 - 1×10^{12} rAAV病毒颗粒。在一些实施方案中,所述 治疗有效量一般约为 1×10^9 - 1×10^{12} rAAV病毒颗粒。在一些实施方案 中,所述治疗有效量一般约为 1×10^{10} - 1×10^{12} rAAV病毒颗粒。

[0116] 在一些实施方案中,所递送的体积约为0.01mL-1mL。在一些实 施方案中,所递送的体积约为0.05mL-1mL。在一些实施方案中,所 递送的体积约为0.1mL-1mL。在一些实施方案中,所递送的体积约为0.1mL-0.5mL。在一些实施方案中,所递送的体积约为0.01mL-0.5mL。在一些实施 方案中,所递送的体积约为0.05mL-0.5mL。在一些实施方案中,所 递送的体积约为0.05mL-1mL。

[0117] 在一些实施方案中,给药频率可以是每天施加至少一次,包括 每天2、3、4或5次。在一些实施方案中,所述治疗可持续1天、2 天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11 天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22 天、23天、24天、25天、26 天、27天、28天、29天、30天、31 天、32天、33天、34天、35天、36天、37天、38天、39天、40 天、41 天、42天、43天、44天、45天、46天、47天、48天、49 天、50天、60天、70天、80天、90天、100天、 150天、200天、250天、300天、400天、500天、750天、1000天或多于1000天。

试剂盒

[0118] 另一方面,本发明提供用于治疗XLRP的试剂盒,其包含本发 明所述的系统和说明 书。在一些实施方案中,所述说明书用于指示施 用所述系统以治疗XLRP的方法。

[0119] 在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含容器。在一些实施 方案中,所述容器被配置为递送本文所述的系统。在一些实施例中, 容器包括小瓶,滴管,瓶,管和注射器。在一些实施方式中,容器是 用于施用所述系统的滴管。在一些实施方案中,容器是用于施用 所述 系统的注射器。

[0120] 本发明的一些实施方案通过以下实施例进一步阐明,该实施例 不应被解释为限制性的。本领域技术人员将会理解,下面的实施例中 公开的技术代表本发明人发现在本文 描述的本发明实施方案的实施 中运作良好的技术,并因此可被认为构成用于实施这些实 施方案的优 选方式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员将理解,在不脱离 本发明的 精神和范围的情况下,可以在本文公开的具体实施方案中作 出许多改变,并且仍可获得同 样或相似的结果。

实施例

[0121] 下列实施例进一步阐述了本发明。这些实施例仅旨在说明本发 明,而不应被解释

为对本发明的限制。

实施例1重组AAV载体的设计和克隆

[0122] 将源自AAV2的cap和rep编码序列连同其相应的启动子分别 克隆至杆状病毒质粒载体中以获得本申请中包含cap和rep蛋白的编 码序列的第一多核苷酸。

[0123] 分别将将编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的核苷酸序列和编码SEQ ID No.1所示的RPGR ORF15多肽的核苷酸序列连同其相应的启动子克 隆至杆状病毒质粒载体中以分别获得包含GFP和RPGR ORF15的编 码序列的第二多核苷酸。

实施例2重组AAV病毒颗粒的制备

[0124] 将实施例1中获得的第一多核苷酸和第二多核苷酸混合以形成 本申请的组合物，并使用所述组合物转染Sf9细胞，以获得包装的 rAAV2/RPGR ORF15和rAAV2/GFP病毒颗粒。从Sf9细胞中分离和 纯化所述重组AAV2/RPGR ORF15和AAV2/GFP病毒颗粒。

实施例3报告基因在小鼠眼部的递送和表达

[0125] 在本实施例中，将小鼠分为实验组和对照组，分别将实施例2 中获得的纯化的 rAAV2/GFP和PBS注射至实验组和对照组小鼠的眼 部。一段时间后，观察小鼠视网膜色素上皮细胞中的荧光表达。

[0126] 结果显示，相比对照组，实验组小鼠视网膜色素中观察到了绿 色荧光。该结果表明，本申请中的第一多核苷酸能够成功包装包含 GFP编码序列的rAAV载体并生成rAAV2/ GFP病毒颗粒以用于GFP 编码序列的递送，且所递送的GFP编码序列能够在小鼠视网膜色素上皮中成功表达。

实施例4 RPGR ORF15在小鼠中的递送和表达

[0127] 将小鼠分为两组，其中对照组和实验组分别使用实施例2中纯 化的rAAV2/GFP和 AAV2/RPGR ORF15病毒颗粒进行眼内注射。注 射后对小鼠眼部进行观察。观察结果表明，GFP成功表达于小鼠视 网膜色素上皮，这说明重组的RPGR ORF15编码序列可以在视网膜上表达。

实施例5本申请组合物在体内的效力

[0128] 使用对照、本申请的中包含rAAV2/RPGR ORF15病毒颗粒的 系统进行2臂临床实验以验证本申请中所述系统的有效性。

序列表

SEQ ID No	序列	描述
1	MREPEELMPDSGAVFTFGKSKFAENNPGKFWFKNDVP VHLSCGDEHSAVVTGNNKLYMFGSNNWQQLGLGSKS AISKPTCVKALKPKEVKLAACGRNHTLVSTEGGNVYA TGGNNEGQLGLGDTEERNTFHVISFFTSEHKIKQLSAGS NTSAALTEDGRLFMWGDNSEGQIGLKKNVSNCVPQQV TIGKPVSWISCGYYHSAFVTTDGELEYVFGEPENGKLGL PNQLLGNHRTPQLVSEIPEKVIQVACGGEHTVVLTENA VYTFGLGQFGQLGLGTFLFETSEPKVIENIRDQTISYISC GENHTALITDIGLMYTFGDGRHGKLGLLENFTNHFIPT LCSNFLRFIVKLVACGGCHMVFAAPHRGVAKEIEFDE INDTCLSVATFLPYSSLTSGNVLQRTLSARMRRERERS PDSFSMRRTLPIEGTLGLSACFLPNSVPRCSERNLQES VLSEQDLMQPEPDYLLDEMTEKAEEIDNSSTVESLGET TDILNMTHIMSLNSNEKSLKLSPVQKQKKQQTIGELTQ DTALTENDDSDEYEEMSEMKEGKACKQHVSQGIFMTQ PATTIEAFSDEEVEIPEEKEGAEDSKNGNGIEEQVEANEE NVKVHGRKEKTEILSDDLTDKAEVSEGKAKSVGEAE DGPEGRGDGTCEEGSSGAEHWQDEEREKGEKDKGRC MERPGEGEGEKELAKEEKKRGEKGEKGEKGEKGE ERNQEMEEGGEHHGEGEHEEEGDREEEEKEGEGKEEG EGEEVEGEREKEGERKKEERAGKEEKGEEGEDQGEG EEEETEGRGEEKEEGGEVEGGGEVEEGKGEREEEEEG GEDEEEGEDEEEGEDEEEGEDEEEGEDEEEGEDEEE EGEGEGEEEGEEGEDEEEGEDEEEGEDEEEGEDEEE EGEEEEEDEGKGEDEEEGEDEEEGEDEEEGEDEEE EEEWEGEDEEEGEDEEEGEDEEEGEDEEEGEDEEE EGEGEEEEEDEGEEEGEEGEDEEEGEDEEEGEDEEE VEGEEGEDEEEGEDEEEGEDEEEGEDEEEGEDEEE EEEYGKYQETGEEENERQDGEEYKKVSKIKGSVKYKG HKTYQKKSVTNTQNGKEQRSKMPVQSKRLLKNGPSG SKKFWNNVLPHYLELK	人野生型 RPGR ORF15 氨基酸序列
2	ATGAGGGAGCCGGAAGAGCTGATGCCCGATTCGGGT GCTGTGTTACATTGGAAAAGTAAATTGCTGAAA ATAATCCCGGAAATTCTGGTTAAAAATGATGTCCC TGTACATCTTCATGTGGAGATGAACATTCTGCTGTT GTTACCGGAAATAATAACTTACATGTTGGCAGTA ACAACGGGGTCAGTTAGGATTAGGATCAAAGTCAG CCATCAGCAAGCCAACATGTGTCAAAGCTCTAACAC	编码人 野生型 RPGR ORF15

	CTGAAAAAGTGAATTAGCTGCCGTGGAAGGAACC ACACCCCTGGTGTCAACAGAAGGAGGAATGTATATG CAAAGTGGTGGAAATAATGAAGGACAGTTGGGGCTTG GTGACACCAGAAGAAAGAACACTTTCATGTAATT GCTTTTTACATCCGAGCATAAGATTAAAGCAGCTGTC TGCTGGATCTAATACTTCAGCTGCCCTAACTGAGGAT GGAAGACTTTATGTGGGGTGACAATTCCGAAGGG CAAATTGGTTAAAAATGTAAGTAATGTCTGTGTCC CTCAGCAAGTGACCATTGGGAAACCTGTCTCCTGGAT CTCTTGTGGATATTACCATTTCAGCTTTGTAACAACA GATGGTGAGCTATATGTGTTGGAGAACCTGAGAAT GGGAAGTTAGGTCTTCCAATCAGCTCCTGGCAATC ACAGAACACCCCCAGCTGGTGTCTGAAATTCCGGAGA AGGTGATCCAAGTAGCCTGTGGAGAGCATACTG TGGTTCTCACGGAGAATGCTGTGTATACCTTGGGCT GGGACAATTGGTCAGCTGGGTCTGGCACTTTCTT TTGAAACTTCAGAACCCAAAGTCATTGAGAATATTA GGGATCAAACAATAAGTTATTTCTGTGGAGAAA ATCACACAGCTTGATAACAGATATCGGCCTATGTA TACTTTGGAGATGGTCGCCACGGAAAATTAGGACTT GGACTGGAGAATTTCACCAATCACTTCATTCTACTT TGTGCTCTAATTGGTGTGGCAAAAGAAATTGAATTGATG GCTTGTGGTGGATGTCACATGGTAGTTTGCTGCTC CTCATCGTGGTGTGGCAAAAGAAATTGAATTGATG AAATAAATGATACTTGCTTATCTGTGGCGACTTTCT GCCGTATAGCAGTTAACCTCAGGAATGACTGCA GAGGACTCTACAGCACGTATGCCGGAGAGAGAG GGAGAGGTCTCCAGATTCTTCAATGAGGAGAAC ACTACCTCCAATAGAAGGGACTCTGGCCTTCTGCT TGTTTCTCCCCAATTCACTGCTTCCACGATGTTCTGA GAGAAACCTCCAAGAGAGTGTCTTATCTGAACAGGA CCTCATGCAGCCAGAGGAACCAAGATTATTGCTAGA TGAAATGACCAAAGAACGAGAGATAGATAATTCTTC AACTGTAGAAAGCCTGGAGAAACTACTGATATCTT AAACATGACACACATCATGAGCCTGAATTCAATGA AAAGTCATTAAAATTATCACCAGTTCAAGAACAAAA GAAACAACAAACAATTGGGAACTGACGCAGGATAC AGCTTACTGAAAACGATGATAGTGTGAATATGA AGAAATGTCAGAAATGAAAGAAGGGAAAGCATGTA AACAAACATGTGTACAAGGGATTTCATGACGCAGC CAGCTACGACTATCGAAGCATTTCAGATGAGGAAG TAGAGATCCCAGAGGAGAAGGAAGGGAGCAGAGGAT TCAAAAGGAAATGGAATAGAGGAGCAAGAGGTAGA AGCAAATGAGGAAAATGTGAAGGTGCATGGAGGAA	的核苷酸序列
--	---	--------

GAAAGGAGAAAAACAGAGATCCTATCAGATGACCTTA
CAGACAAAGCAGAGGTGAGTGAAGGCAAGGCAAAA
TCAGTGGGAGAAGCAGAGGATGGGCTGAAGGTTAG
AGGGGATGGAACCTGTGAGGAAGGTAGTTCAGGAGC
AGAACACTGGCAAGATGAGGAGAGGGAGAAGGGGG
AGAAAGACAAGGGTAGAGGAGAAATGGAGAGGCCA
GGAGAGGGAGAGAAGGAAGTACAGAGAGAAGGAAGA
ATGGAAGAAGAGGGATGGGAAGAGCAGGAGCAGGAA
AGGAGAGGGAGCAGGCCATCAGAAGGAAAGAAC
CAAGAGATGGAGGAGGGAGGGAGGAGGAGCATGG
AGAAGGAGAAGAAGAGGAGGGAGACAGAGAAGAG
GAAGAAGAGAAGGAGGGAGAAGGGAAAGAGGAAG
GAGAAGGGGAAGAAGTGGAGGGAGAACGTGAAAAG
GAGGAAGGAGAGAGGAAAAAGGAGGAAAGAGCGG
GGAAGGAGGAGAAAGGAGGAGGAAGAAGGAGGACCAA
GGAGAGGGGAAGAGGGAGGAAACAGAGGGAGAG
GGGAGGAAAAAGAGGGAGGGAGGGAGTAGAGGGAA
GGGAAGTAGAGGAGGGAAAGGAGAGAGGGAGGAAAG
GGAAGAGGAGGAGGGTGGAGGGGAAGAGGGAGGAAG
GGGAGGGGAAGAGGGAGGAAGGGAGGGAGGGAGGAAG
GGAGGAAGGAGAAGGGAAAGGGAGGAAGAAGGGAGGAAG
GAAGAAGGAGAAGGGAGGAAGAAGGGAGGAAGGAGAAG
GAGAAGGGAGGGAGGAAGAGGGAGGAAGGAGAAGGAG
GGAGGGAGAAGAGGAAGGGAGGAAGGGAGGGAGGAAG
GAGGAGGAAGGAGAAGGGAGGGAGGAAGAGGAAG
GAGAAGGGAGGGAGGAAGAGGGAGGAAGGAGAAGGAG
GAAAGGGAGGAGGAAGGAGAGGAAGGAGAAGGAGAAGGG
GAGGGGAAGAGGGAGGAAGGAGAAGGGGAAGGGGGAG
AGGATGGAGAAGGGAGGGAGGGAGGAAGAGGGAGGAAGGA
GAATGGGAGGGGAAGAGGGAGGAAGGAGAAGGAGAAGGG
GGGGGAAGAGGAAGGAGAAGGGGAAGGGGAGGAA
GGAGAAGGGAGGGAGGAAGAGGGAGGAAGGAGAAG
GGGAGGGGAAGAGGGAGGAAGGGGAAGAAGAAGGAG
GGAGGAAGAAGGGAGGAAGGAGGAGGAAGAAGGGAG
GGAGAAGGGAGGAAGAAGAGGAAGGGGAAGTGGAG
AGGGGAGGTGGAAGGGAGGAAGGAGAGGGAGGGAG
GAGAGGAAGAGGAAGGAGAGGGAGGAAGGAGAAGAAG
AAGGGAAAAGGAGGGGAAGGAGAAGAAAACAGG
AGGAACAGAGAAGAGGGAGGAAGAAGAGGGAG
AGTATCAGGAGACAGGCAGAGAAGAGAATGAAAGG
CAGGATGGAGAGGGAGTACAAAAAAAGTGAGCAAAAT
AAAAGGATCTGTGAAATATGGCAACATAAAACATA
TCAAAAAAAAGTCAGTTACTAACACACAGGGAAATGG
GAAAGAGCAGAGGTCCAAAATGCCAGTCCAGTCAGG

	ACGACTTTAAAAAACGGGCCATCAGGTTCCAAAAA GTTCTGGAATAATGTATTACCACATTACTTGGATTG AAGTAA	
3	ATGAGAGAGCCAGAGGAGCTGATGCCAGACAGTGG AGCAGTGTACATTGGAAAATCTAAGTCGCTGAA AATAACCCAGGAAAGTCTGGTTAAAACGACGTG CCCCTCCACCTGTCTTGTGGCGATGAGCATAGTGCCG TGGTCACTGGGAACAATAAGCTGTACATGTTGGGT CCAACAACTGGGGACAGCTGGGGCTGGATCCAAAT CTGCTATCTCTAAGCCAACCTGCCTGAAGGCAGTGA AACCCGAGAAGGTCAAACGGCCGCTTGTGGCAGAA ACCACACTCTGGTGAGCACCGAGGGCGGAATGTCT ATGCCACCGGAGGCAACAATGAGGGACAGCTGGGAC TGGGGACACTGAGGAAAGGAATACCTTCACGTGA TCTCCTCTTACATCTGAGCATAAGATCAAGCAGCT GAGCGCTGGCTCCAACACATCTGCAGCCCTGACTGA GGACGGGCGCCTGTTCATGTGGGAGATAATTAGA GGGCCAGATTGGCTGAAAACGTGAGCAATGTGTG CGTCCCTCAGCAGGTGACCATCGGAAAGCCAGTCAG TTGGATTCATGTGGCTACTATCATAGCGCCTCGTG ACCACAGATGGCGAGCTGTACGTCTTGGGAGCCC GAAAACGGAAAAGTGGCCTGCCTAACCAAGCTGCTG GGCAATCACCGGACACCCAGCTGGTGTCCGAGATC CCTGAAAAAGTGTCCAGGTGCGCTGCAGGGAGAG CATACAGTGGCCTGACTGAGAATGCTGTGTATACCT TCGGACTGGGCCAGTTGGCCAGCTGGGCTGGAA CCTTCCTGTTGAGACATCCGAACCAAAAGTGTACGA GAACATTGCGACCAGACTATCAGCTACATTCCTGC GGAGAGAATCACACCGCACTGATCACAGACATTGGC CTGATGTATACCTTGGCGATGGACGACACGGGAAG CTGGACTGGACTGGAGAACTTCACTAATCATTAA TCCCCACCCGTGTTCTAACTTCCTGCGGTTACCGT GAAACTGGTCGCTTGCAGGGTGTACATGGTGGT CTTCGCTGCACCTCATAGGGCGTGGCTAAGGAGAT CGAATTGACGAGATAACGATACATGCCTGAGCGT GGCAACTTCCTGCCATACAGCTCCCTGACTTCTGGC AATGTGCTGCAGAGAACCTGAGTGCAGGATGCGG AGAAGGGAGAGGGAACGCTCCTGACAGTTCTCA ATGCGACGAACCTGCCACCTATCGAGGGAACACTG GGACTGAGTGCCTGCTTGCCTGCCTAACTCAGTGTTC CACGATGTAGCGAGCGGAATCTGCAGGAGTCTGTCC TGAGTGAGCAGGATCTGATGCAGCCAGAGGAACCCG ACTACCTGCTGGATGAGATGACCAAGGAGGCCAAA TCGACAACCTAGTACAGTGGAGTCCCTGGCGAGA	密码子 优化的 RPGR ORF15 编 码 序列

	CTACCGATATCCTGAATATGACACACATTATGTCACT GAACAGCAATGAGAAGAGTCTGAAACTGTCACCAGT GCAGAACGAGAACAGCAGACTATTGGCGAGCT GAECTCAGGACACCGCCCTGACAGAGAACGACGATAG CGATGAGTATGAGGAAATGTCCGAGATGAAGGAAGG CAAAGCTTGTAAAGCAGCATGTCAGTCAGGGATCTT CATGACACAGCCAGCCACAACATTGAGGCTTTCA GACGAGGAAGTGGAGATCCCCGAGGAAAAAGAGGG CGCAGAACGATTCCAAGGGGAATGGAATTGAGGAACA GGAGGTGGAAGCCAACGAGGAAAATGTGAAAGTCC ACGGAGGCAGGAAGGAGAAAACAGAAATCCTGTCT GACGATCTGACTGACAAGGCCAGGTGTCCGAAGGC AAGGCAAAATCTGTCCGAGAGGCAGAACGACGGACC AGAGGGACGAGGGATGGAACCTGCGAGGAAGGCT CAAGCGGGCTGAGCATTGGCAGGACGAGGAACGA GAGAAGGGCGAAAAGGATAAAGGCCGCGGGGAGAT GGAACGACCTGGAGAGGGCGAAAAAGAGCTGGCAG AGAAGGAGGAATGGAAGAAAAGGGACGGCGAGGAA CAGGAGCAGAAAGAAAGGGAGCAGGGCCACCAAGAA GGAGCGCAACCAGGAGATGGAAGAGGGCGGCGAGG AAGAGCATGGCGAGGGAGAACAGGAAGAGGGCGAT AGAGAAGAGGAAGAGGAAAAGAAGGCGAAGGGGA AGGAGGAAGGAGAGGGCGAGGAAGTGGAAAGGCGAG AGGGAAAAGGAGGAAGGAGAACGGAAGAAAGAGG AAAGAGCCGGCAAAGAGGAAAAGGGCGAGGAAGAG GGCGATCAGGGCGAAGGCGAGGAGGAAGAGACCGA GGGCCGCGGGGAAGAGAAAGAGGAGGGAGGAGAG TGGAGGGCGGAGAGGTGAAAGAGGGAAAGGGCGAG CGCGAAGAGGAAGAGGAAGAGGGCGAGGGCGAGGA AGAAGAGGGCGAGGGGAAGAAAGAGGAGGGAGAG GGCGAAGAGGAAGAGGGAGGGAGGGAAAGGGCGAAGA GGAAGGAGAGGAAGGGAGGGAGAGGAAGAGGG GAGGAGGGCGAGGGGGAAAGGCAGGGAGGAAGAG AGAGGGGAAGGCAGAGAGGAAGGGAGGGAGGGAG GAGAGGAGGAAGAAGGGAGGGAGGAAGAGGAAGGAG GAGGGAGGAAGGAGAGGGAGGGAGGAAGAGGAAGGAG AAGGGAAAGGGCGAGGGAGGAAGGCAGAGAGGGAG GGGAAGGCAGGAAGAGGAAGGGAGGGAGGGAGGAAG AGAGGACGGCGAGGGCGAGGGAGAACAGAGGAGGAAG GGGAATGGGAAGGCAGAGAGGAAGGGAGGGAGGAAG GAAGGCAGAGAACAGAGGGAGGGAGGAAGAGGAAG GGCGAAGGCAGAGAGGGAGGAAGAGGAAGGCAGAG GAGAAGGCAGGAAGAACAGAGGGAGAGGGAGGAAGG GAGGAGGAAGGAGAGGGAGGGAGGAAGAGGAAGGAGAAG	
--	---	--

	GCGAGGGCGAAGAAGAAGAAGAGGGAGAAAGTGGAG GGCGAACGTCGAGGGGGAGGAGGGAGAAGGGGAAGG GGAGGAAGAAGAGGGCGAAGAAGAAGGCAGGGAAA GAGAAAAAGAGGGAGAAGGGCAGGAAAACCGGAGA AATAGGGAAAGAGGAGGAAGAGGAAGAGGGAAAGTA CCAGGAGACAGGCAGAAGAGGAAAACGAGCGGCAGG ATGGCGAGGAATATAAGAAAGTGAGCAAGATCAA GGATCCGTCAAGTACGGCAAGCACAACCTATCAG AAGAAAAGCGTGACCAACACACAGGGGAATGGAAA AGAGCAGAGGAGTAAGATGCCTGTGCAGTCAAAACG GCTGCTGAAGAATGCCCATCTGGAAGTAAAAATT CTGGAACAATGTGCTGCCCACTATCTGGAACTGAA ATAA	
--	--	--