



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110777124 A

(43)申请公布日 2020.02.11

(21)申请号 201911125836.3

A61K 38/44(2006.01)

(22)申请日 2012.10.26

A61K 48/00(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 27/02(2006.01)

61/552,155 2011.10.27 US

(62)分案原申请数据

201280064474.1 2012.10.26

(71)申请人 威尔斯达眼科制剂公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 罗天赐

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限

公司 11127

代理人 丁香兰 庞东成

(51)Int.Cl.

C12N 9/02(2006.01)

权利要求书3页 说明书30页

C12N 15/86(2006.01)

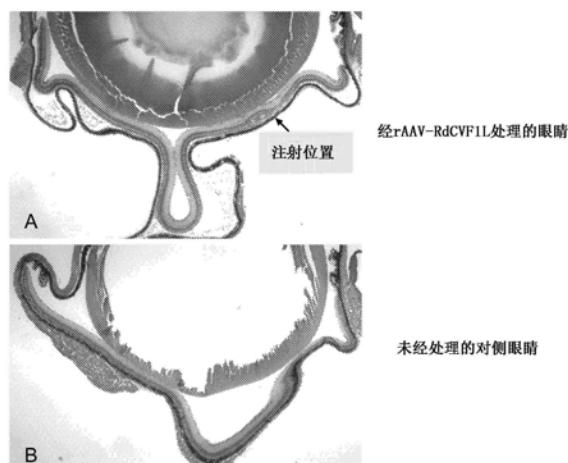
序列表15页 附图9页

(54)发明名称

编码视杆细胞来源的视锥细胞活力因子的载体

(57)摘要

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



1. 一种核酸，所述核酸包含编码RdCVF蛋白的编码序列的核苷酸序列，其中RdCVF编码序列包含重编码核苷酸序列。
2. 如权利要求1所述的核酸，其中，所述RdCVF蛋白是RdCVF1蛋白。
3. 如权利要求1所述的核酸，其中，所述RdCVF蛋白是RdCVF2蛋白。
4. 如上述权利要求中任一项所述的核酸，其中，所述RdCVF蛋白是短版本的RdCVF蛋白。
5. 如权利要求1~3中任一项所述的核酸，其中，所述RdCVF蛋白是长版本的RdCVF蛋白。
6. 如上述权利要求中任一项所述的核酸，其中，所述RdCVF蛋白是人RdCVF蛋白。
7. 如上述权利要求中任一项所述的核酸，其中，所述重编码核苷酸序列缺少起始甲硫氨酸密码子。
8. 如权利要求1所述的核酸，其中，所述RdCVF蛋白的编码序列包含SEQ ID NO:1的106~741位核苷酸、SEQ ID NO:1的106~429位核苷酸、SEQ ID NO:3的106~432位核苷酸或SEQ ID NO:3的106~744位核苷酸。
9. 如上述权利要求中任一项所述的核酸，其中，所述核酸还包含与所述RdCVF蛋白的编码序列可操作地连接的N末端信号序列的第二编码区。
10. 如权利要求9所述的核酸，其中，所述信号序列选自由Igk信号序列、人生长激素(HGH)、脑源性神经营养因子(BDNF)、胰岛素生长因子1(IGF-1)和β-葡糖醛酸糖苷酶(GUSB)组成的组。
11. 如权利要求9所述的核酸，其中，所述信号序列包含SEQ ID NO:1的1~105位核苷酸。
12. 如权利要求9所述的核酸，其中，所述信号序列编码包含SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:2的2~34位氨基酸或SEQ ID NO:2的7~21位氨基酸的氨基酸序列。
13. 如权利要求1所述的核酸，其中，所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1或3。
14. 如权利要求1所述的核酸，其中，所述重编码核苷酸序列的至少40%的密码子经重编码。
15. 如权利要求1所述的核酸，其中，所述重编码核苷酸序列与相应的天然核苷酸序列相比有至少15%的核苷酸不同。
16. 如权利要求1所述的核酸，其中，所述重编码核苷酸序列与相应的天然核苷酸序列具有小于90%的一致性。
17. 如权利要求1~7和9~16中任一项所述的核酸，其中，所述重编码核苷酸序列具有选自由以下特征组成的组中的一个或多个特征：无原核生物(procarya)抑制性基序、无共剪接供体位点、无隐蔽剪接供体位点以及GC含量为60%~65%。
18. 如上述权利要求中任一项所述的核酸，其中，启动子序列与所述RdCVF蛋白的编码序列可操作地连接。
19. 如权利要求18所述的核酸，其中，所述启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子。
20. 如权利要求19所述的核酸，其中，所述CMV启动子包含SEQ ID NO:11的150~812位。
21. 如上述权利要求中任一项所述的核酸，其中，内含子序列与所述RdCVF蛋白的编码序列可操作地连接。
22. 如权利要求21所述的核酸，其中，所述内含子序列是β-珠蛋白内含子序列。
23. 如权利要求21所述的核酸，其中，所述内含子序列包含SEQ ID NO:11的820~1312

位核苷酸。

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

25. 一种病毒载体,所述病毒载体包含上述权利要求中任一项所述的核酸。

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

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

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

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

30. 如权利要求25所述的病毒载体,其中,所述病毒载体不是病毒载体。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

41. 如权利要求38~40中任一项所述的方法,其中,所述哺乳动物是人。

42. 如权利要求38~41中任一项所述的方法,其中,所述哺乳动物罹患选自由以下疾病组成的组中的眼部疾病:视网膜营养不良、斯塔加特氏病、视网膜色素变性、干性年龄相关性黄斑变性(干性AMD)、地图样萎缩(干性AMD的晚期)、湿性年龄相关性黄斑变性(湿性AMD)、青光眼/高眼压症、糖尿病性视网膜病变、巴尔得-别德尔综合征、巴-科综合征、卵黄状黄斑变性、脉络膜瘤、回旋形萎缩、先天性黑朦、雷夫叙姆综合征、乌谢尔综合征、甲状腺相关眼病、格雷夫斯氏病、与视网膜色素上皮细胞相关的疾病、眼前节疾病、晶状体疾病/白

内障、眼杯障碍或葡萄膜炎。

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

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

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

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

47. 如权利要求46所述的方法,其中,所述细胞是哺乳动物细胞。

48. 如权利要求46所述的方法,其中,所述细胞是人细胞。

49. 如权利要求46~48中任一项所述的方法,其中,所述细胞是眼部细胞。

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

51. 如权利要求46~50中任一项所述的方法,其中,所述细胞是体外细胞。

52. 如权利要求46~50中任一项所述的方法,其中,所述细胞是体内细胞。

53. 如权利要求46~50中任一项所述的方法,其中,所述细胞是离体细胞。

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

55. 如权利要求46~54中任一项所述的方法,其中,将所述细胞包封。

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

57. 如权利要求56所述的方法,其中,所述哺乳动物是人。

## 编码视杆细胞来源的视锥细胞活力因子的载体

[0001] 本申请是分案申请,其原申请的国际申请号为PCT/US2012/062106,国际申请日为2012年10月26日,中国国家申请号为201280064474.1,进入中国国家阶段的进入日为2014年06月25日,发明名称为“编码视杆细胞来源的视锥细胞活力因子的载体”。

[0002] 授权信息

[0003] 在美国国家健康研究院的健康与公共服务部资助的SBIR Grant号EY016262之下借助政府支持完成本发明。政府可拥有本发明的某些权利。

### 背景技术

[0004] RdCVF是由视网膜内的视杆感光细胞特异性表达的硫氧还蛋白样蛋白(Léveillard等(2004)Nature Genetics 36:755-759和增补信息)。在人中发现两种不同的RdCVF基因,它们命名为RdCVF1和RdCVF2。两种RdCVF基因都通过选择性剪接编码两种产物:全长蛋白和C末端转录后截短蛋白,分别称为长RdCVF和短RdCVF。

[0005] 短RdCVF据描述为用于促进视锥细胞存活的分泌的营养因子,长RdCVF据描述为与胞内蛋白相互作用的具有氧化还原活性的酶(Léveillard等(2010)Sci Transl Med. 2 (26):26ps16)。例如,tau据描述为RdCVF-L的结合伴侣,并且tau是只在细胞内的(Fridlich等(2009)Molecular&Cellular Proteomics 8 (6):1206-18)。

[0006] 发现罹患某些视网膜营养不良的个体眼中的RdCVF蛋白水平低于未患有视网膜营养不良的个体(PCT公开W002/081513)。

[0007] 已经证明不同形式的RdCVF蛋白可以促进体外和体内的视锥感光细胞存活。例如,短形式的人RdCVF1(RdCVF1S)蛋白的眼内注射不仅挽救视锥细胞免于退化,还在遗传性视网膜退化的动物模型中保护其功能(Yang等(2009)Mol Therapy 17:787-795)。但是,该蛋白对体内视锥细胞的保护效果的证明需要使用多次眼内注射。

[0008] 从基因治疗载体大规模地表达显著水平的RdCVF是一直存在的挑战,例如参见美国专利公开第20110034546号,第[0004]段。

[0009] 本文参考文献的引用或讨论不应解释为承认它们对本发明是现有技术。

### 发明内容

[0010] 本发明部分上涉及编码RdCVF的核酸、RdCVF表达构建体、RdCVF载体、表达RdCVF的方法、减缓、预防或抑制感光细胞(例如视锥细胞和/或视杆细胞)死亡的方法、治疗诸如视网膜营养不良等眼部疾病的方法以及治疗诸如阿尔茨海默氏病和亨廷顿病、帕金森病或嗅觉疾病等神经退行性疾病。

[0011] 本发明提供组合物和用于从细胞表达RdCVF蛋白的方法以及治疗方法。

[0012] 本发明的一些实施方式提供核酸,所述核酸包含编码RdCVF蛋白的编码序列的核苷酸序列,其中所述RdCVF编码序列包含重编码核苷酸序列。

[0013] 本发明还提供病毒载体,所述病毒载体包含核酸,其中所述核酸包含编码RdCVF蛋白的编码序列的核苷酸序列,其中所述RdCVF编码序列包含重编码核苷酸序列。

- [0014] 本发明的一些实施方式涉及分离的细胞,所述分离的细胞包含本发明的核酸。
- [0015] 本发明的其它实施方式涉及由本发明的细胞或本发明的核酸产生的RdCVF蛋白。在一些实施方式中,RdCVF蛋白不是天然存在的RdCVF氨基酸序列。
- [0016] 包括在本发明中的还有药物制剂,所述药物制剂包含(i)药学上可接受的载剂和(ii)本发明的核酸、本发明的病毒载体、本发明的RdCVF蛋白或其组合。
- [0017] 还提供用于生产RdCVF蛋白的方法,所述方法包括在允许所述RdCVF蛋白表达和分泌的条件下培养本发明的细胞,和从所述细胞的培养物中分离所述RdCVF蛋白。
- [0018] 本发明的一些实施方式涉及保护眼视杆细胞(ocular rod cell)的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用本发明的核酸、本发明的病毒载体、本发明的RdCVF蛋白或它们的组合。
- [0019] 本发明还提供治疗疾病的方法,所述疾病例如:视网膜营养不良、斯塔加特氏病(Stargardt's disease)、视网膜色素变性、干性年龄相关性黄斑变性(干性AMD)、地图样萎缩(干性AMD的晚期)、湿性年龄相关性黄斑变性(湿性AMD)、具有或不具有高眼压的青光眼、糖尿病性视网膜病变、巴尔得-别德尔综合征(Bardet-Biedel syndrome)、巴-科综合征(Bassen-Kornzweig syndrome)、卵黄状黄斑变性(Best disease)、脉络膜瘤(choroidema)、回旋形萎缩(gyrate atrophy)、先天性黑朦、雷夫叙姆综合征(refsum syndrome)、乌谢尔综合征、甲状腺相关眼病、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、与视网膜色素上皮细胞相关的疾病、眼前节疾病(anterior segment disease)、晶状体疾病/白内障、眼杯障碍(eye cup disorder)、葡萄膜炎、阿尔茨海默氏病、亨廷顿病、帕金森病或嗅觉疾病。
- [0020] 本发明的一些实施方式涉及保护眼视杆细胞的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用本发明的核酸和/或病毒载体,其中所述核酸和/或病毒载体通过视网膜下注射进行施用,并且在与视网膜下注射的位置不同的位置处保护所述视杆细胞。
- [0021] 本发明的一些实施方式涉及保护眼视锥细胞的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用本发明的核酸和/或病毒载体,其中所述核酸和/或病毒载体通过视网膜下注射进行施用,并且在与视网膜下注射的位置不同的位置处保护所述视锥细胞。
- [0022] 本发明还涉及从细胞中分泌RdCVF蛋白的方法,所述方法包括对所述细胞施用本发明的核酸或病毒载体。
- [0023] RdCVF蛋白可以为RdCVF1或RdCVF2蛋白或者长版本或短版本。
- [0024] 据推测本文所述的任何方法或组合物可以相对于本文所述的任何其它方法或组合物执行。当在权利要求和/或说明书中与术语“包含”一起使用时,单词“一种(a)”或“一个(an)”等的使用可以表示一种(个),但其可以与“一种(个)或多种(个)”、“至少一种(个)”和“一种(个)或多于一种(个)”的意思一致。在与列表一起使用时术语/词组“和/或”表示可以使用所列举项目中的一种或多种,例如,其不限于所述要素中的一个或全部。
- [0025] 该发明内容不必描述本发明的所有特征或必需特征。本发明还可以在于所述特征的亚组合。

## 附图说明

- [0026] 为了说明本发明的目的,在图中描述了本发明的某些实施方式。但是,本发明不限

于附图中所示实施方式的精确排列和手段。

[0027] 图1显示纯化重组AAV-RdCVF1L和AAV-GFP载体颗粒的SDS-PAGE分析。通过SDS-PAGE分离rAAV-GFP制剂(泳道1)和两种rAAV-RdCVF1L制剂(泳道2和3)的蛋白，并且通过银染色分析而可视化。

[0028] 图2显示在经rAAV-RdCVF1L载体转导的ARPE-19细胞中RdCVF1L表达的蛋白印迹分析。通过SDS-PAGE分离rAAV转导的ARPE-19细胞的细胞裂解物(图2A)和上清液(图2B)，并再次对RdCVF1L蛋白进行蛋白印迹。泳道1显示用于对照的未经转导的ARPE-19细胞裂解物(图2A)和上清液(图2B)，泳道2和泳道3分别显示经rAAV-GFP和rAAV-RdCVF1L转导的ARPE-19细胞的细胞裂解物(图2A)和上清液(图2B)。

[0029] 图3显示注射载体6周后通过蛋白印迹确认正常Balb/C小鼠的经rAAV-RdCVF1L注射的眼睛与rAAV-GFP注射的眼睛和未处理眼睛相比RdCVF的表达增加。使用来自经rAAV-RdCVF1L转导的ARPE-19细胞的蛋白提取物作为阳性对照(泳道14和17)，而使用未转导的细胞提取物作为阴性对照(泳道15)。在经rAAV-RdCVF1L注射的眼睛中检测出RdCVF蛋白(泳道6、8、10和12)，而在相同动物的未经处理的对侧眼睛(泳道7、9、11和13)中以及在经rAAV-GFP注射的眼睛中未观察到或仅观察到微弱的对应于RdCVF的条带。泳道1是蛋白标准标志物。泳道16是来自野生型正常小鼠眼睛的蛋白提取物。

[0030] 图4显示在RPE-脉络膜-巩膜平置片(choroid-scleral flatmounts)的RPE细胞中RdCVF的免疫组织化学染色。在载体注射6周后的正常Balb/C小鼠的经rAAV-RdCVF1L注射的眼睛中观察到强健的RdCVF表达(图4A)，但在未经注射的对侧眼睛中未观察到(图4B)。在未经一抗处理的样品中未看到免疫反应性(图4C)。用DAPI对平置片(flatmount)进行复染色从而以蓝色显示细胞核。

[0031] 图5显示神经视网膜平置片的RdCVF1L的免疫组织化学染色。在载体注射6周后在正常Balb/C小鼠的经rAAV-RdCVF1L注射的眼睛中的感光细胞中观察到强健的RdCVF表达(图5A)。大多数染色位于感光细胞的外节中。相反，在未经注射的对侧眼睛中的感光细胞中仅看到背景染色(图5B)。在未经一抗处理的样品中未观察到免疫反应性(图5C)。

[0032] 图6显示证明在rd10小鼠中视网膜下注射AAV-RdCVF1L后5周在RPE和感光细胞中的RdCVF1L表达的研究的结果。在经rAAV-RdCVF1L载体注射的眼睛(A)的约一半的RPE-脉络膜-巩膜平置片中看到表达RdCVF的RPE细胞，而在未注射的对侧眼睛(B)中未看到。感光细胞(C)也被转导因为，在相同眼睛的平置(flat-mounted)视网膜中观察到表达RdCVF的区段。相反，在未经注射的对侧眼睛中未发现RdCVF表达(D)。(D)中的暗绿色细胞可能是附着至视网膜的自体荧光巨噬细胞。保持典型的六角形形态的转导RPE细胞(E)和表达RdCVF的感光区段(F)的高倍放大视图。

[0033] 图7显示在rd10小鼠中通过视网膜下注射AAV-RdCVF1L而挽救的感光体。来自2只小鼠的代表性视网膜切片的光学显微照片，所述小鼠中，右眼在出生后第3天接受rAAV-RdCVF1L(A和C)，左眼(B和D)充当未处理对照。5周大时将rd10小鼠处死。请注意经处理的眼睛(双头箭头)和未经处理的眼睛(单头箭头)之间的外核层(ONL)厚度的差异。在经AAV-RdCVF处理的眼睛(A和C)中存在2~4行，在未经处理的眼睛(B和D)中存在1行。受保护的视网膜的一些区域中保留了感光体内节和外节(E)。IS，内节；OS，外节；ONL，外核层。

[0034] 图8显示了来自代表性5周龄rd10小鼠的眼杯的光学显微照片，所述小鼠的1只眼

睛接受视网膜下注射rAAV-RdCVF1L(小图A,图8),而对侧眼睛不接受处理(小图B,图8)。如所显示的,在经处理的眼睛中保护了更多的感光细胞。

[0035] 图9显示了rAAV-RdCVF1L的有注释的核苷酸序列。

[0036] 图10A:rAAV-RdCVF1L递送改善rd10小鼠中的视网膜功能。在注射rAAV-RdCVF1L约5周后进行ERG。对来自所测试的所有8只小鼠的ERG响应进行的测定显示,来自经处理眼睛的平均b波振幅比未经处理的同组眼(fellow eye)大出约3倍,这具有统计学显著性( $p=0.025$ )。

[0037] 图10B:rAAV-RdCVF1L递送改善rd10小鼠中的视网膜功能。在注射rAAV-RdCVF1L后约5周进行ERG。右图:这些是来自经处理眼睛(黑线, $n=8$ )和未经处理同组眼(红线, $n=8$ )的8个波形的平均值,所述波形在黑暗背景下在 $25\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 强度的单灯闪下进行记录。显然,经处理眼睛具有比同组眼高得多的响应。左图:对来自所测试的所有8只小鼠的ERG响应进行的测定显示,来自经处理眼睛的平均b波振幅比未经处理的同组眼大出约3倍,这具有统计学显著性( $p=0.025$ )。

[0038] 图11A和11B:在rd10小鼠中通过视网膜下注射rAAV-RdCVF1L而进行的感光体保护。来自小鼠的代表性视网膜切片的光学显微照片,所述小鼠中,右眼在出生后第3天接受rAAV-RdCVF1L(A),左眼(B)充当未处理对照。请注意在经处理和未经处理眼睛之间ONL厚度的差异。在经处理眼睛(A)中存在约4行,而在未经处理的眼睛(B)存在1行。感光体外节在受保护视网膜的一些区域中得到保留;onl表示外核层。

[0039] 图12在rd10小鼠中在经rAAV-RdCVF1L处理和未经处理的眼睛中外核层(ONL)的厚度的比较。在经处理眼睛(红条)中ONL的平均厚度显著高于( $P=0.006$ )未处理眼睛中的ONL(黑条)。数值表示平均值+SD。

## 具体实施方式

[0040] 如本文所用,连接术语“包含”是开放式的。使用该术语的权利要求可以包含除了该权利要求中引用要素之外的要素。因此,例如,读起来关于方法的权利要求也包括其中未特别列举的其它步骤,只要存在所列举的要素或它们的等效物。

[0041] 当在比较两个序列(例如核苷酸或氨基酸序列)的情况下使用时术语“同一性”和“同一的”,是指对两个序列进行比对的序列的百分比。百分比同一性可以通过本领域技术人员常用的算法确定。例如,百分比同一性可以使用从美国国家生物技术信息中心(NCBI)的网站上可获得的工具和程序来确定。可以例如使用NCBI/BLAST/blastn套件确定两个核苷酸序列的百分比同一性。可以以下参数组使用Blastn:期望阈值=10;搜索词大小=28;查询区域最多匹配数=0;匹配/错配分数=1,-2;空位罚分=存在空位罚5分,每个延伸罚2分。

[0042] PCT公开W02002/081513、W02008/148860和W02009/146183描述了关于RdCVF的各种组合物和方法。在一些情况下,可以使用涉及PCT公开W02002/081513、W02008/148860和W02009/146183描述的组合物和方法的RdCVF,例如通过将编码RdCVF的核酸、载体或蛋白用本发明的那些(例如,包含野生型RdCVF编码序列的核酸和载体)替换。

[0043] 本发明的一些实施方式提供RdCVF前蛋白氨基酸序列。例如SEQ ID NO:2和4。本发明还提供编码RdCVF前蛋白的核苷酸序列,例如SEQ ID NO:1、3和11。

[0044] 本发明还提供治疗受试对象中的疾病的方法,其中通过对受试对象使用治疗有效量的编码RDCVF1或RdCVF2蛋白的核酸或载体或其相关蛋白或片段或部分,所述疾病受RdCVF1或RdCVF2基因表达的变化(例如,在眼睛中在存在RDCVF1或RDCVF2多肽时下降)介导或与该变化相关。

[0045] 在另一方面,本发明的RdCVF蛋白、核酸、载体或组合物可用于制造例如用于治疗本文列举的疾病的药物。

[0046] 本发明的产品、组合物、工艺和方法可特别用于研究、生物、临床或治疗目的。

[0047] RdCVF

[0048] 已经证明RdCVF蛋白可以促进体外和体内的视锥感光细胞存活。例如,在遗传性视网膜变性的动物模型中人RdCVF1的短形式(RdCVF1S)的眼内注射不仅挽救视锥细胞免于降解,还保护其功能。(Yang等(Mol Therapy (2009) 17: 787-795和增补材料)。RdCVF由数种细胞类型表达,包括视网膜中的视杆感光细胞(Léveillard等(Nature Genetics 36: 755-759)。

[0049] 在人和其它哺乳动物中发现两种不同的RdCVF基因,将它们命名为RdCVF1和RdCVF2。两种RdCVF基因都通过选择性剪接编码两种产物。全长蛋白和C末端截短蛋白,分别称为长RdCVF和短RdCVF。

[0050] 在一些实施方式中,本发明包括重编码RdCVF编码序列。重编码RdCVF编码序列可以编码包括本文描述的任一种RdCVF蛋白在内的任何RdCVF蛋白。各种RdCVF蛋白的序列可在PCT公开号W02002081513和W02010029130;Chalmei等(BMC Molecular Biology (2007) 8: 74pp1-12和增补信息);Léveillard等(NatureGenetics (2004) 36: 755-759和增补信息);Yang等(Mol Therapy (2009) 17: 787-795和增补信息)和GenBank Accession Nos.NP\_612463,AAH14127,Q96CM4,EAW84608,CAD67528,Q5VZ03,NP\_001155097,NP\_660326,CAM24748,CAM14247,AAH22521and CAD67531中发现。(清楚起见,本文讨论的所有这些GenBank序列以及所有其它专利和非专利文献,通过参考并入它们的全部内容)。

[0051] 在一些实施方式中,RdCVF蛋白是保留对视锥细胞和/或视杆细胞的存活活性或保护效果的RdCVF蛋白的片段或类似物。用于测定这些活性或效果的方法是本领域已知的。例如,Léveillard等(Nature Genetics (2004) 36: 755-759和增补信息)描述了相关的小鼠模型和用于测定RdCVF活性的体外方法。由核酸编码的RdCVF蛋白或RdCVF,可以具有除了天然存在的氨基酸序列之外的氨基酸序列。例如,非天然存在的RdCVF蛋白可以含有天然存在的RdCVF蛋白中发现的氨基酸之外的氨基酸(例如在氨基或羧基末端),和/或与天然存在的RdCVF氨基酸序列相比可以含有单个或多个氨基酸取代(例如保守性或非保守性氨基酸取代)。保守性氨基酸取代通常应该不实质上改变亲本序列的结构特性(例如,取代的氨基酸不倾向于破坏亲本序列中存在的螺旋,或干扰表征亲本序列的其它类型的二级结构)。本领域公认的多肽二级结构和三级结构的实例描述于Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton,Ed.,W.H.Freeman and Company,New York (1984));Introduction to Protein Structure(C.Branden and J.Tooze,eds.,Garland Publishing,New York, N.Y. (1991));和Thornton等Nature 354:105 (1991)。保守性取代包括但不限于来自以下组中的取代:酸性残基Asp(D)和Glu(E);碱性残基Lys(K)、Arg(R)和His(H);亲水性不带电残基Ser(S)、Thr(T)、Asn(N)和Gln(Q);脂肪族不带电残基Gly(G)、Ala(A)、Val(V)、Leu(L)和

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

[0052] 重编码RdCVF编码序列

[0053] 术语“重编码”或“重编码核苷酸序列”是指至少一个天然密码子改变为与天然密码子编码相同的氨基酸的不同密码子。在一些实施方式中, 重编码RdCVF的编码区具有重编码的密码子的至少2.5%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少或至少95%。在一些实施方式中, 约20-50%、35-45%、38-42%或39-41%的密码子被重编码。在一些实施方式中, 重编码的密码子被人中更普遍使用的密码子替换。在一些实施方式中, 至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%或至少55%的密码子已经被人中更普遍使用的密码子替换。

[0054] 在一些实施方式中, 重编码序列与相应的天然编码序列具有约70-90%、约75-85%、约80-85%或约82-85%的同一性。在一些实施方式中, 重编码核苷酸序列与相应的天然核苷酸序列相比至少15%的核苷酸不同。在一些实施方式中, 重编码核苷酸序列与相应的天然核苷酸序列具有小于90%的同一性。

[0055] 还可以使用重编码来改变DNA和/或RNA编码序列的化学组成, 例如鸟嘌呤/胞嘧啶(GC)百分比。在一些实施方式中, RdCVF编码区的重编码将GC含量提高至至少60%。在一些实施方式中, 重编码RdCVF的编码区具有60-64%或60.4%-63.5%的GC百分比。

[0056] 使用重编码来改变mRNA的二级结构。还可以使用重编码来从编码序列或核酸分子除去特定的基序, 或向编码序列或核酸分子添加特定的基序, 例如原核生物(procarya)抑制性基序、共有剪接供体位点、隐蔽剪接供体位点或它们的组合。在一些实施方式中, 重编码RdCVF编码序列具有比天然序列更少的原核生物抑制性基序、共有剪接供体位点、隐蔽剪接供体位点或它们的组合。在一些实施方式中, 重编码RdCVF编码序列不含有原核生物抑制性基序、共有剪接供体位点和/或隐蔽剪接供体位点。

[0057] Hoover等(Nucleic Acids Res. (2002) 30:e43, pp1-7); Fath等(PLoS ONE (2011) 6:e17596 pp 1-14); Graf等(J Virol (2000) 74:10822-10826; Raab等Syst Synth Biol (2010) 4:215-225; 和美国专利申请20070141557描述了重编码编码区。

[0058] 在本发明的一些实施方式中, 重编码的RdCVF编码序列不含有起始RdCVF ATG密码子和/或RdCVF终止密码子(例如TAG)。例如, RdCVF重编码编码序列可以5'或3'可操作地连接于另一编码序列, 产生包含分别位于RdCVF氨基酸序列的N末端和/或C-末端的异源氨基酸序列的蛋白。在一些这些实施方式中, 起始RdCVF ATG密码子和/或RdCVF终止密码子可以缺失或存在于RdCVF编码区中。例如, 参见SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3。如果另一编码序列

在RdCVF编码区的3'末端处框内融合，则天然RdCVF终止密码子通常不会存在于RdCVF编码序列的末端。

[0059] 在一些实施方式中，重编码RdCVF编码区包含SEQ ID NO:1的106~741位核苷酸、SEQ ID NO:1的106~429位核苷酸、SEQ ID NO:3的106~432位核苷酸或SEQ ID NO:3的106~744位核苷酸。

[0060] 在一些实施方式中，重编码RdCVF编码区包含编码SEQ ID NO:2的36~246位氨基酸的重编码序列。

[0061] 在一些实施方式中，本发明的编码序列编码含有信号序列的蛋白。

[0062] 信号肽/分泌信号

[0063] 信号序列框内翻译成通常与所选多肽的氨基末端相连的肽。分泌性信号序列会通过与宿主细胞的机制相互作用而引起细胞分泌所述多肽。作为分泌过程的一部分，该分泌性信号序列通常会被切下或至少部分被切下。术语“信号序列”也称为编码信号肽的核酸序列。在一些实施方式中，信号序列与特定RdCVF相比是异源的。

[0064] 典型的信号肽的结构可以包括三个不同的区域：(i) 含有许多带正电的氨基酸(例如赖氨酸和精氨酸)的N末端区域；(ii) 中心疏水性核心区域(h-区)；(iii) 含有被信号肽酶识别的序列基序的亲水性切割区(c-区)。(例如参见 von Heijne, G. (1983) Eur.J.Biochem., 133:17-21; von Heijne, G. (1985) J.Mol.Biol., 184:99-105; von Heijne, G. (1997) Protein Engineering (10):1-6)。可用于本发明的具有信号肽的蛋白的实例包括，但不限于：人生长激素(HGH)、骨成形蛋白7(BMP7)、骨成形蛋白2(BMP2)、睫状神经营养因子(CNTF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、胰岛素生长因子1(IGF-1)、 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶(GUSB)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、肝细胞生长因子(HGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、白血病抑制因子(LIF)、免疫球蛋白、牛生长激素、牛前白蛋白、人前胰岛素、人干扰素 $\gamma$ 、人 $\alpha$ 纤维蛋白原、人IgG重链、大鼠淀粉酶、鼠类 $\alpha$ 胎蛋白、鸡溶菌酶、人胎盘碱性磷酸酶和玉米支配蛋白(Zea mays reein protein)22.1。根据本发明可以使用这些信号肽。在一些实施方式中，根据本发明使用的信号肽选自由HGH、BDNF、IGF-1和GUSB组成的组。在一些实施方式中，信号肽来自诸如IgK等免疫球蛋白。

[0065] 信号序列可以哺乳动物、鼠类或人信号序列。在一些实施方式中，本发明的核酸或载体包含SEQ ID NO:1的1~105位核苷酸或SEQ ID NO:1的4~105位核苷酸。在一些实施方式中，信号序列编码包含SEQ ID NO:2的2~34位氨基酸的氨基酸序列或者包含SEQ ID NO:15。编码信号肽的核苷酸序列可以是野生型序列或者其可以是重编码序列。

[0066] 在本发明的一些实施方式中，信号肽序列编码RdCVF的N末端或C末端。在一些实施方式中，信号肽指导蛋白运送到分泌途径，例如运送至内质网(ER)。在一些实施方式中，信号肽促进蛋白从细胞质运输到细胞外的目的地。信号肽序列可以选自天然存在的信号肽序列、其衍生物或合成设计的序列。在一些实施方式中，设计出的信号肽序列的非限制参数包括3~40残基的序列，其包含3~20位残基的疏水性核心，并侧接数个相对亲水的残基。

[0067] 在一些实施方式中，信号肽序列缺乏疏水性核心。可用于本发明的缺乏典型的疏水性信号序列的哺乳动物分泌性蛋白的非限制性实例包括，但不限于：人IL-1 $\alpha$ 、IL1 $\alpha$ 、bFGF、aFGF、PDEGF、抗凝血蛋白、凝集素L-14、ATL源因子、因子XIIIa、锚连蛋白CII、脂皮质蛋白I、旁胸腺素、 $\alpha$ -前胸腺素和啮齿动物转谷氨酰胺酶、旁胸腺素和MDGI。

[0068] 核酸

[0069] 本发明包括包含编码RdCVF的核苷酸序列的核酸,以及包括包含这些核酸的载体。

[0070] 为了确保局部和/或长期表达目的核酸,本发明的一些实施方式计划用编码RdCVF的核酸或载体对细胞进行转导。本发明不应解释为限于任何具体核酸递送方法,并且使用体内或体外核酸递送策略的任何可利用的核酸递送载体、或操纵细胞的使用(例如the technology of Neurotech,Lincoln,RI,例如参见美国专利第6,231,879、6,262,034、6,264,941、6,303,136、6,322,804、6,436,427、6,878,544号)以及编码RdCVF的本发明的核酸本身(例如“裸DNA”),都可用于本发明的实施。可以与本发明一起使用各种递送载体,例如载体。例如,病毒载体、两性脂质、诸如聚乙烯亚胺(PEI)和聚赖氨酸等阳离子聚合物、诸如梳状分子和星芒状分子等树状高分子、非离子脂质、阴离子脂质、囊泡、脂质体和基因递送的其它合成核酸手段(例如参见美国专利第6,958,325和7,098,030号;Langer,Science 249:1527-1533 (1990);Treat等,in“Liposomes”in“The Therapy of Infectious Disease and Cancer”;和Lopez-Berestein&Fidler (eds.),Liss,New York,第317-327和353-365页(1989);“裸”核酸等可以用于本发明的实施。

[0071] 在一些实施方式中,使用下述核酸分子,所述核酸分子中RdCVF编码序列和任何其它所需序列侧接在基因组的所需位点促进同源重组的区域,由此提供RdCVF核酸的染色体内表达(Koller等,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:8932-8935;Zijlstra等(1989)Nature 342: 435-438)。将核酸递送至患者中可以是直接的,在该情况下患者直接暴露于核酸或携带核酸的载体;或可以是间接的,在该情况下首先将细胞用核酸体外转化,然后将其移植到患者中。

[0072] 载体是通过其将目的核酸(例如治疗性核酸,例如能够编码治疗性蛋白的治疗性核酸)引入目的靶细胞的手段。用于获得或构建目的载体的方法包括,但不限于,本领域已知的标准基因操纵技术、测序反应、限制性酶消化、聚合酶反应、PCR、PCRSOE、连接、重组酶反应(例如Invitrogen's GATEWAY®技术)、作用在核酸上的其它酶活性剂、细菌和病毒增殖材料和方法、化学品和试剂和定点诱变策略等,参见例如Maniatis等的教科书,“Molecular Cloning”。

[0073] 本发明的核酸通常会包含与RdCVF编码序列可操作地连接的启动子序列。启动子可以例如是组织特异性启动子、细胞特异性启动子、诱导性启动子、阻抑启动子、组成性启动子、合成启动子或杂交启动子。用于本发明的构建体的启动子的实例包括,但不限于,可用在本发明的构建体中的启动子的实例包括但不限于噬菌体λ(PL)启动子;SV40早期启动子;单纯疱疹病毒(HSV)启动子;如人CMV即早期启动子等巨细胞病毒(CMV)启动子;具有CMV增强子和鸡β肌动蛋白启动子的杂交启动子;受四环素控制的反式激活应答的启动子(tet)体系;如MoMLV LTR、BIV LTR或HIV LTR等长末端重复序列(LTR)启动子;莫洛尼鼠类肉瘤病毒(Moloney murine sarcoma virus)的U3区启动子;粒酶A(Granzyme A)启动子;金属硫蛋白基因的调节序列;CD34启动子;CD8启动子;胸苷激酶(TK)启动子;B19细小病毒启动子;PGK启动子;糖皮质激素启动子;如HSP65和HSP70启动子等热休克蛋白(HSP)启动子;免疫球蛋白启动子;MMTV启动子;劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子;lac启动子;CaMV 35S启动子;和胭脂氨酸合成酶启动子。在一些实施方式中,启动子是MND启动子(Robbins等,1997,J.Virology 71:9466-9474),或MNC启动子,其是其中LTR增强子与最小CMV启动子组合的MND启

动子的衍生物(Haberman等,J.Virol.74(18):8732-8739,2000)。在一些实施方式中,RdCVF编码序列与包含SEQ ID NO:11的150~812核苷酸序列的启动子序列可操作地连接。

[0074] 在一些实施方式中,本发明的载体或核酸包含与RdCVF蛋白的编码序列可操作地连接的内含子。内含子可以来自RdCVF基因或异源内含子。异源内含子是已知的,并且非限制性实例包括人 $\beta$ -珠蛋白基因内含子和 $\beta$ -肌动蛋白内含子。在一些实施方式中,内含子序列是人 $\beta$ -珠蛋白基因内含子基因。在一些实施方式中,内含子序列包含SEQ ID NO:11的820~1312位核苷酸或SEQ ID NO:11的908~1307位核苷酸。

[0075] 在一些实施方式中,本发明的核酸包含编码RdCVF蛋白的编码序列的核苷酸序列,其中所述RdCVF编码序列包含重编码核苷酸序列。核酸可以编码RdCVF1蛋白和/或RdCVF2蛋白。在一些实施方式中,RdCVF蛋白是短版本的RdCVF蛋白。在一些实施方式中,RdCVF蛋白是长版本的RdCVF蛋白。清楚起见,RdCVF蛋白可以是短RdCVF1、长RdCVF1、短RdCVF2或长RdCVF2。在一些实施方式中,RdCVF蛋白是人RdCVF蛋白。

[0076] 通常哺乳动物的核苷酸编码区以核苷酸序列ATG(起始甲硫氨酸密码子)开始,例如人RdCVF编码区中所发现的。如本文所讨论的,本发明的一些实施方式提供重编码的RdCVF编码区,并且在一些进一步的实施方式中,编码区与诸如信号序列的编码序列等第二编码区框内融合。在一些这些情况下,ATG核苷酸序列不必在RdCVF编码区的起始点,例如RdCVF编码区以编码特定RdCVF蛋白的第二个氨基酸开始。但是,即使当RdCVF编码区与RdCVF编码区的5'的另一编码区可操作地连接时,ATG核苷酸序列也可以在RdCVF编码区的起始点。

[0077] 在一些实施方式中,本发明的核酸包含SEQ ID NO:1、3或11。在一些实施方式中,本发明的核酸包含SEQ ID NO:11的150~812、820~1312和1340~2080位核苷酸。在一些实施方式中,本发明的核酸包含SEQ ID NO:11的150~812、908~1307和1340~2080位核苷酸。在一些实施方式中,核酸还包含SEQ ID NO:11的2130~2608位核苷酸。

[0078] 在一些实施方式中,本发明的核酸包含RdCVF的编码区,其中所述RdCVF编码序列经过重编码。

[0079] 在本发明的一些实施方式中,本发明的核酸位于诸如病毒载体等载体中。

[0080] 病毒载体

[0081] 本发明包括包含本发明的RdCVF编码区的病毒载体。用于本发明的病毒载体的实例描述于PCT公开第W008/106644号和美国专利公开第US20100120665号中。在一些实施方式中,本发明不限于特定的病毒载体。病毒载体包括,但不限于,逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体(参见例如美国专利第7,045,344号)、AAV载体(例如参见美国专利第7,105,345号)、疱疹病毒载体(例如参见美国专利第5,830,727和6,040,172号)、肝炎(例如丁型肝炎)病毒载体(例如参见美国专利第5,225,347号)、SV40载体、EBV载体(例如参见美国专利第6,521,449号)和新城疫病毒载体(例如参见美国专利第6,146,642、7,442,379、7,332,169和6,719,979号)。在一些实施方式中,慢病毒载体是HIV、EIAV、SIV、FIV或BIV载体。在一些实施方式中,载体选自AAV载体或腺病毒载体。本发明还提供产生本发明的病毒载体的细胞。

[0082] 本发明的载体可以体内或体外施用至细胞(例如哺乳动物细胞)。可将载体(病毒性或非病毒性的)用于转导或转化细胞,所述细胞包括但不限于,未分化细胞、分化细胞、体

细胞、原始细胞和/或干细胞。在一些实施方式中，意图将干细胞用于对人施用而不用于移植到适当假孕的女性中以便分化和发育为婴儿。

[0083] 在一些实施方式中，本发明的病毒载体包含衰变加速因子(DAF)。例如，有包膜的病毒载体在病毒膜上包含DAF。在一些实施方式中，DAF是野生型DAF。在一些实施方式中，DAF是具有包膜蛋白的融合蛋白的一部分，例如参见Guibinga等Mol Ther. 2005 11 (4) : 645-51。

[0084] 腺病毒是无包膜的核DNA病毒，具有通常为约36kb的基因组。将人腺病毒分成多种血清型(约47种)，由此进行编号并分类成6组：A、B、C、D、E和F)。

[0085] 重组腺病毒载体具有对分裂细胞和非分裂细胞的趋向性、最小的致病潜力、复制到高滴度以制备载体原液的能力和携带相对大的核苷酸序列插入物的潜力(Berkner, (1992) Curr. Top. Micro. Immunol. 158:39-66; Jolly, (1994) Cancer Gene Therapy 1:51-64)。已经将具有各种腺病毒基因序列的缺失的腺病毒载体设计为用于将核酸递送至细胞的合适载体。在一些实施方式中，本发明的腺病毒载体是依赖于辅助物的或是“无肠”腺病毒。可以使用缺失以下基因中的一个或多个的腺病毒载体：E1a、E1b、E2a、E2b和E3。用于进行基于腺病毒的核酸递送的方法描述于例如美国专利第5,824,544; 5,868,040; 5,871,722; 5,880,102; 5,882,877; 5,885,808; 5,932,210; 5,981,225; 5,994,106; 5,994,132; 5,994,134; 和6,001,557号。

[0086] AAV载体源自单链(ss)DNA细小病毒。单个AAV颗粒可以容纳至多5kb的ssDNA，为转基因和调控元件留出约4.5kb。例如美国专利第6,544,785号中描述的反式剪接系统可以接近两倍于该上限，并且这些类型的载体还可以与本发明一起使用。对于本发明，可以使用基本上任何血清型的AAV。在本发明的一些实施方式中，可以使用AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9血清型(例如参见美国专利第5,173,414; 5,252,479; 5,552,311; 5,658,776; 5,658,785; 5,763,416; 5,773,289; 5,843,742; 5,869,040; 5,942,496; 5,948,675; 6,001,650和7,790,449号；PCT公开第WO2009134681号；Kassim等, PLoS ONE (2010) 5 (10) e13424:1-10; Kotin, Hum Mol Genet (2011) 20 (R1) :R2-6)，尽管本发明不限于这些血清型(参见例如Gao等(2002) PNAS 99:11854-11859；和Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003)。

[0087] 本发明的AAV载体还可以是假型的。假型AAV载体含有在第二AAV血清型的衣壳中的一种AAV血清型的基因组。本发明的AAV载体可以含有突变的衣壳，和/或是重新靶向的。例如，参见Grieger等(Adv Biochem Eng Biotechnol. (2005) 99:119-45)；Gonçalves等(Mol Ther. (2006) 13 (5) :976-86)；和Warrington等(J Virol. (2004) 78 (12) :6595-609)。

[0088] 在本发明的一些实施方式中，使AAV载体包被有诸如反应性聚合物等聚合物，以减少天然趋向性或AAV载体的天然结合；以使AAV载体重新靶向和/或提供对中和抗血清的抗性。例如，参见Carlisle等(J Gene Med. (2008) 10 (4) :400-11)。

[0089] 逆转录病毒是RNA病毒，其中病毒基因组是RNA。当宿主细胞被逆转录病毒感染时，基因组RNA逆转录到DNA中间体中，该DNA中间体被有效地整合至感染细胞的染色体DNA中。慢病毒含有具有调控功能或结构功能的其它基因。用于基因递送的逆转录病毒载体的用途描述于例如美国专利第6,013,516和号美国专利第5,994,136号中。BIV系统的实例例如描述于Matukonis等, 2002Hum. Gene Ther. 13, 1293-1303; Molina等, 2002Virology. 304, 10-

23; Molina等, 2004 Hum. Gene Ther., 15, 65-877; 美国专利第6,864,085, 7,125,712, 7,153, 512号; PCT公开第W008/106644号和美国专利公开第US20100120665号中。

[0090] DNA病毒载体是基于或源自具有DNA类基因组的病毒的病毒载体。无包膜病毒病毒载体是基于或源自缺乏脂质双层膜的病毒的病毒载体。

[0091] 在一些实施方式中,本发明的病毒载体是AAV载体。在一些实施方式中,本发明的病毒载体不是牛免疫缺陷性病毒载体或其不是慢病毒载体。在一些实施方式中,病毒载体选自由DNA病毒载体、无包膜病毒载体和腺病毒载体组成的组。

[0092] RdCVF的细胞递送,包括包封细胞

[0093] 基因治疗或蛋白递送的另一途径包括将基因转移至体外或离体细胞,然后对哺乳动物或患者施用所述细胞。将核酸转移至细胞可以通过任何方法进行,例如转染、显微注射、电穿孔、细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移、原生质球融合、脂质体转染、微粒轰击、磷酸钙介导的转染、病毒载体或噬菌体转导等。可选的是,也可以将可选择性标记引入细胞中。如果采用可选择性标记,则可以将细胞置于选择下,以便例如增强表达和/或分离/选择可表达所转移的编码区的那些细胞(参见例如, Loeffler&Behr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993); Cohen等, Meth. Enzymol. 217: 618-644 (1993); 和 Cline, Pharmac. Ther. 29: 69-92 (1985))。然后可将这细胞直接或在包封后递送至患者。

[0094] 在一些实施方式中,将核酸引入细胞中,然后在体内施用所得到的重组细胞。在一些实施方式中,技术可以对细胞提供稳定的核酸转移,从而使核酸可以被细胞表达,并且一些情况下可以被其细胞子代遗传和表达。可以通过各种方法对患者递送重组细胞。在一些实施方式中,经由可调节、可诱导和/或阻遏性启动子从细胞表达RdCVF蛋白。

[0095] 在一些实施方式中,使用的细胞对患者而言是自体同源的、同种异体的或异源的。在一些实施方式中,可以对自体同源细胞进行操作以使它们含有允许细胞产生或分泌RdCVF蛋白的本发明的核酸,并且将细胞引回患者中。

[0096] 在一些实施方式中,局部(例如关节、玻璃体内、视网膜内、颅内等)或全身(例如静脉内)施用细胞。

[0097] 在一些实施方式中,可以静脉内施用重组血细胞(例如造血干细胞和/或祖细胞)。在一些实施方式中,可以将眼睛细胞和/或多潜能细胞直接注射入眼睛中。

[0098] 根据本发明的一些实施方式,可以使用能够分离并体外保存的干细胞和/或祖细胞。此类干细胞包括但不限于造血干细胞(HSC)、诸如皮肤和内脏内衬等上皮组织的干细胞、胚胎心肌细胞、肝干细胞(参见例如W094/08598)和神经干细胞(例如Stemple and Anderson (1992) Cell 71: 973-985)。在一些实施方式中,所施用的细胞是包含本发明的核酸并且能够表达和分泌RdCVF的干细胞。

[0099] 包封细胞可以允许控制和/或连续体内递送蛋白,例如RdCVF。在一些实施方式中,将包含本发明的核酸并且表达和/或分泌RdCVF的细胞包封。在一些实施方式中,将细胞包封在半透膜内,该半透膜允许RdCVF扩散通过该膜。关于包封细胞和包封细胞植入物的更多信息可在Sieving等(Proc Natl Acad Sci USA, (2006) 103 (10): 3896-901);美国专利第7, 115, 257和7, 820, 195号;和PCT公开第W02011044216号中发现。在本发明的一些实施方式中,对动物递送表达RdCVF蛋白的包封细胞。

[0100] 在一些实施方式中,将包封细胞植入哺乳动物中,例如植入眼睛、脑或嗅区。在一

些实施方式中，包封细胞是视网膜色素上皮细胞，例如ARPE-19(获自ATCC, Manassas, VA)。在一些实施方式中，使用包封细胞来向眼睛，例如眼睛的后部递送RdCVF。

[0101] 在一些实施方式中，本发明的包封细胞植入物由包封在半透性中空纤维膜的节段(section)中的细胞组成，并且所述细胞经过遗传改性以产生RdCVF。在一些实施方式中，包封细胞植入物在一端具有缝合环(suture loop)以将其锚接至眼睛内部的玻璃体视网膜体中的巩膜上。在一些实施方式中，包封细胞植入物的长度为3、4、5、6、7、8、9或10mm。

[0102] RdCVF蛋白分泌和生产

[0103] 可以使用本发明的核酸和病毒载体来从细胞表达、生产和/或分泌RdCVF。该表达、生产和/或分泌可以在体外、体内或离体发生。

[0104] 本发明的一些实施方式提供从细胞分泌RdCVF蛋白的方法，所述方法包括对所述细胞施用本发明的核酸和/或病毒载体。在一些实施方式中，所述细胞可以是哺乳动物细胞、人细胞、眼部细胞(ocular cell)、视网膜色素上皮(RPE)细胞、视杆细胞或视锥细胞。

[0105] 本发明的一些实施方式利用脊椎动物或哺乳动物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例为由由SV40转化的猴肾CVI系(例如，COS-7, ATCC CRL 1651)；人胚胎肾细胞系(例如，包括经亚克隆从而可在悬浮培养物中生长的293或293T细胞系的293或293T细胞，Graham等，J.Gen Virol.36:59 (1977)，如293Freestyle (Invitrogen, Carlsbad, CA) 等)或293FT；幼仓鼠肾细胞(例如，BHK, ATCC CCL 10)；中国仓鼠卵巢细胞；中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(例如，CHO, Urlaub等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216 (1980))；小鼠支持细胞(例如，TM4, Mather, Biol.Reprod.23:243-251 (1980))；猴肾细胞(例如，CVI ATCC CCL 70)；非洲绿猴肾细胞(例如，VERO-76, ATCC CRL-1587)；人类宫颈癌细胞(例如，HELA, ATCC CCL 2)；犬肾细胞(例如，MOCK, ATCC CCL 34)；CF2TH细胞；布法罗大鼠肝细胞(例如，BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人类肺细胞(例如，W138, ATCC CCL 75)；人类肝细胞(例如，Hep G2, HB 8065)；小鼠乳腺肿瘤(例如，MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI细胞(Mather等，Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68 (1983))；MRC 5细胞；ARPE-19细胞(ATCC) 和FS4细胞。

[0106] 在一些实施方式中，细胞选自由293细胞、CHO细胞、PerC6细胞、Vero细胞、BHK细胞、HeLa细胞、COS细胞、MDCK细胞、3T3细胞或WI38组成的组。

[0107] 本发明的一些实施方式提供分离的细胞，所述分离的细胞包含本发明的核酸。在一些实施方式中，核酸被整合至细胞基因组/DNA中。

[0108] 本发明还包括用于生产RdCVF蛋白的方法，所述方法包括在允许RdCVF蛋白表达和分泌的条件下培养细胞和从细胞培养基分离RdCVF蛋白，其中所述细胞包含本发明的核酸，所述核酸编码并允许表达RdCVF蛋白，例如分泌RdCVF蛋白。在一些实施方式中，所述核酸包含含有RdCVF蛋白的编码序列的核苷酸序列，其中所述RdCVF编码序列包含重编码序列。RdCVF蛋白可以是RdCVF 1或2蛋白，或可以是长或短形式。在一些实施方式中，这些方法还包含对来自细胞和/或培养上清液的RdCVF蛋白进行纯化。

[0109] 本发明还包括来自本发明的核酸的通过细胞表达的RdCVF蛋白。本发明还提供本发明的RdCVF蛋白的分泌形式和包含本发明的分泌RdCVF蛋白的组合物。

[0110] 在一些实施方式中，将由细胞表达的RdCVF蛋白纯化至相对于总蛋白的至少90%、至少93%、至少95%、至少98%、至少99.5%或至少99.9%纯度。

[0111] 组合物、制品和制剂

[0112] 本发明的一些实施方式提供含有本发明的核酸、本发明的载体、本发明的RdCVF蛋白或它们的任意组合的组合物、制品和制剂，例如药物组合物。

[0113] 制品(例如用于注射)通常，但不必是活性成分的生物相容性溶液，例如包含汉克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或磷酸盐缓冲盐水。在一些实施方式中，制品或药物组合物包含以下成分中的一种或多种：柠檬酸盐、NaCl、氯化钾(KCl)、二水氯化钙(CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O)、六水氯化镁(MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O)、三水乙酸钠(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na · 3H<sub>2</sub>O)、二水柠檬酸钠(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>O)(例如0.17%)、蔗糖、氢氧化钠和/或盐酸(以调整pH)和水。之前的列表包括作为特定水合物(例如二水合物、三水合物、六水合物等)列出的一些分子。应该理解的是，本发明中可使用这些化合物的各种水合物，并且本发明不限于所列出分子的这些具体水合物形式。在一些实施方式中，制品或药物组合物包含选自由组氨酸、MgCl<sub>2</sub>、海藻糖、聚山梨醇酯、聚山梨醇酯20、NaCl、蔗糖、精氨酸和脯氨酸组成的组中的一种或多种成分。在一些实施方式中，制品包含以下成分中的一种或多种：组氨酸、无水α，α-海藻糖、MgCl<sub>2</sub>、诸如聚山梨醇酯20等聚山梨醇酯和NaCl。在一些实施方式中，制品或药物组合物包含以下成分中的一种或多种：磷酸盐缓冲盐水(PBS)和pluronic F-68。在一些实施方式中，pluronic F-68浓度可以为0.0001%、0.001%、0.005%、0.01%或0.1%。

[0114] 用于所期望施用模式的合适的制品和配制方法的实例可以在Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition, Mack Publishing Co., Easton, PA和美国专利第7,208,577号中发现。

[0115] 在一些实施方式中，用于体内使用的组合物含有“载剂”或药学上可接受的“载剂”。术语“载剂”是指与本发明的核酸、载体或蛋白一起施用的稀释剂、佐剂、赋性剂或运载剂。术语“载剂”包括但不限于包括但不限于固体材料或液体材料，所述固体材料或液体材料可以是无机物或有机物并且可以源自合成或天然，将所述固体材料或液体材料与组合物的活性成分混合或配制以便促进对受试对象的施用。在配制药物中习惯采用的任何其它材料可能是合适的。药物载剂可以不同于典型溶液和悬浮液，其差异在于药物载剂特别为体内使用而制备，从而排除可能对施用以所述组合物的宿主害的物质(例如，除去细菌毒素)。

[0116] 合适的液体载剂的实例包括水和含有含氧有机化合物(例如乙醇)的水性溶液。也可以存在如调味剂和悬浮剂等通常存在于药物制剂中的缓冲液和其它材料。通常，合适的油、盐水、水性右旋糖(葡萄糖)和相关的糖溶液以及诸如丙二醇或乙二醇等二醇通常是合适的胃肠外溶液用载剂。在一些实施方式中，胃肠外施用用溶液含有活性成分的水溶性盐、合适的稳定化剂和需要或必须时的缓冲物质。单独或组合的诸如亚硫酸氢钠、亚硫酸钠或抗坏血酸等抗氧化剂可以用作稳定剂。另外使用的是柠檬酸和其盐以及乙二胺四乙酸钠。此外，胃肠外溶液可以含有防腐剂，例如苯扎氯铵、尼泊金甲酯或尼泊金丙酯以及氯丁醇。

[0117] 载剂可以包括糖类，例如海藻糖、甘露糖、谷胱甘肽、木糖醇、蔗糖、乳糖和山梨糖醇。用于制品的其它成分可以包括，例如DPPC(1,2-二癸酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、DOPE(1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)和DOPC(1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)。可以使用天然或合成的表面活性剂。可以使用聚乙二醇(甚至除了它在衍生化蛋白中的使用外)。可以使用右旋糖苷，例如环糊精。在一些实施方式中，可以使用环糊精、叔胺和/或β-环糊精。可以使用胆汁盐和其它相关增强剂。可以使用纤维素和纤维素衍生物。可以使用氨基

酸,例如将其用于缓冲制剂中。另外,考虑使用脂质体、微囊剂或微球体、包涵复合物或其它类型的载剂。

[0118] 如果需要,组合物还可以含有湿润剂和/或润滑剂,和/或pH缓冲剂。如果需要,组合物还可以包括增溶剂和/或局部麻醉剂(例如利诺卡因),以缓解注射位点的疼痛。

[0119] 在一些实施方式中,本发明的药物制剂或组合物包含(i)药学上可接受的载体和(ii)本发明的核酸、本发明的病毒载体、本发明的RdCVF蛋白或它们的任意组合。

[0120] 施用、递送和治疗

[0121] 应该理解的是,当讨论引入或施用编码RdCVF蛋白的核酸或载体时,本发明还设想引入或施用RdCVF蛋白自身。应该理解的是,当讨论引入RdCVF蛋白时,本发明还设想引入编码RdCVF蛋白的核酸或载体。

[0122] 在一些实施方式中,本发明的组合物可以局部或全身施用。施用的可用途径描述于本发明,并且是本领域已知的。引入或施用的方法包括但不限于:皮内、肌内、腹腔内、静脉内、皮下、鼻内、气管内、局部(topical)、吸入、透皮、直肠、胃肠外途径、硬膜外、颅内、脑内、脑室内(intraventricular)、硬膜下、关节内、鞘内、心内、冠状动脉内、玻璃体内、视网膜下、眼前房内、角膜上局部、结膜下、眼球囊下注射、通过施加滴眼液、口服途径、经气囊导管、经支架或其任何组合。全身施用可以但不限于通过静脉内或动脉内注射或通过透粘膜、皮下、透皮和/或腹膜内递送。

[0123] 在一些实施方式中,例如包括施用至眼睛的实施方式中,约每周、每月、每2个月、每3个月、每6个月、每9个月、每1年、每18个月、每2年、每30个月、每3年、每5年或每10年或按需要施用一次本发明的编码RdCVF的载体或核酸。在一些实施方式中,例如包括施用至眼睛的实施方式中,约每1~4周、约每4~8周、约每1~4个月、约每3~6个月、约每4~8个月、约每6~12个月、约每9~15个月、约每12~18个月、约每15~21个月、约每18~24个月、约每1~2年、约每1.5~3年、约每2~4年、约每3~5年、约每5~7年、约每7~10年或约每10~20年施用本发明的编码RdCVF的载体或核酸。预期编码RdCVF蛋白的载体的施用的频率小于RdCVF蛋白自身的施用。在本发明的一些实施方式中,药物制剂包含编码本发明的RdCVF蛋白的载体,并且将所述药物制剂对患者施用仅一次。

[0124] 在一些实施方式中,通过玻璃体内或视网膜下注射对人类眼睛施用本发明的RdCVF蛋白。在一些实施方式中,通过玻璃体内或视网膜下注射对人类眼睛施用约15 $\mu$ g~约5mg、约15 $\mu$ g~约500 $\mu$ g、约100 $\mu$ g~约900 $\mu$ g、约300 $\mu$ g~约700 $\mu$ g、约500 $\mu$ g~约1mg、约1mg~约5mg、约1mg或约500 $\mu$ g的RdCVF蛋白。

[0125] 在一些实施方式中,通过视网膜下注射或玻璃体内注射编码RdCVF的AAV载体而施用RdCVF蛋白。在一些实施方式中,通过视网膜下注射来施用约 $5 \times 10^8$ ~约 $1 \times 10^9$ 、约 $5 \times 10^8$ ~约 $7.5 \times 10^8$ 、约 $7.5 \times 10^8$ ~约 $1 \times 10^9$ 、约 $6 \times 10^8$ ~约 $9 \times 10^8$ 、约 $7 \times 10^8$ ~约 $8 \times 10^8$ 、约 $5 \times 10^8$ 、约 $6 \times 10^8$ 、约 $7 \times 10^8$ 、约 $8 \times 10^8$ 、约 $9 \times 10^8$ 或约 $1 \times 10^9$ 载体基因组拷贝(GC)数的AAV载体。在一些实施方式中,通过玻璃体内注射来施用约 $5 \times 10^8$ ~约 $1 \times 10^{10}$ 、约 $5 \times 10^8$ ~约 $5 \times 10^9$ 、约 $5 \times 10^8$ ~约 $2 \times 10^9$ 、约 $2 \times 10^9$ ~约 $5 \times 10^9$ 、约 $5 \times 10^9$ ~约 $1 \times 10^{10}$ 、约 $5 \times 10^8$ ~约 $1 \times 10^9$ 、约 $1 \times 10^9$ ~约 $3 \times 10^9$ 、约 $3 \times 10^9$ ~约 $6 \times 10^9$ 、约 $6 \times 10^9$ ~约 $1 \times 10^{10}$ 、约 $1 \times 10^9$ ~约 $1 \times 10^{10}$ 、约 $1 \times 10^{10}$ ~约 $1 \times 10^{11}$ 或 $1 \times 10^{11}$ ~约 $1 \times 10^{12}$ 个GC数的AAV载体。应该理解的是,AAV载体的数量有时以转导单位或以GC数测定。GC数通常是当同一AAV载体样品用转导单位测定时的25~300

倍。

[0126] 在一些实施方式中,可以将消炎剂与本发明的RdCVF蛋白、载体或核酸组合递送。可以在施用本发明的分子或载体之前、同时和/或之后递送消炎剂。在一些实施方式中,可以在与本发明的RdCVF蛋白、核酸或载体相同的溶液和/或相同的注射器中施用消炎剂。在一些实施方式中,对眼睛共施用本发明的RdCVF蛋白、核酸或载体和消炎剂。

[0127] 许多消炎药是本领域已知的,并且包括但不限于:地塞米松、地塞米松间碘基苯甲酸钠、地塞美松磷酸钠、氟米龙、溴芬酸、普拉洛芬、环孢菌素眼用乳剂(例如RESTASIS<sup>TM</sup>)、萘普生、糖皮质激素、酮洛酸、布洛芬、托美汀、非甾体消炎药、甾体消炎药、双氯芬酸、氟比洛芬、吲哚美辛和舒洛芬。

[0128] 本发明的一些实施方式包括既施用RdCVF蛋白和又施用编码其的载体。可以在施用本发明的载体之前、同时和/或之后递送RdCVF蛋白。在一些实施方式中,可以在与本发明的载体相同的溶液和/或相同的注射器中施用RdCVF蛋白。在一些实施方式中,可以对眼睛共施用本发明的载体和RdCVF蛋白。

[0129] 在本发明的一些实施方式中,基因递送系统可以导致RdCVF蛋白的基因或编码区转导和/或稳定整合到靶细胞中。在一些实施方式中,靶细胞是哺乳动物细胞,例如灵长类细胞和人细胞。在一些实施方式中,靶细胞可以是眼睛的细胞,例如视网膜色素上皮细胞、视杆感光细胞、视锥感光细胞、双极细胞、水平细胞、无长突细胞、神经节细胞、视网膜细胞或多潜能细胞。靶细胞可以体外的、离体的或体内的。在一些实施方式中,靶细胞是干细胞。干细胞包括但不限于多潜能干细胞、全能干细胞、造血干细胞、癌干细胞和胚胎干细胞。在一些实施方式中,本文考虑的多潜能干细胞不是用于从受精卵或卵裂球繁殖有生命个体的那些细胞。本发明还设想将部分未分化细胞用于在需要治疗的患者的眼内的植入例如以便使眼细胞再生。

[0130] 本发明还提供治疗方法。在一些实施方式中,本发明提供保护眼视杆细胞(ocular rod cell)的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用本发明的核酸、本发明的病毒载体、本发明的RdCVF蛋白、本发明的药物组合物或它们的组合。在一些实施方式中,通过视网膜下注射、玻璃体内注射、注射到眼睛的前房内、结膜下注射(subconjunctival injection)或眼球囊下注射(subtenon injection)或它们的组合施用本发明的病毒载体和/或核酸。在一些实施方式中,对人进行治疗。在一些实施方式中,要治疗的哺乳动物罹患自由以下组成的组中的眼部疾病:视网膜营养不良、斯塔加特氏病(Stargardt's disease)、视网膜色素变性、干性年龄相关性黄斑变性(干性AMD)、地图样萎缩(干性AMD的高级阶段)、湿性年龄相关性黄斑变性(湿性AMD)、青光眼/高眼压、糖尿病性视网膜病变、巴尔得-别德尔综合征、巴-科综合征、卵黄状黄斑变性、脉络膜瘤、回旋形萎缩、先天性黑朦、雷夫叙姆综合征、乌谢尔综合征、甲状腺相关眼病、格雷夫斯病、与视网膜色素上皮细胞相关的疾病、眼前节疾病、晶状体疾病/白内障、眼杯障碍或葡萄膜炎。在一些实施方式中,受保护的眼视杆细胞不含有本发明的核酸和/或病毒载体。例如,受保护的眼细胞不通过该受保护的眼细胞本身的转导而得到保护。

[0131] 本发明的一些实施方式,提供保护眼视杆细胞的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼睛施用本发明的核酸和/或病毒载体,其中通过视网膜下注射而施用所述核酸和/或病毒载体,并且在离视网膜下注射位置至少1mm、至少2mm、至少3mm、至少5mm、至少7mm、至少

10mm、至少15mm、至少20mm或至少25mm的位置处的视杆细胞和/或视锥细胞得到保护。例如但不希望受理论限制,在视网膜下注射位置用核酸或病毒载体转导的细胞表达和/或分泌长RdCVF和/或短RdCVF蛋白,所述蛋白能够在远离转导细胞或注射位置的位置提供保护眼视杆和/或视锥的效果。

[0132] 除了RdCVF蛋白在眼睛中的表达之外,RdCVF蛋白还在其它组织中天然表达。使用蛋白组方法,发现90种蛋白与包含微管-结合蛋白tau的RdCVFL相互作用(Fridlich等Mol Cell Proteomics (2009) 8 (6) :1206-1218)。Fridlich等证明了TAU的磷酸化水平在Nxn11<sup>-/-</sup>(RdCVF1<sup>-/-</sup>)小鼠的视网膜中增加,因为其在罹患阿尔茨海默氏病的患者脑中超磷酸化,据推测在某些情况下通过氧化胁迫而超磷酸化。Fridlich等还指出RdCVFL抑制TAU磷酸化。Cronin等(Cell Death and Differentiation (2010) 17:1199-1210)发现Nxn11<sup>-/-</sup>(RdCVF1<sup>-/-</sup>)视网膜含有聚集的TAU蛋白,如同在罹患阿尔茨海默氏病的患者脑中发现的那样。

[0133] 缺乏RdCVF2的小鼠的视力和嗅觉受损。正常小鼠在嗅上皮中表达RdCVF2。Jaillard等(ARVO meeting (2009) program#/poster#491/D636)报道发现当在存在RdCVF2下进行培养时嗅神经的存活率更高。Jaillard等还通过进行嗅觉辨别学习试验而比较了RdCVF2<sup>-/-</sup>和对照小鼠。一直到12个月龄,RdCVF2<sup>-/-</sup>小鼠未能对刺激物正确响应。

[0134] RdCVF蛋白具有神经保护活性,并且不仅是视锥细胞和/或视杆细胞的存活因子,还是通用的神经元存活因子。

[0135] 因此综上所述,本发明的编码RdCVF的核酸或病毒载体或者RdCVF蛋白可用于治疗或缓解阿尔茨海默氏病、亨廷顿病、帕金森病和嗅觉疾病。

[0136] 本发明包括治疗疾病的方法,所述方法包括对哺乳动物施用本发明的核酸、本发明的病毒载体、本发明的RdCVF蛋白、本发明药物组合物或它们的组合,其中所述疾病选自由阿尔茨海默氏病、亨廷顿病、帕金森病和嗅觉疾病组成的组。在一些实施方式中,本发明的病毒载体是AAV载体。

#### [0137] 实施例

[0138] 现在参考以下实施例描述本发明。这些实施例仅出于说明目的提供,本发明决不应该解释为限于这些实施例,而是应该解释为包含因本文提供的教导结果而明显的任何变体和所有变体。

[0139] 然而,本文已经出于说明目的描述本发明的具体实施方式,本领域技术人员会意识到的是,无需背离如所附权利要求描述的发明即可进行许多细节的变化。

[0140] 在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请在此通过引用将其全部内容并入说明书中,其程度如同每一篇出版物、专利或专利申请被特别和单独地通过引用并入本文中一样。与任何上述出版物、专利和专利申请一起公布的任何增补信息,也通过参考并入。例如,某些期刊论文与通常可在线获得的增补信息一起公布。

[0141] 实施例1-RdCVF1长形式和短形式的重编码编码序列。

[0142] 设计了重编码人RdCVF1S和RdCVF1L的核苷酸编码区(例如SEQ ID NO:1的106-741位核苷酸、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:3的106-744位核苷酸)。GENEART®(Regensburg,德国)合成了特别是含有RdCVF1S和RdCVF1L的密码子经过优化的核苷酸编码序列的核酸序列。这些编码序列还经重编码以使原核生物抑制性基序、共有剪接供体位点

和隐蔽剪接供体位点等基序最少化。

[0143] 人RdCVF1L编码序列的重编码还提供了重编码RdCVF1S编码区,即在3'端具有终止密码子的SEQ\_ID NO:12的1-327位核苷酸。

### [0144] 天然RdCVF1L编码区与重编码编码区的比对

RdCVF1L (1-639): 同一性 = 529/639 (82.8%) 89/213 密码子不同(41.7%)

RdCVF1S (1-327): 同一性 = 274/327 (83.8%) 44/109 密码子不同(40.4%)

RdCVF1S (1-327 & TGA) 同一性= 277/330 (83.9%) 44/110 密码子不同(40.0%)

ATGGCCTCCCTGTTCTCTGGCCGCATCCTGATCCGAAACAATAGCGACCAGGACGAGCTG 60

ATGGCCAGCCTGTTCAAGCGGCCGGATCTGATCAGGAACAAACAGCGACCAGGACGAGCTG 60

GATACGGAGGCTGAGGTCACTCGCAGGCTGGAGAACCGGCTGGTGCCTGTTCTTTGGT 120

GACACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTGGC 120

[0145]

GCTGGGGCTTGCCACAGTGCCAGGCCTCGTCCCCATCCTCAAGGACTTCTCGTGC GG 180

GCCGGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTCGTCCCCATCCTGAAGGATTCTTGAGG 180

CTCACAGATGAGTTCTATGTACTGCGGGCGGCTCAGCTGGCCCTGGTGTACGTGTCCCCAG 240

CTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAG 240

GA  
CTCCACGGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTCAAGGACATGCCAAAGAAATGGCTTTC 300

GACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTGAAGGACATGCCAAGAAGTGGCTGTC 300

短←→长

CTGCCCCTTGAGGGATGATCTGAGGGAGG↓ GACCTCGGGGCCAGTCTCAGTGGAGCGCCTG 360

CTGCCCTTCGAGGACGACCTGAGAAGA † GACCTGGCAGGCAGTTCAGCGTGGAGAGACTG 360

CCGGCGGTCTGGTGCCTCAAGCCGGACGGGGACGTGCTACTCGCAGGGCGCCGACGAG 420

CCCGCCGTGGTGGTGCAGACGCTGATGGCGACGTGCTGACCAGAGATGGCGCCGACGAG 420

ATCCAGCGCCTGGGCACCGCCTGTTGCCAACTGGCAGGAGGCGGCCGAGGGTGTGGAC 480

1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000

ATCCAGAGACTGGGCACCGCCTGTTGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCCTGGAC 480

[0146]

CGCAACTTCCAGCTGCCAGAGGCACGGAGGACCAAGGAGGCCACGGAGCCTCACCGAGTGC 540

AGAAACTTCCAGCTGCCGAGGATCTGGAGGATCAGGAGCCCCAGATCCCTGACCGAGTGC 540

CTGCGCCGCCACAAGTACCGCGTGGAAAAGGCGGCGCAGGGCGGCGACCCCCGGGGGA 600

CTGAGGGCGGACAAGTACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCAGAGACCCCTGGCGC 600

GGGGGTGGGGAGGAGGGCGGGGCCGGGGGCTGTTCTGA 639 (SEQ ID NO: 7)

GGAGGAGGAGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCTGA 639 (SEQ ID NO: 12)

[0147] 天然RdCVF1L编码序列被重编码成SEQ ID NO:12,除去了2个原核生物抑制性基序、1个共有剪接供体位点和3个隐蔽剪接供体位点,使得这些元件均未留在重编码序列中(SEQ ID NO:12)。重编码还将平均GC含量从65%改变为63%。

[0148] SEQ ID NO:12的1-327位核苷酸还提供不具有诸如TGA等终止密码子的RdCVF1S的重编码编码序列。

### [0149] 天然RdCVF1S编码区与重编码编码区的比对

同一性=278/330(84.2%)

43/110 密码子不同 (39.1%)

ATGGCCTCCCTGTTCTCTGGCGCATCCTGATCCGAAACAATAGCGACCAGGACGAGCTG 60

ATGGCCAGCCTGTT CAGCGGCCGGATCCT GATCAGGAACAAACAGC GACCAGGACGAGCTG 60

GATACGGAGGCTGAGGTCAGTCGCAGGCTGGAGAACCGGGCTGGTGCTGCTGTTCTTGGT 120

GACACCGAGGCCGAAGT GAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTGGC 120

GCTGGGGCTTGTCCACAGTGCCAGGCCTCGTCCCCATCCTCAAGGACTTCTCGTGGG 180

GCCGGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTCGTCCCCATCTGAAGGATTCTTGTGCGG 180

[0150]

CTCACAGATGAGTTCTATGTACTGCGGGCGGCTCAGCTGGCCCTGGTGTACGTGTCCCCAG 240

CTGACCGACGAGTTCTACGTGCTAGAGGCCGCCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAG 240

GA  
CTCCACGGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTCAAGGACATGCCAAGAAATGGCTTTC 300

GACAGCACCAGGGAGCAGCAGGACCTGTTCTGAAGGACATGCCAAGAAGTGGCTGTC 300

CTGCCCTTGAGGATGATCTGAGGAGGTGA 330 (SEQ ID NO: 13)

||||| ||||| ||||| ||| ||||| ||||

CTGCCCTTCGAGGACGACCTGCGGAGATGA 330 (SEQ ID NO: 14)

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

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

### [0153] 质粒克隆

[0154] 通过PCR从GENEART®合成的核酸扩增短形式的RdCVF蛋白的cDNA，并且将其克隆至pSecTag2A质粒(Invitrogen.Catalog No.V900-20)中，所述质粒引入了小鼠Igk信号

肽序列,从而使Igk信号肽DNA序列5开端(prime)定向到RdCVFS编码序列。所得到的质粒称为pAVTrRd034。使用限制性酶消化确认pAVTrRd034的大小和取向。通过PCR从pAVTrRd034扩增Igk-RdCVFS序列,并插入腺相关病毒载体质粒pAAV-MCS (Cell Biolabs, San Diego, CA) 中,形成质粒pAAV-SRd269 (SEQ ID NO:8)。将密码子经过优化的长形式的RdCVF通过PCR扩增,并插入内部(in-house)克隆质粒pAVT001中,形成质粒pAVTLrRd055 (SEQ ID NO:9)。对质粒pAVTLrRd055和pAAV-SRd269用Bg1 II和Stu I进行二重消化。将来自pAAV-SRd269的4.8kb带和来自pAVTLrRd055的540bp带连接,形成含有长RdCVF的重编码编码序列的pAAV-LRd268 (SEQ ID NO:10)。使用限制性酶消化确认pAAV-LRd268的大小和取向。

[0155] 由于短形式和长形式的RdCVF蛋白的N末端序列是同一的,将pAVTrRd034的短RdCVF DNA序列的末端更换为来自质粒pAVTLrRd055的经密码子优化的长RdCVF DNA序列的末端,由此产生rAAV质粒pAAV-LRd268,其含有在AAV-ITR之间的以下特征:

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

[0157] 重组AAV-RdCVF1L和AAV-GFP载体的产生和纯化

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

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

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

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

并用40mL洗涤缓冲液(20mL 5M NaCl, 980mL PBS)进行洗涤。将载体用15mL洗脱缓冲液(80mL 5M NaCl, 920mL PBS)洗脱，并收集在新的50mL锥形管中。

[0162] 载体通过离心过滤来浓缩。将Amicon Ultra-15离心过滤器(Millipore,Catalog No.UFC910024)用PBS冲洗1次，并将洗脱的样品添加至该装置。在Beckman Allegro 6KR离心机中以2,200rpm,22°C进行离心，直到样品浓缩至1mL~2mL体积。添加15mL体积的PBS，重复进行离心，直到样品体积≤1mL。收集所纯化的载体，并用100μL的PBS冲洗过滤器壁。将样品混合，并将载体的30μL等分试样于-80°C贮存在600μL锥形管中，直到使用。

[0163] 重复该过程从而纯化rAAV-GFP载体。

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

[0165] 经纯化重组AAV载体的基因组滴度检验

[0166] 为了测定经纯化的rAAV-RdCVF1L和rAAV-GFP载体的基因组滴度，将5μL的合适载体与5μL 10X DNA酶缓冲液,1μL DNA酶I (Roche,Catalog No.04716728001) 和水混合，总体积为50μL。在37°C温育30分钟后，通过在65°C温育10分钟而使酶失活。添加蛋白酶K (0.5μL) (Roche,Catalog No.03115887001)。将样品短暂地混合，并在50°C温育60分钟。通过95°C持续20分钟使蛋白酶K失活。平行地，使用掺入对照(spike control)，该对照中在反应中添加5μL掺入标准物(spike standard) (2x10<sup>9</sup>来自pAAV-GFP的单链DNA)。在BioRad PCR热循环仪中使用8联平盖条(8-flat cap strip)，在不带有盖的0.2ml的8联管条(Biorad,Catalog No.TBS-0201)中进行这些反应。

[0167] 建立了用于qPCR的主混合液(master mix)，其含有825μL水、1.875μL iQ SYBR Green Supermix (BioRad,Catalog No.170-8882) 和337.5μL各引物(QPCR CMV 1 (SEQ ID NO:5) 和QPCR CMV 2 (SEQ ID NO:6))。向96孔PCR板的每孔中添加45μL体积的所述混合液，并添加5μL的经消化载体、掺入经消化载体(spike digested vector)、未经消化载体(5μL经纯化载体以及40μL水和5μL DNA酶缓冲液)、未经消化掺入载体(undigested spiked vector) (5μL经纯化载体以及35μL水、5μL DNA酶缓冲液和5μL掺入标准物)中的任一种并进行混合。进行PCR过程，并且使用来自第3个循环的样品来进行熔融曲线分析。

[0168] 通过如上所述的定量PCR对这些单链DNA基因组的浓度进行分析。rAAV-RdCVF1L载体颗粒的浓度确定为每毫升2x10<sup>11</sup>个载体基因组拷贝(GC/mL，并且rAAV-GFP载体颗粒的浓度确定为2x10<sup>11</sup> GC/mL。

[0169] 经纯化重组AAV载体的银染色

[0170] 为了检查经纯化rAAV-RdCVF1L和rAAV-GFP载体的纯度，以银染色分析对载体裂解物进行SDS-PAGE。具体而言，向20μL各经纯化的重组AAV载体添加20μL裂解缓冲液(8.4mL water, 500μL 1M Tris (pH 8.0)、1mL甘油、300μL 5M NaCl、50μL NP-40、40μL EDTA、100μL PMSF、1片蛋白酶抑制剂(Roche,Catalog No.11836170001))，并保持在冰上20分钟。在台式离心机中以13,000rpm于4°C将反应液离心2分钟。将上清液转移至新管中，添加10μL的5x还原样品缓冲液(Pierce,Catalog No.39000)，并将样品在95°C温育10分钟。

[0171] 根据制造商说明书进行电泳。将4~15% SDS-PAGE凝胶用水冲洗，并放入凝胶室中。向上和下缓冲室添加运行缓冲液(通过用水稀释10X Tris/甘氨酸/SDS运行缓冲液(BioRad,Catalog No.161-0732)而制成的1X Tris/甘氨酸/SDS)。将孔用200μL运行缓冲液冲洗两次，加载样品。作为对照，向外部孔添加1μL体积的BENCHMARK<sup>TM</sup>蛋白梯度物

(Invitrogen, Catalog No.10747-012)。通过基因组滴度分析而确定,加载相同浓度的载体。在200V跑凝胶,直到染料到达凝胶底部。将凝胶固定,并根据制造商说明书进行银染色(Biorad Silver Stain Plus,Catalog No.161-0449)。

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

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

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

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

[0176] 转导后2天,收获来自经转导和未经转导细胞的上清液,并通过0.45μm过滤器对其进行过滤。添加相等体积的裂解缓冲液(9.4mL水、200μL 1M Tris(pH 8.0)、40μL 0.5M EDTA、300μL 5M NaCl、100μL NP-40、100μL PMSF、1片蛋白酶抑制剂),并于-80℃贮存直到使用。将来自各板的细胞用PBS洗涤,使用细胞铲刮下,汇集并转移到15mL锥形管中。在Beckman Coulter Allegra 6KR离心机中将细胞在1,200rpm下于4℃离心4分钟,弃去上清液。将细胞团再悬浮于1mL裂解缓冲液(参见上述)中,转移至1.5mL管中,在冰上温育10分钟。在台式离心机中以13,000rpm于4℃将细胞裂解物离心2分钟。在1.5mL管中将清澈的细胞裂解物等分成200μL体积,于-80℃贮存直到使用。

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

[0178] 通过标准技术,利用4-20% SDS-PAGE凝胶通过蛋白印迹分析检测RdCVF1L表达。作为对照,向外部孔添加5μL体积的MAGICMARK™ XP标准品(Invitrogen, Catalog No.LC5602)。在200V跑凝胶,直到染料到达凝胶底部。使用Vector Laboratories的Vectastain ABC-Amp蛋白印迹分析试剂盒根据制造商说明的改良版本进行蛋白印迹分析。将SDS-PAGE在转移缓冲液中平衡20分钟,利用Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell在20V将通过SDS-PAGE分离的蛋白转印到硝酸纤维素膜上40分钟。一旦完成转印,在摇臂平台上随着轻度振荡将膜在200mL的1X酪蛋白溶液中封闭,对于上清液在室温(RT)封闭至少2小时,对于细胞裂解物则在4℃温育过夜,再加上在室温温育1小时。随着轻度振荡,将膜与50mL在1X酪蛋白缓冲液中稀释1:2,000(上清液)或1:10,000(细胞裂解物)的兔抗-RdCVF蛋白特异性单克隆抗体(一抗,由Covance(Denver, PA)利用在大肠杆菌中制造的经纯化的His-TagRdCVF1L蛋白(Protein One, Rockville, MD))一起分别于4℃温育过夜,或于室温温育2小时。在室温于温和振荡下将所述膜在30mL的1X酪蛋白溶液中洗涤4次,每次5分钟。随着轻度振荡,将膜与30mL的在1X酪蛋白缓冲液中稀释1:24,000的生物素化羊抗兔IgG(二抗)在室温一起温育1小时。在室温于温和搅拌下将所述膜在30mL的1X酪蛋白溶液中洗涤3次,每次5分钟。将膜在50mL含有100μL的试剂A和100μL的试剂B的1X酪蛋白中于Vectastain

ABC-AmP内温育45分钟。在室温于温和搅拌下将所述膜在30mL的1X酪蛋白溶液中洗涤3次，每次5分钟。

[0179] 将膜在pH 9.5的Tris中温育。使用6mL的Duolox Substrate (Vector Laboratories, Catalog No.SK 6605) 并将膜暴露至胶卷盒中的Kodak BioMax MS X射线膜 (Kodak Carestream Health, Catalog No.8572786) 10秒钟~5分钟, 然后使用柯达显影液和柯达定影液 (Kodak GBX, Catalog No.1900984) 进行显影, 从而获得化学发光信号。

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

#### [0181] 总结

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

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

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

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

#### [0186] 表1:实验设计

	小鼠(BALB/c)	眼睛	视网膜下注射	评价
[0187]	N=7	右眼(OD)	rAAV-RdCVF1L	蛋白印迹免疫组织化学分析
		左眼(OS)	无	
	N=7	双眼(OU)	rAAV-GFP	

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

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

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

[0190] 蛋白印迹分析

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

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

[0193] RdCVF1L蛋白的存在在接受rAAV-RdCVF1L注射的眼睛中被清楚地检测为分子尺寸为约30kDa的明显的两条免疫反应性带(图3)。充当阳性对照的来自用rAAV-RdCVF1L转导的ARPE-19细胞的细胞裂解物的蛋白印迹,也产生了相同尺寸的2条单独的蛋白带。来自未接受视网膜下注射的对侧眼睛或来自用rAAV-GFP注射的眼睛的蛋白提取物,都没有产生与由

抗-RdCVFL抗体所检测类似的蛋白带(图3)。两条免疫反应性带与在由rAAV-RdCVF1L转导的ARPE-19细胞中体外观察到的两条带类似。第三条带(可能是RdCVF1L的分泌形式)不存在的原因是这些体内样品是来自视网膜细胞的蛋白提取物。

[0194] 免疫组织化学分析

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

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

[0197] 小鼠眼睛中的GFP表达

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

[0199] 总结

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

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

[0202] 该研究的目的在于确定编码RdCVF1L的基于AAV的基因治疗载体的视网膜下施用

是否能够促进rd10小鼠中的感光体存活,所述rd10小鼠为人遗传视网膜变性的天然存在的动物模型。rd10小鼠为天然存在的用于常染色体隐性视网膜色素变性(RP)的动物模型。Rd10小鼠在视杆细胞cGMP磷酸二酯酶基因中具有错义点突变,导致感光细胞的凋亡(Chang等(2007) Vision Res 47:624-633)。视杆感光细胞在18天龄时开始变性,峰值感光体死亡出现在P25(Gargini等(2007) J Comp Neurol 500:222-238)。到5周大多数感光细胞已经变性(Chang等(2002) Vision Res 42:517-525; Chang等(2007) Vision Res 47:624-633; Gargini等(2007) J Comp Neurol 500:222-238)。令人感兴趣的是,已经发现在黑暗中饲养rd10小鼠延缓了感光体变性,最多达4周(Chang等(2007) Vision Res 47:624-633),表明光照射可以促进感光体死亡。另一方面,通过将这些小鼠保持在黑暗中而延迟的感光体变性能够将载体需要的治疗性时间窗延长至治疗性转基因表达的时间,例如来自AAV的足够转基因表达通常需要约3周。

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

[0204] 表2:实验设计

	小鼠(rd10)	眼睛	视网膜下注射	评价
[0205] N=12	OD		rAAV-RdCVF1L	视网膜组织
			无	视锥细胞形态/数量

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

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

[0208] 视网膜组织学

[0209] 将小鼠深度麻醉,并将它们的眼睛在上象限用红色组织染料标记以便定向。然后将它们处死,并立即摘出眼睛并在室温固定于Davidson氏固定剂中约24小时。在乙醇和Clear-rite中连续脱水后,将眼睛包埋在石蜡中(Fisher Sci., Houston, TX)。沿着中央经线切成5μm厚度的视网膜切片,以允许检查上下视网膜。将切片用苏木精和曙红染色,并在

光学显微镜(Olympus BX51)下观察。外核层(ONL)厚度通过对中央和外周视网膜中的核的行数进行计数而进行评价。还检查了感光体形态。

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

[0211] 视锥细胞感光体染色和计数

[0212] 使用花生凝集素(PNA)(一种视锥细胞特异性标记物)来将视网膜的整装制片(wholemount preparation)染色。在摘出之前将小鼠眼睛在角膜的上象限用印度墨标记,并在颞侧象限(temporal quadrant)处用红色染料染色。立即将它们于4°C在4%多聚甲醛中固定至少过夜。通过在莱卡解剖显微镜下除去前节而制备眼杯。在上方象限(superior quadrant)制备小切口以用于定向。沿着外周进行4次径切后,将整个视神经视网膜仔细地从眼杯剖下。用1X PBS将视网膜冲洗3次,用具有0.2% Triton-X 100的PBS(Gibco,Cat.No.10010-031)中的6%的胎牛血清(BSA)溶液在室温封闭30分钟。除去封闭液后,使视网膜与凝集素PNA缀合物Alexa Fluor 594(在PBS中1:250,Invitrogen Corp,Chicago,IL)一起于4°C温育过夜。用PBS最后冲洗后,将各视网膜平铺在载玻片上,感光体朝上。然后用配备有数码相机(Spot RT Color 2.2.1,Diagnostic Instruments,Inc)和萤光显微镜的奥林巴斯BX51显微镜对视网膜整装制片进行检查。

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

[0214] 对于一些眼睛,用莱卡低温切片机(Leica Microsystems,Model CM 1850,Leica,Bannockburn,IL)切割视网膜冷冻切片(12 $\mu$ m厚度),并用PNA染色,用前述萤光显微镜进行检查。

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

[0216] RdCVF免疫组织化学

[0217] 在神经视网膜和RPE-脉络膜-巩膜的整装制片中进行RdCVF免疫染色。用1XPBS将整装制片冲洗3次,在室温用在PBS溶液中5%驴血清和2%Triton X-100封闭2小时。在除去封闭液后,将整装制片与在封闭液中1:1,000的一抗即兔抗-RdCVF于4°C一起温育过夜,并

连续与在PBS中二抗即1:1,000的Alexa Fluor® 488驴抗兔和2% Triton X-100在室温下一起温育2小时。用PBS最后冲洗后,将各整装制片用平铺在载玻片上,对于视神经视网膜而言感光体朝上,对于RPE-脉络膜-巩膜而言RPE朝上。然后用配备有数码相机(Spot RT Color 2.2.1, Diagnostic Instruments, Inc)和萤光显微镜的奥林巴斯BX51显微镜对平置片进行检查。

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

[0219] 总结

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

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

[0222] 为了检查rAAV-RdCVF1L挽救感光细胞是否能够延伸至远离注射位置的区域,在出生后3天将rAAV-RdCVF1L(1μL, 2x10<sup>8</sup> GC)视网膜下注射到rd10小鼠右眼的上象限中,使用未注射对侧眼睛作为对照。在5周时将小鼠处死。检查整个眼杯的视网膜组织学。图8显示了来自代表性5周大rd10小鼠的眼杯的光学显微照片,所述小鼠在1只眼睛接受视网膜下注射rAAV-RdCVF1L(小图A,图8),而对侧眼睛不接受处理(小图B,图8)。请注意在经处理和未经处理眼睛之间ONL厚度的差异。在经rAAV-RdCVF1L处理的眼睛的整个视网膜中清楚地观察到感光体保护(小图A,图8)。对上视网膜的注射位点进行标记。与之相反,在未经处理的对侧眼睛中大多数感光细胞丢失,除了在下部外周视网膜中之外(小图B,图8)。

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

[0224] 为了检查rAAV-RdCVF1L是否可以挽救视杆感光细胞(除了视锥感光细胞之外),在出生后第3天对rd10小鼠的右眼视网膜下注射rAAV-RdCVF1L(1μL, 2x10<sup>8</sup> GC),以未经注射的对侧眼睛作为对照。在5周时将小鼠处死。对视网膜组织进行视紫质免疫组织化学染色。用DAPI(二脒基-2-苯基吲哚,蓝色)对切片进行复染色,以帮助鉴定视网膜层。

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

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

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

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

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

[0230] 表3

	小鼠(rd10)	眼睛	视网膜下注射	评价
[0231] N=13		OD	rAAV-RdCVF1L	ERG 视网膜组织学
		OS	无	

[0232] 将动物麻醉,并如上实施例4中所述进行视网膜下注射。

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

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

[0235] 结果

[0236] 经rAAV-RdCVF1L处理的眼睛中视网膜功能的挽救

[0237] 如所预期的,在5周龄时,与年龄匹配的野生型C57BL/6小鼠相比,rd10小鼠在ERG记录中显示暗适应(scotopic)和光适应(photopic)响应的显著减少。但是,在rd10小鼠(n=8)中,在暗适应背景下在闪光强度为25cd时,与未经处理的同组眼相比( $11.5 \pm 8.4 \mu\text{V}$ ),用rAAV-RdCVF1L处理的眼睛显示了b-波振幅增加约3倍( $33.6 \pm 14 \mu\text{V}$ ) (图10A和10B)。在该条件下,记录了视杆细胞和视锥细胞响应。统计分析显示在经rAAV-RdCVF1L处理的眼睛和

对照眼睛中ERG振幅的显著差异 ( $p=0.025$ )。由于可能在新生阶段的眼内手术导致的角膜混浊、白内障或小眼球,将一些动物 ( $n=5$ ) 从ERG测试中排除(在ERG测试前排除)。

[0238] 经rAAV-RdCVF1L处理的眼睛中感光体的结构保护

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

[0240] 总结

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

## 序列表

<110> 威尔斯达眼科制剂公司  
<120> 编码视杆细胞来源的视锥细胞活力因子的载体  
<130> WO2012/018PCT  
<140> PCT/US2012/062106  
<141> 2012-10-26  
<150> US 61/552,155  
<151> 2011-10-27  
<160> 15  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 741  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> Igk信号肽序列和重编码的rdCVF1L编码序列  
(-ATG)  
<400> 1  
atggagacag acacactcct gctatggta ctgctgctct gggttccagg ttccactgg 60  
gacgcggccc agccggccag gcgcgccgt a cgaagcttgg tacccgccag cctgttcagc 120  
ggccggatcc t gatcaggaa caacagcgac caggacgagc tggacaccga ggccgaagt 180  
agcaggaggc tggagaacag actggtgctg ctgttcttg gcgcggagc ctgcctcag 240  
tgccaggcct tcgtgccat cctgaaggat ttctttgtga ggctgaccga cgagttctac 300  
gtgctgagag ccgcggcact ggccctggc tatgtgagcc aggacagcac cgaggaggc 360  
caggacctgt tcctgaagga catgccaag aagtggctgt tcctgccctt cgaggacgac 420  
ctgagaagag acctggcag gcagttcagc gtggagagac tgccgcgt ggtggcgt 480  
aagcctgatg gcgcgtgt gaccagagat ggccgcgacg agatccagag actggcacc 540  
gcctgcttcg ccaactggca ggaggccgc gaggtcctgg acagaaactt ccagctgcc 600  
gaggatctgg aggtcagga gcccagatcc ctgaccgagt gcctgaggcg gcacaagtac 660  
agagtggaga aggccgcag aggccgcaga gaccctggcg gcggaggagg agaggaggc 720  
ggagccggcg gactgttctg a 741  
<210> 2  
<211> 246  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 重编码的RdCVF1L, 具有Igk信号肽序列 (-Met)  
<400> 2

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Val Arg Ser  
 20 25 30  
 Leu Val Pro Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn  
 35 40 45  
 Ser Asp Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu  
 50 55 60  
 Glu Asn Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln  
 65 70 75 80  
 Cys Gln Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr  
 85 90 95  
 Asp Glu Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val  
 100 105 110  
 Ser Gln Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met  
 115 120 125  
 Pro Lys Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg Asp  
 130 135 140  
 Leu Gly Arg Gln Phe Ser Val Glu Arg Leu Pro Ala Val Val Leu  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Asp Gly Asp Val Leu Thr Arg Asp Gly Ala Asp Glu Ile Gln  
 165 170 175  
 Arg Leu Gly Thr Ala Cys Phe Ala Asn Trp Gln Glu Ala Ala Glu Val  
 180 185 190  
 Leu Asp Arg Asn Phe Gln Leu Pro Glu Asp Leu Glu Asp Gln Glu Pro  
 195 200 205  
 Arg Ser Leu Thr Glu Cys Leu Arg Arg His Lys Tyr Arg Val Glu Lys  
 210 215 220  
 Ala Ala Arg Gly Gly Arg Asp Pro Gly Gly Gly Gly Glu Glu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Gly Gly Leu Phe  
 245  
 <210> 3  
 <211> 744  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Igk信号肽序列和重编码的RdCVF1L编码序列  
 (+ATG)

&lt;400&gt; 3

atggagacag acacactcct gctatggta ctgctgtct gggttccagg ttccactgg 60  
 gacgcggccc agccggccag gcgcgccgt acaagcttgg tacccatggc cagcctgttc 120  
 agcggccgga tcctgatcg aacaacagc gaccaggacg agctggacac cgaggccgaa 180  
 gtgagcagga ggctggagaa cagactggtg ctgctgttct ttggcgcgg agcctgcct 240  
 cagtgccagg cttcgtgcc catcctaag gatttcttg tgaggctgac cgacgagttc 300  
 tacgtgctga gagccgccta gctggccctg gtgtatgtga gccaggacag caccgaggag 360  
 cagcaggacc tttcgtgaa ggacatgccc aagaagtggc tttcgtgcc cttcgaggac 420  
 gacctgagaa gagacctggg caggcagttc agcgtggaga gactgcccgc cgtgggttg 480  
 ctgaagcctg atggcgacgt gctgaccaga gatggcgcgg acgagatcca gagactggc 540  
 accgcctgct tcgccaactg gcaggaggcc gccgagggtcc tggacagaaa cttccagctg 600  
 cccgaggatc tggaggatca ggagcccaga tccctgaccg agtgcctgag gcggcacaag 660  
 tacagagtgg agaaggccgc cagaggcggc agagaccctg gcggcggagg aggagaggag 720  
 ggcggagccg gcggactgtt ctga 744

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 247

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重编码的RdCVF1L,具有Igk信号肽序列 (+Met)

&lt;400&gt; 4

Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
1															15
Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Val	Arg	Ser
															30
Leu	Val	Pro	Met	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Gly	Arg	Ile	Leu	Ile	Arg	Asn
															45
Asn	Ser	Asp	Gln	Asp	Glu	Leu	Asp	Thr	Glu	Ala	Glu	Val	Ser	Arg	Arg
															60
Leu	Glu	Asn	Arg	Leu	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Gly	Ala	Gly	Ala	Cys	Pro
															80
Gln	Cys	Gln	Ala	Phe	Val	Pro	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Phe	Val	Arg	Leu
															95
Thr	Asp	Glu	Phe	Tyr	Val	Leu	Arg	Ala	Ala	Gln	Leu	Ala	Leu	Tyr	
															110
Val	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Glu	Glu	Gln	Gln	Asp	Leu	Phe	Leu	Lys	Asp
															125
Met	Pro	Lys	Lys	Trp	Leu	Phe	Leu	Pro	Phe	Glu	Asp	Asp	Leu	Arg	Arg
															140
130															

Asp Leu Gly Arg Gln Phe Ser Val Glu Arg Leu Pro Ala Val Val Val  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Pro Asp Gly Asp Val Leu Thr Arg Asp Gly Ala Asp Glu Ile  
 165 170 175  
 Gln Arg Leu Gly Thr Ala Cys Phe Ala Asn Trp Gln Glu Ala Ala Glu  
 180 185 190  
 Val Leu Asp Arg Asn Phe Gln Leu Pro Glu Asp Leu Glu Asp Gln Glu  
 195 200 205  
 Pro Arg Ser Leu Thr Glu Cys Leu Arg Arg His Lys Tyr Arg Val Glu  
 210 215 220  
 Lys Ala Ala Arg Gly Gly Arg Asp Pro Gly Gly Gly Gly Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Ala Gly Gly Leu Phe  
 245  
 <210> 5  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引物  
 <400> 5  
 ggccggagttg ttacgacat 19  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引物  
 <400> 6  
 gggactttcc tacttggca 19  
 <210> 7  
 <211> 639  
 <212> DNA  
 <213> 智人  
 <400> 7  
 atggcctccc tggctctgg ccgcattctg atccgcaaca atagcgacca ggacgagctg 60  
 gatacggagg ctgaggttag tcgcaggctg gagaaccggc tggtgctgt gttcttttgt 120  
 gctggggctt gtccacagtg ccaggccttc gtgcccatcc tcaaggactt cttcgtgcgg 180  
 ctcacagatg agttctatgt actgcggcgc gctcagctgg ccctgggtta cgtgtcccg 240

gactccacgg aggagcagca ggacctgttc ctcaaggaca tgccaaagaa atggctttc 300  
 ctgcccttg aggatgatct gaggaggac ctcgggcgc agtctcagt ggagcgcctg 360  
 ccggcggtcg tgggtctcaa gccggacggg gacgtgctca ctcgcacgg cgccgacgag 420  
 atccagcgccttggcaccgc ctgcttcgc aactggcagg aggcggccga ggtgctggac 480  
 cgcaacttcc agctgccaga ggacctggag gaccaggagc cacggagcct caccgagtgc 540  
 ctgcgccgccc acaagtaccg cgtggaaaag gcggcgcgag gcgggcgcga ccccgaaaa 600  
 ggggtgggg aggagggcgg ggccgggggg ctgttctga 639  
 <210> 8  
 <211> 5035  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 表达载体  
 <400> 8  
 cctgcaggca gctgcgcgt cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccggcgctc 60  
 gggcgacatt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcggagc gcgcagagag ggagtggcca 120  
 actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgtggagc tagttattaa tagtaatcaa 180  
 ttacgggttc attagttcat agccatata tggagttccg cgttacataa cttacgtaa 240  
 atggccgcgc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 300  
 ttcccatagt aacgtcaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 360  
 aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 420  
 tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgaccta tggactttc 480  
 ctacttggca gtacatctac gtatttagtca tcgcttattac catggtgatg cggtttggc 540  
 agtacatcaa tggcggttga tagcggtttg actcacggg atttccaagt ctccacccca 600  
 ttgacgtcaa tggaggtttg tttgcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 660  
 caactccgcc ccattgacgc aaatggcg tagcggttga cggtggagg tctatataag 720  
 cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gtttgaccc 780  
 ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcggattc gaatccggc cgggaacggt 840  
 gcattggaac gcggattccc cgtgccaaga gtgacgttaa taccgcctat agagtctata 900  
 ggcccacaaa aaatgcttcc ttcttttaat atacttttt gtttatctta tttctaatac 960  
 ttccctaattt cttttttttt cagggcaata atgatacaat gtatcatgcc tctttgcacc 1020  
 attctaaaga ataacagtga taatttctgg gttaggcaaa tagcaatatt tctgcataatac 1080  
 aatatttctg catataaatt gtaactgatg taagaggtt catattgcta atagcagcta 1140  
 caatccagct accattctgc ttttattta tgggtggat aaggctggat tattctgagt 1200  
 ccaagctagg ccctttgtt aatcatgttc ataccttta tcttcctccc acagctcctg 1260  
 ggcaacgtgc tggctgtgt gctggcccat cactttggca aagaattggg attcgaacat 1320  
 cgattgaatt cgagccacca tggagacaga cacactcctg ctatgggtac tgctgctctg 1380  
 ggttccaggt tccactggtg acgcggccca gccggccagg cgccgcgtac gaagcttggt 1440  
 acccgccagc ctgttcagcg gccggatcct gatcaggaac aacagcggacc aggacgagct 1500

ggacaccgag gccgaagtga gcaggaggct ggagaacaga ctggtgcgc tttctttgg 1560  
 cgccggagcc tgccctcagt gccaggcctt cgtccccatc ctgaaggatt tctttgtcg 1620  
 gctgaccgac gagttctacg tgctgagagc cgcccagctg gccctggtgt atgtgagcca 1680  
 ggacagcacc gaggagcagc aggacctgtt cctgaaggac atgccaaga agtggctgtt 1740  
 cctgcccttc gaggacgacc tgcggagatg acgagatcta cgggtggcat ccctgtgacc 1800  
 cctccccagt gcctctcctg gccctggaag ttgccactcc agtcccacc agccttgtcc 1860  
 taataaaatt aagttgcac attttgtctg actaggtgtc cttctataat attatggggt 1920  
 ggaggggggt ggtatggagc aaggggcaag ttgggaagac aacctgttag gcctgcggg 1980  
 tctattggta accaagctgg agtgcagtgg cacaatctt gctactgca atctccgcct 2040  
 cctgggttca agcgattctc ctgcctcagc ctcccagtt gttgggattc caggcatgca 2100  
 tgaccaggct cagctaattt ttgtttttt ggttagagacg gggtttcacc atattggcca 2160  
 ggctggtctc caactcctaa tctcaggtga tctacccacc ttggcctccc aaattgctgg 2220  
 gattacaggc gtgaaccact gctcccttcc ctgtccttct gattttgttag gtaaccacgt 2280  
 gcgaccgag cggccgcagg aacccttagt gatggagttt gccactccct ctctgcgcgc 2340  
 tcgctcgctc actgaggccg ggcgacccaaa ggtcgcccgat cggccgggtt ttgcccgggc 2400  
 ggcctcagtg agcgagcggc cgccgagctg cctgcagggg cgctgtatgc ggtattttct 2460  
 ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catacgtcaa agcaaccata gtacgcgc 2520  
 tgttagcggcg catataagcgc ggcgggtgtt gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt 2580  
 gccagcgccc tagcgcccg tccttcgct ttcttcctt ctttcgcac cacgttcgccc 2640  
 ggcttcccc gtcaagctct aaatcgggg ctccctttag gttccgatt tagtgcttta 2700  
 cggcacctcg accccaaaaa acttgattt ggtgatggtt cacgtatgg gccatcgccc 2760  
 ttagatgacgg ttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tcttaatag tggactctt 2820  
 ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggctatt ctttgattt ataaggatt 2880  
 ttgccgattt cggcctattt gttaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat 2940  
 tttaacaaaa tattaacgtt tacaattttt tggtgcactc tcagtgacat ctgctctgat 3000  
 gcccatagt taagccagcc ccgacaccccg ccaacacccg ctgacgcgc ctgacgggt 3060  
 tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccggag ctgcattgtt 3120  
 cagaggttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctgt gatacccta 3180  
 ttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cactttcgg 3240  
 gaaaaatgtgc gcgaaacccc tatttttttta ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 3300  
 ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagttagt 3360  
 attcaacatt tccgtgtcgc ctttattccc tttttgcgg cattttgcct tcctgtttt 3420  
 gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt 3480  
 gtttacatcg aactggatct caacagcggt aagatcctt gagttttcg ccccgaaagaa 3540  
 cgtttccaa ttagtggcac ttttaaagtt ctgttatgtt ggcgggtatt atccgtatt 3600  
 gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttgggtgag 3660  
 tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 3720  
 gctgccataa ccatgagtga taacactgctg gccaacttac ttctgacaac gatcgagga 3780  
 ccgaaggagc taaccgctt tttgcacaac atggggatc atgtactcg cttgtatgtt 3840

tgggaaccgg agctaatgtt agccataccta aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta 3900  
gcaatggcaa caacgttgcg caaaacttta actggcgaac tacttactct agcttcccgg 3960  
caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttcgag gaccacttct gcgctcgcc 4020  
cttccggctg gctggtttat tgctgataaaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgccgt 4080  
atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgttagttat ctacacgacg 4140  
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcaactg 4200  
attaaggcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa 4260  
cttcattttt aattttaaaag gatcttaggtg aagatcctt ttgataatct catgaccaaaa 4320  
atcccttaac gtgagtttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 4380  
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgtt atctgctgt tgcaaacaaa aaaaccaccc 4440  
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctcttttcc gaaggttaact 4500  
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtcctctag tgtagccgtt gttaggccac 4560  
cacttcaaga actctgttagc accgcctaca tacctcgctc tgctaattct gttaccagt 4620  
gctgctgccs gtggcgatcaa gtcgtgttaccgggactcaagacg atagttaccg 4680  
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg gttcgtgca cacagcccg ctggagcga 4740  
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 4800  
gaagggagaa agcggacag gtatccgta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 4860  
agggagctt cagggggaaa cgcctgttat cttagatgtc ctgtcgggtt tcgccccctc 4920  
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcagggggc ggagctatg gaaaaacgcc 4980  
agcaacgcgg ccttttacg gttcctggcc ttttgctggc ctttgctca catgt 5035  
<210> 9  
<211> 6983  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 质粒  
<400> 9  
  
ctaaattgtt agcgttaata ttttgtttaaa attcgctta aattttgtt aaatcagctc 60  
attttttaac caataggccg aaatcgcaaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120  
gatagggtt agtgttgttc cagttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180  
caacgtcaaa gggcgaaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtt aaccatcacc 240  
ctaattcaatgtt tttttgggtt cgaggtgccc taaagcacta aatcgaaacc ctaaaggag 300  
cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtt gcgagaaagg aaggaaagaa 360  
agcgaagga gcgccgccta gggcgctggc aagtgttagcg gtcacgctgc gcgttaaccac 420  
cacacccgccc ggccttaatg cgccttacca gggcgcttcc cattcgccat tcaggctg 480  
caactgttgg gaagggcgat cgggtcgccc ctcttcgttta acgtccagg tggcgaaagg 540  
ggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgcccagg ttttccagt cacgacgtt 600  
taaaaacgacg gccagtgagc ggcgttaata cgactcaacta tagggcgaat tggagctcca 660  
ccgcgggtggc ggccgcgttca gaacttagtgg atccccggg atcccgtagt tattaaatagt 720

aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 780  
 cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccta acgacccccc cccattgacg tcaataatga 840  
 cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctccatttg acgtaatgg gtggagtatt 900  
 tacggtaaac tgcccacttg gcagtagatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta 960  
 ttgacgtcaa tgacggtaaa tggccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg 1020  
 actttcctac ttggcagttac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcgg 1080  
 tttggcagta caccaatggg cgtggatagc gggttgactc acggggattt ccaagtc 1140  
 accccattga cgtcaatggg agtttgttt ggcaccaaaa tcaacggac ttccaaaat 1200  
 gtcgtaataa ccccgccccg ttgacgaaa tggcggtag gcgtgtacgg tggaggtct 1260  
 atataaacc tatcttact ctgtacttca gctcgtgtacg ctcattagct ccgagctccc 1320  
 caacctacag cctgagagggc actggctcg 1380  
 cttgttggca ttccgcatct acccgtgcct cctgtcttgt cttactcgag cgaaccac 1440  
 actccgcct gctgagctca cagctcg 1500  
 caacgtgggg cttagtaaga gagactcg 1560  
 aagactccgg acaggtgagt agttgcgtgt 1620  
 aaagaagctt cgttagttt gggtgacacc 1680  
 tcttcaatgg gccattagaa tcacgtgatg 1740  
 gggccatac accatatgaa atatacctg 1800  
 tagaacaaca atttcaaaa caaaaattt 1860  
 aggaatggaa aggaccctac aaagtgtt 1920  
 agaattcg 1980  
 atacaccacc atccctccgc atccgaa 2040  
 ttgtgtggc tatcatggcc atcacatcct 2100  
 agcacacgac ggtaagg 2160  
 cccaggacca attcacccac ctgttcagga 2220  
 atagagttt atactggag tgtacactta 2280  
 ggcaagctg 2340  
 ctgtggtaag cagttcctgc 2400  
 ggccaaacag gatatctgt 2460  
 gtccccc 2520  
 gccccaaagga cctgaaatga 2580  
 gcttctgttc 2640  
 cgtcagatcg cctggagacg 2700  
 tagaggatcc accggcgc 2760  
 cagcggccgg atccgtatc 2820  
 ggtgtccagg agactggaga 2880  
 tcagtgcc 2940  
 ctacgtgctg 3000  
 gcagcaggac ctgttcctga 3060

cgacacctgaga agagaccctgg gcaggcagtt cagcgtggag agactgcccg ccgtgggtggt 3120  
 gctgaagcct gatggcgacg tgctgaccag agatggcgcc gacgagatcc agagactggg 3180  
 caccgcctgc ttgcctaact ggcaggaggc cgccgaggtc ctggacagaa acttccagct 3240  
 gcccgaggat ctggaggatc aggagccag atccctgacc gagtgccctga ggcggcacaa 3300  
 gtacagagtg gagaaggccg ccagaggcgg cagagaccct ggccggcggag gaggagagga 3360  
 gggcggagcc ggcggactgt tctgatgagc tagcaccggt tgtacaagtc aagcggccaa 3420  
 ccctccctag atctgttaat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta 3480  
 ttcttaacta ttttgctct tttagctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc 3540  
 atgctattgc ttcccgtatg gcttcattt ttcctcctt gtataaatcc tggttgtgt 3600  
 ctcttatga ggagttgtgg cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgttg 3660  
 ctgacgcaac cccccactgtt tggggcattt ccaccaccc tcagctcctt tccgggactt 3720  
 tcgcttccc cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgcgt 3780  
 ggacaggggc tcggctgtt ggcactgaca attccgtggt gttgtcgaaa aagctgacgt 3840  
 ccttccatg gctgctcgcc tgtgttgcctt cctggattct ggcgggacg tccttctgt 3900  
 acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc 3960  
 ggcctttcc gcgtttcgc cttcccttc agacgagtcg gatctccctt tggggccct 4020  
 cccgcctgt ttgccttctt aggaaactcc tttggacat cttccgcccac gctcttattt 4080  
 taaacttaaa agggtggact gtggggcagg gtgggaccc aggacaacag cagccccgg 4140  
 acttccata tgtgtttattt tgtgaaattt gtgatgctat tgcttattt gtaatctgt 4200  
 cttagctcg ttagctcat tagctccgag ctccccaaacc tacagcctga gaggcactgg 4260  
 ctcgggtgg tagccagctt ttccggtaat aaaggctgt tggcattcgg catctacccg 4320  
 tgcctcctgt cttgttctac tcgagcgaac ccacaactcc gtcctgctga gctcacagct 4380  
 cgcgggcccgg tgaagaacac ccaacagata tatactgtca acatcccatt tggtagctt 4440  
 tgttcttagac aagattctca acaaattctt cccctgaat gtttattttt aaaaaaaaaa 4500  
 caactactag ggctctgtgc atatgtaagt gagatcctt ttagcaggag aacagcaata 4560  
 agatattattt acattacaat attatatttctt agggtattttt aatgcaaggc cattatcaca 4620  
 tacttggcta acagggtcca tactgttgcata atgtattttt accagactga gtaataaaat 4680  
 tgacaacaat ataatcatca tctttttat aggtggggc atttttcaga tgaggtctca 4740  
 gagcacctgc caagcatgga cctcgagggg gggcccggtt cccagctttt gttccctta 4800  
 gtgagggtta attgcgcgt tggcgtaatc atggctatag ctgtttcctg tgtgaaattt 4860  
 ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccgggagc ataaagtgtt aagcctgggg 4920  
 tgcctaataatgt gtgagctaac tcacattaaat tgcgttgcgc tcactgccc cttccagtc 4980  
 gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcgccaa cgccggggaa gaggcgggtt 5040  
 gcgtattggg cgctttccg cttccctcgact cactgactcg ctgcgctcg tcgttccggct 5100  
 gccggcggcgt gtatcagcte actcaaaggc ggtaataacgg ttatccacag aatcagggg 5160  
 taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc 5220  
 cgcgttgctg cgcttttcc ataggctccg ccccccgtac gaggcatcaca aaaatcgacg 5280  
 ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttcccccgg 5340  
 aagctccctc gtgcgtctc ctgttccgac cctgcccgtt accggatacc tgtccgcctt 5400

tctcccttcg ggaagcgtgg cgcttctca tagtcacgc tgttaggtatc tcagttcggt 5460  
 gtaggtcggt cgctccaagg tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg 5520  
 cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatgccact 5580  
 ggcagcagcc actggtaaca ggatttagcag agcgaggtat gttaggcggtg ctacagagtt 5640  
 cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgtct 5700  
 gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tcatccggca aacaaaccac 5760  
 cgctggtagc ggtggtttt ttgttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 5820  
 tcaagaagat ccttgatct ttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcact 5880  
 ttaagggatt ttggcatga gattatcaa aaggatctt acctagatcc ttttaaatta 5940  
 aaaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca 6000  
 atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta ttgcgttcat ccatagttgc 6060  
 ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtc 6120  
 tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc 6180  
 agccggaagg gccgagcgcga gaagtggtcc tgcaactta tccgcctcca tccagtttat 6240  
 taatttgtgc cgggaagcta gagtaagtag ttgcgcagtt aatagttgc gcaacgttgt 6300  
 tgccattgct acaggcatcg tggtgtcacg ctcgtcggtt ggtatggctt cattcagctc 6360  
 cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggtag 6420  
 ctccttcggc ctcgcgtatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatgg 6480  
 tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgtt tttctgtgac 6540  
 tggtgagttac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctctt 6600  
 cccggcgtca atacgggata ataccgcgc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat 6660  
 tggaaaacgt tcttcgggac gaaaactctc aaggatctt ccgcgtgtga gatccagttc 6720  
 gatgttaaccc actcgtgcac ccaactgtatc ttgcgtatct ttactttca ccagcgtttc 6780  
 tgggtgagca aaaaacaggaa ggcaaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa 6840  
 atgttgaata ctcatactct tcctttca atattattga agcatttac agggttattt 6900  
 tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgc 6960  
 cacattccc cgaaaagtgc cac 6983

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 5385

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 表达载体

&lt;400&gt; 10

cctgcaggca gctgcgcgt cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccggggcgtc 60  
 gggcgaccc tggcgcccc gcctcagtga gcgagcgcgc ggcgcagagag ggagtggcca 120  
 actccatcac taggggttcc tgcggccgc cgcgtggagc tagttattaa tagtaatcaa 180  
 ttacgggttc attagttcat agcccatata tggagttccg cggtacataa cttacggtaa 240  
 atggccgcgc tggctgaccg cccaaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 300

ttcccatagt aacgtcaata gggacttcc attgacgtca atgggtggag tatttacgg 360  
 aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 420  
 tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tggacttc 480  
 ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggtttggc 540  
 agtacatcaa tggcggtgga tagcggttg actcacggg atttccaagt ctccacccca 600  
 ttgacgtcaa tggaggttg tttgcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 660  
 caactccgcc ccattgacgc aaatggcgg taggcgtgta cggtggagg tctatataag 720  
 cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gtttgaccc 780  
 ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcggattc gaatccggc cggttacgg 840  
 gcattggaac gcggattccc cgtgccaaga gtgacgtaag taccgcstat agagtctata 900  
 ggcccacaaa aaatgcttc ttctttaat atactttt gtttatctta tttctaatac 960  
 ttccctaatt ctcttcattt cagggcaata atgatacaat gtatcatgcc tctttgcacc 1020  
 attctaaaga ataacagtga taatttctgg gtttaaggcaa tagcaatatt tctgcatata 1080  
 aatatttctg catataaatt gtaactgatg taagagggtt catattgcta atagcagcta 1140  
 caatccagct accattctgc ttttattta tggttggat aaggctggat tattctgagt 1200  
 ccaagctagg ccctttgct aatcatgttc ataccttta tcttcctccc acagctcctg 1260  
 ggcaacgtgc tggctgtgt gctggccat cacttggca aagaattggg attcgaacat 1320  
 cgattgaatt cgagccacca tggagacaga cacactctg ctatgggtac tgctgctctg 1380  
 ggttccaggt tccactggtg acgccccca gccggccagg cgccgcgtac gaagcttgt 1440  
 acccgccagc ctgttcagcg gccggatcct gatcaggaac aacagcgacc aggacgagct 1500  
 ggacaccgag gccgaagtga gcaggaggct ggagaacaga ctggctgctgc tggctttgg 1560  
 cgccggagcc tgccctcagt gccaggcctt cgtgcccattt ctgaaggatt tctttgtgag 1620  
 gctgaccgac gagttctacg tgctgagagc cgccctggctg gccctgggtgt atgtgagcca 1680  
 ggacagcacc gaggaggcagc aggacctgtt cctgaaggac atgccaaga agtggctgtt 1740  
 cctgcccttc gaggacgacc tgagaagaga cctggcagg cagttcagcg tggagagact 1800  
 gcccggcgtg gtggctgta agcctgatgg cgacgtgctg accagagatg gcccggacga 1860  
 gatccagaga ctggccaccc cctgctcgc caactggcag gaggccggc aggtcctgga 1920  
 cagaaacttc cagctggcccg aggatctgga ggatcaggag cccagatccc tgaccgagt 1980  
 cctgaggcgg cacaagtaca gagttggagaa ggccggcaga ggccggcagag accctggcgg 2040  
 cgaggaggaa gaggaggcgg gagccggcgg actgttctga tgagctgca cgggttgtac 2100  
 aagtcaagcg gccaaccctc cctagatcta cgggtggcat ccctgtgacc cctccccagt 2160  
 gcctctcctg gccctggaag ttgccactcc agtgcacccacc agccttgtcc taataaaatt 2220  
 aagttgcattt atttgtctg acttaggtgtc cttctataat attatgggtt ggaggggggt 2280  
 ggtatggagc aaggggcaag ttgggaagac aacctgttagg gcctgcgggg tctattggga 2340  
 accaagetgg agtgcagtgg cacaatctt gtcactgca atctccgcct cctgggttca 2400  
 agcgattctc ctgcctcagc ctcccgagtt gttgggattc caggcatgca tgaccaggct 2460  
 cagctaattt ttgtttttt ggttagagacg gggtttcacc atattggcca ggctggtctc 2520  
 caactcctaa tctcaggtga tctacccacc ttggcctccc aaattgctgg gattacaggc 2580  
 gtgaaccact gtccttcc ctgtccttct gattttgttag gtaaccacgt gcggaccgag 2640

cggccgcagg aaccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc 2700  
 actgaggccg ggcgaccaaa ggtcgcccga cgccccggct ttgcccggc ggcctcagtg 2760  
 agcgagcgag cgcgagctg cctgcagggg cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat 2820  
 ctgtgcggta tttcacaccc catacgtcaa agcaaccata gtacgcgccc tgtagggcg 2880  
 cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgc 2940  
 tagcgcccgc tccttcgct ttctccctt ccttctcgc cacgtcgcc ggcttcccc 3000  
 gtcaagctct aaatcgaaaa ctccttag ggttccgatt tagtgctta cgccaccc 3060  
 accccaaaaa acttgattt ggtgatggc cacgtagttt gccatgcgcc tgatagacgg 3120  
 ttttcgccc tttgacgtt gagtccacgt tcttaatag tggactctt tgccaaactg 3180  
 gaacaacact caaccctatc tcgggctatt ctttgattt ataaggatt ttgcccattt 3240  
 cggcctattt gttaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa 3300  
 tattaacgtt tacaattttt tggtgactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcata 3360  
 taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgc ctgacggcgt tgtctgctcc 3420  
 cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccggag ctgcattgtt cagaggttt 3480  
 caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatagccta ttttatagg 3540  
 ttaatgtcat gataataatg gtttctt cgtcagggtt cactttcgg ggaaatgtgc 3600  
 gcggaacccc tatttgttta ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 3660  
 aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 3720  
 tccgtgtcgc ctttattccc tttttcgg cattttgcct tcctgtttt gctcaccc 3780  
 aaacgcttgtt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt ggttacatcg 3840  
 aactggatct caacagcgtt aagatcctt agagtttcg cccgaagaa cgtttccaa 3900  
 tcatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtt gcgcgttatt atccgtatt gacgcggc 3960  
 aagagcaact cggcgccgc atacactatt ctcagaatga cttgggtttag tactcaccag 4020  
 tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccata 4080  
 ccatgagtga taacactgctt gccaacttac ttctgacaac gatggagga ccgaaggagc 4140  
 taaccgttt tttgcacaac atggggatc atgtaactcg ctttgcgt tggaaccgg 4200  
 agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcgtt gcaatggcaa 4260  
 caacgttgcg caaactattt actggcgaac tacttactt agcttccgg caacaattaa 4320  
 tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccactt ggcgcggcc cttccggctg 4380  
 gctggttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgccgtt atcattgcag 4440  
 cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttt ctacacgacg gggagtcagg 4500  
 caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcaactt attaaggatt 4560  
 ggttaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatTTTTT cttcatTTTTT 4620  
 aattttaaag gatcttaggtt aagatcctt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac 4680  
 gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttotttag 4740  
 atccTTTTT tctgcgcgtt atctgctgtc tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 4800  
 tggTTTTT gccggatcaa gagctacca ctctttcc gaaggttaact ggcttcagca 4860  
 gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgttagccgtt gttaggccac cacttcaaga 4920  
 actctgtac accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca 4980

gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 5040  
 agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagccag cttggagcga acgacctaca 5100  
 ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa 5160  
 aggccggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 5220  
 cagggggaaa cgcctggtat cttagtgcgc ctgtcgggtt tcgccaccc tgacttgagc 5280  
 gtcgatttt gtatgctcg tcagggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5340  
 ccttttacg gttcctggcc ttttgcgtt cttttgcgtca catgt 5385  
 <210> 11  
 <211> 2788  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 表达载体  
 <400> 11

cctgcaggca gctgcgcgt cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccggcgctc 60  
 gggcgaccc ttgtcgcccc gcctcagtga gcgagcggagc gcgcagagag ggagtggcca 120  
 actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgtggagc tagttattaa tagtaatcaa 180  
 ttacggggtc attagttcat agccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 240  
 atggccgcgc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 300  
 ttcccatagt aacgtcaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatattacgtt 360  
 aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 420  
 tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgaccccta tggactttc 480  
 ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgcttattac catggtgatg cgggtttggc 540  
 agtacatcaa tggcggttga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca 600  
 ttgacgtcaa tgggagtttgc ttttgcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 660  
 caactccgcc ccattgacgc aaatggcg taggcgttga cggtggagg tctatataag 720  
 cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gtttgaccc 780  
 ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcggattc gaatccggc cgggaacggt 840  
 gcattggaac gcgattccc cgtgccaaga gtgacgttaag taccgcctat agagtctata 900  
 ggcccacaaa aaatgcttcc ttcttttaat atactttttt gtttatctta tttctaatac 960  
 ttccctaatt ctctttctt cagggcaata atgatacaat gtatcatgcc tctttgcacc 1020  
 attctaaaga ataacagtga taatttctgg gtttggcaaa tagcaatatt tctgcataatac 1080  
 aatatttctg catataaatt gtaactgatg taagaggtt catattgcta atagcagcta 1140  
 caatccagct accattctgc ttttattta tgggtggat aaggctggat tattctgagt 1200  
 ccaagctagg ccctttgtt aatcatgttc ataccttta tcttcctccc acagctcctg 1260  
 ggcaacgtgc tggctgtgt gctggcccat cactttggca aagaattggg attcgaacat 1320  
 cgattgaatt cgagccacca tggagacaga cacactcctg ctatgggtac tgctgctctg 1380  
 ggttccaggt tccactggtg acgcggccca gccggccagg cgccgcgtac gaagcttggt 1440  
 acccgccagc ctgttcagcg gccggatcct gatcaggaac aacagcgcacc aggacgagct 1500

ggacaccgag gccgaagtga gcaggaggct ggagaacaga ctggtgctgc tttcttgg 1560  
 cgccggagcc tgccctcagt gccaggcctt cgtccccatc ctgaaggatt tctttgttag 1620  
 gctgaccgac gagttctacg tgctgagagc cgcccagctg gccctggtgt atgtgagcca 1680  
 ggacagcacc gaggagcagc aggacctgtt cctgaaggac atgccaaga agtggctgtt 1740  
 cctgcccttc gaggacgacc tgagaagaga cctgggcagg cagttcagcg tggagagact 1800  
 gcccggcgtg gtggtgctga agcctgatgg cgacgtgctg accagagatg gcccggacga 1860  
 gatccagaga ctgggcaccg cctgcttcgc caactggcag gaggccgccc aggtcctgga 1920  
 cagaaacttc cagctcccc agatctgga ggtcaggag cccagatccc tgaccgagt 1980  
 cctgaggcgg cacaagtaca gagtgagaa ggccgccaga ggccgcagag accctggcgg 2040  
 cggaggagga gaggagggcg gagccggcgg actgttctga tgagctagca ccgttgtac 2100  
 aagtcaagcg gccaaccctc cctagatcta cgggtggcat ccctgtgacc cctcccaagt 2160  
 gcctctcctg gccctggaag ttgccactcc agtgcacc accctgtcc taataaaatt 2220  
 aagttgcatc atttgtctg actaggtgtc cttctataat attatgggt ggaggggggt 2280  
 ggtatggagc aaggggcaag ttggaaagac aacctgttag gcctgcggg tctattggga 2340  
 accaagctgg agtgcagtgg cacaatctt gctcaactgca atctccgcct cctgggttca 2400  
 agcgattctc ctgcctcagc ctcccgagtt gttgggattc caggcatgca tgaccaggct 2460  
 cagctaattt ttgtttttt ggtagagacg gggtttccacc atattggcca ggctggtctc 2520  
 caactcctaa tctcaggtga tctacccacc ttggcctccc aaattgctgg gattacaggc 2580  
 gtgaaccact gctcccttcc ctgtccttct gatttgttag gtaaccacgt gcggaccgag 2640  
 cggccgcagg aacccttagt gatggagttt gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc 2700  
 actgaggccg ggccgaccaa ggtcgccgaa cggccggct ttggccggc ggcctcagtg 2760  
 agcgagcgag cgccgagctg cctgcagg 2788

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 639

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重编码的编码区域

&lt;400&gt; 12

atggccagcc tgccctcagg ccggatcctg atcaggaaca acagcgacca ggacgagctg 60  
 gacaccgagg ccgaagttag caggaggctg gagaacagac tggtgctgt gttcttggc 120  
 gccggagcct gccctcagtg ccaggccttc gtgcccatcc tgaaggattt ctttgtgagg 180  
 ctgaccgacg agttctacgt gctgagagcc gcccagctgg ccctgggtta tgtgagccag 240  
 gacagcaccg aggagcagca ggacctgttc ctgaaggaca tgcccaagaa gtggctgttc 300  
 ctgccttcg aggacgaccc gagaagagac ctggcagggc agttcagctg ggagagactg 360  
 cccggcgtgg tggtgctgaa gcctgatggc gacgtgctga ccagagatgg cgccgacgag 420  
 atccagagac tggccaccgc ctgcttcgccc aactggcagg agggccgcga ggtcctggac 480  
 agaaacttcc agtgcaccgaa ggatctggag gatcaggagc ccagatccct gaccgagtg 540  
 ctgaggcggc acaagtacag agtggagaag gccggcagag gcccggcggc 600

ggaggaggag aggagggcgg agccggcgga ctgttctga 639  
<210> 13  
<211> 330  
<212> DNA  
<213> 智人  
<400> 13

atggccctccc tttctctgg ccgcacccctg atccgcaaca atagcgacca ggacgagctg 60  
gatacggagg ctgaggtag tcgcaggctg gagaaccggc tggctgctgct gttcttggt 120  
gctggggctt gtccacagtg ccaggccttc gtgcccatcc tcaaggactt cttcggtcg 180  
ctcacagatg agttctatgt actgcggcgc gctcagctgg ccctgggtta cgtgtcccg 240  
gactccacgg aggagcagca ggacctgttc ctcaaggaca tgccaaagaa atggctttc 300  
ctgcccttg agatgatct gaggaggtga 330  
<210> 14  
<211> 330  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 重编码的编码区域  
<400> 14

atggccagcc tttcagcgg ccggatccctg atcaggaaca acagcgacca ggacgagctg 60  
gacaccgagg ccgaagttag caggaggctg gagaacagac tggctgctgct gttcttggt 120  
gccggagcct gccctcagtg ccaggccttc gtgcccatcc tgaaggattt ctttgcgg 180  
ctgaccgacg agttctacgt gctgagagcc gcccagctgg ccctgggtta tgtgagccag 240  
gacagcaccg aggagcagca ggacctgttc ctgaaggaca tgccaaagaa gtggctgttc 300  
ctgcccttcg aggacgacct gcggagatga 330  
<210> 15  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 智人  
<400> 15

Leu Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp  
1 5 10 15

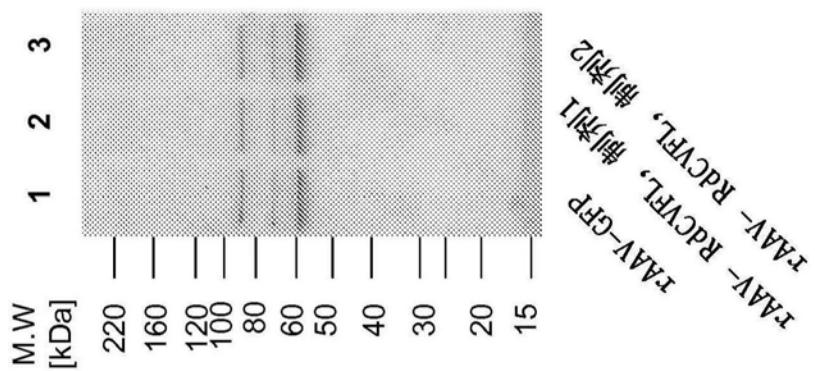


图1

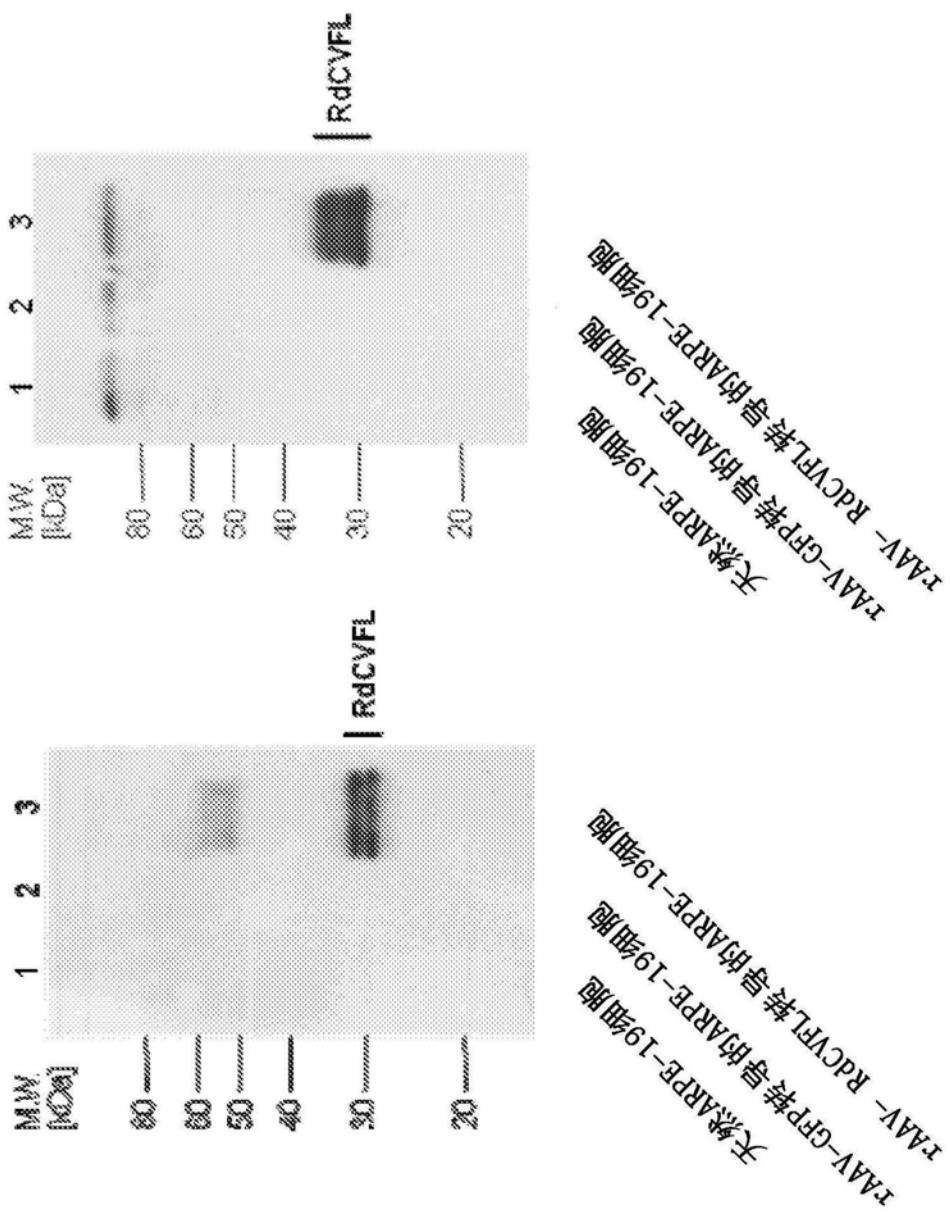


图2B

图2A

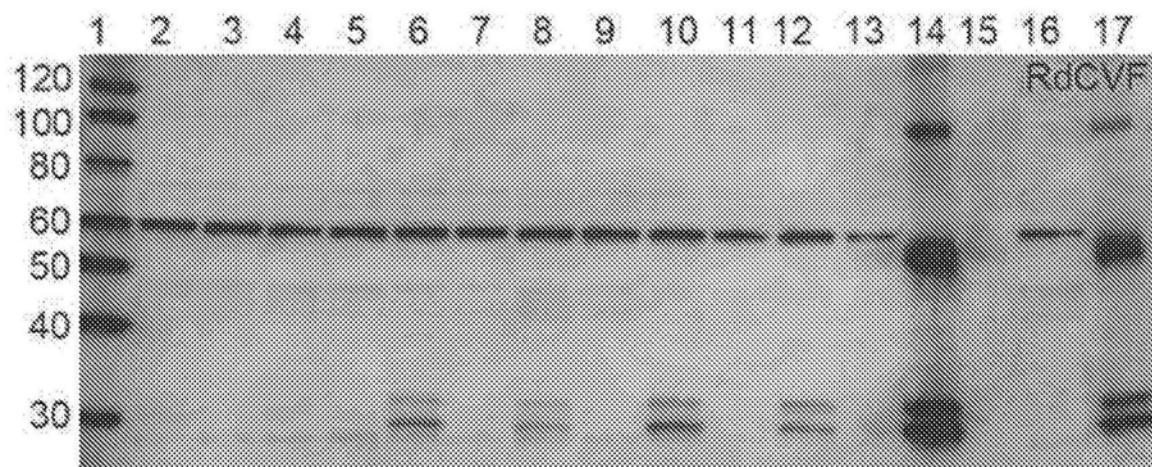


图3

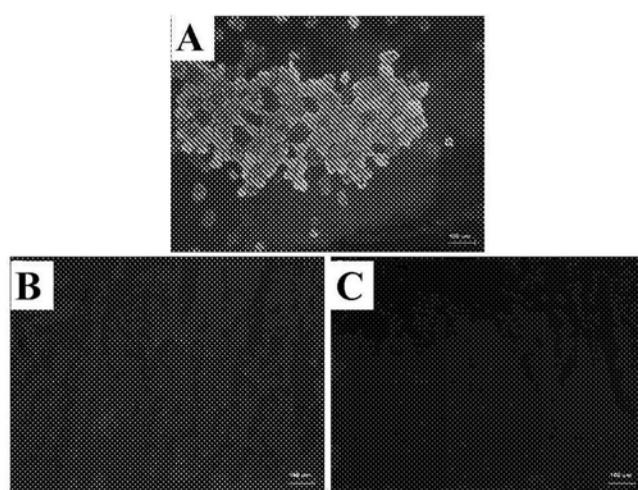


图4

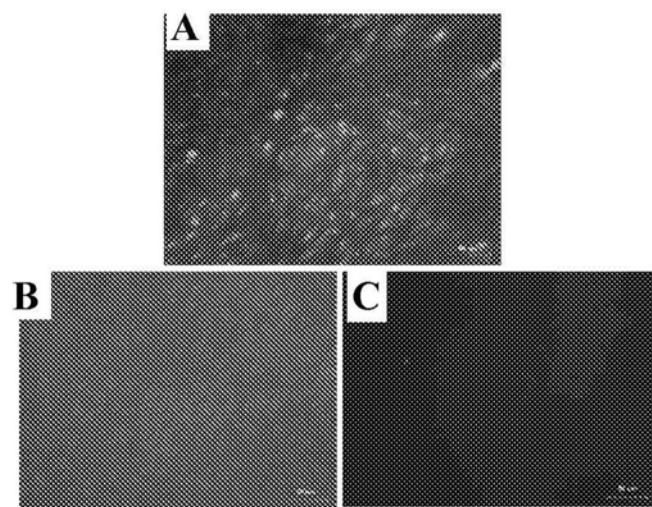


图5

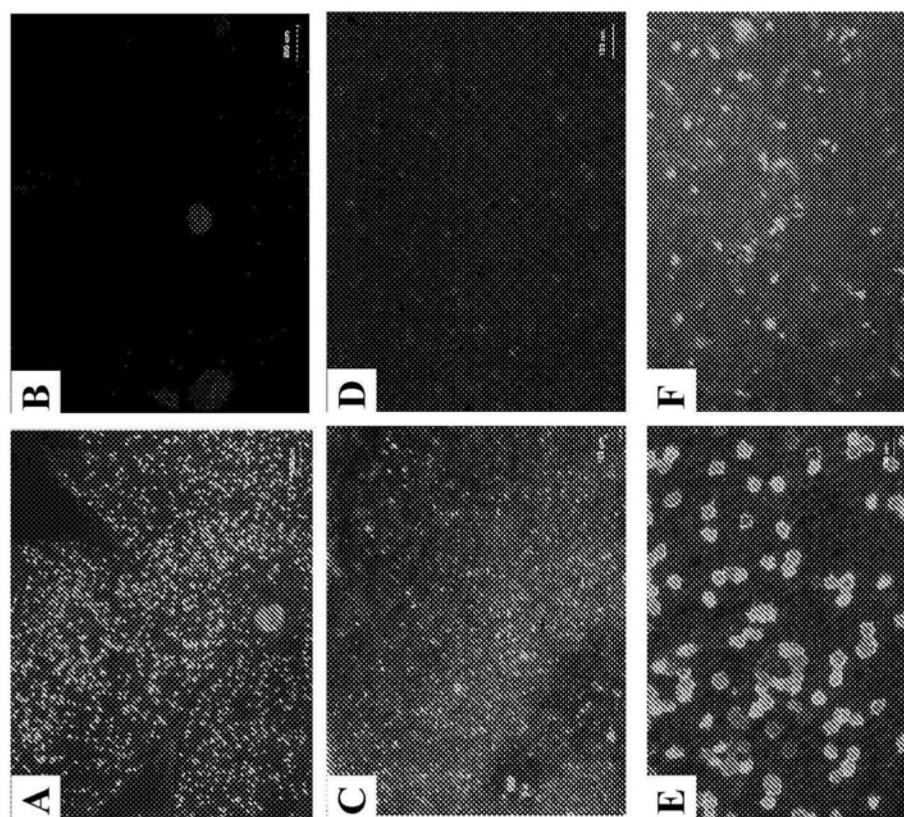


图6

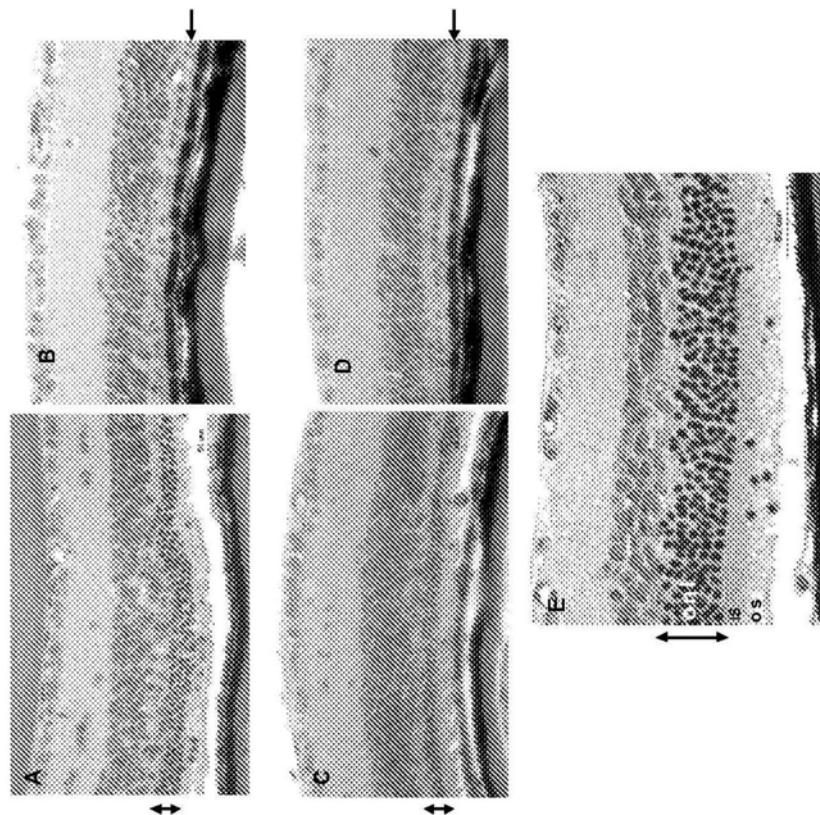


图7

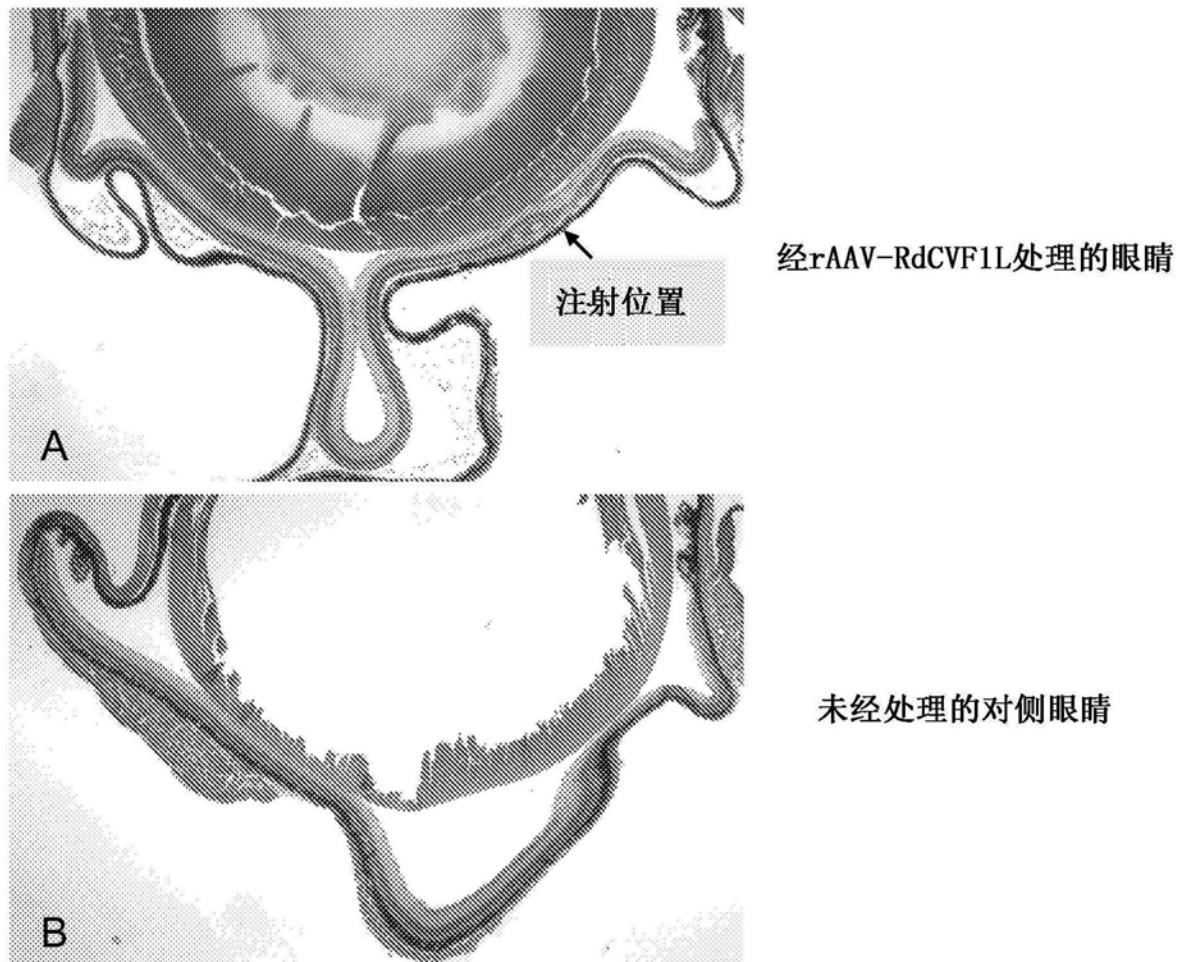


图8

rAAV-RdCVF1L 2788 bp DNA 线性  
**参考 特征** 1 (碱基 1 到 2788)  
**位置/限定符**

misc\_feature 1..141  
/基因="ITR"  
/产物 ="AAV 左 ITR"  
/SECDrawAs=" 区域 "

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

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

misc\_feature 1319..1326  
/基因="MCS"  
/产物 ="多克隆位点 "  
/SECDrawAs=" 区域 "

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

misc\_feature 2085..2129  
/基因="MCS"  
/产物 ="多克隆位点 "  
/SECDrawAs=" 区域 "

misc\_feature 2130..2608  
/基因="多聚A"  
/产物 ="多聚A"  
/SECDrawAs=" 区域 "

misc\_feature 2648..2788  
/基因="ITR"  
/产物 ="AAV 右 ITR"  
/SECDrawAs=" 区域 "

**起点**

1 cctgcaggca gctgcgcgtc cgctcgctca ctgaggccgc ccggggaaag cccgggggtc  
61 gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc ggcgcagagag ggagtggcca  
121 actccatcac taggggttcc tgcggccca cgcgtggagc tagttattaa tagtaatcaa  
181 ttacgggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa  
241 atggcccgcc tggctgaccg cccaaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg  
301 ttcccatagt aacgtcaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt  
361 aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg

图9

421 tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta catgaccta tggacttc  
 481 ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgttattac catggtgatg cggtttggc  
 541 agtacatcaa tggcggtgga tagcggttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca  
 601 ttgacgtcaa tggagtttgcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa  
 661 caactccgccc ccattgacgc aaatggggcg taggcgtgta cggtgggagg tctatataag  
 721 cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcgctgagacgc catccacgcgt gttttgact  
 781 ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcggattc gaatcccggc cgggaaacgg  
 841 gcatttggaaac gcggattccc cgtgccaaga gtgacgtaa taccgcctat agagtctata  
 901 ggcccacaaa aaatgttttc ttcttttaat atactttttt gtttatctta tttctaatac  
 961 ttccctaataat ctcttcttt cagggcaata atgatacaat gtatcatgcc tctttgcacc  
 1021 attctaaaga ataacagtga taatttctgg gttaaggcaa tagcaatatt tctgcatata  
 1081 aatatttctg catataaatt gtaactgatg taagagggtt catattgcta atagcagcta  
 1141 caatccagct accattctgc ttttatttt tggttggat aaggctggat tattctgagt  
 1201 ccaagctagg ccctttgtct aatcatgttc atacctctta tcttcctccc acagctcctg  
 1261 ggcacacgtgc tggctgtgt gctggccat cactttggca aagaatttggg attcgaacat  
 1321 cgattgaatt cgagccacca tggagacaga cacactcctg ctatgggtac tgctgctctg  
 1381 gttccaggt tccactggtg acgcggccca gccggccagg cgccgcgtac gaagcttgg  
 1441 accgcgcagc ctgttcagcg gccggatcct gatcaggaac aacagcgacc aggacgagct  
 1501 ggacaccgag gccaaggta gcaggagct ggagaacaga ctgggtctgc tgttcttgg  
 1561 cgccggagcc tgccctcagt gccaggcctt cgccgcctt ctgaaggatt tctttgttag  
 1621 gctgaccgac gagttctacg tgctgagagc cgcccgactg gcccgggtt atgtgagcca  
 1681 ggacagcacc gaggagcagc aggacctgtt cctgaaggac atgccaaga agtggctgtt  
 1741 cctgccccttc gaggacgacc tgagaagaga cctggcagg cagttcagcg tggagagact  
 1801 gcccggctg gtggctgtga agcctgtatgg cgacgtgctg accagagatg gcccgcacga  
 1861 gatccagaga ctgggcaccg cctgttcgc caactggcag gaggccccc aggtccttgg  
 1921 cagaaacttc cagctccccg aggtatcttgg ggatcaggag cccagatccc tgaccgagtg  
 1981 cctgaggcgg cacaagtaca gagtgagaa ggcggccaga ggcggcagag accctggcgg  
 2041 cgaggagga gaggaggcg gagccggcg actgttctga tgagctgca ccgggtgtac  
 2101 aagtcaagcg gccaaccctc cctagatcta cgggtggcat ccctgtgacc cctccccagt  
 2161 gcctctcctg gcccggaaat ttgccactcc agtggccacc agccttgtcc taataaaatt  
 2221 aagttgcattc attttgtctg actaggtgtc ttcttataat attatgggt ggaggggggt  
 2281 ggtatggagc aaggggcaag ttggaaagac aacctgttagg gcctgcgggg tctattggga  
 2341 accaagctgg agtgcagtgg cacaatcttgc gctcaactgca atctccgcct cctgggttca  
 2401 agcgattctc ctgcctcaggc ctcccgagtt gttgggattc caggcatgca tgaccaggct  
 2461 cagctaattt ttgtttttt ggtagagacg gggtttccacc atattggcca ggctggctc  
 2521 caactcctaa tctcaggta tctaccacc ttggcctccc aaattgctgg gattacaggc  
 2581 gtgaaccact gctcccttcc ctgtccttct gatttgttag gtaaccacgt gcggaccgag  
 2641 cgccgcagg aacccttagt gatggagttg gcaactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc  
 2701 actgaggccg ggcgaccaaa ggtcgcccgaa cggccgggtt ttgcccgggc ggcctcagtg  
 2761 agcgagcagc cgccgcagctg cctgcagg (SEQ ID NO:11)  
 //

图9(续)

## 用AAV-RdCVFL处理的5周龄Rd10小鼠的ERG响应

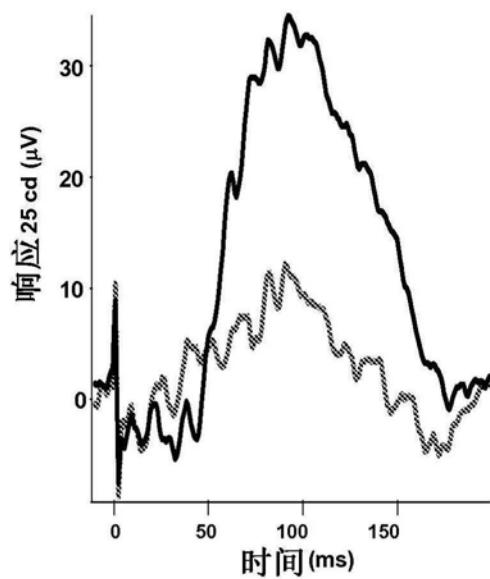
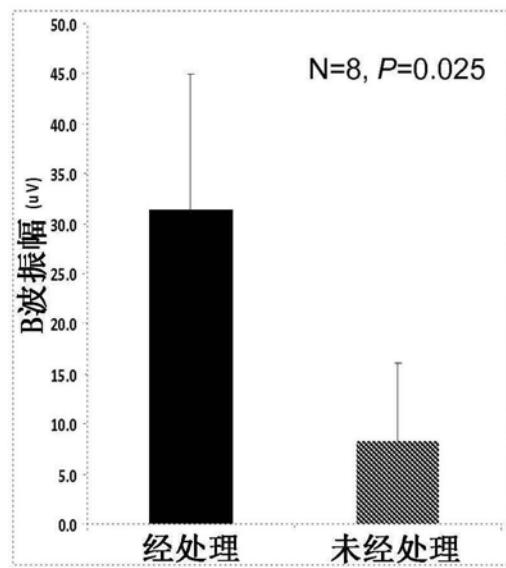


图10A

图10B

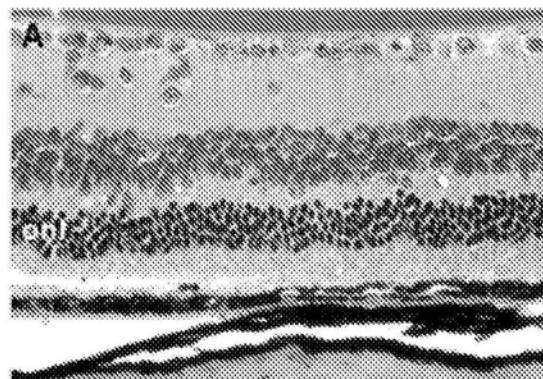


图11A

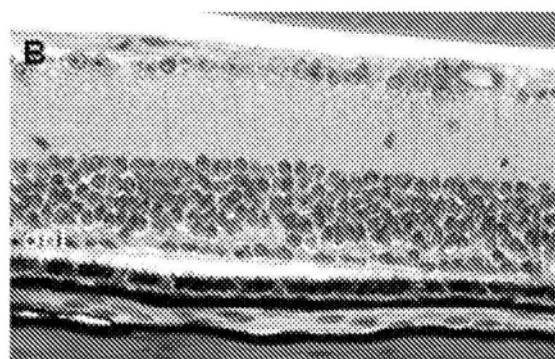


图11B

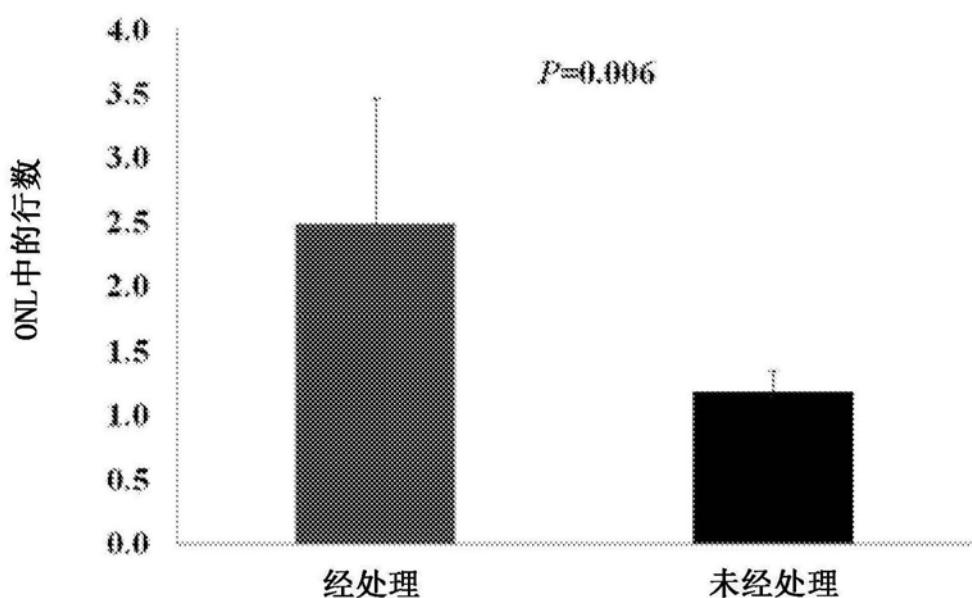


图12