



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120302995 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 11

(21) 申请号 202380063545.4

(22) 申请日 2023.09.15

(30) 优先权数据

63/407,150 2022.09.15 US

63/414,996 2022.10.11 US

63/426,725 2022.11.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.03.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/074351 2023.09.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/059823 EN 2024.03.21

(71) 申请人 艾威医药有限公司

地址 美国新泽西州克兰伯里市西达布鲁克
大道5号2室

(72) 发明人 梁波 洪桂英 吴凌

博瑞斯·特瑞特

马图拉纳·卡罗拉

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

专利代理师 牛丽霞

(51) Int. Cl.

A61K 39/235 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书16页

序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

携带显性负突变dnRhoA基因的自互补scAAV
载体及其用于治疗眼部疾病的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种重组自互补腺相关病毒(scAAV)核酸载体,该载体包含一种普遍存在的真核启动子,例如延伸因子1 α (EF1 α)、鸡 β -肌动蛋白(CBA)和杂合鸡 β -肌动蛋白(CBh),其后紧跟着显性负突变RhoA。此外,本文还提供了所述载体的使用方法,包括通过眼内注射(例如,前房注射)来降低眼内压(IOP)。本文还提供了与这些载体相关的质粒、重组scAAV颗粒、组合物、制剂以及其他使用方法。



1. 一种重组自互补腺相关病毒(scAAV)颗粒,包括:
 - a) 一种AAV衣壳蛋白;以及
 - b) 一种scAAV病毒基因组,包括一个真核启动子,该启动子可操作地连接到一个编码显性负突变RhoA的多核苷酸。
2. 根据权利要求1所述的重组scAAV颗粒,其中显性负突变RhoA包含至少一个氨基酸突变。
3. 根据权利要求2所述的重组scAAV颗粒,其中所述至少一个氨基酸突变是SEQ ID NO: 6中第19位氨基酸的苏氨酸到天冬氨酸的突变(T19N)。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的重组scAAV颗粒,其中所述真核启动子是一种短真核启动子(例如,约100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100或约1200个核苷酸的长度),可选地,所述短真核启动子是截短的延伸因子1 α (EF1 α)、鸡 β -肌动蛋白(CBA)或杂合鸡 β -肌动蛋白(CBh)启动子。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的重组scAAV颗粒,其中编码显性负突变RhoA的多核苷酸针对人类表达进行了密码子优化(例如,所述优化颗粒在人类中表达编码显性负突变RhoA的多核苷酸,比未优化颗粒多约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、350%、400%、450%或约500%)。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的重组scAAV颗粒,其中所述衣壳蛋白针对眼部组织表达进行了优化(例如,所述优化颗粒在眼部组织中表达编码显性负突变RhoA的多核苷酸,比未优化颗粒多约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、350%、400%、450%或约500%)。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的重组scAAV颗粒,其中所述颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV12、AAV2R471A、牛AAV或小鼠AAV血清型。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的重组scAAV颗粒,其中所述衣壳蛋白包含一个或多个氨基酸突变。
9. 根据权利要求8所述的重组scAAV颗粒,其中所述一个或多个氨基酸突变包括Y444F、Y500F和/或Y730F氨基酸突变,根据AAV2的VP1编号(SEQ ID NO:5)。
10. 根据权利要求8所述的重组scAAV颗粒,其中所述一个或多个氨基酸突变降低了免疫原性并/或增加了显性负突变RhoA的表达。
11. 根据权利要求6所述的重组scAAV颗粒,其中所述眼部组织包括小梁网、虹膜、角膜和/或视网膜。
12. 一种降低需要此类治疗的受试者眼内压(IOP)的方法,该方法包括向受试者给予根据权利要求1至11中任一项所述的重组scAAV颗粒的治疗有效量,从而降低受试者的眼内压。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述给予包括眼内注射。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述眼内注射包括注射到眼睛的前房,可选地,到小梁网组织和/或角膜。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述眼内注射是前房注射。

16. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述眼内注射包括注射到眼睛的后房, 可选地, 到视网膜细胞 (例如, 视网膜神经节细胞和/或视网膜色素上皮细胞)。

17. 一种治疗和/或预防需要此类治疗的受试者眼部疾病的方法, 该方法包括向受试者给予根据权利要求1至11中任一项所述的重组scAAV颗粒的治疗有效量, 从而治疗和/或预防受试者的眼部疾病。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述眼部疾病与眼内压升高有关。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述眼部疾病是青光眼、年龄相关性黄斑变性 (AMD)、湿性AMD、糖尿病视网膜病变和/或视网膜裂孔。

20. 根据权利要求17至19中任一项所述的方法, 其中所述给予包括眼内注射。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述眼内注射包括注射到眼睛的前房, 可选地, 到小梁网组织和/或角膜。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述眼内注射包括注射到眼睛的后房, 可选地, 到视网膜细胞 (例如, 视网膜神经节细胞和/或视网膜色素上皮细胞)。

携带显性负突变dnRhoA基因的自互补scAAV载体及其用于治疗眼部疾病的方法

技术领域

[0001] 本文提供了一种重组自互补腺相关病毒(scAAV)核酸载体,该载体包含一种普遍存在的真核启动子,例如延伸因子1 α (EF1 α)、鸡 β -肌动蛋白(CBA)和杂合鸡 β -肌动蛋白(CBh),其后紧跟着显性负突变RhoA。此外,本文还提供了所述载体的使用方法,包括通过眼内注射(例如,前房注射)来降低眼内压(IOP)。本文还提供了与这些载体相关的质粒、重组scAAV颗粒、组合物、制剂以及其他使用方法。

背景技术

[0002] 眼部疾病基因治疗的研究与开发进展正在引领趋势,为更多患者群体带来治愈的希望。传统的基因治疗主要针对遗传性眼部疾病,例如视网膜色素变性、氯离子病、Leber遗传性视神经病变、Leber先天性黑朦(LCA)、色盲和X连锁视网膜色素变性(XLRS)等。新一代的基因治疗则针对慢性疾病的迹象,例如湿性年龄相关性黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变以及其他慢性视网膜状况。

[0003] 青光眼是60岁以上人群致盲的主要原因之一,也是全球致盲的第二大原因。在美国,青光眼的患病率约为每1,000人中有19例。这相当于每1,000名女性中有22例,每1,000名男性中有16例(国家眼科研究所。青光眼数据表)。小梁网(TM)提供了维持生理眼内压(IOP)所需的房水流出阻力。小梁网功能障碍会导致眼内压升高(例如,眼内高血压),这是青光眼发展的主要风险因素。

[0004] 目前,临床上可用的治疗方案包括每日使用眼药水和手术来降低IOP。临床上用于治疗青光眼的眼药水有多种类型,它们通过不同的机制来降低IOP。常用的眼药水包括前列腺素类似物、 β 受体阻滞剂、 α 激动剂、碳酸酐酶抑制剂和Rho激酶抑制剂。大多数青光眼患者是老年人,他们通常还需要额外的药物来治疗其他疾病,因此这些患者对每日使用眼药水的依从性较差。

[0005] 当眼药水无法充分降低IOP或引起显著的副作用时,手术就成为一种选择。激光小梁成形术是用于治疗开角型青光眼的最常见手术之一,它通过帮助改善房水流出量来发挥作用。尽管激光手术具有非常好的安全性,但仍有一些缺点和局限性,例如效果持续时间有限、反应不一、需要持续监测和暂时性IOP升高。如果患者的眼内压无法通过局部眼药水或激光小梁成形术得到控制,建议采用微创青光眼手术(MIGS)。MIGS通过创建旁路来降低眼内压。通过放置小梁网旁路支架或进行小梁切开术(或小梁切除术)来开通旁路,从而改善房水流入Schlemm管的流出量。手术风险包括疗效不确定、需要重复手术和长期有效性。鉴于当前治疗方案的缺点和局限性,开发一种基因治疗方案来降低IOP,不需要频繁(或仅单次)给药,将为青光眼患者带来巨大的益处。

[0006] RhoA是一种GTP结合蛋白,已知其在细胞收缩性方面发挥作用。RhoA在活性和非活性形式之间循环,这种在两种构象之间的循环激活了Rho相关激酶(ROCK)。RhoA通路在调节房水流出设施方面的相关性最初被报道为RhoA介导小梁网细胞收缩。一项研究表明,平滑

肌细胞收缩抑制剂 (Y-27632) 的靶点是一种ROCK抑制剂,这种抑制剂通过降低血管系统中的钙敏感性来减少细胞收缩。这些发现,加上小梁网细胞收缩在房水流出设施方面已确立的作用,激发了一系列研究,这些研究表明Y-27632也影响IOP。自那以后,ROCK抑制剂已成功开发为青光眼治疗的新药物。然而,化学ROCK抑制剂的快速代谢导致为了降低IOP而需要频繁给药。为了满足治疗青光眼的未满足的医疗需求,有必要开发专门针对小梁网组织,更具体地说是针对RhoA通路的新疗法,以造福老年群体。

发明内容

[0007] 本发明基于这样的发现:使用显性负突变RhoA (dnRhoA) 的基因治疗可以通过抑制ROCK信号传导来降低青光眼患者的IOP。可以使用普遍表达启动子来驱动突变dnRhoA的表达。本发明还涉及当使用较短的真核启动子时,dnRhoA表达的意外增强。还可以使用几种AAV衣壳,包括突变的AAV2,来包装本文所述的病毒载体。

[0008] 因此,本发明的一个方面涉及一种重组自互补腺相关病毒(scAAV)颗粒,该颗粒包含一种病毒衣壳蛋白和一种scAAV核酸载体,该载体包含一种真核启动子和显性负突变RhoA。在某些实施例中,显性负突变RhoA包含至少一个氨基酸突变(例如,T19N)。

[0009] 在某些实施例中,普遍启动子包含截短的EF1 α 、CBA、CBh或其他短真核启动子。

[0010] 在某些实施例中,重组scAAV颗粒使用来自不同病毒血清型的衣壳。在某些实施例中,病毒衣壳包含一个或多个氨基酸突变,例如,在AAV2的VP1 (SEQ ID NO:5) 编号中,衣壳上一个或多个位置如Y444F、Y500F和/或Y730F的氨基酸替换。在某些实施例中,病毒衣壳中的一个或多个氨基酸突变降低了免疫原性,增加了显性负突变RhoA转基因的表达和/或增加了显性负突变RhoA转基因表达的持续时间。

[0011] 本文还提供了降低需要此类治疗的受试者眼内压的方法,该方法包括给予本文所述的重组scAAV颗粒的治疗有效量。在某些实施例中,可以通过眼内注射来给予重组scAAV颗粒,可选地,该注射是进入眼睛的前房(例如,到小梁网组织和/或角膜)和/或进入眼睛的后房(例如,到视网膜细胞,包括视网膜神经节细胞(RGC)和/或视网膜色素上皮细胞(RPE))和/或进入虹膜。

[0012] 本发明的另一个方面涉及一种治疗和/或预防需要此类治疗的受试者眼部疾病的方法,该方法包括给予本文所述的重组scAAV颗粒的治疗有效量。

[0013] 本发明的进一步方面是使用本文所述的重组scAAV颗粒来降低需要此类治疗的受试者的眼内压或治疗和/或预防需要此类治疗的受试者眼部疾病的方法。

[0014] 本发明的另一个方面是使用本文所述的重组scAAV颗粒制造用于降低需要此类治疗的受试者的眼内压或治疗和/或预防需要此类治疗的受试者眼部疾病的药物。

[0015] 本发明的这些和其他方面在下面对发明的描述中进行了更详细的阐述。

附图说明

[0016] 图1是用于质粒中的表达盒的示意图。

[0017] 图2是一系列荧光显微镜图像和相关的流式细胞测量图,显示了在汇集的人小梁网(HTM)细胞中转染后72小时,不同启动子驱动的eGFP表达。

[0018] 图3是一系列荧光显微镜图像和相关的流式细胞测量图,显示了在汇集的HTM细胞

上转导后72小时(感染复数为10,000),不同启动子驱动的eGFP表达。

[0019] 图4是通过流式细胞测量法定量GFP阳性细胞的图表,显示了质粒转染或病毒感染后的情况。

[0020] 图5是一张Southern印迹图像,显示了用PvuII-HF限制酶消化含有dnRhoA基因的质粒,并在1%琼脂糖凝胶上观察;泳道1是1千碱基(kb)梯度(Invitrogen),泳道2是pGVB-2001-015的消化产物,泳道3是pGVB-2001-016的消化产物。

[0021] 图6是一张Southern印迹图像,显示了用SmaI限制酶消化含有dnRhoA基因的质粒,并在1%琼脂糖凝胶上观察;泳道1是1kb梯度(Invitrogen),泳道2是pGVB-2001-015的消化产物,泳道3是pGVB-2001-016的消化产物。

[0022] 图7是一张图表,显示了在用三种不同的ROCK激活剂处理HTM细胞后的ROCK活性:鞘氨醇-1-磷酸(S1P) 1 μ M、油酰基L-溶血磷脂酸(LPA) 10 μ M和二甲氧基草酰基甘氨酸(DMOG) 0.5mM;以及一种ROCK抑制剂,Y-27632 50 μ M。

[0023] 图8是一张图表,显示了非感染HTM细胞、用野生型scAAV2衣壳含有dnRhoA基因的HTM细胞感染,或用Y3突变scAAV2衣壳含有dnRhoA基因的HTM细胞感染后的ROCK活性水平;对三名独立供体的HTM细胞进行了测试,并分析了三次AAV感染的技术重复;数据以平均值 $\pm$ 标准误表示,并进行了一次方差分析,随后进行了Dunnett事后检验以比较各组之间;*表示p值<0.033,**表示p值<0.002。

[0024] 图9是一张图表,显示了在Ad5.BMP2注射前后,通过Icare TonoLab张力计测量的眼内压;每根条形图显示了6只眼睛的平均IOP值;统计分析采用了一次方差分析。

[0025] 图10是一张图表,显示了scAAV2.Y3.CBh.dnRhoA注射后,通过Icare TonoLab张力计测量的眼内压。

具体实施方式

[0026] 本发明在下文中进行了更详细的解释。此描述并非旨在成为实施本发明所有不同方式的详细目录,也不是旨在穷尽本发明的所有特征。例如,关于一个实施例所说明的特征可以结合到其他实施例中,而关于特定实施例所说明的特征可以从该实施例中删除。此外,对于本领域的熟练技术人员来说,根据本发明的即时披露,显然可以对本文所述的各种实施例进行许多变化和添加,而不会偏离本发明。因此,以下说明书旨在说明本发明的某些特定实施例,而不是穷尽所有可能的排列、组合和变化。

[0027] 除非上下文另有说明,否则特别意图是,本文描述的发明的各种特征可以以任何组合使用。此外,本发明还考虑了在本发明的一些实施例中,可以排除或省略本文所述的任何特征或特征组合。例如,如果说明书指出一个复合体包含组件A、B和C,则特别意图是,A、B或C中的任何一个,或其组合,都可以被单独或以任何组合排除和放弃。

[0028] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本文用于描述发明的术语是为了描述特定实施例,而不是限制本发明。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、核苷酸序列、氨基酸序列和其他参考文献均以其整体纳入本文作为参考。如果术语发生冲突,以本说明书为准。

[0029] 本文呈现的核苷酸序列仅以单链形式呈现,从左到右为5'到3'方向,除非特别指明。核苷酸和氨基酸以国际纯粹与应用化学联合会-国际生物化学联合会(IUPAC-IUB)生物

化学命名委员会推荐的方式表示,或者(对于氨基酸)以一种字母代码或三种字母代码表示,均符合37C.F.R. §1.822和既定用法。

[0030] 除非另有说明,标准方法已知于本领域的熟练技术人员,可用于生产重组和合成多肽、抗体或其抗原结合片段、操纵核酸序列、生产转化细胞、构建重组腺相关病毒(rAAV)构建体、修饰衣壳蛋白、表达AAV rep和/或cap序列的包装载体,以及瞬时和稳定转化的包装细胞。这些技术为本领域的熟练技术人员所熟知。参见,例如,SAMBROOK等人,《分子克隆:实验室手册》第4版(纽约冷泉港,2012年);F.M. AUSUBEL等人,《分子生物学当前方案》(格林出版协会有限公司和纽约约翰·威利父子公司)。

[0031] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利、核苷酸序列、氨基酸序列和其他参考文献均以其整体纳入本文作为参考。

[0032] 定义

[0033] 在本文的发明描述和所附权利要求中,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”均旨在包括复数形式。

[0034] 本文中,“和/或”指的是包括一个或多个所列项目的所有可能组合,以及当被解释为选择时缺乏组合(“或”)。

[0035] 此外,本发明还考虑了在本发明的一些实施例中,可以排除或省略本文所述的任何特征或特征组合。

[0036] 此外,术语“大约”,当在本文中指代可测量的值,如本发明化合物或剂的量、剂量、时间、温度等时,意味着所指量的 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变化。

[0037] 本文中使用的过渡短语“主要由……组成”应被解释为包括所列举的材料或步骤以及那些不实质性影响所要求发明的基本和新颖特征的材料或步骤。因此,本文中使用的“主要由……组成”不应被解释为等同于“包含”。

[0038] 术语“主要由……组成”(及其语法变体),当应用于本发明的多核苷酸或多肽序列时,指的是一种多核苷酸或多肽,它由所列举的序列(例如,SEQ ID NO)和总共不超过十个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)额外的核苷酸或氨基酸组成,这些额外的核苷酸或氨基酸位于所列举序列的5'和/或3'或N端和/或C端,或者位于两端之间(例如,在结构域之间),使得多核苷酸或多肽的功能没有实质性改变。总共不超过十个额外的核苷酸或氨基酸包括将所有额外的核苷酸或氨基酸加在一起的总数。术语“实质性改变”,当应用于本发明的多核苷酸时,指与由所列举序列组成的多核苷酸相比,表达编码多肽的能力至少增加了约50%或更多。术语“实质性改变”,当应用于本发明的多肽时,指与由所列举序列组成的多肽相比,生物活性至少增加了约50%或更多。

[0039] 术语“增强”或“增加”指所指参数至少增加了约1.25倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、12倍或甚至15倍。

[0040] 本文中使用的术语“抑制”或“减少”或其语法变体指所指水平或活性的减少或降低至少约15%、25%、35%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、95%或更多。在特定实施例中,抑制或减少导致几乎没有或基本上无法检测到活性(最多为约10%或甚至5%的不显著量)。

[0041] 本文中使用的“治疗有效”或“治疗有效”量是一种量,它为受试者提供了一些改善或益处。换句话说,“治疗有效”或“治疗有效”量是一种量,它将为受试者提供至少一种临床

症状的一些缓解、减轻或减少(例如,降低IOP和/或减少眼部退化)。本领域的熟练技术人员将理解,治疗效果不需要是完全的或治愈的,只要为受试者提供了一些益处即可。

[0042] 本文中使用的“治疗”、“治疗”或“治疗”(或语法上等效的术语)的含义是减少或至少部分改善或减轻受试者状况的严重性和/或减轻、减轻或减少至少一种临床症状和/或延缓病情的进展。

[0043] 本文中使用的“预防”、“预防”或“预防”(及其语法变体)的含义是延缓或抑制疾病的发病。这些术语不意味着完全废除疾病,包括任何类型的预防性治疗,以减少疾病、病症和/或临床症状的发生率或延缓其发病。

[0044] 本文中使用的“预防有效”量是一种量,足以预防和/或延缓疾病、病症和/或临床症状在受试者中的发病和/或减少和/或延缓疾病、病症和/或临床症状在受试者中的发病严重性,与在没有本发明方法的情况下相比。本领域的熟练技术人员将理解,预防水平不需要是完全的,只要为受试者提供了一些益处即可。

[0045] 本文中使用的术语“蛋白质”和“多肽”可以互换使用,包括肽和蛋白质,除非另有说明。术语“片段”,当应用于多肽时,将被理解为相对于参考多肽或氨基酸序列长度较短的氨基酸序列,并包含与参考多肽或氨基酸序列相同或几乎相同(例如,90%、92%、95%、98%、99%相同)的连续氨基酸序列。根据本发明的此类多肽片段,如有必要,可以包含在更大的多肽中,它是其组成部分。在某些实施例中,此类片段可以包含、主要由……组成和/或由本发明的多肽或氨基酸序列的至少约4、6、8、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200个或更多连续氨基酸组成。

[0046] 本文中使用的“核酸”、“核苷酸序列”和“多核苷酸”可以互换使用,包括RNA和DNA,包括cDNA、基因组DNA、mRNA、合成(例如,化学合成)的DNA或RNA以及RNA和DNA的嵌合体。术语多核苷酸、核苷酸序列或核酸指核苷酸链,不论链的长度如何。核酸可以是正义链或反义链。

[0047] 本文中使用的术语“基因”指一种核酸分子,能够用于产生mRNA、反义RNA、miRNA等。基因可能或可能不用于产生功能性蛋白质。基因可以包括编码和非编码区域(例如,内含子、调控元件、启动子、增强子、终止序列以及5'和3'非翻译区)。基因可以是“分离的”,其含义是一种核酸,它基本上或本质上没有与自然状态下与核酸结合在一起的成分。此类成分包括其他细胞材料、重组生产培养基和/或用于化学合成核酸的各种化学品。

[0048] 术语“5'部分”和“3'部分”是相对术语,用于定义两个或多个元件之间的空间关系。因此,例如,“3'部分”指多核苷酸的一个片段,该片段位于另一个片段的下游。术语“3'部分”并不意味着该片段一定位于多核苷酸的3'端,甚至也不一定位于多核苷酸的3'半部分,尽管它可能位于那里。同样,“5'部分”指多核苷酸的一个片段,该片段位于另一个片段的上方。术语“5'部分”并不意味着该片段一定位于多核苷酸的5'端,甚至也不一定位于多核苷酸的5'半部分,尽管它可能位于那里。

[0049] 本文中,就核酸而言,术语“可操作地连接”指两个或多个核酸序列之间的功能连接。例如,启动子序列可以被描述为与异源核酸序列“可操作地连接”,因为启动子序列启动和/或介导异源核酸序列的转录。在某些实施例中,可操作连接的核酸序列是连续的和/或处于同一阅读框中。

[0050] 本文中使用的术语“开放阅读框(ORF)”指多核苷酸(例如,基因)的一部分,它编码

多肽,并包括启动转录多肽的起始位点(即,Kozak序列)。术语“编码区”可以与开放阅读框互换使用。

[0051] 本文中使用的术语“优化”或“优化用于表达”,指病毒颗粒已被优化以增加病毒载体中基因的表达式。在某些实施例中,病毒颗粒已被优化以增加在生物体(例如,人类、动物、植物、真菌、古菌或细菌)中和/或在所述生物体的组织类型(例如,眼部组织、脑组织、肌肉组织等)中基因的表达式。在某些实施例中,病毒颗粒通过病毒载体中基因编码序列的密码子优化来实现优化。在某些实施例中,病毒颗粒通过使用特定的病毒血清型(例如,AAV2或AAV5)来实现优化。在某些实施例中,病毒颗粒通过突变病毒衣壳蛋白的氨基酸序列来实现优化。在某些实施例中,优化的病毒衣壳蛋白包含Y3突变(例如,Y444F、Y500F和Y730F突变)。在某些实施例中,与未优化的参考颗粒相比,优化的病毒颗粒在生物体和/或组织类型中表达病毒载体中的基因时,表达量增加了约5%到约1000%(例如,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、350%、400%、450%、500%、600%、700%、800%、900%或约1000%)。

[0052] 本文中使用的术语“密码子优化”指基因编码序列或基因编码序列片段已被优化,通过将野生型序列(例如,野生型序列,包括但不限于编码RhoA蛋白的编码序列)中存在的一个或多个密码子替换为编码相同(同义)氨基酸的密码子,从而增加表达式。通过这种方式,由基因或基因片段编码的蛋白质或蛋白质片段是相同的,但基因或基因片段的底层核苷酸序列或相应的mRNA是不同的。在某些实施例中,优化通过替换一个或多个稀有密码子(即,相对不频繁地出现在特定物种细胞中的tRNA的密码子)为更频繁出现的同义密码子来提高翻译效率。例如,在人类密码子优化中,编码序列中的一个或多个密码子被替换为在人类细胞中更频繁出现的密码子,用于相同的氨基酸。密码子优化也可以通过其他机制增加基因或基因片段的表达式,从而提高转录和/或翻译的效率。策略包括但不限于,增加总GC含量(即,整个编码序列中鸟嘌呤和胞嘧啶的百分比)、降低CpG含量(即,编码序列中CG或GC二核苷酸的数量)、去除隐匿的剪接供体或受体位点和/或添加或去除核糖体进入和/或起始位点,如Kozak序列。理想情况下,密码子优化的基因或相应的mRNA在体外或体内可以与内源性基因和/或相应的mRNA区分开来。

[0053] 本文中使用的“分离的”核酸或核苷酸序列(例如,“分离的DNA”或“分离的RNA”)指一种核酸或核苷酸序列,它已从自然发生生物体或病毒的至少一些其他成分中分离出来,例如,细胞或病毒结构成分或其他通常与核酸或核苷酸序列结合在一起的多肽或核酸。

[0054] 同样,“分离的”多肽指一种多肽,它已从自然发生生物体或病毒的至少一些其他成分中分离出来,例如,细胞或病毒结构成分或其他通常与多肽结合在一起的多肽或核酸。

[0055] 本文中使用的术语“修饰的”,当应用于多核苷酸或多肽序列时,指由于一个或多个缺失、添加、替换或这些的任何组合而与野生型序列不同的序列。

[0056] 本文中,通过“分离”病毒载体,意味着病毒载体已从起始材料中的至少一些其他成分中至少部分分离出来。

[0057] 本文中,“序列一致性”指两个最佳对齐的多核苷酸或蛋白质序列在整个对齐窗口中保持不变的程度。可以通过已知方法计算“一致性”,包括但不限于:《计算分子生物学》(Lesk,A.M.,ed.)牛津大学出版社,纽约(1988年);《生物信息学:信息学和基因组项目》

[0058] (Smith,D.W.,ed.)学术出版社,纽约(1993年);《计算机序列数据分析》(Griffin,

[0059] A.M.和Griffin,H.G.,eds.)Humana出版社,新泽西(1994年);《序列分析在分子生物学中的应用》(von Heinje,G.,ed.)学术出版社(1987年);以及《序列分析入门》

[0060] (Gribskov,M.和Devereux,J.,eds.)斯托克顿出版社,纽约(1991年)。

[0061] 本文中使用的术语“基本上相同”或“对应于”意味着两个核酸序列具有至少60%、70%、

[0062] 80%或90%的序列一致性。在某些实施例中,两个核酸序列可以具有至少85%、90%、

[0063] 95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性。

[0064] 对于对齐的测试序列和参考序列片段的“一致性分数”是两个对齐序列共享的相同组分(即,核苷酸或氨基酸)的数量除以参考序列片段中的总组分数量,即,整个参考序列或参考序列的一个较小定义部分。

[0065] 本文中使用的术语“百分比序列一致性”或“百分比一致性”指参考(“查询”)多核苷酸分子(或其互补链)与测试(“主题”)多核苷酸分子(或其互补链)在最佳对齐时(允许适当插入缺失、插入或空位,总计不超过参考序列比较窗口的20%),相同核苷酸的百分比。在某些实施例中,“百分比一致性”可以指氨基酸序列中相同氨基酸的百分比。

[0066] 对于序列比对以确定比较窗口中的最佳比对,本领域的熟练技术人员非常熟悉,并且可以通过诸如Smith和Waterman的局部同源性算法、Needleman和Wunsch的同源性比对算法、Pearson和Lipman的相似性搜索方法等工具进行,以及这些算法的计算机化实现,如GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,这些工具是GCG®Wisconsin Package®

[0067] (Accelrys Inc.,马萨诸塞州伯灵顿)的一部分。百分比序列一致性表示为一致性分数乘以100。多核苷酸序列的比较可以是针对全长多核苷酸序列或其一部分,也可以是针对更长的多核苷酸序列。出于本发明的目的,“百分比一致性”也可以使用BLASTX版本2.0(用于翻译核苷酸序列)和BLASTN版本2.0(用于多核苷酸序列)来确定。

[0068] 可以使用“最佳拟合”或“空位”程序来确定百分比序列一致性,这些程序是序列分析软件包™(版本10;威斯康星州麦迪逊的遗传计算机组公司)的一部分。“空位”利用Needleman和Wunsch的算法(Needleman和Wunsch,J Mol.Biol.48:443-453,1970年)来找到两个序列的最佳比对,以最大化匹配数并最小化空位数。“最佳拟合”执行两个序列之间最佳相似片段的最优比对,并插入空位以最大化匹配数,使用Smith和Waterman的局部同源性算法(Smith和Waterman,Adv.Appl.Math.,2:482-489,1981年,Smith等人,Nucleic Acids Res.11:2205-2220,1983年)。

[0069] 确定序列一致性的有用方法也在《大型计算机指南》(Martin J.Bishop,ed.,学术出版社,圣地亚哥,1994年)和Carillo,H.和Lipton,D.(应用数学48:1073(1988年))中有描述。更具体地说,用于确定序列一致性的首选计算机程序包括但不限于国家生物技术信息中心(NCBI)从国家医学图书馆、国家卫生研究院(马里兰州贝塞斯达)公开提供的BLAST程序;参见BLAST手册,Altschul等人,NCBI,NLM,NIH;(Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410(1990年));版本2.0或更高版本的BLAST程序允许在比对中引入空位(缺失和插入);对于肽序列,BLASTX可用于确定序列一致性;对于多核苷酸序列,BLASTN可用于确定序列一致性。

[0070] “载体”指用作将外源遗传物质携带到另一个细胞中的工具的化合物,其中可以在

目标细胞中复制和/或表达插入物。含有外源核酸的克隆载体称为重组载体。核酸载体的例子包括质粒、病毒载体、人工染色体等。重组载体通常包含一个复制起点、一个多克隆位点和一个选择标记。核酸序列通常由插入物(重组核酸或转基因)和作为载体“骨架”的较大序列组成。载体将遗传信息转移到另一个细胞中的目的是通常在目标细胞中隔离、复制或表达插入物。载体插入目标细胞的过程对于细菌和真核细胞被称为转化或转染,尽管病毒载体的插入通常被称为转导。术语“载体”也可以更一般地用来描述将外源遗传物质携带到另一个细胞中的项目,例如但不限于,转化细胞或纳米颗粒。

[0071] 本文中使用的术语“启动子”指一种多核苷酸序列,聚合酶(DNA或RNA)或相关转录因子可以结合到该序列上以开始转录。在某些实施例中,启动子可以是来自病毒(例如,CMV、AAV等)、原核生物(例如,大肠杆菌)或真核生物(例如,人类、鸡、小鼠、酵母等)基因组的启动子序列。在某些实施例中,真核启动子具有低免疫原性,例如,包含该真核启动子的病毒载体具有约1%到约30%(例如,约1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%或约30%)的抗药物抗体(ADA)反应率。在某些实施例中,真核启动子在受试者中具有稳定的表达,例如,从包含该真核启动子的病毒载体中的表达具有约1%到约40%(例如,约1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或约40%)的方差,从基线表达水平开始,给予所述受试者后。在某些实施例中,启动子可以是短启动子,例如,序列长度约为100个核苷酸到约2,000个核苷酸(例如,约100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,100或约1,200个核苷酸的长度)。在某些实施例中,短启动子约为500到约1,000个核苷酸的长度(例如,约500、600、700、800、900或约1,000个核苷酸)。在某些实施例中,启动子是CMV5、CBA或EF1 α 启动子(例如,截短的EF1 α 启动子)。在某些实施例中,EF1 α 启动子约为1,000到约1,400个核苷酸的长度(例如,约1,000、1,100、1,200、1,300或约1,400个核苷酸)。在某些实施例中,启动子可以是杂合启动子,例如,其中来自一种或多种不同生物体的两个启动子序列可操作地连接在一起。在某些实施例中,杂合启动子是CBh启动子(例如,CMV和鸡 β -肌动蛋白杂合启动子)。在某些实施例中,CBA和/或CBh启动子约为400到约1,000个核苷酸的长度(例如,约400、500、600、700、800、900或约1,000个核苷酸)。

[0072] 本发明的“受试者”可以包括任何需要的动物。在某些实施例中,受试者可以是,例如,哺乳动物、爬行动物、鸟类、两栖动物或鱼类。哺乳动物受试者可以包括但不限于,实验动物(例如,大鼠、小鼠、豚鼠、兔子、灵长类动物等)、农场或商业动物(例如,牛、猪、马、山羊、驴、绵羊等)或家养动物(例如,猫、狗、雪貂、仓鼠、沙鼠等)。在某些实施例中,哺乳动物受试者可以是灵长类动物,或非人类灵长类动物(例如,黑猩猩、狒狒、猕猴(例如,恒河猴、食蟹猴、短尾猴、猪尾猴)、猴子(例如,松鼠猴、猫头鹰猴等)、狨猴、大猩猩等)。在某些实施例中,哺乳动物受试者可以是人类。

[0073] 本发明的“需要治疗的受试者”可以是任何已知或怀疑有患眼部疾病(例如,青光眼、AMD(例如,干性AMD或湿性AMD)、糖尿病视网膜病变和/或视网膜裂孔)风险增加的受试者,和/或眼内高血压(IOP增加)。

[0074] 组合物和制剂本文提供了重组scAAV载体和使用相同载体治疗眼部疾病(例如,青光眼)和/或眼内高血压的方法。因此,本公开提供了重组scAAV颗粒、包含重组scAAV颗粒的组合物以及治疗眼部疾病(例如,青光眼)和/或眼内高血压的方法。在某些实施例中,本文所述的病毒载体可以与任何AAV衣壳一起使用,无论是否含有突变,用于制造用于治疗眼部

疾病(例如,青光眼)和/或眼内高血压的AAV颗粒,或其任何组合。本文还提供了用于眼内注射的病毒注射液的制药配方和剂量。本文的另一个方面是用于治疗眼部疾病(例如,青光眼)和/或眼内高血压的常用注射途径,或其任何组合。本文的其他方面与病毒载体在青光眼患者中的治疗效果有关。

[0075] 本发明的当前发明人一直在优化传递载体、其货物以及调节货物基因表达的潜在机制。对于传递载体,发明人寻找了一种具有长小梁网持续时间、低免疫原性,并且选择和突变衣壳病毒以增加基因转移效率的载体。对于货物,识别了一种有效的显性负突变RhoA,以在青光眼动物模型中降低IOP。对于启动子,选择了一种杂合鸡 β -肌动蛋白(CBh)启动子来驱动转基因表达。综合来看,本发明的病毒载体可能包含一个RhoA基因,其中包含显性负突变(例如,SEQ ID NO:4)和一个普遍启动子,如CBh(SEQ ID NO:3)。制造了病毒载体(SEQ ID NO:7),并在体外进行了表征,随后在大鼠青光眼模型中测试了其疗效。

[0076] 在某些实施例中,AAV颗粒可以具有改变的VP1衣壳蛋白、改变的VP2衣壳蛋白、改变的VP3衣壳蛋白,或其任何组合。在本文所述的方面和实施例的某些实施例中,AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV12、AAV2R471A、牛AAV和/或小鼠AAV。在某些实施例中,AAV病毒颗粒包含一个AAV衣壳,其中含有一个或多个氨基酸替换,位于Y444F、Y500F和/或Y730F位置,根据AAV2的VP1编号(SEQ ID NO:5)。在某些实施例中,载体包含倒置末端重复序列(ITR)的血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV12、AAV2R471A、牛AAV和/或小鼠AAV。在某些实施例中,载体包含突变的AAV ITR,导致形成自互补AAV。在某些实施例中,AAV病毒颗粒包含一个或多个ITR,其衣壳来源于同一种AAV血清型。在其他实施例中,重组scAAV病毒颗粒包含一个AAV2衣壳,其中载体包含一个AAV2 ITR。

[0077] 在某些实施例中,可以使用各种制剂来促进病毒在眼部组织中的转导。例如,对于重组scAAV颗粒的可注射水溶液的给药,如果需要,该溶液可以适当缓冲,并且液体稀释剂首先用足够的盐水或葡萄糖使其等渗。因此,在某些实施例中,病毒注射液可以包含药学上可接受的载体。术语“载体”指与重组scAAV颗粒一起给药的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。通过“药学上可接受的”是指该材料不具有毒性或其他不期望的特性,即,该材料可以给药于受试者而不会引起任何不期望的生物学效应。此类药学载体可以是无菌液体(例如,水、油、盐水溶液、含葡萄糖的水溶液和/或甘油溶液)、悬浮剂、防腐剂(例如,甲基、乙基和/或丙基-羟基苯甲酸酯)和pH调节剂(如无机酸、有机酸和/或碱)。在某些实施例中,载体包括缓冲盐水溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水、HEPES缓冲盐水等)。在某些实施例中,可以使用美国药典(USP)级别的载体和赋形剂,用于向人类受试者输送重组scAAV颗粒。此类组合物还可以进一步任选地包含脂质体、脂质、脂质复合物、微球、微粒、纳米球和/或纳米颗粒,或者可以以其他方式配制用于向需要的受试者的细胞、组织、器官或身体输送。

[0078] 在某些实施例中,包含本文所述的任何一种重组scAAV颗粒的组合物包含平衡盐溶液(BSS),补充约0.001%到约0.035%的吐温20(聚山梨酯20)(例如,约0.001%、0.007%、0.014%、0.021%、0.028%或约0.035%或其中的任何范围)。在某些实施例中,包含本文所述的任何一种重组scAAV颗粒的组合物包含从约25mM到约500mM的柠檬酸钠(例如,约25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450或约500mM或其中的任

何范围),从约1mM到约50mM的Tris(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或约50mM或其中的任何范围),pH 8.0,补充约0.0001%到约0.005%的普朗尼克F 68(例如,约0.0001%、0.0002%、0.0003%、0.0004%、0.0005%、0.0006%、0.0007%、0.0008%、0.0009%、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%或约0.005%或其中的任何范围)。

[0079] 使用方法

[0080] 本发明的方法在兽医和医学应用中都有用。

[0081] 本发明的AAV颗粒的剂量取决于给药方式、要治疗的疾病或状况、个体受试者的状况、病毒载体和要传递的基因,可以通过常规方式确定。实现治疗效果的示例剂量是至少约 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 转导单位或更多,优选约 10^8 - 10^{13} 转导单位,更优选 10^{11} 转导单位。

[0082] 本文中使用的“给药”或“给药”术语指将本发明的组合物引入或输送给受试者,以执行其预期功能(例如,降低受试者的IOP或治疗青光眼)。在某些实施例中,重组scAAV病毒载体可以通过眼内注射给药。本文中使用的“眼内注射”术语指任何方便的注射途径,可以将重组scAAV载体输送至眼部组织(例如,眼睛的任何部分)。在某些实施例中,眼内注射是注射到眼睛的前部(例如,前房),例如,通过前房注射。在某些实施例中,眼内注射是注射到眼睛的后部(例如,后房),例如,注射到眼睛的玻璃体中,例如,通过玻璃体注射。在某些实施例中,眼内注射是注射到眼睛的角膜中,例如,通过角膜基质内注射。在某些实施例中,眼内注射是注射到眼睛的感光视网膜下,例如,通过视网膜下注射。在某些实施例中,眼内注射是注射到眼睛的视网膜下空间(例如,脉络膜上空间),例如,通过脉络膜上注射。其他方便的给药途径包括但不限于,静脉内、动脉内、眼周、结膜下和筋膜下注射,局部给药(例如,眼部局部给药)和鼻内给药。

[0083] 本文的病毒载体可能治疗或预防神经功能障碍有效。在某些实施例中,本文所述的病毒载体可以为视网膜细胞(如视网膜神经节细胞)提供依赖IOP或不依赖IOP的神经营养保护。在某些实施例中,本文所述的病毒载体通过降低IOP和/或提供直接神经营养保护来预防青光眼的进展。在某些实施例中,病毒载体通过同时提供直接神经营养保护和降低眼内压来预防青光眼的进展。这种疗法提供了在青光眼治疗中意想不到的双重益处。在某些实施例中,病毒载体可以在不降低IOP的情况下预防青光眼的进展。因此,这种治疗方法可能提供一种意想不到的益处,即IOP独立的神经营养保护效果。在某些实施例中,本文所述的病毒载体可以加速角膜损伤后的伤口愈合。因此,这种治疗方法提供了角膜保护的意想不到的益处。在描述了本发明之后,将在下面的实施例中进一步解释相同的发明,这些实施例仅出于说明目的包含在本文中,并且不旨在限制本发明。

[0084] SEQ ID NO:1

[0085] 启动子CMV5

[0086] CGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG CCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT ACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCC

CGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC
CTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTT
CCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCG
ACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAACAGTCACAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGG
CAGCGGGTGGCGGTGCGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTAAAGTAGGCGGTCTTGAGACGGC
GGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCCGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATGAC
TTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTACCTGGCCCCGATCTGGCCATACACTTGA
GTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAA

[0087] SEQ ID NO:2

[0088] 启动子截短的EF1 α

[0089] GAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTT
TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCG
CCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCGCCGCGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTG
AATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTC
GAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTG
CGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTG
CTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG
GGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGGTCCCAGCGCACATGTTGCGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCG
AGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCG
CCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGG
GAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCG
TCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTT
GGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA
AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGATCTTGTTTCATTCTC
AAGCCTCAGACAGTGGTTC AAAGTTTTTTTCTTCCATTT CAGGTGTCGTGA

[0090] SEQ ID NO:3

[0091] 启动子杂合鸡 β -肌动蛋白 (CBh)

[0092] CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAAT
AGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCAGTAC
ATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCC
CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGATTTATTTATTTTTTAATTATTTT
GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCG
AGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGCG
GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG

[0093] SEQ ID NO:4

[0094] 显性负突变RhoA (T19N) 的氨基酸序列

[0095] MAAIRKKLVIVGDGACGKNCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRL
RPLSYPD TDVILMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCNPVPIILVGNKKDLRND EHTRRELAKMKQEPVKPEEGRD

MANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

[0096] SEQ ID NO:5

[0097] AAV2 VP1的氨基酸序列

[0098] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEAD
AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPV
EHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRPDWQRLI
NNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGY
LTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHQSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGT
TTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEE
KFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQD
RDVYLQGPWIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWE
LQKENSkrwnPEIQYTSNynksVnVDFtVDTngvySEPRPIgTRYLTrNL

[0099] SEQ ID NO:6

[0100] 野生型RhoA的氨基酸序列

[0101] MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRL
RPLSYPTDVLIMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCNPVPIILVGNKKDLRNDHTRRELAKMKQEPVKPEEGRD
MANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

[0102] SEQ ID NO:7

[0103] 包含CBh启动子和dnRhoA基因的scAAV2.CBh.dnRhoA载体序列

[0104] CTGGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTA
ACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGATCTGAATTCGGTACCCGTTACATAACTTACGGTAAATG
GCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCATTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT
GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGG
ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTC
ACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGG
GGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTG
CGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAA
AAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGTCCGCCGCCGCTCGCGCC
GCCCCCCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAAT
TAGCTGAGCAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCC
TGAAATCACTTTTTTTTTCAGGTTGGGAGCAATGGCTGCCATCCGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGT
GGAAAGAACTGCTTGCTCATAGTCTTCAGCAAGGACCAGTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTA
TGTGGCAGATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAAGATTATGATC
GCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTTTCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAA
AACATCCCAGAAAAGTGACCCCAAGTCAAGCATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAA
GGATCTTCGGAATGATGAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGCA

GAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAAGATGGAGTGAGAGAGGTT
TTTGAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGGAAGAAAAAATCTGGTTGCCTTGTCTTGTGAGCGGC
CGCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTAAAGTAAACAACAACAATT
TATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT
GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTTAGTCGACTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCG
ACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCC
CACTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTTCTGGGGGGTGGGG
TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGAACCCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCGCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
CTGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCAC
TGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGTCACTCAAAGGCGGTAATACGTTATCCACAG
AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTG
CTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTA
CCGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCG
GTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA
CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG
CGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT
ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGG
TAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTT
CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
ACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTCA
GAAGAAGTCAAGAAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGC
GGTCAGCCCATTTCGCCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACA
CCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATG
GGTCACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGAT
GCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCT
TGGTGGTCAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTC
GGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCACTTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAG
TGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGACGT
TCATTCAGGGCACCGGACAGGTGCGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGC
ATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGAGAACCTGCGT
GCAATCCATCTTGTTCATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGC
GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGA
CGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTT
TCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGG
AGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCA
GATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGAATT
CCAACATCCAATAAATCATACAGGCAAGGCAAAGAATTAGCAAAATTAAGCAATAAAGCCTCAGAGCATAAAGCTAA

ATCGGTTGTACCAAAACATTATGACCCTGTAATACTTTTGCGGGAGAAGCCTTTATTTCAACGCAAGGATAAAAAT
TTTTAGAACCCTCATATATTTTAAATGCAATGCCTGAGTAATGTGTAGGTAAAGATTCAAACGGGTGAGAAAGGCCG
GAGACAGTCAAATCACCATCAATATGATATTCAACCGTTCTAGCTGATAAATTCATGCCGGAGAGGGTAGCTATTTT
TGAGAGGTCTCTACAAAGGCTATCAGGTCATTGCCTGAGAGTCTGGAGCAAACAAGAGAATCGATGAACGGTAATCG
TAAACTAGCATGTCAATCATATGTACCCCGGTTGATAATCAGAAAAGCCCCAAAAACAGGAAGATTGTATAAGCAA
ATATTTAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAA
TAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGAA
CAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTAC
GTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCC
CGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAG
GGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCTAACACCACACCCGCCGCGTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGT
ACTATGGTTGCTTTGACGAGCACGTATAACGTGCTTTCCTCGTTAGAATCAGAGCGGGAGCTAAACAGGAGGCCGAT
TAAAGGGATTTTAGACAGGAACGGTACGCCAGAATCCTGAGAAGTGTTTTTATAATCAGTGAGGCCACCGAGTAAAA
GAGTCTGTCCATCACGCAAATTAACCGTTGTCGCAATACTTCTTTGATTAGTAATAACATCACTTGCCTGAGTAGAA
GAACTCAAATATCGGCCTTGCTGGTAATATCCAGAACAAATATTACCGCCAGCCATTGCAACAGGAAAAACGCTCAT
GGAAATACCTACATTTTGACGCTCAATCGTCTGGAATTCATTGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCG
ATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAG

[0105] 实施例

[0106] 实施例1:比较用于驱动HTM细胞中GFP表达的启动子

[0107] 为了识别HTM细胞中的合适启动子,比较了几种启动子用于驱动绿色荧光蛋白(GFP)表达的效率。选择了四个常用的启动子来构建质粒(图1):CMV5(SEQ ID NO:1)、EF1 α (SEQ ID NO:2)和CBh(SEQ ID NO:3)。第一步是通过Lipofectamine(ThermoFisher)转染测试新质粒在HTM细胞中的表达。HTM细胞(来自两名个体供体)在转染前一天接种到24孔板中,以达到70-80%的汇合度。使用Lipofectamine3000转染试剂(ThermoFisher)将0.5 μ g质粒转染到细胞中,以检查启动子效率。细胞生长72小时后,通过荧光显微镜观察,并通过流式细胞测量法定量GFP阳性细胞的比例。总体而言,通过荧光显微镜和流式细胞测量法记录的HTM细胞中GFP表达水平在不同启动子组之间相似(图2和图4)。

[0108] 通过AAV病毒转导的形式在HTM细胞中进一步测试启动子效率。使用之前转染实验中使用的质粒包装AAV颗粒。由于质粒都包含delta-ITR,病毒DNA是自互补的。选择带有Y3突变(Y444F、Y500F和Y730F)的AAV2作为衣壳。然后,将HTM细胞接种到24孔板中。细胞以10,000MOI感染。细胞生长3天后进行检查。通过流式细胞测量法记录的GFP阳性细胞比例在不同启动子组之间显示出不同的结果。与包含CMV5和EF1 α 启动子的载体感染的细胞组相比,包含CBh启动子的载体感染的细胞组GFP阳性细胞比例要高得多(图3和图4)。

[0109] 实施例2:构建scAAV2.dnRhoA

[0110] 为了产生重组scAAV病毒颗粒,将货物序列(例如,显性负突变RhoA)插入ITR(野生型和缺失型,ITR- Δ ITR)中,以创建特别设计的质粒,命名为pGVB-2001-15和pGVB-2001-16。在pGVB-2001-15和pGVB-2001-16质粒中分别使用EF1 α 和CBh启动子。RhoA的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,显性负突变是一个T19N突变,如dnRhoA序列(SEQ ID NO:4)所示。通过PvuII-HF限制酶消化验证了包含dnRhoA的质粒,然后进行内毒素免费最大制备(图5)。通过

SmaI消化验证了ITR区域的完整性(图6)。然后,通过将质粒三重转染到HEK293细胞中生产scAAV2。通过碘克沙醇梯度超速离心纯化病毒制剂。梯度的制备方法是依次加入:6mL 15%碘克沙醇,6mL 25%碘克沙醇,5mL 40%碘克沙醇和5mL 54%碘克沙醇。将7-8mL裂解物加入梯度顶部,然后用磷酸盐缓冲液(PBS)将试管加满。

[0111] 样品以350,000x g的离心力在18°C下离心2小时。离心后,用一个1英寸长、18号针头连接到10mL注射器上,在40/54界面下方3-5mm处刺穿试管。收集大约1mL的54%界面,收集4mL的40%界面,而不干扰40/25界面处的蛋白质物质。

[0112] 超速离心纯化后,病毒被浓缩并经过缓冲液置换,使用Amicon ultra-15 50kDa离心过滤器。通过向过滤器中加入15mL含有0.1% Pluronic F-68的PBS来准备过滤器,并在室温下孵育10分钟。孵育后,丢弃0.1% Pluronic溶液。然后向过滤器中加入15mL含有0.01% Pluronic的PBS,并以2000x g的离心力离心5分钟,丢弃滤液。最后,向过滤器中加入15mL含有0.001% Pluronic和200mM NaCl的PBS,并以2000x g的离心力离心5分钟,丢弃滤液。准备过滤器后,将样品稀释1:2与配方缓冲液(含有0.001% Pluronic F-68的PBS)。将样品加入过滤器中,并以2000x g的离心力离心5分钟。丢弃滤液后,可以继续加入更多样品并离心。将所有样品浓缩在过滤器上后,加入配方缓冲液,并重复离心,直到有50mL配方缓冲液通过过滤器。然后以2-3分钟的短间隔继续离心,直到达到所需的体积。

[0113] 实施例3:使用基于细胞的检测方法测试scAAV2.CBh.dnRhoA的功能RhoA是一种GTP结合蛋白,它在活性和非活性形式之间循环,以激活ROCK。过表达dnRhoA与内源性RhoA竞争与ROCK的结合,从而抑制ROCK的激活。在细胞中测量ROCK的活性可以开发为一种基于细胞的检测方法,用于测试scAAV2.CBh.dnRhoA的功能。

[0114] Rho家族成员是信号通路的关键调控组分,该通路通过重排肌动蛋白细胞骨架来指导细胞运动、粘附和细胞分裂。Rho通过诸如溶血磷脂酸(LPA)等细胞外信号被激活。Rho的作用通过下游Rho效应子介导。其中一种效应子是ROCK。ROCK介导Rho信号传导,并通过磷酸化几种有助于肌动蛋白丝组装和收缩性的底物来重排肌动蛋白细胞骨架。例如,ROCK通过特异性磷酸化肌球蛋白磷酸酶靶亚基1(MYPT1)上的Thr696位点使肌球蛋白磷酸酶失活,从而导致20kDa肌球蛋白轻链的磷酸化含量增加。

[0115] ROCK活性检测试剂盒是一种用于检测ROCK特异性磷酸化MYPT1上Thr696位点的酶免疫分析试剂盒。一个条带式微孔板预先涂有重组MYPT1。在将底物孔与ROCK样本孵育后,通过抗磷酸化MYPT1(Thr696)抗体检测磷酸化的MYPT1。

[0116] 将人小梁网细胞以每孔500,000个细胞的密度接种到12孔板中。接种48小时后,用细胞裂解缓冲液收获细胞。在与预涂条带孔孵育前,用ROCK激活剂或ROCK抑制剂处理细胞裂解物。然后按照试剂盒的方案测量ROCK活性。使用三种化学物质激活ROCK:S1P(鞘氨醇-1-磷酸,1 μ M)、LPA(油酰基L-溶血磷脂酸,10 μ M)和DMOG(二甲氧基草酰基甘氨酸,0.5mM)。使用一种化学物质抑制ROCK活性:Y-27632(50 μ M)。数据以相对ROCK活性表示,以未处理细胞裂解物为基准进行标准化。如图7所示,所有化学激活剂均增加了ROCK活性,其中LPA是最强的激活剂。化学抑制剂降低了ROCK活性,正如预期的那样。

[0117] 在接下来的实验中,将人小梁网细胞以每孔500,000个细胞的密度接种到12孔板中。进行scAAV2.Y3.CBh.dnRhoA或scAAV2.CBh.dnRhoA的感染,MOI为10,000,以比较野生型AAV2衣壳和Y3突变AAV2衣壳。感染后2天收获细胞。测量ROCK活性。与野生型衣壳感染的细

胞相比,Y3突变衣壳感染的细胞中ROCK活性的降低在统计学上具有显著性,而野生型衣壳感染的细胞中ROCK活性的降低则不那么明显(图8)。

[0118] 实施例4:在HTM细胞转导scAAV2.CBh.dnRhoA后测量RhoA表达在接下来的实验中,将人小梁网细胞以每孔500,000个细胞的密度接种到12孔板中。进行scAAV2.Y3.CBh.dnRhoA的感染,MOI为10,000。感染后2天收获细胞以提取总RNA。通过纳米滴测量RNA含量。进行RT-PCR以测量总RhoA的表达。

[0119] 实施例5:使用青光眼转基因模型测试scAAV2.CBh.dnRhoA的疗效

[0120] 在Ad.BMP2转导的青光眼大鼠模型中测试了scAAV2.Y3.CBh.dnRhoA的疗效。通过增加小梁网组织对房水流出的阻力来升高眼内压。这种增加的阻力可以由多种功能失调的小梁网细胞和机制引起。然而,普遍认为,小梁网细胞外基质(ECM)组织结构的破坏是增加流出阻力的最常见来源。骨形态发生蛋白2(BMP2)属于TGF β 超家族。BMP2本身具有引发骨形成和诱导多能间充质祖细胞向成骨系分化的全部潜力。同样,BMP2在体外诱导原代HTM细胞表现出成骨样特征。通过腺病毒载体过表达BMP2基因可以增加原代HTM细胞中的碱性磷酸酶(ALP)活性,这种酶促进自由磷酸盐的释放,并有助于羟基磷灰石晶体(这是矿化过程的一部分)的形成。在小梁网组织中过表达BMP2基因足以升高眼内压,并创造出类似眼内高压或青光眼的动物模型。

[0121] 在Ad5.BMP2注射前,使用TonoLab张力计(Icare)测量大鼠基线眼内压。在麻醉状态下,将约5 μ l Ad5.BMP2病毒(滴度为 1.8×10^{10} pfu/ml)注射到大鼠眼睛的前房中。然后,监测眼内压至注射后第28天。大鼠眼睛的基线眼内压约为12mmHg。注射Ad5.BMP2后,平均眼内压迅速升高至约25mmHg,然后稳定在约15mmHg(图9)。在所有测量时间点,眼内压的升高均具有显著性。

[0122] 一旦建立了眼内压升高,就注射scAAV2.Y3.CBh.dnRhoA以降低眼内压。仅选择与基线相比眼内压升高超过50%的眼睛进行AAV注射。然后,持续监测眼内压至AAV注射后第14天。在AAV注射后仅7天,观察到约50%的眼内压降低。然后,眼内压维持在接近基线的水平,直至第14天(图10)。

[0123] 前述内容是对本发明的说明,但不应被理解为对本发明的限制。本发明由以下权利要求定义,权利要求的等同物也应包含在其中。



图1

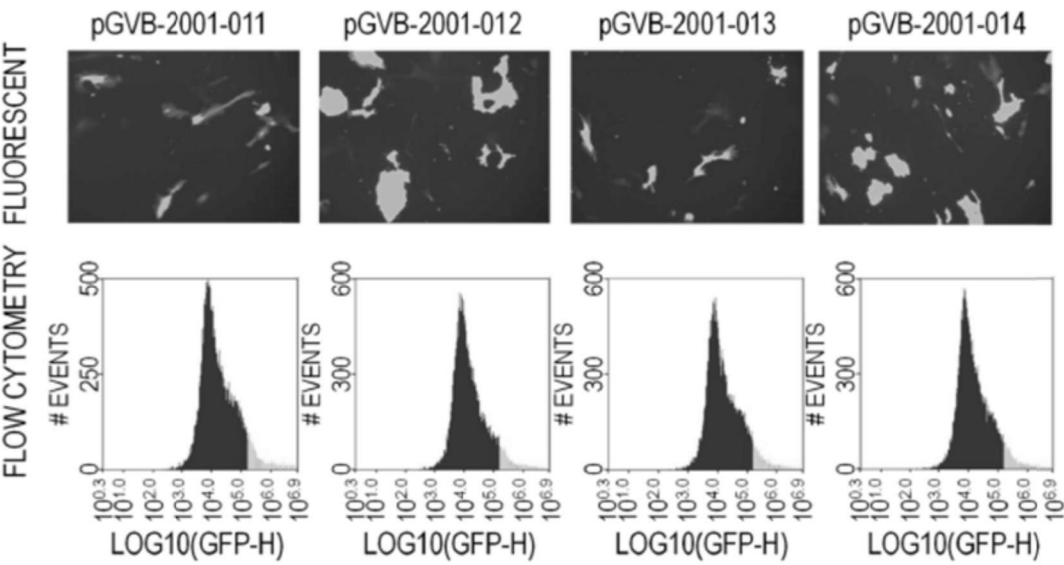


图2

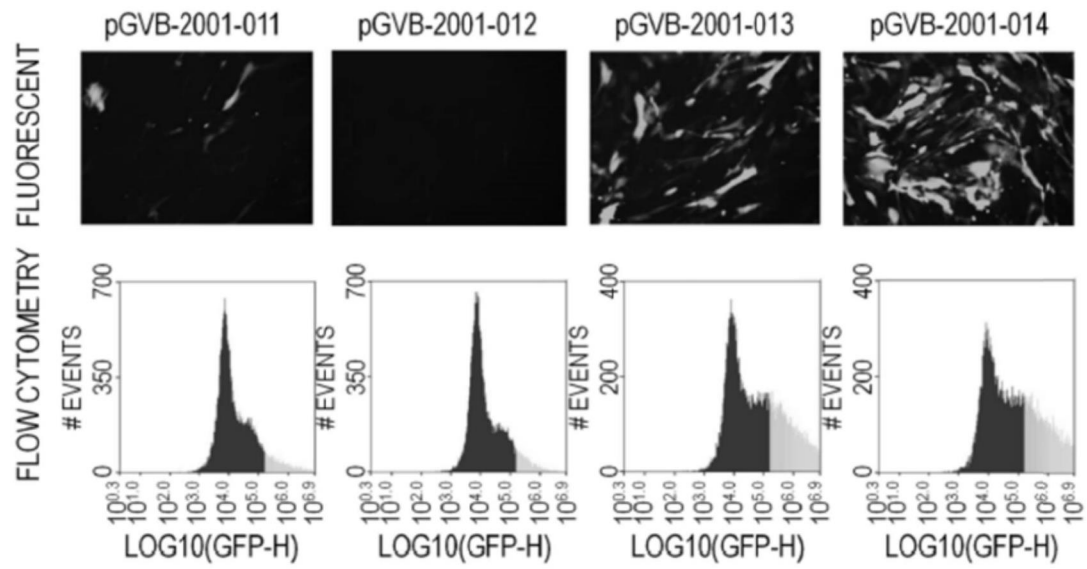


图3

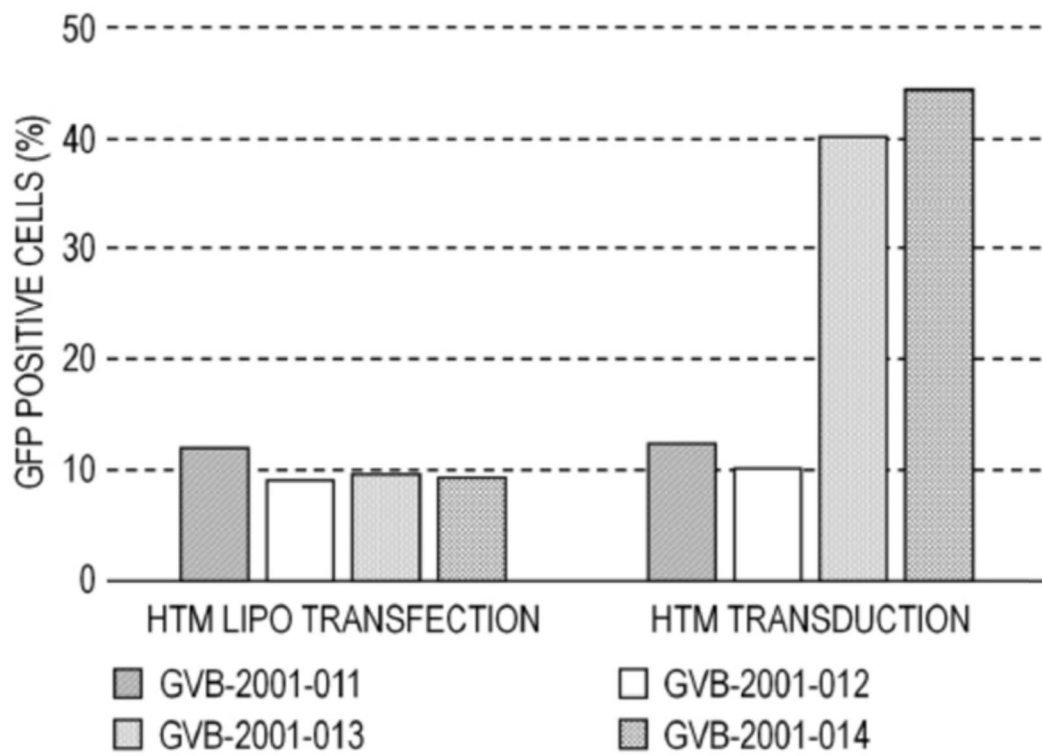


图4

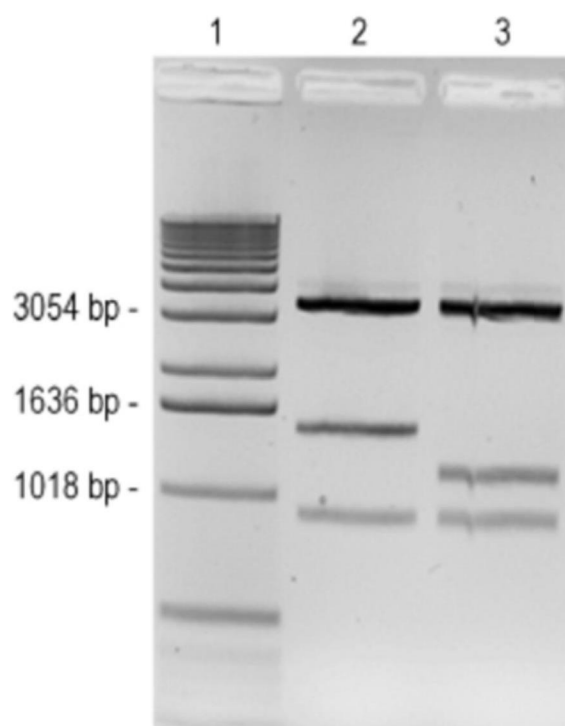


图5

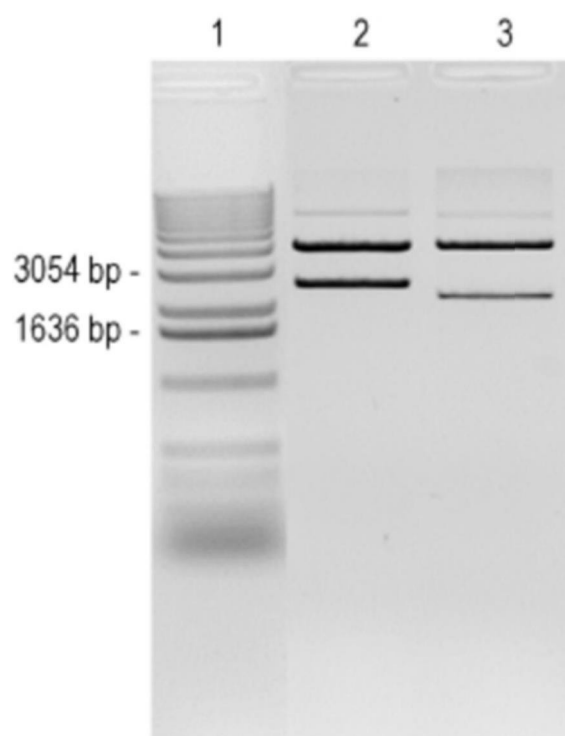


图6

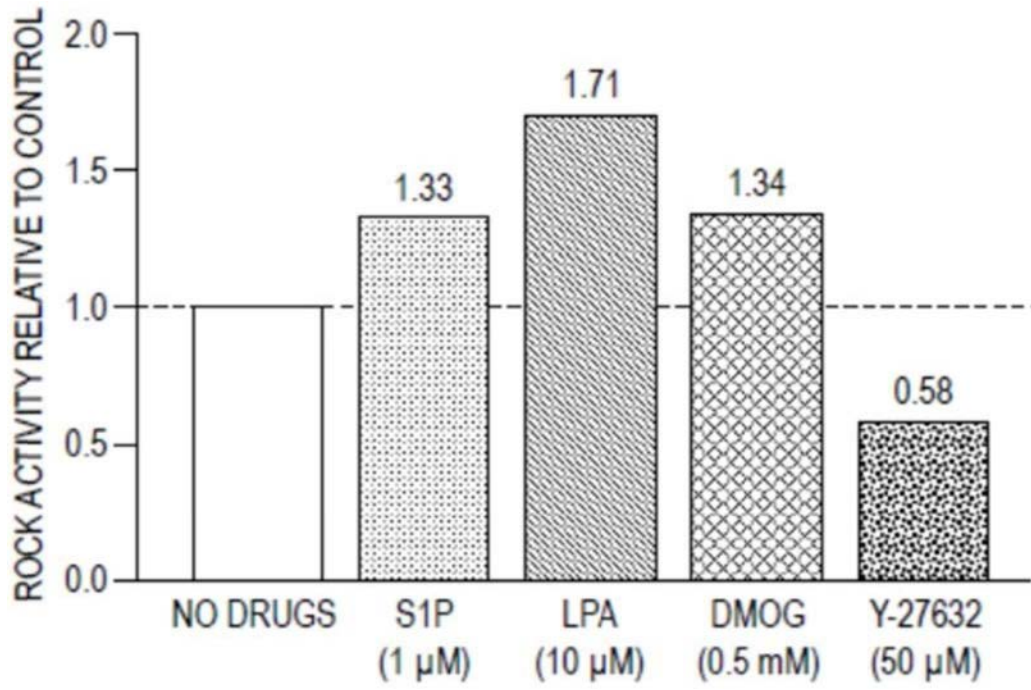


图7

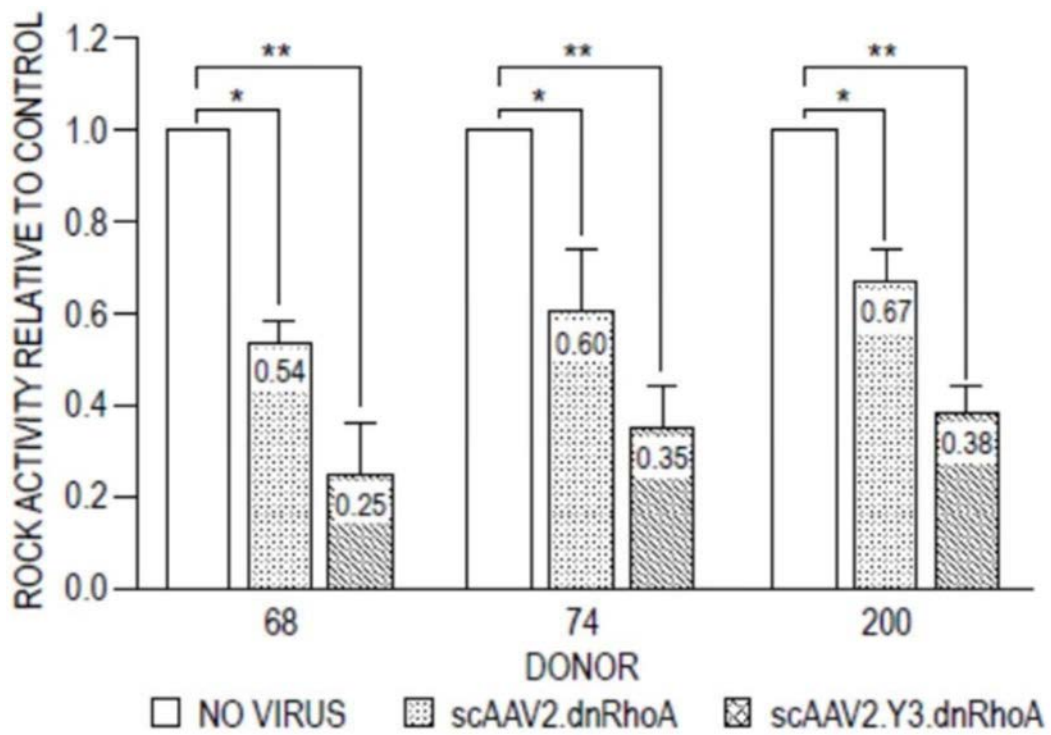


图8

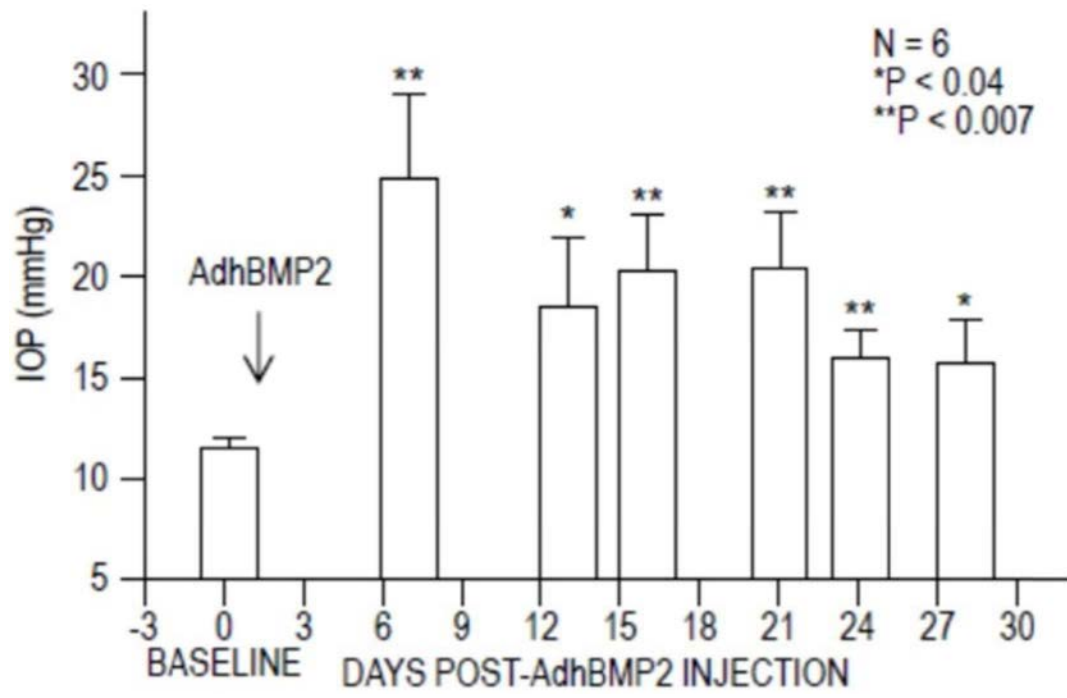


图9

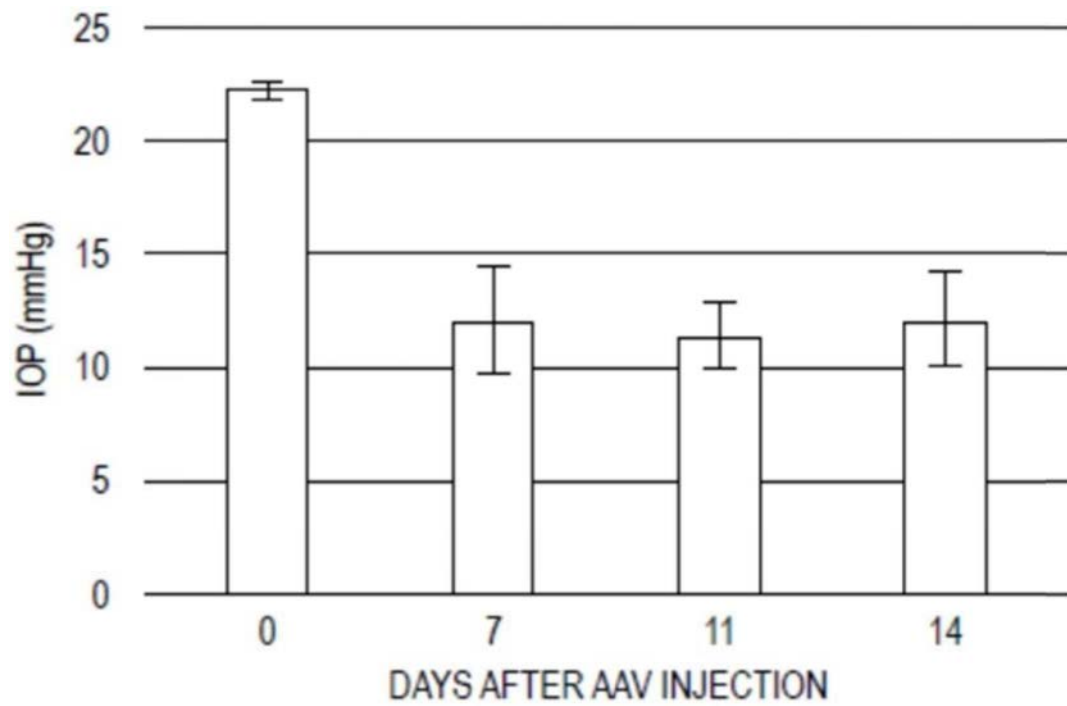


图10