



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119752819 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 04

(21) 申请号 202411354454.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2018.03.01

C12N 7/01 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/864 (2006.01)

62/465,649 2017.03.01 US

C12N 15/12 (2006.01)

62/469,642 2017.03.10 US

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201880029279.2 2018.03.01

(71) 申请人 宾夕法尼亚州立大学托管会

地址 美国

(72) 发明人 琼·贝内特 珍妮特·班尼切利

孙俊伟 宋知伦 塞奇·尼科诺夫

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

专利代理师 刘明海 宁涛

权利要求书2页 说明书42页

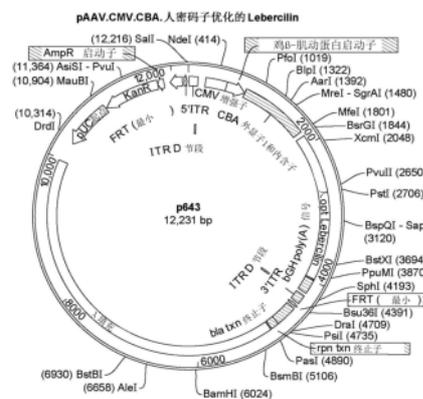
序列表(电子公布) 附图26页

(54) 发明名称

用于眼部病症的基因疗法

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗受试者的莱伯氏先天性黑蒙症(LCA)的组合物和方法。一方面,提供了重组腺相关病毒载体,其包括包含编码Lebercilin的序列的核酸分子。另一方面,Lebercilin具有氨基酸序列SEQ ID NO:1。又一方面,所述核酸分子具有序列SEQ ID NO:3或其变体。在所需实施方案中,所述受试者为人、猫、狗、绵羊或非人灵长类动物。



特征

5' ITR	1..130	130	==
ITR D 片段	113..130	18	==
CMV 增强子	241..544	304	==
鸡β-肌动蛋白启动子	546..823	278	=>
CBA 外显子1和内含子	824..1795	972	==
人opt Lebercilin	1883..3976	2094	==
bGH poly(A) 信号	3993..4200	208	==
3' ITR	4250..4379	130	==
ITR D 片段	4250..4267	18	==
FRT (最小)	4407..4440	34	<=

1. 一种重组腺相关病毒 (rAAV), 所述rAAV包含AAV衣壳和包装在其中的载体基因组, 所述载体基因组包含:

- (a) AAV 5' 反向末端重复 (ITR) 序列;
- (b) 启动子;
- (c) 编码人Lebercilin的编码序列;
- (d) AAV 3' ITR,

其中所述编码序列包含与SEQ ID NO:2具有至少80%序列同一性的核苷酸序列。

2. 根据权利要求1所述的rAAV, 其中所述编码序列包含与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。

3. 根据权利要求2所述的rAAV, 其中所述编码序列包含SEQ ID NO:2。

4. 根据权利要求1所述的rAAV, 其中所述rAAV衣壳包含AAV7m8或其变体、AAV8衣壳或其变体、AAV6衣壳或其变体、AAV9衣壳或其变体、AAV7衣壳或其变体、AAV5衣壳或其变体、AAV2衣壳或其变体、AAV 1衣壳或其变体、AAV3衣壳或其变体、或AAV4衣壳或其变体。

5. 根据权利要求3所述的rAAV, 其中所述rAAV衣壳包含AAV8衣壳。

6. 根据权利要求5所述的rAAV, 其中所述启动子包含杂合启动子。

7. 根据权利要求6所述的rAAV, 其中所述杂合启动子包含巨细胞病毒 (CMV) 启动子序列和鸡 β 肌动蛋白 (CBA) 启动子序列。

8. 根据权利要求7所述的rAAV, 其中所杂合启动子包含SED ID NO:10。

9. 根据权利要求8所述的rAAV, 其中所述AAV 5' ITR或所述AAV 3' ITR来自AAV2。

10. 根据权利要求8所述的rAAV, 其中所述载体基因组还包含polyA序列。

11. 根据权利要求10所述的rAAV, 其中所述载体基因组包含与SEQ ID NO:9的核苷酸1-4368具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。

12. 一种适用于治疗莱伯氏先天性黑蒙症 (LCA) 的水性混悬液, 包含: 水性助悬液体和至少约 1×10^{10} 个重组腺相关病毒 (rAAV) 的病毒粒子, 其中所述rAAV具有AAV衣壳和包装在其中的载体基因组, 其中所述rAAV具有AAV衣壳且具有包装在其中的载体基因组, 其中所述载体基因组包含:

- (a) AAV 5' 反向末端重复 (ITR) 序列;
- (b) 启动子;
- (c) 编码人Lebercilin的编码序列; 及
- (d) AAV 3' ITR,

其中所述编码序列包含与SEQ ID NO:2具有至少80%序列同一性的核苷酸序列。

13. 根据权利要求12所述的水性混悬液, 其中所述编码序列包含与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。

14. 根据权利要求13所述的水性混悬液, 其中所述编码序列包含SEQ ID NO:2。

15. 根据权利要求14所述的水性混悬液, 其中所述水性混悬液适用于视网膜下或玻璃体内注射。

16. 根据权利要求12所述的水性混悬液, 其中所述启动子包含SEQ ID NO:10。

17. 根据权利要求12所述的水性混悬液, 其中所述rAAV衣壳包含AAV7m8或其变体、AAV8衣壳或其变体、AAV6衣壳或其变体、AAV9衣壳或其变体、AAV7衣壳或其变体、AAV5衣壳或其

变体、AAV2衣壳或其变体、AAV 1衣壳或其变体、AAV3衣壳或其变体、或AAV4衣壳或其变体。

18. 根据权利要求17所述的水性混悬液,其中所述rAAV衣壳包含AAV8或其变体。

19. 根据权利要求18所述的水性混悬液,其中所述载体基因组包含与SEQ ID NO:9的核苷酸1-4368具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。

20. 一种组合物,包含:a) 根据权利要求1所述的rAAV或根据权利要求12所述的水性混悬液,和b) 适用于递送至受试者眼部的药学可接受的载剂或赋形剂。

21. 根据权利要求1-11任一项所述的rAAV、根据权利要求12-19任一项所述的水性混悬液或根据权利要求20所述的组合物在制备用于治疗有需要的受试者中莱伯氏先天性黑蒙症(LCA)的药物中的用途。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述rAAV的剂量包含至少约 1×10^{10} 个载体基因组。

23. 根据权利要求21所述的用途,其中所述rAAV是视网膜下或玻璃体内施用。

24. 根据权利要求21所述的用途,其中所述rAAV是以在至少150微升的体积中的至少 1×10^{11} 个rAAV的剂量施用至受试者的眼部。

用于眼部病症的基因疗法

[0001] 本案是申请日为2018年3月1日、题为《用于眼部病症的基因疗法》的中国发明专利申请201880029279.2的分案申请。

[0002] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0003] 本发明是在由国家眼科研究所 (NEI) / 国立卫生研究院 (NIH) 所授予的批准号 R21EY020662 和 P30EY001583 下借助政府资助完成。政府享有本发明中的某些权利。

[0004] 以引用的方式并入以电子形式提交的材料

[0005] 申请人在此将以引用的方式并入以电子形式提交的序列列表材料。此文件标记为“UPN-16-7696PCT_Seq_Listing_ST25.txt”。

背景技术

[0006] 莱伯氏先天性黑蒙症 (LCA; OMIM 204000) 是最严重的遗传性致盲疾病之一。LCA 是罕见的, 发生在 1:50,000 的个体中, 通常以常染色体隐性方式遗传, 并可由至少 22 个不同基因中的任一个中的突变引起 (sph.uth.edu/RetNet/sum-dis.htm)。临床特征包括婴儿期或儿童早期的视力严重异常 (视力下降、视野缩小)、眼球震颤、及生命早期出现的不良视力的进行性丧失。临床试验揭示消失的暗适应和明适应视网膜电图 (ERG) 反应、黑蒙性瞳孔、光敏感度降低、及视网膜中的色素改变。当前没有批准用于 LCA 的治疗。

[0007] 由视网膜色素上皮 65kDa 蛋白编码基因 RPE65 中的突变引起的 LCA 形式 (Redmond TM, Yu S, Lee E, Bok D, Hamasaki D, Chen N 等人 Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet* (1998) 20 (4):344-51; Redmond T, Hamel C. Genetic analysis of RPE65: from human disease to mouse model. *Methods in Enzymol* (2000) 317:705-24, 它们都以引用的方式并入本文) 近年来由于其已成为多基因增强疗法临床试验的靶标而备受关注。通过使用腺相关病毒 (AAV) 血清型 2, 若干研究小组已证实将 RPE65 cDNA 的野生型拷贝递送到视网膜色素上皮 (RPE) 是安全的, 并且这可逆转包括夜盲在内的许多缺陷。(3-9) 测试 AAV2-hRPE65v2 的随机、多中心 3 期研究 (或 voretigene neparvovec, 由 Spark Therapeutics, Philadelphia, PA 主办), 已证实此试剂的视网膜下注射引起光敏感度、视野及甚至能够在一定的亮度条件下使用视觉线索进行精确且快速导航的能力的改善。(10, 11) 美国食品和药物管理局 (FDA) 于 2017 年 12 月 19 日批准了 Voretigene neparvovec-rzyl 的药物, 使其成为美国首批批准的基因疗法药物之一。在开发针对由 RPE65 突变 LCA2 引起的 LCA 的治疗方面的进展为开发针对其他形式的早期发作视网膜变性的治疗铺平了道路, 所述其他形式中的大多数是由光感受器特异性基因而不仅是 RPE 特异性基因的突变引起。

[0008] 这种已经很严重的病状 (LCA) 最严重的形式之一是由编码 Lebercilin 的光感受器特异性基因 LCA5 的突变引起 (12-20)。据估计, LCA5 突变约占 LCA 病例的 2%, 尽管它可能在基因分离的群体中更为普遍。(16) LCA5 突变也被认为是视网膜变性的其他早期发作形式的原因, 所述其他早期发作形式包括视锥营养不良和常染色体隐性色素性视网膜炎 (ARRP)。(15、16、21)

[0009] 因此,需要适用于在有此需要的受试者中表达Lebercilin的组合物。

发明内容

[0010] 本文所述的实施方案涉及关于用于将人LCA5递送给有此需要的受试者的AAV基因疗法载体的组合物和方法,在所述载体经玻璃体内或视网膜下施用后产生莱伯氏先天性黑蒙症(LCA)的长期、可能是10年或更长时间的临床上有意义的修正。

[0011] 一方面,提供了一种编码人Lebercilin的密码子优化的、工程化核酸序列。在一个实施方案中,密码子优化的核酸序列是SEQ ID NO:3或SEQ ID No:2的变体。在另一实施方案中,密码子优化的核酸序列是SEQ ID NO:3。在另一实施方案中,核酸序列是为在人中的表达而优化的密码子。

[0012] 另一方面,提供了一种表达盒,其包含编码Lebercilin的密码子优化的核酸序列。在一个实施方案中,所述表达盒包含编码人Lebercilin的核酸序列SEQ ID NO:3。在另一些实施方案中,Lebercilin编码序列位于5'与3' AAV ITR序列之间。

[0013] 另一方面,提供了一种重组腺相关病毒(rAAV)载体。所述rAAV包含AAV衣壳和包装在其中的载体基因组。在一个实施方案中,所述载体基因组包含:(a) AAV 5'反向末端重复(ITR)序列;(b) 启动子;(c) 编码人Lebercilin的编码序列;及(d) AAV 3' ITR。在一个实施方案中,rAAV载体还包含指导Lebercilin在宿主细胞中的表达的表达控制序列。在其他实施方案中,Lebercilin序列是蛋白质序列SEQ ID NO:1。在一个实施方案中,载体基因组是SEQ ID NO:8的nt 1-4379的序列。在另一实施方案中,载体基因组是SEQ ID NO:9的nt 1-4368的序列。在又一个实施方案中,用如本文所述的另一LCA5编码序列交换任一个所鉴别的载体基因组中的LCA5编码序列。

[0014] 另一方面,提供了一种适用于向LCA患者施用的水性混悬液。在一个实施方案中,混悬液包含水性助悬液体和每眼约 1×10^{10} 个本文所述适用作LCA治疗剂的重组腺相关病毒(rAAV)的GC或病毒粒子至约 1×10^{13} 个GC或病毒粒子。

[0015] 另一方面,一种药物组合物包含药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂和/或佐剂和核酸序列、质粒、载体或病毒载体,如本文具体描述的rAAV。

[0016] 另一方面,一种用于在患有LCA的哺乳动物受试者中治疗由lebercilin基因(LCA5)缺陷引起的莱伯氏先天性黑蒙症和/或恢复视觉功能的方法包括经由玻璃体内、视网膜下或血管内注射向有此需要的受试者递送如本文所述的编码Lebercilin的重组AAV载体。

[0017] 另一方面,提供了如本文所述的AAV载体在患有LCA的哺乳动物受试者中治疗由lebercilin基因(LCA5)缺陷引起的莱伯氏先天性黑蒙症和/或恢复视觉功能中的用途。所述用途包括经由玻璃体内、视网膜下或血管内注射向有此需要的受试者递送如本文所述的编码Lebercilin的重组AAV载体。

[0018] 本发明的其他方面和优点将易于由以下发明详述变得显而易见。

附图说明

[0019] 图1A示出了用于产生如本文所述的AAV7m8.CBA.hopt.LCA5和AAV7m8.CBA.EGFP的转基因盒。

[0020] 图1B-1D提供了LCA5(天然_LCA5)的人核酸序列SEQ ID NO:2与密码子优化的LCA5(密码子优化的_LCA5)序列SEQ ID NO:3的比对。

[0021] 图1E-1F提供了pAAV.CMV.CBA.人密码子优化的Lebercilin载体的质粒图和特征列表。核酸序列在SEQ ID NO:8中重现。

[0022] 图1G-1H提供了在P5时用AAV7m8-hopt-LCA5注射且在P15时分析的眼睛的免疫荧光分析,示出了如实施例1、2和4中所述Lebercilin与微管蛋白阳性外段的基部的共定位。在玻璃体内注射(IVT,图1G)或视网膜下注射(SR)之后,Lebercilin分布遍及视网膜,其在P95时几乎不含光感受器。相比之下,lebercilin不存在于未治疗的P15和P95 Lca5^{-/-}视网膜中。SR:视网膜下;IVT:玻璃体内;(-)未治疗的Lca5^{-/-}。提供示出了玻璃体内注射方案(图1G)和视网膜下注射方案(图1H)的草图。

[0023] 图1I示出了在野生型小鼠和P20时用AAV.LCA5载体视网膜下注射的Lca5^{-/-}小鼠中的Lebercilin表达。

[0024] 图2A-2I示出了与在PN5和PN15时治疗的Lca5^{-/-}小鼠的对照(假注射的)眼相比在AAV7m8.hopt-LCA5注射的小鼠3月龄时测量的归一化瞳孔反射幅度。示出了在(A)玻璃体内和(B)视网膜下注射之后或(C)在未治疗的(-)对照小鼠中的结果。(D)在(A-C)中所示的每个亚组中加上野生型(C57B16)阳性(+)对照小鼠中的动物右眼的相对瞳孔反射幅度(基线瞳孔直径的%)以图形示出(E)。图2F和2G是用于产生图2A-2D中所示的结果的测试方案的表示。图2H和2I示出了在图2A-2D中所示的实验和对照小鼠中的归一化瞳孔反射幅度的比较,所述小鼠经由视网膜下(SR,I)或玻璃体内(IV,H)注射在PN5对比PN15时治疗。*.p<0.1;**p<0.05;***p<0.01。

[0025] 图3A-3F示出了在PN5和PN15时治疗且如实施例3中所述在3月龄时测量的Lca5^{-/-}小鼠的AAV7m8.hopt-LCA5注射的对比对照(假注射的)眼中的水迷宫测试结果。图3A是示出了统计分析结果的表。图3B是水迷宫测试的代表性结果的图示。图3D是示出了训练在出生时用AAV7m8.LCA5载体经玻璃体内或视网膜下治疗的PN5或PN15时Lca5^{-/-}小鼠取得首次成功前的天数的条形图。提供野生型小鼠作为对照。图3D是在出生时用AAV7m8.LCA5载体玻璃体内治疗的PN5时Lca5^{-/-}小鼠在各种光强度(x-轴)下的成功率的线图。图3E是在出生时用AAV7m8.LCA5载体经视网膜下治疗的PN5时Lca5^{-/-}小鼠在各种光强度(x-轴)下的成功率的线图。图3F是在出生时用AAV7m8.LCA5载体玻璃体内治疗的PN15时Lca5^{-/-}小鼠在各种光强度(x-轴)下的成功率的线图。

[0026] 图4是提供在出生后第(PN)5天将AAV7m8.hopt-LCA5递送到Lca5gt/gt视网膜之后的代表性组织学结果的图。该图示出了在用AAV.LCA5进行IVT或SR治疗之后对比假注射的外核层(ONL)的行数。

[0027] 图5A提供了免疫荧光结果,其示出了通过3个月时间点在治疗的(而不是对照未治疗的)光感受器中持续存在视紫红质(红色)。偶然的光感受器细胞是eGFP阳性的(通过与AAV7m8.eGFP共注射所鉴别的注射区域)。

[0028] 图5B-5D提供了来自Lca5gt/gt AAV7m8.hopt-LCA5治疗的视杆和视锥的多电极阵列(MEA)反应类似于野生型(WT)视网膜的那些。(B)从每个闪光平均迹线(未示出)测量的反应幅度(在闪光发生之前和之后的放电速率差异)对比闪光强度数据。来自治疗的视网膜的反应高达来自WT视网膜的反应的70%;未治疗的视网膜存在最小至消除的反应。(C)来自第

一轮和第二轮强度系列的A组视网膜的反应幅度(在第一轮结束时的最亮暴露之前/期间和之后,在每轮强度系列期间刺激系列强度以增量大约0.5log从暗适应增至最亮明适应值)。(D)瞬时ON- (在闪光发生之前和之后的放电速率差异)、持续ON- (在闪光发生和偏移之前的差异)和OFF-反应(在闪光偏移之前和之后的差异)的幅度随第一轮和第二轮强度系列的闪光强度的变化。淡蓝色阴影区表示WT反应的范围(4个视网膜,MEAN±STD),只有线的迹线给出平均WT反应幅度。水平箭头表示在第一轮强度系列结束时,由于暴露在最亮闪光下而导致灵敏性的向右偏移。治疗的Lca5gt/gt和WT视网膜示出了在漂白之前和之后的相似反应/强度依赖性,而未治疗的Lca5gt/gt视网膜反应则变平。用线连接的圆形表示治疗的LCA5gt/gt。用线连接的三角形表示对照LCA5gt/gt。

[0029] 图6A-6E示出了在未治疗的Lca5-/-视网膜中在生命早期的光感受器变性期间存在大量细胞死亡(和在用AAV.hopt.LCA5治疗之后此变性的延迟),如通过(A)TUNEL测定(图6A;图6B-E,第三行)和(B)视紫红质免疫荧光分析(图6B-E,第1、3和4行)所证明。

[0030] 图7A-7D示出了外段存在于AAV7m8.hopt.LCA5治疗的Lca5-/-视网膜中而不是对照Lca5-/-视网膜中。用AAV7m8.hopt.LCA5注射的视网膜的透射电子显微镜评价揭示在3月龄Lca5-/-中具有堆叠盘和连接纤毛的视杆和视锥光感受器外段。在未治疗的Lca5-/-视网膜中不存在这种结构。(A,B)在PN5时用AAV7m8p643(密码子优化的Lebercilin)玻璃体内注射之后PN80,代表性图片;(A1-A3):分辨率12K,拼贴图片示出了成排的光感受器细胞、视杆细胞(箭头头部)、视锥细胞(箭头)、光感受器细胞的许多线粒体(星号);(B),分辨率20K;(B1)纤毛的横截面示出了微管的9+0结构、来自视杆细胞的OS的膜盘(箭头);(C)分辨率30K,基体(箭头);(C1)连接纤毛的矢状切面;(D)分辨率12K,光感受器细胞没有留在ONL上;(D1)死亡细胞的固缩核(箭头头部);(D2)死细胞细胞器的漂浮残骸,包括粗糙ER(箭头)。

[0031] 图8示出了与年龄相当的正常视力男性(蓝色迹线-底线)具有相似时间特征的具LCA5的成年男性(红色迹线-顶线)的一个视网膜的瞳孔对光反应的结果。与正常个体相比,LCA5患者的缩小幅度减小。

[0032] 图9是各种视网膜层厚度的表,其示出了与对照视网膜相比在治疗(*)视网膜中的外核层(ONL)厚度在至少3个月内保持较厚。在其他视网膜层(外丛状层:OPL;内核层:INL;内网状层:IPL)中没有如此明显的趋势。对于每个时间点,从左到右的条形图分别表示ONL、OPL、INL和IPL的厚度。

[0033] 图10提供了在用AAV7m8.hopt.LCA5注射之后在光转导特异性分子的位置中光介导的变化的结果。

[0034] 图11A-11B提供了pAAV.CMV.CBA.人天然Lebercilin载体的质粒图和特征列表。核酸序列在SEQ ID NO:9中重现。

[0035] 图12A-12F显示了在用AAV7m8.hopt-LCA5治疗之后在纯合的人LCA5 p.(Q279*) iPSC-RPE中挽救的纤毛表型。(A)共焦图像示出了成熟的RPE细胞的六角形形态以及免疫荧光可检测的RPE标记物ZO-1和MITF。相位对比(PC)图像展示了来源于正常视力者和LCA5患者的RPE的iPSC-RPE培养物的构造;(B)在正常视力对照RPE和源自LCA5患者的RPE中的LCA5 mRNA表达的定量实时PCR(qRT-PCR)。GAPDH用于归一化表达水平。(C)蛋白质印迹分析示出了在未治疗("-")的正常视力对照细胞或用AAV7m8.eGFP治疗("G")的细胞中的内源性(*)Lebercilin蛋白。在未治疗的或AAV7m8.GFP治疗的LCA5受累细胞中没有内源性

lebercilin。在来自正常视力和用AAV7m8.LCA5治疗的LCA5个体(“L”)的细胞感染之后存在稳健水平的lebercilin。免疫荧光分析显示在正常视力(D)和LCA5来源的(E) iPSC-RPE中存在Arl13b阳性原纤毛。Lebercilin存在于正常视力对照和AAV7m8.LCA5治疗(而不是AAV7m8.eGFP治疗)的LCA5受累细胞中。(F) 在正常视力对比LCA5-iPSC-RPE中每细胞的纤毛数量的定量分析显示在用AAV7m8.LCA5(而不是用AAV7m8.eGFP) 治疗LCA5-iPSC-RPE细胞之后纤毛形成的挽救作用。

具体实施方式

[0036] 本文所述的方法和组合物涉及用于向有此需要的受试者递送编码Lebercilin蛋白的LCA5核酸序列以治疗莱伯氏先天性黑蒙症(LCA)的组合物和方法。在一个实施方案中,此类组合物涉及Lebercilin编码序列的密码子优化。希望提高产物的功效,从而提高安全性,因为可以使用较低剂量的试剂。本文还涵盖包含如SEQ ID NO:2所示的天然Lebercilin编码序列的组合物。

[0037] 本文中使用的技术和科学名词具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解且参考公开文献的相同含义,所述公开文献向本领域技术人员提供关于本申请中所用的许多术语的一般指南。本说明书中包含的定义是出于清楚描述本文的组分和组合物而提供且不意图限制要求保护的发明。

[0038] “Lebercilin”是由染色体6q14上的LCA5基因编码且是纤毛蛋白,其定位于光感受器的连接纤毛以及培养的哺乳动物细胞的微管、中心粒和原纤毛。

[0039] Lebercilin在发育期间广泛表达并且见于培养细胞的纤毛以及成熟光感受器细胞的连接纤毛中。连接纤毛是介于载有细胞的生物合成机构的光感受器内段与含有视蛋白驱动的视觉级联的外段之间的狭窄结构。连接纤毛用作导管,支持在称为鞭毛内转运(IFIT)的过程中蛋白质与囊泡沿着纤毛微管轨迹的双向运输。通过将定量亲和力蛋白质组学应用于基因工程化的Lca5小鼠模型,Boldt等人论证了Lca5功能丧失破坏IFIT,由此引起光感受器外段发育的缺陷及抑制蛋白和视蛋白运输的失败。Lca5无效(Lca5gt/gt)小鼠缺少视锥和视杆ERG反应并且经历了早期和进行性的视网膜变性,其中截至2月龄时仅有一排分散核(相比之下,在野生型小鼠的视网膜中有8-10排相邻细胞)存在于外核层(ONL)中19。

[0040] LCA5中的突变导致遗传形式的视网膜变性,称为莱伯氏先天性黑蒙症(LCA)。在受累个体中的表型限于眼睛并且造成失明。在den Hollander研究的6个家族中,有5个存在纯合无义突变和移码突变且在一个家族中LCA5转录物完全不存在。编码Lebercilin cDNA或其密码子优化形式的核酸具有适当的尺寸以适应腺相关病毒(AAV)载体。参见,例如图1A和1E至1F以及图11A-11B中的序列。如以下实施例中所述,使用rAAV介导的基因增强策略,表明由LCA5突变引起的视网膜变性是可以纠正的。如果基因的野生型或优化拷贝在生命早期(例如,在幼年或出生后早期)递送,则这种疗法是特别有利的。此外,在一个实施方案中,所用的此玻璃体内或视网膜下施用将基因有效地提供给靶细胞(例如光感受器)。

[0041] 认为编码Lebercilin(即697个氨基酸的蛋白)的Lebercilin基因LCA5参与了中心体或纤毛功能和负端定向的微管转运。如本文所用,术语“LCA5”和“Lebercilin”当关于编码序列时可互换使用。编码人Lebercilin的天然核酸序列报告于NCBI参考序列NM_181714.3(转录变体1)、NM_001122769.2(转录变体2)、XM_011535504.1(转录变体X1)和XM_

005248665.4 (转录变体X2) 中,并且在此分别于SEQ ID NO:4、5、6和7中重现。Lebercilin的天然人氨基酸序列在此于SEQ ID NO:1 (NCBI参考序列:NP_001116241.1或NP_859065.2以及UniProtKB/Swiss-Prot ID:Q86VQ0-1) 中重现。LCA5基因突变与莱伯氏先天性黑蒙症(LCA) 相关。在某些实施方案中,术语“LCA5”和“Lebercilin”可互换使用。

[0042] 莱伯氏先天性黑蒙症(LCA) 是主要累及视网膜的眼病症,视网膜是在眼后部处检测光和颜色的特殊组织。患有这种病症的人通常在婴儿期开始就有严重的视力损害。视力损害趋于稳定,尽管随着时间的推移可能会非常缓慢地恶化。莱伯氏先天性黑蒙症还与其他视力问题有关,包括对光的敏感性增加(畏光)、眼睛的自主运动(眼球震颤)和极端远视(远视)。通常会随着进入眼睛的光量扩大和缩小的瞳孔对光没有正常反应。相反,它们的扩大和缩小速度比正常情况下要慢,或者它们对光根本没有反应。此外,眼睛前面的透明覆盖物(角膜)可为锥形的且异常薄,这种情况称为圆锥角膜。一种称为弗氏指-眼体征的特殊行为是莱伯氏先天性黑蒙症的特征。此体征是由用指关节或手指戳、压和揉眼组成。研究人员怀疑,这种行为可能导致受影响儿童的眼睛深陷和圆锥角膜。在极少数病例下,在具有莱伯氏先天性黑蒙症特征的人中报道了发育迟缓和智力障碍。然而,研究人员并不能确定这些个体是否真的有莱伯氏先天性黑蒙症抑或具有类似体征和症状的另一综合征。已经描述了至少13种类型的莱伯氏先天性黑蒙症。这些类型的区别在于它们的遗传原因、视力丧失模式以及相关的眼部异常。

[0043] 术语“同一性百分比(%)”、“序列同一性”、“序列同一性百分比”或“同一百分比”在核酸序列的背景下是指相同的两个序列比对一致性时的残基。序列同一性比较的长度可视需要在全长基因组、全长基因编码序列或至少约500至5000个核苷酸的片段上。然而,也可能需要在较小片段,例如至少约九个核苷酸、通常至少约20至24个核苷酸、至少约28至32个核苷酸、至少约36或更多个核苷酸中的同一性。

[0044] 可以容易地确定全长蛋白质的氨基酸序列、多肽、约32个氨基酸、约330个氨基酸、或其肽片段或相应的核酸序列编码序列的同一性百分比。合适的氨基酸片段长度可以是至少约8个氨基酸,并且可以是至多约700个氨基酸。通常,当提及两个不同序列之间的“同一性”、“同源性”或“相似性”时,参考“比对”序列确定“同一性”、“同源性”或“相似性”。“比对”序列或“比对”是指多个核酸序列或蛋白质(氨基酸)序列,与参考序列相比,其通常含有缺失或额外碱基或氨基酸的校正。

[0045] 同一性可通过准备序列比对且通过使用多种算法和/或本领域中已知或可商购获得的计算机程序[例如BLAST、Expasy;Clustal0;FASTA;使用例如Needleman-Wunsch算法、Smith-Waterman算法]来确定。使用多种公开或可商购获得的多序列比对程序中的任一种执行比对。对于氨基酸序列,可利用序列比对程序,例如“Clustal Omega”、“Clustal X”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“BLOCKMAKER”、“MEME”和“Match-Box”程序。通常,这些程序中的任何程序都在默认设置下使用,但是本领域技术人员可以根据需要改变这些设置。或者,本领域的技术人员可以利用另一种算法或计算机程序,所述算法或计算机程序至少提供由参考算法和程序提供的同一性或比对水平。参见,例如J.D.Thomson等人,Nucl.Acids.Res.,“A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”,27(13):2682-2690(1999)。

[0046] 多序列比对程序也可用于核酸序列。这类程序的实例包括“Clustal Omega”、

“Clustal W”、“CAP Sequence Assembly”、“BLAST”、“MAP”和“MEME”，它们可通过因特网上的Web服务器获得。这类程序的其他来源是本领域技术人员已知的。或者，还使用载体NTI效用。本领域中还已知许多算法可用于测量核苷酸序列同一性，包括在如上所述的程序中所包含的那些。作为另一实例，多核苷酸序列可使用Fasta™（即GCG 6.1版的程序）来比较。Fasta™提供了查询和搜索序列之间的最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比。例如，核酸序列之间的序列同一性百分比可使用具有如GCG 6.1版中所提供的其默认参数（字长为6且打分矩阵为NOPAM因子）的Fasta™来测定，其以引用的方式并入。

[0047] 一方面，提供了一种编码人Lebercilin的密码子优化的、工程化核酸序列。优选地，密码子优化的Lebercilin编码序列与全长天然Lebercilin编码序列具有小于约80%同一性、优选约75%同一性或更小同一性（图1B-1D, SEQ ID NO:2）。在一个实施方案中，密码子优化的Lebercilin编码序列与天然Lebercilin编码序列SEQ ID NO:2具有约74%同一性。在一个实施方案中，密码子优化的Lebercilin编码序列的特征是与天然Lebercilin相比在AAV介导的递送（例如rAAV）之后改进的翻译速率。在一个实施方案中，密码子优化的Lebercilin编码序列与全长天然Lebercilin编码序列SEQ ID NO:2享有小于约99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%或更小的同一性。在一个实施方案中，密码子优化的核酸序列是SEQ ID NO:3的变体。在另一实施方案中，密码子优化的核酸序列是与SEQ ID NO:3享有约99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%或更大同一性的序列。在一个实施方案中，密码子优化的核酸序列是SEQ ID NO:3。在另一实施方案中，核酸序列是为在人中的表达而优化的密码子。在另一实施方案中，lebercilin编码序列是SEQ ID NO:8的nt 1883至nt 3976。在其他实施方案中，选择不同的Lebercilin编码序列。

[0048] 密码子优化的编码区可通过各种不同的方法设计。此优化可使用可在线获得的方法（例如，GeneArt）、公开的方法或提供密码子优化服务的公司例如DNA2.0（Menlo Park, CA）执行。例如，在美国国际专利公布号WO 2015/012924中描述了一种密码子优化方法，所述专利以引用的方式整体并入本文。还参见例如美国专利公布号2014/0032186和美国专利公布号2006/0136184。适当地，修饰产物的开放阅读框（ORF）的整个长度。然而，在一些实施方案中，可以仅改变ORF的片段。通过使用这些方法中的一种，可以将频率应用于任何给定的多肽序列，并产生编码多肽的密码子优化的编码区的核酸片段。

[0049] 许多选择可用于执行密码子的实际变化或用于合成如本文所述设计的密码子优化的编码区。可使用本领域普通技术人员熟知的标准和常规分子生物学操作执行这类修饰或合成。在一种方法中，通过标准方法合成一系列长度各自为80至90个核苷酸且跨越所需序列长度的互补寡核苷酸对。合成这些寡核苷酸对，使得它们在退火时形成80至90个碱基对的含有粘性末端的双链片段，例如，合成所述对中的每个寡核苷酸以延伸超出与所述对中的另一寡核苷酸互补的区域3、4、5、6、7、8、9、10或更多个碱基。设计每对寡核苷酸的单链末端以与另一对寡核苷酸的单链末端一起退火。使寡核苷酸对退火，然后使这些双链片段中的约五个至六个经由粘性单链末端一起退火，接着将它们接合在一起并克隆到标准细菌

克隆载体中,例如可从Invitrogen Corporation,Carlsbad,Calif.购得的TOPO®载体。随后通过标准方法对构建体测序。制备这些构建体中的若干种,其是由接合在一起的80至90个碱基对片段的5至6个片段(即约500个碱基对的片段)组成,使得整个所需序列在一系列质粒构建体中呈现。然后用适当的限制酶切割这些质粒的插入物并将其接合在一起以形成最终的构建体。然后将最终构建体克隆到标准细菌克隆载体中,并测序。其他方法对于熟练技术人员来说是显而易见的。此外,基因合成在商业上很容易获得。

[0050] “工程化”意指将本文所述的编码Lebercilin蛋白的核酸序列装配并放置在任何合适的遗传元件例如裸DNA、噬菌体、转位子、粘粒、附加体等中,这些遗传元件将其上携带的Lebercilin序列转移到宿主细胞中,例如用于产生非病毒递送系统(例如,基于RNA的系统、裸DNA等)或用于在包装宿主细胞中产生病毒载体和/或用于递送到受试者的宿主细胞中。在一个实施方案中,遗传元件是质粒。用于制备这种工程化构建体的方法是核酸操作领域的技术人员所知的且包括基因工程化、重组工程化及合成技术。参见,例如Green和Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY(2012)。

[0051] 如本文所用,术语“宿主细胞”可指的是包装细胞系,其中重组AAV是由生产质粒产生。在替代方案中,术语“宿主细胞”可指的是其中需要表达编码序列的任何靶细胞。因此,“宿主细胞”是指含有外源或异源DNA的原核或真核细胞,所述外源或异源DNA已通过以下任何手段引入细胞中,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、显微注射、转化、病毒感染、转染、脂质体递送、膜融合技术、高速DNA包衣沉淀、病毒感染和原生质体融合。在本文的某些实施方案中,术语“宿主细胞”是指用于产生并包装病毒载体或重组病毒的细胞。在本文的其他实施方案中,术语“宿主细胞”是指用于体外评估本文所述的组合物的各种哺乳动物物种的眼部细胞的培养物。还有,在其他实施方案中,术语“宿主细胞”意在提及针对LCA在体内治疗的受试者的眼部细胞。

[0052] 如本文所用,术语“眼部细胞”是指在眼中或与眼功能有关的任何细胞。该术语可指的是任一种光感受器,包括视杆光感受器、视锥光感受器和光敏性神经节细胞、视网膜色素上皮(RPE)细胞、穆勒细胞(Mueller cell)、脉络膜细胞、双极细胞、水平细胞和无长突细胞。在一个实施方案中,眼部细胞是光感受器。在另一实施方案中,眼部细胞是视锥光感受器。在另一实施方案中,眼部细胞是视杆光感受器。

[0053] 在一个实施方案中,编码Lebercilin的核酸序列还包含编码与其共价连接的标签多肽的核酸。标签多肽可选自己知的“表位标签”,包括但不限于myc标签多肽、谷胱甘肽-S-转移酶标签多肽、绿色荧光蛋白标签多肽、myc-丙酮酸激酶标签多肽、His6标签多肽、流感病毒血球凝集素标签多肽、flag标签多肽、和麦芽糖结合蛋白标签多肽。

[0054] 另一方面,提供了一种表达盒,其包含编码Lebercilin的核酸序列。在一个实施方案中,所述序列是密码子优化的序列。在另一实施方案中,所述密码子优化的核酸序列是编码人Lebercilin的SEQ ID NO:3。

[0055] 如本文所用,“表达盒”是指包含Lebercilin蛋白的编码序列、启动子的核酸分子,并且可包括其他调控序列,所述盒可被包装到病毒载体(例如病毒粒子)的衣壳中。通常,用于产生病毒载体的这种表达盒包含本文所述的LCA5序列,其侧接有病毒基因组的包装信号及其他表达控制序列,如本文所述的那些。例如,对于AAV病毒载体来说,包装信号是5'反向

末端重复 (ITR) 和3' ITR。当包装到AAV衣壳中时, ITR连同表达盒一起在本文中可被称为“重组AAV (rAAV) 基因组”或“载体基因组”。在一个实施方案中, 表达盒包含编码Lebercilin蛋白的密码子优化的核酸序列。在一个实施方案中, 所述盒提供与表达控制序列可操作结合的密码子优化的LCA5, 所述表达控制序列指导编码Lebercilin的密码子优化的核酸序列在宿主细胞中的表达。在一个实施方案中, 载体基因组是SEQ ID NO:8的nt 1-4379的序列。在另一实施方案中, 载体基因组是SEQ ID NO:9的nt 1-4368的序列。在仍另一实施方案中, 用如本文所述的另一LCA5编码序列交换任一个所鉴别的载体基因组中的LCA5编码序列。

[0056] 在另一实施方案中, 提供了用于AAV载体中的表达盒。在那个实施方案中, AAV表达盒包括至少一个AAV反向末端重复 (ITR) 序列。在另一实施方案中, 表达盒包含5' ITR序列和3' ITR序列。在一个实施方案中, 5' 和3' ITR侧接编码Lebercilin的密码子优化的核酸序列, 视情况具有指导编码Lebercilin的密码子优化的核酸序列在宿主细胞中的表达的另外的序列。因此, 如本文所述, AAV表达盒意在描述在其5' 端由5' AAV反向末端重复序列 (ITR) 侧接且在其3' 端由3' AAV ITR侧接的如上所述的表达盒。因此, 此rAAV基因组含有将表达盒包装到AAV病毒粒子 (即AAV 5' 和3' ITR) 中所需的最小序列。AAV ITR可获自如本文所述的任何AAV的ITR序列。这些ITR可具有与所得重组AAV中使用的衣壳相同的AAV来源或具有不同AAV来源 (以产生AAV假型)。在一个实施方案中, 为了方便及加快监管审批起见, 使用来自AAV2的ITR序列或其缺失形式 (Δ ITR)。然而, 可以选择来自其他AAV来源的ITR。当ITR的来源是来自AAV2且AAV衣壳是来自另一AAV来源时, 所得的载体可称为假型化的。通常, AAV载体基因组包含AAV 5' ITR、Lebercilin编码序列和任何调控序列、及AAV 3' ITR。然而, 这些元件的其他构型可为合适的。已经描述了缩短形式的5' ITR (称为 Δ ITR) 其中D-序列和末端解链位点 (trs) 是缺失的。在其他实施方案中, 使用全长AAV 5' 和3' ITR。然后可将每个rAAV基因组引入生产质粒中。

[0057] 如本文所用, 术语“调控序列”、“转录控制序列”或“表达控制序列”是指DNA序列, 如起动因子序列、增强子序列、和启动子序列, 其诱发、阻抑或以其他方式控制其可操作连接的蛋白质编码核酸序列的转录。

[0058] 如本文所用, 术语“可操作地连接”或“可操作地结合”是指与编码Lebercilin的核酸序列邻接的表达控制序列和/或呈反式或以一定距离起作用以控制其转录和表达的表达控制序列。

[0059] 一方面, 提供了一种载体, 其包含本文所述的任何表达盒。如本文所述, 此类载体可为多种来源的质粒且在某些实施方案中, 适用于生成如本文进一步描述的重组复制缺陷型病毒。

[0060] 如本文所用, “载体”是其中可插入外源或异源或工程化核酸转基因的核酸分子, 然后可将其引入适当的宿主细胞中。载体优选具有一个或多个复制起点以及可将重组DNA插入其中的一个或多个位点。载体常常具有从无载体细胞中选择有载体细胞的手段, 例如, 它们编码耐药基因。常见载体包括质粒、病毒基因组和 (主要在酵母和细菌中) “人工染色体”。本文描述了某些质粒。

[0061] 在一个实施方案中, 载体是非病毒质粒, 其包含所述表达盒, 例如“裸DNA”、“裸质粒DNA”、RNA和mRNA; 与各种组合物和纳米粒子偶联, 包括例如胶束、脂质体、阳离子脂质-核酸组合物、聚多糖组合物及其他聚合物、基于脂质和/或胆固醇的核酸缀合物、及其他构建

体,如本文所述的。参见,例如X.Su等人,Mol.Pharmaceutics,2011,8(3),第774-787页;网络发布:2011年3月21日;WO2013/182683、WO 2010/053572和WO 2012/170930,全部都以引用的方式并入本文。可通过本文所述的途径施用这种非病毒Lebercilin载体。病毒载体或非病毒载体可用生理学上可接受的载剂配制以用于基因转移和基因疗法应用中。

[0062] 在另一实施方案中,载体是包含其中所述的表达盒的病毒载体。“病毒载体”被定义为含有外源或异源LCA5核酸转基因的复制缺陷型病毒。在一个实施方案中,如本文所述的表达盒可被工程化到质粒上,所述质粒是用于药物递送或产生病毒载体。合适的病毒载体优选为复制缺陷型的且选自靶向眼部细胞的那些。病毒载体可包括适用于基因疗法的任何病毒,包括但不限于腺病毒;疱疹病毒;慢病毒;逆转录病毒;细小病毒等等。然而,为了便于理解,在本文中将腺相关病毒作为示例性病毒载体引用。

[0063] “复制缺陷型病毒”或“病毒载体”是指合成或重组病毒粒子,其中含有所关注基因的表达盒被包装在病毒衣壳或包膜中,其中同样包装在病毒衣壳或包膜中的任何病毒基因组序列是复制缺陷型的;即,它们不能产生子代病毒粒子,但保留感染靶细胞的能力。在一个实施方案中,病毒载体的基因组不包括编码复制所需酶的基因(基因组可被工程化成“无肠的”-仅含有所关注的转基因,其侧接有扩增和包装人工基因组所需的信号),但这些基因可在生产期间供应。因此,认为用于基因疗法是安全的,因为除了存在复制所需的病毒酶之外,不会发生由于子代病毒体进行的复制和感染。

[0064] 在另一实施方案中,提供了重组腺相关病毒(rAAV)载体。所述rAAV包含AAV衣壳和包装在其中的载体基因组。在一个实施方案中,载体基因组包含:(a) AAV 5'反向末端重复(ITR)序列;(b) 启动子;(c) 编码人Lebercilin的编码序列;及(d) AAV 3' ITR。在另一实施方案中,载体基因组是本文所述的表达盒。在一个实施方案中,LCA5序列编码全长Lebercilin蛋白。在一个实施方案中,Lebercilin序列是蛋白质序列SEQ ID NO:1。在另一实施方案中,编码序列是SEQ ID NO:3或其变体。

[0065] 腺相关病毒(AAV),即细小病毒家族的成员,是具有4.7千碱基(kb)至6kb单链线性DNA基因组的小型非包膜二十面体病毒。已知的AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9等。ITR或其他AAV组分可使用本领域技术人员可利用的技术自AAV中轻易分离或工程化。这种AAV可被分离、工程化或获自学术、商业或公共来源(例如,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA)。或者,AAV序列可通过合成或其他合适的手段,参考公开序列(如可在文献或数据库如GenBank、PubMed等中获得)而被工程化。AAV病毒可通过常规分子生物学技术被工程化,使得可能优化这些粒子以用于核酸序列的细胞特异性递送、免疫原性的最小化、调整稳定性和粒子寿命、有效降解、向核的精确递送等等。

[0066] AAV片段可轻易在多种载体系统和宿主细胞中使用。理想的AAV片段是cap蛋白,包括vp1、vp2、vp3和高变区;rep蛋白,包括rep 78、rep 68、rep 52和rep 40;以及编码这些蛋白的序列。这类片段可单独、与其他AAV血清型序列或片段组合或与来自其他AAV或非AAV病毒序列的元件组合使用。如本文所用,人工AAV血清型包括但不限于具有非天然存在的衣壳蛋白的AAV。这样一种人工衣壳可通过任何合适的技术,使用本发明的新型AAV序列(例如,vp1衣壳蛋白的片段)与可获自另一AAV血清型(已知的或新型的)、相同AAV血清型的非邻接部分、非AAV病毒来源或非病毒来源的异源序列组合产生。人工AAV血清型可为但不限于嵌合AAV衣壳、重组AAV衣壳或“人源化”AAV衣壳。在一个实施方案中,载体含有本发明的AAV8

cap和/或rep序列。参见,例如美国专利申请公布号US2009/02270030,其以引用的方式并入本文。

[0067] 如本文所用,术语“AAV”或“AAV血清型”是指许多天然存在的和可用的腺相关病毒以及人工AAV。在从人或非人灵长类动物(NHP)分离或工程化并充分表征的AAV中,人AAV2是作为基因转移载体而开发的首个AAV;其已经广泛用于不同靶组织和动物模型中的有效基因转移实验。除非另有规定,AAV衣壳、ITR及本文所述的其他所选AAV组分可容易选自任何AAV,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV8bp、AAV7M8和AAVAnc80、已知或提及的AAV或有待发现的AAV中的任一者的变体、或其变体或混合物。参见,例如WO 2005/033321,其以引用的方式并入本文。在另一实施方案中,AAV衣壳是AAV8bp衣壳,其优先靶向双极细胞。参见,WO 2014/024282,其以引用的方式并入本文。在另一实施方案中,AAV衣壳是AAV7m8衣壳,其显示出优先递送至外部视网膜。AAV7m8衣壳核酸序列重现于SEQ ID NO:11中且氨基酸序列重现于SEQ ID NO:12中。参见,Dalkara等人, *In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous*, *Sci Transl Med* 5,189ra76(2013),其以引用的方式并入本文。

[0068] 如本文所用,“AAV7m8衣壳”是由多个AAV7m8 vp(可变蛋白)蛋白构成的自组装AAV衣壳。AAV7m8 vp蛋白通常表示为由核酸序列SEQ ID NO:11或其编码vp1氨基酸序列SEQ ID NO:12的至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%序列所编码的替代剪接变体。这些剪接变体产生SEQ ID NO:12的长度不同的蛋白质。在某些实施方案中,“AAV7m8衣壳”包括具有与SEQ ID NO:12达99%同一性的氨基酸序列的AAV。

[0069] 在另一实施方案中,rAAV衣壳选自AAV8衣壳或其变体、AAV6衣壳或其变体、AAV9衣壳或其变体、AAV7衣壳或其变体、AAV5衣壳或其变体、AAV2衣壳或其变体、AAV1衣壳或其变体、AAV3衣壳或其变体、及AAV4衣壳或其变体。在一个实施方案中,提供了一种重组腺相关病毒(rAAV)载体,其包含AAV7m8衣壳和本文所述的表达盒,其中所述表达盒包含编码Lebercilin的核酸序列、反向末端重复序列及指导Lebercilin在宿主细胞中的表达的表达控制序列。

[0070] 在仍又一实施方案中,提供了一种重组腺相关病毒(AAV)载体,其用于递送LCA5构建体和本文所述的优化序列。腺相关病毒(AAV)病毒载体是AAV DNase抗性粒子,其具有AAV蛋白衣壳和包装在其中用于递送到靶细胞的核酸序列。AAV衣壳是由60个衣壳(cap)蛋白亚基VP1、VP2和VP3构成,它们取决于所选AAV以大约1:1:10至1:1:20的比率呈二十面体对称排列。AAV可被选为如上所鉴别的AAV病毒载体衣壳的来源。参见,例如美国公开专利申请号2007-0036760-A1;美国公开专利申请号2009-0197338-A1;EP 1310571。也参见WO 2003/042397(AAV7及其他猴AAV)、美国专利7790449和美国专利7282199(AAV8)、WO 2005/033321和US 7,906,111(AAV9)、和WO 2006/110689、及WO 2003/042397(rh.10)和(Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH等人 *In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous*. *Sci Transl Med* (2013) 5(189):189ra76. doi:10.1126/scitranslmed.3005708.) (AAV7m8)。这些文献各自以引用的方式并入本文。这些文献还描

述了其他AAV衣壳,所述AAV衣壳可被选出用于产生AAV,且文献以引用的方式并入。在一些实施方案中,用于病毒载体中的AAV cap可通过诱变(即通过插入、缺失或取代)上述AAV衣壳中的一个或其编码核酸而产生。在一些实施方案中,AAV衣壳是嵌合的,包含来自两个或三个或四个或更多个上述AAV衣壳蛋白的结构域。在一些实施方案中,AAV衣壳是来自两个或三个不同AAV或重组AAV的Vp1、Vp2和Vp3单体的嵌合体。在一些实施方案中,rAAV组合物包含一个以上上述Cap。

[0071] 如本文所用,关于AAV,术语变体意指衍生自已知AAV序列的任何AAV序列,包括与氨基酸或核酸序列享有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或更大序列同一性的那些序列。在另一实施方案中,AAV衣壳包括可包含与任何所述或已知AAV衣壳序列有至多约10%变异的变体。也就是说,AAV衣壳与本文所提供和/或本领域中已知的AAV衣壳享有约90%同一性至约99.9%同一性、约95%至约99%同一性或约97%至约98%同一性。在一个实施方案中,AAV衣壳与AAV衣壳享有至少95%同一性。当测定AAV衣壳的同一性百分比时,可对任何可变蛋白(例如vp1、vp2或vp3)进行比较。在一个实施方案中,AAV衣壳与AAV7m8在vp1、vp2或vp3上享有至少95%同一性。在另一实施方案中,衣壳是具有Y447F、Y733F和T494V突变的AAV8衣壳(也称为“AAV8(C&G+T494V)和rep2-cap8(Y447F+733F+T494V)”),如由Kay等人,Targeting Photoreceptors via Intravitreal Delivery Using Novel,Capsid-Mutated AAV Vectors,PLoS One.2013;8(4):e62097.网上发布于2013年4月26日所述,该文献以引用的方式并入本文。

[0072] 在一个实施方案中,需要利用AAV衣壳,其展示了对所需靶细胞例如光感受器(例如视杆和/或视锥)、RPE或其他眼部细胞的趋向性。在一个实施方案中,AAV衣壳是酪氨酸衣壳-突变体,其中某些表面暴露的酪氨酸残基被苯丙氨酸(F)取代。这种AAV变体描述于例如Mowat等人,Tyrosine capsid-mutant AAV vectors for gene delivery to the canine retina from a subretinal or intravitreal approach,Gene Therapy 21,96-105(2014年1月)中,该文献以引用的方式并入本文。

[0073] 如本文所用,“人工AAV”意指但不限于具有非天然存在的衣壳蛋白的AAV。这样一种人工衣壳可通过任何合适的技术,使用所选AAV序列(例如,vp1衣壳蛋白的片段)与异源序列组合而产生,所述异源序列可获自不同的所选AAV、相同AAV的非邻接部分、非AAV病毒来源或非病毒来源。人工AAV可为但不限于假型化AAV、嵌合AAV衣壳、重组AAV衣壳或“人源化”AAV衣壳。假型化载体适用于本发明,其中一个AAV的衣壳被异源衣壳蛋白替换。在一个实施方案中,AAV2/5和AAV2/8是示例性假型化载体。

[0074] 在另一实施方案中,使用自身互补AAV。“自身互补AAV”是指具有表达盒的质粒或载体,其中由重组AAV核酸序列携带的编码区已被设计来形成分子内双链DNA模板。一旦感染,scAAV的两个互补半分将结合形成准备好立即复制和转录的双链DNA(dsDNA)单位,而非等待第二条链的细胞介导的合成。参见,例如D M McCarty等人,“Self-complementary recombinant adeno-associated virus(scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis”,Gene Therapy,(2001年8月),第8卷,第16期,第1248-1254页。自身互补AAV描述于例如美国专利号6,596,535;7,125,717;和7,456,683中,这些专利各自以引用的方式整体并入本文。

[0075] 术语“外源性”用于描述核酸序列或蛋白质,意指核酸或蛋白质不天然地存在于其

存在于染色体或宿主细胞中的位置中。外源性核酸序列还指的是来源于相同的宿主细胞或受试者并插入其中的序列,但该序列以非天然状态存在,例如不同的拷贝数,或在不同调控元件的控制下。

[0076] 术语“异源性”用于描述核酸序列或蛋白质,意指核酸或蛋白质来源于与其中表达所述核酸或蛋白质的宿主细胞或受试者不同的生物体或相同生物体的不同物种。术语“异源性”当关于质粒、表达盒或载体中的蛋白质或核酸使用时表示蛋白质或核酸与另一序列或子序列一起存在,所讨论的蛋白质或核酸与所述另一序列或子序列在自然界中不以相同关系存在。

[0077] 在仍另一实施方案中,将表达盒(包括本文所述的那些中的任一个)用于产生重组AAV基因组。

[0078] 在一个实施方案中,将本文所述的表达盒工程化到合适的遗传元件(载体)中,所述遗传元件适用于产生病毒载体和/或递送到宿主细胞,例如裸DNA、噬菌体、转位子、粘粒、附加体等,其转移其上携带的LCA5序列。选出的载体可通过任何合适的方法递送,包括转染、电穿孔、脂质体递送、膜融合技术、高速DNA包覆沉淀、病毒感染和原生质体融合。用于制备这种构建体的方法是核酸操作领域的技术人员所知的且包括基因工程化、重组工程化及合成技术。参见,例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY。

[0079] 关于将表达盒或rAAV基因组或生产质粒包装到病毒体中来说,ITR是在与表达盒相同的构建体中呈顺式所需的唯一AAV组分。在一个实施方案中,将用于复制(rep)和/或衣壳(cap)的编码序列从AAV基因组中移走并呈反式或由包装细胞系来供应以产生AAV载体。

[0080] 用于产生和分离适用于向受试者递送的AAV病毒载体的方法是本领域中已知的。参见,例如美国专利7790449;美国专利7282199;WO 2003/042397;WO 2005/033321;WO 2006/110689;和US 7588772B2]。在一个系统中,将生产细胞系用编码侧接有ITR的转基因的构建体及编码rep和cap的构建体瞬时转染。在第二系统中,将稳定供应rep和cap的包装细胞系用编码侧接有ITR的转基因的构建体瞬时转染。在这些系统的每个中,AAV病毒体响应于辅助腺病毒疱疹病毒的感染而产生,由此需要将rAAV从污染病毒中分离出来。新近,已经开发了不需要用辅助病毒感染以回收AAV的系统-所述系统在转运中还提供了所需辅助功能(即,腺病毒E1、E2a、VA和E4或疱疹病毒UL5、UL8、UL52和UL29、及疱疹病毒聚合酶)。在这些最新的系统中,辅助功能可通过用编码所需辅助功能的构建体瞬时转染细胞来提供,或者细胞可被工程化以便稳定地含有编码辅助功能的基因,其表达可被控制在转录或转录后水平下。

[0081] 术语“分离的”意指材料从其原始环境(例如,如果它是天然存在的,则为天然环境)中移出。例如,存在于活的动物中的天然存在的多核苷酸或多肽是未分离的,但与天然系统中的一些或所有共存材料分离的相同的多核苷酸或多肽是分离的,即使后来再引入天然系统中。此类多核苷酸可以是载体的一部分和/或此类多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分,且它们仍然是分离的,因为这种载体或组合物不是其天然环境的一部分。

[0082] 在又一系统中,将由ITR和rep/cap基因侧接的表达盒通过用基于杆状病毒的载体感染而引入昆虫细胞中。关于这些生产系统的综述,一般参见,例如Zhang等人.,2009,“Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-

associated virus production,"Human Gene Therapy 20:922-929,其内容以引用的方式整体并入本文。制备和使用这些及其他AAV生产系统的方法也描述于以下美国专利中,其各自的内容以引用的方式整体并入本文:5,139,941;5,741,683;6,057,152;6,204,059;6,268,213;6,491,907;6,660,514;6,951,753;7,094,604;7,172,893;7,201,898;7,229,823;和7,439,065。一般参见,例如Grieger&Samulski,2005,"Adeno-associated virus as a gene therapy vector:Vector development,production and clinical applications,"Adv.Biochem.Engin/Biotechnol.99:119-145;Buning等人,2008,"Recent developments in adeno-associated virus vector technology,"J.Gene Med.10:717-733;及以下引用的参考文献,其各自以引用的方式整体并入本文。

[0083] 用于构建本发明任何实施例的方法为那些具有核酸操作技能的人所知,且包括遗传工程、重组工程和合成技术。参见,例如Green和Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY(2012)。同样,产生rAAV病毒体的方法是众所周知的,且选择合适的方法并不限制本发明。参见,例如K.Fisher等人,(1993)J.Virol.,70:520-532和美国专利号5,478,745。

[0084] “质粒”在本文中一般根据本领域技术人员所熟知的标准命名规则由在前面的小写p和/或继之以大写字母和/或数字来命名。可根据本发明使用的许多质粒及其他克隆和表达载体是本领域技术人员公知且容易利用的。此外,熟练技术人员可容易构建适用于本发明的任何数量的其他质粒。本领域技术人员将容易从本公开内容显而易见这种质粒以及本发明中的其他载体的性质、构建和用途。

[0085] 在一个实施方案中,生产质粒是本文所述的或如W02012/158757中所述,该专利以引用的方式并入本文。本领域中已知用于产生rAAV载体的各种质粒,并且它们适用于本文中。将生产质粒在表达AAV cap和/或rep蛋白的宿主细胞中培养。在宿主细胞中,每个rAAV基因组被挽救并包装成衣壳蛋白或包膜蛋白,以形成感染性病毒粒子。

[0086] 一方面,提供了一种生产质粒,其包含如上所述的表达盒。在一个实施方案中,生产质粒是如SEQ ID NO:8和图1E-1F中所示,其被称为p643。此质粒是用于生成rAAV-人密码子优化的Lebercilin载体的实施例中。这种质粒是含有5' AAV ITR序列;所选启动子;polyA序列;和3' ITR的质粒;另外,其还含有填充序列,如 λ 。在又一实施方案中,填充序列使rAAV载体基因组保持以下尺寸:介于约3千碱基(kb)至约6kb、约4.7kb至约6kb、约3kb至约5.5kb、或约4.7kb至5.5kb之间。在一个实施方案中,非编码 λ 填充区域包括在载体主链中。包含Lebercilin编码序列的p643的一个实例可见于SEQ ID NO:8中。在另一实施方案中,生产质粒是如图11A-11B和SEQ ID NO:9中所示。在另一实施方案中,生产质粒被修饰以优化载体质粒生产效率。这种修饰包括添加其他中性序列、或缺失整个 λ 填充序列的一个或多个部分以调节载体质粒的超螺旋水平。本文涵盖这种修饰。在其他实施方案中,终止子及其他序列包括在质粒中。

[0087] 在某些实施方案中,rAAV表达盒、载体(如rAAV载体)、病毒(如rAAV)、生产质粒包含AAV反向末端重复序列、编码Lebercilin的密码子优化的核酸序列、及指导编码蛋白在宿主细胞中的表达的表达控制序列。在其他实施方案中,rAAV表达盒、病毒、载体(如rAAV载体)、生产质粒还包含以下中的一个或多个:内含子、Kozak序列、polyA、转录后调控元件等。在一个实施方案中,转录后调控元件是土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件(WPRE)。

[0088] 表达盒、载体和质粒包含可使用本领域中已知的技术(包括例如如本文所述的密码子优化)为特定物种而优化的其他组分。盒、载体、质粒和病毒或本文所述的其他组合物的组分包含启动子序列作为表达控制序列的一部分。在另一实施方案中,启动子是细胞特异性的。术语“细胞特异性”意指为重组载体选择的特定启动子可指导优化的Lebercilin编码序列在特定的眼部细胞类型中的表达。在一个实施方案中,启动子对于转基因在光感受器细胞中的表达有特异性。在另一实施方案中,启动子对于在视杆和视锥中的表达有特异性。在另一实施方案中,启动子对于在视杆中的表达有特异性。在另一实施方案中,启动子对于在视锥中的表达有特异性。在一个实施方案中,光感受器特异性启动子是人视紫红质激酶启动子。已显示视紫红质激酶启动子在视杆和视锥中都有活性。参见,例如Sun等人, Gene Therapy with a Promoter Targeting Both Rods and Cones Rescues Retinal Degeneration Caused by AIPL1 Mutations, Gene Ther. 2010年1月;17(1):117-131,其以引用的方式整体并入本文。在一个实施方案中,启动子被修饰以添加一个或多个限制位点,由此促进克隆。

[0089] 在另一实施方案中,启动子是人视紫红质启动子。在一个实施方案中,对启动子进行修饰,使其包含用于克隆的末端的限制。参见,例如Nathans和Hogness, Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin, PNAS, 81:4851-5(1984年8月),其以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中,启动子是人视紫红质启动子的一个部分或片段。在另一实施方案中,启动子是人视紫红质启动子的变体。

[0090] 其他示例性启动子包括人G蛋白偶联受体蛋白激酶1 (GRK1) 启动子 (Genbank登录号AY327580)。在另一实施方案中,启动子是GRK1启动子的292nt片段(位置1793-2087)(参见,Beltran等人, Gene Therapy 2010 17:1162-74,其以引用的方式整体并入于此)。在另一优选实施方案中,启动子是人光感受器间类视黄醇结合蛋白近端 (IRBP) 启动子。在一个实施方案中,启动子是hIRBP启动子的235nt片段。在一个实施方案中,启动子是RPGR近端启动子(Shu等人, IOVS, 2102年5月,其以引用的方式整体并入本文)。适用于本发明的其他启动子包括但不限于视杆视蛋白启动子、红绿视蛋白启动子、蓝色视蛋白启动子、cGMP- β -磷酸二酯酶启动子(Qgueta等人, IOVS, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000年12月;41(13):4059-63)、小鼠视蛋白启动子(以上引用的Beltran等人2010)、视紫红质启动子(Mussolino等人, Gene Ther, 2011年7月, 18(7):637-45);视锥转导蛋白的 α 亚基(Morrissey等人, BMC Dev, Biol, 2011年1月, 11:3); β 磷酸二酯酶(PDE)启动子;色素性视网膜炎(RP1)启动子(Nicord等人, J. Gene Med, 2007年12月, 9(12):1015-23);NXNL2/NXNL1启动子(Lambard等人, PLoS One, 2010年10月, 5(10):e13025)、RPE65启动子;慢性视网膜变性/外周蛋白2(Rds/perph2)启动子(Cai等人, Exp Eye Res. 2010年8月;91(2):186-94);以及VMD2启动子(Kachi等人, Human Gene Therapy, 2009(20:31-9))。这些文献各自以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中,启动子选自人EF1 α 启动子、视紫红质启动子、视紫红质激酶、光感受器间结合蛋白(IRBP)、视锥视蛋白启动子(红绿、蓝色)、含有红绿视锥基因座控制区的视锥视蛋白上游序列、视锥转导和转录因子启动子(神经视网膜亮氨酸拉链(Nr1)和光感受器特异性核受体Nr2e3, bZIP)。

[0091] 在另一实施方案中,启动子是普遍存在的或组成型启动子。合适的启动子的一个实例是具有巨细胞病毒(CMV)增强子元件的杂合鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子,如图1E-1F中

所示的序列在另一实施方案中,启动子是CB7启动子。其他合适的启动子包括人 β -肌动蛋白启动子、人延伸因子-1 α 启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、猿猴病毒40启动子和单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子。参见,例如Damdindorj等人,(2014年8月)A Comparative Analysis of Constitutive Promoters Located in Adeno-Associated Viral Vectors.PLoS ONE 9 (8):e 106472。还有些其他合适的启动子包括病毒启动子、组成型启动子、可调控性启动子[参见,例如WO 2011/126808和WO 2013/04943]。或者,对生理引发物有反应的启动子可用于本文所述的表达盒、rAAV基因组、载体、质粒和病毒中。在一个实施方案中,启动子由于AAV载体的尺寸限制而具有小尺寸,在1000bp下。在另一实施方案中,启动子在400bp下。其他启动子可由本领域技术人员选出。

[0092] 在又一实施方案中,启动子选自SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、和磷酸甘油激酶(PGK)启动子、视紫红质激酶启动子、视杆视蛋白启动子、红绿视蛋白启动子、蓝色视蛋白启动子、光感受器间结合蛋白(IRBP)启动子和cGMP- β -磷酸二酯酶启动子、噬菌体 λ (PL)启动子、单纯性疱疹病毒(HSV)启动子、四环素控制的反式激活蛋白反应性启动子(tet)系统、长末端重复(LTR)启动子如RSV LTR、MoMLV LTR、BIV LTR或HIV LTR、莫洛尼氏鼠肉瘤病毒的U3区启动子、粒酶A启动子、金属硫蛋白基因的调控序列、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、热休克蛋白(HSP)启动子如HSP65和HSP70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、胭脂碱合成酶启动子、MND启动子或MNC启动子。其启动子序列是本领域技术人员已知的或可公开获得,如在文献中或在例如GenBank、PubMed等数据库中。

[0093] 在另一实施方案中,启动子是诱导型启动子。诱导型启动子可选自己知的启动子,包括雷帕霉素/雷帕霉素类似物启动子、蜕皮激素启动子、雌激素反应性启动子、及四环素反应性启动子、或异二聚阻遏开关。参见Sochor等人,An Autogenously Regulated Expression System for Gene Therapeutic Ocular Applications.Scientific Reports,2015年11月24日;5:17105和Daber R,Lewis M.,A novel molecular switch.J Mol Biol.2009年8月28日;391(4):661-70,Epub 2009年6月21日,这两者都以引用的方式整体并入本文。

[0094] 在又一实施方案中,启动子是鸡 β -肌动蛋白启动子,其具有SEQ ID NO.8的nt 546至nt 283的核酸序列。

[0095] 在其他实施方案中,表达盒、载体、质粒和本文所述的病毒含有其他适当的转录起始、终止、增强子序列、有效的RNA加工信号如剪接和多腺苷酸化(polyA)信号;TATA序列;使细胞质mRNA稳定的序列;提高翻译效率的序列(即Kozak共有序列);内含子;提高蛋白质稳定性的序列;以及在需要时,增加编码产物分泌的序列。表达盒或载体可不含任何一个或多个本文所述的元件。

[0096] 合适的polyA序列的实例包括例如合成的polyA或来自牛生长激素(bGH)、人生长激素(hGH)、SV40、兔 β -球蛋白(RGB)或修饰的RGB(mRGB)。在又一实施方案中,poly A具有SEQ ID NO:8的nt 3993至nt 4200的核酸序列。

[0097] 合适的增强子的实例包括例如CMV增强子、RSV增强子、甲胎蛋白增强子、TTR最小启动子/增强子、LSP(TH结合球蛋白启动子/ α 1-微球蛋白/bikunin增强子)、APB增强子、

ABPS增强子、 α mic/bik增强子、TTR增强子、en34、ApoE等等。在一个实施方案中,增强子具有SEQ ID NO:8的nt 241至nt 544的核酸序列。

[0098] 在一个实施方案中,在Lebercilin编码序列的上游处包括Kozak序列以增强来自正确起始密码子的翻译。在另一实施方案中,CBA外显子1和内含子包括在表达盒中。在一个实施方案中,Lebercilin编码序列是在杂合鸡 β 肌动蛋白(CBA)启动子的控制下放置。此启动子是由巨细胞病毒(CMV)立即早期增强子、近端鸡 β 肌动蛋白启动子和侧接有内含子1序列的CBA外显子1组成。

[0099] 在另一实施方案中,内含子选自CBA、人 β 球蛋白、IVS2、SV40、bGH、 α -球蛋白、 β -球蛋白、胶原、卵白蛋白、p53、或其片段。

[0100] 在一个实施方案中,表达盒、载体、质粒和病毒含有5' ITR、鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子、CMV增强子、CBA外显子1和内含子、人密码子优化的Lebercilin序列、bGH poly A和3' ITR。在又一实施方案中,表达盒包含SEQ ID NO:8的nt 1至4379。在仍又一实施方案中,5' ITR具有SEQ ID NO:8的nt 1至nt 130的核酸序列且3' ITR具有SEQ ID NO:8的nt 4250至nt 4379的核酸序列。在又一实施方案中,CBA外显子1和内含子具有SEQ ID NO:8的nt 824至nt 1795的核酸序列。在又一实施方案中,生产质粒具有序列SEQ ID NO:8,也示于图1E-1F中。在又一实施方案中,生产质粒具有序列SEQ ID NO:9,也示于图1A-11B中。

[0101] 另一方面,在患有LCA的受试者中治疗由lebercilin基因缺陷引起的莱伯氏先天性黑蒙症和/或恢复视觉功能的方法包括向有此需要的受试者递送如本文所述的编码Lebercilin的载体(如rAAV)。在一个实施方案中,提供了一种用本文所述的rAAV治疗患有LCA的受试者的方法。

[0102] 如所述方法中使用的“施用”意指向特征为LCA的所选靶细胞递送所述组合物。在一个实施方案中,所述方法涉及通过视网膜下注射向RPE、光感受器细胞或其他眼部细胞递送所述组合物。在另一实施方案中,采用向受试者进行玻璃体内注射。在另一实施方案中,采用向受试者进行视网膜下注射。在仍另一方法中,可采用血管内注射,如经由睑静脉进行注射。本领域技术人员可考虑到本公开来选择其他施用方法。

[0103] “施用”或“施用途径”是本文所述的组合物向受试者的递送,有或没有药物载剂或赋形剂。如果需要的话,可组合施用途径。在一些实施方案中,定期重复所述施用。本文所述的药物组合物被设计成通过任何合适的途径或不同途径的组合向有此需要的受试者递送。在一些实施方案中,采用向眼睛直接递送(任选地经由眼部递送、视网膜下注射、视网膜内注射、玻璃体内、局部)或经由全身途径递送,例如血管内、动脉内、眼内、静脉内、肌内、皮下、皮内及其他胃肠外施用途径。本文所述的核酸分子、表达盒和/或载体可在单一组合物或多个组合物中递送。任选地,可递送两个或更多个不同的AAV,或多种病毒[参见,例如WO20 2011/126808和WO 2013/049493],在另一实施方案中,多种病毒可单独或与蛋白质组合含有不同的复制缺陷型病毒(例如AAV和腺病毒)。

[0104] 本文还提供了药物组合物。本文所述的药物组合物被设计成通过任何合适的途径或不同途径的组合向有此需要的受试者递送。这些递送手段被设计以避免含有本文所述的AAV组合物的混悬液的直接全身递送。适当地,这可具有以下益处:与全身施用相比减少的剂量、降低的毒性和/或对AAV和/或转基因产物的减少的不希望有的免疫反应。

[0105] 在还有些其他方面中,这些核酸序列、载体、表达盒和rAAV病毒载体适用于药物组

合物中,所述药物组合物还包含药学上可接受的载剂、赋形剂、缓冲剂、稀释剂、表面活性剂、防腐剂和/或佐剂等。这种药物组合物用于通过经由这种重组工程化的AAV或人工AAV的递送在宿主细胞中表达优化的Lebercilin。

[0106] 为了制备含有核酸序列、载体、表达盒和rAAV病毒载体的这些药物组合物,优选地通过常规方法就污染对序列或载体或病毒载体进行评估,然后将其配制到适用于向眼部施用的药物组合物中。这种制剂涉及药学上和/或生理学上可接受的媒介物或载剂的使用,特别是适用于向眼部施用的那种,如缓冲盐水或其他缓冲剂,例如HEPES,以便将pH维持在适当的生理水平下,及任选其他药用试剂、药物试剂、稳定剂、缓冲剂、载剂、佐剂、稀释剂、表面活性剂或赋形剂等。关于注射,载剂通常是液体。示例性生理学上可接受的载剂包括无菌、无热原的水和无菌、无热原的磷酸盐缓冲盐水。多种这类已知载剂提供于美国专利公布号7,629,322中,该专利以引用的方式并入本文。在一个实施方案中,载剂是等渗氯化钠溶液。在另一实施方案中,载剂是平衡盐溶液。在一个实施方案中,载剂包括tween。如果将要长期储存病毒,那么可将其在甘油或Tween20的存在下冷冻。

[0107] 在某些实施方案中,关于向人患者施用,适当地将rAAV悬浮于含有盐水、表面活性剂和生理上相容的盐或盐混合物的水溶液中。适当地,将制剂调节至生理学上可接受的pH,例如在pH 6至9、或pH6.5至7.5、pH 7.0至7.7、或pH 7.2至7.8的范围内。由于脑脊液的pH为约7.28至约7.32,对于鞘内递送,可能需要在此范围内的pH;而对于玻璃体内或视网膜下递送,可能需要6.8至约7.2的pH。然而,对于其他递送途径,可选择在此最宽范围或这些子范围内的其他pH。

[0108] 合适的表面活性剂或表面活性剂的组合可选自无毒的非离子型表面活性剂。在一个实施方案中,选择以伯羟基为端基的双官能嵌段共聚物表面活性剂,例如像Pluronic® F68[BASF],也称为泊洛沙姆188,其具有中性pH,具有8400的平均分子量。可以选择其他表面活性剂和其他泊洛沙姆,即由侧接两个聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))亲水链的聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))的中心疏水链构成的非离子三嵌段共聚物;SOLUTOL HS15(Macrogol-15羟基硬脂酸);LABRASOL(聚氧辛酸甘油酯);聚氧10油基醚;TWEEN(聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯);乙醇和聚乙二醇。在一个实施方案中,制剂含有泊洛沙姆。这些共聚物通常用字母“P”(对于泊洛沙姆)命名,后面跟三个数字:前两个数字x 100给出聚氧丙烯芯的近似分子量,最后一个数字x 10给出聚氧乙烯含量百分比。在一个实施方案中,选择泊洛沙姆188。表面活性剂可以至多约0.0005%至约0.001%悬浮液的量存在。

[0109] 在一个实施例中,制剂可含有例如缓冲盐水溶液,其包含于水中的以下一种或多种:氯化钠、碳酸氢钠、葡萄糖、硫酸镁(例如硫酸镁-7H₂O)、氯化钾、氯化钙(例如氯化钙-2H₂O)、磷酸二钠及其混合物。适当地,对于鞘内递送,渗透压在与脑脊液相容的范围内(例如,约275至290);参见,例如medicine.medscape.com/article/2093316-overview。任选地,对于鞘内递送,可商购获得的稀释剂可用作悬浮剂或与另一悬浮剂及其他任选的赋形剂组合。参见,例如ElliottsB® solution[Lukare Medical]。在其他实施方案中,制剂可含有一种或多种渗透促进剂。合适的渗透促进剂的实例可包括例如甘露醇、甘氨酸钠、牛磺胆酸钠、脱氧胆酸钠、水杨酸钠、辛酸钠、癸酸钠、月桂基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂醚或EDTA。

[0110] 在另一实施方案中,组合物包含载剂、稀释剂、赋形剂和/或佐剂。考虑到转移病毒

所针对的适应症,本领域技术人员可容易选择合适的载剂。例如,一种合适的载剂包括盐水,其可用多种缓冲溶液配制(例如磷酸盐缓冲盐水)。其他示例性载剂包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。缓冲剂/载剂应包括防止rAAV黏在输液管上但不妨碍rAAV的体内结合活性的组分。

[0111] 任选地,本发明组合物除rAAV和载剂之外还可含有其他常规药物成分,如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性防腐剂包括氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟苯甲酸酯、乙基香兰素、甘油、苯酚和对氯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0112] 根据本发明的组合物可包含如上所定义的药学上可接受的载剂。适当地,本文所述的组合物包含有效量一种或多种AAV,其悬浮于药学上合适的载剂中和/或与合适的赋形剂混合,所述赋形剂被设计用于经由注射、渗透泵、鞘内导管递送到受试者或通过另一装置或途径递送。在一个实施例中,组合物被配制用于玻璃体内递送。在一个实施例中,组合物被配制用于视网膜下递送。

[0113] 在一个示例性特定实施方案中,载剂或赋形剂的组合物含有180mM NaCl、10mM NaPi, pH7.3,具有0.0001%-0.01% Pluronic F68 (PF68)。缓冲剂的盐水组分的确切组成在160mM至180mM NaCl范围内。任选地,使用不同pH缓冲剂(可能是HEPES、碳酸氢钠、TRIS)代替具体所述的缓冲剂。还或者,含有0.9% NaCl的缓冲剂是有用的。

[0114] 在AAV病毒载体的情况下,基因组拷贝(“GC”)、载体基因组(“VG”)或病毒粒子的定量可用作包含在制剂或混悬液中的剂量的量度。本领域中已知的任何方法都可用于测定本发明的复制缺陷型病毒组合物的基因组拷贝(GC)数量。AAV GC数量滴定的一种方法如下进行:首先用DNase处理纯化的AAV载体样品以便将未包壳的AAV基因组DNA或污染质粒DNA从生产过程中除去。然后使DNase抗性粒子经历热处理以便从衣壳中释放基因组。然后使用靶向病毒基因组特定区域(通常是poly A信号)的引物/探针集,通过实时PCR定量所释放的基因组。在另一方法中,如S.K. McLaughlin等人,1988J. Virol., 62:1963中所述测量携带编码优化的Lebercilin编码序列的核酸序列的重组腺相关病毒的有效剂量,该文献以引用的方式整体并入本文。

[0115] 如本文所用,术语“剂量”可指的是在治疗过程中递送给受试者的总剂量或在单个单位(或多单位或分次剂量)施用中递送的量。药物病毒组合物可以剂量单位配制以便每剂量含有以下量的携带如本文所述的编码Lebercilin的密码子优化的核酸序列的复制缺陷型病毒:在约 1.0×10^9 GC至约 1.0×10^{15} 个GC的范围内,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,组合物被配制以便每剂量含有至少 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 或 9×10^9 个GC,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在另一实施方案中,组合物被配制以便每剂量含有至少 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 或 9×10^{10} 个GC,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在另一实施方案中,组合物被配制以便每剂量含有至少 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 或 9×10^{11} 个GC,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在另一实施方案中,组合物被配制以便每剂量含有至少 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 或 9×10^{12} 个GC,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在另一实施方案中,组合物被配制以便每剂量含有至少 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 或 9×10^{13} 个

GC,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在另一实施方案中,组合物被配制以便每剂量含有至少 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 或 9×10^{14} 个GC,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在另一实施方案中,组合物被配制以便每剂量含有至少 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 或 9×10^{15} 个GC,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,对于人类应用,剂量可在每剂量 1×10^{10} 至约 1×10^{12} 个GC的范围内,包括在该范围内的所有整数量或分数量。所有剂量都可通过任何已知的方法测量,包括通过oqPCR或微滴式数字PCR(ddPCR)所测量,如在例如M. Lock等人, Hum Gene Ther Methods. 2014年4月; 25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131中所述,该文献以引用的方式并入本文。

[0116] 在一个实施方案中,提供了一种适于向LCA患者施用的水性混悬液。混悬液包含水性助悬液体和每眼约 1×10^{10} 个本文所述的重组腺相关病毒(rAAV)的GC或病毒粒子至约 1×10^{12} 个GC或病毒粒子,所述重组腺相关病毒适用作LCA的治疗剂。

[0117] 还可能需要施用多个“增强(booster)”剂量的本发明药物组合物。例如,取决于眼部靶细胞内的转基因持续时间,可能以6个月间隔时间递送增强剂量,或在首次施用之后每年递送。AAV中和抗体不能通过施用rAAV载体而产生的事实应允许另外的增强施用。

[0118] 这类增强剂量及由此的需要可由主治医师使用例如视网膜和视觉功能测试及以下实施例中所述的视觉行为测试来监测。其他类似测试可用于测定所治疗的受试者随时间的状态。可由主治医师选择适当的测试。还或者,本发明方法还可涉及在单一或多重感染中注射更大体积的含病毒溶液以允许视觉功能水平接近野生型视网膜中所见的那些。

[0119] 在另一实施方案中,携带编码Lebercilin的密码子优化的核酸序列的本文所述的载体、病毒和复制缺陷型病毒的量在每眼约 1.0×10^7 个VG至每眼约 1.0×10^{15} 个VG的范围内,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,其量是每眼至少 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 或 9×10^7 个VG,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,其量是每眼至少 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 或 9×10^8 个VG,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,其量是每眼至少 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 或 9×10^9 个VG,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,其量是每眼至少 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 或 9×10^{10} 个VG,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,其量是每眼至少 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 或 9×10^{11} 个VG,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,其量是每眼至少 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 或 9×10^{12} 个VG,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,其量是每眼至少 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 或 9×10^{13} 个VG,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,其量是每眼至少 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 或 9×10^{14} 个VG,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,其量是每剂量至少 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 或 9×10^{15} 个GC,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在一个实施方案中,所述方法包括每剂量每眼 1×10^9 至约 1×10^{13} 个VG范围内的剂量,包括在该范围内的所有整数量或分数量。在另一实施方案中,所述方法包括递送水性混悬液中的载体。在另一实施方案中,所述方法包括以约或

至少150微升的体积以 1×10^9 至 1×10^{13} 个GC的剂量施用本文所述的rAAV,由此恢复所述受试者的视觉功能。所有剂量都可通过任何已知的方法测量,包括通过oqPCR或微滴式数字PCR(ddPCR)所测量,如在例如M.Lock等人,Hum Gene Ther Methods.2014年4月;25(2):115-25.doi:10.1089/hgtb.2013.131中所述,该文献以引用的方式并入本文。

[0120] 上述这些剂量可在不同体积的载剂、赋形剂或缓冲剂制剂中施用,范围在约25至约1000微升范围内,包括在该范围内的所有数值,取决于要治疗的区域的大小、所用的病毒滴度、施用途径、及方法的所需效果。在一个实施方案中,载剂、赋形剂或缓冲剂的体积是至少约25 μ L。在一个实施方案中,体积为约50 μ L。在另一实施方案中,体积为约75 μ L。在另一实施方案中,体积为约100 μ L。在另一实施方案中,体积为约125 μ L。在另一实施方案中,体积为约150 μ L。在另一实施方案中,体积为约175 μ L。在仍另一实施方案中,体积为约200 μ L。在另一实施方案中,体积为约225 μ L。在仍另一实施方案中,体积为约250 μ L。在仍另一实施方案中,体积为约275 μ L。在仍另一实施方案中,体积为约300 μ L。在仍另一实施方案中,体积为约325 μ L。在另一实施方案中,体积为约350 μ L。在另一实施方案中,体积为约375 μ L。在另一实施方案中,体积为约400 μ L。在另一实施方案中,体积为约450 μ L。在另一实施方案中,体积为约500 μ L。在另一实施方案中,体积为约550 μ L。在另一实施方案中,体积为约600 μ L。在另一实施方案中,体积为约650 μ L。在另一实施方案中,体积为约700 μ L。在另一实施方案中,体积为约800 μ L。在另一实施方案中,体积介于约150与800 μ L之间。在另一实施方案中,体积介于约700与1000 μ L之间。在另一实施方案中,体积介于约250与500 μ L之间。

[0121] 在一个实施方案中,病毒构建体可以至少 1×10^9 至至少 1×10^{11} 个GC的剂量以约1 μ L至约3 μ L的体积向小动物受试者如小鼠递送。对于具有与人眼大致相同尺寸的眼睛的更大兽医受试者,更大的上述人剂量和体积是有用的。关于对向各种兽医动物施用物质的良好实践的论述,参见,例如Diehl等人,J.Applied Toxicology,21:15-23(2001)。此文献以引用的方式并入本文。

[0122] 最好利用最低有效浓度的病毒或其他递送媒介物来降低不希望有的作用(如毒性、视网膜发育异常和脱落)的风险。主治医师在考虑以下因素之后可选出在这些范围内的还有些其他剂量:所治疗的受试者(优选人类)的身体状况、受试者的年龄、LCA及该病症(如果是进行性的)发展的程度。

[0123] 本文所述的又一个方面是一种治疗、延缓或停止哺乳动物受试者中的LCA进展的方法。在一个实施方案中,可向包括人受试者的所需受试者施用优选悬浮于生理学上相容的载剂、稀释剂、赋形剂和/或佐剂中的携带Lebercilin天然的、修饰的或密码子优化的序列的rAAV。此方法包括向有此需要的受试者施用以下任一种:核酸序列、表达盒、rAAV基因组、质粒、载体或rAAV载体或含有它们的组合物。在一个实施方案中,视网膜下递送所述组合物。在另一实施方案中,玻璃体内递送所述组合物。在仍另一实施方案中,使用适于治疗LCA的施用途径的组合递送所述组合物,并且还可涉及经由睑静脉或其他静脉内或常规施用途径进行施用。

[0124] 关于在这些方法中的使用,每个剂量的体积和病毒滴度是单独确定的,如本文中进一步所述,并且可与在同侧或对侧眼中进行的其他治疗相同或不同。主治医师在考虑了本说明书的教导之后可确定剂量、施用和方案。在一个实施方案中,组合物是以选自上文在受累眼中列出的那些剂量的单一剂量来施用。在另一实施方案中,组合物是作为选自上文

在两只受累眼中列出的那些剂量的单一剂量同时或依次施用。依次施用可意味着从一只眼到另一只眼的施用时间间隔是数分钟、数小时、数天、数周或数月。在另一实施方案中,所述方法涉及向眼施用两个或更多个剂量(例如分次剂量)的组合物。在另一实施方案中,多次注射是在同一眼的不同部分中进行。在另一实施方案中,包含所选表达盒(例如,含LCA5的盒)的rAAV的第二次施用是在稍后的时间点进行。这类时间点可以是首次施用之后的数周、数月或数年。在一个实施方案中,这种第二次施用是用具有与首次施用的rAAV不同的衣壳的rAAV来进行。在另一实施方案中,首次与第二次施用的rAAV具有相同的衣壳。

[0125] 在还有些其他实施方案中,本文所述的组合物可在单一组合物或多个组合物中递送。任选地,可递送两个或更多个不同的AAV,或多重病毒[参见,例如WO 2011/126808和WO 2013/049493],在另一实施方案中,多重病毒可含有不同的复制缺陷型病毒(例如AAV和腺病毒)。

[0126] 在本发明的某些实施方案中,需要进行非侵袭性视网膜成像和功能研究以鉴别疗法将要靶向的视杆和视锥光感受器的区域并且测试治疗功效。在这些实施方案中,使用临床诊断测试来确定一次或多次视网膜下注射的精确位置。这些测试可包括视网膜电图(ERG)、视野检查法、视网膜各层的地形绘图及借助于共焦激光断层扫描检眼镜检查(cSLO)和光学相干断层成像术(OCT)对其各层厚度的测量、经由自适应光学(AO)、功能性眼科检查、多电极阵列(MEA)、瞳孔对光反应等进行的视锥密度地形绘图,这取决于所治疗的受试者的种类、其身体状况和健康情况及剂量。鉴于成像和功能研究,在本发明的一些实施方案中,在同一眼中进行一次或多次注射以靶向受累及眼的不同领域。每次注射的体积和病毒滴度是单独确定的,如本文中进一步所述,并且可与在同侧或对侧眼中进行的其他注射相同或不同。在另一实施方案中,进行单次更大体积的注射以便治疗整只眼。在一个实施方案中,选择rAAV组合物的体积和浓度以使得仅受损眼部细胞的区域受到影响。在另一实施方案中,rAAV组合物的体积和/或浓度是更大的量,以便达到眼睛的更多部分,包括非受损的光感受器。

[0127] 在另一实施方案中,所述方法包括进行另外的研究,例如,功能和成像研究,以便确定治疗功效。对于在动物中的检查,这种测试包括经由考察视杆和视锥光感受器功能的视网膜电图(ERG)进行的视网膜和视觉功能评估、视动性眼球震颤、瞳孔测量法、水迷宫测试、明-暗偏好、光学相干断层扫描(来测量视网膜各层的厚度)、组织学(视网膜厚度、外核层中成排的核、免疫荧光以记录转基因表达、视锥光感受器计数、用花生凝集素对视网膜切片进行染色-其鉴别了视锥光感受器鞘)。

[0128] 具体来说,对于人受试者,在施用本说明书中所述的组合物剂量之后,使用以下手段就治疗功效对受试者进行测试:视网膜电图(ERG)以检查视杆和视锥光感受器功能、瞳孔测量法视敏度、对比敏感性颜色视觉测试、视野测试(汉弗莱视野/哥德曼视野)、视野检查活动能力测试(超越障碍训练场)、及阅读速度测试。在用本文所述的药物组合物治疗之后受试者所暴露于的其他有用的治疗后功效测试是功能性磁共振成像(fMRI)、全视野光敏度测试、视网膜结构研究,包括光学相干断层扫描、眼底照相、眼底自身荧光、自适应光学激光扫描检眼镜检查、活动能力测试、阅读速度和准确度的测试、微视野检查和/或检眼镜检查。这些及其他功效测试描述于美国专利号8,147,823;共同待审的国际专利申请公布WO 2014/011210或WO 2014/124282中,这些专利以引用的方式并入。

[0129] 在本文所述的方法的一个实施方案中,如本文所述的组合物(例如,优化的LCA5盒的AAV递送)的一次性眼内递送适用于治疗受试者的LCA。在本文所述的方法的另一实施方案中,如本文所述的组合物(例如,优化的LCA5盒的AAV递送)的一次性眼内递送适用于治疗处于风险中的受试者的LCA。

[0130] 因此,在一个实施方案中,组合物是在疾病发作之前施用。在另一实施方案中,组合物是在开始视力受损或丧失之前施用。在另一实施方案中,组合物是在开始视力受损或丧失之后施用。在仍另一实施方案中,与非患病眼相比,当小于90%的视杆和/或视锥或光感受器功能正常或保留时,施用所述组合物。在一个实施方案中,新生儿治疗被定义为在递送的8小时、头12小时、头24小时或头48小时内施用如本文所述的Lebercilin编码序列、表达盒或载体。在另一实施方案中,特别是对于灵长类动物(人或非人),新生儿递送在约12小时至约1周、2周、3周或约1个月时期内或在约24小时至约48小时之后。在另一实施方案中,在症状出现之后递送组合物。在一个实施方案中,对患者的治疗(例如,首次注射)是在生命的第一年之前开始。在另一实施方案中,治疗是在1岁之后、或2至3岁之后、5岁之后、11岁之后或在更大年龄时开始。在一个实施方案中,治疗开始于约4岁至约12岁。在一个实施方案中,治疗开始于约4岁时或之后。在一个实施方案中,治疗开始于约5岁时或之后。在一个实施方案中,治疗开始于约6岁时或之后。在一个实施方案中,治疗开始于约7岁时或之后。在一个实施方案中,治疗开始于约8岁时或之后。在一个实施方案中,治疗开始于约9岁时或之后。在一个实施方案中,治疗开始于约10岁时或之后。在一个实施方案中,治疗开始于约11岁时或之后。在一个实施方案中,治疗开始于约12岁时或之后。然而,治疗可开始于约15岁、约20岁、约25岁、约30岁、约35岁或约40岁时或之后。在一个实施方案中,子宫内治疗被定义为在胎儿中施用本文所述的组合物。参见,例如David等人,Recombinant adeno-associated virus-mediated in utero gene transfer gives therapeutic transgene expression in the sheep, Hum Gene Ther. 2011年4月;22(4):419-26. doi:10.1089/hum.2010.007. Epub 2011年2月2日,其以引用的方式并入本文。

[0131] 在另一实施方案中,组合物是在日后再施用。任选地,允许一次以上的再施用。这种再施用可用相同类型的载体、不同的病毒载体或经由如本文所述的非病毒递送。在一个实施方案中,向患者最初注射的视网膜的不同部分再施用载体。在一个实施方案中,向患者最初注射的视网膜的相同部分再施用载体。

[0132] 在仍另一实施方案中,任何上述方法可与另一或第二疗法组合进行。第二疗法可以是任何现在已知的或至今未知的疗法,其有助于预防、阻止或改善这些突变或缺陷或与此有关的任何效应。第二疗法可在施用如上所述的组合物之前、与此同时、或之后施用。在一个实施方案中,第二疗法涉及用于维持视网膜细胞健康的非特异性方法,如施用神经营养因子、抗氧化剂、抗凋亡剂。非特异性方法是通过注射蛋白质、重组DNA、重组病毒载体、干细胞、胎儿组织或基因修饰细胞来实现。后者可包括被封装的基因修饰细胞。

[0133] 在一个实施方案中,产生重组rAAV的方法包括获得如上所述含有AAV表达盒的质粒及在足以允许将AAV病毒基因组包装到感染性AAV包膜或衣壳中的病毒序列存在下培养携带所述质粒的包装细胞。rAAV载体生成的特定方法如上所述并且可用于产生rAAV载体,所述rAAV载体可递送在如上及以下实施例所述的表达盒和基因组中的密码子优化的LCA5。

[0134] 在本发明的某些实施方案中,受试者患有莱伯氏先天性黑蒙症(LCA),本发明的组分、组合物和方法被设计来治疗所述病症。如本文所用,术语“受试者”意指哺乳动物,包括人类、兽医或农场动物、家畜或宠物、以及通常用于临床研究的动物。在一个实施方案中,这些方法和组合物的受试者是人。还有些其他合适的受试者包括但不限于鼠类、大鼠、犬、猫、猪、牛、羊、非人灵长类动物等等。如本文所用,术语“受试者”与“患者”可互换使用。

[0135] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”被定义为涵盖出于改善LCA的一种或多种症状的目的向受试者施用一种或多种本文所述的化合物或组合物。“治疗”可因此包括在给定受试者中的以下一种或多种:减少LCA的发作或进展;预防疾病;降低疾病症状的严重程度;或延缓其进展,包括失明的进展;消除疾病症状;延迟疾病发作或监测疾病进展或疗法的功效。

[0136] 应注意,术语“一个/种(a/an)”是指一个/种或多个/种。因此,术语“一个/种(a/an)”、“一个/种或多个/种”和“至少一个/种”在本文中可互换使用。

[0137] 词语“包含(comprise/comprises/comprising)”应是包含在内而不是排他性地解释。单词“由...组成(consist/consisting)”及其变型应排他性地解释,而不是包含在内。虽然说明书中的各种实施方案是使用“包含”语言呈现的,但在其他情况下,相关实施方案也旨在使用“由...组成”或“基本上由.....组成”语言来解释和描述。

[0138] 如本文所用,“疾病”、“病症”和“病状”可互换使用以表示在受试者中的异常状态。

[0139] 除非另有说明,否则本文所用的术语“约”或“~”是指与给定参考值相差10%。

[0140] 如本文所用,术语“调控”或其变型是指组合物抑制生物途径的一种或多种组分的能力。

[0141] 除非在本说明书中另有定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员并且参考公开的文本通常理解的含义相同的含义,其为本领域技术人员提供了对本申请中使用的许多术语的一般指导。

[0142] 实施例

[0143] 以下实施例仅用于说明性的目的并且不意图限制本发明。

[0144] 实施例1:重组rAAV和体外表达研究

[0145] 已在人受试者的>310只眼中且在29个不同的临床试验(clinicaltrials.gov)中使用最充分研究的重组AAV血清型AAV2进行视网膜基因转移。这些试验靶向不同的疾病,包括常染色体缺陷(RPE65缺陷、MERTK突变引起的色素性视网膜炎、无脉络膜、色盲)、线粒体疾病(莱伯氏遗传性视神经病)、年龄相关黄斑变性的并发症(脉络膜新血管形成)和晚期视网膜变性(使用光遗传疗法)。在大多数这些研究(18/29或采用AAV和视网膜下注射的22个研究中的18个)中,目标是有效地靶向RPE细胞。最终的结果是获得了大量关于眼内注射AAV的安全数据。视网膜下注射是同样的手术方法,其将是靶向LCA5患者中的光感受器所必需的。

[0146] 根据所获得的信息,已经做出了巨大的努力来开发一种战胜LCA5及其他涉及原发性光感受器缺陷的疾病的道路。令人遗憾地,AAV2载体不能有效地靶向光感受器,且如上所述,光感受器包含LCA5及大部分其他遗传性视网膜变性中的主要细胞类型。出于此原因,选择AAV7m8,一种通过进化设计产生的载体。已显示此载体在不同物种(小鼠和非人灵长类动物(NHP))中且使用不同施用途径有效地靶向光感受器。

[0147] 本文所报告的功效包括所治疗动物使用视觉线索导航能力的改善、如瞳孔测量法所示通往大脑的视觉通路的恢复、光感受器凋亡的减少、及具有此细胞类型所特有的形态和标记物的功能性光感受器的保存,包括在外视网膜中存在视紫红质。所治疗的Lca5gt/gt光感受器显示外核层较厚,外段保存完好,外段盘堆叠。这与未治疗的Lca5gt/gt视网膜形成鲜明的对比,后者到3月龄时减至单排非邻接的光感受器核19。改善不是永久性的。然而,它们持续至少3个月,此时在未治疗的Lca5gt/gt小鼠中没有保留光感受器。视网膜电图和MEA结果显示了光感受器的成功转导,LCA5基因疗法能够至少部分地恢复视杆和视锥光感受器所介导的反应。细胞反应具有接近正常的动力学,包括反映了多种神经节细胞类型的活性的反应以及在未治疗的视网膜中观察到的支配视黑素反应的逆转。这些结果与瞳孔测量法和视觉行为研究结果相辅相成,并且将为未来的研究提供框架,旨在进一步表征和优化治疗效果(包括在低照度条件下的视觉行为研究)。这些数据提供了以下希望:在人中使用的类似于在Lca5gt/gt小鼠中所用的基因增强方法可以改善视力。或许可以进一步优化干预措施,以获得甚至更持久的挽救效果。转基因盒的组分(启动子等)和所治疗的视网膜区域的改造可能会带来额外的益处。给药研究应鉴别治疗效果的最佳剂量。实情是,LCA5无效患者可保留光感受器直到成人期(而光感受器在小鼠的生命早期便丧失),提示与Lca5-/-小鼠相比在LCA5人中可能有更宽的机会窗口。光感受器在LCA5无效的人的中心凹外核层中已被记录,长达30年。这很重要,因为成功的基因疗法需要存在受累及的细胞。我们能够证明,具有LCA5突变的成人中保留的光感受器与正常视力个体的光感受器表现出类似的光反应时间模式(尽管幅度有所降低)。这些结果表明,尽管LCA5患者存在结构和生理缺陷,但其残留的光感受器仍具有功能。来源于LCA5突变患者的iPSC-RPE的原纤毛比来自对照细胞的那些少得多。实情是在Lca5gt/gt小鼠的光感受器中的纤毛缺陷可通过基因增强疗法纠正且纤毛数量可增至正常水平,提示可能改善在患有此病状的人中存在的纤毛缺陷。

[0148] A. 重组AAV

[0149] 在Center for Advanced Retinal and Ocular Therapeutics (CAR OT),使用AAV7m8衣壳产生重组AAV,已知AAV7m8衣壳比AAV2更有效地感染光感受器(Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Vis el M, Yin L, Merigan WH等人 *In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous*. *Sci Transl Med* (2013) 5 (189) :189ra76. doi:10.1126/scitranslmed.3005708.) 人(h)野生型lebercilin编码的优化cDNA(hopt.LCA5)是针对最优密码子使用进行定制设计并通过DNA2.0 (Menlo Park, CA) 来合成。在侧接有内含子1序列且具有巨细胞病毒(CMV)立即早期增强子的杂合鸡 β -肌动蛋白(CBA)外显子1的控制下放置LCA5 cDNA(图1A和1E)。牛生长激素poly(A)是在cDNA之后。为了防止包装(即非转基因含有)载体从AAV2反向末端重复中逆转,纳入了长填充序列。载体是通过三重转染制得并在由含有0.001% Pluronic F68 (PF68)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)组成的赋形剂中配制。参见,例如Mizukami, Hiroaki等人 *A Protocol for AAV vector production and purification*. *Diss. Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine*, 1998。对照载体代替LCA5 cDNA并入增强型绿色荧光蛋白(eGFP) cDNA中。

[0150] 通过蛋白质印迹就适当大小的转基因蛋白的表达对rAAV进行测试。将8431细胞以每孔 2×10^6 个细胞铺板。铺板之后两天,用AAV7m8.hopt.LCA5(或AAV7m8.CBA.EGFP作为对照)在 1×10^5 或 5×10^5 vg下转导细胞。48小时后,收获细胞并针对电泳和蛋白质印迹进行处理。抗体包括LCA5兔多克隆抗体(Proteintech,Rosemont,IL)并且定量信号,其中每个值都根据背景和蛋白质负载差异通过用GAPDH免疫信号归一化进行校正。

[0151] AAV7m8.CBA.hopt.LCA5病毒能够驱动LCA5转基因在8431细胞中的有效表达。在用AAV7m8.CBA.hopt.LCA5感染之后所预测的~81kDA Lebercilin蛋白的产生证明了剂量依赖性反应。

[0152] 实施例2:LCA小鼠模型Lca5^{-/-}小鼠研究

[0153] 在Lca5^{gt/gt}小鼠模型中开发基因增强疗法的概念验证需要几项挑战:1)因为视网膜退行性变化开始很早且进展迅速,所以必须对新生小鼠进行干预;2)由于这是一种光感受器特异性疾病,因此必须利用重组的AAV载体有效地靶向光感受器。在动物和人类研究中广泛使用的靶向RPE细胞的AAV2载体不像其他AAV血清型那样有效地靶向光感受器,如通过用等剂量感染之后不同血清型的转导比较所示。理想情况下,应开发出能够最终推进人类临床试验的疗法;以及3)必须开发出能够准确鉴别并量化视网膜和视觉功能改善的结果措施,其在基线时如此之低以至于难以评分。在此,使用通过定向进化设计的重组AAV载体(AAV7m8)来递送密码子优化的编码人lebercilin的cDNA。通过使用AAV7m8在生命早期将LCA5递送到患病的光感受器,我们发现基因增强疗法既造成了Lca5^{gt/gt}小鼠视网膜的结构改善也造成了其视力的功能改善。

[0154] Lebercilin定位于光感受器细胞的连接纤毛(22)。连接纤毛是光感受器胞体内段与触角样外段之间的过渡区,支持蛋白质和膜囊泡的选择性转运。因此,连接纤毛用作导管,其支持沿着纤毛微管轨迹的双向蛋白质运输,或称为鞭毛内转运(IFT)。使用定量亲和蛋白质组学(亲和力纯化、质谱法及生物信息学分析)和基因工程化小鼠模型,Bo1dt等人论证LCA5突变妨碍IFT,(22)由此引起光感受器外段发育的早发性缺陷且无法正确地运输在光感受器中特异性地表达的两种不同蛋白,即抑制蛋白和视蛋白。Lca5基因在小鼠中的剔除产生视网膜变性表型。Lca5^{-/-}小鼠发育出脱色素性视网膜斑块,从未发育外段且缺少视锥和视杆ERG对光的反应。存在早期和快速进行性视网膜变性且到2月龄时ONL中仅有单(病态)排核。(22)因此,将Lca5^{-/-}小鼠用作LCA的动物模型。

[0155] 成年Lca5^{gt/gt}(Lca5^{-/-})小鼠是购自Jackson Labs(Bar Harbor,ME)且品系是通过兄妹杂交产生。对研究中使用的所有动物的基因型进行了验证(参见Supplementary Methods)。小鼠处于12小时光/12小时暗循环,且随意供应食物/水。这些研究是遵照联邦和机构规定进行。

[0156] 如先前(28)在幼仔的队列中所述,视网膜下注射是在新生小鼠中单侧进行。小鼠出生后第5天(PN5)的麻醉为低温。在出生后第15天(PN15),用氯胺酮/甲苯噻嗪使动物麻醉。表1示出了每队列使用的动物数量。

[0157] 还进行了AAV7m8的玻璃体内注射,由于先前已显示此载体从玻璃体面穿透小鼠视网膜到达靶标光感受器。(25)在队列1中以于 $1 \mu\text{l}$ 中总计 9.20×10^9 vg注射AAV7m8.CBA.hopt.LCA5。注射溶液含有5%v/v的AAV7m8.CBA.EGFP以使得注射区域可在稍后的时间点通过增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的存在来肯定地确认。另外的动物接受假注射

(队列2),接受AAV7m8.CBA.EGFP的单独注射(队列3),或保持未注射的作为对照(队列4)。注射之后,幼仔回到其母身边直到断奶。

[0158] 表1.在所示的出生后天数(PN)注射且在体内研究的新生Lca5^{-/-}小鼠的队列。ROA-施用途径。

PN5					
组编号	眼#1		眼#2		动物数量
	测试材料	ROA	测试材料	ROA	
1	赋形剂	玻璃体内	NA	假	5+4
2	赋形剂	视网膜下	NA	假	7+4
3	AAV7m8.hopt.LCA5 (+ 5% AAV7m8.GFP)	玻璃体内	NA	假	10+8
4	AAV7m8.hopt.LCA5 + 5% AAV7m8.GFP)	视网膜下	NA	假	17+8
PN15					
组编号	眼#1		眼#2		动物数量
	测试材料	ROA	测试材料	ROA	
5	赋形剂	玻璃体内	NA	假	13
6	赋形剂	视网膜下	NA	假	6
7	AAV7m8.hopt.LCA5 (+ 5% AAV7m8.GFP)	玻璃体内	NA	假	13
8	AAV7m8.hopt.LCA5 (+ 5% AAV7m8.GFP)	视网膜下	NA	假	11

[0160] 注射后约1个月进行检眼镜检查,证实基质清晰,视网膜未脱落,且因此没有手术并发症。任何有角膜或玻璃体混浊的动物都被排除在进一步的研究之外。

[0161] 对小鼠队列进行饲养和研究,且在出生后早期(PN5)和幼年(PN15)时间点进行注射(表1)。注射基本上没有并发症。在PN5注射后,大多数动物被发现没有角膜或玻璃体混浊,角膜或玻璃体混浊会干扰进一步的测试。少数混浊的动物被排除在进一步的分析之外。

[0162] AAV7m8.CβA.hopt-LCA5病毒能够在玻璃体内(IVT)和视网膜下(SR)施用(分别是图1C和1D)之后驱动人LCA5转基因在小鼠视网膜中的有效表达(图1A和1B)。蛋白质印迹分析显示在Lca5gt/gt和野生型小鼠中在PN20用AAV7m8.CβA.hopt-LCA5眼内递送之后产生所预测的~81kDa LCA5蛋白(图1B)。免疫荧光分析显示在野生型成年视网膜的ONL、内段(IS)和连接纤毛(CC)中存在lebercilin蛋白(图1E)。在Lca5gt/gt视网膜中玻璃体内或视网膜下注射AAV7m8.CβA.hopt-LCA5之后,lebercilin见于CC以及IS和ONL中(图1G和1H)。相比之下,在假注射的Lca5gt/gt视网膜中,不存在lebercilin(图1F)。此外,在IVT注射之后,大量的Muller细胞产生lebercilin(图1G)。

[0163] 实施例3:视网膜/视觉功能测试

[0164] 对视觉和视网膜功能的测试包括光提示的水迷宫(注射后2-3个月)、瞳孔测量法(注射后2.5个月)、多电极阵列(注射后3个月)以及在实施例2中指示并描述的利用小鼠的视网膜电图。然后评估视网膜的组织病理学和免疫荧光,如实施例4中所述。随后进行了全面的组织分析。

[0165] A. 视网膜电图

[0166] 我们记录了来自8只Lca5gt/gt小鼠、5个野生型动物及16只Lca5gt/gt小鼠的ERG,其左眼已在PN5用赋形剂玻璃体内注射且右眼用AAV7m8.CβA.hopt-LCA5玻璃体内注射。Lca5gt/gt未注射的对照的眼或用赋形剂注射的Lca5gt/gt眼(总共32只眼睛)都没有产生可检测的ERG反应。在16只用AAV7m8.CβA.hopt-LCA5注射的眼中,四只显示出在暗适应状态下与信号的视杆介导一致的对昏暗闪光的ERG反应以及对更亮闪光的混合视杆-视锥反应,其类似于野生型(WT)混合视杆-视锥ERG波形的较小缩减版(图S2)。光适应的ERG在这些眼中也可检测到,提示明适应反应的视锥介导。治疗后可检测的ERG的幅度范围为WT幅度的20至25%(图S2)。结果表明在基因疗法之后一些动物中的视杆和视锥光感受器功能的恢复。全视野ERG结果的不一致可能反映了在这些技术上具挑战性的视网膜下注射(在出生后早期进行)后维持的视网膜覆盖不完全和/或组织损伤(白内障、未解决的脱离等)。结果显著不同于在未治疗的Lca5gt/gt眼中观察到的不可检测的ERG,但在程度上是可变的或是不常见的。

B. 水迷宫导航研究

[0167] 通过水迷宫测试,评估了5室水迷宫中每个动物识别包含淹没平台的室的能力(图11)。测试之前,将装置保持在一间没有外来光的房间里且光源直接放置在平台上。在迷宫的中心处释放暗适应小鼠且给予60秒,无间断,以便找到并把四只爪子都放在光平台上。

[0168] 训练在室内光(约200Lux)下进行,然后让老鼠适应黑暗,且在昏暗的灯光下进行测试。在训练期间,如果在60秒结束时小鼠找不到平台,那么实验者将老鼠引导到平台上。在每次试验时,光和平台被随机放置在不同的室中。

[0169] 训练通过标准被定义为:在9次连续试验中有5次以上的试验,小鼠能够在60秒内独立进入正确的室,而不会偏离到不同的室,并登上平台。所有小鼠均接受为期5天的训练,而不考虑满足训练通过标准的那天。使用与训练中所用相同的程序进行为期4天的测试,但是通过一系列的滤光片来进一步降低光源的亮度。通过使用滤光片,亮度为: 1.06×10^5 、 8.69×10^3 、 5.87×10^2 scot cd m²,或在关灯的情况下,亮度为0 scot cd m²。

[0170] 动物在2-2.5个月大时接受训练,然后用光提示的水迷宫进行测试。光提示的水迷宫测试结果显示,AAV7m8.CβA.hopt.LCA5视网膜下或玻璃体内注射的组比对照显著表现更好。(表2B;参见粗体值;图3)。图2A示出了原始数据,即每个队列中分析的动物数量,然后使用水迷宫在指定的光照水平下进行测试。表2B示出了使用单向方差分析(ANOVA)的统计分析结果。所治疗的动物能够在 8.69×10^3 scot cd m²下通过测试,而来自对照赋形剂注射的队列的动物则不是($p < 0.01$)。

[0171] 表2. 在Lca5-/-小鼠中水迷宫测试的结果

(A) 干预	n	通过的平均值(SD)%			
		光照水平(scot cd m ²)			
		1.06 x 10 ⁵	8.69 x 10 ³	5.87 x 10 ²	0
赋形剂(PBS) 在 PN5 时的玻璃体内	5	53.3 (36.36)	31.1 (9.29)	31.1 (21.38)	13.3 (9.29)
赋形剂(PBS) 在 PN15 时的玻璃体内	13	46.15(17.5)	33.31 (17.57)	17.08 (9.74)	33.32 (13.64)
赋形剂(PBS) 在 PN5 时的视网膜下	7	73.0 (16.78)	34.9 (16.28)	22.2 (16.96)	14.3 (12.35)
AAV7m8-hopt-LCA5 5% GFP) 在 PN5 时的玻璃体内	(+10	70.0(17.43)	52.3 (13.93)	40.0 (21.09)	15.5 (13.03)
AAV7m8-hopt-LCA5 5% GFP) 在 PN15 时的玻璃体内	(+13	53.85 (24.80)	28.19 (17.35)	18.78 (11.45)	27.75 (11.64)
AAV7m8-hopt-LCA5 5% GFP) 在 PN5 时的视网膜下	(+17	88.99(16.2)	77.1 (15.9)	47.7 (23.8)	14.4 (8.6)

[0172]

(B)	光照水平(scot cd m ²)			
	1.06 x 10 ⁵	8.69 x 10 ³	5.87x 10 ²	0
与 PBS 对照组的成对比较的 P 值[†]				
在 PN5 时的 AAV7m8-hopt-LCA5 玻璃 体对比在 PN5 时的赋形剂 玻璃体内	0.24	0.01	0.46	0.74
在 PN15 时的 AAV7m8-hopt-LCA5 玻璃 体内对比在 PN15 时的赋 形剂玻璃体内	0.37	0.46	0.69	0.48
在 PN5 时的 AAV7m8-hopt-LCA5 视网 膜下对比在 PN5 时的赋形 剂视网膜下	0.042	0.00001	0.018	0.981

[0173] C. 瞳孔对光反射

[0174] 在每只眼的一系列10次闪光期间,测量瞳孔收缩的幅度。闪光强度是1,000scot lux。PLR被定义为在闪光后0.6-1.2秒时间间隔内瞳孔收缩反应的最大幅度,超过刺激前直径的3个标准差。对治疗模式不知情的科学家在分析之前评价了每只动物的数据以确保每个瞳孔都被准确追踪。如果没有,那么特定的动物将被排除在进一步的分析之外。

[0175] 对于统计分析,比较在每个光强度下来自治疗的(右)和对侧假注射的对照(左)Lca5^{-/-}眼的归一化瞳孔直径。通过将所治疗眼的归一化收缩幅度除以未治疗眼的幅度,可获得反应的最大差异幅度(MDAR)百分比。MDAR的百分比越高,说明对干预的反应越强。另外的年龄匹配的未治疗的Lca5^{-/-}和野生型(C57B1/6)小鼠分别用作阳性和阴性对照。未治疗的Lca5^{-/-}和C57B1/6小鼠的MDAR为约0,由于两只眼之间存在最小差异。

[0176] 另外的分析评估了不同队列的小鼠的右眼中瞳孔收缩幅度的大小。因此,可比较治疗与未治疗的Lca5^{-/-}小鼠和未治疗的C57B1/6小鼠之间的收缩幅度。

[0177] 通过刺激治疗的对比对照眼产生的瞳孔对光反射幅度的分析揭示了与未治疗的对照Lca5^{-/-}动物相比在用AAV7m8.hopt-LCA5视网膜下或玻璃体内治疗的Lca5^{-/-}小鼠的眼中瞳孔反射幅度的显著($p < 0.05$)改善(图2)。在PN5时通过任一递送途径(图2A、2B、2H和2I)且在PN15时用视网膜下递送注射的动物中检测到瞳孔对光反射(PLR)的显著改善,但在玻璃体内递送下也有改善的趋势(图2H和2I)。

[0178] D. 多电极阵列

[0179] 在5只动物接受掺入有5% (v/v) AAV7m8.CBA.GFP的AAV7m8.CMV/CBA.hopt.LCA5的单侧玻璃体内注射(约 9.87×10^{10} 个vg/眼)之后2.5-3.5个月,对这些动物进行多电极阵列(MEA)测试。对侧眼是假注射且用作阴性对照。5只未治疗的年龄匹配的野生型(WT)C57B1/6小鼠充当阳性对照。光适应小鼠的视网膜在红光下被解剖,并在多孔MEA室中单侧向下固定神经节细胞。外植体中GFP的存在证实了光感受器对AAV的暴露。不同强度的455nm光(色素激发的效率为约40%:视紫红质和M-视蛋白;约0.2%:S-视蛋白)的校准的全视野闪光被用于光刺激(在0.1Hz下2s闪光或在4Hz下50ms闪光)。使用Matlab(MatLab,Natick,MA)中的自定义代码分析数据;在Plexon Offline Sorter(Plexon,Dallas,TX)中进行峰电位分类。在PN5时使用多电极阵列(MEA)分析探测AAV7m8.CBA.hopt-LCA5。使用MEA的理由是,它测量视网膜发送到大脑的输出信号,且因此,除了测试光感受器功能外,还提供有关视网膜布线的信息。在用MEA测试的5个视网膜/动物中,两个具有明显可检测的视杆和视锥ERG(参见图S2中的代表性记录),一个具有残余细微的、~10V ERG,且两个不具有任何可检测的ERG。5个AAV7m8.CBA.hopt.LCA5注射的视网膜中有3个在MEA测试中具有强光反应,一个显示中值反应且1个显示最小反应(图5A-D)。反应在暗适应强度下变得可检测($42-112$ 个光子 $\cdot s^{-1} \cdot \mu m^{-2}$ 或平均起来, $8.28e1$ hv/ μm^2 ;455nm)并且通过 $2.00e9$ 个光子 $\cdot s^{-1} \cdot \mu m^{-2}$ 的最明亮适应强度观察到强反应。假设对于端点照射的视杆和视锥的收集面积在峰值灵敏度的波长下为约 $1 \mu m^2$,23,24(注意,在ERG及我们的MEA实验中,光是从神经节细胞侧进入视网膜)且通过455nm光刺激视紫红质及M-和S-视锥视蛋白的效率分别为约60%、50%和0.3%,25-27在我们的实验中产生明显可检测反应的暗灯光在视杆中每秒每细胞产生小于70次光异构化,在M-视锥中小于60次,且在S-视锥中每秒约0.3次光异构化。吸液管记录的数据显示,在这种色素激发速率下,视杆可产生可检测的光反应(反应幅度超过最大值的20%),而视锥反应预计将比在最有利条件下的小至少20倍(在视杆-转导蛋白剔除的视网膜中的暗适应Mcones)且在视杆支配的小鼠视网膜中应是不可检测的25,26,28(注意,在吸液管记录中的侧面照射时的收集面积对于视杆为约 $0.5 \mu m^2$ 且对于视锥为约 $0.2 \mu m^2$)。因此,在我们的实验中,在较暗强度范围下的光反应观察结果证实在治疗的Lca5^{gt/gt}视网膜中视杆功能的恢复。强度更亮端的反应应起源于视锥(在M-和S-视锥中,最亮强度应超过M-和S-视锥每秒每细胞

分别产生约 $1.00e9$ 和 $6.00e6$ 次光异构化的能力)。如对于视杆/视锥驱动反应所预期,在第1轮强度系列(光敏视网膜经受至少2轮强度系列,范围在昏暗的暗适应至最亮的明适应强度内,增量为 $\sim 0.51\log$)结束时暴露于最亮刺激系列之后,暗适应反应消失,但明适应反应没有受到显著影响(图5C和D)。WT和治疗的Lca5gt/gt视网膜在预期驱动视锥反应的强度下也对4Hz闪烁刺激有反应(数据未示出)。假注射的对侧眼的视网膜表现为最小至消除的反应,伴有高度自发放电和明显的视黑素反应。

[0180] 慢视黑素驱动反应也在AAV7m8.C β A.hopt-LCA5-治疗的Lca5gt/gt视网膜和来自野生型小鼠的视网膜中检测到(表现为在第2次闪光开始时放电速率的升高,归因于在一系列的1次闪光之后的慢恢复),与未治疗的相比,视黑素反应似乎在治疗的视网膜中被消滅。

[0181] 表3. 在所治疗的和对照Lca5-/-小鼠中MEA反应的概述

治疗/结果	记录数	注释
治疗的 Lca5-/-视网膜/光反应	4	3个视网膜的反应与WT几乎无法区分,其中一个反应较弱,但仍然明显
治疗的 Lca5-/-视网膜/无光反应	2	一个有较弱的自发放电
[0182] 未治疗的 Lca5-/- (左视网膜对照)/无光反应	6	所有反应的 Lca5-/-视网膜(右)具有来自左眼的相应对照
WT /光反应	5	强度在 40 至 $2e9$ 个光子/ $\mu\text{m}^2/\text{秒}$ 范围内
所有视网膜(除一个治疗的 Lca5-/-视网膜外)当测试视黑素驱动反应(长闪光间的时间间隔,以允许慢恢复)时表现出强自发放电。未治疗的 Lca5-/-视网膜表现出强视黑素驱动反应。		

[0183] 两个治疗的Lca5-/-视网膜具有注射后损伤体征且不表现出光反应,尽管有强自发放电。

[0184] AAV7m8.CBA.hopt.LCA5治疗的视网膜的反应类似于未治疗的野生型视网膜的那些。在最短注射后期之后测试的一个治疗的视网膜表现出降低的光敏度及OFF-反应的不存在和持续的ON-反应(图5D的红色向下的三角)。与ON-反应相比,OFF-反应的发展似乎需要更长的注射后时间,这与10个治疗的视网膜的OFF-反应幅度的变异性增加相一致。在全视野刺激下WT视网膜中鉴别的所有神经节细胞类型的功能在峰电位分类之后在Lca5gt/gt AAV治疗的视网膜中检测到(图S10)。在暗适应和明适应刺激(直至最亮强度,近似 $100\text{mW}/\text{cm}^2$)下观察到强反应。如对于视杆/视锥驱动反应所预期,在暴露于最亮的光之后,暗适应反应消失,而明适应反应没有受到显著影响(数据未示出)。

[0185] AAV7m8.hopt.LCA5治疗的视网膜的反应在暗适应强度($42-112$ 个光子 $\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-2}$ 或平均起来, $8.28e1$ $\text{hv}/\mu\text{m}^2$; 455nm)下变得可检测且通过 $2.00e9$ 个光子 $\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-2}$ 的最亮明适应强度观察到强反应。假注射的对侧眼的视网膜表现出最小至消除的反应(数据未示出。对照Lca5-/-)。AAV7m8.hopt.LCA5治疗的视网膜中的反应类似于野生型小鼠视网膜中的那些反应。闪烁反应显示在暴露于最亮的光($2E9\text{hv}/\text{cm}^2$)之后,明适应反应没有受到显著影响(数据未示出,Lca5-/-治疗的)。代表性AAV7m8.CBAhopt.LCA5治疗的视网膜的闪烁反应强度系列($3.53E2-1.52E6$ hv/cm^2)显示,反应幅度随着光强度的提高而提高。最亮闪光之后的视杆和视锥耐久反应测试显示出视锥反应的持久性,类似于野生型视网膜中所见。

闪烁反应测试显示与野生型小鼠的视网膜相比在治疗的Lca5^{-/-}视网膜中的类似反应。在治疗的Lca5^{-/-}视网膜中视杆和视锥的放电速率接近野生型视网膜(与对照未治疗的Lca5^{-/-}视网膜相对比)随光强度而变化的放电速率。

[0186] 反应动力学类似于WT视网膜中的那些(数据未示出)。光敏感度在治疗的Lca5^{-/-}中稍微较低,对比最敏感的WT视网膜,其中第一反应在8-21个光子*s⁻¹*μm⁻²下检测到(数据未示出)。在全视野刺激(ON、OFF和ON/OFF型)下WT视网膜中鉴别的所有神经节细胞类型在峰电位分类之后在Lca5^{-/-}治疗的视网膜中检测到。WT和治疗的Lca5^{-/-}视网膜对在3.53e2-2.00e9个光子*s⁻¹*μm⁻²下的4Hz闪烁刺激有反应(数据未示出)。所有未治疗的Lca5^{-/-}视网膜显示出在更亮强度下的慢视黑素驱动反应,这在光敏性治疗的Lca5^{-/-}视网膜中不存在。研究结果的概述示于表3中。

[0187] 虽然通过视网膜电图和MEA实验获得的结果显示在至少一些动物中有视杆和视锥功能的恢复,但这些方法不足以评估大多数动物中的干预效率,因为只有四分之一的治疗小鼠产生有用的ERG信号。因此,我们基于另外两种方法评估干预效果,即瞳孔对光反射(PLR)和视觉行为的分析,这首先提供了比电生理学更高的灵敏度,其次,验证了AAV7m8.CpA.hopt-LCA5对Lca5gt/gt视网膜的治疗造成光诱导的信号通过通往大脑的视觉通路传递到视网膜以外。

[0188] 瞳孔对光反射(PLR)依赖于信号的传递,信号最初从光感受器传递到视网膜神经节细胞,然后传递到大脑中的埃-韦二氏核,最后经由睫状神经节返回到瞳孔括约肌,睫状神经节控制虹膜直径。治疗对比对照眼在刺激之后的PLR分析揭示,与假注射的对照相比,在用AAV7m8.CpA.hopt-LCA5治疗的Lca5gt/gt小鼠的眼中PLR幅度的显著(p<0.05)增加(图2C)。在PN5时玻璃体内或视网膜下注射的动物中检测的PLR存在显著改善(图2A-2B和2E-2F)以使得观察到近野生型反应(图2D)。通过比较反应的最大差异幅度也证明了PLR幅度的统计上显著改善(MDAR;图2G-2I;图S1)。通过IVT或SR递送接受AAV7m8.CpA.hopt-LCA5的动物也表现出显著改善的PLR,如通过MDAR所定量(图2H和2I)。

[0189] 由于PLR显示视网膜信号和功能,但不提供形成的视觉信息,我们如上所述使用光提示的水迷宫测试来测量功能性视觉。大多数未治疗的野生型(正常视力)小鼠能够在所有光水平下成功地通过水迷宫,而未治疗的Lca5gt/gt则严重受损(表2,图3A)。水迷宫测试结果显示,IVT和视网膜下AAV7m8.CpA.hopt-LCA5注射的Lca5gt/gt动物在至少一个光条件下以统计上显著的方式表现得优于未注射的对照(表2;图3)。在PN5时视网膜下治疗的动物表现出在每个光照测试条件(1.06E+05、8.69E+03和5.87E+02scot cd m⁻²)下与对照赋形剂注射的队列(p<0.01)相比显著改善的通过率。当在PN15时(IVT或SR)注射动物时,改善是最小的(图3)。为了证实小鼠只使用给定的光提示,在无光条件下(0.00scot cd m²)进行测试,并且超过90%的小鼠测试失败(包括正常视力小鼠;图3B)。

[0190] 实施例4:眼部组织学、组织病理学、免疫荧光及TUNEL测定

[0191] 通过评价与光转导级联的适当功能有关的分子及结构测量评估PN5时用AAV7m8.CpA.hopt-LCA5治疗之后的Lca5gt/gt光感受器的组织学挽救。在3月龄时对如实施例2和3中所述的动物施以安乐死。摘除眼,并通过Boldt等人所述的方法修订版评价视网膜切片。(22)将组织在PBS中用4%聚甲醛固定,然后在30%蔗糖/PBS中冷冻保护,之后冷冻并生成冷冻切片。通过检查4',6'-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI,Thermo Fisher Scientific,

Philadelphia, PA) 染色的切片和/或通过用苏木精和伊红染色来进行组织病理学分析。对于免疫荧光研究,将切片在阻断溶液存在下用抗lebercilin(1:300, (12,22) 培育,洗涤,然后用Cy3-缀合的第二抗体处理。所用的额外抗体是抗视紫红质(1:500, Leico Technologies)、抗红/绿视锥视蛋白(1:250, Chemicon)、抗乙酰化微管蛋白(1:1,000, Sigma-Aldrich)。染色切片用含DAPI(Electron Microscopy Services, Hatsfield, PA)的Citifluor封固剂盖片。按照制造商建议(Vector Laboratories, Burlingame, CA),使用末端脱氧核苷酰转移酶(TdT) dUTP缺口末端标签(TUNEL)测定试剂盒进行TUNEL染色。用配备有落射荧光和Axio-Vision 4.6软件的Zeiss Axio Imager M2显微镜及共焦激光扫描显微镜(Olympus Fluoview 1000, Center Valley, PA, USA)评价切片。使用FEI-Tecnaï T12 S/TEM对指定的组织样品进行透射电子显微术(TEM)。

[0192] 在PN5时用AAV7m8-hopt-LCA5注射且在PN15时分析的眼睛的免疫荧光分析显示了Lebercilin与微管蛋白阳性外段基部的共定位。玻璃体内注射之后,Lebercilin分布遍及视网膜各处,其在PN95时几乎不含光感受器。相比之下,Lebercilin不存在于PN15和PN95Lca5^{-/-}视网膜中。

[0193] 在AAV7m8.hopt-LCA5(含有5%v/v AAV7m8.eGFP)的玻璃体内(IVT)或视网膜下(SR)注射之后的苏木精和伊红染色的治疗和对照视网膜切片的PN40对比PN99比较结果可与假注射相比。苏木精和伊红染色(H&E)的视网膜的显微图显示在AAV7m8.hopt-LCA5的IVT或SR注射之后直到3个月时间点(PN99)时内段/外段(IS/OS)和ONL是保存的(数据未示出)。相比之下,假注射的对照视网膜在PN99时缺少这类层(数据未示出)。此外,lebercilin在治疗的视网膜而不是假治疗的对照视网膜中检测到(数据未示出)。通过免疫荧光分析(数据未示出)也证实了视紫红质在ONL中的持续表达,但仅见于治疗的眼中。

[0194] 在PN5时通过IVT或SR注射AAV7m8.C β A.hopt-LCA5治疗的视网膜中的光感受器细胞层的厚度显著大于对照视网膜(图4)。在通过视网膜下注射治疗的视网膜中暴露于AAV或未暴露于AAV的视网膜区域之间的厚度也存在显著边界(数据未示出)。光感受器层的保存持续到最近的时间点(PN99)。厚度的增加是由于外核层的行数增加以及内段和外段的存在(图4)。与此一致的是,根据TUNEL标记所判断,与AAV.LCA5治疗的视网膜相比,在对照中存在比例高得多的光感受器死亡,特别是在干预后的第一个月内(数据未显示)。

[0195] 在注射后1-3个月对在PN5时用AAV7m8.hLCA5注射的Lca5^{-/-}小鼠视网膜的评价揭示了外核层厚度的增加(图5A和图9)。免疫荧光分析揭示了在AAV7m8.hOPT.LCA5治疗的Lca5^{-/-}视网膜中Lebercilin与微管蛋白阳性外段基部的共定位。在未治疗的Lca5^{-/-}视网膜中生命的第一个月时存在许多TUNEL阳性细胞,但在AAV7m8.hOPT.LCA5治疗的视网膜中则显著较少(图6B和6C)。TUNEL阳性细胞的数量到动物长到3月龄时便减少(图6D和6E)。在未治疗的Lca5^{-/-}视网膜中随时间在对照(未治疗的)视网膜中变性的大多数细胞是光感受器,如视紫红质阳性细胞仅见于AAV治疗的视网膜中这一实情所示(图6B)。免疫荧光分析证实了此结果(参见蓝色DAPI染色的ONL),并显示持续3个月时间点的视紫红质(红染色)增加(图6D)。有证据表明,在用AAV7m8.hopt.LCA5注射之后在光转导特异性分子的位置中有光介导的变化(图10)。

[0196] AAV7m8.hopt.LCA5治疗的视网膜的透射电子显微术(TEM)显示出外段的精密性,包括堆叠的外段盘,原纤毛(图7B)和连接纤毛(图7)所特有的9+0微管阵列。相比之下,未治

疗的Lca5^{-/-}视网膜缺少连接纤毛和外段。未治疗的视网膜缺少外段,并且显示光感受器的大量变性,仅有固缩核和光感受器细胞器的残留物。在对照未治疗的或假注射的视网膜中,只有紊乱的、变性的光感受器细胞体存在。

[0197] 用AAV7m8.hopt-LCA5在PN5时治疗的暗适应成年Lca5^{gt/gt}视网膜的光刺激产生光转导蛋白到外段中的正常易位模式。在AAV7m8.hopt-LCA5治疗的视网膜中光暴露之后抑制蛋白适当地易位。由于IS/OS的变性,这种活性无法在对照视网膜中进行评估。这些数据反映了递送野生型(WT)hLCA5 cDNA后小鼠视网膜中鞭毛内转运缺陷的恢复。

[0198] 在Lca5^{-/-}小鼠模型中开发基因增强疗法的概念验证需要几项挑战:1)因为视网膜退行性变化在生命早期进展迅速,所以必须对新生小鼠进行干预;2)由于这是一种光感受器特异性疾病,因此必须利用重组的AAV载体有效地靶向光感受器。已在动物和人研究中广泛用于靶向RPE细胞的AAV2载体不像其他AAV那么有效地靶向光感受器。(23,24)。理想情况下,应使用最终能够用于人类临床试验中的试剂;以及3)必须开发出能够反映视网膜和视觉功能水平的改善的结果措施,所述水平在基线时如此之低以至于难以测量。在此,通过定向进化设计的重组AAV(即AAV7m8)(25)被用于测试在递送天然的人Lebercilin编码cDNA之后的功效。其他研究表明,此载体在玻璃体内递送后能有效靶向光感受器。(25-27)。通过在生命早期使用AAV7m8将hLCA5 cDNA递送到患病的光感受器,基因增强疗法造成Lca5^{-/-}小鼠视网膜的结构和功能改善及视力的改善。

[0199] 在实施例3和4中,据证实AAV7m8介导的基因增强疗法在Lca5^{-/-}小鼠中挽救了视网膜和视觉功能以及视网膜结构。

[0200] 本实施例中报道的功效包括此模型使用视觉提示进行导航能力的改善;如多电极阵列(MEA)所示的视杆和视锥光感受器反应的恢复;凋亡性细胞死亡的减少(且由此使光感受器得以保存);以及功能正常的光感受器所特有的细胞生物和物理特征的存在,如视紫红质在外视网膜中的存在和正常出现的外段的发育,具有堆叠的外段盘。MEA结果表明,考虑到成功的注射以及足够的注射后时间来表达转基因蛋白及恢复视杆/视锥外段的功能,基因疗法使变性的视网膜细胞恢复到与WT条件几乎无法区分的状态。此外,野生型LCA5的递送可以防止光感受器的变性。未治疗的Lca5^{-/-}视网膜到3月龄时减至单排病态光感受器,而AAV治疗的区域具有较厚的外核,包括内段和外段。这种增长持续至少3个月,这是一个非常重要的发现,尤其是考虑到这个年龄,在未治疗的Lca5^{-/-}小鼠视网膜中没有剩余的光感受器。这些数据表明,在人中使用与Lca5^{-/-}小鼠相似的基因增强方法可以改善视力。

[0201] 实施例5:人类研究:瞳孔对光反射测试

[0202] 在获得IRB批准的方案(#815348)的书面知情同意后进行测试。用Procyon P3000瞳孔计和PupilFit6软件(Monmouthshire,UK)同时记录两眼的瞳孔反应。在右眼接受101lux绿光刺激持续0.2秒继之以暗时间间隔后,记录瞳孔对光的反应。红外线敏感摄像机每秒可拍摄25帧视频图像,允许每40ms测量一次双眼瞳孔的直径。

[0203] 进行了瞳孔对光反射测试,以确定在LCA5纯合突变的成人中是否存在残留的光感受器功能的任何证据。如图8所示,此个体中存在瞳孔对光反射,其时间序列与正常视力的个体中的相同。然而,与正常视力的个体相比,反应幅度大大降低。

[0204] 实施例6:LCA5的诱导多能干细胞(iPSC)模型

[0205] 为了有助于将小鼠挽救研究转化为人类挽救研究,我们研究了人诱导多能干细胞

(iPSC)系,该细胞系是为了研究而从视力正常的个体和受LCA5突变影响的LCA患者产生。近年来,iPSC来源的视网膜色素上皮(RPE)已显示重现极化上皮的功能表型,其分泌、基因表达和成熟特征与胎儿和成人RPE相当²⁹。这些细胞显示出关于理解与纤毛生物学的缺陷有关的疾病机制的巨大前景^{30,31}。在此,我们将iPSC分化为RPE细胞(图12A),这一过程可以在更短的时间内评估纤毛细胞,并且比生成神经元/光感受器细胞更有效(图S12)。我们评估了LCA5基因的表达,并且显示LCA5 mRNA在未受影响的iPSC来源的RPE中表达,且LCA患者RPE中LCA5的表达水平明显低于对照(图12B)。当测量纤毛分布时,来源于LCA5患者的iPSC-RPE上存在的纤毛明显少于来自正常视力个体的RPE(图12D-E)。用AAV7m8.hopt-LCA5治疗LCA5-iPSC-RPE导致产生lebercilin蛋白(图12C)且在AAV7m8.LCA5治疗的和正常视力个体的RPE细胞中产生可比的纤毛数量(图12D-F)。

[0206] 在具有LCA5突变的两个不同先证者签署了知情同意书(IRB批准的方案#808828)之后,采集外周血单核细胞(PBMC)。一个先证者(即JB605)是LCA5 Gln279Stop CAG>TAG het与Lys172del14ctcAAAG het的复合杂合子;另一个(即JB590)是LCA5 c.835C>T p.Q279X的纯合子。野生型细胞来自个体PBWT4.6。诱导多能干细胞系是由三个个体的每个产生。在由补充有细胞因子和激素的QBSF-60(Invitrogen,Carlsbad,CA)培养基组成的扩增培养基中培养PBMC。每2-3天补充培养基持续7-9天的一段时期直到细胞进入指数生长阶段。

[0207] 对于重编程,在慢病毒载体中用rTTA慢病毒和强力霉素诱导型“干细胞盒”转导扩增的PBMC,所述慢病毒载体递送OCT4、KLF4、SOX2和cMyc cDNA及由TetO/CMV启动子驱动的微RNA 302/367簇。细胞生长在补充有聚凝胺(5 μ g/ml;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)的扩增培养基中。在37 $^{\circ}$ C下培育细胞20-24h。然后洗涤感染的细胞,并且置于补充有1 μ g/ml强力霉素(DOX)的扩增培养基中。48h之后,将细胞再悬浮于含有以下各物的Iscove's改质的Dolbecco's培养基(IMDM)中:10%胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素、L-谷氨酰胺、 β -巯基乙醇、非必需氨基酸、4ng/ml碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和1 μ g/ml的DOX(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO),然后移到基质胶包被的(BD Biosciences, San Jose, CA)小鼠胚胎成纤维细胞板(MEF板)上。细胞保留在此培养基中持续10天,然后转移到人胚胎干细胞(hESC)培养基(DMEM/F12、20%剔除血清替代品、非必需氨基酸、4ng/ml bFGF、0.001% β -巯基乙醇、青霉素/链霉素、L-谷氨酰胺和1 μ g/ml的DOX(Invitrogen,Carlsbad,CA)中。4周之后,手动挑选iPSC样集落并在基质胶包被的MEF板上扩增持续6代,然后过渡到0.1%明胶包被的MEF板上持续至少15代。iPSC的表征是基于使用针对SSEA3+、SSEA4+、TRA-1-60和TRA-1-81(Biolegend, San Diego, CA)的抗体通过流式细胞术所测量的表面抗原表达,并且RT-qPCR分析包括多能性表达标记物:DMNT3B、ABCG2、REX1、OCT4、SOX2、NANOG、cMYC、KLF4。通过G显带法对iPSC进行核型分析,得到了可见的核型。利用PCR胚层分析法(Qiagen.Germantown,MD,USA)研究了细胞分化为多种不同谱系的能力。

[0208] 通过激活Wnt信号通路、抑制成纤维细胞生长因子信号通路及抑制Rho相关的含卷曲螺旋的蛋白激酶信号通路,将所表征的iPSC分化为RPE。通过geltrex基质上8腔载玻片上的平板黏附纯化扩增的色素细胞。培养富集的细胞,直到它们发育成具有长方体形状的铺路石外观。通过基因表达、免疫细胞化学和显微术证实了iPS-RPE的特征。在固定并针对ARL13B和中心粒周蛋白染色之后测量纤毛长度。使用由Wistar Imaging Facility(Wistar Institute,Philadelphia,PA)设计的定制设计软件在三维空间上测量纤毛长度。

[0209] 在对照和LCA5 iPSC-RPE细胞系中,对纤毛的密度和长度进行评估。两个LCA5患者的RPE细胞上存在的纤毛明显少于野生型细胞系。此外,LCA5衍生系上的纤毛明显短于野生型细胞。

[0210] 先前曾观察到LCA5患者能够保留包括在中心凹外核层中的光感受器长达30年。(21,29)。由于成功的基因疗法需要细胞的存在(即使它们是病态的),LCA5光感受器可能适于治疗。以下事实是令人鼓舞的:本实施例表明具有LCA5的成人中保留的光感受器与正常视力个体的光感受器表现出类似的光反应时间模式(尽管幅度有所降低)。这些结果进一步支持这样一个事实,即在那些异常视网膜中残留的光感受器是有活力的,但其结构和功能存在缺陷。此外,LCA患者来源的iPSC-RPE细胞的纤毛明显短于野生型对照细胞。实情是在Lca5^{-/-}小鼠的光感受器中的纤毛缺陷可通过基因增强疗法纠正,提示可能改善在患有此病状的人中存在的纤毛缺陷。目前正在对iPSC来源的RPE细胞的体外纤毛缺陷纠正的研究。

[0211] 目前正在对具有LCA5的人中的基因增强疗法的安全性和功效进行测试。除了需要为这种严重的致盲病状开发适当的结果措施外,本申请还为规划人类临床试验中的几个问题提供了解决方案,包括制定实现挽救的约束条件。在Lca5^{-/-}小鼠中,实施例表现出在新生(PN5)和幼年(PN15)小鼠中的挽救。在此小鼠模型中,由于早期光感受器丢失,在疾病的后期没有观察到干预。小鼠模型中的发展异常(与光感受器的变性相一致)提示存在该疾病的发展组分。在人类病状中也可能有发展组分。如上所述,在具有LCA5的人中,甚至在成人中也有一些黄斑光感受器持续存在的证据。(21)正在进行研究以确定如何改善这些光感受器的功能并且根据以下事实确定在具有LCA5的人中的视觉通路是否可以复苏:在招募到RPE65基因疗法临床试验中的人的皮质视觉的复苏已经取得了成功,甚至在遭受数十年的视力受限之后。(4,30,31)

[0212] 实施例7:Lca5^{-/-}小鼠的基因分型

[0213] 使用以下寡聚物对基因组DNA进行PCR扩增:LCA-13F6(共用F)GCCTGTTCCCTGCTTGCTTAC(随SEQ ID NO:13附上);LCA-13R2(WT反向)TGCTTTCCAAAGTAAGCACAAA(随SEQ ID NO:14附上)

[0214] en2.8r(突变体反向)CCTGGCCTCCAGACAAGTAG(随SEQ ID NO:15附上)。进行35轮PCR循环,其中退火温度为50°C,且延伸步骤在72°C下。预测产物为353bp(野生型)和439bp(Lca5^{-/-})。

[0215] 实施例8:AAV7m8.hLCA5的玻璃体内注射使Lca5^{-/-}小鼠中的光感受器功能恢复至接近WT水平

[0216] 早发性视力丧失是由LCA5中的突变引起,LCA5基因编码Lebercilin,这种蛋白质对光感受器的健康和功能至关重要。由于光感受器的相对保存,LCA5疾病可能适合基因增强疗法。对下述可能性进行了测试:使用AAV7m8.CMV/CBA.hLCA5的玻璃体内递送的基因增强疗法在Lca5小鼠模型(Lca5^{-/-})中使用多电极阵列(MEA)恢复光感受器和视网膜的功能。

[0217] 用与5%(v/v)AAV7m8.CBA.GFP混合的AAV7m8.CMV/CBA.hLCA5(大约 9.87×10^{10} 个vg/眼)玻璃体内注射出生后第5天的Lca5^{-/-}小鼠。对侧眼是未注射的且用作阴性对照。在干预之后3个月且在光适应条件下,在红光下解剖Lca5^{-/-}视网膜并在多孔MEA室中单侧向下固定神经节细胞。对未治疗的年龄匹配的野生型小鼠(C57B1/6)执行同样的解剖和制备

工序作为阳性对照。GFP的存在证实了光感受器对AAV的暴露。在暗适应和明适应强度范围(在0.1Hz下10次2s闪光或在4Hz下400次50ms闪光)内的455nm光的校准的全视野闪光被用于光刺激(蓝光用于通过靶向M-和S-视锥使反应检测的机会最大化,M-和S-视锥激发的效率相应地为约40%和0.2%)。使用Matlab的自定义代码分析数据,使用P1lexon Offline Sorting进行峰电位分类。

[0218] 三个月后,在具有完整视网膜的眼中,当使用MEA记录测试时,5只中有3只表现强光反应,1只显示中值反应且1只显示最小反应。在具有强反应的3个视网膜中,光反应在暗适应范围(42至112个光子 $\times s^{-1}\times\mu m^{-2}$)内变得可检测且观察到强反应直至 2.00×10^9 个光子 $\times s^{-1}\times\mu m^{-2}$ 的最亮明适应强度。与此同时,未注射的对侧眼的视网膜显示最小反应至消除的反应。如对于视杆/视锥驱动的反应所预期,在暴露于最亮的刺激系列之后,暗适应反应消失,而明适应范围内的反应没有受到显著影响。反应动力学和敏感性极类似于在相同方案下测试的5个WT视网膜中所观察到的(治疗的视网膜的敏感性稍微低于最敏感的WT视网膜,后者产生视杆驱动反应的最暗闪光在8-21个光子 $\times s^{-1}\times\mu m^{-2}$ 范围内)。在注射之后两个月测试的一个所治疗的视网膜表现出较低的光敏性(反应起始于 1.52×10^4 个光子 $\times s^{-1}\times\mu m^{-2}$ 的明适应强度)且反应大多在最亮暴露后消失。这可能表明,靶蛋白的充分表达和功能性视杆/视锥外段的生成需要3个mos。在全视野刺激(ON-、OFF-和ON/OFF-型)下WT视网膜中可鉴别的所有神经节细胞类型在峰电位分类之后在Lca5-/-治疗的视网膜中检测到。与WT视网膜一样,治疗的Lca5-/-视网膜对在 3.53×10^2 - 2.00×10^9 个光子 $\times s^{-1}\times\mu m^{-2}$ 的强度范围的4Hz闪烁刺激有反应。7个对照未治疗的Lca5-/-视网膜中仅有一个表现出在亮的明适应刺激下极弱的光反应,可能表示剩余视锥功能。所有未治疗的Lca5-/-视网膜表现出在更亮强度下的慢视黑素驱动反应,这在光敏性治疗的Lca5-/-视网膜中不存在。

[0219] 两个治疗的Lca5-/-视网膜具有注射后损伤体征且不表现出光反应,尽管有强自发放电。一个治疗的视网膜不显示注射后损伤的明显体征,但表现出在刺激强度更亮端(8.07×10^8 个光子 $\times s^{-1}\times\mu m^{-2}$ 及更高)下仅极弱的光反应,这可能表示靶蛋白的低表达和/或弱的剩余视锥功能。

[0220] 考虑到成功的注射以及足够的注射后时间来表达靶蛋白及恢复视杆/视锥外段的功能,基因疗法使变性的视网膜细胞恢复到与WT条件几乎无法区分的状态。

[0221] 综上所述,LCA本身是最严重的视网膜变性疾病之一,而LCA5是此类疾病中最严重的亚型之一。通常LCA5患者在生命早期仅具有光感,且由于眼球震颤,甚至难以对这些超低视力受试者进行结构研究和专门的视觉功能测试。因此,这种疾病被认为很难接近。然而,Lca5-/-小鼠的表型反映了在具有LCA5突变的人中的许多临床发现。Lca5-/-小鼠中的挽救数据带来了希望,即在人中类似的基因增强方法可以改善视力。在进行人类临床试验的临床前研究的同时,重要的是开发一种方法来精确测量LCA5视网膜的结构和功能,以便在临床试验中可靠并准确地获取基因疗法的效果。这类研究和基因疗法临床试验不仅可以实现对此毁灭性疾病的治疗,而且它们还可以为衡量干预对其他严重的早发性致盲病状的效果提供框架。

[0222] 实施例9:人中的LCA5疾病的初步分析

[0223] 进行了PLR测试,以确定在LCA5纯合突变的成人中是否存在残留光感受器功能的任何证据。如图S11所示,此个体中存在PLR,其时间序列与正常视力个体中的相同。然而,与

正常视力的个体相比,反应幅度大大降低。

[0224] 实施例10:Lebercilin丧失引起细胞和动物模型中的RPE成熟和纤毛功能的失调

[0225] 对莱伯氏先天性黑蒙症5 (LCA5) 的视觉系统中出现的病理改变进行了探究,LCA5 是一种由Lebercilin编码LCA5基因的表达丧失所引起的疾病。以往的研究阐明了Lebercilin缺陷对视神经视网膜的有害影响,特别是对光感受器。本研究旨在通过研究正常的LCA5表达对视网膜色素上皮 (RPE) 发育和功能的影响,进一步阐明导致LCA5的发病机制。

[0226] 采用两种独立的实验范式:一种使用从正常视力个体和LCA5患者的诱导多能干细胞 (iPSC) 中生成的RPE细胞。测量了原纤毛的RPE细胞形态、色素沉着、细胞特异性标记物及特征。第二种方法评估了野生型小鼠与LCA5缺陷的鼠类模型视网膜的比较研究 (LCA5^{gt/gt}小鼠)。为了描述由于缺乏LCA5蛋白而引起的视觉系统中出现的退化和发育变化,对其空间-时间分化模式进行了表征。

[0227] 结果表明,在人RPE细胞模型和活小鼠的RPE中,LCA5缺陷都会导致这些细胞的发育发生深刻的变化。通过基因表达分析,鉴别了负责纤毛形成和鞭毛内转运、色素沉着及发育性WNT信号通路的关键蛋白的失调。免疫染色还鉴别了上皮屏障的差异,这与由于LCA5蛋白功能丧失而导致的成熟改变一致。

[0228] 这项工作揭示了LCA5抑制在RPE中通过改变过程(如色素沉着)的有害影响,可能是由于抑制细胞内运输或间接延迟这些细胞的成熟进程。在这项研究中,我们介绍了RPE细胞在视网膜病理学中可能的主要作用,传统上认为是光感受器功能障碍。

[0229] 本说明书中引用的所有专利、专利公布及其他公布以引用的方式并入本文,以及优先权申请,2017年3月1日提交的美国临时专利申请号62/465,649和2017年3月10日提交的美国临时专利申请号62/469,642。类似地,本文引用的和所附序列表中出现的SEQ ID NO 都以引用的方式并入。虽然本发明已参照具体实施方案进行了描述,但应当理解在不背离本发明精神的情况下可以进行修改。这类修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0230] (序列自由文本)

[0231] 以下信息用于包含数字标识符<223>下的自由文本的序列。

SEQ ID NO: (含有自由文本)	在<223>下的自由文本
3	<223> 构建序列
8	<223> 构建序列
[0232] 9	<223> 构建序列
10	<223> 构建序列
11	<223> 构建序列
12	<223> 构建序列
13	<223> 构建序列
[0233] 14	<223> 构建序列
15	<223> 构建序列

[0234] 参考文献

[0235] 1.Redmond TM,Yu S, Lee E,Bok D,Hamasaki D,Chen N,et al.Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle.Nat

Genet(1998)20(4):344-51.PubMed PMID:9843205.

[0236] 2.Redmond T,Hamel C.Genetic analysis of RPE65:from human disease to mouse model.Methods in Enzymol(2000)317:705-24.

[0237] 3.Maguire AM,High KA,Auricchio A,Wright JF,Pierce EA,Testa F,et al.Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis:a phase 1 dose-escalation trial.Lancet(2009)374(9701):1597-605.PubMed PMID:19854499.

[0238] 4.BennettJ,Wellman J,Marshall KA,McCague S,Ashtari M,DiStefano-Pappas J,et al.Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65mutations:a follow-on phase 1 trial.Lancet(2016)388(10045):661-72.doi:10.1016/S0140-6736(16)30371-3.PubMed PMID:27375040.

[0239] 5.Jacobson SG,Cideciyan AV,Ratnakaram R,Heon E,Schwartz SB,Roman AJ,et al.Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by RPE65 Mutations:Safety and Efficacy in 15Children and Adults Followed Up to 3Years.Arch Ophthalmol(2012)130(1):9-24.Epub 2011/09/14.doi:archophthalmol.2011.298[pii]

[0240] 10.1001/archophthalmol.2011.298.PubMed PMID:21911650.

[0241] 6.Cideciyan AV,Jacobson SG,Beltran WA,Sumaroka A,Swider M,Iwabe S,et al.Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement.Proc Natl Acad Sci U S A(2013).Epub 2013/01/24doi:1218933110[pii]

[0242] 10.1073/pnas.1218933110.PubMed PMID:23341635.

[0243] 7.Bainbridge JW,Smith AJ,Barker SS,Robbie S,Henderson R,Balaggan K,et al.Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis.N Engl J Med(2008)358(21):2231-9.PubMed PMID:18441371.

[0244] 8.Weleber RG,Pennesi ME,Wilson DJ,Kaushal S,Erker LR,Jensen L,et al.Results at 2Years after Gene Therapy for RPE65-Deficient Leber Congenital Amaurosis and Severe Early-Childhood-Onset Retinal Dystrophy.Ophthalmology(2016)123(7):1606-20.doi:10.1016/j.ophtha.2016.03.003.PubMed PMID:27102010.

[0245] 9.Banin E,Bandah-Rozenfeld D,Obolensky A,Cideciyan AV,Aleman TS,Marks-Ohana D,et al.Molecular anthropology meets genetic medicine to treat blindness in the north african jewish population:human gene therapy initiated in Israel.Hum Gene Ther(2010)21(12):1749-57.Epub 2010/07/08.doi:10.1089/hum.2010047.PubMed PMID:20604683.

[0246] 10.Maguire A,Russell S,Bennett J,Chung D,Wellman J,High K, editors.Phase 3trial of AAV2-hRPE65v2 (SPK-RPE65) to treat RPE65 mutation-associated inherited retinal dystrophies.American Academy of Ophthalmology Retina Subspecialty Day;2015;,Los Vegas,NV.

- [0247] 11. Russell S, Bennett J, High K, Chung D, Wellman J, Maguire A. Phase 3 trial of AAV2-hRPE65v2 (SPK-RPE65) to treat RPE65 mutation-associated inherited retinal dystrophies. Saudi Ophthalmologic Society (2016).
- [0248] 12. den Hollander AI, Koenekoop RK, Mohamed MID, Arts HH, Boldt K, Towns KV, et al. Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. Nat Genet (2007) 39(7):889-95. Epub 2007/06/05. doi: ng2066[pii]10.1038/ng2066. PubMed PMID:17546029.
- [0249] 13. Gerber S, Hanein S, Perrault I, Delphin N, Aboussair N, Leowski C, et al. Mutations in LCA5 are an uncommon cause of Leber congenital amaurosis (LCA) type II. Hum Mutat (2007) 28(12):1245. doi:10.1002/humu.9513. PubMed PMID:18000884.
- [0250] 14. Chen X, Sheng X, Sun X, Zhang Y, Jiang C, Li H, et al. Next-generation Sequencing Extends the Phenotypic Spectrum for LCA5 Mutations: Novel LCA5 Mutations in Cone Dystrophy. Sei Rep (2016) 6:24357. doi:10.1038/srep24357. PubMed PMID:27067258; PubMed Central PMCID:PMCPMC4828721.
- [0251] 15. Corton M, Avila-Fernandez A, Vallespin E, Lopez-Molina MI, Almoguera B, Martin-Garrido E, et al. Involvement of LCA5 in Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa in the Spanish population. Ophthalmology (2014) 121(1):399-407. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.08.028. PubMed PMID:24144451.
- [0252] 10.1016/j.ophtha.2013.08.028. PubMed PMID:24144451.
- [0253] 16. Mackay DS, Borman AD, Sui R, van den Born LI, Berson EL, Ocaka LA, et al. Screening of a large cohort of leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa patients identifies novel LCA5 mutations and new genotype-phenotype correlations. Hum Mutat (2013) 34(11):1537-46. doi:10.1002/humu.22398. PubMed PMID:23946133; PubMed Central PMCID:PMCPMC4337959.
- [0254] 17. Vallespin E, Avila-Fernandez A, Almoguera B, Velez-Monsalve C, Cantalapiedra D, Garcia-Hoyos M, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol:LCA5. Disease:Leber congenital amaurosis. Hum Genet (2010) 127(4):487. PubMed PMID:21488265.
- [0255] 18. Vallespin E, Avila-Fernandez A, Almoguera B, Cantalapiedra D, Garcia-Hoyos M, Riveiro-Alvarez R, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol:LCA5. Disease:Leber Congenital Amaurosis (LCA). Hum Genet (2010) 127(1):118. PubMed PMID:20108395.
- [0256] 19. Ahmad A, Daud S, Kakar N, Nurnberg G, Nurnberg P, Babar ME, et al. Identification of a novel LCA5 mutation in a Pakistani family with Leber congenital amaurosis and cataracts. Mol Vis (2011) 17:1940-5. PubMed PMID:21850168; PubMed Central PMCID:PMCPMC3154126.
- [0257] 20. Seong MW, Kim SY, Yu YS, Hwang JM, Kim JY, Park SS. LCA5, a rare genetic cause of leber congenital amaurosis in Koreans. Ophthalmic Genet (2009) 30(1):

54-5.doi:10.1080/13816810802592567.PubMed PMID:19172513.

[0258] 21.Jacobson SG,Aleman TS,Cideciyan AV,Sumaroka A,Schwartz SB,Windsor EA,et al.Leber congenital amaurosis caused by Lebercilin(LCA5)mutation: retained photoreceptors adjacent to retinal disorganization.Mol Vis(2009)15: 1098-106.Epub 2009/06/09.doi:116[pii].PubMed PMID:19503738;PubMed Central PMCID:PMC2690955.

[0259] 22.Boldt K,Mans DA,Won J,van Reeuwijk J,Vogt A,Kinkl N,et al.Disruption of intraflagellar protein transport in photoreceptor cilia causes Leber congenital amaurosis in humans and mice.J Clin Invest(2011)121 (6):2169-80.Epub 2011/05/25.doi:45627[pii]10.1172/JCI45627.PubMed PMID: 21606596;PubMed Central PMCID:PMC3104757.

[0260] 23.Vandenberghe L,Bell P,Maguire A,Cearley C,Xiao R,Calcedo R,et al.Dosage Thresholds for AAV2 and AAV8 Photoreceptor Gene Therapy in Monkey.Sci Transl Med(2011)3(88):88ra54.Epub 22 June 2011.

[0261] 24.Ramachandran PS, Lee V,Wei Z,Song JY,Casal G,Cronin T,et al.Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina.Hum Gene Ther(2016).doi:10.1089/hum.2016.111.PubMed PMID: 27750461.

[0262] 25.Dalkara D,Byrne LC,Klimczak RR,Visel M,Yin L,Merigan WH,et al.In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous.Sci Transl Med(2013)5(189): 189ra76.doi:10.1126/scitranslmed.3005708.PubMed PMID:23761039.

[0263] 26.Dalkara D,Kolstad KD,Caporale N,Visel M,Klimczak RR,Schaffer DV,et al.Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous.Mol Ther (2009)17(12):2096-102.doi:10.1038/mt.2009.181.PubMed PMID:19672248;PubMed Central PMCID:PMCPMC2814392.

[0264] 27.Mace E,Caplette R,Marre O,Sengupta A,Chaffiol A,Barbe P,et al.Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV Restores ON and OFF visual responses in blind mice.Mol Ther (2015)23(1):7-16.doi:10.1038/mt.2014.154.PubMed PMID:25095892;PubMed Central PMCID:PMCPMC4270733.

[0265] 28.Liang FQ,Anand V,Maguire AM,Bennett J.Intraocular delivery of recombinant virus.Methods Mol Med(2001)47:125-39.doi:10.1385/1-59259-085-3: 125.PubMed PMID:21394582.

[0266] 29.Mohamed M,Topping N,Jafri H,Raashed Y,McKibbin M,Inglehearn C.Progression of phenotype in Leber's congenital amaurosis with a mutation at the LCA5 locus.Br J Ophthalmol(2003)87(4):473-5.

[0267] 30.Ashtari M,Cyckowski LL,Monroe JF,Marshall KA,Chung DC,Auricchio A, et al.The human visual cortex responds to gene therapy-mediated recovery of

retinal function. *J Clin Invest* 121(6):2160-8. Epub 2011/05/25. doi:57377[pii]
[0268] 10.1172/JCI57377. PubMed PMID:21606598; PubMed Central PMCID:
PMC3104779.

[0269] 31. Bennett J, Ashtari M, Wellman J, Marshall KA, Cyckowski LL, Chung DC, et al. AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci Transl Med* 4(120):120ra15. Epub 2012/02/11. doi:4/120/120ra15 [pii]

[0270] 10.1126/scitranslmed.3002865. PubMed PMID:22323828.

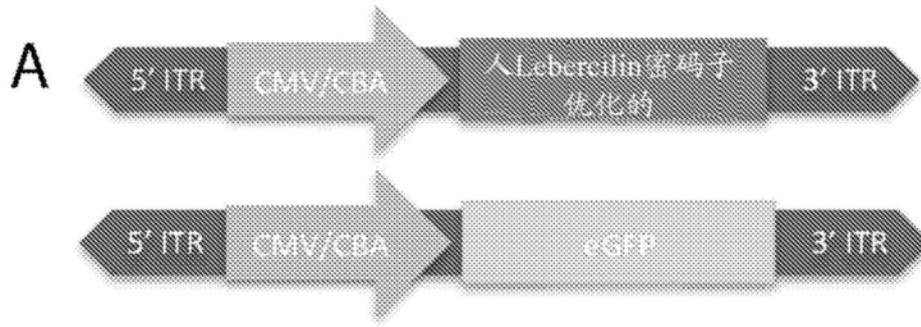
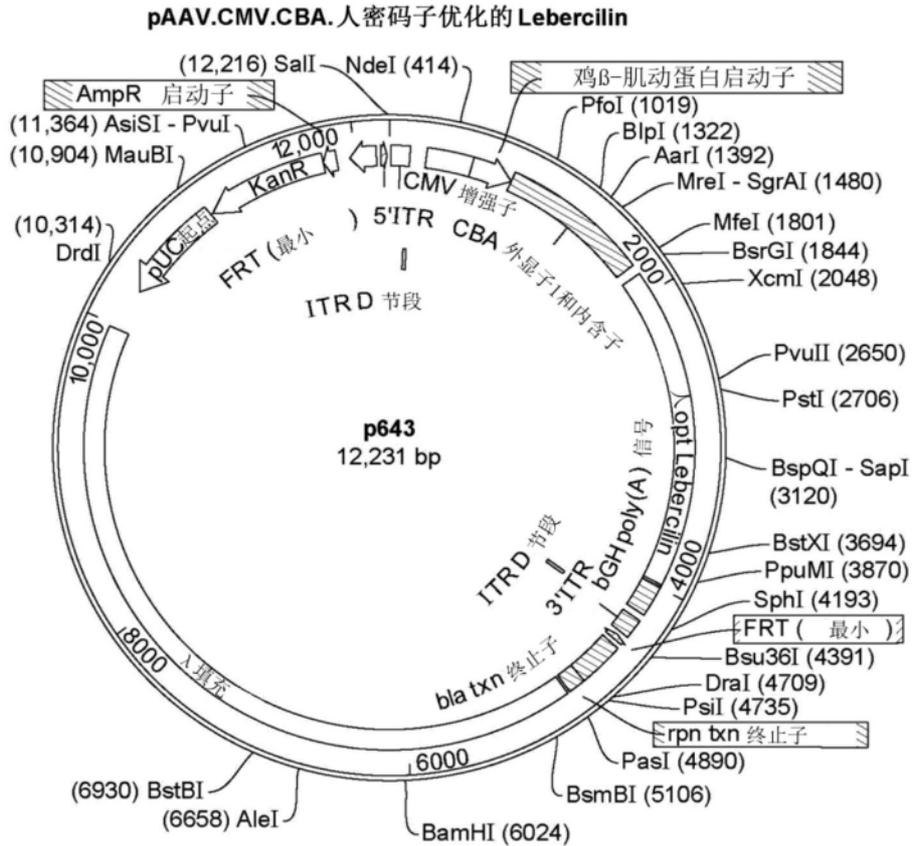


图1A

天然_LCA5	atggggaaagagcaggaagtccaggtactgaccaagaagaaaggcaggcaaacaccat	60
密码子优化的_LCA5	atgggagaacgagcaggcagccctggtagcagcaaggacgaaggcgggaaacaccac	60
	***** ** * ***** ** * ***** ***** ** * ***** ** *****	
天然_LCA5	tattcttacttatctgatttgaaacgccacagctctctggccgatcatcgctggtcagt	120
密码子优化的_LCA5	tatagctatttgtcagactttgagacaccgagagctcgggtcggtcaccttgggtgctg	120
	*** ** * ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
天然_LCA5	tcttcaccctgcaagtgttaggagaaaaatcc taaaagacaacttcagatggccaagta	180
密码子优化的_LCA5	tc aagcccggctagcgtcggcgaaagaatcc aagcgccaacgtcagatggccaagtg	180
	** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
天然_LCA5	catcaccaagccctcggaaacc aagccc aagggtctacc aacagaaaggagtcgga	240
密码子优化的_LCA5	catcatcaggctcccggaaaccctgcc aaggattgccgaacagaaaggggtccgg	240
	***** ** * ** * ***** ***** ** * ** * ***** *****	
天然_LCA5	gtgggatttcgctccagagcctcaatagagagccacttcggaaagatactgatcttgtt	300
密码子优化的_LCA5	gtagggttagatcgagagcctgaatcgcgagcctcttagaaaagatacagaccttgg	300
	** * ** * ** * ** * ***** ** * ** * ***** ** * ** * ***** ** *	
天然_LCA5	acaaaacggattctgtctgcaagactgctaaaaatcaatgagttgcagaatgaagtatct	360
密码子优化的_LCA5	actaagaggattctgtcggcagcactggtgaagattaacgaacttcagaatgaggtgtca	360
	** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
天然_LCA5	gaactccaggccaagttagctgagctgctaaaagaaaataatctttgaaaaggcttcag	420
密码子优化的_LCA5	gaactccaagtaaaacttgcggaactgcttaaggagaacaaatcgctcaagcggcttcag	420
	***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
天然_LCA5	tacagacaggagaagccctgaataagtttgaagatgccgaaaatgaaatctcacaactt	480
密码子优化的_LCA5	tatcgccaagagaagcgtcaac aagttcgaggacgcggaaaacgagatttcgagttg	480
	** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
天然_LCA5	atatttcgtcataaacatgagattacagcactcaagaacgcttaagaaaatc aagag	540
密码子优化的_LCA5	atctttaggataaacagagatcacgccttaagaacgcttgcgcaaaagccaggag	540
	** * ** * ***** ***** ** * ** * ***** ***** ** * ** * ** *	
天然_LCA5	aaagaacgggcaactgagaaaagggtaaaagatacagaagtgaactatntagacaaa	600
密码子优化的_LCA5	aaagaacgcgccacggagaaggggtcaaggacaccgaatcggaaactgttagaactaag	600
	***** ** * ** * ***** ***** ** * ** * ***** ***** ** *	
天然_LCA5	ttttccttacagaactgaaagagatctctgaagctagacacctacgtgaacgagatgat	660
密码子优化的_LCA5	ttttcgcttcaaaagcttaagaatctcggaaagcaggcatctccc tgaagcagatgat	660
	***** * ** ** * ** ***** ***** ***** ** * ** * ***** *****	
天然_LCA5	ttggcaagaactagtttcagcagagttaaagttagatgacaccgagagaagaattaag	720
密码子优化的_LCA5	ttggctaagaacttgtatcggcagagctcaattggatgatacggagaggaggattaag	720
	***** ***** ** * ** * ***** ** * ** * ***** ** * ** * *****	

图1B



特征

5' ITR	1...130	130	==
ITR D 节段	113...130	18	==
CMV 增强子	241...544	304	==
鸡β-肌动蛋白启动子	546...823	278	=>
CBA 外显子1和内含子	824...1795	972	==
人 opt Lebercilin	1883...3976	2094	==
bGH poly(A) 信号	3993...4200	208	==
3' ITR	4250...4379	130	==
ITR D 节段	4250...4267	18	==
FRT (最小)	4407...4440	34	<=

图1E

bla txn终止子	4473...4773	301	==
rpn txn终止子	4780...4893	114	==
λ填充	4909...9975	5067	==
pUC起点	10,267...10,855	589	<=
KanR	10,979...11,788	810	<=
源	10,980...10,979	12231	==
AmpR启动子	11,789...11,880	92	<=
rmB1 B2 T1 txn终止子	11,967...12,141	175	<=
FRT (最小)	12,173...12,206	34	=>

图1F

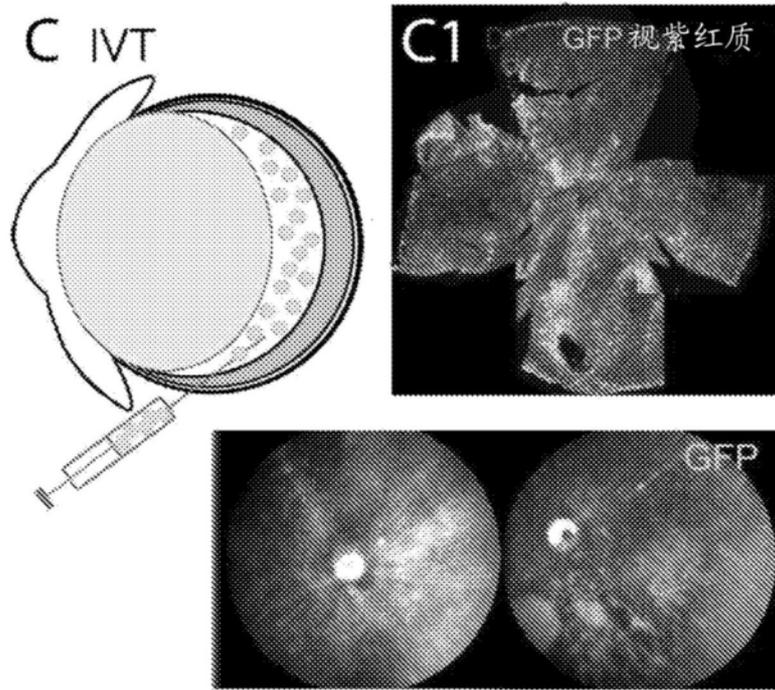


图1G

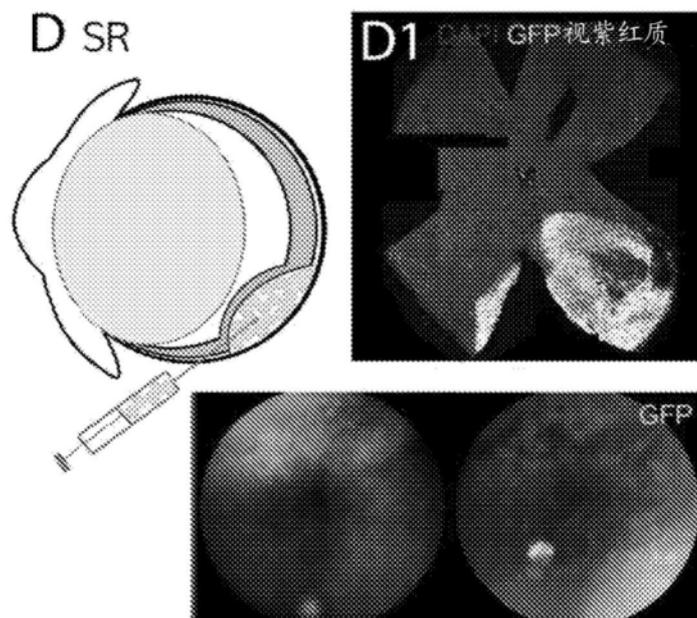


图1H

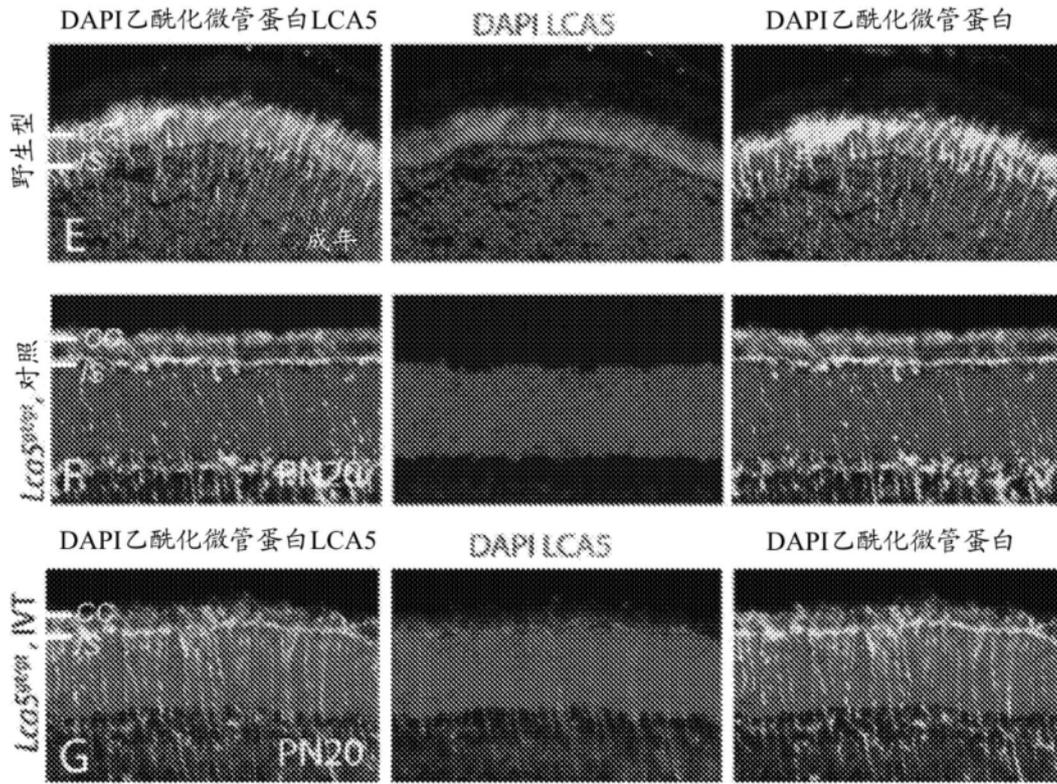


图1I

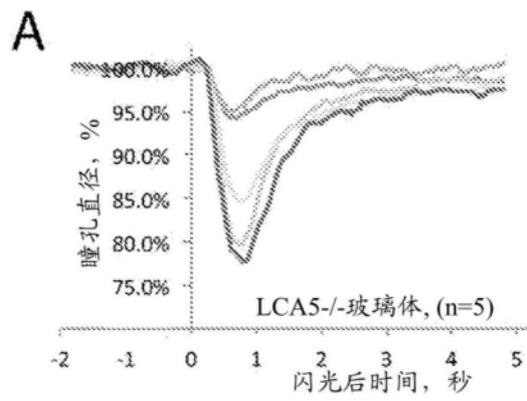


图2A

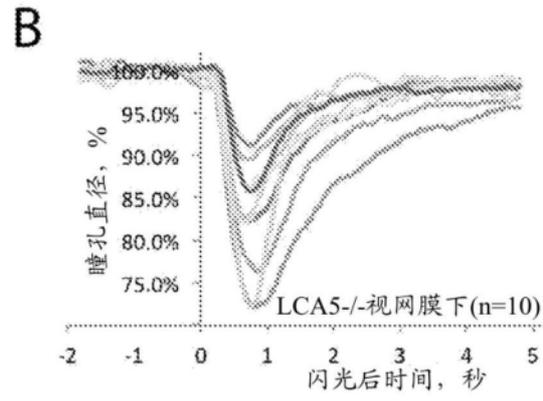


图2B

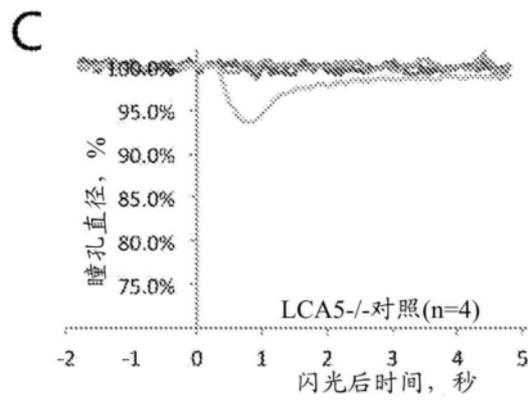


图2C

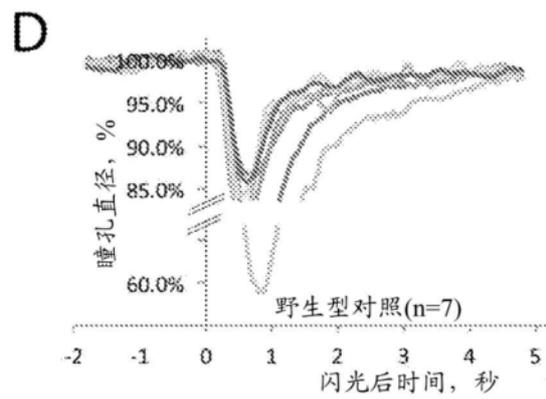


图2D

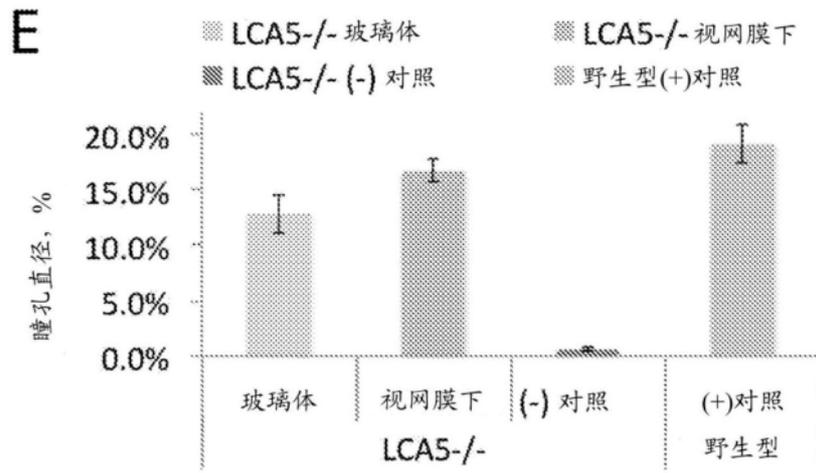


图2E

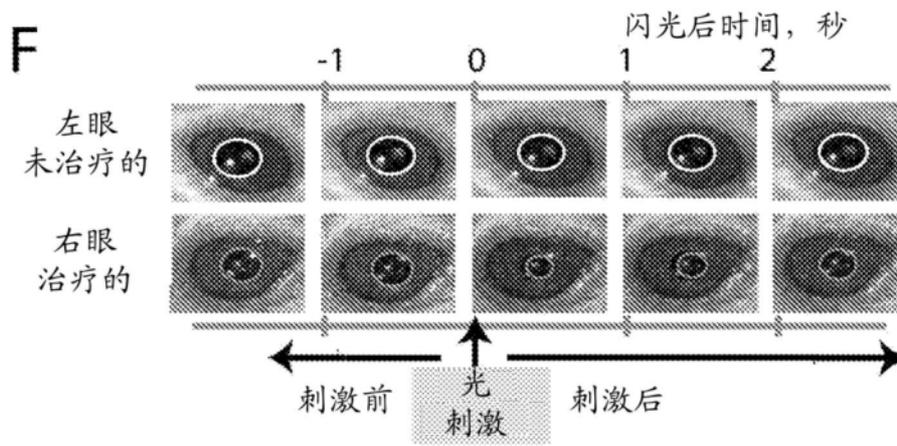


图2F

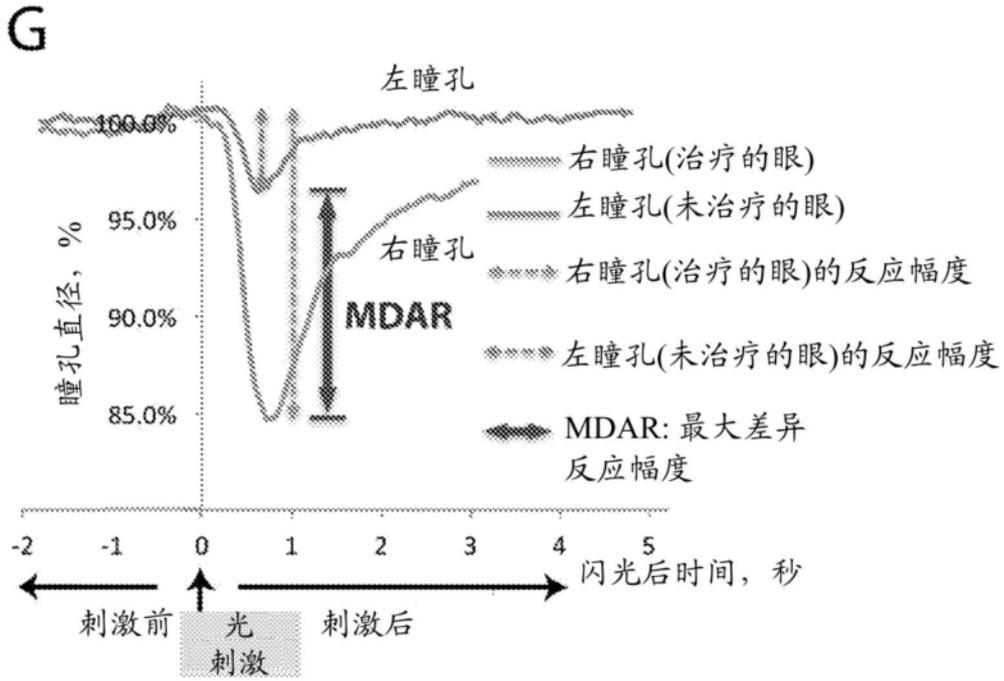


图2G

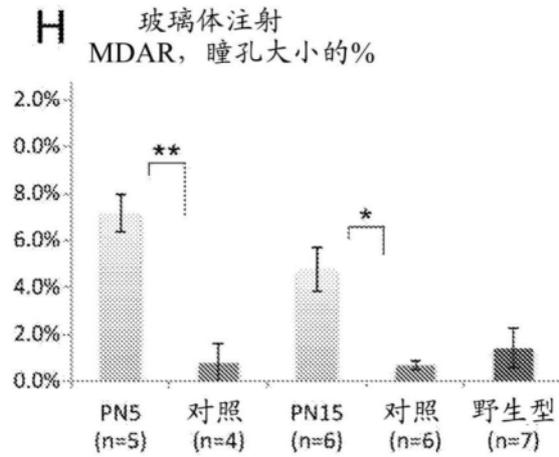


图2H

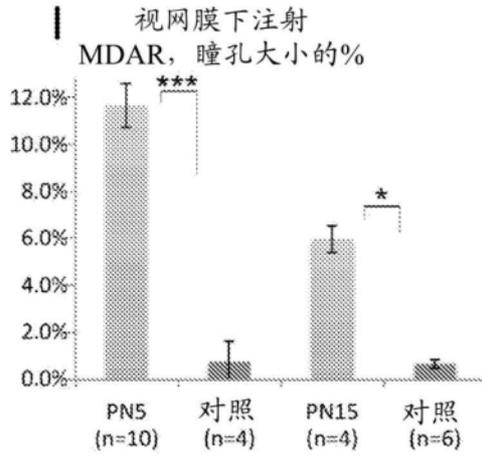


图2I

训练	测试				
1.57E+06 持续5天	1.06E+05 第1天	8.69E+03 第2天	5.87E+02 第3天	0.00E+00 第4天	

图3A

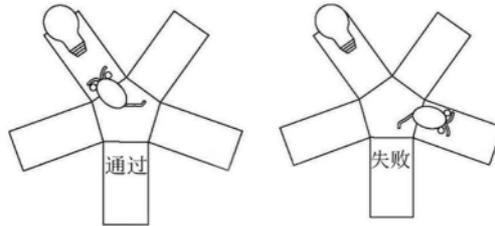


图3B

□ 训练直到第一次成功的天数(天, 最多5天)

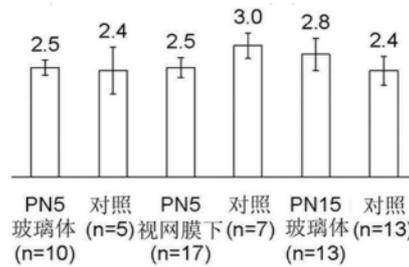


图3C

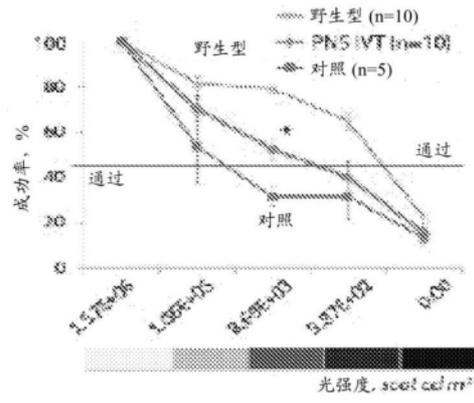


图3D

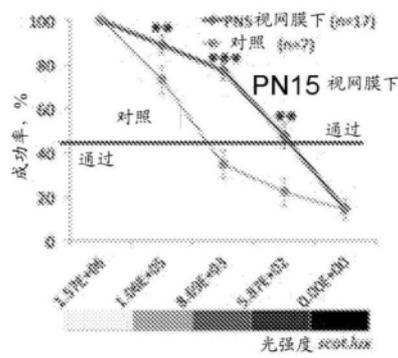


图3E

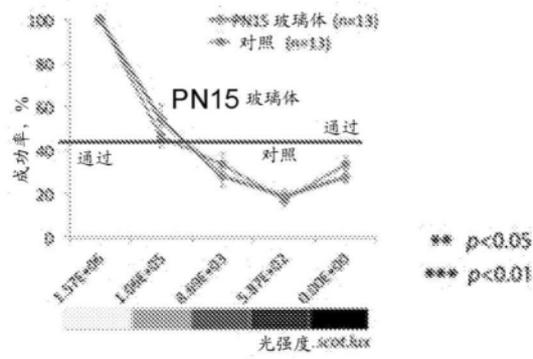


图3F

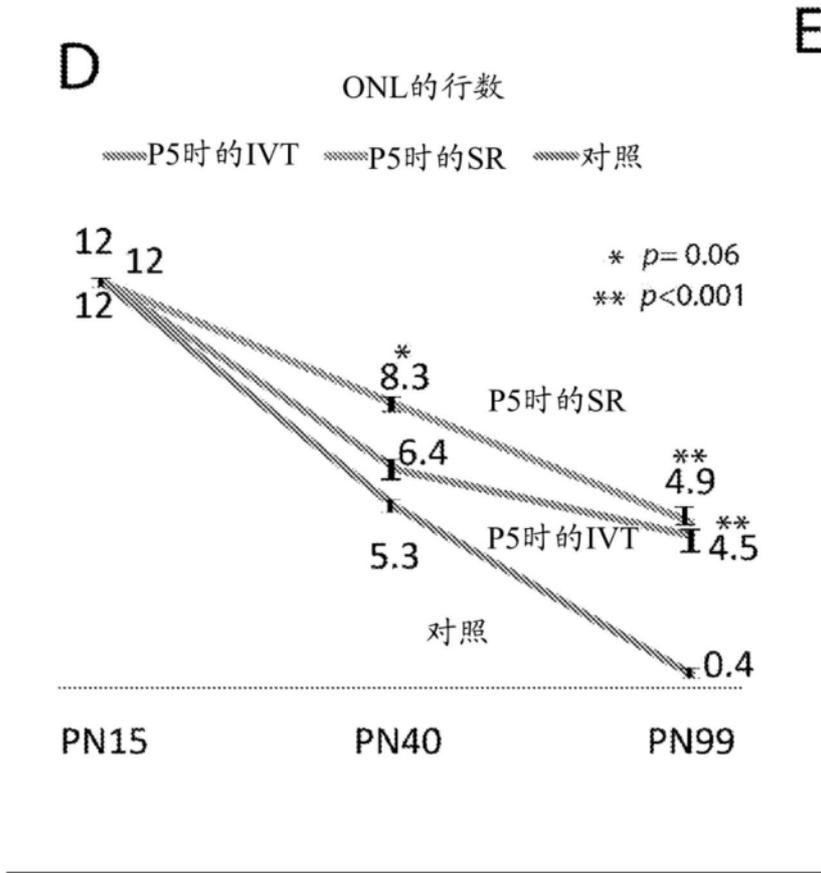


图4

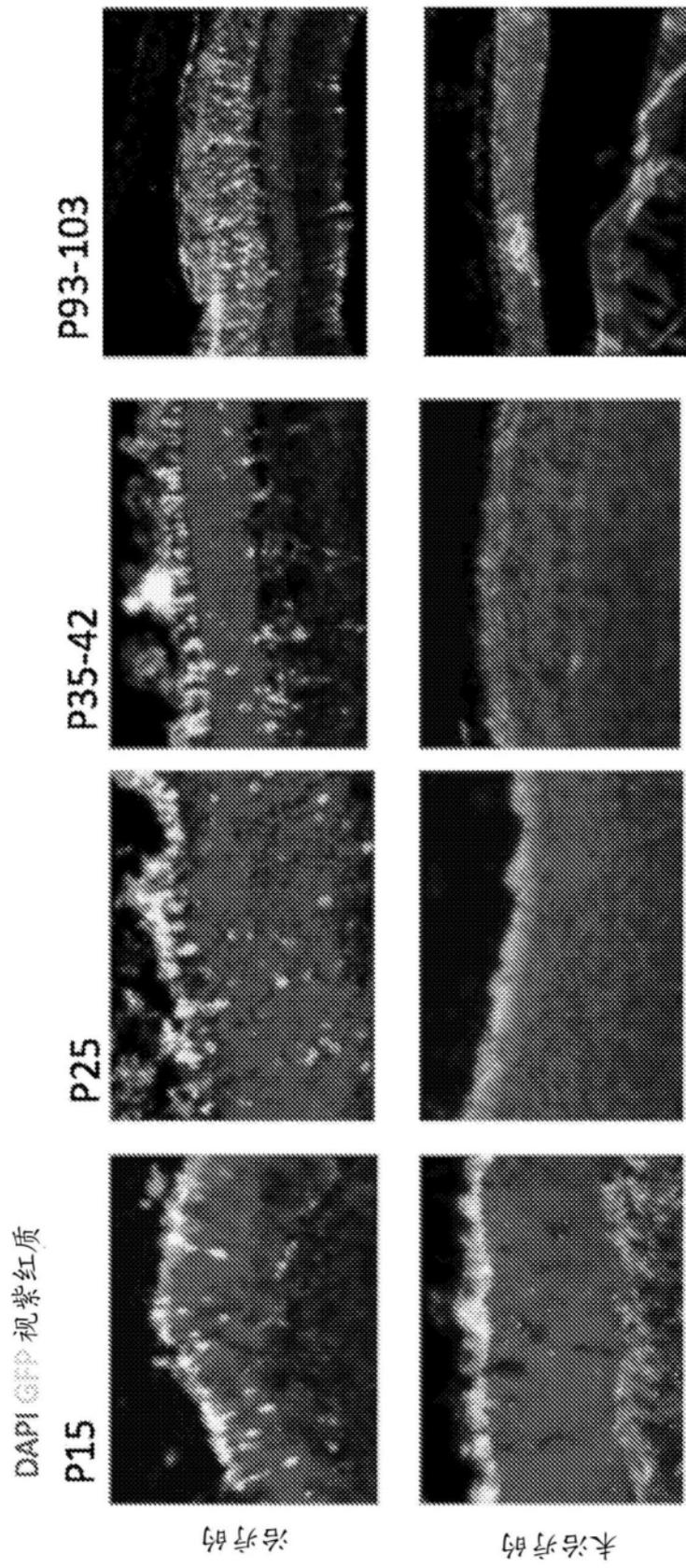


图5A

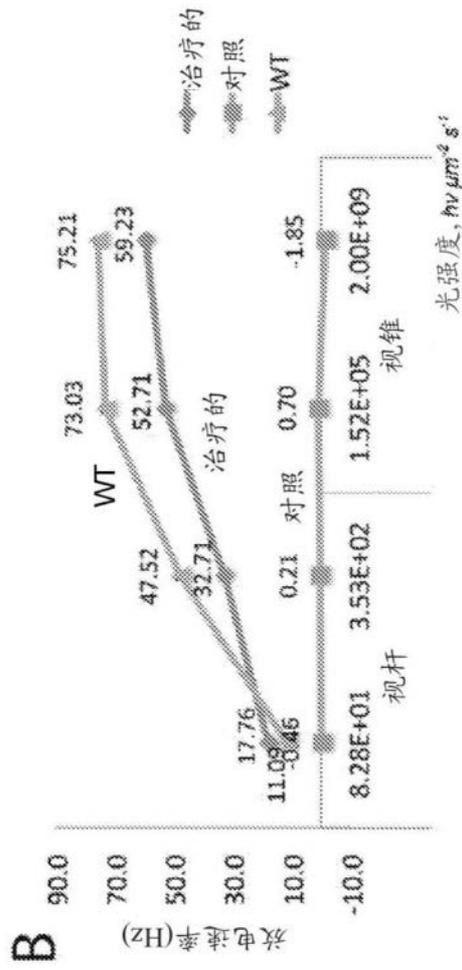


图5B

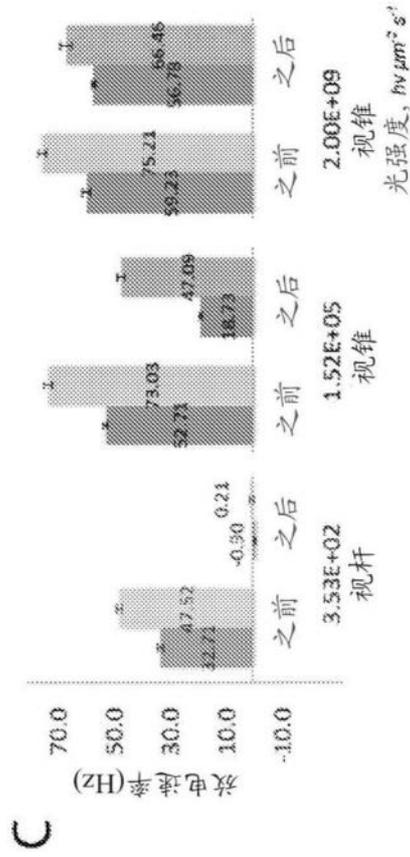


图5C

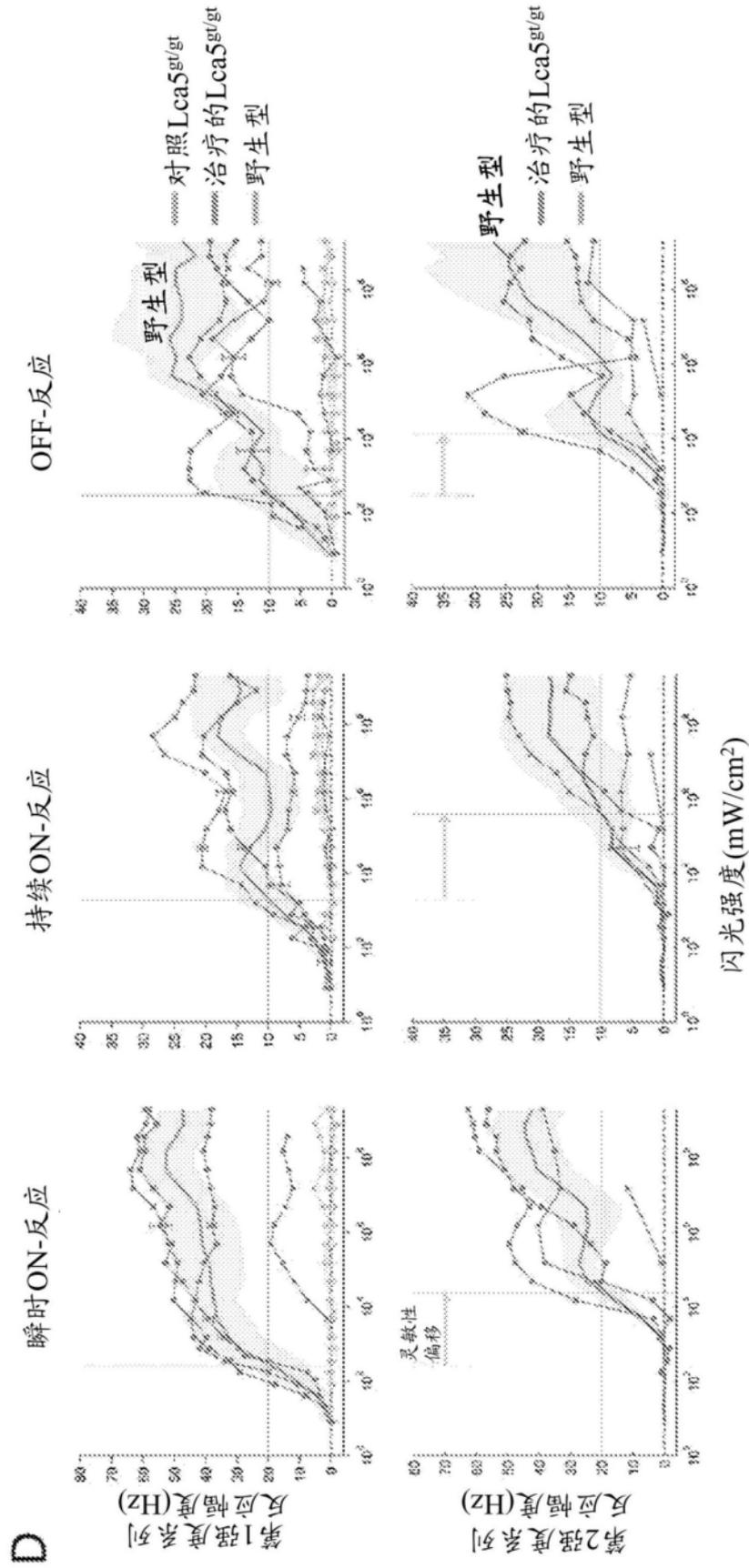


图5D

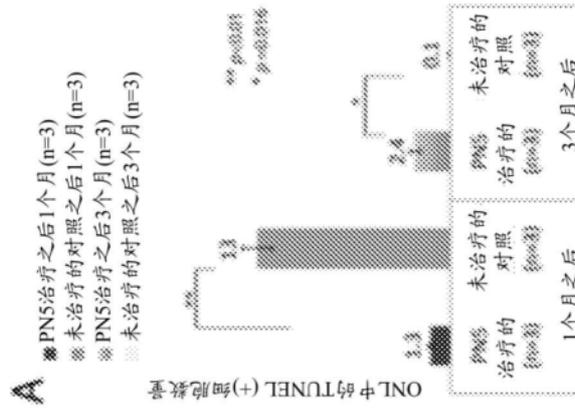


图6A

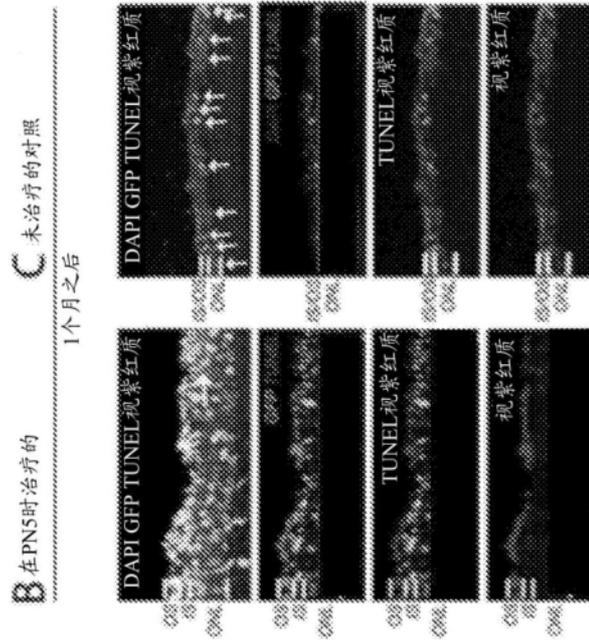


图 6B 图 6C

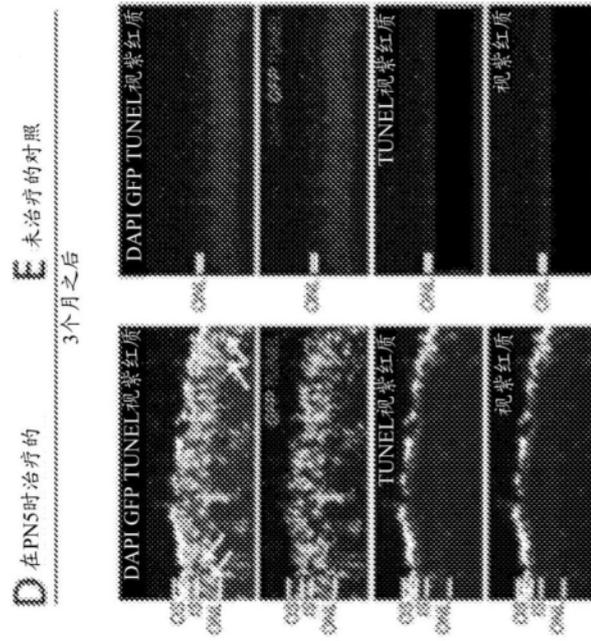


图 6E

图 6D

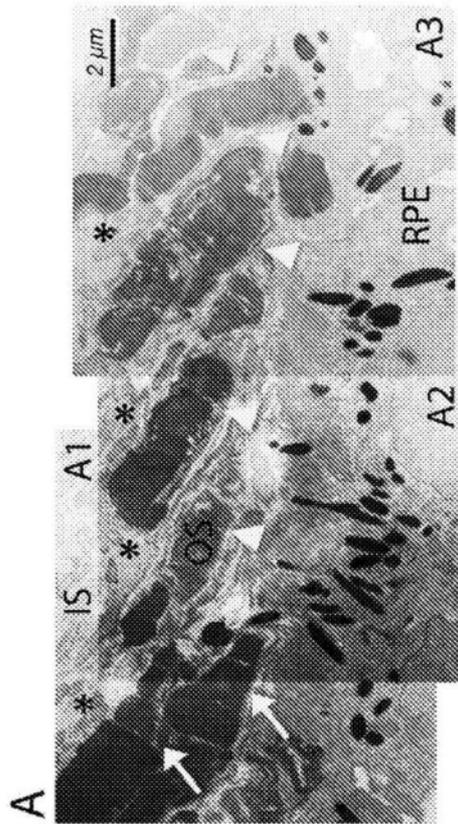


图7A

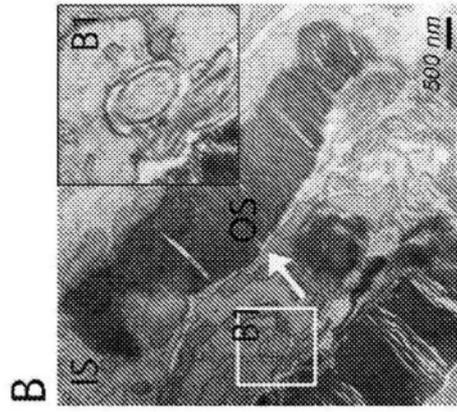


图7B

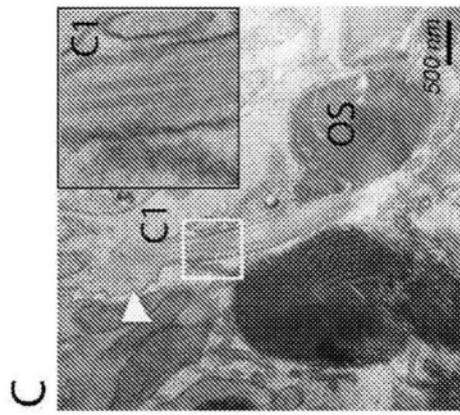


图7C

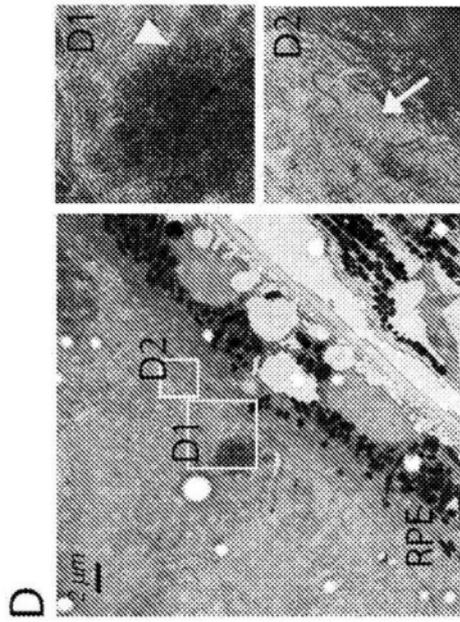


图7D

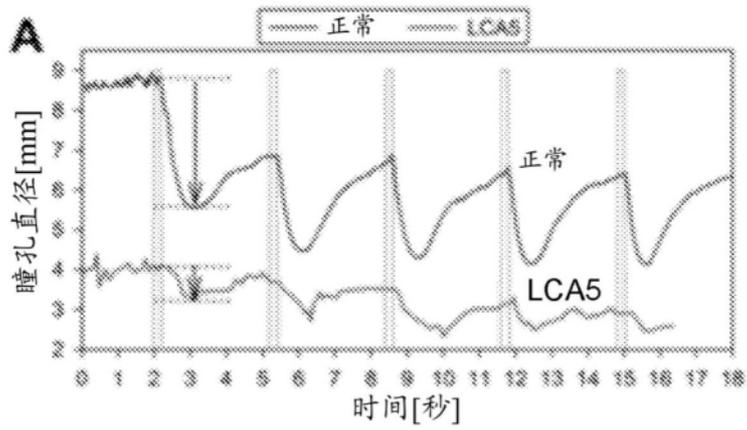


图8

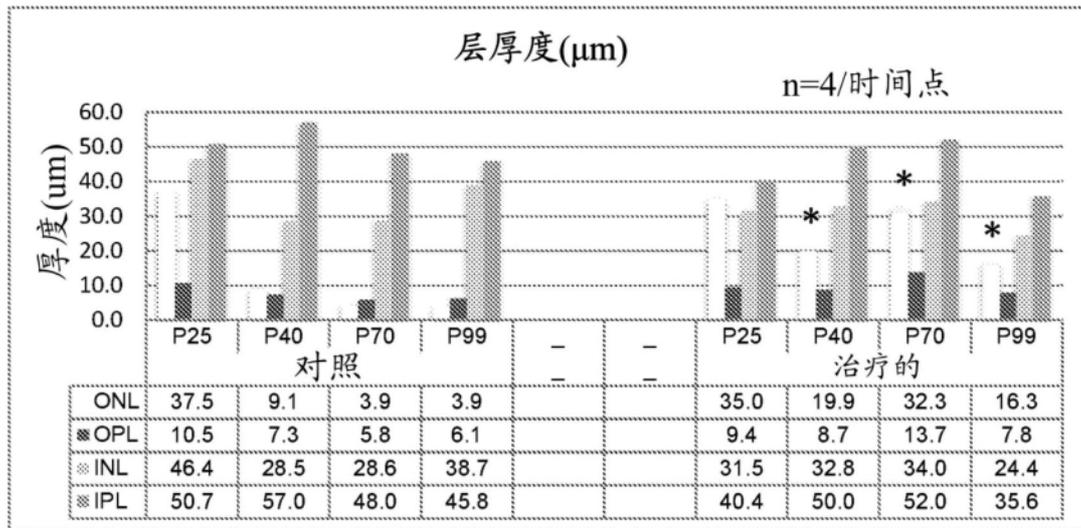


图9

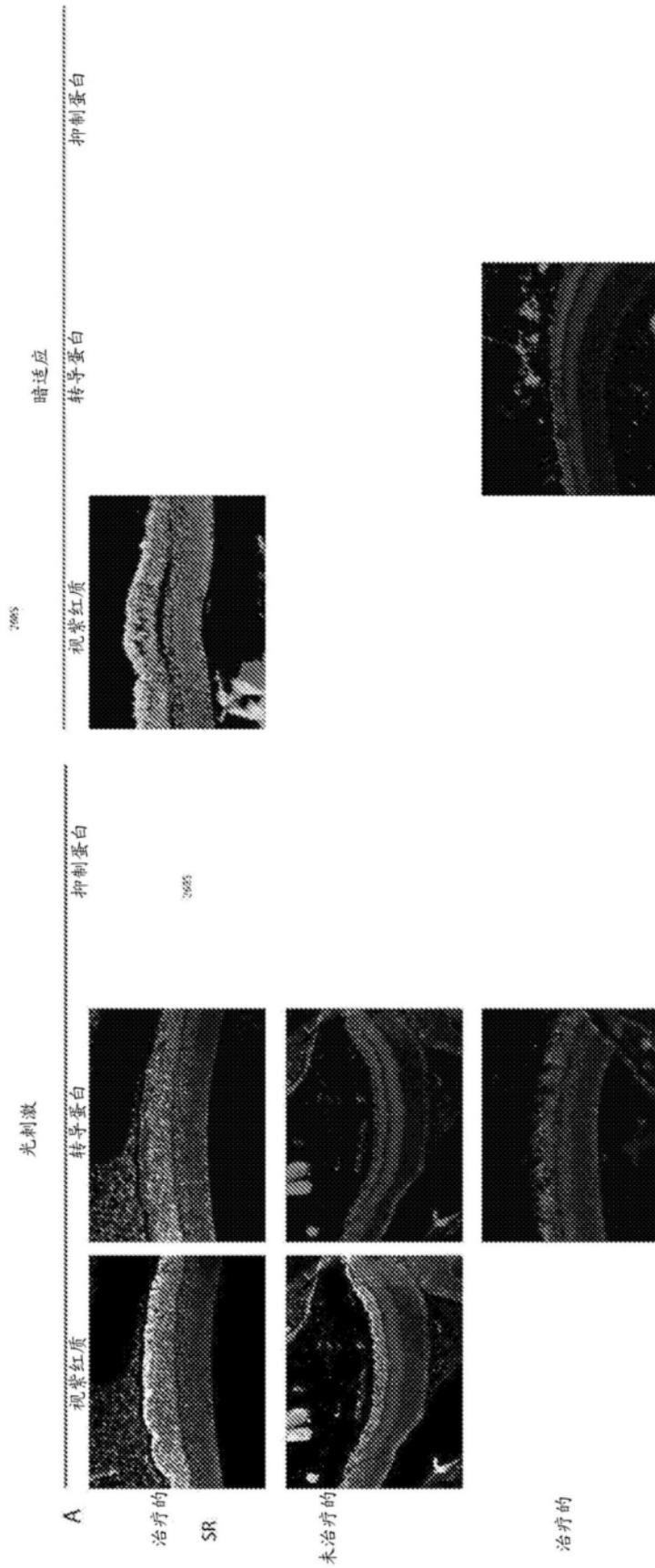


图10

用SnapGene®生成

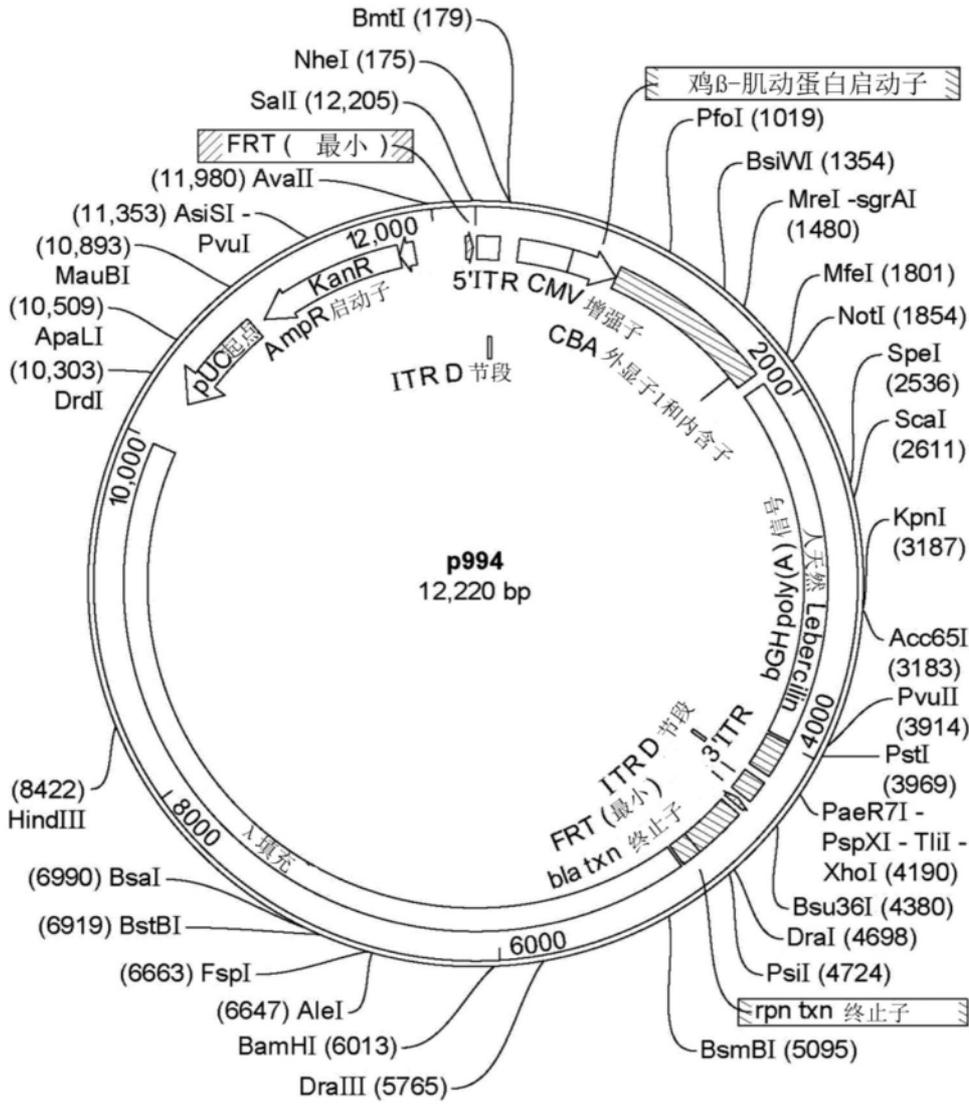


图11A

特征

5' ITR	1...130	130	==
ITR D节段	113...130	18	==
CMV增强子	241...544	304	==
鸡β-肌动蛋白启动子	546...823	278	=>
CBA外显子1和内含子	824...1795	972	==
人天然Lebercilin	1853...3970	2118	==
bGH poly(A)信号	3982...4189	208	==
3' ITR	4239...4368	130	==
ITR D节段	4239...4256	18	==
FRT (最小)	4396...4429	34	<=
bla txn 终止子	4462...4762	301	==
rpn txn 终止子	4769...4882	114	==
λ填充	4898...9964	5067	==
pUC起点	10,256...10,844	589	<=

KanR	10,968...11,777	810	<=
源	10,969...10,968	12220	==
AmpR 启动子	11,778...11,869	92	<=
FRT (最小)	12,162...12,195	34	=>

图11B

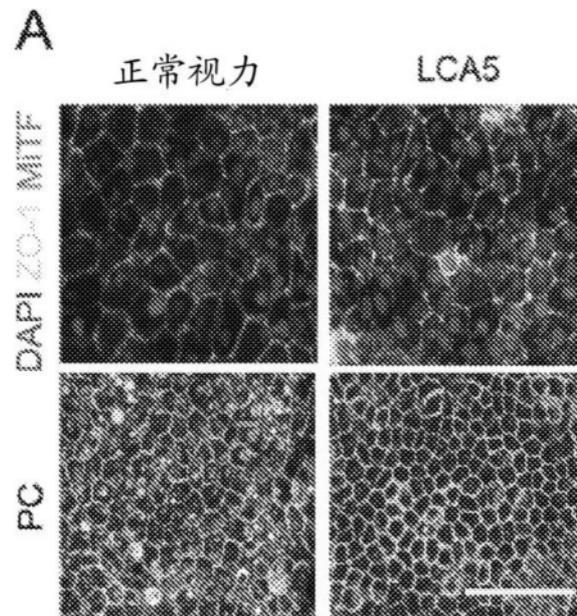


图12A

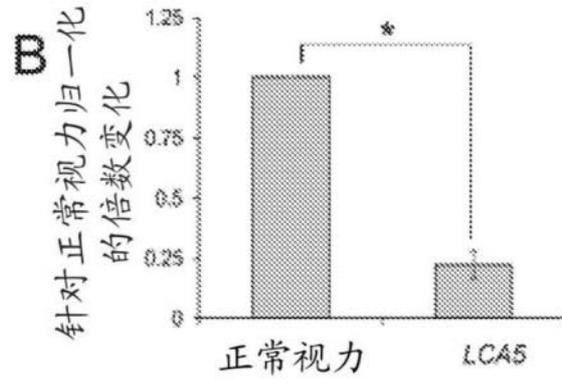


图12B

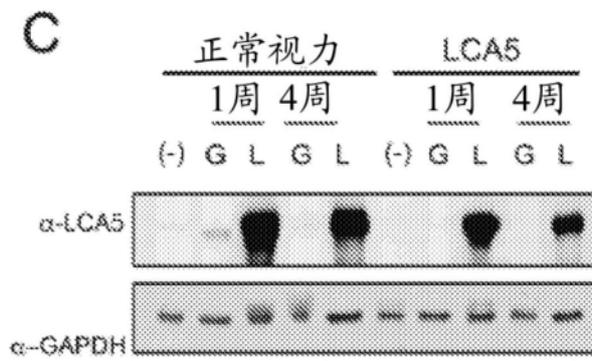


图12C

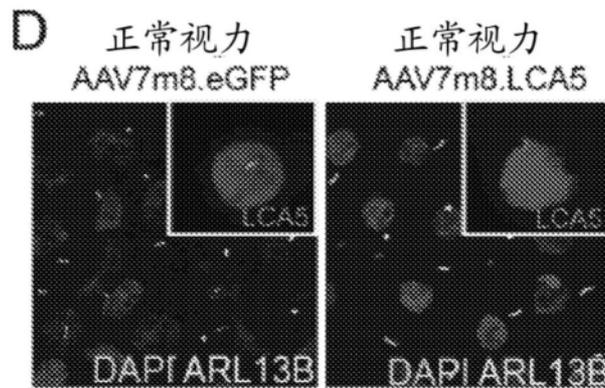


图12D

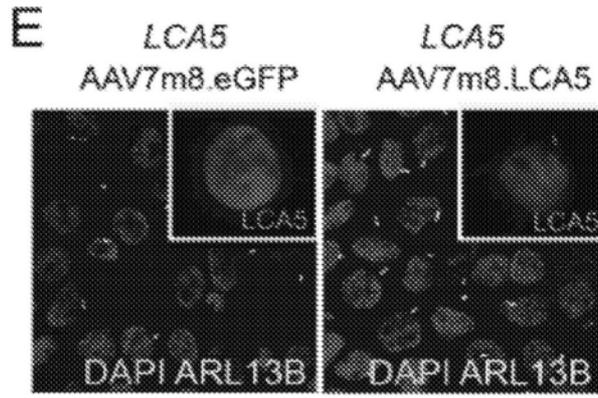


图12E

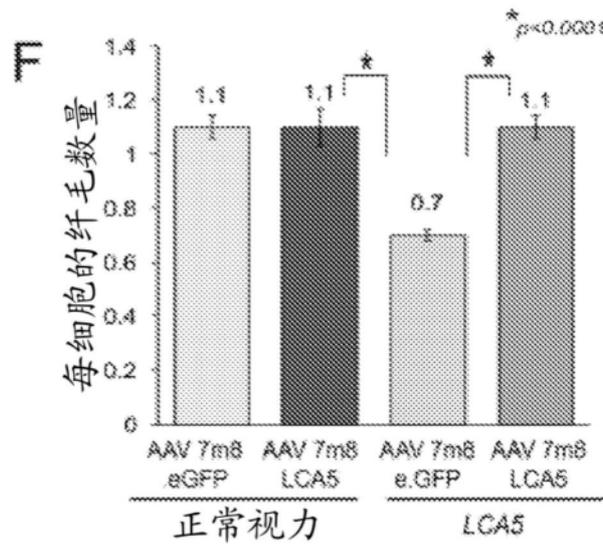


图12F