



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118679182 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 20

(21) 申请号 202380020029.3

(22) 申请日 2023.02.01

(30) 优先权数据

63/305,923 2022.02.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/012083 2023.02.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/150142 EN 2023.08.10

(71) 申请人 阿库斯股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 E·J·西蒙斯 R·吴

M·J·麦肯纳

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 彭昶

(51) Int.Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

A61P 27/16 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书3页 说明书196页 附图51页

(54) 发明名称

用于治疗前庭神经鞘瘤相关症状的抗VEGF
抗体构建体和相关方法

(57) 摘要

本公开提供了一种构建体,其包含与启动子可操作地连接的编码序列,其中所述编码序列编码血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分。在一些实施方案中,构建体为AAV构建体。在一些实施方案中,AAV构建体为AAV颗粒的一部分。包含本文所述的构建体和AAV颗粒的组合物可用于治疗听力损失,例如与前庭神经鞘瘤相关的听力损失。



图 4A

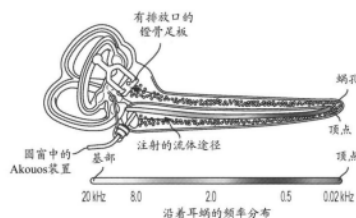


图 4B

1. 一种构建体,其包含与启动子可操作地连接的编码序列,其中所述编码序列编码血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分。

2. 如权利要求1所述的构建体,其中所述启动子为CAG启动子、CBA启动子、CMV启动子或CB7启动子。

3. 如权利要求1或2所述的构建体,其中所述VEGF结合剂为或包含抗体或其片段。

4. 如权利要求3所述的构建体,其中所述抗体片段为Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fd'片段、互补决定区(CDR)、单链Fv或Fc结构域。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂为或包含免疫球蛋白重链、免疫球蛋白轻链或其组合。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂包含:

(i) 包含根据SEQ ID NO:16的氨基序列的多肽,

(ii) 包含根据SEQ ID NO:20的氨基序列的多肽,或

(iii) 其组合。

7. 如权利要求6所述的构建体,其中所述VEGF结合剂为或包含雷珠单抗。

8. 如权利要求1-3或5-6中任一项所述的构建体,其中所述编码序列包含:

(i) 包含SEQ ID NO:13的核酸序列,

(ii) 包含SEQ ID NO:19的核酸序列,或

(iii) 其组合。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的构建体,其中所述编码序列包含各自编码信号肽的一个或多个核酸序列。

10. 如权利要求9所述的构建体,其中至少一个核酸序列编码白细胞介素2(IL2)信号肽。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的构建体,其中所述编码序列包含编码自裂解肽的一个或多个序列。

12. 如权利要求11所述的构建体,其中所述自裂解肽为明脉扁刺蛾病毒2A(T2A)肽。

13. 如权利要求1-3或5-12中任一项所述的构建体,其中所述编码序列为或包含根据SEQ ID NO:21的核酸序列。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的构建体,其还包含两个AAV反向末端重复序列(ITR),其中所述两个AAV ITR侧接所述编码序列和启动子。

15. 如权利要求14所述的构建体,其中所述两个AAV ITR为或源自AAV2 ITR。

16. 如权利要求14或15所述的构建体,其中所述两个AAV ITR包含有包含根据SEQ ID NO:45或47的核酸序列的5' ITR和包含根据SEQ ID NO:46或48的核酸序列的3' ITR。

17. 如权利要求1所述的构建体,其中所述构建体包含根据SEQ ID NO:90、91、92或106中任一者的核酸序列。

18. 一种AAV颗粒,其包含权利要求1-17中任一项所述的构建体。

19. 如权利要求18所述的AAV颗粒,其还包含AAV衣壳,其中所述AAV衣壳为或源自AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh39、AAV-rh43或AAV Anc80衣壳。

20. 如权利要求19所述的AAV颗粒,其中所述AAV衣壳为AAV Anc80衣壳,任选地为AAV

Anc80L65衣壳。

21. 如权利要求19或20所述的AAV颗粒,其中所述AAV衣壳包含根据SEQ ID NO:113或SEQ ID NO:114的多肽。

22. 一种组合物,其包含权利要求1-17中任一项所述的构建体或权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒。

23. 如权利要求22所述的组合物,其中所述组合物为还包含药学上可接受的载剂的药物组合物。

24. 如权利要求22或23所述的组合物,其以约 1×10^{11} vg/mL至约 1×10^{15} vg/mL的剂量配制。

25. 如权利要求22-24中任一项所述的组合物,其以约 1×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗的剂量配制。

26. 如权利要求22-25中任一项所述的组合物,其以约0.01mL至0.1mL的体积施用。

27. 一种方法,其包括使内耳细胞与权利要求1-17中任一项所述的构建体、权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒或权利要求22-26中任一项所述的组合物接触。

28. 一种方法,其包括使细胞与以下各项接触:

(i) 权利要求1-17中任一项所述的构建体;和

(ii) 一种或多种构建体,其包含AAV Rep基因、AAV Cap基因、AAV VA基因、AAV E2a基因和AAV E4基因。

29. 一种方法,其包括将权利要求1-17中任一项所述的构建体、权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒或权利要求22-26中任一项所述的组合物引入到受试者的内耳中。

30. 如权利要求29所述的方法,其还包括测量所述受试者的听力水平。

31. 如权利要求30所述的方法,其还包括将所述受试者的所述听力水平与参考听力水平进行比较。

32. 如权利要求31所述的方法,其中在引入权利要求1-17中任一项所述的构建体、权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒或权利要求22-26中任一项所述的组合物之后,测量所述受试者的所述听力水平,并且所述参考听力水平为在引入权利要求1-17中任一项所述的构建体、权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒或权利要求22-26中任一项所述的组合物之前测量的所述受试者的听力水平。

33. 如权利要求29-32中任一项所述的方法,其还包括测量受试者的血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平。

34. 如权利要求33所述的方法,其还包括将所述受试者的所述血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平与血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的参考水平进行比较。

35. 如权利要求29-34中任一项所述的方法,其还包括测量受试者的肿瘤体积。

36. 如权利要求35所述的方法,其还包括将所述受试者的肿瘤体积与参考肿瘤体积进行比较。

37. 一种治疗听力损失的方法,其包括向有需要的受试者施用权利要求1-17中任一项所述的构建体、权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒或权利要求22-26中任一项所述的组合物。

38. 一种治疗哺乳动物的内耳病症的方法,其包括向有需要的受试者施用权利要求1-17中任一项所述的构建体、权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒或权利要求22-26中任一项所述的组合物。

39. 如权利要求38所述的方法,其中所述内耳病症为前庭神经鞘瘤或II型神经纤维瘤病。

40. 一种治疗哺乳动物的前庭神经鞘瘤的方法,其包括向有需要的受试者施用权利要求1-17中任一项所述的构建体、权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒或权利要求22-26中任一项所述的组合物。

41. 如权利要求1-17中任一项所述的构建体、如权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒或如权利要求22-26中任一项所述的组合物,其用于治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与所述耳科疾病相关的一种或多种症状。

42. 如权利要求1-17中任一项所述的构建体、如权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒或如权利要求22-26中任一项所述的组合物,其用于治疗内耳病症。

43. 如权利要求42所述的所使用的构建体,其中所述内耳病症为前庭神经鞘瘤或II型神经纤维瘤病。

44. 如权利要求1-17中任一项所述的构建体、如权利要求18-21中任一项所述的AAV颗粒或如权利要求22-26中任一项所述的组合物,其用于治疗前庭神经鞘瘤。

45. 如权利要求1-17中任一项所述的构建体、如权利要求18-21中任一项所述的颗粒或如权利要求22-26中任一项所述的组合物用于制造治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与所述耳科疾病相关的一种或多种症状的药物的用途。

46. 如权利要求1-17中任一项所述的构建体、如权利要求18-21中任一项所述的颗粒或如权利要求22-26中任一项所述的组合物用于制造治疗内耳病症的药物的用途。

47. 如权利要求46所述的用途,其中所述内耳病症为前庭神经鞘瘤或II型神经纤维瘤病。

48. 如权利要求1-17中任一项所述的构建体、如权利要求18-21中任一项所述的颗粒或如权利要求22-26中任一项所述的组合物用于制造治疗前庭神经鞘瘤的药物的用途。

49. 如权利要求37-40中任一项所述的方法、如权利要求41-44中任一项所述的所使用的AAV构建体或如权利要求45-48中任一项所述的用途,其中所述哺乳动物为人。

50. 一种药盒,其包含权利要求1-17中任一项所述的构建体、权利要求18-21中任一项所述的颗粒或权利要求22-26中任一项所述的组合物。

用于治疗前庭神经鞘瘤相关症状的抗VEGF抗体构建体和相关方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年2月2日提交的美国临时专利申请63/305,923的优先权,所述临时专利申请的全部内容特此通过引用并入。

背景技术

[0003] 听力损失可为传导性(由耳道或中耳引起)、感觉神经性(由内耳或听觉神经引起)或混合性的。感觉神经性听力损失包括由哺乳动物内耳中的细胞(例如,毛细胞)的故障引起的听力损失。感觉神经性听力损失的非限制性原因包括暴露于巨大噪音、头部外伤、病毒感染、自体免疫性内耳疾病、遗传性听力损失、衰老、内耳畸形、梅尼埃病(Meniere's disease)、耳硬化症和肿瘤。如本文所论述,听力损失的另一个原因可为前庭神经鞘瘤(VS),其为例如在自内耳通向大脑的神经上形成的肿瘤。

发明内容

[0004] 本公开提供了如下认知:向受试者施用抗VEGF蛋白(例如,雷珠单抗(ranibizumab)、贝伐单抗(bevacizumab)和/或阿柏西普(aflibercept))可用于治疗与血管新生相关的病状、疾病或病症。本公开还认识到,抗VEGF蛋白的施用可能并不总是直接的。例如,抗VEGF蛋白的施用应以一种方式达成,使得在与血管新生相关的细胞和组织处局部提供适当水平的抗VEGF蛋白。

[0005] 本公开表明,施用可表达抗VEGF蛋白(例如,雷珠单抗、贝伐单抗、和/或阿柏西普)的抗VEGF构建体可用于治疗与血管新生相关的病状、疾病或病症。具体而言,编码抗VEGF蛋白(例如,雷珠单抗、贝伐单抗和/或阿柏西普)的重组AAV(rAAV)构建体可以特别用于治疗与耳和眼中的血管新生相关的病状、疾病或病症,尤其是当与rAAVAnc80衣壳一起使用以形成rAAVAnc80-抗VEGF颗粒时。

[0006] 在其他情况下,本公开提供了一种构建体,其包含与启动子可操作地连接的编码序列,其中所述编码序列编码血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分(在本文中也统称为抗VEGF蛋白)。

[0007] 在一些实施方案中,启动子为诱导型启动子、组成型启动子或组织特异性启动子。在一些实施方案中,启动子为CAG启动子、CBA启动子、CMV启动子或CB7启动子。在一些实施方案中,启动子包含根据SEQ ID NO:49或50、SEQ ID NO:64和/或SEQ ID NO:65的核酸序列。

[0008] 在一些实施方案中,编码序列为或包含灵长类动物编码序列。在一些实施方案中,编码序列为或包含人编码序列。在一些实施方案中,编码序列为或包含工程化编码序列。

[0009] 在一些实施方案中,VEGF结合剂或其部分为灵长类动物VEGF结合剂。在一些实施方案中,VEGF结合剂为或包含人VEGF结合剂。在一些实施方案中,VEGF结合剂为或包含人源化VEGF结合剂。

[0010] 在一些实施方案中, VEGF结合剂能够结合至少一种VEGF蛋白。在一些实施方案中, 至少一种VEGF蛋白为VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D或其组合。在一些实施方案中, 至少一种VEGF蛋白为VEGF-A。

[0011] 在一些实施方案中, VEGF结合剂包含至少一种多肽。在一些实施方案中, VEGF结合剂为或包含抗体或其片段。在一些实施方案中, 抗体片段为Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fd'片段、互补决定区(CDR)、单链Fv或Fc结构域。在一些实施方案中, VEGF结合剂为或包含免疫球蛋白重链、免疫球蛋白轻链或其组合。

[0012] 在一些实施方案中, VEGF结合剂包含有包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中, VEGF结合剂包含有包含根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中, VEGF结合剂包含有包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列的多肽和包含根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列的多肽。

[0013] 在一些实施方案中, VEGF结合剂为或包含雷珠单抗。

[0014] 在一些实施方案中, 编码序列包含根据SEQ ID NO:13的核酸序列。在一些实施方案中, 编码序列包含根据SEQ ID NO:19的核酸序列。在一些实施方案中, 编码序列包含根据SEQ ID NO:13的核酸序列和根据SEQ ID NO:19的核酸序列。

[0015] 在一些实施方案中, 编码序列为或包含根据SEQ ID NO:103的核酸序列。

[0016] 在一些实施方案中, VEGF结合剂包含有包含根据SEQ ID NO:24的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中, VEGF结合剂包含有包含根据SEQ ID NO:25的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中, VEGF结合剂包含有包含根据SEQ ID NO:24的氨基酸序列的多肽和包含根据SEQ ID NO:25的氨基酸序列的多肽。

[0017] 在一些实施方案中, VEGF结合剂为或包含贝伐单抗。

[0018] 在一些实施方案中, 编码序列包含根据SEQ ID NO:108的核酸序列。在一些实施方案中, 编码序列包含根据SEQ ID NO:109的核酸序列。在一些实施方案中, 编码序列包含根据SEQ ID NO:108的核酸序列和根据SEQ ID NO:109的核酸序列。

[0019] 在一些实施方案中, 编码序列为或包含根据SEQ ID NO:22的核酸序列。

[0020] 在一些实施方案中, 编码序列包含各自编码信号肽的一个或多个核酸序列。在一些实施方案中, 至少一个核酸序列编码白细胞介素2(IL2)信号肽。

[0021] 在一些实施方案中, 编码序列包含编码自裂解肽的一个或多个序列。在一些实施方案中, 自裂解肽为明脉扁刺蛾病毒(thosea asigna virus)2A(T2A)肽。

[0022] 在一些实施方案中, VEGF结合剂包含Fc结构域。在一些实施方案中, Fc结构域包含根据SEQ ID NO:111的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中, 编码序列包含根据SEQ ID NO:110的核酸序列。

[0024] 在一些实施方案中, VEGF结合剂包含VEGF受体的一个或多个细胞外结构域。在一些实施方案中, VEGF受体的一个或多个细胞外结构域包含有包含根据SEQ ID NO:112的氨基酸序列的细胞外结构域。

[0025] 在一些实施方案中, VEGF结合剂包含VEGF受体的两个细胞外结构域。

[0026] 在一些实施方案中, 编码序列包含各自编码信号肽的一个或多个核酸序列。在一些实施方案中, 至少一个核酸序列编码IL2信号肽。

[0027] 在一些实施方案中, 构建体包含两个AAV反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方

案中,两个AAV ITR侧接编码序列和启动子。

[0028] 在一些实施方案中,两个AAV ITR为或源自AAV2 ITR。

[0029] 在一些实施方案中,两个AAV ITR包含有包含根据SEQ ID NO:45或47的核酸序列的5' ITR和包含根据SEQ ID NO:46或48的核酸序列的3' ITR。

[0030] 在一些实施方案中,构建体包含根据SEQ ID NO:90、91、92、93、94、106或107中任一者的核酸序列。

[0031] 在一些实施方案中,构建体包含根据SEQ ID NO:95或96中任一者的核酸序列。

[0032] 在一些实施方案中,如本文所述的构建体用于治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与耳科疾病相关的一种或多种症状。在一些实施方案中,提供如本文所述的构建体用于制造治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与耳科疾病相关的一种或多种症状的药物的用途。在一些实施方案中,与耳科疾病相关的一种或多种症状包含听力损失、毛细胞退化、内耳液生化环境的改变、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血、耳蜗血管供应中断、耳鸣、头晕、顽固性头痛、面部神经病变、三叉神经病变、面瘫、面部感觉异常、脑积水、小脑疝或死亡。

[0033] 本公开还提供了一种AAV颗粒,其包含如本文所述的构建体。

[0034] 在一些实施方案中,rAAV颗粒包含rAAV衣壳,其中rAAV衣壳为或源自AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh39、AAV-rh43或AAV Anc80衣壳。在一些实施方案中,rAAV衣壳为rAAV Anc80衣壳。在一些实施方案中,rAAV Anc80衣壳为rAAV Anc80L65衣壳。

[0035] 在一些实施方案中,如本文所述的AAV颗粒用于治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与耳科疾病相关的一种或多种症状。在一些实施方案中,如本文所述的AAV颗粒用于制造治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与耳科疾病相关的一种或多种症状的药物的用途。在一些实施方案中,与耳科疾病相关的一种或多种症状包括听力损失、毛细胞退化、内耳液生化环境的改变、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血、耳蜗血管供应中断、耳鸣、头晕、顽固性头痛、面部神经病变、三叉神经病变、面瘫、面部感觉异常、脑积水、小脑疝或死亡。

[0036] 本公开提供了一种组合物,其包含如本文所述的构建体和/或如本文所述的AAV颗粒。

[0037] 在一些实施方案中,组合物为药物组合物。在一些实施方案中,组合物包含药学上可接受的载剂。

[0038] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含磷酸氢二钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至少1mM、至少2mM、至少3mM、至少4mM、至少5mM、至少6mM、至少7mM或至少8mM磷酸氢二钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至多15mM、至多14mM、至多13mM、至多12mM、至多11mM或至多10mM磷酸氢二钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含5-12mM、6-10mM或7-9mM磷酸氢二钠。

[0039] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含磷酸二氢钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至少0.1mM、至少0.2mM、至少0.3mM、至少0.4mM、至少0.5mM、至少0.6mM、至少0.7mM、至少0.8mM、至少0.9mM、至少1.0mM、至少1.1mM、至少1.2mM、至少1.3mM、至少1.4mM或至少1.5mM磷酸二氢钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包

含至多2.0mM、至多1.9mM、至多1.8mM、至多1.7mM、至多1.6mM或至多1.5mM磷酸二氢钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含0.5-2.0mM或1.0-2.0mM磷酸二氢钾。

[0040] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含氯化钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至少1.5mM、至少1.6mM、至少1.7mM、至少1.8mM、至少1.9mM、至少2.0mM、至少2.1mM、至少2.2mM、至少2.3mM、至少2.4mM、至少2.5mM、至少2.6mM或至少2.7mM氯化钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至多3.5mM、至多3.4mM、至多3.3mM、至多3.2mM、至多3.1mM、至多3.0mM、至多2.9mM或至多2.8mM氯化钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含2.0-3.5mM或2.5-3.0mM氯化钾。

[0041] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含氯化钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至少50mM、至少75mM、至少100mM、至少110mM、至少120mM、至少130mM、至少140mM、至少150mM、至少160mM或至少170mM氯化钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至多250mM、至多240mM、至多230mM、至多220mM、至多210mM、至多200mM、至多190mM或至多180mM氯化钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含150-250mM或150-200mM氯化钠。

[0042] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含泊洛沙姆188。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至少0.0005%、至少0.0006%、至少0.0007%、至少0.0008%、至少0.0009%或至少0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至多0.002%、至多0.0019%、至多0.0018%、至多0.0017%、至多0.0016%、至多0.0015%、至多0.0014%、至多0.0013%、至多0.0012%、至多0.0011%或至多0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含0.0005-0.002%或0.0005-0.0015%泊洛沙姆188(vol/vol%)。

[0043] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含约8.10mM磷酸氢二钠、约1.5mM磷酸二氢钾、约2.7mM氯化钾、约172mM氯化钠和约0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含8.10mM磷酸氢二钠、1.5mM磷酸二氢钾、2.7mM氯化钾、172mM氯化钠和0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。

[0044] 在一些实施方案中,包含本文所述的AAV颗粒,例如rAAV-抗VEGF颗粒的组合物(例如,药物组合物)以约 1×10^{11} vg/mL至约 1×10^{15} vg/mL的剂量(例如量)施用。在一些实施方案中,包含本文所述的AAV颗粒,例如rAAV-抗VEGF颗粒的组合物(例如,药物组合物)以 2.5×10^{12} vg/mL $\pm$ 10%的剂量(例如量)施用。在一些实施方案中,包含本文所述的AAV颗粒,例如rAAV-抗VEGF颗粒的组合物(例如,药物组合物)以 5×10^{12} vg/mL $\pm$ 10%的剂量(例如量)施用。在一些实施方案中,包含本文所述的AAV颗粒,例如rAAV-抗VEGF颗粒的组合物(例如,药物组合物)以 1×10^{13} vg/mL $\pm$ 10%的剂量(例如量)施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含约8.10mM磷酸氢二钠、约1.5mM磷酸二氢钾、约2.7mM氯化钾、约172mM氯化钠和约0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含8.10mM磷酸氢二钠、1.5mM磷酸二氢钾、2.7mM氯化钾、172mM氯化钠和0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。

[0045] 在一些实施方案中,包含本文所述的AAV颗粒,例如rAAV-抗VEGF颗粒的组合物(例如,药物组合物)以约 1×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗的剂量施用。在一些实施方案中,包含本文所述的AAV颗粒,例如rAAV-抗VEGF颗粒的组合物(例如,药物组合物)以约 2.3×10^{11} vg/耳蜗

的剂量施用。在一些实施方案中,包含本文所述的AAV颗粒,例如rAAV-抗VEGF颗粒的组合物(例如,药物组合物)以约 4.5×10^{11} vg/耳蜗的剂量施用。在一些实施方案中,包含本文所述的AAV颗粒,例如rAAV-抗VEGF颗粒的组合物(例如,药物组合物)以约 9×10^{11} vg/耳蜗的剂量施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含约8.10mM磷酸氢二钠、约1.5mM磷酸二氢钾、约2.7mM氯化钾、约172mM氯化钠和约0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含8.10mM磷酸氢二钠、1.5mM磷酸二氢钾、2.7mM氯化钾、172mM氯化钠和0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。

[0046] 在一些实施方案中,包含本文所述的AAV颗粒,例如rAAV-抗VEGF颗粒的组合物(例如,药物组合物)以约0.01mL至0.1mL的体积向受试者施用。在一些实施方案中,包含本文所述的AAV颗粒,例如rAAV-抗VEGF颗粒的组合物(例如,药物组合物)以约0.09mL的体积向受试者施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含约8.10mM磷酸氢二钠、约1.5mM磷酸二氢钾、约2.7mM氯化钾、约172mM氯化钠和约0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含8.10mM磷酸氢二钠、1.5mM磷酸二氢钾、2.7mM氯化钾、172mM氯化钠和0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。

[0047] 在一些实施方案中,如本文所述的组合物用于治疗例如哺乳动物中以血管新生为特征的耳科疾病和/或与耳科疾病相关的一种或多种症状。在一些实施方案中,提供如本文所述的构建体用于制造治疗例如哺乳动物中以血管新生为特征的耳科疾病和/或与耳科疾病相关的一种或多种症状的药物的用途。在一些实施方案中,与耳科疾病相关的一种或多种症状包括听力损失、毛细胞退化、内耳液生化环境的改变、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血、耳蜗血管供应中断、耳鸣、头晕、顽固性头痛、面部神经病变、三叉神经病变、面瘫、面部感觉异常、脑积水、小脑疝、死亡或其组合。

[0048] 在一些实施方案中,如本文所述的组合物用于治疗例如哺乳动物中的内耳病症。在一些实施方案中,提供如本文所述的构建体用于制造治疗例如哺乳动物中的内耳病症的药物的用途。在一些实施方案中,内耳病症包含前庭神经鞘瘤或II型神经纤维瘤病。在一些实施方案中,内耳病症为或包含前庭神经鞘瘤。在一些实施方案中,内耳病症为或包含II型神经纤维瘤病。前庭神经鞘瘤也可称为听神经瘤,并且两个术语在本文中可互换使用。

[0049] 在一些实施方案中,如本文所述的组合物用于治疗例如哺乳动物中的前庭神经鞘瘤。在一些实施方案中,提供如本文所述的构建体用于制造治疗例如哺乳动物中的前庭神经鞘瘤的药物的用途。

[0050] 在本文公开的方法或用途中任一者的一些实施方案中,哺乳动物为人。

[0051] 本公开还提供了一种细胞。在一些实施方案中,细胞包含如本文所述的构建体、如本文所述的rAAV颗粒和/或如本文所述的组合物。

[0052] 在一些实施方案中,细胞为体内的、离体的或体外的。

[0053] 在一些实施方案中,细胞为哺乳动物细胞。在一些实施方案中,细胞为人细胞。在一些实施方案中,人细胞是在受试者的耳朵中。

[0054] 在一些实施方案中,细胞被永生化以产生稳定细胞系。

[0055] 本公开提供了一种系统。系统包含如本文所述的构建体、如本文所述的rAAV颗粒、如本文所述的组合物、和/或如本文所述的细胞。

[0056] 本公开提供了一种方法。在一些实施方案中,方法包括使细胞与如本文所述的构

建体、如本文所述的rAAV颗粒、和/或如本文所述的组合物接触。

[0057] 在一些实施方案中,细胞为受试者的细胞。

[0058] 在一些实施方案中,细胞为耳朵细胞。在一些实施方案中,细胞为内耳细胞。在一些实施方案中,内耳细胞为外毛细胞。在一些实施方案中,内耳细胞为内毛细胞。在一些实施方案中,内耳细胞是柱细胞。在一些实施方案中,内耳细胞是Hensen细胞。在一些实施方案中,内耳细胞是克劳氏细胞(Claudius cell)。

[0059] 在一些实施方案中,内耳细胞是在体外的或离体的。

[0060] 在一些实施方案中,方法包括将如本文所述的构建体、如本文所述的rAAV颗粒、和/或如本文所述的组合物引入到受试者的内耳中。

[0061] 在一些实施方案中,将构建体、rAAV颗粒或组合物引入到受试者的耳蜗中。在一些实施方案中,构建体、rAAV颗粒或组合物经由圆窗膜注射来引入。

[0062] 在一些实施方案中,将本文公开的构建体、rAAV颗粒或组合物施用至受试者的耳蜗中使得在受试者的耳蜗中表达由所述构建体、rAAV颗粒或组合物编码的转基因。在一些实施方案中,转基因编码抗VEGF蛋白。在一些实施方案中,抗VEGF蛋白在受试者耳蜗中的一种或多种细胞中表达。在一些实施方案中,抗VEGF蛋白在外毛细胞、内毛细胞、柱细胞、Hensen细胞、克劳氏细胞或其组合中表达。在一些实施方案中,抗VEGF蛋白在一种或多种耳蜗细胞中的表达对所述一种或多种耳蜗细胞的存活和/或功能具有最小影响(例如,无影响)。

[0063] 在一些实施方案中,方法包括测量受试者的听力水平。在一些实施方案中,听力水平通过执行听觉脑干反应(ABR)测试来测量。

[0064] 在一些实施方案中,方法包括将受试者的听力水平与参考听力水平进行比较。在一些实施方案中,参考听力水平为公开的或历史参考听力水平。

[0065] 在一些实施方案中,在引入如本文所述的构建体、如本文所述的rAAV颗粒和/或如本文所述的组合物之后测量受试者的听力水平,且参考听力水平为在引入如本文所述的构建体、如本文所述的rAAV颗粒和/或如本文所述的组合物之前测量的受试者的听力水平。

[0066] 在一些实施方案中,方法包括测量受试者中血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平。

[0067] 在一些实施方案中,在受试者的内耳中测量血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平。在一些实施方案中,在受试者的耳蜗中测量血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平。

[0068] 在一些实施方案中,方法包括将受试者的血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平与血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的参考水平进行比较。

[0069] 在一些实施方案中,血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的参考水平为血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的公开的或历史参考水平。

[0070] 在一些实施方案中,在引入如本文所述的构建体、如本文所述的AAV颗粒、和/或如本文所述的组合物之后测量受试者的血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平,且血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的参考水平为在引入如本文所述的构建体、如本文所述的AAV颗粒、和/或如本文所述的组合物之前测量的受试者的血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平。

[0071] 在一些实施方案中,方法包括测量受试者的肿瘤的尺寸或体积。在一些实施方案中,尺寸为穿过肿瘤的最大直径或长度。

[0072] 在一些实施方案中,方法包括分别将受试者肿瘤的尺寸或体积与参考肿瘤尺寸或体积进行比较。

[0073] 在一些实施方案中,参考肿瘤尺寸或体积为公开的或历史参考肿瘤尺寸或体积。

[0074] 在一些实施方案中,在引入如本文所述的构建体、如本文所述的AAV颗粒、和/或如本文所述的组合物之后测量受试者的肿瘤的尺寸或体积,且参考肿瘤尺寸或体积为在引入如本文所述的构建体、如本文所述的AAV颗粒、和/或如本文所述的组合物之前测量的受试者的肿瘤的尺寸或体积。

[0075] 在一些实施方案中,方法为治疗听力损失的方法,其包括向有需要的受试者施用如本文所述的构建体、如本文所述的rAAV颗粒、和/或如本文所述的组合物。

[0076] 在一些实施方案中,受试者患有以血管新生为特征的耳科疾病或处于患有所述疾病的风险中。在一些实施方案中,耳科疾病为或包含前庭神经鞘瘤。

[0077] 在一些实施方案中,方法为治疗内耳病症的方法,其包括向有需要的受试者施用如本文所述的构建体、如本文所述的rAAV颗粒、和/或如本文所述的组合物。在一些实施方案中,内耳病症为前庭神经鞘瘤或II型神经纤维瘤病。

[0078] 在本文公开的方法或用途中任一者的一些实施方案中,受试者为人。

[0079] 在一些实施方案中,在施用如本文所述的构建体、如本文所述的AAV颗粒和/或如本文所述的组合物后,与耳科疾病相关的一种或多种症状得到缓解或改善。在一些实施方案中,一种或多种症状包括听力损失、毛细胞退化、内耳液生化环境的改变、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血、耳蜗血管供应中断、耳鸣、头晕、顽固性头痛、面部神经病变、三叉神经病变、面瘫、面部感觉异常、脑积水、小脑疝或死亡。

[0080] 在一些实施方案中,方法为治疗前庭神经鞘瘤的方法。

[0081] 在一些实施方案中,方法为调节VEGF水平的方法。

[0082] 在一些实施方案中,方法为调节活性VEGF水平的方法。

[0083] 在一些实施方案中,方法为降低VEGF活性的方法。

[0084] 本公开提供了一种方法,其包括使细胞与如本文所述的构建体和一种或多种包含AAV Rep基因、AAV Cap基因、AAV VA基因、AAV E2a基因和AAV E4基因的构建体接触。

[0085] 在一些实施方案中,细胞为内耳细胞。在一些实施方案中,内耳细胞为外毛细胞。在一些实施方案中,内耳细胞为内毛细胞。在一些实施方案中,内耳细胞是柱细胞。在一些实施方案中,内耳细胞是Hensen细胞。在一些实施方案中,内耳细胞是克劳氏细胞。在一些实施方案中,内耳细胞是在受试者的耳朵中。在一些实施方案中,内耳细胞是体外的或离体的。

[0086] 本公开提供了一种细胞群,其包含一种或多种如本文所述的细胞,其中所述群为或包含稳定细胞系。

[0087] 本文描述了用于本发明的方法和材料;也可使用本领域中已知的其他合适方法和材料。材料、方法和实例仅为说明性的且不意欲限制。所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和本文提及的其他参考文献均以引用的方式整体并入。如有冲突,则以本说明书(包括定义)为准。

[0088] 定义

[0089] 本公开的范围由所附权利要求书限定且不限于本文所述的某些实施方案。本领域技术人员在阅读本说明书后将意识到可以等效于此类所描述实施方案或在权利要求书的范围内的其他修改。一般而言,除非另有明确说明,否则本文所用术语与其在本领域中理解的含义一致。下文提供了某些术语的明确定义;贯穿本说明书,这些和其他术语在特定情况下的含义对于本领域技术人员而言将为由上下文清楚的。

[0090] 权利要求书中使用改变权利要求书元素的序数术语诸如“第一”、“第二”、“第三”等自身并不暗示任何优先权、优先级、或一个权利要求书元素优于另一权利要求书元素的顺序或者执行方法的动作的临时顺序,但仅用作区分具有某一名称的一个权利要求书元素与具有相同名称的另一元素(但是对于使用序数术语而言)以区分所述权利要求书元素。

[0091] 除非明确指出相反,否则如本文所用冠词“一个/种(a/an)”应理解为包括复数指代物。除非相反指示或另外由上下文清楚,否则在一组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求书或说明书认为满足组成员的一者、多于一者、或全部存在于给定产物或方法中、用于给定产品或方法中、或在其他方面与给定产物或方法相关。在一些实施方案中,一组的恰好一个成员存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或在其他方面与给定产品方法相关。在一些实施方案中,多于一个或所有组成员存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或在其他方面与给定产品或方法相关。应理解本公开涵盖所有变化、组合、和排列,其中除非另外指示或除非本领域普通技术人员清楚会出现矛盾或不一致,否则来自所列出权利要求中的一个或多个的一个或多个限制、元素、条款、描述性术语等被引入到从属相同基础权利要求的另一权利要求(或作为相关的任何其他权利要求)。在元素如列表呈现(例如,在Markush组或类似形式中)时,应理解也公开所述元素的各子组,且可自所述组去除任一个或多个元素。应当理解,一般而言,在实施方案或方面称为“包含”特定元素、特征等的情况下,某些实施方案或方面“由此类元素、特征等组成”或“基本上由此类元素、特征等组成”。为简单起见,那些实施方案并未在每一种情况下都在本文中用如此多词语具体阐述。也应理解,任何实施方案或方面都可以明确地自权利要求书中排除,而不管是否在说明书中陈述具体排除。

[0092] 贯穿本说明书,当多核苷酸或多肽由字母序列(例如,A、C、G和T,在多核苷酸的情况下分别表示腺苷、胞苷、鸟苷和胸苷)表示时,此类多核苷酸或多肽自左到右以5'到3'或N端到C端的顺序呈现。

[0093] 施用:如本文所用,术语“施用”通常是指向受试者或全身施用组合物以达成将剂递送至受试者或系统。在一些实施方案中,剂为组合物或包括在组合物中;在一些实施方案中,通过组合物或其一种或多种组分的代谢产生剂。本领域普通技术人员将意识到在适当情况下可用于向受试者例如人施用的多种途径。例如,在一些实施方案中,施用可以为系统的或局部的。在一些实施方案中,全身施用可以为静脉内的。在一些实施方案中,施用可以为局部的。局部施用可涉及经由例如通过圆窗膜的注射来递送至耳蜗外淋巴,或者经由通过内淋巴、外淋巴和/或在耳道造口术后内淋巴的注射递送到鼓阶、中阶。在一些实施方案中,施用可仅涉及单次剂量。在一些实施方案中,施用可涉及应用固定数量的剂量。在一些实施方案中,施用可涉及间歇性(例如,时间上分开的多个剂量)给药和/或周期性(例如,由共同时间段分开的个别剂量)给药的给药。在一些实施方案中,施用可涉及持续至少所选时

间段的连续给药(例如,灌注)。

[0094] 等位基因:如本文所用,术语“等位基因”是指特定多态性基因组基因座的两个或更多个现有遗传变体之一。

[0095] 改善:如本文所用,术语“改善”是指受试者状态的预防、减轻或缓解,或受试者状态的改善。改善可包括但不要求完全康复或完全预防疾病、病症或病状。

[0096] 氨基酸:在最广泛的意义上,如本文所用,术语“氨基酸”是指可以例如通过形成一个或多个肽键而并入多肽链中的任何化合物和/或物质。在一些实施方案中,氨基酸具有一般结构,例如 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{COOH}$ 。在一些实施方案中,氨基酸为天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸为非天然氨基酸;在一些实施方案中,氨基酸为D-氨基酸;在一些实施方案中,氨基酸为L-氨基酸。“标准氨基酸”是指天然存在的肽中常见的二十种标准L-氨基酸中的任一种。“非标准氨基酸”是指除标准氨基酸之外的任何氨基酸,无论其为合成制备或自天然来源获得的。在一些实施方案中,与如上所示的一般结构相比,在多肽中包括羧基端和/或氨基端氨基酸的氨基酸可包含结构修饰。例如,在一些实施方案中,与一般结构相比,氨基酸可以通过甲基化、酰胺化、乙酰化、聚乙二醇化、糖基化、磷酸化和/或取代(例如氨基、羧酸基、一个或多个质子和/或羟基)来修饰。在一些实施方案中,与含有其他方面相同的未修饰的氨基酸的多肽相比,此类修饰可以例如改变含有修饰的氨基酸的多肽的循环半衰期。在一些实施方案中,与含有其他方面相同的未修饰的氨基酸的多肽相比,此类修饰不显著改变含有修饰的氨基酸的多肽的相关活性。

[0097] 抗体:如本文所用,术语“抗体”是指包括足以赋予与特定靶抗原的特异性结合的标准免疫球蛋白序列元件的多肽。如本领域中已知的,自然界中产生的完整抗体为大约150kD的四聚体剂,其包含两个相同重链多肽(各自约50kD)和两个相同轻链多肽(各自约25kD),所述多肽彼此缔合成共同称为“Y形”结构的物质。每条重链包含至少四个结构域(每个结构域长约110个氨基酸):一个氨基端可变(VH)结构域(位于Y结构的尖端),然后为三个恒定结构域:CH1、CH2和羧基端CH3(位于Y茎的基部)。称为“开关”的短区域连接重链可变区和恒定区。“铰链”将CH2和CH3结构域连接到抗体的其余部分。此铰链区中的两个二硫键将完整抗体中的两个重链多肽彼此连接。每个轻链包含两个结构域:一个氨基端可变(VL)结构域,然后为一个羧基端恒定(CL)结构域,所述结构域通过另一个“开关”彼此分隔。完整抗体四聚体包含两个重链-轻链二聚体,其中重链和轻链通过单个二硫键彼此连接;另外两个二硫键将重链铰链区彼此连接,从而使二聚体彼此连接并形成四聚体。天然产生的抗体也被糖基化,通常在CH2结构域上。天然抗体中的每个结构域均具有以“免疫球蛋白折叠”为特征的结构,所述折叠由呈压缩反平行 β 桶形式彼此堆积的两个 β 片层(例如,3、4或5链片层)来形成。每个可变结构域包含三个称为“补体决定区”的高变环(CDR1、CDR2和CDR3)和四个稍微不变的“框架”区(FR1、FR2、FR3和FR4)。当天然抗体折叠时,FR区形成 β 片层,所述片层为结构域提供结构框架,且来自重链和轻链的CDR环区在三维空间中聚集在一起,使其形成位于Y结构的尖端的单一高变抗原结合位点。天然存在的抗体的Fc区与补体系统的元件结合,且也与效应细胞上的受体结合,包括例如介导细胞毒性的效应细胞。如本领域中已知的,Fc区对Fc受体的亲和力和/或其他结合属性可以通过糖基化或其他修饰来调节。在一些实施方案中,根据本发明产生和/或利用的抗体包括糖基化的Fc结构域,包括具有修饰的或工程化的这种糖基化的Fc结构域。出于本发明的目的,在某些实施方案中,包括在天然抗体

中发现的足够免疫球蛋白结构域序列的任何多肽或多肽复合物均可称为和/或用作“抗体”，无论此类多肽为天然产生的(例如，由生物体对于抗原作出反应来产生)，或通过重组工程化、化学合成或其他人工系统或方法产生。在一些实施方案中，抗体为多克隆的；在一些实施方案中，抗体为单克隆的。在一些实施方案中，抗体具有小鼠、兔、灵长类动物或人抗体特有的恒定区序列。在一些实施方案中，如本领域中已知，抗体序列元件为人源化的、灵长类化的、嵌合的等。此外，如本文所用，术语“抗体”在适当实施方案中(除非另有说明或从上下文清楚)可以是指以替代呈现方式利用抗体结构和功能特征的本领域已知或开发的构建体或形式中的任一者。例如，在一些实施方案中，根据本发明使用的抗体的形式选自但不限于完整IgA、IgG、IgE或IgM抗体；双特异性或多特异性抗体(例如，**Zybodies®**)；抗体片段，诸如Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd'片段、Fd片段和分离的CDR或其集合；单链Fv；多肽-Fc融合物；单结构域抗体(例如，鲨鱼单结构域抗体，诸如IgNAR或其片段)；骆驼科抗体；掩蔽抗体(例如，**Probodies®**)；小型模块化免疫药物(“SMIPTM”)；单链或串联双抗体(**TandAb®**)；VHH；**Anticalins®**；**Nanobodies®**微型抗体；**BiTE®**；锚蛋白重复蛋白或**DARPINs®**；**Avimers®**；**DART**；TCR样抗体；

Adnectins®；**Affilins®**；**Trans-body®**；**Affibodies®**；**TrimerX®**；微蛋白；

Fynomers®、**Centyrins®**；和**KALBITOR®**。在一些实施方案中，抗体可包括重链和/或轻链可变结构域。在一些实施方案中，抗体可不包括恒定结构域。在一些实施方案中，抗体可能缺乏它在天然产生时将具有的共价修饰(例如，聚糖的附接)。在一些实施方案中，抗体可包含共价修饰(例如，聚糖、有效载荷[例如可检测部分、治疗部分、催化部分等]或其他侧基[例如聚乙二醇等]的附接。

[0098] 大约或约：如本文所用，术语“大约”或“约”可应用于一个或多个感兴趣的值，包括与所述参考值相似的值。在一些实施方案中，除非另有说明或另外由上下文清楚，否则术语“大约”或“约”是指落于所述参考值的±10% (大于或小于) 内的值范围(除了其中这样的数字将超过可能值的100%)。例如，在一些实施方案中，术语“大约”或“约”可涵盖在参考值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内的值范围。

[0099] 关联：如本文所用，若一个事件或实体的存在、水平和/或形式与另一个事件或实体的存在、水平和/或形式相关，则术语“关联”将两个事件或实体描述为彼此“关联”。例如，若特定实体(例如，多肽、遗传特征、代谢物、微生物等)的存在、水平和/或形式与疾病、病症或病状的发生率和/或易感性相关(例如，在相关群体中)，则所述实体被认为与特定疾病、病症或病状相关。在一些实施方案中，若两个或更多个实体直接或间接地相互作用，使得它们处于和/或保持物理上彼此接近，则它们彼此物理“缔合”。在一些实施方案中，彼此物理缔合的两个或更多个实体彼此共价连接；在一些实施方案中，彼此物理缔合的两个或更多个实体彼此不共价连接而是例如通过氢键、范德华相互作用、疏水相互作用、磁性及其组合非共价缔合。

[0100] 生物活性：如本文所用，术语“生物活性”是指由感兴趣的剂或实体达成的可观察到的生物效应或结果。例如，在一些实施方案中，特异性结合相互作用为生物活性。在一些实施方案中，生物途径或事件的调节(例如，诱导、增强或抑制)为生物活性。在一些实施方案中，生物活性的存在或程度通过检测由感兴趣的生物途径或事件产生的直接或间接产物

来评估。

[0101] 特征部分:如本文所用,术语“特征部分”在最广泛的意义上是指物质的一部分,其存在(或不存在)与物质的特定特征、属性或活性的存在(或不存在)相关。在一些实施方案中,物质的特征部分为在给定物质和共享特定特征、属性或活性的相关物质中发现,而在不共享特定特征、属性或活性的那些物质中未发现的部分。在一些实施方案中,特征部分与完整物质共享至少一个功能特征。例如,在一些实施方案中,蛋白质或多肽的“特征部分”为含有连续氨基酸段或连续氨基酸段的集合的部分,所述段一起为蛋白质或多肽的特征。在一些实施方案中,每个这种连续段通常含有至少2、5、10、15、20、50或更多个氨基酸。一般而言,物质(例如蛋白质、抗体等)的特征部分为除了上文指定的序列和/或结构同一性之外,与相关完整物质共享至少一个功能特征的部分。在一些实施方案中,特征部分可以具有生物活性。

[0102] 特征序列:如本文所用,术语“特征序列”为在多肽或核酸家族的所有成员中发现的序列,且因此本领域普通技术人员可以使用所述术语来定义所述家族的成员。

[0103] 特征序列元件:如本文所用,短语“特征序列元件”是指存在于聚合物中(例如,在多肽或核酸中)且表示所述聚合物的特征部分的序列元件。在一些实施方案中,特征序列元件的存在与聚合物的特定活性或性质的存在或水平相关。在一些实施方案中,特征序列元件的存在(或不存在)将特定聚合物定义为此类聚合物的特定家族或组的成员(或不是所述家族或组的成员)。特征序列元件通常包含至少两个单体(例如,氨基酸或核苷酸)。在一些实施方案中,特征序列元素包括至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50个或更多个单体(例如,连续连接的单体)。在一些实施方案中,特征序列元件包括至少第一连续单体段和第二连续单体段,其被一个或多个间隔区隔开,所述间隔区的长度可以随共享序列元件的聚合物而变化或不随其变化。

[0104] 组合疗法:如本文所用,术语“组合疗法”是指受试者同时暴露于两种或更多种治疗方案(例如,两种或更多种治疗剂)的那些情况。在一些实施方案中,可以同时施用两种或更多种剂。在一些实施方案中,可以依序施用两种或更多种剂。在一些实施方案中,可以在重叠给药方案中施用两种或更多种剂。

[0105] 可比较:如本文所用,术语“可比较”是指两个或更多个剂、实体、情况、条件集合、受试者、群体等,它们可能彼此不相同但足够相似以允许在其之间进行比较,使得本领域技术人员将理解,可以基于所观察的差异或相似性合理地得出结论。在一些实施方案中,可比较的剂、实体、情况、条件集合、受试者、群体等的集合的特征在于多个基本相同的特征和一个或少量不同特征。本领域普通技术人员将理解在上下文中,在任何给定情况下两个或更多个此类剂、实体、情况、条件集合、受试者、群体等需要何种程度的同一性才能视为具有可比性。例如,本领域普通技术人员将理解,剂、实体、情况、条件集合、受试者、群体等的集合当特征在于足够数量和类型的基本上相同的特征以保证得出以下合理结论时为彼此可比较的:在环境、刺激、剂、实体、情况集合、条件集合、受试者、群体等的不同集合下或在所述情况下,所获得的结果或观察到的现象的差异由改变的那些特征的变化引起或指示所述变化。

[0106] 构建体:如本文所用,术语“构建体”是指包含能够携带至少一种异源多核苷酸的多核苷酸的组合物。在一些实施方案中,构建体可以为质粒、转座子、粘粒、人工染色体(例

如,人人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生性人工染色体(PAC))或病毒构建体,以及任何Gateway®质粒。构建体可例如包括足以用于表达的顺式作用元件;其他用于表达的元件可由宿主灵长类动物细胞提供或在体外表达系统中提供。构建体可以包括当与适当控制元件缔合时能够复制的任何遗传元件(例如,质粒、转座子、粘粒、人工染色体或病毒构建体等)。因此,在一些实施方案中,“构建体”可包括克隆和/或表达构建体和/或病毒构建体(例如,腺相关病毒(AAV)构建体、腺病毒构建体、慢病毒构建体或逆转录病毒构建体)。

[0107] 保守:如本文所用,术语“保守”是指描述保守氨基酸取代的情况,包括一个氨基酸残基被另一个具有带有类似化学性质(例如,电荷或疏水性)的侧链R基团的氨基酸残基取代。一般而言,保守氨基酸取代基本上不会改变蛋白质的感兴趣的功能特性,例如受体结合配体的能力。具有带有类似化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括:脂族侧链,诸如甘氨酸(Gly,G)、丙氨酸(Ala,A)、缬氨酸(Val,V)、亮氨酸(Leu,L)和异亮氨酸(Ile,I);脂族羟基侧链,诸如丝氨酸(Ser,S)和苏氨酸(Thr,T);含有酰胺的侧链,诸如天冬酰胺(Asn,N)和谷氨酰胺(Gln,Q);芳族侧链诸如苯丙氨酸(Phe,F)、酪氨酸(Tyr,Y)和色氨酸(Trp,W);碱性侧链诸如赖氨酸(Lys,K)、精氨酸(Arg,R)和组氨酸(His,H);酸性侧链,诸如天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E);和含硫侧链,诸如半胱氨酸(Cys,C)和甲硫氨酸(Met,M)。保守氨基酸取代组包括例如缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸(Val/Leu/Ile,V/L/I)、苯丙氨酸/酪氨酸(Phe/Tyr,F/Y)、赖氨酸/精氨酸(Lys/Arg,K/R)、丙氨酸/缬氨酸(Ala/Val,A/V)、谷氨酸/天冬氨酸(Glu/Asp,E/D)和天冬酰胺/谷氨酰胺(Asn/Gln,N/Q)。在一些实施方案中,保守氨基酸取代可以为蛋白质中的任何天然残基被丙氨酸的取代,如例如丙氨酸扫描诱变中所用。在一些实施方案中,进行了保守取代,其在Gonnet,G.H.等人,1992,Science 256:1443-1445中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值,所述文献以引用方式整体并入本文。在一些实施方案中,取代为适度保守的取代,其中所述取代在PAM250对数似然矩阵中具有非负值。本领域技术人员应了解,在来自不同物种的相同蛋白质之间不保守的氨基酸变化(例如,取代、添加、缺失等)不太可能对蛋白质的功能具有影响,因此,应选择这些氨基酸进行突变。在来自不同物种的相同蛋白质之间保守的氨基酸不应改变(例如缺失、添加、取代等),因为这些突变更可能导致蛋白质功能改变。

保守氨基酸取代		
对于氨基酸	编码	被以下置换
丙氨酸	A	D-ala、Gly、Aib、 β -Ala、Acp、L-Cys、D-Cys
精氨酸	R	D-Arg、Lys、D-Lys、高-Arg、D-高-Arg、Met、Ile、D-Met、D-Ile、Orn、D-Orn
[0108] 天冬酰胺	N	D-Asn、Asp、D-Asp、Glu、D-Glu、Gln、D-Gln
天冬氨酸	D	D-Asp、D-Asn、Asn、Glu、D-Glu、Gln、D-Gln
半胱氨酸	C	D-Cys、S-Me-Cys、Met、D-Met、Thr、D-Thr
谷氨酰胺	Q	D-Gln、Asn、D-Asn、Glu、D-Glu、Asp、D-Asp
谷氨酸	E	D-Glu、D-Asp、Asp、Asn、D-Asn、Gln、D-Gln
甘氨酸	G	Ala、D-Ala、Pro、D-Pro、Aib、 β -Ala、Acp

[0109]

异亮氨酸	I	D-Ile、Val、D-Val、AdaA、AdaG、Leu、D-Leu、Met、D-Met
亮氨酸	L	D-Leu、Val、D-Val、AdaA、AdaG、Leu、D-Leu、Met、D-Met
赖氨酸	K	D-Lys、Arg、D-Arg、高-Arg、D-高-Arg、Met、D-Met、Ile、D-Ile、Orn、D-Orn
甲硫氨酸	M	D-Met、S-Me-Cys、Ile、D-Ile、Leu、D-Leu、Val、D-Val
苯丙氨酸	F	D-Phe、Tyr、D-Thr、L-多巴、His、D-His、Trp、D-Trp、反式-3,4 或 5-苯脯氨酸、AdaA、AdaG、顺式-3,4 或 5-苯脯氨酸、Bpa、D-Bpa
脯氨酸	P	D-Pro、L-I-噁唑烷-4-羧酸、D-或-L-1-噁唑烷-4-羧酸 (Kauer, 美国专利号 4,511,390, 其以引用方式整体并入本文)
丝氨酸	S	D-Ser、Thr、D-Thr、别-Thr、Met、D-Met、Met (O)、D-Met (O)、L-Cys、D-Cys
苏氨酸	T	D-Thr、Ser、D-Ser、别-Thr、Met、D-Met、Met (O)、D-Met (O)、Val、D-Val
酪氨酸	Y	D-Tyr、Phe、D-Phe、L-多巴、His、D-His
缬氨酸	V	D-Val、Leu、D-Leu、Ile、D-Ile、Met、D-Met、AdaA、AdaG

[0110] 对照:如本文所用,术语“对照”是指本领域理解的“对照”为比较结果的标准的含义。通常,对照用于通过隔离变量,以便对此类变量做出结论,从而增强实验的完整性。在一些实施方案中,对照为与测试反应或测定同时进行以提供比较物的反应或测定。例如,在一个实验中,应用了“测试”(即正测试的变量)。在第二个实验中,不应用“对照”,即正测试的变量。在一些实施方案中,对照为历史对照(例如,先前进行的测试或测定,或先前已知的量或结果)。在一些实施方案中,对照为或包含打印的或以其他方式保存的记录。在一些实施方案中,对照为阳性对照。在一些实施方案中,对照为阴性对照。

[0111] 确定、测量、评价、评估、测定和分析:如本文所用,术语“确定”、“测量”、“评价”、“评估”、“测定”和“分析”可以互换使用以指代任何形式的测量,且包括确定元素是否存在。这些术语包括定量和/或定性确定。测定可以为相对的或绝对的。例如,在一些实施方案中,“测定...的存在”可以为确定某物存在的量和/或确定它存在或不存在。

[0112] 工程化:一般而言,如本文所用,术语“工程化”是指已被人工操纵的方面。例如,若细胞或生物体被操纵以改变其遗传信息(例如,通过转化、交配、体细胞杂交、转染、转导或其他机制引入了先前不存在的新遗传物质,或例如通过取代或缺失突变或通过交配方案改变或移除先前存在的遗传物质),则所述细胞或生物体被认为是“工程化的”。按照惯例且由本领域技术人员理解,即使对先前实体进行实际操作,工程化多核苷酸或细胞的后代通常仍称为“工程化的”。在一些实施方案中,“工程化”包含编码序列的“人源化”。在一些实施方案中,“人源化”可以包括将人非编码序列(诸如内含子和调控元件)引入到非人序列中。在一些实施方案中,“人源化”可包括对核苷酸序列进行密码子优化以供人使用。在一些实施方案中,“人源化”可以包括用人多肽或核苷酸序列替换一部分多肽(诸如结构域,例如框架区或互补结构域区)或核苷酸序列(例如,编码或非编码)。

[0113] 赋形剂:如本文所用,术语“赋形剂”是指可包含在药物组合物中,例如以提供或有助于所需一致性或稳定作用的无活性(例如,非治疗)剂。在一些实施方案中,合适的药物赋形剂可以包括例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。

[0114] 表达:如本文所用,术语核酸序列的“表达”是指由核酸序列产生任何基因产物(例如转录物,例如mRNA,例如多肽等)。在一些实施方案中,基因产物可以为转录物。在一些实施方案中,基因产物可以为多肽。在一些实施方案中,核酸序列的表达涉及以下中的一者或多者:(1)由DNA序列产生RNA模板(例如,通过转录);(2)RNA转录物的加工(例如,通过剪接、编辑、5' cap形成和/或3'末端形成);(3)将RNA翻译成多肽或蛋白质;和/或(4)多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[0115] 功能性:如本文所用,术语“功能性”描述以表现出表征的性质和/或活性的形式存在的事物。例如,在一些实施方案中,“功能性”生物分子为其表现出表征的性质和/或活性的形式的生物分子。在一些此类实施方案中,功能性生物分子相对于另一个非功能性生物分子来表征,因为“非功能性”型式不表现出与“功能性”分子相同或等效的性质和/或活性。生物分子可以具有一种功能、两种功能(即双功能性)或多种功能(即多功能性)。

[0116] 基因:如本文所用,术语“基因”是指染色体中编码基因产物(例如RNA产物,例如多肽产物)的DNA序列。在一些实施方案中,基因包括编码序列(即,编码特定产物的序列)。在一些实施方案中,基因包括非编码序列。在一些特定实施方案中,基因可包括编码序列(例如外显子)和非编码序列(例如内含子)。在一些实施方案中,基因可包括一种或多种调控序列(例如,启动子、增强子等)和/或内含子序列,其例如可控制或影响基因表达的一个或多个方面(例如,细胞类型特异性表达、诱导型表达等)。如本文所用,术语“基因”通常是指编码多肽或其片段的核酸的一部分;所述术语可以任选地包括调控序列,如本领域普通技术人员将由上下文清楚的。此定义预期不排除将术语“基因”应用于非蛋白质编码表达单位,而是澄清在大多数情况下,如本文件中所用的术语是指多肽编码核酸。在一些实施方案中,基因可以编码多肽,但所述多肽可能没有功能,例如基因变体相对于野生型基因可以编码不以相同方式起作用或根本不起作用的多肽。在一些实施方案中,基因可以编码转录物,在一些实施方案中,其毒性可能超过阈值水平。在一些实施方案中,基因可以编码多肽,但所述多肽可能没有功能和/或可能具有超过阈值水平的毒性。

[0117] 听力损失:如本文所用,术语“听力损失”可用于表示活生物体部分或完全没有听力。在一些实施方案中,听力损失可以为获得性的。在一些实施方案中,听力损失可以为遗传性的。在一些实施方案中,听力损失可以为基因性的。在一些实施方案中,听力损失可能是由疾病或创伤(例如,身体创伤、用一种或多种导致听力损失的剂治疗等)引起的。在一些实施方案中,听力损失可能是由于一种或多种已知遗传原因和/或综合征。在一些实施方案中,听力损失可能具有未知病因。在一些实施方案中,听力损失可以或不可以通过使用助听器或其他治疗来减轻。

[0118] 异源:如本文所用,术语“异源”可用于指与另一区域和/或另一分子相比特定分子的一个或多个区域。例如,在一些实施方案中,异源多肽结构域是指多肽结构域并非天然地一起出现(例如,在同一多肽中)的事实。例如,在人工产生的融合蛋白中,来自一种多肽的多肽结构域可以与来自不同多肽的多肽结构域融合。在这种融合蛋白中,两个多肽结构域

将被认为相对于彼此为“异源”的,因为它们不会天然地一起出现。

[0119] 同一性:如本文所用,术语“同一性”是指聚合物分子之间,例如核酸分子(例如,DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。在一些实施方案中,若聚合物分子的序列为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%相同,则聚合物分子被认为彼此“基本相同”。两个核酸或多肽序列的同一性百分比的计算例如可以通过比对两个序列以用于最佳比较目的来进行(例如,可以在第一序列和第二序列中的一者或两者中引入间隙以进行最佳比对且出于比较目的,可以忽略不相同序列)。在一些实施方案中,出于比较目的而比对的序列的长度为参考序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或基本上100%;然后比较相应位置处的核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置相同的残基(例如,核苷酸或氨基酸)占据时,则两个分子(即,第一和第二)在所述位置是相同的。两个序列之间的同一性百分比随正比较的两个序列所共享的相同位置的数量而变化,考虑到为了两个序列的最佳比对而需要引入的间隙的数量和每个间隙的长度。两个序列之间的序列的比较和同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。例如,可以使用Meyers和Miller的算法(CABIOS, 1989, 4:11-17,其以引用方式整体并入本文)来确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比,所述算法已经并入ALIGN程序(2.0版)。在一些实施方案中,使用ALIGN程序进行的核酸序列比较使用PAM120权重残基表、间隙长度罚分12和间隙罚分4。

[0120] 改善、增加、增强、抑制或减少:如本文所用,术语“改善”、“增加”、“增强”、“抑制”、“减少”或其语法等效物表示相对于基线或其他参考测量值的值。在一些实施方案中,值与基线或其他参考测量值具有统计学上显著的差异。在一些实施方案中,适当参考测量值可以为或包含在不存在特定剂或治疗(例如,之前和/或之后),或在存在适当可比较参考剂的情况下,在其他方面可比较条件下,特定系统(例如,单个个体)中的测量值。在一些实施方案中,适当参考测量值可以为或包含在相关剂或治疗存在下已知或预期以特定方式响应的可比较系统中的测量值。在一些实施方案中,适当参考为阴性参考;在一些实施方案中,适当参考为阳性参考。

[0121] 核酸:如本文所用,术语“核酸”在其最广泛的意义上是指并入或可并入寡核苷酸链中的任何化合物和/或物质。在一些实施方案中,核酸为经由磷酸二酯键联并入或可并入寡核苷酸链中的化合物和/或物质。如由上下文将清楚,在一些实施方案中,“核酸”是指单个核酸残基(例如,核苷酸和/或核苷);在一些实施方案中,“核酸”是指包含单个核酸残基的寡核苷酸链。在一些实施方案中,“核酸”为或包含RNA;在一些实施方案中,“核酸”为或包含DNA。在一些实施方案中,核酸为一种或多种天然核酸残基,包含所述一种或多种天然核酸残基或由所述一种或多种天然核酸残基组成。在一些实施方案中,核酸为一种或多种核酸类似物,包含所述一种或多种核酸类似物或由所述一种或多种核酸类似物组成。在一些实施方案中,核酸类似物与核酸的不同之处在于它不利用磷酸二酯骨架。替代地或另外地,在一些实施方案中,核酸具有一个或多个硫代磷酸酯和/或5'-N-亚磷酰胺键联而非磷酸二酯键。在一些实施方案中,核酸为一种或多种天然核苷(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷),包含所述一种或多种天然核苷或由所述一种或多种天然核苷组成。在一些实施方案中,核酸为一种或多种核苷类似物(例如,2-氨基腺

苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并-嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、0(6)-甲基鸟嘌呤、2-硫代胞苷、甲基化碱基、嵌入碱基及其组合),包含所述一种或多种核苷类似物或由所述一种或多种核苷类似物组成。在一些实施方案中,与天然核酸中的那些相比,核酸包含一个或多个修饰的糖(例如,2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖)。在一些实施方案中,核酸具有编码功能性基因产物诸如RNA或蛋白质的核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸包括一个或多个内含子。在一些实施方案中,核酸通过以下中的一者或多者制备:自天然来源分离、基于互补模板通过聚合来酶促合成(体内或体外)、在重组细胞或系统中繁殖和化学合成。在一些实施方案中,核酸长为至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000个或更多个残基。在一些实施方案中,核酸部分或全部为单链的;在一些实施方案中,核酸为部分或全部为双链的。在一些实施方案中,核酸具有包含至少一种编码多肽或与编码多肽的序列互补的元件的核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸具有酶促活性。

[0122] 可操作地连接:如本文所用,是指并列,其中所描述的组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系中。与功能元件“可操作地连接”的控制元件以一种方式缔合,使得在与控制元件相容的条件下达成功能元件的表达和/或活性。在一些实施方案中,“可操作地连接的”控制元件与感兴趣的编码元件相邻(例如,共价连接);在一些实施方案中,控制元件与感兴趣的功能元件相反或以其他方式起作用。术语“可操作地连接”是指调控序列与异源核酸序列之间引起后者表达的功能性键联。例如,当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。在一些实施方案中,例如,功能性键联可包括转录控制。例如,若启动子影响编码序列的转录或表达,则所述启动子与编码序列可操作地连接。可操作地连接的DNA序列可彼此相邻,且例如在需要接合两个蛋白编码区时,处于同一阅读框中。

[0123] 药物组合物:如本文所用,术语“药物组合物”是指其中活性剂与一种或多种药学上可接受的载剂一起配制的组合物。在一些实施方案中,活性剂以适于在治疗中施用的单位剂量存在,当施用于相关群体时,所述治疗方案显示达成预定治疗效果的统计学上显著的概率。在一些实施方案中,药物组合物可以被专门配制用于以固体或液体形式施用,包括适合于例如施用的那些形式,例如作为例如被设计用于施用于耳道的水性或非水性溶液或悬浮液或液滴的可注射制剂。在一些实施方案中,药物组合物可以被配制用于经由注射在特定器官或隔室中施用,例如直接施用于耳朵,或全身施用例如静脉内施用。在一些实施方案中,制剂可以为或包含浸液(水性或非水性溶液剂或混悬剂)、片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、糊剂、胶囊剂、粉剂等。在一些实施方案中,活性剂可以为或包含分离的、纯化的或纯的化合物。

[0124] 药学上可接受:如本文所用,术语“药学上可接受”例如可参考用于配制如本文公开的药物组合物的载剂、稀释剂或赋形剂来使用,意指载剂、稀释剂或赋形剂与组合物的其他成分相容且对其接受者无害。

[0125] 药学上可接受的载剂:如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”意指参与将标题化合物自身体体的一个器官或一部分携带或运输到身体的另一个器官或一部分的药学上可接受的材料、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料。在与制剂的其他成分相容且对患者无害的意义上,每个载剂都必须是“可接受的”。可用作药学上可接受的载剂的材料的一些实例包括:糖类,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙纤维素;黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;油类,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,诸如丙二醇;多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯类,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液(Ringer's solution);乙醇;pH缓冲溶液;聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;和其他用于药物制剂的无毒相容物质。

[0126] 聚腺苷酸化:如本文所用,“聚腺苷酸化”是指聚腺苷酰基(polyadenyl)部分或其修饰的变体与信使RNA分子的共价键联。在真核生物中,大多数信使RNA(mRNA)分子在3'末端被聚腺苷酸化。在一些实施方案中,3' poly(A)尾为通过酶——聚腺苷酸聚合酶的作用添加到前mRNA中的腺嘌呤核苷酸长序列(例如,50、60、70、100、200、500、1000、2000、3000、4000或5000)(SEQ ID NO:117)。在高等真核生物中,poly(A)尾可以添加到含有特定序列、聚腺苷酸化信号或“poly(A)序列”的转录物上。poly(A)尾和与其结合的蛋白质有助于保护mRNA免受核酸外切酶的降解。聚腺苷酸化可实现转录终止、mRNA自细胞核输出和翻译。通常,聚腺苷酸化在DNA转录为RNA后立即在细胞核中发生,但此外随后也可在细胞质中发生。转录终止后,可以通过与RNA聚合酶结合的核酸内切酶复合物的作用来裂解mRNA链。裂解位点的特征可以在于在裂解位点附近存在碱基序列AAUAAA。mRNA裂解后,可以将腺苷残基添加至裂解位点的自由3'末端。如本文所用,“poly(A)序列”为触发mRNA的核酸内切酶裂解且在裂解的mRNA的3'末端添加一系列腺苷的序列。

[0127] 多肽:如本文所用,术语“多肽”是指通常通过肽键连接的残基(例如氨基酸)的任何聚合链。在一些实施方案中,多肽具有在自然界中存在的氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽具有在自然界中不存在的氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽具有工程化的氨基酸序列,因为其是通过人工行为设计和/或产生的。在一些实施方案中,多肽可包含天然氨基酸、非天然氨基酸或两者或由其组成。在一些实施方案中,多肽可在多肽的N端、在多肽的C端或其任何组合处包括一个或多个侧基或其他修饰,例如修饰或附接到一个或多个氨基酸侧链。在一些实施方案中,此类侧基或修饰可为乙酰化、酰胺化、脂化、甲基化、聚乙二醇化等,包括其组合。在一些实施方案中,多肽可含有L-氨基酸、D-氨基酸或两者,且可含有本领域已知的多种氨基酸修饰或类似物中的任一种。在一些实施方案中,有用修饰可以为或包括例如末端乙酰化、酰胺化、甲基化等。在一些实施方案中,蛋白质可以包含天然氨基酸、非天然氨基酸、合成氨基酸及其组合。术语“肽”通常用于指长度小于约100个氨基酸、小于约50个氨基酸、小于20个氨基酸或小于10个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,蛋白质为抗体、抗体片段、其生物活性部分和/或其特征部分。

[0128] 多核苷酸:如本文所用,术语“多核苷酸”是指核酸的任何聚合物链。在一些实施方案中,多核苷酸为或包含RNA;在一些实施方案中,多核苷酸为或包含DNA。在一些实施方案中,多核苷酸为一个或多个天然核酸残基,包含所述一个或多个天然核酸残基或由所述一

个或多个天然核酸残基组成。在一些实施方案中,多核苷酸为一个或多个核酸类似物,包含所述一个或多个核酸类似物或由所述一个或多个核酸类似物组成。在一些实施方案中,多核苷酸类似物与核酸的不同之处在于它不利用磷酸二酯骨架。替代地或另外地,在一些实施方案中,多核苷酸具有一个或多个硫代磷酸酯和/或5'-N-亚磷酰胺键联而非磷酸二酯键。在一些实施方案中,多核苷酸为一种或多种天然核苷(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷),包含所述一种或多种天然核苷或由所述一种或多种天然核苷组成。在一些实施方案中,多核苷酸为一种或多种核苷类似物(例如,2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并-嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、0(6)-甲基鸟嘌呤、2-硫代胞苷、甲基化碱基、嵌入碱基及其组合),包含所述一种或多种核苷类似物或由所述一种或多种核苷类似物组成。在一些实施方案中,与天然核酸中的那些相比,多核苷酸包含一种或多种修饰的糖(例如,2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖)。在一些实施方案中,多核苷酸具有编码功能基因产物诸如RNA或蛋白质的核苷酸序列。在一些实施方案中,多核苷酸包括一个或多个内含子。在一些实施方案中,多核苷酸通过以下中的一种或多种方式制备:自天然来源分离、基于互补模板通过聚合来酶促合成(体内或体外)、在重组细胞或系统中繁殖和化学合成。在一些实施方案中,多核苷酸长为至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000个或更多个残基。在一些实施方案中,多核苷酸部分或全部为单链的;在一些实施方案中,多核苷酸为部分或完全双链的。在一些实施方案中,多核苷酸具有包含至少一种编码多肽或与编码多肽的序列互补的元件的核苷酸序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有酶促活性。

[0129] 蛋白质:如本文所用,术语“蛋白质”是指多肽(即,通过肽键彼此连接的至少两个氨基酸的串)。蛋白质可以包括除氨基酸之外的部分(例如,可为糖蛋白、蛋白聚糖等),且/或可以以其他方式加工或修饰。本领域普通技术人员将理解,“蛋白质”可为由细胞产生的完整多肽链(具有或没有信号序列),或者可为其特征部分。本领域普通技术人员将理解,蛋白质有时可包括多于一条多肽链,例如通过一个或多个二硫键连接或通过其他方式缔合。

[0130] 重组:如本文所用,术语“重组”意欲指代通过重组方式设计、工程化、制备、表达、创造、制造和/或分离的多肽,诸如使用转染到宿主细胞中的重组表达构建体来表达的多肽;自重组、组合人多肽文库中分离的多肽;自动物(例如小鼠、兔、羊、鱼等)中分离的多肽,所述动物经一个或多个基因或编码和/或指导所述多肽或其一个或多个组分、部分、元件或结构域的表达的基因组分进行转基因或被操纵以表达所述一个或多个基因或基因组分;和/或通过任何其他方式制备、表达、产生或分离的多肽,所述方式涉及将所选核酸序列元件彼此剪接或连结、化学合成所选序列元件、和/或以其他方式产生编码和/或指导多肽或其一个或多个组分、部分、元件或结构域的表达的核酸。在一些实施方案中,此类所选序列元件中的一者或多者在自然界中发现。在一些实施方案中,此类所选序列元件中的一者或多者通过电脑模拟设计。在一些实施方案中,一个或多个此类所选序列元件由例如来自天然或合成来源,例如像在感兴趣的来源生物体(例如,人、小鼠等)的生殖系中的已知序列元

件的诱变(例如,体内或体外)而产生。

[0131] 参考:如本文所用,术语“参考”描述进行比较所相对的标准或对照。例如,在一些实施方案中,将感兴趣的剂、动物、个体、群体、样品、序列或值与参考或对照剂、动物、个体、群体、样品、序列或值进行比较。在一些实施方案中,参考或对照与感兴趣的测试或确定基本上同时测试和/或确定。在一些实施方案中,参考或对照为历史参考或对照,其任选地体现在有形介质中。通常,如本领域技术人员所理解的,参考或对照为在与所评估参考或对照相当的条件或环境下确定或表征的。本领域技术人员将理解何时存在足够相似性以证明对特定可能参考或对照的依赖和/或比较。在一些实施方案中,参考为阴性对照参考;在一些实施方案中,参考为阳性对照参考。

[0132] 调控元件:如本文所用,术语“调控元件”或“调控序列”是指以某种方式调控一种或多种特定基因的表达的DNA的非编码区。在一些实施方案中,此类基因与给定调控元件并列或“在其附近”。在一些实施方案中,此类基因位于离给定调控元件相当远的位置处。在一些实施方案中,调控元件削弱或增强一种或多种基因的转录。在一些实施方案中,调控元件可以与正在调控的基因顺式定位。在一些实施方案中,调控元件可以与正在调控的基因反式定位。例如,在一些实施方案中,调控序列是指如下核酸序列,其调控可操作地连接于所述调控序列的基因产物的表达。在一些此类实施方案中,此序列可为增强子序列和调控基因产物表达的其他调控元件。

[0133] 样品:如本文所用,术语“样品”通常是指自感兴趣的来源获得或衍生的材料的等分试样。在一些实施方案中,感兴趣的来源为生物或环境来源。在一些实施方案中,感兴趣的来源可以为或包含细胞或生物体,诸如微生物(例如,病毒)、植物或动物(例如,人)。在一些实施方案中,感兴趣的来源为或包含生物组织或流体。在一些实施方案中,生物组织或流体可以为或包含羊水、房水、腹水、胆汁、骨髓、血液、母乳、脑脊液、耳垢、乳糜、食糜(chyme)、射精液(ejaculate)、内淋巴、渗出液、粪便、胃酸、胃液、淋巴、黏液、心包液、外淋巴、腹膜液、胸膜液、脓液、稀黏液(rheum)、唾液、皮脂、精液、血清、包皮垢、痰、滑液、汗液、眼泪、尿液、阴道分泌物、玻璃体液、呕吐物和/或其组合或组分。在一些实施方案中,生物流体可以为或包含细胞内液、细胞外液、血管内液(血浆)、间质液、淋巴液和/或跨细胞液。在一些实施方案中,生物流体可以为或包含植物渗出液。在一些实施方案中,生物组织或样品可以通过例如抽吸、活检(例如细针或组织活检)、拭子(例如口腔、鼻腔、皮肤或阴道拭子)、刮擦、手术、洗涤或灌洗(例如,支气管肺泡、导管、鼻腔、眼部、口腔、子宫、阴道或其他洗涤或灌洗)获得。在一些实施方案中,生物样品为或包含自个体获得的细胞。在一些实施方案中,样品为通过任何适当方式直接自感兴趣的来源获得的“初级样品”。在一些实施方案中,如将由上下文中清楚的,术语“样品”是指通过处理初级样品(例如,通过移除一种或多种组分和/或通过向其中添加一种或多种剂)而获得的制剂。例如,使用半透膜来过滤。这种“处理的样品”可以包含例如自样品中提取或通过使初级样品经受一种或多种技术诸如核酸的扩增或逆转录、某些组分的分离和/或纯化等而获得的核酸或蛋白质。

[0134] 受试者:如本文所用,术语“受试者”是指生物体,通常为哺乳动物(例如,人,在一些实施方案中包括出生前人形式)。在一些实施方案中,受试者患有相关疾病、病症或病状。在一些实施方案中,受试者易患疾病、病症或病状。在一些实施方案中,受试者表现出疾病、病症或病状的一种或多种症状或特征。在一些实施方案中,受试者不表现出疾病、病症或病

状的任何症状或特征。在一些实施方案中,受试者为具有对疾病、病症或病状的易感性或患疾病、病症或病状的风险所特有的一种或多种特征的人。在一些实施方案中,受试者为患者。在一些实施方案中,受试者为接受和/或已接受诊断和/或治疗的个体。

[0135] 基本上:如本文所用,术语“基本上”是指表现出感兴趣的特征或性质的全部或接近全部范围或程度的定性条件。本领域普通技术人员将理解,生物和化学现象很少(若有)达到完成和/或进行至完全或达成或避免绝对结果。因此,术语“基本上”在本文中用于包罗许多生物和化学现象中固有的潜在缺乏完全性。

[0136] 治疗:如本文所用,术语“治疗(treatment/treat/treating)”是指部分或完全减轻、改善、消除、逆转、缓解、抑制特定疾病、病症和/或病状的一种或多种症状、特征和/或病因、延迟其发作、降低其严重性和/或降低其发生率的任何疗法施用。在一些实施方案中,这种治疗可以针对不表现出相关疾病、病症和/或病状的迹象的受试者和/或仅表现出疾病、病症和/或病状的早期迹象的受试者。替代地或另外地,这种治疗可以针对表现出相关疾病、病症和/或病状的一种或多种确定迹象的受试者。在一些实施方案中,治疗可针对已诊断为患有相关疾病、病症和/或病状的受试者。在一些实施方案中,治疗可以针对已知具有一种或多种易感因素的受试者,所述因素在统计学上与给定疾病、病症和/或病状的发展风险增加有关。

[0137] 肿瘤:如本文所用,术语“肿瘤”是指细胞或组织的异常生长。在一些实施方案中,肿瘤可包含癌前(例如,良性)、恶性、转移前、转移和/或非转移的细胞。在一些实施方案中,肿瘤与癌症相关或者为癌症的表现。在一些实施方案中,肿瘤可以为分散性肿瘤或液体肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤可为实体肿瘤。

[0138] 变体:如本文所用,术语“变体”是指在某种程度上不同于另一型式的某物例如基因序列的型式。为了确定某物是否为变体,通常选择参考型式,且变体相对于所述参考型式为不同的。在一些实施方案中,变体可具有与野生型序列相同或不同(例如,增加或减少)的活性或功能性水平。例如,在一些实施方案中,若变体例如被密码子优化以抵抗例如抑制性核酸例如miRNA的降解,则变体与野生型序列相比可以具有改善的功能性。这种变体在本文中称为功能获得变体。在一些实施方案中,变体具有导致负面结果的活性或功能性的降低或消除或活性的变化(例如,电活动增加导致慢性去极化,这导致细胞死亡)。这种变体在本文中称为功能丧失变体。例如,在一些实施方案中,基因序列为野生型序列,其编码功能性蛋白质并存在于大多数其中基因组含有所述基因的物种的成员中。在一些此类实施方案中,功能获得变体可以为相对于野生型基因序列包含一个或多个核苷酸差异的基因序列。在一些实施方案中,功能获得变体为被密码子优化的序列,其编码的转录物或多肽与其相应野生型(例如,非密码子优化)型式相比可具有改善的性质(例如对降解的敏感性降低,例如对miRNA介导的降解的敏感性降低)。在一些实施方案中,功能丧失变体具有一种或多种产生转录物或多肽的变化,所述转录物或多肽相对于野生型转录物和/或多肽在某些方面存在缺陷(例如,功能降低、无功能)。

[0139] VEGF抑制剂:如本文所用,术语“VEGF抑制剂”与术语“抗VEGF蛋白”可互换使用。

附图说明

[0140] 图1为人耳的代表性解剖结构示意图,其包括发生前庭神经鞘瘤(VS)的常见区域。

[0141] 图2为内耳道内VS(宽度小于5mm)位置的图形表示。在此分析中,基于MRI扫描的测量结果,大多数小的耳道内VS(完全位于内耳道中的VS)靠近内耳道底部(例如,在耳蜗基部的几毫米内)而定位(Koen 2020,其以引用方式整体并入本文)。当这些38个肿瘤的起源位于内耳道长度的外侧、中间和内侧三分之一时,60%起源于外侧三分之一(内耳相邻)(Koen 2020,其以引用方式整体并入本文);当分析这些肿瘤作为内耳道长度百分比的函数的分布时(针对个体之间适度内耳道长度[mm]变化进行标准化),约85%曲线下面积位于内耳道一半的外侧(内耳相邻)(Koen 2020,其以引用方式整体并入本文)。

[0142] 图3A-图3B为内耳的示意图,指示左侧前庭系统与右侧耳蜗(鼓阶、前庭阶)之间的外淋巴的流体连续性。如美国临时专利申请63/152,832(其全部内容以引用方式并入本文)的图3A-图3B所示,外淋巴以浅紫色示出。图3A为盘绕耳蜗的示意图。所示耳蜗转数代表小鼠内耳。图3B为示出耳蜗横截面的示意图。在示意图中,鼓阶和前庭阶充满外淋巴,而中阶充满内淋巴(Talaei 2019,其以引用方式整体并入本文)。

[0143] 图4A-图4B为如本文所述的施用方法的示意图。图4A包括如本文所述的递送装置的图像(附录A,其以引用方式整体并入本文)。如所示的递送装置意欲用于通过圆窗膜耳蜗内施用注射流体,使用止动器引导插入深度。在美国临时专利申请63/152,832的图4A中,所述止动器以绿色示出,所述申请的全部内容以引用方式并入本文。图4B包括的图像示出了注射流体通过鼓阶到达前庭阶(经由耳蜗顶点的蜗孔处连通)的预期流动,且然后通过设置在椭圆窗内的递送装置的镫骨足板(stapes footplate)上的排放口流出耳蜗(Talei 2019,其以引用方式整体并入本文)。

[0144] 图5A-图5B为简化的内源性AAV构建体(图5A)和简化的重组AAV(rAAV)构建体(图5B)的示意图。

[0145] 图6A-图6D为如本文所述的示例性rAAV构建体的一系列示意图。图6A为示例性rAAV-抗VEGF构建体,其尤其包含编码免疫球蛋白重链可变结构域和免疫球蛋白轻链可变结构域的序列,所述序列被编码自裂解肽的序列隔开。这种构建体在本文中称为“V_H/V_L构建体”或“rAAV-V_H/V_L构建体”。示例性rAAV-V_H/V_L包括rAAV-雷珠单抗和rAAV-雷珠单抗-PC,其为编码雷珠单抗的rAAV-V_H/V_L。图6B为示例性rAAV-抗VEGF构建体,其尤其包含编码免疫球蛋白重链可变结构域、任选的免疫球蛋白重链恒定结构域、免疫球蛋白轻链可变结构域、任选的免疫球蛋白轻链可变结构域,以及绿色荧光蛋白(GFP)的序列。这些组分中的每一者均可以被编码自裂解肽的序列隔开。这种构建体可称为“ABGFP构建体”或“rAAV-ABGFP构建体”。示例性rAAV-ABGFP包括rAAV-雷珠单抗-GFP和rAAV-贝伐单抗-GFP,其为编码雷珠单抗或贝伐单抗的rAAV-ABGFP。图6C为示例性rAAV-抗VEGF构建体,其尤其包含编码免疫球蛋白重链(包含免疫球蛋白重链可变结构域和免疫球蛋白重链恒定结构域)和免疫球蛋白轻链(包含免疫球蛋白轻链可变结构域和免疫球蛋白轻链恒定结构域)的序列,其中所述链被编码自裂解肽的序列隔开。这种构建体在本文中称为“AB构建体”或“rAAV-AB构建体”。示例性rAAV-AB包括rAAV-贝伐单抗和rAAV-贝伐单抗-PC,其为编码贝伐单抗的rAAV-AB。图6D为示例性rAAV构建体,其尤其包含编码VEGF受体细胞外结构域1、VEGF受体细胞外结构域2和人免疫球蛋白 γ (IgG)Fc的一部分的序列。这种构建体可称为“VEGF TRAP构建体”或“rAAV-TRAP构建体”。示例性rAAV-TRAP包括rAAV-阿柏西普和rAAV-阿柏西普-PC,其为编码阿柏西普的rAAV-TRAP。

[0146] 图7包括示出使用本文所述的示例性rAAV-抗VEGF构建体的转染或转导得到的不同抗VEGF蛋白雷珠单抗和贝伐单抗的HEK细胞表达的Western印迹。沿着图顶部标注泳道,在图左侧标注预测的蛋白质大小。泳道2-8含有还原的蛋白质,而泳道10-16含有未还原的蛋白质。泳道1:预染色的PageRuler™蛋白阶梯。泳道2:未转染/阴性对照。泳道3:用rAAV-贝伐单抗-PC构建体转染。泳道4:用rAAV-雷珠单抗-GFP构建体转染。泳道5:用rAAV-雷珠单抗-PC构建体转染。泳道6:用rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒转导,其中感染复数(MOI)为 7.5×10^4 。泳道7:用rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒转导,其中MOI为 2.2×10^5 。泳道8:用rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒转导,其中MOI为 5.5×10^5 。泳道9:预染色的PageRuler™蛋白阶梯。泳道10:未转染/阴性对照。泳道11:用rAAV-贝伐单抗-PC构建体转染。泳道12:用rAAV-雷珠单抗-GFP构建体转染。泳道13:用rAAV-雷珠单抗-PC构建体转染。泳道14:用rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒转导,其中MOI为 7.5×10^4 。泳道15:用rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒转导,其中MOI为 2.2×10^5 。泳道16:用rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒转导,其中MOI为 5.5×10^5 。

[0147] 图8A-图8D为示出本文所述的某些抗VEGF蛋白的亲合力的一系列图,如通过Octet®HTX生物传感器仪器使用Octet®分析软体Data Analysis HT10.0测量的。图8A为示出对照小鼠抗人VEGF单克隆抗体(抗hVEGF MmAb)在使用重组人VEGF作为结合剂的缓冲液中的亲和力的图。在此测定中,在CM中以 $100 \mu\text{g/mL}$ 制备抗hVEGF MmAb,然后在1x动力学缓冲液中稀释至终浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 。图8B为示出使用重组人VEGF作为结合剂,用与SEQ ID NO: 90对应的rAAV-雷珠单抗-PC构建体转染的HEK细胞的培养基中分泌蛋白的亲合力的图。图8C为示出使用重组人VEGF作为结合剂,用与SEQ ID NO: 93对应的rAAV-贝伐单抗-PC构建体转染的HEK细胞的培养基中分泌蛋白的亲合力的图。图8D为示出用重组人VEGF作为结合剂,未转染的HEK细胞的对照培养基(CM)中分泌蛋白的亲合力的图。

[0148] 图9为AAV进化谱系的系统发育和祖先序列重构的图形表示。树状图模拟了具有AAV4和5血清型早期规范的AAV的进化途径,与名为Anc80的单个节点平行。红色圆圈代表通过祖先序列重构来重构的进化中间体。蓝色圆圈表示围绕AAVAnc80变体的概率序列空间库。为清楚起见,将子分支折叠起来(Zinn 2015,其以引用方式整体并入本文)。

[0149] 图10为AAVAnc80衣壳表面的结构建模的示意图。与AAV2(左)和AAV8(右)相比,VP1三聚体上氨基酸变化的结构映射使病毒粒子的外部(顶部)和内部(底部)可视化。AAVAnc80中有一些发散的残基,并且在Anc80Lib中有一些不明确且因此二态的残基。如美国临时专利申请63/152,832(其全部内容以引用方式并入本文)的图10中所示,发散的残基以蓝色示出,而不明确且二态的残基以红色示出。

[0150] 图11包括描绘了新生小鼠中经由圆窗膜递送进行天然存在的AAV血清型和AAVAnc80变体的体内耳蜗转导的代表性荧光图像。向小鼠(P1)注射不同AAV衣壳(AAV1、AAV2、AAV8、AAV6[未示出]和AAVAnc80),其包含编码增强型GFP(eGFP)的构建体。标记肌动蛋白的鬼笔环肽在美国临时专利申请63/152,832的图11中以红色示出,所述申请的全部内容以引用方式并入本文。在递送包含编码增强型GFP的构建体(rAAVAnc80-eGFP)的rAAVAnc80之后,eGFP阳性内毛细胞(IHC)和外毛细胞(OHC)的量化示出自基部至顶点大约90%至100%的转导效率(Landegger 2017,其以引用方式整体并入本文)。

[0151] 图12包括描绘了新生小鼠中经由圆窗膜递送进行rAAVAnc80颗粒的体内前庭转导

的代表性荧光图像。向小鼠 (P1) 注射了AAVAnc80-eGFP和肌动蛋白标记的鬼笔环肽染色。在美国临时专利申请63/152,832的图12中,eGFP以绿色示出且鬼笔环肽以红色示出,所述申请的全部内容以引用方式并入本文。在椭圆囊的I型和II型毛细胞(图(A))以及半规管脊的细胞(图(B))中均观察到转导(Landegger2017,其以引用方式整体并入本文)。

[0152] 图13包括描绘在成年小鼠中经由后半规管递送进行rAAVAnc80颗粒的体内耳蜗转导的代表性荧光图像。向小鼠(7周龄)注射rAAVAnc80-eGFP颗粒。图(A)包括注射耳蜗的中蜗轴部分的低放大率视图,示出在图中称为(I)的IHC、在图中称为(O)的OHC、在图中称为(SL)的螺旋缘、在图中称为(RM)的赖斯纳膜、和在图中称为(SG)的螺旋神经节中的eGFP信号。图(B1)和图(B2)包括自耳蜗的顶端区域(图(B1))和中部(图(B2))区域的柯蒂氏器官的高放大率视图。eGFP阳性细胞的量化表明,大约100% IHC被转导,而OHC转导自顶点到基部减少。图(C)为低放大率视图,其示出在螺旋神经节的细胞子集(神经元和卫星神经胶质细胞)中检测到eGFP信号(Suzuki 2017,其以引用方式整体并入本文)。此图中提供的图的彩色图像在美国临时专利申请63/152,832的图13中示出,所述申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0153] 图14包括描绘在成年小鼠中经由后半规管递送进行rAAVAnc80-eGFP的体内前庭转导的代表性荧光图像。向小鼠(7周龄)注射rAAVAnc80-eGFP。图(A1)和图(A2)包括穿过前庭的部分的低放大率视图,其示出椭圆囊和球囊中的eGFP信号。图(B)和图(C)包括穿过前庭终末器官的部分的高放大率视图(图(B):椭圆囊;图(C):壶腹脊),其示出支持细胞和毛细胞中的eGFP表达。实心箭头表示示例性转导支持细胞(未指明毛细胞)(Suzuki 2017,其以引用方式整体并入本文)。此图中提供的图的彩色图像在美国临时专利申请63/152,832的图14中示出,所述申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0154] 图15包含描绘在成年小鼠中,经由圆窗膜递送与管开窗,与rAAVAnc80变体相比的天然存在的AAV2血清型的体内耳蜗和前庭转导的代表性荧光图像。向小鼠(4周龄)注射编码eGFP的不同AAV颗粒(此处示出AAV2和rAAVAnc80;未示出AAV1、AAV8和AAV9)。与AAV2相比,经rAAVAnc80介导的转导表现出相当的IHC和OHC转导率(图(A1)与图(A2))但螺旋神经节细胞(图(B1)与图(B2))和球囊的毛细胞(图(C1)与图(C2):全形封闭(whole mounts);图(D1)与图(D2):部分)的转导更广泛(Omichi 2020,其以引用方式整体并入本文)。此图中提供的图的彩色图像在美国临时专利申请63/152,832的图15中示出,所述申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0155] 图16A-图16B为用包含如本文公开的抗VEGF蛋白的rAAVAnc80颗粒(rAAVAnc80-抗VEGF)转导WT新生(P2)小鼠耳蜗外植体后,耳蜗外植体中RNA表达和耳蜗外植体培养基中分泌蛋白表达的图形表示。rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒(根据SEQ ID NO:93的构建体)或rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒(根据SEQ ID NO:90的构建体)转导WT小鼠耳蜗外植体中的细胞且驱动编码抗VEGF蛋白的mRNA的表达和分泌。图16A描绘了RNA表达分析,并展示了在分别接受rAAVAnc80-雷珠单抗-PC或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC的外植体细胞中编码雷珠单抗和贝伐单抗的mRNA的表达。在接受媒介物的外植体中未检测到表达。结果表示为平均值+SD。图16B描绘了在接受不同浓度(1.4E10、2.8E10或4.2E10 vg)rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒的外植体培养基中检测到的雷珠单抗的Meso Scale Discovery (MSD)介导的量化;在接受rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒的外植体而非接受媒介物的外植体的培养基中检测到雷珠

单抗。开圆 (open circles) 表示单个样品 ($n=4$ /组) 中的雷珠单抗浓度, 而条表示平均值。

[0156] 图17包括来自第一项研究(本文称为“研究1”)的代表性低放大率荧光染色图像, 描绘了用如本文所述的rAAVAnc80-抗VEGF颗粒转导的CBA/CaJ小鼠的内耳。图像为耳蜗内施用 $1.4E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-雷珠单抗-PC(根据SEQ ID NO:90的构建体)颗粒、 $1.2E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-贝伐单抗-PC(根据SEQ ID NO:93的构建体)颗粒或媒介物对照之后, 显微解剖耳蜗的中圈的耳蜗显微照片。用针对鬼笔环肽的初级抗体、毛细胞标记物(在这些显微照片中也显示螺旋缘的微弱非特异性标记)和雷珠单抗(“抗Fab染色”)对感觉上皮进行免疫染色, 以便检测抗VEGF蛋白表达。如美国临时专利申请63/152,832(其全部内容以引用方式并入本文)的图17中所示, 鬼笔环肽以红色示出且雷珠单抗以绿色示出。人抗雷珠单抗抗体用于检测蛋白质的Fab区段, 所述区段在雷珠单抗与贝伐单抗之间共享。在IHC和OHC侧面的支持细胞中检测到清晰的标记。在耳蜗神经纤维区域检测到背景染色(例如, 对于注射颗粒和注射媒介物的耳蜗, 神经元纤维的标记为明显的), 从而阻止了在此特定区域进行可靠表达评估。

[0157] 图18包括来自研究1的代表性荧光染色图像, 其描绘了与未注射和/或媒介物注射的对照相比, 用 $1.4E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-雷珠单抗-PC(根据SEQ ID NO:90的构建体)颗粒或 $1.2E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-贝伐单抗-PC(根据SEQ ID NO:93的构建体)颗粒转导的CBA/CaJ小鼠的内耳。用抗肌球蛋白VIIa抗体对IHC和OHC进行免疫染色, 并使用公开的耳蜗图(Viberg和Canlon, 2004, 其以引用方式整体并入)在8、16和32kHz区域成像。对照未注射耳朵图像来自对照媒介物注射耳朵对侧的耳朵。比例尺=20 μ M。此图中提供的图的彩色图像在美国临时专利申请63/152,832的图18中示出, 所述申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0158] 图19包括来自研究1的代表性共聚焦图像, 其描绘了用rAAVAnc80-雷珠单抗-PC(根据SEQ ID NO:90的构建体)转导的CBA/CaJ小鼠群体的转导毛细胞和神经元。图(A)和图(C)代表用抗Fab抗体免疫染色的转导细胞。图(B)和图(D)代表用抗神经丝200免疫染色的神经元突起。媒介物注射样品(图(A)和(B))和rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒注射样品(图(C)和(D))在内沟区域中而非在柯蒂氏器官中具有转导神经元突起。仅rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒注射样品具有转导内毛细胞和外毛细胞。比例尺=20 μ M。此图中提供的图的彩色图像在美国临时专利申请63/152,832的图19中示出, 所述申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0159] 图20A-图20B为研究1的图形表示, 其描绘了与未注射和/或媒介物注射的对照相比, 用 $1.4E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-雷珠单抗-PC(根据SEQ ID NO:90的构建体)颗粒或 $1.2E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-贝伐单抗-PC(根据SEQ ID NO:93的构建体)颗粒转导的CBA/CaJ小鼠的IHC和OHC计数直方图。在此分析中使用的数据集的代表性群体示于图18中。图20A描绘了未注射对照、媒介物注射对照和测试制品的OHC计数。图20B描绘了未注射对照、媒介物注射对照和测试制品的IHC计数。对图20A和图20B的计数进行量化并作为治疗组和频率区域的函数来绘制。各组的N为9或10只动物, 且数据表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差(S.E.M)。对照未注射耳朵的量化来自对照媒介物注射耳朵对侧的耳朵。与除支架外的未注射耳朵相比, 得到 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 和 $***p<0.001$ 。p值通过双因素方差分析、随后事后Tukey检验确定。

[0160] 图21A-图21B为毛细胞(HC)和非毛细胞(非HC)的转导频率的图形表示。在此分析中使用的数据集的代表性群体示于图18中。图21A描绘了未注射对照、媒介物注射对照和测试制品的毛细胞(HC)计数。图21B描绘了未注射对照、媒介物注射对照和测试制品的非毛细胞(非HC)计数。数据来自研究1,且代表用 $1.4E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-雷珠单抗-PC(根据SEQ ID NO:90的构建体)颗粒或 $1.2E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-贝伐单抗-PC(根据SEQ ID NO:93的构建体)颗粒转导的CBA/CaJ小鼠的群体。将转导的(Fab+)毛细胞(图21A)和非毛细胞(图21B)的量化作为治疗组和频率区域的函数,并以组合了两种性别的数据来绘制。各组的N为9或10只动物,且数据表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差(SEM)。对照未注射耳朵量化来自对照媒介物注射耳朵对侧的耳朵。由于样品之间的差异,未进行统计学比较。

[0161] 图22包括来自研究2的代表性高放大率图像,其描绘了 $1.4E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-雷珠单抗-PC(根据SEQ ID NO:90的构建体)颗粒进行耳蜗转导的荧光染色。示出了来自注射耳蜗(63X)的三个区域的耳蜗显微照片,其示出了抗雷珠单抗(mAb)标记。各行代表通过自注射小鼠获得的共聚焦图像堆栈的最大投影,且各列代表来自耳蜗顶点(8kHz)、中部(16kHz)和底部(32kHz)的频率区域。各列右侧列出免疫染色呈阳性的主要细胞类型。在耳蜗神经纤维区域检测到大量背景染色(例如,对于注射耳蜗和未注射耳蜗,神经元纤维的标记为明显的[未注射耳蜗未示出]),从而阻止了在此特定区域进行可靠表达评估。此图中提供的图的其中抗雷珠单抗标记为绿色的彩色图像在美国临时专利申请63/152,832的图22中示出,所述申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0162] 图23为来自研究2的血清中分泌的抗VEGF蛋白的检测和量化的图形表示,且为在耳蜗内递送 $1.4E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-雷珠单抗-PC(根据SEQ ID NO:90的构建体)颗粒之后。使用meso scale discovery在注射rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒的小鼠血清中检测到抗VEGF蛋白,其水平高于注射媒介物的小鼠血清中的水平。开圆表示单个样品(媒介物, $n=7$;雷珠单抗, $n=9$)中的抗VEGF蛋白浓度,而条表示平均值。

[0163] 图24为来自研究1的小鼠脑脊髓液(CSF)中分泌的抗VEGF蛋白的检测和量化的图形表示,且为在耳蜗内递送 $1.4E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-雷珠单抗-PC(根据SEQ ID NO:90的构建体)颗粒或 $1.2E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-贝伐单抗-PC(根据SEQ ID NO:93的构建体)颗粒之后。使用MSD在施用rAAVAnc80-抗VEGF颗粒的小鼠的CSF中而非在施用媒介物的小鼠的CSF中检测到抗VEGF蛋白(雷珠单抗或贝伐单抗)。开圆表示单个样品(媒介物, $n=10$;雷珠单抗, $n=9$;贝伐单抗, $n=4$)中的抗VEGF蛋白浓度,而条表示平均值。

[0164] 图25为耳蜗内递送 $1.4E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-雷珠单抗-PC(根据SEQ ID NO:90的构建体)颗粒或 $1.2E10$ vg/耳蜗的rAAVAnc80-贝伐单抗-PC(根据SEQ ID NO:93的构建体)颗粒之前和之后的研究1小鼠听觉脑干反应(ABR)阈值的图形表示。耳蜗内手术后所有组的平均ABR阈值均升高,包括媒介物和rAAVAnc80颗粒注射小鼠。在rAAVAnc80颗粒和媒介物注射耳朵中,相对于手术前测量的基线ABR,平均ABR阈值升高。误差条代表标准偏差。

[0165] 图26A-图26B为耳蜗内递送rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒(根据SEQ ID NO:90的构建体)后研究2小鼠畸变产物耳声发射(DPOAE)和ABR阈值的图形表示。耳蜗和听觉功能(分别为DPOAE图26A和ABR图26B)证明了当与未注射小鼠相比时,在施用示例性rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒的小鼠中的正常平均阈值。*表示在功能测试期间施用rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒的一只小鼠死亡,因此在此时间之前在此动物中仅测量了DPOAE和啁啾诱发的

ABR;因此,对于8、16和32kHz ABR,N=2。误差条代表标准偏差。

[0166] 图27A-图27B提供了示意性描述和图形模型,其描绘了与至VS的距离相比的抗VEGF蛋白浓度(使用来自提供rAAVAnc80-雷珠单抗颗粒(根据SEQ ID NO:91的构建体)的NHP的测量浓度来建模)。图27A为计算建模方法的示意图:其描绘了90- μ L球体中恒定来源的抗VEGF蛋白相对于距球体表面(例如鼓阶/底部边界)的距离(以mm为单位)的三维扩散。根据自Koen 2020获得的数据估计自底部到肿瘤内侧和外侧边界的距离(<5mm宽),所述文献以引用方式整体并入本文(紧邻图2)。图27B代表保守建模方法,其示出外淋巴抗VEGF蛋白浓度随扩散距离而降低,但在内耳道肿瘤附近内仍保持在报告的生物活性范围内(Y轴上10-100%与X轴上0-11mm之间的区域)。估计的抗VEGF蛋白浓度随扩散系数的选择而变化,所述扩散系数表示为基于三个报告的扩散系数的范围(带实心点的阴影区域)。美国临时专利申请63/152,832的图27B中提供了带有阴影的图27B的彩色图像,所述申请的全部内容以引用方式并入本文。估计生物活性范围和预测治疗相关范围为约28ng/mL;在体外细胞增殖测定中将VEGF-A的生物活性抑制50%所需的浓度为11至27ng/mL,如Genentech 2017中所述,其以引用方式整体并入本文)。

[0167] 图28描绘了接受AAVAnc80-eGFP的耳蜗内(RWM)施用和镫骨足板排放的七个NHP(6个单侧,1个双侧)和接受AAVAnc80-eGFP的耳蜗内(RWM)施用而无镫骨足板排放的两个NHP(双侧)的内毛细胞(IHC)转导事件。在3周生命周期后,分析了耳蜗在IHC中的eGFP表达。在较高剂量下(如NHP M6-M9所见)可达成猕猴IHC中的约80%至100%的转导效率,而在较低剂量下(如NHP M1-M3所见)观察到eGFP表达的顶端至基部梯度。对于接受手术而无镫骨足板排放的动物,仅观察到在耳蜗顶端75%的耳蜗区域发生零星转导。

[0168] 图29阐明根据本公开的方面的用于将流体递送到内耳的装置的透视图。

[0169] 图30阐明根据本公开的方面的弯针子组件的侧视图。

[0170] 图31阐明根据本公开的方面的用于将流体递送到内耳的装置的透视图。

[0171] 图32阐明根据本公开的方面的耦合至装置远端的弯针子组件的透视图。

[0172] 图33是实施例12中使用的实验设置的示意图。

[0173] 图34A-34C是一系列图形表示,描绘在NHP中耳蜗内递送rAAVAnc80-雷珠单抗颗粒后的平均ABR阈值偏移。示出在耳蜗内注射媒介物(图34A)或 6.0×10^{10} vg/耳蜗(图34B)或 3.0×10^{11} vg/耳蜗(图34C)剂量的rAAVAnc80-雷珠单抗颗粒后1、2、3和6个月的ABR阈值的偏移(相对于在耳蜗内注射之前在同一耳朵中获得的基线ABR)。每个时间点的组平均值($\pm$ SD)反映研究中每个NHP的双侧测量值。

[0174] 图35是实施例14中使用的实验设置的示意图。

[0175] 图36是示出对于AAV-抗VEGF的每种剂量,NHP的外淋巴中的抗VEGF浓度的图表。每个剂量组具有3个NHP,并且媒介物组具有2个NHP。

[0176] 图37是示出在距内耳道(IAC)底部的不同距离处的估计的抗VEGF浓度(y轴)的计算建模的图表。所报告的生物活性阈值浓度与图27中所述的生物活性阈值浓度相似。红色阴影区域表示已报告早期前庭神经鞘瘤(VS)的位置(Koen等人,2020)的报告。着色线显示来自每个建模剂量的抗VEGF蛋白的估计量。预期所有剂量的AAV-抗VEGF在通常发现VS肿瘤的位置产生超过生物活性阈值的抗VEGF蛋白水平。

[0177] 图38是实施例15中使用的实验设置的示意图。

[0178] 图39A-39C描绘定量耳蜗显微照片中的蛋白质表达的方法。

[0179] 图40A-40D是描绘在所有测试的剂量下,在三个频率位置(0.25kHz、4kHz和22.6kHz)中耳蜗中的抗VEGF蛋白表达的代表性图像。图40A示出第1个月的抗VEGF蛋白表达。图40B示出第6个月的抗VEGF蛋白表达。图40C示出特化毛细胞中的抗VEGF、鬼笔环肽和赫斯特(Hoechst)染色,所述特化毛细胞包括内毛细胞、柱细胞、外毛细胞、Hensen细胞和克劳氏细胞。图40D是图40C中的图像的一部分的高分辨率放大。

[0180] 图41是示出来自63x显微照片的NHP耳蜗中的抗VEGF表达的图表。数据显示在用媒介物对照或用1X、2X和4X剂量的AAV抗VEGF治疗的动物中在第1、3和6个月的抗VEGF表达。对于图表上的每组三个条形,第一个条形表示来自第1个月的数据,第二个条形表示来自第3个月的数据,并且最后一个条形表示来自第6个月的数据。显示了相对于媒介物对照的抗VEGF蛋白表达,并在所有耳蜗频率位置上求和。

[0181] 图42A-42B是描绘在三个频率位置:0.25kHz、4kHz和22.6kHz中在所有研究组的NHP耳蜗中的总体毛细胞存活的图表。用媒介物对照或用1X、2X或4X剂量的AAV抗VEGF治疗动物。对于图42A和图42B中的每个频率位置,第一个、第四个、第七个和第十个条形表示来自第1个月的数据,第二个、第五个、第八个和第十一个条形表示来自第3个月的数据,并且第三个、第六个、第九个和第十二个条形表示来自第6个月的数据。图42A示出内毛细胞存活,并且图42B示出外毛细胞存活。

具体实施方式

[0182] 在某些实施方案中,本公开涉及一种意欲用于治疗患有与血管新生相关的耳科疾病的受试者的rAAV-抗VEGF颗粒。在某些实施方案中,此种与血管新生相关的耳科疾病为前庭神经鞘瘤(VS)或在耳道内的前庭耳蜗神经周围的细胞中形成的良性肿瘤。在某些实施方案中,与早期VS相关的常见症状包括听力损失、耳鸣和头晕;随着肿瘤继续生长,它们会压迫脑干,这代表对更严重发病率和在极少数情况下对死亡率的重大关注。

[0183] 在某些实施方案中,本公开涉及一种意欲用于治疗患有例如像本文所述的耳内病症的受试者的rAAV-抗VEGF颗粒。在一些实施方案中,耳内病症包括前庭神经鞘瘤或II型神经纤维瘤病。在一些实施方案中,耳内病症为或包含前庭神经鞘瘤。在一些实施方案中,耳内病症为或包含II型神经纤维瘤病。

[0184] 在一些实施方案中,本公开涉及一种意欲用于治疗患有前庭神经鞘瘤的受试者的rAAV-抗VEGF颗粒。

[0185] 在某些情况下,使用血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂的治疗提供了减轻进行性VS肿瘤的机会,而非使用当前标准护理侵入性替代方法,诸如手术切除和/或放射治疗。在某些实施方案中,临床数据自功效角度支持在患有VS肿瘤的患者中使用全身施用的VEGF抑制剂;然而,长期全身施用VEGF抑制剂与重大安全问题有关。在某些实施方案中,rAAV-抗VEGF被设计并意欲通过将基因转移到内耳以促进抗VEGF蛋白的局部表达和分泌来治疗患有VS的个体。在某些实施方案中,目标为在VS位点提供治疗性VEGF抑制剂(例如抗VEGF蛋白,例如贝伐单抗、雷珠单抗和/或阿柏西普)的局部暴露,从而限制全身暴露并使与全身施用相关的不良反应的可能性(potential)最小化。

[0186] 在某些实施方案中,内耳的耳蜗和前庭细胞被rAAV-抗VEGF转导,并将抗VEGF蛋白

分泌到外淋巴:所述外淋巴为与VS肿瘤所在的前庭耳蜗神经的间质和神经周围空间保持扩散连续性的耳蜗液。在某些实施方案中,缺乏沿内耳道扩散的屏障为在外淋巴中表达的治疗性抗VEGF蛋白到达神经间质中的预期VS靶标提供了潜在途径。在某些实施方案中,耳蜗轴的转导细胞被定位以将所需抗VEGF蛋白直接分泌到神经间质液中。

[0187] 在某些实施方案中,经由单侧耳蜗内注射向患有单侧(例如,散发性)进行性VS的个体(例如,哺乳动物,例如有需要的人患者)施用递增剂量的本文所述的组合物(例如,包含rAAV-抗VEGF)。在某些实施方案中,这些肿瘤的生长速率为可变的,且一些VS肿瘤不会进展,在某些实施方案中,个体(例如哺乳动物,例如人)可能限于肿瘤展示明确进展证据的那些个体,排除在连续成像评价中具有稳定肿瘤证据的那些个体。在某些实施方案中,这些肿瘤的生长速率为可变的,且一些VS肿瘤不会进展,在某些实施方案中,个体(例如哺乳动物,例如有需要的人患者)可能限于肿瘤展示明确缺乏进展证据的那些个体,排除在连续成像评价中具有增加肿瘤体积证据的那些个体。

[0188] 在某些实施方案中,具有较大肿瘤(例如,具有更大压迫脑干潜力的肿瘤)的个体(例如,哺乳动物,例如,有需要的人患者)自用本文所述的组合物的治疗中排除,因为在一些实施方案中,这些个体处于潜在威胁生命的肿瘤相关后遗症的高风险中,这些后遗症可以使用手术切除和放射治疗的当前标准护理来潜在地避免。在某些实施方案中,患有较大肿瘤(例如,患有压迫脑干的更大潜力的肿瘤)的个体(例如,哺乳动物,例如,有需要的人患者)明确地为使用本文所述的组合物的治疗所靶向,因为在一些实施方案中,这些个体处于潜在威胁生命的肿瘤相关后遗症的高风险下,与手术切除和放射治疗的当前标准护理相比,这些后遗症可以使用如本文所述的组合物以更少侵入方式和/或以更大或相等功效来潜在地避免。

[0189] 在某些实施方案中,具有生长肿瘤的个体(例如哺乳动物,例如人),其中肿瘤大小不太可能影响脑干,有可能自使用如本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF疗法)的介入中获得最大益处,同时根据需要仍然为未来手术切除和/或放射治疗的候选者。在某些实施方案中,具有生长肿瘤的个体(例如哺乳动物,例如人),其中肿瘤大小可能影响脑干,有可能自使用本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF疗法)的介入中获得最大益处,同时根据需要仍然为未来手术切除和/或放射治疗的候选者。

[0190] 在某些实施方案中,本文提供的方法包括将有效量(例如治疗有效量)的包含构建体核苷酸序列的rAAV颗粒引入到个体(例如哺乳动物,例如,人)的内耳中,所述构建体核苷酸序列编码:(a)包含与信号肽可操作地连接的抗体重链可变结构域的多肽和包含与信号肽可操作地连接的抗体轻链可变结构域的多肽;或(b)包含与信号肽可操作地连接的抗原结合抗体片段(例如Fab或scFv)的多肽。

[0191] 在某些实施方案中,如本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)可由耳外科医生在受控的无菌条件下在手术室中施用。

[0192] 在一些实施方案中,本文提供用于增加个体(例如哺乳动物,例如有需要的人)的内耳和/或内耳道中的抗体的水平的方法,所述方法包括:将有效量(例如治疗有效量)的rAAV颗粒引入到哺乳动物的内耳中,所述颗粒包含编码以下的核苷酸序列:(a)包含与信号肽可操作地连接的抗体重链可变结构域的多肽和包含与信号肽可操作地连接的抗体轻链可变结构域的多肽;或(b)包含与信号肽可操作地连接的抗原结合抗体片段(例如Fab或

scFv)的多肽;其中所述引入导致个体(例如哺乳动物,例如人)的内耳中抗体或抗原结合抗体片段的水平增加。

[0193] 在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗个体(例如哺乳动物,例如有需要的人)中的内耳病症的方法,其包括将有效量(例如治疗有效量)的rAAV颗粒引入到哺乳动物的内耳中,所述颗粒包含编码以下的核苷酸序列:(a)包含与信号肽可操作地连接的抗体重链可变结构域的多肽和包含与信号肽可操作地连接的抗体轻链可变结构域的多肽;或(b)包含与信号肽可操作地连接的抗原结合抗体片段的多肽;其中所述引入导致哺乳动物中的内耳病症的治疗。

[0194] 在一些实施方案中,本文提供了减少个体(例如哺乳动物,例如有需要的人)的内耳中的VEGF活性的方法,其包括将有效量(例如治疗有效量)的rAAV颗粒引入到哺乳动物的内耳中,所述颗粒包含编码以下的核苷酸序列:(a)包括与信号肽可操作地连接的抗体重链可变结构域的多肽和包含与信号肽可操作地连接的抗体轻链可变结构域的多肽;或(b)包含与信号肽可操作地连接的抗原结合抗体片段(例如,Fab或scFv)的多肽;其中(a)的多肽编码特异性结合至VEGF并减少VEGF活性的抗体,(b)的多肽编码特异性结合至VEGF并减少VEGF活性的抗原结合抗体片段;且其中所述引入导致个体(例如哺乳动物或人)的内耳中的VEGF活性减少。

[0195] 在一些实施方案中,本文提供了治疗个体(例如哺乳动物,例如人)的内耳中与血管新生相关的耳科疾病(例如,VS或II型神经纤维瘤病)的方法,所述方法包括:将有效量(例如,治疗有效量)的rAAV颗粒引入到个体的内耳中,所述颗粒包含编码以下的核苷酸序列:(a)包含与信号肽可操作地连接的抗体重链可变结构域的多肽和包含与信号肽可操作地连接的抗体轻链可变结构域的多肽;或(b)包含与信号肽可操作地连接的抗原结合抗体片段(例如Fab或scFv)的多肽;其中(a)的多肽编码特异性结合至VEGF且减少VEGF活性的抗体,(b)的多肽编码特异性结合至VEGF且减少VEGF活性的抗原结合抗体片段;且其中所述引入导致个体的内耳中与血管新生相关的耳科疾病(例如VS)的治疗。

[0196] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括将有效量(例如,治疗有效量)的rAAV颗粒引入到个体(例如哺乳动物,例如人)的内耳中,所述颗粒包含编码与信号肽可操作地连接的可溶性VEGF受体的核苷酸序列。

[0197] 在一些实施方案中,本公开提供了用于增加有需要的个体(例如哺乳动物,例如人)的内耳中可溶性VEGF受体的水平的方法,其包括将有效量(例如,治疗有效量)的rAAV颗粒引入到个体的内耳中,所述颗粒包含编码与信号肽可操作地连接的可溶性VEGF受体的核苷酸序列;其中所述引入导致个体内耳中可溶性VEGF受体的水平增加。

[0198] 在一些实施方案中,本文提供了用于治疗有需要的个体(例如哺乳动物,例如人)的内耳病症的方法,其包括将有效量(例如,治疗有效量)的rAAV颗粒引入到个体的内耳中,所述颗粒包含编码与信号肽可操作地连接的可溶性VEGF受体的至少一部分的核苷酸序列;其中所述引入导致个体中的内耳病症的治疗。

[0199] 在一些实施方案中,本文提供了减少有需要的个体(例如哺乳动物,例如人)的内耳中的VEGF活性的方法,其包括将有效量(例如,治疗有效量)的rAAV颗粒引入到个体的内耳中,所述颗粒包含编码与信号肽可操作地连接的可溶性VEGF受体的至少一部分的核苷酸序列;其中所述引入导致个体的内耳中的VEGF活性减少。

[0200] 在一些实施方案中,本文提供了治疗个体(例如哺乳动物,例如人)的内耳(包括例如内耳道)中与血管新生相关的耳科疾病VS或2型神经纤维瘤病的方法,其包括将有效量(例如,治疗有效量)的rAAV颗粒引入到个体的内耳中,所述颗粒包含编码与信号肽可操作地连接的VEGF受体的至少一部分的核苷酸序列;其中所述引入分别导致个体的内耳中与血管新生相关的耳科疾病VS或II型神经纤维瘤病的治疗。

[0201] 在其他实施方案中,本公开还提供了包含本文所述的任何rAAV颗粒的药盒。

[0202] 组合物、药盒和方法的其他非限制性方面在本文中描述,且可无限地以任何组合使用。

[0203] 本公开尤其提供了例如使用本文公开的组合物治疗患有与血管新生相关的耳科疾病例如VS的个体的基因治疗方法,其通过在与内耳道中的VS肿瘤环境紧邻并与其扩散连续的耳蜗和前庭系统的细胞中局部表达分泌的抗VEGF蛋白来进行。在一些实施方案中,所述方法包括使用包含构建体的rAAV颗粒将基因转移至耳蜗,所述构建体含有编码抗VEGF蛋白(rAAV-抗VEGF)的互补DNA(cDNA)。不希望受理论束缚,据信在一些实施方案中,rAAV-抗VEGF(例如,rAAVAnc80-抗VEGF)转导的内耳的耳蜗和前庭细胞可以将抗VEGF蛋白分泌到外淋巴和前庭耳蜗神经(由上、下前庭神经和耳蜗神经组成)的间质和神经周围空间。大多数VS肿瘤起源于内耳道的最靠近耳蜗的外侧三分之一处,所述内耳道容纳前庭耳蜗神经(图1-图3)。缺乏沿此耳道扩散的屏障导致耳蜗神经浸入连续流体中,其中外淋巴在其外侧末端且CSF在其内侧末端;因此,自外淋巴扩散到神经间质中为在外淋巴中表达的治疗性抗VEGF蛋白到达预期VS靶标提供了潜在途径。虽然VEGF抑制剂导致肿瘤控制和消退的确切机制尚不完全清楚,但在一些实施方案中,机制包括通过抑制内皮细胞增殖来降低血管通透性和/或异常血管生成,以及肿瘤血管系统的正常化(Brastianos 2009,其以引用方式整体并入本文)。

[0204] 迄今为止,尚无包括使用rAAV颗粒转移到人的内耳中的已知基因转移临床试验;然而,评价包含编码人无调转录因子(Hath1)的互补DNA(cDNA)的构建体的腺病毒颗粒用于治疗严重至重度听力损失的临床试验于2014年启动,并于2019年完成(Clinicaltrials.gov 2020a[NCT02132130],其以引用方式整体并入本文)。

[0205] 在一些实施方案中,本文公开的递送方法包括用于转导内耳细胞的合成AAV衣壳(例如,AAVAnc80)和/或用于直接靶向递送至耳蜗的装置。

[0206] VS患者的当前标准护理包括多种方法和多个治疗目标(Doherty2006;Kaul 2018,其中每一者以引用方式整体并入本文)。治疗包括成像/观察、手术和放射治疗。治疗目标可以包括保留听力,但通常患者出现完全或部分耳聋,且肿瘤的大小和生长可以要求采取更积极的介入措施,所述介入措施接受听力损失作为必然的治疗结果。手术和放射治疗都会带来不良反应;重要地,与单独观察相比,两者都与生活品质指标的改善无关(Carlson 2015,其以引用方式整体并入本文),因此显然需要可以减轻肿瘤生长影响的较小侵入性治疗。

[0207] 全身施用贝伐单抗控制NF2患者的肿瘤生长和相关听力损失的临床功效并非没有显著风险,因为维持治疗益处所需的持续静脉输注也增加了严重并发症的风险;在对使用贝伐单抗用于NF2的研究进行的荟萃分析中,基于对包含125名患者的五个临床试验群体的荟萃分析,严重毒性(3级或4级)的合并发生率为17%(Lu 2019,其以引用方式整体并入本

文)。高血压、蛋白尿、肝酶升高、动脉血栓栓塞事件 (ATE)、静脉血栓栓塞事件、出血以及手术和伤口愈合并发症均与高剂量的贝伐单抗治疗有关 (Chen 2009; Hanna 2019, 其中每一者均以引用方式整体并入本文)。本文尤其公开了一种治疗VS的替代方法, 例如, 其不需要高水平的循环抗VEGF蛋白 (例如贝伐单抗), 且在一些实施方案中, 可以在与全身暴露于治疗分子相关的事件方面对患者呈现较低风险。

[0208] 在一些实施方案中, 使用耳蜗内施用途径将rAAV-抗VEGF递送至内耳、转导内耳细胞且随后表达和/或分泌抗VEGF蛋白 (例如, 贝伐单抗、雷珠单抗和/或阿柏西普) 可以在肿瘤附近产生持续治疗药物储库。在一些实施方案中, 被rAAV-抗VEGF转导的内耳的耳蜗和前庭细胞可以将抗VEGF蛋白分泌到附近腔室 (例如, 外淋巴和耳蜗轴的细胞, 例如螺旋神经节神经元和卫星神经胶质细胞) 中, 且/或可以将蛋白质直接分泌到耳蜗神经的间质液中。在一些实施方案中, 缺乏沿内耳道扩散的屏障导致耳蜗神经浸入连续流体中, 外淋巴在其外侧末端 (最接近于耳蜗, 大部分VS肿瘤起源于此处 [图1-图3]) 且CSF在其内侧末端。在一些实施方案中, 自外淋巴扩散到神经间质中为在外淋巴中表达的治疗性抗VEGF蛋白到达预期VS靶标提供了潜在途径。

[0209] 在一些实施方案中, 使用耳蜗内施用途径将rAAV-抗VEGF递送至内耳、转导内耳细胞且随后表达和/或分泌抗VEGF蛋白 (例如, 贝伐单抗、雷珠单抗和/或阿柏西普) 导致非耳蜗组织或流体隔室中非治疗相关或不可检测水平的抗VEGF蛋白。在一些实施方案中, 抗VEGF蛋白以非治疗相关或不可检测的水平存在于血清、CSF、肝脏、脾脏、脑干、听觉皮层、下颌淋巴结或其组合中。

[0210] 在一些实施方案中, 尽管与来自血流的抗VEGF蛋白的外渗相比, 进入和中和VEGF的扩散途径不同, 但在肿瘤表面局部暴露于抗VEGF蛋白仍可控制肿瘤生长。例如, Lichtenbeld等人, 1999 (其以引用方式整体并入本文) 将抗VEGF蛋白局部应用于小鼠肿瘤并观察到血管通透性显著降低, 与在小鼠中以类似程度达成血管通透性降低的全身剂量相比, 上述剂量显著降低了20倍 (Yuan 1996, 其以引用方式整体并入本文)。

[0211] 不希望受理论束缚, 据信在一些实施方案中, 在VS周围的流体中低水平但持续地暴露于抗VEGF蛋白可以通过各种机制例如像降低肿瘤血管通透性和使肿瘤血管系统正常化来稳定和/或减少肿瘤生长。在一些实施方案中, 通过使抗VEGF蛋白的循环水平最小化, 将rAAV-抗VEGF局部递送至耳部以及所产生的肿瘤微环境中的抗VEGF蛋白暴露可提供持久治疗益处, 同时使与全身抗VEGF蛋白施用相关的不良事件的风险最小化。

[0212] 前庭神经鞘瘤 (VS)

[0213] VS (也称为听神经瘤) 为一种良性、通常生长缓慢的肿瘤 (或多个肿瘤), 由将前庭耳蜗神经 (也称为颅神经VIII) 插入鞘的雪旺细胞 (Schwann cell) 瘤形成引起。VS通常起源于前庭耳蜗神经的上前庭分支或下前庭分支, 所述神经负责将关于声音和平衡的信息自内耳传递到大脑 (参见例如图1-图3)。这些肿瘤通常发生在内耳道内 (例如, 紧邻内耳) 且可以延伸到小脑桥脑角; 它们可以作为散发性单侧肿瘤发生, 或者不太常见地作为双侧肿瘤发生, 这通常发生在2型神经纤维瘤病 (NF2) 的情况下。VS发生的常见区域为沿着前庭耳蜗神经 (参见例如图1-图3)。较小耳道内肿瘤 (宽度小于5mm) 可以出现在例如内耳道的外侧三分之一内, 最靠近耳蜗 (Koen 2020, 其以引用方式整体并入本文)。

[0214] 与VS相关的常见症状包括听力损失、耳鸣和头晕。随着肿瘤继续生长且扩张至内

耳道以外并进入颅腔,它们会压迫脑干,这代表了对更严重发病率和生存威胁的重大关注。在当前标准护理中,小的或非生长的肿瘤之后可能仅需要观察,而手术切除和/或放射治疗则被指示用于较大和/或进展性肿瘤。

[0215] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法可以减少和/或改善与VS和/或用于治疗VS的当前标准护理方法相关的症状。此类症状可包括但不限于:听力损失、毛细胞退化、内耳液生化环境的改变、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血、耳蜗血管供应中断、耳鸣、头晕、顽固性头痛、面部神经病变、三叉神经病变、面瘫、面部感觉异常、脑积水、小脑疝和/或死亡。

[0216] 值得注意的是,越来越多的已发现VS肿瘤为无症状的,且在针对其他适应症而接受成像的患者中鉴定出(Reznitsky 2019,其以引用方式整体并入本文)。在某些情况下,VS的症状可能由于耳蜗神经受压和前庭耳蜗神经(颅神经VIII)的前庭分支侵入引起。虽然面神经通常被肿瘤拉伸且张开,但面瘫通常并不常见。在某些情况下,负责将面部感觉信息传递到大脑的附近三叉神经受压会导致面部感觉异常。尽管在组织学上为良性的,但在一些情况下,大肿瘤会压迫脑干并导致脑积水、小脑疝且在极少数情况下会导致死亡。

[0217] VS诱发的听力损失被认为是例如由耳蜗神经受压和/或耳蜗功能障碍引起,在大多数情况下,耳蜗病理的存在支持了此观点。假设VS诱发听力损失的机制包括例如毛细胞退化、内耳液生化环境的改变(例如来自肿瘤的毒性细胞因子)、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血和/或耳蜗血管供应中断(Roosli 2012;Dilwali2015;Remenschneider 2017,其中每一者以引用方式整体并入本文)。

[0218] 虽然当前治疗可能会降低与肿瘤生长相关的风险,但它们与稳定听力损失或耳鸣无关,且它们通常会导致不良反应,包括残余听力单侧损失、顽固性头痛和面神经缺陷(Pedrosa 1994;Sampath 1997;Sardhara 2020,其中每一者以引用方式整体并入本文)。虽然罕见,但放射治疗也带来继发性恶性肿瘤的额外风险(Kapurch 2016,其以引用方式整体并入本文)。根据当前VS治疗方案对听力保留的估计各不相同,但在手术切除程序的大规模回顾性比较中,Ansari报告了平均术后听力损失范围为40.6%至82.7%,这取决于所使用的手术入路以及肿瘤的大小和位置;这包括诸如颅中窝和乙状窦后的手术入路,根据肿瘤大小,这些手术入路可能优于经迷路入路,特别有利于更好地保留听力(Ansari 2012,其以引用方式整体并入本文)。神经外科医生大会(Congress of Neurological surgeons)指南建议劝告患者考虑接受放射外科、显微外科或预期在10年内有50%至75%听力损失几率的观察,因为它们仅描述在10年内使用这些治疗选项中的每一者保留听力的适度低概率(定义为>25%至50%)(Carlson 2018,其以引用方式整体并入本文)。目前尚无可用VS标准治疗方法具有改善听力的潜力。

[0219] 关于散发性VS治疗的决策为复杂的。肿瘤的存在通常经由磁共振成像(MRI)确认,且初始标准护理基于症状的严重性和肿瘤大小。在诊断时,大约20%至30%的病例小于1cm,大约30%的病例为1至2cm(包括端点),且其余病例(大约40%至50%)大于2cm(Peris-Celda 2019,其以引用方式整体并入本文)。随着MRI扫描仪的可用性和使用增加,一般而言,这些肿瘤更早(更小)且更经常地在无症状阶段发现(Reznitsky 2019,其以引用方式整体并入本文)。在某些实施方案中,本公开提供的组合物和方法可特别适于阻止或减缓肿瘤生长和/或使其收缩,所述肿瘤小于0.5cm、小于1cm、小于2cm、小于3cm、小于4cm或小于5cm。

[0220] 在一些情况下,VS表现出可变且通常不可预测的生长率。肿瘤的此固有行为因成像方式、肿瘤大小估计和生长定义的可变性而进一步复杂化(Kondziolka 2012,其以引用方式整体并入本文)。虽然总体肿瘤生长平均大约为1mm/年,但所有肿瘤中有30%至60%表现出低生长或无明显生长;对于确实生长的那些肿瘤,年线性速率在2到3mm/年之间(Paldor 2016;Lees 2018,其中每一者以引用方式整体并入本文)。在一些具有小肿瘤的患者中,治疗仅包含MRI扫描,且仅当肿瘤显示出可测量生长或症状恶化时才考虑额外治疗(MacKeith2013;Kirchmann 2017,其中每一者以引用方式整体并入本文)。在肿瘤持续生长并因此出现脑干压迫等后遗症风险显著增加的一些患者中,当前治疗选项包括手术切除、放射治疗(Golfinos 2016,其以引用方式整体并入本文)或这些方法的一些组合。虽然这些治疗可能会降低与肿瘤生长相关的风险,但它们与听力损失的长期稳定(Carlson2018,其以引用方式整体并入本文)或耳鸣的改善(Sardhara 2020,其以引用方式整体并入本文)无关,且通常会导致不良反应,包括残余听力单侧损失、顽固性头痛(Pedrosa 1994,其以引用方式整体并入本文)和面神经缺陷(Sampath 1997,其以引用方式整体并入本文)。目前,所有VS病例中大约一半最终将需要手术切除和/或放射治疗。在一些实施方案中,本公开提供了降低与肿瘤生长相关的风险的组合物和方法,所述风险诸如听力损失、语言理解损失、耳鸣、生活品质下降、脑干压迫和/或死亡。在一些实施方案中,本公开提供了减少相关风险的组合物和方法,所述风险诸如肿瘤生长、听力损失、毛细胞退化、内耳液生化环境的改变、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血、耳蜗血管供应中断、耳鸣、头晕、顽固性头痛、面部神经病变、三叉神经病变、面瘫、面部感觉异常、脑积水、小脑疝和/或死亡。

[0221] 尽管在手术和放射治疗方面的现代和最新改进,但在一些实施方案中,更保守的观察方法获得了青睐;只要肿瘤不生长,这代表保留剩余听觉功能且使介入治疗的潜在不利影响最小化的当前最佳策略(MacKeith 2013;Kirchmann 2017;Torres Maldonado 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,改善的治疗将为可以促进VS停滞和/或消退的治疗,且因此避免对包括手术切除或放射治疗在内的更多侵入性方法的需要。

[0222] 在美国,据估计总VS发病率为每100,000人口1.09至1.98个新病例;因此,每年在美国有3300至6300名患者被诊断为患有VS(Kshetry 2015;Ostrom 2018,其中每一者以引用方式整体并入本文)。近年来报告的发病率增加源于老龄化人口与成像技术不断增强的组合。VS患者的当前标准护理包括多种方法和多个治疗目标(Doherty2006;Kaul 2018,其中每一者以引用方式整体并入本文)。治疗包括成像/观察、手术和放射治疗。治疗目标可以包括保留听力,但通常患者出现完全或部分耳聋,且肿瘤的大小和生长可以要求采取更积极的介入措施,所述介入措施接受听力损失作为必然的治疗结果。手术和放射治疗都会带来不良反应;重要地,与单独观察相比,两者都与生活品质指标的改善无关(Carlson 2015,其以引用方式整体并入本文),因此显然需要可以减轻肿瘤生长影响的较小侵入性治疗。

[0223] 对于这些患者中肿瘤不断增大或者肿瘤正受压迫或可能最终压迫脑干的许多患者,单独观察可能为不可接受的,且可能需要手术切除或放射治疗以防止对神经功能的影响。在一些情况下,不可能在不损伤面神经的情况下切除整个肿瘤。在这些情况下,通常进行不完全切除以保留面神经功能;然而,此治疗方法会留下可以继续生长的残留肿瘤。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用作与手术切除和/或放射治疗相结合的组合

疗法。在一些实施方案中,此类组合治疗方法降低面神经损伤或残留肿瘤细胞生长的风险。

[0224] 在一些实施方案中,利用本文所述的组合物,例如rAAV-抗VEGF的本文所述的治疗方法在药理学上减弱肿瘤生长,同时避免与当前标准护理治疗(诸如手术切除和/或放射治疗)相关的不良反应和/或使所述不良反应最小化。

[0225] 随着成像技术逐步发展以及识别且跟踪肿瘤生长的能力提高,当前VS标准护理在过去20到30年中逐步发展。存在趋向于保守性观察性“等待和重新扫描”方法的渐进趋势,人们越来越意识到许多肿瘤表现出缓慢或低生长,且只要保持低生长率就可不会影响听力(MacKeith 2013;Reznitsky 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。

[0226] 在某些实施方案中,本文所述的介入、方法和/或组合物包含益处,包括通过例如阻止肿瘤生长、稳定听力和/或消除对诸如手术切除和/或放射治疗的更具侵入性治疗方法的需要来增强保守治疗方法的机会。虽然阻止VS生长可能提供实质性临床益处,但在一些实施方案中,使用本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的方法和疗法也有可能超越肿瘤停滞并驱动肿瘤缩小、语言理解恢复和感知到的语言理解困难减少,如在NF2患者中贝伐单抗治疗的VS肿瘤的研究中证明(Huang 2018;Plotkin 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。此外,全身施用VEGF抑制剂的研究表明,NF2相关的生活品质有所改善,包括NF2患者的与VS相关的症状(Plotkin 2019,其以引用方式整体并入本文)。然而,这些全身施用通常伴随着负面副作用。这些早期研究的结果可能表明,抗VEGF蛋白治疗有可能改善和潜在对抗与VS相关的症状。在某些实施方案中,本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)可允许较小侵入性的治疗方式和与肿瘤处于扩散连续性的抗VEGF蛋白的持续和局部表达,从而向与血管新生相关的耳科疾病(例如VS)患者潜在地提供抗VEGF治疗的更集中且改善的益处而无全身治疗相关副作用。

[0227] 血管内皮生长因子(VEGF)和VS中的VEGF抑制

[0228] 已发现新血管发育和血管形成为许多肿瘤生长模型中的重要因素,且可能对VS生长很重要。VEGF为血管生成的主要调节剂之一。在某些情况下,VEGF蛋白及其受体在散发性VS肿瘤中表达(Cayé-Thomasen 2003;Plotkin 2009,其中每一者以引用方式整体并入本文),例如在182个切除的散发性VS肿瘤的研究中检查的所有肿瘤均表达VEGF受体(Koutsimpelas 2012,其以引用方式整体并入本文)。在一些情况下,此类型的神经鞘瘤中VEGF蛋白和/或受体表达水平已显示与由连续MRI确定的肿瘤生长速率和/或生长指数(Cayé-Thomasen 2005;Koutsimpelas 2007,其中每一者以引用方式整体并入本文)和微血管密度(Koutsimpelas 2007,其以引用方式整体并入本文)相关,这表明VEGF表达在VS生长中的作用。此外,使用VEGF抑制剂(贝伐单抗)进行全身治疗可有效控制患有VS的NF2患者的生长且改善其听力。不希望受理论束缚,据信使用VEGF抑制剂可以通过控制血管生长,例如肿瘤血管形成,导致控制肿瘤生长,例如VS生长。

[0229] VEGF基因编码血管内皮生长因子(VEGF),以前称为fms样酪氨酸激酶(F1t-1)。VEGF蛋白为诱导血管内皮细胞迁移和增殖的肝素结合蛋白。本文描述了编码野生型VEGF蛋白的蛋白质和核苷酸序列的非限制性实例。

[0230] 在一些实施方案中,尽管与来自血流的抗VEGF蛋白的外渗相比,进入和中和VEGF的扩散途径不同,但在肿瘤表面局部暴露于抗VEGF蛋白仍有控制肿瘤生长的潜力。例如,Lichtenbeld等人,1999(其以引用方式整体并入本文)将抗VEGF蛋白局部应用于小鼠肿瘤

并观察到血管通透性显著降低,与在小鼠中以类似程度也达成血管通透性降低的全身剂量相比,上述剂量显著降低了20倍(Yuan 1996,其以引用方式整体并入本文)。因此,在一些实施方案中,如本文所述的组合物(例如,包含rAAV-抗VEGF)在VS周围流体中递送低水平但持续的对抗VEGF蛋白的暴露,因此具有稳定和/或减少肿瘤生长的潜力。在某些实施方案中,如本文所述的组合物(例如,包含rAAV-抗VEGF)通过降低肿瘤血管的通透性和/或使肿瘤血管系统正常化来稳定和/或减少肿瘤生长。

[0231] 在某些实施方案中,例如,如本文所述,用于VS的抗VEGF蛋白疗法减弱了生长的肿瘤,而无需诸如手术切除和/或放射治疗的侵入性替代方案,从而例如避免手术切除和/或放射治疗的并发症。已表明,全身施用VEGF抑制剂(贝伐单抗)可展示在稳定或减少2型神经纤维瘤病(NF2)患者的VS生长和听力损失后遗症方面的功效,其中由NF2种系突变导致的肿瘤也高度表达VEGF及其受体(Plotkin2009;Plotkin 2012;Lu 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。然而,全身施用用于控制NF2患者的VS生长的VEGF抑制剂也可能与不良反应相关,在对五组临床试验参与者(包含125名患者)的荟萃分析中,严重毒性(3级或4级)的合并发生率为17%(Lu 2019,其以引用方式整体并入本文)。

[0232] 在某些实施方案中,如本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)可用于治疗患有VS的个体(例如哺乳动物,例如人)的方法中,所述方法通过将基因转移至内耳以例如促进抗VEGF蛋白的表达和分泌来进行。在某些实施方案中,本文所述的组合物,例如rAAV-抗VEGF,例如在内耳中提供对抗VEGF蛋白的局部暴露。在某些实施方案中,例如在内耳中局部暴露于VS部位的抗VEGF蛋白限制了全身暴露,且/或减少了潜在不良反应(例如使其最小化)。在某些实施方案中,如本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)包含雷珠单抗(48千道尔顿[kDa]),所述雷珠单抗为一种源自全长鼠类抗人VEGF单克隆抗体的人源化单克隆抗体片段(Fab)。在某些实施方案中,雷珠单抗结合至VEGF并抑制VEGF与其受体VEGFR-1和/或VEGFR-2的结合,从而减少血管渗漏、异常血管生成和/或肿瘤生长(Genentech 2017,其以引用方式整体并入本文)。

[0233] 在某些实施方案中,内耳的耳蜗和前庭细胞通过如本文所述的组合物(例如,包含rAAV-抗VEGF)转导。在某些实施方案中,这些细胞类型和/或其他细胞类型可将抗VEGF蛋白分泌至外淋巴中,所述外淋巴为与肿瘤所在的前庭耳蜗神经的间质和神经周围空间保持扩散连续性的内耳液,所述前庭耳蜗神经包含上前庭神经、下前庭神经和耳蜗神经。在一些实施方案中,大多数VS肿瘤起源于内耳道的外侧三分之一(最靠近耳蜗)处,所述内耳道容纳前庭耳蜗神经。在一些实施方案中,缺乏沿此耳道扩散的屏障导致耳蜗神经浸入连续流体中,其中外淋巴在其外侧末端且CSF在其内侧末端;因此,自外淋巴扩散到神经间质中为在外淋巴中表达的治疗性抗VEGF蛋白到达预期VS靶标提供了潜在途径(Rask-Andersen 2006,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,耳蜗轴内的螺旋神经节神经元和/或其卫星神经胶质细胞被如本文所述的组合物(例如,包含rAAV-抗VEGF)转导和/或转染,这些细胞被定位以将蛋白质直接分泌到耳蜗神经的间质液中。

[0234] 在一些实施方案中,耳蜗内施用本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)在患有与血管新生相关的耳科疾病(例如,VS)的个体(例如,哺乳动物,例如人)中具有消除对未来治疗的需要并保留生理听力的潜力,无论潜在病因是什么。在一些实施方案中,耳蜗内施用本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)有可能延迟侵入性治疗方法,诸如手术切除和/或放

射治疗,以及相关生理听力损失。在一些实施方案中,在耳蜗内施用本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)之后进行后续标准护理治疗。在一些实施方案中,本文所述组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的耳蜗内施用发生在放射治疗之前和/或之后。在一些实施方案中,本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的施用可以通过使肿瘤敏感并允许较低辐射剂量来改善个体(例如,哺乳动物,例如人)对放射治疗的反应(Koutsimpelas 2012;Gao 2015,其中每一者以引用方式整体并入本文)。

[0235] 如上文所述,已发现新血管发育和血管形成成为VS生长的重要因素(Koutsimpelas 2007;Wong 2010,其中每一者以引用方式整体并入本文),且VEGF为血管生成的主要调节剂之一。除了血管生成作用之外,VEGF也提供细胞保护和对辐射诱导的细胞凋亡的抵抗力(Koutsimpelas 2012,其以引用方式整体并入本文)。在过去十年中,临床数据已表明VEGF抑制剂可以阻止或逆转VS生长。贝伐单抗(Avastin®)为目前唯一在VS患者中已证明其在NF2情况下的有效性的初步证据的药剂。

[0236] 最初临床证据公布于十多年前Plotkin等人的一篇开创性论文中(Plotkin 2009,其以引用方式整体并入本文)。在此研究中,向基线肿瘤大小为2.2至38.7cm³且基线年生长率为9%至121%,且大多数出现听力损失的十名NF2患者(六名男性和四名女性,中位年龄为25岁)每2周一次全身给予贝伐单抗5mg/kg,达平均12个月(3至19个月)。重复贝伐单抗给药后,十名患者中有九名患者的肿瘤缩小,其中六名患者的MRI反应显示肿瘤体积至少减少20%;在11至16个月随访期间,六名患者中有四名患者保持了反应。十名肿瘤较小患者中有九名对治疗的中位最佳反应为体积减少26%。在可用于听力测试的七名患者中,四名患者表现出改善,其定义为单词识别分数显著增加,两名患者表现出稳定听力损失,且一名患者表现出与基线测试相比进行性听力损失(Plotkin 2009,其以引用方式整体并入本文)。这些结果可表明,此种方法可潜在地逆转在肿瘤持续生长的患者中观察到的进行性听力损失。

[0237] 在此最初公布后,报告了对用静脉内贝伐单抗全身治疗(每2周5mg/kg,持续6至41个月;中位持续时间14个月)的三十一名NF2患者进行的更大规模的回顾性审查(Plotkin 2012,其以引用方式整体并入本文)。在类似患者群体的此研究中,57%评价的患者表现出听力改善,其定义为与基线相比单词识别分数增加,且55%表现出放射学反应,其定义为与基线相比肿瘤体积至少减少20%。在评估长期治疗反应时,90%的患者在一年后听力稳定或有所改善,且61%的那些患者在三年后继续所述趋势。此外,88%的患者在治疗一年后肿瘤大小稳定或缩小,且54%的那些患者在三年时保持稳定(Plotkin 2012,其以引用方式整体并入本文)。

[0238] 最近,Plotkin等人公布了在患有进行性VS的NF2患者中全身静脉内施用贝伐单抗的多中心、前瞻性2期功效试验的结果(Plotkin2019,其以引用方式整体并入本文)。在此试验中,患者(中位年龄为23岁)以每两周10mg/kg全身接受贝伐单抗达六个月,随后每三周以5mg/kg全身接受贝伐单抗达十八个月。与先前发现一致,中期试验结果表明,在治疗六个月后,41%的参与者表现出听力改善,且32%的患者表现出放射学反应。

[0239] 在美国和欧洲进行的八项临床试验的治疗结果荟萃分析中,也已审查了全身施用的贝伐单抗对患有VS的NF2患者的初步功效和安全性(Killeen 2019;Karajannis 2019;Lu 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。评价了这些八项研究中患有196个神经鞘瘤

的161名NF2患者的治疗结果,这些患者每2周接受5至10mg/kg范围内的贝伐单抗剂量(整个研究的平均范围为11至22个月)。在这些研究中,综合数据表明,大约41%神经鞘瘤的放射学反应(至少20%体积减少)、大约47%神经鞘瘤的肿瘤稳定性和大约7%神经鞘瘤的肿瘤进展(至少20%体积增加)。在可获得听力测试数据的患者中,这些剂量的贝伐单抗与大约20%个体的听力改善、大约69%个体的听力保留(稳定听力损失)和大约6%个体的听力损失恶化有关。在报告的随访时间期间,11%患者需要进行后续手术介入。此外,也评估了贝伐单抗的副作用,诸如严重毒性(包括高血压、蛋白尿和闭经)。基于对包含125名患者的五组临床试验参与者的荟萃分析,严重毒性(3级或4级)的合并发生率为17%(Lu 2019,其以引用方式整体并入本文)。在某些实施方案中,本公开提供了适用于满足有效治疗与血管新生相关的耳科疾病的长期需要同时潜在地避免与治疗性抗VEGF蛋白的全身递送相关的负面后果的方法和组合物。

[0240] 上述大量临床数据(显示肿瘤缩小的约30%到超过60%反应率)支持全身使用VEGF抑制剂来减少VS生长并改善相关听力损失症状,尽管全身使用VEGF抑制剂相关的副作用很常见(Plotkin 2009;Plotkin 2012;Lu 2019;Plotkin 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。在不治疗的情况下,VS平均生长率自0.4到2.9mm/年不等(Yoshimoto 2005,其以引用方式整体并入本文),据报导,在多达212名患者的研究中,自发肿瘤缩小为零至11%的肿瘤(Tschudi 2000;Slattery 2004;Peyre 2013;Schnurman 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文),或在1261名患者的大型研究中为3.8%的肿瘤(Huang2013,其以引用方式整体并入本文)。迄今为止,全身抗VEGF蛋白疗法的局限性在于不可避免的全身副作用。在某些实施方案中,本公开提供了施用抗VEGF蛋白的方法。在某些实施方案中,提供了利用腺相关病毒(AAV)递送机制的方法和组合物。在某些实施方案中,这种AAV包含重组构建体,且称为重组AAV(rAAV)。此类构建体的实施方案在下文更详细地描述。在某些实施方案中,提供组合物以将局部抗VEGF蛋白例如rAAV-抗VEGF递送到耳蜗中,例如紧邻肿瘤例如VS的位置。在一些实施方案中,将VEGF抑制剂(例如,rAAV-抗VEGF)施用到耳蜗中减少了与VEGF抑制剂的全身递送相关的副作用。

[0241] 尽管它们不足以评价经由耳蜗内施用途径递送来治疗VS的基因治疗颗粒的生物活性剂量范围,但已利用几种小鼠模型来生成数据,以支持VEGF抑制剂在降低肿瘤血管通透性方面的生物学合理性。使用颅窗模型,Yuan等人移植各种人肿瘤细胞系,然后施用静脉推注的针对VEGF/VPF(血管通透性因子)的中和抗体或磷酸盐缓冲盐水对照(Yuan 1996,其以引用方式整体并入本文)。他们证明,抗体治疗组的肿瘤血管对白蛋白的通透性低于匹配对照,且在连续治疗后,肿瘤血管的直径变小,并最终消失。这些数据证明可以通过中和内源性VEGF/VPF来降低肿瘤血管通透性(Yuan 1996,其以引用方式整体并入本文)。最近,Gao等人同时使用坐骨神经模型和颅内窗模型来表征抗VEGF蛋白治疗对于双侧VS的机制(Gao 2015,其以引用方式整体并入本文)。此组将人HEI193神经鞘瘤细胞注射到小鼠坐骨神经鞘中或颅窗植入小鼠右半球的软脑膜与蛛网膜之间。在肿瘤大小达到直径4mm后,经由腹膜内(IP)途径以5mg/kg/周施用VEGF抑制剂贝伐单抗。所得数据表明,贝伐单抗减轻了小鼠的肿瘤水肿,改善了神经功能,并使肿瘤血管系统暂时正常化。

[0242] 这些研究提供了概念验证数据,支持使用VEGF抑制剂减缓小鼠神经鞘瘤进展的科学原理,这与使用Avastin®全身治疗的NF2患者的初步临床数据一致(Plotkin 2009;

Plotkin 2012;Lu 2019;Plotkin2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。这些先前研究的一个限制在于它们不能反映有限靶标位置中的持久暴露水平。

[0243] 在某些实施方案中,本文公开的方法和组合物(例如,包含rAAV-抗VEGF)导致VEGF抑制剂在有限靶标位置(例如内耳)中的持续水平。不希望受理论束缚,据信本文公开的组合物(例如VEGF抑制剂)可以通过自与内耳的外淋巴隔室处于连续性的周围流体浴直接摄取,穿过神经间质来进入VS肿瘤细胞中,内耳供应的抗VEGF蛋白可自神经间质中扩散。在荷瘤小鼠中,将抗VEGF蛋白局部应用于肿瘤组织,而非穿过血流,从而导致有益效果,诸如血管通透性降低(Lichtenbeld 1999,其以引用方式整体并入本文)。

[0244] 在某些实施方案中,本公开提供了适用于将VEGF抑制剂例如rAAV-抗VEGF局部递送至肿瘤部位的方法和组合物。在一些实施方案中,这些方法和组合物有可能保持抗VEGF蛋白控制肿瘤生长的益处,同时潜在地使已记录的全身VEGF抑制剂施用的严重毒性的风险最小化。在某些实施方案中,本公开提供了适用于转导内耳细胞的方法和组合物。在一些实施方案中,内耳细胞的转导可以使抗VEGF蛋白能够在具有最小全身暴露的肿瘤部位处和/或附近持久表达。

[0245] VEGF多核苷酸序列

[0246] 除其他外,本公开提供了多核苷酸,例如包含VEGF基因或其特征部分的多核苷酸,以及包括此类多核苷酸的组合物和利用此类多核苷酸和/或组合物的方法。

[0247] 在一些实施方案中,包含VEGF基因或其特征部分的多核苷酸可以为DNA或RNA。在一些实施方案中,DNA可以为基因组DNA或cDNA。在一些实施方案中,RNA可以为mRNA。在一些实施方案中,多核苷酸包含VEGF基因的外显子和/或内含子。

[0248] 在一些实施方案中,基因产物自包含VEGF基因或其特征部分的多核苷酸表达。在一些实施方案中,这种多核苷酸的表达可利用一个或多个控制元件(例如,启动子、增强子、剪接位点、聚腺苷酸化位点、翻译起始位点等)。因此,在一些实施方案中,本文提供的多核苷酸可包括一个或多个控制元件。

[0249] 在一些实施方案中,VEGF基因为哺乳动物VEGF基因。在一些实施方案中,VEGF基因为鼠类VEGF基因。在一些实施方案中,VEGF基因为灵长类动物VEGF基因。在一些实施方案中,VEGF基因为人VEGF基因。在一些实施方案中,VEGF基因为基因组DNA序列。在一些实施方案中,VEGF基因为编码蛋白质产物的RNA序列。在一些实施方案中,VEGF基因为编码互补RNA序列的互补DNA序列,所述互补RNA序列编码蛋白质产物。

[0250] 在一些实施方案中,示例性人VEGF基因存在于人染色体位置6p21.1处;在当前2020组装的NC_000006.12(43770209..43786487)处的位置,且称为VEGF-A,其中NCBI参考序列号:NG_008732.1。在一些实施方案中,示例性人VEGF基因为涵盖在VEGF-A基因内的cDNA序列(例如,VEGF-A转录物变体1、转录物变体2、转录物变体3等)。在一些实施方案中,示例性人VEGF基因为VEGF-A的至少9种已知转录同工型之一,本领域技术人员将理解这些转录同工型可以经历替代剪接以产生替代性翻译同工型。在一些实施方案中,示例性人VEGF-A基因为由转录物变体1表示的cDNA序列,编码VEGF同工型A(NCBI参考序列:NM_001025366.3)。在一些实施方案中,示例性人VEGF-A基因为由转录物变体2表示的cDNA序列,编码VEGF同工型B(NCBI参考序列:NM_003376.6)。在一些实施方案中,示例性人VEGF-A基因为由转录物变体3表示的cDNA序列,编码VEGF同工型C(NCBI参考序列:NM_

001025367.3)。在一些实施方案中,示例性人VEGF-A基因为由转录物变体4表示的cDNA序列,编码VEGF同工型D (NCBI参考序列:NM_001025368.3)。在一些实施方案中,示例性人VEGF-A基因为由转录物变体5表示的cDNA序列,编码VEGF同工型E (NCBI参考序列:NM_001025369.3)。在一些实施方案中,示例性人VEGF-A基因为由转录物变体6表示的cDNA序列,编码VEGF同工型F (NCBI参考序列:NM_001025370.3)。在一些实施方案中,示例性人VEGF-A基因为由转录物变体7表示的cDNA序列,编码VEGF同工型G (NCBI参考序列:NM_001033756.3)。在一些实施方案中,示例性人VEGF-A基因为由转录物变体8表示的cDNA序列,编码VEGF同工型H (NCBI参考序列:NM_001171622.2)。在一些实施方案中,示例性人VEGF-A基因为由转录物变体表示的cDNA序列,编码VEGF同工型R (NCBI参考序列:NM_001204385.2)。

[0251] 在一些实施方案中,示例性人VEGF基因存在于人染色体位置11q13.1、位置NC_000011.10(64234584..64239264)处,且称为VEGF-B (NCBI参考序列:NG_029823.1)。在一些实施方案中,示例性人VEGF基因为涵盖在VEGF-B基因内的cDNA序列,例如VEGF-B转录物变体167 (NCBI参考序列:NM_001243733.2)和/或转录物变体186 (NCBI参考序列:NM_003377.5)。

[0252] 在一些实施方案中,示例性人VEGF基因存在于人染色体位置4q34.1-q34.3、位置NC_000004.12(176683538..176792922,补体)处,且称为VEGF-C (NCBI参考序列:NG_034216.1)。在一些实施方案中,示例性人VEGF基因为涵盖在VEGF-C基因内的cDNA序列,例如,VEGF-C转录物变体1 (NCBI参考序列:NM_005429.5)。

[0253] 在一些实施方案中,示例性人VEGF基因存在于人染色体位置Xp22.2、位置NC_000023.11(15345596..15384413,补体)处,且称为VEGF-D (NCBI参考序列:NG_012509.1)。在一些实施方案中,示例性人VEGF基因为涵盖在VEGF-D基因内的基因组序列或cDNA序列,例如,VEGF-D转录物变体1 (NCBI参考序列:NM_004469.5)。

[0254] VEGF蛋白序列

[0255] 在某些实施方案中,感兴趣的蛋白质为VEGF-A基因的同工型。此基因为PDGF(血小板衍生生长因子)/VEGF(血管内皮生长因子)家族(PDGF/VEGF)的成员。其编码肝素结合蛋白,所述蛋白通常以二硫键连接的同源二聚体形式存在。此生长因子诱导血管内皮细胞的增殖和迁移,且对生理和病理血管生成而言均必不可少。已经描述了编码不同同工型的替代性剪接转录物变体。有大量证据表明上游非AUG (CUG) 密码子的替代性翻译起始导致额外同工型。在一些实施方案中,感兴趣的蛋白质为内源性VEGF-A功能的抑制剂。

[0256] 示例性人VEGF-A同工型L-VEGF₂₀₆前体(也称为同工型A)氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1)

[0257] MTDRQTDTPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQLLGCSRFGGAVV
RAGEAEPGSAARSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLGARKPGSWTGEAAVCADSAPAARAPQALARASRG
GRVARRGAEESGPPHSPSRSGSASRAGPGRASETMNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKF
MDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGM
SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQ
DPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

[0258] 示例性人VEGF-A同工型L-VEGF₁₈₉前体(也称为同工型B)氨基酸序列 (SEQ ID NO:

2)

[0259] MTDRQTDTPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQLLGCSRFGGAVV
RAGEAEPSPAARSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLGARKPGSWTGEAAVCADSAPAARAPQALARASRG
GRVARRGAEESSPPHSPSRGSASRAGPGRASETMNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKF
MDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM
SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCK
ARQLELNERTCRCDKPRR

[0260] 示例性人VEGF-A同工型VEGF₁₁₁前体氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)

[0261] MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEI
EYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRCDKPRR

[0262] 示例性人VEGF-A同工型VEGF₁₂₁前体氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)

[0263] MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEI
EYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKCDKPR
R

[0264] 示例性人VEGF-A同工型VEGF₁₄₅前体氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)

[0265] MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEI
EYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRG
KGKGQKRKRKKSRYKSWSVCDKPRR

[0266] 示例性人VEGF-A同工型VEGF_{165A}前体氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)

[0267] MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEI
EYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPC
SERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

[0268] 示例性人VEGF-A同工型VEGF₁₈₉前体氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)

[0269] MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEI
EYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRG
KGKGQKRKRKKSRYKSWSVPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

[0270] 示例性人VEGF-A同工型VEGF₂₀₆前体氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)

[0271] MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEI
EYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRG
KGKGQKRKRKKSRYKSWSVYGARCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNER
TCRCDKPRR

[0272] 在某些实施方案中,感兴趣的蛋白质为VEGF-B基因的同工型。此基因编码PDGF/
VEGF的成员。VEGF家族成员调控血管形成并参与内皮细胞生理学。此成员为VEGFR-1 (血管
内皮生长因子受体1) 和NRP-1 (神经纤毛蛋白-1) 的配体。在一些实施方案中,感兴趣的蛋白
质为内源性VEGF-B功能的抑制剂。

[0273] 示例性人VEGF-B同工型VEGFB-167前体氨基酸序列 (SEQ ID NO:9)

[0274] MSPLLRLLLAALLQLAPAQAPVSQPDAPGHQRKVVSWIDVYTRATCQPREVVVPLTVELMGTVAKQLV
PSCVTVQRCGGCCPDDGLECVPTGQHQRVMQILMIRYPSSQLGEMSLEEHSQCECRPKKKDSAVKPDSRPLCPRCT
QHHQRDPDPTCRRCRRRSFLRCQGRGLELNPDTCRCKLR

[0275] 示例性人VEGF-B同工型VEGFB-186前体氨基酸序列(SEQ ID NO:10)

[0276] MSPLLRLLLLAALLQLAPAQAPVSPDPAGHQKRVSWIDVYTRATCQPREVVVPLTVELMGTVAKQLV
PSCVTVQRCGGCCPDDGLECVPTGQHQRVMQILMIRYPSSQLGEMSLEEHSQCECRPKKKDSAVKPDRAATPHHRPQ
PRSVPGWDSAPGAPSPADITHPTAPGPSAHAAPSTTSALTGPAAAAADAAASSVAKGGA

[0277] 在某些实施方案中,感兴趣的蛋白质为VEGF-C基因的同工型。此基因编码的蛋白质为PDGF/VEGF家族的成员。编码的蛋白质促进血管生成和内皮细胞生长,且也可以影响血管通透性。前体蛋白进一步裂解成完全加工的形式,所述形式可以结合并活化VEGFR-2和VEGFR-3受体。在一些实施方案中,感兴趣的蛋白质为内源性VEGF-C功能的抑制剂。

[0278] 示例性人VEGF-C前体氨基酸序列(SEQ ID NO:11)

[0279] MHLLGFFSVACSLLAALLPGPREAPAAAAAFESGLDLSDAEPDAGEATAYASKDLEEQLRSVSSVDEL
MTVLYPEYWKMYKQLRKGGWQHNRQANLNSRTEETIKFAAAHYNTEILKSIDNEWKRTQCMPREVCIDVGKEFGV
ATNTFFKPPCVSVYRCGGCCNSEGLQCMNTSTSYLSKTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHTSCRCMSKLDVYRQVHS
IIRSLPATLPQCQAANKTCPTNYMWNHICRCLAQEDFMFSSDAGDDSTDGFHDICGPNKELDEETCQCVCRAGLR
PASCOPHKELDNRSCQCVCKNKLFPSCGANREFDENTCQCVCKRTCPRNQPLNPGKCACECTESPQKCLLKGGKFH
HQTCSYRRPCTNRQKACEPGFSYSEEVCRCPVPSYWKRPQMS

[0280] 在某些实施方案中,感兴趣的蛋白质为VEGF-D基因的同工型。此基因编码的蛋白质为PDGF/VEGF家族的成员,且在血管生成、淋巴管生成和内皮细胞生长中具有活性。此分泌蛋白经过复杂蛋白水解成熟,从而产生多种加工的形式,所述形式结合并活化VEGFR-2和VEGFR-3受体。此蛋白质在结构和功能上与VEGF-C相似。在一些实施方案中,感兴趣的蛋白质为内源性VEGF-D功能的抑制剂。

[0281] 示例性人VEGF-D前体氨基酸序列(SEQ ID NO:12)

[0282] MYREWVVNVFMMLYVQLVQGSSNEHGPVKRSSQSTLERSEQQIRAASSLEELLRITHSEDWKLWRCRL
RLKSFTSMDSRSASHRSTRFAATFYDIETLKVIDEWQRTQCSPRETCVEASELGKSTNTFFKPPCVNVFRCGGCC
NEESLICMNTSTSYISKQLFEISVPLTSVPPELVVKVANHTGCKCLPTAPRHPYSIIRRSIQIPEEDRCSHKKLCP
IDMLWDSNKCKCVLQENPLAGTEDHSHLQEPALCGPHMMFDEDRCECVCKTPCPKDLIQHPKNCSCECKESLETC
CQKHKLFPDTCSCEDRCPFHTRPCASGKTACAKHCRFPKEKRAAQGPHSRKNP

[0283] VEGF、VEGF-R和VEGF结合蛋白

[0284] 在一些实施方案中,感兴趣的蛋白质为可以结合VEGF的蛋白质。在一些实施方案中,VEGF结合蛋白可以为或包含抗体和/或其片段。在一些实施方案中,VEGF结合蛋白可以为或包含血管内皮生长因子受体(VEGFR)蛋白和/或其片段。

[0285] 如上文所述,已经产生的数据可以支持VEGF抑制剂在降低肿瘤血管通透性方面的生物学合理性。在一些实施方案中,这种数据为使用小鼠模型产生的,其已用于产生支持VEGF抑制剂在降低肿瘤血管通透性方面的生物学合理性的数据。在一些实施方案中,此类小鼠模型对于评价基因治疗颗粒的生物活性剂量范围并不理想,所述颗粒经由耳蜗内施用途径递送,例如用于治疗VS。使用颅窗模型,Yuan等人移植各种人肿瘤细胞系,然后施用静脉推注的针对VEGF/VPF(血管通透性因子)的中和抗体或磷酸盐缓冲盐水对照(Yuan 1996,其以引用方式整体并入本文)。作者证明,抗体治疗组的肿瘤血管对白蛋白的通透性低于匹配对照,且在连续治疗后,肿瘤血管的直径变小,并最终消失。这些数据证明可以通过中和内源性VEGF/VPF来降低肿瘤血管通透性(Yuan 1996,其以引用方式整体并入本文)。最近,

Gao等人同时使用坐骨神经模型和颅内窗模型来力图表征抗VEGF蛋白治疗对于双侧VS的机制(Gao 2015,其以引用方式整体并入本文)。此组将人HEI193神经鞘瘤细胞注射到小鼠坐骨神经鞘中或颅窗植入小鼠右半球的软脑膜与蛛网膜之间。在肿瘤大小达到直径4mm后,经由腹膜内(IP)途径以5mg/kg/周施用VEGF抑制剂贝伐单抗。所得数据表明,贝伐单抗减轻了小鼠的肿瘤水肿,改善了神经功能,并使肿瘤血管系统暂时正常化。

[0286] 总之,这些研究提供了概念验证数据,支持使用VEGF抑制剂减缓小鼠神经鞘瘤进展的科学原理,这与使用**Avastin®**全身治疗的NF2患者的初步临床数据一致(Plotkin 2009;Plotkin 2012;Lu 2019;Plotkin2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。这些先前研究的一个限制在于它们不能反映有限靶标位置中的持久暴露水平。

[0287] 在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物导致VEGF抑制剂(例如rAAV-抗VEGF)在例如个体(例如哺乳动物,例如人)的内耳中的有限靶标位置处的持续水平。不希望受理论束缚,据信在一些实施方案中,VEGF抑制剂可以通过自与内耳的外淋巴隔室处于连续性的周围流体浴的直接摄取,穿过神经间质来进入VS肿瘤细胞中,内耳供应的抗VEGF蛋白可能自神经间质中扩散。在荷瘤小鼠中,将抗VEGF蛋白局部应用于肿瘤组织,而非穿过血流,从而导致有益效果,诸如血管通透性降低(Lichtenbeld 1999,其以引用方式整体并入本文)。

[0288] 抗VEGF抗体

[0289] 在本文所述的任何抗体的一些实施方案中,所述抗体可以结合至VEGF抗原(例如,本文所述的任何示例性VEGF蛋白,例如成熟人VEGF-A、成熟人VEGF-B、成熟人VEGF-C,和成熟人VEGF-D中的一者或多者)(例如,本文所述的任何结合亲和力)。

[0290] 在本文所述的一些实施方案中,抗体可减少VEGF(例如,本文所述的任何示例性VEGF蛋白中的一者或多者,例如,成熟人VEGF-A、成熟人VEGF-B、成熟人VEGF-C,和成熟人VEGF-D中的一者或多者)的活性。在一些实施方案中,抗体可阻断VEGF(例如,本文所述的任何示例性VEGF蛋白中的一者或多者,例如成熟人VEGF-A、成熟人VEGF-B、成熟人VEGF-C、和成熟人VEGF-D中的一者或多者)与其一种或多种受体(例如,一种或多种VEGF受体)结合参见例如WO 1998/045331、US 9,079,953、US2015/0147317、US2016/0289314、Plotkin等人Otolology&Neurotology 33:1046-1052(2012);和Ferrara等人(2005)Biochem Biophys Res Commun 333(2):328-335,其中每一者以引用方式整体并入本文。在一些实施方案中,抗体可以降低下游信号传导(例如,VEGF受体下游的信号传导,例如本文所述的任何示例性VEGF受体中的一者或多者,例如人VEGFR-1、人VEGFR-2和人VEGFR-3中的一者或多者)。在一些实施方案中,可以间接检测VEGF活性的降低,例如通过VS肿瘤大小和/或本文所述的VS相关症状的改变,例如通过听力的增加(例如,听力增加1%至约400%(或本文所述的此范围的任何子范围))或分别与在施用本文所述的任何rAAV颗粒之前哺乳动物中VS或II型神经纤维瘤病的一种或多种症状(例如,听力损失、耳鸣、眩晕、生活品质下降等)的严重性和/或VS或II型神经纤维瘤病的大小相比,哺乳动物中的VS肿瘤大小和/或VS或II型神经纤维瘤病的一种或多种症状的严重性减少(例如,减少1%至99%、1%至95%、1%至90%、1%至85%、1%至80%、1%至75%、1%至70%、1%至65%、1%至60%、1%至55%、1%至50%、1%至45%、1%至40%、1%至35%、1%至30%、1%至25%、1%至20%、1%至15%、1%至10%、1%至5%、5%至99%、5%至95%、5%至90%、5%至85%、5%至80%、5%至75%、5%至

70%、5%至65%、5%至60%、5%至55%、5%至50%、5%至45%、5%至40%、5%至35%、5%至30%、5%至25%、5%至20%、5%至15%、5%至10%、10%至99%、10%至95%、10%至90%、10%至85%、10%至80%、10%至75%、10%至70%、10%至65%、10%至60%、10%至55%、10%至50%、10%至45%、10%至40%、10%至35%、10%至30%、10%至25%、10%至20%、10%至15%、15%至99%、15%至95%、15%至90%、15%至85%、15%至80%、15%至75%、15%至70%、15%至65%、15%至60%、15%至55%、15%至50%、15%至45%、15%至40%、15%至35%、15%至30%、15%至25%、15%至20%、20%至99%、20%至95%、20%至90%、20%至85%、20%至80%、20%至75%、20%至70%、20%至65%、20%至60%、20%至55%、20%至50%、20%至45%、20%至40%、20%至35%、20%至30%、20%至25%、25%至99%、25%至95%、25%至90%、25%至85%、25%至80%、25%至75%、25%至70%、25%至65%、25%至60%、25%至55%、25%至50%、25%至45%、25%至40%、25%至35%、25%至30%、30%至99%、30%至95%、30%至90%、30%至85%、30%至80%、30%至75%、30%至70%、30%至65%、30%至60%、30%至55%、30%至50%、30%至45%、30%至40%、30%至35%、35%至99%、35%至95%、35%至90%、35%至85%、35%至80%、35%至75%、35%至70%、35%至65%、35%至60%、35%至55%、35%至50%、35%至45%、35%至40%、40%至99%、40%至95%、40%至90%、40%至85%、40%至80%、40%至75%、40%至70%、40%至65%、40%至60%、40%至55%、40%至50%、40%至45%、45%至99%、45%至95%、45%至90%、45%至85%、45%至80%、45%至75%、45%至70%、45%至65%、45%至60%、45%至55%、45%至50%、50%至99%、50%至95%、50%至90%、50%至85%、50%至80%、50%至75%、50%至70%、50%至65%、50%至60%、50%至55%、55%至99%、55%至95%、55%至90%、55%至85%、55%至80%、55%至75%、55%至70%、55%至65%、55%至60%、60%至99%、60%至95%、60%至90%、60%至85%、60%至80%、60%至75%、60%至70%、60%至65%、65%至99%、65%至95%、65%至90%、65%至85%、65%至80%、65%至75%、65%至70%、70%至99%、70%至95%、70%至90%、70%至85%、70%至80%、70%至75%、75%至99%、75%至95%、75%至90%、75%至85%、75%至80%、80%至99%、80%至95%、80%至90%、80%至85%、85%至99%、85%至95%、85%至90%、90%至99%、90%至95%或95%至99%)。在一些实施方案中,可以在体外测定中检测VEGF活性的降低。

[0291] 在一些实施方案中,抗体可以为人源化抗体、嵌合抗体或多价抗体。在一些实施方案中,抗体可以为scFv-Fc、VHH结构域、VNAR结构域、(scFv)₂、微型抗体或BiTE。在一些实施方案中,抗体可以为DVD-Ig、双亲和重靶向抗体(DART)、三功能抗体(triomab)、具有共同LC的kih IgG、交叉抗体(crossmab)、正交Fab IgG、2合1-IgG、IgG-ScFv、scFv₂-Fc、双纳米抗体、串联抗体、DART-Fc、scFv-HAS-scFv、DNL-Fab₃、DAF(二合一或四合一)、DutaMab、DT-IgG、孔中钮共同LC、孔中钮组件、电荷对抗体、Fab臂交换抗体、SEED体、三功能抗体、LUZ-Y、Fcab、k λ 体、正交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H) IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)-IgG、IgG(L,H)-Fc、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv₄-Ig、Zybody、DVI-IgG、纳米抗体、纳米抗体-HSA、双抗体、TandAb、sc双抗体、sc双抗体-CH₃、双抗体-CH₃、三体(Triple Body)、微抗体、微型抗体、TriBi微型抗体、scFv-CH₃ KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、sc双抗体-Fc、双抗体-Fc、串联scFv-Fc、胞内抗体(intrabody)、对接和锁定双特异性抗体、

ImmTAC、HSAbody、sc双抗体-HAS、串联scFv、IgG-IgG、Cov-X-Body和scFv1-PEG-scFv2。

[0292] 抗体的其他实例包括Fv片段、Fab片段、F(ab')₂片段和Fab'片段。抗体的其他实例包括IgG的抗原结合片段(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的抗原结合片段)(例如人或人源化IgG,例如人或人源化IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的抗原结合片段);IgA的抗原结合片段(例如IgA1或IgA2的抗原结合片段)(例如人或人源化IgA,例如人或人源化IgA1或IgA2的抗原结合片段);IgD的抗原结合片段(例如,人或人源化IgD的抗原结合片段);IgE的抗原结合片段(例如,人或人源化IgE的抗原结合片段);或IgM的抗原结合片段(例如,人或人源化IgM的抗原结合片段)。

[0293] 在一些实施方案中,本文所述的任何抗体可特异性结合至VEGF。在一些实施方案中,本文所述的任何抗体可特异性结合至PDGF/VEGF。

[0294] VHH结构域为可以在骆驼科动物中发现的单个单体可变抗体结构域。VNAR结构域为可发现于软骨鱼中的单个单体可变抗体结构域。VHH结构域和VNAR结构域的非限制性方面描述于例如Cromie等人,Curr.Top.Med.Chem.15:2543-2557,2016;De Genst等人,Dev.Comp.Immunol.30:187-198,2006;De Meyer等人,Trends Biotechnol.32:263-270,2014;Kijanka等人,Nanomedicine 10:161-174,2015;Kovaleva等人,Expert.Opin.Biol.Ther.14:1527-1539,2014;Krah等人,Immunopharmacol.Immunotoxicol.38:21-28,2016;Mujic-Delic等人,Trends Pharmacol.Sci.35:247-255,2014;Muyldermans,J.Biotechnol.74:277-302,2001;Muyldermans等人,Trends Biochem.Sci.26:230-235,2001;Muyldermans,Ann.Rev.Biochem.82:775-797,2013;Rahbarizadeh等人,Immunol.Invest.40:299-338,2011;Van Audenhove等人,EBioMedicine 8:40-48,2016;Van Bockstaele等人,Curr.Opin.Investig.Drugs 10:1212-1224,2009;Vincke等人,Methods Mol.Biol.911:15-26,2012;和Wesolowski等人,Med.Microbiol.Immunol.198:157-174,2009,其中每一者以引用方式整体并入本文。

[0295] 在一些实施方案中,"Fv"片段包含一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的非共价连接的二聚体。

[0296] 在一些实施方案中,除了Fv片段的重链和轻链可变结构域之外,"Fab"片段也包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。

[0297] 在一些实施方案中,"F(ab')₂"片段包含在铰链区附近通过二硫键接合的两个Fab片段。

[0298] 在一些实施方案中,"双可变结构域免疫球蛋白"或"DVD-Ig"是指多价和多特异性结合蛋白,例如像在DiGiammarino等人,Methods Mol.Biol.899:145-156,2012;Jakob等人,MABs 5:358-363,2013;以及美国专利号7,612,181;8,258,268;8,586,714;8,716,450;8,722,855;8,735,546;和8,822,645中描述,其中每一者以引用方式整体并入本文。

[0299] 在一些实施方案中,药物亲和反应靶稳定性(DARTS)测定如在例如Garber,Nature Reviews Drug Discovery 13:799-801,2014中发现所描述和执行;所述文献以引用方式整体并入本文。

[0300] 在一些实施方案中,本文所述的任何抗体的解离常数(KD)小于1x10⁻⁵M(例如小于0.5x10⁻⁵M、小于1x10⁻⁶M、小于0.5x10⁻⁶M、小于1x10⁻⁷M、小于0.5x10⁻⁷M、小于1x10⁻⁸M、小于0.5x10⁻⁸M、小于1x10⁻⁹M、小于0.5x10⁻⁹M、小于1x10⁻¹⁰M、小于0.5x10⁻¹⁰M、小于1x10⁻

11M、小于 0.5×10^{-11} M或小于 1×10^{-12} M),例如,如使用表面等离子体共振 (SPR) 在磷酸盐缓冲盐水中对于VEGF蛋白(例如,本文所述的任何VEGF蛋白,例如成熟人VEGF-A、成熟VEGF-B、成熟人VEGF-C和成熟人VEGF-D中的一者或多者)所测量的。

[0301] 在一些实施方案中,本文所述的任何抗体的KD为约 1×10^{-12} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M、约 0.5×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 0.5×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M、约 0.5×10^{-8} M、约 1×10^{-9} M、约 0.5×10^{-9} M、约 1×10^{-10} M、约 0.5×10^{-10} M、约 1×10^{-11} M或约 0.5×10^{-11} M(包括端点);约 0.5×10^{-11} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M、约 0.5×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 0.5×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M、约 0.5×10^{-8} M、约 1×10^{-9} M、约 0.5×10^{-9} M、约 1×10^{-10} M、约 0.5×10^{-10} M或约 1×10^{-11} M(包括端点);约 1×10^{-11} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M、约 0.5×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 0.5×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M、约 0.5×10^{-8} M、约 1×10^{-9} M、约 0.5×10^{-9} M、约 1×10^{-10} M或约 0.5×10^{-10} M(包括端点);约 0.5×10^{-10} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M、约 0.5×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 0.5×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M、约 0.5×10^{-8} M、约 1×10^{-9} M、约 0.5×10^{-9} M或约 1×10^{-10} M(包括端点);约 1×10^{-10} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M、约 0.5×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 0.5×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M、约 0.5×10^{-8} M、约 1×10^{-9} M或约 0.5×10^{-9} M(包括端点);约 0.5×10^{-9} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M、约 0.5×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 0.5×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M、约 0.5×10^{-8} M或约 1×10^{-9} M(包括端点);约 1×10^{-9} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M、约 0.5×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 0.5×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M或约 0.5×10^{-8} M(包括端点);约 0.5×10^{-8} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M、约 0.5×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 0.5×10^{-7} M或约 1×10^{-8} M(包括端点);约 1×10^{-8} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M、约 0.5×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M或约 0.5×10^{-7} M(包括端点);约 0.5×10^{-7} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M、约 0.5×10^{-6} M或约 1×10^{-7} M(包括端点);约 1×10^{-7} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M、约 1×10^{-6} M或约 0.5×10^{-6} M(包括端点);约 0.5×10^{-6} M至约 1×10^{-5} M、约 0.5×10^{-5} M或约 1×10^{-6} M(包括端点);约 1×10^{-6} M至约 1×10^{-5} M或约 0.5×10^{-5} M(包括端点);或约 0.5×10^{-5} M至约 1×10^{-5} M(包括端点),例如,如使用表面等离子体共振 (SPR) 在磷酸盐缓冲盐水中对于VEGF蛋白(例如,本文所述的任何VEGF蛋白,例如,成熟人VEGF-A、成熟人VEGF-B、成熟人VEGF-C和成熟人VEGF-D中的一者或多者)所测量的。

[0302] 可以使用本领域中已知的多种不同方法来确定本文所述的任何抗体的KD值(例如,电泳迁移率变化测定、过滤器结合测定、表面等离子体共振和双分子结合动力学测定等)。

[0303] 在本文所述的任何抗体的一些实施方案中,与类似受试者中的对照抗体(例如,本文所述的任何对照抗体或条件)的半衰期相比较,受试者(例如,人)中的抗体的半衰期减少约0.5倍至约4倍(例如,约0.5倍至约3.5倍、约0.5倍至约3倍、约0.5倍至约2.5倍、约0.5倍至约2倍、约0.5倍至约1.5倍、约0.5倍至约1倍、约1倍至约4倍、约1倍至约3.5倍、约1倍至约3倍、约1倍至约2.5倍、约1倍至约2倍、约1.5倍至约4倍、约1.5倍至约3.5倍、约1.5倍至约3倍、约1.5倍至约2.5倍、约1.5倍至约2倍、约2倍至约4倍、约2倍至约3.5倍、约2倍至约3倍、约2倍至约2.5倍、约2.5倍至约4倍、约2.5倍至约3.5倍、约2.5倍至约3倍、约3倍至约4倍、约3倍至约3.5倍或约3.5倍至约4倍)。参见例如Leabman等人,MAbs.5(6):896-903,2013,其以引用方式整体并入本文。在一些实施方案中,本文所述的抗体在Fc区具有一个或多个氨基酸取代,这会降低其在哺乳动物中的半衰期,且对照抗体缺少Fc区中这些一个或多个氨基

酸取代中的至少一个(例如,缺少全部)。

[0304] 在一些实施方案中,特异性结合至VEGF的抗体为贝伐单抗(**Avastatin®**)。贝伐单抗(全尺寸抗体约150kDa)抑制VEGF-A的所有同工型。贝伐单抗于2004年获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于结肠癌,2-3周时静脉内(IV)剂量为4.0-7.5mg/kg(血浆半衰期21天),玻璃体内(IVT)剂量为0.05mL中的1.25mg(半衰期5.6天)。贝伐单抗对VEGF₁₆₅(VEGF-A)的 K_D 为58pM。参见例如WO 2017/050825;其以引用方式整体并入本文。

[0305] 在一些实施方案中,特异性结合至VEGF的抗体为雷珠单抗(**Lucentis®**)。雷珠单抗(约50kDa)抑制VEGF-A的所有同工型。雷珠单抗于2006年获得FDA批准用于眼部用途,2-3周时静脉内(IV)剂量为4.0-7.5mg/kg(血浆半衰期0.5天),玻璃体内(IVT)剂量为0.05mL中的0.5mg(半衰期3.2天)。雷珠单抗对VEGF-A₁₆₅(VEGF-A同工型165,如SEQ ID NO:6所示)的 K_D 为46pM。参见例如WO 2014/178078;其以引用方式整体并入本文。

[0306] 在一些实施方案中,特异性结合至VEGF的抗体为赛伐珠单抗(sevacizumab)(APX003/SIM-BD0801)或其特征部分。

[0307] 在某些实施方案中,包含在如本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)内的抗VEGF蛋白编码序列选自批准用于视网膜、神经胶质母细胞瘤和其他癌症中病理性血管形成的VEGF抑制剂,包括例如:贝伐单抗(**Avastin®**);阿柏西普(**Eylea®**);ziv-阿柏西普(**Zaltrap®**);布洛赛珠单抗(brolucizumab,**Beovu®**);和/或雷珠单抗(**Lucentis®**)。此外,在一些实施方案中,可以利用非临床和临床开发的各个阶段的许多这些产品的生物仿制药,和雷珠单抗生物仿制药**Razumab®**。

[0308] 雷珠单抗、阿柏西普和布洛赛珠单抗各自均获准用于湿性年龄相关性黄斑变性(AMD)的重复玻璃体内施用;雷珠单抗和阿柏西普另外被批准用于视网膜静脉阻塞(RVO)、糖尿病性黄斑水肿(DME)和糖尿病性视网膜病变(DR)的重复玻璃体内施用。已经观察到,与VEGF抑制剂的静脉内治疗方案相比,靶向局部递送和相关全身暴露减少可能会导致安全概况改善(包括血栓栓塞事件发生率较低)。这些治疗剂的基因治疗型式目前正处于AMD和DME的临床开发阶段(Clinicaltrials.gov 2020b、2020c和2020d[NCT03066258、NCT03748784和NCT04418427],其中每一者以引用方式整体并入本文)。阿柏西普为一种重组融合蛋白(97kDa),其由与人IgG1的Fc部分融合的人VEGF受体1和2细胞外结构域的部分组成,当通过反复玻璃体内施用来局部递送至眼部时,所述融合蛋白已经证明在湿性AMD和DME临床试验中有效。与贝伐单抗一样,ziv-阿柏西普也被批准用于静脉内输注,且在出血和伤口愈合方面具有类似风险和警告(Sanofi-Aventis US2020,其以引用方式整体并入本文)。

[0309] 在一项针对湿性年龄相关性黄斑变性(AMD)患者的研究中,经由玻璃体内注射局部递送临床剂量的抗VEGF蛋白(诸如贝伐单抗和雷珠单抗)与4个月时视敏度显著改善有关;然而,在同一时间点,VEGF血浆水平仅在注射贝伐单抗的队列中显著降低(Carneiro 2012,其以引用方式整体并入本文)。在某些实施方案中,本公开中描述的方法和组合物提供了降低与全身递送相关和/或可能与贝伐单抗的急性局部递送相关的血浆VEGF水平的解决方案。某些研究已经证明与药代动力学研究结果一致的结果,例如,在兔中,玻璃体内注射后在血清中检测到贝伐单抗,而非雷珠单抗(Bakri 2007,其以引用方式整体并入本文)。对来自AMD关键试验的临床安全性数据的审查表明,雷珠单抗重复玻璃体内施用长达两年

与显著安全风险无关 (Schmidt-Erfurth2010,其以引用方式整体并入本文)。

[0310] 雷珠单抗

[0311] 雷珠单抗为一种人源化单克隆抗体片段 (Fab),当通过玻璃体内施用在眼中局部递送时,具有与阿柏西普相似的临床功效和等效的血栓栓塞事件发生率 (Genentech 2017,其以引用方式整体并入本文)。雷珠单抗为结合并中和VEGF的IgG1 Fab。雷珠单抗被认为通过阻止人VEGF-A蛋白的所有已知同工型与同源受体 (VEGFR-1和VEGFR-2) 的相互作用来结合至所述同工型并抑制生物活性。雷珠单抗以商品名**Lucentis®**销售。FDA批准其用于适应症,诸如治疗视网膜静脉阻塞后黄斑水肿、年龄相关性黄斑变性 (湿性) 和糖尿病性黄斑水肿。与贝伐单抗相比,雷珠单抗表现出高超过8倍的结合能力和高66倍的结合亲和力 (Klettner 2008;Yang 2014,其中每一者以引用方式整体并入本文)。这些差异导致雷珠单抗对VEGF诱导内皮增殖的IC₅₀比贝伐单抗小6倍,雷珠单抗对VEGF活性的临床相关影响低至0.37纳摩尔 (nM) (约17纳克/毫升 [ng/mL] 雷珠单抗;Yang 2014,其以引用方式整体并入本文)。重要地,雷珠单抗也缺少Fc区,从而允许分子避免Fc再循环并使其 (48kDa) 显著小于全尺寸抗体 (149kDa) (Meyer2011,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,此较小分子大小可能有利于改善向靶位点的扩散、渗入肿瘤间质的能力和/或扩散到肿瘤内靶位点的效率 (Xenaki 2017,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,如本文所述的组合物包含用于开发成rAAV基因治疗产品的雷珠单抗的编码序列。在一些实施方案中,如本文所述的组合物 (例如,rAAV-抗VEGF) 可被递送到耳蜗中,其中耳蜗内施用可导致低全身暴露并因此导致与静脉内施用相比安全概况得到改善。

[0312] 在某些实施方案中,本公开提供了包含缺乏Fc区的抗VEGF蛋白雷珠单抗的组合物。在贝伐单抗上发现的抗体Fc区被认为允许通过Fc受体介导的转运使贝伐单抗跨越生物屏障来分布,以及贝伐单抗对免疫反应的活化 (Kim 2009;Meyer 2011,其中每一者以引用方式整体并入本文)。某些研究表明,与贝伐单抗相比,雷珠单抗在高度稀释时可能表现出高17倍的结合能力和高6倍的结合亲和力 (Ferrara 2006;Klettner 2008,其中每一者以引用方式整体并入本文),这表明在较低浓度下比活性更大。在一些实施方案中,雷珠单抗的较小分子大小 (48kDa,相比之下贝伐单抗为149kDa) 也可有利于改善向靶位点的扩散、渗入肿瘤间质的能力和/或扩散到肿瘤内靶位点的效率 (Xenaki 2017,其以引用方式整体并入本文)。

[0313] 在一些实施方案中,如本文所述的与VEGF和/或其抗原呈递片段特异性结合的抗VEGF蛋白为抗体。在一些实施方案中,这种抗体包含免疫球蛋白轻链可变结构域,其为或包含与雷珠单抗的免疫球蛋白轻链可变结构域至少80% (例如,至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%) 相同的序列,且/或包含免疫球蛋白重链可变结构域,其为或包含与雷珠单抗的免疫球蛋白重链可变结构域至少80% (例如,至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%) 相同的序列。

[0314] 在一些实施方案中,如本文所述的与VEGF和/或其抗原呈递片段特异性结合的抗VEGF蛋白为抗体。在一些实施方案中,这种抗体尤其包含免疫球蛋白轻链可变结构域,其为或包含雷珠单抗的免疫球蛋白轻链可变结构域,和/或免疫球蛋白重链可变结构域,其为或包含雷珠单抗的免疫球蛋白重链可变结构域的。在一些实施方案中,抗体包含免疫球蛋白

轻链可变结构域,其为或包含雷珠单抗的免疫球蛋白轻链可变结构域的序列(如SEQ ID NO:20所示),不同之处在于其包含一、两、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或十五个氨基酸取代,且/或包含免疫球蛋白重链可变结构域,其为或包含雷珠单抗的免疫球蛋白重链可变结构域的序列(如SEQ ID NO:16、17或18所示),不同之处在于其包含一、两、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或十五个氨基酸取代。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含雷珠单抗的免疫球蛋白轻链可变结构域中的三个CDR,和/或雷珠单抗的免疫球蛋白重链可变结构域中的三个CDR。

[0315] 示例性雷珠单抗重链核苷酸序列(SEQ ID NO:13)

[0316] GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCC
GCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGG
ATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCA
GCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCC
TACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTAC
AAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGG
TCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTTGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCA
GCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGA
CCCACACCGCAAG

[0317] 示例性雷珠单抗重链核苷酸序列(SEQ ID NO:14)

[0318] GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCC
GCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGG
ATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCA
GCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCC
TACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTAC
AAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGG
TCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTTGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCA
GCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGA
CCCACAAG

[0319] 示例性雷珠单抗重链核苷酸序列(SEQ ID NO:15)

[0320] GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCC
GCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGG
ATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCA
GCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCC
TACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTAC
AAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGG
TCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTTGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCA
GCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGC

[0321] 示例性雷珠单抗重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:16)

[0322] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFT
FSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTGK

[0323] 示例性雷珠单抗重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:17)

[0324] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFT
FSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHL

[0325] 示例性雷珠单抗重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:18)

[0326] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFT
FSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KS

[0327] 示例性雷珠单抗轻链核苷酸序列 (SEQ ID NO:19)

[0328] GACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGT
AGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACCTGGTATCAGCAAAAGCCCGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTA
CTTACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA
TATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGACATTTGGCCAG
GGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAA
GTCTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGTGACCA
ATGCCCTGCAGAGCGGAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGC
ACCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAG
CCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT

[0329] 示例性雷珠单抗轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:20)

[0330] DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0331] 包含重链和轻链雷珠单抗的示例性可裂解多肽,核苷酸序列 (SEQ ID NO:103)

[0332] ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAG
CTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTT
CACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCCGATGGATCAACACCTACA
CCGGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTAC
CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAG
CCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTT
TCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCC
GAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAG
CGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGA

ACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAGCGG
AAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTA
TAGAATGCAGCTCCTGTCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCC
CCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTACCTG
AACTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCC
CAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCA
CCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCTTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTG
GCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCCTGCT
GAACAACCTTCTACCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGA
GCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAG
AAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGA
ATGT

[0333] 包含重链和轻链雷珠单抗的示例性可裂解多肽 (SEQ ID NO:21)

[0334] MYRMQLLSICIALSLALVTNSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVG
WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWQGTLTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGKRKRSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMYRMQLLSICIALSLALVTNSDI
QLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0335] 贝伐单抗

[0336] 贝伐单抗为一种针对VEGF的人源化单克隆全长抗体,其被批准用于静脉内输注,用于治疗神经胶质母细胞瘤、结直肠癌、肺癌、肾癌、宫颈癌和卵巢癌。然而,贝伐单抗治疗的主要缺点为需要持续定期静脉内输注和与体循环中高剂量相关的副作用,其包括高血压、蛋白尿、肝酶升高、动脉血栓栓塞事件 (ATE)、静脉血栓栓塞事件、出血、以及手术和伤口愈合并发症。当前,贝伐单抗为唯一已在VS患者中证明有效性的初步临床证据的药剂。

[0337] 在一些实施方案中,如本文所述的与VEGF和/或其抗原呈递片段特异性结合的抗VEGF蛋白为抗体。在一些实施方案中,这种抗体包含免疫球蛋白轻链可变结构域,其为或包含与贝伐单抗的免疫球蛋白轻链可变结构域至少80% (例如,至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%) 相同的序列,且/或包含免疫球蛋白重链可变结构域,其为或包含与贝伐单抗的免疫球蛋白重链可变结构域至少80% (例如,至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%) 相同的序列。

[0338] 在一些实施方案中,如本文所述的与VEGF和/或其抗原呈递片段特异性结合的抗VEGF蛋白为抗体。在一些实施方案中,这种抗体包含免疫球蛋白轻链可变结构域,其为或包含贝伐单抗的免疫球蛋白轻链可变结构域,和/或免疫球蛋白重链可变结构域,其为或包含贝伐单抗的免疫球蛋白重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体包含免疫球蛋白轻链可变结构域,其为或包含贝伐单抗的免疫球蛋白轻链可变结构域的序列,不同之处在于其包含一、两、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或十五个氨基酸取代,且/或包

含免疫球蛋白重链可变结构域,其为或包含贝伐单抗的免疫球蛋白重链可变结构域的序列,不同之处在于其包含一、两、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或十五个氨基酸取代。

[0339] 在一些实施方案中,如本文所述的与VEGF和/或其抗原呈递片段特异性结合的抗VEGF蛋白为抗体。在一些实施方案中,这种抗体包含免疫球蛋白轻链(例如,包含免疫球蛋白轻链可变结构域和免疫球蛋白轻链恒定结构域),其为或包含贝伐单抗的免疫球蛋白轻链恒定结构域,和/或免疫球蛋白重链(例如,包含免疫球蛋白重链可变结构域和免疫球蛋白重链恒定结构域),其为或包含贝伐单抗的免疫球蛋白重链恒定结构域。在一些实施方案中,抗体包含免疫球蛋白轻链恒定结构域,其为或包含贝伐单抗的免疫球蛋白轻链恒定结构域的序列,不同之处在于其包含一、两、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或十五个氨基酸取代,且/或包含免疫球蛋白重链恒定结构域,其为或包含贝伐单抗的免疫球蛋白重链恒定结构域的序列,不同之处在于其包含一、两、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或十五个氨基酸取代。

[0340] 在一些实施方案中,第一抗原结合结构域包含贝伐单抗的免疫球蛋白轻链可变结构域中的三个CDR,和/或贝伐单抗的免疫球蛋白重链可变结构域中的三个CDR。在一些实施方案中,第二抗原结合结构域包含贝伐单抗的免疫球蛋白轻链可变结构域中的三个CDR,和/或贝伐单抗的免疫球蛋白重链可变结构域中的三个CDR。

[0341] 示例性贝伐单抗核苷酸序列(SEQ ID NO:22)

[0342] ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTC AACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTT CACCAACTACGGCATGAAGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTGAATGGGTTCGATGGATCAACACCTAC CCGGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCCACTACTACGGCAGCAG CCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTT TCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCC GAGCCTGTGACCGTGTCTTGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAG CGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGA ACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCTCA TGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTCTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAG CAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGG ACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCC TATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG AGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAG CAAGCTGACAGTGGAACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGC CTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCTGATTGCCCTGAG CCTGGCTCTCGTGACCAACAGCGACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAG

TGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGCAAGGCCCT
AAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGA
CTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTT
GGACATTTGGCCAGGGCACAAGGTGGAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGC
GACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCAGAGAAGCCAAGGTGCA
GTGGAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCT
ATAGCCTGAGCAGACCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCAC
CAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT

[0343] 包含重链和轻链贝伐单抗氨基酸序列的示例性可裂解多肽 (SEQ ID NO:23)

[0344] MYRMQLLSICIALSLALVTNSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG
WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWQGGLTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
HEALHNHYTQKSLSLSPGKRKRGRSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMYRMQLLSICIALSLALVTNSDIQMTQSPSSLSA
SVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPKGAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0345] 示例性贝伐单抗重链核苷酸序列 (SEQ ID NO:108)

[0346] ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAG
CTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTT
CACCAACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTGAATGGGTGGATGGATCAACACCTACA
CCGGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTAC
CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCCACTACTACGGCAGCAG
CCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTT
TCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCC
GAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAG
CGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGA
ACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCTCA
TGTCTGTCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAG
CAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTG
CTGACCGTGTGACACGAGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCC
TATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAAG
AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG
AGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAG
CAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA
ACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAG

[0347] 示例性贝伐单抗重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:24)

[0348] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFT
FSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0349] 示例性贝伐单抗轻链核苷酸序列 (SEQ ID NO:109)

[0350] GACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGT
AGGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTA
CTTACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA
TATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGACATTTGGCCAG
GGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAA
GTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACA
ATGCCCTGCAGAGCGGAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGC
ACCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAG
CCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT

[0351] 示例性贝伐单抗轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:25)

[0352] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0353] VEGF TRAP

[0354] 可溶性VEGF受体 (本文也称为VEGF TRAP) 为一种多肽,其包含与信号肽 (例如,本文所述的任何示例性信号肽) 可操作地连接的一种或多种 (例如,两种或三种) 哺乳动物VEGF受体 (例如,VEGFR-1、VEGFR-2和VEGFR-3中的一者或多者) 的细胞外区域的一部分,其中可溶性VEGF受体能够特异性结合至一种或多种哺乳动物VEGF蛋白 (例如,VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C和VEGF-D中的一种或多种 (例如,两种、三种或四种),例如人野生型VEGF-A、人野生型VEGF-B、人野生型VEGF-C和人野生型VEGF-D中的一种或多种 (例如,两种、三种或四种))。

[0355] 在一些实例中,可溶性VEGF受体包含VEGFR-1的细胞外区域的一部分 (例如,约10个氨基酸至约732个氨基酸、约10个氨基酸至约700个氨基酸、约10个氨基酸至约650个氨基酸、约10个氨基酸至约600个氨基酸、约10个氨基酸至约550个氨基酸、约10个氨基酸至约500个氨基酸、约10个氨基酸至约450个氨基酸、约10个氨基酸至约400个氨基酸、约10个氨基酸至约350个氨基酸、约10个氨基酸至约300个氨基酸、约10个氨基酸至约250个氨基酸、约10个氨基酸至约200个氨基酸、约10个氨基酸至约150个氨基酸、约10个氨基酸至约100个氨基酸、约10个氨基酸至约50个氨基酸、约50个氨基酸至约732个氨基酸、约50个氨基酸至约700个氨基酸、约50个氨基酸至约650个氨基酸、约50个氨基酸至约600个氨基酸、约50个氨基酸至约550个氨基酸、约50个氨基酸至约500个氨基酸、约50个氨基酸至约450个氨基酸、约50个氨基酸至约400个氨基酸、约50个氨基酸至约350个氨基酸、约50个氨基酸至约

300个氨基酸、约50个氨基酸至约250个氨基酸、约50个氨基酸至约200个氨基酸、约50个氨基酸至约150个氨基酸、约50个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约732个氨基酸、约100个氨基酸至约700个氨基酸、约100个氨基酸至约650个氨基酸、约100个氨基酸至约600个氨基酸、约100个氨基酸至约550个氨基酸、约100个氨基酸至约500个氨基酸、约100个氨基酸至约450个氨基酸、约100个氨基酸至约400个氨基酸、约100个氨基酸至约350个氨基酸、约100个氨基酸至约300个氨基酸、约100个氨基酸至约250个氨基酸、约100个氨基酸至约200个氨基酸、约100个氨基酸至约150个氨基酸、约150个氨基酸至约732个氨基酸、约150个氨基酸至约700个氨基酸、约150个氨基酸至约650个氨基酸、约150个氨基酸至约600个氨基酸、约150个氨基酸至约550个氨基酸、约150个氨基酸至约500个氨基酸、约150个氨基酸至约450个氨基酸、约150个氨基酸至约400个氨基酸、约150个氨基酸至约350个氨基酸、约150个氨基酸至约300个氨基酸、约150个氨基酸至约250个氨基酸、约150个氨基酸至约200个氨基酸、约200个氨基酸至约732个氨基酸、约200个氨基酸至约700个氨基酸、约200个氨基酸至约650个氨基酸、约200个氨基酸至约600个氨基酸、约200个氨基酸至约550个氨基酸、约200个氨基酸至约500个氨基酸、约200个氨基酸至约450个氨基酸、约200个氨基酸至约400个氨基酸、约200个氨基酸至约350个氨基酸、约200个氨基酸至约300个氨基酸、约200个氨基酸至约250个氨基酸、约250个氨基酸至约732个氨基酸、约250个氨基酸至约700个氨基酸、约250个氨基酸至约650个氨基酸、约250个氨基酸至约600个氨基酸、约250个氨基酸至约550个氨基酸、约250个氨基酸至约500个氨基酸、约250个氨基酸至约450个氨基酸、约250个氨基酸至约400个氨基酸、约250个氨基酸至约350个氨基酸、约250个氨基酸至约300个氨基酸、约300个氨基酸至约732个氨基酸、约300个氨基酸至约700个氨基酸、约300个氨基酸至约650个氨基酸、约300个氨基酸至约600个氨基酸、约300个氨基酸至约550个氨基酸、约300个氨基酸至约500个氨基酸、约300个氨基酸至约450个氨基酸、约300个氨基酸至约400个氨基酸、约300个氨基酸至约350个氨基酸、约350个氨基酸至约732个氨基酸、约350个氨基酸至约700个氨基酸、约350个氨基酸至约650个氨基酸、约350个氨基酸至约600个氨基酸、约350个氨基酸至约550个氨基酸、约350个氨基酸至约500个氨基酸、约350个氨基酸至约450个氨基酸、约350个氨基酸至约400个氨基酸、约400个氨基酸至约732个氨基酸、约400个氨基酸至约700个氨基酸、约400个氨基酸至约650个氨基酸、约400个氨基酸至约600个氨基酸、约400个氨基酸至约550个氨基酸、约400个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸至约450个氨基酸、约450个氨基酸至约732个氨基酸、约450个氨基酸至约700个氨基酸、约450个氨基酸至约650个氨基酸、约450个氨基酸至约600个氨基酸、约450个氨基酸至约550个氨基酸、约450个氨基酸至约500个氨基酸、约500个氨基酸至约732个氨基酸、约500个氨基酸至约700个氨基酸、约500个氨基酸至约650个氨基酸、约500个氨基酸至约600个氨基酸、约500个氨基酸至约550个氨基酸、约550个氨基酸至约732个氨基酸、约550个氨基酸至约700个氨基酸、约550个氨基酸至约650个氨基酸、约550个氨基酸至约600个氨基酸、约600个氨基酸至约732个氨基酸、约600个氨基酸至约700个氨基酸、约600个氨基酸至约650个氨基酸、约650个氨基酸至约732个氨基酸、约650个氨基酸至约700个氨基酸或约700个氨基酸至约732个氨基酸)(例如,来自野生型人VEGFR-1的连续序列(例如,包括来自野生型人VEGFR-1(例如,SEQ ID NO:27、29、31或33)的细胞外区域中的一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个)免疫球蛋白样结构域的连续序列或与来自野生型人

VEGFR-1的连续序列至少80% (例如,至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%)相同的序列,例如与SEQ ID NO:27、29、31或33中的连续序列至少80% (例如,至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%)相同的序列。

[0356] 在一些实例中,可溶性VEGF受体包含VEGFR-2的细胞外区域的一部分(例如,约20个氨基酸至约745个氨基酸,或本文所述的此范围的任何子范围)(例如,来自野生型人VEGFR-2的连续序列(例如,包括来自野生型人VEGFR-2(例如,SEQ ID NO:35)的细胞外区域中的一个或多个(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个)免疫球蛋白样结构域的连续序列或与来自野生型人VEGFR-2的连续序列至少80% (例如,至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%)相同的序列,例如与SEQ ID NO:35中的连续序列至少80% (例如,至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%)相同的序列)。

[0357] 在一些实例中,可溶性VEGF受体包含VEGFR-1细胞外区域的一部分(例如,本文所述的VEGFR-1细胞外区域的任何部分)和VEGFR-2细胞外区域的一部分(例如本文所述的VEGFR-2细胞外区域的任何部分)。例如,可溶性VEGF受体可以包括来自野生型人VEGFR-1的细胞外区域中的一个或多个(例如两个、三个、四个、五个、六个或七个)免疫球蛋白样结构域和来自野生型人VEGFR-2(例如,阿柏西普)的细胞外区域中的一个或多个(例如两个、三个、四个、五个、六个或七个)免疫球蛋白样结构域。

[0358] 在一些实例中,可溶性VEGF受体包含VEGFR-3的细胞外区域的一部分(例如,约20个氨基酸至约751个氨基酸,或本文所述的此范围的任何子范围)(例如,来自野生型人VEGFR-3的连续序列(例如,包括来自野生型人VEGFR-3(例如,SEQ ID NO:37、39或41)的细胞外区域中的一个或多个(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个)免疫球蛋白样结构域的连续序列或与来自野生型人VEGFR-3的连续序列至少80% (例如,至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%)相同的序列,例如与SEQ ID NO:37、39或41中的连续序列至少80% (例如,至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%)相同的序列)。

[0359] 本文描述了不同哺乳动物VEGFR-1、不同哺乳动物VEGFR-2和不同哺乳动物VEGFR-3的细胞外区域的非限制性实例。下文示出了编码野生型VEGF受体蛋白质的蛋白质和核苷酸序列的非限制性实例。本领域技术人员可以理解,物种之间保守的氨基酸的取代更可能导致蛋白质功能发生改变,而物种之间不保守的氨基酸位置的取代不太可能对蛋白质的功能产生影响。

[0360] 在人染色体位置13q12.3处发现的VEGFR-1基因编码33外显子,其含有血管内皮生长因子受体(VEGFR)家族的成员。VEGFR家族成员为受体酪氨酸激酶(RTK),其含有具有七个免疫球蛋白(Ig)样结构域的细胞外配体结合区、跨膜区段和胞质结构域内的酪氨酸激酶(TK)结构域。此蛋白与VEGF-A、VEGF-B和胎盘生长因子结合,且在血管生成和血管发生中起重要作用。在血管内皮细胞、胎盘滋养层细胞和外周血单核细胞中发现此受体的表达。已发现此基因的编码不同同工型的多种转录物变体。同工型包括全长跨膜受体同工型和缩短可溶性同工型。

[0361] 示例性人VEGFR-1同工型1cDNA序列 (SEQ ID NO:26)

[0362] ATCGAGGTCCGCGGGAGGCTCGGAGCGCGCCAGGCGGACACTCCTCTCGGCTCCTCCCCGGCAGCGGCG
GCGGCTCGGAGCGGGCTCCGGGGCTCGGGTGCAGCGGCCAGCGGGCGCCTGGCGGCGAGGATTACCCGGGGAAGTGG
TTGTCTCCTGGCTGGAGCCGCGAGACGGGCGCTCAGGGCGCGGGGCCGGCGGCGGAACGAGAGGACGGACTCTGG
CGGCCGGGTCGTTGGCCGCGGGAGCGCGGGACCGGGCGAGCAGGCCGCGTCGCGCTCACCATGGTCAGCTACTGG
GACACCGGGTCTGTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTTAAAGA
TCCTGAACTGAGTTTAAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGGAAG
CAGCCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCCTGTGGA
AGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAACCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAA
ATATCTAGCTGTACCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACAGGTAGAC
CTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGG
GTTACGTACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAAT
CTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAG
TCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACA
CCACGCCCAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTGTCTCAATTGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGT
TCAAATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAATTGACCAAAGCAATTCCC
ATGCCAACATATTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAAAAATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTGA
AGGAGTGGACCATCATTCAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTCACTGTGAAACATCG
AAAACAGCAGGTGCTTGAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTATGAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGC
CGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTACCTGCGACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTA
ATTATCAAGGACGTAAGTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATGTGTTAA
AAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCAGATTTACGAAAAGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGG
CTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCCTGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTC
TGGCACCCCTGTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTCCAATAATGAAGAGTCCTTTATCCTGGA
TGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGCATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGATGG
CTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTCTAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTG
GGAAGAAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTAACTTGGAAAAATGCCGACGGAAGG
AGAGGACCTGAACTGTCTTGACAGTTAACAAGTTCTTATACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGACAGTTA
ATAACAGAACAATGCACTACAGTATTAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTT
ACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCTGCAGAGCCAGGAATGTATACACAGGGGAAGAAAT
CCTCCAGAAGAAAGAAATTACAATCAGAGATCAGGAAGCACCATACCTCCTGCGAAACCTCAGTGATCACACAGTGG
CCATCAGCAGTTCCACCACTTTAGACTGTCATGCTAATGGTGTCCCCGAGCCTCAGATCACTTGGTTTTAAAAACAAC
CACAAAATACAACAAGAGCCTGGAATTATTTAGGACCAGGAAGCAGCACGCTGTTTATTGAAAGAGTCACAGAAGA
GGATGAAGGTGTCTATCACTGCAAAGCCACCAACCAGAAGGGCTCTGTGGAAAGTTCAGCATACCTCACTGTTCAAG
GAACCTCGGACAAGTCTAATCTGGAGCTGATCACTCTAACATGCACCTGTGTGGCTGCGACTCTCTTCTGGCTCCTA
TTAACCTCTTTATCCGAAAAATGAAAAGGTCTTCTTCTGAAATAAAGACTGACTACCTATCAATTATAATGGACCC
AGATGAAGTTCCTTTGGATGAGCAGTGTGAGCGGCTCCCTTATGATGCCAGCAAGTGGGAGTTTGCCCGGGAGAGAC
TTAAACTGGGCAAATCACTTGGAAGAGGGGCTTTTGAAAAAGTGGTTCAAGCATCAGCATTTGGCATTAAAGAAATCA
CCTACGTGCCGACTGTGGCTGTGAAAATGCTGAAAGAGGGGGCCACGGCCAGCGAGTACAAAGCTCTGATGACTGA

GCTAAAAATCTTGACCCACATTGGCCACCATCTGAACGTGGTTAACCTGCTGGGAGCCTGCACCAAGCAAGGAGGGC
CTCTGATGGTGATTGTTGAATACTGCAAAATATGGAATCTCTCCAACTACCTCAAGAGCAAACGTGACTTATTTTTT
CTCAACAAGGATGCAGCACTACACATGGAGCCTAAGAAAAGAAAAATGGAGCCAGGCCTGGAACAAGGCAAGAAACC
AAGACTAGATAGCGTCACCAGCAGCGAAAAGCTTTGCGAGCTCCGGCTTTCAGGAAGATAAAAGTCTGAGTGATGTTG
AGGAAGAGGAGGATTCTGACGGTTTCTACAAGGAGCCCATCACTATGGAAGATCTGATTTCTTACAGTTTTCAAGTG
GCCAGAGGCATGGAGTTCCTGTCTTCCAGAAAAGTGCAATTCATCGGGACCTGGCAGCGAGAAACATTCTTTTATCTGA
GAACAACGTGGTGAAGATTTGTGATTTTGGCCTTGCCCGGGATATTTATAAGAACCCCGATTATGTGAGAAAAGGAG
ATACTCGACTTCCTCTGAAATGGATGGCTCCTGAATCTATCTTTGACAAAATCTACAGCACCAAGAGCGACGTGTGG
TCTTACGGAGTATTGCTGTGGGAAATCTTCTCCTTAGGTGGGTCTCCATACCCAGGAGTACAAATGGATGAGGACTT
TTGCAGTCGCCTGAGGGAAGGCATGAGGATGAGAGCTCCTGAGTACTCTACTCCTGAAATCTATCAGATCATGCTGG
ACTGCTGGCACAGAGACCCAAAAGAAAGGCCAAGATTGCAGAACTTGTTGAAAACTAGGTGATTTGCTTCAAGCA
AATGTACAACAGGATGGTAAAGACTACATCCCAATCAATGCCATACTGACAGGAAATAGTGGGTTTACATACTCAAC
TCCTGCCTTCTCTGAGGACTTCTTCAAGGAAAGTATTTAGCTCCGAAGTTTAATTCAGGAAGCTCTGATGATGTCA
GATACGTAAATGCTTTCAAGTTCATGAGCCTGGAAAAGTCAAAACCTTTGAAGAACTTTTACCGAATGCCACCTCC
ATGTTTGATGACTACCAGGGCGACAGCAGCACTCTGTTGGCCTCTCCCATGCTGAAGCGCTTCACCTGGACTGACAG
CAAACCCAAGGCCTCGCTCAAGATTGACTTGAGAGTAACCAGTAAAAGTAAGGAGTCGGGGCTGTCTGATGTCAGCA
GGCCCAGTTTCTGCCATTCCAGCTGTGGGCACGTCAGCGAAGGCAAGCGCAGGTTACCTACGACCACGCTGAGCTG
GAAAGGAAAATCGCGTGCTGCTCCCCGCCCCAGACTACAACCTCGGTGGTCTGTACTCCACCCACCCATCTAGAG
TTTGACACGAAGCCTTATTTCTAGAAGCACATGTGTATTTATACCCCAAGGAACTAGCTTTTGCCAGTATTATGCA
TATATAAGTTTACACCTTTATCTTTCCATGGGAGCCAGCTGCTTTTTGTGATTTTTTTAATAGTGCTTTTTTTTTTT
TGACTAACAAGAATGTAACCTCCAGATAGAGAAATAGTGACAAGTGAAGAACTACTGCTAAATCCTCATGTTACTC
AGTGTTAGAGAAATCCTTCTAAACCAATGACTTCCCTGCTCCAACCCCGCCACCTCAGGGCACGCAGGACCAGT
TTGATTGAGGAGCTGCACTGATCACCAATGCATCACGTACCCCACTGGGCCAGCCCTGCAGCCAAAACCCAGGGC
AACAAGCCCGTTAGCCCCAGGGATCACTGGCTGGCCTGAGCAACATCTCGGGAGTCCTCTAGCAGGCCTAAGACATG
TGAGGAGGAAAAGGAAAAAAGCAAAAAGCAAGGGAGAAAAGAGAAACCGGAGAAAGGCATGAGAAAGAATTTGAGA
CGCACCATGTGGGCACGGAGGGGGACGGGGCTCAGCAATGCCATTTAGTGGCTTCCCAGCTCTGACCCTTCTACAT
TTGAGGGCCCAGCCAGGAGCAGATGGACAGCGATGAGGGGACATTTTCTGGATTCTGGGAGGCAAGAAAAGGACAAA
TATCTTTTTTTGGAATAAAGCAAATTTTAGAATTTACCTATGGAAGTGGTTCTATGTCCATTCTCATTTCGTGGCAT
GTTTTGATTTGTAGCACTGAGGGTGGCACTCAACTCTGAGCCATACTTTTGGCTCCTCTAGTAAGATGCACTGAAA
ACTTAGCCAGAGTTAGGTTGTCTCCAGGCCATGATGGCCTTACACTGAAAATGTCACATTCTATTTTGGGTATTAAT
ATATAGTCCAGACACTTAACTCAATTTCTTGGTATTATTCTGTTTTGCACAGTTAGTTGTGAAAGAAAGCTGAGAAG
AATGAAAATGCAGTCCTGAGGAGAGGAGTTTTCTCCATATCAAAACGAGGGCTGATGGAGGAAAAGGTCAATAAGG
TCAAGGGAAAACCCCGTCTCTATACCAACCAAAACCAATTCACCAACACAGTTGGGACCCAAAACACAGGAAGTCAGT
CACGTTTTCTTTTCAATTAATGGGGATTCCACTATCTCACACTAATCTGAAAGGATGTGGAAGAGCATTAGCTGGCG
CATATTAAGCACTTTAAGCTCCTTGAGTAAAAAGGTGGTATGTAATTTATGCAAGGTATTTCTCCAGTTGGGACTCA
GGATATTAGTTAATGAGCCATCACTAGAAGAAAAGCCATTTTCAACTGCTTTGAACTTGCCTGGGGTCTGAGCAT
GATGGGAATAGGGAGACAGGGTAGGAAAGGGCGCCTACTCTCAGGGTCTAAAGATCAAGTGGGCCTTGGATCGCTA
AGCTGGCTCTGTTTGATGCTATTTATGCAAGTTAGGGTCTATGTATTTATGATGTCTGCACCTTCTGCAGCCAGTCA
GAAGCTGGAGAGGCAACAGTGGATTGCTGCTTCTTGGGGAGAAGAGTATGCTTCCTTTTATCCATGTAATTTAACTG

TAGAACCTGAGCTCTAAGTAACCGAAGAATGTATGCCTCTGTTCTTATGTGCCACATCCTTGTTTAAAGGCTCTCTG
TATGAAGAGATGGGACCGTCATCAGCACATTCCCTAGTGAGCCTACTGGCTCCTGGCAGCGGCTTTTGTGGAAGACT
CACTAGCCAGAAGAGAGGAGTGGGACAGTCCCTCTCCACCAAGATCTAAATCCAAACAAAAGCAGGCTAGAGCCAGAA
GAGAGGACAAATCTTTGTTCTTCTCTTTACATACGCAAACCACCTGTGACAGCTGGCAATTTTATAAATCAGG
TAACTGGAAGGAGGTTAAACACAGAAAAAAGAAGACCTCAGTCAATTCTCTACTTTTTTTTTTTTCCAAATCAGA
TAATAGCCCAGCAAATAGTGATAACAAATAAAACCTTAGCTATTTCATGTCTTGATTTCAATAATTAATTCTTAATCA
TTAAGAGACCATAATAAATACTCCTTTTCAAGAGAAAAAGCAAAACCATTAGAATTGTTACTCAGCTCCTTCAAACCTC
AGGTTTGTAGCATACATGAGTCCATCCATCAGTCAAAGAATGGTTCATCTGGAGTCTTAATGTAGAAAGAAAAATG
GAGACTTGTAATAATGAGCTAGTTACAAAGTGCTTGTTTCATTAAAATAGCACTGAAAATTGAAACATGAATTAAGT
ATAATATTCCAATCATTTGCCATTTATGACAAAAATGGTTGGCACTAACAAAGAACGAGCACTTCCTTTCAGAGTTT
CTGAGATAATGTACGTGGAACAGTCTGGGTGGAATGGGGCTGAAACCATGTGCAAGTCTGTGTCTTGTCTAGTCCAAG
AAGTGACACCGAGATGTTAATTTTAGGGACCCGTGCCTTGTTTCCTAGCCCACAAGAATGCAAACATCAAACAGATA
CTCGCTAGCCTCATTTAAATTGATTAAAGGAGGAGTGCATCTTTGGCCGACAGTGGTGTAACTGTATGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGGTGTATGTGTGTTTGTGCATAACTATTTAAGGAACTGGAATTTTAAAGT
TACTTTTATACAAACCAAGAATATATGCTACAGATATAAGACAGACATGGTTTGGTCTATATTTCTAGTCATGATG
AATGTATTTTGTATACCATCTTCATATAATAAACTTCCAAAAACACA

[0363] 示例性人VEGFR-1同工型1前体氨基酸序列(SEQ ID NO:27)

[0364] MVS YWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPPEMVS
KESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII
HMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYTH
RQNTNIIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDK
MQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLKDGLPAT
EKSARYLTRGYSLIIKDVTEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTC
TAYGIPQPTIKWFHPCNHNHSEARCDFCNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMALIEGKNKMASTLVVADSRISG
IYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLKMPTEGEDLKLCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQK
MAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTACRARNVYTGEIILQKKEITIRDQEAPYLLRNLSHTVAISSSTTLCHAN
GVPEPQITWFKNNHKIQQEPGII LGPGSSTLFIERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAYLTVQGTSDKSNLELITL
TCTCVAATLFWLLTLFIRKMKRSSSEIKTDYLSIIMDPDEVPLDEQCERLPYDASKWEFARERLKLKGLGRGAFG
KVVQASAFGIKKSPTCRTVAVKMLKEGATASEYKALMTELKILTHIGHHLNVNLLGACTKQGGPLMIVIEYCKYGN
LSNYLKSKRDLFFLNKDAALHMEPKKEKMEPGLEQGKKPRLDVTSSESFASSGFQEDKSLSDVEEEEDSDGFYKEP
ITMEDLISYSFQVARGMEFLSSRKCIHRDLAARNILLSENN VKICDFGLARDIYKNPDYVRKGDTRLPLKWMAPES
IFDKIYSTKSDVWSYGVLLWEIFSLGGSPYPGVQMDDEFCSRLREGMRRAPEYSTPEIYQIMLDCWHRDPKERPRF
AELVEKLGDLLQANVQQDGKDYIPINAILTGNSGFTYSTPAFSEDFFKESISAPKFNSGSSDDVRYVNAFKFMSLER
IKTFEELLPNATSMFDDYQGDSSSTLLASPMLKRFTWTD SKPKASLKIDLRVTSKSKESGLSDVSRPSFCHSSCGHVS
EGKRRFTYDHAELERKIACCSPPPDYNSVVLYSTPPI

[0365] 此变体(2),也称为sFlt1或sVEGFR-1,与变体1相比,在3'编码区和3'UTR方面有所不同。所编码的可溶性蛋白(同工型2)具有更短、独特的C端,且缺乏同工型1的跨膜和细胞质区域。

[0366] 示例性人VEGFR-1同工型2(也称为sVEGFR-1)cDNA序列(SEQ ID NO:28)

[0367] ATCGAGGTCCGCGGGAGGCTCGGAGCGCGCCAGGCGGACACTCCTCTCGGCTCCTCCCCGGCAGCGGCG
GCGGCTCGGAGCGGGCTCCGGGGCTCGGGTGCAGCGGCCAGCGGGCGCCTGGCGGCGAGGATTACCCGGGGAAGTGG
TTGTCTCCTGGCTGGAGCCGCGAGACGGGCGCTCAGGGCGCGGGGCCGGCGGCGGAACGAGAGGACGGACTCTGG
CGGCCGGGTCGTTGGCCGCGGGGAGCGCGGGCACCGGGCGAGCAGGCCGCGTCGCGCTCACCATGGTCAGCTACTGG
GACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAAAGA
TCCTGAACTGAGTTTAAAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGGAAG
CAGCCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCCTGTGGA
AGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAACCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAA
ATATCTAGCTGTACCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACAGGTAGAC
CTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGG
GTTACGTACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAAT
CTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAG
TCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACA
CCACGCCCAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTTGTCCTCAATTGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGT
TCAAATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAATTGACCAAAGCAATTCCC
ATGCCAACATATTCTACAGTGTCTTACTATTGACAAAAATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTGA
AGGAGTGGACCATCATTCAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTCACTGTGAAACATCG
AAAACAGCAGGTGCTTGAAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTATGAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGC
CGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTTACCTGCGACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTA
ATTATCAAGGACGTAAGTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATGTGTTTAA
AAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCCAGATTACGAAAAGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGG
CTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCCTGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTC
TGGCACCCCTGTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTCATAATGAAGAGTCCTTTATCCTGGA
TGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGCATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGATGG
CTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTCTAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTG
GGAAGAAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTAACTTGGAAAAATGCCGACGGAAGG
AGAGGACCTGAAACTGTCTTGACAGTTAACAAGTTCTTATACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGACAGTTA
ATAACAGAACAATGCACTACAGTATTAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTT
ACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCTGCAGAGCCAGGAATGTATACACAGGGGAAGAAAT
CCTCCAGAAGAAAGAAATTACAATCAGAGGTGAGCACTGCAACAAAAAGGCTGTTTTCTCTCGGATCTCCAAATTTA
AAAGCACAAGGAATGATTGTACCACACAAAGTAATGTAAAACATTAAAGGACTCATTAAAAAGTAACAGTTGTCTCA
TATCATCTTGATTTATTGTCACTGTTGCTAACTTTCAGGCTCGGAGGAGATGCTCCTCCCAAAATGAGTTCGGAGAT
GATAGCAGTAATAATGAGACCCCCGGGCCCCAGCTCTGGGCCCCCATTACAGGCCGAGGGGGCTGCTCCGGGGGGCC
GACTTGGTGCACGTTTGGATTTGGAGGATCCCTGCACTGCCTTCTCTGTGTTTGTGCTCTTGCTGTTTTCTCCTGC
CTGATAAACAACTTGGGATGATCCTTTCCTTCCATTTTGATGCCAACCTCTTTTTATTTTAAAGTGTGAAGCT
GCACAACTGAATAATTTAAACAAATGCTGGTTTCTGCCAAAGATGGACACGAATAAGTTAATTTTCCAGCTCAGAA
TGAGTACAGTTGAATTTGAGACTCTGTGCGACTTCTGCCTGGTTTTATTTGGGACTATTTTCATCTGCTCTTGATTTG
TAAATAGCACCTGGATAGCAAGTTATAATGCTTATTTATTTGAAAATGCTTTTTTTTTTTTTTACGTTAAGCACATTT
ATCTTGAACTGGAGCTTCTAAAATGGGCCCCAGGGGTGCAAGATGTTGGTGAATTCAGAGATAGTAAAGGTTTATC

GCAGTGTGAATTATAAGAGTCCATCCAAATCAACGTCCCCTCCCTCCTCTCATGCGATCCAGGTAATTATGCAGTTA
GTGCCACAGTAGACTAGCCTAGCAAAGGGTTTGCTCCTTGCTGTCTCTGACTGCACCACACAGCTATTGATGGCAGC
TGAAAGAAAGTGGATCATGCCTTAATTTTAAATATTCCTGTCTCTGGTTATTATTTTAAGGAACTTCATCATGTTA
AAATGACAGCATTCAAAGGTGTACCACAATCAATTTATCAAGGAAATAAAGGCTATTGTAACCAGAGATTTAATGCA
TTCTTCTAAATGTAAATTTAAAAATTTGCCCTTTAAAAAAGTCCACTTTCCCATATGCAAATGTTAATAGGATTTTT
ATGGGGATTAAGAAGCGGCAAAACTACAGAAGCAGAATTCAAAGTAATTTAAAAAATACACACCAGTTTTAAATCAA
GAGAAGTTGTAATCTCTTGTTTTAAGCTTGCGTTTGAGGGAAAAATGACTTTTTTACCAATTTAATATGCATTGTTCT
GTTGTTTTTATTTATGATTGATCATTATATGTGACTTGCATAAACTATTTAAAAAATACTATAATGACCAAAAT
AGCCATGGCTGAGAAACACAGTGGCTGGGCAGTTCAATAGGAGGTGACAATATGACAACCTTCTCAAGCTTGGGAACT
CACCAGACTGTTTCTCCTTTAGGTAACAGATTCTGTCCACGGCTAAACTTGTCTTTCACGTGGGAATTGCTTTTG
TCAAACGTGAAAGAGTAAACAATAGCATTTCGCCAGAATGCCAGTTTTATGGAGCCCCAAATGCTCTGAAAACAATT
AGTAACCTGGAAGTTGTCAGCCCCAAAGGAAAGAAAAATCAATTGTATCTTGAAATTTTACCTATGGCTCTTTGGCCT
GGCTTCTTTGTTTCATTATAAGTTAGTGTGTTCCCTCAGGAAACAATGCCTTAATACCATAGAACATGGGGGCCTTAA
TAGTTGCTAACATTAAAAAAGCAAACAGAATGATTGAGGGATCCTTATGAAAACAAAATGGTGAATTGGACATGCAG
AACCTACCATTTTCTTCCCCTGTTTGCAATTTTGTGGGGAGGGGAGGATGTTAGTATTTACAAAAGATGATTTTAA
GAACTTCCAAGAGATGAGTTTAAGAATTCATAGAGTATTAGTTGTTCACTGTGTAATTAATCCTTCCGGAGAGTCT
TTTTTTTTTTTTTAAAGAACTTTTGGGTGGGTTTTGTTTTTATTAGTTACCCTAGGGGTATGTTACCCTGGGGT
ATGAAGGGAGGTGAAGATAACGGAGGGGGGAGAAAAAAGGAGAAAAAGGAGCCTAAAATGGGGAATAATTGA
AATGGAACAGGGGGTGTGAGGCTGGTTCCTCAGTCCCCATTCCAAACGGAGGATAGAAGCTGTGTATTTATGTGACC
TGGCAGATCTCTGGGGCCATAACACTGAAAAGTGAAAGAACCTGGTGGGCAGCTATCTTTGGCTACTGATAACCAGC
AGAAATGTCTGTTAATTCTGATTTTCTCAATTTGAAGGGATCAGCTACACTGTAAATTTTGAAAGCCACTACCTA
CTTCCATCAAGTAACTTAGGTTTCGAAATATGGGTTCACGCACCTCCCTTATTCAAAATGTCAAATAGATTATTA
TAATGTATAAAGTAAGAATTGACAAAATATGATTCTTGGGTGATTGGTCATTTAGAACTAGCCAAAAGTGAGACT
TTTAATGTAGAACATTTTTCAGAAATGGGTACAAAGAAAAATGCATATTACTGTATATTTAGAGTGTTTATGTGAA
CCTTGATTTAATTGAGAGTCCCATGTACGTTCTGCAGCCTTTTTGCTGCTTCTATCATCTGAAGTTTGTGTAGTAC
AAATAAGGCCTTTGGGATTCTTAATGACATTTATGTTAAATGTTCTCTTCTTTAAACACCGTTTTCCAATCCAC
CTGTGAGGGAGTCCAAATCGTGTCTGTGTTGATGATGCTATACTTTGTAGCTAGAAAAACAATTTTAGTGTTGTGGG
CTCTGTATTACAGACTTCCTTTTTACAAGACCGATGGGCAGTGATAGATTATTTTATCATATTTAATGCATGGGAAAT
AGTGTGCTGAGGAAGCTATTAAGTATAACTCAGTGAATTGGGTCTGAGTTTTAAATGAGATATTTCAAATTTGGC
TTGCCACTGTAAAAGCGACTAAATAATAATGATACTGTTCTTTATGATCTTGTCATGTTTCACTGATATGTTTGG
GGTCTTCACTATGTAAAAAATGTCAAATTTGTAATGAGCAAGCATGTACAAGTAGTCGTAAATCAAAGGTTTTAAAC
AGGACTGCATTTTCAATTAGGAAAAGCTGTTTGGCAGATAGCATCCAATGCAAAAACAGAAATATCGTAACGTTCTG
CTTAGTGGGCAAGATAAGATAGGAAAGACATGCTCAAAGAGGCAAAAGAATCATTGCTATCATTCTTACACTAG
TTTGAAGAAGTTTTTGTACATCAGAGCACTTCCTTCAGCACACTTTTTTGCCTTCAGATTTTCAATTTTTTATAAAATG
AGAAGACTAATGATAAACTGTAGAAATCAAATTTATTGAGAAATCTGTTTCTCCTAACAGATAGTAACCCTGCCAT
GATATACTACTTCAACAATGTTATAAAATTTATGTGATAATATACATTTTAACTGGGATTTCTAAATTGCTTTAAC
AAATGCTAATCCTGAGAGTTGCCCTGCAGGACTCAAAGGGAAAGGTTTTGGGACGTGGCAGAACCTGCAGGGACA
TGGAATTAAGGCCATTGCAATGTATCATCTTTGTAGCATTGTCATCACTCCTAAGCTGCCTTCACAGTTTTAGTACA
CTAAGATGAGGAAATCGAAAATGGGCAGAGAAAGCTCATACTGTATAATTGAAGACAGTGACAGAGAACGTGTCAGT

TATGCCAAAACTCTTTTGATTTCTGTTCCAGGATTTCCAACAAGAGGGGAAAGGAATGACTTGGGAGGGTGGGAAAG
ACATTAGGAGTTGTTTTATTTTTTACCTTGGAAGCTTTAGCTACCAATCCAGTACCCTCCTAACTAGAAATGTATAC
ACATCAGCAGGACTGACTGACTACTTCATTAGAGATATACTGTACTCATTGGGGGCCTTGGGGGTACTGCTGTTCTT
ATGTGGGATTTTAATGTTGTAATGTATTGCATCTTAATGTATTGAATTCATTTTGTGTACTATATTGGTTGGCATT
TTATTAATAATAAATTGTATTGTATCATATTTGTATGTTTTAAGAGAAAATAATATAAAATACAATATTTGTACTATT
ATATAGTGCAAAAACCTACAAATCTGTGCCTCTGCCTCTTGAATTAATTCCTTTGGTTGCTTGCATTTGGGAAGGGAAT
GGAGAAAGGAAAGAACCAATAAAGCTTTCAAAGTTCAAGAAA

[0368] 示例性人VEGFR-1同工型2(也称为sVEGFR-1)前体氨基酸序列(SEQ ID NO:29)

[0369] MVSYWDTVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPPEMVS
ESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII
HMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYTH
RQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDK
MQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFFSPEVVWLKDGLPAT
EKSARYLTRGYSLIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTC
TAYGIPQPTIKWFHPCNHNHSEARCDFCNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMALIEGKNKMASTLVVADSRISG
IYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLKMPTEGEDLKLSTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQK
MAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTACRARNVYTGEELQKKEITIRGEHCNKKAVFSRISKFKSTRNDCTTQSNV
KH

[0370] 此变体(3)与变体1相比,在3'编码区和3'UTR方面有所不同。所编码的可溶性蛋白(同工型3)具有更短、独特的C端,且缺乏同工型1的跨膜和细胞质区域。

[0371] 示例性人VEGFR-1同工型3cDNA序列(SEQ ID NO:30)

[0372] ATCAGGTCCGCGGGAGGCTCGGAGCGCGCCAGGCGGACACTCCTCTCGGCTCCTCCCCGGCAGCGGCG
GCGGCTCGGAGCGGGCTCCGGGGCTCGGGTGACGCGCCAGCGGGCGCCTGGCGGCGAGGATTACCCGGGGAAGTGG
TTGTCTCCTGGCTGGAGCCGCGAGACGGGCGCTCAGGGCGCGGGGCCGGCGGCGGCGAACGAGAGGACGGACTCTGG
CGGCCGGGTCGTTGGCCGCGGGGAGCGCGGGCACCGGGCGAGCAGGCCGCGTCGCGCTACCATGGTCAGCTACTGG
GACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAAAGA
TCCTGAACTGAGTTTAAAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGGAAG
CAGCCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCCTGTGGA
AGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAACCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAA
ATATCTAGCTGTACCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACAGGTAGAC
CTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGG
GTTACGTACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAAT
CTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAG
TCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTCAAATAAGCACA
CCACGCCCAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTTGCTCAATTGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGT
TCAAATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAATTGACCAAAGCAATTCCC
ATGCCAACATATTCTACAGTGTCTTACTATTGACAAAATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTGA
AGGAGTGGACCATCATTCAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTCACTGTGAAACATCG
AAAACAGCAGGTGCTTGAAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTATGAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGC

CGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTACCTGCGACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTA
ATTATCAAGGACGTAAGGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATGTGTTTAA
AAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCAGATTTACGAAAAGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGG
CTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCCTGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTC
TGGCACCCCTGTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTCCAATAATGAAGAGTCCTTTATCCTGGA
TGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGCATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGATGG
CTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTCTAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTG
GGAAGAAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTAACTTGGAAAAATGCCGACGGAAGG
AGAGGACCTGAAACTGTCTTGACAGTTAACAAGTTCTTATACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGACAGTTA
ATAACAGAACAATGCACTACAGTATTAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTT
ACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCTGCAGAGCCAGGAATGTATACAGGGGAAGAAAT
CCTCCAGAAGAAAGAAATTACAATCAGAGATCAGGAAGCACCATACCTCCTGCGAAACCTCAGTGATCACACAGTGG
CCATCAGCAGTTCCACCCTTTAGACTGTCATGCTAATGGTGTCCCCGAGCCTCAGATCACTTGGTTTTAAAAACAAC
CACAAAATACAACAAGAGCCTGAACTGTATACATCAACGTCACCATCGTCATCGTCATCATCACCATTGTCATCATC
ATCATCATCGTCATCATCATCATCATCATAGCTATCATCATTATCATCATCATCATCATCATCATAGCTACCAT
TTATTGAAAACATTATGTGTCAACTTCAAAGAACTTATCCTTTAGTTGGAGAGCCAAGACAATCATAACAATAACA
AATGGCCGGGCATGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGTGGATCATTTGAGGTCAG
GAGTTCAAGACCAGCCTGACCAAGATGGTGAATGCTGTCTCTATTAATAACAAAATTAGCCAGGCATGGTGGCT
CATGCCTGTAATGCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGACAGGAGAATCACTTGAACCCAGGAGGCAGAGGTTGCAGGGAG
CCGAGATCGTGTACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGCGAACTCCGTCTCAAAAAACAAATAAATAAATAAATA
AATAAACAGACAAAATTCATTTTTATTCTATTAACTTAACATACATGCATTAA

[0373] 示例性人VEGFR-1同工型3cDNA序列(SEQ ID NO:31)

[0374] MVS YWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSK
ESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII
HMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYTH
RQNTNIIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDK
MQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLKDGLPAT
EKSARYLTRGYSLIIKDVTEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTC
TAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMALIEGKNKMASTLVVADSRISG
IYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLKMPTEGEDLKLSTVKNFLYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQK
MAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTACRARNVYTGEELQKKEITIRDQEAPYLLRNLSDHTVAISSSTTLTLDCHAN
GVPEPQITWFKNNHKIQQEPELYTSTSPSSSSSSPLSSSSSSSSSSSS

[0375] 此变体(4)与变体1相比,在3'编码区和3'UTR方面有所不同。所编码的可溶性蛋白
(同工型4)具有更短、独特的C端,且缺乏同工型1的跨膜和细胞质区域。

[0376] 示例性人VEGFR-1同工型4cDNA序列(SEQ ID NO:32)

[0377] ATCAGAGTCCGCGGGAGGCTCGGAGCGCGCCAGGCGGACACTCCTCTCGGCTCCTCCCCGGCAGCGGCG
GCGGCTCGGAGCGGGCTCCGGGGCTCGGGTGCAGCGGCCAGCGGGCGCCTGGCGGCGAGGATTACCCGGGGAAGTGG
TTGTCTCCTGGCTGGAGCCGCGAGACGGGCGCTCAGGGCGCGGGGCCGGCGGCGGCAACGAGAGGACGGACTCTGG
CGGCCGGGTCGTTGGCCGCGGGAGCGCGGGCACCGGGCGAGCAGGCCGCGTCGCGCTCACCATGGTCAGCTACTGG

GACACCGGGTCTGCTGTGCGCGTCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAAAGA
TCCTGAACTGAGTTTAAAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGGAAG
CAGCCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCCTGTGGA
AGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAACCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAA
ATATCTAGCTGTACCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACAGGTAGAC
CTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGG
GTTACGTACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAAT
CTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAG
TCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACA
CCACGCCCAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTTGTCTCAATTGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGT
TCAAATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAATTGACCAAAGCAATTCCC
ATGCCAACATATTCTACAGTGTCTTACTATTGACAAAAATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTGA
AGGAGTGGACCATCATTCAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATGATAAAGCATTCACTGTGAAACATCG
AAAACAGCAGGTGCTTGAAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTATGAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGC
CGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTTACCTGCGACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTA
ATTATCAAGGACGTAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATGTGTTTAA
AAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCAGATTACGAAAAGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGG
CTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCCTGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTC
TGGCACCCCTGTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTCCAATAATGAAGAGTCCTTTATCCTGGA
TGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGCATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGCTTC
CACCAGCTAACAGTTCTTTTCATGTTGCCACCTACAAGCTTCTCTTCCAACCTACTTCCATTTCCCTCCGTGA

[0378] 示例性人VEGFR-1同工型4cDNA序列(SEQ ID NO:33)

[0379] MVS YWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSK
ESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII
HMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYTH
RQNTNIIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDK
MQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLKDGLPAT
EKSARYLTRGYSLIIKDVTEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTC
TAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMALIEGKNKLPPANSSFMLPPTS
FSSNYFHFLP

[0380] 在人染色体位置4q12处发现的VEGFR-2基因编码含有血管内皮生长因子受体家族(VEGFR)的成员的30外显子,且为编码VEGF-A的受体的两个基因之一。此受体,称为激酶插入结构域受体,为III型受体酪氨酸激酶。其充当VEGF-A诱导的内皮增殖、存活、迁移、肾小管形态发生和发芽的主要介质。此受体的信号传导和运输受多种因素调控,包括Rab GTP酶、P2Y嘌呤核苷酸受体、整合素 $\alpha V\beta 3$ 、T细胞蛋白酪氨酸磷酸酶等。

[0381] 示例性人VEGFR-2cDNA序列(SEQ ID NO:34)

[0382] ACTGAGTCCCGGGACCCCGGGAGAGCGGTCAATGTGTGGTCGCTGCGTTTCTCTGCCTGCGCCGGGCA
TCACTTGCGCGCCGAGAAAGTCCGTCTGGCAGCCTGGATATCCTCTCCTACCGGCACCCGAGACGCCCTGCAGC
CGCGGTGCGCGCCCGGGCTCCCTAGCCCTGTGCGCTCAACTGTCTGCGCTGCGGGGTGCCGCGAGTTCCACCTCCG

CGCCTCCTTCTCTAGACAGGCGCTGGGAGAAAGAACCGGCTCCCGAGTTCTGGGCATTTGCCCCGGCTCGAGGTGCA
GGATGCAGAGCAAGGTGCTGCTGGCCGTCGCCCTGTGGCTCTGCGTGGAGACCCGGGCCGCTCTGTGGGTTTGCT
AGTGTCTTCTCTGATCTGCCAGGCTCAGCATACAAAAAGACATACTTACAATTAAGGCTAATACAACCTCTTCAAAT
TACTTGCAGGGGACAGAGGGACTTGGACTGGCTTTGGCCCAATAATCAGAGTGGCAGTGAGCAAAGGTGGAGGTGA
CTGAGTGCAGCGATGGCCTCTTCTGTAAGACACTCACAATTCCAAAAGTGATCGGAAATGACACTGGAGCCTACAAG
TGCTTCTACCGGAAACTGACTTGGCCTCGGTCAATTTATGTCTATGTTCAAGATTACAGATCTCCATTTATTGCTTC
TGTTAGTGACCAACATGGAGTCGTGTACATTACTGAGAACAAAAACAAACTGTGGTGATTCCATGTCTCGGGTCCA
TTTCAAATCTCAACGTGTCACTTTGTGCAAGATACCCAGAAAAGAGATTTGTTCCCTGATGGTAACAGAATTTCTGG
GACAGCAAGAAGGGCTTTACTATTCCCAGCTACATGATCAGCTATGCTGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAAAATTA
TGATGAAAGTTACCAGTCTATTATGTACATAGTTGTCGTTGTAGGGTATAGGATTTATGATGTGGTTCTGAGTCCGT
CTCATGGAATTGAACTATCTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACAGCAAGAACTGAACTAAATGTGGGGATT
GACTTCAACTGGGAATACCCTTCTTGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGG
GAGTGAGATGAAGAAATTTTTGAGCACCTTAACTATAGATGGTGTAAACCCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTG
CAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGAAGAACAGCACATTTGTCAGGGTCCATGAAAAACCTTTTGTGCTTTTGGGA
AGTGGCATGGAATCTCTGGTGGAAGCCACGGTGGGGGAGCGTGTGAGAATCCCTGCGAAGTACCTTGGTTACCCACC
CCCAGAAATAAAATGGTATAAAAAATGGAATACCCCTTGAGTCCAATCACACAATTAAAGCGGGGCATGTACTGACGA
TTATGGAAGTGAGTGAAAGAGACACAGGAAATTACACTGTCATCCTTACCAATCCCATTTCAAAGGAGAAGCAGAGC
CATGTGGTCTCTCTGGTTGTGTATGTCCCACCCAGATTGGTGAGAAATCTCTAATCTCTCCTGTGGATTCTACCA
GTACGGCACCACTCAAACGCTGACATGTACGGTCTATGCCATTCTCCCCCGCATCACATCCACTGGTATTGGCAGT
TGGAGGAAGAGTGCGCCAACGAGCCCAGCCAAGCTGTCTCAGTGACAAACCCATACCCTTGTGAAGAATGGAGAAGT
GTGGAGGACTTCCAGGGAGGAAATAAAATTGAAGTTAATAAAAAATCAATTTGCTCTAATTGAAGGAAAAACAAAAC
TGTAAGTACCCTTGTTATCCAAGCGGCAAATGTGTCAGCTTTGTACAAATGTGAAGCGGTCAACAAAGTCGGGAGAG
GAGAGAGGGTGATCTCCTTCCACGTGACCAGGGTCCTGAAATTACTTTGCAACCTGACATGCAGCCCACTGAGCAG
GAGAGCGTGTCTTTGTGGTGAAGTGCAGACAGATCTACGTTTGAGAACCTCACATGGTACAAGCTTGGCCACAGCC
TCTGCCAATCCATGTGGGAGAGTTGCCACACCTGTTTGCAAGAACTTGGATACTCTTTGGAAATTGAATGCCACCA
TGTTCTCTAATAGCACAAATGACATTTTGATCATGGAGCTTAAGAATGCATCCTTGCAGGACCAAGGAGACTATGTC
TGCCTTGCTCAAGACAGGAAGACCAAGAAAAGACATTGCGTGGTCAGGCAGCTCACAGTCCTAGAGCGTGTGGCACC
CACGATCACAGGAAACCTGGAGAATCAGACGACAAGTATTGGGGAAAGCATCGAAGTCTCATGCACGGCATCTGGGA
ATCCCCCTCCACAGATCATGTGGTTTAAAGATAATGAGACCCTTGTTAGAAGACTCAGGCATTGTATTGAAGGATGGG
AACCGGAACCTCACTATCCGCAGAGTGAGGAAGGAGGACGAAGGCCTCTACACCTGCCAGGCATGCAGTGTCTTGG
CTGTGCAAAAGTGGAGGCATTTTTTCATAATAGAAGGTGCCAGGAAAAGACGAACCTGGAAATCATTATTCTAGTAG
GCACGGCGGTGATTGCCATGTTCTTCTGGCTACTTCTTGTGCATCATCCTACGGACCGTTAAGCGGGCCAATGGAGGG
GAACTGAAGACAGGCTACTTGTCCATCGTCATGGATCCAGATGAACTCCCATTGGATGAACATTGTGAACGACTGCC
TTATGATGCCAGCAAATGGGAATTCCCCAGAGACCGGCTGAAGCTAGGTAAGCCTCTTGGCCGTGGTGCCTTTGGCC
AAGTGATTGAAGCAGATGCCTTTGGAATTGACAAGACAGCAACTTGCAGGACAGTAGCAGTCAAAATGTTGAAAGAA
GGAGCAACACACAGTGAGCATCGAGCTCTCATGTCTGAACTCAAGATCCTCATTCATATTGGTCACCATCTCAATGT
GGTCAACCTTCTAGGTGCCTGTACCAAGCCAGGAGGGCCACTCATGGTGATTGTGGAATTCTGCAAAATTTGGAACC
TGTCCACTTACCTGAGGAGCAAGAGAAATGAATTTGTCCCCTACAAGACCAAAGGGGCAGATTCCGTCAAGGGAAA
GACTACGTTGGAGCAATCCCTGTGGATCTGAAACGGCGCTTGGACAGCATCACCAGTAGCCAGAGCTCAGCCAGCTC

TGGATTTGTGGAGGAGAAGTCCCTCAGTGATGTAGAAGAAGAGGAAGCTCCTGAAGATCTGTATAAGGACTTCCTGA
CCTTGGAGCATCTCATCTGTTACAGCTTCCAAGTGGCTAAGGGCATGGAGTTCTTGGCATCGCGAAAGTGTATCCAC
AGGGACCTGGCGGCACGAAATATCCTCTTATCGGAGAAGAACGTGGTTAAAATCTGTGACTTTGGCTTGGCCCGGA
TATTTATAAAGATCCAGATTATGTCAGAAAAGGAGATGCTCGCCTCCCTTTGAAATGGATGGCCCCAGAAACAATTT
TTGACAGAGTGACACAATCCAGAGTGACGTCTGGTCTTTTGGTGTCTTGTGCTGTGGGAAATATTTTCCTTAGGTGCT
TCTCCATATCCTGGGGTAAAGATTGATGAAGAATTTTGTAGGCGATTGAAAGAAGGAACTAGAATGAGGGCCCCTGA
TTATACTACACCAGAAATGTACCAGACCATGCTGGACTGCTGGCACGGGGAGCCCAGTCAGAGACCCACGTTTTTCAG
AGTTGGTGGAAACATTTGGGAAATCTCTTGCAAGCTAATGCTCAGCAGGATGGCAAAGACTACATTGTTCTTCCGATA
TCAGAGACTTTGAGCATGGAAGAGGATTCTGGACTCTCTGCTACCTCACCTGTTTCTGTATGGAGGAGGAGGA
AGTATGTGACCCCAAATTCATTATGACAACACAGCAGGAATCAGTCAGTATCTGCAGAACAGTAAGCGAAAGAGCC
GGCCTGTGAGTGTA AAAACATTTGAAGATATCCCGTTAGAAGAACCAGAAGTAAAGTAATCCCAGATGACAACCAG
ACGGACAGTGGTATGGTTCTTGCCTCAGAAGAGCTGAAAACCTTGAAGACAGAACCAAATTATCTCCATCTTTTGG
TGGAATGGTGGCCAGCAAAAGCAGGGAGTCTGTGGCATCTGAAGGCTCAAACCAGACAAGCGGCTACCAGTCCGGAT
ATCACTCCGATGACACAGACACCACCGTGACTCCAGTGAGGAAGCAGAACTTTTAAAGCTGATAGAGATTGGAGTG
CAAACCGGTAGCACAGCCCAGATTCTCCAGCCTGACTCGGGGACCACACTGAGCTCTCCTCCTGTTTAAAAGGAAGC
ATCCACACCCCCAACTCCTGGACATCACATGAGAGGTGCTGCTCAGATTTTCAAGTGTTGTTCTTTCCACCAGCAGG
AAGTAGCCGCATTTGATTTTCATTTGACAACAGAAAAAGGACCTCGGACTGCAGGGAGCCAGTCTTCTAGGCATAT
CCTGGAAGAGGCTTGTGACCCAAGAATGTGTCTGTGTCTTCTCCAGTGTTGACCTGATCCTCTTTTTCATTCAATTT
AAAAAGCATTTATCATGCCCCCTGCTGCGGGTCTCACCATGGGTTTAGAACAAAGACGTTCAAGAAATGGCCCCATC
CTCAAAGAAGTAGCAGTACCTGGGGAGCTGACACTTCTGTAAACTAGAAGATAAACCAGGCAATGTAAGTGTTGGA
GGTGTGTAAGATGGGAAGGATTTGCAGGGCTGAGTCTATCCAAGAGGCTTTGTTTAGGACGTGGGTCCCAAGCCAAG
CCTTAAGTGTTGAATTCGGATTGATAGAAAGGAAGACTAACGTTACCTTGCTTTGGAGAGTACTGGAGCCTGCAAT
GCATTGTGTTTGTCTGTTGGAGGTGGGCATGGGGTCTGTTCTGAAATGTAAAGGTTTCAGACGGGGTTTCTGGTTT
TAGAAGGTTGCGTGTTCTTCGAGTTGGGCTAAAGTAGAGTTCGTTGTGCTGTTTCTGACTCCTAATGAGAGTTCCTT
CCAGACCGTTACGTGTCTCCTGGCCAAGCCCCAGGAAGGAAATGATGCAGCTCTGGCTCCTTGTCTCCAGGCTGAT
CCTTTATTGAGAATACCACAAAGAAAGGACATTCAGCTCAAGGCTCCCTGCCGTGTTGAAGAGTTCTGACTGCACAA
ACCAGCTTCTGGTTTCTTCTGGAATGAATACCTCATATCTGTCCCTGATGTGATATGTCTGAGACTGAATGCGGGAG
GTTCAATGTGAAGCTGTGTGTGGTGTCAAAGTTTCAGGAAGGATTTTACCCTTTTGTCTTCCCCCTGTCCCCAACC
CACTCTCACCCGCAACCCATCAGTATTTTAGTTATTTGGCCTCTACTCCAGTAAACCTGATTGGGTTTGTTCACCTC
TCTGAATGATTATTAGCCAGACTTCAAAATATTTTATAGCCCAAATTATAACATCTATTGTATTATTTAGACTTTT
AACATATAGAGCTATTTCTACTGATTTTGGCCTTGTCTGTCTTTTTTTCAAAAAAGAAAATGTGTTTTTTGTTT
GGTACCATAGTGTAAGTGTGGGAACAATGACTATAAGACATGCTATGGCACATATATTTATAGTCTGTTTATGTA
GAAACAAATGTAATATATTAAGCCTTATATATAATGAACTTTGTACTATTACATTTTGTATCAGTATTATGTAGC
ATAACAAAGGTCATAATGCTTTCAGCAATTGATGTCATTTTATTAAAGAACATTGAAAAAATTTGAAAAAATTTT
AAAAA

[0383] 示例性人VEGFR-2前体氨基酸序列 (SEQ ID NO:35)

[0384] MQSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSG
SEQRVEVTECSDGLFCKLTIPKVIIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTV
VIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRI

YDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS
DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTI
KAGHVLTIMEVSRDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGTQTTLTCTVYAIPPPH
HIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTNYPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCE
AVNVKVRGERVISFHVTRGPEITLQPDMPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPPQPLIHVGELPTPVCKNLDT
LWKLNATMFSNSTNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSIGESIE
VSCTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTI RRVKEDGLYTCQACSVLGCAKVEAFFIIEGAQKTN
LEIIILVGTAVIAMFFWLLLVIILRTVKRANGGELKTGYLSIVMDPELPLDEHCERLPYDASKWEFPRDRLKLGKP
LGRGAFGQVIEADAFGIDKTATCRTVAVKMLKEGATHSEHRALMSELKILIHIGHHLNVNLLGACTKPGGPLMVIV
EFCKFGNLSTYLRSKRNEFVPYKTKGARFRQGKDYVGAIPVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEEKSLSDVEEEEEAPE
DLYKDFTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKC IHRDLAARNILLSEKNVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGDARLPLK
WMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVKIDEEFCRRLKEGTRMRAPDYTTPEMYQTMLDCWHGEP
SQRPTFSELVEHLGNLLQANAQQDGKDYIVLP ISETLSMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEEVCDPKFHYDNTAGISQYL
QNSKRKSRPVSVKTFEDIPLEEPEVKVIPDDNQTD SGMLASEELKTLEDRTKLSPSF GGMVPSKSRESVASEGSNQ
TSGYQSGYHSDDTDTTVYSSEEAE LLK LIEIGVQTGSTAQILQPD SGTTLSPPV

[0385] 在人染色体位置5q35.3发现的VEGFR-3基因编码含有血管内皮生长因子受体家族(VEGFR)成员的35外显子。此基因编码血管内皮生长因子C和D的酪氨酸激酶受体。所述蛋白质被认为参与淋巴管生成和淋巴管内皮的维持。

[0386] 示例性人VEGFR-3同工型1cDNA序列(SEQ ID NO:36)

[0387] ACTTTCAGCCCCGAGCCGCGGCCGCTCGGGTCGGACCCACGCGCAGCGCCGGAGATGCAGCGGGGCGC
CGCGCTGTGCCTGCGACTGTGGCTCTGCCTGGGACTCCTGGACGGCCTGGTGAGTGGCTACTCCATGACCCCCCGA
CCTTGAACATCACGGAGGAGTCACACGTCATCGACACCGGTGACAGCCTGTCCATCTCCTGCAGGGGACAGCACCCC
CTCGAGTGGGCTTGGCCAGGAGCTCAGGAGGCGCCAGCCACCGGAGACAAGGACAGCGAGGACACGGGGGTGGTGCG
AGACTGCGAGGGCACAGACGCCAGGCCCTACTGCAAGGTGTTGCTGCTGCACGAGGTACATGCCAACGACACAGGCA
GCTACGTCTGCTACTACAAGTACATCAAGGCACGCATCGAGGGCACCACGGCCGCGCAGCTCCTACGTGTTCTGTGAGA
GACTTTGAGCAGCCATTTCATCAACAAGCCTGACACGCTCTTGGTCAACAGGAAGGACGCCATGTGGGTGCCCTGTCT
GGTGTCCATCCCCGGCCTCAATGTCACGCTGCGCTCGAAAGCTCGGTGCTGTGGCCAGACGGGCAGGAGGTGGTGT
GGGATGACCGGCGGGGCATGCTCGTGTCCACGCCACTGCTGCACGATGCCCTGTACCTGCAGTGCAGAGACCACCTGG
GGAGACCAGGACTTCCTTTCCAACCCCTTCCTGGTGACATCACAGGCAACGAGCTCTATGACATCCAGCTGTTGCC
CAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTAGGGGAGAAGCTGGTCCTGAACTGCACCGTGTGGGCTGAGTTTAACTCAGGTG
TCACCTTTGACTGGGACTACCCAGGGAAGCAGGCAGAGCGGGGTAAGTGGGTGCCCCGAGCGACGCTCCCAGCAGACC
CACACAGAACTCTCCAGCATCCTGACCATCCACAACGTCAGCCAGCACGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAA
CAACGGCATCCAGCGATTTCTGGGAGAGCACCGAGGTCATTGTGCATGAAAATCCCTTCATCAGCGTCGAGTGGCTCA
AAGGACCCATCCTGGAGGCCACGGCAGGAGACGAGCTGGTGAAGCTGCCCCTGAAGCTGGCAGCGTACCCCCGCCC
GAGTTCCAGTGGTACAAGGATGGAAGGCACTGTCCGGGCGCCACAGTCCACATGCCCTGGTGTCAAGGAGGTGAC
AGAGGCCAGCACAGGCACCTACACCCTCGCCCTGTGGAACCTCGCTGCTGGCCTGAGGCGCAACATCAGCCTGGAGC
TGGTGGTGAATGTGCCCCCAGATACATGAGAAGGAGGCTCCTCCCCCAGCATCTACTCGCGTCACAGCCGCCAG
GCCCTCACCTGCACGGCCTACGGGGTGCCCTGCCTCTCAGCATCCAGTGGCACTGGCGGCCCTGGACACCCTGCAA
GATGTTTGCCAGCGTAGTCTCCGGCGCGGCAGCAGCAAGACCTCATGCCACAGTGCCGTGACTGGAGGGCGGTGA

CCACGCAGGATGCCGTGAACCCCATCGAGAGCCTGGACACCTGGACCGAGTTTGTGGAGGGAAAGAATAAGACTGTG
AGCAAGCTGGTGATCCAGAATGCCAACGTGTCTGCCATGTACAAGTGTGTGGTCTCCAACAAGGTGGGCCAGGATGA
GCGGCTCATCTACTTCTATGTGACCACCATCCCCGACGGCTTCACCATCGAATCCAAGCCATCCGAGGAGCTACTAG
AGGGCCAGCCGGTGCTCCTGAGCTGCCAAGCCGACAGCTACAAGTACGAGCATCTGCGCTGGTACCGCCTCAACCTG
TCCACGCTGCACGATGCGCACGGGAACCCGCTTCTGCTCGACTGCAAGAACGTGCATCTGTTCCGCCACCCCTCTGGC
CGCCAGCCTGGAGGAGGTGGCACCTGGGGCGCGCCACGCCACGCTCAGCCTGAGTATCCCCCGCGTCGCGCCCGAGC
ACGAGGGCCACTATGTGTGCGAAGTGCAAGACCGGCGCAGCCATGACAAGCACTGCCACAAGAAGTACCTGTGGTG
CAGGCCCTGGAAGCCCCCTCGGCTCACGCAGAACTTGACCGACCTCCTGGTGAACGTGAGCGACTCGCTGGAGATGCA
GTGCTTGGTGGCCGGAGCGCACGCGCCAGCATCGTGTGGTACAAAGACGAGAGGCTGCTGGAGGAAAAGTCTGGAG
TCGACTTGGCGGACTCCAACCAGAAGCTGAGCATCCAGCGCGTGC GCGAGGAGGATGCGGGACGCTATCTGTGCAGC
GTGTGCAACGCCAAGGGCTGCGTCAACTCCTCCGCCAGCGTGGCCGTGGAAGGCTCCGAGGATAAGGGCAGCATGGA
GATCGTGATCCTTGTGCGTACCGGCGTCATCGCTGTCTTCTTCTGGGTCCTCCTCCTCATCTTCTGTAACATGA
GGAGGCCGGCCACGCAGACATCAAGACGGGCTACCTGTCCATCATCATGGACCCCGGGGAGGTGCCTCTGGAGGAG
CAATGCGAATACCTGTCTACGATGCCAGCCAGTGGGAATCCCCCGAGAGCGGCTGCACCTGGGGAGAGTGCTCGG
CTACGGCGCCTTCGGGAAGGTGGTGGAAGCCTCCGCTTTCGGCATCCACAAGGGCAGCAGCTGTGACACCGTGGCCG
TGAAAATGCTGAAAGAGGGCGCCACGGCCAGCGAGCACCGCGCGCTGATGTGCGAGCTCAAGATCCTCATTACATC
GGCAACCACCTCAACGTGGTCAACCTCCTCGGGCGTGCACCAAGCCGAGGGCCCCCTCATGGTGATCGTGGAGTT
CTGCAAGTACGGCAACCTCTCCAACCTCCTGCGCGCCAAGCGGGACGCCTTCAGCCCCTGCGCGGAGAAGTCTCCCG
AGCAGCGCGGACGCTTCCGCGCCATGGTGGAGCTCGCCAGGCTGGATCGGAGGCGGCCGGGAGCAGCGACAGGGTC
CTCTTCGCGCGTTCTCGAAGACCGAGGGCGGAGCGAGGCGGGCTTCTCCAGACCAAGAAGCTGAGGACCTGTGGCT
GAGCCCGCTGACCATGGAAGATCTTGTCTGCTACAGCTTCCAGGTGGCCAGAGGGATGGAGTTCCTGGCTTCCCGAA
AGTGCATCCACAGAGACCTGGCTGCTCGGAACATTCTGCTGTGCGAAAGCGACGTGGTGAAGATCTGTGACTTTGGC
CTTGCCCGGGACATCTACAAAGACCCCGACTACGTCCGCAAGGGCAGTGCCCGGCTGCCCCCTGAAGTGGATGGCCCC
TGAAAGCATCTTCGACAAGGTGTACACCACGCAGAGTGACGTGTGGTCTTTGGGGTGCTTCTCTGGGAGATCTTCT
CTCTGGGGGCTCCCCGTACCCTGGGGTGAGATCAATGAGGAGTTCTGCCAGCGGCTGAGAGACGGCACAAGGATG
AGGGCCCCGGAGCTGGCCACTCCCGCCATACGCCGCATCATGCTGAACTGCTGGTCCGGAGACCCCAAGGCGAGACC
TGCATTCTCGGAGCTGGTGGAGATCCTGGGGGACCTGCTCCAGGGCAGGGGCCTGCAAGAGGAAGAGGAGGTCTGCA
TGGCCCCGCGCAGCTCTCAGAGCTCAGAAGAGGGCAGCTTCTCGCAGGTGTCCACCATGGCCCTACACATCGCCAG
GCTGACGCTGAGGACAGCCCGCCAAGCCTGCAGCGCCACAGCCTGGCCGCCAGGTATTACAACCTGGGTGTCTTTCC
CGGGTGCTGGCCAGAGGGGTGAGACCCGTGGTTCCTCCAGGATGAAGACATTTGAGGAATTTCCCATGACCCAA
CGACCTACAAAGGCTCTGTGGACAACCAGACAGACAGTGGGATGGTGTGGCCTCGGAGGAGTTTGAGCAGATAGAG
AGCAGGCATAGACAAGAAAGCGGCTTCAGCTGTAAAGGACCTGGCCAGAATGTGGCTGTGACCAGGGCACACCCTGA
CTCCCAAGGGAGGCGGCGGCGCCTGAGCGGGGGGCCGAGGAGGCCAGGTGTTTTACAACAGCGAGTATGGGGAGC
TGTCGGAGCCAAGCGAGGAGGACCACTGCTCCCCGTGCCCCGCTGACTTTCTTCACAGACAACAGCTACTAAGCA
GCATCGGACAAGACCCCCAGCACTTGGGGGTTCAGGCCCGGCAGGGCGGGCAGAGGGCTGGAGGCCAGGCTGGGAA
CTCATCTGGTTGAACTCTGGTGGCACAGGAGTGCCTCTCCCTCTCTGCAGACTTCCAGCTAGGAAGAGCAGGAC
TCCAGGCCAAAGGCTCCCGGAATTCGTCACACGACTGGCCAGGGCCACGCTCCAGCTGCCCCGGCCCCCTCCCCCT
GAGATTGAGATGTCAATTTAGTTTACGATCCGCAAGTGCTGGTCCCGGGGCCAGCACTTCCATGGGAATGTCTCTTTG
GCGACCTCCTTTCATCACACTGGGTGGTGGCCTGGTCCCTGTTTTCCACAGGAATCTGTGGGTCTGGGAGTCACA

CAGTGTGGAGGTTAAGGCATACGAGAGCAGAGGTCTCCCAAACGCCCTTTCCTCCTCAGGCACACAGCTACTCTCC
CCACGAGGGCTGGCTGGCCTCACCCACCCCTGCACAGTTGAAGGGAGGGGCTGTGTTTCCATCTCAAAGAAGGCATT
TGCAGGGTCTCTTCTGGGCCTGACCAAAACAGCCAACTAGCCCCTGGGGTGGCCACCAGTATGACAGTATTATACGC
TGGCAACACAGAGGCAGCCCGCACACCTGCGCCTGGGTGTTGAGAGCCATCCTGCAAGTCTTTTTCAACAGAACTTC
ACAGACTGTTAGAGCTGCTGAGAAGAATTTGCTTTCCGAATTCAGCCTGGAAGGCGCCAGGGACAGCTGTACTGAG
TCTAGATGACTCTGACCCCCGCCCCAGGTCAAGGCCAGCAGAGCAGTCAGTGCCTCTGGAGAAGGCCCTTGCTCTCC
CACCTGGCCCAGACTCCGAGGAGCCTGGGTCTGGAGCTGCCGGTCTGGTTCTTCCCTTTAGAGCCCGGATCTGCCAC
CTGCGGCCCTCCCAAGCCGTGAACCAGCTCATGAGAGATGAACACTGTGGGATCCACTCAGGAAGGCTCGGGGCTG
GCACAAAGGACCACCCAGCATTGCCCTGTGCCACCCAGCACTCAGTGGACATTCTGGGGACCTGCCTTCAGCCTTTT
CCTGCCCTGTGCCTGACATCAGCACCCCTGGCTGGTCAGAATGCCGCCCTCCCAGAGGAGCAGCCGAGAGATCCCCTG
AAGGCTGGAGGCATTCTGCTCAGGACCCCTATCCCAGCTCACAGTGGCCAAACCATCTCACCAGGAGAAAGAGCCACA
TCCCCACGTTAGGACCACGGAGACTGACCACCACCCTGACCCCCCAAACCCACGCACCAGACGCTTGCAGGACAGGC
GCCGCGCAGCGGGCAGGGGCTTGCCCGGCCGACCTCCCCTCCCCACCTCCCCACTGCGCGTTACTCCAGGATATG
CCGAGTGCACGTATAAGGTCATCTTCGTCGTCCCCGTGGACCTCCCCCTTCCTCTGCACGTCGTCCAACGTGGGACT
GGCGTGTGAGGCTTCCCTGGGAGGATCTGGAGGTTGTTCTCTGCAGAGAACCAGCCTGGCTCCTGGCGCGCACCTCT
GCTCCCTTCTCCTCACTACCCACCCACGCATGTACCGGGAAAAAACTACTATGCCCTTCTAGACCATGTTCTGAGA
AAAGATCGAAAATATTTAACAAGAGATAATAATAAATCTGATGCCGGTCTTTGTGTGTGTTGCGGA

[0388] 示例性人VEGFR-3同工型1前体氨基酸序列(SEQ ID NO:37)

[0389] MQRGAALCLRLWLCLGLLDGLVSGYSMTPTLNITEESHVIDTGDLSLISCRGQHLEWAWPGAQEAPA
TGDKDSED TGVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTL
LVNRKDAMWVCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFVH
ITGNELYDIQLLRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTFDWDYPGKQAERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHN
SQHDLGSYVCKANNIGIRFRESTEVI VHENPFISVEWLKGP ILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSG
RHSPHALVLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALTCTAYGVPLPL
SIQWHWRPWPCKMFAQRSLRRRQQQLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESLDTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNAVVSAM
YKCVVSNKVQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKPSEELLEGPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLL
DCKNVHLFATPLAASLEEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKYLSVQALEAPRLTQNL
DLLVNVS DSLEMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSSAS
VAVEGSEDKGSMEIVILVGTGVI AVFFWVLLLLIFCNMRRPAHADIKTGYSIIMDPGEVPLEEQCEYLSYDASQWE
FPRERLHLGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDTVAVKMLKEGATASEHRALMSELKILIHIGNHLNVNLLGAC
TKPQGPLMVIVEFCKYGNLSNFLRAKRDAFSPCAEKSPQGRFRAMVELARLDRRRPGSSDRVL FARFSKTEGGAR
RASPDQEAEDLWLSPLTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKC IHRDLAARNILLS ESDVVKICDFGLARDIYKDPDYVR
KGSARLPLKWMAPESIFDKVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVQINEEFCQRLRDGTRMRAPELATPAIRRI
MLNCWSGDPKARPAFSELVEILGDLLQGRGLQEEEEVC MAPRSSQSSEEGSFSQVSTMALHIAQADAEDSPPSLQRH
SLAARYYNWVSFPGCLARGAETRGS SRMKTFEEFPMPTTYKGSVDNQTD SGMVLASEE FEQIESRHRQESGFSCKG
PGQNAVAVTRAHPDSQGRRRRPERGARQQVFYNSEYGELSEPSEEDHCSP SARVTFFTDNSY

[0390] 与变体1相比,此变体(2)包含替代性3'端外显子。这导致与同工型1相比具有更短C端的同工型(2)。

[0391] 示例性人VEGFR-3同工型2cDNA序列(SEQ ID NO:38)

[0392] ACTTTCAGCCCCGAGCCGCGGCCGCTCGGGTCGGACCCACGCGCAGCGGCCGAGATGCAGCGGGGCGC
CGCGCTGTGCCTGCGACTGTGGCTCTGCCTGGGACTCCTGGACGGCCTGGTGAGTGGCTACTCCATGACCCCCCGA
CCTTGAACATCACGGAGGAGTCACACGTCATCGACACCGGTGACAGCCTGTCCATCTCCTGCAGGGGACAGCACCCC
CTCGAGTGGGCTTGGCCAGGAGCTCAGGAGGCGCCAGCCACCGGAGACAAGGACAGCGAGGACACGGGGGTGGTGCG
AGACTGCGAGGGCACAGACGCCAGGCCCTACTGCAAGGTGTTGCTGCTGCACGAGGTACATGCCAACGACACAGGCA
GCTACGTCTGCTACTACAAGTACATCAAGGCACGCATCGAGGGCACCACGGCCGCCAGCTCCTACGTGTTCTGTGAGA
GACTTTGAGCAGCCATTTCATCAACAAGCCTGACACGCTCTTGGTCAACAGGAAGGACGCCATGTGGGTGCCCTGTCT
GGTGTCCATCCCCGGCCTCAATGTCACGCTGCGCTCGCAAAGCTCGGTGCTGTGGCCAGACGGGCAGGAGGTGGTGT
GGGATGACCGGGCGGGGCATGCTCGTGTCCACGCCACTGTGTCACGATGCCCTGTACCTGCAGTGCAGAGACCACCTGG
GGAGACCAGGACTTCCTTTCCAACCCCTTCCTGGTGACATCACAGGCAACGAGCTCTATGACATCCAGCTGTTGCC
CAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTAGGGGAGAAGCTGGTCTGAACTGCACCGTGTGGGCTGAGTTTAACTCAGGTG
TCACCTTTGACTGGGACTACCCAGGGAAGCAGGCAGAGCGGGTAAGTGGGTGCCCCGAGCGACGCTCCCAGCAGACC
CACACAGAACTCTCCAGCATCCTGACCATCCACAACGTCAGCCAGCACGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAA
CAACGGCATCCAGCGATTTTCGGGAGAGCACCGAGGTCATTGTGCATGAAAATCCCTTCATCAGCGTCGAGTGGCTCA
AAGGACCCATCCTGGAGGCCACGGCAGGAGACGAGCTGGTGAAGCTGCCCCGTAAGCTGGCAGCGTACCCCCCGCCC
GAGTTCCAGTGGTACAAGGATGGAAGGCACTGTCCGGGCGCCACAGTCCACATGCCCTGGTGTCAAGGAGGTGAC
AGAGGCCAGCACAGGCACCTACACCCTCGCCCTGTGAACTCCGCTGCTGGCCTGAGGCGCAACATCAGCCTGGAGC
TGGTGGTGAATGTGCCCCCCCAGATACATGAGAAGGAGGCCTCCTCCCCCAGCATCTACTCGCGTCACAGCCGCCAG
GCCCTCACCTGCACGGCCTACGGGGTGCCCTGCCTCTCAGCATCCAGTGGCACTGGCGGCCCTGGACACCCTGCAA
GATGTTTGCCAGCGTAGTCTCCGGCGGCGGCAGCAGCAAGACCTCATGCCACAGTGCCGTGACTGGAGGGCGGTGA
CCACGCAGGATGCCGTGAACCCCATCGAGAGCCTGGACACCTGGACCGAGTTTGTGGAGGGAAAGAATAAGACTGTG
AGCAAGCTGGTGATCCAGAATGCCAACGTGTCTGCCATGTACAAGTGTGTGGTCTCCAACAAGGTGGGCCAGGATGA
GCGGCTCATCTACTTCTATGTGACCACCATCCCCGACGGCTTCACCATCGAATCCAAGCCATCCGAGGAGCTACTAG
AGGGCCAGCCGGTGTCTCTGAGCTGCCAAGCCGACAGCTACAAGTACGAGCATCTGCGCTGGTACCGCCTCAACCTG
TCCACGCTGCACGATGCGCACGGGAACCCGCTTCTGCTCGACTGCAAGAACGTGCATCTGTTCCGCCACCCCTCTGGC
CGCCAGCCTGGAGGAGGTGGCACCTGGGGCGCGCCACGCCACGCTCAGCCTGAGTATCCCCCGCGTCGCGCCCGAGC
ACGAGGGCCACTATGTGTGCGAAGTGCAAGACCGGCGCAGCCATGACAAGCACTGCCACAAGAAGTACCTGTCTGGTG
CAGGCCCTGGAAGCCCTCGGCTCACGCAGAACTTGACCGACCTCCTGGTGAACGTGAGCGACTCGCTGGAGATGCA
GTGCTTGGTGGCCGGAGCGCACGCGCCAGCATCGTGTGGTACAAAGACGAGAGGCTGCTGGAGGAAAAGTCTGGAG
TCGACTTGGCGGACTCCAACCAGAAGCTGAGCATCCAGCGCGTGC GCGAGGAGGATGCGGGACGCTATCTGTGCAGC
GTGTGCAACGCCAAGGGCTGCGTCAACTCCTCCGCCAGCGTGGCCGTGGAAGGCTCCGAGGATAAGGGCAGCATGGA
GATCGTGATCCTTGTGCGGTACCGGCGTCATCGTGTCTTCTTCTGGGTCCTCCTCCTCATCTTCTGTAACATGA
GGAGGCCGGCCACGCAGACATCAAGACGGGCTACCTGTCCATCATCATGGACCCCGGGGAGGTGCCTCTGGAGGAG
CAATGCGAATACCTGTCTACGATGCCAGCCAGTGGGAATTCCCCCGAGAGCGGCTGCACCTGGGGAGAGTGCTCGG
CTACGGCGCCTTCGGGAAGGTGGTGGAAGCCTCCGCTTTCGGCATCCACAAGGGCAGCAGCTGTGACACCGTGGCCG
TGAAAATGCTGAAAGAGGGCGCCACGGCCAGCGAGCACCGCGCGCTGATGTGCGAGCTCAAGATCCTCATTACATC
GGCAACCACCTCAACGTGGTCAACCTCCTCGGGCGTGCACCAAGCCGCAGGGCCCCCTCATGGTGATCGTGGAGTT
CTGCAAGTACGGCAACCTCTCCAACCTCCTGCGCGCCAAGCGGGACGCCTTCAGCCCCTGCGCGGAGAAGTCTCCCG
AGCAGCGCGGACGCTTCCGCGCCATGGTGGAGCTCGCCAGGCTGGATCGGAGGCGGCCGGGGAGCAGCGACAGGGTC

CTCTTCGCGCGGTTCTCGAAGACCGAGGGCGGAGCGAGGCGGGCTTCTCCAGACCAAGAAGCTGAGGACCTGTGGCT
GAGCCCGCTGACCATGGAAGATCTTGTCTGCTACAGCTTCCAGGTGGCCAGAGGGATGGAGTTCCTGGCTTCCCGAA
AGTGCATCCACAGAGACCTGGCTGCTCGGAACATTCTGCTGTCGAAAGCGACGTGGTGAAGATCTGTGACTTTGGC
CTTGCCCGGGACATCTACAAAGACCCCGACTACGTCCGCAAGGGCAGTGCCCGGCTGCCCCTGAAGTGGATGGCCCC
TGAAAGCATCTTCGACAAGGTGTACACCACGCAGAGTGACGTGTGGTCTTTGGGGTGCTTCTCTGGGAGATCTTCT
CTCTGGGGGCTCCCCGTACCCTGGGGTGAGATCAATGAGGAGTTCCTGCCAGCGGCTGAGAGACGGCACAAGGATG
AGGGCCCCGGAGCTGGCCACTCCCGCCATACGCCGCATCATGCTGAACTGCTGGTCCGGAGACCCCAAGGCGAGACC
TGCATTCTCGGAGCTGGTGGAGATCCTGGGGGACCTGCTCCAGGGCAGGGGCTGCAAGAGGAAGAGGAGGTCTGCA
TGGCCCCGCGCAGCTCTCAGAGCTCAGAAGAGGGCAGCTTCTCGCAGGTGTCCACCATGGCCCTACACATCGCCCAG
GCTGACGCTGAGGACAGCCCGCCAAGCCTGCAGCGCCACAGCCTGGCCGCCAGGTATTACAAGTGGGTGTCTTTCC
CGGGTGCTGGCCAGAGGGGCTGAGACCCGTGGTTCCTCCAGGATGAAGACATTTGAGGAATTCCCCATGACCCAA
CGACCTACAAAGGCTCTGTGGACAACCAGACAGACAGTGGGATGGTGTGGCCTCGGAGGAGTTTGAGCAGATAGAG
AGCAGGCATAGACAAGAAAGCGGCTTCAGGTAGCTGAAGCAGAGAGAGAAGGCAGCATACGTCAGCATTTTCTTC
TCTGCACTTATAAGAAAGATCAAAGACTTTAAGACTTTCGCTATTTCTTCTACTGCTATCTACTACAACTTCAAAG
AGGAACCAGGAGGACAAGAGGAGCATGAAAGTGGACAAGGAGTGTGACCACTGAAGCACCACAGGGAGGGGTTAGGC
CTCCGGATGACTGCGGGCAGGCTGGATAATATCCAGCCTCCACAAGAAGCTGGTGGAGCAGAGTGTTCCCTGACT
CCTCCAAGGAAAGGGAGACGCCCTTTCATGGTCTGCTGAGTAACAGGTGCCTTCCCAGACACTGGCGTTACTGCTTG
ACCAAAGAGCCCTCAAGCGGCCCTTATGCCAGCGTGACAGAGGGCTCACCTCTGCCTTCTAGGTCACTTCTCACAA
TGTCCCTTCAGCACCTGACCCTGTGCCCACCAGTTATTCCTTGGTAATATGAGTAATACATCAAAGAGTAGTATTAA
AAGCTAATTAATCATGTTTATACTAA

[0393] 示例性人VEGFR-3同工型1前体氨基酸序列(SEQ ID NO:39)

[0394] MQRGAALCLRLWLCLGLLDGLVSGYSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHLEWAWPGAQEAPA
TGDKDSED TGVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTL
LVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVH
ITGNELYDIQLLPRKSLELLVGEKLVNCTVWAEFNSGVTFDWDYPGKQAERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHNV
SQHDLGSYVCKANNGIQRFRETEVIVHENPFISVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSG
RHSPHALVLKEVTEASTGYTLALWNSAAGLRRNISLELVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALTCTAYGVPLPL
SIQWHWPWTPCKMFAQRSLRRRQQQLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESLDTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNAVNSAM
YKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKPSEELLEGPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLL
DCKNVHLFATPLAASLEEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKYLSVQALEAPRLTQNL
DLLVNVSDSLEMQLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSSAS
VAVEGSEDKGSMEIVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNMRRPAHADIKTGYSIIMDPGEVPLEEQCEYLSYDASQWE
FPRERLHLGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDTVAVKMLKEGATASEHRAIMSELKILIHIGNHLNVNLLGAC
TKPQGPLMVI VEFCKYGNLSNFLRAKRDAFSPCAEKSPEQRGRFRAMVELARLDRRRPGSSDRVLFARFSKTEGGAR
RASPDQEAEDLWLSPLTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSVVKICDFGLARDIYKDPDYVR
KGSARLPLKWMAPESIFDKVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVQINEEFCQRLRDGTRMRAPELATPAIRRI
MLNCWSGDPKARPAFSELVEILGDLLQGRGLQEEEEVCMAPRSSQSSEEGSFSQVSTMALHIAQADAEDSPPSLQRH
SLAARYYNWVSFPGCLARGAETRGSRRMKTFFEFPMPTPTYKGSVDNQTDSGMVLASEEFEQIESRHRQESGFR

[0395] 与变体1相比,此变体(3)包含替代性3'端外显子。这导致与同工型1相比具有更短

C端的同工型(3)。

[0396] 示例性人VEGFR-3同工型2cDNA序列(SEQ ID NO:40)

[0397] ACTTTCAGCCCCGAGCCGCGGCCGCTCGGGTCGGACCCACGCGCAGCGGCCGAGATGCAGCGGGGCGC
CGCGCTGTGCCTGCGACTGTGGCTCTGCCTGGGACTCCTGGACGGCCTGGTGAGTGGCTACTCCATGACCCCCCGA
CCTTGAACATCACGGAGGAGTCACACGTCATCGACACCGGTGACAGCCTGTCCATCTCCTGCAGGGGACAGCACCCC
CTCAGTGGGCTTGGCCAGGAGCTCAGGAGGCGCCAGCCACCGGAGACAAGGACAGCGAGGACACGGGGGTGGTGCG
AGACTGCGAGGGCACAGACGCCAGGCCCTACTGCAAGGTGTTGCTGCTGCACGAGGTACATGCCAACGACACAGGCA
GCTACGTCTGCTACTACAAGTACATCAAGGCACGCATCGAGGGCACCACGGCCGCCAGCTCCTACGTGTTCTGTGAGA
GACTTTGAGCAGCCATTTCATCAACAAGCCTGACACGCTCTTGGTCAACAGGAAGGACGCCATGTGGGTGCCCTGTCT
GGTGTCCATCCCCGGCCTCAATGTCACGCTGCGCTCGAAAAGCTCGGTGCTGTGGCCAGACGGGCAGGAGGTGGTGT
GGGATGACCGGCGGGGCATGCTCGTGTCCACGCCACTGTGTCAGATGCCCTGTACCTGCAGTGCAGAGACCACCTGG
GGAGACCAGGACTTCCTTTCCAACCCCTTCCTGGTGACATCACAGGCAACGAGCTCTATGACATCCAGCTGTTGCC
CAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTAGGGGAGAAGCTGGTCCTGAACTGCACCGTGTGGGCTGAGTTTAACTCAGGTG
TCACCTTTGACTGGGACTACCCAGGGAAGCAGGCAGAGCGGGGTAAGTGGGTGCCCCGAGCGACGCTCCCAGCAGACC
CACACAGAACTCTCCAGCATCCTGACCATCCACAACGTCAGCCAGCACGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAA
CAACGGCATCCAGCGATTTTCGGGAGAGCACCGAGGTCATTGTGCATGAAAATCCCTTCATCAGCGTCGAGTGGCTCA
AAGGACCCATCCTGGAGGCCACGGCAGGAGACGAGCTGGTGAAGCTGCCCCGTAAGCTGGCAGCGTACCCCCGCCC
GAGTTCCAGTGGTACAAGGATGGAAGGCACTGTCCGGGCGCCACAGTCCACATGCCCTGGTGCTCAAGGAGGTGAC
AGAGGCCAGCACAGGCACCTACACCCTCGCCCTGTGGAACCTCCGCTGCTGGCCTGAGGCGCAACATCAGCCTGGAGC
TGGTGGTGAATGTGCCCCCAGATACATGAGAAGGAGGCCTCCTCCCCAGCATCTACTCGCGTCACAGCCGCCAG
GCCCTCACCTGCACGGCCTACGGGGTGCCCTGCCTCTCAGCATCCAGTGGCACTGGCGGCCCTGGACACCCTGCAA
GATGTTTGCCAGCGTAGTCTCCGGCGGCGGCAGCAGCAAGACCTCATGCCACAGTGCCGTGACTGGAGGGCGGTGA
CCACGCAGGATGCCGTGAACCCCATCGAGAGCCTGGACACCTGGACCGAGTTTGTGGAGGGAAAGAATAAGACTGTG
AGCAAGCTGGTGATCCAGAATGCCAACGTGTCTGCCATGTACAAGTGTGTGGTCTCCAACAAGGTGGGCCAGGATGA
GCGGCTCATCTACTTCTATGTGACCACCATCCCCGACGGCTTCACCATCGAATCCAAGCCATCCGAGGAGCTACTAG
AGGGCCAGCCGGTGCTCCTGAGCTGCCAAGCCGACAGCTACAAGTACGAGCATCTGCGCTGGTACCGCCTCAACCTG
TCCACGCTGCACGATGCGCACGGGAACCCGCTTCTGCTCGACTGCAAGAACGTGCATCTGTTCCGCCACCCCTCTGGC
CGCCAGCCTGGAGGAGGTGGCACCTGGGGCGCGCCACGCCACGCTCAGCCTGAGTATCCCCCGCGTCGCGCCCGAGC
ACGAGGGCCACTATGTGTGCGAAGTGCAAGACCGGCGCAGCCATGACAAGCACTGCCACAAGAAGTACCTGTGCGTG
CAGGCCCTGGAAGCCCTCGGCTCACGCAGAACTTGACCGACCTCCTGGTGAACGTGAGCGACTCGCTGGAGATGCA
GTGCTTGGTGGCCGAGCGCACGCGCCAGCATCGTGTGGTACAAAGACGAGAGGCTGCTGGAGGAAAAGTCTGGAG
TCGACTTGCGGACTCCAACCAGAAGCTGAGCATCCAGCGCGTGCAGGAGGATGCGGGACGCTATCTGTGCAGC
GTGTGCAACGCCAAGGGCTGCGTCAACTCCTCCGCCAGCGTGGCCGTGGAAGGCTCCGAGGATAAGGGCAGCATGGA
GATCGTGATCCTTGTCGGTACCGGCGTCATCGTGTCTTCTTCTGGGTCCTCCTCCTCATCTTCTGTAACATGA
GGAGGCCGGCCACGCAGACATCAAGACGGGCTACCTGTCCATCATCATGGACCCCGGGGAGGTGCCTCTGGAGGAG
CAATGCGAATACCTGTCTACGATGCCAGCCAGTGGGAATTCCCCCGAGAGCGGCTGCACCTGGGGAGAGTGCTCGG
CTACGGCGCCTTCGGGAAGGTGGTGGAAGCCTCCGCTTTCGGCATCCACAAGGGCAGCAGCTGTGACACCGTGGCCG
TGAAAATGCTGAAAGAGGGCGCCACGGCCAGCGAGCACCGCGCGTGTATGTCGGAGCTCAAGATCCTCATTACATC
GGCAACCACCTCAACGTGGTCAACCTCCTCGGGCGTGCACCAAGCCGCAGGGCCCCCTCATGGTGATCGTGGAGTT

CTGCAAGTACGGCAACCTCTCCAACCTCTCTGCGCGCCAAGCGGGACGCCTTCAGCCCCTGCGCGGAGAAGTCTCCCG
AGCAGCGCGGACGCTTCCGCGCCATGGTGGAGCTCGCCAGGCTGGATCGGAGGCGGCCGGGAGCAGCGACAGGGTC
CTCTTCGCGCGGTTCTCGAAGACCGAGGGCGGAGCGAGGCGGGCTTCTCCAGACCAAGAAGCTGAGGACCTGTGGCT
GAGCCCGCTGACCATGGAAGATCTTGTCTGCTACAGCTTCCAGGTGGCCAGAGGGATGGAGTTCCTGGCTTCCCGAA
AGTGCATCCACAGAGACCTGGCTGCTCGGAACATTCTGCTGTGCGAAAGCGACGTGGTGAAGATCTGTGACTTTGGC
CTTGCCCGGGACATCTACAAAGACCCCGACTACGTCCGCAAGGGCAGTGCCCGGCTGCCCCTGAAGTGGATGGCCCC
TGAAAGCATCTTCGACAAGGTGTACACCACGCAGAGTGACGTGTGGTCTTTGGGGTGCTTCTCTGGGAGATCTTCT
CTCTGGGGGCTCCCCGTACCCTGGGGTGCAGATCAATGAGGAGTTCGCCAGCGGCTGAGAGACGGCACAAGGATG
AGGGCCCCGGAGCTGGCCACTCCCGCCATACGCCGCATCATGCTGAAGTGTGGTCCGGAGACCCCAAGGCGAGACC
TGCATTCTCGGAGCTGGTGGAGATCCTGGGGGACCTGCTCCAGGGCAGGGGCTGCAAGAGGAAGAGGAGGTCTGCA
TGGCCCCGCGCAGCTCTCAGAGCTCAGAAGAGGGCAGCTTCTCGCAGGTGTCCACCATGGCCCTACACATCGCCCAG
GCTGACGCTGAGGACAGCCCGCCAAGCCTGCAGCGCCACAGCCTGGCCGCCAGGTATTACAAGTGGGTGTCTTTCC
CGGGTGCCTGGCCAGAGGGGCTGAGACCCGTGGTTCCTCCAGGATGAAGACATTTGAGGAATTCCCCATGACCCAA
CGACCTACAAAGGCTCTGTGGACAACCAGACAGACAGTGGGATGGTGTGGCCTCGGAGGAGTTTGAGCAGATAGAG
AGCAGGCATAGACAAGAAAGCGGCTTCAGAGGAACCAGGAGGACAAGAGGAGCATGAAAGTGGACAAGGAGTGTGAC
CACTGAAGCACACAGGGAGGGGTAGGCCTCCGGATGACTGCGGGCAGGCCTGGATAATATCCAGCCTCCCACAAG
AAGCTGGTGGAGCAGAGTGTTCCTGACTCCTCCAAGGAAAGGAGACGCCCTTTCATGGTCTGCTGAGTAACAGGT
GCCTTCCCAGACACTGGCGTTACTGCTTGACCAAAGAGCCCTCAAGCGGCCCTTATGCCAGCGTGACAGAGGGCTCA
CCTCTTGCTTCTAGGTCACCTTCTACAATGTCCCTTCAGCACCTGACCCTGTGCCACCAGTTATTCCTTGTAAT
ATGAGTAATACATCAAAGAGTAGTATTAAGCTAATTAATCATGTTTATACTAA

[0398] 示例性人VEGFR-3同工型1前体氨基酸序列(SEQ ID NO:41)

[0399] MQRGAALCLRLWLCLGLLDGLVSGYSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHPLEWAWPGAQEAPA
TGDKDSED TGVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTL
LVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVH
ITGNELYDIQLLRKSLELLVGEKLVNCTVWAEFNSGVTFDWDYPGKQAERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHNV
SQHDLGSYVCKANNGIQRFRETEVIVHENPFISVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSG
RHSPHALVLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALTCTAYGVPLPL
SIQWHWPWTPCKMFAQRSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESLDTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNAVNSAM
YKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKPSEELLEGPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLL
DCKNVHLFATPLAASLEEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYL SVQALEAPRLTQNL
DLLVNVSDSLEMQLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSSAS
VAVEGSEDKGSMEIVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNMRRPAHADIKTGYSIIMDPGEVPLEEQCEYLSYDASQWE
FPRERLHLGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDTVAVKMLKEGATASEHRAIMSELKILIHIGNHLNVNLLGAC
TKPQGPLMVI VEFCKYGNLSNFLRAKRDAFSPCAEKSPEQRGRFRAMVELARLDRRRPGSSDRVLFARFSKTEGGAR
RASPDQEAEDLWLSPLTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSVVKICDFGLARDIYKDPDYVR
KGSARLPLKWMAPESIFDKVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVQINEEFCQRLRDGTRMRAPELATPAIRRI
MLNCWSGDPKARPAFSELVEILGDLLQGRGLQEEEEVCMAPRSSQSSEEGSFSQVSTMALHIAQADAEDSPPSLQRH
SLAARYYNWVSFPGCLARGAETRGSSRMKTFEEFPMTPTTYKGSVDNQTDSGMVLASEEFEQIESRHRQESGFRGTR
RTRGA

[0400] 融合蛋白

[0401] 融合蛋白或嵌合蛋白为通过接合两个或更多个最初编码不同蛋白质的基因而产生的蛋白质。融合基因的翻译导致产生具有源自每个原始蛋白质的功能性质的单个或多个多肽。重组融合蛋白经人工产生,且所得蛋白质可以具有带有不同功能和/或物理化学模式的潜在多肽。在一些实施方案中,如本文所述的抗VEGF蛋白组合物包含如本文所述的一种或多种VEGF-R蛋白或其特征部分的融合物。

[0402] 例如,抗体融合蛋白可以将靶向特定抗原的抗体与能够改变免疫反应或诱导对癌细胞的直接损害的蛋白质组合。例如,溶细胞融合蛋白通过将抗体附接至毒素来增加抗体消除癌细胞的能力。这些所谓“免疫毒素”的效力源自毒素,而其特异性源自它们所附接的抗体或抗体片段。在某些实施方案中,此类融合蛋白可包含与细胞因子融合的多肽(例如,抗体和/或其特征部分)以产生“免疫细胞因子”。这种融合蛋白可以将肿瘤靶向抗体(例如抗VEGF抗体)与细胞因子(先天免疫反应介质)组合。在一些此类实施方案中,这增加了肿瘤微环境中免疫系统的局部活化,潜在地支持癌细胞和/或肿瘤(例如,VS)的消除。

[0403] 在一些实施方案中,本文所述的任何抗VEGF蛋白(例如,抗体、可溶性VEGF受体和/或其特征VEGF结合部分)可以包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)Fc区中的氨基酸取代,例如与不包括一个或多个氨基酸取代中的至少一个的其他方面相同的抗体和/或可溶性VEGF受体的半衰期相比,所述氨基酸取代减少哺乳动物中抗体和/或可溶性VEGF受体的半衰期。确定哺乳动物中抗体和/或可溶性VEGF受体的半衰期的方法为本领域中公知的。Leabman等人,MAbs 5(6):896-903,2013中描述了Fc突变中可以减少抗体和/或可溶性VEGF受体的半衰期的点突变的非限制性实例;所述文献以引用方式整体并入本文。

[0404] 阿柏西普

[0405] 在某些实施方案中,如本文所述的抗VEGF蛋白为阿柏西普。阿柏西普为一种重组融合蛋白,其由与人IgG1的Fc部分融合的人VEGF受体1和2细胞外结构域的部分组成。阿柏西普为一种二聚体糖蛋白,其中蛋白质分子量为大约97千道尔顿(kDa),且可含有翻译后糖基化,这可构成总分子量的另外15%,导致总分子量为115kDa。阿柏西普已获得FDA批准,并已经指定用于治疗新生血管(湿性)年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞后黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿、转移性结直肠癌和糖尿病性视网膜病变。

[0406] 在某些实施方案中,阿柏西普充当VEGF-TRAP。与本文所述的某些示例性基于抗体的VEGF结合策略(例如利用雷珠单抗和/或贝伐单抗)相比,在一些实施方案中,VEGF-TRAP并入VEGFR-1受体的第二结合结构域和VEGFR-2受体的第三结构域。通过将这些细胞外蛋白质序列与人IgG骨架的Fc区段融合,产生了一种具有非常高VEGF结合亲和力($K_d \approx 1\text{pM}$)的嵌合蛋白。与雷珠单抗和贝伐单抗一样,VEGF-TRAP(诸如阿柏西普)结合VEGF-A家族的所有异构体,并且也结合VEGF-B和胎盘生长因子。在某些实施方案中,阿柏西普蛋白与合适分泌信号序列诸如IL2SS(下文所述)缀合。在某些实施方案中,VEGF-TRAP蛋白产物由SEQ ID NO: 43或44表示。

[0407] 示例性阿柏西普核苷酸编码序列(SEQ ID NO:42)

[0408] ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTAGCGATACCGGAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCC

CTGCAGAGTGACAAGCCCCAACATCACCGTGACTCTGAAGAAGTTCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGA
GAATCATCTGGGACAGCCGGAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAAGAGATCGGCCTGCTGACCTGTGAA
GCCACCGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACACACAGACAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCT
GAGCCCTAGCCACGGCATTGAACTGTCTGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGTACCGCCAGAACCGAGCTGAACG
TGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCACAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACC
CAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTGAGCACCTTGACCATCGACGGCGTGACCAGATCTGACCAGGGCCTGTA
CACATGTGCCGCCAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACCTTCGTGCGGGTGACGAGAAGGACAAGACCC
ACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGAC
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTT
CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAATAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAG
GCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACACTGCC
TCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCG
CCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGA

[0409] 示例性阿柏西普氨基酸序列 (SEQ ID NO:43)

[0410] MYRMQLLSICIALSLALVTNSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTL
IPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTA
RTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH
EKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0411] 示例性阿柏西普细胞外 (EC) 结构域氨基酸序列 (SEQ ID NO:112)

[0412] MYRMQLLSICIALSLALVTNSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDT
LIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTA
RTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFV
RVHEK示例性阿柏西普氨基酸序列 (SEQ ID NO:44)

[0413] SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNA
TYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQ
HKKL VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0414] 示例性可结晶片段 (Fc) 核苷酸序列 (SEQ ID NO:110)

[0415] GACAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTT
CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA
GGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAAC
AGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAG

TGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACC
CCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCT
TCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCTGTG
CTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT
CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCCTGGC

[0416] 示例性可结晶片段 (Fc) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:111)

[0417] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

[0418] 构建体

[0419] 除其他外,本公开提供了:如本文所述的一些多核苷酸为多核苷酸构建体。根据本公开的多核苷酸构建体包括本领域中已知的所有那些多核苷酸构建体,包括粘粒、质粒(例如,裸露或包含在脂质体中)和病毒构建体(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒构建体),所述构建体并入有包含抗VEGF蛋白(例如抗VEGF抗体)和/或可溶性VEGF受体(例如,抗VEGF-TRAP蛋白(例如,融合蛋白,诸如阿柏西普))的多核苷酸。本领域技术人员将能够选择合适构建体以及细胞来制备本文所述的任何多核苷酸。在一些实施方案中,构建体为质粒(即,可在细胞内自主复制的环状DNA分子)。在一些实施方案中,构建体可以为粘粒(例如,pWE或sCos系列)。

[0420] 在一些实施方案中,构建体为病毒构建体。在一些实施方案中,病毒构建体为慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒构建体。在一些实施方案中,构建体为腺相关病毒(AAV)构建体(参见例如Asokan等人,Mol. Ther. 20:699-7080, 2012, 其以引用方式整体并入本文)。WT AAV基因组的简化实例在图5图(A)中表示,而重组AAV(rAAV)构建体的简化实例在图5图(B)中表示。在一些实施方案中,病毒构建体为腺病毒构建体。在一些实施方案中,病毒构建体也可基于或源自 α 病毒。 α 病毒包括辛得比(Sindbis)(和VEEV)病毒、奥拉病毒(Aura virus)、巴班基病毒(Babanki virus)、巴马森林病毒(Barmah Forest virus)、比巴鲁病毒(Bebaru virus)、卡巴斯欧病毒(Cabassou virus)、屈公病毒(Chikungunya virus)、东方马脑炎病毒、埃沃格雷病毒(Everglades virus)、摩根堡病毒(Fort Morgan virus)、给塔病毒(Getah virus)、高地J病毒(Highlands J virus)、孜拉加奇病毒(Kyzylagach virus)、马亚罗病毒(Mayaro virus)、Me Tri病毒、马尔堡病毒(Middelburg virus)、莫斯达斯佩德拉斯病毒(Mosso das Pedras virus)、穆坎博病毒(Mucambo virus)、恩杜穆病毒(Ndumu virus)、奥绒绒病毒(O'nyong-nyong virus)、Pixuna病毒、尼格罗河病毒(Rio Negro virus)、罗斯河病毒(Ross River virus)、鲑鱼胰腺病病毒(Salmon pancreas disease virus)、Semliki森林病毒、南方象海豹病毒(Southern elephant seal virus)、图那特病毒(Tonate virus)、特罗卡拉病毒(Trocar virus)、乌纳病毒(Una virus)、委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus)、西部马脑炎病毒(Western equine encephalitis virus)和瓦塔罗阿病毒(Whataroa virus)。通常,此类病毒的基因组编码可在宿主细胞的细胞质中翻译的非结构蛋白(例如复制子)和结构蛋白(例如衣壳和包膜)。罗斯河病毒、辛得比病毒、Semliki森林病毒(SFV)和

委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV) 均已用于开发用于编码序列递送的病毒构建体。假型病毒可以通过将 α 病毒包膜糖蛋白和逆转录病毒衣壳组合来形成。 α 病毒构建体的实例可以在美国公开号20150050243、20090305344和20060177819中找到;构建体及其制造方法以引用方式整体并入本文。

[0421] 本文提供的构建体可具有不同大小。在一些实施方案中,构建体为质粒,且可包括多达约1kb、多达约2kb、多达约3kb、多达约4kb、多达约5kb、多达约6kb、多达约7kb、多达约8kb、多达约9kb、多达约10kb、多达约11kb、多达约12kb、多达约13kb、多达约14kb或多达约15kb的总长度。在一些实施方案中,构建体为质粒且可以具有约1kb至约2kb、约1kb至约3kb、约1kb至约4kb、约1kb至约5kb、约1kb至约6kb、约1kb至约7kb、约1kb至约8kb、约1kb至约9kb、约1kb至约10kb、约1kb至约11kb、约1kb至约12kb、约1kb至约13kb、约1kb至约14kb或约1kb至约15kb范围内的总长度。

[0422] 在一些实施方案中,构建体为病毒构建体且核苷酸总数可多达10kb。在一些实施方案中,病毒构建体的核苷酸总数可在以下范围内:约1kb至约2kb、1kb至约3kb、约1kb至约4kb、约1kb至约5kb、约1kb至约6kb、约1kb至约7kb、约1kb至约8kb、约1kb至约9kb、约1kb至约10kb、约2kb至约3kb、约2kb至约4kb、约2kb至约5kb、约2kb至约6kb、约2kb至约7kb、约2kb至约8kb、约2kb至约9kb、约2kb至约10kb、约3kb至约4kb、约3kb至约5kb、约3kb至约6kb、约3kb至约7kb、约3kb至约8kb、约3kb至约9kb、约3kb至约10kb、约4kb至约5kb、约4kb至约6kb、约4kb至约7kb、约4kb至约8kb、约4kb至约9kb、约4kb至约10kb、约5kb至约6kb、约5kb至约7kb、约5kb至约8kb、约5kb至约9kb、约5kb至约10kb、约6kb至约7kb、约6kb至约8kb、约6kb至约9kb、约6kb至约10kb、约7kb至约8kb、约7kb至约9kb、约7kb至约10kb、约8kb至约9kb、约8kb至约10kb或约9kb至约10kb。

[0423] 在一些实施方案中,构建体为慢病毒构建体且核苷酸总数可多达8kb。在一些实例中,慢病毒构建体的核苷酸总数可为约1kb至约2kb、约1kb至约3kb、约1kb至约4kb、约1kb至约5kb、约1kb至约6kb、约1kb至约7kb、约1kb至约8kb、约2kb至约3kb、约2kb至约4kb、约2kb至约5kb、约2kb至约6kb、约2kb至约7kb、约2kb至约8kb、约3kb至约4kb、约3kb至约5kb、约3kb至约6kb、约3kb至约7kb、约3kb至约8kb、约4kb至约5kb、约4kb至约6kb、约4kb至约7kb、约4kb至约8kb、约5kb至约6kb、约5kb至约7kb、约5kb至约8kb、约6kb至约8kb、约6kb至约7kb或约7kb至约8kb。

[0424] 在一些实施方案中,构建体为腺病毒构建体且核苷酸总数可多达8kb。在一些实施方案中,腺病毒构建体的核苷酸总数可在以下范围内:约1kb至约2kb、约1kb至约3kb、约1kb至约4kb、约1kb至约5kb、约1kb至约6kb、约1kb至约7kb、约1kb至约8kb、约2kb至约3kb、约2kb至约4kb、约2kb至约5kb、约2kb至约6kb、约2kb至约7kb、约2kb至约8kb、约3kb至约4kb、约3kb至约5kb、约3kb至约6kb、约3kb至约7kb、约3kb至约8kb、约4kb至约5kb、约4kb至约6kb、约4kb至约7kb、约4kb至约8kb、约5kb至约6kb、约5kb至约7kb、约5kb至约8kb、约6kb至约7kb、约6kb至约8kb或约7kb至约8kb。

[0425] 本文所述构建体中的任一者可进一步包括控制序列,例如选自以下的组的控制序列:转录起始序列、转录终止序列、启动子序列、增强子序列、RNA剪接序列、聚腺苷酸化 (poly (A)) 序列、Kozak共有序列和/或可容纳转录前或转录后调控和/或控制元件的额外非翻译区。在一些实施方案中,启动子可为天然启动子、组成型启动子、诱导型启动子和/或组

织特异性启动子。控制序列的非限制性实例描述于本文中。

[0426] AAV颗粒

[0427] 除其他外,本公开提供了包含本文所述的AAV衣壳的AAV颗粒,所述AAV衣壳含有编码抗VEGF蛋白(例如抗VEGF抗体和/或抗VEGF-TRAP蛋白)的重组AAV(rAAV)构建体。在一些实施方案中,AAV颗粒可被描述为具有血清型,其为构建体品系和衣壳品系的描述。例如,在一些实施方案中,AAV颗粒可被描述为AAV2,其中所述颗粒具有AAV2衣壳和包含特征性AAV2反向末端重复序列(ITR)的构建体。在一些实施方案中,AAV颗粒可被描述为假型,其中衣壳和构建体源自不同AAV品系,例如,AAV2/9将是指包含利用AAV2 ITR的构建体和AAV9衣壳的AAV颗粒。此相同命名法也可用于rAAV衣壳、构建体和/或颗粒。

[0428] 在某些实施方案中,使用rAAV颗粒的基因治疗出于如下几个原因作为一种有前景的内耳病症治疗方式:(1)含有听觉和前庭感觉上皮的内耳,具有改良的免疫监视,类似于中枢神经系统中的免疫监视(Fujioka 2014,其以引用方式整体并入本文);(2)耳蜗柯蒂氏器官的感觉和支持细胞为有丝分裂后的,允许在单次施用rAAV后长期表达的可能性;和(3)经由多种施用途径在成人和儿童中递送rAAV的综合临床经验表明,rAAV作为递送媒介物具有很强安全性,特别为在局部递送和/或低至中等剂量下时。

[0429] 利用rAAV颗粒的临床试验始于二十多年前,且在几十项临床试验中,rAAV颗粒已以高达大约 1×10^{15} vg或更大的剂量向数百名参与者进行全身施用来施用(Flotte 1996; Flotte 2013; Parente 2018; Wang 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。其中rAAV颗粒已用于体内基因转移的试验数量稳步增加。安全概况连同广泛范围的靶组织转导的高效率已将rAAV颗粒确立为体内基因治疗的首选平台(Wang 2019,其以引用方式整体并入本文)。rAAV技术已在临床上成功应用于多种病状,包括凝血障碍、遗传性失明和神经退行性疾病(Colella 2018; Wang 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。

[0430] 在某些实施方案中,包含有包含编码抗VEGF蛋白的构建体的rAAV颗粒的组合物称为rAAV-抗VEGF。在其中使用Anc80衣壳的某些组合物中,此种组合物可称为rAAVAnc80-抗VEGF。在一些实施方案中,这些组合物也可称为AK-抗VEGF。在一些实施方案中,rAAVAnc80-抗VEGF颗粒包含特定rAAV构建体,例如其可包含如图6图(A)表示的构建体。此种构建体在本文中称为 V_H/V_L 构建体,和/或rAAVAnc80- V_H/V_L ;示例性rAAVAnc80- V_H/V_L 构建体编码雷珠单抗。在一些实施方案中,rAAVAnc80-抗VEGF颗粒包含如图6图(B)表示的构建体,其中所述构建体可称为抗体GFP构建体(ABGFP)和/或rAAVAnc80-ABGFP;示例性rAAVAnc80-ABGFP构建体编码与GFP转录连接的雷珠单抗或贝伐单抗。在一些实施方案中,rAAVAnc80-抗VEGF构建体包含如图6图(C)表示的构建体,其中构建体可称为抗体(AB)构建体和/或rAAVAnc80-AB;示例性rAAVAnc80-AB构建体编码贝伐单抗。在一些实施方案中,rAAVAnc80-抗VEGF构建体包含如图6图(D)表示的构建体,其中构建体可称为抗VEGF-TRAP(TRAP)和/或rAAVAnc80-TRAP;示例性rAAVAnc80-TRAP构建体编码阿柏西普。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)为基因治疗组合物且意欲用于治疗患有VS的患者。在一些实施方案中,本文公开的组合物包含腺相关病毒(AAV)颗粒血清型1、2、8和9的推定共同祖先AAVAnc80(Zinn 2015,其以引用方式整体并入本文),作为编码雷珠单抗序列的转基因的递送媒介物,所述雷珠单抗为先前被优化以在眼内施用后进行VEGF抑制的抗体片段(Fab)(Genentech 2017,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,本文公开的组合物为

直径大约26纳米 (nm) 的无包膜二十面体病毒粒子。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如合成AAVAnc80衣壳序列)所基于的腺相关病毒为细小病毒科的非致病性、含单链DNA基因组、辅助病毒依赖性成员。

[0431] 重组AAV (rAAV) 颗粒在保留与野生型腺相关病毒相同的整体衣壳结构的同时,将不含任何病毒蛋白编码序列并在其位置插入治疗性基因表达盒的基因组包裹起来。病毒起源的唯一序列为反向末端重复 (ITR) 序列,此为在颗粒产生期间指导基因组复制和包装所必需的。病毒编码序列的移除使rAAV颗粒的包装容量最大化,并造成它们在体内递送时的低免疫原性和细胞毒性 (Wang 2019,其以引用方式整体并入本文)。

[0432] AAVAnc80为一种合理设计的AAV衣壳,其序列为通过祖先序列重构推断出来的 (Zinn 2015,其以引用方式整体并入本文)。首次报告的AAVAnc80在哺乳动物内耳中的使用揭示了耳蜗和前庭毛细胞的高转导效率,以及敲入小鼠模型中听觉、耳蜗和前庭功能恢复的证据 (Landegger 2017;Pan 2017,其中每一者以引用方式整体并入本文)。随后的研究已证实,AAVAnc80的耳蜗和前庭细胞转导效率显著高于小鼠 (Landegger 2017;Tao 2018;Yoshimura 2018;Omichi 2020,其中每一者以引用方式整体并入本文) 和非人灵长类动物 (Andres-Mateos 2019,其以引用方式整体并入本文) 中的其他AAV血清型。

[0433] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)包含两种组分:AAVAnc80(也称为Anc80L65;Zinn 2015,其以引用方式整体并入本文)衣壳和编码抗VEGF蛋白的单链rAAV DNA基因组,所述抗VEGF蛋白诸如rAAV- V_H/V_L (例如,雷珠单抗)、rAAV-AB (例如,贝伐单抗)、rAAV-ABGFP (例如,用GFP标记的抗体,例如,用GFP标记的雷珠单抗或贝伐单抗)和/或被所述AAVAnc80衣壳包裹的rAAV-TRAP (例如,阿柏西普)。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)包含两个组分:AAVAnc80(也称为Anc80L65;Zinn 2015,其以引用方式整体并入本文)衣壳和被所述AAVAnc80衣壳包裹的3000-5000个核苷酸的单链DNA基因组,不包括ITR序列(例如,如图6图(A)-图(D)所示)。

[0434] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如重组构建体DNA基因组)侧接有AAV2 ITR序列且包含编码以下启动子和调控序列的真核表达盒:巨细胞病毒 (CMV) 早期增强子元件;位于第二个外显子的5'侧接区域与近端区域之间的鸡 β 肌动蛋白 (C β A) 基因序列;和源自兔 β 珠蛋白 (R β G) 基因的3'剪接受体序列,共同称为CAG启动子 (Miyazaki 1989;Niwa 1991;Orbán 2009,其中每一者以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,在此杂交调控元件之后为编码雷珠单抗重链和轻链的双顺反子盒,所述重链和轻链由弗林蛋白酶和明脉扁刺蛾病毒衍生的蛋白酶2A (T2A) 裂解位点分隔。在一些实施方案中,为了促进蛋白质分泌,20个氨基酸的人白细胞介素-2 (IL-2) 前导序列位于每条Fab链上游。在本文公开的组合物的一些实施方案中,抗VEGF蛋白编码序列的下游为牛生长激素聚腺苷酸化位点。

[0435] 随着成像技术逐步发展以及识别且跟踪肿瘤生长的能力提高,当前VS标准护理在过去20到30年中逐步发展。存在趋向于保守性观察性“等待和重新扫描”方法的渐进趋势,人们越来越意识到许多肿瘤表现出缓慢或低生长,且只要保持低生长率就可能不影响听力 (MacKeith 2013;Reznitsky 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)的关键潜在益处为例如通过阻止肿瘤生长、稳定听力和/或消除对诸如手术切除和/或放射治疗的更具侵入性的治疗方法的需要来增强此保守治疗方法的机会。不希望受理论束缚,据信在一些实施方案中,虽然阻止VS生长可能

提供基本临床益处,但是还有可能本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF疗法)可以超越肿瘤停滞并推动肿瘤缩小、语言理解恢复和/或感知到的语言理解困难减少,如在NF2患者中贝伐单抗治疗的VS肿瘤的研究中证明(Huang 2018;Plotkin 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。此外,全身施用VEGF抑制剂的研究已表明,NF2相关性生活品质有所改善,包括NF2患者的与VS相关的症状(Plotkin 2019,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,这些临床数据表明,rAAV-抗VEGF施用以及与肿瘤处于扩散连续性的抗VEGF蛋白的持续和局部表达有可能为患有VS的患者提供这些额外益处。

[0436] 在一些实施方案中,耳蜗内施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)具有消除对未来治疗的需要并在患有VS的那些患者中保留生理听力的潜力,无论潜在病因是什么。在一些实施方案中,本文公开的组合物可导致延迟侵入性治疗方法,诸如手术切除和/或放射治疗,以及相关生理听力损失。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,所述方法还包括施用标准护理治疗。在一些实施方案中,对随后接受放射治疗的受试者也可能有潜在益处,因为抗VEGF蛋白治疗可以通过使肿瘤敏感并允许较低放射剂量来改善受试者对放射治疗的反应(Koutsimpelas 2012;Gao 2015,其中每一者以引用方式整体并入本文)。

[0437] AAV构建体

[0438] 本公开提供了包含抗VEGF抗体和/或可溶性VEGF受体(例如抗VEGF TRAP蛋白,诸如融合蛋白阿柏西普)的多核苷酸构建体。在本文所述的一些实施方案中,包含抗VEGF抗体和/或可溶性VEGF受体的多核苷酸称为构建体,且可以涵盖在AAV衣壳内以产生rAAV颗粒。在某些实施方案中,rAAV构建体可称为载体,并可量化为载体基因组(vg);例如,作为每毫升(mL)的vg.WT AAV基因组的简化示意图描绘于图5图(A)中,而rAAV构建体的简化示意图描绘于图5图(B)中。

[0439] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体包含一种或多种源自天然存在的AAV基因组构建体或自其修饰的组分。在一些实施方案中,源自AAV构建体的序列为AAV1构建体、AAV2构建体、AAV3构建体、AAV4构建体、AAV5构建体、AAV6构建体、AAV7构建体、AAV8构建体、AAV9构建体、AAV2.7m8构建体、AAV8BP2构建体、AAV293构建体或AAVAnc80构建体。可用于本文中的其他示例性AAV构建体为本领域中已知的。参见例如Kanaan等人,Mol. Ther. Nucleic Acids 8:184-197,2017;Li等人,Mol. Ther. 16(7):1252-1260,2008;Adachi等人,Nat. Commun. 5:3075,2014;Isgrig等人,Nat. Commun. 10(1):427,2019;和Gao等人,J. Virol. 78(12):6381-6388,2004;其中每一者以引用方式整体并入本文。

[0440] 在一些实施方案中,所提供的构建体包含编码序列,例如抗VEGF基因或其特征部分、一个或多个调控和/或控制序列,以及任选的5'和3' AAV衍生的反向末端重复序列(ITR)。在其中利用5'和3' AAV衍生的ITR的一些实施方案中,多核苷酸构建体可称为重组AAV(rAAV)构建体。在一些实施方案中,所提供的rAAV构建体被包装到AAV衣壳中以形成rAAV颗粒。

[0441] 在一些实施方案中,AAV衍生序列(其包含在多核苷酸构建体中)通常包括顺式作用的5'和3' ITR序列(参见例如B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses," P. Tijsser 编, CRC Press, 第155-168页,1990,其以引用方式整体并入本文)。典型AAV2衍生ITR序列长度为约145个核苷酸。在一些实施方案中,典型ITR序列的至少80%(例如,至少85%、至少90%或至少95%)并入本文提供的构建体中。修饰这些ITR序列的能力在本领域的技能范围

内(参见例如,文章,诸如Sambrook等人,“Molecular Cloning.A Laboratory Manual”,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1989;和K.Fisher等人,JVirol.70:520-532,1996,其中每一者以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,本文所述的任何编码序列和/或构建体的侧接有5'和3' AAV ITR序列。AAV ITR序列可获自任何已知AAV,包括目前鉴别的AAV类型。

[0442] 在一些实施方案中,根据本公开并以本领域已知的模式来描述的多核苷酸构建体(参见例如Asokan等人,Mol. Ther. 20:699-7080,2012,其以引用方式整体并入本文)通常包含编码序列或其一部分、至少一个和/或控制序列和任选的5'和3' AAV反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方案中,所提供的构建体可包装于衣壳中以产生rAAV颗粒。可以将rAAV颗粒递送到所选靶细胞。在一些实施方案中,所提供的构建体包含作为与构建体序列异源的核酸序列的额外任选的编码序列,其编码感兴趣的多肽、蛋白质、功能性RNA分子(例如,miRNA、miRNA抑制剂)或其他基因产物。在一些实施方案中,核酸编码序列以允许编码序列在靶组织的细胞中转录、翻译和/或表达的方式与控制组分可操作地连接。

[0443] 如图5图(A)中所示,未修饰的AAV内源基因组包含两个开放阅读框“cap”和“rep”,其均侧接有ITR。如图5图(B)所示,示例性rAAV构建体类似地包括侧接编码区例如编码序列(例如抗VEGF基因)的ITR。在一些实施方案中,rAAV构建体也包含常规控制元件,所述控制元件与编码序列以允许所述编码序列在用质粒构建体转染或用本公开产生的病毒感染的细胞中转录、翻译和/或表达的方式可操作地连接。在一些实施方案中,rAAV构建体任选地包含启动子(图5图(B)中所示)、增强子、非翻译区(例如,5'UTR、3'UTR)、Kozak序列、内部核糖体进入位点(IRES)、剪接位点(例如,受体位点、供体位点)、聚腺苷酸化位点(图5图(B)中所示)或其任何组合。此类附加元件在本文中进一步描述。

[0444] 在一些实施方案中,构建体为rAAV构建体。在一些实施方案中,rAAV构建体可以包括至少500bp、至少1kb、至少1.5kb、至少2kb、至少2.5kb、至少3kb、至少3.5kb、至少4kb或至少4.5kb。在一些实施方案中,rAAV构建体可包括至多7.5kb、至多7kb、至多6.5kb、至多6kb、至多5.5kb、至多5kb、至多4.5kb、至多4kb、至多3.5kb、至多3kb或至多2.5kb。在一些实施方案中,rAAV构建体可包括约1kb至约2kb、约1kb至约3kb、约1kb至约4kb、约1kb至约5kb、约2kb至约3kb、约2kb至约4kb、约2kb至约5kb、约3kb至约4kb、约3kb至约5kb或约4kb至约5kb。

[0445] 本文所述的任何构建体可进一步包括调控和/或控制序列,例如选自以下的组的控制序列:转录起始序列、转录终止序列、启动子序列、增强子序列、RNA剪接序列、聚腺苷酸化(poly(A))序列、Kozak共有序列和/或其任何组合。在一些实施方案中,启动子可为天然启动子、组成型启动子、诱导型启动子和/或组织特异性启动子。控制序列的非限制性实例描述于本文中。

[0446] 示例性构建体组分

[0447] 反向末端重复序列(ITR)

[0448] 构建体的AAV衍生序列通常包含顺式作用5'和3' ITR(参见例如B.J.Carter,in “Handbook of Parvoviruses”,P.Tijsser编,CRC Press,第155-168页,(1990),其以引用方式整体并入本文)。通常,ITR能够形成发夹。形成发夹的能力可有助于ITR自引发的能力,允许第二条DNA链不依赖引物酶而合成。ITR也可以有助于将rAAV构建体有效地包裹在rAAV颗粒中。

[0449] 在一些实施方案中,本公开的rAAV颗粒(例如,AAV2/Anc80颗粒)可以包含rAAV构建体,所述构建体包含编码序列(例如,抗VEGF基因)和侧接有5'和3' AAV ITR序列的相关元件。在一些实施方案中,ITR为或包含约145个核酸。在一些实施方案中,使用全部或基本上全部编码ITR的序列。AAV ITR序列可获自任何已知AAV,包括目前鉴别的哺乳动物AAV类型。在一些实施方案中,ITR为AAV2 ITR。

[0450] 本公开中采用的构建体分子的实例为包含转基因的“顺式作用”构建体,其中所选转基因序列和相关调控元件侧接有5'或“左”和3'或“右”AAV ITR序列。5'和左侧指示是指在有义方向上自左到右阅读,ITR序列相对于整个构建体的位置。例如,在一些实施方案中,当以有义取向线性地描绘构建体时,5'或左ITR为最接近给定构建体的启动子(与聚腺苷酸化序列相反)的ITR。同时,3'和右侧指示是指在有义方向上自左到右阅读,ITR序列相对于整个构建体的位置。例如,在一些实施方案中,当以有义取向线性地描绘构建体时,3'或右ITR为最接近给定构建体的聚腺苷酸化序列(与启动子序列相反)的ITR。根据有义链以5'到3'的顺序描绘了如本文所提供的ITR。因此,本领域技术人员将理解,当自有义方向转换为反义方向时,5'或“左”取向的ITR也可以被描绘为3'或“右”ITR。此外,将给定有义ITR序列(例如,5'/左AAV ITR)转化为反义序列(例如,3'/右ITR序列)完全在本领域技术人员的能力范围内。本领域普通技术人员将理解如何修饰给定ITR序列以用作5'/左或3'/右ITR或其反义型式。

[0451] 例如,ITR(例如,5' ITR)可以具有根据SEQ ID NO:45的序列。在一些实施方案中,ITR(例如,3' ITR)可以具有根据SEQ ID NO:46的序列。在一些实施方案中,ITR包含一种或多种修饰,例如像本领域中已知的截短、缺失、取代或插入。在一些实施方案中,ITR包含少于145个核苷酸,例如127、130、134或141个核苷酸。例如,在一些实施方案中,ITR包含110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144或145个核苷酸。在一些实施方案中,ITR(例如,5' ITR)可以具有根据SEQ ID NO:47的序列。在一些实施方案中,ITR(例如,3' ITR)可以具有根据SEQ ID NO:48的序列。

[0452] 5' AAV ITR序列的非限制性实例为SEQ ID NO:45。3' AAV ITR序列的非限制性实例为SEQ ID NO:46。5' AAV ITR序列的非限制性实例为SEQ ID NO:47。3' AAV ITR序列的非限制性实例为SEQ ID NO:48。在一些实施方案中,本公开的rAAV构建体包含5' AAV ITR和/或3' AAV ITR。在一些实施方案中,5' AAV ITR序列为SEQ ID NO:45。在一些实施方案中,3' AAV ITR序列为SEQ ID NO:46。在一些实施方案中,5'和3' AAV ITR(例如,SEQ ID NO:45和46或47和48)侧接编码序列的一部分,例如抗VEGF基因的全部或一部分(例如,SEQ ID NO:13、14、15、19、22、42和/或103)。修饰这些ITR序列的能力在本领域的技能范围内。(参见例如,文章,诸如Sambrook等人,“Molecular Cloning.A Laboratory Manual”,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(1989);和K.Fisher等人,J Virol.,70:520532(1996),其中每一者以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,5' ITR序列与由SEQ ID NO:45或47表示的5' ITR序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。在一些实施方案中,3' ITR序列与由SEQ ID NO:46或48表示的3' ITR序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。

[0453] 示例性5' AAV ITR(SEQ ID NO:45)

[0454] TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG

ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT

[0455] 示例性3`AAV ITR(SEQ ID NO:46)

[0456] AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAC
CAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

[0457] 示例性5`AAV ITR(SEQ ID NO:47)

[0458] CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAG
CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT

[0459] 示例性3`AAV ITR(SEQ ID NO:48)

[0460] AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAC
CAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

[0461] 启动子

[0462] 在一些实施方案中,构建体(例如,rAAV构建体)包含启动子。术语“启动子”是指被酶/蛋白质识别的DNA序列,其可以促进和/或启动可操作地连接的基因(例如,抗VEGF基因)的转录。例如,启动子通常是指例如RNA聚合酶和/或任何相关因子与其结合且可以自其启动转录的核苷酸序列。因此,在一些实施方案中,构建体(例如,rAAV构建体)包含与本文所述的非限制性示例启动子之一可操作地连接的启动子。

[0463] 在一些实施方案中,启动子为诱导型启动子、组成型启动子、哺乳动物细胞启动子、病毒启动子、嵌合启动子、工程化启动子、组织特异性启动子或本领域中已知的任何其他类型的启动子。在一些实施方案中,启动子为RNA聚合酶II启动子,诸如哺乳动物RNA聚合酶II启动子。在一些实施方案中,启动子为RNA聚合酶III启动子,包括但不限于H1启动子、人U6启动子、小鼠U6启动子或猪U6启动子。启动子通常将为能够在内耳细胞中促进转录的启动子。在一些实施方案中,启动子为耳蜗特异性启动子或耳蜗定向启动子。在一些实施方案中,启动子为毛细胞特异性启动子或支持细胞特异性启动子。

[0464] 可在本文中使用的多种启动子是本领域中已知的。可在本文中使用的启动子的非限制实例包括:人EF1 α 、人巨细胞病毒(CMV)(美国专利号5,168,062,其以引用方式整体并入本文)、人泛素C(UBC)、小鼠磷酸甘油酸激酶1、多瘤腺病毒、猿猴病毒40(SV40)、 β -球蛋白、 β -肌动蛋白、 α -胎蛋白、 γ -球蛋白、 β -干扰素、 γ -谷氨酰基转移酶、小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)、劳斯肉瘤病毒、大鼠胰岛素、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、金属硫蛋白II(MT II)、淀粉酶、组织蛋白酶、MI毒蕈碱受体、逆转录病毒LTR(例如,人T细胞白血病病毒HTLV)、AAV ITR、白细胞介素-2、胶原酶、血小板衍生性生长因子、腺病毒5E2、基质溶素、鼠类MX基因、葡萄糖调控蛋白(GRP78和GRP94)、 α -2-巨球蛋白、波形蛋白、MHC I类基因H-2_k b、HSP70、多育曲菌素、肿瘤坏死因子、甲状腺刺激激素 α 基因(thyroid stimulating hormone agene)、免疫球蛋白轻链、T细胞受体、HLA DQ α 和DQ、白细胞介素-2受体、MHC II类、MHC II类HLA-DR α 、肌肉肌酸激酶、前白蛋白(转甲状腺素蛋白)、弹性蛋白酶I、白蛋白基因、c-fos、c-HA-ras、神经细胞黏着分子(NCAM)、H2B(TH2B)组蛋白、大鼠生长激素、人血清淀粉样蛋白(SAA)、肌钙蛋白I(TN I)、杜氏肌营养不良症、人免疫缺陷病毒、和长臂猿白血病病毒(GALV)启动子。启动子的其他实例为本领域中所已知。参见例如Lodish,Molecular Cell Biology,Freeman and Company,New York 2007,其中每一者以引用方式整体并入本文。在一些实施方案中,启动子为CMV立即早期启动子。在一些实施方案中,启动子为CAG启动子或CAG/CBA启动子。

在一些实施方案中,启动子包含SEQ ID NO:49或由其组成。在一些实施方案中,启动子包含SEQ ID NO:50或由其组成。在某些实施方案中,启动子包含在SEQ ID NO:51中例示的CMV/CBA增强子/启动子构建体。在某些实施方案中,启动子包含在SEQ ID NO:52中例示的CMV/CBA增强子/启动子构建体。在某些实施方案中,启动子包含在SEQ ID NO:53中例示的CAG启动子或CMV/CBA/SV-40增强子/启动子构建体。在某些实施方案中,启动子包含在SEQ ID NO:54中例示的CAG启动子或CMV/CBA/SV-40增强子/启动子构建体。在一些实施方案中,启动子序列与由SEQ ID NO:49或50表示的启动子序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。在一些实施方案中,增强子-启动子序列与由SEQ ID NO:51、52、53或54表示的增强子-启动子序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。

[0465] 术语“组成型”启动子是指如下核苷酸序列,其在与编码蛋白质(例如,抗VEGF蛋白)的核酸可操作地连接时,在细胞中在大多数或所有生理学条件下使得RNA自所述核酸转录。

[0466] 组成型启动子的实例包括但不限于逆转录病毒劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子(参见例如,Boshart等人,Cell 41:521-530,1985,其以引用方式整体并入本文)、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 β -肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF1- α 启动子(Invitrogen)。

[0467] 诱导型启动子允许调控基因表达,且可通过外源提供的化合物、环境因素诸如温度、或存在特定生理学状态例如急性期、细胞特定分化状态或仅在复制细胞中来调控。诱导型启动子和诱导型系统可获自多种商业来源,包括但不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。诱导型启动子的其他实例为本领域中所已知。

[0468] 由外源提供的化合物调控的诱导型启动子的实例包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(dexamethasone, Dex)诱导型小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO 98/10088,其以引用方式整体并入本文);蜕皮激素昆虫启动子(No等人,Proc.Natl.Acad.Sci.US.A.93:3346-3351,1996,其以引用方式整体并入本文)、四环素抑制型系统(Gossen等人Proc.Natl.Acad.Sci.US.A.89:5547-5551,1992,其以引用方式整体并入本文)、四环素诱导型系统(Gossen等人Science 268:1766-1769,1995,也参见Harvey等人Curr.Opin.Chem.Biol.2:512-518,1998,其中每一者以引用方式整体并入本文)、RU486-诱导型系统(Wang等人,Nat.Biotech.15:239-243,1997,和Wang等人,Gene Ther.4:432-441,1997,其中每一者以引用方式整体并入本文)、和雷帕霉素诱导型系统(Magari等人J Clin.Invest.100:2865-2872,1997,其以引用方式整体并入本文)。

[0469] 术语“组织特异性”启动子是指仅在某些特定细胞类型和/或组织中具有活性的启动子(例如,特定基因的转录仅在表达结合至组织特异性启动子的转录调控和/或控制蛋白的细胞内发生)。在一些实施方案中,调控和/或控制序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况下,组织特异性调控和/或控制序列结合以组织特异性方式诱导转录的组织特异性转录因子。

[0470] 在一些实施方案中,组织特异性启动子为耳蜗特异性启动子。在一些实施方案中,组织特异性启动子为耳蜗毛细胞特异性启动子。耳蜗毛细胞特异性启动子的非限制性实例包括但不限于:ATO1启动子、POU4F3启动子、LHX3启动子、MYO7A启动子、MYO6启动子、 α 9ACHR启动子和 α 10ACHR启动子。在一些实施方案中,启动子为耳蜗毛细胞特异性启动子,诸

如PRESTIN启动子或ONCOMOD启动子。参见例如Zheng等人,Nature 405:149-155,2000;Tian等人Dev.Dyn.231:199-203,2004;和Ryan等人,Adv.Otorhinolaryngol.66:99-115,2009,其中每一者以引用方式整体并入本文。

[0471] 在一些实施方案中,组织特异性启动子为耳细胞特异性启动子。在一些实施方案中,组织特异性启动子为内耳细胞特异性启动子。内耳非感觉细胞特异性启动子的非限制性实例包括但不限于:GJB2、GJB6、SLC26A4、TECTA、DFNA5、COCH、NDP、SYN1、GFAP、PLP、TAK1或SOX21。在一些实施方案中,耳蜗非感觉细胞特异性启动子可以为内耳支持细胞特异性启动子。内耳支持细胞特异性启动子的非限制性实例包括但不限于:SOX2、FGFR3、PROX1、GLAST1、LGR5、HES1、HES5、NOTCH1、JAG1、CDKN1A、CDKN1B、SOX10、P75、CD44、HEY2、LFNG或S100b。

[0472] 在一些实施方案中,所提供的rAAV构建体包含选自CAG、CBA、CMV或CB7启动子的启动子序列。在本文所述治疗组合中任一者的一些实施方案中,第一和/或单独rAAV构建体进一步包含选自耳蜗和/或内耳特异性启动子的至少一种启动子序列。

[0473] 示例性CBA启动子(SEQ ID NO:49)

[0474] GTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG

[0475] 示例性CBA启动子(SEQ ID NO:50)

[0476] GTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG

[0477] 示例性CMV/CBA增强子/启动子(SEQ ID NO:51)

[0478] GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG

[0479] 示例性CMV/CBA增强子/启动子(SEQ ID NO:52)

[0480] GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC

ATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGA
GGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGG
CGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGCG

[0481] 示例性CAG增强子/启动子 (SEQ ID NO:53)

[0482] GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG
AGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATA
ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGC
CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCT
GGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC
ATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGA
GAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT
GGCGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCC
GTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGG
GACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAG
CCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGG
AGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGGGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTG
TGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGG
GTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCG
AGTTGCTGAGCACGGCCCGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGG
GGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGGCGC
CCCCGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCA
GGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCACCCCCCTCTAGCGGGCGGGG
CGAAGCGGTGCGGCGCCGCGAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCGCTCCCTTCTC
CCTCTCCAGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGCGAGGGCGGGGTTCTGGCTTCTG
GCGTGTGACCGGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTCTACAG

[0483] 示例性CAG增强子/启动子 (SEQ ID NO:54)

[0484] GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG
AGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATA
ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGC
CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCT
GGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC
ATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGA
GGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGG
CGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGT
GCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGA
CGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCC

TTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAG
CGCCGCGTGCGGCCCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTG
CGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGT
GTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAG
TTGCTGAGCACGGCCCCGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG
TGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGGCC
CCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGG
GACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCG
AAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGCTCCCTTTCTCC
TCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGC
GTGTGACCGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAG

[0485] 在某些实施方案中,启动子为如SEQ ID NO:55所阐述的内源性人ATO1增强子-启动子。在一些实施方案中,增强子-启动子序列与由SEQ ID NO:55表示的增强子-启动子序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。

[0486] 示例性人ATO1增强子-启动子(SEQ ID NO:55)

[0487] CTATGGAGTTTGCATAACAAACGTTTGGCAGCTCGCTCTCTTAACTCCATTAACAAGCTGTAACATAT
AGCTGCAGGTTGCTATAATCTCATTAATATTTTGGAACTTGAATATTGAGTATTTCTGAGTGCTCATTCCCCATAT
GCCAGCCACTTCTGCCATGCTGACTGGTTCTTTCTCTCCATTATTAGCAATTAGCTTCTTACCTTCCAAAGTCAGA
TCCAAGGTATCCAAGATACTAGCAAAGGAATCAACTATGTGTGCAAGTTAAGCATGCTTAATATCACCCAAACAAAC
AAAGAGGCAGCATTTCTTAAAGTAATGAAGATAGATAAATCGGGTTAGTCCTTTGCGACACTGCTGGTGCTTTCTAG
AGTTTTATATATTTTAAAGCAGCTTGCTTTATATTCTGTCTTTGCCTCCCACCCACCAGCACTTTTATTTGTGGAGG
GTTTTGGCTCGCCACACTTTGGGAACTTATTTGATTTACGGAGAGCTGAAGGAAGATCATTTTGGCAACAGACA
AGTTTAAACACGATTTCTATGGGACATTGCTAACTGGGGCCCCTAAGGAGAAAGGGGAACTGAGCGGAGAATGGGT
TAAATCCTTGGAAGCAGGGGAGAGGCAGGGGAGGAGAGAAGTCGGAGGAGTATAAAGAAAAGACAGGAACCAAGAA
GCGTGGGGGTGGTTTGCCGTAATGTGAGTGTTTCTTAATTAGAGAACGTTGACAATAGAGGGTCTGGCAGAGGCTC
CTGGCCGCGGTGCGGAGCGTCTGGAGCGGAGCACGCGCTGTCAGCTGGTGAGCGCACTCTCCTTTCAGGCAGCTCCC
CGGGGAGCTGTGCGGCCACATTTAACACCATCATCACCCCTCCCCGGCCTCCTCAACCTCGGCCTCCTCCTCGTCGA
CAGCCTTCTTGGCCCCCACCAGCAGAGCTCACAGTAGCGAGCGTCTCTCGCCGTCTCCCGCACTCGGCCGGGGCCT
CTCTCCTCCCCAGCTGCGCAGCGGGAGCCGCCACTGCCACTGCACCTCCCAGCAACCAGCCCAGCACGCAAAGAA
GCTGCGCAAAGTTAAAGCCAAGCAATGCCAAGGGGAGGGGAAGCTGGAGGCGGGCTTTGAGTGGCTTCTGGGCGCCT
GGCGGGTCCAGAATCGCCCAGAGCCCGCCGCGTGTGACATCTGACCCGAGTCAGCTTGGGCACCAGCCGAGAGC
CGGCTCCGCACCGCTCCCGCACCCAGCCCGGGGTGGTGACACACACCGGAGTCGAATTACAGCCCTGCAATTAA
CATATGAATCTGACGAATTTAAAAGAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAACCTGAGCAGGCTTGGGAGTCCTCTGCACACAAG
AACTTTTCTCGGGGTGTAAAACTCTTTGATTGGCTGCTCGCACGCGCCTGCCCGCGCCCTCCATTGGCTGAGAAGA
CACGCGACCGGCGCGAGGAGGGGGTTGGGAGAGGAGCGGGGGGAGACTGAGTGGCGCGTGCCGCTTTTTAAAGGGGC
GCAGCGCCTTACGAACCGGAGAAGCATAGTTGCACGCGACCTGGTGTGTGATCTCCGAGTGGGTGGGGGAGGGTCCG
AGGAGGGAAAAAAAAATAAGACGTTGCAGAAGAGACCCGAAAGGGCCTTTTTTTTGGTTGAGCTGGTGTCCAGTG
CTGCCTCCGATCCTGAGCCTCCGAGCCTTTGCAGTGCAA

[0488] 在某些实施方案中,启动子是如SEQ ID NO:56或57所阐述的内源性人SLC26A4立

即启动子。在某些实施方案中,启动子是如SEQ ID NO:58、59或60所阐述的内源性人SLC26A4增强子-启动子。在一些实施方案中,增强子-启动子序列与由SEQ ID NO:56、57、58、59或60表示的启动子或增强子-启动子序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。在某些实施方案中,启动子是包含在SEQ ID NO:58、59或60内的人SLC26A4内源性增强子-启动子序列。

[0489] 示例性人SLC26A4立即启动子(SEQ ID NO:56)

[0490] CTGCCTTCTGAGAGCGCTATAAAGGCAGCGGAAGGGTAGT CCGCGGGGCATTCCGGGCGG

[0491] 示例性人SLC26A4立即启动子(SEQ ID NO:57)

[0492] CTCTAGGCGGGCTCTGCTCTTCTTTAAGGAGTCCCACAGG GCCTGGCCCGCCCCTGACCT

[0493] 示例性人SLC26A4增强子-启动子(SEQ ID NO:58)

[0494] TAAAGAGTTGTGAGTTGTGTAGGTGAGTTGCCATGGAGCTACAAATATGAGTTGATATTCTGAAATCCT
AGACAGCCATCTCCAAGGTTAAGAAAAATCCTTATGCACTCACTTGCAAAGATATCCACAGCATGCTCTTAATGGAG
AAAAACAAAGCCTTAGATCAAATATGTAAAGTAATTTTTAGTTTTTTGAAAAGGTATGTTTGGGCTATAGATAAATC
TGTTCAAAAAACATGAGAGAAGATAATAATGGTTGAAAGGAGACACAGTGCTTGCCCTCAAGAAGTTTTTGTCTAGT
GAGGGAGAGAGAACTTGATGTAAATAAAATGTGTTACTAAGGTAGTAGTGAGAAGTAACTTAAGAGAGGATCAG
ATAAGGTATTAAGAGAATACAGAAAAGGGTCTGGATTAATTCTGAACAGCATCAAAGAATGTTCTTGCAAGAGATAG
TGTTTTTACCAGATCTTGAAGGTATGGATGAGGGTATACAGAGTGAGTATATTCAGATTCTACTTTAAACAAATAC
TTTCTCTGTTGTAGTGGAGTTGAGCTATACATCCAACAATAATGAAAAATACACGCATATATACATATATGGAGA
GAGATACATATTTTAGTACATGTAGCAATTGATTAATAAATGTACAGTTTAAGTCGCATGCAAAACCTTGAGTGAT
AGCAAACCTTCATTGTAGGATGTTTAGCAGCATCTCTGGTCTCTACTCACTAGATCCCAATAGCATCTCCCTAGGTGT
GACAACCAAAAATGTCTCCAGGCATTGACCTCTGGAGGCAAAAAAGCCCTTTATTAAGAACCAGTGGTATACATAA
GTAAACATACACAAGAGATTCTCCCTCTTCTCTGTATGTGAATAAAAATTGCAAAGTTCATGACCTGGATTTTC
CTTTTAGGTTTCTTCTTTAGTGGTTCTTAACCTCATTGGGTGAAGTAAGCCTTTGAAGATCTGTTGAAAGCTGTTGA
CTCATTCACTTCTCAGGAAAACGCACATGCTGACTACCATTTCAGAGAATTTGCATCAGGGTTCTCTGGGGAGGAGT
TCTGAGTTCTGTTTCCAGGAGCTCGTAGAATTGTCATGGTCTGCATATGCAAGGCAGGTGGATTACGGAAGGTTGAT
GTACAGAGGTCTGTATTTTGGAGCCTCTTCTGTATTTACTTCAGAACACTAACAATCAGGCGAGAATGTTCTGGTTT
ATCAAACCTTCCTTCTGCCTTTCATCTTAACCATGCATTAGTTTTTAACAAAGTTCATCCCAACAGAAGACAAAACA
CTGATGAGGTAGGATAGCTCCAGCTCCTCCTCCTCTCTTCTAGTCTTGATTTCCATGTAGTCCAGTTTATTCCTTC
CCTGATTGTCCAGGAGAATGAGAAAAAGAAAAACAGAGTCTAGTGGGTAAGAAAGGGCCACCTGGACGGCTTGATT
TGGATTGTGAAATAAAACACACACACATGCACACGTAGAATAAGTGGCTAAAATCTGAGTAAATCGTGAACCTCTCTG
TATCCTCCACCCATTGAATACTCCTAAAAGACTTTCTAGAAATTCAAGGACTTATTAATATAGAAACCTGGCCATTG
TTCTCTTCTCCTCCCATGTGGTATGAGAGCACCTGTGGCAGGCTCCCAGAGACCACGGACCTCTTCTCTAGGCG
GGCTCTGCTCTTCTTTAAGGAGTCCCACAGGGCCTGGCCCGCCCCTGACCTCGCAACCCTTGAGATTAGTAACGGGA
TGAGTGAGGATCCGGGTGGCCCTGCGTGGCAGCCAGTAAGAGTCTCAGCCTTCCCGGTTCCGGGAAAGGGGAAGAAT
GCAGGAGGGGTAGGATTTCTTCTGATAGGATCGGTTGGGAAAGACCGCAGCCTGTGTGTGTCTTTCCCTTCGACC
AAGGTGTCTGTTGCTCCGTAAATAAAACGTCCCACTGCCTTCTGAGAGCGCTATAAAGGCAGCGGAAGGGTAGTCCG
CGGGGC

[0495] 示例性人SLC26A4增强子-启动子(SEQ ID NO:59)

[0496] GGCTGCTCGGAAAACAGGACGAGGGGAGAGACTTGCTCAATAAGCTGAAAGTTCTGCCCCGAGAGGGC

TGCGACAGCTGCTGGAATGTGCCTGCAGCGTCCGCCTCTTGGGGACCCGCGGAGCGCGCCCTGACGGTTCCACGCCT
GGCCCCGGGGTCTGCACCTCTCTCCAGTGCGCACCTGGAGCTGCGTCCCGGGTCAGGTGCGGGGAGGGAGGGAATC
TCAGTGTCCCTTCCAGCCTTGCAAGCGCCTTTGGCCCCTGCCCCAGCCCCCTCGGTTTGGGGGAGATTTCAGAACGC
GGACAGCGCCCTGGCTGCGGGCCATAGGGGACTGGGTGGAAGTTCGGGAAGCCCCAGAGCAGGGGCTTACTCGCTTC
AAGTTTGGGGAACCCCGGGCAGCGGTGCAGGCCACGAGACCCGAAGGTTCTCAGGTGCCCCCTGCAGGCTGGCCG
TGCGCGCCGTGGGGCGCTTGTGCGGAGCGCCGAGGGCTGCAGGACGCGGACCAGACTCGCGGTGCAGGGGGGCTGG
CTGCAGCTAACAGGTGATCCCGTTCTTTCTGTTCTCGCTCTTCCCCTCCGATCGTCTCGCTTACCGCGTGTCTC
CCTCCTCGCTGTCTCTGGCTCGCAGGTCATGGCAGCGCCAGGCGGCAGGTTCGGAGCCGCCGAGCTCCCCGAGTAC
AGCTGCAGCTACATGGTGTGCGGGCCGGTCTACAGCGAGCTCGCTTTCCAGCAACAGCACGAGCGGCGCCTGCAGGA
GCGCAAGACGCTGCGGGAGAGCCTGGCCAAGTGCTGCAGGTAGCGGCCGCGGGGCTGCGTAGAGAGAAGCGGAGC
GGGGCGTCCACGCCTTGGGGAGGGAAGGGCGTCCCCAGCGGGCGAGAGTGGGGTGGGGCGGCGGAGCCCCCTGGGCG
CCAGCTGCTTCTCCAGAGGCCCGACTTTCGGTCTCCGGTCTCCACGCCGCCCTTCTGGTGGGAGGGTGGCTCCAT
CAGTCTCGGGCCCCGAAATGAACTTACCTGGGAACTCGCCTTTGGGGAGAGTGGGTCTAGGAGCCCCGTCTCTCTT
TTTCTCTCTGAAGGAACTTGGAGTGCCTCTTGGGGTACAGTGGGTCCCTGTTGCCTTCTTGGGAGCTTGTTTTAA
TGAAATGAATAGGGAAACCCAGCTCTTGACCAGGAGGAGTCTTGAAACACTCAAGCTAAGTAGGCGGGCTACCATT
CAGTTAGAGACCAGGATGCAAGCTAGAACCCAGGGGAGCGCGGGGTGTGCCAAGTACTTCATCAGCAGGCTGTGGGA
CCCCTGGGGAAAGCCACCCTCAGTCTCTAAACCCAAACATGCCGTAAGTAGATGTCACAAACATAAAGAAATTAGAG
TTTCTAAACCTTTCATTATAG

[0497] 示例性人SLC26A4增强子-启动子 (SEQ ID NO:60)

[0498] CGGAAGGTTGATGTACAGAGGTCTGTATTTTGGAGCCTCTTCTGTATTTACTTCAGAACACTAACAATC
AGGCGAGAATGTTCTGGTTTATCAAACCTTCCCTTCTGCCTTTCATCTTAACCATGCATTAGTTTAAACAAAGTTCA
TCCCAACAGAAGACAAAACACTGATGAGGTAGGATAGCTCCAGCTCCTCCTCCCTCTCTTCTAGTCTTGATTTCAT
GTAGTCCAGTTTATTCCTTCCCTGATTGTCCAGGAGAATGAGAAAAAGAAAAACAGAGTCTAGTGGGTAAGAAAGG
GCCACCTGGACGGCTTGATTGATTGTGAAATAAAACACACACATGCACACGTAGAATAAGTGGCTAAAATCTG
AGTAAATCGTGAACCTCTCTGTATCCTCCACCCATTGAATACTCCTAAAAGACTTTCTAGAAATTCAGGACTTATTA
ATATAGAAACCTGGCCATTGTTCTCTTCTCCTCCCCATGTGGTATGAGAGCACCTGTGGCAGGCTCCAGAGACCA
CGGACCTCTTCTCTAGGCGGGCTCTGCTCTTCTTAAAGGAGTCCCACAGGGCCTGGCCCCGCCCTGACCTCGCAAC
CCTTGAGATTAGTAACGGGATGAGTGAGGATCCGGGTGGCCCCTGCGTGGCAGCCAGTAAGAGTCTCAGCCTTCCCG
GTTTCGGGAAAGGGGAAGAATGCAGGAGGGGTAGGATTTCTTTCCTGATAGGATCGGTTGGGAAAGACCGCAGCCTGT
GTGTGTCTTTCCCTTCGACCAAGGTGTCTGTGCTCCGTAAATAAAACGTCCCACTGCCTTCTGAGAGCGCTATAAA
GGCAGCGGAAGGGTAGTCCGCGGGGCATTCCGGGCGGGGCGCGAGCAGAGACAGGTGAGTT

[0499] 在某些实施方案中,启动子为如SEQ ID NO:61所阐述的人LGR5增强子-启动子。在一些实施方案中,增强子-启动子序列与由SEQ ID NO:61表示的增强子-启动子序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。在一些实施方案中,启动子为包含在SEQ ID NO:61内的人LGR5内源性增强子-启动子序列。

[0500] 示例性人LGR5增强子-启动子 (SEQ ID NO:61)

[0501] AGGGCTATTTGTACCTCAACGAGGGCTTCTCTCCAAGAAAGCCCTGAATCCTTTTCTCCTTTTCTCTG
CAGATTCACTATAGGACACTTTTTGAAGCAAGAGCATGCATTTCCCCCTGGCGCTCTGCAGCGGTTCTCAGAGCCC
AGTGTCACTCACATAGGTGGGACTGCTCTCAGTTCAGAGAGCGCTGGGACACTTAAGATGAAAAGTCCCTGGAAGTT

AGCAAACAGCCATCTGTCACTCTGGCATCGATTTACTAAAAGTGACTTCTAGGGTATTCTAAACCACTTTTAAAAA
CAAATGAGTCACTTCGACTTCCTCACCCCGCAAGAGATAGGAAGGCAGCAGTGGAGTGCTCGCTCAGGAGCTGTATT
TGTTTAGCGATTAGCCTAGAGCTTTGATTTTAGGGCAAAAGCGAGCCAGACAGTGCGGCAGACGTAAGGATCAAAAA
GGCCACCTATCATTCGCCGGGGACGCCTGCCTCCTTACCCTGATAACGTAACCTATTTCTCTGCATAGGATTTTAGTT
TTTGTGTTTTTTGTTTTGTTTTATTCTGTTTAATCACTTCAAGTATCTCATCCATTATTTGAAGCGGGCTCGGAGGAA
ACGTGCCGCATCCTCCAGTCCTTGTGCGTCTGTTTAGGTCTCTCCGAAGCAGGTCCCTCTCGACTCTTAGATCTGGG
TCTCCAGCACGCATGAAGGGGTAAGGGTGGGGGGTCCCCTATTCGGCGCGCGGCGTTGAGCACTGAATCTTCCAG
GCGGAGGCTCAGTGGGAGCGCCGAGAACTCGCCAGTACCGCGCGCTGCCTGCTGCCTGCTGCCTCCCAGCCCAGGAC
TTGGGAAAGGAGGGAGGGGACAAGTGAGGGGAAAGTGGGGCCGGGCGGGGGTGCCTGGGAAGCCAGGCTGCGCTGA
CGTCACTGGGCGCGCAATTCGGGCTGGAGCGCTTTAAAAAACGAGCGTGCAAGCAGAGATGCTGCTCCACACCGCTC
AGGCCGCGAGCAGCAGCAAGGCGCACCGCCACTGTCGCCGCTGCAGCCAGGGCTGCTCCGAAGGCCGGCGTGGCGGC
AACCGGCACCTCTGTCCCCGCCGCGCTTCTCCTCGCCGCCACGCCGTGGGGTCAGGAACGCGGCGTCTGGCGCTGC
AGACGCCCGCTGAGTTGAGAAGCCACGAGCGCGCCGCGCGCCACGGCCGTAGCAGTCCGGTGTGCTCTC
CGCCCGCGTCCGGCTCGTGGCCCCCTACTTCGGGCACCGACCGGT

[0502] 在某些实施方案中,启动子为如SEQ ID NO:62所阐述的人SYN1增强子-启动子。在一些实施方案中,增强子-启动子序列与由SEQ ID NO:62表示的增强子-启动子序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。在一些实施方案中,启动子为包含在SEQ ID NO:62内的人SYN1内源性增强子-启动子序列。

[0503] 示例性人SYN1增强子-启动子 (SEQ ID NO:62)

[0504] TGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGTGCCTACCTGACGACCGAC
CCCACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAG
GATGCGGCGAGGCGCGTGCCTGCTGAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCTGGCGGCGCGGCC
ACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGTCCTCCCGCAAACCTCCCTTCCCGCCACCTTGGT
CGCGTCCGCGCCGCGCCGCGGCCAGCCGACCGCACCGAGGCGCGAGATAGGGGGGACGGGCGCGACCATCT
GCGCTGCGGCGCCGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGACGCGAGGAGTGTGCTGCTGAGAGCGC
AGTCGAGAA

[0505] 在某些实施方案中,启动子为如SEQ ID NO:63所阐述的人GFAP增强子-启动子。在一些实施方案中,增强子-启动子序列与由SEQ ID NO:63表示的增强子-启动子序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。在一些实施方案中,启动子为包含在SEQ ID NO:63内的人GFAP内源性增强子-启动子序列。

[0506] 示例性人GFAP增强子-启动子 (SEQ ID NO:63)

[0507] CCCACCTCCCTCTCTGTGCTGGGACTCACAGAGGGAGACCTCAGGAGGCAGTCTGTCCATCACATGTCC
AAATGCAGAGCATACCCTGGGCTGGGCGCAGTGGCGCACAACCTGTAATTCCAGCACTTTGGGAGGCTGATGTGGAAG
GATCACTTGAGCCAGAAGTTCTAGACCAGCCTGGGCAACATGGCAAGACCCTATCTCTACAAAAAAGTTAAAAA
TCAGCCACGTGTGGTGACACACACCTGTAGTCCCAGCTATTCAGGAGGCTGAGGTGAGGGGATCACTTAAGGCTGGG
AGGTTGAGGCTGCAGTGAGTCGTGGTTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGTGAGACCCTGTCTCAAAAGAC
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCC
TGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGG
CCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAG

TGCCTGCTTCCCGCCGACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCAC
CCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACC
GGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTACAGCCTGTGCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCAGGCATGGACAGTGGGT
GGCAGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGACTGGGCAGGGTTC
TGACCCTGTGGGACCAGAGTGAGGGCGTAGATGGACCTGAAGTCTCCAGGGACAACAGGGGCCAGGTCTCAGGCTC
CTAGTTGGGCCCAGTGGCTCCAGCGTTTCCAAACCCATCCATCCCCAGAGGTTCTTCCCATCTCTCCAGGCTGATGT
GTGGGAACTCGAGGAAATAAATCTCCAGTGGGAGACGGAGGGGTGGCCAGGGAAACGGGGCGCTGCAGGAATAAAGA
CGAGCCAGCACAGCCAGCTCATGTGTAACGGCTTTGTGGAGCTGTCAAGGCCTGGTCTCTGGGAGAGAGGCACAGGG
AGGCCAGACAAGGAAGGGGTGACCTGGAGGGACAGATCCAGGGGCTAAAGTCCTGATAAGGCAAGAGAGTGCCGGCC
CCCTCTTGCCCTATCAGGACCTCCACTGCCACATAGAGGCCATGATTGACCCTTAGACAAAGGGCTGGTGTCCAATC
CCAGCCCCCAGCCCCAGAACTCCAGGGAATGAATGGGCAGAGAGCAGGAATGTGGGACATCTGTGTTCAAGGGAAGG
ACTCCAGGAGTCTGCTGGGAATGAGGCCTAGTAGGAAATGAGGTGGCCCTTGAGGGTACAGAACAGGTTTATTCTTC
GCCAAATTCCCAGCACCTTGACGGCACTTACAGCTGAGTGAGATAATGCCTGGGTTATGAAATCAAAAAGTTGGAAG
GCAGGTGAGAGGTCATCTGGTACAGCCCTTCCTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGACAAGGTCTCTCTGT
TGCCCAGGCTGGAGTGGCGCAAACACAGCTCACTGCAGCCTCAACCTACTGGGCTCAAGCAATCCTCCAGCCTCAGC
CTCCCAAAGTGCTGGGATTACAAGCATGAGCCACCCCACTCAGCCCTTTCCTTCCTTTTAAATTGATGCATAATAAT
TGTAAGTATTTCATCATGGTCCAACCAACCTTTCTTGACCCACCTTCCTAGAGAGAGGGTCTCTTGCTTCAGCGGT
CAGGGCCCCAGACCCATGGTCTGGCTCCAGGTACCACCTGCCTCATGCAGGAGTTGGCGTGCCCAGGAAGCTCTGCC
TCTGGGCACAGTGACCTCAGTGGGGTGAGGGGAGCTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCAACCCCAACCCCTCAGG
CTATGCCAGGGGTGTTGCCAGGGGCACCCGGGCATCGCCAGTCTAGCCCACTCCTTCATAAAGCCCTCGCATCCCA
GGAGCGAGCAGAGCCAGAGCAGGTTGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGC

[0508] 增强子

[0509] 在一些情况下,构建体可以包括增强子序列。术语“增强子”是指可增加编码感兴趣的蛋白质(例如,抗VEGF蛋白)的核酸的转录水平的核苷酸序列。增强子序列(长度通常为50-1500bp)通常通过为转录相关蛋白(例如,转录因子)提供额外结合位点来增加转录水平。在一些实施方案中,在内含子序列内发现增强子序列。与启动子序列不同,增强子序列可在距转录起始位点大得多的距离处起作用(例如,与启动子相比)。增强子的非限制性实例包括RSV增强子、CMV增强子和/或SV40增强子。在一些实施方案中,构建体包含由SEQ ID NO:64例示的CMV增强子。在一些实施方案中,增强子序列与由SEQ ID NO:64表示的增强子序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。在一些实施方案中,SV-40衍生的增强子为由SEQ ID NO:65例示的SV-40T内含子序列。在一些实施方案中,增强子序列与由SEQ ID NO:65表示的增强子序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。

[0510] 示例性CMV增强子(SEQ ID NO:64)

[0511] GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG
AGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATA
ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGC
CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCT
GGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC
ATGG

[0512] 示例性SV-40合成内含子 (SEQ ID NO:65)

[0513] GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGCGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGGCTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGCGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCTCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAG

[0514] 非翻译区:5`UTR和3`UTR

[0515] 在一些实施方案中,本文所述的任何构建体可包括非翻译区(UTR),诸如5`UTR或3`UTR。基因的UTR被转录但不翻译。5`UTR在转录起始位点处开始,且持续至起始密码子,但不包括起始密码子。3`UTR紧跟在终止密码子之后开始且持续直至转录终止信号。UTR的调控和/或控制特征可并入如本文所述的任何构建体、组合物、药盒或方法中以增强或以其他方式调节抗VEGF蛋白的表达。

[0516] 天然5`UTR包括在翻译起始中起作用的序列。在一些实施方案中,5`UTR可包含通常已知在核糖体启动许多基因翻译的过程中所涉及的序列,如Kozak序列。Kozak序列具有共有序列CCR(A/G)CCAUGG,其中R为起始密码子(AUG)上游三个碱基的嘌呤(A或G),且起始密码子之后为另一“G”。也已知5`UTR形成参与伸长因子结合的二级结构。

[0517] 在一些实施方案中,5`UTR包括在本文所述的任何构建体中。可使用5`UTR的非限制性实例可用于增强核酸分子诸如mRNA的表达,所述实例包括来自以下基因的那些:白蛋白、血清淀粉样蛋白A、载脂蛋白A/B/E、转铁蛋白、 α -胎蛋白、促红细胞生成素和因子VIII。

[0518] 在一些实施方案中,由耳蜗中的细胞转录的mRNA的5`UTR可包括在本文所述的任何构建体、组合物、药盒和方法中。在一些实施方案中,5`UTR源自内源基因座且可以包括全部或部分内源序列。

[0519] 发现3`UTR紧邻于感兴趣的基因的终止密码子3`处。在一些实施方案中,由耳蜗中的细胞转录的mRNA的3`UTR可包括在本文所述的任何构建体、组合物、药盒和方法中。在一些实施方案中,3`UTR源自内源基因座且可以包括全部或部分内源序列。

[0520] 已知3`UTR中包埋有数段腺苷和尿苷(呈RNA形式)或胸苷(呈DNA形式)。这些富含AU的特征在具有高翻转率(rates of turnover)的基因中尤其普遍。基于富含AU的元件(ARE)的序列特征和功能特性,其可分为三类(Chen等人,Mol.Cell.Biol.15:5777-5788,1995;Chen等人,Mol.Cell Biol.15:2010-2018,1995,其中每一者以引用方式整体并入本文):I类ARE在富含U的区域含有AUUUA基序的数个分散复本。例如,c-Myc和MyoD mRNA含

有I类ARE。II类ARE具有两个或更多个重叠UUAUUUA (U/A) (U/A) 九聚体。GM-CSF和TNF- α mRNA为含有II类ARE的实例。III类ARE的定义不太明确。这些富含U的区域不含AUUUA基序,此类别的两个充分研究的实例为c-Jun和肌细胞生成素mRNA。

[0521] 已知大多数与ARE结合的蛋白质会使信使(messenger)不稳定,而ELAV家族的成员(最显著HuR)已证明可增加mRNA的稳定性。HuR结合所有三种类别的ARE。将HuR特异性结合位点工程化至核酸分子的3'UTR中将引起HuR结合,从而在体内稳定信使(message)。

[0522] 在一些实施方案中,3'UTR ARE的引入、移除或修饰可用于调节编码抗VEGF蛋白的mRNA的稳定性。在其他实施方案中,可移除ARE或使其突变以增加细胞内稳定性,且因此增加抗VEGF蛋白的翻译和产生。

[0523] 在其他实施方案中,可将非UTR序列并入5'或3'UTR中。在一些实施方案中,可将内含子或内含子序列的部分并入本文所提供的任何构建体、组合物、药盒和方法中的多核苷酸的侧接区域中。内含子序列的并入可增加蛋白质产量以及mRNA水平。

[0524] 内部核糖体进入位点(IRES)

[0525] 在一些实施方案中,编码抗VEGF蛋白的构建体可包括内部核糖体进入位点(IRES)。IRES形成复杂二级结构,所述二级结构允许自紧邻IRES所处位置下游的任何位置发生mRNA的翻译起始(参见例如,Pelletier和Sonenberg,Mol.Cell.Biol.8(3):1103-1112,1988,其以引用方式整体并入本文)。

[0526] 本领域技术人员已知有数种IRES序列,包括来自例如以下的那些:口蹄疫病毒(FMDV)、脑心肌炎病毒(EMCV)、人鼻病毒(HRV)、蟋蟀麻痹病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、甲型肝炎病毒(HAV)、丙型肝炎病毒(HCV)和脊髓灰质炎病毒(PV)。参见例如Alberts,Molecular Biology of the Cell,Garland Science,2002;和Hellen等人,Genes Dev.15(13):1593-612,2001,其中每一者以引用方式整体并入本文。

[0527] 在一些实施方案中,并入编码抗VEGF蛋白或抗VEGF蛋白的一部分的构建体中的IRES序列为口蹄疫病毒(FMDV)2A序列。口蹄疫病毒2A序列为已展示介导多聚蛋白的裂解的小肽(长度为大约18个氨基酸)(Ryan,MD等人,EMBO 4:928-933,1994;Mattion等人,JVirology 70:8124-8127,1996;Furler等人,Gene Therapy 8:864-873,2001;和Halpin等人,Plant Journal 4:453-459,1999,其中每一者以引用方式整体并入本文)。2A序列的裂解活性先前已在包括质粒和基因治疗构建体(AAV和逆转录病毒)的人工系统中展现(Ryan等人EMBO 4:928-933,1994;Mattion等人,J Virology 70:8124-8127,1996;Furler等人,Gene Therapy 8:864-873,2001;和Halpin等人,Plant Journal 4:453-459,1999;de Felipe等人,Gene Therapy 6:198-208,1999;de Felipe等人,Human Gene Therapy 11:1921-1931,2000;和Klump等人,Gene Therapy 8:811-817,2001,其中每一者以引用方式整体并入本文)。

[0528] IRES可用于rAAV构建体。在一些实施方案中,编码抗VEGF蛋白的C端部分的构建体可包括多核苷酸内部核糖体进入位点(IRES)。在一些实施方案中,IRES可以为包含多于一种构建体的组合物的一部分。在一些实施方案中,IRES用于由单一基因转录物产生多于一种多肽。

[0529] 分泌和裂解信号

[0530] 在一些实施方案中,本文提供的任何构建体可包括分泌信号、裂解位点和/或接头

序列。在一些实施方案中,这些位点在翻译的蛋白质中起作用,并导致翻译后修饰和/或加工事件。在一些实施方案中,如本文所述的构建体被翻译成相对长的前体多肽,然后这种前体多肽可以经历翻译后修饰和/或加工,这可能涉及内源细胞酶促。这种加工步骤可产生多种肽,此类肽的生物学功能可单独通过一种肽或通过协同起作用的多种肽的功能来达成。

[0531] 在一些实施方案中,本文提供的构建体包括信号肽。在一些实施方案中,信号肽可以为信号序列、靶向信号、定位信号、定位序列、转运肽、前导序列或前导肽。在一些实施方案中,这种序列通常很短(例如,长度为大约16-30个氨基酸)。在一些实施方案中,这种信号肽存在于感兴趣的肽的N端。在一些实施方案中,翻译产物中可存在多于一种信号肽。在一些实施方案中,示例性信号肽包含来自白细胞介素-2的分泌信号(IL2SS)。在一些实施方案中,示例性信号肽由SEQ ID NO:66或67表示的核苷酸序列编码。在一些实施方案中,这种氨基酸序列由SEQ ID NO:68表示,且可以与这种序列95%、90%、85%、80%或75%相同。本领域技术人员将认识到存在替代性分泌信号序列,且可以将其并入如本文所述的构建体中。

[0532] 在一些实施方案中,本文提供的构建体包括接头肽。在一些实施方案中,接头肽用于接合翻译产物中的两个或更多个功能性肽。在一些实施方案中,这种接头肽可包括额外功能序列,诸如内源性肽酶的识别序列。在一些实施方案中,这种接头序列包含弗林蛋白酶裂解信号。在一些实施方案中,包含弗林蛋白酶裂解信号的示例性接头序列由SEQ ID NO:71表示的核苷酸序列编码。在一些实施方案中,这种接头序列包含弗林蛋白酶裂解信号且可以由SEQ ID NO:72表示,或者可以与这种序列大约90%、80%、70%或60%相似。在一些实施方案中,接头肽序列的可以长度为一个氨基酸、长度为两个氨基酸、长度为三个氨基酸、长度为四个氨基酸、长度为五个氨基酸、长度为六个氨基酸、长度为七个氨基酸、长度为八个氨基酸、长度为九个氨基酸、长度为十个氨基酸、长度为十一个氨基酸、长度为十二个氨基酸、长度为十三个氨基酸、长度为十四个氨基酸、长度为十五个氨基酸、长度为十六个氨基酸、十七个氨基酸、长度为十八个氨基酸、长度为十九个氨基酸长度或长度为二十个氨基酸。在一些实施方案中,接头肽序列的长度可以多至五十个氨基酸。本领域技术人员将认识到存在替代性接头序列(功能性或非功能性),且可并入如本文所述的构建体中。

[0533] 在一些实施方案中,本文提供的构建体包括在翻译期间诱导多肽裂解和/或未能形成肽键联的肽序列。在一些实施方案中,如本文所述的构建体可包括自裂解肽,其在一些实施方案中可为2A自裂解肽。在一些实施方案中,这种肽的长度为大约18至22个氨基酸,例如长度为18个氨基酸、长度为19个氨基酸、长度为20个氨基酸、长度为21个氨基酸或长度为22个氨基酸。在一些实施方案中,这种肽可在蛋白质翻译期间诱导核糖体跳跃。在一些实施方案中,2A自裂解肽由核心序列基序DxExNPGP(SEQ ID NO:115)表示,且在一系列病毒家族中内源地发现。在一些实施方案中,自裂解肽通过使核糖体不能形成肽键而自单个转录物产生多聚蛋白。在一些实施方案中,自裂解和/或裂解信号由SEQ ID NO:69表示的核苷酸序列编码。在一些实施方案中,自裂解和/或裂解信号由SEQ ID NO:70或共享大约95%、90%、80%、75%、70%、65%、60%、55%或50%同一性的序列表示。本领域技术人员将认识到存在替代性肽裂解序列(自裂解或需要内源性细胞机制的辅助),且可并入如本文所述的构建体中。

[0534] 示例性信号分泌核苷酸序列(SEQ ID NO:66)

[0535] ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCT GGCCCTGGTCACCAATTCT

[0536] 示例性信号分泌核苷酸序列(SEQ ID NO:67)

[0537] ATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCCTGCATTGCCCTGAGCCT GGCTCTCGTGACCAACAGC

[0538] 示例性信号分泌氨基酸序列(SEQ ID NO:68)

[0539] MYRMQLSCIALSLAVTNS

[0540] 示例性裂解信号核苷酸序列(SEQ ID NO:69)

[0541] GGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCG ACGTGAAGAGAACCCCGGACCT

[0542] 示例性裂解信号氨基酸序列(SEQ ID NO:70)

[0543] GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP

[0544] 示例性接头/裂解信号核苷酸序列(SEQ ID NO:71)

[0545] GACAAGACCCACACCGGCAAGCGGAAGAGAAGA

[0546] 示例性接头/裂解信号氨基酸序列(SEQ ID NO:72)

[0547] DKTHTGKRKRR

[0548] 剪接位点

[0549] 在一些实施方案中,本文提供的任何构建体均可包括剪接供体和/或剪接受体序列,其在转录期间发生的RNA加工期间起作用。在一些实施方案中,剪接位点参与反式剪接。

[0550] 示例性剪接供体内含子(SEQ ID NO:73)

[0551] GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAAT AGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAA
GACTCTTGCGTTTCT

[0552] 示例性剪接受体内含子(SEQ ID NO:74)

[0553] GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTT CTCTCCACAG

[0554] 聚腺苷酸化序列

[0555] 在一些实施方案中,本文提供的构建体可包括聚腺苷酸化(poly(A))信号序列。大多数新生真核mRNA在其3'末端具有poly(A)尾,所述尾在复杂过程期间添加,所述过程包括初级转录物的裂解和由poly(A)信号序列所驱动的偶联的聚腺苷酸化反应(参见例如 Proudfoot等人Cell 108:501-512,2002,其以引用方式整体并入本文)。poly(A)尾赋予mRNA稳定性和可转移性(Molecular Biology of the Cell,第三版,B.Alberts等人, Garland Publishing,1994,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,poly(A)信号序列位于编码序列的3'。

[0556] 如本文所用,“聚腺苷酸化”是指聚腺苷酰基(polyadenylyl)部分或其修饰的变体与信使RNA分子的共价键联。在真核生物体中,大多数信使RNA(mRNA)分子在3'末端被聚腺苷酸化。3' poly(A)尾为通过酶(聚腺苷酸聚合酶)的作用添加到前mRNA中的腺嘌呤核苷酸长序列(例如,50、60、70、100、200、500、1000、2000、3000、4000或5000)(SEQ ID NO:117)。在一些实施方案中,将poly(A)尾添加至含有特定序列例如poly(A)信号的转录物上。poly(A)尾和相关蛋白有助于保护mRNA以免被核酸外切酶降解。聚腺苷酸化也在转录终止、mRNA自细胞核输出和翻译中起作用。聚腺苷酸化通常在DNA转录为RNA后立即在细胞核中发生,但也可稍后在细胞质中发生。转录终止后,通过与RNA聚合酶缔合的核酸内切酶复合物的作用来裂解mRNA链。裂解位点的特征通常在于在裂解位点附近存在碱基序列AAUAAA。mRNA裂解后,将腺苷残基添加至裂解位点的自由3'末端。

[0557] 如本文所用,“poly (A) 信号序列”或“聚腺苷酸化信号序列”为触发mRNA的核酸内切酶裂解和一系列腺苷向裂解的mRNA的3'末端的添加的序列。

[0558] 有几种可以使用的poly (A) 信号序列,包括源自以下的那些序列:牛生长激素(bGH) (Woychik等人,Proc.Natl.Acad Sci.US.A.81 (13):3944-3948,1984;美国专利号5,122,458,其中每一者以引用方式整体并入本文)、小鼠- β -珠蛋白、小鼠- α -珠蛋白(Orkin等人,EMBO J 4(2):453-456,1985;Thein等人,Blood 71(2):313-319,1988,其中每一者以引用方式整体并入本文)、人胶原蛋白、多瘤病毒(Batt等人,Mol.Cell Biol.15(9):4783-4790,1995,其以引用方式整体并入本文)、单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV TK)、IgG重链基因多聚腺苷酸化信号(US2006/0040354,其以引用方式整体并入本文)、人生长激素(hGH) (Szymanski等人,Mol.Therapy 15(7):1340-1347,2007,其以引用方式整体并入本文)、由SV40 poly (A) 位点诸如SV40迟和早poly (A) 位点组成的组(Schek等人,Mol.Cell Biol.12(12):5386-5393,1992,其以引用方式整体并入本文)。

[0559] poly (A) 信号序列可为AATAAA。AATAAA序列可被与AATAAA具有同源性且能够对聚腺苷酸化进行信号传导的其他六核苷酸序列取代,所述其他六核苷酸序列包括ATTAAA、AGTAAA、CATAAA、TATAAA、GATAAA、ACTAAA、AATATA、AAGAAA、AATAAT、AAAAAA、AATGAA、AATCAA、AACAAA、AATCAA、AATAAC、AATAGA、AATTAA或AATAAG(参见例如WO 06/12414,其以引用方式整体并入本文)。

[0560] 在一些实施方案中,poly (A) 信号序列可为合成聚腺苷酸化位点(参见例如Promega的pCl-neo表达构建体,其基于Levitt等人,Genes Dev.3(7):1019-1025,1989,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,poly (A) 信号序列为可溶性神经纤毛蛋白-1(sNRP)的聚腺苷酸化信号(AAATAAAATACGAAATG)(SEQ ID NO:116)(参见例如WO 05/073384,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,poly (A) 信号序列包含SV40 poly (A) 位点或由SV40 poly (A) 位点组成。在一些实施方案中,poly (A) 信号包含SEQ ID NO:76或由SEQ ID NO:76组成。在一些实施方案中,poly (A) 信号序列包含bGHpA或由bGHpA组成。在一些实施方案中,poly (A) 信号包含SEQ ID NO:75或由SEQ ID NO:75组成。poly (A) 信号序列的其他实例为本领域已知的。在一些实施方案中,poly (A) 序列与由SEQ ID NO:75或76表示的poly (A) 序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。

[0561] 示例性bGH poly (A) 信号序列(SEQ ID NO:75)

[0562] CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG

[0563] 示例性SV40 poly (A) 信号序列(SEQ ID NO:76)

[0564] AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTA

[0565] 其他序列

[0566] 在一些实施方案中,本公开的构建体可包含一个或多个克隆位点。在一些此类实施方案中,在制造用于向受试者施用之前可能未完全移除克隆位点。在一些实施方案中,克隆位点可具有功能作用,包括作为接头序列、作为核苷酸和/或肽裂解信号、和/或作为

Kozak位点的部分。如本领域技术人员将理解,克隆位点的一级序列可显著变化,同时保留其所需功能。在一些实施方案中,构建体可含有克隆位点的任何组合,示例性克隆位点由SEQ ID NO:77-82表示。

[0567] 示例性克隆位点A (SEQ ID NO:77)

[0568] TTGTCGACGCGGCCGCACGCGT

[0569] 示例性克隆位点B (SEQ ID NO:78)

[0570] CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACC

[0571] 示例性克隆位点C (SEQ ID NO:79)

[0572] TAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA

[0573] 示例性克隆位点D (SEQ ID NO:80)

[0574] AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGG

[0575] 示例性克隆位点E (SEQ ID NO:81)

[0576] GCGGCCGCACGCGT

[0577] 示例性克隆位点F (SEQ ID NO:82)

[0578] AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCT

[0579] 去稳定结构域

[0580] 在一些实施方案中,本文提供的任何构建体可以任选包括编码用于暂时控制蛋白质表达的去稳定结构域的序列(“去稳定序列”)。去稳定序列的非限制性实例包括编码FK506序列、二氢叶酸还原酶(DHFR)序列或其他示例性去稳定序列的序列。

[0581] 在不存在稳定配体的情况下,与去稳定序列可操作地连接的蛋白质序列由泛素化降解。相反,在稳定配体存在下,蛋白质降解得到抑制,从而使与去稳定序列可操作地连接的蛋白质序列被活跃表达。作为使蛋白表达稳定的阳性对照,可以通过常规方法检测蛋白表达,包括酶促、放射照相、比色、荧光或其他光谱测定;荧光活化细胞分选(FACS)测定;免疫学测定(例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和免疫组织化学)。

[0582] 去稳定序列的其他实例为本领域已知的。在一些实施方案中,去稳定序列为FK506-和雷帕霉素结合蛋白(FKBP12)序列,且稳定配体为Shield-1(Shld1)(Banaszynski等人(2012)Cell 126(5):995-1004,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,去稳定序列为DHFR序列,且稳定配体为曲美普林(TMP)(Iwamoto等人(2010)Chem Biol 17:981-988,其以引用方式整体并入本文)。

[0583] 在一些实施方案中,去稳定序列为FKBP12序列,且通过western印迹检测受试者细胞(例如支持耳蜗外毛细胞)中携带FKBP12基因的rAAV构建体的存在。在一些实施方案中,可以使用去稳定序列来验证本文所述的任何rAAV构建体的时间特异性活性。

[0584] 示例性DHFR去稳定氨基酸序列 (SEQ ID NO:83)

[0585] MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPSTD
DRVTWVKSVDIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQ
NSHSYCFEILERR

[0586] 示例性DHFR去稳定核苷酸序列 (SEQ ID NO:84)

[0587] GGTACCATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATTACGTTATCGGCATGGAAAACGCCATGCCGTGG
AACCTGCCTGCCGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCCGTGATTATGGGCCGCCATACCTGGGA

ATCAATCGGTCGTCCGTTGCCAGGACGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGAGTACGGACGATCGCGTAACGT
GGGTGAAGTCGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCATGGTGATTGGCGGCGGTTCGCGTT
ATTGAACAGTTCTTGCCAAAAGCGCAAAAAGTGTATCTGACGCATATCGACGCAGAAAGTGAAGGCGACACCCATTT
CCCGGATTACGAGCCGGATGACTGGAATCGGTATTCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAGCT
ATTGCTTTGAGATTCTGGAGCGGCGATAA

[0588] 示例性去稳定结构域 (SEQ ID NO:85)

[0589] ATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATTACGTTATCGGCATGGAAAACGCCATGCCGTGGAACCTG
CCTGCCGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCCGTGATTATGGGCCGCCATACCTGGGAATCAAT
CGGTTCGTCCGTTGCCAGGACGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGAGTACGGACGATCGCGTAACGTGGGTGA
AGTCGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCATGGTGATTGGCGGCGGTTCGCGTTATTGAA
CAGTTCTTGCCAAAAGCGCAAAAAGTGTATCTGACGCATATCGACGCAGAAAGTGAAGGCGACACCCATTTCCCGGA
TTACGAGCCGGATGACTGGAATCGGTATTCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAGCTATTGCT
TTGAGATTCTGGAGCGGCGA

[0590] 示例性FKBP12去稳定肽氨基酸序列 (SEQ ID NO:86)

[0591] MGVEKQVIRPGNGPKPAPGQTVTVHCTGFGKDGDLQKFWSTKDEGQKPFQIGKGAIVIKGWDEGVIG
MQIGEVARLRCSSDYAYGAGGFPWGIQPNVLDLFEIEVLSVQ

[0592] 报告序列或元件

[0593] 在一些实施方案中,本文所提供的构建体可任选包括编码报告多肽和/或蛋白的序列(“报告序列”)。报告序列的非限制性实例包括编码以下的DNA序列: β -内酰胺酶、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白、mCherry荧光蛋白、黄色荧光蛋白、氯霉素乙酰转移酶(CAT)和荧光素酶。报告序列的额外实例为本领域中已知的。当与驱动其表达的控制元件缔合时,报告序列可提供可通过常规手段来检测的信号,所述手段包括酶促、放射照相、比色、荧光或其他光谱测定;荧光活化细胞分选(FACS)测定;免疫学测定(例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和免疫组织化学)。

[0594] 在一些实施方案中,报告序列为LacZ基因,且哺乳动物细胞(例如耳蜗毛细胞)中携带LacZ基因的构建体的存在通过 β -半乳糖苷酶活性测定来检测。当报告基因为荧光蛋白(例如,绿色荧光蛋白)或荧光素酶时,哺乳动物细胞(例如,耳蜗毛细胞)中携带荧光蛋白或荧光素酶的构建体的存在可以通过荧光技术(例如,荧光显微镜或FACS)或光度计中的光产生(例如分光光度计或IVIS成像仪器)来测量。在一些实施方案中,报告序列可用于验证本文所述的任何构建体的组织特异性靶向能力和组织特异性启动子调控和/或控制活性。

[0595] 在一些实施方案中,报告序列为FLAG标签(例如,3xFLAG标签),且在哺乳动物细胞(例如,内耳细胞,例如耳蜗毛或支持细胞)中携带FLAG标签的构建体的存在通过蛋白质结合或检测测定(例如,Western印迹、免疫组织化学、放射免疫测定(RIA)、质谱法)检测。示例性3xFLAG标签序列作为SEQ ID NO:87提供。

[0596] 在一些实施方案中,报告序列为增强型绿色荧光蛋白(eGFP)标签(例如,eGFP标签),且在哺乳动物细胞(例如,内耳细胞,例如,耳蜗毛或支持细胞)中携带eGFP标签的构建体的存在通过荧光、蛋白质结合或检测测定(例如,Western印迹、免疫组织化学、放射免疫测定(RIA)、质谱法)来检测。示例性eGFP标签序列作为SEQ ID NO:104和105提供。

[0597] 示例性3xFLAG标签序列(SEQ ID NO:87)

[0598] GGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATA AAGATCATGACATCGACTACAAGGATG
ACGATGACAAG

[0599] 示例性增强型绿色荧光蛋白(eGFP)核苷酸序列(SEQ ID NO:104)

[0600] MVSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLTYG
VCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNY
NSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLE
FVTAAGITLGMDELYK

[0601] 示例性增强型绿色荧光蛋白(eGFP)氨基酸序列(SEQ ID NO:105)

[0602] ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA
AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTG
CACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCT
ACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC
TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCT
GAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCT
ATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTG
CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAG
CACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCG
GGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG

[0603] AAV衣壳

[0604] 本公开提供了一种或多种多核苷酸构建体,其包装在AAV衣壳中。在一些实施方案中,AAV衣壳来自或源自AAV2、3、4、5、6、7、8、9、10、rh8、rh10、rh39、rh43或Anc80血清型的AAV衣壳或其一种或多种杂交体。在一些实施方案中,AAV衣壳来自AAV祖先血清型。在一些实施方案中,AAV衣壳为祖先(Anc) AAV衣壳。Anc衣壳自使用进化概率和进化建模构建以确定可能祖先序列的构建体序列来创建。因此,已知自然界中不存在Anc衣壳/构建体序列。例如,在一些实施方案中,AAV衣壳为Anc80衣壳(例如,Anc80L65衣壳)。在一些实施方案中,使用包含SEQ ID NO:88的模板核苷酸编码序列产生AAV衣壳。在一些实施方案中,衣壳包含由SEQ ID NO:89表示的多肽。在一些实施方案中,衣壳包含与由SEQ ID NO:89表示的多肽具有至少85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的多肽。在一些实施方案中,衣壳包含由SEQ ID NO:113表示的多肽。在一些实施方案中,衣壳包含与由SEQ ID NO:113表示的多肽具有至少85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的多肽。在一些实施方案中,衣壳包含由SEQ ID NO:114表示的多肽。在一些实施方案中,衣壳包含与由SEQ ID NO:114表示的多肽具有至少85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的多肽。

[0605] 如本文所提供,AAV衣壳和rAAV构建体(例如,包含AAV ITR)的任何组合可用于本公开的重组AAV(rAAV)颗粒。例如,野生型或变体AAV2 ITR和Anc80衣壳、野生型或变体AAV2 ITR和AAV6衣壳等。在本公开的一些实施方案中,AAV颗粒包含AAV2组分(例如,衣壳并且ITR为AAV2血清型)。在一些实施方案中,AAV颗粒为AAV2/6、AAV2/8或AAV2/9颗粒(例如,带有具有AAV2 ITR的AAV构建体的AAV6、AAV8或AAV9衣壳)。在本公开的一些实施方案中,AAV颗粒为包含Anc80衣壳(例如,包含SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:113或SEQ ID NO:114的多肽)的

AAV2/Anc80颗粒,所述衣壳包裹具有AAV2 ITR(例如,SEQ ID NO:45和46,或47和48)的AAV构建体,所述AAV2 ITR侧接编码序列的一部分,例如编码抗VEGF蛋白的序列(例如,SEQ ID NO:13、14、15、19、22、42和/或103)。其他AAV颗粒为本领域已知的且在例如Sharma等人,Brain Res Bull.2010年2月15日;81(2-3):273中描述,所述文献以引用方式整体并入本文。在一些实施方案中,衣壳序列与分别由SEQ ID NO:88或89表示的衣壳核苷酸或氨基酸序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。

[0606] 在一些实施方案中,本文公开的平台递送方法将称为祖先AAV(AAVAnc)衣壳的合成AAV衣壳的文库加以组合,所述衣壳重建当前天然存在的病毒的进化谱系。在一些实施方案中,这些AAV衣壳与新颖、最小侵入性施用程序偶联以将产品候选物直接递送至耳蜗。在一些实施方案中,递送方法利用来自此文库的AAVAnc80衣壳变体(也称为Anc80L65)。在一些实施方案中,这种衣壳用于产生rAAV颗粒,其中这种颗粒通过添加如本文所述的构建体(例如包含如本文所述的抗VEGF蛋白的构建体)创建以产生rAAVAnc80-抗VEGF。在一些实施方案中,这种颗粒可以递送VEGF抑制剂的cDNA,所述VEGF为可以引起异常血管生长的蛋白质。在一些实施方案中,这种治疗用于以血管新生为特征的耳科疾病,例如用于治疗VS,即前庭耳蜗神经(也称为颅神经VIII)肿瘤。

[0607] 在一些实施方案中,本文公开的组合物包含AAVAnc80衣壳,其为合理设计的合成AAV衣壳,其序列通过祖先序列重构推断。祖先序列重构使用来自天然存在的腺相关病毒的可用序列信息,且作为系统发育和统计预测的结果,在各种中间进化节点处识别序列的祖先状态(图9)。在AAVAnc80的创建期间,重构九个节点,并从头合成且表征跨AAV谱系的电脑模拟衍生序列。这导致鉴定Anc80文库节点(Anc80Lib),所述节点为被广泛研究的AAV血清型1、2、8和9的推定祖先。Anc80Lib蛋白质序列随后进行反向翻译并通过基因合成来生成,且单个克隆针对包装、感染性和生物特性来单独评价。在一些实施方案中,并基于这些结果,选择第65个Anc80Lib克隆(Anc80L65)AAVAnc80用于进一步表征。AAVAnc80衣壳变体具有独特组成;尽管AAV8和AAV2的序列与AAVAnc80分别仅相差大约9%和12%,但AAVAnc80的结构建模表明,其颗粒外表面的大约20%以在衣壳表面上分布的方式与已知循环AAV不同(图9和图10)(Zinn 2015,其以引用方式整体并入本文)。

[0608] 在一些实施方案中,已表征了AAVAnc80作为体内基因治疗颗粒的性能且包含AAVAnc80的rAAV颗粒已证明具有充当广泛适用的基因治疗颗粒的潜力。在一些实施方案中,在小鼠和非人灵长类动物(NHP)中进行的研究表明,当静脉内注射后靶向肝脏时,AAVAnc80具有与AAV8相似的转导效率,而无明显全身毒性迹象(Zinn 2015;Murillo 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。此外,在一些实施方案中,AAVAnc80已显示出对于小鼠眼前节(Wang 2017,其以引用方式整体并入本文)、小鼠和NHP视网膜(Zinn 2015;Carvalho2018,其中每一者以引用方式整体并入本文)、小鼠骨骼肌(Zinn 2015,其以引用方式整体并入本文)、通过全身和器官实质内递送的小鼠中枢神经系统(CNS)(Hudry 2018,其以引用方式整体并入本文)和鼠类肾(Ikeda 2018,其以引用方式整体并入本文)的趋向性和对其的有效转导。

[0609] 在一些实施方案中,如本文所述的组合物(例如,包含rAAV-抗VEGF)包含AAVAnc80衣壳。在一些实施方案中,AAVAnc80衣壳对耳蜗和前庭细胞表现出高转导效率。AAVAnc80为一种合理设计的AAV衣壳,其序列为通过祖先序列重构推断出来的(Zinn 2015,其以引用方

式整体并入本文)。祖先序列重构使用来自天然存在的AAV的可用序列信息,且作为系统发育和统计预测的结果,在各种中间进化节点识别序列的祖先状态。如文献中所述,对跨AAV谱系的电脑模拟衍生序列进行从头合成和表征,导致鉴定Anc80文库(Anc80Lib)节点,此节点为广泛研究的AAV血清型1、2、8和9的推定祖先。随后对Anc80Lib序列的评价导致AAVAnc80(第65个Anc80Lib克隆(Anc80L65))的进一步表征。这些研究表明AAVAnc80衣壳变体具有独特组成和不同外表面颗粒分布,从而产生稳定和功能AAV变体,其转导效率与AAV8相似(Zinn 2015,其以引用方式整体并入本文)。首次报告的AAVAnc80于哺乳动物内耳中的使用揭示在耳蜗和前庭毛细胞中的高转导效率(Landegger 2017,其以引用方式整体并入本文)。多个后续、独立调查已确认AAVAnc80的耳蜗和前庭细胞转导效率相对于其他AAV血清型增加;在不同年龄的小鼠中(Landegger2017;Tao 2018;Yoshimura 2018;Omichi 2020,其中每一者以引用方式整体并入本文)以及在非人灵长类动物中(Andres-Mateos 2019,其以引用方式整体并入本文),与许多其他AAV衣壳相比,AAVAnc80具有更高的转导效率和更广泛的趋向性。

[0610] 出于诸如以下的若干原因,使用AAV颗粒的基因治疗为一种有前景的内耳病症治疗方式:(1)含有听觉和前庭感觉上皮的内耳,具有改良的免疫监视,类似于中枢神经系统中的免疫监视(Fujioka 2014,其以引用方式整体并入本文);(2)耳蜗柯蒂氏器官的感觉和支持细胞为有丝分裂后的,允许在单次施用AAV后长期表达的可能性;和(3)经由多种施用途径在成人和儿童中递送rAAV的综合临床经验表明,AAV作为递送媒介物具有很强的安全性概况,特别为在局部递送中和/或低至中等剂量下时。

[0611] 二十多年前自最初临床试验开始,在数十项临床试验中,rAAV颗粒已以高达大约 $1E15$ vg或更大的剂量向数百名参与者进行全身施用来施用(Flotte 1996;Flotte 2013;Parente 2018;Wang 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。已将AAV颗粒用于体内基因转移的试验数量稳步增加。安全性概况连同广泛范围的靶组织转导的高效率已将rAAV颗粒确立为体内基因治疗的首选平台(Wang 2019,其以引用方式整体并入本文)。rAAV技术已在临床上成功应用于多种病状,包括凝血障碍、遗传性失明和神经退行性疾病(Colella 2018;Wang2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。

[0612] 2012年,欧洲药品管理局(EMA)首次批准一种rAAV颗粒产品(alipogene tiparvovec;Glybera[®])用于治疗脂蛋白脂肪酶缺乏症。随后,两种rAAV产品——用于治疗确诊的双等位基因RPE65突变相关性视网膜营养不良的voretigene neparvovec-rzyl(Luxturna[®])和用于治疗脊髓性肌萎缩症(SMA)伴SMN1基因的双等位基因突变的onasemnogene abeparvovec-xioi(Zolgensma[®]),分别于2017年和2019年获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准;voretigene neparvovec-rzyl(Luxturna[®])也被EMA批准用于治疗遗传性视网膜营养不良导致的视力丧失(当所述疾病为由基因RPE65突变引起时)。

[0613] 在一些实施方案中,药物和生物制剂(包括rAAV颗粒)可以通过将它们递送到外淋巴中而到达内耳中的许多靶细胞。外淋巴为一种在组成上与脑脊液(CSF)非常相似(Lysaght 2011,其以引用方式整体并入本文),且与脑脊液具有扩散连续性的流体。外淋巴覆盖位于内耳的骨迷路中的耳蜗和前庭系统的大部分感觉、神经和支持细胞(图1和图3)。在一些实施方案中,向其递送本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)的耳蜗的外淋巴空间

包含两个阶或通道:鼓阶和前庭阶,它们在耳蜗螺旋的顶点处经由蜗孔而彼此连续。内耳的许多细胞通过组织中的间隙空间与外淋巴保持流体连续性。

[0614] 在一些实施方案中,本文也公开了一种用于耳蜗内施用的一次性使用的无菌递送装置,以通过具有位于镫骨足板的排放口的圆窗膜将本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)递送至内耳的外淋巴液。在一些实施方案中,在此耳蜗内施用方法中,本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)将通过具有椭圆窗内的镫骨足板中的排放口的圆窗膜来施用到鼓阶中,使得组合物灌注穿过鼓阶,然后经由蜗孔处的连接来穿过前庭阶,并沿着流体途径到达镫骨足板的排放口(图4)。在一些实施方案中,与注射端口不同的排放口的存在允许药物沿耳蜗的长度更均匀地分布并防止在内耳内有害地累积额外流体压力。在一些实施方案中,如通过使用此双窗孔、注射加排放技术来转导前庭细胞所证明的,此递送方法也允许本文公开的组合物例如注射液(injectate)扩散至前庭系统。在一些实施方案中,整个过程可以使用相对非创伤性方法通过外耳道在受试者中完成;参见图1,和有关手术施用程序的附加信息的实施例。

[0615] 已公布许多关于小鼠AAVAnc80转导的研究。已考虑将不同类型的病毒载体(例如腺病毒载体、单纯疱疹病毒载体)用于将基因递送至动物模型中的内耳(Chen 2001;Wenzel 2007;Husseman 2009,其中每一者以引用方式整体并入本文);然而,鉴于可接受的安全性概况和持久转基因表达,包括在敲除和敲入小鼠模型中听觉、耳蜗和前庭功能的恢复,rAAV颗粒似乎为将基因直接传递到耳蜗的有前途工具(Akil 2012;Kim 2016;Pan 2017;Akil 2019;Al-Moyed 2019;György 2019,其中每一者以引用方式整体并入本文)。已经使用不同手术方法和剂量将几种AAV血清型递送到新生小鼠和成年小鼠的内耳中(Akil 2012;Askew 2015;Chien 2016;Landegger 2017;Suzuki 2017;Tao 2018;Yoshimura 2018;Akil 2019-Moyed 2019;György 2019;Kim 2019;Omichi 2020,其中每一者以引用方式整体并入本文)。如通过耳蜗和前庭器官的不同细胞类型中的GFP表达所评估,转导效率因小鼠出生后年龄、用于递送颗粒的方法和所评价的血清型或衣壳变体而不同。

[0616] 在一些实施方案中,与其他AAV衣壳相比,AAVAnc80变体表现出对新生小鼠和成年小鼠耳蜗和前庭器官的耳蜗和前庭感觉细胞(毛细胞)和辅佐细胞(accessory cell)的高效靶向(Landegger 2017;Suzuki 2017;Omichi 2020,其中每一者以引用方式整体并入本文)。Anc80新生趋向性和基因转移效率在出生后第1天(P1)通过圆窗施用注射的C57BL/6小鼠中进行体内评价(Landegger 2017,其以引用方式整体并入本文)。与先前研究一致,AAV2、AAV6和AAV8靶向低百分比的IHC,且AAV1能够以更高效率转导IHC,但OHC转导是最少的;相比之下,AAVAnc80(1.7E9 vg/耳蜗)能够转导大约100%的IHC和约90%的OHC(图11),而对耳蜗或听觉功能没有任何有害影响(Landegger 2017,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,在前庭系统中,AAVAnc80转导椭圆囊的I型和II型毛细胞以及半规管脊的细胞(图12),而不影响前庭功能(Landegger 2017,其以引用方式整体并入本文)。

[0617] 使用经由后半规管的不同施用途径,在成年(7周)CBA/CaJ小鼠中评价AAVAnc80趋向性和基因转移效率(Suzuki 2017,其以引用方式整体并入本文)。AAVAnc80(9.6E8 vg/耳蜗)靶向耳蜗的感觉和辅佐细胞,包括整个耳蜗长度中大约100%的IHC以及很大一部分OHC、螺旋缘细胞和赖斯纳膜,以及耳蜗轴细胞(例如,螺旋神经节神经元和卫星神经胶质细胞)(图13),同时保持正常耳蜗和听觉功能(Suzuki 2017,其以引用方式整体并入本文)。前

庭系统的多种细胞类型也被转导,包括椭圆囊和半规管脊以及球囊中的毛细胞子集和几乎100%的支持细胞(图14),所有这些细胞均对前庭功能无有害影响(Suzuki2017,其以引用方式整体并入本文)。

[0618] 最近,使用本文中使用的递送途径(经由带有后半规管开窗的圆窗膜递送)评价成年(4周)C3H/FeJ小鼠的AAVAnc80体内转导,并直接与天然存在的血清型AAV1、AAV2、AAV8和AAV9的转导进行比较(Omichi 2020,其以引用方式整体并入本文)。如通过对照样(未注射的)ABR阈值所证明,所有颗粒均产生某种程度的转导,而不会对听觉功能产生有害影响。AAVAnc80(5.5E9 vg/耳蜗)沿耳蜗长度转导几乎100%的IHC和大约27%至66%的OHC,这取决于耳蜗位置(图15)。尽管与AAVAnc80相比,AAV2对OHC的转导效率略高(3.68E9vg/耳蜗),但AAVAnc80比AAV2保持明显更广泛的趋向性,如通过耳蜗中球囊的eGFP阳性毛细胞和螺旋神经节神经元所证明的;在这些相同细胞类型中,AAV2几乎不产生转导(图15)(Omichi 2020,其以引用方式整体并入本文)。

[0619] 在一些实施方案中,AAVAnc80靶向新生小鼠到成年小鼠的广泛范围的内耳细胞类型(包括耳蜗IHC和OHC、支持细胞、耳蜗螺旋神经节细胞、椭圆囊、球囊和壶腹脊的前庭毛细胞以及耳蜗和前庭支持/辅佐细胞)的能力表明,例如AAVAnc80可以促进内耳病症基因治疗方法的发展。

[0620] 在某些实施方案中,使用报告构建体在非人灵长类动物(NHP)中进行平台和支持性研究,以评价内耳中的AAVAnc80转导。在一些实施方案中,在NHP中进行探索性平台和其他支持性研究,以评价AAVAnc80趋向性和AAVAnc80颗粒递送的剂量依赖性效应。在一些实施方案中,使用包含编码增强型GFP(eGFP)报告转基因的构建体并经由耳蜗内注射通过圆窗膜递送的rAAVAnc80颗粒促进AAVAnc80衣壳对NHP内耳细胞类型的趋向性的评价。在一些实施方案中,此类颗粒也可用于开发如本文所述的用于直接有效递送至耳蜗的新型装置。

[0621] 在一些实施方案中,针对耳蜗毛细胞的转导效率和毛细胞转导的剂量依赖性对NHP耳朵进行组织学评价。在一些实施方案中,也分析了此类耳朵的耳蜗和/或前庭器官中细胞类型转导的广度。在一些实施方案中,增加用如本文所述的rAAV颗粒(例如,包含rAAVAnc80-抗VEGF)转导的内耳细胞的群体可能支持以下可能性:在rAAVAnc80-抗VEGF的情况下,内耳可以维持分泌型抗VEGF蛋白的持续储库;进而,此种蛋白质有可能经由相邻内耳道中肿瘤部位的邻近性和扩散连续性来控制VS生长。在一些实施方案中,也在NHP中评价了某一程序对毛细胞存活的耐受性、在预先存在的中和抗体(NAb)存在下的转导和对侧(未注射)耳朵的任何潜在转导。结果总结在实施例。

[0622] 在一些实施方案中,合理设计的合成AAVAnc80L65衣壳变体(AAAVAnc80)在使用设计用于圆窗膜施用的递送装置以剂量依赖性方式转导灵长类动物IHC方面高度有效。在一些实施方案中,使用包含编码转基因的构建体的AAVAnc80颗粒,以约 6.0×10^{10} vg/耳蜗或更高的剂量,在注射的耳朵中达成大约75%至100%的IHC转导。

[0623] 在一些实施方案中,当经由耳蜗内施用途径递送颗粒时,在血清中至少处于中等水平下的针对AAVAnc80的预先存在的中和抗体不抑制IHC或支持细胞转导。

[0624] 在一些实施方案中,注射的耳朵的定性评估证明了跨多种耳蜗和前庭细胞类型的转导,所有这些细胞类型均被定位以在通过rAAVAnc80-抗VEGF转导后将抗VEGF蛋白分泌到外淋巴或直接分泌到耳蜗神经的间质液中,从而通过在前庭耳蜗神经间质中的扩散而潜在

地控制VS的生长。

[0625] 示例性AAV Anc80衣壳DNA序列 (SEQ ID NO:88)

[0626] ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGG
GACTTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCCTGG
CTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGC
ACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTT
CAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCT
CGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCAATCACCCCAGG
AACCAGACTCCTCTTCGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCCGCAAGAAGAGACTCAACTTTGGGCAGACAGGC
GACTCAGAGTCAGTGCCCGACCCCTCAACCACTCGGAGAACCCCCCGCAGCCCCCTCTGGTGTGGGATCTAATACAAT
GGCAGCAGGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAACGCCTCAGGAAATTGGC
ATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTCCCCACCTACAACAAC
CACCTCTACAAGCAAATCTCCAGCCAATCGGGAGCAAGCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCCTG
GGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATGGG
GATTCCGGCCCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACGACGAATGATGGCACCACG
ACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGGTCTTTACGGACTCGGAATACCAGCTCCCGTACGTCTCTGGCTC
TGCGCACCAGGGGTGCTGCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCCCTCAGTACGGGTACCTGACTCTGAACA
ATGGCAGTCAGGCCGTGGGCCGTTCTCTCTACTGCCTGGAGTACTTTCCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAAC
AACTTTGAGTTCAGCTACACGTTTGAGGACGTGCCTTTTACAGCAGCTACGCGCACAGCCAAAGCCTGGACCGGT
GATGAACCCCTCATCGACCAGTACCTGTACTACCTGTCTCGGACTCAGACCACGAGTGGTACCGCAGGAAATCGGA
CGTTGCAATTTTCTCAGGCCGGGCTAGTAGCATGGCGAATCAGGCCAAAACTGGCTACCCGGGCCCTGCTACCGG
CAGCAACGCGTCTCCAAGACAGCGAATCAAAATAACAACAGCAACTTTGCCTGGACCGGTGCCACCAAGTATCATCT
GAATGGCAGAGACTCTCTGGTAAATCCCGGTCCCGCTATGGCAACCCACAAGGACGACGAAGACAAATTTTTTCCGA
TGAGCGGAGTCTTAATATTTGGGAAACAGGGAGCTGGAAATAGCAACGTGGACCTTGACAACGTTATGATAACCAGT
GAGGAAGAAATTAACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCACGGTGGCCACTAACCTGCAATCGTCAAA
CACCGCTCCTGCTACAGGGACCGTCAACAGTCAAGGAGCCTTACCTGGCATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACC
TGCAGGGTCTATCTGGGCCAAGATTCCTCACACGGACGGACACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGA
CTGAAACACCCGCTCCTCAGATCCTGATTAAGAATACACCTGTTCCCGCGAATCCTCCAACCTACCTTCAGTCCAGC
TAAGTTTGCGTCGTTTCATCACGCAGTACAGCACCGGACAGGTCAGCGTGGAAATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAA
ACAGCAAACGCTGGAACCCAGAGATTCAATACACTTCCAACCTACAACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTTGAC
ACAAATGGCGTTTATTCTGAGCCTCGCCCCATCGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATCTG

[0627] 示例性AAV Anc80衣壳氨基酸序列 (SEQ ID NO:89)

[0628] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPYKYLGPFNGLDKGEPVNAAD
AAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPV
EQSPQEPDSSSGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQPLGEPPAAPSGVGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGN
ASGNWHCDSTWLGRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRL
INNNWGRFRKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYG
YLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFESYTFEDVPFHSSYAHQS LDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTS
TAGNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTANQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMATHKDDE

DKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDLDNVMITSEEEIKTTNPVATEQYGT VATNLQSSNTAPATGT VNSQGALPGMVWQ
NRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEW
ELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0629] 示例性AAV Anc80衣壳氨基酸序列 (SEQ ID NO:113)

[0630] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAA
DAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKR
PVEQSPQEPDSSSGIGKKGQXPAX₁KRL NFGQTGDSSEVPDPQPLGEPPAAPSGVGSNTMX₂AGGGAPMADN NEG
ADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLY KQISSQSGX₃STNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCH
FSPRDWQRLIN NNWGRPKX₄LNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVFTD SEYQLPYVLGSAHQGCLP
PFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRS SFYCLEYFPSQMLRTGNNFX₅FSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMN P
LIDQYLYLSRTQTTSGTAGNRX₆LQFSQAGPSSMANQAKNWLP GPCYRQQRVSKTX₇NQNNNSNFAWTGATKYHL
NGRDSLVPNGPA MATHKDDKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDLDNVMITX₈EEEIK TTNPVATEX₉YGT VATNL
QX₁₀NTAPATGT VNSQGALPGMVWQX₁₁RDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPV P
ANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ YTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTR
YLTRNL

[0631]

SEQ ID NO:113 中的符号	相应氨基酸
X ₁	K 或 R
X ₂	A 或 S
X ₃	A 或 G
X ₄	R 或 k
X ₅	E 或 Q
X ₆	T 或 E
X ₇	A 或 T
X ₈	S 或 N
X ₉	Q 或 E
X ₁₀	S 或 A
X ₁₁	N 或 D

[0632] 示例性AAV Anc80衣壳氨基酸序列 (SEQ ID NO:114)

[0633] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAA
AAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPV
EQSPQEPDSSSGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSSEVPDPQPLGEPPAAPSGVGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGN
ASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRL
INNNWGRPKKLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYG
YLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSG
TAGNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTTNQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMATHKDD
DKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDLDNVMITNEEEIKTTNPVATEEYGT VATNLQSANTAPATGT VNSQGALPGMVWQ
DRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEW

ELQKENSkrwnPEIQYTSNynKSTnVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTrNL

[0634] 示例性AAV颗粒

[0635] 在某些实施方案中,本公开涉及一种rAAV-抗VEGF组合物,其包含有包含rAAV2/Anc80L65-CAG.雷珠单抗.bGH的颗粒。在某些实施方案中,rAAV-抗VEGF组合物包含:a)合理设计的合成AAV衣壳Anc80L65;b)源自AAV2的反向末端重复序列(上游和下游);c)巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件、位于第二个外显子的5'侧接区域与近端区域之间的鸡 β 肌动蛋白(C β A)基因序列和源自兔 β 珠蛋白(R β G)基因的3'剪接序列(Miyazaki 1989;Niwa 1991;和Orbán 2009,其中每一者以引用方式整体并入本文),它们一起共同称为CAG启动子(上游);d)雷珠单抗(抗体片段[Fab])编码序列,所述序列包含,i)编码雷珠单抗重链和轻链可变区的双顺反子盒,所述可变区由弗林蛋白酶和明脉扁刺蛾病毒衍生的蛋白酶2A(T2A)裂解位点分隔,和ii)在每条Fab链上游克隆以促进蛋白质分泌的20个氨基酸的人白细胞介素2(IL-2)前导序列;和e)牛生长激素(bGH)聚腺苷酸化(pA)信号(下游)。

[0636] 在某些实施方案中,本公开涉及一种rAAVAnc80-抗VEGF组合物,其包含有包含rAAV2/Anc80L65-CAG.贝伐单抗.bGH的颗粒。在某些实施方案中,rAAV-抗VEGF组合物包含:a)合理设计的合成AAV衣壳Anc80L65;b)源自AAV2的反向末端重复序列(上游和下游);c)巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件、位于第二个外显子的5'侧接区域与近端区域之间的鸡 β 肌动蛋白(C β A)基因序列和源自兔 β 珠蛋白(R β G)基因的3'剪接序列(Miyazaki 1989;Niwa 1991;和Orbán2009,其中每一者以引用方式整体并入本文),它们一起共同称为CAG启动子(上游);d)贝伐单抗编码序列(包含Fab区和Fc区的抗体),所述序列包含,i)编码重链和轻链可变区和恒定区的双顺反子盒,所述区域由弗林蛋白酶和明脉扁刺蛾病毒衍生的蛋白酶2A(T2A)裂解位点分隔,和ii)在每条Fab链上游克隆以促进蛋白质分泌的20个氨基酸的人白细胞介素2(IL-2)前导序列;和e)牛生长激素(bGH)聚腺苷酸化(pA)信号(下游)。

[0637] 在某些实施方案中,本公开涉及一种rAAVAnc80-抗VEGF组合物,其包含有包含rAAV2/Anc80L65-CAG.阿柏西普.bGH的颗粒。在某些实施方案中,rAAV-抗VEGF组合物包含:a)合理设计的合成AAV衣壳Anc80L65;b)源自AAV2的反向末端重复序列(上游和下游);c)巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件、位于第二个外显子的5'侧接区域与近端区域之间的鸡 β 肌动蛋白(C β A)基因序列和源自兔 β 珠蛋白(R β G)基因的3'剪接序列(Miyazaki 1989;Niwa 1991;和Orbán2009,其中每一者以引用方式整体并入本文),它们一起共同称为CAG启动子(上游);d)阿柏西普编码序列,所述序列包含,i)任选的20个氨基酸的人白细胞介素2(IL-2)前导序列,和ii)由与人IgG1的Fc部分融合的人VEGF受体1和2细胞外结构域的部分组成的重组融合蛋白;和e)牛生长激素(bGH)聚腺苷酸化(pA)信号(下游)。

[0638] 组合物

[0639] 除其他外,本公开提供了组合物。在一些实施方案中,组合物包含如本文所述的构建体。在一些实施方案中,组合物包含一种或多种如本文所述的构建体。在一些实施方案中,组合物包含多种如本文所述的构建体。在一些实施方案中,当组合物中包括多于一种构建体时,所述构建体各自不同。

[0640] 在一些实施方案中,组合物包含如本文所述的rAAV颗粒。在一些实施方案中,组合物包含一种或多种如本文所述的rAAV颗粒。在一些实施方案中,组合物包含多种rAAV颗粒。在一些实施方案中,当组合物中包括多于一种rAAV颗粒时,rAAV颗粒各自不同。

[0641] 在一些实施方案中,组合物包含抗VEGF蛋白。在一些实施方案中,组合物包含细胞。在一些实施方案中,组合物为或包含药物组合物。

[0642] 在一些实施方案中,rAAVAnc80-抗VEGF颗粒包含AAVAnc80衣壳和编码雷珠单抗的单链DNA基因组,所述雷珠单抗为临床上用于抑制VEGF的48千道尔顿(kDa)的人源化单克隆抗体片段(Fab)。在某些实施方案中,rAAVAnc80-抗VEGF将在CRO或在内部操作GMP设施制造。

[0643] 在一些实施方案中,rAAVAnc80-抗VEGF通过人胚肾(HEK)293上皮细胞的瞬时转染产生。在一些实施方案中,将澄清的细胞收获物通过亲和色谱纯化,然后通过氯化铯等密度梯度分离来进一步纯化和富集完整rAAVAnc80颗粒。在一些实施方案中,制剂缓冲液包含含有0.1-5mM范围内的磷酸二氢钾(例如,1.5mM的磷酸二氢钾)、1-20mM范围内的磷酸氢二钠(例如,8.1mM磷酸氢二钠)、0.1-10mM范围内的氯化钾(例如,2.7mM氯化钾)、100-1000mM范围内的氯化钠(例如,172mM氯化钠)和0.0001%-0.001%范围内的泊洛沙姆(例如,0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%))的无菌水。在一些实施方案中,一旦纯化和配制,包含构建体的rAAVAnc80颗粒就称为原料药。在一些实施方案中,原料药随后进行无菌过滤(例如,使用0.2微米[μm]过滤器)且无菌地填充到无菌小瓶中以供一次性使用并加塞。在一些实施方案中,这些装入小瓶的等分试样构成药物产品且在合适温度下储存直至施用当天(例如,4℃到-100℃,例如,在≤-65℃下)。

[0644] 在一些实施方案中,可以产生单独稀释剂药物产品(例如,AAVAnc80稀释剂),且可以在组成上与制剂缓冲液相当或接近。在一些实施方案中,这种稀释剂可以进行无菌过滤(0.2μm过滤器),无菌填充到无菌小瓶中以供一次性使用,并在适当温度下储存直到施用当天(例如,4℃到-100℃,例如,在≤-65℃下)。在一些实施方案中,稀释剂药物产品用于制备本文所述的原料药剂量所需的浓度。

[0645] 施用剂量和体积

[0646] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如本文公开的一种或多种AAV载体)作为单剂量或多个剂量施用。

[0647] 在一些实施方案中,本文公开的组合物作为单剂量施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物作为多个剂量,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个剂量施用。

[0648] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以约0.01mL、约0.02mL、约0.03mL、约0.04mL、约0.05mL、约0.06mL、约0.07mL、约0.08mL、约0.09mL、约1.00mL、约1.10mL、约1.20mL、约1.30mL、约1.40mL、约1.50mL、约1.60mL、约1.70mL、约1.80mL、约1.90mL或约2.00mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约0.01mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约0.02mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约0.03mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约0.04mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约0.05mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约0.06mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约0.07mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约0.08mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约0.09mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约1.00mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约1.10mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组

合物以约1.20mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约1.30mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约1.40mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约1.50mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约1.60mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约1.70mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约1.80mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约1.90mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以约2.00mL的体积施用。

[0649] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以约0.01至2.00mL、约0.02至1.90mL、约0.03至1.8mL、约0.04至1.70mL、约0.05至1.60mL、约0.06至1.50mL、约0.06至1.40mL、约0.07至1.30mL、约0.08至1.20mL或约0.09至1.10mL的体积施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以约0.01至2.00mL、约0.02至2.00mL、约0.03至2.00mL、约0.04至2.00mL、约0.05至2.00mL、约0.06至2.00mL、约0.07至2.00mL、约0.08至2.00mL、约0.09至2.00mL、约0.01至1.90mL、约0.01至1.80mL、约0.01至1.70mL、约0.01至1.60mL、约0.01至1.50mL、约0.01至1.40mL、约0.01至1.30mL、约0.01至1.20mL、约0.01至1.10mL、约0.01至1.00mL、约0.01至0.09mL的体积施用。

[0650] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以约0.01mL至约0.30mL、约0.01mL至约0.25mL、约0.01mL至约0.20mL、约0.01mL至约0.15mL、约0.01mL至约0.14mL、约0.01mL至约0.13mL、约0.01mL至约0.12mL、约0.01mL至约0.11mL、约0.01mL至约0.10mL、约0.01mL至约0.09mL、约0.01mL至约0.08mL、约0.01mL至约0.07mL、约0.01mL至约0.06mL、约0.01mL至约0.05mL、约0.01mL至约0.04mL、约0.01mL至约0.03mL或约0.01mL至约0.02mL的体积施用。

[0651] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以约0.02mL至约0.30mL、0.03mL至约0.30mL、0.04mL至约0.30mL、0.05mL至约0.30mL、0.06mL至约0.30mL、0.07mL至约0.30mL、0.08mL至约0.30mL、0.09mL至约0.30mL、0.10mL至约0.30mL、0.11mL至约0.30mL、0.12mL至约0.30mL、0.13mL至约0.30mL、0.14mL至约0.30mL、0.15mL至约0.30mL、0.16mL至约0.30mL、0.17mL至约0.30mL、0.18mL至约0.30mL、0.19mL至约0.30mL、0.20mL至约0.30mL或0.25mL至约0.30mL的体积施用。

[0652] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以约0.01mL至约0.03mL、约0.02mL至约0.25mL、约0.03mL至约0.20mL、约0.04mL至约0.18mL、约0.05mL至约0.16mL、约0.06mL至约0.14mL、约0.07mL至约0.12mL或约0.08mL至约0.1mL的体积施用。

[0653] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以以下量施用:约 1×10^{11} vg/mL至约 1×10^{15} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 9×10^{14} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 8×10^{14} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 7×10^{14} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 6×10^{14} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 5×10^{14} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 4×10^{14} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 3×10^{14} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 2×10^{14} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 1×10^{14} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 9×10^{13} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 8×10^{13} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 7×10^{13} vg/mL、约 1×10^{11} vg/mL至约 6×10^{13} vg/mL、约 $1 \times$

建体的组合物)以以下量施用:约 1×10^{12} vg/mL、约 1.1×10^{12} vg/mL、 1.2×10^{12} vg/mL、约 1.3×10^{12} vg/mL、约 1.4×10^{12} vg/mL、约 1.5×10^{12} vg/mL、约 1.6×10^{12} vg/mL、约 1.7×10^{12} vg/mL、约 1.8×10^{12} vg/mL、约 1.9×10^{12} vg/mL、约 2.0×10^{12} vg/mL、约 2.1×10^{12} vg/mL、约 2.2×10^{12} vg/mL、约 2.3×10^{12} vg/mL、约 2.4×10^{12} vg/mL、约 2.5×10^{12} vg/mL、约 2.6×10^{12} vg/mL、约 2.7×10^{12} vg/mL、约 2.8×10^{12} vg/mL、约 2.9×10^{12} vg/mL、约 3.0×10^{12} vg/mL、约 3.1×10^{12} vg/mL、约 3.2×10^{12} vg/mL、约 3.3×10^{12} vg/mL、约 3.4×10^{12} vg/mL、约 3.5×10^{12} vg/mL、约 3.6×10^{12} vg/mL、约 3.7×10^{12} vg/mL、约 3.8×10^{12} vg/mL、约 3.9×10^{12} vg/mL、约 4.0×10^{12} vg/mL、约 4.1×10^{12} vg/mL、约 4.2×10^{12} vg/mL、约 4.3×10^{12} vg/mL、约 4.4×10^{12} vg/mL、约 4.5×10^{12} vg/mL、约 4.6×10^{12} vg/mL、约 4.7×10^{12} vg/mL、约 4.8×10^{12} vg/mL、约 4.9×10^{12} vg/mL、约 5.0×10^{12} vg/mL、约 5.1×10^{12} vg/mL、约 5.2×10^{12} vg/mL、约 5.3×10^{12} vg/mL、约 5.4×10^{12} vg/mL、约 5.5×10^{12} vg/mL、约 5.6×10^{12} vg/mL、约 5.7×10^{12} vg/mL、约 5.8×10^{12} vg/mL、约 5.9×10^{12} vg/mL、约 6.0×10^{12} vg/mL、约 7.0×10^{12} vg/mL、约 8.0×10^{12} vg/mL、约 9.0×10^{12} vg/mL、约 9.1×10^{12} vg/mL、约 9.2×10^{12} vg/mL、约 9.3×10^{12} vg/mL、约 9.4×10^{12} vg/mL、约 9.5×10^{12} vg/mL、约 9.6×10^{12} vg/mL、约 9.7×10^{12} vg/mL、约 9.8×10^{12} vg/mL、约 9.9×10^{12} vg/mL、约 1×10^{13} vg/mL、 1.1×10^{13} vg/mL、 1.2×10^{13} vg/mL、 1.3×10^{13} vg/mL、 1.4×10^{13} vg/mL、 1.5×10^{13} vg/mL、 1.6×10^{13} vg/mL、 1.7×10^{13} vg/mL、 1.8×10^{13} vg/mL、 1.9×10^{13} vg/mL、 2×10^{13} vg/mL、 5×10^{13} vg/mL或 1×10^{14} vg/mL。

[0658] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 2.5×10^{12} vg/mL $\pm 10\%$ 的量施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 2.5×10^{12} vg/mL的量施用。

[0659] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 5×10^{12} vg/mL $\pm 10\%$ 的量施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 5×10^{12} vg/mL的量施用。

[0660] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 1×10^{13} vg/mL $\pm 10\%$ 的量施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 1×10^{13} vg/mL的量施用。

[0661] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以以下量施用:约 1×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 2×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 3×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 4×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 5×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 6×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 7×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 8×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 9×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 1×10^{11} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 2×10^{11} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 3×10^{11} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 4×10^{11} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 5×10^{11} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 6×10^{11} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 7×10^{11} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 8×10^{11} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 9×10^{11} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 1×10^{12} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 2×10^{12} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 3×10^{12} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 4×10^{12} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 5×10^{12} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 6×10^{12} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 7×10^{12} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 8×10^{12} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗或约 9×10^{12} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗。

[0662] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以以下量施用:约 1×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 9×10^{12} vg/耳

蜗、约 1×10^{10} 至约 8×10^{12} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 7×10^{12} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 6×10^{12} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 5×10^{12} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 4×10^{12} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 3×10^{12} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 2×10^{12} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 1×10^{12} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 9×10^{11} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 8×10^{11} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 7×10^{11} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 6×10^{11} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 5×10^{11} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 4×10^{11} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 3×10^{11} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 2×10^{11} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 1×10^{11} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 9×10^{10} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 8×10^{10} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 7×10^{10} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 6×10^{10} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 5×10^{10} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 4×10^{10} vg/耳蜗、约 1×10^{10} 至约 3×10^{10} vg/耳蜗、至约 1×10^{10} 至约 2×10^{10} vg/耳蜗。

[0663] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以以下量施用:约 1×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗、约 5×10^{10} 至约 5×10^{12} vg/耳蜗、约 8×10^{10} 至约 1×10^{12} vg/耳蜗、约 1×10^{11} 至约 9×10^{11} vg/耳蜗、约 2×10^{11} 至约 8×10^{11} vg/耳蜗、约 2.5×10^{11} 至约 5×10^{11} vg/耳蜗、约 3×10^{11} 至约 4.5×10^{11} vg/耳蜗。

[0664] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以以下量施用:约 1×10^{10} vg/耳蜗、约 5×10^{10} vg/耳蜗、约 1×10^{11} vg/耳蜗、约 1.5×10^{11} vg/耳蜗、约 2×10^{11} vg/耳蜗、约 2.1×10^{11} vg/耳蜗、 2.2×10^{11} vg/耳蜗、 2.3×10^{11} vg/耳蜗、 2.4×10^{11} vg/耳蜗、约 2.5×10^{11} vg/耳蜗、 2.6×10^{11} vg/耳蜗、 2.7×10^{11} vg/耳蜗、 2.8×10^{11} vg/耳蜗、 2.9×10^{11} vg/耳蜗、约 3×10^{11} vg/耳蜗、 3.1×10^{11} vg/耳蜗、 3.2×10^{11} vg/耳蜗、 3.3×10^{11} vg/耳蜗、 3.4×10^{11} vg/耳蜗、约 3.5×10^{11} vg/耳蜗、 3.6×10^{11} vg/耳蜗、 3.7×10^{11} vg/耳蜗、 3.8×10^{11} vg/耳蜗、 3.9×10^{11} vg/耳蜗、约 4×10^{11} vg/耳蜗、 4.1×10^{11} vg/耳蜗、 4.2×10^{11} vg/耳蜗、 4.3×10^{11} vg/耳蜗、 4.4×10^{11} vg/耳蜗、约 4.5×10^{11} vg/耳蜗、 4.6×10^{11} vg/耳蜗、 4.7×10^{11} vg/耳蜗、 4.8×10^{11} vg/耳蜗、 4.9×10^{11} vg/耳蜗、约 5×10^{11} vg/耳蜗、约 5.5×10^{11} vg/耳蜗、约 6×10^{11} vg/耳蜗、约 6.5×10^{11} vg/耳蜗、约 7×10^{11} vg/耳蜗、约 7.5×10^{11} vg/耳蜗、约 8×10^{11} vg/耳蜗、约 8.5×10^{11} vg/耳蜗、约 9×10^{11} vg/耳蜗、约 9.5×10^{11} vg/耳蜗、约 1×10^{12} vg/耳蜗。

[0665] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 2.3×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ 的量施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 2.3×10^{11} vg/耳蜗的量施用。

[0666] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 4.5×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ 的量施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 4.5×10^{11} vg/耳蜗的量施用。

[0667] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 9×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ 的量施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,包含一种或多种本文公开的rAAV构建体的组合物)以 9×10^{11} vg/耳蜗的量施用。

[0668] 在一些实施方案中,本文公开的组合物作为单剂量施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物作为多个剂量,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个剂量施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物作为多个剂量,包括至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个剂量施用。

[0669] 在一些实施方案中,本文公开的组合物以给药方案施用。在一些实施方案中,给药

方案包括一个或多个剂量。在一些实施方案中,给药方案包括第一剂量和一个或多个后续剂量(例如,第二剂量、第三剂量、第四剂量等)。在一些实施方案中,本文公开的给药方案包括至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个剂量。

[0670] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,在施用后续剂量之前施用第一剂量。在一些实施方案中,后续剂量在施用第一剂量后至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月或至少12个月施用。

[0671] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 $2.5 \times 10^{12} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $2.5 \times 10^{12} \text{vg/mL}$)的量施用。在一些实施方案中,给药方案包括一个或多个后续剂量。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相似的量施用。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相比不同的量施用。在一些实施方案中,当后续剂量的剂量与第一剂量相比不同时,后续剂量可以 $5 \times 10^{12} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $5 \times 10^{12} \text{vg/mL}$)或以 $1 \times 10^{13} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $1 \times 10^{13} \text{vg/mL}$)或所述剂量之间的剂量施用。

[0672] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 $2.5 \times 10^{12} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $2.5 \times 10^{12} \text{vg/mL}$)的量施用,并且第二剂量以小于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量小约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,例如,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。在一些实施方案中,第二剂量是预期在VS肿瘤部位实现抗VEGF蛋白的生物活性浓度的剂量,例如约 $1.2 \times 10^{11} \text{vg/耳蜗}$ 或约 $1.3 \times 10^{12} \text{vg/mL}$)。

[0673] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 $2.5 \times 10^{12} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $2.5 \times 10^{12} \text{vg/mL}$)施用,并且第二剂量以高于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量高约5%、高约10%、高约20%、高约30%、高约40%、高约50%、高约60%、高约70%、高约80%或高约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。在一些实施方案中,第二剂量以约 $5 \times 10^{12} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $5 \times 10^{12} \text{vg/mL}$)施用。在一些实施方案中,第二剂量以约 $1 \times 10^{13} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $1 \times 10^{13} \text{vg/mL}$)施用。

[0674] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 $5 \times 10^{12} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $5 \times 10^{12} \text{vg/mL}$)的量施用。在一些实施方案中,给药方案包括一个或多个后续剂量。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相似的量施用。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相比不同的量施用。在一些实施方案中,当后续剂量的剂量与第一剂量相比不同时,后续剂量可以 $2.5 \times 10^{12} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $2.5 \times 10^{12} \text{vg/mL}$)或以 $1 \times 10^{13} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $1 \times 10^{13} \text{vg/mL}$)或所述剂量之间的剂量施用。

[0675] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 $5 \times 10^{12} \text{vg/mL} \pm 10\%$ (例如,约 $5 \times 10^{12} \text{vg/mL}$)的量施用,并且第二剂量以小于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量小约5%、小约10%、小约20%、小约30%、小约40%、小约50%、小约60%、小约70%、小约80%或小约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的

剂量,例如,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。在一些实施方案中,第二剂量以约 2.5×10^{12} vg/mL $\pm 10\%$ (例如,约 2.5×10^{12} vg/mL)施用。

[0676] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 5×10^{12} vg/mL $\pm 10\%$ (例如,约 5×10^{12} vg/mL)施用,并且第二剂量以高于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量高约5%、高约10%、高约20%、高约30%、高约40%、高约50%、高约60%、高约70%、高约80%或高约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,例如,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。在一些实施方案中,第二剂量以约 1×10^{13} vg/mL $\pm 10\%$ (例如,约 1×10^{13} vg/mL)施用。

[0677] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 1×10^{13} vg/mL $\pm 10\%$ (例如,约 1×10^{13} vg/mL)的量施用。在一些实施方案中,给药方案包括一个或多个后续剂量。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相似的量施用。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相比不同的量施用。在一些实施方案中,当后续剂量的剂量与第一剂量相比不同时,后续剂量可以 2.5×10^{12} vg/mL $\pm 10\%$ (例如,约 2.5×10^{12} vg/mL)或以 5×10^{12} vg/mL $\pm 10\%$ (例如,约 5×10^{12} vg/mL)或所述剂量之间的剂量施用。

[0678] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 1×10^{13} vg/mL $\pm 10\%$ (例如,约 1×10^{13} vg/mL)的量施用,并且第二剂量以小于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量小约5%、小约10%、小约20%、小约30%、小约40%、小约50%、小约60%、小约70%、小约80%或小约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,例如,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。在一些实施方案中,第二剂量以约 5×10^{12} vg/mL $\pm 10\%$ (例如,约 5×10^{12} vg/mL)施用。在一些实施方案中,第二剂量以约 2.5×10^{12} vg/mL $\pm 10\%$ (例如,约 2.5×10^{12} vg/mL)施用。

[0679] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 1×10^{13} vg/mL $\pm 10\%$ (例如,约 1×10^{13} vg/mL)施用,并且第二剂量以高于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量高约5%、高约10%、高约20%、高约30%、高约40%、高约50%、高约60%、高约70%、高约80%或高约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,例如,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。

[0680] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 2.3×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 2.3×10^{11} vg/耳蜗)的量施用,在一些实施方案中,给药方案包括一个或多个后续剂量。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相似的量施用。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相比不同的量施用。在一些实施方案中,当后续剂量的剂量与第一剂量相比不同时,后续剂量可以约 4.5×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 4.5×10^{11} vg/耳蜗)或以约 9×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 9×10^{11} vg/耳蜗)或所述剂量之间的剂量施用。

[0681] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 2.3×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 2.3×10^{11} vg/耳蜗)的量施用,并且第二剂量以小于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量小约5%、小约10%、小约20%、小约30%、小约40%、小约50%、小约60%、小约70%、小约80%或小约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,例如,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。在一些实施方案中,第二剂量是预期在VS肿瘤部位实现抗VEGF蛋白的生物活性浓度的剂量,例如约 $1.2 \times$

10^{11} vg/耳蜗或约 1.3×10^{12} vg/mL])。

[0682] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 2.3×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 2.3×10^{11} vg/耳蜗)施用,并且第二剂量以高于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量高约5%、高约10%、高约20%、高约30%、高约40%、高约50%、高约60%、高约70%、高约80%或高约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。在一些实施方案中,第二剂量以约 4.5×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 4.5×10^{11} vg/耳蜗)施用。在一些实施方案中,第二剂量以约 9×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 9×10^{11} vg/耳蜗)施用。

[0683] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 4.5×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 4.5×10^{11} vg/耳蜗)的量施用,在一些实施方案中,给药方案包括一个或多个后续剂量。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相似的量施用。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相比不同的量施用。在一些实施方案中,当后续剂量的剂量与第一剂量相比不同时,后续剂量可以约 2.3×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 2.3×10^{11} vg/耳蜗)或以约 9×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 9×10^{11} vg/耳蜗)或所述剂量之间的剂量施用。

[0684] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 4.5×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 4.5×10^{11} vg/耳蜗)的量施用,并且第二剂量以小于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量小约5%、小约10%、小约20%、小约30%、小约40%、小约50%、小约60%、小约70%、小约80%或小约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,例如,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。在一些实施方案中,第二剂量以约 2.3×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 2.3×10^{11} vg/耳蜗)施用。

[0685] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 4.5×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 4.5×10^{11} vg/耳蜗)施用,并且第二剂量以高于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量高约5%、高约10%、高约20%、高约30%、高约40%、高约50%、高约60%、高约70%、高约80%或高约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,例如,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。在一些实施方案中,第二剂量以约 9×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 9×10^{11} vg/耳蜗)施用。

[0686] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 9×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 9×10^{11} vg/耳蜗)的量施用,在一些实施方案中,给药方案包括一个或多个后续剂量。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相似的量施用。在一些实施方案中,一个或多个后续剂量以与第一剂量相比不同的量施用。在一些实施方案中,当后续剂量的剂量与第一剂量相比不同时,后续剂量可以约 2.3×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 2.3×10^{11} vg/耳蜗)或以约 4.5×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 4.5×10^{11} vg/耳蜗)或所述剂量之间的剂量施用。

[0687] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 9×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 9×10^{11} vg/耳蜗)的量施用,并且第二剂量以小于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量小约5%、小约10%、小约20%、小约30%、小约40%、小约50%、小约60%、小约70%、小约80%或小约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,例如,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。在一些实施方案中,

第二剂量以约 4.5×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 4.5×10^{11} vg/耳蜗)施用。在一些实施方案中,第二剂量以约 2.3×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 2.3×10^{11} vg/耳蜗)施用。在一些实施方案中,第二剂量是预期在VS肿瘤部位实现抗VEGF蛋白的生物活性浓度的剂量,例如约 1.2×10^{11} vg/耳蜗或约 1.3×10^{12} vg/mL)。

[0688] 在本文所述的给药方案的一些实施方案中,第一剂量以 9×10^{11} vg/耳蜗 $\pm 10\%$ (例如,约 9×10^{11} vg/耳蜗)施用,并且第二剂量以高于第一剂量的量施用。在一些实施方案中,第二剂量比第一剂量高约5%、高约10%、高约20%、高约30%、高约40%、高约50%、高约60%、高约70%、高约80%或高约90%。在一些实施方案中,第二剂量是安全且可耐受的剂量,例如,如通过本文公开的安全性和/或功效参数所测量的。

[0689] 在一些实施方案中,给药方案可重复施用。在一些实施方案中,给药方案可至少每1周、至少每2周、至少每3周、至少每1个月、至少每2个月、至少每3个月、至少每4个月、至少每5个月、至少每6个月、至少每7个月、至少每8个月、至少每9个月、至少每10个月、至少每11个月或至少每12个月施用。

[0690] 在一些实施方案中,给药方案可每1周、每2周、每3周、每1个月、每2个月、每3个月、每4个月、每5个月、每6个月、每7个月、每8个月、每9个月、每10个月、每11个月或每12个月施用。

[0691] 单个AAV构建体组合物

[0692] 在一些实施方案中,本公开提供了包含有包含单个构建体的rAAV颗粒的组合物或系统。在一些此类实施方案中,单个构建体可以递送编码抗VEGF基因的功能性 (例如,如前所述和/或其他功能性的,例如密码子优化的) 拷贝的多核苷酸。在一些实施方案中,构建体为或包含rAAV构建体。在本文所述的一些实施方案中,单个rAAV构建体能够在靶细胞 (例如,内耳细胞) 中表达全长抗VEGF信使RNA (mRNA) 或其特征性蛋白质。在一些实施方案中,单个构建体 (例如,本文所述的任何构建体) 可包括编码功能性抗VEGF蛋白的序列 (例如,产生功能性抗VEGF蛋白的任何构建体)。在一些实施方案中,单个构建体 (例如,本文所述的任何构建体) 可包括编码功能性抗VEGF蛋白的序列 (例如,产生功能性抗VEGF蛋白的任何构建体) 和任选额外多肽序列 (例如,调控序列和/或报告序列)。

[0693] 在一些实施方案中,单个构建体组合物或系统可包含本文所述的任何或所有示例性构建体组分。在一些实施方案中,示例性单个构建体由SEQ ID NO:90表示。在一些实施方案中,示例性单个构建体由SEQ ID NO:91表示。在一些实施方案中,示例性单个构建体由SEQ ID NO:92表示。在一些实施方案中,示例性单个构建体由SEQ ID NO:93表示。在一些实施方案中,示例性单个构建体由SEQ ID NO:94表示。在一些实施方案中,示例性单个构建体由SEQ ID NO:95表示。在一些实施方案中,示例性单个构建体由SEQ ID NO:96表示。在一些实施方案中,示例性单个构建体由SEQ ID NO:106表示。在一些实施方案中,示例性单个构建体由SEQ ID NO:107表示。在一些实施方案中,示例性单个构建体与由SEQ ID NO:90、91、92、93、94、95、96、106或107表示的序列至少85%、90%、95%、98%或99%相同。本领域技术人员会认识到,构建体可以进行额外修饰,包括密码子优化、新颖但功能等效 (例如,沉默突变) 的引入、报告序列的添加和/或其他常规修饰。

[0694] 在一些实施方案中,构建体具有根据SEQ ID NO:90的序列,此构建体可称为rAAV-雷珠单抗-PC构建体,为图6图(A)所示的示意图的示例性实施方案,且编码抗VEGF蛋白雷珠

单抗。在一些实施方案中,示例性构建体包含:由SEQ ID NO:47例示的5`ITR、任选由SEQ ID NO:81例示的克隆位点、由SEQ ID NO:64例示的CMV增强子、由SEQ ID NO:50例示的CBA启动子、由SEQ ID NO:65例示的嵌合内含子、任选由SEQ ID NO:78例示的克隆位点、由SEQ ID NO:103例示的抗VEGF编码区、任选由SEQ ID NO:79例示的克隆位点、由SEQ ID NO:75例示的poly(A)位点、任选由SEQ ID NO:82例示的克隆位点和由SEQ ID NO:48例示的3`ITR。

[0695] 在一些实施方案中,构建体具有根据SEQ ID NO:91的序列,此构建体可称为rAAV-雷珠单抗构建体,为图6图(A)所示的示意图的示例性实施方案,且编码抗VEGF蛋白雷珠单抗。在一些实施方案中,示例性构建体包含:由SEQ ID NO:45例示的5`ITR、任选由SEQ ID NO:77例示的克隆位点、由SEQ ID NO:64例示的CMV增强子、由SEQ ID NO:49例示的CBA启动子、由SEQ ID NO:65例示的嵌合内含子、任选由SEQ ID NO:78例示的克隆位点、由SEQ ID NO:103例示的抗VEGF编码区、任选由SEQ ID NO:79例示的克隆位点、由SEQ ID NO:75例示的poly(A)位点、任选由SEQ ID NO:80例示的克隆位点和由SEQ ID NO:46例示的3`ITR。

[0696] 在一些实施方案中,构建体具有根据SEQ ID NO:92的序列,此构建体可称为rAAV-雷珠单抗.2构建体,为图6图(A)所示的示意图的示例性实施方案,且编码抗VEGF蛋白雷珠单抗。在一些实施方案中,示例性构建体包含:由SEQ ID NO:45例示的5`ITR、任选由SEQ ID NO:77例示的克隆位点、由SEQ ID NO:64例示的CMV增强子、由SEQ ID NO:50例示的CBA启动子、由SEQ ID NO:65例示的嵌合内含子、任选由SEQ ID NO:78例示的克隆位点、由SEQ ID NO:103例示的抗VEGF编码区、任选由SEQ ID NO:79例示的克隆位点、由SEQ ID NO:75例示的poly(A)位点、任选由SEQ ID NO:80例示的克隆位点和由SEQ ID NO:46例示的3`ITR。

[0697] 在一些实施方案中,构建体具有根据SEQ ID NO:106的序列,此构建体可称为rAAV-雷珠单抗-GFP构建体,为图6图(B)所示的示意图的示例性实施方案,且编码抗VEGF蛋白雷珠单抗。在一些实施方案中,示例性构建体包含:由SEQ ID NO:47例示的5`ITR、任选由SEQ ID NO:81例示的克隆位点、由SEQ ID NO:64例示的CMV增强子、由SEQ ID NO:50例示的CBA启动子、由SEQ ID NO:65例示的嵌合内含子、任选由SEQ ID NO:78例示的克隆位点、由SEQ ID NO:103例示的抗VEGF编码区、任选由SEQ ID NO:104例示的报告序列、任选由SEQ ID NO:79例示的克隆位点、由SEQ ID NO:75例示的poly(A)位点、任选由SEQ ID NO:82例示的克隆位点和由SEQ ID NO:48例示的3`ITR。

[0698] 在一些实施方案中,构建体具有根据SEQ ID NO:93的序列,此构建体可称为rAAV-贝伐单抗-PC构建体,为图6图(C)所示的示意图的示例性实施方案,且编码抗VEGF蛋白贝伐单抗。在一些实施方案中,示例性构建体包含:由SEQ ID NO:47例示的5`ITR、任选由SEQ ID NO:81例示的克隆位点、由SEQ ID NO:64例示的CMV增强子、由SEQ ID NO:50例示的CBA启动子、由SEQ ID NO:65例示的嵌合内含子、任选由SEQ ID NO:78例示的克隆位点、由SEQ ID NO:22例示的抗VEGF编码区、任选由SEQ ID NO:79例示的克隆位点、由SEQ ID NO:75例示的poly(A)位点、任选由SEQ ID NO:82例示的克隆位点和由SEQ ID NO:48例示的3`ITR。

[0699] 在一些实施方案中,构建体具有根据SEQ ID NO:94的序列,此构建体可称为rAAV-贝伐单抗构建体,为图6图(C)所示的示意图的示例性实施方案,且编码抗VEGF蛋白贝伐单抗。在一些实施方案中,示例性构建体包含:由SEQ ID NO:45例示的5`ITR、任选由SEQ ID NO:77例示的克隆位点、由SEQ ID NO:64例示的CMV增强子、由SEQ ID NO:49例示的CBA启动子、由SEQ ID NO:65例示的嵌合内含子、任选由SEQ ID NO:78例示的克隆位点、由SEQ ID

N0:22例示的抗VEGF编码区、任选由SEQ ID N0:79例示的克隆位点、由SEQ ID N0:75例示的poly(A)位点、任选由SEQ ID N0:80例示的克隆位点和由SEQ ID N0:46例示的3' ITR。

[0700] 在一些实施方案中,构建体具有根据SEQ ID N0:107的序列,此构建体可称为rAAV-贝伐单抗-GFP构建体,为图6图(B)所示的示意图的示例性实施方案,且编码抗VEGF蛋白贝伐单抗。在一些实施方案中,示例性构建体包含:由SEQ ID N0:47例示的5' ITR、任选由SEQ ID N0:81例示的克隆位点、由SEQ ID N0:64例示的CMV增强子、由SEQ ID N0:50例示的CBA启动子、由SEQ ID N0:65例示的嵌合内含子、任选由SEQ ID N0:78例示的克隆位点、由SEQ ID N0:22例示的抗VEGF编码区、任选由SEQ ID N0:104例示的报告序列、任选由SEQ ID N0:79例示的克隆位点、由SEQ ID N0:75例示的poly(A)位点、任选由SEQ ID N0:82例示的克隆位点和由SEQ ID N0:48例示的3' ITR。

[0701] 在一些实施方案中,构建体具有根据SEQ ID N0:95的序列,此构建体可称为rAAV-阿柏西普-PC构建体,为图6图(D)所示的示意图的示例性实施方案,且编码抗VEGF蛋白阿柏西普。在一些实施方案中,示例性构建体包含:由SEQ ID N0:47例示的5' ITR、任选由SEQ ID N0:81例示的克隆位点、由SEQ ID N0:64例示的CMV增强子、由SEQ ID N0:50例示的CBA启动子、由SEQ ID N0:65例示的嵌合内含子、任选由SEQ ID N0:78例示的克隆位点、由SEQ ID N0:42例示的抗VEGF编码区、任选由SEQ ID N0:79例示的克隆位点、由SEQ ID N0:75例示的poly(A)位点、任选由SEQ ID N0:82例示的克隆位点和由SEQ ID N0:48例示的3' ITR。

[0702] 在一些实施方案中,构建体具有根据SEQ ID N0:96的序列,此构建体可称为rAAV-阿柏西普构建体,为图6图(D)所示的示意图的示例性实施方案,且编码抗VEGF蛋白阿柏西普。在一些实施方案中,示例性构建体包含:由SEQ ID N0:45例示的5' ITR、任选由SEQ ID N0:77例示的克隆位点、由SEQ ID N0:64例示的CMV增强子、由SEQ ID N0:49例示的CBA启动子、由SEQ ID N0:65例示的嵌合内含子、任选由SEQ ID N0:78例示的克隆位点、由SEQ ID N0:42例示的抗VEGF编码区、任选由SEQ ID N0:79例示的克隆位点、由SEQ ID N0:75例示的poly(A)位点、任选由SEQ ID N0:80例示的克隆位点和由SEQ ID N0:46例示的3' ITR。

[0703] 在某些实施方案中,产生包含编码抗VEGF蛋白的构建体的rAAVAnc80颗粒并将其用于评价所述构建体的生物活性和内耳耐受性,以便支持VS的局部抗VEGF疗法的生物学合理性和合理安全性。在一些实施方案中,通过使用以下方法/模型的一系列研究进行此类评价:细胞系的转导和/或转染、耳蜗外植体的转导和/或转染;野生型小鼠细胞的耳蜗内施用和转导;和/或NHP细胞的耳蜗内施用和转导。某些抗VEGF颗粒的总结示出在表1中。

[0704] 表1-某些研究中使用或计划使用的颗粒的总结

	衣壳	启动子	VEGF 抑制剂编码序列	pA 信号
[0705]	AAVAnc80	CAG	贝伐单抗	bGH
	AAVAnc80	CAG	雷珠单抗	bGH
	AAVAnc80	CAG	阿柏西普	bGH

[0706] 缩写:bGH=牛生长激素;CAG=巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件、位于第二个外显子的5'侧接区域与近端区域之间的鸡 β 肌动蛋白(C β A)基因序列和源自兔 β 珠蛋白(R β G)基因的3'剪接序列(Miyazaki1989;Niwa 1991;Orbán 2009,其中每一者以引用方式整体并入本文),它们一起共同称为CAG启动子;GLP=良好实验室规范;pA=聚腺苷酸化。

[0707] 示例性rAAV-雷珠单抗-PC构建体序列(SEQ ID NO:90)

[0708] CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTAGCGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGTTTAAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGGCGGTGCCCGGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGGCGCGCGGTGCGGCTGTAAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATTGTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGCGATGGATCAACACCTACACCGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCCATGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCGTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCGTGACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAAATGACGCTCCTGTCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTACCTGAACGTATCAGCAAAAGCCCGGAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCA

GATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTAC
TACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAATCAAGCGGACTGTGGCCG
TCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAACA
ACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGAAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTG
ACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCA
CAAAGTGACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTT
AAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCT
TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGT
CATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA
TGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC
ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

[0709] 示例性rAAV-雷珠单抗构建体序列 (SEQ ID NO:91)

[0710] TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAATCCATCACTAGGGGTTCTT
TGTCGACGCGGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCAT
AGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCC
ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT
TACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
CATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCA
ATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCGAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGG
GGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAA
AGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCG
TTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGCTCTGACTGACCGGTTACTCCCACA
GGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGTTTAAATGACGGCTCGTTTTCTTTCTGT
GGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG
TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCTGCGGCCCGCGCTGCCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGGCTTTG
TGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA
GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCG
ACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCC
GTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGA
GGGGCGCGGCGGCCCCCGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGT
GCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCTCT
AGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGCCTGCGCG
CCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGACGGGGCAGGGCGG
GGTTGCGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTTTCTTCTACAG
CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTC
TCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGA

GACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGC
CTTGAATGGGTTCGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTT
CAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT
GCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTG
TCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGC
TCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCG
TGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCT
CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAA
GAGCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTG
GCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTG
ACCAACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTG
TAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCT
ACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACC
ATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACATTTGGCCA
GGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGA
AGTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGTGGAC
AATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAG
CACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTA
GCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCC
AGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCCTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTAATAA
AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG
GGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCC
TCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG
GGCGACCAAAAGGTCGCCCCAGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAA

[0711] 示例性rAAV-雷珠单抗.2构建体序列 (SEQ ID NO:92)

[0712] TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTT
TGTCGACGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCAT
AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCC
ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
CATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCA
ATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGG
CGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAG
TTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTT
GCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCACAGG
TGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGG

CTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTG
TGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGGCTTTGTG
CGCTCCGCGTGTGCGGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGG
CTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGGCTGTAACCCCCCTGCAC
CCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGT
GCGGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGAGG
GGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGC
GAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCTAG
CGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGCCTGCGCGCCGCG
GTCCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGG
TTGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCT
CCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTC
TGGCCCTGGTGACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGA
CTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAAGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCT
TGAATGGGTGCGATGGATCAACACCTACACCGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCA
GCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC
GCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTC
TAGCGCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTC
TGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG
CACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA
GCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGC
GACGTGGAAGAGAACCCCGACCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCTGATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGAC
CAACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTA
GCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTAC
TTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT
ATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCCTGACCTTGGACATTTGGCCAGG
GCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAG
TCTGGCACAGCCTCTGTGCTGTGCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGTGGACAA
TGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCA
CCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCCAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGC
CCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTAAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAG
CCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCTAATAAAAA
TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGG
AGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTC
GGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG
CGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGAGAGGGAGTGGC
CAA

[0713] 示例性rAAV-雷珠单抗-GFP构建体序列 (SEQ ID NO:106)

[0714] CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGTCGCTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGTTTAAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCGCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGACCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAAGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGCGATGGATCAACACCTACACGGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTAATACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCCATGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCGTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCGGAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAAATGACAGCTCCTGTCTGCTGCAATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTACCTGAACTGTATCAGCAAAAGCCCGGAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTAC

TACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGC
TCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAACA
ACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGAAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTG
ACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCA
CAAAGTGACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTA
TGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCAC
AAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGG
CAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGACGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACC
ACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC
GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAT
CGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGG
CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC
GACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC
CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTC
TCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG
TTTGCCCCCTCCCCCGTGCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATT
GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGA
AGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAG
GAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCG
CCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

[0715] 示例性rAAV-贝伐单抗-PC构建体序列 (SEQ ID NO:93)

[0716] CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAG
CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTA
CGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCAC
GTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTG
CAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCG
GAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGG
CCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCG
CGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTG
TAATTAGCGCTTGTTTAAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCC
CTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTG
CCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCGGGG
GGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCA
GGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTT
CGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCG

GGCGGGGCGGGCCGCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGCGGCCCGGAGCGCGGGCGGCTGTGCG
AGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAATCT
GTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGG
AAGGAAATGGGCGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCTCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCC
GCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTGGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAG
CCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCC
ACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGT
GGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTTCACCA
ACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCCTGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACCGGC
GAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCA
GATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCCACTACTACGGCAGCAGCCACT
GGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCA
CTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCC
TGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACACCTTTCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCC
TGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCAC
AAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCC
TGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAA
CCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC
GTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGAC
CGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAA
TGGCCAGCCAGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGC
TGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC
TACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCT
TACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCATTGCCCTGAGCCTGG
CTCTCGTGACCAACAGCGACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACC
ATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCCGGAAGGCCCTAAGGT
GCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCA
CCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACA
TTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGA
GCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGA
AAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGC
CTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGG
CCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTAAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTC
TAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTT
CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC
AGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCT
GACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG

GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

[0717] 示例性rAAV-贝伐单抗构建体序列(SEQ ID NO:94)

[0718] TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCT
TGTCGACGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT
AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCC
ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
CATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCA
ATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGG
GGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAA
AGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCG
TTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACA
GGTGAGCGGGGCGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGT
GGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG
TGTGTGCGTGAGCGCGCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTG
TGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA
GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGCGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGC
ACCCCCCTCCCCAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCC
GTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGA
GGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGT
GCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCCCTCT
AGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCCCGCGCCG
CCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGACGGGGCAGGGCGG
GGTTCCGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAG
CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTC
TCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGA
GACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGC
CTTGAATGGGTGCGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTT
CAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT
GCGCCAAGTATCCCCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTG
TCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGC
TCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCG
TGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCT
CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAA
GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTC
CTCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAG
GATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACA

GTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGT
GCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC
CAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTT
CTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGC
TGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAGCGGAA
GAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATA
GAATGCAGCTCCTGTCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAACAGCGACATCCAGATGACACAGAGCCCC
AGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTACCTGAA
CTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCCA
GCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCCTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAATCAAGCGGACTGTGGC
CGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCCTGTCTGA
ACAACCTTCTACCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGC
GTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAA
GCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAAT
GTAAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCCT
CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG
TGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG
GGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGA
GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTG
CCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

[0719] 示例性rAAV-贝伐单抗-GFP构建体序列 (SEQ ID NO: 107)

[0720] CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAG
CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTTCCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTA
CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCAC
GTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTG
CAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCG
GAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGG
CCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGTGCGTTGCCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTCG
CGCCGCCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTG
TAATTAGCGCTTGTTTAAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCC
CTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTG
CCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCGGG
GGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCA

GGGGGTGTGGGCGGGCGGTTCGGGCTGTAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTT
CGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCG
GGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGC
AGGCGCGGCAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCT
GTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGG
AAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCC
GCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAG
CCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCC
ACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGT
GGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTTCACCA
ACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACGGC
GAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCA
GATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCAAGTATCCCCACTACTACGGCAGCAGCCACT
GGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCA
CTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCC
TGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACACCTTTCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCC
TGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCAC
AAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCC
TGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCGTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAA
CCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC
GTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGAC
CGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAA
TGGCCAGCCAGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGC
TGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC
TACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCT
TACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCTGATTGCCCTGAGCCTGG
CTCTCGTGACCAACAGCGACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACC
ATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGT
GCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCA
CCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACA
TTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGA
GCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTGCTGTGCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGA
AAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGC
CTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCGAGG
CCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGG
TGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT
GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCCTCGTGAC

CACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCA
TGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG
TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA
CAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGT
TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC
GGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA
TCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGAGCTCG
CTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGG
AAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATT
CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGG
CTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT
CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
GAGCGAGCGAGCGCGCAG

[0721] 示例性rAAV-阿柏西普-PC构建体序列 (SEQ ID NO:95)

[0722] CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAG
CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGC GGCCGCACGCGTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTA
CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCAC
GTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTG
CAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCG
GAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGG
CCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTCG
CGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTG
TAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCC
CTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTG
CCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGG
GGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCA
GGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTT
CGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCG
GGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGCG
AGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAATCT
GTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGG
AAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGCGCGCGCCGCGGCTCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCC
GCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAG
CCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCC
ACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTAGCGATACCGGCAG

ACCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCCTGCA
GAGTGACAAGCCCCAACATCACCGTGACTCTGAAGAAGTTCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGAGAATC
ATCTGGGACAGCCGGAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAAGAGATCGGCCTGCTGACCTGTGAAGCCAC
CGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACACACAGACAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCC
CTAGCCACGGCATTGAACTGTCTGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGTACCGCCAGAACCAGCTGAACGTGGGC
ATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAAGAACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACCCAGAG
CGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCAGATCTGACCAGGGCCTGTACACAT
GTGCCGCCAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACCTTCGTGCGGGTGACGAGAAGGACAAGACCCACACC
TGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCT
GATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATT
GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAATAGCACCTACAGAGTG
GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCT
GCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACACTGCCTCCAA
GCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCGATATCGCCGTG
GAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGG
CCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGC
CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTC
CTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA
GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTC
AGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGGGCGACCAAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

[0723] 示例性rAAV-阿柏西普构建体序列(SEQ ID NO:96)

[0724] TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCTT
TGTCGACGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT
AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCC
ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
CATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCA
ATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGG
GGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAA
AGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCG
TTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACA
GGTGAGCGGGGCGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGT
GGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG
TGTGTGCGTGGGAGCGCCGCTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGGCGCGGGGGCTTTG
TGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA

GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGCGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGGCTGTAACCCCCCTGC
ACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCC
GTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGA
GGGGCGCGGCGGCCCCCGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGT
GCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCT
AGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCG
CCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGG
GGTTGCGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATTGTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAG
CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTC
TCTGGCCCTGGTCACCAATTCTAGCGATACCGGCAGACCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCC
ACATGACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCCTGCAGAGTGACAAGCCCCAACATCACCCTGACTCTGAAGAAGTTC
CCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGAGAATCATCTGGGACAGCCGAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCAC
CTACAAAGAGATCGGCCTGCTGACCTGTGAAGCCACCGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACACACA
GACAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCTAGCCACGGCATTGAAGTGTCTGTGGGCGAGAAGCTGGTG
CTGAAGTGTACCGCCAGAACCAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCCAGCAGCAAGCACCAGCA
CAAGAACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTGAGCACCTGACCATCG
ACGGCGTGACCAGATCTGACCAGGGCCTGTACACATGTGCCGCCAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACC
TTCGTGCGGGTGACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTC
CGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG
ATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAG
CCTAGAGAGGAACAGTACAATAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGG
CAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCC
AGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGC
CTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGAC
AACCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGACAAAGAGCAGATGGCAGC
AGGGCAACGTGTTGAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCT
CCTGGATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTG
CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAG
TAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG
CTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGA
TGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCGGGC
TTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

[0725] 多个AAV构建体组合物

[0726] 本公开认识到,一些编码蛋白质(例如,抗VEGF蛋白)的编码序列可以通过将编码序列分成多个部分来递送,所述多个部分各自包括在不同构建体中。在一些实施方案中,本文提供了包含至少两种不同构建体(例如,两种、三种、四种、五种或六种)的组合物或系统。在一些实施方案中,至少两种不同构建体中的每一种均包含编码编码区不同部分的编码序列(例如,编码靶蛋白,例如内耳靶蛋白,例如抗VEGF蛋白),每个编码部分为至少10个氨基酸(例如,至少约10个氨基酸、至少约20个氨基酸、至少约30个氨基酸、至少约60个氨基酸、

至少约70个氨基酸、至少约80个氨基酸、至少约90个氨基酸、至少约100个氨基酸、至少约110个氨基酸、至少约120个氨基酸、至少约130个氨基酸、至少约140个氨基酸、至少约150个氨基酸、至少约160个氨基酸、至少约170个氨基酸、至少约180个氨基酸、至少约190个氨基酸、至少约200个氨基酸、至少约210个氨基酸、至少至少约220个氨基酸、至少约230个氨基酸、至少约240个氨基酸、至少约250个氨基酸、至少约260个氨基酸、至少约270个氨基酸、至少约280个氨基酸、至少约290个氨基酸、至少约300个氨基酸、至少约310个氨基酸、至少约320个氨基酸、至少约330个氨基酸、至少约340个氨基酸、至少约350个氨基酸、至少约360个氨基酸、至少约370个氨基酸、至少约380个氨基酸、至少约390个氨基酸、至少约400个氨基酸、至少约410个氨基酸、至少约420个氨基酸、至少约430个氨基酸、至少约440个氨基酸、至少约450个氨基酸、至少至少约460个氨基酸、至少约470个氨基酸、至少约480个氨基酸、至少约490个氨基酸、至少约500个氨基酸、至少约510个氨基酸、至少约520个氨基酸、至少约530个氨基酸、至少约540个氨基酸、至少约550个氨基酸、至少约560个氨基酸、至少约570个氨基酸、至少约580个氨基酸、至少约590个氨基酸、至少约600个氨基酸、至少约610个氨基酸、至少约620个氨基酸、至少约630个氨基酸、至少约640个氨基酸、至少约650个氨基酸、至少约660个氨基酸、至少约670个氨基酸、至少约680个氨基酸、至少约690个氨基酸、至少约700个氨基酸、至少约710个氨基酸、至少约720个氨基酸、至少约730个氨基酸、至少约740个氨基酸、至少约750个氨基酸、至少约760个氨基酸、至少约770个氨基酸、至少约780个氨基酸、至少约790个氨基酸、至少约800个氨基酸、至少约810个氨基酸或至少约820个氨基酸), 其中每个编码的部分的氨基酸序列可以任选地与一个不同编码的部分的氨基酸序列部分地重叠; 至少两种不同构建体中并没有单个构建体编码活性靶蛋白; 且当引入到受试者细胞(例如动物细胞, 例如灵长类动物细胞, 例如人细胞)中时, 至少两种不同构建体可以彼此进行同源重组, 其中重组核酸编码活性靶蛋白(例如, 抗VEGF蛋白)。在一些实施方案中, 核酸构建体中的一者可包括编码靶蛋白(例如抗VEGF蛋白)的一部分的编码序列, 其中所述编码的部分为至多约820个氨基酸(例如, 至多约10个氨基酸、至多约20个氨基酸、至多约30个氨基酸、至多约60个氨基酸、至多约70个氨基酸、至多约80个氨基酸、至多约90个氨基酸、至多约100个氨基酸、至多约110个氨基酸、至多约120个氨基酸、至多约130个氨基酸、至多约140个氨基酸、至多约150个氨基酸、至多约160个氨基酸、至多约170个氨基酸、至多约180个氨基酸、至多约190个氨基酸、至多约200个氨基酸、至多约210个氨基酸、至多约220个氨基酸、至多约230个氨基酸、至多约240个氨基酸、至多约250个氨基酸、至多约260个氨基酸、至多约270个氨基酸、至多约280个氨基酸、至多约290个氨基酸、至多约300个氨基酸、至多约310个氨基酸、至多约320个氨基酸、至多约330个氨基酸、至多约340个氨基酸、至多约350个氨基酸、至多约360个氨基酸、至多约370个氨基酸、至多约380个氨基酸、至多约390个氨基酸、至多约400个氨基酸、至多约410个氨基酸、至多约420个氨基酸、至多约430个氨基酸、至多约440个氨基酸、至多约450个氨基酸、至多约460个氨基酸、至多约470个氨基酸、至多约480个氨基酸、至多约490个氨基酸、至多约500个氨基酸、至多约510个氨基酸、至多约520个氨基酸、至多约530个氨基酸、至多约540个氨基酸、至多约550个氨基酸、至多约560个氨基酸、至多约570个氨基酸、至多约580个氨基酸、至多约590个氨基酸、至多约600个氨基酸、至多约610个氨基酸、至多约620个氨基酸、至多约630个氨基酸、至多约640个氨基酸、至多约650个氨基酸、至多约660个氨基酸、至多约670个氨基酸、至多约680个氨基酸、至多约690个

氨基酸、至多约700个氨基酸、至多约710个氨基酸、至多约720个氨基酸、至多约730个氨基酸、至多约740个氨基酸、至多约750个氨基酸、至多约760个氨基酸、至多约770个氨基酸、至多约780个氨基酸、至多约790个氨基酸、至多约800个氨基酸、至多约810个氨基酸或至多约820个氨基酸)。

[0727] 在一些实施方案中,每个构建体的编码的部分的氨基酸序列与一个不同编码的部分的氨基酸序列不重叠,甚至不部分地重叠。在一些实施方案中,构建体的编码的部分的氨基酸序列与不同构建体的编码的部分的氨基酸序列部分地重叠。在一些实施方案中,每个构建体的编码的部分的氨基酸序列与至少一种不同构建体的编码的部分的氨基酸序列部分地重叠。在一些实施方案中,重叠氨基酸序列在约10个氨基酸残基至约820个氨基酸之间,或此范围的任何子范围(例如,长度为约10个氨基酸、约20个氨基酸、约30个氨基酸、约60个氨基酸、约70个氨基酸、约80个氨基酸、约90个氨基酸、约100个氨基酸、约110个氨基酸、约120个氨基酸、约130个氨基酸、约140个氨基酸、约150个氨基酸、约160个氨基酸、约170个氨基酸、约180个氨基酸、约190个氨基酸、约200个氨基酸、约210个氨基酸、约220个氨基酸、约230个氨基酸、约240个氨基酸、约250个氨基酸、约260个氨基酸、约270个氨基酸、约280个氨基酸、约290个氨基酸、约300个氨基酸、约310个氨基酸、约320个氨基酸、约330个氨基酸、约340个氨基酸、约350个氨基酸、约360个氨基酸、约370个氨基酸、约380个氨基酸、约390个氨基酸、约400个氨基酸、约410个氨基酸、约420个氨基酸、约430个氨基酸、约440个氨基酸、约450个氨基酸、约460个氨基酸、约470个氨基酸、约480个氨基酸、约490个氨基酸、约500个氨基酸、约510个氨基酸、约520个氨基酸、约530个氨基酸、约540个氨基酸、约550个氨基酸、约560个氨基酸、约570个氨基酸、约580个氨基酸、约590个氨基酸、约600个氨基酸、约610个氨基酸、约620个氨基酸、约630个氨基酸、约640个氨基酸、约650个氨基酸、约660个氨基酸、约670个氨基酸、约680个氨基酸、约690个氨基酸、约700个氨基酸、约710个氨基酸、约720个氨基酸、约730个氨基酸、约740个氨基酸、约750个氨基酸、约760个氨基酸、约770个氨基酸、约780个氨基酸、约790个氨基酸、约800个氨基酸、约810个氨基酸或约820个氨基酸)。

[0728] 在一些实例中,所需基因产物(例如,治疗性基因产物)由至少两种不同构建体编码。在一些实施方案中,至少两种不同构建体中的每一者均包含潜在编码区的不同区段,其中编码区可以包含或不包含非编码序列,诸如内含子和/或调控区。在一些实施方案中,至少两种不同构建体转导相同细胞。在一些实施方案中,转导的细胞转录且翻译两种不同构建体。在一些实施方案中,翻译的多肽然后可以在三级和/或四级结构水平上组合以产生功能性抗VEGF蛋白。例如,在一些实施方案中,雷珠单抗轻链和雷珠单抗重链在至少两种不同构建体上编码,且在翻译之后以本文所述和本领域已知的方式组合以形成雷珠单抗蛋白。

[0729] 在一些实施方案中,本文所述的包含抗VEGF基因的组合物包括天然存在和/或合成的内含子序列。内含子可以包括存在于内源基因组DNA序列(例如,内耳细胞靶基因组DNA(例如,VEGF和/或VEGF-R基因组DNA序列)中的内含子的核苷酸序列。在一些实施方案中,不同内含子区段重叠。在一些实施方案中,不同内含子区段序列重叠的长度至多约12,000个核苷酸(例如,至多约100个核苷酸、至多约200个核苷酸、至多约300个核苷酸、至多约600个核苷酸、至多约700个核苷酸、至多约800个核苷酸、至多约900个核苷酸、至多约1,000个核苷酸、至多约1,100个核苷酸、至多约1,200个核苷酸、至多约1,300个核苷酸、至多约1,400个核苷酸、至多约1,500个核苷酸、至多约1,600个核苷酸、至多约1,700个核苷酸、至多约1,

800个核苷酸、至多约1,900个核苷酸、至多约2,000个核苷酸、至多约2,100个核苷酸、至多约2,200个核苷酸、至多约2,300个核苷酸、至多约2,400个核苷酸、至多约2,500个核苷酸、至多约2,600个核苷酸、至多约2,700个核苷酸、至多约2,800个核苷酸、至多约2,900个核苷酸、至多约3,000个核苷酸、至多约3,100个核苷酸、至多约3,200个核苷酸、至多约3,300个核苷酸、至多约3,400个核苷酸、至多约3,500个核苷酸、至多约3,600个核苷酸、至多约3,700个核苷酸、至多约3,800个核苷酸、至多约3,900个核苷酸、至多约4,000个核苷酸、至多约4,100个核苷酸、至多约4,200个核苷酸、至多约4,300个核苷酸、至多约4,400个核苷酸、至多约4,500个核苷酸、至多约4,600个核苷酸、至多约4,700个核苷酸、至多约4,800个核苷酸、至多约4,900个核苷酸、至多约5,000个核苷酸、至多约5,100个核苷酸、至多约5,200个核苷酸、至多约5,300个核苷酸、至多约5,400个核苷酸、至多约5,500个核苷酸、至多约5,600个核苷酸、至多约5,700个核苷酸、至多约5,800个核苷酸、至多约5,900个核苷酸、至多约6,000个核苷酸、至多约6,100个核苷酸、至多约6,200个核苷酸、至多约6,300个核苷酸、至多约6,400个核苷酸、至多约6,500个核苷酸、至多约6,600个核苷酸、至多约6,700个核苷酸、至多约6,800个核苷酸、至多约6,900个核苷酸、至多约7,000个核苷酸、至多约7,100个核苷酸、至多约7,200个核苷酸、至多约7,300个核苷酸、至多约7,400个核苷酸、至多约7,500个核苷酸、至多约7,600个核苷酸、至多约7,700个核苷酸、至多约7,800个核苷酸、至多约7,900个核苷酸、至多约8,000个核苷酸、至多约8,100个核苷酸、至多约8,200个核苷酸、至多约8,300个核苷酸、至多约8,400个核苷酸、至多约8,500个核苷酸、至多约8,600个核苷酸、至多约8,700个核苷酸、至多约8,800个核苷酸、至多约8,900个核苷酸、至多约9,000个核苷酸、至多约9,100个核苷酸、至多约9,200个核苷酸、至多约9,300个核苷酸、至多约9,400个核苷酸、至多约9,500个核苷酸、至多约9,600个核苷酸、至多约9,700个核苷酸、至多约9,800个核苷酸、至多约9,900个核苷酸、至多约10,000个核苷酸、至多约10,100个核苷酸、至多约10,200个核苷酸、至多约10,300个核苷酸、至多约10,400个核苷酸、至多约10,500个核苷酸、至多约10,600个核苷酸、至多约10,700个核苷酸、至多约10,800个核苷酸、至多约10,900个核苷酸、至多约11,000个核苷酸、至多约11,100个核苷酸、至多约11,200个核苷酸、至多约11,300个核苷酸、至多约11,400个核苷酸、至多约11,500个核苷酸、至多约11,600个核苷酸、至多约11,700个核苷酸、至多约11,800个核苷酸、至多约11,900个核苷酸或至多约12,000个核苷酸)。在一些实施方案中,任何两种不同构建体中的重叠核苷酸序列可包括靶基因(例如抗VEGF基因)的一个或多个外显子的部分或全部。

[0730] 在一些实施方案中,组合物或系统为或包含两种、三种、四种或五种不同构建体。在组合物中不同构建体的数目为两种的组合物中,两种不同构建体中的第一者可以包括编码蛋白质(例如,抗VEGF蛋白)的N端部分的编码序列,其可以称为前导部分、第一构建体或5'部分(例如至少两条抗体链之一,例如编码重链可变区和/或轻链可变区的序列)。在一些实例中,靶基因的N端部分的长度为至少约10个氨基酸(例如,至少约10个氨基酸、至少约20个氨基酸、至少约30个氨基酸、至少约60个氨基酸、至少约70个氨基酸、至少约80个氨基酸、至少约90个氨基酸、至少约100个氨基酸、至少约110个氨基酸、至少约120个氨基酸、至少约130个氨基酸、至少约140个氨基酸、至少约150个氨基酸、至少约160个氨基酸、至少约170个氨基酸、至少约180个氨基酸、至少约190个氨基酸、至少约200个氨基酸、至少约210个氨基酸、至少约220个氨基酸、至少约230个氨基酸、至少约240个氨基酸、至少约250个氨基酸、至

少约260个氨基酸、至少约270个氨基酸、至少约280个氨基酸、至少约290个氨基酸、至少约300个氨基酸、至少约310个氨基酸、至少约320个氨基酸、至少约330个氨基酸、至少约340个氨基酸、至少约350个氨基酸、至少约360个氨基酸、至少约370个氨基酸、至少约380个氨基酸、至少约390个氨基酸、至少约400个氨基酸、至少约410个氨基酸、至少约420个氨基酸、至少约430个氨基酸、至少约440个氨基酸、至少约450个氨基酸、至少约460个氨基酸、至少约470个氨基酸、至少约480个氨基酸、至少约490个氨基酸、至少约500个氨基酸、至少约510个氨基酸、至少约520个氨基酸、至少约530个氨基酸、至少约540个氨基酸、至少约550个氨基酸、至少约560个氨基酸、至少约570个氨基酸、至少约580个氨基酸、至少约590个氨基酸、至少约600个氨基酸、至少约610个氨基酸、至少约620个氨基酸、至少约630个氨基酸、至少约640个氨基酸、至少约650个氨基酸、至少约660个氨基酸、至少约670个氨基酸、至少约680个氨基酸、至少约690个氨基酸、至少约700个氨基酸、至少约710个氨基酸、至少约720个氨基酸、至少约730个氨基酸、至少约740个氨基酸、至少约750个氨基酸、至少约760个氨基酸、至少约770个氨基酸、至少约780个氨基酸、至少约790个氨基酸、至少约800个氨基酸、至少约810个氨基酸或至少约820个氨基酸)。在一些实例中,第一构建体包含启动子(例如,本文所述或本领域中已知的任何启动子)和Kozak序列(例如,本文所述或本领域中已知的任何示例性Kozak序列)中的一者或两者。在一些实例中,第一构建体包含作为诱导型启动子、组成型启动子或组织特异性启动子的启动子。在一些实例中,两种不同构建体中的第二者包含编码蛋白质的C端部分的编码序列,所述C端部分可以称为末端部分、第二构建体或3'部分(例如,至少两条抗体链之一,例如编码重链可变区和/或轻链可变区的序列)。在一些实例中,靶蛋白的C端部分的长度为至少约10个氨基酸(例如,至少约10个氨基酸、至少约20个氨基酸、至少约30个氨基酸、至少约60个氨基酸、至少约70个氨基酸、至少约80个氨基酸、至少约90个氨基酸、至少约100个氨基酸、至少约110个氨基酸、至少约120个氨基酸、至少约130个氨基酸、至少约140个氨基酸、至少约150个氨基酸、至少约160个氨基酸、至少约170个氨基酸、至少约180个氨基酸、至少约190个氨基酸、至少约200个氨基酸、至少约210个氨基酸、至少约220个氨基酸、至少约230个氨基酸、至少约240个氨基酸、至少约250个氨基酸、至少约260个氨基酸、至少约270个氨基酸、至少约280个氨基酸、至少约290个氨基酸、至少约300个氨基酸、至少约310个氨基酸、至少约320个氨基酸、至少约330个氨基酸、至少约340个氨基酸、至少约350个氨基酸、至少约360个氨基酸、至少约370个氨基酸、至少约380个氨基酸、至少约390个氨基酸、至少约400个氨基酸、至少约410个氨基酸、至少约420个氨基酸、至少约430个氨基酸、至少约440个氨基酸、至少约450个氨基酸、至少约460个氨基酸、至少约470个氨基酸、至少约480个氨基酸、至少约490个氨基酸、至少约500个氨基酸、至少约510个氨基酸、至少约520个氨基酸、至少约530个氨基酸、至少约540个氨基酸、至少约550个氨基酸、至少约560个氨基酸、至少约570个氨基酸、至少约580个氨基酸、至少约590个氨基酸、至少约600个氨基酸、至少约610个氨基酸、至少约620个氨基酸、至少约630个氨基酸、至少约640个氨基酸、至少约650个氨基酸、至少约660个氨基酸、至少约670个氨基酸、至少约680个氨基酸、至少约690个氨基酸、至少约700个氨基酸、至少约710个氨基酸、至少约720个氨基酸、至少约730个氨基酸、至少约740个氨基酸、至少约750个氨基酸、至少约760个氨基酸、至少约770个氨基酸、至少约780个氨基酸、至少约790个氨基酸、至少约800个氨基酸、至少约810个氨基酸或至少约820个氨基酸)。在一些实例中,第二构建体还包含poly(A)序列。

[0731] 在组合物中不同构建体的数目为两种的一些实例中,由两个构建体之一编码的N端部分可包括一个部分,所述部分包括抗VEGF蛋白(例如,SEQ ID NO:16、17、18、20、21、23、和/或43)的氨基酸位置1至约氨基酸位置820或此范围的任何子范围(例如,氨基酸1至至少约氨基酸10、氨基酸1至至少约氨基酸20、氨基酸1至至少约氨基酸30、氨基酸1至至少约氨基酸60、氨基酸1至至少约氨基酸70、氨基酸1至至少约氨基酸80、氨基酸1至至少约氨基酸90、氨基酸1至至少约氨基酸100、氨基酸1至至少约氨基酸110、氨基酸1至至少约氨基酸120、氨基酸1至至少约氨基酸130、氨基酸1至至少约氨基酸140、氨基酸1至至少约氨基酸150、氨基酸1至至少约氨基酸160、氨基酸1至至少约氨基酸170、氨基酸1至至少约氨基酸180、氨基酸1至至少约氨基酸190、氨基酸1至至少约氨基酸200、氨基酸1至至少约氨基酸210、氨基酸1至至少约氨基酸220、氨基酸1至至少约氨基酸230、氨基酸1至至少约氨基酸240、氨基酸1至至少约氨基酸250、氨基酸1至至少约氨基酸260、氨基酸1至至少约氨基酸270、氨基酸1至至少约氨基酸280、氨基酸1至至少约氨基酸290、氨基酸1至至少约氨基酸300、氨基酸1至至少约氨基酸310、氨基酸1至至少约氨基酸320、氨基酸1至至少约氨基酸330、氨基酸1至至少约氨基酸340、氨基酸1至至少约氨基酸350、氨基酸1至至少约氨基酸360、氨基酸1至至少约氨基酸370、氨基酸1至至少约氨基酸380、氨基酸1至至少约氨基酸390、氨基酸1至至少约氨基酸400、氨基酸1至至少约氨基酸410、氨基酸1至至少约氨基酸420、氨基酸1至至少约氨基酸430、氨基酸1至至少约氨基酸440、氨基酸1至至少约氨基酸450、氨基酸1至至少约氨基酸460、氨基酸1至至少约氨基酸470、氨基酸1至至少约氨基酸480、氨基酸1至至少约氨基酸490、氨基酸1至至少约氨基酸500、氨基酸1至至少约氨基酸510、氨基酸1至至少约氨基酸520、氨基酸1至至少约氨基酸530、氨基酸1至至少约氨基酸540、氨基酸1至至少约氨基酸550、氨基酸1至至少约氨基酸560、氨基酸1至至少约氨基酸570、氨基酸1至至少约氨基酸580、氨基酸1至至少约氨基酸590、氨基酸1至至少约氨基酸600、氨基酸1至至少约氨基酸610、氨基酸1至至少约氨基酸620、氨基酸1至至少约氨基酸630、氨基酸1至至少约氨基酸640、氨基酸1至至少约氨基酸650、氨基酸1至至少约氨基酸660、氨基酸1至至少约氨基酸670、氨基酸1至至少约氨基酸680、氨基酸1至至少约氨基酸690、氨基酸1至至少约氨基酸700、氨基酸1至至少约氨基酸710、氨基酸1至至少约氨基酸720、氨基酸1至至少约氨基酸730、氨基酸1至至少约氨基酸740、氨基酸1至至少约氨基酸750、氨基酸1至至少约氨基酸760、氨基酸1至至少约氨基酸770、氨基酸1至至少约氨基酸780、氨基酸1至至少约氨基酸790、氨基酸1至至少约氨基酸800、氨基酸1至至少约氨基酸810或氨基酸1至至少约氨基酸820)。在组合物中不同构建体的数目为两种的一些实例中,前体抗VEGF蛋白的N端部分可包括一个部分,所述部分包括抗VEGF蛋白(例如,SEQ ID NO:16、17、18、20、21、23、和/或43)的至多氨基酸位置1至氨基酸位置820或此范围的任何子范围(例如,氨基酸1至至多约氨基酸10、氨基酸1至至多约氨基酸20、氨基酸1至至多约氨基酸30、氨基酸1至至多约氨基酸60、氨基酸1至至多约氨基酸70、氨基酸1至至多约氨基酸80、氨基酸1至至多约氨基酸90、氨基酸1至至多约氨基酸100、氨基酸1至至多约氨基酸110、氨基酸1至至多约氨基酸120、氨基酸1至至多约氨基酸130、氨基酸1至至多约氨基酸140、氨基酸1至至多约氨基酸150、氨基酸1至至多约氨基酸160、氨基酸1至至多约氨基酸170、氨基酸1至至多约氨基酸180、氨基酸1至至多约氨基酸190、氨基酸1至至多约氨基酸200、氨基酸1至至多约氨基酸210、氨基酸1至至多约氨基酸220、氨基酸1至至多约氨基酸230、氨基酸1至至

多约氨基酸240、氨基酸1至至多约氨基酸250、氨基酸1至至多约氨基酸260、氨基酸1至至多约氨基酸270、氨基酸1至至多约氨基酸280、氨基酸1至至多约氨基酸290、氨基酸1至至多约氨基酸300、氨基酸1至至多约氨基酸310、氨基酸1至至多约氨基酸320、氨基酸1至至多约氨基酸330、氨基酸1至至多约氨基酸340、氨基酸1至至多约氨基酸350、氨基酸1至至多约氨基酸360、氨基酸1至至多约氨基酸370、氨基酸1至至多约氨基酸380、氨基酸1至至多约氨基酸390、氨基酸1至至多约氨基酸400、氨基酸1至至多约氨基酸410、氨基酸1至至多约氨基酸420、氨基酸1至至多约氨基酸430、氨基酸1至至多约氨基酸440、氨基酸1至至多约氨基酸450、氨基酸1至至多约氨基酸460、氨基酸1至至多约氨基酸470、氨基酸1至至多约氨基酸480、氨基酸1至至多约氨基酸490、氨基酸1至至多约氨基酸500、氨基酸1至至多约氨基酸510、氨基酸1至至多约氨基酸520、氨基酸1至至多约氨基酸530、氨基酸1至至多约氨基酸540、氨基酸1至至多约氨基酸550、氨基酸1至至多约氨基酸560、氨基酸1至至多约氨基酸570、氨基酸1至至多约氨基酸580、氨基酸1至至多约氨基酸590、氨基酸1至至多约氨基酸600、氨基酸1至至多约氨基酸610、氨基酸1至至多约氨基酸620、氨基酸1至至多约氨基酸630、氨基酸1至至多约氨基酸640、氨基酸1至至多约氨基酸650、氨基酸1至至多约氨基酸660、氨基酸1至至多约氨基酸670、氨基酸1至至多约氨基酸680、氨基酸1至至多约氨基酸690、氨基酸1至至多约氨基酸700、氨基酸1至至多约氨基酸710、氨基酸1至至多约氨基酸720、氨基酸1至至多约氨基酸730、氨基酸1至至多约氨基酸740、氨基酸1至至多约氨基酸750、氨基酸1至至多约氨基酸760、氨基酸1至至多约氨基酸770、氨基酸1至至多约氨基酸780、氨基酸1至至多约氨基酸790、氨基酸1至至多约氨基酸800、氨基酸1至至多约氨基酸810或氨基酸1至至多约氨基酸820)。

[0732] 在组合物中不同构建体的数目为两种的一些实例中,由两种构建体之一编码的C端部分可包括一个部分,所述部分包括抗VEGF蛋白(例如,SEQ ID NO:16、17、18、20、21、23、和/或43)的最终氨基酸(例如约氨基酸位置820)至约氨基酸位置1或此范围的任何子范围(例如,氨基酸820至至少约氨基酸10、氨基酸820至至少约氨基酸20、氨基酸820至至少约氨基酸30、氨基酸820至至少约氨基酸60、氨基酸820至至少约氨基酸70、氨基酸820至至少约氨基酸80、氨基酸820至至少约氨基酸90、氨基酸820至至少约氨基酸100、氨基酸820至至少约氨基酸110、氨基酸820至至少约氨基酸120、氨基酸820至至少约氨基酸130、氨基酸820至至少约氨基酸140、氨基酸820至至少约氨基酸150、氨基酸820至至少约氨基酸160、氨基酸820至至少约氨基酸170、氨基酸820至至少约氨基酸180、氨基酸820至至少约氨基酸190、氨基酸820至至少约氨基酸200、氨基酸820至至少约氨基酸210、氨基酸820至至少约氨基酸220、氨基酸820至至少约氨基酸230、氨基酸820至至少约氨基酸240、氨基酸820至至少约氨基酸250、氨基酸820至至少约氨基酸260、氨基酸820至至少约氨基酸270、氨基酸820至至少约氨基酸280、氨基酸820至至少约氨基酸290、氨基酸820至至少约氨基酸300、氨基酸820至至少约氨基酸310、氨基酸820至至少约氨基酸320、氨基酸820至至少约氨基酸330、氨基酸820至至少约氨基酸340、氨基酸820至至少约氨基酸350、氨基酸820至至少约氨基酸360、氨基酸820至至少约氨基酸370、氨基酸820至至少约氨基酸380、氨基酸820至至少约氨基酸390、氨基酸820至至少约氨基酸400、氨基酸820至至少约氨基酸410、氨基酸820至至少约氨基酸420、氨基酸820至至少约氨基酸430、氨基酸820至至少约氨基酸440、氨基酸820至至少约氨基酸450、氨基酸820至至少约氨基酸460、氨基酸820至至少约氨基酸470、氨基酸820至

至少约氨基酸480、氨基酸820至至少约氨基酸490、氨基酸820至至少约氨基酸500、氨基酸820至至少约氨基酸510、氨基酸820至至少约氨基酸520、氨基酸820至至少约氨基酸530、氨基酸820至至少约氨基酸540、氨基酸820至至少约氨基酸550、氨基酸820至至少约氨基酸560、氨基酸820至至少约氨基酸570、氨基酸820至至少约氨基酸580、氨基酸820至至少约氨基酸590、氨基酸820至至少约氨基酸600、氨基酸820至至少约氨基酸610、氨基酸820至至少约氨基酸620、氨基酸820至至少约氨基酸630、氨基酸820至至少约氨基酸640、氨基酸820至至少约氨基酸650、氨基酸820至至少约氨基酸660、氨基酸820至至少约氨基酸670、氨基酸820至至少约氨基酸680、氨基酸820至至少约氨基酸690、氨基酸820至至少约氨基酸700、氨基酸820至至少约氨基酸710、氨基酸820至至少约氨基酸720、氨基酸820至至少约氨基酸730、氨基酸820至至少约氨基酸740、氨基酸820至至少约氨基酸750、氨基酸820至至少约氨基酸760、氨基酸820至至少约氨基酸770、氨基酸820至至少约氨基酸780、氨基酸820至至少约氨基酸790、氨基酸820至至少约氨基酸800、氨基酸820至至少约氨基酸810或氨基酸820至至少约氨基酸820)。在组合物中不同构建体的数目为两种的一些实例中,前体抗VEGF蛋白的C端部分可包括一个部分,所述部分包括抗VEGF蛋白(例如,SEQ ID NO:16、17、18、20、21、23和/或43)的最终氨基酸(例如约氨基酸位置820)至至多约氨基酸位置1或此范围的任何子范围(例如,氨基酸820至至多约氨基酸10、氨基酸820至至多约氨基酸20、氨基酸820至至多约氨基酸30、氨基酸820至至多约氨基酸60、氨基酸820至至多约氨基酸70、氨基酸820至至多约氨基酸80、氨基酸820至至多约氨基酸90、氨基酸820至至多约氨基酸100、氨基酸820至至多约氨基酸110、氨基酸820至至多约氨基酸120、氨基酸820至至多约氨基酸130、氨基酸820至至多约氨基酸140、氨基酸820至至多约氨基酸150、氨基酸820至至多约氨基酸160、氨基酸820至至多约氨基酸170、氨基酸820至至多约氨基酸180、氨基酸820至至多约氨基酸190、氨基酸820至至多约氨基酸200、氨基酸820至至多约氨基酸210、氨基酸820至至多约氨基酸220、氨基酸820至至多约氨基酸230、氨基酸820至至多约氨基酸240、氨基酸820至至多约氨基酸250、氨基酸820至至多约氨基酸260、氨基酸820至至多约氨基酸270、氨基酸820至至多约氨基酸280、氨基酸820至至多约氨基酸290、氨基酸820至至多约氨基酸300、氨基酸820至至多约氨基酸310、氨基酸820至至多约氨基酸320、氨基酸820至至多约氨基酸330、氨基酸820至至多约氨基酸340、氨基酸820至至多约氨基酸350、氨基酸820至至多约氨基酸360、氨基酸820至至多约氨基酸370、氨基酸820至至多约氨基酸380、氨基酸820至至多约氨基酸390、氨基酸820至至多约氨基酸400、氨基酸820至至多约氨基酸410、氨基酸820至至多约氨基酸420、氨基酸820至至多约氨基酸430、氨基酸820至至多约氨基酸440、氨基酸820至至多约氨基酸450、氨基酸820至至多约氨基酸460、氨基酸820至至多约氨基酸470、氨基酸820至至多约氨基酸480、氨基酸820至至多约氨基酸490、氨基酸820至至多约氨基酸500、氨基酸820至至多约氨基酸510、氨基酸820至至多约氨基酸520、氨基酸820至至多约氨基酸530、氨基酸820至至多约氨基酸540、氨基酸820至至多约氨基酸550、氨基酸820至至多约氨基酸560、氨基酸820至至多约氨基酸570、氨基酸820至至多约氨基酸580、氨基酸820至至多约氨基酸590、氨基酸820至至多约氨基酸600、氨基酸820至至多约氨基酸610、氨基酸820至至多约氨基酸620、氨基酸820至至多约氨基酸630、氨基酸820至至多约氨基酸640、氨基酸820至至多约氨基酸650、氨基酸820至至多约氨基酸660、氨基酸820至至多约氨基酸670、氨基酸820至至多约氨基酸680、氨基酸820至至多约氨基酸690、氨基酸820至至多约氨

基酸700、氨基酸820至至多约氨基酸710、氨基酸820至至多约氨基酸720、氨基酸820至至多约氨基酸730、氨基酸820至至多约氨基酸740、氨基酸820至至多约氨基酸750、氨基酸820至至多约氨基酸760、氨基酸820至至多约氨基酸770、氨基酸820至至多约氨基酸780、氨基酸820至至多约氨基酸790、氨基酸820至至多约氨基酸800、氨基酸820至至多约氨基酸810或氨基酸820至至多约氨基酸820或在其之间的任何长度序列。

[0733] 在一些实施方案中,剪接位点参与反式剪接。在一些实施方案中,剪接供体位点(Trapani等人EMBO Mol.Med.6(2):194-211,2014,其以引用方式整体并入本文)在N端构建体中的编码序列之后。在C端构建体中,剪接受体位点可以恰好在抗VEGF基因的第二部分的编码序列之前进行亚克隆。在一些实施方案中,在编码序列内,可引入沉默突变,产生用于限制性消化的另一位点。

[0734] 在一些实施方案中,本文提供的任何构建体都可包括在适用于向动物施用以改善与以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)相关的症状的组合物中。

[0735] 药物组合物

[0736] 在某些实施方案中,本公开的组合物涉及一种单独稀释剂药物产品(AAV稀释剂药物产品),其在组成上与rAAV-抗VEGF制剂缓冲液相当或接近。在某些实施方案中,稀释剂药物产品将被制造、进行无菌过滤(0.2 μ m过滤器),且被无菌填充到一次性使用的小瓶中。

[0737] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含磷酸氢二钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至少1mM、至少2mM、至少3mM、至少4mM、至少5mM、至少6mM、至少7mM或至少8mM磷酸氢二钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至多15mM、至多14mM、至多13mM、至多12mM、至多11mM或至多10mM磷酸氢二钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含5-12mM、6-10mM或7-9mM磷酸氢二钠。

[0738] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含磷酸二氢钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至少0.1mM、至少0.2mM、至少0.3mM、至少0.4mM、至少0.5mM、至少0.6mM、至少0.7mM、至少0.8mM、至少0.9mM、至少1.0mM、至少1.1mM、至少1.2mM、至少1.3mM、至少1.4mM或至少1.5mM磷酸二氢钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至多2.0mM、至多1.9mM、至多1.8mM、至多1.7mM、至多1.6mM或至多1.5mM磷酸二氢钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含0.5-2.0mM或1.0-2.0mM磷酸二氢钾。

[0739] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含氯化钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至少1.5mM、至少1.6mM、至少1.7mM、至少1.8mM、至少1.9mM、至少2.0mM、至少2.1mM、至少2.2mM、至少2.3mM、至少2.4mM、至少2.5mM、至少2.6mM或至少2.7mM氯化钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至多3.5mM、至多3.4mM、至多3.3mM、至多3.2mM、至多3.1mM、至多3.0mM、至多2.9mM或至多2.8mM氯化钾。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含2.0-3.5mM或2.5-3.0mM氯化钾。

[0740] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含氯化钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至少50mM、至少75mM、至少100mM、至少110mM、至少120mM、至少130mM、至少140mM、至少150mM、至少160mM或至少170mM氯化钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至多250mM、至多240mM、至多230mM、至多220mM、至多210mM、至多200mM、至多190mM或至多180mM氯化钠。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含150-250mM或150-200mM氯化钠。

[0741] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含泊洛沙姆188。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至少0.0005%、至少0.0006%、至少0.0007%、至少0.0008%、至少0.0009%或至少0.001%泊洛沙姆188(vo/vol%)。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含至多0.002%、至多0.0019%、至多0.0018%、至多0.0017%、至多0.0016%、至多0.0015%、至多0.0014%、至多0.0013%、至多0.0012%、至多0.0011%或至多0.001%泊洛沙姆188(vo/vol%)。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含0.0005-0.002%或0.0005-0.0015%泊洛沙姆188(vo/vol%)。

[0742] 在某些实施方案中,制剂缓冲液包含含有1.5mM磷酸二氢钾、8.1mM磷酸氢二钠、2.7mM氯化钾、172mM氯化钠和0.001%泊洛沙姆188(vo/vol%)的无菌水。在某些实施方案中,稀释剂药物产品将用于制备描述用于感兴趣的哺乳动物(例如,有需要的人)的剂量所需的浓度。

[0743] 除其他外,本公开提供了药物组合物。在一些实施方案中,本文提供的组合物适用于向动物施用以改善与以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)相关的症状。

[0744] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物可包含例如多核苷酸,例如像本文所述的一种或多种构建体。在一些实施方案中,药物组合物可包含如本文所述的一种或多种AAV颗粒,例如由一种或多种AAV血清型衣壳包裹的一种或多种rAAV构建体。

[0745] 在一些实施方案中,药物组合物包含一种或多种药学上或生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”包含与药物施用相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂、抗真菌剂等。补充活性化合物也可并入本文所述的任何组合物中。此类组合物可包含一种或多种缓冲剂,诸如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;一种或多种碳水化合物,诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖和葡聚糖;甘露糖醇;一种或多种蛋白质、多肽或氨基酸,诸如甘氨酸;一种或多种抗氧化剂;一种或多种螯合剂,诸如EDTA或谷胱甘肽;和/或一种或多种防腐剂。在一些实施方案中,制剂呈剂型,诸如可注射溶液、可注射凝胶、药物释放胶囊等。

[0746] 在一些实施方案中,本公开的组合物被配制以用于静脉内施用。在一些实施方案中,本公开的组合物被配制以用于耳蜗内施用。在一些实施方案中,治疗组合物被配制以包含脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、小环DNA和/或CELId DNA。

[0747] 在一些实施方案中,治疗组合物被配制以包含合成外淋巴溶液。例如,在一些实施方案中,合成外淋巴溶液包含20-200mM NaCl;1-5mM KCl;0.1-10mM CaCl₂;1-10mM葡萄糖;和2-50mM HEPES,其中pH在约6与约9之间。在一些实施方案中,将治疗组合物以适当稀释度在生理学上可接受的溶液(例如,人工外淋巴包含NaCl,120mM;KCl,3.5mM;CaCl₂,1.5mM;葡萄糖,5.5mM;HEPES,20mM,用NaOH滴定以将其pH调节至7.5(Na⁺总浓度为130mM),如Chen等人,J Controlled Rel.110:1-19,2005中所述,其以引用方式整体并入本文)中进行配制。在一些实施方案中,治疗组合物被配制以包含生理学上合适的溶液。例如,在一些实施方案中,生理学上合适的溶液包含市售的具有泊洛沙姆188的1xPBS,其被制备成终浓度为:8.10mM磷酸氢二钠、1.5mM磷酸二氢钾、2.7mM氯化钾、172mM氯化钠和0.001%泊洛沙姆188(vo/vol%)。如本领域技术人员所理解的,泊洛沙姆188也称为普朗尼克酸F68。在一些实施方案中,利用替代性普朗尼克酸。在一些实施方案中,利用替代性离子浓度。

[0748] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含约5-15mM磷酸氢二钠;约20-

200mM氯化钠;约1-5mM氯化钾;约1-5mM磷酸二氢钾;和约0.0005%至0.005%泊洛沙姆-188(vo/vol%)。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物包含8.10mM磷酸氢二钠、1.5mM磷酸二氢钾、2.7mM氯化钾、172mM氯化钠和0.001%泊洛沙姆188(vo/vol%)。

[0749] 在一些实施方案中,本文所述的任何药物组合物还可包含促进本文所述的核酸或任何构建体进入哺乳动物细胞中的一种或多种剂(例如,脂质体或阳离子脂质)。在一些实施方案中,可使用天然和/或合成聚合物配制本文所述的任何构建体。可包括在本文所述的任何组合物中的聚合物的非限制性实例可包括但不限于DYNAMIC POLYCONJUGATE®(Arrowhead Research Corp.,Pasadena,Calif.)、来自Mirus Bio(Madison,Wis.)和Roche Madison(Madison,Wis.)的制剂、PhaseRX聚合物制剂诸如但不限于SMARTT POLYMER TECHNOLOGY®(PhaseRX,Seattle,Wash.)、DMRI/DOPE、泊洛沙姆、来自Vical(San Diego,Calif.)的VAXFECTIN®佐剂、壳聚糖、来自Calando Pharmaceuticals(Pasadena,Calif.)的环糊精、树状聚合物和聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)聚合物、RONDEL™(RNAi/寡核苷酸纳米颗粒递送)聚合物(Arrowhead Research Corporation,Pasadena,Calif.)和pH反应性共嵌段聚合物诸如但不限于由PhaseRX(Seattle,Wash.)产生的聚合物。许多这些聚合物中已展现出将寡核苷酸体内递送至哺乳动物细胞中的功效(参见例如,deFougerolles,Human Gene Ther.19:125-132,2008;Rozema等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.104:12982-12887,2007;Rozema等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.104:12982-12887,2007;Hu-Lieskovan等人,Cancer Res.65:8984-8982,2005;Heidel等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.104:5715-5721,2007,其中每一者以引用方式整体并入本文)。

[0750] 在一些实施方案中,组合物包含药学上可接受的载剂(例如,磷酸盐缓冲盐水、盐水或抑菌水)。在配制后,在一些实施方案中,以与剂量制剂相容的方式且以治疗有效的量来施用溶液。在一些实施方案中,制剂以多种剂型施用,所述剂型诸如可注射溶液、可注射凝胶、药物释放胶囊等。

[0751] 在一些实施方案中,本文提供的组合物可被配制以与其预期施用途径相容。预期施用途径的非限制性实例为局部施用(例如,耳蜗内施用)。

[0752] 在一些实施方案中,所提供的组合物包含一种核酸构建体。在一些实施方案中,所提供的组合物包含两种或更多种不同构建体。在一些实施方案中,组合物包括单一核酸构建体,所述单一核酸构建体包含编码抗VEGF蛋白和/或其功能特征部分的编码序列。在一些实施方案中,组合物包含单一核酸构建体,所述单一核酸构建体包含编码抗VEGF蛋白和/或其功能特征部分的编码序列,在引入到哺乳动物细胞中时,所述编码序列整合至哺乳动物细胞的基因组中。在一些实施方案中,组合物包含至少两种不同构建体,例如构建体包含编码抗VEGF蛋白的不同部分的编码序列,构建体可被组合以在哺乳动物细胞中产生编码活性抗VEGF蛋白(例如,全长雷珠单抗、贝伐单抗或阿柏西普蛋白)的序列,从而治疗以血管新生为特征且适合如本文所述的抗VEGF蛋白治疗的相关VS和/或其他耳科相关疾病。

[0753] 也提供包括本文所述的任何组合物的药盒。在一些实施方案中,药盒可包括固体组合物(例如,包括本文所述的至少两种不同构建体的冻干组合物)和用于溶解冻干组合物的液体。在一些实施方案中,药盒可包括预装载注射器,所述预装载注射器包括本文所述的任何组合物。

[0754] 在一些实施方案中,药盒包含小瓶,所述小瓶包含本文所述的任何组合物(例如,被配制成水性组合物,例如水性药物组合物)。在一些实施方案中,药盒可包括用于进行本文所述的任何方法的说明书。

[0755] 遗传修饰的细胞

[0756] 本公开也提供了一种细胞(例如,动物细胞,例如哺乳动物细胞,例如灵长类动物细胞,例如人细胞),其包含本文所述的任何核酸、构建体或组合物。在一些实施方案中,动物细胞为人细胞(例如人支持细胞或人毛细胞)。在其他实施方案中,动物细胞为非人哺乳动物(例如猿猴细胞、猫科细胞、犬科细胞等)。本领域技术人员将理解,可以将本文所述的核酸和构建体引入到任何动物细胞(例如,适用于兽医介入的任何动物的支持细胞或毛细胞)中。本文描述了构建体和用于将构建体引入到哺乳动物细胞中的方法的非限制性实例。

[0757] 在一些实施方案中,动物细胞可以为内耳的任何细胞,包括毛细胞和/或支持细胞。此类细胞的非限制性实例包括:Hensen细胞、Deiters细胞、内淋巴囊和导管的细胞、球囊、椭圆囊和壶腹中的移行细胞、内毛细胞和外毛细胞、螺旋韧带细胞、螺旋神经节细胞、螺旋突起细胞、外球囊细胞、边缘细胞、中间细胞、基底细胞、内柱细胞、外柱细胞、克劳氏细胞(Claudianus cell)、内缘细胞、内指状细胞或血管纹细胞。

[0758] 在一些实施方案中,动物细胞为耳蜗的特化细胞。在一些实施方案中,动物细胞为毛细胞。在一些实施方案中,动物细胞为耳蜗内毛细胞或耳蜗外毛细胞。在一些实施方案中,动物细胞为耳蜗内毛细胞。在一些实施方案中,动物细胞为耳蜗外毛细胞。在一些实施方案中,动物细胞是耳蜗柱细胞。在一些实施方案中,动物细胞是耳蜗Hensen细胞。在一些实施方案中,动物细胞是耳蜗克劳氏细胞。

[0759] 在一些实施方案中,动物细胞为体外细胞。在一些实施方案中,动物细胞为内源性存在于动物(例如灵长类动物和/或人)中的细胞类型。在一些实施方案中,动物细胞为自动物获得并离体培养的自体细胞。

[0760] 方法

[0761] 除其他外,本公开提供了用于治疗患有与血管形成相关的耳科疾病(例如VS)的受试者的方法。在一些实施方案中,方法包括将如本文所述的组合物引入到受试者的内耳(例如耳蜗)中。例如,本文提供的方法在一些实施方案中包括向受试者(例如动物,例如哺乳动物,例如灵长类动物,例如人)的内耳(例如耳蜗)施用有效量(例如治疗有效量)的本文所述的任何组合物。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,先前已将受试者鉴定为具有缺陷型内耳细胞靶基因(例如,支持和/或听力细胞靶基因具有导致由所述基因编码的支持和/或听力细胞靶蛋白的表达和/或活性降低的突变,例如NF2中的突变)。本文公开的任何方法的一些实施方案进一步包括在引入或施用步骤之前,确定受试者具有缺陷型内耳细胞靶基因。本文公开的任何方法的一些实施方案可进一步包括检测受试者中内耳细胞靶基因中的突变。本文公开的任何方法的一些实施方案可进一步包括将受试者鉴定或诊断为患有非综合症性或综合症性感神经性听力损失。

[0762] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括施用本文公开的组合物,例如rAAV-抗VEGF,用于治疗患有VS的受试者,例如哺乳动物,例如人,例如患者。在一些实施方案中,本文公开的组合物经由手术递送来递送至例如耳蜗。

[0763] 在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者存在单

侧(例如,散发性)进行性VS(定义为彼此在24个月内发生、至少间隔6个月的连续MRI扫描中具有记录的 $\geq 20\%$ 体积生长的单个肿瘤)。在一些实施方案中,最近的MRI在施用本文公开的组合物(例如,AAV-抗VEGF)之前不超过6个月获得。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者存在在用于确定资格的初始MRI上最大尺寸大于2mm并且在单个序列中的至少三个切片上可见的肿瘤。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者具有极度听力损失,例如定义为受影响的耳朵在最佳辅助条件下词语识别得分(WRS)为40%或更低或纯音测听阈值 $>90\text{dB HL}$ (跨250至8000Hz平均)。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者在rAAV-抗VEGF施用时至至少18岁。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者如果具有生育能力则同意在施用期间使用有效的避孕方法。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的临床试验,则愿意遵守所有试验要求,如通过成功完成知情同意过程所证明。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的临床试验,则愿意在试验完成后参与单独的长期随访(LTFU)研究方案。

[0764] 在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者具有以下特征中的一项或多项或全部:(i)存在单侧(例如,散发性)进行性VS(定义为彼此在24个月内发生、至少间隔6个月的连续MRI扫描中具有记录的 $\geq 20\%$ 体积生长的单个肿瘤),其中最近的MRI在施用本文公开的组合物之前不超过6个月获得;(ii)存在在用于确定资格的初始MRI上最大尺寸大于2mm并且在单个序列中的至少三个切片上可见的肿瘤;(iii)极度听力损失,例如定义为受影响的耳朵在最佳辅助条件下词语识别得分(WRS)为40%或更低或纯音测听阈值 $>90\text{dB HL}$ (跨250至8000Hz);(iv)在rAAV-抗VEGF施用时至至少18岁;(v)如果具有生育能力则同意在施用期间使用有效的避孕方法;(vi)如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的临床试验,则愿意遵守所有试验要求,如通过成功完成知情同意过程所证明;和(vii)如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的临床试验,则愿意在试验完成后参与单独的长期随访(LTFU)研究方案。

[0765] 在一些实施方案中,受试者患有进行性肿瘤,例如在连续扫描中具有至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%的生长率的肿瘤,例如有进展证据的肿瘤。在一些实施方案中,受试者患有进行性肿瘤,例如在不间断扫描中具有至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%的生长率的肿瘤,例如有进展证据的肿瘤。

[0766] 在一些实施方案中,受试者患有稳定肿瘤,例如在连续扫描中具有小于5%、小于10%、小于20%或小于30%的生长率的肿瘤,例如缺乏实质性进展的证据的肿瘤。在一些实施方案中,受试者患有稳定肿瘤,例如在不间断扫描中具有小于5%、小于10%、小于20%或小于30%的生长率的肿瘤,例如缺乏实质性进展的证据的肿瘤。

[0767] 在一些实施方案中,受试者不具有最大尺寸为约1.5cm或更大的肿瘤(例如,可能侵入小脑桥脑角并潜在地压迫脑干的肿瘤)。在一些实施方案中,受试者未处于潜在威胁生命的肿瘤相关后遗症的高风险下,所述后遗症可通过手术切除和放射治疗的当前标准护理避免。在一些实施方案中,本文公开的方法进一步包括施用手术切除或放射治疗。

[0768] 在一些实施方案中,受试者具有最大尺寸为约1.5cm或更大的肿瘤(例如,可能侵入小脑桥脑角并潜在地压迫脑干的肿瘤)。在一些实施方案中,受试者处于潜在威胁生命的

肿瘤相关后遗症的高风险下,所述后遗症可以通过施用如本文所述的方法和组合物来避免。在一些实施方案中,如本文所述的方法和组合物用作与当前标准护理方法一起的组合法,例如在一些实施方案中,本文公开的方法进一步包括施用手术切除或放射治疗。

[0769] 在一些实施方案中,受试者的对侧耳朵无重度耳聋。在一些实施方案中,受试者在对侧耳朵中具有听觉功能。在一些实施方案中,受试者可以保持对重要听觉域的获取,诸如语言接收和环境意识。在一些实施方案中,不向患有NF2的受试者施用本文公开的组合物。在一些实施方案中,本文公开的组合物安全性和耐受性可以在单侧(例如,散发性)进行性VS中进行评估。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,受试者具有小的(最大尺寸小于2cm)和/或单侧(例如,散发性)肿瘤的进行性生长。在一些实施方案中,可以在本文公开的受试者中评估本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)的安全性和耐受性。

[0770] 在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者在小脑桥脑角(不包括IAC组件)中不具有最大尺寸为1.5cm或更大的肿瘤。在一些实施方案中,在施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者中,一年的额外观察期将使受试者处于进一步的肿瘤相关后遗症(除了听力损失之外)的高风险中。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者不具有与脑干没有接触并且不延伸1.5cm或更多到小脑桥脑角中的肿瘤。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者不具有NF2的先前诊断或不具有双侧VS。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者不具有针对VS的既往手术或放射治疗。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者不具有幼年性白内障、神经胶质瘤、室管膜瘤、神经纤维瘤或多于一种脑膜瘤的当前诊断或病史。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者在受影响的耳朵中不具有与内淋巴积水(记录的波动性感音神经性听力损失和/或发作性眩晕)一致的临床病史。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者在未受影响的耳朵中不具有前庭功能低下的病史。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者不具有禁忌接受手术或全身麻醉或使用皮质类固醇的医学或心理疾患。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者不具有妨碍手术方法的耳解剖异常(例如,耳道闭锁)。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者不具有针对使用造影剂获得常规高分辨率MRI的任何禁忌(例如,患有肾衰竭、严重幽闭恐惧症或非MRI相容性植入物的参与者)。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者在受影响的耳朵中不具有中耳积液的证据。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者在施用(第0天)rAAV-抗VEGF之前6周内,在受影响的耳朵中不具有暂时妨碍手术方法的活动性中耳炎(AOM)、外耳炎或其他类似感染或此类的病史。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者在施用(第0天)rAAV-抗VEGF之前6个月内,在受影响的耳朵中没有既往中耳或内耳手术。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者未妊娠或哺乳,或计划在12个月内尝试妊娠(男性或女性)。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者在施用(第0天)之前6个月内未长期使用皮质类固醇(全身或口服)。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者对VEGF抑制剂或计划在围手术期使用的其他药物没有已知的敏感性或过敏性。在一些实

施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者没有脑血管疾病的病史或当前诊断。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者在施用(第0天)之前6个月内先前未参与过使用研究药物的临床试验,或者之前未参与过任何基因疗法临床试验。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者未患任何其他将不允许受试者在施用rAAV-抗VEGF的试验过程中完成随访检查和/或研究者认为使潜在参与者不适合参加试验的疾患。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的试验,则没有不愿意或不能遵守所有研究要求和随访。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者不具有极度听力损失,例如定义为未受影响的耳朵在最佳辅助条件下词语识别得分(WRS)为40%或更低或纯音测听阈值>90dB HL(跨250至8000Hz)。

[0771] 在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者不具有以下特征中的一项或多项或全部:(i)在小脑桥脑角(不包括IAC组件)中最大尺寸为1.5cm或更大的肿瘤;或者其中一年的额外观察期将使受试者处于进一步的肿瘤相关后遗症(除了听力损失之外)的高风险中;或与脑干没有接触并且不延伸1.5cm或更多到小脑桥脑角中的肿瘤;(ii)NF2的先前诊断和/或具有双侧VS;(iii)针对VS的既往手术或放射治疗;(iv)幼年性白内障、神经胶质瘤、室管膜瘤、神经纤维瘤或多于一种脑膜瘤的当前诊断或病史;(v)在受影响的耳朵中与内淋巴积水(记录的波动性感音神经性听力损失和/或发作性眩晕)一致的临床病史;(vi)在未受影响的耳朵中前庭功能低下的病史;(vii)禁忌接受手术或全身麻醉或使用皮质类固醇的医学或心理疾患;(viii)妨碍手术方法的耳解剖异常(例如,耳道闭锁);(ix)针对使用造影剂获得常规高分辨率MRI的任何禁忌(例如,患有肾衰竭、严重幽闭恐惧症或非MRI相容性植入物的参与者);(x)在受影响的耳朵中中耳积液的证据;(xi)在施用(第0天)rAAV-抗VEGF之前6周内,在受影响的耳朵中暂时妨碍手术方法的活动性中耳炎(AOM)、外耳炎或其他类似感染或此类的病史;(xii)在施用(第0天)rAAV-抗VEGF之前6个月内,在受影响的耳朵中既往中耳或内耳手术;(xiii)妊娠或哺乳,或计划在12个月内尝试妊娠(男性或女性);(xiv)在施用(第0天)之前6个月内,长期使用皮质类固醇(全身或口服);(xv)对VEGF抑制剂或计划在围手术期使用的其他药物的已知敏感性或过敏性;(xvi)脑血管疾病的病史或当前诊断;(xvii)在施用(第0天)之前6个月内先前参与过使用研究药物的临床试验,或者先前参与过任何基因疗法临床试验;(xviii)任何其他将不允许受试者在施用rAAV-抗VEGF的试验过程中完成随访检查和/或研究者认为使潜在参与者不适合参加试验的疾患;(xix)如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的试验,则受试者不愿意或不能遵守所有研究要求和随访;以及(xx)不具有极度听力损失,例如定义为未受影响的耳朵在最佳辅助条件下词语识别得分(WRS)为40%或更低或纯音测听阈值>90dB HL(跨250至8000Hz)。

[0772] 在一些实施方案中,施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者可能经历一种或多种不想要的副作用(例如,不良事件)。在一些实施方案中,不想要的副作用包括:耳部感染、前庭症状、耳鸣、其他耳科不良事件、手术并发症、施用rAAV-抗VEGF的耳朵中残余听力的持续损失、与口服皮质类固醇方案有关的不良事件、对rAAV-抗VEGF的衣壳和/或转基因的免疫反应或其组合。

[0773] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)被配制用于耳蜗内

施用的无菌悬浮液。在一些实施方案中,组合物包含以下量的构建体:至少 1×10^{11} 、至少 5×10^{11} 、至少 1×10^{12} 、至少 1×10^{12} 、至少 2×10^{12} 、至少 3×10^{12} 、至少 4×10^{12} 、至少 5×10^{12} 、至少 6×10^{12} 、至少 7×10^{12} 、至少 8×10^{12} 、至少 9×10^{12} 、至少 1×10^{13} 、至少 2×10^{13} 、至少 3×10^{13} 、至少 4×10^{13} 、至少 5×10^{13} 、至少 6×10^{13} 、至少 7×10^{13} 、至少 8×10^{13} 、至少 9×10^{13} 或至少 1×10^{14} 载体基因组(vg)/毫升(mL)(vg/mL)。在一些实施方案中,组合物包含以下量的构建体:至多 1×10^{15} 、至多 5×10^{14} 、至多 1×10^{14} 、至多 5×10^{13} 、至多 1×10^{13} 、至多 9×10^{12} 、至多 8×10^{12} 、至多 7×10^{12} 、至多 6×10^{12} 、至多 5×10^{12} 、至多 4×10^{12} 、至多 3×10^{12} 、至多 2×10^{12} 或至多 1×10^{12} 载体基因组(vg)/毫升(mL)。在一些实施方案中,组合物包含以下量的构建体:约 1×10^{12} vg/mL至 1×10^{13} vg/mL、约 5×10^{12} vg/mL至 5×10^{13} vg/mL或约 1×10^{13} vg/mL至 2×10^{13} vg/mL。

[0774] 在一些实施方案中,组合物包含以下量的构建体:约 1×10^{12} vg/mL、约 1.1×10^{12} vg/mL、 1.2×10^{12} vg/mL、约 1.3×10^{12} vg/mL、约 1.4×10^{12} vg/mL、约 1.5×10^{12} vg/mL、约 1.6×10^{12} vg/mL、约 1.7×10^{12} vg/mL、约 1.8×10^{12} vg/mL、约 1.9×10^{12} vg/mL、约 2.0×10^{12} vg/mL、约 2.1×10^{12} vg/mL、约 2.2×10^{12} vg/mL、约 2.3×10^{12} vg/mL、约 2.4×10^{12} vg/mL、约 2.5×10^{12} vg/mL、约 2.6×10^{12} vg/mL、约 2.7×10^{12} vg/mL、约 2.8×10^{12} vg/mL、约 2.9×10^{12} vg/mL、约 3.0×10^{12} vg/mL、约 3.1×10^{12} vg/mL、约 3.2×10^{12} vg/mL、约 3.3×10^{12} vg/mL、约 3.4×10^{12} vg/mL、约 3.5×10^{12} vg/mL、约 3.6×10^{12} vg/mL、约 3.7×10^{12} vg/mL、约 3.8×10^{12} vg/mL、约 3.9×10^{12} vg/mL、约 4.0×10^{12} vg/mL、约 4.1×10^{12} vg/mL、约 4.2×10^{12} vg/mL、约 4.3×10^{12} vg/mL、约 4.4×10^{12} vg/mL、约 4.5×10^{12} vg/mL、约 4.6×10^{12} vg/mL、约 4.7×10^{12} vg/mL、约 4.8×10^{12} vg/mL、约 4.9×10^{12} vg/mL、约 5.0×10^{12} vg/mL、约 5.1×10^{12} vg/mL、约 5.2×10^{12} vg/mL、约 5.3×10^{12} vg/mL、约 5.4×10^{12} vg/mL、约 5.5×10^{12} vg/mL、约 5.6×10^{12} vg/mL、约 5.7×10^{12} vg/mL、约 5.8×10^{12} vg/mL、约 5.9×10^{12} vg/mL、约 6.0×10^{12} vg/mL、约 7.0×10^{12} vg/mL、约 8.0×10^{12} vg/mL、约 9.0×10^{12} vg/mL、约 9.1×10^{12} vg/mL、约 9.2×10^{12} vg/mL、约 9.3×10^{12} vg/mL、约 9.4×10^{12} vg/mL、约 9.5×10^{12} vg/mL、约 9.6×10^{12} vg/mL、约 9.7×10^{12} vg/mL、约 9.8×10^{12} vg/mL、约 9.9×10^{12} vg/mL、约 1×10^{13} vg/mL、 1.1×10^{13} vg/mL、 1.2×10^{13} vg/mL、 1.3×10^{13} vg/mL、 1.4×10^{13} vg/mL、 1.5×10^{13} vg/mL、 1.6×10^{13} vg/mL、 1.7×10^{13} vg/mL、 1.8×10^{13} vg/mL、 1.9×10^{13} vg/mL、 2×10^{13} vg/mL、 5×10^{13} vg/mL或 1×10^{14} vg/mL。

[0775] 在一些实施方案中,组合物包含 2.5×10^{12} vg/mL $\pm 10\%$ 的量的构建体。

[0776] 在一些实施方案中,组合物包含 5×10^{12} vg/mL $\pm 10\%$ 的量的构建体。

[0777] 在一些实施方案中,组合物包含 1×10^{13} vg/mL $\pm 10\%$ 的量的构建体。

[0778] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)在手术室中由经过认证的有执行耳科手术经验的外科医生在受控的无菌条件下施用。在一些实施方案中,施用程序为显微镜或内窥镜辅助的经耳道探查鼓膜切开术和激光辅助的显微镫骨切开术,然后为圆窗注射以递送例如约0.09mL的含有本文公开的组合物,例如rAAV-抗VEGF颗粒的溶液。经耳道探查鼓膜切开术为用于暴露中耳结构的常见程序;经耳道探查鼓膜切开术通常伴随着激光辅助的镫骨切除术(移除镫骨足板)或镫骨切开术(在镫骨足板上开一个洞),例如对于耳硬化症患者。在一些实施方案中,镫骨足板上大约0.25mm的排放孔(使用耳科激光形成)用于防止迷路内压力的潜在有害升高。

[0779] 在本文公开的任何方法的一些实施方案中,受试者将接受免疫调节剂(例如皮质

类固醇)的围手术期疗程。在一些实施方案中,皮质类固醇是或包括泼尼松。在一些实施方案中,皮质类固醇经口服施用。

[0780] 在一些实施方案中,免疫调节剂(例如,皮质类固醇)根据给药方案施用。在一些实施方案中,免疫调节剂(例如,皮质类固醇)的给药方案包括一个或多个剂量。

[0781] 在一些实施方案中,免疫调节剂(例如,皮质类固醇)的给药方案施用于约14天。在一些实施方案中,免疫调节剂(例如,皮质类固醇)的给药方案在施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)之前3天开始施用,在施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)当天施用,和在施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)后至多10天施用。

[0782] 在免疫调节剂(例如,皮质类固醇)的给药方案的一些实施方案中,免疫调节剂以约1mg/kg/天的固定剂量施用(例如,持续四天,从施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)之前三天开始(例如,第-3天至第-1天)并且包括施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)当天(例如,第0天))。

[0783] 在一些实施方案中,免疫调节剂(例如,皮质类固醇)以约60mg/天的最大剂量施用,而与体重无关。

[0784] 在免疫调节剂(例如,皮质类固醇)的给药方案的一些实施方案中,在施用免疫调节剂4天后降低免疫调节剂的剂量。在一些实施方案中,在给药方案的第5天至第14天施用较低剂量的免疫调节剂。

[0785] 在一些实施方案中,在免疫调节剂(例如,皮质类固醇)的给药方案的第5天和第6天(例如,术后第1天和第2天),免疫调节剂以比前四天施用的剂量少约10mg的剂量施用。在一些实施方案中,免疫调节剂(例如,皮质类固醇)在第5天和第6天以约50mg/天的剂量施用。

[0786] 在一些实施方案中,在免疫调节剂(例如,皮质类固醇)的给药方案的第7天和第8天(例如,术后第3天和第4天),免疫调节剂以比第5天和第6天施用的剂量少约10mg的剂量施用。在一些实施方案中,免疫调节剂(例如,皮质类固醇)在第7天和第8天以约40mg/天的剂量施用。

[0787] 在一些实施方案中,在免疫调节剂(例如,皮质类固醇)的给药方案的第9天和第10天(例如,术后第5天和第6天),免疫调节剂以比第7天和第8天施用的剂量少约10mg的剂量施用。在一些实施方案中,免疫调节剂(例如,皮质类固醇)在第9天和第10天以约30mg/天的剂量施用。

[0788] 在一些实施方案中,在免疫调节剂(例如,皮质类固醇)的给药方案的第11天和第12天(例如,术后第7天和第8天),免疫调节剂以比第9天和第10天施用的剂量少约10mg的剂量施用。在一些实施方案中,免疫调节剂(例如,皮质类固醇)在第11天和第12天以约20mg/天的剂量施用。

[0789] 在一些实施方案中,在免疫调节剂(例如,皮质类固醇)的给药方案的第13天和第14天(例如,术后第9天和第10天),免疫调节剂以比第11天和第12天施用的剂量少约10mg的剂量施用。在一些实施方案中,免疫调节剂(例如,皮质类固醇)在第13天和第14天以约10mg/天的剂量施用。

[0790] 在一些实施方案中,免疫调节方案(例如,全身口服皮质类固醇)减少与外科施用程序有关的炎症。在一些实施方案中,免疫调节方案还可进一步降低对衣壳(例如,AAVAnc

80) 或基础构建体 (例如, 转基因产物, 例如抗VEGF蛋白) 的免疫反应的可能性。

[0791] 在一些实施方案中, 本文公开了一种一次性使用的无菌递送装置, 以通过具有位于镫骨足板的排放口的圆窗膜将本文公开的组合物施用至内耳的外淋巴液。在一些实施方案中, 例如在治疗剂的安全性和功效的潜力方面, 此定制装置提供优于可用材料的优势, 因为其被专门设计用于耳蜗内施用途径。在一些实施方案中, 递送装置的设计要素包括: 保持注射流体的无菌; 使进入内耳的气泡最小化; 能够以受控流速精确递送小体积 (结合使用标准泵); 允许外科医生查看圆窗膜和通过外耳道递送; 使对圆窗膜或圆窗膜以外的耳蜗结构的损害最小化; 和/或使通过圆窗膜的外流最小化。

[0792] 在一些实施方案中, 本文公开的任何方法包括剂量递增研究, 以评估例如患有单侧进行性 (例如, 散发性) VS 的受试者 (例如哺乳动物, 例如人, 例如患者) 中的安全性和耐受性。在一些实施方案中, 以本文公开的给药方案施用本文公开的组合物, 例如rAAV-抗VEGF。在一些实施方案中, 给药方案包括单侧或双侧耳蜗内施用例如像本文所述的剂量的本文公开的组合物, 例如rAAV-抗VEGF。在一些实施方案中, 给药方案包括以以下体积递送: 每个耳蜗至少0.01mL、至少0.02mL、至少0.03mL、至少0.04mL、至少0.05mL、至少0.06mL、至少0.07mL、至少0.08mL、至少0.09mL、至少0.10mL、至少0.11mL、至少0.12mL、至少0.13mL、至少0.14mL、至少0.15mL、至少0.16mL、至少0.17mL、至少0.18mL、至少0.19mL或至少0.20mL。在一些实施方案中, 给药方案包括以以下体积递送: 每个耳蜗至多0.30mL、至多0.25mL、至多0.20mL、至多0.15mL、至多0.14mL、至多0.13mL、至多0.12mL、至多0.11mL、至多0.10mL、至多0.09mL、至多0.08mL、至多0.07mL、至多0.06mL或至多0.05mL。在一些实施方案中, 给药方案包括例如根据群体, 以以下体积递送: 每个耳蜗约0.05mL、约0.06mL、约0.07mL、约0.08mL、约0.09mL、约0.10mL、约0.11mL、约0.12mL、约0.13mL、约0.14mL或约0.15mL。

[0793] 在一些实施方案中, 给药方案包括以以下体积递送: 约0.01mL至约0.30mL、约0.01mL至约0.25mL、约0.01mL至约0.20mL、约0.01mL至约0.15mL、约0.01mL至约0.14mL、约0.01mL至约0.13mL、约0.01mL至约0.12mL、约0.01mL至约0.11mL、约0.01mL至约0.10mL、约0.01mL至约0.09mL、约0.01mL至约0.08mL、约0.01mL至约0.07mL、约0.01mL至约0.06mL、约0.01mL至约0.05mL、约0.01mL至约0.04mL、约0.01mL至约0.03mL或约0.01mL至约0.02mL。

[0794] 在一些实施方案中, 给药方案包括以以下体积递送: 约0.02mL至约0.30mL、0.03mL至约0.30mL、0.04mL至约0.30mL、0.05mL至约0.30mL、0.06mL至约0.30mL、0.07mL至约0.30mL、0.08mL至约0.30mL、0.09mL至约0.30mL、0.10mL至约0.30mL、0.11mL至约0.30mL、0.12mL至约0.30mL、0.13mL至约0.30mL、0.14mL至约0.30mL、0.15mL至约0.30mL、0.16mL至约0.30mL、0.17mL至约0.30mL、0.18mL至约0.30mL、0.19mL至约0.30mL、0.20mL至约0.30mL或0.25mL至约0.30mL。

[0795] 在一些实施方案中, 给药方案包括以以下体积递送: 约0.01mL至约0.03mL、约0.02mL至约0.25mL、约0.03mL至约0.20mL、约0.04mL至约0.18mL、约0.05mL至约0.16mL、约0.06mL至约0.14mL、约0.07mL至约0.12mL或约0.08mL至约0.1mL。

[0796] 在一些实施方案中, 患有 (例如, 散发性) 进行性VS的受试者通常单侧呈现。在一些实施方案中, 向患有单侧 (例如, 散发性) 进行性VS的受试者施用本文公开的组合物的单侧施用。在一些实施方案中, 患有NF2的受试者通常经历双侧VS。在一些实施方案中, 向患有NF2的受试者施用本文公开的组合物的单侧或双侧施用。

[0797] 在一些实施方案中,本文公开的方法评价了经由向例如18至80岁的患有单侧(例如,散发性)进行性VS的受试者单侧耳蜗内注射来施用递增剂量的本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)的安全性和耐受性。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)抑制肿瘤的生长。

[0798] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法包括评价本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)的安全性和耐受性。在一些实施方案中,在随机、受控情况下(使用并行、非介入观察组)进行本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)治疗(例如,散发性)进行性VS的功绩的评价。

[0799] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法包括确定本文公开的组合物(例如rAAV-抗-VEGF)的最佳剂量。在一些实施方案中,本文公开的任何方法包括评价本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)在更广泛VS群体中的功绩。在一些实施方案中,本文公开的任何方法包括确定最佳给药方案,例如包括用于双侧VS肿瘤(在NF2的情况下)。

[0800] 在本文公开的任何方法的一些实施方案中,所述方法进一步包括施用当前标准护理,例如肿瘤手术切除和/或放射治疗。

[0801] 在一些实施方案中,在本文公开的任何方法中,如在血清中检测到的预先存在的中和抗体(NAb)基本上不影响通过耳蜗内施用途径递送的rAAV颗粒的转导。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物的受试者具有预先存在的中和抗体(NAb),例如,如本文所述。在一些实施方案中,施用本文公开的组合物的受试者不具有预先存在的中和抗体(NAb),例如,如本文所述。

[0802] 在一些实施方案中,本文提供了改善和/或治疗以血管新生为特征的疾病(例如,VS)的方法,其通过在受试者(例如动物,例如哺乳动物,例如灵长类动物,例如人)的内耳中表达抗VEGF蛋白(例如,雷珠单抗、贝伐单抗和/或阿柏西普蛋白)来进行。在一些实施方案中,方法包括向受试者的内耳施用有效量(例如治疗有效量)的本文所述的任何组合物,其中所述施用通过表达抗VEGF蛋白来改善和/或治疗以血管新生为特征的疾病。在一些实施方案中,产生抗VEGF蛋白的内耳靶细胞可以为感觉细胞,例如毛细胞,和/或非感觉细胞,例如支持细胞,和/或内耳细胞的全部或任何子集。

[0803] 本文也提供了增加受试者(例如动物,例如哺乳动物,例如灵长类动物,例如人)的任何内耳细胞子集中抗VEGF蛋白的表达水平的方法,其包括:向受试者的内耳施用有效量(例如治疗有效量)的本文所述的任何组合物,其中所述施用导致在受试者内耳的任何细胞子集中抗VEGF蛋白(例如,雷珠单抗、贝伐单抗和/或阿柏西普)的表达水平增加。在一些实施方案中,内耳靶细胞可以为感觉细胞,例如毛细胞,和/或非感觉细胞,例如支持细胞,和/或内耳细胞的全部或任何子集。

[0804] 本文也提供了在被鉴定为患有以血管新生为特征的耳科相关疾病的受试者(例如动物,例如哺乳动物,例如灵长类动物,例如人)中治疗VS相关症状(例如,听力损失、耳鸣、眩晕、头晕、耳胀感、面部麻木、面部感觉异常、头痛、步态笨拙和/或精神错乱等)的方法,其包括:向受试者的内耳施用有效量(例如治疗有效量)的本文所述的任何组合物。本文也提供了这样的方法,所述方法包括向受试者的内耳施用有效量(例如治疗有效量)的本文所述的任何组合物。

[0805] 本文也提供了用于治疗VS的手术方法。在一些实施方案中,所述方法包括以下步

骤:向受试者的耳蜗中在第一切口点处引入切口(例如第一切口);以及耳蜗内施用有效量(例如治疗有效量)的本文提供的任何组合物。在一些实施方案中,在切口点(例如第一切口点)处向受试者施用组合物。在一些实施方案中,在第一切口中或通过第一切口向受试者施用组合物。

[0806] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,在耳蜗椭圆窗膜中或通过耳蜗椭圆窗膜向受试者施用本文所述的任何组合物。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,在耳蜗圆窗膜中或通过耳蜗圆窗膜向受试者施用本文所述的任何组合物。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,使用能够在圆窗膜中形成多个切口的医疗装置来施用组合物。在一些实施方案中,医疗装置包含多个微针。在一些实施方案中,医疗装置包含多个微针,所述多个微针包括基本上圆形的第一外观,其中每个微针的直径为至少约10微米。在一些实施方案中,医疗装置包含基座和/或能够容纳组合物的储器。在一些实施方案中,医疗装置包含多个空心微针,所述多个空心微针分别包括能够转移组合物的内腔。在一些实施方案中,医疗装置包括用于产生至少部分真空的构件。

[0807] 在一些实施方案中,本公开的技术用于治疗患有听力损失或处于听力损失风险下的受试者。在一些实施方案中,本公开的技术用于治疗患有耳鸣或处于耳鸣风险下的受试者。在一些实施方案中,本公开的技术用于治疗患有眩晕或处于眩晕风险下的受试者。在一些实施方案中,本公开的技术用于治疗患有VS肿瘤生长或处于肿瘤生长风险下的受试者。在一些实施方案中,本公开的技术用于治疗患有与VS和/或标准护理VS治疗选项相关的各种症状或处于所述症状风险下的受试者。例如,在一些实施方案中,受试者具有归因于NF2的至少一种致病性变异的症状。本领域技术人员将理解,NF2中的许多不同突变可导致致病性变异。在一些此类实施方案中,致病性变异通过增加以血管新生为特征的疾病的可能性而导致听力损失、耳鸣、眩晕、肿瘤生长等或使处于所述症状的风险下。

[0808] 在一些实施方案中,将对经历VS相关症状(例如,听力损失、耳鸣、眩晕、头晕、耳胀感、面部麻木、面部麻痹、头痛、步态笨拙和/或精神错乱等)的受试者进行评价以确定是否存在可导致所述VS相关症状的一个或多个突变以及存在于何处。在一些此类实施方案中,将评价某些基因产物或功能的状态(例如,经由蛋白质或测序分析)。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,受试者或动物为哺乳动物,在一些实施方案中,哺乳动物为驯养动物、农场动物、动物园动物、非人灵长类动物或人。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,动物、受试者或哺乳动物为成年、青少年、少年、儿童、学步儿童、婴儿或新生儿。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,动物、受试者或哺乳动物为1-5、1-10、1-20、1-30、1-40、1-50、1-60、1-70、1-80、1-90、1-100、1-110、2-5、2-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-110、10-30、10-40、10-50、10-60、10-70、10-80、10-90、10-100、10-110、20-40、20-50、20-60、20-70、20-80、20-90、20-100、20-110、30-50、30-60、30-70、30-80、30-90、30-100、40-60、40-70、40-80、40-90、40-100、50-70、50-80、50-90、50-100、60-80、60-90、60-100、70-90、70-100、70-110、80-100、80-110或90-110岁。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,受试者或哺乳动物为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个月龄。

[0809] 在一些实施方案中,本文所述的任何方法和/或组合物可导致VS相关症状(例如听力损失、耳鸣、眩晕、头晕、耳胀感、面部麻木、面部感觉异常、头痛、步态笨拙和/或精神错乱

等)的改善。在一些实施方案中,在有需要的受试者中(例如,使用如本文所述或在本领域中已知的用于确定这样的症状的改善的任何量度)来测量和确定这样的症状,持续至少10天、至少15天、至少20天、至少25天、至少30天、至少35天、至少40天、至少45天、至少50天、至少55天、至少60天、至少65天、至少70天、至少75天、至少80天、至少85天、至少100天、至少105天、至少110天、至少115天、至少120天、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月或至少12个月。

[0810] 在一些实施方案中,受试者(例如动物,例如哺乳动物,例如人)具有VS相关症状(例如听力损失、耳鸣、眩晕、头晕、耳胀感、面部麻木、面部感觉异常、头痛、步态笨拙和/或精神错乱等)或处于发生所述症状的风险下。在一些实施方案中,受试者(例如动物,例如哺乳动物,例如人)先前已鉴定为在NF2基因中具有突变。在一些实施方案中,受试者(例如动物,例如哺乳动物,例如人)具有本领域已知的与以血管新生为特征的疾病(例如VS)相关的任何NF2基因的突变。在一些此类实施方案中,受试者(例如,动物,例如哺乳动物,例如人)已被鉴定为与VS相关的基因中突变的携带者(例如,经由遗传测试),所述突变先前未被鉴定。在一些此类实施方案中,鉴定的突变可为新颖的(例如,先前未在文献中描述),且用于患有或易患VS的受试者的治疗方法将针对特定患者的突变进行个性化。

[0811] 在一些实施方案中,受试者(例如,动物,例如哺乳动物,例如人)已被鉴定为NF2基因中的突变的携带者(例如,经由遗传测试)。在一些实施方案中,受试者(例如动物,例如哺乳动物,例如人)先前已被鉴定为在NF2基因中具有突变且被诊断出患有VS相关症状(例如听力损失、耳鸣、眩晕、头晕、耳胀感、面部麻木、面部感觉异常、头痛、步态笨拙和/或精神错乱等)。在一些实施方案中,受试者(例如动物,例如哺乳动物,例如人)被鉴定为患有与以血管新生为特征的症状。

[0812] 在一些实施方案中,VS和VS相关症状(例如听力损失、耳鸣、眩晕、头晕、耳胀感、面部麻木、面部感觉异常、头痛、步态笨拙和/或精神错乱等)的成功治疗可以使用本领域已知的任何常规方法在受试者中确定,所述方法包括但不限于:听力测试、耳鸣测试、步态测试、认知测试、成像技术和/或诊断生物标志物采样。例如,功能性听力测试的非限制性实例为各种类型的听力测定(例如,纯音测试、语言测试、中耳测试、听觉脑干反应和耳声发射)。

[0813] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,向受试者的耳蜗中引入或施用两个或更多个剂量的本文所述的任何组合物。这些方法中任一者的一些实施方案可包括向受试者的耳蜗中引入或施用第一剂量的组合物,在引入或施用第一剂量后评估受试者的听力功能,并且向发现不具有在正常范围内的听力功能(例如,如使用本领域中已知的任何听力测试所确定)的受试者的耳蜗中施用另一剂量的组合物。

[0814] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,组合物可被配制以用于耳蜗内施用。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,本文所述的组合物可经由耳蜗内施用或局部施用来施用。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,通过使用医疗装置(例如,本文所述的示例性医疗装置中的任一者)来施用组合物。

[0815] 在一些实施方案中,可使用本文所述或本领域中已知的任何方法进行耳蜗内施用。例如,在一些实施方案中,可使用以下手术技术向耳蜗中施用或引入组合物:首先使用0度2.5-mm刚性内窥镜进行可视化,清理外耳道,且使用圆刀清晰地划定大约5-mm鼓膜瓣。随后抬高鼓膜瓣,且向后进入中耳。鉴别且分割鼓索神经,且使用刮匙移除小骨(scutal

bone),从而暴露圆窗膜。为增加所施用或引入组合物的顶端分布,可使用手术激光在椭圆窗中形成2-mm小窗,以允许在组合物的跨圆窗膜输注期间进行外淋巴排出。随后装填微输注装置,且带入手术区。将装置操纵至圆窗,且将尖端安放在骨圆窗悬垂物内,以允许微针穿透膜。将踏板接合以允许进行组合物的计量的稳定输注。随后撤出装置,且用明胶泡沫贴片密封圆窗和镫骨足板。

[0816] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,受试者具有VS和/或VS相关症状或处于发展所述疾病和症状的风险下。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,受试者先前已被鉴定为在牵涉到VS发展的基因中具有突变,这样的基因可在支持细胞和/或毛细胞中表达。

[0817] 在一些实施方案中,受试者细胞为在体外的。在一些实施方案中,受试者细胞最初自受试者获得并离体培养。在一些实施方案中,受试者细胞被认为在其他方面为健康的,且进行离体培养和扩增。在一些实施方案中,受试者细胞先前已被确定为具有缺陷型内耳细胞靶基因。在一些实施方案中,受试者细胞先前已被确定为具有缺陷型毛细胞靶基因。在一些实施方案中,受试者细胞先前已被确定为具有缺陷型支持细胞靶基因。

[0818] 装置、施用和手术方法

[0819] 本文提供了用于治疗听力损失(例如,非综合症性感神经性听力损失或综合症性感神经性听力损失)的治疗递送系统。在一些实施方案中,治疗递送系统包括:i)能够在有需要的受试者的内耳的圆窗膜中形成一个或多个切口的医疗装置,和ii)有效剂量的组合物(例如,本文所述的任何组合物)。在一些实施方案中,医疗装置包括多个微针。

[0820] 在本文公开的任何方法的一些实施方案中,受试者将接受包含用本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)给药的治疗。在一些实施方案中,受试者可以接受至少一种额外治疗,包括用本文公开的组合物给药。在一些实施方案中,将在每次测试制品组合物(例如,包含rAAV颗粒的溶液)施用之间监测受试者持续至少30天。

[0821] 在某些实施方案中,如本文所述的方法和组合物用作与某些当前治疗选项一起的组合疗法,所述治疗选项诸如通过MRI连续观察而无需额外主动介入、立体定向放射外科(SRS)、分次放射治疗(FRT)和/或显微外科(MS)。

[0822] 在一些实施方案中,如本文所述的方法和组合物用作与使用MRI连续观察一起的组合疗法。在某些实施方案中,MRI测量可以鉴定肿瘤生长、肿瘤停滞或肿瘤消退。在某些实施方案中,当与单独使用基于连续MRI的观察的方法相比时,与没有额外介入的连续观察结合的如本文所述的方法提高了听力保留率。

[0823] 在一些实施方案中,如本文所述的方法和组合物用作与如本领域中已知的放射手术(例如,伽马刀手术)一起的组合疗法。在一些实施方案中,在用本文所述的组合物和方法治疗之前或之后,向肿瘤递送单一有效剂量的辐射(例如,5至10gy的辐射、7至12gy的辐射、9至14gy的辐射、11至16gy的辐射、13至18gy的辐射或12至17gy的辐射)。在一些实施方案中,利用如本文所述的方法和组合物的组合疗法降低必要辐射剂量分布,从而减少辐射分布可能与肿瘤相邻的结构重叠的机会。在一些实施方案中,此组合治疗方法降低了放射外科引起的颅神经或脑干结构功能障碍的可能性。在一些实施方案中,组合治疗方法减少与耳蜗或相关脑干核的辐射剂量增加相关的术后听力损失。在一些实施方案中,组合治疗方法降低术后脑积水的可能性。在一些实施方案中,组合治疗方法降低术后继发性恶性肿瘤

的可能性。在一些实施方案中,组合治疗方法减缓肿瘤生长、阻止肿瘤生长和/或缩小肿瘤大小。在一些实施方案中,组合治疗方法提高放射外科的功效,例如增加肿瘤生长停滞的机会、减少对额外治疗的要求、增加听力保留的机率、减少永久性面部神经病变的机率、降低三叉神经病变的机率和/或降低脑积水的机率。

[0824] 在一些实施方案中,如本文所述的方法和组合物用作与如本领域已知的分次放射治疗一起的组合疗法。在一些实施方案中,在用如本文所述的组合物和方法来治疗之前、期间或之后,有效剂量的辐射在数周时间段(例如,1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周或大于12周)内通过多个微剂量(例如约5微剂量、约10微剂量、约15微剂量、约20微剂量、约25微剂量或约30微剂量)递送至肿瘤,最终对肿瘤进行一次大剂量辐射(例如,约30gy、约40gy、约50gy、约60gy或约70gy的辐射)。在一些实施方案中,如本文所述的组合治疗方法通过抑制血管新生来导致肿瘤的持续损害,同时允许周围组织在剂量之间愈合。在一些实施方案中,如本文所述的组合治疗方法增加分次放射治疗的功效,例如,增加平均肿瘤停滞率、增加5年精算率、减少需要额外治疗的机会、增加听力保留、降低发展面部神经病变的机率、降低发展三叉神经病变的机率、和/或降低脑积水的机率。

[0825] 在一些实施方案中,如本文所述的方法和组合物用作与本领域已知的手术介入一起的组合疗法。在一些实施方案中,此种组合治疗方法提高了手术介入的功效,同时降低了额外手术并发症的机会,诸如颅神经损害、脑脊液(CSF)渗漏和/或术后感染。在一些实施方案中,此种组合方法降低了需要额外治疗的机率,增加了听力保留的机率,降低了永久性面部神经病的机率,降低了与CSF患者相关的急性发病的机率,和/或降低了死亡的机率。

[0826] 本文也提供用于治疗听力损失(例如,非综合症性感神经性听力损失或综合症性感神经性听力损失)的手术方法。在一些实施方案中,方法包括如下步骤:向受试者的耳蜗中在第一切口点处引入第一切口;以及耳蜗内施用治疗有效量的本文所提供的任何组合物。在一些实施方案中,组合物在第一切口点处向受试者施用。在一些实施方案中,在第一切口中或通过第一切口向受试者施用组合物。

[0827] 在一些实施方案中,已经评价了VEGF抑制剂的全身施用以治疗NF2患者中的VS,且这些研究的结果为使用VEGF抑制剂治疗VS提供了初步临床证据。在一些实施方案中,NF2患者处于施用本文公开的组合物的高风险中,因为他们通常患有导致双耳听力受损的双侧神经鞘瘤。在一些实施方案中,不向患有NF2的受试者施用本文公开的组合物。在一些实施方案中,例如基于经由单侧或双侧耳蜗内施用递送的本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)的安全性和功效,向患有NF2的受试者施用本文公开的组合物。

[0828] 在一些实施方案中,散发性VS肿瘤表达VEGF(Saito 2003;Cayé-Thomasen 2003,其中每一者以引用方式整体并入本文),且VEGF表达水平例如与肿瘤的生长率相关(Cayé-Thomasen 2003;Cayé-Thomasen 2005,其中每一者以引用方式整体并入本文)。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,受试者具有进行性散发性VS(例如,定义为在连续扫描中具有至少20%的生长率的单个肿瘤),但其肿瘤仍然足够小,其中额外一年观察期不会使他们面临其他肿瘤相关性后遗症(听力损失除外)的高风险。在一些实施方案中,受试者为正在接受或将接受侵入性手术切除和/或放射治疗的成年人。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括评价安全剂量,例如起始剂量(低于预期NOAEL8倍)。在一些实施方案中,起始剂量导致紧邻肿瘤位置的组织和流体中的VEGF抑制剂暴露水平。

[0829] 在一些实施方案中,如本文所述的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)可以通过递送到外淋巴中而到达内耳中的许多靶细胞。外淋巴为一种在组成上与脑脊液(CSF)非常相似且与其具有扩散连续性的流体(Lysaght 2011,其以引用方式整体并入本文)。外淋巴包裹着位于内耳的骨迷路中的耳蜗和前庭系统的大部分感觉、神经和支持细胞。在一些实施方案中,将向其递送本文所述的组合物(例如包含rAAV-抗VEGF)的耳蜗的外淋巴空间包含两个阶或通道:鼓阶和前庭阶,它们在耳蜗螺旋的顶点处经由蜗孔而彼此连续。内耳的许多细胞通过组织中的间隙空间与外淋巴保持流体连续性。

[0830] 使用如本文所述的递送装置耳蜗内施用rAAV-抗VEGF组合物通常将通过圆窗膜进行(参见图1)。在一些实施方案中,使用用于耳蜗内施用的无菌一次性使用递送装置将如本文所述的组合物递送至个体(例如哺乳动物,例如人)。在某些实施方案中,如本文所述的组合物通过具有位于镫骨足板上的排放口的圆窗膜递送至内耳的外淋巴液。在某些实施方案中,耳蜗内施用方法包括通过在椭圆窗内的镫骨足板中具有排放口的圆窗膜来将如本文所述的组合物施用到鼓阶中,使得rAAV颗粒灌注穿过鼓阶,然后经由蜗孔处的连接来穿过前庭阶,并沿着流体途径到达镫骨足板上的排放口。在一些实施方案中,与注射端口不同的排放口的存在允许药物沿耳蜗的长度更均匀和/或受控分布且/或防止在内耳中潜在有害地累积额外流体压力。在一些实施方案中,此递送方法也允许注射物扩散到前庭系统。在一些实施方案中,可以通过外耳道以相对非创伤性方式在患者中完成诸如本文所述的过程。

[0831] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,在耳蜗椭圆窗膜中或通过耳蜗椭圆窗膜向受试者施用本文所述的任何组合物。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,在耳蜗圆窗膜中或通过耳蜗圆窗膜向受试者施用本文所述的任何组合物。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,使用能够在圆窗膜中形成多个切口的医疗装置来施用组合物。在一些实施方案中,医疗装置包括多个微针。在一些实施方案中,医疗装置包括多个微针,所述多个微针包括基本上圆形的第一外观,其中每个微针的直径为至少约10微米。在一些实施方案中,医疗装置包括基座和/或能够容纳组合物的储器。在一些实施方案中,医疗装置包括多个空心微针,所述多个空心微针单独包括能够转移组合物的内腔。在一些实施方案中,医疗装置包括用于产生至少部分真空的构件。

[0832] 在一些实施方案中,本文公开了一种一次性使用的无菌递送装置,以通过具有位于镫骨足板的排放口的圆窗膜将本文公开的组合物施用至内耳的外淋巴液。在一些实施方案中,在治疗剂的安全性和功效的潜力方面,此定制装置提供优于可用材料和通用手术器械的优势,因为其被专门设计用于耳蜗内施用途途。递送装置的重要设计要素包括:保持注射流体的无菌;使进入内耳的气泡最小化;能够以受控流速精确递送小体积(结合使用标准泵);允许外科医生查看圆窗膜和通过外耳道递送;使对圆窗膜或圆窗膜以外的耳蜗结构的损害最小化;以及使通过圆窗膜的外流最小化。在一些实施方案中,在将约0.09mL的本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)递送到耳蜗的外淋巴中之后,将自耳朵移除定制专用装置。

[0833] 由于感觉细胞和非感觉支持细胞/结构的脆弱性和不可接近性,限制了在无意外损害的情况下的手术方法的类型,因此向内耳递送具有挑战性。在一些实施方案中,填充流体的耳蜗空间的适当排放防止内耳因流体体积增加而受损。

[0834] 哺乳动物内耳的结构和功能在哺乳动物中高度保守(Manley2017,其以引用方式整体并入本文),尽管在灵长类动物和其他哺乳动物之间,相对于妊娠和出生的耳蜗发育时

间存在差异。小鼠的耳蜗发育在出生时仍在进行中,在出生后第12天左右开始有听力(P12; Bulakina 2012,其以引用方式整体并入本文)。相比之下,人在子宫内经历了完全耳蜗发育,且在妊娠第25至28周开始出现听力(Litovsky 2015,其以引用方式整体并入本文)。在开发潜在疗法和其在耳朵中的递送中必须考虑的成熟内耳的两个重要结构方面为:1)不同物种的内耳的大小差异;和2)在耳蜗外淋巴与脑脊液(CSF)之间运行的耳蜗导水管是否通畅。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,耳蜗体积用于剂量外推,例如自动到人。

[0835] 在一些实施方案中,当受试者为啮齿动物,例如小鼠时,使用Yoshimura等人,2018描述的手术方法,所述方法包括通过具有后半规管开窗的圆窗膜来递送,此方法已证明稳健且可靠的转导,而与注射时动物年龄无关(Yoshimura 2018,其以引用方式整体并入本文)。形成耳后切口以进入颞骨。分开胸锁乳突肌的一部分以暴露耳泡。使用直径0.5至0.6mm的耳科钻在耳泡上钻一个小孔;然后将孔扩大以观察镫骨动脉和圆窗膜。使用耳科钻(直径0.5至0.6mm)对后半规管进行开窗,以在耳蜗施用期间充当内耳的排放口。用小鼠递送装置来穿透圆窗膜,所述装置由硼硅酸盐毛细管移液器和10 μ L Hamilton注射器组成,且通过圆窗膜将1 μ L包含病毒颗粒的溶液(内耳总体积的大约40%至50%)以300nL/min的速率递送至鼓阶中。

[0836] 在一些实施方案中,当受试者为NHP时,形成耳后切口且将软组织解剖至骨膜水平。在一些实施方案中,将骨膜切开并升高以暴露乳突骨。使用高速切割和金刚石钻头的组合来进行皮质乳突切除术。然后打开面神经隐窝,从而允许充分显现圆窗和椭圆窗(OW)。使用Rosen针,对OW中的镫骨足板开窗。与其他模型一样,开窗允许注射更大体积而不会损害内耳;此外,排放允许包含rAAV颗粒的溶液流向耳蜗的顶点。通过圆窗膜将30 μ L包含rAAV颗粒的溶液(内耳总体积的大约40%至50%)以30 μ L/min的速率递送。

[0837] 在一些实施方案中,当受试者为哺乳动物(例如人)时,例如使用通过外耳道的较小侵入性方法,因为相关结构相对较大,即使在出生时也为如此。在一些实施方案中,临床施用程序为经耳道探查鼓膜切开术和激光辅助显微镫骨切开术(使用磷酸氧钛钾[KTP]或CO₂耳科激光在镫骨足板上设置一个小排放孔[大约0.25mm]),然后进行圆窗注射,以便在三分钟期间,通过圆窗膜递送约0.09mL(或90 μ L,总内耳体积的大约40%至50%)的包含本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF颗粒)的溶液。在一些实施方案中,排放用于防止迷路内压力的潜在有害升高。经耳道探查鼓膜切开术为用于暴露中耳结构的常见程序;经耳道探查鼓膜切开术通常伴随着激光辅助的镫骨切除术(移除镫骨足板)或镫骨切开术(在镫骨足板上开一个洞),例如对于耳硬化症患者。

[0838] 在一些实施方案中,本公开描述了一种递送方法,其利用通过外耳道进入中耳和/或内耳的较小侵入性、广为接受的手术技术。所述程序包括在椭圆窗处打开中耳与内耳之间的物理屏障之一,且随后使用例如像图33-36所示的本文公开的装置(或微导管)以受控流速和固定体积经由圆窗膜递送本文公开的组合物。

[0839] 在一些实施方案中,用于哺乳动物(例如,啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠或兔)、灵长类动物(例如,NHP(例如,猕猴、黑猩猩、猴子或猿)或人)的手术程序可以包括排放以增加AAV载体沿耳蜗长度的转导率。在一些实施方案中,当与伴随排放来进行手术后的AAV载体耳蜗细胞转导率相比时,在手术期间无排放可导致AAV载体耳蜗细胞转导率更低。在一些实施方案中,排放促进整个耳蜗中约75-100% IHC的转导率。在一些实施方案中,排放使得

耳蜗基部的IHC转导率为约50-70%、约60-80%、约70-90%或约80-100% (参见图28)。在一些实施方案中,排放使得耳蜗顶部的IHC转导率为约50-70%、约60-80%、约70-90%或约80-100% (参见图28)。

[0840] 可将本文所述的递送装置放置在手术室的无菌区中且可将管的末端自无菌区移出并连接至已装载有本文公开的组合物(例如,一种或多种AAV载体)并安装在泵中的注射器。在适当启动(priming)系统以移除任何空气之后,然后可以在可视化(手术显微镜、内窥镜和/或远端摄影机)下将针头穿过中耳。针(或微针)可用于刺穿RWM。可以插入针直到止动器接触到RWM。然后可以将装置保持在所述位置,同时将本文公开的组合物以受控流速递送至内耳,持续所选持续时间。在一些实施方案中,流速(或输注速率)可包括约30 μ L/min、或约25 μ L/min至约35 μ L/min、或约20 μ L/min至约40 μ L/min、或约20 μ L/min至约70 μ L/min、或约20 μ L/min至约90 μ L/min、或约20 μ L/min至约100 μ L/min的速率。在一些实施方案中,流速为约20 μ L/min、约30 μ L/min、约40 μ L/min、约50 μ L/min、约60 μ L/min、约70 μ L/min、约80 μ L/min、约90 μ L/min或约100 μ L/min。在一些实施方案中,流速(或输注速率)可包括约90 μ L/min $\pm$ 10%的速率。在一些实施方案中,流速(或输注速率)可包括约90 μ L/min的速率。在一些实施方案中,所选持续时间(即,本文公开的组合物流动的时间)可为约3分钟、或约2.5分钟至约3.5分钟、或约2分钟至约4分钟、或约1.5分钟至约4.5分钟、或约1分钟至约5分钟。在一些实施方案中,本文公开的组合物流向内耳的总体积可为约0.09mL、或约0.08mL至约0.10mL、或约0.07mL至约0.11mL。在一些实施方案中,本文公开的组合物的总体积等于内耳体积的约40%至约50%。

[0841] 一旦递送完成,即可以移除装置。在一些实施方案中,本文所述的装置可被配置为一次性使用的产品。在其他实施方案中,本文所述的装置可被配置为多用途的可消毒产品,例如,具有可更换和/或可消毒针子组件。一次性使用装置可在施用完成后适当丢弃(例如,在生物危害锐器容器中)。

[0842] 在一些实施方案中,本文公开的组合物包含一种或多种rAAV构建体。在一些实施方案中,当组合物中包括多于一种rAAV构建体时,rAAV构建体各自不同。在一些实施方案中,rAAV构建体包含例如像本文所述的抗VEGF编码区。在一些实施方案中,组合物包含有包含本文所述的AAV构建体的rAAV颗粒。在一些实施方案中,rAAV颗粒被Anc80衣壳包裹。在一些实施方案中,Anc80衣壳包含SEQ ID NO:89的多肽。在一些实施方案中,Anc80衣壳包含SEQ ID NO:113的多肽。在一些实施方案中,Anc80衣壳包含SEQ ID NO:114的多肽。

[0843] 在一些实施方案中,本文公开的组合物可以通过手术程序向受试者施用。在一些实施方案中,例如经由手术程序施用包括经由如本文所述的递送装置将本文公开的组合物注射到内耳中。在一些实施方案中,本文公开的手术程序包括进行经耳道鼓膜切开术;进行激光辅助显微镫骨切开术;以及经由如本文所述的递送装置将本文公开的组合物注射到内耳中。

[0844] 在一些实施方案中,手术程序包括进行经耳道鼓膜切开术;进行激光辅助显微镫骨切开术;经由如本文所述的递送装置将本文公开的组合物注射到内耳中;将密封剂涂覆于受试者的圆窗和/或椭圆窗周围;以及将受试者的鼓膜瓣降低至解剖位置。

[0845] 在一些实施方案中,手术程序包括执行经耳道鼓膜切开术;准备受试者的圆窗;执行激光辅助显微镫骨切开术;制备如本文所述的递送装置和本文公开的组合物用于递送至

内耳;经由递送装置将本文公开的组合物注射到内耳中;将密封剂涂覆于受试者的圆窗和/或椭圆窗周围;以及将受试者的鼓膜瓣降低至解剖位置。

[0846] 在一些实施方案中,执行激光辅助的显微镙骨切开术包括使用KTP耳科激光器和/或CO₂耳科激光器。

[0847] 作为另一个实例,本文公开的组合物使用专门设计用于耳蜗内施用途的装置和/或系统来施用。在一些实施方案中,本文所述装置的设计要素可包括:保持注射流体的无菌;使进入内耳的气泡最小化;能够以受控流速精确递送小体积;由外科医生通过外耳道递送;使对圆窗膜(RWM)或内耳例如RWM以外的耳蜗结构的损害最小化;和/或使注射流体通过RWM回渗最小化。

[0848] 本文提供的装置、系统和方法也描述了将组合物安全且有效地递送到内耳中以治疗将受益于本文公开的组合物到内耳中的递送的病状和病症的潜力,所述病状和病症包括但不限于例如像本文所述的听力病症。作为另一个实例,通过在镙骨足板上设置排放口以及通过RWM注射,本文公开的组合物分散在整个耳蜗中,在作用部位具有最小稀释度。所描述的装置的开发允许通过人的外耳道进行手术施用程序。在将一定量的流体输注到耳蜗的外淋巴中之后,可以自耳朵移除所描述装置。在受试者中,所述装置可以在手术显微镜控制下或与内窥镜一起通过外耳道推进。

[0849] 用于本文公开的任何方法中的示例性装置在图29-32中描述。图29说明了用于将流体递送到内耳的示例性装置10。装置10包括滚花手柄12和耦合到伸缩式海波管针支撑件24的远端手柄黏合剂14(例如,诸如Loctite 4014的环氧树脂)。滚花手柄12(或手柄部分)可包括滚花特征和/或凹槽以增强抓握力。滚花手柄12(或手柄部分)可为约5mm至约15mm厚、或约5mm至约12mm厚、或约6mm至约10mm厚、或约6mm至约9mm厚、或约7mm至约8mm厚。滚花手柄12(或手柄部分)可以为中空的,使得在使用期间流体可以穿过装置10。装置10也可包括在滚花手柄12的近端18处的近端手柄黏合剂16、在装置10的远端20处具有止动器28(如图30所示)的针子组件26(如图30所示)、和应变消除特征22。应变消除特征22可由Santoprene材料、Pebax材料、聚氨甲酸酯材料、硅树脂材料、尼龙材料和/或热塑性弹性体组成。伸缩式海波管针支撑件24围绕设置在其中的弯针38(图30中所示)并支撑所述弯针。

[0850] 仍参考图29,止动器28可以由热塑性材料或塑料聚合物(诸如UV固化聚合物)以及其他合适材料组成,且可以用于防止弯针38插入耳道太远(例如,防止弯针38插入侧壁或其他内耳结构)。装置10也可包括设置在滚花手柄12与远端手柄黏合剂14之间的锥形部分23,所述远端手柄黏合剂14耦合至伸缩式海波管针支撑件24。滚花手柄12(或手柄部分)可包括在手柄部分12的远端处的锥形部分23。装置10也可以包括流体连接到装置10的近端16的管36且用作将装置连接到上游部件(例如,泵、注射器和/或在一些实施方案中可以耦合到控制系统和/或电源(未示出)的上游部件)的流体入口管线。在一些实施方案中,弯针38(如图30所示)自远端20延伸,穿过伸缩式海波管针支撑件24,穿过锥形部分23,穿过滚花手柄12,并穿过应变消除特征22且直接流体连接到管36。在其他实施方案中,弯针38与滚花手柄的中空内部流体连接(例如,经由伸缩式海波管针支撑件24),其进而在近端16与管36流体连接。在弯针38并未一直延伸穿过装置10的内部的实施方案中,接触面积(例如,在重叠嵌套的海波管42之间)、公差和/或接口部件之间的密封剂必须足以防止治疗流体自装置10(其在相对低的压力(例如,约1帕斯卡至约50Pa、或约2Pa至约20Pa、或约3Pa至约10Pa)下操作)

中泄漏出。

[0851] 图30说明根据本发明公开实施方案的方面的弯针子组件26的侧视图。弯针子组件26包括具有弯曲部分32的针38。弯针子组件26也可包括耦合至弯曲部分32的止动器28。弯曲部分32包括在装置10的远端20处的倾斜尖端34,用于刺穿耳膜(例如,RWM)。针38、弯曲部分32和倾斜顶部34为中空,使得流体可以自其中流过。弯曲部分32的角度46(如图33所示)可以变化。止动器28的几何形状可以为圆柱形、圆盘形、环形、圆顶形和/或其他合适形状。止动器28可以模制到弯曲部分32上的位置。例如,止动器28可以使用黏合剂或压缩配合围绕弯曲部分32同心地定位。黏合剂的实例包括UV固化黏合剂(诸如Dymax 203A-CTH-F-T)、弹性体黏合剂、热固性黏合剂(诸如环氧树脂或聚氨甲酸酯)或乳液黏合剂(诸如聚乙酸乙烯酯)。止动器28围绕弯曲部分32同心地装配,使得倾斜尖端34以所需插入深度插入耳朵中。弯针38可以使用增量成形以及其他合适技术由直针形成。

[0852] 图31说明用于将流体递送至内耳的示例性装置10的透视图。管36的长度可以为约1300mm(图31中的尺寸11)至约1600mm、或约1400mm至约1500mm、或约1430mm至约1450mm。应变释放特征22的长度可为约25mm至约30mm(图31中的尺寸15),或长度为约20mm至约35mm。手柄12的长度可为约155.4mm(图31中的尺寸13)、或约150mm至约160mm、或约140mm至约170mm。伸缩式海波管针支撑件24可具有两个或更多个嵌套海波管,例如三个嵌套海波管42A、42B和42C,或四个嵌套海波管42A、42B、42C和42D。海波管42A、42B、42C和尖端组件26的总长度(图31中的尺寸17)可以为约25mm至约45mm、或约30mm至约40mm、或约35mm。此外,伸缩式海波管针支撑件24的长度可为约36mm、或约25mm至约45mm、或约30mm至约40mm。三个嵌套海波管42A、42B和42C各自可分别具有3.5mm、8.0mm和19.8mm加或减约20%的长度。伸缩式海波管针支撑件24的最内部嵌套海波管(或最窄部分)可以围绕针38同心地设置。

[0853] 图32说明根据本发明公开实施方案的方面的耦合至装置10的远端20的弯针子组件26的透视图。如图32所示,弯针子组件26可包括耦合至弯曲部分32的针38。在其他实施方案中,弯针38可以为单个针(例如,然后弯曲成使其包括所需角度46的直针)。针38可以为33号针,或可以包括约32号到约34号或约31号到35号。在更细规格下,必须注意确保管36不会扭结或损坏。针38可以附接到手柄12上,以便将针38安全且准确地放置到内耳中。如图32所示,弯针子组件26也可包括围绕弯曲部分32安置的止动器28。图32也表明弯曲部分32可包括倾斜尖端34,用于刺穿耳膜(例如,RWM)。止动器28的高度48可以为约0.5mm、或约0.4mm至约0.6mm、或约0.3mm至约0.7mm。弯曲部分32的长度52可以为约1.45mm、或约1.35mm至约1.55mm、或约1.2mm至约1.7mm。在其他实施方案中,弯曲部分32的长度可以大于2.0mm,使得止动器28的远端与倾斜尖端34的远端之间的距离为约0.5mm至约1.7mm、或约0.6mm至约1.5mm、或约0.7mm至约1.3mm、或约0.8mm至约1.2mm。图32表明止动器28可以具有圆柱形、盘形和/或圆顶形的几何形状。本领域普通技术人员将理解,可以使用其他几何形状。

[0854] 治疗受试者的方法

[0855] 除其他外,本公开提供的是,本文所述的技术可用于治疗患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于所述疾病的风险下的受试者的潜在疾病和/或症状。

[0856] 在一些实施方案中,方法包括向受试者施用本文所述的构建体(例如,rAAV构建体)、颗粒(例如,rAAV颗粒)或本文所述的组合物。在一些实施方案中,方法为治疗方法。在一些实施方案中,受试者为患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于所述疾病

的风险下的受试者。

[0857] 在一些实施方案中,向受试者施用本文所述的构建体(例如,rAAV构建体)、颗粒(例如,rAAV颗粒)或本文所述的组合物可以减轻和/或改善与以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)相关的一种或多种症状。症状可包括例如听力损失、毛细胞退化、内耳液生化环境的改变、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血、耳蜗血管供应中断、耳鸣、头晕、顽固性头痛、面部神经病变、三叉神经病变、面瘫、面部感觉异常、脑积水、小脑疝和/或死亡。

[0858] 在一些实施方案中,以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)与基因突变(例如,缺失突变、移码突变、无义突变、亚形态突变、超形态突变、新形态突变、异常过度表达、异常低表达等)。在一些实施方案中,患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于所述疾病的风险下的受试者可能在与耳科肿瘤进展相关的基因中具有突变,其特征可如本文所述。

[0859] 在一些实施方案中,在用本文所述的技术(例如实时PCR、定量实时PCR、Western印迹、免疫沉淀、免疫组织化学、质谱、或免疫荧光、基因和/或蛋白质表达的间接表型测定(例如,通过功能性听力测试、ABR、DPOAE等)等)治疗之前、期间和/或之后,在基因上和/或在症状上表征受试者。在一些实施方案中,患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于所述疾病的风险下的受试者可使其相关疾病状态通过组织取样(例如,包含一个或多个内耳细胞,例如,包含一个或多个毛细胞和/或一个或多个支持细胞)来表征。在一些实施方案中,在施用如本文所述的任何技术(例如方法,例如组合物,例如包含构建体和/或颗粒的组合物等)之前、期间和/或之后,经由形态学分析评价组织以确定毛细胞和/或支持细胞的形态。在一些此类实施方案中,可以进行标准免疫组织化学或组织学分析。在一些实施方案中,若细胞在体外或离体使用,则可以进行额外免疫细胞化学或免疫组织化学分析。在一些实施方案中,可以对来自受试者或体外细胞群的一种或多种样品进行一种或多种蛋白质或转录物的一种或多种测定(例如,Western印迹、ELISA、聚合酶链反应)。

[0860] 在一些实施方案中,当与用本文所述的技术治疗之前进行的免疫组织化学测试比较时,或当与对照群体比较时,向受试者施用本文所述的构建体(例如,rAAV构建体)、颗粒(例如,rAAV颗粒)或本文所述的组合物改善了受试者的免疫组织化学评价(例如,如上所述的测试)。

[0861] 治疗受试者以改善听力损失、耳鸣、头晕和/或语言的症状

[0862] 在一些实施方案中,患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于所述疾病的风险下的受试者可接受以听力功能表征的治疗方案。在一些实施方案中,治疗方案的功能性通过听力功能表征,其中在用本文所述的组合物和方法治疗之前、之后和/或期间使用听觉脑干反应测量(ABR)在个体中确定此听力功能。在一些实施方案中,治疗方案的功能性通过听力功能表征,其中在用本文所述的组合物和方法治疗之前、之后和/或期间通过测量畸变产物耳声发射(DPOAE)在个体中确定此听力功能。在一些此类实施方案中,自受试者的一只耳朵或两只耳朵进行听力测量。在一些此类实施方案中,将记录与同一受试者的先前记录和/或用于定义例如相对于被定义为正常听力的可接受听力范围的听力损失的此类响应测量的已知阈值进行比较。在一些实施方案中,受试者在接受任何治疗之前记录了ABR和/或DPOAE测量值。在一些实施方案中,与治疗前相比,用本文所述的一种或多种技术治疗

的受试者在治疗后将在ABR和/或DPOAE测量方面有所改善。在一些实施方案中,在施用治疗后和施用后的定期随访间隔进行ABR和/或DPOAE测量。在一些实施方案中,当与在用本文所述的技术治疗之前进行的测试相比时或当与对照群体相比时,使用本文所述的技术的治疗改进受试者的测试评价(例如,如上所述的测试)。

[0863] 在一些实施方案中,患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于患有所述疾病的风险下的受试者可具有以听力功能随着语言、语言理解和/或音调识别而变化的特征的治疗方案。在一些实施方案中,治疗方案的功能性通过确定语言模式识别来表征和/或由语言治疗师确定。在一些实施方案中,使用本文所述的技术的治疗性治疗方案的功能性通过纯音测试确定。在一些实施方案中,使用本文所述的技术的治疗性治疗方案的功能性通过骨传导测试确定。在一些实施方案中,使用本文所述的技术的治疗性治疗方案的功能性通过声反射测试确定。在一些实施方案中,使用本文所述的技术的治疗性治疗方案的功能性通过鼓室测压法来确定。在一些实施方案中,使用本文所述的技术的治疗性治疗方案的功能性由本领域已知的听力分析的任何组合确定。在一些实施方案中,使用本文所述的技术的治疗性治疗方案的功能性为整体测量的,且/或自受试者的一只耳朵或两只耳朵测量。在一些实施方案中,使用本文所述的技术的治疗性治疗方案的功能性利用与同一受试者的先前记录和/或分析和/或用于定义例如相对于被定义为正常听力的可接受听力范围的听力损失的此类响应测量的已知阈值相比较,在方案后获得的记录和/或专业分析。在一些实施方案中,治疗受试者在接受任何治疗之前进行语言模式识别、纯音测试、骨传导测试、声反射测试和/或鼓室压测量和/或分析。在一些实施方案中,与治疗前相比,用本文所述的一种或多种技术治疗的受试者在治疗后将在语言模式识别、纯音测试、骨传导测试、声反射测试和/或鼓室压测量方面有所改善。在一些实施方案中,在施用治疗后和施用后的定期随访间隔进行语言模式识别、纯音测试、骨传导测试、声反射测试和/或鼓室压测量。在一些实施方案中,当与在用本文所述的技术治疗之前进行的测试相比时或当与对照群体相比时,使用本文所述的技术的治疗改进受试者的测试评价(例如,如上所述的测试)。

[0864] 在一些实施方案中,患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于所述疾病的风险下的受试者可通过包含行为测听评价的方法来经历治疗功能评价。在一些实施方案中,行为测听评价包括具有适当掩蔽的空气和骨骼曲线的纯音测听、语言测听、安静中的词或噪声中的词分析。在一些实施方案中,行为测听评价包括通过听觉脑干反应测试进行的电生理测听。在一些实施方案中,行为测听评价包括标准化问卷:HHIA:成人听力障碍量表,DHI:头晕障碍量表,THI:耳鸣障碍量表,PANQOL:宾州听神经瘤生活品质(QoL)。在一些实施方案中,当与在用本文所述的技术治疗之前进行的测试相比时或当与对照群体相比时,使用本文所述的技术的治疗改进受试者的测试评价(例如,如上所述的测试)。

[0865] 在一些实施方案中,可以通过评价耳科、前庭和/或全身不良事件以及血液学、临床化学和/或尿液分析参数来监测患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于所述疾病的风险下的受试者。在一些实施方案中,可以评估接受使用本文所述的技术的治疗的受试者的血液中的抗VEGF蛋白水平和耳拭子、鼻拭子、唾液和血液中的构建体DNA。在一些实施方案中,接受使用本文所述的技术的治疗的受试者可收集血液用于评价对衣壳和/或分泌的转基因产物的潜在体液免疫反应。

[0866] 在一些实施方案中,患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于所述疾

病的风险下的受试者可使其治疗功能通过ABR测试来分析。在一些实施方案中,ABR测试测量受试者的耳蜗、耳蜗神经和脑干是否对每个声音刺激做出响应,此类测试通常用作耳朵健康的量度。在一些实施方案中,除了测量受试者脑干可以可靠地处理的各个刺激频率的最低强度(阈值)之外,也可以测量响应于超阈值刺激的波I的幅度,以评估自耳蜗毛细胞到听觉神经的传入信息流的完整性。在一些实施方案中,ABR阈值可以提供关于受试者耳朵传递到脑干并由脑干处理的最低声音水平的重要信息,ABR波I的幅度中的超阈值响应已越来越多地用作内毛细胞基部和听神经树突之间的带状突触连接的完整性的代表。在一些实施方案中,当与在用本文所述的技术治疗之前进行的测试相比时或当与对照群体相比时,使用本文所述的技术的治疗改善受试者的ABR评价。

[0867] 在一些实施方案中,患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于所述疾病的风险下的受试者可使其治疗功能通过基于DPOAE的测试来分析。在一些实施方案中,DPOAE为由耳蜗外毛细胞的运动产生的声音,且在耳道中使用换能器和麦克风组合进行非侵入性测量。在一些实施方案中,诱发的DPOAE的大小为外毛细胞功能的有用量度。在一些实施方案中,向耳朵呈现两个主要音调(f_1 和 f_2),产生机械振动,在刺激和畸变频率下引起耳蜗流体的压力变化。在一些实施方案中,这些压力变化反向驱动耳朵,激活中耳然后激活鼓膜以在耳道中产生声音。在一些实施方案中,DPOAE以在ABR中使用的相同测试频率(8、16、32kHz)收集且可以在受试者针对ABR处于麻醉状态时进行。在一些实施方案中, f_2 以8、16和32kHz为中心,而 $f_1 = f_2 * 0.8 + 10\text{dB}$ 。在一些实施方案中,在各频率下,以5-dB递增的增量呈现10-80dB SPL的音调。在一些实施方案中,DPOAE评估外毛细胞功能,因此通常用作响应强度的超阈值评估,被测量为畸变产物发射响应的幅度。在一些实施方案中,使用所有三个测试频率。在一些实施方案中,对于所测试的各个频率可能无法获得可靠畸变产物响应,在此类情况下,可以适当地进行分析。在一些实施方案中,当与在用本文所述的技术治疗之前进行的测试相比时或当与对照群体相比时,使用本文所述的技术的治疗改善受试者的BPOAE评价。

[0868] 治疗受试者以减小肿瘤大小和/或血管系统

[0869] 在一些实施方案中,患有以血管新生为特征的耳科疾病(例如,VS)或处于所述疾病的风险下的受试者可使其治疗功能通过基于图像的技术来分析。在一些实施方案中,可以使用放射照相方法测量用本文所述的组合物和方法治疗个体的功效。在一些实施方案中,此类放射照相方法可包括但不限于计算机断层扫描(CT)(也称为计算机轴向断层扫描(CAT)扫描)、X射线、磁共振成像(MRI)、三维流体衰减反转恢复(3D-FLAIR)MRI、正电子发射断层扫描(PET)和/或PET-CT扫描。其他可能合适的放射照相技术和方法为本领域已知的。在一些实施方案中,当与在用本文所述的技术治疗之前进行的测试相比时或当与对照群体相比时,使用本文所述的技术的治疗改善受试者的基于图像的评价。

[0870] 在一些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者与通过放射照相技术测量的VS大小的减小相关。在一些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者与通过放射照相技术测量的VS大小的停滞相关。在一些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者与通过放射照相技术测量的VS大小生长的减缓相关。

[0871] 在一些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者与三维流体衰减反转恢复(3D-FLAIR)MRI上流体的信号强度降低相关。在某些实施方案中,3D FLAIR图像上较高耳蜗信号

与VS患者的听力损失之间存在相关性。在某些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者降低了与VS受试者的FLAIR图像上的耳蜗信号增强相关的外淋巴空间中的蛋白质浓度。

[0872] 治疗受试者以改善神经功能

[0873] 在一些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者与神经功能的改善相关。在一些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者减轻肿瘤水肿。在一些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者使个体的肿瘤血管系统暂时和/或稳定地正常化。

[0874] 在一些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者与语言理解改善和/或恢复相关。在一些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者与患者感知的语言理解困难的减少相关。在一些实施方案中,用本文所述的技术治疗受试者与个体报告的生活品质的改善和/或恢复相关。

[0875] 表征疾病状态的方法

[0876] 除其他外,本公开提供了表征受试者的疾病状态的方法,例如患有VS或处于VS的风险下的受试者。在一些实施方案中,疾病状态可以通过确定基因中突变的存在(或不存在)来表征。术语“基因中的突变”是指已知共有功能基因中的修饰,所述修饰产生与共有功能蛋白相比具有以下中的一者或多者的蛋白:一个或多个氨基酸缺失、一个或多个氨基酸取代和一个或多个氨基酸插入,且/或导致与不具有突变的哺乳动物细胞中编码蛋白的表达水平相比,哺乳动物细胞中编码蛋白的表达水平降低。在一些实施方案中,突变可产生具有一个或多个氨基酸(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个氨基酸)缺失的蛋白。在一些实施方案中,突变可使基因移码。术语“移码”在本领域中已知涵盖编码序列中引起编码序列的阅读框中移位的任何突变。在一些实施方案中,移码可产生无功能蛋白。在一些实施方案中,点突变可为无义突变(例如,在基因外显子中产生提前终止密码子)。无义突变可产生可有功能或可无功能的截短蛋白(与相应共有功能蛋白相比)。在一些实施方案中,所述突变可引起mRNA或蛋白质或者mRNA与蛋白两者的表达损失(或水平降低)。在一些实施方案中,与共有功能蛋白相比,所述突变可产生一种或多种生物活性(功能)损失或降低的改变的蛋白。

[0877] 在一些实施方案中,突变为将一个或多个核苷酸插入到基因中。在一些实施方案中,突变在基因的调控和/或控制序列中,即,所述基因中不为编码序列的一部分中。在一些实施方案中,调控和/或控制序列中的突变可在启动子或增强子区中,且阻止或减少基因的适当转录。在一些实施方案中,突变在已知与蛋白质相互作用的已知异源基因中。

[0878] 基因分型和/或检测基因mRNA和/或蛋白质的表达或活性的方法为本领域已知的(参见例如Ito等人,World J Otorhinolaryngol.2013年5月28日;3(2):26-34和Roesch等人,Int J Mol Sci.2018年1月;19(1):209,其中每一者以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,可以直接检测mRNA或蛋白质的表达水平(例如,检测蛋白质、检测mRNA等)。可用于直接检测基因的表达和/或活性的技术的非限制性实例包括例如实时PCR、定量实时PCR、Western印迹、免疫沉淀、免疫组织化学、质谱或免疫荧光。在一些实施方案中,可间接检测基因和/或蛋白质的表达(例如,通过功能听力测试、ABR、DPOAE等)。

[0879] 在一些实施方案中,在施用如本文所述的任何剂(例如组合物,例如包含构建体和/或颗粒的组合物等)之前和之后,组织样品(例如,包含一个或多个内耳细胞,例如,包含一个或多个毛细胞和/或一个或多个支持细胞)可经由形态学分析来评价以确定毛细胞和/

或支持细胞的形态。在一些此类实施方案中,可以进行标准免疫组织化学或组织学分析。在一些实施方案中,若细胞在体外或离体使用,则可以进行额外免疫细胞化学或免疫组织化学分析。在一些实施方案中,可以对来自受试者或体外细胞群的一种或多种样品进行一种或多种蛋白质或转录物的一种或多种测定(例如,Western印迹、ELISA、聚合酶链反应)。

[0880] 评价听力损失、耳鸣、头晕和症状恢复

[0881] 在一些实施方案中,在用本文所述的组合物和方法治疗之前、之后和/或期间使用听觉脑干反应测量(ABR)在个体中确定听力功能。在一些实施方案中,在用本文所述的组合物和方法治疗之前、之后和/或期间通过测量畸变产物耳声发射(DPOAE)在个体中确定听力功能。在一些此类实施方案中,自受试者的一只耳朵或两只耳朵进行测量。在一些此类实施方案中,将记录与同一受试者的先前记录和/或用于定义例如相对于被定义为正常听力的可接受听力范围的听力损失的此类响应测量的已知阈值进行比较。在一些实施方案中,受试者在接受任何治疗之前记录了ABR和/或DPOAE测量值。在一些实施方案中,与治疗前相比,用本文所述的一种或多种技术治疗的受试者在治疗后将在ABR和/或DPOAE测量方面有所改善。在一些实施方案中,在施用治疗后和治疗后的定期随访间隔进行ABR和/或DPOAE测量。

[0882] 在一些实施方案中,听力功能使用语言模式识别来确定或由语言治疗师确定。在一些实施方案中,听力功能通过纯音测试确定。在一些实施方案中,听力功能通过骨传导测试确定。在一些实施方案中,听力功能通过声反射测试确定。在一些实施方案中,听力功能通过鼓室测压法确定。在一些实施方案中,听力功能通过本领域已知的听力分析的任何组合来确定。在一些此类实施方案中,测量为整体进行的,且/或自受试者的一只耳朵或两只耳朵进行。将记录和/或专业分析与同一受试者的先前记录和/或分析和/或用于定义例如相对于被定义为正常听力的可接受听力范围的听力损失的此类响应测量的已知阈值进行比较。在一些实施方案中,受试者在接受任何治疗之前进行语言模式识别、纯音测试、骨传导测试、声反射测试和/或鼓室压测量和/或分析。在一些实施方案中,与治疗前相比,用本文所述的一种或多种技术治疗的受试者在治疗后将在语言模式识别、纯音测试、骨传导测试、声反射测试和/或鼓室压测量方面有所改善。在一些实施方案中,在施用治疗后和治疗后的定期随访间隔进行语言模式识别、纯音测试、骨传导测试、声反射测试和/或鼓室压测量。

[0883] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法包括行为测听评价。在一些实施方案中,行为测听评价包括具有适当掩蔽的空气和骨骼曲线的纯音测听、语言测听、安静中的词或噪声中的词。在一些实施方案中,行为测听评价包括通过听觉脑干反应测试进行的电生理测听。在一些实施方案中,行为测听评价包括标准化问卷:HHIA:成人听力障碍量表,DHI:头晕障碍量表,THI:耳鸣障碍量表,PANQOL:宾州听神经瘤生活品质(QoL)。

[0884] 在本文公开的任何方法的一些实施方案中,安全性和功效可以通过耳科、前庭和全身不良事件以及血液学、临床化学和/或尿液分析参数的评价来监测。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,待评估的额外参数将包括血液中的抗VEGF蛋白水平和耳拭子、鼻拭子、唾液和血液中的构建体DNA。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,也可以收集血液以评价对衣壳和分泌的转基因产物的潜在体液免疫反应。

[0885] ABR测试测量动物的耳蜗、耳蜗神经和脑干是否对每个声音刺激做出响应,且通常

用作耳朵健康的量度。此相同的基本测试通常用于在医院测试新生儿的听力,并且它为用于实验室动物的标准听力测试。在一些实施方案中,ABR测试涉及向小鼠注射IP剂量的氯氨酮/甲苯噻嗪麻醉剂以使运动和肌肉伪象最小化并帮助放置测量电极。在一些实施方案中,ABR测试(当同时使用DPOAE且在双耳中进行时)需要大约45分钟才能完成,因此有时需要加强剂量的麻醉剂。在一些实施方案中,麻醉剂的初始剂量由氯氨酮(100mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg) IP组成,且若需要,则为由原始氯氨酮剂量的1/4-1/2组成的仅氯氨酮加强剂。在一些实施方案中,基于兽医建议不进行甲苯噻嗪的重新给药。在一些实施方案中,将穿过皮肤表面的经皮记录电极放置在三个标准位置(在耳朵之间等距的颅骨顶点处、在测试耳朵的耳廓后面的乳突上方和相反耳朵的耳廓后面的乳突上方用于接地电极)。在一些实施方案中,刺激由以递增5-dB步进自10dB SPL至80dB SPL的低(8kHz)、中(16kHz)和高(32kHz)频率纯音pip刺激(0.1ms上升下降,1.5ms持续时间)组成。在一些实施方案中,刺激将以30/秒的速率呈现,且在每个刺激水平获得512个无伪象的平均值。在一些实施方案中,取决于组,在2-3个独立的时间点收集ABR;基线和末期第4-6周,部分动物也在手术后3周进行测试。在一些实施方案中,除了测量动物脑干可以可靠地处理的各个刺激频率的最低强度(阈值)之外,也可以测量响应于超阈值刺激的波I的幅度,以评估自耳蜗毛细胞到听觉神经的传入信息流的完整性。在一些实施方案中,ABR阈值可以提供关于动物耳朵传递到脑干并由脑干处理的最低声音水平的重要信息,ABR波I的幅度中的超阈值响应已越来越多地用作内毛细胞底部和听神经树突之间的带状突触连接的完整性的代表。

[0886] DPOAE为由耳蜗外毛细胞的运动产生的声音,且在耳道中使用换能器和麦克风组合进行非侵入性测量。在一些实施方案中,诱发的DPOAE的大小为外毛细胞功能的有用量度。此相同的基本测试通常也用于在医院测试新生儿的听力,并且它为用于实验室动物的标准听力测试。在一些实施方案中,向耳朵呈现两个主要音调(f_1 和 f_2),产生机械振动,在刺激和畸变频率下引起耳蜗流体的压力变化。在一些实施方案中,这些压力变化反向驱动耳朵,激活中耳且然后激活鼓膜以在耳道中产生声音。在一些实施方案中,DPOAE以在ABR中使用的相同测试频率(8、16、32kHz)收集且在针对ABR处于麻醉状态时进行。在一些实施方案中, f_2 以8、16和32kHz为中心,而 $f_1 = f_2 * 0.8 + 10\text{dB}$ 。在一些实施方案中,在各频率下,以5-dB递增的增量呈现10-80dB SPL的音调。在一些实施方案中,DPOAE评估外毛细胞功能,且因此通常用作响应强度的超阈值评估,被测量为畸变产物发射响应的幅度。在一些实施方案中,使用所有三个测试频率。在一些实施方案中,对于所测试的各个频率可能无法获得可靠畸变产物响应,在这些情况下,可以适当地进行分析。

[0887] 评估肿瘤大小和血管系统

[0888] 在一些实施方案中,可以使用放射照相方法测量用本文所述的组合物和方法治疗个体的功效。在一些实施方案中,此类放射照相方法可包含计算机断层扫描(CT)(也称为计算机轴向断层扫描(CAT)扫描)、X射线、磁共振成像(MRI)、三维流体衰减反转恢复(3D-FLAIR)MRI、正电子发射断层扫描(PET)和/或PET-CT扫描。其他可能合适的放射照相技术和方法为本领域已知的。

[0889] 在一些实施方案中,用本文所述的方法和/或组合物治疗个体与通过放射照相技术测量的VS大小的减小相关。在一些实施方案中,用本文所述的方法和/或组合物治疗个体与通过放射照相技术测量的VS大小的停滞相关。在一些实施方案中,用本文所述的方法和/

或组合物治疗个体与通过放射照相技术测量的VS大小生长的减缓相关。

[0890] 在一些实施方案中,用本文所述的方法和/或组合物治疗个体与三维流体衰减反转恢复(3D-FLAIR)MRI上流体的信号强度降低相关联。在某些实施方案中,3D FLAIR图像上较高耳蜗信号与VS患者的听力损失之间存在相关性。在某些实施方案中,如本文所述的方法和/或组合物降低了与VS受试者的FLAIR图像上的耳蜗信号增强相关的外淋巴空间中的蛋白质浓度。

[0891] 评价神经功能

[0892] 在一些实施方案中,用本文所述的方法和/或组合物治疗个体与神经功能的改善相关。在一些实施方案中,用方法和/或组合物治疗个体减轻肿瘤水肿。在一些实施方案中,用方法和/或组合物治疗个体暂时和/或稳定地使个体的肿瘤血管系统正常化。

[0893] 在一些实施方案中,用本文所述的方法和/或组合物治疗个体与语言理解改善和/或恢复相关。在一些实施方案中,用本文所述的方法和/或组合物治疗个体与患者感知的语言理解困难的减少相关。在一些实施方案中,用本文所述的方法和/或组合物治疗个体与个体报告的生活品质的改善和/或恢复相关。

[0894] 评价生物样品中的抗VEGF蛋白浓度

[0895] 在一些实施方案中,本文所述的方法包括在用本文所述的组合物治疗之前、期间和/或之后评价来自个体的一个或多个生物样品中的抗VEGF蛋白浓度。

[0896] 在这些方法的一些实施方案中,在治疗后,例如一次或两次或更多次施用本文所述的组合物后,抗VEGF蛋白的表达增加。在一些实施方案中,当相对于对照水平,例如与引入包含如本文所述的任何构建体的组合物之前抗VEGF蛋白的表达水平相比时,如本文所述的活性抗VEGF蛋白的表达增加。

[0897] 检测靶RNA和/或蛋白质的表达和/或活性的方法为本领域中已知的。在一些实施方案中,可直接检测内耳细胞靶蛋白的表达水平(例如,检测内耳细胞靶蛋白或靶mRNA)。可用于直接检测靶RNA或蛋白质的表达和/或活性的技术的非限制性实例包括:实时PCR、Western印迹、免疫沉淀、免疫组织化学、质谱或免疫荧光。在一些实施方案中,可间接检测内耳细胞靶蛋白的表达(例如,通过功能听力测试)。

[0898] 在一些实施方案中,进行rAAV颗粒的生物分布和/或流泄分析。在一些实施方案中,本文公开了一种组合物,其包含rAAV-抗VEGF复制缺陷型rAAV颗粒,用于递送cDNA,例如,以表达抗VEGF蛋白。在一些实施方案中,如本文所述的rAAV颗粒用于治疗患有VS或处于发展VS的风险下的受试者,例如人,例如患者。在一些实施方案中,本文公开的组合物经由耳蜗内途径来施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物以本文所述的rAAV颗粒的剂量施用(例如,如通过载体基因组qPCR分析测量的)。在一些实施方案中,本文公开的组合物施用身体局部区域。在一些实施方案中,本文公开的组合物导致构建体序列在身体局部区域例如耳蜗和/或外淋巴处的可检测表达。在一些实施方案中,预期本文公开的组合物导致有限血管扩散和全身暴露。在一些实施方案中,本文公开的组合物在耳蜗中产生更高水平的构建体序列,但在非耳蜗组织或流体隔室例如肝脏、脾脏、淋巴结、脑干、听觉皮层、血清和/或CSF中不产生。在一些实施方案中,本文公开的组合物在所收集的非耳蜗组织和流体中产生较低但可检测水平的构建体序列。在一些实施方案中,构建体序列在非耳蜗组织中的表达处于与治疗无关的水平。在一些实施方案中,构建体序列的水平通常到六个月总体上降

低。在一些实施方案中,构建体序列的水平在血液样品中随时间降低,例如在耳蜗内施用本文公开的组合物后一个月。

[0899] 在本文公开的任何方法或用途的一些实施方案中,本文公开的构建体或AAV颗粒的特征在于当(例如,通过耳蜗内途径)施用于受试者时,抗VEGF蛋白在受试者的局部区域中(例如,在受试者的外淋巴中)以可检测水平表达。在一些实施方案中,抗VEGF蛋白在受试者的外淋巴中表达。在一些实施方案中,抗VEGF蛋白以约20ng/mL至约1000ng/mL、约40ng/mL至约1000ng/mL、60ng/mL至约1000ng/mL、80ng/mL至约1000ng/mL、100ng/mL至约1000ng/mL、200ng/mL至约1000ng/mL、300ng/mL至约1000ng/mL、400ng/mL至约1000ng/mL、500ng/mL至约1000ng/mL、600ng/mL至约1000ng/mL、700ng/mL至约1000ng/mL、800ng/mL至约1000ng/mL、900ng/mL至约1000ng/mL、约20ng/mL至约900ng/mL、约20ng/mL至约800ng/mL、约20ng/mL至约700ng/mL、约20ng/mL至约600ng/mL、约20ng/mL至约500ng/mL、约20ng/mL至约400ng/mL、约20ng/mL至约300ng/mL、约20ng/mL至约200ng/mL、约20ng/mL至约100ng/mL、约20ng/mL至约80ng/mL、约20ng/mL至约60ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL的范围表达。在一些实施方案中,抗VEGF蛋白以约20ng/mL、约30ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约300ng/mL、约400ng/mL、约500ng/mL、约600ng/mL、约700ng/mL、约800ng/mL、约900ng/mL或约1000ng/mL表达。

[0900] 在本文公开的任何方法或用途的一些实施方案中,构建体或AAV颗粒的特征在于当(例如,通过耳蜗内途径)施用于受试者时,抗VEGF蛋白在血清、CSF或非耳蜗组织或其组合中不以可检测水平存在。在一些实施方案中,非耳蜗组织选自肝脏、颅神经、脾脏、下颌淋巴结、腋窝淋巴结和腹股沟淋巴结中的一种或多种。

[0901] 在本文公开的任何方法或用途的一些实施方案中,构建体或AAV颗粒的特征在于当(例如,通过耳蜗内途径)施用于受试者时,观察到抗VEGF蛋白的剂量依赖性表达。在一些实施方案中,增加构建体或AAV颗粒的剂量例如在受试者的局部区域中(例如在受试者的外淋巴中)产生更高水平的抗VEGF蛋白。

[0902] 在本文公开的任何方法或用途的一些实施方案中,构建体或AAV颗粒的特征在于当(例如,通过耳蜗内途径)施用于受试者时,抗VEGF蛋白存在于耳朵中发现VS的一个或多个位置处或附近。在一些实施方案中,VS包括早期VS或晚期VS。在一些实施方案中,VS包括I级、II级、III级或IV级VS。在一些实施方案中,VS位置的特征在于其距内耳道(IAC)底部的距离。在一些实施方案中,所述位置距IAC底部约1-5mm。在一些实施方案中,所述位置距IAC底部约1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5mm。在一些实施方案中,抗VEGF蛋白以生物活性阈值或高于生物活性阈值存在,例如,如本文所述。

[0903] 在本文公开的任何方法的一些实施方案中,收集和/或评价用于生物分布和流泄的相关流体(例如,血液、血清、尿液、唾液、鼻拭子和耳拭子以及CSF流体)。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,收集和/或评价非目标组织。在一些实施方案中,预期衣壳变体确定趋向性。在一些实施方案中,本文公开的组合物包含衣壳变体,例如AAVAnc80衣壳变体。在一些实施方案中,例如经由相同施用途、在相同颗粒制剂中和/或以等效或更低颗粒剂量递送本文公开的包含衣壳变体的组合物预期不会导致生物分布和流泄模式的差异。

[0904] 在一些实施方案中,本文公开的组合物,例如rAAV-抗VEGF,以小于约 5×10^{12} 总vg/耳蜗的水平给药。在一些实施方案中,本文公开的组合物,例如rAAV-抗VEGF,以小于约

5×10^{13} vg/耳蜗的水平给药。在一些实施方案中,本文公开的组合物剂量随着例如体积和rAAV颗粒浓度的限制而变化。

[0905] 相比之下,在一些情况下,使用rAAV颗粒的临床试验经由全身施用途向年龄6个月以下的参与者递送了超过 1×10^{14} vg/kg (AveXis 2019,其以引用方式整体并入本文)。

[0906] 其他使用相对低剂量的rAAV颗粒的局部递送尚未报告目标区域以外的广泛生物分布,例如,遍及全身,或广泛rAAV颗粒流泄(排泄/分泌;通常通过诸如qPCR的方法测量潜在构建体DNA浓度)。例如,据报导,对于以 7.5×10^{11} vg/眼的剂量来双侧递送的Luxturna®,在眼部目标区域以外(特别为在注射颗粒的眼睛的视神经、视交叉、脾脏和肝脏中,以及偶尔在研究动物的淋巴结中)的分布水平较低。类似地,在3期临床试验中,45%参与者的眼泪中rAAV颗粒短暂地以低水平流泄;在视网膜下施用以 1.5×10^{11} vg/眼的剂量双侧递送的Luxturna®之后的几天内,在10%参与者的血清(但不是全血)样品中检测到所述颗粒的水平也很低(Russell 2017;Spark Therapeutics 2017,其中每一者以引用方式整体并入本文)。

[0907] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法包括使用例如验证的qPCR方法来评价在单侧施用耳蜗后一段时间内的血液(例如血清和全血)中rAAV颗粒序列的分布。在一些实施方案中,将收集额外样本(例如,外耳道拭子、鼻拭子、唾液和尿液)用于评价受试者的流泄。在一些实施方案中,自受试者收集样本直到获得至少三个连续阴性样品。

[0908] 在一些实施方案中,在用本文所述的组合物和/或方法治疗之前、期间和/或之后测量与VS相关听力损失相关的蛋白质。在某些实施方案中,此类VS相关听力损失相关蛋白包括: μ -晶体蛋白(CRYM)、低密度脂蛋白受体相关蛋白2(LRP2)、免疫球蛋白(Ig) γ -4链C区、Ig κ 链C区、补体C3、免疫球蛋白重恒定 γ 3和/或趋化因子受体4(CXCR4)。

[0909] 在一些实施方案中,测量对AAV衣壳和/或颗粒的免疫原性。对递送到局部区域且与全身应用相比剂量相对较低的AAV衣壳和/或颗粒的免疫原性通常不会产生特定免疫反应模式;重要地是,通过体液和细胞介导的免疫监测(例如,分别通过酶联免疫吸附测定[ELISA]/中和抗体[NAb]和酶联免疫吸附斑点[ELISPOT]测定)观察到的反应主要对于提供一些免疫保护的施用途(ROA)(例如,直接施用至大脑)无临床相关性。

[0910] 在本文公开的任何方法的一些实施方案中,预期耳蜗内ROA,例如在具有非开放耳蜗导水管的物种(例如,NHP和人)中提供相似水平的保护。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,受试者将在施用本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)之前3天开始,接受短期围手术期免疫调节方案,例如全身口服皮质类固醇,持续大约17天。在一些实施方案中,免疫调节方案减少与手术施用程序相关的炎症。在一些实施方案中,免疫调节方案也可以进一步降低对衣壳(例如,AAVAnc80)或基础构建体(例如,转基因产物,例如,抗VEGF蛋白)的免疫反应的可能性。

[0911] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法进一步包括评价响应于本文公开的组合物施用的体液免疫(例如,抗体反应)。在一些实施方案中,评价例如通过血清NAb水平测量的预先存在的免疫性对于经由耳蜗内ROA递送的本文公开的组合物转导的影响。在一些实施方案中,预先存在的NAb水平不抑制通过耳蜗内施用途递送的AAV颗粒的转导。在一些实施方案中,本文公开的任何方法进一步包括评价血清的对AAV衣壳和/或转基因产物(例如,分泌的蛋白)的潜在全身体液反应。在一些实施方案中,响应于全身体液反应的评

价,可以开发用于双侧耳蜗内施用本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)的治疗间隔。

[0912] 在一些实施方案中,本文公开的任何方法并不例如针对经由局部施用途径(ROA)诸如耳蜗内施用来递送的AAV颗粒、衣壳和/或来自rAAV颗粒的构建体(例如潜在转基因)产物产生细胞毒性T细胞反应。例如,Luxturna®的标签指出,并无受试者具有临床上显著的细胞毒性T细胞反应(Spark Therapeutics 2017,其以引用方式整体并入本文);在临床开发计划期间获得了孤立阳性干扰素- γ (IFN- γ)ELISPOT测定结果(Bennett 2012,其以引用方式整体并入本文),但这些孤立结果的意义尚不清楚,因为未观察到临床炎症反应且在临床计划中未观察到剂量限制性毒性。

[0913] 在某些实施方案中,测量并收集本文所述的任何组合物或组合物的产物的药代动力学。在某些实施方案中,分泌抗VEGF蛋白;先前技术已经描述了当随着时间的推移,以高剂量全身递送时(每2至3周,5至15mg/kg),高剂量的全身抗VEGF蛋白与高血压、蛋白尿、肝酶升高、动脉血栓栓塞事件、静脉血栓栓塞事件、出血以及手术和伤口愈合并发症相关。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,本文公开的组合物局部施用。在一些实施方案中,本文公开的组合物局部递送导致任何一种或多种有害脱靶效应的可能性降低。在一些实施方案中,本文公开的组合物局部递送不导致任何有害脱靶效应。在本文公开的任何方法的一些实施方案中,通过监测血清中的抗VEGF蛋白(例如,使用电化学发光测定)、生命体征、尿液分析和/或临床化学来跟踪受试者。在一些实施方案中,对施用本文公开的组合物受试者的监测允许早期介入和/或使任何脱靶效应最小化。

[0914] 在一些实施方案中,在施用如本文所述的组合物后,可收集血清并分析抗VEGF蛋白测量。在一些实施方案中,此类测量可在组合物施用之前(基线)、施用后第2周和每月进行,持续适当持续时间(例如,3个月、6个月、1年、2年、3年、4年或超过5年)。在一些实施方案中,在接受媒介物或一定剂量的本文所述的rAAV-抗VEGF颗粒的耳蜗内递送的个体中,在基线时或在施用后的任何时间点,将不会在个体的血清中检测到抗VEGF蛋白。

[0915] 在本文公开的任何方法的一些实施方案中,方法包括使用(例如,如本文所述的电化学发光测定)收集和/或评价血清中抗VEGF蛋白的存在。

[0916] 产生方法

[0917] AAV系统通常为本领域中众所周知的(参见例如Kelleher和Vos,Biotechniques, 17(6):1110-17(1994);Cotten等人,P.N.A.S.U.S.A.,89(13):6094-98(1992);Curiel,Nat Immun,13(2-3):141-64(1994);Muzyczka,Curr Top Microbiol Immunol,158:97-129(1992);和Asokan A等人,Mol.Ther.,20(4):699-708(2012),其中每一者以引用方式整体并入本文)。用于产生和使用AAV构建体的方法描述于例如美国专利号5,139,941、4,797,368和PCT提交申请US2019/060328中,其中每一者以引用方式整体并入本文。

[0918] 用于获得病毒构建体的方法为本领域已知的。例如,为了产生AAV构建体,所述方法通常涉及培养含有以下的宿主细胞,以允许将重组AAV构建体包装到AAV衣壳蛋白中:编码AAV衣壳蛋白或其片段的核酸序列;功能性rep基因;由AAV反向末端重复序列(ITR)和编码序列组成的重组AAV构建体;和/或足够辅助功能。

[0919] 在一些实施方案中,可以向宿主细胞反式提供待在宿主细胞中培养以将AAV构建体包装在AAV衣壳中的组分。或者,任何一种或多种组分(例如,重组AAV构建体、rep序列、cap序列和/或辅助功能)可以由稳定宿主细胞提供,所述细胞已经使用本领域技术人员已

知的方法工程化为含有一种或多种此类组分。在一些实施方案中,此种稳定宿主细胞含有在诱导型启动子控制下的此类组分。在一些实施方案中,此类组分可在组成型启动子的控制下。在一些实施方案中,所选稳定宿主细胞可包含在组成型启动子控制下的所选组分和在一个或多个诱导型启动子控制下的其他所选组分。例如,可以产生源自HEK293细胞(其包含在组成型启动子控制下的E1辅助功能)但含有在诱导型启动子控制下的rep和/或cap蛋白的稳定宿主细胞。本领域技术人员可以使用常规方法产生其他稳定宿主细胞。

[0920] 可以使用任何合适遗传元件(例如,构建体)将产生本公开的AAV所需的重组AAV构建体、rep序列、cap序列和辅助功能递送至包装宿主细胞。所选遗传元件可以通过在本领域中例如具有核酸操作技术的人员已知的任何合适方法递送且包括遗传工程化、重组工程化和合成技术(参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,其以引用方式整体并入本文)。类似地,产生AAV颗粒的方法为众所周知的,且任何合适方法都可以用于本公开(参见例如K.Fisher等人,J.Virol.,70:520-532(1993)和美国专利号5,478,745,其以引用方式整体并入本文)。

[0921] 在一些实施方案中,重组AAV可以使用三重转染方法产生(例如,如美国专利号6,001,650中所述,其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,通过用待包装成AAV颗粒的重组AAV构建体(包含编码序列)、AAV辅助功能构建体和辅佐功能构建体转染宿主细胞来产生重组AAV。AAV辅助功能构建体编码“AAV辅助功能”序列(例如,rep和cap),其反式起作用以用于生产性AAV复制和包裹。在一些实施方案中,AAV辅助功能构建体支持有效AAV构建体产生而不产生任何可检测的野生型AAV颗粒(例如,包含功能性rep和cap基因的AAV颗粒)。适用于本公开的构建体的非限制性实例包括pHLP19(参见例如美国专利号6,001,650,其以引用方式整体并入本文)和pRep6cap6构建体(参见例如美国专利号6,156,303,其以引用方式整体并入本文)。辅佐功能构建体编码非AAV衍生病毒和/或细胞功能的核苷酸序列,AAV复制依赖于这些功能(例如,“辅佐功能”)。辅佐功能可以包括AAV复制所需的那些功能,包括但不限于参与活化AAV基因转录、阶段特异性AAV mRNA剪接、AAV DNA复制、cap表达产物合成和AAV衣壳组装的那些部分。基于病毒的辅佐功能可以源自任何已知辅助病毒,诸如腺病毒、疱疹病毒(除单纯疱疹病毒1型之外)和痘苗病毒。

[0922] 用于产生和分离适用于向受试者递送的AAV病毒构建体的其他方法描述于例如美国专利号7,790,449;美国专利号7,282,199;WO 2003/042397;WO 2005/033321、WO 2006/110689;和美国专利号7,588,772中,其中每一者以引用方式整体并入本文。在一个系统中,生产细胞系用编码侧接有ITR的编码序列的构建体和编码rep和cap的构建体来瞬时转染。在另一个系统中,稳定供应rep和cap的包装细胞系用编码侧接有ITR的编码序列的构建体来瞬时转染。在这些系统中的每一个中,AAV颗粒为响应于辅助腺病毒或疱疹病毒的感染而产生,且AAV自污染病毒中分离。其他系统不需要感染辅助病毒来回收AAV,辅助功能(例如,腺病毒E1、E2a、VA和E4或疱疹病毒UL5、UL8、UL52和UL29,以及疱疹病毒聚合酶)也由系统反式提供。在这些系统中,辅助功能可以通过用编码辅助功能的构建体瞬时转染细胞来提供,或者细胞可以工程化成稳定地含有编码辅助功能的基因,其表达可以在转录或转录后水平进行控制。

[0923] 在一些实施方案中,确定纯化后的病毒构建体滴度。在一些实施方案中,滴度使用

定量PCR确定。在某些实施方案中,利用对构建体具有特异性的TaqMan探针来确定构建体水平。在某些实施方案中,TaqMan探针由SEQ ID NO:97表示,而正向和反向扩增引物分别由SEQ ID NO:98和99例示。

[0924] 用于量化构建体的示例性TaqMan探针 (SEQ ID NO:97)

[0925] /56-FAM/TAATTCCAA/ZEN/CCAGCAGAGTCAGGGC/3IABkF Q/

[0926] 用于量化构建体的示例性正向qPCR引物 (SEQ ID NO:98)

[0927] GATACAGCTAGAGTCCTGATTGC

[0928] 用于量化构建体的示例性反向qPCR引物 (SEQ ID NO:99)

[0929] GATCTGCCAAGTACCTCACTATG

[0930] 如本文所述,在一些实施方案中,本公开的病毒构建体为腺相关病毒 (AAV) 构建体。已经表征几种AAV血清型,包括AAV1、AAV2、AAV3 (例如AAV3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV Anc80,以及其变体。在一些实施方案中,AAV颗粒为AAV2/6、AAV2/8、AAV2/9或AAV2/Anc80颗粒 (例如,具有AAV6、AAV8、AAV9或Anc80衣壳和具有AAV2 ITR的构建体)。其他AAV颗粒和构建体描述于例如Sharma等人,Brain Res Bull.2010年2月15日;81 (2-3):273中,其以引用方式整体并入本文。通常,任何AAV颗粒均可用于递送本文所述的编码序列。然而,血清型具有不同趋向性,例如,它们优先感染不同组织。在一些实施方案中,AAV构建体为自我互补AAV构建体。

[0931] 除其他外,本公开提供了制造基于AAV的构建体的方法。在一些实施方案中,此类方法包括使用宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞为哺乳动物细胞。宿主细胞可用作AAV辅助构建体、AAV微基因质粒、辅佐功能构建体和/或与重组AAV产生相关的其他转移DNA的受体。所述术语包括已经转染的原始细胞的后代。因此,如本文所用,“宿主细胞”可是指已用外源DNA序列转染的细胞。应当理解,由于自然、偶然或故意突变,单个亲代细胞的后代在形态学或基因组或总DNA补体方面不一定与原始亲代完全相同。

[0932] 用于产生和分离适用于向受试者递送的AAV颗粒的其他方法描述于例如美国专利号7,790,449;美国专利号7,282,199;WO 2003/042397;WO 2005/033321;WO 2006/110689;和美国专利号7,588,772中,其中每一者以引用方式整体并入本文。在一个系统中,生产细胞系用编码侧接有ITR的编码序列的构建体和编码rep和cap的构建体来瞬时转染。在另一个系统中,稳定供应rep和cap的包装细胞系用编码侧接有ITR的编码序列的构建体来瞬时转染。在这些系统中的每一个中,AAV颗粒为响应于辅助腺病毒或疱疹病毒的感染而产生,且AAV颗粒自污染病毒中分离。其他系统不需要感染辅助病毒来回收AAV颗粒,辅助功能 (例如,腺病毒E1、E2a、VA和E4或疱疹病毒UL5、UL8、UL52和UL29,以及疱疹病毒聚合酶) 也由系统反式提供。在这些系统中,辅助功能可以通过用编码辅助功能的构建体瞬时转染细胞来提供,或者细胞可以工程化成稳定地含有编码辅助功能的基因,其表达可以在转录或转录后水平进行控制。

[0933] 在另一个系统中,通过用基于杆状病毒的构建体感染将侧接有ITR和rep/cap基因的编码序列引入到昆虫宿主细胞中。此类产生系统为本领域中已知的 (一般参见例如Zhang等人,2009,Human Gene Therapy 20:922-929,其以引用方式整体并入本文)。制造和使用这些和其他AAV产生系统的方法也在美国专利号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中描述,其中每一者以引用方式整体并入本文。

[0934] 在本文公开的任何方法的一些实施方案中,针对本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF,例如,AAV-抗VEGF原料药(DS))使用一组集中的分析测试和较短稳定性测试方案。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)的DS和药物产品(DP)非常相似,例如仅附加过滤步骤和将由DS制造的DP装入小瓶。在一些实施方案中,DP经历更全面分析测试和更长稳定性测试方案。在一些实施方案中,DS并未长期存储,例如,DS迅速地自DS转移到DP制造。在一些实施方案中,在填充/完成过程之前,DS被储存,例如,保持在 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 。

[0935] 在本文公开的任何方法的一些实施方案中,本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF DS和DP)的稳定性使用例如指示产品稳定性的测定来评价,包括外观、载体基因组滴度(ddPCR)、效力和/或生物负载(DS)或无菌(DP)。在一些实施方案中,一旦产生了足够数据以支持规范的建立,效力测定就包含规范。在一些实施方案中,DS和DP将稳定地置于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下约6周。在一些实施方案中,DS不会在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下长时间储存。在一些实施方案中,DP在目标储存温度($\leq -65^{\circ}\text{C}$)下储存60个月。在一些实施方案中,将DS储存,例如,置于稳定状态,约12个月。

[0936] 在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF)的效力和强度使用测定例如本文所述的测定矩阵来评价。在一些实施方案中,测定包括评价多个产品特性,且将用于评估产品功能活性、一致性、稳定性,和/或在向制造过程引入任何变化之后提供可比性的证据。在一些实施方案中,在向受试者施用本文公开的组合物之前,ddPCR滴度测定被证明具有适合性。在一些实施方案中,在体外哺乳动物细胞系中评估抗VEGF蛋白的表达。在一些实施方案中,跨越几个感染复数(MOI)评估蛋白质表达并相对于参考标准进行比较。在一些实施方案中,在本文公开的方法中使用功能性生物测定,例如,包括用于确定抗VEGF活性的市售药盒和公开方法。在一些实施方案中,使用评估效力的功能性生物测定,例如所表达抗VEGF蛋白的生物活性的灵敏且定量的测量。

[0937] 在一些实施方案中,使用如本文公开的制造方法。在一些实施方案中,预期制造方法不会影响rAAV颗粒的品质属性或影响相关研究的解释。

[0938] 在一些实施方案中,本文公开的组合物包含重组颗粒,例如rAAV-抗VEGF,其包含两种组分,例如AAVAnc80衣壳(Zinn 2015,其以引用方式整体并入本文)和被AAVAnc80衣壳包裹的3555个核苷酸的单链DNA基因组,不包括反向末端重复(ITR)序列(图6图(A)和SEQ ID NO:92表示的构建体的实例)。在一些实施方案中,本文公开的组合物(例如rAAV-抗VEGF颗粒)表达雷珠单抗,其为一种用于例如临床上抑制VEGF的48kDa人源化单克隆Fab(源自全长鼠类抗人VEGF单克隆抗体A.4.6.1)。

[0939] 实施例

[0940] 本公开通过提及以下实验实施例进一步详细描述。仅出于说明的目的而提供这些实施例,且除非另有说明,否则所述实施例不意欲为限制性的。因此,本公开绝不应解释为限于以下实施例,而应解释为涵盖由于本文提供的教导而变得显而易见的任何和所有变型。

[0941] 据信本领域普通技术人员可以使用前面描述和下面实施例以及本领域所已知的来制造和利用本公开的技术。

[0942] 实施例1:病毒构建体的构建

[0943] 本实施例提供了产生编码如本文所述的抗VEGF蛋白的示例性病毒构建体的描述。本领域普通技术人员将容易理解,可以根据所述实施例制造类似构建体。例如,可以生成在单一、双重或多重构建体策略下表达哺乳动物、灵长类动物或人源性抗VEGF蛋白的rAAV构建体。可各自制备AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、rh8、rh10、rh39、rh43和Anc80以包封抗VEGF蛋白构建体,并形成rAAV颗粒。除其他外,rAAV颗粒可用于测试(i)串联-反式剪接策略,(ii)杂交内含子-同源重组-反式剪接策略,(iii)外显子同源重组策略,如通过Pryadkina等人,Meth.Clin.Devel.2:15009,2015总结的,所述文献以引用方式整体并入本文,和/或(iv)单一构建体策略。

[0944] 实施例1.1:rAAV-雷珠单抗、rAAV-雷珠单抗-PC和rAAV-贝伐单抗-PC构建体的构建

[0945] 本实施例提供了生成如本文所述rAAV-雷珠单抗、rAAV-雷珠单抗-GFP和rAAV-贝伐单抗-PC构建体的描述。第一重组产生的构建体具有根据SEQ ID NO:90的序列。此构建体在整个实施例中称为“rAAV-雷珠单抗-PC构建体”。rAAV-雷珠单抗-PC构建体为由图6图(A)所示示意图表示的rAAV- V_H/V_L 构建体的示例性实施方案,且包含编码雷珠单抗的序列。第二重组产生的构建体具有根据SEQ ID NO:91的序列。此构建体在整个实施例中称为“rAAV-雷珠单抗构建体”。rAAV-雷珠单抗构建体为由图6图(A)所示示意图表示的rAAV- V_H/V_L 构建体的示例性实施方案,且包含编码雷珠单抗的序列。第三重组产生的构建体具有根据SEQ ID NO:106的序列。此构建体在整个实施例中称为“rAAV-雷珠单抗-GFP构建体”。rAAV-雷珠单抗-GFP构建体为由图6图(B)所示示意图表示的rAAV-ABGFP构建体的示例性实施方案,且包含编码雷珠单抗的序列。第四个重组产生的构建体具有根据SEQ ID NO:93的序列。此构建体在整个实施例中称为“rAAV-贝伐单抗-PC构建体”。rAAV-贝伐单抗-PC构建体为由图6图(C)所示示意图表示的rAAV-AB构建体的示例性实施方案,且包含编码抗VEGF蛋白贝伐单抗的序列。

[0946] 将如上所述的某些构建体、具有AAV Rep和Cap基因的反式质粒和具有来自腺病毒基因组的必需区域的辅助质粒共转染到HEK293细胞中。然后用上述rAAV构建体产生AAVAnc80衣壳以形成rAAVAnc80-雷珠单抗、rAAVAnc80-雷珠单抗-PC和rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒。

[0947] 实施例1.2:rAAV-贝伐单抗、rAAV-贝伐单抗-GFP、rAAV-阿柏西普-PC和rAAV-阿柏西普构建体的构建

[0948] 本实施例提供了产生如本文所述的rAAV-贝伐单抗、rAAV-贝伐单抗-GFP、rAAV-阿柏西普-PC、和rAAV-阿柏西普构建体的描述。一种构建体具有根据SEQ ID NO:94的序列。此构建体在整个实施例中称为“rAAV-贝伐单抗构建体”。rAAV-贝伐单抗构建体为由图6图(C)所示示意图表示的rAAV-AB构建体的示例性实施方案,且包含编码抗VEGF蛋白贝伐单抗的序列。另一种构建体具有根据SEQ ID NO:107的序列。此构建体在整个实施例中称为“rAAV-贝伐单抗-GFP构建体”。rAAV-贝伐单抗-GFP构建体为由图6图(B)所示示意图表示的rAAV-ABGFP构建体的示例性实施方案,且包含编码抗VEGF蛋白贝伐单抗的序列。另一种构建体具有根据SEQ ID NO:95的序列。此构建体在整个实施例中称为“rAAV-阿柏西普-PC构建体”。rAAV-阿柏西普-PC构建体为由图6图(D)所示示意图表示的rAAV-TRAP构建体的示例性实施方案,且包含编码抗VEGF蛋白阿柏西普的序列。另一种构建体具有根据SEQ ID NO:96的序

列。此构建体在整个实施例中称为“rAAV-阿柏西普构建体”。rAAV-阿柏西普构建体为由图6图(D)所示示意图表示的rAAV-TRAP构建体的示例性实施方案,且包含编码抗VEGF蛋白阿柏西普的序列。rAAV颗粒为通过使用无腺病毒的方法转染而产生的,如由Xiao等人J Virol.73(5):3994-4003,1999所述,其以引用方式整体并入本文。将如上所述的个别rAAV-贝伐单抗-PC、rAAV-贝伐单抗-GFP、rAAV-阿柏西普-PC或rAAV-阿柏西普构建体、具有AAV Rep和Cap基因的反式质粒和具有来自腺病毒基因组的必需区域的辅助质粒共转染到HEK293细胞中。然后用上述rAAV构建体产生AAVAnc80衣壳以形成rAAVAnc80-贝伐单抗、rAAVAnc80-贝伐单抗-PC、rAAV-Anc80-雷珠单抗-GFP、rAAVAnc80-阿柏西普-PC、和rAAVAnc80-阿柏西普颗粒。

[0949] 实施例2:纯化病毒颗粒

[0950] 本实施例提供了可用于纯化如本文所述的编码抗VEGF蛋白的rAAV颗粒的方法的描述。

[0951] 实施例2.1:纯化rAAVAnc80-雷珠单抗、rAAVAnc80-雷珠单抗-PC和rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒

[0952] 本实施例提供了可用于纯化编码抗VEGF蛋白的rAAV颗粒例如实施例1中形成的那些颗粒的方法的描述。实施例1.1中产生的rAAVAnc80-雷珠单抗、rAAVAnc80-雷珠单抗和rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒各自独立地通过两个连续氯化铯(CsCl)密度梯度来纯化,如由Pryadkina等人Mol. Ther. 2:15009,2015所描述,其以引用方式整体并入本文。在第二次CsCl密度梯度离心步骤后,自CsCl密度梯度管回收11份500 μ l级分,且通过在1xPBS中透析来纯化。通过点印迹分析级分,以确定含有rAAV基因组的那些颗粒。使用对应于AAV构建体基因组的ITR区的引物和探针,通过基于定量实时PCR的滴定法确定每种制剂的病毒基因组数(vg)(参见例如Bartoli等人, Gene Ther. 13:20-28,2006,其以引用方式整体并入本文)。

[0953] 实施例2.2:纯化rAAVAnc80-雷珠单抗-GFP、rAAVAnc80-贝伐单抗、rAAVAnc80-贝伐单抗-GFP、rAAVAnc80-阿柏西普和rAAVAnc80-阿柏西普-PC颗粒

[0954] 本实施例也提供了可用于纯化编码抗VEGF蛋白的rAAV颗粒(例如,实施例1中形成的那些颗粒)的方法的描述。实施例1.1中产生的rAAVAnc80-雷珠单抗颗粒以及实施例1.2中产生的rAAVAnc80-贝伐单抗、rAAVAnc80-贝伐单抗-GFP、rAAVAnc80-阿柏西普-PC和rAAVAnc80-阿柏西普颗粒各自独立地通过两个连续氯化铯(CsCl)密度梯度来纯化,如由Pryadkina等人, Mol. Ther. 2:15009,2015所描述,其以引用方式整体并入本文。在第二次CsCl密度梯度离心步骤后,自CsCl密度梯度管回收11份500 μ l级分,且通过在1xPBS中透析来纯化。通过点印迹分析级分,以确定含有rAAV基因组的级分。使用对应于AAV构建体基因组的ITR区的引物和探针,通过基于定量实时PCR的滴定法确定每种制剂的病毒基因组数(vg)(参见例如Bartoli等人, Gene Ther. 13:20-28,2006,其以引用方式整体并入本文)。

[0955] 实施例2.3:纯化rAAVAnc80颗粒

[0956] 本实施例也提供了可用于纯化编码抗VEGF蛋白的rAAV颗粒(例如实施例1中形成的那些颗粒)的其他方法的描述。在转染后72小时以以下方式纯化rAAV-抗VEGF颗粒。向溶液中加入10% Triton(终浓度为2%),且将细胞培养物在37 $^{\circ}$ C下在细胞振荡器上孵育1小时。随后,加入100U/mL benzonase和2 μ M MgCl₂,并将细胞在37 $^{\circ}$ C下在细胞振荡器上孵育2小时。接下来,添加NaCl(150 μ M)并将细胞在37 $^{\circ}$ C下在细胞振荡器上孵育20分钟。将样品以

2000xg离心10分钟。将上清液转移到干净容器中并储存在-80℃,或立即进行切向流过滤(TFF)。然后将过滤的上清液装入到AVB柱中以便进行AVB柱色谱和rAAV过滤。然后对过滤的洗脱液进行CsCl密度梯度离心(RI=1.3905-1.3915,旋转速度=65,000RPM,在15℃下持续≥16小时)。然后对纯化的全颗粒样品进行最后一轮TFF,并将制剂装入到小瓶中以备后用。

[0957] 实施例3:rAAVAnc80-抗VEGF颗粒的配制

[0958] 本实施例涉及包含病毒颗粒的组合物的制备,所述病毒颗粒包括如本文所述的编码抗VEGF蛋白的构建体。

[0959] 实施例3.1:rAAVAnc80-雷珠单抗、rAAVAnc80-雷珠单抗-PC、和rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒的配制

[0960] 将包括本文所述的各自编码抗VEGF蛋白的构建体rAAV-雷珠单抗、rAAV-雷珠单抗-PC或rAAV-贝伐单抗-PC的rAAVAnc80颗粒如以上实施例中所阐述来产生并纯化至如通过定量数字液滴(dd)PCR测定的合适滴度(例如,大约 1.39^{13} vg/mL)。然后在生理学上可接受的溶液中以已知的稀释度(例如, 6×10^4 、 1.3×10^5 、 1.8×10^5 、 4.5×10^9 和 1.3×10^{10} vg/mL)制备纯化的颗粒。所使用的生理学上合适的溶液包含市售的具有泊洛沙姆188的1xPBS,制备成终浓度为:8.10mM磷酸二氢钠、1.5mM磷酸二氢钾、2.7mM氯化钾、172mM氯化钠和0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。使用正向引物序列CCGATTTCGG CCTATTGGTTA(SEQ ID NO:100)、反向引物序列CTGCGTAAA GTAG(SEQ ID NO:101)和具有适当荧光团(FAM)的探针序列GGCACCTATTGGTCTTACTGACATCC(SEQ ID NO:102)来执行rAAVAnc80-雷珠单抗颗粒、rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒的滴度量。化。

[0961] 实施例3.2:rAAVAnc80-雷珠单抗、rAAVAnc80-雷珠单抗-PC、和rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒的配制

[0962] 将包括本文所述的各自编码抗VEGF蛋白的构建体rAAV-雷珠单抗-GFP、rAAV-贝伐单抗、rAAV-贝伐单抗-GFP、rAAV-阿柏西普或rAAV-阿柏西普-PC的rAAVAnc80颗粒如以上实施例中所阐述来产生并纯化至如通过定量数字液滴(dd)PCR测定的合适滴度(例如,大约 1.39^{13} vg/mL)。然后在生理学上可接受的溶液中以已知的稀释度(例如 6×10^4 、 1.3×10^5 、 1.8×10^5 、 4.5×10^9 、和 1.3×10^{10} vg/mL)制备纯化的颗粒。所使用的生理学上合适的溶液可包括市售的具有泊洛沙姆188的1xPBS,且可制备成终浓度为:8.10mM磷酸二氢钠、1.5mM磷酸二氢钾、2.7mM氯化钾、172mM氯化钠和0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。使用正向引物序列CCGATTTCGGCCTATTGGTTA(SEQ ID NO:100)、反向引物序列CTGCGTAAAGTAG(SEQ ID NO:101)和具有适当荧光团(例如FAM)的探针序列GGCACCTATTGGTCTT ACTGACATCC(SEQ ID NO:102)来执行rAAVAnc80-雷珠单抗-GFP颗粒、rAAVAnc80-贝伐单抗颗粒、rAAVAnc80-贝伐单抗-GFP颗粒、rAAVAnc80-阿柏西普颗粒或rAAVAnc80-阿柏西普-PC颗粒的滴度量。化。

[0963] 实施例4:装置描述

[0964] 本实施例涉及适用于将rAAV颗粒递送至内耳的装置,所述rAAV颗粒包括包含编码本文所述抗VEGF蛋白的构建体的rAAV颗粒。被设计用于一致且安全地穿透圆窗膜的专用微导管可用于将本文提供的组合物递送至受试者的耳蜗(例如,如图4中所描绘)。微导管成形以使得执行递送程序的外科医生可经由外耳道进入中耳腔且使微导管的末端与圆窗膜接触。微导管的远端可包括至少一根直径为约10微米至约1,000微米的微针,其在圆窗膜中产生穿孔,所述穿孔足以允许包含如本文所述的构建体(例如,包含抗VEGF蛋白的编码序列)

的rAAV颗粒以不损害内耳的速率(例如生理学上可接受的速率,例如大约30 μ L/min至大约90 μ L/min的速率)进入鼓阶的耳蜗外淋巴,但足够小,使得无需手术修复即可愈合。微导管中接近微针的其余部分,装载有限定滴度的rAAV/人工外淋巴制剂(例如大约 1×10^{12} 至 5×10^{13} vg/mL)。微导管的近端与微操纵器连接,所述微操纵器允许进行大约30 μ L至大约100 μ L的精确小体积输注。

[0965] 实施例5:自细胞系产生的抗VEGF蛋白的表达和分泌

[0966] 本实施例涉及示例性构建体的转导和/或转染,以及本文所述示例性蛋白质的表达和分泌。

[0967] 实施例5.1:来自rAAV-雷珠单抗-PC、rAAV-雷珠单抗-GFP、和rAAV-贝伐单抗-PC构建体的蛋白质的表达和分泌

[0968] 如本文所述,将细胞系(例如,HEK293FT)用示例性rAAV-抗VEGF构建体转染或用示例性rAAVAnc80-抗VEGF颗粒转导。对于转染事件,将HEK293FT细胞以 7×10^4 个细胞/孔在24孔板格式中接种过夜,培养体积为400 μ L。使用jetprime转染试剂(Polyplus-transfection®SA)将大约800ng抗VEGF构建体rAAV-雷珠单抗-PC、rAAV-贝伐单抗-PC或rAAV-雷珠单抗-GFP(如实施例1中所述)转染到细胞中。对于转导事件,在2 μ M依托泊苷(Fisher Scientific 34120525MG)存在下,将HEK293FT细胞以 4×10^4 个细胞/孔在96孔板格式中接种6小时,培养体积为50 μ L,将示例性rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒(如实施例1中所述)分别以 7.5×10^4 、 2.2×10^5 和 5.5×10^5 的MOI添加到培养基中。对于转染或转导的细胞,在处理72小时收集每个样品的上清液。对于蛋白质表达分析,将30 μ L样品装载到各个孔中的4-12% Bis-Tris蛋白质凝胶中,并进行本领域已知的标准western印迹程序。条带模式为使用荧光读数器确定的,测试抗雷珠单抗抗体(靶向Fab表位;由Abcam提供,ab168684-25UG)作为主要检测探针,且抗人IgG作为辅助检测探针(secondary detection probe)(参见图7)。

[0969] 实施例5.2:来自rAAV-雷珠单抗、和rAAV-贝伐单抗、rAAV-贝伐单抗-GFP、rAAV-阿柏西普、和rAAV-阿柏西普-PC构建体的蛋白质的表达和分泌

[0970] 如本文所述,将细胞系(例如,HEK293FT)用示例性抗VEGF构建体转染或用示例性rAAVAnc80-抗VEGF颗粒转导。对于转染事件,将HEK293FT细胞以大约 7×10^4 个细胞/孔在24孔板格式中接种过夜,培养体积为400 μ L。使用jetprime转染试剂(Polyplus-transfection®SA)将大约800ng的rAAV-雷珠单抗、rAAV-贝伐单抗、rAAV-贝伐单抗-GFP、rAAV-阿柏西普-PC或rAAV-阿柏西普构建体(例如实施例1中所述)转染到细胞中。对于转导事件,在2 μ M依托泊苷(Fisher Scientific 34120525MG)存在下,HEK293FT细胞以 4×10^4 个细胞/孔在96孔板格式中接种6小时,培养体积为50 μ L。rAAVAnc80-雷珠单抗、rAAVAnc80-雷珠单抗-PC、rAAVAnc80-雷珠单抗-GFP、rAAVAnc80-贝伐单抗、rAAVAnc80-贝伐单抗-GFP、rAAVAnc80-阿柏西普-PC或rAAVAnc80-阿柏西普(例如实施例1中所述)以大约 7.5×10^4 、 2.2×10^5 和/或 5.5×10^5 的MOI添加到培养基中。对于转染或转导的细胞,在处理72小时收集每个样品的上清液。对于蛋白质表达分析,将30 μ L样品装载到各个孔中的4-12% Bis-Tris蛋白质凝胶中,并进行本领域已知的标准western印迹程序。条带模式为使用荧光读数器确定的,测试抗雷珠单抗(靶向Fab表位;由Abcam提供,ab168684-25UG)和测试抗阿柏西普抗体作为主要检测探针,且抗人IgG作为辅助检测探针。

[0971] 实施例6:自细胞系产生的抗VEGF蛋白的结合活性

[0972] 本实施例描述如何确定如以上实施例5中所述产生的示例性抗VEGF蛋白的结合活性。

[0973] 实施例6.1:抗VEGF蛋白雷珠单抗和贝伐单抗的结合活性

[0974] 使用Octet®HTX生物传感器仪器分析如以上实施例5中所述通过转染产生的示例性抗VEGF蛋白雷珠单抗或贝伐单抗的结合活性。进行第一组对照实验以校准等离子体表面共振仪器,例如使用添加到对照细胞条件培养基中的小鼠抗人VEGF单克隆抗体(抗hVEGF MmAb;R&D Systems,MAB293-100),使用重组人VEGF作为结合剂(图8图(A))。进行第二组实验以确定来自转染如实施例1中所述的示例性构建体rAAV-雷珠单抗-PC或rAAV-贝伐单抗-PC之后的HEK293TF细胞的条件培养基或对照非转染细胞条件培养基中所包含的颗粒的VEGF结合活性。测试材料的图形结果显示在图8图(B)或图(C),对照培养基在图8图(D)中表示。

[0975] 测试样品包括自用如实施例1所述的构建体rAAV-雷珠单抗-PC或rAAV-贝伐单抗-PC转染的HEK293TF细胞分泌并存在于培养基中的可溶性雷珠单抗和贝伐单抗。通过在1x动力学缓冲液(Fortebio,18-1105)中1:10稀释细胞条件培养基来制备样品并等分到384孔样品板中。将抗hVEGF MmAb(R&D Systems,MAB293-100)以10 μ g/mL的浓度稀释,作为阳性对照。将捕获剂重组人VEGF(R&D Systems,293-VE-010)以一系列1:2的稀释比自200nM稀释到3.125nM。

[0976] 在Octet®HTX生物传感器仪器中在1x动力学缓冲液中测量条件培养基样品和小鼠抗人VEGF抗体(R&D Systems)样品的结合亲和力。通过Octet®分析软体Data Analysis HT10.0生成结合特征和值。所收集的数据如表2所示,其中列出了相应 K_D 、平衡缔合常数(k_a)和解离(k_{dis})。

[0977] 抗hVEGF小鼠抗体(R&D Systems)显示出高结合亲和力。类似地,rAAV构建体编码的雷珠单抗或贝伐单抗显示出对人VEGF的高结合亲和力。无法自对照条件培养基样品的结合数据推断出 K_D 值。总之,这些数据表明,如本文提供的构建体可导致抗VEGF蛋白雷珠单抗或贝伐单抗的表达和分泌,且如本文提供的构建体可用于在哺乳动物的内耳中表达抗VEGF蛋白。

[0978] 表2:重组抗VEGF蛋白的结合动力学

	样品编号	KD (M)*	ka (1/Ms)	kdis (1/s)	全 R^2
[0979]	贝伐单抗	3.30E-10	8.49E+04	2.80E-05	0.9998
	雷珠单抗	1.68E-10	2.45E+05	4.11E-05	0.9991
	MmAb-R&D	2.29E-10	3.40E+05	7.77E-05	0.9993

[0980] 分泌型雷珠单抗能够以168pM的KD结合生物素化重组人VEGF(Acro Biosystems,VE5-H8210),且分泌型贝伐单抗能够以330pM的KD结合(对于阳性对照小鼠抗人VEGF重组抗体[R&D Systems,MAB293-100],KD=229pM)。与雷珠单抗和贝伐单抗对VEGF-A165的结合亲和力(分别为20.6和35.1pM)(Papadopoulos 2012,其以引用方式整体并入本文)相比,这些数据表明包含抗VEGF蛋白编码序列的质粒形式的rAAV构建体能够在体外产生具有可接受结合亲和力的蛋白质。

[0981] 实施例6.2:抗VEGF蛋白雷珠单抗、贝伐单抗、和阿柏西普的结合活性

[0982] 使用Octet®HTX生物传感器仪器分析如本文所述的示例性抗VEGF结合剂的结合活性。在转染如实施例1中所述的示例性构建体rAAV-雷珠单抗、rAAV-贝伐单抗、rAAV-雷珠单抗-GFP、rAAV-贝伐单抗-GFP、rAAV-阿柏西普-PC或rAAV-阿柏西普,或用包含在AAV Anc80衣壳内以形成rAAV颗粒(例如rAAVAnc80-雷珠单抗颗粒、rAAVAnc80-贝伐单抗颗粒、rAAVAnc80-雷珠单抗-GFP颗粒、rAAVAnc80-贝伐单抗-GFP颗粒、rAAVAnc80-阿柏西普-PC颗粒或rAAVAnc80-阿柏西普颗粒)的相同构建体转导后,在细胞系(例如HEK293FT细胞)中产生抗VEGF蛋白。进行第一组对照实验以校准等离子体表面共振仪器,例如使用对照条件培养基中的小鼠抗人VEGF单克隆抗体(抗hVEGF MmAb;R&D Systems,MAB293-100),使用重组人VEGF作为结合剂。进行第二组实验以确定在转染或转导如本文所述的示例性构建体或rAAV颗粒之后HEK293TF细胞的条件培养基或对照条件培养基的人VEGF结合活性。图形结果描绘了转基因抗VEGF蛋白的示例性结合活性。

[0983] 测试样品包括自用如本文所述(例如,如实施例1中所述)的构建体转导或转染的HEK293TF细胞分泌并存在于培养基中的可溶性雷珠单抗、贝伐单抗和/或阿柏西普。通过在1x动力学缓冲液(Fortebio,18-1105)中以1:10稀释细胞条件培养基并等分到384孔样品板中来制备样品。将抗hVEGF MmAb(R&D Systems,MAB293-100)以10 μ g/mL的浓度稀释,作为阳性对照。将捕获剂重组人VEGF(R&D Systems,293-VE-010)以一系列1:2的稀释比自200nM稀释到3.125nM。

[0984] 在Octet®HTX生物传感器仪器中在1x动力学缓冲液中测量条件培养基样品和小鼠抗人VEGF抗体(R&D Systems)样品的结合亲和力。通过Octet®分析软体Data Analysis HT10.0生成结合特征和值。所收集的数据表示为 K_D 、平衡缔合常数(k_a)、和解离率(k_{dis})。

[0985] 实施例7:抗VEGF蛋白产生的离体证明

[0986] 本实施例涉及在体外或离体生长的哺乳动物耳蜗外植体中表达抗VEGF蛋白的rAAV构建体的引入和表达分析。耳蜗外植体培养模型可以提供可靠实验系统来模拟耳蜗的感觉毛细胞和非感觉支持细胞的形态和分子特征,以研究体内发现的内在细胞环境中rAAV颗粒的转导和表达。

[0987] 实施例7.1:抗VEGF蛋白雷珠单抗和贝伐单抗的离体产生

[0988] 本文描述了来自rAAV(例如,rAAVAnc80)颗粒转导的新生(P2)野生型(WT)小鼠耳蜗外植体的抗VEGF蛋白表达和分泌的离体评估,所述颗粒包含构建体rAAV- V_H/V_L 或rAAV-AB,由rAAV-雷珠单抗-PC或rAAV-贝伐单抗-PC(如实施例1中所述)例示。在这些实验中,将柯蒂氏器官切开并安装在盖玻片上,然后用媒介物或一系列剂量的rAAV颗粒-rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒孵育三到四天。将rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒以1.2E10、2.4E10和3.5E10 vg/外植体转导,而将rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒以1.4E10、2.8E10和4.2E10 vg/外植体转导。

[0989] 收集外植体周围的培养基并使用MSD免疫测定进行分析,所述平台采用电化学发光检测技术来量化分析物,与传统ELISA分析相比,灵敏度更高且动态范围更大。在与样品一起孵育之前,将链霉亲和素包被的MSD测定板阻断并用生物素化的VEGF配体包被。然后用标记的山羊多克隆抗 κ 轻链(pAb)抗体检测与测定板结合的抗VEGF蛋白(图16图(B))。将外植体裂解,以便使用定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)与用于GAPDH(管家对照)和抗VEGF蛋白编码核苷酸(编码贝伐单抗或雷珠单抗的mRNA产物)的Taqman引物探针,进行核糖核酸

(RNA)表达分析(图16图(A))。

[0990] 在接受rAAVAnc80-抗VEGF颗粒的外植体中检测到抗VEGFRNA,但在接受媒介物的外植体中未检测到(图16图(A)),且在接受rAAVAnc80-抗VEGF颗粒的外植体的培养基中检测到分泌的抗VEGF蛋白,但在接受媒介物的外植体中未检测到(图16图(B))。这些数据表明,向WT小鼠耳蜗离体施用包含编码抗VEGF蛋白的构建体的rAAVAnc80-抗VEGF颗粒,产生靶蛋白由转导细胞的表达和分泌。耳蜗外植体结果支持用rAAVAnc80-抗VEGF颗粒对WT小鼠进行耳蜗内注射的体内测试,以确定至少体内耐受性,以及评估体内分泌的抗VEGF蛋白水平。

[0991] 实施例7.2:抗VEGF蛋白雷珠单抗、贝伐单抗、和阿柏西普的离体产生

[0992] 制备模拟rAAV颗粒或rAAV颗粒rAAVAnc80-雷珠单抗、rAAVAnc80-雷珠单抗-GFP、rAAVAnc80-贝伐单抗、rAAVAnc80-贝伐单抗-GFP、rAAVAnc80-阿柏西普-PC或rAAVAnc80-阿柏西普(例如像实施例1中描述)且将其以合适MOI(例如,以 1.2×10^9 、 1.4×10^9 、 2.4×10^9 、 2.8×10^9 、 3.5×10^9 和/或 4.2×10^9 vg/外植体等)转导至新生(P2)野生型(WT)小鼠耳蜗外植体。在这些实验中,将柯蒂氏器官切开并安装在盖玻片上,然后用媒介物或一系列剂量的如实施例1中所述rAAVAnc80-雷珠单抗颗粒、rAAVAnc80-雷珠单抗-GFP颗粒、rAAVAnc80-贝伐单抗颗粒、rAAVAnc80-贝伐单抗-GFP颗粒、rAAVAnc80-阿柏西普-PC颗粒或rAAVAnc80-阿柏西普颗粒孵育三到四天。收集外植体周围的培养基并使用MSD免疫测定进行分析。在与样品一起孵育之前,将链霉亲和素包被的MSD测定板阻断并用生物素化的VEGF配体包被。然后用标记的山羊多克隆抗 κ 轻链(pAb)抗体检测与测定板结合的抗VEGF蛋白(例如,雷珠单抗、贝伐单抗、和/或阿柏西普)。

[0993] 任选地,进行实验以确定转导到野生型外植体(离体)中的rAAV-抗VEGF构建体的mRNA表达水平。制备模拟rAAV颗粒或包含由Anc80衣壳包裹的rAAV构建体(例如,如实施例1中所述)的rAAV颗粒并将其以合适MOI(例如,以上述MOI,和/或以大约 4.5×10^9 vg/耳蜗或 1.5×10^{10} vg/耳蜗的MOI)转导至外植体中。收集上清液,在转导后72小时使用350 μ L RLT Plus RNA裂解缓冲液(Qiagen)收集细胞,并使用RNeasy Micro Kit(Qiagen)制备RNA样品。相对mRNA表达水平使用定量实时PCR,使用抗VEGF蛋白编码核苷酸特异性扩增引物(例如,对贝伐单抗、雷珠单抗和/或阿柏西普编码核苷酸具有特异性的引物)和TaqMan探针来确定且与适当对照(例如,作为对照的小鼠GAPDH探针(Life Technologies))进行比较。观察到稳健且剂量依赖性的抗VEGF蛋白编码mRNA的产生。如上所述测定可溶的分泌抗VEGF蛋白水平。

[0994] 实施例8:模型动物中的手术方法和rAAV颗粒分析

[0995] 当前实施例涉及将本文所述的技术(例如,构建体、颗粒和/或组合物)引入到老年小鼠的内耳中。在制剂缓冲液(例如,人工外淋巴,或具有泊洛沙姆188的1xPBS)中制备包含编码抗VEGF蛋白的构建体的rAAV颗粒,然后将其施用至小鼠的鼓阶,如Shu等人(Human Gene Therapy,doi • 10 1089/hum.2016 053,June 2016,其以引用方式整体并入本文)所述。使用甲苯噻嗪(大约5-10mg/kg)和氯氨酮(大约90-120mg/kg)的腹膜内注射来麻醉大于P15的雄性和雌性小鼠。使用电热垫使体温维持在37℃下。自右耳后区产生切口,且暴露鼓泡和后半规管。用手术针将鼓泡穿孔,且将小孔扩大以提供通向耳蜗的通道。用牙钻使鼓阶的耳蜗侧壁的骨变薄,以使膜侧壁保持完整。然后在后半规管中钻一个小孔。通过查看到外

淋巴缓慢渗漏证实了耳道造口术的通畅性。纳升显微注射系统与玻璃微量移液管用于将总共大约1 μ L含有构建体的缓冲液(例如,在人工外淋巴或具有泊洛沙姆188的1xPBS中的大约4.5x10⁹至5x10¹⁰ vg/每耳蜗的本文所述的rAAV构建体)以2nL/s的速率递送到鼓阶。将玻璃微量移液器在注射后保留在原位5分钟。耳蜗造口术和注射后,用小块脂肪来密封鼓泡和后半规管的开口,且缝合肌肉和皮肤。使小鼠自麻醉中苏醒,且用0.15mg/kg盐酸丁丙诺啡(buprenorphine hydrochloride)控制其疼痛3天。

[0996] 进行诸如本实施例中描述的那些研究等研究以准备在患有单侧进行性(例如,散发性)VS的成人参与者中的首次人体安全性和剂量递增试验。rAAV(例如,AAVAnc80,例如,AAVAnc80-抗VEGF)的耳蜗内递送可用于转导内耳的耳蜗和前庭细胞,然后预期这些细胞将抗VEGF蛋白分泌到外淋巴中或直接分泌到耳蜗神经的间质液中。缺乏沿内耳道扩散的屏障导致耳蜗神经浸入连续流体中,外淋巴在其外侧末端(最接近于耳蜗,大部分VS肿瘤起源于此处(图1和3))且CSF在其内侧末端;因此,自外淋巴扩散到神经间质中为在外淋巴中表达的治疗性抗VEGF蛋白到达预期VS靶标提供了潜在途径。

[0997] 在鼠中,手术方法,例如,在Yoshimura等人2018中描述的方法可用于递送如本文所述的rAAV颗粒(Yoshimura 2018,其以引用方式整体并入本文)。具体而言,通过具有后半规管开窗的圆窗膜来递送,此方法已证明稳健可靠的转导,而与注射时动物年龄无关(Yoshimura 2018,其以引用方式整体并入本文)。形成耳后切口以进入颞骨。分开胸锁乳突肌的一部分以暴露耳泡。使用直径0.5至0.6mm的耳科钻在耳泡上钻一个小孔;然后将孔扩大以观察镫骨动脉和圆窗膜。使用耳科钻(直径0.5至0.6mm)对后半规管进行开窗,以在耳蜗施用期间充当内耳的排放口。用小鼠递送装置来穿透圆窗膜,所述装置包含硼硅酸盐毛细管移液器和10 μ L Hamilton注射器,通过圆窗膜将1 μ L包含病毒颗粒的溶液(内耳总体积的大约40%至50%)以300nL/min的速率递送至鼓阶中。包含编码抗VEGF蛋白的构建体的AAVAnc80颗粒的研究在具有成熟耳蜗的小鼠中执行。

[0998] 实施例9:小鼠中抗VEGF蛋白的转基因表达、分析和成像

[0999] 本实施例涉及抗VEGF蛋白在小鼠中的转基因表达,以及随后对所述动物的成像和表型分析。

[1000] 实施例9.1:抗VEGF蛋白雷珠单抗和贝伐单抗在小鼠中的体内表达和成像

[1001] 评价包含本文所述的抗VEGF蛋白的组合物的生物耐受性和/或暴露,包括在耳蜗内递送本文所述的包含编码抗VEGF的构建体的rAAV颗粒之后测量CSF和血清中的抗VEGF水平。将rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒(如实施例1中所述)注射到P30 WT CBA/CaJ小鼠中。研究1组的概要可以在表3中找到。也进行了本文所述的另外研究(在本文中称为“研究2”),其结果描述如下,研究组的概要可以在表4中找到。这些研究捕获了与手术导入、rAAV颗粒转导以及分泌抗VEGF蛋白的随后表达和暴露相关的数据。这些结果总结如下且其细节可以在图17-26中找到。在这些研究中,rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒(如实施例1中所述)通过具有后半规管开窗(如本文所述)的圆窗膜经由单侧耳蜗内注射来施用。以制剂缓冲液注射媒介物对照动物。

[1002] 将CAB/CaJ野生型小鼠麻醉以准备引入本文所述的组合物。制备媒介物对照、rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒(如实施例1中所述)并通过圆窗膜引入到小鼠内耳中。通过以下步骤引入rAAV颗粒:A)耳前切口暴露耳蜗耳泡,B)用微量

移液器拉拔器(目录号P87-Sutter仪器)拉至约10μm最终OD的玻璃微量移液器(目录号4878-WPI)用于将含有rAAV颗粒的组合物手动递送(由Nanoliter 2000显微操作器保持的微量移液器-WPI)进入鼓阶,从而允许进入内耳细胞,C)合适缓冲液中的合适浓度的1μL本文所述的组合物(在实施例1中描述,大约1.4x10¹⁰ vg/每耳蜗的rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或大约1.2x10¹⁰ vg/每耳蜗的rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒;各自在具有泊洛沙姆188的1xPBS中稀释)以0.3μL/min的释放速率(由MICRO4微注射控制器-WPI控制)注射到每个测试耳蜗中。在以媒介物作为阴性对照的情况下,如上进行假手术。允许小鼠自手术中恢复而无需额外介入。在注射后5周,对动物实施安乐死,收集脑脊液(CSF)样品、血清样品和内耳切片用于免疫荧光分析。

[1003] 表3:研究1组分配

组	动物数量*	测试制品	浓度(载体基因组[vg]/mL)	剂量(vg/耳蜗)	生存期
1	10	rAAVAnc80-雷珠单抗-PC 颗粒	1.4E13	1.4E10	4 至 5 周
2	10	rAAVAnc80-贝伐单抗-PC 颗粒	1.2E13	1.2E10	4 至 5 周
3**	10	媒介物	n/a	n/a	4 至 5 周

[1005] *雄性和雌性组合(每组4至6个雄性)。**来自媒介物对照组的未注射对侧耳朵用作组织学对照。缩写:n/a=不适用。

[1006] 为了评价由于本文所述的rAAV颗粒(rAAVAnc80-抗VEGF颗粒)的内耳转导所导致的抗VEGF蛋白暴露,在耳蜗内递送后4至5周终止时收集血液和CSF,并在使用MSD免疫测定法(例如,如实施例7中所述)测量CSF和血清中的抗VEGF蛋白水平。测量了CSF中可溶性抗VEGF蛋白(雷珠单抗或贝伐单抗)的水平,范围为2.71-19.29ng/mL。收集这些液体后,将小鼠进行心脏灌注,收获耳蜗并浸没固定以进行组织学评估。将耳蜗样品脱钙并显微解剖。整体和切片的经解剖柯蒂氏器官用抗雷珠单抗(Abcam,ab168684-25UG,mAb)染色以便确定本文所述构建体的转基因表达,并使用抗鬼笔环肽(Thermo Fisher A12381)染色来表征不同内耳细胞类型(图17)且抗肌球蛋白VIIa染色用于标记毛细胞(在图18中描绘并在图20中量化)。一半样品也用抗Sox2染色以标记支持细胞,另一半用抗神经丝200染色以标记神经元突起(图19)。免疫染色组织的共聚焦分析用于鉴定转导效率/抗VEGF表达和细胞存活(图20和21)。

[1007] 基于信号的出现而非强度来评价抗VEGF蛋白表达。不希望受任何特定理论的束缚,上述情况的一个原因可能为与单克隆抗雷珠单抗一抗缀合的相应较小大小的人源化小鼠抗体雷珠单抗相比,多克隆二抗可能潜在地结合与小鼠单克隆抗雷珠单抗一抗(上述MmAb)缀合的人源化小鼠抗体贝伐单抗上的更大数量的表位。在接受rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒的大多数耳蜗中(19个耳蜗中的17个),内毛细胞稳健地表达转基因(如实施例1中所述,结果如图17所示并在图21中量化)。在这些17个耳蜗中,有14个也在一部分OHC和/或非毛细胞中表达。与接受rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒的耳朵相比,接受rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒的耳朵之间在细胞同一性和表达模式方面未检测到显著差异。

[1008] 确定了耳蜗组织中的此表达导致抗VEGF蛋白(雷珠单抗或贝伐单抗)的产生和分泌。自动物收集和分析CSF(自大池取样)和血清样品(图23和24)。也可以测量外淋巴中的抗VEGF蛋白浓度,以更好地了解外淋巴和CSF之间抗VEGF蛋白暴露的比率。小鼠外淋巴样品收集在技术上具有挑战性。在本实施例中,收集了一个外淋巴样品。与在注射媒介物的对照中未检测到相比,在注射了rAAV颗粒的动物的CSF中检测到抗VEGF蛋白(雷珠单抗或贝伐单抗)(图24)。通过MSD测定检测分泌的抗VEGF蛋白仅限于雷珠单抗与贝伐单抗之间的定性比较,因为使用了与检测耳蜗组织中的表达(如上所述)相似的多克隆次级(polyclonal secondary),其中因为表位的可用性更高,所以对于来自接受rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒的耳朵的样品,观察到更强信号。不希望受任何特定理论的束缚,在CSF中明确检测到抗VEGF蛋白可能为由于此物种的外淋巴与CSF之间经由开放耳蜗导水管而得以连通。

[1009] 通过使用检测雷珠单抗的抗- κ 轻链(pAb)抗体的MSD测定(上文和实施例7中所述)来评估小鼠血清的抗VEGF蛋白(雷珠单抗)。与注射媒介物的动物相比,接受rAAV-雷珠单抗-PC颗粒耳蜗内递送的小鼠在递送后4至5周表现出更高水平的血清中抗VEGF蛋白(雷珠单抗)(图23)。

[1010] 来自接受耳蜗内递送rAAV-雷珠单抗、rAAV-雷珠单抗-GFP、rAAV-贝伐单抗-PC、rAAV-贝伐单抗、rAAV-贝伐单抗-GFP、rAAV-阿柏西普-PC或rAAV-阿柏西普颗粒(例如,包含兰比单抗、贝伐单抗或阿柏西普)的小鼠的血清可以进行评价。

[1011] 研究2也使用相同参数进行:例如,小鼠品系、年龄、rAAV衣壳、雷珠单抗编码构建体和耳蜗内施用程序,以解决表明可能面临手术挑战的新数据。所述研究使用了rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒(如实施例1中所述),因为在某些实施例中,与贝伐单抗相比,雷珠单抗可能具有不同特征,例如,更高结合能力和更高结合亲和力、无Fc结构域和更小分子质量。rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒(如实施例1中所述)通过具有后半规管开窗(如本文所述)的圆窗膜,经由单侧耳蜗内注射以 1.4×10^{10} vg/耳蜗施用。注射媒介物小鼠的未注射耳朵作为对照。研究结束后,对动物进行经心灌注并且将耳蜗收获、脱钙且显微解剖,使用以下标签进行共聚焦显微镜成像:抗雷珠单抗(mAb)用于检测转基因表达;抗肌球蛋白VIIa用于标记毛细胞;以及抗Tuj1用于标记耳蜗神经纤维(例如,桡神经纤维)的突起。

[1012] 表4:研究2组分配

[1013]

组	动物数量*	测试制品	浓度(载体基因组 [vg]/mL)	剂量 (vg/耳蜗)	生存期
1	3	rAAV-雷珠单抗 -PC 颗粒	1.4E13	1.4E10	4 周
2	2	未经注射	n/a	n/a	4 周*

[1014] *基于小鼠年龄的占位手术日期(无假手术)。缩写:n/a=不适用。

[1015] 本研究中感觉上皮的耳蜗组织学描绘了在多种细胞类型(包括内毛细胞和外毛细胞、侧支持细胞、和螺旋缘的齿间细胞)中,在耳蜗长度上(图22)的抗VEGF蛋白(雷珠单抗)表达的广泛分布。一般而言,毛细胞存在于耳蜗的分析区域,除了在小鼠1的耳蜗的最顶端区域观察到一些IHC损失。

[1016] 实施例9.2:小鼠体内雷珠单抗和贝伐单抗递送和产生的表型分析

[1017] 评价了如本文所述的rAAV-抗VEGF颗粒在小鼠中的耳蜗耐受性。作为进行以评价

耳蜗内递送示例性rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒(如实施例1中所述)后的小鼠中转导和随后蛋白质分泌的研究的一部分,也评估了总体耐受性、听觉功能和耳蜗毛细胞存活率以评价手术施用和转基因表达的耳蜗耐受性。在耳蜗内递送后的整个4至5周内未检测到体重或身体状况评分的有害变化,除了一只动物在递送后1周因不明原因死亡(没有手术并发症或注意到健康观察的异常发现)。未检测到如通过转圈或摇头所证明的前庭系统受损的迹象。

[1018] 在手术前和手术后4至5周(即安乐死之前)经由ABR评估听觉功能。在接受rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒的组以及接受媒介物的组中观察到阈值变化。阈值变化在各组之间具有相似幅度,表明由于外科手术而非由于转基因表达引起对耳蜗的潜在损害(图25)。

[1019] 与功能评估(ABR;图25)一致,在接受rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒的组以及接受媒介物的组中检测到毛细胞损失,但在未注射(对侧)对照耳朵中未检测到。在接受rAAVAnc80-抗VEGF颗粒的19只耳朵中的16只中以及在接受媒介物的10只耳朵中的9只中检测到耳蜗底部的基底膜受损,随后这些受损区域之外毛细胞损失在16和32kHz下为明显的(图18)。总体而言,IHC损失并不显著;仅在接受rAAVAnc80-抗VEGF颗粒的19只耳朵中的2只耳朵中的8kHz频率区域中检测到散发性IHC损失(图18)。虽然在所述特定研究(本文称为“研究1”)中施用途径导致毛细胞损害,但无论接受rAAVAnc80-抗VEGF颗粒或媒介物,各耳朵的功能评估和细胞存活之间的一致性表明细胞损失可能是由于外科手术而非rAAV衣壳毒性、转基因表达或随后蛋白质分泌。

[1020] 鉴于手术程序可能导致细胞损失的发现,进行了研究2。所述研究表明,在耳蜗内递送rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒(如实施例1中所述)后4周,基底膜无系统性损害和后续OHC损失,仅有在顶点和基底部的零星损失(图22)。与相应区域中总体毛细胞存活的定性评估一致,耳蜗功能(DPOAE)和听觉功能(ABR)的评估揭示与未注射对照相比,施用后4周时阈值正常(图26图(A)和(B))。

[1021] 组合数据揭示了rAAVAnc80-抗VEGF颗粒(例如rAAVAnc80-雷珠单抗-PC颗粒或rAAVAnc80-贝伐单抗-PC颗粒(如实施例1中所述)的递送,当引入小鼠时,导致包括毛细胞和各种支持细胞的多种细胞类型中的转基因表达,以及检测到CSF中分泌的抗VEGF蛋白(雷珠单抗或贝伐单抗)。在小鼠中,抗VEGF蛋白存在于CSF中,不希望受任何特定理论的束缚,此可能由于外淋巴和CSF的主动流体交换经由所述物种的开放耳蜗导水管而得以发生。这些结果描绘了1)在耳蜗细胞中的强大抗VEGF蛋白表达和2)检测到CSF中分泌的抗VEGF蛋白,支持将程序推进到更解剖学相关的可转化物种,例如非人灵长类动物。

[1022] 实施例10:前庭神经鞘瘤(VS)鼠类模型中抗VEGF蛋白编码mRNA的转基因表达和蛋白表达的表型分析

[1023] 本实施例涉及在鼠类模型(例如,Chen等人,Nature Protocols 2019中描述的模型,其以引用方式整体并入本文)中与VS相关的表型分析。如Chen等人所述制备模型小鼠,允许小鼠自手术中恢复一段合适时间(例如,大约1周),然后麻醉以准备引入本文所述的组合物。制备由Anc80衣壳包裹的模拟rAAV颗粒或rAAV构建体(例如,如实施例1中所述的那些)并通过圆窗膜引入到小鼠内耳中。通过以下步骤引入rAAV-抗VEGF颗粒:A)耳前切口暴露耳蜗耳泡,B)用微量移液器拉拔器(例如目录号P87-Sutter仪器)拉至约10 μ m最终OD的玻

璃微量移液器(例如目录号4878-WPI)用于将含有rAAV颗粒的组合物手动递送(例如由Nanoliter 2000显微操作器保持的微量移液器-WPI)进入鼓阶,从而允许进入内耳细胞,C)将1 μ L本文所述的组合物(例如在具有泊洛沙姆188的1xPBS中的大约 4.5×10^9 至 5×10^{10} vg/每耳蜗的本文所述rAAV构建体)以0.3 μ L/min的释放速率(例如由MICRO4微注射控制器-WPI控制)注射到每个测试耳蜗中。在以媒介物作为阴性对照的情况下,如上进行假手术。允许小鼠自手术中恢复而无需额外介入。

[1024] 在手术后的适当时间间隔(例如,2周、3周、4周、5周、6周、7周和8周),用(例如,35mg/kg)腹膜内递送的戊巴比妥钠麻醉已进行单侧或双侧组合物或假注射的VS鼠类模型。然后将小鼠放置并保持在接地且声学 and 电绝缘的测试室内的头部支架中。诱发电位检测系统(例如,Smart EP 3.90,Intelligent Hearing Systems,Miami,FL,USA)用于测量小鼠听觉脑干反应(ABR)的阈值。咔嗒声以及不同强度(例如,自10到130dB SPL)的8、16和32kHz音调脉冲用于在测试小鼠中唤起ABR。用自腹外侧插入小鼠耳朵的皮下针电极记录响应信号。本实施例证实,引入如本文所述的示例性构建体(例如,如实施例1中所述)可以减少和/或预防VS诱导的症状,进一步的分析可以帮助确定准确施用时间窗口以及如何抗VEGF蛋白表达起到抑制VS诱导症状的作用。结果以ABR迹线来描绘,并将测试动物和/或耳朵与对照进行比较,其中可能包括未注射动物或未注射耳朵。与对照耳朵相比,在试验耳朵中或与对照动物相比,在试验动物中观察到ABR性能的改善。由于自注射耳朵到未注射耳朵的交叉,在未注射耳朵中也可以观察到对刺激的反应的改善。

[1025] 在手术后的适当时间间隔(例如,2周、3周、4周、5周、6周、7周和8周),例如用(35mg/kg)腹膜内递送的戊巴比妥钠麻醉已进行单侧或双侧组合物或假注射的VS鼠类模型。随后对小鼠实施安乐死,并收获VS肿瘤。比较肿瘤体积、转录模式、蛋白质组成和/或组织学。与对照未注射VS模型小鼠相比,注射如本文所述的示例性组合物的测试小鼠显示出减少的肿瘤体积、改变的转录模式、改变的蛋白质组成和/或改变的组织学。

[1026] 为了评价内耳毒性的可能性,在大体检查之后,可以对耳蜗进行处理、解剖和染色,且可以进行细胞耳蜗图分析以评价IHC和/或OHC的损失。对侧耳蜗/耳朵可以进行中耳和内耳组织病理学和显微镜评价(例如,由经过认证的病理学家)以评价任何大体和微观病变。

[1027] 实施例11:非人灵长类动物模型中抗VEGF mRNA的转基因表达和蛋白质表达的分析

[1028] 本实施例提供了非人灵长类动物(NHP)中rAAVAnc80-抗VEGF颗粒的体内研究。在其他情况下,这些研究可以确定在施用如本文所述的方法和/或组合物之后的耐受性、毒理学和表型反应。适当NHP模型(例如,长尾猕猴(*Cynomolgus macaque*)又名食蟹猴(*Macaca fascicularis*))用于此目的,因为NHP与人之间的内耳生理相似性比在鼠类模型中发现的更为明显。NHP动物模型猕猴的内耳形态在很大程度上代表了灵长类动物的内耳形态,其中缺乏开放耳蜗导水管有助于对注入外淋巴的注射量进行可预测和定量评估。由于与人相比,NHP的外耳道直径相对较小,因此所述动物模型所需的手术方法更具侵入性(通过乳突/面神经隐窝进入,而非通过外耳道进入)。不希望受任何特定理论的束缚,由于上述原因,此种方法可能导致对预期传导损失、手术创伤或两者的高估。尽管约有人总内耳体积的三分之一,但猕猴耳蜗在解剖学上相似,且建议的药物递送过程(例如,圆窗膜注射)本身以先前

概述的方式进行。为了分析和研究本文所述的rAAV-抗VEGF颗粒的耳蜗内施用,猕猴代表了最实用的解剖学上正确动物模型,用于评价安全性和耐受性以及导致接近VS和/或相关肿瘤的有效抗VEGF蛋白暴露水平所需的rAAV颗粒剂量。

[1029] 实施例11.1:NHP中抗VEGF蛋白雷珠单抗的体内表达和分析

[1030] 在NHP中,如下递送如本文所述的rAAV-抗VEGF颗粒(例如,rAAVAnc80-抗VEGF):形成耳后切口且将软组织解剖至骨膜水平。将骨膜切开并升高以暴露乳突骨。使用高速切割和金刚石钻头的组合来进行皮质乳突切除术。然后打开面神经隐窝,从而允许充分显现圆窗和椭圆窗(OW)。使用Rosen针,对OW中的镫骨足板开窗。与其他模型一样,开窗允许注射更大体积而不会损害内耳;此外,排放允许包含rAAV-抗VEGF颗粒的溶液流向耳蜗的顶点。通过圆窗膜将30 μ L包含病毒颗粒的溶液(内耳总体积的大约40%至50%)以30 μ L/min的速率递送。

[1031] 使用在NHP(食蟹猴)中同时双侧耳蜗内施用rAAVAnc80-雷珠单抗颗粒(如实施例1所述),随后进行2个月或6个月的恢复期,评价本文所述的组合物和方法的局部和全身耐受性。除其他外,所述评估:1)证明了局部和全身耐受性和2)在耳蜗内施用rAAVAnc80-抗VEGF颗粒后,允许评估外淋巴、CSF、血清和其他组织中抗VEGF蛋白的表达水平。使用了低剂量组和高剂量组。低剂量组和高剂量组基于先前在NHP中进行的平台和支持性研究,其中约为较高剂量的相应浓度的剂量(1.0E13 vg/mL对应于3.0E11 vg/耳蜗;人体等效值9.0E11vg/耳蜗)与NHP毛细胞的病理学无关,而较高的浓度(3.7E13 vg/mL对应于1.1E12 vg/耳蜗;人等效值3.3E12 vg/耳蜗)与某些动物的毛细胞中潜在衣壳相关病理学相关。在此进行的研究包括额外高剂量组和媒介物组,其主要目的为收集外淋巴以确保测量抗VEGF蛋白水平(例如,通过MSD)的样品可用性;需要这些单独组,因为外淋巴收集几乎总是会损害周围耳蜗。

[1032] 自这些实验中获得的结果表明,在NHP的外淋巴中检测到了抗VEGF蛋白(雷珠单抗)。在注射媒介物的对照NHP的外淋巴中未检测到抗VEGF蛋白,在任何NHP的终末CSF中均未检测到抗VEGF蛋白,无论施用后持续时间(2或6个月)如何。

[1033] 图27展示了结合外淋巴暴露水平以估计自内耳到典型VS部位的扩散特性的计算模型。抗VEGF蛋白通过内耳道扩散的计算模型(如图27所示)预测外淋巴中的抗VEGF水平超过所报告的早期VS位置范围内的生物活性阈值浓度(雷珠单抗的IC₅₀)。在体外细胞增殖测定中将VEGF-A的生物活性抑制50%所需的浓度为11至27ng/mL,如Genentech 2017中所述,其以引用方式整体并入本文。

[1034] 如实施例12和14中进一步详细描述,在NHP中评价了血清抗VEGF蛋白水平,且在所有NHP中在血清中检测到的抗VEGF蛋白水平为最低至检测不到。在任何NHP的任何非耳蜗组织裂解物中也未检测到抗VEGF蛋白,包括肝脏、脾脏、脑干、左右听觉皮层和左右下颌淋巴结。在用包含抗VEGF的AAV给药的NHP的外淋巴中检测到抗VEGF蛋白(参见下文实施例12和14)。

[1035] 结合证明全身抗VEGF蛋白在控制VS肿瘤生长和缓解VS肿瘤症状方面的功效的临床数据,这些实验突出了产生抗VEGF蛋白的内耳储库以通过局部暴露于抗VEGF蛋白,从而限制与重复全身抗VEGF蛋白施用相关的不良反应来潜在缩小肿瘤大小,和/或控制肿瘤生长和其后遗症的可行性。

[1036] 实施例12:NHP中抗VEGF的耐受性和暴露的评价

[1037] 如上所述,使用rAAVAnc80-抗VEGF颗粒(如实施例1中所述)在NHP(食蟹猴)中进行暴露和耐受性研究,其中颗粒经双侧递送到耳蜗中,以评估在NHP中rAAVAnc80-抗VEGF颗粒的局部和全身作用。在其他情况下,所述研究提供了用于告知耳蜗耐受性的数据(施用后长达6个月的连续ABR测量;施用后2个月和6个月的细胞耳蜗图;以及施用后2个月和6个月的耳部组织病理学)以及通过连续采血评价的总体全身耐受性的数据,用于临床病理学和抗VEGF蛋白评估。

[1038] 使用如上所述的进入圆形和椭圆形窗的经乳突/面神经隐窝手术方法来进行具有两个示例性剂量(剂量1和剂量2)的rAAVAnc80-抗VEGF颗粒(如实施例1中所述)或媒介物的双侧耳蜗内施用。剂量1低于剂量2。

[1039] 所使用的研究设计示于图33中。在给药前2周内以及给药后1、2、3和6个月(根据活体持续时间)对第1组至第5组的动物进行双侧听觉脑干反应(ABR)评价。在4个不同的频率(1.1,2.8,8.0,和22.6kHz)下在便携式减音电屏蔽外壳中测量ABR。制备耳蜗用于组织学分析,以评估rAAVAnc80-抗VEGF颗粒的手术方法和/或耳蜗内施用的潜在耳毒性。还收集了脑组织(重点是听觉区域)用于组织病理学评估。从所有动物中收集血清,同时从第6组和第7组的动物收集外淋巴和CSF,用于抗VEGF蛋白水平的MSD测定。

[1040] 在如本文所述的rAAVAnc80-抗VEGF颗粒的耳蜗内施用之前,每个剂量组(媒介物、剂量1的rAAVAnc80-雷珠单抗和剂量2的rAAVAnc80-雷珠单抗)的基线ABR阈值范围为约30至50dB声压级(SPL),这取决于测试频率,与测试设施历史对照数据一致。在耳蜗内施用后,在每个测试间隔计算每只耳朵的相对于基线的ABR阈值偏移(图34A-34C)。在两种测试剂量下,在施用媒介物或rAAVAnc80-雷珠单抗后1、2、3和6个月,相对于基线的ABR阈值偏移相似。观察到的最小ABR阈值偏移可能归因于所使用的手术方法。所述数据显示,在以高剂量和低剂量施用rAAVAnc80-雷珠单抗后,在所有频率下,平均ABR阈值与基线阈值相似。

[1041] 细胞耳蜗图分析揭示没有与rAAVAnc80-雷珠单抗相关的耳毒性迹象。也没有可归因于rAAVAnc80-雷珠单抗的组织病理学发现。

[1042] 总之,施用后,没有记录到与耳蜗内施用和/或测试rAAVAnc80-抗VEGF颗粒相关的显著临床观察结果。轻微的神经系统体征被认为与可能影响前庭系统的手术操作有关,NHP无需医疗介入即可恢复。总体而言,2个月和6个月即恢复的所有NHP的临床观察主要为内耳手术后的预计临时发现。

[1043] 还在用媒介物或rAAVAnc80-雷珠单抗给药的NHP中评价了抗VEGF蛋白表达。在外淋巴中,以高剂量施用rAAVAnc80-雷珠单抗后两个月,检测到抗VEGF水平在67.0至694.9ng/mL的范围内,平均水平为406.8ng/mL。在注射媒介物的对照NHP的外淋巴中未检测到抗VEGF蛋白。

[1044] 对于血清样品,在两种剂量下,82%的样品的抗VEGF水平低于检测限。在施用后2个月或6个月,在施用任一剂量的rAAVAnc80-雷珠单抗的NHP的CSF和非耳蜗组织中未检测到抗VEGF蛋白。所评价的非耳蜗组织包括肝脏、脾脏、脑干、听觉皮层或下颌淋巴结。

[1045] 从这些实验中获得的结果表明,在NHP的外淋巴中容易检测到抗VEGF蛋白(兰尼单抗)。无论施用后持续时间(2或6个月)如何,在任何NHP的终末CSF或非耳蜗组织中均未检测到抗VEGF蛋白。所述数据支持局部慢性抗VEGF蛋白表达的初步耐受性。

[1046] 实施例13:人施用

[1047] 本实施例公开了对偶然或与综合征(例如,神经纤维瘤病-2)相关而具有听力损失和/或与VS相关的附加症状的受试者的治疗。

[1048] 与在上述模型生物中使用的方法相比,在人中,可以使用用于递送本文所述的药剂的较小侵入性的方法,例如,通过外耳道;在一些实施方案中,它更实用,因为人的相关结构相对较大,甚至在出生时也为如此。简言之,本文所述临床施用方法可包括经耳道探查鼓膜切开术和激光辅助显微镙骨切开术(使用磷酸氧钛钾[KTP]或CO₂耳科激光在镙骨足板上设置一个小排放孔[大约0.25mm]),然后进行圆窗注射,以便在三分钟期间,通过圆窗膜递送约0.09mL(或约90μL,总内耳体积的大约40%至50%)的包含本文公开的rAAV-抗VEGF颗粒的溶液。与非临床和尸体模型一样,排放用于防止迷路内压力的潜在有害升高。可以在本公开全文中找到关于临床施用程序和递送装置的附加信息。

[1049] 患者可被诊断为患有单侧或双侧VS(例如,由MRI确定)。临床施用程序可以为经耳道探查鼓膜切开术和激光辅助显微镙骨切开术,然后为圆窗注射,以在短时间内通过圆窗来递送适当滴度的适当体积的含有本文所述的rAAV-抗VEGF颗粒的溶液。在手术之前,可以鉴定待进行手术的耳朵,并在耳朵上方以不可消除的标记物来设置标记,以确保符合机构要求。可以在施用麻醉之前确认本文所述的rAAV颗粒的可用性。全身麻醉诱导后,受试者仰卧位,头部转向一侧,手术耳朵朝上。耳朵可以用聚维酮碘准备并以通常方式覆盖。使用手术显微镜或内窥镜,在麻醉下(例如,1%利多卡因和肾上腺素)对外耳道进行四象限阻滞。形成后鼓膜瓣,进入中耳以暴露椭圆窗和圆窗。此举可能需要使用微型刮匙或钻头移除骨管和鼓膜交界处的少量骨头。使用合适激光(例如,KTP或CO₂耳科激光),在镙骨足板上开一个小孔(例如,大约0.25mm)。此孔可在注射期间充当排放口,以防止迷路内压力的潜在有害升高。然后注射导管可以穿过圆窗膜到合适深度(例如,不超过1mm),此由注射装置尖端附近的止动器确定。暴露圆窗可能需要移除假膜或悬垂骨的凸部。在滴入适当体积的溶液时,可将递送装置固定在适当位置。移除导管后,将血液/组织贴片和/或一滴密封剂(例如,透明质酸钠,例如Healon®)放置在圆窗膜和镙骨足板上,以在随后24到48小时内发生生物愈合的同时,对两个窗孔形成功能性密封。然后将鼓膜瓣放回其解剖位置并用浸有抗生素的可吸收明胶海绵固定。

[1050] 在适当时间间隔下,受试者可以进行后续成像分析(例如,MRI分析)以测量肿瘤体积和/或肿瘤生长率。与未用本文所述的示例性方法和/或组合物治疗的受试者相比,用本文所述的示例性方法和/或组合物治疗的受试者可表现出减少的肿瘤体积和/或降低的肿瘤生长率。

[1051] 使用无菌、一次性使用的递送装置进行递送。此装置被设计成允许通过圆窗膜将本文所述的候选产品rAAV-抗VEGF颗粒安全有效地递送到耳蜗中。递送装置意欲用于递送本文所述的候选基因治疗产品,通常与耳蜗内施用途相结合。可以开发一次性使用装置,以便通过具有位于镙骨足板上的排放口的圆窗膜将测试制品递送到内耳的外淋巴液中;装置的形状因子(form factor)优化了通过外耳道进入圆窗膜的方法。定制装置在安全性和治疗剂功效的潜力方面提供优于市售材料的优势,因为这些装置被专门设计用于此耳蜗内施用途(图4)。装置的设计要素包括但不限于:保持注射流体的无菌;使进入内耳的气泡最小化;能够以受控流速精确递送小体积(结合使用标准泵);允许外科医生查看圆窗膜和通过外耳道递送;使对圆窗膜或圆窗膜以外的耳蜗结构的损害最小化;和/或使通过圆窗膜

之外流最小化。

[1052] 实施例14:评价rAAVAnc80-雷珠单抗在非人灵长类动物(NHP)中的剂量依赖性暴露

[1053] 本实施例公开了使用rAAVAnc80-抗VEGF颗粒(如实施例1中所述)在NHP(食蟹猴)中的暴露研究,其中颗粒被双侧递送到耳蜗中。本研究的目的是评估抗VEGF蛋白水平对临床开发的剂量依赖性。

[1054] 本研究中使用了五组动物,并测试了四种不同的剂量。一组动物充当对照。在研究结束时,收获终末流体和组织用于分析。收集血清、CSF和外淋巴用于评估抗VEGF蛋白水平。研究设计示于图35中。

[1055] 从本研究获得的数据显示,在施用后2个月观察到外淋巴中抗VEGF水平的剂量反应(图36)。在媒介物对照中未观察到抗VEGF蛋白。对于用rAAVAnc80-抗VEGF颗粒给药的NHP,对于用0.65x剂量给药的动物检测到平均4,170ng/mL抗VEGF蛋白。施用1.25x剂量的动物显示平均4,490ng/mL的抗VEGF蛋白。以2.5x剂量给药的动物具有7,560ng/mL的平均抗VEGF蛋白,并且以5x剂量给药的动物具有7,670ng/mL的平均抗VEGF蛋白。

[1056] 与实施例12中所述的研究一样,在任何NHP(媒介物或rAAVAnc80-抗VEGF颗粒)的血清中均未检测到生物活性水平的抗VEGF蛋白。此外,在任何NHP的CSF或非耳蜗组织中均未检测到可定量的抗VEGF蛋白。所评价的非耳蜗组织包括肝脏、颅神经、脾脏、下颌淋巴结、腋窝淋巴结和腹股沟淋巴结。

[1057] 如实施例11.1和图27中所述,基于NHP的外淋巴中抗VEGF蛋白的检测的计算建模支持在通常发现前庭神经鞘瘤的位点存在生物活性水平的抗VEGF蛋白。基于本实施例中在外淋巴中测量的抗VEGF蛋白的水平,使用进一步的计算建模来评估在报告的前庭神经鞘瘤位置处的近似抗VEGF水平(Koen等人,(2020)Otolaryngol Head Neck Surg.162(2):211-214,其通过引用并入本文)。使用经验性确定的NHP的外淋巴中的抗VEGF水平和保守建模假设,估计抗VEGF水平在通常发现前庭神经鞘瘤的位置处或附近超过生物活性阈值浓度(图37)。

[1058] 总之,此数据证明了NHP的外淋巴中抗VEGF水平的剂量依赖性关系。此数据进一步表明,包含抗VEGF的AAV颗粒的耳蜗内递送预期在通常发现前庭神经鞘瘤的位置产生处于或高于生物活性阈值的抗VEGF蛋白水平。此信息可用于供局部递送用的包含抗VEGF的AAV颗粒(例如rAAVAnc80-抗VEGF)的临床开发。

[1059] 实施例15:评价在用rAAVAnc80-雷珠单抗给药的非人灵长类动物(NHP)中持久且可耐受的抗VEGF蛋白的潜力

[1060] 本实施例公开了使用rAAVAnc80-抗VEGF颗粒(如实施例1中所述)在NHP(例如,食蟹猴)中的研究,其中颗粒被双侧递送到耳蜗中。本研究的目的是评估抗VEGF蛋白水平在NHP的内耳中的持久性和耐受性。

[1061] 本研究中测试了三种不同剂量:1X剂量、2X剂量和4X剂量。对照动物用媒介物处理。在研究结束时,进行了左耳蜗的解剖和免疫染色以检测毛细胞存活和抗VEGF蛋白。研究设计示于图38中。为了定量耳蜗显微照片中的抗VEGF蛋白表达,在三个频率位置评价了耳蜗的毛细胞存活和抗VEGF蛋白的检测。在三个频率位置中对每个体素中的荧光强度求和,然后对单个代表值求和,如图39A-39C所示。

[1062] 从该研究获得的数据显示,在NHP内耳中的多种细胞类型中检测到抗VEGF蛋白,包括在内毛细胞、柱细胞、外毛细胞、Hensen细胞和克劳氏细胞(图40A-40D)。此外,在所有测试剂量和所有存活持续时间中,在NHP耳蜗中观察到高的相对抗VEGF蛋白表达水平(图41)。与媒介物对照相比,在本研究中测试的所有三个剂量下用rAAVAnc80-抗VEGF颗粒给药的NHP在所有时间点:施用后1个月、3个月和6个月显示耳蜗中抗VEGF蛋白水平增加约100倍至10,000倍。如图42A-42B所示,在所有研究组中,在NHP耳蜗中总体内毛细胞存活和外毛细胞存活是稳健的。

[1063] 总之,此数据证明了用rAAVAnc80-抗VEGF颗粒给药的NHP的耳蜗中抗VEGF蛋白水平的持久性和NHP耳蜗中抗VEGF蛋白水平的耐受性。此数据支持用于耳蜗内递送的包含抗VEGF的AAV颗粒(例如rAAVAnc80-抗VEGF)的临床开发。

[1064] 示例性实施方案

[1065] 实施方案1.一种构建体,其包含与启动子可操作地连接的编码序列,其中所述编码序列编码血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分。

[1066] 实施方案2.如实施方案1所述的构建体,其中所述启动子为诱导型启动子、组成型启动子或组织特异性启动子。

[1067] 实施方案3.如实施方案1或2所述的构建体,其中所述启动子为CAG启动子、CBA启动子、CMV启动子或CB7启动子。

[1068] 实施方案4.如实施方案1-3中任一项所述的构建体,其中所述启动子包含根据SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:49和/或SEQ ID NO:65的核酸序列。

[1069] 实施方案5.如实施方案1-4中任一项所述的构建体,其中所述编码序列为或包含灵长类动物编码序列。

[1070] 实施方案6.如实施方案1-5中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂或其部分为灵长类动物VEGF结合剂。

[1071] 实施方案7.如实施方案1-4中任一项所述的构建体,其中所述编码序列为或包含人编码序列。

[1072] 实施方案8.如实施方案1-4或6中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂为或包含人VEGF结合剂。

[1073] 实施方案9.如实施方案1-4中任一项所述的构建体,其中所述编码序列为或包含工程化编码序列。

[1074] 实施方案10.如实施方案1-4或9中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂为或包含人源化VEGF结合剂。

[1075] 实施方案11.如实施方案1-10中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂能够结合至少一种VEGF蛋白或其片段。

[1076] 实施方案12.如实施方案11所述的构建体,其中所述至少一种VEGF蛋白为VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D或其组合。

[1077] 实施方案13.如实施方案11所述的构建体,其中所述至少一种VEGF蛋白为或包含VEGF-A。

[1078] 实施方案14.如实施方案1-13中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂包含至少一种多肽。

[1079] 实施方案15.如实施方案1-14中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂为或包含抗体或其片段。

[1080] 实施方案16.如实施方案15所述的构建体,其中所述抗体片段为Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fd'片段、互补决定区(CDR)、单链Fv或Fc结构域。

[1081] 实施方案17.如实施方案1-15中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂为或包含免疫球蛋白重链、免疫球蛋白轻链或其组合。

[1082] 实施方案18.如实施方案1-15或17中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂包含:

[1083] (i) 包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列的多肽,

[1084] (ii) 包含根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列的多肽,或

[1085] (iii) 其组合。

[1086] 实施方案19.如实施方案18所述的构建体,其中所述VEGF结合剂为或包含雷珠单抗。

[1087] 实施方案20.如实施方案1-15或17-19中任一项所述的构建体,其中所述编码序列包含:

[1088] (i) 包含SEQ ID NO:13的核酸序列,

[1089] (ii) 包含SEQ ID NO:19的核酸序列,或

[1090] (iii) 其组合。

[1091] 实施方案21.如实施方案1-20中任一项所述的构建体,其中所述编码序列包含各自编码信号肽的一个或多个核酸序列。

[1092] 实施方案22.如实施方案21所述的构建体,其中所述至少一种核酸序列编码白细胞介素2(IL2)信号肽。

[1093] 实施方案23.如实施方案1-22中任一项所述的构建体,其中所述编码序列包含编码自裂解肽的一个或多个序列。

[1094] 实施方案24.如实施方案23所述的构建体,其中所述自裂解肽为明脉扁刺蛾病毒2A(T2A)肽。

[1095] 实施方案25.如实施方案1-15或17-24中任一项所述的构建体,其中所述编码序列为或包含根据SEQ ID NO:21的核酸序列。

[1096] 实施方案26.如实施方案1-15或17中任一项所述的构建体,其中所述VEGF结合剂包含:

[1097] (i) 包含根据SEQ ID NO:24的氨基酸序列的多肽,

[1098] (ii) 包含根据SEQ ID NO:25的氨基酸序列的多肽,或

[1099] (iii) 其组合。

[1100] 实施方案27.如实施方案26所述的构建体,其中所述VEGF结合剂为或包含贝伐单抗。

[1101] 实施方案28.如实施方案1-15、17、26或27中任一项所述的构建体,其中所述编码序列包含:

[1102] (i) 包含SEQ ID NO:108的核酸序列,

[1103] (ii) 包含SEQ ID NO:109的核酸序列,或

[1104] (iii) 其组合。

[1105] 实施方案29. 如实施方案26-28中任一项所述的构建体, 其中所述编码序列包含各自编码信号肽的一个或多个序列。

[1106] 实施方案30. 如实施方案29所述的构建体, 其中至少一种核酸序列编码IL2信号肽。

[1107] 实施方案31. 如实施方案26-30中任一项所述的构建体, 其中所述编码序列包含编码自裂解肽的一个或多个序列。

[1108] 实施方案32. 如实施方案31所述的构建体, 其中所述自裂解肽为T2A肽。

[1109] 实施方案33. 如实施方案1-15、17或26-32中任一项所述的构建体, 其中所述编码序列为或包含根据SEQ ID NO:22的核酸序列。

[1110] 实施方案34. 如实施方案1-15中任一项所述的构建体, 其中所述VEGF结合剂包含Fc结构域。

[1111] 实施方案35. 如实施方案1-15或34中任一项所述的构建体, 其中所述Fc结构域包含根据SEQ ID NO:111的氨基酸序列。

[1112] 实施方案36. 如实施方案1-15、34或35中任一项所述的构建体, 其中所述编码序列包含根据SEQ ID NO:110的核酸序列。

[1113] 实施方案37. 如实施方案1-15或34-36中任一项所述的构建体, 其中所述VEGF结合剂包含VEGF受体的一个或多个细胞外结构域。

[1114] 实施方案38. 如实施方案37所述的构建体, 其中所述VEGF受体的所述一个或多个细胞外结构域包含根据SEQ ID NO:112的氨基酸序列。

[1115] 实施方案39. 如实施方案1-15或34-38中任一项所述的构建体, 其中所述VEGF结合剂包含VEGF受体的两个细胞外结构域。

[1116] 实施方案40. 如实施方案34-39中任一项所述的构建体, 其中所述编码序列包含各自编码信号肽的一个或多个核酸序列。

[1117] 实施方案41. 如实施方案40所述的构建体, 其中至少一种核酸序列编码IL2信号肽。

[1118] 实施方案42. 如实施方案1-41中任一项所述的构建体, 其还包含两个AAV反向末端重复序列(ITR), 其中所述两个AAV ITR侧接所述编码序列和所述启动子。

[1119] 实施方案43. 如实施方案42所述的构建体, 其中所述两个AAV ITR为或源自AAV2 ITR。

[1120] 实施方案44. 如实施方案42或43所述的构建体, 其中所述两个AAV ITR包含有包含根据SEQ ID NO:45或47的核酸序列的5' ITR和包含根据SEQ ID NO:46或48的核酸序列的3' ITR。

[1121] 实施方案45. 如实施方案1所述的构建体, 其中所述构建体包含根据SEQ ID NO:90、91、92、93、94、106或107中任一者的核酸序列。

[1122] 实施方案46. 如实施方案1所述的构建体, 其中所述构建体包含根据SEQ ID NO:95或96中任一者的核酸序列。

[1123] 实施方案47. 一种AAV颗粒, 其包含如实施方案1-46中任一项所述的构建体。

[1124] 实施方案48. 如实施方案47所述的AAV颗粒, 其还包含AAV衣壳, 其中所述AAV衣壳

为或源自AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh39、AAV-rh43或AAV Anc80衣壳。

[1125] 实施方案49.如实施方案48所述的AAV颗粒,其中所述AAV衣壳为AAV Anc80衣壳。

[1126] 实施方案50.一种组合物,其包含如实施方案1-46中任一项所述的构建体。

[1127] 实施方案51.一种组合物,其包含如实施方案47-50中任一项所述的AAV颗粒。

[1128] 实施方案52.如实施方案51所述的组合物,其中所述AAV颗粒包含AAV衣壳,其中所述AAV衣壳为或源自AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh39、AAV-rh43或AAV Anc80衣壳。

[1129] 实施方案53.如实施方案52所述的组合物,其中所述AAV颗粒的所述AAV衣壳为AAV Anc80衣壳。

[1130] 实施方案54.如实施方案53所述的组合物,其中所述AAV Anc80衣壳为AAV Anc80L65衣壳。

[1131] 实施方案55.如实施方案50-54中任一项所述的组合物,其中所述组合物为药物组合物,任选地其中所述药物组合物包含8.10mM磷酸氢二钠、1.5mM磷酸二氢钾、2.7mM氯化钾、172mM氯化钠和0.001%泊洛沙姆188(vol/vol%)。

[1132] 实施方案56.如实施方案55所述的组合物,其还包含药学上可接受的载剂。

[1133] 实施方案57.如实施方案55或56所述的组合物,其以约 1×10^{11} vg/mL至约 1×10^{15} vg/mL的剂量配制。

[1134] 实施方案58.如实施方案55-57中任一项所述的组合物,其以约 1×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/耳蜗的剂量配制。

[1135] 实施方案59.如实施方案55-58中任一项所述的组合物,其以约0.01mL至0.1mL的体积施用。

[1136] 实施方案60.一种细胞,其包含如实施方案50-59中任一项所述的组合物。

[1137] 实施方案61.如实施方案60所述的细胞,其中所述细胞为体内的、离体的或体外的。

[1138] 实施方案62.如实施方案60或61所述的细胞,其中所述细胞为哺乳动物细胞。

[1139] 实施方案63.如实施方案62所述的细胞,其中所述哺乳动物细胞为人细胞。

[1140] 实施方案64.如实施方案60所述的细胞,其中所述细胞被永生化以产生稳定细胞系。

[1141] 实施方案65.如实施方案63所述的细胞,其中所述人细胞是在受试者的耳朵中。

[1142] 实施方案66.如实施方案63所述的细胞,其中所述人细胞为内耳细胞。

[1143] 实施方案67.如实施方案66所述的细胞,其中所述内耳细胞为内毛细胞、外毛细胞或两者。

[1144] 实施方案68.一种系统,其包括如实施方案50-59中任一项所述的组合物。

[1145] 实施方案69.一种方法,其包括使内耳细胞与如实施方案1-46中任一项所述的构建体接触。

[1146] 实施方案70.一种方法,其包括使内耳细胞与如实施方案47-49中任一项所述的AAV颗粒接触。

[1147] 实施方案71.一种方法,其包括使内耳细胞与如实施方案50-59中任一项所述的组

合物接触。

[1148] 实施方案72.如实施方案69-71中任一项所述的方法,其中所述内耳细胞为外毛细胞。

[1149] 实施方案73.如实施方案69-71中任一项所述的方法,其中所述内耳细胞为内毛细胞。

[1150] 实施方案74.如实施方案69-73中任一项所述的方法,其中所述内耳细胞在受试者的耳朵中。

[1151] 实施方案75.如实施方案69-73中任一项所述的方法,其中所述内耳细胞在体外或离体。

[1152] 实施方案76.一种方法,其包括使细胞与以下各项接触:

[1153] (i) 如实施方案1-46中任一项所述的构建体;和

[1154] (ii) 一种或多种构建体,其包含AAV Rep基因、AAV Cap基因、AAV VA基因、AAV E2a基因和AAV E4基因。

[1155] 实施方案77.如实施方案76所述的方法,其中所述细胞为内耳细胞。

[1156] 实施方案78.如实施方案77所述的方法,其中所述内耳细胞为外毛细胞。

[1157] 实施方案79.实施方案77所述的方法,其中所述内耳细胞为内毛细胞。

[1158] 实施方案80.如实施方案77-79中任一项所述的方法,其中所述内耳细胞在体外或离体。

[1159] 实施方案81.一种方法,其包括将如实施方案1-46中任一项所述的构建体引入到受试者的内耳中。

[1160] 实施方案82.一种方法,其包括将如实施方案47-49中任一项所述的AAV颗粒引入到受试者的内耳中。

[1161] 实施方案83.一种方法,其包括将如实施方案50-59中任一项所述的组合物引入到受试者的内耳中。

[1162] 实施方案84.如实施方案81-83中任一项所述的方法,其中将所述构建体、AAV颗粒或组合物引入到所述受试者的耳蜗中。

[1163] 实施方案85.如实施方案81-84中任一项所述的方法,其中所述构建体、AAV颗粒或组合物经由圆窗膜注射来引入。

[1164] 实施方案86.如实施方案69-75和81-85中任一项所述的方法,其还包括测量所述受试者的听力水平。

[1165] 实施方案87.如实施方案86所述的方法,听力水平通过执行听觉脑干反应 (ABR) 测试来测量。

[1166] 实施方案88.如实施方案86或87所述的方法,其还包括将所述受试者的听力水平与参考听力水平进行比较。

[1167] 实施方案89.如实施方案88所述的方法,其中所述参考听力水平为公开或历史参考听力水平。

[1168] 实施方案90.如实施方案89所述的方法,其中在引入如实施方案1-46中任一项所述的构建体、如实施方案47-49中任一项所述的AAV颗粒或如实施方案50-59中任一项所述的组合物之后,测量所述受试者的听力水平,且所述参考听力水平为所述受试者在引入如

实施方案1-46中任一项所述的构建体、如实施方案47-49中任一项所述的AAV颗粒或如实施方案50-59中任一项所述的组合物之前测量的听力水平。

[1169] 实施方案91.如实施方案69-75和81-90中任一项所述的方法,其还包括测量受试者的血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平。

[1170] 实施方案92.如实施方案91所述的方法,其中测量所述受试者的内耳中所述血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平。

[1171] 实施方案93.如实施方案91或92所述的方法,其中测量所述受试者的耳蜗中所述血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平。

[1172] 实施方案94.如实施方案69-75和81-93中任一项所述的方法,其还包括将所述受试者的所述血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平与血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的参考水平进行比较。

[1173] 实施方案95.如实施方案94所述的方法,其中血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的所述参考水平为血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的公开或历史参考水平。

[1174] 实施方案96.如实施方案91-95中任一项所述的方法,其中在引入如实施方案1-46中任一项所述的构建体、如实施方案47-49中任一项所述的AAV颗粒或如实施方案50-59中任一项所述的组合物之后,测量所述受试者的所述血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平,且血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的参考水平为在引入如实施方案1-46中任一项所述的构建体、如实施方案47-49中任一项所述的AAV颗粒或如实施方案50-59中任一项所述的组合物之前测量的所述受试者的血管内皮生长因子(VEGF)结合剂或其部分的水平。

[1175] 实施方案97.如实施方案69-75和81-96中任一项所述的方法,其还包括测量受试者的肿瘤的体积。

[1176] 实施方案98.如实施方案97所述的方法,其还包括将所述受试者的肿瘤体积与参考肿瘤体积进行比较。

[1177] 实施方案99.如实施方案98所述的方法,其中所述参考肿瘤体积为公开或历史参考肿瘤体积。

[1178] 实施方案100.如如实施方案97-99中任一项所述的方法,其中在引入如实施方案1-46中任一项所述的构建体、如实施方案47-49中任一项所述的AAV颗粒或如实施方案50-59中任一项所述的组合物之后,测量所述受试者的肿瘤体积,且所述参考肿瘤体积为在引入如实施方案1-46中任一项所述的构建体、如实施方案47-49中任一项所述的AAV颗粒或如实施方案50-59中任一项所述的组合物之前测量的所述受试者的肿瘤体积。

[1179] 实施方案101.一种治疗听力损失或治疗内耳病症的方法,其包括向有需要的受试者施用如实施方案1-46中任一项所述的构建体、如实施方案47-49中任一项所述的AAV颗粒或如实施方案50-59中任一项所述的组合物。

[1180] 实施方案102.如实施方案74和81-101中任一项所述的方法,其中所述受试者患有以血管新生为特征的耳科疾病或处于所述疾病的风险下。

[1181] 实施方案103.如实施方案102所述的方法,其中所述耳科疾病为或包含前庭神经鞘瘤。

[1182] 实施方案104.如实施方案103所述的方法,其中所述前庭神经鞘瘤为单侧进行性前庭神经鞘瘤。

[1183] 实施方案105.如实施方案104所述的方法,其中患有前庭神经鞘瘤的所述受试者患有2型神经纤维瘤病(NF2),

[1184] 实施方案106.如实施方案102-105中任一项所述的方法,其中与所述耳科疾病相关的一种或多种症状得到缓解或改善。

[1185] 实施方案107.如实施方案106所述的方法,其中所述一种或多种症状包括听力损失、毛细胞退化、内耳液生化环境的改变、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血、耳蜗血管供应中断、耳鸣、头晕、顽固性头痛、面部神经病变、三叉神经病变、面瘫、面部感觉异常、脑积水、小脑疝、死亡或其组合。

[1186] 实施方案108.如实施方案69-75、81-102和104-107中任一项所述的方法,其中所述方法为治疗前庭神经鞘瘤的方法。

[1187] 实施方案109.如实施方案69-75和81-107中任一项所述的方法,其中所述方法为调节VEGF水平的方法。

[1188] 实施方案110.如实施方案69-75和81-107中任一项所述的方法,其中所述方法为调节活性VEGF的水平的方法。

[1189] 实施方案111.如实施方案69-75和81-107中任一项所述的方法,其中所述方法为降低VEGF的活性的方法。

[1190] 实施方案112.如实施方案1-46中任一项所述的构建体,其用于治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与所述耳科疾病相关的一种或多种症状。

[1191] 实施方案113.如实施方案47-49中任一项所述的AAV颗粒,其用于治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与所述耳科疾病相关的一种或多种症状。

[1192] 实施方案114.如实施方案50-59中任一项所述的组合物,其用于治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与所述耳科疾病相关的一种或多种症状。

[1193] 实施方案115.如实施方案112所述的构建体、如实施方案113所述的AAV颗粒或如实施方案114所述的组合物,其中与所述耳科疾病相关的所述一种或多种症状包括听力损失、毛细胞退化、内耳液生化环境的改变、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血、耳蜗血管供应中断、耳鸣、头晕、顽固性头痛、面部神经病变、三叉神经病变、面瘫、面部感觉异常、脑积水、小脑疝、死亡或其组合。

[1194] 实施方案116.如实施方案1-46中任一项所述的构建体用于制造治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与所述耳科疾病相关的一种或多种症状的药物的用途。

[1195] 实施方案117.如实施方案47-49中任一项所述的颗粒用于制造治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与所述耳科疾病相关的一种或多种症状的药物的用途。

[1196] 实施方案118.如实施方案50-59中任一项所述的组合物用于制造治疗以血管新生为特征的耳科疾病和/或与所述耳科疾病相关的一种或多种症状的药物的用途。

[1197] 实施方案119.如实施方案116-118中任一项所述的用途,其中与所述耳科疾病相关的所述一种或多种症状包括听力损失、毛细胞退化、内耳液生化环境的改变、迷路内蛋白升高、内淋巴积水、耳蜗孔阻塞、迷路内出血、耳蜗血管供应中断、耳鸣、头晕、顽固性头痛、面部神经病变、三叉神经病变、面瘫、面部感觉异常、脑积水、小脑疝、死亡或其组合。

- [1198] 实施方案120.一种细胞群,其包含根据实施方案60-67中任一项所述的一种或多种细胞,其中所述群为或包含稳定细胞系。
- [1199] 实施方案121.一种药盒,其包含如实施方案50-59中任一项所述的组合物。
- [1200] 实施方案122.如实施方案121所述的药盒,其中所述组合物预装载在装置中。
- [1201] 实施方案123.如实施方案122所述的药盒,其中所述装置为微导管。
- [1202] 实施方案124.如实施方案123所述的药盒,其中所述微导管成形以使得其可经由外耳道进入中耳腔且使所述微导管的末端与RWM接触。
- [1203] 实施方案125.如实施方案123或124所述的药盒,其中所述微导管的远端包含直径为10微米至1,000微米的至少一个微针。
- [1204] 实施方案126.如实施方案121-125中任一项所述的药盒,其进一步包括装置。
- [1205] 实施方案127.如实施方案126所述的药盒,其中所述装置为图29-32中任一者中描述的装置。
- [1206] 实施方案128.如实施方案122-127中任一项所述的药盒,其中所述装置包括针,所述针包括弯曲部分和倾斜尖端。
- [1207] 实施方案129:如实施方案81-111中任一项所述的方法,其中所述构建体或AAV颗粒的特征在于,当施用于受试者时,抗VEGF蛋白在所述受试者的外淋巴中以可检测水平表达。
- [1208] 实施方案130:如实施方案129所述的方法,其中所述抗VEGF蛋白以约20ng/mL至约1000ng/mL的范围表达。
- [1209] 实施方案131:如实施方案81-111中任一项所述的方法,其中所述构建体或AAV颗粒的特征在于,当施用于受试者时,抗VEGF蛋白在血清、CSF或非耳蜗组织或其组合中不以可检测水平存在。
- [1210] 实施方案132:如实施方案131所述的方法,其中所述非耳蜗组织选自肝脏、颅神经、脾脏、下颌淋巴结、腋窝淋巴结和腹股沟淋巴结中的一种或多种。
- [1211] 实施方案133:如实施方案81-111中任一项所述的方法,其中所述构建体或AAV颗粒的特征在于,当施用于受试者时,观察到抗VEGF蛋白的剂量依赖性表达。
- [1212] 实施方案134:如实施方案81-111中任一项所述的方法,其中所述构建体或AAV颗粒的特征在于,当施用于受试者时,抗VEGF蛋白存在于耳朵中发现VS的一个或多个位置处或附近。
- [1213] 实施方案135:如实施方案134所述的方法,其中所述VS包括早期VS或晚期VS。
- [1214] 实施方案136:如实施方案134所述的方法,其中所述VS包括I级、II级、III级或IV级VS。
- [1215] 实施方案137:如实施方案134所述的方法,其中所述VS位置的特征在于其距内耳道(IAC)底部的距离。
- [1216] 实施方案138:如实施方案137所述的方法,其中所述位置距IAC底部约1-5mm。
- [1217] 实施方案139:如实施方案138所述的方法,其中所述位置距IAC底部约1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5mm。
- [1218] 实施方案140:如实施方案134-139中任一项所述的方法,其中所述抗VEGF蛋白以生物活性阈值或高于生物活性阈值存在。

[1219] 实施方案141:如实施方案112-119中任一项所述的用途,其中向受试者施用所述AAV颗粒或构建体。

[1220] 实施方案142:如实施方案141所述的用途,其中所述构建体或AAV颗粒的特征在于,当施用于受试者时,抗VEGF蛋白在所述受试者的外淋巴中以可检测水平表达。

[1221] 实施方案143:如实施方案142所述的用途,其中所述抗VEGF蛋白以约20ng/mL至约1000ng/mL的范围表达。

[1222] 实施方案144:如实施方案141所述的用途,其中所述构建体或AAV颗粒的特征在于,当施用于受试者时,抗VEGF蛋白在血清、CSF或非耳蜗组织或其组合中不以可检测水平存在。

[1223] 实施方案145:如实施方案144所述的用途,其中非耳蜗组织选自肝脏、颅神经、脾脏、下颌淋巴结、腋窝淋巴结和腹股沟淋巴结中的一种或多种。

[1224] 实施方案146:如实施方案141所述的用途,其中所述构建体或AAV颗粒的特征在于,当施用于受试者时,观察到抗VEGF蛋白的剂量依赖性表达。

[1225] 实施方案147:如实施方案141所述的用途,其中所述构建体或AAV颗粒的特征在于,当施用于受试者时,抗VEGF蛋白存在于耳朵中发现VS的一个或多个位置处或附近。

[1226] 实施方案148:如实施方案147所述的用途,其中所述VS包括早期VS或晚期VS。

[1227] 实施方案149:如实施方案148所述的用途,其中所述VS包括I级、II级、III级或IV级VS。

[1228] 实施方案150:如实施方案147所述的用途,其中所述VS位置的特征在于其距内耳道(IAC)底部的距离。

[1229] 实施方案151:如实施方案147所述的用途,其中所述位置距IAC底部约1-5mm。

[1230] 实施方案152:如实施方案151所述的用途,其中所述位置距IAC底部约1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5mm。

[1231] 实施方案153:如实施方案147-152中任一项所述的用途,其中所述抗VEGF蛋白以生物活性阈值或高于生物活性阈值存在。

[1232] 实施方案154:如权利要求81-111或129-140中任一项所述的方法,其中所述受试者具有以下特征中的一项或多项或全部或任何组合:(i)存在单侧(例如,散发性)进行性VS(定义为彼此在24个月内发生、至少间隔6个月的连续MRI扫描中具有记录的 $\geq 20\%$ 体积生长的单个肿瘤),其中最近的MRI在施用本文公开的组合物之前不超过6个月获得;(ii)存在用于确定资格的初始MRI上最大尺寸大于2mm并且在单个序列中的至少三个切片上可见的肿瘤;(iii)极度听力损失,例如定义为受影响耳朵在最佳辅助条件下词语识别得分(WRS)为40%或更低或纯音测听阈值 >90 dB HL(跨250至8000Hz);(iv)在rAAV-抗VEGF施用至少18岁;(v)如果具有生育能力则同意在施用期间使用有效的避孕方法;(vi)如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的临床试验,则愿意遵守所有试验要求,如通过成功完成知情同意过程所证明;和(vii)如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的临床试验,则愿意在试验完成后参与单独的长期随访(LTFU)研究方案。

[1233] 实施方案155:如权利要求81-111或129-140中任一项所述的方法,其中施用本文公开的组合物(例如,rAAV-抗VEGF)的受试者不具有以下特征中的一项或多项或全部或任何组合:(i)在小脑桥脑角(不包括IAC组件)中最大尺寸为1.5cm或更大的肿瘤;或者其中一

年的额外观察期将使受试者处于进一步的肿瘤相关后遗症 (除了听力损失之外) 的高风险中;或与脑干没有接触并且不延伸1.5cm或更多到小脑桥脑角中的肿瘤;(ii) NF2的先前诊断和/或具有双侧VS;(iii) 针对VS的既往手术或放射治疗;(iv) 幼年性白内障、神经胶质瘤、室管膜瘤、神经纤维瘤或多于一种脑膜瘤的当前诊断或病史;(v) 在受影响的耳朵中与内淋巴积水 (记录的波动性感音神经性听力损失和/或发作性眩晕) 一致的临床病史;(vi) 在未受影响的耳朵中前庭功能低下的病史;(vii) 禁忌接受手术或全身麻醉或使用皮质类固醇的医学或心理疾患;(viii) 妨碍手术方法的耳解剖异常 (例如, 耳道闭锁);(ix) 针对使用造影剂获得常规高分辨率MRI的任何禁忌 (例如, 患有肾衰竭、严重幽闭恐惧症或非MRI相容性植入物的参与者);(x) 在受影响的耳朵中中耳积液的证据;(xi) 在施用 (第0天) rAAV-抗VEGF之前6周内, 在受影响的耳朵中暂时妨碍手术方法的活动性中耳炎 (AOM)、外耳炎或其他类似感染或此类的病史;(xii) 在施用 (第0天) rAAV-抗VEGF之前6个月内, 在受影响的耳朵中既往中耳或内耳手术;(xiii) 妊娠或哺乳, 或计划在12个月内尝试妊娠 (男性或女性);(xiv) 在施用 (第0天) 之前6个月内, 长期使用皮质类固醇 (全身或口服);(xv) 对VEGF抑制剂或计划在围手术期使用的其他药物的已知敏感性或过敏性;(xvi) 脑血管疾病的病史或当前诊断;(xvii) 在施用 (第0天) 之前6个月内先前参与过使用研究药物的临床试验, 或者先前参与过任何基因疗法临床试验;(xviii) 任何其他将不允许受试者在施用rAAV-抗VEGF的试验过程中完成随访检查和/或研究者认为使潜在参与者不适合参加试验的疾患;(xix) 如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的试验, 则受试者不愿意或不能遵守所有研究要求和随访;以及(xx) 极度听力损失, 例如定义为未受影响的耳朵在最佳辅助条件下词语识别得分 (WRS) 为40%或更低或纯音测听阈值>90dB HL (跨250至8000Hz)。

[1234] 实施方案156: 如权利要求112-119或141-153中任一项所述的用途, 其中所述受试者具有以下特征中的一项或多项或全部或任何组合: (i) 存在单侧 (例如, 散发性) 进行性VS (定义为彼此在24个月内发生、至少间隔6个月的连续MRI扫描中具有记录的 $\geq 20\%$ 体积生长的单个肿瘤), 其中最近的MRI在施用本文公开的组合物之前不超过6个月获得;(ii) 存在用于确定资格的初始MRI上最大尺寸大于2mm并且在单个序列中的至少三个切片上可见的肿瘤;(iii) 极度听力损失, 例如定义为受影响耳朵在最佳辅助条件下词语识别得分 (WRS) 为40%或更低或纯音测听阈值>90dB HL (跨250至8000Hz);(iv) 在rAAV-抗VEGF施用至少18岁;(v) 如果具有生育能力则同意在施用期间使用有效的避孕方法;(vi) 如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的临床试验, 则愿意遵守所有试验要求, 如通过成功完成知情同意过程所证明;和(vii) 如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的临床试验, 则愿意在试验完成后参与单独的长期随访 (LTFU) 研究方案。

[1235] 实施方案157: 如权利要求112-119或141-153中任一项所述的用途, 其中施用本文公开的组合物 (例如, rAAV-抗VEGF) 的受试者不具有以下特征中的一项或多项或全部或任何组合: (i) 在小脑桥脑角 (不包括IAC组件) 中最大尺寸为1.5cm或更大的肿瘤;或者其中一年的额外观察期将使受试者处于进一步的肿瘤相关后遗症 (除了听力损失之外) 的高风险中;或与脑干没有接触并且不延伸1.5cm或更多到小脑桥脑角中的肿瘤;(ii) NF2的先前诊断和/或具有双侧VS;(iii) 针对VS的既往手术或放射治疗;(iv) 幼年性白内障、神经胶质瘤、室管膜瘤、神经纤维瘤或多于一种脑膜瘤的当前诊断或病史;(v) 在受影响的耳朵中与内淋巴积水 (记录的波动性感音神经性听力损失和/或发作性眩晕) 一致的临床病史;(vi)

在未受影响的耳朵中前庭功能低下的病史；(vii) 禁忌接受手术或全身麻醉或使用皮质类固醇的医学或心理疾患；(viii) 妨碍手术方法的耳解剖异常（例如，耳道闭锁）；(ix) 针对使用造影剂获得常规高分辨率MRI的任何禁忌（例如，患有肾衰竭、严重幽闭恐惧症或非MRI相容性植入物的参与者）；(x) 在受影响的耳朵中中耳积液的证据；(xi) 在施用（第0天）rAAV-抗VEGF之前6周内，在受影响的耳朵中暂时妨碍手术方法的活动性中耳炎（AOM）、外耳炎或其他类似感染或此类的病史；(xii) 在施用（第0天）rAAV-抗VEGF之前6个月内，在受影响的耳朵中既往中耳或内耳手术；(xiii) 妊娠或哺乳，或计划在12个月内尝试妊娠（男性或女性）；(xiv) 在施用（第0天）之前6个月内，长期使用皮质类固醇（全身或口服）；(xv) 对VEGF抑制剂或计划在围手术期使用的其他药物的已知敏感性或过敏性；(xvi) 脑血管疾病的病史或当前诊断；(xvii) 在施用（第0天）之前6个月内先前参与过使用研究药物的临床试验，或者先前参与过任何基因疗法临床试验；(xviii) 任何其他将不允许受试者在施用rAAV-抗VEGF的试验过程中完成随访检查和/或研究者认为使潜在参与者不适合参加试验的疾患；(xix) 如果正在参与施用rAAV-抗VEGF的试验，则受试者不愿意或不能遵守所有研究要求和随访；以及 (xx) 极度听力损失，例如定义为未受影响的耳朵在最佳辅助条件下词语识别得分（WRS）为40%或更低或纯音测听阈值>90dB HL（跨250至8000Hz）。

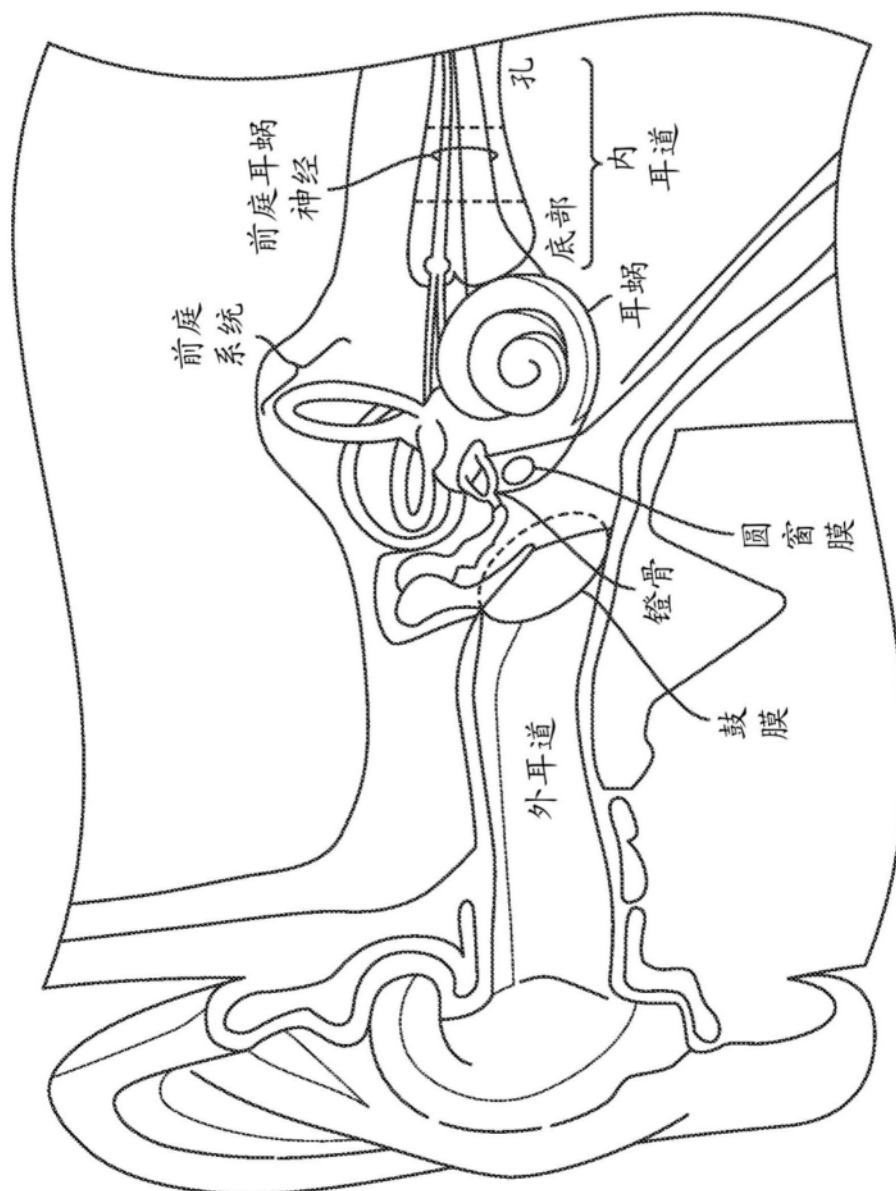


图1

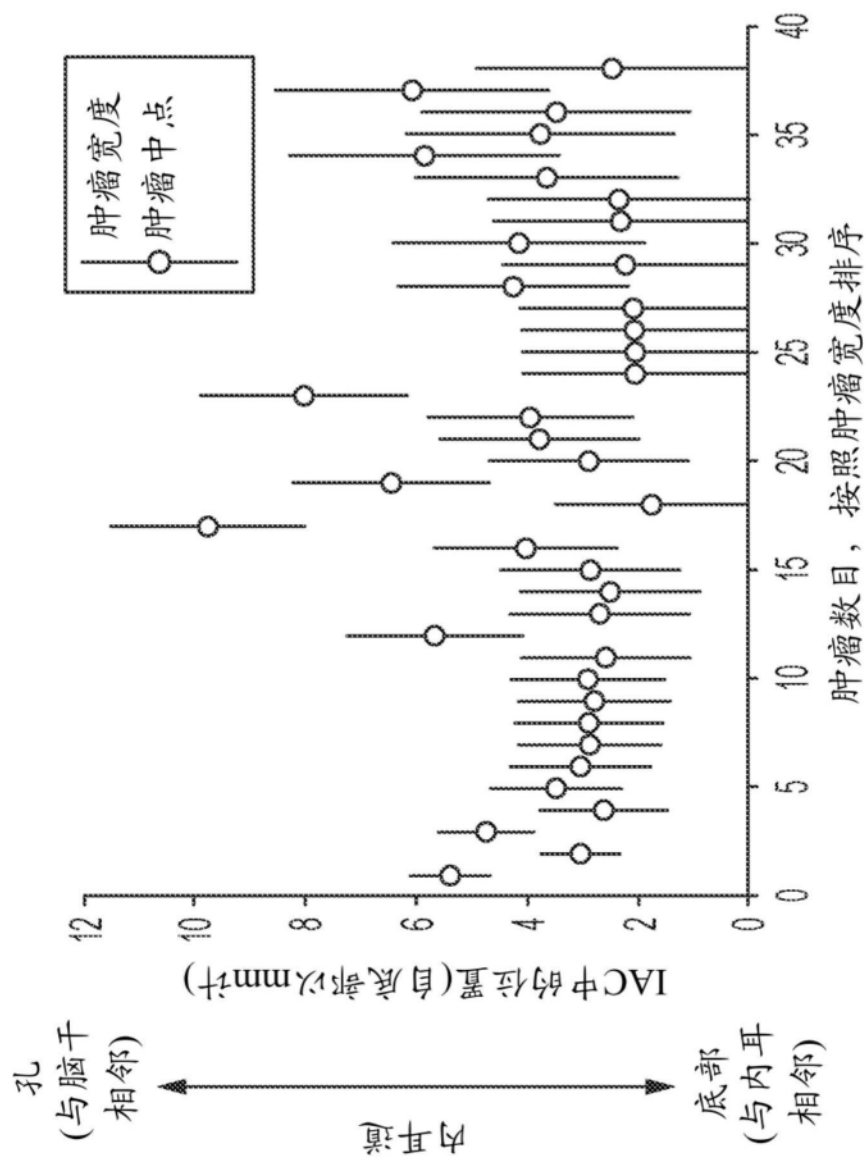


图2

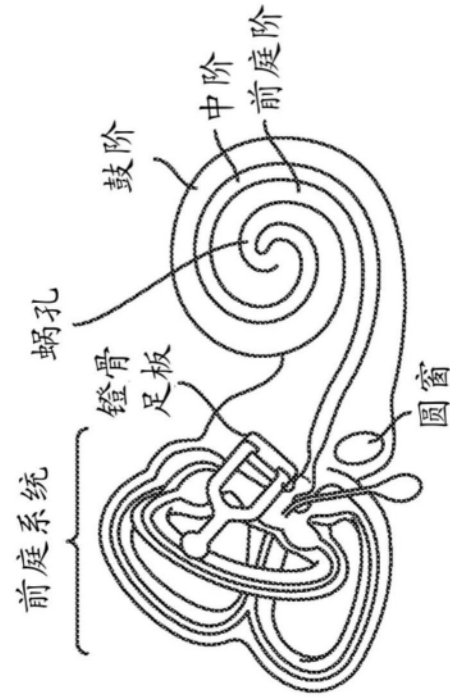


图3A

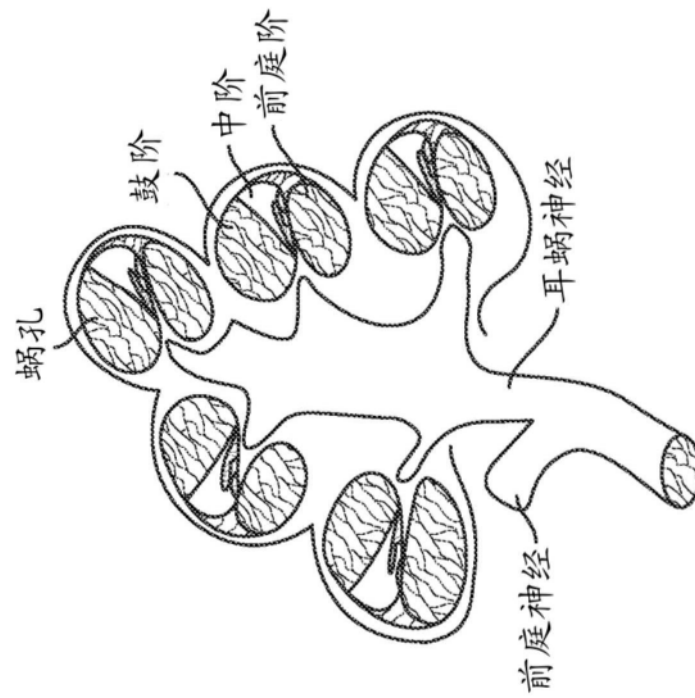


图3B

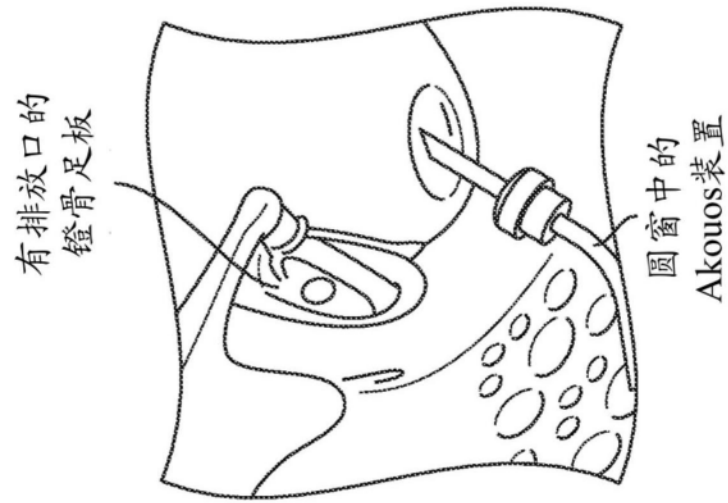


图4A

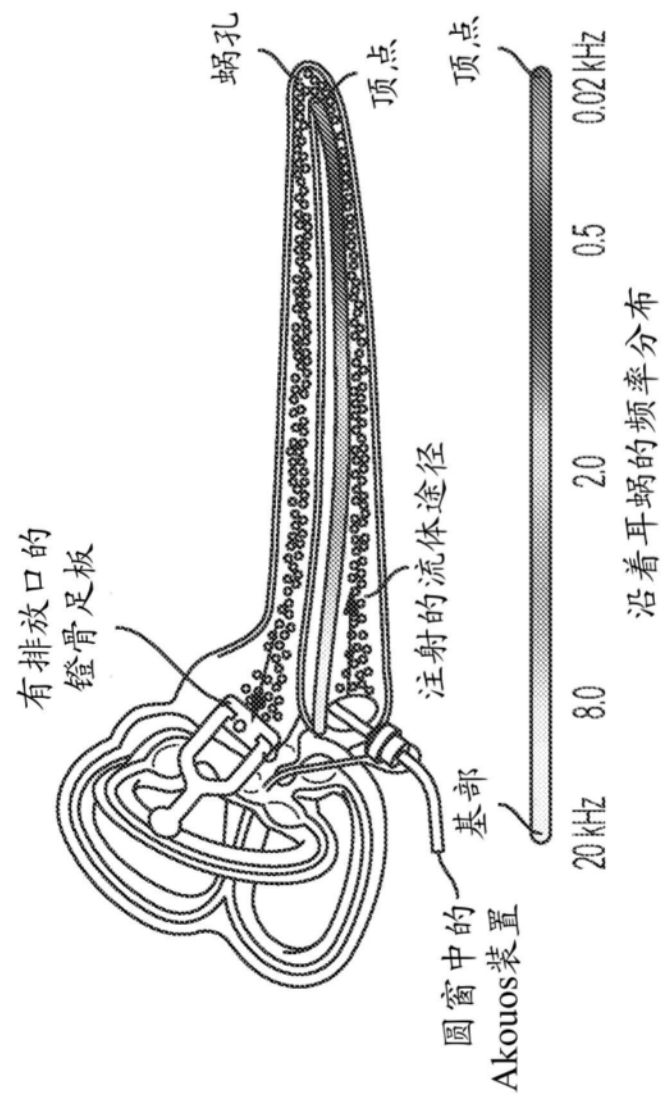


图4B

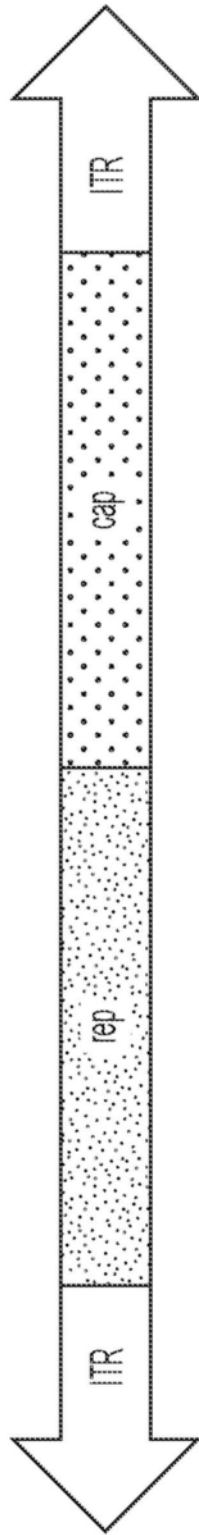


图5A

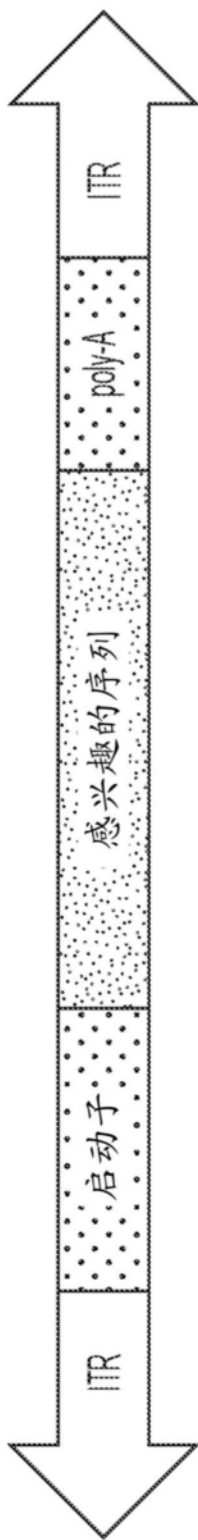


图5B

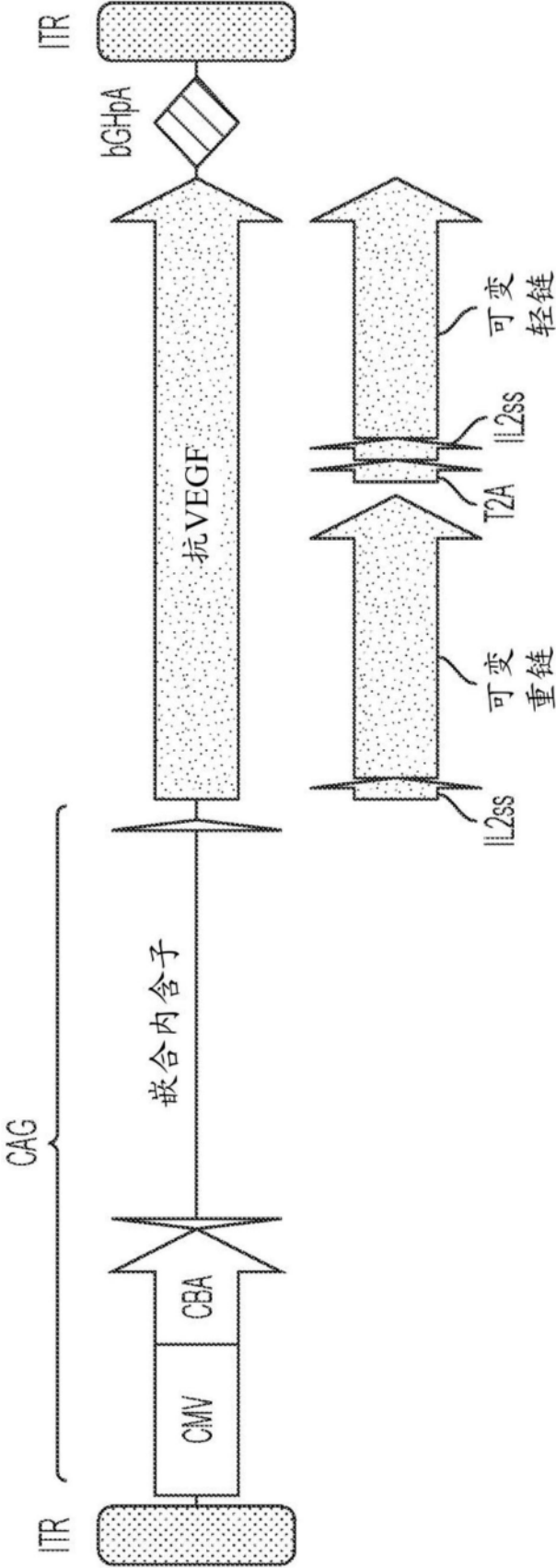


图6A

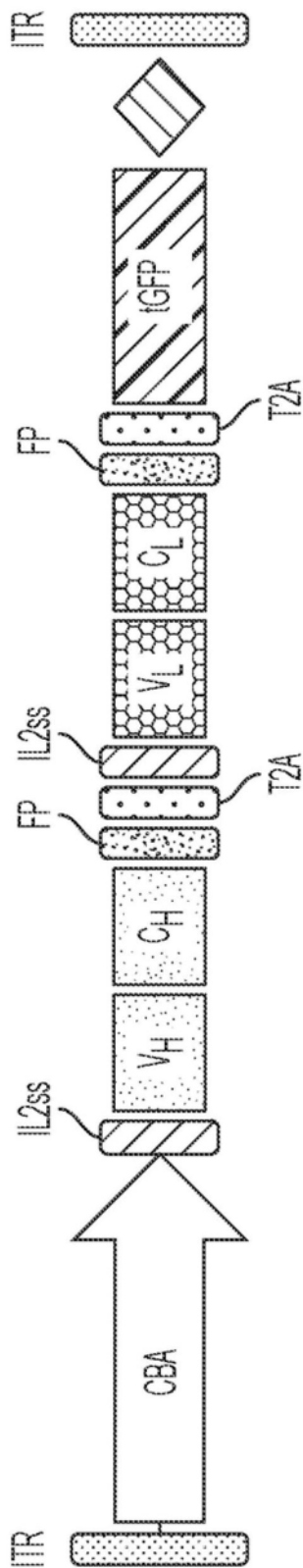


图6B

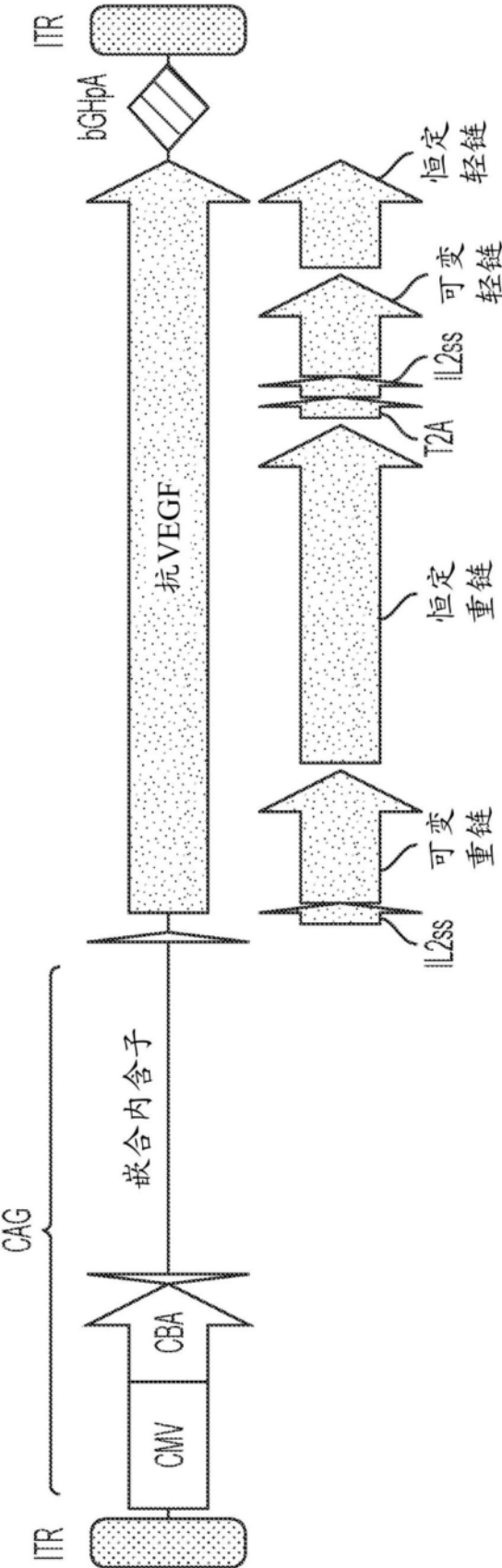


图6C

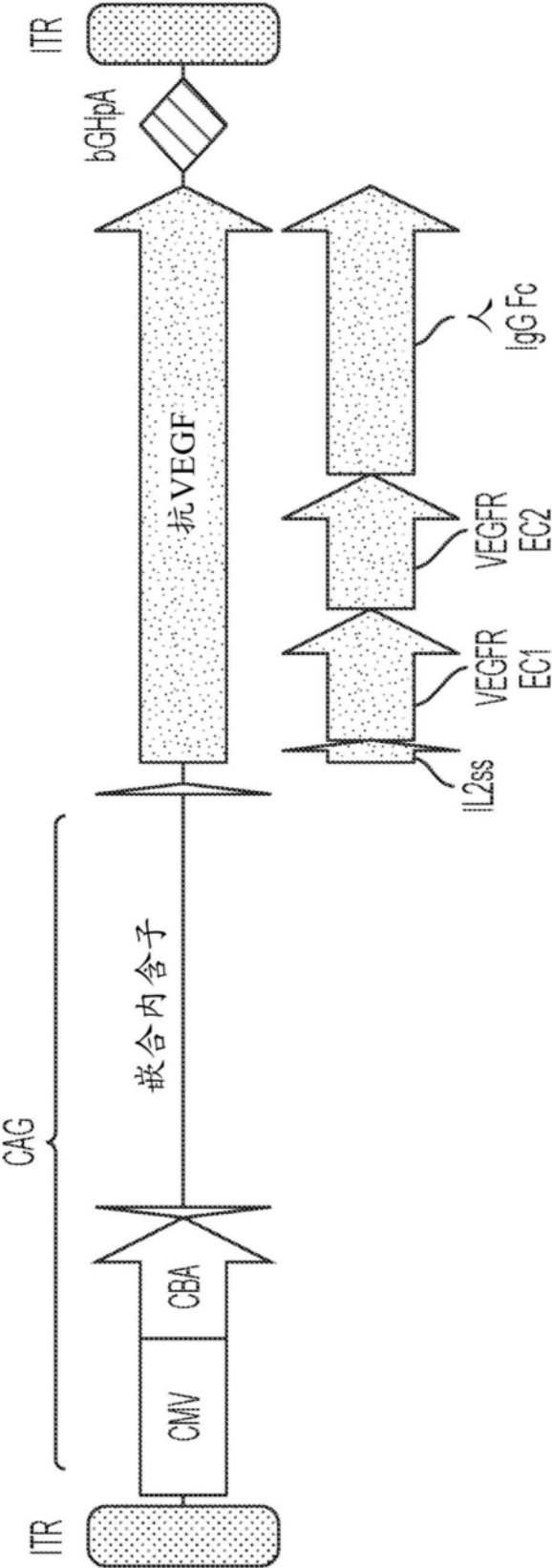


图6D

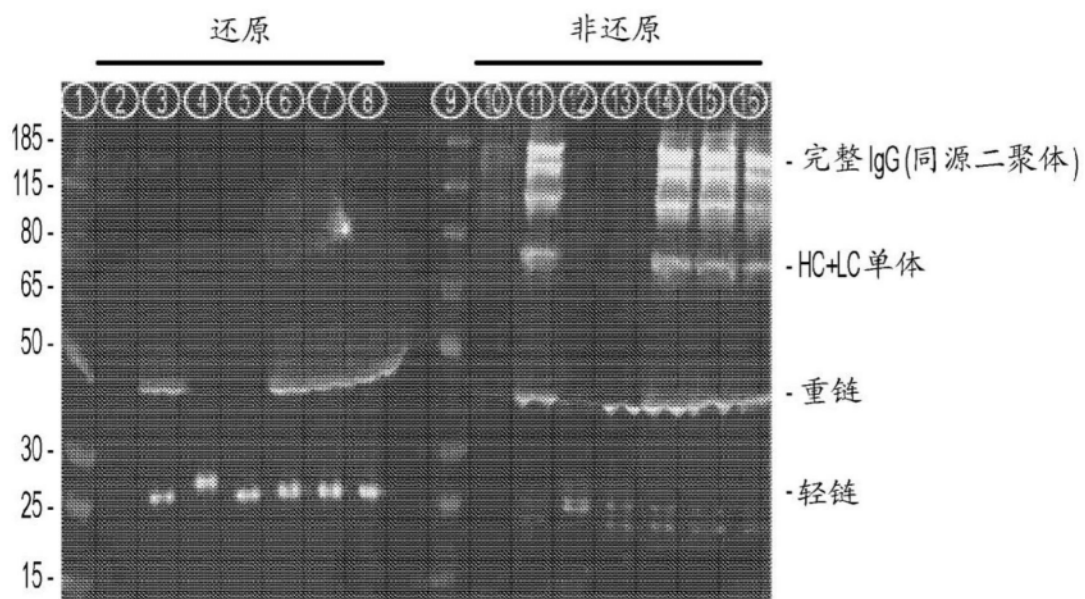


图7

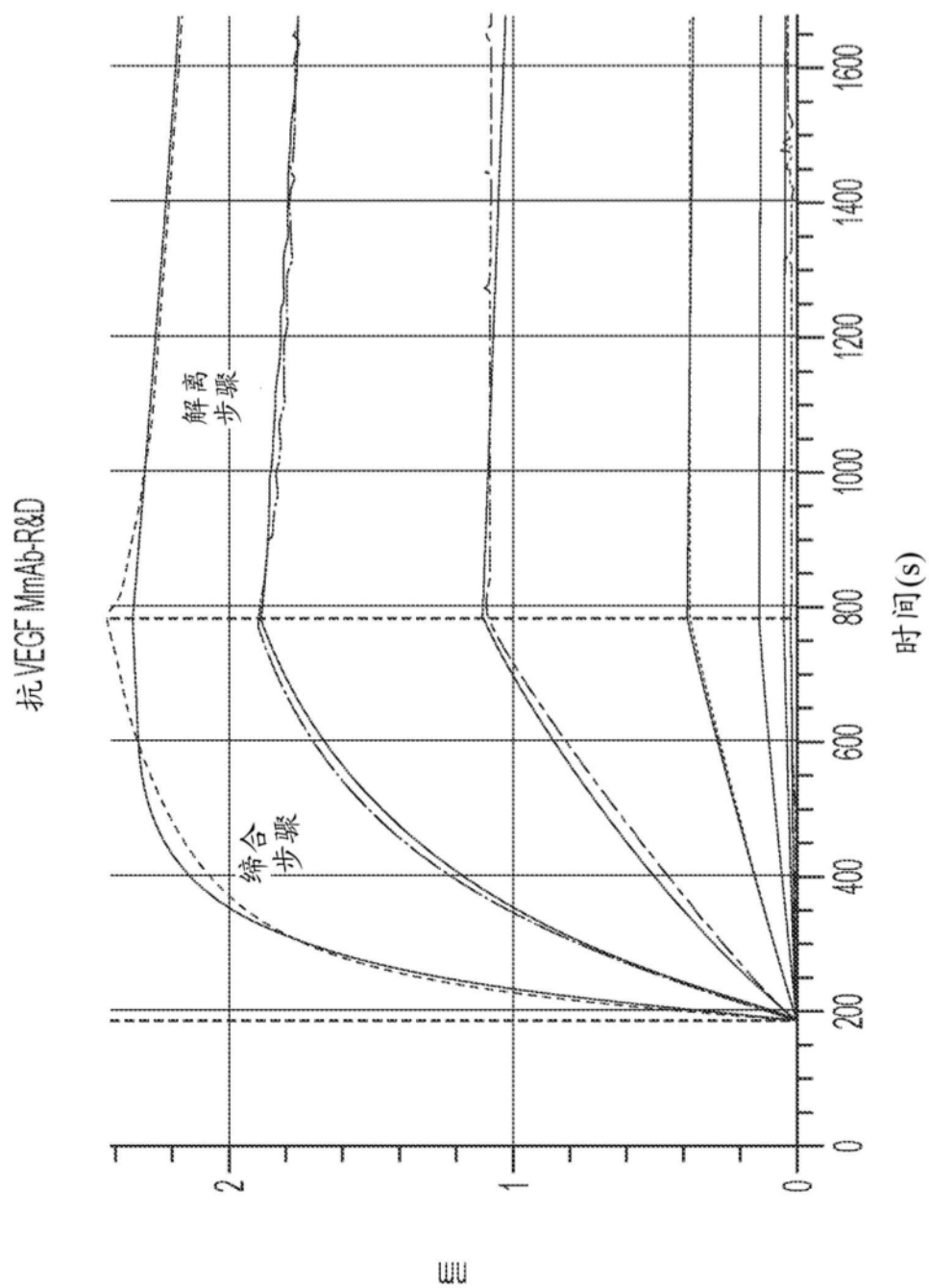


图8A

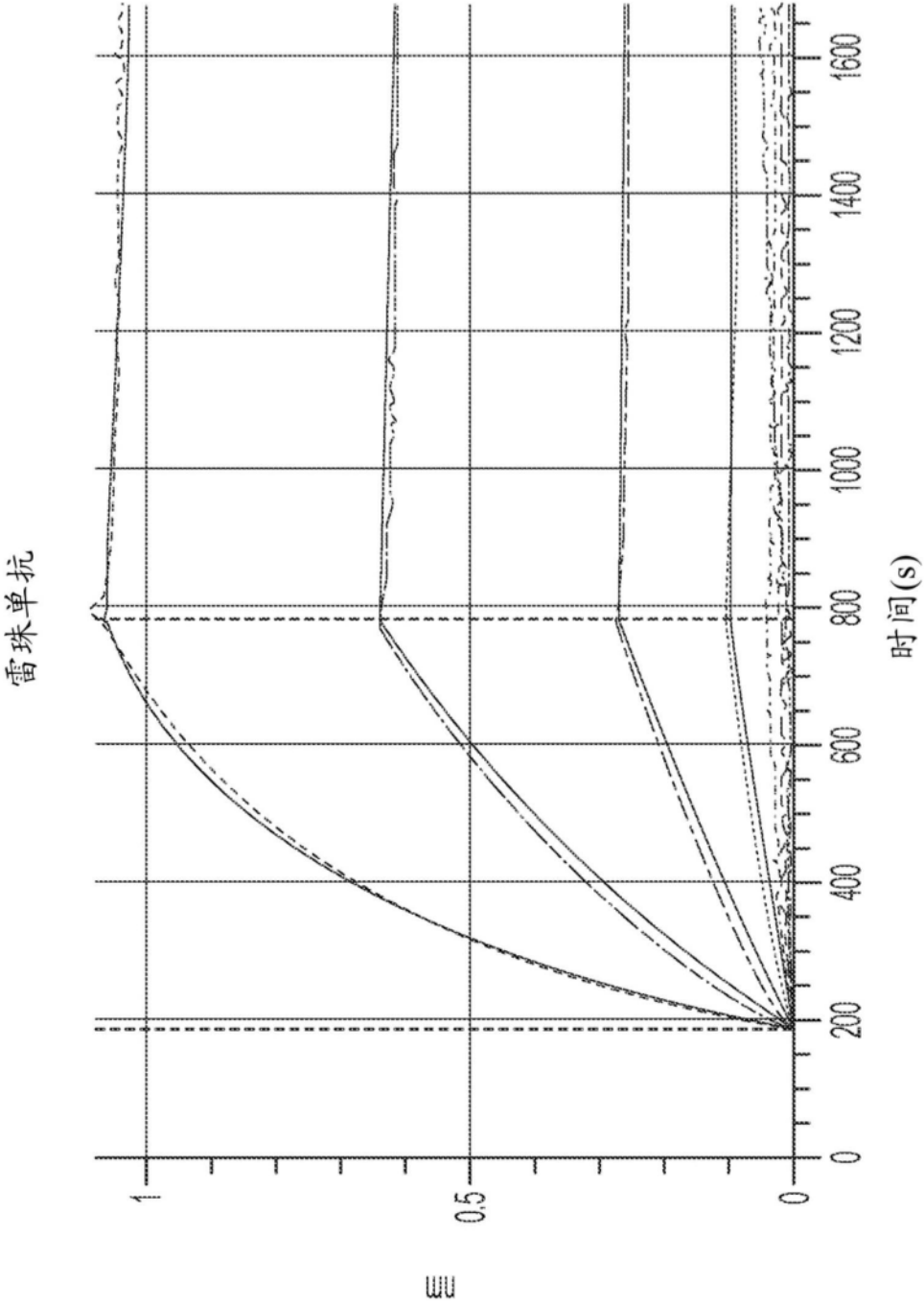


图8B

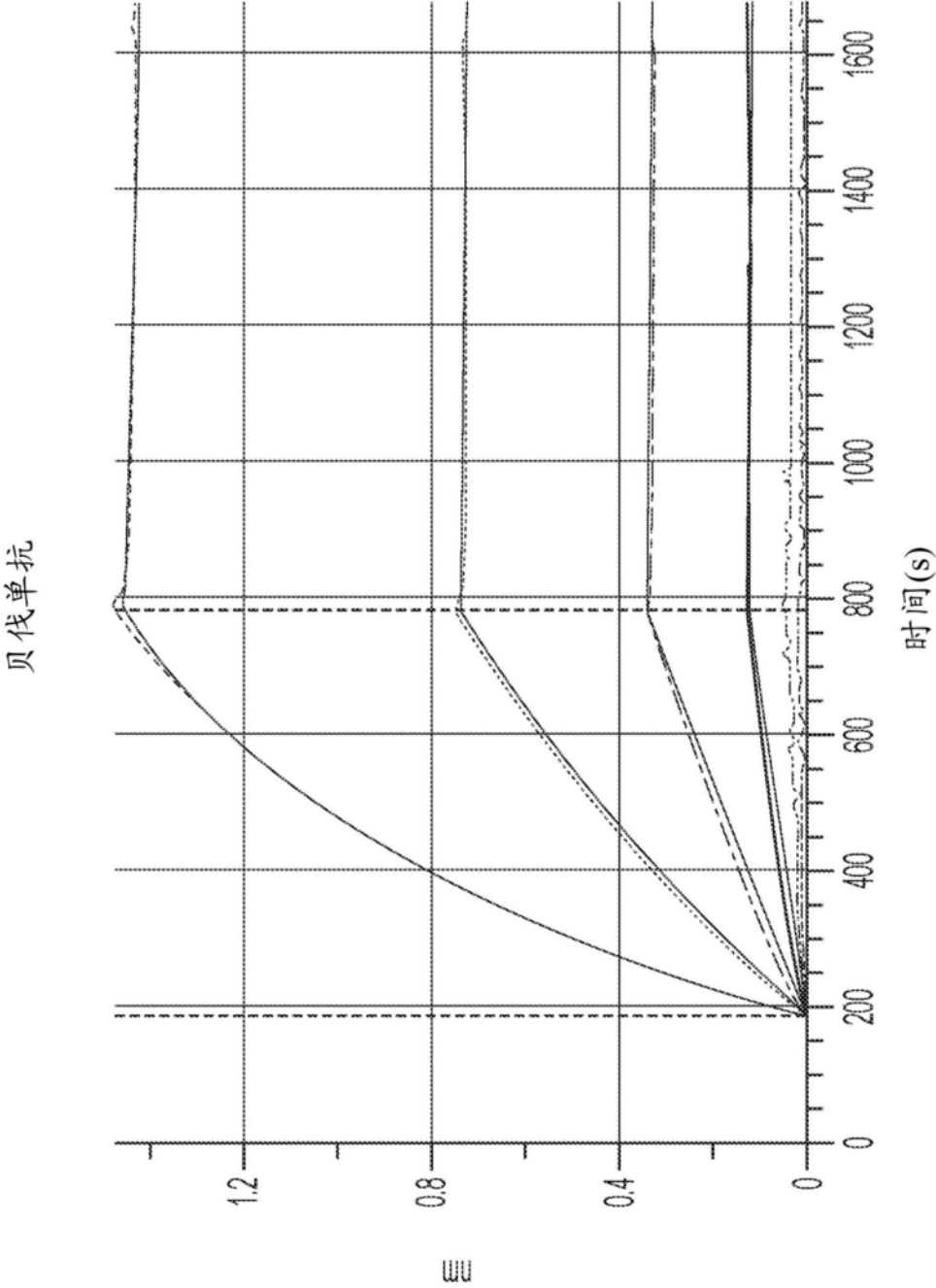


图8C

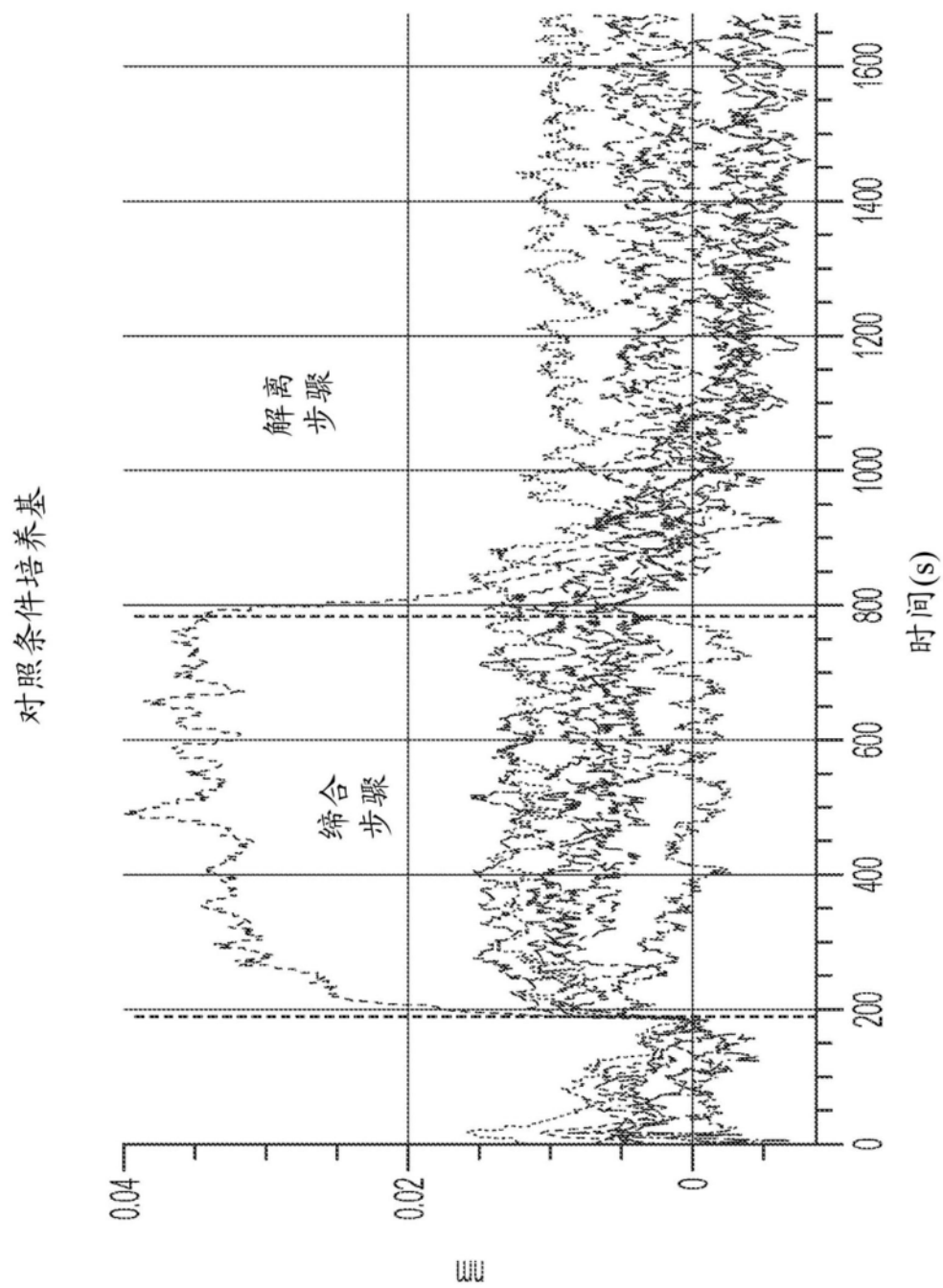


图8D

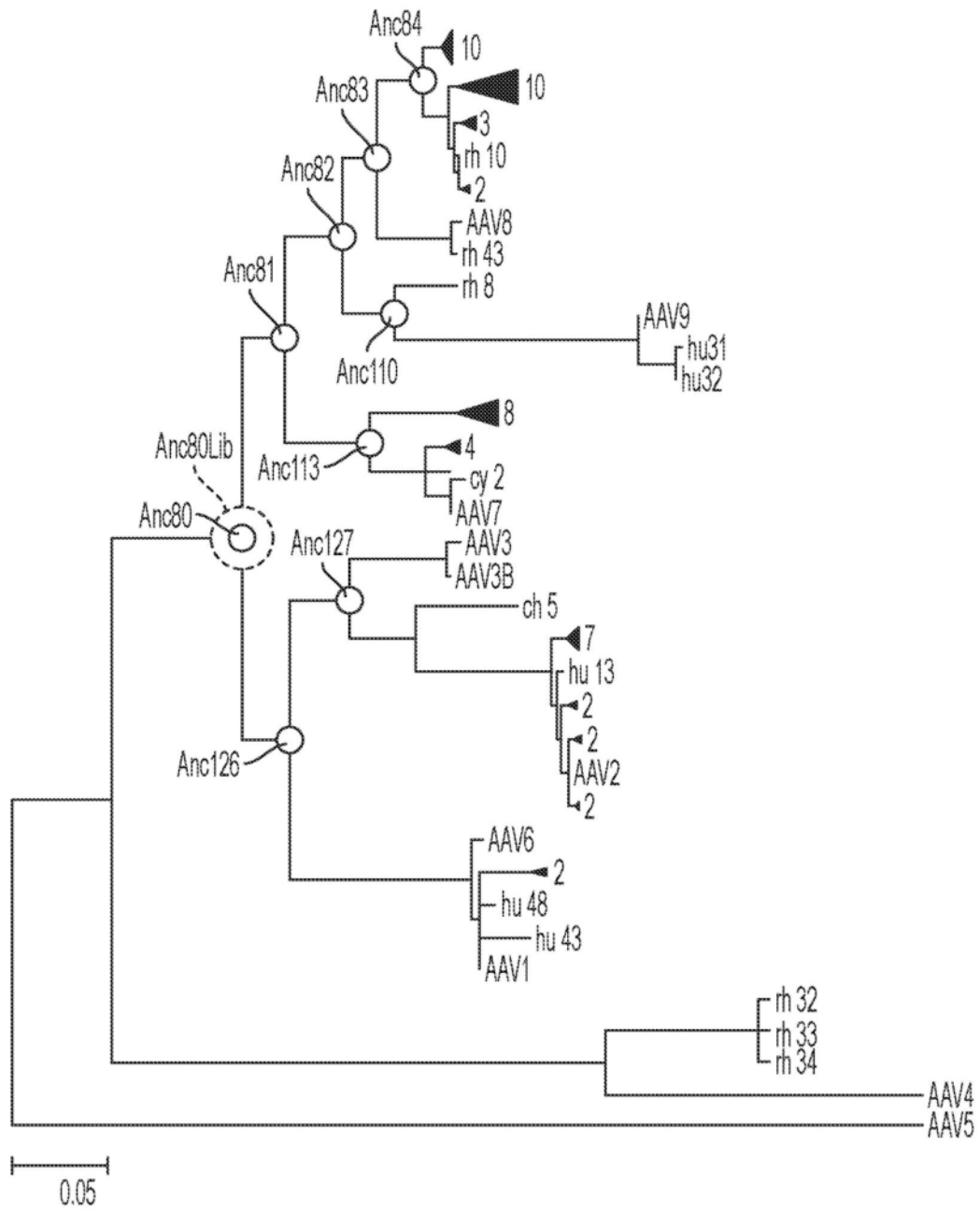


图9

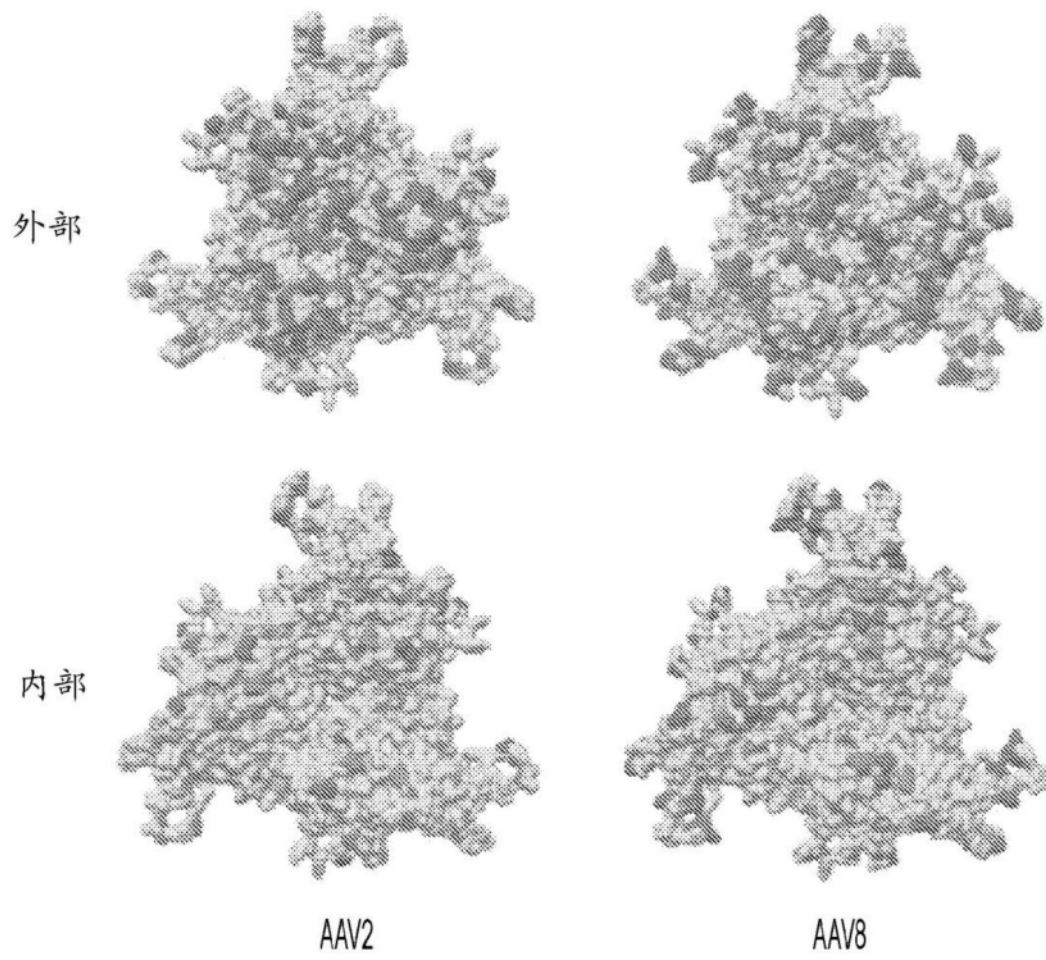


图10

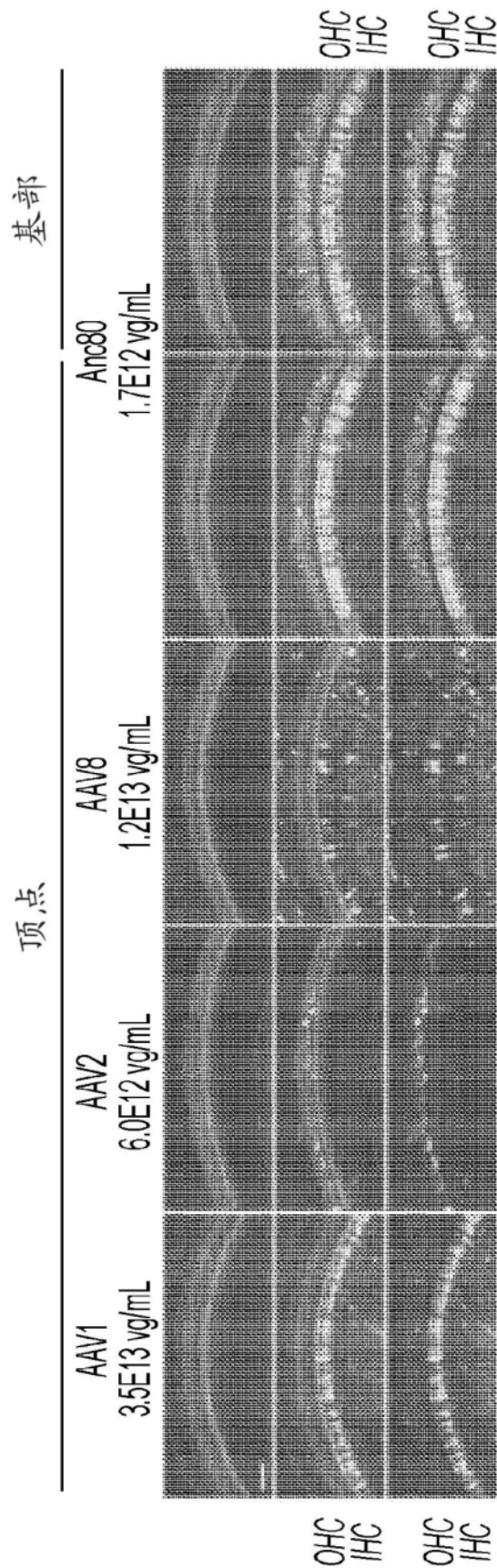


图11

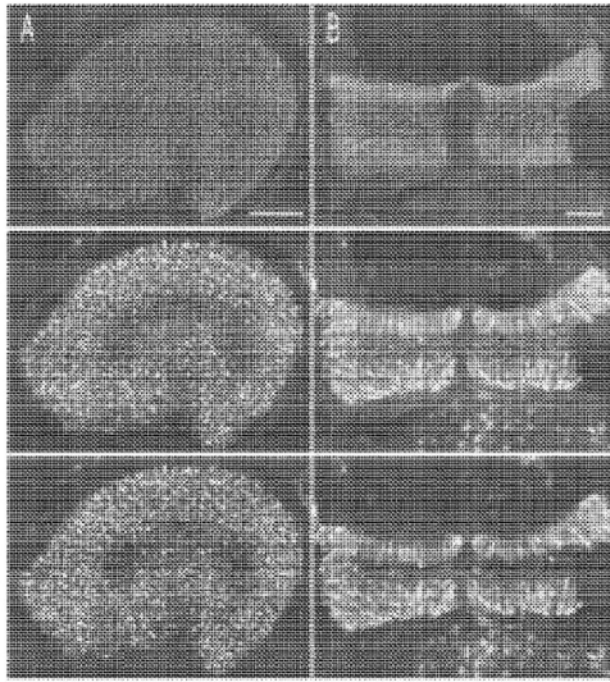


图12

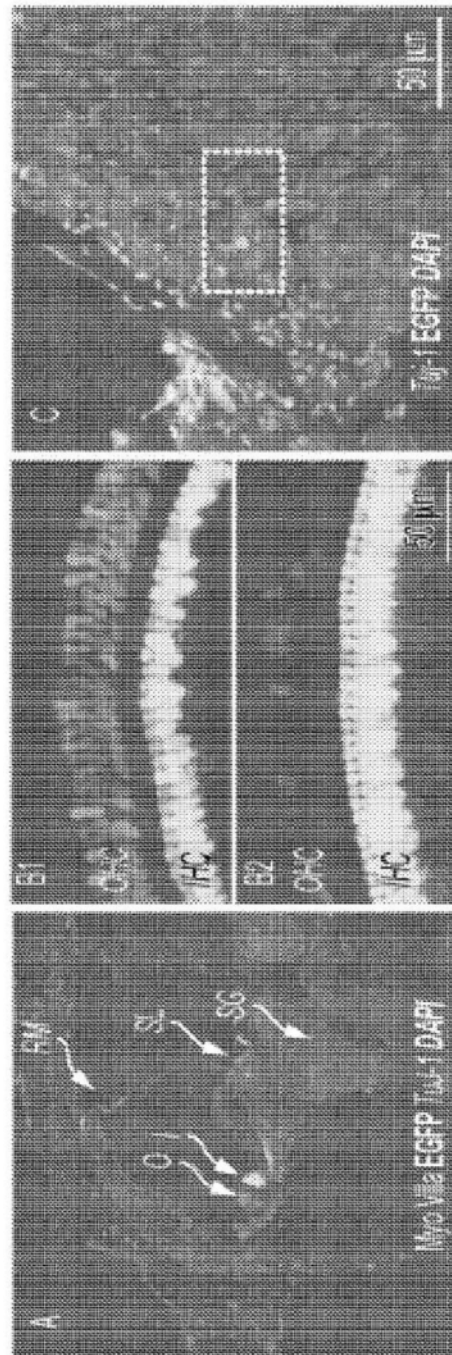


图13

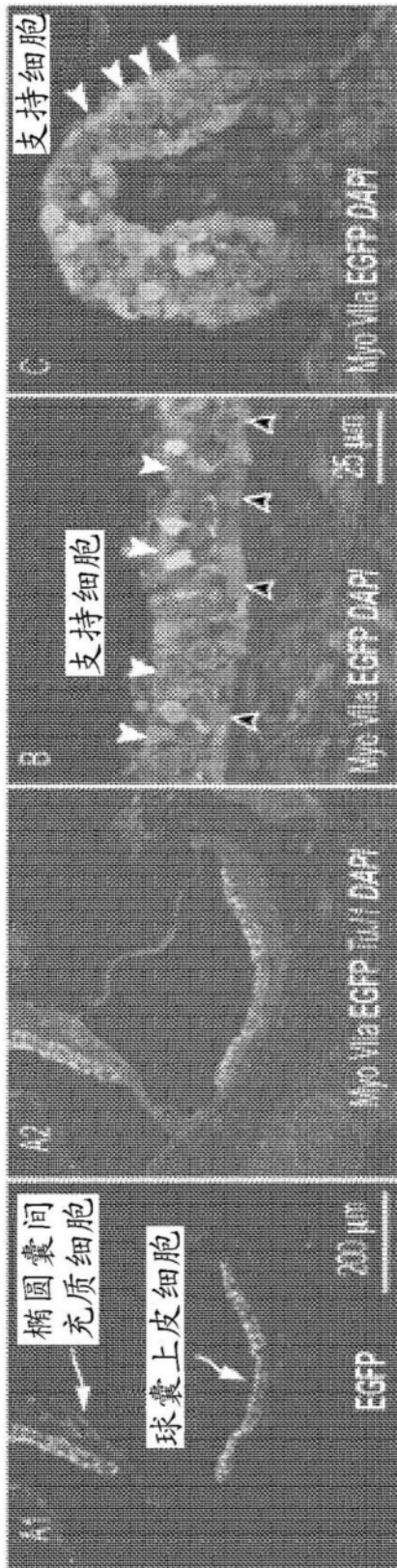


图14

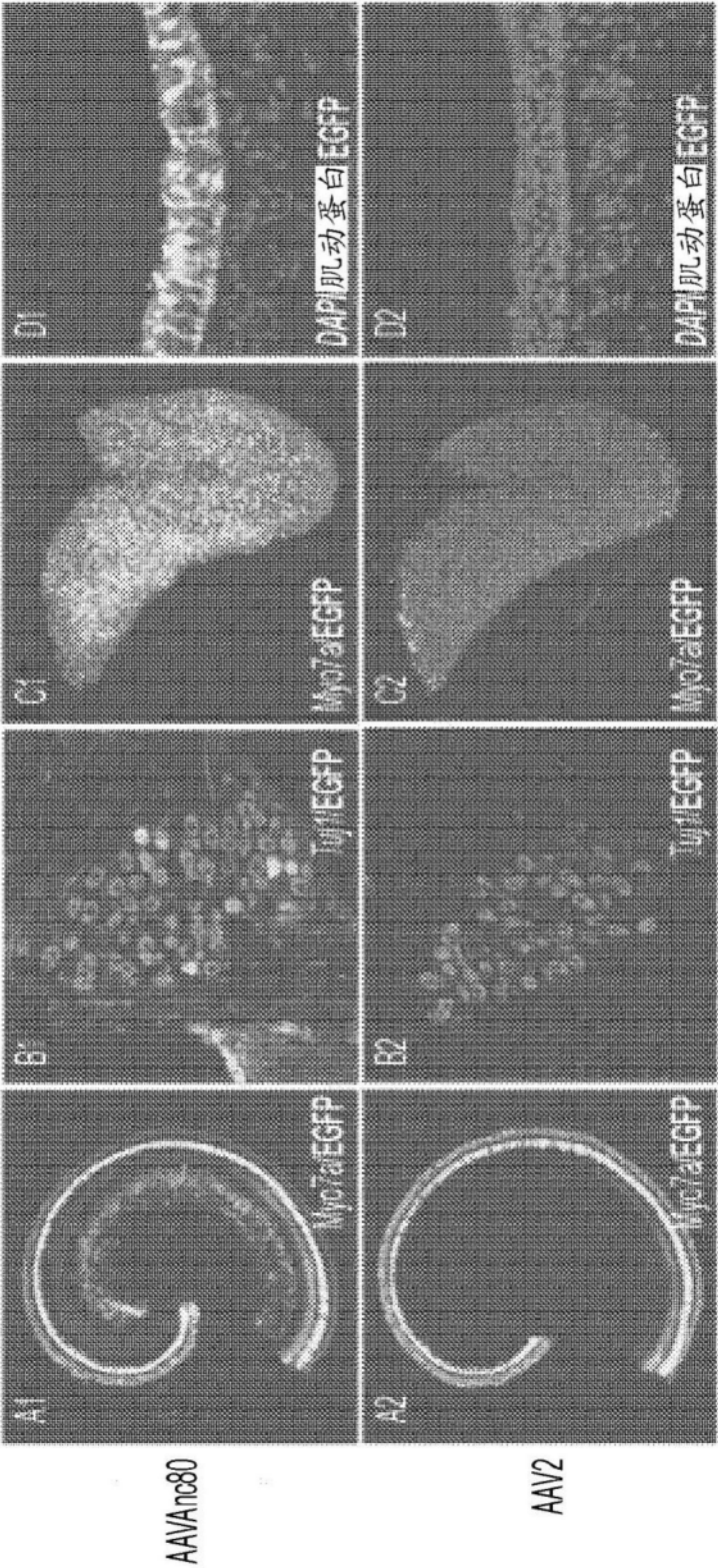


图15

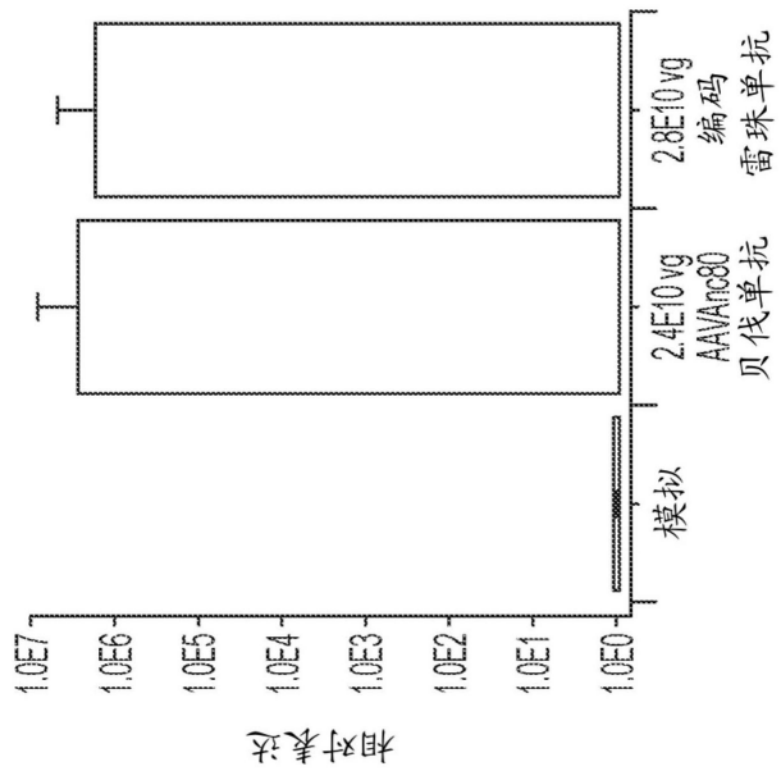


图16A

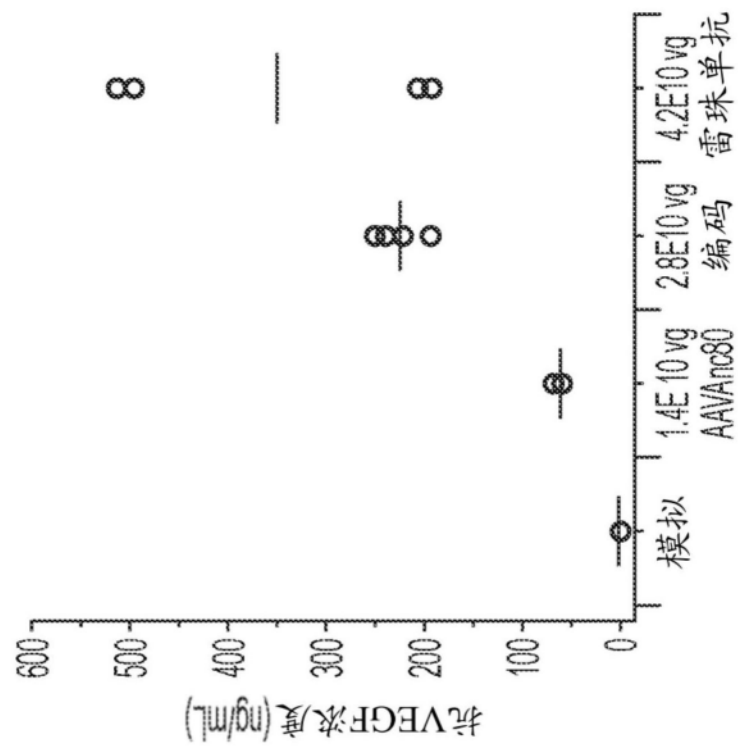


图16B

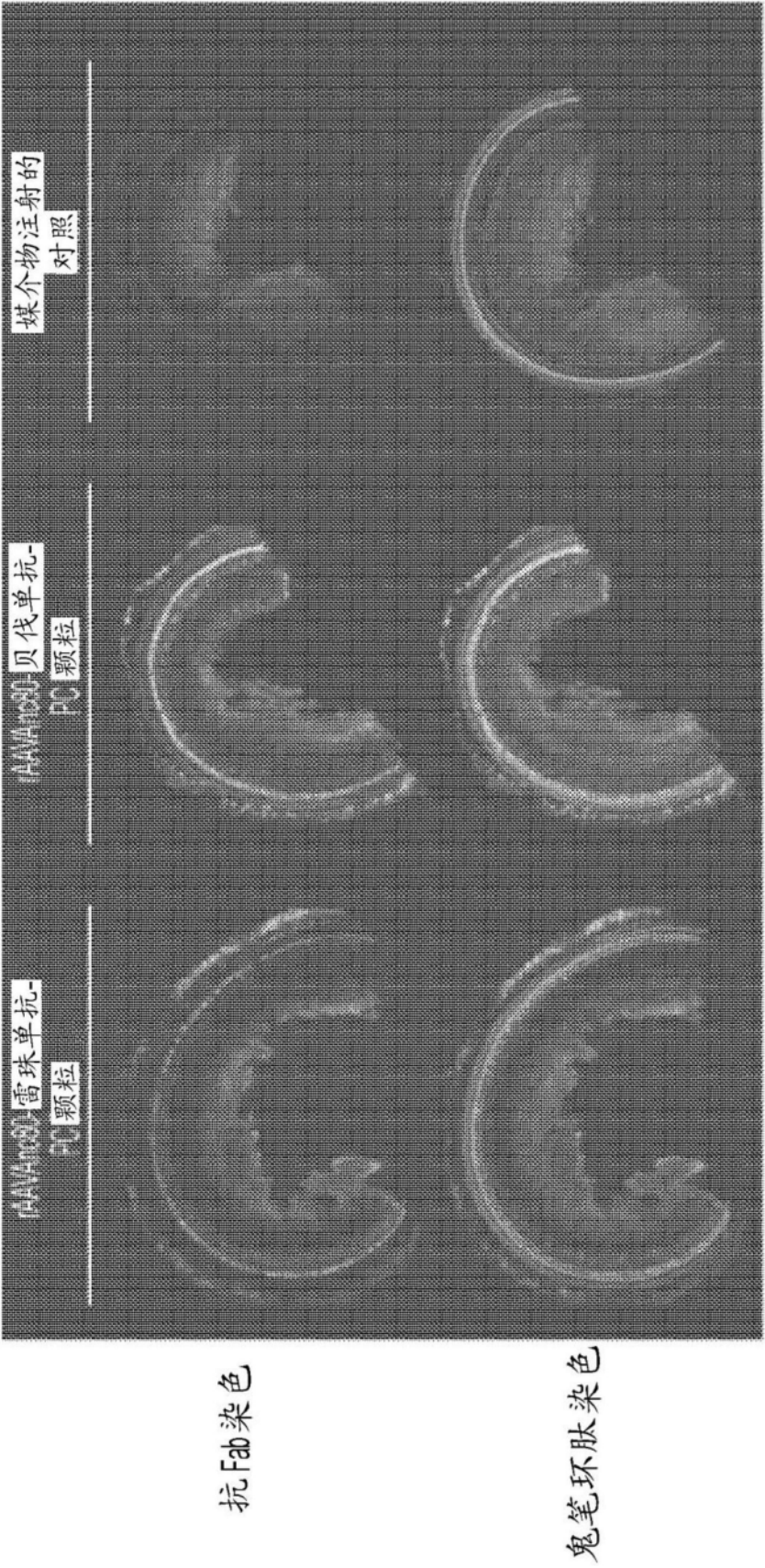


图17

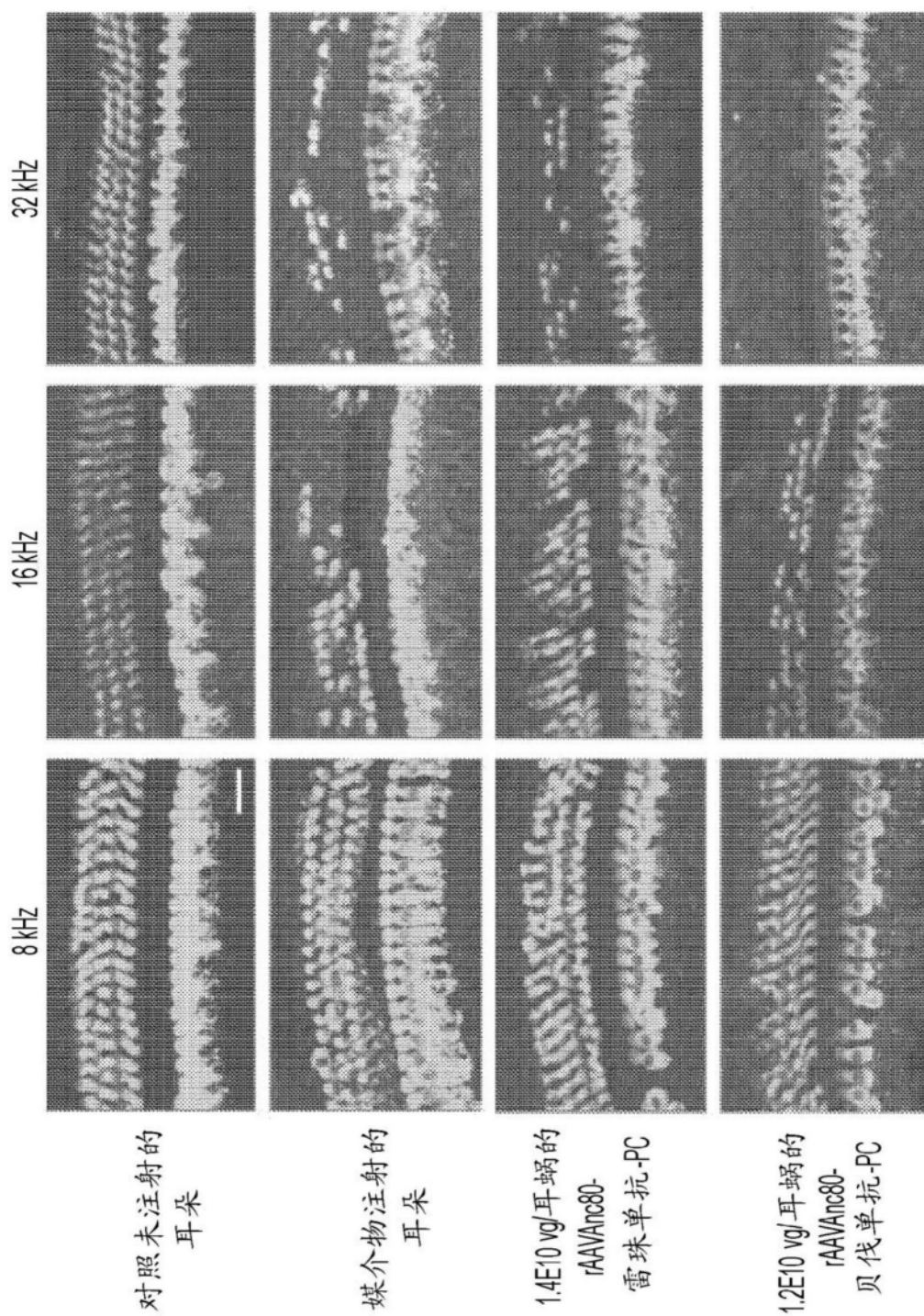


图18

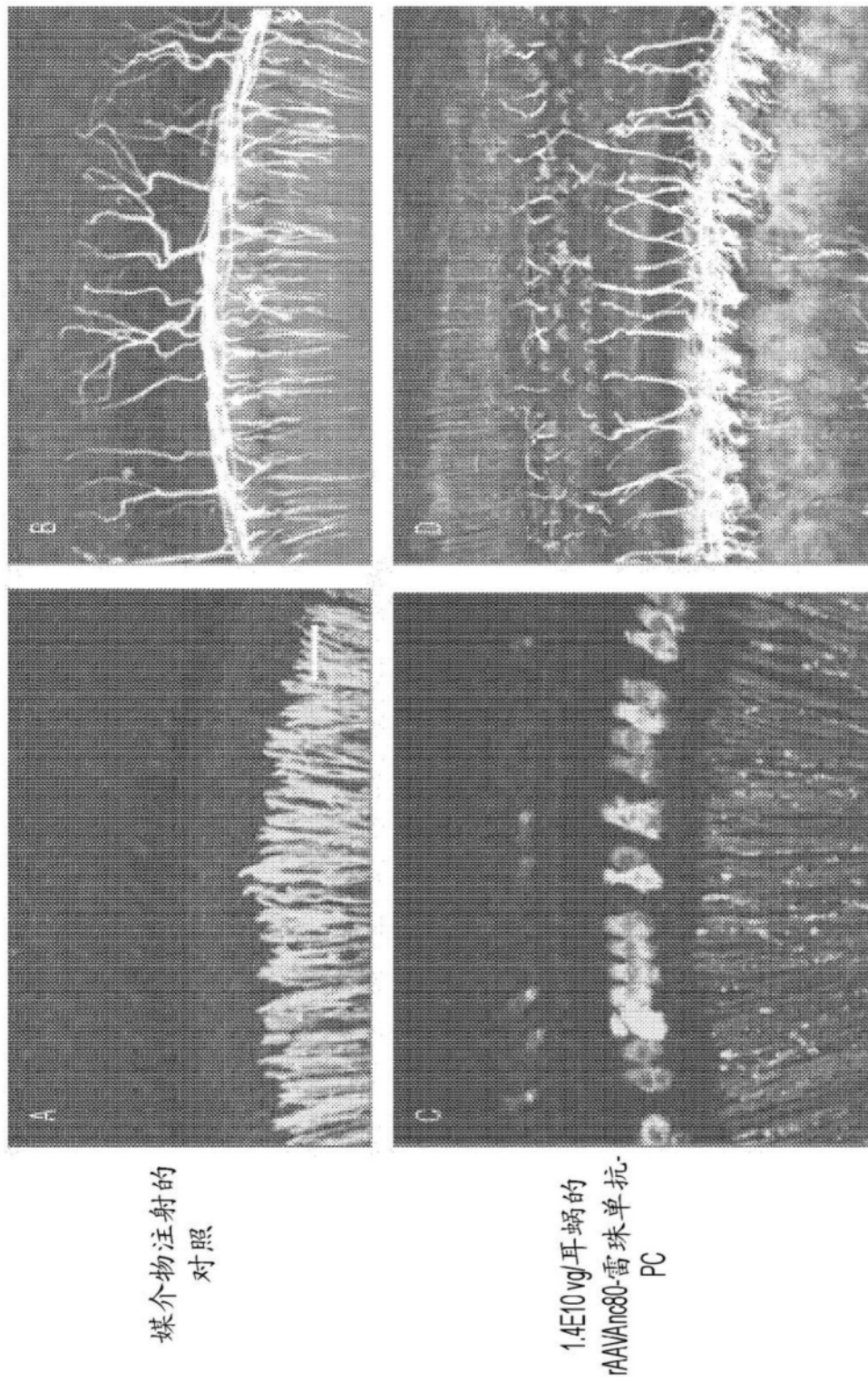


图19

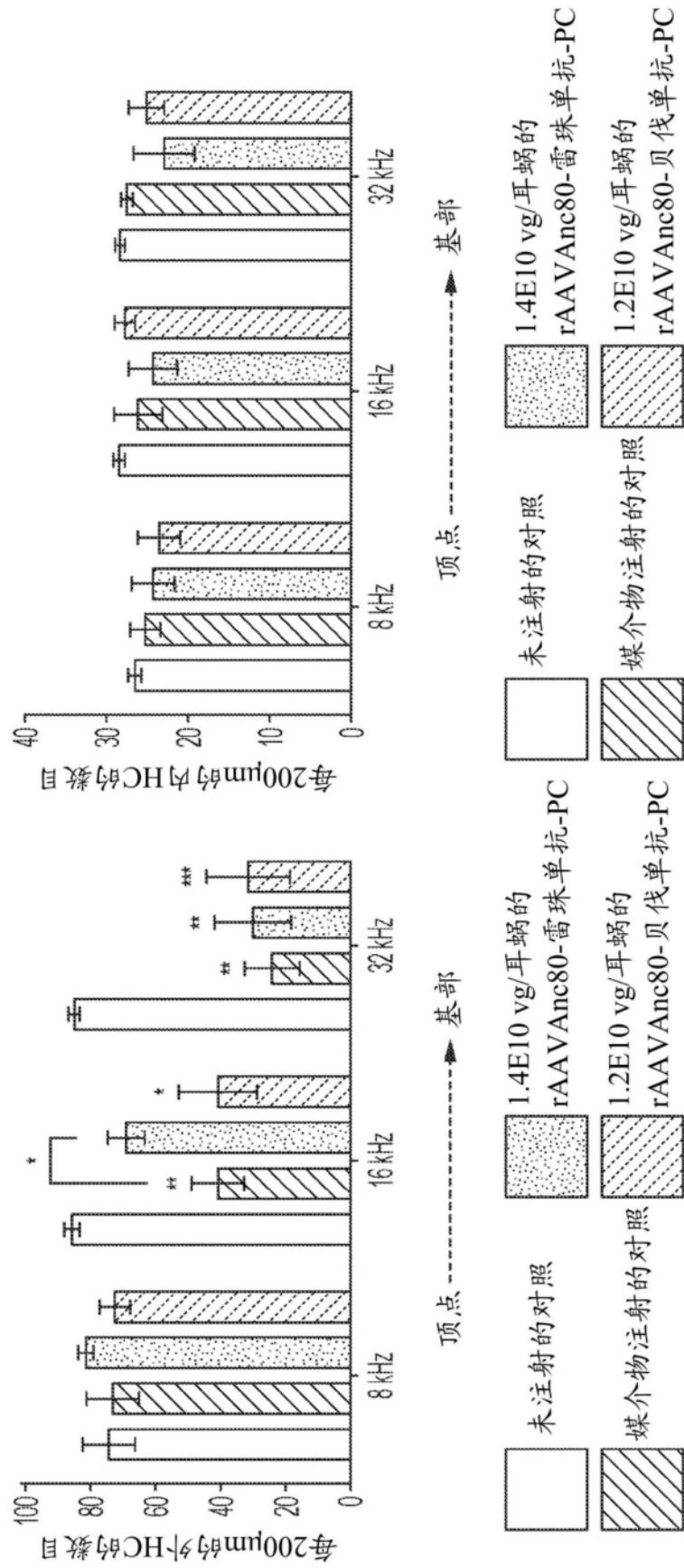


图 20A

图 20B

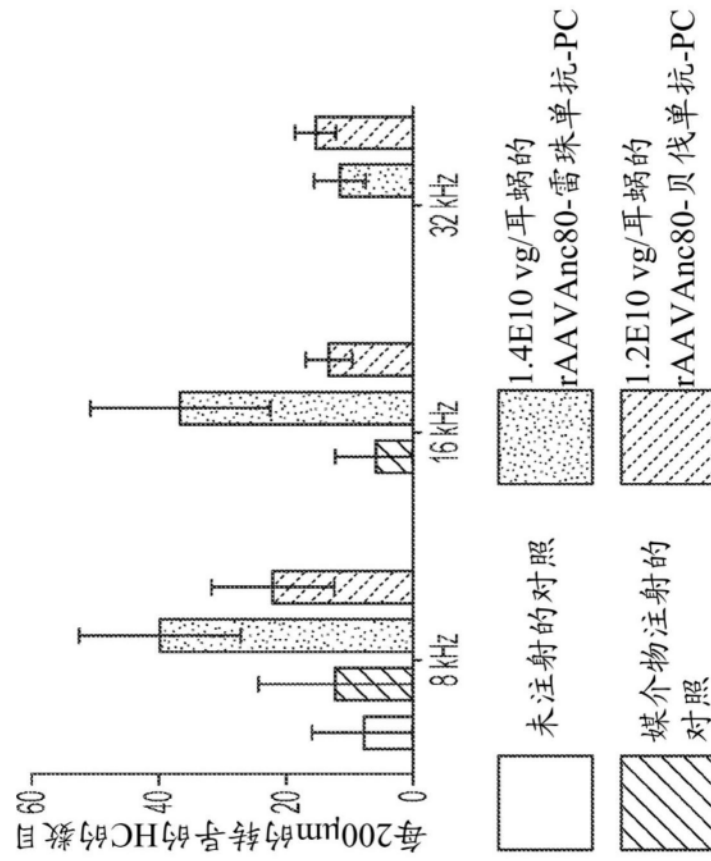


图21A

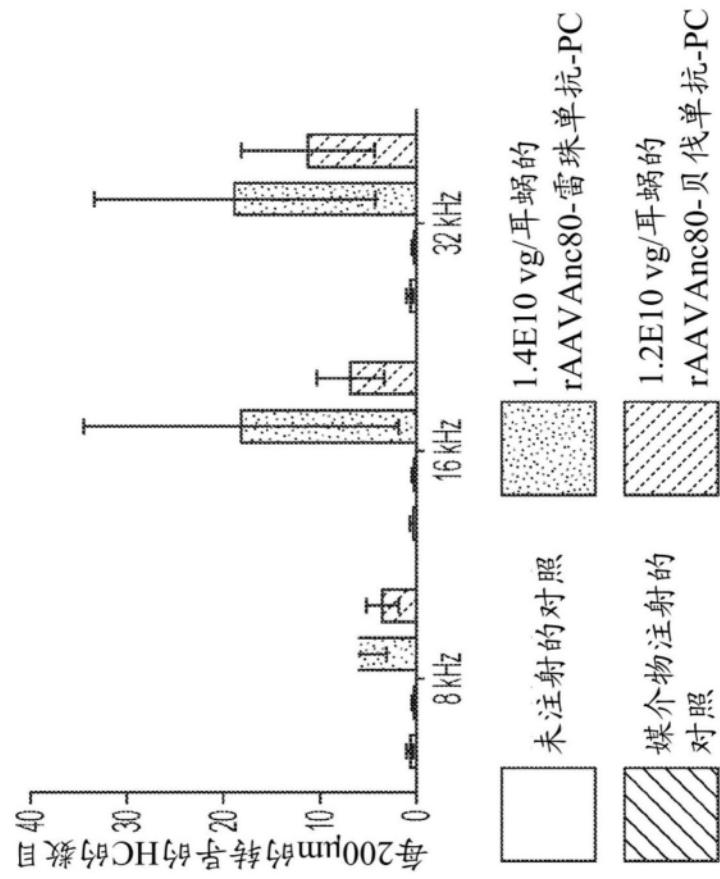


图21B

1.4E10 vg/耳蜗的 rAAVnc80-HCLC

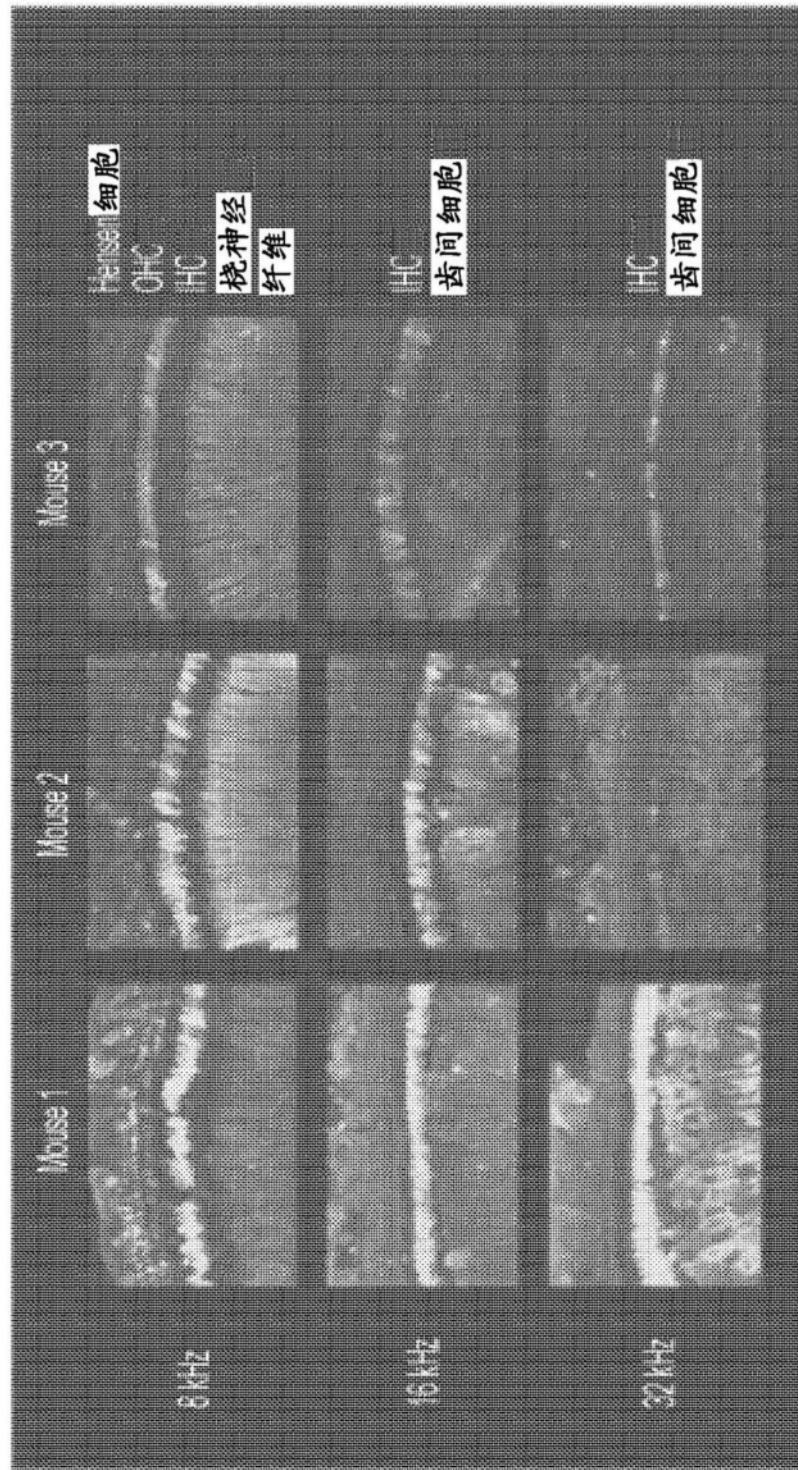


图22

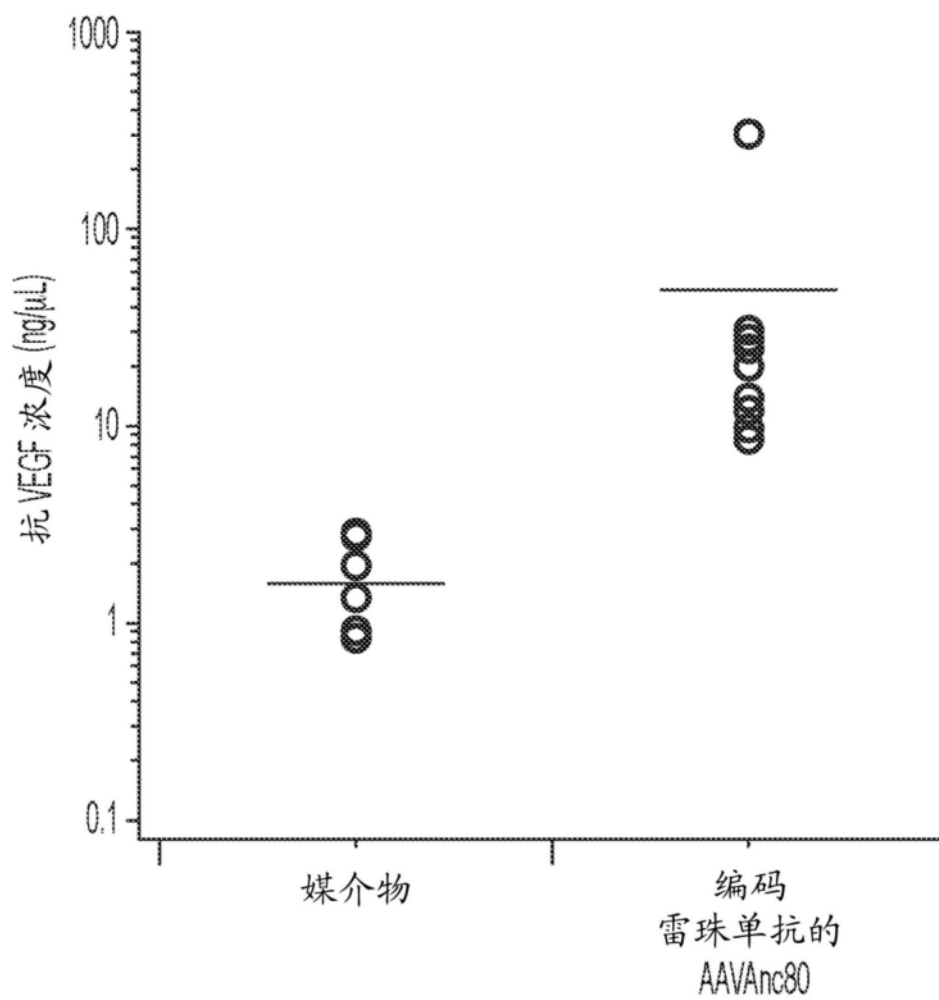


图23

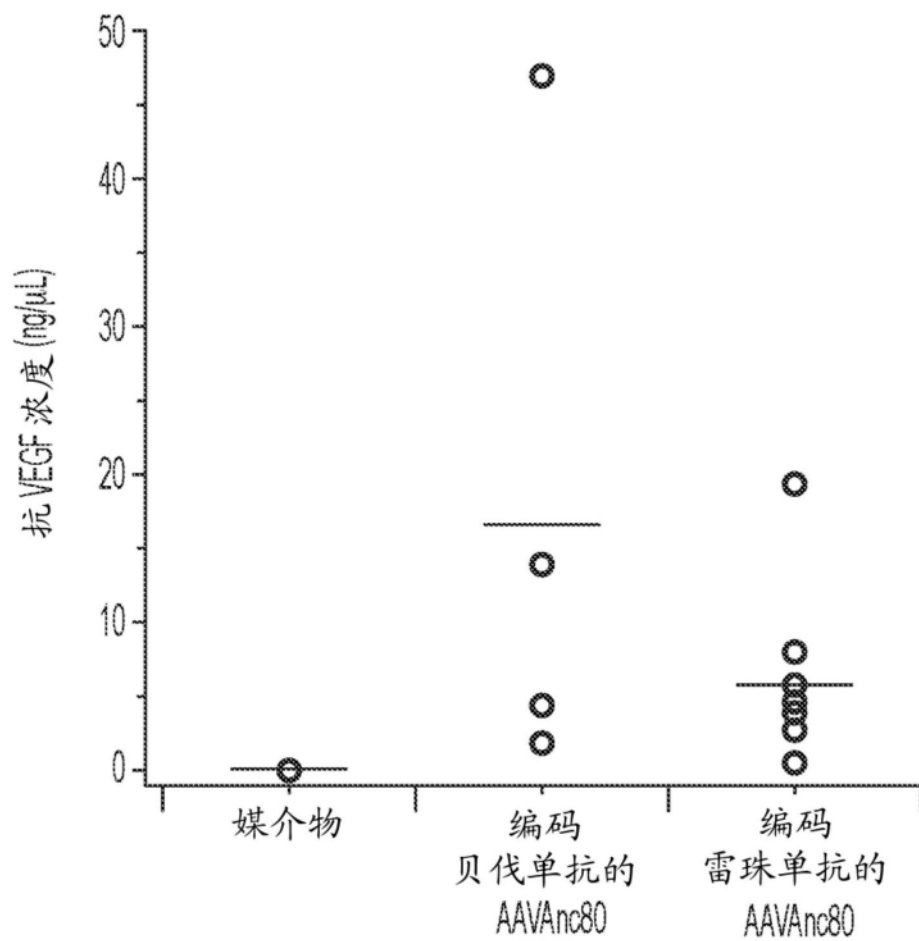


图24

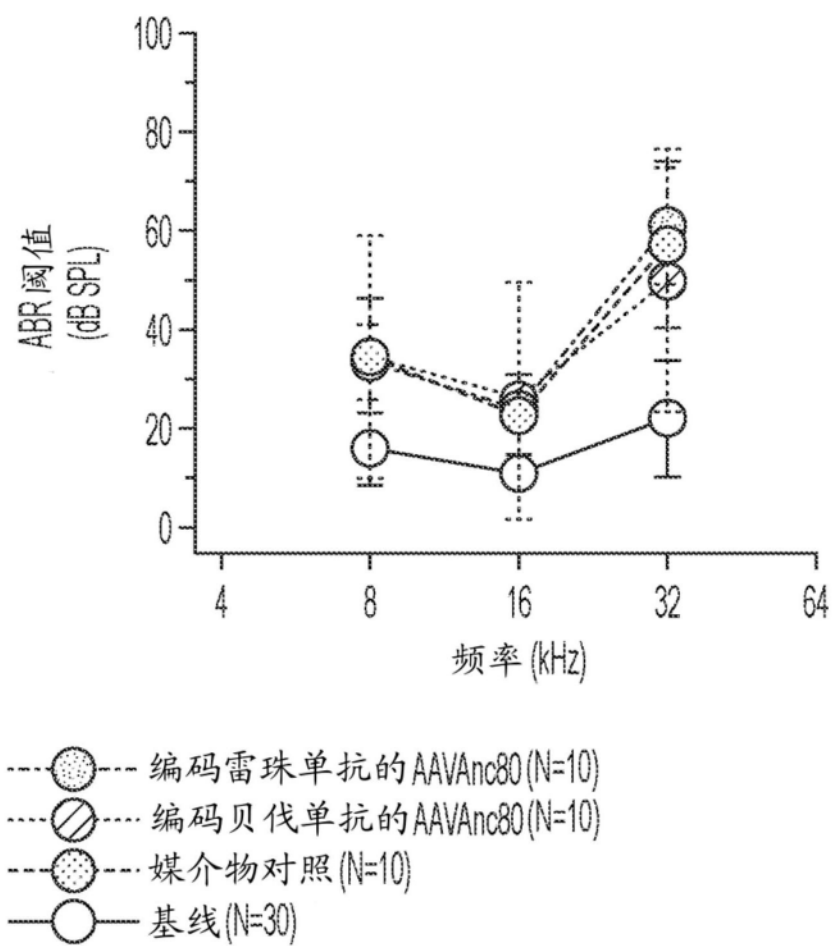


图25

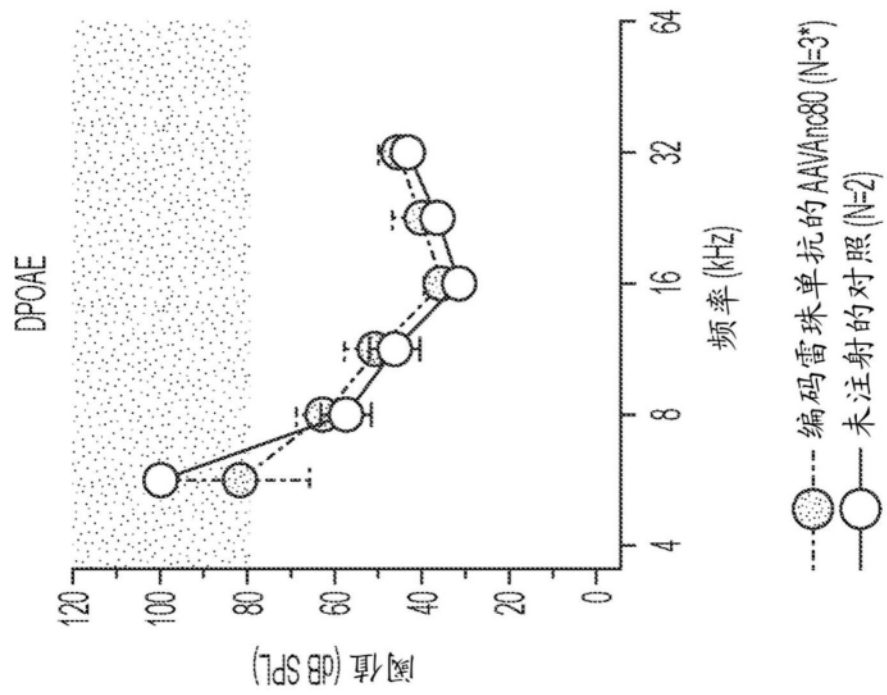


图26A

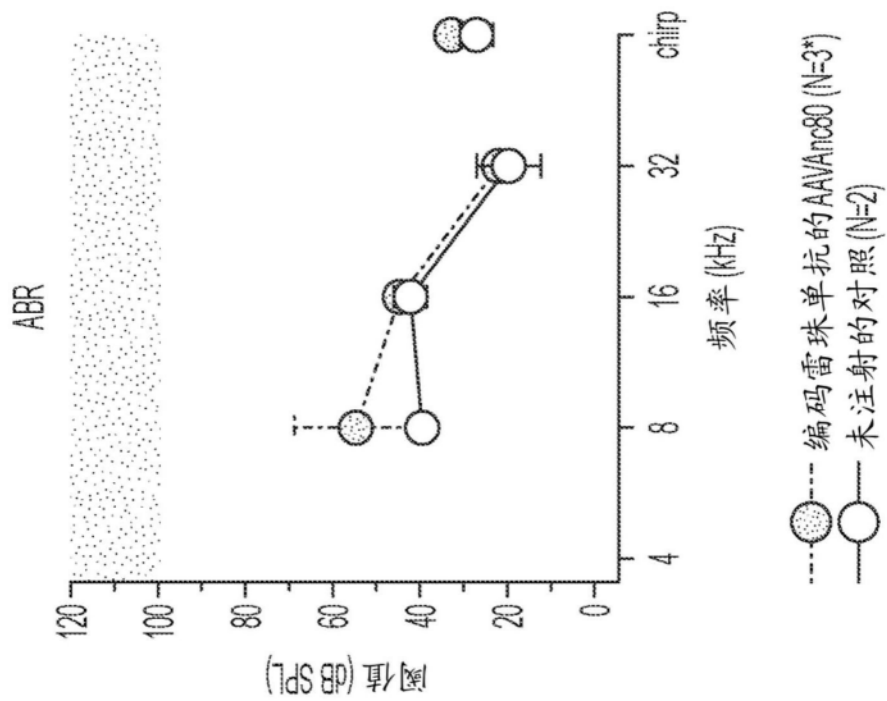


图26B

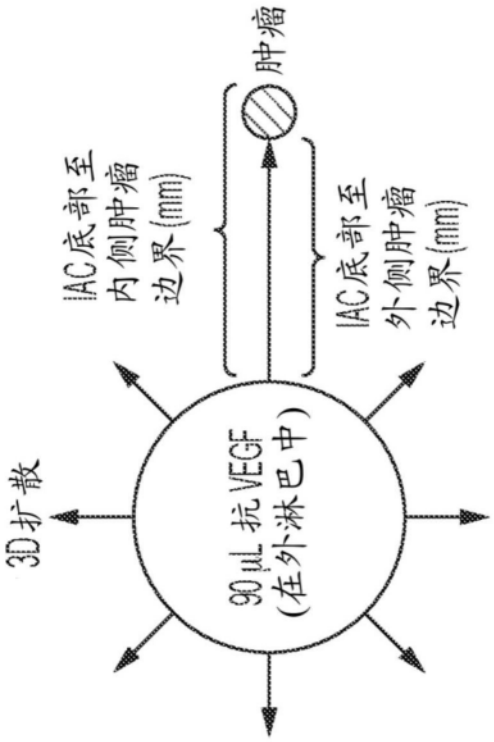


图27A

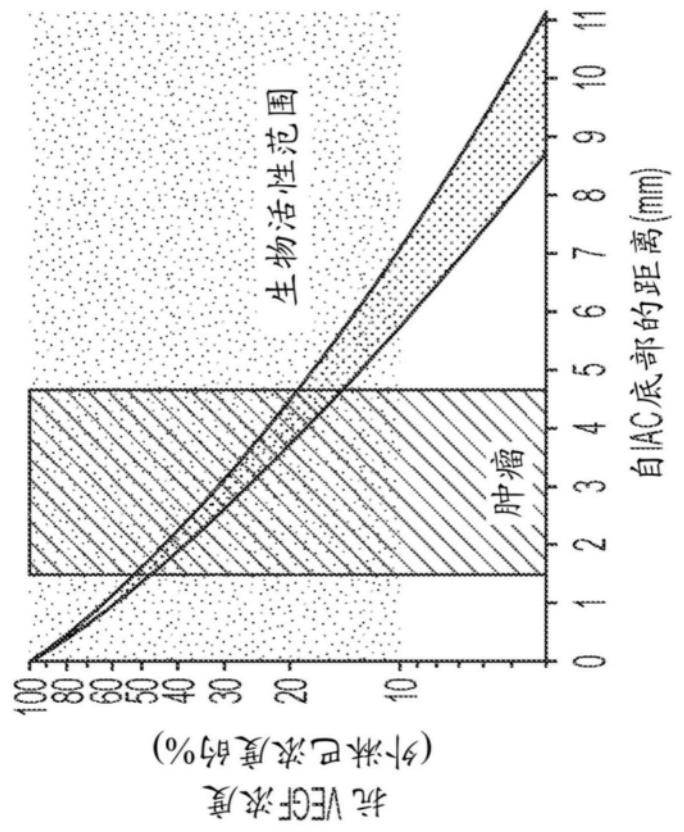


图27B

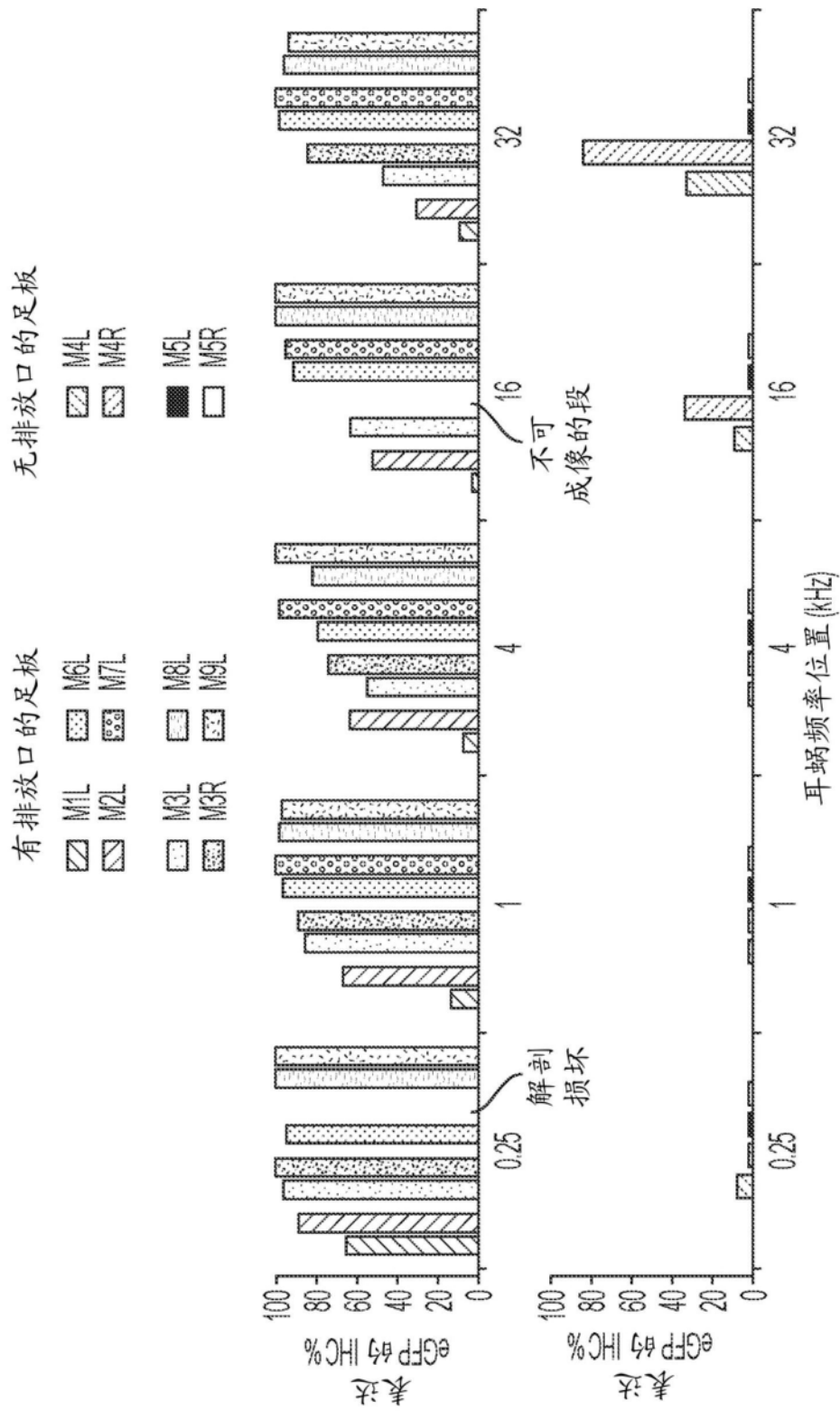


图28

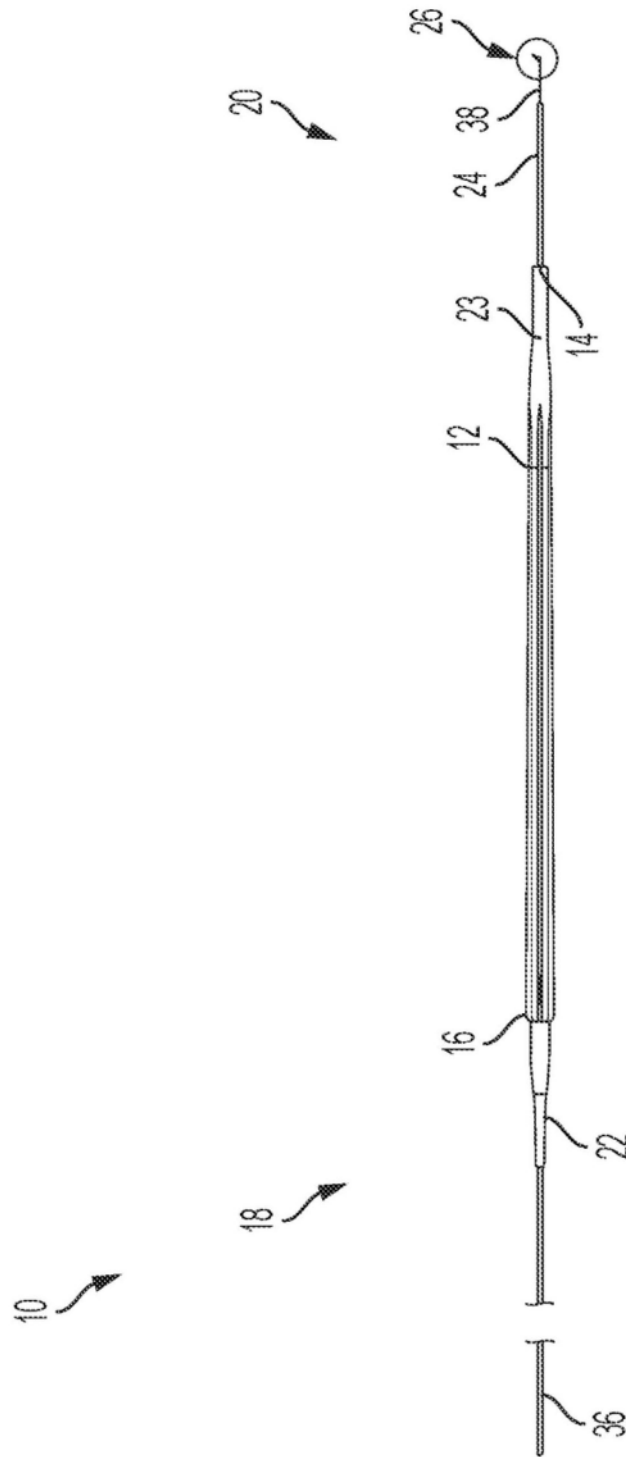


图29

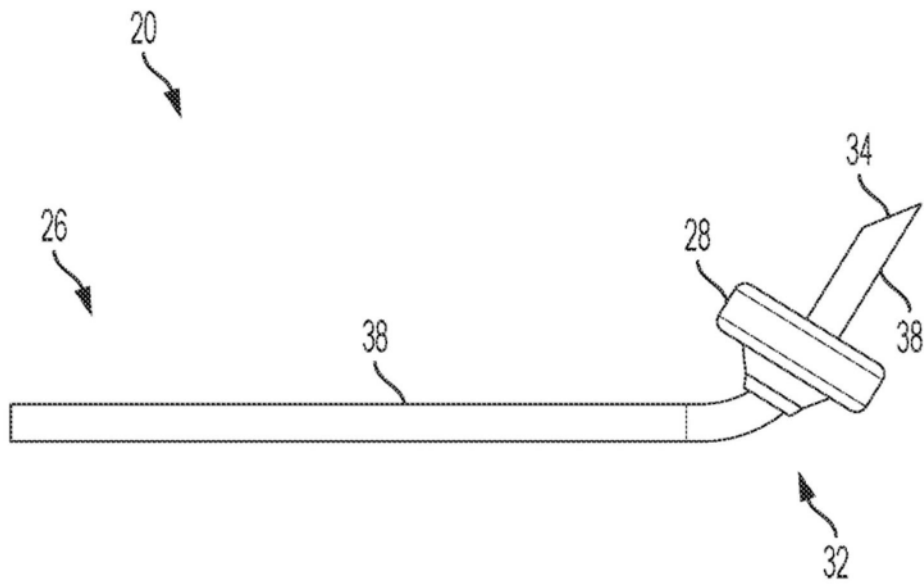


图30

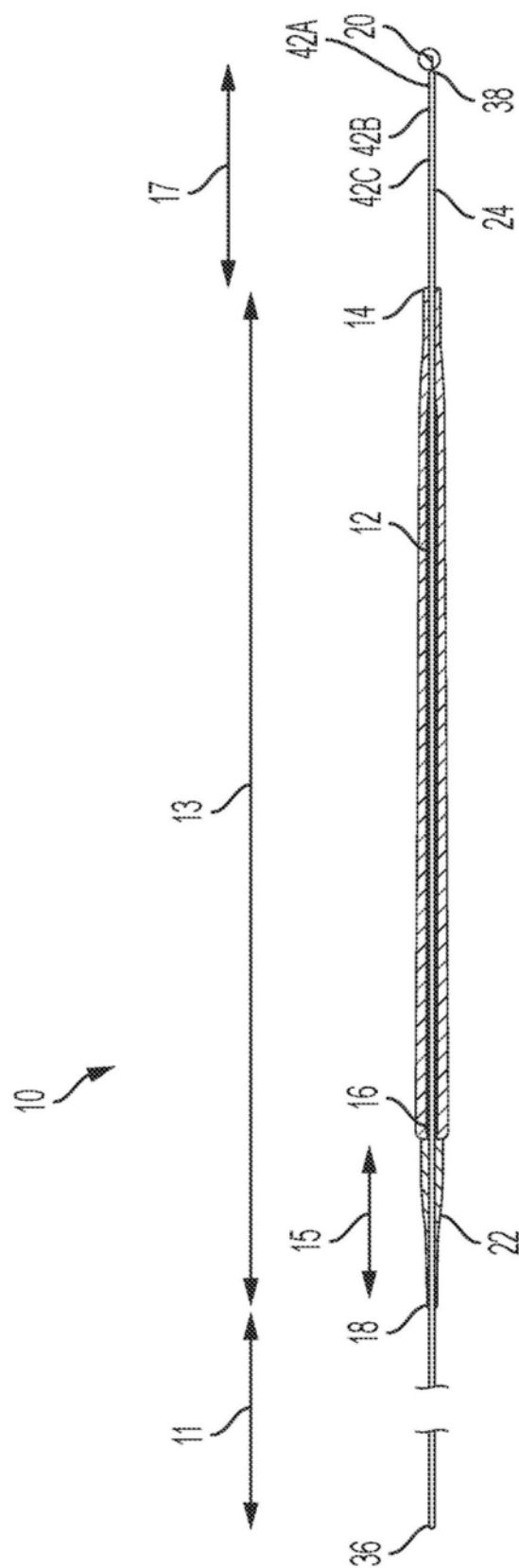


图31

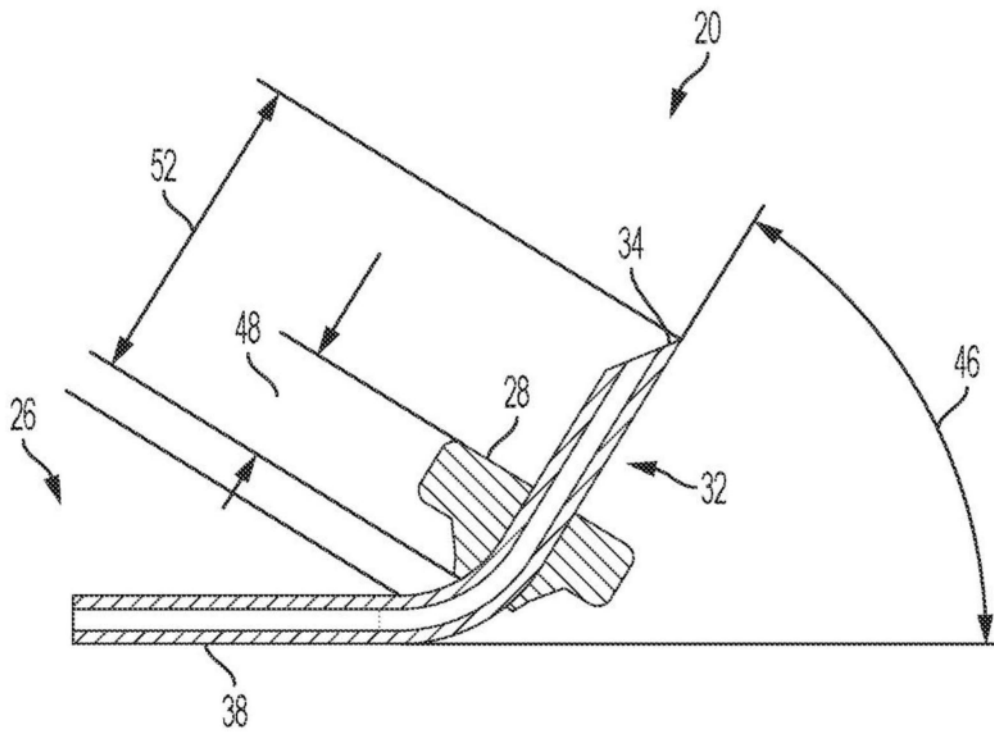


图32

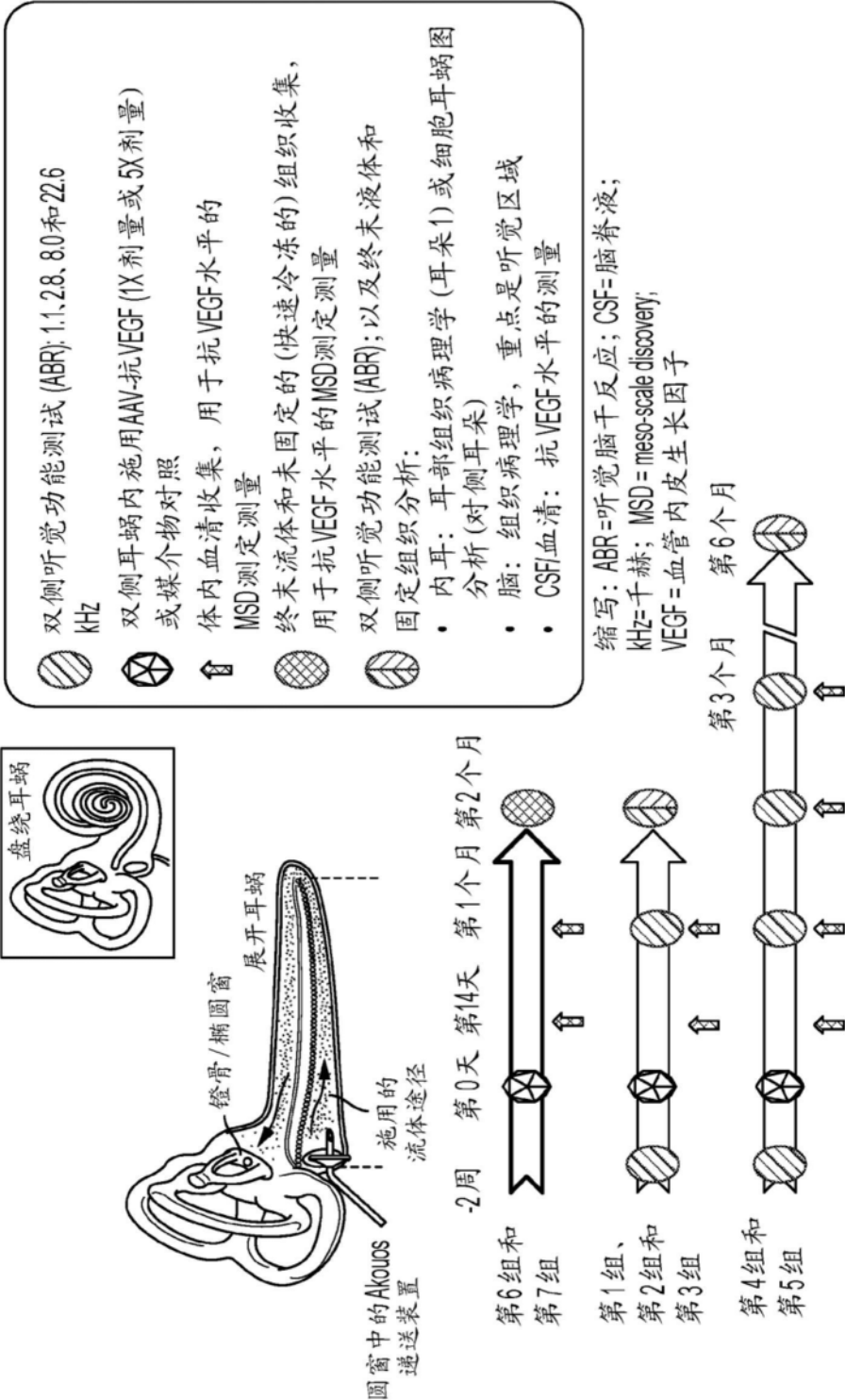


图33

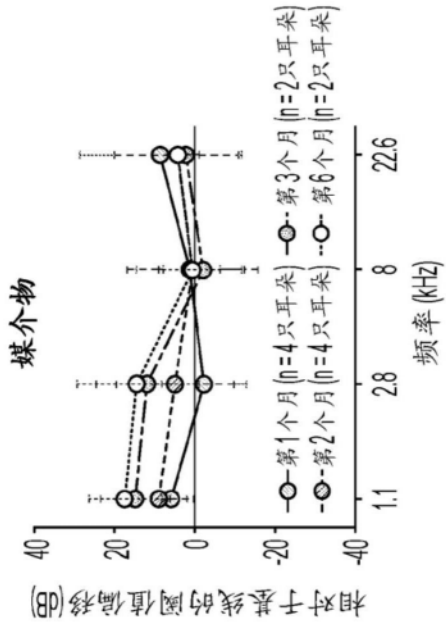


图34A

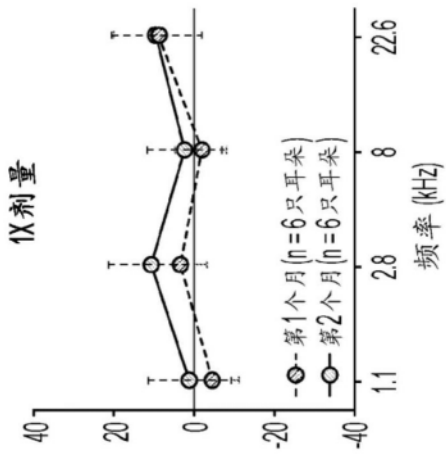


图34B

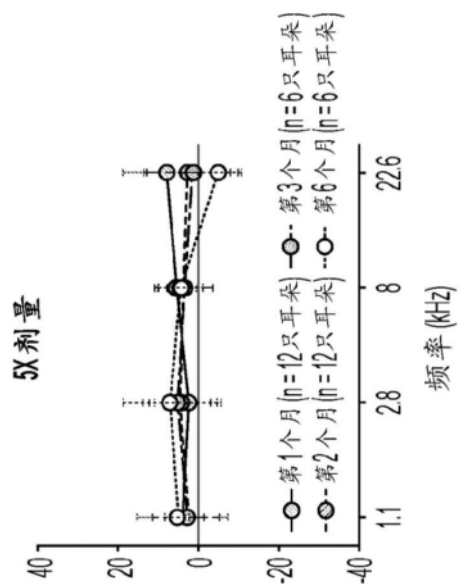
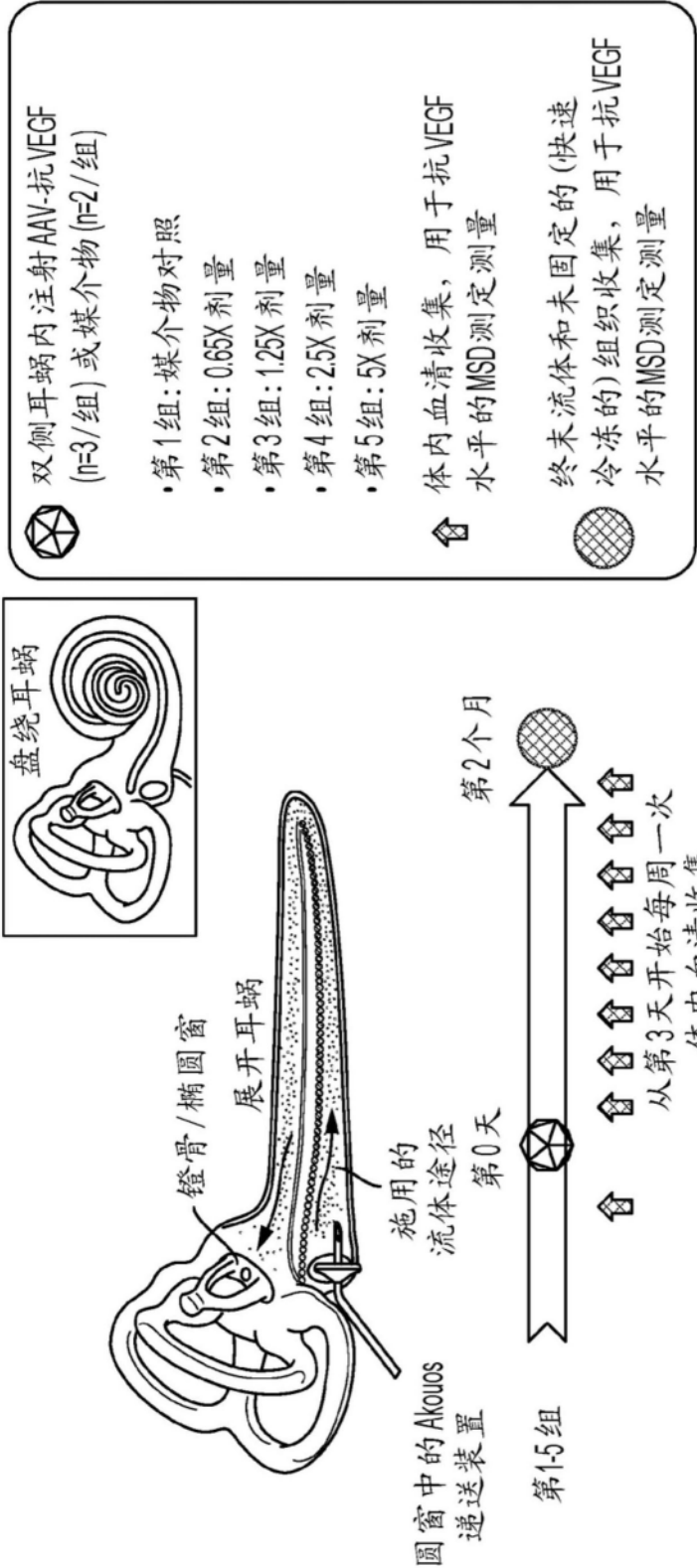


图34C



缩写: CSF=脑脊液; NHP=非人灵长类动物; MSD = meso-scale discovery; VEGF = 血管内皮生长因子

图35

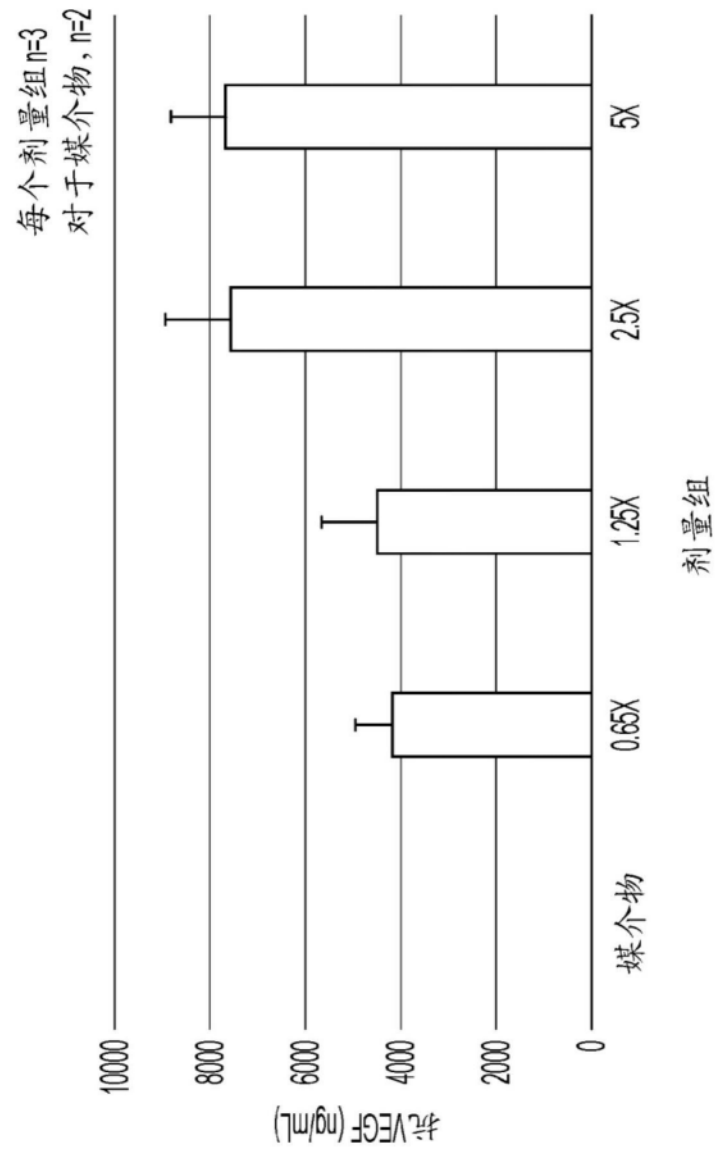


图36

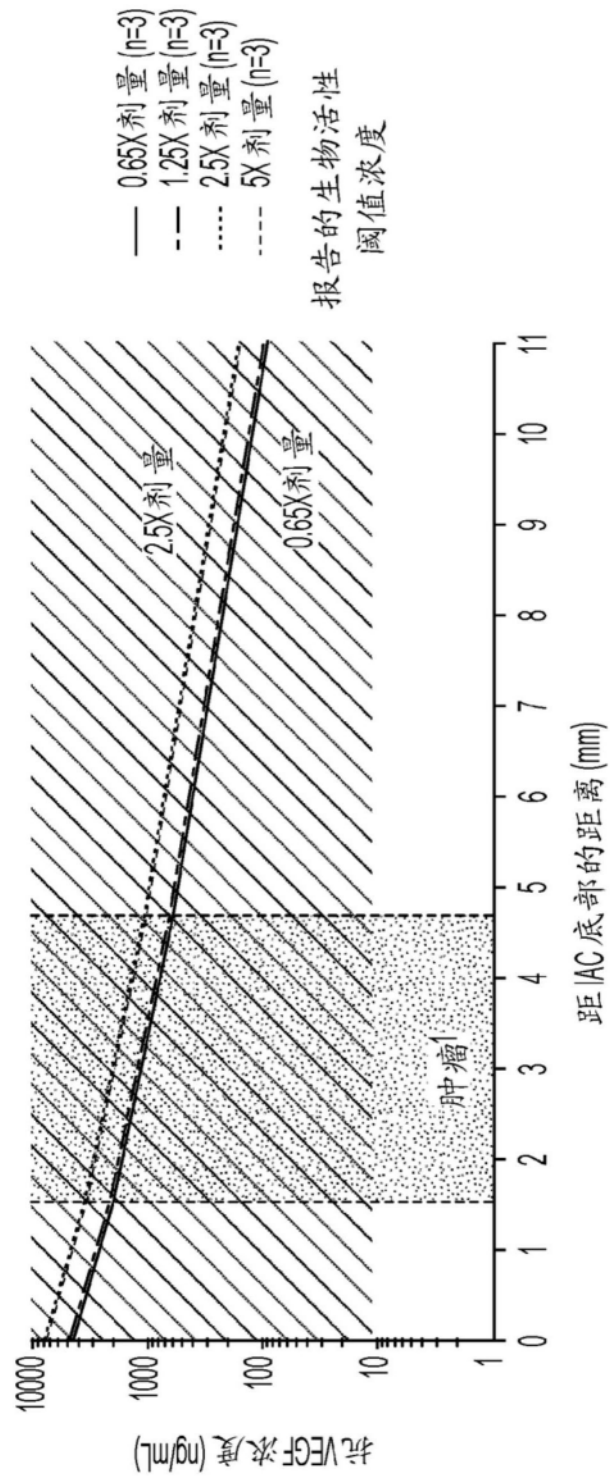


图37

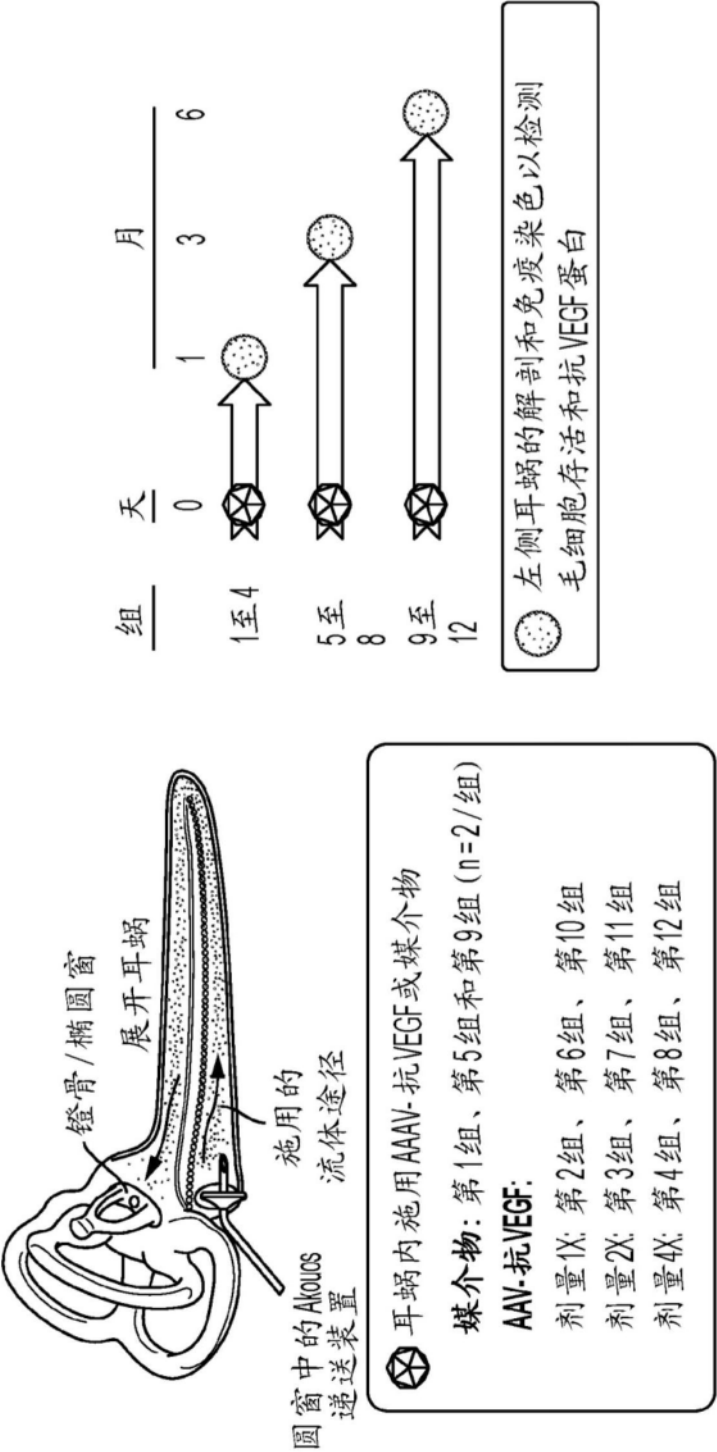


图38

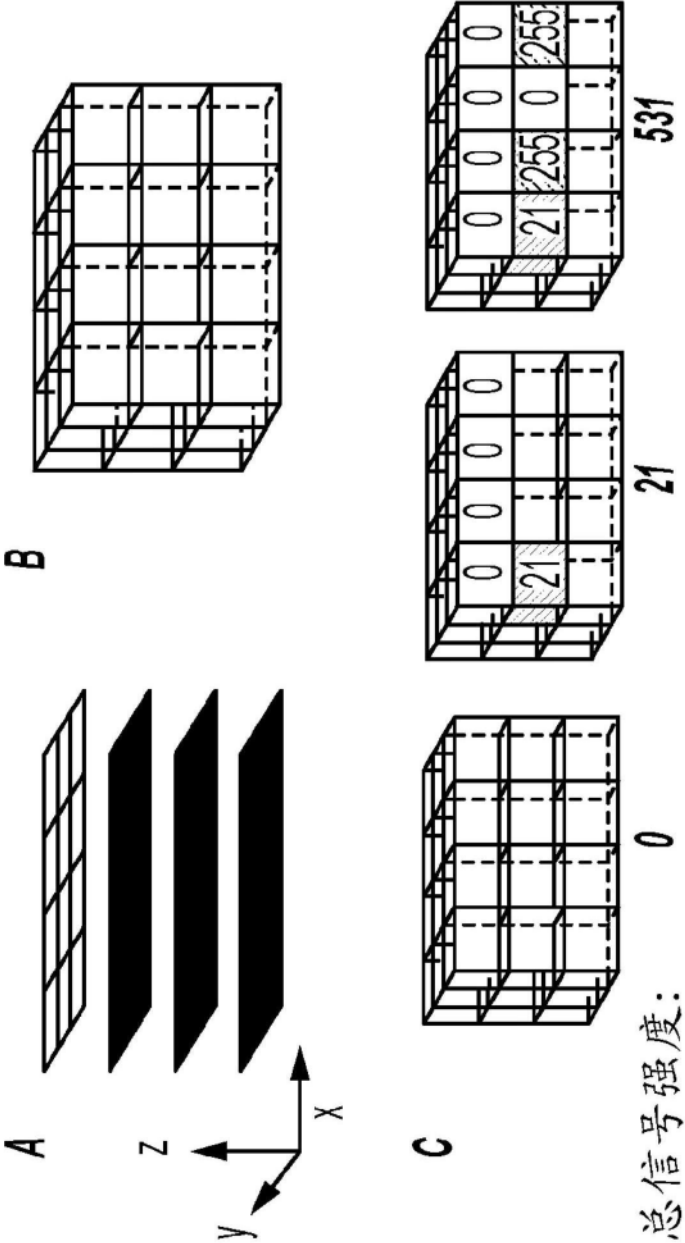


图39A-39C

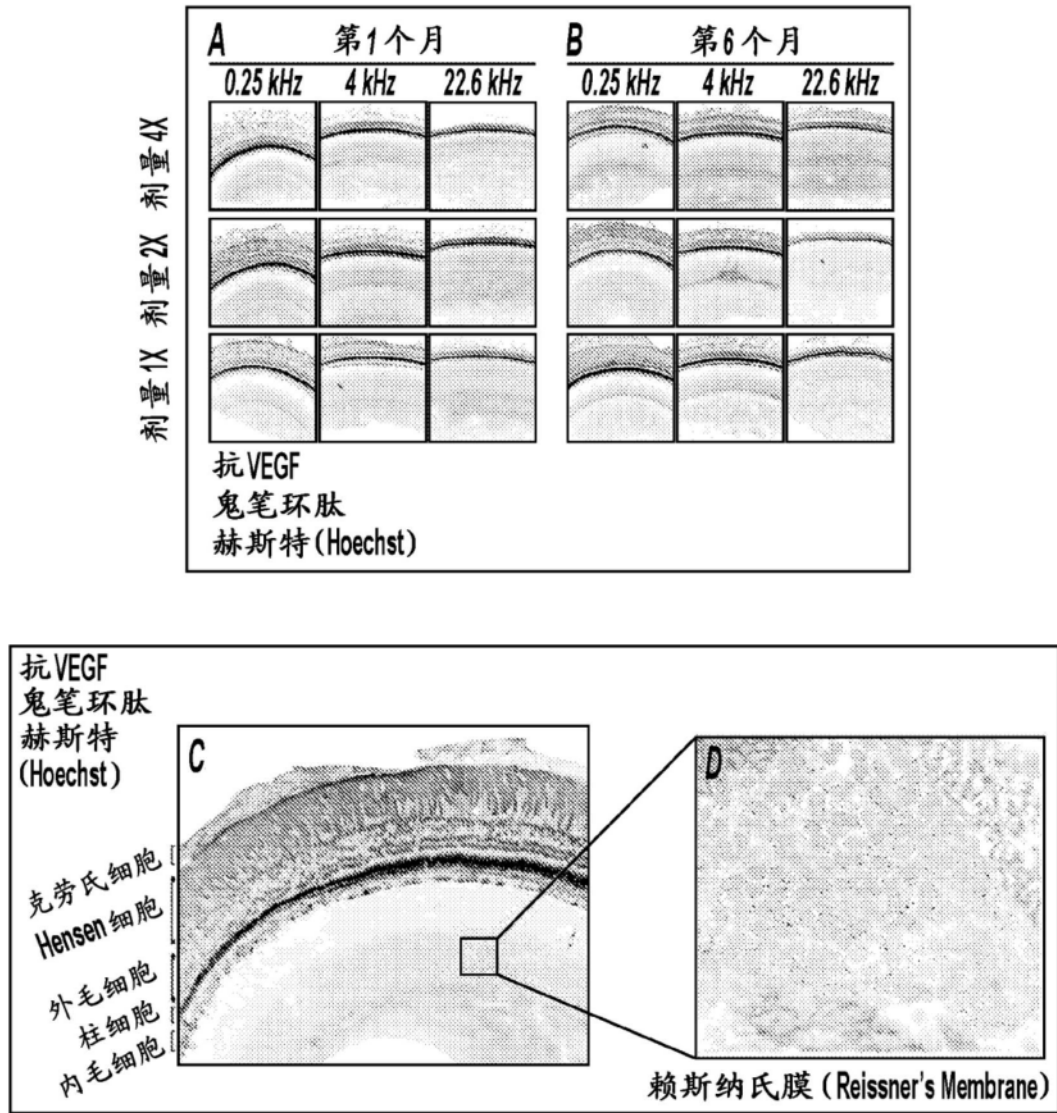


图40A-40D

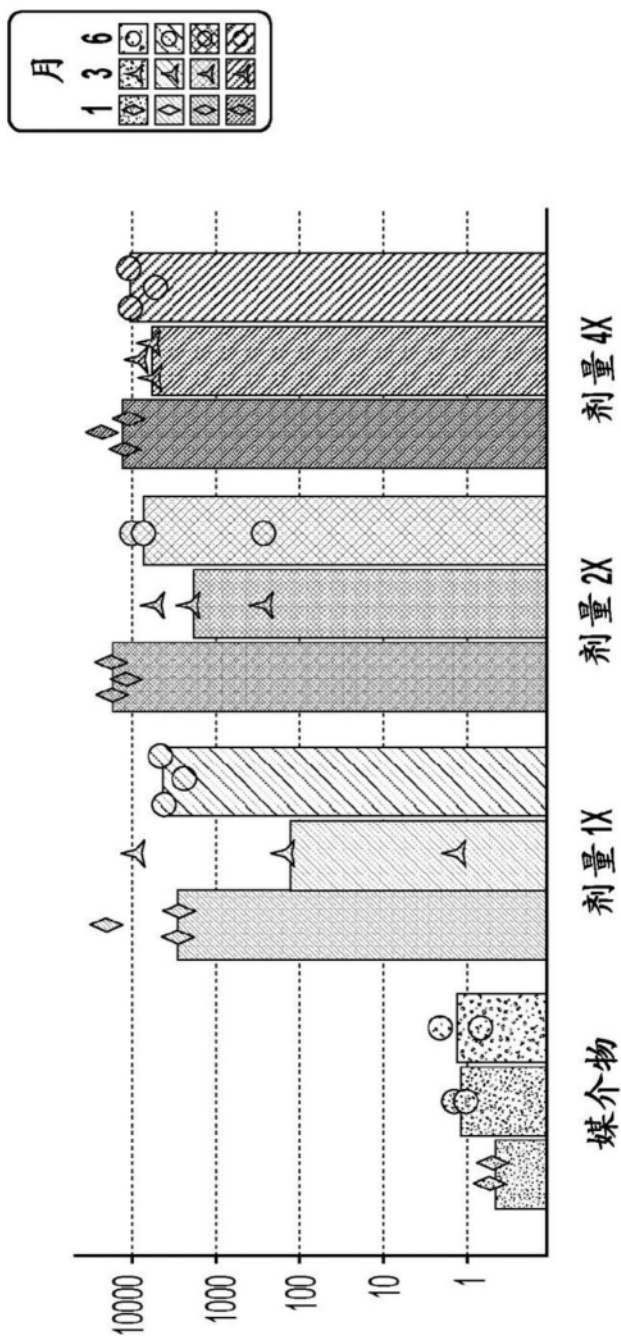


图41

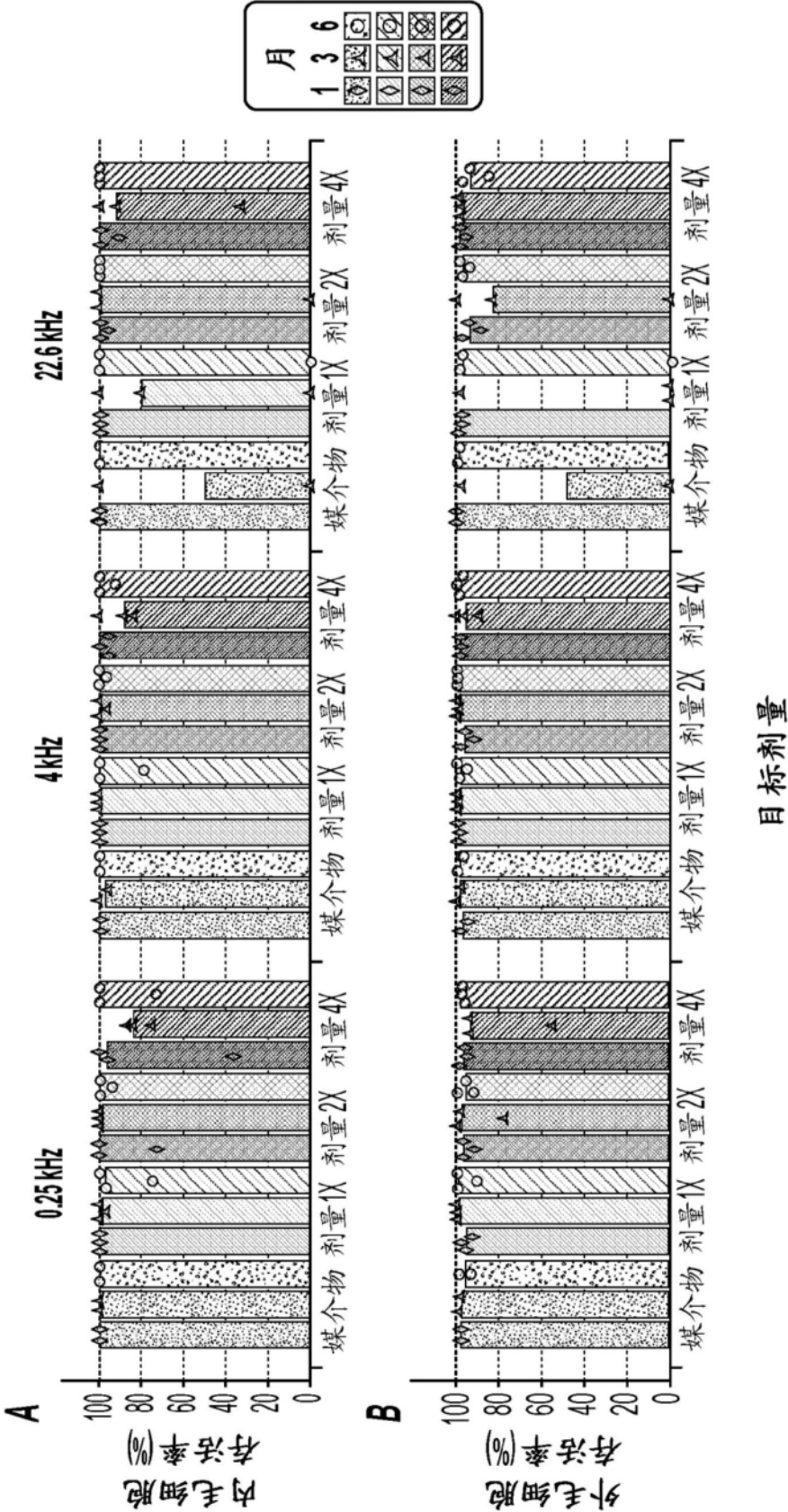


图42A-42B