一种人核因子 E2 相关因子 2 的表达载体及其应用

技术领域

本发明涉及生物制剂领域，尤其涉及一种人核因子 E2 相关因子 2 的表达载体及其应用。

背景技术

视神经发源于视网膜的神经节细胞层，是中枢神经系统的一部分，视网膜所得到的视觉信息，经由视神经传递到大脑。视神经损伤相关的疾病有很多，包括青光眼、缺血性视神经病变、Leber's 遗传视神经病变（LHON）、常染色体显性视神经萎缩（Autosomal dominant optic atrophy, DOA）等。节细胞及其轴突的损伤是不可逆的，是导致病人视力下降甚至失明的主要原因。目前市场上针对视神经损伤并没有有效的药物。针对视神经保护的药物研究主要针对神经营养因子类药物，如 BDNF、CNTF 等等，其作用机理是促进神经元的生长以及修复受损的视神经，但是治疗效果并不理想。

因此，本领域亟需开发一种治疗效果好的治疗视神经损伤等视神经相关疾病的方法。

发明内容

本发明的第一个目的是提供一种治疗效果好的治疗视神经损伤等视神经相关疾病的方法。

本发明的第二个目的是，针对现有技术的不足，提供一种能够长效治疗眼科疾病的编码人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的核苷酸序列；

本发明的第三个目的是，提供一种编码人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的腺相关病毒载体；

本发明的第四个目的是，提供上述任一所述的核苷酸、腺相关病毒载体、质粒在治疗急性或慢性视神经相关疾病中的用途；优选的，所述疾病为青光眼、DOA、LHON 以及缺血性视神经病变等。

本发明的第五个目的是，提供一种药物制剂，所述药物制剂含有上述载体，以及药学上可接受的载体或赋形剂；

本发明的第六个目的是，提供上述药物制剂的递送方法，将上述药物制剂在

眼内注射，更优选的，所述眼内注射为玻璃体腔注射。

本发明的第一方面，提供了一种编码人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的核苷酸序列，所述核苷酸序列选自下组：

(a) 所述核苷酸序列如 SEQ ID NO.: 1 所示；和

(b) 所述核苷酸序列与 SEQ ID NO.: 1 所示的核苷酸序列有≥95%相同性，优选地≥98%，更优选地≥99%。

在另一优选例中，所述核苷酸序列包括 DNA 序列、cDNA 序列、或 mRNA 序列。

在另一优选例中，所述核苷酸序列包括单链序列和双链序列。

在另一优选例中，所述核苷酸序列包括与 SEQ ID NO.: 1 完全互补的核苷酸序列。

本发明提供了一种载体，所述载体含有如本发明第一方面所述的核苷酸序列。

在另一优选例中，所述载体包含一个或多个启动子，所述启动子可操作地与所述核酸序列、增强子、转录终止信号、多腺苷酸化序列、复制起点、选择性标记、核酸限制性位点、和/或同源重组位点连接。

在另一优选例中，所述启动子选自下组：SYN、CMV、CAG、或其组合。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：质粒、病毒载体。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、或其组合，较佳地，所述载体为 AAV 载体。

在另一优选例中，所述 AAV 载体的血清型选自：AAV2、AAV5、AAV7、AAV8、或其组合。

在另一优选例中，所述的载体包括 DNA 病毒、逆转录病毒载体。

在另一优选例中，所述载体为含有或插入有如权利要求 1 所述的核苷酸序列的 AAV 载体；较佳地为 AAV 载体质粒 pAAV、pAAV-MCS、pAAV-MCS2、或 pAAV-2Aneo。

在另一优选例中，所述载体用于表达重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白。

本发明第三方面提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有本发明第二方面所述的载体，或其染色体中整合有外源的如本发明第一方面所述的核苷酸序列。

在另一优选例中，所述宿主细胞为哺乳动物细胞，所述哺乳动物包括人和非

人哺乳动物。

在另一优选例中，所述宿主细胞选自下组：HEK293 细胞、HEK293T 细胞、HEK293T-17 细胞、感光细胞(包括锥状细胞和/或杆状细胞)、其他视觉细胞(如双节细胞)、(视)神经细胞、或其组合。

在另一优选例中，所述宿主细胞选自下组：视杆细胞、视锥细胞、给光双极细胞、撤光双极细胞、水平细胞、神经节细胞、无长突细胞、或其组合，较佳地，所述宿主细胞为(视网膜)神经节细胞。

本发明第四方面提供了如本发明第二方面所述的载体的用途，用于制备一制剂或组合物，所述制剂或组合物用于治疗视神经相关疾病。

在另一优选例中，所述制剂或组合物还用于选自下组的一种或多种用途：

(a) 激活细胞抗炎或抗氧化反应；

(b) 增加神经节细胞的存活率；

(c) 阻止或延缓神经节细胞的凋亡；

(d) 引起 Nrf2 基因在视网膜神经节细胞内的稳定高表达；

(e) 清除病变细胞的自由基。

在另一优选例中，所述视神经相关疾病包括视神经损伤。

在另一优选例中，所述视神经相关疾病包括急性视神经损伤和慢性视神经损伤。

在另一优选例中，所述视神经相关疾病选自下组：青光眼、常染色体显性视神经萎缩（DOA）、Leber's 遗传视神经病变（LHON）、缺血性视神经病变、或其组合。

本发明第五方面提供了一种药物制剂，所述的制剂含有(a)本发明第二方面所述的载体，以及(b)药学上可接受的载体或赋形剂。

在另一优选例中，所述药物制剂的剂型选自下组：冻干制剂、液体制剂、或其组合。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、或其组合，较佳地，所述载体为 AAV 载体。

在另一优选例中，所述药物制剂中载体的含量为 1×10^{9}-1×10^{16} 个病毒/毫升，较佳地 1×10^{10}-1×10^{12} 个病毒/毫升。

在另一优选例中，所述药物制剂用于治疗视神经相关疾病。

本发明第六方面提供了一种治疗方法，所述方法包括将本发明第二方面所述

的载体施用于需要的对象。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、或其组合，较佳地，所述载体为 AAV 载体。

在另一优选例中，将所述载体引入到需要的对象的眼睛内。

在另一优选例中，所述需要的对象包括人和非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述治疗方法为治疗视神经相关疾病的方法。

在另一优选例中，所述施用包括眼内注射。

在另一优选例中，所述施用包括玻璃体腔注射。

本发明第七方面提供了一种重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的制备方法，包括步骤：培养本发明第三方面所述的宿主细胞，从而得到重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图 1a 是 rAAV2/2-NRF2_native 以及 rAAV2/2-NRF2_opt 病毒感染小鼠视网膜后 Nrf2 蛋白的表达水平比较；

图 1b 是 rAAV2/2-NRF2_native 以及 rAAV2/2-NRF2_opt 病毒感染小鼠视网膜后 Nrf2 下游靶基因 *nqo1* 的转录水平比较；

图 2a 是正常组小鼠视网膜 TUJ1 染色结果（20x）；

图 2b 是对照组小鼠视网膜 TUJ1 染色结果；

图 2c 是 rAAV2/2-Nrf2_native 组小鼠视网膜铺片 TUJ1 染色结果；

图 2d 是 rAAV2/2-Nrf2_opt 组小鼠视网膜铺片 TUJ1 染色结果；

图 2e 是各组小鼠视网膜神经节细胞密度的统计结果；

图 3a 是正常组小鼠视网膜 Brn3a 染色结果（20x）；

图 3b 是模型组小鼠视网膜 Brn3a 染色结果；

图 3c 是模型+CAG-Nrf2_opt 组小鼠视网膜 Brn3a 染色结果；

图 3d 是模型+SYN-Nrf2_opt 组小鼠视网膜 Brn3a 染色结果；

图 3e 是各组小鼠视网膜神经节细胞密度的统计结果；

图 4a 是模型+CAG-Nrf2_opt 组小鼠眼球切片荧光照相；

图 4b 是模型+SYN-Nrf2_opt 组小鼠眼球切片荧光照相；

图 5a 是对照组兔子眼底照相；

图 5b 是实验 A 组兔子眼底照相；

图 5c 是实验 B 组兔子眼底照相；

图 6a 是对照组兔子眼球切片 H&E 染色；

图 6b 是实验 A 组兔子眼球切片 H&E 染色；

图 6c 是实验 B 组兔子眼球切片 H&E 染色；

图 7 是质粒的特征图谱及各元件的起止位点:包括增强子/启动子，基因序列，polyA,病毒包装 ITR 序列,7a、7b、7c、7d 分别为 pAAV-CMV-Nrf2_native、pAAV-CMV-Nrf2_opt、pAAV-CAG-Nrf2_opt、pAAV-SYN-Nrf2_opt 质粒的特征图谱。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，对重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的编码序列进行了针对性优化设计，从而获得了一种特别适合在哺乳动物(如人)细胞中进行高效转录和高效表达 Nrf2 蛋白的核苷酸序列，并构建了重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的重组表达载体。经过特殊优化后的 Nrf2 编码序列(SEQ ID NO.: 1)的转录效率和翻译效率显著提高，重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白表达量提高了 5 倍以上。在此基础上，发明人完成了本发明。

术语

为了可以更容易地理解本公开，首先定义某些术语。如本申请中所使用的，除非本文另有明确规定，否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。

术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成，其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。例如，如本文所用，表述“约 100”包括 99 和 101 和之间的全部值(例如，99.1、99.2、99.3、99.4 等)。

如本文所用，术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之，所述术语也包括“基本上由…构成”、或“由…构成”。

序列同一性通过沿着预定的比较窗(其可以是参考核苷酸序列或蛋白的长度的 50%、60%、70%、80%、90%、95%或 100%)比较两个对齐的序列，并且确定出现相同的残基的位置的数目来确定。通常地，这表示为百分比。核苷酸序列的序列同一性的测量是本领域技术人员熟知的方法。

如本文使用的，术语“受试者”、“需要的对象”指任何哺乳动物或非哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人类、脊椎动物诸如啮齿类、非人类灵长类、牛、马、狗、猫、猪、绵羊、山羊。

术语“人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白”、“Nrf2(蛋白)”、“多肽”、“本发明多肽”和“本发明蛋白”可互换使用。

腺相关病毒

腺相关病毒(adeno-associated virus，AAV),也称腺伴随病毒,属于微小病毒科依赖病毒属,是目前发现的一类结构最简单的单链 DNA 缺陷型病毒，需要辅助病毒(通常为腺病毒)参与复制。它编码两个末端的反向重复序列(ITR)中的 cap 和 rep 基因。ITRs 对于病毒的复制和包装具有决定性作用。cap 基因编码病毒衣壳蛋白，rep 基因参与病毒的复制和整合。AAV 能感染多种细胞。

重组腺相关病毒载体(rAAV)源于非致病的野生型腺相关病毒，由于其安全性好、宿主细胞范围广(分裂和非分裂细胞)、免疫源性低，在体内表达外源基因时间长等特点，被视为最有前途的基因转移载体之一，在世界范围内的基因治疗和疫苗研究中得到广泛应用。经过 10 余年的研究，重组腺相关病毒的生物学特性已被深入了解，尤其是其在各种细胞、组织和体内实验中的应用效果方面已经积累了许多资料。在医学研究中，rAAV 被用于多种疾病的基因治疗的研究(包括体内、体外实验)；同时作为一种有特点的基因转移载体，还广泛用于基因功能研究、构建疾病模型、制备基因敲除鼠等方面。

在本发明一个优选的实施例中，载体为重组 AAV 载体。AAV 是相对较小的 DNA 病毒，其可以稳定和位点特异性方式整合到它们所感染的细胞的基因组中。它们能够感染一大系列的细胞而不对细胞生长、形态或分化产生任何影响，并且它们似乎并不涉及人体病理学。AAV 基因组已被克隆、测序及表征。AAV 含有大约 4700 碱基并在每个末端包含约 145 个碱基的反向末端重复序列(ITR)区域，其作为病毒的复制起点。该基因组的其余被分成两个带有衣壳化功能的重要区域：包含涉及病毒复制和病毒基因表达的 rep 基因的基因组左边部分；以及包含编码

病毒衣壳蛋白的 cap 基因的基因组右边部分。

AAV 载体可采用本领域的标准方法制备。任何血清型的腺相关病毒均是合适的。用于纯化载体的方法可见于例如美国专利 No.6566118、6989264 和 6995006，它们的公开内容整体以引用方式并入本文。杂合载体的制备在例如 PCT 申请 No.PCT/US2005/027091 中有所描述，该申请的公开内容整体以引用方式并入本文。用于体外和体内转运基因的衍生自 AAV 的载体的使用已有描述(参见例如国际专利申请公布 No.WO91/18088 和 WO93/09239；美国专利 No.4,797,368、6,596,535 和 5,139,941，以及欧洲专利 No.0488528，它们均整体以引用方式并入本文)。这些专利公布描述了其中 rep 和/或 cap 基因缺失并被所关注的基因替换的各种来源于 AAV 的构建体，以及这些构建体在体外(进入培养的细胞中)或体内(直接进入生物体)转运所关注的基因的用途。复制缺陷重组 AAV 可通过将以下质粒共转染进被人类辅助病毒(例如腺病毒)感染的细胞系而制备：所含的所关注核酸序列的侧翼为两个 AAV 反向末端重复序列(ITR)区域的质粒，和携带 AAV 衣壳化基因(rep 和 cap 基因)的质粒。然后通过标准技术纯化所产生的 AAV 重组体。

在一些实施方案中，重组载体被衣壳化到病毒粒子(例如包括但不限于 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15 和 AAV16、AAV-DJ 的 AAV 病毒粒子)中。因此，本公开包括含有本文所述的任何载体的重组病毒粒子(因其包含重组多核苷酸而为重组的)。产生这样的粒子的方法是本领域已知的，并在美国专利 No.6,596,535 中有所描述。

核酸编码序列

本发明的要解决的技术问题是克服现有技术中核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白转染效率不高、治疗效果不佳的技术缺陷。本发明提供一种核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白及其制备方法和应用。经研究发现，本发明优化的 Nrf2 基因序列(SEQ ID NO.: 1)，使 Nrf2 蛋白表达效率更高，有更多的 Nrf2 蛋白在患者视神经节细胞发挥生理作用。

本发明所述的编码人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的核酸，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.: 1 所示。所述编码人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的核酸，其全长为 1818bp。在本发明中，所述编码人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的核酸又称作 Nrf2 优化基因或 Nrf2 优化核酸。

本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。在另一优选例中，所述核苷酸为 DNA。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。

本发明的核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据已公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明多肽(或其片段，或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及用本发明的载体或多肽编码序列经基因工程产生的宿主细胞。上述多核苷酸、载体或宿主细胞可以是分离的。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然的物质，原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开，则为分离纯化的。

在本发明较佳的实施方式中，所述核苷酸序列如 SEQ ID NO.: 1 所示。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

应用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法被优选用于获得本发明的基因。用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择，并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的 DNA/RNA 片段。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及用本发明的载体或蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞，以及经重组技术利用所述宿主细胞表达 Nrf2 蛋白的方法。

通过常规的重组 DNA 技术，可利用本发明的多核苷酸序列获得表达本发明

Nrf2 蛋白的宿主细胞(如哺乳动物细胞)。一般来说包括步骤：将本发明第一方面所述的多核苷酸或本发明第二方面所述的载体转导入宿主细胞内。

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含本发明多肽的编码 DNA 序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导 mRNA 合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达多肽。

宿主细胞可以是原核细胞，或是低等真核细胞，或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞(包括人和非人哺乳动物)。代表性例子有：CHO、NS0、COS7、或 293 细胞的动物细胞等。在本发明的一个优选实施方式中，选择 HEK 细胞、HEK293 细胞、HEK293T 细胞、HEK293T-17 细胞、感光细胞(包括锥状细胞和/或杆状细胞)、其他视觉细胞(如双节细胞)、神经细胞为宿主细胞。在另一优选例中，所述宿主细胞选自下组：视杆细胞、视锥细胞、给光双极细胞、撤光双极细胞、水平细胞、神经节细胞、无长突细胞、或其组合。较佳地，所述宿主细胞为(视网膜)神经节细胞。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 $CaCl_2$ 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 $MgCl_2$。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的蛋白质。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化蛋

白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

序列优化

本发明进行 Nrf2 核苷酸序列优化(如 SEQ ID NO：1 所示，在本发明中简称优化 Nrf2 基因/核酸)，此序列是经过特殊优化，转录效率和翻译效率显著提高如图 1a 所示，优化的 Nrf2 和未优化的 Nrf2 序列的同源性为 75%。

在本发明中，提供了重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白细胞核密码子偏好优化后的序列如 SEQ ID NO.: 1 所示。

如本文所用，所述“优化的 Nrf2 编码序列”、“优化 Nrf2 编码基因”均指一种用于编码重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的核苷酸序列，所述的重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.:3 所示)。

表达载体和宿主细胞

本发明还提供了一种用于 Nrf2 蛋白的表达载体，它含有本发明的优化 Nrf2 编码序列。

通过提供的序列信息，熟练的技术人员可以使用可用的克隆技术以产生适于转导进入细胞的核酸序列或载体。

优选地，编码 Nrf2 蛋白的核酸序列作为载体，优选地表达载体被提供。优选地，其可作为优选地适用于在视网膜靶细胞中转导和表达的基因治疗载体被提供。载体可以是病毒的或非病毒的(例如质粒)。病毒载体包括源自以下的那些病毒载体:腺病毒、包括突变的形式的腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、MMLV、GaLV、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、HIV、痘病毒和 SV40。优选地，病毒载体是复制缺陷的(replication defective)，尽管设想其可以是复制缺乏的(replication deficient)、能够复制或条件性复制的。病毒载体通常可以保持染色体外状态而不整合进入靶视网膜细胞的基因组。用于向视网膜靶细胞引入编码 Nrf2 蛋白的核酸序列的优选的病毒载体是 AAV 载体，例如自身互补的腺相关病毒(scAAV)。使用特定的 AAV 血清型(AAV 血清型 2 到 AAV 血清型 12、AAV-DJ)

或这些血清型中的任何一个的修饰的版本(包括 AAV 4YF 和 AAV 7m8 载体)可以实现选择性靶向。

病毒载体可被修饰以缺失任何非必需的序列。例如，AAV 中，病毒可被修饰以缺失全部或部分的 IX 基因、Ela 和/或 Elb 基因。对于野生型 AAV，没有辅助病毒诸如腺病毒的存在，复制是非常低效率的。对于重组的腺相关病毒，优选地，复制基因和衣壳基因以反式被提供(在 pRep/Cap 质粒中)，并且仅 AAV 基因组的 2ITR 被保留并且包装进入病毒体，同时需要的腺病毒基因被被腺病毒或另一个质粒提供。也可对慢病毒载体做出类似的修饰。

病毒载体具有进入细胞的能力。然而，非病毒载体诸如质粒可与剂复合以有利于病毒载体被靶细胞的摄取。此类剂包括聚阳离子剂。可选地，递送系统诸如基于脂质体的递送系统可被使用。用于在本发明中使用的载体优选地适于在体内或体外使用，并且优选地适于在人类中使用。质粒较佳地为 AAV 载体质粒 pAAV、pAAV-MCS、pAAV-MCS2、或 pAAV-2Aneo。

载体将优选地包含一个或多个调节序列以指导核酸序列在视网膜靶细胞中的表达。调节序列可以包括与核酸序列可操作地连接的启动子、增强子、转录终止信号、多腺苷酸化序列、复制起点、核酸限制性位点、和同源重组位点。载体还可包括选择性标记，例如来确定载体在生长系统(例如细菌细胞)中或在视网膜靶细胞中的表达。

“可操作地连接”意指，核酸序列在功能上与其可操作地连接的序列相关，以使得它们以使得它们影响彼此的表达或功能的方式连接。例如，与启动子可操作地连接的核酸序列将具有被启动子影响的表达模式。

启动子介导与其连接的核酸序列的表达。启动子可以是组成型的或可以是诱导型的。启动子可以指导在内视网膜细胞中遍在的表达，或神经元特异的表达。在后一种情况中，启动子可以指导细胞类型特异的表达，例如对给视神经节细胞。合适的启动子将是本领域技术人员已知的。例如，合适的启动子可以选自由以下组成的组: CAG、SYN、L7、thy-1、恢复蛋白、钙结合蛋白、人类 CMV、GAD-67、鸡β肌动蛋白、hSyn、Grm6、Grm6 增强子 SV40 融合蛋白。使用细胞特异的启动子可以实现靶向，例如 Grm6-SV40 用于选择性靶向给视神经细胞。Grm6 启动子是 Grm6 基因的 200 碱基对增强子序列和 SV40 真核启动予的融合体，Grm6 基因编码给视神经细胞特异的代谢型谷氨酸受体 mGluR6。Grm6 基因的优选的来源是小鼠和人类。使用泛-神经元的启动子可以实现遍在的表达，其实例在本领域是已

知的并且可得的。一个此类实例是 CAG。CAG 启动子是 CMV 早期增强子和鸡β肌动蛋白启动子的融合体。

合适的启动子的一个例子为即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列为能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1α(EF-1α)。然而，也可使用其他组成型启动子序列，包括但不限于类人猿病毒 40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV 启动子、鸟类白血病病毒启动子、艾伯斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子，诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地，本发明不应被限于组成型启动子的应用。诱导型启动子也被考虑为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关，其能够当这样的表达是期望的时，打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达，或当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

在一优选实施方式中，本发明的启动子包括，但并不限于：CAG 启动子、SYN1 启动子、CMV 启动子。

在一优选实施方式中，CAG 启动子的序列如 SEQ ID NO.:4 所示。

在一优选实施方式中，SYN1 启动子的序列如 SEQ ID NO.:5 所示。

在一优选实施方式中，CMV 启动子的序列如 SEQ ID NO.:6 所示。

许多表达载体可应用 Nrf2 蛋白在哺乳动物细胞(较佳地为人，更佳地为人视神经细胞或感光细胞)表达。本发明优选用腺相关病毒作为表达载体。

本发明还提供了一种宿主细胞，用于表达 Nrf2 蛋白。优选地，所述宿主细胞为哺乳动物细胞(较佳地为人，更佳地为人视神经细胞或感光细胞)，提高 Nrf2 蛋白的表达量。

本发明还提供一种重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的制备方法，包括步骤：培养上述的宿主细胞，从而得到重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白。

本发明还提供了一种治疗方法，所述方法包括所述的载体施用于需要的对象。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、或其组合。较佳地，所述载体为 AAV 载体。

在另一优选例中，将所述载体引入到需要的对象的眼睛内。

在另一优选例中，所述需要的对象包括人和非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述治疗方法为治疗视神经相关疾病的方法。

在另一优选例中，所述视神经相关疾病选自下组：青光眼、常染色体显性视神经萎缩（DOA）、Leber's 遗传视神经病变（LHON）、缺血性视神经病变或其组合。

制剂和组合物

本发明提供一种制剂或组合物，所述制剂或组合物含有(a) 权利要求 2 所述的载体，以及(b)药学上可接受的载体或赋形剂。

在另一优选例中，所述药物制剂的剂型选自下组：冻干制剂、液体制剂、或其组合。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、或其组合，较佳地，所述载体为 AAV 载体。

在另一优选例中，所述药物制剂中载体的含量为 1×10^{9}-1×10^{16}，较佳地 1×10^{10}-1×10^{12} 个病毒/毫升。

在另一优选例中，所述药物制剂用于治疗视神经相关疾病。

在另一优选例中，所述药物制剂用于选自下组的一种或多种用途：

(a) 激活细胞抗炎或抗氧化反应；

(b) 增加神经节细胞的存活率；

(c) 阻止或延缓神经节细胞的凋亡；

(d) 引起 Nrf2 基因在视网膜神经节细胞内的稳定高表达；

(e) 清除病变细胞的自由基。

本发明所述药物组合物中的“活性成分”是指本发明所述的载体(vector)，例如病毒载体(包括腺相关病毒载体)。本发明所述的“活性成分”、制剂和/或组合物可用于治疗视神经相关疾病。“安全有效量”指的是：活性成分的量足以明显改善病情或症状，而不至于产生严重的副作用。“药学上可接受的载体或赋形剂(excipient)”指的是：一种或多种相容性固体或液体填料或凝胶物质，它们适合于人使用，而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”在此指的是组合物中各组份能和本发明的活性成分以及它们之间相互掺和，而不明显降低活性成分的药效。

组合物可以是液体或固体，例如粉末、凝胶或糊剂。优选地，组合物是液体，优选地可注射液体。合适的赋形剂将是本领域技术人员已知的。

在本发明中，所述载体可通过视网膜下或玻璃体内施用向眼睛施用。在任一种施用模式中，优选地，载体作为可注射液体被提供。优选地，可注射液体作为胶囊或注射器被提供。

药学上可以接受的载体部分例子有纤维素及其衍生物(如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素钠、纤维素乙酸酯等)、明胶、滑石、固体润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁)、硫酸钙、植物油(如豆油、芝麻油、花生油、橄榄油等)、多元醇(如丙二醇、甘油、甘露醇、山梨醇等)、乳化剂(如吐温®)、润湿剂(如十二烷基硫酸钠)、着色剂、调味剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、无热原水等。

组合物可包含生理上可接受的无菌含水或无水溶液、分散液、悬浮液或乳液，和用于重新溶解成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。适宜的含水和非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、多元醇及其适宜的混合物。

本发明提供的编码 Nrf2 的核酸或融合核酸，可以体外或体内生产 Nrf2 蛋白，所述蛋白或者含所述蛋白的制剂可应用于制备治疗视神经相关疾病的药物。

经优化的编码人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白的核酸表达量更高，从而翻译出更多的 Nrf2 蛋白。将含有优化 Nrf2 核酸的药剂注入兔眼玻璃体腔中，该药剂在玻璃体腔内保持活力，并转染到视神经细胞。优化 Nrf2 核酸编码比现有技术更多的 Nrf2 蛋白，其转染效率更高，能较好地治疗视神经相关疾病。

与现有技术相比，本发明主要具有以下优点：

1.本发明重组人核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白编码基因序列进行了特殊优化。与 Nrf2 的未优化的 DNA 编码序列相比，转录效率和翻译效率显著提高，密码子使用更加高效，并且优化后的序列 Nrf2 蛋白表达量显著提高、生物活性高。

2.本发明优化的 Nrf2 编码基因(SEQ ID NO.: 1)能够非常有效地治疗视神经相关疾病，并且安全性好。

3．本发明提供了一种腺病毒相关载体，能在人体内表达 Nrf2 蛋白，小鼠急性损伤模型表明，该腺病毒相关载体能高效感染视网膜并大量表达目的基因，激活细胞抗炎抗氧化反应，有效地增加小鼠 RGCs 的存活率。因此能够用于治疗急性或慢性视神经相关疾病，如视神经损伤、青光眼等。

4. 本发明的优化的序列表达量更高，体内表达更稳定，提高药物的治疗效果。

下面结合具体实施，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

除非特别说明，否则实施例中的材料和试剂均为市售产品。

实施例 1　pAAV-Nrf2 载体构建方法

1.1 载体构建

获取人的 Nrf2 核苷酸序列（如 SEQ ID NO.:2 所示）后，进行了 Nrf2 核苷酸序列优化（如 SEQ ID NO.1 所示）。核苷酸序列优化包括，密码子使用偏好性，消除不利于表达的二级结构(如发夹结构)，改变 GC 含量，CpG 二核苷酸含量，mRNA 的二级结构，隐蔽剪接位点，早期多聚腺苷化位点，内部核糖体进入位点和结合位点，负 CpG 岛，RNA 不稳定区，重复序列(直接重复、反向重复等)和可能影响克隆的限制性位点。将优化后的序列(SEQ ID NO：1)加 Cla I 和 Xba I 两个酶切位点或者将以该新基因设计引物用 PCR 扩增的产物与 pAAV 质粒载体，分别进行 Cla I 和 Xba I 双酶切，回收酶切产物，T4 DNA Ligase 连接过夜，连接产物转化感受态细胞得到重组 pAAV-Nrf2.挑取单克隆进行进行菌液测序，将测序得到的序列进行序列比对分析，成功得到序列正确的重组腺相关病毒质粒 pAAV-Nrf2，如图 7 所示，包括增强子/启动子、基因序列、polyA、病毒包装 ITR 序列，图 7a、7b、7c、7d 分别为 pAAV-CMV-Nrf2_native、pAAV-CMV-Nrf2_opt、pAAV-CAG-Nrf2_opt、pAAV-SYN-Nrf2_opt 质粒的特征图谱。

1.2 pAAV-Nrf2 重组腺相关病毒包被

将 pAdHelper、pAAV-r2c5、pAAV-Nrf2 质粒转染 293T 细胞(接种于 225cm^2 细胞培养瓶)，48 小时后收取细胞。用 PBS 重悬细胞，并反复冻融 3 次。

1.3 rAAV2/2-Nrf2 病毒的纯化与浓缩

采用氯仿处理-PEG/NaCl 沉淀-氯仿抽提三步来分离、浓缩和纯化 rAAV2/2-Nrf2 病毒。总回收率=终产物的病毒颗粒数/起始物的病毒颗粒数。

1.4 荧光定量 PCR 方法检测 rAAV2/2-Nrf2 的物理滴度

实验材料：SYBRⅡ(takara)；目的片段引物(20uM)；包装病毒用目的质粒(已知浓度)；待测病毒；PCR 八联管(Bio-red)。

PCR 反应条件：预变性：95℃ 10min；循环：95℃ 15sec，60℃ 1min。

最终确定其基因组滴度为 1×10^{12}vg/mL。

其他载体制备方法同上。

实施例 2 rAAV2/2-Nrf2_native 以及 rAAV2/2-Nrf2_opt 在小鼠中表达水平及生物学活性的比较

2.1 小鼠眼睛玻璃体重组腺相关病毒注射

使用 5%的水合氯醛通过腹腔注射麻醉小鼠，待小鼠麻醉后，对小鼠眼睛外部和眼球进行清洗消毒。用胰岛素针在小鼠角巩缘下开孔，微量注射器在玻璃体腔内注射 1-2μl 重组腺相关病毒制剂，其由重组腺相关病毒载体，以及药学上可接受的载体或赋形剂组成。标准环境培养，自由饮食，每天观察小鼠眼睛状态。

2.2 小鼠视网膜表达水平及生物学活性的比较

给药 3 周后断脊处死小鼠，取出眼球，在冰上迅速的剥离出视网膜，液氮条件下保存。RIPA buffer 裂解视网膜组织后，WB 实验检测 Nrf2 蛋白表达水平。图 1a 是 rAAV2/2-Nrf2_native 以及 rAAV2/2-Nrf2_opt 病毒感染小鼠视网膜后的蛋白水平比较，序列优化后载体的蛋白表达水平比优化前要高出 5 倍以上。

同时，取小鼠视网膜提取 RNA, qPCR 实验检测了 Nrf2 调控的下游靶基因 *nqo*1 的转录水平。图 1b 是 rAAV2/2-NRF_native 以及 rAAV2/2-NRF_opt 病毒感染小鼠视网膜后 Nrf2 下游靶基因的转录水平比较,结果显示序列优化后载体蛋白激活下游基因的转录水平比优化前要高 4 倍左右。说明序列优化后的载体具有更强的生物学活性。

实施例 3 急性视神经损伤模型的视神经保护作用

3.1 小鼠视神经急性损伤模型

成年 BL6/C57 小鼠腹腔注射 5%的水合氯醛进行麻醉。将小鼠固定于动物手术台上，碘伏消毒眼部皮肤。从角巩缘开始沿着巩膜剪开眼球结膜组织，在眼球和结膜间向后钝性分离，暴露出肌椎，分离充分暴露出视神经，在球后

2mm 处用镊端宽 1mm 的反向自锁弯头镊子夹持视神经 10s。术后观察和滴眼膏，剔除眼底出血，晶体损伤以及眼内炎症的小鼠。

3.2 实验分组及玻璃体腔注射

5 只未造模小鼠作为正常组。造模成功的小鼠分为三组进行玻璃体腔注射。对照组注射 rAAV2/2-mCherry 病毒 (n=7), 实验组 A 注射 rAAV2/2-Nrf2_native 病毒(n=8), 实验组 B 注射 rAAV2/2-Nrf2_opt 病毒(n=8)。

3.3 视网膜神经节细胞免疫荧光染色以及 RGCs 细胞计数

断脊处死小鼠，取出眼球在固定液固定 20 分钟，后剥离出视网膜，剪裁成 4 瓣花瓣状，4%多聚甲醛 4°C 固定过夜。1%TritonX-100 打孔 2 小时，封闭液封闭 1 小时。TUJ1 抗体(节细胞特异性抗体)一抗 4℃孵育过夜，二抗室温孵育 2 小时。DAPI 染细胞核 15 分钟后封片。

荧光显微镜下分别选取视网膜颞象限、上象限、鼻象限、下象限的外周 2 个视野（距视盘 3mm 处）及中心 1 个视野（距视盘 1mm 处）进行拍照计数。每个视网膜采集 12 个视野图像，统计出平均值，计算单位面积内的视网膜神经节细胞数。

结果如图 2 所示，ONC 造模组存活的神经节细胞密度(322±46 RGCs/mm^2, 图 2b)比正常组神经节细胞密度(1496±53 RGCs/mm^2,图 2a)显著降低,$P<0.005$，说明造模成功。rAAV2/2-Nrf2_native 药物组(479±46 RGCs/mm^2，图 2c)以及 rAAV2/2-Nrf2_opt 药物组(802±16 RGCs/mm^2，图 2d)神经节细胞密度与对照组(322±46 RGCs/mm^2,图 2b)相比均有显著提高，说明药物组对造模小鼠视网膜神经节细胞有保护作用。其中，rAAV2/2-Nrf2_opt 药物组小鼠存活的神经节细胞数显著高于 rAAV2/2-Nrf2_native 药物组($P<0.05$)，说明序列优化后药物的神经节细胞保护作用要好于天然序列药物。附图 2e 是各组小鼠单位视网膜面积内的 RGC 细胞数的统计结果。

实施例 4　青光眼小鼠模型的视神经保护作用

4.1 DBA/2J 小鼠玻璃体腔注射

将 7 月龄的 DBA/2J 小鼠(眼压>18mmHg)分为三组，6 只注射 PBS 作为模型组,其余两组分别单眼玻璃体腔注射 rAAV2/2-CAG-Nrf2_opt 病毒(n=7)，rAAV2/2-SYN-Nrf2_opt 病毒 (n=7)。5 只同龄的 C57/BL6 小鼠作为正常组。

4.2 小鼠眼压，眼底检查

术后每隔 3-5 天检眼镜、眼压检查。所有小鼠眼睛均无明显异常，无结膜充血，分泌物，无眼内炎，眼压并无明显变化。

4.3 视网膜神经节细胞染色及计数

给药 5 个月后断脊处死小鼠，取视网膜进行节细胞免疫荧光染色以及计数。结果如图 3 所示，模型组小鼠存活的神经节细胞密度(971±146 RGCs/mm^2,图 3b)显著低于正常组神经节细胞密度(1506±152 RGCs/mm^2,图 3a),P<0.05。rAAV2/2-CAG-Nrf2_opt 组 (1426±179 RGCs/mm^2 ，图 3c) 以及 rAAV2/2-SYN-Nrf2_opt 组(1384±88 RGCs/mm^2，图 3d)神经节细胞密度比模型组(1506±152 RGCs/mm^2,图 3b)有显著性增加(P<0.05)，说明药物组对造模小鼠视网膜神经节细胞有保护作用。而 rAAV2/2-CAG-Nrf2_opt 组和 rAAV2/2-SYN-Nrf2_opt 组之间并没有显著性差异。附图 3e 是各组小鼠视网膜单位面积内的 RGC 细胞计数的统计结果。

4.4 视网膜表达层次

取眼球冰冻切片，用 Nrf2 抗体进行免疫荧光染色。检测 rAAV2/2-CAG-Nrf2_opt 与 rAAV2/2-SYN-Nrf2_opt 在视网膜的表达层次。结果如图 4 所示，rAAV2/2-CAG-Nrf2_opt 感染小鼠视网膜后 Nrf2 蛋白不仅在视网膜神经节细胞，还在双极细胞，无长突细胞中有较强表达(图 4a)。而 rAAV2/2-SYN-Nrf2_opt 感染视网膜后主要在视网膜神经节细胞中表达(图 4b)，特异性更高。

实施例 5 rAAV2/2-CAG-Nrf2_opt 以及 rAAV2/2-SYN-Nrf2_opt 在兔子视网膜的表达及安全性检测

5.1 兔眼玻璃体腔注射

取 27 只新西兰大白兔分为 3 组，分为 PBS 组, 实验 A 组以及实验 B 组，分别吸取 50ul 1×10^{12}vg/mL 的 rAAV2/2-CAG-Nrf2_opt 以及 rAAV2/2-SYN-Nrf2_opt 在距角膜缘外 3mm 处穿刺睫状体平坦部进入玻璃体腔内，进行玻璃体腔注射。

5.2 裂隙灯、眼压、眼底照相检查

三组兔子分别于术后 1、3、7、30 天进行裂隙灯，眼压的检查。所有兔子均无明显异常，无结膜充血、分泌物，无眼内炎，眼压均无升高。术后一个月的兔子眼底照相结果如图 5 所示。与对照组兔子眼底(图 5a)相比，实验 A 组(图

5b)与实验 B 组(图 5c)兔子的视网膜血管和视神经均无明显并发症或损害，表明正规标准的玻璃体腔注射不会发生明显的炎症反应或其他并发症。

5.3 眼球石蜡切片 H&E 染色

兔子眼球切片 H&E 染色结果显示实验 A 组(图 6b)、实验 B 组(图 6c)和对照组(图 6a)的视网膜神经节细胞数量基本一样，且层次结构完整，表明 Nrf2_opt 重组基因是安全的，没有对视网膜造成损伤。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。