

一种融合型腺相关病毒及其应用

技术领域

本发明涉及生物医药领域，涉及一种融合型腺相关病毒及其应用，尤其涉及在耳病和/或眼科疾病的预防和/或治疗中的应用。

背景技术

迄今为止已知的人类疾病约有七千多种，其中基因问题导致的疾病占了80%左右，世界上有三亿多人深受基因类疾病的困扰。目前的化学疗法、蛋白质疗法等仅能治疗不到500种人类疾病，对基因问题导致的疾病通常是无力的，所以需要开发新的药物和治疗方案。

基因治疗是一种新兴的治疗方法，它可以将功能基因输送到患者体内，以对抗或替代功能失调的基因，从而在没有化学药物干预、放射治疗或手术的情况下治愈疾病。基因疗法通过病毒或非病毒载体将遗传物质引入靶细胞，通过纠正或补充缺陷基因来治疗或预防疾病，治疗的效果可以是持久的，不需要重复干预。基因治疗可以通过离体或体内策略来实现，离体基因疗法是从患者身上采集靶细胞，经过基因改造并回输到患者体内；体内基因疗法是将遗传物质直接递送到患者的靶器官或组织中。目前已经利用各种类型的基因递送策略对癌症、失明、免疫和神经元疾病等多种疾病进行了治疗。

病毒载体是最常用的基因治疗递送载体，因为它进入细胞和引入遗传物质的效率很高，常用的有腺病毒、逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒（AAV）等。如今，AAV 载体在体内基因治疗的临床试验中取得了很好的效果，逆转录病毒和慢病毒载体是体外基因治疗临床试验中的首选载体。AAV 能够成功作为治疗性基因递送载体的主要因素是其低免疫原性和缺乏致病性。多项上市药物批准和正在进行的临床试验，证明了AAV 载体已成为基因治疗的主要基因递送工具之一。2012 年，Glybera是欧洲第一个获批用于治疗脂蛋白脂肪酶缺乏症的 AAV 疗法。这些药物的上市清楚地证明了基于AAV 的治疗方法的安全性和有效性。此后，用于治疗 Leber 先天性黑蒙的 Luxturna和用于治疗脊髓性肌萎缩症（SMA）的 Zolgensma分别于 2017 年和 2019 年获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 的批准。目前的临床研究集中在通过基因替代、基因沉默或基因编辑治疗单基因疾病。

AAV除可用于癌症、失明、免疫和神经元疾病等多种疾病的治疗外，还有望用于疫苗的开发。

虽然AAV具有低免疫原性和低致病性的特点，基于 AAV 的基因疗法也取得了惊人的成功，但由于人体免疫系统预先存在天然AAV衣壳蛋白的中和抗体，目前多达 50% 的患者被排除在这种治疗方法之外。为规避这种免疫障碍，可以用工程改造的 AAV 衣壳逃避预先存在的中和抗体或采取治疗前暂时清除中和抗体的方法。工程改造AAV衣壳不仅可以逃避中和抗体，还可以使AAV靶向到预期的组织细胞类型，实现精准治疗的目的。定向进化是当前改造AAV衣壳的强大工具，从原理上讲，定向进化采用高通量技术手段将突变引入基因及其编码的蛋白质中，并模拟自然进化极大的加速蛋白多样化和选择过程。该方法包括三个基本步骤：建立目标基因的序列多样化文库，从突变基因库编码的蛋白质库中进行筛选以及扩增编码所需性状的基因序列。这三个步骤构成了一轮定向进化，可以迭代进行多轮进化筛选，直到获得具有改良特性的特异基因/蛋白质。

但是，目前将腺相关病毒用作听力系统基因治疗的载体，仍然存在组织特异性较差，感染效率不高等缺点，例如已知腺相关病毒载体在感染毛细胞的同时，也会感染支持细胞；而支持细胞和毛细胞会分别表达不同的致病基因，这种载体感染的非特异性对于疾病的治疗存在不利影响。因此，要实现精准基因治疗，需要高效且特异的新型重组腺相关病毒载体。

发明内容

本发明的目的旨在克服现有技术的缺陷，提出改造一种新兴的可以在耳蜗、眼睛视网膜等组织高效特异递送基因的新型腺相关病毒载体，用于基因治疗。本发明将改造的新型腺相关病毒载体在体感染小鼠耳蜗，能够介导目的基因特异性地在耳蜗支持细胞中表达，从而特异标记或操控支持细胞。该新型腺相关病毒在耳蜗支持细胞的结构与功能解析、疾病模型建立和基因治疗等方面具有广泛的应用价值和市场前景。同时，将该病毒通过玻璃体注射到小鼠眼球中发现，该病毒载体具有较目前现有载体更优异的感染特性，在眼科细胞的结构与功能解析、疾病模型建立和基因治疗等方面同样具有广泛的应用价值和市场前景。

本发明的目的之一是提供一种融合型腺相关病毒衣壳蛋白，所述衣壳蛋白包含血清型AAV1、AAV2、AAV6和AAV7的肽段的融合肽段或其变体。

本发明的另一目的是提供一种核酸，所述核酸编码如上所述的融合型腺相关

病毒衣壳蛋白。

本发明的另一目的是提供一种构建体，所述构建体含有如上所述的核酸。

本发明的另一目的是提供一种宿主细胞，所述宿主细胞包含如上所述的构建体或基因组中整合有外源的如上所述的核酸，或所述宿主细胞包含如上所述的融合型腺相关病毒。

本发明的另一目的是提供一种融合型腺相关病毒，所述融合型腺相关病毒的衣壳结构含有如上任一项所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白。

使用如上所述的融合型腺相关病毒转化的宿主细胞。

本发明的另一目的是提供一种融合型腺相关病毒载体系统，包含包装质粒，所述包装质粒中包含如上所述的核酸或核酸片段。

本发明的另一目的是提供一种融合型腺相关病毒，由如上所述融合型腺相关病毒载体系统经病毒包装获得。

本发明的另一目的是提供一种药物组合物，所述药物组合物包含如上任一项所述的融合型腺相关病毒以及药学上可接受的辅料。

本发明的另一目的是提供如上所述融合型腺相关病毒衣壳蛋白、核酸、构建体、融合型腺相关病毒、宿主细胞、融合型腺相关病毒载体系统、药物组合物或偶联物在制备治疗疾病的药物中的用途；优选地，在制备基因治疗疾病的药物中的用途。

与现有技术相比，本发明具有以下优点及有益效果：（1）提供了一种支持细胞特异性新型腺相关病毒载体，能够介导目的基因特异性地在新生小鼠耳蜗支持细胞中表达；（2）提供了一种新型腺相关病毒载体，能够介导目的基因特异性地在成年小鼠耳蜗内毛细胞中表达；（3）提供了一种新型腺相关病毒载体，能够介导目的基因特异性地在成年小鼠视网膜RPE层中表达；（4）新型腺相关病毒载体介导目的基因表达比传统的转基因方法更灵活，安全性更高，应用更方便，成本更低；（5）新型特异性的腺相关病毒载体使得开发精准治疗耳科及眼科相关疾病的基因疗法成为可能。

附图说明

图1示出了DNA家族改组文库体内筛选流程。

图2示出了计算机模拟的AAV-M9结构图。

图3示出了腺相关病毒对新生小鼠的感染特性。图3a显示了AAV-ic和AAV-

M9在新生小鼠体内注射到耳蜗，14天后，取出耳蜗组织解剖后绿色荧光EGFP与毛细胞特异性标记蛋白Myo7a的免疫染色照片。图片选取毛细胞层面。图3b显示了AAV-ie和AAV-M9在新生小鼠体内注射到耳蜗，14天后，取出耳蜗组织解剖后绿色荧光EGFP与毛细胞特异性标记蛋白Myo7a的免疫染色照片。图片选取支持细胞层面。图3c显示了对图3a, 3b中毛细胞和Dieters cells的数据统计结果。

图4示出了腺相关病毒对新生小鼠的安全性。图4a显示了AAV-M9在新生小鼠体内注射到耳蜗，14天后取出的耳蜗组织，和正常小鼠耳蜗解剖后毛细胞特异性标记蛋白Myo7a的免疫染色照片。图4b显示了对图4a中外毛细胞和内毛细胞的数据统计结果。

图5示出了腺相关病毒对成年小鼠的感染特性。图5a显示了AAV-ie和AAV-M9在成年小鼠体内注射到耳蜗，14天后，取出耳蜗组织解剖后绿色荧光EGFP与毛细胞特异性标记蛋白Myo7a的免疫染色照片。图5b显示了对图5a中外毛细胞的数据统计结果。图5c显示了对图5a中内毛细胞的数据统计结果。

图6示出了腺相关病毒对成年小鼠的安全性。图6a显示了AAV-M9在成年小鼠体内注射到耳蜗，14天后取出的耳蜗组织，和正常小鼠耳蜗解剖后毛细胞特异性标记蛋白Myo7a的免疫染色照片。图6b显示了对图6a中外毛细胞和内毛细胞的数据统计结果。

图7示出了AAV-M9-CMV-EGFP对眼球RPE层感染情况。

图8示出了AAV-M9-CMV-EGFP在非人灵长类动物上的眼部转染特征。

具体实施方式

以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用，本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用，在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

本发明提供了一种融合型腺相关病毒衣壳蛋白，所述衣壳蛋白包含血清型AAV1、AAV2、AAV6和AAV7的肽段融合形成的肽段（融合肽段或嵌合肽段）或其变体。

在一些优选实施方式中，在所述融合型腺相关病毒衣壳蛋白中，所述融合肽段包含依次连接的第一肽段、第二肽段、第三肽段、第四肽段和第五肽段；所述第一肽段包含来自AAV1的肽段，所述第二肽段包含来自AAV7的肽段，所述第三

肽段包含来自AAV2的肽段, 所述第四肽段来自包含AAV1的肽段, 所述第五肽段来自包含AAV6的肽段。优选地, 所述第一肽段包含SEQ ID No:2第1位到第262位的氨基酸片段(SEQ ID NO:3), 所述第二肽段包含SEQ ID No:2第263位到第325位的氨基酸片段(SEQ ID NO:4), 所述第三肽段包含SEQ ID No:2第326位到第417位的氨基酸片段(SEQ ID NO:5), 所述第四肽段包含SEQ ID No:2第418位到第583位的氨基酸片段(SEQ ID NO:6), 所述第五肽段包含SEQ ID No:2第584位到第736位的氨基酸片段(SEQ ID NO:7), 所述融合型腺相关病毒衣壳蛋白包含一个S430I突变。

表1. 序列信息

SEQ ID No	序列信息	备注
1	atggctgccgatgggtattctccagattggctcaggacaaacctctctgagggcattcgcgagtggtgggacttgaaacctggagccccg aagcccaagccaaccagcaaaagcaggacgacggcggggtctgtggtcttctggctacaagtacctcggaccttcaacgggactc gacaagggggagcccgtaacgcggcgacgagcgccctcagcagcagacaaggcctacgaccagcagctcaaaagcgggtgac aatccgtacctgctggtataaccacgacgacgaggtttcaggagcgtctgcaagaagatacgtctttgggggcaacctcggggcagc agtctccaggccaagaagcgggttctgaacctctcggtctggttgagggaaggcgttaagacggctcctggaaagaaacgtccgtag agcagtcgccacaagagccagactcctcctcgggcatcggcaagacagggccagcagcccgctaaaagagactcaattttggtcagac tggcgactcagagtcagtcctccgatccacaacctctcggagaacctccagcaacccccgctgctgtgggactactacaattggcttcag gcggtggcgaccaatggcagacaataacgaaggcgccgacggagtggttaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggct ggggcagcagatcaccaccagcaccgcacgtgggacctgcccacctacaacaatcacctctacaagcaaatctccagtgaaact gcaggtagtaccaacgacaacacctactcggctacagcaccctcggggtattttgacttttaacagattccactgceacttctaccacg tgactggcagcagactcaacaacaactgggattccggcccaagaagctcggttcaagctcttcaacatccaggtaacggaggtca cgcagaatgacggtagcagcagcattgccataacctaccagcagcgttcagggttactgactcggagtaccagctcccgtacgtcct cggctcggcgcatcaaggatgcctcccgccttcccagcagacgtcttcattggtccacagatggatacctcaccctgaacaacggga gtcaggcagtaggacgctcttatttactgcctggaatttccatcgcagatgctgagaacgggcaataactttacctcagctacacct tgagggaagtgcctttccacagcagctacgcgcacagccagatcctggaccggctgatgaatcctctcagcaccataacctgtattacctg aacagaaactcaaatcagtcggaagtgcccaaaacaaggactgctgtttagccgtgggtctccagctggcatgctgttcagcccaaa aactggctacctggacctgttatcggcagcagcgctgttctaaaacaaaaacagacaacaacaacgcaattttacctggactggtgctt caaaatataacctcaatggcgctgaatccatcatcaacctggcactgctatggcctcacacaagacgacgaagacaagtcttctccat gagcgggtgatgattttggaaaagagagcgccggagcttcaaacactgcattggacaatgtcatgatcacagacgaagaggaaatca aagccactaaccctggtgccaccgaaagatttgggactgtggcagtcattctcagagcagcagcacagacctgcgaccggagatgt gcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacagagacgtatacctgcagggaccatttgggccaagattcctcacccga tggacactttatccttccactgatgggaggttttgggctcaaacacccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgctgttctcgcgaa tctcctcggcgagttttagctacaaaagtttgccttcatcacccaatactccacaggacaagtgtgtggaattgaatgggagctgc agaaagaaaacgaacgcgtggaatcccgaagtgcagtacacatcaattatgcaaaatctgccaacgttgattttactgtggacaaca tggactttatctagcctcgcccaattggcaccgttaccttaccctgcccctgtaa	核酸序列
2	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFG NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGG NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKR LNFGQTGDSESVDPQPLGEPPATPAAVGPTTMSAGGGAPMADNNEGADGVGNASGN WHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSETAGSTNDNTYFGYSTPWGYFD FNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRPKLRFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQ VFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP SQMLRTGNNTFSYTFEEVPFHSSYAHSQLDRLMNLIDQYLYLNRQTQNSGSAQN KDLLFSRGSAPAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGR ESIINPGTAMASHKDDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVA TERFGTVAVNLQSSSTDPATGDIVHMGALPGMVWQDRDVYLQGIWAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQK ENSKRWNPVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL	氨基酸序列

3	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPF NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGG NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKR LNFGQTGDSESVDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGN WHCDSTWLGD RVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISS	氨基酸 序列
4	ETAGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLRFKLFNIQ VKEVT	氨基酸 序列
5	QNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNN GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFSYTFE	氨基酸 序列
6	EVPFHSSYAHSQILDRLMNPLIDQYLYLNRQTQNSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQP KNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDED KFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVN	氨基酸 序列
7	LQSSSTD PATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFG LKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEV QYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL	氨基酸 序列
8	gtcaggcaacgtggcgtgtgtg	核苷 酸序 列
9	ggc gatgagttccgccgtggc	核苷 酸序 列

本发明所述融合型腺相关病毒衣壳蛋白中，所述各肽段之间直接融合。

本发明所述融合型腺相关病毒衣壳蛋白中，所述血清型AAV1和AAV6的肽段组装成所述衣壳蛋白的三重对称轴突起；所述血清型AAV2、AAV6、AAV7的肽段组装成所述衣壳蛋白的五重对称轴的通道；所述血清型AAV6的肽段在所述衣壳蛋白的二重对称轴处形成凹陷，其计算机模拟结构示意图如图2所示。

在电镜下，腺相关病毒的核衣壳一般呈近圆形。这种近圆形衣壳，实际上是由多个蛋白质壳粒排列构成的封闭的二十面体对称中空衣壳，基因组核酸即包裹于其中。一个二十面体对称结构包含三种旋转对称方式：3-重、2-重、5-重对称(3-, 2-, 5-fold symmetry)。即这个对称立体结构有穿过病毒颗粒相对两面中心点的3-重对称轴，壳粒绕3-重对称轴120°旋转三次复位，构成三角面；有2-重对称轴（棱），壳粒绕2-重对称轴180°旋转二次复位，形成两个相交三角面；还有穿过两个相对顶点的5-重对称轴，壳粒绕5-重对称轴72°旋转五次复位，构成五聚体（pentamer）。因此，二十面体对称型衣壳由20个等边三角面所组成，其中每2个三角面相交形成棱边，共有30条棱边；每5个三角面相接，聚成12个顶点。

在一些优选实施方式中，所述衣壳蛋白包括：

如SEQ ID No:2所示的氨基酸序列；

与SEQ ID No:2具有90%以上序列一致性, 以及具有SEQ ID No:2所示的氨基酸序列的功能的多肽片段。

具体的, b) 中的多肽片段具体指: 如 SEQ ID No: 2 所示的氨基酸序列经过取代、缺失或者添加一个或多个(具体可以是 1-50、1-30 个、1-20 个、1-10 个、1-5 个、1-3 个、1 个、2 个、或 3 个) 氨基酸而得到的, 或者在 N-末端和/或 C-末端添加一个或多个(具体可以是 1-50 个、1-30 个、1-20 个、1-10 个、1-5 个、1-3 个、1 个、2 个、或 3 个) 氨基酸而得到的, 且具有氨基酸序列如 SEQ ID No: 2 所示的多肽片段的功能的多肽片段, 所述 b) 中的氨基酸序列可与 SEQ ID No: 2 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%以上的序列一致性。

在一些优选实施方式中, 所述衣壳蛋白的编码基因的核酸序列包含如SEQ ID No:1所示的核苷酸序列, 优选地, 所述衣壳蛋白的编码基因的核酸序列如 SEQ ID No:1所示。在一些优选实施方式中, 所述衣壳蛋白的编码基因的核酸序列包含与 SEQ ID No: 1 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%以上的序列一致性的核苷酸序列。

本发明还提供了一种核酸, 所述核酸编码如上所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白。

本发明还提供了一种构建体, 所述构建体含有上述的核酸。所述构建体通常可以通过将上述核酸插入合适的表达载体中构建获得, 本领域技术人员可选择合适的表达载体。

本发明还提供了一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含上述的构建体或基因组中整合有外源的上述核酸, 或所述宿主细胞包含上任一项所述的融合型腺相关病毒。

作为适当宿主细胞的代表性示例, 可举例哺乳动物细胞(如CHO或COS)、植物细胞、人细胞(人胚胎肾细胞如HEK293FT)、细菌细胞(如大肠杆菌、链霉菌属、鼠伤寒沙门氏菌)、真菌细胞(如酵母)、昆虫细胞(如Sf9)等。本领域技术人员根据本文教导能够选择合适的宿主。优选地, 所述宿主细胞是动物细胞, 且更优选是人细胞。宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞, 即直接从生物体(如人)中分离。该宿主细胞可以是粘附性细胞或悬浮的细胞, 即悬液形式生长的细胞。

本发明还提供了一种融合型腺相关病毒，所述融合型腺相关病毒含有如上任一项所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白。

进一步地，所述融合型腺相关病毒还包括编码目的产物的异源核苷酸序列，所述编码目的产物的异源核苷酸序列可以是各种衣壳蛋白能包裹携带的。上述编码目的产物的异源核苷酸序列通常可以是构建体，所述构建体通常可以含有编码目的产物的核酸。所述构建体通常可以通过将编码目的产物的核酸插入合适的表达载体中构建获得，本领域技术人员可选择合适的表达载体，例如，上述表达载体可以是包括但不限于pAAV-CAG、pAAV-TRE、pAAV-EF1a、pAAV-GFAP promoter、pAAV-Lgr5 promoter、pAAV-Sox2 promoter表达载体等。本发明中，当所述融合型腺相关病毒编码目的产物的异源核苷酸序列时，所述融合型腺相关病毒含有衣壳，所述病毒载体携有编码基因产物的转基因，所述转基因受指导其在宿主细胞内表达的调控序列的调控；在一些优选实施方式中，所述衣壳蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

进一步地，所述目的产物可以为核酸或蛋白质，所述核酸包括但不限于是小向导RNA(sgRNA)、干扰RNA(RNAi)等，所述蛋白质编码基因包括但不限于是Prestin、Atoh1。

所述融合型腺相关病毒可以作为载体材料，将外源的基因导入受试个体的细胞中，相比于腺相关病毒如AAV-ie，所述融合型腺相关病毒可以特异性感染幼年个体的支持细胞，特异性感染成年个体的内毛细胞。

本发明还提供了一种使用如上所述的融合型腺相关病毒转化获得的工程化宿主细胞。所述工程化宿主细胞包含上述融合型腺相关病毒。所述宿主细胞可以是真核细胞和/或原核细胞。

作为适当宿主细胞的代表性示例，可举例哺乳动物细胞（如CHO或COS）、植物细胞、人细胞（人胚胎肾细胞如HEK293FT）、细菌细胞（如大肠杆菌、链霉菌属、鼠伤寒沙门氏菌）、真菌细胞（如酵母）、昆虫细胞（如Sf9）等。本领域技术人员根据本文教导能够选择合适的宿主。优选地，所述宿主细胞是动物细胞，且更优选是人细胞。宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞，即直接从生物体（如人）中分离。该宿主细胞可以是粘附性细胞或悬浮的细胞，即悬液形式生长的细胞。

本发明还提供了一种融合型腺相关病毒载体系统，所述载体系统包含包装质

粒，所述包装质粒中包含如上所述的核酸或核酸片段。

进一步地，所述包装质粒中还包含腺相关病毒的rep基因片段。其中所述rep基因片段包含内含子，所述内含子包含转录终止序列。

进一步地，所述腺相关病毒载体系统还包括表达质粒，所述表达质粒包含负责编码目的产物的异源核苷酸。进一步地，所述目的产物可以为核酸或蛋白质，所述核酸包括但不限于小向导RNA(sgRNA)、干扰RNA(RNAi)等，所述蛋白质编码基因包括但不限于Prestin、Atoh1。

进一步地，所述腺相关病毒载体系统还包括辅助病毒质粒或辅助病毒。进一步地，所述腺相关病毒载体系统还包括宿主细胞。

本发明将所述的包装质粒、表达质粒、辅助病毒质粒转入宿主细胞，其中的核酸序列全部整合于宿主细胞中，以生产所述融合型腺相关病毒。在一些实施方式中，所述核酸序列全部一起整合在所述宿主细胞的细胞基因组内的单一基因座处。在一些实施方式中，编码各种基因的核酸序列作为单独的表达盒存在，其防止任何重组以形成能够复制的病毒的风险；编码rep和cap基因的核酸序列存在于同一表达盒中。

本发明还提供了一种融合型腺相关病毒，由如上所述的融合型腺相关病毒载体系统经病毒包装获得。

本发明还提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含如上所述的融合型腺相关病毒以及药学上可接受的辅料。本发明所提供的融合型腺相关病毒或药物组合物等可以适应于合适的给药方式，可以是注射到耳蜗、眼睛、肌肉、神经系统或者血液循环系统。本领域技术人员可根据给药方式，选择合适的剂量。

所述辅料可以包括各种赋形剂和稀释剂，这些辅料本身并不是必要的活性成分，且施用后没有过分的毒性。合适的辅料对于本领域技术人员来说应该是熟知的。所述可接受的载体例如无菌水或生理盐水、稳定剂、赋形剂、抗氧化剂（抗坏血酸等）、缓冲剂（磷酸、枸橼酸、其它的有机酸等）、防腐剂、表面活性剂（PEG、Tween等）、螯合剂（EDTA等）、粘合剂等。而且，也可含有其它低分子量的多肽；血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白等蛋白质；甘氨酸、谷酰胺、天冬酰胺、精氨酸和赖氨酸等氨基酸；多糖和单糖等糖类或碳水化合物；甘露糖醇或山梨糖醇等糖醇。当制备用于注射的水溶液时，例如生理盐水、含有葡萄糖或其它的辅助药物的等渗溶液，如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇、氯化钠，

可并用适当的增溶剂例如醇（乙醇等）、多元醇（丙二醇，PEG等）、非离子表面活性剂（吐温80，HCO-50）等。

本发明所提供的药物组合物中，所述融合型腺相关病毒AAV-M9可以是单一有效成分，也可以与其他一种或多种对于听力损伤或眼科疾病治疗有用的活性组分进行组合，构成联合制剂。所述其他活性组分可以是其他各种可以用于治疗听力损伤或眼科疾病治疗的药物。组合物中活性组分的含量通常为安全有效量，所述安全有效量对于本领域技术人员来说应该是可以调整的，例如，所述融合型腺相关病毒AAV-M9和药物组合物的活性成分的施用量通常依赖于患者的体重、应用的类型、疾病的病情和严重程度，例如，作为活性成分的所述双功能化合物的施用量通常可以为1~1000 mg/kg/天、1~3 mg/kg/天、3~5 mg/kg/天、5~10 mg/kg/天、10~20 mg/kg/天、20~30 mg/kg/天、30~40 mg/kg/天、40~60 mg/kg/天、60~80 mg/kg/天、80~100 mg/kg/天、100~200 mg/kg/天、200~500 mg/kg/天、或大于500mg/kg/天。

本发明还提供了一种偶联物，所述偶联物包括如上所述的融合型腺相关病毒AAV-M9或连接的生物活性多肽。

本发明还提供了上述融合型腺相关病毒AAV-M9衣壳蛋白、核酸、构建体、融合型腺相关病毒AAV-M9、宿主细胞、融合型腺相关病毒载体系统、药物组合物或偶联物在制备预防和/或治疗疾病药物中的用途；优选地，在用于制备预防和/或基因治疗疾病的药物中的用途；所述疾病包括但不限于是听力障碍疾病、眼科疾病、炎症、肿瘤、代谢疾病、疼痛、神经退行性炎症疾病等中的一种或几种。

所述听力障碍疾病选自听力下降、耳聋、耳鸣。

所示眼科疾病包括但不限于干性 AMD、湿性 AMD 或脉络膜新生血管 (CNV)；例如可以选自年龄相关性黄斑变性 (AMD)，脉络膜新生血管 (CNV)，脉络膜新生血管膜(CNVM)，黄斑囊样水肿 (CME)，视网膜前膜 (ERM)和黄斑裂洞；近视相关的脉络膜新生血管，血管样条纹，视网膜脱落，糖尿病视网膜病变，糖尿病黄斑水肿 (DME)，视网膜色素上皮细胞(RPE)的萎缩性病变，视网膜色素上皮细胞(RPE)的肥厚性病变，视网膜静脉阻塞，脉络膜视网膜静脉阻塞，黄斑水肿；由于缺氧导致的角膜血管生成，翼状胬肉结膜，视网膜下水肿和视网膜内水肿；由于视网膜静脉阻塞导致的黄斑 水肿，色素性视网膜炎，斯特格氏

病，青光眼，炎性疾病，白内障，难治性异常现象，圆锥形角膜，早产儿视网膜病变，眼前部血管生成，角膜炎后角膜血管生成，角膜移植或角膜成形中的一种或几种；诸如RPE细胞相关基因突变导致的先天性黑朦（LCA）、色素视网膜变性、Stargardt疾病。在一些优选实施方式中，所述眼科疾病是指RPE层相关疾病，即可以通过将病毒感染RPE层，可以实现眼科疾病的基因治疗。

所述炎症选自皮肤炎症、脉管炎症、变态反应、自身免疫性疾病、纤维组织形成、硬皮病或移植物排斥；所述自身免疫性疾病选自风湿关节炎、系统性硬化症、系统性红斑狼疮、类口眼干燥综合征、多发性肌炎等中的一种或多种。

所述癌症选自淋巴瘤、血液瘤或实体瘤；具体选自肾上腺皮质癌、膀胱尿路上皮癌、乳腺癌、宫颈鳞状细胞癌、宫颈内腺癌、胆管癌、结肠腺癌、淋巴样淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、食管癌、多形性成胶质细胞瘤、头颈部鳞状细胞癌、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、急性髓性白血病、脑低度胶质瘤、肝细胞癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、间皮细胞癌、卵巢癌、胰腺癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、前列腺癌、直肠癌、恶性肉瘤、黑色素瘤、胃癌、睾丸生殖细胞肿瘤、甲状腺癌、胸腺癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、葡萄膜黑色素瘤、多发性骨髓瘤、急性淋系白血病、慢性淋系白血病、慢性髓性白血病、T细胞淋巴瘤、B细胞淋巴瘤肿瘤细胞中的一种或多种；优选地，所述肿瘤为结直肠癌和/或黑色素细胞瘤等中的一种或几种。

所述代谢疾病选自糖尿病，包括I型和II型糖尿病以及与糖尿病相关的疾病和病症；所述代谢性疾病包括但不限于动脉粥样硬化，心血管疾病，肾病，神经病，视网膜病， β -细胞机能障碍，血脂异常，高血糖，胰岛素抵抗、慢性阻塞性肺病等中的一种或几种。

在一些更优选实施方式中，所述基因治疗是指听力障碍疾病的治疗。所述融合型腺相关病毒或药物组合物可通过将目的产物递送至个体的毛细胞和/或支持细胞以实现听力障碍疾病的治疗。

本发明所述融合型腺相关病毒AAV-M9、宿主细胞、载体系统、药物组合物或偶联物在用于将目的产物递送至个体的毛细胞和/或支持细胞中的用途中，所述目的产物递送可以是非诊断治疗目的的，例如，可以是体外的，对离体的毛细胞和/或支持细胞进行目的产物递送。所述毛细胞通常包括外毛细胞和/或内毛细胞；优选地，所述毛细胞为成年个体内毛细胞。

进一步地，所述目的产物为核酸或蛋白质，所述核酸可以是小向导RNA(sgRNA)、干扰RNA(RNAi)等。

本发明中，所述听力障碍疾病可以由环境因素引起的耳蜗损伤导致的。因此，本发明还提供了上述融合型腺相关病毒在治疗个体中环境因素导致的听力障碍疾病的药物中的用途。

进一步地，所述听力障碍疾病为毛细胞和/或支持细胞相关疾病。在一些优选实施方式中，对于幼年个体，所述听力障碍疾病优选为支持细胞相关疾病。在一些优选实施方式中，对于成年个体，所述听力障碍疾病优选为内毛细胞相关疾病。在一些优选实施方式中，所述听力障碍疾病通过诱导内毛细胞再生进行预防或治疗。在另一优选实施方式中，所述听力障碍疾病通过过表达Wnt2b和Atoh1以诱导内毛细胞再生进行预防或治疗。

进一步地，所述听力障碍疾病为基因缺陷、环境损伤或衰老的相关疾病，例如，可以是基因突变等所导致的相关疾病，再例如，可以是噪声所致的、药物所导致的相关疾病，再例如，可以是衰老所导致的相关疾病。

进一步地，听力障碍疾病可以为细胞损伤等的相关疾病，具体可以是耳蜗毛细胞损伤、支持细胞损伤等，更具体可以是基因突变导致的耳蜗毛细胞损伤、基因突变导致的支持细胞损伤等、噪声所致的细胞损伤、药物所导致的细胞损伤或者衰老所导致的细胞损伤。

进一步地，所述融合型腺相关病毒作为递送目的产物的载体。

本发明还提供了一种治疗听力障碍疾病的方法，所述方法包括向有此需要的对象给予有效量的本发明所述的融合型腺相关病毒、本发明所述宿主细胞、载体系统或药物组合物或偶联物。通常，医师都可确定对单个患者而言最适用的实际剂量且其会根据特定个体的年龄、体重和反应而变化。

在本发明中，可向患者给予本发明的融合型腺相关病毒或宿主细胞或载体系统或药物组合物。本领域技术人员能够确定适当的给药方式和剂量。

通过本发明所述融合型腺相关病毒递送一种或多种治疗基因，可单独使用或与其他治疗方法或治疗组分联用。

本发明的融合型腺相关病毒用于感染细胞，从而将基因和/或连接的（例如但不限于，共价连接的）生物活性多肽递送至细胞。因此，本发明提供了一种将转基因递送至细胞的方法，所述方法通过使一个或多个本发明的融合型腺相关病

毒或偶联物至细胞来感染细胞，其中所述融合型腺相关病毒或偶联物包含一个或多个转基因。

本发明还提供了产生稳定的融合型腺相关病毒载体的生产细胞系的方法，其包括：

将如本文所定义的融合型腺相关病毒载体引入哺乳动物宿主细胞的培养物中；和在所述培养物内选择具有在整合至所述哺乳动物宿主细胞的内源染色体中的载体上编码的核酸序列的哺乳动物宿主细胞。

所述AAV载体生产细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方式中，所述哺乳动物细胞选自HEK293细胞、CHO细胞、Jurkat细胞、K562细胞、PerC6细胞、HeLa细胞或其衍生物。在一些实施方式中，所述哺乳动物宿主细胞是HEK293细胞，或源自HEK293细胞。在一些实施方式中，所述HEK293细胞是HEK293T细胞。

AAV的各种血清型的基因组序列以及天然ITR、Rep蛋白和衣壳蛋白的序列是本领域中已知的。此类序列可见于文献中或公共数据库诸如GenBank中。其公开内容通过引用并入本文用于AAV核酸和氨基酸序列。

本发明化合物及其应用中，当所述融合型腺相关病毒与其他治疗剂联用时，所述活性化合物与其他治疗剂共同给予。“共同给予”表示在同一制剂中或在两种不同制剂中经由相同或不同途径同时给予，或通过相同或不同途径顺次给予。“顺次”给予表示在两种或多种不同化合物的给药之间具有以秒、分钟、小时或天计的时间差异。

在某些实施方式中，本发明的融合型腺相关病毒及其方法可用于预防听力损伤，可作为预防性治疗方法在听力损伤之前施用或在接触易造成听力损伤的环境后的一段时间后施用。

除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。

术语“载体”指含有多肽或与多肽结合并可用于介导多肽递送至细胞的大分子或大分子的联合体。说明性的载体包括，例如质粒、病毒载体、脂质体或其它基因递送载体。

术语“AAV”是腺相关病毒的缩写，可用于指病毒自身或其衍生物。

术语“重组AAV载体”指含有异源性多核苷酸序列的AAV载体，通常是用于

遗传性转化细胞的感兴趣的序列。总体上，异源多核苷酸的两侧连接有至少一条，一般是两条AAV末端反向重复序列(ITR)。

术语“AAV病毒”或“AAV病毒颗粒”或“AAV载体颗粒”指至少含有一种AAV衣壳蛋白和一种包裹的多核苷酸的AAV载体的病毒颗粒。

术语“包装”指导致AAV颗粒装配和包裹的一系列胞内过程。

术语AAV “rep”和“cap”基因指编码腺相关病毒的复制和包裹蛋白的多核苷酸序列。文中AAV rep和cap指AAV“包装基因”。

术语AAV的“辅助病毒”指能使AAV被哺乳动物细胞复制和包装的病毒。各种这样的AAV辅助病毒是本领域已知的，包括腺病毒、疱疹病毒和痘病毒(例如牛痘)。

术语“感染性”病毒或病毒颗粒是含有能将多核苷酸成分递送进该病毒种类具有嗜性的细胞。该术语无需暗示病毒有任何复制能力。

术语“生产细胞”是指具有稳定整合至宿主细胞基因组中的AAV包装基因(rep和cap基因)、所需的辅助病毒基因和重组AAV载体的DNA基因组(例如，由两个AAV反向末端重复(ITR)侧接的目标转基因)的细胞系。

术语“包含”、“含有”等应理解为是包括性的意思，而没有排他性或穷尽的意思；即“包括但不限于”的意思。

术语“个体”通常包括人类、非人类的灵长类，如哺乳动物、狗、猫、马、羊、猪、牛等，其可因利用所述制剂、试剂盒或联合制剂进行治疗而获益。

术语“治疗有效量”通常指一用量在经过适当的给药期间后，能够达到治疗如上所列出的疾病的效果。

术语“治疗性”和“预防性”应理解为其最宽的意义。术语“治疗性”不一定暗示哺乳动物接受治疗直至完全恢复。类似地，“预防性”不一定表示对象最终不会感染疾病病症。因此，治疗和预防包括缓解具体病症的症状或防止或降低具体病症产生的风险。术语“预防”可理解为降低具体病症发作的严重程度。治疗也可降低已有病症的严重程度或急性发作的频率。

本发明中，进行治疗性或预防性治疗的对象或个体优选哺乳动物，例如但不限于人、灵长类、牲畜(如绵羊、牛、马、驴、猪)、宠物(如狗、猫)、实验室试验动物(如小鼠、家兔、大鼠、豚鼠、仓鼠)或被捕获的野生动物(如狐狸、鹿)。所述对象优选灵长类。所述对象最优选人。

在进一步描述本发明具体实施方式之前，应理解，本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案；还应当理解，本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案，而不是为了限制本发明的保护范围；在本发明说明书和权利要求书中，除非文中另外明确指出，单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

当实施例给出数值范围时，应理解，除非本发明另有说明，每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义，本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外，根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载，还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

除非另外说明，本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明。

实施例1. 新型腺相关病毒AAV-M9（又称为代号AAV-WM01）的获得

a. DNA家族改组文库的构建

以在人和非人灵长类身上发现的13种AAV血清型（AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13）的衣壳序列作为亲本进行DNA家族改组。将亲本衣壳序列按等摩尔比混合共4 μ g用于DNA家族改组，在25°C下用0.04U的DNase I处理30秒，把完整的亲本衣壳序列随机打断成不同长度的片段。回收纯化100-500 bp大小的DNA片段，取500 ng进行无引物PCR使其延伸成完整的嵌合衣壳序列。扩增得到足够的嵌合体衣壳序列后，把嵌合体衣壳序列重组到含有AAV2 Rep基因和末端重复序列的文库载体上。将重组产物电击转化到感受态细胞中，取部分菌液涂板，对平板上长出的菌落进行计数，并通过测序进行鉴定以确定其多样性。剩余菌液接入500 mL培养基中37°C培养过夜，次日提取的质粒即是DNA家族改组文库质粒。DNA家族改组文库体内筛选流程如图1所示。

b. DNA家族改组文库病毒的包装

将得到的DNA家族改组文库质粒和腺病毒辅助质粒pHelper以合适的量共转于HEK-293T细胞中，pHelper质粒（质粒全序列同AAV-ie专利文献CN110437317A的SEQ ID NO: 12所示）。每个15 cm皿的细胞仅用20 ngDNA家族改组文库质粒进行转染。

转染72小时后收集培养基，再48小时后收集细胞和培养基。用110 mM柠檬酸盐缓冲液（pH4.2）裂解细胞释放出AAV，离心后含病毒的上清液用1/5体积的2M HEPES中和，再加入终浓度8%的聚乙二醇8000和500 mM氯化钠，4℃度过夜使病毒沉淀。离心后，将沉淀重新悬浮在含有2 mM Mg^{2+} 的PBS中，并加入终浓度100 U/mL的benzonase，在37℃消化核酸至少1小时。用碘克沙醇密度梯度溶液（15%、25%、40%和60%）超速离心纯化病毒悬液，然后使用AAV2 Rep基因特异性引物（WPRE-F:GTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTG (SEQ ID NO.8); WPRE-R:GGCGATGAGTTCCGCCGTGGC(SEQ ID NO:9)），通过qPCR测定病毒滴度。

c. 体内筛选

通过在体注射到小鼠耳蜗中，筛选可以高效感染耳蜗细胞的新型腺相关病毒。

将大约 $1E+10\sim 11$ vg文库病毒通过圆窗注射到出生2-3天小鼠耳蜗内，注射7~10天后，小鼠被安乐死，收集耳蜗。此时文库病毒中可以感染耳蜗细胞的AAV进入到细胞内，未能感染细胞的AAV被免疫系统和循环系统清除。因此，本发明可以从组织细胞的总DNA中回收出感染细胞的AAV的衣壳基因。用Trizol提取组织总DNA，采用PCR方法从总DNA中回收AAV的衣壳基因，完成对AAV文库的一次体内筛选。将PCR得到的片段克隆到文库载体中，便得到下一轮文库质粒，再次包装成病毒，可以重复进行体内筛选过程，3~5轮筛选后，将回收得到的AAV的衣壳基因进行三代测序。这样就得到了一些在耳蜗细胞中富集的AAV突变体衣壳基因的信息，其中丰度高的一些突变体AAV理论上能对耳蜗细胞进行高效地转导。其中，获得的如SEQ ID NO:1所示的AAV-M9为其中一个高丰度突变体。

测序结果表明，AAV-M9由AAV1、2、6、7嵌合而成，并包含一个S430I突变。通过与其亲本血清型氨基酸序列比对，使用其VP3区域的残基生成AAV-M9衣壳的3D同源建模。衣壳的内表面(B)和外表面(C)都显示出来自四个亲本AAV衣壳片段的存在，并表明AAV-M9的三重对称轴突起是由AAV1和AAV6构成，

AAV2、6、7组装成了五重对称轴的通道，AAV6在二重对称轴处形成凹陷（图2）。所述AAV-M9的编码基因的序列如SEQ ID No:1所示，氨基酸序列如SEQ ID No:2所示。计算机模拟的AAV-M9结构图如图2所示。

实施例2 新型腺相关病毒AAV-M9-CMV-EGFP在听力系统的活体验证

2.1 腺相关病毒AAV-M9-CMV-EGFP的构建

上述测序结果中得到的AAV-M9的编码基因的序列由苏州金唯智生物科技有限公司进行合成，得到AAV-M9的Rep-Cap质粒，即pAAV-M9。将得到的AAV-M9的Rep-Cap质粒pAAV-M9，表达一个绿色荧光蛋白EGFP的基因组质粒pAAV-CMV-EGFP，pHelper质粒以合适的量共转于HEK-293T细胞中，采用碘二烷醇梯度超高速离心纯化AAV病毒，测量病毒滴度在 $1E+12$ - $1E+13$ GC/mL为合适浓度，放置-80℃备用。

2.2 腺相关病毒AAV-M9-CMV-EGFP对新生小鼠的感染特性

将相同滴度的AAV-ie和AAV-M9-CMV-EGFP通过圆窗注射到出生2-3天C57BL/6J小鼠的耳蜗中。病毒经10-14天充分感染表达EGFP后，脱颈椎处死小鼠，取出注射耳的耳蜗，放置4%多聚甲醛中，室温固定2小时。用PBS清洗三次，每次5分钟。再用0.5 mM EDTA脱钙处理，室温浸泡2小时，使耳蜗软化。在体式显微镜下用眼科手术刀解剖基底膜。通过免疫荧光染色，利用anti-Myo7a抗体标记毛细胞，制成耳蜗样品。通过激光共聚焦扫描显微镜对其进行成像，病毒感染的细胞其细胞核中会表达绿色荧光蛋白。激发光波长分别为488 nm，647 nm。活体检测结果如图3a，3b所示。图3a为注射AAV-ie和AAV-M9-CMV-EGFP病毒的毛细胞层面耳蜗铺片图；图3b为注射AAV-ie和AAV-M9-CMV-EGFP病毒的支持细胞层面耳蜗铺片图；其中，紫色所示为一种毛细胞的标记蛋白Myo7a，绿色所示为病毒感染细胞表达的荧光蛋白，图3c为AAV-ie和AAV-M9-CMV-EGFP病毒对毛细胞和Dieters Cells（一种支持细胞）的统计数据，结果表明AAV-M9-CMV-EGFP在幼年鼠的耳蜗中特异感染支持细胞，而对毛细胞不具有感染特性。Dieters Cells被认为是最具有再生潜力的支持细胞，因此AAV-M9在支持细胞的基因治疗和毛细胞再生中有很大的潜力。

2.3 腺相关病毒AAV-M9-CMV-EGFP对新生小鼠的安全性

将AAV-M9-CMV-EGFP通过圆窗注射到出生2-3天C57BL/6J小鼠的耳蜗中。病毒经10-14天充分表达后，脱颈椎处死小鼠，取出注射耳的耳蜗，同时取相同年龄的C57BL/6J小鼠的耳蜗作为对照，将耳蜗放置4%多聚甲醛中，室温固定2小时。用PBS清洗三次，每次5分钟。再用0.5 mM EDTA脱钙处理，室温浸泡2小时，使耳蜗软化。在体式显微镜下用眼科手术刀解剖基底膜。通过免疫荧光染色，利用anti-Myo7a 抗体标记毛细胞，制成耳蜗样品。通过激光共聚焦扫描显微镜对其进行成像，病毒感染的细胞其细胞核中会表达绿色荧光蛋白。活体检测结果如图4a, 4b所示。统计结果表明，注射AAV-M9病毒的小鼠耳蜗细胞数量和形态与正常小鼠一致，表明AAV-M9病毒对新生小鼠没有毒性。

2.4 腺相关病毒AAV-M9-CMV-EGFP对成年小鼠的感染特性

将AAV-ie和AAV-M9-CMV-EGFP通过后半规管注射到出生30天C57BL/6J小鼠的耳蜗中，病毒经10-14天充分感染表达EGFP后，脱颈椎处死小鼠，取出注射耳的耳蜗，放置4%多聚甲醛中，室温固定2小时。用PBS清洗三次，每次5分钟。再用0.5 mM EDTA脱钙处理，室温浸泡过夜，使耳蜗软化。在体式显微镜下用眼科手术刀解剖基底膜。通过免疫荧光染色，利用anti-Myo7a 抗体标记毛细胞，制成耳蜗样品。通过激光共聚焦扫描显微镜对其进行成像，病毒感染的细胞其细胞核中会表达绿色荧光蛋白。激发光波长分别为488 nm, 647 nm。活体检测结果如图5a所示。该图为注射AAV-ie和AAV-M9-CMV-EGFP 病毒的耳蜗铺片图。紫色所示为一种毛细胞的标记蛋白Myo7a，绿色所示为病毒感染细胞表达的荧光蛋白，结果表明AAV-M9在成年鼠的耳蜗中特异感染内毛细胞，而对外毛细胞不具有感染特性，统计结果显示，AAV-M9对成年小鼠外毛细胞的感染率为 $0.33\% \pm 0.333$ ，AAV-ie对成年小鼠外毛细胞的感染率为 $56.33\% \pm 1.202$ ，如图5b所示；AAV-M9对成年小鼠内毛细胞的感染率为 $98.67\% \pm 0.667$ ，AAV-ie对成年小鼠内毛细胞的感染率为 $100\% \pm 0$ ，如图5c所示。AAV-M9在成年鼠的耳蜗中对内毛细胞的感染具有高效性和特异性，可用于内毛细胞的基因治疗。

2.5 腺相关病毒AAV-M9-CMV-EGFP对成年小鼠的安全性

将AAV-M9-CMV-EGFP通过圆窗注射到出生30天C57BL/6J小鼠的耳蜗中。病毒经10-14天充分表达后，脱颈椎处死小鼠，取出注射耳的耳蜗，同时取相同年龄的C57BL/6J小鼠的耳蜗作为对照，将耳蜗放置4%多聚甲醛中，室温固

定2小时。用PBS清洗三次，每次5分钟。再用0.5 mM EDTA脱钙处理，室温浸泡2小时，使耳蜗软化。在体式显微镜下用眼科手术刀解剖基底膜。通过免疫荧光染色，利用anti-Myo7a 抗体标记毛细胞，制成耳蜗样品。通过激光共聚焦扫描显微镜对其进行成像，病毒感染的细胞其细胞核中会表达绿色荧光蛋白。活体检测结果如图6a, 6b所示。统计结果表明，注射AAV-M9病毒的小鼠耳蜗细胞数量和形态与正常小鼠一致，表明AAV-M9病毒对成年小鼠没有毒性。

实施例3 腺相关病毒AAV-M9-CMV-EGFP 在视觉系统的活体验证

将麻醉的成年小鼠放在显微镜下，在眼球上滴1-2滴托吡卡胺眼药水使瞳孔扩散。左手持弯头镊子从视神经盘处托起并固定眼球，右手持1 mL注射器或玻璃针戳破角膜以减小眼内压力。用纸巾轻拭去眼周液体。左手持镊子固定眼球，右手持吸取2 μ L病毒的玻璃针，在角巩膜后缘与虹膜平面呈50°进针，缓慢注入实施例2中2.1构建的腺相关病毒AAV-M9-CMV-EGFP，滴度为 1.5×10^{13} gc/mL。注射完，玻璃针停留30s再慢慢拔出。在伤口处抹上红霉素软膏后，小鼠放到41°C水浴锅中的鼠笼上保温，待小鼠苏醒后移至小鼠房饲养。10天后，取眼杯。脊椎脱臼法处死小鼠，取下眼球后用1mL注射器扎破角膜，放出房水。眼球放在装有PBS溶液的小培养皿中，在显微镜下解剖。尖头镊夹住角膜，眼科剪从角膜的伤口中戳进去，圆周剪下角膜，用镊子取出晶状体，视神经保留约2 mm。眼杯放在4% PFA中固定12小时，4°C。已固定的眼杯放在30%蔗糖中脱水12小时，4°C。冷冻切片后，在荧光显微镜下挑出效果较好、组织完整的切片进行染色。免疫荧光结果表明，AAV-M9可以感染RPE层。活体检测结果如图7所示。该图为注射AAV-M9-CMV-EGFP病毒的视网膜切片图。绿色所示为病毒感染所表达出的荧光蛋白，蓝色为细胞核，结果表明同样AAV-M9-CMV-EGFP对视网膜RPE层有较高的感染，可以用于眼科基因治疗。

实施例4 AAV-M9-CMV-EGFP在非人灵长类动物上的眼部转染特征

本试验对成年健康雄性恒河猴进行双眼玻璃体单次注射50 μ L的腺相关病毒AAV-M9- CMV-EGFP，病毒滴度为 3.89×10^{12} vg/mL。病毒注射后第63天（D63），将动物安乐死后摘取眼球，对视网膜和脉络膜进行病理制片和染色，分析眼部组织转染特征。结果见图8，GFP表达主要在视网膜视杆视锥层（RCL, rod and cone layer）和色素上皮层（RPE, pigment epithelium layer），部分脉络膜

和/或巩膜处血管内皮细胞也有表达。

本发明融合型腺相关病毒AAV-M9及其在耳病或眼科疾病的预防和/或治疗中的应用有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

以上的实施例是为了说明本发明公开的实施方案，并不能理解为对本发明的限制。此外，本文所列出的各种修改以及发明中方法、组合物的变化，在不脱离本发明的范围和精神的前提下对本领域内的技术人员来说是显而易见的。虽然已结合本发明的多种具体优选实施例对本发明进行了具体的描述，但应当理解，本发明不应仅限于这些具体实施例。事实上，各种如上所述的对本领域内的技术人员来说显而易见的修改来获取发明都应包括在本发明的范围内。

权 利 要 求 书

1. 一种融合型腺相关病毒衣壳蛋白，其特征在于，所述衣壳蛋白包含来自血清型AAV1、AAV2、AAV6和AAV7的肽段的融合肽段或其变体。

2. 如权利要求1所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白，其特征在于，所述融合肽段包含依次连接的第一肽段、第二肽段、第三肽段、第四肽段和第五肽段；所述第一肽段包含来自AAV1的肽段，所述第二肽段包含来自AAV7的肽段，所述第三肽段包含来自AAV2的肽段，所述第四肽段来自包含AAV1的肽段，所述第五肽段来自包含AAV6的肽段。

3. 如权利要求1所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白，其特征在于，所述第一肽段包含SEQ ID No:3所示的氨基酸片段，所述第二肽段包含SEQ ID No: 4所示的氨基酸片段，所述第三肽段包含SEQ ID No: 5所示的氨基酸片段，所述第四肽段包含SEQ ID No: 6所示的氨基酸片段，所述第五肽段包含SEQ ID No: 7所示的氨基酸片段。

4. 如权利要求1所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白，其特征在于，包括以下至少任一项：

- 1) 所述血清型AAV1和AAV6的肽段组装成所述衣壳蛋白的三重对称轴突起；
- 2) 所述血清型AAV2、AAV6、AAV7的肽段组装成所述衣壳蛋白的五重对称轴的通道；
- 3) 所述血清型AAV6的肽段在所述衣壳蛋白的二重对称轴处形成凹陷。

5. 如权利要求1所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白，其特征在于，所述衣壳蛋白包括：

- a) 如SEQ ID No:2所示的氨基酸序列；
- b) 与SEQ ID No: 2具有90%以上序列一致性，以及具有SEQ ID No:2所示的氨基酸序列的功能的多肽片段。

6. 一种核酸，其特征在于，所述核酸编码如权利要求1~5任一项所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白。

7. 一种构建体，所述构建体含有如权利要求6所述的核酸。

8. 一种融合型腺相关病毒，其特征在于，所述融合型腺相关病毒的衣壳结构

含有如权利要求1~5任一项所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白。

9. 如权利要求8所述的融合型腺相关病毒，其特征在于，所述融合型腺相关病毒还包括编码目的产物的异源核苷酸序列；优选地，所述目的产物为核酸或者蛋白质；更优选地，所述核酸包括小向导RNA或干扰RNA。

10. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包含如权利要求7所述的构建体，或所述宿主细胞的基因组中整合有外源的如权利要求6所述的核酸，或所述宿主细胞包含如权利要求1~5任一项所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白，或所述宿主细胞由如权利要求8或9所述的融合型腺相关病毒转化得到。

11. 一种融合型腺相关病毒载体系统，其特征在于，包含包装质粒，所述包装质粒中包含权利要求6所述的核酸。

12. 如权利要求11所述的融合型腺相关病毒载体系统，其特征在于，所述包装质粒中还包含腺相关病毒的rep基因片段。

13. 如权利要求12所述的融合型腺相关病毒载体系统，其特征在于，所述腺相关病毒载体系统还包括表达质粒，所述表达质粒包含负责编码目的产物的异源核苷酸；优选地，所述目的产物为核酸或者蛋白质；更优选地，所述核酸包括小向导RNA或干扰RNA。

14. 如权利要求11-13任一项所述的融合型腺相关病毒载体系统，其特征在于，所述腺相关病毒载体系统还包括辅助病毒质粒或辅助病毒，所述腺相关病毒载体系统还包括宿主细胞。

15. 一种融合型腺相关病毒，由权利要求11-14任一项所述的融合型腺相关病毒载体系统经病毒包装获得。

16. 一种药物组合物或偶联物，其特征在于，所述药物组合物包含如权利要求8、9和15任一项所述的融合型腺相关病毒以及药学上可接受的辅料；所述偶联物包含如权利要求8、9和15任一项所述的融合型腺相关病毒以及其上连接的生物活性多肽。

17. 如权利要求1~5任一项所述的融合型腺相关病毒衣壳蛋白、如权利要求6所述的核酸、如权利要求7所述的构建体、如权利要求8、9和15任一项所述的融合型腺相关病毒、如权利要求10所述的宿主细胞、如权利要求11-14任一项所述

的融合型腺相关病毒载体系统、或如权利要求16所述的药物组合物或偶联物在制备用于预防和/或治疗疾病的药物中的用途。

18. 如权利要求17所述的用途，其特征在于，所述疾病选自听力障碍疾病、眼科疾病、炎症、肿瘤、代谢疾病、疼痛、神经退行性炎症疾病中的一种或几种。

19. 如权利要求18所述的用途，其特征在于，所述眼科疾病为RPE层相关疾病，诸如干性 AMD、湿性 AMD 或脉络膜新生血管 (CNV)；诸如可以选自年龄相关性黄斑变性 (AMD)、脉络膜新生血管 (CNV)、脉络膜新生血管膜(CNVM)，黄斑囊样水肿 (CME)、视网膜前膜 (ERM)和黄斑裂洞；近视相关的脉络膜新生血管、血管样条纹、视网膜脱落、糖尿病视网膜病变、糖尿病黄斑水肿 (DME)、视网膜色素上皮细胞(RPE)的萎缩性病变、视网膜色素上皮细胞(RPE)的肥厚性病变、视网膜静脉阻塞、脉络膜视网膜静脉阻塞、黄斑水肿；由于缺氧导致的角膜血管生成、翼状胬肉结膜、视网膜下水肿和视网膜内水肿；或由于视网膜静脉阻塞导致的黄斑水肿、色素性视网膜炎、斯特格氏病、青光眼、炎症性疾病、白内障、难治性异常现象、圆锥形角膜、早产儿视网膜病变、眼前部血管生成、角膜炎后角膜血管生成、角膜移植或角膜成形中的一种或几种；诸如RPE细胞相关基因突变导致的先天性黑朦 (LCA)、色素视网膜变性、Stargardt疾病。

20. 如权利要求17所述的用途，其特征在于，所述药物用于基因治疗疾病。

21. 如权利要求17所述的用途，其特征在于，包括以下至少一项：

- 1) 所述听力障碍疾病是指幼年个体耳蜗支持细胞相关听力障碍疾病；
- 2) 所述听力障碍疾病是指成年个体耳蜗内毛细胞相关听力障碍疾病；
- 3) 所述药物用于诱导内毛细胞再生；
- 4) 所述眼科疾病为RPE层相关疾病；
- 5) 所述听力障碍疾病由耳蜗损伤导致；
- 6) 所述听力障碍疾病为细胞损伤的相关疾病；
- 7) 所述听力障碍疾病为由基因缺陷导致的相关疾病；
- 8) 所述听力障碍疾病为由环境因素导致的相关疾病；所述环境因素选自噪声或耳毒性药物；
- 9) 所述听力障碍疾病为由衰老导致的相关疾病。