

说明书

发明名称: 编码抗VEGF蛋白的核酸、
多核苷酸表达盒及重组腺相关病毒

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域/生物医药领域,具体而言,本发明涉及编码抗VEGF蛋白的核酸、多核苷酸表达盒及重组腺相关病毒及其相关应用。

背景技术

[0002] 新生血管的形成是许多疾病发展和扩散的关键所在。眼部的许多疾病都涉及血管发生,包括年龄相关性黄斑变性(AMD)、视网膜静脉阻塞(RVO)、糖尿病视网膜病变(DR)和病理性近视等。VEGF是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用。许多研究已证实如果VEGF表达过量就可以诱发病理性新生血管性眼病。由于VEGF信号传递对血管新生的重要性,阻断VEGF或VEGF受体从而达到抑制血管新生,对包括癌症、视网膜血管病变等与血管新生相关的疾病有着重要的治疗作用。在过去的十多年,诞生了一些用于治疗眼部新生血管性眼病的抗VEGF药物,如哌加他尼(Macugen)、贝伐珠单抗(Avastin)、雷珠单抗(Lucentis)、阿柏西普(Eylea)等。

[0003] 但是由于目前上市药物的半衰期较短,需要反复给药,增加了医生和患者的负担。因此,基因治疗手段由于具有药物的持续表达从而实现长时间的药效维持而被寄予期望,例如腺相关病毒载体(AAV)基因治疗工具。但是目前关于AAV的应用还存在一些挑战,例如剂量问题引起的注射部位刺激、免疫反应等,因此希望对AAV载体进行进一步的优化设计。

[0004] 发明内容

[0005] 为了解决上述问题,本发明对表达抗VEGF蛋白的编码序列进行了大量的优化,如密码子优化、CpG去除、编码序列区的内含子插入等,目的是为了提高抗VEGF蛋白表达水平。例如,在一些优选的实施方案中,所述编码序列经过密

密码子优化。本发明提出了密码子优化的编码序列，所述编码序列在不改变编码产物氨基酸序列基础上，采用本领域所公知的方法对密码子进行修饰，例如使用在靶细胞中高频表达的密码子替代低频表达的密码子。在一些优选的实施方案中，所述编码序列是去除了CpG的编码序列。改变CpG岛的组成或编码区的GC含量可能影响密码子使用偏好的选择。在另一些优选的实施方案中，所述编码序列是去除了CpG且经过密码子优化的编码序列。在一些优选的实施例中，本发明所述的编码抗VEGF蛋白的编码序列包括密码子优化和/或CpG去除和/或内含子插入。

- [0006] 本发明一方面在于提供一种核酸，所述核酸包含编码抗VEGF蛋白的编码序列，且所述编码序列经过密码子优化。
- [0007] 在一些实施例中，本发明所述的抗VEGF蛋白包含VEGF受体1的胞外结构域2和VEGF受体2的胞外结构域3。在某些实施例中，本发明所述的抗VEGF蛋白进一步包含VEGF受体2的胞外结构域4。在某些实施例中，本发明所述的抗VEGF蛋白还包含免疫球蛋白Fc片段(如人免疫球蛋白IgG1、IgG2或IgG4)。
- [0008] 在一些实施例中，本发明所述的抗VEGF蛋白包含VEGF受体1的胞外结构域2，VEGF受体2的胞外结构域3，和免疫球蛋白Fc片段。在另一些实施例中，本发明的抗VEGF蛋白包含VEGF受体1的胞外结构域2，VEGF受体2的胞外结构域3，VEGF受体2的胞外结构域4和免疫球蛋白Fc片段。
- [0009] 在一些具体的实施例中，本发明所述的抗VEGF蛋白包含SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2或与其任一序列具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的蛋白。
- [0010] 在一些具体的实施方案中，所述经过密码子优化的核酸包含SEQ ID NO: 7所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的核苷酸序列。
- [0011] 在一些优选的实施方案中，所述编码序列的核酸分子进一步去除了CpG。在一些实施例中，相比于未去除CpG的编码序列，可去除至少1个，2个，3个，4个，5个，6个，7个，8个，9个，10个，20个，30个，40个，50个CpG。在一些实施例中，相比于未去除CpG的编码序列，可去除至少10%，20%，30%，40

%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%的CpG。在一些优选的具体实施方案中,所述编码序列的核酸包含SEQ ID NO: 8所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的核酸序列。

- [0012] 在一些实施例中,本发明所述编码序列的核酸分子进一步包括内含子插入。在一些具体的实施例中,所述内含子选自: VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子、Chimeric内含子。在一些具体的实施例中,所述VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子、Chimeric内含子分别具有如SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 20所述的核苷酸序列。
- [0013] 在一些具体的实施方案中,所述的编码抗VEGF蛋白的编码序列同时经过密码子优化、CpG去除和内含子插入。在一些优选的实施方案中,所述编码抗VEGF蛋白的编码序列包含如SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性的核酸序列。
- [0014] 本发明的另一方面在于提供一种多核苷酸表达盒,其包含本发明所述的核酸和表达调控元件(其中如前所述,本发明所述的核酸包含编码抗VEGF蛋白的编码序列)。
- [0015] 在具体的实施方案中,本发明所述的多核苷酸表达盒,从5'到3'顺序包含:
- [0016] 1)5'ITR;
- [0017] 2)启动子;
- [0018] 3)内含子;
- [0019] 4)本发明前述的包含编码抗VEGF蛋白的核酸;
- [0020] 5)多聚腺苷酸化信号序列;
- [0021] 6)3'ITR。
- [0022] 所述启动子选自 β -肌动蛋白启动子(CBA)、巨细胞病毒启动子(CMV)、延伸因子1 α 启动子(EF1 α)、EFS启动子、NA65P启动子、MNT启动子、UB6启动子、CAG启动子、RPE65启动子、UBC启动子或视蛋白启动子,优选CBA、CMV、EF1 α 或CAG启动子。

- [0023] 所述内含子选自VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子、鸡 β -肌动蛋白内含子(Chicken β -action)、U12内含子、RHD内含子、PI内含子、MBL内含子等,优选VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子、鸡 β -肌动蛋白内含子。
- [0024] 所述多腺苷酸化信号包括猴空泡病毒40(SV40)、人生长激素(HGH)、牛生长激素(BGH)或 β -珠蛋白(RGB)。
- [0025] 在一些具体的实施方案中,所述包含编码抗VEGF蛋白的核酸编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或与其具有至少85%同源性的氨基酸序列。
- [0026] 在一些更具体的实施方案中,所述编码抗VEGF蛋白的核酸包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列。
- [0027] 在一些更具体的实施方案中,本发明所述的多核苷酸表达盒从5'到3'顺序包含:
- [0028] 1)5'ITR;
- [0029] 2)CBA启动子;
- [0030] 3)鸡 β -肌动蛋白内含子;
- [0031] 4)kozak序列;
- [0032] 5)编码抗VEGF蛋白的核酸,其中所述核酸编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或与其具有至少85%同源性的氨基酸序列;
- [0033] 6)RGB多聚腺苷酸化信号序列;
- [0034] 7)3'ITR。
- [0035] 在一些更具体的实施方案中,本发明所述的多核苷酸表达盒从5'到3'顺序包含:
- [0036] 1)5'ITR;
- [0037] 2)CBA启动子;
- [0038] 3)鸡 β -肌动蛋白内含子;
- [0039] 4)kozak序列;

- [0040] 5)编码抗VEGF蛋白的核酸，其中所述核酸包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列；
- [0041] 6)RGB多聚腺苷酸化信号序列；
- [0042] 7)3'ITR。
- [0043] 在一些具体的实施例中，所述多核苷酸表达盒中编码抗VEGF蛋白的核酸经过密码子优化。在一些更具体的实施例中，多核苷酸表达盒(编码抗VEGF蛋白的核酸经过密码子优化)从5'到3'包含SEQ ID NO:27所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的序列。
- [0044] 在一些具体的实施例中，所述多核苷酸表达盒中编码抗VEGF蛋白的核酸经过CpG去除。在一些更具体的实施例中，多核苷酸表达盒(编码抗VEGF蛋白的核酸经过密码子优化且CpG去除)从5'到3'包含SEQ ID NO:29所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的序列。
- [0045] 在一些具体的实施例中，所述多核苷酸表达盒中编码抗VEGF蛋白的核酸进一步包括内含子的插入。所述内含子示例性的包括但不限于VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子、Chimeric内含子。在一些优选的实施例中，所述编码抗VEGF蛋白的核酸包含VH4内含子的插入，所述多核苷酸表达盒从5'到3'包含SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO:31所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列。在一些优选的实施例中，所述编码抗VEGF蛋白的核酸包含SV40内含子的插入，所述多核苷酸表达盒从5'到3'包含SEQ ID NO: 23所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列。在一些优选的实施例中，所述编码抗VEGF蛋白的核酸包含Chimeric内含子的插入，所述多核苷酸表达盒从5'到3'包含SEQ ID NO: 24所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列。
- [0046] 在一些更具体的实施方案中，本发明所述的多核苷酸表达盒从5'到3'顺序包含：
- [0047] 1)5'ITR；
- [0048] 2)CBA启动子；

- [0049] 3)鸡 β -肌动蛋白内含子;
- [0050] 4)kozak序列;
- [0051] 5)编码抗VEGF蛋白的核酸,其中所述核酸编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或与其具有至少85%同源性的氨基酸序列;
- [0052] 6)SV40多聚腺苷酸化信号序列;
- [0053] 7)3'ITR。
- [0054] 在一些更具体的实施方案中,本发明所述的多核苷酸表达盒从5'到3'顺序包含:
- [0055] 1)5'ITR;
- [0056] 2)CBA启动子;
- [0057] 3)鸡 β -肌动蛋白内含子;
- [0058] 4)kozak序列;
- [0059] 5)编码抗VEGF蛋白的核酸,其中所述核酸包含SEQ ID NO:6或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列;
- [0060] 6)SV40多聚腺苷酸化信号序列;
- [0061] 7)3'ITR。
- [0062] 在一些更具体的实施例中,多核苷酸表达盒从5'到3'包含SEQ ID NO:33所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的序列。
- [0063] 本发明的另一方面在于提供一种质粒,所述质粒包含本发明前述的包含编码抗VEGF蛋白的核酸或或多核苷酸表达盒。
- [0064] 在一些优选的实施方案中,本发明所述的质粒具有如SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性的序列。
- [0065] 本发明的另一方面在于提供一种重组腺相关病毒(rAAV),所述重组腺相关病毒包括衣壳蛋白和本发明前述的多核苷酸表达盒。
- [0066] 在一些优选的实施方案中,所述衣壳蛋白为野生型或经过修饰的选自AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV

8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12任一项所述的衣壳蛋白。在一些更优选的实施方案中,所述衣壳蛋白是AAV8衣壳蛋白或经过修饰的AAV8衣壳蛋白。在一些优选的实施方案中,所述经过修饰的衣壳蛋白包括在位于亲本AAV8的第588~592位氨基酸处(所述亲本/野生型AAV8衣壳蛋白的第588~592位氨基酸为“QQNTA”)的约5-14个氨基酸的异源多肽取代,如多肽序列RGNQQNTARQ(SEQ ID NO:11)。

[0067] 本发明的另一方面在于提供一种宿主细胞,所述宿主细胞包含本发明前述的包含编码抗VEGF蛋白的核酸或或多核苷酸表达盒或质粒或重组腺相关病毒。

[0068] 本发明的另一个方面,在于提供一种药物组合物。所述药物组合物包括本发明的多核苷酸表达盒、质粒或重组病毒,和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,所述药物组合物包括本发明所述的重组病毒和药学上可接受的赋形剂。在一些实施例中,药物组合物被制备为玻璃体内注射、视网膜下注射、脉络膜上腔注射、静脉注射、肿瘤内注射或肌肉注射的制剂。

[0069] 本发明的另一个方面在于提供本发明所述的多核苷酸表达盒、质粒或重组病毒在制备用于治疗与VEGF有关的疾病的药物中的用途。在某些实施例中,所述与VEGF有关的疾病为眼部新生血管疾病。在某些实施例中,所述眼部新生血管疾病选自年龄相关性黄斑变性,糖尿病视网膜病变,糖尿病性黄斑水肿,视网膜中央静脉阻塞,视网膜分支静脉阻塞所致黄斑水肿,继发于视网膜静脉阻塞的黄斑水肿,息肉状脉络膜血管病变,极低视力的湿性年龄相关性黄斑变性,继发于病理性近视的脉络膜新生血管。

[0070] 本发明的另一方面在于提供一种治疗哺乳动物受试者中与VEGF有关的疾病的方法,所述方法包括将治疗有效量的包含本发明所述的多核苷酸表达盒、质粒或重组病毒递送至眼睛。在某些实施例中,所述与VEGF有关的疾病为眼部新生血管疾病。在某些实施例中,所述眼部新生血管疾病选自年龄相关性黄斑变性,糖尿病视网膜病变,糖尿病性黄斑水肿,视网膜中央静脉阻塞,视网膜分支静脉阻塞所致黄斑水肿,继发于视网膜静脉阻塞的黄斑水肿,息肉状脉络膜血管病变,极低视力的湿性年龄相关性黄斑变性,继发于病理性近视的脉络膜新生血管。

- [0071] 在一些实施例中，通过玻璃体内注射、视网膜下注射、脉络膜上腔注射、静脉注射、肿瘤内注射或肌肉注射本发明所述的重组病毒或药物组合物。
- [0072] 在一些实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E8/眼~E16/眼。在一些优选的实施方案中，所述所述重组腺相关病毒的给药剂量为5E11/眼~2E12/眼。在一些更优选的实施方案中，所述所述重组腺相关病毒的给药剂量为2E12/眼。
- [0073] 详细描述
- [0074] 在本发明中，下述术语具有如下定义。
- [0075] 本文所述的“多核苷酸表达盒”是指包括两个或多个功能性核苷酸序列并且彼此之间可操作性地连接。该核苷酸序列如表达调控元件、翻译起始序列、编码序列、终止序列等，通常核苷酸序列由DNA构成。
- [0076] 本文所述的“编码序列”是指对体内或体外基因产物进行编码的核苷酸序列。编码序列或基因可以对多肽或蛋白分子进行编码。
- [0077] 本文所述“启动子”指引导RNA聚合酶结合并且由此促进RNA合成的DNA序列。启动子和对应的蛋白质表达可以是普适性的(意指在细胞、组织和物种中具有强活性)或具有细胞特异性、组织特异性或物种特异性。
- [0078] 本文所述“内含子”指内含子可指可被转录但不被翻译的任何序列。在一些情况下，内含子可以指被转录并从细胞中的成熟RNA转录物中去除的任何序列。
- [0079] 术语“可操作地连接”是指遗传元件以允许它们以预期方式操作的关系并置。例如，如果启动子有助于启动编码序列的转录，则将其可操作地连接至编码区域。只要维持该功能，在启动子和编码区之间可以存在中间残基。
- [0080] 术语“反向末端重复序列(ITR)”指用于复制、包装AAV病毒的ITR序列。
- [0081] 术语“AAV”是腺相关病毒的缩写，用于指病毒本身或其衍生物。所述术语包括所有病毒亚型以及天然、重组形式存在的病毒。包含AAV 1型(AAV-1)、AAV 2型(AAV-2)、AAV 3型(AAV-3)、AAV 4型(AAV-4)、AAV 5型(AAV-5)、AAV 6型(AAV-6)、AAV 7型(AAV-7)、AAV 8型(AAV-8)、9型(AAV-9)、10型(AAV-10)、11型(AAV-11)、12型(AAV-12)、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV以及绵羊AAV。“灵长类动物

AAV”是指感染灵长类动物的AAV，“非灵长类动物AAV”是指感染非灵长类动物的AAV等。

- [0082] 术语“变体”指参考核苷酸或氨基酸的突变体，例如相对于天然核苷酸或氨基酸的序列具有至少具有一个核苷酸或氨基酸的差异(如氨基酸或核苷酸的插入、取代、删除)。对于本发明所述的核苷酸或氨基酸的突变体，也可描述为经过修饰的氨基酸或核苷酸。
- [0083] 术语“包括”或“包含”指除了主题中所必须的元素，还可以包括主题中未提及的元素。例如对于包括启动子的多核苷酸表达盒，可以包含除了启动子之外其他的元素(如ITR、增强子、内含子、编码基因、多腺苷酸化序列等)。
- [0084] 术语“多腺苷酸化序列”、“多腺苷酸化区”、“聚腺苷酸化信号”包括核酶内切酶切割RNA转录物所需的识别区域，随后是聚腺苷酸化共有序列AATAAAA。多腺苷酸化序列提供PolyA位点，即RNA转录物上的位点，通过转录后聚腺苷酸化将腺嘌呤残基添加到该位点。
- [0085] 术语“Kozak序列”指位于真核生物mRNA 5'端帽子结构后面的一段核苷酸序列，通常是GCCACCAUGG，它可以与翻译起始因子结合而介导含有5'帽子结构的mRNA翻译起始。在蛋白质起始翻译中起作用。
- [0086] 术语“同源性”指当两个或更多个核苷酸序列或氨基酸序列进行比对时，氨基酸序列或者碱基序列相似的程度，以百分比计，如85%、90%、95%、99%、100%。
- [0087] 术语“宿主细胞”指用载体转导、感染、转染或转化的细胞。载体可以是质粒、病毒颗粒、噬菌体等。应理解，术语“宿主细胞”是指原始转导、感染、转染或转化的细胞和其子代。
- [0088] 术语“转导的”、“感染的”、“转染的”或“转化的”通常指用于向细胞施用、引入或插入外源DNA(载体)的方法。当通过病毒或病毒载体将DNA引入到细胞中时，用外源DNA转导所述细胞。当通过非病毒方法将DNA引入到细胞中时，用外源DNA转染所述细胞。术语“转导的”和“感染的”在本文中可互换使用来指代已经从病毒或病毒载体接受外源DNA或多核苷酸的细胞。

- [0089] 术语“VEGF有关的疾病”指由VEGF的异常表达(如过量或缺陷)引起的相关疾病。
- [0090] 术语“表达调控元件”是指调控与之可操作地相连的核苷酸序列的表达的一段核酸序列。当一段表达调控元件控制和调控一段核苷酸序列的转录和/或翻译时,所述表达调控元件就与所述核苷酸序列“可操作地连接”。因此,表达调控元件可包括启动子、增强子、内部核糖体进入位点(IRES)、转录终止子、蛋白编码基因前的起始密码子、内含子剪接信号和终止密码子。术语“表达调控元件”在最低限度上意图包括一段为了影响表达而存在的序列,也可包括其他有利组件。该术语还可包括将框内外不想要的可能的起始密码子从所述序列中除去的核酸序列设计。其还可包括将不想要的可能的剪接位点除去的核酸序列设计。其还可包括指引添加多聚腺苷酸化或polyA的序列。
- [0091] 术语“密码子优化”指对同一编码产物的核酸序列,用同义密码子序列进行修饰,例如采用在靶细胞或物种中高频表达的密码子替换低频表达的密码子,目的在于增强目的基因在靶细胞、组织或物种中的表达水平(如提高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或超过100%)。任意的能够有助于提高目的基因在靶细胞或物种中表达同一编码产物的核酸修饰,均属于本发明密码子优化的范畴。
- [0092] 载体
- [0093] 为了提高目的基因编码或表达治疗性蛋白或抗体的水平,本发明对表达抗VEGF蛋白的编码序列进行了大量的优化,如密码子优化、CpG去除、编码序列区的内含子插入等,以使得表达载体(例如核酸、多核苷酸表达盒、质粒或重组腺相关病毒)对靶组织或靶细胞(例如视网膜)具有增加的感染性或表达能力。例如在一些实施例中,表达载体在靶细胞或靶组织中的抗VEGF蛋白的表达水平相对于未优化的载体提高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%及以上。
- [0094] 因此,本发明一方面在于提供一种核酸载体,所述核酸包含编码抗VEGF蛋白的编码序列,且所述编码序列经过密码子优化。本发明提出了密码子优化的编码序列,所述编码序列在不改变编码产物氨基酸序列基础上,采用本领域所公

知的方法对密码子进行修饰，例如使用在靶细胞中高频表达的密码子替代低频表达的密码子。

- [0095] 本发明的抗VEGF蛋白靶向(如特异性结合)人VEGF受体。VEGF受体是血管内皮生长因子(VEGF)的受体。VEGF受体有三种主要的亚型，分别为VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR3。VEGF受体具有由7个免疫球蛋白样结构域(如细胞外结构域1-7)，单个跨膜跨越区域和包含分裂的酪氨酸激酶结构域的细胞内部分组成的细胞外部分。
- [0096] 在一些实施例中，本发明的抗VEGF蛋白是人VEGF受体或受体的一部分。其能够识别并结合VEGF配体但不能激活受体复合物，起到抑制作用，与配体结合并阻止配体与常规受体结合。例如，本发明的抗VEGF蛋白是人VEGF受体1的细胞外结构域1-7中的任一个结构域，或者多个结构域的组合。再例如，本发明的抗VEGF蛋白是人VEGF受体2的细胞外结构域1-7中的任一个结构域，或者多个结构域的组合。再例如，本发明的抗VEGF蛋白是人VEGF受体3的细胞外结构域1-7中的任一个结构域，或者多个结构域的组合。再例如，本发明的抗VEGF蛋白是人VEGF受体1，和/或VEGF受体2，和/或VEGF受体3中1-7个结构域中的一个或多个细胞外结构域的组合。
- [0097] 在一些实施例中，本发明所述的抗VEGF蛋白包含VEGF受体1的胞外结构域2和VEGF受体2的胞外结构域3。在某些实施例中，本发明所述的抗VEGF蛋白进一步包含VEGF受体2的胞外结构域4。在某些实施例中，本发明所述的抗VEGF蛋白还包含免疫球蛋白Fc片段(如人免疫球蛋白IgG1、IgG2或IgG4)。
- [0098] 在一些实施例中，本发明所述的抗VEGF蛋白包含VEGF受体1的胞外结构域2，VEGF受体2的胞外结构域3，和免疫球蛋白Fc片段。在另一些实施例中，本发明的抗VEGF蛋白包含VEGF受体1的胞外结构域2，VEGF受体2的胞外结构域3，VEGF受体2的胞外结构域4和免疫球蛋白Fc片段。
- [0099] 本发明所述的蛋白包括多肽、融合蛋白、抗体或其功能性片段。
- [0100] 在一些具体的实施例中，本发明所述的抗VEGF蛋白包含SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2或与其任一序列具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的蛋白。

- [0101] 在一些具体的实施方案中，所述经过密码子优化的核酸包含SEQ ID NO: 7所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的核苷酸序列。
- [0102] 在一些优选的实施方案中，所述核酸载体的编码序列进一步去除了CpG的编码序列。改变CpG岛的组成或编码区的GC含量可能影响密码子使用偏好的选择。在一些实施例，相比于未去除CpG的编码序列，可去除至少1个，2个，3个，4个，5个，6个，7个，8个，9个，10个，20个，30个，40个，50个CpG。在一些实施例中，相比于未去除CpG的编码序列，可去除至少10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，100%的CpG。在另一些优选的实施方案中，所述编码序列是去除了CpG且经过密码子优化的编码序列。在一些具体的实施方案中，所述经过密码子优化且CpG去除的核酸包含SEQ ID NO: 8所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的核苷酸序列。
- [0103] 在一些优选的实施例，所述的编码抗VEGF蛋白的编码序列进一步包括内含子插入。在一些优选的实施例中，所述的编码抗VEGF蛋白的编码序列同时经过密码子优化、CpG去除和内含子插入。本发明所述的编码序列中内含子选自：VH4内含子、SV40内含子、Chi、Chimeric内含子。在一些具体的实施例中，所述VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子、Chimeric内含子分别具有如SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 20所述的核苷酸序列。本发明意外发现，在编码抗VEGF蛋白的编码序列的特定位置引入内含子，可以有效提升蛋白的表达水平，例如提高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或超过100%。
- [0104] 在一个具体的实施方案中，经过密码子优化、CpG去除和VH4内含子的编码序列的核酸包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 13所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的核酸序列。在另一个具体的实施方案中，经过密码子优化、CpG去除和SV40内含子的编码序列的核酸包含SEQ ID NO: 21所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的核酸序列。在另一个具

体的实施方案中，经过密码子优化、CpG去除和Chimeric内含子的编码序列的核酸包含SEQ ID NO: 22所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的核酸序列。

[0105] 因此，本发明另一方面在于提供一种多核苷酸表达盒，所述多核苷酸表达盒包含本发明所述的核酸和表达调控元件(如前所述，本发明所述的核酸包含编码抗VEGF蛋白的编码序列)。

[0106] 例如，表达调控元件包含启动子，所述启动子可操作性地连接于核酸分子编码序列。启动子包括启动子序列或其功能性片段。所述启动子对真核细胞或哺乳动物细胞具有特异性。所述启动子选自下组的启动子： β -肌动蛋白启动子(CBA)、巨细胞病毒启动子(CMV)、延伸因子1 α 启动子(EF1 α)、CAG启动子、EFS启动子、NA65P启动子、MNT启动子、UB6启动子、CAG启动子、RPE65启动子、视蛋白启动子。

[0107] 本发明的表达调控元件还可以包括内含子，所述内含子位于启动子之后。在一些情况下，内含子可指可被转录但不被翻译的任何序列。在一些情况下，内含子可以指被转录并从细胞中的成熟RNA转录物中去除的任何序列。所述内含子选自VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子、鸡 β -肌动蛋白内含子(Chicken β -action intron)、U12内含子、RHD内含子等。

[0108] 本发明的表达调控元件还可以包括多腺苷酸化信号(polyA)。多腺苷酸化信号保护mRNA，免受核酸外切酶攻击，并且对转录终结、将mRNA从细胞核输出及进行翻译都十分重要。多腺苷酸化信号包含多个连续的腺苷一磷酸，通常含有AAUAAA重复序列。本发明所述多腺苷酸化信号位于编码VEGF拮抗剂的编码序列的下游。在一些实施例中，多腺苷酸化信号包括猴空泡病毒40(SV40)、人生长激素(HGH)、牛生长激素(BGH)或 β -珠蛋白(RGB)。

[0109] 在某些实施例中，本发明的多核苷酸表达盒在5'和3'末端侧接有功能性的腺病毒反向末端重复序列(ITR)。功能性的腺病毒反向末端重复序列(ITR)是指如用于整合、复制和包装AAV病毒粒子的ITR序列。所述反向末端重复序列是血清型的腺相关病毒ITR，选自AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AA

V4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAV11 ITR和AAV12 ITR。

[0110] 在一些实施例中，所述多核苷酸表达盒从5'到3'顺序包含：

[0111] 1)5'ITR；

[0112] 2)启动子；

[0113] 3)内含子；

[0114] 4)本发明前述的包含编码抗VEGF蛋白的核酸；

[0115] 5)多聚腺苷酸化信号序列；

[0116] 6)3'ITR。

[0117] 所述启动子选自下组的启动子： β -肌动蛋白启动子(CBA)、巨细胞病毒启动子(CMV)、延伸因子1 α 启动子(EF1 α)、UBC启动子、EFS启动子、NA65P启动子、MNT启动子、UB6启动子、CAG启动子、RPE65启动子、视蛋白启动子。

[0118] 所述内含子选自VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子、鸡 β -肌动蛋白内含子(Chicken β -action intron)、U12内含子、RHD内含子等。

[0119] 所述多腺苷酸化信号包括猴空泡病毒40(SV40)、人生长激素(HGH)、牛生长激素(BGH)或 β -珠蛋白(RGB)。

[0120] 在一些更具体的实施方案中，所述包含编码抗VEGF蛋白的核酸编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或与其具有至少85%同源性的氨基酸序列。

[0121] 在一些更具体的实施方案中，所述编码抗VEGF蛋白的核酸包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列。

[0122] 在一些更具体的实施方案中，本发明所述的多核苷酸表达盒从5'到3'顺序包含：

[0123] 1)5'ITR；

[0124] 2)CBA启动子；

[0125] 3)鸡 β -肌动蛋白内含子；

[0126] 4)kozak序列；

- [0127] 5)编码抗VEGF蛋白的核酸,其中所述核酸编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或与其具有至少85%同源性的氨基酸序列;
- [0128] 6)RGB多聚腺苷酸化信号序列;
- [0129] 7)3'ITR。
- [0130] 在一些更具体的实施方案中,本发明所述的多核苷酸表达盒从5'到3'顺序包含:
- [0131] 1)5'ITR;
- [0132] 2)CBA启动子;
- [0133] 3)鸡 β -肌动蛋白内含子;
- [0134] 4)kozak序列;
- [0135] 5)编码抗VEGF蛋白的核酸,其中所述核酸包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列;
- [0136] 6)RGB多聚腺苷酸化信号序列;
- [0137] 7)3'ITR。
- [0138] 在一些更具体的实施方案中,本发明所述的多核苷酸表达盒从5'到3'顺序包含:
- [0139] 1)5'ITR,具有如SEQ ID NO:14所述的核苷酸序列;
- [0140] 2)CBA启动子,具有如SEQ ID NO:15所述的核苷酸序列;
- [0141] 3)鸡 β -肌动蛋白内含子,具有如SEQ ID NO:16所述的核苷酸序列;
- [0142] 4)kozak序列,具有如SEQ ID NO:17所述的核苷酸序列;
- [0143] 5)编码抗VEGF蛋白的核酸,其中所述核酸包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列;
- [0144] 6)RGB多聚腺苷酸化信号序列,具有如SEQ ID NO:18所述的核苷酸序列;
- [0145] 7)3'ITR,具有如SEQ ID NO:19所述的核苷酸序列。
- [0146] 在一些具体的实施例,所述多核苷酸表达盒中编码抗VEGF蛋白的核酸经过密码子优化。在一些更具体的实施例中,多核苷酸表达盒(编码抗VEGF蛋白的核

酸经过密码子优化)从5' 到3' 包含SEQ ID NO:27所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的序列。

[0147] 在一些具体的实施例中,所述多核苷酸表达盒中编码抗VEGF蛋白的核酸经过CpG去除。在一些更具体的实施例中,多核苷酸表达盒(编码抗VEGF蛋白的核酸经过密码子优化且CpG去除)从5' 到3' 包含SEQ ID NO:29所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的序列。

[0148] 在一些具体的实施例中,所述多核苷酸表达盒中编码抗VEGF蛋白的核酸进一步包括内含子的插入。所述内含子示例性的包括但不限于VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子、Chimeric内含子。在一些优选的实施例中,所述编码抗VEGF蛋白的核酸包含VH4内含子的插入,所述多核苷酸表达盒从5' 到3' 包含SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 31所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的核苷酸序列。在一些优选的实施例中,所述编码抗VEGF蛋白的核酸包含SV40内含子的插入,所述多核苷酸表达盒从5' 到3' 包含SEQ ID NO: 23所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列。在一些优选的实施例中,所述编码抗VEGF蛋白的核酸包含Chimeric内含子的插入,所述多核苷酸表达盒从5' 到3' 包含SEQ ID NO: 24所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的核苷酸序列。

[0149] 在一些更具体的实施方案中,本发明所述的多核苷酸表达盒从5' 到3' 顺序包含:

[0150] 1)5'ITR;

[0151] 2)CBA启动子;

[0152] 3)鸡 β -肌动蛋白内含子;

[0153] 4)kozak序列;

[0154] 5)编码抗VEGF蛋白的核酸,其中所述核酸编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或与其具有至少85%同源性的氨基酸序列;

[0155] 6)SV40多聚腺苷酸化信号序列;

[0156] 7)3'ITR。

- [0157] 在一些更具体的实施方案中，本发明所述的多核苷酸表达盒从5'到3'顺序包含：
- [0158] 1)5'ITR；
- [0159] 2)CBA启动子；
- [0160] 3)鸡 β -肌动蛋白内含子；
- [0161] 4)kozak序列；
- [0162] 5)编码抗VEGF蛋白的核酸，其中所述核酸包含SEQ ID NO:6或与其具有至少85%同源性的核苷酸序列；
- [0163] 6)SV40多聚腺苷酸化信号序列；
- [0164] 7)3'ITR。
- [0165] 在一些更具体的实施例中，多核苷酸表达盒从5'到3'包含SEQ ID NO:33所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)的序列。
- [0166] 本发明的另一方面在于提供一种质粒，所述质粒包含本发明前述的包含编码抗VEGF蛋白的核酸或或多核苷酸表达盒。在一些优选的实施方案中，本发明所述的质粒包含SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34所述的核苷酸序列或与其具有至少85%(如85%、90%、95%、98%、99%或100%)同源性的序列。
- [0167] 本发明上述的表达载体显示出在靶细胞或靶组织中具有增加的抗VEGF蛋白表达水平。例如在2 μ g单质粒瞬时转染293细胞后，相对于未优化的质粒，蛋白表达量提升提高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%及以上。
- [0168] 例如在2.5 μ g单质粒瞬时转染APRE细胞后，相对于未优化的质粒，蛋白表达量提升提高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%及以上。
- [0169] 本发明的另一方面，提供了一种重组病毒，所述重组病毒包括：衣壳蛋白和本发明所述的多核苷酸表达盒。在一些实施例中，重组病毒为重组腺相关病毒(

rAAV), 其中所述重组腺相关病毒包括rAAV衣壳蛋白和本发明所述的多核苷酸盒。

- [0170] 在一些实施例中, 本发明的rAAV包含衣壳蛋白, 衣壳蛋白是由AAV的cap基因编码的结构蛋白。rAAV包含三个衣壳蛋白, 分别称为VP1, VP2和VP3, 所有这些蛋白均通过替代剪接从单个cap基因转录而来。VP1, VP2和VP3的分子量分别为约87kDa, 约72kDa和约62kDa。翻译后, 衣壳蛋白在病毒基因组周围形成球形的60聚体蛋白壳。衣壳蛋白的功能是保护病毒基因组, 递送基因组并与宿主相互作用。
- [0171] 本发明所述的衣壳蛋白可以来自于任何腺相关病毒的血清型, 包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12等, 所述腺相关病毒血清型中的任何腺相关病毒血清型都可以充当基因递送载体。例如, AAV衣壳可以是野生型衣壳或天然衣壳。特别关注的野生型AAV衣壳包含AAV2、AAV5、AAV8和AAV9。与ITR一样, 衣壳不是必须为野生型衣壳, 而是只要衣壳能够对特定细胞或组织进行转导, 就可以通过核苷酸的插入、缺失或取代对野生型的VP1、VP2或VP3序列进行改变。换句话说, AAV衣壳可以是变体AAV衣壳, 所述变体AAV衣壳包括相对于亲本衣壳蛋白或AAV衣壳蛋白的一个或多个氨基酸取代、缺失或插入。
- [0172] 在一些实施方案中, AAV衣壳变体与已知的亲本AAV衣壳(例如AAV血清型2, AAV2/3(例如AAV2/3杂交), AAV血清型8)相比, 包含约1至约100个氨基酸(例如, 1-10个氨基酸之间、1-20个氨基酸之间、1-30个氨基酸之间、20-50个氨基酸之间、20-60个氨基酸之间、50-80个氨基酸之间、50-100个氨基酸之间、60-100个氨基酸之间等)氨基酸的取代、插入或缺失。在一些实施例中, AAV衣壳变体相对于亲本衣壳包含超过100个氨基酸(例如, 100-200个氨基酸之间、200-300个氨基酸之间、100-500个氨基酸之间、500-1000个氨基酸之间或更多)的取代、插入或缺失。在一些实施例中, AAV衣壳变体相对于亲本衣壳(例如AAV血清型2, AAV2/3(例如AAV2/3杂交), AAV血清型8)可包含约5至约50个氨基酸(例如, 5-10个氨基酸之间、5-20个氨基酸之间、5-30个氨基酸之间、5-

40个氨基酸之间、10-20个氨基酸之间、10-30个氨基酸之间、10-40个氨基酸之间、10-50个氨基酸之间，或在30-50个氨基酸之间)的替换、插入或缺失。在一些实施例中，AAV衣壳变体相对于亲本衣壳(例如AAV血清型2，AAV2/3(例如AAV2/3杂交)，AAV血清型8)可包含约10至约30个氨基酸(例如，10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30)的取代、插入或缺失。在一些实施例中，AAV衣壳变体相对于亲本衣壳(例如AAV血清型2，AAV2/3(例如AAV2/3杂交)，AAV血清型8)可包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸取代、插入或缺失。

- [0173] 在一些实施例中，衣壳变体可以是嵌合衣壳变体。嵌合衣壳变体序列可包含两个或多个AAV衣壳血清型或其变体的部分。在一些实施例中，嵌合衣壳包含2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多不同的壳蛋白血清型的部分。在一些实施例中，嵌合衣壳蛋白具有不同的特性，例如其来源的AAV壳蛋白具有组织取向性等。片段可通过任何适当的方法并入，例如重组DNA克隆。
- [0174] 在一些实施例中，本发明所述的AAV衣壳变体是AAV2、AAV2/3(例如AAV2/3混合)或AAV8的变体。AAV2已被观察到能有效地转导眼部组织(如光感受器细胞和视网膜色素上皮(RPE))、人类中枢神经系统(CNS)组织、肾脏组织和其他组织。在一些实施例中，本发明所述的AAV衣壳是AAV2变体，且所述的AAV2变体可用于将基因治疗传递到眼组织(例如，视网膜)。AAV3被观察到能有效地转化癌细胞。在一些实施例中，本发明所述的AAV变体是AAV2/3(例如AAV2/3杂交体)。AAV8也已被观察到能转导眼部组织(例如，视网膜神经节细胞、干细胞)。
- [0175] 在一个实施例中，所述经过修饰的AAV衣壳蛋白为经过修饰的AAV8衣壳蛋白。申请人研究并申请了AAV8的衣壳变体的相关专利CN202211691417.8或者PCT/CN2022/142185(发明名称：经过修饰的AAV衣壳蛋白及其用途)，其全部内容在此引入。在一些优选的实施方案中，所述衣壳蛋白为经过修饰的AAV8衣壳蛋白，所述经过修饰的衣壳蛋白包括在位于亲本AAV8的第588~592位氨基酸处

(所述亲本/野生型AAV8衣壳蛋白的第588~592位氨基酸为“QQNTA”)的约5-14个氨基酸的异源多肽取代,如多肽序列RGNQQNTARQ(SEQ ID NO:11)。

- [0176] 在一些实施方案中,本发明所述的rAAV是单链AAV(ssAAV)或双链AAV(scAAV)。其中ssAAV是指在分开的链上具有目的基因表达盒的编码序列和互补序列的rAAV,并且被包装在分开的病毒衣壳中。scAAV是在rAAV基础上将其编码区域设计成双链DNA。
- [0177] 本发明的另一方面在于提供一种宿主细胞,所述宿主细胞包含本发明前述的包含编码抗VEGF蛋白的核酸或或多核苷酸表达盒或质粒。将要在宿主细胞中培养以将rAAV载体封装在AAV衣壳中的组件反向提供给宿主细胞。所需组件中的任何一个或多个(例如,重组AAV载体、rep序列、cap序列和/或辅助功能)可由稳定的宿主细胞提供,该宿主细胞已被设计成使用本领域已知的方法来包含所需组分中的一个或多个。优选的,稳定的宿主细胞将在诱导启动子的控制下包含所需的组件。本发明在前面已经详细描述过本发明可选择的启动子类型。
- [0178] “宿主细胞”是指包含或能够包含目标物质的任何细胞。通常,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是感光细胞,视网膜色素上皮细胞,角质形成细胞,角膜细胞和/或肿瘤细胞。宿主细胞可用作AAV辅助构建体,AAV载体,辅助功能载体或与重组AAV的产生相关的其他转移DNA的受体。该术语包括已被转染的原始细胞的后代。因此,本文所用的“宿主细胞”可以指已经用外源DNA序列转染的细胞。可理解的是,由于自然,偶然或故意的突变,单个亲本细胞的后代在形态或基因组或总DNA补体上不一定与原始亲本完全相同。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞,酵母细胞,细菌细胞,昆虫细胞,植物细胞或真菌细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是神经元,感光细胞,有色素的视网膜上皮细胞或神经胶质细胞。产生本发明的rAAV所需的重组AAV载体,rep序列,cap序列和辅助功能可以使用任何适当的遗传元件(载体)递送至包装宿主细胞。所述的遗传元件可以通过任何本领域技术人员已知的并且合适的方法递送,如基因工程,重组工程和合成技术。
- [0179] 药物组合物

- [0180] 本发明的另一个方面，在于提供一种药物组合物。所述药物组合物包括本发明的多核苷酸表达盒、质粒或重组病毒，和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。
- [0181] 本领域技术人员可以容易地选择合适的稀释剂、载体或赋形剂。如本文所用，载体或赋形剂包括任何的溶剂、分散介质、载体、涂料、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂、吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体、防腐剂或化学稳定剂等。
- [0182] 示例性的载体或赋形剂包括无菌生理盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。例如，一种合适的赋形剂或载体包括盐水，其可与多种缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲液)调配。可通过各种抗菌和抗真菌剂来防止微生物的作用，例如，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下，最好包括等渗剂，例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝和明胶，可以使可注射组合物的吸收延长。
- [0183] 为了给予可注射水溶液，可以根据需要适当地配制缓冲溶液，并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液特别适合于静脉内，肌肉内，皮下和腹膜内给药。
- [0184] 无菌注射溶液的制备方法是将所需量的活性rAAV与本发明所列举的各种其他成分混合在适当的溶剂中，然后过滤灭菌。通常，通过将各种已灭菌活性成分并入无菌载体中制备分散体，该载体包含分散介质和所需的其它成分。
- [0185] 本发明的rAAV组合物也可以以中性或盐形式配制。药学上可接受的盐，包括酸加成盐及由无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸)形成。由自由羧基形成的盐也可来自无机碱，例如钠、钾、铵、钙或氢氧化铁，或者有机碱，例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。配制完成后，溶液将以与剂型相容的方式给药，并且以治疗有效量施用。所述制剂易于以各种剂型施用，例如可注射溶液、药物释放胶囊等。
- [0186] 可以通过例如脂质体，纳米胶囊，微粒，微球，脂质颗粒，囊泡等递送载体将本发明的组合物递送至合适的宿主细胞中。

- [0187] 以单位剂型配制注射、口服或肠胃外组合物以易于施用是有利的。如本文所使用的，单位剂型是指适于作为单一剂量用于待治疗的受试者的物理离散单位；每个单位含有经计算与所需药物载剂关联产生期望的治疗效果的预定量的活性化合物。本发明的单位剂型的规格由活性化合物的独特特性和待实现的特定治疗效果以及本领域中在混配这种活性化合物以用于治疗个体时固有的局限性决定。例如单位剂量的可以是一定量的载体基因组，或者每毫升中含有一定量的载体基因组，或者含有使用感染复数(MOI)测量药物组合物的单位剂量，MOI意指载体或病毒基因组与核酸可以递送到的细胞的比率或倍数。药物组合物可以与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器中，分配器例如注射器。
- [0188] 在一些实施例中，药物组合物被制备为适合于玻璃体内注射、视网膜下注射、脉络膜上腔注射、静脉注射、肿瘤内注射或肌肉注射的制剂。
- [0189] 重组腺相关病毒(rAAV)的递送
- [0190] 本发明的另一个方面在于提供本发明所述的多核苷酸表达盒、质粒或重组病毒在制备用于治疗与VEGF有关的疾病的药物中的用途。或者本发明的另一方面在于提供一种治疗哺乳动物受试者中与VEGF有关的疾病的方法，所述方法包括将治疗有效量的包含本发明所述的多核苷酸表达盒、质粒或重组病毒递送至眼睛。
- [0191] 本发明所述的rAAV可以根据本领域已知的任何合适方法递送至受试者。例如，优选将悬浮于生理相容性载体中(例如，在组合物中)的rAAV施用于受试者，即宿主动物，例如人、小鼠、大鼠、猫、狗、绵羊、兔子、马、牛、山羊、猪、豚鼠、仓鼠、鸡、火鸡或非人类灵长类动物(例如，猕猴)。在一些实施例中，宿主动物不包括人类。在一些实施例中，受试者是人类。
- [0192] “治疗有效量”是指以达到所需治疗效果所需的剂量和时间有效的量。治疗有效量的rAAV病毒或药物组合物可根据诸如待治疗受试者的疾病状态，年龄，性别和体重以及rAAV病毒或药物组合物在受试者中引发所需反应的能力之类的因素而变化。可以调节给药方案以提供最佳的治疗反应。治疗有效量通常也是其中rAAV病毒或药物组合物的任何毒性或有害作用被治疗有益作用所超过的量。“预防有效量”是指以达到所需预防效果所需的剂量和时间有效的量，例

如预防或抑制各种病症。预防剂量可用于疾病发生前或早期的受试者，在某些情况下，预防有效量可大于或小于治疗有效量。给药剂量在很大程度上取决于被治疗对象的状况和大小以及治疗配方，治疗频率和给药途径。用于持续治疗的方案，包括剂量，制剂和频率，可以由初始反应和临床判断指导。

[0193] 在一些实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E8/眼~E16/眼。在一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E8/眼~E15/眼。在一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E9/眼~E15/眼。在一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E9/眼~E14/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E10/眼~E14/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E11/眼~E14/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E12/眼~E14/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E13/眼~E14/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E8/眼~E13/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E9/眼~E13/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E10/眼~E13/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E11/眼~E13/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E12/眼~E13/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E8/眼~E12/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E9/眼~E12/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E10/眼~E12/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E11/眼~E12/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E8/眼~E11/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E9/眼~E11/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E10/眼~E11/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E8/眼~E10/眼。在另一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E9/眼~E10/眼。在另一些具体的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E8/眼、2E8/眼、3E8/眼、4E8/眼、5E8/眼、6E8/眼、7E8/眼、8E8/眼、9E8/眼

、E9/眼、2E9/眼、3E9/眼、4E9/眼、5E9/眼、6E9/眼、7E9/眼、8E9/眼、9E9/眼、E10/眼、2E10/眼、3E10/眼、4E10/眼、5E10/眼、6E10/眼、7E10/眼、8E10/眼、9E10/眼、E11/眼、2E11/眼、3E11/眼、4E11/眼、5E11/眼、6E11/眼、7E11/眼、8E11/眼、9E11/眼、E12/眼、2E12/眼、3E12/眼、4E12/眼、5E12/眼、6E12/眼、7E12/眼、8E12/眼、9E12/眼、E13/眼、2E13/眼、3E13/眼、4E13/眼、5E13/眼、6E13/眼、7E13/眼、8E13/眼、9E13/眼、E14/眼、2E14/眼、3E14/眼、4E14/眼、5E14/眼、6E14/眼、7E14/眼、8E14/眼、9E14/眼。在一些优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为5E11/眼~2E12/眼。在一些更优选的实施例中，所述重组腺相关病毒的给药剂量为2E12/眼。

- [0194] 在一些实施方案中，rAAV病毒或药物组合物给予受试者每天一次、每周一次、每两周一次、每月一次、每2个月一次、每3个月一次、每6个月一次、每年一次或每2年一次、每5年一次、一生一次。
- [0195] 示例性的给药和递送途径包括静脉内(I.V.)，关节内，腹膜内(I.P.)，动脉内，肌肉内，胃肠外，皮下，胸膜内，真皮，透皮，胃肠外，例如透粘膜，颅内，脊柱内，口服(消化性)，粘膜，呼吸，鼻内，插管，肺内，肺内滴注，颊，舌下，血管内，鞘内，腔内，离子电渗疗法，眼内，腺内，器官内，输卵管内。
- [0196] 在一些实施方案中，rAAV递送至哺乳动物受试者可通过例如眼内注射、视网膜下注射、脉络膜注射(例如脉络膜上腔注射)或局部施用(例如滴眼液)或藉由注射至受眼部组织以此来影响哺乳动物的眼睛(例如玻璃体内注射)。“眼组织”是指源自或包含在眼睛中的任何组织。眼组织的非限制性实例包括神经元、视网膜(例如，感光细胞)、巩膜、脉络膜、视网膜、玻璃体、黄斑、中央凹、视盘、晶状体、瞳孔、虹膜、水液、角膜、结膜睫状体和视神经。视网膜位于眼睛的后部，由感光细胞组成。这些光感受器细胞(如视杆、视锥)通过辨别颜色和视野中的对比度赋予视力。在一些实施例中，通过眼内注射施用本发明中所述的rAAV或组合物。在一些实施例中，通过玻璃体内注射施用本发明中所述的rAAV或组合物。在一些实施例中，通过视网膜下注射施用本发明中所述的rAAV或组合物。在一些实施例中，通过脉络膜内(例如，脉络膜上腔)注射施用本发明中

所述的rAAV或组合物。在一些实施例中，通过静脉注射施用本发明中所述的rAAV或组合物。在一些实施例中，通过玻璃体内注射、视网膜下注射、脉络膜上腔注射、静脉注射、肿瘤内注射或肌肉注射本发明所述的重组病毒或药物组合物。

- [0197] “与VEGF有关的疾病”是指与异常VEGF活性/信号相关的一组疾病。许多研究已证实如果VEGF异常过量就可以刺激及诱导病理性血管新生，引起血管新生相关眼部疾病。非限制性示例性血管新生相关眼部疾病包括血管生成依赖性癌症，血管生成相关的眼部疾病，实体瘤(例如，肺癌，乳腺癌，肾癌，肝癌，胰腺癌，头颈癌，结肠癌)，黑色素瘤，血液源性肿瘤，例如白血病，转移性肿瘤，良性肿瘤(例如血管瘤，听神经瘤，神经纤维瘤，气管炎和化脓性肉芽肿)，类风湿关节炎，牛皮癣，红肿，Osier-Webber综合征，心肌血管生成，斑块，毛细血管扩张，血友病关节或血管纤维瘤。
- [0198] 在一些实施例中，血管生成相关眼部疾病包括但不限于糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、黄斑变性、角膜移植排斥反应、新生血管性青光眼和晶状体后纤维增生、流行性角膜结膜炎、维生素A缺乏症、接触镜过度磨损、特应性角膜炎，细菌性角膜炎，溃疡，溃疡，细菌性角膜炎，溃疡，原发性角化病、类风湿性关节炎、系统性狼疮、多动脉炎、创伤、韦格纳结节病、巩膜炎、史蒂芬约翰逊病、类天疱疮放射状角膜切开术、角膜移植排斥反应、镰状细胞贫血、结节病、弹性假黄瘤、佩吉茨病、静脉阻塞、动脉闭塞、颈动脉阻塞性疾病，慢性葡萄膜炎/玻璃炎、分枝杆菌感染、莱姆病、系统性红斑狼疮、早产儿视网膜病变、Eales病、白塞病、视网膜炎或脉络膜炎感染、假定的眼部组织胞浆菌病、Bests病、近视、视凹、Stargardt病、扁平部炎、慢性视网膜脱离，高粘血症综合征、弓形虫病、创伤或激光后并发症。
- [0199] 在一些实施例中，眼部疾病选自视网膜新生血管、脉络膜新生血管、虹膜新生血管、角膜新生血管性眼部疾病、非感染性葡萄膜炎或青光眼。
- [0200] 在一些实施例中，眼部疾病选自年龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿、继发于视网膜静脉阻塞的黄斑水肿、视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞所致黄斑水肿、糖尿病性

视网膜水肿、糖尿病性视网膜病变、增生性糖尿病视网膜病变、糖尿病性视网膜缺血、息肉状脉络膜血管病变、继发于退行性近视的脉络膜新生血管或早产儿视网膜病变。黄斑变性的具体形式可以包含急性黄斑变性、非渗出性年龄相关黄斑变性和渗出性年龄相关黄斑变性。

[0201] 在一些优选的实施例中，眼部疾病选自年龄相关性黄斑变性，糖尿病视网膜病变，糖尿病性黄斑水肿，视网膜中央静脉阻塞，视网膜分支静脉阻塞所致黄斑水肿，继发于视网膜静脉阻塞的黄斑水肿，息肉状脉络膜血管病变，极低视力的湿性年龄相关性黄斑变性，继发于病理性近视的脉络膜新生血管。

[0202] 说明书附图

[0203] 图1 No.3、No.4、No.5质粒中多核苷酸表达盒示意图

[0204] 图2实施例4中缓冲液和高剂量组的四级光斑图

具体实施方式

[0205] 下面结合具体实施例，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并不用于限制本发明的范围。并且以下实施例也不代表以下实验为本发明所有的实验或仅有的实验。

[0206] 实施例1：抗VEGF蛋白编码序列的优化及质粒构建

[0207] 本实施例的主要目的在于构建具有表达如SEQ ID NO：1所述的抗VEGF蛋白的质粒。使用标准的重组DNA克隆技术或者通用的分子生物学技术构建产生了一系列含有调控元件和编码序列的各种组合的多核苷酸表达盒(表1)。然后使用常规的DNA重组技术和克隆技术在大肠杆菌中构建和克隆包含本表1中所述的多核苷酸表达盒的重组质粒。

[0208] 首先包括对于抗VEGF蛋白编码序列的优化，例如包括密码子优化、CpG去除和/或内含子的插入。例如对于密码子优化，采用Homo sapiens密码子优化策略，通过CDS区符合人源化偏好，降低GC含量，降低重复序列。对于CpG去除优化，通过对密码子优化后的CDS区域根据人源化密码子优化的偏好性策略进行了去除。对于VH4内含子的插入，根据氨基酸的一级和二级结构的特点，以及VH4内含子插入的特点，符合前体mRNA序列的特征“A/C A G G U……

A G G”，其中前3位碱基为外显子，第3位和第4位为5'剪接位，3'末端的倒数第1位和第2位之间为3'剪接位，共设计2种插入方式。

[0209] 然后分别构建基于上述优化或未优化的抗VEGF蛋白编码序列的多核苷酸表达盒及质粒。示例性的，如表达盒或质粒No.1-7的5'到3'顺序包括：AAV 5' ITR、CBA启动子、鸡 β -肌动蛋白内含子(附图1中表示为Chi intron)、Kozak序列、编码抗VEGF蛋白的编码序列核酸、兔-珠蛋白(RGB)多聚腺苷酸化信号、AAV 5' ITR。

[0210] 包含上述多核苷酸表达盒的质粒中，抗VEGF蛋白的编码序列未经优化的质粒编号为No.1，其中抗VEGF蛋白的编码序列核酸如SEQ ID NO:12，5'到3'核苷酸序列如SEQ ID NO:25，质粒核苷酸序列如SEQ ID NO:26；抗VEGF蛋白的编码序列经过密码子优化的质粒编号为No.2，其中抗VEGF蛋白的编码序列核酸如SEQ ID NO:7，5'到3'核苷酸序列如SEQ ID NO:27，质粒核苷酸序列如SEQ ID NO:28；抗VEGF蛋白的编码序列经过密码子优化且CpG去除的质粒编号为No.3，其中抗VEGF蛋白的编码序列核酸如SEQ ID NO:8，5'到3'核苷酸序列如SEQ ID NO:29，质粒核苷酸序列如SEQ ID NO:30；No.4和No.5质粒中分别在抗VEGF蛋白的编码序列中的不同位置插入VH4内含子，No.4质粒中抗VEGF蛋白的编码序列核酸如SEQ ID NO:6，5'到3'核苷酸序列如SEQ ID NO:9，质粒核苷酸序列如SEQ ID NO:10；No.5质粒中抗VEGF蛋白的编码序列核酸如SEQ ID NO:13，5'到3'核苷酸序列如SEQ ID NO:31，质粒核苷酸序列如SEQ ID NO:32；No.6和No.7质粒中分别在抗VEGF蛋白的编码序列中插入SV40内含子和Chimeric内含子；No.8-19质粒含有不同表达调节元件(如启动子、内含子和多腺苷酸化信号)，No.8质粒中抗VEGF蛋白的编码序列核酸如SEQ ID NO:6，5'到3'核苷酸序列如SEQ ID NO:33，质粒核苷酸序列如SEQ ID NO:34。质粒编号及主要组成如下表1所示，代表性的质粒主要组成如附图1。

[0211] 表1

编号	启动子	内含子	kozak	目的基因编码序列	多腺苷酸化信号
No.1	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:12	RGB
No.2	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:7	RGB
No.3	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:8	RGB
No.4	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:6	RGB
No.5	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:13	RGB
No.6	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:21	RGB
No.7	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:22	RGB
No.8	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:6	SV40
No.9	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:6	BGH
No.10	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:6	HGH
No.11	CMV	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:6	RGB
No.12	EF1 α	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:6	RGB
No.13	CAG	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:6	RGB
No.14	CBA	Chi	kozak	SEQ ID NO:6	RGB
No.15	CBA	PI	kozak	SEQ ID NO:6	RGB
No.16	CBA	SV40	kozak	SEQ ID NO:6	RGB
No.17	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:6	SV40
No.18	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:6	BGH
No.19	CBA	chicken β -action	kozak	SEQ ID NO:6	HGH

[0212] 实施例2：质粒瞬时转染293细胞的蛋白表达

[0213] 为了对每个多核苷酸表达盒或质粒的表达特性进行体外评估，使用转染试剂将每个重组构建体转染到悬浮的HEK293F细胞中进行转染。具体方法为：选择合适的细胞代数(不超过P15代)，在转染质粒前2h,在不干扰细胞单层的情况下，小心加入10ml DMEM(含10%FBS)培养基；然后通过Lipofectamine™ 2000的方法进行单质粒转染，具体包括：加入含2 μ g目的基因的质粒(需除去内毒素)于1mL无血清培养基中，另加入5 μ L LiP2000于1mL无血清培养基中；各自静置5min；然后轻轻混匀，静置15min；将上步所得混合液加入细胞培养皿内，加入时将混合液均匀分布在各个位置，完毕后轻轻混匀整个培养液，于37℃，5%CO2培养；转染6h后，小心吸除培养基，并更换为新鲜培养基(10%FBS，1%P/S)，继续培

养48~72h后，收集细胞及细胞上清液；通过反复冻融3次，制备含表达蛋白的细胞裂解液，通过ELISA测定蛋白含量(n=3)，结果如表2。

[0214] 表2

质粒编号	单质粒瞬时转染 293 细胞 表达量 (ng/mL)
No.1	627.7
No.2	1030.1
No.3	719.1
No.4	3810.3
No.5	712.6

[0215] 实施例3：质粒瞬时转染APRE19细胞的蛋白表达

[0216] 使用转染试剂将每个重组构建体转染到悬浮的APRE19细胞中进行转染。具体方法为：选择合适的细胞代数(不超过P15代)，在转染质粒前2h,在不干扰细胞单层的情况下，小心加入10ml DMEM(含10%FBS)培养基；然后通过Lipofect amine™ 2000的方法进行单质粒转染，具体包括：加入含2.5 μ g目的基因的质粒(需除去内毒素)于1mL无血清培养基中，另加入5 μ L LiP2000于1mL无血清培养基中；各自静置5min；然后轻轻混匀，静置15min；将上步所得混合液加入细胞培养皿内，加入时将混合液均匀分布在各个位置，完毕后轻轻混匀整个培养液，于37℃，5% CO2培养；转染6h后，小心吸除培养基，并更换为新鲜培养基(10% FBS，1% P/S)，继续培养48~72h后，收集细胞及细胞上清液；通过反复冻融3次，制备含表达蛋白的细胞裂解液，通过ELISA测定蛋白含量(n=3)，结果如表3所示。

[0217] 表3

质粒编号	单质粒瞬时转染 APRE19 细胞 表达量 (ng/mL)
No.1	230.67
No.4	946.87
No.5	877.50

No.8	498.83
No.9	54.93
No.10	86.30

- [0218] 实施例3：AAV病毒感染293细胞的蛋白表达
- [0219] 本实施例采用的AAV衣壳为经过修饰的AAV8衣壳蛋白，其包括在位于亲本AAV8的第588~592位氨基酸处被具有如SEQ ID NO:11(RGNQQNTARQ)所述的多肽序列取代。包含该衣壳蛋白的质粒构建在相关专利PCT/CN2022/142185(发明名称：经过修饰的AAV衣壳蛋白及其用途)中有具体描述，在此引入。
- [0220] AAV病毒包装通过三质粒共转染细胞生成：包括实施例1构建的ITR侧接抗VEGF蛋白编码序列的第一质粒(No.4质粒)；如上述对Rep/Cap基因进行编码的质粒(第二质粒，编码上述经过修饰的AAV8衣壳蛋白)；以及含有腺病毒辅助功能基因的第三质粒。转染后收集细胞，裂解释放病毒，并通过PCR测定病毒滴度，备用。
- [0221] 将ARPE19细胞种于6孔板中，培养至细胞融合度70-80%；将培养基(10%FBS，1%P/S)吸除，每孔更换为无血清无双抗培养基；按所需比例(6E10 vg AAV病毒加入3.6E5 ARPE19细胞)加入病毒，使得病毒+无血清无双抗培养基总量为1000μL；感染6h后，每孔2mL新鲜培养基(10%FBS，1%P/S)，继续培养至72h，通过ELISA检测目的蛋白的表达量。结果表明，AAV病毒的蛋白表达量为3437.6ng/mL。
- [0222] 实施例4：AAV病毒感染NHP后的药效实验
- [0223] 动物模型

- [0224] 食蟹猴共16只，设为4个组：1个阴性对照组和3个剂量供试品组(各4只)。
- [0225] 受试药物
- [0226] rAAV剂量组：低剂量组-5E11 vg/眼，中剂量组-1E12vg/眼，高剂量组-2E12 vg/眼(根据实施例3制备rAAV，并在缓冲液(20mM Tris-Cl pH8.0,150mM NaCl,1mM MgCl₂,0.003%Poloxamer 188)中透析。
- [0227] 阴性对照组(Vehicle)：缓冲液(20mM Tris-Cl pH8.0,150mM NaCl,1mM MgCl₂,0.003%Poloxamer 188)
- [0228] 给药方式
- [0229] 0天给药，剂量组、阴性对照组均脉络膜上腔给药，双眼注射，100μL/眼。第21天,对各组猴激光造模，每眼6个激光造模点(阴性对照组和中低剂量组各48个光斑点，高剂量组有一只猴的眼因出血未统计，即光斑点为42个)。第35天和第49天，即造模后14天和28天，FFA(荧光素眼底血管造影)检测4级光斑形成情况。
- [0230] 检测结果
- [0231] 如图2所示，造模后14天，缓冲液组的4级光斑数为21；rAAV低剂量组的4级光斑数为16，rAAV中剂量组的4级光斑数为11，rAAV高剂量组的4级光斑数为0。造模后28天，缓冲液组的4级光斑数为34，rAAV低剂量组的4级光斑数为20，rAAV中剂量组的4级光斑数为12，rAAV高剂量组的4级光斑数为0，各组四级光斑的比例如表4。rAAV高剂量组的FFA结果实例如图2。
- [0232] 表4

细则 91,
17.06.2024

组别	2 周	4 周
缓冲液	21/48	34/48
5E11	16/48	20/48
1E12	11/48	12/48
2E12	0/42	0/42

权利要求书

- [权利要求 1] 一种核酸，其特征在于，所述核酸包含编码抗VEGF蛋白的编码序列，且所述编码序列经过密码子优化。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的核酸，其特征在于，所述抗VEGF蛋白包含VEGF受体1的胞外结构域2和VEGF受体2的胞外结构域3；优选地，所述抗VEGF蛋白还包含VEGF受体2的胞外结构域4；更优选地，所述抗VEGF蛋白还包含免疫球蛋白Fc片段；更优选地，所述抗VEGF蛋白包含SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2或与其中任一序列具有至少85%同源性的蛋白。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的核酸，其特征在于，所述核酸包含SEQ ID NO：7或与其具有至少85%同源性的序列。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述的核酸，其特征在于，所述核酸的编码序列进一步经过CPG去除。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的核酸，其特征在于，所述核酸包含SEQ ID NO：8或与其具有至少85%同源性的序列。
- [权利要求 6] 根据权利要求1-5任一项所述的核酸，其特征在于，所述核酸的编码序列进一步包含内含子的插入。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的核酸，其特征在于，所述内含子选自VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子或Chimeric内含子；优选地，所述VH4内含子、SV40内含子、Chi内含子或Chimeric内含子具有如SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5或SEQ ID NO：20所述的核苷酸序列。
- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的核酸，其特征在于，所述核酸包含SEQ ID NO：6、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：21或SEQ ID NO：22所述的核苷酸序列或与其中任一序列具有至少85%同源性的核酸。
- [权利要求 9] 一种多核苷酸表达盒，其特征在于，所述多核苷酸表达盒权利要求1-8中任一项所述的核酸和表达调控元件。

- [权利要求 10] 根据权利要求9所述的多核苷酸表达盒，其特征在于，所述多核苷酸表达盒从5' 到3' 顺序包含：
- 1)5'ITR；
 - 2)启动子；
 - 3)内含子；
 - 4)权利要求1-8中任一项所述的核酸；
 - 5)多聚腺苷酸化信号序列；
 - 6)3'ITR。
- [权利要求 11] 根据权利要求10所述的多核苷酸表达盒，其特征在于，所述多核苷酸表达盒从5' 到3' 顺序包含：
- 1)5'ITR；
 - 2)CBA启动子；
 - 3)鸡 β -肌动蛋白内含子；
 - 4)kozak序列；
 - 5)权利要求1-8中任一项所述的核酸；
 - 6)RGB多聚腺苷酸化信号序列；
 - 7)3'ITR；或者，
- 所述多核苷酸表达盒从5' 到3' 顺序包含：
- 1)5'ITR；
 - 2)CBA启动子；
 - 3)鸡 β -肌动蛋白内含子；
 - 4)kozak序列；
 - 5)权利要求1-8中任一项所述的核酸；
 - 6)SV40多聚腺苷酸化信号序列；
 - 7)3'ITR。
- [权利要求 12] 根据权利要求11所述的多核苷酸表达盒，其特征在于，所述多核苷酸表达盒包含SEQ ID NO： 9、SEQ ID NO： 23、SEQ ID NO： 24、SEQ ID NO： 27、SEQ ID NO： 29、SEQ ID NO：

- 31、SEQ ID NO: 33所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性的序列。
- [权利要求 13] 一种质粒，包括权利要求1-8中任一项所述的核酸或权利要求9-12中任一项所述的多核苷酸表达盒。
- [权利要求 14] 根据权利要求13所述的质粒，其特征在于，所述质粒包含SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34所述的核苷酸序列或与其具有至少85%同源性的序列。
- [权利要求 15] 一种重组腺相关病毒(rAAV)，其包括衣壳蛋白和权利要求9-12中任一项所述的多核苷酸表达盒；优选地，所述衣壳蛋白为野生型或经过修饰的选自AAV1，AAV2，AAV3，AAV4，AAV5，AAV6，AAV7，AAV8，AAV9，AAV10，AAV11，AAV12任一项所述的衣壳蛋白。
- [权利要求 16] 根据权利要求15所述的重组腺相关病毒，其特征在于，包括：
(i)rAAV衣壳蛋白，其中衣壳蛋白是AAV8衣壳蛋白或经过修饰的AAV8衣壳蛋白；及
(ii)权利要求9-12中任一项所述的多核苷酸表达盒。
- [权利要求 17] 根据权利要求16所述的重组腺相关病毒，其特征在于，衣壳蛋白为经过修饰的AAV8衣壳蛋白，所述经过修饰的AAV8衣壳蛋白包括在位于亲本AAV8的第588～592位氨基酸处被具有如SEQ ID NO:11所述的多肽序列取代。
- [权利要求 18] 一种宿主细胞，其特征在于所述宿主细胞包含权利要求1-8中任一项所述的核酸或权利要求9-12中任一项所述的多核苷酸表达盒或权利要求13或14中所述的质粒或权利要求15-17中任一项所述的重组腺相关病毒。
- [权利要求 19] 一种药物组合物，其特征在于包括根据权利要求1-8中任一项所述的核酸或权利要求9-12中任一项所述的多核苷酸表达盒或权利要求13或14中所述的质粒或权利要求15-17中任一项所述的重组腺相

关病毒和药学上可接受的载体；优选地，所述药物组合物为玻璃体内注射剂、视网膜下注射制剂、脉络膜内注射制剂、静脉注射制剂、肿瘤内注射制剂或肌肉注射制剂。

[权利要求 20] 权利要求1-8中任一项所述的核酸或权利要求9-12中任一项所述的多核苷酸表达盒或权利要求13或14中所述的质粒或权利要求15-17中任一项所述的重组腺相关病毒在制备用于治疗与VEGF有关的疾病的药物中的用途；优选地，所述与VEGF有关的疾病为眼部新生血管疾病；更优选地，所述眼部新生血管疾病选自年龄相关性黄斑变性，糖尿病视网膜病变，糖尿病性黄斑水肿，视网膜中央静脉阻塞，视网膜分支静脉阻塞所致黄斑水肿，继发于视网膜静脉阻塞的黄斑水肿，息肉状脉络膜血管病变，极低视力的湿性年龄相关性黄斑变性，继发于病理性近视的脉络膜新生血管。

[权利要求 21] 一种预防或治疗与VEGF有关的疾病的方法，其特征在于，给予受试者治疗有效剂量的权利要求1-8中任一项所述的核酸或权利要求9-12中任一项所述的多核苷酸表达盒或权利要求13或14中所述的质粒或权利要求15-17中任一项所述的重组腺相关病毒；优选地，所述与VEGF有关的疾病为眼部新生血管疾病；更优选地，所述眼部新生血管疾病选自年龄相关性黄斑变性，糖尿病视网膜病变，糖尿病性黄斑水肿，视网膜中央静脉阻塞，视网膜分支静脉阻塞所致黄斑水肿，继发于视网膜静脉阻塞的黄斑水肿，息肉状脉络膜血管病变，极低视力的湿性年龄相关性黄斑变性，继发于病理性近视的脉络膜新生血管。

[权利要求 22] 根据权利要求21所述的方法，其特征在于，所述方法通过玻璃体内注射、视网膜下注射或脉络膜上腔注射给药，优选通过脉络膜上腔注射给药。

[权利要求 23] 根据权利要求22所述的方法，其特征在于，所述重组腺相关病毒的给药剂量为E8/眼~E16/眼，优选5E11/眼~2E12/眼，更优选的2E12/眼。