

经过修饰的 AAV 衣壳蛋白及其用途

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及经过修饰的 AAV 衣壳蛋白及其用途。

背景技术

用于基因治疗的载体可分为病毒载体与非病毒载体。病毒载体中，最为常用的有腺病毒载体、慢病毒载体、腺相关病毒载体、单纯疱疹病毒载体等。

腺相关病毒 (AAV) 属于细小病毒科 (Parvoviridae) 和伴随病毒 (Dependovirus) 属。病毒体由 25nm 二十面体衣壳组成，所述 25nm 二十面体衣壳包含具有以下两个开放阅读框的 4.7kb 单链 DNA 基因组：Rep 和 Cap。非结构性 Rep 基因编码病毒复制所必需的四种调节蛋白，而 Cap 编码装配成 60 亚基衣壳的三种结构蛋白 (VP1-3)。该病毒衣壳介导 AAV 载体克服病毒转导的许多生物屏障，包括细胞表面受体结合、内吞作用、细胞内运输和细胞核中的解包封的能力。

AAV 广泛用于基因转导、基因治疗、疫苗接种以及溶瘤治疗等多个领域，具有致病性低、感染组织广、宿主细胞范围广（可在增殖和非增殖细胞中感染和表达）、免疫源性低，在体内表达外源基因时间长、无宿主细胞基因组整合等诸多优点，在实验和临床研究中被广泛应用。美国 FDA 在 2017 年批准了首个 AAV 介导的基因治疗，其用于治疗罕见的遗传性眼病，患者通过单次视网膜下施用 rAAV 载体递送的治疗药物后，四年多时间里持续观察到治疗药物的表达。

但是，目前关于 AAV 的应用目前仍存在一些挑战，例如如何提高载体的组织及细胞靶向性及转导效率，以及如何提高特定载体的包装效率，以适应工业化生产等。

发明内容

本发明涉及将包含目的基因的病毒载体（如 AAV 病毒载体）递送至期望的细胞或组织。具体地，本发明包含经过修饰的衣壳蛋白，所述经过修饰的衣壳蛋白相对于亲本 AAV 衣壳蛋白具有在氨基酸序列上的一个或多个修饰（如取代、插入或突变），当存在于 AAV 病毒载体中时，与包含未修饰的亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 病毒载体相比，对靶组织或靶细胞（例如视网膜、肌肉或关节腔）具有增加的感染性。

本发明一方面提供了一种经过修饰的腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白，所述衣壳蛋白相对于亲本 AAV 衣壳蛋白包含约 5-14 个氨基酸的多肽取代，并且其中与包含相应亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 病毒相比，包含所述经过修饰的衣壳蛋白的 AAV 病毒具有增强的视网膜细胞感染性。

在一些具体的实施方案中，所述多肽包括选自 RGNRQ (SEQ ID NO: 1)、QQNTARGNRQ (SEQ ID NO: 2)、RGNRQAAQNTA (SEQ ID NO: 3)、RGNRQQNTA (SEQ ID NO: 4)、RGNRQQQNTA (SEQ ID NO: 5)、SGNTQ (SEQ ID NO: 6)、RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7)、RGNQQPRPTSRQ (SEQ ID NO: 8)、RGNRQAAQQPTPTS (SEQ ID NO: 9) 或 RGNRQQQPTPTS (SEQ ID NO: 19) 的氨基酸序列；并且所述取代位于亲本 AAV8 的第 588~592 位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处。

在一些具体的实施方案中，所述衣壳蛋白多肽包括选自 QQNTARGNRQ (SEQ ID NO: 2)、RGNRQQNTA (SEQ ID NO: 4)、SGNTQ (SEQ ID NO: 6)、RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7) 或 RGNRQQQPTPTS (SEQ ID NO: 19) 的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述衣壳蛋白进一步包括相对于亲本 AAV8 衣壳蛋白第 262~272 位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处的突变，突变后的氨基酸序列为 SQSGASNDNH (SEQ ID NO: 10)。在一个优选的实施方案中，所述衣壳蛋白包括位于亲本 AAV8 的第 588~592 位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处的多肽取代，所述多肽为

RGNRQ (SEQ ID NO: 1); 和相对于亲本 AAV8 衣壳蛋白第 262~272 位或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处的突变, 突变后的氨基酸序列为 SQSGASNDNH (SEQ ID NO: 10)。

在一些具体的实施方案中, 本发明所述 AAV 可以源自任何血清型 AAV, 例如 AAV 血清型选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAV-DJ9、AAVrh8、AAVrh8R 或 AAVrh10。在一个优选的实施方案中, 本发明所述 AAV 选自 AAV8。

在一些具体的实施方案中, 所述衣壳蛋白进一步包括相对于亲本 AAV8 衣壳蛋白 D80 和/或 V125 位置处氨基酸的突变。在一个优选的实施方案中, 所述突变为 D80N 和/或 V125A。在另一个优选的实施方案中, 所述突变为 D80Q 和/或 V125G。在一个优选的具体实施方案中, 衣壳蛋白包括位于亲本 AAV8 的第 588~592 位氨基酸的多肽取代, 所述多肽为 RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7); 和相对于亲本 AAV8 衣壳蛋白 D80 和 V125 位置处的氨基酸突变, 所述突变为 D80N 和 V125A。在另一个优选的具体实施方案中, 所述衣壳蛋白包括位于亲本 AAV8 的第 588~592 位氨基酸的多肽取代, 所述多肽为 RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7); 和相对于亲本 AAV8 衣壳蛋白 D80 和 V125 位置处的氨基酸突变, 所述突变为 D80Q 和 V125G。

本发明的另一方面提供了另一种经过修饰的腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白, 所述衣壳蛋白包括位于亲本 AAV8 第 589 位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置后的多肽插入, 并且其中与包含相应亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 病毒相比, 包含所述经过修饰的衣壳蛋白的 AAV 病毒具有增强的视网膜细胞感染性。

在一些具体的实施方案中, 所述多肽包含选自 RGDLTTPQQ (SEQ ID NO: 20)、RGDLNTPQQ (SEQ ID NO: 21) 或 RGDVSSPQQ (SEQ ID NO: 22) 的氨基酸序列。所述 AAV 可以源自任何血清型 AAV, 例如 AAV 血清型选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAV-DJ9、AAVrh8、AAVrh8R 或 AAVrh10。在一个优选的实施方案中, 所述 AAV 血清型为 AAV8。

本发明另一方面提供了一种重组腺相关病毒 (rAAV), 包括:

- i. 本发明提供的所述经过修饰的衣壳蛋白;
- ii. 包含编码基因产物的异源核酸。

在一些具体的实施方案中, 所述基因产物为 VEGF 拮抗剂或 TNF- α 拮抗剂。

在一些具体的实施方案中, 所述 VEGF 拮抗剂选自阿柏西普、康柏西普、雷珠单抗、布洛赛珠单抗, 优选阿柏西普。

在一些具体的实施方案中, 所述 TNF- α 拮抗剂选自依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗、培塞利珠单抗或戈利木单抗, 优选依那西普。

本发明另一方面提供了一种药物组合物, 其包括:

- a) 本发明提供的所述重组腺相关病毒;
- b) 药学上可接受的赋形剂。

本发明另一方面提供了用作药物的根据本发明所述的重组腺相关病毒。

在一些具体的实施方案中, 本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过玻璃体、视网膜、脉络膜注射给药、静脉、皮下、肌肉或关节腔注射给药。在一个优选的实施方案中, 本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过脉络膜上腔注射给药。在另一个优选的实施方案中, 本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过肌肉或关节腔注射给药。

本发明另一方面提供了用于治疗的根据本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物。

在一些具体的实施方案中, 本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过玻璃体、视网膜或脉络膜注射给药。在一个优选的实施方案中, 本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过脉络膜上腔注射给药。

本发明另一方面提供了所述的重组腺相关病毒在制备用于预防或治疗眼部疾病的药物中的用途。

本发明另一方面提供了一种预防或治疗眼部疾病的方法，所述方法包括向有需要的个体施用有效量的根据本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物。

在一些具体的实施方案中，本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过玻璃体、视网膜或脉络膜注射给药。在一个优选的实施方案中，本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过脉络膜上腔注射给药。

在一些具体的实施方案中，本发明所述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。在一些具体的实施方案中，本发明所述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。

本发明另一方面提供了用于眼部疾病治疗方法的根据本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物。

在一些具体的实施方案中，本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过玻璃体、视网膜或脉络膜注射给药。在一个优选的实施方案中，本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过脉络膜上腔注射给药。

在一些具体的实施方案中，本发明所述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。在一些具体的实施方案中，本发明所述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。

本发明另一方面提供了所述重组腺相关病毒在制备用于预防或治疗关节炎疾病或相关病症的药物中的用途。

本发明另一方面提供了一种预防或治疗关节炎疾病或相关病症的方法，所述方法包括向有需要的个体施用有效量的根据本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物。

在一些具体的实施方案中，本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过静脉、皮下、肌肉或关节腔注射给药。

在一些具体的实施方案中，本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过肌肉或关节腔注射给药。

在一些具体的实施方案中，本发明所述关节炎疾病或相关病症选自类风湿性关节炎，青少年类风湿性关节炎，骨关节炎，痛风，假性痛风，脊椎炎，克罗恩病、斑块型银屑病，银屑病关节炎，强直性脊柱炎，脓毒性关节炎，关节炎，青少年特发性关节炎，钝性创伤，关节置换或 Still's 疾病。

本发明另一方面提供了用于关节炎疾病或相关病症治疗方法的根据本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物。

在一些具体的实施方案中，本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过静脉、皮下、肌肉或关节腔注射给药。

在一些具体的实施方案中，本发明所述的重组腺相关病毒或药物组合物通过肌肉或关节腔注射给药。

在一些具体的实施方案中，本发明所述关节炎疾病或相关病症选自类风湿性关节炎，青少年类风湿性关节炎，骨关节炎，痛风，假性痛风，脊椎炎，克罗恩病、斑块型银屑病，银屑病关节炎，强直性脊柱炎，脓毒性关节炎，关节炎，青少年特发性关节炎，钝性创伤，关节置换或 Still's 疾病。

附图说明

图 1A 显示了 AAV 衣壳蛋白 GH 环部分区域的氨基酸序列比对；
图 1B 显示了 AAV 衣壳蛋白 GH 环部分区域的氨基酸序列比对；
图 2 为 AAV8 衣壳蛋白突变体质粒的构建示意图；
图 3 显示了小鼠玻璃体内注射 AAV8 突变体病毒的 EGFP mRNA 表达水平；
图 4 显示了小鼠玻璃体内注射 AAV8 突变体病毒的视网膜铺片 EGFP 荧光信号；
图 5 显示了大鼠玻璃体内注射 AAV8 突变体病毒的视网膜铺片 EGFP 荧光信号；
图 6 显示了兔脉络膜上腔注射 AAV8 突变体病毒的 EGFP 荧光信号及 DAPI 信号；
图 7 为 ARPE19 细胞培养 AAV8 突变体病毒的 EGFP 荧光信号；
图 8A 显示了流式细胞术对 AAV8 突变体病毒感染 ARPE19 细胞后 EGFP 阳性细胞计数；
图 8B 显示了流式细胞术对 AAV8 突变体病毒感染 ARPE19 细胞后 EGFP 阳性细胞计数；
图 9 显示了兔脉络膜上腔注射 AAV8 突变体病毒 mCherry 基因组 DNA 相对含量；
图 10 显示了小鼠肌肉注射 AAV8 突变体病毒的 luciferase 荧光强度；
图 11 显示了小鼠关节腔/肌肉注射 AAV8 突变体病毒的临床评分；
图 12 显示了小鼠关节腔/肌肉注射 AAV8 突变体病毒脚掌厚度。

具体实施方式

本发明涉及与包含未修饰的亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 病毒载体相比，对靶组织或靶细胞（例如视网膜、肌肉或关节腔）具有增加的感染性的衣壳蛋白、包含该衣壳蛋白并表达目的基因（例如 VEGF 拮抗剂、TNF- α 拮抗剂）的 rAAV 及其药物组合物和应用。

衣壳蛋白

本发明提供了一种经过修饰的 AAV 衣壳蛋白，其中经过修饰的 AAV 衣壳蛋白与对应的野生型 AAV 或亲本 AAV 相比包括一个或多个氨基酸修饰。所述修饰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。所述修饰与包含未修饰的亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 病毒载体相比，对靶组织或靶细胞（例如视网膜、肌肉或关节腔）具有增加的感染性。

在特定实施方案中，经过修饰的 AAV 衣壳蛋白包括在属于以下的衣壳蛋白血清型例如 VP1 内的异源多肽取代：AAV 1 型、AAV 2 型、AAV 3 型、AAV 4 型、AAV 5 型、AAV 6 型、AAV 7 型、AAV 8 型、AAV 9 型、AAV 10 型、AAVrh10、禽类 AAV、牛类 AAV、犬类 AAV、马类 AAV、灵长类 AAV、非灵长类 AAV、牛类 AAV、AAV2.7m8、AAVShH10、AAV2.5T、AAV2.5T/7m8、AAV9/7m8、和 AAV5/7m8。在一些实施方案中，衣壳变体可以是嵌合衣壳变体。嵌合衣壳变体的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 或更多不同的衣壳蛋白血清型的部分。

在特定实施方案中，经过修饰的 AAV 衣壳蛋白包括约 5-14 个氨基酸的异源多肽取代。在一些特定实施方案中，本发明经过修饰的衣壳蛋白包括在位于亲本 AAV8 的第 588~592 位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处的约 5-14 个氨基酸的异源多肽取代。AAV1~AAV9 等的氨基酸序列如专利 US8962330B、US10041090B 等中所描述。在一个具体的实施方案中，本发明经过修饰的衣壳蛋白包括在位于亲本 AAV8 的第 588~592 位氨基酸处的约 5-14 个氨基酸的异源多肽取代。所述亲本/野生型 AAV8 衣壳蛋白的第 588~592 位氨基酸为“QQNTA”。因此本发明的一个具体实施方案为经过修饰的衣壳蛋白在亲本/野生型 AAV8 衣壳蛋白的第 588~592 位氨基酸“QQNTA”取代为 5-14 个氨基酸的异源多肽。与 AAV8 第 588~592 位氨基酸相对应的取代位点在其他衣壳蛋白的对应位置处，例如如图 1A 中所示。例如在 AAV1 的 586~590 氨基酸处，在 AAV2 的 585~589 氨基酸处，在 AAV3 的 586~590 氨基酸处，在 AAV4 的 584~588 氨基酸处，在 AAV5 的 575~579 氨基酸处，在 AAV6 的 586~590 氨基酸处，在 AAV7 的 587~591 氨基酸处，在 AAV9 的 586~590 氨基酸处，在 AAV10 的 588~592 氨基酸处。

对于上述的取代异源多肽，长度为 5 个氨基酸、6 个氨基酸、7 个氨基酸、8 个氨基酸、9 个氨基酸、10 个氨基酸或 11 个氨基酸。在一些具体的实施方案中，本发明所述多肽包括选自

RGNRQ (SEQ ID NO: 1), QQNTARGNRQ (SEQ ID NO: 2)、RGNRQAAQQNTA (SEQ ID NO: 3)、RGNRQQNTA (SEQ ID NO: 4)、RGNRQQQNTA (SEQ ID NO: 5)、SGNTQ (SEQ ID NO: 6)、RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7)、RGNQQPRPTS RQ (SEQ ID NO: 8)、RGNRQAAQQPTPTS (SEQ ID NO: 9)或RGNRQQQPTPTS (SEQ ID NO: 19)的氨基酸序列。在一些优选的实施方案中,本发明所述多肽包括选自QQNTARGNRQ (SEQ ID NO: 2)、RGNRQQNTA (SEQ ID NO: 4)、SGNTQ (SEQ ID NO: 6)或RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7)或RGNRQQQPTPTS (SEQ ID NO: 19)的氨基酸序列。

在特定实施方案中,经过修饰的AAV衣壳蛋白进一步包括在相对于亲本AAV8衣壳蛋白第262~272位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处的突变。所述亲本/野生型AAV8衣壳蛋白的第262~272位氨基酸为“SNGTSGGATND”。因此本发明的一个具体实施方案为,经过修饰的衣壳蛋白在亲本/野生型AAV8衣壳蛋白的第262~272位氨基酸“SNGTSGGATND”进行突变。与AAV8第262~272位氨基酸相对应的突变位点在其他衣壳蛋白的对应位置处,例如在AAV1的261~271氨基酸处,在AAV2的261~271氨基酸处,在AAV3的261~271氨基酸处,在AAV4的255~265氨基酸处,在AAV5的251~261氨基酸处,在AAV6的261~271氨基酸处,在AAV7的262~272氨基酸处,在AAV9的261~271氨基酸处,在AAV10的262~272氨基酸处。与AAV8第262~272位氨基酸相对应的突变位点在其他衣壳蛋白的对应位置处,例如如图1B中所示。在一些具体的实施方案中,本发明突变后的氨基酸序列为SQSGASNDNH (SEQ ID NO: 10)。

在一些具体的实施方案中,本发明所述经过修饰的衣壳蛋白包括位于亲本AAV8的第588~592位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处的多肽取代,所述多肽为RGNRQ (SEQ ID NO: 1);和相对于亲本AAV8衣壳蛋白第262~272位或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处的突变,突变后的氨基酸序列为SQSGASNDNH (SEQ ID NO: 10)。在一些优选的实施方案中,本发明所述的亲本衣壳蛋白血清型为AAV8。

在另一些实施方案中,本发明经过修饰的AAV衣壳蛋白进一步包括在相对于亲本AAV8衣壳蛋白第D80和/或V125位置处氨基酸的突变。在一些具体的实施方案中,所述突变为D80N和/或V125A。在一些具体的实施方案中,所述突变为D80Q和/或V125G。在一些优选的实施方案中,所述衣壳蛋白包括位于亲本AAV8的第588~592位氨基酸的多肽取代,所述多肽为RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7);和相对于亲本AAV8衣壳蛋白D80和V125位置处的氨基酸突变,所述突变为D80N和V125A。在另一些优选的实施方案中,所述衣壳蛋白包括位于亲本AAV8的第588~592位氨基酸的多肽取代,所述多肽为RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7);和相对于亲本AAV8衣壳蛋白D80和V125位置处的氨基酸突变,所述突变为D80Q和V125G。

在另一些实施方案中,本发明经过修饰的AAV衣壳蛋白包括在相对于亲本AAV8第589位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置后的多肽插入。插入位点位于AAV8第589位氨基酸或其他衣壳蛋白的对应位置之后,例如在AAV1的589氨基酸处,在AAV2的586氨基酸处,在AAV3的587氨基酸处,在AAV4的585氨基酸处,在AAV5的576氨基酸处,在AAV6的587氨基酸处,在AAV7的588氨基酸处,在AAV9的587氨基酸处,在AAV10的589氨基酸处之后。在一些具体的实施方案中,所述插入的多肽包含RGDLTTPQQ (SEQ ID NO: 20)、RGDLNTPQQ (SEQ ID NO: 21)或RGDVSSPQQ (SEQ ID NO: 22)的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中,本发明所述经过修饰的AAV衣壳蛋白包括在相对于亲本AAV8第589位氨基酸后的多肽插入,所述插入多肽包含RGDLTTPQQ (SEQ ID NO: 20)、RGDLNTPQQ (SEQ ID NO: 21)或RGDVSSPQQ (SEQ ID NO: 22)的氨基酸序列。

在一些实施方案中,本发明所述经过修饰的衣壳蛋白还包括与上述经过氨基酸的取代、突变和/或插入的衣壳蛋白的氨基酸序列具有至少85%、90%、95%、98%、99%或100%同源性的序列。

在一些实施方案中,与包含相应于亲本/野生型衣壳蛋白的AAV病毒相比,包含经过修饰的衣壳蛋白的AAV对视网膜细胞的感染性增强至少1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍甚至更高。所述视网膜细胞包括RPE-19细胞(人视网膜色素上皮细胞系)、视网膜神经节

细胞、无长突细胞、水平细胞、双极细胞、感光细胞、视锥细胞、视杆细胞、Müller神经胶质细胞和视网膜色素上皮细胞等。

在一些具体的实施方案中，与包含相应于亲本/野生型衣壳蛋白的AAV病毒相比，包含经过修饰的衣壳蛋白的AAV对RPE细胞的感染性增强至少1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍甚至更高。

在一些具体的实施方案中，与包含相应于亲本/野生型衣壳蛋白的AAV病毒相比，包含经过修饰的衣壳蛋白的AAV经过脉络膜上腔注射后对视网膜细胞的感染性增强至少1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍甚至更高。

在一些具体的实施方案中，与包含相应于亲本/野生型衣壳蛋白的AAV病毒相比，包含经过修饰的衣壳蛋白的AAV经过玻璃体注射后对视网膜细胞的感染性增强至少1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍甚至更高。

重组腺相关病毒 (rAAVs)

本发明的基因递送载体为重组腺相关病毒 (rAAVs)。在一些实施方案中，本发明所述的rAAV是单链AAV (ssAAV)。其中ssAAV是指在分开的链上具有目的基因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。

在一些实施方案中，本发明所述重组腺相关病毒 (rAAV) 包括：i) 根据本发明所述的经过修饰的衣壳蛋白；ii) 包含编码基因产物的异源核酸。

在某些实施例中，本发明所述的rAAV包括本发明前述的经过修饰的衣壳蛋白，使得本发明所述的重组AAV (rAAV) 相对于包含亲本或野生型的衣壳蛋白的rAAV具有增强的细胞或组织（例如眼组织或细胞、肌肉组织或关节腔等）特异性靶向能力或感染性。

在某些实施例中，本发明所述的rAAV包含编码基因产物的异源核酸以及调节元件的多核苷酸表达盒。术语“调节元件”是指调节与之可操作地相连的基因产物的表达的一段核酸序列。因此，表达调节元件可包括启动子、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。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的序列等。

本发明所述多核苷酸表达盒中，异源核酸包括对目的基因的基因产物例如治疗性基因产物进行编码的核苷酸序列。在一些实施例中，基因产物是干扰RNA。在一些实施例中，基因产物是适配体。在一些实施例中，基因产物是多肽。在一些实施例中，基因产物是提供用于对基因功能进行位点特异性敲低的位点特异性核酸酶。在一些优选的实施例中，基因产物是多肽、蛋白、融合蛋白、抗体等。

在一些实施方案中，本发明所述基因产物选自VEGF拮抗剂、TNF- α 拮抗剂、PD-1/PD-L1抑制剂、Ang-2抑制剂、血浆激肽释放酶抑制剂、内皮抑素、肿瘤抑素、血管抑素、色素上皮衍生因子 (PEDF)、可溶性Tie-2受体、Ang-2拮抗剂、CD组织金属蛋白酶抑制剂-3 (TIMP-3)、光响应性视蛋白（例如视紫红质）、抗凋亡多肽（例如Bcl-2、Bcl-Xl）、神经胶质源性神经营养因子 (GDNF)、成纤维细胞生长因子2、神经秩蛋白 (neurturin, NTN)、睫状神经营养因子 (CNTF)、神经生长因子 (NGF)、神经营养蛋白-4 (NT4)、脑源性神经营养因子 (BDNF) 以及其功能性变体和片段，包含与这些蛋白或多肽中的任何蛋白或多肽具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的序列同一性的变体、以及包括这些蛋白、多肽或其变体中至少20%、至少30%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的片段。

在一个实施方案中，本发明所述基因产物选自VEGF拮抗剂。在一个具体的实施方案中，所述VEGF拮抗剂选自VEGF受体1 (VEGFR-1，或Flt) 或受体2 (VEGFR-2，或Flk) 的细胞外结构域1-7中的任一个结构域，例如VEGFR-1细胞外结构域2 (Flt d2) 和/或VEGFR-2细胞外结构域3或4。

在一个具体的实施方案中，所述VEGF拮抗剂包括选自下列组中的至少1项：

a) 包含VEGFR-1的细胞外结构域2和VEGFR-2的细胞外结构域3的融合蛋白；示例性的，所述融合蛋白具有SEQ ID NO: 11 (Fltd2 Flkd3) 所述的氨基酸序列；

b) 包含VEGFR-1的细胞外结构域2、VEGFR-2的细胞外结构域3和结构域4的融合蛋白；示例性的，所述融合蛋白具有SEQ ID NO: 12 (Fltd2 Flkd3, 4) 所述的氨基酸序列；

c) 具有SEQ ID NO: 13所述的抗体重链可变区序列和SEQ ID NO: 14所述的抗体轻链可变区序列；

d) 具有SEQ ID NO: 15所述的抗体重链可变区序列和SEQ ID NO: 16所述的抗体轻链可变区序列。

其中，SEQ ID NO: 12为如下所示的序列：

GRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISN
 ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTNIIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTEL
 NVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG
 LMTKKNSTFVRVHEKPFVAFSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLES
 NHTIKAGHVLTIMEVSRDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLLVYVPPGPGDKTHTCPLCPA
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13为如下所示的序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPT
 YAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 14为如下所示的序列：

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ

SEQ ID NO: 15为如下所示的序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTIDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPY
 YATWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 16为如下所示的序列：

MEIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRF
 SSGSGSAEFTLTISSLQPDFFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG

在一个具体的实施方案中，所述VEGF拮抗剂具有如SEQ ID NO: 11所述的氨基酸序列：

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGF
 ISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTNIIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTART
 ELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASS
 GLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK (SEQ ID NO: 11)

在一个具体的实施方案中，所述编码VEGF拮抗剂的核苷酸具有如SEQ ID NO: 23所述的序列：

AGCGACACCGGCCCGGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAAATCCCTGAGATCATTCACA
 TGACAGAAGGCCGCGAACTGGTGATTCCCTGCAGGGTTACCAGCCCAAACATCACCGT
 GACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCTGACGGCAAACGGATCATCTGG
 GACTCTAGGAAAGGCTTTATCATCTCCAATGCCACATACAAAGAGATTGGCCTGCTGA
 CCTGCGAGGCTACGGTCAACGGCCACCTGTACAAAACAAATTACCTGACCCACAGACA
 GACCAACACAATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCATCCCATGGCATTGAGCTGTCCGTG

GGAGAAAAGCTGGTGTGCTGAATTGTACGGCTAGAACAGAACTTAACGTGGGCATCGATT
TCAACTGGGAGTACCCTAGCTCCAAGCACCAGCATAAAAAGCTGGTGAACCGGGACCT
GAAGACCCAGTCCGGCAGTGAGATGAAAAAGTTCTTGAGCACCTGACCATCGATGGA
GTGACCCGAAGCGACCAGGGCCTGTACACCTGTGCCGCCTCCTCTGGGCTGATGACAA
AAAAGAACAGCACCTTTGTCTAGAGTGCACGAGAAGGATAAAACCCACACCTGCCCTCC
TTGTCCCGCTCCTGAGCTGCTGGGGGGACCCTGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCA
AGGATACCCTGATGATCAGCCGAACCCAGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTC
CCACGAGGACCCAGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAT
GCCAAGACCAAAACCAAGAGAGGAGCAGTATAACTCCACCTACAGGGTGGTGGACGTG
CTGACTGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTTAGCA
ATAAAGCTCTGCCCCCCCCATCGAAAAGACCATTTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCAAG
GGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTG
AGTCTCACATGTCTCGTGAAGGGCTTTTACCCTAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAAA
GCAACGGACAGCTGAGAATAACTATAAGACCACACCCCCCGTGCTGGATTCCGACGG
CAGTTTTTTCCTGTACTCTAAGCTGACAGTGGACAAATCCCGCTGGCAGCAGGGCAAC
GTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTATACAGAAGAGCC
TGAGCCTGAGCCCCGGGAAGTGA (SEQ ID NO: 23)

在一些实施方案中，所述蛋白或多肽选自TNF- α 拮抗剂。在一些具体实施方案中，所述VEGF拮抗剂包括选自依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗、培塞利珠单抗或戈利木单抗。

在一个具体的实施方案中，所述TNF- α 拮抗剂具有SEQ ID NO: 17所述的重链可变区序列和SEQ ID NO: 18所述的轻链可变区序列。

SEQ ID NO: 17为如下所示的序列：

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHID
YADSVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLVT
VSS

SEQ ID NO: 18为如下所示的序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRF
SGSGSGTDFLTITSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK

在一个具体的实施方案中，所述TNF- α 拮抗剂具有SEQ ID NO: 24所述的氨基酸序列：

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDST
YTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRTPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK
CRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSDTTSSTDICRPHQICNVVAIPGDASMDAVCTSTS
PTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPSPPAEGSTGDEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 24)

在一个具体的实施方案中，所述编码TNF- α 拮抗剂的核苷酸具有如SEQ ID NO: 25所述的序列：

CTGCCCCGCCAAGTGGCCTTCACCCCCTATGCCCCGAGCCCGGCTCCACCTGTAGACT
GAGAGAGTACTACGATCAGACCGCTCAGATGTGCTGCAGCAAGTGCAGCCCCGGGCAG
CACGCCAAGGTGTTCTGCACCAAGACAAGCGACACCGTGTGCGACAGCTGCGAGGACA
GCACATACACACAACCTGTGGAACCTGGGTGCCCGAGTGCCTGAGCTGCGGCAGCAGATG
CAGCAGCGACCAAGTGGAGACCCAAGCCTGCACAAGAGAGCAGAACAGAATCTGCAC
CTGCAGACCCGGCTGGTACTGCGCCCTGAGCAAGCAAGAGGGCTGCAGACTGTGCGCC
CCCCTGAGAAAGTGTAGACCCGGCTTTGGCGTGGCTAGACCCGGCACAGAAACAAGCG
ACGTCGTGTGCAAACCTTGCGCTCCCGGCACCTTCAGCGACACCACAAGCAGCACCGA

CATCTGCAGACCCCATCATGATCTGCAACGTGGTGGCCATCCCCGGCGACGCTAGCATG
GACGCCGTCTGCACCTCCACAAGCCCCACCCGGAGCATGGCTCCTGGCGCGTGCATC
TGCCTCAGCCCGTGAGCACCCGGTCCCAACACACACAGCCTACCCCCGAGCCTAGCAC
CGCTCCCTCCACATCCTTCTGCTCCCTATGGGGCCTAGCCCCCCTGCCGAAGGCAGCA
CCGGCGACGAGCCCAAGAGCTGCGATAAAACCCACACATGCCCCCCTGCCCCGCCCC
TGAATCCTGGGCGGGCCTAGCGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGA
TGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCC
CGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA
GCCTAGAGAGGAGCAGTACGACAGCACCTACAGAGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTG
CACCAAGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTG
CCCGTCTCTATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGGCAGCCTAGAGAGCCCCAA
GTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTGAGCCTGACCT
GCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGGCA
GCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTC
CTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAAGGCAACGTGTTCAGTG
GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCCTACACACAGAAGAGCCTGAGCCTGA
GCCCCGGCTGA (SEQ ID NO: 25)

在一些实施方案中,所述VEGF拮抗剂或TNF- α 拮抗剂具有与上述氨基酸序列具有至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%同一性或100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中,所述VEGF拮抗剂或TNF- α 拮抗剂具有与上述核苷酸序列具有至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%同一性或100%同一性的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述蛋白或多肽选自具有一个或多个不同的抗原结合位点。例如在一些实施方案中，所述蛋白或多肽同时结合VEGF和Ang-2。在一个具体的实施方案中，所述蛋白或多肽为同时结合VEGF和Ang-2的双特异性抗体，例如Faricimab双抗。

在本发明的一些实施例中，可以使用密码子优化将编码序列设计用于更好地表达目的基因。本发明可以对编码多肽、融合蛋白、抗体或其功能性片段的核苷酸密码子进行优化，以提高目的基因在靶细胞、组织或物种中的蛋白表达水平。编码序列是对用于转录和翻译的氨基酸进行编码的mRNA序列的一部分。在转录和翻译过程中，61个核苷酸密码子中的每三个核苷酸密码子被转录和翻译成20个氨基酸中的任一个氨基酸。然而，不同的细胞类型和不同的动物物种对相同氨基酸进行编码的tRNA频率不同。当基因序列含有不频繁表达的密码子时，核糖体转录机制可能会减慢，从而阻碍有效转录。因此本领域技术人员可以通过“密码子优化”来改善目的基因的表达水平。简言之，编码产物的核苷酸序列用同义密码子序列修饰，例如采用在靶细胞中能够更高频率表达的密码子来替换低频率表达的密码子，以此来提高目标物质在特定细胞、组织或物质中的表达水平，例如提高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或超过100%。密码子优化的编码序列可以通过各种不同的方法来设计。这种优化可以使用在线提供的方法、公开的方法或提供密码子优化服务的公司来进行。例如在国际专利公开号WO2015/012924中描述了一种密码子优化方法，其通过引用并入本文。产物的开放阅读框（ORF）的整个长度适当地被修改。然而，在一些实施方案中，只有ORF的一个片段可以被改变。通过使用这些方法之一，产生编码多肽的密码子优化的编码核苷酸。

在一些实施方案中，本发明所述多核苷酸表达盒中一种或多种表达调控元件。例如，调控元件包含组成型启动子区，编码基因产物的核苷酸序列与组成型启动子可操作地连接，所述启动子是广泛存在与细胞、组织或物种中具有活性的启动子，所述启动子促进体内或体外特定细胞或组织中目的基因的表达。在一些实施方式中，启动子的实例包含鸡 β -肌动蛋白启动子(CBA)、巨细胞病毒启动子(CMV)、CMV早期增强子/鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子/兔 β -珠蛋白内含子(CAG)、延伸因子1 α 启动子(EF1 α)、人类磷酸甘油酸激酶启动子(PGK)、

MNT启动子、UB6启动子、CAG启动子、RPE65启动子、视蛋白启动子、线粒体重链启动子、泛素启动子等。

在一些实施方案中，调控元件包含诱导性启动子区，编码基因产物的核苷酸序列与诱导性启动子可操作地连接。在一些实施方案中，所述诱导性启动子为光感受器特异性启动子。合适的光感受器特异性启动子包含例如视紫红质启动子、视紫红质激酶启动子、 β 磷酸二酯酶基因启动子、视网膜色素变性基因启动子、光感受器间维甲酸结合蛋白（IRBP）基因增强子、IRBP基因启动子、视蛋白基因启动子、视网膜劈裂蛋白基因启动子、CRX同源域蛋白基因启动子、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 转导活性多肽1（GNAT1）基因启动子、神经视网膜特异性亮氨酸拉蛋白（NRL）基因启动子、人类视锥抑制蛋白（hCAR）启动子、以及PR2.1、PR1.7、PR1.5和PR1.1启动子、RPE特异性启动子（如RPE65基因启动子）、细胞视黄醛结合蛋白（CRALBP）基因启动子、色素上皮源性因子（PEDF aka serpin F1）基因启动子、卵黄样营养不良（VMD2）启动子、穆勒神经胶质细胞特异性启动子（如神经胶质原纤维酸性蛋白（GFAP）启动子）、双极特异性启动子（如GRM6启动子）等。

本发明所述多核苷酸表达盒中的表达调控序列还可以包含多腺苷酸化信号。所述多腺苷酸化信号也被称为多腺苷酸化位点、多腺苷酸尾、Poly(A)位点、Poly(A)信号或Poly(A)尾。多腺苷酸化区是指多聚腺苷酸与信使RNA（mRNA）分子的共价链结。在蛋白质生物合成的过程中，这是产生准备作翻译的成熟mRNA的方式的一部分。在真核生物中，多聚腺苷酸化是一种机制，令mRNA分子于它们的3'端中断。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。一些示例性的多腺苷酸化信号包含猴空泡病毒40（SV40）、人生长激素（HGH）、牛生长激素（BGH）或 β -珠蛋白。

本发明所述的多核苷酸表达盒还可以包含反向末端重复序列（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。通常，ITR序列的长度约为145bp。优选地，分子中基本上使用了编码ITR的整个序列，以及本领域技术人员根据本领域的常规技术手段对这些ITR序列的修饰。在本申请中使用ITR分子的一个实例是包含目的基因的“顺式”质粒，其中目的基因序列和相关的调控元件侧接5'和3'AAV ITR序列。AAV ITR序列可以从任何已知的AAV获得，包括目前鉴定的哺乳动物AAV类型。在一些实施方案中，编码目的基因的异源核苷酸在AAV ITR的侧面（例如，在方向5'-ITR-目的基因-ITR-3'）。在一些实施例中，AAV ITR选自自由AAV1 ITR，AAV2 ITR，AAV3 ITR，AAV4 ITR，AAV5 ITR，AAV6 ITR，AAV7 ITR，AAV8 ITR，AAV9 ITR，AAV10 ITR，AAV11 ITR和AAV12 ITR组成的组。

本发明所述的多核苷酸表达盒进一步包括位于编码序列下游和聚腺苷酸化位点上游的RNA输出信号。RNA输出信号是顺式作用的转录后调控元件，可增强RNA从细胞核中的输出。示例性的RNA输出序列包括但不限于来自乙型肝炎病毒转录后调控元件（HPRE）和土拨鼠肝炎病毒转录后元件（WPRE）序列。

本领域技术人员可以理解的是，本发明所述的多核苷酸表达盒可以任选包含其他元件，包括但不限于促进克隆的限制性位点，用于可操作性地连接各元件，或调节基因表达的调节元件。例如如质粒载体的细菌序列、噬菌体整合酶载体的attP位点、attB位点、启动子接头、多腺苷酸化序列接头等。

在某些实施方案中，本发明所述的多核苷酸表达盒包含本领域技术人员根据对上述所提到的元件中的两个或多个元件以及目的基因的组合产生，其中多核苷酸表达盒中目的基因编码序列和相关的调控元件的侧面是5'和3'AAV ITR序列。

例如，本发明的多核苷酸表达盒，按照5'到3'的顺序可以包括N端AAV ITR、增强子/启动子/内含子、Kozak序列，基因产物的编码序列，WPRE或HPRE RNA输出信号序列，多腺苷酸化信号序列、以及C端AAV ITR。

在一个具体的实施方案中，本发明所述的重组腺相关病毒包含编码基因产物的多核苷酸表达盒，所述多核苷酸表达盒从5'到3'端顺序包括：

- (a) 5'AAV ITR;
- (b) CMV增强子;
- (c) CBA启动子;
- (d) 鸡 β -肌动蛋白内含子;
- (e) 基因产物编码序列;
- (f) 兔 β -珠蛋白多聚腺苷酸信号序列;
- (g) 3'AAV ITR。

所述基因产物编码序列为编码前述基因产物（例如前述的VEGF拮抗剂或TNF- α 拮抗剂）的核酸序列。

可以使用标准方法生产包含本发明所述的经过修饰的衣壳蛋白的重组病毒载体。例如，所述方法包括培养含有人工基因组的宿主细胞，所述人工基因组包含：由AAV ITR侧接的顺式多核苷酸表达盒，其中所述顺式多核苷酸表达盒包含基因产物的编码序列，所述编码序列可操作地连接至将控制基因产物在人类细胞中的表达的表达控制元件；缺乏AAV ITR的反式表达盒，其中所述反式表达盒编码AAV rep和衣壳蛋白，所述AAV rep和衣壳蛋白可操作地连接至驱动所述AAV rep和衣壳蛋白在培养物中的所述宿主细胞中的表达并且反式供应rep和cap蛋白的表达控制元件；足以准许通过AAV衣壳蛋白复制和包装所述人工基因组的腺病毒辅助功能；以及从所述细胞培养物回收包裹所述人工基因组的重组AAV。

“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。

药物组合物

本发明的另一方面在于提供包含rAAV的药物组合物，所述组合物包含本发明前述的重组腺相关病毒和药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

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。

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。

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，肌内，皮下和腹膜内给药。

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他成分。

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。

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。

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体剂型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。

重组腺相关病毒（rAAV）的递送

本发明涉及一种用于预防或治疗疾病或症状的方法，其中所述方法包括将治疗有效量的本发明所述rAAV病毒或药物组合物递送至受试者。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。

“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。

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。

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。

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。

在一些实施方案中，rAAV递送至哺乳动物受试者可通过例如肌肉注射进入哺乳动物受试者。

在一些实施方案中，rAAV递送至哺乳动物受试者可通过例如静脉注射进入哺乳动物受试者。

在一些实施方案中，rAAV递送至哺乳动物受试者可通过例如关节内注射进入哺乳动物受试者。“关节内注射”这里定义为注射或注入到关节中。关节内注射通常用于将药物施用到受炎症影响的关节中。

施用包含本发明所述的rAAV或药物组合物的作用可以是预防病症发展、停止病症进展、逆转病症进展等。疾病或病症与rAAV所装载的目的基因及表达的基因产物有关。例如当基因产物为VEGF拮抗剂，预防或治疗的疾病或病症可以是VEGF相关的疾病。例如“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。

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、Best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。

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。

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。

例如当基因产物为TNF- α 拮抗剂，预防或治疗的疾病或病症可以是关节炎疾病或相关病症。目前，估计有超过100种不同形式的关节炎。通常，关节紊乱被称为关节病，当涉及一个或多个关节的炎症时，这种紊乱被称之为关节炎。关节炎在本文中被理解为指“关节疼痛”或“关节疾病”。在一个优选实施方案中，关节炎疾病选自成人发作的Still病、强直性脊柱炎、关节炎、背痛、Behcet病、钝性创伤、滑囊炎、焦磷酸钙沉积病（CPPD）、腕管综合征、髌骨软骨软化症、慢性疲劳综合征、复杂局部疼痛综合征、冷冻比林相关周期性综合征（CAPS）、退行性椎间盘疾病、发育性髋关节发育不良、埃勒-丹洛斯、家族性地中海热、纤维肌痛、第五疾病、巨细胞动脉炎、痛风、血色病、感染性关节炎、炎性关节炎，炎性肠病、关节置换、幼年关节炎、幼年皮炎（JD）、青少年特发性关节炎（JIA）、青少年类风湿性关节炎、青少年硬皮病、川崎病、狼疮、儿童和青少年狼疮、莱姆病、混合性结缔组织病、肌炎（包括多发性肌炎、皮炎）、骨关节炎（OA）、骨质疏松症、pagets、回旋风湿症、髌股痛综合征、儿童风湿性疾病、儿童SLE、风湿性多肌痛、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺氏现象、反应性关节炎、反射性交感神经营养不良、赖特综合征、风湿热、风湿病、类风湿关节炎、硬皮病、脓毒性关节炎，干燥症、椎管狭窄、脊椎关节炎、斯蒂尔氏病、系统性青少年特发性关节炎和系统性红斑狼疮，儿童和青少年系统性红斑狼疮、系统性硬化、颞动脉炎、腱炎、血管炎和韦格纳肉芽肿。

在另一优选实施方案中，关节炎疾病选自类风湿性关节炎，青少年类风湿性关节炎，骨关节炎，痛风，假性痛风，脊椎炎，克罗恩病、斑块型银屑病，银屑病关节炎，强直性脊柱炎，脓毒性关节炎，关节炎，青少年特发性关节炎，钝性创伤，关节置换或Still's疾病。

在更优选的实施方案中，关节炎疾病是涉及一个或多个关节炎的关节紊乱。优选地，所述关节炎疾病选自类风湿关节炎（RA）、幼年类风湿性关节炎、骨关节炎（OA）、痛风、假痛风、脊椎关节炎（SpA）、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、脓毒性关节炎，关节炎、幼年特发性关节炎和Still氏病。

下面将结合实施例对本发明作进一步阐述，但这些实施例不对本发明构成任何限制。
下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。
下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

实施例 1 突变体构建

使用定点诱变和重组 DNA 技术来生成 AAV8 的变体，所述变体包含位于亲本 AAV8 的第 Q588~A592 位氨基酸（QQNTA）5-14 个氨基酸的一段多肽取代，或者进一步包括位于亲本 AAV8 衣壳蛋白第 N262~N272 位氨基酸对应位置处的突变，突变后的氨基酸序列为 SQSGASNDNH（SEQ ID NO: 10）；或者进一步包括 D80N、V125A、V125G 位突变，如表 1。示例性的 No.12 衣壳突变体质粒示意如图 2。

表 1

突变体	Q588~A592 氨基酸取代
No.12	RGNRQ (SEQ ID NO: 1)
No.121	QQNTARGNRQ (SEQ ID NO: 2)
No.122	RGNRQAAQQNTA (SEQ ID NO: 3)
No.123	RGNRQQNTA (SEQ ID NO: 4)
No.124	RGNRQQQNTA (SEQ ID NO: 5)
No.125	SGNTQ (SEQ ID NO: 6)
No.128	RGNQQTARQ (SEQ ID NO: 7)
No.129	RGNQQPRPTS (SEQ ID NO: 8)
No.1213	RGNRQAAQQPTPTS (SEQ ID NO: 9)
No.1214	RGNRQQQPTPTS (SEQ ID NO: 19)

表 2

突变体	Q588~A592 氨基酸取代	D80 突变	V125 突变
No.1281	RGNQQTARQ (SEQ ID NO: 7)	D80N	V125A
No.1282	RGNQQTARQ (SEQ ID NO: 7)	D80Q	V125G

表 3

突变体	Q588~A592 氨基酸取代	N262~N272 突变
No.1312	RGNRQ (SEQ ID NO: 1)	SQSGASNDNH (SEQ ID NO: 10)

另一组衣壳蛋白突变体则是在亲本 AAV8 的第 Q589 位氨基酸后插入一段多肽序列，如表 4。

表 4

突变体	589 位氨基酸后插入多肽序列
No.15	RGDLTTPQQ (SEQ ID NO: 20)
No.151	RGDLNTPQQ (SEQ ID NO: 21)
No.152	RGDVSSPQQ (SEQ ID NO: 22)

AAV8 突变体的病毒包装通过三质粒共转染细胞生成：包括 ITR 侧接目的基因的表达盒（GFP 或荧光素酶）的第一质粒（pAAV-CAG-EGFP）；本实施例 1 中构建的对 Rep/Cap 基因进行编码的突变体质粒（第二质粒）；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，后续备用。

实施例 2 小鼠玻璃体注射转染实验

2.1 突变体的 EGFP mRNA 表达水平

将纯化后的 AAV8 突变体病毒，按 7E+8vg/每眼进行小鼠玻璃体注射。玻璃体注射 21d 后，取小鼠眼球，使用冰冻匀浆机磨碎眼球，使用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA，并使用逆转录试剂盒合成 cDNA，通过 qPCR 测定特异性 EGFP 引物探针组（其中，上游引物 EGFP-F 的序列为：5'-CACATGAAGCAGCAGCACTT-3'（SEQ ID NO: 26）；下游引物 EGFP-R 的序列为：5'-TCGTCCTTGAAGAAGATGGT-3'（SEQ ID NO: 27）；探针为：5'-AGTCCGCCATGCCCGAAGGCT-3'-TAMRA，探针中所含序列如 SEQ ID NO: 28 所示），计算归一化 AAV8 突变体的 EGFP mRNA 水平，即比较不同 AAV8 突变体对玻璃体转染效果，结果如图 3。

2.2 视网膜铺片

将纯化后的 AAV8 突变体病毒，按 7E+8vg/每眼进行小鼠玻璃体注射；玻璃体注射 21d 后，取小鼠眼球，4%多聚甲醛过夜固定小鼠眼球，使用手术显微镜剪在正置显微镜下剥离小鼠视网膜，对小鼠视网膜进行铺片，共聚焦拍摄 EGFP 荧光信号，结果如图 4 所示。

实施例 3 大鼠玻璃体注射转染实验

将纯化后的 AAV8 突变体病毒，按 1.92E+9vg/每眼进行大鼠玻璃体注射；玻璃体注射 21d 后，取大鼠眼球；4%多聚甲醛过夜固定大鼠眼球；使用手术显微镜剪在正置显微镜下剥离大鼠视网膜；对大鼠视网膜进行铺片，荧光扫描显微镜拍摄 EGFP 荧光信号，结果如图 5 所示。

实施例 4 兔脉络膜上腔注射转染实验

将纯化后的 AAV8 突变体病毒，按 5E+10vg/每眼进行新西兰兔的脉络膜上腔注射；脉络膜上腔注射 14d 后，取新西兰兔眼球；4%多聚甲醛过夜固定新西兰兔眼球；对固定的眼球进行脱水及组织包埋处理；进行冰冻切片，然后细胞核染色（DAPI）；使用共聚焦显微镜进行全图扫描，捕获 EGFP 荧光信号及 DAPI 信号，结果如图 6 所示（图 5 中，EGFP：自发荧光，DAPI：细胞核，RGC：神经节细胞，INL：视网膜内核层；ONL：视网膜外核层；RPE：视网膜上皮细胞），从荧光图来看，野生型对感光细胞层及 RPE 层的转导效率不高，而突变体对感光细胞及 RPE 层的转导效率大幅度提高。

实施例 5 ARPE19 细胞感染实验

将 ARPE19 细胞种于 12 孔板中，培养至细胞融合度 70-80%（一般细胞个数为 1.0E+5 个）；按所需比例加入病毒上清（4.5E+9 Vg），使得病毒上清量+培养基总量为 1000 μ L；感染 16 h

后，每日更换培养基，继续培养至 72 小时，共聚焦拍摄 EGFP 荧光信号，观测荧光蛋白表达情况。ARPE19 细胞 48 小时感染情况如图 7 所示。

同时，采用流式细胞术方法对 EGFP 阳性细胞数进行计数。以 2E+5 细胞数于 6 孔板细胞皿培养，加入 1E+10 vg 已包装的突变体病毒，37℃培养 48 h；使用胰蛋白酶消化细胞，收集细胞，并用 300 μL 无菌 PBS 重悬细胞；使用罗氏流式细胞术选用 FITC（488nm）通道测量，设定测量总细胞数为 10 万，计数 EGFP 阳性细胞数。结果如图 8A、8B 所示。

实施例 6 兔脉络膜上腔注射转染实验

按照实施例 1 中所述三质粒共转染方法制备包括不同突变体病毒 AAV-mCherry(mCherry 是一种珊瑚中分离出来的蛋白，此处用作一种红色荧光染料示踪剂)，并通过 ddPCR 测量每种病毒的基因组滴度；将每种突变体的病毒的基因组滴度通过缓冲液稀释至 1.0E12 vg/mL，在兔眼颞上方 4 mm 处进行脉络膜上腔注射，每眼 100 μL，每种病毒注射 2 只兔，4 只眼；5 天后，处死新西兰兔，取眼球，分离视网膜/脉络膜组织后，进行低温组织匀浆，取上清，通过病毒基因组 DNA 提取试剂盒提取病毒基因组 DNA，通过 qPCR 测定每种病毒转导视网膜/脉络膜病毒基因组 DNA 相对含量，结果如表 5 及图 9 所示。

表 5

	AAV8	No.128	No.1281	No.1282	No.151	No.15	No.152
病毒基因组 DNA 相对含量 (vg/mL)	1.88E8	4.45E9	4.41E9	2.30E10	1.19E9	1.81E9	7.71E8

实施例 7 感染 APRE 细胞蛋白表达实验

按照实施例 1 中所述三质粒共转染生产 AAV8-阿柏西普病毒和 AAV No.12-阿柏西普突变体病毒，并通过 ddPCR 测量每种病毒的基因组滴度；将每种突变体的病毒的基因组滴度通过缓冲液稀释至 3.0E12 vg/mL，细胞数为 3.0E5，每孔加入 10 μL 病毒，培养 16 h 后进行换液，72 h 后进行收集细胞及细胞上清液；通过液氮冷冻，反复冻融 3 次，进行细胞裂解，选用 ELISA 方法测定 Trap 蛋白表达水平。结果表明 AAV8-阿柏西普病毒的蛋白表达量为 97 ng/ml，AAV No.12-阿柏西普病毒的蛋白表达量为 1662 ng/ml。

实施例 8 恒河猴脉络膜上腔注射蛋白表达实验

按照实施例 1 中所述三质粒共转染生产 AAV No.128-阿柏西普病毒，并通过 ddPCR 测量每种病毒的基因组滴度；将病毒的基因组滴度通过缓冲液稀释至 1.0E13 vg/mL，在猴眼颞上方 4 mm 处进行脉络膜上腔注射，每眼 100 μL，注射 1 只猴，2 只眼；56 天后，处死恒河猴，取眼球，分离猴眼各个组织（包括，房水，脉络膜，结膜，虹膜睫状体，视网膜，巩膜，玻璃体），加入蛋白酶抑制剂后，进行低温组织匀浆，取上清，通过 ELISA 测定阿柏西普蛋白表达水平（ng/ml），结果如表 6 所示。

表 6

编号	房水	脉络膜	结膜	虹膜睫状体	视网膜	巩膜	玻璃体
左眼	12.1	1638	48.48	134.4	4056	48.42	44.9
右眼	9.95	1032	BLQ*	502.2	2112	84	36

BLQ*：未检测到。

实施例 9 小鼠肌肉注射转染实验

按照实施例 1 中所述三质粒共转染生产 AAV8-luciferase 和 AAV No.128-luciferase 病毒，并通过 ddPCR 测量病毒的基因组滴度；将病毒的基因组滴度通过缓冲液稀释至 1.62E11 vg/mL，在小鼠右腿腓肠肌进行注射，体积为 50 μ L，每种病毒注射 5 只鼠（Balb/c）；在病毒注射后的 7 天、14 天、28 天、160 天，分别于小鼠腹腔注射一定量的荧光素钠盐底物，进行小鼠活体成像，于活体成像仪进行荧光强度分析，结果如表 7 及图 10 所示。

表 7

编号	7 d	14 d	28 d	160 d
AAV8-luciferase	6.69E+06	6.30E+06	5.93E+06	4.76E+06
AAV No.128-luciferase	1.49E+08	3.18E+08	3.72E+08	1.74E+08

实施例 10 转染 293F 细胞蛋白表达实验

分别构建 AAV8-No.128-依那西普、AAV No.128-阿达木单抗质粒；选取 2 μ g 质粒，进行单质粒转染 293F 细胞，待 72 h 后，通过 ELISA 方法检测质粒的蛋白表达水平。结果表明，AAV No.128-阿达木单抗质粒的表达水平为 1010 ng/mL，而 AAV No.128-依那西普质粒的表达水平为 2020 ng/mL。

实施例 11 小鼠关节腔/肌肉注射有效性实验

1) 样品溶液制备

供试品制备：AAV No.128-依那西普病毒按照实施例 1 中所述方法进行制备并测定病毒基因组滴度，然后稀释至 9.98E12 vg/mL，备用。

阳性对照品：取阿达木单抗原液 40 mg/400 μ L，稀释至 1.6 μ g/ μ L。

2) 造模

第 0 天初次造模：选用 6 周龄的 DBA/1 雄性小鼠，先将 0.6ml 牛 II 型胶原（CII）溶液（2 mg/ml）与 0.6ml（4 mg/ml）完全弗氏佐剂装入挤膜器中，制备得到 1 ml 左右乳白色乳剂。小鼠每只尾根部皮下注射 100 μ L 乳剂，观察尾根部肿胀且乳剂未漏出，小鼠未死亡，即说明给药基本成功。

第 21 天二次造模：将 0.6ml 牛 II 型胶原（CII）（2mg/ml）与 0.6ml（4 mg/ml）不完全弗氏佐剂装入挤膜器中，制备得到 1 ml 左右乳白色乳剂，小鼠每只尾根部皮下注射 100 μ L 乳剂。

3) 给药

第 22 天给药，给药第 0 天，关节腔内注射 AAV No.128-依那西普病毒样品溶液 10 μ L/ankle（双腿均注射）。

第 22 天给药，给药第 0 天，临近关节腔肌肉注射 AAV No.128-依那西普病毒样品溶液 100 μ L/ankle（双腿均注射）。

第 22 天，阿达木单抗组背部皮下给阿达木单抗 160 μ g（原液 40mg/400 μ L 稀释至 1.6 μ g/ μ L，背部皮下使用胰岛素针注射 100 μ L），每两周给药一次。

4) 结果观察

从第 23 天起，给药第 2 天，使用电子游标卡尺监控测量脚掌厚度，同时对关节炎症情况进行临床评分，每两天一测。评分标准如下表 8：

表 8

严重程度评分	炎症程度
0	无红斑和肿胀迹象

1	局限于跗骨或踝关节的红斑和轻度肿胀
2	从脚踝到跗骨的红斑和轻度肿胀
3	从踝关节到跗骨关节的红斑和中度肿胀
4	脚踝、足部和手指周围出现红斑和严重肿胀，或肢体强直

5) 结果

脚掌厚度测量及对关节炎症情况进行临床评分的结果如图 11 及图 12 所示。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

权利要求书

1. 一种经过修饰的腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白,其特征在于,所述衣壳蛋白相对于亲本 AAV 衣壳蛋白包含约 5-14 个氨基酸的多肽取代,并且其中与包含相应亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 相比,包含所述经过修饰的衣壳蛋白的 AAV 具有增强的视网膜细胞感染性。
2. 根据权利要求 1 所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述多肽包括选自 RGNRQ (SEQ ID NO: 1)、QQNTARGNRQ (SEQ ID NO: 2)、RGNRQAAQQNTA (SEQ ID NO: 3)、RGNRQQNTA (SEQ ID NO: 4)、RGNRQQQNTA (SEQ ID NO: 5)、SGNTQ (SEQ ID NO: 6)、RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7)、RGNQQPRPTS RQ (SEQ ID NO: 8)、RGNRQAAQQPTPTS (SEQ ID NO: 9) 或 RGNRQQQPTPTS (SEQ ID NO: 19) 的氨基酸序列;并且所述取代位于亲本 AAV8 的第 588~592 位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处。
3. 根据权利要求 2 所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述多肽包括选自 RGNRQ (SEQ ID NO: 1)、QQNTARGNRQ (SEQ ID NO: 2)、RGNRQAAQQNTA (SEQ ID NO: 3)、RGNRQQNTA (SEQ ID NO: 4)、SGNTQ (SEQ ID NO: 6)、RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7) 或 RGNRQQQPTPTS (SEQ ID NO: 19) 的氨基酸序列。
4. 根据权利要求 2 或 3 所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述衣壳蛋白进一步包括相对于亲本 AAV8 衣壳蛋白第 262~272 位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处的突变,突变后的氨基酸序列为 SQSGASNDNH (SEQ ID NO: 10)。
5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述衣壳蛋白包括位于亲本 AAV8 的第 588~592 位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处的多肽取代,所述多肽为 RGNRQ (SEQ ID NO: 1);和相对于亲本 AAV8 衣壳蛋白第 262~272 位或另一血清型衣壳蛋白的对应位置处的突变,突变后的氨基酸序列为 SQSGASNDNH (SEQ ID NO: 10)。
6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述 AAV 血清型选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAV-DJ9、AAVrh8、AAVrh8R 和 AAVrh10。
7. 根据权利要求 6 所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述 AAV 血清型为 AAV8。
8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述衣壳蛋白进一步包括相对于亲本 AAV8 衣壳蛋白 D80 和/或 V125 位置处氨基酸的突变。
9. 根据权利要求 8 所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述突变为 D80N 和/或 V125A。
10. 根据权利要求 8 所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述突变为 D80Q 和/或 V125G。
11. 根据权利要求 8 或 9 所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述衣壳蛋白包括位于亲本 AAV8 的第 588~592 位氨基酸的多肽取代,所述多肽为 RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7);和相对于亲本 AAV8 衣壳蛋白 D80 和 V125 位置处的氨基酸突变,所述突变为 D80N 和 V125A。
12. 根据权利要求 8 或 10 所述的衣壳蛋白,其特征在于,所述衣壳蛋白包括位于亲本 AAV8 的第 588~592 位氨基酸的多肽取代,所述多肽为 RGNQQNTARQ (SEQ ID NO: 7);和相对于亲本 AAV8 衣壳蛋白 D80 和 V125 位置处的氨基酸突变,所述突变为 D80Q 和 V125G。

13. 一种经过修饰的腺相关病毒（AAV）衣壳蛋白，其特征在于，所述衣壳蛋白包括位于亲本 AAV8 第 589 位氨基酸或另一血清型衣壳蛋白的对应位置后的多肽插入，并且其中与包含相应亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 病毒相比，包含所述经过修饰的衣壳蛋白的 AAV 病毒具有增强的视网膜细胞感染性。

14. 根据权利要求 13 所述的衣壳蛋白，其特征在于，所述多肽包含选自 RGDLTTPQQ（SEQ ID NO: 20）、RGDLNTPQQ（SEQ ID NO: 21）和 RGDVSPQQ（SEQ ID NO: 22）的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的衣壳蛋白，其特征在于，所述 AAV 血清型选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAV-DJ9、AAVrh8、AAVrh8R 和 AAVrh10。

16. 根据权利要求 15 所述的衣壳蛋白，其特征在于，所述 AAV 血清型为 AAV8。

17. 一种重组腺相关病毒（rAAV），其包括：

- i. 前述权利要求 1-16 中任一项所述的经过修饰的衣壳蛋白；
- ii. 包含编码基因产物的异源核酸。

18. 根据权利要求 17 所述的重组腺相关病毒，其特征在于，所述基因产物为 VEGF 拮抗剂或 TNF- α 拮抗剂。

19. 根据权利要求 18 所述的重组腺相关病毒，其特征在于，所述 VEGF 拮抗剂选自阿柏西普、康柏西普、雷珠单抗、布洛赛珠单抗。

20. 根据权利要求 19 所述的重组腺相关病毒，其特征在于，所述 VEGF 拮抗剂选自阿柏西普。

21. 根据权利要求 18 所述的重组腺相关病毒，其特征在于，所述 TNF- α 拮抗剂选自：依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗、培塞利珠单抗、戈利木单抗。

22. 根据权利要求 21 所述的重组腺相关病毒，其特征在于，所述 TNF- α 拮抗剂选自依那西普。

23. 一种药物组合物，其包括：

- a) 权利要求 17-22 任一项所述的重组腺相关病毒；
- b) 药学上可接受的赋形剂。

24. 权利要求 17-22 任一项所述的重组腺相关病毒在制备用于预防或治疗眼部疾病的药物中的用途。

25. 一种预防或治疗眼部疾病的方法，所述方法包括向有需要的个体施用有效量的权利要求 17-22 任一项所述的重组腺相关病毒或权利要求 23 所述的药物组合物。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，其特征在于，通过玻璃体、视网膜或脉络膜注射给药。

27. 根据权利要求 26 所述的方法，其特征在于，通过脉络膜上腔注射给药。

28. 根据权利要求 24 所述的用途或权利要求 25-27 任一项所述的方法，其特征在于，所述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。

29. 根据权利要求 24 所述的用途或权利要求 25-27 任一项所述的方法，其特征在于，所述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。

30. 权利要求 17-22 任一项所述的重组腺相关病毒在制备用于预防或治疗关节炎疾病或相关病症的药物中的用途。

31. 一种治疗关节炎疾病或相关病症的方法，所述方法包括向有需要的个体施用有效量的权利要求 17-22 任一项所述的重组腺相关病毒或权利要求 23 所述的药物组合物。

32. 根据权利要求 31 所述的方法，其特征在于，通过静脉、皮下、肌肉或关节注射给药。

33. 根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，通过肌肉或关节内注射给药。

34. 根据权利要求 30 所述的用途或权利要求 31-33 任一项所述的方法，所述关节炎疾病或相关病症选自类风湿性关节炎，青少年类风湿性关节炎，骨关节炎，痛风，假性痛风，脊椎炎，克罗恩病、斑块型银屑病，银屑病关节炎，强直性脊柱炎，脓毒性关节炎，关节炎，青少年特发性关节炎，钝性创伤，关节置换或 Still's 疾病。