



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106267236 A

(43)申请公布日 2017. 01. 04

(21)申请号 201610649118.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2011.11.04

A61K 48/00(2006.01)

(30)优先权数据

G01N 33/50(2006.01)

61/410,725 2010.11.05 US

A01K 67/027(2006.01)

61/410,720 2010.11.05 US

(62)分案原申请数据

201180060052.2 2011.11.04

(71)申请人 斯坦福大学托管董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 K·戴瑟罗斯 V·索哈尔

L·居纳伊登

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

权利要求书2页 说明书30页

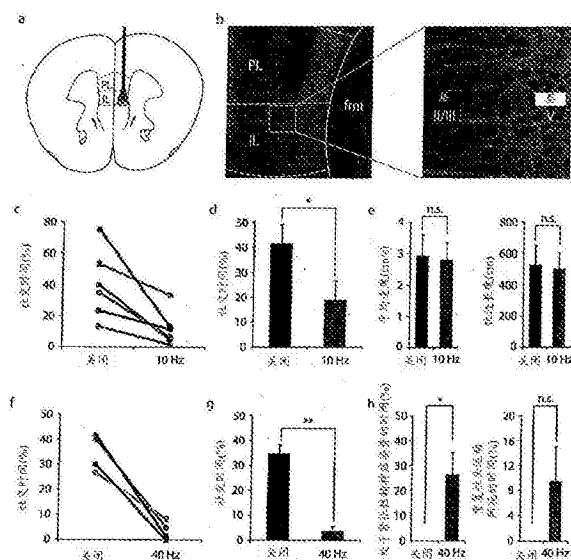
序列表6页 附图8页

(54)发明名称

精神病状态的控制和表征

(57)摘要

本发明提供使用光反应性视蛋白在动物中诱发精神病的方法,以及鉴别或筛选可适用于治疗精神病的化合物的方法。



1. 一种产生非人动物的方法,其包括在前额皮质中的V层锥体神经元子集的细胞膜上表达光反应性视蛋白,其中光活化所述视蛋白诱导所述膜的去极化并且诱发所述动物的精神病。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述V层锥体神经元子集具有单个大顶树突。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述视蛋白选自由以下组成的组:ChR2、VChR1和DChR。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述视蛋白包含与SEQ ID NO:1-7之一所示的氨基酸序列具有至少90%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

5. 一种前额皮质组织切片,其包含V层锥体神经元子集,其中光反应性视蛋白是在V层锥体神经元中的顶树突的细胞膜上表达,并且所述视蛋白的光活化诱导所述膜的去极化。

6. 如权利要求5所述的前额皮质组织切片,其中所述V层锥体神经元子集具有单个大顶树突。

7. 如权利要求5所述的前额皮质组织切片,其中所述视蛋白选自由以下组成的组:ChR2、VChR1和DChR。

8. 如权利要求5所述的前额皮质组织,其中所述视蛋白选自由以下组成的组:SFO、SSFO、C1V1、C1V1-E122T、C1V1-E162T和C1V1-E122T/E162T。

9. 一种光反应性视蛋白在制备用于在非人动物中诱发精神病的药物中的用途,其中所述光反应性视蛋白是在所述动物的所述前额皮质中的V层锥体神经元子集的细胞膜上表达,并且其中所述视蛋白的所述光活化诱导所述细胞膜的去极化。

10. 如权利要求9所述的用途,其中所述V层锥体神经元子集具有单个大顶树突。

11. 如权利要求9所述的用途,其中所述视蛋白选自由以下组成的组:ChR2、VChR1和DChR。

12. 如权利要求9所述的用途,其中所述视蛋白包含与SEQ ID NO:1-7之一所示的氨基酸序列具有至少90%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

13. 一种筛选可适用于治疗精神病的化合物的方法,其包括在向非人动物的前额皮质施用所述化合物之前和之后测量所述动物的精神病状态,其中通过光活化在所述动物的V层锥体神经元的主体的细胞膜上表达的光反应性视蛋白来诱发所述精神病状态,并且所述视蛋白的活化诱导所述膜的去极化;其中在施用所述化合物之后精神病状态测量值中的一个或多个的改良表明所述化合物可适用于治疗精神病。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述精神病状态测量值是行为测量值。

15. 如权利要求13所述的方法,其中所述精神病状态测量值是细胞测量值。

16. 如权利要求9所述的方法,其还包括在施用所述化合物之前向所述动物施用D2激动剂的步骤。

17. 一种筛选用于治疗精神病的候选化合物的方法,所述方法包括:在孵育所述组织切片与所述化合物之前和之后测量前额皮质组织切片的精神病状态,其中所述前额皮质组织切片包含V层锥体神经元的主体并且光反应性视蛋白是在V层锥体神经元的所述主体的细胞膜上表达,其中通过经由活化所述光反应性视蛋白诱导所述神经元的膜去极化来诱发所述精神病状态;其中在与所述化合物孵育之后精神病状态示值读数中的一个或多个的改良表明所述化合物为治疗精神病的候选化合物。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述精神病状态测量值是细胞测量值。

19. 如权利要求17所述的方法,其还包括在与所述化合物孵育之前孵育D2激动剂与所述前额皮质组织切片的步骤。

20. 光反应性视蛋白在制备药物中的用途,所述药物在用于改性目标神经元群体的方法中使用,所述方法包括:

向目标神经元群体提供刺激;

测量所述目标神经元群体响应所述刺激的第一电模式;

将已知诱发精神病的药物引入所述目标神经元群体中;

向所述目标神经元群体提供刺激

测量所述目标神经元群体响应所述刺激的后续电模式;以及

比较所述第一电模式与所述后续电模式。

21. 如权利要求20所述的用途,其中所述刺激为电刺激。

22. 光反应性视蛋白在制备药物中的用途,所述药物在用于改性目标神经元群体的方法中使用,所述方法包括:

用光反应性分子改性目标神经元群体,所述目标神经元群体的神经元具有单个大顶树突;

向所述目标神经元群体提供光,所述光活化所述光反应性视蛋白;以及

将药物引入所述目标神经元群体中;所述药物使得所述神经元的膜电位在去除所述光之后仍是升高的。

23. 如权利要求22所述的用途,其中所述光反应性视蛋白响应光来激发所述目标神经元群体。

24. 如权利要求23所述的用途,其中所述光反应性分子包含与SEQ ID NO:1-7之一所示的氨基酸序列具有至少90%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

25. 如权利要求22所述的用途,其中所述目标神经元群体是V层锥体神经元子集。

26. 如权利要求22所述的用途,其中所述膜电位的升高抑制所述细胞响应刺激而进行的放电。

27. 如权利要求22所述的用途,其中所述膜电位的升高使得在去除去极化电流之后发生放电。

28. 如权利要求22所述的用途,其中所述顶树突延伸到脑的浅层中。

29. 如权利要求22所述的用途,其还包括确定所述升高的膜电位的来源。

30. 如权利要求22所述的用途,其中所述药物诱发精神病。

31. 如权利要求22所述的用途,其中所述目标神经元群体的L型钙通道牵涉活动依赖性去极化。

精神病状态的控制和表征

[0001] 本申请是申请日为2011年11月4日、申请号为201180060052.2、发明名称为“精神病状态的控制和表征”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2010年11月5日提交的美国临时申请号61/410,720以及2010年11月5日提交的美国临时申请号61/410,725的优先权益,各申请的内容以引用方式整体并入本文中。

发明领域

[0004] 本申请涉及使用在前额皮质中的V层锥体神经元子集的质膜上表达的光反应性视蛋白蛋白质来诱发非人动物的精神病的方法,以及用于鉴别或筛选可用于治疗精神病的化合物的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 精神分裂症影响约1%全世界人口并且在发达国家位列前10种残疾病因中,但当前药物疗法经常无效并且诱发严重的治疗限制性副作用。广泛相信前额皮质(PFC)功能障碍下伏于精神分裂症(1、2)的许多最衰弱性方面;然而,还没有可能有原因地关联细胞生理学的特定方面与精神分裂症中的前额叶功能障碍。为寻找在精神分裂症和相关病状中观察到的精神病行为和受损认知的可能的细胞基础,我们寻求鉴别符合以下细胞行为模式:(1)发生在与精神病行为有关的神经元中,(2)由多种与精神分裂症有关的药理学或基因操作引起,以及(3)保持表面效度作为精神病的细胞内在表型。

[0007] 认为精神分裂症的许多衰弱性方面是由前额皮质功能障碍引起,但因为前额叶神经元中的特定病原性活动模式仍是未知的,所以这种功能障碍的生理学是神秘的。鉴别和理解与PFC区域内精神病相关活动模式有关的神经通路可帮助发现治疗精神分裂症患者的药理学疗法。然而,仍需要适用的允许鉴别这些复杂的神经病原性通路的精神分裂症动物模型系统。这种动物模型系统将允许筛选和鉴别药理学疗法,所述药理学疗法改良促进精神分裂症症状的病原性神经活动模式。

[0008] 发明概述

[0009] 在一些方面,本发明提供非人动物,所述非人动物包含在前额皮质中的V层锥体神经元子集的细胞膜上表达的光反应性视蛋白,其中视蛋白光活化诱导膜去极化,并且其中用光照射视蛋白诱发动物精神病。在一些实施方案中,V层锥体神经元子集具有单个大顶树突。在一些实施方案中,视蛋白选自由ChR2、VChR1和DChR组成的组。在另一实施方案中,视蛋白选自由以下组成的组:SF0、SSF0、C1V1、C1V1-E122T、C1V1-E162T和C1V1-E122T/E162T。

[0010] 在其它方面,本发明提供在非人动物中诱发精神病的方法,所述方法包括在动物的前额皮质中的V层锥体神经元子集的细胞膜上表达光反应性视蛋白,其中视蛋白光通过光诱导膜去极化,并且其中用光照射视蛋白诱发动物精神病。在其它方面,本发明提供在非人动物中诱发精神病的方法,所述方法包括光活化光反应性视蛋白,其中光反应性视蛋白是在动物的前额皮质中的V层锥体神经元子集的细胞膜上表达,并且其中视蛋白光活化诱

导细胞膜去极化并且诱发动物精神病。在一些实施方案中，V层锥体神经元子集具有单个大顶树突。在一些实施方案中，视蛋白选自由ChR2、VChR1和DChR组成的组。在另一实施方案中，视蛋白选自由以下组成的组：SF0、SSF0、C1V1、C1V1-E122T、C1V1-E162T和C1V1-E122T/E162T。

[0011] 在其它方面，本发明提供前额皮质组织切片，所述前额皮质组织切片包含V层锥体神经元子集，其中光反应性视蛋白是在V层锥体神经元中的顶树突的细胞膜上表达，并且光反应性视蛋白的光活化诱导膜的去极化。在一些实施方案中，V层锥体神经元子集具有单个大顶树突。在一些实施方案中，视蛋白选自由ChR2、VChR1和DChR组成的组。在另一实施方案中，视蛋白选自由以下组成的组：SF0、SSF0、C1V1、C1V1-E122T、C1V1-E162T和C1V1-E122T/E162T。

[0012] 在其它方面，本发明提供筛选可适用于治疗精神病的化合物的方法，所述方法包括在向动物前额皮质施用化合物之前和之后测量非人动物的精神病状态，其中通过光活化在动物的V层锥体神经元的主体的细胞膜上表达的光反应性视蛋白来诱发精神病状态，并且视蛋白的活化诱导膜的去极化；其中在施用化合物之后精神病状态测量值中的一个或多个的改良表明化合物可适用于治疗精神病。在一些实施方案中，精神病状态测量值是行为测量值。在一些实施方案中，精神病状态测量值是细胞测量值。在一些实施方案中，所述方法还包括在施用化合物之前向动物施用D2激动剂的步骤。

[0013] 在一些方面，本发明提供筛选可适用于治疗精神病的化合物的方法，所述方法包括在与化合物一起孵育组织切片之前和之后测量前额皮质组织切片的精神病状态，其中前额皮质组织切片包含V层锥体神经元的主体，并且光反应性视蛋白是在V层锥体神经元的主体的细胞膜上表达，其中精神病状态是通过活化光反应性视蛋白来诱导神经元膜去极化来诱发；其中在与化合物一起孵育之后精神病状态示值读数中的一个或多个的改良表明化合物可适用于治疗精神病。在一些实施方案中，精神病状态测量值是细胞测量值。在一些实施方案中，所述方法还包括在与化合物一起孵育之前与前额皮质组织切片一起孵育D2激动剂的步骤。

[0014] 本公开是关于鉴别涉及于如本文所述的各种精神病症的神经细胞群体。尽管本公开不一定限于这些上下文，但本发明的各个方面可通过使用这些上下文和其它上下文来讨论实施例加以了解。

[0015] 本公开的方面针对鉴别牵涉于各种精神病症中的神经细胞群体的方法。所述方法包括向表达光反应性视蛋白的目标神经元群体提供光学刺激。测量响应光学刺激的目标神经元细胞群体的第一电模式。接着，将已知诱发目标病症的药物引入目标神经元细胞群体中。再次向目标神经元群体提供光学刺激。测量响应光学刺激的目标神经元细胞群体的后续电模式。接着比较第一电模式和后续电模式。电模式的比较可用来确定例如哪些神经元涉及产生疾病样状态。在已鉴别出特定神经元群体之后，可在特定神经元群体靶向后续可能的治疗。或者，举例来说，可对特定神经元群体进行其它研究来确定异常行为后的机制。

[0016] 本公开的方面是针对比较在引入已知诱发目标病症的药物之前和之后目标目标神经元群体的电活动。在引入药物之前和之后都提供刺激，并且比较对药物的电反应模式。刺激可为例如光学刺激、电刺激或磁刺激。

[0017] 在某些特定实施方案中，选择脑内的目标区域。这个选择可依据关于以下的先前

知识做出：脑功能以及在精神病症时所靶向的药物的工作机制。举例来说，V层锥体神经元先前与某些精神病形式有关。本发明的方面允许如下鉴别与精神病行为有关的锥体神经元子集：使用光学刺激和诱发受试者行为异常的组合来检查V层锥体神经元，所述诱发受试者行为异常是通过引入先前被发现诱发异常行为的物质来实现。

[0018] 与精神病行为有关的神经元群体的这种鉴别允许有效测试各种精神病行为的可能治疗。一旦在精神病期间的特定神经元的反应被知晓并且与还没引入精神病时的反应相比，便可基于使神经元反应返回它的基线状态的治疗能力来测试各种治疗。

[0019] 本公开的某些方面还针对获得对脑内机制和引起精神病的特定神经元群体的更好理解。在鉴别出目标特定神经元之后，可较详细地研究神经元内的通道，以及将所述神经元连接到其它神经元的通路。这可产生关于各种形式精神病的病因的新见解。

[0020] 本公开还关于涉及于各种精神病症中的特定神经细胞群体，所述各种精神病症包括如本文所述的精神病(和/或精神病症状)。尽管本公开不一定限于这些上下文，但本发明的各个方面可通过使用这些上下文和其它上下文来讨论实施例加以了解。

[0021] 本公开的方面针对一种涉及牵涉于各种精神病症中的特定神经细胞群体的方法，所述各种精神病症包括精神病(和/或精神病症状)。所述方法包括向表达光反应性视蛋白的目标神经元群体提供光学刺激。测量响应光学刺激的目标神经元细胞群体的第一电模式。接着，将已知诱发精神病症状的药物引入目标神经元细胞群体中。再次向目标神经元群体提供光学刺激。测量响应光学刺激的目标神经元细胞群体的后续电模式。接着比较第一电模式和后续电模式。电模式的比较可用来确定例如哪些神经元涉及产生疾病样状态。在已鉴别出特定神经元群体之后，可在特定神经元群体靶向后续可能的治疗。或者，举例来说，可对特定神经元群体进行其它研究来确定异常行为后的机制。在某些实施方案中，可使用多种刺激(包括光学刺激、电刺激和/或磁刺激)进行其它研究。

[0022] 本公开的方面针对通过控制已知涉及精神病的目标神经元群体的性质来诱发疾病病况。目标神经元群体的神经元具有单个大顶树突。用光反应性分子改性目标神经元群体。向目标神经元群体提供光，从而活化光反应性分子。将药物引入目标神经元群体中，从而使得神经元的膜电位在去除光之后仍是升高的。升高的膜电位使得产生针对刺激的改性的细胞反应，以及当不存在刺激时神经元活化。实验结果显示受试者显示与精神病一致的行为，所述受试者具有在具有单个大顶树突的某些神经元群体中诱导的这种神经元活动。

[0023] 在较特定实施方案中，使用这种改性的神经元活动来帮助确定用于精神病的可能治疗。可在测试各种可能的治疗之前诱发疾病病况。测试可包括向神经元引入治疗、刺激神经元，以及比较在治疗存在下的反应和在不存在治疗下的反应。

[0024] 本领域技术人员具体来说可鉴于图和/或以下讨论来了解与这些方法和设备有关和/或使用这些方法和设备的各个实施方案。上文概述并不意图描述本公开的各个所说明的实施方案或每一实施。欲知关于可与本文教义以不同程度组合的其它实施方案、实验和应用的细节的信息，可参考实施例中提供的教义和下方参考文献，所述实施例形成本专利文件的一部分并且以引用的方式完全并入本文中。

[0025] 附图简述

[0026] 可结合附图考虑以下详细描述来较完整地理解各个示例实施方案，其中：

[0027] 图1显示在Thy1::ChR2转基因小鼠中通过光学刺激下边缘V层锥体神经元所诱发

的精神病样行为。A)将单侧光学纤维放在下边缘皮质上方的示意图。B)Thy1::ChR2-EYFP小鼠中前额皮质的冠状切片的共焦图像,其显示光学纤维放在V层下边缘皮质上方(左图)以及V层神经元中的ChR2-EYFP表达(右图)。C)用473nm蓝光(10Hz,5-ms脉冲宽度)对V层神经元进行低频光学刺激在6只所测试的Thy1::ChR2-EYFP动物的6只中显著减少新奇幼崽的社交性探索($p=0.03$;光打开/光关闭时期交错)。D)如(A)中所示的10Hz刺激对社交性探索的影响的概述资料。E)概述旷场资料,其显示10Hz光学刺激对Thy1::ChR2动物的总速度(左边)或轨迹长度(右边)没有影响。F)用473nm蓝光(40Hz,5-ms脉冲宽度)对V层神经元进行 γ 带光学刺激在6只测试动物的6只中甚至更强力地消除新奇幼崽的社交性探索($p<0.01$;光打开/光关闭时期交错)。G)如(F)中所示的40Hz刺激对社交性探索的影响的概述资料。H)在6只测试小鼠的3只中($p<0.05$),40Hz光学刺激显著增加在紧张性精神症样僵硬姿势所用的时间,并且在6只测试小鼠的2只中($p=0.13$)观察到专心于重复面对面头运动所用的时间增加的倾向。

[0028] 图2展示在Thy1::ChR2转基因小鼠中,D2激动剂喹吡罗(quinpirole)调节活体外前额叶网络对ChR2刺激的反应。A)在对照条件(上方,黑色迹线)中以及在喹吡罗(20 μ M;紫色,下方迹线)中,V层锥体神经元对一串闪光(470nm,1毫秒)的反应。在应用喹吡罗之后,先前引起峰电位的一些闪光不再引起峰电位(箭头),出现一些与闪光无关的新峰电位(“+”),并且观察到平台电位(“p”)。B)在应用喹吡罗(20 μ M;紫色,中间迹线)之后,这个V层锥体神经元显示长久去极化,所述长久去极化比光刺激期持久并且引起出峰电位。长久去极化在洗去喹吡罗并应用氟哌啶醇(1 μ M;绿色,下方迹线)之后消除。C)峰电位速率所传递的关于V层锥体神经元中的闪光的速率的信息量,在所述V层锥体神经元中喹吡罗引起活动依赖性去极化($n=8$ 个在对照物中和20 μ M喹吡罗中的细胞; $n=4$ 个在0.2-2 μ M氟哌啶醇中和5 μ M舒必利(sulpiride)中的细胞)。D)V层锥体神经元的随闪光速率而变的峰电位速率,在所述V层锥体神经元中喹吡罗引起活动依赖性去极化(如B中所说明)(在各条件下 $n=4$ 个细胞;0.2-2 μ M氟哌啶醇;5 μ M舒必利)。D)中展示对照物(在(D)的右部结束的上方迹线)、喹吡罗(在(D)的右部结束的中间迹线)和氟哌啶醇/舒必利迹线(在(D)的右部结束的下方迹线)。E)C中描绘对于相同细胞,随峰电位间间隔而变的峰电位数目。E)中展示对照物(从(E)的左部开始的上方迹线)、喹吡罗(从(E)的左部开始的中间迹线)和氟哌啶醇/舒必利迹线(从(E)的左部开始的下方迹线)。F)在对照条件(黑色迹线;在(F)的右部结束的上方迹线)、喹吡罗(20 μ M;紫色迹线;在(F)的右部结束的下方迹线)和喹吡罗+舒必利(5 μ M;绿色迹线;在(F)的右部结束的中间迹线)下,V层锥体神经元(其中喹吡罗引起活动依赖性去极化)对ChR2和单个1毫秒闪光后网络驱动活动的组合的反应。箭头指示峰电位AHP。

[0029] 图3显示D2受体活化引起由L型 Ca^{2+} 通道介导的活动依赖性去极化。A、C、G)在各种药理学条件下,V层锥体神经元对超极化和/或去极化电流脉冲的反应。B)在响应喹吡罗中的去极化电流脉冲期间显示(左边)和不显示(右边)活动依赖性去极化和后去极化的V层锥体神经元的形态(响应各细胞以下的去极化和超极化电流脉冲)。D)上方:在250pA去极化电流脉冲之后,在对照条件(黑色;左条形)或喹吡罗(紫色;右条形)下,膜电位朝基线衰减63%或90%的时间常数。注意,我们已排除3个在喹吡罗中变得双稳定的细胞(即,膜电位未能返回基线持续>1秒)。下方:在对照条件(黑色)或喹吡罗(紫色)下,在250pA去极化电流脉冲结束之后10毫秒的膜电位(相对于基线)。E)在应用20 μ M喹吡罗之后,具有显著下跌和回

弹后去极化的V层锥体神经元的部分,所述部分显示继去极化电流注入之后的后去极化(ADP)、出峰电位的去极化阻断(depolarization阻断)、双稳定性或比去极化电流注入期持久的持续性放电(persistent firing)。F)在喹吡罗中在去极化电流脉冲之后观察持续性活性的功率谱(由A图中的迹线计算)。

[0030] 图4展示苯环己哌啶(PCP)也经由L型Ca²⁺通道引起活动依赖性去极化。A)V层锥体神经元对去极化电流脉冲的反应。在应用PCP(5μM;中间两条迹线)之后,神经元显示后去极化和比电流注入期持久的持续性放电。这些不被D2对抗剂硫代硫酸盐(5μM;绿色迹线)逆转,但由L型Ca²⁺通道对抗剂硝苯地平(10μM;灰色迹线)阻断。B)在应用5μM PCP之后,具有显著下跌和回弹后去极化的V层锥体神经元的部分,所述部分显示继去极化电流注入之后的后去极化(ADP)、出峰电位的去极化阻断(depolarization阻断)、双稳定性或比去极化电流注入期持久的持续性放电。C)上方:硝苯地平以剂量依赖性方式损害社交性探索(各组中n=8只小鼠)。下方:在PCP处理的小鼠中,以剂量依赖性方式,PCP损害社交性探索,但硝苯地平改善这种不足(各组中n=8只小鼠)。D)在野生型小鼠中,以及在设计为功能基因的CACNA1C获得的TS2neo剔除小鼠中,V层锥体神经元(20)对超极化和去极化电流脉冲的反应。*=p<0.05,**=p<0.01。所述影响存在于4/4突变型细胞和0/5野生型细胞中,其中所述细胞响应超极化电流注入具有大的下跌和回弹去极化(依据Fisher's精确检验,p<0.01)。

[0031] 图5展示一个根据本公开的一个示例实施方案的模型。

[0032] 图6展示根据一个示例实施方案的鉴别目标细胞的方法。

[0033] 图7展示根据本公开的一个示例实施方案用于表征神经病症的模型。

[0034] 图8展示根据一个示例实施方案确定治疗功效的方法。

[0035] 尽管本公开服从各种修改和替代形式,但其细节已在图中以举例说明的方式展示并且将详细描述。然而应了解,并不意图将本公开限于所述的具体实施方案。相反地,意图涵盖所有属于本公开范畴的修改、等效物和替代物,包括权利要求中规定的各个方面。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明提供患有如下诱发的精神病的非人动物:活化在前额皮质的V层锥体神经元的目标的质膜上表达的光反应性视蛋白,其中活化光反应性视蛋白诱导膜去极化。还提供非人动物的前额皮质组织切片。本发明还提供在非人动物中诱发精神病的方法,以及使用本文所述的非人动物和组织切片来鉴别或筛选可用于治疗精神病的化合物的方法。

[0038] 如本文所用,“动物”是哺乳动物。哺乳动物包括(但不限于)人、家畜、体育动物、宠物(例如狗和猫)、灵长类动物、小鼠、大鼠和其它啮齿动物。

[0039] 如本文所用,除非另有指示,否则单数形式“一(a/an)”和“所述(the)”包括复数个参考物。

[0040] 通用技术

[0041] 除非另外指示,否则本发明的实践将采用本领域技术人员所熟知的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学、免疫学、生理学、泌尿学和病理生理学药物成瘾和奖赏相关行为的常规技术。这些技术完全解释于文献中,所述文献如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等,1989)和Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第三版(Sambrook和Russell,2001),(本文中统称为“Sambrook”);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等编,1987,包括到2001年的增

刊);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等编,1994);Harlow和Lane(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York;Harlow和Lane(1999)Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(本文中统称为“Harlow和Lane”),Beaucage等编,Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,John Wiley&Sons,Inc.,New York,2000),Handbook of Experimental Immunology,第4版(D.M.Weir和C.C.Blackwell编,Blackwell Science Inc.,1987);以及Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller和M.P.Calos编,1987)。其它适用的参考文献包括Harrison's Principles of Internal Medicine(McGraw Hill;J.Isseleacher等编),和Addiction Research Methods,(Miller等编,2010;Wiley-Blackwell,United Kingdom)。

[0042] 光反应性视蛋白蛋白质

[0043] 本发明提供基于光遗传学的组合物和方法,其用于使前额皮质的V层锥体神经元的目标选择性去极化,其中这些神经元去极化诱发动物精神病。在一些实施方案中,诱发精神分裂症。光遗传学是指基因方法和光学方法与跟上功能完整生物系统所需的时间精确性(毫秒时标)的组合,所述基因方法和光学方法是用来控制甚至在自由移动的哺乳动物和其它动物体内活组织目标细胞中的特定事件。光遗传学需要将快速光反应性通道或泵蛋白引入目标神经元细胞的质膜,从而允许时间上精确操作神经元膜电位,同时经由使用特定靶向机制来维持细胞类型分解。

[0044] 可用于本发明中的光反应性视蛋白包括用光诱导神经元的细胞膜去极化的视蛋白。下表1中展示这些视蛋白的实施例。

[0045] 表1展示用于在可见光谱上激发和调节的所鉴别的视蛋白:

视蛋白类型	生物来源	波长敏感性	规定动作
<i>VChR1</i>	强壮团藻 (<i>Volvox carteri</i>)	589 nm 效用 535 nm 最大	激发 (去极化)
<i>DChR</i>	杜氏盐藻 (<i>Dunaliella salina</i>)	500 nm 最大	激发 (去极化)
<i>ChR2</i>	莱茵衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	470 nm 最大 380-405 nm 效用	激发 (去极化)
<i>ChETA</i>	莱茵衣藻	470 nm 最大 380-405 nm 效用	激发 (去极化)
<i>SFO</i>	莱茵衣藻	470 nm 最大 530 nm 最大	激发 (去极化) 不活化
<i>SSFO</i>	莱茵衣藻	445 nm 最大 590 nm; 390-400 nm	阶梯样活化 (去极化) 不活化
<i>C1V1</i>	强壮团藻和 莱茵衣藻	542 nm 最大	激发 (去极化)

[0047] 表1(续):

	视蛋白类型	生物来源	波长敏感性	规定动作
	<i>C1V1 E122</i>	强壮团藻和 莱茵衣藻	546 nm 最大	激发 (去极化)
[0048]	<i>C1V1 E162</i>	强壮团藻和 莱茵衣藻	542 nm 最大	激发 (去极化)
	<i>C1V1 E122/E162</i>	强壮团藻和 莱茵衣藻	546 nm 最大	激发 (去极化)

[0049] 如本文所用,光反应性视蛋白(如ChR2、VChR1、DChR和ChETA)包括天然存在的蛋白质和功能变体、片段、包含片段或全长蛋白质的融合蛋白。在一些实施方案中,可去除信号肽。变体可具有与天然存在的蛋白质序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中任一者的同一性的氨基酸序列。功能变体可与天然存在的蛋白质具有相同或类似的去极化功能。

[0050] 增强的细胞内输送氨基酸基元

[0051] 本公开提供如下改性在细胞中表达的光反应性视蛋白蛋白质:添加一个或多个增强向哺乳动物细胞质膜输送的氨基酸序列基元。光反应性视蛋白蛋白质具有来源于进化上较简单的生物体的组分,所述组分可能不为哺乳动物细胞所表达或耐受,或当在哺乳动物细胞中高程度表达时可能显示受损的亚细胞定位。因此,在一些实施方案中,在细胞中表达的光反应性视蛋白蛋白质可与一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列基元融合:信号肽、内质网(ER)出口信号、膜输送信号和/或N端高尔基出口信号(N-terminal golgi export signal)。所述一个或多个增强向哺乳动物细胞质膜的光反应性视蛋白蛋白质输送的氨基酸序列基元可与光反应性视蛋白蛋白质的N端、C端,或N端和C端两者融合。任选地,光反应性视蛋白蛋白质和所述一个或多个氨基酸序列基元可由连接子分隔。在一些实施方案中,光反应性视蛋白蛋白质可通过添加增强向细胞质膜输送蛋白质的输送信号来改性。在一些实施方案中,输送信号可来源于人内向整流性钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在其它实施方案中,输送信号可包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。

[0052] 美国专利申请号12/041,628(以引用的方式整体并入本文)中描述可增强向细胞质膜的光反应性视蛋白蛋白质输送的其它蛋白质基元。在一些实施方案中,蛋白质中的信号肽序列可缺失或被来自不同蛋白质的信号肽序列取代。

[0053] 光反应性通道蛋白

[0054] 在一些方面,光反应性视蛋白蛋白质是光反应性通道蛋白。在本文提供的方法的一些构建,光反应性离子通道的通道视紫红质家族的一个或多个成员表达于前额皮质中的V层锥体神经元子集的质膜上。

[0055] 在一些方面,光反应性阳离子通道蛋白可来源于莱茵衣藻,其中当细胞被光照射时阳离子通道蛋白可能介导细胞中的去极化电流。在另一实施方案中,光反应性阳离子通道蛋白可包含与SEQ ID NO:1中所示的序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列。用来活化来源于莱茵衣藻的光反应性阳

离子通道蛋白的光的波长可在约460nm和约495nm之间或其波长可为约470nm。另外,光强度可为至少约100Hz。在一些实施方案中,用强度为100Hz的光活化来源于莱茵衣藻的光反应性阳离子通道可引起表达光反应性阳离子通道的神经元的去极化诱导性突触耗尽。光反应性阳离子通道蛋白可另外包含取代、缺失和/或插入,所述取代、缺失和/或插入被引入原生氨基酸序列中以增大或减小感光性、增大或减小对特定波长的光的敏感性,和/或增大或减小光反应性阳离子通道蛋白调节细胞质膜的极化态的能力。另外,光反应性阳离子通道蛋白可含有一个或多个保守性氨基酸取代和/或一个或多个非保守性氨基酸取代。包含引入原生氨基酸序列中的取代、缺失和/或插入的光反应性阳离子通道蛋白适合地保留了使神经元细胞质膜响应光而去极化的能力。

[0056] 在其它实施方案中,光反应性阳离子通道蛋白可为阶跃函数视蛋白(SF0)蛋白质或稳定化阶跃函数视蛋白(SSF0)蛋白质,所述蛋白质可在蛋白质的整个视黄醛结合口袋(retinal binding pocket)中的关键位置具有特异性氨基酸取代。在一些实施方案中,SF0蛋白可在SEQ ID NO:1的氨基酸残基C128处具有突变。在其它实施方案中,SF0蛋白在SEQ ID NO:1中具有C128A突变。在其它实施方案中,SF0蛋白在SEQ ID NO:1中具有C128S突变。在另一实施方案中,SF0蛋白在SEQ ID NO:1中具有C128T突变。在一些实施方案中,SSF0蛋白可在SEQ ID NO:1的氨基酸残基C128和D156处具有突变。在其它实施方案中,SSF0蛋白在SEQ ID NO:1中具有C128S突变和D156A突变。在一些实施方案中,SF0蛋白可包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中所示的序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列。

[0057] 在其它实施方案中,光反应性阳离子通道蛋白可为来源于以下的C1V1嵌合蛋白:强壮团藻的VChR1蛋白和莱茵衣藻的ChR1蛋白,其中所述蛋白质包含VChR1的氨基酸序列,所述VChR1的氨基酸序列的至少第一和第二跨膜螺旋被ChR1的第一和第二跨膜螺旋替代;对光起反应;并且当细胞被光照射时能够介导细胞中的去极化电流。另外,在一些实施方案中,本发明可包括包含取代或突变的氨基酸序列的多肽,其中突变型多肽保留前体C1V1嵌合多肽的特征性光反应性质,但还可在一些特定方面的性质改变。举例来说,本文所述的突变型光反应性C1V1嵌合蛋白可显示在动物细胞内或在动物细胞质膜上的表达量都增大;当曝露于不同波长的光(具体来说是红光)时反应性改变;和/或特性组合,从而嵌合C1V1多肽具有以下性质:低不敏感化、快速去活化、低紫光活化以便与其它光反应性阳离子通道具有最小的交叉活化,和/或在动物细胞中的强表达。在一些实施方案中,C1V1蛋白可包含与SEQ ID NO:4、5、6或7中所示的序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列。

[0058] 关于光反应性阳离子通道蛋白的其它公开内容可见于美国专利申请公布号2007/0054319和国际专利申请公布号WO 2009/131837和WO 2007/024391中。关于SF0或SSF0蛋白的其它公开内容可见于国际专利申请公布号WO 2010/056970和美国临时专利申请号61/410,704和61/511,905中。关于C1V1嵌合阳离子通道以及其突变型变体的其它公开内容可见于美国临时专利申请号61/410,736、61/410,744和61/511,912中。关于特异性光反应性视蛋白蛋白质的上述参考文献中每一者的公开内容都以引用的方式整体并入本文中。

[0059] 编码光反应性视蛋白蛋白质的聚核苷酸

[0060] 本公开还提供聚核苷酸,其包含编码本文所述的光反应性视蛋白蛋白质的核苷酸

序列。在一些实施方案中,聚核苷酸包含表达卡匣。在一些实施方案中,聚核苷酸是包含上述核酸的载体。在一些实施方案中,本公开的编码光反应性视蛋白蛋白质的核酸可操作地连接于促进剂。促进剂为本领域所熟知。在胆碱能中间神经元中起作用的任何促进剂都可用于表达本公开的光反应性蛋白质和/或其任何变体。适用于推动光反应性视蛋白蛋白质或其变体在特定动物细胞中表达的起始控制区域或促进剂是众多的并且为本领域技术人员所熟悉。实际上可使用能够推动这些核酸的任何促进剂。在一些实施方案中,用来推动光反应性蛋白质表达的促进剂可为胸腺细胞抗原1(Thy1)促进剂,所述促进剂能够推动转基因在前额皮质的锥体神经元中稳固表达(参见例如Arenkiel等,Neuron 54,205(2007年4月19日))。

[0061] 本文还提供载体,所述载体包含编码本文所述的光反应性视蛋白蛋白质或其任何变体的核苷酸序列。可根据本发明施用的载体还包括包含核苷酸序列的载体,所述核苷酸序列编码RNA(例如mRNA),所述RNA当从载体的聚核苷酸转录时将引起光反应性蛋白质在目标动物细胞上累积。可使用的载体包括(不限于)慢病毒、HSV、腺病毒和腺相关病毒(AAV)载体。慢病毒包括(但不限于)HIV-1、HIV-2、SIV、FIV和EIAV。慢病毒可用其它病毒的包膜蛋白假型化,所述其它病毒包括(但不限于)VSV、狂犬病(rabies)、Mo-MLV、杆状病毒和Ebola。这些载体可使用本领域的标准方法制备。

[0062] 在一些实施方案中,载体是重组型AAV载体。AAV载体是相对较小尺寸的DNA病毒,其可以稳定并且位点特异性的方式整合到它们感染的细胞的基因组中。它们能够感染较宽范围的细胞而不诱导对细胞生长、形态或分化的任何影响,并且它们并不显得涉及人病理中。AAV基因组已得到克隆、测序以及表征。它涵盖约4700个碱基并且在各端含有约145个碱基的反转式末端重复序列(ITR)区域,所述区域用作病毒的复制起点。基因组的其余部分分成两个携带壳体化功能的必需区域:基因组的左手部分,其含有涉及病毒复制和表达病毒基因的rep基因;以及基因组的右手部分,其含有编码病毒的衣壳蛋白的cap基因。

[0063] AAV载体可使用本领域的标准方法制备。任何血清型的腺相关病毒都适合(参见例如Blacklow,“Parvoviruses and Human Disease”J.R.Pattison编.(1988)的第165-174页;Rose,Comprehensive Virology 3:1,1974;P.Tattersall“The Evolution of Parvovirus Taxonomy”Parvoviruses(JR Kerr,SF Cotmore.ME Bloom,RM Linden,CR Parrish编)第5-14页,Hudder Arnold,London,UK(2006);以及DE Bowles,JE Rabinowitz,RJ Samulski“The Genus Dependovirus”(JR Kerr,SF Cotmore.ME Bloom,RM Linden,CR Parrish编)第15-23页,Hudder Arnold,London,UK(2006),其各自的公开内容以引用的方式整体并入本文中)。用于纯化载体的方法可见于例如标题为“Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors”的美国专利号6,566,118、6,989,264和6,995,006以及W0/1999/011764中,所述专利的公开内容以引用的方式整体并入本文中。制备杂合载体描述于例如PCT申请号PCT/US2005/027091中,所述PCT申请的公开内容以引用的方式整体并入本文中。来源于AAV的载体用于活体外和活体内转移基因的用途已得到描述(参见例如国际专利申请公布号91/18088和W0 93/09239;美国专利号4,797,368、6,596,535和5,139,941;以及欧洲专利号0488528中,所有这些专利都以引用的方式整体并入)。这些公布描述各种来源于AAV的构建体,其中rep和/或cap基因缺失并以目标基因替代,并且描述这些构建体用于活体外转移(到培养细胞中)或活体内转移(直接

到生物体中)目标基因的用途。本发明的复制缺陷型重组型AAV可如下制备:将含有侧接两个AAV反转式末端重复序列(ITR)区域的目标核酸序列的质体,和携带AAV壳体化基因(rep和cap基因)的质体共转染到感染人辅助病毒(例如腺病毒)的细胞株中。所产生的AAV重组物接着通过标准技术纯化。

[0064] 在一些实施方案中,将用于本发明方法的载体壳体化到病毒粒子(例如AAV病毒粒子,包括(但不限于)AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15和AAV16)中。因此,本发明包括包含任何本文所述的载体的重组型病毒粒子(因为它含有重组型聚核苷酸,所以是重组型)。产生这些粒子的方法为本领域已知并且描述于美国专利号6,596,535中,所述专利的公开内容以引用的方式整体并入本文中。

[0065] 光反应性视蛋白蛋白质的递送

[0066] 在一些方面,可使用针、导管或相关装置,使用本领域已知的神经外科技术,如通过立体定向注射(参见例如Stein等,J.Virol,73:34243429,1999;Davidson等,PNAS,97:3428-3432,2000;Davidson等,Nat.Genet.3:219-223,1993;以及Alisky和Davidson,Hum.GeneTher.11:2315-2329,2000,所述文献各自的内容都以引用的方式整体并入本文中)将编码本文公开的光反应性视蛋白蛋白质(例如AAV载体)的聚核苷酸直接递送到动物前额皮质的锥体神经元。

[0067] 在一些方面,光反应性视蛋白蛋白质可在转基因动物的前额皮质的锥体神经元中表达。举例来说,可使用Cre-重组酶,在胸腺细胞抗原1(Thy1)促进剂的控制下采用转基因小鼠细胞株。接着可将携带光反应性视蛋白基因的Cre-诱导性腺相关病毒(AAV)载体以趋触性方式注入前额皮质中。

[0068] 在其它方面,任何光反应性视蛋白蛋白质都可在转基因动物的前额皮质的锥体神经元中表达。举例来说,可使用ChR2,在胸腺细胞抗原1(Thy1)促进剂的控制下采用转基因小鼠细胞株。转基因小鼠可使用标准原核注射技术(参见例如Arenkiel等,Neuron 54,205(2007年4月19日))来产生。

[0069] 也可使用向锥体神经元递送光反应性蛋白质的其它方法,如(但不限于)用离子脂质或聚合物转染、电穿孔、光学转染、刺穿转染(impalefection)或经由基因枪。

[0070] 在一些方面,本发明提供通过本文所述的任何方法产生的非人动物。在一些实施方案中,非人动物包含在动物前额皮质的V层锥体神经元子集的细胞膜上表达的光反应性视蛋白蛋白质,其中视蛋白通过光诱导膜去极化,并且其中用光照射视蛋白诱发动物的精神病。在一些方面,本发明提供前额皮质组织切片,所述前额皮质组织切片包含非人动物的前额皮质的V层锥体神经元子集,其中光反应性视蛋白在V层锥体神经元子集的细胞膜上表达,并且光活化视蛋白诱导膜去极化。

[0071] 光源

[0072] 能够应用具有活化神经元中表达的光反应性蛋白质的波长的光的任何装置都可用来使神经元去极化。举例来说,可使用活化光反应性视蛋白蛋白质以影响一个或多个神经元的膜电压的光递送装置。光递送装置可配置成向目标脑部区域提供光学刺激。光递送装置可包括基础、连接于基础的套管导向器,以及一根或多根经由套管导向器连接于基础的光学管道。基础可包括一个或多个光递送口,所述光递送口定位成将光从光学管道递送

到目标组织区域,如前额皮质中的锥体神经元。光学管道可为光学纤维,其中纤维近端连接于光学光源,并且远端和光递送口连通。光学光源可能提供连续光和/或脉动光,并且可为可编程的以按照预定脉冲序列提供光。据可能所需,光递送装置可具有任何数目的光学管道,例如1、2、3、4、5、10、15、20,等。光学管道可各自载运相同或不同波长的光。所递送的光的波长在450nm和600nm之间,如黄光或绿光或蓝光。据可能所需,光递送装置可具有任何数目的光递送口,例如1、2、3、4、5、10、15、20,等。在一些变化形式中,可能存在与光学管道相同数目的光递送口,而在其它变化形式中,可能存在不同数目的光学管道和光递送口。举例来说,可能存在将光输送到两个或更多个光递送口的单一光学管道。或者或另外,单一光学管道可连接于单一光递送口。套管导向器可被配置成有助于固定和对准光学管道与光递送口。在一些实施方案中,将光递送装置配置成向前额皮质的V层锥体神经元子集递送光以诱导在V层锥体神经元子集的细胞膜上表达的视蛋白蛋白质去极化。光递送装置还可包括一个或多个可配置来测量神经活动的测量电极。举例来说,测量电极可记录以下的变化:当神经元响应刺激时,一个或多个神经元的膜电位(例如动作电位)和/或跨膜电流。在一些变化形式中,测量电极可测量一个或多个神经元对光学刺激的电反应。测量电极可为细胞外或细胞内电极。

[0073] 在其它方面,光递送装置可为不需要物理连接到外部电源的可植入光源。可植入光源可包括内部主体,所述内部主体具有至少一个用于产生光的被配置成电源的部件。在一些实施方案中,电源可为用于向产生光的部件提供电力的内部电池。在另一实施方案中,可植入光源可包括外部天线,所述外部天线用于从为产生光的部件提供电力的外部来源接收无线传输的电磁能。无线传输的电磁能可为无线电波、微波或任何其它电磁能源,其可传输自外部来源以向可植入光源的产生光的部件提供电力。在一个实施方案中,产生光的部件是由使用半导体或本领域已知的其它方法制造的集成电路控制。

[0074] 在一些方面,光部件可为发光二极管(LED)。在一些实施方案中,LED可产生蓝光和/或绿光。在其它实施方案中,LED可产生琥珀色光、黄光和/或蓝光。在一些实施方案中,将若干微LED嵌入可植入光源的内部主体中。在其它实施方案中,产生光的部件为固态激光二极管或能够产生光的任何其它部件。产生光的部件可产生强度足以活化在光源(如光套(light cuff))附近神经质膜上表达的光反应性蛋白质的光。在一些实施方案中,产生光的部件所产生的达到NAc或纹状体的胆碱能中间神经元的光的强度具有以下任一者的强度:约0.05mW/mm²、0.1mW/mm²、0.2mW/mm²、0.3mW/mm²、0.4mW/mm²、0.5mW/mm²、约0.6mW/mm²、约0.7mW/mm²、约0.8mW/mm²、约0.9mW/mm²、约1.0mW/mm²、约1.1mW/mm²、约1.2mW/mm²、约1.3mW/mm²、约1.4mW/mm²、约1.5mW/mm²、约1.6mW/mm²、约1.7mW/mm²、约1.8mW/mm²、约1.9mW/mm²、约2.0mW/mm²、约2.1mW/mm²、约2.2mW/mm²、约2.3mW/mm²、约2.4mW/mm²、约2.5mW/mm²、约3mW/mm²、约3.5mW/mm²、约4mW/mm²、约4.5mW/mm²、约5mW/mm²、约5.5mW/mm²、约6mW/mm²、约7mW/mm²、约8mW/mm²、约9mW/mm²或约10mW/mm²(包括的),包括这些数字之间的值。

[0075] 在一些方面,产生光的部件可由外部控制器外部启动。外部控制器可包括可安装于传输线圈的发电机。在外部控制器的一些实施方案中,电池可连接至发电机,以便向其提供电力。开关可连接至发电机,从而允许个体将发电机手动启动或去除启动。在一些实施方案中,在启动开关后,发电机可通过外部控制器上传输线圈和可植入光源的外部天线之间的电磁耦合向光源上产生光的部件提供电力。传输线圈可与可植入光源的外部天线(当与

其邻近时)建立电磁耦合,以便向产生光的部件提供电力并且向可植入光源传输一个或多个控制信号。在一些实施方案中,外部控制器的传输线圈和可植入光源的外部天线之间的电磁耦合可为射频磁性电感耦合。当使用射频磁性电感耦合时,无线电波的操作频率可在约1MHz和20MHz(包括的)之间,包括这些数字之间的任何值(例如约1MHz、约2MHz、约3MHz、约4MHz、约5MHz、约6MHz、约7MHz、约8MHz、约9MHz、约10MHz、约11MHz、约12MHz、约13MHz、约14MHz、约15MHz、约16MHz、约17MHz、约18MHz、约19MHz或约20MHz)。然而,可使用其它耦合技术,如光学接收器、红外线或生物医学遥测系统(参见例如Kiourti, “Biomedical Telemetry: Communication between Implanted Devices and the External World, Opticon1826,(8):Spring,2010)。

[0076] 光刺激装置的实施例(包括光源)可见于国际专利申请号PCT/US08/50628和PCT/US09/49936以及Llewellyn等,2010,Nat.Med.,16(10):161-165中,上述文献各自的公开内容因此整体并入本文中。

[0077] 诱发精神病并筛选影响精神病状态的化合物的方法

[0078] 本发明提供在非人动物中诱发精神病的方法,所述方法包括向非人动物施用编码光反应性视蛋白蛋白质的聚核苷酸,其中光反应性视蛋白蛋白质是在非人动物前额皮质中V层锥体神经元子集的细胞膜上表达,并且当V层锥体神经元子集被光照射时蛋白质对光起反应并能够诱导V层锥体神经元子集的膜去极化,从而用光活化蛋白质诱发非人动物的精神病。在一些实施方案中,诱发精神分裂症。在一些实施方案中,诱导社交性探索的干扰。

[0079] 本发明还提供用于诱导前额皮质组织切片中V层锥体神经元子集的膜去极化的方法,所述方法包括:活化在前额皮质组织切片中V层锥体神经元子集的细胞膜上表达的光反应性视蛋白蛋白质,其中光反应性视蛋白蛋白质能够用光诱导神经元的膜去极化。

[0080] 在一些方面,本文所述的非人动物和前额皮质组织切片可用来鉴别、筛选或测试适用于治疗精神病(例如精神分裂症)的化合物的有效性。举例来说,本文提供筛选可适用于治疗精神病的化合物的方法,所述方法包括在向动物前额皮质施用化合物之前和之后测量非人动物的精神病状态,其中如下诱发精神病状态:光活化在动物的V层锥体细胞的目标的细胞膜上表达的光反应性视蛋白,并且视蛋白活化诱导膜去极化;其中在施用化合物之后精神病状态测量值中一个或多个的改良表明化合物可适用于治疗精神病。在一些实施方案中,精神病状态测量值是行为测量值(如社交性探索)。在一些实施方案中,精神病状态测量值是细胞测量值(如V层锥体神经元子集所显示的去极化模式的电生理学测量值)。在另一实施方案中,方法还包括在施用化合物之前向动物施用D2激动剂(如喹吡罗)的步骤。在一些实施方案中,化合物可为D2对抗剂,如(但不限于)舒必利(sulpiride)和氟哌啶醇。在一些实施方案中,化合物可为L型Ca²⁺通道对抗剂,如(但不限于)硝苯地平。

[0081] 本发明还提供筛选可适用于治疗精神病的化合物的方法,所述方法包括在与化合物一起孵育组织切片之前和之后测量前额皮质组织切片的精神病状态,其中前额皮质组织切片包含V层锥体细胞的目标,并且光反应性视蛋白是在V层锥体细胞的目标的细胞膜上表达,其中精神病状态是通过活化光反应性视蛋白来诱导神经元膜去极化来诱发;其中在与化合物一起孵育之后精神病状态示值读数中一个或多个的改良表明化合物可适用于治疗精神病。在一些实施方案中,精神病状态测量值是细胞测量值。在另一实施方案中,还包括在与化合物一起孵育之前施用D2激动剂(如喹吡罗)与前额皮质组织切片的步骤。在一些实

施方案中,化合物可为D2对抗剂,如(但不限于)舒必利和氟哌啶醇。在一些实施方案中,化合物可为L型Ca²⁺通道对抗剂,如(但不限于)硝苯地平。

[0082] 示例性实施方案

[0083] 据信本公开适用于鉴别涉及各种精神病症的神经细胞群体。本发明的特定应用有助于评估有关与各种精神病症有关的神经细胞群体的疾病模型。因为本文公开的示例实施方案的许多方面是关于并且显著基于这个领域的先前发展,所以以下讨论概述这些先前发展来对可获取实施细节和改进的基础和内在教义(包括实施例中所见者)提供可靠理解。在本上下文中提供以下讨论并且使这些参考文献中的教义以引用的方式并入本文中。尽管本发明不一定限于这类应用,但本发明的各个方面可通过使用本上下文来讨论各个实施例而得到了解。

[0084] 本文讨论的实施方案和特定应用(包括实施例)可与上述方面、实施方案和实施,以及图中所示并且下文所述的内容中一个或多个关联实施。可参考以下实施例,以下实施例形成临时专利文件的部分并且以引用的方式完全并入本文中。欲知光反应性分子和/或视蛋白(包括方法、装置和物质)的其它细节,还可参考以下背景出版物:Zhang等标题为“System for Optical Stimulation of Target Cells”的美国专利公布号2010/0190229; Zhang等标题也为“System for Optical Stimulation of Target Cells”的美国专利公布号2010/0145418;以及Boyden等标题为“System for Optical Stimulation of Target Cells”的美国专利公布号2007/0261127。这些申请形成临时专利文件的部分并且以引用的方式完全并入本文中。根据这些公布,众多视蛋白可用于活体内和活体外哺乳动物细胞中以提供目标细胞的光学刺激和控制。举例来说,当ChR2引入细胞中时,ChR2通道视紫红质的光活化引起细胞激发和放电。在NpHR引入细胞中的情况下,NpHR视蛋白的光活化引起细胞抑制。上述专利申请的公开内容的这些和其它方面可适用于实施本公开的各个方面。

[0085] 在一些方面,本发明提供鉴别涉及精神病症的神经群体的方法,所述方法包括:向表达光反应性视蛋白的目标神经元群体提供光学刺激、测量目标神经元群体响应光学刺激的第一电模式、向目标神经元群体引入已知诱发精神病的药物、向目标神经元群体提供光学刺激、测目标神经元群体响应光学刺激的量后续电模式,以及比较第一电模式和后续电模式。在另一实施方案中,鉴别与精神病相关的神经元的子集。在一些实施方案中,神经元子集是V层锥体神经元子集。在一些实施方案中,目标神经元细胞群体是在患者体内。在一些实施方案中,药物可为D2激动剂,如(但不限于)喹吡罗。在一些实施方案中,药物可为NMDA受体抑制剂,如(但不限于)苯环己哌啶。

[0086] 转到图5,描绘根据本公开的一个实施方案鉴别目标细胞的模型。指定脑内的目标区域(500)。举例来说,可依据先前鉴别的目标疾病的特征或区域的已知功能来选择目标区域。用视蛋白修改目标区域内的一种或多种细胞类型(510)。不同细胞类型各自可用响应不同波长的光的不同视蛋白修改。在某些替代性实施方案中,不同细胞类型是用然而在不同样本或患者中的相同视蛋白修改。用依据以下确定的范围内的可见光刺激目标区域中的不同细胞类型(520):用来修改受刺激的特定细胞类型的视蛋白。观察各细胞类型的反应(580)。将已知当以宏观层面(而非细胞层面)观察时在患者中诱发特定状态的药物引入目标区域(530)。观察在药物存在下各细胞类型的反应(590)。将在已知诱发特定状态的药物存在下各细胞类型的反应与以下反应相比(540):当细胞处于“正常”或“自然”状态(即不存

在药物)时,相同细胞类型对刺激的反应。依据所述比较,可确定细胞类型中一种或多种是否涉及产生由药物触发的状态(550)。如果在药物存在下的反应中一种或多种不同于基线反应,那么可进一步研究反应改变的细胞类型以确定细胞类型是否涉及于导致特定状态诱发中。

[0087] 在各个替代性并且互补性实施方案中,可活体内(560)、活体外(570)或以这两种方式研究目标区域。在活体外研究目标区域的实施方案中,可使用维持神经回路完整的目标区域的切片。使用多个切片组,各组中在目标区域内的不同细胞类型得到修改。或者,可研究目标区域中的各细胞类型的单个细胞。替代性活体外方法允许观察分离中细胞的反应,以及它对周围细胞的影响。使用多个切片组或单个细胞允许单一视蛋白类型用来修改所有不同细胞类型,而不会导致所有细胞同时放电。

[0088] 在研究活体内目标区域的实施方案中,可使用多个受试者,其中不同细胞类型在各受试者中得到修改。或者,对不同波长的光起反应的不同兴奋性视蛋白可用来修改目标区域中的不同细胞类型。

[0089] 在某些较特定实施方案中,目标区域是前额皮质的V层。改性V层的锥体神经元。据信前额皮质涉及于精神病状态(如精神分裂症)中。将如喹吡罗或PCP的药物引入V层锥体神经元中。在比较引入药物前的细胞反应和引入药物后的反应中,已用实验方式发现V层锥体神经元的子集具有不同反应。V层锥体细胞的这个子集可用来研究各种治疗对于精神分裂症或其它精神病的有效性。

[0090] 转到图6,公开了确定目标细胞类型的方法。选择目标细胞类型(600)。可基于先前实验结果来选择目标细胞。刺激目标细胞,并且观察对刺激的反应(610)。在某些较特定实施方案中,通过活化已引入目标细胞中的光反应性分子实现目标细胞的刺激。诱发精神病(620)。这可通过引入已知在受试者中诱发精神病的药物来实现。再次刺激目标细胞,并且观察反应(630)。在诱发精神病前和诱发精神病后的目标细胞的反应之间进行比较(640)。所述比较可用来确定目标细胞是否涉及在受试者中引起精神病,所述确定是基于在已知诱发精神病的药物存在下细胞是否不同地反应。

[0091] 在本公开的某些实施方案中,D2激动剂(如喹吡罗)和拟精神病性药物(如苯环己哌啶(“PCP”))在人和动物中产生精神分裂症样行为。尽管这些药物和其它药物经由不同神经元受体起作用,但所述药物都在前额皮质(“PFC”)中的V层锥体神经元子集中诱发活动依赖性去极化表型。这些神经元中的活动依赖性去极化干扰通过神经元的信息流并且有原因地与消极症状型社会行为有关。

[0092] 本公开的各个方面针对前额皮质中V层锥体神经元子集的特征。子集的特征包括活动依赖性去极化,所述活动依赖性去极化引起双稳定性并且干扰通过这些神经元的信息流。干扰性双稳定性取决于 Ca^{2+} 通道亚型(L型通道)。这个通道先前已牵涉于精神分裂症中。此外,尽管子集神经元的去极化产生非社交性表型,但阻断L型通道会校正拟精神病诱导性社交功能障碍。

[0093] 本公开的某些方面针对鉴别如在精神分裂症和其它相关病状中观察到的精神病行为和认知受损的可能细胞基础。使用光遗传学工具来活化细胞而不引入外电源。这允许观察已感染视蛋白的目标细胞群体对活化的反应,而不会例如使区域中的其它细胞也被活化并改变结果。在某些实施方案中,在“自然”状态(即不存在已知在宏观层面引起行为变化

的其它刺激)细胞中观察到细胞反应。接着将这种反应与在已引入刺激之后目标细胞的反应相比。

[0094] 本公开的某些方面是针对寻找与精神分裂症或其它精神病中的前额叶功能障碍有关的特定神经元。可选择脑部特定区域或神经细胞类型以用于进一步检查,如PFC内的V层锥体神经元。因为PFC中的D2受体集中于V层锥体神经元上并且已知D2受体在精神分裂症中起作用,所以关于精神分裂症和其它形式的精神病,对V层锥体神经元有兴趣。此外,V层锥体神经元是新皮质的输出神经元并且负责信号,包括推测放电(corollary discharge)。

[0095] 使用本公开的各个方面来验证精神病症和特定神经元之间的联系。将目标神经元改性以活体内表达通道视紫红质-2(ChR2)。刺激经过改性的神经元中的ChR2。定量认知受损和由刺激引起的其它消极症状。在使用Thy1::Chr18转基因小鼠的模型中,ChR2表达定位于PFC中的V层锥体神经元。适度光学刺激(例如470nm、0.4mW、在10Hz下5毫秒)足以干扰小鼠的社交性探索而不影响正常运动。增大刺激频率(例如470nm、0.4mW、在40Hz下2.5毫秒)几乎完全消除社交性行为并且引起多种紧张性精神症样行为。评估这些结果得出以下结论:表达ChR2的细胞促进精神病样行为。在某些实施方案中,将如此发现用作表达视蛋白的细胞的回路层面研究的基础。

[0096] 本公开的某些方面针对组合视蛋白活化与药理学操作目标目标细胞。D2激动剂喹吡罗在动物中引起精神分裂症样行为。喹吡罗可活体内递送,或可施用于来自目标区域的切片。当使用切片时,研究由光引起的网络活性。如实施例(包括图2A)中所讨论,施用喹吡罗改变V层锥体神经元子集的反应。细胞反应的变化包括不再引起峰电位的一些闪光、与闪光无关的新峰电位,以及平台电位。高频出峰电位期之后是长久去极化,所述长久去极化比直接刺激持久几十毫秒或几百毫秒。在某些情况下,这种长久去极化引起进一步出峰电位。在其它情况下,去极化在峰电位临限值上方产生平台样去极化。

[0097] 使用已知诱发精神病的药物来诱发异常反应允许测试抗精神病药的有效性,以及证实已知抗精神病药的机制。举例来说,应用抗精神病药氟哌啶醇逆转喹吡罗对目标细胞的影响。类似地,当以正确剂量使用时,特定D2对抗剂舒必利也逆转喹吡罗对目标细胞的影响。参见实施例对以下的更多讨论:喹吡罗、氟哌啶醇和舒必利对D2受体的影响、峰电位速率以及目标细胞的其它特征。

[0098] 如上简要讨论,观察到当存在喹吡罗时,V层锥体神经元子集显示活动依赖性去极化。具有这种反应的细胞子集可如下鉴别出:当不存在喹吡罗时,响应超极化电流脉冲在去极化后的显著下跌和回弹。在喹吡罗存在下,没有显著下跌和回弹的V层锥体神经元不显示活动依赖性去极化。两个亚群的锥体神经元在它们的输入电阻或膜时间恒定性方面并无不同。然而,显示活动依赖性去极化的细胞倾向于在休息时稍微更加去极化。

[0099] 在某些更特定的实施方案中,所有来自Thy1:ChR2转基因小鼠(其中喹吡罗引起活动依赖性去极化)的神经元都强烈表达ChR2,而相反地,大多数强烈表达ChR2的神经元显示活动依赖性去极化。因此,显示活动依赖性去极化的V层锥体神经元的亚群大致上类似于由ChR2活化的群体,所述ChR2在Thy1::ChR2转基因小鼠中引起社交性行为异常和其它行为异常。在转基因小鼠中,活动依赖性去极化可仅由电流注入引起并且不需要光遗传学刺激。

[0100] 显示活动依赖性去极化的细胞在形态上是不同的。V层锥体神经元子集具有直到达到浅层2/3才分叉的单个大顶树突。细胞在V层还具有许多突出物。相反地,没有活动依赖

性去极化的细胞具有更异质的形态,包括在层4或5中分支的顶树突。参见实施例对以下的较深入讨论:第5层锥体神经元子集之间的差异。

[0101] 在本公开的某些实施方案中,在单个细胞层面上研究电生理学模式。活动依赖性去极化似乎引起一系列值得注意的细胞行为,包括阻断进一步出峰电位的显著去极化、长久双稳定性、由电流注入引起的出峰电位增加,以及比直接刺激期持久并且可引起其它峰电位的后去极化。双稳定性通常与 β/γ 带中有节奏的活动相关。在某些实施方案中,在功率谱中,双稳定性在20Hz和40Hz之间出现峰。

[0102] 在某些实施方案中,噻吡罗对神经兴奋性的净影响(例如出峰电位增加相对于去极化阻断和相关现象)取决于噻吡罗的施用剂量和持续时间,以及输入强度。具体来说,出峰电位增加可在早期噻吡罗施用期间或响应微弱去极化输入而发生,在施用噻吡罗较久之后或响应较强去极化输入,微弱去极化输入发展成长久去极化或双稳定性。活动依赖性去极化可在对照条件(在施用噻吡罗之前)下存在。发现这种现象在一些情况下可由切片中非常高的D2受体活化程度引起。

[0103] 本公开的某些方面针对全细胞电压夹持。这允许鉴别影响活动依赖性去极化的离子通道电流。在所鉴别的V层锥体神经元子集(上文所讨论)中,电压依赖性 Ca^{2+} 电流促进活动依赖性去极化。在动作电位期间经由L型通道的 Ca^{2+} 流入活化 Ca^{2+} 依赖性 K^{+} 电流,这在峰电位再极化中起到重要作用。强D2活化还增强经由L型通道的 Ca^{2+} 流入。另外,预期强D2活化增强峰电位AHP,并且选择性抑制在短峰电位间间隔下出峰电位。预期D2阻断抑制 Ca^{2+} 依赖性 K^{+} 电流的募集,从而引起折衷的峰电位再极化、较宽峰电位、较大 Na^{+} 通道不活化、较高峰电位临限值以及减少的在短峰电位间间隔下出峰电位。

[0104] 在本公开的某些实施方案中,将噻吡罗对目标细胞群体的影响与另一拟精神病药(如苯环己哌啶(PCP))的影响相比。PCP产生与人精神分裂症密切类似的综合症,并且已长久地用来模仿动物的精神分裂症。长久以来PCP的拟精神病作用已归于NMDA受体阻断。惊人的是,已发现在和阻断前额叶NMDA受体的剂量类似的剂量下,PCP产生活动依赖性去极化和后去极化,所述活动依赖性去极化和后去极化比直接刺激期持久、与由噻吡罗引起的活动依赖性去极化和后去极化实际上相同。与噻吡罗相反,舒必利不阻断所述作用,但硝苯地平阻断所述作用。这表明尽管PCP不活化D2受体,但它确实经由L型 Ca^{2+} 通道产生活动依赖性去极化。PCP经由活动依赖性去极化产生与噻吡罗类似的影响范围,包括比直接刺激期持久的后去极化、阻断出峰电位的显著去极化、双稳定性和比直接刺激期持久的持续放电。活动依赖性去极化限于响应超极化电流注入显示显著下跌和回弹后去极化的V层锥体神经元亚群。有趣的是,在一些情况下发现PCP引起宽动作电位,所述宽动作电位由硝苯地平阻断并且可代表树突 Ca^{2+} 峰电位。在响应Thy1::ChR2皮质切片中的光脉冲串期间,PCP(如噻吡罗)抑制在短峰电位间间隔下出峰电位,表明PCP对L型 Ca^{2+} 电流的影响(如噻吡罗的影响)增强在动作电位期间 Ca^{2+} 依赖性 K^{+} 电流的募集。

[0105] 在结构上和功能上不同的拟精神病药噻吡罗和PCP集中于常见的有原因地重要的 Ca^{2+} 通道依赖性异常中性状态。因此,PCP尽管先前未与这种通路关联,但似乎通过募集L型 Ca^{2+} 通道来发挥它的拟精神病作用的部分。在PCP存在下,L型钙通道对抗剂硝苯地平改善小鼠中由PCP诱导的社交性不足。硝苯地平还降低仅由PCP引起的紧张性精神症样行为的发生率。适当剂量的硝苯地平降低过度程度的钙通道活化,从而防止长久出峰电位或双稳定性,并

且恢复正常前额叶输出和由前额皮质介导的其它行为。

[0106] 将所观察到的V层锥体神经元子集的反应应用于在患有精神分裂症和/或其它形式精神病的患者中观察到的症状下,活动依赖性去极化代表可支持前额叶网络中固执行为(perseverative behavior)和离题行为(tangential behavior)的单个细胞现象。因此,神经元,以及活动依赖性去极化的诱导可用作研究疾病(如精神分裂症)的新型可能治疗的疾病模型。

[0107] 据信本公开适用于靶向涉及各种精神病症,并且更具体来说精神病和/或精神病症状的特定神经细胞群体。本发明的特定应用通过靶向连接有关系的特定神经细胞群体来有助于评估、治疗和表征精神病和/或精神病症状。因为本文公开的示例实施方案的许多方面是关于并且显著基于这个领域的先前发展,所以以下讨论概述这些先前发展来对可获取实施细节和改进的基础和下伏教义(包括实施例中所见者)提供可靠理解。在本上下文中提供以下讨论并且使这些参考文献中的教义以引用的方式并入本文中。尽管本发明不一定限于这些应用,但本发明的各个方面可通过使用本文来讨论各个实施例得到了了解。

[0108] 本公开的实施方案针对靶向作为V层锥体神经元子集的细胞。靶向这些细胞可尤其适用于产生、研究、治疗或另外表征精神病状态。

[0109] 转到图7,描绘了根据本公开的一个实施方案控制和表征神经病症的模型。选择已鉴别为牵涉于目标神经病症中的细胞类型。取决于细胞类型的特征和已知功能,选择(700)视蛋白来感染所鉴别的细胞类型。举例来说,在某些较特定实施方案中,选择兴奋性的视蛋白(如ChR2)来感染所鉴别的细胞类型。当需要激发所鉴别的细胞类型时选择ChR2。可使用第二视蛋白,或通过引入药物来修改所鉴别的细胞类型以显示异常行为,已知所述药物诱发所模仿的疾病的异常行为。行为可在宏观层面上显示并且可包括所模仿的疾病的外部征兆(outwards sign)。在其它实施方案中,行为是在细胞层面上监测并且可包括细胞对刺激的反应。

[0110] 在各个实施方案中,如图7中所描绘,所鉴别的细胞类型可活体内(730)或活体外(725)定位和刺激(705)。举例来说,所鉴别的细胞类型可以单个细胞(750)形式或作为来自动物的切片(745)的部分加以刺激。举例来说,对于活体内(730)模仿,所鉴别的细胞类型可在转基因动物(735)或人(740)中。

[0111] 在所选视蛋白已递送到目标细胞类型之后,刺激(705)所鉴别的细胞类型并且观察反应(720)。当细胞处于它的“正常”状态时或当已诱发患病状态时,或两者,可观察所鉴别的细胞类型的反应。在初始观察之后,选择目标药物。可依据以下来选择药物:所鉴别的细胞类型、所模仿的疾病、其它药物的先前观察结果、这些因素的组合物,或指导确定治疗特定疾病的可能药物的其它因素。将初始剂量的药物引入所鉴别的细胞中(710),并且观察在药物存在下细胞对刺激的反应(715)。接着将所述反应与不存在药物时的细胞反应相比(755)。

[0112] 在其它实施方案中,将在存在目标药物下的细胞反应与在存在已知诱发异常行为的药物下的细胞反应相比。除已知诱发异常行为的药物以外,还可将目标药物引入所鉴别的细胞类型中。

[0113] 在某些实施方案中,依据评估,修改目标药物的剂量并且再次刺激所鉴别的细胞类型。接着可将经过修改的剂量的反应与不存在目标药物下的反应以及对先前剂量的

目标药物的反应相比。也可将反应与用于所模仿的疾病的其它药物或治疗相比。这允许确定用于特定疾病的最优剂量和药物。因为所观察到的反应可为行为反应或细胞反应,所以有效剂量和/或药物可据一组可能药物来确定。

[0114] 在某些较特定实施方案中,所鉴别的细胞类型为V层锥体神经元的子集。根据要模仿的疾病病况,将如PCP或喹吡罗的药物引入所鉴别的细胞类型来诱发异常行为。接着使用活化引入细胞中的视蛋白的可见光刺激所鉴别的细胞类型,并且观察对刺激的反应。接着将第二药物(目标药物)引入所鉴别的细胞类型中。观察在目标药物存在下对刺激的反应,并且与患病状态下的细胞反应相比。这种比较可用来确定目标药物的功效。它也可用来确定是否应对剂量或药物施用的其它方面进行修改。

[0115] 转到图8,描绘了一种根据本公开的一个实施方案,用于确定所建议治疗的功效的方法。当活体外研究治疗时,异常行为可在细胞层面上发生。当活体外研究治疗时,异常行为可处于细胞层面和/或处于宏观层面,包括患者的可观察到的行为。异常行为可通过施用已知引起要治疗的异常行为的药物来诱发(800)。向患者(活体内)或向一个细胞(或多个细胞)(活体外)施用所建议的治疗(810)。观察在治疗存在下细胞或患者对刺激的反应(820)。观察结果接着用来评估治疗功效(830)。

[0116] 在根据图8的各个实施方案中,治疗例如可为药物、电刺激,或行为治疗。举例来说,可对光刺激起反应。依据引入目标细胞群体中的所选光反应性分子,光刺激可激发或抑制细胞。

[0117] 本文所述和图中所示的各个实施方案可一起实施和/或以其它方式实施。图式/图中所描绘的条目中一个或多个也可以较分离或较整体的方式实施,或在某些情况下被去除和/或变得不可操作(如根据具体应用适用)。举例来说,涉及如以上所讨论的疾病模仿的实施方案可使用多种不同视蛋白和刺激来实施。此外,模仿可活体内或活体外发生。鉴于本文的描述,本领域技术人员将认识到可在不脱离本发明的精神和范畴下使其产生许多变化。

实施例

[0118] 在本文中,我们展示D2激动剂喹吡罗和拟精神病性苯环己哌啶,其在人和动物中产生精神分裂症样行为,但经由不同受体起作用,集中于PFC中V层锥体神经元子集中的新的活动依赖性去极化表型。我们展示这种活动依赖性去极化引起双稳定性并且干扰通过神经元的信息流,并且这种干扰性双稳定性取决于已牵涉于精神分裂症中的 Ca^{2+} 通道亚型(L型通道)。最终,我们展示这些神经元的细胞内在表型有原因地与消极症状型社交性行为有关;使这种神经元选择性去极化在光遗传学上产生非社交性表型,而阻断L型通道会校正拟精神病性诱发性社交性功能障碍。这些资料一起定义由与精神分裂症和相关病症有关的机制募集的前额叶功能障碍的新细胞机制。

[0119] 实施例1:在小鼠中通过光学刺激表达ChR2的下边缘V层锥体神经元所诱发的精神病样行为。

[0120] 我们出于两个原因选择进行我们在PFC内V层锥体神经元中的搜寻。第一,PFC中的D2受体集中在V层锥体神经元(3、4)上,并且D2受体在精神分裂症和其它形式的精神病(5)中起到重要作用,因为所有已知的抗精神病药都阻断D2受体,而提高多巴胺含量(例如左旋多巴(L-Dopa)、兴奋剂)的药物,以及多巴胺受体激动剂可在正常个体中引起精神病,或加

重精神分裂症患者的症状。实际上,结合于皮质D2受体可具体地解释某些抗精神病药的优越功效,尤其是对于精神分裂症(6)的认知和消极症状的功效。第二,V层锥体神经元是新皮质的关键输出神经元,其负责包括推测放电的信号,当所述推测放电不足时可促进产生精神病症状(如幻听(7))的自我监测的失败。

[0121] 为验证这些神经元在小鼠中促进精神病行为,我们使用公认的Thy1::ChR2转基因小鼠刺激PFC内V层锥体神经元中的通道视紫红质-2(ChR2)(图1A-B),在所述Thy1::ChR2转基因小鼠中,ChR2的新皮质表达主要定位于V层锥体神经元(8)。为了定量精神分裂症的认知受损和消极症状特征,我们在这些小鼠中测量了社交性探索,并且为了评估积极样症状,我们测量了混乱行为或紧张性精神症行为,包括活动刻板 and 僵硬。

[0122] 材料和方法

[0123] 如下实现Thy1::ChR2转基因小鼠中表达ChR2-EYFP的下边缘V层锥体神经元的光学刺激:将单侧光学纤维放在下边缘前额皮质上方(图1A-B)。分别用473nm蓝光(10Hz,5毫秒脉冲宽度)和473nm蓝光(40Hz,5毫秒脉冲宽度)实现V层神经元的低频和高频 γ 带光学刺激。为了定量精神分裂症的认知受损和消极症状特征,我们在这些小鼠中测量了社交性探索,并且为了评估积极样症状,我们测量了混乱行为或紧张性精神症行为,包括活动刻板 and 僵硬。

[0124] 结果

[0125] 我们发现相对适度的光学刺激(470nm,0.4mW,5毫秒,在10Hz下)足以显著干扰社交性探索而不影响正常运动(图1C-E)。具体地说,低频光学刺激在6只测试动物的6只中减少新奇幼崽的社交性探索($p=0.03$;光打开/光关闭时期交错)减少新奇幼崽的社交性探索(图1C-D)。旷场资料显示在低频光学刺激时,Thy1::ChR2动物的总速度(左边)或轨迹长度(右边)没有差异,表明适度刺激不影响正常运动(图1E)。增大刺激频率(470nm,0.4mW,2.5毫秒,在40Hz下)几乎完全消除社交性行为并且引起多种紧张性精神症样行为(图F-H)。具体地说,增大V层锥体神经元的光学刺激频率在6只测试动物的6只中几乎完全消除新奇幼崽的社交性探索($p<0.01$;光打开/光关闭时期交错)减少新奇幼崽的社交性探索(图F-G)。另外,在6只测试小鼠的3只中(左边; $p<0.05$),高频40Hz光学刺激显著增加在紧张性精神症样僵硬姿势所用的时间,并且在6只测试小鼠的2只中(右边; $p=0.13$)观察到专心于重复面对面头运动所用的时间增加的倾向(图1H)。这些结果进一步验证了以下想法:PFC中V层锥体神经元中的异常活动可促进精神分裂症样行为(9),并且为回路层面研究提供基础。此外,这些结果证明光学刺激Thy1::ChR2-EYFP小鼠细胞株中表达ChR2的V层锥体神经元允许这只小鼠用作精神分裂症的动物模型。

[0126] 实施例2:D2激动剂引起活动依赖性去极化,所述活动依赖性去极化是由V层锥体神经元子集中L型Ca²⁺通道介导,由D2对抗剂治疗可逆。

[0127] 表达ChR2的层锥体神经元的光学刺激在Thy1:ChR2-EYFP转基因小鼠中诱发精神分裂症样行为。因此,我们继续探索与精神分裂症有关的药理学操作可影响PFC中这些V层锥体神经元的方法。如以上所讨论,D2受体在精神分裂症中起到关键作用,并且D2激动剂喹吡罗在动物(10、11)中引起精神分裂症样行为。为探索与精神分裂症有关的药理学操作可影响PFC中这些V层锥体神经元的方法,使用Thy1::ChR2小鼠的前额叶切片来研究由以下引起的网络活动:在存在或不存在喹吡罗下的光,继之以用已知D2对抗剂进行治疗(图2和3)。

[0128] 材料和方法

[0129] 我们使用Thy1::ChR2小鼠的前额叶切片来研究由光引起的网络活动。从Thy1::ChR2转基因小鼠分离的脑部切片经历活体外光刺激,并且通过电生理学记录在不存在D2激动剂(对照物)或存在D2激动剂(20 μ M噻吡罗)下对闪光串(470nm,1毫秒)的细胞反应来监测V层锥体神经元。随后洗涤脑部切片以去除噻吡罗并且用0.2–2 μ M氟哌啶醇或5 μ M舒必利处理,已知氟哌啶醇和舒必利都是D2对抗剂。定量V层锥体神经元的峰电位速率和由峰电位速率传输的信息量,以及随峰电位间间隔而变的峰电位数目。

[0130] 随后在单独或与以下组合的20 μ M噻吡罗存在下处理V层锥体神经元以使电流脉冲超极化和/或去极化:D2对抗剂氟哌啶醇(2 μ M)或舒必利(5 μ M),或L型Ca²⁺通道对抗剂硝苯地平(10 μ M)。电生理学记录监测当在药理学条件或治疗下时V层锥体神经元对活体外光刺激的细胞反应。

[0131] 结果

[0132] 如图2A中所说明,施用噻吡罗(20 μ M;紫色迹线,下图)使大部分V层锥体神经元的反应发生显著变化,以使先前引起峰电位的一些闪光不再引起峰电位(箭头),而出现与闪光(“+”)和平台电位(“p”)无关的新峰电位。在V层锥体细胞子集中,我们观察到高频出峰电位期之后为长久去极化,所述长久去极化比直接刺激持久几十或几百毫秒(图2B,中图,紫色迹线;在16/26V层锥体神经元中观察)。这种活动依赖性去极化可引起进一步出峰电位,或在峰电位临限值上方产生平台样去极化(图2B)。冲去噻吡罗并且同时施用抗精神病药氟哌啶醇快速逆转这种影响(图2B,下图,绿色迹线;在9/9细胞中观察到用0.2–10 μ M氟哌啶醇实现逆转),同时施用噻吡罗和特异性D2对抗剂舒必利也是这样(用5 μ M舒必利逆转;在2/2细胞中观察到)。

[0133] 有趣的是,对于D2受体活化对这些神经元的峰电位速率所传输的关于闪光速率的信息量的影响,观察到倒U形曲线;在对照条件中信息量最高,当D2受体由噻吡罗(20 μ M)活化时所述信息量中等,并且当D2受体用氟哌啶醇(0.2–2 μ M)或舒必利(5 μ M)阻断时所述信息量最低(图2C; $p < 0.05$;对照物相对于噻吡罗; $p < 0.01$,对照物相对于氟哌啶醇/舒必利;双向ANOVA(2-way ANOVA))。我们鉴别出这种关系的机制,其在于,对于D2受体活化对响应ChR2刺激出峰电位的影响,还存在U形曲线:在对照条件下,神经元出现峰电位最多,并且当D2受体用氟哌啶醇(0.2–2 μ M)或舒必利(5 μ M)阻断时最少(图2D; $p < 0.01$;对照物相对于噻吡罗; $p < 0.001$,对照物相对于氟哌啶醇/舒必利;双向ANOVA)。当D2由噻吡罗活化或由氟哌啶醇或舒必利阻断时,较低峰电位速率尤其与在短峰电位间间隔下的峰电位损失有关(图2E;每组 $n = 4$ 个细胞),并且实际上D2激动剂和对抗剂的影响似乎反映对重复动作电位的影响(图2F)。和将在对照条件下引起第二峰电位的赋予性亚临限值后续输入一致,用噻吡罗实现的D2活化(紫色迹线)增强峰电位后超极化(AHP,图2F中的箭头)。相反地,根据经由如Na⁺通道不活化的机制来防止在短峰电位间间隔下出峰电位,用舒必利实现的D2阻断加宽动作电位。

[0134] 我们进一步表征活动依赖性去极化。第一,我们寻求确定它是否将存在于由任何具体的鉴别性电生理学性质、基因表达模式或形态定义的V层锥体神经元的特定亚群中。我们发现在施用20 μ M噻吡罗(16/17细胞)之后几乎每个V层锥体细胞(响应超极化电流脉冲具有显著的下落和回弹后去极化(图3A中的“*”,上图))都显示活动依赖性去极化,而0/9的没

有这种性质的V层锥体神经元在应用喹吡罗之后显示活动依赖性去极化。这两个亚群的锥体神经元在它们的输入电阻或膜时间常数方面并无不同,而显示活动依赖性去极化的细胞在休息时稍微更加去极化。有趣的是,所有来自喹吡罗引起活动依赖性去极化的Thy1::ChR2转基因小鼠的神经元都强烈表达ChR2(14/14细胞);相反地,大多数强烈表达ChR2的神经元显示活动依赖性去极化(14/18细胞)。因此,显示活动依赖性去极化的V层锥体神经元的亚群大致上类似于由ChR2活化的群体,所述ChR2在Thy1::ChR2转基因小鼠中引起社交性行为异常和其它行为异常(图1)。重要的是,活动依赖性去极化可仅由电流注入引起(图3A中的“1”,中图,紫色迹线)并且不需要光遗传学刺激,也不需要图2中所示的那种网络活动表达,如下文所述。我们还鉴别与存在活动依赖性去极化有关的形态特征,所述活动依赖性去极化可能涉及中间PFC(12)的V层中的先前所述的形态学子网络:具有活动依赖性去极化的细胞不变地具有直到达到浅层2/3才分叉的单个大顶树突,以及许多在V层内展现的过程(图3B,左图;n=5),而相反地,没有活动依赖性去极化的细胞具有较异质的形态,经常包括在第4或第5层中分支的顶树突(右图)。

[0135] 为发展对这种影响的细胞结果的理解,我们探索在单细胞层面鉴别的相关电生理学模式。活动依赖性去极化似乎引起一系列值得注意的细胞行为,包括阻断进一步出峰电位的显著去极化(图3A中的“2”)、长久双稳定性(图3A中的“3”)、由电流注入引起的出峰电位增加(图3C中的“4”),以及比直接刺激期持久并且可引起其它峰电位的后去极化(图3C中的“5”)。如图3D中所示来定量最通常观察到的后去极化,并且由喹吡罗引起的较宽影响范围概述于图3E中,作为具有显著下跌和回弹后去极化的V层锥体神经元的部分,所述部分显示继去极化电流注入之后的后去极化(ADP)、出峰电位的去极化阻断(depolarization阻断)、双稳定性或比去极化电流注入期持久的持续性放电。值得注意的是,双稳定性通常与 β/γ 带中有节奏的活动相关(图3F;4/6具有双稳定性的细胞在它们的功率谱中在20Hz和40Hz之间具有峰)。

[0136] 我们接着寻求证实活动依赖性去极化是由D2受体介导。实际上,我们发现它可使用抗精神病性氟哌啶醇(0.2–10 μ M;图3A;下图;绿色迹线;9/9细胞),或较特异性D2对抗剂舒必利(5 μ M;图3C,下图,绿色迹线;2/2细胞)来阻断。活动依赖性去极化也可使用较低剂量的喹吡罗引起;在8/10的在超极化电流脉冲期间具有显著下跌后去极化并且在超极化电流脉冲之后具有回弹后去极化的细胞中,5 μ M(-)喹吡罗或10 μ M喹吡罗引起活动依赖性去极化和相关现象(例如长久后去极化和/或双稳定性)。我们还发现喹吡罗对神经兴奋性的净影响(例如出峰电位增加相对于去极化阻断和相关现象)取决于喹吡罗的施用剂量和持续时间,以及输入强度。具体来说,我们经常观察到出峰电位增加可在早期喹吡罗施用期间或响应微弱去极化输入而发生,在施用喹吡罗较久之后或响应较强去极化输入,微弱去极化输入发展成长久去极化或双稳定性。活动依赖性去极化偶尔存在于对照条件(在应用喹吡罗之前)中,表明这种现象在一些情况下可由切片中非常高的D2受体活化程度引起;实际上,在这些情况下(n=3),适度剂量的氟哌啶醇(0.2–2 μ M)可将双稳定性转化为较适度的后去极化,或完全阻断活动依赖性去极化。

[0137] 我们接着寻求鉴别可能的在全细胞电压夹中介导活动依赖性去极化的离子通道电流。在一系列1毫秒步进到0mV以模拟动作电位之后,喹吡罗(20 μ M)引起缓慢活化去极化电流(在-30mV下),并且增大快速不活化尾电流(在-60mV下);这些影响都由舒必利(5 μ M)阻

断。这些观察结果表明电压依赖性 Ca^{2+} 电流促进活动依赖性去极化,并且实际上应用电压依赖性 Ca^{2+} 通道对抗剂在5/5细胞中阻断活动依赖性去极化(5mM Ni^{2+} 或100 μM 硝苯地平, $n=2$;10 μM 硝苯地平, $n=3$,图3G,下图,灰色)。L型 Ca^{2+} 通道在活动依赖性去极化中的这种作用可赋特征于(inform)D2受体活化对出峰电位的影响的U形曲线(图2C-F),因为在动作电位期间经由L型通道流入 Ca^{2+} 活化在峰电位再极化中起到重要作用的 Ca^{2+} 依赖性 K^{+} 电流(13)。预期强D2活化增强经由L型通道的 Ca^{2+} 流入(13)、增强峰电位AHP,并且选择性抑制在短峰电位间间隔下出峰电位;相反地,预期D2阻断抑制 Ca^{2+} 依赖性 K^{+} 电流的募集,从而引起折衷的峰电位再极化、较宽峰电位、较大 Na^{+} 通道不活化、较高峰电位临限值,以及最终减少的在短峰电位间间隔下出峰电位。

[0138] 实施例3:苯环己哌啶(PCP)还经由L型 Ca^{2+} 通道引起活动依赖性去极化,其由治疗可逆。

[0139] 已研究了喹吡罗对介导前额叶输出的神经元的影响,并且鉴别出干扰它们信息传输能力的机制,我们接着比较喹吡罗对另一拟精神病药苯环己哌啶(PCP)的情况的影响。PCP产生与人精神分裂症密切类似的综合症(14),并且已长久地用来模仿动物的精神分裂症。

[0140] 材料和方法

[0141] 使从Thy1::ChR2转基因小鼠分离的脑部切片经历直流刺激,并且通过电生理学记录在不存在或存在5 μM PCP下对去极化电流脉冲的细胞反应来监测V层锥体神经元。随后用5 μM 舒必利或10 μM 硝苯地平处理脑部切片,并且用电生理学记录监测对治疗的细胞反应。为定量精神分裂症的认知受损和消极症状特征,在用单独或与5mg/kg PCP组合的4-15mg/kg硝苯地平处理的小鼠中测量社交性探索。

[0142] 在应用5 μM PCP之后,具有显著下跌和回弹后去极化的V层锥体神经元的部分,所述部分显示继去极化电流注入之后的后去极化(ADP)、出峰电位的去极化阻断(depolarization阻断)、双稳定性或比去极化电流注入期持久的持续性放电(图4B)。上方:硝苯地平以剂量依赖性方式损害社交性探索(各组中 $n=8$ 只小鼠)。下方:在PCP处理的小鼠中,以剂量依赖性方式,PCP损害社交性探索,但硝苯地平改善这种不足(各组中 $n=8$ 只小鼠)(图4C)。在野生型小鼠中,以及在设计为功能基因的CACNA1C获得的TS2neo剔除小鼠中,V层锥体神经元对超极化和去极化电流脉冲的反应(图4D)(20)。*= $p<0.05$,**= $p<0.01$ 。所述影响存在于4/4突变型细胞和0/5野生型细胞中,其中所述细胞响应超极化电流注入具有大的下跌和回弹去极化(依据Fisher's精确检验, $p<0.01$)。

[0143] 结果

[0144] PCP的拟精神病性作用已长久地归于NMDA受体阻断;惊人的是,我们发现在和阻断前额叶NMDA受体的剂量(5 μM)(15)类似的剂量下,PCP产生活动依赖性去极化和后去极化,所述活动依赖性去极化和后去极化比直接刺激期持久、与由喹吡罗引起的活动依赖性去极化和后去极化实际上相同(图4A;在6/12V层锥体神经元中观察到)。这些作用未被D2对抗剂舒必利(5 μM ; $n=2$ 个细胞)阻断,但被L型 Ca^{2+} 通道对抗剂硝苯地平(10 μM ; $n=2$ 个细胞)阻断,表明尽管PCP不活化D2受体,如喹吡罗,但它经由L型 Ca^{2+} 通道产生活动依赖性去极化。惊人的是,PCP经由活动依赖性去极化产生与喹吡罗类似的作用范围,包括比直接刺激期持久的后去极化、阻断出峰电位的显著去极化、双稳定性和比直接刺激期持久的持续放电(图4B)。

活动依赖性去极化又限于V层锥体神经元的亚群,所述亚群响应超极化电流注入显示显著的下跳和回弹后去极化(在6/9这些神经元中以及在0/3没有这些性质的V层锥体神经元中观察到活动依赖性去极化)。有趣的是,在一些情况下发现PCP引起宽动作电位,所述宽动作电位由硝苯地平阻断并且可代表树突 Ca^{2+} 峰电位(图4A)。最终,在响应Thy1::ChR2皮质切片中的光脉冲串期间,PCP(如噻吡罗)抑制在短峰电位间间隔下出峰电位,表明PCP对L型 Ca^{2+} 电流的作用(如噻吡罗的作用)增强在动作电位期间 Ca^{2+} 依赖性 K^{+} 电流的募集。

[0145] 如果在结构上和功能上不同的拟精神病药噻吡罗和PCP实际上集中于常见的有原因地重要的 Ca^{2+} 通道依赖性异常中性状态,那么出现以下预测:PCP(先前不与这种通路有关)可通过募集L型 Ca^{2+} 通道来发挥它的拟精神病作用的部分。为测试这个新假设,我们测量PCP(5mg/kg)和L型钙通道对抗剂硝苯地平(4mg/kg、15mg/kg)对小鼠社交性行为的影响。根据假设的U形影响曲线,我们发现单独的硝苯地平以剂量依赖性方式损害社交性(图4C,上方; $p<0.05$,每组 $n=8$ 只小鼠),而形成鲜明对比的是,硝苯地平以剂量依赖性方式改善由PCP诱发的社交性不足(图4C,下方; $p<0.05$,每组 $n=8$ 只小鼠)。此外,硝苯地平(15mg/kg;没展示)还降低由单独的PCP引起的紧张性精神症样行为(例如转圈和僵硬)的发生率(16)。这些资料与所提出的假设一致;单独的硝苯地平将使 Ca^{2+} 通道活化降低到损害峰电位再极化和重复出峰电位的程度(从而损害前额叶介导性行为),但与PCP组合时,适当剂量的硝苯地平将降低过度程度的钙通道活化(防止长久出峰电位或双稳定性),从而恢复正常前额叶输出并援救由前额皮质介导的行为。

[0146] 讨论

[0147] 在本文中,我们已鉴别并表征了一种由D2受体活化介导的新型活动依赖性去极化;这种现象存在于PFC中V层锥体神经元的规定子集中,所述规定子集当活化时在小鼠中产生拟精神病性样行为。我们还已经确定了这种活动依赖性去极化产生双稳定性、异常出峰电位和干扰通过这些神经元的信息流的其它细胞行为,因此保持表面效度作为可促进在精神分裂症和相关精神病形式中的前额叶功能障碍的机制。我们已惊人地发现,根本上不同种类的拟精神病药(苯环己哌啶)还引起与D2受体活化无关的类似活动依赖性去极化。最终,我们确定这种共享的活动依赖性去极化取决于L型 Ca^{2+} 通道,并且阻断L型 Ca^{2+} 通道改善作出行为的小鼠中的PCP的拟精神病性作用。

[0148] 这些V层神经元充分平衡以影响在精神分裂症中受干扰的认知域。如由噻吡罗的作用所示,这些神经元表达D2受体,并且前额叶D2受体涉及工作记忆和定势转移任务(9、17);此外,在PFC中,D2受体主要定位于V层锥体神经元(4)上,所述V层锥体神经元将输出从PFC送到其它脑区域中。因此,经由图1A-D中所示的作用,这些V层神经元中的L型 Ca^{2+} 通道可深深地改变流出PFC流进脑部区域(如纹状体(18))中的信息。我们注意到这假设D2受体在门控前额叶输出中的作用可补充通过D1受体(19-23)的延迟期活动的稳定化,并且通过阶段性多巴胺释放(25)来门控前额叶输入(24),这将优先地活化D1受体(26)。也有趣的是推测由本文报道的活动依赖性去极化介导的作用范围可有助于解释看上去矛盾的临床观察结果。患有精神分裂症或其它形式精神病的急性精神病患者经常高度离题,其言语和想法都在仅有微弱联系(即使有的话)的主题之间快速转换。然而,相同患者几乎在同时也可明显地固执,不能改变他们的想法或语言以远离单一想法或措词。活动依赖性去极化代表一种单个细胞现象,所述现象可支持前额叶网络中的固执行为和离题行为。如果D2活化影响

前额叶神经元子集,所述前额叶神经元子集介导输出信号,所述输出信号经由活动依赖性去极化(增强这些神经元中的出峰电位)来触发运动反应或推测放电(7、9、18、27),那么所得异常或长久出峰电位(图2A、B;图3C、E)可产生对应于皮质网络所介导的过程中离题行为的杂乱或不当的输出信号。极高的D2活化程度又可产生双稳定性(图3A)或出峰电位的去极化阻断(图3A、E),从而防止输出信号传导并且对应于固执性网络行为或紧张性精神症网络行为。疗法副作用还可由这种细胞表型告知,因为用高剂量抗精神病药阻断D2受体将抑制在这个关键输出神经元群体中的前额叶信息传输(图2C、D、F;图3A、C),从而可能促进精神运动性阻滞和帕金森症(Parkinsonism),如在临床上所观察。以下事实使人想起其它精神现象,例如D1受体活化(19)和由过度表达和不足表达MeCP2引起的类似神经劣化(28)的作用的U形曲线:过度活化和阻断D2受体都可产生类似表型(出峰电位减少)。

[0149] 依据全基因组关联研究(29),L型Ca²⁺通道已牵涉于精神分裂症中,但到目前为止,对它们的作用还没有明确的假设。实际上,极少的例外是(30),已经极难以关联特定神经元中的离子通道与精神疾病症状。基因研究也已牵涉双极性病症(31)中的L型Ca²⁺通道,所述双极性病症包括类似于精神分裂症(32)中所见的离题和认知不足,并且我们最近已发现设计来通过延长L型电流(35)来产生高L型Ca²⁺通道活性(33、34)的小鼠细胞株在V层神经元中引起类似细胞功能障碍(图4D)。我们也已发现L型Ca²⁺通道对抗作用受损的社交性行为,而相同剂量援救这种行为中的PCP诱发性不足(图4C)。适度剂量的硝苯地平和其它L型钙通道对抗剂已偶而被显示有希望用于治疗精神分裂症(36-38),但缺乏决定性研究。本文报道的发现可如下告知这些研究的审慎设计和剂量选择:提供相关细胞内在表型,所述内在表型关联特定前额叶神经元亚群中特定离子通道推动的现象与有关精神分裂症和其它精神病的症候学。

[0150] 本发明涉及以下实施方式:

[0151] 1.一种非人动物,其包含在前额皮质中的V层锥体神经元子集的细胞膜上表达的光反应性视蛋白,其中光活化所述视蛋白诱导所述膜的去极化并且诱发所述动物的精神病。

[0152] 2.如实施方式1所述的动物,其中所述V层锥体神经元子集具有单个大顶树突。

[0153] 3.如实施方式1所述的动物,其中所述视蛋白选自由以下组成的组:ChR2、VChR1和DChR。

[0154] 4.如实施方式1所述的动物,其中所述视蛋白选自由以下组成的组:SF0、SSF0、C1V1、C1V1-E122T、C1V1-E162T和C1V1-E122T/E162T。

[0155] 5.一种前额皮质组织切片,其包含V层锥体神经元子集,其中光反应性视蛋白是在V层锥体神经元中的顶树突的细胞膜上表达,并且所述视蛋白的光活化诱导所述膜的去极化。

[0156] 6.如实施方式5所述的前额皮质组织切片,其中所述V层锥体神经元子集具有单个大顶树突。

[0157] 7.如实施方式5所述的前额皮质组织切片,其中所述视蛋白选自由以下组成的组:ChR2、VChR1和DChR。

[0158] 8.如实施方式5所述的前额皮质组织,其中所述视蛋白选自由以下组成的组:SF0、SSF0、C1V1、C1V1-E122T、C1V1-E162T和C1V1-E122T/E162T。

[0159] 9.一种在非人动物中诱发精神病的方法,其包括通过光来活化光反应性视蛋白,其中所述光反应性视蛋白是在所述动物的所述前额皮质中的V层锥体神经元子集的细胞膜上表达,并且其中所述视蛋白的所述光活化诱导所述细胞膜的去极化。

[0160] 10如实施方式9所述的方法,其中所述V层锥体神经元子集具有单个大顶树突。

[0161] 11.如实施方式9所述的方法,其中所述视蛋白选自由以下组成的组:ChR2、VChR1和DChR。

[0162] 12.如实施方式9所述的方法,其中所述视蛋白选自由以下组成的组:SF0、SSF0、C1V1、C1V1-E122T、C1V1-E162T和C1V1-E122T/E162T。

[0163] 13.一种筛选可适用于治疗精神病的化合物的方法,其包括在向非人动物的前额皮质施用所述化合物之前和之后测量所述动物的精神病状态,其中通过光活化在所述动物的V层锥体神经元的主体的细胞膜上表达的光反应性视蛋白来诱发所述精神病状态,并且所述视蛋白的活化诱导所述膜的去极化;其中在施用所述化合物之后精神病状态测量值中的一个或多个的改良表明所述化合物可适用于治疗精神病。

[0164] 14.如实施方式13所述的方法,其中所述精神病状态测量值是行为测量值。

[0165] 15.如实施方式13所述的方法,其中所述精神病状态测量值是细胞测量值。

[0166] 16.如实施方式9所述的方法,其还包括在施用所述化合物之前向所述动物施用D2激动剂的步骤。

[0167] 17.一种筛选可适用于治疗精神病的化合物的方法,其包括在孵育所述组织切片与所述化合物之前和之后测量前额皮质组织切片的精神病状态,其中所述前额皮质组织切片包含V层锥体神经元主体并且光反应性视蛋白是在V层锥体神经元的所述主体的细胞膜上表达,其中通过经由活化所述光反应性视蛋白诱导所述神经元的膜去极化来诱发所述精神病状态;其中在与所述化合物孵育之后精神病状态示值读数中的一个或多个的改良表明所述化合物可适用于治疗精神病。

[0168] 18.如实施方式17所述的方法,其中所述精神病状态测量值是细胞测量值。

[0169] 19.如实施方式17所述的方法,其还包括在与所述化合物孵育之前孵育D2激动剂与所述前额皮质组织切片的步骤。

[0170] 20.一种方法,其包括:

[0171] 向表达光反应性视蛋白的目标神经元群体提供光学刺激;

[0172] 测量所述目标神经元群体响应所述光学刺激的第一电模式;

[0173] 将已知诱发精神病的药物引入所述目标神经元群体中;

[0174] 向所述目标神经元群体提供光学刺激

[0175] 测量所述目标神经元群体响应所述光学刺激的后续电模式;以及

[0176] 比较所述第一电模式与所述后续电模式。

[0177] 21.如实施方式20所述的方法,其还包括鉴别与精神病相关的神经元子集。

[0178] 22.如实施方式21所述的方法,其中所述神经元子集是第5级锥体神经元的子集。

[0179] 23.如实施方式21所述的方法,其中所述目标神经元细胞群体是在患者中。

[0180] 24.如实施方式23所述的方法,其还包括向所述患者提供潜在的治疗,并且观察在所述潜在的治疗过程中和之后响应光的第三电模式。

[0181] 25.如实施方式24所述的方法,其还包括比较所述第三电模式与所述第一和第二

电模式,并且评估所述潜在的治疗的功效。

[0182] 26.如实施方式20所述的方法,其还包括提高表达Thy1的前额皮质神经元子集内的活性。

[0183] 27.装置、试剂、工具、技术、方法以及途径,其是针对评估、治疗或控制由D2受体活化所介导的活动依赖性去极化。

[0184] 28.装置、试剂、工具、技术、方法以及途径,其用于使用基于精神病的病症的模型来研究所述病症、鉴别表型/内在表型,和/或鉴别其治疗。

[0185] 29.如实施方式28所述的发明,其中所述治疗包括药理学方法、电学方法、磁学方法、手术方法或光遗传学方法中的一种或多种。

[0186] 30.装置、试剂、工具、技术、方法以及途径,其是针对评估、治疗或控制由L型钙通道所介导的活动依赖性去极化。

[0187] 31.一种方法,其包括:

[0188] 向目标神经元群体提供刺激;

[0189] 测量目标神经元群体响应所述刺激的第一电模式;

[0190] 将已知诱发精神病的药物引入所述目标神经元群体中;

[0191] 向所述目标神经元群体提供刺激

[0192] 测量所述目标神经元群体响应所述刺激的后续电模式;以及

[0193] 比较所述第一电模式与所述后续电模式。

[0194] 32.如实施方式31所述的方法,其中所述刺激是电刺激。

[0195] 33.一种方法,其包括:

[0196] 用光反应性分子改性目标神经元群体,所述目标神经元群体的神经元具有单个大顶树突;

[0197] 向所述目标神经元群体提供光,所述光活化所述光反应性分子;以及

[0198] 将药物引入所述目标神经元群体中;所述药物使得所述神经元的膜电位在去除所述光之后仍是升高的。

[0199] 34.如实施方式33所述的方法,其中所述光反应性分子响应光来激发所述目标神经元群体。

[0200] 35.如实施方式34所述的方法,其中所述光反应性分子是ChR2。

[0201] 36.如实施方式33所述的方法,其中所述目标神经元群体是V层锥体神经元子集。

[0202] 37.如实施方式33所述的方法,其中所述膜电位的升高抑制所述细胞响应刺激而进行的放电。

[0203] 38.如实施方式33所述的方法,其中所述膜电位的升高使得在去除去极化电流之后发生放电。

[0204] 39.如实施方式33所述的方法,其中所述顶树突延伸到脑的浅层中。

[0205] 40.如实施方式33所述的方法,其还包括确定所述升高的膜电位的来源。

[0206] 41.如实施方式33所述的方法,其中所述药物诱发精神病。

[0207] 42.如实施方式33所述的方法,其中所述目标神经元群体的L型钙通道牵涉活动依赖性去极化。

[0208] 43.一种方法、系统或装置,其用于靶向在本文中针对干预和/或治疗精神病行为

所鉴别的解剖学目标、功能目标、结构目标以及回路目标。

[0209] 44.如实施方式43所述的发明,其中所述精神病行为包括刻板症、偏见和社会功能障碍症状中的一者。

[0210] 45.如实施方式43所述的发明,其中所述干预和/或治疗是使用基于药理学、电学、磁学、手术以及光遗传学中的至少一者的解决方法来提供的。

[0211] 46.装置、试剂、工具、技术、方法以及途径,其是基于解剖学目标、功能目标、结构目标、回路目标、以及用于研究和探索这些病症和相关病症,鉴别表型、内在表型和治疗目标的相关病症模型。

[0212] 47.装置、试剂、工具、技术、方法以及途径,其是针对由L型钙通道和/或D2受体所介导的细胞的活动依赖性去极化。

[0213] 48.一种方法,其包括:

[0214] 选择目标神经元群体;

[0215] 将药物引入所述目标神经元群体中;以及

[0216] 刺激所述目标神经元群体,所述药物使得所述神经元的膜电位在去除所述刺激之后仍是升高的。

[0217] 49.如实施方式48所述的方法,其中所述刺激是电刺激

[0218] 尽管已借助于说明和实施例相当详细地描述了前述发明以达到理解清楚性的目的,但不应将说明书和实施例视为限制本发明的范畴。

[0219] 本文所公开的所有参考文献、公布和专利应用都以引用的方式整体并入本文中。

[0220] 参考文献

[0221] 1.P.S.Goldman-Rakic,L.D.Selemon,Schizophr Bull 23,437(1997).

[0222] 2.D.M.Barch等,Arch Gen Psychiatry 58,280(2001年3月).

[0223] 3.M.S.Lidow,F.Wang,Y.Cao,P.S.Goldman-Rakic,Synapse 28,10(1998年1月).

[0224] 4.N.Santana,G.Mengod,F.Artigas,Cereb Cortex 19,849(2009年4月).

[0225] 5.A.Bonci,F.W.Hopf,Neuron 47,335(2005年8月4日).

[0226] 6.R.M.Kessler等,Neuropsychopharmacology 31,1991(2006年9月).

[0227] 7.C.Frith,Lancet 346,615(1995年9月2日).

[0228] 8.B.R.Arenkiel等,Neuron 54,205(2007年4月19日).

[0229] 9.M.Wang,S.Vijayraghavan,P.S.Goldman-Rakic,Science 303,853(2004年2月6日).

[0230] 10.R.Y.Peng,R.S.Mansbach,D.L.Braff,M.A.Geyer,Neuropsychopharmacology 3,211(1990年6月).

[0231] 11.A.F.Arnsten,J.X.Cai,J.C.Steere,P.S.Goldman-Rakic,J Neurosci 15,3429(1995年5月).

[0232] 12.Y.Wang等,Nat Neurosci 9,534(2006年4月).

[0233] 13.B.P.Bean,Nat Rev Neurosci 8,451(Jim,2007).

[0234] 14.D.C.Javitt,S.R.Zukin,Am J Psychiatry 148,1301(1991年10月).

[0235] 15.R.Y.Wang,X.Liang,Neuropsychopharmacology 19,74(1998年7月).

[0236] 16.G.T.Bolger,M.F.Rafferty,J.N.Crawley,S.M.Paul,P.Skolnick,Pharmacol

Biochem Behav 25,45(1986年7月).

[0237] 17.S.B.Floresco,O.Magyar,S.Ghods-Sharifi,C.Vexelman,M.T.Tse, Neuropsychopharmacology 31,297(2006年2月).

[0238] 18.T.W.Robbins,Schizophr Bull 16,391(1990).

[0239] 19.G.V.Williams,P.S.Goldman-Rakic,Nature 376,572(1995年8月17日).

[0240] 20.D.Durstewitz,J.K.Seamans,T.J.Sejnowski,J Neurophysiol83,1733(2000年3月).

[0241] 21.K.Y.Tseng,P.O'Donnell,Cereb Cortex 15,49(2005年1月).

[0242] 22.G.Winterer,D.R.Weinberger,Trends Neurosci 27,683(2004年11月).

[0243] 23.K.Sidiropoulou等,Nat Neurosci 12,190(2009年2月).

[0244] 24.T.S.Braver,D.M.Batch,J.D.Cohen,Biol Psychiatry 46,312(1999年8月1日).

[0245] 25.W.Schultz,Annu Rev Neurosci 30,259(2007).

[0246] 26.Y.Goto,A.A.Grace,Nat Neurosci 8,805(Jim,2005).

[0247] 27.Y.Wang,P.S.Goldman-Rakic,Proc Natl Acad Sci USA 101,5093(2004年4月6日).

[0248] 28.M.Chahrour,H.Y.Zoghbi,Neuron 56,422(2007年11月8日).

[0249] 29.M.Nyegaard等,Mol Psychiatry 15,119(2010年2月).

[0250] 30.V.Krishnan等,Cell 131,391(2007年10月19日).

[0251] 31.P.Sklar等,Mol Psychiatry 13,558(2008年6月).

[0252] 32.M.F.Green,J Clin Psychiatry 67,e 12(2006年10月).

[0253] 33.I.Splawski等,Cell 119,19(2004年10月1日).

[0254] 34.S.R.Wersinger,Bett,G.C.,Hess,R.A.,Baizer,Rasmusson,R.L.,paper presented at the Society for Neuroscience,2008,Washington,DC,2008.

[0255] 35.C.F.Barrett,R.W.Tsien,Proc Natl Acad Sci USA 105,2157(2008年2月12日).

[0256] 36.K.Yamada等,Psychiatry Clin Neurosci 49,237(1995年8月).

[0257] 37.K.Yamada等,J Clin Psychopharmacol 16,437(1996年12月).

[0258] 38.B.L.Schwartz,M.Fay-McCarthy,K.Kendrick,R.B.Rosse,S.I.Deutsch,Clin Neuropsychopharmacol 20,364(1997年8月).

[0259] 序列

[0260] Chr2的氨基酸序列

[0261]

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLPEDQCYCAGWIESRGTNQAQTASNVLQWLAAGFSILLMFYAYQTWKS
TCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPMSMLYLATGHRVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLV
SDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRQRQVVTGMAWLFVSWGMFPILFI
LGPEFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGA
VP(SEQ ID NO:1)

[0262] SFO的氨基酸序列:

[0263]

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMFYAYQTWKS
TCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRYAEWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLV
SDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCGLGCGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFI
LGPEGFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGA
VP(SEQ ID NO:2)

[0264] SSF0的氨基酸序列:

[0265]

MDYGGALSAVGRFLLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMFYAYQTWKS
TCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRYAEWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLV
SAIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCGLGCGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFI
LGPEGFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGA
VP(SEQ ID NO:3)

[0266] C1V1的氨基酸序列:

[0267]

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPNNGQCFCLA
WLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWEEIYVATIEMIKFIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNK
TVWLRVYAEWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTILFFLISLSYGYMYTYFHA
AKVYIEAFHTVPKGTCRELVRVMAWTFVFAWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWGVLGNYLRV
KTHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVELTVAEEED(SEQ ID NO:4)

[0268] C1V1(E122T)的氨基酸序列:

[0269]

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPNNGQCFCLA
WLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWETIYVATIEMIKFIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNK
TVWLRVYAEWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTILFFLISLSYGYMYTYFHA
AKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVFAWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWGVLGNYLRV
KIHEHILLYGDIRKKQKITTAGQEMEVELTVAEEED(SEQ ID NO:5)

[0270] C1V1(E162T)的氨基酸序列:

[0271]

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPNNGQCFCLA
WLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWETIYVATIEMIKFIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNK
TVWLRVYATWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTILFFLISLSYGYMYTYFHA
AKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVFAWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWGVLGNYLRV
KIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVELTVAEEED(SEQ ID NO:6)

[0272] C1V1(E122T/E162T)的氨基酸序列:

[0273]

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPNNGQCFCLA
WLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWETIYVATIEMIKFIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNK
TVWLRVYATWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTILFFLISLSYGYMYTYFHA
AKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVFAWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWGVLGNYLRV

KIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVELVAEEED(SEQ ID NO:7)

序列表

<110> Deisseroth, Karl
Sohal, Vikaas
Gunaydin, Lisa

<120> 精神病状态的控制和表征

<130> STAN-902W0

<140> US2011/059383

<141> 2011-11-04

<150> 61/410,720

<151> 2010-11-05

<150> 61/410,725

<151> 2010-11-05

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows 4.0版

<210> 1

<211> 310

<212> PRT

<213> 莱茵衣藻

<400> 1

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
1 5 10 15
Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
20 25 30
Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
35 40 45
Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
50 55 60
Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
65 70 75 80
Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
85 90 95
Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
100 105 110
Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys
115 120 125
Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
130 135 140
Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile
145 150 155 160
Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
165 170 175
Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
180 185 190
Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
195 200 205
Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
210 215 220
Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
225 230 235 240
Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
245 250 255
Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
260 265 270
Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
275 280 285
Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
290 295 300
Glu Ala Gly Ala Val Pro
305 310

<210> 2

<211> 310

<212> PRT

[0001]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
 20 25 30
 Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
 35 40 45
 Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
 50 55 60
 Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
 65 70 75 80
 Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
 85 90 95
 Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
 100 105 110
 Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Ser
 115 120 125
 Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
 130 135 140
 Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile
 145 150 155 160
 Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
 165 170 175
 Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
 180 185 190
 Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
 195 200 205
 Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
 210 215 220
 Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
 245 250 255
 Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
 260 265 270
 Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 275 280 285
 Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
 290 295 300
 Glu Ala Gly Ala Val Pro
 305 310

[0002]

<210> 3

<211> 310

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 3

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
 20 25 30
 Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
 35 40 45
 Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
 50 55 60
 Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
 65 70 75 80
 Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
 85 90 95
 Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
 100 105 110
 Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Ser
 115 120 125
 Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
 130 135 140
 Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Ala Ile Gly Thr Ile

```

145          150          155          160
Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
165          170          175
Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
180          185          190
Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
195          200          205
Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
210          215          220
Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
225          230          235
Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
245          250          255
Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
260          265          270
Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
275          280          285
Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
290          295          300
Glu Ala Gly Ala Val Pro
305          310

```

<210> 4
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

[0003]

<400> 4

```

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1      5      10      15
Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20     25     30
Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35     40     45
Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
50     55     60
Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
65     70     75     80
Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
85     90     95
Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
100    105    110
Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr Val Ala Thr Ile
115    120    125
Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
130    135    140
Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
145    150    155    160
Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
165    170    175
Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
180    185    190
Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
195    200    205
Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
210    215    220
Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
225    230    235    240
Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
245    250    255
Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
260    265    270
Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
275    280    285
Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
290    295    300
Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
305    310    315    320
Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
325    330    335
Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
340

```

<210> 5
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 5
 Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
 20 25 30
 Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
 35 40 45
 Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
 50 55 60
 Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
 85 90 95
 Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
 100 105 110
 Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Thr Ile Tyr Val Ala Thr Ile
 115 120 125
 Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
 130 135 140
 Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
 145 150 155 160
 Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Ile His Leu Ser Asn
 165 170 175
 Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
 180 185 190
 Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
 195 200 205
 Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
 210 215 220
 Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
 245 250 255
 Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
 260 265 270
 Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
 275 280 285
 Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
 290 295 300
 Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
 305 310 315 320
 Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
 325 330 335
 Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
 340

[0004]

<210> 6
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 6
 Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
 20 25 30
 Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
 35 40 45
 Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
 50 55 60
 Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
 65 70 75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
 85 90 95
 Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
 100 105 110
 Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr Val Ala Thr Ile
 115 120 125
 Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
 130 135 140
 Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
 145 150 155 160
 Ala Thr Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
 165 170 175
 Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
 180 185 190
 Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
 195 200 205
 Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
 210 215 220
 Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
 245 250 255
 Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
 260 265 270
 Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
 275 280 285
 Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
 290 295 300
 Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
 305 310 315 320
 Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
 325 330 335
 Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
 340

[0005]

<210> 7
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 7
 Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
 20 25 30
 Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
 35 40 45
 Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Gly Ser Val
 50 55 60
 Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
 85 90 95
 Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
 100 105 110
 Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Thr Ile Tyr Val Ala Thr Ile
 115 120 125
 Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
 130 135 140
 Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
 145 150 155 160
 Ala Thr Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
 165 170 175
 Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
 180 185 190
 Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
 195 200 205
 Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
 210 215 220
 Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp

```

                245                250                255
Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
                260                265                270
Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
                275                280                285
Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
                290                295                300
Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
305                310                315                320
Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
                325                330                335
Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
                340

```

[0006]

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

```

Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile Pro Leu Asp Gln Ile
 1          5          10          15
Asp Ile Asn Val
                20

```

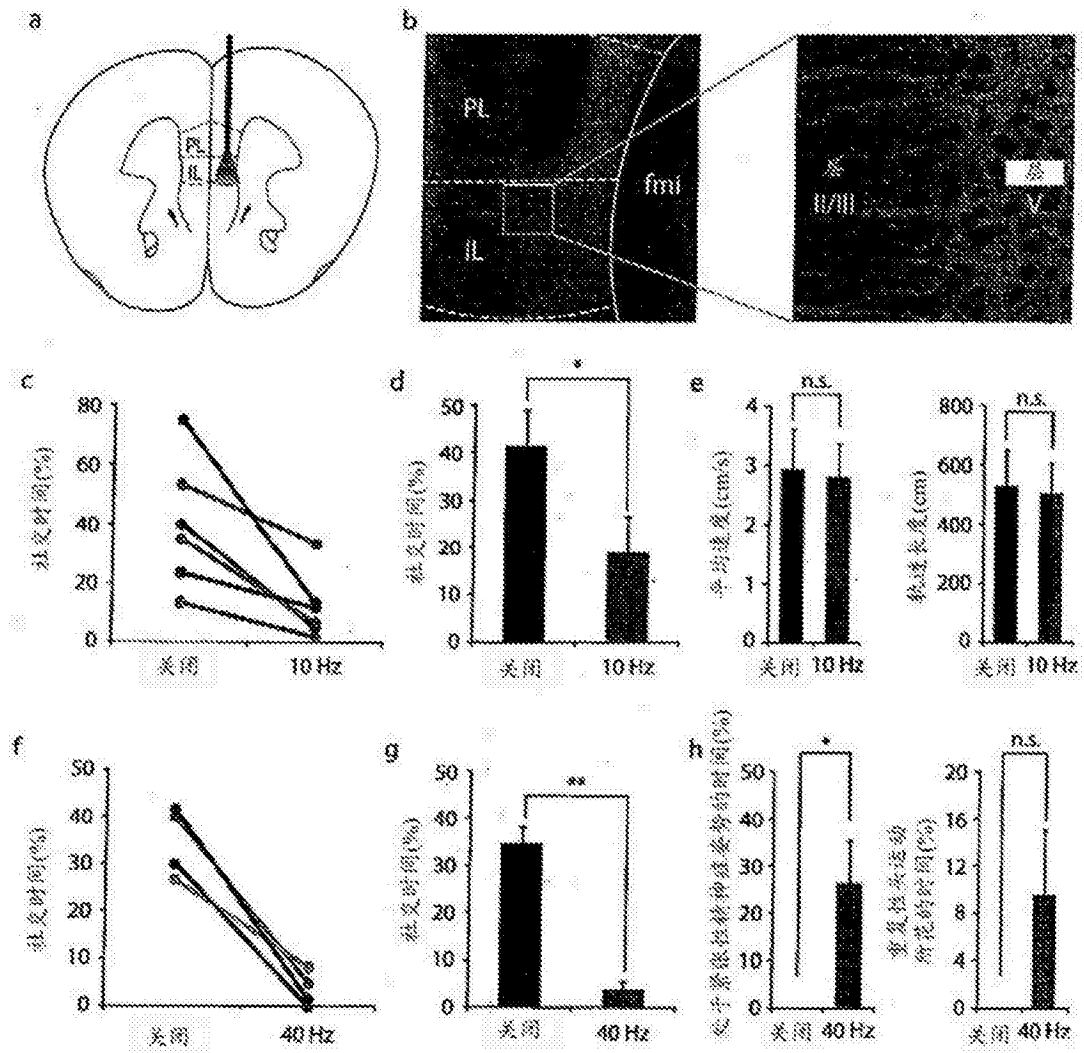


图1

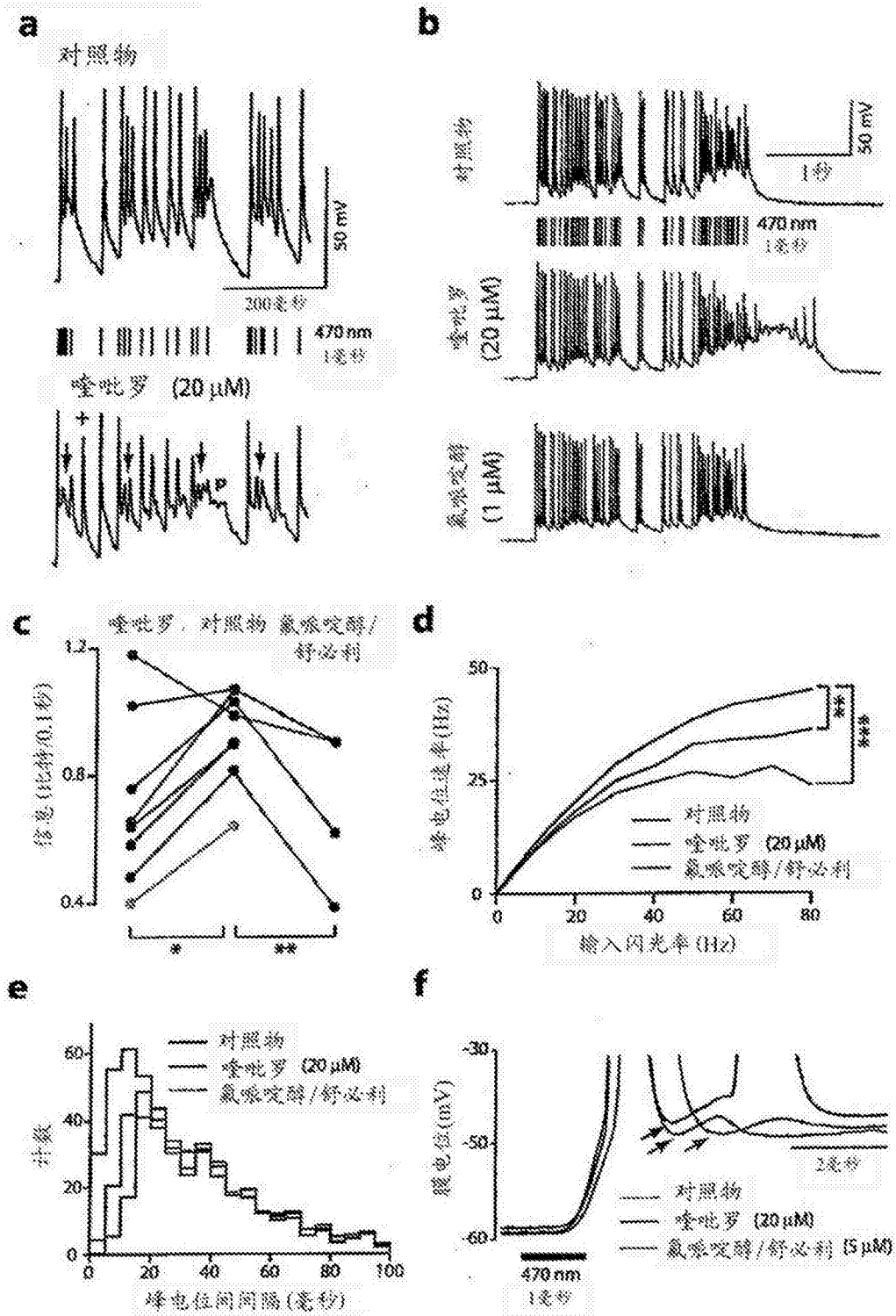


图2

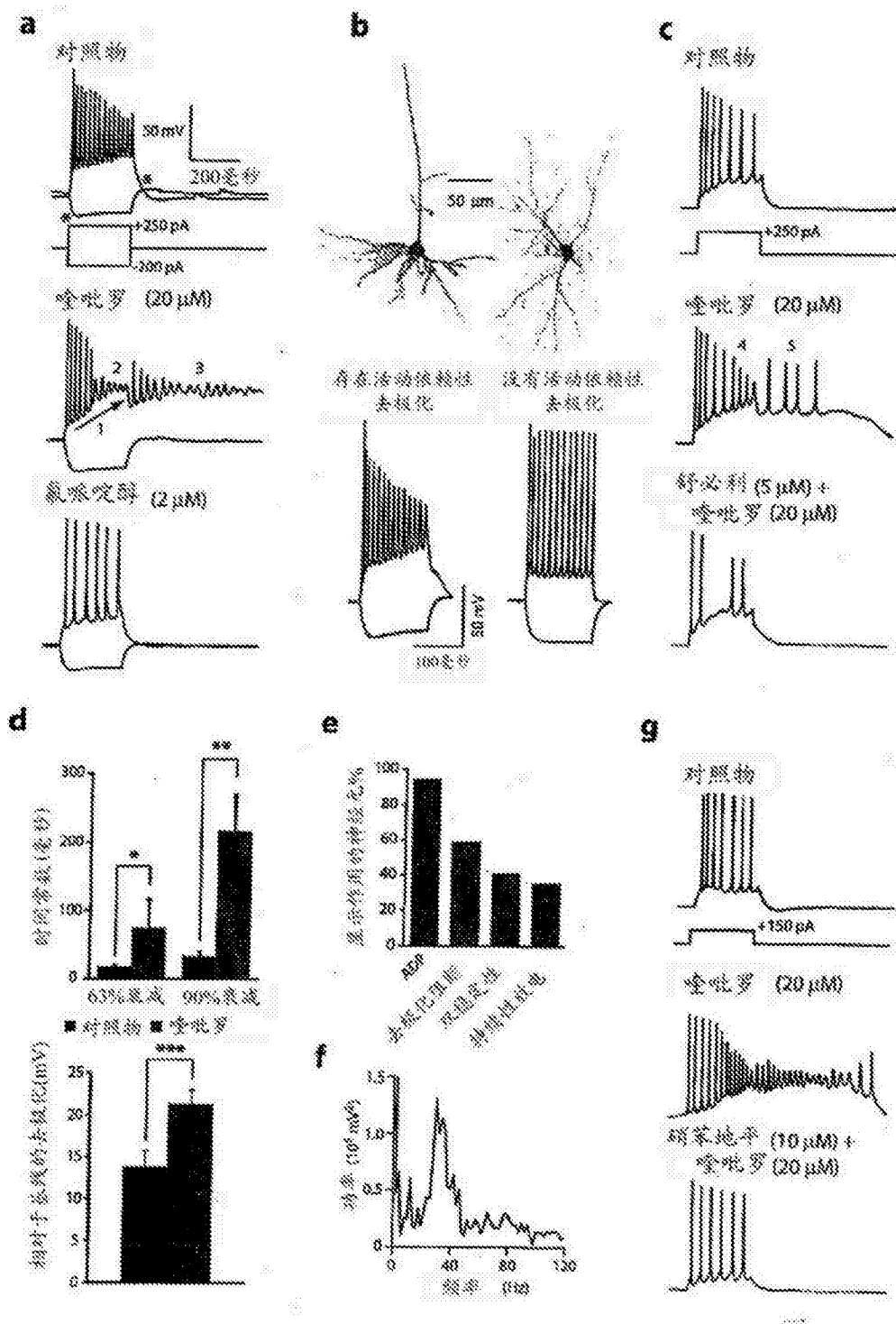


图3

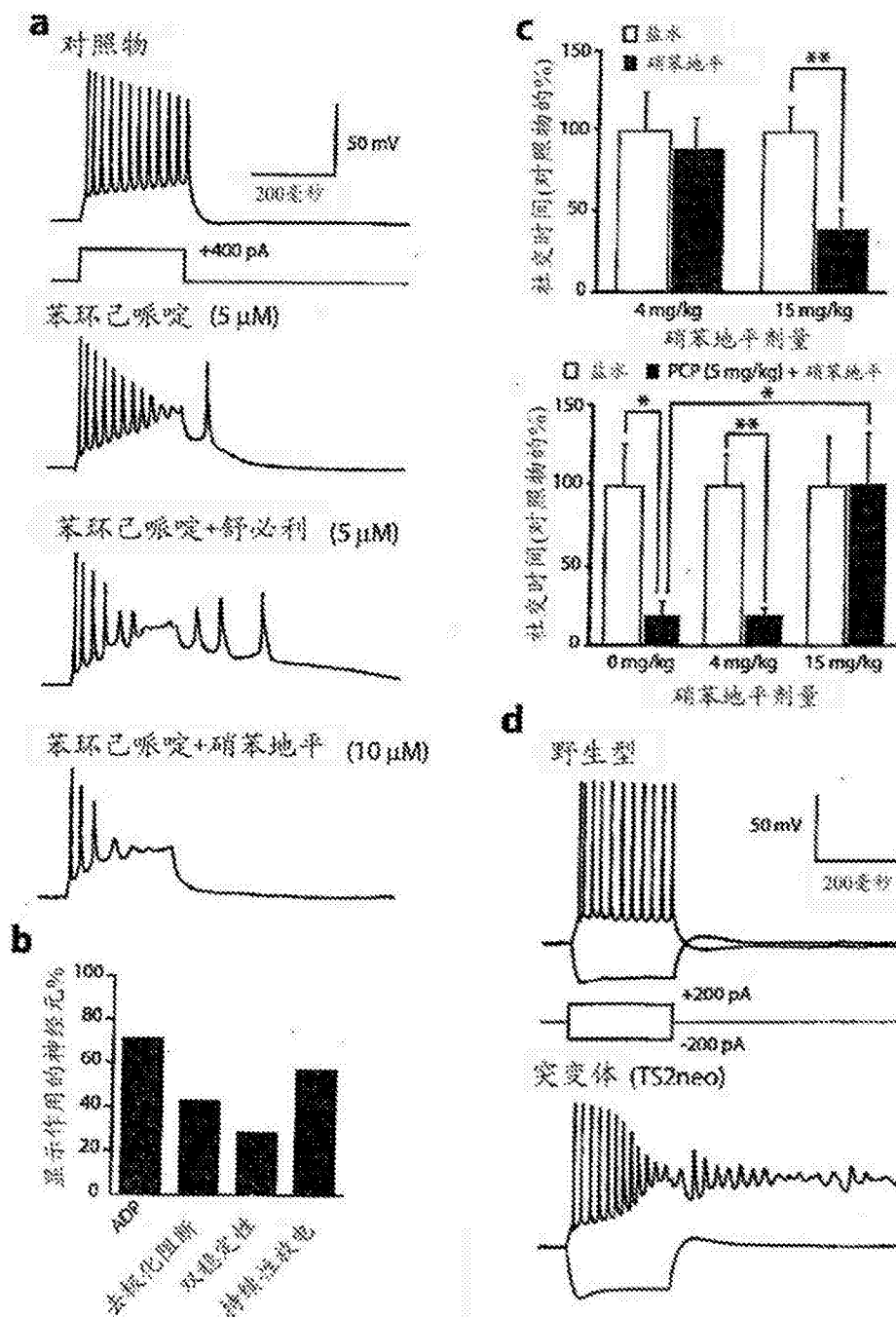


图4

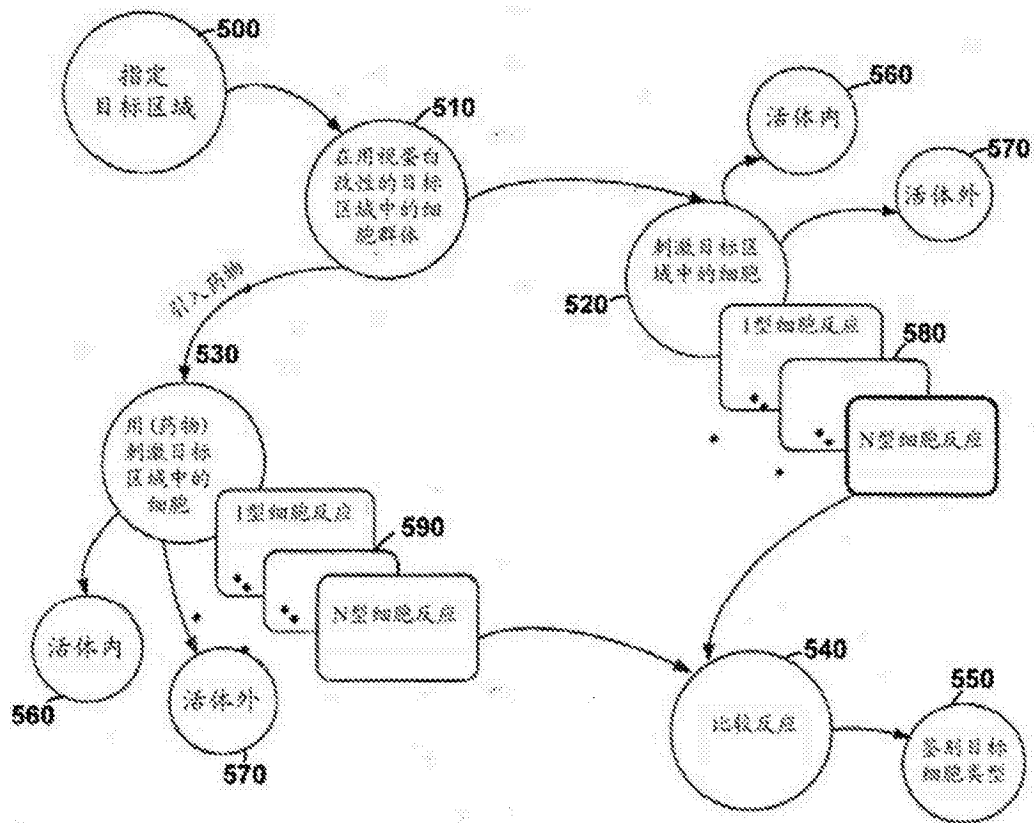


图5

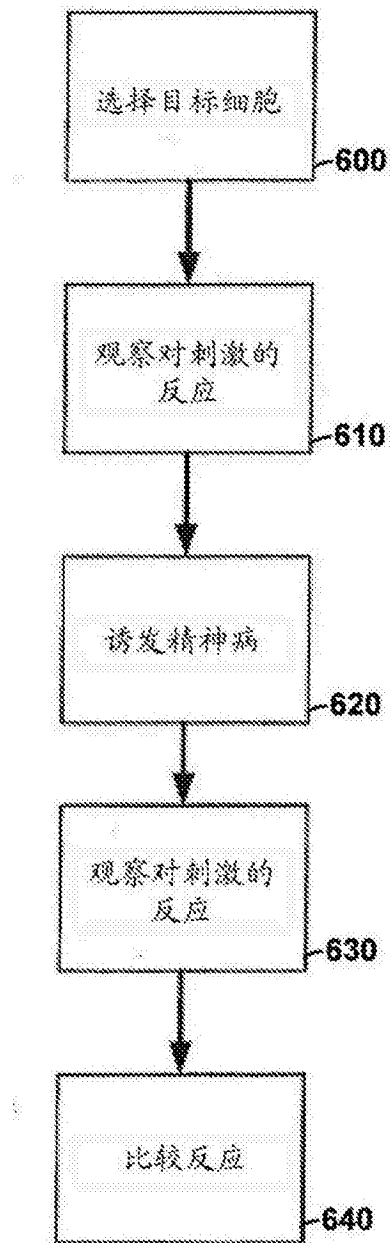


图6

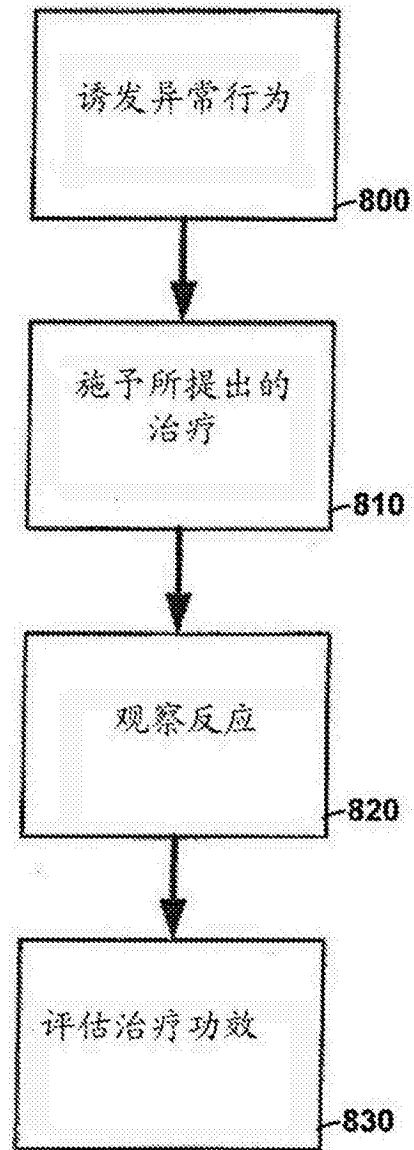


图8