



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112930200 A

(43) 申请公布日 2021.06.08

(21) 申请号 201980069414.0

(22) 申请日 2019.10.24

(30) 优先权数据

18202538.7 2018.10.25 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/059092 2019.10.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/084541 EN 2020.04.30

(71) 申请人 弗里德里克·米谢尔生物医学研究
所

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J·于特纳 J·科洛尔

B·罗斯卡

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 张莉 黄革生

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

用于视网膜神经节细胞中特异表达基因的
启动子SynP151 (ProC29)

(57) 摘要

本发明提供了一种分离的核酸分子及其用途,所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:1的核酸序列或与SEQ ID NO:1的所述序列具有至少80%同一性的至少550bp的核酸序列,或者由前述序列组成,其中当与编码基因的核酸序列可操作地连接时,所述分离的核酸分子特异性地导致所述基因在视网膜神经节细胞中的表达。

1. 一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:1的核酸序列或由其组成,或者由与SEQ ID NO:1的所述序列具有至少80%同一性的至少550bp的核酸序列组成,其中当编码外源基因的核酸序列与所述分离的核酸分子可操作地连接时,所述分离的核酸分子导致所述外源基因在视网膜神经节细胞中的特异性表达。

2. 根据权利要求1所述的分离的核酸分子,所述分离的核酸分子进一步包含最小启动子,例如SEQ ID NO:2的最小启动子。

3. 一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含在严格条件下与根据权利要求1或2所述的分离的核酸分子杂交的序列。

4. 一种表达盒,所述表达盒包含作为促进特定细胞中的基因表达的元件的根据权利要求1或2所述的分离的核酸,其中,所述分离的核酸与至少一种编码有待在视网膜神经节细胞中特异性表达的基因的核酸序列可操作地连接。

5. 一种载体,所述载体包含根据权利要求4所述的表达盒。

6. 根据权利要求5所述的载体,其中,所述载体是病毒载体。

7. 根据权利要求1或2所述的核酸、根据权利要求4所述的表达盒或根据权利要求5所述的载体用于在视网膜神经节细胞中使基因表达的用途。

8. 一种在视网膜神经节细胞中表达基因的方法,所述方法包括用根据权利要求4所述的表达盒转染分离的细胞、细胞系或细胞群的步骤,其中,如果所述细胞是视网膜神经节细胞或者所述细胞包含视网膜神经节细胞,则待表达的基因将通过所述分离的细胞、细胞系或细胞群特异性表达。

9. 一种分离的细胞,所述分离的细胞包含根据权利要求4所述的表达盒或根据权利要求5所述的载体。

10. 根据权利要求9所述的细胞,其中,所述表达盒或载体稳定地整合到所述细胞的基因组中。

11. 根据权利要求1或2所述的分离的核酸分子、根据权利要求4所述的表达盒、根据权利要求5所述的载体、根据权利要求7所述的用途、根据权利要求8所述的方法或根据权利要求9所述的细胞,其中,所述基因的产物是光敏分子,例如盐细菌视紫红质或视紫红质通道蛋白。

12. 一种用于在视网膜神经节细胞中表达基因的试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1或2所述的分离的核酸分子。

13. 一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:1的核酸序列、或由其组成。

14. 根据权利要求13所述的核酸分子,所述分离的核酸分子进一步包含最小启动子,例如SEQ ID NO:2的最小启动子。

15. 一种表达盒,所述表达盒包含根据权利要求1或2所述的分离的核酸,其中所述分离的核酸与至少一种编码基因的核酸序列可操作地连接。

16. 一种病毒载体,所述病毒载体包含根据权利要求15所述的表达盒。

17. 根据权利要求16所述的病毒载体,所述病毒载体是AAV病毒载体。

18. 根据权利要求1、2、3、13或14所述的核酸分子、或根据权利要求4或15所述的表达盒、或根据权利要求5、6、16或17所述的载体,用于在治疗以下疾病的方法中使用:致盲性疾

病,例如眼底黄色斑点症、年龄相关性黄斑变性、莱伯先天性黑朦、视网膜色素变性、莱伯遗传性视神经病变、显性视神经萎缩或青光眼。

用于视网膜神经节细胞中特异表达基因的启动子SynP151 (ProC29)

技术领域

[0001] 本发明涉及一种核酸序列及相关用途,该核酸序列使得基因在视网膜神经节细胞的细胞中特异性表达。

背景技术

[0002] 出于表达目的,通常将重组基因在活性表达盒的背景下作为cDNA构建体转染到靶细胞、细胞群或组织中,以允许异源基因转录。DNA构建体在涉及顺式调控元件上的许多反式作用转录因子(TF)的活性的过程中被细胞转录机器识别,这些顺式调控元件包括增强子、沉默子、绝缘子和启动子(本文统称为“启动子”)。

[0003] 基因启动子参与所有这些层面的调控,通过整合DNA序列、转录因子结合特征和表观遗传特征的影响,充当基因转录中的决定因素。它们决定例如由质粒载体编码的转基因表达的强度,以及将在其中表达所述转基因的一种或多种细胞类型。

[0004] 用于驱动哺乳动物细胞中的异源基因表达的最常见启动子是人和小鼠巨细胞病毒(CMV)主要立即早期启动子。它们赋予强烈的表达,并且已在若干细胞类型中证明了稳健性。其他病毒启动子如SV40立即早期启动子和劳氏肉瘤病毒(RSV)长末端重复序列(LTR)启动子也经常用在表达盒中。

[0005] 也可以使用细胞启动子代替病毒启动子。已知的启动子有来自管家基因的那些启动子,这些管家基因编码大量转录的细胞转录物,如 β -肌动蛋白、延伸因子1- α (EF-1 α)或泛素。与病毒启动子相比,真核基因表达更复杂并且需要许多不同因子的精确协调。

[0006] 关于内源性调控元件用于转基因表达的用途的一个方面是产生稳定的mRNA,并且该表达可以在宿主细胞的天然环境中进行,其中相应地提供反式作用转录因子。由于真核基因的表达受顺式和反式作用调控元件的复杂机制控制,因此大多数细胞启动子未得到广泛的功能表征。部分真核启动子通常紧邻其转录序列的上游,并且充当转录起始点。核心启动子直接围绕转录起始位点(TSS),该位点足以被转录机器识别。近端启动子包含核心启动子上游的区域,并且含有TSS和转录调控所需的其他序列特征。转录因子通过与启动子和增强子序列中的调控基序结合而序列特异性地起作用,从而激活染色质和组蛋白修饰酶,这些酶改变核小体结构及其位置,最终允许转录起始。功能性启动子的鉴定主要取决于相关上游或下游增强子元件的存在。

[0007] 关于内源性调控元件用于转基因表达的用途的另一关键方面是一些启动子可以按细胞特异性方式起作用并且将使得转基因在特定类型的细胞上/中表达,或取决于启动子,在特定亚群的细胞中表达。

[0008] 因此,本发明的一个目的是获得适于在哺乳动物细胞中以高表达水平且以细胞类型特异性方式表达重组基因的新序列。

[0009] 此类序列解决本领域对视网膜细胞特异性启动子的需要,以开发用于研究神经退行性疾病、视力恢复、药物发现、肿瘤治疗和疾病诊断的系统。

发明内容

[0010] 人们可以将视网膜分为视网膜色素上皮 (RPE) 和神经感觉视网膜两部分。RPE 积极参与维持神经感觉视网膜功能。神经感觉视网膜被组织为神经网络, 包括光感受器和视网膜神经节细胞 (RGC, 或视网膜神经节)。光感受器将导向 RGC 的光信息转换为电信息, 后者负责将视觉信息从视网膜传输到视觉皮层。在这些不同的细胞类型之间, 我们还可以发现具有调节功能的细胞, 例如诱导负反馈的水平细胞, 这些细胞允许视网膜响应适应各种光强度条件并且增加对比度信息。

[0011] 本发明的诸位发明人已结合表观遗传学、生物信息学和神经科学来寻找当处于眼睛中时, 仅驱动在视网膜神经节细胞中的基因表达的启动子。

[0012] 本发明的序列的核酸序列为:

```
CTTACCGATTGCAGACGAAACCGAAACTTAGCTGACATCGAGTCGAAACCGAAACTTTTC
ATGGCCGAAGGCGAAACCGAAACTTGCGTCCGTGTAACGCGAAACCGAAACTTCCCGA
GCATCCTTACGAAACCGAAACTGCAACCGGCTACACTCGAAACCGAAACTACTAATGATA
CCAACCGAAACCGAAACTCGGTAAGTGAAACTGCGAAACCGAAACTTGGTGGACAGCCT
TCCGAAACCGAAACTGGACGATGTTCTGTTCCGAAACCGAAACTATATTCGTGCCCAAGC
GAAACCGAAACTAGGGGGCCGATATCCCGAAACCGAAACTACAGGCCCCGCCCGTTCGA
AACCGAAACTTACGTCTCAGGAAGTCGAAACCGAAACTGGCTACCACTGACCACGAAAC
CGAAACTTCTACTGTTCCGTGACGAAACCGAAACTGACGGACAAGAGTACCGAAACCGA
AACTTAGTCAGGCGTCCATCGAAACCGAAACTCAAAGATTCAAAAACGAAACCGAAACT
TTCTGTTGGGATGTCCGAAACCGAAACTGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGT
CAGCAACCATAGTCCC GCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCC
GCCATTCTCCGCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCC
TCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTG
CAAA (SEQ ID NO:1)。
```

[0013] 因此, 本发明提供了一种分离的核酸分子, 其包含 SEQ ID NO:1 的核酸序列或与 SEQ ID NO:1 的所述核酸序列具有至少 80% 同一性的至少 550bp 的核酸序列或由其组成。

[0014] 在一个方面, 因此, 本发明提供了一种分离的核酸分子, 该核酸分子包含 SEQ ID NO:1 的核酸序列或与 SEQ ID NO:1 的所述核酸序列具有至少 70% 同一性的至少 550bp 的核酸序列, 或者由前述序列组成, 其中所述分离的核酸分子当与编码基因的核酸序列可操作地连接时使得所述基因在视网膜神经节细胞 (例如人视网膜神经节细胞或非人灵长类 (NHP) 视网膜神经节细胞) 中特异性表达。在一些实施例中, 该核酸序列为至少 550bp, 与 SEQ ID NO:1 的所述核酸序列具有至少 80% 同一性。在一些实施例中, 该核酸序列为至少 550bp, 并且与 SEQ ID NO:1 的所述核酸序列具有至少 85% 同一性。在一些实施例中, 该核酸序列为至少 550bp, 并且与 SEQ ID NO:1 的所述核酸序列具有至少 90% 同一性。在一些实施例中, 该核酸序列为至少 550bp, 并且与 SEQ ID NO:1 的所述核酸序列具有至少 95% 同一性。在一些实施例中, 该核酸序列为至少 550bp, 并且与 SEQ ID NO:1 的所述核酸序列具有至少 96% 同一性。在一些实施例中, 该核酸序列为至少 1000bp, 并且与 SEQ ID NO:1 的所述核酸序列具有至少 97% 同一性。在一些实施例中, 该核酸序列为至少 550bp, 并且与 SEQ ID NO:1 的所述核酸序列具有至少 98% 同一性。在一些实施例中, 该核酸序列为至少 550bp, 并且与 SEQ ID NO:1 的所述核酸序列具有至少 99% 同一性。在一些实施例中, 该核酸序列为至少 550bp, 并

且与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有100%同一性。所述同一性是分子在一个或多个重叠区段上的序列的同一性。具有上文所述同一性的本发明的核酸分子可以具有至少550bp、至少600bp、至少650bp、至少700bp、至少740bp、至少755bp、至少774bp的长度。

[0015] 本发明的分离的核酸分子可另外包含最小启动子,例如SV40最小启动子,例如SV40最小启动子或实例中使用的例如,

ATCCTCACATGGTCCTGCTGGAGTTAGTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAG
CTATCACATCCACTGTGTTGTTGTGAACTGGAATCCACTATAGGCCA (SEQ ID NO:2) 的启动子。

[0016] 还提供了一种分离的核酸分子,该核酸分子包含在严格条件下与如上所述的本发明的分离的核酸分子杂交的序列。

[0017] 本发明还提供了包含如上所述的本发明的分离的核酸的表达盒,其中所述启动子与至少一种编码有待在视网膜神经节细胞中特异性表达的基因的核酸序列可操作地连接。在特定方面,表达盒适合在人视网膜神经节细胞中特异性表达。在特定方面,表达盒适合在NHP视网膜神经节细胞或小鼠视网膜神经节细胞中特异性表达。

[0018] 本发明进一步提供了构成本发明的表达盒的载体。在一些实施例中,所述载体是病毒载体,例如AAV载体。

[0019] 本发明还涵盖本发明的核酸、本发明的表达盒或本发明的载体用于使基因在视网膜神经节细胞(例如小鼠视网膜神经节细胞、NHP视网膜神经节细胞、或人视网膜神经节细胞)中表达的用途。

[0020] 本发明进一步提供了一种使基因在视网膜神经节细胞中表达的方法,该方法包括用本发明的表达盒转染分离的细胞、细胞系或细胞群(例如组织)的步骤,其中如果所述细胞是视网膜神经节细胞或者所述细胞包含视网膜神经节细胞,则待表达的基因将通过该分离的细胞、细胞系或细胞群表达。在一些实施例中,该分离的细胞、细胞系或细胞群或组织是人类的。在一些实施例中,该分离的细胞、细胞系或细胞群或组织是非人灵长类(例如食蟹猴)。

[0021] 本发明还提供了一种分离的细胞,该细胞包含本发明的表达盒。在一些实施例中,该表达盒或载体稳定地整合到所述细胞的基因组中。

[0022] 在特定方面,本发明提供了用于治疗眼科疾病的方法,所述眼科疾病例如是致盲性疾病,例如眼底黄色斑点症、年龄相关性黄斑变性、莱伯先天性黑朦、视网膜色素变性、莱伯遗传性视神经病变、显性视神经萎缩或青光眼,通过向有需要的患者施用(i)包含合成启动子(例如SEQ ID NO:1)的核酸分子,或(ii)包含可操作地连接至编码外源基因的核酸序列的合成启动子的表达盒,或(iii)包含此类核酸分子或表达盒的病毒载体。

[0023] 可以与本发明的启动子可操作地连接的典型基因的非限制性实例是编码盐细菌视紫红质或视紫红质通道蛋白的基因。还可以使用治疗基因,即编码可用于治疗病理病症的治疗性蛋白的基因,例如与眼科疾病相关联的基因。治疗基因的实例包括但不限于用于替换已知引起视网膜疾病的缺失或突变基因的核酸,例如MT-ND4(基因ID:4538)、MT-ND1(基因ID:4535)、MT-ND6(基因ID:4541)、MT-CYB(基因ID:4519)、MT-CO3(基因ID:4514)、MT-ND5(基因ID:4540)、MT-ND2(基因ID:4536)、5MT-COI(基因ID:4512)、MT-ATP6(基因ID:4508)、MT-ND4L(基因ID:4539)、OPA1(基因ID:4976)、OPA3(基因ID:80207)、OPA7(基因ID:

84233)、和AC02(基因ID:50)。治疗基因也可以编码神经营养因子,例如GDNF(基因ID:2668)、CNTF(基因ID:1270)、FGF2(基因ID:2247)、BDNF(基因ID:627)和EPO(基因ID:2056),抗凋亡基因例如BCL2(基因ID:596)和BCL2L1(基因ID:598),抗血管生成因子例如内皮抑素、血管抑素(angiostatin)和sFlt,抗炎因子例如IL10(基因ID:3586)、IL1R1(基因ID:3554)、TGFB1(基因ID:7045)和IL4(基因ID:3565),或杆细胞来源视锥细胞活性因子(RdCVF)(基因ID:115861)。

[0024] 另外,本发明还提供了用于使基因在视网膜神经节细胞中表达的试剂盒,该试剂盒包含本发明的分离的核酸分子。

附图说明

[0025] 图1:在施用AAVBP2-ProC29-Catch-GFP至人器官型视网膜培养物之后3个月时,来自具有SEQ ID NO:1的启动子的EGFP表达的激光扫描共聚焦显微镜图像。可以观察到在视网膜神经节细胞中的诱导表达。A:GFP或CatCh-GFP(在灰度图像上为绿色或灰色);B:具有标记的免疫染色(在灰度图像上为品红色或浅灰色);C:GFP或CatCh-GFP和标记;D:GFP或CatCh-GFP以及标记和核染色(灰度图像上的Hoechst,更亮、更白的斑点)。E:AAV感染的视网膜的共聚焦图像(顶视图)、GFP、或CatCh-GFP(黑色)。F:GFP+或CatCh-GFP+细胞密度定量化为靶细胞类型或细胞类别密度的百分比;值是平均值 \pm s.e.m(从n=10个共聚焦图像)。G:AAV靶向特异性的定量显示为表达转基因的细胞中主要(黑色)和次要(灰色)细胞类型的百分比。

具体实施方式

[0026] 本文引用的任何参考文献,包括例如所有专利,公开的专利申请和非专利出版物,均通过引用全文并入本文。

[0027] 人们可以将视网膜分为视网膜色素上皮(RPE)和神经感觉视网膜两部分。RPE积极参与维持神经感觉视网膜功能。神经感觉视网膜被组织为神经网络,包括光感受器和视网膜神经节细胞(RGC,或视网膜神经节)。光感受器将导向RGC的光信息转换为电信息,后者负责将视觉信息从视网膜传输到视觉皮层。在这些不同的细胞类型之间,我们还可以发现具有调节功能的细胞,例如诱导负反馈的水平细胞,这些细胞允许视网膜响应适应各种光强度条件并且增加对比度信息。

[0028] 本发明的诸位发明人已结合表观遗传学、生物信息学和神经科学来寻找当处于眼睛中时,仅驱动在具体眼细胞,例如视网膜神经节细胞中的基因表达的启动子。在小鼠视网膜、NHP视网膜和/或人视网膜中,用体内细胞类型靶向策略对这些启动子的活性进行了实验测试和验证。

[0029] 本发明的序列的核酸序列为:

CTTACCGATTGCAGACGAAACCGAAACTTAGCTGACATCGAGTCGAAACCGAAACTTTTC
 ATGGCCGAAGGCGAAACCGAAACTTTCGTCCGTGTAACGCGAAACCGAAACTTCCCGA
 GCATCCTTACGAAACCGAAACTGCAACCGGCTACACTCGAAACCGAAACTACTAATGATA
 CCAACCGAAACCGAAACTCGGTAAGTGAAACTGCGAAACCGAAACTTGGTGGACAGCCT
 TCCGAAACCGAAACTGGACGATGTTTCGTTCCGAAACCGAAACTATATTCGTGCCCAAGC
 GAAACCGAAACTAGGGGGCCGATATCCCGAAACCGAAACTACAGGCCCCGCCCCGTCGA
 AACCGAAACTTACGTCTCAGGAAGTCGAAACCGAAACTGGCTACCACTGACCACGAAAC
 CGAAACTTCTACTGTTCCGTGACGAAACCGAAACTGACGGACAAGAGTACCGAAACCGA
 AACTTAGTCAGGCGTCCATCGAAACCGAAACTCAAAGATTCAAAAAACGAAACCGAAACT
 TTCTGTTGGGATGTCCGAAACCGAAACTGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGT
 CAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCC
 GCCCATTCTCCGCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCC
 TCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTG
 CAAA (SEQ ID NO:1)。

[0030] 因此,本发明提供了一种分离的核酸分子,该核酸分子包含SEQ ID NO:1的核酸序列或与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有至少70%同一性的至少550bp的核酸序列,或者由前述序列组成,其中所述分离的核酸分子特异性地导致在与编码所述基因的所述核酸序列可操作地连接的基因的视网膜神经节细胞中的表达。在一些实施例中,该核酸序列为至少550bp,与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有至少80%同一性。在一些实施例中,该核酸序列为至少550bp,并且与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有至少85%同一性。在一些实施例中,该核酸序列为至少550bp,并且与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有至少90%同一性。在一些实施例中,该核酸序列为至少550bp,并且与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有至少95%同一性。在一些实施例中,该核酸序列为至少550bp,并且与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有至少96%同一性。在一些实施例中,该核酸序列为至少550bp,并且与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有至少97%同一性。在一些实施例中,该核酸序列为至少550bp,并且与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有至少98%同一性。在一些实施例中,该核酸序列为至少550bp,并且与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有至少99%同一性。在一些实施例中,该核酸序列为至少550bp,并且与SEQ ID NO:1的所述核酸序列具有100%同一性。所述同一性是分子在一个或多个重叠区段上的序列的同一性。具有上文所述同一性的本发明的核酸分子可以具有至少550bp、至少600bp、至少650bp、至少700bp、至少740bp、至少755bp、至少774bp的长度。

[0031] 在一个具体方面,本发明提供了分离的核酸分子,其包含SEQ ID NO:1的核酸序列或由前述序列组成。在具体实施例中,启动子进一步包含最小的TATA盒启动子元件。

[0032] 本发明的分离的核酸分子可另外包含最小启动子,例如SV40最小启动子,例如SV40最小启动子或实例中使用的例如,

ATCCTCACATGGTCTGCTGGAGTTAGTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAG
 CTATCACATCCACTGTGTTGTTGTGAACTGGAATCCACTATAGGCCA (SEQ ID NO:2)

的启动子。

[0033] 还提供了一种分离的核酸分子,该核酸分子包含在严格条件下与如上所述的本发明的分离的核酸分子杂交的序列。

[0034] 本发明还提供了包含如上所述的本发明的分离的核酸的表达盒,其中所述启动子与至少一种编码有待在视网膜神经节细胞(例如小鼠视网膜神经节细胞或NHP视网膜神经节细胞或人视网膜神经节细胞)中特异性表达的基因的核酸序列可操作地连接。

[0035] 本发明进一步提供了构成本发明的表达盒的载体。在一些实施例中,所述载体是病毒载体,例如腺相关病毒(AAV)载体或逆转录病毒载体。AAV具有不同的血清型,例如血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10和11。AAV也可以是杂合血清型,例如AAV2/8或AAV2/8BP2。在某些实施例中,AAV是自我互补的腺相关病毒(scAAV)。

[0036] 本发明还涵盖本发明的核酸、本发明的表达盒或本发明的载体用于使基因在视网膜神经节细胞中表达的用途。

[0037] 本发明进一步提供了一种使基因在视网膜神经节细胞中表达的方法,该方法包括用本发明的表达盒转染分离的细胞、细胞系或细胞群(例如组织)的步骤,其中如果所述细胞是视网膜神经节细胞或者所述细胞包含视网膜神经节细胞,则待表达的基因将通过该分离的细胞、细胞系或细胞群表达。在一些实施例中,该分离的细胞、细胞系或细胞群或组织是人类的。在一些实施例中,该分离的细胞、细胞系或细胞群或组织是非人灵长类的。在一些实施例中,该分离的细胞、细胞系或细胞群或组织是小鼠的。

[0038] 本发明还提供了一种分离的细胞,该细胞包含本发明的表达盒。在一些实施例中,该表达盒或载体稳定地整合到所述细胞的基因组中。

[0039] 在特定方面,本发明提供了用于治疗眼科疾病的方法,所述眼科疾病例如是致盲性疾病,例如眼底黄色斑点症、年龄相关性黄斑变性、莱伯先天性黑朦、视网膜色素变性、莱伯遗传性视神经病变、显性视神经萎缩或青光眼,通过向有需要的患者施用(i)包含合成启动子(例如SEQ ID NO:1)的核酸分子,或(ii)包含可操作地连接至编码外源基因的核酸序列的合成启动子的表达盒,或(iii)包含此类核酸分子或表达盒的病毒载体。

[0040] 可以与本发明的启动子可操作地连接的典型基因的非限制性实例是编码盐细菌视紫红质或视紫红质通道蛋白的基因。还可以使用治疗基因,即编码可用于治疗病理病症的治疗性蛋白的基因。治疗基因的实例包括但不限于用于替换已知引起视网膜疾病的缺失或突变基因的核酸,例如MT-ND4(基因ID:4538)、MT-ND1(基因ID:4535)、MT-ND6(基因ID:4541)、MT-CYB(基因ID:4519)、MT-CO3(基因ID:4514)、MT-ND5(基因ID:4540)、MT-ND2(基因ID:4536)、5MT-CO1(基因ID:4512)、MT-ATP6(基因ID:4508)、MT-ND4L(基因ID:4539)、OPA1(基因ID:4976)、OPA3(基因ID:80207)、OPA7(基因ID:84233)、和ACO2(基因ID:50)。治疗基因也可以编码神经营养因子,例如GDNF(基因ID:2668)、CNTF(基因ID:1270)、FGF2(基因ID:2247)、BDNF(基因ID:627)和EPO(基因ID:2056),抗凋亡基因例如BCL2(基因ID:596)和BCL2L1(基因ID:598),抗血管生成因子例如内皮抑素、血管抑素(angiotatin)和sFlt,抗炎因子例如IL10(基因ID:3586)、IL1R1(基因ID:3554)、TGFB1(基因ID:7045)和IL4(基因ID:3565),或杆细胞来源视锥细胞活性因子(RdCVF)(基因ID:115861)。

[0041] 另外,本发明还提供了用于使基因在视网膜神经节细胞中表达的试剂盒,该试剂盒包含本发明的分离的核酸分子。

[0042] 如本文所用,术语“启动子”是指任何顺式调控元件,包括增强子、沉默子、绝缘子和启动子。启动子是DNA的通常位于需要转录的基因上游(朝向5'区域)的区域。启动子容许正确激活或抑制其控制的基因。在本发明的上下文中,启动子导致与它们可操作地连接的

基因在视网膜神经节细胞中的特异性表达。“外源基因的特异性表达”，也称为“仅在某种类型的细胞中表达”意指至少超过75%，优选地超过85%、超过90%或超过95%的表达所关注外源基因的细胞具有指定的类型，即在本案中为视网膜神经节细胞。

[0043] 典型地将表达盒引入载体中，该载体有利于表达盒进入宿主细胞并将表达盒保持在宿主细胞中。此类载体是常用的并且是本领域技术人员熟知的。许多此类载体可例如从英杰公司 (Invitrogen)、斯特吉公司 (Stratagene)、宝日医公司 (Clontech) 等商购获得，并且在许多指南中有描述，例如 Ausubel、Guthrie、Strathem 或 Berger，全部同上。此类载体典型地包括启动子、多聚腺苷酸化信号等，连同多个克隆位点，以及其他元件，如复制起点、选择标记基因 (例如，LEU2、URA3、TRP1、HIS3、GFP)、着丝粒序列等。

[0044] 病毒载体，例如 AAV、PRV 或慢病毒，适于使用本发明的启动子将基因靶向并递送至视网膜神经节细胞。

[0045] 视网膜细胞的输出可以使用电学方法测量，如多电极阵列或膜片钳，或使用目视法测量，如荧光检测。

[0046] 使用本发明的核酸序列的方法可用于鉴定用于治疗神经疾病或涉及视网膜神经节细胞的视网膜疾病的治疗剂，所述方法包括以下步骤：使试验化合物与在本发明的启动子下表达一种或多种转基因的视网膜神经节接触，以及将所述试验化合物存在时获得的视网膜神经节细胞的至少一种输出与不存在所述试验化合物时获得的相同输出作比较。

[0047] 此外，使用本发明启动子的方法还可用于视觉恢复的体外测试，所述方法包括以下步骤：将在本发明启动子控制下表达一种或多种转基因的视网膜神经节细胞与试剂接触，并将与所述试剂接触后获得的至少一种输出与在与所述试剂接触前获得的相同输出进行比较。

[0048] 视紫红质通道蛋白是视蛋白的一个亚家族，起到光学门控离子通道的作用。它们在单细胞绿藻中充当感觉光感受器，从而控制趋光性，即响应于光的运动。在其他生物体的细胞中表达时，它们能够用光来控制细胞内酸度、钙流入、电兴奋性和其他细胞过程。目前已知至少有三种“天然”视紫红质通道蛋白：视紫红质通道蛋白-1 (ChR1)、视紫红质通道蛋白-2 (ChR2) 和 *Volvox* 视紫红质通道蛋白 (VChR1)。此外，还存在这些蛋白质的一些修饰/改进形式。所有已知的视紫红质通道蛋白都是非特异性阳离子通道，传导 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 离子。

[0049] 盐细菌视紫红质是一种光驱动离子泵，对氯离子有特异性并发现于系统发育学上古老的“细菌” (古生菌) (被称为盐杆菌 (*halobacteria*)) 中。它是亚视黄基 (retinylidene) 蛋白家族的七次跨膜蛋白，与光驱动的质子泵细菌视紫红质同源，并且在三级结构 (而不是一级序列结构) 上与脊椎动物视紫红质 (视网膜中感受光的色素) 相似。盐细菌视紫红质也与视紫红质通道蛋白 (光驱动的离子通道) 具有序列相似性。盐细菌视紫红质含有必需的光可异构化维生素 A 衍生物全反式视黄醛。盐细菌视紫红质是少数晶体结构已知的膜蛋白之一。盐细菌视紫红质同种型可以在多种盐杆菌中发现，包括盐生盐杆菌 (*H. salinarum*) 和嗜盐碱单胞菌 (*N. pharaonis*)。许多正在进行的研究正在探索这些差异，并用它们来解析光循环和泵的性质。在细菌视紫红质之后，盐细菌视紫红质可以是研究的最佳 I 型 (微生物) 视蛋白。盐细菌视紫红质视网膜复合物的峰值吸光度为约 570nm。最近，盐细菌视紫红质已成为光遗传学中的工具。就像蓝光激活的离子通道视紫红质通道蛋白-2 开

启了用短暂的蓝光脉冲激活可兴奋细胞(如神经元、肌肉细胞、胰腺细胞和免疫细胞)的能力一样,盐细菌视紫红质开启了用短暂的黄光脉冲使可兴奋细胞沉默的能力。因此,盐细菌视紫红质和视紫红质通道蛋白一起实现了神经活动的多色光激活、沉默和去同步,从而创造了强大的神经工程工具箱。

[0050] 在一些实施例中,启动子是靶向视网膜的载体的一部分,所述载体表达至少一种在活体视网膜神经节细胞中可检测到的报告基因。

[0051] 适于本发明的病毒载体是本领域熟知的。例如,AAV、PRV或慢病毒适于将基因靶向并递送至视网膜神经节细胞。

[0052] 当用于分离的视网膜时,可以通过以下方式实现视网膜细胞的最佳病毒递送:使一侧向下而固定神经节细胞,以使得视网膜的光感受器侧被暴露出来并因此可以更好地转染。另一种技术是对视网膜的内界膜进行切片(例如用剃刀刀片),使得递送病毒可以穿透内膜。另一种方式是将视网膜包埋在琼脂中,对所述视网膜进行切片并从切片侧面施加递送病毒。

[0053] 转染后的细胞的输出可以使用熟知的方法测量,例如使用电学方法,如多电极阵列或膜片钳,或使用目测法,如荧光检测。在一些情况下,通过对内界膜进行显微手术来去除内界膜。在其他情况下,通过对内界膜进行切片来实现记录。

[0054] 任何视网膜细胞来源均可用于本发明。在本发明的一些实施例中,视网膜细胞来自人视网膜或处于人视网膜中。在其他实施例中,视网膜来自动物,例如为牛或啮齿动物来源的。人视网膜可以容易地从角膜库获得,其中所述视网膜通常在角膜解剖后丢弃。成人视网膜具有大的表面(约1100mm²),并因此可以容易地分成许多实验亚区。此外,视网膜也可以用作突触通信的精巧模型,因为视网膜具有与大脑其他部分同一的突触。

[0055] 如本文所用,术语“动物”在本文中用于包括所有动物。在本发明的一些实施例中,非人动物为脊椎动物。动物的实例为人、小鼠、大鼠、牛、猪、马、鸡、鸭、鹅、猫、狗等。术语“动物”还包括处于所有发育期(包括胚胎和胎儿期)的个体动物。“经遗传修饰的动物”是含有一种或多种下述细胞的任何动物,所述细胞带有通过在亚细胞水平上的有意遗传操作,例如通过靶向重组、显微注射或重组病毒感染而直接或间接改变或接收的遗传信息。术语“经遗传修饰的动物”无意涵盖经典杂交或体外受精,而是意在涵盖其中一种或多种细胞被重组DNA分子改变或接收该重组DNA分子的动物。该重组DNA分子可以特异性地靶向限定的遗传基因座,可以随机整合到染色体内,或者可以是染色体外复制DNA。术语“种系遗传修饰的动物”是指其中将遗传改变或遗传信息引入种系细胞中,从而赋予将遗传信息传递给其后代的能力的经遗传修饰的动物。如果这种后代实际上具有该改变或遗传信息中的一些或全部,则它们也是经遗传修饰的动物。

[0056] 该改变或遗传信息对于受者所属的动物物种可能是外来的,或者仅对于特定的个体受者是外来的,或者可以是受者已经具有的遗传信息。在最后一种情况下,该改变或引入的基因可以与天然基因不同地表达,或者根本不表达。

[0057] 用于改变靶基因的基因可以通过多种技术获得,这些技术包括但不限于从基因组来源分离、由分离的mRNA模板制备cDNA、直接合成或其组合。

[0058] 用于引入转基因的一类靶细胞是ES细胞。ES细胞可以从体外培养的植入前胚胎获得并与胚胎融合(Evans等人(1981),Nature[自然]292:154-156;Bradley等人(1984),

Nature[自然]309:255-258;Gossler等人(1986),Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]83:9065-9069;Robertson等人(1986),Nature[自然]322:445-448;Wood等人(1993),Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:4582-4584)。可以通过标准技术例如使用电穿孔进行DNA转染或通过逆转录病毒介导的转导,将转基因有效地引入ES细胞中。之后可以通过聚集将得到的转化ES细胞与桑椹胚组合或注射到来自非人动物的囊胚中。之后所引入的ES细胞定殖于胚胎并产生所得嵌合动物的种系(Jaenisch(1988),Science[科学]240:1468-1474)。在产生基因靶向的经遗传修饰的小鼠中基因使用基因靶向的ES细胞如1987(Thomas等人(1987),Cell[细胞]51:503-512)所述,并另见综述(Frohman等人(1989),Cell[细胞]56:145-147;Capecchi(1989),Trends in Genet.[遗传性趋势]5:70-76;Baribault等人(1989),Mol.Biol.Med.[医学分子生物学]6:481-492;Wagner(1990),EMBO J.[EMBO杂志]9:3025-3032;Bradley等人(1992),Bio/Technology[生物/技术]10:534-539)。

[0059] 有技术可用于通过使用靶向同源重组将特定变化插入染色体等位基因中,而使任何遗传区失活或改变成任何所需的突变。

[0060] 如本文所用,“靶向基因”是通过人为干预(包括但不限于本文所述的方法)引入非人动物种系中的DNA序列。本发明的靶向基因包括被设计成特异性改变同源内源性等位基因的DNA序列。

[0061] 在本发明中,“分离的”是指从其原始环境(例如,如果它是天然存在的,则为天然环境)中移出的材料,并因此“通过人工”从其天然状态改变。例如,分离的多核苷酸可以是载体或物质组合物的一部分,或者可以包含在细胞内,并且仍然是“分离的”,因为该载体、物质组合物或特定细胞不是多核苷酸的原始环境。术语“分离的”不是指基因组或cDNA文库、全细胞总体或mRNA制备物、基因组DNA制备物(包括通过电泳分离并转移到印迹上的那些)、剪切的全细胞基因组DNA制备物或其中本领域并未显示出本发明的多核苷酸/序列的区别性特征的其他组合物。分离的DNA分子的进一步实例包括保持在异源宿主细胞中的重组DNA分子或溶液中的纯化(部分或基本上)DNA分子。分离的RNA分子包括本发明的DNA分子的体内或体外RNA转录物。然而,出于本发明的目的,作为某文库(例如,基因组或cDNA文库)的成员但尚未与该文库的其他成员分离(例如,呈含有克隆和该文库的其他成员的均一溶液的形式)的克隆中所含的核酸,或从细胞或细胞裂解物中移出的染色体(例如,“染色体分散”,如在核型中),或随机剪切的基因组DNA的制备物,或经一种或多种限制酶切割的基因组DNA的制备物不是“分离的”。如本文进一步讨论的,根据本发明的分离的核酸分子可以是以天然、重组或合成方式产生的。

[0062] “多核苷酸”可以由单链和双链DNA、作为单链和双链区混合物的DNA、单链和双链RNA、以及作为单链和双链区混合物的RNA、包含可为单链或更常见为双链的或为单链和双链区混合物的DNA和RNA的杂交分子组成。另外,多核苷酸可由包含RNA或DNA或者RNA和DNA两者的三链区组成。多核苷酸还可以含有一个或多个经修饰的碱基或出于稳定性或其他原因而修饰的DNA或RNA主链。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化碱基和稀有碱基,如肌苷。可以对DNA和RNA进行多种修饰;因此,“多核苷酸”包括以化学、酶促或代谢方式修饰的形式。

[0063] 表述“编码多肽的多核苷酸”涵盖仅包括该多肽的编码序列的多核苷酸以及包括另外的编码序列和/或非编码序列的多核苷酸。

[0064] “严格杂交条件”是指在42℃下在包含50%甲酰胺、5x SSC (750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠)、50mM磷酸钠 (pH 7.6)、5x邓哈特氏溶液 (Denhardt's solution)、10%硫酸葡聚糖和20μg/ml变性的剪切鲑精DNA的溶液中过夜孵育,然后在约50℃下在0.1x SSC中洗涤过滤器。杂交和信号检测严格性的改变主要通过控制甲酰胺浓度(较低的甲酰胺百分比导致严格性降低);盐条件或温度实现。例如,中高等严格性条件包括于37℃下在包含6X SSPE (20X SSPE=3M NaCl;0.2MNaH₂PO₄;0.02M EDTA,pH 7.4)、0.5%SDS、30%甲酰胺、100μg/ml阻断DNA的鲑鱼精液的溶液中过夜孵育;之后用1XSSPE,0.1%SDS于50℃下洗涤。另外,为了达到甚至更低的严格性,严格杂交后进行的洗涤可以在更高的盐浓度(例如5X SSC)下进行。上述条件的变化可以通过包含和/或替换用于抑制杂交实验中的背景的替代性阻断试剂来实现。典型的阻断试剂包括邓哈特氏试剂 (Denhardt's reagent)、BLOTTO、肝素、变性鲑精DNA和市售专利配制剂。由于相容性问题,包含特定的阻断剂可能需要修改上述杂交条件。

[0065] 当涉及多肽时,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”意指保留与此类多肽基本上相同的生物学功能或活性的多肽。类似物包括前蛋白 (pro-protein),它可以通过裂解前蛋白部分而激活以产生活性成熟多肽。

[0066] 术语“基因”意指参与产生多肽链的DNA片段;它包括编码区之前和之后的区域“前导区和尾区”以及各个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0067] 多肽可以由通过肽键或修饰的肽键彼此连接的氨基酸组成,即肽等排体,并且可以含有除20种基因编码的氨基酸之外的氨基酸。多肽可以通过天然过程(如翻译后加工)或通过本领域熟知的化学修饰技术进行修饰。此类修饰在基础教科书和更详细的专著以及大量研究文献中有充分描述。修饰可以发生在多肽中的任何地方,包括肽主链、氨基酸侧链和氨基末端或羧基末端。应当认识到,相同类型的修饰可以在给定多肽中的几个位点以相同或不同的程度存在。而且,给定多肽可以含有许多类型的修饰。例如,多肽可以例如由于泛素化而分支,并且它们可以是环状的,有或没有分支。环状、分支和分支环状多肽可以由翻译后的天然过程产生,或者可以通过合成方法制备。修饰包括但不限于乙酰化、酰化、生物素化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、通过已知的保护/阻断基团衍生化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、半胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、γ-羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、与抗体分子或其他分子配体连接、甲基化、豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白水解加工(例如,裂解)、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转运RNA介导的向蛋白质添加氨基酸(如精氨酸化)和泛素化。(参见,例如,PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES[蛋白质-结构和分子性质],第2版,T.E.Creighton,纽约W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman and Company,New York)(1993);POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS[蛋白质翻译后共价修饰],B.C.Johnson编,纽约学术出版社(Academic Press,New York),第I-12页(1983);Seifter等人,Meth Enzymol[酶学方法]182:626-646(1990);Rattan等人,Ann NY Acad Sci[纽约科学院年鉴]663:48-62(1992)。

[0068] “具有生物学活性”的多肽片段是指表现出与原始多肽(包括成熟形式)的活性相似但不一定同一的活性的多肽,如在特定生物学测定法中所测量的,具有或不具有剂量依赖性。在确实存在剂量依赖性的情况下,它不需要与该多肽的剂量依赖性同一,而是与原始

多肽相比与给定活性中的剂量依赖性基本上相似(即,相对于原始多肽,候选多肽将表现出更强的活性或低不超过约25倍且在一些实施例中,低不超过约十倍的活性,或低不超过约三倍的活性。)

[0069] 可以通过以下方式分离和鉴定物种同源物:由本文提供的序列制备合适的探针或引物,以及针对所需同源物对合适的核酸来源进行筛选。

[0070] “变体”是指与原始多核苷酸或多肽不同但保留其基本性质的多核苷酸或多肽。通常,变体与原始多核苷酸或多肽总体上非常相似,并且在许多区域中,与原始多核苷酸或多肽同一。

[0071] 实际上,可以使用已知的计算机程序以常规方式确定任何特定核酸分子或多肽是否与本发明的核苷酸序列至少80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。用于测定查询序列(本发明的序列)与目标序列之间的最佳总体匹配的优选方法,也称为全局序列比对,可以使用基于Brutlag等人(Comp. App. Biosci. [计算机生物科学应用] (1990) 6:237-245)的算法的FASTDB计算机程序来确定。在序列比对中,查询序列和目标序列都是DNA序列。可以通过将U转换为T来比较RNA序列。所述全局序列比对的结果是百分比同一性。用于DNA序列的FASTDB比对以计算百分比同一性的优选参数是:矩阵(Matrix) = 酉(Unitary), k -元组(k -tuple) = 4,错配罚分(Mismatch Penalty) --1,连接罚分(Joining Penalty) --30,随机分组长度(Randomization Group Length) = 0,截止得分(Cutoff Score) = 1,空位罚分(Gap Penalty) --5,空位大小罚分(Gap Size Penalty) 0.05,窗口大小(Window Size) = 500或目标核苷酸序列的长度(以较短者为准)。如果目标序列由于5'或3'缺失,而不是因为内部缺失而比查询序列短,则必须对结果进行人工校正。这是因为FASTDB程序在计算百分比同一性时不考虑目标序列的5'和3'截短。对于相对于查询序列在5'或3'末端截短的目标序列,通过计算查询序列中在目标序列5'和3'而未匹配/对齐的碱基数占查询序列总碱基数的百分比来校正百分比同一性。通过FASTDB序列比对的结果确定核苷酸是否匹配/对齐。然后从上述FASTDB程序使用指定参数计算的百分比同一性中减去该百分比,以得出最终的百分比同一性得分。该校正后的得分是用于本发明目的的得分。为了人工调整百分比同一性得分,仅计算目标序列5'和3'碱基外(如通过FASTDB比对展示的)未与查询序列匹配/对齐的碱基。例如,将90个碱基的目标序列与100个碱基的查询序列比对以测定百分比同一性。缺失发生在目标序列的5'末端,因此,FASTDB比对未显示5'末端前10个碱基的匹配/对齐。这10个受损碱基占序列的10%(5'和3'端未匹配的碱基数/查询序列中的碱基总数),所以从通过FASTDB程序计算的百分比同一性得分中减去10%。如果剩余的90个碱基完全匹配,则最终的百分比同一性为90%。在另一个实例中,将90个碱基的目标序列与100个碱基的查询序列进行比较。这次缺失是内部缺失,所以在目标序列的5'或3'上没有与查询序列不匹配/对齐的碱基。在这种情况下,通过FASTDB计算的百分比同一性不进行人工校正。再次,仅人工校正目标序列5'和3'处与查询序列不匹配/对齐的碱基。

[0072] 所谓具有与本发明的查询氨基酸序列至少(例如)95%“同一”的氨基酸序列的多肽,旨在表示除了以下方面外,目标多肽的氨基酸序列与查询序列同一:目标多肽序列可以在查询氨基酸序列的每100个氨基酸中包括最多五个氨基酸改变。换言之,为了获得具有与查询氨基酸序列至少95%同一的氨基酸序列的多肽,目标序列中最多5%的氨基酸残基可以插入、缺失或用另一种氨基酸取代。参考序列的这些改变可以发生在参考氨基酸序列的

氨基或羧基末端位置或那些末端位置之间的任何位置,单独散布在参考序列中的残基之间或参考序列内的一个或多个连续组中。

[0073] 实际上,可以使用已知的计算机程序以常规方式测定任何特定多肽是否与例如序列中所示的氨基酸序列或与保藏DNA克隆所编码的氨基酸序列至少80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。用于测定查询序列(本发明的序列)与目标序列之间的最佳总体匹配的优选方法,也称为全局序列比对,可以使用基于Brutlag等人(Comp.App.Biosci.[计算机生物科学应用](1990)6:237-245)的算法的FASTDB计算机程序来确定。在序列比对中,查询序列和目标序列均为核苷酸序列或均为氨基酸序列。所述全局序列比对的结果是百分比同一性。用于FASTDB氨基酸比对的优选参数是:矩阵=PAM 0,k-元组=2,错配罚分=-1,连接罚分=20,随机分组长度=0,截止得分=1,窗口大小=序列长度,空位罚分=-5,空位大小罚分=-0.05,窗口大小=500或目标氨基酸序列的长度(以较短者为准)。如果目标序列由于N-或C-端缺失,而不是因为内部缺失而比查询序列短,则必须对结果进行人工校正。这是因为FASTDB程序在计算全局百分比同一性时不考虑目标序列的N-和C-端截短。对于相对于查询序列在N-和C-端截短的目标序列,通过计算查询序列中在目标序列N-和C-端而未与相应目标残基匹配/对齐的残基数占查询序列总碱基数的百分比来校正百分比同一性。通过FASTDB序列比对的结果确定残基是否匹配/对齐。然后从上述FASTDB程序使用指定参数计算的百分比同一性中减去该百分比,以得出最终的百分比同一性得分。该最终百分比同一性得分是用于本发明目的的得分。为了人工调整百分比同一性得分,仅考虑目标序列N-和C-端未与查询序列匹配/对齐的碱基。也就是说,仅查询位于目标序列的最远N-和C-端残基外的残基位置。仅人工校正目标序列N-末端和C-末端外(如FASTDB比对所展示的)与查询序列不匹配/对齐的残基位置。出于本发明的目的,不需要进行其他人工校正。

[0074] 天然存在的蛋白质变体称为“等位基因变体”,并且是指占据生物染色体上的给定基因座的基因的几种替代性形式之一。(Genes[基因]11,Lewin,B.编,纽约约翰威利国际出版公司(John Wiley&Sons,New York)(1985)。)这些等位基因变体可以在多核苷酸和/或多肽水平上变化。替代性地,非天然存在的变体可以通过诱变技术或通过直接合成而产生。

[0075] “标记”是指能够直接地或通过信号产生系统的一个或多个另外成员相互作用而提供可检测信号的试剂。可直接检测并且可用于本发明的标记包括荧光标记。特定的荧光团包括荧光素、若丹明、BODIPY、花青染料等。

[0076] “荧光标记”是指当被另一波长的光激发时能够发射某一波长的光的任何标记。

[0077] “荧光”是指任何可检测的荧光信号特征,包括强度、光谱、波长、胞内分布等。

[0078] “检测”荧光是指使用定性或定量方法评估细胞的荧光。在本发明的一些实施例中,将以定性方式检测荧光。换言之,是否存在荧光标记,表明重组融合蛋白是否表达。对于其他情况,可以使用定量手段测定荧光,例如,测量荧光强度、光谱或胞内分布,从而允许对不同条件下获得的值进行统计比较。该水平还可以使用定性方法来测定,例如视觉分析和人为对多个样品进行比较,例如,使用荧光显微镜或其他光学检测器(例如,图像分析系统等)检测样品。荧光的“改变”或“调制”是指在特定条件下与另一条件相比,荧光的强度、胞内分布、光谱、波长或其他方面的任何可检测的差异。例如,以定量方式检测“改变”或“调制”,并且差异是统计学上显著的差异。荧光的任何“改变”或“调制”可以使用标准仪器,如

荧光显微镜、CCD或任何其他荧光检测器来检测,并且可以使用自动化系统(如集成系统)来检测,或者可以通过人类观察者来反映对改变的主观检测。

[0079] “绿色荧光蛋白”(GFP)是一种由238个氨基酸组成的蛋白质(26.9kDa),该蛋白质最初从水母维多利亚多管发光水母(*Aequorea victoria*)/水螅水母(*Aequorea aequorea*)/肋骨水母(*Aequorea forskalea*)分离,当暴露于蓝光时发出绿色荧光。来自维多利亚多管发光水母的GFP具有在395nm的波长下的主要激发峰和在475nm处的次要激发峰。其发射峰在509nm处,这处于可见光谱的绿色下部。来自海肾(*Renilla reniformis*)的GFP具有在498nm处的单个主要激发峰。由于广泛使用的潜力和研究人员不断变化的需求,已经工程设计了许多不同的GFP突变体。第一个主要的改进是1995年由Roger Tsien在Nature[自然]上报道的单点突变(S65T)。这种突变显著改善了GFP的光谱特征,导致增强的荧光、光稳定性和主要激发峰迁移至488nm而发射峰保持在509nm。将37°C折叠效率(F64L)点突变添加至这个支架产生了增强的GFP(EGFP)。EGFP的消光系数(表示为 ϵ),也称为其光学截面,为 $9.13 \times 10^{-21} \text{m}^2/\text{分子}$,也作为55,000L/(mol·cm)引述。2006年报道了超级折叠GFP,这是一系列允许GFP即使在与弱折叠肽融合时也快速折叠和成熟的突变。

[0080] “黄色荧光蛋白”(YFP)是源自维多利亚水母的绿色荧光蛋白的遗传突变体。其激发峰为514nm且发射峰为527nm。

[0081] 如本文所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”也包括复数指示物。

[0082] “病毒”是不能在宿主细胞外生长或繁殖的亚微观感染因子。每种病毒颗粒或病毒粒子由在称为衣壳的保护性蛋白外壳内的遗传物质DNA或RNA组成。衣壳形状从简单的螺旋和二十面体(多面体或近球形)形式到更复杂的具有尾部或包膜的结构变化。病毒感染细胞生命形式并且根据感染的宿主类型,分为动物、植物和细菌类型。

[0083] 如本文所用的术语“跨突触病毒”是指能够通过突触从一个神经元迁移到另一个相连神经元的病毒。此类跨突触病毒的实例是弹状病毒,例如狂犬病病毒和 α 疱疹病毒,例如假狂犬病病毒或单纯疱疹病毒。如本文所用的术语“跨突触病毒”还涵盖自身具有通过突触从一个神经元迁移到另一个相连神经元的能力的病毒亚单位和包含此类亚单位并展示出通过突触从一个神经元迁移到另一个相连神经元的能力的生物载体(如经修饰的病毒)。

[0084] 跨突触迁移可以是顺行的或逆行的。在逆行迁移期间,病毒将从突触后神经元移动到突触前神经元。因此,在顺行迁移期间,病毒将从突触前神经元移动到突触后神经元。

[0085] 同源物是指具有共同祖先的蛋白。类似物没有共同的祖先,但具有一些功能(而非结构)相似性,使得将它们包括在一个类别中(例如胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶明显不相关-它们在活性位点外的结构完全不同,但它们具有几何学上几乎同一的活性位点,并因此被认为是趋同进化为类似物的实例)。

[0086] 同源物有两个亚类-直系同源物和旁系同源物。直系同源物是不同物种中的相同基因(例如细胞色素‘c’)。相同生物体中的两个基因不可能是直系同源物。旁系同源物是基因复制的结果(例如血红蛋白 β 和 δ)。如果两种基因/蛋白是同源的并且在相同的生物体中,则它们是旁系同源物。

[0087] 如本文所用,术语“障碍”是指小病、疾病、病痛、临床病症或病理病症。

[0088] 如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”是指不干扰活性成分的生物活性的有效

性、是化学惰性的并且对所施用的患者无毒的载剂介质。

[0089] 如本文所用,术语“药学上可接受的衍生物”是指例如使用本发明的筛选方法鉴定的、对受试者相对无毒的药剂的任何同源物、类似物或片段。

[0090] 术语“治疗剂”是指有助于预防或治疗障碍或障碍的并发症的任何分子、化合物或治疗。

[0091] 可以制备配制在相容性药物载剂中的包含这种药剂的组合物、包装并贴标签以用于治疗。

[0092] 如果复合物是水溶性的,则可以将其配制在合适的缓冲液中,例如磷酸盐缓冲盐水或其他生理上相容的溶液。

[0093] 替代性地,如果所得的复合物在水性溶剂中的溶解性差,则可以用非离子表面活性剂如吐温(Tween)或聚乙二醇配制。因此,化合物及其生理上可接受的溶剂化物可以被配制成通过以下方式施用:吸入或吹入(通过口或鼻)或口服、含服、肠胃外、直肠施用,或者在肿瘤的情况下,直接注射到实体瘤中。

[0094] 对于口服施用,药物制剂可以呈液体形式,例如溶液、糖浆或悬浮液,或者可以作为在使用前用水或其他合适的媒介物复原的药物产品来呈现。此类液体制备物可以通过常规手段用药学上可接受的添加剂制备,这些添加剂例如为助悬剂(例如山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(例如卵磷脂或阿拉伯胶);非水性媒介物(例如杏仁油、油酯或分馏植物油);以及防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。药物组合物可以采用例如通过常规手段用药学上可接受的赋形剂制备的片剂或胶囊剂,这些赋形剂例如为粘合剂(例如,预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石或二氧化硅);崩解剂(例如马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或润湿剂(例如十二烷基硫酸钠)。片剂可以通过本领域熟知的方法包衣。

[0095] 可以适当地配制用于口服施用的制备物以实现活性化合物的控释。

[0096] 化合物可以被配制成通过注射,例如通过推注或连续输注而进行肠胃外施用。注射用制剂可以以单位剂型呈现,例如,在添加了防腐剂的安瓿中或多剂量容器中。

[0097] 该组合物可以采取例如溶于油性媒介物或水性媒介物的悬浮液、溶液或乳剂的形式,并且可以含有配制剂(例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂)。替代性地,活性成分可以呈粉末形式,以在使用前用合适的媒介物(例如无菌无热原水)复原。

[0098] 化合物也可以配制成供局部应用,如霜剂或洗剂。

[0099] 除了先前描述的制剂以外,化合物还可配制成贮库(depot)制剂。此类长效型制剂可以通过植入(例如,眼内、皮下或肌内)或通过肌内注射而施用。

[0100] 因此,例如,化合物可以用合适的聚合或疏水性材料配制(例如配制成可接受的油中的乳液)或用离子交换树脂配制,或配制成难溶性衍生物,例如配制成难溶性盐。脂质体和乳液是用于亲水性药物的递送媒介物或载剂的熟知实例。

[0101] 如果需要,组合物可以呈现于包装或分配装置中,该包装或分配装置可以含有一个或多个包含活性成分的单位剂型。该包装例如可以包含金属箔或塑料箔,例如泡罩包装。该包装或分配装置可以附有施用说明。

[0102] 本发明还提供了用于实施本发明的治疗方案的试剂盒。此类试剂盒在一个或多个

容器中包含治疗或预防有效量的药学上可接受形式的组合物。

[0103] 试剂盒的小瓶中的组合物可以呈药学上可接受的溶液的形式,例如与无菌盐水、葡萄糖溶液或缓冲溶液或其他药学上可接受的无菌流体组合。替代性地,复合物可以冻干或脱水;在这种情况下,试剂盒任选地进一步在容器中包含优选地为无菌的药学上可接受的溶液(例如,盐水、葡萄糖溶液等),以将复合物复原以形成用于注射目的溶液。

[0104] 在另一个实施例中,试剂盒进一步包含优选地以无菌形式包装以用于注射复合物的针或注射器,和/或包装好的酒精垫。任选地包括供临床医生或患者施用组合物的说明书。

[0105] “视网膜神经节细胞”(RGC)是位于眼视网膜的内表面(神经节细胞层)附近的一类神经元。它经由两种中继神经元类型:双极细胞和视网膜无长突细胞从光感受器接收视觉信息。视网膜神经节细胞以动作电位的形式将来自视网膜的成像和非成像视觉信息共同地传递到丘脑、下丘脑和中脑(mesencephalon)或中脑(midbrain)中的若干区域。视网膜神经节细胞在其大小、连接和对视觉刺激的响应方面存在显著差异,但它们都具有延伸到脑中的长轴突的限定性质。这些轴突形成视神经、视交叉和视神经束。小部分百分比的视网膜神经节细胞对视力的贡献很小或没有,但它们本身是光敏的;它们的轴突形成视网膜下丘脑束,并且有助于昼夜节律和瞳孔光反射、瞳孔的大小改变。

[0106] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然与本文所述的那些方法和材料类似或等同的方法和材料可以用于本发明的实践或测试,但是以下描述合适的方法和材料。在冲突存在的情况下,则以包括定义在内的本说明书为准。此外,材料、方法和实例仅是说明性的而不旨在限制。

[0107] 实例

[0108] 载体构建体

[0109] 本发明的诸位发明人已结合表观遗传学、生物信息学和神经科学来寻找当处于眼睛中时,仅驱动在具体眼细胞,例如视网膜神经节细胞中的基因表达的启动子。例如,通过包含与随机序列交织的细胞类型特异性转录因子(例如Irf8)的重复转录因子结合位点(TFBS)来产生合成启动子(参见,例如Siegert,S.等人,Nat.Neurosci.[自然神经科学]15,487-495(2012))。对这些启动子的活性进行了实验测试,并且通过小鼠视网膜和NHP视网膜中的体内细胞类型靶向策略进行了验证。

[0110] 此研究中使用的合成启动子ProC29由774bp序列(SEQ ID NO:1)组成。在该启动子和优化的Kozak序列(GCCACC)之后立即插入与绿色荧光蛋白融合的光敏感通道蛋白变体(CatCh-GFP)编码序列,之后插入土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)和SV40聚腺苷酸化位点。使用具有 $2.2E+14$ GC/mL滴度的AAV血清型2/8BP2(参见例如Cronin,T.等人,EMBO Mol.Med.[欧洲分子生物学学会杂志之分子医学]6,1175-1190(2014))靶向非人灵长类视网膜神经元。

[0111] AAV质粒构建

[0112] 合成启动子序列由GENEWIZ化学合成,具有包含MluI/NheI/AscI和BamHI/EcoRI/BglIII限制性位点的短侧翼。使用合适的限制性位点组合将合成启动子序列亚克隆到pAAV-EF1a-CatCh-GFP中替换EF1a或hRO启动子。通过衔接子PCR和Clontech In-Fusion试剂盒使

用pcDNA3.1(-)-CatCh-GFP构建pAAV-EF1a-CatCh-GFP质粒。

[0113] AAV产生和滴定

[0114] 使用分支聚乙烯亚胺(聚科学公司(Polysciences))用AAV转基因质粒,编码用于选定衣壳(BP2)的AAV Rep2和Cap蛋白的AAV辅助质粒以及带有腺病毒基因的pHGT1-Adeno1辅助质粒共转染HEK293T细胞。在HEK293T细胞80%汇合的情况下,将一个直径为15cm的细胞培养皿与质粒混合物一起共转染。将含有在5ml DMEM中的7 μ g AAV转基因质粒、7 μ g编码Rep2和Cap的质粒、20 μ g AAV辅助质粒和6.8 μ M聚乙烯亚胺的细胞转染混合物在室温下孵育15min,然后添加到含有10ml DMEM的细胞培养皿。转染后60h,收集细胞并将其重悬于含有150mM NaCl和20mM Tris-HCl,pH 8.0的缓冲液中。通过反复的冻融循环裂解细胞,并添加MgCl₂使其终浓度为1mM。将质粒和基因组DNA通过在37 $^{\circ}$ C下用250U ml⁻¹的TurboNuclease处理10min去除。通过在4,000r.p.m下离心30min除去细胞碎片。纯化AAV颗粒,并在Millipore Amicon 100K柱(目录号UFC 910008;默克密理博公司(Merck Millipore))中浓缩。在使用蛋白酶K使AAV颗粒变性之后,通过TaqMan逆转录PCR(正向引物:GGCTGTTGGGCACTGACAA;反向引物:CCAAGGAAAGGACGATGATTC;探针:TCCGTGGTGTGTCG;赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))对衣壳化的病毒DNA进行定量;滴度计算为基因组拷贝数/ml。

[0115] 病毒转染和组织制备

[0116] 为了在小鼠中施用AAV,在用2.5%异氟烷麻醉的小鼠上进行眼注射。用锋利的30-G针在晶状体附近的巩膜上做一个小切口,并用一个装在显微操纵器中的钝的5 μ l汉密尔顿(汉密尔顿公司(Hamilton Company))注射器通过该切口将2 μ l AAV悬浮液注入视网膜下/玻璃体内间隙。

[0117] 对于在非人灵长类动物中进行AAV施用,与中国昆明的眼科医师和第三方承包商合作进行了视网膜下注射50微升的AAV颗粒悬浮液。3个月后,将分离的眼杯在PBS中的4%PFA中固定过夜,接着是在4 $^{\circ}$ C下在PBS中的洗涤步骤。接受固定的眼杯后,解剖感染的视网膜区域,并在室温下用PBS中的10%正常驴血清(NDS)、1%BSA、0.5%Triton X-100处理1h。在室温用在PBS中的3%NDS、1%BSA、0.5%曲通X-100中的单克隆大鼠抗GFP抗体(分子探针公司(Molecular Probes Inc.);1:500)和多克隆山羊抗-ChAT(密理博公司(Millipore):1:200)处理5天。用驴抗大鼠Alexa Fluor-488二抗(分子探针公司;1:200)、抗山羊Alexa Fluor-633和Hoechst处理2小时。洗涤切片,用ProLong Gold抗褪色试剂(分子探针公司)封固在载玻片上,并使用Zeiss LSM 700Axio Imager Z2激光扫描共聚焦显微镜(卡尔·蔡司公司(Carl Zeiss Inc.))拍照。

[0118] 在无菌条件下,在死亡后2小时内摘出人眼球,并且在聚维酮碘(Egis Pharmaceuticals PLC公司,匈牙利)中冲洗以净化。使用细剪刀解剖视网膜。对于器官型培养,分离5mm \times 5mm的视网膜片,并且将神经节细胞或感光体朝上放置在聚碳酸酯膜插入物(康宁公司(Corning))上。将培养物维持在37 $^{\circ}$ C,在5%CO₂中,在DMEM/F12培养基(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))中,培养基补充有0.1%BSA、10 μ M O-乙酰基-L-肉毒碱盐酸盐、1mM富马酸、0.5mM半乳糖、1mM葡萄糖、0.5mM甘氨酸、10mM HEPES、0.05mM甘露糖、13mM碳酸氢钠、3mM牛磺酸、0.1mM腐胺二盐酸盐、0.35 μ M视黄醇、0.3 μ M乙酸视黄酯、0.2 μ M(+)- α -生育酚、0.5mM抗坏血酸、0.05 μ M亚硒酸钠、0.02 μ M氢化可的松、0.02 μ M孕酮、1 μ

M胰岛素、0.003 μ M 3,3',5-三碘-L-甲状腺素、2,000U青霉素和2mg链霉素(西格玛公司(Sigma))。对于AAV感染,每个视网膜片施用20-40微升的AAV。病毒施用后6-8周检查AAV诱导的转基因表达。将感染的视网膜片在PBS中的4%PFA中固定过夜,接着是在4 $^{\circ}$ C下在PBS中的洗涤步骤。接受固定的眼杯后,解剖感染的视网膜区域,并在室温下用PBS中的10%正常驴血清(NDS)、1%BSA、0.5%Triton X-100处理1h。在室温用在PBS中的3%NDS、1%BSA、0.5%曲通X-100中的单克隆大鼠抗GFP抗体(分子探针公司(Molecular Probes Inc.);1:500)和多克隆山羊抗-ChAT(密理博公司(Millipore):1:200)处理5天。用驴抗大鼠Alexa Fluor-488二抗(分子探针公司;1:200)、抗山羊Alexa Fluor-633和Hoechst处理2小时。洗涤切片,用ProLong Gold抗褪色试剂(分子探针公司)封固在载玻片上,并使用Zeiss LSM 700Axio Imager Z2激光扫描共聚焦显微镜(卡尔·蔡司公司(Carl Zeiss Inc.))拍照。

[0119] 图1显示了在人器官型视网膜培养物中视网膜下注射AAV-ProC29-Catch-GFP后3个月,可以观察到视网膜神经节细胞中的诱导表达(小图A中灰度图像的浅灰色区域)。

[0120] 下表1总结了合成启动子ProC29驱动小鼠、非人灵长类(NHP)、和人视网膜细胞中表达的能力。

[0121] 表1:小鼠、NHP和人视网膜细胞中的细胞特异性表达

	靶向的细胞类型			靶标表达	
	以丰度顺序	靶向特异性	靶向的细胞的密度(作为靶标群体密	视网 膜外	视网 膜内
[0122]					

	靶向的细胞类型			靶标表达	
			度的百分比)		
[0123]	小鼠	MG、AC、AII AC、HC		1	1
	NHP	GC、AC			
	人	s-GC、C	GC (70%)、C (30%)	GC (2 \pm 0.4%)	

[0124] MG=米勒神经胶质细胞;AC=无长突神经细胞;AII AC=AII无长突神经细胞;HC=水平细胞;GC=神经节细胞;C=视锥细胞;s-(作为前缀)=稀少表达

序列表

<110> 弗里德里克·米谢尔生物医学研究所(FRIEDRICH MIESCHER INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH)

<120> 用于视网膜神经节细胞中特异表达基因的启动子 SynP151 (ProC29)

<130> PAT058288-WO-PCT

<140> PCT/IB2019/059092

<141> 2019-10-24

<150> EP 18202538.7

<151> 2018-10-25

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 774

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

<400> 1

[0001]

```

cttaccgatt gcagacgaaa ccgaaactta gctgacatcg agtcgaaacc gaaacttttc      60
atggccgaag gcgaaaccga aacttgcgtc cgtgtaacgc gaaaccgaaa ctccccgagc      120
atccttacga aaccgaaact gcaaccgctt acactcgaaa ccgaaactac taatgatacc      180
aaccgaaacc gaaactcggg aagtgaaact gcgaaaccga aacttggtgg acagccttcc      240
gaaaccgaaa ctggacgatg ttcgttccga aaccgaaact atattcgtgc ccaagcgaaa      300
ccgaaactag ggggccgata tcccgaaacc gaaactacag gccccgcccg tcgaaaccga      360
aacttacgtc tcaggaagtc gaaaccgaaa ctggctacca ctgaccacga aaccgaaact      420
tctactgttc cgtgacgaaa ccgaaactga cggacaagag taccgaaacc gaaacttagt      480
caggcgctca tcgaaaccga aactcaaaga ttcaaaaaac gaaaccgaaa ctttctgttg      540
ggatgtccga aaccgaaact gctcgagatc tgcgatctgc atctcaatta gtcagcaacc      600
atagtcccg ccctaactcc gcccatccc cccctaactc cgcccagttc cgcccattct      660
ccgccccate getgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctcggcctct      720
gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt ttggaggcc taggcttttg caaa          774
    
```

<210> 2

<211> 106

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

<400> 2

```

atcctcacat ggtcctgctg gagttagtag agggtatata atggaagctc gacttccagc      60
tatcacatcc actgtgttgt tgtgaactgg aatccactat aggcca          106
    
```

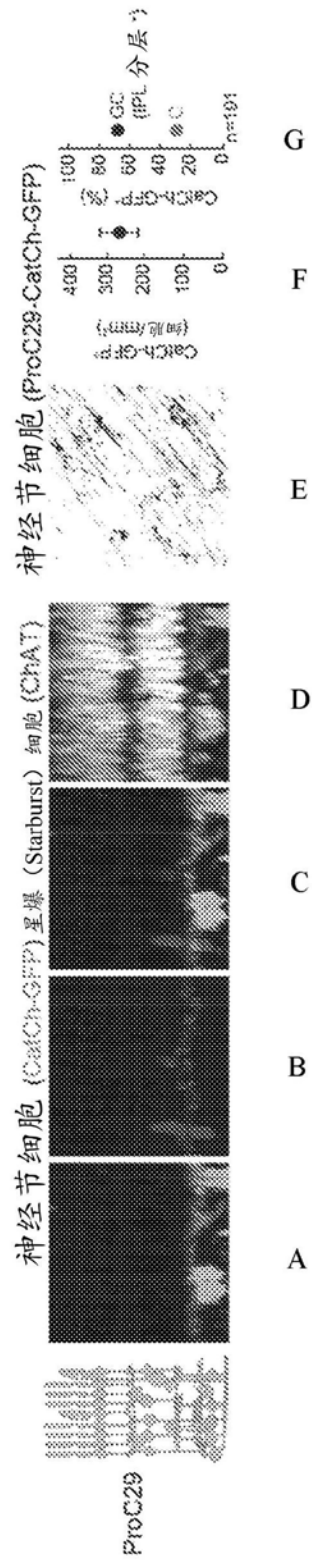


图1