



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104334575 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 04

(21) 申请号 201380022635. 5

(22) 申请日 2013. 03. 05

(30) 优先权数据

61/606, 663 2012. 03. 05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 10. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/029171 2013. 03. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/134295 EN 2013. 09. 12

(71) 申请人 韦恩州立大学

地址 美国密歇根州

(72) 发明人 Z-h. 潘

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

C07K 14/705 (2006. 01)

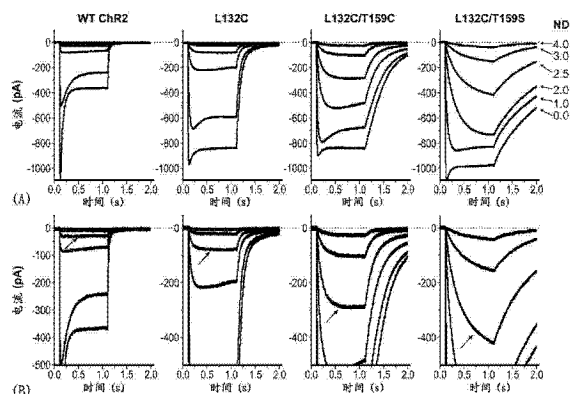
权利要求书2页 说明书29页 附图5页

(54) 发明名称

通道视蛋白-2(Chop2) 突变的鉴定及使用方
法

(57) 摘要

本发明提供了组合物和试剂盒,其包含至少一种编码突变体ChR2蛋白的核酸或多肽分子。本发明的方法包括对受试者施用包含突变体ChR2的组合物以保护,改善,或恢复光转导。优选地,对具有受损视觉的受试者提供本发明的组合物和方法,由此将视觉恢复到正常水平。



1. 一种分离的多肽分子,其包含 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L)。
2. 权利要求 1 的多肽分子,其中所述第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C) 或丙氨酸 (A)。
3. 权利要求 2 的多肽分子,其中所述第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C),且其中所述多肽分子包含 SEQ ID NO:13。
4. 权利要求 2 的多肽分子,其中所述第 132 位氨基酸是丙氨酸 (A),且其中所述多肽分子包含 SEQ ID NO:20。
5. 一种分离的多肽分子,其包含 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T)。
6. 权利要求 5 的多肽分子,其中所述第 159 位氨基酸是半胱氨酸 (C),丝氨酸 (S),或丙氨酸 (A)。
7. 权利要求 6 的多肽分子,其中所述第 159 位氨基酸是半胱氨酸 (C),且其中所述多肽分子包含 SEQ ID NO:14。
8. 权利要求 6 的多肽分子,其中所述第 159 位氨基酸是丝氨酸 (S),且其中所述多肽分子包含 SEQ ID NO:17。
9. 权利要求 6 的多肽分子,其中所述第 159 位氨基酸是丙氨酸 (A),且其中所述多肽分子包含 SEQ ID NO:23。
10. 一种分离的多肽分子,其包含 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L) 且所述第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T)。
11. 权利要求 10 的多肽分子,其中所述第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C),其中所述第 159 位氨基酸是半胱氨酸 (C)。
12. 权利要求 10 或 11 的多肽分子,其中所述多肽分子包含 SEQ ID NO:16。
13. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 12 的分离的多肽。
14. 权利要求 13 的核酸分子,其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO:15。
15. 权利要求 10 的多肽分子,其中所述第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C),其中所述第 159 位氨基酸是丝氨酸 (S)。
16. 权利要求 10 或 15 的多肽分子,其中所述多肽分子包含 SEQ ID NO:19。
17. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 16 的分离的多肽。
18. 权利要求 17 的核酸分子,其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO:18。
19. 权利要求 10 的多肽分子,其中所述第 132 位氨基酸是丙氨酸 (A),其中所述第 159 位氨基酸是半胱氨酸 (C)。
20. 权利要求 10 或 19 的多肽分子,其中所述多肽分子包含 SEQ ID NO:22。
21. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 22 的分离的多肽。
22. 权利要求 21 的核酸分子,其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO:21。
23. 权利要求 10 的多肽分子,其中所述第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C),其中所述第 159 位氨基酸是丙氨酸 (A)。
24. 权利要求 10 或 23 的多肽分子,其中所述多肽分子包含 SEQ ID NO:25。
25. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 24 的分离的多肽。
26. 权利要求 25 的核酸分子,其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO:24。

27. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 1,3,4,5,6,7,8,9,10,11,15,16,19,20,23,和 24 中任一项的分离的多肽。

28. 权利要求 27 的分离的核酸分子,其中所述分离的多肽长约 315,310,300,275,250,225,200,175,或 160 个氨基酸。

29. 权利要求 27 或 28 的分离的核酸分子,其进一步包含药学可接受载体。

30. 权利要求 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16,19,20,23,和 24 中任一项的分离的多肽分子,其中所述多肽分子编码突变体 ChR2 蛋白,其响应比野生型 ChR2 蛋白的阈值低的阈值光强度而引发电流。

31. 权利要求 30 的分离的多肽分子,其中所述多肽分子长约 315,310,300,275,250,225,200,175,或 160 个氨基酸。

32. 权利要求 30 或 31 的分离的多肽分子,其进一步包含药学可接受载体。

33. 一种组合物,其包含权利要求 27,28,和 29 中任一项的分离的核酸分子。

34. 一种组合物,其包含权利要求 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16,19,20,23,24,29,30 和 31 中任一项的分离的多肽分子。

35. 一种细胞,其包含权利要求 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16,19,20,23,24,29,30 和 31 中任一项的分离的多肽分子。

36. 一种细胞,其包含分离的核酸分子,该分离的核酸分子编码权利要求 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16,19,20,23,24,29,30 和 31 中任一项的分离的多肽分子。

37. 一种细胞,其包含权利要求 27 或 28 的分离的核酸分子。

38. 一种组合物,其包含权利要求 35,36,和 37 中任一项的细胞。

39. 权利要求 35,36,和 37 的细胞,其中所述细胞在体外,离体,在体内,或原位与所述分离的多肽或编码所述多肽的分离的核酸接触。

40. 权利要求 35,36,和 37 的细胞,其中所述细胞是光感受器,双极细胞,杆状双极细胞,ON 型锥体双极细胞,视网膜神经节细胞,感光性视网膜神经节细胞,水平细胞,无长突细胞,或 AII 无长突细胞。

41. 权利要求 40 的细胞,其中所述细胞是视网膜神经节细胞或感光性视网膜神经节细胞。

42. 一种改善或恢复视觉的方法,其包括对受试者施用权利要求 33 的组合物。

43. 一种改善或恢复视觉的方法,其包括对受试者施用权利要求 34 的组合物。

44. 一种改善或恢复视觉的方法,其包括对受试者施用权利要求 38 的组合物。

45. 权利要求 42,43 和 44 的方法,其中所述受试者具有正常的视觉。

46. 权利要求 42,43 和 44 的方法,其中所述受试者具有受损的视觉。

47. 权利要求 42,43 和 44 的方法,其中所述受试者患有眼疾病。

48. 权利要求 47 的方法,其中所述眼疾病是黄斑变性 (macular degeneration) 或色素性视网膜炎 (retinitis pigmentosa)。

49. 权利要求 42,43 和 44 的方法,其中通过玻璃体内或视网膜下注射施用所述组合物。

50. 权利要求 42,43 和 44 的方法,其中所述改善或恢复视觉包括下列任一项:提高光敏感性;降低引发光电流需要的阈值光强度;及提高视皮质中的视觉诱发电位。

通道视蛋白 -2 (Chop2) 突变的鉴定及使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2012 年 3 月 5 日提交的美国临时申请 No. 61/606, 663 的优先权和权益, 其内容完整并入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明是在国立健康研究所 / 国立眼科研究所拨款 NIH EY 17130 下得到美国政府支持进行的。政府具有本发明的某些权利。

发明领域

[0005] 一般而言, 本发明涉及分子生物学领域。鉴定了通道视蛋白 -2 (Channelopsin-2, Chop2) 基因中的突变。在治疗方法中使用包含突变体 Chop2 基因的组合物以改善和恢复视觉丧失。

[0006] 发明背景

[0007] 视网膜由光感受器 (或光感受器细胞, 杆和锥体) 组成。光感受器是高度特化的神经元, 该神经元负责光转导, 或光 (为电磁辐射形式) 转化成电和化学信号, 其在视觉系统内传播事件级联, 最终产生我们世界的画像。

[0008] 光感受器丧失或变性若不完全抑制也是严重危及视网膜内视觉信息的光转导。光感受器细胞的丧失和 / 或光感受器细胞功能的丧失是降低的视觉敏锐度, 降低的光敏感性, 和盲的主要原因。本领域中长期需要恢复经历视觉丧失的受试者的视网膜的光敏感性的组合物和方法。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供了对恢复和 / 或提高光感受器细胞的光敏感性的方法的长期需要的解决方法, 其通过表达通道视蛋白 -2 (Chop2) 基因的有利突变, 和 / 或其组合, 随后提供基于通道视蛋白 -2 (Chop2) 的基因疗法的方法进行。

[0011] 基于通道视蛋白 -2 (Chop2) 的基因疗法提供了用于恢复光感受器变性后视黄醛光敏感性的卓越策略。Chop2 基因的蛋白质产物在与光可异构化发色团全反式视黄醛结合时形成功能性光门控通道, 称作通道视紫红质 -2 (ChR2, channelrhodopsin-2)。天然 ChR2 显示较低的光敏感性。最近, 报告了两种突变体 ChR2, 即 L132C 和 T159C 显著提高其光敏感性 (Kleinlogel 等 (2011) Nat Neurosci. 14:513-8; Berndt 等 (2011) Proc Natl Acad Sci USA. 108:7595-600; Prigge 等 (2012) J Biol Chem. 287(38)3104:12; 每篇的内容完整并入本文)。检查这两种 ChR2 突变体 (即 L132C 和 T159C) 的特性, 并且与多种在这两个位点处的双重突变体比较以鉴定治疗方法的合适候选物。为了恢复视觉, 对此需要的受试者提供包含这些中一种或多种突变的组合物。具体地, 将 Chop2 基因中的期望突变引入细胞和 / 或整合到细胞的基因组 DNA 中以改善或恢复视觉。Chop2 基因中引入细胞以改善或恢复视觉的期望突变也可以保持为附加体的, 尚未整合到基因组 DNA 中。

[0012] Chop2 的 L132 或 T159 氨基酸位置处的突变 (且因此所得的 ChR2) 显著降低引发 ChR2 介导的光电流需要的阈值光强度。氨基酸位置 L132 和 T159 处的双重突变体进一步

提高光强度时的光电流,其超过任一种相应单突变的。表达 L132 和 T159 位置处的双重突变体的视网膜神经节细胞可以响应适合于恢复有用视觉的光强度,其落入正常户外光照条件的范围内,但是应当仍然维持足够的,且高的时间分辨率 (temporal resolution)。因此,形成具有改善的光敏感性的突变体 ChR2 的本发明突变体 Chop2 蛋白单独或组合使用以恢复或改善视觉。

[0013] 具体地,本发明提供了分离的多肽分子,其包含或组成为 (consisting of) SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L)。在分离的多肽分子的某些实施方案中,所述第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C) 或丙氨酸 (A)。在第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C) 时,多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:13。在第 132 位氨基酸是丙氨酸 (A) 时,多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:20。

[0014] 本发明提供了分离的多肽分子,其包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T)。在分离的多肽分子的某些实施方案中,第 159 位氨基酸是半胱氨酸 (C),丝氨酸 (S),或丙氨酸 (A)。在第 159 位氨基酸是半胱氨酸 (C) 时,多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:14。在第 159 位氨基酸是丝氨酸 (S) 时,多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:17。在第 159 位氨基酸是丙氨酸 (A) 时,多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:23。

[0015] 本发明提供了分离的多肽分子,其包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L),且第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T)。在分离的多肽分子的某些实施方案中,所述分离的多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L),且第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T),第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C),且第 159 位氨基酸是半胱氨酸 (C)。在此分离的多肽分子的优选的实施方案中,多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:16。本发明提供了编码分离的多肽的分离的核酸分子,所述分离的多肽包含或组成为 SEQ ID NO:16。优选地,编码包含或组成为 SEQ ID NO:16 的分离的多肽的分离的核酸分子是包含或组成为 SEQ ID NO:15 的核酸分子。

[0016] 在分离的多肽分子的某些实施方案中,所述分离的多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L),且第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T),第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C),且第 159 位氨基酸是丝氨酸 (S)。分离的多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:19,所述分离的多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L),且第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T)。或者/另外,分离的多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:19,所述分离的多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L),且第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T),其中第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C),且其中第 159 位氨基酸是丝氨酸 (S)。本发明提供了编码分离的多肽的分离的核酸分子,所述分离的多肽包含或组成为 SEQ ID NO:19。优选地,核酸分子包含或组成为 SEQ ID NO:18。

[0017] 在分离的多肽分子的某些实施方案中,所述分离的多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L) 且第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T),第 132 位氨基酸是丙氨酸 (A) 且第 159 位氨基酸是半胱氨酸 (C)。分离的多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:22,所述分离的多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L) 且第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T)。或者

/另外,分离的多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:22,所述分离的多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L) 且第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T),其中第 132 位氨基酸是丙氨酸 (A) 且其中第 159 位氨基酸是半胱氨酸 (C)。本发明提供了编码分离的多肽的分离的核酸分子,所述分离的多肽包含或组成为 SEQ ID NO:22。优选地,核酸分子包含或组成为 SEQ ID NO:21。

[0018] 在分离的多肽分子的某些实施方案中,所述分离的多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L) 且第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T),第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C) 且第 159 位氨基酸是丙氨酸 (A)。分离的多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:25,所述分离的多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L) 且第 159 位氨基酸不是苏氨酸 (T)。或者/另外,分离的多肽分子可以包含或组成为 SEQ ID NO:25,所述分离的多肽分子包含或组成为 SEQ ID NO:26,其中 SEQ ID NO:26 的第 132 位氨基酸不是亮氨酸 (L) 且第 159 位的氨基酸不是苏氨酸 (T),其中第 132 位氨基酸是半胱氨酸 (C) 且其中第 159 位氨基酸是丙氨酸 (A)。本发明提供了编码分离的多肽的分离的核酸分子,所述分离的多肽包含或组成为 SEQ ID NO:25。优选地,核酸分子包含或组成为 SEQ ID NO:24。

[0019] 本发明提供了本文中描述的任一种分离的多肽分子,其中所述多肽分子编码突变体 Chop2 蛋白,该突变体 Chop2 蛋白形成突变体 ChR2,该突变体 ChR2 响应比野生型 ChR2 蛋白的阈值低的阈值光强度而引发电流。此外,电流传导阳离子。例示性的阳离子包括但不限于 H^+ , Na^+ , K^+ , 和 Ca^{2+} 离子。本文中描述的 ChR2 野生型和突变体蛋白非特异性传导阳离子。因此,电流传导下列一种或多种: H^+ , Na^+ , K^+ , 和 Ca^{2+} 离子。

[0020] 本发明提供了本文中描述的任一种分离的多肽分子,其进一步包含药学可接受载体。本发明还提供了组合物,其包含本文中描述的至少一种分离的多核苷酸分子。组合物可以进一步包含药学可接受载体。

[0021] 本发明提供了分离的核酸分子,其编码本文中描述的任何分离的多肽。此外,分离的核酸分子可以进一步包含药学可接受载体。本发明还提供了组合物,其包含本文中描述的至少一种分离的核酸分子。组合物可以进一步包含药学可接受载体。

[0022] 本发明提供了细胞,其中该细胞已经接触或包含本发明的分离的多肽分子。此外,本发明提供了细胞,其中该细胞已经接触或包含本发明的分离的核酸分子,其编码本发明的分离的多肽分子。本发明提供了组合物,其包含,组成基本上为 (consisting essentially of),或组成为细胞,该细胞包含本发明的分离的多肽分子或编码本发明的分离的多肽分子的核酸分子。本发明的细胞可以在体外,离体,在体内,或原位与分离的多肽或编码多肽的分离的核酸接触。在本发明的某些实施方案中,细胞是光感受器;水平细胞;双极细胞 (bipolar cell);无长突细胞,和特别是 AII 无长突细胞;或视网膜神经节细胞,包括感光性视网膜神经节细胞。优选地,细胞是视网膜神经节细胞,感光性视网膜神经节细胞,双极细胞,ON 型双极细胞,杆状双极细胞,或 AII 无长突细胞。在本发明的某些方面,细胞是光感受器,双极细胞,杆状双极细胞,ON 型锥体双极细胞,视网膜神经节细胞,感光性视网膜神经节细胞,水平细胞,无长突细胞,或 AII 无长突细胞。

[0023] 本发明提供了改善或恢复视觉的方法,其包括对受试者施用本文中描述的任一种组合物。本发明进一步提供了保护视觉的预防方法,其包括对受试者施用本文中描述的任

一种组合物。

[0024] 本文中描述的方法也可以应用于那些健康的盲（部分或完全）的受试者，和 / 或那些患有视网膜变性（以杆状和 / 或锥体光感受器细胞丧失为特征）的受试者，但是可以依赖于感光性视网膜神经节细胞的活性以测定周围光水平。例如，可以使用本文中描述的方法来保护，改善，或恢复感光性视网膜神经节细胞的活性，其介导用于将生理节奏（circadian rhythm）同步到 24 小时光照 / 黑暗周期的光照信息的转换，瞳孔控制和反射，和黑素释放的光调节。

[0025] 在本发明的方法的某些实施方案中，受试者可以具有正常的视觉或受损的视觉。或者 / 另外，受试者可以有风险形成导致视觉损伤的眼科疾病。例如，受试者可以具有眼科疾病，包括黄斑变性（macular degeneration）和色素性视网膜炎（retinitis pigmentosa）的家族史。受试者可以有风险招致眼损伤，其对视网膜中的感光性细胞引起损伤。受试者可以具有遗传标志物或遗传 / 先天性状况，其导致受损的视觉，低视觉，法定盲（legal blindness），部分盲（partial blindness），或完全盲。受试者可以具有屈折缺陷（refractive defect），其导致近视（myopia）（近视眼（near-sightedness））或远视（hyperopia）（远视眼（far-sightedness））。

[0026] 可以对受试者系统或局部施用本发明的方法的组合物。局部施用的优选路径是玻璃体内（intravitreal）注射。

[0027] 本发明的其它特征和优点从以下详细描述和权利要求书看会是显而易见的，并且由以下详细描述和权利要求书涵盖。

[0028] 附图简述

[0029] 图 1 显示了用于比较其光敏感性的 HEK 细胞中来自野生型（WT）ChR2，L132C，L132C/T159C，和 L132C/159S 突变体的光引发电流（light-evoked current）的代表性记录（A）。光刺激（光子 / $\text{cm}^2 \cdot \text{s}$ ，于 460nm）由氙弧灯产生并且通过中性密度滤光片（neutral density filter）减弱：ND4.0 (2.8×10^{14})，ND3.0 (1.4×10^{15})，ND2.5 (4.8×10^{15})；ND2.0 (1.6×10^{16})，ND1.0 (1.3×10^{17})，ND0 (1.2×10^{18})（B）。以不同电流比例显示了相同的电流迹线。以箭头指向的迹线通过相同的光强度（ND2.5）引发。

[0030] 图 2 显示了用于比较其失活时间过程（deactivation time course）（光照关闭后的衰减时间过程）的 HEK 细胞中针对 10ms 光脉冲（ 1.2×10^{18} 个光子 / cm^2/s ，于 460nm）的来自野生型（WT）ChR2，T159C，L132C，L132C/T159C，和 L132C/T159S 突变体的光引发电流的代表性记录。

[0031] 图 3 显示了用于比较其光敏感性的视网膜整装（retinal whole-mount）中来自视网膜神经节细胞的 WT ChR2，L132C，L132C/T159C，和 L132C/T159S 介导的尖峰形成活性（spiking activities）的代表性多通道阵列记录。光刺激（光子 / cm^2/s ）由 473nm 蓝色激光产生，并且通过中性密度滤光片减弱：ND0 (6.3×10^{16})，ND1.0 (7.4×10^{15})，ND1.5 (2.7×10^{15})，ND2.0 (7.3×10^{14})，ND2.5 (3.2×10^{14})，ND3.0 (8.5×10^{13})，ND3.5 (3.8×10^{13})，和 ND4.0 (9.5×10^{12})。

[0032] 图 4 显示了用于比较其时间动态（temporal dynamics）的视网膜整装中来自视网膜神经节细胞的 WT ChR2，L132C，L132C/T159C，和 L132C/T159S 介导的尖峰形成活性的代表性多通道阵列记录。在每个小图中，显示了源自单个光子的 10 个连续光引发尖峰

(light-elicited spike) 的光栅图 (顶部) 和平均尖峰率 (averaged spike rate) 直方图 (底部)。以高于每个突变体的阈值强度约 1 个对数单位的强度通过 473nm 蓝色激光产生不同频率的光脉冲。WT ChR2 和 L132C 的记录显示于 (A), 且 L132C/T159C 和 L132C/T159S 的记录显示于 (B)。

[0033] 发明详述

[0034] 视觉系统

[0035] 中枢神经系统经由视觉系统中存在的特化细胞和信号转导的独特方法介导视觉 (在本文中又称为视力)。视觉系统的原则责任是将电磁辐射形式的光转化成周围世界的画像或图像。在此系统的“视觉”功能外,视觉系统还调节瞳孔光反射 (pupillary light reflex, PLR), 向周期性光照 / 黑暗周期的生理节奏光牵引 (circadian photoentrainment to periodic light/dark cycle), 和激素褪黑素的释放。

[0036] 视网膜的细胞是视觉或神经系统遇到光 (不同波长和强度的电磁辐射) 的第一种细胞。光子在达到视网膜前穿过角膜, 瞳孔, 和晶状体。视网膜由于直接吸收光子的光感受器细胞位于视网膜的外层而具有独特的结构。在达到光感受器细胞 (又称为杆和椎体) 的外层前, 穿过晶状体的光子首先遇到视网膜神经节细胞 (少数视网膜神经节细胞通过表达视蛋白黑视蛋白 (melanopsin) 而为感光性) 的内层和双极细胞的中间层。杆状光感受器在暗淡照明条件 (暗适应视觉) 中起作用, 而椎体光感受器在明亮照明条件 (光适应视觉) 中起作用, 负责颜色视觉。椎体光感受器直接对 ON 和 OFF 型椎体双极细胞上形成突触, 其继而直接对 ON 和 OFF 型视网膜神经节细胞上形成突触。杆状光感受器向杆状双极细胞 (一种独特类型的双极细胞, 其为 ON 型) 形成突触, 所述杆状双极细胞向 AII 无长突细胞形成突触。AII 无长突细胞然后通过缝隙连接对 ON 型椎体双极细胞及通过抑制性甘氨酸能突触对 OFF 型椎体双极细胞及 OFF 神经节细胞中继 (relay) 视觉信号。视网膜神经节细胞负责将视觉信号与脑神经元关联。

[0037] 光转导

[0038] 在视网膜内, 光感受器细胞吸收光子颗粒, 并将光频率和波长的原始数据转化成化学及随后电信号, 其遍及视觉和神经系统传播此种初始信息。具体地, 位于光感受器 (杆状, 椎体, 和 / 或感光性视网膜神经节细胞) 表面上的蛋白质视蛋白吸收光子, 并且启动胞内信号传导级联, 其导致光感受器的超极化。在黑暗中, 蛋白质视蛋白不吸收光子, 光感受器是去极化的。光感受器的视觉信号然后经由双极细胞, 无长突细胞, 和神经节细胞中继到脑的高视觉中心。具体地, 当杆状和椎体光感受器去极化 (在黑暗中) 时, 它们引起杆状双极细胞和 ON 型椎体双极细胞的去极化, 但 OFF 性椎体双极细胞的超极化, 这继而引起 AII 无长突细胞的去极化和 ON 型视网膜神经节细胞的尖峰形成 (spiking) 增加和 OFF 型视网膜神经节细胞的尖峰形成减少。当杆状和椎体光感受器超极化 (响应光) 时, 发生相反的事情 (就杆状, ON 和 OFF 双极细胞, AII 无长突细胞及 ON 和 OFF 神经节细胞而言)。

[0039] 光照信息通过光感受器, 双极细胞, 水平细胞, 无长突细胞, 和视网膜神经节细胞的作用被显著加工和提炼 (refine)。为了增加此系统的复杂性, 光感受器以三种主要种类发现, 包括杆状, 椎体 (其中三类最强烈响应不同的光波长), 和感光性视网膜神经节细胞。因此, 在差异响应某些光波长和强度的光感受器水平发生第一层信息加工。视网膜的双极细胞接受来自光感受器细胞和水平细胞两者的信息。视网膜的水平细胞接受来自多种光

感受器细胞的信息,且因此整合视网膜中细胞类型和穿过距离之间的信息 (information between cell types and across distances in the retina)。双极细胞通过对视网膜神经节细胞产生主要分段电势 (mainly graded potential) 进一步整合直接来自光感受器细胞和水平细胞的信息,尽管一些最近的研究指示一些双极细胞可以产生作用电势。锥体双极细胞在视网膜神经节细胞和无长突细胞上形成突触,而杆状双极细胞仅对 AII 无长突细胞形成突触。类似于水平细胞,大多数无长突细胞在视网膜内侧向整合信息。不同于水平细胞,大多数无长突细胞是抑制性 (GABA 能) 中间神经元。无长突细胞也比水平细胞更为特化,因为每个无长突细胞在特定类型的双极细胞 (双极细胞的 10 个种类之一) 上特异性形成突触。特别地,AII 无长突细胞是杆状途径 (在暗适应视觉下,此时椎体光感受器不响应) 中的一种重要中继神经元。AII 无长突细胞接受来自杆状双极细胞的突触输入,然后将信号捎带确认 (piggy-back) 到如上文描述的从 ON 和 OFF 锥体双极细胞至 ON 和 OFF 神经节细胞的椎体途径。因此,杆状双极细胞或 AII 无长突细胞中的 Chop2 的表达和所得的 ChR2 形成可以在视网膜神经节细胞中创建开启 (ON) 和关闭 (OFF) 响应。此外,视网膜神经节细胞整合来自双极细胞及来自无长突细胞的信息。虽然视网膜神经节细胞就大小,连接性 (connectivity),和对视觉刺激 (例如视野) 的响应而言显著变化,所有视网膜神经节细胞将长的轴突延伸到脑中。除了转导关于瞳孔光反射和生理节奏光牵引的非视觉信息的一小部分视网膜神经节细胞外,从视网膜神经节细胞延伸的全部轴突形成中枢神经系统的视神经,视交叉,和视束。因此,视网膜自身中发生大量的信息加工。

[0040] 光感受器细胞表达内源视蛋白蛋白质,诸如视紫红质。本发明的突变体 Chop2 蛋白可以在任何细胞类型中表达,并且形成功能性 ChR2 通道。优选地,细胞是视网膜细胞。例示性的细胞包括但不限于光感受器细胞 (例如杆状,椎体和感光性视网膜神经节细胞),水平细胞,双极细胞,无长突细胞,和视网膜神经节细胞。

[0041] 通道视蛋白 -2 (Chop2)

[0042] 通道视蛋白 -2 (Chop2) 首次从绿藻莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 分离。通道视蛋白 -2 是一种七跨膜域蛋白质,其在与发色团全反式视黄醛结合时变为光可转换的 (光敏感性)。Chop2 在经由 Schiff 碱连接与视网膜分子连接时形成光门控的,非特异性,内部整流的阳离子通道,称作通道视紫红质 -2 (Channelrhodopsin-2) (Chop2retinalidene,缩写为 ChR2)。

[0043] 如本文中提及的,“通道视蛋白 -2”或“Chop2”指编码通道视蛋白 -2 的基因,所述通道视蛋白 -2 在结合视黄醛后然后形成通道视紫红质 -2 (ChR2)。本发明的基因构建体主要指通道视蛋白 -2 (即,没有视黄醛),并且本文中公开的所有 Chop2 变体形成功能性通道视紫红质 -2 变体。本文中公开的方法可以包括将 Chop2 投递到没有外源视黄醛的细胞。应当理解,在细胞 (即视网膜神经元) 中表达 Chop2 后,内源可用的视黄醛结合野生型 Chop2 或本发明的 Chop2 突变体以形成功能性光门控通道 WT ChR2 或突变体 ChR2。因此,如本文中提及的 Chop2 蛋白与 ChR2 也可以是同义的。

[0044] 如本文中使用的,“通道视紫红质 -2”或“ChR2”指视黄醛结合的功能性光敏感性通道。在一个实施方案中,可以外源提供结合的视黄醛。在一个优选的实施方案中,从细胞中可用的内源水平提供结合的视黄醛。本发明还涵盖由编码本文中描述的 Chop2 突变体的多肽和多核苷酸形成的功能性通道视紫红质 -2 通道。

[0045] 在通过优选剂量的光发射照明后, ChR2 开放通道的孔, H^+ , Na^+ , K^+ , 和 / 或 Ca^{2+} 离子通过该孔从胞外空间流到细胞中。ChR2 通道的活化通常引起表达通道的细胞的去极化。去极化的细胞产生分段电势和或作用电势 (action potential) 以将信息从 Chop2/ChR2 表达细胞携带到视网膜或脑的其他细胞。

[0046] ChR2 的野生型形式或具有高时间分辨率的突变体 ChR2 已经变为神经科学研究的中心焦点。在哺乳动物神经元中表达时, ChR2 介导体外或离体培养物的光控制去极化。野生型 ChR2 或具有高时间分辨率的突变体 ChR2 (后者通常展现出低光敏感性) 提出了使其能够用于视觉恢复目的必须解决的几项挑战。为了视觉恢复, 具有较高光敏感性而非高时间分辨率的 ChR2 是期望的。

[0047] 野生型 ChR2 蛋白需要来自较高蓝光强度的照明以实现完全活化 (即 10^{18} – 10^{19} 个光子 $s^{-1}cm^{-2}$, 于 480nm 的波长)。此类连续照明可以损伤细胞。

[0048] 野生型 ChR2 蛋白的动力学对于使通道效力最大化是次优的。效力可以通过修饰野生型 ChR2 蛋白的一个或多个氨基酸以延长通道的开放状态或者提高通道的单位电导, 或两者提高。野生型 ChR2 的单通道电导是小的。因此, 体内的神经元活化应当需要野生型通道的高表达或用优选的蓝光波长的非常强烈的活化。更简单的解决办法可以通过改变通道电导发现或延长通道开放时间。这些机制的任一种及特别是这些机制的组合使得能使用更低且更安全的光强度达到相同水平的细胞去极化。

[0049] 例如, 本发明的突变体 ChR2 蛋白经由通道开放状态的延长实现更大的光敏感性。因此, 在被相同光强度活化时, 每个突变体 ChR2 通道比野生型 ChR2 通道传导更大的光电流。因此, 突变体通道被比野生型 ChR2 通道活化需要的光强度低的光强度活化。可以通过比引发来自表达野生型 ChR2 的视网膜神经节细胞的尖峰形成活性需要的光强度低 1.5–2 个对数单位的光强度引发表达突变体 ChR2 蛋白的视网膜神经节细胞的数量上可检测的尖峰形成活性。因此, 活化突变体 ChR2 蛋白需要的光强度选择为或落入正常户外光照条件的范围。

[0050] 以下序列提供了野生型和突变体 Chop2 蛋白, 和编码本发明的所述 WT 和突变体 Chop2 蛋白的多核苷酸, 并形成本发明的 WT 和野生型 ChR2 的多核苷酸的非限制性例子。

[0051] 本发明的野生型 (WT) Chop2 可以由以下莱茵衣藻衣视蛋白 4 (chlamyopsin 4) 光门控离子通道 (COP4) mRNA 序列 (GenBank 登陆号 XM_001701673 和 SEQ ID NO:1) 编码:

[0052]

```
1 gcagcaccat acttgacatc tgtcgccaag caagcattaa acatggatta tggaggcgcc
61 ctgagtgccg ttggggcgca gctgctatct gtaacgaacc cagtagtcgt caatggctct
121 gtacttgtgc ctgaggacca gtgttactgc gcgggetgga ttgagtcgct tggcacaaac
181 ggtgccc aaa cggcgctcga cgtgctgcaa tggcttgcgt ctggcttctc catcctactg
241 ctbtatgttt acgcctacca aacatggaag tcaacctgcg gctgggagga gatctatgtg
301 tgcgctatcg agatgggtcaa ggtgattctc gagttcttct togagtttaa gaaccogtcc
361 atgctgtatc tagccacagg ccaecgcgtc cagtgggttg gttacgccga gtgggttctc
421 acctgcccgg tcatctctcat tcaacctgtc aacctgacgg gcttgtccaa cgactacagc
481 aggcgcacca tgggtctctgt tgtgtctgat attggcacia ttgtgtgggg cgcacttcc
541 gccatggcca ccggatagct caaggctatc ttcttctgct tgggtctgtg ttatgggtgt
601 aacacgttct ttacacgtgc caaggctatc atcgagggtt accacaccgt gccgaagggc
661 cgggtgtcgc aggtggtgac tggeatggct tggctcttct tcgtatcatg gggatgttct
```

[0053]

```

721 cccatcctgt tcatectcgg ccccgagggc ttccggcgctc tgagcgtgta cggctccacc
781 gtcgggccaca ccatcattga cctgatgtcg aagaactgct ggggtctgct cggccactac
841 ctgcgcgtgc tgatccacga gcatatcctc atccacggcg acattcgcaa gaccaccaa
901 ttgaacattg gtggcaactg gattgaggte gagacgctgg tggaggacga ggccgaggct
961 ggcgcgggtca acaagggcac cggcaagtac gcctcccgcg agtccttctt ggtcatgcgc
1021 gacaagatga aggagaaggc cattgacgtg cgcgcctctc tggacaacag caaggagggtg
1081 gagcaggagc aggcgcgcag ggcctgccatg atgatgatga acggcaatgg catgggtatg
1141 ggaatgggaa tgaacggcat gaacggaatg ggcggtatga acgggatggc tggcggcgcc
1201 aagcccgccc tggagctcac tccgcagcta cagcccgccc gcgtcatcct ggcggtgccg
1261 gacatcagca tgggtgactt cttccgcgag cagtctgctc agctatcggt gacgtacgag
1321 ctggtgccgg cctggggcgc tgacaacaca ctggcgctgg ttacgcaggc gcagaacctg
1381 ggcggcggtg actttgtgtt gattcacccc gagttcctgc gcgacgctc tagcaccagc
1441 atcctgagcc gcctgcgcgg cgcggggccag cgtgtggctg cgttcggctg ggcgcagctg
1501 gggcccatgc gtgacctgat cgagtcgca aacctggacg gctggctgga gggccctcg
1561 ttcggacagg gcacctgcc ggccacatc gttgccctgg tggccaagat gcagcagatg
1621 cgcaagatgc agcagatgca gcagattgga atgatgaccg gcggcatgaa cggcatgggc
1681 ggcgggtatgg ggcggggcat gaacggcatg ggcggcgcca acggcatgaa caacatgggc
1741 aacggcatgg ggcggggcat gggcaacggc atggcgcgca atggcatgaa cggaatgggt
1801 ggcggcaacg gcataaaca catgggcggc aacggaatgg ccggcaacgg aatggcggc
1861 ggcattggcg gcaacgggat ggggtggctc atgaacggca tgagctccgg cgtggtggcc
1921 aacgtgacgc cctccgcgc cggcggcgat ggcggcatga tgaacggcg catggctgcg
1981 cccagtcgc cggcatgaa cggcggcgc ctgggtacca accgctctt caacgcgcg
2041 cctcacgc tcagctcga gctcgggtgc gaggcaggca tgggcagcat gggaggcatg
2101 ggcggaatga gcggaatggg aggcattggg ggaatggggg gcatggcgcg cgcggcgcc
2161 gccacgacgc aggtgcggg cggcaacggc gaggcggaga tgctgcagaa tctcatgaac
2221 gagatcaatc gcctgaagcg cgagcttggc gagtaaaagg ctggaggccg gtactgcgat
2281 acctgcgagc tcgcgcgcct gactcgtcgt acacacggct caggagcacg cgcgcgtgga
2341 cttctcaacc tgtgtgcaac gtatctagag cggcctgtgc gcgacgctc gtgagcattc
2401 cgggtgcgat ttcgcgcct cgcacgcga gttcccttc tggccctgct gcgcctgacg
2461 catcgtccga acggaagggc ggcttgatca gtaaagcatt gaagactgaa gtcgtgcgac
2521 cgtagtgeta tggctctgca cgtaatggg cgtgccttg cttactacgc attgccaaag
2581 actgcttctt tttgggtggc gaggccttg tccacatca ttcatttgca taacgtactg
2641 tttagttaca taagctttgc ttaacctga caattgcaac atgggctgag agtcgtaag
2701 ggcgctatgg acgaagggtg tatcgatgt gattaggaat ctcggttgaa aggtctcgag
2761 aaagtgagct tcactctgtg cttctgttgg ggtcatcaag aagaacgacg gtaaggcaaa
2821 cgaggtaaaa gtggcacgtc tttgtgcaca acgggcccgt ggagagtggg ggagtgcag
2881 tgtgcggtcc taacacgcga gtgcaaagcg ggctttcttg gagctgggtt acggtctggc
2941 tggcaactg ctctgtgttt taaccacagc ttcgggaagtc tgggtatggt ttgttggcag
3001 aaacatttgg gtaacttgag ggtgattcgt ctggagtcgg acaacatggc tgccgtccgt
3061 gtgcagggac ggtaatcaat gagctggagc tgtgatgctc accacacgct gcataccct
3121 gcttacaaaa acactttgat gtcgtggcca aactatgctg gagcaaagag ttaaagaggc
3181 atgagtgcag ggttggggac gtgcgcaaca attgeatcaa gtatttgacg ccttcaagcc
3241 aacaagtgcg cgcgcggcaa cttgattaac acgcgggacg cagtgggtggg ggcgtgtaca
3301 gtgtttatga gctgccatc tgcgatccgt agtggttaggt tgcgtgtgac gccgcgcggc
3361 tgtgggccc taccatggaga gttgggtgct tcaccacagc gttggcgccg ctgaagggtg
3421 tctatgttt tggtaaagcc ggggccctga agaccgcaac cgtagaaccg tactgaaagg
3481 gtgtcagccc ggggtaactg gatgccctgg gacatagcta ttaatgttga agtgaagccg
3541 tcaagccgag tgcggtgcgc cgtgtatca ccaaggccc tctca

```

[0054] 本发明的野生型 (WT) ChR2 可以由以下莱茵衣藻衣视蛋白 4 光门控离子通道 (COP4) 氨基酸序列 (GenBank 登录号 XP_001701725, 和 SEQ ID NO:2) 编码:

[0055]

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edgcycagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyycaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcbp ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwqatsamat gyvkviffcl
181 gleygantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawllf vswgmfpilf ilgpegfgvl

```

[0056]

```

241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklmig gteievetlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammmmn
361 gngmgmgmgm ngmgmgmgmn gmaggakpgl eltpqlqpgv vilavpdism vdfreqfag
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlihpelr drsstsilsr lrgagqrva
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfgqg ilpahivalv akmqgmrmkq qmqqigmmtg
541 gmgmgggmgg gmgmgmgggn gmnmgmgmgg gmgmgmgggn gmgmgggng mnmggngma
601 gngmgggmgg ngmggsmngm ssgvvanvtp saaggmggmm nggmaapqsp gmgggrlgt
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmggms gmgmgggmgg mggagaattq aaggnaeae
721 lqnlmneinr lkrelge

```

[0057] 本发明的野生型 (WT) Chop2 可以由以下莱茵衣藻视黄醛结合蛋白 (cop4) 基因序列 (GenBank 登录号 AF461397, 和 SEQ ID NO:3) 编码:

[0058]

```

1 gcattctgtcg ccaagcaagc attaaacatg gattatggag gcgccttgag tgccgttggg
61 cgcgagctgc tatttgtaac gaaccagta gtgcgtaatg gctctgtact tgtgcctgag
121 gaccagtgtt actgcgegggt ctggattgag tcgcgtggca caaacgggtgc ccaaacggcg
181 tggaaacgtgc tggcaatggct tgcctgctggc ttctccatcc tactgcttat gttttacgce
241 taccaaacat ggaagtcaac ctgcggctgg gaggagatct atgtgtgcgc tatcgagatg
301 gtcaagggtga ttctcagatt cttcttcgag tttaagaacc cgtccatgct gtatctagec
361 acaggccacc gcgtccagtg gttgcgttac gccgagtggc ttctcacctg ccgggtcatt
421 ctcatccacc tgtcaaacct gacgggcttg tccaaacgact acagcaggcg caccatgggt
481 ctgcttctgt ctgatatctg cacaattgtg tggggcgcca ctccgcccat ggccacggga
541 taagtcaagg tcatctctct ctgcctgggt ctgtgttatg gtgctaacac gttctttcac
601 gctgccaaag cctacatcga ggggtaccac acogtgccga agggccgggtg tegccagggtg
661 gtgactggca tggcttggct cttcttcgta tcatggggta tgttccccat cctgttcate
721 ctccggcccg agggcttcgg cgtcctgagc gtgtacggct ccacgctcgg ccacaccate
781 attgacctga tgtcgaagaa ctgctggggc ctgctcggcc actacctgog cgtgctgate
841 caccagcata tctcctatca cggcgacatt cgcaagacca ccaaattgaa cattggtggc
901 actgagattg aggtcgagac gctggtggag gacgagggcg aggtggcgc ggtcaacaag
961 ggcacccggc agtacgcctc ccgcgagtc ttcttggtca tgcgcgacaa gatgaaggag
1021 aagggcattg acgtgcgcgc ctctctggac aacagcaagg aggtggagca ggagcaggcc
1081 gccagggctg ccatgatgat gatgaacggc aatggcatgg gtatgggaat gggaatgaac
1141 ggcaggaacg gaatggggcg tatgaacggg atggctggcg gcgccaagcc cggcctggag
1201 ctcaactccg agctacagcc cggccgcgtc atcctggcgg tgccggacat cagcatgggt
1261 gacttcttcc gcgagcagtt tgctcagcta tcgggtgacgt acgagctggg gccggccctg
1321 ggcgctgaca acacactggc gctggttacg caggcgcgag acctggggcg cgtggacttt
1381 gtgttgatgc accccgagtt cctgcgcgac cgctctagca ccagcatcct gacccgctg
1441 cgcggcgcgg gccagcgtgt ggctgcgttc ggctgggccc agctggggcc catgctgac
1501 ctgatcgagt ccgcaaacct ggacggctgg ctggagggcc cctcgctcgg acagggcatc
1561 ctgcgggccc acatcgcttc cctgggtggc aagatgcagc agatgcgcaa gatgcagcag
1621 atgcagcaga ttggcatgat gaccggcggc atgaacggca tggggcgggg tatggggcg
1681 ggcattgaac gcatggggcg cggcaacggc atgaacaaca tgggcaacgg catggggcg
1741 ggcattggga acggcatggg cggcaatggc atgaacggaa tgggtggcg caacggcatg
1801 aacaacatgg gcggcaacgg aatggccggc aacggaatgg gcggcgccat gggcggaac
1861 ggtatgggtg gctccatgaa cggcatgagc tccggcgtgg tggccaaagt gacgccttc
1921 gccgcggcg gcatggggcg catgatgaac ggccggcatg ctgcgcccc gtcgcccggc
1981 atgaacggcg gccgcctggg taccaccccg ctcttcaacg ccgcgcctc accgctcagc
2041 tcgcagctcg gtgcggaggg aggcattggg agcatgggag gcatggggcg aatgagcgga
2101 atgggaggca tgggtggaat gggggcgatg ggccggcgcc gcgcccac gacgcaggct
2161 gcggggcgga acgcggaggg ggagatgctg cagaatctca tgaacgagat caatcgctg
2221 aagcgcgagc ttggcgagta a

```

[0059] 本发明的野生型 (WT) Chop2 可以由以下莱茵衣藻视黄醛结合蛋白 (cop4) 氨基酸序列 (GenBank 登录号 AAM15777, 和 SEQ ID NO:4) 编码:

[0060]

1 mdyggalsav grellfvtnp vvvngsvlvp edqcyagwi esrgtngaqt asnvlqwlai
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weelyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr

[0061]

121 yaewlltcbv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigi vwgatsamat gyvkviffcl
181 glcygantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklnig gteievetlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskevegeq aaraammmmn
361 gngmgmgmgm ngmngmggm gmaggakpgl eltpqlqpgr vilavpdism vdfreqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlihpeflr drsstsilsr lrgagqrva
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfgqg ilpahivalv akmqqmrmq qmqqigmmtg
541 gmngmgggmg ggmngmggn gmnmgngmg ggmngmggn gmngmgggng mnmggngma
601 gngmgggmg ngmggsmng ssgvvanvtp saaggmgmm nggmaapqsp gmgggrlgt
661 plfnaapsl ssqgaeagm gsmggmgms gmgmgmgmg mggagaattq aaggnaeae
721 lqnlmneinr lkrelge

[0062] 本发明的野生型 (WT) Chop2 可以由以下莱茵衣藻感觉视蛋白 B (CSOB) mRNA 序列 (GenBank 登录号 AF508966, 和 SEQ ID NO:5) 编码:

[0063]

1 ttgacatctg tcgccaagca agcattaaac atggattatg gaggcgcctt gaggcgccgtt
61 gggcgcgagc tgcattttgt aacgaaccca gtatgcgtca atggctctgt acttggtgctt
121 gaggaccagt gttactgcgc gggctggatt gagtcgcgtg gcacaaacgg tgcccaaacg
181 gcgtcgaaac tgctgcaatg gcttgctgct ggcttctcca tcctactgct tatgttttac
241 goctaccaaa catggaagtc aacctgcggc tgggaggaga tctatgtgtg cgtatcagag
301 atgggtcaagg tgattctcga gttcttcttc gagtttaaga acccgtecat gctgtatcta
361 gccacaggcc acccgctcca gtgggttgct taacgcgagt ggcttctcac ctgcccggtc
421 attctcattc acctgtcaaa cctgacgggc ttgtccaacg actacagcag gcgcaccatg
481 ggtctgcttg tgtctgatat tggcacaatt gtgtggggcg ccacttcgcg catggccacc
541 ggatacgtca aggtcatctt cttctgcctg ggtctgtgtt atgggtgctaa cacgttcttt
601 cacgctgcc aaggctacat cgagggttac cacacgctgc cgaaggcgcg gtgtcgccag
661 gtgggtgactg gcatggcttg gctcttcttc gtatcatggg gtatgttccc catcctgttc
721 atcctcggcc ccgagggtt cggtctctcg agcgtgtacg gctccacgt cgccacacc
781 atcattgacc tgatgtcgaa gaactgctgg ggtctgctcg gccactacct gcgctgctg
841 atccacgagc atatctcat ccacggcgac attcgcaaga ccaccaaatt gaacattggt
901 ggcactgaga ttgaggctga gacgctggtg gaggacgagg ccgaggctgg cgcggtcaac
961 aagggcaccg gcaagtaagc ctcccgagag tcttctctgg tcatgcgcga caagatgaag
1021 gagaagggca ttgacgtgag cgcctctctg gacaacagca aggagggtga gcaggagcag
1081 gccgcccagg ctgccatgat gatgatgaac ggcaatggca tgggtatggg aatgggaatg
1141 aacggcatga acggaatggg cggtatgaac gggatggctg gcggcgccaa gcccggtctg
1201 gagctcactc cgcagctaca gccggcgccg gtcatctctg cgggtgcgga catcagcatg
1261 gttgacttct tcgcgagcga gtttgcctag ctatcgggtg cgtacgagct ggtgccggcc
1321 ctgggcgctg acaacacact ggctgtggtt acgcaggcgc agaacctggg cggcgtggac
1381 tttgtgttga ttcacccoga gttctgcgc gacgctcta gcaccagcat cctgagccgc
1441 ctgcgcggcg cgggcccagc tgtggctgcg ttcggctggg cgcagctggg gcccatgcgt
1501 gacctgatcg agtcgcgcaa cctggacggc tggctggagg gccctcgtt cggacagggc
1561 atcctgcggg ccacatcgt tgccctggtg gccaatgagc agcagatgcg caagatgcag
1621 cagatgcagc agattggcat gatgaccggc ggcattgaac gcatgggcgg cggtatgggc
1681 ggcggcattga acggcatggg cggcgccaac ggcattgaaca acatgggcaa cggcatgggc
1741 ggcggcattg gcaacggcat gggcgccaat ggcattgaac gaatgggtgg cggcaacggc
1801 atgaacaaca tgggcggcaa cggaatggc ggcaacggaa tgggcggcg catgggcggc
1861 aacggtatgg gtggctccat gaacggcatg agctccggcg tggtgcccaa cgtgacgccc
1921 tccgcgcggg gcggcatggg cggcatgatg aacggcgcca tggctgcgcc ccagtcgccc
1981 ggcattgaac gcggcgccct gggtagcaac ccgtcttca acgcgcgcgc ctcaccgctc
2041 agctcgcagc tcggtgcgca ggcaggcatg ggcagcatgg gaggcatggg cggaatgagc
2101 ggaatgggag gcatgggtgg aatggggggc atgggcggcg ccggcgccgc cagcagcag
2161 gctgcggggc gcaacgcgga ggcggagatg ctgcagaatc tcatgaacga gatcaatcgc
2221 ctgaagcgcg agcttggcga gtaaaaggct ggaggccggt actgcgatac ctgcgagctc
2281 gcgcgcctga ctgcgtgtac acacggctca ggagcacgcg cgcgtggact totcaacctg
2341 tgtgcaacgt atctagagcg gcctgtgcgc gacogtccgt gagcattccg gtgcgactct
2401 cccgccttcg caccgcaagt tcccttctcg gccctgctgc gctgacgca tcgtccgaac
2461 ggaaggcgcg cttgatcagt aaagcattga agactgaagt cgtgcgaccg tagtgctatg
2521 gctctgcaag taagtgggag ctgcctctgt tactacgcat tgcccaagac tgccttcttt

[0064]

```

2581 tgggtggccga ggccttggtc ccacatcatt catttgcata acgtactggt tagttacata
2641 cgcttttgctt aacctegaca attgcaacat gggctgagag tccgtacggc ggctatggac
2701 gaaggtgtta tcggatgtga ttaggaatct cggttgaaag gcttcagaaa agtgagcttc
2761 ttctgtgggt tctgttgggg tcatcaagaa gaacgacggt aaggcaaacg aggtaaaagt
2821 ggcacgtctt tgtgcacaac gggcccgtgg agagtggggg agtgcatgtg tgcggtccta
2881 acacgegagt gcaaagcggg cttttctgga gctgggttac ggtctggctc ggcaactgct
2941 ctgtgtttta accacagott cggaaagtct ggatatgttt gttggcagaa acatttgggt
3001 aaacttgagg tgatttgtct ggagtcggac aacatggctg ccgtccgtgt gcagggacgg
3061 taatcaatga agctgaagct gtgatgctca ccacacgttg cataccctgt cttacaaaaa
3121 cactttgatg tcgtggccaa actatgcgtg agcaaagagt taaagaggca tgagtgcagt
3181 gttgcggacg tgcgcaacaa ttgcatcaag tatttgacgc cttcaagcca acaagtgcgc
3241 ggcgcggcaac ttgattaaca cgcgggacgc agtggtgggg gcgtgtacag tgtttatgag
3301 ctgccattct gcgatccgta gtgttaggtt gcgtgtgacg ccgcgcggct gtgggccctt
3361 acatggagag ttgggtgctt caccacacgg ttggcgccgc tgaaggtgtt gctatgtttt
3421 ggtaaaagcc gggccctgaa gaccgcaacc gtagaaccgt actgaaaggg tgtcagcccg
3481 gggtaactgg atgccctggg acatagctat taatgttgaa gtgaagccgt caagccgagt
3541 gccgtgcgcc gctgtatcac caaggcccg ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

[0065] 本发明的野生型 (WT) Chop2 可以由以下莱茵衣藻感觉视蛋白 B (CSOB) 氨基酸序列 (GenBank 登录号 AAM44040, 和 SEQ ID NO:6) 编码：

[0066]

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqcyagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcpv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl
181 glcygantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklmig gteievettlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammmmmn
361 gngmgmgmgm ngmngmggmn gmaggakpgl eltpqlqpgr vilavpdism vdfvreqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlihpeflr drsstsilsr lrgagqrva
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfggg ilpahivalv akmqqmrmkq qmqqigmmtg
541 gmgmgggmgg gmgmgmgggn gmnmgngmgg gmgmgmgggn gmgmgggngg mnmggngma
601 gmgmgggmgg ngmggsmngm ssgvvanvtp saaggmggmm nggmaapqsp gmgggrlgtn
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmggms gmgmgmgmgg mggagaattq aaggnaeaem
721 lqnlmneinr lkrelge

```

[0067] 本发明的野生型 (WT) Chop2 可以由古细菌型视蛋白 2 核酸序列 (GenBank 登录号 AB058891, 和 SEQ ID NO:7) 的以下莱茵衣藻 acop2mRNA 编码：

[0068]

```

1  catctgtcgc caagcaagca ttaaacaatgg attatggagg cgcoctgagt gccgttgggc
61  gcgagtgtct atttgtaacg aaecacagtag tcgtcaatgg ctctgtactt gtgcctgagg
121 accagtggtta ctgcgcgggc tggattgagt cgcgtggcac aaacgggtgcc caaacggcgt
181 cgaacgtgtct gcaatggctt gctgctggct tctccatcct actgcttatg ttttacgcct
241 accaaacatg gaagtcaacc tgcggctggg aggagatcta tgtgtgcgct atcgagatgg
301 tcaagggtgat tctcgagtto ttcttcgagt ttaagaaccc gtccatgctg tatctagcca
361 caggccacccg cgtccagtgg ttgcgttacg ccgagtggct tctcacctgc cgggtcattc
421 teattcacct gtcaaacctg acgggcttgt ccaacgaeta cagcaggcgc accatgggtc
481 tgcttgtgtc tgatattggc acaattgtgt ggggcgcac ttcgcocatg gccaccggat
541 acgtcaaggt catcttcttc tgcttgggtc tgtgttatgg tgctaacacg ttctttcacg
601 ctgccaaggc ctacatcgag ggttaccaca ccgtgcgcaa gggcgggtgt cgcaggtgg
661 tgactggcat ggcttggctc ttcttcgtat catggggtat gtccccatc ctgttcattc
721 tgggccccga gggcttcggc gtccatgagc tgtaacggct caccgtcggc cacaccatca
781 ttgacctgat gtcaagaac tgctgggttc tgctcggcca ctacctgcgc gtgctgatcc
841 acgagcatat cctcatccac ggcgacattc gcaagaccac caaattgaac attggtggca
901 ctgagattga ggtcgagacg ctggtggagg acgaggccga ggctggcgcg gtcaacaagg
961 gcaccggcaa gtacgcctcc cgcgagtcc tcttggctat gcgcgacaag atgaaggaga
1021 agggcattga cgtgcgcgcc tctctggaca acagcaagga ggtggagcag gagcaggccg
1081 ccagggtctc catgatgatg atgaacggca atggcatggg tatgggaatg ggaatgaacg
1141 gcatgaacgg aatgggcggg atgaacggga tggctggcgg cgccaagccc ggcttggagc

```

[0069]

```

1201 tcaotccgca gctacagccc ggccgcgctc tcttggcggg gccggacato agcatggttg
1261 aettcttccg cgagcagttt gctcagctat cgggtgacga cgagctgggt cgggccttgg
1321 gcgctgacaa cacactggcg ctggttacgc aggcgcagaa cctgggcggc gtggactttg
1381 tgttgattca ccccgagtto ctgcgcgacc gctctagcac cagcatcctg agccgcctgc
1441 ggggcgcggg ccagcgtgtg gctgcgttcg gctgggcgca gctggggccc atgctgacc
1501 tgatcgagtc cgcacaacct gacggctggc tggaggggcc ctcttctgga cagggcattc
1561 tgcgcgcccc catcgttgcg ctggtggcca agatgcagca gatgcgcaag atgcagcaga
1621 tgcagcagat tggcatgatg accggcgcca tgaacggcat gggcggcggt atgggcggcg
1681 gcatgaacgg catgggcggc ggcaacggca tgaacaacat gggcaacggc atgggcggcg
1741 gcatgggcaa cggcatgggc ggcaatggca tgaacggaat gggtggcggc aacggcatga
1801 acaacatggg cggcaacgga atggcgcgca acggaatggg cggcggcagt ggcggaacg
1861 gtatgggtgg ctccatgaac ggcattgagc ccggcgtggg ggccaacgtg acgcccctcg
1921 ccgcggcgcg catgggcggc atgatgaacg gcggcatggc tgcgccccag tgcgccggca
1981 tgaaocggcg ccgcctgggt accaaccgcg tcttcaacgc cgcgccctca ccgctcagct
2041 cgcagctcgg tgccgaggca ggcattggga gcatgggagg catgggcgga atgagcggaa
2101 tgggaggcat ggggtggaatg gggggcatgg gcggcgccgg cgcgcacacg acgcaggctg
2161 cgggcggcaa cgcggaggcg gagatgctgc agaattctat gaacgagato aatcgcttga
2221 agcgcgagct tggcgagtaa aaggctggag gccggtactg cgatacctgc gagctcgcgc
2281 gcctgactcg tcgtacacac ggctcaggag cagcgcgcgc tggacttctc aacctgtgtg
2341 caacgtatct agagcggcct gtgcgcgacc gtccgtgagc attccggtgc gatcttcccg
2401 ccttcgcacc gcaagttccc ttcttggccc tgctgcgcct gacgcate

```

[0070] 本发明的野生型 (WT) Chop2 可以由古细菌型视蛋白 2 氨基酸序列 (GenBank 登录号 BAB68567, 和 SEQ ID NO:8) 的以下莱茵衣藻 acop2mRNA 编码:

[0071]

```

1  mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqcyagwi esrgtngaqt asnylqwlaa
61  gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcbv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviiffcl
181 glcygantff haakayiegy htpkggrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklng gteievetlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammmnn
361 gngmgmgmgm ngmngmggmn gmaggakpgl eltpqlqpgr vilavpdism vdfreqfqaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlihpelr drsstsilsr lrgagqrva
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfggg ilpahivalv akmqgmrmq gmqqigmntg
541 gmngmgggmg ggmngmgggn gmnmgngmg ggmngmgggn gmngmgggng mnmggngma
601 gngmgggmg ngmggsmngm ssgvvanvtp saaggmggm nggmaapqsp gmnggrlgt
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmggms gmggmgggmg mggagaattq aaggnaeem
721 lqnlmneinr lkrelge

```

[0072] ChR2 突变体

[0073] 本发明提供了 Chop2 突变体, 其中一个或多个氨基酸是突变的。在一些实施方案中, Chop2 是具有至少一个氨基酸突变的全长多肽, 诸如 SEQ ID NO:2, 4, 6, 和 8。在一些实施方案中, 突变在氨基酸 132 和 / 或氨基酸 159 处。在一些优选的实施方案中, 第 132 位氨基酸从亮氨酸突变为半胱氨酸或丙氨酸。在一些优选的实施方案中, 第 159 位氨基酸从苏氨酸突变为丙氨酸, 半胱氨酸, 或丝氨酸。在所有实施方案中, Chop2 突变体形成功能性 ChR2 通道。

[0074] 本发明还涵盖 Chop2 蛋白和编码 Chop2 的生物学活性片段或保守氨基酸取代或其它突变变体的核酸。有用片段的非限制性例子包括编码野生型 Chop2 (即 SEQ ID NO:26) 的氨基酸 1-315 的多肽, 其中至少一个氨基酸是突变或保守取代的, 例如在氨基酸位置 132 和 / 或 159。野生型 Chop2 的较小片段, 其中至少一个氨基酸是突变或保守取代的 (即在氨基酸位置 132 和 / 或 159), 也可用于本发明。因而, 本发明的 Chop2 多肽和核酸进一步包括但不限于编码野生型 Chop2 的氨基酸 1-315, 1-310, 1-300, 1-275, 1-250, 1-225, 1-200, 1-175, 或 1-160 的生物学活性片段, 其中至少一个氨基酸是突变或保守取代的, 例如在氨基酸位置 132 和 / 或 159。在其它实施方案中, 本发明的 Chop2 多肽和核酸可以多达或约长 315 个氨基酸, 长 310 个氨基酸, 长 300 个氨基酸, 长 275 个氨基酸, 长 250 个氨基酸, 长 225 个氨基酸, 长 200 个氨基酸, 长 175 个氨基酸, 或长 160 个氨基酸。

[0075] 本发明的单一突变体 Chop2 可以由以下合成构建体 hVChR1-mKate-betahChR2(L132C) 基因序列 (GenBank 登录号 JN836746, 和 SEQ ID NO:9) 编码, 具有以下注释, GFP 序列为粗体, L132C Chop2 序列是有下划线的:

[0076]

```

1  atggattacc  ctgtggcccg  gtccctgatt  gtaagatacc  ccaccgatct  gggcaatgga
61  accgtgtgca  tgcccagagg  acaatgctac  tgcgaggggt  ggctgaggag  cgggggcact
121 agtategaaa  aaaccatcgc  tatcaccctc  cagtgggtag  tgttcgtctc  gtccgtagcc
181 tgtctcggct  ggtatgcata  ccaagcctgg  agggctacct  gtgggtggga  ggaagtatac
241 gtggccctga  tcgagatgat  gaagtccatc  atcgaggctt  tccatgagtt  cgactcccca
301 gccacactct  ggctcagcag  tgggaatggc  gtagtgtgga  tgagatatgg  agagtggctg
361 ctgacctgtc  ccgtcctgct  cattcatctg  tccaatctga  ccgggctgaa  agatgactac
421 tccaagagaa  caatgggaet  gctggtagat  gacgtggggt  gtatttgttg  gggagccacc
481 tccgccatgt  gcactggatg  gaccaagatc  ctctttttcc  tgatttccct  ctccataggg
541 atgtatacat  acttccacgc  cgctaagggt  tatattgagg  ccttccacac  tgtacctaaa
601 ggcatctgtg  gggagctcgt  gcgggtgatg  gcatggacct  tcttttgtgg  ctgggggatg
661 ttecccggtg  tgttcctcct  cggcactgag  ggatttggec  acattagtcc  ttacgggtcc
721 gcaattggac  actccatcct  ggatctgatt  gccagaata  tgtgggggtg  gctgggaaat
781 tatctgcggg  taaagatcca  cgagcatatc  ctgctgtatg  gcgatatcag  aaagaagcag
841 aaaatcacca  ttgctggaca  ggaaatggag  gtggagacac  tggtagcaga  ggaggaggac
901 gggaccgcgg  tegccaccat  ggtgtctaag  ggogaagagc  tgattaagga  gaacatgcac
961 atgaagctgt  acatggaggg  caccgtgaac  aaccaccact  tcaagtgcac  atccgagggc
1021 gaaggcaagc  cctacgaggg  caccagacc  atgagaatca  aggtggctga  gggcggccct
1081 ctccccttcg  ccttcgacat  cctggctacc  agcttcatgt  acggcagcaa  aaccttcac
1141 aaccacaccc  agggcatacc  cgacttcttt  aagcagtcct  tccctgaggg  cttcacatgg
1201 gagagagtca  ccacatacga  agacgggggc  gtgctgaccg  ctaccagga  caccagcctc
1261 caggacggct  gcctcatcta  caacgtcaag  atcagagggg  tgaacttccc  atccaacggc
1321 cctgtgatgc  agaagaaaac  actcggctgg  gaggcctcca  ccgagatgct  gtaccccgct
1381 gacggcgggc  tggaaggcag  agccgacatg  gcctgaagc  tcgtggggcg  gggccacctg
1441 atctgcaact  tgaagaccac  atacagatcc  aagaaacccg  ctaagaacct  caagatgccc
1501 ggcgtctact  atgtggacag  aagactggaa  agaatcaagg  aggccgacaa  agagacctac
1561 gtcgagcagc  acgaggtggc  tgtggccaga  tactgcgacc  tccttagcaa  actggggcac
1621 aaacttaatt  gcctgcagga  gaagaagtea  tgcagccage  gcatggccga  attccggcaa
1681 tactgttgga  acccggacac  tgggcagatg  ctgggcgcga  ccccagcccg  gtgggtgtgg
1741 atcagcctgt  actatgcage  tttctacgtg  gtcatgaact  ggctctttgc  cttgtgcate
1801 tatgtgctga  tgcagaecat  tgatccctac  acccccgact  accaggacca  gttaaagtca

```

[0077]

```

1861 cggggggtaa  ccttgagacc  ggatgtgtat  ggggaaagag  ggctgcagat  ttcctacaac
1921 atctctgaaa  acagctctag  acaggcccag  atcaccggac  gtccggagac  tgagacattg
1981 ccaccggtgg  actacggggg  ggccctgagc  gctgtgggca  gagaactcct  gttcgtgaca
2041 aatccagtcg  tggtgaacgg  ctccgtactc  gtacccgagg  atcagtgcct  ttgcgcagga
2101 tggatcgaga  gcagaggcac  aaacggcgca  cagaactgcat  ccaacgtgct  ccagtggttg
2161 gccgcaggct  tttccattct  cctgctcatg  ttttaagcct  accagaactg  gaagtccaca
2221 tgtggctggg  aggaaatcta  cgtgtgtgca  atcgaaatgg  tgaagggtgat  cctggagtgt
2281 ttcttcgaat  ttaaaaacco  aagcatgctg  tacctggcta  ctggccacag  agtgcagtgg
2341 ctgcggtatg  ccgaatggct  gctgacttgc  ccagtgattt  gcateccact  gtccaacctg
2401 actgggctgt  ctaacgatta  cagtaggaga  acaatgggac  tgctcgtata  cgacatcggc
2461 actatcgtat  ggggcgcaac  tagtgccatg  gccactggat  acgtgaaagt  gatcttcttc
2521 tgcctgggac  tctgctacgg  agcaaacaca  ttttttcatg  ccgcaaaagc  atatatcgag
2581 gggtatcata  ccgtcccaaa  gggcgggtgt  agacaagtgg  tgactggcat  ggcttggctg
2641 ttcttcgtgt  cctgggggat  gtttcccatc  ctctttatcc  tgggccacga  aggettcggg
2701 gtgctgagtg  tgtatggcag  taccgtagga  cacaactatc  ttgacctgat  gagcaaaaac
2761 tgttgggggc  tgtctggcca  ctacctgaga  gtactcatec  acgagcatat  cctgattcat
2821 ggcgatatcc  ggaaaactac  caagctcaat  atcgggggca  ccgagattga  agtggagaca
2881 ctcgtggagg  acgaggccga  ggccggagca  gtgaacaaag  gcaactggca  gtatgcctcc
2941 agagaatcct  ttctgggtgat  gcgggacaaa  atgaaggaga  aaggcattga  tgtacgggtgc
3001 agtaatgcca  aagccgtoga  gactgatgtg  tag

```

[0078] 本发明的单一突变体 ChR2 可以由以下合成构建体 hVChR1-mKate-betahChR2(L132C) 氨基酸序列 (GenBank 登录号 AER29839, 和 SEQ ID NO:10) 编码, 具有以下注释, GFP 序列为粗体, L132C Chop2 序列是有下划线的:

[0079]

```

1 mdypvarsli vryptdlng tvcmprgqcy cegwlrsgt siektiaitl qwvfvalsva
61 clgwyayqaw ratcgweevy valiemmsi ieafhefdsp atlwlssgng vwmrygewl
121 ltcpllihl snltglkddy skrtmgllvs dvgcivwgt samctgwtki lfflislsyg
181 mytyfhaakv yieafhtvpk gicrelvrvm awtffvawgm fpvlfllgte gfgghispygs
241 aighsildli aknmwgvlg ylrvihehi llygdirkkq kitiaggeme vetlvaeed
301 gtavatmvsk geelikenmh mklymegtvn nhhfktseg egkpyegtqt mrikvveggp
361 lpfafdilal sfmygsktfi nhtqgipdff kqsfpegtftw ervttyedgg vltatqdtsl
421 qdgcliynvk irgvnfpsng pvmqkktlgw eastemlypa dgglegradm alklvggghl
481 icnlkttys kkpaknlkmp gvyyvdrle rikeadkety veqhevavar ycdlpsklgh
541 klnclqekks csqrmaefrq ycnwpdtgqm lgrtparvwv islyyaafyv vmtglfalci
601 yvlmqtidpy tpdydqqlks pgvtlrpdvy gerglqisyn isenssrqaq itgrpetetl
661 ppvdyggals avgrellfvt npvvvngsvl vpedqcycag wiesrgtnga qtasnlqlwl
721 aagfsilllm fyaygtwkst cgweeiyyca iemkvilef ffefknpsml ylatghrvqw
781 lryaewlltc pvicihlsnl tglsndysrr tmgllvsdig tivwgatsam atgyvkviff
841 clglcygant ffhaakayie gyhtvpkgrc rqvvtgmawl ffvswgmfp lfilgpegfg
901 vlsvygstvg htiidlmskn cwgllghylr vlihehilih gdirkttkln iggteievet
961 lvedeaeaga vnkgtgkyas resflvmrdk mkekgidvrc snakavetdv

```

[0080] 本发明的单一突变体 Chop2 可以由以下合成构建体 hVChR1-mKate-betahChR2(L132C) 基因序列 (GenBank 登录号 JN836745 和 SEQ ID NO:11) 编码, 具有以下注释, GFP 序列为粗体, L132C Chop2 序列是有下划线的:

[0081]

```

1 atggattacc ctgtggcccg gtccctgatt gtaagatacc ccaccgatct gggcaatgga
61 accgtgtgca tgcccagagg acaatgctac tgcaggggt ggctgaggag cgggggcaact
121 agtatcgaaa aaaccatcgc taccacctc cagtgggtag tgttgcctct gtccgtagcc
181 tgtctcggct ggtatgcata ccaagcctgg agggctacct gtgggtggga ggaagtatac
241 gtggccctga tcgagatgat gaagtccatc atcgaggctt tccatgagtt cgaactccca

```

[0082]

```

301 gccacactct ggctcagcag tgggaatggc gtagtggtga tgagatatgg agagtggctg
361 ctgacctgtc ccgtectgct cattcatctg tccaatctga ccgggctgaa agatgactac
421 tccaagagaa caatgggact gctggtgagt gaactggggg gtattgtgtg gggagccacc
481 tccgccatgt gcaactggatg gaccaagatc ctctttttcc tgatttccct ctcctatggg
541 atgtatacat acttccacgc cgctaagggt tatattgagg ccttccacac tgtacctaaa
601 ggcactctgt gggagctcgt gcgggtgatg goactggacct tctttgtggc ctgggggatg
661 ttecccggtg tgttctctct cggaactgag ggatttggcc acattagtcc ttacgggtcc
721 gcaattggac actccatcct ggatctgatt gccagaata tgtggggggg gctgggaaat
781 tatctgcggg taaagatcca cgagcatatc ctgetgtatg gcgatatcag aaagaagcag
841 aaaatcaoca ttgctggaca ggaaatggag gtggagacac tggtagcaga ggaggaggac
901 gggaccggg tcgccaccat ggtgtctaag ggogaagagc tgattaagga gaacatgcac
961 atgaagctgt acatggaggg caccgtgaac aaccaccact tcaagtgcac atccgagggc
1021 gaaggcaagc cctacgaggg caccagacc atgagaatca aggtggtcga gggcgccct
1081 ctccccctcg ccttcgacat cctggtacc agcttcatgt acggcagcaa aaccttcac
1141 aaccacaccc agggcatccc cgacttcttt aagcagtcct tccctgaggg cttcacatgg
1201 gagagagtca ccacatacga agacgggggc gtgctgaccg ctaccagga caccagctc
1261 caggacggct gcctcatcta caacgtcaag atcagagggg tgaacttccc atccaacggc
1321 cctgtgatgc agaagaaaac actcggctgg gaggcctcca ccgagatgct gtaccccgct
1381 gacggcggcc tgggaaggcag agccgacatg gccctgaagc tcgtggggcg gggccacctg
1441 atctgcaact tgaagaccac atacagatcc aagaaacccg ctaagaacct caagatgcc
1501 ggcgtctact atgtggacag aagactggaa agaatacagg aggccgacaa agagacctac
1561 gtcagagcagc acgaggtggc tgtggccaga tactgcgacc tccctagcaa actggggcac
1621 aaacttaatt gcctgcagga gaagaagtea tgcagccagc gcattggcca attccggcaa
1681 tactgttgga acccgacac tgggcagatg ctgggcccga cccagoccg gtgggtgtgg
1741 atcagocctgt actatgcagc tttctacgtg gtcatgactg ggctotttgc cttgtgcac
1801 tatgtgetga tgcagaccat tgatccctac acccccgact accaggacca gttaaagtca
1861 cegggggtaa ccttgagacc ggatgtgtat ggggaaagag ggetgcagat ttctacaac
1921 atctctgaaa acagctctag acaggcccag atcacgggac gtcoggagac tgagacattg
1981 ccaccgggtg actacggggg ggcctgagc gctgtgggca gagaactcct gttcgtgaca
2041 aatccagtcg tgggtgaacgg ctccgtactc gtacccgagg atcagtgcata ttgcgcagga
2101 tggatcgaga gcagaggcac aaacggcgca cagaactgat ccaactgct ccagtgggtg
2161 gccgcagget ttccattct cctgtctatg ttttacgct accagaactg gaagtcacaa
2221 tgtggtggg aggaatcta cgtgtgtgca atcgaaatgg tgaagggtgat cctggagttt
2281 ttcttcgaat ttaaaaaccc aagcatgctg tacctggcta ctggccacag agtgcagtgg
2341 ctgcggtatg ccgaatggct gctgacttgc ccagtgatc tgatccacct gtccaacctg
2401 actgggctgt ctaacgatta cagtaggaga acaatgggac tgctcgtatc cgacatcggc
2461 actatcgtat ggggcgcaac tagtgccatg gccactggat acgtgaaagt gatcttctc
2521 tgccctgggac tctgctacgg agcaaacaca ttttttcatg ccgcaaaagc atatatcgag
2581 gggatatcata ccgtcccaa gggccgggtg agacaagtgg tgactggcat ggcttggctg
2641 ttcttcgtgt cctgggggat gtttcccatc ctctttatcc tgggcccaga aggcttcggg
2701 gtgctgagtgt tgtatggcag taccgtagga cacaactatc ttgacctgat gagcaaaaac
2761 tgetgggggc tgctggcca ctacctgaga gtactcatcc acgagcatat cctgatctat
2821 ggcgatatcc ggaaaactac caagctcaat atcgggggca ccgagattga agtggagaca
2881 ctctgtgagg acgaggccga ggccggagca gtgaacaaag gcaactggca gtatgcctcc
2941 agagaatcct ttctggtgat gcgggacaaa atgaaggaga aaggcattga tgtacgggtg
3001 agtaatgcca aagccgtcga gactgatgtg tag

```

[0083] 本发明的单一突变体 Chop2 可以由以下合成构建体 hVChR1-mKate-betahChR2 (L132C) 氨基酸序列 (GenBank 登录号 AER29838 和 SEQ ID NO:12) 编码, 具有以下注释, GFP 序列为粗体, L132C Chop2 序列是有下划线的:

[0084]

```

1 mdyppvarsli vryptdlng tvcmprgqcy cegwlrsgt siektiaitl qwvfvfalsva
61 clgwyayqaw ratcgweevy valiemmxsi ieafhefdsp atlwlssgng vvmrygewl
121 ltcplvllhl snltglkddy skrtmgllvs dvgcivwgt samctgwtki lfflislsgy
181 mytyfhaakv yieafhtvpk gicrelvrvm awtffvawgm fpvlfllgte gfghispygs
241 aighsildli aknmwgvlg ylrvkihehi llygdirkkq kitiagqeme vetlvaeed

```

[0085]

```

301 gtavatmvs k geelikenmh mklymegtvn nhhfktseg egkpyegtqt mrikvveggp
361 lpfafdilat sfmygsktfi nhtqgipdff kqsfpegftw ervttiedgg vltatqdtsl
421 qdgcliynvk irgvnfpsng pvmqkktlgw eastemlypa dgglegradm alklvggghl
481 icnlkttyrs kkpaknlkmp gvyyvdrrle rikeadkety veqhevavar ycdlpsklgh
541 klnclqekks csqrmaefrq ycnwpdtgqm lgrtparvwv islyyaafyv vmtglfalci
601 yvlmqtidpy tpdydqqlks pgvtlrpdvy gerglqisyn isenssrqag itgrpetetl
661 ppvdyggals avgrellfvt npvvvngsvl vpedqcyag wiesrgtnga qtsnvlqwl
721 aagfsilllm fyayqtwkst cgweeiyvca iemkvilef ffefknpsml ylatghrvqw
781 lryaewlltc pvilihlsl tglndysrr tmglvdsdig tivwgatsam atgyvkviff
841 clglcygant ffhaakayie gyhtvpkgrc rqvvtgmawl ffvswgmfpil lfilgpegfg
901 vlsyvgstvg htiidmskn cwglghylr vlihehilih gdirkttkln iggteievet
961 lvedeaeaga vnkgtgkyas resflvmrdk mkekgidvrc snakavetdv

```

[0086] 本发明的 L132C 单一突变体 Chop2 可以由以下氨基酸序列（第 132 位加下划线且粗体, SEQ ID NO:13）编码：

[0087]

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICIHLNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMALFF VSWGMFPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

[0088] 本发明的 T159C 单一突变体 Chop2 可以由以下氨基酸序列（第 159 位加下划线且为粗体, SEQ ID NO:14）编码：

[0089]

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGCI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMALFF VSWGMFPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

[0090] 本发明的 L132C/T159C 双重突变体 Chop2 可以由以下核苷酸序列（SEQ ID NO:15）编码：

[0091]

```

1 atggactacg ggggggctct gtctgctgtc gggagggaaac tgctgtttgt gactaacctt
61 gtcgtcgtga acgggagtgt gctgggccct gaggaccagt gctactgtgc cggtgggac 121
gaatcacgag gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgetgcagtg gctggccgct 181
gggttttagta tctgtctgct gatgtttctac gctatcaga cttggaagtc aacctgccc 241
tgggaggaaa tctacgtgtg cgtattgag atgggtgaaag tgatcctgga gttctttctt 301
gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtgcg gtggctgaga 361
tatgcagaat ggctgtgac atgcccgctc atctgcatte acctgtccaa cctgacagcg 421
ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggaactgctg tgtccgacat cggctgcatt 481
gtctggggag caactttctg tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgctg 541
gggtgtgct atggcgcaaa tacctttttt cacgcagcca aggcctacat tgaggggtat 601
catacgtgc caaaaggccg gtgccgacag gtggtcacag gaatggcttg gctgtttttt 661
gtctcttggg gaatgtttcc cactctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgtgt 721
tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgtttg 781
ggcctgtgtg gacaactatc gagagtgtgt atccacgagc atatcctgat tcatggcgat 841
attcggaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacactgggtg 901
gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaa

```

[0092] 本发明的 L132C/T159C 双重突变体 Chop2 可以由以下氨基酸序列（第 132 位和第 159 位加下划线且为粗体, SEQ ID NO:16）编码：

[0093]

```
1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICIHLNLG LSNDYSRRTM GLLVSDIGCI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK
```

[0094] 本发明的 T159S 单一突变体 Chop2 可以由以下氨基酸序列（第 159 位加下划线且为粗体，SEQ ID NO:17）编码：

[0095]

```
1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLNLG LSNDYSRRTM GLLVSDIGSI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK
```

[0096] 本发明的 L132C/T159S 双重突变体 Chop2 可以由以下核苷酸序列（SEQ ID NO:18）编码：

[0097]

```
1 atggactacg ggggggctct gtctgctgtc gggaggggaa tgctgtttgt gactaacct
61 gtcgtcgtga acgggagtgt getggtccct gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc 121
gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgetgcagtg gctggccgct 181
gggttttagta tcttgetgtg gatgtttctac gcctatcaga cttggaagtc aacctgcggc 241
tgaggaggaaa tctacgtgtg cgtatttgag atggtgaaag tgatcctgga gttcttcttc 301
gagttcaaga acccaagcat getgtacctg gctactggac accgagtgcg gtggctgaga 361
tatgcagaat ggetgtgtac atgcccgtgc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc 421
ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgctgg tgtccgacat cggcagcatt 481
gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgcctg 541
gggtgtgtgt atggcgcaa tacctttttc cacgcagcca aggcctacat tgaggggtat 601
cataccgtgc caaaaggccg gtgcccagag gtggtcacag gaatggcttg gctgtttttc 661
gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg 721
tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg 781
ggcctgctgg gacactatct gagagtgtgt atccacgagc atatcctgat tcatggcgat 841
attcggaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacactgggtg 901
gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaa
```

[0098] 本发明的 L132C/T159S 双重突变体 Chop2 可以由以下氨基酸序列（第 132 位和第 159 位加下划线且为粗体，SEQ ID NO:19）编码：

[0099]

```
1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICIHLNLG LSNDYSRRTM GLLVSDIGSI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK
```

[0100] 本发明的 L132A 单一突变体 Chop2 可以由以下氨基酸序列（第 132 位加下划线且为粗体，SEQ ID NO:20）编码：

[0101]

```
1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV IAIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFCCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK
```

[0102] 本发明的L132A/T159C双重突变体Chop2可以由以下核苷酸序列 (SEQ ID NO:21) 编码：

[0103]

```
1 ATGGACTACG GGGGGGCTCT GTCTGCTGTC GGGAGGGAAC TGCTGTTTGT GACTAACCCCT
61 GTCGTCGTGA ACGGGAGTGT GCTGSTCCCT GAGGACCAGT GCTACTGTGC CGGCTGGATC 121
GAATCACGCG GAACCAACGG GGCCCAGACA GCTAGCAATG TGCTGCAGTG GCTGGCCGCT 181
GGGTTTAGTA TCCTGCTGCT GATGTTCTAC GCCTATCAGA CTTGGAAGTC AACCTGCGGC 241
TGGGAGGAAA TCTACGTGTG CGCTATTGAG ATGGTGAAAG TGATCCTGGA GTTCTTCTTC 301
GAGTTCAAGA ACCCAAGCAT GCTGTACCTG GCTACTGGAC ACCGAGTGCA GTGGCTGAGA 361
TATGCAGAAAT GGCTGCTGAC ATGCCCCGTC ATCGCCATTC ACCTGTCCAA CCTGACAGGC 421
CTGAGCAATG ACTACTCCAG GAGAACTATG GGACTGCTGG TGTCCGACAT CGGCTGCATT 481
GTCTGGGGAG CAACTTCTGC TATGGCAACC GGATACGTGA AGGTCATCTT TTTCTGCCTG 541
GGGCTGTGCT ATGGCGCAAA TACCTTTTTC CACGCAGCCA AGGCCTACAT TGAGGGGTAT 601
CATACCGTGC CAAAAGGCCG GTGCCGACAG GTGGTCACAG GAATGGCTTG GCTGTTTTTC 661
GTCTCTTGGG GAATGTTTCC CATCCTGTTT ATTCTGGGGC CTGAAGGGTT CGGCGTGTCTG 721
TCTGTCTACG GAAGTACAGT GGGGCATACT ATCATTGACC TGATGTCCAA AAAGTGTG 781
GGCCTGCTGG GACACTATCT GAGAGTGCTG ATCCACGAGC ATATCCTGAT TCATGGCGAT 841
ATTCGGAAGA CCACAAACT GAATATCGGC GGAACCGAGA TTGAAGTGGA AACACTGGTG 901
GAAGACGAGG CTGAGGCTGG GGCTGTGAAC AAGGGGACTG GCAAA
```

[0104] 本发明的L132A/T159C双重突变体Chop2可以由以下氨基酸序列 (第132位和第159位加下划线且为粗体, SEQ ID NO:22) 编码：

[0105]

```
1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV IAIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGCI VWGATSAMAT GYVKVIFFCCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK
```

[0106] 本发明的T159A单一突变体Chop2可以由以下氨基酸序列 (第159位加下划线且为粗体, SEQ ID NO:23) 编码：

[0107]

```
1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGAI VWGATSAMAT GYVKVIFFCCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK
```

[0108] 本发明的L132C/T159A双重突变体Chop2可以由以下核苷酸序列 (SEQ ID NO:24) 编码：

[0109]

```

1 atggactacg ggggggctct gtctgctgtc gggagggaac tgctgtttgt gactaacct
61 gtctgctga acgggagtgt gctggtcctt gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc 121
gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct 181
gggttttagta tcctgctgct gatgttttac gcctatcaga cttggaagtc aacctgcggc 241
tgggaggaaa tctacgtgtg cgctattgag atggtgaaag tgatcctgga gttcttcttc 301
gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtgcg gtggctgaga 361
tatgcagaat ggcctgctgac atgcccgcgc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc 421
ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggaactgctg tgctccgacat cggcgccatt 481
gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgctg 541
gggctgtgct atggcgcaaa tacctttttc caccgagcca aggcctacat tgaggggtat 601
cataccgtgc caaaaggccg gtgcccagac gtggtcacag gaatggcttg gctgtttttc 661
gtctcttggg gaatgttttc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg 721
tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg 781
ggcctgctgg gacactatct gagagtgtct atccacgagc atatectgat tcatggcgat 841
attcggaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacactgggtg 901
gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaaa

```

[0110] 本发明的 L132C/T159A 双重突变体 Chop2 可以由以下氨基酸序列（第 132 位和第 159 位加下划线且为粗体，SEQ ID NO:25）编码：

[0111]

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEBIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV CIHLNLTG LSNDYSRRIM GLLVSDIGAI VWGATSAMAT GYVKVIEFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

[0112] 本发明的野生型 (WT) Chop2 可以由以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:26) 编码：

[0113]

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEBIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLNLTG LSNDYSRRIM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIEFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

[0114] 本发明的突变体 ChR2 蛋白还表明了较慢的通道动力学。发现较高的光敏感性与较慢的通道动力学相关联，这指示光敏感性和通道动力学之间的平衡。形成本发明的 ChR2 蛋白的 Chop2 蛋白还可以包含能改善 ChR2 的通道动力学，或提高其失活速率的其它突变或修饰。特别优选的 ChR2 突变体平衡光敏感性阈值与通道动力学。

[0115] 组合物和试剂盒

[0116] 本发明的组合物和试剂盒包含至少一种核酸分子或多肽分子，其编码本发明的突变体 Chop2 蛋白和所得的 ChR2。编码本发明的突变体 Chop2 蛋白的至少一种核酸分子或多肽分子可以进一步包含药学可接受载体。本发明的试剂盒进一步包含关于对受试者施用本发明的组合物的用法说明。

[0117] 治疗用途

[0118] 对经密码子优化的 Chop2-GFP 融合蛋白进行突变以创建 L132（亮氨酸 132）和 T159（苏氨酸 159）位点处的单一和双重突变。首先在 HEK 细胞中检查每个突变体 ChR2 或其

组合的功能性特性。将 AAV2 病毒载体生成,并玻璃体内注射到成年小鼠的眼中,所述 AAV2 病毒载体携带由 CAG 启动子驱动的突变体 Chop2-GFP 构建体。通过使用来自整装视网膜的多电极阵列记录检查突变体 Chop2 介导的光应答。

[0119] 单一突变体 ChR2,即 L132 和 T159C 显著降低引发 ChR2 介导的光电流需要的阈值光强度。此外,发现几种双重突变体 ChR2 变体,包括 L132C/T159C, L132A/T159C, 和 L132C/T159S 进一步提高光电流,其在低光强度时高于任何单一突变体 ChR2 的结果。双重突变体展现出较慢的关闭速率 (off-rate),其可能促成在低光强度时升高的光电流。在 10^{13} 个光子/cm²/s 的光强度和 473nm 的波长观察到由 L132C/T159C 双重突变体介导的视网膜神经节细胞的尖峰形成活性。此光水平比在野生型 ChR2 情况下引发尖峰形成活性需要的光水平低约 1.5 至 2 个对数单位。表达 L132C/T159C 的视网膜神经节细胞的尖峰激发 (spike firing) 可以因多达 15Hz 的光闪烁频率而起。正在进行的研究评估本发明的突变体 ChR2 在视网膜神经元中的长期表达和安全性。

[0120] 此外,发现本发明的突变体 Chop2 蛋白和所得的 ChR2 蛋白的表达在小鼠中病毒注射后没有引起长达 2 个月的神经毒性,这证明了本发明对于治疗用途的安全性。

[0121] 本发明中使用的载体可以包括各种病毒载体,诸如质粒和重组病毒,即重组腺伴随病毒 (rAAV),重组腺病毒,重组逆转录病毒,重组慢病毒,和本领域中已知的其他病毒。

[0122] 在一些实施方案中,本发明的 Chop2 蛋白的表达由组成型启动子,即 CAG 启动子,CMV 启动子,LTR 驱动。在其他实施方案中,启动子是诱导性或细胞特异性启动子。在细胞的特定亚群,即视网膜神经元细胞或变性细胞中实现 Chop2 蛋白表达的细胞类型特异性启动子可以是优选的。这些细胞可以包括但不限于视网膜神经节细胞,光感受器细胞,双极细胞,杆状双极细胞,ON 型锥体双极细胞,视网膜神经节细胞,感光性视网膜神经节细胞,水平细胞,无长突细胞,或 AII 无长突细胞。细胞类型特异性启动子是本领域中公知的。特别优选的细胞类型特异性启动子包括但不限于 mGluR6, NK-3, 和 Pcp2 (L7)。

[0123] 在一些实施方案中,在本发明的突变体 Chop2 蛋白外不同视蛋白基因的使用和靶向基因表达可以进一步提高光敏感性或改善视觉。视觉信息通过视网膜经由两种途径加工:发出光开启 (ON) 信号的 ON 途径,和发出光关闭 (OFF) 信号的 OFF 途径。ON 和 OFF 途径的存在对于对比灵敏度的增强是重要的。ON 途径中的视觉信号从 ON 锥体双极细胞中继到 ON 神经节细胞。ON 锥体双极细胞和 ON 神经节细胞两者响应光而去极化。在另一个方面,OFF 途径中的视觉信号从 OFF- 锥体双极细胞携带到 OFF 神经节细胞。OFF 锥体双极细胞和 OFF- 神经节细胞两者响应光而极化不足的 (hypopolarized)。负责暗淡光 (暗适应视觉) 中观看的能力的杆状双极细胞是 ON 双极细胞 (响应光而去极化)。杆状双极细胞将视觉信号从 AII 无长突细胞 (ON 型视网膜细胞) 中继到 ON, OFF 锥体双极细胞。

[0124] 因而,可以使用双重视紫红质系统重演对于视觉加工和锐度而言完整的 ON 和 OFF 途径。简言之,本发明的 Chop2 蛋白可以特异性靶向到 ON 型视网膜神经元 (即 ON 型神经节细胞和 / 或 ON 型双极细胞),而极化不足光传感器 (即盐细菌视紫红质 (halorhodopsin) 或本领域中已知的其他氯化物泵) 可以靶向到 OFF 型视网膜神经元 (即 OFF 型神经节细胞和 / 或 OFF 型双极细胞) 以创建 ON 和 OFF 途径。可以通过使用不同细胞类型特异性启动子实现对优选细胞亚群的特异性靶向。例如,Chop2 表达可以由 mGluR6 启动子驱动以在 ON 型视网膜神经元 (即 ON 型神经节细胞和 / 或 ON 型双极细胞) 中靶向表达,而极化不足通

道（诸如盐细菌视紫红质）表达由 NK-3 启动子驱动以在 OFF 型视网膜神经元（即 OFF 型神经节细胞和 / 或 OFF 型双极细胞）中靶向表达。

[0125] 在视网膜中恢复 ON 和 OFF 途径的备选方法通过对杆状双极细胞或 AII 无长突细胞表达去极化光传感器, 诸如 ChR2 实现。在此方法中, 杆状双极细胞或 AII 无长突细胞的去极化可以在锥体双极细胞和下游视网膜神经节细胞水平上导致 ON 和 OFF 应答。因此, 视网膜中固有的 ON 和 OFF 途径得到维持。

[0126] 本发明可以配制为适合于对受试者或患者施用的药物组合物或药物。合适的施用路径包括例如玻璃体内, 眼内, 或视网膜下注射。

[0127] 此类配制剂包含药学和 / 或生理学可接受媒介物, 稀释剂, 载体或赋形剂, 诸如缓冲盐水或其他缓冲液, 例如 HEPES, 以维持生理 pH。为了讨论此类组分及其配制, 一般参见 Gennaro, AE., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2003 或最近版本)。还可参见 W000/15822。若制剂要贮存较长的时段, 则可以将其例如在存在甘油的情况下冷冻。

[0128] 根据靶向的视网膜层, 通过任何合适的路径, 优选通过玻璃体内或视网膜下注射对具有视觉或失明疾病的受试者施用上文描述的药物组合物。

[0129] 来自 Bennett 及同事 (本文引用) 的公开内容关注视网膜色素上皮 (距离玻璃体 (vitreal) 空间的最远端层) 的靶向。根据本发明, 将 Chop2 构建体或多肽靶向到视网膜细胞, 即视网膜神经节细胞或双极细胞。已知此类细胞适当地经受如本文中公开的玻璃体内注射。玻璃体内和 / 或视网膜下注射可以提供对双极细胞的必要接近, 尤其是在光感受器细胞层由于变性而缺乏的情况下, 在本发明意图克服的某些变性形式中正是如此。

[0130] 为了通过 AAV 介导的递送测试载体表达本发明的 Chop2 突变体的能力, 特别是在哺乳动物视网膜神经元中, 可以将优选的启动子序列, 与其连接的报告基因诸如 LacZ 或 GFP, 与其连接的 SV40 多聚 A 序列的组合插入质粒中, 并包装到 rAAV 病毒颗粒中, 浓缩, 测试污染性腺病毒, 并使用感染中心测定法 (infectious center assay) 对 rAAV 滴定。可以对多个测试受试者 (优选近交小鼠) 的右眼在视网膜下注射约 $1 \mu\text{l}$ rAAV 制剂 (例如大于约 10^{10} 个感染单位 ml)。2 周后, 可以将半数动物的右眼 (测试) 和左眼 (对照) 取出, 固定并用合适的底物或抗体或其它物质染色以揭示报告基因的存在。注射眼中的大多数测试视网膜会展现出焦点染色区, 例如蓝色 (对于 LacZ/Xgal), 或绿色 (对于 GFP), 其与创建局部视网膜分开的注射病毒的视网膜下起泡一致。所有对照眼在报告基因产物方面可以呈阴性。在后来的时段中处死的小鼠中检查的报告基因表达在注射后检出至少 10 周, 这提示了报告转基因的持久表达。

[0131] 在一个实施方案中, 将 Chop2 构建体在腺病毒载体中包装以进行转基因递送。优选地, rAAV 病毒体的有效量的范围为每次注射的约 $150\text{--}800 \mu\text{l}$ 的体积中约 10^{10} 至约 10^{13} 个 rAAV 感染单位, 所述 rAAV 病毒体携带选择启动子, 优选组成性 CMV 启动子或细胞特异性启动子诸如 mGluR6 的控制下编码 Chop2DNA 的核酸序列。rAAV 感染单位可以依照 McLaughlin, SK 等, 1988, J Virol 62:1963 测量。更优选地, 有效量是约 $10^{10}\text{--}10^{12}$ 个 rAAV 感染单位, 并且注射体积优选是约 $250\text{--}500 \mu\text{l}$ 。其它剂量和体积优选在这些范围内, 但是可能在它们外部, 可以考虑所治疗的受试者 (优选人) 的身体状态, 包括年龄, 重量, 一般健康, 和特定眼病的性质和严重性, 由治疗专业人员选择。

[0132] 也可以期望施用本核酸或 rAAV 组合物的额外剂量（“加强”）。例如，根据盐靶细胞内的转基因表达的持续时间，可以在 6 个月后或每年施用第二治疗，并且可以类似重复。鉴于使用的路径和剂量，预期不产生针对 AAV 的中和性抗体，由此容许重复治疗轮次。

[0133] 例如，治疗专业人员可以使用公知的电生理学和其它视网膜和视觉功能测试和视觉行为测试监测对此类额外剂量的需要。治疗专业人员会能够选择应用本领域常规技术的合适测试。可以期望在单一或多次剂量中注射更大体积的组合物，以进一步改善相关的结果参数。

[0134] 眼病症

[0135] 目前的 Chop2 蛋白和所得的 ChR2 蛋白意图针对并且可以用于改善一种或多种视觉参数的眼病症包括但不限于影响眼的前段和后段两者的发育异常。前段病症 (anterior segment disorder) 包括青光眼 (glaucoma)，白内障 (cataract)，角膜营养失调 (corneal dystrophy)，圆锥形角膜 (keratoconus)。后端病症 (posterior segment disorder) 包括由光感受器机能失常引起的盲病症 (blinding disorder) 和 / 或由视网膜营养失调和变性引起的死亡。视网膜病症包括先天性静止性夜盲 (congenital stationary night blindness)，年龄相关黄斑变性 (age-related macular degeneration)，先天性椎体营养失调 (congenital cone dystrophy)，和一大批色素性视网膜炎 (RP) 相关病症。这些病症包括各个年龄发生的视网膜中光感受器细胞，杆和椎体的有遗传素因的死亡。那些之一是重度视网膜病，诸如随年龄进展并引起儿童和早期成人失明的 RP 亚型自身和 RP 相关疾病，诸如 LCA 的遗传亚型，其经常导致儿童（早到生命的第一岁）期间的视觉丧失。后一种病症一般以光感受器细胞，杆和椎体的严重减少及经常完全丧失为特征。(Trabulsi, EI 编, Genetic Diseases of the Eye, Oxford University Press, NY, 1998)。

[0136] 特别地，本发明的 Chop2 和 ChR2 蛋白可用于对受试者治疗和 / 或恢复至少部分视觉，所述受试者由于眼病症，诸如 RPE 相关视网膜病（其以眼组织结构的长期保持尽管功能丧失为特征且以受试者的眼细胞中功能丧失与正常基因的缺陷或缺乏之间的关联为特征）而丧失视觉。多种此类眼病症是已知的，诸如幼发性失明疾病 (childhood onset blinding disease)，色素性视网膜炎，黄斑变性 (macular degeneration)，和糖尿病性视网膜病 (diabetic retinopathy)，及本领域中已知的眼失明疾病。预期的是，这些其它病症及目前未知原因但以后以如上文的相同描述表征的失明病症也可以通过本发明的 Chop2 和 ChR2 蛋白成功治疗。因此，通过本发明治疗的特定眼病可以包括上文提及的病症和许多尚未如此表征的疾病。

[0137] 光遗传学 (Optogenetics)

[0138] 光遗传学的新兴领域牵涉组合遗传和光学方法来控制活组织的靶定细胞中的特定事件。光遗传学可以在自由活动的哺乳动物和其它动物内使用。此外，光遗传方法的时间精确性（毫秒 - 时间量程）足以在完整的生物学系统内发挥功能。

[0139] 本发明对眼的视网膜组织提供 Chop2 基因疗法，其通过对视网膜细胞导入编码至少一种 Chop2 突变体形式的核酸或多肽。本发明的突变体 Chop2/ChR2 蛋白特别适合于在比起野生型对应物低的光强度阈值被光活化。因而，可以使用本发明的突变体 Chop2/ChR2 蛋白来活化视网膜和视觉系统的细胞，其使用损害较小的照明源进行。突变体 Chop2/ChR2 蛋白在活化后也传导较大的光电流，导致来自突变体 Chop2/ChR2 表达细胞的更稳健

(robust) 或有效的应答。

[0140] 例如,通过局部,玻璃体内或视网膜下注射编码突变体 Chop2 的核酸分子,突变体 Chop2 多肽分子,或表达突变体 Chop2/ChR2 的细胞对受试者施用本发明的突变体 Chop2 蛋白。受试者的视网膜细胞在质膜内表达突变体 Chop2 蛋白。在经转染的或经转化的视网膜细胞遇到光发射时,经转染的或经转化的视网膜细胞转导改善的或恢复的信号。

[0141] 这些方法可以在正常和 / 或受损视觉的受试者中使用。本发明的 Chop2/ChR2 突变体可以保持,改善,或恢复视觉。此外,使用本发明的 Chop2/ChR2 突变体来保持,改善,或恢复非视觉信息从感光性视网膜神经节细胞转导到脑。

[0142] 如本文中使用的,术语“视觉”定义为生物体有用检测光作为区别或作用的刺激的能力。视觉意图涵盖下列各项:

[0143] 1. 光检测或感知:辨别是否存在光的能力;

[0144] 2. 光投射:辨别光刺激来到的方向的能力;

[0145] 3. 分辨率 (Resolution):在格子 (grating) 或字母靶标 (letter target) 中检测不同光亮水平 (即对比度) 的能力;和

[0146] 4. 识别:通过参考靶物内的不同对比度水平识别视觉靶物形状的能力。

[0147] 如此,“视觉”包括简单检测光存在的能力。可以使用编码本发明的突变体 Chop2 的多肽和多核苷酸来改善或恢复视觉,其中视觉的改善或恢复包括例如光检测或感知的升高,响应光刺激的光照敏感性或光敏感性的升高,分辨光刺激来源的方向的能力升高,检测不同光亮水平的能力的升高,识别视觉靶物的形状的能力升高,和视觉诱发电位或从视网膜传输到皮质的升高。因此,视觉的改善或恢复可以或不可以包括视力的完全恢复,即其中将用本发明治疗的患者的视觉在程度上恢复到未受累个体的视觉。下文描述的动物研究中描述的视觉恢复就人而言可以将个体置于视觉功能的低端,通过提高视觉的一个方面 (即,光敏感性,或视觉诱发电位) 而不恢复完全视力进行。不过,在此水平的放置会是一种重大益处,因为这些个体可以在活动性中以及潜在地在可给他们提供与全盲相比大大改善的视觉独立水平的低阶分辨率任务中受训练 (because these individuals could be trained in mobility and potentially in low order resolution tasks which would provide them with a greatly improved level of visual independence compared to total blindness)。使用本组合物和方法改善其视觉的视觉受损个体使用甚至可以基本光感知来完成特定的每日任务,并改善一般活动性,能力,和生命质量。

[0148] 可以在施用包含例如编码 Chop2 的 DNA 的载体之前且优选之后通过测量视觉测定视觉恢复的程度。可以使用本领域中公知的许多方法或尚未建立的方法测量视觉。如通过本发明改善或恢复的视觉可以通过下列任一种视觉应答测量:

[0149] 1. 在暴露于光刺激后受试者的光检测应答:其中寻求如下的证据,其关于在光被开启时受试者个体对光的一般方向的指示或移动的可靠应答;

[0150] 2. 在暴露于光刺激后受试者的光投射应答:其中寻求如下的证据,其关于在光被开启时个体对光的特定方向的指示或移动的可靠应答;

[0151] 3. 受试者对光照与黑暗图案的视觉刺激 (light vs dark patterned visual stimuli) 的光分辨率,其测量受试者分辨光照与黑暗图案的视觉刺激的能力,如以下证明的:

[0152] a. 存在可论证的可靠视动产生眼球震颤样 (nystagmoid) 眼运动和 / 或相关的头或身体运动, 其证明靶物的追踪 (参见上文) 和 / 或

[0153] b. 存在分辨图案视觉刺激及通过口头或非口头手段 (包括指向, 或按下条或按钮) 指出此类区别的可靠能力; 或

[0154] 4. 对光闪光刺激或图案视觉刺激的视皮质应答的电记录, 其是从恢复视网膜到视皮质的电传输的端点, 又称为视觉诱发电位 (VEP)。测量可以通过视皮质区的头皮表面, 皮质表面上的电记录, 和 / 或视皮质细胞内的记录。

[0155] 因此, 依照本发明的视觉改善或恢复可以包括但不限于: 视网膜细胞中响应光刺激的光电流或电应答的振幅或动力学升高, 视网膜细胞的光敏感性升高 (即降低启动响应光刺激的光电流或电应答需要的阈值光强度, 由此需要更少或更低的光来引发光电流), 光引发的尖峰形成或尖峰激发的数目或幅度的升高, 对视皮质的光应答的升高, 其包括从视网膜或视网膜细胞传输到视皮质或脑的视觉诱发电位升高。

[0156] 可以使用用于评估本发明的各种参数的体外和体内研究两者, 包括公认的盲人眼病动物模型。人视网膜病 (例如儿童失明) 的大动物模型是有用的。本文中提供的例子容许本领域技术人员容易地预期此方法可以在治疗一大批视网膜疾病中类似使用。

[0157] 虽然其他人的早期研究已经证明了视网膜变性可以通过基因疗法技术延迟, 但是本发明证明了明确的生理学功能恢复, 预期其产生或改善视觉的各种参数, 包括行为参数。

[0158] 行为测量 (behavioral measure) 可以使用已知的动物模型和测试中获得, 例如在水迷宫中的表现, 其中其视觉已经被保持或恢复到不同程度的受试者会游向光 (Hayes, JM 等, 1993, Behav Genet 23:395-403)。

[0159] 在失明在成年生命期间诱导或先天性失明缓慢形成得足以使个体在其丧失前经历视觉的模型中, 可以完成受试者在各项测试中的训练。这样, 在这些测试在视觉丧失后再次施行以对本组合物和方法的效力测试其视觉恢复效果时, 动物没有必要重新而在盲的状态中学习任务。其它行为任务不需要学习, 并且依赖于某些行为的本能性 (instinctiveness)。一个例子是视动眼球震颤测试 (optokinetic nystagmus test) (Balkema GW 等, 1984, Invest Ophthalmol Vis Sci. 25:795-800; Mitchiner JC 等, 1976, 视觉 Res. 16:1169-71)。

[0160] 本发明也可以与本领域中已知的其它形式的视觉疗法组合使用以改善或恢复视觉。例如, 使用视觉假体 (visual prostheses), 其包括视网膜植入物, 皮质植入物, 外侧膝状核 (lateral geniculate nucleus) 植入物, 或视神经植入物。因此, 在使用本方法使视网膜神经元存活的遗传修饰外, 可以在采用分子方法之前, 同时, 或之后给所治疗的受试者提供视觉假体。可以通过训练个体改善视觉假体的有效性, 如此增强如本文中涵盖的患者细胞的 Chop2 转化的潜在影响。训练方法, 诸如适应训练 (habituation training), 其以训练受试者以识别 (i) 不同水平的光和 / 或图案刺激, 和 / 或 (ii) 如本领域技术人员会理解的来自常见光源或物体的环境刺激为特征; 和方向和活动性训练, 其以训练受试者以检测视觉局部物体并且比在不训练情况下更有效地在所述物体间移动为特征。实际上, 通常用于低视觉复原领域的任何视觉刺激技术在本文是可适用的。

实施例

[0161] 实施例 1 :经标记的突变体 Chop2 构建体的产生。

[0162] 对密码子优化的 Chop2-GFP 融合蛋白进行突变以创建 L132(亮氨酸 132) 和 T159(苏氨酸 159) 位点处的单一和双重突变。产生几个突变体,例如单一突变体,诸如 L132A, L132C, T159A, T159C, 和 T 159S, 和双重突变体,诸如 L132C/T159C, L132C/T159S, L132A/T159C, 和 L132C/T159A。使用本领域中已知的方法将 Chop2-GFP 转基因克隆到 rAAV 载体中,在 CAG 启动子的控制下。

[0163] 实施例 2 :突变体 Chop2 构建体的体外分析。

[0164] 首先,在 HEK 细胞中检查每种突变体 Chop2 或其组合的功能性特性。例如通过腺病毒感染将 Chop2 构建体递送到 HEK 细胞。在表达 WT 或突变体 Chop2 后,形成功能性 WT 和突变体 ChR2 通道。如本文中描述的,评估 ChR2 通道的光敏感性和其它特性的测量。光刺激(光子/cm²·s, 于 460nm) 由氙弧灯产生并且通过中性密度滤光片减弱:ND4.0(2.8x10¹⁴), ND3.0(1.4x10¹⁵), ND2.5(4.8x10¹⁵); ND2.0(1.6x10¹⁶), ND1.0(1.3x10¹⁷), ND0(1.2x10¹⁸)。从野生型 ChR2, T159C, L132C, L132C/T159C, 和 L132C/T159S 测量光引发的电流。使用本领域中已知的方法实施膜片钳(patch clamp) 记录。

[0165] 来自比较 Chop2 构建体间的光敏感性的此实验的代表性记录证明单独或与 T159 突变组合的 L132 突变与 WT 相比显示升高的光电流(图 1A 和 1B)。图 1B 显示了在不同刻度的相同电流迹线以更清楚显示 WT ChR2 和 ChR2 突变体之间的光电流幅度的差异。图 1B 特别比较使用中性密度滤光片(ND 2.5) 源自光刺激(等同于 4.8x 10¹⁵ 个光子/cm²/s) 的电流迹线;迹线以箭头标示。L132C 突变体的光电流的幅度大于 WT 的;双重突变体 L132C/T159C 的光电流幅度大于 L132C 的;而 L132C/T159S 突变体的光电流幅度大于 L132/T159C。ChR2 突变体,特别是双重突变体 L132C/T159C 和 L132C/T159S 的电流迹线在与 WT 和 L132C 比较时也显示更慢的失活动力学。

[0166] 图 2 显示了通过 10ms 光脉冲(1.2x 10¹⁸ 个光子/cm²/s, 于 460nm 波长) 刺激后来自 WT ChR2, L132C, L132C/T159C, 和 L132C/T159S 的光引发电流的代表性记录以比较失活时间过程,或光关闭后的衰减时间过程。突变体 ChR2 显示更长的失活时间过程,双重突变体 L132C/T159S 具有最长的。如由 L132C/T159C 和 L132C/T159S 表明的较高光敏感性可以与较慢的通道动力学相关联。

[0167] 实施例 3 :突变体 Chop2 构建体的体内眼施用和分析。

[0168] 制备 AAV2 病毒载体,并玻璃体内注射到 C57BL/6J 成年小鼠的眼中,所述 AAV2 病毒载体携带由 CAG 启动子驱动的突变体 Chop2-GFP 构建体。通过氯胺酮(ketamine)(100mg/kg) 和甲苯噻嗪(10mg/kg) 的 IP 注射麻醉成年小鼠。在解剖显微镜下,通过剪刀经由眼睑产生切口以暴露巩膜。用针在晶状体后的巩膜区中进行小穿孔,并用具有 32 号钝末端针的 Hamilton 注射器将约 10¹¹ 个基因组颗粒/ml 的浓度的 0.8 - 1.5 μl 病毒载体悬浮液经由孔注射到玻璃体内空间中。对于每只动物,通常仅对一只眼注射携带 Chop2 构建体的病毒载体,并且对另一只眼不注射或注射仅携带 GFP 的对照病毒载体。在表达本发明的 WT 或突变体 Chop2 后,利用内源视黄醛形成功能性 WT 或突变体 ChR2 通道,并且评估这些 ChR2 蛋白的特性,如本文中描述的。

[0169] 通过使用来自整装视网膜的多电极阵列记录检查 ChR2 介导的光应答。光刺激(光子/cm²/s) 由 473nm 蓝色激光产生,并且通过中性密度滤光片减弱:ND0(6.3x10¹⁶),

ND1.0 (7.4×10^{15}), ND1.5 (2.7×10^{15}), ND2.0 (7.3×10^{14}), ND2.5 (3.2×10^{14}), ND3.0 (8.5×10^{13}), ND3.5 (3.8×10^{13}), 和 ND4.0 (9.5×10^{12})。

[0170] 多电极阵列记录基于由 Tian 和 Copenhagen (2003) 报告的规程。简言之,将视网膜剖开,并在硝酸纤维素滤纸条 (Millipore Corp., Bedford, MA) 上光感受器侧向下放置。将安放好的视网膜置于间隔 200 μm 放置的 30 μm 直径电极的 MEA-60 多电极阵列记录室 (Multi Channel System MCS GmbH, Reutlingen, Germany) 中,其中神经节细胞层面向记录电极。将视网膜在充氧胞外溶液中于 34°C 在所有实验期间连续灌注。胞外溶液含有 (以 mM 计): NaCl, 124; KCl, 2.5; CaCl_2 , 2; MgCl_2 , 2; NaH_2PO_4 , 1.25; NaHCO_3 , 26; 和葡萄糖, 22 (pH 7.35 以及 95% O_2 和 5% CO_2)。通常在记录室中放置视网膜后 60 分钟开始记录。每个光刺激的启动间的时间间隔是 10 - 15s。将信号在 200Hz (低截留) 和 20kHz (高截留) 之间过滤。使用 Offline Sorter 软件 (Plexon, Inc., Dallas, TX) 分析来自各个神经元的应答。

[0171] 单一突变体 Chop2/ChR2 突变体,即 L132 和 T159C 显著降低引发 ChR2 介导的光电流需要的阈值光强度。此外,发现几个双重突变体,包括 L132C/T159C, L132A/T159C, 和 L132C/T159S 进一步提高低光强度的光电流。使用不同中性密度滤光片减弱光刺激以区别低光照中的 Chop2 构建体的光引发应答。在比野生型 ChR2 情况下引发尖峰形成活性需要的光水平低约 1.5 至 2 个对数单位的光强度观察到由本发明的突变体介导的视网膜神经节细胞的尖峰形成活性 (图 3)。特别地,展现的 WT ChR2 没有展现响应中性密度滤光片 2.5 得到的光刺激 (3.2×10^{14} 个光子/ cm^2/s) 的任何尖峰形成活性,而 ChR2 突变体 (L132C, L132C/T159C, 和 L132C/T159S) 表明尖峰形成活性。实际上,ChR2 突变体在中性密度滤光片 3.0 和 3.5 的情况下仍展现出响应光的尖峰形成活性。因此,本发明的 ChR2 突变体拥有较高的光敏感性及因此明显较低的引发 ChR2 介导的光电流需要的阈值光强度。此外,ChR2 双重突变体比单一突变体,即 L132C 拥有更高的光敏感性。另外,表达 L132C/T159C 和 L132/T159S 的视网膜神经节细胞的尖峰形成激发可以分别在多达 15Hz 和 5Hz 的光闪烁频率后 (图 4)。

[0172] L132C/T159A 突变体显示高的光敏感性,可能是这些突变体间最为光敏感的,但是其也显示极慢的关闭速率 (off-rate) (通道连续开放以实现通道关闭后的许多许多次发送)。令人感兴趣地,它可以使用具有长波长的光,诸如黄光更快速关闭。L132C/T159A 突变体 (由 SEQ ID NO:24 和 25 编码) 表明显著的潜力。

[0173] 鉴于光敏感性和通道动力学之间的折衷,表明光敏感性和通道动力学之间平衡的 Chop2/ChR2 突变体,诸如 L132C/T159C 或 L132C/T159S 可适合于视觉恢复的应用。

[0174] 实施例 4:在鼠疾病模型中分析突变体 Chop2 构建体。

[0175] 变性性眼病的小鼠模型是本领域中已知的。例如,纯合 rd1 (rd1/rd1) 小鼠是常用的光感受器变性 (degeneration) 模型。Rd1 小鼠携带环 GMP 磷酸二酯酶 PDE6 的无效突变,类似于人色素性视网膜炎的一些形式。可以特别有兴趣证明 ChR2 突变体安全性和效力的其他公知小鼠眼病模型包括 rds (又称为 Prph^{Rd2}), rd3, rd4, rd5, rd6, rd7, rd8, rd9, Pde6b^f^{di0} 或 cpl11 小鼠。

[0176] 可以将本发明的 Chop2-GFP 构建体在玻璃体内注射到 2-12 月龄的新生 (P1) 或成年小鼠的眼中。可以在注射有 Chop2-GFP 的视网膜中观察到 GFP 信号,以测定特定细胞群体,诸如视网膜神经节细胞中 ChR2 表达水平或表达。可以对突变体 Chop2-GFP 表达监测预

定的时间量,即病毒注射后 3-6 个月,或 1 年。膜片钳和多通道阵列记录可以使用本领域中已知和本文中描述的方法实施以测量体内突变体 Chop2-GFP 表达细胞的光引发应答。

[0177] 其他技术和测试是本领域中完善建立的,用以测试光敏感性或视觉的恢复。可以检查来自 Chop2-GFP 表达细胞或视皮质的视觉诱发电位,如记载于 PCT 公开文本 W0 2007/131180 的。其他测试包括小鼠的视觉敏锐度的行为评估,即视觉视动 (optomotor) 测试和视觉水迷宫。

[0178] 实施例 5:突变体 Chop2 构建体的长期表达和对视网膜神经元施用的安全性的分析

[0179] 在注射本发明的 Chop2 构建体的 C57BL/6J 成年小鼠中评估神经毒性。通过暴露于强蓝光 2 周后的免疫染色和细胞计数评估视网膜中的 Chop2 突变体的表达安全性。发现小鼠无一在注射后长达 2 个月展现出神经毒性症状。

[0180] 其他进行中的研究评估本发明的 Chop2/ChR2 突变体在视网膜神经元中的长期表达和安全性。

[0181] 其它实施方案

[0182] 虽然本发明已经结合其详细描述进行了描述,但是前述描述意图例示而不限制本发明的范围,其以所附权利要求书的范围限定。其它方面,优点和修改在所附权利要求书的范围内。

[0183] 本文中提及的专利和科学文献建立了本领域技术员可用的知识。本文中引用的所有美国专利和公开或未公开的美国专利申请通过提及并入。本文中提及的所有公开的外国专利和专利申请在此通过提及并入。本文中引用的所有其他公开参考文献,文件,手稿和科学文献在此通过提及并入。

[0184] 虽然本发明已经参考其具体实施方案具体显示并描述,但是本领域技术人员应当理解,可以在不偏离所附权利要求书涵盖的本发明范围的前提下对其进行形式和详情的各种变化。

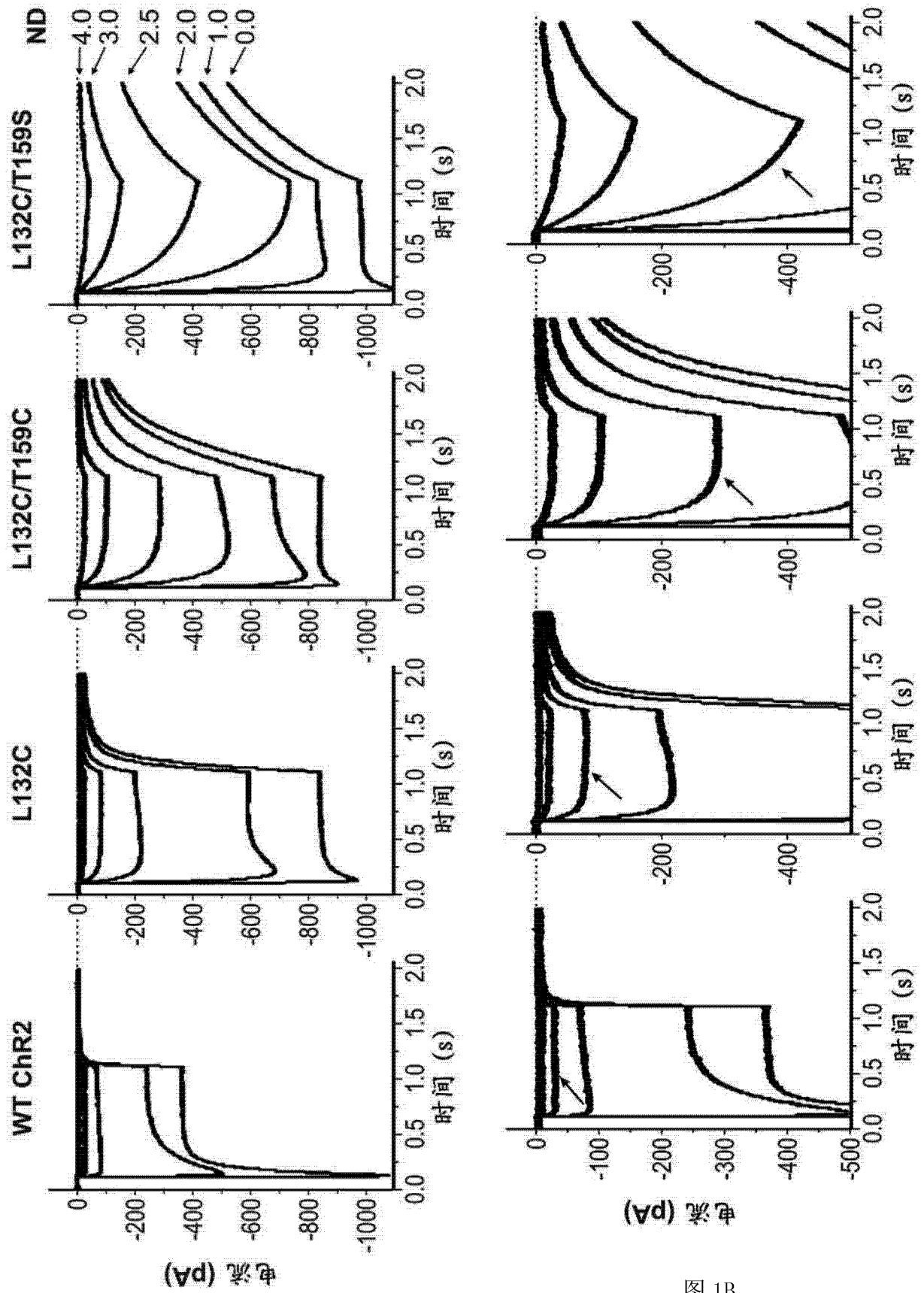


图 1B

图 1A

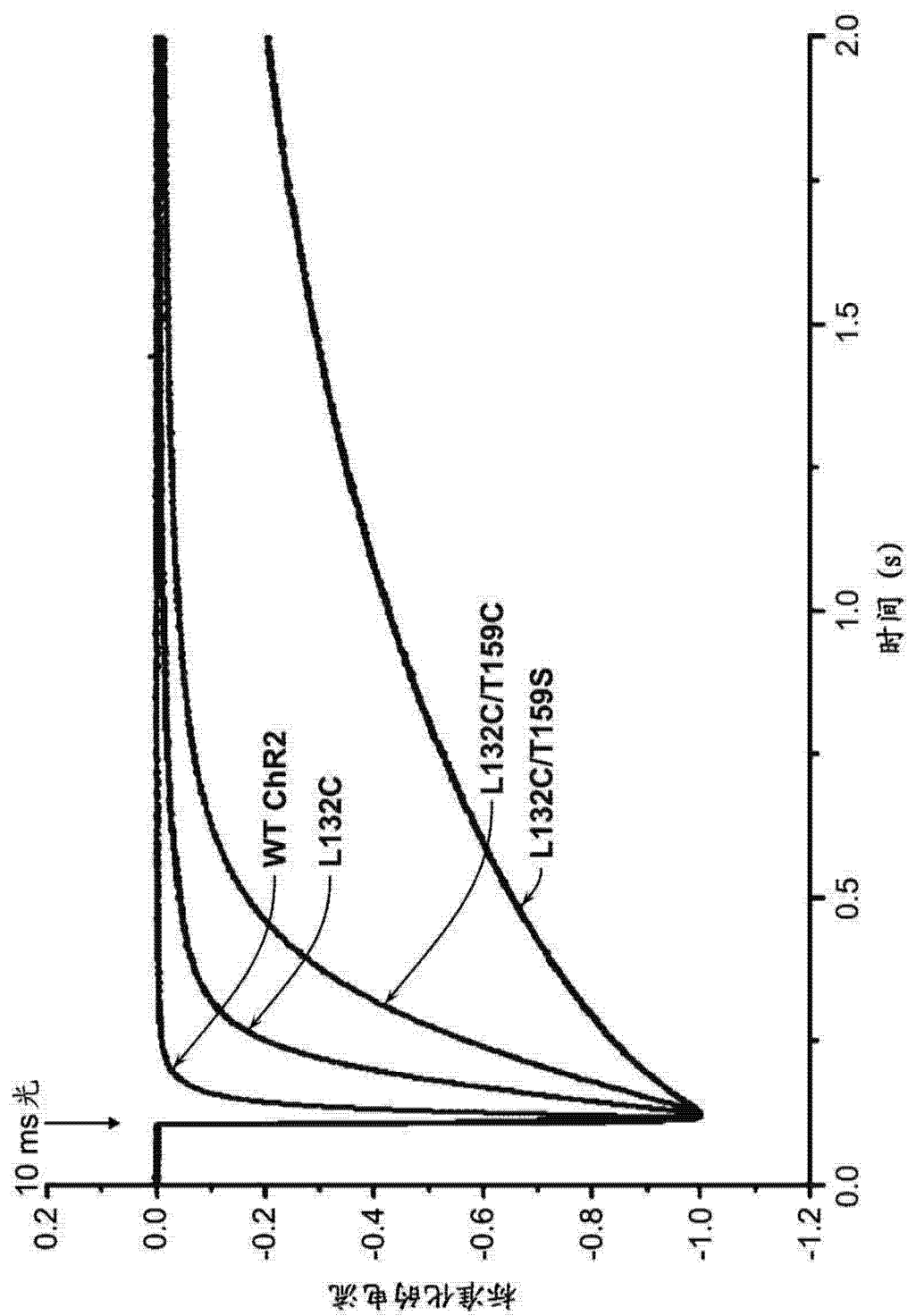


图 2

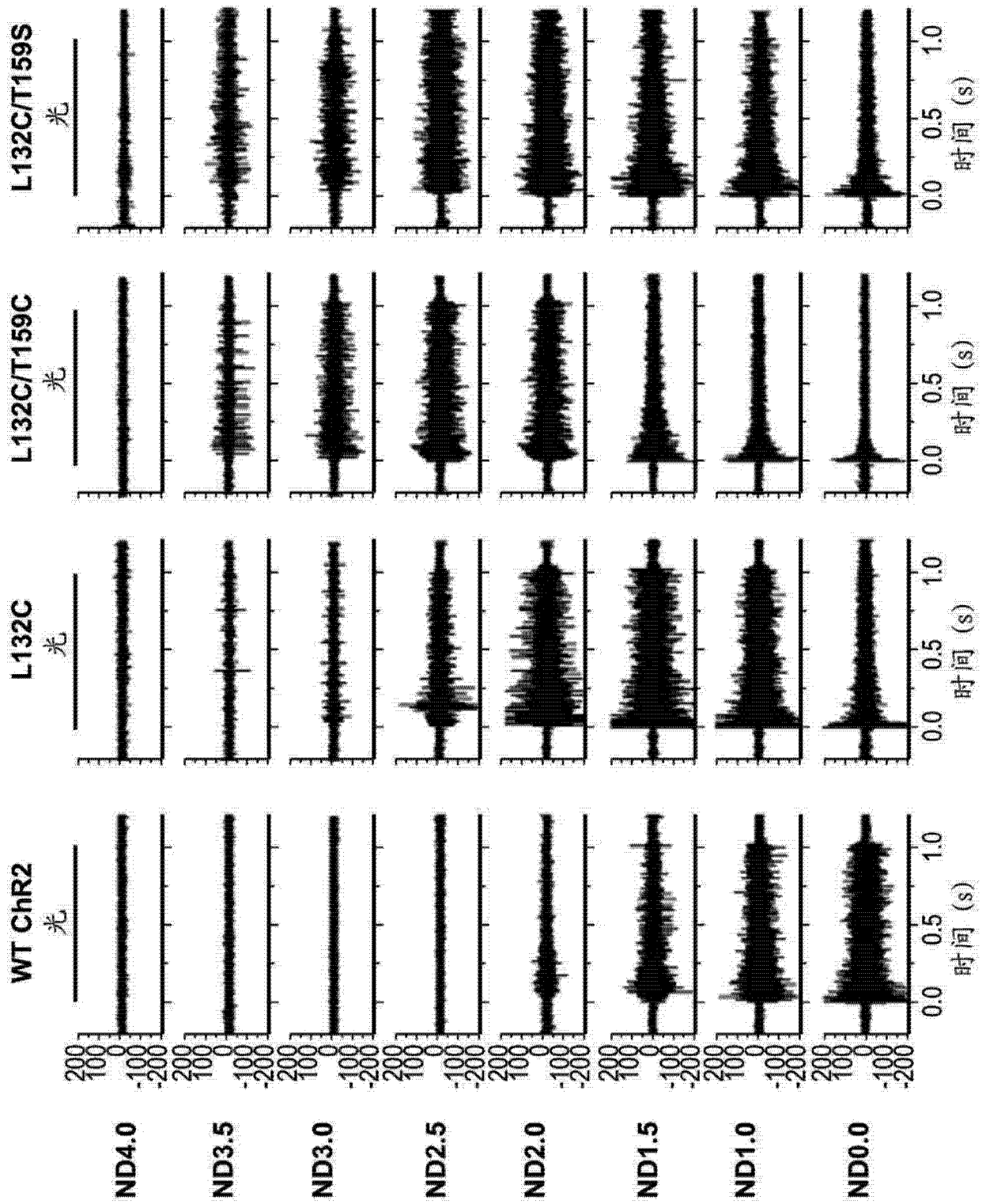


图 3

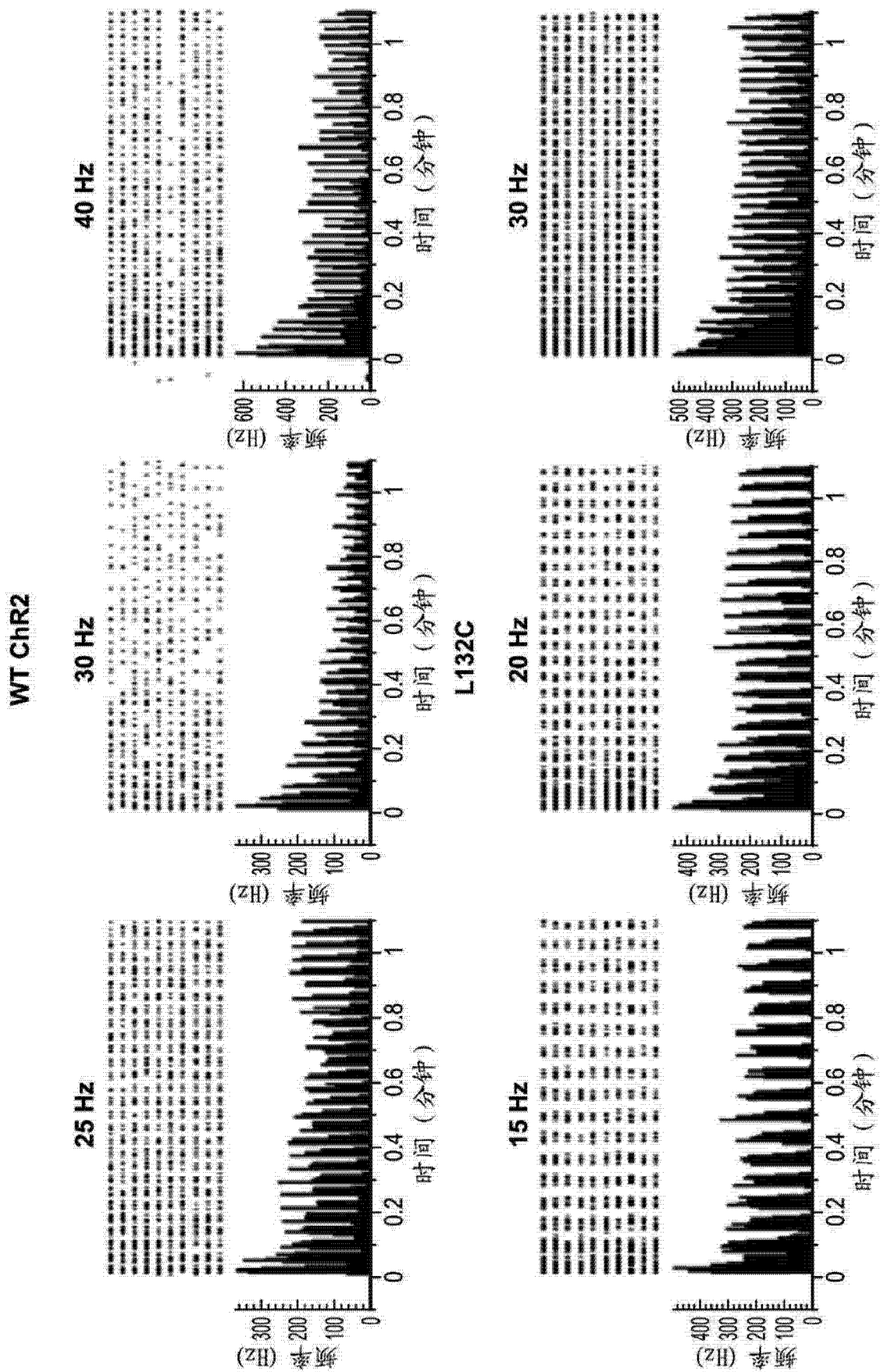


图 4a

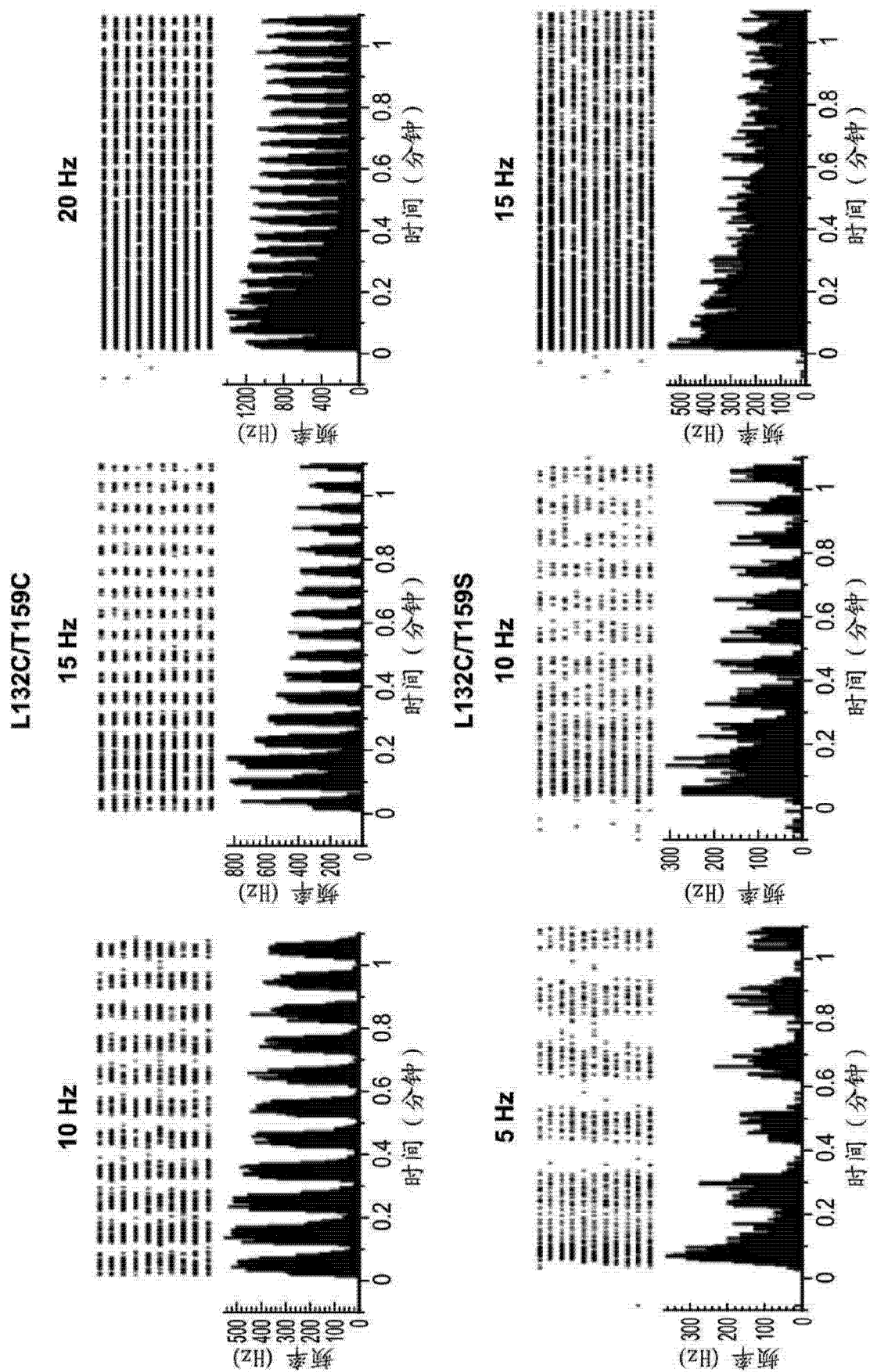


图 4b