



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118717946 A

(43) 申请公布日 2024.10.01

(21) 申请号 202310322266.7

A61P 27/06 (2006.01)

(22) 申请日 2023.03.29

(71) 申请人 郑州大学第一附属医院

地址 450052 河南省郑州市二七区建设东
路50号

(72) 发明人 康建胜 杨润舟 张嘉漪

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限
公司 31266

专利代理师 王正君 徐迅

(51) Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书15页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种嵌合蛋白在治疗视神经变性疾病中的
应用

(57) 摘要

本发明提供了一种嵌合蛋白在治疗视神经
变性疾病中的应用,具体地,本发明提供一种嵌
合蛋白及其编码核酸的用途,用于制备一组合物
或制剂,所述组合物或制剂用于预防和/或治疗
视神经变性疾病。所述嵌合蛋白为GPR蛋白突变
体,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对
应于登录号为AF349993_1的选自下组的一个或
多个跨膜区发生替换和突变:4-5号跨膜区;和/
或4-6号跨膜区;和/或1-2号跨膜区,本发明的具
有特定结构的嵌合蛋白可有效预防和/或治疗视
神经变性疾病(比如青光眼)。

1. 一种嵌合蛋白、或其编码多核苷酸、或其促进剂的用途,其特征在于,用于制备一组合物或制剂,所述组合物或制剂用于预防和/或治疗视神经变性疾病,所述嵌合蛋白为GPR蛋白突变体,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的选自下组的一个或多个跨膜区发生替换:

4-5号跨膜区;和/或

4-6号跨膜区;和/或

1-2号跨膜区。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述嵌合蛋白包含从N端到C端的式I结构:

Z1-Z2-Z3(I)

式中,Z1为GPR蛋白的第一跨膜区;

Z2为APR蛋白的跨膜区;

Z3为GPR蛋白的第二跨膜区;

其中,各“-”独立地为连接肽或肽键。

3. 如权利要求2所述的用途,其特征在于,所述Z1元件对应于登录号为AF349993_1的蛋白序列的第1-114位。

4. 如权利要求2所述的用途,其特征在于,所述Z2元件对应于登录号为WP_014952819的蛋白序列的第120-170位或120-201位。

5. 如权利要求2所述的用途,其特征在于,所述Z3元件对应于登录号为AF349993_1的蛋白序列的第166-249位或196-249位。

6. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述嵌合蛋白选自下组:

(A) 具有SEQ ID NO:1或3或5所示氨基酸序列的多肽;

(B) 具有与SEQ ID NO:1或3或5所示氨基酸序列 $\geq 80\%$ 同源性(优选地, $\geq 90\%$ 的同源性;等优选地 $\geq 95\%$ 的同源性;最优选地, $\geq 97\%$ 的同源性,如98%以上,99%以上)的多肽,且所述多肽具有线粒体定位及质子泵活性;

(C) 将SEQ ID NO:1或3或5中任一所示氨基酸序列经过1-15个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有线粒体定位及质子泵活性的衍生多肽。

7. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述视神经变性疾病包括原发性视神经变性、继发性视神经变性。

8. 一种药物组合物,其特征在于,包括:

(a1) 用于预防和/或治疗视神经变性疾病的第一活性成分,所述第一活性成分包括:嵌合蛋白、或其编码多核苷酸、或其促进剂,所述嵌合蛋白为GPR蛋白突变体,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的选自下组的一个或多个跨膜区发生替换:

4-5号跨膜区;和/或

4-6号跨膜区;和/或

1-2号跨膜区;

(a2) 任选的,预防和/或治疗视神经变性疾病的第二活性成分,所述第二活性成分包括:其他的用于预防和/或治疗视神经变性疾病的药物;和

(b) 药学上可接受的载体。

9. 一种药盒,其特征在于,包括:

(i) 第一容器,以及位于该第一容器中的活性成分(a1)嵌合蛋白、或其编码多核苷酸、或其促进剂,或含有活性成分(a1)的药物,所述嵌合蛋白为GPR蛋白突变体,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的选自下组的一个或多个跨膜区发生替换:

4-5号跨膜区;和/或

4-6号跨膜区;和/或

1-2号跨膜区;

(ii) 任选的第二容器,以及位于该第二容器中的活性成分(a2)其他的用于预防和/或治疗视神经变性疾病的药物,或含有活性成分(a2)的药物。

10. 一种权利要求8所述的药物组合物或权利要求9所述药盒的用途,其特征在于,用于制备预防和/或治疗视神经变性疾病的药物。

一种嵌合蛋白在治疗视神经变性疾病中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地,本发明涉及一种嵌合蛋白在治疗视神经变性疾病中的应用。

背景技术

[0002] 光疗法早在古埃及和古印度就被用来治疗创伤和皮肤疾病。现代光疗法被广泛应用于治疗皮肤疾病如寻常性狼疮、银屑病、白癜风等以及神经系统疾病,如多发性硬化及视网膜病。近年来,近红外(NIR)被用来治疗阿尔兹海默症和帕金森氏症。近红外照射能够提高三磷酸腺苷(ATP)的含量,降低 β -淀粉样蛋白的沉积,减轻帕金森氏症的运动障碍和阿尔兹海默症的认知障碍。然而,近红外(NIR)治疗仍然处于临床前阶段并且对晚期神经退行性疾病作用有限。近年来,随着光遗传学的发展,拓宽了我们对于传统光疗法的认知。光遗传学在近年来被成功用来治疗视觉障碍和神经精神性疾病。

[0003] 视神经属于视网膜的神经纤维,是中枢神经系统的一部分,视网膜所得到的视觉信息,经视神经传送到大脑。视神经病变主要包括视神经炎、视神经萎缩、缺血性视盘病变、视乳头水肿等。青光眼是一组以视乳头萎缩及凹陷、视野缺损及视力下降为共同特征的疾病,病理性眼压增高、视神经供血不足是其发病的原发危险因素,视神经对压力损害的耐受性也与青光眼的发生和发展有关。

[0004] 线粒体是真核细胞内负责能量代谢、产热、细胞死亡、离子及代谢底物稳态的内共生细胞器。线粒体内膜上的呼吸链复合体产生跨膜质子梯度。以质子电化学梯度的形式储存起来的能量,驱动ATP合酶催化ADP和Pi合成ATP,在神经元静息电位的维持,肌肉收缩和蛋白合成中都具有重要作用。在许多神经退行性系统疾病、糖尿病、癌症、视网膜退化中都伴有线粒体功能的缺陷。作为电子传递链中最大的复合物(包含45~64个亚基),线粒体复合体I的缺陷占线粒体疾病的30%。

[0005] 然而目前用于治疗由线粒体缺陷导致的视神经变性疾病仍鲜有报道。因此,本领域迫切需要开发一种治疗视神经变性疾病的新方法。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种治疗视神经变性疾病的新方法。

[0007] 本发明的第一方面提供了一种嵌合蛋白、或其编码多核苷酸、或其促进剂的用途,用于制备一组合物或制剂,所述组合物或制剂用于预防和/或治疗视神经变性疾病,所述嵌合蛋白为GPR蛋白突变体,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的选自下组的一个或多个跨膜区发生替换:

[0008] 4-5号跨膜区;和/或

[0009] 4-6号跨膜区;和/或

[0010] 1-2号跨膜区。

[0011] 在另一优选例中,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为

AF349993_1的4-5号跨膜区被APR蛋白的第4-5号跨膜区替换。

[0012] 在另一优选例中,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的4-6号跨膜区被APR蛋白的4-6号跨膜区替换。

[0013] 在另一优选例中,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的1-2号跨膜区被APR蛋白的1-2号跨膜区替换。

[0014] 在另一优选例中,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的4-5号跨膜区的第114-165位发生替换。

[0015] 在另一优选例中,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的4-6号跨膜区的第114-195位发生替换。

[0016] 在另一优选例中,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的1-2号跨膜区的第33-91位发生替换。

[0017] 在另一优选例中,所述APR蛋白的第4-5号跨膜区对应于登录号为WP_014952819的蛋白序列的第120-170位。

[0018] 在另一优选例中,所述APR蛋白的第4-6号跨膜区对应于登录号为WP_014952819的蛋白序列的第120-201位。

[0019] 在另一优选例中,所述APR蛋白的第1-2号跨膜区对应于登录号为WP_014952819的蛋白序列的第38-96位。

[0020] 在另一优选例中,所述嵌合蛋白包含从N端到C端的式I结构:

[0021] Z1-Z2-Z3(I)

[0022] 式中,Z1为GPR蛋白的第一跨膜区;

[0023] Z2为APR蛋白的跨膜区;

[0024] Z3为GPR蛋白的第二跨膜区;

[0025] 其中,各“-”独立地为连接肽或肽键。

[0026] 在另一优选例中,所述Z1元件对应于登录号为AF349993_1的蛋白序列的第1-114位。

[0027] 在另一优选例中,所述Z2元件对应于登录号为WP_014952819的蛋白序列的第120-170位或120-201位。

[0028] 在另一优选例中,所述Z3元件对应于登录号为AF349993_1的蛋白序列的第166-249位或196-249位。

[0029] 在另一优选例中,所述嵌合蛋白包含从N端到C端的式IV结构:

[0030] P0-P1-P2(IV)

[0031] 式中,

[0032] P0为任选的GPR蛋白的信号肽;

[0033] P1为APR蛋白的跨膜区;

[0034] P2为GPR蛋白的跨膜区;

[0035] 其中,各“-”独立地为连接肽或肽键。

[0036] 在另一优选例中,所述P0元件对应于登录号为AF349993_1的蛋白序列的第1-32位。

[0037] 在另一优选例中,所述P1元件对应于登录号为WP_014952819的蛋白序列的第38-

96位。

[0038] 在另一优选例中,所述P2元件对应于登录号为AF349993_1的蛋白序列的第92-249位。

[0039] 在另一优选例中,所述嵌合蛋白选自下组:

[0040] (A) 具有SEQ ID NO:1或3或5所示氨基酸序列的多肽;

[0041] (B) 具有与SEQ ID NO:1或3或5所示氨基酸序列 $\geq 80\%$ 同源性(优选地, $\geq 90\%$ 的同源性;等优选地 $\geq 95\%$ 的同源性;最优选地, $\geq 97\%$ 的同源性,如98%以上,99%以上)的多肽,且所述多肽具有线粒体定位及质子泵活性;

[0042] (C) 将SEQ ID NO:1或3或5中任一所示氨基酸序列经过1-15个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有线粒体定位及质子泵活性的衍生多肽。

[0043] 在另一优选例中,所述嵌合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或3或5所示。

[0044] 在另一优选例中,所述嵌合蛋白包括野生型嵌合蛋白和突变型嵌合蛋白。

[0045] 在另一优选例中,所述的突变型嵌合蛋白在GPR蛋白突变体的对应于SEQ ID NO.:1的选自下组的一个或多个与线粒体定位和质子泵活性相关的核心氨基酸发生突变:

[0046] 第196位甘氨酸(G);和/或

[0047] 第137位甘氨酸(G)。

[0048] 在另一优选例中,所述第196位甘氨酸(G)突变为丝氨酸(S);和/或

[0049] 第137位甘氨酸(G)突变为苏氨酸(T)。

[0050] 在另一优选例中,所述突变型嵌合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.:7所示。

[0051] 在另一优选例中,所述促进剂选自下组:小分子化合物、表达嵌合蛋白的核酸构建物、或其组合。

[0052] 在另一优选例中,所述表达嵌合蛋白的核酸构建物包括嵌合蛋白编码多核苷酸和表达嵌合蛋白的载体。

[0053] 在另一优选例中,所述载体包括病毒载体和非病毒载体。

[0054] 在另一优选例中,所述病毒载体选自下组:腺相关病毒载体、慢病毒载体、或其组合。

[0055] 在另一优选例中,所述非病毒载体包括质粒或干细胞。

[0056] 在另一优选例中,所述嵌合蛋白具有线粒体定位及质子泵活性。

[0057] 在另一优选例中,所述视神经变性疾病包括原发性视神经变性、继发性视神经变性。

[0058] 在另一优选例中,所述视神经变性疾病选自下组:糖尿病眼病、缺血性视乳头病变、视乳头炎、视乳头水肿、视网膜脉络膜炎、视网膜色素变性、视网膜中央动脉阻塞、青光眼、或其组合。

[0059] 在另一优选例中,所述组合物或制剂还用于选自下组的一种或多种用途:

[0060] (a) 提高视锐度;

[0061] (b) 提高外周视网膜神经节细胞存活率;

[0062] (c) 减轻青光眼性视网膜神经节细胞退化和视觉丧失;

[0063] (d) 降低青光眼所导致的眼内高压。

[0064] 在另一优选例中,所述嵌合蛋白为光激活的蛋白。

[0065] 在另一优选例中,利用环境光、外置发光二极管(LED)、激光或其他适合的光源对嵌合蛋白进行激活。

[0066] 在另一优选例中,所述光激活指用波长400-700nm,较佳地,450-600nm(比如530nm)的可见光(比如绿光)持续照明。

[0067] 在另一优选例中,所述光激活的照度为2000-5000勒克斯,较佳地,3000-4000勒克斯(比如3200勒克斯)。

[0068] 在另一优选例中,每天连续进行2-24h,较佳地,4-20h,更佳地,6-16h,最佳地,8-15小时(比如12小时)的光激活。

[0069] 本发明第二方面提供了一种药物组合物,包括:

[0070] (a1) 用于预防和/或治疗视神经变性疾病的第一活性成分,所述第一活性成分包括:嵌合蛋白、或其编码多核苷酸、或其促进剂,所述嵌合蛋白为GPR蛋白突变体,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的选自下组的一个或多个跨膜区发生替换:

[0071] 4-5号跨膜区;和/或

[0072] 4-6号跨膜区;和/或

[0073] 1-2号跨膜区;

[0074] (a2)任选的,预防和/或治疗视神经变性疾病的第二活性成分,所述第二活性成分包括:其他的用于预防和/或治疗视神经变性疾病的药物;和

[0075] (b) 药学上可接受的载体。

[0076] 在另一优选例中,所述促进剂选自下组:小分子化合物、表达嵌合蛋白的核酸构建物、或其组合。

[0077] 在另一优选例中,所述表达嵌合蛋白的核酸构建物包括嵌合蛋白编码多核苷酸和表达嵌合蛋白的载体。

[0078] 在另一优选例中,所述载体包括病毒载体和非病毒载体。

[0079] 在另一优选例中,所述病毒载体选自下组:腺相关病毒载体、慢病毒载体、或其组合。

[0080] 在另一优选例中,所述的药物组合物中,所述组分(a1)占所述药物组合物总重量的1-99wt%,较佳地10-90wt%,更佳地30-70wt%。

[0081] 在另一优选例中,所述的药物组合物中,所述组分(a2)占所述药物组合物总重量的1-99wt%,较佳地10-90wt%,更佳地30-70wt%。

[0082] 在另一优选例中,所述第一活性成分和第二活性成分的重量比为1:100至100:1,较佳地为1:10至10:1。

[0083] 在另一优选例中,所述其他的预防和/或治疗视神经变性疾病的药物包括B族维生素、营养神经的药物神经节苷酯或神经生长因子。

[0084] 在另一优选例中,所述药物组合物可以是单一化合物,也可以是多个化合物的混合物。

[0085] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于制备治疗或预防视神经变性疾病的药物或制剂。

[0086] 在另一优选例中,所述的药物剂型为口服给药或非口服给药剂型。

[0087] 在另一优选例中,所述的口服给药剂型是片剂、散剂、颗粒剂或胶囊剂,或乳剂或糖浆剂。

[0088] 在另一优选例中,所述的非口服给药剂型是注射剂或针剂。

[0089] 在另一优选例中,所述的活性成分(a1)和活性成分(a2)的总含量为组合物总重的1~99wt%,更佳地为5~90wt%。

[0090] 本发明第三方面提供了一种药盒,包括:

[0091] (i) 第一容器,以及位于该第一容器中的活性成分(a1)嵌合蛋白、或其编码多核苷酸、或其促进剂,或含有活性成分(a1)的药物,所述嵌合蛋白为GPR蛋白突变体,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的选自下组的一个或多个跨膜区发生替换:

[0092] 4-5号跨膜区;和/或

[0093] 4-6号跨膜区;和/或

[0094] 1-2号跨膜区;

[0095] (ii) 任意的第二容器,以及位于该第二容器中的活性成分(a2)其他的用于预防和/或治疗视神经变性疾病的药物,或含有活性成分(a2)的药物。

[0096] 在另一优选例中,所述的第一容器和第二容器是相同或不同的容器。

[0097] 在另一优选例中,所述的第一容器的药物是含嵌合蛋白的单方制剂。

[0098] 在另一优选例中,所述的第二容器的药物是含其他的用于预防和/或治疗视神经变性疾病的药物的单方制剂。

[0099] 在另一优选例中,所述药物的剂型为口服剂型或注射剂型。

[0100] 在另一优选例中,所述试剂盒还含有说明书,所述说明书中记载了给予活性成分(a1),或联合给予活性成分(a1)和活性成分(a2)从而预防和/或治疗视神经变性疾病的说明。

[0101] 在另一优选例中,所述含有活性成分(a1)嵌合蛋白或含有(a2)其他的用于预防和/或治疗视神经变性疾病的药物的制剂的剂型分别包括胶囊、片剂、栓剂、或静脉注射剂。

[0102] 本发明第四方面提供了一种本发明第二方面所述的药物组合物或本发明第三方面所述药盒的用途,用于制备预防和/或治疗视神经变性疾病的药物。

[0103] 本发明第五方面提供了一种预防和/或治疗视神经变性疾病的方法,包括步骤:

[0104] 给需要的对象,施用嵌合蛋白、或其编码多核苷酸其促进剂、或本发明第二方面所述的药物组合物、或本发明第三方面所述的药盒,所述嵌合蛋白为GPR蛋白突变体,所述GPR蛋白突变体在野生型的GPR蛋白的对应于登录号为AF349993_1的选自下组的一个或多个跨膜区发生替换:

[0105] 4-5号跨膜区;和/或

[0106] 4-6号跨膜区;和/或

[0107] 1-2号跨膜区。

[0108] 在另一优选例中,所述的施用包括口服、注射。

[0109] 在另一优选例中,所述的对象包括人或非人哺乳动物。

[0110] 在另一优选例中,所述非人哺乳动物包括啮齿动物和灵长目动物,优选小鼠、大鼠、兔、猴。

- [0111] 在另一优选例中,所述的嵌合蛋白以单体和/或二聚体形式施用。
- [0112] 在另一优选例中,所述方法在光照下进行。
- [0113] 在另一优选例中,所述嵌合蛋白的施用频率为每周连续1-7天,较佳地,每周连续2-5天,更佳地,每周连续2-3天。
- [0114] 在另一优选例中,所述嵌合蛋白的施用时间为1-20周,较佳地,2-12周,更佳地,4-8周。
- [0115] 在另一优选例中,所述嵌合蛋白的施用包括光激活。
- [0116] 在另一优选例中,所述光激活包括利用环境光、外置发光二极管(LED)、激光或其他适合的光源对嵌合蛋白进行激活。
- [0117] 在另一优选例中,所述光激活为用波长400-700nm,较佳地,450-600nm(比如530nm)的可见光(比如绿光)持续照明。
- [0118] 在另一优选例中,所述光激活的照度为2000-5000勒克斯,较佳地,3000-4000勒克斯(比如3200勒克斯)。
- [0119] 在另一优选例中,所述光激活每天连续进行2-24h,较佳地,4-20h,更佳地,6-16h,最佳地,8-15小时(比如12小时)。
- [0120] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

- [0121] 图1显示了EcGAPR转基因小鼠的构建及验证。(A)利用CRISPR-Cas9技术构建mt-EcGAPR转基因小鼠的模式图。(B)mt-EcGAPR小鼠原代培养的神经元海马免疫荧光染色结果。mt-EcGAPR在N末端含有myc标签,利用myc抗体及线粒体内膜蛋白mitofilin共染,结果显示myc阳性信号与mitofilin有共定位,提示mt-EcGAPR在小鼠中能正确定位至线粒体。
- [0122] 图2显示了EcGAPR转基因小鼠的视网膜切片及硅油注射构建小鼠青光眼模型。(A)mt-EcGAPR转基因小鼠与对照小鼠的视网膜切片免疫荧光染色结果。绿色:GFP。银色:PKC- α ,视网膜双极细胞的标志物。红色:Brn3a,视神经节细胞的标志物。蓝色:DAPI,标记细胞核。图上标尺,25 μ m。(B)硅油注射构建小鼠青光眼模型的模式图。上方:正常小鼠眼球的OCT包埋图,下方:硅油注射后的小鼠眼球OCT包埋图。
- [0123] 图3显示了青光眼模型小鼠光治疗模式图及眼内压变化(A)将小鼠放置于布有LED(\sim 530nm, \sim 3200勒克斯)的笼内饲养。(B)光照模式为12小时光照,12小时黑暗,光照持续8周。(C)光照过程中,青光眼模型小鼠眼内压的变化,EcGAPR小鼠1-8周数目分别为13,12,11,11,11,10,7,7,7.对照小鼠1-8周数目分别为13,10,10,10,10,9,6,4,4。
- [0124] 图4显示了青光眼模型小鼠光治疗过程中视锐度的变化(A)利用视动反应测定小鼠的视锐度。将4块LCD显示屏排列成四方形,顶部置有相机来跟踪小鼠的运动。在显示器上以恒速(12度/秒)顺时针(左眼)或逆时针(右眼)显示对比度100%的黑白漂移光栅。当运动的图案刺激模式动物的大部分视野时,会产生自我运动的感觉,为了减少视网膜上所成物像的移动,动物的眼睛、头部和身体就会自然地跟随眼睛凝视的方向(也就是物体运动的方向)移动,头部或者是身体的运动称作为补偿性头部运动。(B)光照过程中,青光眼模型小鼠

视锐度的变化, EcGAPR小鼠1-8周数目分别为20, 18, 11, 11, 9, 8, 8, 6. 对照小鼠1-8周数目分别22, 18, 11, 11, 9, 8, 5, 5. T检验, $p < 0.0001$.

[0125] 图5显示了青光眼模型小鼠光治疗过程视网膜视神经节细胞数目的变化(A) Brn3a标记视神经节细胞, 对照小鼠青光眼建模后光照1周和2周的视神经节细胞数目明显下降。(B) EcGAPR小鼠青光眼建模后光照1周和2周的视神经节细胞数目变化不明显。(C) 相比于对侧眼(未注射硅油), 注射硅油侧存活的视网膜视神经节细胞数目百分率. EcGAPR小鼠1-2周数目分别6和4, 对照小鼠1-2周数目4和5. t-检验, 1周和2周 $p = 0.0073$ 和 0.0001 . (D) 对侧眼(未注射硅油)视神经节细胞数目两组无明显差异。

具体实施方式

[0126] 通过广泛而深入的研究, 本发明人首次发现, 具有特定结构的嵌合蛋白可有效预防和/或治疗视神经变性疾病(比如青光眼)。在此基础上, 本发明人完成了本发明。

[0127] 术语

[0128] GPR(Green proteorhodopsin)基因和蛋白

[0129] 在本发明中, 质子泵型视紫红质GPR可来自人、非人哺乳动物或细菌。一种代表性的GPR基因及其所编码GPR蛋白的氨基酸序列见AF349993_1(genbank登录号), 其来自海洋变形杆菌, 编码一个具有249个氨基酸的膜蛋白, 该蛋白具有光质子泵活性。

[0130] APR(alpha proteorhodopsin)基因和蛋白

[0131] 在本发明中, 质子泵型视紫红质APR可来自人、非人哺乳动物或细菌。一种代表性的APR基因及其所编码APR蛋白的氨基酸序列见WP_014952819(genbank登录号), 其来自海洋变形杆菌, 编码一个具有255个氨基酸的膜蛋白, 该蛋白具有光质子泵活性。

[0132] 本发明的蛋白或多肽、及其编码多核苷酸

[0133] 在本发明中, “嵌合蛋白”、“EcGAPR”“本发明蛋白”、“本发明嵌合蛋白”、“本发明多肽”、“嵌合多肽”可互换使用, 均指GPR蛋白突变体, 所述GPR蛋白突变体中的4-5号跨膜区被APR蛋白的第4-5号跨膜区替代, 或所述GPR蛋白突变体中的4-6号跨膜区被APR蛋白的4-6号跨膜区替代; 或所述GPR蛋白突变体中的1-2号跨膜区被APR蛋白的1-2号跨膜区替代, 在一优选实施方式中, 本发明的嵌合蛋白如式I或式IV所示。在另一些优选实施方式中, 本发明嵌合蛋白是具有SEQ ID NO:1或3或5所示氨基酸序列的多肽或其变异多肽。

[0134] 特别地, 本发明嵌合蛋白包括野生型和突变型嵌合蛋白, 所述突变型嵌合蛋白指在GPR蛋白突变体上与SEQ ID NO.:1的第196位甘氨酸(G)和/或第137位甘氨酸(G)相对应的位置发生点突变所产生的蛋白。上述两个位点是与线粒体定位和质子泵活性相关的核心氨基酸位点。所述“相对应的位置”是指在同源蛋白的序列比对(sequence alignment)中, 与SEQ ID NO.:1的第196位甘氨酸(G)和/或第137位甘氨酸(G)对应的位点。所述突变保留或增强了突变型嵌合蛋白的线粒体定位和质子泵活性。优选突变为丝氨酸(S)或苏氨酸(T)。在一个优选实施方式中, 突变型嵌合蛋白是具有SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的多肽或其变异多肽。

[0135] 如本文所用, “分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质, 原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的, 但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开, 则为分离纯化

的。

[0136] 如本文所用,“分离的嵌合蛋白或多肽”是指本发明的嵌合蛋白基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化本发明的嵌合蛋白或多肽。基本上纯的蛋白或多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。本发明的嵌合蛋白或多肽的纯度能用氨基酸序列分析。

[0137] 本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽,优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物,或是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主,本发明的多肽可以是糖基化的,或可以是非糖基化的。本发明的多肽还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

[0138] 本发明还包括嵌合蛋白的片段、衍生物和类似物。如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的嵌合蛋白相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或信号肽序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与抗原IgG片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0139] 术语“嵌合蛋白”还包括与嵌合蛋白相同功能的变异形式或变异多肽。这些变异形式包括(但并不限于):一个或多个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括嵌合蛋白的活性片段和活性衍生物。

[0140] 该多肽的变异形式包括:同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与嵌合多肽DNA杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗嵌合多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽,如包含嵌合多肽或其片段与其他多肽所形成的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外,本发明还包括了嵌合多肽的可溶性片段。通常,该片段具有嵌合多肽序列的至少约10个连续氨基酸,通常至少约30个连续氨基酸,较佳地至少约50个连续氨基酸,更佳地至少约80个连续氨基酸,最佳地至少约100个连续氨基酸。

[0141] 发明还提供嵌合蛋白或多肽的类似物。这些类似物与嵌合多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到,如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变,还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解,本发明的多肽并不限于上述列举的代表性的多

肽。

[0142] 修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

[0143] 在本发明中,“嵌合蛋白保守性变异多肽”指与嵌合蛋白的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表I进行氨基酸替换而产生。

[0144] 表I

[0145]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu

[0146]	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0147] 在本发明中,嵌合蛋白的“编码基因”、“编码核酸”、“编码多核苷酸”可互换使用,均指可以通过转录和/或翻译等过程产生本发明嵌合蛋白的多核苷酸序列。本发明的编码多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式、可以是单链的或是双链的、可以是编码链或非编码链。DNA形式可以是cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。

[0148] 编码嵌合蛋白的成熟多肽的多核苷酸包括:只编码成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列;成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0149] 本发明蛋白的制备

[0150] 本发明中的多肽和多核苷酸优选以分离的形式提供,更佳地被纯化至均质。

[0151] 本发明的嵌合核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

[0152] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0153] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0154] 应用PCR技术扩增DNA/RNA的方法(Saiki, et al. Science 1985;230:1350-1354)被优选用于获得本发明的基因。特别是很难从文库中得到全长的cDNA时,可优选使用RACE法(RACE-cDNA末端快速扩增法),用于PCR的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择,并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的DNA/RNA片段。

[0155] 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体,以及用本发明的载体或嵌合蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞,以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

[0156] 通过常规的重组DNA技术(Science, 1984;224:1431),可利用本发明的多聚核苷酸序列可用来表达或生产重组的嵌合多肽。一般来说有以下步骤:

[0157] (1).用本发明的编码嵌合多肽的多核苷酸(或变体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0158] (2). 在合适的培养基中培养的宿主细胞;

[0159] (3). 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

[0160] 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0161] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0162] 肽接头

[0163] 本发明的嵌合蛋白可任选地含有肽接头。肽接头大小和复杂性可能会影响蛋白的活性。通常,肽接头应当具有足够的长度和柔韧性,以保证连接的两个蛋白在空间上有足够的自由度以发挥其功能。同时避免肽接头中形成 α 螺旋或 β 折叠等对嵌合蛋白的稳定性的影响。

[0164] 连接肽的长度一般为0-10个氨基酸,较佳地1-5个氨基酸。

[0165] 药物组合物及施用方法

[0166] 本发明还提供了一种组合物,它含有有效量的本发明的嵌合蛋白,以及药学上可接受的载体。可选地,该组合物也可以含有其他的用于预防和/或治疗视神经变性疾病的药物。通常,可将本发明的嵌合蛋白、其他的用于预防和/或治疗视神经变性疾病的药物配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地,pH约为6-8。

[0167] 如本文所用,术语“有效量”或“有效剂量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人和/或动物所接受的量,如0.001-99wt%;较佳的0.01-95wt%;更佳的,0.1-90wt%。

[0168] 如本文所用,“药学上可接受的”成分是适用于人和/或哺乳动物而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即具有合理的效益/风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。

[0169] 本发明的药物组合物含有安全有效量的本发明的嵌合蛋白以及药学上可接受的载体。这类载体包括(但不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。通常药物制剂应与给药方式相匹配,本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。所述的药物组合物宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量。本发明的药物制剂还可制成缓释制剂。

[0170] 本发明嵌合蛋白的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于:本发明嵌合、其他的用于预防和/或治疗视神经变性疾病的药物的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等;患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。针对青光眼患者,通常,当本发明的嵌合

蛋白每天以约0.5mg-5mg/kg体重(较佳的2mg-4mg/kg体重)的剂量给予,能得到令人满意的效果。例如,由治疗状况的迫切要求,可每天给予若干次分开的剂量,或将剂量按比例地减少。

[0171] 视网膜变性疾病

[0172] 视神经变性疾病是指视网膜的神经纤维发生萎缩、炎症导致功能下降或丧失所导致的视觉障碍。

[0173] 在本发明中,视网膜变性疾病包括青光眼、视神经炎、视神经萎缩、缺血性视盘病变、视乳头水肿。

[0174] 青光眼(Glaucoma)是一种常见的进行性视神经变性疾病,常会导致不可逆的失明。之前的研究表明线粒体功能的异常和青光眼高度相关。高眼内压是青光眼的危险因素之一,因此常用高眼内压来诱导青光眼的模型。

[0175] 本发明的主要优点包括:

[0176] (1)本发明首次发现,具有特定结构的嵌合蛋白可有效预防和/或治疗视神经变性疾病(比如青光眼)。

[0177] (2)本发明首次发现,本发明的嵌合蛋白还能保护由药物诱导的青光眼导致的视网膜神经节细胞退化和视觉丧失。

[0178] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0179] 除非有特别说明,否则本发明实施例中的试剂和材料均为市售产品。

[0180] 材料与amp;方法

[0181] 1. EcGAPR转基因小鼠

[0182] 突变型嵌合蛋白EcGAPR的筛选及其具体结构如中国专利申请CN

[0183] 201810456360.0中所述。筛选得到的突变型嵌合蛋白EcGAPR的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示(对应于CN 201810456360.0的SEQ ID NO.:2),其核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示(对应于CN 201810456360.0的SEQ ID NO.3)。

[0184] 用CRISPR/Cas9技术将CAG-mt-EcGAPR-2A-EGFP-WPRE-polyA基因插入基因组的Rosa26位点。利用体外转录获得gRNA和Cas9的mRNA。利用同源重组法,将5'同源重组臂,3'同源重组臂和CAG-mt-EcGAPR-2A-EGFP-WPRE-polyA构建入供体质粒。将gRNA和Cas9的mRNA和供体质粒共同注射入小鼠受精卵,得到F0代小鼠。将F0代小鼠与野生型小鼠杂交得到F1代转基因小鼠。CAG-mt-EcGAPR-2A-EGFP-WPRE-polyA基因中,CAG为启动子,mt为4次重复的线粒体内膜蛋白细胞色素c氧化酶VIII信号肽序列,2A为2A肽,WPRE为转录后调节元件。

[0185] 2. 青光眼建模

[0186] 用1.25% Avertin腹腔注射麻醉小鼠,注射后5~10分钟使小鼠处于左侧位。滴一滴透明质酸钠至右眼角膜以保持湿润,用32G x 4mm针头靠近上颞叶最小损伤地刺穿角膜到达前房。当房水涌出,将硅油注入前房。当硅油覆盖虹膜大部分区域时停止注射。在注射区涂抹盐酸左氧氟沙星眼膏(0.015g in 5g)以防止感染。

[0187] 3. 眼内压测量

[0188] 利用眼压计每周测量小鼠眼压。测量时,用1.25% Avertin腹腔注射麻醉小鼠,15分钟后测量眼内压。每次取3个连续的值的平均值作为测量值,每隔5min测量1次。

[0189] 4. 视锐度检测

[0190] 通过视动响应来测量小鼠视锐度(视锐度是指,当运动的图案刺激模式动物的大部分视野时,它们会产生自我运动的感觉,也就是为了减少视网膜上所成物像的移动,模式动物的眼睛、头部和身体就会自然地跟随眼睛凝视的方向(也就是物体运动的方向)移动,头部或者是身体的运动称作为补偿性头部运动,眼睛移动称为补偿性眼球运动反应)。将4块LCD显示屏排列成四方形,顶部置有相机来跟踪小鼠的运动。在显示器上以恒速(12度/秒)顺时针(左眼)或逆时针(右眼)显示对比度100%的黑白漂移光栅。在测试之前,小鼠进行1天的适应。小鼠位于4个显示屏的中央底座上。开始时,屏幕显示灰色,当小鼠停止运动后,灰色背景被低速的漂移光栅取代,当追踪行为被观测到后,增大频率直到产生反应的最大的频率。统计硅油注射眼的视锐度并和对侧相比较。

[0191] 5. 免疫染色

[0192] 细胞的免疫染色:培养在盖玻片上的细胞PBS洗3遍后用4% FSB(4% PFA,4% sucrose in 1x PBS)固定。细胞用5%封闭液(0.5% Triton X-100,5%山羊血清配置在PBS中)进行封闭。随后孵育一抗30分钟,用PBS洗3遍后加二抗避光孵育30分钟,孵育完后用PBS洗3遍后显微镜拍照。

[0193] 完整视网膜的免疫染色:小鼠用生理盐水和4% PFA依次灌流后摘出眼球,在4% PFA中固定30分钟。解剖取出视网膜在4% PFA固定过夜。用PBS洗涤后,在0.5% TritonX-100中处理1小时。10% DST封闭2小时后与一抗4℃孵育30-36小时。用PBS洗涤后,与二抗室温避光孵育2.5小时。孵育完后用PBS洗去残留二抗,晾干,用AQUA-MOUNT封片,显微镜观察。

[0194] 视网膜切片的免疫染色:视网膜取下后,依次用4℃.10%,20%,30%的蔗糖脱水,用OCT包埋,置于-80℃下冰冻。用切片机进行切片,厚度14μm。切片用PBS洗3次,每次15分钟。0.05% TritonX-100处理30分钟,室温10% DST封闭1小时。与一抗4℃孵育20-24小时,用PBS洗3次,每次15分钟,后与二抗室温避光孵育2.5小时。用PBS洗3次,每次15分钟,随后切片晾干,用AQUA-MOUNT封片,显微镜观察。

[0195] 在本发明中,质子泵型视紫红质的分子筛选以及本发明的嵌合蛋白以及突变型嵌合蛋白(即EcGAPR(enhanced chimeric GPR and APR))的构建以及具体结构如中国专利申请CN 201810456360.0中所述。

[0196] 其中GPR的4-5号跨膜区被相对应的APR的跨膜区所替换的嵌合蛋白的一个代表性氨基酸序列如SEQ ID NO.:1所示(对应于CN 201810456360.0的SEQ ID NO.:1),核苷酸序列如SEQ ID NO.:2所示(对应于CN 201810456360.0的SEQ ID NO.:4),GPR的4-6号跨膜区被相对应的APR的跨膜区所替换的嵌合蛋白的一个代表性氨基酸序列如SEQ ID NO.:3所示(对应于CN 201810456360.0的SEQ ID NO.:5),核苷酸序列如SEQ ID NO.:4所示(对应于CN 201810456360.0的SEQ ID NO.:7),GPR的1-2号跨膜区被相对应的APR的跨膜区所替换的嵌合蛋白的一个代表性氨基酸序列如SEQ ID NO.:5所示(对应于CN 201810456360.0的SEQ ID NO.:6),核苷酸序列如SEQ ID NO.:6所示(对应于CN 201810456360.0的SEQ ID NO.:8),突变型嵌合蛋白的一个代表性氨基酸序列如SEQ ID

NO.7所示(即EcGAPR,对应于CN 201810456360.0的SEQ ID NO.:2),其核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示(对应于CN 201810456360.0的SEQ ID NO.3)。

[0198] 实验结果

[0199] EcGAPR是从自然界已有的质子泵型视紫红质中筛选得到并通过遗传工程手段改造的能够高效定位至线粒体并保持质子泵功能的视紫红质,结构如中国专利申请CN 201810456360.0中所述。利用Crisper/cas9技术构建得到全身稳定广泛表达线粒体定位的EcGAPR(mt-EcGAPR)的转基因小鼠(图1A-B)。该转基因小鼠具有正常的出生率和死亡率,表型无显著差异,提示过表达mt-EcGAPR不会造成细胞毒性。原代细胞培养(图1B)的结果表明,mt-EcGAPR转基因小鼠中,mt-EcGAPR仍能够保持线粒体定位。图2A显示mt-EcGAPR在转基因小鼠的视网膜组织中表达正常,并且对小鼠视网膜结构没有影响。

[0200] 青光眼(Glaucoma)是一种常见的进行性视网膜变性疾病,常会导致不可逆的失明。之前的研究表明线粒体功能的异常和青光眼高度相关。高眼内压是青光眼的危险因素之一,因此常用高眼内压来诱导青光眼的模型。一种手段是利用硅油注射导致眼内高压和视网膜神经节细胞的退化从而诱导青光眼模型。在过表达mt-EcGAPR的小鼠中,构建青光眼模型(图2B)。在青光眼模型小鼠中给与光治疗,检测眼内压变化,结果显示在注射的第六周,mt-EcGAPR和野生型对照组眼内压出现明显差异,过表达mt-EcGAPR组小鼠眼内压更低,提示mt-EcGAPR可以降低眼内压,缓解青光眼症状(图3A-C)。在青光眼模型小鼠中给予光照,每周检查小鼠的视锐度(图4A-B)。光照的mt-EcGAPR小鼠相比于野生型小鼠视觉保留的更多。在第一周和第二周,光照的mt-EcGAPR视锐度分别下降到79%和71%,而野生型小鼠的视锐度则分别下降到47%和38%(图4B)。检查青光眼模型小鼠光治疗过程中视网膜神经节细胞数目的变化(图5A-D)。免疫组化显示在第一周和第二周野生型小鼠分别有50%和45%的外周视网膜神经节细胞存活,而光照的mt-EcGAPR小鼠则分别有83%和82%的外周视网膜神经节细胞存活(图5C-D)。而对侧未注射侧视网膜神经节细胞数目则无明显差异。因此,通过光遗传激活mt-EcGAPR靶向的线粒体能够显著减轻青光眼性视网膜神经节细胞退化和视觉丧失。结合前述图3的结果(在注射的第六周,mt-EcGAPR和野生型对照组眼内压出现明显差异),暗示mt-EcGAPR能够阻止由于大量的细胞死亡所造成的免疫反应。

[0201] 此外,发明人用CN 201810456360.0中所提及的其它嵌合蛋白如cGAPR、cGAPR46和cGAPR12,以及cGAPR46和cGAPR12(CN 201810456360.0中记载如下:其中嵌合体1457(GPR的4-5号跨膜区被相对应的APR的跨膜区所替换)的加权指数最高,将其命名为cGAPR(chimeric GPR and APR),氨基酸序列如SEQ ID NO.:1所示,核苷酸序列如SEQ ID NO.:4所示,嵌合体1467(GPR的4-6号跨膜区被相对应的APR的跨膜区所替换),将其命名为cGAPR46,其氨基酸序列如SEQ ID NO.:5所示,核苷酸序列如SEQ ID NO.:7所示,嵌合体0127(GPR的1-2号跨膜区被相对应的APR的跨膜区所替换),将其命名为cGAPR12,其氨基酸序列如SEQ ID NO.:6所示,核苷酸序列如SEQ ID NO.:8所示)的双突变体进行实验,取得了与mt-EcGAPR类似的效果,均能显著减轻青光眼性视网膜神经节细胞退化和视觉丧失。

[0202] 讨论与展望

[0203] 线粒体是一个容量有限的非常精巧的细胞器,尤其是内膜上的蛋白质密度极高。在线粒体内过表达蛋白很可能导致线粒体的形态和功能发生变化。因此要使线粒体光激活视紫红质发挥功能,视紫红质必须满足以下几个标准:(1)线粒体保持正常的形态和膜电

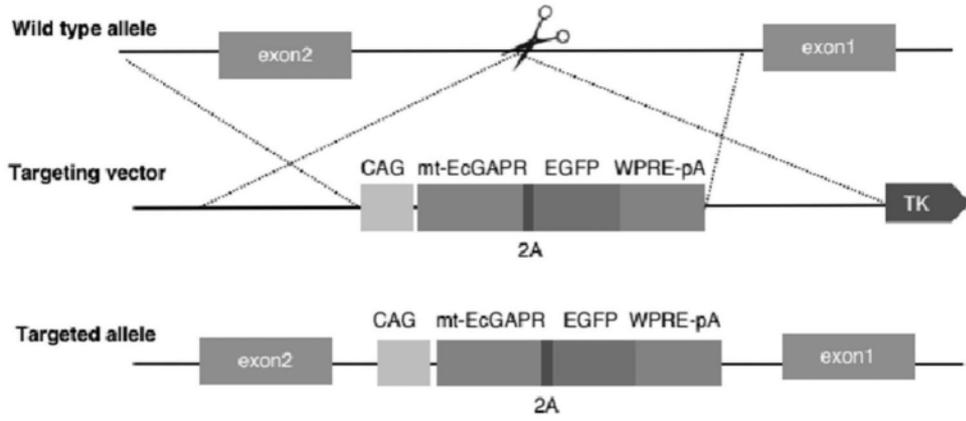
压；(2) 视紫红质在哺乳动物细胞中具有质子泵活性；(3) 视紫红质在不同系统中应保持线粒体的定位，在细胞膜上无泄露表达；(4) 视紫红质具有合适的反转电压，以防使线粒体膜发生超极化产生过多的活性氧而损伤细胞。通过遗传工程手段筛选得到的EcGAPR满足了以上的所有标准。

[0204] 研究表明，青光眼的发生与线粒体功能障碍有关。眼内压升高导致视网膜供血不足，导致线粒体功能受损。青光眼发病和进展随年龄增长而增长，这和线粒体随着年龄的增长所出现的结构和功能的退化相关。比如氧化磷酸化能力减弱、活性氧的产生增加、线粒体DNA的突变增多等。因为视神经中含有丰富的线粒体，对这些变化可能尤其敏感，而视神经的损害，进而会影响视觉功能。

[0205] EcGAPR转基因小鼠表现为在光下对高眼内压诱导的青光眼具有一定的保护作用。EcGAPR能够在线粒体呼吸链蛋白受损伤的情况下，在光存在的情况下为线粒体提供质子动力势，以改善细胞的能量缺乏状态。在环境营养贫瘠的状态下，通过光为细胞提供生长所需能量。糖尿病眼病和青光眼的发病机理比较类似，两者都是微血管循环障碍造成线粒体代谢功能不足，从而导致视网膜受损。青光眼是急性病变，而糖尿病眼病是慢性病变，因此理论上EcGAPR这种对线粒体的干预和补偿功能应同样适用于糖尿病眼病及其他一些视网膜/视神经变性疾病(如缺血性视乳头病变、视乳头炎、视乳头水肿、视网膜脉络膜炎、视网膜色素变性、视网膜中央动脉阻塞等)。

[0206] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

A



B

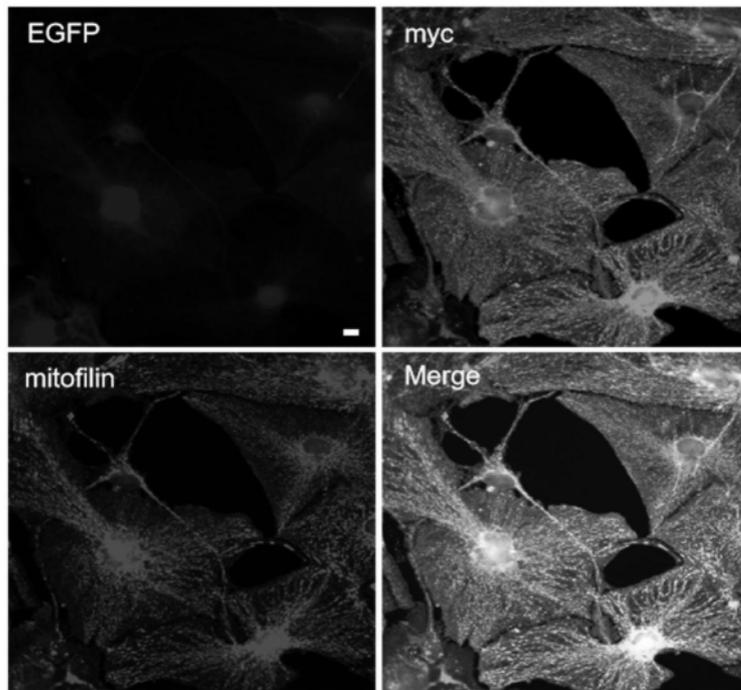


图1

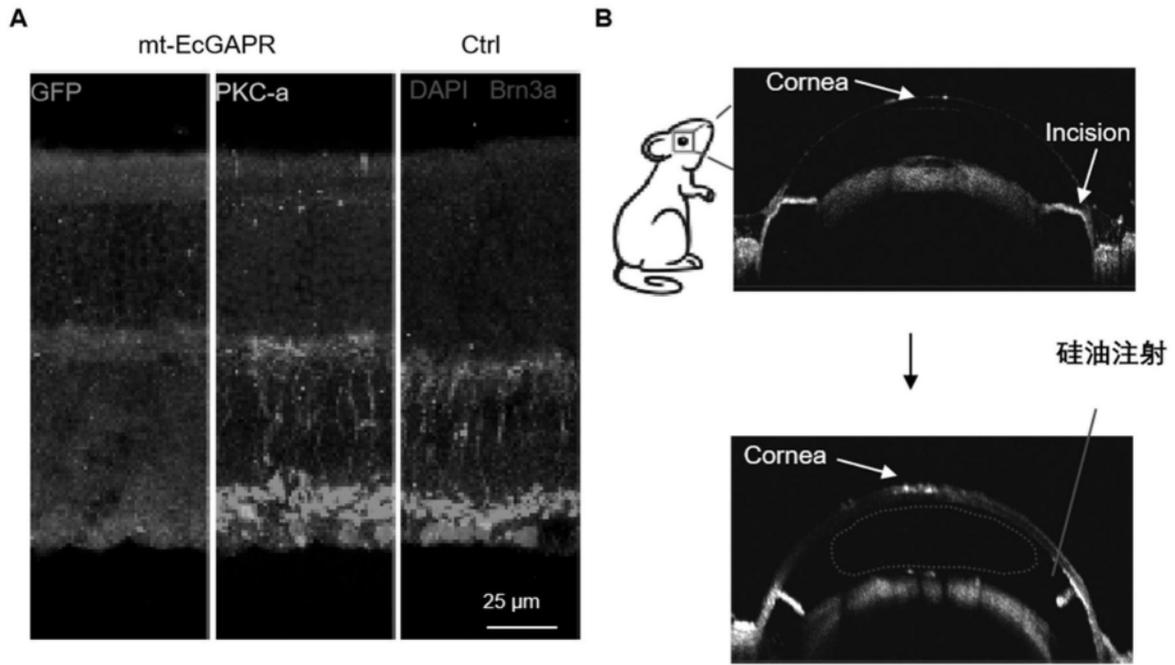


图2

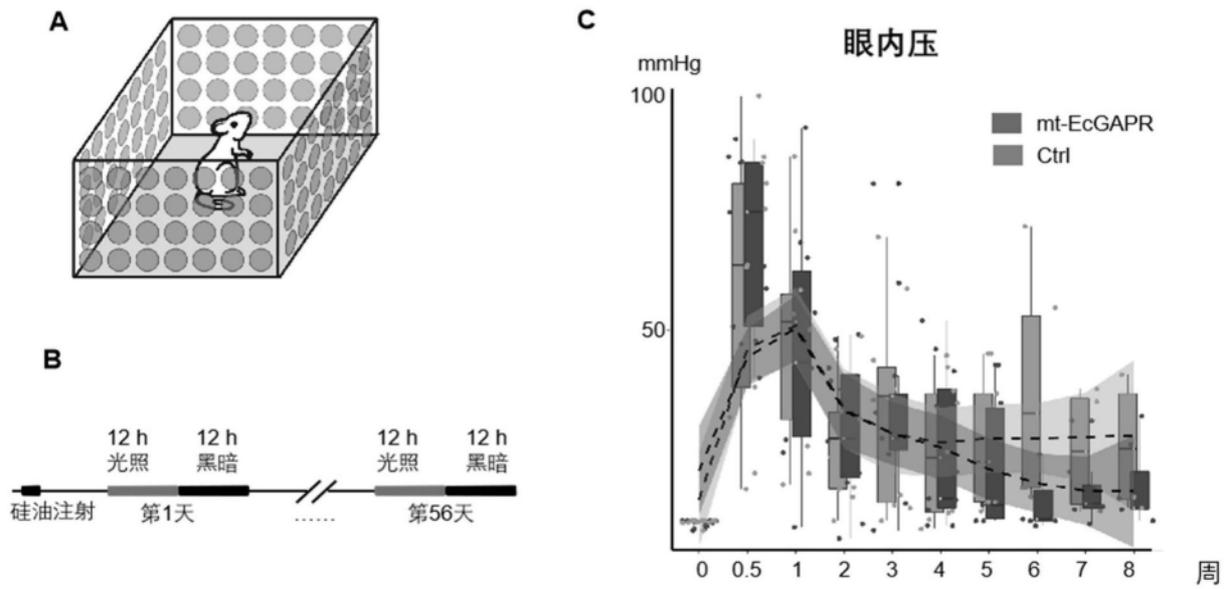


图3

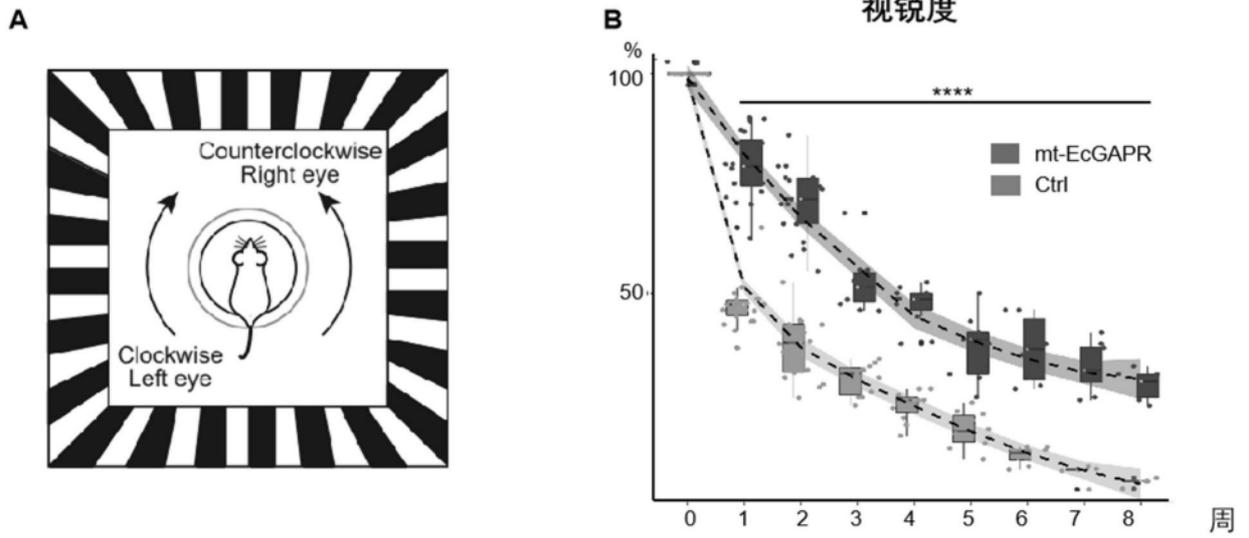


图4

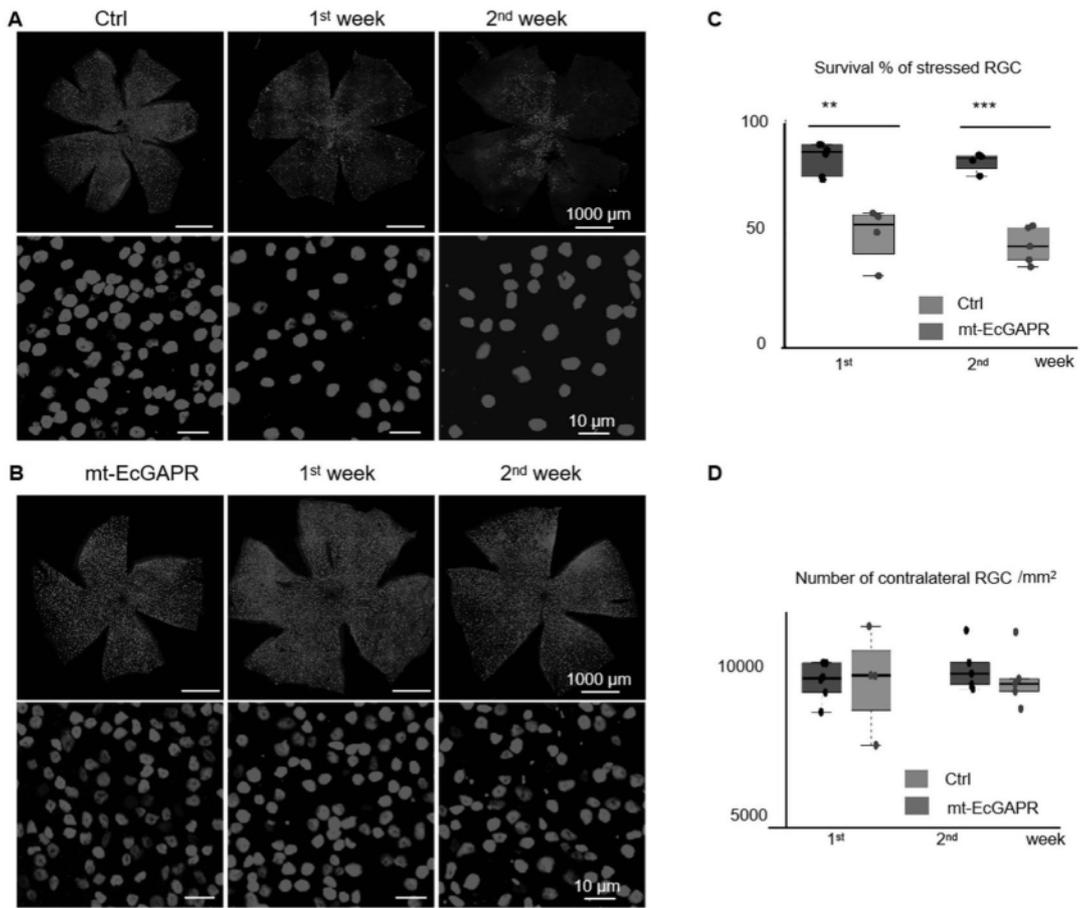


图5